

**T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**FLORÜR İLE OLUŞTURULAN TESTİKÜLER HASARA
KARŞI ARI SÜTÜNÜN KORUYUCU ETKİLERİNİN
MOLEKÜLER BİYOLOJİK YÖNDEN ARAŞTIRILMASI**

Gözde PARLAK

Doktora Tezi
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Moleküler Biyoloji

OCAK 2022

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

FLORÜR İLE OLUŞTURULAN TESTİKÜLER HASARA KARŞI ARI
SÜTÜNÜN KORUYUCU ETKİLERİNİN MOLEKÜLER BİYOLOJİK
YÖNDEN ARAŞTIRILMASI

Tez Yazarı
Gözde PARLAK

Danışman
Doç. Dr. Abdullah ASLAN

OCAK 2022
ELAZIĞ

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Biyoloji Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Başlığı:	Florür ile Oluşturulan Testiküler Hasara Karşı Arı Sütünün Koruyucu Etkilerinin Moleküler Biyolojik Yönden Araştırılması
Yazarı:	Gözde PARLAK
İlk Teslim Tarihi:	09.12.2021
Savunma Tarihi:	11.01.2022

TEZ ONAYI

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına göre hazırlanan bu tez aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından değerlendirilmiş ve akademik dinleyicilere açık yapılan savunma sonucunda OYBİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

Danışman:	Doç. Dr. Abdullah ASLAN Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi	<i>İmza</i> Onayladım
Başkan:	Prof. Dr. Mustafa KARATEPE Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi	Onayladım
Üye:	Prof. Dr. İrfan EMRE Fırat Üniversitesi, Eğitim Fakültesi	Onayladım
Üye:	Doç. Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR Bingöl Üniversitesi, Fen Fakültesi	Onayladım
Üye:	Dr. Öğr. Üyesi Ömer ELKIRAN Sinop Üniversitesi, Sağlık Hizm. M.Y.O.	Onayladım

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun/...../20..... tarihli toplantısında tescillenmiştir.

İmza
Prof. Dr. Kürşat Esat ALYAMAÇ
Enstitü Müdürü

BEYAN

Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım “Florür ile Oluşturulan Testiküler Hasara Karşı Arı Sütünün Koruyucu Etkilerinin Moleküler Biyolojik Yönden Araştırılması” Başlıklı Doktora Tezimin içindeki bütün bilgilerin doğru olduğunu, bilgilerin üretilmesi ve sunulmasında bilimsel etik kurallarına uygun davrandığımı, kullandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi, maddi ve manevi desteği olan tüm kurum/kuruluş ve kişileri belirttiğimi, burada sunduğum veri ve bilgileri unvan almak amacıyla daha önce hiçbir şekilde kullanmadığımı beyan ederim.

11.01.2022

Gözde PARLAK



ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasının planlanması, çevrede kirlenici bir unsur olarak yer alan ve çeşitli sağlık problemlerine sebep olan Florür ile çeşitli sağlık problemlerinde faydalı etkileri olduğu bilinen arı sütünün kendilerine ait özellik ve etkileri göz önünde tutularak yapılmıştır. İncelenen literatür çalışmalarında, Florürün çeşitli dokularda toksik etkileri olduğu, Arı sütünün de doku ve hücreler üzerinde bazı faydalı etkilerinin olduğu belirlenmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, Florürün erkek üreme hücrelerine ve testis dokusu üzerine olan etkilerin nasıl ve ne şekilde ortaya çıkabileceği, bu etkilere karşı arı sütünün ne derece koruyucu olabileceği hipotezi üzerine tez çalışmamız planlanmıştır. Bu amaçla, ratlarda florür ile testis hasarı oluşturulmuş ve arı sütü verilerek testis dokusundaki koruyucu özellikleri çeşitli moleküler biyolojik yöntemlerle araştırılmıştır. Pandeminin oluşturduğu zor koşullar altında tez çalışmamız tamamlanmış olup literatüre katkı sağlayacak önemli veriler elde edilmiştir.

Bu doktora tezimin oluşum aşamasında ve tüm doktora eğitimi süresince gerek teorik gerek pratik alanda bana her zaman yol gösteren, yardımlarını, bilgi ve tecrübelerini her zaman yanımda hissettiğim tez danışmanım ve değerli hocam Sayın Doç. Dr. Abdullah ASLAN'a; çalışmamızda spermatolojik ve histolojik deney aşamalarında değerli katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Gaffari TÜRK ve Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU hocalarıma ve çalışma ekiplerine; Tez izleme komitesinde bulunan ve değerli bilgileriyle katkı sunan Sayın Prof. Dr. Mustafa KARATEPE ve Sayın Prof. Dr. İrfan EMRE hocalarıma; çalışmalar sırasında yardımlarından dolayı Arş. Gör. Özlem GÖK, Dr. Seda BEYAZ, Arş. Gör. M. İsmail CAN, Dr. Merve KAVAK BALGETİR ve Doç. Dr. Akif Evren PARLAK'a ayrıca Fırat Üniversitesi ve İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümündeki değerli Hocalarıma teşekkür ediyorum. Çalışmamızın deney hayvanları aşamasını yürüttüğümüz FÜDAM'ın değerli çalışanlarına ve bu çalışmaya maddi destek sağlayan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi (FÜBAP)' ne teşekkür ediyorum. Ayrıca eğitim hayatım boyunca her zaman bana destek olan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması, Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (FÜBAP) koordinatörlüğü tarafından **F.F. 19.16** protokol numarasıyla desteklenmiş ve Fırat Üniversitesi Girişimsel Olmayan Etik Kurulun **30/05/2018** tarih ve **2018/57** protokol numaralı ve **101** sayılı izni ile gerçekleştirilmiştir.

Gözde PARLAK
ELAZIĞ, 2022

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
TABLOLAR LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. Testisin Genel Yapısı	4
2.2. Testisin Anatomisi ve Histolojisi	5
2.3. Testis Gelişimi ve Spermatogenezis.....	6
2.4. Seminifer Tübül Histolojisi	7
2.5. Seminifer Tübüllerin İnce Yapısı ve Spermatogenezis	8
2.6. Germ Hücrelerinin İnce Yapısı ve Erken Spermiyogenezis	9
2.7. Germ Hücrelerinin İnce Yapısı ve İleri Evredeki Spermiyogenezis.....	10
2.8. Sertoli Hücrelerinin Yapısı ve Görevi	11
2.9. Leydig Hücrelerinin Histolojisi ve İnce Yapısı	12
2.10. Leydig Hücrelerinin İnce Yapısı ve İşlevi.....	13
2.11. Florür	14
2.11.1. Florür Toksisite Etki Mekanizması	16
2.11.2. Florür ve Erkek İnfertilitesi.....	17
2.12. Arı Sütü	22
2.12.1. Arı Sütü ve Erkek İnfertilitesi	28
2.13. Apoptozis.....	29
2.13.1. Apoptozisin Düzenlenmesinde Görev Alan Genler	31
2.13.2. B-hücreli Lenfoma- 2 (Bcl-2) Ailesi Genleri	32
2.13.3. Bcl-2 Proteinleri Aracılığıyla Apoptozisin Düzenlenmesi	34
2.13.4. Apoptoziste Sinyal İletim Yolakları (Ölüm Almaçları)	36
2.13.5. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α)	37
2.13.6. Kaspazlar	41
2.13.7. Kaspaz Aktivasyonu.....	41
2.13.8. Kaspaz Aktivitesinin Düzenlenmesi.....	42
2.13.9. Apoptotik Hücre Ölümünde Kaspaz-3'ün Rolü.....	43
2.14. Nükleer Faktör Kappa B (NF- κ B).....	44
2.15. Nükleer Faktör Eritroid 2 İlişkili Faktör 2 (Nrf-2)	47
2.16. Siklooksijenaz-2 (COX-2).....	49
2.17. İnterlökin-1alfa (IL-1 α)	51
3. OKSİDATİF STRES, MDA VE ANTİOKSİDAN ENZİMLER	53
3.1. Malondialdehit (MDA).....	54
3.2. Katalaz.....	55
3.3. Glutasyon	56
4. MATERYAL VE METOT	58

4.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları	58
4.2. Doku Homojenizasyonu	60
4.3. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi.....	61
4.4. Testis Doku Örneklerindeki MDA Analizi.....	61
4.5. Testis Plazma örneklerindeki MDA Analizi.....	61
4.6. MDA Ölçümleri için Standart Eğri Çizimi.....	61
4.7. Testis Doku örneklerindeki GSH (Glutasyon) Analizi	62
4.8. Testis Doku Örneklerindeki Katalaz Aktivite Tayini	62
4.9. Histopatolojik değerlendirme ve TUNEL Metoduyla Apoptozis Düzeylerinin Belirlenmesi	62
4.10. Vücut ve Üreme organ ağırlıklarının ölçülmesi	63
4.11. Spermatolojik Analizler.....	63
4.11.1. Epididimal spermatozoon yoğunluğu.....	63
4.11.2. Spermatozoon motilitesi.....	63
4.11.3. Anormal spermatozoon oranı	64
4.12. İstatistiksel Analizler	64
5. BULGULAR.....	65
5.1. Deney hayvanlarının Ağırlık Düzeyleri.....	65
5.2. Testis Doku ve Plazmasındaki Malondialdehit (MDA) Düzeyleri	66
5.3. Testis Dokusu Katalaz Enzim Aktivite Düzeyleri.....	69
5.4. Testis Dokusu Glutasyon (GSH) Düzeyleri.....	71
5.5. COX-2, IL1- α , Tnf- α , NF- κ B, Nrf-2, Bcl-2, Kaspaz-3 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri	73
5.5.1. Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Düzeyleri	73
5.5.2. Bcl-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri	74
5.5.3. Nrf-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri	75
5.5.4. NF- κ B Protein Ekspresyon Düzeyleri.....	76
5.5.5. TNF- α Protein Ekspresyon Düzeyleri	77
5.5.6. COX-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri	78
5.5.7. Interlökin1-alfa (IL1- α) Protein Ekspresyon Düzeyleri	79
5.6. Üreme Organ Ağırlıkları	80
5.6.1. Üreme organları absolut ağırlıkları	80
5.6.2. Üreme organları rölatif ağırlıkları	85
5.7. Spermatolojik Muayene Bulguları.....	90
5.7.1. Sperm Yoğunluğu	90
5.7.2. Sperm Motilitesi.....	91
5.7.3. Anormal Sperm Oranı	92
5.8. Histopatolojik Bulgular ve Değerlendirmeler.....	94
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	101
ÖNERİLER	127
KAYNAKLAR.....	128
ÖZGEÇMİŞ	

ÖZET

Florür ile Oluşturulan Testiküler Hasara Karşı Arı Sütünün Koruyucu Etkilerinin Moleküler Biyolojik Yönden Araştırılması

Gözde PARLAK

Doktora Tezi

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Ocak 2022, Sayfa: xiv + 150

Florür günlük olarak yiyecek ve içme suyu yoluyla vücuda alınır. Günlük olarak besinlerle ve içme suları ile vücuda alınan bu elementin miktarı güvenlik eşiğini aşacak olursa florozis olarak bilinen kronik flor zehirlenmesi oluşmaktadır. Arı ürünlerinin tedavi amaçlı kullanımı çok eski zamanlara dayanmaktadır ve günümüzde de bu tedavi yöntemlerinin çeşitli hastalıklara karşı hızla iyileşme göstermesi, kullanım alanlarını ve kullananların sayılarını artırmıştır. Bu çalışma, florür verilerek testis hasarı oluşturulmuş ratların testis dokusu üzerinde arı sütünün koruyucu özelliklerinin incelenmesi amacıyla yapılmıştır. Testis dokusunda lipit peroksidasyonu MDA (malondialdehit) analizleri ile CAT (katalaz) ve GSH (glutasyon) düzeyi spektrofotometre ile belirlenmiştir. Ratların testiküler hasar incelemeleri Tunel metoduyla değerlendirilmiştir. Sperm motilitesi, epididimal sperm yoğunluğu ve anormal sperm oranları incelenip, ışık mikroskopuyla görüntülenmiştir. Testis dokusunda Kaspaz-3, Bcl-2, Nrf-2, NF- κ B, Cox-2, TNF- α ve IL-1- α proteinlerinin ekspresyon seviyeleri western blot tekniği ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda MDA düzeyi, Bcl-2, NF- κ B, Cox-2, TNF- α ve IL-1- α proteinlerinin ekspresyon düzeyleri, anormal sperm oranları Florür-50 ve Florür-100 gruplarında diğer gruplara göre yüksek bulunmuştur. Ayrıca, Florür-50 ve Florür-100 gruplarında histolojik değerlendirmede diğer gruplara göre testiküler dokuda daha fazla dejenerasyon bulunmuştur. Diğer taraftan, Florür + Arı Sütü gruplarında GSH, Katalaz enzim düzeyleri, Kaspaz-3 ve Nrf-2 proteinlerinin ekspresyon düzeyleri Florür-50 ve Florür-100 gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur. Bunun yanında, Florür + Arı Sütü gruplarının histolojik değerlendirmesinde diğer gruplara göre testiküler dokuda daha düşük dejenerasyonu bulunmuştur.

Sonuç olarak, arı sütünün florür kaynaklı testiküler hasara karşı etkili bir koruma sağladığını düşünmekteyiz. Bu bağlamda arı sütünün insanlar üzerinde de denendiğinde benzer sonuçların alınacağını ümit ediyoruz.

Anahtar Kelimeler: Arı sütü, Florür, Testis hasarı, Sperm parametreleri, Proteinler

ABSTRACT

Molecular Biological Investigation of the Protective Effects of Royal Jelly Against Testicular Damage Caused by Fluoride

Gözde PARLAK

Ph.D. Thesis

FIRAT UNIVERSITY
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

January 2022, Pages: xiv + 150

Fluoride is taken into the body daily through food and drinking water. If this element is taken more than its safe value, chronic fluorine poisoning occurs, known as fluorosis. The therapeutic use of bee products dates to ancient times. Today, the rapid recovery of these treatment methods against various diseases has increased the areas of use and the number of users. This study was carried out to investigate the protective properties of royal jelly on the testicular tissue of rats with testicular damage by giving fluoride. Lipid peroxidation in testicular tissue was determined by MDA (malondialdehyde) analysis. CAT (catalase) and GSH (glutathione) levels were determined by spectrophotometer. Sperm motility, epididymal sperm density and abnormal sperm ratios of rats were examined according to the methods in the literature and visualized with a light microscope. Testicular damage examinations of rats were evaluated by Tunel method. Sperm motility, epididymal sperm density and abnormal sperm ratios were examined and visualized with a light microscope. Expression levels of Caspase-3, Bcl-2, Nrf-2, NF- κ B, Cox-2, TNF- α and IL1- α proteins in testis tissue were determined by western blot technique. As a result of the study, MDA level, expression level of Bcl-2, NF- κ B, Cox-2, TNF- α and IL1- α proteins, abnormal sperm rates were found higher in Fluoride-50 and Fluoride-100 groups compared to other groups. In addition, more degeneration was found in the testicular tissue in the histological evaluation in the Fluoride-50 and Fluoride-100 groups compared to the other groups. On the other hand, GSH, Catalase enzyme levels, expression levels of Caspase-3 and Nrf-2 proteins were found to be higher in Fluoride + Royal Jelly groups compared to Fluoride-50 and Fluoride-100 groups. In addition, lower degeneration of testicular tissue was found in the histological evaluation in the Fluoride + Royal Jelly groups compared to the other groups.

As a result, when the data are evaluated, we believe that royal jelly provides effective protection against testicular damage. From this point of view, we hope that similar results will be obtained when royal jelly is tested on humans.

Keywords: Royal Jelly, Fluoride, Testicular damage, Sperm parameters, Proteins.

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Testisin genel yapısı.....	4
Şekil 2.2. Testisin dokusu.....	5
Şekil 2.3. Testis anatomisi ve testis dokusu kesitlerinin mikroskopik görünümü.	6
Şekil 2.4. Spermatogenezde gelişim basamakları ve Olgun spermatozoon yapısı	7
Şekil 2.5. Seminifer tübül histolojik görünüm.....	8
Şekil 2.6. Seminifer tübül epitelinin elektron mikroskobu görüntüsü.	9
Şekil 2.7. Seminifer epiteldeki erken spermatid görünümü.....	10
Şekil 2.8. Uzamış spermatid görünümü.....	10
Şekil 2.9. Seminifer tübül ve sertoli hücrelerinin görüntüleri	11
Şekil 2.10. Leydig hücre kümeleri görüntüleri.	12
Şekil 2.11. Leydig hücresi ve kapiler endotel hücre görüntüleri	13
Şekil 2.12. Florürün etkilediği hücresel sistemler.	17
Şekil 2.13. Florürün spermatozoa üzerindeki etkileri.....	19
Şekil 2.14. Florürün erkek üreme sistemi üzerine etkileri.	21
Şekil 2.15. Arı sütünün görünümü.	22
Şekil 2.16. 10-hidroksi-2-dekenoik asit bileşiğinin yapısı.	25
Şekil 2.17. Arı sütünün etkilediği bazı alanlar.	26
Şekil 2.18. Ticari ürün olarak satılan arı sütü örnekleri.....	27
Şekil 2.19. Memelilerde Bulunan Bcl-2 Ailesi Üyeleri.....	33
Şekil 2.20. Bax aktivasyonunun kontrolü.	34
Şekil 2.21. TNF- α ,’ nın trimerizasyon ile aktivasyonu.	37
Şekil 2.22. TNF- α ,’ disregülasyonunun yansımaları.	38
Şekil 2.23. TNF almaç kompleksi.	39
Şekil 2.24. TNF sinyal iletim yolları	40
Şekil 2.25. Apoptotik yollar ve kaspazlar.....	43
Şekil 2.26. NF- κ B aile üyeleri.....	44
Şekil 2.27. NF- κ B a sinyal yolları ve dimerizasyonları	45
Şekil 2.28. NF- κ B yolları.	46
Şekil 2.29. Nrf-2’ nin hücrede düzenlenmesi.	48
Şekil 2.30. Spermatogenez için önemli olan başlıca antioksidan enzim ürünleri ve Nrf-2.	48
Şekil 2.31. COX-2 enziminin etkileri ve salınımının düzenlenmesinde rol oynayan sitokin ve yollar. ...	50

Şekil 2.32. Interlökin-1alfa (IL-1 α) yapısı.	51
Şekil 3.1. Erkek Üreme sistemi primer patolojileri.	53
Şekil 3.2. MDA kimyasal yapısı.....	54
Şekil 3.3. Katalaz yapısı.....	55
Şekil 3.4. Oksidatif stres ve GSH ilişkisi.	56
Şekil 4.1. Hayvanların beslenme düzeni ve gruplarına göre kafeslere ayrılması.	58
Şekil 4.2. Ratlara yapılan uygulamalar.....	60
Şekil 5.1. Ratların uygulama sonundaki vücut ağırlıklarına ait istatistiksel grafik.	65
Şekil 5.2. MDA standart eğrisi	66
Şekil 5.3. Ratlara ait testis dokusu MDA sonuçlarına ait istatistiksel grafik.	67
Şekil 5.4. Ratlara ait testis plazma MDA sonuçlarına ait istatistiksel grafik.	68
Şekil 5.5. Katalaz standart eğrisi	69
Şekil 5.6. Ratlara ait testis dokusu Katalaz enzim aktivitesi sonuçlarına ait istatistiksel grafik.	70
Şekil 5.7. GSH standart eğrisi.	71
Şekil 5.8. Ratlara ait testis dokusu GSH enzim aktivitesi sonuçlarına ait istatistiksel grafik.	72
Şekil 5.9. Kaspaz-3 proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik.	73
Şekil 5.10. Bcl-2proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik.	74
Şekil 5.11. Nrf-2 proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik.	75
Şekil 5.12. NF- κ B proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik.....	76
Şekil 5.13. TNF- α proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik.	77
Şekil 5.14. COX-2proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik.	78
Şekil 5.15. IL1- α proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik.....	79
Şekil 5.16. Rat testis absolut üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik.	81
Şekil 5.17. Rat epididimis absolut üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik.	82
Şekil 5.18. Rat sağ kauda epididimis absolut üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik.....	83
Şekil 5.19. Rat seminal bez absolut üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik.	84
Şekil 5.20. Rat ventral prostat absolut üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik.	85
Şekil 5.21. Rat testis rölatif üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik.....	86
Şekil 5.22. Rat epididimis rölatif üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik.	87
Şekil 5.23. Rat sağ kauda epididimis rölatif üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik.	88
Şekil 5.25. Rat ventral prostat bez rölatif üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik.....	90
Şekil 5.26. Rat sperm yoğunluk miktarlarına ait istatistiksel grafik.....	91
Şekil 5.27. Rat sperm motilite (%) değerlerine ait istatistiksel grafik.	92
Şekil 5.28. Rat anomalili sperm değerlerine ait istatistiksel grafikler.	93

Şekil 5.29. Kontrol grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler	94
Şekil 5.30. RJ grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler	94
Şekil 5.31. F 50 grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler ..	95
Şekil 5.32. RJ + F 50 grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler	95
Şekil 5.33. F 100 grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler	96
Şekil 5.34. RJ + F 100 grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler	96
Şekil 5.35. Kontrol grubu Testis (bölgesel kesit görünümü).....	98
Şekil 5.36. RJ grubu Testis (bölgesel kesit görünümü).....	98
Şekil 5.37. F50 grubu Testis (bölgesel kesit görünümü).....	99
Şekil 5.38. RJ + F50 grubu Testis (bölgesel kesit görünümü).....	99
Şekil 5.39. F 100 grubu Testis (bölgesel kesit görünümü).....	100
Şekil 5.40. RJ + F 100 grubu Testis (bölgesel kesit görünümü).....	100

TABLÖLAR LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. Bazı Besin maddelerindeki florid miktarları.....	15
Tablo 2.2. Arı sütü içeriği	23
Tablo 2.3. Arı sütü vitamin içeriği	23
Tablo 2.4. Arı sütü karbohidrat içeriği.....	24
Tablo 2.5. Arı sütü yağ asidi içeriği.....	25
Tablo 2.6. Arı sütü hormon içeriği.....	25
Tablo 2.7. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklılıklar	31
Tablo 2.8. Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan genler.....	32
Tablo 4.1. Ratlara verilen besin içeriği	59
Tablo 4.2. Deney grupları	60
Tablo 5.1. Ratların uygulama sonundaki vücut ağırlık sonuçları.....	65
Tablo 5.2. Ratlara ait testis dokusu MDA sonuçları.	66
Tablo 5.3. Ratlara ait testis plazma MDA sonuçları.	67
Tablo 5.4. Ratlara ait testis doku Katalaz enzim aktivitesi sonuçları.....	69
Tablo 5.5. Ratlara ait testis doku GSH enzim aktivitesi sonuçları.	71
Tablo 5.6. Rat Testis absolut üreme organ ağırlıkları	80
Tablo 5.7. Rat epididimis absolut üreme organ ağırlıkları.....	81
Tablo 5.8. Rat sağ kauda epididimis absolut üreme organ ağırlıkları	82
Tablo 5.9. Rat seminal bez absolut üreme organ ağırlıkları.....	83
Tablo 5.10. Rat ventral prostat bez absolut üreme organ ağırlıkları	84
Tablo 5.11. Rat testis rölatif üreme organ ağırlıkları	85
Tablo 5.12. Rat epididimis rölatif üreme organ ağırlıkları.....	86
Tablo 5.13. Rat sağ kauda epididimis rölatif üreme organ ağırlıkları	87
Tablo 5.14. Rat seminal bez rölatif üreme organ ağırlıkları.....	88
Tablo 5.15. Rat ventral prostat rölatif üreme organ ağırlıkları.....	89
Tablo 5.16. Rat sperm yoğunluk miktarları.	91
Tablo 5.17. Rat sperm motilite (%) değerleri.....	92
Tablo 5.18. Rat Anormal sperm oranları (%).....	93
Tablo 5.19. TUNEL yöntemiyle belirlenen apoptotik indeks	97

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

kg	: Kilogram
mA	: Miliamper
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece
rpm	: Revolutions per minute
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ppm	: Milyonda bir birim
µg	: Mikrogram

Kısaltmalar

AP-1	: Aktivatör protein-1
Apaf-1	: Apoptozla İlgili Faktör-1
Are	: Antioksidan tepki/cevap elemanları
Bcl-2	: B-hücreli Lenfoma- 2
BH3-only	: Sadece BH3 içeren protein
Bid	: Proapoptotik Bcl-2 Ailesi Proteini (BCL-2 etkileşim domaini)
CA	: Canlı Ağırlık
cAMP	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
CAT	: Katalaz
CARD	: Kaspaz aktivasyon ve alım bölgeleri
COX-1	: Siklooksijenaz-1
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CREB	: Siklik AMP cevap elemanı bağlanma proteini
DAB	: 3,3'-Diaminobenzidin
DED	: Ölüm efektör alanı
DER	: Düz yüzlü Endoplazmik Retikulum
DISC	: Ölüm Neden Olan Sinyal Kompleksi
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EGF	: Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	: Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ERK	: Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz.
F⁻	: Florür
FADD	: Fas ilişkili ölüm domain
FasL	: Fas reseptör ligandı
FLIP	: FLICE inhibitör protein
FÜDAM	: Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi
GPx	: Glutasyon Peroksidaz
GR	: Glutasyon Redüktaz
GSH	: Glutasyon (indirgenmiş)
GST	: Glutasyon S-transferaz
GSSG	: Okside Glutasyon

H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
IAP	: Apoptozis inhibitörleri
IKK	: IκB kinaz
IL-1α/ β	: Interlökin-1alfa/ beta
IL1R1	: Interlökin1 tip I reseptörüne
IMS	: İntermembran Boşluk
KEAP1	: Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1
MDA	: Malondialdehit
mTNF	: Membranöz TNF
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NEMO	: Nükleer faktör-κB esansiyal modifiye edici
NF-κB	: Nükleer Faktör Kappa B
NF-κBIA	: IκBα, nükleer faktör-kappa B inhibitör alfa
Nrf-2	: Nükleer Faktör Eritroid 2 (Nf-E2) İlişkili Faktör 2
¹O₂	: Singlet oksijen
O₂[•]	: Süperoksit radikali
OH[•]	: Hidroksil radikali
Pi	: İnorganik fosfor
PARP	: polyADP-riboz polimeraz
PRX	: Peroksiredoksin
RIP1	: Reseptörler etkileşen protein 1
RJ	: Arı sütü
RNA	: Ribonükleik Asit
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
SDS-PAGE	: Sodyum Dodesil Sülfat Ploiakrilamid Jel Elektroforezi
SOD	: Süperoksit dismutaz
SOR	: Serbest Oksijen Reaktifleri
SUMO	: Küçük Ubikuitin ilgili değiştirici proteini
sTNF	: Çözülebilir yapıdaki
T₃	: Triiyodotironin (Tiroid hormonu)
TBA	: Tiyobarbitürik Asit
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
TNF-α	: Tümör Nekroz Faktörü-alfa
TNFR1	: Tümör Nekroz Faktörü Almaç (reseptör) 1
TNFR2	: Tümör Nekroz Faktörü Almaç (reseptör) 2
TRADD	: TNFR-1 ilişkili ölüm domaini (TRADD)
TRAIL	: Tümör Nekroz Faktörü ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand
TRX	: Tioredoksin
TUNEL	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz dUTP Çentik Uç Etiketleme
USF-1	: Yukarı yönlü uyarıcı faktör-1

1. GİRİŞ

İnsanlar, sağlıklarını etkileyebilecek düzeyde çevrede çok sayıda ve farklı türde kimyasala maruz kalabilmektedir. Çok çeşitli endüstriyel ve çevresel toksik maddelerin erkek üreme fonksiyonlarını tehlikeye attığı bilinmektedir [1]. Son elli yılda sağlıklı erkeklerde ortalama sperm sayısının ve sperm hacminin dünya çapında %50 oranında azaldığı rapor edilmiştir, [2]. Bu azalma çevresel kirleticilerdeki artışlarla ilişkilendirilebilir. Günümüzde, çevresel değışikliklerin erkek üremesi üzerindeki etkileriyle ilgili endişeler gittikçe artmakta ve bu konuda yapılan çalışmaların da önemi artmaktadır [3].

Son derece aktif bir element olan flor, çevrede yaygın olarak bulunmaktadır. Bir halojen olan flor elementi, J. H. Moisson tarafından 1886 yılında, Fransa'da keşfedilmiştir. İnorganik bir anyon olarak florür, yerkabuğunda en bol bulunan 13. elementtir. Su, insanların florüre maruz kalmasının ana kaynağıdır [4, 5]. Sudaki florür konsantrasyonu her coğrafi bölgeye bağılı olmasına rağmen, insan vücudundaki başlıca florür kaynağı florürlü sudur. Ayrıca birçok ülkede dış çürüklerinin önlenmesi ve kemik homeostazının korunmasındaki rolü nedeniyle Florür içme suyuna eklenmiştir [6,7].

Günlük en büyük florür alımı genellikle içme suyundan, özellikle de dünyanın her yerindeki yeraltı suyundan gelir. Yeraltı sularında yüksek florür içeriğı olduğu bildirilmiştir [8]. Dünya çapında yapılan araştırmalarda, Afrika'nın çeşitli bölgelerinin, ABD, Arjantin, Bulgaristan, Çin, Etiyopya, İran, Kore ve Meksika, içme suyunun ciddi şekilde kirlenmesine yol açan yüksek bir florür konsantrasyonuna sahip olduğu bildirilmiştir [9]. Arpa, pirinç, tatlı patates, deniz ürünleri, çay gibi bazı besin içeriklerinde de yüksek florür konsantrasyonları tespit edilmiştir. Ek olarak, endüstriyel emisyonlar, dış macunları, böcek ilaçları florüre maruziyetine yol açan bazı kaynaklar arasında yer alır [10].

Flor, reaktifliğı ve elektronegatifliğı yüksek olan bir elementtir. Bu nedenle genellikle asalgazlar (soygazlar) ve oksijen dışında diğere birçok elementlerle bileşik oluşturarak doğada moleküler (florür) yapıda bulunur. Florür, vücuda alınan su, bazı besinler, içecekler, ilaçlar, dişçilik ve kozmetik ürünleri, dış macunu gibi ürünlerdeki çeşitli bileşiklerin yapısında yer alarak metabolizmaya girebilir [11]. Flor içme suyunda da iyonik bileşik yapısında yer alır böylece bağırsaktan hızlıca geçer [12]. Bileşiklerde florun toksisitesi bileşiğin suda çözünabilirliğı ile ilişkilidir. Bu nedenle, kalsiyum florür, kaya fosfatı veya kriyolit gibi bileşiklere göre çözünürlüğü daha fazla olan sodyum florür daha etkili bir aktiviteye sahiptir [13]. Günümüzde ilerleyen endüstri ve teknolojiye bağılı olarak florür birçok ürünün yapısında olduğu gibi geri kalan atığında da bulunabilir. Bu nedenle günümüzde insanlar yüksek miktarda florür maruziyetiyle karşı karşıyadır. Bu nedenle vücuda florür alımı daha fazla gerçekleşebilir, bu durum toksik etkilere neden olabilir. Literatürde Florürün kümülatif bir toksik madde olduğu bildirilmiştir [14, 15].

Kümülatif toksisitede, toksik etkilerin ortaya belirli bir süre sonra, birikmeye bağlı artan doz ile etkisini göstermesi şeklinde tanımlanabilir [14, 15]. Güçlü penetrasyon kabiliyetine sahip bir anyon olarak florür, serbest difüzyon yoluyla hücre zarlarına kolayca nüfuz edebilir ve hücre yapısı ve işlevi üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir [16].

Literatürde, düşük konsantrasyonlu florürün dişlerin ve kemiklerin gelişimine katkıda bulunduğu, aşırı flor alımının ise tiroid, kemikler, dişler, karaciğer, böbrekler, beyin, bağırsaklar gibi çeşitli doku ve organlar üzerinde olumsuz bir etkisi olduğu bildirilmiştir [17-24]. Aşırı florüre uzun süre maruz kalmanın çeşitli dokularda hematolojik, hepatik, renal ve nörolojik hastalıklara yol açabildiği de bildirilmiştir [25-27]. Tüm bu etkilere göre florür, insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olan çevresel bir toksik madde olarak da sınıflandırılabilir [28]. Florür birikimlerinin iskelet ve diş florozisi hastalıklarına neden olduğu kliniksel olarak tanımlanmıştır [29]. Bununla birlikte, yapılan birçok çalışmaya rağmen, florürün toksisite mekanizması net olarak ortaya koyulamamıştır. Florürün üreme işlevleri üzerindeki etkilerine yönelik yapılan çalışmalar da florür toksisitesine işaret edilen sonuçlar elde edilmiştir. Florür alımının sperm azalmasına ve düşük üreme hormonu seviyelerine neden olabileceğini gösteren ve sodyum florür alan erkek sıçanlarda infertiliteye yol açabileceğini bildiren çalışmalar vardır [30, 31]. Erkek kısırlığı, çiftlerin karşılaştıkları doğurganlık sorunlarının yaklaşık %50'sinden sorumludur. Erkeklerde kısırlık, genellikle azalmış sperm sayısı, anormal sperm kalitesinin (örn., azalmış hareketlilik ve değişmiş morfoloji) veya değişen seks hormon düzeylerinin (örn., düşük testosteron) sonucudur [32]. Erkek üreme sisteminde testis ve epididimin normal yapısı, androjen ve östrojen salınımı arasındaki denge, spermatogenez ve sperm olgunlaşması için çok önemlidir. Spermin anormal morfolojisi, yapısı ve işlevi sadece meni kalitesini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda erkek kısırlığına da neden olur. Testis, erkek üreme sisteminde sperm üreten tek organdır. Bu nedenle testisin normal yapısı, spermatogenez ve çeşitli fizyolojik fonksiyonların sürdürülmesinde önemlidir. Çok sayıda epidemiyolojik araştırma, florüre aşırı maruz kalmanın, testiste bariz hasara neden olabileceğini göstermiştir. Florür erkek üreme fonksiyonunu etkilemektedir. Farklı türde yapılan kliniksel ve deneysel çalışmalarda florürün, spermde yapı ve işlev kusurlarına, sperm miktarında düşüşe, üreme hormonlarının seviyelerinde değişimlere, epididimis ve yardımcı üreme bezlerinde farklılaşmaya, kısırlığa, testiküler dokuda hasara yol açtığı gösterilmektedir [33, 34]. Florürün toksik etkisi hücrelerde protein hasarından serbest radikallerin oluşumuna kadar farklı şekillerde ortaya çıkabilir ve sonucunda hücre işlevlerinde bozulma gerçekleşir [35].

Metabolizmada, farklı nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilen toksisitenin oluşturduğu etkinin en aza indirilmesi için yeterli miktarda antioksidan ya da antioksidan özellikte ürünler tüketilmelidir.

Arı sütü, işçi arıların yutakaltı (hipofaringeal) bezlerinden salgılanan değerli bir gıdadır. Yapısında; yaklaşık %60-70 su, %10-12 karbonhidrat, %12-15 protein ve %3-7 lipid

bulunmaktadır [36, 37]. Arı sütü, koyu kıvamlı, jelatinöz vasıfta, beyaz-sarı renkli olmakla birlikte homojen bir maddedir. Keskin fenolik koku ve karakteristik ekşi tada sahiptir. Arı sütünün hafızayı güçlendirdiği, fiziksel performansı arttırdığı, yorgunluk giderici, doku ve cilt yenilenmesine yardımcı olduğu, tümör önleyici, antioksidatif, diyabet önleyici, bağışıklık sistemini uyarıcı, antialerjik, antibakteriyel, antiülser, östrojenik, antiinflamatuvar, antihipertansif, kadın ve erkekte üremeyi, arttırıcı etkisinin olduğu bildirilmiştir [38]. Arı sütü, yaygın olarak kullanılan bir tür fonksiyonel gıda [39] ve birçok biyolojik aktiviteye sahip besin takviyesidir [40].

Literatürdeki bu bilgilerden yola çıkarak bu tez çalışması, çocukluk çağlarından itibaren (okul öncesi-anaokulu dönemi florür uygulaması ve sonraki dönemlerde diş macunu kullanımları), tüm hayatımız süresince sürekli maruz kaldığımız florürün testis dokusunda oluşturduğu hasarı belirlemek ve bu hasara karşı arı sütünün koruyucu etkisinin ne olduğunu tespit etmek amacıyla planlanmıştır.

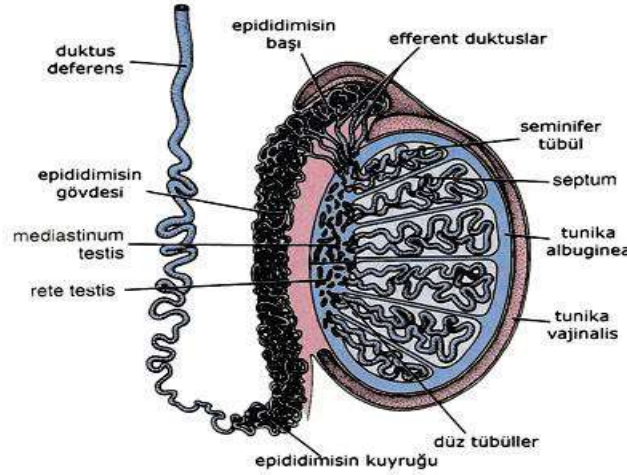
Bu hedefle, tez çalışmamızda kontrol, florür ve arı sütü gruplarıyla oluşturduğumuz deney modelinde, testiküler doku analizleri için; moleküler marker (belirteç) olarak kullanılan bazı proteinlerinin analizi yapılmış ve bu ekspresyonlardaki değişimlerle ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir. Histolojik yönden doku incelenmiş testiküler doku hasarları belirlenmiştir. Ayrıca testis doku ve plazma MDA miktarı ile oksidatif hasar düzeyi ölçülmüş ve Katalaz ve GSH analizleri yapılarak antioksidan enzim aktiviteleri de araştırılmıştır. Üreme organ ağırlıkları ölçülmüş ve spermatozoalar toplanarak yoğunluk, motilite, morfoloji açısından değerlendirilmiş ve erkek infertilitesinde (kısırlık) faydalanılabilecek önemli veriler elde edilmiştir.

Florür ile oluşturulan testiküler hasara karşı arı sütünün koruyucu etkilerinin moleküler biyolojik yönden araştırılması başlıklı tez çalışmamızda yaptığımız analizler sonucunda elde ettiğimiz verilerin, bu alandaki literatüre önemli bir katkı sunacağı düşünülmektedir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. Testisin Genel Yapısı

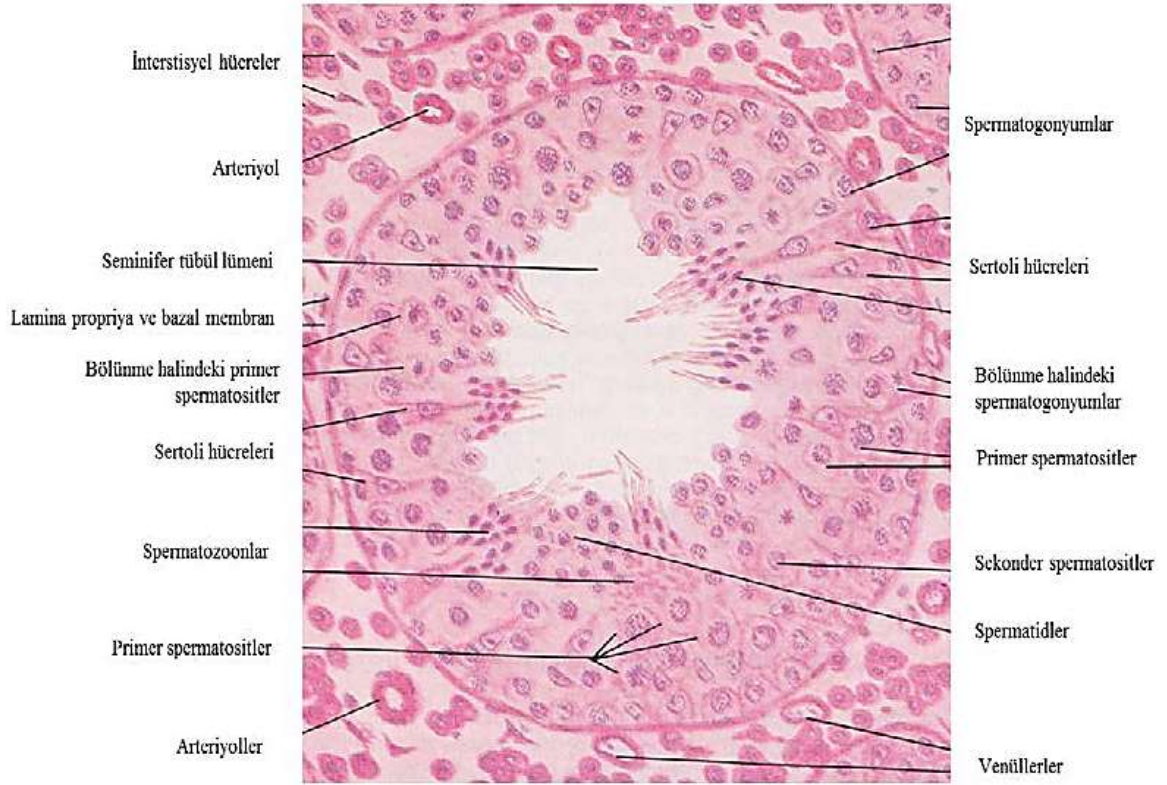
Erkek üreme sistemi birincil cinsiyet organı olan ve hem ekzokrin, hem de endokrin işlevleri bulunan bir çift testis ile boşaltım kanalları ve yardımcı bezlerden oluşan birkaç ikincil cinsiyet organını kapsamaktadır. Skrotum ve erektile bir organ olan penis dış genital organlardır. Testisler skrotumun içinde, vücut boşluğunun dışında asılı durumda ve belli bir konumda yer almaktadır. Testisler ve bunlara bağlı sperm kordonları, erkek gonadlarının orijinal yeri olan karın boşluğu içinden skrotuma inmesi sırasında ayrı doku tabakalarıyla sarılır. Testisler, germinal epitelinde spermatozoonlar olarak adlandırılan erkek üreme hücrelerinin üretildiği küçük kıvrımlı seminifer tübülleri ve interstisyel bağ dokusunu içerir. Leydig (interstisyel) hücreler erkeklerdeki ikincil cinsiyet özelliklerinden sorumlu hormon olan testosteronu üretir. Spermatozoonlar, testislerde üretildikten sonra uzun, dolambaçlı bir yol izleyerek seminifer tübüllerden çift yapılar olan rete testise, duktuli efferentese (efferent kanalcıklara), epididimise, duktus (vas) deferense, ejakülator kanala ve tekli yapılar olan üretra ve penise yönelir. Yardımcı bezler salgılarını ejakülator kanallara ve üretraya boşaltan iki adet seminal vezikülü, tek yapı olan prostat bezini ve çift yapılar olan bulboüretral bezleri kapsar (Şekil 2.1.). Bu sistemin önemli üç işlevi spermatozoonlar üretilmesi, bu hücrelerin semen aracılığıyla dışı üreme sistemine aktarılması ve testosteron üretimidir [41, 42].



Şekil 2.1. Testisin genel yapısı [42].

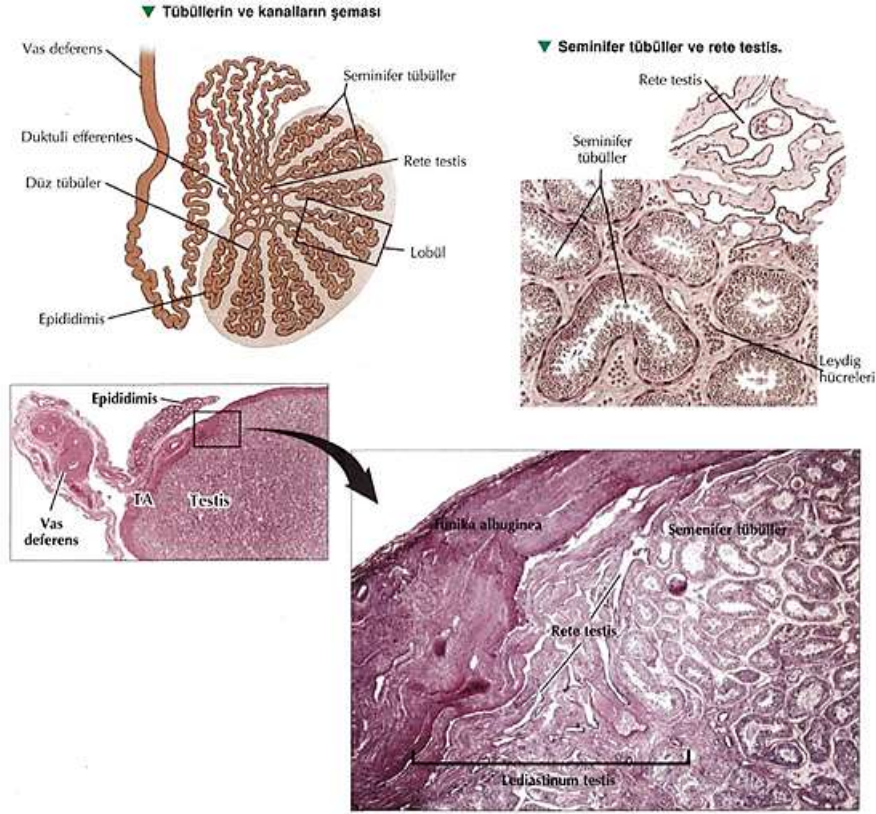
2.2. Testisin Anatomisi ve Histolojisi

On beş gram ağırlığında oval bir bez olan testis, canlıda beyaz görünüm sergilemesi nedeniyle tunika albuginea adı verilen sıkı fibroelastik bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsülle sarılmış durumdadır. Daha dış kısımdaki visseral katman olan tunika vaginalis kapsülü dıştan sarar. Testisin arka kenarında kapsül kaim bir katlanma şeklinde içeriye doğru uzanır, bu kısım mediastinum testis adını alır. Söz konusu katlanma diğer bezlerde kanalların, kan damarlarının, lenfatiklerin ve sinirlerin bez içine bağlandığı hilum yapısına karşılık gelmektedir. İnce fibröz bölmeler ya da başka bir deyişle septumlar, mediastinumdan ışınal olarak uzanarak insanda kama şeklindeki yaklaşık ikiyüz elli adet lobülü oluşturur. Lobüller içinde seminifer tübüller bulunur (Şekil 2.2), bunlar kesite farklı düzlemlerde girer çünkü yapıları kıvrımlıdır [41-43].



Şekil 2.2. Testisin dokusu [43].

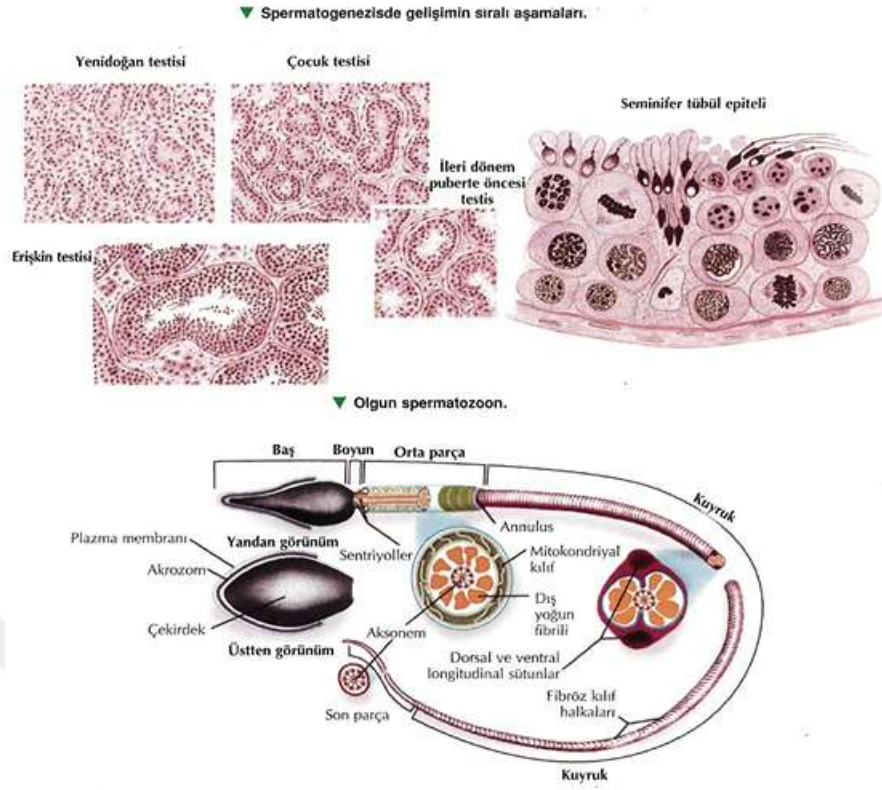
Her testiste toplam uzunluğu 280-400 m arasında olan 600-1200 seminifer tübül bulunur. Mediastinumda, seminifer tübüller tübülü rektiye (düz tübüllere) ve rete testise boşalır, rete testis birleşerek sayısı altı ile sekiz adet olan duktuli efferentes oluşturur (Şekil 2.3.). Bu kanallar testis sıvısını ve spermatozoonları epididimisin proksimal bölümüne aktarır. Rete testis tek katlı kübik epitelden oluşan labirent biçimindeki toplayıcı bölümlerdir. Bezin %20-%30 kadarını interstisyel bağ dokusu oluşturur; interstisyel doku hormon üreten Leydig hücre kümelerinin yer aldığı damardan zengin bağ dokusu içerir [41-43].



Şekil 2.3. Testis anatomisi ve testis dokusu kesitlerinin mikroskopik görünümü [41].

2.3. Testis Gelişimi ve Spermatogenezis

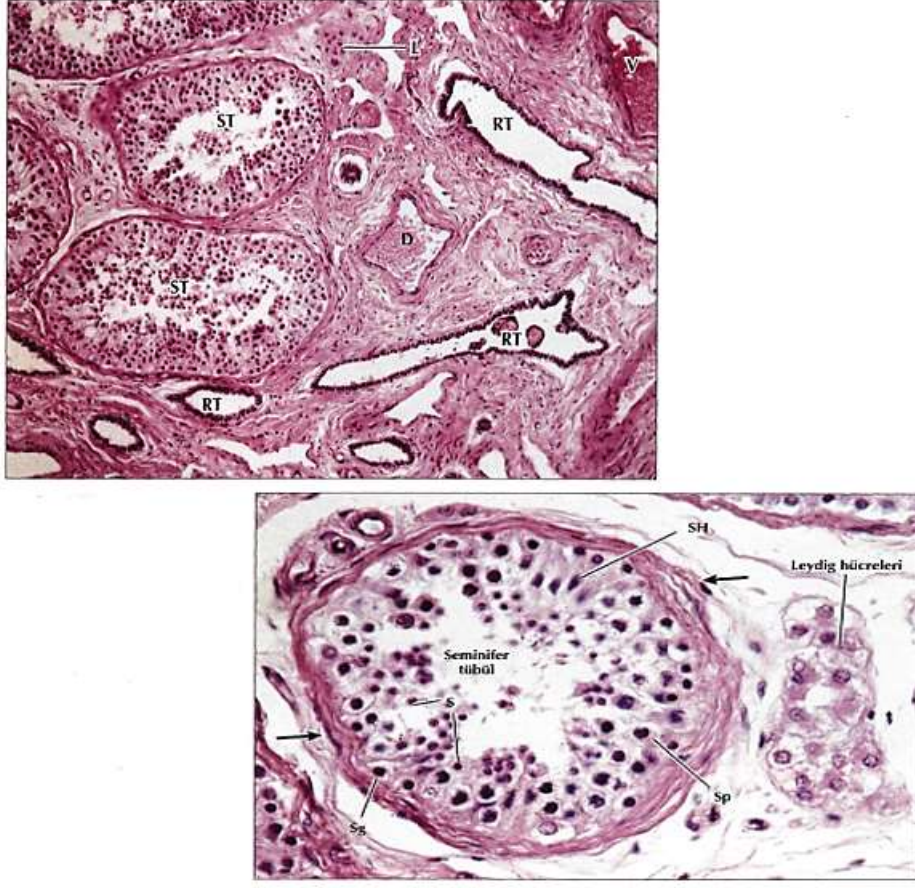
Testisler embriyonik ara mezodermden köken alır. Ara mezoderm, ilk olarak seminifer tübüllerin öncülleri olan primer epiteliyal cinsiyet kordonlarını oluşturur. Dört haftalık embriyoda, primordial germ hücreleri vitellus kesesi endoderminden kordonlara doğru göç eder. Yeni doğandaki testis, tabakalar halinde düzenlenmiş olan içi dolu germ hücre kordonlarından ve bunlara eşlik eden, gelecekte destekleyici Sertoli hücrelerine dönüşecek olan epitel hücrelerinden ibarettir (Şekil 2.4.). Kordonlar puberteye dek dolu durumda kalır, uzadıklarında çapları genişler ve içlerinde lümen oluşur. Leydig hücreleri seminifer tübüllerin arasındaki mezenkimden gelişir. Pubertede ilkel germ hücreleri- spermatogonyumlar- büyür ve mitoz bölünme geçirmeye başlar. Bu hücreler seminifer tübül epitelindeki diploid spermatogonyumların haploid spermatozoonları oluşturduğu spermatogenezis sürecine girer. Spermatozoonlar farklılaşma sırasında mitoz ve mayoz bölünme geçirip olgunlaşırken, tübüllerin lümenine doğru göç ederler. Sertoli hücreleri tarafından koordine edilen bu işlem 64-74 günde gerçekleşir ve yaşam boyu sürer [41-43].



Şekil 2.4. Spermatogenezde gelişim basamakları ve Olgun spermatozoon yapısı [41].

2.4. Seminifer Tübül Histolojisi

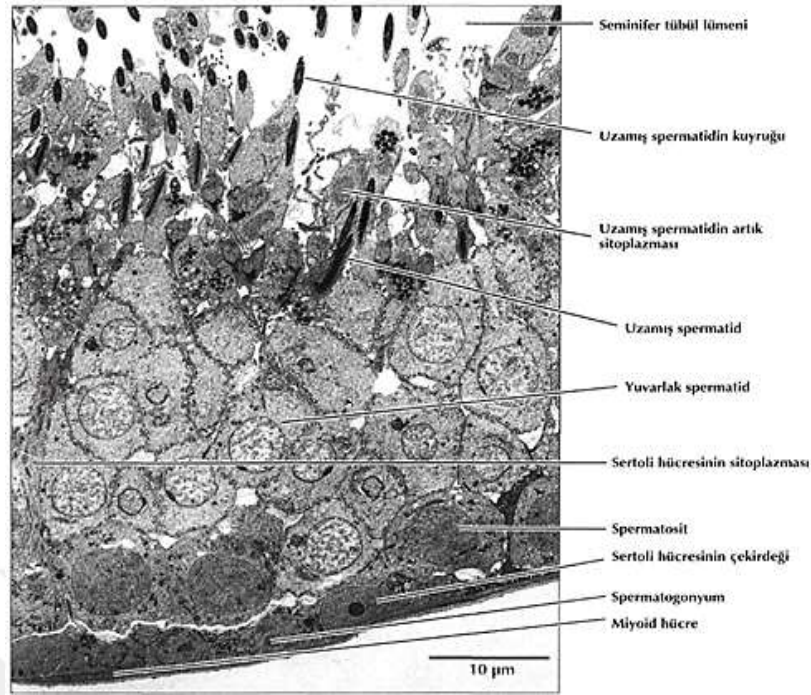
Seminifer tübülleri ayrı bir bağ dokusu, yassı miyoid hücrelerden oluşan bir tabaka ve bir bazal membran çevreler (Şekil 2.5). Seminifer tübül epiteli olağanın dışında, iki hücre grubu barındıran karmaşık birçok katlı epitel özelliği sergiler: spermatogenik (ya da germ) hücreler ve çoğalma özelliğine sahip olmayan Sertoli hücreleri. Seminifer tübüldeki üreme (germ) hücreleri spermatogenezin değişik evrelerini sergiler. Hücrelerin bazal membrana en yakın olanları yuvarlak çekirdekli spermatogonyumlardır. Yine yuvarlak çekirdekli olan, ancak kromatini spagettiye benzeyen daha büyük hücreler primer spermatositlerdir. Haploid sekonder spermatositler seyrek görülür; oluşur oluşmaz bölünerek spermatidleri oluştururlar. Dönüşüm döneminde, spermatidler nispeten daha az sayıda Sertoli hücresine tutunur, Sertoli hücreleri uzun ve sütuna benzeyen hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanı bazal membran üzerine oturur; serbest uçları yayılarak uzanır ve lümene ulaşır. Erken ve ileri dönem olarak anılan spermatidler, bölünmeksizin lümene bırakılacak ve efferent kanallara aktarılacak olan spermatozoonlara olgunlaşır [41-43].



Şekil 2.5. Seminifer tübül histolojik görünüm [41].

2.5. Seminifer Tübüllerin İnce Yapısı ve Spermatogenezis

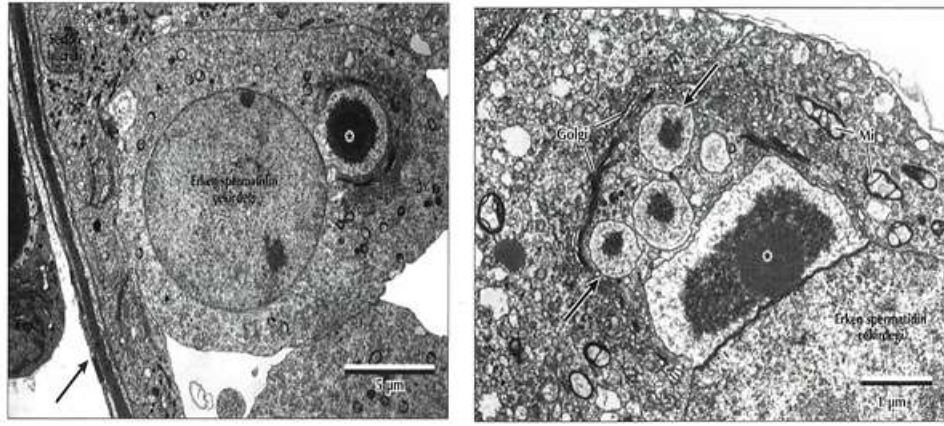
Spermatogonyumlar seminifer tübülün bazal membranına oturmuş olan, aralıksız yenilenen kök hücre topluluğudur (Şekil 2.6.). Bunlar, çapı yaklaşık 12 μ m olan ve nispeten büyük, yuvarlak bir çekirdeği bulunan ve en az olgunlaşmış grubu oluşturan diploid kök hücrelerdir. Bölündüklerinde seminifer tübüllerin üçte bir orta bölgesinde bulunan nispeten büyük çekirdeklere sahip primer spermatositleri oluştururlar. Bu hücreler 10-22 gün sonra, mayoz bölünme geçirerek daha küçük olan sekonder spermatositleri meydana getirir; ikincil spermatositler DNA replikasyonu gerçekleşmeksizin hızla sekonder mayoz bölünmeyi geçirir. Bu bölünme sonunda oluşan yuvarlak spermatidler yaklaşık 9 μ m çapında, haploid kromozom sayısına ve DNA içeriğine sahip hücrelerdir. Spermatidler Sertoli hücrelerinin girintileri arasına gömülmüş durumdadır. Spermatidler lümene doğru yol alırken Şekilleri uzar ve *spermiyogenezis* adı verilen, mitoz bölünmenin gerçekleşmediği karmaşık bir olgunlaşma işleminden geçer. Sonuçta oluşan spermatozoonlar, tek bir kamçıya ve küçük, yoğun, koni biçimli bir çekirdeğe sahip yüksek düzeyde özelleşmiş hücrelerdir. Günde yaklaşık 300 milyon adet üretilen spermatozoonlar lümene bırakılır [41-43].



Şekil 2.6. Seminifer tübül epitelinin elektron mikroskobu görüntüsü [41].

2.6. Germ Hücrelerinin İnce Yapısı ve Erken Spermiyogenezis

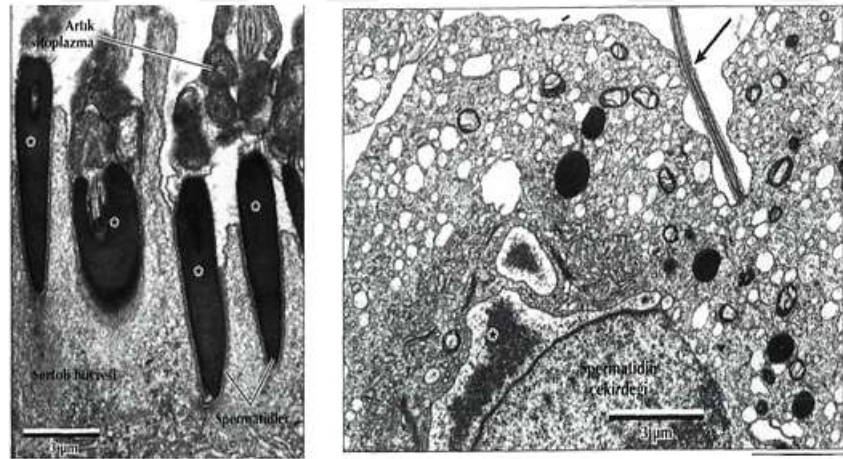
Spermatidler, spermiyogenezis olarak adlandırılan karmaşık bir olgunlaşma işlemi geçirir. Yuvarlak Şekilli, hareketsiz spermatidlerin uzayarak, hareketli spermatozoonlara dönüştüğü sıralı değişimler gerçekleşir. Seminifer tübül epitelinin üst katmanlarında bu farklılıklar çekirdek kromatininin yoğunlaşması, çekirdeğin uzaması, akrozomun oluşması, sitoplazma organellerinin tipik olgun hücredeki konumuna yerleşmesi, tek bir kamçı yapısının oluşması ve artık sitoplazmanın ortadan kalkması şeklinde sıralanan olaylarla gerçekleşir. İlk olarak Golgi kompleksinin çekirdeğe bitişik kısmında birkaç adet küçük akrozom vezikülü oluşur. Bu veziküller çekirdek zarına tutunan, zarla sarılı tek ve büyük bir akrozomu oluşturacak şekilde birleşir. Vezikül içinde aşamalı olarak çekirdeğin ön yüzeyini örtecek şekilde yayılacak ve son aşamada olgun spermatozoonun ön tarafını oluşturacak olan elektron yoğun akrozom granülü ortaya çıkar. (Şekil 2.7.). Değişikliğe uğramış bir lizozom olan akrozom içinde, döllenmede spermatozoonların kadındaki oositin zona pelusidasmı ve korona radyatısını aşabilmesine olanak sağlayan hyaluronidaz, lizozomal hidrolazlar ve proteaz enzimleri bulunur [41-43].



Şekil 2.7. Seminifer epiteldeki erken spermatid görünümü [41].

2.7. Germ Hücrelerinin İnce Yapısı ve İleri Evredeki Spermiyogenezis

Spermiyogenezisin daha ileri döneminde, bir çift sentriyol spermatid çekirdeğinin karşı kutbuna göç eder ve bunların birinden tek bir kamçı gelişir. Merkezinde iki santral mikrotübül ve çevresinde dokuz adet mikrotübül çifti bulunan bu yapı spermin kuyruk hareketini sağlar. Mitokondriyonlar kamçıya doğru göç ederek çeperinde kılıf ya da manşon şeklinde dizilirler. Artık sitoplazma ve organel fazlası uzaklaştırılır ve bitişikteki Sertoli hücreleri tarafından fagositozla yok edilir (Şekil 2.8.).

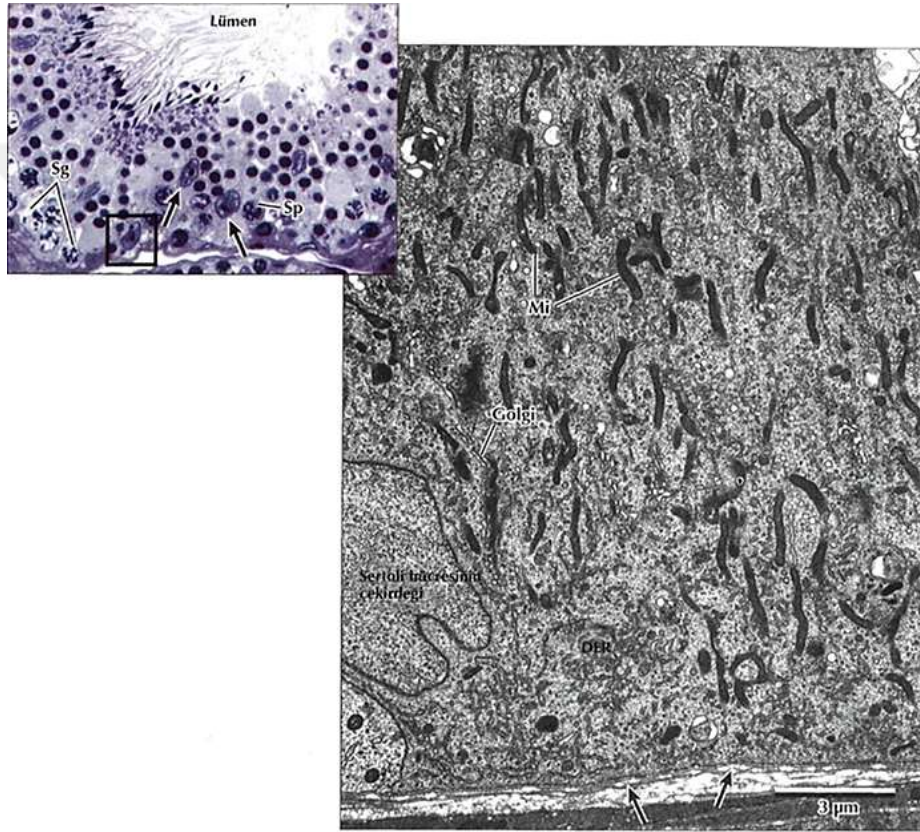


Şekil 2.8. Uzamış spermatid görünümü.

