



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**BOĞALARDA MUSK KSİLEN VE MUSK KETONUN
REPRODUKTİF TOKSİSİTESİNİN *IN VİTRO*
ARAŞTIRILMASI**

Barış ÖTÜN

**VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

**ANKARA
2022**

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BOĞALARDA MUSK KSİLEN VE MUSK KETONUN
REPRODUKTİF TOKSİSİTESİNİN *IN VİTRO*
ARAŞTIRILMASI**

Barış ÖTÜN

**VETERİNERLİK FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİSİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün
19L0239008 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ANKARA
2022**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Boğalarda Musk Ksilen ve Musk Ketonun Reprodüktif Toksikitesinin *In Vitro* Araştırılması” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Barış ÖTÜN

Tarih:

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veterinerlik Farmakoloji ve Toksikolojisi Anabilim Dalında
Barış ÖTÜN tarafından hazırlanan
“Boğalarda Musk Ksilen ve Musk Ketonun Reprodüktif Toksisitesinin *In Vitro* Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ
olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:21/07/2022

İmza
Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Jüri Başkanı)

İmza
Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Üye)

İmza
Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ
Kırıkkale Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
(Üye)

İmza
Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Eldivan SHMYO
(Üye)

İmza
Dr. Öğr. Üyesi Koray TEKİN
Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Dölerme ve Suni Tohumlama ABD
(Üye)

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

İmza
Prof. Dr. Fügen AKTAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Çizelgeler	xiii
Şekiller	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Endokrin Bozucular	5
1.1.1. Nitro Muskular	7
1.1.1.1. Musk Keton ve Musk Ksilen	8
1.1.1.1.1. MX ve MK'nın Toksikolojik Etkileri	8
1.2. Sperma Kalitesi	11
1.2.1. Spermanın Makroskopik Görünümü	15
1.2.2. İlk Mikroskopik İnceleme	15
1.2.3. Sperm Motilitesi	15
1.2.4. Toplam Sperm Sayısı	16
1.2.5. Sperm Morfolojisi	17
1.3. Erkek İnfertilite Etki Mekanizmaları	18
1.3.1. Kan Testis Bariyeri	19
1.3.1.1. Kan-Testis Bariyerinin Fonksiyonları	20
1.3.1.2. Kan Testis Bariyerinin Sıkı Kavşak (Tight Junction, TJ) Proteinleri	20
1.3.2. Testisteki İlaç Taşıyıcıları	21
1.3.2.1. Testiste ABC (ATP-binding cassette) Taşıyıcı Süperfamilyası	24
1.3.2.1.1. P-glikoprotein	25
1.4. Kirleticilerin Sperm Üzerine Etkileri	26
1.4.1. SFT ve Sperm Test Bataryaları (Analiz Serileri)	28
1.4.2. Gelişmiş Klinik Testler	32
1.4.2.1. Bilgisayar Destekli Sperm Analizi (CASA)	35
1.4.2.1.1. CASA ile Sperm Motilitesi Ölçümü	37
1.4.2.1.2. CASA ile Sperm Konsantrasyonu Ölçümü	38
1.4.2.1.3. CASA Terminolojisi	38
1.4.2.1.4. CASA ve Toksisite	40
1.4.3. Sitotoksitite Testleri	42
1.4.3.1. MTT Testi	43
1.5. Tezin Amacı	44
2. GEREÇ VE YÖNTEM	46
2.1. Gereç	46
2.1.1. Kimyasal Maddeler	46
2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri	47
2.2. Yöntem	48
2.2.1. Dokuların Toplanması ve Hücre Kültürü Koşulları	48

2.2.2. Sperma Toplanması	49
2.2.3. Epididimal Sperma Alınması	50
2.2.4. Nitro Musk Bileşiklerinin Uygulanması	52
2.2.5. Sitotoksisite Analizleri	52
2.2.6. CASA	53
2.2.7. Spermatozoa Canlılık	54
2.2.8. Spermatozoanın Akrozom Bütünlüğü Yönünden Değerlendirilmesi	55
2.2.9. Western Blot Analizi	56
2.2.10. İstatistik Analiz	57
3. BULGULAR	59
3.1. Sitotoksisite ve Spermotoksisite Bulguları	59
3.2. CASA Bulguları	60
3.2.1. TM (Total Motility, Toplam Hareketlilik) (%)	60
3.2.2. VAP (Ortalama Yörünge Hızı, Velocity Average Path) ($\mu\text{m/s}$)	63
3.2.3. VCL (Eğrisel Hız, Curvilinear Velocity) ($\mu\text{m/s}$)	65
3.2.4. VSL (Doğrusal Hız, Velocity Straight Line) ($\mu\text{m/s}$)	68
3.2.5. ALH (Başın Lateral Amplitüdü, Amplitude Lateral Head) (μm)	71
3.2.6. BCF (Çapraz Geçiş Frekans Ritmi, Beat Cross Frequency) (Hz)	74
3.2.7. HYP (Hiperaktivite, Hyperactivity) ($\text{HYP} = \text{VCL} \times \text{ALHX}$)	76
3.2.8. LIN (Doğrusallık, Linearity) ($\text{LIN} = \text{VSL}/\text{VCL} \times 100$) (%)	79
3.2.9. MP (Mukus Penetrasyonu, Mucus Penetration)	82
3.2.10. WOB (Salınım, Wobble) ($\text{WOB} = \text{VAP}/\text{VCL} \times 100$) (%)	84
3.2.11. PR (Progresivite, Progression) (%)	87
3.2.12. STR (Doğrusallık, Straightness) ($\text{STR} = \text{VSL}/\text{VAP} \times 100$) (μm)	89
3.2.13. Bazı Kinetik CASA Bulgularının Değerlendirilmesi	92
3.3. Flow Sitometri Bulguları	106
3.4. Musk Ksilen ve Musk Ketonun P-gp İfadesine Etkisi (Western Blot)	109
4. TARTIŞMA	111
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	122
ÖZET	124
SUMMARY	126
KAYNAKLAR	128
EKLER	141
ÖZGEÇMİŞ	145

ÖNSÖZ

Hayvan modelleri ve epidemiyolojik kanıtlar, sperm sayısının azalması, infertilitenin artması, testiküler disgenезis sendromu, testiküler ve prostat kanserleri ile endokrin bozucu kimyasallara maruz kalmayı ilişkilendirmektedir. Kimyasal maddelerin sperm kalitesi üzerine etkilerinin CASA ile ölçülmesi hem üreme toksikolojisi hem de risk değerlendirmesi bakımından önemli olup, henüz veteriner hekimlikte yaygın uygulama alanı bulamamıştır. Kimyasalların insan erkek reproduktif toksisitesine yönelik etkilerinin araştırılmasında *in vitro* testler içerisinde boğa spermi ile yapılan MTT ve CASA testleri batarya test olarak kabul edilmektedir. Ancak türler arası farklılık göz önünde bulundurulduğunda, bu testlerin farklı hayvan türleri arasında değerlendirilmesi ve maruziyete bağlı risk analizlerinin yapılmasında türlere özgü sistemlerin geliştirilmesi öne çıkmaktadır. Dolayısıyla boğalarda sperm kalitesinin değerlendirilmesi, genellikle klinik ortamda doğurganlığın öngörülmesi ile veya maksimum sayıda yavruya ulaşma isteğiyle bağlantılıdır; ancak kirleticiler gibi çevresel faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu tür değerlendirmeler milyarlarca dolarlık endüstrileri (ör. süt, hayvancılık, kümes hayvanları) etkileyen risk değerlendirmelerinin temelini oluşturmaktadır. Yapılan çalışma ile nitro musk bileşiklerinden musk ksilen ve musk ketonun boğalarda erkek reproduktif toksisitesi ve testiküler P-Gp ile ilişkisi değerlendirilmiş, ayrıca kullanılan test sistemi ile ileride boğa reproduktif toksisite araştırmalarında batarya testi olarak kullanılabilmesi için önemli bir alt yapı oluşturulması hedeflenmiştir.

Tez çalışmam ve doktora eğitimim süresince her zaman yanımda olan, yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN'e, değerli hocalarım Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine, Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekanı Sayın Prof. Dr. Ender YARSAN'a ve Veteriner Fakültesi Dekanlığına, laboratuvar çalışmalarındaki katkılarından dolayı

Sayın Prof. Dr. Calogero STELLATTA, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Koray TEKİN, Sayın Vet.Hek. Yağmur TURGUT ve Sayın Vet. Hek. Recep UYAR'a, 19L0239008 proje numarasıyla destek veren Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinatörlüğü'ne, örneklerin toplanmasında gerekli izin ve destekleri veren Tarım ve Orman Bakanlığı Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'ne bağlı Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü'ne, tez jürisi hocalarım Sayın Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN, Sayın Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ, Sayın Doç. Dr. Hüsamettin EKİCİ, Sayın Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Koray TEKİN'e, tezin biçimsel değerlendirilmesinde yardımcı olan kardeşim Baran'a, her zaman beni destekleyen, sabrını esirgemeyen, bu zorlu süreçte her daim motive eden sevgili Eşim Nur'a ve biricik yavrumuz Mert Efe'ye teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
µM	Mikromolar
AB	Avrupa Birliği
ABC	ATP bağlayıcı kaset
AGD	Anogenital aralık
AKA	European Chemicals Agency
ALH	Amplitude lateral head
AR	Androjen reseptörü
ATF3	Aktif edici transkripsiyon faktörü 3
ATP	Adenozin trifosfat
BCF	Beat cross frequency
BCIP/NBT	5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat/nitro blue tetrazolyum
BCIP/NBT	5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat/nitro blue tetrazolyum
BCRP	Breast cancer resistance protein
BPA	Bisfenol A
BSA	Bovine serum albumin
BTB	Blood testis barrier
CAR	Koksakivirüs ve adenovirüs reseptörü
CASA	Bilgisayar destekli sperm analizi
CDMA	Code division multiple access
CIS	Carsinoma in situ
cm ²	Santimetrekare
CT	Bilgisayarlı tomografi
DBP	Dibütil fitalat
DDT	Diklorodifenil trikloroetan

DEHP	Di-2-etilheksil fitalat
DES	Dietilstilbestrol
DNA	Deoksiribonükleik asit
dUTP	Deoksiyuridin trifosfat
EC	Embriyo kültürü
EDC	Endokrin bozucu kimyasallar
EMA	Elektromanyetik alan
EMQN	European Molecular Genetics Quality Network
ER	Östrojen reseptörü
ES	Ektoplazmik uzmanlıklar
FBS	Fetal bovine serum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FISH	Fluorescence in situ hybridization
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FSH	Folikül stimüle edici hormon
g	Gram
GHz	Gigahertz
GnRH	Gonadotropin salınım hormonu
HA	Baş alanı
hCG	İnsan koryonik gonadotropin hormonu
HMG	İnsan menapozal gonadotropini
HPF	High-power field
HSA	Human sperm assay
HYP	Hiperaktivite
IARC	The International Agency for Research on Cancer
IM	İmmotilite
INSL3	Insulin-like peptide 3
IU	Uluslararası birim

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
IVF	İn vitro fertilizasyon
Kg	Kilogram
L	Litre
LD	Letal doz
LH	Luteinleştirici hormon
LIN	Doğrusallık (linearity)
LSR	Lipolysis-stimulated lipoprotein receptor
MAD	Ortalama açısal yer değiştirme (mean angular displacement)
MARS	Multifunctional androgen receptor screening
MDR	Çoklu ilaç direnci
mg	Miligram
MHz	Megahertz
MK	Musk keton
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mm ³	Milimetre küp
MP	Mukus penetrasyonu
MR	Manyetik rezonans
MRP	Çok ilaca dirençli protein
MTS	3-(4,5- dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür
MX	Musk ksilen
NK	Nötral kırmızı
NM	Nitro musklar
NP	Nonprogresif motilite
OAT	Organik anyon taşıyıcı
OATP	Organik anyon taşıyan polipeptit

OCT	Organik katyon taşıyıcı
OCTP	Organik katyon taşıyan polipeptit
PCT	Postcoidal test
P-gp	P-glikoprotein
PI	Propidyum iyodür
ppb	Milyarda bir birim
PR	Progresif motilite
PR	Progresivite
PVDF	Poliviniliden florid
QC	Quality control
RAR	Risk değerlendirme raporu
RIPA	Radio-immunoprecipitation assay
ROS	Reaktif oksijen türleri
SCCNFP	The Scientific Committee on Cosmetic Products and Non-Food Products Intended for Consumers
SFT	Sperm fonksiyon testleri
SLC	Çözücü taşıyıcı
sn	Saniye
STR	Doğrusallık (straightness)
TB	Toluidine blue
TBS-T	% 0,5 tween- 20 tamponu
TDS	Testiküler disgenesis sendromu
USEPA	U.S. Environmental Protection Agency
VAP	Ortalama yol hızı (average path velocity)
VCL	Eğrisel hız (curvilinear velocity)
VL	Hız (velocity)
VP	Hız ve progresivite, velocity and progressivity
VSL	Doğrusal hız (rectilinear velocity)
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

WOB	Salınım hareketi (wobble)
WST	2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum
XTT	2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksianilid
α	Alfa
β	Beta
μL	Mikrolitre
μmol	Mikromol

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Erkeklerde Sık Karşılaşılan Üreme Bozuklukları	3
Çizelge 1.2. Erkek Üreme Sistemine Etki Eden Faktörler	5
Çizelge 1.3. Spermanın Karakteristik Özelliklerinin Alt Ref. Limitleri	13
Çizelge 1.4. D.S.Ö. Raporlarına Göre Sperma Özelliklerinin Alt Ref. Sınırları	14
Çizelge 1.5. Hamilelik Süresi 12 Ay veya Daha Az Olan Çiftler İçin Sperma Parametrelerinin Düşük Referans Sınırları	27
Çizelge 3.1. TM Toplam Hareketlilik, MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	61
Çizelge 3.2. TM Toplam Hareketlilik, Epd. Sperma ile Taze Sperma Karş	61
Çizelge 3.3. TM Toplam Hareketlilik, Doz-İlaç Karşılaştırma	62
Çizelge 3.4. VAP Motil MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	64
Çizelge 3.5. VAP Motil Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	64
Çizelge 3.6. VAP Motil Doz-İlaç Karşılaştırma	64
Çizelge 3.7. VCL Motil MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	67
Çizelge 3.8. VCL Motil Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	67
Çizelge 3.9. VCL Motil Doz-İlaç Karşılaştırma	67
Çizelge 3.10. VSL Motil MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	69
Çizelge 3.11. VSL Motil Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	70
Çizelge 3.12. VSL Motil Doz-İlaç Karşılaştırma	70
Çizelge 3.13. ALH Motil MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	72
Çizelge 3.14. ALH Motil Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	72
Çizelge 3.15. ALH Motil Doz-İlaç Karşılaştırma	73
Çizelge 3.16. BCF Motil MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	75
Çizelge 3.17. BCF Motil Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	75
Çizelge 3.18. BCF Motil Doz-İlaç Karşılaştırma	75
Çizelge 3.19. HYP Toplam MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	77
Çizelge 3.20. HYP Toplam Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	78
Çizelge 3.21. HYP Toplam Doz-İlaç Karşılaştırma	78
Çizelge 3.22. LIN Motil MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	80
Çizelge 3.23. LIN Motil Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	80

Çizelge 3.24. LIN Motil Doz-İlaç Karşılaştırma	81
Çizelge 3.25. MP Toplam MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	83
Çizelge 3.26. MP Toplam Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	83
Çizelge 3.27. MP Toplam Doz-İlaç Karşılaştırma	83
Çizelge 3.28. WOB Motil MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	85
Çizelge 3.29. WOB Motil Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	86
Çizelge 3.30. WOB Motil Doz-İlaç Karşılaştırma	86
Çizelge 3.31. PR Progresif MK-MX Doz-Saat Karş	88
Çizelge 3.32. PR Progresif Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	88
Çizelge 3.33. PR Progresif Doz-İlaç Karşılaştırma	88
Çizelge 3.34. STR Motil MK-MX Doz-Saat Karşılaştırma	90
Çizelge 3.35. STR Motil Epd. Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma	91
Çizelge 3.36. STR Motil Doz-İlaç Karşılaştırma	91
Çizelge 3.37. Toplam Motilite (%) 24. Saat Verileri	93
Çizelge 3.38. STR 24. Saat Verileri	94
Çizelge 3.39. WOB 24. Saat Verileri	95
Çizelge 3.40. Mukus Penetrasyonu (% Toplam) 24. Saat Verileri	97
Çizelge 3.41. Mukus Penetrasyonu (% Motil) 24. Saat Verileri	98
Çizelge 3.42. LIN (%) 24. Saat Verileri	99
Çizelge 3.43. VSL (μm^2) 24. Saat Verileri	100
Çizelge 3.44. Hiperaktivite (%) 24. Saat Verileri	101
Çizelge 3.45. VCL ($\mu\text{m/s}$) 24. Saat Verileri	103
Çizelge 3.46. BCF (Hz) 24. Saat Verileri	104
Çizelge 3.47. ALH (μm) 24. Saat Verileri	105
Çizelge 3.48. VAP ($\mu\text{m/s}$) 24. Saat Verileri	106
Çizelge 3.49. Flow Sonuçları, Acrosome reacted, dead. Fitc (+), PI (+)	108
Çizelge 3.50. Flow Sonuçları, Acrosome reacted, viable. Fitc (+), PI (-)	108
Çizelge 3.51. Flow Sonuçları, Acrosome intact, viable. Fitc (-), PI (-)	109
Çizelge 3.52. Flow Sonuçları, Acrosome intact, dead. Fitc (-), PI (-)	109

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Musk Ksilen ve Musk Ketonun Kimyasal Yapıları	8
Şekil 1.2. CASA Sistemleriyle Ölçülen Değişkenler İçin Standart Terminoloji	39
Şekil 2.1. Boğa Testiküler Hücre Kültürü	49
Şekil 2.2. Taze Sperma Toplanması	50
Şekil 2.3. Laboratuvarında Epididimal Sperma Alınması	52
Şekil 2.4. Örnek CASA Verisi	54
Şekil 2.5. Flow Sitometre Cihazı	55
Şekil 3.1. Testiküler Parenşim Primer Hücre Kültüründe 24 Saat İnkübasyon	59
Şekil 3.2. Musk Keton, TM Toplam Hareketlilik, Doz-Saat-TM Karşılaştırma	62
Şekil 3.3. Musk Ksilen, TM Toplam Hareketlilik, Doz-Saat-TM Karşılaştırma	62
Şekil 3.4. Musk Keton, VAP Motil Doz-Saat-VAP Karşılaştırma	65
Şekil 3.5. Musk Ksilen, VAP Motil Doz-Saat-VAP Karşılaştırma	65
Şekil 3.6. Musk Keton, VCL Motil Doz-Saat-VCL Karşılaştırma	68
Şekil 3.7. Musk Ksilen, VCL Motil Doz-Saat-VCL Karşılaştırma	68
Şekil 3.8. Musk Keton, VSL Motil Doz-Saat-VSL Karşılaştırma	70
Şekil 3.9. Musk Ksilen, VSL Motil Doz-Saat-VSL Karşılaştırma	71
Şekil 3.10. Musk Keton, ALH Motil Doz-Saat-ALH Karşılaştırma	73
Şekil 3.11. Musk Ksilen, ALH Motil Doz-Saat-ALH Karşılaştırma	73
Şekil 3.12. Musk Keton, BCF Motil Doz-Saat-BCF Karşılaştırma	76
Şekil 3.13. Musk Ksilen, BCF Motil Doz-Saat-BCF Karşılaştırma	76
Şekil 3.14. Musk Keton, HYP Toplam Doz-Saat-HYP Karşılaştırma	78
Şekil 3.15. Musk Ksilen, HYP Toplam Doz-Saat-HYP Karşılaştırma	79
Şekil 3.16. Musk Keton, LIN Motil Doz-Saat-LIN Karşılaştırma	81
Şekil 3.17. Musk Ksilen, LIN Motil Doz-Saat-LIN Karşılaştırma	81
Şekil 3.18. Musk Keton, MP Toplam Doz-Saat-MP Karşılaştırma	84
Şekil 3.19. Musk Ksilen, MP Toplam Doz-Saat-MP Karşılaştırma	84
Şekil 3.20. Musk Keton, WOB Motil Doz-Saat-WOB Karşılaştırma	86
Şekil 3.21. Musk Ksilen, WOB Motil Doz-Saat-WOB Karşılaştırma	87
Şekil 3.22. Musk Keton, PR Progresif Doz-Saat-PR Karşılaştırma	89

Şekil 3.23. Musk Ksilen, PR Progresif Doz-Saat-PR Karşılaştırma	89
Şekil 3.24. Musk Keton, STR Motil Doz-Saat-STR Karşılaştırma	91
Şekil 3.25. Musk Ksilen, STR Motil Doz-Saat-STR Karşılaştırma	92
Şekil 3.26. Örnek Flow Sitometri Çıktısı	107
Şekil 3.27. Musk Bileşikleri Uygulanan Boğa Sperminde P-gp Protein İfadesi	110

1. GİRİŞ

Doğal musklar antik çağlardan beri parfümlerin hazırlanmasında koku olarak kullanılmıştır. Doğal musk özlerinin kokulu bileşenleri makrosiklik ketonlar, makrosiklik laktonlar, makrosiklik alkoller ve piridin türevleridir. Düşük üretim maliyetleri ve kolay hazırlanma nedeniyle muskların sentetik türevleri olan nitro musklar; sabun, kozmetik, çamaşır deterjanı ve yumuşatıcı gibi sayısız ürünün endüstriyel üretiminde yapay koku olarak büyük miktarlarda kullanılmıştır. Musk keton şüpheli bir ko mutajen iken, musk ksilen şüpheli bir ko mutagen ve kanserojendir. Musk ksilen, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından grup 3'te (insanlarda kanserojen olarak sınıflandırılmaz) sınıflandırılmıştır. İn vitro çalışmalarda ise nitro muskların (musk ksilen ve musk ketonun) muhtemelen östrojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bileşiklere canlılar özellikle inhalasyon ve dermal yol ile maruz kalmaktadır. Bu kirleticiler, çevresel yolla su kaynaklarına bulaşabilmekte ve su canlılarına, çevreye ve organizmalarda sağlığa yönelik istenmeyen etkiler oluşturabilmektedir. Bu bileşiklerin insan sütüne geçişine ilişkin çalışmalar bulunmakla birlikte, inek ya da diğer hayvanların süt ya da dokusuna geçişine ilişkin çalışmalar sınırlıdır veya bulunmamaktadır. Özellikle insan ve çevresel kaynaklı maruziyet yolları göz önünde bulundurulduğunda, boğalarda, endokrin bozucu etkinliği gösterilen bu kimyasallar için reproduktif toksisitenin yapılmamış olması, ileride damızlık potansiyeline sahip olan hayvanlar için önem taşımaktadır.

Bu değerlendirmelerden yola çıkılarak, hazırlanan tezin amacı, parfüm bazlarında bulunabilen nitro musk bileşiklerinden musk ksilen ve musk ketonun boğalarda erkek reproduktif toksisitesinin *in vitro* olarak araştırılmasıdır. Bu amaçla, mezbahaneden alınacak boğa testisinin parenşimal bölgesi ve epididimal kısımları kültür edilmiş, primer hücre kültüründe nitro musk bileşiklerinin (musk ksilen ve musk keton) IC50'si spermiyotoksitate bakımından MTT ile tespit edilmiştir. Sperm üzerine motilite ve morfolojik etkileri ise IC50 dozunun altındaki konsantrasyonlarda uygulanmasını takiben Bilgisayar Aracılı Sperm Analizi, CASA analizi ile yapılmıştır.

Kirleticilerin membran transport proteinleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde, bazılarının ekspresyonu arttırdığı, bazılarının ise azalttığı ve buna bağlı olarak toksik etki gösterdikleri görülmektedir. Kan testis bariyeri organizmada en kompleks bariyerler arasındadır ve özellikle gelecek nesillerin korunması için transport proteinlerin ekspresyonu önem taşımaktadır. Yapılan çalışmada, nitro musk bileşiklerinin membran transport proteinleri arasında önemli olan P-Gp üzerine etkileri, primer boğa testiküler parenşimine IC50 dozu altında uygulanmasını takiben Western Blot ile araştırılmıştır.

Akrozom bütünlüğü, spermatoozonun zona pellusidanın içine penetrasyonuyla karakterize olan, fertilizasyon açısından önemli parametrelerden birisidir. Çalışmamızda flow sitometre cihazı kullanılarak florokrom floresan isotiosinat (FITC) / Propidium iodid (PI) boyama yapılmış, viabilite, akrozom bütünlüğüyle birlikte canlı/ölü ve sağlam/hasar görmüş spermatozoonların belirlenerek sperma kalitesinin ortaya konulması amaçlanmıştır.

Erkeklerde reproduktif problemlerin giderek yaygınlaştığı ve nüfusun en az % 5'ini etkilediği epidemiyolojik çalışmalarda bildirilmiştir. Bu problemlerin % 75'inin idiyopatik olduğu ve tedavisinin olmadığı belirtilmiştir. İnfertil erkeklerin büyük çoğunluğu normal veya subnormal (oligospermi) sayıda sperm üretir ve spermelerin hiçbir belirgin morfolojik veya fonksiyonel anomalilikleri olmayabilir. Anomalisi olmayan, bir veya birden fazla anomaliliğe sahip olan erkek grupları, subfertil erkeklerin heterojen bir grup olduklarını ve subfertiliteilerinin birçok farklı nedenden kaynaklandığını ortaya çıkarır (Lamb IV ve Foster, 1988). Hayvanlarda da durum benzerdir ve erkeklerde sık karşılaşılan üreme bozuklukları Çizelge 1.1.'de sıralanmıştır (Noakes ve ark., 2001 ve Sontaş, 2016).

Çizelge 1.1. Erkeklerde sık karşılaşılan üreme bozuklukları

Üreme Bozukluğu	Referans
Kriptorşidizm	Feldman ve Nelson, 2004; Johnston ve ark., 2001; Kolon ve ark., 2014 ve Toppari ve ark., 2014.
Hipospadias	Göllü Bahadır ve ark., 2016; Hayes ve Wilson, 1986; Netto ve ark., 2013; Ndikuwera, 2005 ve Snodgrass, 2012.
Anogenital Aralığın (Anogenital Distance, AGD) Kısalması	Aspinall ve Cappello, 2015; Hsieh ve ark., 2008; Swan ve ark., 2005 ve Thankamony ve ark., 2014.
Pubertal Problemler	Euling ve ark., 2008; Evanthia-Kandarakis ve Gore, 2012; Gönç, 2009; Kumanov ve Agarwal, 2016; Noakes ve ark., 2001 ve Villanueva ve Argente, 2014.
Çevresel Faktörler	Kumanov ve Agarwal, 2016.
İnfertilite	Andrology-Australia, 2014; Jungwirth ve ark., 2012; Lamb IV ve Foster, 1988; Ng ve ark., 1988; Raheem ve Ralph, 2011 ve WHO, 2010.
Testis Kanseri	ACS, 2018; Buetow, 1996; Kliesch, 1998; Nieschlag ve ark., 2010.
Prostat Kanseri	Eble ve ark., 2004; Naz, 2005 ve Quinn ve Babb, 2002.
Testiküler Disgenesis Sendromu (TDS)	Bay ve ark., 2006 ve Skakkebaek ve ark., 2001.

Erkeklerde infertilite yaygınlaşmaktadır ve genellikle nüfusun en az % 5'ini etkilediği düşünülmektedir. Bu erkeklerin belki % 75'inde durum idiyopattır ve tedavi edilemez (Lamb IV ve Foster, 1988). Hayvanlarda da durum benzerdir ve tanının temel taşı sperma analizidir (Noakes ve ark., 2001 ve Sontaş, 2016). Bir organizmanın üreme sağlığı, yaşlanma, beslenme, yaşam tarzı, davranış, üreme sistemi enfeksiyonları, stres ve ksenobiyotik gibi birçok faktörden etkilenebilir. Sanayileşme ve kentleşme dönemlerinde, binlerce kimyasal madde çevreye düzenli olarak girer ve organizmayı soluma, emilim ve yutma yollarıyla etkiler. Biyoakümülyasyon ve biyomagnifikasyon, bu kimyasalların etkisini daha da arttırabilir. Bu kimyasallardan bazıları ağır metaller, pestisidler, insektisidler, plastikleştiriciler, halojenli hidrokarbonlar ve aromatik hidrokarbonlardır (Negro-Vilar, 1993 ve Tiwari ve ark., 2011). Daha önce yapılan araştırmalar, ksenobiyotiklerin doğurganlığı etkilediğini ve maruz kalan organizmalardaki anormal sperm konsantrasyonu, sperm hareketliliği, bozulmuş spermatogenez ve hormonal dengesizlik ile ilişkili olduğunu ileri sürmüştür. Ksenobiyotiklerin üreme üzerindeki olumsuz etkileri her iki cinsiyette de üreme

toksitesitesi olarak adlandırılır ve üreme toksitesitesine neden olan ajanlar üreme toksik maddeleri olarak adlandırılır. Ayrıca, üreme toksitesitesi yetişkin maruziyeti ile sınırlı değildir, aynı zamanda gebelik öncesi, gebelik, doğum öncesi ve/veya doğum sonrası dönemlerde ebeveynin toksik etkilere maruz kalmasından kaynaklanabilir (European Commission Institute for Health and Consumer Protection, 2005). Endokrin bozucular, çevredeki östrojen benzeri ve antiandrojenik kimyasallardır, sadece çeşitli su bitkileri, yaban hayatı ve insan sağlığı üzerinde değil aynı zamanda genel ekolojik refah üzerinde potansiyel tehlikeli etkilere sahiptir. Doğal hormonları taklit etmesi, hormonların etkisini inhibe etmesi veya endokrin sistemlerin normal düzenleyici işlevini değiştirdiği düşünülen bu kimyasallar; testis ve prostat kanserlerinin yanı sıra anormal cinsel gelişim, hipofiz bezi ve tiroid bezi işlevlerinde değişiklikler, bağışıklık baskılanması ve nörodavranışsal etkiler yanında erkeklerde doğurganlığın azalmasına neden olabilmektedir. Gelişme döneminde, androjen müdahalesi, düşük sperm üretim kapasitesini içeren erkek üreme sistemi anomalilerine neden olabilir (Naz, 2005). Sperm kalitesinin ölçülmesi, klinik androloji, üreme toksikolojisi, epidemiyoloji ve risk değerlendirmesinde erkek doğurganlığının bir ölçüsü olarak kullanılır. Klinik ortamda sperma kalitesi rutin olarak incelenir ve doğurganlık değerlendirmesinde başvuran çiftler için önemli bir bileşendir (Rowe ve ark., 1993).

Canlılarda üreme sağlığını etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunların başlıcaları; yaş, diyet, yaşam biçimi, üreme sistemi enfeksiyonları, ksenobiyotikler ve stres' dir. Şehirleşmenin, sanayileşmenin ve teknolojinin artmasıyla canlılar çeşitli yollarla binlerce kimyasal maddeye maruz kalırlar. Ağır metaller, insektisidler, pestisidler, halojenli hidrokarbonlar, plastikleştiriciler ve aromatik hidrokarbonlar bunlardan bazılarıdır (Negro-Vilar, 1993 ve Tiwari ve ark., 2011). Erkek üreme sistemine etki eden faktörlerin bazıları Çizelge 1.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Erkek üreme sistemine etki eden faktörler

Elektromanyetik Alanlar	Gye ve Park, 2012.
X Işınları ve Radyoaktivite	Farrelly ve McEntee, 2014; MacLeod ve Wisner, 2011; Ogilvy ve Shalet, 1993; Pommer, 1958 ve Rowley ve ark., 1974.
Stres	Alejandro ve ark., 2014; Coubrough, 1985; Dobson ve Smith, 2000; McGrady, 1984; Nargund, 2015; Negro-Vilar, 1993 ve Palti, 1969.
Ksenobiyotikler	Khetan, 2014 ve Naz, 2005.
Nikotin	Aydos ve ark., 2001; Cassidenti ve ark., 1990; Daniel ve ark., 1992; Oyeyipo ve ark., 2010; Rubes ve ark., 1998 ve Spangler, 1999.
Alkol	Emanuele ve Emanuele, 1998.
İlaçlar	Bancroft ve Reinisch, 1990.
Ağır Metaller	Braunstein ve ark., 1978; Foster ve ark., 1993; Friberg ve ark., 1974; Gilfillan, 1965; King ve ark., 1997; Lancranjan ve ark., 1975; Naz, 2005; Snow, 1992; Sokol, 1987; Weir Jr ve Fisher, 1972 ve Winder, 1989.
Endokrin Bozucular	Khetan, 2014; Kumanov ve Agarwal, 2016; Lea ve ark., 2016; Naz, 2005 ve Taylor ve ark., 2014.

1.1. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucu kimyasallar (Endocrine-disrupting chemicals, EDC'ler), hava, su, toprak, yaban hayatı ve insanlar da dahil olmak üzere ekolojik dengeyi ciddi anlamda tehdit etmektedir. Bu maddeler; doğal hormonları taklit eden, etkilerini inhibe edip (hormon reseptörüne bağlanarak, reseptör sonrası olayları tetikleyerek/inhibe ederek) doğal hormon üretimini, biyotransformasyonunu, bağlanmasını veya atılımını bozup endokrin sistemin çalışmasını bozarak etkilerini gösterirler. Endokrin bozucularla birlikte çeşitli kanser türleri (testis ve prostat gibi), cinsel gelişim bozukluğu, hipofiz ve tiroid bezi bozuklukları, bağışıklık problemleri ve nörodavranışsal etkiler erkeklerde infertilitenin en önemli sebepleri olarak gösterilir. (Naz, 2005).

Epidemiyolojik bulgular, endokrin bozucu kimyasallara maruziyetin sonucu olarak sperm sayısında azalma, infertilitenin yaygınlaşması, TDS (Testiküler Disgenesis Sendromu), testis ve prostat kanserini göstermektedir. Çevresel kontaminasyonları ve sık kullanımları insan ve yaban hayatını negatif etkilemeleri endokrin bozucular ile ilgili kaygıları arttırmaktadır (Khetan, 2014).

EDC'ler grubuna dahil edilen kimyasallar arasında; çözücüler/yağlayıcılar (PCB, PBB ve dioksinler), plastikler (BPA), plastikleştiriciler (fitalat), pestisidler (metoksiklor, DDT, klorpirifos), fungusidler ve bazı farmasötik ajanlar (DES) yer almaktadır. Bu maddeler doğal olarak da sentezlenebilirler, buna örnek olarak fitoöstrojenik ve mikoöstrojenik maddeler gösterilebilir. Bazı maddeler ile etkileşim östrojenik olurken (BPA gibi), bazı maddeler ile androjenik (vinklozin gibi) bazıları ile ise aromataz ve steroidogenez (fadrazol ve ketokonazol gibi) etkileşim görülebilmektedir. Örneğin Atrazin, sıçanlarda LH ve prolaktin düzeyini düşürerek ergenliği geciktirir. En fazla araştırılan endokrin bozucu kimyasalların başında fitalat ve adipatlar, bisfenol A ve pestisidler gelmektedir (Kumanov ve Agarwal, 2016).

Çevresel kimyasallara maruziyet, insanlarda sperm kalitesinin bozulması ve kriptorşidizm ile bağdaştırılmıştır. 26 yıllık (2014 ve 1988 arası) bir çalışmada bir grup köpeğin zamanla sperm kalitesinin düştüğü ve yavrularında kriptorşidizm görülme sıklığının arttığı tespit edilmiştir. Erkeklerin sayısı dişilere göre azalmıştır. Yetişkin köpek testisleri ve ticari köpek gıdalarında bakılan Dietilheksil fitalat (DEHP) ve poliklorlu bifenil 153 (PCB153) konsantrasyonları reproduktif aktiviteyi bozacak düzeyde bulunmuştur. DEHP ve PCB153 ün testisteki miktarlarının, *in vitro* sperm canlılığını, sperm hareketliliğini ve DNA bütünlüğünü bozduğu fakat LH kaynaklı testosteron salınmasını etkilemediği bulunmuştur. Buradan yola çıkarak endokrin bozucuların hem insanlarda hem de hayvanlarda (köpekte) üreme sistemini etkilediği sonucuna varılır (Lea ve ark., 2016).

Endokrin bozucular sınıfına dahil olan sentetik nitro musklar, ev ve kişisel bakım ürünlerinde bulunan kokulu kimyasallardır. Bu ürünlerin kullanımı, kontamine toz ve uçucu kokuların solunmasının yanı sıra dermal absorpsiyon yoluyla doğrudan maruziyete yol açar. Çalışmalar ayrıca insanların kontamine sıvıların ve gıdaların ağızdan emilmesi yoluyla bu kimyasalların düşük dozlarına maruz kaldığını göstermektedir. Bu bileşikler lipofilik olduğundan, onlar ve metabolitleri sadece kanda değil anne sütü ve yağ dokusunda da bulunmuştur. Kişisel kullanımdan sonra, bu kalıcı kirleticiler atık sular yoluyla çevreye geçer (Taylor ve ark., 2014).

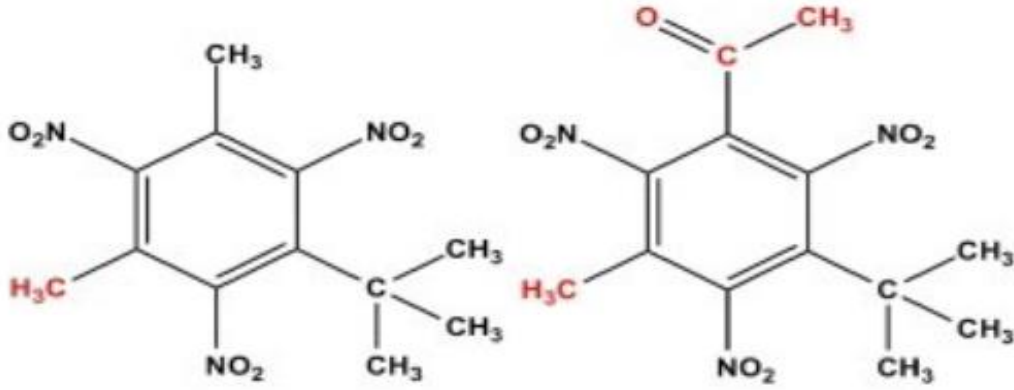
1.1.1. Nitro Musklar

Antik çağlardan beri doğal musklar parfümlerin hazırlanmasında koku olarak kullanılmıştır. Doğal musk her zaman çok kıymetli olmuştur, erkek musk geyiklerinin (*Moschus moschiferus*) ekzokrin bezleri sadece 30 gram doğal musk içerir. Doğal musk özlerinin kokulu bileşenleri makrosiklik ketonlar, makrosiklik laktonlar, makrosiklik alkoller ve piridin türevleridir. 19. yüzyılın sonunda A. Baur (1891), dinitro ve trinitro konumlu benzen türevlerinden oluşan nitro musklar grubunu (NM) keşfetti (Liebl ve Ehrenstorfer, 1993) .

Bu sentetik bileşikler, doğal musk özlerinden meydana gelen bileşiklerden yapısal olarak tamamen farklı olmasına rağmen, hayvanlarda ve bitkilerde bulunanlara benzer bir koku özelliklerine sahiptir. Düşük üretim maliyetleri ve kolay hazırlanma nedeniyle nitro musklar, sabun, kozmetik, çamaşır deterjanı ve yumuşatıcı gibi sayısız ürünün endüstriyel üretiminde yapay koku olarak büyük miktarlarda kullanılmıştır. Ek olarak, bazı nitro musklar, yiyecek katkı maddeleri, oda kokuları, çiğneme tütünü, balık yemleri ve herbisit formülasyonları ve patlayıcılar gibi teknik ürünlerde kullanılır. NM'ler grubunda bulunan musk ksilen (MX) ve musk keton (MK), koku endüstrisi için bugüne kadarki en önemli bileşiklerdir (Heinz ve ark., 2001).

1.1.1.1. Musk Keton ve Musk Ksilen

IUPAC adlandırmasına göre musk ksilen; 1-tert-butil-3,5-dimetil-2,4,6-trinitrobenzen ve musk keton ise 4-tert-butil-3,5-dinitro-2,6-dimetilasetofenon diye bilinirler ve kimyasal yapıları Şekil 1.1.'deki gibidir.



Şekil 1.1. Musk Ksilen ve Musk Ketonun Kimyasal Yapıları (IUPAC)

1.1.1.1.1. MX ve MK'nın Toksikolojik Etkileri

Avrupa Komisyonu'na bağlı Tüketiciler İçin Kozmetik Ürünleri ve Gıda-Dışı Ürünler Bilimsel Komitesinin (The Scientific Committee On Cosmetic Products And Non-Food Products Intended For Consumers, SCCNFP), 8 Aralık 1999 genel kurulunda musk ksilen (SCCNFP / 0163/99) ve musk ketonun (SCCNFP / 0162/99) indirgenmesiyle oluşan aminlerin zayıf östrojenler olduğunu ve çevrede kalıcı olduğunu belirtilmiştir. Toksikolojik karakterizasyonu etkileyebilecek başka yeni rapor bulunamamıştır. İki maddeye ilişkin Risk Değerlendirme Raporları (Risk Assessment Reports, RAR), Konsey Tüzüğü (EEC) 793/93 uyarınca hazırlanmıştır. Tehlikeli Maddelerin Sınıflandırılması ve Etiketlenmesi Komisyonu Çalışma Grubu daha sonra maddelerin kanserojen kategorisinin 3 olarak sınıflandırılması gerektiği sonucuna varmıştır. RAR'larda kanserojen etki için eşik değer bulunduğunu

varsayarak risk karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. SCCNFP, bu yaklaşımı kullanmak için bir eşik belirleme kanıtının yeterli olduğunu düşünmemektedir (The Scientific Committee On Cosmetic Products and Non-Food, 2004).

Avrupa Birliği bu konuda Birleşmiş Milletlerin Global Uyumlaştırılmış Sistemi (GHS) göre yönetmeliğini yenileyerek “Kimyasalların Kaydı, Değerlendirilmesi, İzni ve Kısıtlanmasına Yönelik Yönetmeliği (Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals; REACH)”ni çıkarmıştır. Bu yönetmelikte musk ksilen 609-068-00-1 indeks numarasıyla bulunmakta Sınıf 2 karsinojen (şüpheli insan karsinojeni) olarak değerlendirilmektedir. musklar ve fitalatların özenli kullanımı ya da yasaklanmasına yönelik çalışmalarına rağmen, özellikle bazı kozmetik ve temizlik şirketleri bu kimyasalların varlığını belirtmemektedirler. Amerikan Çevre Koruma Ajansı (USEPA) yasakladığı bu kimyasalların alternatifi olarak yönetmeliklerde adı geçmeyen, toksisite ve çevre araştırmaları ayrıntılı olarak yapılmayan yenilerini önermektedir. Avrupa Kimyasallar Ajansı'nın (AKA; European Chemicals Agency - ECHA) 2009'da yayınladığı bildiriye göre, Avrupa Birliğinde musk ksilen üretimi yapılmamaktadır ve yılda bir tondan fazla üreten veya ithal eden firmaların faaliyetleri durdurulmuştur (Yurdakök ve Aydın, 2013).

Musk ksilen (5-tert-butil grubunda 3H-etiketli) erkek Wistar sıçanlarına intragastrik olarak uygulandığında, dozun yaklaşık % 50'sinin 24 saatte idrar ve dışkıya atıldığı ve yedi güne kadar bu oranın % 87 olduğu gözlenmiştir. İdrar ve dışkıya atılan dozun oranı sırasıyla % 10,3 ve % 75,5'tir (Minegishi ve ark., 1991).

Musk ksilen 'in akut oral LD₅₀'sinin 10 g / kg'ı, tavşanlarda akut dermal LD₅₀'nin 15 g / kg'ı aştığı bildirilmiştir (Opdyke, 1975).

Musk ksilen, *S. typhimurium* mutasyon testi, fare lenfoma tahlili, Çin hamsteri yumurtalık (CHO) hücrelerinde *in vitro* sitogenetik tahlili, primer sıçan hepatositlerinde *in vitro* programlanmamış DNA sentez tahlili ve *in vivo* programlanmamış DNA sentez tahlili gibi bir dizi kısa süreli genotoksisite testinde eşit derecede olumsuz sonuçlar vermiştir (IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, 1996).