Yüksek düzeyde özelleşmiş hücreler olan spermatozoonların boyu yaklaşık 60 µm'dir ve tipik olarak beş bölge ayırt edilmektedir. Baş kısmında koni şeklinde, küçük ve yoğun bir çekirdek; boyun kısmında ise sentriyol çifti bulunur. Orta kısımda spermatozoonların hareketi için enerji sağlayan sarmal şeklinde düzenlenmiş mitokondriyonlar bulunur. Son kısımları asinüsları oluşturan esas ve uç parçaları aksonemi içerir ve kaim, uzamma lifler tarafından sarılmış olarak izlenir [41-43].

2.8. Sertoli Hücrelerinin Yapısı ve Görevi

Sertoli hücreleri spermatozoonların desteklenmesinde ve olgun hale gelmesinde çok önemli rol oynar. Puberteden sonra seminifer tübül epitelindeki hücrelerin yaklaşık %10'unu Sertoli hücreleri oluşturur. Sınırları zor bir şekilde farkedilebilen bu prizmatik hücreler bazal membrandan seminifer tübül epiteline kadar uzanır. Tepe kısımlarında yeni oluşan spermatozoonlar lümene bırakılıncaya kadar spermatidlerin yerleştiği kriptaya şeklinde girintiler bulunur. Her hücrenin sınırları düzgün olmayan ökromatik bir çekirdeği ve belirgin bir çekirdekçisi bulunur [41-43].



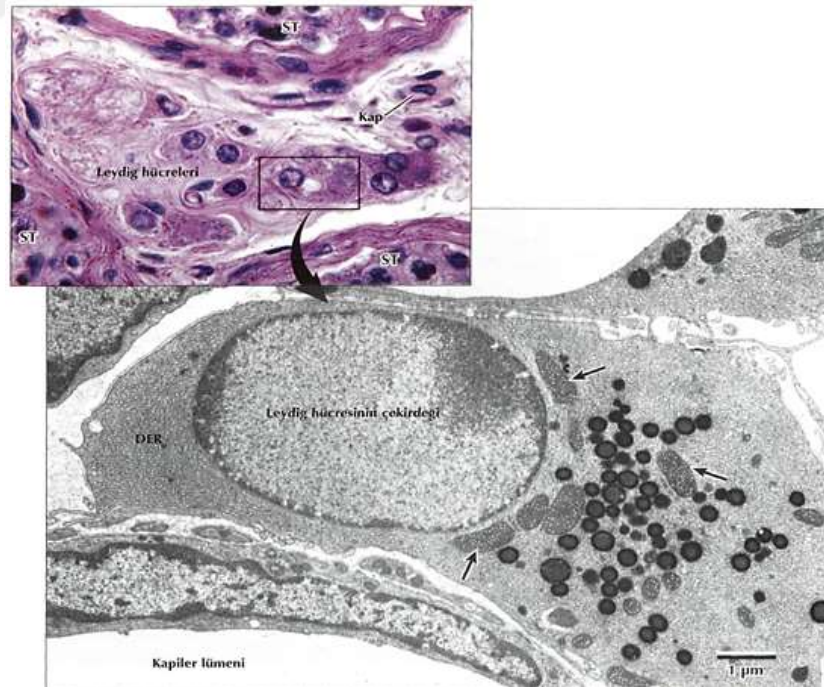
Şekil 2.9. Seminifer tübül ve sertoli hücrelerinin görüntüleri [41].

Sitozolde mikrotübüller ve ara filamanlardan oluşan gelişmiş bir hücre iskeletinin yanı sıra, yassı mitokondriyomlar, belirginliği az olan düz bir endoplazma retikulumu, fazla miktarda lipid damlacığı ve lipofuskin ihtiva eden lizozomlar bulunur. Bitişik hücreler taban ve yan yüzeylerindeki sıkı bağlantı kompleksleriyle birbirine tutunur (Şekil 2.9.). Bu tutunma kompleksleri epiteli bazal ve adluminal bölmelere ayırır. Buna bağlı olarak oluşan kan-testis bariyeri spermatogonyumlarla primer spermatositleri daha tepedeki sekonder spermatositler ve spermatidlerden ayırır [41-43].

Bu seminifer tübül lümeninin içindeki yapılar dolaşım sistemindeki antijenlerden yalıtılır, dolayısıyla spermatositler ve spermatidleri otoimmün bağışıklık reaksiyonlarından ve kanda bulunan maddelerden korur. Sertoli hücreleri spermatid artıklarını fagosite eder ve spermin yaşaması için mutlaka gerekli olan androjen bağlayıcı protein gibi pek çok maddeyi ve sıvıyı salgılar. Hücre bağlantıları ektoplazmik özelleşmeler olarak adlandırılan bölgelerde aktin filamanları ve endoplazma retikulumuyla sıkı bir ilişki gösterir. Bu özelleşmeler spermatozoonların lümene doğru hareketi sırasında bağlantının yapısındaki değişikliklere uyumu sağlayan yapılar olabilir. Sertoli hücrelerinin yaygın hücre iskeleti ağı spermatozoonların hareketinin sağlanmasına yardımcı olur [41-43].

2.9. Leydig Hücrelerinin Histolojisi ve İnce Yapısı

Seminifer tübüllerin aralarındaki gevşek bağ dokusunda Leydig hücreleri bulunur. Bu hücrelerin sitoplazmasının kö-püksü görünümü testosteron sentezi için depolanan kolesterole bağlı olarak yüksek düzeyde lipit içermesinden kaynaklanır. Büyük, çok yüzeyli olan bu hücrelerde merkezin dışında bulunan ve bir veya iki çekirdekçiği bulunan bir çekirdek mevcuttur. Hücre yüzeyinde fazla miktarda mikrovilus yer alır. Bu hücreler genellikle pencere kapillerler ve küçük lenf damarlarına yakın yerde bulunurlar [41-43].

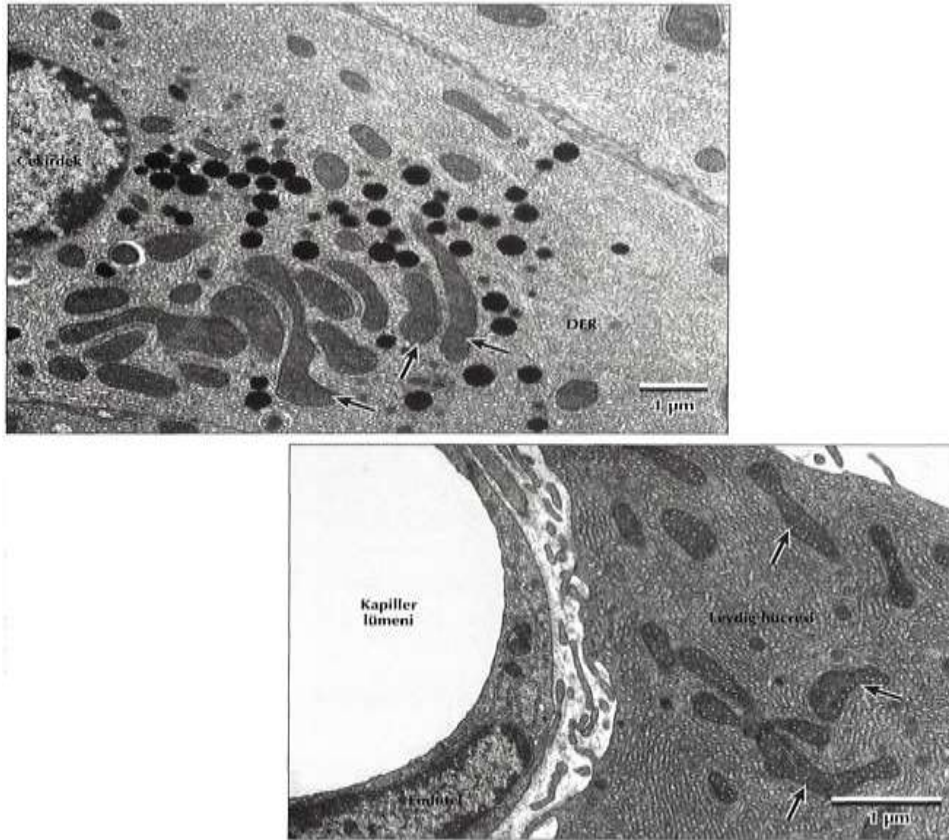


Şekil 2.10. Leydig hücre kümeleri görüntüleri [41].

Sitoplazmalarında steroid salgılayan hücelere ait bir özellik olan yoğun, sıkı paketlenmiş düz endoplazma retikulumu bulunur. Ayrıca, nispeten düşük miktarda ribozom ve granüllü endoplazma retikulumu, fazla miktarda tübuloveziküler kristalleri bulunan dağınık durumda mitokondriyon, çekirdeğin hemen yanında büyük bir Golgi kompleksi ve değişken boylarda çok sayıda yuvarlak lipid damlacığı bulunur (Şekil 2.10.). İnsanl leydig hücrelerinde, birbirine dik açılı çizgiler şeklinde çok düzenli bir biçimde dizilmiş kristaloid inklüzyonlar (Reinke kristalleri) da görülür ancak işlevleri bilinmemektedir. Bu inklüzyonlar puberteden önce görülmez ve yaş ilerledikçe sayıları artar. Tersiyer lizozomlarla ilişkili lipofuksin pigmentinin miktarı da ileri yaşlarda artar [41-43].

2.10. Leydig Hücrelerinin İnce Yapısı ve İşlevi

Leydig hücrelerindeki organellerin ve inklüzyonların çoğu testosteron sentezini ve salgısını düzenler, ancak en fazla düz yüzölü endoplazmik retikulum (DER) bulunur. Testosteron, öncülü olan kolesterolden türer. Kolesterol ya doğrudan DER zarlarında sentezlenmekte ya da dolaşımdaki düşük yoğunluklu lipoprotein moleküllerinden türemektedir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Leydig hücresi ve kapiler endotel hücre görüntüleri [41].

Zarla sarılı olmayan lipit damlacıklarında gerektiğinde kullanılmak üzere kolesterol depolanır. Taşıyıcı proteinler kolesterolü mitokondriyonun iç zarına aktardıktan sonra mitokondriyonlar luteinizan hormonun etkisiyle kolesterolü pregnanolona çevirir. Sentezlenen pregnanolon mitokondriyon zarından DER'e aktarılır. DER üzerindeki enzimler pregnanolon üzerinde başka değişiklikler gerçekleştirerek testosterona çeviriler. Bu hücreler tarafından aralıksız sentezlenen testosteron mikroviluslarla yüzey alanı artırılan hücre zarından difüzyonla geçer. Hücre dışı aralığa salıverilen testosteron hızla dolaşımdaki steroid bağlayıcı proteinlere bağlanır [41-43].

2.11. Florür

Flor, atomik ağırlığı 18,99, atom no 9 olan, molekül formülü F_2 şeklinde gösterilen ozona benzer kokusu olan, renk olarak soğuk sarı, kahvemsı sarı ya da mat-yeşilimsi sarı şeklinde tarif edilen, halojenler grubuna ait bir elementtir [33,44-46]. Tüm elementler içinde Flor elementi elektronegatif olarak en yüksek elektronegatif özellik gösteren ve bu nedenle reaktifliği güçlü elementtir. Fiziksel durumu gaz şeklinde olan florun elektronegatif fazla olduğundan, tabiatta farklı elementlerle reaksiyona girerek bileşik formunda bulunur [45, 46].

Yerkabuğunun 0.3g/kg'ını oluşturan bölümünde yaygın olarak dağılmıştır [47]. Çevrede genellikle sodyum florür, kalsiyum florür ve hidrojen florür gibi inorganik florürler veya metil florür, politetrafloroetilen ve perflorooktansülfonik asit gibi organik florür bileşikleri olarak bulunur [48]. Ayrıca florür yer kabuğunda mineral yapıda da bulunur [49]. Florür içeriği bakımından değerli olan mineraller Florspar, kriyolit, fluorapatit, mika, hornbled ve tumarin şeklinde sınıflandırılabilir. Gerek element gerek mineral yapıda olsun inorganik ve organik yapıda bulunabilen flor insanlar tarafından çeşitli kaynaklardan vücut yapılarına alınabilirler [45, 49].

İnsanlar başta içme suyu olmak üzere, yediği bitki ve hayvansal besinler ile floru vücutlarına alırlar. İnsanların genel olarak hava, su, besin, dişçilik ve kozmetik ürünler olmak üzere dört farklı şekilde florüre maruz kaldığı söylenebilir. Havada normal flor değeri 0.5 ng/m^3 dir. Emisyonda ilave edildiğinde havada kabul edilen flor düzeyi 3 ng/m^3 tür [50]. Ayrıca 30' dan fazla sanayi bünyesinde kullanılan flor ile üretilen ürünler ve bunların atıkları sayesinde de çevresel flor alımı artmaktadır [51]. Hava yoluyla özellikle kömür gibi yapısında flor olan maddelerin yanmasıyla havaya verilmesi, volkanik hareketlenmeler ile lav oluşumu ile küllerin meydana gelmesi ve havaya karışması, flor kullanan sanayi sektöründeki faaliyetler sonucu oluşan atık gazların havaya verilmesi sonucunda havadaki flor konsantrasyonu artmaktadır. Hava ile alınan florür, hidroflorik asit şeklinde deriyle emilir. Emilim sonrası kan vasıtasıyla vücudun tümünde yayılır. Tüketilen gıdalardan bazılarının flor düzeyi yüksek olabilir (Tablo 2.1.). Örneğin pirinç, arpa, patates bu besinler arasında yer alır. Bunun yanı sıra içecek olarak tüketilen çay, süt ve süt ürünlerinin de flor derecesi de yüksektir. Beslenme ile vücuda giren florürün %75-90'ı midede emilir. Midede emilim pasif difüzyon yoluyla olur ve sonrasında ince bağırsaktan hızlıca yayılım gösterir [52-59].

Diş macunları, ağız gargaraları, vernikler, jeller gibi dental ve kozmetik ürün kullanımı da flor alımın miktarına değiştirebilir. Günlük florür içerikli besinlerinin tüketimi, florürlü macunlar, diş bakım ve diş tedavisinde yer alan bazı maddeler, teşhis ve tedavi amaçlı kullanılan florürlü ilaçlar ve ana kaynak olarak içme suyu bireyin günlük florür alımına katkı sunar [52- 59].

Tablo 2.1. Bazı Besin maddelerindeki florid miktarları [53].

Kaynak	Florid miktarı (kg/ppm)
Çay	32,0
Kurutulmuş yosun	326.0
Sardalya balığı	11
Karides	4.5
Tavuk eti	1.5
Yumurta	1.3
Sığır eti	1.2
Ispanak	1.0
Maydanoz	0.9
Buğday ekmeği	0.8
Tereyağı	1.5
Kırmızı şarap	1.05
Beyaz şarap	2.02
Soya fasulyesi	1,4
Diyet Pepsi Kola	0.46
Pepsi Kola	0 32
Peynir	1,7
Hazır elma suyu	1.04
Beyaz üzüm suyu	2.04
Kuru üzüm	2.34
Patates cipsi	1.06

Türkiye'de yılda bir kişinin bin iki yüz elli bardak çay içtiği ve günlük ikiyüz kırkbeş milyon bardak çay tüketimiyle dünyada ilk sırada yer aldığı bildirilmiştir. Dünya Çay Raporu 2016 verilerine göre, kişi başı tüketimde yıllık olarak, Türkiye 3,5 kilogramla ilk sırada bulunmaktadır. [53, 60-61]. Bir araştırmaya göre, bir bardak demli çay içilerek 0,0786 mg florid alındığı bildirilmiştir. Dolayısıyla flor miktarının optimum dozu, dikkat edilmezse günlük olarak maruz kaldığımız ve kullandığımız kaynaklara bağlı olarak kolayca aşılabilir [53, 62].

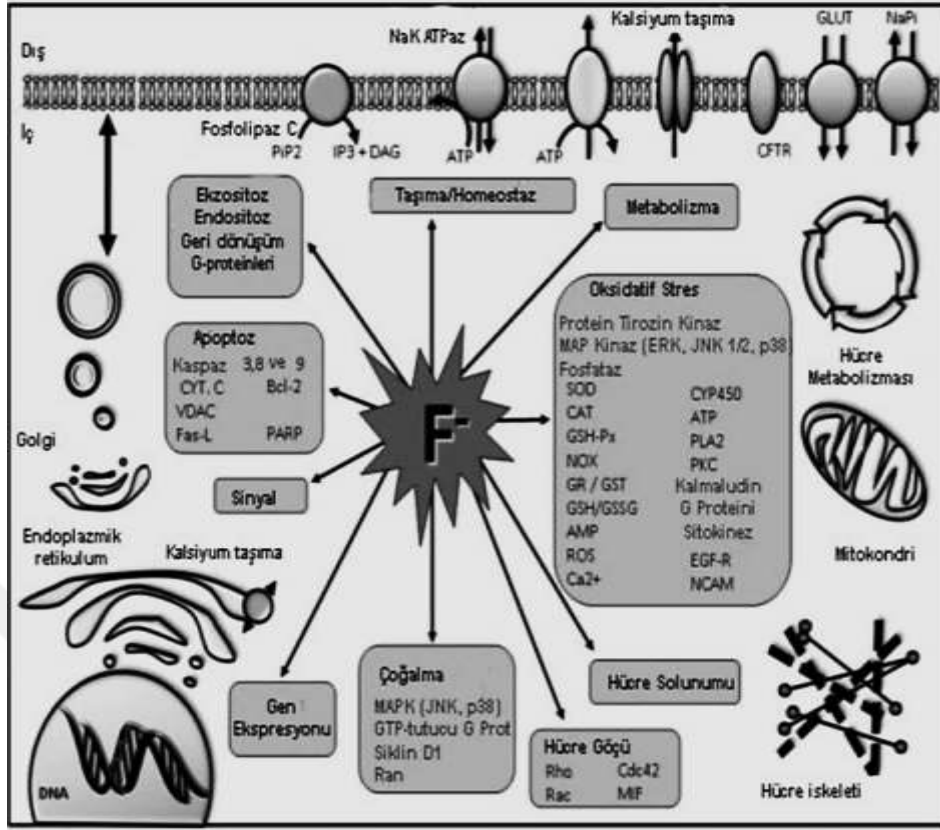
Flor elementinin farklı elementlerle oluşturduğu tuz yapısında bileşik, “florid” diye isimlendirilir. Tuz formundaki bu bileşikler sodyum florid ve kalsiyum florid gibi fiziksel olarak katı yapıda olan maddelerdir [45, 46]. Florid bileşikler, canlılarda (hayvan ve insan) mide-bağırsak sisteminden kolayca emilir. Flor elementi insanlarda en çok sert dokulardan olan diş ve kemiklerde birikir diğer kalan bölümü ise damarlı yapılardan oluşan yumuşak dokulara giriş yapar. Yumuşak dokuda florür, hidrojenflorür şeklinde hücre içi sıvısına girer. Buradaki miktarı kan tarafından ayarlanır [33,47,63,64].

Beslenme ile mide bağırsak sisteminden ve hava solunumu ile akciğerlerden bulunan florürün yüzde doksanı albumine bağlı olarak kan dolaşımına verilirken, yüzde onluk kısmı da iyonize yapıdadır ve iyonize flor vücutta tahribat oluşturur. Çeşitli kaynaklardan farklı nedenlerle bünyemize giriş yapan flor vücut için ihtiyaç duyulan dozu geçerse bu aşan miktara bağlı olarak vücutta farklı etkiler ortaya çıkabilmektedir [33, 65-67].

2.11.1. Florür Toksisite Etki Mekanizması

Florürün *in vitro* çalışmalarda çok düşük mikron dozlarda anabolik ajan gibi davrandığı, milimolar dozlarda ise hücredeki bazı enzimlerin fonksiyonlarını işlevsiz hale getirerek ya da değiştirerek hasar oluşturduğu gösterilmiştir. *In vivo* çalışmalarda ise farklı birçok doku üzerinde farklı dozlarda yapı veya işlevde hasarlara yol açtığı bildirilmiştir. Florürün *in vitro* ve *in vivo* sistemlerdeki etki mekanizmasının çeşitliliği ve karmaşıklığından ötürü florür toksisitesinin mekanizması net olarak ortaya koyulamamıştır [33,68,69]. Genel olarak, florür; gen salınım, hücre siklusu, çoğalma ve göç, solunum, metabolizma, iyon taşınması, salgılama, endositoz, apoptoz/nekroz ve oksidatif stres gibi çeşitli süreçlerde ve çeşitli sinyal yollarının işleyişinde etkinliğinin görüldüğü bildirilmiştir. [28, 33].

Hücre mekanizmasının bu değişikliklerine dahil olan birçok protein, özellikle fosfatazlar tanımlanmış olmasına rağmen, bu olaylarda yer alan hedeflerin çoğu ve kesin mekanizmalar/yollar hala bilinmemektedir. Bununla birlikte, Pi (inorganik fosfor) tarafından G proteinlerinin aktivasyonunu taklit eden spesifik etki, sıklıkla Şekil 2.12.' de gösterilen biyolojik etkilerin birçoğunda yer alır. Halihazırda G proteinlerinin florür bileşikler tarafından aktivasyonuna ilişkin artan bilgi, bu tür etkilerin, florürün vezikül trafiği, hücre göçü, hücre çoğalması, gen ifadesi ve hücredeki diğer önemli işlevler üzerindeki doğal etkileriyle sonuçlanabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, florürün bu süreçler üzerindeki etkileri karmaşıktır çünkü florürün neden olduğu etkiler doz ve konsantrasyonla yakından ilişkilidir (hormesis etkisi) [28].



Şekil 2.12. Florürün etkilediği hücresel sistemler [33].

Bazı çalışmalarda izin verilen konsantrasyonlarda florür maruziyetinin potansiyel olumsuz etkileri hakkında net bir kanıt bulunmasa da bazı çalışmalarda ise biyolojik olarak ilgili konsantrasyonlarda florürün hücresel süreçler üzerindeki etkilerine dair kanıtlar göstermiştir [28]. Bu nedenle, hücre tipleri üzerindeki etkilerini kesin olarak belirlemek için kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

2.11.2. Florür ve Erkek İnfertilitesi

Genel olarak güvenli olarak kabul edilen florürün toksisitesi, yetmiş yılı aşkın bir süredir ilgi çekmemiştir. 1990'lara kadar, topikal uygulama ve diş macunlarında çürükleri önleme konusundaki "iyi itibarı" nedeniyle florürün toksisitesi büyük ölçüde göz ardı edilmiştir [28, 70]. Ek olarak diş çürüğüne karşı önlem almak amacıyla ağız içi florid seviyesini artırma hedefiyle araştırmalar da yapılmıştır [70]. Özellikle 90'lı yılların başında yapılmaya çalışılan araştırmalarla florürün içme suyu içeren florürün insan doğum oranları üzerindeki etkilerini belirlemeye yönelik bir çalışmayla, azalan toplam doğurganlık oranının artan florür seviyeleri ile ilişkisi ortaya konmuştur [70]. Freni, 1994'te içme suyundaki yüksek F^- içeriğinin üreme oranında bir azalmaya yol açabileceğini bildirmiştir [71].

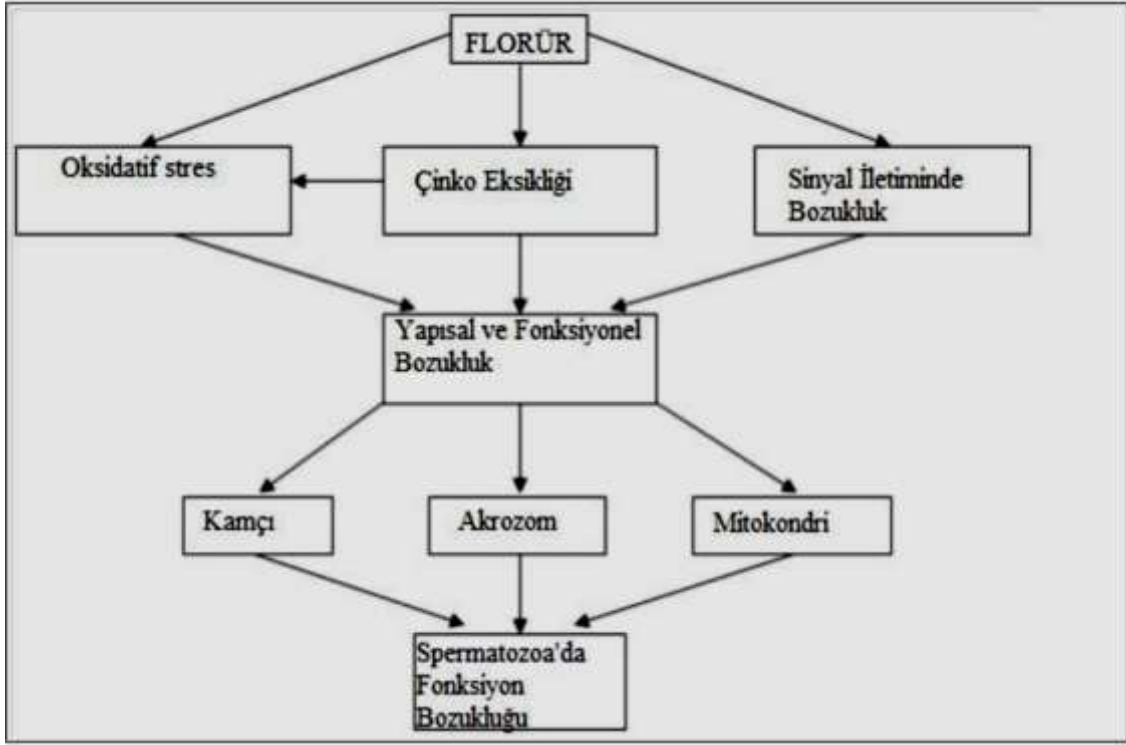
Yirminci yüzyılın yarısında, florür, florozdan muzdarip insan popülasyonlarında ve *in vivo* deneysel modellerde yüksek konsantrasyonlarda zararlı etkileri nedeniyle toksikologların ilgisini çekmeye başlamıştır [28]. Ayrıca son on yılda bu elementin düşük dozlarda bile hücresel sistemlerle etkileşime girdiğinin bilinmesiyle birlikte istenmeyen etkilerine olan ilgi artmaya başlamıştır [28]. Florür toksisitesinin insanlar, özellikle erkek üreme sistemleri üzerindeki kanıtlarının artması, florür toksisitesi ve erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri hakkındaki çalışmalara olan ilgiyi artırmıştır [28, 70].

Dünya Sağlık Örgütü infertilite (kısırlık) terimini on iki ay veya daha fazla zamanda, planlanmış korunmasız ilişki sonrasında başarılı bir gebelik oluşamaması olarak tanımlamaktadır. Tüm çiftlerin yaklaşık %10 ila %15'i 1 yıl boyunca hamile kalmaya çalıştıktan sonra çocuk sahibi olamamaktadır [72, 73]. Çevresel ve yaşam tarzı faktörleri gibi birçok faktör insan doğurganlığını etkileyebilir [72,74-76].

İnfertilite dünyadaki en temel sorunlardan biridir ve büyüyen küresel bir halk sağlığı sorunudur. Kısırlık karmaşık bir hastalıktır ve fiziksel, kimyasal, biyolojik, davranışsal, sosyal ve ekonomik olmak üzere birçok faktörden kaynaklanabilir. Üreme sağlığını etkileyebilecek çevresel faktörler, insan gelişiminin kritik dönemlerinde içme suyunun kurşun, arsenik, krom ve F⁻ ile kirlenmesi gibi risk faktörlerine maruz kalmayı içerir. Florürün hem kadın hem de erkek üreme sağlığı üzerindeki etkileri bilim camiasında endişe veren bir meseledir. F⁻'nin üreme sağlığı sistemi üzerindeki rolü karmaşıktır ve ilgili mekanizmalar belirsizdir. Dünya çapında F⁻ ve doğurganlık üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen, insan F⁻'e maruz kalma ile doğurganlık, kısırlık ve kürtaj prevalansı arasındaki korelasyon hakkında az sayıda bazı epidemiyolojik çalışma yapılmıştır. Çeşitli klinik çalışmalar, yüksek konsantrasyonda F⁻ içeren içme suyunun uzun süreli alımı ile bozulmuş üreme arasında bir ilişki bulmuştur [72,77-81] Araştırmalar, yüksek F⁻ maruziyetinin azalmış östrojen ve testosteron seviyeleri ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Ek olarak, bulunan olumsuz sonuçlar arasında spermatogenez ile etkileşim, sperm hareketliliğinde bir düşüş ve sperm sayısı ve diğer üreme fonksiyonlarında bir azalma yer alır. Florürler özellikle üreme sistemini, özellikle erkekleri hedef alır [70].

Çoklu hayvan modelleriyle yapılan araştırmalar incelendiğinde çalışılan hayvan türlerinin çoğunda florür toksisitesinin erkek üreme yeteneğini azalttığını ortaya koymuştur. Vücuttaki florür fazlalığı testislerde ve erkek üreme sisteminde çinko eksikliğine yol açabilir [82]. Sonuçta ortaya çıkan çinko eksikliği, testis gelişimi için kritik olarak gerekli olan testosteron seviyelerinin baskılanmasına yol açabilir ve daha da önemlisi, testislerde oksidatif stresi artırarak daha düşük kaliteli spermatozoaya yol açar [83]. Florür fazlalığı, özellikle spermatozoanın kapasitasyon ve akrozom reaksiyonlarını içeren sinyal sistemlerini de bozabilir [84]. Ek olarak, yüksek florür seviyeleri, sperm başı tirozin fosforilasyonu ve aktin polimerizasyonunun azalmasıyla sonuçlanabilir, böylece spermatozoadaki kapasitasyon ve akrozom reaksiyonlarını azaltabilir [31].

Florürün ayrıca zona pellucida'nın penetrasyonu için gerekli bir tür sperm hareketliliği olan sperm hiperaktivasyonunda yer alan kalsiyum sinyal yolunu bloke ettiği bilinmektedir [85]. Florür toksisitesinin etkisi olarak kalsiyum sinyal yolundaki bozulma, sperm hiperaktivasyonuna zarar vererek spermatozoanın işlev bozukluğuna yol açabilir. Florürlerin erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri [33,76] detaylı olarak listelenmiştir (Şekil 2.13).



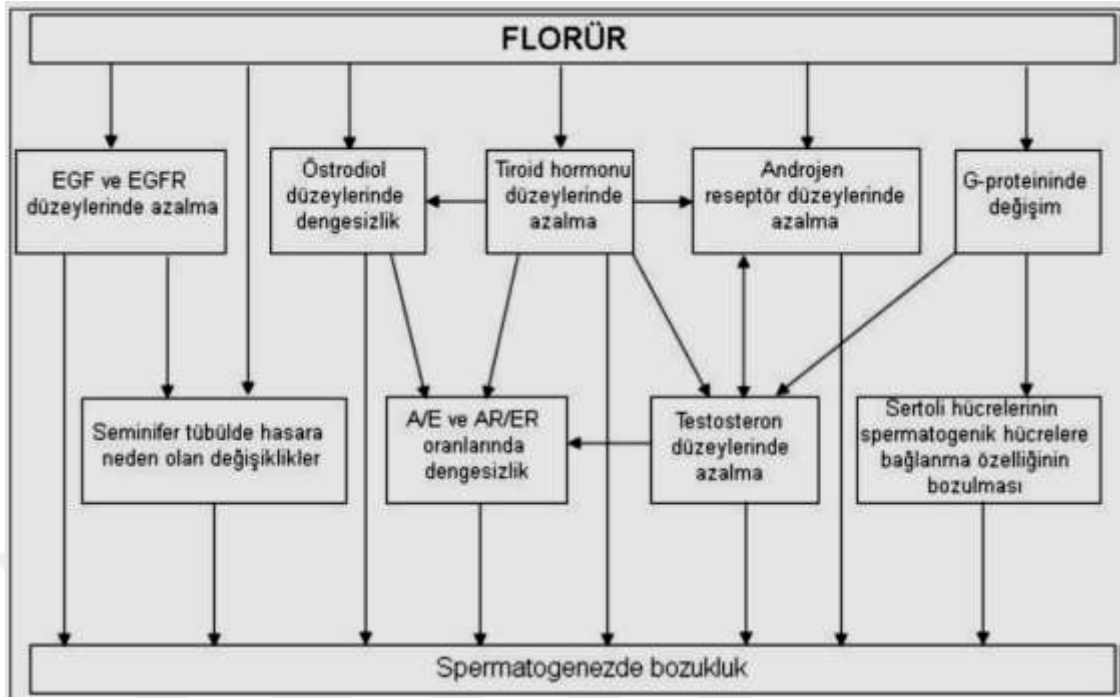
Şekil 2.13. Florürün spermatozoa üzerindeki etkileri [33].

Florüre uzun süreli maruz kalınması, spermatogenezi koruyan kan-testis bariyerinin geçilerek spermatogeneze zarar verilmesi şeklinde bir hasara neden olabilir. Kan testis-bariyerinin geçişine florürün, seminifer tübüllerinde oluşturduğu nekrozun neden olduğu düşünülmektedir. [77, 86]. Florürün bariyeri geçtikten sonra, spermatositlerin olgunlaşmasında ve farklılaşmasında, spermilerin parçalanmasında ve hatta spermatogenezin durmasında neden olabileceği bildirilmiştir. [87,88]. Hem EGF (epidermal büyüme faktörü) hem de EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü), spermatogenezin güçlü araçlarıdır ve normal spermatojenik proliferasyonun aracılığı ile ilişkilidir. Hem EGF hem de EGFR düzeylerindeki herhangi bir azalma, spermatogenez yolunun tıkanmasına yol açabilmektedir. Florürün spermatojenik hücrelerde EGF (epidermal büyüme faktörü) ve EGFR (epidermal büyüme faktörü reseptörü) ekspresyonunun azalmasına neden olabileceği de yapılan çalışmalarda gösterilmiştir [89, 90].

Florürün seminifer tübüllerin çapının küçülmesinden de sorumlu olabileceği bildirilmiştir. Florür, seminifer epitel hücre katmanlarının sayısındaki azalma ile seminiferin germinal epitel hücrelerinin önemli bir düzensizliğine ve soyulmasına neden olabilir [89]. Ayrıca, florür, luteinize edici hormon adı verilen hipofiz hormonu tarafından kullanılan G-protein bağlı reseptörler olarak adlandırılan önemli hücre sinyal dönüştürücülerini değiştirerek spermatogeneze müdahale edebileceği bildirilmiştir. Bu nedenle, G-proteinlerinin florüre bağımlı indüklenmiş modifikasyonu, testosteron salınımını baskılayabilir ve böylece spermatogenezin bozulmasına yol açabilir [91]. Florürlerin endokrin sistem üzerinde büyük etkisi vardır, özellikle erkek cinsiyet hormonlarının üretimini ve salınımını bozarlar. Genellikle testosteron ve androjen reseptör seviyelerini düşürür, östradiol seviyesini bozar ve doğrudan spermatogenez ve diğer üreme faaliyetleri ile ilgili olan tiroid hormonlarına müdahale eder. Florürlerin ayrıca katekolamin ve melatonin düzeylerini değiştirerek hipotalamus-hipofiz testis eksenine [92] müdahale ettiği bulunmuştur.

Florür fazlalığının, spermatogenezin başlatılması için gerekli olan erkeklerin birincil hormon düzeylerini azalttığına yönelik araştırmalar yapılmıştır [93, 94]. Ek olarak, florürler EGFR ve androjen reseptör ekspresyonunu azaltma eğilimindedir [89, 90]. Leydig hücrelerinin çapında değişikliğe neden olmanın dışında leydig hücrelerinde G-proteinlerini engeller. Bu yapısal değişiklikler, Leydig hücrelerinin testosteron sentezleme yeteneğini azaltır. Florürler ayrıca testiküler steroidogenez için gerekli enzimleri baskılayarak Leydig hücrelerinde steroid üretimine müdahale eder [95, 96].

Florür etkileşimi, gonadotropik hormonların seviyesini etkilemeden testosteron salınımını bastırır. Bu hormonlar, Sertoli hücreleri için, tiroid hormonu tri-iyodotironin (T3) adlı anti-proliferatif sinyallerle dengelenmiş gibi görünen çoğalma sinyalleri üretir. Ancak bu sinyallerdeki herhangi bir dengesizlik zararlı olabilir ve testis tümörleri gibi bazı sonuçlara yol açabilir [97]. Florür konsantrasyonundaki artış, androjen reseptörünün ekspresyonunu azaltabilir [90]. Hem Sertoli hücrelerindeki hem de Leydig hücrelerindeki fonksiyonel androjen reseptörleri, sırasıyla spermatogenez ve steroidogenezde hayati bir rol oynadığından, florür kaynaklı androjen reseptörleri seviyesindeki herhangi bir azalma, spermatogenez sürecini bozar ve testosteron seviyesini ve fonksiyonunu azaltır [98]. Florürlerin fazlalığı ayrıca estradiol seviyelerinde azalmaya neden olur, bu da spermatojenik hücrelerin apoptozisine yardımcı olabilir ve bu da spermatogenezin azalması veya kesilmesi ile sonuçlanır. Yüksek florür seviyeleri tiroid hormonlarını olumsuz etkiler. Tiroid hormonlarında, özellikle de Triiyodotironin (T3) de keskin bir düşüş olacaktır, bu da aynı anda artan aromataz aktivitesi, androjen seviyesinde bir azalma ve östrojen seviyesinde bir artış ile sonuçlanır [99].



Şekil 2.14. Florürün erkek üreme sistemi üzerine etkileri [33].

Şekil 2.14'te yer alan florürün erkek üreme sistemi üzerine etkilerinin verildiği genel bakışa göre, florürlerin diğer fonksiyonel sistemlerden ayrı olarak erkek üreme sistemi üzerinde kesinlikle zararlı etkileri olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Florürün içme suyundaki güvenli kullanım aralığı 1,5 mg/l'ten daha düşük olarak Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından önerilmiştir [50]. Güvenli bulunma aralığı son derece sınırlı olan Florür, ortamdaki aşırı maruziyet nedeniyle, spermatozoanın normal yapısını ve işlevlerini bozarak, spermatogenez sürecini etkileyerek ve erkek üremesi için gerekli hormon düzeylerini olumsuz yönde etkileyerek toksik etkilerini gösterir. Erkek üreme sistemindeki hasarın yoğunluğu, kadın üreme sistemi dahil diğer sistemlerin de yüksek florür düzeylerinden eşit şekilde etkilenebileceği endişesini uyandırmaktadır [70, 100]. Bu nedenle, ilgili moleküler yolları açıklamak ve florür toksisitesinin olumsuz bir etkisinin olmaması amacıyla kan-testis seviyelerinde gereken optimum florür dozunu bulmak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Mevcut epidemiyolojik araştırmalar, üreme sisteminin florür toksisitesine karşı daha savunmasız olduğunu ve çok dikkat edilmesi gerektiğini belirlemiştir [28, 70]. Literatürdeki verilere dayanarak florür, erkek üreme yeteneği üzerinde olumsuz etkileri olabilen bir madde olarak görülebilir. Florürün, testiküler dokuda oksidatif strese neden olan serbest radikallerin oluşumunu artırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur [101-103].

2.12. Arı Sütü

Arı sütü (RJ), ilk defa 1623 senesinde zengin besin içeriğine sahip olan arı ürünü olarak ortaya çıkmıştır. İlk zamanlara krallara ait manasında “Gelatine Reale” ismi verilmiştir. 1972 yılında ise ilk defa Huber tarafından anlam olarak İngiliz dilinde süper (mükemmel) besin olarak ifade edilen "Royal Jelly" şeklinde tanımlanmıştır Arı sütü, beş ile onbeş günlük işçi arıların alt çene (mandibular) ve yavru besini bezi olarak da adlandırılan hypopharyngeal bezlerinden ergin ana arı ve genç larvaları beslemek için salgılanan bir üründür [104-107].

Genç işçi arılar bal ve polen ile beslendiklerinde bu besinler sindirim organlarında sindirilir ve arı sütü yavru besin bezlerinde üretilir. Bu üretim için gerekli olan maddeler kan yoluyla süt salgı bezlerine gelir ve bu bezlerde üretilen süt ağız boşluğuna verilir. Arı sütü salgılanır salgılanmaz doğrudan larva ya da kraliçe arıyı (ana arı) beslemek için kullanılır. Arı sütü, kraliçe arının ana yiyeceğidir ve büyüme-gelişme sırasındaki farklılaşmayı sağlar [108-110]. Arı sütü salgılanıp ağız boşluğuna verildiği anda süt kıvamındadır. Petek gözlerine konulduktan sonra koyulaşarak krem rengini almaktadır (Şekil 2.15.). Arı sütü peltemsi yapıda, kemiğimsi renkte, spesifik kokusu ve tadı bulunan bir gıdadır [104].



Şekil 2.15. Arı sütünün görünümü [104].

Arı sütünün temel bileşenlerini; su, proteinler, karbohidratlar, yağlar, vitaminler ve mineraller oluşturmaktadır (Tablo 2.2.). Bu maddelerin arı sütünde bulunma oranları ise; %57-70 oranında su, %11-17 oranında protein, %11-16 oranında karbohidrat, %3-6 oranında lipid, %0,5-2 oranında esansiyel aminoasitler, %0,8-4 oranında tanımlanamayan maddeler bulunmaktadır [104].

Tablo 2.2. Arı sütü içeriği [104].

İçerik	Miktarı (%)
Su	57-70
Protein	11-17
Yağ Asitleri	4-5
Şekerler	11-13
Mineraller	2.34-3.34
Fosfor	0.5
Sülfür	0.6
Na, K, Ca, Fe, Cu, Mg, Mn	Eser
Bilinmeyen Maddeler	2-3

Arı sütünün (RJ), pH değeri 3,6 ila 4,2 arasında değişir. Yoğunluğu 1.1 g/cm³'e yakındır ve suda bir miktar çözünür. Viskozite özelliği muhafaza koşullarına, süreye ve su tutma kapasitesine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Oda ısısındaki viskozite ile buzdolabında 5 °C' ısıda muhafaza edildiğinde viskozite farklılık gösterir [111-113].

İçinde barındırdığı biyolojik aktiviteye sahip vitaminlere; tiamin, niasin, riboflavin, E vitamini gibi pek çok örnek verilebilir (Tablo 2.3.). Ayrıca arı sütünün içinde; kalsiyum, potasyum, sodyum, demir, magnezyum gibi mineraller bulunmaktadır [112-115].

Tablo 2.3. Arı sütü vitamin içeriği [104].

İçerik	Miktar
Vit. B1 Thiamine	1.3- 2 µg
Vit. B2 Riboflavine	7.5 -10 µg
Vit. B6 Pyridoxine	2 -8 µg
Vit. H Biotine	2 -3 µg
Vit. C Askor. acid	3-5 µg
Pantotenik Asit	195-250 µg
NikotinikAsit	395-475 µg
Folik Asit	0.3-0.35 µg
Inositol	100-125 µg

Arı sütü yapan işçi arının ömrü 8 ay kadarken, arı sütüyle beslenen ana arının (kraliçe arı) uzun ömürlü ve olağanüstü verimliliğe sahip olması özel olarak arı sütü ile beslendiğinden insanlarda da benzer etkiler ortaya çıkaracağına inanılmaktadır.

1950'lerin ilk yıllarında birkaç hastanede yürütülen araştırmalara dayanan, arı sütünün özelliklerini övücü Fransızca arıcılık yayınları görülmeye başlanmıştır. Son zamanlarda Apiterapi olarak da isimlendirilen arı ürünleriyle tedavi yaklaşımı ilgi görmeye başlamıştır. Bu ürünler arasında arı sütü kullanımı da oldukça ilgi görmektedir.

Arı sütünün kimyasal içeriği ile ilgili araştırmalar çokça yapılmıştır. Fakat arı sütü asiditesinin fazla olması ve muhteviyatının karışık olması nedeniyle yapılan deneylerde zorluklarda yaşanmıştır [106, 107,116, 117].

Farklı sonuçlara ait araştırmalar olsa da çoğu araştırmada arı sütü içeriğinin farklı arı ırk ve koloniler ve farklı mevsimlerde nispeten aynı olduğu bulunmuştur. Fakat işçi arıların özellikleri (yaşı, yediği polen içeriği, beslenmesi gibi) ve arı sütünün tutulduğu yer ve şartlar ve deney metodolojisinden kaynaklanan arı sütü karakterizasyonunda farklı muhteviyatlar görülebilir. Arı sütü içeriğinde en fazla farklılık görülen içerik şekerdir (Tablo 2.4.). Bunun nedeni ise işçi arıların kraliçe arının yaşına bağlı olarak çeşitli değerlerde arı sütüne şeker ilave etmesinden kaynaklanır [117].

Tablo 2.4. Arı sütü karbohidrat içeriği [106,125,126]

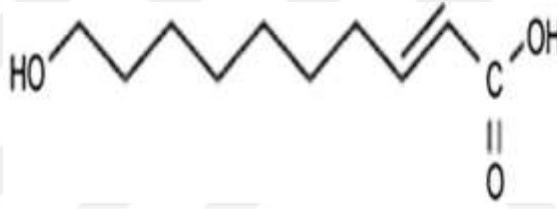
Karbohidrat	(%)
Fruktoz	3-13
Glukoz	4-8
Sükroz	0,5-2

Arı sütünün gösterdiği biyolojik etkilerde içerdiği yağ asitlerinin önemli bir yer tuttuğu bildirilmiştir (Tablo 2.5.). Arı sütü içeriğindeki yağ asitleri, çoğu kısa zincirlidir. Arı sütünün medikal etkilerine yönelik araştırmalarda, arı sütünün özellikle antimikrobiyal, immun düzenleyici, antitümör, antidiyabet, antikolesterol, yara iyileştirici gibi etkilerinin ortaya çıkmasında arı sütü içeriğindeki 10- hidroksidekanoik asit miktarının önemli olduğu bildirilmektedir [117, 119,120].

10-hidroksi-2-dekenoik asit (Şekil 2.16), arı sütünün kalitesinin göstergesi olarak nitelendirilen bir yağ asididir. Arı sütünde Türk Standartları Enstitüsü kriterlerine göre minimum yüzde 1,40 oranında 10-HDA (10-hidroksi-2-dekenoik asit) bulunmalıdır [121, 122].

Tablo 2.5. Arı sütü yağ asidi içeriği [118, 119].

	İçerik	Miktar
Ortalama Yağ Asitleri ve Sterol İçeriği	3- Hidroksioktanoik asit	%0,3
	8- Hidroksioktanoik asit	%5,5
	8-Hidroksidekanoik asit	%1,9
	10- Hidroksidekanoik asit	%21,6
	(E)-10-Hidroksidek-2-enoik asit	%31,8
	3,10-Dihidroksidekanoik asit	%1,8
	Glukonoik asit	%24
	24-metilen kolesterol	50 µg /gr
	P- Stigmasterol	20 µg /gr
	Kolesterol	10 µg /gr
	Testesteron	0,012 µg /gr



Şekil 2.16. 10-hidroksi-2-dekanoik asit (10 HDA) bileşiğinin yapısı [121, 122].

Arı sütü içeriğinde kuru madde miktarı olarak en çok protein bulunmaktadır. Muhteviyattaki proteinin çoğu albümin şeklinde olup ve immunmodülatör etki gösterir. Ek olarak içerikte yer alan apisimin, antihipertansif, jelelin, antibakteriyel, polifenoller de antioksidatif aktivite gösterir. Yapısında yer alan protein ve peptitlerin, hormonların (Tablo 2.6.) arı sütüne antiinflamatuvar, antiallerjik, antidiyabetik ve yara iyileşmesini hızlandırıcı özellik kazandırdığı bildirilmiştir [117,119, 120,124].

Tablo 2.6. Arı sütü hormon içeriği [119, 123].

İçerik	nmol/100 gr
Testesteron	0,20±0,03
Progesteron	4,61±0,26
Prolaktin	70,80±20,00
Östradiol	52,00±6,00

Günümüzde sağlık için giderek daha fazla doğal ürün kullanılmaktadır. Bu ürünlerin kronik hastalık riskini azalttığı kanıtlanmıştır. Arı sütü ile ilgili yapılan araştırmalar sonucunda arı sütünün birçok biyolojik aktivitesi olduğu belirlenmiştir. Son yıllarda doğal arı ürünleri geleneksel ve modern tıpta yaygın olarak kullanılmaktadır. Arı sütü (RJ), bir arı ürünü olarak insan sağlığını korumak için de kullanılmaktadır [128].

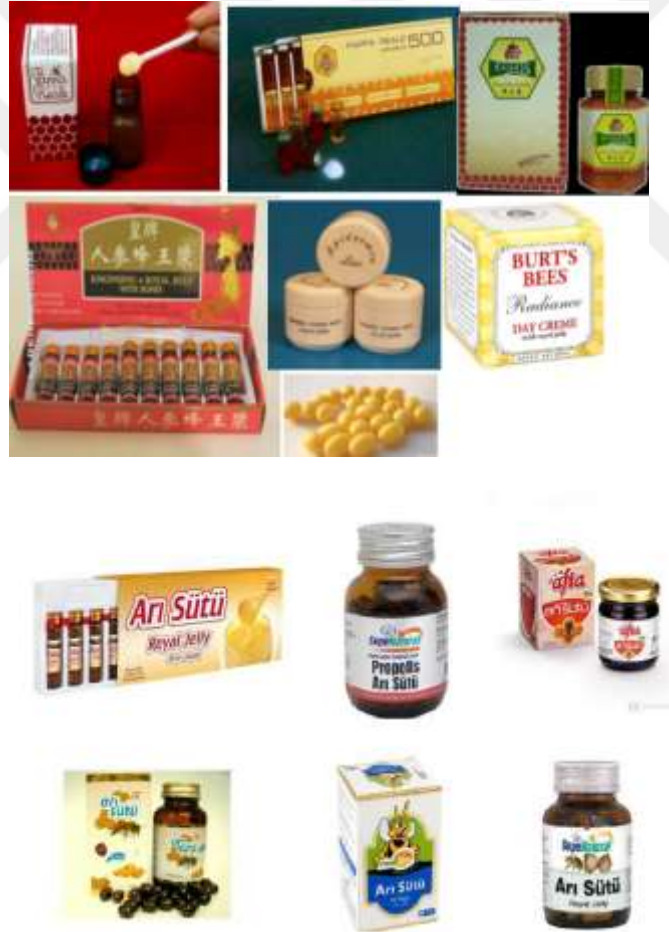
Arı sütünün hücre metabolizması üzerinde olumlu etkisiyle organizmanın bağışıklığının kuvvetlendiği ve güçlü bir yapıya kavuştuğu yapılan hayvan deneylerindeki araştırmalarda saptanmıştır. Arı sütünün, kan kolestorel, toplam yağ, fosfolipid, trigliserid, lipoprotein düzeylerini azaltması; antihipertansif ve vazodilatör (damar genişletici) etkisi bulunmaktadır. Ek olarak, hipoglisemik ve immünolojik etkisi, antibakteriyel ve antifungal aktiviteye sahip olması, dermatolojik bazı hastalıklarında iyileştirici etkisi, iştah eksikliği, kronik stres, zehirli kimyasallar ve kanser hastalığında kullanılan ağır ilaçların yan etkilerine karşı faydalı olduğu ileri sürülmüştür. Üreme bozuklukları düzenleyici etkileri, ruh-sinir-pskolojik hastalıklar, uyku problemi, karaciğer ve farklı doku hasarına bağlı bozuklukları, bazı bağışıklığın düşmesine bağlı rahatsızlıklara karşı fayda sağladığı, bazı kanser türlerinde tümör büyümesini inhibe edici olduğu, hücrelerde onarım ve antiageing (genç tutma) etkileri olduğu da bildirilmektedir [127-129].

Biyolojik aktivitesinin geniş spektrumlu olması nedeniyle birçok rahatsızlığı iyileştirilmesinde tıbbi tedavi döneminde ilave destek amacıyla günlük beslenme rejiminde arı sütünün kullanımı yaygınlaşmaktadır. Özellikle kemoterapi, radyoterapi ya da ağır kimyasal ilaç kullanılan hastalıklarda bu ilaçların çeşitli organlara yapabileceği yan etkileri azaltarak dokuları korumak hedefiyle kullanılmaktadır (Şekil 2.17). Bundan dolayı arı sütünün gıda olarak kullanımı, gittikçe daha da fazlalaşmaktadır [104].



Şekil 2.17. Arı sütünün etkilediği bazı alanlar [127].

Arı sütüne olan ilginin artması literatürdeki çalışmaların artmasına ve bu çalışma sonuçlarındaki olumlu sonuçlara göre de kullanımına yönelik ilginin daha da artmasına sebep olmaktadır. Bu durum arı sütü üretiminin artırılmasına ve ticari ürün olarak piyasada satışa sunulmasına da yol açmıştır. Günümüzde arı sütü, ilaç firmaları ve ticari firmalar tarafından çeşitli formlarda (saf olarak, bal karışım, propolisle birlikte veya bal mumuyla karışım olarak) ve paketlerde (damla, toz, macun, enjeksiyon, tablet ve kapsül) eczanelerde ve büyük marketlerde hatta internet ortamında satılmaktadır (Şekil 2.18). Dünyada ve ülkemizde de farklı konsantrasyonlara sahip çeşitli arı sütü içeren ürünler de satılmaktadır; ayrıca apiterapi alanında arılardan elde edilen bal, polen, arı sütü ve arı zehrinden farklı içeriklerde çokça bitkisel ilaç hazırlanmaktadır. Ancak tıp alanında tedavi ya da destek olarak arı sütü kullanımı için, alanında uzman tıp doktorunun görüşü ve denetimiyle ile güvenilir ürünlerin kullanılması gerekir [104,106, 129].



Şekil 2.18. Ticari ürün olarak satılan arı sütü örnekleri [106, 119].

2.12.1. Arı Sütü ve Erkek İnfertilitesi

Erkek infertilitesi farklı nedenlere bağlı olarak ortaya çıkabilir, bu nedenle erkeklerin çocuk sahibi olma yeteneklerini geliştirmek için farklı tedavi yaklaşımları uygulanmıştır. Hamileliğin oluşması spermin dölleme yeteneğine bağlıdır ve erkeklerde doğurganlık potansiyelini belirlemek için semen analizi kullanılarak sperm parametreleri incelenir.

Spermin dölleme potansiyelinin artırılması için bazı gıda takviyelerinin ve besinlerin kullanılmasına yönelik çalışmalara ilgi gittikçe artmaktadır. İşçi arılar kısırdır ve yedi ila sekiz hafta yaşar. Buna karşılık arı sütü ile beslenen kraliçe arı üreme açısından verimli dölleri verir ve beş ila yedi yıl yaşayabilirler. Sadece arı sütü ile beslenen kraliçe arıların genotipi aynı işçi arılardan yapısal ve fiziksel özellikler olarak farklılık göstermesi, yaşam süresinin uzun oluşu, üstün üreme yeteneğine sahip oluşu, insan popülasyonunda da aynı etkilerin ortaya çıkabileceği düşüncesiyle ürüne duyulan ilgiyi oldukça artırmıştır [104-107, 127-129].

Arı sütünün kraliçe arıya kazandırdığı bu özellikler arı sütünün (RJ), umut verici tıbbi ve beslenme amaçları nedeniyle doğal tıp bilimciler tarafından listelenen en değerli tedavi edici ürünlerden biri olarak gösterilmiştir. Diğer taraftan, arı sütünün fizyolojik etkileri henüz net bir şekilde tam olarak aydınlatılamamıştır. Arı sütü genel olarak vücutta hücre yenilenmesi, üretimi ve metabolizması üzerinde etkili olduğundan organizmanın bütün dokularında canlılık ve bunun sonucunda sağlık, enerji ve bağışıklık sisteminde önemli değişiklikler oluşturabilmektedir [126, 130].

Arı sütünün (RJ) yaşam süresini ve üreme gücünü artırmadaki faydaları bu alanda Proteinlerin, peptitlerin, lipitlerin, fenoliklerin ve flavonoidlerin arı sütünün çeşitli farmasötik özelliklerinden sorumlu ana biyoaktif bileşikler olduğu doğrulanmıştır. Biyoaktif bileşiklerin doğal değişimi, farklı ekosistemde bulunan flora türlerinin biyolojik çeşitliliğine bağlıdır [126, 130]. RJ'den izole edilen protein, peptitler, peptit fraksiyonu, yağ asidi ve fenolik bileşikler gibi farklı biyolojik bileşikler, bu ürüne çeşitli biyolojik aktiviteler ve farmasötik uygulamalar sağlar. Bu nedenle RJ, antimikrobiyal, antioksidan, yara iyileşmesi, immünomodülatör, anti-aging, anti-kanser, anti-inflamatuar, anti-hipertansiyon, anti-hiperlipidemik, östrojenik ve nörotrofik gibi fonksiyonel özelliklere sahiptir. Arı sütü alımı, genital parametreleri özellikle sperm sayısını ve hareketliliğini artırabildiğini, olgun ve aktif hücreleri büyütürken testisin mikroskobik yapısı üzerinde de faydalı olduğunu gösteren sonuçlarla, düşük sperm sayılarına ve zayıf sperm hareketliliğine sahip kısır erkekler için üreme yeteneğine yardımcı olmak için faydalı olduğu gösterilmiştir. Özellikle biyoaktif amino asitler, mineral (Ca, K, Mg, Na) ve vitaminler (C ve E) için RJ'nin kimyasal bileşimi, sperm zarının bütünlüğünün korunmasında önemli rol oynar [111-115, 131].

Arı sütü, hayvan ve insan üremesinde yararlı etkilerine ilişkin artan veriler sonucunda büyük ilgi görmüştür. Sperm kalitesi, sperm canlılığını, hareketliliğini ve doğurganlığını sürdürme yeteneği üzerinde çeşitli etkileri olduğundan, diyetle arı sütü ekleme tavsiyesi gittikçe yaygınlaşmaktadır RJ'nin farklı konsantrasyonlarda beslenme rejimine dahil edilmesinin erkek hayvanlarda üreme özelliklerini, semen kalitesini ve in vitro fertilizasyon sonuçlarını iyileştirdiği bildirilmiştir Yüksek kaliteli RJ'nin günlük alımının hormonları düzenlemeye yardımcı olduğu gösterilmiştir. Endokrin sisteme fayda sağladığı için hormonal dengesizlikten muzdarip bireyler için faydalıdır. Bu aynı zamanda hormonal dengesizliğe bağlı olarak doğurganlıkla ilgili sorunlara da yardımcı olabilir. Ayrıca RJ, testosteron, LH ve FSH gibi hormonların aktivitesi ile ilişkilidir. Bu nedenle, RJ, eksojen hormonların kullanımına dayanmayan alternatif bir üreme tedavi yönetimi olarak uygulanabilir [127, 128, 131].

Arı sütü uygulaması, kısır erkeklerde sperm aktif hareketliliğini, lüteinize edici hormonları ve testosteron seviyelerini önemli ölçüde artırır. RJ'nin uzun süreli beslenmesi, deney hayvanlarında testis fonksiyonunda yaşa bağlı düşüşü durdurarak testosteron seviyelerini ve spermatogenezi artırdığı [132], astenozoospermiye bağlı infertilite tedavisinde bal ve RJ'nin birlikte uygulanması etkili olabildiği gösterilmiştir [133]. Arı sütü uygulamasının, sperm sayısı, sperm hareketliliğindeki defektlerde iyileştirici bir etkisinin olduğu, ayrıca sperm lipid peroksidasyon seviyesini etkili bir şekilde iyileştirebilir olduğu ayrıca hayvan deneylerinde testis dokusunun biyokimyasal, hormonal ve yapısal yönlerini iyileştirebildiği gösterilmiştir [36,122,134-136]. Literatürdeki çalışma sonuçlarına göre, arı sütü içerisindeki aktif biyolojik maddelerin etkinliğine bağlı olarak, erkek üreme sisteminde faydalı etkilere sahip olup tedaviyi destekleyici bir ürün olarak önemli bir rol oynayabilir.

2.13. Apoptozis

Apoptozis, organizmanın gelişimi sırasında, sağlıklı organizmalarda görülen normal hücrel bir süreçtir. Apoptoz, embriyolojik gelişim sırasında, doğumdan sonra ve yetişkinlik döneminde önemli bir rol oynayan programlanmış hücre ölümünün morfolojik ve biyokimyasal olarak farklı bir şeklidir. Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz, dikkatle kontrol edilen, enerjiye bağımlı bir hücre ölümü sürecidir. Canlının başarılı bir organ gelişimini sağlayabilmesi embriyonik gelişme sırasında gerçekleşen hücre ölümüne bağlıdır. Hücre farklılaşması ve değişik hücrelere dönüşmesi hem hücre bölünmesinin hem de hücre ölümünün kontrol edildiğini göstermektedir. Bu nedendir ki embriyonik gelişme sırasında her hücre komşu hücrelerden bağımsız biçimde hareket edebilmiş ve her bir hücre ileride dönüşeceği hücre tipine geçeceği süreci uygun bir denge içerisinde tamamlayabilmiştir. Erişkin hücrelerde apoptozis normal hücre homeostazisini sağlamaktadır [137,138].

Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesiyle fazlalaşan hücre sayısı hücre ölümleriyle dengelenir. Eğer organizmada bir hücreye artık ihtiyaç yoksa, hücrede programlanmış hücre ölümü aktif hale geçerek o hücrenin kendini yok etme süreci başlatılır. Bu yok etme süreci Latince (Yunanca) yaprak dökümü (düşüşü) anlamına gelen apoptozis ya da programlı hücre ölümüyle gerçekleşir. Bu durum özellikle uzun yaşam süresi olan, fizyolojik olduğu kadar patolojik birçok ölüm sinyalini de entegre etmesi gereken memeliler için oldukça önemlidir. Apoptozun uyarılması, hücre morfolojide ve ölümdede değişikliklerle sonuçlanan bir dizi karakteristik biyokimyasal olayla sonuçlanır. Apoptoz geçiren hücrelerde kabarcıklanma, hücre büzülmesi, nükleer parçalanma ve DNA parçalanması görülür. Apoptoz fizyoloji ve patolojide önemli roller oynar ve iskemi, hipoksi, belirli ilaçlara ve kimyasallara maruz kalma, bağışıklık reaksiyonları, bulaşıcı ajanlar, yüksek sıcaklık, radyasyon ve çeşitli hastalık durumları dahil olmak üzere çok sayıda uyaran tarafından tetiklenebilir. Ayrıca, apoptoziste görevli genlerin fonksiyon kaybı ya da kazanımı (gain/loss of function) hücre dengesinin bozulmasına neden olarak farklı türde hastalıkların ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu genlerdeki işlevsizlik yetersiz apoptozise ve buna bağlı olarak kanser, otoimmün hastalıklara veya hızlandırılmış apoptozise ve dolayısıyla akut ve dejeneratif birçok hastalığa sebebiyet verebilmektedir [137, 138, 144].

Apoptoz terimi ilk kez 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie tarafından yaptıkları araştırma sonuçlarını yayınladıkları makalede hücre ölümünün morfolojik olarak farklı bir biçimini tanımlamak için kullanılmıştır. Araştırma sonuçlarında, apoptotik hücrelerin, hücre içeriğinin salınması olmaksızın komşu hücreler tarafından fagosite edilen apoptotik cisimler oluşturduklarını tespit etmişlerdir. Vücudumuzda her bir hücrenin hayat döngüsü; doğum, farklılaşma, işlev görme ve ölüm evrelerinden oluşur. Her bir hücre tipinin farklı bir canlı kalım süresi vardır. Örneğin nötrofiller dokuda dört gün, eritrositler kanda yüzyirmi gün, beyin ve sinir hücreleri ise elli ile yüz yıl arasında yaşarlar. Özellikle embriyonik gelişme sırasında hücre ölümünün önemli bir yeri vardır. Erişkin organizmalarda da bu süreç devam eder çünkü hücre çoğalmasıyla hücre ölümleri dengede kalmak zorundadır. Eğer böyle bir denge olmasaydı, dokular hücre çoğalmasıyla sürekli büyümek zorunda kalırdı. Canlı organizmalarda nekroz ve apoptozis olmak üzere iki ana hücre ölüm şekli vardır. Nekroz, hücre yaralanmaları sonucu hücrenin zarar görerek şişip, patlayarak ölmesidir. Hücreler apoptozis sırasında çeşitli uyarıcılarla ölüme giderler ancak bu ölüm programlı, kontrollü ve düzenli bir biçimde gerçekleşir. Nekrotik ölümdede hücre kontrolsüz olarak ölüme gider, hücre parçalanır, enflamasyon görülür. Apoptoziste ise hücre kendi ölümü esnasında aktif rol alarak her aşamasına katkıda bulunur. Bundan ötürü apoptozis hücre intiharı olarak da adlandırılır. Nekrozda patlamış hücrenin içeriği komşu hücrelere de zarar verirken, apoptoziste çevre hücreler zarar görmez ve ölen hücreden etkilenmezler [137, 138, 144].