Musk keton, fizikokimyasal ve toksikokinetik özellikler bakımından musk ksilen ile oldukça karşılaştırılabilir ve her iki kimyasal da hem sıçanlarda hem de farelerde fenobarbital gibi karaciğer enzimlerini indüklerler. Fertilite ile ilgili olarak, Musk ketonla ilgili çoklu nesil üreme toksisitesi çalışması mevcut değildir. Sıçanlarla yapılan 90 günlük dermal toksisite çalışmasında musk keton üreme organları üzerinde hiçbir etkiye neden olmamasına rağmen yapısal olarak ilişkili bileşik musk ambreti aynı çalışmada testis atrofisine neden olmuştur. Sıçanlarla yapılan bir oral gelişimsel toksisite çalışmasında, maternal toksisite doza bağlı olarak 45 ve 150 mg/kg/gün olmuştur. Bu toksisite düşük vücut ağırlığı artışı ve düşük gıda tüketimini de içeriyordu. İmplantasyon sonrası artmış kayıp ve düşük fetal vücut ağırlığı dahil olmak üzere gelişimsel toksisite, sadece 150 mg/kg/gün olarak görülmüştür. Teratojenite belirtisi yoktur. Peri/postnatal toksisite çalışmasından elde edilen veriler musk ketonun üreme toksisitesi için sınıflandırılmaması gerektiğini göstermektedir. Sıçanlarla yapılan 90 günlük bir dermal toksisite çalışmasında, yapısal olarak ilişkili bileşik olan musk ambretinin aksine, musk keton için nörotoksik bir potansiyel belirtisi bulunmamıştır (European Commission Institute for Health and Consumer Protection, 2005).

Sekiz musk kokusunun E-screen assay yöntemi ile östrojenik aktivite açısından test edildiği bir çalışmada nitro-musk kokularından musk ksilen ve musk ketonun *in vitro* östrojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Musk ksilen için benzer sonuçlar daha önce elde edilmiştir (Schuller, 1998). Musk keton daha önce E-screen assay ile test edilmemiştir. Bu çalışmada kullanılan test sisteminde, musk keton, musk

ksilenden üç kat daha fazla östrojen reseptörüne afinite göstermiştir. Amin azaltılması, nitro kokularının dönüşümünde ilk adımdır (Gatermann ve ark., 1998) (Rimkus ve ark., 1994). Musk keton amine indirgendiğinde, östrojenik aktivite kaybolur. Musk ksilende ise ketonun aksine östrojenik potansiyelde bir artışa yol açar (Bitsch ve ark., 2002).

Musk keton şüpheli bir ko mutajen iken, musk ksilen şüpheli bir ko mutagen ve kanserojendir. Musk ksilen, IARC tarafından grup 3'te (insanlarda kanserojenliğine göre sınıflandırılmaz) sınıflandırılmıştır. Musk ksilen ve musk keton yapısal olarak benzer olmasına ve neredeyse aynı fizikokimyasal özelliklere sahip olmalarına rağmen, biyolojik özelliklerinde önemli farklılıklar gösterir. İn vitro bir çalışmada musk ksilen ve musk ketonun muhtemelen östrojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir ve musk keton, ER'ye musk ksilen 'den üç kat daha fazla bir afinite göstermiştir. nitro kokularının dönüşümündeki ilk adım, musk keton azaldığında östrojenik aktivitenin kaybolduğu, amine indirgenmesidir; oysa musk ksilen 'in azaltılması, östrojenik gücün artmasına neden olur. Ayrıca, musk ksilen 'in para pozisyonunda amine indirgenmesi proliferatif etkilerin artmasına neden olur, aksine, amin grubunun orto pozisyonunda indirgenmesi sitotoksik etkiye neden olur. Böylece, nitro musk kokularının azaltılmasının, metabolitin biyolojik etkisi üzerinde pozisyona bağlı değişken bir etkiye yol açtığı görülmektedir. Kemirgenler üzerine yapılan bir çalışma, musk ketonun, musk ksilen 'den farklı olarak enzim aktivitelerini kuvvetli bir şekilde indüklendiğini göstermiştir. Dolayısıyla, enzim modüle edici aktivitesinin bir sonucu olarak, musk keton, düşük dozlarda bile, birkaç insan kanserojeniyle kombinasyon halinde bir ko-genotoksikan olarak görev yapar (Siddique ve ark., 2016).

1.2. Sperma Kalitesi

Erkeklerde doğurganlık, sperm kalitesi, klinik muayene, toksikolojik değerlendirme, epidemiyoloji ve risk değerlendirme ile ilişkilidir. Rutin sperma

kalitesi ölçümü kliniğe başvuran çiftler için ilk yapılması gerektir ve doğurganlık tespiti için çok önemlidir (Rowe ve ark., 1993).

Ejakülasyon sırasında sperma, spermatozoanın konsantre süspansiyonundan oluşturulur, iki epididimde depolanır, aksesuar cinsel organlardan gelen sıvı salgılarıyla karışır ve seyreltilir. Semen birkaç bolus şeklinde atılır. Vazektomi öncesi ve sonrası semen hacimlerinin karşılaştırması, semen hacminin yaklaşık % 90'ının aksesuar bezlerden (Weiske, 1994), esas olarak prostat ve seminal keselerden, önemsiz miktarlarda da bulbouretral bezler (Cowper bezi) ve epididimlerden gelen salgılardan oluştuğunu göstermektedir. Dünya Sağlık Örgütü ilk kez 1980 yılında olmak üzere WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction (İnsan sperması ve spermının incelenmesi-servikal mukusla etkileşimi) adlı broşürleri yayınlamaya başlamıştır. Bu yayınların amacı insan sperma analizlerinin standardize edilmesiydi. Bu el kitapları toplamda beş kez (1980, 1992, 1999, 2010) yayınlanmış ve birçok dile çevrileri yapılmıştır. Evrensel bir standart sağladığı için son 30 yılda tüm dünyada araştırma ve geliştirme laboratuvarlarında kabul görmekte ve kullanılmaktadır (WHO, 2010).

Sperma kalitesi ile ilgili yapılan bir çalışmada aşağıdaki parametrelere bakılmıştır;

1. Erkeğin ve kadının yaşı, sigara ve alkol tüketimi, diğer demografik ve kişisel özellikler (gebelik sayısı ve kontrasepsiyon uygulaması gibi)
2. Spermanın hacmi, sperm konsantrasyonu, sperm sayısı, hareketli sperm sayısı ve hareketli sperm yüzdesi, normal sperm yüzdesi, normal sperm sayısı, amorfik sperm yüzdesi gibi sperm kalite göstergeleri (Zinaman ve ark., 2000).

Hayvanlarda da sperm kalitesinin laboratuvar ortamında değerlendirilmesi ilk yapılması gerektir. Hem üreme potansiyelinin belirlenmesi hem de subfertil

olanların tespiti için tekrarlanabilir, hızlı ve hassas yöntemlere ihtiyaç vardır. Burada da sperm konsantrasyonu, sperm motilitesi ve sperm morfolojisi bakılan temel parametrelerdir (Gadea ve ark., 2004).

Dünya Sağlık Örgütü, sperma analizini 3 aşamada değerlendirir. Bu aşamalar;

1. Standart testler (makroskobik görünüm [genel görünüm, sperma hacmi ve pH]), (mikroskobik görünüm [agregasyon, aglütinasyon, sperm olmayan hücreler]), sperm motilitesi, sperm canlılığı (eğer motilite düşükse), sperm sayısı, sperm morfolojisi, lökosit peroksidaz aktivitesi (eğer birçok sperm olmayan hücresi mevcutsa), karışık antiglobulin reaksiyon testi (eğer çok aglütinasyon mevcutsa)

2. İsteğe bağlı testler (teratozoospermi endeksleri, pan-lökosit CD4 boyası, *in vitro* mukus penetrasyon testleri, seminal plazmanın biyokimyasal değerlendirmeleri)

3. Araştırma testleri (reaktif oksijen türleri, zona etkileşim testleri, indüklenmiş akrozomlar reaksiyon testleri, hamster oosit penetrasyon testleri) (WHO, 2010).

Dünya Sağlık Örgütüne göre spermanın karakteristik özelliklerinin alt referans sınırları Çizelge 1.1.'de, sperma özelliklerinin alt referans sınırlarının farklı yıllarda çıkarılan raporlara göre değişimi Çizelge 1.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.3. Spermanın karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri (% 5 ve % 95 güven aralıkları) (WHO, 2010).

Parametre	Alt referans limiti
Sperma hacmi (ml)	1,5 (1,4-1,7)
Toplam sperm sayısı (10 ⁶ /ejakülat)	39 (33-46)
Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /ml)	15 (12-16)
Toplam motilite (PR+NP, %)	40 (38-42)
İleriye doğru hareketlilik (PR, %)	32 (31-34)

Çizelge 1.3.Devam Spermanın karakteristik özelliklerinin alt referans limitleri (% 5 ve % 95 güven aralıkları) (WHO, 2010).

Vitalite (canlı sperm, %)	58 (55–63)
Sperm morfolojisi (normal formlar, %)	4 (3,0–4,0)
Uzlaşılabilir diğer eşik değerler	
pH	≥ 7,2
Peroksidaz pozitif lökositler (10 ⁶ /ml)	< 1,0
MAR testi (partiküllere bağlı hareketli sperm, %)	< 50
<i>İmmunobead</i> test (boncukların bağlandığı hareketli sperm, %)	< 50
Seminal çinko (µmol/ejakülat)	≥ 2,4
Seminal fruktoz (µmol/ejakülat)	≥ 13
Seminal nötral glikozidaz (mU/ejakülat)	≥ 20

Çizelge 1.4. Dünya Sağlık Örgütü raporlarına göre sperma özelliklerinin alt referans sınırları (Esteves, 2014).

Spermanın karakteristik özellikleri	WHO 1980	WHO 1987	WHO 1992	WHO 1999	WHO 2010 ¹
Hacim (mL)	ND	≥ 2	≥ 2	≥ 2	1,5
Sperm konsantrasyonu (10 ⁶ /mL)	20-200	≥ 20	≥ 20	≥ 20	15
Toplam sperm sayısı (10 ⁶)	ND	≥ 40	≥ 40	≥ 40	39
Toplam motilite (%)	≥ 60	≥ 50	≥ 50	≥ 50	40
İleriye doğru hareketlilik (PR, %) ²	≥ 2 ³	≥ 25%	≥ 25% (grade a)	≥ 25% (grade a)	32% (a + b)
Vitalite (canlı sperm, %)	ND	≥ 50	≥ 75	≥ 75	58
Morfoloji (normal formlar, %)	80,5	≥ 50	≥ 30 ⁴	(14) ⁵	4 ⁶
Lökosit sayısı (10 ⁶ /mL)	< 4.7	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0

¹Alt beşinci centil değerden üretilen daha düşük referans limitleri;

²Grade a = hızlı ileriye doğru hareketlilik (> 25µm / s); Grade b = yavaş / durgun ileriye doğru hareketlilik (5-25µm / s); normal =% 50 hareketlilik (a + b) veya % 25 ileriye doğru hareketlilik (grade a)(Ejakülasyondan sonra 60 sn. içinde);

³İleriye doğru hareketlilik (ölçek 0-3);

⁴Rasgele değer;

⁵Değeri tanımlanmadı, ancak katı kriterler önerildi;

⁶Tygerberg ölçütü;

ND (not defined) = tanımlanmamış.

1.2.1. Spermmanın Makroskobik Görünümü

Normal bir sperma örneği homojen, mat-gri renktedir ve oda sıcaklığında 20 dk.'da sıvılaşır. Rengin beyaz olması yüksek sperm sayısını ya da spermada lökosit bulunmasını gösterebilir; sarımsı renkle birlikte koku varlığı enfeksiyonları gösterir; kıvılcık-kahverengi renk; spermada kırmızı kan hücrelerinin varlığına işaret edebilir (hemospermia). Ejakülat sıvılaştırıldıktan sonra iyi karıştırılmalı, sonra pH ölçülmeli, pH 8'den büyük olursa enfeksiyondan kuşkulandırılmalıdır. Karbondioksit üretimi başladıktan sonra pH yükselmeye devam ederse doğal tamponlanma kaybedilir. pH'ın 7,0'ın altında olması ve beraberinde azoospermi görülmesi epididimisin, sperm kanallarının, seminal veziküllerin veya ejakülatuar kanalların malformasyonunu veya tıkanıklığını gösterir (von Eckardstein ve ark., 2000).

1.2.2. İlk Mikroskobik İnceleme

Seyreltilmemiş spermmanın ıslak preparatları üzerinde tek faz-kontrast mikroskop kullanılarak mikroskobik inceleme yapılabilir. Bunu yapmak için, belirli bir miktar sperma (örn. 6,5 µl), uygun boyutta bir lamelin (örn. 18 x 18 mm) altındaki önceden belirli sıcaklığa ulaştırılmış bir lamel üzerine 20 µm derinliğinde bir kabarcık oluşturacak şekilde yerleştirilir (Bu incelemede derinliğini elde etmek için diğer hacimlerde sperma ve farklı lameller kullanılabilir.). Sperm agregasyonu ve aglütinasyonu ve epitel hücreleri, lökositler ve germ hücreleri gibi sperm dışı hücreler ve yuvarlak hücrelerin çıkarılması bunun üzerine yapılabilir (Nieschlag ve ark., 2010).

1.2.3. Sperm Motilitesi

Sperm motilitesi, taze sıvılaştırılmış bir sperma örneğinde x 400-600 büyütmede araştırılır. Bu, oda sıcaklığında (20°C ile 24 °C arasında), fakat tercihen 37°C'de, 1 saatlik sürede, fakat tercihen yukarıda açıklanan ıslak bir preparasyon üzerinde

ejakülasyondan 30 dakika sonra yapılır. Hareketlilik kalitesi 37°C'de veya oda ısısında değerlendirilir ve aşağıda belirtilen hareketlilik kategorilerinin yüzdesel oranı olarak açıklanır.

- İleri hareket (Progresif Motilite; PR): Hızdan bağımsız olarak doğrusal veya geniş bir daire içinde aktif olarak hareket eden spermatozoa.
- Yerinde hareket (Nonprogresif Motilite; NP): İleri hareketi olmayan diğer tüm hareket türleri, örneğin küçük dairelerde yüzmeye, neredeyse başı yerinden zorlukla oynatan kamçısal hareket veya sadece kuyruğun kamçısal hareketi gözlemlenebilir.
- Hareketsizlik (İmmotilite; IM): Hiçbir şekilde hareketin gerçekleşmemesi

Sperm değişkenliğini incelerken total hareketlilik (PR+NP) ya da ileri hareketliliğin (PR) dileytilmesi önem arz etmektedir (WHO, 2010).

Sperm motilitesini ölçmek için CASA (computer assisted sperm analysis - bilgisayar destekli sperm analizi) kullanılması her bir sperm video görüntüsünün izlenmesi ve hızı ile ilgili objektif veriler sağlar. CASA'da hız verileri gerektiğinde 37°C'lik sıcaklığa ihtiyaç duyulur. Normal hareketli spermatozoonların başları, ejakülata ışık mikroskopunda analiz edildiğinde globüler şekilde görünür. İğne baş (pinhead) olarak bilinen sperm hücreleri aslında başsız sperm kuyruklarıdır ve çok hareketli olabilirler. Genetik bilgi taşımadıkları için sperm sayısı, motilite ya da morfoloji değerlendirilmelerinin içine sokulmazlar (Nieschlag ve ark., 2010).

1.2.4. Toplam Sperm Sayısı

İlk kez 1980 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından yayınlanan Sperma Analizi Kılavuzuna göre, ejakülatta ml başına 20 milyon (alt referans limit) spermatozoon bulunurken, bu sayı 2010 yılında yayınlanan son kılavuzda ml başına

15 milyon'a kadar azalmaktadır. Bu değişiklik, erkeklerin sperm kalitesine ilişkin büyük uluslararası çalışmalardan elde edilen verileri incelemek amacıyla kullanılan istatistiksel yöntemlere dayanmaktadır ve bu sonuçlar günümüzde kabul edilmektedir (WHO, 2010).

Boğalarda yapılan bir çalışmada 6 Avusturya Esmeri boğasından gün aşırı arka arkaya alınan 2'şer ejakülattan toplam 120 ejakülatta spermatozoon yoğunluğu cm^3 başına 54,58 milyon ve 15 dakika sonra alınan ejakülattaki spermatozoon yoğunluğu cm^3 başına 62,58 milyon olarak bulunmuştur (Yurdaydın N ve Sevinç A, 1985).

DSÖ tarafından yayınlanan kılavuzların referans sayısı ile çelişen birkaç yayın bulunmaktadır (Skakkebaek, 2010). Skakkebaek araştırmasında azospermi olmadığı sürece hamile kalmanın mümkün olduğunu ve bu sayının cinsel partneri hamile olan erkeklerde ml başına 15 milyon sperm ile gerçekleşebileceğini belirtir. Öte yandan, bazı kaynaklar sperm sayısı için referans alt sınırın ml başına 40 milyon olması gerektiğini önermektedir (Andersson ve ark., 2008). Bu nedenle Skakkebaek sperm sayısı alt sınırının 15 ila 40 milyon olması gerektiğini ve bu belirlenen alanı da gri kısırlık alanı olarak tasvirler (Skakkebaek, 2010).

1.2.5. Sperm Morfolojisi

Ejakülatta aranan normal spermler, endoservikal mukusa erişilebilen spermlerdir. Hava ile kurutulmuş ve boyanan spermatozoa, baş veya kuyrukta belirli bir kusur göstermezler. Morfolojik olarak normal spermatozoa popülasyonu, zona pelusida spermatozoa ile (memelilerde yumurta zarını çevreleyen jel benzeri kaplama) yakından ilişkili olan popülasyondur (Garrett ve ark., 1997). Sperm morfolojisi değerlendirmesinin sebebi mukus tanımlı alt popülasyonun kapsamını ortaya çıkarmaktır. Düzenli ve oval biçimli bir kafa ile birlikte güçlü ve ince bir gövdeye ve birden bire meydana gelen kırılmalara neden olmayan genel bir yapıya sahiptirler.

Akrozom net bir şekilde görülür ve sperm baş bölgesinin % 40-70'ini oluşturur. Vacuoller, akrozomal bölgenin % 20'sinin üzerine çıkmaz ve akrozom sonrası alanda bulunmaz. Spermatozoalar eğer sitoplazma başın % 30'undan küçük durumda ise damlacıklar olarak kabul edilir ve normaldir. Bunun tam tersine eğer başın hacminin % 30'undan fazla ise sitoplazma fazlalığı olduğu ve spermatozoanın anormal bir yapıda olduğu kabul edilir. Erkekler belirli miktarda dölleyici spermatozoa üretirler ve bununla birlikte yalnızca seminal spermatozoaların çok düşük bir kısmı zona pellucida'ya bağlanabilir (Lui ve ark., 2003). Klinik uygulamada doğru değerlendirilen sperma incelemeleri doğurganlığın değerlendirilmesinde temel olmayı sürdürmektedir (Nieschlag ve ark., 2010).

Morfoloji, tek tek sperm hücrelerinin gerçek fiziksel yapısını ifade eder. Bir boğanın yeterli damızlık olarak sınıflandırılması için minimum eşik, % 70 normal canlı hücrelerdir. Sperm anomallikleri, birincil ve ikincil anomallikler olarak adlandırılan iki ana kategoriye ayrılır. Primer anomallikler, testislerde hücre oluşumu sırasında meydana gelen problemlerden kaynaklanır. Sekonder anomallikler, sperm epididim boyunca ilerlerken meydana gelir. Her iki anomallik kategorisinin de test sonuçlarının % 30'dan daha fazla miktarlarda olması, boğanın doğurganlığının azaldığını ve sonuç olarak boğanın ya “yetersiz potansiyel damızlık” olarak değerlendirilmesi gerektiğini ya da sorunun çözülüp çözülmediğini görmek için 21-60 gün sonra tekrar test edilmesi gerektiğini gösterir (Chapman ve Rood, 2016).

1.3. Erkek İnfertilite Etki Mekanizmaları

Erkek infertilitesinin birçoğunun nedeni bilinmez (idiyopatik infertilite) ya da öngörülen patolojik halinin hala net bir tedavisi ortaya çıkarılmamıştır (ör. varikoselli hastalarda, seminal plazmadaki lökositler ya da yüzey antikorları). Bu nedenle, çoğu androlojik bozukluk için rasyonel tedaviler günümüzde hala eksiklik göstermektedir (Nieschlag ve ark., 2010).

Erkek infertilitesini etkileyen faktörler;

- Oksidatif stres ve reaktif oksijen türleri
- Spermatozoanın lipid peroksidasyonu
- Nitrik oksit
- Yaşlanma ve oksidatif stres
- Çevresel kirleticiler

olarak gruplandırılmıştır (Sheweita ve ark., 2005).

Geleneksel erkek infertilite nedenleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir; ikincil hipogonadizm/gonadotropin eksikliği, retrograd ejakülasyon, inmemiş testis, varikozel ve enfeksiyonlar. Erkek infertilitesinin immünolojik olarak incelenmesi de önerilir. Hormon tedavileri de (GnRH tedavisi, HCG/HMG, Safılaştırılmış HMG preparatları ve rekombinant FSH, androjenler, anti-östrojenler) idiyopatik infertilite bakımından değerlendirilebilir (Kamischke ve Nieschlag, 1999).

1.3.1. Kan Testis Bariyeri

Kan-testis bariyeri (blood testis barrier, BTB), memeli vücudundaki en sıkı kan-doku bariyerlerinden biridir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çevresel toksinlerin (örn., kadmiyum, bisfenol A) moleküler mekanizmaları göz önüne alındığında, BTB'de testiküler hasarı indükleyerek germ-hücre adezyonunda hasar meydana getirdikleri, böylece germ hücre kaybına, sperm sayısının azalmasına ve erkek infertilitesine veya subfertilitesine neden oldukları tartışılmaktadır. Bu durum değerlendirildiğinde, erkeklerde toksin kaynaklı üreme fonksiyon bozukluğunu azaltılması, yenilikçi kontraseptif yöntemler geliştirilmesi ve daha iyi ilaç etkisi elde etmek için BTB'nin ayrıntılı olarak araştırılması gerektiği anlaşılmalıdır (Cheng ve Mruk, 2012).

Spermatogenez, Sertoli hücrelerinin yapısal ve besinsel desteği ve endokrin faktörlerin hassas düzenlemesi ile seminifer tübüllerde spermatogoninin olgun spermatidlere dönüştüğü hücrel bir süreçtir. Germ hücreleri geliştikçe seminiferöz epiteli çaprazlarlar. Bu süreç, Sertoli germ hücre bağlantılarının ve ayrıca kan-testis bariyerlerindeki Sertoli-Sertoli hücre kavşaklarının yeniden şekillenmesini içerir. Spermatogenez için gerekli olan kan testis bariyeri seminifer tübül tabanının yakınında bulunur ve epiteli bazal ve aduluminal olmak üzere 2 ayrı bölüme ayırır. Spermatogonia ve preleptoten spermatozoidler bazal bölmede bulunurken diğer primer ve sekonder spermatozoidler, yuvarlak spermatidler ve uzayan / uzamış spermatozoidler aduluminal bölmede bulunurlar. Böylece kan testis bariyeri, ayrıcalıklı bir mikro ortam sağlamak için mayoz bölünmenin tamamlanmasından itibaren aduluminal bölme içerisinde bulunan germ hücrelerini, dolaşım ve lenfatik sistemlerden ve beraberinde lokal immün baskılanmadan ayırır (Mrunk ve Cheng, 2015).

1.3.1.1. Kan-Testis Bariyerinin Fonksiyonları

Kan testis bariyerinin fonksiyonlarını şu şekilde özetlenir (Cheng ve Mruk, 2012);

1) Kan testis bariyerinin "çit" (fence) ve "kapı koruyucu" (gate-keeper) fonksiyonları vardır.

- a. Biyomoleküllerin paraselüler akışını sınırlar.
 - b. Spermatogenezin epitelyal döngüsü boyunca hücrel olayları ayırır.
2. Kan testis bariyeri, immünolojik bir engel oluşturur.
3. Seminifer epitelyumda hücre polaritesini sağlar

1.3.1.2. Kan Testis Bariyerinin Sıkı Kavşak (Tight Junction, TJ) Proteinleri

Sıkı kavşaklar (TJ), hücreleri kemer benzeri bir şekilde kuşatan, sürekli bir anastomoz yapan, fibrillerin özel bir mikro bölgesini oluşturur. Bitişik hücrelerden

gelen fibriller, döngüsel bir şekilde bir araya gelir, hücreler arasındaki parselüler alanı kapatır ve geçirimsiz bir bariyer oluşturur. Her bir fibril, iskele ve sinyal proteinleri ile birlikte doğrudan ya da dolaylı olarak sitoskeletal proteinler ile bütünleşen bir zar proteinden oluşur (Cerejido ve Anderson, 2001).

Proteinlerin sınıflandırılması aşağıdaki gibidir.

- 1) Yapısal Proteinler
 - a) Okludin
 - b) Klaudinler
 - c) Trisellulin ve lipoliz ile uyarılan lipoprotein reseptörü (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor, LSR)
 - d) Koksakivirüs ve adenovirüs reseptörü (Coxsackievirus and adenovirus receptor, CAR)
- 2) İskele Proteinleri
 - a) Zona Okludensleri
- 3) Sinyal Proteinleri
 - a) The CRB-PALS-PATJ hücre polaritesi kompleksi
 - b) PAR3-PAR6-aPKC hücre polaritesi kompleksi
 - c) SCRIB-DLG-LGL hücre kutupluluğu kompleksi

1.3.2. Testisteki İlaç Taşıyıcıları

İlaç taşıyıcıları; testis, böbrek, karaciğer, beyin ve bağırsak gibi doku ve organlar gibi birçok yerde bulunur. Bu taşıtlar ilaç emiliminde, dağılımında, metabolizmasında ve atılımında kritik rol oynarlar. Memelilerde fizyolojik ve patolojik koşullar altında farklı doku ve / veya organlara giren ilaçların (ör. adjüdin), ksenobiyotiklerin (örneğin kadmiyum ve bisfenol A) ve diğer kimyasalların (örneğin civa ve kurşun) miktarı ilaç taşıyıcıları tarafından belirlenir. Bilinen yaklaşık 800 ilaç taşıyıcısından yaklaşık % 60'ı memelilerde hücre epiteli ve endotelde biyolojik zarlar

boyunca ksenobiyotiklerin taşınmasını sağlayan veya taşınmasını önleyen bütünlüyci zar proteinleridir (Dallas ve ark., 2006; Dalton ve ark., 2005; Franke ve ark., 2010 ve Rochat, 2009).

İlaç taşıyıcıları, BTB'yi oluşturan testislerdeki Sertoli hücreleri ile sınırlı değildir. Bu, gelişmekte olan germ hücrelerinin, gelişimleri için gerekli olan bileşiklerin seçiminde/absorpsiyonunda ve ayrıca yarı epitelyal epitelyumdan istenmeyen toksik maddelerin "pompanmasında" aktif olarak yer aldığını gösterir. Bununla birlikte, testiküler Sertoli, Leydig, germ ve peritubular miyoid hücrelerinde birçok farklı ilaç taşıyıcı madde bulunması (ve daha birçok ilaç taşıyıcısının tanımlanması gerektiği açıktır), spermatogenezi zararlı bileşiklerden ve toksik maddelerden korumada testisler için büyük bir zorluk teşkil eder. Örneğin, zararlı/zehirli bir madde, tıkanmış olsalar bile seçilen hücre giriş pompaları vasıtasıyla BTB'yi geçerek apikal bölmeye giriş yapabilir veya Sertoli hücrelerinden ve / veya germ hücrelerinden aktif olarak pompanırlar. Bu toksik maddeler, seminifer epitele girdikten sonra, aktin sitoskelet ağı bozarak etkilerini hızla gösterebilirler (örn. aktin kümeleşmesini bozarak veya aktin çekirdeği oluşturarak) ve apikal ES (ektoplazmik uzmanlıklar)'deki protein endositozunu hızlandırarak spermiasyona benzeyen olayların istenmeyen etkilerine neden olabilirler. Özetle, erkek üreme biyolojisi için ilaç taşıyıcılarının daha fazla araştırılması gerektiği düşünülmektedir (Su ve ark., 2011).

İlaç taşıyıcıları, işlevleri için ATP hidrolizi gerektiren birincil aktif taşıyıcılar, ATP tüketimi olmaksızın beraber taşınan veya iyon değişimi ile birlikte gerçekleşen ikincil ve üçüncül aktif taşıyıcılar olarak sınıflandırılır. HUGO Gen Adlandırma Komitesi, artan sayıdaki ilaç taşıyıcıları yüzünden tüm taşıyıcı proteinleri iki geniş kategoriye ayırmıştır: 1) ATP bağlayıcı kaset (ATP-binding cassette, ABC) ve 2) çözünen taşıyıcı (solute carrier, SLC). Her iki grup da geniş bir perspektifte ilaçların veya substratların taşınmasında yer alan birçok alt aileden oluşur. Alternatif olarak, ilaç taşıyıcıları, hücre giriş ve hücre çıkış pompası olarak geniş bir şekilde de

sınıflandırılıp, substrat veya ilaçların taşınma yönü ile tanımlanır. Örneğin, hücre giriş pompaları (örn. organik anyon taşıyıcı (OAT) / organik anyon taşıyan polipeptit (OATP) ve organik katyon taşıyıcı (OCT) / organik katyon taşıyan polipeptit (OCTP)), ilaçları hücrelere naklemeden, hücre çıkış pompaları (örn. P- glikoprotein, çok ilaca dirençli proteinle ilişkili proteinler (MRP'ler) ve meme kanseri direnci proteini (BCRP)) ilaçları hücre dışına taşımakta ve ayrıca 'istenmeyen' ilaçların bir hücreye girmesini önleyebilmektedir. Bundan dolayı hücre çıkış pompaları, hücre içindeki bir ilacın miktarını belirler. Hücre çıkış pompaların etkinliği çoğunlukla, kemoterapötik ajanlara cevap vermeyen kanser hastalarında gerçekleşir; burada tümör hücreleri, gelişmekte olan veya metastatik tümörün dışında kemoterapötik ilaçları etkin bir şekilde pompalamaktadır. İlaç taşıyıcılarının özellikleri, ilacın biyoyararlanımının, farmakokinetiğinin ve etkinliğinin belirlenmesinde önemli bir rol oynadıkları için ilaç tasarımında dikkate alınması önemlidir. Alternatif olarak, belirli dokularda spesifik hücre giriş taşıyıcıları yoksa bu dokuları inhibe etmek için ilaçlar tasarlanabilir; böylece yan etkiler ve toksisite azaltılır (Alam ve ark., 2010; Ganta ve ark., 2010; Gaucher ve ark., 2010 ve Kis ve ark., 2010). Öte yandan, belirli ilaçlara maruz kaldıktan sonra çoğalan belirli ilaç taşıyıcılarını içeren seçilmiş dokuları hedef alacak şekilde ilaçlar geliştirilebilir veya modifiye edilebilir (Fardel ve Vée, 2009 ve Yu ve ark., 2010).

Erkeklerde hormonal olmayan kontraseptiflerin gelişimi için testislerdeki ilaç taşıyıcılarının daha iyi anlaşılması özellikle önemlidir çünkü araştırılan birçok bileşik etkilerini BTB'nin arkasında gösterirler ve testiste bu ilaçlar ile ilaç taşıyıcıları arasındaki etkileşimler nedeniyle biyoyararlanımları düşüktür (Su ve ark., 2011).

Taşıyıcıların, çeşitli hastalıklarda rolü ve ksenobiyotiklerin toksikolojik ve farmakolojik etkileri üzerinde büyük etkisi vardır. Bu önemli protein yapıları böbrek veya karaciğer gibi organlarda kapsamlı bir şekilde çalışılmış olmasına rağmen, testislerdeki taşıyıcıların karakterizasyonu hala geliştirilme aşamasındadır. Taşıyıcı işlevleri hakkında bilgi sahibi olmak, testiste meydana gelen fizyolojik ve toksikolojik

süreçlerin anlaşılmasını büyük ölçüde iyileştirebilir. Hem organik hem de inorganik taşıyıcıları içeren çeşitli temel çalışmalar, testisin endojen ve ksenobiyotik bileşiklerle nasıl etkileşime girdiğine dair anlayışı ilerletmede önemli olmuştur. Neredeyse tüm taşıyıcılar, itici güce dayalı 2 süper familyasından biriyle ilişkilidir:

- ATP bağlayıcı kaset (ATP-binding cassette, ABC) taşıyıcıları (elektrokimyasal bir gradyana karşı, transporta enerji sağlamak için ATP hidrolizini kullanan)
- Çözücü ileten (solute carrier, SLC) taşıyıcılar (elektrokimyasal gradyanları kullanarak bileşikleri taşıyan, genellikle yardımcı bir substrata bağlanan, tipik olarak Na⁺ gibi bir iyon) (Klein ve Cherrington, 2014).

Taşıyıcılar yönelimlerine göre, yani substratların hücre içine girmesi (uptake), hücre dışına çıkması (efflux) veya her ikisi (iki yönlü) olup olmadığına göre karakterize edilebilir (Klein ve Cherrington, 2014).

1.3.2.1. Testiste ABC (ATP-binding cassette) Taşıyıcı Süperfamilyası

Kemoterapi, kanser hastaları için mevcut en önemli tedavi yöntemlerinden biridir. Ne yazık ki, tedavi sırasında kanser hücreleri, (ana etken faktörlerden dolayı) ya da intrinsik (genetik veya epigenetik) mekanizmalara bağlı olarak işlevsel ve yapısal olarak farklı antikanser ilaçlara direnç geliştirirler. Kanser hücreleri tarafından farklı kanser ilacı sınıflarına karşı direnç gösteren bu fenomene, çoklu ilaç direnci (MDR) adı verilir. Bu yaygın ve sinsi klinik problem sonunda hastalarda kanser nüksetmesine ve ölümüne neden olur. MDR mekanizmaları açık bir şekilde incelenmiştir, ancak MDR üreten tüm mekanizmalar aydınlatılmamıştır. Kanser hücrelerinin kemoterapiden kaçınmak için kullandıkları veya geliştirdikleri mekanizmalar karmaşıktır ve birkaç yeni incelemede ayrıntılı olarak açıklanmıştır. MDR'nin altında yatan en önemli mekanizmalardan biri, ATP'ye dayalı enerjiyi kullanarak konsantrasyon gradyanına karşı geniş bir antikanser ilaç spektrumu çıkaran

adenosin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcılarının aşırı ekspresyonudur (Sodani ve ark., 2012).

ABC protein süperfamilyasının 40'tan fazla üyesi vardır. Bu proteinler, ATP kullanarak substratları biyolojik membranlardan geçirirler. ABC taşıyıcılar için substratlar; iyonlar, peptidler, hormonlar, konjuge metabolitler, ve ilaçları da içeren ksenobiyotiklerdir. ABC taşıyıcı süperfamilyasının sadece 3 üyesi ilaç moleküllerini substratlarına taşırlar;

- P-glikoprotein (P-gp) (ABCB1 geni tarafından kodlanmış, eski adı MDR1 geni)
- Meme kanseri direnci proteini (breast cancer resistance protein) (BCRP) (ABCG2 geni tarafından kodlanmış)
- Çoklu ilaç dirençli-ilişkili protein (multidrug resistance-related protein) (MRP) (ABCC1 geni tarafından kodlanmış)

1.3.2.1.1. P-glikoprotein

Bir hücre çıkış membran taşıyıcısı olan P-glikoprotein (P-gp), vücuda yaygın şekilde dağılmıştır. Hücresel alımın sınırlandırılmasından, ksenobiyotiklerin ve toksik maddelerin dağılımından sorumludur. Yapısal olarak yüzlerce çeşitlilik gösteren terapötik ajanlar, bunun substratlarıdır ve ilaçların emilimini, geçirgenliğini ve retansiyonunu engeller, hücrelerin dışına iter. Kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilir ve kemoterapötik ajanların hücre internalizasyonunu engellemekten ve anti-tümör tedavileri sırasında kanser hücreleri tarafından taşıyıcı aracılı direnç geliştirmekten sorumludur. İlaç dağıtımı ve kanser hedeflemesinin başarısını tehlikeye attığından, P-gp aracılı ilaç transportunun üstesinden gelmek için stratejiler geliştirilmektedir (Amin, 2013).

P-glikoprotein gibi başlıca ilaç taşıyıcılarının, ksenobiyotikler ve farmasötikler dahil bir çok substratın alımını ve akışını düzenlediği bilinmektedir (Ambudkar ve ark., 1999; Aller ve ark., 2009). Önceki çalışmalarda steroidlerin ve ksenobiyotiklerin P-gp taşınması *in vitro* olarak araştırılmış olsa da (Kim ve Benet, 2004), P-gp'nin *in vivo* olarak EDC akışını etkileme derecesi daha az anlaşılmıştır (Souder ve Gorelick, 2018). Veriler, testiküler toksisite ile ilgili EDC risk değerlendirmesinde ABC taşıyıcılarının toksikolojik ve klinik olarak ilişkili olduğunu göstermektedir (Dankers ve ark., 2013).

1.4. Kirleticilerin Sperm Üzerine Etkileri

Ejakülasyon esnasında sperma, spermatozoanın konsantre süspansiyonundan oluşturulur, epididimlerde depolanır, sıvı salgılarıyla karışır (aksesuar cinsel organlardan gelen) ve seyreltilir. Sperma türlere göre farklı sayıda fraksiyonlar halinde atılır. Sperma hacminin % 90'ının aksesuar organlarından, büyük çoğunluğunun prostat ve seminal keselerinden, az miktarının da Cowper bezi ve epididimlerden gelen salgılardan meydana geldiği vazektomi öncesi ve sonrası sperma hacimlerinin karşılaştırılmasıyla tespit edilmiştir (WHO, 2010).

Sperm fonksiyonu için spermatozoanın özellikleri (canlılık, hareketlilik ve morfoloji) ve seminal sıvının bileşiminin bilinmesi önemlidir. Cinsel birleşme esnasında ejakülatın spermden zengin prostat fraksiyonu (ilk kısım) vajinada servikal mukusla etkileşirken, sıvının geri kalan kısmı vajinada birikir. Laboratuvar ortamında ejakülatın tümü aynı ortamda bulunduğundan, spermatozoa proteince zengin seminal kese kökenli bir koagulum içinde tutulur. Daha sonra bu koagulum, prostatik proteazca likefaksiyona uğrar (sıvılaştırılır). Böylece sıvının osmolalitesi artar. Bazı çalışmalarda ejakülatın oluşma biçiminin sperma kalitesini etkilediği gösterilmiştir. Laboratuvar ortamında alınan ejakülatlar, ev ortamında cinsel ilişki sırasında spermisit içermeyen prezervatiflere alınan ejakülate göre daha kalitesiz çıkabilmektedir. Laboratuvar ortamında örnek verene kadar geçen ve ejakülasyondan önceki seminal emisyonu da kapsayan süre spermanın kalitesini etkiler. Uygun örnek toplama

şartlarıyla alınan spermanın kalitesi, cinsel perhiz, enfeksiyon geçmişi, testislerin sperm üretim potansiyeli, aksesuar bezlerin salgıları gibi parametrelere de bağlıdır. Sonuçlar değerlendirilirken bu faktörlere de bakılmalıdır (WHO, 2010).

Sperma parametrelerinin düşük referans sınırları (hamilelik süresi 12 ay veya daha az olan çiftler için) Çizelge 1.3.'deki gibidir (Nieschlag ve ark., 2010).

Beşeri hekimlikte spermiyogram yapılırken bakılan parametreler şunlardır: Spermanın hacmi ve katılığı, sperm konsantrasyonu, toplam sperm sayısı, sperm motilitesi, normal ve hasarlı sperm sayısı, koagülasyon (çökme) ve likefaksiyon (çözünürlülük), Fruktoz, pH, immatür sperm sayısı, lökosit, enfeksiyonlu hücre sayısı.

Çizelge 1.5. Sperma parametrelerinin düşük referans sınırları (hamilelik süresi 12 ay veya daha az olan çiftler için) (Nieschlag ve ark., 2010).

Parametre	Önerilen normal değer (WHO 1999)	Düşük referans limiti (güvenirlilik aralığı) (WHO 2009)
Sperma hacmi (ml)	$\geq 2,0$	1,5 (1,4 -1,7)
Toplam hareketlilik (PR+NP, %)		40 (38-42)
İlerlemiş hareketlilik (a+b, PR, %)	≥ 50	
Canlılık	≥ 50	
Toplam sperm sayısı (10^6 /ejakulat)	≥ 40	
Sperm konsantrasyonu (10^6 /ml)	≥ 20	
Sperm morfolojisi (normal, %)		4 (3-4)
<i>Diğer ortak değerler</i>		
pH	$\geq 7,2$	$\geq 7,2$
Çinko (μmol /ejakulat)	$\geq 2,4$	$\geq 2,4$
Nötral α -glukozidaz (mU/ejakulat)	≥ 20	≥ 20
Beyaz kan hücreleri (10^6 /ml)	<1	<1

Çizelge 1.5.Devam Sperma parametrelerinin düşük referans sınırları (hamilelik süresi 12 ay veya daha az olan çiftler için) (Nieschlag ve ark., 2010).

MAR-testi (%)	<50	<50
İmmünobead testi (%)	<50	<50

Sperm morfolojisinin belirlenmesinde en sık kullanılan değerlendirme yöntemi Dünya Sağlık Örgütü ve Kruger kriterlerine göre yapılan değerlendirme yöntemidir. Bu yöntemde incelenecek olan sperm, özel bir hazırlıktan geçirilerek spermin farklı bölgeleri (baş, boyun ve kuyruk) detaylı olarak değerlendirilir; değerlendirme sonuçlarına göre spermde belirli bir miktarın üzerindeki sperm-normal oranı incelenirse sonuç normal kabul edilir. Özellikle Kruger yöntemiyle analiz edilen numunelerde % 4 ve daha yüksek seviyeler normal kabul edilir. Yani bilinen üreme sağlığı sorunu olmayan erkeklerde üretilen spermlerin % 10'unda anomali görülmesi normaldir. Erkek infertilitesini daha iyi anlamak ve döllenme potansiyelini ortaya çıkarmak için antisperm antikoru, spermanın biyokimyasal analizi, sperm membran bütünlüğünün tespiti, akrozom reaksiyonları, hiperaktivasyon ve kapasitasyon, viabilite, stres toleransı, zona bağlama, mukus penetrasyonu, sperm olgunluğu, kromozomal anöplodi, sperm DNA hasarının tespiti gibi testler yapılır (Hossain ve ark., 2010).

Doğal üremede spermler, serviks, uterus ve ovidukt üzerinden vajinal depolama alanına geçerler. Sperm, kromozom içeriğinin nakledilmesi için ooplasmaya ulaşmalıdır; böylece oosit, polar gövde ekstrüzyonu aracılığıyla fazlalıkları atarak kromozom setini oluşturabilir. Bu amaçla spermlerin yeteneği, bir dizi test olan sperm fonksiyon testleri (SFT) ile laboratuvar ortamında tespit edilir. Diğer taraftan, *in vitro* fertilizasyonun (IVF) da yapılması bu test serisinde kalite kontrolü açısından çok önemlidir (Hossain ve ark., 2010).

1.4.1. SFT (Sperm Fonksiyon Testleri) ve Sperm Test Bataryaları (Analiz Serileri)

Erkeklerde infertilitenin doğru değerlendirilmesi için uygun laboratuvar testleri mutlaka yapılmalıdır. Sperm fonksiyon testleri, spermin yumurtaya ulaşmak ve yumurtayı döllemek için gerekli olan biyolojik yetkinliğe sahip olup-olmadığını belirlemek ve canlı doğum oranını arttırmak amacıyla kullanılır. Verimli bir sperm *in vivo* ortamda servikal mukusu geçip yumurtaya ulaşır. Uygun embriyo gelişimi için fonksiyonel DNA'nın ooplazmaya ulaşması gerekir. Bu aşamalarda herhangi bir kusur infertilite ile sonuçlanabilir. Tüm bu aşamaları değerlendirmek için farklı testler yapılabilir. Bu testlerden doğru sonuçlar alabilmek için klinisyenin hangi parametrelere baktığı, bu parametrelerin göstergelerini ve sonuçlarını yorumlayabilmesi önemlidir. Ayrıca klinisyen hasta yönetimini doğru yapmalı ve gerek görürse daha ileri testleri önermelidir (Sigman ve ark., 2009).