Nekroz, genellikle geniş hücre alanlarını etkileyen kontrolsüz ve pasif bir süreçtir, oysa apoptoz kontrol edilir ve enerjiye bağlıdır ve bireysel veya hücre kümelerini etkileyebilir. Nekrotik hücre hasarına iki ana mekanizma aracılık eder; hücrenin enerji kaynağına müdahale ve hücre zarlarına doğrudan zarar verir. Apoptoz ve nekrozun mekanizmaları ve morfolojileri farklılık gösterse de bu iki süreç arasında bir örtüşme vardır. Kanıtlar, nekroz ve apoptozun “apoptoz-nekroz sürekliliği” olarak tanımlanan ortak bir biyokimyasal ağın morfolojik ifadelerini temsil ettiğini göstermektedir. Örneğin, devam eden bir apoptotik süreci nekrotik bir sürece dönüştürecek iki faktör, kaspazların ve hücre içi ATP'nin mevcudiyetinde bir azalmayı içerir. Bir hücrenin nekroz veya apoptoz yoluyla ölmesi, kısmen hücre ölüm sinyalinin doğasına, doku tipine, dokunun gelişim aşamasına ve fizyolojik ortama bağlıdır [137, 138, 144].

Apoptozis için sinyal alındıktan sonra hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişim gözlenir. Hücre küçülmeye ve kondanse olmaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı yer yer erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır. Apoptozisin erken evrelerinde kaspaz proteinleri salınmaya başlar ve aktive olan bu proteinler hücrenin birçok substratın kesilmesine hem aracılık eder hem de neden olur. Kaspaz enzimleri ayrıca hücrenin diğer sindirim enzimlerini de harekete geçirirler. Bunun sonucunda hücre hem biyokimyasal hemde morfolojik (dış görünüm) olarak değişir [137]. Nekroz ve apoptozis sırasında görülen değişimler Tablo 2.7.'de gösterilmektedir

Tablo 2.7. Apoptozis ve nekroz arasındaki farklılıklar [137].

Apoptozis	Nekroz
Kromatin kondensasyonu	Çekirdeğin şişmesi
Hücre küçülmesi	Hücrenin büyümesi ve şişmesi
Organel ve hücre membranlarının bütünlüğü	Organellerin bütünlüğünün bozulması
Komşu hücreler tarafından çabuk yutulma (eliminasyon-fagositoz)	Hücrelerin parçalanması ve içeriklerinin çevreye dağılması
DNA fragmentasyonu	Enflamasyon

2.13.1. Apoptozisin Düzenlenmesinde Görev Alan Genler

Çok sayıda gen apoptoziste görev alır (Tablo 2.8). Bu genlerin bir bölümü hücre yüzeyinde bir bölümü ise hücre içi sinyal iletim yollarında görev alırlar. Bu genlerden apoptoziste görev alan en önemli gen grubu B-hücreli Lenfoma- 2 (Bcl-2) ailesidir. Kondensasyonu ve hacim daralmasını engeller. Memeli hücreleri Bcl-2 ailesinin tüm üyelerine sahiptir [137-139].

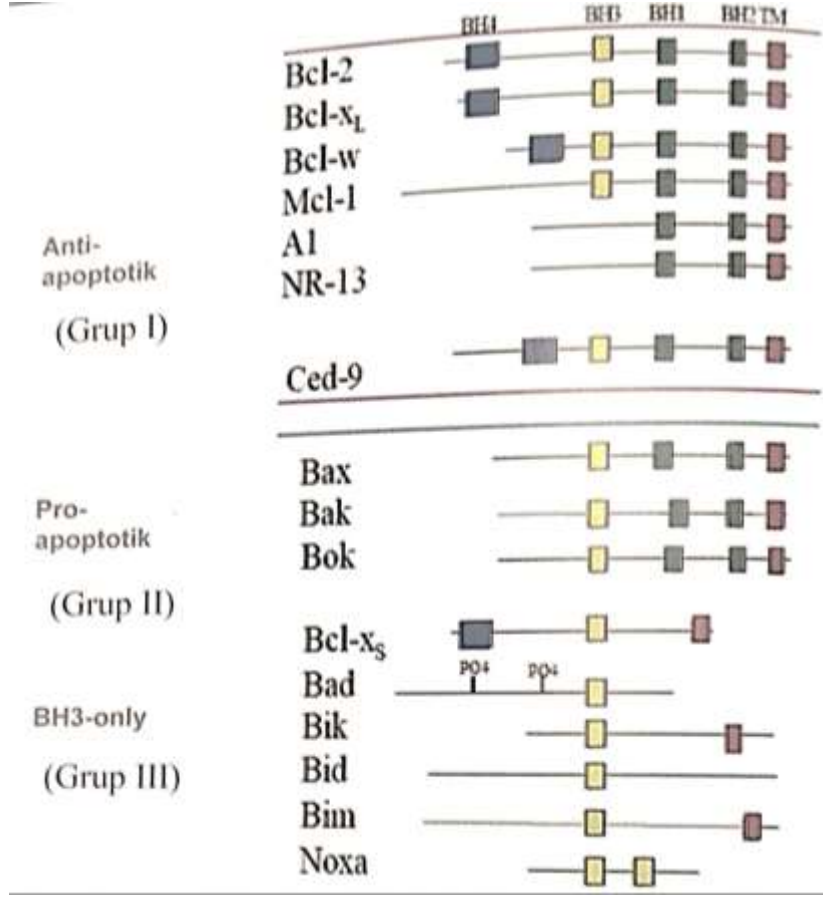
Bu ailede bulunan proteinlerin bazıları apoptozisi hızlandırırken (proapoptotikler) diğerleri apoptozisi inhibe ederler (anti-apoptotikler). Bcl-2 ailesi onikiden fazla proteini kapsar ve 3 adet işlevsel gruba ayrılır. Grup I ya da antiapoptotik üyeler (Bcl-2, Bcl-XL) evrimsel süreçte korunmuş 4 tane Bcl-2 homoloji (BH) domaini (BH1-BH4) taşır [137, 139]. Hepsinin hidrofobik C-terminal kuyruğu bulunur ve bu kuyruk aracılığıyla mitokondri dış membranına yerleşir (nadiren endoplazmik retikulum membranına da tutunur), proteinin büyük bölümü sitoplazmaya bakar. Grup 1 üyelerinin en önemli özelliği anti-apoptotik aktiviteye sahip olmalarıdır ve hücreleri ölümden korurlar. Grup H'de yer alan üyeler aksine pro-apoptotik aktiviteye sahiptir ve hücreleri ölüme gönderirler [137-139].

Tablo 2.8. Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan genler [137].

• Fas, Trail, TNF (almaç ve Ligandlar)	• Kaspazlar (yaklaşık 13 tane),
• Bcl-2 Ailesi Proteinler (yaklaşık 12 tane)	Granzim, Kalpain
• Kinazlar	• Kaspaz Düzenleyicileri
RIP3, CAP, AKT, PKA, MapK	IAP/Survivin (5 tane), Apaf-1
• Mitokondri Proteinleri	• Transkripsiyon Faktörleri
VDAC, ANT, Sitokrom C, AIF, SMAC	p53, myc, Nur77
• Proteazlar	• Diğerleri
	FADD, TPvADD, DAD1

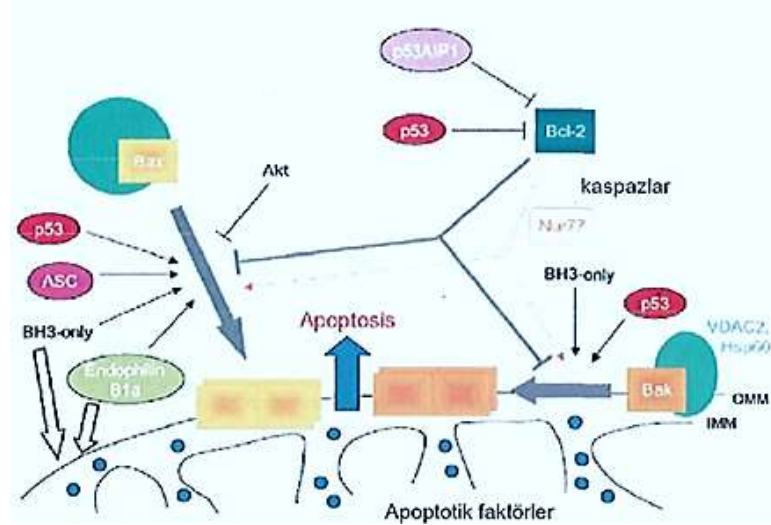
2.13.2. B-hücreli Lenfoma- 2 (Bcl-2) Ailesi Genleri

Bcl-2 ailesi proteinleri apoptozis kontrol noktalarında görev alırlar. Bcl-2, B-hücre lenfomasında tanımlandığından ötürü bu ismi almıştır. B hücreli lenfoma-2 (Bcl-2) ailesi proteinleri programlanmış hücre ölümünü düzenler. Ailenin bazı üyeleri (Bcl-2 ve Bcl-xL gibi) apoptozu inhibe ederken, diğerleri (Bax ve Bak gibi) hücre ölümünü teşvik eder [139]. Yapılan araştırmalarda Bcl-2 proteininin apoptozisi inhibe ederek kanser gelişimine neden olduğu tespit edilmiştir. Bcl-2 mitokondride bulunur ve apoptoziste görülen çekirdek sürüklerler. Bu grubun üyeleri yapısal olarak grup 1 üyelere benzer. Hidrofobik kuyruk kısımları vardır ancak BH4 domaini taşımazlar. Grup 3'te yer alan üyeler yapısal olarak çeşitlilik gösterir. Ortak yanları yaklaşık 12-16 amino asitlik BH3 domaini taşımalarıdır. Bu nedenle sadece BH3 içeren (BH3-only) olarak adlandırılırlar. Bu proteinlerin yapı ve sınıflandırılmaları Şekil 2.19'da gösterilmektedir. Pro- veya anti-apoptotik aktivitelere sahip olan Bcl-2 ailesi proteinleri, apoptoz, tümörjenez ve anti-kanser tedavisine hücrel tepkilerin düzenlenmesindeki önemleri nedeniyle son on yılda yoğun bir şekilde incelenmiştir [137, 139].



Şekil 2.19. Memelilerde Bulunan Bcl-2 Ailesi Üyeleri [137].

Canlı hücrelerde çoklu-domaine sahip Bax ve Bak monomer olarak bulunur. Apoptozun başlangıcında, BAX ve BAK konformasyonel değişikliklere uğrar, mitokondrinin dış zarının çeşitli proteinlere karşı geçirgen olmasına neden olur ve mitokondrinin daha küçük birimlere bölünmesini indükler. Ölüm sinyali alındığında Bax homodimerize olur ve mitokondri dış zarına girer. Mitokondride konuşlanmış olan inaktif Bak bu ölüm sinyaline cevap oluştururken yapısal değişim geçirir, dimerize olur ve aktivite kazanır. Böylece mitokondri dış membranı geçirgen bir yapı kazanır. Bu geçirgenlik site'yi de kapsayan diğer intermembran boşluk (IMS) proteinlerinin salınmasına olanak verir (Şekil 2.20). Apoptoz sırasında mitokondrideki değişiklikler, özellikle sitokrom c'nin salınması, ölmekte olan hücrelerin verimli bir şekilde parçalanmasını düzenleyen kaspaz proteazlarının aktivasyonu ile sonuçlanır [137-140].



Şekil 2.20. Bax aktivasyonunun kontrolü [137].

Bcl-2 ailesi üyelerinin önemli özelliklerinden biri homo- ve heterodimer oluşturmalarıdır. 239 amino asitlik (26KDa) Bcl-2, Bax ile heterodimer oluşturur. Alternatif mRNA splicing ile iki protein oluşturan Bcl-X proteini'nde (Bcl-XL/Bcl-X uzun ve Bcl-Xs/BclX kısa) Bcl-2 ile heterodimer oluşturur. Bcl-xL241 amino asitten oluşur ve apoptozisi inhibe eder. Bcl-Xs ise XLden 66 amino asit daha küçüktür ve pro-apoptotik olarak işlev görür. Bcl-xLmonome-rinde BH1-3 domainlerinin birbirlerine yakın konuştandıkları görülür. Bu üç domain bir cep oluşturur ve proapoptotik üye sahip olduğu BH3 domaini aracılığıyla bu cebe bağlanır. Bcl-2 proteinlerinin mitokondriyel yolları endoplazmik retikulum ile de birleşir. Endoplazmik retikulum da apoptoziste kritik bir rol oynamaktadır. Endoplazmik retikulum, bir yandan sitoplazmik ölüm yollarını aktive ederken diğer yandan mitokondri için direkt proapoptotik uyarı gönderir. Endoplazmik retikulum, Fas ve p53 aracılıklı apoptozise katkıda bulunur [137-140].

2.13.3. Bcl-2Proteinleri Aracılığıyla Apoptozisin Düzenlenmesi

Apoptozis mekanizmasında anahtar görev kaspaz aktivasyonudur. Kaspazların aktivasyonu farklı moleküller tarafından kontrol edilir. Bcl-2 ailesi proteinleri, bu moleküller içinde önemli bir yer tutar. Kaspaz 3 aktivasyonunundan daha önce Bcl-2 ailesi apoptozisi kontrol ettiğine göre bu proteinler hücrenin yaşayıp yaşamayacağına karar verirler. Dolayısıyla bu proteinlerin aktivitelerinin de kontrol edilmesi gereklidir. Bcl-2 ailesi proteinlerin aktiviteleri hücrede çeşitli yollarla düzenlenir. Bunlar, transkripsiyonel seviyede kontrol, fosforilasyon, dimerizasyon, translokasyon ve proteolitik yıkımdır [137-140].

Transkripsiyon

Bcl-2' nin transkripsiyonel kontrolü, hücre ölümünün regülasyonunda önemli bir görev alır. Örnek verilecek olursa, kanserojenik hücrelerde Bcl-2 protein seviyesinin arttığı, inflamasyonda ise azaldığı tespit edilmiştir. Proapoptotik üyelerin de transkripsiyon düzeyinde kontrol edildiği belirlenmiştir. Normal yapıda hücrelerde toksisiteden korunmak için hücreler Bcl-2 proteinlerini aktiveleştirmezler. Bcl-2 ekspresyon düzeyi düşüktür. Ölüm sinyali alınınca bu genlerin transkripsiyonu ve regülasyonu başlar [137].

Dimerizasyon

Bu proteinler hem homo hem de hetero-dimerler oluşturdıkları için hem tek başlarına hem de bir diğer üyeye birlikte apoptozisin düzenlenmesini sağlarlar. Bcl-2, Bax ile hetero-dimer oluşturduğunda Bcl-2 etkisini antagonize eder. Ancak hangisinin efektör hangisinin düzenleyici olduğu bilinmemektedir. Bir varsayıma göre: (i) Bcl-2 hücrede yaşam yolağını aktive ederek hücrenin hayatta kalmasını teşvik ederken, Bax, Bcl-2'nin negatif regülatörü olarak rol alır; (ii) Bax direkt ya da dolaylı olarak hücre ölüm sinyali yayarken Bcl-2, Bax'ın baskın inhibitörü olarak rol alır. Bax-Bcl-2 etkileşimine ek olarak diğer üyeler de dimerizasyona uğrarlar: (i) Bcl-2/Bcl-2, (ii) Bcl-2/Bcl-XL, (iii) Bcl-2/Bcl-Xs, (iv) Bcl-2/Mcl-1, (v) Bcl-XL/Bcl-XL, (vi) Bcl-XL/Bax, (vii) Bcl-XL/Mcl-1, (ix) Bax-Mcl-1 [137].

Fosforilasyon

Sadece BH3 içeren (BH3-only) proteinlerden Bad'in işlevi fosforilasyonla hızlı biçimde değişir. Bu fosforilasyon hem proteinin hücre içi yerleşimini hem de protein-protein etkileşimini değiştirir. Yaşam sinyallerinin varlığında Bad, Seri 12 ve Seri 36'dan fosforile edilmiş olarak bulunur. Bu fosforik form 14-3-3'e bağlı kaldığı için proapoptotik rolü baskılanır. Ölüm sinyalini takiben (örneğin büyüme faktör azlığı) Bad defosforile edilir ve mitokondri membranına geçer ve burada Bcl-XL/Bcl-2 heterodimeri ile etkileşime girer. Yalnızca defosforile Bad Bcl-xL ve Bad'in BH3-only domainine bağlanabilir. Bu bağlantı da apoptozis için oldukça önemlidir. Bad fosforilasyonu hücre yaşamını teşvik eden iki tane kinaz tarafından sağlanır. Bunlar Akt ve PKA'dır. PKA mitokondri membranına yerleşik cAMP bağımlı protein kinazdır ve Seri 12 fosforilasyonunu sağlar. Akt (PKB) ise seri36 bölgesinden fosforilasyonu sağlar [137].

Proteolitik Kesme

BH3-only proteinlerden Bad zararsız bir formda küçük, esnek bir halkasal yapıya sahip olarak sitoplazmada bulunur. Belirli hücre tiplerinde ölüm ligandları hücreyi uyardığında kaspaz-8 aktive olur ve Bid'in esnek halkasal yapısını keser. İç yolakta ise Bid kaspaz-3 tarafından kesilir. Bid'in (p22) N-terminal kısmının kesilmesi sonucu tBid olarak gösterilen kesikli (truncated) p15 Bid oluşur ve tBid mitokondriye girer ve burada mitokondriyel proteinlerle etkileşerek apoptozisi indükler. Bu durum Bid'in N-terminal domaininin inhibitör rolü oynadığı düşüncesini desteklemektedir [137].

Translokasyon

Bax aktivasyonu için hem translokasyon hem de dimerizasyon gerekir. Normal görünümlü hücrelerde Bax sitozolde monomer olarak bulunur. Apoptotik sinyal bu proteinin Bax/Bax homodimerleri biçiminde sitoplazmada birikmesine neden olur. Homo-dimer konumuna geçen Bax daha sonra mito-kondriye transloke olarak membrana entegre olur. Ancak Bax dimerizasyonunun sitoplazmada mı yoksa mitokondri membranında mı gerçekleştiği tam olarak bilinmemektedir. Ancak bugüne kadar elde edilen bilgiler proteinin N-terminalinin molekülü kapalı bir yapıda tuttuğunu ve bir uyarıyla beraber aktive konuma geçtiğini ortaya çıkarmıştır. Bim mitokondriye transloke olan başka bir Bcl-2 ailesi üyesidir. Sağlıklı hücrelerde Bim mikrotübül ilintili dinein motor kompleksine bağlı olarak bulunur ve apoptozisi indükleyemez. Ölüm sinyali alan hücrede Bim bu kompleksten ayrılır ve mitokondriye transloke olur ve burada Bcl-2 ya da onun homologlarından biriyle etkileşime girerek antiapoptotik etkiyi antagonize eder [137].

2.13.4. Apoptoziste Sinyal İletim Yolakları (Ölüm Almaçları)

Ölüm almaçları tümör nekroz faktörü (TNF) süperaillesine aittir. En iyi tanımlanmış olan üyeleri Fas reseptörü (ya da CD95), TNFR1 (TNF almaç 1) ve TRAIL (TNF ile ilişkili apoptozu indükleyen ligand) almaçları olan ölüm reseptör 4 (DR4) ve Ölüm reseptör 5 (DR5)'tir.

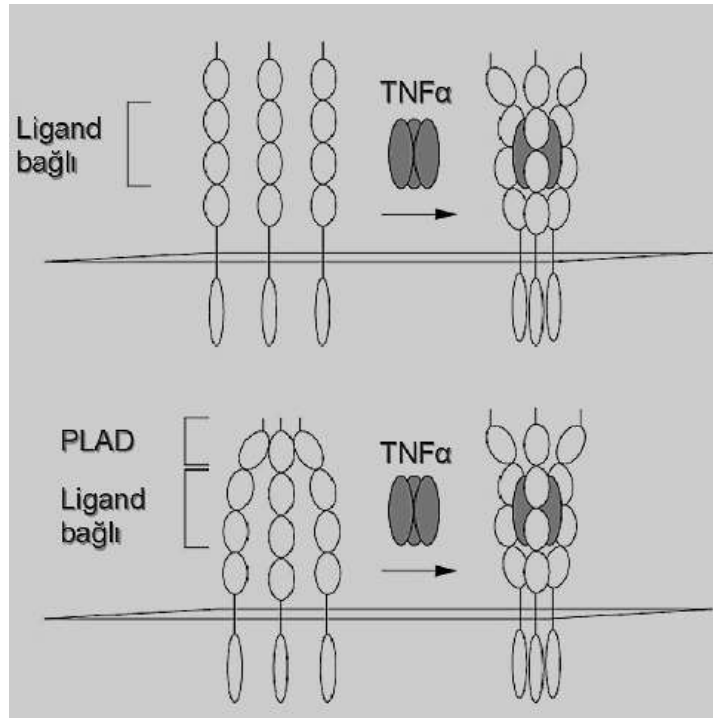
Ölüm almaçları yolaklarının prototipi TNF- α ve FasL (Fas reseptörünün ligandı; FasLigand) sinyal iletim yolaklarıdır ve her ikisi de almaçları olan TNFR1 ve Fas aracılığıyla benzer hücre içi yolakları uyarırlar. Ligand bağlanmasıyla birlikte bu almaçlar DISC adı verilen (death inducing signaling complex; ölüme neden olan sinyal kompleksi) karmaşık bir yapı oluşturmak üzere kümeleşirler. DISC, yüksek lokal prokaspaz-8 düzeyinin korunmasını sağlar. Prokaspaz-8 düzeyi artınca, otokatalitik aktivasyona uğrar ve DISC'ten ayrılır. Daha sonra effektör kaspazları aktive eder.

Hücrelerin işlevlerine bağlı olarak ölüm almaçları yolakları ile mitokondride gerçekleşen apoptozis yolağı kesişebilir. Örneğin prokaspaz-8 konsantrasyonunun düşük düzeyde olduğu hücrelerde Bid (proapoptotik Bcl-2 ailesi proteini) aktive olarak mitokondri aracılığıyla apoptozis sinyalini oluşturur. Ayrıca hücre içi diğer moleküller de bu yolakları düzenlerler. Örneğin FLIP (Flice-inhibitory protein) FasL/TNF- α aracılı apoptozisi inhibe eder. Flip FADD etkileşimi prokaspaz-8'in FADD ile etkileşimini engelleyerek DISC oluşumunu önler. Ayrıca FLIP, NF- κ B VE ERK (Hücre dışı sinyalle düzenlenen kinaz) gibi hücrenin hayatta kalımını aktive eden yaşam sinyallerini de aktive eder. Bu transkripsiyon faktörleri FasL ve TNF- α tarafından indüklenen apoptotik yolağı inhibe ederler [137-140].

2.13.5. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α)

TNF- α , süper aile tümör nekroz faktörüne (TNF) aittir. Tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), aktive makrofajlar ve monositler tarafından doğal olarak üretilir ve normal ve malign hücreler üzerinde pleiotropik etkilere sahiptir. 157 amino asitten oluşan 17 kDa'lık bir protein olan tümör nekroz faktörü (TNF), inflamatuvar ve immün fonksiyonların güçlü bir parakrin ve endokrin aracısıdır. TNF- α , esas olarak sistemik inflamasyonun indüklenmesi için uyaranlara yanıt olarak salgılanır. Ayrıca çok çeşitli hücre tiplerinin büyümesini ve farklılaşmasını düzenlediği de bilinmektedir [137].

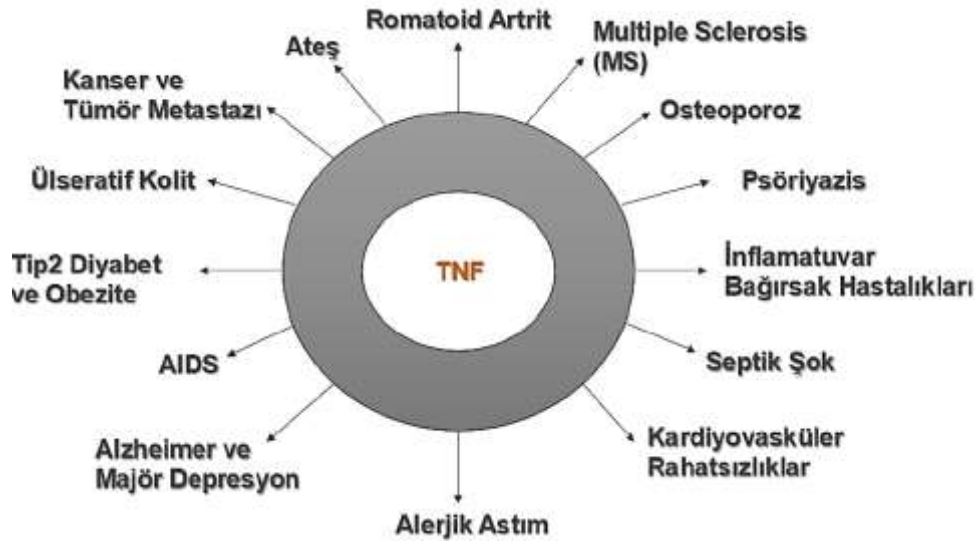
TNF- α geni insanlarda 6. Kromozomda yer alır (6p21.3); Uzunluk olarak üç kilobaz ve 4 ekzona sahiptir. İnsanlarda TNF- α proteini yirmi altı kDa ağırlığında, iki yüz otuz üç amino asit ihtiva eder ve membranöz TNF (mTNF) tip 2 transmembran zar proteini olarak sentezlenir. Sinyal peptidi ihtiva etmeyen TNF- α ; TNF- α -dönüştürücü enzim aracılığıyla, amino ucundaki (N-terminal) 76 aminoasiti uzaklaştırır geriye 157 amino asit kalır, daha sonra hücre yüzeyinden aktif bir yapı olan trimer yapısıyla kana geçer ve 17 kDa'luk çözülebilir yapıdaki (sTNF) meydana gelir. mTNF ve sTNF yapılarındaki TNF'ler trimer olan reseptörlerine bağlanır ve trimerizasyon ile aktifleşerek (Şekil 2.21.) etki gösterirler [142-146].



Şekil 2.21. TNF- α 'nın trimerizasyon ile aktivasyonu [142].

mTNF- α tercihi olarak TNFR2'ye bağlanırken, sTNF- α TNFR1 ile aktivasyon sağlar. Her iki reseptörün hücre dışı alanları benzerlik gösterir ve sistein aminoasiti tekrarlarından meydana gelir ve ligand-öncesi bağlanma bölgeleri (pre-ligand assembly domain, PLAD) içerirler. PLAD, reseptörde ligand olsun olmasın trimerik şekle dönüşümü sağlar, böylelikle trimer durumdaki ligand gelince sinyal iletimi hızlı gerçekleşir [142, 147]. İki reseptör arasındaki esas fark, intraselüler bölgelerinden kaynaklanır. TNFR1 sitoplazmik kısmında 80 aminoasitlik ölüm bölgesi yer alırken TNFR2'de bu bölge yer almaz. TNFR2'nin genel olarak hücre canlılığının devamında görev aldığı bildirilmiş ve bundan ötürü TNF- α 'nın fizyolojik işlevlerinin birçoğundan TNFR1 sorumlu olduğu tespit edilmiştir [142]. TNF ile aktifleşen pro-enflamatuar ve programlanmış hücre ölüm yolları çoğunlukla TNFR1 yoluyla ile yönlendirilmekteyken TNFR2 sinyalinin doku tamiri ve anjiogenezi arttırdığı gösterilmiştir [148, 149].

TNF reseptörleri (TNFR1 ve TNFR2) aracılığıyla TNF-alfa sinyali, Şekil 2.22'de gösterildiği gibi apoptozu, hücre hayatta kalmasını veya iltihaplanmayı indüklemek için farklı yolları aktive edebilir. TNF- α 'nın düzensizliği (disregülasyonu) ya da aşırı ekspresyonu, astım, kronik bronşit ve akut solunum sıkıntısı sendromu dahil olmak üzere birçok hastalığın karakteristik fenomeni olan inflammatuar reaksiyonların gelişmesine neden olur [146].



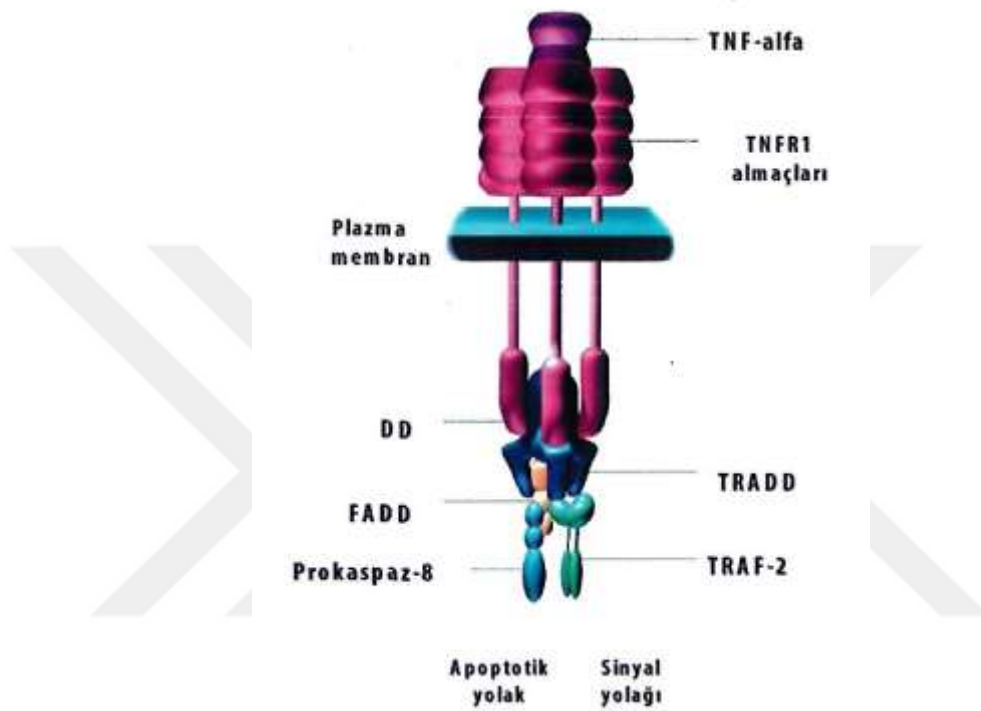
Şekil 2.22. TNF- α 'nın disregülasyonunun yansımaları [142].

TNF- α ligandının TNF reseptörüne (TNFR1) bağlanması, pro-inflamatuar ve pro-apoptotik sinyal kaskadlarını başlatır. Pro-inflamatuar sinyal yolları, NF- κ B veya MAPK'nın aktivasyonu ile uyandırılır [150].

TNF, enfeksiyona cevap olarak T-hücreleri ve aktive makrofajlar tarafından üretilir. TNF-alfa almacına bağlandıktan sonra farklı aktiviteler gösterir. Bazı hücrelerde NF- κ B VE AP-1 aktivasyonuna yol açarak çeşitli proenflamatuar immün modülatör genlerini indükler, bazı hücrelerde ise apoptozisi indükler. Tnf almaç kompleks yapısı Şekil 2.21' de gösterilmektedir [137].

TNFR1 enflamasyon reaksiyonlarında hücrede ifade edilir. Hücrenin sitoplazmik kısmında DISC'e bağlanan adaptör moleküllere bağlı olarak hücre çoğalması ya da apoptozis için sinyal oluşturur [137-144].

Bu adaptör moleküllerden komplekse ilk katılanı TRADD'dır. TRADD eğer FADD katılımını sağlarsa hücre apoptozise girer, RIP ya da TRAF katılımını aktive ederse, antiapoptotik yolak kullanılır [137].



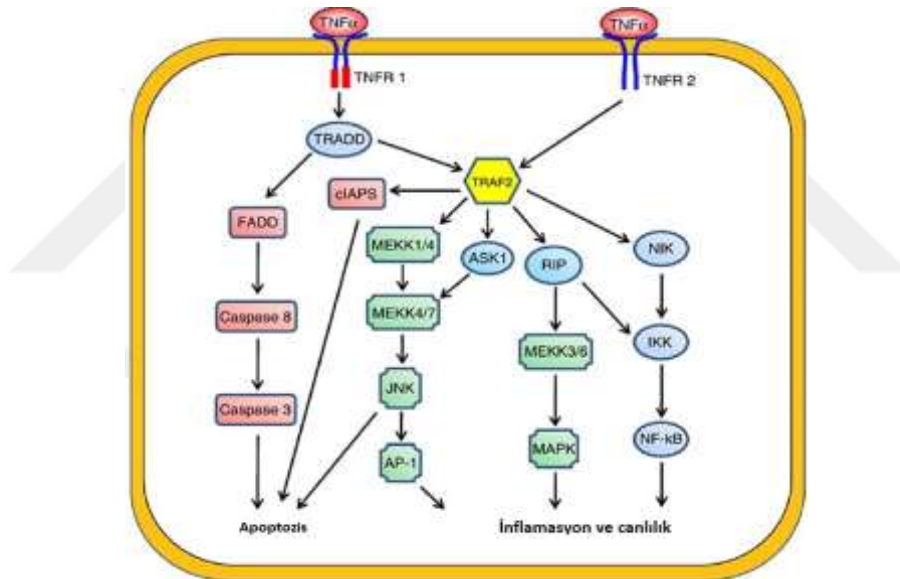
Şekil 2.23. TNF alfaç kompleksi [137].

TNF-alfa yolağının aktivasyonu TNF- α 'nın TNFR1'e bağlanmasıyla başlar ve bunu alfaç trimerizasyonu izler. Sitoplazmik kısımda hücre içi ölüm domainleri gruplaşmaya başlar. Bunu hücre içi adaptör molekül TRADD'ın ölüm domainleri aracılığıyla komplekse katılması izler. TRADD aktive almaca birkaç tane daha proteinin katılmasını sağlar. Eğer TRAF2 katılırsa NF- κ B ve JNK/Ap-1 yolağı aktive olur [137-144].

TRADD'ın FADD ile de ilişki kurması prokaspaz-8 aktivasyonunu indükler ve apoptotik yolak çalışmaya başlar. TNFR1 ayrıca RAIDD (RIP-associated ICH-1/ölüm domaini olan CED-3 homolog proteini) olarak adlandırılan adaptör molekülün DISC'e katılımını sağlayarak apoptozise aracılık eder. RAIDD DD'leri (ölüm alanı) aracılığıyla RIP'in DDleri ile etkileşime girer ve bu etkileşim kaspaz-2'yi aktive eder. Kaspaz-2 aktivasyonu apoptozisi indükler [137].

TNF sinyal iletim yolları karışık ve kompleks yapıdadır. Transkripsiyon faktörü Nükleer faktör kappa B' nin (NF- κ B) düzenlenmesi, TNF sinyalizasyonu için önemlidir. NF- κ B indüksiyonu, TNF- α -aracılı TNFR1 proteininin ekspresyonunu sağlar. Ayrıca NF- κ B aktivitesi TNFR1-aracılı apoptozu sınırlandırmaktadır. NF- κ B inaktif olduğu durumlarda hücre apoptoza yönelir [151-153].

TNF-alfa sinyali, TNF reseptörleri olan TNFR1 ve TNFR2 aracılığıyla, Şekil 2.22 'de gösterildiği gibi apoptozu, hücre hayatta kalmasını (canlılık) veya iltihaplanmayı (inflamasyon) indüklemek için farklı yolları aktive edebilir. TNF alfa'nın aşırı ekspresyonu, birçok hastalığın karakteristik fenomeni olan inflamatuvar reaksiyonların gelişmesine neden olur. [148,154,156]. TNF reseptörleri TNFR1 ve TNFR2'nin birbirine benzer ve/veya birbirinden farklı moleküllerle ilişkiye girebilmesi, TNF-alfa'nın farklı ve çeşitli fonksiyonlarda yer almasını açıklayabilmektedir. TNF reseptör ailesini, TNFR2, TRAF2 ve TRAF 1 gibi üyeleri farklı sinyalleri iletirler (Şekil 2.24) [155, 156].



Şekil 2.24. TNF sinyal iletim yolları [156].

Seminal plazmada normalde bulunan TNF- α , lökositospermide ve bakteriyospermide seminal plazmada yüksek konsantrasyonlarda bulunabilir. TNF- α ile sperm apoptozisinin yakın bir ilişkisi vardır. Yakın geçmişte yapılan çalışmalarda, TNF- α 'nın sperm apoptozisi ve DNA kırıklarını artırdığı ortaya konulmuştur. Bu bulgulara paralel olarak motilite ve membran bütünlüğünün de bozulduğu görülmektedir. Bu bulguların TNF- α antikorları ile inkübasyondan sonra gerilediği rapor edilmiştir. Seminal plazmada bulunan çeşitli sitokinlerin (IL-1, IL-2 ve TNF- α) konsantrasyonlarının artışı, kötü semen kalitesi ve erkek infertilitesiyle ilişkili bulunmuştur [157].

2.13.6. Kaspazlar

Kaspaz enzimleri büyük bir proteaz enzim ailesidir. Aktif merkezlerinde sistein amino asidi taşırlar ve hedefledikleri proteinleri aspartik asit birimlerinden kestikleri için bu ismi almışlardır (C-Asp-ase; C: sistein amino asiti simgesi, Asp: aspartik asit, -ase: kesici enzim eki). Kaspazlar hücre içerisinde inaktif zimojenler olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar. Bu inaktif prokaspaz enzimleri apoptozis sinyalinin alınmasıyla birlikte diğer kaspazlar tarafından aspartik asit birimlerinden kesilerek aktive edilirler. Aktive olan kaspaz diğer kaspazları keserek inaktif formdan aktif forma dönüştürür. Kaspazlar büyük ve küçük olmak üzere iki alt birimden oluşur ve N-terminallerinde pro-domainleri bulunur. Büyük ve küçük alt birimler birbirleriyle etkileşime girerek enzimin aktif merkezini oluştururlar (Şekil 2.23). Enzimin pro-domaini çeşitlilik gösterir; CARD (caspase recruitment domain; kaspaz aktivasyon ve alım bölgeleri) ve DED (death effector domain; Ölüm efektör alanı) enzimin pro-domaininde bulunan özel motiflerdir ve protein-protein etkileşiminde görev alırlar. Enzim tam aktivitesini Şekil 2.23'te gösterilen 2 kesme noktasından kesildikten sonra gösterir. Evrimsel süreçte korunmuş olan sistein, enzimin aktif merkezinde bulunur ve bu amino asidi çevreleyen dizi de evrimsel süreçte korunmuştur. Kristalografi çalışmaları iki tane heterodimerin bir araya gelerek tetramer yapıda aktif kaspaz enzimini oluşturduğunu ortaya koymuştur. Böylece her enzim iki tane aktif merkeze sahip olmaktadır. Apoptozis sırasında kaspazlardan ilk görev alanlar (upstream caspases) başlatıcı (initiator) ya da öncü kaspazlardır ve bunların uzun pro-domainleri bulunur. Apoptotik yolağın sonraki aşamalarında görev alan kaspaz enzim zincirinin diğer üyeleri ise efektör (downstream caspases) kaspazlar olarak adlandırılırlar. Effektör kaspazlar başlatıcı bir kaspazla aktive edilirler. Amino asit kütüphanelerinin taranmasıyla her bir kaspaz enzimi için optimum kesme bölgesi belirlenmiş ve bu bölgenin aspartik asit kesme noktasının N-terminalinde bulunan dört amino asitlik bir motif olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bu motifin görevlerinden biri kaspazın hedeflediği proteinin seçimini belirlemek, diğeri ise ilgili kaspazın peptid inhibitörlerle inaktive olmasına aracılık etmektir. Kaspaz 2, 8, ve 10 başlatıcı kaspazlardandır, 3, 6 ve 7 ise efektör kaspazlardır. Kaspazlar hücrelerde yüzden farklı proteini sübstrat olarak kullanırlar [137,145].

2.13.7. Kaspaz Aktivasyonu

Apoptozis sinyali alan bir hücrede başlatıcı kaspazların aktivasyonları adaptör proteinler aracılığıyla tetiklenir. Bu adaptör proteinler başlatıcı kaspazları birbirine yaklaştırarak kümelennemelerini sağlar ve kümeleşen başlatıcılar birbirlerini keserek aktive eder ve kaspaz zincirinde yer alan diğer üyeler giderek artan bir hızla aktive olmaya başlarlar. Sinyal gittikçe artarak zincirin en sonunda bulunan kaspaza kadar erişir ve bu giderek artan ölüm sinyali ölüme mahkûm edilen hücrenin her bölgesine yayılır [137, 142].

Aktive olan kaspazlardan bazıları lamin proteinlerini parçalarken, bazıları hücre içi iskelet proteinlerine saldırır. Başka bir kaspaz DNaz enzimi aracılığıyla onu inhibe eden proteine bağlanıp DNaz'ın serbest kalmasını sağlar ve serbest kalan DNaz çekirdek DNAsını parçalara ayırır. Kaspaz zincirinde yer alan enzimler bir kez aktive olduktan sonra geriye dönüş yoktur ve bulundukları hücreyi ölüme sürüklerler. Dolayısıyla aktiviteleri hücrelerde sıkı biçimde kontrol altında tutulur. Kaspaz aktivasyonunda 3 temel mekanizma vardır:

- a. Başlatıcı bir kaspaz tarafından proteolitik kesim sonucu aktivasyon
- b. Yakın indüklenme (induced proximity)
- c. Holoenzim oluşumu

Başlatıcı bir kaspaz tarafından diğer bir kaspazın (effektör kaspaz) proteolitik olarak kesilmesi oldukça etkin bir mekanizmadır ve efektör kaspazlar bu yolla aktive olurlar. Bu mekanizma granzim B gibi kaspaz olmayan proteazların aktivasyonunda da kullanılmaktadır. İkinci mekanizmada ise birçok prokaspaz-8 molekülü birbirine yaklaşıp kümeler oluşturarak bir araya gelir ve çapraz biçimde birbirlerini aktive ederler. Holoenzim oluşumunda ise sit-c ve ATP-bağımlı Apaf-1 oligomerizasyonu prokaspaz-9' un bu komplekse katılmasına olanak vererek apoptozomu oluşturur. Kaspaz-9' un bu yolla aktivasyonu proteolitik değil, kompleksin biçim değiştirmesiyle sağlanır [137, 142, 144, 145].

2.13.8. Kaspaz Aktivitesinin Düzenlenmesi

Apoptozisin düzenlenmesinde görev alan bir diğer hücre içi protein ailesi IAP'lardır (inhibitor of apoptosis/apoptozis inhibitörleri). İki yolla apoptozisi inhibe ederler:

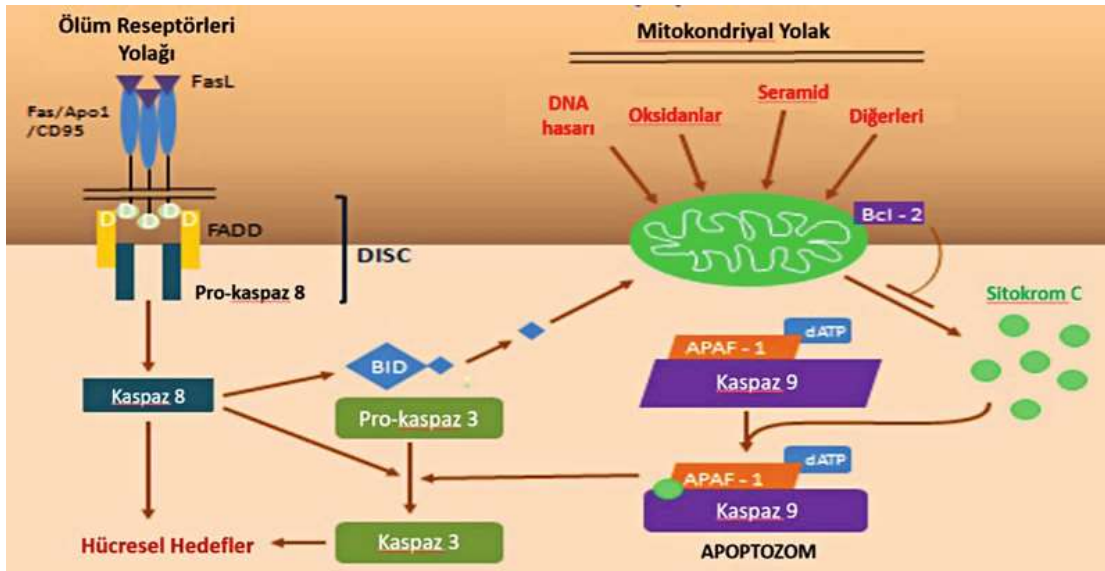
- a. Prokaspazlara bağlanarak aktivasyonlarını önler,
- b. Aktif kaspazlara bağlanarak aktivite göstermelerini engeller. LAP proteinleri ilk kez böcek virüslerinde tanımlanmıştır.

Bu proteinler enfekte ettikleri böcek hücrelerinin kendi kendilerini öldürmelerini önleyerek virüsün replikasyonu için yeterli zamanı kazandırmaktadırlar. Bu proteinler hücrel homologları da dâhil olan birkaç tane BIR domainine (Baculovirus LAP tekrarları) sahiptirler. Bu domainleri aracılığıyla doğrudan ya da dolaylı olarak kaspazları inhibe ettikleri düşünülmektedir. SMAC-DLABLO ve OMI-HTR2 mitokondrinin membranlar arası boşluğunda bulunan iki tane proteindir. Bu proteinler apoptozis sırasında salınırlar. Her iki protein de LAP bağlanma motifi taşır ve kaspazların LAP ile inhibisyonunu antagonize eder. SMAC dimer halindeyken XIAP'ın BIR2 domainine bağlanarak kaspaz-3'ü aktive ederken, monomer hâlde kaspaz-9'dan XLAP'ı ayırır [137,142,144].

2.13.9. Apoptotik Hücre Ölümünde Kaspaz-3'ün Rolü

Kaspaz-3, hücre ölümünü destekleyen sistein proteaz (kaspaz) ailesinin bir üyesidir. Başlangıçta zimojen olarak üretilir ve sırasıyla apoptozun dış ve iç yollarında kaspaz -8 ve kaspaz-9'un proteolitik bölünmesiyle aktive edilir. Böylece, dışsal ve içsel sinyal yolları için bir yakınsama noktası görevi görür. Apoptotik programın yürütülmesinde merkezi bir rol oynamaktadır. Temel görevleri ise, DNA polimeraz enzim aktivitesini engelleyerek hücrenin apoptozise uğrayıp yok olmasını gerçekleştirmektedir [144, 156-159].

Kaspaz-3'ün enzimatik aktivasyonu, apoptozu yürütmek için 1300'den fazla hücresel substratın bölünmesine yol açar. Bu nedenle, aktif kaspaz-3'ün tespiti, hücrenin apoptozun uygulama aşamasına giriş noktasının önemli bir biyolojik belirteci olarak incelenmiştir [156]. Apoptotik yollar ve kaspaz enzimlerinin aktivasyon mekanizmaları Şekil 2.25'te gösterilmektedir.



Şekil 2.25. Apoptotik yollar ve kaspazlar [144].

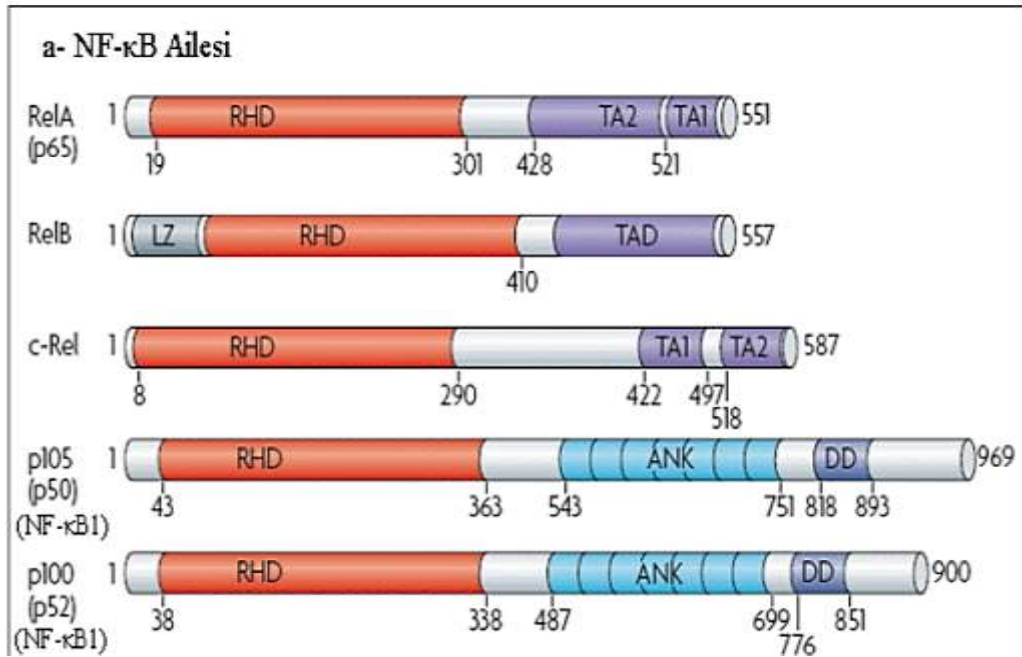
Spermde apoptoz mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Spermde kaspazların varlığı apoptozun en iyi göstergelerinden biridir. DNA fragmentasyonu da geç dönem apoptozun iyi bir göstergesidir. DNA fragmentasyonu, kısmen Kaspaz-3'ün aktivasyonu ile ortaya çıkmaktadır. Kaspaz-3, bir DNA tamir enzimi olan PARP'ı (polyADP-ribose polimeraz) inaktive ederek hasarlı DNA'nın tamir edilmesine engel olur.

Çeşitli çalışmalarda apoptoz göstergeleri (kaspaz aktivasyonu, fosfatidilserin atılımı ve DNA hasarı) ve erkek infertilitesi arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Fosfatidilserin eksternalizasyonu ve DNA fragmentasyonunun, kaspaz-3 aktivasyonu görülen spermelerde daha sık görüldüğü bildirilmiştir [160, 161].

2.14. Nükleer Faktör Kappa B (NF-κB)

1986 yılında Sen ve Baltimore isimli bilim insanları tarafından ortaya çıkarılan Nükleer faktör-kappaB (NF-κB) bir oksidatif strese duyarlı bir transkripsiyon faktörüdür, inflamasyon ve apoptoz gibi çok çeşitli biyolojik etkileri kontrol eden yüzden fazla geni düzenler. Nükleer faktör kappa-B, bir 50 kDa (p50) ve bir 65 kDa (p65) polipeptitli bir heterodimerden oluşur [162-166]. NF-κB 'nin aktivitesi, inhibitör IκB proteinleri ile etkileşim yoluyla sıkı bir şekilde kontrol edilir. Bu nedenle çoğu hücrede NF-κB sitoplazmada inaktif, IκB'ye bağlı bir kompleks olarak bulunur. NF-κB ve inhibitör protein NF-κBIA (IκBα, nükleer faktör-kappa B inhibitör alfa) geni üzerinde bazı polimorfik bölgeler belirlenmiştir [163]. Polimorfizmlerin NF-κB'nin fonksiyonları üzerine aktiviteleri saptanmıştır [167, 168]. NF-κB'nin düzensiz işlevi, astım, artrit, doku fibrozisi, şeker hastalığı, karsinoma, HIV, damar sertliği gibi bazı hastalıkların çıkmasına ya da hasarının artmasıyla bağlantılı olabileceği tespit edilmiştir [169-171]. Bu nedenle birçok araştırmaya konu olmuştur.

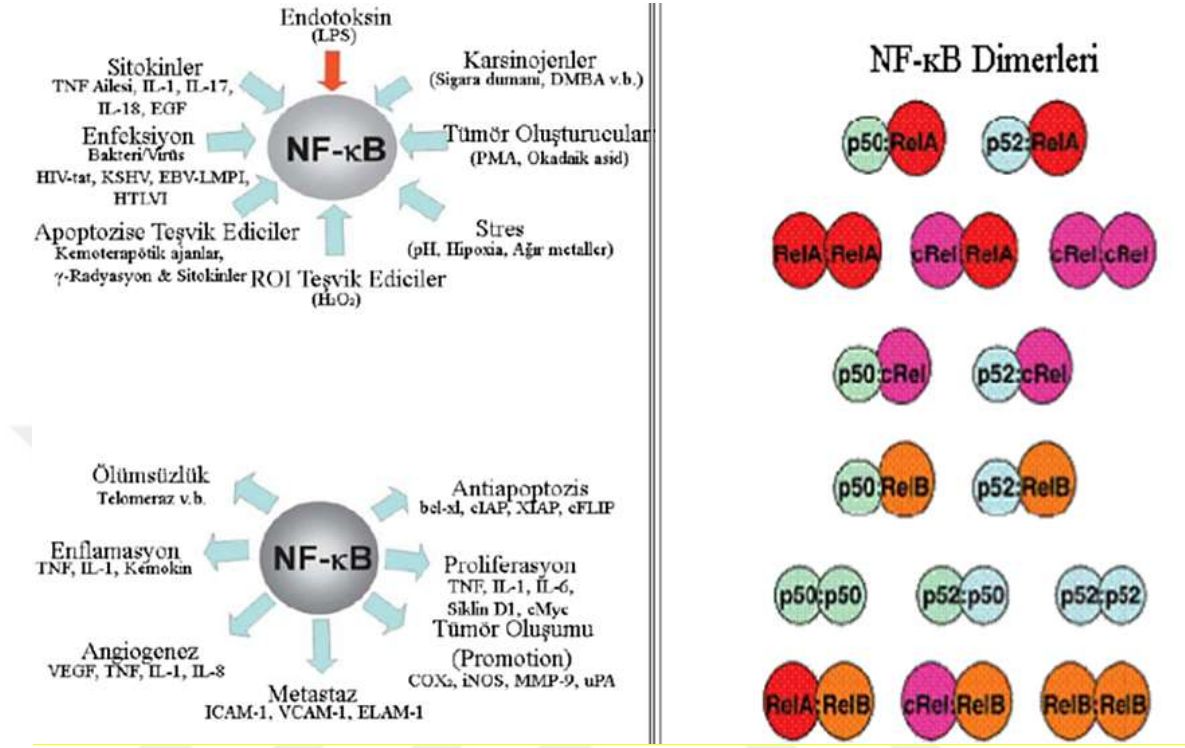
Memelilerde, NF-κB 'nin Rel gen ailesinden RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) ve p52/p100 olarak isimlendirilen 5 üyesi vardır (Şekil 2.26) [171, 172].



Şekil 2.26. NF-κB aile üyeleri [171].

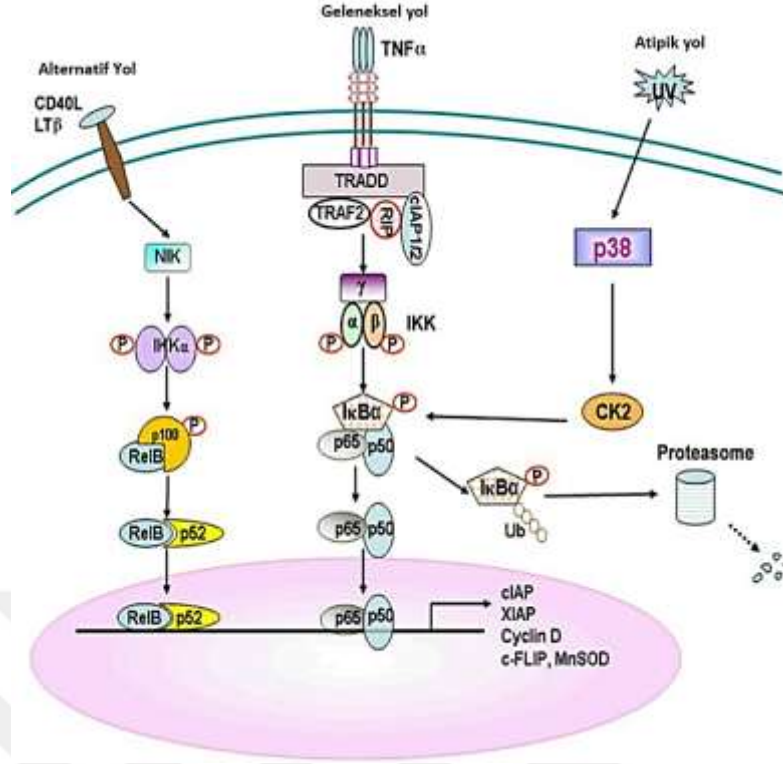
Normal şartlar altında hücre içinde inaktif şekilde yeralan NF-κB'nin aktif hale dönüşebilmesi için RelA (p65), RelB, c-Rel, p50/p105 (NF-κB1) ve p52/p100 alt birimlerin homo ya da heterodimer meydana getirmesi gerekir [173,174].

NF- κ B protein zinciri beş farklı dimerizasyonla onbeş transkripsiyon faktörü oluşturabilir. NF- κ B regüle ettiği genler aktif ettiği sinyal yolları ve dimerizasyonları Şekil 2.27’de özetlenmiştir.



Şekil 2.27. NF- κ B a sinyal yolları ve dimerizasyonları, r (RHD: Rel domain bölgesi, GGG: Glisince zengin bölge, Ank: Ankrin tekrarları, TA: Transaktivasyon bölgesi) [171].

Genel olarak NF- κ B sinyal yollarının aktivitesi şu şekilde gerçekleşir; normal şartlarda hücrede, inhibe edici I-kappa-B proteinlerine (I κ B α , β ve γ) bağlanmış olarak, hücre sitoplazmasında aktif olmadan bulunur [175]. Hücre dışı sinyal iletimiyle I κ B kinaz (IKK) enzimlerinin regülatör alt birimleri uyarılır ve iletileri diğer katalitik altbirimlere aktarır. Bunun sonucunda inhibe edici I-kappa-B proteinlerin fosforilasyonu ve yıkılımı gerçekleşir. İnhibitör I-kappa-B proteinlerin yıkılmasıyla NF- κ B inaktif halden aktif hale geçer ve hücre çekirdeğine taşınır [163]. NF- κ B'nin çekirdekte oluşumundan belli bir süre sonra fosforilasyonlu tekrar sentezlenen NF- κ BIA proteini meydana gelir. NF- κ BIA promotöründe NF- κ B bağlanma bölgesi bulunduğundan, aktifleştirici iletiler gelince aktifleşen NF- κ B, NF- κ BIA ekspresyonunu başlatır [176]. Büyük ölçüde hücreleri indükleyen ve NF- κ B transkripsiyon faktörünü aktif hale geçiren sinyaller; mikrobiyal, kanserojenler, sitokinler ve radikaller şeklinde sınıflandırılabilir [169]. NF- κ B aktifleşmesi için alt birimlerin dimerizasyonu üç değişik yolla meydana gelir. Bu yollar; geleneksel (canonical), alternatif (non-canonical) ve DNA hasarında ortaya çıkan atipik olarak da adlandırılabilen yollardır [156]. (Şekil 2.28)



Şekil. 2.28. NF-κB yolakları [156].

Geleneksel yolda; örneğin proenflamatuvar sitokin tümör nekroz faktör α (TNF α) IKK kompleksinin β altünitesini uyararak aktive eder. Böylece hedef I κ B molekülü 26S proteosom aracılığıyla yıkılır. Bu enzim çeşitli hücre düzenleyicilerin ve p53, Bcl-2, p21, p27 gibi apoptozisi indükleyici faktörleri ve A, B, D, E siklinlerinin yıkılmasını sağlar [177, 178].

Alternatif yolda; IKK kompleksinin α altünitesi aktive edilir ve p100 veya p105 proteinini C-terminal ucundan fosforile eder. Fosforile edilen p100 proteinleri daha sonra C-terminalinden proteozomlarca yıkılıma uğrar. Bunun sonucunda p105'in amino-terminal yarısından oluşan p50 meydana gelir [179, 180].

Atipik yolak olarak da adlandırılan DNA hasarına karşı oluşan cevapta bu yolak sorumludur [173, 181]. Bu yolakta, geleneksel ve alternatif yollardaki gibi ilk etapta inhibitör kappa kinaz (IKK) etkinliğine ihtiyaç yoktur. DNA'nın zincirlerindeki kırık bozunumlarında ortaya çıkan bu yolda iki süreç yer alır. Birinci süreçte, ölüm alanı olarak ifade edilen p53'ü ihtiva eden PIDD isimli proteinin uyarılması gerçekleşir ve protein etkin hale gelerek hücre nükleusuna geçer. Daha sonra, nükleusta yer alan inhibitör kappa kinaz (IKK) / Nükleer faktör- κ B esansiyel modifiye edici (NEMO) nin, bir kinaz çeşidi RIP1 (Reseptörler etkileşen protein 1) proteini ile birleşerek IKK/ NEMO birleşimi meydana getirir. Daha sonra ise oluşan IKK/ NEMO birleşimi Küçük Ubikuitin ilgili değiştirici proteini (SUMO) ve ubikitin yollarıyla modifiyeye uğrar. İkinci aşamadaysa modifiye IKK/ NEMO birleşimi sitoplazmaya geçiş yapar ve IKK'yi etkinleştirerek NF- κ B aktive olur [173, 182].

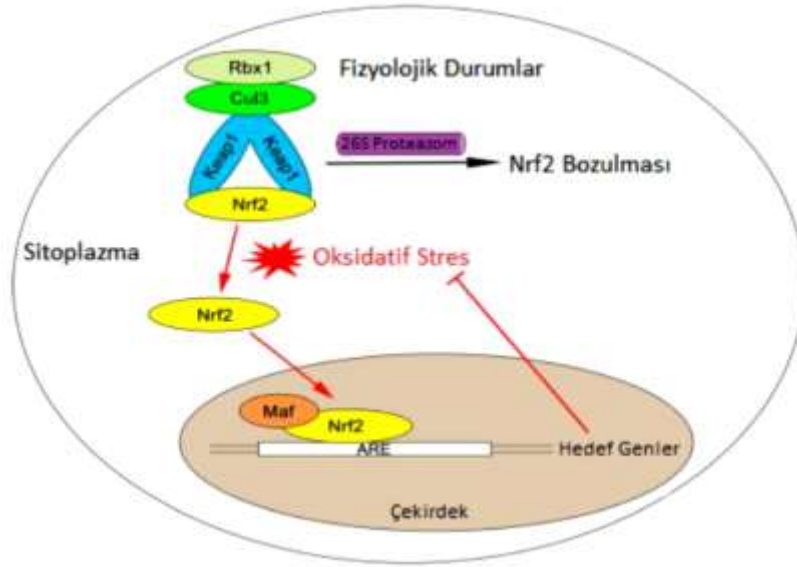
NF- κ B aktivitesinin farklı hücrelerde apoptozisin düzenlenmesinde görev aldığı bildirilmiştir. NF- κ B'nin apoptozis aşamalarını direkt inhibe eden IAPs, c-FLIP ve Bcl-2 ailesi gibi ürünleri meydana getiren antiapoptotik genlerin salınımını yapılmasında rol aldığı ve böylece NF- κ B'nin antiapoptotik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [183-185]. Ayrıca NF- κ B'nin Transkripsiyon faktörü çatallı kutu proteini (Forkhead Box protein), büyüme engelleyici proteinler, DNA hasar uyarıcı gen 153/C/EBP-homolog proteini gibi bazı proapoptotik genlerin baskılanmasında görev alabileceği de bildirilmiştir [186, 187]. Diğer taraftan, NF- κ B aktivitesinin bazı hücrelerde bazı koşullarda proapoptotik aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. TNF reseptör süper ailesinin üyeleri olan DR4, DR5, DR6, Fas ve Fask ligantları gibi apoptozisi uyaran ürünler meydana getiren genlerin salınımlarını regüle etmektedirler [188, 189]. Ek olarak, Nükleer faktör kappa- B (NF- κ B) indüklenebilir strese yanıt olarak eyleme geçen ve birçok genin ekspresyonunda ve inflamatuvar genlerin üretiminden sorumlu olan redoks- duyarlı transkripsiyon faktörüdür. Nükleer faktör kappa- B (NF- κ B) ve inhibitörü olan NF- κ B inhibitör (I κ B) ile fertilitiyi etkileyebilen germ hücre apoptozu arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir [171, 175].

2.15. Nükleer Faktör Eritroid 2 İlişkili Faktör 2 (Nrf-2)

Oksidatif strese karşı önemli hücrel savunma mekanizmalarından biri transkripsiyon faktörü nükleer faktör eritroid 2 (NF-E2) ilişkili faktör 2 (Nrf-2)'dir. Nrf-2, ROT'a (reaktif oksijen türleri) karşı koruma için önemli olan antioksidan enzimleri kodlayan genlerin bazal ve indüklenebilir transkripsiyonunu düzenlemektedir [190].

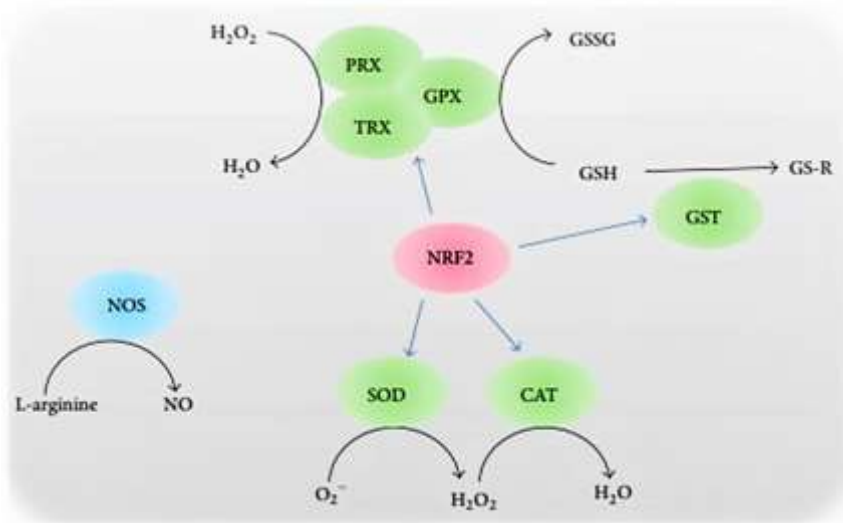
Nrf-2, oksidatif strese karşı endojen olarak indüklenen koruma sistemlerinin temel düzenleyicisi olarak görev yapan bir transkripsiyon faktörüdür. Nrf-2 düzenlemesinin en iyi karakterize edilen mekanizması, sitoplazmik baskılayıcısı Kelch benzeri ECH ile ilişkili protein 1 (Keap1) ile etkileşimidir (Şekil 2.29). Normal fizyolojik koşullar altında, Nrf-2 öncelikle Keap1'e bağlı sitoplazmada bulunur, Keap1, Nrf-2'yi sitoplazmada tutar ve Nrf-2 ubiquitine aracılık eder. [191-193]. Oksidatif strese cevaben Nrf-2, Keap1'den salınır. Nrf-2 sitozolde birikir ve nükleusa yerleşir. Maf proteinleriyle dimerizasyon yapar ve oksidatif strese karşı bir antioksidatif gen bölgesinde nükleustaki antioksidan yanıt elemanlarına ARE' ye (ARE: antioxidant response elements; antioksidan tepki/cevap elemanları) bağlanır [194-198].

Nrf-2, ARE' ye bağlandıktan sonra hedeflediği transkripsiyonunu düzenleyerek enzimatik ve non-enzimatik antioksidantlar dahil olmak üzere farklı antioksidan genlerin salınımını teşvik eder. Ayrıca, Nrf-2 ve NF- κ B sinyal yolları arasında, bir etkileşim olduğu bildirilmiştir. NF- κ B, proinflamatuvar sitokin COX-2' yi aktive ettiği COX-2 aktivitelerinin de bazı prostaglandinler üzerinden oksidatif stresin hasarlarını hafifleten Nrf-2'yi indüklediği bildirilmiştir [156, 193, 199].



Şekil. 2.29. Nrf-2' nin hücrede düzenlenmesi [198].

Nrf-2 hedef genlerin koordineli indüksiyonu, çeşitli hastalık ve doku hasarları dahil olmak üzere oksidatif strese karşı hücresel koruma için gereklidir. Yüksek konsantrasyonda ROT üretimi lipid peroksidasyonu ve bozulmuş membran fonksiyonlarına neden olarak sperm metabolizmasını dolayısıyla morfoloji, motilite ve fertilitiyi olumsuz yönde etkileyerek erkek infertilitesinde önemli rol oynamaktadır [200, 201]. Araştırmacıların yaptığı bir çalışmada erkek fertilitesinde Nrf-2'nin rolü ilk defa gösterilmiştir. Bu çalışmada Nrf-2 knockout erkek farelerde testiküler spermatogenezin kronik oksidatif stress ile bozulmaya son derece duyarlı olduğunu ve spermatogenezin oksidatif bozulmasını önlemede transkripsiyon faktörü Nrf-2'nin kritik bir rol oynadığını göstermektedir [190].



Şekil 2.30. Spermatogenez için önemli olan başlıca antioksidan enzim ürünleri ve Nrf-2 [206].

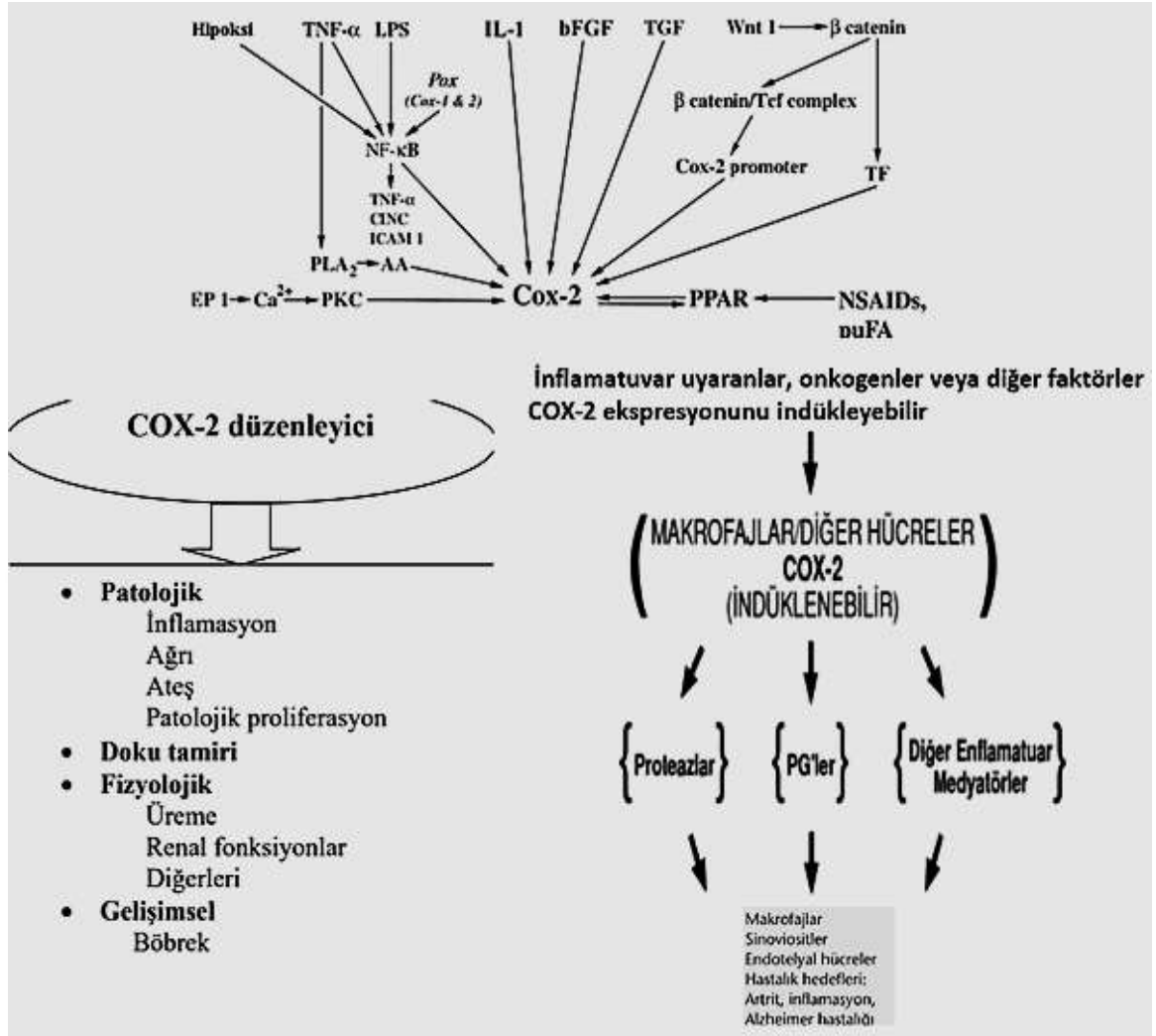
Antioksidan genler, spermatogenezin farklı aşamalarında işlev görür ve bunların ekspresyonundaki kusurlar, erkek kısırlığının ortaya çıkmasına önemli ölçüde katkıda bulunabilir. Nrf-2' nin, peroksiredoksin (PRX), tioredoksin (TRX), glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon S-transferaz (GST), süperoksit dismutazlar (SOD'ler) ve katalaz (CAT) dahil olmak üzere birçok antioksidan enzimin ekspresyonunu düzenlenmesinde rol aldığı bildirilmiştir. (Şekil 2.30.) Bu nedenle, antioksidan ile ilgili genler spermatogenez ve sperm fonksiyonunda önemli bir rol oynayabilir ve bunların genetik varyasyonları, insan üreme sisteminin antioksidan kapasitesini değiştirebilir ve erkek kısırlığı riskini artırabilir. Spermatogenezdeki ilgili bozukluklarda oksidatif stres ve NRF2' nin, rolünü anlaşılmasına yönelik çalışmaların yapılması teşhis ve tedaviye yönelik stratejilerin belirlenmesi açısından oldukça önemlidir [202-206].

2.16. Siklooksijenaz-2 (COX-2)

Siklooksijenazlar (COX), doymamış yağ asitleri ile araşidonik asidin prostaglandine (PG) dönüşümünde görev yapan anahtar enzimlerdir. Siklooksijenazların COX-1 ve COX-2 olarak adlandırılan 2 izoformu vardır. COX- 1 çoğu dokuda yapısal olarak salınırken, COX-2 uyarılabilir bir yapıdadır çoğunlukluda bazı organ ya da dokuda eksprese olur. Genel bir ifadeyle, COX-1 fizyolojik, COX-2 de patolojik enzim olarak tanımlanabilir. COX-2'nin patolojik enzim olarak tanımlanmasında, COX-2'yi indüklediği bilinen IL-1 α / β (İnterloklin-1 α / β), TNF- α , NF- κ B gibi uyaranların çoğunun inflamasyon ile ilişkili olmasından ötürüdür. COX-2 transkripsiyonel ve posttranslasyonel düzeylerde kontrol edilen bir enzimdir [207-209].

COX-2 sadece bir çeşit immün cevap sırasında uyarılır. COX-2 geninin transkripsiyonu NF- κ B, Aktivatör protein-1 (AP-1), siklik AMP cevap elemanı bağlanma proteini (CREB), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP β ve δ), USF-1 (upstream uyarıcı faktör-1) gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir [210-213].

COX-2 enziminin salınımının düzenlenmesinde rolü olan sitokin ve yolaklar ve etkileri Şekil 2.31'de gösterilmiştir. Siklooksijenaz-2 (COX-2) enzimi, çeşitli enflamatuar hastalıkların patogeneğinde rol oynamaktadır. Yapılan çalışmalarda indüklenebilir siklooksijenazın farklı prostaglandinlerin üretilmesi yoluyla hem pro- hem de antienflamatuar özelliklere sahip olabileceği bildirilmektedir. İnflamasyon esnasında aşırı salınım yapar [214]. COX-2'nin indüksiyonu, farklı organ kanserlerinde hücre proliferasyonunu, hücre ölümünü ve tümörlerin istilasını modüle eden prostaglandin biyosentezinin artmasıyla ilgilidir. Yapılan araştırmalar COX-2 geni tarafından ekprese edilen proteinin proonkogenik olduğunu ve bunun tümör dokularındaki overekspresyonunun karsinogeneze neden olduğunu düşündürmektedir [215-219].



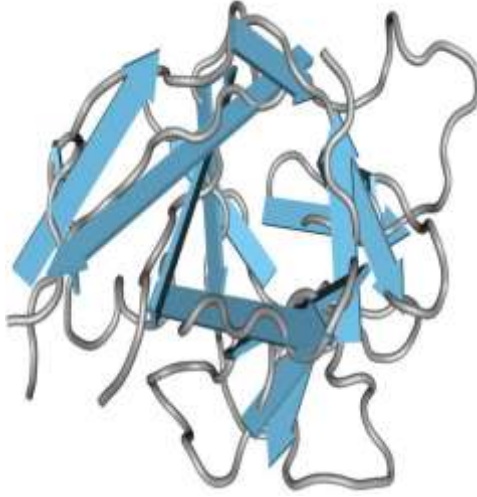
Şekil 2.31. COX-2 enziminin etkileri ve salınımının düzenlenmesinde rol oynayan sitokin ve yollar [217].

COX-2 aralarında AP-1, NF-kappaB, aktive T hücre nükleer faktörü, nükleer faktör IL-6, IL-1, TNF-alfa, sitokinler, tümör promoterleri, groft faktörler ve gonodotropinler, büyümeyi ve inflamasyonu sitmüle eden birçok sitokin tarafından sitümüle edilebilen bir enzimdir (Şekil 2.31) [217]. Yapılan bazı çalışmalarda, yetişkin ve fetal insan üreme dokularında COX-2 'nin etkinliği araştırılmıştır [220-222]. Son çalışmalar, siklooksijenazın (COX) testis fonksiyonu ve erkek fertilitésinin düzenlenmesindeki etkisine işaret etmiştir. Belirgin COX-2 ekspresyonu son zamanlarda kısır hastaların testislerinde tarif edilmiştir. COX ifadesi dolaylı olarak spermde tanımlanmıştır; enzim ve PG'lerin döllenme sürecine ve daha spesifik olarak akrozom reaksiyonuna dahil olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, vas deferansta COX-2 baskılamasının genel etkisi, sperm sayısını veya canlılığını değiştirmeden spermde ciddi hareketlilik kusurlarına yol açtığı bildirilmiştir. Bu nedenle, testiküler doku hasarı ve sperm kusurlarının iyileştirilmesinde ve infertilite (kısırlık) tedavisi için COX-2 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi oldukça önemlidir [220-222].

2.17. İnterlökin-1alfa (IL-1 α)

İnterlökin, ilk kez belirlendikleri akyuvar lenfositlerinden eksprese olan iletim bileşikleri olan sitokinleri içeren bir ailedir [223]. Bir polipeptit hormonu olan IL-1 doku ya da organlara sirayet eden hastalıklara ya da hasara karşı vücudun oluşturduğu cevaba aracılık eden ana maddelerdendir. Hasar veya inflammatuar karşısında IL-1'doku veya organda biyolojik etkinlik gösterir. İnterlökin-1 (IL-1) sitokin ve reseptörleri pro-inflamatuar ve anti-inflamatuar olarak görev yapabilirler [224, 225]. İnterlökin-1 sitokinleri doku hasarında ya da hastalık yapıcı mikrobiyal girişlere karşı koruma sağlamak amacıyla savunma cevabı oluşturmada rol oynarlar. İnterlökin-1 molekülleri, inflamasyon ve immün patolojilerde gen ekspresyonlarını indüklediğinden ötürü proinflammatuar özelliğine sahip sitokinler olarak tanımlanırlar. İnterlökin-1 aile üyeleri öncül maddelerin pro-parça uzunluk ve boyutuna göre alt sınıflara ayrılır. IL-1 ailesi 3 üyeye sahiptir. Bunlar pro-inflamatuar aktivite gösteren IL-1 α , IL-1 β ve anti-inflamatuar aktivite gösteren IL-1ra'dır [226].

IL-1 α 'nın yapısı Şekil 2.32' de verilmiştir [227]. IL-1 α 'de sinyal peptidi yer almadığından nükleer DNA'ya bağlanır. Polipeptidin N terminal ucundaki amino asitin proteaz enzimlerince uzaklaştırılmasıyla olgun yapıdaki peptid meydana gelir. Olgun protein yapısında veya işlenmemiş öncül yapısında bulunan IL-1 α , İnterlökin1 tip I reseptörüne (IL1R1) bağlanır ve hücre dışına salınır [228, 229].



Şekil 2.32. İnterlökin-1alfa (IL-1 α) yapısı [227].

Bazı epitel ve endotel hücreler, hepatositler, fibroblastlar interlökin 1 α içeren bazı hücreler olarak gösterilebilir [230]. Ayrıca monositler ve B-lenfositlerde membranda öncül yapıda interlökin 1 α bulunur [231]. Ayrıca trombositler de interlökin 1 α içerdiği belirlenmiştir. İnterlökin 1 α 'nın büyüme faktörü şeklinde otokrin olarak etkisinin olduğu bildirilmiştir [232,233].

Seminifer tubulde yer alan hücrelerdeki Interlökin 1 düzeyinin infeksiyon yapıcı situmulanlar nedeniyle değişime uğradığı bulunmuştur [234-236]. Bundan dolayı interlökin 1'in fizyolojik ve infeksiyon durumlarında otokrin ve parakrin işlemlere katıldığı belirtilmiştir. Interlökin 1'in, germ ve olgunlaşmamış Leydig hücre artışında etkin olduğu [237] ayrıca olgun Leydig ve Sertoli hücrelerinde de bu hücrelerin bazı işlevlerinde görev aldığı [238-240] yapılan bazı çalışmalarda bildirilmiştir. İnteristisyumda bulunan leydig, sertoli ve testiküler makrofaj hücrelerince Interlökin-1 α salınımını tespit edilmiştir [238, 240-243].

Literatürde farklı araştırmalarda çalışmalar, Interlökin-1 reseptörlerinin fare testisinde yer aldığı belirlenmiş olup interlökin-1'in spermatogenezde, leydig hücrelerinde testesteron, sertoli hücrelerinde ise transferrin hormon düzeylerinde etki gösterdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak, interlökin-1 düzeyinin belirlenmesi, doku hasarı ve oluşan cevap açısından değerlendirilmesi gereken bir parametre olarak düşünülmelidir [244, 245-248].

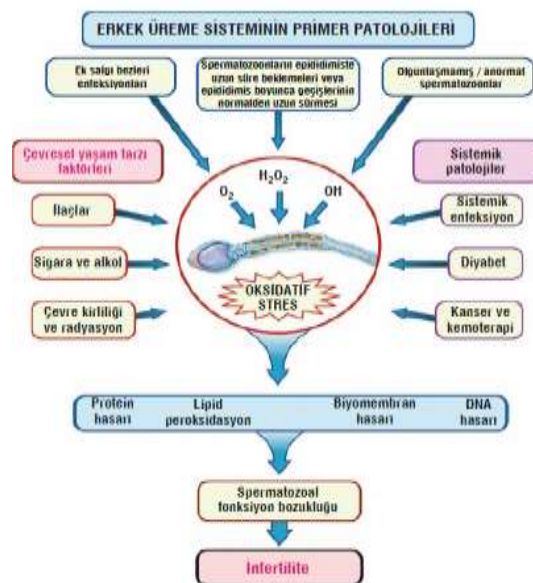
3. OKSİDATİF STRES, MDA VE ANTIOKSİDAN ENZİMLER

Metabolizmada oksijen hücrenin enerji elde edilmesinde kullanılan oksijen serbest oksijen radikalleri oluşumunda artmaya sebep olabilmektedir. SOR (serbest oksijen radikalleri) bir ya da birden fazla eşlenmemiş elektrona sahip olan ve moleküllerin yapılarını okside etki ile değiştiren reaktif moleküllerdir.

Serbest oksijen radikalleri arasında; 1O_2 (singlet oksijen), $O_2^{\cdot-}$ (süperoksit radikali), $OH^{\cdot}$ (hidroksil radikali), H_2O_2 (hidrojen peroksit) gibi reaktif oksijen türleri (ROT) ile $NO^{\cdot}$ (nitrik oksit) ve $NO_2^{\cdot}$ (nitrojen dioksit) gibi reaktif nitrojen türleri yer alır [244]. Serbest radikallerin meydana gelme süresi ile Glutatyon-peroksidaz (GSH-Px), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz gibi endojen enzimatik antioksidanlar ve Glutatyon (GSH), vitamin A, E, C ve selenyum melatonin, transferrin, seruloplazmin, miyogloblin, ferritin, hemoglobin, bilirubin, sistein, metiyonin, ürat, albümin ve laktoferrin, gibi enzimatik olmayan endojik antioksidanlarca ortamdan uzaklaştırılma süresi denge halinde ise bu duruma oksidatif denge denir [249-252].

Oksidatif denge devam ettikçe, serbest oksijen radikallerinin zararı oluşmadığı gibi bazı fizyolojik aktivitelerinde düzenlenmesinde görev alabilirler. Örnek olarak, dengedeki SOR seviyeleri sperm cAMP miktarında ve proteintirozin fosforilasyonunda artışa neden olarak spermlerin maturasyonunda, kapasitasyonda, akrozomal reaksiyonlarda, hiperaktivasyonda ve sperm-oosit etkileşiminde rol oynarlar.

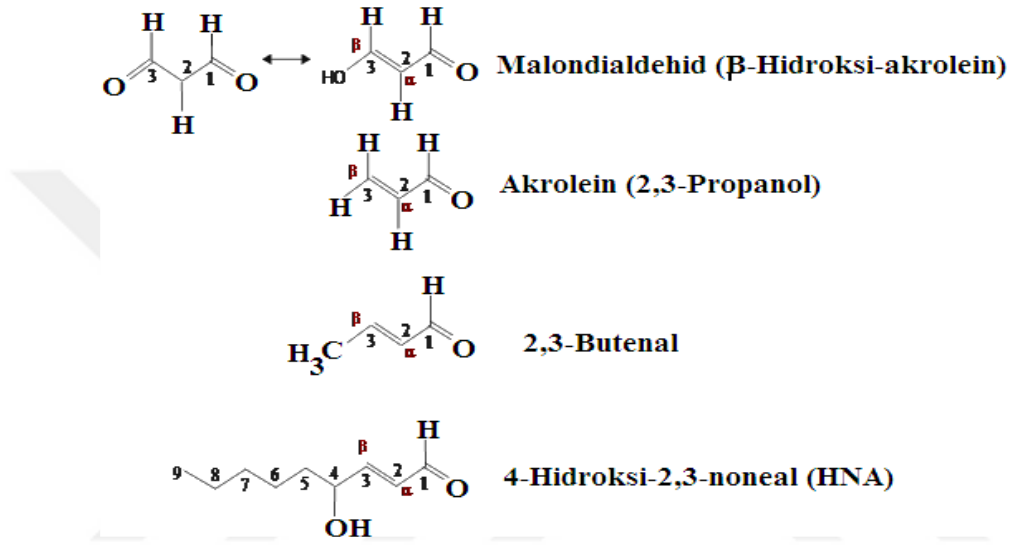
Oksidatif dengenin bozularak değişmesine ise oksidatif stres denir. Farklı birçok etmen (Şekil 3.1.), erkek kısırlığında önemli faktörlerden biri olarak yer alan oksidatif strese yol açmaktadır [251-254].



Şekil 3.1. Erkek Üreme sistemi primer patolojileri [252].

3.1. Malondialdehit (MDA)

Reaktif oksijen türlerinin neden olduğu doku hasarının ana mekanizması, hücre zarlarındaki lipidlerin peroksidasyonudur. Lipid hidroperoksitlerin parçalanması, çok çeşitli yan ürünlerle sonuçlanır; bunlardan biri, serbest formda veya farklı doku bileşenleriyle bir kompleks halinde bulunabilen MDA'dır. Çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif bozunmasının bir sonucu olarak oluşan MDA, artık lipid peroksidasyonunun güvenilir bir biyolojik belirteci olarak kabul edilmektedir [255,256].

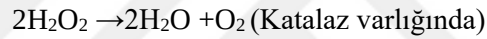


Şekil 3.2. MDA kimyasal yapısı [257].

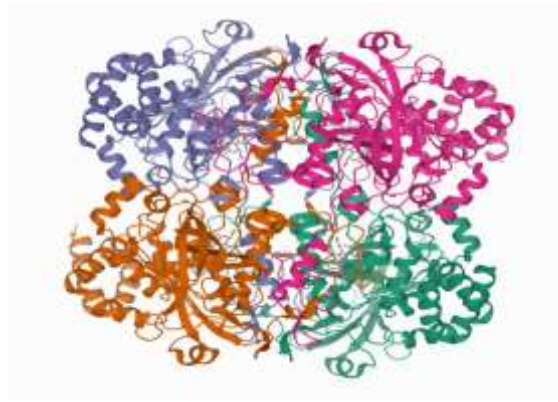
Şekil 3.2’de yapısı gösterilen MDA’nın oluşumu, hücre zarlarından iyon değişimini etkileyerek zar bileşenlerinin çapraz bağlanmasıyla sonuçlanır ve iyon geçirgenliği ve enzim aktivitesinin değişmesi gibi zararlı sonuçlara neden olur. Bu özelliğinden dolayı malondialdehit, DNA ve RNA ile reaksiyona girebilir. Bu nedenle MDA mutajenik, genotoksik ve kanserojen özelliklere sahiptir [255,258- 260]. Ortamdaki lipid peroksidasyonunu kontrol altına alabilmek ya da azalmasını sağlamak amacıyla antioksidan takviyeleri yapılır [261].

3.2. Katalaz

Tetramerik bir heme proteini olan (Şekil 3.3) ve başlıca antioksidan enzimlerden biri olan katalaz enzimi, hidrojen peroksiti (H_2O_2) oksijene ve suya detoksifiye eder. Katalaz oldukça verimlidir; bir saniyede milyonlarca H_2O_2 molekülünü parçalayabilir [262]. Aşırı H_2O_2 durumunda, hücrede bulunan ferroz (Fe^{2+}), daha toksik hidroksil radikalleri ($\cdot OH$) oluşturmak üzere hidrojen peroksit ile reaksiyona girebildiğinde, hemen hemen tüm hücre bileşenleri için potansiyel olarak tehlikeli meydana gelir. Oluşan hidroksil radikali lipitleri okside eder ve membrana zarar verecek serbest radikal zincir reaksiyonu başlatır. Bu nedenle, hızlı ve etkili bir şekilde ortamdaki kaldırması gerekir çünkü bu durum aerobik canlılar için hayati derecede önemlidir [263-265]. Enzimler içinde yüksek katalitik dönüşüm süresine haiz olan katalaz, H_2O_2 molekülünün meydana geliş süresinin hızına bağlı olarak arttığı koşullarda katalitik tepkime ile H_2O_2 ’nin H_2O ’ya dönüşümünü gerçekleştirerek ortamdaki uzaklaştırmaktadır. H_2O_2 molekülünün meydana geliş süresinin düştüğü koşullarda ise katalaz enzimi peroksidatif etki göstermektedir. Bu durumda, katalaz enziminin hidrojen peroksitin oksijeninden yararlanarak elemental civa, etanol ya da metanol gibi hidrojen donörleri ile peroksidatif reaksiyon verir [266-269].



Katalaz, sitokromlu sisteme sahip tüm aerobik hücrelerde bulunur. Radyasyona dayanıklı anaerob bakterilerde de bulunur [265]. Eritrosit, karaciğer ve böbrek hücrelerinde, peroksizomlar başta olmak üzere sitozolde ve endoplazmik retikulumda, hücre zarında aktiviteleri gösterirler [270, 271]. Canlı organizmalarda reaktif oksijen türlerinin verdiği hasara karşı korumada rol alırlar [273-276]. Oksidatif stresin erkek kısırlığındaki önemi, oksijenli ortamda inkübasyonu yapılan insan spermatozoonlarının motilitesi üzerine yapılan bir çalışmada ortama katalaz enzimi ilave edilmesiyle spermatozoa hareketliliğinin arttığı tespit edilmiş ve böylelikle katalaz enziminin faydası ortaya konulmuştur [277].



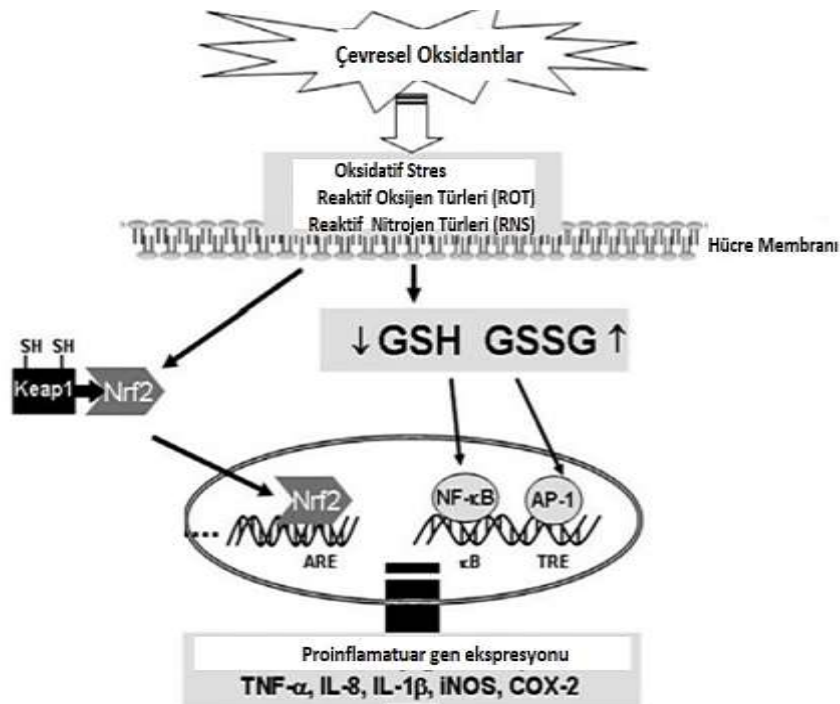
Şekil 3.3. Katalaz yapı [272].

3.3. Glutasyon

Glutasyon, oksidatif hasar ve lipid peroksidasyona karşı koruyucu olarak görev yapan non-enzimatik antioksidandır. Glutasyon, çoğu hücrede sentezlenen en önemli tripeptit (sistein, glisin ve glutamik asit) hücre içi antioksidandır. Epitel astar sıvısı ve akciğer dokusu gibi bazı hücre dışı ortamlarda yüksek GSH konsantrasyonu vardır [278].

Hücrelerde iki tip glutasyon vardır: indirgenmiş glutasyon (GSH) ve iki GSH parçasının sülfidril bağları ile birleştiği oksitlenmiş form (GSSG). GSH ve ilişkili enzimler, bir transkripsiyon faktörü Nrf-2 tarafından kontrol edilir. Glutasyon peroksidaz (GPx) ve glutasyon-s-transferaz (GST), temel olarak GSH kullanarak detoksifikasyon reaksiyonları yoluyla düzenli bir redoks dengesi sağlar ve onu GSSG'ye dönüştürür. Glutasyon redüktaz (GR), NADPH (Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) kullanarak GSSG'yi GSH'ye dönüştürerek yeniden kazanma yolunu yönlendirir ve hücrel GSH havuzunu geri yükler [279]. Bu nedenle, vücuttaki düzenli redoks dengesini korumak ve stres koşullarında hücre hayatta kalmasını desteklemek için GSH ve GSH'ye bağlı enzimlere ihtiyaç vardır.

Bu enzimler, indirgenmiş glutasyon ile hidrojen peroksitin suya ve GSSG'ye indirgenmesini katalize eder (Şekil 3.4.). Hücrel ortamda, GSH bir antioksidan görevi görür ve hücreleri ROS, lipid hidroperoksitler, ksenobiyotik toksik maddeler ve ağır metaller dahil olmak üzere çok çeşitli serbest radikallere karşı korur [279].



Şekil 3.4. Oksidatif stres ve GSH ilişkisi [280].

Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi sperm hücrelerine zarar verebilir ve bu durum erkek kısırlığının mekanizmalarından biri olarak kabul edilir. Serbest radikallerin ve lipid peroksidasyon ürünlerinin zararlı etkilerinden hücrenin korunması, genellikle antioksidan koruma derecesi ile belirlenir [281].

Rat ve fare testis dokusunda yüksek düzeyde glutatyon belirlenmiştir [282]. Rat testis dokusunda spermatogenez esnasında glutatyon düzeyinin üç kat attığı tespit edilmiştir. Hamster spermatosit ve spermatidlerinde, yüksek düzeyde GSH olduğu, glutatyon sentezi ve glutatyon-bağımlı korunma sistemlerini kullandıkları saptanmıştır [283, 284].

Testis, üreme kanal sıvıları ve epididimal spermatozoada belirli konsantrasyonda glutatyon bulunduğu bunun aksine ejakülasyon sonrası spermatozoada düşük konsantrasyonda bulunduğu bildirilmiştir [281]. Glutatyon takviyesinin erkek kısırlığını iyileştirici etkisinden ötürü glutatyon seviyesini artırıcı ürünler erkek kısırlığının tedavisinde uygulanmaktadır [285, 286].

4. MATERYAL VE METOT

4.1. Hayvan Materyali ve Araştırma Grupları

Tez çalışmamızın hayvan deneyleri kısmının tümü, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 30.05.2018 tarih, 2018/57 protokol no.'lu ve 101 numaralı karar izni ile Fırat Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (FÜDAM) yapılmıştır. Araştırmamızda her bir grupta 7'şer adet olmak üzere toplamda 42 adet Wistar albino (8 haftalık) erkek ratlar kullanılmıştır (Şekil 4.1). Ratlara 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık olacak şekilde günlük aydınlatma periyodu uygulanmıştır. Arı sütü uygulaması, sekiz hafta süresince haftada beş defa olmak üzere 100 mg/kg CA (canlı ağırlık) gavaj yoluyla verilmiştir [36]. Florür uygulaması ise haftada beş kez 50 mg/kg CA ve 100 mg/kg dozlarında içme suyuna katılmak üzere yapılmıştır [287]. Arı sütü, Eskişehir'de bulunan Apilife firmasından, Florür ise Chemsolute markasından temin edilmiştir. Deneyler için kullanılan diğer tüm kimyasallar analitik saflıktaydı. Çalışma, 8 hafta sürdürülmüştür (Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. Hayvanların beslenme düzeni ve gruplarına göre kafeslere ayrılması.

Yem ve su, çalışma boyunca ad libitum şeklinde verilmiştir. (Tablo 4.1.) Ratlar, canlı ağırlıkları (CA) birbirine yakın olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır (Tablo 4.2.). Gruplar: (i) Kontrol: Standart diyet ile beslenen, Arı sütü ve Florür verilmeyen grup; (ii) Arı sütü grubu: Standart diyet ile beslenen, florür uygulanmayan fakat Arı sütü (100 mg/kg, gavajla) verilen grup; (iii) Florür Grubu: Standart diyet ile beslenen ve Florür verilen grup (50 mg/kg, İçme suyu); (iv) Florür + Arı sütü: Standart diyet ile beslenen, Florür (50 mg/kg, içme suyu) ve Arı sütü (100 mg/kg, gavajla) uygulanan grup; (v) Florür Grubu: Standart diyet ile beslenen ve Florür verilen grup (100mg/kg, İçme suyu); (vi) Florür + Arı sütü: Standart diyet ile beslenen, Florür (100 mg/kg, İçme suyu) ve Arı sütü (100 mg/kg, gavajla) verilen grup. Canlı ağırlıklar çalışma boyunca haftalık olarak kaydedilmiştir.

Tablo 4.1. Ratlara verilen besin içeriği

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29,4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0,6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0,2
Methionin (%)	0,2
DCP (%)	1,6

1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D3, 12 mg E, 0,8 mg K3, 0,8 mg B1, 2,4 mg B1, 1,2 mg Be 0,006 mg B1 vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Pantlı., 0,32 mg Mn, 16 mgFe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg L 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca bulunur. %18 fosfor, %25 kalsiyum %0,2 flor dan oluşur.

Tablo 4.2. Deney grupları

Gruplar	Uygulama Şekli	Deneme Süresi
Kontrol	Standart diyet ile beslenen, florür ve arı sütü verilmeyen grup	8 hafta
RJ (Arı sütü 100)	Standart diyet ile beslenen, florür verilmeyen fakat 100 mg/kg Arı sütü verilen grup	8 hafta
Florür 50mg/kg	Standart diyet ile beslenen ve 50 mg/kg florür verilen grup	8 hafta
Florür 50mg/kg + RJ	Standart diyet ile beslenen, Florür (50 mg/kg) ve arı sütü (100 mg/kg) verilen grup	8 hafta
Florür 100mg/kg	Standart diyet ile beslenen ve 100 mg/kg florür verilen grup	8 hafta
Florür 100mg/kg+ RJ	Standart diyet ile beslenen, Florür (100 mg/kg) ve arı sütü (100 mg/kg) verilen grup	8 hafta



Şekil 4.2. Ratlara yapılan uygulamalar

4.2. Doku Homojenizasyonu

8 haftalık flor ve arı sütü uygulamalarının sonrasında ratlara ait testis dokuları alınarak gerekli analizler yapılmıştır. Testis dokuları küçük parçalara ayrıldı ve lizis tamponu (0,5M Tris; pH: 8, EDTA, PMSF) içinde parçalandı ve homojenatlar hazırlandı. Numuneler daha sonra 45 dakika 15.000 rpm'de santrifüjlendi. Süpernatant daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı [288,289].

4.3. SDS-PAGE ve Western Blotlama Tekniği ile Proteinlerin Analizi

Primer antikorlar 1/500 oranında seyreltildi, sekonder antikorlar ise 1/1000 oranında seyreltildi. Protein yoğunlukları Lowry kiti kullanılarak ölçüldü ve her kuyucuğa 25 µg protein yüklendi. Dokuya ait protein örnekleri, SDS-PAGE metodu ile %12 jel üzerinde yürütülmüştür. Daha sonra Western blot tekniği ile proteinler (Kaspaz-3, Bcl-2, Nrf-2, NF-κB ve Beta-aktin) nitroselüloz membrana aktararak sentez oranları belirlenmiş ardından ise yoğunluk ölçüm analiz sistemiyle protein seviyeleri tespit edilmiştir [288, 290].

4.4. Testis Doku Örneklerindeki MDA Analizi

Testis dokusu örnekleri 0,5 gram olacak şekilde küçük parçalara ayrılarak %1.15 KCl' den 4,5 ml ilave edilip parçalandı. Hazırlanan bu homojenizasyondan, MDA tayini yapıldı [291]. Ölçüm işlemi sırasında 0,1 ml doku homojenatı alınarak üstüne 0.1 ml %8,1 sodyum dodesil sülfat (SDS) + asetik asit solüsyonuna (750 µl %20, pH 3.5) ilave edildi. Daha sonra tiobarbutrik asit solüsyonu (750 µl %0,8, pH 3.5) distile su ile ilave edilerek karışımın son hacmi 4 ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu karışım 95 °C'de 45 dakika kaynar su banyosunda bırakıldıktan sonra 1 ml distile su ve 5 ml 15:1 (h/h) oranında karışım ilave edilerek soğutulup vortekslenmiştir. N-bütanol-piridin 5.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant alındı ve spektrofotometrik olarak 532 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Sonuçlar nmol/ml olarak kayıt altına alındı [289, 291].

4.5. Testis Plazma örneklerindeki MDA Analizi

Gruplardan 200 µl numune alındı ve 200 µl %8,1 SDS eklendi. 1.5 ml %20 asetik asit (pH: 3.5), ve 1.5 ml %0,8 (pH: 3.5) TBA eklendi ve 4 ml'lik bir nihai hacim olacak şekilde damıtılmış su ilave edildi. Daha sonra 95 °C'de 1 saat kaynar su banyosunda ısıtıldı ve daha sonra soğutuldu ve 1 ml distile su ve 5 ml n-bütanol piridin ile 15:1 (h/h) oranında vortekslendi. 15 dakika 4000 rpm'de santrifüj yapılmasının ardından üst organik tabaka çıkarıldı ve spektrofotometrik olarak 532 nm dalga boyunda ölçümü yapıldı. Sonuçlar nmol/ml olarak kayıt altına alındı [289, 291].

4.6. MDA Ölçümleri için Standart Eğri Çizimi

Standart MDA stoklarından günlük 10 µl alınarak 100 ml saf suyla tamamlandı. Eğri çizimi için günlük standarttan, saf suyla farklı (40, 20, 10, 8, 5, 4) oranlarında seyreltme yapıldı ve 15, 30, 60, 75, 121, 151 n/mol derişimlerinde çalışma standartları hazırlandı. Daha sonra, MDA prosedürüne göre diğer işlemler yapılarak sonuçlar doku için nmol/g; plazma için nmol/ml olarak kaydedildi ve standart eğri grafiği çizildi [292].

4.7. Testis Doku örneklerindeki GSH (Glutatyon) Analizi

Testis homojenatından elde edilen GSH içeriği, GSH'nin DTNB (Ellman reaktifi olarak da bilinir) ile reaksiyonuna dayalı olarak spektrofotometrik olarak ölçüldü. Kısaca, 0,4 ml TCA (%10 trikloroasetik asit) çözeltisine 0,1 ml hücre homojenatı ilave edildi. İyice vorteksledikten ve 3.000 rpm'de beş dakika santrifüj edildikten sonra 0.1 ml süpernatant temiz bir tüpe alındı ve 0.9 ml distile su, 2 ml Tris tamponu (0.4M pH 8.9) ve 0.1 ml DTNB solüsyonu ile karıştırıldı. Elde edilen sarı renk, damıtılmış suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okunmuştur [293, 294].

4.8. Testis Doku Örneklerindeki Katalaz Aktivite Tayini

Katalaz ölçümünde kullanılmak üzere 1/15 M Na-K-fosfat tamponu ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$, pH 7) solüsyonuna spektrofotometrik yöntemle dalga boyu 240 nm.'de absorbans 0,7-0.9 oluncaya dek konsantre hidrojen peroksit eklendi. Hazırlanmış olan bu karışımdan, numunelerin katalaz aktivitesini ölçmek için 1.000 mikrolitre alınarak inkübatöre konuldu. Çalışma aralığına bağlı olarak, artan konsantrasyonlarda 30 mikrolitreden başlanarak süpernatant ilave edilmiş ve ardından H_2O_2 'nin absorbans değişimi 30 saniye süreyle spektrofotometrede kaydedilmiştir [295, 296].

4.9. Histopatolojik değerlendirme ve TUNEL Metoduyla Apoptozis Düzeylerinin Belirlenmesi

Alınan kesitler Hematoksilen – Eozin (H&E) yöntemiyle boyandı. Elde edilen preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenip fotoğraflandı ve histopatolojik değerlendirmeler yapıldı. [297, 298].

Parafin bloklardan 5-6 μm kalınlığında alınan kesitler polilizin mikroskop lamına aktarılmıştır. Tüm gruplardan alınan testis dokuları, uygun solüsyonunda tespit edildikten sonra rutin histolojik takip serilerinden geçirilip ardından parafin bloklara gömüldü. Bu parafin bloklar içinden 5-6 Mm kalınlığında kesitler alındı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranı ile Apoptotik indeks (AI)'i hesaplandı ve istatistiksel analizleri yapıldı. Apoptotik hücreler, Apop Tag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, kat no: S7101, ABD) kullanılarak üreticinin talimatlarına uygun olarak saptanmış ve daha sonra preparasyonlar değerlendirilmiştir ve bir Leica DM500 mikroskobu üzerinde fotoğraf çekimleri yapılmıştır. TUNEL boyama işleminde Harris hematoksilenle boyanan hücre çekirdekleri normal görünümüne sahip olarak, kahverengi boyananlar ise apoptotik olarak kabul edilmiştir [300].

4.10. Vücut ve Üreme organ ağırlıklarının ölçülmesi

Çalışma sonunda sıçanlar dekapite edilip testis ve epididimisleri yağ dokularından arındırıldı ve tartıldı. Eklenti bezlerinden v. seminalis ile prostat çıkarılarak tartıldı. Tüm üreme organlarının absolut ve rölatif ağırlıkları tespit edilerek kaydedildi. Rölatif organ ağırlıkları $Rölatif\ organ\ ağırlığı = Absolut\ üreme\ organ\ ağırlığı\ (g) / Vücut\ ağırlığı\ (g) \times 100$ formülüyle hesaplanmıştır [299].

4.11. Spermatolojik Analizler

Çalışma sonunda sıçanlar dekapite edilip testis ve epididimisleri yağ dokularından arındırıldıktan sonra tartılmıştır. Ayrıca, eklenti bezlerinden seminal bez ile prostat çıkarılarak tartılmıştır [299].

4.11.1. Epididimal spermatozoon yoğunluğu

Sağ epididimis petri kutusu içerisindeki 1 ml fizyolojik tuzlu suda (%0,9'luk NaCl) bistüri ve makas yardımıyla iyice parçalanarak 2 dakika boyunca bir pensle parçacıklar iyice ezilmiştir. Sonra epididimal dokudaki bütün spermatozoonların sıvıya geçmesi için oda sıcaklığında 4 saat inkubasyona bırakılmıştır. Bekleme süresini takiben spermatozoon ihtiva eden süpernatant alyuvar pipetinin 0,5 çizgisine kadar eozin solüsyonu (5 g sodyum bikarbonat, 1 ml formalin, 25 mg eozin ve 100 ml distile su) da 101 çizgisine kadar çekilmiştir. Dolayısıyla süpernatant 1:200 oranında sulandırılmaktadır. Yaklaşık 10 µl sulandırılmış süpernatant önceden lamel yapıştırılmış Neubauer lamının (0,1 mm derinlik, 0,0025 mm²'lik alan, LABART, Munich, Germany) her iki sayım alanına lamelin kenarına pipetin ucu değdirilerek yerleştirilmiştir. Neubauer lamı ışık mikroskobuna yerleştirilip 5 dakika beklenerek solüsyon içerisindeki spermatozoonların tüm alana homojen bir şekilde dağılması sağlanmıştır. Her iki sayım alanındaki tüm karelere düşen spermatozoonlar ışık mikroskobunun 200'lük büyütmesinde sayılıp ve hesaplanmıştır [299].

4.11.2. Spermatozoon motilitesi

Analiz için bir lam mikroskobun ısıtma tablasına yerleştirilerek sıcaklığının 37 °C'a ulaşması sağlanmıştır. 200 µl Tris buffer solüsyonu [Tris (hidroksimetil) aminometan 3,63 g, glukoz 0,50 g, sitrik asit 1,99 g ve distile su 100 ml] ısıtma tablası üzerindeki lama damlatılmıştır. Daha sonra sol kauda epididimisten kesit yapılarak alınan ve spermatozoon ihtiva eden 5-10 µl'lik süspansiyon Tris buffer solüsyonu üzerine damlatılıp ve lamel yardımıyla karıştırılarak homojen bir hal alması sağlanmıştır [299]. Işık mikroskobunun 400'lük büyütmesinde gözle motilite yüzdesi belirlenmiştir. Motilite tahminleri sol kauda epididimisten alınan bir damla süspansiyon için üç farklı saha incelenerek yapılmıştır. Bu üç farklı sahanın ortalama değerleri yüzde motilite oranı olarak hesaplanmıştır [299].

4.11.3. Anormal spermatozoon oranı

Anormal spermatozoon oranını tayin etmek için motilite tayininde kullanılan Tris buffer-spermatozoon karışımından 20 µl alınarak kuru, temiz ve önceden ısıtılmış (37 °C) bir lam üzerine damlatılmıştır. Bu karışım üzerine Eozin-Nigrozin boyasından (1,67 g eozin, 10 g nigrozin, 2,9 g sodyum sitrat, 100 ml distile su) damlalık yardımıyla 2 damla damlatılıp ve bir lamel yardımıyla karıştırılıp homojen hale getirilmiştir. Daha sonra bu karışımdan ince frotiler çekilerek çok kısa sürede kuruması sağlanacaktır. Kurutma işleminden sonra frotiler ışık mikroskobunun 400'lük büyütmesinde incelenmiştir. Bir frotide toplam 200 spermatozoon incelenip anormal spermatozoon oranı yüzde olarak ifade edilmiştir [299].

4.12. İstatistiksel Analizler

Deneylerden hesaplanan sonuçlar, SPSS 21 paket programında varyans analizi kullanılarak istatistiksel olarak incelenmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar Tek Yönlü ANOVA Post Hoc LSD testi ve Tek yönlü ANOVA Post Hoc Games-Howell Testleri ile belirlenmiştir. Tunel apoptozis verilerinin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis Testi uygulanmıştır. İstatistiklerin güvenilirliği için en az üç tekrarlı ölçüm yapılmıştır.

5. BULGULAR

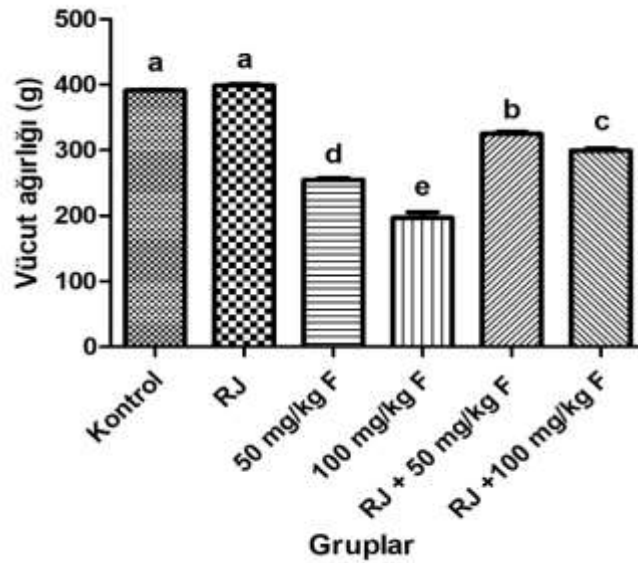
5.1. Deney hayvanlarının Ağırlık Düzeyleri

Başlangıç ağırlıkları istatistiksel olarak önemsiz olacak şekilde yakın ağırlıklara sahip deney gruplarındaki ratların dekapitasyon öncesi bitiş canlı vücut ağırlıkları Tablo 5.1’ de ve Şekil 5.1’ de sunulmuştur. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde tek başına verilen Arı sütü 100 grubunda Kontrol grubuna kıyasla vücut ağırlığında sayısal olarak bir artışın olduğu ancak istatistiksel açıdan fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Tek başına uygulanan F50 ve F100 gruplarında ise vücut ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla istatistiki açıdan anlamlı şekilde bir azalmanın olduğu bulunmuştur. Florür +Arı sütü gruplarında kontrole göre vücut ağırlıklarında azalma olduğu görülmekle birlikte bu azalmanın tek başına uygulanan Florür gruplarına göre daha az olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 5.1. Ratların uygulama sonundaki vücut ağırlık sonuçları

Gruplar	Vücut ağırlığı (Bitiş) (g)
Kontrol	391 ± 4,00 ^a
RJ	399 ± 4,00 ^a
50 mg/kg F	255 ± 2,00 ^d
100 mg/kg F	200 ± 2,00 ^e
RJ + 50 mg/kg F	325 ± 3,00 ^b
RJ + 100 mg/kg F	298 ± 2,00 ^c

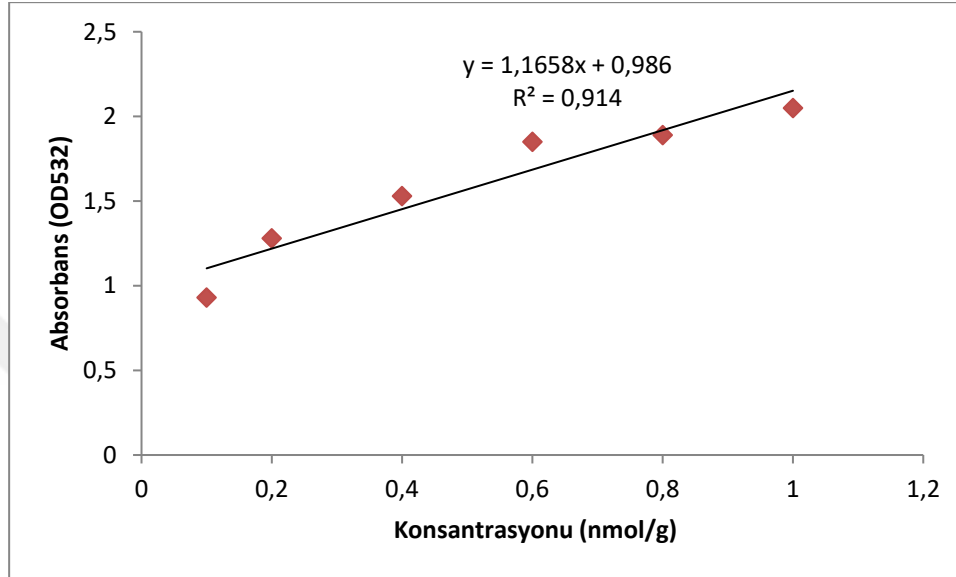
a–e; Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü Anova Post Hoc LSD Testi uygulanmıştır. (RJ: Arı sütü100, F: Florür)



Şekil 5.1. Ratların uygulama sonundaki vücut ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a-f: Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

5.2. Testis Doku ve Plazmasındaki Malondialdehit (MDA) Düzeyleri

Testis doku ve plazmasındaki MDA düzeylerinin ölçme denklemi $x = (y - 0,986) / 1,1658$ şeklinde hesaplanmıştır. Denklemdaki 'y' sonucu, spektrofotometrede belirlenen MDA değeridir ($y = 1,1658x + 0,986$). Bu veriler ile MDA standart eğrisi oluşturulmuştur. (Şekil 5.2.).



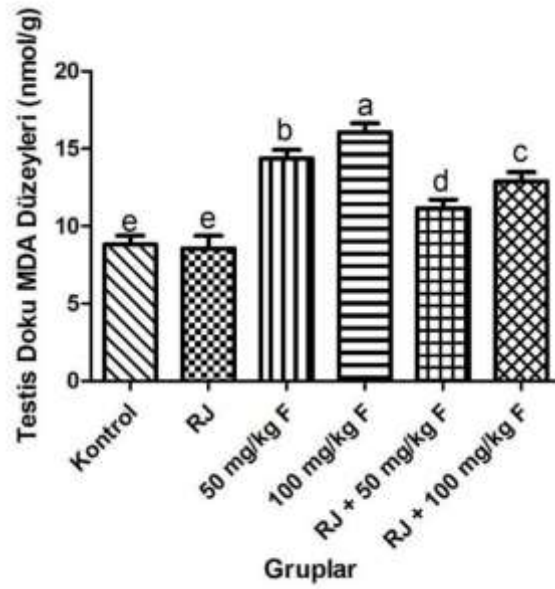
Şekil 5.2. MDA standart eğrisi

Deney gruplarının testis doku MDA düzeylerine ait elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 5.2 ve Şekil 5.3.'de sunulmuştur.

Tablo 5.2. Ratlara ait testis dokusu MDA sonuçları.

Gruplar	Testis Dokusu MDA Düzeyi (nmol/g)
Kontrol	8,81 ± 0,02 ^e
RJ	8,56 ± 0,02 ^e
50 mg/kg F	14,35 ± 0,01 ^b
100 mg/kg F	16,06 ± 0,02 ^a
RJ + 50 mg/kg F	11,15 ± 0,01 ^d
RJ + 100 mg/kg F	12,90 ± 0,02 ^c

a–e; Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü ANOVA Post Hoc LSD Testi uygulanmıştır. (RJ: Arı sütü100, F: Florür)



Şekil 5.3. Ratlara ait testis dokusu MDA sonuçlarına ait istatistiksel grafik. a–e; Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür

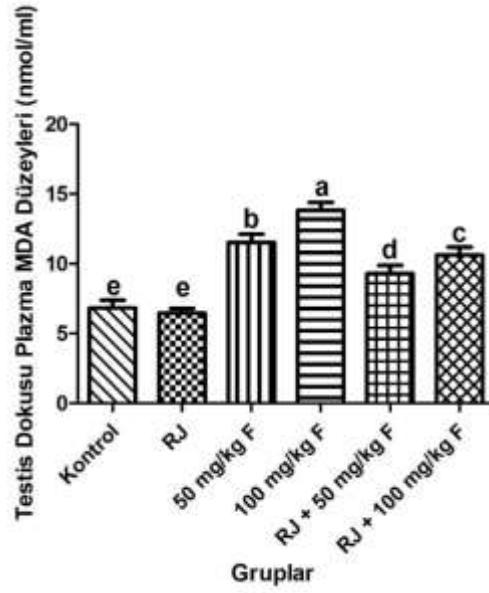
Tablo ve Şekildeki değerler, kontrol grubuna kıyasla en yüksek MDA düzeylerinin sırasıyla, Florür 100, Florür 50, Arısütü 100+Florür100 ve Arı sütü 100+ Florür 50 gruplarında oluştuğunu göstermektedir. Arı sütü 100 grubunun MDA düzeyi kontrol grubuna yakın değerde bulunmuştur.

Deney gruplarının testis plazmasındaki MDA düzeylerine ait elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 5.3 ve Şekil 5.4’te sunulmuştur.

Tablo 5.3. Ratlara ait testis plazma MDA sonuçları.

Gruplar	Testis Plazma MDA Düzeyi (nmol/ml)
Kontrol	$6,82 \pm 0,02^e$
RJ	$6,45 \pm 0,02^e$
50 mg/kg F	$11,53 \pm 0,01^b$
100 mg/kg F	$13,82 \pm 0,02^a$
RJ + 50 mg/kg F	$9,29 \pm 0,01^d$
RJ + 100 mg/kg F	$10,62 \pm 0,02^c$

a–e; Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü ANOVA Post Hoc LSD Testi uygulanmıştır. (RJ: Arı sütü100, F: Florür)



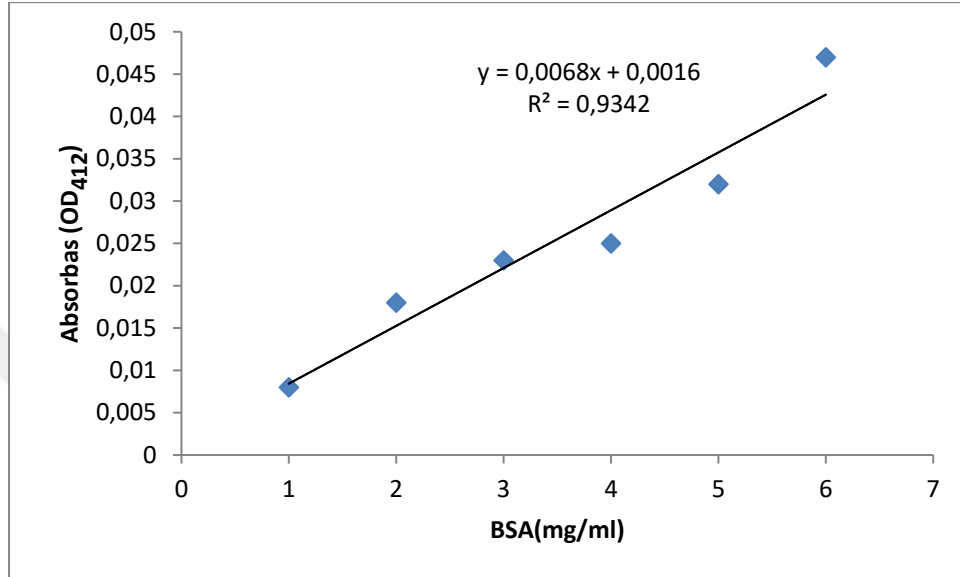
Şekil 5.4. Ratlara ait testis plazma MDA sonuçlarına ait istatistiksel grafik. (a–e; Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Tablo ve Şekildeki bulgulara göre en yüksek plazma MDA değeri F100 grubunda ortaya çıkmıştır. Bunu sırayla F50, Florür-100 + Arı Sütü 100, Florür-50 + Arı Sütü 100 grupları takip etmiştir. Kontrol grubuna kıyasla en düşük MDA düzeyi Arı sütü 100 grubunda belirlenmiş olup, kontrol grubuna yakın değerde bulunmuştur.

Genel olarak, Tablo ve Şekillerde sunulan, testis doku ve plazmadaki MDA düzeyleri incelendiğinde Kontrol ve Arı sütü 100 grubunun MDA değerlerinin yakın değerlerde olduğu ve istatistiksel bir fark oluşmadığı, kombine uygulanan RJ (Arı sütü) + Florür gruplarında, tek başına uygulanan Florür-50 ve Florür-100 gruplarına göre MDA düzeyinin azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlı derecede farkların olduğu tespit edilmiştir.

5.3. Testis Dokusu Katalaz Enzim Aktivite Düzeyleri

Testis doku Katalaz düzeylerinin ölçme denklemi $x = (y - 0,0016) / 0,0068$ şeklinde hesaplanmıştır. Denklemdaki 'y' sonucu, spektrofotometrede belirlenen katalaz değeridir ($y = 0,0068x + 0,0016$). Bu veriler ile Katalaz standart eğrisi oluşturulmuştur. (Şekil 5.5.)



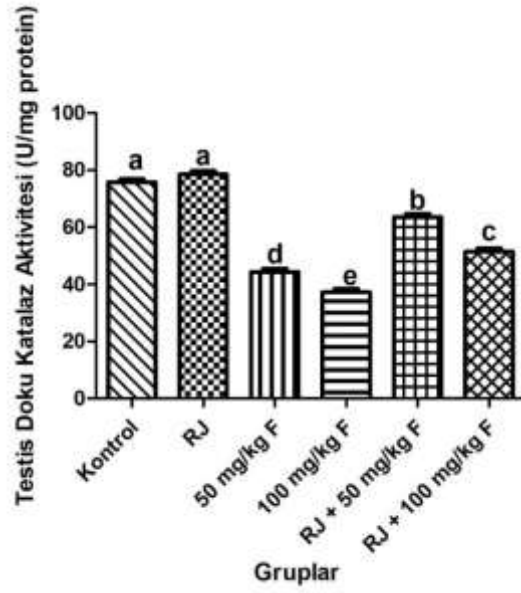
Şekil 5.5. Katalaz standart eğrisi

Deney gruplarının testis doku Katalaz düzeylerine ait elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 5.4 ve Şekil 5.6.' de sunulmuştur.

Tablo 5.4. Ratlara ait testis doku Katalaz enzim aktivitesi sonuçları.

Gruplar	Testis Doku Katalaz Aktivitesi (U/mg protein)
Kontrol	75,76 ± 2,00 ^a
RJ	78,52 ± 2,00 ^a
50 mg/kg F	44,41 ± 3,00 ^d
100 mg/kg F	37,05 ± 3,00 ^e
RJ + 50 mg/kg F	63,52 ± 3,00 ^b
RJ + 100 mg/kg F	51,47 ± 3,00 ^c

a–e; Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü ANOVA Post Hoc LSD Testi uygulanmıştır. RJ: Arı sütü100, F: Florür

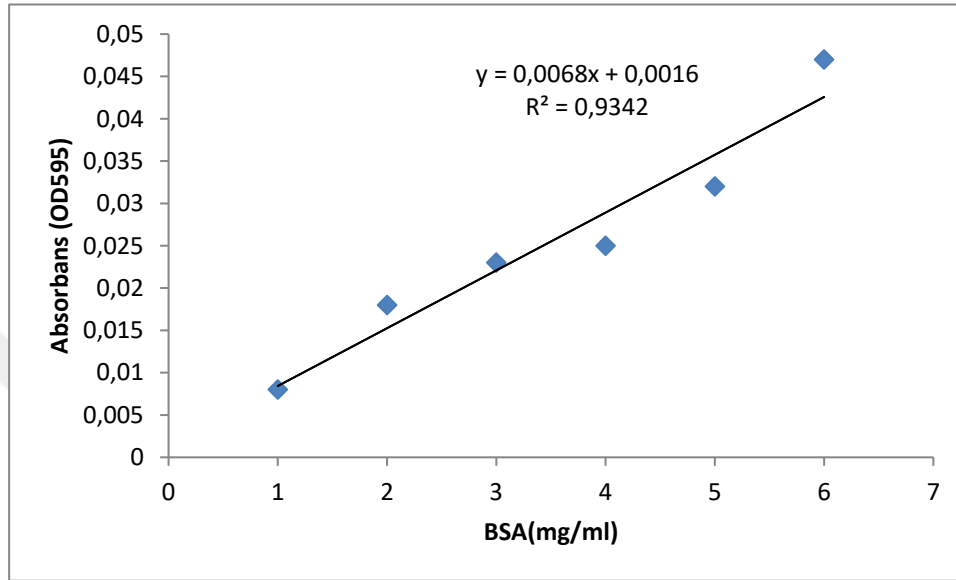


Şekil 5.6. Ratlara ait testis dokusu Katalaz enzim aktivitesi sonuçlarına ait istatistiksel grafik. (a–e; Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Sunulan Tablo ve Şekildeki değerler incelendiğinde, deney gruplarında en yüksek katalaz aktivitesi kontrol grubuna yakın değerde bulunan Arı sütü 100 grubunda görülmüştür. Katalaz aktivitesi Florür + Arı sütü gruplarında ise tek başına uygulanan Fluoride 50 ve F100 gruplarına göre daha yüksek bulunmuştur. Kontrol grubuna kıyasla en yüksek Katalaz enzim aktivite düzeylerinin sırasıyla, Arı sütü 100>Arısütü 100+Florür50> Arı sütü 100+ Florür 100> Florür 50> Florür 100 şeklinde oluşmuştur.

5.4. Testis Dokusu Glutatyon (GSH) Düzeyleri

Testis doku GSH düzeylerinin ölçme denklemi $x = (y - 0,0016) / 0,0068$ şeklinde hesaplanmıştır. Denklemdaki 'y' sonucu, spektrofotometrede belirlenen GSH değeridir ($y = 0,0068x + 0,0016$). Bu veriler ile GSH standart eğrisi oluşturulmuştur. (Şekil 5.7).