İdeal bir sperm fonksiyon testi (test bataryaları) için aşağıdaki klinik adımlar takip edilmelidir: (i) Sperm disfonksiyonunun teşhisi; (ii) gebelik ve dölleme ihtimalinin tespiti; ve (iii) tanımlanan sperm disfonksiyonunu azaltmak için uygun bir tedavinin belirlenmesi (Franken ve Oehninger, 2012).

Doğru bir sperma analizi için aşağıdaki aşamalar bütünüyle takip edilmelidir (Franken ve Oehninger, 2012);

- Spermin doğru sulandırılması ve numunenin hazırlanması
- Motilitenin değerlendirilmesi
- Sperm konsantrasyonunun tespiti
- Sperm morfolojisinin incelenmesi
- Analizin kalitesi
- Referans deęerlerin bilinmesi

İdeal bir sperm fonksiyon testinde aşağıdaki testler değerlendirilir (Franken ve Oehninger, 2012);

- Spermin morfolojisi ve DNA'nın durumu
- Akrozom reaksiyonu
- Sperm-zona pellusida bağlanma testi
- Hipo-osmotik şişme (hypo-osmotic swelling, HOS) testi
- Reaktif oksijen türleri (Reactive oxygen species, ROS)

Genel kabul görmüş sperma analizi, doğru gebelik sonuçlarını tahmin etmede yetersiz olabilir. Bu sebeple, ileri sperm fonksiyon testleri geliştirilerek kliniklerde kullanıma başlamıştır. İnfertilitenin değerlendirilmesinde sperm oluşumunun her aşama için geliştirilen değişik yöntemler ve teknikleri içeren testler vardır. Bu testlerden bazıları aşağıda sıralanmıştır (Kızılay ve Altay, 2017);

- Sperm penetrasyon testi
- Sperm-zona pellusida bağlanma testi (hemizona testi)
- Akrozom reaksiyon testi
- Hiyaluronan bağlanma testi
- Hipo-osmotik şişme testi
- Manyetik-aktifiteli hücre sıralaması
- Zeta sperm seçimi

Normal sperm analizleri yapılmadan test bataryalarını kullanmak doğru bir yaklaşım değildir. Daha önce dölleme yeteneği olan kişilerde spermin farklı özelliklerine bakmak için test bataryalarını kullanmak daha doğrudur. Doğurganlığın rutin değerlendirmesine paralel olarak klinisyenler tarafından çeşitli sperm fonksiyon testleri tavsiye edilir ve yapılır. Bu testler, spermatozonun özel kısımlarının işlevini tespit eder ve oositin döllemedeki fonksiyonunu ortaya çıkarır. Spermin beslenme durumu fruktozun nicel ve nitel değerlendirilmesi, sitratın değerlendirilmesi ile ortaya konabilir. Lökosit tespit testi ve ROS (reaktif oksijen türleri) tahmini ile spermler yangı hücreleri ve reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerinden korunabilir. Bunlara

ek olarak sperm sayıları optimal olmalı ve dölleme yeteneği normal (sperm morfolojisi) olmalıdır. Canlılık ve hipo-ozmotik şişkinlik testi spermin vajina ve uterus sıvıları içindeki viabilitesi için sağlam ve işlevsel bir membrana sahip olup-olmadığı, mitokondriyal aktivite endeksi testi ise hücrenin enerji fonksiyonu için iyi bir mitokondriyal aktiviteye sahip olup-olmadığının tespiti için yapılır. Akrozom bütünlüğü, zona penetrasyon testi ise zona pelusidanın açılabilmesi için akrozom işlevinin doğru olup-olmadığını inceler. Ayrıca, nükleer renk bozulma testi ile erkekte bulunan genlerin oosite geçebilmesi için DNA'nın doğru şekilde paketlenmiş olup-olmadığına bakar (Talwar ve Hayatnagarkar, 2015).

IVF gebeliğinde kullanılan kimyasalları ve materyalleri denemek için bu konunun öncülerinden olan Edwards ve Steptoe, insan sperm analizini (human sperm assay, HSA) kullanmıştır. HSA testi ile embriyoların *in vitro* büyümesini etkileyen faktörler tespit edilmiş ve test embriyo kültür şartlarını geliştirme imkanı vermiştir. Daha sonra, embriyo kültürü şartlarını değerlendirmede fare zigot, embriyolar, hamster spermleri, yumurtalık hücreleri, kümülüs hücreleri gibi hücreler kullanılmış bu da başka yöntemlerin geliştirilmesinin önünü açmıştır. HSA ile birlikte genellikle QC (quality control) testi de yapılır ve QC infertilite laboratuvarlarında kalite kontrol yöntemi olarak kabul görür. Sonuçta IVF ve diğer reproduktif teknolojiler infertilite tedavisinin gereksinimleri için geliştirilmiştir (Hossain ve ark., 2010).

HSA ve QC dışında fare embriyo testi ve hamster sperm motilite testleri de kullanılmaktadır fakat hem maliyetleri hem de etik problemleri nedeniyle kullanımları sınırlıdır (de Jonge ve ark., 2003). Başka bir sperm fonksiyon testi olan Postkoital test (the postcoital test, PCT), sperm ile servikal mukusun etkileşimini değerlendirmek için kullanılır ve bu testte genellikle ilerleyici hareket eden, her 400 HPF (high-power field) başına 10-20'den fazla sperm bulunması normal kabul edilir (Fredricsson ve Björk, 1977). PCT'de zamanlama problemlerinin olması en önemli dezavantajlarından biridir ve normal olmayan bir PCT sonucu, servikal faktör infertilitesinin varlığını

gösterse de yeterli değildir. Bu yüzden bu test için daha kapsamlı doğrulamalara ihtiyaç duyulmuştur (Vasan, 2011).

1.4.2. Gelişmiş Klinik Testler

Gelişmiş klinik testler içinde Floresan İn Situ Hibridizasyonda Sperm Anöploidi Testi, Sperm Değerlendirmesi için Akış Sitometrik Yöntemler, Mikro Dekelasyon Analizi, MARS Testi ve Bilgisayar Destekli Sperm Analizi (Computer-assisted sperm analysis, CASA) en önemlileridir.

Flüoresan in situ hibridizasyon (Fluorescence in situ hybridization, FISH), floresan problemlerin kromozomların spesifik bölgelerine bağlanmasına ve böylelikle translokasyonlar gibi yapısal kusurların belirlenmesine ve kromozomların sayımına izin verir. Bir IVF döngüsü öncesinde FISH ile sperm analiz ederek, hastaları kromozomal sapmaları iletilmenin olası riskleri konusunda daha iyi yönlendirmek ve sonuçları tahmin etme doğruluğunu arttırmak mümkündür. Ağır sperm morfolojisi defekti olan ciddi oligozoospermik erkekler ve bazı kimyasal öyküsü olan erkekler artmış sperm anöploidi olasılığı riski altındadır ve tarama düşünülmelidir. Her bir hücredeki tüm kromozomal bileşenlerin analizi, protokolün fazla uzun sürmesi nedeniyle şu an için pratik değildir. Dolayısıyla, kötü sonuçlar için en yüksek riske sahip olan veya mayoz döneminde en çok anöploidi olma eğilimi gösteren kromozomlar, tipik olarak analiz edilir. En sık test edilen kromozomlar X, Y, 13, 16, 18, 21 ve 22 iken, tekrarlayan düşük oranını en fazla öngören kromozomlar 1, 15, 17, 21 ve 22'dir (Emery, 2013).

Günümüzde, sperm FISH tekniği, erkek infertilitesinin teşhisi ve kromozomal anomalilerin yavrulara iletilmesinde babanın değerlendirilmesi için kullanılan temel araçlardan biri haline gelmiştir. Sperm FISH testini yapmak için endikasyonlar aşağıdaki şekilde listelenmiştir:

1. Normal karyotipli hastalar

- a. Bozulmuş sperm parametreleri: oligozoospermi ve şiddetli teratozoospermi
- b. Nonobstrüktif azoospermi
- c. Testiküler analizde bozulmuş mayoz
- d. Kemoterapi ve radyoterapi tedavileri
- e. Bilinmeyen, tekrarlayan düşük nedeniyle klinik öykü
- f. Tekrarlayan implantasyon başarısızlığının klinik öyküsü
- g. Kromozopatili daha önceki gebelik

2. Anormal karyotipli hastalar

- a. Cinsiyet kromozomları için sayısal anormallikler: Klinefelter sendromu (XXY) ve XYY erkekleri
- b. Yapısal kromozom anormallikleri: karşılıklı ve Robertsonian translokasyonlar ve inversiyonlar (Garrido ve Rivera, 2017)

Akış sitometrisi, çok sayıda protokolün ardından birden fazla sperm parametresinin değerlendirilmesine izin verir. Burada, sperm kalitesinin kritik yönlerini değerlendirmek için üç yöntem açıklanmaktadır:

- Sperm canlılığını değerlendirmek için SYBR-14 ve propidyum iyodür (PI) çift boyama
- Akrozom bütünlüğünü ve sperm yaşayabilirliğini birlikte değerlendirmek için PNA-FITC (yer fıstığı aglutinin floresein izotiosiyanat) ve PI çift boyama;
- Mitokondriyal zar potansiyelini değerlendirmek için JC-1 (5,5', 6,6' tetrakloro-1,1', 3,3' -tetraetil-benzimidazolilkarbosiyenin iyodid).

Bu üç boyama yaygın olarak kullanılır ve temel akış sitometreleri ile analiz edilebilir (Robles ve Martínez-Pastor, 2013).

PCR çoğul testleri, insan Y kromozomunun uzun kolundaki genetik tekrarlayıcı genomik dizi bloklarındaki genetik mikrolelesyonları hızla ortaya çıkarmak için tercih edilen yöntemdir. Bunlar işlevsel olarak bozulduğunda erkek infertilitesine neden olan Azoospermi Faktörü (Azoospermia factor, AZF) genlerini barındırırlar. Y genlerini kodlayan bu proteinler, erkek germ hücresi gelişimi sırasında yani ağırlıklı olarak insan spermatogenezinin farklı evrelerinde eksprese edilir. Bunlar sırasıyla AZFa, AZFb ve AZFc olarak adlandırılan üç farklı genomik dizi bölgesinde bulunurlar. "Klasik" AZF mikrolelesyonu olarak da adlandırılan bir AZF bölgesinin tamamen silinmesi, erkek infertilitesi ve belirgin bir testis patolojisi ile her zaman ilişkilidir. Tek AZF Y genleri de dahil olmak üzere kısmi AZF delesyonları, tamamen silinmeye denk gelen (örneğin, AZFa'da DDX3Y gen delesyonları) aynı testiküler patolojiye neden olabilir veya erkek infertilitesiyle hiç bağlantılı olmayabilir (örn., AZFc'de bazı BPY2, CDY1, DAZ gen silinmeleri). Bu sebeple, Vogt ve Bender sadece klinik uygulamalar için uygun olan belirli bir testis patolojisine neden olan AZF mikro-delesyonlarını azaltmayı amaçlayan bir PCR multipleks testi önerir. Erkek germ hücrelerinde ifade edildiği bilinen ve üç AZF bölgesinde bulunan Y genlerinin ekson yapıları içinde sadece Dizi Etiketli Site (Sequence Tagged Site, STS) silme işaretleyicilerini içerir. Ayrıca, Avrupa Moleküler Genetik Kalite Ağı (European Molecular Genetics Quality Network, EMQN) 'nın sıkı kurallarına göre kalite kontrolünün temel prensiplerini içeren dört PCR çoklu karışım için sağlam bir standart protokole entegre edilmiştir. Bir AZF bölgesinin tüm Y genleri silinirse, bu AZF mikro-delesyonunun moleküler uzantısının, "klasik" AZF mikro-delesyonunununkiyle karşılaştırılabilir olup olmadığı ile ilgili teşhis konulabilir. Bu işlem varsayılan AZF kırılma noktasını analiz eden ek bir PCR multipleks analizi ile yapılabilir (Vogt ve Bender, 2013).

Androjen reseptörü (AR), androjene duyarlı genlerin transkripsiyonunu düzenleyen ve erkek sekonder cinsel özelliklerin gelişmesinden ve korunmasından sorumlu olan bir steroid hormon reseptörüdür. AR aktivitesini değiştiren kimyasallar androjene duyarlı dokularda patolojik koşullara neden olabilir. Androjenik aktiviteyi modüle eden kimyasallar için tarama yapan, androjene duyarlı promotörler tarafından yönlendirilen çeşitli haberci sistemler geliştirildi. Akış sitometrisi kullanarak AR

transkripsiyonel aktivitesinin yeni modölatörlerinin tanımlanmasını kolaylaştırmak için esnek, yüksek verimli AR transkripsiyonel aktivasyon testi olan Çok İşlevli Androjen Alıcı Tarama (Multifunctional Androgen Receptor Screening, MARS) testi geliştirildi (Dennis ve ark., 2013).

1.4.2.1. Bilgisayar Destekli Sperm Analizi (Computer-assisted sperm analysis, CASA)

Sperm kalitesini değerlendirmenin metodolojisini geliştirmek, objektif ve kantitatif hale getirmek için gerçek sperm hızı manuel veya otomatik olarak ölçülebilir. Bir mikroskop yardımı ile sperm hareketi videoya çekilir ve ardından video monitörüne sabitlenmiş bir asetat film üzerinde her bir spermin konumu işaretletilerek, kaydın kare kare tekrarlanması izlenir. Kayıt uzunluğunun ölçülmesinden ve video kaydedicinin kare hızının bilinmesinden, sperm hızı için bir değer hesaplamak mümkündür (Kime ve ark., 2001).

Bilgisayar destekli sperm analizi (Computer-assisted sperm analysis, CASA) sistemleri, yaklaşık 40 yıldır geliştirilmektedir ve görüntüyü mikroskoptan almak için cihazlar geliştirilmekte, bilgisayar boyutundaki şaşırtıcı azalma ile birlikte hesaplama gücündeki büyük artışlar olmakta, yeni bilgisayar dilleri ve güncellenmiş / genişletilmiş yazılım algoritmaları oluşturulmaktadır. Dikkat çekici bir şekilde, spermleri ve hareket şekillerini tanımlamak için temel kavramlar pek az değişmiştir. Şu an daha eski ve yavaş sistemler kullanımdadır. Çoğu büyük spermatoloji laboratuvarı ve sperma işleme tesisi bir CASA sistemine sahiptir, ancak güven dereceleri çok çeşitlidir. Amann ve Waberski (2014) çalışmalarında domuz, boğa ve aygır spermleri için kullanılan mevcut CASA teknolojisinin yeteneklerini ve sınırlamalarını ve gelecekteki muhtemel gelişmelerini izah etmektedir. Pazarlanan her sistem farklıdır. Modern CASA sistemleri, sığ numune kabında, açık veya karmaşık yayıcılarda, saniyede 50 veya 60 kare / saniye ile 500 ile 2000 ve daha fazla sayıda sperm arasında parıltılı görüntüler elde etmek için otomatik olarak birçok alanı

görüntüleyebilir ve 2 dakikadan daha kısa bir sürede 30'dan fazla kare kaydedebilir ve her spermatozoon ve popülasyon için özet veriler sağlar. Birkaç sistem görüntülerle eş zamanlı olarak sperm morfolojisini değerlendirir. CASA, bir sperma örneğinden veya denekten elde edilen verilerle doğurganlığı doğru olarak tahmin edemez. Bununla birlikte, dikkatli bir şekilde değerlendirildiğinde, mevcut CASA sistemleri, pazarlama için planlanan meni kalite güvencesi için önemli bilgiler sağlar ve araştırmalardaki mikro ortamdaki değişikliklere karşı sperm yanıtlarının çeşitliliğini anlamak için kullanılır.

Yapılan çalışmalardan çıkarılacak dört mesaj şunlardır (Amann ve Waberski, 2014)'in;

1. Hayvan türleri, genişletici veya ortam, numune haznesi, aydınlatma yoğunluğu, görüntüleme donanımı ve yazılımı, cihaz ayarları, teknisyen vs. hepsi çıktı değerlerinin doğruluğunu ve hassasiyetini etkiler.
2. Sperma üretim tesisleri muhtemelen önemli ölçüde farklı bir CASA sistemine ihtiyaç duymazken, biyoloji laboratuvarları derin haznelerdeki spermleri esnek bir süre boyunca görüntüleyebilir ve takip edebilen sistemlerden yararlanabilir.
3. Yazılım, özellik bazında bireysel spermlerin gruplanmasını sağlar ve böylece çıktılar, benzersiz özelliklere sahip spermlerin alt popülasyonlarını veya kümelerini yansıtır, toplam nüfus için ortalama veya ortanca değerler yetersizdir.
4. Sahada, kent merkezlerin dışında, insan spermleri ile çalışan saha teriyojenolistleri veya androloglar için bireysel spermlerin hareketini ve iki veya üç morfolojik özelliklerini ölçmek için, taşınabilir bir CASA sistemi gereklidir ve bu sistemlerde görüntü yakalamak ve verileri işlemek için uygun donanım mevcuttur (Amann ve Waberski, 2014).

Sperm konsantrasyonunu CASA ile ölçmek, spermatozoa ile katı parçacıkların ayırt edilmesindeki güçlükler nedeniyle uzun yıllar rutin uygulamaya girememiştir.

Ancak özellikle florasana DNA boyaları ve kuyruk-tespit algoritmalarındaki teknolojik ilerlemeler, sperm konsantrasyonu ve ileri hareketli spermatozoaların konsantrasyonunun hesaplanmasını mümkün hale getirmiştir. Böylece preparatların hazırlanmasında gerekli hassasiyetin gösterilmesi ve uygun cihazların kullanılmasıyla CASA'nın kullanımı genişlemiştir. CASA ile sperm motilitesini de objektif şekilde değerlendirmek mümkündür. Ayrıca bazı cihazlarda yarı-otomatik morfoloji modülleri de bulunmaktadır. Bu cihazlarla yapılan ölçümlerin manuel ölçümlerden iki üstünlüğü mevcuttur: 1. CASA ile elde edilen sonuçlar daha kesindir ve objektiftir, 2. spermatozoa hareket parametrelerine dair nicel veriler sağlamaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda CASA ile hesaplanan konsantrasyon ve motilite parametrelerinin gebe kalma süresi, *in vitro* ve *in vivo* fertilizasyon oranlarıyla belirgin ilişkili olduğunu göstermiştir (Şerefoğlu, 2011).

1.4.2.1.1. CASA ile Sperm Motilitesi Ölçümü

Hareketli hücreleri saptayabildikleri için, CASA cihazlarının en iyi kullanım alanı, spermatozoanın kinematik analizleridir. Hareketsiz spermatozoanın sayısını belirlemeye dayandığı ve hücre döküntüleri hareketsiz spermatozoayla karışabildiği için, motilite yüzdesi tahminleri güvenilir olmayabilir (WHO, 2010). CASA cihazlarının performansını; numunenin hazırlanması, sperm konsantrasyonu ve sayma kamarasının derinliği gibi birçok faktör olumsuz etkilemektedir (Davis ve Katz, 1992; Kraemer ve ark., 1998 ve Mortimer, 1994). Bununla birlikte, uygun prosedürler izlendiğinde güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebilmektedir (Davis ve Katz, 1992). Bu amaçla, CASA kullanımına ilişkin kılavuzlara başvurulmalıdır (ESHRE, 1998 ve Mortimer ve ark., 1995). Motilite parametrelerini elde etmek için, CASA'yı kullanırken her numune için en azından 200 hareketli sperm incelenmelidir. Bu tespit, "çok daha fazla sayıda spermin saptanmasının gerekeceği" anlamı taşımaktadır. Sperm, hareketin tipine göre kategorize edilecekse veya bir numune içinde başka değişkenlik analizleri de planlanacaksa, en azından 200 ve mümkünse 400 hareketli spermin incelenmesine gerek duyulacaktır. Her bir numunede, incelenecek sperm sayısının standardize edilmesi gerekecektir. CASA cihazı, verilerin düzenlenmesi ve

istatistiksel analizine izin veren bilgisayar yazılımıyla bağlantılı olmalıdır. Motilite parametrelerinin birçoğunun dağılımı Gaussian dağılımına uymaz, her bir değişkenin merkezi eğiliminin özeti olarak, ortalama değerlerden ziyade ortanca değerler daha uygundur. Belli bazı istatistiksel analizler yapılmadan önce, bir spermatozoanın ölçümlerinin matematiksel formüllere dönüştürülmesi gerekebilir (WHO, 2010).

1.4.2.1.2. CASA ile Sperm Konsantrasyonu Ölçümü

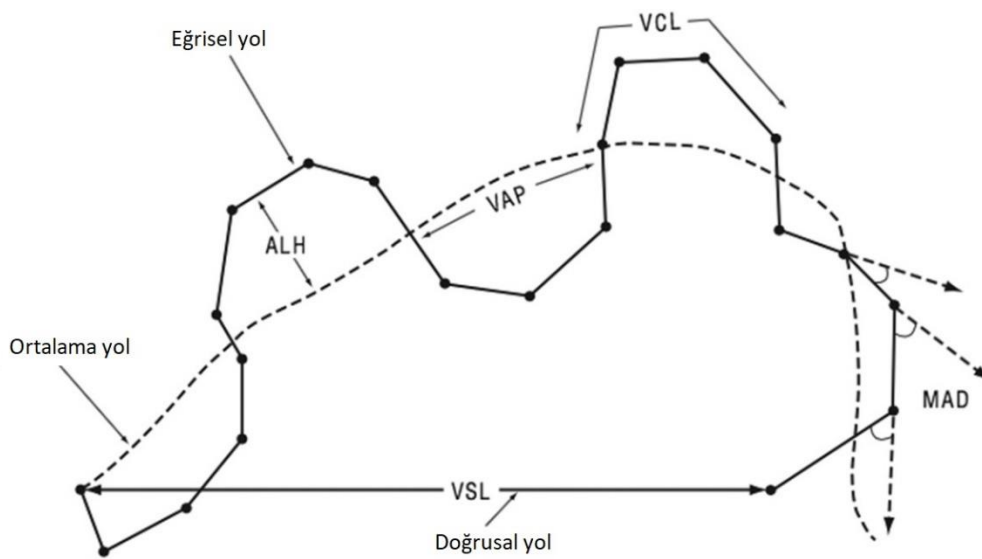
CASA'yla birlikte floresan DNA boyalarının kullanılması, tekniğe titizlikle uyulduğu takdirde, hareketli spermelerin konsantrasyonu ve motilite yüzdesinin doğru olarak belirlenmesine olanak tanır (Garrett ve ark., 2003). Örneğin, tek kullanımlık sayma kamaralarında, kamara boyunca spermelerin dağılımı homojen olmayacağı için, kamaraya numunenin doldurulduğu noktadan farklı mesafelerdeki spermeleri de değerlendirme önem taşır (Douglas-Hamilton ve ark., 2005). Bir hemositometreyle geçerliliğini yapmak esastır (WHO, 2010). Burada bahsi geçen konsantrasyon hesaplaması IVOS cihazı için tanımlanmış bir prosedürdür. Sadece infertilite sorunu olan hastalar için uygulanabilir. Diğer nesil CASA cihazları için genelleme yapılamaz.

1.4.2.1.3. CASA Terminolojisi

Şekil 1.2.'de CASA sistemleriyle ölçülen değişkenler için bazı standart terminoloji betimlenmektedir.

1. VCL, eğriçizgisel hız (curvilinear velocity) ($\mu\text{m/s}$). Mikroskopik gözlem altında iki boyutta algılandığı gibi, bir sperm başının gerçek eğriçizgisel yolağı boyunca zamana göre ortalama hızı. Hücre canlılığının bir ölçümüdür.
2. VSL, doğrusal hız (rectilinear velocity) ($\mu\text{m/s}$). Bir sperm başının, saptanan ilk konumuyla son konumu arasında çizilen düz çizgi boyunca zamana göre ortalama hızı.

3. VAP, ortalama yol hızı (average path velocity) ($\mu\text{m/s}$). Bir sperm başının ortalama yolu boyunca zamana göre ortalama hızı. Bu yol, CASA cihazlarındaki algoritmalara göre eğriçizgisel traseyi düzleştirerek hesaplanır. Farklı CASA cihazları farklı algoritmalar kullandığı için, sistemlerin saptadığı değerler karşılaştırılabilir düzeyde olmayabilir.
4. ALH, sperm başının lateral deplasman amplitüdü (μm). Sperm başının ortalama yoluna göre dış yana hareketinin boyutu. Maksimal değer veya bu deplasman amplitüdülerinin ortalaması olarak ifade edilebilir. Farklı CASA cihazları farklı algoritmalar kullanarak ALH'yi hesapladıkları için, sistemlerin saptadığı değerler karşılaştırılabilir düzeyde olmayabilir.
5. LIN, doğrusallık (linearity). Eğriçizgisel yolun doğrusallığı, VSL/VCL.
6. WOB, salınım hareketi (wobble). O anki sperm hareket yolunun, ortalama yol etrafında salınım hareketinin ölçümü VAP/VCL.
7. STR, doğrusallık (straightness). Ortalama hareket yolunun doğrusallık derecesi, VSL/VAP.
8. BCF, çaprazlama sıklığı (beat-cross frequency) (Hz). Eğriçizgisel yolun ortalama yolu çaprazlama sıklığı.
9. MAD, ortalama açısal yer değiştirme (mean angular displacement) (derece). Sperm başının eğriçizgisel yolu boyunca anlık dönüş açısının zamana göre ortalama mutlak değerleri (WHO, 2010).



Şekil 1.2. CASA sistemleriyle ölçülen değişkenler için standart terminoloji (WHO, 2010).

1.4.2.1.4. CASA ve Toksikite

CASA teknolojisi, sperm hareketindeki toksik maddelerin neden olduğu değişiklikleri tanımlamamızı sağlar. Bilgisayar destekli sperm (hareket) analiz sistemlerinin (CASA) kullanımı, klinik, hayvancılık ve toksikolojik araştırma ortamlarında yaygınlaşmıştır. Üreme toksikolojisi araştırma ortamında CASA teknolojisinin başarılı bir şekilde uygulanması için, laboratuvarlar arasında CASA metodolojilerinin standardizasyonu gereklidir (Tyson ve Witschi, 1993).

Toksikolojide, günümüz teknolojisi CASA'nın belirli bir sperm örneğinin hareket parametrelerini yeterince tarif edemediği durumlarda kullanılmaktadır. Bu gibi durumlarda, CASA / manuel interaktif hareketlilik değerlendirmesi yapılması gerekebilir. Bununla birlikte, CASA toksikoloji çalışmalarında, daha önce mümkün olmadığı kadar nicel veriler sağlayarak yararlılığını kanıtlamaktadır, böylece toksikologların toksik maddelerin sperm motilitesi üzerindeki etkilerini daha iyi karakterize etmesine ve motilite ile doğurganlık arasındaki ilişkileri netleştirmesine yardımcı olmaktadır (Slott ve ark., 1993).

Bazı pestisitlerin taze köpek ve teke spermaları üzerindeki etkileri, MTT (mitokondriyal etkinlik/canlılık), Nötral Kırmızı-NK (lizozomal etkinlik/canlılık) ve Bilgisayar Destekli Sperma Analizi-CASA (motilite parametreleri, VCL, VSL, VAP, lineerlik, doğrusallık, yalpalama) kullanılarak *in vitro* olarak araştırılmıştır. Sonuç olarak üreme toksisite testlerinde alternatif testler arasında bulunan ve batarya testleri içerisinde yer alan *in vitro* sperm toksisite araştırmasında MTT ve CASA ile birlikte NK'nın kullanılmasının kimyasalların sperma üzerine etkilerinin değerlendirilmesinde daha etkili olacağı ve türe özgü farklılıkların kimyasalların sperma canlılık ve motilite parametrelerini farklı şekil ve düzeyde etkileyeceği, dolayısıyla spermada türe özgü

ksenobiyotik moleküler savunma mekanizmalarının araştırılmasının gerekliliği gösterilmiştir (Yurdakök-Dikmen ve ark., 2017).

Bilgisayar destekli sperm analizi (CASA) ile boğa sperm özelliklerinin ölçülmesi ve doğurganlık ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada hareketli sperm yüzdesi ve spermlerin konsantrasyonu verileri CASA ile değerlendirilmiş ve dölleme potansiyelini tahmin etmede CASA değişkenleri kullanılmıştır (Farrel ve ark., 1998).

Üreme organ ağırlıkları (testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat), sperm sayıları (testiküler ve epididimal) ve sperm hareket parametreleri CASA kullanılarak Linder ve ark. (1992) tarafından incelenmiştir. Testiküler histoloji, testiküler sperm sayısı, kauda sperm sayısı, sperm morfolojisi ve sperm hızı, bir veya daha fazla çalışmada toksikolojik kanıtları desteklemiş ancak, testis ve epididim histopatolojisi, üreme hasarının en tutarlı göstergesi olmuştur. Epididimal sıvıdaki hareketli sperm ve sperm konsantrasyonu yüzdesi en hassas ölçümlerdir. Veriler, orta ve şiddetli sperm hasarı üretme potansiyeline sahip çoğu kimyasalın kısa süreli testlerle saptanabileceğini önermektedir. Video ve dijital teknolojinin sperm analizine uygulanması, bireysel sperm parçaları hakkında bilgi de dahil olmak üzere, sperm hareketinin daha detaylı ve objektif bir şekilde değerlendirilmesini sağlar. Aynı zamanda, gerektiğinde tekrar analiz edilebilen (manuel veya bilgisayar destekli) sperm izlerinin kalıcı bir kaydı sağlar. Bilgisayar destekli teknoloji ile sperm hızı (düz çizgi ve eğrisel) ile birlikte sperm sayısı ve frekansı hakkında çok sayıda bilgi elde edilir. Bu teknolojiyi kullanarak, kimyasalların neden olduğu sperm hareketi değişiklikleri algılanmıştır ve bu tür değişiklikler maruz kalan hayvanlarda doğurganlık ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmalar, hareketli spermin yüzdesi etkilenmese bile, sperm hızındaki önemli düşüşlerin infertilite ile ilişkili olduğunu göstermektedir. CASA parametreleri, giderek hareketlenen spermler için çeşitli nesnel sınıflamalar sağlamak üzere tanımlanabilir. Bu, basitçe, kontrol hayvanlarından sperm hareket özelliklerine dayanan bir veya daha fazla CASA parametresi (ör. doğrusallık) için kullanıcı tanımlı eşikleri belirleyerek yapılır. Bilgisayar, daha sonra bu eşikleri aşan hareketli spermin

yüzdesini hesaplar ve bunu gelişme olarak değerlendirir (Klinefelter ve Veeramachaneni, 2014).

CASA sistemleri, sperm hareket parametrelerinin değerlendirilmesinde devrim yaratmıştır ve üreme toksikolojisi çalışmalarının bileşenleri olarak sperm motilite / hızlarını ölçmek için pratik ve kullanışlı bir yöntemdir (Slott ve ark., 1993).

1.4.3. Sitotoksosite Testleri

Sitotoksosite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılır. Hücre temelli sitotoksosite çalışmaları, gerek uygulama kolaylığı, gerekse *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilir hale gelmiştir. Sitotoksosite, incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağılı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalırsa apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler. Hücre bazlı sitotoksosite çalışmaları ile test edilen maddenin sitostatik ve sitotoksik etkileri hakkında temel bilgi edinilir. Deneysel olarak kimyasal, biyolojik ya da fiziksel etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, bu çalışmaların önemli bir basamağıdır. Hücre canlılığının belirlenmesi için uygulanan çok sayıda test vardır. Yapılan sitotoksosite çalışmasının tipi ne olursa olsun, önemli olan çalışma sonundaki canlı/ölü hücre miktarının belirlenmesidir. Sitotoksosite belirleme metotları genel olarak kolorimetrik, lüminesans ve enzimatik yöntemlerdir (Tokur ve Aksoy, 2017).

Kolorimetrik metotlarda,

- 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT),

- 3-(4,5- dimetiltiyazol-2-yl)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4- sülfofenil)-2H-tetrazolyum (MTS),
- 2,3-bis-(2- metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-2H-tetrazolyum-5- karboksianilid (XTT),
- 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)- 5-(2,4-disülfofenil)-2H-tetrazolyum (WST)

gibi tetrazolyum tuzları kullanılarak renk değişikliği ya da kristal viyole, nötral kırmızısı gibi boya maddeleri kullanılarak hücrelerin spesifik boyanması esasına dayalı ölçüm yapılır. Luminometrik metotlar, floresans ve biyolüminesans olarak ikiye ayrılmaktadır. Floresans metotlarda, floresans özellikteki maddeler kullanılırken, biyolüminesans metotlarda lusiferaz denilen özel enzimler ve bunların substratlarının kullanımı ile canlı/ölü hücre tespiti yapılması söz konusudur. Daha gelişmiş biyolüminesans metotlarda (gerçek zamanlı biyolüminesans), hücrelerin sitotoksik madde ile maruziyeti, sadece testin yapıldığı anda değil, maruziyet süresince incelenebilir hale gelmiştir. Hücre hasarını ya da ölümünü takiben vasatta sızan enzimler de ölü hücre sayısının belirteci olarak ele alınmıştır. Bu enzimler içerisinde stabilitesi ile öne çıkan laktat dehidrojenaz (LDH), hücre ölümü belirteci olarak canlılık testleri arasındaki yerini almıştır. Bu bileşikler, hücre içine girebilme ve vasatta çözünme özelliklerine göre ikiye ayrılırlar. İlk grupta bulunan MTT, pozitif yüklü bir bileşik olup, ökaryot hücrelerin membranını kolaylıkla geçerek hücre içinde indirgenebilir ancak indirgenme sonucu oluşan formazon, suda çözünmez niteliktedir ve dolayısıyla vasatta kristal şeklinde çökelmektedir. İkinci grupta bulunan MTS, XTT ve WST bileşikleri ise negatif yüklü olup hücre membranını geçemezler (Tokur ve Aksoy, 2017).

1.4.3.1. MTT Testi

MTT, 3- (4,5-Dimetil-tiyazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolyum bromür, canlı hücrelerden gelen bir mitokondriyal dehidrojenaz enziminin, soluk sarı MTT'nin tetrazolium halkalarını kesme kabiliyetine dayanan hücre canlılığı testinde (MTT) kullanılan bileşiktir ve koyu mavi formazan kristalleri oluşturur. İlke, MTS tahlilinde olduğu gibi aynıdır (Lackie, 2007).

Somatik hücreler için rutin MTT testinde, MTT, 5 mg / mL'de PBS (phosphate-buffered saline, fosfat tamponlu salin) içerisinde çözündürülür ve daha sonra, bazı MTT serilerinde mevcut olan az miktarda çözünmeyen kalıntıların sterilizasyonu ve uzaklaştırılması için filtrelendirilir. Daha sonra MTT, mL başına 0,5 mg MTT'lik nihai konsantrasyon elde etmek için somatik hücreler ve kültür ortamı karışımına eklenir (Nasr-Esfahani ve ark., 2002).

1.5. Tezin Amacı

Endokrin bozucu kimyasalların erkek üreme sistemi üzerine etkileri ile ilgili araştırmalar gün geçtikçe artmaktadır. Nitro musk grubu kimyasallar da endokrin bozucu olarak değerlendirilmektedir. Birçok ülkede kullanımlarının yasak olduğu nitro muskların, sabun, kozmetik, çamaşır deterjanı ve yumuşatıcı gibi sayısız ürünün endüstriyel üretiminde yapay koku olarak büyük miktarlarda kullanıldıkları bilinmekte, bazı ülkeler milyonlarca ton üretim yapmaktadırlar. Bu bileşiklere direkt maruziyetin veya hava, su veya toprak ile bu bileşiklerin kontaminasyonunun erkek üreme sistemine verdiği zararların ortaya çıkarılması ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bu endokrin bozucular hem insan hem de hayvan üreme sağlığını ciddi şekilde etkilemektedir.

Bu tezin hipotezi; farklı araştırmalarda endokrin bozucu etkinliği gösterilmiş ve günlük hayatta maruz kalınabilen nitro musk grubuna dahil olan musk keton ve musk ksilenin, hem boğa sperması üzerine toksik etkili olduğu hem de bu etkinin doz/süre ve P-gp ile ilişkili olduğudur. Bu hipotezi test etmek amacıyla tezin amacını, ilgili bileşiklerin spermiyotoksisite, motilite/morfolojik etkileri ve P-gp protein ifadesi üzerine etkilerinin araştırılması oluşturmaktadır. Bu amaçla, suni vajen ile ve epididimal olarak alınan spermde spermiyotoksisitenin MTT testi ile tespit edilmesi, IC50 dozundan daha düşük konsantrasyonlarda farklı doz ve sürelerde

motilite/morfolojik özelliklerin CASA ve flow sitometri ile belirlenmesi ve P-gp proteininin western blot ile araştırılması hedeflenmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kimyasal Maddeler

Çalışmada aşağıda sıralanan kimyasallar kullanılmıştır.

Dulbecco's PBS, Fosfat Tamponlu Salin (Phosphate-Buffered Saline) (Sigma-Aldrich, MFCD00131855)

% 20 FBS, Fetal Sığır Serumu (Fetal Bovine Serum) (Biological Industries)

10000 IU/ml Penisilin- 10 mg/ml Streptomisin Çözeltisi (Biological Industries, 03-031-1B)

Tyripsin- EDTA (0,05 %) in DBPS (Biological Industries, 03-052-1A)

Musk ksilen (MKs) (Sigma-Aldrich, 81-15-2)

Musk keton (MKe) (Sigma-Aldrich, 81-14-1)

Triton X-100 (Sigma-Aldrich, 9036-19-5)

Sarı Tetrazolium Tuzu [3-(4,5-di-metiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür, MTT] (Merck 298-93-1)

% 1 Sodyum Dodesil Sülfat (Sigma-Aldrich, 151-21-3)

FITC-PNA Temel Boyası (Peanut Agglutinin Conjugated with Fluorescein Isothiocyanate) (Sigma-Aldrich; L-7381)

PI, Propidyum İyodür Boyama Çözeltisi (Propidium Iodide) (Invitrogen, BMS500PI)

RIPA Tampon Çözeltisi (Radio-Immunoprecipitation Assay) (Sigma-Aldrich, R0278)

Bovin Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, 9048-46-8)

% 0,5 Tween-20 Tamponu (TBS-T) (Bio-Rad, 1610781)

Bloke Edici Çözelti (Blocking Buffer) (Bio-Rad)

Renk Geliştirme Ajanı BCIP/NBT (5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat/nitro blue tetrazolyum) (Sigma-Aldrich, B6404)

Tris Tamponu (Sigma-Aldrich, 1185-53-1)

2.1.2. Cihazlar ve Laboratuvar Malzemeleri

Çalışmada aşağıda sıralanan cihazlar ve laboratuvar malzemeleri kullanılmıştır.

SpectraMax i3 Çok Modlu Algılama Platformu (Multi-Mode Detection Platform) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)

CASA, Sperm Class Analyzer (SCA® v.6.3.0.59, Barcelona, İspanya) ve IVOS (Hamilton Thorne Bioscience, Beverly, MA, ABD)

Basler acA1600-60gc kamera (CS-Mount) (Basler AG Ahrensburg, Almanya)

Flow Sitometre Cihazı (Beckman Coulter Cytoflex, Indianapolis, ABD)

CO2 İnkübatör (EC 160, Nüve)

iBlot 2 Western Blot Sistemi (Thermo Fisher Scientific MA, ABD)

LI-COR Odyssey FC Görüntüleme Cihazı (Biosciences, Lincoln, NE ABD)

- 20 °C Buzdolabı (Panasonic)

- 80 °C Buzdolabı (Panasonic)

+4 °C dolap (Arçelik)

Santrifüj (Universal 320 R)

Hassas Terazı (Sartorius)

Leja lamları

100 µM hücre süzgeçleri (Falkon)

3 ml MEM içeren 25 cm²'lik doku kültürü şişeleri

10 kuyucuklu jel (Bio-Rad)

Poliviniliden florid (PVDF) membran (Bio-Rad)

Otomatik pipetler (Ependorf)

Bistüri, makas, pens, tek kullanımlık cerrahi skapeller, mikrotom bıçağı, hemostatik pens, 21 G enjektör, mezür tüp, 96 kuyulu plakalar, lam, lamel, buz kalıbı, pamuk ve falkon tüp kullanıldı.

2.2. Yöntem

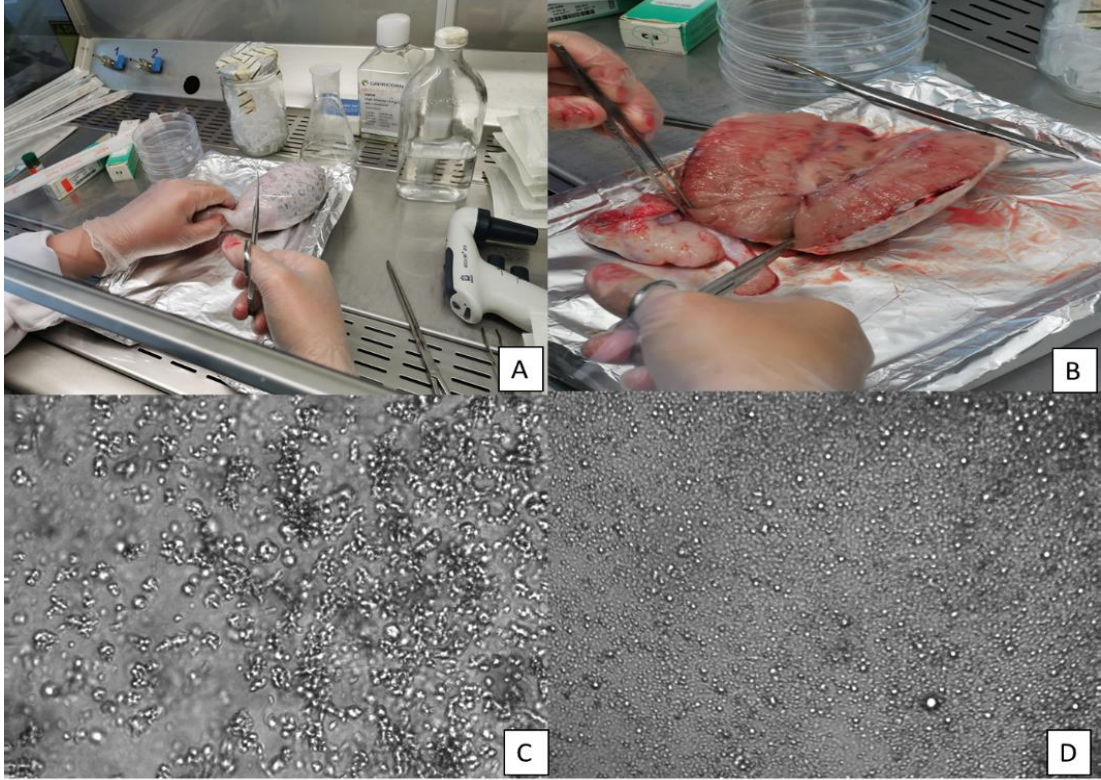
2.2.1. Dokuların Toplanması ve Hücre Kültürü Koşulları

Dört olgun Holstein boğasından (18-48 aylık) Epididimal-Testis kompleksleri Kazan Et Kombinasyonu mezahasından toplanmış ve 2 saat içinde 4°C' de laboratuvara taşınmıştır. Antibiyotikler (penisilin, 1000 IU/ml; streptomisin, 1000 µg/ml) içeren fosfat tamponlu salinle (PBS) üç kez yıkadıktan sonra makas ve tek kullanımlık cerrahi skapeller ile dikkatlice açılmıştır.

Testiküler parankimden doku örnekleri toplanmış, küçük parçalara (~ 1 mm³) kıyılmış ve daha sonra gece boyunca 37 °C'de % 5 CO₂' de tripsinize edilmiştir. Daha sonra, hücreler 100 µM hücre süzgeçlerinden (Falkon) süzölmüş ve % 20 fetal sığır serumu (FBS) (Sigma- Aldrich, MFCD00131855), penisilin-streptomisin (Biological Industries, 03-031-1B) ve 3 ml MEM içeren 25 cm²'lik doku kültürü şişelerine aktarılmıştır.

Kültür ortamında sertoli hücreleri (seminifer tübülde bulunan ve spermin gelişimini desteklemek için ana işlevi olan) leyding hücreleri (testisin interstitiumundaki testosteron üreten hücreler), epididimal hücreleri (sperm olgunlaşması ve depolanması için mikro-ortamı oluşturan) ve vas deferens hücreleri (boşalma sırasında epididimden sperm transferi için ince bir tüp olan) bulunmaktadır.

Kültürün ilk haftasından sonra, primer hücrelerin tek katmanının oluştuğu yer olan büyüme ortamı iki günde bir değiştirilmiştir. Boğa testiküler parenşim hücre kültürü aşamaları Şekil 2.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Boğa testiküler hücre kültürü.

a. Testisin steril ortamda açılışı. b. Mediastinal testis. c. Hücre kültürü klasterları (oturmayan hücre ve hücre artıkları) d. Tek sıralı testiküler hücreler.

2.2.2. Sperma Toplanması

Araştırmada kullanılan taze sperma örnekleri için T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü'nden onay yazısı 07/08/2020 tarih ve E-92190712-604.01.02-2200731 tarihinde alınmıştır. İlgili iznin alınmasını takiben Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğünde üretimi yapılan ve şap aşısını takiben imha edilecek boğaların (18-48

aylık) sperma örnekleri (3 farklı boğadan alınan) standart prosedürlere göre suni vajina yardımı ile toplanmış (Şekil 2.2.) ve doğrudan 35,5 °C'de hacim, renk ve pH için makroskopik olarak ve morfoloji, canlılık ve hareketlilik için mikroskopik olarak ön değerlendirmeyi takiben, 2 saat içinde 4 °C' de laboratuvara taşınmıştır. Deneysel prosedürler önceden laboratuvarlarımızda yapılan çalışma (Yurdakök Dikmen ve ark., 2015) temel alınarak takip edilmiştir. Minimum konsantrasyonda 1×10^9 spermatozoa/ml ve % 75 hareket kabiliyetine sahip ejakülatlar kullanılmış ve Tris-bazlı bir genişletici içinde $3,6 \times 10^6$ spermatozoa/ ml'ye seyreltilmiştir.



Şekil 2.2. Taze sperma toplanması (Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi).

2.2.3. Epididimal Sperma Alınması

Yurt dışından ithal edilen boğalardan kesim öncesinde pasaport belgeleri alındı. Yetişkin sağlıklı boğadan vas deferens ligature edildikten sonra epididim ile birlikte toplam 4 (çift olarak 8) testis toplandı. Testisler + 8 °C'de Dulbecco fosfat saline içeren örnek kaplarına bireysel bilgiler girilerek alındı. Örnekler, içerisinde

buz aküleri bulunan kaplarda muhafaza edilerek 2 saat içerisinde Ankara Üniversitesi Dölerme ve Suni Tohumlama Laboratuvarına ulaştırıldı.

Laboratuvara ulaşıldıktan sonra makas ve bisturi yardımı ile ek dokular alınarak testisler temizlendi. Kauda epididiminden spermatozoanın eldesi Tris tamponunda (Sigma-Aldrich, 1185-53-1) retrograde flushing yöntemi kullanılarak yapıldı. Kısaca, kauda epididimi testislerden aseptik olarak çıkarıldı ve vas deferens dikkatlice disekte edilerek uzunlamasına spermatik kord içerisinde ayrılarak çıkarıldı. Disekte edilen vas deferens, spermanın kaybına engel olmak için hemostatik pens yardımıyla kapatıldı. Sonrasında 21 G iğne kullanılarak vas deferens kateterize edildi. Epididimal kaudanın uç kısımlarına doğru tek bir ensizyon atılarak spermanın 15 ml falkon tüp içerisine yıkanarak alınması işlemi gerçekleştirildi (Şekil 2.3.). Spermanın konsantrasyonunun hesaplanmasına dilüsyon oranını belirlemek amacıyla her bir testis 4 ml tris solüsyon kullanılarak yıkandı.

Elde edilen sperma örneklerinin renk, miktar, kıvam ve pH yönünden değerlendirmeleri gerçekleştirilerek kaydedildi. Örnekler, falkon tüplerde etiketlenerek 30 dk. hareket (motilite) yeteneklerini kazanmaları için 37 °C'de inkübasyona bırakıldı. Her bir numunenin konsantrasyonu fotometre kullanılarak belirlendi. Sonrasında motilite analizi için (CASA, SCA Microptics) sperma örnekleri ml'de 1×10^6 spermatozoon olacak şekilde sulandırıldı. SCA motilite analiz programı kullanılarak analiz gerçekleştirildi.

Motilite analizi sonrasında % 70'den fazla motiliteye sahip numuneler, sitotoksite analizi için $3,6 \times 10^5$ spermatozoon olacak şekilde final konsantrasyon oranında sulandırılarak mezür tüplere alındı. İşaretlenen örnekler +4 °C'de muhafaza edilerek 1 saat içerisinde farmakoloji ve toksikoloji laboratuvarına ulaştırıldı.



Şekil 2.3. Laboratuvarında epididimal sperma alınması.

2.2.4. Nitro Musk Bileşiklerinin Uygulanması

Hücreler tek tabaka oluşturduktan sonra, musk ksilen (MKs) (Sigma-Aldrich, CAS No: 81-15-2) ve musk keton (MKe) (Sigma-Aldrich, CAS No: 81-14-1) uygulaması için 96 kuyulu plakalara aktarılmış ve bağlanma için gece boyunca kültürlenmiştir. 100 µl ortamda kültürlenmiş hücrelere nihai konsantrasyon 2,5-0,0024 µg/ml olacak şekilde 12 farklı konsantrasyonda ilaç uygulaması (20 µl) yapıldı. MTT testi için nispi absorbanslar, negatif (vasat ilave edilmiş, spermiyotoksistide sadece sulandırıcı eklenmiş) ve pozitif kontrol gruplarına (Triton X-100) göre hesaplanmıştır. Her dozdaki işlemler, bir plakada üç tekrarda gerçekleştirilmiş ve deneyler üçer kez tekrarlanmıştır.

2.2.5. Sitotoksosite Analizleri

Hem sperma (3×10^6 / ml spermatozoa) hem de testiküler hücre kültürüne uygulanan musk ksilen ve musk keton bileşikleri 24 saatlik maruziyeti takiben ortamdaki uzaklaştırılmış ve hücreler 10 µl MTT çözeltisine (fosfat tamponlu salin

içinde 0,5 mg/ml) alınmıştır. Hücrelerin mitokondriyal metabolik aktivitesinin etkisi için, mitokondriyal süksinat dehidrojenaz (mitokondriyal redüktaz) aracılığıyla sarı tetrazolium tuzu [3-(4,5-di-metiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür, MTT] mor formazan partiküllerine dönüştürülmüştür (Mosmann, 1983). 37 °C' de 4 saat sonra oluşan formazan kristalleri, % 1 sodyum dodesil sülfat (100 µL) (Sigma-Aldrich, 151-21-3) içinde çözülmüştür. Daha sonra hücre canlılığı 540 nm'de SpectraMax i3 Çok Modlu Algılama Platformu (Multi-Mode Detection Platform) (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) kullanılarak ölçülmüştür.

Sitotoksosite analizlerinde aynı konsantrasyonlar, 100 µL'de seyreltilmiş sperm hücrelerine uygulanmış ve spermiyotoksosite, MTT ile değerlendirilmiştir. Spermiyotoksosite çalışmaları için farklı hayvanlardan toplam 6 ejakulat kullanılmıştır. Çalışılan her doz için de üç tekrar yapılmıştır.

2.2.6. CASA

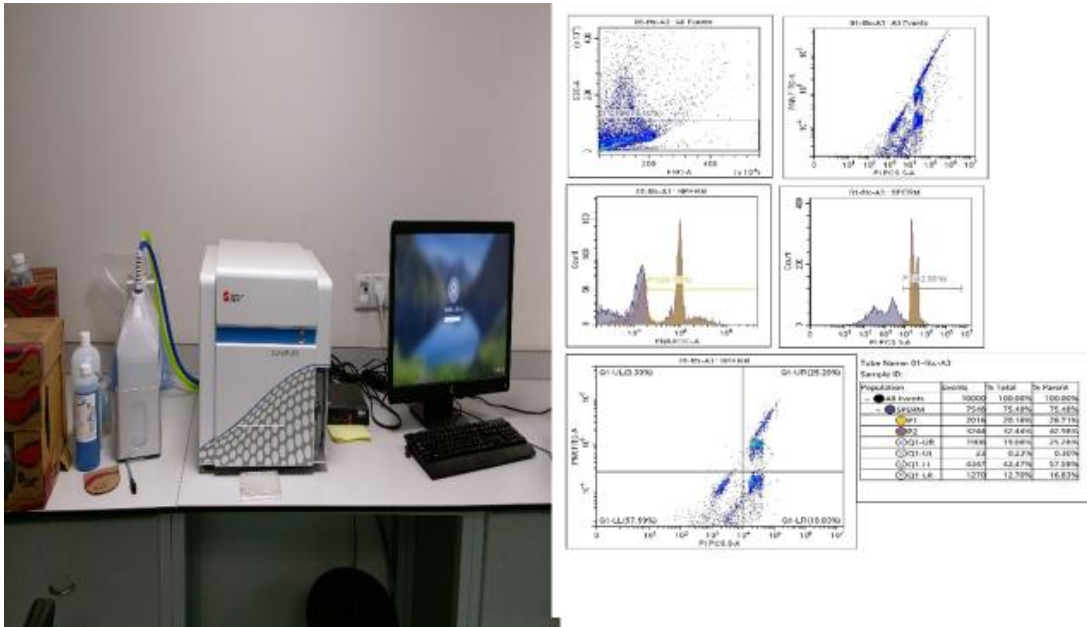
CASA çalışmaları spermiyotoksosite çalışmalarının tamamlanması ve IC50 değerlerinin hesaplanmasını takiben yapılmıştır. CASA çalışmaları için farklı hayvanlardan toplam 6 ejakulat kullanılmıştır. Çalışılan her doz için de üç tekrar yapılmıştır.

Çözüm sonu motilite ve diğer kinetik parametrelerin değerlendirilmesinde CASA, Sperm Class Analyzer (SCA® v.6.3.0.59, Barcelona, İspanya) ve IVOS (Hamilton Thorne Bioscience, Beverly, MA, ABD) (taze sperma için) kullanılmıştır. Sperma analizi SCA sistemindeki mevcut boğa spesifik değerlendirme parametreleri ile değerlendirilmiştir.

Spermatozoa canlılığının tespiti için Flow Sitometre Cihazı (Beckman Coulter Cytoflex, Indianapolis, ABD) kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Cihaz ile çok daha kapsamlı değerlendirmeler yapılabilecek bulgular elde edilmiştir.

2.2.8. Spermatozoanın Akrozom Bütünlüğü Yönünden Değerlendirilmesi

Akrozom değerlendirmesi için, FITC-PNA/PI floresan boyaması (Sigma-Aldrich; L-7381) uygulandı. Bunun için, 100 µl sperma süspansiyonu (25×10^6 /ml) 10 µl Formolsitrat (1,7 mM) ile tespit edildi. FITC- PNA temel çözeltisinden sperma süspansiyonu üzerine 10 µl ilave edilip, karanlık ortamda oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Bunun üzerine 2 µl PI (Invitrogen, BMS500PI) ilave edilip, karanlık ortamda oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Hazırlanan 2 µl'lik lam-lamel arası örnekte, spermatozoonların akrozomal yapıları fluoresans mikroskopta 450-490 nm dalga boyunda 5000-10000 spermatozoon sayılarak değerlendirildi. Akrozomu yeşil boya alanlar hasarlı akrozoma sahip spermatozoonları, akrozomu boya almayanlar ise sağlam akrozoma sahip spermatozoonlar olarak değerlendirildi. Flow sitometre cihazı ve örnek flow sitometre çıktısı Şekil 2.5.'de gösterildi.



Şekil 2.5. Flow sitometre cihazı.

2.2.9. Western Blot Analizi

Sperm hücrelerine MTT testi ile belirlenen doz aralıklarında (IC50 ve IC50/2) uygulama yapıldı. 24 saatlik inkübasyonu takiben kuyucuklar 4 °C' de tutulmuş PBS (Sigma- Aldrich, MFCD00131855) ile yıkandıktan sonra proteaz inhibitörleri eklenmiş RIPA tampon solüsyonu (Sigma-Aldrich, R0278) her bir kuyucuğa 300 µl eklendi. Daha sonra ince uçlu sonikatör ile homojenize edildi ve 14.100 xg de 2 dakika boyunca santrifüj işlemi uygulandı. Daha sonra 30 µl örneklerden alındı ve DTT içeren örnek tamponundan 10 µl alınarak karıştırılarak ve 65 °C' de 10 dakika bekletilerek Western Blot tayini için hazır hale getirildi. Protein miktarı ise BCA test yöntemine göre absorbans değeri üzerinden belirlendi. Öncelikle BCA çalışma reaktifleri (WR) A ve B solüsyonlarından 1:50 (A:B) ölçülerinde hazırlandı. Ekstre edilmiş her bir örnekten 10 µl 96 gözlü kuyucuklara konuldu ve hazırlanan 200 µl WR solüsyonu eklendi ve 37 °C'de yarım saat bekletildi. Kolorimetrik standart solüsyonu için, Bovin Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich, 9048-46-8) 0,5 mg/ml stoktan 5, 10, 15, 20 µl alındı ve 562 nm spektrofotometrede okundu.

Protein tayin edilmesinin ardından 30 µg protein içeren numune 1:1 oranında tamponla karıştırılarak % 10'luk SDS-Page elektroforezi yapıldı. % 4-20'lik hazır 10 kuyucuklu jellerin (Bio-Rad) her birine 10 µL PageRuler prestained protein ladder (Bio-Rad) ile birlikte örnekler eklendi. Jelden elde edilen proteinler poliviniliden florid (PVDF) membranına (Bio-Rad) aktarıldıktan sonra % 0,5 Tween-20 (TBS-T) (Bio-Rad, 1610781) ile Tris tamponlu salin (TBS) (Sigma-Aldrich, 1185-53-1) içinde durularak 1 saat boyunca bloke edici çözeltiliye (bloking buffer) (Bio-Rad) aktarıldı. TBS-T tamponunda, 1:1000 veya 1:2000 seyreltilerek anti-CYP1A1 protein antikoru hazırlandı. Membran, antikor solüsyonunda 4°C'de sürekli çalkalanarak gece boyu inkübe edildi. Hemen ardından 5'er dk.'lık aralıklar ile 3 kez bol miktarda TBS-T tampon ile çalkalanarak yıkandı; TBS-T tamponunda, 1:10.000 (veya 1:5.000) seyreltilerek anti goat alkalın fosfataz-konjugat sekonder antikor

hazırlandı. Membran, hazırlanan konjugat TBS-T solüsyonunda 1 saat çalkalanarak inkübe edildi ve membran, TBS-T ile 3 kez 5'er dk.'lık çalkalamalı inkübasyona bırakıldı. Ardından 2 kez 10'ar dk.'lık çalkalamalı TBS inkübasyonu yapıldı. Renk geliştirme ajanı BCIP/NBT (5-Bromo-4-kloro-3-indolil fosfat/nitro blue tetrazolyum) (Sigma-Aldrich, B6404) ile membran muamele edildi. Bantlar görünür hale geldiğinde derhal bu solüsyondan çıkarıldı. Renk geliştirme ajanı döküldü ve membran TBS ile 10 dk çalkalanarak yıkandı. LI-COR Odyssey FC Görüntüleme Cihazı (Biosciences, Lincoln, NE ABD) ile elde edilen veriler incelendi ve Image Studio görüntüleme programı ile sonuçlar değerlendirildi.

2.2.10. İstatistik Analiz

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak yapılan analizlerde her bir değişken için tanımlayıcı istatistikler hesaplandı ve "Ortalama±Standart Ortalama Hatası (SEM)" olarak sunuldu. Her değişken için veriler, Genel Doğrusal Model prosedürü kullanılarak iki yönlü ANOVA'ya (varyans analizi) tabi tutuldu. Model, ana etkiler olarak "Grup" (musk keton, musk ksilen) ve "Doz" (IC50, IC50/2, IC50/4, IC50/8, Kontrol) ve "Grup*Doz" etkileşim etkilerini içerdi. Modelde anlamlı bir etkileşim terimi olması durumunda Bonferroni düzeltmesi ile etki analizi uygulandı. Modeldeki herhangi bir önemli ana etki terimi için Bonferroni düzeltmeli ikili karşılaştırmalar yapıldı. 0,05'ten küçük bir olasılık değeri, aksi belirtilmedikçe anlamlı kabul edildi. İstatistiksel analiz için SPSS 22 kullanıldı.

Bazı seçili kinetik parametreler için analiz yapılırken 24. saat verileri esas alınarak her bir değişken için tanımlayıcı istatistikler hesaplandı ve "Ortalama±Standart Ortalama Hatası (SEM)" olarak sunuldu. Model, ana etkiler olarak "Grup" (musk keton, musk ksilen) ve "Doz" (IC50, IC50/2, IC50/4, IC50/8, Kontrol) ve "Grup*Doz" etkileşim etkilerini içerdi. Bu analiz çalışmasında; 5 farklı dozda uygulanmış iki farklı ilacın, 12 farklı parametre (Total Motilite, STR, WOB, Mukus Penetrasyonu (% Total), Mukus Penetrasyonu (% Motil), LIN, VSL,

Hiperaktivite, VCL, BCF, ALH, VAP) üzerine etkisi araştırıldı. Bunun için Genelleştirilmiş Lineer Model tabanlı İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) uygulandı. İki yönlü varyans analizi, iki farklı etkiyi aynı anda incelemeye çalışır. Bu etkiler arasında etkileşme (interaction) olup olmasına göre de “etkileşimli” ve “etkileşimsiz” iki yönlü varyans analizi olarak sınıflandırılır. Bu çalışmada ayrıca etkileşim etkisi için Bonferroni düzeltme terimi kullanıldı. Gruplar arası farklılıklarda farklılığın kaynağını ölçmek için Çoklu Karşılaştırma (Post Hoc) Testlerinden Scheffe testi kullanılarak değerlendirmelerde bulunuldu. Gruplar arasında mümkün olan bütün doğrusal kombinasyonların karşılaştırması için geliştirilmiş olan bu metot genel itibariyle, en esnek ve karşılaştırılacak grup sayılarının çok olması durumunda α hata payını kontrol altında tutabilen (conservative) ve gruptaki gözlem sayılarının eşit olması varsayımını dikkate almayan bir post hoc türü olarak ele alınmaktadır (Scheffe, 1953¹; Scheffe, 1959²). Bu yöntem bu sebeple tercih edilmiştir. Analiz çalışmasında tüm değerlendirmeler ve hesaplamalarda güven düzeyi % 95 (hata payı % 5) olarak değerlendirildi. SPSS 22 Paket Programı kullanılarak sonuçlar elde edildi.

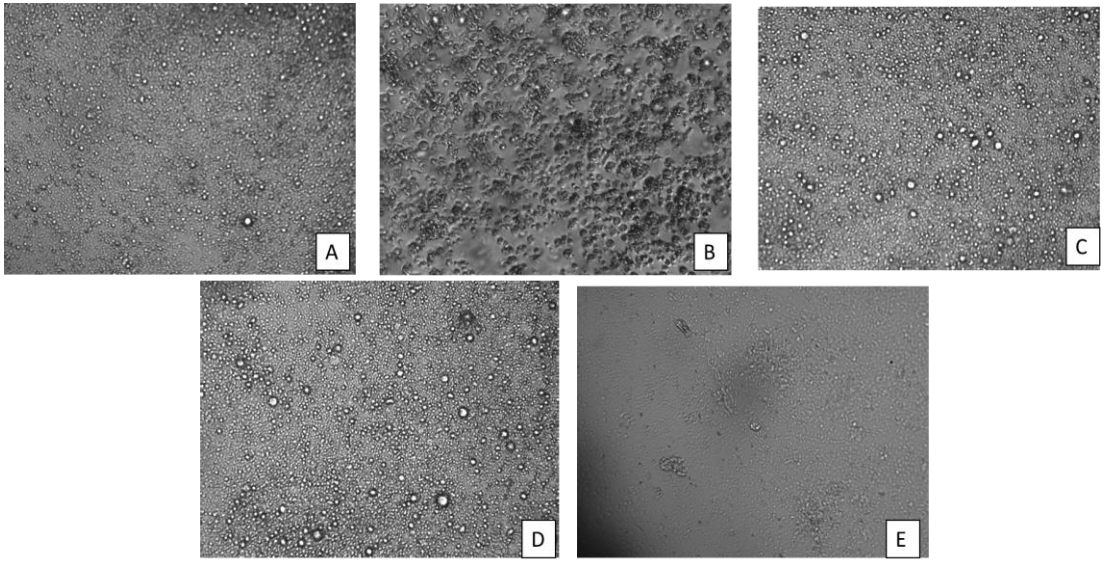
¹ Scheffe, H. (1953). A method of judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrika*, 40, 87-104.

² Scheffe, H. (1959). *The analysis of variance*. New York: John Wiley press.

3. BULGULAR

3.1. Sitotoksisite ve Spermiyotoksisite Bulguları

Primer testiküler parenşim hücre kültüründe 24 saat inkübasyon sonucunda hücre görüntüleri Şekil 3.1.'de gösterildi.



Şekil 3.1. Testiküler parenşim primer hücre kültüründe 24 saat inkübasyon.

a. Musk ksilen 0,078 µg/ml b. Musk ksilen 0,16 µg/ml c. Musk keton 0,078 µg/ml d. Negatif kontrol e. Pozitif kontrol.

IC50 değerleri testiküler primer hücre kültürü örneklerinde, MKs için 0,34 µg/ml, MKe için 0,32 µg/ml bulundu.

IC50 değerleri epididimal sperma örneklerinde, MKs için 0,48 µg/ml, MKe için 0,58 µg/ml bulundu.

3.2. CASA Bulguları

CASA, Sperm Class Analyzer (SCA® v.6.3.0.59, Barcelona, İspanya) ve IVOS (Hamilton Thorne Bioscience, Beverly, MA, ABD) cihazı kullanılarak elde edilen sonuçlar farklı parametreler için değerlendirilmiştir.

CASA sonuçları her parametre için inkübasyon süreleri (0, 4 ve 24), dozlar (IC50, IC50/2, IC50/4 ve IC50/8) ve ilaçlara (musk keton ve musk ksilen) göre ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

3.2.1. TM (Total Motility, Toplam Hareketlilik) (%)

TM parametresi % olarak Çizelge 3.1. ve Şekil 3.2.-3.3.'e göre değerlendirildiğinde; MK için 0. saat IC50/4 dozu % toplam motilite değerinin kontrol grubuna en yakın, 4. saat IC50/8 dozu % toplam motilite değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 24. saat IC50 dozu % toplam motilite değerinin kontrol grubuna en yakın, 24. saat IC50/8 dozu % toplam motilite değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.1.).

MK için tüm saatlerde IC50/8 dozu verilerinin diğer dozlardan düşük olduğu, MX için tüm saatlerde IC50/8 dozu verilerinin diğer dozlardan yüksek olduğu gözlemlendi. MK için 0. saatte tüm dozlarda bulunan değerler kontrol grubundan düşük bulundu. MX için 0. saatte doz azaldıkça % total motilite değerlerinde artış gözlemlendi (Çizelge 3.1.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda MK için IC50 dozunda taze sperma değerinin epididimal sperma değerinden düşük, diğer dozlarda taze sperma değerinin epididimal sperma değerinden yüksek olduğu, MX için

tüm saat ve dozlarda taze sperma değerinin epididimal sperma değerinden yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.2.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında ve doz ve ilaç arasında anlamlı sonuçlar bulunurken, ilaçlar arasında bulunamadı (Çizelge 3.3.).

Çizelge 3.1. TM Total Motility, (Toplam Hareketlilik) (%) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

TM-Total Motility (Arit.Ort.± Std. Hata) (%)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	44,04±1,75	39,39±1,10	13,90±4,29	44,04±1,75	39,39±1,10	13,90±4,29
IC50	26,06±4,40	21,3±10,62	16,44±8,97	24,82±0,45	20,82±4,80	14,15±7,47
IC50/2	29,98±4,74	47,08±5,64	18,95±2,46	26,41±6,58	9,99±5,41	13,11±7,27
IC50/4	41,05±4,97	35,13±6,89	16,57±2,54	31,34±1,64	19,05±1,00	17,06±1,49
IC50/8	20,17±2,00	9,49±2,71	16,35±10,44	45,23±1,57	41,61±1,83	28,93±1,08

Çizelge 3.2. TM Total Motility, (Toplam Hareketlilik) (%) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

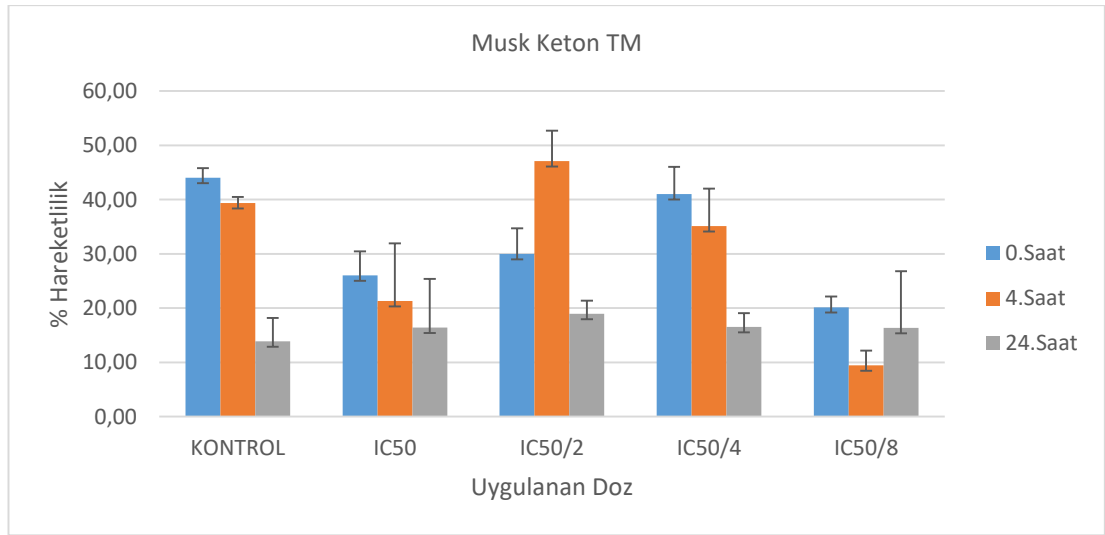
Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	13,90±4,29	13,90±4,29	13,90±4,29	13,90±4,29
IC50	16,44±8,97	14,15±7,47	21,58±15,00	5,74±11,48
IC50/2	18,95±2,46	13,11±7,27	3,78±0,29	7,57±11,08
IC50/4	16,57±2,54	17,06±1,49	3,17±0,72	6,50±6,64
IC50/8	16,35±10,44	28,93±1,08	2,31±1,30	5,00±5,05

Çizelge 3.3. TM Total Motility, (Toplam Hareketlilik) (%) Doz-İlaç Karşılaştırma.

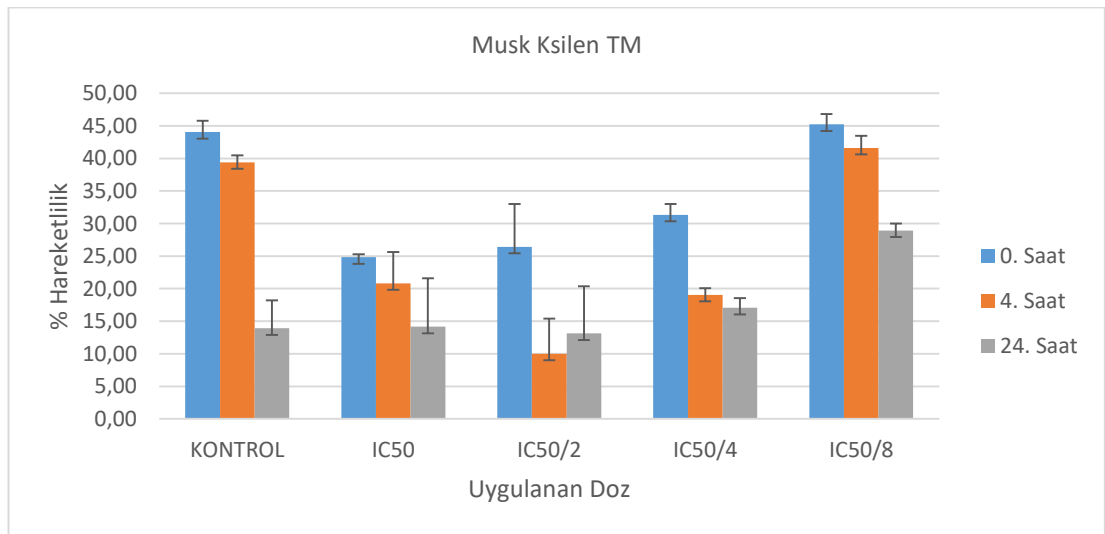
	Doz	İlaç		Doz	İlaç	P
		Musk Keton	Musk Ksilen			
		Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata			
TM, Total Motility, Toplam Hareketlilik (%)	IC50	19,23 ± 3,6 b, B	14,85 ± 3,21 b, A	0,005	0,553	0,049
	IC50/2	25,83 ± 5,31 b, A	12,93 ± 3,32 b, B			
	IC50/4	19,5 ± 5,47 b,A	16,09 ± 3,32 b,A			
	IC50/8	14,28 ± 2,55 b,B	26,65 ± 5,51 b,A			
	Kontrol	34,1 ± 5,33 a, A	34,1 ± 5,33 a, A			

a, b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı belirtir (p<0,05)

A,B: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı belirtir (p<0,05)



Şekil 3.2. Musk Keton, TM Total Motility, (Toplam Hareketlilik) (%) Doz-Saat-TM Karşılaştırma.



Şekil 3.3. Musk Ksilen, TM Total Motility, (Toplam Hareketlilik) (%) Doz-Saat-TM Karşılaştırma.

3.2.2. VAP (Ortalama Yörünge Hızı, Velocity Average Path) ($\mu\text{m/s}$)

VAP parametreleri (motile, non-progressive, medium progressive, rapid progressive) genel olarak değerlendirildiğinde; MK 0. saat verilerinin kontrol grubuna en uzak veriler olduğu tespit edildi.

VAP parametrelerinden Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Çizelge 3.4. ve Şekil 3.4.-3.5.'e göre değerlendirildiğinde; MK için 24. saat IC50/4 dozu motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 4. saat IC50 dozu motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 24. saat IC50/4 dozu motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 4. saat IC50/8 dozu motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.4.).

0. saatte hem MK hem MX verilerinde doz azaldıkça motil verilerinde düzenli bir artış olduğu, kontrol grubuna göre IC50/8 verilerinin oldukça yüksek olduğu saptandı. 4. ve 24. saatlerde, her iki ilaç grubu tüm dozlarında, motil verilerinde kontrol grubuna göre düşüşler gözlemlendi. İki ilaç verisi kıyaslandığında MX 4. saat IC50 dozu verisinin MK'ya göre oldukça yüksek olduğu (% 69,69 fark) bulundu (Çizelge 3.4.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda her iki ilaç için tüm dozlarda taze sperma motile ($\mu\text{m/s}$) değerlerinin epididimal sperma değerlerinden yüksek olduğu, epididimal spermada doz düştükçe motile verilerinde artışlar olduğu saptandı (Çizelge 3.5.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar

arasında anlamlı sonuçlar bulundu, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.6.).

Çizelge 3.4. VAP Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

VAP-Motile (Arit.Ort. \pm Std. Hata) ($\mu\text{m/s}$)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	49,38 \pm 11,06	63,32 \pm 3,84	46,74 \pm 5,80	49,38 \pm 11,06	63,32 \pm 3,84	46,74 \pm 5,80
IC50	61,13 \pm 4,36	31,99 \pm 3,65	39,64 \pm 2,05	52,78 \pm 8,64	54,29 \pm 3,43	34,91 \pm 4,11
IC50/2	51,49 \pm 5,53	47,80 \pm 2,16	37,84 \pm 2,23	51,97 \pm 9,31	48,85 \pm 1,05	35,63 \pm 4,98
IC50/4	69,51 \pm 4,55	56,35 \pm 3,25	44,83 \pm 1,12	60,01 \pm 3,42	41,37 \pm 7,64	44,95 \pm 2,61
IC50/8	72,66 \pm 8,21	43,76 \pm 2,74	30,05 \pm 2,49	63,79 \pm 3,00	29,56 \pm 4,70	36,12 \pm 2,18

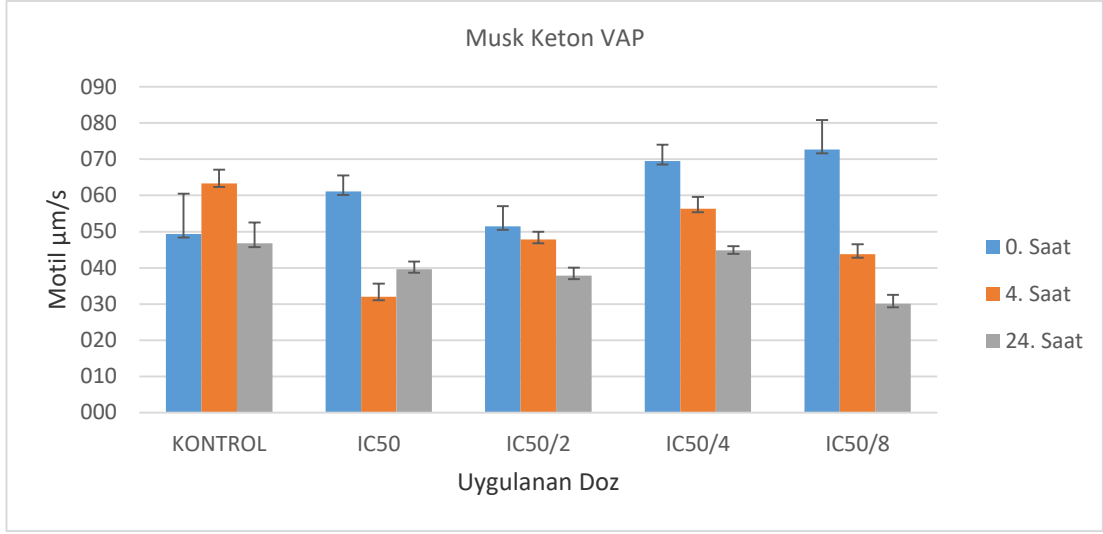
Çizelge 3.5. VAP Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	46,74 \pm 5,80	46,74 \pm 5,80	46,74 \pm 5,80	46,74 \pm 5,80
IC50	39,64 \pm 2,05	34,91 \pm 4,11	16,28 \pm 11,38	4,71 \pm 9,42
IC50/2	37,84 \pm 2,23	35,63 \pm 4,98	17,49 \pm 6,10	7,40 \pm 10,25
IC50/4	44,83 \pm 1,12	44,95 \pm 2,61	10,19 \pm 7,27	12,21 \pm 8,38
IC50/8	30,05 \pm 2,49	36,12 \pm 2,18	23,96 \pm 7,14	13,34 \pm 9,01

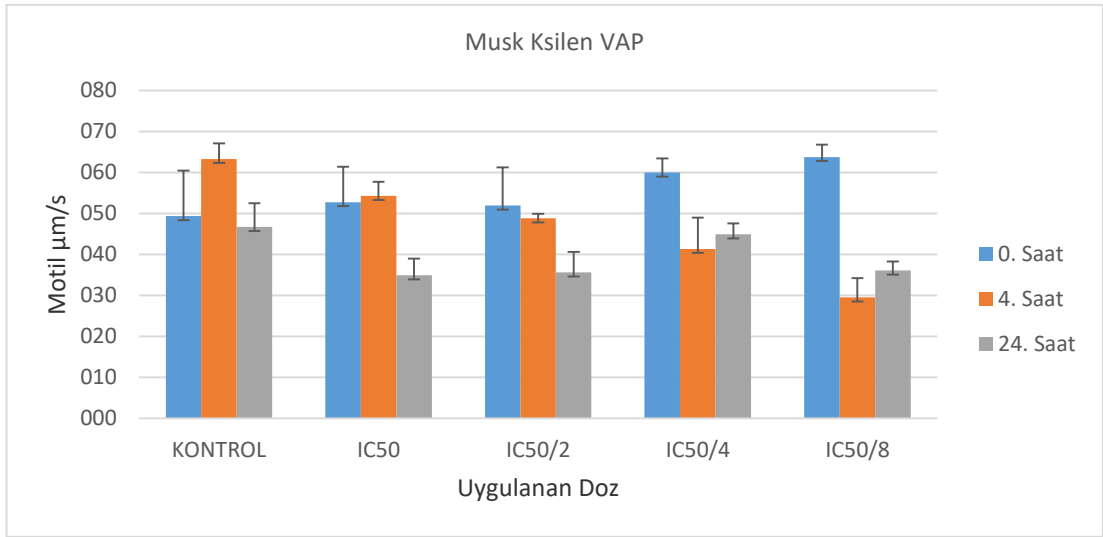
Çizelge 3.6. VAP Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Doz-İlaç Karşılaştırma.

Doz		İlaç		Doz	P	Doz*İlaç
		Musk Keton	Musk Ksilen			
		Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata			
VAP, Velocity Average Path, Motile (Ortalama Yörünge Hızı, Motil) ($\mu\text{m/s}$)	IC50	33,06 \pm 5,98 b	32,54 \pm 6,6 b			
	IC50/2	36,13 \pm 4,41 ab	32,23 \pm 6,55 ab			
	IC50/4	38,21 \pm 8,19 ab	34,15 \pm 6,57 ab	0,046	0,405	0,97
	IC50/8	39,32 \pm 5,75 ab	31,23 \pm 6,44 ab			
	Kontrol	52,23 \pm 3,64 a	52,23 \pm 3,64 a			

a, b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı belirtir (p<0,05)



Şekil 3.4. Musk Keton, VAP Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Doz-Saat-VAP Karşılaştırma.



Şekil 3.5. Musk Ksilen, VAP Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Doz-Saat-VAP Karşılaştırma.

3.2.3. VCL (Eğrisel Hız, Curvilinear Velocity) ($\mu\text{m/s}$)

VCL parametreleri (motile, non-progressive, medium progressive, rapid progressive) genel olarak değerlendirildiğinde; MK için tüm parametrelerde 4. saat verilerinin kontrol grubuna en yakın veriler olduğu tespit edildi.

VCL parametrelerinden Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Çizelge 3.7. ve Şekil 3.6.-3.7.'ye göre değerlendirildiğinde; MK için 24. saat IC50/2 dozu motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 4. saat IC50 dozu motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 0. saat IC50/8 dozu motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 4. saat IC50/8 dozu motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.7.).

MK için 4. saat IC50 dozu verisi kontrol grubundan oldukça farklı (% 42,70 fark) olmakla birlikte diğer saatler ve dozlarda kontrol grubuna yakın bulundu. MX için 0. saatte doz azaldıkça motil verilerinde artış, 4. saatte doz azaldıkça motil verilerinde azalma görüldü (Çizelge 3.7.).

MK ve MX verileri karşılaştırıldığında tüm saatler ve dozlarda MX için ölçülen motil verileri MK verilerinden yüksektir (Çizelge 3.7.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda her iki ilaç için tüm dozlarda taze sperma motile değerlerinin epididimal sperma değerlerinden yüksek olduğu, MK epididimal sperma verilerinin MX epididimal sperma verilerinden yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.8.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuçlar bulundu (Çizelge 3.9.).

Çizelge 3.7. VCL Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

VCL-Motile (Arit.Ort. \pm Std. Hata) ($\mu\text{m/s}$)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	101,18 \pm 4,07	111,21 \pm 2,39	77,03 \pm 2,08	101,18 \pm 4,07	111,21 \pm 2,39	77,03 \pm 2,08
IC50	105,05 \pm 5,70	63,73 \pm 3,66	73,83 \pm 3,63	52,78 \pm 8,64	54,29 \pm 3,43	37,28 \pm 0,33
IC50/2	98,59 \pm 3,62	101,18 \pm 5,27	78,55 \pm 9,25	57,33 \pm 0,91	48,85 \pm 1,05	35,63 \pm 4,98
IC50/4	94,54 \pm 2,50	106,35 \pm 2,02	79,21 \pm 5,86	60,01 \pm 3,42	41,37 \pm 7,64	41,69 \pm 5,94
IC50/8	114,85 \pm 3,18	108,64 \pm 3,75	74,22 \pm 5,90	63,79 \pm 3,00	36,68 \pm 5,37	39,44 \pm 2,52

Çizelge 3.8. VCL Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

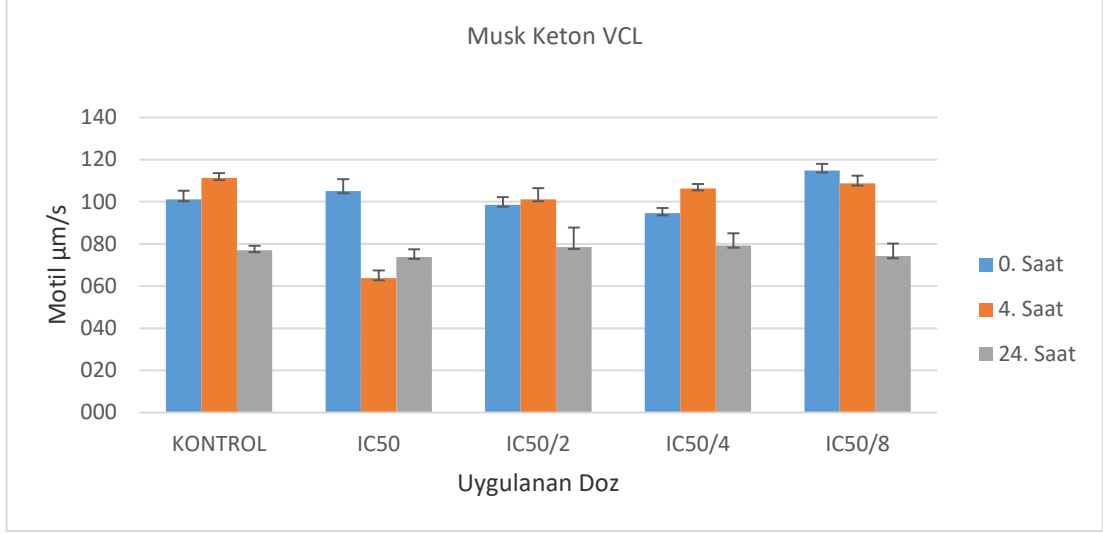
Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	77,03 \pm 2,08	77,03 \pm 2,08	77,03 \pm 2,08	77,03 \pm 2,08
IC50	73,83 \pm 3,63	37,28 \pm 0,33	28,45 \pm 20,97	4,71 \pm 9,42
IC50/2	78,55 \pm 9,25	35,63 \pm 4,98	29,00 \pm 13,69	7,40 \pm 10,25
IC50/4	79,21 \pm 5,86	41,69 \pm 5,94	14,42 \pm 10,08	12,21 \pm 8,38
IC50/8	74,22 \pm 5,90	39,44 \pm 2,52	44,41 \pm 16,69	13,34 \pm 9,01

Çizelge 3.9. VCL Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Doz-İlaç Karşılaştırma.