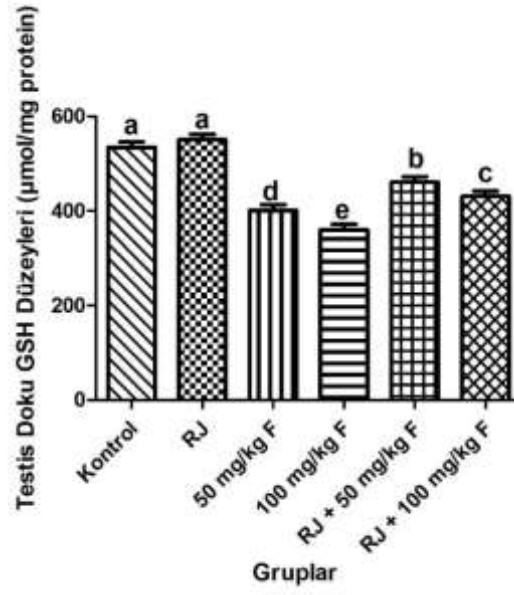
Şekil 5.7. GSH standart eğrisi.

Deney gruplarının testis doku GSH düzeylerine ait elde edilen sonuçlar aşağıdaki Tablo 5.5. ve Şekil 5.8.'de sunulmuştur.

Tablo 5.5. Ratlara ait testis doku GSH enzim aktivitesi sonuçları.

Gruplar	Testis Dokusu GSH Düzeyleri ($\mu\text{mol/mg protein}$)
Kontrol	534,41 $\pm$ 2,00 ^a
RJ	550,58 $\pm$ 2,00 ^a
50 mg/kg F	401,47 $\pm$ 2,00 ^d
100 mg/kg F	360,23 $\pm$ 2,00 ^e
RJ + 50 mg/kg F	460,94 $\pm$ 2,00 ^b
RJ + 100 mg/kg F	430,64 $\pm$ 2,00 ^c

a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü ANOVA Post Hoc Games-Howell Testi uygulanmıştır. RJ: Arı sütü100, F: Florür



Şekil 5.8. Ratlara ait testis dokusu GSH enzim aktivitesi sonuçlarına ait istatistiksel grafik. (a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

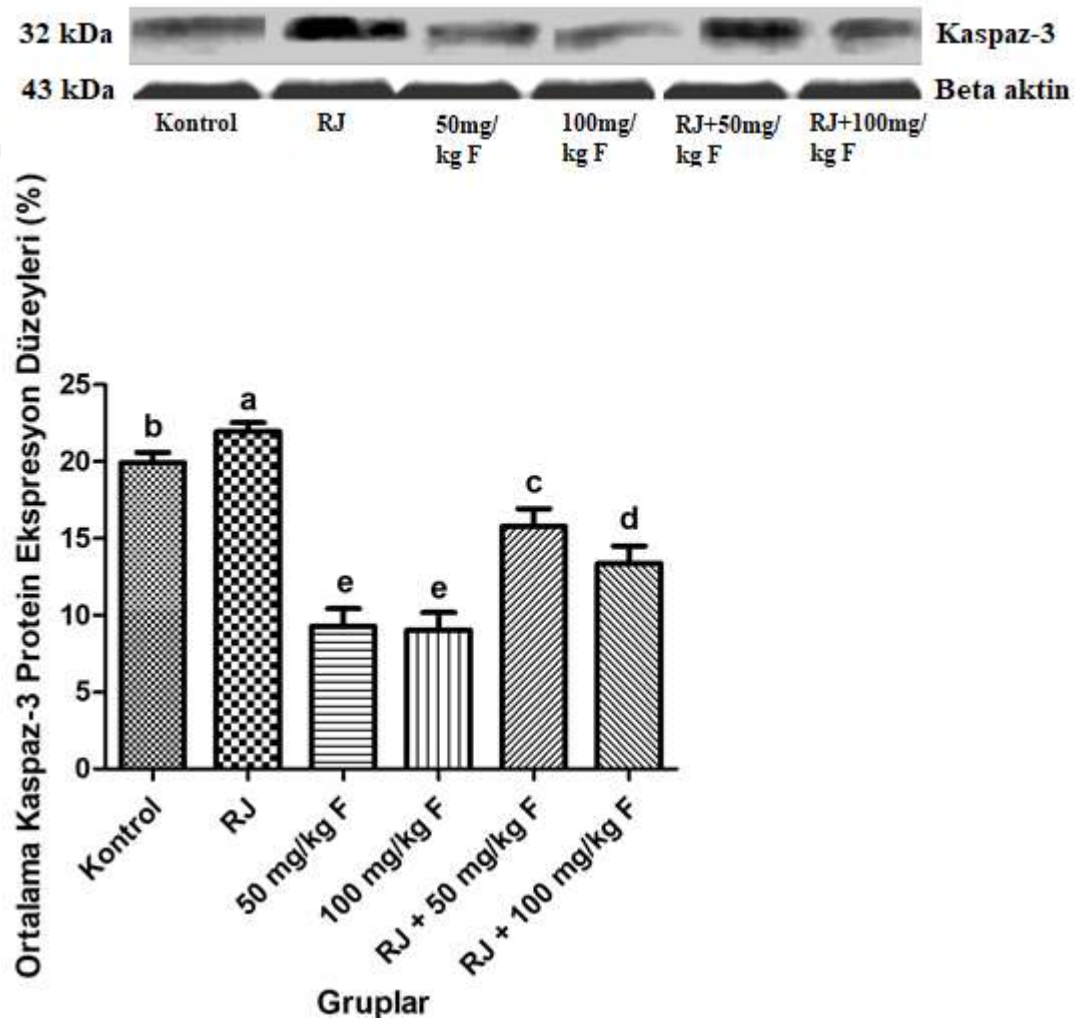
Sunulan Tablo ve Şekildeki değerlere göre, en düşük GSH değerinin F100 grubunda ortaya çıktığı, kontrol grubuna en yakın ve en yüksek GSH değerinin ise Arı sütü 100 grubunda bulunduğu tespit edilmiştir. Florür 50 ve Florür 100 gruplarında ise GSH seviyelerinin diğer gruplara kıyasla daha düşük seviyelerde olduğu belirlenmiştir.

5.5. COX-2, IL1- α , Tnf- α , NF- κ B, Nrf-2, Bcl-2, Kaspaz-3 Proteinlerinin Ekspresyon Düzeyleri

Deney gruplarına ait izolasyonu yapılan proteinlerin ekspresyon düzeylerine ait protein bantları Şekil 5.9-5.15' te sunulmuştur.

5.5.1. Kaspaz-3 Protein Ekspresyon Düzeyleri

Kaspaz-3 proteinin gruplara göre ekspresyon seviyeleri Şekil 5.9' da verilmiştir.

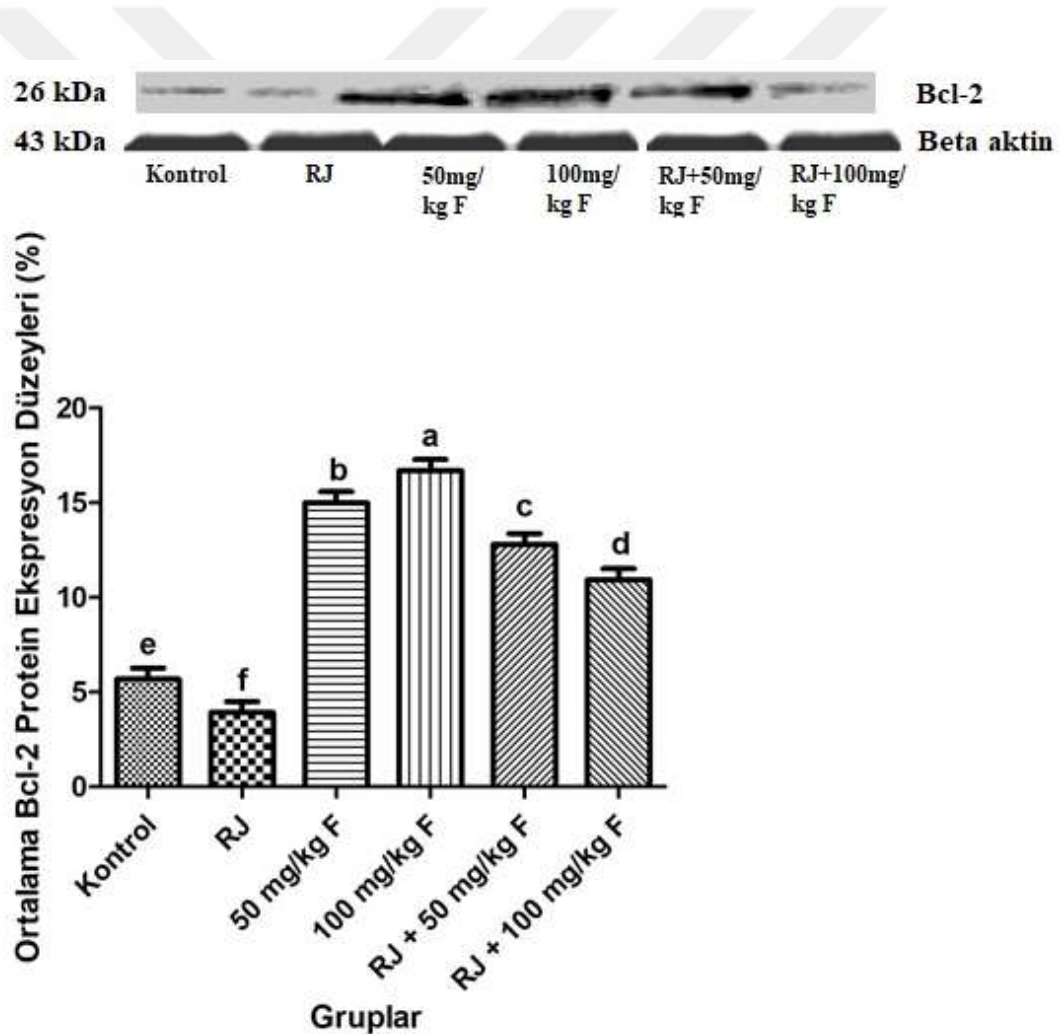


Şekil 5.9. Kaspaz-3 proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik. (a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü Anova Post Hoc Games-howell Testi uygulanmıştır RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesi değerleri incelendiğinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, gruplar arasında en yüksek değer RJ (Arı sütü 100) grubunda ortaya çıktığı, Florür100 ve Florür 50 gruplarında ise en düşük değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Arı sütü + Florür gruplarında kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesinin kontrole göre düşük değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Diğer taraftan, Arı sütü + Florür gruplarında kaspaz-3 protein ekspresyon seviyesi tek başına uygulanan Florür gruplarına (F50 ve F100) göre ise yüksek değerde ortaya çıkmıştır. Bazı gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır. (Şekil 5.9).

5.5.2. Bcl-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri

Bcl-2 proteinin gruplara göre ekspresyon seviyeleri Şekil 5.10' da verilmiştir.

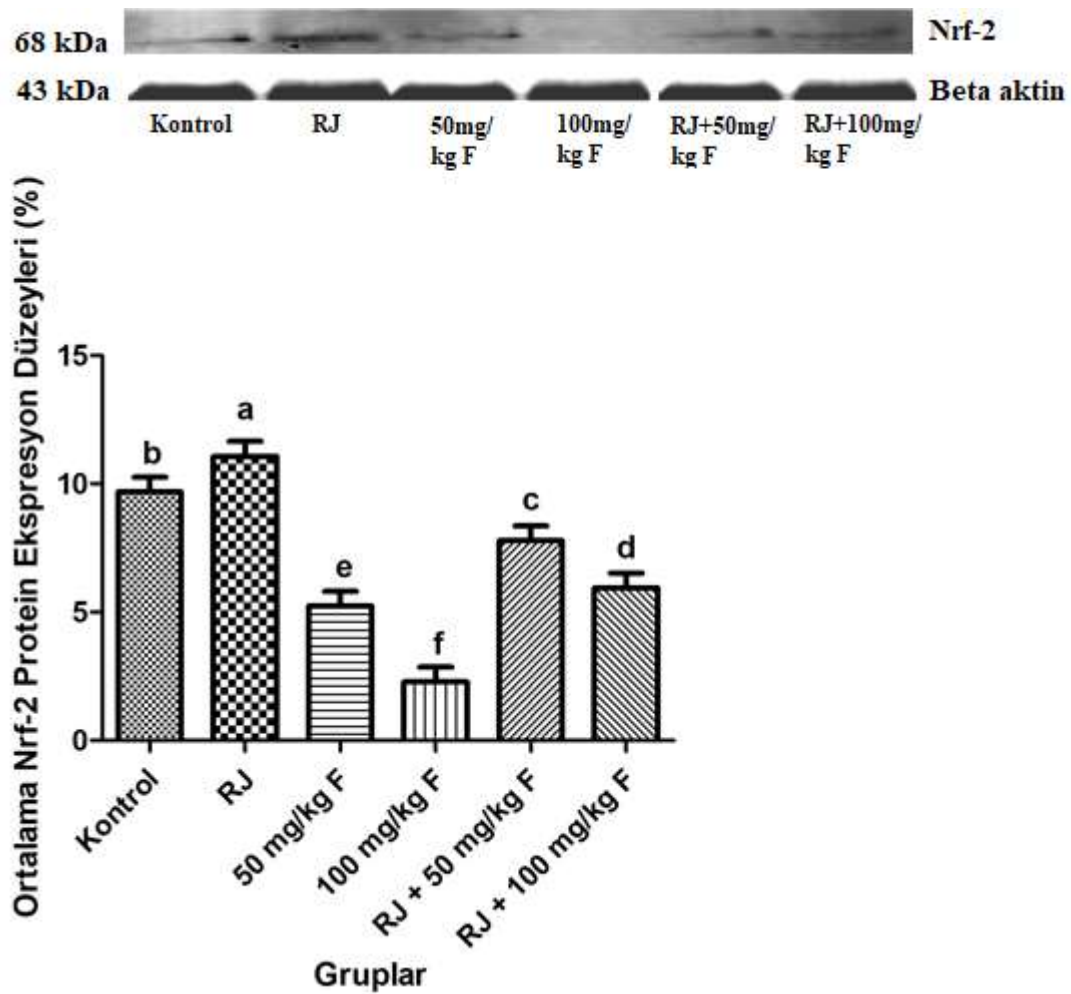


Şekil 5.10. Bcl-2 proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü Anova Post Hoc Games-howell Testi uygulanmıştır RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Bcl-2 protein ekspresyon seviyesi gruplar arasında en yüksek değerlerde Florür100 ve Florür 50 gruplarında ortaya çıkmıştır. RJ (Arı sütü 100) grubunda ise en düşük değerde olduğu bulunmuştur. Arı sütü + florür gruplarında Kontrol grubuna göre Bcl-2 protein ekspresyon seviyesi yüksek değerlerde ortaya çıkarken, tek başına uygulanan Florür gruplarıyla (F50 ve F100) karşılaştırıldığında bu gruplara göre daha düşük değerlerde olduğu belirlenmiştir. Tüm gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır. (Şekil 5.10).

5.5.3. Nrf-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri

Nrf-2 proteinin gruplara göre ekspresyon seviyeleri Şekil 5.11’ de verilmiştir.

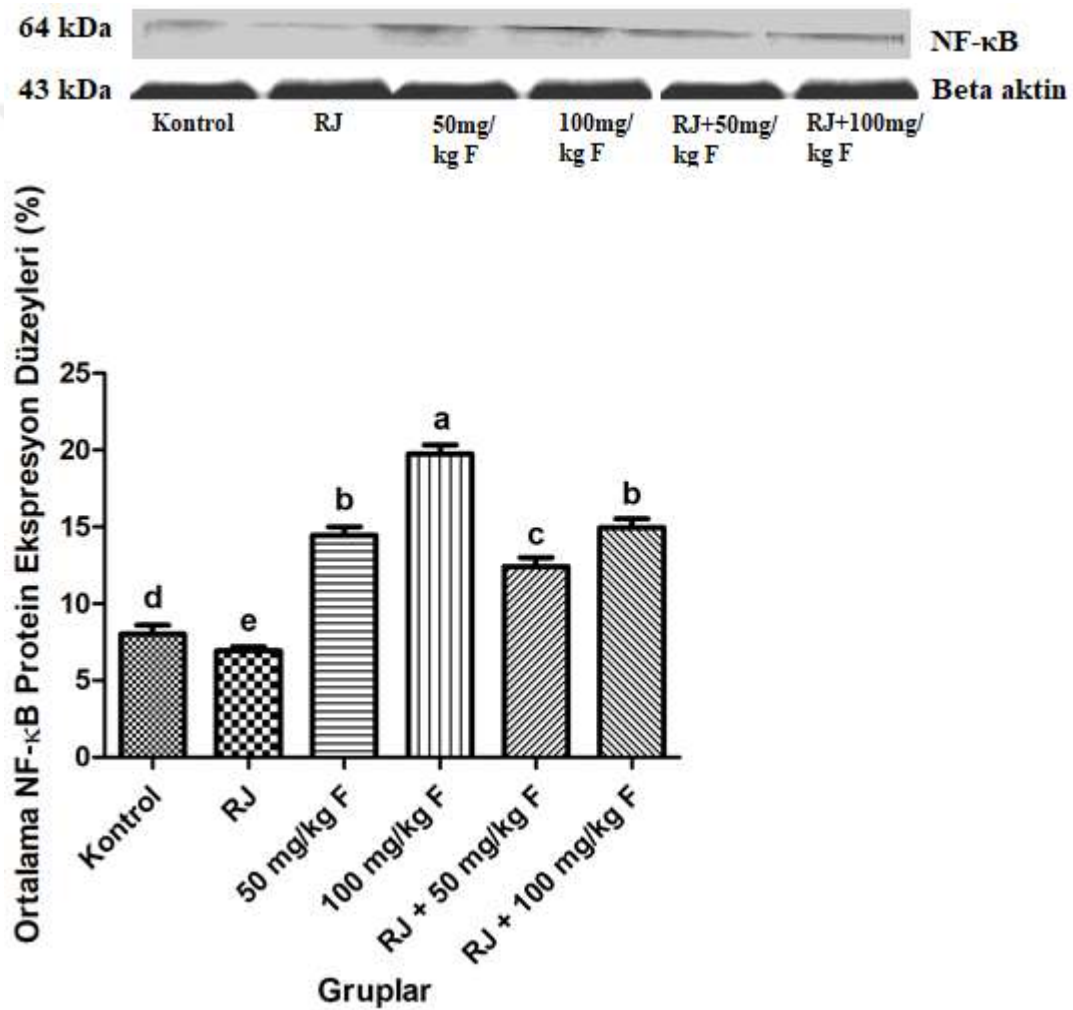


Şekil 5.11. Nrf-2 proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü Anova Post Hoc Games-howell Testi uygulanmıştır RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Nrf-2 protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasında, en yüksek değerde RJ (Arı sütü100) grubunda ortaya çıktığı, Florür 100 grubunda ise en düşük değerde olduğu bulunmuştur. Arı sütü + florür gruplarında ise Nrf-2 protein ekspresyon seviyesi Kontrol grubuna göre düşük değerlerde kalırken, tek başına uygulanan Florür gruplarına (F50 ve F100) göre ise daha yüksek değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Tüm gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır (Şekil 5.11).

5.5.4. NF-κB Protein Ekspresyon Düzeyleri

NF-κB proteinin gruplara göre ekspresyon seviyeleri Şekil 5.12’ de verilmiştir.

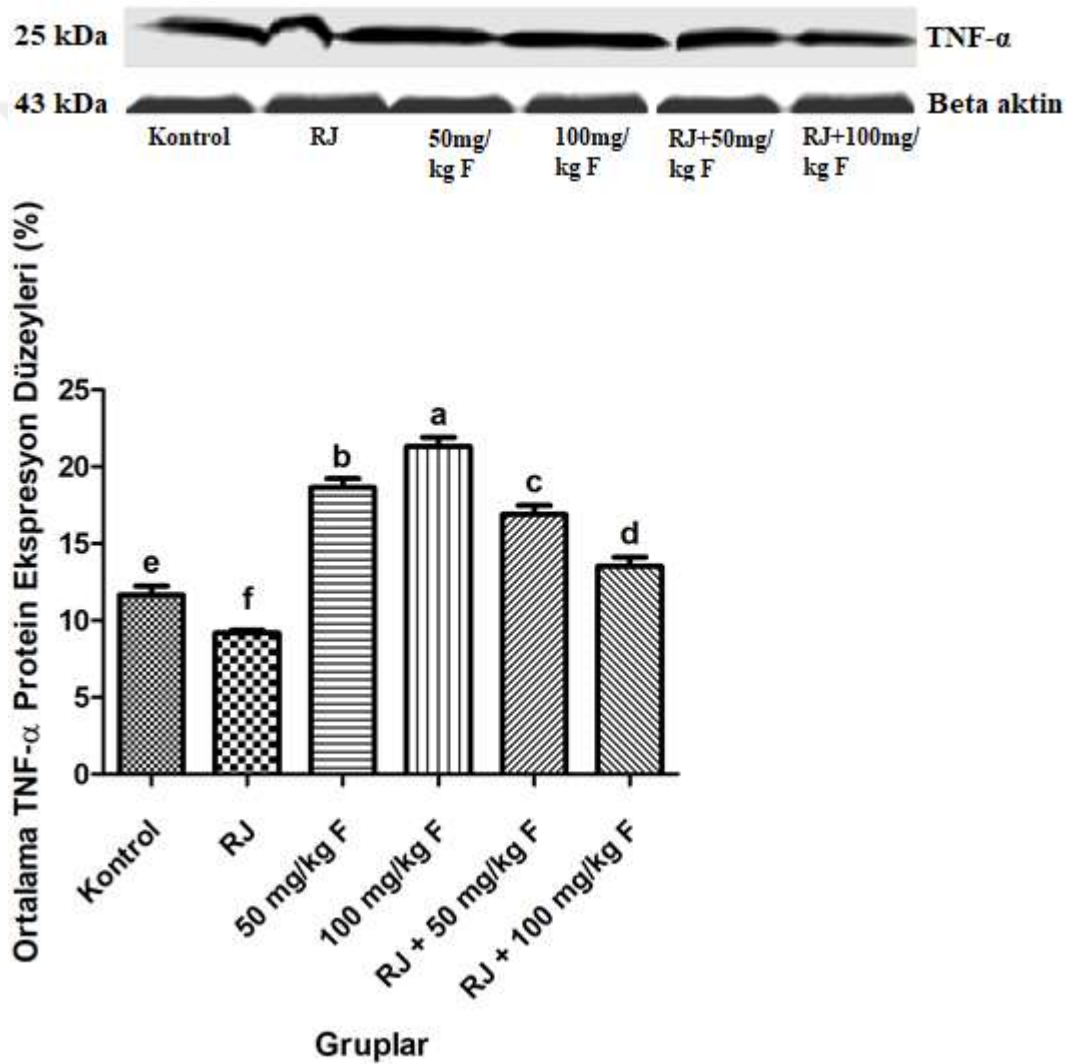


Şekil 5.12. NF-κB proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik. (a-e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü Anova Post Hoc Games-howell Testi uygulanmıştır RJ: Arı sütü100, F: Florür)

NF- κ B protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasında, en yüksek değerde Florür 100 grubunda ortaya çıktığı bulunurken, RJ (arı sütü 100) grubunda ise en düşük değerde olduğu bulunmuştur. Arı sütü + florür gruplarında ise NF- κ B protein ekspresyon seviyesi Kontrol grubuna göre yüksek değerlerde bulunurken, tek başına uygulanan Florür gruplarına (F50 ve F100) göre ise daha düşük değerlerde olduğu bulunmuştur. Bazı gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır. (Şekil 5.12).

5.5.5. TNF- α Protein Ekspresyon Düzeyleri

TNF- α proteinin gruplara göre ekspresyon seviyeleri Şekil 5.13’ de verilmiştir.

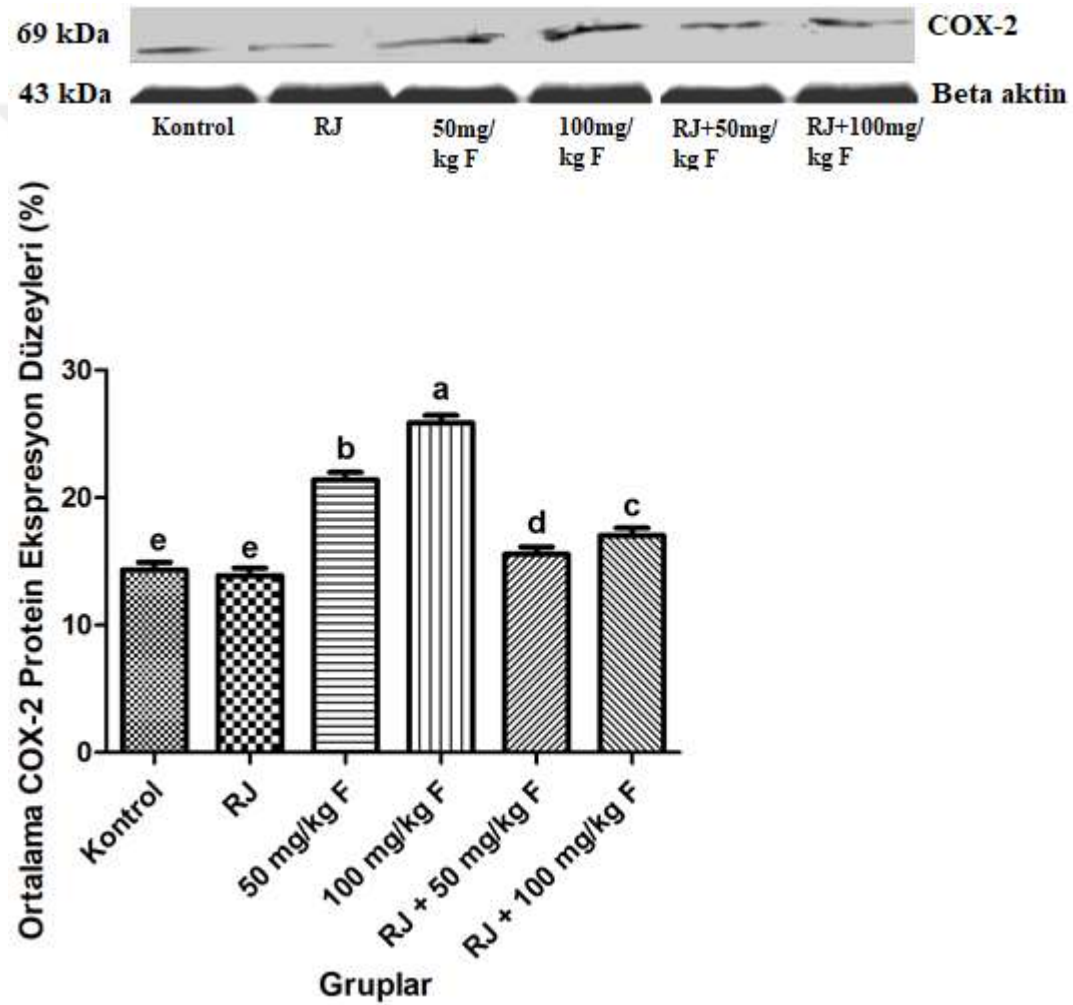


Şekil 5.13. TNF- α proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik. (a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü Anova Post Hoc Games-howell Testi uygulanmıştır RJ: Arı sütü100, F: Florür)

TNF- α protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasında, en yüksek değerde Florür 100 grubunda ortaya çıktığı bulunurken, RJ (Arı sütü 100) grubunda ise en düşük değerde olduğu bulunmuştur. Arı sütü + florür gruplarında ise TNF- α protein ekspresyon seviyesi Kontrol grubuna göre yüksek değerde ortaya çıkarken, tek başına uygulanan Florür gruplarına (F50 ve F100) göre ise daha düşük değerlerde ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Tüm gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır (Şekil 5.13).

5.5.6. COX-2 Protein Ekspresyon Düzeyleri

COX-2 proteinin gruplara göre ekspresyon seviyeleri Şekil 5.14' de verilmiştir.

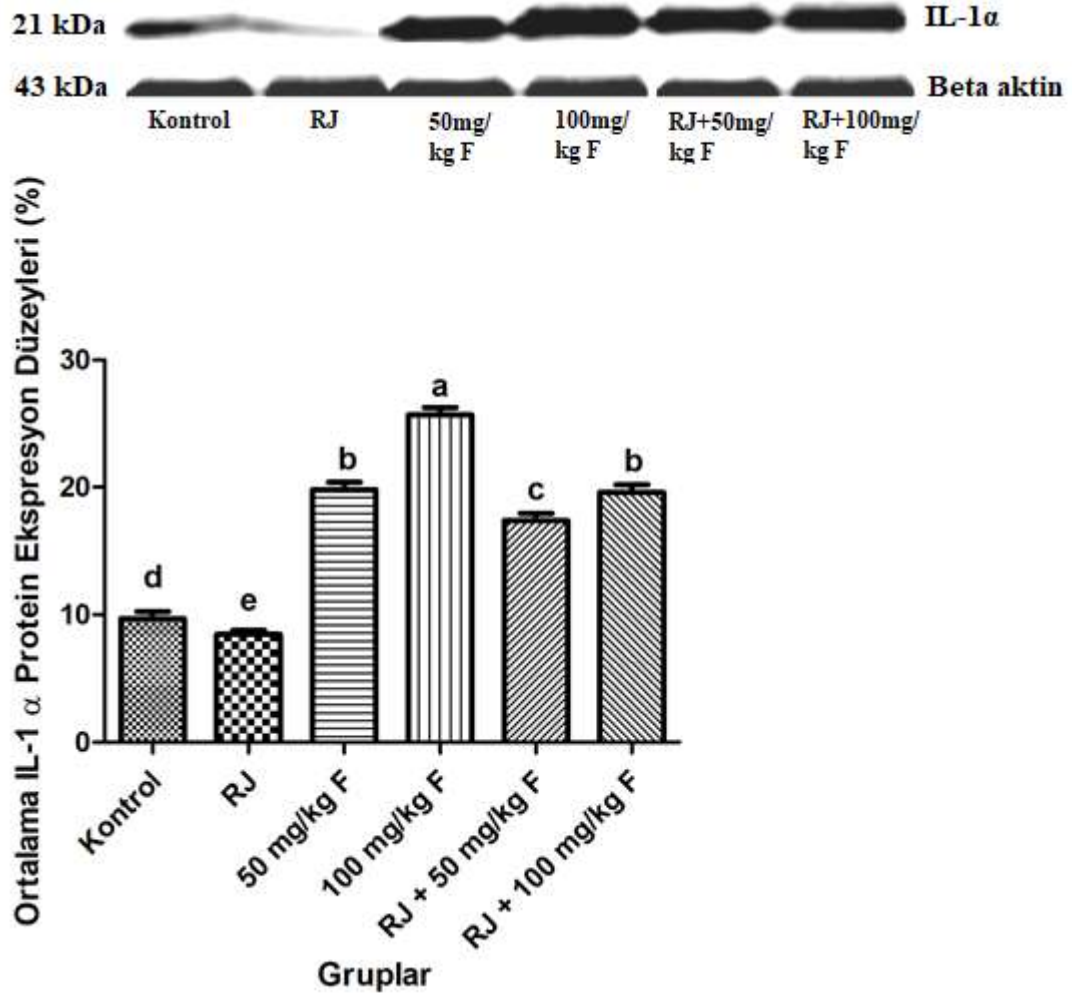


Şekil 5.14. COX-2proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik. (a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü Anova Post Hoc Games-howell Testi uygulanmıştır RJ: Arı sütü100, F: Florür)

COX-2 protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasında, en yüksek değerde Florür 100 grubunda ortaya çıktığı belirlenmiştir. RJ (Arı sütü 100) grubunda COX-2 protein ekspresyon seviyesinin, Kontrol grubuna yakın değerde olduğu ve istatistiksel açıdan farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir. Arı sütü + florür gruplarında ise COX-2 protein ekspresyon seviyelerinin, Kontrol grubuna göre yüksek değerlerde olduğu, tek başına uygulanan Florür gruplarına (F50 ve F100) göre ise daha düşük değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Bazı gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır (Şekil 5.14).

5.5.7. Interlökin1-alfa (IL1- α) Protein Ekspresyon Düzeyleri

IL1- α proteinin gruplara göre ekspresyon seviyeleri Şekil 5.15' te verilmiştir.



Şekil 5.15. IL1- α proteinin ekspresyon düzeylerine ait protein bantı ve istatistiksel grafik. (a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü Anova Post Hoc Games-howell Testi uygulanmıştır RJ: Arı sütü100, F: Florür)

IL1- α protein ekspresyon seviyesinin gruplar arasında, en yüksek değerde Florür100 grubunda ortaya çıktığı bulunmuştur. RJ (Arı sütü 100) grubunda ise en düşük değerde olduğu tespit edilmiştir. Arı sütü + florür gruplarında IL1- α protein ekspresyon seviyelerinin, Kontrol grubuna göre daha yüksek değerde olduğu, tek başına uygulanan Florür gruplarına (F50 ve F100) göre ise daha düşük değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Tüm gruplar arasındaki farklar istatistiksel açıdan anlamlı çıkmıştır. (Şekil 5.15).

5.6. Üreme Organ Ağırlıkları

Üreme organ ağırlıkları Absolut ve Rölatif olarak hesaplanarak Tablo ve grafikler şeklinde sunulmuştur.

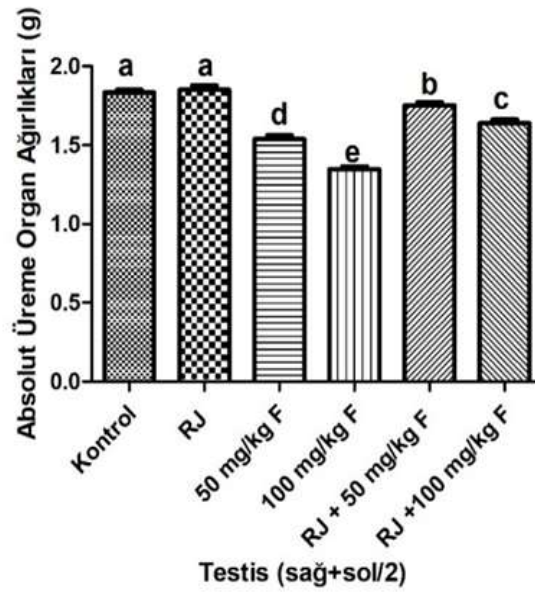
5.6.1. Üreme organları absolut ağırlıkları

Testis ağırlığı açısından kontrol ve arı sütü grupları arasında önemli bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 5.6.). Diğer taraftan, Kontrol grubuna kıyasla F50 ve F100 gruplarında anlamlı ($p < 0.05$) azalmalar bulunmuştur. Ayrıca, florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında testis ağırlığında anlamlı ($P < 0.05$), artışların olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.16.).

Tablo 5.6. Rat Testis absolut üreme organ ağırlıkları

Gruplar	Absolut Üreme Organ Ağırlıkları (g) (Testis-sağ+sol/2)
Kontrol	1,840 $\pm$ 0,02 ^a
RJ	1,850 $\pm$ 0,02 ^a
50 mg/kg F	1,540 $\pm$ 0,03 ^d
100 mg/kg F	1,310 $\pm$ 0,07 ^e
RJ + 50 mg/kg F	1,780 $\pm$ 0,07 ^b
RJ + 100 mg/kg F	1,600 $\pm$ 0,01 ^c

a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü Anova *Post Hoc* LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



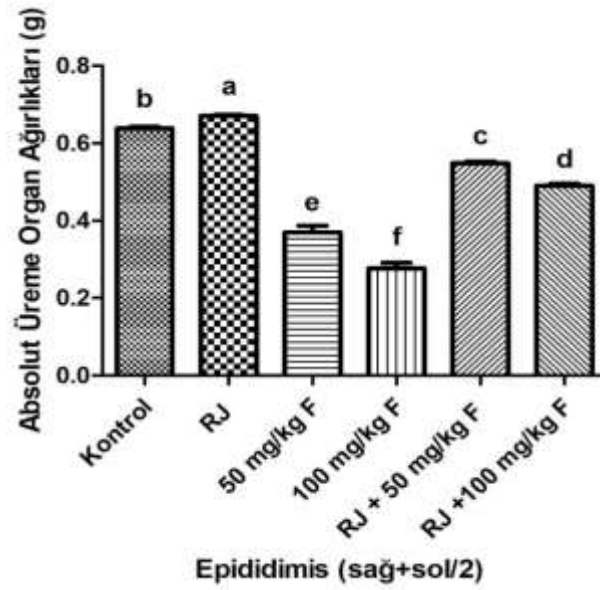
Şekil 5.16. Rat testis absolut üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü 100, F: Florür)

Epididimis ağırlığı açısından bulgular değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur. (Tablo 5.7.) Kontrol grubuna kıyasla en fazla ağırlık kaybının F50 ve F100 gruplarında olduğu bulunmuştur. Ayrıca, florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında epididimis ağırlığında anlamlı ($P < 0.05$) artışların olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.17).

Tablo 5.7. Rat epididimis absolut üreme organ ağırlıkları

Gruplar	Absolut Üreme Organ Ağırlıkları (g) Epididimis (sağ+sol/2)
Kontrol	$0,640 \pm 0,01^b$
RJ	$0,670 \pm 0,02^a$
50 mg/kg F	$0,370 \pm 0,04^e$
100 mg/kg F	$0,280 \pm 0,01^f$
RJ + 50 mg/kg F	$0,550 \pm 0,03^c$
RJ + 100 mg/kg F	$0,490 \pm 0,01^d$

a–f: Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



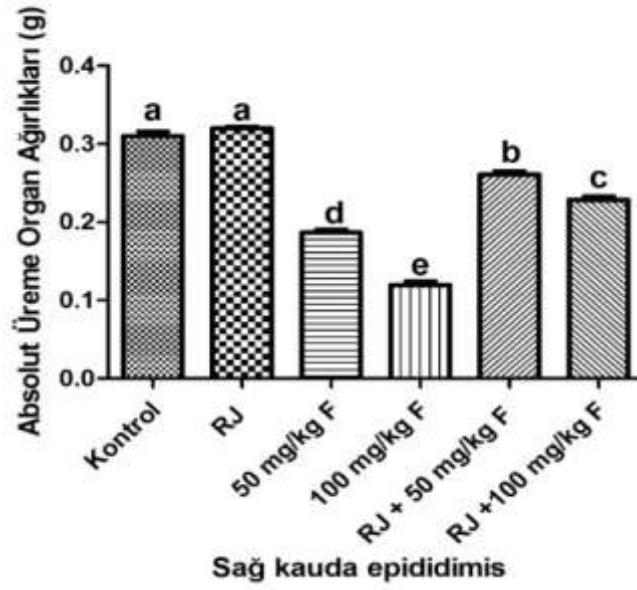
Şekil 5.17. Rat epididimis absolut üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a–f: Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Sağ kauda epididimis ağırlığı açısından kontrol ve arı sütü grupları arasında önemli bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 5.8.). Diğer taraftan, Kontrol grubuna kıyasla F50 ve F100 gruplarında anlamlı azalmalar bulunmuştur. Florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında sağ kauda epididimis ağırlığında anlamlı ($P < 0.05$) artışların olduğu belirlenmiştir. (Şekil 5.18.)

Tablo 5.8. Rat sağ kauda epididimis absolut üreme organ ağırlıkları

Gruplar	Absolut Üreme Organ Ağırlıkları (g) (Sağ kauda epididimis)
Kontrol	0,300 ± 0,02 ^a
RJ	0,320 ± 0,02 ^a
50 mg/kg F	0,180 ± 0,01 ^d
100 mg/kg F	0,120 ± 0,02 ^e
RJ + 50 mg/kg F	0,260 ± 0,02 ^b
RJ + 100 mg/kg F	0,230 ± 0,01 ^c

a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



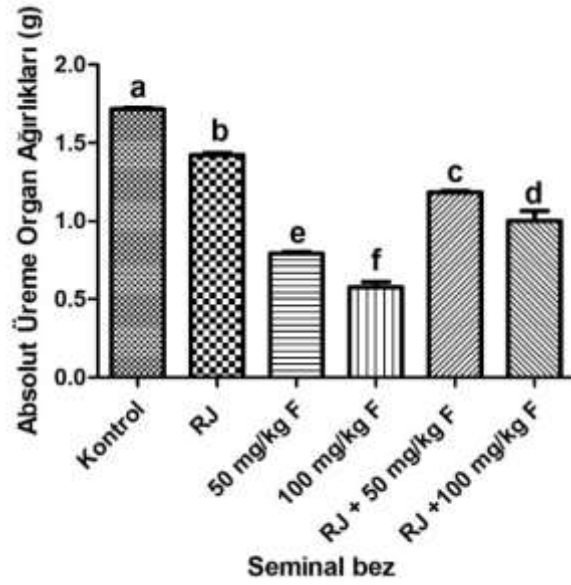
Şekil 5.18. Rat sağ kauda epididimis absolt üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Seminal bez ağırlığı açısından bulgular incelendiğinde tüm gruplarda istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmuştur (Tablo 5.9.). Kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda seminal bez ağırlığında azalmalar olduğu belirlenmiştir. Gruplar arasında en fazla azalma Florürün tek başına uygulandığı dozlarda, en az ağırlık kaybı ise RJ (Arı sütü100) grubunda tespit edilmiştir. Florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında seminal bez ağırlığında anlamlı ($P<0.05$) artışlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.19.)

Tablo 5.9. Rat seminal bez absolt üreme organ ağırlıkları

Gruplar	Absolut Üreme Organ Ağırlıkları (g) (Seminal bez)
Kontrol	$1,720 \pm 0,02^a$
RJ	$1,430 \pm 0,01^b$
50 mg/kg F	$0,780 \pm 0,01^e$
100 mg/kg F	$0,610 \pm 0,02^f$
RJ + 50 mg/kg F	$1,180 \pm 0,01^c$
RJ + 100 mg/kg F	$0,990 \pm 0,01^d$

a–f : Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



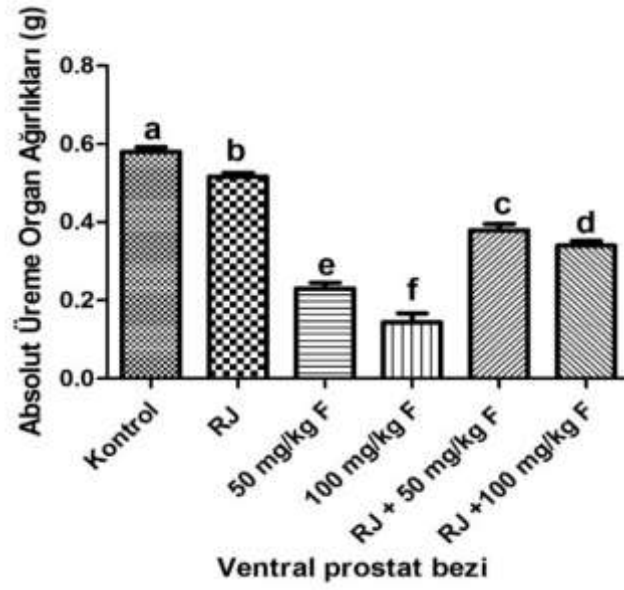
Şekil 5.19. Rat seminal bez absolut üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$ RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Ventral prostat bez ağırlığı açısından bulgular incelendiğinde tüm gruplarda istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmuştur (Tablo 5.10.). Kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda ventral prostat bez ağırlığında azalmalar olduğu belirlenmiştir. Gruplar arasında en fazla azalma Florürün tek başına uygulandığı dozlarda, en az ağırlık kaybı ise RJ (Arı sütü100) grubunda tespit edilmiştir. (Şekil 5.20).

Tablo 5.10. Rat ventral prostat bez absolut üreme organ ağırlıkları

Gruplar	Absolut Üreme Organ Ağırlıkları (g) (Ventral prostat bezi)
Kontrol	0,580 ± 0,02 ^a
RJ	0,530 ± 0,02 ^b
50 mg/kg F	0,240 ± 0,02 ^e
100 mg/kg F	0,180 ± 0,01 ^f
RJ + 50 mg/kg F	0,390 ± 0,02 ^c
RJ + 100 mg/kg F	0,340 ± 0,01 ^d

a–f: Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



Şekil 5.20. Rat ventral prostat absolut üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü 100, F: Florür)

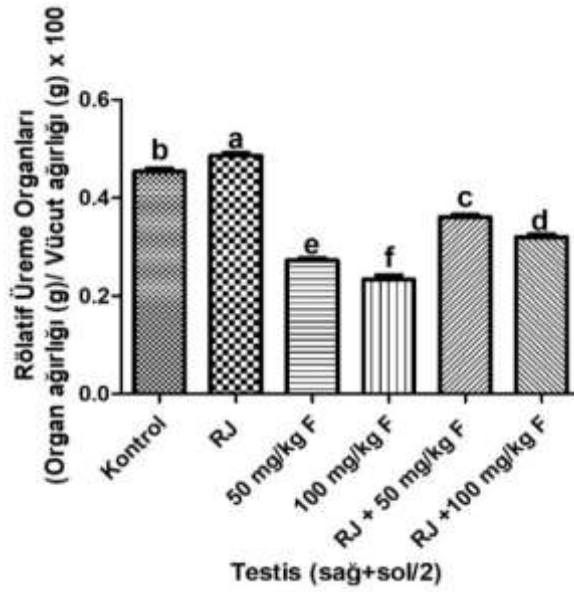
5.6.2. Üreme organları rölatif ağırlıkları

Rölatif testis ağırlığı açısından kontrol ve diğer tüm gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur (Tablo 5.11.). Kontrol grubuna kıyasla ağırlıkta en çok azalmalar F50 ve F100 gruplarında ortaya çıkmıştır. Arı sütü 100 grubunda kontrol grubuna kıyasla ağırlıkta anlamlı bir artışın olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında testis ağırlığında anlamlı ($P < 0.05$), artışlara neden olduğu belirlenmiştir. (Şekil 5.21.)

Tablo 5.11. Rat testis rölatif üreme organ ağırlıkları

Gruplar	Rölatif Üreme Organları (Testis-sağ+sol/2)
Kontrol	0,454 ± 1,00 ^b
RJ	0.486± 1,00 ^a
50 mg/kg F	0,272 ± 1,00 ^e
100 mg/kg F	0,230 ± 1,00 ^f
RJ + 50 mg/kg F	0,360 ± 1,00 ^c
RJ + 100 mg/kg F	0,320 ± 1,00 ^d

a–f: Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



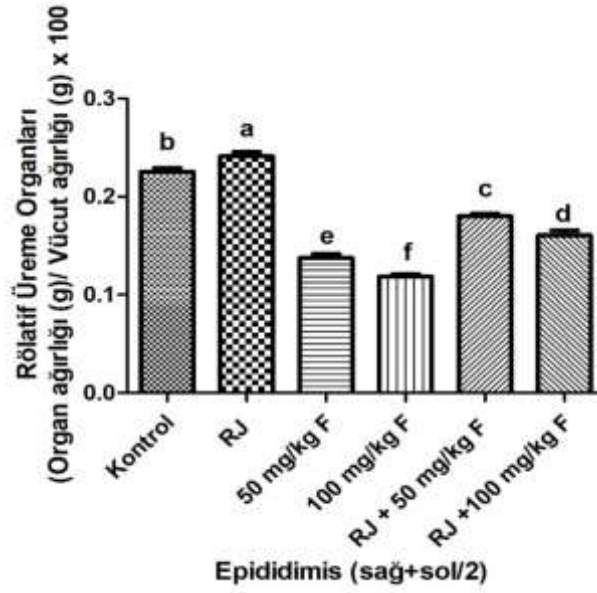
Şekil 5.21. Rat testis rölatif üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Epididimis ağırlığı açısından bulgular değerlendirildiğinde tüm gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulunmuştur (Tablo 5.12). Kontrol grubuna kıyasla en fazla ağırlık kaybının F50 ve F100 gruplarında olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan arı sütü100 grubunda kontrol grubuna kıyasla ağırlık artışı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında epididimis ağırlığında anlamlı ($P < 0.05$) artışlar olduğu belirlenmiştir. (Şekil 5.22).

Tablo 5.12. Rat epididimis rölatif üreme organ ağırlıkları

Gruplar	Rölatif Üreme Organları Epididimis (sağ+sol/2)
Kontrol	0,223 ± 1,00 ^b
RJ	0,235 ± 1,00 ^a
50 mg/kg F	0,138 ± 1,00 ^e
100 mg/kg F	0,118 ± 1,00 ^f
RJ + 50 mg/kg F	0,180 ± 1,00 ^c
RJ + 100 mg/kg F	0,160 ± 1,00 ^d

a–f: Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



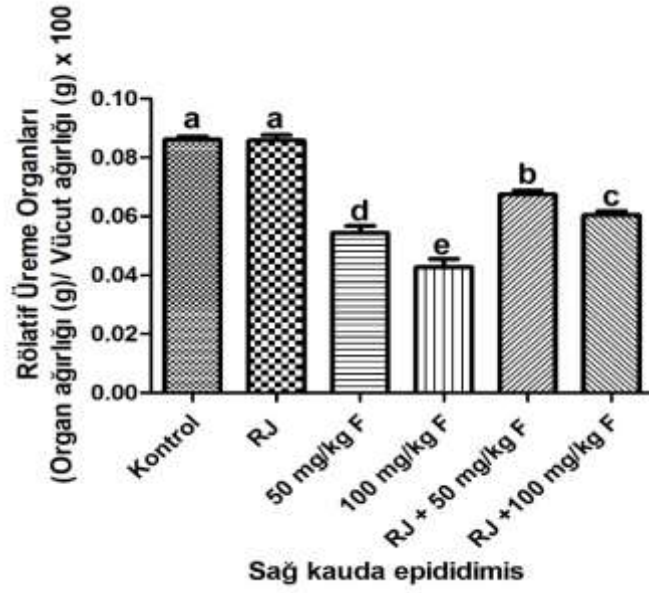
Şekil 5.22. Rat epididimis rölatif üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Sağ kauda epididimis ağırlığı açısından kontrol ve arı sütü grupları arasında önemli bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 5.13) Diğer taraftan, Kontrol grubuna kıyasla F50 ve F100 gruplarında anlamlı azalmalar bulunmuştur. Florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında sağ kauda epididimis ağırlığında anlamlı ($P < 0.05$) artışlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.23.).

Tablo 5.13. Rat sağ kauda epididimis rölatif üreme organ ağırlıkları

Gruplar	Rölatif Üreme Organları (Sağ kauda epididimis)
Kontrol	0,086 ± 1,00 ^a
RJ	0,082 ± 1,00 ^a
50 mg/kg F	0,055 ± 1,00 ^d
100 mg/kg F	0,042 ± 1,00 ^e
RJ + 50 mg/kg F	0,067 ± 1,00 ^b
RJ + 100 mg/kg F	0,060 ± 1,00 ^c

a–e: Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



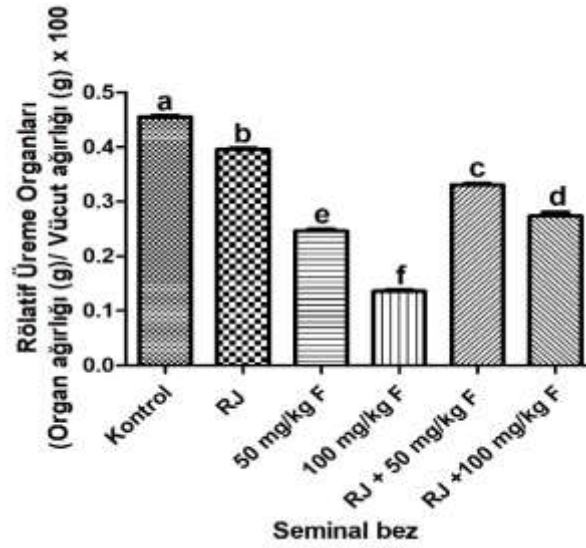
Şekil 5.23. Rat sağ kauda epididimis rölatif üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Seminal bez ağırlığı açısından bulgular incelendiğinde tüm gruplarda istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmuştur (Tablo 5.14.). Kontrol grubuna kıyasla tüm gruplarda seminal bez ağırlığında azalmalar olduğu belirlenmiştir. Gruplar arasında en fazla azalma Florürün tek başına uygulandığı dozlarda, en az ağırlık kaybı ise RJ (Arı sütü100) grubunda tespit edilmiştir. Florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında seminal bez ağırlığında anlamlı ($P < 0.05$) artışlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.24.)

Tablo 5.14. Rat seminal bez rölatif üreme organ ağırlıkları

Gruplar	Rölatif Üreme Organları (Seminal bez)
Kontrol	$0,455 \pm 1,00^a$
RJ	$0,395 \pm 1,00^b$
50 mg/kg F	$0,246 \pm 1,00^e$
100 mg/kg F	$0,137 \pm 1,00^f$
RJ + 50 mg/kg F	$0,330 \pm 1,00^c$
RJ + 100 mg/kg F	$0,278 \pm 1,00^d$

a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



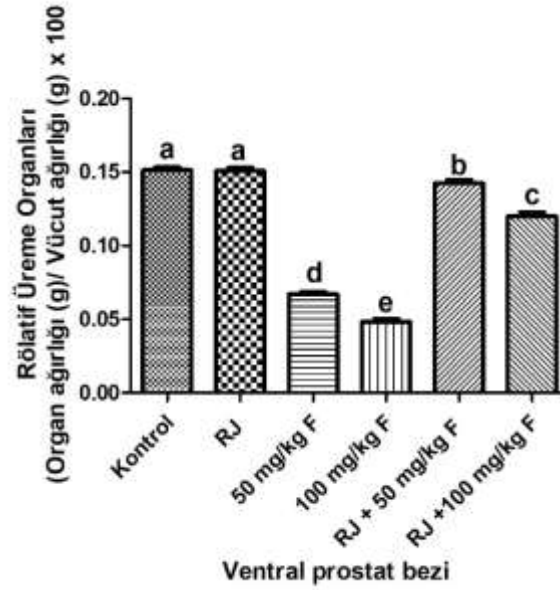
Şekil 5.24. Rat seminal bez rölatif üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

Ventral prostat bez ağırlığı açısından bulgular incelendiğinde kontrol ve arı sütü 100 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmamıştır (Tablo 5.15.) Kontrol grubuna kıyasla F50 ve F100 gruplarında ventral prostat bez ağırlığında azalmaların en fazla olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, gruplar arasında en fazla azalma florürün tek başına uygulandığı dozlarda bulunurken, florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında ventral prostat bez ağırlığında anlamlı artışlar olduğu belirlenmiştir. (Şekil 5.25)

Tablo 5.15. Rat ventral prostat rölatif üreme organ ağırlıkları

Gruplar	Rölatif Üreme Organları (Ventral prostat bezi)
Kontrol	0,151 ± 1,00 ^a
RJ	0,150 ± 1,00 ^a
50 mg/kg F	0,067 ± 1,00 ^d
100 mg/kg F	0,048 ± 1,00 ^e
RJ + 50 mg/kg F	0,142 ± 1,00 ^b
RJ + 100 mg/kg F	0,120 ± 1,00 ^c

a–e Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



Şekil 5.25. Rat ventral prostat bez rölatif üreme organ ağırlıklarına ait istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

5.7. Spermatolojik Muayene Bulguları

Deney sonunda ratlar dekapite edilip epididimisten spermatozoalar toplanarak yoğunluk, motilite ve morfoloji açısından değerlendirildi.

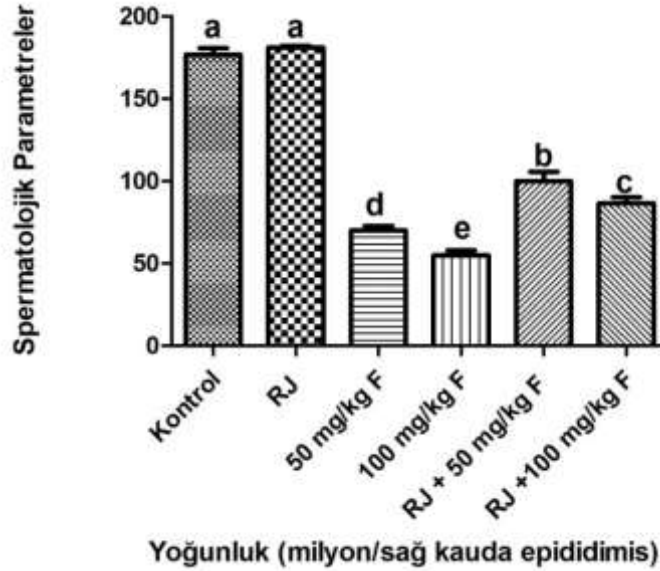
5.7.1. Sperm Yoğunluğu

Florürün tek başına uygulandığı F50 ve F100 grupları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, epididimal sperm yoğunluğunda istatistiksel olarak anlamlı azalmaların olduğu tespit edildi. (Tablo 5.16) Florür ile eş zamanlı arı sütü uygulamasının ise F50 ve F100 grupları ile karşılaştırıldığında florürün azalttığı sperm yoğunluğunu artırdığı belirlenmiştir. Diğer taraftan, tek başına arı sütünün uygulandığı Arı sütü 100 grubunda kontrol grubuna kıyasla epididimal sperm yoğunluğunun sayısal olarak arttığı görülmesine rağmen bu artış istatistiki olarak önemsiz bulunmuştur (Şekil 5.26).

Tablo 5.16. Rat sperm yoğunluk miktarları.

Gruplar	Spermatolojik parametreler Yoğunluk (milyon/sağ kauda epididimis)
Kontrol	176 ± 1,00 ^a
RJ	181 ± 1,00 ^a
50 mg/kg F	70 ± 1,00 ^d
100 mg/kg F	55 ± 1,00 ^e
RJ + 50 mg/kg F	100 ± 1,00 ^b
RJ + 100 mg/kg F	86 ± 1,00 ^c

a–e: Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



Şekil 5.26. Rat sperm yoğunluk miktarlarına ait istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

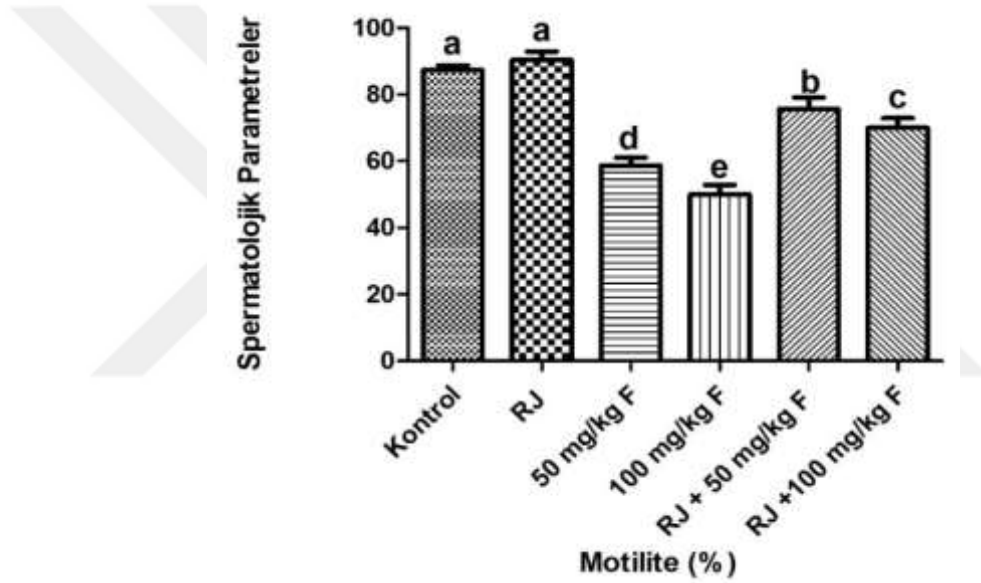
5.7.2. Sperm Motilitesi

Sperm motilitesi açısından bulgular incelendiğinde tek başına arı sütü uygulanan grupta motilite oranı sayısal olarak artış gösterse de Kontrol ve Arı sütü 100 grupları arasında istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar bulunmamıştır ($p < 0.05$) (Tablo 5.17.) Kontrol grubuna kıyasla F50 ve F100 gruplarında motilitede yüzdesi oran olarak azalmaların en fazla olduğu belirlenmiştir. Diğer taraftan, gruplar arasında en fazla azalma florürün tek başına uygulandığı dozlarda bulunurken, florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında motilite yüzdesinde anlamlı artışlar olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.27)

Tablo 5.17. Rat sperm motilite (%) değerleri

Gruplar	Spermatolojik parametreler
	Motilite (%)
Kontrol	87 ± 1,00 ^a
RJ	90 ± 1,00 ^a
50 mg/kg F	58 ± 1,00 ^d
100 mg/kg F	50 ± 1,00 ^e
RJ + 50 mg/kg F	82 ± 1,00 ^b
RJ + 100 mg/kg F	70 ± 1,00 ^c

a–e: Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p < 0.05). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



Şekil 5.27. Rat sperm motilite (%) değerlerine ait istatistiksel grafik. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (p < 0.05). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

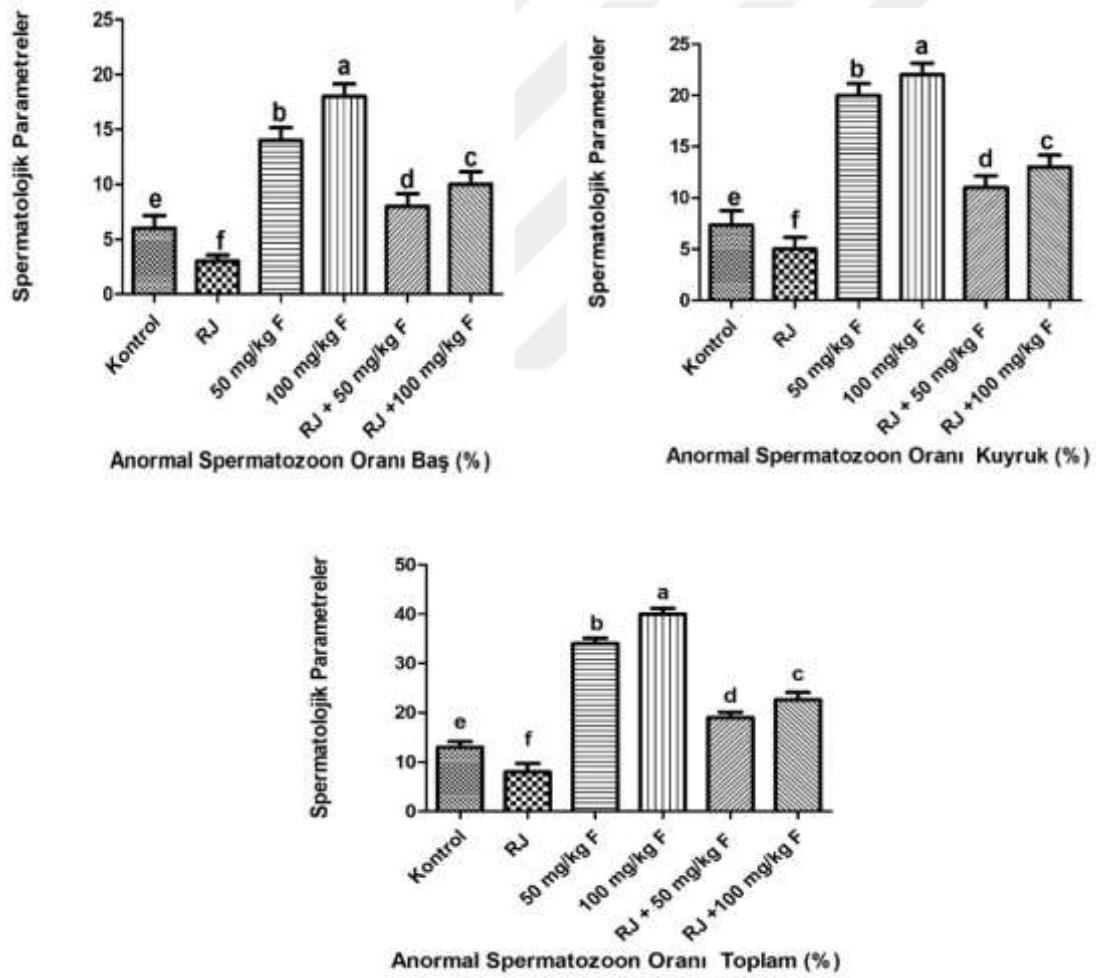
5.7.3. Anormal Sperm Oranı

Anormal sperm oranı bulguları incelendiğinde, tek başına florür uygulanan F50 ve F100 gruplarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında baş, kuyruk ve toplam anormal sperm oranında önemli artışların olduğu belirlendi. (Tablo 5.18) Diğer taraftan, florür ile arı sütü birlikte verilen gruplarla sadece florür uygulanan gruplar karşılaştırıldığında baş, kuyruk ve toplam anormal sperm oranı yüzdelerinde anlamlı azalmalar olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.28)

Tablo 5.18. Rat Anormal sperm oranları (%)

Gruplar	Anormal sperm oranı (%)		
	Baş	Kuyruk	Toplam
Kontrol	6 ± 2,00 ^e	7 ± 2,00 ^e	13 ± 1,00 ^e
RJ	3 ± 1,00 ^f	5 ± 2,00 ^f	8 ± 1,00 ^f
50 mg/kg F	14 ± 1,00 ^b	20 ± 1,00 ^b	34 ± 1,00 ^b
100 mg/kg F	18 ± 1,00 ^a	22 ± 1,00 ^a	40 ± 1,00 ^a
RJ + 50 mg/kg F	8 ± 1,00 ^c	11 ± 2,00 ^d	19 ± 2,00 ^d
RJ + 100 mg/kg F	10 ± 1,00 ^d	13 ± 1,00 ^c	23 ± 1,00 ^c

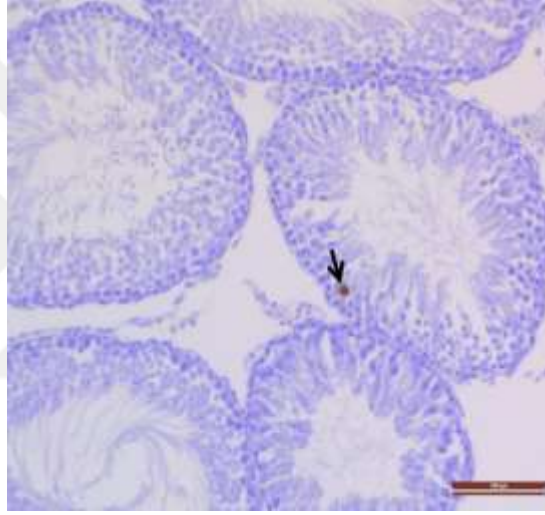
a–f: Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). Tek yönlü AnovaPost Hoc LSD Test. (RJ; Arı sütü 100 mg/kg F: Florür).