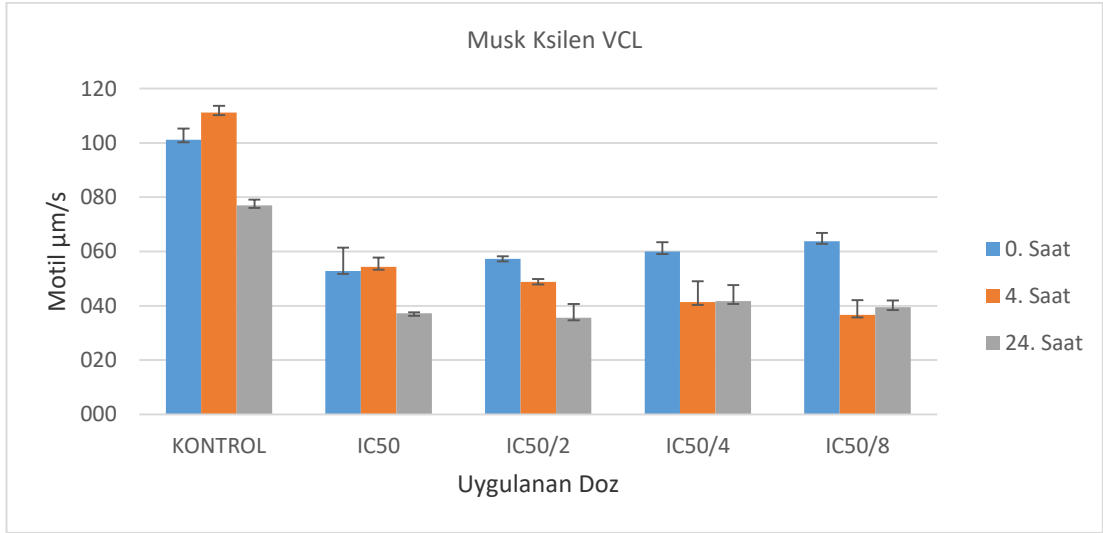
Doz	İlaç		Doz	İlaç	Doz*İlaç
	Musk Keton	Musk Ksilen			
	Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata			
VCL, Curvilinear Velocity, Motile (Eğrisel Hız, Motil) ($\mu\text{m/s}$)	IC50	59,9 \pm 10,45 b,A	32,75 \pm 7,23 b,B		
	IC50/2	68,29 \pm 10,12 b,A	31,32 \pm 7,18 b, B		
	IC50/4	61,78 \pm 13,35 b, A	34,24 \pm 5,94 b, B	<0.001	<0.001
	IC50/8	77,3 \pm 10,55 b, A	33,32 \pm 6,53 b, B		0,012
	Kontrol	94,53 \pm 5 a, A	94,53 \pm 5 a, A		

a, b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı belirtir (p<0,05)

A,B: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı belirtir (p<0,05)



Şekil 3.6. Musk Keton, VCL Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Doz-Saat-VCL Karşılaştırma.



Şekil 3.7. Musk Ksilen, VCL Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) Doz-Saat-VCL Karşılaştırma.

3.2.4. VSL (Doğrusal Hız, Velocity Straight Line) ($\mu\text{m/s}$)

VSL parametreleri (motile, non-progressive, medium progressive, rapid progressive) genel olarak değerlendirildiğinde; MK için dört parametrenin üçünde 4. saat verilerinin kontrol grubuna en yakın veriler olduğu tespit edildi.

VSL parametrelerinden Motile (Motil) (μm^2) Çizelge 3.10. ve Şekil 3.8.-3.9.'a göre değerlendirildiğinde; MK için 0. saat IC50/8 dozu VSL motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 0. saat IC50/4 dozu VSL motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 0. saat IC50 dozu VSL motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 4. saat IC50/8 dozu VSL motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.10.).

MK için IC50/4 dozu verilerinin tüm saatlerde diğer doz verilerinden yüksek olduğu, MX için 0 ve 4. saatte IC50 dozu, 24. saatte IC50/4 dozu verilerinin diğerlerinden yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.10.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda her iki ilaç için tüm dozlarda taze sperma motile değerlerinin epididimal sperma değerlerinden yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.11.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında anlamlı farklar bulunurken, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.12.).

Çizelge 3.10. VSL Motile (Motil) (μm^2) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

VSL-Motile (Arit.Ort. \pm Std. Hata) ($\mu\text{m}/\text{s}$)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	29,06 \pm 4,21	38,47 \pm 0,96	43,18 \pm 1,59	26,79 \pm 4,21	38,47 \pm 0,96	43,18 \pm 1,59
IC50	24,87 \pm 2,60	21,30 \pm 1,41	25,38 \pm 3,42	25,64 \pm 2,26	26,81 \pm 1,71	21,13 \pm 4,26
IC50/2	31,17 \pm 3,76	26,47 \pm 0,56	28,79 \pm 2,19	20,18 \pm 2,69	21,13 \pm 2,67	21,48 \pm 2,12
IC50/4	52,48 \pm 2,26	29,45 \pm 2,43	35,00 \pm 0,81	21,37 \pm 5,47	22,06 \pm 0,77	35,16 \pm 2,03
IC50/8	28,46 \pm 9,07	24,74 \pm 2,43	26,65 \pm 1,71	20,86 \pm 8,71	17,06 \pm 1,13	29,83 \pm 2,40

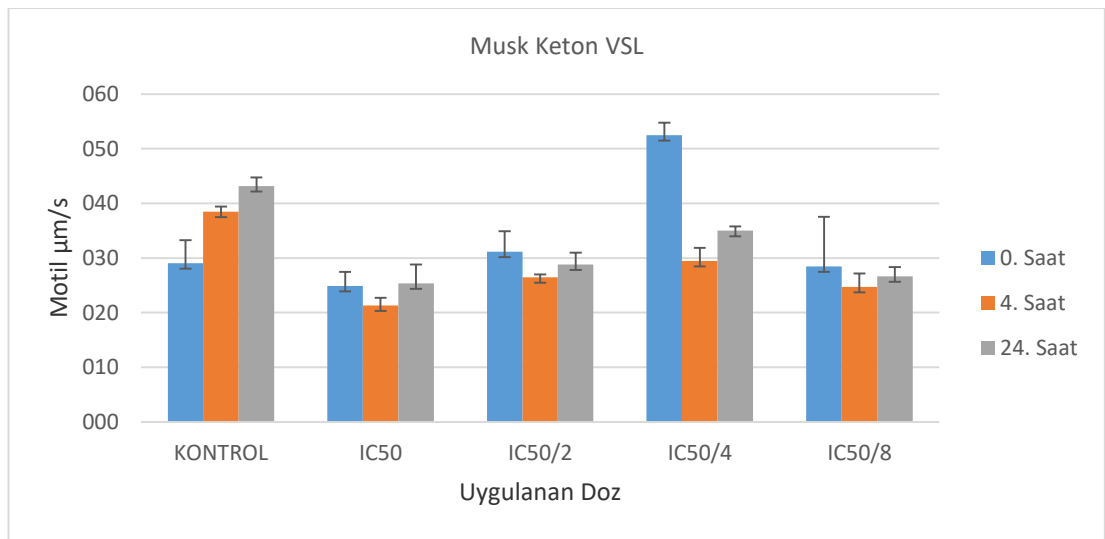
Çizelge 3.11. VSL Motile (Motil) (μm^2) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	43,18±1,59	43,18±1,59	43,18±1,59	43,18±1,59
IC50	25,38±3,42	21,13±4,26	7,60±5,17	2,49±4,98
IC50/2	28,79±2,19	21,48±2,12	7,54±5,03	3,65±4,70
IC50/4	35,00±0,81	35,16±2,03	4,35±4,81	5,11±5,61
IC50/8	26,65±1,71	29,83±2,40	7,71±2,71	4,77±4,16

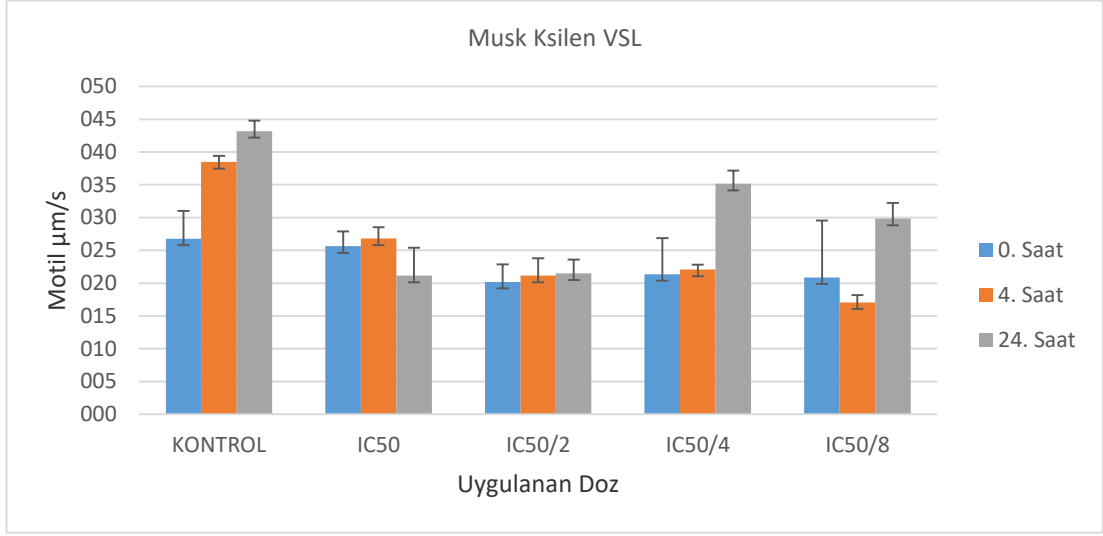
Çizelge 3.12. VSL Motile (Motil) (μm^2) Doz-İlaç Karşılaştırma.

Doz	İlaç		Doz	İlaç	Doz*İlaç
	Musk Keton	Musk Ksilen			
	Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata			
VSL, Velocity Straight Line, Motile (Doğrusal Hız, Motil) ($\mu\text{m/s}$)	IC50	18,08 ± 2,74 b	17,09 ± 3,32 b		
	IC50/2	20,3 ± 3,66 b	14,66 ± 2,79 b		
	IC50/4	25,12 ± 6,27 b	17,76 ± 4 b		
	IC50/8	19,57 ± 3,04 b	17,85 ± 3,29 b	<0.001	0,202 0,85
	Kontrol	36,14 ± 3,19 a	36,14 ± 3,19 a		

a, b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı belirtir ($p < 0,05$)



Şekil 3.8. Musk Keton, VSL Motile (Motil) (μm^2) Doz-Saat-VSL Karşılaştırma.



Şekil 3.9. Musk Ksilen, VSL Motile (Motil) (μm^2) Doz-Saat-VSL Karşılaştırma.

3.2.5. ALH (Başın Lateral Amplitüdü, Amplitude Lateral Head) (μm)

ALH parametreleri (motile, medium progressive, rapid progressive) genel olarak değerlendirildiğinde; ALH tüm parametrelerde MX için kontrol grubuna en yakın dozun IC50/8 olduğu tespit edildi.

ALH parametrelerinden Motile (μm) Çizelge 3.13. ve Şekil 3.10.-3.11.'e göre değerlendirildiğinde; MK için 24. saat IC50 dozu motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 0. saat IC50 dozu motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 24. saat IC50/8 dozu motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 0. saat IC50 dozu motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. (Çizelge 3.13.).

0.ve 4. saatlerde hem MK' da hem MX' de doz azaldıkça motilitede doza bağlı olarak artış gözlemlendi. Bu artış kontrol grubuyla kıyaslandığında en düşük doz olan IC50/8 verileri kontrol grubuna en yakın olarak bulundu (Çizelge 3.13.).

Taze ve epididimal sperma verileri incelendiğinde 24. saatin sonunda her iki ilaç içinde bu veriler arasında anlamlı farklar olduğu, sadece MK uygulanan epididimal spermanın IC50/8 verisinin diğer dozlara göre kontrol grubuna daha yakın olduğu saptandı (Çizelge 3.14.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.15.).

Çizelge 3.13. ALH Motile (Motil) (μm) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

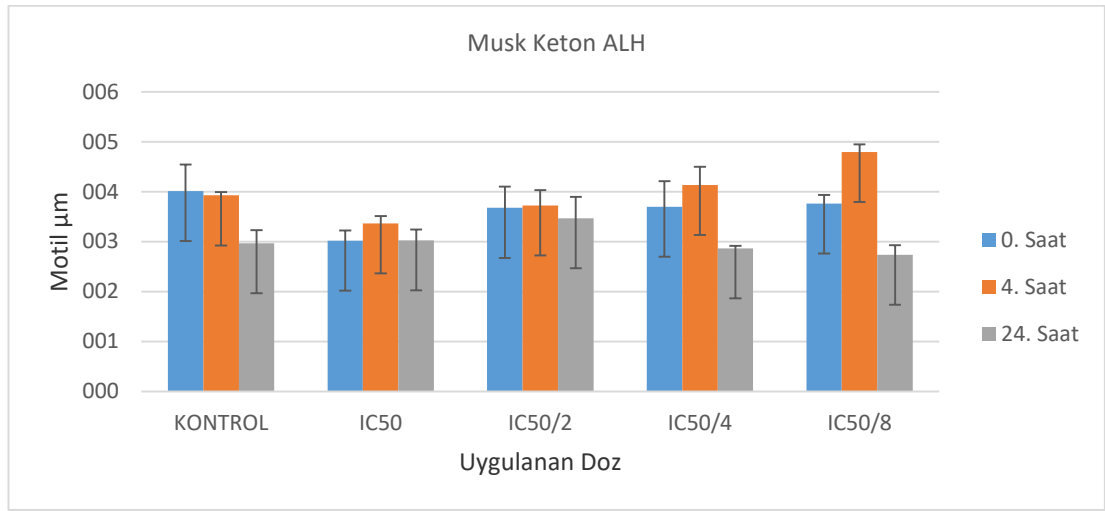
ALH-Motile (Arit.Ort. \pm Std. Hata)(μm)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	4,01 \pm 0,53	3,93 \pm 0,06	2,97 \pm 0,26	4,01 \pm 0,53	3,93 \pm 0,06	2,97 \pm 0,26
IC50	3,02 \pm 0,20	3,37 \pm 0,15	3,03 \pm 0,22	2,99 \pm 0,50	3,82 \pm 0,86	2,93 \pm 0,43
IC50/2	3,68 \pm 0,43	3,73 \pm 0,30	3,47 \pm 0,43	3,51 \pm 0,62	4,13 \pm 0,78	3,63 \pm 0,30
IC50/4	3,70 \pm 0,51	4,14 \pm 0,36	2,87 \pm 0,05	3,62 \pm 0,27	4,31 \pm 0,40	3,17 \pm 0,22
IC50/8	3,76 \pm 0,17	4,79 \pm 0,16	2,74 \pm 0,19	3,90 \pm 0,40	3,49 \pm 0,11	2,96 \pm 0,49

Çizelge 3.14. ALH Motile (Motil) (μm) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

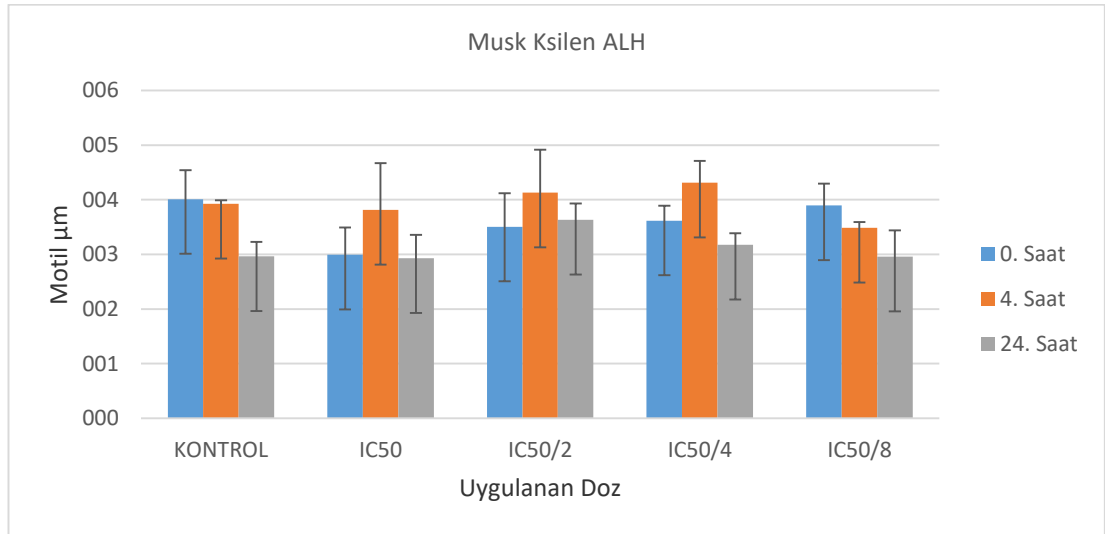
Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	2,97 \pm 0,26	2,97 \pm 0,26	2,97 \pm 0,26	2,97 \pm 0,26
IC50	3,03 \pm 0,22	2,93 \pm 0,43	1,35 \pm 1,00	0,38 \pm 0,75
IC50/2	3,47 \pm 0,43	3,63 \pm 0,30	1,40 \pm 0,64	0,59 \pm 0,76
IC50/4	2,87 \pm 0,05	3,17 \pm 0,22	0,80 \pm 0,55	0,96 \pm 0,68
IC50/8	2,74 \pm 0,19	2,96 \pm 0,49	2,01 \pm 0,73	0,84 \pm 0,58

Çizelge 3.15. ALH Motile (Motil) (μm) Doz-İlaç Karşılaştırma.

	Doz	İlaç		P		
		Musk Keton	Musk Ksilen	Doz	İlaç	Doz*İlaç
		Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata			
ALH, Amplitude Lateral Head, Motile (Başın Lateral Amplitüdü, Motil) (μm)	IC50	2,48 \pm 0,32	2,24 \pm 0,44	0,066	0,747	0,824
	IC50/2	2,89 \pm 0,34	2,92 \pm 0,41			
	IC50/4	2,57 \pm 0,46	2,91 \pm 0,38			
	IC50/8	3,13 \pm 0,35	2,58 \pm 0,41			
	Kontrol	3,69 \pm 0,22	3,69 \pm 0,22			



Şekil 3.10. Musk Keton, ALH Motile (Motil) (μm) Doz-Saat-ALH Karşılaştırma.



Şekil 3.11. Musk Ksilen, ALH Motile (Motil) (μm) Doz-Saat-ALH Karşılaştırma.

3.2.6. BCF (Çapraz Geçiş Frekans Ritmi, Beat Cross Frequency) (Hz)

BCF parametreleri (motile, medium progressive, rapid progressive) genel olarak değerlendirildiğinde; MK için üç parametrede de 0. saat IC50/2 verilerinin kontrol grubuna en yakın veriler olduğu tespit edildi.

BCF parametrelerinden Motile (Motil) (Hz) Çizelge 3.16. ve Şekil 3.12.-3.13.'e göre değerlendirildiğinde; MK için 0. saat IC50/2 dozu motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 0. saat IC50/8 dozu motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 0. saat IC50 dozu motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 4. saat IC50/2 dozu motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.16.).

Her iki ilaç için de 4. ve 24. saat verileri tüm dozlarda kontrol grubundan düşük bulundu (Çizelge 3.16.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda her iki ilaç için tüm dozlarda taze sperma motile değerlerinin epididimal sperma değerlerinden yüksek olduğu, MK epididimal sperma değerlerinin MX epididimal sperma değerlerinden yüksek olduğu saptandı (Çizelge 3.17.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında anlamlı farklar varken, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.18.).

Çizelge 3.16. BCF Motile (Motil) (Hz) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

BCF-Motile (Arit.Ort.± Std. Hata) (Hz)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	7,18±0,23	10,71±0,46	12,34±0,26	7,18±0,23	10,71±0,46	12,34±0,26
IC50	5,99±0,78	5,47±0,57	8,79±0,45	7,42±0,17	7,56±0,34	6,38±0,54
IC50/2	6,84±0,77	6,11±0,95	5,70±0,51	8,38±0,33	4,44±0,17	5,70±0,57
IC50/4	11,19±0,02	8,54±0,04	9,37±0,45	9,36±0,12	4,55±0,54	10,08±0,3
IC50/8	11,45±0,81	5,79±1,00	8,35±0,17	5,86±0,20	7,24±0,14	9,33±0,28

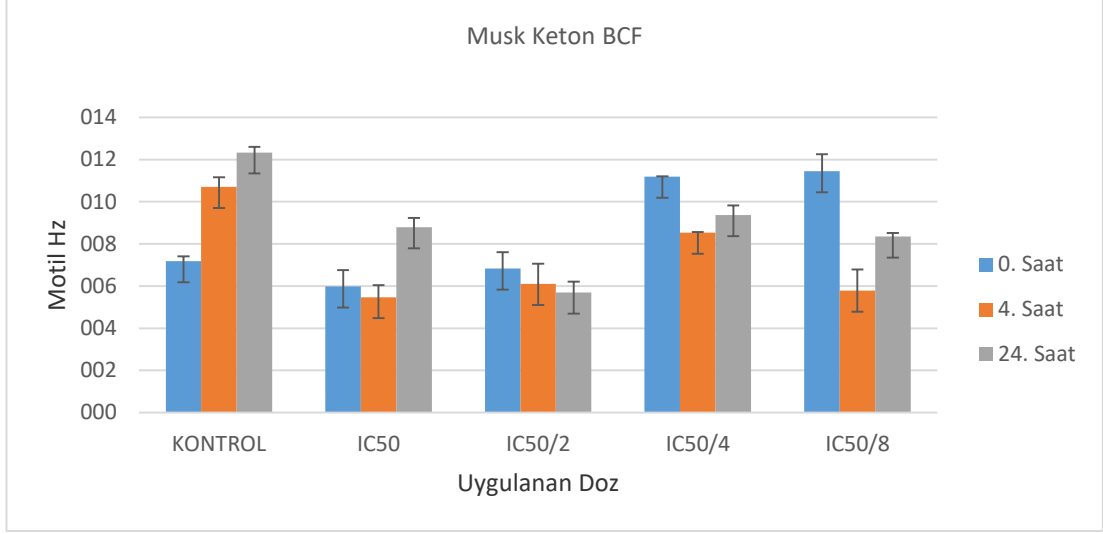
Çizelge 3.17. BCF Motile (Motil) (Hz) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	12,34±0,26	12,34±0,26	12,34±0,26	12,34±0,26
IC50	8,79±0,45	6,38±0,54	1,86±1,36	0,89±1,77
IC50/2	5,7±0,51	5,7±0,57	2,39±1,82	1,17±1,87
IC50/4	9,37±0,45	10,08±0,3	1,25±1,5	1,15±0,95
IC50/8	8,35±0,17	9,33±0,28	2,24±2,35	1,17±1,17

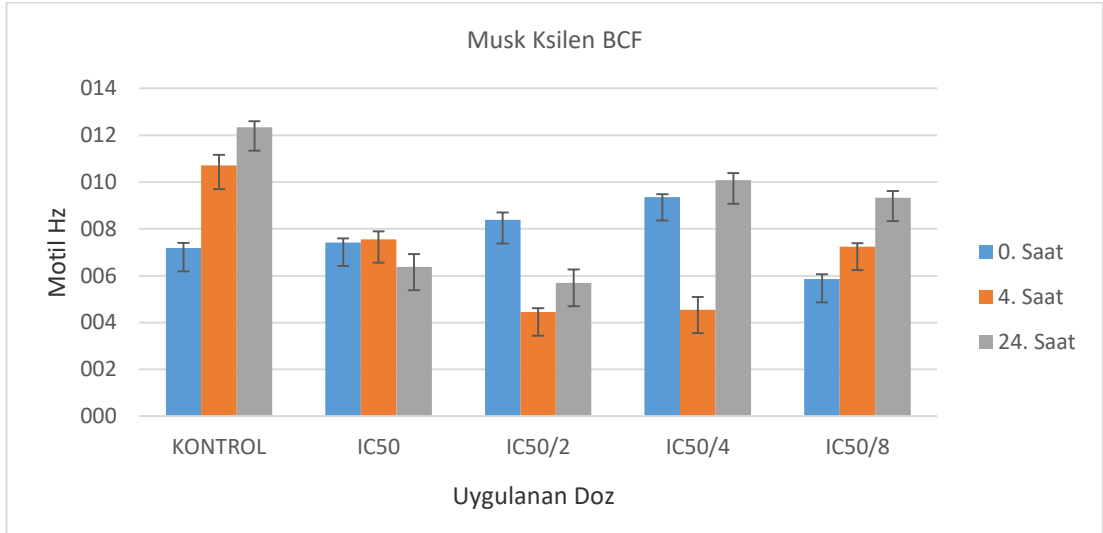
Çizelge 3.18. BCF Motile (Motil) (Hz) Doz-İlaç Karşılaştırma.

	Doz	İlaç		Doz	İlaç	Doz*İlaç	
		Musk Keton	Musk Ksilen				P
		Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata				
BCF, Beat Cross Frequency, Motile (Çapraz Geçiş Frekans Ritmi, Motil) (Hz)	IC50	6,41 ± 1,13 b	7,23 ± 1,58 b				
	IC50/2	7,17 ± 1,74 b	6,34 ± 1,5 b				
	IC50/4	7,44 ± 2,06 b	7,01 ± 1,79 b	0,001	0,939	0,98	
	IC50/8	7,47 ± 2,11 b	8,31 ± 1,9 b				
	Kontrol	13,89 ± 0,41 a	13,89 ± 0,41 a				

a, b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı belirtir (p<0,05)



Şekil 3.12. Musk Keton, BCF Motile (Motil) (Hz) Doz-Saat-BCF Karşılaştırma.



Şekil 3.13. Musk Ksilen, BCF Motile (Motil) (Hz) Doz-Saat-BCF Karşılaştırma.

3.2.7. HYP (Hiperaktivite, Hyperactivity) ($HYP = VCL \times ALHX$)

HYP parametreleri (total, % motile, % total, M/mL, M/sample) genel olarak değerlendirildiğinde; MX için beş parametrenin dördünde IC50 verilerinin kontrol grubuna en yakın, tüm parametrelerde 24. saat IC50/2 verilerinin kontrol grubuna en uzak veriler olduğu tespit edildi.

HYP parametrelerinden Total (Toplam) Çizelge 3.19. ve Şekil 3.14.-3.15.'e göre değerlendirildiğinde; MK için 0. saat IC50/8 dozu HYP total değerinin kontrol grubuna en yakın, 24. saat IC50 dozu HYP total değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 24. saat IC50 dozu HYP total değerinin kontrol grubuna en yakın, 24. saat IC50/2 dozu HYP total değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.19.).

Hem MK hem de MX için 24. saat verileri 0. ve 4. saat verilerinden oldukça düşüktür. MK ve MX için 4. saat verilerinin total hiperaktivitede diğer saatlere ve kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.19.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda MK için epididimal sperma IC50/8 dozunun taze sperma dozundan yüksek olduğu, diğer dozlarda taze sperma dozu verilerinden düşük olduğu, MX için ise epididimal sperma değerlerinin tümünün sıfır olduğu bulundu (Çizelge 3.20.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.21.).

Çizelge 3.19. HYP Total (Toplam) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

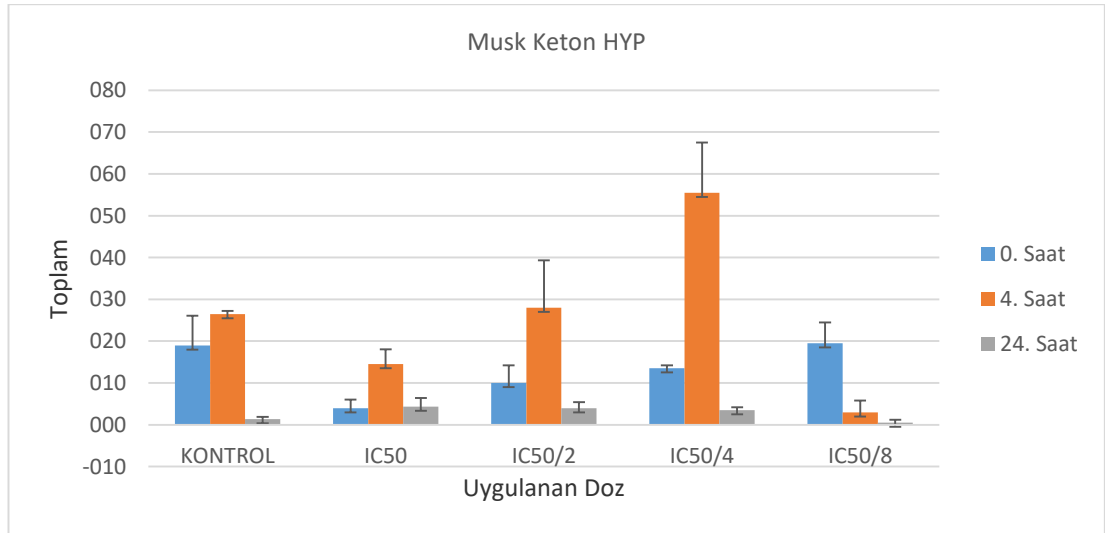
HYP-Total (Arit.Ort.± Std. Hata)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	19,00±7,07	26,50±0,71	1,33±0,58	19,00±7,07	26,50±0,71	1,33±0,58
IC50	4,00±2,00	14,50±3,54	4,33±2,08	6,67±5,03	19,00±4,24	1,67±2,89
IC50/2	10,00±4,24	28,00±11,31	4,00±1,41	12,00±7,07	11,50±6,36	6,00±5,48
IC50/4	13,50±0,71	55,50±12,02	3,50±0,71	10,33±5,51	54,50±2,12	2,33±2,08
IC50/8	19,50±4,95	3,00±2,83	0,50±0,71	14,00±7,07	15,50±2,12	2,25±4,50

Çizelge 3.20. HYP Total (Toplam) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

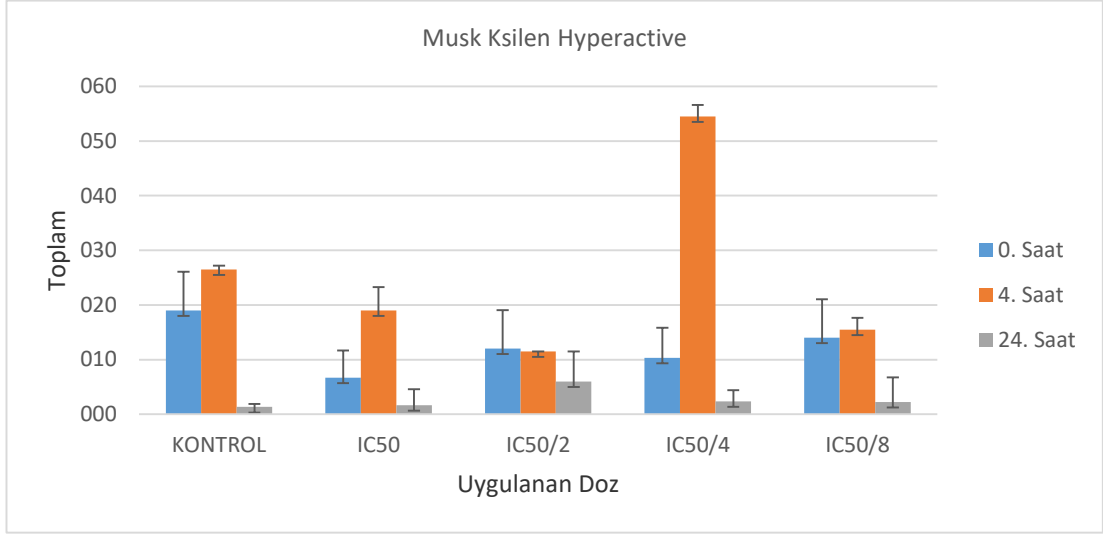
Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	1,33±0,58	1,33±0,58	1,33±0,58	1,33±0,58
IC50	4,33±2,08	1,67±2,89	0,50±0,58	0,00±0,00
IC50/2	4,00±1,41	6,00±5,48	0,25±0,50	0,00±0,00
IC50/4	3,50±0,71	2,33±2,08	0,00±0,00	0,00±0,00
IC50/8	0,50±0,71	2,25±4,50	0,75±1,50	0,00±0,00

Çizelge 3.21. HYP Total (Toplam) Doz-İlaç Karşılaştırma.

Doz	İlaç		Doz	P		
	Musk Keton	Musk Ksilen		İlaç	Doz*İlaç	
	Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata				
HYP, Hyperactivity, Total (Hiperaktivite, Toplam)	IC50	4,67 ± 1,49	5,25 ± 2,16	0,067	0,815	0,984
	IC50/2	8,5 ± 3,69	5,92 ± 1,86			
	IC50/4	14,5 ± 7,14	12,45 ± 6,43			
	IC50/8	4,9 ± 2,54	6 ± 2,03			
	Kontrol	13,57 ± 4,61	13,57 ± 4,61			



Şekil 3.14. Musk Keton, HYP Total (Toplam) Doz-Saat-HYP Karşılaştırma.



Şekil 3.15. Musk Ksilen, HYP Total (Toplam) Doz-Saat-HYP Karşılaştırma.

3.2.8. LIN (Doğrusallık, Linearity) ($LIN = VSL/VCL \times 100$) (%)

LIN parametreleri (motile, non-progressive, medium progressive, rapid progressive) genel olarak değerlendirildiğinde; MX için tüm parametrelerde 0. saat IC50/4 verilerinin kontrol grubuna en uzak veriler olduğu tespit edildi.

LIN parametrelerinden Motile (Motil) (%) Çizelge 3.22. ve Şekil 3.16.-3.17.'ye göre değerlendirildiğinde; MK için 24. saat IC50 dozu LIN motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 0. saat IC50/2 dozu LIN motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 24. saat IC50/2 dozu LIN motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 0. saat IC50/4 dozu LIN motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.22.).

0. Saatte MX IC50/4 ve IC50/8 dozlarının verilerinin MK 'dan daha yüksek olduğu görüldü (Çizelge 3.22.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda her iki ilaç için tüm dozlarda taze sperma değerlerinin epididimal sperma değerlerinden yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.23.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.24.).

Çizelge 3.22. LIN Motile (Motil) (%) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

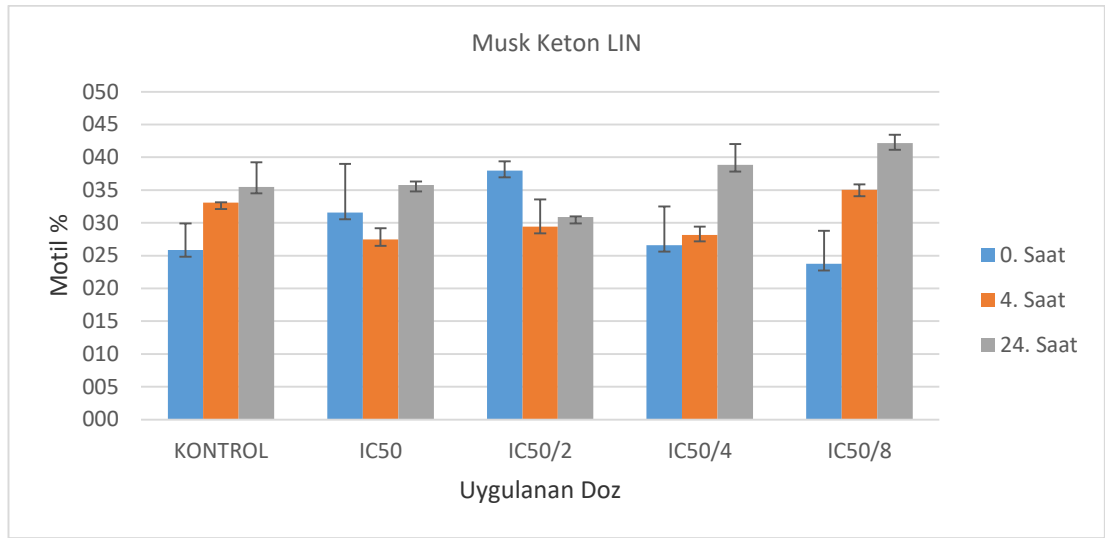
LIN-Motile (Arit.Ort.± Std. Hata) (%)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	25,84±4,09	33,10±0,05	35,49±3,75	25,84±4,09	33,10±0,05	35,49±3,75
IC50	31,55±7,44	27,49±1,67	35,79±0,51	31,06±7,20	26,74±3,22	33,70±1,72
IC50/2	37,96±1,43	29,41±4,15	30,89±0,08	29,63±2,01	29,84±2,21	36,31±5,48
IC50/4	26,61±5,87	28,16±1,27	38,83±3,19	42,60±3,73	26,48±1,19	31,97±2,24
IC50/8	23,74±5,05	35,06±0,80	42,16±1,28	41,85±5,68	31,34±3,29	41,84±0,65

Çizelge 3.23. LIN Motile (Motil) (%) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

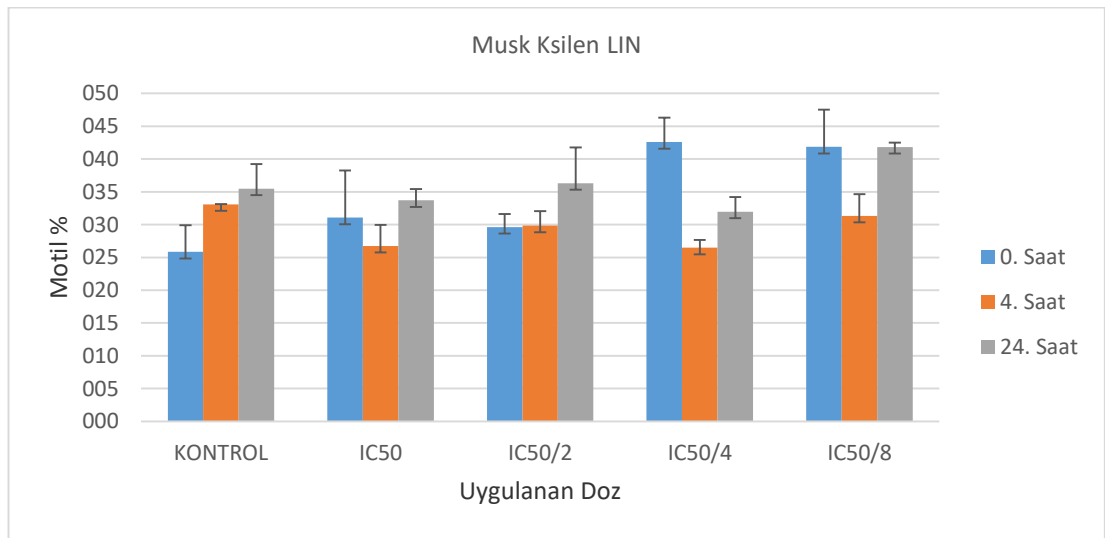
Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	35,49±3,75	35,49±3,75	35,49±3,75	35,49±3,75
IC50	35,79±0,51	33,70±1,72	26,49±18,14	7,27±14,54
IC50/2	30,89±0,08	36,31±5,48	26,76±14,24	14,59±17,22
IC50/4	38,83±3,19	31,97±2,24	21,79±23,87	18,78±20,03
IC50/8	42,16±1,28	41,84±0,65	23,75±18,46	20,01±15,79

Çizelge 3.24. LIN Motile (Motil) (%) Doz-İlaç Karşılaştırma.

	Doz	İlaç		P		
		Musk Keton	Musk Ksilen	Doz	İlaç	Doz*İlaç
		Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata			
LIN, Linearity, Motile (Doğrusallık, Motil) (%)	IC50	29,56 ± 3,07	22,34 ± 4,46	0,648	0,41	0,748
	IC50/2	30,27 ± 2,72	25,43 ± 3,97			
	IC50/4	27,43 ± 4,88	28,11 ± 4,31			
	IC50/8	30,18 ± 3,88	31,06 ± 3,66			
	Kontrol	31,48 ± 2,1	31,48 ± 2,1			



Şekil 3.16. Musk Keton, LIN Motile (Motil) (%) Doz-Saat-LIN Karşılaştırma.



Şekil 3.17. Musk Ksilen, LIN Motile (Motil) (%) Doz-Saat-LIN Karşılaştırma.

3.2.9. MP (Mukus Penetrasyonu, Mucus Penetration)

MP parametreleri (total, % motile, % total, M/mL, M/sample) genel olarak değerlendirildiğinde; MK için tüm parametrelerde 0. saat verilerinin kontrol grubuna en uzak, MX için beş parametreden dördünde IC50/2 verilerinin kontrol grubuna en uzak veriler olduğu tespit edildi.

MP parametrelerinden Total (Toplam) Çizelge 3.25. ve Şekil 3.18.-3.19.'a göre değerlendirildiğinde; MK için 4. saat IC50 dozu total mukus penetrasyonu değerinin kontrol grubuna en yakın, 0. saat IC50/2 dozu total mukus penetrasyonu değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 0. saat IC50/2 dozu total mukus penetrasyonu değerinin kontrol grubuna en yakın, 24. saat IC50/2 dozu total mukus penetrasyonu değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.25.).

MK için 24. saat sonrasında doz azaldıkça total mukus penetrasyonu verilerinde artış gözlemlendi (Çizelge 3.25.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda her iki ilaç için tüm dozlarda taze sperma değerlerinin epididimal sperma değerlerinden yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.26.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.27.).

Çizelge 3.25. MP Total (Toplam) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

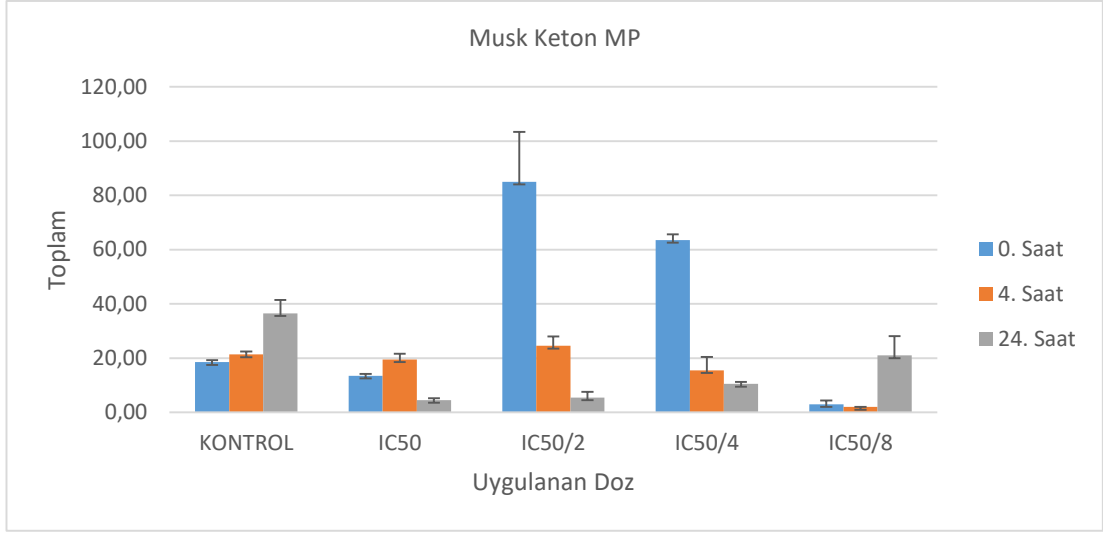
MP-Total (Arit.Ort.± Std. Hata)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	18,50±0,71	21,33±1,15	36,50±4,95	18,50±4,01	21,33±1,93	36,50±0,82
IC50	13,50±0,71	19,50±2,12	4,50±0,71	21,50±6,36	12,33±3,21	48,50±7,78
IC50/2	85,00±18,38	24,50±3,54	5,50±2,12	19,00±12,73	5,33±3,51	4,67±3,79
IC50/4	63,50±2,12	15,50±4,95	10,50±0,71	25,50±3,54	9,33±3,21	13,00±2,83
IC50/8	3,00±1,41	2,00±0,00	21,00±7,07	27,50±7,78	12,00±2,65	20,00±13,23

Çizelge 3.26. MP Total (Toplam) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

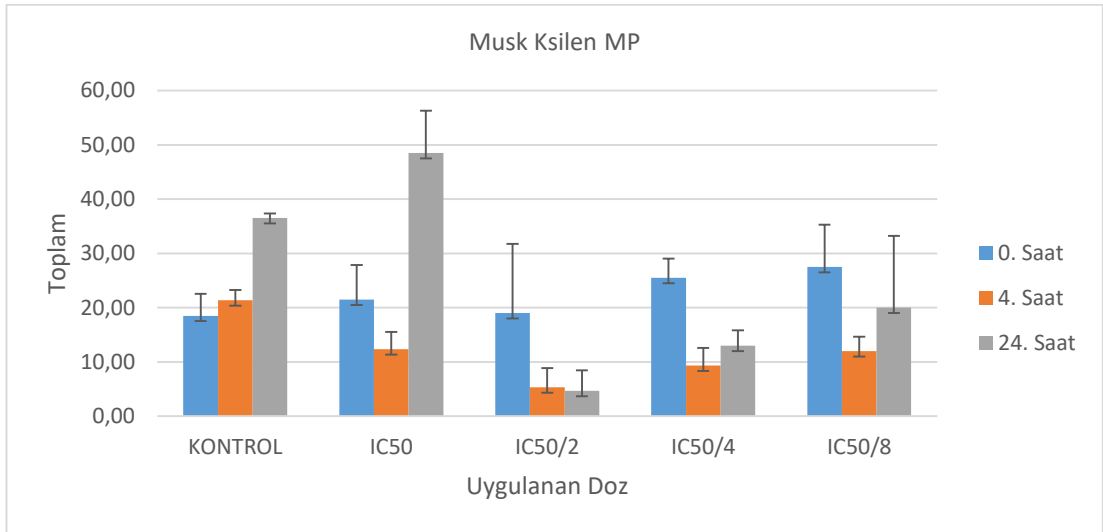
Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	36,50±4,95	36,50±0,82	36,50±4,95	36,50±0,82
IC50	4,50±0,71	48,50±7,78	0,75±0,50	0,00±0,00
IC50/2	5,50±2,12	4,67±3,79	1,25±1,89	0,25±0,50
IC50/4	10,5±0,71	13,00±2,83	0,00±0,00	0,00±0,00
IC50/8	21,00±7,07	20,00±13,23	0,25±0,50	0,00±0,00

Çizelge 3.27. MP Total (Toplam) Doz-İlaç Karşılaştırma.

	Doz	İlaç		P		
		Musk Keton	Musk Ksilen	Doz	İlaç	Doz*İlaç
		Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata			
MP, Mucus Penetration, Total (Mucus Penetrasyonu, Toplam)	IC50	7,8 ± 2,51	16,09 ± 5,53			
	IC50/2	23,5 ± 10,83	5,75 ± 2,29			
	IC50/4	17,9 ± 7,88	9,55 ± 2,92	0,089	0,535	0,06
	IC50/8	5,3 ± 2,75	12,58 ± 3,56			
	Kontrol	24,86 ± 3,15	24,86 ± 3,15			



Şekil 3.18. Musk Keton, MP Total (Toplam) Doz-Saat-MP Karşılaştırma.



Şekil 3.19. Musk Ksilen, MP Total (Toplam) Doz-Saat-MP Karşılaştırma.

3.2.10. WOB (Salınım, Wobble) ($WOB = VAP/VCL \times 100$) (%)

WOB parametreleri (motile, non-progressive, medium progressive, rapid progressive) genel olarak değerlendirildiğinde; 4 farklı parametre arasında kontrol grubuna yakınlık ve uzaklık anlamında bir ilişki kurulamamış, parametreler için ayrı ayrı değerlendirmeler yapılmıştır.

WOB parametrelerinden Motile (Motil) (%) Çizelge 3.28. ve Şekil 3.20.-3.21.'e göre değerlendirildiğinde; MK için 0. saat IC50/2 dozu WOB motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 24. saat IC50/2 dozu WOB motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 0. saat IC50/4 dozu WOB motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 24. saat IC50 dozu WOB motil kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.28.).

MX için epididimal sperma değerlerinde doz azaldıkça % motilde artış gözlemlendi. MK ve MX değerleri karşılaştırıldığında birbirlerine yakın değerler bulundu (Çizelge 3.28.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda taze sperma değerleri ile epididimal sperma değerlerinin MK için yakın, MX için uzak olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.29.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.30.).

Çizelge 3.28. WOB Motile (Motil) (%) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

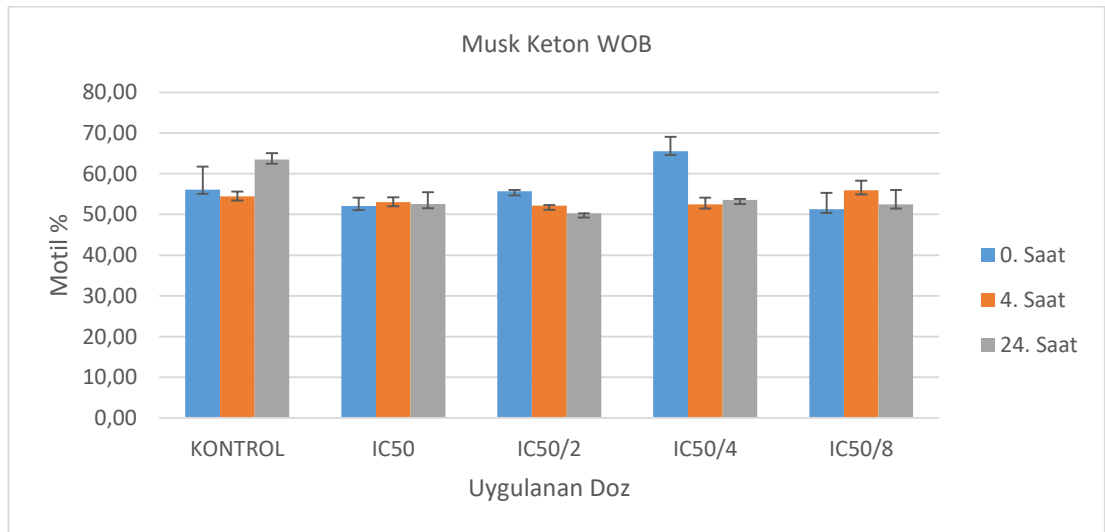
WOB-Motile (Arit.Ort.± Std. Hata) (%)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	56,10±5,69	54,41±1,20	63,50±1,54	56,10±5,69	54,41±1,20	63,50±1,54
IC50	52,08±2,02	53,02±1,22	52,56±2,91	53,34±0,71	56,27±3,55	52,91±0,40
IC50/2	55,69±0,30	52,18±0,18	50,26±0,03	57,28±5,75	49,59±1,73	53,78±0,81
IC50/4	65,57±3,49	52,45±1,71	53,54±0,30	56,55±5,49	49,01±0,78	53,78±0,01
IC50/8	51,33±3,98	55,95±2,34	52,48±3,57	53,14±5,04	50,78±0,82	56,25±3,74

Çizelge 3.29. WOB Motile (Motil) (%) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

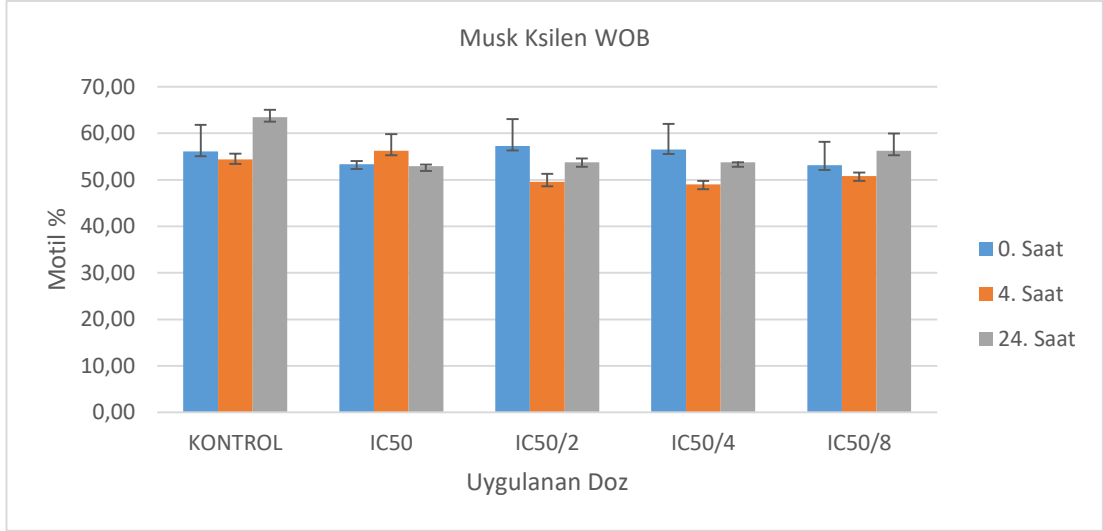
Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	63,50±1,54	63,50±1,54	63,50±1,54	63,50±1,54
IC50	52,56±2,91	52,91±0,40	47,51±31,72	13,56±27,11
IC50/2	50,26±0,03	53,78±0,81	60,86±9,36	26,90±32,50
IC50/4	53,54±0,30	53,78±0,01	52,77±35,29	42,99±30,12
IC50/8	52,48±3,57	56,25±3,74	58,97±19,08	56,37±39,33

Çizelge 3.30. WOB Motile (Motil) (%) Doz-İlaç Karşılaştırma.

Doz	İlaç		P			
	Musk Keton	Musk Ksilen	Doz	İlaç	Doz*İlaç	
	Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata				
WOB, Wobble, Motile (Salımm, Motil) (%)	IC50	50,68 ± 5,31	39,59 ± 7,69	0,276	0,121	0,812
	IC50/2	55,97 ± 2,24	44,65 ± 6,29			
	IC50/4	55,42 ± 6,68	49,74 ± 5,34			
	IC50/8	55,54 ± 3,69	54,23 ± 6,57			
	Kontrol	58 ± 2,08	58 ± 2,08			



Şekil 3.20. Musk Keton, WOB Motile (Motil) (%) Doz-Saat-WOB Karşılaştırma.



Şekil 3.21. Musk Ksilen, WOB Motile (Motil) (%) Doz-Saat-WOB Karşılaştırma.

3.2.11. PR (Progresivite, Progression) (%)

PR parametreleri (progressive, non-progressive, immotile) genel olarak değerlendirildiğinde; MX için tüm parametrelerde 0. saat verilerinin kontrol grubuna en yakın veriler olduğu tespit edildi.

PR parametrelerinden Progressive (Progresif) (%) Çizelge 3.31. ve Şekil 3.22.-3.23.'e göre değerlendirildiğinde; MK için 24. saat IC50/8 dozu % progresif değerinin kontrol grubuna en yakın, 0. saat IC50/2 dozu % progresif değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 0. saat IC50 dozu % progresif değerinin kontrol grubuna en yakın, 24. saat IC50 dozu % progresif kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.31.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda her iki ilaç için tüm dozlarda taze sperma değerlerinin epididimal sperma değerlerinden yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.32.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.33.).

Çizelge 3.31. PR Progressive (Progresif) (%) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

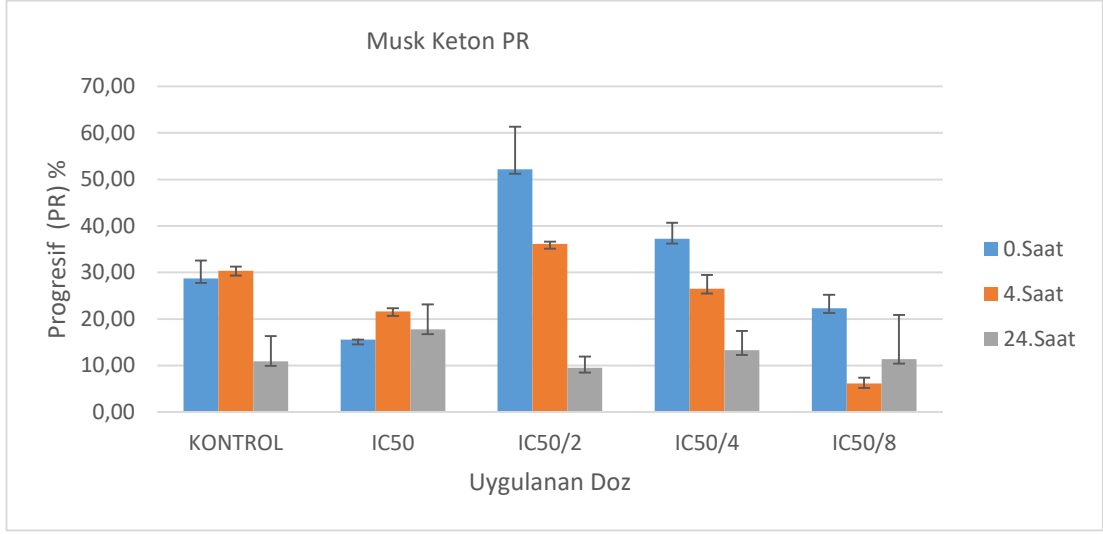
PR-Progressive (Arit.Ort.± Std. Hata) (%)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	28,71±3,87	30,33±0,89	10,91±5,44	28,71±3,87	30,33±0,89	10,91±5,44
IC50	15,56±0,01	21,65±0,66	17,73±5,39	32,10±6,51	11,00±4,35	30,56±5,06
IC50/2	52,19±9,11	36,13±0,46	9,48±2,42	17,49±6,38	13,92±4,16	16,36±6,30
IC50/4	37,24±3,47	26,49±3,00	13,27±4,16	21,98±0,74	23,09±8,00	12,28±1,49
IC50/8	22,28±2,94	6,16±1,21	11,40±9,45	32,62±1,29	24,28±2,33	14,40±4,45

Çizelge 3.32. PR Progressive (Progresif) (%) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

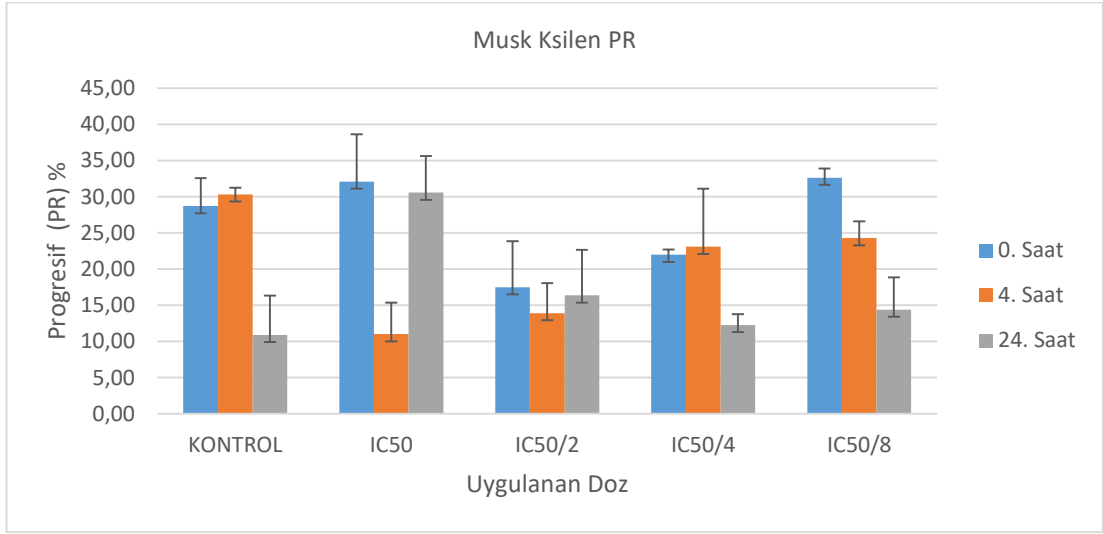
Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	10,91±5,44	10,91±5,44	10,91±5,44	10,91±5,44
IC50	17,73±5,39	30,56±5,06	3,31±3,03	2,05±4,10
IC50/2	9,48±2,42	16,36±6,30	3,73±6,94	1,85±3,70
IC50/4	13,27±4,16	12,28±1,49	0,00±0,00	1,51±2,53
IC50/8	11,40±9,45	14,40±4,45	2,26±3,86	0,41±0,82

Çizelge 3.33. PR Progressive (Progresif) (%) Doz-İlaç Karşılaştırma.

Doz	İlaç		P			
	Musk Keton	Musk Ksilen	Doz	İlaç	Doz*İlaç	
	Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata				
PR, Progression, Progressive (Progresivite, Progresif) (%)	IC50	12,31 ± 2,66	15,55 ± 4,6	0,075	0,707	0,292
	IC50/2	21,4 ± 6,68	10,29 ± 2,64			
	IC50/4	14,81 ± 4,98	12,07 ± 3,29			
	IC50/8	8,87 ± 2,8	14,42 ± 4,31			
	Kontrol	24,09 ± 3,62	24,09 ± 3,62			



Şekil 3.22. Musk Keton, PR Progressive (Progresif) (%) Doz-Saat-PR Karşılaştırma.



Şekil 3.23. Musk Ksilen, PR Progressive (Progresif) (%) Doz-Saat-PR Karşılaştırma.

3.2.12. STR (Doğrusallık, Straightness) ($STR = VSL/VAP \times 100$) (μm)

STR parametreleri (motile, non-progressive, medium progressive, rapid progressive) genel olarak değerlendirildiğinde; MK için dört parametrenin üçünde 0. saat verilerinin kontrol grubuna en uzak, MX için dört parametrenin üçünde 4. saat

verilerinin kontrol grubuna en yakın veriler olduğu tespit edildi.

STR parametrelerinden Motile (Motil) (%) Çizelge 3.34. ve Şekil 3.24.-3.25.'e göre değerlendirildiğinde; MK için 4. saat IC50/2 dozu STR motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 0. saat IC50/8 dozu STR motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü. MX için 4. saat IC50/8 dozu STR motil değerinin kontrol grubuna en yakın, 0. saat IC50 dozu STR motil değerinin kontrol grubuna en uzak değer olduğu görüldü (Çizelge 3.34.).

Taze sperma ile epididimal sperma karşılaştırmasında 24. saatin sonunda her iki ilaç için tüm dozlarda taze sperma değerlerinin epididimal sperma değerlerinden yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 3.35.).

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.36.).

Çizelge 3.34. STR Motile (Motil) (%) Musk Keton-Musk Ksilen Doz-Saat Karşılaştırma.

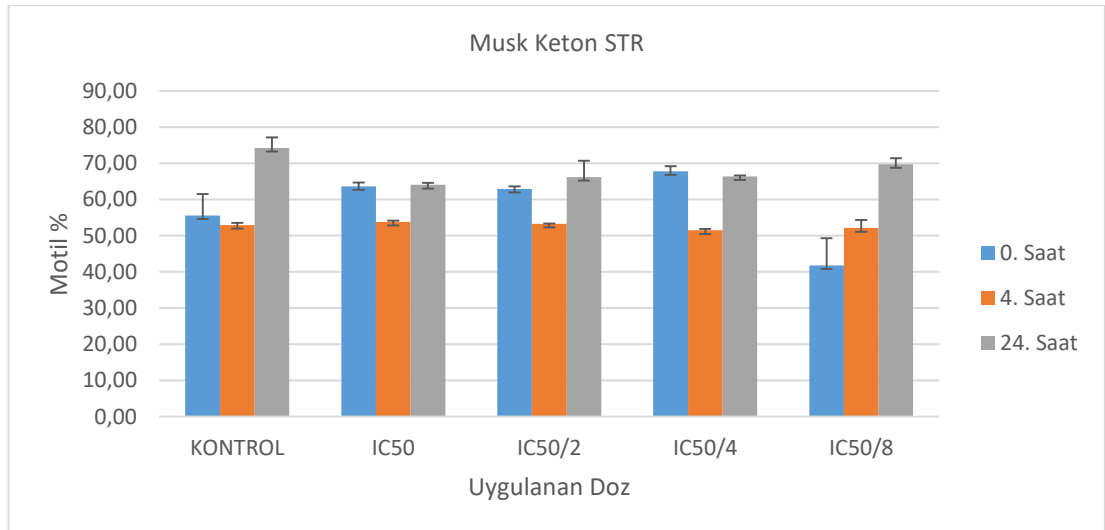
STR-Motile (Arit.Ort.± Std. Hata) (%)						
Doz	Musk Keton			Musk Ksilen		
	0. Saat	4. Saat	24. Saat	0. Saat	4. Saat	24. Saat
Kontrol	55,61±5,93	52,94±0,57	74,30±2,88	55,01±5,93	57,72±0,57	81,73±2,88
IC50	63,65±1,02	53,85±0,29	64,05±0,62	69,82±0,42	54,69±1,01	61,64±0,86
IC50/2	62,94±0,71	53,30±0,08	66,24±4,51	61,94±1,93	50,49±1,52	61,23±6,30
IC50/4	67,82±1,36	51,50±0,34	66,42±0,21	62,31±1,59	50,94±3,17	62,41±3,24
IC50/8	41,82±7,53	52,10±2,26	69,78±1,67	69,75±9,37	55,64±5,95	64,10±2,16

Çizelge 3.35. STR Motile (Motil) (%) Epididimal Sperma ile Taze Sperma Karşılaştırma.

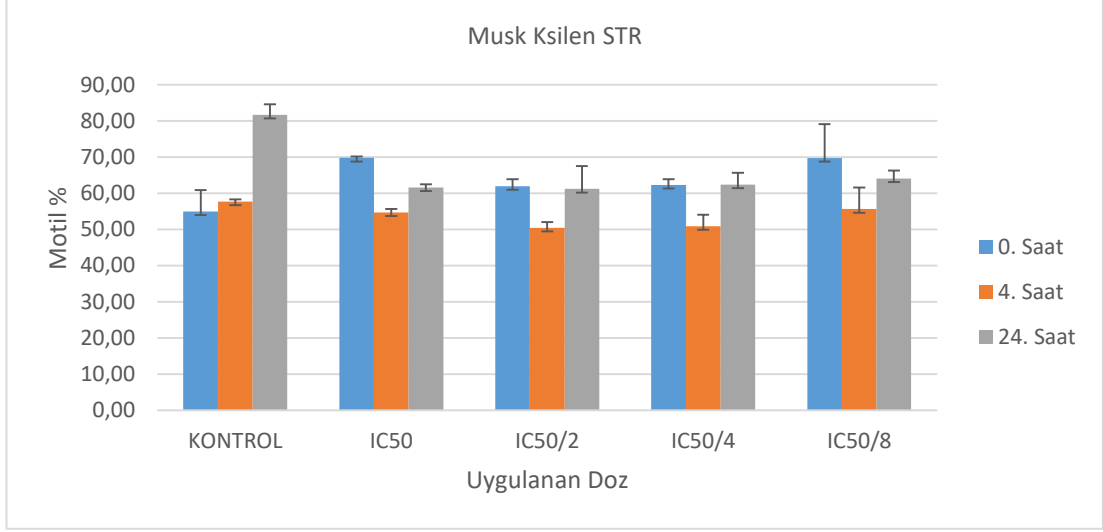
Doz	Taze Sperma		Epididimal Sperma	
	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat	Musk Keton 24. Saat	Musk Ksilen 24. Saat
Kontrol	81,73±2,88	81,73±2,88	81,73±2,88	81,73±2,88
IC50	64,05±0,62	61,64±0,86	35,54±23,92	11,09±22,18
IC50/2	66,24±4,51	61,23±6,30	46,10±21,21	25,03±29,13
IC50/4	66,42±0,21	62,41±3,24	31,57±32,91	29,46±26,32
IC50/8	69,78±1,67	64,10±2,16	33,89±18,89	24,91±20,51

Çizelge 3.36. STR Motile (Motil) (%) Doz-İlaç Karşılaştırma.

Doz	İlaç		Doz	İlaç	Doz*İlaç	
	Musk Keton	Musk Ksilen				
	Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata				
STR, Straightness, Motile (Doğrusallık, Motil) (%)	IC50	50,52 ± 6,1	42,85 ± 8,58	0,178	0,542	0,777
	IC50/2	55,66 ± 4,4	46,3 ± 7,15			
	IC50/4	49,93 ± 7,26	48,32 ± 6,42			
	IC50/8	46,29 ± 5,74	51,69 ± 5,71			
	Kontrol	64,82 ± 5,5	64,82 ± 5,5			



Şekil 3.24. Musk Keton, STR Motile (Motil) (%) Doz-Saat-STR Karşılaştırma.



Şekil 3.25. Musk Ksilen, STR Motile (Motil) (%) Doz-Saat-STR Karşılaştırma.

3.2.13. Bazı Kinetik CASA Bulgularının Değerlendirilmesi

İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak yapılan değerlendirmelerden (Çizelge 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33 ve 36) ayrı olarak sadece 24. saat verilerine göre değerlendirme yapıldı. Buna göre 5 farklı dozda (IC50, IC50/2, IC50/4, IC50/8, kontrol) uygulanmış musk keton ve musk ksilen için 12 farklı parametre (Total Motilite, STR, WOB, Mukus Penetrasyonu (% Total), Mukus Penetrasyonu (% Motil), LIN, VSL, Hiperaktivite, VCL, BCF, ALH, VAP) ilaç türleri ve ilaç dozları bakımından istatistiksel olarak değerlendirildi. Bu değerlendirmelere göre;

Çizelge 3.37.'de görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,717) > $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında Total Motilite (%) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. Benzer şekilde % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,338) > $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında Total Motilite (%) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. Son olarak p değeri (0,310) > $\alpha=0,05$ olduğundan

çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin olmadığı da görülmektedir. Gruplar arasında farklılık görülmediği için Post Hoc testleri Total Motilite (%) parametresi için uygulanmamıştır.

İlaç ve ilaç dozları arasında Total Motilite (%) bakımından farklılık olmadığı faktörlerin, ortalama ve güven aralıklarına bakılarak da kabaca anlaşılmaktadır. İlaç ve ilaç dozlarının bütün alt gruplarının güven aralıkları birbiri ile kesişmektedir.

Çizelge 3.37. Total Motilite (%) 24.saat verileri.

Doz	İlaç			Doz	P		
	Musk Keton	Musk Ksilen	Total		İlaç	İlaç*Doz	
	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>				
Total Motilite (%)	IC50	16,44±8,97	14,15±7,47	15,29±6,87	0,34	0,72	0,31
	IC50/2	18,95±2,46	13,11±7,27	16,03±5,57			
	IC50/4	16,57±2,54	17,06±1,49	16,81±1,72			
	IC50/8	16,35±10,44	28,93±1,08	22,64±9,46			
	Kontrol	13,90±4,29	13,90±4,29	13,90±3,50			
	Toplam	16,44±5,23	17,43±7,29	16,94±6,20			

Çizelge 3.38.'de görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,023) < $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında STR (%) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,000) < $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında STR (%) üzerine etkisi bakımından anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi. Son olarak p değeri (0,677) > $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin olmadığı da görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre her iki faktöründe düzeyleri arasında STR (%) bakımından farklılık olduğu gözlemlendi, buna

göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde p değeri =0.000< $\alpha=0,05$ olarak bulunduğundan kontrol grubu ilaç dozu ile diğer ilaç dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görülmektedir. Bu durumda IC50, IC50/2, IC50/4 ve IC50/8 ilaç dozları STR (%) bakımından benzer iken kontrol grubunun bunlardan oldukça farklı olduğu söylenebilir.

Çizelge 3.38.'de verilen istatistikler incelendiğinde kontrol grubu ilaç dozunun STR (%) bakımından ortalaması 81,7250 olarak elde edilmiş ve bu değer diğer grupların ortalamalarından oldukça yüksek çıkmıştır. Son olarak ilaç grupları arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştu bu durumda ilaç grup ortalamalarını kıyasladığımızda Çizelge 3.38.'de musk keton grubu ortalamasının (69,6410 > 66,218) STR (%) bakımından daha büyük olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.38. STR 24.saat verileri.

Doz	İlaç			P		
	Musk Keton	Musk Ksilen	Total	Doz	İlaç	İlaç*Doz
	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>			
STR (%)						
IC50	64,05±0,62	61,64±0,86	62,84±1,52			
IC50/2	66,24±4,51	61,23±6,30	63,73±5,33			
IC50/4	66,42±0,21	62,41±3,24	64,01±3,18	0,00	0,02	0,68
IC50/8	69,78±1,67	64,10±2,16	66,37±3,57			
Kontrol	81,73±2,88	81,73±2,88	81,73±2,35			
Toplam	69,64±6,92	66,22±8,01	67,50±7,62			

Çizelge 3.39.'da görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,112) > $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında WOB (%) üzerine etkisi bakımından

istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. Buna karşın % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,000) < $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında WOB (%) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu söylenebilir. Son olarak p değeri (0,510) > $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin olmadığı da görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre ilaç türleri arasında WOB (%) bakımından farklılık gözlenmezken ilaç dozları arasında farklılık olduğu gözlemlendi, buna göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde kontrol grubu ile diğer ilaç dozları arasında p değeri < α olduğundan kontrol grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görülmektedir. Bu durumda IC50, IC50/2, IC50/4 ve IC50/8 ilaç dozları WOB (%) bakımından benzer iken kontrol grubunun bunlardan oldukça farklı olduğu söylenebilir. Çizelge 3.39.'da verilen istatistikler incelendiğinde kontrol grubunun WOB (%) bakımından ortalaması 63,50 olarak elde edilmiş ve bu değer diğer grupların ortalamalarından oldukça yüksek çıkmıştır.

Çizelge 3.39. WOB 24.saat verileri.

Doz	İlaç			Doz	P		
	Musk Keton	Musk Ksilen	Total		İlaç	İlaç*Doz	
	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>				
WOB (%)	IC50	52,56±2,91	52,91±0,40	52,73±1,71	0,00	0,11	0,51
	IC50/2	50,26±0,03	53,78±0,81	52,02±2,08			
	IC50/4	53,54±0,30	53,78±0,01	53,66±0,22			
	IC50/8	52,48±3,57	56,25±3,74	54,36±3,69			
	Kontrol	63,50±1,54	63,50±1,54	63,50±1,26			
	Toplam	54,47±5,16	56,04±4,33	55,25±4,70			

Çizelge 3.40.'da görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,428) $> \alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında Mukus Penetrasyonu (% Toplam) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,000) $< \alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında Mukus Penetrasyonu, (% Toplam) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu söylenebilir. Son olarak p değeri (0,002) $< \alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin anlamlı olduğu görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre ilaç türleri arasında Mukus Penetrasyonu, (% Toplam) bakımından farklılık gözlenmezken ilaç dozları arasında farklılık olduğu gözlemlendi, buna göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde p değeri $< \alpha$ olduğundan, kontrol grubu ile ilaç dozları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu görülmektedir. Bunun yanında IC50/2 ilaç dozu da IC50/4, IC50/8 ve kontrol grubu ilaç dozlarından Mukus Penetrasyonu, (% Toplam) bakımından istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlara göre IC/50 ve IC50/4 ilaç dozu grubunun ise Mukus Penetrasyonu, (% Toplam) bakımından benzer olduğu gözlemlendi.

Çizelge 3.40. Mukus Penetrasyonu (% Toplam) 24.saat verileri.

	Doz	İlaç			Doz	P	
		Musk Keton	Musk Ksilen	Total		İlaç	İlaç*Doz
		<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>			
Mukus Penetrasyonu, (% Toplam)	IC50	3,37±2,39	11,97±1,44	7,67±5,22	0,00	0,43	0,00
	IC50/2	7,64±2,28	1,92±0,66	4,78±3,58			
	IC50/4	11,06±1,21	8,60±1,04	9,83±1,70			
	IC50/8	11,55±3,55	7,86±1,75	9,70±3,13			
	Kontrol	27,99±0,30	27,99±0,30	27,99±0,25			
	Toplam	12,32±8,97	11,67±9,30	12,00±8,90			

Çizelge 3.41.'de görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,054) > $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında Mukus Penetrasyonu, (% Motil) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,000) < $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında Mukus Penetrasyonu, (% Motil) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu söylenebilir. Son olarak p değeri (0,007) < $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin anlamlı olduğu görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre ilaç türleri arasında Mukus Penetrasyonu, (% Motil) bakımından farklılık gözlenmezken ilaç dozları arasında farklılık olduğu gözlemlendi, buna göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde p değeri $< \alpha$ olduğundan, kontrol grubu diğer gruplardan istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. Bunun yanında IC50 ve IC50/2 ilaç dozları ile IC50/4 ve IC50/8 ilaç dozları kendi içlerinde benzer iken kendilerinden farklı diğer ilaç dozu gruplarından Mukus Penetrasyonu, (% Motil) bakımından istatistiksel olarak farklılık göstermektedir.

Çizelge 3.41. Mukus Penetrasyonu (% Motil) 24.saat verileri.

Doz	İlaç			Doz	P		
	Musk Keton	Musk Ksilen	Total		İlaç	İlaç*Doz	
	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>				
Mukus Penetrasyonu (% Motil)	IC50	19,44±3,93	24,31±0,97	21,88±3,66	0,00	0,05	0,01
	IC50/2	13,81±1,85	15,61±3,63	14,71±2,57			
	IC50/4	37,87±2,65	25,28±3,60	30,32±7,47			
	IC50/8	35,71±3,37	27,14±4,92	31,43±6,03			
	Kontrol	39,42±0,82	39,42±0,82	39,42±0,67			
	Toplam	29,25±11,28	26,26±8,06	27,68±9,60			

Çizelge 3.42.'de görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,520) $> \alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında LIN (%) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,006) $< \alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında LIN (%) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu söylenebilir. Son olarak p değeri (0,065) $> \alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre ilaç türleri arasında LIN (%) bakımından farklılık gözlenmezken ilaç dozları arasında farklılık olduğu gözlemlendi, buna göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde p değeri $< \alpha$ olduğundan, IC50/8 dozu IC50, IC50/2 ve IC50/4 gruplardan istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. Bunun yanında IC50/8 ilaç dozu ile kontrol grubu arasında LIN (%) bakımından önemli bir farklılık bulunmamaktadır. IC50, IC50/2, IC50/4 dozu ve kontrol grubu ise birbirleri arasında farklılık göstermemektedir.

Çizelge 3.42. LIN (%) 24. saat verileri.

Doz	İlaç			P			
	Musk Keton	Musk Ksilen	Total	Doz	İlaç	İlaç*Doz	
	Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata				
LIN (%)	IC50	35,79 \pm 0,51	33,70 \pm 1,72	34,54 \pm 1,69	0,01	0,52	0,07
	IC50/2	30,89 \pm 0,08	36,31 \pm 5,48	33,60 \pm 4,45			
	IC50/4	38,83 \pm 3,19	31,97 \pm 2,24	34,71 \pm 4,38			
	IC50/8	42,16 \pm 1,28	41,84 \pm 0,65	42,00 \pm 0,85			
	Kontrol	35,49 \pm 3,75	35,49 \pm 3,75	35,49 \pm 3,06			
	Toplam	36,63 \pm 4,30	35,36 \pm 4,14	35,94 \pm 4,17			

Çizelge 3.43.'de görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,019) $< \alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında VSL (μm^2) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,001) $< \alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında VSL (μm^2) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu söylenebilir. Son olarak p değeri (0,894) $> \alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre her iki faktöründe düzeyleri arasında VSL (μm^2) bakımından farklılık olduğu gözlemlendi,

buna göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde p değeri $< \alpha$ olduğundan, kontrol grubu IC50, IC50/2 ve IC50/8 gruplardan istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. Bunun yanında IC50/4 ilaç dozu ile kontrol grubu arasında VSL (μm^2) bakımından önemli bir farklılık bulunmamaktadır. IC50, IC50/2 ve IC50/4 dozları ise birbirleri arasında farklılık göstermemektedir. Bu durumda VSL (μm^2) bakımından IC50, IC50/2 ve IC50/8 grup benzer IC50/4 ve kontrol grubu birbirlerine benzer olduğundan bu 5 grubu benzerlik bakımından bu şekilde 2 gruba ayırarak ifade edebiliriz.

Son olarak ilaç grupları arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştu (Çizelge 3.43.). Bu durumda ilaç grup ortalamalarını kıyasladığımızda Çizelge 3.43.'de musk keton grubu ortalamasının ($31,797 > 25,869$) VSL (μm^2) bakımında daha büyük olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.43. VSL (μm^2) 24. saat verileri.

Doz	İlaç			Doz	P		
	Musk Keton	Musk Ksilen	Total		İlaç	İlaç*Doz	
	Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata				
VSL (μm^2)	IC50	25,38 \pm 3,42	21,13 \pm 4,26	23,26 \pm 4,16	0,00	0,02	0,89
	IC50/2	28,79 \pm 2,19	21,48 \pm 2,12	25,14 \pm 4,57			
	IC50/4	35,00 \pm 0,81	26,19 \pm 7,43	28,39 \pm 7,49			
	IC50/8	26,65 \pm 1,71	24,40 \pm 7,02	24,85 \pm 6,29			
	Kontrol	43,18 \pm 1,59	36,14 \pm 7,82	37,90 \pm 7,39			
	Toplam	31,21 \pm 7,10	27,02 \pm 8,40	28,30 \pm 8,16			

Çizelge 3.44.'de görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri ($0,159 > \alpha=0,05$) olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında Hiperaktivite (%) üzerine etkisi

bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,012) < $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında Hiperaktivite (%) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu söylenebilir. Son olarak p değeri (0,131) > $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre ilaç türleri arasında Hiperaktivite (%) bakımından farklılık gözlenmezken ilaç dozları arasında farklılık olduğu gözlemlendi, buna göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde p değeri < α olduğundan, IC50/2 dozu ile IC50/8 dozu Hiperaktivite (%) bakımından istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir. Geri kalan gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık bulunmadığı söylenebilir.

Çizelge 3.44. Hiperaktivite (%) 24. saat verileri.

	Doz	İlaç			Doz	P	
		Musk Keton	Musk Ksilen	Total		İlaç	İlaç*Doz
		Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata			
Hiperaktivite (%)	IC50	6,83 \pm 0,73	0,92 \pm 1,59	3,28 \pm 3,45	0,01	0,16	0,13
	IC50/2	6,39 \pm 2,76	8,47 \pm 5,92	7,58 \pm 4,62			
	IC50/4	6,50 \pm 2,12	1,77 \pm 2,20	3,66 \pm 3,20			
	IC50/8	0,46 \pm 0,65	1,00 \pm 2,01	0,82 \pm 1,61			
	Kontrol	3,15 \pm 0,78	3,15 \pm 0,78	3,15 \pm 0,70			
	Toplam	4,68 \pm 2,85	3,26 \pm 4,22	3,85 \pm 3,73			

Çizelge 3.45.'de görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven

düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,000) < $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında VCL ($\mu\text{m/s}$) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi. Benzer şekilde % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,000) < $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında VCL ($\mu\text{m/s}$) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi. Son olarak p değeri (0,00) < $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre her iki faktöründe düzeyleri arasında VCL ($\mu\text{m/s}$) bakımından farklılık olduğu gözlemlendi, buna göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde p değeri < α olduğundan, kontrol grubu diğer gruplardan istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. Bunun yanında diğer ilaç dozu grupları birbirleri arasında VCL ($\mu\text{m/s}$) bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemektedir.

Son olarak ilaç grupları arasındaki farklılık anlamlı bulunmuştu (Çizelge 3.45.), bu durumda ilaç grup ortalamalarını kıyasladığımızda Çizelge 3.45.'de musk keton grubunun ortalamasının (76,564>46,213) VCL ($\mu\text{m/s}$) bakımından daha büyük olduğu görülmektedir.

Çizelge 3.45. VCL ($\mu\text{m/s}$) 24. saat verileri.

	Doz	İlaç			P		
		Musk Keton	Musk Ksilen	Total	Doz	İlaç	İlaç*Doz
		Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata			
VCL ($\mu\text{m/s}$)	IC50	73,83 \pm 3,63	37,28 \pm 0,33	55,55 \pm 21,20	0,00	0,00	0,00
	IC50/2	78,55 \pm 9,25	35,63 \pm 4,98	61,38 \pm 24,53			
	IC50/4	79,21 \pm 5,86	41,69 \pm 5,94	56,69 \pm 21,18			
	IC50/8	74,22 \pm 5,90	39,44 \pm 2,52	56,83 \pm 20,42			
	Kontrol	77,03 \pm 2,08	77,03 \pm 2,08	77,03 \pm 1,93			
	Toplam	76,79 \pm 5,15	50,61 \pm 18,71	63,70 \pm 18,95			

Çizelge 3.46.'da görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,419) $>$ $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında BCF (Hz) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. Benzer şekilde % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,000) $<$ $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında BCF (Hz) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi. Son olarak p değeri (0,00) $<$ $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre ilaç türleri arasında BCF (Hz) bakımından farklılık gözlenmezken ilaç dozları arasında farklılık olduğu gözlemlendi, buna göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde p değeri $<$ α olduğundan, IC50, IC50/2 ilaç grupları ve kontrol grubu birbirilerinden ve diğer gruplardan istatistiksel olarak farklılık göstermektedir. Bunun yanında IC50/4 ve IC50/8 ilaç dozu grupları birbirleri arasında BCF (Hz) bakımından istatistiksel olarak farklılık göstermeyip, diğer ilaç dozlarından farklılık göstermektedir.

Çizelge 3.46. BCF (Hz) 24. saat verileri.

Doz	İlaç			P			
	Musk Keton	Musk Ksilen	Total	Doz	İlaç	İlaç*Doz	
	Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata	Arit. Ort. ± Std. Hata				
BCF (Hz)	IC50	8,79±0,45	6,38±0,54	7,34±1,39	0,00	0,42	0,00
	IC50/2	5,70±0,51	5,70±0,57	5,70±0,44			
	IC50/4	9,37±0,45	10,08±0,30	9,65±0,52			
	IC50/8	8,35±0,17	9,33±0,28	8,94±0,58			
	Kontrol	12,34±0,26	12,34±0,26	12,34±0,21			
Toplam	8,95±2,15	8,61±2,46	8,77±2,27				

Çizelge 3.47.'de görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,393) > $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında ALH (μm) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. Benzer şekilde % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,041) < $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında ALH (μm) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi. Son olarak p değeri (0,877) > $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre ilaç türleri arasında ALH (μm) bakımından farklılık gözlenmezken ilaç dozları arasında farklılık olduğu gözlemlendi, buna göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde p değeri < α olduğundan, IC50/2 ve IC50/8 dozu ilaç gruplarının birbirlerinden istatistiksel olarak farklılık gösterdiği, bunun yanında diğer ilaç dozu gruplarının birbirleri arasında ALH (μm) bakımından istatistiksel olarak farklılık olmadığı görülmemektedir.

Çizelge 3.47. ALH (μm) 24. saat verileri.

	Doz	İlaç			P		
		Musk Keton	Musk Ksilen	Total	Doz	İlaç	İlaç*Doz
		Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata	Arit. Ort. \pm Std. Hata			
ALH (μm)	IC50	3,03 \pm 0,22	2,93 \pm 0,43	2,97 \pm 0,32	0,04	0,39	0,88
	IC50/2	3,47 \pm 0,43	3,63 \pm 0,30	3,57 \pm 0,32			
	IC50/4	2,87 \pm 0,05	3,17 \pm 0,22	3,05 \pm 0,23			
	IC50/8	2,74 \pm 0,19	2,96 \pm 0,49	2,87 \pm 0,38			
	Kontrol	2,97 \pm 0,26	2,97 \pm 0,26	2,97 \pm 0,21			
	Toplam	3,01 \pm 0,33	3,14 \pm 0,41	3,09 \pm 0,38			

Çizelge 3.48.'de görüldüğü gibi, % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,930) $>$ $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaçlar arasında VAP ($\mu\text{m/s}$) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı gözlemlendi. Benzer şekilde % 5 önem düzeyinde (veya % 95 güven düzeyinde) yapılan iki yönlü varyans analizi testinde, p değeri (0,000) $<$ $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç dozları arasında VAP ($\mu\text{m/s}$) üzerine etkisi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu gözlemlendi. Son olarak p değeri (0,410) $>$ $\alpha=0,05$ olduğundan çalışmada kullanılan ilaç ve ilaç dozları arasında etkileşimin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir.

Yapılan İki Yönlü Varyans Analizi (Two-Way ANOVA) sonuçlarına göre ilaç türleri arasında VAP ($\mu\text{m/s}$) bakımından farklılık gözlenmezken ilaç dozları arasında farklılık olduğu gözlemlendi, buna göre ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğunu tespit etmek için Post Hoc testlerinden Scheffe Testi kullanılmıştır.

Yapılan Scheffe Testi sonuçlarına göre % 95 güven düzeyinde p değeri $<$ α olduğundan, kontrol grubu IC50, IC50/2 ve IC50/8 ilaç dozu gruplarından istatistiksel olarak farklılık gösterdiği, bunun yanında IC50/4 ilaç dozu grubu ile aralarında VAP ($\mu\text{m/s}$) ile bakımından istatistiksel olarak farklılık olmadığı gözlenmiştir. Ayrıca

IC50/8 dozu ilaç grubu IC50/4 dozu ilaç grubundan da farklılık göstermekte olup bu 5 ilaç dozu grubunu sınıflayacak olursak, VAP ($\mu\text{m/s}$) bakımından IC50, IC50/2 ve IC50/8 bir grup IC50/4 ilaç dozu grubu ve kontrol grubunu gösterdikleri etki bakımından bir grup olarak değerlendirilebiliriz.