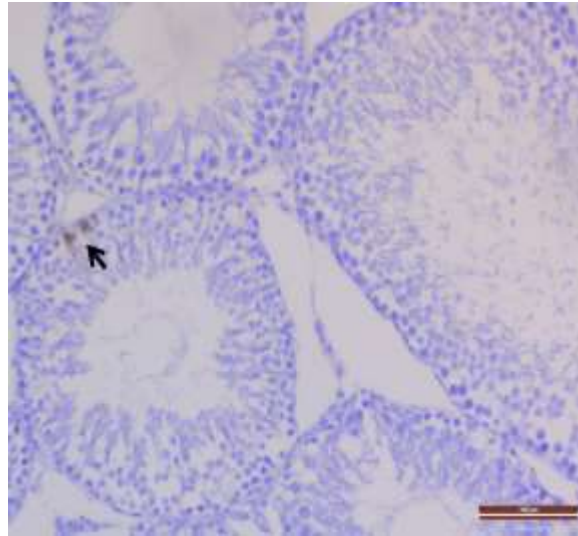
Şekil 5.28. Rat anormal başlı, kuyruklu sperm ve toplam anomalili sperm (%) değerlerine ait istatistiksel grafikler. (a–f Farklı harfi taşıyan gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0.05$). RJ: Arı sütü100, F: Florür)

5.8. Histopatolojik Bulgular ve Değerlendirmeler

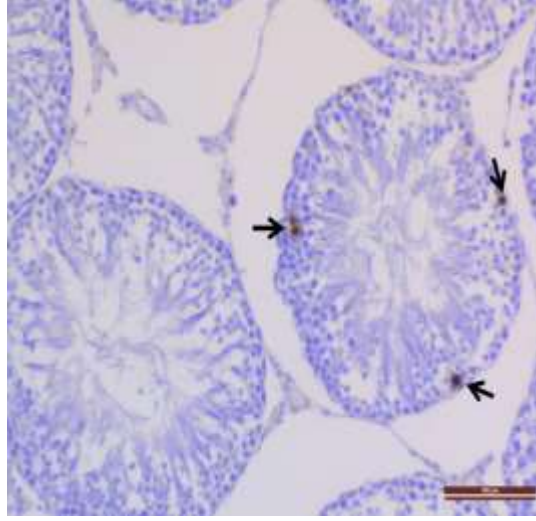
Testis dokusunda TUNEL yöntemi uygulanarak gruplara ait testiküler dokulardaki hasar düzeyleri belirlenmiştir. Boyamanın değerlendirilmesinde hematoksilin ile maviye boyanmış çekirdekler normal iken kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler hasarlı olarak analiz edilmiştir. Deney gruplarındaki ratların testis dokusundaki hücrelerin görsellerinde belirtilen siyah ok TUNEL pozitifliği diğer bir ifadeyle dokudaki hücre hasarını ifade etmektedir. TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; testis dokusunda florürün tek başına uygulandığı F50 ve F100 grupları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında TUNEL pozitiflik düzeyinde oldukça fazla artışın olduğu gözlenmiştir. Kontrol grubu ile Arı sütü 100 grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Buna karşın Florür ve arı sütünün birlikte uygulandığı gruplarda sadece florürün tek başına uygulandığı F50 ve F100 gruplarına göre TUNEL pozitiflik düzeyinde azalmalar tespit edilmiştir. Görüntüler Şekil 5.29- 5.34' te verilmiştir.



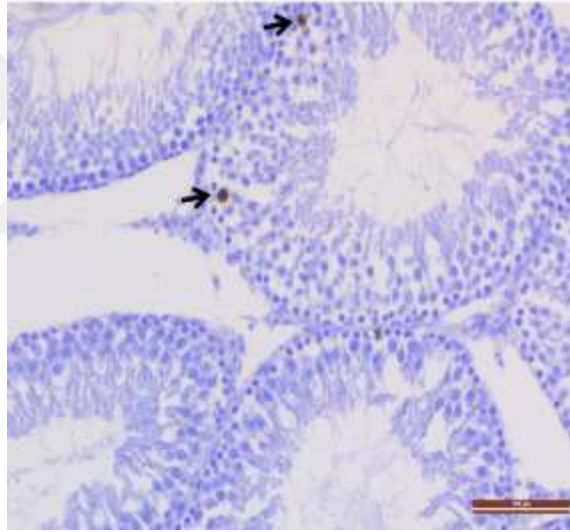
Şekil 5.29. Kontrol grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (→) Skala bar: 100µm.



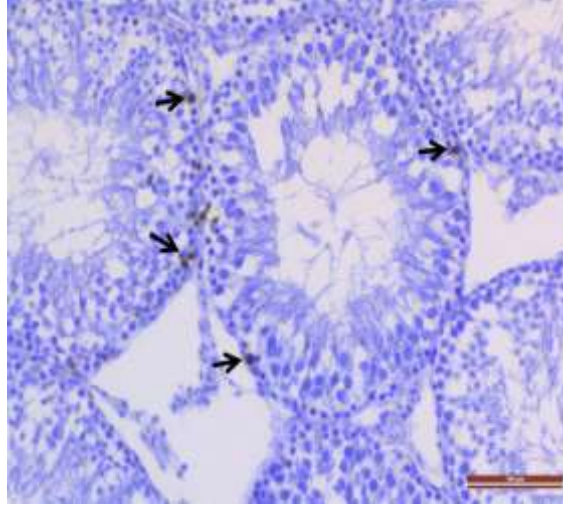
Şekil 5.30. RJ (Arı sütü 100 mg/kg) grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (→) Skala bar: 100µm.



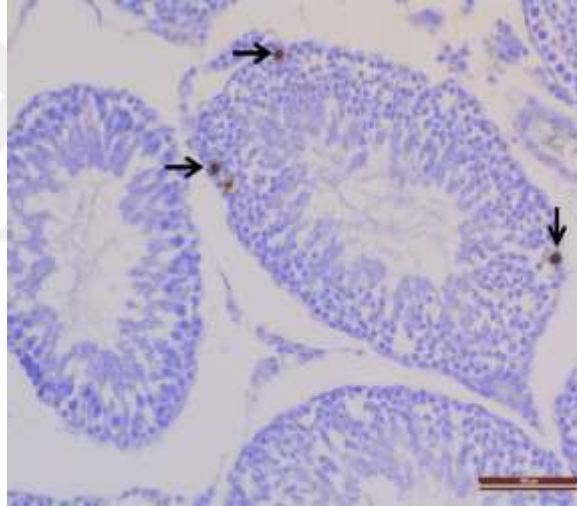
Şekil 5.31. F50 (Florür 50 mg/kg) grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (→) Skala bar: 100µm.



Şekil 5.32. RJ (Arı sütü 100 mg/kg) + F50 (Florür 50 mg/kg) grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (→) Skala bar: 100µm.



Şekil 5.33. F 100 (Florür 100 mg/kg) grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (→) Skala bar: 100µm



Şekil 5.34. RJ (Arı sütü 100 mg/kg) + F 100 (Florür 100 mg/kg) grubu testis dokusundaki TUNEL pozitif hücreler (→) Skala bar: 100µm.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucunda; RJ (Arı sütü 100 mg/kg) (Şekil 5.30.) ($p=0,886$) grubunun TUNEL pozitifliği Kontrol grubuyla (Şekil 5.29) kıyaslandığında benzer olarak izlenirken Florür 50 (Şekil 5.31.) ($p=0,02$) ve Florür 100 (Şekil 5.33.) ($p=0,002$) gruplarında ise kontrol grubuna kıyasla TUNEL pozitifliğin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artmış olduğu izlendi. Bununla birlikte Florür 50 ve Florür 100 grupları arasında TUNEL pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p=0,932$).

Florür 50 grubuyla (Şekil 5.31.) kıyaslandığında TUNEL pozitifliği Florür 50 + RJ (Arı sütü 100 mg/kg) (Şekil 5.32.) grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak izlendi ($p=0,002$).

Florür 100 grubuyla (Şekil 5.33.) kıyaslandığında TUNEL pozitifliği Florür 100 + RJ (Arı sütü 100 mg/kg) (Şekil 5.34) grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmış olarak gözlemlendi ($p=0,003$). Tablo 5.19'da Apoptotik indeks değerleri sunulmuştur.

Tablo 5.19. TUNEL yöntemiyle belirlenen apoptotik indeks

Gruplar	Apoptotik indeks Median (min-maks)
Kontrol	1,00(1,00-3,00)
RJ (Arı sütü 100 mg/kg)	1,00(1,00-2,00)
F 50 (Florür 50 mg/kg)	5,50(3,00-7,00) ^a
RJ (Arı sütü 100 mg/kg) + F 50 (Florür 50 mg/kg)	1,00(1,00-3,00) ^{bc}
F 100 (Florür 100 mg/kg)	5,00(4,00-8,00) ^a
RJ (Arı sütü 100 mg/kg) + F 100 (Florür 100 mg/kg)	1,50(1,00-2,00) ^{bc}

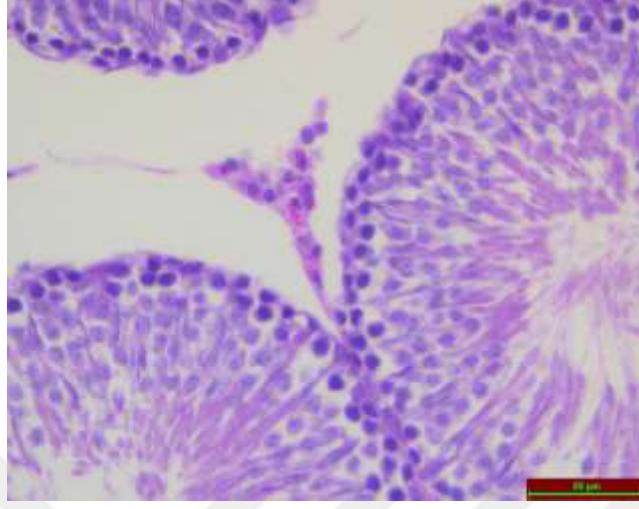
Değerler median (min-maks) olarak verilmiştir.

^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında,

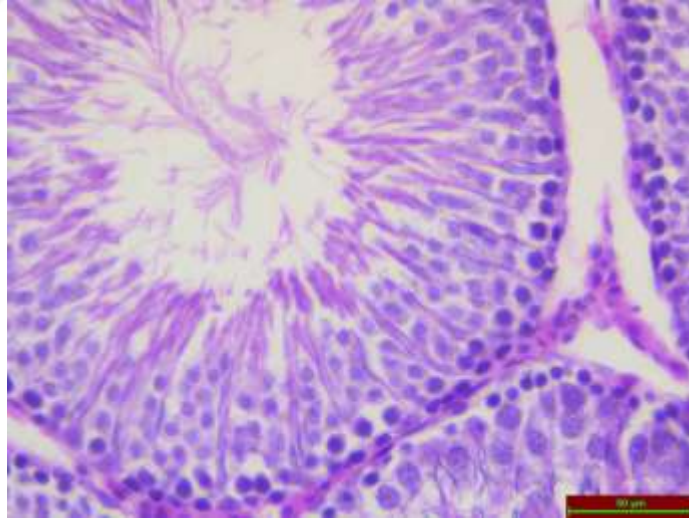
^b Florür 50 grubu ile karşılaştırıldığında,

^c Florür 100 grubu ile karşılaştırıldığında, ($p<0.05$).

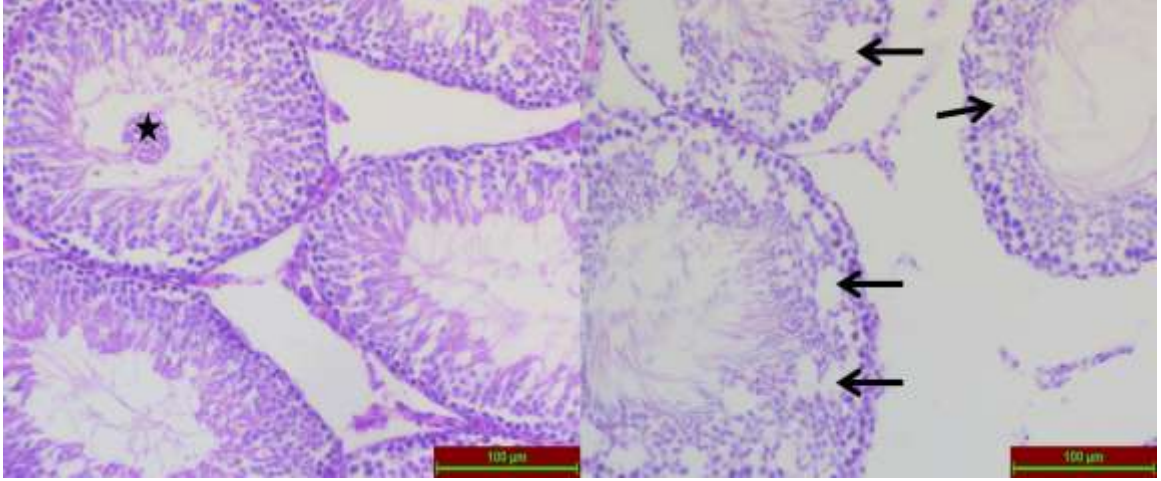
Hematoksilen & eozin ile boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucunda; Kontrol (Şekil 5.35) ve RJ (Arı sütü 100 mg/kg, Şekil 5.36) gruplarına ait testis dokularının normal görünümde olduğu izlenmiştir. Kontrol grubu (Şekil 5.35) ile karşılaştırıldığında; Florür 50mg/kg (Şekil 5.37) ve Florür 100 mg/kg gruplarının (Şekil 5.39) testis dokularında belirgin vakualizasyon (siyah ok) ve germ hücre dökülmesi (siyah yıldız) izlenmiştir. Bununla birlikte Florür 50 mg verilen grupta (Şekil 5.37) Arı sütü ile birlikte Florür uygulanan grup kıyaslandığında, Florür 50mg + Arı sütü 100mg grubunda (Şekil 5.38) germ hücre dökülmesinin gerilediği fakat vakualizasyonun devam ettiği izlenmiştir. Florür 100mg (Şekil 5.39) verilen grupta Arı sütü ile birlikte Florür uygulanan grup kıyaslandığında, Florür 100mg + Arı sütü 100mg grubunda germ hücre dökülmesinin gerilediği fakat vakualizasyonun devam ettiği izlenmiştir (Şekil 5.40).



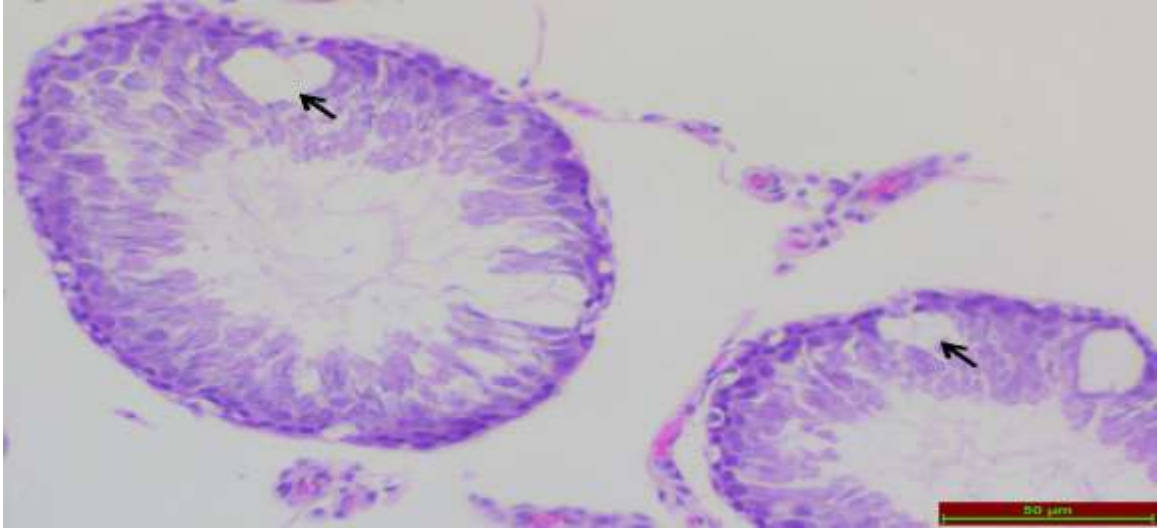
Şekil 5.35. Kontrol grubu Testis (bölgesel kesit görünümü). Boya: Hematoksilen ve Eozin Skala bar: 50µm. Normal görünüme sahip.



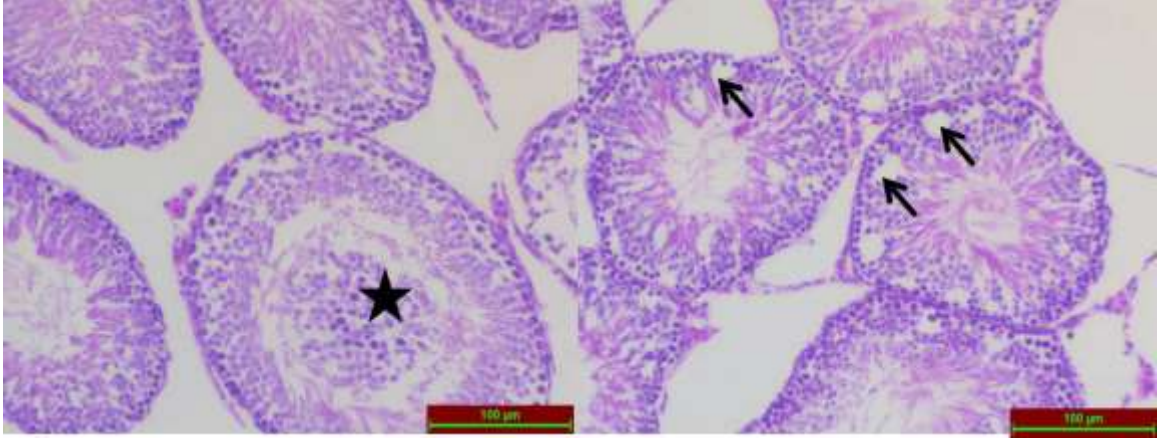
Şekil 5.36. RJ (Arı sütü 100 mg/kg) grubu Testis (bölgesel kesit görünümü). Boya: Hematoksilen ve Eozin Skala bar: 50µm. Normal görünüme sahip.



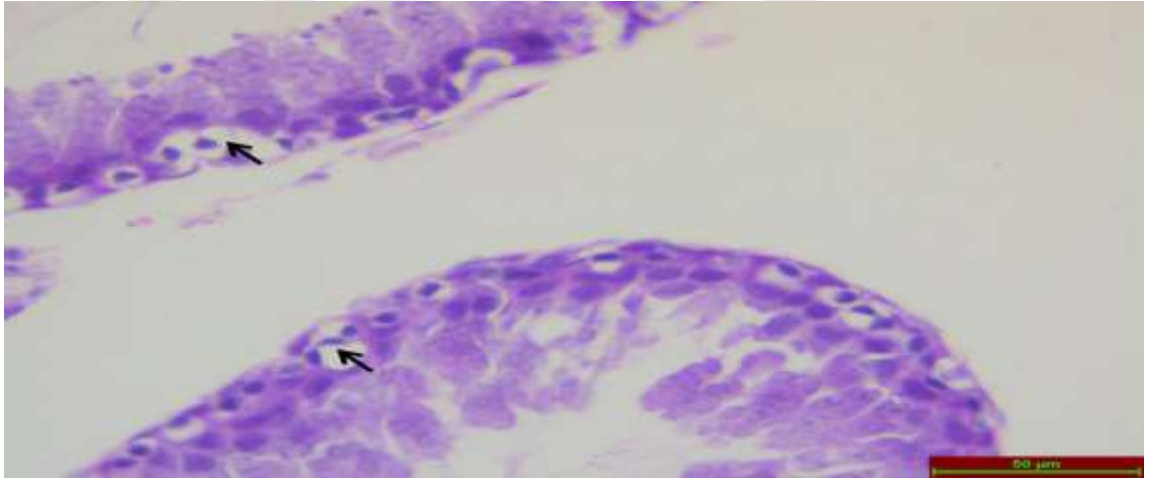
Şekil 5.37. F50 (Florür 50 mg/kg) grubu Testis (bölgesel kesit görünümü). Boya: Hematoksilen ve Eozin Skala bar: 100µm. Belirgin vakualizasyon (siyah ok) ve germ hücre dökülmesi (siyah yıldız).



Şekil 5.38. RJ (Arı sütü 100 mg/kg) + F50 (Florür 50 mg/kg) grubu Testis (bölgesel kesit görünümü). Boya: Hematoksilen ve Eozin Skala bar: 50µm. Vakulizasyon ve azalmış germ hücre dökülmesi.



Şekil 5.39. F100 (Florür 1000 mg/kg) grubu Testis (bölgesel kesit görünümü). Boya: Hematoksilen ve Eozin
Skala bar: 100µm. Belirgin vakualizasyon (siyah ok) ve germ hücre dökülmesi (siyah yıldız).



Şekil 5.40. RJ (Arı sütü 100 mg/kg) + F100 (Florür 100 mg/kg) grubu Testis (bölgesel kesit görünümü).
Boya: Hematoksilen ve Eozin Skala bar: 50µm. Vakulizasyon ve azalmış germ hücre dökülmesi.

6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çevresel kirleticilere ve kimyasallara maruz kalmadaki artış, üreme sağlığı sorunlarına yol açabilmektedir. İnfertilite (kısırlık) çiftlerin %13-18'ini etkilemekte olup klinik ve epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen sonuçlar, infertilitede, erkek üreme sorunlarının görülme sıklığının arttığını göstermektedir. İnfertil çiftlerin %40-50'sinde erkek faktörlü problemlerden kaynaklanan infertilite görülmektedir [301].

Erkek kısırlığının patogenezi değerlendirildiğinde, çevresel faktörlere bağlı kusurlu spermatogenezin, konjenital anormalliklerin, immünolojik ve nörojenik faktörlere bağlı kusurlu spermlerin veya testiküler dokudaki hasarların önemli bir yer tuttuğu görülmektedir. Çevresel kirleticiler ve kimyasallar nedeniyle insan spermi kalitesinin azaldığı, testiküler dokuda deformasyonların olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir [301, 302].

Florür, oldukça aktif bir çevresel elementtir ve büyük reaktivitesinden dolayı çevrede inorganik veya organik bileşikler olarak yaygın olarak bulunur. Florür (F) doğal formda toprakta, suda ve gıdada değişen miktarlarda bulunur. Ayrıca diş çürüklerini önlemek için diş macunu, gargara ve içme suyunda katkı maddesi olarak yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek florür tüketimi vücut yükünde bir artışa neden olabilir. Birçok çalışma, aşırı florürün sadece kemiklere ve dişlere zarar vermediğini, aynı zamanda sinir, bağışıklık, solunum, sindirim ve üreme sistemi gibi diğer dokulara ve sistemlere de zararının olduğunu göstermiştir. Yiyecek, su ve havadaki sürekli artan florür seviyeleri, insan sağlığı ve çevre için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Yapılan çalışmalar, aşırı florür maruziyetinin, üreme dokuları özellikle de erkek üreme sistemi olmak üzere yumuşak dokularda çeşitli patolojik değişikliklere neden olduğunu göstermiştir [303-308].

Erkek infertilitesinde çeşitli etiyolojik faktörler tanımlanmıştır. Bu faktörler arasında nütrisyonel (beslenme ile alakalı) faktörlerde yer almaktadır. İyi beslenme, sperm hücrelerinin sürekli üretiminde de yararlı bir rol oynar. Arı sütü, larvaların beslenmesinde kullanılan bir bal arısı salgısıdır. Genç işçilerin başlarındaki hipofaringeal bezlerden salgılanır ve kolonideki larvaları beslemek için kullanılır. B-kompleks vitamin içeriği nedeniyle çeşitli sağlık yararları olduğu iddia edilen bir insan diyet takviyesi olarak toplanır. Arı sütünün genel bileşimi %67 su, %12,5 ham protein (küçük miktarlarda birçok farklı amino asit dahil) ve %11 basit şekerlerden (monosakarit) oluşur, ayrıca %5 yağ asidi içerir. Ayrıca birçok eser mineral, bazı enzimler, antibakteriyel ve antibiyotik bileşenleri ve eser miktarda C vitamini içerir [38, 309, 310].

Arı sütünün ayrıca hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği, yaşlanma süreci ve sıçanlarda stres reaksiyonları üzerindeki etkileri üzerinde önemli bir rol oynayabilecek antioksidan özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir. Arı sütünün, üreme potansiyeli, doğurganlık sağlığı ve infertilite üzerindeki olumlu etkileri daha önceki bazı çalışmalarda bildirilmiştir [94, 311-313].

Florür toksisitesine ait endişeler gittikçe artmaktadır. Bundan ötürü, florür toksisitesine yönelik çalışmalara ilgi artmıştır [306]. Arı ürünleri terapötik etkileri ve biyoaktif maddeleri ihtiva etmesinden dolayı birçok çalışmanın ana konuları içerisinde yer almaktadır [38]. Literatürdeki tüm bu bilgiler kapsamında florür toksisitesinin ve arı sütünün antioksidan ve immünomodülatör aktivitelerinin aydınlatılmasına yönelik yeni bilimsel çalışmalara, bakış açısı oluşturacak araştırmalara ihtiyaç vardır.

Bu amaca yönelik olarak planladığımız doktora tez çalışmamızda, florür verilerek testis hasarı oluşturulmuş ratların testis dokusu üzerinde arı sütünün koruyucu özellikleri çeşitli moleküler biyolojik yöntemlerle araştırılmıştır. Elde ettiğimiz verilerin literatüre göre yapılan değerlendirmeleri aşağıda sunulmuştur.

Hayvanların başlangıç canlı ağırlıkları eşit olacak şekilde ayarlanıp gruplar oluşturulduktan sonra gruplara göre uygulanan deney prosedürleri sona erdiğinde bitiş canlı vücut ağırlıkları ölçülmüştür. Ölçüm sonucunda elde edilen veriler bulgular kısmında Tablo ve Şekiller halinde sunulmuştur. Tablo ve grafikteki verilere göre bitiş vücut ağırlıkları açısından, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı bulunmasa da sayısal olarak artışın olduğu tek grubun Arı sütü 100 grubunun olduğu belirlenmiştir. Florür 50 ve Florür 100 gruplarında kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan anlamlı olacak düzeyde bir azalmanın olduğu bulunmuştur. Diğer taraftan, Arı sütü 100 ile beraber uygulanan Florür 50 ve Florür 100 gruplarında, sadece florürün uygulandığı Florür 50 ve Florür 100 gruplarına kıyasla vücut ağırlığında daha düşük bir azalma olduğu tespit edilmiştir.

Deney sonundaki vücut ağırlığı ölçüm sonuçlarına göre florürün kilo kaybına neden olması, kilo kaybının altında yatan florür kaynaklı bir patolojinin ya da hasarın ortaya çıktığının fiziksel bir ön göstergesi olarak değerlendirilebilir. Ayrıca, elde edilen ölçümlere göre florürlü gruplara arı sütü ilave edilmesi, tek başına florür uygulanmasıyla oluşan kilo kaybını azaltmıştır. Arı sütü takviyesinin florürün oluşturduğu kilo kaybını iyileştirmesi ile arı sütünün florür toksisitesinde koruyuculuk sağlayabileceği şeklinde değerlendirebilir. Vücut ağırlığı ölçümleriyle elde edilen sonuçlar, vücut ağırlığı parametresi açısından florürün negatif bir etki, arı sütünün de pozitif bir etki gösterdiği şeklinde yorumlanabilir.

Vücut ağırlığında belirlenen bu farklılıkların üreme organ ağırlıkları üzerinde de oluşup oluşmadığını belirlemek amacıyla sıçanlar dekapite edildikten sonra üreme organlarının tartımı yapıp absolut ve rölatif ağırlıkları tespit edilerek kaydedilmiştir. Elde edilen veriler, bulgular kısmında Tablo ve Şekil olarak sunulmuştur. Deney gruplarına ait absolut ve rölatif üreme organ ağırlıkları sonuçlarının benzer şekilde çıktığı görülmüştür. Testis, epididimis, sağ kauda epididimis, seminal bez, ventral prostat bez organ ağırlıklarının tartım ve absolut ve rölatif hesaplarının neticesinde genel olarak tüm deney grupları içerisinde sadece RJ (Arı sütü 100) uygulanan grupta üreme organ ağırlıklarının kontrole yakın değerlerde olduğu bulunmuştur.

Bununla birlikte epididimis ağırlıkları açısından absolut ve rölatif olarak RJ (Arı sütü 100) grubunda Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak artış olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, arı sütünün tek başına verildiğinde organ ağırlıklarında herhangi bir olumsuz etkiye neden olmadığını ortaya koymaktadır. Kontrol grubuna kıyasla F 50 ve F 100 gruplarında organ ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar bulunmuştur. Organ ağırlıklarındaki azalmalar en çok sadece florür uygulaması yapılan gruplarda ortaya çıkmıştır. Bu sonuç üreme organ ağırlıklarındaki azalmanın florürle olan bağlantısını ortaya koymaktadır. Ayrıca, organ ağırlıklarında en fazla görülen azalmanın F100 grubunda ortaya çıkması florürün doza bağlı olarak etkisini arttırdığını da düşündürmektedir.

Gerek deney sonucu ağırlıkları gerekse üreme organ ağırlıkları sonuçları değerlendirildiğinde, florür toksisitesinin ratlarda günlük besin alımında azalmaya ve/veya dokulardaki hücre sayısının azalmasına yol açtığı fikrini akla getirmektedir. Literatürde de bu fikrimizi destekleyen bazı çalışma sonuçları yer almaktadır. Yapılan bir çalışmada, florür kaynaklı testis bozukluğunda kalsiyum ve vitamin E nin koruyuculuğu araştırılmış, florür verilen ratların prostat, epididim ve testis rölatif (nispi) ağırlıklarında önemli azalmalar olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada Vitamin-E veya kalsiyum +Vitamin-E birlikte uygulamasından sonra nispi ağırlıkların kontrol seviyesine yaklaştığı da bildirilmiştir [314]. Bir başka çalışmada ise erkek farelerin üreme organlarındaki florür kaynaklı biyokimyasal değişiklikler araştırılmış olup bu çalışmada florür uygulaması sonrası canlı vücut ağırlıklarında azalmaların olduğu tespit edilmiştir [315]. Bir diğer çalışmada da Sodyum florür ile muamele edilen sıçanlarda florürden sonra prostat ve seminal veziküllerin nispi ıslak ağırlıklarının azaldığı bulunmuştur [94].

Florür ile arı sütünün birlikte uygulandığı gruplardaki organ ve canlı ağırlıklarının sadece florür uygulanan gruplara göre daha fazla olması arı sütünün florürün oluşturduğu kilo kaybına karşı istatistiksel olarak anlamlı bir önleyici etkisinin olduğunu ortaya koymaktadır. Bu sonuç, arı sütünün besinsel olarak zengin içeriğinin sağladığı yararlı etkiyi gösteren bir veri olarak yorumlanabilir. Nitekim yaptığımız yorumları destekleyici bazı çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Yapılan bir çalışmada kemoterapik bir ajanla tedavi edilen sıçanlarda testis / vücut ağırlığı oranı önemli ölçüde düşük bulunurken, arı sütü uygulamasıyla bu testis / vücut ağırlığı oranının kontrol grubu seviyesine döndürülmesi sağlanmıştır [316]. Başka bir çalışmada ise arı sütü, hidrojen peroksitin neden olduğu testiküler ağırlık azalmasına karşı iyileştirici etkisiyle önemli bir testiküler ağırlık artışı sağlarken, aynı çalışmada epididimis, prostat ve vücut ağırlıklarında ise istatistiksel olarak önemli farklılıkların olmadığı gösterilmiştir [317]. Farklı bir çalışmada ise arı sütünün diyabetin neden olduğu testis ağırlığındaki azalmaları iyileştirdiği gösterilmiştir [36]. Tez çalışmamızda, elde ettiğimiz sonuçlarla uyum gösteren literatürdeki bu çalışmalar bulduğumuz verileri destekler niteliktedir.

Vücut ve üreme organ ağırlıkları üzerine bütün olarak değerlendirme yaptığımızda florürün vücut ağırlığı ve üreme organ ağırlıklarını azaltarak olumsuz yönde etki ettiği ve buna karşın arı sütü uygulamasının florürün bu zararlı etkisine karşı kısmen iyileştirici bir etkisinin olduğunu söyleyebiliriz.

Genel olarak oksidatif stres, potansiyel olarak yıkıcı reaktif oksijen türlerinin üretimiyle vücudun kendi doğal antioksidan savunmasını aştığında ortaya çıkar. Aşırı ROT üretimi, bir lipid peroksidasyon ürünü olan MDA'yı üretmek için hücrel membranların fosfolipid bileşenlerinin peroksidatif parçalanması ve sonuç olarak hücrel hasarın yayılması ile sonuçlanır. Sonuç olarak, lipid peroksidasyonunun belirteci olarak MDA birikir. Serbest radikaller, bir organizmada lipid peroksidasyon sürecini oluşturur. Malondialdehit (MDA), hücrelerde çoklu doymamış yağ asitleri peroksidasyonunun son ürünlerinden biridir. Serbest radikaller seviyelerindeki artış, MDA'nın fazlaca üretimine sebep olur. Malondialdehit düzeyi, hücrel hasarlarda oksidatif stresin ve antioksidan durumun bir belirteci olarak bilinir [318]. Lipid peroksidasyonu, genel olarak, serbest radikaller gibi oksidanların, karbon karbon çift bağları içeren lipidlere, özellikle çoklu doymamış yağ asitlerine (PUFA'lar) saldırdığı bir süreç olarak tanımlanabilir. Son kırk yılda, lipid peroksidasyonu ile ilgili geniş bir literatür, hücre biyolojisi ve insan sağlığındaki önemli rolünü göstermiştir [319]. Testis dokusu ve plazmasında yapılan değerlendirmeler sonucunda elde edilen sonuçlar bulgular kısmında Tablo ve Şekillerde verilmiştir.

Testiküler dokudaki MDA sonuçlarını incelediğimizde RJ (Arı sütü 100) grubuyla kontrol grubu arasında istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Diğer taraftan Florür 50 ve Florür 100 gruplarında Kontrol ve RJ (Arı sütü 100) grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede bir artışın olduğu belirlenmiştir. Kontrol ve RJ (Arı sütü 100) grupları ile karşılaştırıldığında F50 ve F100 gruplarında MDA'nın anlamlı bir şekilde yükselmesiyle florür toksisitesinin ortaya çıktığını ve testis dokusunda lipid peroksidasyonunu indüklediğini söyleyebiliriz. Ayrıca MDA düzeyindeki artışın en yüksek düzeyde Florür 100 grubunda gerçekleşmiş olması, Florürün konsantrasyonu arttıkça etkisinin de arttığının göstergesi olabilir. Tek başına arı sütü uygulanan grup ile kontrol grubunun MDA sonuçları birbirine yakın değerlerde çıktığından arı sütünün oksidatif stres oluşturacak bir etkiyi indüklediğini de düşünebiliriz. Ayrıca, Florür-50 + Arı sütü (100) ve Florür-100 + Arı sütü (100) gruplarındaki sonuçlar incelendiğinde tek başına uygulanan Florür-50 ve Florür-100 gruplarına kıyasla arı sütü ile yapılan kombine uygulamalarda MDA düzeylerinin düştüğü tespit edilmiştir. Bu açıdan arı sütü takviyesinin MDA'yı düşürücü ve iyileştirici bir etki oluşturduğunu söyleyebiliriz.

Testis plazma MDA düzeylerine bakıldığında, Testis dokusunda elde edilen MDA sonuçlarıyla benzer sonuçların ortaya çıktığı bulunmuştur. Testis plazma sıvısından elde edilen sonuçlar incelendiğinde, tek başına uygulanan Florür gruplarında MDA düzeylerinin kontrol ve arı sütü (100) gruplarına göre neredeyse iki katı kadar bir artışın olduğu tespit edilmiştir. Florürle birlikte Arı sütü uygulanan gruplarda ise bu artışın düştüğü belirlenmiştir.

Elde ettiğimiz sonuçları literatürde florürle yapılan bazı çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırdığımızda kendi bulgularımızı doğrulayan sonuçların olduğu görülmüştür. Oksidatif stresin, testis disfonksiyonunda ve ardından erkek kısırlığında yaygın bir faktör olduğu ve florürün oksidatif stres indükleyicisi olduğu *in vivo* ve *in vitro* yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada [320] rat testis dokusunda 90 gün boyunca uygulanan Florürün 1mg'lık en düşük dozunda bile yüksek malondialdehit seviyesine yol açarak oksidatif strese önemli artışlar meydana getirdiği tespit edilmiştir. Araştırmacıların yaptıkları bu çalışmada, kendi tez çalışmamıza kıyasla daha düşük dozda (1mg) ve daha uzun süreli (90gün) bir uygulama yapılmıştır. Tez çalışmamızda da ise daha yüksek dozda ve daha kısa süreli bir uygulama yapılmıştır. Her iki çalışma açısından bakıldığında Florürün MDA seviyesini belirgin bir şekilde artırmış olması Florür maruziyetinin düşük ya da yüksek düzeylerde, kısa veya uzun sürelerde, testiküler dokuda MDA seviyesini artırabileceğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu veriler florür maruziyetinin farklı doz ve sürelerde testis gibi yumuşak dokulara zarar verebileceğini göstermesi açısından değerlidir.

İçme suyunda tek başına 15 mg/L florür uygulaması yapılan farklı bir çalışmada ise, tek başına Florür uygulamasının sıçanların testis ve epididiminde oksidatif stres indekslerinde artışa neden olduğu MDA düzeyleri ölçülerek tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada bir hücre içi β -amino asit olan taurinin florür kaynaklı üreme toksisitesi üzerindeki etkisi araştırılmış olup, taurinin florürün oksidatif etkisini azalttığı bulunmuştur [321]. Bir başka çalışmada [322] ise yalnız başına 20 mg/L verilen florürün kontrol grubuna kıyasla MDA seviyesini %50 daha fazla artırdığı bulunmuştur. Aynı çalışmada E vitaminiyle birlikte Florür uygulaması yapıldığında E vitaminin etkisiyle MDA düzeyinin kontrol grubu seviyesine eşdeğer bir düzeye indiği belirlenmiştir. Ayrıca kalsiyumla kombine verilen florür grubunda da MDA düzeyinin düştüğü görülmüştür. Yine aynı çalışmada en iyi MDA düzeyine ise Kalsiyum-Vitamin E ve Florür üçlü kombinasyon uygulanan grupta olduğu ortaya konmuştur.

Testis dokusunda florürün artırdığı MDA üzerine düşürücü bir etkiye sahip olduğunu gösterdiğimiz arı sütünün bu etkileri testis dokusunda araştırılan önceki çalışmaların bulgularıyla uyumludur. Örneğin yapılan bir çalışmada, kontrol grubuna kıyasla diyabetik ratlarda, MDA'nın anlamlı bir şekilde yükseldiği, Arı sütü uygulamasının diyabetik grupta testis dokusu MDA düzeylerinde kısmi bir düşüşe neden olduğu bildirilmiştir [323].

Bir başka yapılan çalışmada, erkek sıçanlarda kadmiyum kaynaklı kısırlığa karşı arı sütünün koruyucu potansiyeli araştırılmış ve kadmiyumun artırdığı MDA seviyelerinin arı sütü ile düştüğü gösterilmiştir [324]. Bir diğer çalışmada erkek sıçanlarda hidroksiüre kaynaklı kısırlığa karşı arı sütünün etkinliği araştırılmış ve testis dokusunda kontrol grubuna göre hidroksiüre kaynaklı artan MDA düzeylerinin arı sütü uygulamasıyla düşürüldüğü tespit edilmiştir [325].

Testis doku ve plazmasında elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, florürün testis doku ve plazmasında oksidatif stresi indükleyerek MDA düzeyini artırıcı bir etkiye sahip olduğu belirgin bir şekilde ortaya çıkmıştır. Arı Sütünün florürün artırdığı MDA seviyelerini düşürdüğü deney sonucunda saptanmıştır. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz testis doku ve plazma MDA sonuçlarına göre testiküler dokuda, florürün pro-oksidan bir etkiye, arı sütünün ise antioksidatif bir etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz

Glutasyon ve glutasyon ile ilgili enzimler, antioksidan sistemde özel bir konuma sahiptir ve sitotoksik ve kanserojen bileşiklerin yanı sıra reaktif oksijen türlerinin (ROT) metabolizmasında ve detoksifikasyonunda işlev görür. Glutasyon; glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir tripeptittir, γ -L-glutamil-L-sisteinilglisin yapısındadır. Tiyol ile indirgenmiş (redükte) (GSH) ve disülfid ile oksitlenmiş (GSSG) formlarda bulunur [326, 327].

Glutasyonun redükte yapısında olan GSH formu vücuda zarar veren serbest oksijen türlerinin ya da serbest radikallerin etkilerinin yok edilmesinde görev alır. Redükte Glutasyon (GSH) reaktif oksijen türlerine ya da serbest radikallere kendi elektronunu verir ve radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırır. Kendi elektronunu veren GSH okside forma dönüşür. Böylece sağlıklı hücrelerin serbest radikallerin oksitlenmesini engeller ve kendi okside olarak okside Glutasyon (GSSG) haline dönüşür [326,327].

Redükte Glutasyon düzeyi oksidatif stres düzeyinin de bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Hücre ya da dokulardaki toksisiteyi belirlemede önemli bir belirteç olarak kullanılır. Bundan ötürü, tez çalışmamızda florür maruziyetinin testis dokusunda oluşturabileceği oksidatif stres düzeyinin bir göstergesi olan GSH (Redükte Glutasyon) düzeyini tüm gruplarda inceledik.

Elde ettiğimiz sonuçları değerlendirdiğimizde Florür (50 mg/kg) ve Florür (100 mg/kg) gruplarında GSH seviyesinin kontrol grubuna göre oldukça azaldığı tespit edilmiştir. Tek başına uygulanan Arı Sütü (100 mg/kg) grubunda ise istatistiksel açıdan önemli olmasa da kontrol grubuna göre GSH düzeyinin arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, Arı Sütünün florür ile beraber uygulanmasıyla sadece florür uygulanan gruplara göre GSH düzeyinin anlamlı derecede arttığı tespit edilmiştir. Tüm gruplardaki GSH sonuçları değerlendirildiğinde kontrol grubuna kıyasla ister tek uygulansın ister arı sütü ile uygulansın florür maruziyetinin testis dokusundaki GSH düzeyini azalttığı bulunmuştur. Ayrıca, en yüksek florür dozunda en düşük GSH seviyesi belirlenmiştir. Bu durum artan doza bağlı olarak florürün etkisinin arttığını göstermiştir.

Florürün MDA düzeyini artırması ve GSH düzeyini azaltmasıyla etkili bir oksidatif stres indükleyicisi olduğu fikri iyice güçlenmiştir. Literatürdeki bulgular da florür toksisitesinde serbest radikallerin oluştuğuna dair fikrimizi desteklemektedir. Florür toksisitesiyle GSH düzeylerinin azalttığını gösteren çalışmalar mevcuttur [28].

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde çalışmamızı destekler nitelikte sonuçlar içeren çalışmaların olduğu da görülmektedir. Yapılan bir çalışmada testis dokusunda düşük ve yüksek olan florür uygulamalarının GSH düzeylerini anlamlı bir şekilde azalttığı bulunmuştur [328]. Farklı bir çalışmada da böbrek, karaciğer, beyin gibi çeşitli kan ve serum örneklerinde florürün GSH düzeylerini azalttığı ortaya konmuştur [329]. Diğer bir çalışmada (100 mg florür) sodyum florür uygulanmasının GSH seviyesini önemli ölçüde azalttığı ortaya konmuştur [330]. Literatürde Florürün glutatyon seviyelerini değiştirdiğini ve bu değişimin aşırı reaktif oksijen türleri (ROT) üretimine neden olan hücresel bileşenlerin zarar görmesine yol açan bir etkiyle sonuçlandığını gösteren çalışmalarda mevcuttur [331-333]. Tez çalışmamızdaki florürün GSH değerlerine olan etkisi literatürdeki bu çalışmaların sonuçlarıyla uyumluluk göstermektedir.

Arı sütü uygulamasının, florüre karşı koruyucu aktiviteye sahip olduğu GSH düzeyi sonuçlarıyla da ortaya konulmuştur. Arı sütünün florürün oluşturduğu güçlü negatif etkiye karşı gösterdiği aktivite oldukça iyi seviyede tespit edilmiştir. Arı sütü takviyesi ile kontrol seviyelerine yaklaşan GSH artışı sağlanmıştır. Bu açıdan arı sütünün, enzimatik olmayan antioksidan GSH düzeyini artırarak florürü indüklediğini düşündüğümüz serbest radikallerin oksitlenmesini kısmen engellemiş olabileceğini söyleyebiliriz. Bu sonuçlar, arı sütünün redükte glutatyon (GSH) düzeyini artıran etkili bir antioksidan aktiviteye sahip olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir. Elde ettiğimiz sonuçlar, literatürde arı sütünün GSH düzeyini artırdığını gösteren çalışmalarla uyum göstermektedir. Arı sütünün antioksidan aktivitesi, çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde araştırılmıştır. Yapılan bir çalışmada arı sütü beslenmesinin, hamsterların testis dokusunda lipid peroksidaz (LPO) konsantrasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiği, organları serbest radikal kaynaklı hücresel hasardan koruduğu, serbest radikal temizleme işlevi nedeniyle, RJ antioksidan görevi gördüğü bildirilmiştir [334]. Farklı bir çalışmada, arı sütü uygulamasının farelerde kadmiyum kaynaklı genotoksisite ve oksidatif strese karşı glutatyon (GSH) düzeylerini artırarak iyileştirme sağladığı gösterilmiştir [335]. Bir diğer çalışmada, üç hafta boyunca kontamine fumonisin (FB) (200 mg/kg) ve RJ (150 mg/kg) ile beslenen Sprague-Dawley sıçanlarda Arı sütü, glutatyon peroksidaz oluşumunu artırarak ve lipid peroksidasyonunun ve serbest radikal oluşumunun etkilerini azaltarak fumonisinin yan etkilerini azalttığı bildirilmiştir [336]. Sisplatin ve karbon tetraklorüre maruz bırakılan sıçanlarda arı sütü uygulaması yapılan bir çalışmada da arı sütünün MDA üretimini azaltarak ve redükte glutatyon ve hücresel antioksidan enzimlerin konsantrasyonunu artırarak karaciğer ve böbrek dokularındaki oksidatif strese karşı direnç gösterildiği bildirilmiştir [337].

Serbest radikallere karşı arı sütünün etkinliğinin ortaya çıkmasında, arı sütünün yapısında yer alan 2-4 parçalı güçlü antioksidan peptitlerin (Ala-Lys, Phe-Arg, Ile Arg, Lys-Phe, Lys-Leu, Lys -Tyr, Arg-Tyr, Tyr-Asp, Tyr-Tyr, Leu-Asn-Arg ve Lys-Asn-Tyr-Pro) ve üç dipeptitin (Lys-Tyr, Arg-Tyr ve Tyr-Tyr) rol oynadığını bildiren bir çalışmada arı sütünün doğal bir bileşik olarak antioksidan bir besin takviyesi olduğu gösterilmiştir [338].

Testis dokusu GSH bulgularımız değerlendirildiğinde, Florürün GSH seviyelerini düşürdüğü, arı sütünün ise redükte glutatyon (GSH) oluşumunu iyileştirerek, florürün zararlı etkisini hafiflettiğini net olarak ifade edebiliriz.

Katalaz (CAT) enzimi hücrel dokuyu serbest radikallerden koruyan antioksidan bir enzim türüdür. Hastalıklara yol açan serbest radikallerin zararlı etkilerinin azaltılmasında önemli bir rol oynar. Özellikle zararlı serbest radikallerin oluşturduğu hidrojen peroksidin su ve oksijene parçalanmasında görev alır. Böylece hidrojen peroksit birikimini önleyerek doku ve organları serbest radikallerden korur [339].

Tez çalışmamızda, testis dokusunda oksidatif stres biyoindikatörleri olarak da gösterilen GSH ve MDA düzeylerini belirlerken aynı zamanda antioksidan enzimlerden biri olan katalaz (CAT) aktivitesini de araştırdık. Böylece, florüre maruz kalmanın ratların testis dokusunda antioksidan enzim düzeylerine olan etkisini katalaz aktivitesi ile belirlemeye çalıştık. Çalışma sonucunda florür maruziyetinin, katalaz aktivite düzeyini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı tespit edilmiştir. Özellikle sadece florür uygulanan F50 ve F100 gruplarındaki düşüşler kontrol grubuna kıyasla neredeyse yarı yarıya olacak şekilde belirlenmiştir. Bu durum, florür maruziyetinin oluşturduğu toksisitesinin çok etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürdeki çalışmaların bazılarında florürün, katalaz gibi antioksidan enzimlerin aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda florür ile indüklenen oksidatif stres ve testis disfonksiyonu üzerine melatoninin koruyucu etkisi araştırılmış olup uygulanan florürün testis katalaz aktivite değerlerini kontrole göre azalttığı, bu azalmanın doza bağlı olarak da yüksek bulunduğu bildirilmiştir Ayrıca bu çalışmada florürün GSH düzeyini artırdığı da gösterilmiştir [324]. Bir diğer çalışmada, kitosan ve kitosan oligosakkaridin erkek sıçanlarda sodyum florür kaynaklı testis hasarı üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmış olup, NaF grubunda GSH düzeyi ve katalaz aktivitesi önemli derecede azalırken, MDA önemli biçimde arttığı bildirilmiştir [340]. Testis dokusunda yapılan bu çalışmalar ile kendi çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar birbirlerini doğrular veya destekler niteliktedir. Florürün farklı dokularda da CAT seviyelerini azalttığını gösteren sonuçlar literatürde yer almaktadır [341-348].

Katalaz aktivitesi ölçümlerinde elde ettiğimiz sonuçları arı sütü açısından değerlendirdiğimizde ise arı sütü verilen grupta kontrol grubuyla yakın değerlerde CAT aktivitesi belirlenmiştir. Bu durum, sağlıklı bir yapıda arı sütü takviyesinin güvenilir bir besin takviyesi olabileceğinin bir göstergesi olarak da düşünülebilir.

Ayrıca arı sütü ve florürün birlikte verildiği gruplardaki katalaz artışına bağlı olarak arı sütünün, CAT aktivitesini artırma yoluyla dokuyu florür toksisitesinin oluşturduğu etkiye karşı koruduğunu söyleyebiliriz. Literatürdeki önceki çalışmalar da arı sütünün katalaz aktivitesini artırıcı etkisi olduğunu doğrulamışlardır. Yapılan bir çalışmada testiküler dokuda nikotin azalttığı katalaz seviyelerini arı sütü uygulamasının kayda değer bir şekilde artırdığı bulunmuştur [349].

Bir başka çalışmada ise kemoterapik bir ilaca karşı testiküler dokuda uygulanan arı sütünün CAT seviyesini artırarak kemoprotektif bir etkisinin olduğu ortaya konulmuştur [325]. Farklı bir çalışmada ise androjenik bir steroid olan Oxymetholone uygulaması sonucu rat testis dokularında CAT aktivitesinde azalma ve lipid peroksidasyonda artma tespit edilmiştir. Bu çalışmada arı sütünün uygulanması ile CAT aktivitesinin normale yakın seviyesine geri döndüğü bulunmuştur [350]. Tüm bu literatürdeki çalışmalar ve tez çalışmamızda bulduğumuz veriler ışığında arı sütünün yumuşak bir doku olan testis dokusunda antioksidatif bir etkisinin olduğu bunu da antioksidan bir enzim olan katalaz aktivitesini artırarak yaptığını söyleyebiliriz.

Bütün olarak GSH, MDA ve CAT sonuçlarını bir arada değerlendirdiğimizde, testislerde florür kaynaklı serbest radikal oluşumunun indüklendiğini, bu durumun üstesinden gelmek için arı sütü uygulamasının iyileştirici bir besin takviyesi olarak fayda sağlayacağını ileri sürebiliriz.

Tez çalışmamızda florür ve arı sütü uygulamalarının spermatojenik özelliklerine olan etkilerini de araştırdık. Spermatojenik özellikler açısından sperm motilitesi (hareketlilik), toplam abnormal sperm oranı, sperm kuyruk ve baş anomali düzeyleri, epididimal sperm yoğunluğu parametrelerini inceledik.

Elde ettiğimiz sonuçlara göre; sperm motilitesi açısından florür gruplarında (Florür 50 mg/kg ve 100 mg/kg) kontrol gruplarına kıyasla sperm motilitelerinde istatistiksel açıdan önemli derecede azalma olduğunu tespit ettik. Erkek infertilitesinde önemli bir etken olan sperm hareketliliğindeki azalma florür uygulanan gruplarda belirgin bir şekilde ortaya çıktı. Florürün sperm hareketliliği üzerine olumsuz etkisi oldukça önemlidir. Florürün sperm hareketliliğinde azalmaya yol açması florürün erkek infertilitesine sebep olabilecek bir faktör olarak değerlendirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Sperm motilitesi açısından bakıldığında arı sütü uygulamasının oldukça etkili bir şekilde fayda sağladığını görmekteyiz. Tek başına florür uygulanan gruplarda (Florür 50 mg/kg ve 100 mg/kg) motilite belirgin bir şekilde azalırken, arı sütü ile birlikte florür uygulanan gruplarda bu negatif etkinin önemli bir şekilde iyileştiği tespit edildi. Arı sütü eklenmiş florür gruplarında motilite seviyeleri artarak kontrole yakın seviyelere kadar iyileşme gösterdiği bulundu. Özellikle florürün tek başına uygulanan dozlarındaki yıkıcı etkisinin bu şekilde iyileştirici bir etkiyle düzelebilmesi, arı sütünün sperm hareketliliği üzerine, florür maruziyetine karşı oldukça iyileştirici bir aktiviteye sahip olduğunu net bir şekilde ortaya koymuştur.

Tek başına arı sütünün uygulamasının da sperm motilitelerine karşı herhangi bir zararlı etkiye sahip olmadığı da gösterilmiştir. Elde edilen tüm bu veriler değerlendirildiğinde arı sütü alımının sağlıklı bireylerde ya da sperm motilitesi yönünden zarar görmüş bireyler için iyileştirici bir besin takviyesi olarak fayda sağlayabileceği fikrini ileri sürebiliriz.

Sperm anomali düzeylerinde elde ettiğimiz bulgular oldukça dikkat çekicidir. Tek başına florür dozları uygulanan gruplarda, florürün en çok kuyruk anomalisine yol açtığını belirledik. Ayrıca, florürün spermelerde kuyruk dışında baş anomalisine sebebiyet verme düzeyinin de istatistiksel olarak önemli seviyede olduğunu tespit ettik. Gerek baş gerekse kuyruk anomalisi şeklinde kendini gösteren anormal morfolojik yapıdaki toplam sperm miktarının özellikle sadece florür uygulanan gruplarda kontrole kıyasla istatistiksel açıdan önemli derecede arttığını belirledik. Özellikle anomali gösteren spermelerin, döllenme başarısızlığına ya da embriyonel gelişim evresinde defektlere neden olabileceği göz önünde tutulursa, florürün erkek infertilitesinde önemli bir rol oynayabileceğini söyleyebiliriz. Diğer taraftan arı sütü ile kombine verilen florür gruplarında bu hasarın önemli ölçüde giderilmiş olması bu etkinin arı sütü uygulamasıyla iyileştirilebileceğini göstermiştir. Bu sonuç arı sütünün koruyucu (proflaktik) bir rol oynayabileceğini göstermiştir. Proflaktif tedavide proflaktik doz oldukça önemlidir. Bu açıdan arı sütü ile ilgili olarak doza yönelik çalışmaların daha fazla yapılmasını önermekteyiz.

Sperm densusitesi özellikle epididimisteki sperm yoğunluğu ile oluşan ya da var olan sperm miktarını işaret eder. Elde ettiğimiz verileri incelediğimizde sadece florür verilen gruplarda florürün sperm miktarında düşüşe neden olduğunu belirledik. Bu düşüş kontrol grubuna kıyasla yüzde 50 oranından daha fazla bir kayıba karşılık gelmektedir. Bu açıdan florür toksisitesinin sperm miktarına oldukça zarar verdiğini söyleyebiliriz. Tek başına arı sütü uygulamasının istatistiksel olarak önemli olmasa da kontrol grubuna kıyasla sperm miktarlarında artışa neden olduğu söylenebilir. Bu açıdan arı sütünün sperm üretimine katkı sunduğunu söyleyebiliriz. Bu sonuç oldukça önemlidir çünkü erkek infertilitesinde görülen yetersiz sperm miktarı problemine karşı arı sütünün tedaviye alternatif doğal besin takviyesi olarak kullanılabileceğinin bir göstergesidir. Ayrıca, florür ile birlikte arı sütü uygulanan gruplarda tek başına florür verilen gruplara kıyasla bir iyileşme olduğu gözlenmiştir. Arı sütüyle beraber uygulanan florür gruplarında iyileşme sağlanmasına karşın kontrol gruplarına kıyasla bu iyileşmenin düşük kaldığı görülmüştür. Ancak bu fayda düşük olarak nitelendirilemez çünkü istatistiksel açıdan önem arz etmektedir. Ayrıca florürün güçlü toksisitesi sperm miktarlarını oldukça düşürmüştür. Ek olarak, arı sütü doz miktarının artırılmasıyla bu faydanın da artabileceği düşünülebilir. Sperm miktarındaki bu grupsal farklılıklar kendini epididimis organ ağırlıklarında da belirgin bir şekilde göstermiştir.

Sperm miktarının düşük kaldığı florür gruplarında epididimal organ ağırlıklarının da düşük kaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, epididimal organ ağırlığının sperm miktarlarına bağlı olarak değiştiği fikrini akla getirmektedir. Sperm miktarı az olan grupların epididimal organ ağırlıklarının da düşük kalması bu fikri destekler niteliktedir.

Literatürde *in vitro* ve insan araştırmalarıyla tutarlı olarak, hayvanlar üzerinde yapılan 60'tan fazla çalışma (sıçanlar, fareler, horozlar ve tavşanlar dahil) florürün erkek üreme sistemini olumsuz yönde etkilediğini bulmuştur [351]. Bu çalışmalarda, testosteron seviyelerinde azalma; sperm motilitesinde azalma, sperm morfolojisinde değişiklik; sperm miktarında azalma, oksidatif strese artış ve üreme kapasitesinde azalma gibi etkiler bulunmuştur. Yapılan bu 60'tan fazla çalışma incelendiğinde, çalışmaların çoğunda farklı dozlarda florür uygulamalarının yapıldığı görülmektedir. Çok düşük dozlarda dahi florür uygulamalarının toksisitesini gösteren çalışmalara rastlanmaktadır [351].

Literatürdeki çalışmalardan bazıları incelendiğinde, yapılan bir çalışmada, farelere, 0, 1, 10 ve 100ppm konsantrasyonlarında florür 3 ay boyunca uygulanmış ve 10 ve 100 ppm florür konsantrasyonları için, sperm başı tirozin fosforilasyonu ve aktin polimerizasyonunun azalması sonucu, spermatogenez anormallikleri ve ortaya koyulmuştur [352]. Bir başka çalışmada ise, 49 gün boyunca 70 ve 150 mg/l NaF'ye maruz kalmanın, farelerden alınan spermelerde CatSper1'i içeren Ca²⁺ sinyal yolunun değiştirilmesi yoluyla düşük hiperaktivasyon ile sonuçlanabileceğini göstermiştir [353]. Spermelerde düşük hiperaktivasyon başarısız döllenmelere yol açar. Araştırmacıların yaptığı farklı bir çalışmada ise, 120 gün boyunca sırasıyla 0, 50, 100 ve 150 mg/L sodyum florür içeren su ile beslenen farelerde, spermatositlerin sitoplazma ve çekirdeklerinden vakuollü değişiklikler bulunmuştur ayrıca hücrel mikronükleus frekansı daha yüksek olduğu ve deforme olmuş spermeler de tespit edilmiştir [354]. Diğer bir çalışmada ise, Meksikalı araştırmacılardan oluşan bir ekip, sekiz hafta boyunca 0.2 ila 0.26 ppm kan florür seviyelerinin oksidatif stresin artmasına, sperm motilitesinde azalmaya ve erkek sıçanlarda doğurganlığın azalmasına neden olduğunu bulmuştur [355]. Yapılan bir çalışmada, florürle tedavi edilen sıçanlardan alınan spermatozoa SOD aktivitesinde önemli bir düşüş buna karşın reaktif oksijen türlerinin oluşumunda önemli bir artış olduğu, kontrol grubundaki spermatozoaya göre lipid peroksidasyon konsantrasyonunda ise önemli bir artış olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma sonucunda florürün spermelerde oksidatif stresi indüklediği ortaya konulmuştur [356].

Diğer bir çalışmada ise gebelik ve emzirme döneminde NaF'ye maruz kalmanın, spermatogenezi ve steroidogenezi azaltarak yetişkin sıçanlarda erkek üremeyi etkilediğini göstermiştir. Yapılan bu çalışmada, florür gebelik ve emzirme boyunca dişi sıçanlara içme suyu yoluyla 4.5 ve 9.0 ppm dozlarında verilmiştir. Yeni doğanlara 90 güne kadar musluk suyu verilerek büyümesine izin verilmiş ve ardından sperm parametreleri, testis steroidojenik belirteç enzim aktivite seviyeleri ve dolaşım hormonu seviyeleri incelenmiştir. Bu grupta yer alan sıçanlardaki sperm sayısı, sperm motilitesi ve sperm canlılığı kontrollerle karşılaştırıldığında azalmanın olduğu bulunmuştur [357].

Araştırmacıların yaptığı bir diğer çalışmada ise, olgun erkek Wistar sıçanları, 6 ay boyunca içme suyunda 2, 4 ve 6 ppm sodyum florüre maruz bırakıldı. Kauda epididiminde Sperm motilitesi ve yoğunluğu değerlendirildi. Florür uygulamasının testis, epididim ve ventral prostat ağırlığında önemli bir azalmaya neden olduğu, sperm hareketliliği ve yoğunluğu önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda, erkek sıçanlara 6 ay boyunca 2, 4 ve 6 ppm konsantrasyonlarında içme suyuna uygulanan sodyum florür, doğurganlıklarını ve üreme sistemlerini olumsuz yönde etkilediği ortaya konulmuştur [307]. Aşırı florürün, spermatojenik hücreli apoptoz için önemli bir faktör olan serum estradiol seviyesine zarar verebileceği başka bir çalışmada da gösterilmiştir [358]. Literatürdeki bir diğer çalışmada ise, erkek sıçanlara 10 hafta boyunca sodyum florür içme suyu (150 mg/L) ile verilmiştir. Sperm sayısı ve sperm hareketliliği araştırılmıştır. Kontrol sıçanlarının aksine, sperm sayısı, sperm hareketliliği oranının florür gruplarında florür tarafından düşürüldüğü tespit edilmiştir. Sonuç olarak, yüksek doz florüre uzun süre maruz kalmanın erkek üreme sistemi üzerinde toksik etki yaratabildiği ortaya konmuştur [359].