Çizelge 3.48. VAP ($\mu\text{m/s}$) 24. saat verileri.

	Doz	İlaç			P		
		Musk Keton	Musk Ksilen	Total	Doz	İlaç	İlaç*Doz
		<i>Arit. Ort. \pm Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. \pm Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. \pm Std. Hata</i>			
VAP ($\mu\text{m/s}$)	IC50	39,64 \pm 2,05	34,91 \pm 4,11	36,80 \pm 4,03	0,00	0,93	0,41
	IC50/2	37,84 \pm 2,23	35,63 \pm 4,98	36,96 \pm 3,18			
	IC50/4	44,83 \pm 1,12	44,95 \pm 2,61	44,89 \pm 1,64			
	IC50/8	30,05 \pm 2,49	36,12 \pm 2,18	33,09 \pm 3,99			
	Kontrol	46,74 \pm 5,80	46,74 \pm 5,80	46,74 \pm 5,18			
	Toplam	40,23 \pm 6,63	39,86 \pm 6,52	40,05 \pm 6,43			

3.3 Flow Sitometri Bulguları

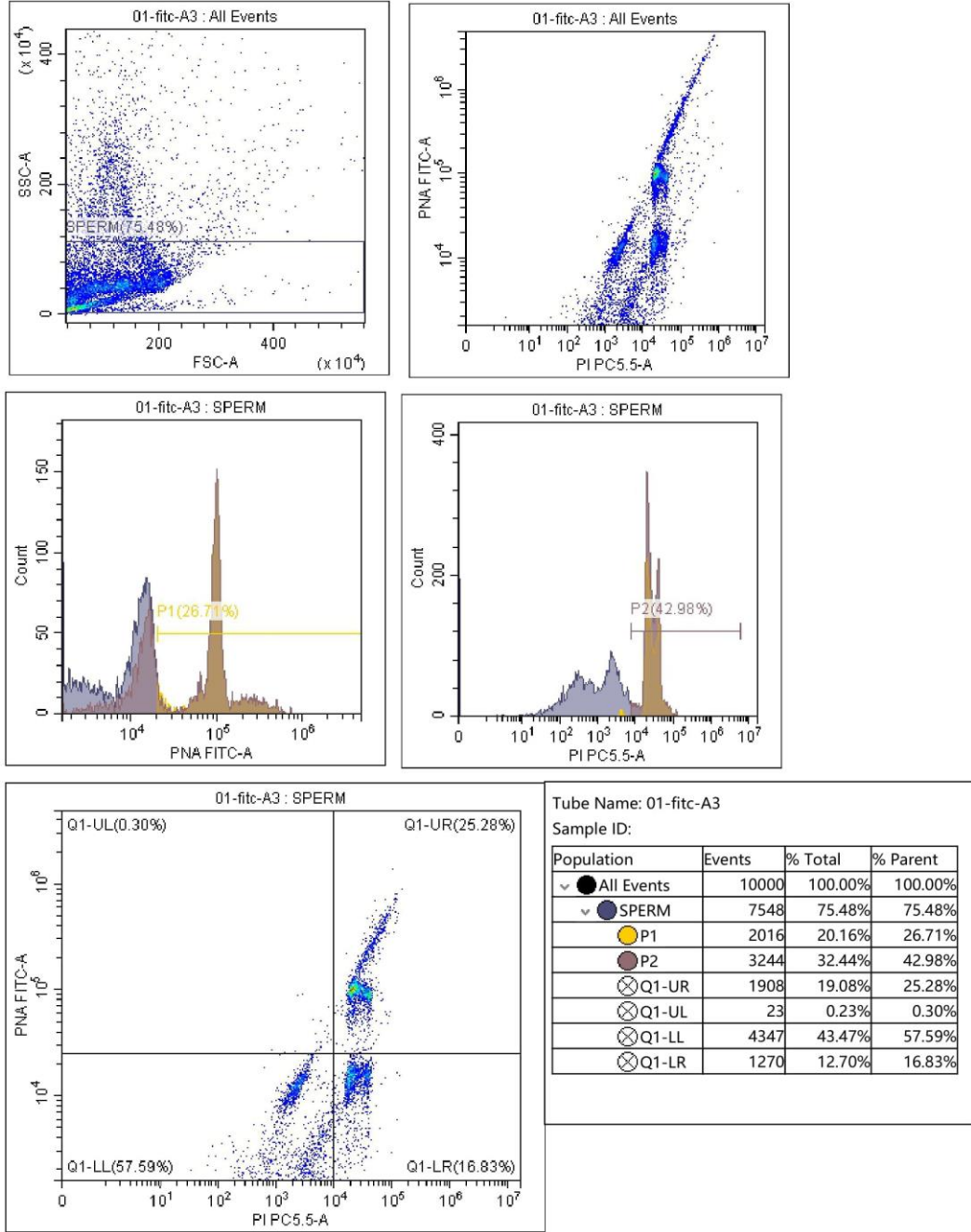
Akrozom bütünlüğü, spermatoozonun zona pellusidanın içine penetrasyonu ile karakterize olan, fertilizasyon açısından önemli parametrelerden birisidir. Akrozom bütünlüğü akrozomal matriksin boyanmasıyla flow sitometri cihazında belirlendi. Akrozom bütünlüğü akrozomal matriksin boyanmasıyla flow sitometri cihazında belirlenebilmektedir. Florokrom floresan isotiosinat (FITC) / Propidium iodid (PI) boyama, viabilite, akrozom bütünlüğüyle birlikte canlı/ölü ve sağlam/hasar görmüş spermatozoonların belirlenerek sperma kalitesinin ortaya konulmasını sağlamaktadır. Örnek flow sitometre çıktısı Şekil 3.26. 'da gösterilmiştir. Buna göre flow sitometri parametreleri şunları ifade etmektedir:

Q1-UR-- \rightarrow Acrosome reacted dead (Akrozoma etkili-ölü) Fitc (+), PI (+).

Q1-UL-- \rightarrow Acrosome reacted viable (Akrozoma etkili-canlı) Fitc (+), PI (-).

Q1-LL-- \rightarrow Acrosome intact viable (Akrozom sağlam-canlı) Fitc (-), PI (-).

Q1-LR-- \rightarrow Acrosome intact dead (Akrozom sağlam-ölü) Fitc (-), PI (-).



Şekil 3.26. Örnek Flow Sitometri Çıktısı.

Flow sitometri sonuçlarından UR değerlendirildiğinde MK için kontrol grubu verilerinin diğer doz verilerinden daha yüksek, MX için IC50/4 dozu verilerinin

kontrol grubu ve diğer doz verilerinden yüksek olduğu gözlemlendi. İstatistiksel anlamda değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.49.).

Çizelge 3.49. Flow Sonuçları, Acrosome reacted dead (Akrozoma etkili-ölü) Fitc (+), PI (+).

Doz	Q1-UR İlaç		İlaç	P	
	Musk Keton	Musk Ksilen		Doz	İlaç*Doz
	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>			
IC50	25,44±3,59	27,79±3,11			
IC50/2	27,74±2,61	27,50±2,97			
IC50/4	26,82±2,80	30,88±3,13	0,453	0,614	0,924
IC50/8	27,48±3,23	27,94±1,58			
Kontrol	30,82±1,93	30,82±1,93			

Flow sitometri sonuçlarından UL değerlendirildiğinde MK için IC50/8 verilerinin diğer doz verilerinden daha yüksek, MX için IC50/4 dozu verilerinin kontrol grubu ve diğer doz verilerinden yüksek olduğu gözlemlendi. İstatistiksel anlamda değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.50.).

Çizelge 3.50. Flow Sonuçları, Acrosome reacted viable (Akrozoma etkili-canlı) Fitc (+), PI (-).

Doz	Q1-UL İlaç		İlaç	P	
	Musk Keton	Musk Ksilen		Doz	İlaç*Doz
	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>			
IC50	0,06±0,03	0,18±0,08			
IC50/2	0,15±0,06	0,22±0,06			
IC50/4	0,20±0,05	0,32±0,09	0,634	0,575	0,779
IC50/8	0,31±0,14	0,18±0,07			
Kontrol	0,29±0,20	0,29±0,20			

Flow sitometri sonuçlarından LL değerlendirildiğinde MK için IC50 verilerinin diğer doz verilerinden daha yüksek, MX için IC50 dozu verilerinin kontrol grubu ve diğer doz verilerinden yüksek olduğu gözlemlendi. İstatistiksel anlamda değerlendirme

yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.51.).

Çizelge 3.51. Flow Sonuçları, Acrosome intact viable (Akrozom sağlam-canlı) Fitc (-), PI (-).

Doz	Q1-LL İlaç		İlaç	P	
	Musk Keton	Musk Ksilen		Doz	İlaç*Doz
	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>			
IC50	39,55±10,43	38,00±7,49			
IC50/2	33,79±5,92	35,29±6,10			
IC50/4	34,91±7,01	30,82±4,37	0,759	0,814	0,994
IC50/8	37,88±7,68	35,57±6,02			
Kontrol	31,56±4,08	31,56±4,08			

Flow sitometri sonuçlarından LR değerlendirildiğinde MK için IC50/2 verilerinin diğer doz verilerinden daha yüksek, MX için IC50/4 dozu verilerinin kontrol grubu ve diğer doz verilerinden yüksek olduğu gözlemlendi. İstatistiksel anlamda değerlendirme yapıldığında dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı (Çizelge 3.52.).

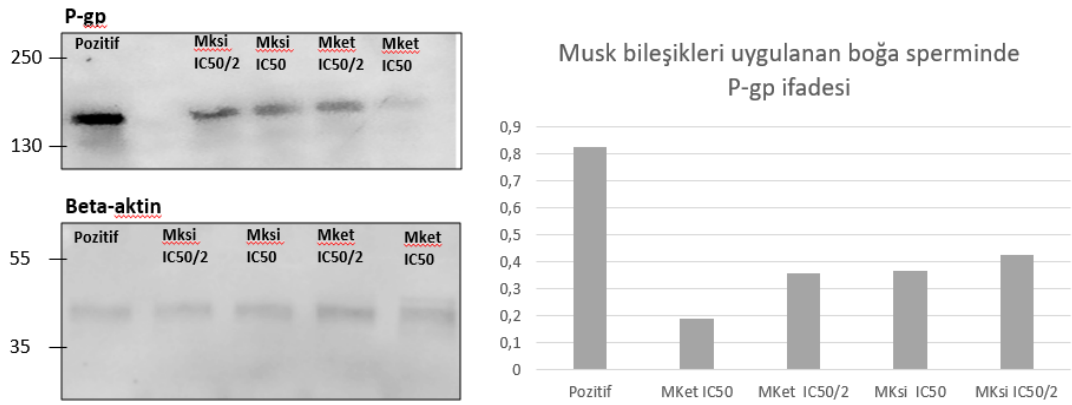
Çizelge 3.52. Flow Sonuçları, Acrosome intact dead (Akrozom sağlam-ölü) Fitc (-), PI (-).

Doz	Q1-LR İlaç		İlaç	P	
	Musk Keton	Musk Ksilen		Doz	İlaç*Doz
	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>	<i>Arit. Ort. ± Std. Hata</i>			
IC50	34,95±7,86	34,03±6,89			
IC50/2	38,32±6,73	37,00±7,32			
IC50/4	38,08±6,90	37,97±7,33	0,986	0,977	0,999
IC50/8	34,34±7,00	36,31±7,03			
Kontrol	37,33±3,66	37,33±3,66			

3.4. Musk Ksilen ve Musk Ketonun P-gp İfadesine Etkisi (Western Blot)

Musk ksilen ve musk ketonun boğa sperm hücrelerinde P-gp'nin protein ifadesi üzerine etkisi Western Blot ile araştırıldı. İlk uygulamada antikorun (insan/köpek)

çalışmaması üzerine boğa için yeni antikor alındı. Sperme IC50 ve IC50/2 dozunda musk keton ve musk ksilen bileşiklerinin uygulanmasını takiben değerlendirme yapıldı. Buna göre, musk bileşikleri uygulanmayan gruptaki ifadeye göre, MK ve MX IC50 konsantrasyonunda sırasıyla % 77,31 ve 55,83'lük azalmaya neden olduğu, IC50/2 konsantrasyonunda ise % 56,92 ve % 48,30'luk azalmaya neden olduğu görüldü (Şekil 3.27.).



Şekil 3.27. Musk bileşikleri uygulanan boğa sperminde P-gp protein ifadesi (Western Blot).

4. TARTIŞMA

Erkeklerde reproduktif toksisite çalışmaları için Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınladığı “İnsan sperminin incelenmesi ve işlenmesi için WHO laboratuvar kılavuzu (WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, Fifth Edition)” na göre spermelerin uygun koşullarda toplanmasından sonra sperm makroskopik ve mikroskopik görünümü, sperm motilitesi, sperm canlılığı, sperm sayısı ve sperm morfolojisi gibi parametrelere bakılmaktadır (WHO, 2010). Bununla birlikte yeni araştırma tekniklerinin geliştirilmesiyle CASA tekniği ön plana çıkmaktadır. Klinik uygulamada iyi kontrol edilen konvansiyonel sperma analizleri doğurganlığın değerlendirilmesinde temel olmaya devam etmektedir. CASA çıktıları, infertil bir çiftin rutin muayenesi için isteğe bağlı ve tamamlayıcı olarak düşünülmelidir (Nieschlag ve ark., 2010). Amann ve Waberski (2014) çalışmalarında domuz, boğa ve aygır spermleri için kullanılan mevcut CASA teknolojisinin yeteneklerini ve sınırlamalarını ve gelecekteki muhtemel gelişmelerini izah etmektedirler.

MX ve MK'nin kadınlarda hafif bir yumurtalık yetmezliğine neden olduğu, nitro muskların kadınlarda üreme toksisitesi üzerinde negatif etkili olduğu ve endokrin bozucu özelliklerinin olduğu gösterilmiştir (Eisenhardt ve ark.,2001). Çalışmamızda bu kimyasalların erkek üreme sistemi üzerine etkilerinin bir kısmı incelenmiştir.

Musk ksilenin (MX) biyoakümüülasyonunun, yetişkin ve gelişmekte olan Long Evans sıçanlarında GC-ECD (Gas chromatography-electron capture detection) ile ölçüldüğü bir çalışmada, erkek ve dişi sıçanlar çiftleşmeden 10 hafta önce MX içeren yem ile beslendirilmiştir. Çalışma hamilelik ve emzirme döneminde devam ettirilmiştir. MX'in bazı organlarda (yumurtalık, adrenal) önemli miktarlarda biriktiği, yağ doku seviyelerini arttırdığı (dişilerde erkeklere göre 3,7–6,8) ve anne sütüne geçtiği tespit edilmiştir (Suter-Eichenberger ve ark., 1998). Çalışmamızda özellikle

üreme organlarında biriken ve yağ doku seviyesini arttıran kimyasal olan MX kullanılmıştır.

Bazı pestisitlerin köpek ve teke taze spermaları üzerindeki etkileri, MTT (mitokondriyal etkinlik/canlılık), Nötral Kırmızı-NK (lizozomal etkinlik/canlılık) ve Bilgisayar Destekli Sperma Analizi-CASA (motilite parametreleri, VCL, VSL, VAP, lineerlik, doğrusallık, yalpalama) kullanılarak *in vitro* olarak araştırılmıştır. Üreme toksisite testlerinde alternatif testler arasında bulunan ve batarya testleri içerisinde yer alan *in vitro* sperm toksisite araştırmasında; MTT ve CASA ile birlikte NK'nın birlikte kullanılmasının kimyasalların sperma üzerine etkilerinin değerlendirilmesinde daha etkili olacağı ve türe özgü farklılıkların kimyasalların sperma canlılık ve motilite parametrelerini farklı şekil ve düzeyde etkileyeceği, dolayısıyla spermada türe özgü ksenobiyotik moleküler savunma mekanizmalarının araştırılmasının gerekliliği gösterilmiştir (Yurdakök-Dikmen ve ark., 2017).

Bilgisayar Destekli Sperm Analizi (CASA) ile boğa sperm özelliklerinin ölçülmesi ve doğurganlık ile ilişkisinin incelendiği bir çalışmada, hareketli sperm yüzdesi ve sperm konsantrasyon verileri CASA ile değerlendirilmiş ve döllenme verimi tespitinde CASA değişkenlerini kullanılmıştır (Farrel ve ark., 1998). CASA sistemi, sperm hareket parametrelerinin değerlendirilmesinde devrim yaratmıştır ve üreme toksikolojisi çalışmalarında sperm motilitesini ölçmek için pratik ve kullanışlı bir yöntemdir (Slott ve ark., 1993). Bu yüzden bu çalışmada CASA sistemi tercih edilmiştir.

Bu çalışmada olgun Holstein boğasından (18-48 aylık) toplanan epididimal sperma örnekleri ile taze sperma örnekleri nitro musk bileşiklerinin (musk ksilen ve musk keton) uygulanmasını takiben MTT ile spermiyotoksosite, sperma hücrelerine MTT testi ile belirlenen doz aralıklarında (IC50 ve IC50/2) western blot testi uygulandı. CASA ile nitro musk uygulanması sonrası (IC50, IC50/2 ve IC50/8

dozlarında) 0, 4 ve 24. saatlerde CASA parametrelerinin farklılığı incelenmiş ayrıca aynı parametreler için 24. saatin sonunda taze sperma ile epididimal sperma verileri karşılaştırılmıştır.

Yapılan bir çalışmada eğrisel hız (VCL) ve ortalama yol hızının (VAP), koyun servikal mukusunda göç etme yeteneği ile anlamlı pozitif korelasyonlar sunan kinematik parametreler olduğunu, VCL, VAP, VSL ve STR'nin keçi servikal mukusunda migrasyon verimliliği ile yüksek oranda ilişkili olduğunu ve sadece lateral kafa yer değiştirmesi, sığır servikal mukusunda sperm migrasyonu ile negatif ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar, spesifik kinematik parametrelerin, spermatozoanın farklı reolojik özelliklere sahip epitelyal mukusta kolonize olma ve göç etme yeteneğini sağladığını göstermektedir (Robayo ve ark., 2008). Bu çalışmada da Total Mukus Penetrasyonu hem VCL hem de VAP parametreleri ile ilişkili olup bahsedilen çalışma ile paralel sonuçlara ulaşılmıştır. Ayrıca VCL parametresi değerlendirilirken musk ksilen verilerinin musk keton verilerinden yüksek olduğu yani musk ketonun eğrisel hızı musk ksilene göre daha fazla azalttığı görülmüştür. VAP değerlerine bakıldığında beklendiği üzere doz azaldıkça motilite verilerinde artış saptanmıştır.

Moringa olifera yaprağı ekstraktının sulandırıcıdaki antioksidan etkisinin incelendiği bir çalışmada manda sperması kullanılmış, dondurulmuş spermaların çözülme sonrası kalitesi, kinematiği, lipid peroksidasyonu, toplam antioksidan kapasitesi ve doğurganlığını araştırılmıştır. CASA ile yapılan sperma değerlendirmesinde çözülme sonrası TM, PR, STR, BCF, VCL ve LIN parametrelerinde artışlar tespit edilmiş ve çözülmüş sperma kullanmanın doğurganlığı arttırdığı bulunmuştur (Iqbal ve ark., 2021). Çalışmamızda taze sperm örnekleri kullanılmış ve musk keton ve musk ksilenin VCL ve BCF verilerini değiştirdiği, 24. saat için yapılan değerlendirmede TM'de anlamlı farklılık gözlenmezken inkübasyon sürelerinin ortalaması alındığında total motilitede azalmaya neden olduğu, STR, PR ve LIN verileri değiştirmede bulunmuştur.

Boğa sperma örneklerinde inkübasyon süresinin (0-2, 4-6 ve 24 saat), sulandırıcı çeşidinin (AndroMed®, BIOXcell®, INRA96®) ve sıcaklığın (5 ve 25°C) kinetik parametrelere (CASA) etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada toplam ve progresif motilite, VCL, VAP, VCL, ALH, BCF, STR, LIN ve WOB değerlerine bakılmıştır. Çalışmada motilitede 4-6 saatten sonra, diğer kinetik parametrelerde ise 24. saatten sonra azalma olduğu gözlenmiştir (Fernandez-Novo ve ark., 2021). Çalışmamızda TM için İnkübasyon sürelerinin ortalamaları alınarak değerlendirme yapıldığında dozlar arasında ve doz ve ilaç arasında anlamlı sonuçlar bulunurken, ilaçlar arasında bulunamadı. Çalışmamızda bahsedilen çalışma ile paralel olarak saat ilerledikçe TM verilerinde düşüşler gözlemlendi. Diğer parametrelerin 0, 4 ve 24. saat verileri tutarlılık içermemektedir. Bu durum kullanılan hayvan türü, cihaz ya da yöntem farklılığı ile ilişkilendirilebilir. Tüm CASA parametrelerine bakıldığında 24. saat sonunda verilerde ciddi düşüşler olduğu görüldü ve bu da yukarıdaki çalışma sonuçlarını desteklemektedir.

Çinko oksit nano parçacıklarının balık spermi üzerindeki toksikolojik etkilerinin CASA ile değerlendirildiği bir çalışmada CASA parametrelerinden bazılarını kirleticinin farklı dozlarında incelemiş ve VCL, VSL, VAP, STR, ALH ve BCF içeren spermatozoa motilite parametreleri hesaplanmıştır. Sonuçlarına göre VCL, VAP ve BCF doz farkları istatistiksel olarak anlamlı iken, VSL, ALH ve STR istatistiksel olarak anlamlı değildir (Ozgur ve ark., 2018). Çalışmamız sonuçlarına göre VCL ve BCF verileri adı geçen çalışmayla benzer olarak anlamlı sonuçlar vermişken VAP verilerinde doz azalmasıyla birlikte artış gözlenirken sonuçlar anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. Yine ALH ve STR verileri ilgili çalışmayla benzer şekilde istatistiksel olarak anlamsız bulunurken VSL sonuçları, ilgili çalışmanın aksine doza bağımlı olarak istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Yapılan bir çalışmada Mancozeb adlı zirai mantar ilacının (endokrin bozucu) boğa spermi üzerindeki etkileri CASA ile araştırılmıştır. Mancozeb, 2 saatlik

inkübasyon sonrası toplam sperm hareketliliğini ve sperm progresif hareketliliğini önemli ölçüde azaltmıştır. VAP, VSL, VCL ve ALH parametreleri hem saf hem de ticari olarak temin edilebilen Mancozeb ile 2 saatlik inkübasyondan sonra önemli ölçüde azalmıştır. BCF'nin ise sadece ticari Mancozeb ile önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Kodithuwakku ve ark., 2021). Çalışmamızda başka endokrin bozucular olan musk keton ve musk ksilenin CASA sperm parametreleri üzerindeki etkileri incelendi. Adı geçen çalışmayla paralel olarak 4. saat verilerine bakıldığında TM, VAP, VSL, VCL ve BCF verilerinde düşüşler gözlenirken ALH verilerinde tutarlılık gözlenmemiştir. ALH sonuçlarının farklı olması kullanılan kimyasalların türü ile ilişkilendirilebilir.

Dondurulmuş boğa spermlerinin hazırlanma farklılıklarının motilite üzerindeki etkisinin CASA ile incelendiği bir çalışmada; Makler odası kullanılarak analiz edilen spermanın, 5 ve 10 dakika sonra VAP, VSL ve VCL'de önemli bir azalma gösterdiğini, sperm hızındaki bu azalmanın, kullanılan haznedenden bağımsız olarak numunenin 1 veya 2 dakika içinde analiz edilmesi gerektiğini düşündürdüğü sonucuna ulaşılmıştır (Contri ve ark., 2010). Çalışmamızda bulunan VAP değerleri ilgili çalışma ile paralel olup saat ilerledikçe düşüşler gözlenmiştir. VSL kontrol grubu değerleri ilgili çalışmanın aksine saat ilerledikçe artmış, ilaç uygulanan gruplar arasında tutarlılık görülmemiştir. VCL verilerine bakıldığında da bulunan sonuçlar ilgili çalışma ile paralel olup, 24. saatin sonunda tüm dozlarda düşüşler gözlenmiştir.

Boğa sperminde CASA kinetik parametreleri ile akrozom bütünlüğü için FITC-PNA boyama yönteminin birlikte kullanıldığı bir çalışmada, FITC-PNA boyama yönteminde spermler arasında anlamlı farklar bulunmamıştır. Araştırmacılar, çeşitli floresan boyama yöntemleri ve gebelik oranı ile pozitif korelasyona sahip CASA kinetik parametrelerinin kombinasyonu kullanılarak boğa sperminin *in vitro* değerlendirilmesinin, suni tohumlama için sperma örneklerinin fertilitasını tahmin etmede yararlı bir araç olabileceği, boğa sperminde güvenilir bir dölleme yeteneği tahmini sağlayabileceği sonucuna ulaşmışlardır (İnanç ve ark., 2018). Çalışmamızda

CASA kinetik parametreleri ve FITC-PI boyama yöntemi birlikte kullanılarak flow sitometri sonuçları değerlendirilmiştir. Flow sitometri sonuçları 4 parametrede (UR, UL, LL, LR) değerlendirilmiş ve ilgili çalışmayla paralel olarak anlamlı sonuçlara ulaşılmamıştır. UR ve UL için genel olarak ilaç uygulanan gruplarda kontrole göre daha yüksek sonuçlar elde edilmişken, LL için ilaç uygulanan gruplarda bulunan sonuçlar kontrolden daha yüksektir. LR için sonuçlar kontrol ve dozlara göre farklılık gösterse de tüm flow sitometri sonuçları istatistiksel olarak anlamlı farklar oluşturmamıştır.

Dondurulmuş teke spermaları ile yapılan bir çalışmada CASA sistemi kullanılmış ve progresif motilite, total motilite ve kinetik parametreler (VCL, VSL, VAP, LIN, STR, WOB, ALH, BCF and hyperactivity) incelenmiştir. Bu parametrelerden progresif motilitede anlamlı sonuçlar bulunmamıştır (İnanç ve ark., 2017). Çalışmamız sonucunda da progresif motilite parametresi için dozlar arasında ve ilaçlar arasında anlamlı sonuçlara ulaşılmamıştır.

Western Blot deneyleri, insan testisinde olduğu kadar sıçan Leydig hücrelerinde, testis makrofajlarında, peritübüler hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde de bir miktar P-gp'nin bulunduğunu, ancak spermatogonia, spermatozoidler ve erken spermatidlerde bulunmadığını ortaya koymuştur. Araştırmacılar P-gp'nin somatik hücrelerin kendini korumasına yardımcı olduğunu ve büyük olasılıkla kan-testis bariyerine işlevselliğini kazandıran moleküllerden biri olduğu sonucuna ulaşmışlardır (Melanine ve ark., 2002). Çalışmamızda musk ksilen ve musk ketonun boğa sperm hücrelerinde P-gp'nin protein ifadesi üzerine etkisi Western Blot ile araştırıldı. MK ve MX IC50 konsantrasyonunda sırasıyla % 77,31 ve 55,83, IC50/2 konsantrasyonunda ise % 56,92 ve % 48,30'luk azalmaya neden olduğu görüldü. P-gp ifadesindeki bu azalma, ksenobiyotiklerin sperma hücresine girerek toksik etki oluşturma potansiyelini arttırmaktadır.

PCB'lerin Simental boğalarının taze spermatozoaları üzerindeki doğrudan etkilerinin *in vitro* olarak değerlendirildiği bir çalışmada CASA ile çalışmış, doza ve maruz kalma süresine (0, 2, 4 saat) bağlı olarak total motilite, progresif motilite ve canlılığın azaldığını tespit edilmiştir (Yurdakök-Dikmen ve ark., 2014). Çalışmamızda benzer olarak boğa spermaları kullanılmış, maruziyet süreleri 0, 4, ve 24 olarak alınmıştır. PCB'lerin yerine başka endokrin bozucular olan musk keton ve musk ksilen kullanılmıştır. 24. saat için yapılan değerlendirmede total motilitede anlamlı farklılık gözlenmezken inkübasyon sürelerinin ortalaması alındığında sözü geçen çalışma ile benzer olarak total motilitede azalma tespit edilmiştir.

Çalışmamızda; musk keton ve musk ksilene 0, 4 ve 24 saatlik maruziyetten sonra alınan sperma örnekleri CASA parametreleri için kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Toplamda oluşturulan 4 doz (IC50, IC50/2, IC50/4 ve IC50/8) grubu ve kontrol grubu için dozlar arasında, ilaçlar arasında ve ilaç ve ilaç dozları arasındaki farklar detaylı olarak incelendi. Ayrıca epididimal sperma ile taze sperma karşılaştırıldı ancak epididimal sperma örneklerinden alınan CASA sonuçları, sperm canlılığının düşük olması nedeniyle kullanılmadı.

Ek olarak kinetik CASA parametrelerinden bazıları (Total Motilite, STR, WOB, Mukus Penetrasyonu (% Total), Mukus Penetrasyonu (% Motil), LIN, VSL, Hiperaktivite, VCL, BCF, ALH, VAP) 4 farklı dozda (IC50, IC50/2, IC50/4, IC50/8) sadece 24 saat inkübasyondan sonrası için değerlendirildi.

Bu 12 kinetik parametre içinde Total Motilite dışında kalan diğerlerinde dozlar arasında anlamlı farklılıklara ulaşıldı. Farklı dozda ilaç uygulamalarının Total Motilite üzerine etkisinin olmadığı, diğerlerinde doz değişikliklerinin kinetik parametreleri etkilediği sonucuna varıldı.

İlaç farklılığının bu parametreler üzerindeki etkisine bakıldığında STR, VSL ve VCL için musk ketonun musk ksilene göre spermilerin doğrusallığını, doğrusal ve eğrisel hızını daha fazla etkilediği sonucuna ulaşıldı.

Yine bu 12 parametre için ilaç dozları bakımından hangi gruplar arasında farklılık olduğu tespit edildi. Buna göre Mukus Penetrasyonu (% Total), Mukus Penetrasyonu (%Motil), VCL ve BCF için anlamlı sonuçlara ulaşıldı. Yani spermilerin mukus penetrasyonu (hem toplam hem de yüzde motilite olarak), eğrisel hızları ve çapraz geçiş frekans ritimleri kontrol grubundan farklıdır. Kullanılan ilaçların bu parametreleri düşürdüğü belirlendi.

İnkübasyon sürelerinin ortalamalarının alınarak yapılan istatistiki değerlendirmede;

VAP Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) parametresi için dozlar arasında anlamlı farklılıklar görüldü. Kullanılan ilaçların VAP Motil değerini kontrol grubuna göre düşürdüğü gözlemlendi. Yani musk keton ve musk ksilenin spermilerin ortalama yörünge hızını düşürdüğü sonucuna ulaşıldı.

BCF Motile (Motil) (Hz) parametresi için dozlar arasında anlamlı farklılıklar görüldü. Kullanılan ilaçların BCF değerlerini kontrol grubuna göre düşürdüğü gözlemlendi. Yani musk keton ve musk ksilenin spermilerin çapraz geçiş frekans ritimlerini düşürdüğü sonucuna ulaşıldı.

VCL Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) parametresi için dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuçlara ulaşıldı. Yani musk keton ve musk ksilenin

spermlerin eğrisel hızlarını düşürdüğü, doz azaldıkça hızlarında artış görüldüğü, musk ksilenin musk ketona göre eğrisel hızı daha fazla düşürdüğü sonucuna ulaşıldı.

VSL Motile (Motil) ($\mu\text{m/s}$) parametresi için dozlar arasında anlamlı farklılıklar görüldü. Kullanılan ilaçların VSL değerlerini kontrol grubuna göre düşürdüğü gözlemlendi. Yani musk keton ve musk ksilenin spermlerin doğrusal hızlarını düşürdüğü sonucuna ulaşıldı.

MP Total (Toplam) (%) parametresi için dozlar arasında anlamlı farklılıklar görüldü. Kullanılan ilaçların MP değerlerini kontrol grubuna göre düşürdüğü gözlemlendi. Yani musk keton ve musk ksilenin spermlerin mukus penetrasyonlarını düşürdüğü sonucuna ulaşıldı.

TM Total Motility (Toplam Hareketlilik) (%) parametresi incelendiğinde dozlar arasında ve doz ile ilaç arasında anlamlı farklılıklar görüldü. Kullanılan ilaçların TM değerlerini kontrol grubuna göre düşürdüğü gözlemlendi. Yani musk keton ve musk ksilenin spermlerin toplam hareketliliğini yüzdesel anlamda düşürdüğü sonucuna ulaşıldı. Ayrıca musk ksilenin spermlerin toplam hareketliliğe etkisinin musk ketondan daha fazla olduğu görüldü.

Flow sitometri sonuçları değerlendirildiğinde;

Flow sitometri parametrelerinden UR, UL, LL ve LR'de dozlar arasında, ilaçlar arasında, doz ve ilaç arasında anlamlı sonuç bulunamadı. Yani kullanılan ilaçların spermlerin akrozom bütünlüğüne (hem ölü hem canlı spermelerde) etkisi anlamlı olmamakla birlikte bazı dozlarda verilerde değişikliğe neden olduğu gözlemlendi.

Flow sitometri sonuçlarından UR değerlendirildiğinde MK için kontrol grubu verilerinin diğer doz verilerinden daha yüksek, MX için IC50/4 dozu verilerinin kontrol grubu ve diğer doz verilerinden yüksek olduğu gözlemlendi. UL değerlendirildiğinde MK için IC50/8 verilerinin diğer doz verilerinden daha yüksek, MX için IC50/4 dozu verilerinin kontrol grubu ve diğer doz verilerinden yüksek olduğu gözlemlendi. LL değerlendirildiğinde MK için IC50 verilerinin diğer doz verilerinden daha yüksek, MX için IC50 dozu verilerinin kontrol grubu ve diğer doz verilerinden yüksek olduğu gözlemlendi. LR değerlendirildiğinde MK için IC50/2 verilerinin diğer doz verilerinden daha yüksek, MX için IC50/4 dozu verilerinin kontrol grubu ve diğer doz verilerinden yüksek olduğu gözlemlendi.

Musk ksilen ve musk ketonun P-gp ifadesine etkisi (Western Blot) değerlendirildiğinde;

Sperme IC50 ve IC50/2 dozunda musk keton ve musk ksilen bileşiklerinin uygulanmasını takiben değerlendirme yapıldı. Buna göre, musk bileşikleri uygulanmayan gruptaki ifadeye göre, musk keton ve musk ksilen IC50 konsantrasyonunda sırasıyla % 77,31 ve 55,83'lük azalmaya neden olduğu, IC50/2 konsantrasyonunda ise % 56,92 ve % 48,30'lük azalmaya neden olduğu görüldü.

Hayvan modelleri ve epidemiyolojik kanıtlar, sperm sayısının azalması, infertilitenin artması, testiküler disgenezis sendromu ve testiküler ve prostat kanserleri ile endokrin bozucu kimyasallara maruz kalmayı ilişkilendirmektedir. Kimyasal maddelerin sperm kalitesi üzerine etkilerinin CASA ile ölçülmesi hem üreme toksikolojisi hem de risk değerlendirmesi bakımından önemli olup, henüz veteriner hekimlikte yaygın uygulama alanı bulamamıştır (Khetan, 2014). Kimyasalların insan erkek reproduktif toksisitesine yönelik etkilerinin araştırılmasında *in vitro* testler içerisinde boğa spermi ile yapılan MTT ve CASA testleri batarya test olarak kabul edilmektedir. Ancak türler arası farklılık göz önünde bulundurulduğunda, bu testlerin farklı hayvan türleri arasında değerlendirilmesi ve maruziyete bağlı risk analizlerinin

yapılmasında türlere özgü sistemlerin geliştirilmesi öne çıkmaktadır. Dolayısıyla boğalarda sperm kalitesinin değerlendirilmesi, genellikle klinik ortamda doğurganlığın öngörülmesi ile veya maksimum sayıda yavruya ulaşma isteğiyle bağlantılıdır; ancak kirleticiler gibi çevresel faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu tür değerlendirmeler milyarlarca dolarlık endüstrileri (ör. süt, hayvancılık, kümes hayvanları) etkileyen risk değerlendirmelerinin temelini oluşturmaktadır.

Sitotoksosite araştırmaları, bir maddenin sitotoksik potansiyelinin olup olmadığının belirlenmesi amacıyla yapılır. Hücre temelli sitotoksosite çalışmaları, gerek uygulama kolaylığı, gerekse *in vivo* çalışmalardan elde edilen verilerle uyum göstermesi nedeniyle, hayvan deneylerine alternatif olarak doğmuş ve toksikoloji laboratuvarlarında sıkça tercih edilir hale gelmiştir. Sitotoksosite, incelenen maddenin dozuna ve maruziyet süresine bağılı olarak hücrelere değişik derecelerde zarar veren bir olaydır. Hücreler, sitotoksik maddeye maruz kalırsa apoptoz, otofaji ve nekroz gibi olaylar sonucu ölebilir ya da sitostazis nedeniyle proliferasyon özelliklerini kaybedebilirler. Hücre bazlı sitotoksosite çalışmaları ile test edilen maddenin sitostatik ve sitotoksik etkileri hakkında temel bilgi edinilir. Deneysel olarak kimyasal, biyolojik ya da fiziksel etkenlere maruz bırakılan hücrelerin, maruziyet sonrasındaki canlılıklarının belirlenmesi, bu çalışmaların önemli bir basamağıdır (Tokur ve Aksoy, 2017). Çalışmamızda nitro musk bileşiklerinden musk ksilen ve musk ketonun boğalarda erkek reproduktif toksisitesi ve testiküler P-Gp ile ilişkisi değerlendirilmiş olup, ayrıca kullanılan test sistemi ile ileride boğa reproduktif toksisite araştırmalarında batarya testi olarak kullanılabilmesi için önemli bir alt yapı oluşturulmuştur.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Muskların sabun, kozmetik, çamaşır deterjanı ve yumuşatıcı gibi sayısız ürünün endüstriyel üretiminde yapay koku olarak büyük miktarlarda kullanıldıkları bilinmekte, bazı ülkeler milyonlarca ton üretim yapmaktadırlar. Bu kimyasalların kullanımları birçok ülkede yasaklanmıştır. Yasaklanmalarına karşın halen kozmetik sanayide yaygın olarak kullanımları günlük hayatta maruziyeti doğurmaktadır. Endokrin bozucu niteliği çeşitli araştırmalarda gösterilmiş olan bu bileşiklerin erkek reproduksiyon üzerine etkilerini gösteren çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında; erkek üreme sağlığını ciddi şekilde etkileyen ve endokrin bozucular olarak değerlendirilen nitro musk grubu kimyasallardan musk keton ve musk ksilenin hem epididimal hem de taze boğa sperması üzerindeki toksikolojik etkileri *in vitro* değerlendirmiş, toksisite seviyelerinin hem doz hem de bekleme süresi (0, 4, ve 24 saat) ile ilişkisi toksikolojik anlamda incelenmiştir. Tezin amaçlarından biri erkek reprotoksisite araştırmalarında tekrar edilebilir, güvenli ve duyarlı yöntemlerin geliştirilmesidir. Bu amaçla CASA sistemi, MTT ve Flow Sitometrinin birlikte bir batarya düzeneği olarak kullanılmıştır. Batarya düzeneklerinde toksisiteye verilen yanıtlar birlikte değerlendirilmektedir. Ayrıca araştırma amacına uygun olarak en önemli membran transporterlarından p-glikoprotein ifadesi Western Blot ile protein düzeyinde araştırılmıştır.

Parfümlü ürünlerin (sabun, şampuan, vücut losyonu, çamaşır yumuşatıcı gibi) içerisinde sentetik musk (polisiklik ve nitro musk) bileşenleri bulunabilmektedir. Nitro musklardan musk ksilen ve musk keton inhalasyon ve dermal yolla emilebilmekte ve endokrin bozucu etkinlik gösterebilmektedir. Bu kirleticiler, çevresel yolla su kaynaklarına bulaşabilmekte ve su canlılarına yönelik istenmeyen etkiler oluşturabilmektedir. Bu bileşiklerin insan sütüne geçişine ilişkin çalışmalar bulunmakla birlikte, inek ya da diğer hayvanların süt ya da dokusuna geçişine ilişkin çalışmalar sınırlıdır veya bulunmamaktadır. Özellikle insan ve çevresel kaynaklı maruziyet yolları göz önünde bulundurulduğunda boğalarda, endokrin bozucu

etkinliği gösterilen bu kimyasallar için reproduktif toksisitenin yapılmamış olması, ileride damızlık potansiyeline sahip olan hayvanlar için önem taşımaktadır. Bu değerlendirmelerden yola çıkılarak parfüm bazlarında bulunabilen nitro musk bileşiklerinden musk ksilen ve musk ketonun boğalarda erkek reproduktif toksisitesi *in vitro* olarak araştırılmıştır.

Sonuç olarak;

Boğalarda musk ksilen ve musk ketonun reproduktif toksisitesinin *in vitro* araştırılmasının yapıldığı çalışmamızda hem musk ketonun hem de musk ksilenin boğa spermleri için toksik olduğu, ilaçların bazı sperm fonksiyonlarını bozduğu, birçok parametrede musk ketonun musk ksilene göre toksikolojik etkisinin daha fazla olduğu sonucuna ulaşıldı. Bununla birlikte tez çalışması *in vitro* olarak tasarlanmıştır. Araştırma bulgularının *in vivo* çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca bu bileşiklerin toksikokinetik özelliklerinin belirlenmesi ve diğer ilaç/kirletici etkileşimlerinin belirlenmesi genomik, proteomik ve metabolomik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Teknoloji ve sanayileşmeyle birlikte hem beşeri hem de hayvan erkek üreme sağlığını etkileyen çevresel etmenler hızla artmakta ve sperma analizi için yeni yöntemler ve cihazlar geliştirilmektedir. Reproduksiyon ve tüm endokrin sistemi etkileyen çevresel kirleticilerin etkilerinin tek başına veya karışım halinde belirlenebilmesi için artan maliyetleri azaltacak, duyarlılığı yüksek yeni metot ve sistemlerin geliştirilmesi önerilmektedir.

ÖZET

Boğalarda Musk Ksilen ve Musk Ketonun Reprodüktif Toksisitesinin *In Vitro* Araştırılması

Antik çağlardan beri doğal musk parfümlerin hazırlanmasında koku olarak kullanılmıştır. Doğal musk her zaman çok kıymetli olmuştur, erkek musk geyiklerinin (*Moschus moschiferus*) ekzokrin bezlerinde bulunur. Doğal musk özlerinin kokulu bileşenleri makrosiklik ketonlar, makrosiklik laktonlar, makrosiklik alkoller ve piridin türevleridir. Düşük üretim maliyetleri ve kolay hazırlanma nedeniyle muskların sentetik türevleri olan nitro musklar; sabun, kozmetik, çamaşır deterjanı ve yumuşatıcı gibi sayısız ürünün endüstriyel üretiminde yapay koku olarak büyük miktarlarda kullanılmıştır. Musk keton şüpheli bir ko mutajen iken, musk ksilen şüpheli bir ko mutagen ve kanserojendir. Musk ksilen, Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından grup 3'te (insanlarda kanserojen olarak sınıflandırılmaz) sınıflandırılmıştır. *In vitro* çalışmalarda ise nitro musk (musk ksilen ve musk ketonun) muhtemelen östrojenik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Bu bileşiklere canlılar özellikle inhalasyon ve dermal yol ile maruz kalmaktadır. Bu kirleticiler, çevresel yolla su kaynaklarına bulaşabilmekte ve su canlılarına, çevreye ve organizmalarda sağlığa yönelik istenmeyen etkiler oluşturabilmektedir. Bu bileşiklerin insan sütüne geçişine ilişkin çalışmalar bulunmakla birlikte, inek ya da diğer hayvanların süt ya da dokusuna geçişine ilişkin çalışmalar sınırlı veya bulunmamaktadır. Özellikle insan ve çevresel kaynaklı maruziyet yolları göz önünde bulundurulduğunda boğalarda, endokrin bozucu etkinliği gösterilen bu kimyasallar için reprodüktif toksisitenin yapılmamış olması, ileride damızlık potansiyeline sahip olan hayvanlar için önem taşımaktadır. Bu değerlendirmelerden yola çıkılarak, yapılan çalışmada, parfüm bazlarında bulunabilen nitro musk bileşiklerinden musk ksilen ve musk ketonun boğalarda erkek reprodüktif toksisitesinin *in vitro* olarak araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla öncelikle musk keton ve musk ksilen bileşikleri primer parenşimal testiküler hücre kültüründe, sperm örneklerinde toksisitesi belirlenmiştir. IC₅₀ değeri hücre kültüründe MK için 0,34 µg/ml, MX için 0,32 µg/ml bulunmuş olup, epididimal sperm hücrelerinde MK için 0,48 µg/ml, MX için 0,58 µg/ml bulunmuştur. Daha sonra sperm hücreleri IC₅₀ ve daha düşük konsantrasyonlarda nitro musklara maruz bırakılmış ve Bilgisayar Aracılı Sperm Analiz Sistemi (CASA) kullanılarak 0, 4 ve 24 saat içerisinde motilite parametreleri (progresyon, motilite, VCL, VSL, VAP ve LIN değerleri, ALH, hiperaktivite vb.) yönüyle değerlendirilmiştir. Flow Sitometre kullanılarak akrozom uyarılmış/uyarılmamış, canlı/ölü oranlar yönüyle nitro muskın sperm üzerine etkileri gösterilmiştir. Kirleticilerin membran transport proteinleri üzerine etkileri değerlendirildiğinde, bazılarının bu proteinlerin ifadelerini arttırdığı, bazılarının ise azalttığı ve buna bağlı olarak toksik etki gösterdikleri görülmektedir. Kan testis bariyeri organizmada en kompleks bariyerler arasındadır ve özellikle gelecek nesillerin korunması için bu transport proteinlerin ekspresyonu önem taşımaktadır. Yapılan çalışma kapsamında nitro musk bileşiklerinin membran transport proteinleri arasında en önemlileri arasında yer alan P-gp üzerine etkileri, Western blot ile araştırılmıştır. P-gp protein ifadesi, her iki nitro musk bileşiği uygulaması sonrası azalmıştır, bu azalma MK için MX'den daha yüksektir. Hayvan modelleri ve epidemiyolojik kanıtlar, sperm sayısının azalması, infertilitenin artması, testiküler disgenezis sendromu ve testiküler ve prostat kanserleri ile endokrin bozucu kimyasallara maruz kalmayı ilişkilendirmektedir. Kimyasal maddelerin sperm kalitesi üzerine etkilerinin CASA ile ölçülmesi hem üreme toksikolojisi hem de risk değerlendirmesi bakımından önemli olup, henüz veteriner hekimlikte yaygın

uygulama alanı bulamamıştır. Kimyasalların insan erkek reproduktif toksisitesine yönelik etkilerinin araştırılmasında *in vitro* testler içerisinde boğa spermi ile yapılan MTT ve CASA testleri batarya test olarak kabul edilmektedir. Ancak türler arası farklılık göz önünde bulundurulduğunda, bu testlerin farklı hayvan türleri arasında değerlendirilmesi ve maruziyete bağlı risk analizlerinin yapılmasında türlere özgü sistemlerin geliştirilmesi öne çıkmaktadır. Dolayısıyla boğalarda sperm kalitesinin değerlendirilmesi, genellikle klinik ortamda doğurganlığın öngörülmesi ile veya maksimum sayıda yavruya ulaşma isteğiyle bağlantılıdır; ancak kirleticiler gibi çevresel faktörlerden etkilenebilmektedir. Bu tür değerlendirmeler milyarlarca dolarlık endüstrileri (ör. süt, hayvancılık, kümes hayvanları) etkileyen risk değerlendirmelerinin temelini oluşturmaktadır. Bu çalışmada; nitro musk bileşiklerinden musk ksilen ve musk ketonun boğalarda erkek reproduktif toksisitesi ve testiküler P-gp ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; boğalarda musk ksilen ve musk ketonun reproduktif toksisitesinin *in vitro* araştırılmasının yapıldığı çalışmamızda hem musk ketonun hem de musk ksilenin boğa spermleri için toksik olduğu, ilaçların bazı sperm fonksiyonlarını bozduğu, birçok parametrede musk ketonun musk ksilene göre toksikolojik etkisinin daha fazla olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu çalışma MTT, CASA ve flow sitometre testlerinin boğa reproduktif toksisite denemelerinde batarya testi olarak kullanılabilmesi için önemli bir alt yapı oluşturmuştur.

Anahtar Sözcükler: İnfertilite, Musk Keton, Musk Ksilen, Reproduktif Toksisite, Spermiyotoksisite.

SUMMARY

***In Vitro* Reproductive Toxicity of Musk Xylene and Musk Ketone in Bulls**

Since ancient times, natural musk has been used as a fragrance in the preparation of perfumes. Natural musk has always been very valuable, found in the exocrine glands of male musk deer (*Moschus moschiferus*). Fragrant components of natural musk extracts are macrocyclic ketones, macrocyclic lactones, macrocyclic alcohols and pyridine derivatives. Nitro musks, which are synthetic derivatives of musks due to their low production costs and easy preparation; are used in large quantities as an artificial fragrance in the industrial production of numerous products such as soap, cosmetics, laundry detergent and fabric softener. Musk ketone is a suspected commutagen, while musk Xylene is a suspected comutagen and carcinogen. musk Xylene has been classified in group 3 (not classifiable as a human carcinogen) by the International Agency for Research on Cancer (IARC). *In vitro* studies have shown that nitro musk (musk xylene and musk ketone) probably has estrogenic activity. Living things are exposed to these compounds, especially by inhalation and dermal route. These pollutants can contaminate water resources by environmental means and cause undesirable effects on aquatic organisms, the environment and health of organisms. Although there are studies on the excretion of these compounds into human milk, studies on the transfer into the milk or tissue of cows or other animals are limited or absent. Considering the human and environmental exposure routes, it is important for animals with breeding potential that no reproductive toxicity has been made for these chemicals, which have endocrine disrupting activity in bulls. Based on these evaluations, in this study, it was aimed to investigate the male reproductive toxicity of musk xylene and musk ketone, which are nitro musk compounds that can be found in perfume bases, in bulls *in vitro*. For this purpose, firstly, the toxicity of musk ketone and musk xylene compounds in primary parenchymal testicular cell culture and sperm samples were determined. The IC₅₀ value was found to be 0,34 µg/ml for musk ketone, 0,32 µg/ml for musk xylene in cell culture, and 0,48 µg/ml for musk ketone and 0,58 µg/ml for musk xylene in epididymal sperm cells. Afterwards, sperm cells were exposed to nitro musks at IC₅₀ and lower concentrations and using Computer-Aided Sperm Analysis System (CASA) in 0, 4 and 24 hours for motility parameters (progression, motility, VCL, VSL, VAP and LIN values, ALH, hyperactivity etc.). The effects of nitro musk on sperm in terms of acrosome stimulated/unstimulated live/dead ratios were demonstrated using flow cytometry. When the effects of contaminants on membrane transport proteins are evaluated, it is seen that some of them increase the expression of these proteins, while others decrease them and accordingly have toxic effects. The blood testis barrier is among the most complex barriers in the organism, and the expression of these transport proteins is especially important for the protection of future generations. In this study, the effects of nitro musk compounds on P-gp, which is among the most important membrane transport proteins, were investigated by Western blot. P-gp protein expression decreased after administration of both nitro musk compounds, the reduction being higher for musk ketone than for musk xylene. Animal models and epidemiological evidence link exposure to endocrine disrupting chemicals with decreased sperm count, increased infertility, testicular dysgenesis syndrome, and testicular and prostate cancers. Measuring the effects of chemical substances on sperm quality with CASA is important in terms of both reproductive toxicology and risk assessment, and has not yet found widespread application in veterinary medicine. In the investigation of the effects of chemicals on human male reproductive toxicity, MTT and CASA tests performed with bull sperm among *in vitro* tests are considered battery tests. However, considering the differences between species, the

development of species-specific systems comes to the fore in the evaluation of these tests among different animal species and in conducting risk analysis related to exposure. Thus, evaluation of sperm quality in bulls is often linked to the prediction of fertility in the clinical setting or the desire to achieve the maximum number of offspring; however, it can be affected by environmental factors such as pollutants. Such assessments form the basis of risk assessments affecting multibillion-dollar industries (eg dairy, livestock, poultry). In this study; musk xylene and musk ketone, which are nitro musk compounds, were evaluated for male reproductive toxicity and testicular P-gp in bulls. As a result; in our study, in which the reproductive toxicity of musk xylene and musk ketone was investigated in bulls, it was concluded that both musk ketone and musk xylene are toxic for bull sperm, drugs affect some sperm functions, and musk ketone has more toxicological effects than musk xylene in many parameters. This study has formed an important infrastructure for the use of MTT, CASA and flow cytometry tests as battery tests in bull reproductive toxicity trials.

Key Words: Infertility, Musk Ketone, Musk Xylene, Reproductive Toxicity, Spermiotoxicity.

KAYNAKLAR

- ACS (2018). *www.cancer.org*. 18.06.2022 tarihinde <http://www.cancer.org/cancer/testicularcancer/detailedguide/testicular-cancer-risk-factors>. (American Cancer Society) adresinden alındı.
- ALAM MI, BEG S, SAMAD A, BABOOTA S, KOHLI K, ALI J, AHUJA A, AKBAR M (2010). Strategy for effective brain drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **40**(5): 385-403.
- ALEJANDRO CI, ABEL VM, JAIME OP, PEDRO SA (2014). Environmental stress effect on animal reproduction. *Open Journal of Animal Sciences*, **4**: 79-84.
- ALLER SG, YU J, WARD A, WENG Y, CHITTABOINA S, ZHUO R, HARRELL PM, TRINH YT, ZHANG Q, URBATSCH IL, CHANG G (2009). Structure of p-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug bindings. *Science*, **323**(5922): 1718-1722.
- AMANN RP, WABERSKID (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*, **81**: 5-17.
- AMBUDKAR SV, DEY S, HRYCYN CA, RAMACHANDRA M, PASTAN I, GOTTESMAN MM (1999). Biochemical, cellular and pharmacological aspects of the multidrug transporter. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **39**(1): 361-398.
- AMIN L (2013). P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Target Insides*, **7**: 27-34.
- ANDERSSON AM, JØRGENSEN N, MAIN KM, TOPPARI J, DE MEYTS R, LEFFERS H, JUUL A, JENSEN TK, SKAKKEBÆK NE (2008). Adverse trends in male reproductive health: we may have reached a crucial 'tipping point'. *International Journal of Andrology*, **31**(2): 74-80.
- ANDROLOGY-AUSTRALIA (2014). Male Infertility. Australia: Andrology Australia, Clayton, Vic.
- ASPINALL V, CAPPELLO M (2015). Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology. China: Elsevier.
- AYDOS K, GUVEN MC, CAN B, ERGUN A (2001). Nicotine toxicity to the ultrastructure of the testis in rats. *BJU International*, **88**: 622-626.

- BANCROFT J, REINISCH JM (1990). Adolescence and Puberty. Oxford: Oxford University Press.
- BAY K, ASKLUND C, SKAKKEBAEK NE, ANDERSSON AM (2006). Testicular dysgenesis syndrome: possible role of endocrine disrupters. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **20**(1): 77-90.
- BRAUNSTEIN GD, DAHLGREN J, LORIAUX DO (1978). Hypogonadism in chronically lead poisoned men. *Infertility*, **1**(1): 33-35.
- BUETOW SA (1996). Testicular cancer: to screen or not to screen? *Journal of Medical Screening*, **3**: 3-6.
- CASSIDENTI DL, VIJOD AG, VIJOD MA, STANCZYK FZ, LOBO RA (1990). Short-term effects of smoking on the pharmacokinetic profiles of micronized estradiol in postmenopausal women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, **163**(6): 1953-1960.
- CEREIJIDO M, ANDERSON JM (2001). Tight Junctions. Boca Raton: CRC Press.
- CHAPMAN CK, ROOD KA (2016). Understanding the semen evaluation portion of the breeding soundness evaluation. *Agriculture, Utah University*, **1287**: 1-4.
- CHENG CY, MRUK DD (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*, **64**(1): 16-64.
- CONTRÌ A, VALORZ C, FAUSTINI M, WEGHER L, CARLUCCIO A (2010). Effect of semen preparation on CASA motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, **74**(3): 424-435.
- COUBROUGH RI (1985). Stress and fertility. A review. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, **52**(3): 153-156.
- DALLAS S, MILLER DS, BENDAYAN R (2006). Multidrug resistance-associated proteins: Expression and function in the central nervous system. *Pharmacological Reviews*, **58**(2): 140-161.
- DALTON TP, HE L, WANG B, MILLER ML, JIN L, STRINGER KF, CHANG X, BAXTER CS, NEBERT DW (2005). Identification of mouse SLC39A8 as the transporter responsible for cadmium-induced toxicity in the testis. *PNAS*, **102**(9): 3401-3406.
- DANIEL M, MARTIN AD, DRINKWATER DT (1992). Cigarette smoking, steroid hormones and bone mineral density in young women. *Calcified Tissue International*, **50**(4): 300-305.
- DANKERS A, ROELOFS M, PIERSMA A, SWEEP F, RUSSEL F, VAN DEN BERG M, VAN DUURSEN M, MASEREEUW R (2013). Endocrine disruptors differentially

target Atp-binding cassette transporters in the blood-testis barrier and affect leydig cell testosterone secretion *in vitro*. *Toxicological Sciences*, **136**(2): 382–391.

DAVIS RO, KATZ DF (1992). Standardization and comparability of CASA instruments. *Journal of Andrology*, **13**(1): 81-86.

DE JONGE CJ, CENTOLA GM, REED ML, SHABANOWITZ RB, SIMON SD, QUINN P (2003). Andrology lab corner: Human sperm survival assay as a bioassay for the assisted reproductive technologies laboratory. *Journal of Andrology*, **24**(1): 16-18.

DENNIS MK, BOWLES HJ, MACKENZIE DA, BURCHIEL SW, EDWARDS BS, SKLAR LA, PROSSNITZ ER, THOMPSON TA (2013). A multifunctional androgen receptor screening (MARS) assay using the high-throughput HyperCyt® Flow Cytometry System. *Cytometry Part A*, **73**(5): 1-21.

DOBSON H, SMITH RF (2000). What is stress, and how does it affect reproduction? *Animal Reproduction Science*, **60**(61): 743-752.

DOUGLAS-HAMILTON DH, SMITH NG, KUSTER C, VERMEIDEN JP, ALTHOUSE GC (2005). Capillary-loaded particle fluid dynamics: Effect on estimation of sperm concentration. *Journal of Andrology*, **26**(1): 115-122.

EBLE JN, SAUTER G, EPSTEIN JI, SESTERHENN IA (2004). Pathology and Genetics of Tumours of The Urinary System and Male Genital Organs World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press.

EISENHARDT S, RUNNEBAUM B, KLAUSDIETER B, INGRID G (2001). Nitromusk compounds in women with gynecological and endocrine dysfunction. *Environ Res*, **87**(3): 123-30.

EMANUELE MA, EMANUELE NV (1998). Alcohol's effects on male reproduction. *Alcohol Health & Research World*, **22**(3): 195-201.

EMERY BR (2013). Sperm Aneuploidy Testing Using Fluorescence. Carrell DT, Aston KI içinde *Spermatogenesis Methods and Protocols* (s. 167-174). Salt Lake City: Humana Press.

ESHRE (1998). Guidelines on the application of CASA technology in the analysis of spermatozoa. *Human Reproduction*, **13**(1): 142-145.

ESTEVEZ SC (2014). Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. *International Brazilian Journal Of Urology*, **4**(4): 181-184.

EULING SY, SELEVAN SG, PESCOVITZ OH, SKAKKEBAEK NE (2008). Role of environmental factors in the timing of puberty. *Pediatrics*, **121**(3): 167-171.

- EVANTHIA-KANDARAKIS D, GORE AC (2012). Introduction to Endocrine Disruptors. Evanthia-Kandarakis D, Gore AC içinde *Endocrine Disruptors and Puberty* (s. 1-10). New York: Humana Press.
- FARDEL O, VÉE ML (2009). Regulation of human hepatic drug transporter expression by pro-inflammatory cytokines. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **5**(12): 1469-1481.
- FARRELL PB, PRESICCE GA, BROCKETT CC, FOOTE RH (1998). Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. *Theriogenology*, **49**(4): 871-879.
- FARRELLY J, MCENTEE MC (2014). A survey of veterinary radiation facilities in 2010. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, **55**(6): 638-643.
- FELDMAN EC, NELSON RW (2004). Canine Male reproduction. İçinde *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction* (Third Edition) (s. 930-950). St. Louis, Missouri: Saunders.
- FERNANDEZ-NOVO A, SANTOS-LOPEZ S, BARRAJON-MASA C, MOZAS P, DE MERCADO E, CACERES E, GARRAFA A, GONZALEZ-MARTÍN JV, PEREZ-VÍLLALOBOS N, OLÍET A, ASTÍZ S, PEREZ-GARNELO S (2021). Effect of extender, storage time and temperature on kinetic parameters (CASA) on bull semen samples. *Biology*, **10**: 806-822.
- FOSTER WG, MCMOHAN A, YOUNGLAI EV, HUGHES EG, RICE DC (1993). Reproductive endocrine effects of chronic lead exposure in the male cynomolgus monkey. *Reproductive Toxicology*, **7**(3): 203-209.
- FRANKE RM, GARDNER ER, SPARREBOOM A (2010). Pharmacogenetics of drug transporters. *Current Pharmaceutical Design*, **16**(2): 220-230.
- FRANKEN DR, OEHNINGER S (2012). Semen analysis and sperm function testing. *Asian Journal of Andrology*, **14**: 6-13.
- FRIBERG L, PISCATOR M, NORDBERG GF, KJELLSTRÖM T (1974). Cadmium In The Environment. Ohio: PRC Press Inc.
- GADEA J, SELLÉS E, MARCO MA (2004). The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, **39**(5): 303-308.
- GANTA S, DESHPANDE D, KORDE A, AMIJI M (2010). A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug delivery barriers. *Molecular Membrane Biology*, **27**(7): 260-273.

- GARRETT C, LUI DY, BAKER GH (1997). Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphometry. *Fertility and Sterility*, **67**(2): 362-371.
- GARRETT C, LIU DY, RUSHFORD DD, BAKER HW (2003). Automated semen analysis: 'zona pellucida preferred' sperm morphometry and straight-line velocity are related to pregnancy rate in subfertile couples. *Human Reproduction*, **18**(8): 1643-1649.
- GARRIDO N, RIVERA R (2017). A Practical Guide to Sperm Analysis Basic Andrology and Reproductive Medicine. Boca Raton: CRC Press.
- GAUCHER G, SATTURWAR P, JONES MC, FURTOS A, LEROUX JC (2010). Polymeric micelles for oral drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **76**(2): 147-158.
- GILFILLAN SC (1965). Lead poisoning and the fall of rome. *Journal of Occupational Medicine*, **7**: 53-60.
- GÖLLÜ BAHADIR G, ERGÜN E, TELLİ O, KHANMAMMADOV F, ÇAKMAK AM (2016). Hormone therapy in hypospadias surgery: A survey on the current practice in Turkey. *Turkish Journal of Medical Sciences*, **46**: 1624-1628.
- GÖNÇ EN (2009). Normal puberte gelişimi ve puberte prekoks. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **40**: 164-168.
- GYE CM, PARK JC (2012). Effect of electromagnetic field exposure on ther eproductive system. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, **39**(1): 1-9.
- HAYES HM, WILSON GP (1986). Hospital incidence of hypospadias in dogs in North America. *The Veterinary Record*, **118**(22): 605-607.
- HSIEH MH, BREYER BN, EISENBERG ML, BASKIN LS (2008). Associations among hypospadias, cryptorchidism, anogenital distance, and endocrine disruption. *Current Urology Reports*, **9**(2): 137-142.
- HOSSAIN A, ARYAL S, OSUAMPKE C, PHELPS J (2010). Human sperm bioassay for reprotoxicity testing in embryo culture media: Some practical considerations in reducing the assay time. *Advances In Urology*, **10**: 1-6.
- IQBAL S, NAZ S, BHUTTA MF, SUFYAN A, AWAN MA (2021). Antioxidant effect of Moringa olifera leaves extract in extender improves post-thaw quality, kinematics, lipid peroxidation, total antioxidant capacity and fertility of water buffalo bull semen. *Andrologia*, **54**(1): 1-7.
- İNANÇ ME, TEKİN K, OLĞAÇ KT, TIRPAN MB, ALEMDAR H, ÇİL B, KAYA U, STELLETTA C, DAŞKIN A (2017). Ankara keçilerinde bölgesel ve bireysel özelliklerin sperma dondurulabilirliğine etkisi. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, **88**(1): 31-39.

- İNANÇ ME, ÇİL B, TEKİN K, ALEMDAR H, DAŞKIN A (2018). The combination of CASA kinetic parameters and fluorescein staining as a fertility tool in cryopreserved bull semen. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, **42**(5): 452-458.
- JOHNSTON SD, KUSTRITZ MV, OLSON PS (2001). Disorders of The Canine Testes and Epididymes. İçinde *Canine and Feline Theriogenology* (s. 312). Philadelphia: Saunders.
- JUNGWIRTH A, GIWERCMAN A, TOURNAYE H, DIEMER T, KOPA Z, DOHLE G, KRAUSZ C; European Association Of Urology Working Group On Male Infertility (2012). European association of urology guidelines on male infertility: The 2012 update. *European Urology*, **62**: 324-332.
- KAMISCHKE A, NIESCHLAG E (1999). Analysis of medical treatment of male infertility. *Human Reproduction*, **14**(1): 1-23.
- KHETAN SK (2014). Endocrine Disruptors In The Environment. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- KIZILAY F, ALTAY B (2017). Sperm function tests in clinical practice. *Turkish Journal of Urology*, **43**(4): 393-400.
- KİM WY, BENET LZ (2004). P-glycoprotein (P-gp/MDR1)-mediated efflux of sex-steroid hormones and modulation of P-gp expression *in vitro*. *Pharmaceutical Research*, **21**(7): 1284-1293.
- KIME DE, VAN LOOK KJ, MCALLISTER BG, HUYSKENS G, RURANGWA E, OLLEVIER F (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, **130**: 425-433.
- KING LM, ANDREW MG, SIKKA SC, GEORGE WJ (1997). Murine strain differences in cadmium-induced testicular toxicity. *The Toxicologist*, **36**(2): 186.
- KIS O, ROBILLARD K, CHAN GN, BENDAYAN R (2010). The complexities of antiretroviral drug-drug interactions: role of ABC and SLC transporters. *Trends in Pharmacological Sciences*, **31**(1): 22-35.
- KLEIN DM, CHERRINGTON NJ (2014). Organic and inorganic transporters of the testis: A review. *Spermatogenesis*, **4**(2): 1-6.
- KLIESCH S (1998). Tumoren und Fehlbildungen des Nebenhodens und des Samenstranges. Krause W, Weidner W, Sperling H, Diemer T içinde, *Andrologie – Krankheiten der männlichen Geschlechtsorgane*. (s. 220-223). Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

- KLINEFELTER GR, VEERAMACHANENI DR (2014). Assesment of Male Reproductif Toxicology. A. W. Hayes, & C. L. Kruger içinde, *Hayes' Principles and Methods of Toxicology* (Sixth Edition b., s. 1601-1637). Boca Raton: CRC Press.
- KODITHUWAKKU C, PRASADANI YGM, WĪJAYAGUNAWARDHANE MPB, RATHNAYAKE C, LEE KF, KODĪTHUWAKKU S (2021). Functional impairment of bovine spermatozoa by fungicide Mancozeb: An *in vitro* exposure study. *Tropical Agricultural Research*, **32** (3): 368-381.
- KOLON TF, HERNDON ACD, BAKER LA, BASKIN LS, BAXTER CG, CHENG EY, DIAZ M, LEE PA, SEASHORE CJ, TASIAN GE, BARTHOLD JS (2014). Evaluation and treatment of cryptorchidism: AUA Gideline. *The Journal of Andrology*, **192**(2): 1-38.
- KRAEMER M, FILLION C, MARTIN-PONT B, AUGER J (1998). Factors influencing human sperm kinematic measurements by the Celltrak computer-assisted sperm analysis system. *Human Reproduction*, **13**(3): 611-619.
- KUMANOV P, AGARWAL A (2016). Puberty Physiology and Abnormalities. Switzerland: Springer.
- LACKIE JM (2007). The Dictionary of Cell and Molecular Biology (Fourth Edition). London: Academic Press.
- LAMB IV JC, FOSTER PM (1988). Physiology And Toxicology of Male Reproduction. California: Academic Press, Inc.
- LANCRANJAN I, POPESCU HI, GĂVĂNESCU O, KLEPSCH I, SERBĂNESCU M (1975). Reproductive ability of workmen occupationally exposed to lead. *Archives of Environmental Health: An International Journal*, **30**: 396-401.
- LEA RG, BYERS AS, SUMNER RN, RHIND SM, ZHANG Z, FREEMAN SL, MOXON R, RICHARDSON HM, GREEN M, CRAIGON J, ENGLAND GCW (2016). Environmental chemicals impact dog semen quality in vitro and may be associated with a temporal decline in sperm motility and increased cryptorchidism. *Scientific Reports*, **6**(31281): 1-12.
- LEE HJ, PACK JK, KIM T, LEE YS (2010). The lack of histological changes of CDMA cellular phone-based radio frequency on rat testis. *Bioelectromagnetics*, **31**(7): 528-534.
- LINDER RE, STRADER LF, SLOTT VL, SUAREZ JD (1992). Endpoints of spermatotoxicity in the rat after short duration exposures to fourteen reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology*, **6**(6): 491-505.
- LUIDY, GARRETT C, BAKER HW (2003). Low proportions of sperm can bind to the zona pellucida of human oocytes. *Human Reproduction*, **18**(11): 2382-2389.

- MACLEOD AG, WISNER ER (2011). Computed Tomography and Magnetic Resonance Imaging of The Urinary Tract. Bartges J, Polzin DJ içinde *Nephrology and Urology of Small Animals* (s. 146-161). Iowa: Blackwell Publishing Ltd.
- MCGRADY AV (1984). Effects of psychological stress on male reproduction: a review. *Archives of Andrology*, **13**(1): 1-7.
- MORTIMER D (1994). Laboratory standards in routine clinical andrology. *Reproductive Medicine Review*, **3**: 97-111.
- MORTIMER D (1994). Practical Laboratory Andrology. Oxford: Oxford University Press.
- MORTIMER D, MORTIMER ST, AITKEN RJ, PACEY AA (1995). Workshop report: clinical CASA - The quest for consensus. *Reproduction, Fertility and Development*, **7**(4): 951-959.
- MRUNK DD, CHENG CY (2015). The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. *Endocrine Reviews*, **36**(5): 564-591.
- NARGUND VH (2015). Effects of psychological stress on male fertility. *Nature Reviews Urology*, **12**(7): 378-382.
- NASR-ESFAHANI MH, ABOUTORABI R, ESFANDIARI E, MARDANI M (2002). Sperm MTT viability assay: A new method for evaluation of human sperm viability. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **19**(10): 477-482.
- NAZ RK (2005). Endocrine Disrupters Effects on Male and Female Reproductive Systems. FLORIDA: CRC Press.
- NDIKUWERA J (2005). A case of hypospadias in a dog. *Irish Veterinary Journal*, **58**(9): 504-506.
- NEGRO-VILAR A (1993). Stress and other environmental factors affecting fertility in men and women: Overview. *Environmental Health Perspectives Supplements*, **101**(2): 59-64.
- NETTO JM, FERRAREZ CE, LEAL AA, TUCCI JRS, GOMEZ CA, BARROSO JRU (2013). Hormone therapy in hypospadias surgery: A. *Journal of Pediatric Urology*, **9**(6): 971-979.
- NG CS, TSAKOK MF, TAN SL, CHAN KH (1988). Frontiers In Reproductive Endocrinology and Infertility. Hingham: Kluwer Academic Publishers.
- NIESCHLAG E, BEHRE HB, NIESCHLAG S (2010). Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction (3rd Edition). New York: Springer.

- NOAKES DE, PARKINSON TJ, ENGLAND GC (2001). Normal Reproduction In Male Animals. *Arthur's Veterinary Reproduction and Obstetrics* (s. 673-750). içinde England: Elsevier.
- OGILVY AL, SHALET SM (1993). Effect of radiation on the human reproductive system. *Environmental Health Perspectives Supplements*, **101**(2): 109-116.
- OYEYIPO IP, RAJI Y, EMIKPE BO, BOLARINWA AF (2010). Effects of oral administration of nicotine on organ weight, serum testosterone level and testicular histology in adult male rats. *Nigerian Journal of Physiological Sciences*, **25**: 81-86.
- OZGUR ME, ULU A, BALÇIOĞLU S, OZCAN I, OKUMUS F, KOYTEPE S, ATES B (2018). Investigation of toxicity properties of flower-like ZNO nanoparticles on cyprinus carpio sperm cells using Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **18**: 771-780.
- PALTIZ (1969). Psychogenic male infertility. *Psychogenic Medicine*, **31**(4): 326-330.
- POMMER A (1958). X-Ray Therapy In Veterinary Medicine. New York: Academic Press.
- QUINN M, BABB P (2002). Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part II: Individual countries. *BJU International*, **90**(2): 174-184.
- RAHEEM AA, RALPH D (2011). Male infertility: Causes and investigations. *Trends In Urology & Men's Health*, **2**(5): 8-11.
- ROBAYO I, VALDES C, COX JF (2008). CASA assessment of kinematic parameters of ram spermatozoa and their relationship to migration efficiency in ruminant cervical mucus. *Reproduction in Domestic Animals*, **43**(4): 393-399.
- ROBLES V, MARTÍNEZ-PASTOR F (2013). Flow Cytometric Methods for Sperm Assessment. Carrell DT, Aston KI içinde, *Spermatogenesis Methods and Protocols* (s. 175-186). Salt Lake City: Humana Press.
- ROCHAT B (2009). Importance of influx and efflux systems and xenobiotic metabolizing enzymes in intratumoral disposition of anticancer agents. *Current Cancer Drug Targets*, **9**(5): 652-674.
- ROWE PJ, COMHAIRE FH, HARGREAVE TB, MELLOWS HJ (1993). WHO Manual For The Standardized Investigation and Diagnosis of The Infertile Couple. Cambridge: Cambridge University Press.
- ROWLEY MJ, LEACH DL, WARNER GA, HELLER KG (1974). Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis. *Radiation Research*, **59**(3): 665-678.

- RUBES J, LOWE X, MOORE II D, PERREAULT S, SLOTT V, EVENSON D, SELEVAN SG, WYROBEK AJ (1998). Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertility and Sterility*, **70**(4): 715-723.
- SCHEFFE H (1953). A method of judging all contrasts in the analysis of variance. *Biometrika*, **40**: 87-104.
- SCHEFFE H (1959). *The Analysis of Variance*. New York: John Wiley press.
- SHEWEITA SA, TILMISANY AM, AL-SAWAF H (2005). Mechanisms of male infertility: Role of antioxidants. *Current Drug Methabolism*, **6**: 495-501.
- SIGMAN M, ZINI A, BAAZEEM A (2009). Semen analysis and sperm function assays: What do they mean? *Seminars in Reproductive Medicine*, **27**(2): 115-123.
- SKAKKEBAEK NE (2010). Normal reference ranges for semen quality and their relations to fecundity. *Asian Journal of Andrology*, **12**(1): 95-98.
- SKAKKEBAEK NE, MEYTS ERD, MAIN KM (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Human Reproduction*, **16**(5): 972-978.
- SLOTT VL, SUAREZ JD, POSS PM, LINDER RE, STRADER LF, PERREAULT SD (1993). Optimization of the Hamilton-Thorn computerized sperm motility analysis system for use with rat spermatozoa in toxicological studies. *Fundamental and Applied Toxicology*, **21**(3): 298-307.
- SNODGRASS W (2012). Hypospadias. Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AV, Peters CA içinde *Campbell-Walsh Urology* (10th Edition) (s. 3503-3536). Saunders.
- SNOW ET (1992). Metal carcinogenesis: Mechanistic implications. *Pharmacology & Therapeutics*, **53**(1): 31-65.
- SODANI K, PATEL A, KATHAWALA RJ, CHEN ZS (2012). Multidrug resistance associated proteins in multidrug resistance. *Chinese Journal of Cancer*, **31**(2): 58-72.
- SOKOL RZ (1987). Hormonal effects of lead acetate in the male rat: Mechanism of action. *Biology of Reproduction*, **37**(5): 1135-1138.
- SONTAŞ HB (2016). Erkek kedi ve köpeklerde üreme sistemine ait sıklıkla karşılaşılan hastalık ve bozukluklar: Teşhis ve tedavi. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences- Obstetrics and Gynecology-Special Topics*, **2**(2): 42-55.
- SOUDEYER JP, GORELİCK DA (2018). Assaying uptake of endocrine disruptor compounds in zebrafish embryos and larvae. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, **208**: 105-113.

- SPANGLER JG (1999). Smoking and hormone-related disorders. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, **26**(3): 499-511.
- SU L, MRUK DD, CHENG CY (2011). Drug transporters, the blood–testis barrier, and spermatogenesis. *Journal of Endocrinology*, **208**(3): 207-223.
- SUTER-EICHENBERGER R, ALTORFER H, LICHTENSTEIGER W, SCHLUMPF M (1998). Bioaccumulation of musk xylene (MX) in developing and adult rats of both sexes. *Chemosphere*, **36**: 2747–2762.
- SWAN SH, MAIN KM, LUI F, STEWART SL, KRUSE RL, CALAFAT AM, MAO CS, REDMON JB, TERNAND CL, SULLIVAN S, TEAGUE JL; Study For Future Families Research Team (2005). Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal. *Environmental Health Perspectives*, **113**(8): 1056-1061.
- ŞEREFÖĞLU EC (2011). Bilgisayar yardımlı sperm analizi. *Türk Üroloji Seminerleri*, **2**: 8-10.
- TALWAR P, HAYATNAGARKAR S (2015). Sperm function test. *Journal of Human Reproductive Sciences*, **8**(2): 61-69.
- TAYLOR KM, WEISSKOPF M, SHINE J (2014). Human exposure to nitro musks and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Environmental Health*, **13**(14): 1-7.
- THANKAMONY A, LEK N, CARROLL D, WILLIAMS M, DUNGER DB, ACERINI CL, ONG KK, HUGHES IA (2014). Anogenital distance and penile length in infants with hypospadias or cryptorchidism: Comparison with normative data. *Environmental Health Perspectives*, **122**(2): 207-211.
- TIWARI AK, PRAGYA P, RAVI RAM K, KAR CHOWDHURI D (2011). Environmental chemical mediated male reproductive toxicity: *Drosophila Melanogaster* as an alternate animal model. *Theriogenology*, **76**: 197-216.
- TOKUR O, AKSOY A (2017). *In vitro* sitotoksikite testleri. *Harran Üniversitesi Veteriner Farmakoloji Dergisi*, **6**(1): 112-118.
- TOPPARI J, RODPRASET W, VIRTANEN HE (2014). Cryptorchidism–disease or symptom? *Annales d'Endocrinologie*, **75**: 72-76.
- TYSON CA, WITSCHI H (1993). *Methods in Toxicology*. California: Academic Press, Inc. .
- VILLANUEVA C, ARGENTE J (2014). Pathology or normal variant: What constitutes a delay in puberty? *Hormone Research in Paediatrics*, **82**: 213-221.

- VOGT PH, BENDER U (2013). Human Y Chromosome Microdeletion Analysis by PCR Multiplex Protocols Identifying only Clinically Relevant tAZF Microdeletions. Carrell DT, Aston KI içinde, *Spermatogenesis Methods and Protocols* (s. 187-204). Salt Lake City: Humana Press.
- VON ECKARDSTEIN S, COOPER TG, RUTSCHA K, MESCHEDE D, HORST J, NIESCHLAG E (2000). Seminal plasma characteristics as indicators of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene mutations in men with obstructive azoospermia. *Fertility and Sterility*, **73**(6): 1226-1231.
- WANG Y, YANG J, JIA Y, XIONG C, MENG T, GUAN H, XIA W, DING M, YUCHI M (2014). Variability in the morphologic assessment of human sperm: use of the strict criteria recommended by the World Health Organization in 2010. *Fertility and Sterility*, **101**(4): 945-949.
- WEIR JR RJ, FISHER RS (1972). Toxicologic studies on borax and boric acid. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **23**(3): 351-364.
- WEISKE WH (1994). Minimal invasive vasktomie mittels fulgurationstechnik. Erfahrungen bei 1000 patienten in 12 jahren. *Urologe*, **B34**: 448-452.
- WHO (1980). WHO Laboratory Manual For the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press.
- WHO (1987). WHO Laboratory Manual For the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press.
- WHO (1992). WHO WHO Laboratory Manual For the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press.
- WHO (1999). WHO WHO Laboratory Manual For the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge: Cambridge University Press.
- WHO (2010). WHO Laboratuvar El Kitabı İnsan Semeninin İncelenmesi ve İşlemlerden Geçirilmesi. (A. Kadioğlu, Çev.) İstanbul: Nobel Matbaacılık.
- WHO (2020). *www.who.int*. Chemical safety: Pesticides. 18.06.2022 tarihinde <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/chemical-safety-pesticides> adresinden alındı.
- WINDER C (1989). Reproductive and chromosomal effects of occupational exposure to lead in the male. *Reproductive Toxicology*, **3**(4): 221-233.
- YU M, ZHANG W, QIN L, TIAN L, ZHOU C (2010). Enhancement of p-glycoprotein expression by hepatocyte transplantation in carbon tetrachloride-induced rat liver. *The Anatomical Record*, **293**(7): 1167-1174.

YURDAKOK-DIKMEN B, TEKIN K, TIRPAN MB, DAŞKIN A, FİLAZI A (2017). *In vitro* toxicity of some pesticides on goat and dog spermatozoa. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **23**(2): 297-303.

YURDAKOK-DIKMEN B, TEKİN K, DAŞKIN A, FİLAZİ A (2014). Effects of polychlorinated biphenyls 28, 30 and 118 on bovine spermatozoa *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, **50**: 1, 41-47.

YURDAYDIN N, SEVİNÇ A (1985). Boğa sperması ve spermatolojik özellikleri üzerinde çalışmalar (Study on spermatological characteristics of bull semen). *Lalahan Zoot. Araşt. Enst. Derg.*, **25** (1-4): 30-40.

ZINAMAN MJ, BROWN CC, SELEVAN SG, CLEGG ED (2000). Semen quality and human fertility: A prospective study with healthy couples. *Journal of Andrology*, **21**(1): 145-153.

EKLER

EK-1 Bakanlık Onayı



T.C.
TARIM VE ORMAN BAKANLIĞI
Tarımsal Araştırmalar ve Politikalar Genel Müdürlüğü

Sayı : E-92190712-604.01.02-2200731

07.08.2020

Konu : DOÇ.DR. BEGÜM YURDAKÖK- BARIŞ
ÖTÜN'ÜN DOKTORA TEZİ İÇİN
SPERM İSTEMİ HK.

DAĞITIM YERLERİNE

İlgi : 28.07.2020 tarihli ve 11965581-5171 sayılı yazınız.

İlgi yazınız ve ekleri incelenmiş olup, Genel Müdürlüğümüze bağlı Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğünde üretimi yapılan ancak şap aşısını takiben imha edilmek üzere 3 farklı boğadan alınan taze spermanın Barış ÖTÜN'ün "*Boğalarda Musk Msilen ve Musk Ketonun Reprodüktif Toksisitesinin In Vitro Araştırılması*" isimli doktora tezinde kullanılması talep edilmektedir.

Söz konusu talep araştırma sonucu yazılacak tez ve yapılacak yayınlarda kullanılan materyalin Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğündeki boğalardan üretimi yapılan spermallerden şap aşısını müteakip imha edilecek spermalar olduğunun belirtilmesi, Enstitü Müdürlüğümüz ve Genel Müdürlüğümüze teşekkür kısmında atıfta bulunulması şartı ile uygun görülmektedir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

İhsan ASLAN
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı V.

Dağıtım:

Ankara Üniversitesi Rektörlüğüne
(Veteriner Fakültesi Dekanlığı)
Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim
Merkezi Müdürlüğüne

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2 Dekanlık Onayı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Veteriner Fakültesi Dekanlığı
Fakülte Sekreterliği



Sayı : 21304664-045.01-E.5485

11.08.2020


Konu : DOÇ.DR. BEGÜM YURDAKÖK-
BARIŞ ÖTÜN'ÜN DOKTORA TEZİ
İÇİN SPERM İSTEMİ HK.

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi : Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı Başkanlığımın 14.07.2020 tarihli ve 41298163-302.14.01-E.4908 sayılı yazımız.

Fakültemiz Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Begüm YURDAKÖK DİKMEN'in danışmanı olduğu doktora öğrencilerinden Barış ÖTÜN'ün yürüttüğü "Boğalarda Musk Ksilen ve Musk Ketonun Reprodüktif Toksisitesinin In Vitro Araştırılması" başlıklı tez çalışması kapsamında; Lalahan Uluslararası Hayvancılık Araştırma ve Eğitim Merkezi Müdürlüğü'nde üretimi yapılan ve Şap Aşısı'nı takiben sağım işlemi sonrasında imha edilen (3 farklı boğadan alınan) taze spermin belirtilen çalışmada kullanılabilmesi amacıyla alınabilmesi talebine ilişkin, ilgili Genel Müdürlük'ten alınan yazı ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

 e-İmza İdir

Prof. Dr. Belgin SARİMEHMETOĞLU
Dekan V.

Ek : Tarım ve Orman Bakanlığı'ndan alınan 07/08/2020 tarihli
E-92190712-604.01.02-2200731 sayılı yazı. (1 sayfa)

Not: 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-3 Etik Kurul Onayı



T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

TOPLANTI TARİHİ : 03/04/2019
TOPLANTI NO : 2019-8
DOSYA NO : 2019-53
KARAR NO : 2019-8-83

Yürütücülüğünü Üniversitemiz Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Begüm YURDAKÖK DİKMEN'in yaptığı; araştırmacı olarak Barış ÖTÜN'ün katıldığı "Boğalarda Musk Ksilen ve Musk Ketonun Reprodüktif Toksisitesinin In Vitro Araştırılması" başlıklı çalışma Üniversite Senatosunun 12/2/2016 tarih ve 430/3642 sayılı kararı ile kabul edilen ve Hayvan Deneyleri Merkezi Etik Kurulu'nun 19/2/2016 tarih ve 42 sayılı kararı ile onaylanan "Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi" nin 7-h maddesi kapsamında değerlendirilmiş ve izne tabi olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Geçerlilik Süresi : 01/07/2019-01/01/2021

ETİK KURUL ÜYELERİ				
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. M. Taner KARAOĞLU (Başkan)	Viroloji Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Prof. Dr. Tanju ÖZÇELİKAY (Başkan Vekili)	Farmakoloji Anabilim Dalı	Eczacılık Fakültesi	E	
Prof. Dr. Nuri YİĞİT (Üye)	Zooloji Anabilim Dalı	Fen Fakültesi	E	
Prof. Dr. Fatin CEDDEN (Üye)	Hayvan Yetiştirme Anabilim Dalı	Ziraat Fakültesi	E	
Prof. Dr. Mine KIRKAĞAÇ (Üye)	Su Ürünleri Mühendisliği Bölümü	Ziraat Fakültesi	K	
Prof. Dr. Emine DEMİREL YILMAZ (Üye)	Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Doç. Dr. Gülnur GÖLLÜ BAHADIR (Üye)	Çocuk Cerrahisi Anabilim Dalı	Tıp Fakültesi	K	
Doç. Dr. Mehmet SAĞLAM (Üye)	Cerrahi Anabilim Dalı	Veteriner Fakültesi	E	
Dr. Öğr. Üyesi Atilla ÖZGÜR (Üye)	Veteriner Hekimliği	Veteriner Fakültesi	E	

	Tarihi ve Deontoloji Anabilim Dalı			
Uzm. Vet. Hek. Attila İŞGÖREN (Üye)	Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Laboratuvarı	Tıp Fakültesi	E	
Dr. Vet. Hek. Gürbüz ERTÜRK (Üye)	Active Veteriner Sağlık Merkezi	Serbest	E	
Uzm. Vet. Hek. Hüseyin DEDE (Üye)	Veteriner Hekimler Derneği	Serbest	E	
Fatma Aysun COŞKUN (Üye)	İktisat	Serbest	K	