Çalışmamızın amacına benzer olarak yapılan bir çalışmada; Sodyum florür ile beslenen farelerde sperm sayısında, motilitede, progresif motilitede ve epididimal ağırlıkta kontrole kıyasla anlamlı azalma görüldüğü tespit edilmiştir. Ayrıca, D vitamini takviyesi ile sperm sayısında, motilitede ve progresif motilitede anlamlı bir iyileşme olduğu, E vitamini takviyesinin de sperm sayısında normale yakın anlamlı bir iyileşme sağladığı bulunmuştur [360]. Yaptığımız çalışmada florür gruplarının sperm parametrelerine olan etkileri, literatürdeki bu çalışmadaki sonuçları doğrulayıcı veya destekleyici niteliktedir. Ayrıca doğal bir ürün olarak destekleyici takviye olarak kullandığımız arı sütünün D ve E vitaminine göre daha etkili olduğunu literatürdeki çalışmayı kıyaslayarak söyleyebiliriz. Yapılan çalışmada D ve E vitamininin iyileşme sağlamasına karşın motilite ve densitide kontrole göre düşük kaldığı görülürken kendi çalışmamızda arı sütü takviyesinin florür uygulamasına karşı iyileşme sağlamasının dışında tek başına uygulandığında bile kontrole kıyasla daha artırıcı bir etkisinin olduğunu görmekteyiz.

Çalışmamıza benzer amaçla yapılan bir başka çalışmada ise, florürle muamele edilmiş sıçanlardan alınan spermatozoa, reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumunda önemli bir artış sergilenmiştir. Bu sonuçlar, florürün subkronik maruziyetin neden olduğu oksidatif stres hasarın oluşturduğunu göstermektedir [355]. ROT oluşumundaki artışın, NADPH oksidaz aktivitesinin bir inhibitörü olan difenilen iyodonyum tarafından önemli ölçüde azaltıldığı tespit edilmiştir. Buna karşılık, florür ile birlikte alfa-tokoferole maruz bırakılan sıçanların spermalarında ROT oluşumunda azalma, SOD aktivitesinde artış ve TBARS oluşum sürecinin önlenmesi gözlenmiştir. Alfa-tokoferol tedavisi, florür ile tedavi edilen sıçanların spermalarında gözlenen IVF yetersizliğini önlediği tespit edilmiştir. Bu çalışmada, florürün döllenme başarısızlığına neden olabilecek olumsuz etkisine karşı alfa tokoferolün iyileştirici bir etkisinin olabileceği ortaya konmuştur [356].

Yapılan bir diğer çalışmada ise sağlıklı, yetişkin erkek sıçanlara, 60 gün boyunca florürlü su verilmiştir (F.su. +5.8 ppm). Buna karşın F.su. + askorbik asit, F.su. + vitaminler (C, D) ve Ca^{+2} ile tedavi edilmiştir. Sıçanlara 60 gün boyunca florürlü verilmesi ile kontrol değerlerine kıyasla seminal vezikül ağırlığı, sperm motilitesi ve kauda epididim ve testis sperm yoğunluğunda önemli bir azalmanın olduğu bulunmuştur. 60 gün boyunca askorbik asit ve C vitamini, D vitamini ve kalsiyumun florürlü su ile ekzojen beslenmesi, dolaşımdaki testosteron seviyesi, kan fizyolojisi, sperm fonksiyonu ve doğurganlık dahil olmak üzere incelenen tüm değiştirilmiş parametrelerde iyileşmeye neden olduğu tespit edilmiştir. Veriler, askorbik asit ve C vitamini, D vitamini ve Ca^{+2} tedavisinin florür toksisitesinde normal fizyolojiyi sürdürmek için etkili olduğunu göstermektedir [361]. Bir başka çalışmada da kronik florozis testis hasarına neden olduğu ve taurin-çinko takviyesinin sıçanlarda iyileştirici etki sunduğu bulunmuştur [362]. Literatürde kullanılan takviye edici maddelerin (askorbik asit, C vit, D vit, E vit. Çinko) sonuçlarını incelediğimizde çalışmamızda kullandığımız arı sütünün infertilitede medikal tedavilerde takviye tedavi olarak kullanımda yer alan besin takviyeleri kadar öneme sahip olması gerektiğini ileri sürebiliriz.

Literatürde arı sütünün farklı etken maddelerinin sperm üzerine olan olumsuz etkilerine karşı kısmen düzelmeyi sağladığını bildiren çeşitli çalışmalar vardır. Yapılan bir çalışmada kan hastalığı türü olan aplastik anemi tedavisinde de kullanılan sentetik bir androjen olan oxymetholone'nun kontrol grubuyla kıyaslandığında sperm sayısı ve motilitesinde anlamlı bir azalmaya yol açtığı, anomalili sperm miktarında ise artışlara neden olduğu bildirilmiştir. Oxymetholone'nun tüm parametrelerde oluşturduğu bu hasarların arı sütü uygulamasıyla kısmen düzeldiği yapılan bu çalışmada bildirilmiştir [350]. Farklı bir çalışmada ise sperm parametrelerinden olan sperm hareketliliği ve canlılığını düşüren ayrıca DNA hasarı olan sperm sayısını arttıran nikotine karşı arı sütü uygulamasının bu olumsuz durumlara karşı koruyucu bir etkisinin olduğu gösterilmiştir [349].

Farklı bir çalışmada ise bir antineoplastik sınıfından olan ve çeşitli malignite türlerinin tedavisinde kullanılan hidroksiürea ile tedavi edilen sıçanlarda görülen sperm kalite bozukluklarının arı sütü uygulamasıyla başarılı bir şekilde iyileştirildiği ve bu ilaç türünün neden olduğu erkek kısırlığını iyileştirmek için kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır [325].

Streptozotosin (STZ) ile indüklenen diyabetik sıçanlarda, Streptozotosin' in sperm sayısı, hareketliliği, canlılığı ve testis ağırlığını azalttığı görülürken, arı sütü ile tedavi edilen diyabetik sıçanlarda testis ağırlığı, sperm sayısı, hareketliliği, canlılığı gibi parametrelerin iyileştiği ve testis dokusuna ait MDA seviyelerinin ise azaldığı gösterilmiştir [112]. Farklı bir çalışmada da bleomycin ile indüklenen erkek sıçanlarda arı sütünün bleomycin kaynaklı sperm parametrelerindeki olumsuz etkileri düzelttiği bildirilmiştir [363].

Yapılan farklı çalışmalarda da birçok materyalde bulunabilen nano gümüş parçacıklarının kemoterapik bir ilacın (6-merkeptopurin) sisplatinin sperm parametrelerine olan olumsuz etkilerini arı sütü ile düzeltebileceği gösterilmiştir [364].

Kısırlığa neden olan sebeplerin başında yer alan varikosel hastalığında varikoselin neden olduğu olumsuz üreme parametrelerine karşı arı sütünün faydalı olduğu da yapılan deneysel sıçan (rat) çalışmasında ortaya konmuştur [365].

TUNEL metodu, hücrelerde meydana gelen apoptozis oranlarını belirlemede standart metotlar arasında yer alır. Parafin bloklar, dondurulmuş halde bulunan kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki ya da "plate"lere ekilmiş veya lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerdeki apoptozis bu yöntemle belirlenebilir. Çalışmamız sonucunda testis dokusunda TUNEL metodu kullanılarak apoptozis düzeyleri ve doku hasarları incelenmiştir [297, 298]. Tez çalışmamızdaki TUNEL metodu sonuçlarına ait görüntüler Şekil 5.30-5.35.' de sunulmuştur.

TUNEL boyama analizinde Harris hematoksilen ile boyanan hücre çekirdekleri normal, kahverengi nükleer boyanma gösterenler apoptotik olarak değerlendirildi. Histolojik görüntülerde hücrelerde belirtilen siyah ok TUNEL pozitifliği diğer bir ifadeyle dokudaki hücre hasarını ifade eder. Histolojik bulgulara ait görüntüler incelendiği zaman testiküler germ hücre apoptozları ve seminifer tübül epitelinde atrofi açısından sadece florür uygulanan F50 ve F100 dozlarında TUNEL pozitif hücrelerde belirgin artışlar gözlenmiştir. F50 ve F100 gruplarıyla beraber Arı sütü uygulamasının, bu gruplarda görülen hücre ve tübül dejenerasyonlarını azalttığı belirlenmiştir. TUNEL metoduyla belirlenen apoptotik indeks sonuçlarına göre; Testis dokusunda apoptotik indeks değeri en fazla F 50 ve F 100 gruplarında belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; apoptotik indeks değerinde RJ (Arı sütü 100 mg/kg) verilen grupta benzer değerde olduğu, florürlü gruplara göre ise daha düşük bir seviyede olduğu tespit edilmiştir. RJ (Arı sütü) + F (Florür) gruplarında, tek başına florür uygulanan gruplarla (F 50 ve F 100) kıyaslandığında apoptotik indeksin azalma göstererek bir iyileşme sağladığı tespit edilmiştir.

Hematoksilen & eozin ile boyama yapılarak ışık mikroskopi altında testis dokusunun histolojik incelenmesi sonucunda; Kontrol grubuna kıyasla Florür 50mg/kg ve Florür 100 mg/kg gruplarının testis dokularında belirgin vakualizasyon ve germ hücre dökülmesi izlenmiştir. Bununla birlikte RJ (Arı sütü) + F (Florür) grupları tek başına florür uygulanan gruplarla (F 50 ve F 100) kıyaslandığında, RJ (Arı sütü) + F (Florür) gruplarında germ hücre dökülmesinin gerilediği fakat vakualizasyonun devam ettiği izlenmiştir.

Gerek TUNEL yöntemi gerekse mikroskopik görüntülemelerle yapılan histolojik değerlendirmeler sonucunda florürün testis dokusunda hasar oluşturduğu net bir şekilde ortaya konulmuştur. Ek olarak, arı sütünün florür kaynaklı testis hasarına karşı koruma ve iyileştirme sağladığı da tespit edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda da florürün testis toksisitesi meydana getirdiği histolojik bulgularla bildirilmiştir. Farklı şiddette ortaya çıkan etkilerin florür uygulama dozu, süre ve incelenen doku farklılığına bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Genel olarak literatürdeki sonuçlar çalışmamızdaki bulgularla uyumludur. Kronik olarak florüre maruz kalmanın ratlarda spermatogenezis ve testisin histopatolojisine olumsuz etkilerinin gösterildiği bir çalışmada kronik flor toksikasyonunun ratların testislerinin tubulus duvarında incelmeye, atrofi ve intertubuler aralıklarda ödem oluşturduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, spermatosit ve spermatozoa sayısında azalma görülmüştür [366].

Bir diğer çalışmada, kitosan ve kitosan oligosakkaridin erkek sıçanlarda sodyum florür kaynaklı testis hasarı üzerindeki koruyucu etkileri araştırılmış ve verilen dozdaki NaF'nin toplam testis hacmi, toplam germinal epitel hacmi, toplam seminifer tubul hacmi, seminifer tubullerin toplam uzunluğu ve germinal epitel yüksekliğini kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaltarak testis hasarına neden olabileceği bildirilmiştir [340]. Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda florür kaynaklı testis toksisitesi araştırılmış olup araştırma sonucunda florürün doza bağlı olarak ciddi ultrastrüktürel anormallikler dahil olmak üzere belirgin histopatolojik lezyonlarla yol açtığı bildirilmiştir [367]. Bir başka çalışmada araştırmacılar, testislerde dilate seminifer tübülleri gözlemlemişler ve florür kaynaklı bu testis histolojik hasarının oksidatif stres ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir [368]. Kendi çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar, florürün oksidatif stres oluşturduğunu ve testis dokusunda hasar meydana getirdiğini ortaya koymuştur dolayısıyla tez sonuçlarımız, araştırmacıların kurduğu bu bağlantıyı destekler niteliktedir. Ayrıca, çalışmamızda florürün sperm parametreleri üzerine olan olumsuz etkileri gösterilmiş olup bu etkilerin, florürün testiküler dokuda oluşturduğu hasarla bağlantılı olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte, florürün sperm ve testis dokusunda oluşturduğu hasarın altında yatan moleküler mekanizmaların tam olarak anlaşılabilmesi için bu konuda çok daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır. Literatürde arı sütünün oluşturulan testiküler hasarlarda, oluşan hasara karşı iyileştirici olduğunu gösteren çalışmalar da yer almaktadır. Arı sütünün diyabetik sıçanların testislerindeki histopatolojik değişiklikler üzerine antioksidan ve koruyucu etkileri üzerine yapılan

bir araştırmada, RJ, muhtemelen antioksidan özelliği sayesinde testiste diyabet kaynaklı bozulmayı iyileştirdiği bildirilmiştir [323]. Yapılan bir çalışmada arı sütü diyetinin hamsterlerin testis fonksiyonlarına etkisi araştırılmış ve arı sütü uygulamasının testiküler disfonksiyonlarını azalttığı bildirilmiştir [369]. Farklı bir çalışmada, Ofloksasin uygulanan sıçanda arı sütünün histomorfolojik, oksidatif üzerine koruyucu etkileri incelenmiş ve arı sütünün, ofloksasin ile muamele edilen erkek sıçanların üreme fonksiyonu üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu histomorfolojik olarak gösterilmiştir [370]. Arı sütü uygulamasıyla yapılan birçok farklı çalışmalarda, RJ'nin diabetes mellitus sıçanlarına uygulanması ile böbrek histopatolojilerini iyileştirdiği, fumonisinin karaciğerdeki hasarına karşı arı sütünün iyileştirici etkisinin olduğu, yine arı sütü uygulamasının sisplatinin neden olduğu hepatik toksisiteye karşı potansiyel önleyici ajan olabileceği bulunmuştur [38, 128, 371, 372]. Bununla birlikte arı sütü tedavisi ile paklitaksel maddesinin neden olduğu histopatolojik ve biyokimyasal değişikliklerin korunabileceğini gösterilmiştir [373]. Arı sütünün kronik lambda-sihalotrin toksisitesi üzerindeki koruyucu etkisi ve yine testis, prostat ve epididimal hasarlarda arı sütünün tedavi edici etkileri histopatolojik değerlendirmelerle gösterilmiştir [374].

Sonuç olarak, florürlü gruplarda sperm parametrelerinden motilitede azalmalar, anomalilerde artmalar, yoğunlukta azalmalar, testis dokusunda hasarlar tespit edilmiştir. Tespit edilen bu sonuçların her biri erkek infertilitesinde, infertiliteye yol açan faktörler olarak tanımlanmaktadır. Bu durum florürün doza bağlı olarak erkek infertilitesine yol açabilecek toksisiteye sahip olduğunun bir göstergesidir. Arı sütü ise bu olumsuz etkileri kontrole yakın seviyelere ulaştırabilme potansiyeline sahip bir besin takviyesi olarak etki göstermiştir. Florürün sperm üzerine toksisitesi ve bu toksisitenin de arı sütü tarafından iyileştirilebilir olması elde edilen önemli sonuçlardır. Bu açıdan florürün sperme etki mekanizması hangi yollar üzerinden gerçekleştiği, arı sütünün bu etkilere nasıl bir cevap oluşturduğu gibi konuların daha detaylı araştırılmasına ihtiyaç vardır. Elde ettiğimiz sonuçlar, florür toksisitesinin irreversible olmadığını ve arı sütünün içeriği yönüyle de bu toksisiteye karşı iyileştirme ve koruma sağlamanın ortaya konması açısından oldukça önemlidir.

Bcl-2 protein ekspresyon düzeyleri verileri (%) incelendiğinde F50 ve F100 gruplarında bu değerlerin oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Sadece florür uygulanan gruplarda bu değer, Kontrol ve sadece arı sütü uygulanan gruplara kıyasla üç katından fazla çıkmıştır. Bcl-2 antiapoptatik proteinlerden olup yüksek salınımı, istenmeyen hastalık ya da hasar durumlarının göstergesi olarak kabul edilir. Dolayısıyla Bcl-2 ekspresyonunun artışı florürün toksisitesinin önemini ve güçlü etkisini göstermektedir. Arı sütünün tek başına kullanımı ile bu salınım kontrole kıyasla düşmesi arı sütünün antioksidan gücünü bir kez daha ortaya koymuştur. Ek olarak, florürün Bcl-2 protein salınımını indükleyici etkisinin fazla olmasına rağmen arı sütünün florürün neden olduğu yüksek Bcl-2 seviyesini azaltarak bir iyileşme sağlması, arı sütünün antioksidan etkisinin göstergesi olarak yorumlanabilir. Florürün sperm parametrelerinde ve testiküler dokuda oluşturduğu hasar göz

önünde tutulduğunda Bcl-2 artışının florür toksistesine bağlı olarak oluştuğu akla getirilmektedir. Nitekim literatürde de testiküler dokuda germ hücrelerde oluşabilen hasarlarda Bcl-2 seviyesinin artabileceği bildirilmiştir [375].

Ayrıca, literatürde de farklı dokularda florür etkisiyle hücre hasarının oluşmasının bir göstergesi olarak Bcl-2 seviyesinin arttığını gösteren çalışmalar mevcuttur [376, 377]. Bu çalışmalarda kalp ve kas dokularında florürün etkisiyle Bcl-2 seviyesinin artarak, Bax seviyesinin ise azalarak apoptozisin baskılandığı bildirilmiştir.

Elde ettiğimiz verilere dayanarak testis dokusunda antiapoptatik bir protein olan Bcl-2 seviyesinin artmasını hasarlı hücrelerin apoptozis gibi bir mekanizmayla kontrol altına alınmadığının bir göstergesi olarak düşünebiliriz.

Kaspaz-3 protein ekspresyon seviyelerine baktığımızda, sadece florür uygulanan F50 ve F100 dozlarında kaspaz aktivasyon seviyesindeki düşüşte bunu destekleyen bir veri olarak karşımıza çıkmaktadır. Florürün Bcl-2'yi indükleyerek, kaspaz-3'ü baskılayarak hasarlı hücre oluşumuna neden olduğunu söyleyebiliriz. Kaspaz-3 apoptoz mekanizmasının işlevsel olarak çalışmasında aktif rol oynar. Apoptoz da kaspaz-3 seviyesi artar [378].

Bundan ötürü Kaspaz-3 seviyesindeki azalma ve Bcl-2 seviyesindeki artış apoptoz mekanizmasının yetersiz kalmasını ve hasarlı hücre sağ kalımının devam ettiğinin bir göstergesidir. Florür uygulanan gruplarda oluşan hücre hasarının antiapoptatik Bcl-2 seviyesinin artışı ve Kaspaz-3 'ın düşüşüyle apoptozisden çok fazla etkilenmeden kontrol dışı kaldığını söyleyebiliriz. Florürün apoptozisten etkilenmeden hasar oluşturma etkisini bazı kanser türlerinde görülen bir durumdur. Kanser türlerinin çoğunda kanseri oluşturan etmen, apoptozun gerçekleşmemesi için antiapoptatik Bcl-2 protein seviyesini artırarak apoptozdan kaçıp kanserli hücrelerin canlılığını sürdürmesini ister [378]. Bu açıdan florürün dokuda kanserleşmeye neden olabilecek bir hücre hasarına yol açabilme riskine sahip bir potansiyeli olabileceği fikri düşünülebilir. Yetersiz apoptozis de aşırı apoptozis gibi kontrolsüz uygun olmayan bir apoptozis olup çeşitli hastalıklara neden olabilmektedir [379]. Bu açıdan florürün Bcl-2 ekspresyonunu artırması ve Kaspaz-3 seviyesini düşürmesiyle yetersiz bir apoptozise neden olduğu söyleyebiliriz. Diğer taraftan arı sütünün ise florürün oluşturduğu bu hasarlı etkiyi düşürdüğünü elde ettiğimiz verilerle belirledik. Arı sütünün bu iyileştirici etkisinde arı sütü ile Kaspaz-3 aktivitesinin artışının, Bcl-2seviyesinin ise azalmasının bağlantılı olduğunu düşünmekteyiz. Arı sütü ve florür birlikte verilen gruplarda sadece florür verilen gruplara kıyasla Bcl-2'deki azalma ve Kaspaz 3'teki artma bu düşüncenin akla gelmesine neden olmuştur. Bu sonuçlara göre, arı sütünün Bcl-2'nin baskılanması ve kaspaz yolunun düzenlenmesi yoluyla ratlarda florür kaynaklı testiküler hasarın gelişmesini engellediğini ifade edebiliriz. Literatürde de farklı dokularda arı sütünün florürün oluşturduğu hasara karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir [376, 377]. Yapılan bir çalışmada ise arı sütünden izole edilen proteinlerin CCl₄'ün neden olduğu hepatoksisitede ve oluşan hepatoselüler karsinoma hücrelerinde

Bcl-2' yi düşürerek kaspaz 3 ü artırarak apoptozis oluşumunu artırdığı böylece kanserli hücreleri yok etme yoluyla doku hasarını azaltabileceğini gösterilmiştir [380].

Bu çalışmaya dayanarak, bizim sonuçlarımızda da arı sütü + florürlü gruplarda Bcl-2'nin düştüğü, Kaspaz3'ün arttığından ötürü apoptozis teşvik edilerek yeterli olmayan apoptozis mekanizmasıyla ortaya çıkan hasarın iyileştirilmesi sağlanmıştır diyebiliriz. Hasarın arı sütü ilave edilmiş gruplarda azaldığı tez çalışmamızdaki histolojik, spermatolojik ve diğer deney sonuçlarıyla da doğrulanmıştır.

Bazı reaktif oksijen türleri hücrel proteinleri hedefleyebilmektedir. Bu olay sırasında ROT (Reaktif Oksijen Türleri) protein moleküllerinin aminoasit zincirleri ile reaksiyona girerek proteinde oksidatif hasar oluşturabilir. Bu olay proteinlerin salınım düzeylerini de etkileyebilir [381]. Bazı çalışmalarda, oksijenden türetilen bazı serbest radikallerin interlökin- 1 α (IL-1 α), TNF- α gibi pro-enflamatuar sitokinlerin fazla üretilmesine neden olabileceği, bu fazla üretimin ise NF- κ B gibi bazı yolakların indüklenmesinde uyarıcı etki yapabileceği öne sürülmüştür [381-383]. Dolayısıyla tez çalışmamızda oksidatif stres oluşumuna bağlı olabilecek inflammatuar belirteçlerini gösteren TNF- α , NF- κ B, IL-1 α protein ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. TNF- α akut faz reaksiyonunu indükleyerek sistematik inflamasyonda yer alan bir hücre sinyal sitokindir. Farklı toksisitelerin oluşturduğu inflammatuar sonucu ekspresyon seviyelerinde farklılaşma olur. Tez çalışmamızdaki TNF- α sonuçlarını incelediğimizde sadece florür uygulanan F50 ve F100 gruplarında TNF- α seviyesinin kontrol grubuna kıyasla aşırı derecede artmış olduğu bulunmuştur. Yüksek TNF- α seviyelerine dayalı olarak ratlarda florür toksikasyonuna bir yanıt olduğu söylenebilir. Ek olarak IL-1 α protein ekspresyon düzeylerinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Gerek TNF- α gerekse IL-1 α seviyelerinde florür (F50 ve F100) gruplarındaki artış kontrol grubuna kıyasla oldukça fazla seviyede kendini göstermiştir. Her iki sonuç bir arada değerlendirildiğinde florür toksisitesine yanıt olarak TNF- α ve IL-1 α protein ekspresyonlarının arttığını ileri sürebiliriz. Bilindiği üzere TNF- α ve interlökinler sitokin türleri içerisinde yer alırlar. Sitokinler; makrofajlar, B-T Lenfositleri, mast hücreleri gibi bağışıklık hücreleri ve çeşitli hücreler tarafından üretilen ve serbest bırakılabilen proteinlerdir. TNF- α ve IL-1 temel proinflammatuar sitokinlerin arasında yer alır. Dolayısıyla enfeksiyon durumlarında ya da inflamasyonda TNF- α ve IL-1 sentezi de artar. Bazı hastalıklarda IL-1' e yanıt olarak TNF- α 'nın da arttığı bildirilmiştir [384, 385]. Sitokinler uyarılan hücrelerden kısa sürede ve genellikle düşük yoğunlukta hareket eder ve spesifik membran reseptörlerine bağlanırlar ve etkilerini gösterirler. Bu etkiler oldukça değişkendir. Hem koruyucu hem de hasar verici tepkilere neden olabilir. Örneğin sitokinler, malign (kanseri) hücreleri üzerinde büyümeyi doğrudan inhibe ederek tümörde regresyona sebep olabilirler. Ek olarak, antitümör etkilerin artırılmasında sitokinlerin görevi vardır. Diğer taraftan bunların tersine bazı sitokinler, malign hücreler için büyüme faktörü olabilir veya metastaz oluşumuna aracılık edebilir. Bu gibi

durumlarda bu sitokinlerin inhibe edilmesi için çeşitli antisitokin ilaçlar tedavide yer almaktadır [384].

Güncel olarak Kovid-19 vakalarında bazı hastaların asemptomatik veya hafif/orta şiddette belirtiler gösterirken bazılarının ise ağır bir zatürreyi takiben sitokin fırtınasıyla ağır akciğer enfeksiyonu, çoklu organ yetmezliği gibi durumların ortaya çıktığı görülmüştür. Buna neden olan sitokin fırtınasının başlıca sorumluları arasında IL-1 ve TNF- α da bulunmaktadır [382]. Bu nedenle TNF- α ve IL-1 α ekspresyonu gibi sitokinlerin ölçümü klinik açısından da son derece faydalı olup, deneysel araştırmalarda da bu seviyelerin ortaya koyulması oldukça önemlidir. Biz de tez çalışmamızda bu proteinlerin ekspresyonlarının değişimini araştırdık. Elde edilen bulgular florürün testis dokusundaki toksisite etkisini bir kez daha ortaya koymaktadır. Bu proteinlerin salınımindaki artış dokudaki hasarın bir göstergesi olarak artmıştır. Bulduğumuz bu sonuçlar literatürdeki çalışmalar ile değerlendirildiğinde benzer bulguların çeşitli çalışmalarda da gösterildiği görülmüştür [388-391].

Yapılan bir çalışmada testiste patolojik durumlarda TNF- α ve IL-1 α düzeyleri araştırılmıştır. Çalışma sonucunda gerek testis torsiyonu (testisin kendi çevresinde dönmesi oluşan bozulma) gerekse testis otoimmün orşit (Testis iltihaplanması) gibi patolojik durumlarda IL-1 α ve TNF- α sinyal yollarının uyarıldığı ve bunların ekspresyonlarında artış olduğu ortaya konmuştur [387]. Literatürde TNF- α ve IL-1 α 'nın testis dokusunda ekspresyonu bildirilmektedir. Testiste TNF- α 'nın yuvarlak spermatidler, pakiten spermatositler ve testiküler makrofajlar tarafından üretildikleri bildirilmiştir [384-387]. IL-1 α 'nın ise sertoli hücreleri, testis makrofajları ve postmanyetik germ hücreleri tarafından üretildikleri bildirilmiştir [392-396]. TNF- α ve IL-1 α proinflatuar sitokinlerinin normal testis homeostazında önemli rolleri olduğu ve testiküler disfonksiyonlarda ekspresyonlarının yükseldiği bildirilmiştir [390]. Proinflatuar sitokinlerin testisteki ve testis patolojilerindeki rollerinin anlaşılması, testis inflamasyonunun olumsuz etkilerinden korumak için terapilerin geliştirilmesine yardımcı olacak ve erkek kısırlığına ilişkin fikir verecektir. Bu amaçla tez çalışmamızda florür toksisitesinin TNF- α ve IL-1 α proinflatuar etkisi ve arı sütünün tedavi etkisini inceledik. Sonuçlarımız gösterdi ki testiküler dokuda florür toksisitesine yanıt olarak TNF- α ve IL-1 α düzeylerinin ekspresyonları indüklenmiştir. Arı sütü uygulamasıyla testiküler dokudaki iyileşmeye bağlı olarak TNF- α ve IL-1 α ekspresyonlarının F50 ve F100 gruplarına kıyasla düştüğü belirlenmiştir. Ancak bu düşüş kontrol grubuna kıyasla yine de yüksek kalmıştır. Bu yüzden arı sütünün hasarı tamamen tedavi edici bir etkiye sahip olmadığı ancak iyileştirici bir aktiviteye sahip olduğunu söyleyebiliriz. F50 ve F100 gruplarında yüksek salınının, arı sütü ile birlikte uygulanan florürlü gruplarda ise azalmış salınının ortaya çıkması, TNF- α ve IL-1 ekspresyonlarının oluşan hasarın şiddetine bağlı olarak değiştiğinin göstergesidir.

Literatürde de florürün çeşitli protein ekspresyonlarında değişikliğe neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar da tez çalışmamızdaki bulguları doğrular niteliktedir. Yapılan bir çalışmada, toksik olmayacak kadar düşük dozda bile uygulanan florürün kontrol grubuna kıyasla değer olarak TNF- α ve IL-1 α ekspresyonunu artırdığını karaciğer dokusunda ortaya konmuştur. Bu çalışmada toksik etkisi olmayan dozlarda kombine olarak kadmiyum + florür uygulamasının ise hepatoksisiteye neden olduğu bu durumda da TNF- α ve IL-1 α seviyelerinin oldukça arttığı ortaya konmuştur [383]. Yapılan farklı çalışmada 30 gün boyunca florüre maruz bırakılan sıçanda florürün, IL-1 α sentezini artışına neden olduğu belirlenmiştir [397]. Başka bir çalışmada kalp dokusunda 50 ppm ve 100 ppm florür verilen gruplarda İnterlökin protein ailesinden IL-17 seviyesinin arttığı gözlenmiştir [398]. Bu çalışmada İnterlökin grubunda, IL-1 α protein seviyesindeki artışın kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan oldukça önemli şekilde arttığı ifade edilmiştir. IL-17 seviyesinin artmasının IL-1 ve Tnf-alfa sitokin üretimini indükleyebileceği belirlenmiştir [399]. Bir diğer çalışmada ise kronik florür maruziyetinin sıçan seminifer tübüllerinde, TNF- α , IL-1 β ekspresyonunu artırdığı tespit edilmiştir [400].

Tez çalışmamızda literatürdeki arı sütü ile protein ekspresyonlarını araştıran çalışma sonuçlarıyla uyumlu bulgular elde ettiğimizi söyleyebiliriz. Literatürde farklı çalışmalarda testis dokularında yapılan çalışmalarda kadmiyumun neden olduğu hasara karşı arı sütünün koruyucu etkisinin olduğu ve bu koruyucu aktivitede kadmiyumun artırdığı TNF- α ve IL-1 β düzeylerinin arı sütünün kadmiyumla beraber uygulamasıyla düştüğü tespit edilmiştir [324, 401]. Bir başka çalışmada ise arı sütünün sıçanlarda etilen glikol kaynaklı böbrek iltihabında artmış olan TNF- α ve IL-1 β düzeylerini azalttığı gösterilmiştir [402]. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla literatürde yer alan sonuçları değerlendirdiğimizde arı sütünün doku hasarı üzerine düzeltici bir aktiviteye sahip olduğu bunu yaparken proinflamatuvar sitokinlerden olan TNF- α ve interlökin-1 protein ekspresyonlarındaki artışı inhibe ettiği ve böylece kısmen tedavi ile iyileştirme sağlayarak potansiyel bir koruyucu aktiviteye sahip olduğu fikrini ileri sürebiliriz.

TNF- α 'nın normal sağlıklı koşullar altında, dolaylı olarak spermatogenezin sürdürülmesini sağladığı bildiren çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda TNF- α 'nın sertoli hücrelerinde transferrin üretimini indükleyerek ya da NF- κ B aktivasyonunu uyarak spermatogenezini desteklediğini bildirmektedir. Bu nedenle TNF- α ve IL-1 normal fizyolojik koşullar altında testiste üretilerek testis fonksiyonlarının ve spermatogenezin devamında önemli rol oynar. Bununla birlikte belirli bir patolojik durumda bu proinflamatuvar sitokinlerin ekspresyonu artar. Bu artış ile denge immun yanıtlar lehine dönüşür. Nötrofiller, lenfositler gibi bağışıklık hücreleri testiste toplandığında ya da makrofajlar testiste aktivite edildiğinde germ (üreme) hücrelerinde bozulma gözlenebilir ve spermatogenez bozulur. Dolayısıyla spermatogenez bozukluğu erkek kısırlığı açısından bir risk oluşturur.

Erkek üreme sisteminde oluşabilecek inflamatuvar etekli proinflamatuvar sitokinler 1β , TNF- α ve IL-1 α sitokinleridir [403]. Bu nedenle florürlü gruplarda görülen sperm anomalilerinin daha fazla ortaya çıkmasında bu durumun neden olabileceğini ileri sürebiliriz. Florür kaynaklı sperm anomalilerindeki artışta TNF- α ve IL-1 α seviyelerindeki artışın dolaylı katkısının da olduğunu düşünmekteyiz.

NF- κ B oksidatif stres ya da oksidatif strese bağılı oluşabilecek hasara karşı bir yanıt olarak aktivitesi indüklenelilen bir transkripsiyon faktördür. Oksidatif stres durumunda NF- κ B 'nin aktivasyonunun arttığı bu sayede çok sayıda enflamatuvar sitokin salgılanabileceği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir [404-407]. Bu açıdan NF- κ B 'nin bağıışıklıkta çeşitli sinyal yolaclarını başlatabilecek kadar kritik bir öneme sahip olduğu söylenebilir. Çalışmamızda florür kaynaklı oluşabilecek oksidatif streste NF- κ B 'nin ekspresyon seviyesini araştırarak florürün etki ve şiddeti ile NF- κ B aktivitesindeki değişimi belirlemeyi amaçladık. Ayrıca florür kaynaklı testis hasarında arı sütünün NF- κ B aktivasyonundaki etkisini araştırarak arı sütü ile NF- κ B arasındaki etkileşimindeki değişimi inceledik.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, florür uygulamasıyla NF- κ B protein ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla oldukça artmıştır. Bu sonuçla, florürün testis dokusunda şiddetli bir oksidatif stres oluşturduğunu ve oksidatif stres aktivasyonu ile NF- κ B 'nin yukarı yönlü regülasyonunun tetiklendiğini ve ekspresyon seviyesinin arttığını söyleyebiliriz. Diğer taraftan arı sütünün florür kaynaklı testiküler hasar ya da oksidatif strese bağılı olarak indüklenen NF- κ B aktivasyonunu hafiflettiğini tespit ettik. Bu durum arı sütünün oksidatif stresi azaltarak NF- κ B aktivasyonunu aşağı regüle olmasını sağladığı şeklinde açıklanabilir. Arı sütünün böylece antiinflamatuvar bir özellik gösterdiğini de söyleyebiliriz. Ayrıca arı sütünün MDA ve GSH sonuçlarındaki verilerde bu durumu desteklemektedir. NF- κ B aktivasyonundaki artış enflamasyonun indüklenmesine neden olabilir. Enflamasyonda, NF- κ B aktivasyonu çeşitli antiinflamatuvar ajanlar ve antioksidan inhibitörler tarafından inhibe edilerek homeostazinin dengelenmesi sağlanmaya çalışılır [407, 408]. Bu açıdan arı sütü de NF- κ B düzeyinin düşmesini sağlayarak antiinflamatuvar ve/veya antioksidan özellik göstermiştir diyebiliriz. Literatürdeki çalışmaları incelediğimizde elde edilen bulgular ile tez çalışmamızdaki bulguları değerlendirdiğimizde birbirleriyle uyumlu sonuçların olduğu görülmüştür. Örneğin karaciğer dokusuyla yapılan bir çalışmada sadece florür verilen gruba, kadmiyumla birlikte florür verilen grubun kontrol grubuyla kıyaslanması sonucunda karaciğer dokusundaki NF- κ B'nin oldukça yüksek seviyede ekspresyona sahip olduğunu bildirmişlerdir [383]. Farklı bir çalışmada ise florürün testiküler dokuda NF- κ B ekspresyonunu artırdığını ortaya koymuşlardır [409].

Bir başka çalışmada ise sodyum florür uygulamasının NF- κ B sinyal yolunu aktive ettiği, bu aktivasyonda farelerde antiinflamatuvar sitokin ekspresyonunun azaldığı ve böbrek dokusunda renal inflamasyona neden olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu çalışmada florürlü gruplarda, NF- κ B sinyal yolunun aktivasyonu, TNF- α , interlökin-1, COX-2 protein ekspresyon seviyelerinin artışıyla da karakterize edilmiştir [410]. TNF- α 'nın NF- κ B sinyal yollarını uyarabileceği, patolojik koşullar altında TNF- α , IL-1- α , IL-1 β , NF- κ B ekspresyon artışlarının ise hastalığın ilerlemesiyle ilişkili olduğu çeşitli araştırmalarda bildirilmiştir [411- 414]. Dolayısıyla literatürdeki çalışmalara göre kendi tez çalışmamızda florürün oluşturduğu toksisite ve oksidatif stres sonucundaki patolojik koşullar altında TNF- α , IL-1- α ve COX-2 seviyelerinin arttığını ve bu artışın NF- κ B sinyal yolunu aktive ederek NF- κ B salınımını artırdığı fikrini ileri sürebiliriz. Florürün testiküler hasar oluşumundaki etki mekanizmasının NF- κ B 'nin indüklenmesine neden olduğunu söyleyebiliriz. Yine de florürün toksisite etki mekanizması henüz net olarak ortaya koyulmamış olup bu konuda daha detaylı araştırmalar yapılması gerekliliği vardır. Arı sütünün bu NF- κ B protein ekspresyonu üzerine etkisiyle ilgili çalışmalar literatürde yer almaktadır. Arı sütü ile yapılan bir çalışmada arı sütü uygulamasının farelerde kadmiyum kaynaklı nefrotoksisiteyi azalttığı gösterilmiştir [415]. Bu yapılan çalışmada TNF- α ve IL-1- β , daki artışlar arı sütü uygulamasıyla azalmıştır. Bu azalmanın arı sütünün NF- κ B aktivitesini baskılayarak IL-1- β ve TNF- α ekspresyonu üzerinde güçlü bir inhibitör etki ile olduğu ortaya konmuştur. Yapılan bir başka çalışmada ise [409], sodyum florür maruziyetinin testiküler oksidatif yükü, NF- κ B ve COX-2 seviyelerini artırdığı ve bu sayede inflamasyonunda belirgin şekilde arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar melatonin ile bu proteinlerin ekspresyonlarının azaltıldığı ve testis fonksiyonlarının da önemli ölçüde yeniden düzenlendiğini bulmuşlardır. Bu çalışmaların sonuçları ile kendi tez çalışmamızdaki bulgular tutarlılık göstermiştir. Bu bakış açısıyla tez çalışmamızdaki sonuçlara göre florürün toksisitesine bağlı olarak TNF- α , IL-1 α ve NF- κ B 'nin ekspresyonlarının indüklendiği ve arı sütü uygulamasıyla da proteinlerdeki bu artışların gerilediğini ve bu sayede toksisite şiddetinin azaldığı tezini ileri sürebiliriz.

Yapılan bazı çalışmalarda patolojik durumlarda COX-2'nin artan ekspresyonları olduğu görülmüştür. Yapılan çalışmalarda COX enzimlerinin patogeneze biyolojik bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca inflamasyonlu dokularda da COX-2 düzeylerinin belirgin olarak arttığı da bildirilmiştir [416]. Bu artışta sitokinlerin, sinyal yollarının da indüklemeye etkisinin olduğu da unutulmamalıdır. Son zamanlarda yapılan çalışmalar testis fonksiyonu ve erkek fertilitésinin düzenlenmesinde COX'un etkisi üzerine yoğunlaşmıştır [417, 418].

İnfertil hastaların testislerinde belirgin COX-2 ekspresyonları tanımlanmıştır. Yapılan bir çalışmada diyabetik ve varikoselli hastaların spermatozoalarında COX-1 ve COX-2 ekspresyonlarının arttığı gösterilmiş olup bu durumun diyabet ve varikoseel hastalıklarında anormal sperm morfolojisinin ötesine geçerek moleküler düzeyde zararlı etkilerinin olabileceğini işaret etmektedir [419]. Dolayısıyla biz de tez çalışmamızda erkek infertilitesinin teşhisi olarak bir belirteç olarak da kullanılabilecek COX-2 protein ekspresyonunun florür maruziyetine bağlı olarak değişkenliğini ve arı sütünün bu etkinliğe karşı aktivitesinin nasıl olduğunu belirlemeyi amaçladık. Literatürde yoğun araştırmalara rağmen COX izoformlarının erkek üreme biyolojisi ve fizyolojisi üzerindeki etkileri büyük ölçüde bilinmemektedir. COX ekspresyon ifadesi spermelerde dolaylı olarak tanımlanmıştır. Ancak sağlıklı ve hastalıklı bireylerde COX izoformlarının farklı ekspresyona sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [417-419]. COX izoformların erkek infertilitesinde özel bir ilgisi olabileceği ve sperm metabolizmasını düzenlenmesinde kilit bir rol oynayabileceği öne sürülmüştür [417-419].

Literatürdeki tüm bilgiler ışığında yaptığımız tez çalışmasında florürlü gruplarda COX-2 ekspresyon seviyesinin yukarı regüle edilerek arttığı tespit edilmiştir. Florürün testis dokusundaki toksisitesine bağlı olarak testis dokusunda COX-2 ekspresyonunu artırdığını ve böylece sperm parametrelerini de olumsuz yönde etkilemiş olabileceğini de düşünmekteyiz.

Florür toksisitesinin TNF- α , IL-1 sitokin düzeylerini ve NF- κ B aktivitesini artırmış olması COX-2 ekspresyonunu da indüklemiş olabilir. Bu durum patolojik dokularda, oksidatif hasarda COX-2 seviyesinin arttığını gösteren çalışma sonuçlarını desteklemektedir. Örneğin yapılan çalışmalarda böbrek ve karaciğer dokularında inflamasyonuna ve toksisiteye neden olan sodyum florürün COX-2 protein ekspresyonunu artırdığı bildirilmiştir [410, 420]. Farklı bir çalışmada ise infertil kişilerde seminal sıvıda oksidatif stresle COX-2 düzeyleri arasındaki ilişki araştırılmış olup, oksidatif stres derecesi arttıkça COX-2 seviyesinin arttığı bildirilmiştir [221]. Literatürde sperm bozukluğuna yol açan diyabet, varikoseel, testis kanseri ve infertilite gibi hastalıkların testis dokusundaki COX-2 düzeylerini artırdığını gösteren bazı çalışmaların [417-420] sonuçlarına dayanarak tez çalışmamızdaki florürlü gruplarda ortaya çıkan anomalili sperm miktarlarının artışında da COX-2 seviyesindeki artışın etkisinin olabileceği fikri doğmaktadır. Bu tez çalışmamızda arı sütü takviyesi ile birlikte uygulanan florür gruplarında COX-2 düzeylerinin oldukça iyi bir şekilde kontrole yakın düzeylere kadar düşürüldüğü tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu bulgular literatürde de çeşitli çalışma sonuçlarıyla da uyum göstermektedir.

Araştırmacıların yaptıkları çalışmalarda [421-423] inflamasyonlu bağırsak dokusunda arı sütünün GSH-Px aktivitesini artırdığı, TNF- α , NF- κ B, COX-2 seviyelerini düşürerek iyileştirici bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Tez çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında arı sütünün florür kaynaklı testiküler toksisitede NF- κ B, TNF- α ve COX-2'nin ekspresyonunu azaltmasıyla antiinflamatuvar etkiye de sahip olabileceğini ortaya konulmuştur. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, patolojik durumlarda artan inflamatuvar protein seviyelerini inhibe edici aktivitesiyle ve oluşan oksidatif strese karşı gösterdiği antioksidatif etkiyle arı sütünün tedavi edici (proaktif) potansiyeli olan bir bileşime sahip olduğunu net bir şekilde ifade edebiliriz.

Oksidatif stres ve elektrolitik stres koşulları altında oluşan oksidatif strese karşı etkili bir hücrel yanıtın anahtar koordinatörlerinden biri de transkripsiyon faktörü NRF-2'dir. Organizmalar birçok faktörün etkisiyle sıklıkla oksidatif strese maruz kalırlar. Bu tür stresli koşullar sırasında oluşan oksidatif stres, DNA ve proteinlere zarar verebilir ve bunun sonucunda hücrel süreçler bozulur. Artan reaktif oksijen türlerinin düzeyine karşı savaşmak için özel hücrel cevaplar etkinleştirilmelidir. Böylelikle oksidatif stresle aktifleşmiş hücrel yollar aracılığıyla zararlı oksidatif stres koşullarına uyum sağlanır. NRF-2, hücrel redoks dengesinin ve koruyucu antioksidan enzimlerin ve detoksifikasyon yanıtların düzenlenmesinden sorumlu bir transkripsiyon faktörüdür [424-430].

NRF-2 aracılı antioksidan sistemin uyarılmasıyla NRF-2 çekirdekte birikerek antioksidan enzimlerin ve ilgili proteinlerin ekspresyonunu indükleyerek çeşitli oksidatif ve elektrofilik stresörlere karşı anahtar molekül olarak tanımlanır. Oksidatif stres olmadığı normal koşullar altında, uyarılmamış halde bulunan NRF-2, bir aktin bağlayıcı- baskılayıcı protein (keop 1) tarafından sitoplazmada salgılanır. Hücrelerin oksidatif strese veya tiyol gruplarını oksitlenme veya kovalent olarak dönüştürme kapasitesine sahip elektrofilik bileşiklere maruz kalması üzerine, NRF-2, baskılayıcı protein- keop 1'dan ayrılır ve çekirdeğe geçer ve antioksidan yanıt (tepki) elemanına (ARE) bağlanır ve detoksifiye edici ve antioksidan enzimlerin genlerini transaktivite eder. Sonuç olarak NRF-2 artışı ya da birikimi gen transkripsiyon faktörü işlevi için önemli bir sinyalleme adımıdır. Transkripsiyonun başlamasıyla oksidatif hasara karşı konulma süreci başlamaktadır. Bu nedenle NRF-2 yalnızca antioksidan, antienflamatuvar ve detoksifiye edici proteinleri kodlayan genlerin ekspresyonunu düzenleyen sitoprotektif bir faktör olarak kabul edilmez, aynı zamanda türlerin uzun ömürlülüğünün güçlü bir modülatörü olarak da kabul edilir [424-430].

Tez çalışmamızda elde ettiğimiz NRF-2 protein ekspresyon düzeylerini incelediğimizde tek başına florür uygulanan grupların NRF-2 düzeylerinin kontrol grubuna kıyasla oldukça düştüğü tespit edilmiştir. Özellikle F100 mg/kg grubunda düşüş kayda değer şekilde en düşük seviyede bulunmuştur. Florür ile birlikte arı sütü uygulamasıyla NRF-2 değerlerinde belirgin bir şekilde artış olduğu bulunmuştur. Bulduğumuz bu sonuçlarla florür toksisitesinin NRF-2 transkripsiyonel aktivitesi üzerindeki negatif etkisine karşı arı sütünün koruma sağladığını ortaya koymuş olduk. Nrf-2 aktivitesindeki artışla oksidatif strese karşı bir yanıt oluşturmak üzere bazı antioksidan enzimlerin de aktivite olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Bu görüşler ışığında çalışmamızdaki Nrf-2, GSH ve Katalaz bulguları beraber değerlendirildiğinde NRF-2, GSH ve Katalaz sonuçlarının birbirini destekler nitelikte olduğunu tespit ettik. NRF-2, GSH ve Katalaz sonuçları beraber değerlendirildiğinde florürlü gruplarda, NRF-2 aktivitesi düşerken aynı zamanda GSH düzeyi ve Katalaz aktivitesinin de düştüğü tespit edilmiştir. Diğer taraftan arı sütü uygulamasıyla NRF-2 aktivitesi artış gösterirken, GSH ve Katalaz aktivitelerinin de artış gösterdiği tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar beraber değerlendirildiğinde florürün NRF-2 yolunu inaktive ederek GSH düzeyi ve Katalaz aktivitelerini de azalttığını, diğer taraftan arı sütü mevcudiyetine bağlı olarak NRF-2 yolunun aktive olduğu ve GSH ve Katalaz aktivitelerinin de artarak antioksidan yanıtın oluştuğunu söyleyebiliriz. Bunun yanı sıra, arı sütü alımı ile NRF-2 yolunun aktive olduğu ve oksidatif hasara karşı daha güçlü bir tepki oluştuğunu ve NRF-2 aktivasyonunun GSH ve Katalaz sentezini uyarmada etkin bir unsur olabileceğini de söyleyebiliriz.

Yaptığımız bu tez çalışmasında arı sütü ile NRF-2 seviyesi ve buna duyarlı olan GSH ve Katalaz enzim seviyeleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu ortaya koymuş olduk. Bu pozitif korelasyon florür açısından ise tam tersi bir durum olarak ortaya çıkmıştır. Literatürde de sonuçlarımızla uyumlu bulgular gösteren çalışmalar mevcuttur. Örneğin yapılan bir çalışmada, L-arginin'in NRF-2 yolunu aktive ettiği ayrıca buna bağlı olarak da GSH sentezini uyardığı tespit edilmiştir [431]. Bir başka çalışmada ise kadmiyum klorürün oluşturduğu hepatolojik etkiyle NRF-2 aktivitesinin azaldığı buna karşı uygulanan arı sütü takviyesiyle NRF-2 düzeyinin arttığı ve böylece bir koruma sağlandığı ortaya konmuştur [432]. Farklı bir çalışmada ise arı sütünde bulunan bir yağ asidinin NRF-2 yolunun aktive etmesiyle Parkinson hastalığında oksidatif strese bağlı hasara karşı koruma oluşturabileceği ileri sürülmüştür [424]. Bir diğer araştırma sonucunda ise florürün indükleyici testiküler hasarda Epigallocatekin galat (EGCG)'ın NRF-2 artırarak testiste flor kaynaklı hasarı azalttığı bulunmuştur [400]. Yine bir çalışmada NaF kaynaklı oksidatif strese karşı uygulanan melatonin tedavisinde NRF-2 ve çeşitli antioksidan enzimlerin ekspresyonunda artışın olduğu gösterilmiştir [328]. Farklı çalışmalarda da testis beyin ve dalak dokularında sodyum florür (NaF) kaynaklı oksidatif hasarda NRF-2 ekspresyonunda belirgin bir düşüş olduğu gösterilmiştir [433-436]. Kendi çalışmamızda da arı sütünün NRF-2 aktivasyonu yoluyla testiste flor toksisitesini azalttığı bulunmuştur.

Elde ettiğimiz tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, çeşitli faktörlerle fazla miktarda florüre maruz kalmanın testis dokusunda hasar oluşturduğu, spermatozoanın normal yapısını ve işlevlerini bozduğu, oksidatif stres meydana getirdiği ve önemli bazı proteinlerin salınım düzeylerini değiştirdiği belirlenmiştir. Bu verilere dayanarak, florürün testiküler doku için ve spermatolojik parametreler için toksik etki potansiyeli olan bir yapıda olduğunu net bir şekilde ifade edebiliriz. Bu etkilerin ortaya çıkmasında birçok faktör olduğu belirlenmiştir.

Tez sonuçlarımıza göre şu varsayımları öne sürebiliriz;

- ✓ Florür toksisitesi testis dokusunda enzim ve hücre düzeyinde fonksiyonel ve histolojik yönden bozukluklar oluşturarak etkisini göstermiştir.
- ✓ Florürün, lipid peroksidasyonunun yan ürünü olan MDA seviyelerinde artışa sebebiyet vermesi florürün, lipid peroksidasyon ürünlerini arttırdığına işaret etmektedir. Lipid peroksidasyon oksidatif stres oluşturarak, doku hasarına sebep olmuştur. Bu durum, florürle oluşturulan sitotoksitenin önemli bir mekanizması olarak belirlenmiştir.
- ✓ Florür toksisitesiyle oluşan oksidatif stres CAT ve GSH gibi enzim aktivitelerinde azalmaya yol açarak hücreler içindeki prooksidan ve antioksidan aktiviteler arasındaki dengesizliğe neden olmuştur.
- ✓ Florür toksisitesinin neden olduğu prooksidan-antioksidan dengesizliği sonucunda oksidatif strese duyarlı transkripsiyon faktörlerinde, apoptotik sinyal iletim yollarının aktivitelerinde ve bunlarla ilişkili protein ekspresyon düzeylerinde değişiklikler meydana gelmiştir.
- ✓ Florür toksisitesi testis dokusu hücrelerinde dejenerasyona yol açarak histopatolojik değişikliklere neden olmuştur.
- ✓ Florür toksisitesi spermatojenik hücrelerde de anomalilere yol açarak erkek üreme hücrelerini de etkilemiştir.
- ✓ Florür uygulamalarına karşı arı sütü takviyesinin testis dokusundaki hasarlı yapıyı azalttığı, spermatolojik parametrelerde iyileştirme sağladığı, oksidatif stresi düşürdüğü, protein seviyelerini düzenlediği belirlenmiştir. Bu verilere dayanarak arı sütünün testiküler dokuda florür kaynaklı toksik etkilere karşı koruyucu ve iyileştirici etki gösteren bir yapıya sahip olduğunu net bir şekilde ifade edebiliriz.

Sonuç olarak, ileride yapılacak yeni araştırmalar açısından, tez çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçların literatüre katkı sunacak içerikte olduğunu düşünmekteyiz.

ÖNERİLER

Bu tez çalışmamızda elde ettiğimiz verilere göre bazı önerilerde bulunabiliriz:

- Florürlü ürünleri kullanırken fazla doz alımı oluşturabilecek bir kullanımdan kaçınmamız gerektiğini önermekteyiz. İçtiğimiz suların, aldığımız besinlerin ve kozmetik, diş- ağız sağlığında kullanıldığımız florür içerikli ürünlerin florür miktarlarına dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu ürünler özellikle çocuklar tarafından kullanılırken bilinçli bir şekilde tüketilmelidir.
- Florürün insanlarda meydana getirebileceği doku hasarlarının ortaya konabilmesi için daha fazla araştırmanın yapılması gerekmektedir. İnsanların florürü su dışında, dental ürünler, yiyecekler, çevresel etmenler gibi pek çok farklı kaynaktan bünyesine aldıkları unutulmamalıdır. Dolayısıyla insanlar yaşamları süresince florüre maruz kalırken, flor alım miktarlarının sadece içme sularındaki flor konsantrasyonlarını göz önünde bulundurarak hesaplamak doğru değildir. Bundan ötürü, yaygın olarak kullanılan florürlü ürünlerden alınan florür alım seviyelerinin ne olduğuna yönelik ve bunların etkilerini belirlemek için daha fazla araştırma yapılmasını önermekteyiz.
- Arı sütünün ticari olarak güvenilir, sertifikasyonu eksik olmayan, bakanlıkça denetlenen firmalardan alınması gerekir.
- Farklı arı sütü ürünlerindeki içeriğine de dikkat edilmesi gerekir. Arı sütü içerikleri allerji gibi başka etkilere sahip olma potansiyeline sahip olduğundan arı sütü kullanımında doz ayarlanması oldukça önemlidir. Arı sütünün kullanımı için belirlenmiş standart bir dozaj yoktur. Arı sütü ve bağırsak sistemi arasındaki etkileşim, bağırsak florasının varlığı nedeniyle daha karmaşık hale gelebilir, bu da daha fazla araştırılma yapılması gerekliliğini ortaya koyar.
- Arı sütü şu anda güvenli ve etkili bir besin takviyesi gibi görünmekle birlikte arı sütünün tedavide rutin uygulamalara sokmak aynı zamanda tıbbi potansiyelini daha iyi anlamak için daha çok *in vitro* ve *in vivo* çalışmaya ihtiyaç vardır. Bundan dolayı farklı arı sütü türleriyle daha geniş çalışmaların yapılmasını önermekteyiz.

KAYNAKLAR

- [1] Mathur, P.P., D'Cruz, S.C. (2011). The effect of environmental contaminants on testicular function, *Asian Journal of Andrology*, 13, 585-91.
- [2] Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years, *British Medical Journal*, 305, 609-13.
- [3] Zhang, Y. (2003). Environmental pollution threatens human fertility, *Environmental Reviews*, 22, 20-5.
- [4] Murutu, C., Onyango, M.S., Ochieng, A. and Otieno, F.A. (2012). Fluoride removal performance of phosphoric acid treated lime: Breakthrough analysis and point-of-use system performance, *Water SA- African Journal*, 38, 279-286. doi: 10.4314/wsa. v38i2.14
- [5] Mohammed, A.T., Mohamed, A.A.-R., Ali, H. (2017). Pulmonary apoptotic and oxidative damaging effects of triclosan alone or in combination with fluoride in Sprague Dawley rats, *Acta Histochemica*, 119, 357-363.
- [6] Edmunds, W.M., Smedley, P.L. (1996). Groundwater geochemistry and health: an overview, in: Appleton, J.D., Fuge, R., McCall, G.J.H. (Eds.), *Environmental Geochemistry and Health, Geological Society Special Publication*, 113, 91-105.
- [7] Urbansky, E.T. (2002). Fate of fluorosilicate drinking water additives, *Chemical Reviews*, 102, 2837-2854.
- [8] https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/fluoride_drinking_water_full.pdf, Erişim Tarihi: 11.11.2021, Fawell, J., Bailey, K., Chilton, J., Dahi, E., Fewtrell, L., Magara, Y. (Eds.). (2006). *Fluoride in Drinking-Water*, World Health Organization (WHO), Geneva, Switzerland.
- [9] Sharma, D., Singh, A., Verma, K., Paliwal, S., Sharma, S. and J. (2017). Dwivedi. Fluoride: a review of pre-clinical and clinical studies, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 56, 297-313.
- [10] Mikkonen, H.G., Dasika, R., Drake, J.A., Wallis, C.J., Clarke, B.O., Reichman, S.M. (2018). Evaluation of environmental and anthropogenic influences on ambient background metal and metalloid concentrations in soil, *Sci. Total Environ.* 624, 599-610.
- [11] Shulman, J.D., Wells, L.M., (1997). Acute fluoride toxicity from ingesting home-use dental products in children, birth to 6 years of age, *Journal of Public Health Dentistry*, 57, 150-158.
- [12] Shanthakumari, D., Srinivasalu, S., Subramanian, S. (2004). Effects of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats, *Toxicology*, 204, 219-228.
- [13] Akdoğan, M., Bilgili, A., Karagöz, E., Gökçimen, A., Erarslan, G., Üstüner, E. (2002). Flor zehirlenmesi oluşturulmuş tavşanların böbrek dokusunda yapısal ve biyokimyasal değişiklikler, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26, 71-77.
- [14] Alhusami, A.M., Faddah, L.M., El Orabi, N.F., Hasan, I.H. (2018). Role of Some Natural Antioxidants in the Modulation of Some Proteins Expressions against Sodium Fluoride Induced Renal Injury, *BioMed Research International*, 9.
- [15] Yuan, G., Dai, S., Yin, Z., Lu, H., Jia, R., Xu, J., Song, X., Li, L., Shu, Y., Zhao, X. (2014). Toxicological assessment of combined lead and cadmium: acute and sub-chronic toxicity study in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 65, 260-268.
- [16] Zhou, B.H., Zhao, J., Liu, J., Zhang, J.L., Li, J., Wang, H.W. (2015). Fluoride-induced oxidative stress is involved in the morphological damage and dysfunction of liver in female mice, *Chemosphere*, 139, 504-11.
- [17] Zhang, J.H., Zhu, Y.C., Shi, Y., Han, Y.L., Liang, C., Feng, Z.Y., Zheng, H.P., Eng, M., Wang, J.D. (2017). Fluoride-induced autophagy via the regulation of phosphorylation of mammalian targets of rapamycin in mice Leydig cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 8966-8976.

- [18] Sun, Z.L., Li, S.J., Yu, Y.X., Chen, H.Y., Ommati, M.M., Manthari, R.K., Niu, R.Y., Wang, J.D. (2018). Alterations in epididymal proteomics and antioxidant activity of mice exposed to fluoride, *Archives of Toxicology*, 92, 169-180.
- [19] Sun, Z.L., Wei, R.F., Luo, G.Y., Niu, R.Y., Wang, J.D. (2018). Proteomic identification of sperm from mice exposed to sodium fluoride, *Chemosphere*, 207, 676-681.
- [20] Liu, Y., Liang, C., Gao, Y., Jiang, S.S., He, Y.Y., Han, Y.L., Olfati, A., Manthari, R.K., Wang, J.D., Zhang, J.H. (2019). Fluoride interferes with the sperm fertilizing ability via downregulated SPAM1, ACR, and PRSS21 expression in rat epididymis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67, 5240-5249.
- [21] Liu, W.H., Sha, Y.W., Li, Y., Mei, L.B., Lin, S.B., Huang, X.J., Lu, J.H., Ding, L., Kong, S.B., Lu, Z.X. (2019). Loss-of-function mutations in SPEF2 cause multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF), *Journal of Medical Genetics*, <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2018-105952>.
- [22] Zhou, B.H., Zhao, J., Liu, J., Zhang, J.L., Li, J., Wang, H.W. (2015). Fluoride-induced oxidative stress is involved in the morphological damage and dysfunction of liver in female mice, *Chemosphere*, 139, 504-511.
- [23] Niu, R.Y., Chen, H.J., Manthari, R.K., Sun, Z.L., Wang, J.M., Zhang, J.H., Wang, J.D. (2018). Effects of fluoride on synapse morphology and myelin damage in Mouse hippocampus, *Chemosphere*, 194, 628-633.
- [24] Ge, Y.M., Niu, R.Y., Zhang, J.H., Wang, J.D. (2011). Proteomic analysis of brain proteins of rats exposed to high fluoride and low iodine, *Archives of Toxicology*, 85, 27-33.
- [25] Hindmarsh, J.T. (2000). Arsenic its clinical and environmental significance, *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine*, 13, 165-172.
- [26] Flora, S.J.S., Bhadauria, S., Pant, S.C., Dhaked, R.K. (2005). Arsenic induced blood and brain oxidative stress and its response to some thiol chelators in rats, *Life Sciences*, 77, 2324-2337.
- [27] Mittal, M. and Flora, S.J.S. (2007). Vitamin E supplementation protects oxidative stress during arsenic and fluoride antagonism in male mice, *Drug and Chemical Toxicology*, 30, 263-281.
- [28] Barbier, O., Arreola-Mendoza, L., Del Razo, L.M. (2010). Molecular mechanisms of fluoride toxicity, *Chemico-Biological Interactions*, 188, 319-333.
- [29] <https://www.who.int/teams/environment-climate-change-and-health/water-sanitation-and-health/water-safety-and-quality>, World Health Organization (WHO), Water Sanitation and Health (who.int), Erişim tarihi: 02-10-2021.
- [30] Chinoy, N.F., Narayana, M.V., Dalal, V., Rawat, M., Patel, D. (1995). Amelioration of fluoride toxicity in some accessory reproductive glands and spermatozoa of rat, *Fluoride*, 28, 75-86.
- [31] Izquierdo-Vega, J.A., Sánchez-Gutiérrez, M., Del Razo, L.M. (2008). Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230, 352-7.
- [32] <https://fluoridealert.org/issues/health/fertility/>, Fluoride Action Network | Male Fertility (fluoridealert.org), Erişim tarihi: 02-10-2021.
- [33] Orta, B. (2012). *Sodyum Florür'ün Tm4 Sertoli Hücreleri Üzerinde Oluşturduğu Oksidatif Hasara Vitamin C'nin Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [34] Wang, A.G., Xia, T., Chu, Q.L., Zhang, M., Liu, F., Chen, X.M., Yang, K.D. (2004). Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo hepatocytes, *Biomedical and Environmental Sciences*, 17, 217-222.
- [35] Muscarella, D.E. and Bloom, S.E. (2002). Differential activation of the c-jun n-terminal kinase pathway in arsenite-induced apoptosis and sensitization of chemically resistant compared to susceptible b-lymphoma cell lines, *Toxicological Sciences*, 68, 82-92.
- [36] Ghanbari, E., Nejati, V., Najafi, G., Khazaei, M., Babaei, M. (2015). Study on the effect of royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic rats, *International Journal of Fertility and Sterility*, 9, 113-20.

- [37] Mobasser, M., Ghiyasvand, S., Ostadrahimi, A., Ghojzadeh, M., Noshad, H., Pourmoradian, S. (2015). Effect of fresh royal jelly ingestion on glycemic response in patients with type 2 diabetes, *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 17, 20074.
- [38] Jianying, Guo., Zixu, Wang., Yaoxing, Chen., Jing, Cao., Wenli, Tian., Baochen, Ma., Yulan, Dong. (2021). Active components and biological functions of royal jelly, *Journal of Functional Foods*, 82, 104514
- [39] Ramadan, M. F., Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review, *Journal of Functional Foods*, 4, 39–52.
- [40] Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., Gan, S.H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: A comprehensive review of their biological actions and health benefits, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 1259510. <https://doi.org/10.1155/2017/1259510>
- [41] K.O. William., N.c., Patrick (2009). *Netter Temel Histoloji*, Güneş Kitapevi, İstanbul.
- [42] Ozel, H.B. (2009). *Tek Taraflı Testis Torsiyonunda karşı Testiste Testikuler Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Aktivitesindeki Değişimlerin Histolojik ve Histosimik Olarak Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [43] Kayalı, H., (Çeviren). (1981) Di Fiore MSH. *Histoloji Atlası*, 5. Baskı, Güven Yayınları, İstanbul
- [44] Beyhan, M. (2003). *Atık çamurlar ve doğal malzemeler ile sulardan florür iyonu gideriminin araştırılması*, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [45] Varol, E., Varol, Simge. (2010). Fluorosis as an Environmental Disease and its Effect on Human Health, *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 9, 233-238.
- [46] Atabey, E. (2005). *Tıbbi Jeoloji*. Ankara. Jeoloji Mühendisleri Odası Yayınları, 216.
- [47] Ayoob, S., Gupta, A.K. (2006). Fluoride in drinking water: a review on the status and stress effects, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36, 433-487.
- [48] Kaminsky, L.S., Mahoney, M.C., Leach, J., Melius, J., Miller, M.J. (1990). Fluoride: benefits and risks of exposure, *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 1, 261-281.
- [49] Varol, S., Davraz, A., Varol, E. (2008). Yeraltı suyu Kimyası ve Sağlığa Etkisinin Tıbbi Jeoloji Açısından Değerlendirilmesi, *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 7, 351-356.
- [50] Demirel, Ü. (2009). The Effect Of Fluoride On Animal And Human And Fluorosis Problem In Capadocia Region, *1.Tıbbi Jeoloji Çalıştayı*, Ürgüp/ Nevşehir
- [51] https://www.mta.gov.tr/v3.0/sayfalar/hizmetler/kutuphane/ekonomi-bultenleri/2006_01/4.pdf Erişim tarihi: 02-10-2021. (Ayaz, M.E Dünya flüorit rezervleri, üretimi ve tüketimi)
- [52] Susheel, A.K., (1985). Fluoride toxicity, *International Society for Fluoride Research*, Delhi, India, 1-16.
- [53] Demirel, Ü., Delibaşı, T., Aren, G. (2012). Effect of High-Fluoride Water on Different Body Parts in Human, *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 46, 79-90.
- [54] Susheela, A.K., (2000). A treatise on fluorosis, *Fluoride*, 34,3 181-183.
- [55] Dabrowska, E., Letko, M., Roszkowska-Jakimiec, W., Letko, R., Jamiolkowski, J., (2005). Effect of fluoride preparations on the activity of human salivary catepsin C, *Annales Academiae Medicae Bialostocensis*, 50,160-162.
- [56] http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39746/WHO_TRS_846.pdf?sequence=1, Erişim tarihi: 11-11-2021. World Health Organization Expert Committee on oral health status and fluoride use. Fluorides and oral health. WHO Technical Report Series No. 846. Geneva: WHO, 1994.
- [57] Egemen, A., Akflit, S. (1997). Flor ve çocuk sağlığındaki yeri. *Ege Pediatri Bülteni*, 4, 65-84.
- [58] Orten, J.M., Neuhaus, O.W. (1975). *Human biochemistry nutrition*. Saint Louis: Mosby, 549-51.
- [59] Whitford, G.M. (1993). *Health effects of ingested floride*, Washington: National Academy Press.
- [60] <https://www.cnnturk.com/yasam/dunya-cay-raporu-aciklandi-en-cok-turkler-iciyor?page=3> Erişim tarihi: 02-10-2021.

- [61] <https://www.trthaber.com/haber/koronavirus/salgin-doneminde-cay-tuketimi-artti-533824.html>, Erişim tarihi: 02-10-2021.
- [62] Kalayci, Ş., Somer, G. (2003). Factors affecting the extraction of fluoride from tea: application to three tea samples, *Fluoride*, 36, 267-70.
- [63] Whitford, G.M., (1997). Determinants and mechanism of enamel fluorosis, *Ciba Foundation symposium*, 205, 226-245.
- [64] Fawell, J., Nieuwenhuijsen, M.J. (2003). Contaminants in drinking water, *British Medical Bulletin*, 68, 199-208.
- [65] Angmar-Mansson, B., Whitford, G.M., (1990). Environmental and physiological factors affecting dental fluorosis, *Journal of Dental Research*, 69,706-13.
- [66] Whitford, G.M., Ekstrand, J., (1990). Summary of Session I: Metabolism of fluoride, *Journal of Dental Research*, 69, 513.
- [67] https://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/GDWQ2004web.pdf, Erişim tarihi: 13.11.2021 World Health Organization, 2004, Guidelines for drinking-water quality. Vol 1 Recommendations. 3rd; Geneva, World Health Organization.
- [68] Adamek, E., (2005). In vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity, *Annals Academy of Medicine Singapore*, 51, 69-85.
- [69] Mendoza-Schulz, A., Solano-Agama, C., Arreola-Mendoza, L., Reyes-Márquez, B., Barbier, O., Razo, L.M.D., Mendoza-Garrido, M.E. (2009). The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells, *Toxicology Letters*, 190, 179-186.
- [70] Pervez, A., Sinha, M.K., Meena, Y. (2016). Implications of fluoride toxicity on the male reproductive system: a Review, *Journal of Mountain Research*, 11: 1-7 ISSN: 0974-3030.
- [71] Freni, S.C. (1994). Exposure to high fluoride concentrations in drinking water is associated with decreased birth rates, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 42,109-12.
- [72] Yousefia, M., Mohammadi, A.A., Yaseri, M., Mahvi, A.H. (2017). Epidemiology Of Drinking Water Fluoride And Its Contribution To Fertility, Infertility, And Abortion: An Ecological Study In West Azerbaijan Province, Poldasht County, Iran, Research report, *Fluoride*, 50, 343–353.
- [73] Oliva, A., Spira, A., Multigner, L. (2001). Contribution of environmental factors to the risk of male infertility, *Human Reproduction*,16,1768-76.
- [74] Negro-Vilar, A. (1993). Stress and other environmental factors affecting fertility in men and women: overview, *Environmental Health Perspectives*, 101,59-64.
- [75] Younglai, E.V., Holloway, A.C., Foster, W.G. (2005). Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success, *Human Reproduction Update*,11,43-57.
- [76] Long, H., Jin, Y., Lin, M., Sun, Y., Zhang, L., Clinch, C. (2009). Fluoride toxicity in the male reproductive system [review], *Fluoride*, 42, 260-76.
- [77] Kour, K., Singh, J. (1980). Histological finding of mice testes following fluoride ingestion, *Fluoride*,13, 160-2.
- [78] Case, A.M. (2003). Infertility evaluation and management: strategies for family physicians, *Canadian Family Physician*, 49,1465-72.
- [79] Elbetieha, A., Darmani, H., Al-Hiyasat, A.S. (2000). Fertility effects of sodium fluoride in male mice, *Fluoride*, 33,128-34.
- [80] Birnbaum, L. (2008). The effects of environmental chemicals on human health. *Fertility and Sterility*, 89,31.
- [81] Sharma, R., Biedenharn, K.R., Fedor, J.M., Agarwal, A. (2013). Life style factors and reproductive health: taking control of your fertility, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11, 1-15.

- [82] Krasowska, A., Wlostowski, T. (1996). Photoperiodic elevation of testicular zinc protects seminiferous tubules against fluoride toxicity in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*), *Comparative biochemistry and physiology. Part C, Pharmacology, toxicology & endocrinology*, 113,81-84.
- [83] El-Seweidy, M.M., Hashem, R.M., Abo-El-matty, D.M., Mohamed, R.H. (2008). Frequent inadequate supply of micronutrients in fast food induces oxidative stress and inflammation in testicular tissues of weanling rats, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60,1237-42.
- [84] Dvorakova, H.K., Sandera, M., Jursova, M., Vasinova, J., Peknicova, J. (2008). The influence of fluorides on mouse sperm capacitation, *Animal Reproduction Science*, 108,157-170.
- [85] Sun, Z.L., Wang, B., Niu, R.Y., Zhang, J.H., Wang, J.D. (2009). Decreased sperm hyperactivation and low Catsper1 expression in mice exposed to fluoride, *Fluoride*, 42, 167-73.
- [86] Susheela, A.K., Kumar, A. (1991). A study of the effect of high concentrations of fluoride on the reproductive organs of male rabbits, using light and scanning electron microscopy, *Journal of reproduction and fertility*, 92, 353-360.
- [87] Kumar, A., Susheela, A.K. (1995). Effects of chronic fluoride toxicity on the morphology of ductus epididymis and the maturation of spermatozoa of rabbit, *International Journal of Experimental Pathology*, 76,1-11.
- [88] Wan, S.X., Zhang, J.H., Wang, J.D. (2006). Fluoride-induced changes in the expression of epidermal growth factor and its receptor in testicular tissues of young male rats, *Fluoride*, 39, 121-125.
- [89] Wan, S.X., Zhang, J.H., Wang, J.D. (2006). Effects of high fluoride on sperm quality and testicular histology in male rats, *Fluoride*, 39, 17-21.
- [90] Huang, C., Yang, H.B., Niu, R.Y., Sun, Z.L., Wang, J.D. (2008). Effects of sodium fluoride on androgen receptor expression in male mice. *Fluoride*, 41,10-17.
- [91] Zhang, J.H., Liang, C., Ma, J.J., Niu, R.Y., Wang, J.D. (2006). Effects of sodium fluoride and sulfur dioxide on sperm motility and serum testosterone in male rats, *Fluoride*, 39,126-31.
- [92] Ma, X., Cheng, X., Li, F., Guo, J. (2008). Experimental research on endocrine disturbing effect of fluorine on hypothalamus-hypophysis-testis axis in male rats, *Wei Sheng Yan Jiu*, 37,733-735.
- [93] Susheela, A.K., Jethanandani, P. (1996). Circulating testosterone levels in skeletal fluorosis patients, *Fundamental and Applied Toxicology*, 34,183-189.
- [94] Ghosh, D., Das, S.S., Maiti, R., Jana, D., Das, U.B. (2002). Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress, *Reproductive Toxicology*, 16, 385-90.
- [95] Narayana, M.V., Chinoy, N.J. (1994). Effect of fluoride on rat testicular steroidogenesis, *Fluoride*, 27, 7-12.
- [96] Susheela, A.K., Kumar, A. (1997). Ultrastructural studies on the Leydig cells of rabbits exposed to chronic fluoride toxicity, *Environmental Sciences*, 5,79-94.
- [97] Fukagai, T., Kurosawa, K., Sudo, N., Aso, T., Sugawara, S., Naoe, M., et al. (2005). Bilateral testicular tumors in an infertile man previously treated with follicle-stimulating hormones, *Urology*, 65,592.
- [98] Xu, Q., Lin, H.Y., Yeh, S.D., Yu, I.C., Wang, R.S., Chen, Y.T., et al. (2007). Infertility with defective spermatogenesis and steroidogenesis in male mice lacking androgen receptor in Leydig cells, *Endocrine*, 32, 96-106.
- [99] O'Donnell, L., Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R. (2001). Estrogen and spermatogenesis, *Endocrine Reviews*, 22, 289-318.
- [100] Reprotox. (2004). *Fluorides*. Vol. 126. Englewood, CO: Micromedex, Inc.
- [101] Yilmaz, B.O., Erkana, M. (2015). Effects of vitamin c on sodium fluoride-induced Oxidative damage in sertoli cells, Research report, *Fluoride* 48, 241-251.
- [102] Inkielewicz-Stepniak, I., Czarnowski, W. (2010). Oxidative stress parameters in rats exposed to fluoride and caffeine, *Food and Chemical Toxicology*, 48,1607-11.

- [103] Wang, A.G., Xia, T., Chu, Q.L., Zhang, M., Liu, F., Chen, X.M., et al. (2004). Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo hepatocytes, *Biomedical and Environmental Sciences*, 217-22.
- [104] Akyol, E., Baran, Y. (2015). Structure of Royal Jelly, Importance for Humans and Bees, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 15, 16-21
- [105] Karabağ, K., Dinç, H., Selçuk, M. (2010). Arı Sütünün İnsan Sağlığı İçin Önemi, *Ulusal Meslek Yüksekokulları Öğrenci Sempozyumu*, Düzce -Türkiye.
- [106] Korkmaz, A., Öztürk, C. (2010). *Arı Sütü*, Tarım ve Köyişleri Bakanlığı, Samsun İl Tarım Müdürlüğü, Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi Yayınları.
- [107] Şahinler, N. (2000). Arı Ürünleri ve İnsan Sağlığı Açısından Önemi, *Mustafa Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 5, 139-148.
- [108] Stocker, A., Schramel, P., Kettrup, A., Bengsch, E. (2005). Trace and mineral elements in royal jelly and homeostatic effects, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 19, 183-189.
- [109] Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernandez, L.J., Perez, A.J.A. (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of Food Science*, 73,9.
- [110] Kubo, T., Sasaki, M., Nakamura, J., Sasagawa, H., Ohashi, K., Takeuchi, H., Natori, S. (1996). Change in the expression of hypopharyngeal- gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role, *The Journal of Biochemistry*, 119,291-295.
- [111] Mobasser, M., Ghiyasvand, S., Ostadrahimi, A., Ghojzadeh, M., Noshad, H., Pourmoradian, S. (2015). Effect of fresh royal jelly ingestion on glycemic response in patients with type 2 diabetes, *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 17,20074.
- [112] Elham, G., Nejati, V., Najafi, G., Khazaei, M., Babaei, M. (2015). Study on the effect of royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic rats, *International Journal of Fertility and Sterility*, 9,113-20.
- [113] Sebai, H., Selmi, S., Rtibi, K., Gharbi, N., Sakly, M. (2015). Protective effect of lavandula stoechas and rosmarinus officinalis essential oils against reproductive damage and oxidative stress in alloxan-induced diabetic rats, *Journal of Medicinal Food*, 18, 241-9.
- [114] Kanbur, M., Eraslan, G., Beyaz, L., Silici, S., Liman, B.C., Altinordulu, S., et al. (2009). The effects of royal jelly on liver damage induced by paracetamol in mice, *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61, 123-32.
- [115] Karaca, T., Bayiroglu, F., Yoruk, M., Kaya, M.S., Uslu, S., Comba, B., et al. (2010). Effect of royal jelly on experimental colitis Induced by acetic acid and alteration of mast cell distribution in the colon of rats, *European Journal of Histochemistry*, 54, 193-6.
- [116] Ulusoy, E. (2012). Bal ve Apiterapi, *Uludağ Arıcılık Dergisi*, 12, 89-97.
- [117] Graham, J.M. (1992). *The Hive and the Honey Bee*, Dadant & Sons Hamilton, Illinois., 3330.
- [118] Burimistrova, L. (1999). *Physico-chemical and biological appreciation of drone brood*, PhD, Medical University, Russia, 159.
- [119] Atabay, N.Ö. (2012). *Akkaraman ırkı koyunlarda arı sütünün infertilite üzerine etkisi*, Doktora tezi, Kayseri.
- [120] Bogdanov, S. (2016). *Royal Jelly Bee Brood: Composition, Health, Medicine. The Royal Jelly Book Chapter 2*, Bee Product Science, www.bee-hexagon.net
- [121] Ramadan, M.F., Al-Ghamdi, A. (2012). Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. *Journal of Functional Foods*, 4, 39-52.
- [122] Yavaş, Ş. (2017). *Arı sütünün diyabetik sıçan testis dokularındaki apoptoz, proliferasyon ve insl3 immunreaktivitelerine etkisi*, Yüksek lisans tezi, Edirne.
- [123] Burimistrova, L. (1999). *Physico-chemical and biological appreciation of drone brood*, The Royal Jelly Book Chapter 2, Bee Product Science, www.bee-hexagon.net

- [124] Olivo, S. (2005). Screening of biological activities present in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly, *Toxicology in Vitro*, 19, 645-51.
- [125] Lercker, G., Vecchi, M.A., Sabatini, A. (1986). Carbohydrate determination of royal jelly by high resolution gas chromatography, *Food Chemistry*, 19, 255-64.
- [126] Sever, M. (2014). *Arı Sütünün (Royal Jelly) Yenidoğan Rat Büyüme Plağına Histomorfometrik ve İmmünohistokimyasal Etkileri*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Isparta.
- [127] Jianying, G.U.O., Zixu, W., Yaoxing, C., Jing, C.A.O., Wenli, T., Baochen, M.A., Yulan, D. (2021). Active components and biological functions of royal jelly, *Journal of Functional Foods*, 82, 104514.
- [128] Saboor, A., Maria, G.C., Filippo, F., Solomon, Z.A., Jianke, Li. (2020). New Insights into the Biological and Pharmaceutical Properties of Royal Jelly, *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 382; doi:10.3390/ijms21020382.
- [129] Çubuk, S. (2016). *Deneyisel hipotiroidi oluşturulmuş ratlarda arı sütünün tnf- α düzeyleri ile oksidan-antioksidan sistemler üzerine etkisi*, Doktora tezi, Van.
- [130] Scully, C., Epstein, J., Sonis, S. (2003). Oral mucositis: A challenging complication of radiotherapy, chemotherapy, and radiochemotherapy: part 1, pathogenesis and prophylaxis of mucositis, *Head & neck*, 25, 1057-70.
- [131] Sameh, A., Abdelnour, M.E., Abd El-Hack, M.A., Ayman, E., Taha, S.S., Elnesr, O.M., Abd Elmonem, A.S. (2020). Useful impacts of royal jelly on reproductive sides, fertility rate and sperm traits of animals, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104, 1798–1808.
- [132] Hassan, A.A. (2009). Effect of royal jelly on sexual efficiency in adult male rats, *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 23, 155-60.
- [133] Abdelhafiz, A.T., Muhamad, J.A. (2008). Midcycle pericoital intravaginal bee honey and royal jelly for male factor infertility, *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 101, 146-9.
- [134] Karacal-Tamamogullari, F., Aral, F., Demirkol, R. (2006). Erkek farelerde arı sütünün uzun süreli uygulanmasının bazı spermatolojik özellikler üzerine etkisi, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20, 341-4.
- [135] Elnagar, S.A. (2010). Royal jelly counteracts bucks "summer infertility", *Animal Reproduction Science*, 121, 174-80.
- [136] Karaca, T., Demirtas, S., Karaboga, I., Ayvazz, S. (2015). Protective effects of royal jelly against testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats, *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45, 27-32.
- [137] Karakaş, M. (2014) *Moleküler Biyoloji*, Genişletilmiş 2. Basım, Nobel Yayınları, Ankara
- [138] E., S. (2007) Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death, *Toxicologic Pathology*, 35(4): 495–516
- [139] Youle, R., Strasser, A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9, 47–59 <https://doi.org/10.1038/nrm2308>
- [140] Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., Karagin, P.H. (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi, *Güncel Gastroenteroloji* 24,3.
- [141] Dilsiz, N. (2009) *Moleküler Biyoloji*, Genişletilmiş 2. Basım, Palme Yayıncılık, Ankara
- [142] Çopuroğlu F.E. (2019). *Tümör Nekrozis Faktör Reseptör-1 'In Src-Homoloji-3 Bağlanma Bölgesinin Sinyal İletimi Üzerine Etkisi*, Y. lisans Tezi, Antalya
- [143] Kriegler, M., ve ark. (1988). A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF, *Cell*, 53, 45-53.
- [144] Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P., Karagin, P.H. (2020). Apoptoz ve Apoptotik Yolların Gözden Geçirilmesi, *Güncel Gastroenteroloji* 24,3.
- [145] Black, R. A., Rauch, C.T., et.al. (1997). A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells, *Nature*, 385, 729-733.

- [146] Smith, R. A., Baglioni, C. (1987). The active form of tumor necrosis factor is a trimer, *Journal of Biological Chemistry*, 262, 6951-6954.
- [147] Chan, F. K., ve ark. (2000). A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling, *Science*, 288, 2351-2354.
- [148] Hamurcu, N. (2021). *Dişeti Büyümlerinde Etkili Olan Olan Tnf-A, Fraktalkin ve Tgf-B Kemokin Seviyelerinin Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Ankara.
- [149] Bradley, J.R., Pober, J.S., (1996). Prolonged cytokine exposure causes a dynamic redistribution of endothelial cell adhesion molecules to intercellular junctions, Laboratory Investigation; *A Journal of Technical Methods and Pathology*, 75, 463- 472.
- [150] Jeffrey, J.L. (2004). The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis, *Reproductive Biology and Endocrinology*, This article is available from: <http://www.rbej.com/content/2/1/9>
- [151] Tartaglia, L. A., ve ark. (1993). A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death, *Cell*, 74(5), 845-853.
- [152] Viemann, D., ve ark. (2004). Transcriptional profiling of IKK2/NF-kappa B- and p38 MAP kinase-dependent gene expression in TNF-alpha-stimulated primary human endothelial cells, *Blood*, 103(9), 3365-3373.
- [153] Micheau, O. and J, Tschopp. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes, *Cell*, 114(2), 181-190.
- [154] Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., and Ghidelli, S., (2004). A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway, *Nature Cell Biology*, 6(2), 97-105.
- [155] Wu, Y., Zhou, B. (2010). TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion, *British journal of cancer*, 102, 639. doi: 10.1038/sj.bjc.6605530.
- [156] Yousif, T.H. (2020). *Investigation of the effect of ellagic acid on the Expression of some apoptotic proteins in lung -injury induced-rats*, Master thesis, Institute of science, Elazığ.
- [157] Aşçı, R., Çayan, S., Erdemir, F., Orhan, İ., Yaman, Ö., Usta, M.F., Kendirci, M., Ekmekçioğlu, O., Kadioğlu, A. (2013). *Erkek Üreme Sistemi Hastalıkları ve Tedavisi*, 1. Baskı, İstanbul Medikal Yayıncılık Bilimsel Eserler dizisi, İstanbul.
- [158] Mishra, S., Vinayak, M. (2015). Role of Ellagic Acid in Regulation of Apoptosis by Modulating Novel and Atypical PKC in Lymphoma Bearing Mice, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(281), 2-8.
- [159] Mosadegh, M., Hasanzadeh, S., Razi, M. (2017). Nicotine-induced damages in testicular tissue of rats evidences for bcl-2, p53 and caspase-3 expression, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20,199-208.
- [160] Nabil, A., Rakesh, K.S., Reda, M., Rajesh, J., Ashok, A. (2011). Association of sperm morphology and the sperm deformity index (SDI) with poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage inhibition, *Fertility and Sterility*, 95, 2481-2484.
- [161] Karabulut, S. (2014). *Sperm Kriyoprezervasyonu'nun Sinyal Yolakları, Apoptoz ve Sperm Parametreleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi*, Doktora Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü, Gebze.
- [162] Lee, I.T., Yang, C.M. (2012). Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediatorsinduced airway and pulmonary diseases, *Biochemical Pharmacological*, 84, 581-90. doi: 10.1016/j.bcp.2012.05.005.
- [163] Gilmore, T.D. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives, *Oncogene*, 25, 6680-6684. doi: 10.1038/sj.onc.1209954.
- [164] Li, N., Karin, M. (1999). Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *The FASEB journal*, 13, 1137-1143.

- [165] Brigelius-Flohé, R., Flohe, L. (2011). Basic Principles and Emerging Concepts in the Redox Control of Transcription Factors, *Antioxidants & redox signaling*, 15, 2335-81. doi: 10.1089/ars.2010.3534.
- [166] Park, H.S., Kim, S.R., Lee, Y.C. (2009). Impact of oxidative stress on lung diseases, *Respirology*, 14, 27-38.
- [167] Campbell, K.J., Perkins, N.D. (2006). Regulation of NF-kappaB function, *Biochemical Society Symposia.*, 73, 165–180.
- [168] Glavac, D., Ravnik-Glavac, M., O'Brien, S.J., Dean, M. (1994). Polymorphisms in the 3' untranslated region of the IκB/MAD-3 (NFKBI) gene located on chromosome 14, *Human Genetics*, 93(6), 694–696.
- [169] Baldwin Jr, A.S., (2001). Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease, *Journal of Clinical Investigation*, 107, 3–6.
- [170] Chen, L.F., Greene, W.C. (2004). Shaping the nuclear action of NF-κB, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5, 392–401.
- [171] Şenol, S. (2008). *Aydın İli Populasyonunda Nükleer Faktör-Kappab1 (NF-κB1) ve NF-κBIA Genlerinin Polimorfizminin PCR-RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi*, Y. lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.
- [172] Nabel, G.J., Verma, I.M. (1993). Proposed NF-B/IB family nomenclature, *Genes & Development*, 7, 2063.
- [173] Şen, M., Ay, U., Akbayır, E., Şenyer, S., Tüzün, E., Küçükali, C.İ. (2017). Nf-Kb, Sumo ve Ubikitinasyon İlişkisi, *Deneyisel Tıp Dergisi*, Cilt, 7, 13
- [174] Hoffmann, A., Baltimore, D. (2006). Circuitry of nuclear factor κB signaling, *Immunological Reviews*, 210(1), 171–186.
- [175] Tak, P.P., Firestein, G.S. (2001). NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases, *Journal of Clinical Investigation.*, 107, 7–11.
- [176] Chiao, P.J., Miyamoto, S., Verma, I.M. (1994). Autoregulation of IκBα activity, *Biochemistry*, 91, 28–32.
- [177] Maki, C.G., Huibregtse J.M., Howley P.M. (1996). In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53(1), *Cancer Research.*, 56, 2649–2654.
- [178] Chadebech, P., Brichese, L., Baldin, V., Vidal, S., Valette, A. (1999). Phosphorylation and proteasome-dependent degradation of Bcl-2 in mitotic-arrested cells after microtubule damage, *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, 262, 823–827.
- [179] Palombella, V.J., Rando, O.J., Goldberg, A.L., Maniatis, T. (1994). The ubiquitinproteasome pathway is required for processing the NF-κB1 precursor protein and the activation of NF-κB, *Cell*, 78, 773-785.
- [180] Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000). Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF-κB Activity, *Annual Review of Immunology*, 18, 621-663.
- [181] Schmitz, M.L., Mattioli, I., Buss, H., Kracht, M. (2004). NF-κB: A multifaceted transcription factor regulated at several levels, *ChemBioChem*, 5, 1348-1358.
- [182] Calzado, M.A., Bacher, S., Schmitz, M.L. (2007). NF- κB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer. *Current Medicinal Chemistry*, 14, 367-376.
- [183] Barkett, M., Gilmore, T.D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kB transcription factors, *Oncogene*, 18, 6910–6924.
- [184] Deveraux, Q.L., Reed, J.C. (1999). IAP family proteins: suppressors of apoptosis, *Genes & Development*, 13, 239–252.
- [185] Wang, C.Y., Mayo, M.W., Korneluk, R.G., Goeddel, D.V., Baldwin Jr, A.S. (1998). NF-kB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation, *Science*, 281, 1680–1683.

- [186] Delhalle, S., Blasius, R., Dicato, M., Diederich, M. (2004). A Beginner's Guide to NF- κ B Signaling Pathways, *Annals of the New York Academy of Sciences.*, 1030, 1–13.
- [187] Tran, H., Brunet, A., Griffith, E.C., Greenberg, M.E. (2003). The many forks in FOXO's road, *Signal transduction knowledge environment* (172), RE5.
- [188] Ravi, R., Bedi, G.C., Engstrom, L.W., Zeng, Q., Mookerjee, B., G  linas, C., Fuchs, E.J., Bedi, A. (2001). Regulation of death receptor expression and TRAIL/Apo2L-induced apoptosis by NF- κ B. *Nature Cell Biology.*, 3, 409–416.
- [189] Kasof, G.M., Lu, J.J., Liu, D., Speer, B., Mongan, K.N., Gomes, B.C., Lorenzi, M.V. (2001). Tumor necrosis factor- α induces the expression of DR6, a member of the TNF receptor family, through activation of NF- κ B. *Oncogene*, 20, 7965–7975.
- [190] Nakamura, B.N., Lawson, G., Chan, J.Y., Banuelos, J., Cort  s, M.M., Hoang, Y.D., Ortiz, L., Rau, B.A., Luderer, U. (2010). Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner, *Free Radical Biology and Medicine*, 49(9), 1368-79.
- [191] Cho, H.Y., Reddy, S.P., Kleeberger, S.R. (2006). Nrf2 defends the lung from oxidative stress, *Antioxidants & redox signaling*, 8, 76-87. doi: 10.1089/ars.2006.8.76.
- [192] Liu, Q., Gao, Y., Ci, X. (2019). Role of Nrf2 and Its Activators in Respiratory Diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 17. doi: 10.1155/2019/7090534.
- [193] Ahmed, S.M.U., Luo, L., Namani, A., Wang, X.J., Tang, X. (2017). Nrf2 signaling pathway: pivotal roles in inflammation, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1863, 585-597. doi: 10.1016/j.bbadis.2016.11.005.
- [194] Satoh, T., Okamoto, S.I., Cui, J., et al. (2006). Activation of the Keap1/Nrf2 pathway for neuroprotection by electrophilic [correction of electrophilic] phase II inducers, *Proceedings of the National Academy of Sciences, U S A*, 103, 768–773. doi:10.1073/pnas.0505723102.
- [195] Niture, S.K., Khatri, R., Jaiswal, A.K. (2014). Regulation of Nrf2 an update. *Free Radical Biology and Medicine*, 66,36–44. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008.
- [196] Chen, B., Lu, Y., Chen, Y., et al. (2015). The role of Nrf2 in -induced endothelial injuries. *Journal of Endocrinology*, 225, R83–R99. doi:10.1530/joe-14-0662.
- [197] Zhou, S., SunW, Z.Z., et al. (2014). The role of Nrf2-mediated pathway in cardiac remodeling and heart failure, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 260429. doi:10.1155/2014/260429.
- [198]   ahin, T. (2021). *Serebral iskemi reperfüzyon hasarında uzak iskemik ardko  ullanmanın infarkt alanı, asprosin, nükleer faktör eritroidle ilişkili faktör 2, mirna-93 ve mirna-27b düzeylerine etkileri*, Yüksek lisans tezi, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Elâzığ.
- [199] Wardyn, J.D., Ponsford, A.H., Sanderson, C.M. (2015). Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways, *Biochemical society transactions*, 43, 621-626. doi:10.1042/BST20150014.
- [200] Abdul-Aziz, A., MacEwan, D.J., Bowles, K.M., et al. (2015). Oxidative stress responses and NRF2 in human leukaemia, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 454659. doi:10.1155/2015/454659.
- [201] Yılmaz, S., Sofuo  lu, K., Delikara, N.,   etinkaya, T., Yılmaz, E. (2008). Semende Reaktif Oksijen T  revleri ve Antioksidanlar, *Zeynep K  mil Tıp B  lteni*, 39 (3), 131- 135.
- [202] Shi, G.J., Li, Z.M., Zheng, J., et al. (2017). Diabetes Associated With Male Reproductive System Damages: Onset Of Presentation, Pathophysiological Mechanisms And Drug Intervention, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 90, 562–574.
- [203] Wang, Y., Zhang, Z., Guo, W., et al. (2014). Sulforaphane Reduction Of Testicular Apoptotic Cell Death In Diabetic Mice Is Associated With The Upregulation Of Nrf2 Expression And Function, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 307,14–23.
- [204] Rajesh, K.T., Doreswamy, K., Shrilatha, B. (2002). Oxidative Stress Associated Dna Damage In Testis Of Mice: Induction Of Abnormal Sperms And Effects On Fertility, *Mutation Research*,513,103–111.

- [205] Araklı, G. (2020). *Deneyisel Diyabet Oluşturulmuş Ratlarda Karvakrolün Testikular Apoptozis, İnflamasyon, Nrf2/Ho-1 Sinyal Yolu ve Spermatolojik Parametreler Üzerine Etkileri*, Doktora Tezi, Elâzığ.
- [206] Bolan, Y., Zhaofeng, H. (2015). Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility, *BioMed Research International*, 10. doi: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/513196>.
- [207] Soberman, R.J., Christmas, P. (2003). The Organization And Consequences Of Eicosanoid Signaling, *Journal of Clinical Investigation*, 111: 1107-13.
- [208] Smith, W.L., Garavito, R.M., DeWitt, D.L. (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and 2. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 33157-60.
- [209] Örkan, G.Ş (2016). *Kolorektal Adenom ve Karsinomlarda İmmünohistokimyasal Cox-2, P53, Cd10 ve e-Cadherin Ekspresyonunun Tanısal Yararı*, Uzmanlık Tezi, Konya.
- [210] Dubois, R., Abramson, S., Crofford, L. (1998). Cyclooxygenase in Biology And Disease. *The FASEB Journal*, 12(12), 1063-73.
- [211] Heitmer, M., Kelly, C., Ensor, N., Gibson, K. (2004). Role of Cyclooxygenase-2 in Cytokine-induced B-cell Dysfunction and Damage by Isolated Rat and Human Islets, *The Journal of Biological Chemistry*, 279(51), 53145-51.
- [212] Inoue, H., Tanabe, T., Umesono, K. (2000). Feedback Control Of Cyclooxygenase-2 Expression Through Ppargamma. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(36), 28028-32.
- [213] Yurteri, Buket. (2016). *Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulmuş Sıçan Pankreasında Resveratrol Kullanımına Bağlı Proinflamatuvar Gen İfadelemelerinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- [214] Turgut, S. (2017). *Sağlıklı Koyunlarda Flunixin Meglumine ve Meloksikam Uygulamasının Koagülasyon Profili Üzerine Etkilerinin Araştırılması*, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- [215] Yoshimura, R., Sano, H., Masuda, C., Kawamura, M., Tsubouchi, Y., Chargui J, et al. (2000). Expression Of Cyclooxygenase- 2' in Prostate Carcinoma, *Cancer*, 89, 589- 96.
- [216] Denkert, C., Winzer, K.J., Müller, B.M., Weichert, W., Pest, S., Kobel, M., et al. (2003). Elevated Expression Of Cyclooxygenase- 2 is A Negative Prognostic Factor For Disease Free Survival And Overall Survival in Patients With Breast Carcinoma, *Cancer*, 97, 2978- 787.
- [217] Özdil, B. (2008). *Kronik Hepatit ve Sirozlu Vakalarda Cox-2 Gen Polimorfizminin Fibrozis Gelişimindeki Önemi*, Yan Dal Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi.
- [218] Crosby, C.G., DuBois, R.N. (2003). *The Cyclooxygenase-2 Pathway As A Target For Treatment Or Prevention Of Cancer*, Taylor & Francis. p. 1-7. doi: 10.1517/14728214.8.1.1.
- [219] Poligone, B., Baldwin, A.S. (2001). Positive And Negative Regulation Of NF-κB by COX-2, Roles Of Different Prostaglandins, *Journal of Biological Chemistry*, 276:38658–38664.
- [220] Frungieri, M.B., Calandra, R.S., Mayerhofer, A., Matzkin, M. (2015). Cyclooxygenase And Prostaglandins In Somatic Cell Populations Of The Testis, *Society for Reproduction and Fertility*, doi: 10.1530/REP-14-0392 ISSN 1470–1626, 1741–7899
- [221] Mostafa, T., Rashed, L., Taymour, M. (2016). Seminal Cyclooxygenase Relationship With Oxidative Stress In Infertile Oligoasthenoteratozoospermic Men With Varicocele, *Andrologia*, 48, 137–142.
- [222] Perrotta, I., Santoro, M., Guido, C., Avena, P., Tripepi, S., Amicis, F.D., Gervasi, M.C., Aquila, S. (2012). Expression Of Cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 In Human Male Gametes From Normal Patients, And Those With Varicocele And Diabetes: A Potential Molecular Marker For Diagnosing Male Infertility Disorders, *Journal of Anatomy*, 221, pp. 209–220.
- [223] *Unless else specified in boxes then ref is: Lippincott's Illustrated Reviews: Immunology. Paperback: 384 pages. Publisher: Lippincott Williams & Wilkins; (July 1, 2007). Language: English. ISBN 0781795435. ISBN 978-0781795432. Page 17.*

- [224] Dinarello, C.A. (2000). The Role Of The Interleukin-1-Receptor Antagonist In Blocking Inflammation Mediated By Interleukin-1, *The New England Journal of Medicine*, 343, 732–734.
- [225] Dinarello, C.A. (2007). Interleukin-18 and The Pathogenesis Of Inflammatory Diseases, *Seminars in Nephrology*, 27, 98–114.
- [226] Dinarello, C.A. (1991). Interleukin-1 and Interleukin-1 Antagonism, *Blood*, 77(8), 1627- 1652.
- [227] <https://en.wikipedia.org/wiki/IL1A> Erişim Tarihi:09.09.2021
- [228] Arend, W.P., (2002). The Balance Between IL-1 and IL-1Ra In Disease, *Cytokine and Growth Factor Reviews*,13,323-340.
- [229] Auron, P.E., Webb, A.C. (1994). Interleukin-1: A Gene Expression System Regulated At Multiple Levels, *European Cytokine Network*,5, 573-592.
- [230] Veerdonk, F., Netea, M. (2013). New Insights in the Immunobiology of IL-1 Family Members, *Frontiers in Immunology*, 4(167).
- [231] Kurt-Jones, E.A., Beller, D.I., Mizel, S.B., Unanue, E.R. (1985). Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(4), 1204-1208.
- [232] Thornton, P., McColl, B.W., Greenhalgh, A., Denes, A., Allan, S.M., Rothwell, N.J. (2010). Platelet Interleukin-1 α Drives Cerebrovascular Inflammation, *Blood*, 115(17), 3632-3639.
- [233] Gawaz, M., Brand, K., Dickfeld, T., Pogatsa-Murray, G., Page, S., Bogner, C., Koch, W., Schömig, A., Neumann, F.J. Platelets induce alterations of chemotactic and adhesive properties of endothelial cells mediated through an interleukin-1-dependent mechanism. Implications for atherogenesis, *Atherosclerosis*, 148(1), 75-85.
- [234] Yi-June, L., Cheing, M.L., Man-Ying, W., Lein-Tuan, H., Weikuei, C. (1999). Interleukin-1 Secreting Cells In Inflamed Gingival Tissue Of Adult Periodontitis Patients, *Cytokine*, 11, 626-33.
- [235] Cudicini, C., Lejeune, H., Gomez, E., (1997). Human Leydig cells and Sertoli Cells Are Producers Of Interleukin-1 and -6, *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82,1426–1433.
- [236] Stephan, J.P., Syed, V., Jegou, B. (1997). Regulation Of Sertoli Cell Il-1 And Il-6 Production In Vitro, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 134,109–118.
- [237] Khan, S.A., Khan, S.J., Dorrington, J.H. (1992). Interleukin-1 Stimulates Deoxyribonucleic Acid Synthesis In Immature Rat Leydig Cells In Vitro. *Endocrinology*,131,1853-57.
- [238] Jegou, B., Cudicini, C., Gomez, E., Stephan, J.P. (1995). Interleukin-1, Interleukin-6 And Germ Cell-Sertoli Cell Cross-Talk, *Reproduction, Fertility and Development*,7,723-30.
- [239] Zeyse, D., Lunenfeld, E., Prinsloo, I., Huleihel, M. (1999). Regulation Of Interleukin-1 Receptor Antagonist Production By Sertoli cells. In: *Program of the Conjoint Annual Meeting Of The American Society For Reproductive Medicine And The Canadian Fertility And Andrology Society*, Toronto, Ontario, Canada.
- [240] Soeder, O., Syed, V., Callard, G.V. (1991). Production And Secretion Of An Interleukin- 1-Like Factor Is Stage-Dependent And Correlates With Spermatogonial DNA Synthesis In The Rat Seminiferous Epithelium, *International Journal of Andrology*, 14, 223–231.
- [241] Cudicini, C., Lejeune, H., Gomez, E. (1997). Human Leydig Cells And Sertoli Cells Are Producers Of Interleukin-1 and -6, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82 5, 1426–1433, <https://doi.org/10.1210/jcem.82.5.3938>.
- [242] Gerard, N., Syed, V., Bardin, W. (1991). Sertoli Cells Are The Site Of Interleukin-1a Synthesis In Rat Testis, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 82, R13–16.
- [243] Wang, J.E., Josefsen, G.M., Hansson, V., Haugen, T.B. (1998). Residual Bodies And Il-1a Stimulate Expression Of Mrna For Il-1a And Il-1 Receptor Type I In Cultured Rat Sertoli Cells, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 137,139–144.
- [244] Hoebe, E., Van-Damme, J., Put, W. (1996). Cytokines Derived From Activated Human Mononuclear Cells Markedly Stimulate Transferrin Secretion By Cultured Sertoli Cells. *Endocrinology*, 137,514–521.

- [245] Hoeben, E., Wuyts, A., Proost, P. (1997). Identification of IL-6 As One Of The Important Cytokines Responsible For The Ability Of Mononuclear Cells To Stimulate Sertoli Cells Functions, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 132,149–160.
- [246] Karzai, A.W., Wright, W.W. (1992). Regulation Of The Synthesis And Secretion Of Transferrin And Cycl.Protein-2/Cathepsin L By Mature Sertoli Cells In Culture, *Biology of Reproduction*, 47,823–831.
- [247] Takao, T., Mitchell, W.M., Tracey, D.E., DeSouza, E.B. (1990). Identification Of İnterleukin-1 Receptors İn Mouse Testi, *Endocrinology*, 127,251–258.
- [248] Hampl, R., Drabkova, P., Kandar, R., Stepan, J. (2012). Impact Of Oxidative Stress On Male İnfertility, *Ceska Gynekologie*, 77(3), 241-245.
- [249] Şener, G., Yeğen, B.Ç. (2009). İskemi Reperfüzyon Hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi*, 22(3), 5-13.
- [250] Aitken, R.J., Roman, S.D. (2008). Antioxidant Systems And Oxidative Stress In The Testes, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*,1,15-24.
- [251] Agarwal, A., Sekhon, L.H. (2010). The Role Of Antioxidant Therapy In The Treatment Of Male Infertility, *Human Fertility*, 13,217-25.
- [252] Türk, G. (2013). Kemoterapötiklerin Erkek Üreme Sistemi Üzerindeki Yan Etkileri ve Koruyucu Stratejiler. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 17, 73-92.
- [253] Ford, W.C.L. (2004). Regulation Of Sperm Function By Reactive Oxygen Species, *Human Reproduction Update*, 10,387-99.
- [254] Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., Du Plessis, S.S. (2010). Free Radicals: Their Beneficial And Detrimental Effects On Sperm Function, *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 425-35.
- [255] Valenzuela, A. (1991). The Biological Significance Of Malondialdehyde Determination In The Assessment Of Tissue Oxidative Stress, *Life sciences*, 48, 301-309. doi: 10.1016/0024-3205(91)90550-u.
- [256] Varškevičienė, Z., Černiauskienė, R., Grybauskas, P. (1984). Effect of α-Tocopherol on the Production Of Malondialdehyde In Rat Tissue Homogenates After Hypobaric Exposure, *General Physiology and Biophysics*, 3, 47-53.
- [257] Parlak, A.E. (2015). *Bis-1,2,4- triazol içeren bazı mannich bazlarının biyolojik etkilerinin araştırılması*, Doktora Tezi, Uşak Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [258] Gutteridge, J.M., (1995). Lipid Peroxidation And Antioxidants As Biomarkers Of Tissue Damage, *Clinical Chemistry*, 41, 1819-1828.
- [259] Khan, H.A., Abdelhalim, M.A.K., Al-Ayed, M.S., Alhomida, A.S. (2012). Effect Of Gold Nanoparticles On Glutathione And Malondialdehyde Levels İn Liver, Lung And Heart Of Rats, *Saudi Journal Of Biological Sciences*, 19, 461-464. doi: 10.1016/j.sjbs.06.005.
- [260] Turgut, G., Enli, Y., Kaptanoglu, B., Turgut, S., Genç, O. (2006). Changes In The Levels of MDA and GSH In Mice Serum, Liver And Spleen After Aluminum Administration, *Eastern Journal of Medicine*, 11, 7-12.
- [261] Köse, K., Dogan, P. (1992). Lipit peroksidasyonu, *Erciyes Üniversitesi Tıp Dergisi*, Ek1, 340-350.
- [262] Ighodaro, O., Akinloye, O., (2018). First Line Defence Antioxidants-Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) And Glutathione Peroxidase (GPX): Their Fundamental Role In The Entire Antioxidant Defence Grid, *Alexandria Journal of Medicine*, 54, 287-293. doi: 10.1016/j.ajme.2017.09.001.
- [263] Zamocky, M., Furtmüller, P.G., Obinger, C. (2008). Evolution Of Catalases From Bacteria To Humans, *Antioxidants & Redox Signaling*, 10, 1527-1548. doi: 10.1089/ars.2008.2046.
- [264] Odajima, N., Betsuyaku, T., Nagai, K., Moriyama, C., Wang, D.H., Takigawa, T., Ogino, K., Nishimura, M. (2010). The Role Of Catalase In Pulmonary Fibrosis, *Respiratory Research*, 11, 183. doi: 10.1186/1465-9921-11-183.

- [265] Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview Of Its Protective Roles, *Measurement, And Biosynthesis, Molecular Aspects of Medicine*, 30, 1-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
- [266] Aebi, H. (1984). Catalase In Vitro. *Methods In Enzymology*, 105,121-126.
- [267] Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1996). *Free Radicals In Biology And Medicine*, 2.Edt. Oxford.
- [268] Sichak, S.P., Dounce, A.L. (1986). Analysis Of The Peroxidatic Mode Of Action Of Catalase, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 249(2),286-295.
- [269] Percy, M.E. (1984). Catalase: An Old Enzyme With A New Role? *Canadian Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 62(10), 1006-1014.
- [270] Mailer, K., Maestro, R.F. (1991). Stability Of The Anti-Oxidative Enzymes In Aqueous And Detergent Solution, *Molecular and Cellular Biochemistry*, 107(1), 47-54.
- [271] Sun, Y., Oberley, L.W., Elwell, J.H., Sierra-Rivera, E. (1989). Antioxidant Enzyme Activities In Normal And Transformed Mouse Liver Cells, *International Journal of Cancer*, 44(6), 1028-1033.
- [272] <https://www.rcsb.org/structure/1f4j>, Erişim tarihi: 16.10.2021
- [273] Dündar, Y., Aslan, R. (2000). *Hekimlikte Oksidatif Stres ve Antioksidanlar*. I. Basım. Uyum Ajans Ankara, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Afyon, s,32.
- [274] Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, E.C. (1992). Free Radical Antioxidants And Human Disease: Where Are We Now? *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 119 (6), 598-620.
- [275] Mates, J.M., Peres-Gomez, C., De-Castro, I.N. (1999). Antioxidant Enzymes And Human Disease. *Clinical Biochemistry*, 32(8), 595-603.
- [276] Bedwal *et al.* (2009). Catalase in testes and epididymidis of zinc deficient rats. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(1): 55–58.
- [277] MacLeod, J. (1943). The Role Of Oxygen In The Metabolism And Motility Of Human Spermatozoa. *American Journal of Physiology*, 138(3), 512-518.
- [278] Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A. (2009). Glutathione: Overview Of Its Protective Roles, *Measurement, And Biosynthesis, Molecular Aspects of Medicine*, 30, 1-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
- [279] Narayanankutty, A., Jdevagiri, J., Narayanankutty, V. (2019). Glutathione, An Antioxidant Tripeptide: Dual Roles In Carcinogenesis And Chemoprevention, *Current Protein & Peptide Science*, 20,907-917. doi: 10.2174/1389203720666190206130003.
- [280] Biswas, S.K., Rahman, I. (2009). Environmental Toxicity, Redox Signaling And Lung Inflammation: The role of glutathione, *Molecular Aspects of Medicine*, 30, 60-76. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.07.001>.
- [281] Fafula, R.V., Onufrovych, O.K., Iefremova, U.P., Melnyk, O.V., Nakonechnyi, I.A., Vorobets, D.Z., Vorobets, Z.D. (2017). Glutathione Content In Sperm Cells Of Infertile Men, *Regulatory Mechanisms In Biosystems*, 8(2), 157–161. doi:10.15421/021725.
- [282] Grosshans, K., Calvin H.I., (1985), Estimation Of Glutathione In Purified Populations Of Mouse Testis Germ Cells, *Biology of Reproduction*, 33(5),1197-205. doi: 10.1095/biolreprod33.5.1197.
- [283] Den Boer, D.J., Mackenbach, P., Grootegoed, J.A. (1989). Glutathione Metabolism In Cultured Sertoli Cells And Spermatogenic Cells From Hamsters, *Journal of reproduction and fertility*, 87, 391-400.
- [284] Den Boer, P.J., Poot, M., Verkerk, A. et al. (1990). Glutathione-Dependent Defence Mechanisms In Isolated Round Spermatids From The Rat, *International Journal of Andrology*, 13, 26-38.
- [285] Agrawal, Y.P., Vanha-Perttula, T. (1988). Glutathione, L-Glutamic Acid And Y-Glutamyl Transpeptidase In The Bull Reproductive Tissues, *International Journal of Andrology*, 11, 123-131.
- [286] Donnelly, E.T., McClure, N., Lewis, S.E.M. (2000). Glutathione And Hypotaurine In Vitro: Effects On Human Sperm Motility, DNA Integrity And Production Of Reactive Oxygen Species, *Mutagenesis*,15,61-68.

- [287] Wang, C., Chen, Y., Manthari, R.K., Wang, J., (2018). Abnormal Spermatogenesis Following Sodium Fluoride Exposure Is Associated With The Downregulation Of CREM and ACT In The Mouse Testis, *Toxicology and Industrial Health*, 34(4), 219-227.
- [288] Aslan, A., (2011). *Ratlarda Azoksimetan Uygulanarak Oluşturulan Kolorektal Kanserde Likopenin Siklooksijenaz-2 (Cox-2), Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, P53 Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi*, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elâzığ.
- [289] Aslan, A., Can, M.İ., (2014). Milk Thistle Impedes the Development of Carbontetrachloride-Iduced Liver Damage in Rats Through Suppression of Bcl-2 and Regulating Caspase Pathway, *Life Sciences*, 117, 13-18.
- [290] Laemmli, U.K. (1970). Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680. doi: 10.1038/227680a0.
- [291] Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. (1979). Assay For Lipid Peroxides İn Animal Tissues By Thiobarbituric Acid Reaction, *Analytical Biochemistry*, 95, 351-358. doi: 10.1016/0003-2697(79)90738-3.
- [292] Antmen, Ş.E., (2005). *Beta Talasemide Oksidatif Stres*, Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana.
- [293] Ellman, G.L. (1959). Tissue Sulphydryl Groups, *Archives Of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77. doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
- [294] Yiğit, M., (2015). *Astaksantin arpe-19 hücrelerinde sigara dumanı bileşenlerinden hidrokuinon ile oluşturulan oksidatif stres modelinde antioksidan parametreler (GSH, GSH-PX, MDA), ca+2 sinyali ve apoptosis düzeyleri üzerine olan etkisinin araştırılması*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta.
- [295] Luck, H. (1963). *Catalase//Methods İn Enzymatic Analysis/H.-U. Bergmeyer ed*, Verlag Chemie, GmbH, Academic Press, New York, 885-894.
- [296] Aslan, A., Gok, O., Erman, O., Kuloglu, T. (2018). Ellagic Acid İmpedes Carbontetrachlorideinduced Liver Damage İn Rats Through Suppression Of NF-kB, Bcl-2 and Regulating Nrf-2 and Caspase Pathway, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 105, 662-669. doi: 10.1016/j.biopha.2018.06.020.
- [297] Yılmaz, İ., (2005). *Erişkin Ratlarda Deneysel Varikosel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptosis Düzeylerinin Yükselmesi ve Yükselmiş Olan Apoptosisin Varikoselektomi Sonrası Gerileme Düzeyi ve Süresinin TUNEL Yöntemi ile Değerlendirilmesi*, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul.
- [298] Qiu, J., Liu, Z., Li, Y., Xuan, H., Lin, Q., Li, F., Wang, Y., Li, Z., Zhao, M. (2007). Overexpression of the Gene for Transmembrane 4 Superfamily Member 4 Accelerates Liver Damage in Rats Treated with CCl4, *Journal of Hepatology*, 46, 266-275.
- [299] Türk, G., Ateşşahin, A., Sönmez, M., Yüce, A., Çeribaşı, A.O. (2007). Lycopene Protects against Cyclosporine A-Induced Testicular Toxicity in Rats, *Theriogenology*, 67 (4), 778-785.
- [300] Can, M.İ., (2014). *Karbon Tetraklorür (CCL4) ile Karaciğer Hasarı Oluşturulmuş Ratlarda Deve Diken (Silybum marianum L.)'nin Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2 Proteinlerinin Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elâzığ.
- [301] Swan, S.H., Elkin, E.P., Fenster, L. (2000). The Question Of Declining Sperm Density Revisited: An Analysis Of 101 Studies Published 1934–1996, *Environmental Health Perspectives*;108:961–966.
- [302] Hagai, L., Niels, J., Anderson, M.A., Jaime, M., Dan Weksler-Derri, I.M., Rachel, P., Shanna, H.S. (2017). Temporal Trends İn Sperm Count: A Systematic Review And Meta-Regression Analysis, *Human Reproduction Update*, 23, 6, 646–659, <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx022>
- [303] Spittle, B. (2008). Fluoride and Fertility, *Editorial Fluoride*, 41(2)98–100.
- [304] Zilong, S., Ruiyan, N., Bin, W., Zhibin, J., Jinming, W., Jianhai, Z., Shaolin, W., Jundong, W. (2011) Fluoride-Induced Apoptosis and Gene Expression Profiling İn Mice Sperm İn Vivo, *Archives of Toxicology* 85,1441–1452.

- [305] Karadeniz, A., Şimşek, N., Koç, F., Alp, H. (2009). Kronik Flor Toksikasyonu Oluşturulan Farelerde Testis Dokusundaki Oksidatif Hasar Üzerine Panax ginseng'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 15 (1), 1-8.
- [306] fluoridealert.org/issues/health/fertility/, Erişim Tarihi: 26.10.2021
- [307] Gupta, R.S., Khan, T.I., Agrawal, D., Kachhawa, J.B.S. (2007) The Toxic Effects Of Sodium Fluoride On The Reproductive System Of Male Rats, *Toxicology and Industrial Health*, 23, 507–513.
- [308] Pervez, A., Sinha, M.K., Yadav, M. (2016). Implications Of Fluoride Toxicity On The Male Reproductive System: A Review, *Journal of Mountain Research.*, 11, 1-7.
- [309] Al-Sanafi, A.E., Mohssin, S.A., Abdulla, S.M. (2007). Effect of Royal Jelly on Male Infertility, *Thi-Qar Medical Journal (TQMJ)*, 1, 1-12.
- [310] Abdelnour, S.A., Mohamed, E., El-Hack, A., Alagawany, M., Ayman, E.T., Shaaban, S.E., Osama, M.A. E., Ayman, A.S. (2020). Useful Impacts Of Royal Jelly On Reproductive Sides, Fertility Rate And Sperm Traits Of Animals, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 104, 1798–1808.
- [311] Minami, A., Matsushita, H., Ieno, D., Matsuda, Y., Horii, Y., Ishii, A., Suzuki, T. (2016). Improvement of Neurological Disorders in Postmenopausal Model Rats By Administration Of Royal Jelly, *Climacteric: The Journal of the International Menopause Society*, 19(6), 568–573. <https://doi.org/10.1080/13697137.2016.1238452>.
- [312] Pan, Y., Xu, J., Jin, P., Yang, Q., Zhu, K., You, M., Hu, F. (2019). Royal Jelly Ameliorates Behavioral Deficits, Cholinergic System Deficiency, And Autonomic Nervous Dysfunction in Ovariectomized Cholesterol-Fed Rabbits, *Molecules* (Basel, Switzerland), 24(6), 1149. <https://doi.org/10.3390/molecules24061149>.
- [313] Caixeta, D. C., Teixeira, R. R., Peixoto, L. G., Machado, H. L., Baptista, N. B., de Souza, A. V., Salmen Espindola, F. (2018). Adaptogenic Potential of Royal Jelly in Liver of Rats Exposed To Chronic Stress, *Plos one*, 13(1), e0191889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191889>.
- [314] Sarkar, S.D., Maiti, R., Ghosha, D., (2006). Management Of Fluoride Induced Testicular Disorders By Calcium And Vitamin-E Co-Administration In The Albino Rat, *Reproductive Toxicology*, 22 606–612.
- [315] Chinoy, N.J., Ahmedabad, E.S. (1989). Fluoride Induced Biochemical Changes in Reproductive Organs Of Male Mice, *Fluoride*, 22, 2.
- [316] Kasmaie, F.D., Malekinejad, H., Khoramjouy, M., Rezaei-Golmisheh, A., Acyabar, H.J. (2014). Royal Jelly Protects From Taxol-Induced Testicular Damages via Improvement of Antioxidant Status and up-Regulation of E2f1, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 60:2, 80-88, DOI: 10.3109/19396368.2013.852271.
- [317] Hassan, A.A. (2009). Effect of Royal Jelly on Sexual Efficiency in Adult Male Rats, *Iraqi Journal Of Veterinary Sciences*, Vol. 23, Supplement II, 155-160.
- [318] Gawel, S., Wardas, M., Niedworok, E., Wardas, P. (2004). Dialdehyd Malonowy (Mda) Jako Wskaźnik Procesów Peroksydacji Lipidów W Organizmie [Malondialdehyde (MDA) as a Lipid Peroxidation Marker], *Wiadomości Lekarskie*, 57(9-10):453-5. Polish. PMID: 15765761.
- [319] Ayala, A., Muñoz, M.F., Argüelles, Sandro. (2014) Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.*, 31, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/360438>.
- [320] Wang, Junling., Zhang, Y., Zhang, H., Zhang, K., Zhang, Z., Lanzhou, J.L. (2009). Toxic effects of fluoride on reproductive ability in Male rats: sperm motility, oxidative stress, Cell cycle, and testicular apoptosis, Research report, *Fluoride*, 42(3)174–178.
- [321] Adedara, I.A., Olabiyi, B.F., Ojuade, T.D., Idris, U.F., Onibiyo, E.M., Farombi, E.O. (2017). Taurine reverses sodium fluoride-mediated increase in inflammation, caspase-3 activity, and oxidative damage along the brain-pituitary-gonadal axis in male rats, *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(9):1019-1029. doi: 10.1139/cjpp-2016-0641. Epub Jun 27. PMID: 28654759.

- [322] Sarkar, S.D, Maiti, R., Ghosha, D. (2006). Management of fluoride induced testicular disorders by calcium and Vitamin-E co-administration in the albino rat, *Reproductive Toxicology*, 22, 606–612.
- [323] Ghanbari, Elham., Nejati, Vahid., Khazaei, Mozafar. (2016). Antioxidant and protective effects of Royal jelly on histopathological changes in testis of diabetic rats, *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 14(8),519-526.
- [324] Mohamed, M.A., Samir, A.E., Alkafafy, M.E., Mohamed, A.A., Mousa, A.A. (2018). Protective potential of royal jelly against cadmium-induced infertility in male rats, *Andrologia*, 50: e12996.
- [325] Tohamy, H.G., Dina, R.G., Yasser, S.E. (2019). Attenuation potentials of royal jelly against hydroxyurea-induced infertility through inhibiting oxidation and release of pro-inflammatory cytokines in male rats, *Environmental Science and Pollution Research*, 26,21524–21534.
- [326] Knapen, M.F., Zusterzeel, P.L., Peters, W.H., Steegers, E.A. (1999). Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction, A review, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 82,171–184.
- [327] Lu, S.C. (2009). Regulation of glutathione synthesis, *Molecular Aspects of Medicine*, 30,42–59.
- [328] Mandava, V.R., Rajendra, N.B. (2012). Protective effect of melatonin on fluoride-induced Oxidative stress and testicular dysfunction in rats, Research report, *Fluoride*, 45(2),116–124.
- [329] Krechniak, J., Inkielewicz, I. (2005). Correlations between fluoride concentrations and Free radical parameters in soft tissues of rats, Research report, *Fluoride*, 38(4), 293–296.
- [330] Zilong, S., Sujuan, L., Yuxiang, Y., Hongyu, C., Mohammad, M.O., Ram, K.M., Ruiyan, N., Jundong, W. (2018). Alterations in epididymal proteomics and antioxidant activity of mice exposed to fluoride, *Archives of Toxicology*, DOI 10.1007/s00204-017-2054-2.
- [331] Zhang, M., Wang, A., He, W., He, P., Xu, B., Xia, T., Chen, X., Yang, K. (2007). Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons, *Toxicology*, 236, 208–216.
- [332] Ghosh, J., Das, J., Manna, P., Sil, P.C. (2008). Cytoprotective effect of arjunolic acid in response to sodium fluoride mediated oxidative stress and cell death via necrotic pathway, *Toxicology in Vitro*, 22, 1918–1926.
- [333] Shivarajashankara, Y.M., Shivashankara, A.R., Gopalakrishna, B.P., Rao, S.H. (2001). Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis, *Fluoride*, 34, 108–113.
- [334] Chalapathy, C.V., Chatterjee, A., Jayaramaiah, U., Shivasharanappa, Kirankumar., Hanchinalmath, J.V., Patil, S.J. (2020). Impact of Royal Jelly on Infertility: A Review, *Asian Journal of Biological and Life Sciences*, Vol 9, Issue 3.
- [335] Cavusoglu, K., Yapar, K., Yalçın, E. (2009). Royal jelly (honey bee) is a potential antioxidant against cadmium-induced genotoxicity and oxidative stress in albino mice, *Journal of Medicinal Food*, 12, 1286–1292.
- [336] El-Nekeety, A.A., El-Kholy, W., Abbas, N.F., Ebaid, A., Amra, H.A., Abdel-Wahhab, M.A. (2007). Efficacy of royal jelly against the oxidative stress of fumonisin in rats, *Toxicon*, 50, 256–269.
- [337] Karadeniz, A., Simsek, N., Karakus, E., Yildirim, S., Kara, A., Can, I., Kisa, F., Emre, H., Turkeli, M. (2011). Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 981793 doi: 10.1155/2011/981793. Epub 2011 Aug 1. PMID: 21904651; PMCID: PMC3166579.
- [338] Guo, H., Kouzuma, Y., Yonekura, M. (2009). Structures and properties of antioxidative peptides derived from royal jelly protein, *Food Chemistry*, 113, 238–245.
- [339] Nandi, A., Yan, L.J., Jana, C.K., Das, N. (2019). Role of Catalase in Oxidative Stress- and Age-Associated Degenerative Diseases, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019: 9613090. doi: 10.1155/2019/9613090
- [340] Altındağ, F., Ozdek, U. (2021). Protective Effects of Chitosan and Chitosan Oligosaccharide on Sodium Fluoride-Induced Testicular Damage in Male Rats: A Stereological and Histopathological Study, *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 27 (2), 183-189.

- [341] García-Montalvo, E.A., Reyes-Pérez, H., Del Razo, L.M. (2009). Fluoride exposure impairs glucose tolerance via decreased insulin expression and oxidative stress, *Toxicology* 263,75–83.
- [342] Izquierdo-Vega, J.A., Sánchez-Gutiérrez, M., Del Razo, L.M. (2008). Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230,352–357.
- [343] C.D. Nobes, A. (1995). Hall, Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia, *Cell*, 81,53–62.
- [344] Liu, G., Chai, C., Cui, L. (2003). Fluoride causing abnormally elevated serum nitric oxide levels in chicks, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13199–204.
- [345] Hassan, H.A., Yousef, M.I. (2009). Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2332–2337.
- [346] Aydin, G., Cicek, E., Akdogan, M., Gökalp, O. (2003). Histopathological and biochemical changes in lung tissues of rats following administration of fluoride over several generations, *Journal of Applied Toxicology*, 23,437–446.
- [347] Flora, S.J., Mittal, M., Mishra, D. (2009). Co-exposure to arsenic and fluoride on oxidative stress, glutathione linked enzymes, biogenic amines and DNA damage in mouse brain, *Journal of the Neurological Sciences*, 285,198–205.
- [348] Mittal, M., Flora, S.J. (2006). Effects of individual and combined exposure to sodium arsenite and sodium fluoride on tissue oxidative stress, arsenic and fluoride levels in male mice, *Chemico-Biological Interactions*, 162,128–139.
- [349] Azad, F., Nejati, V., Shalizar-Jalali, A., Najafi, G., Rahmani, F. (2018). Royal jelly protects male mice against nicotine-induced reproductive failure, *Veterinary Research Forum*, 9 (3),231 – 238.
- [350] Najafi, G., Nejati, V., Jalali, A.S, Zahmatkesh, E. (2014). Protective Role of Royal Jelly in Oxymetholone-induced Oxidative Injury in Mouse Testis, *Iranian Journal of Toxicology*, 8, 25.
- [351] <https://fluoridealert.org/studies/fertility02/>, Erişim Tarihi: 13.11.2021. Michael Connett, Fluoride's Effect On Male Reproductive System: Animal Studies. *Fluoride Action Network*, 2012.
- [352] Dvoráková-Hortová, K., et al. (2008). The influence of fluorides on mouse sperm capacitation, *Animal Reproduction Science*, 108(1-2),157-70.
- [353] Sun, Z., et al. (2010). Effects of sodium fluoride on hyperactivation and Ca²⁺ signaling pathway in sperm from mice: an in vivo study, *Archives of Toxicology*, 84(5),353-61.
- [354] Wu, P.F., et al. (2010). Morphologic observation of mouse testicular tissue lesions induced by fluorine, *Animal Husbandry and Feed Science*. 4, 20-22.
- [355] Izquierdo-Vega, J.A., et al. (2008). Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230(3),352-7.
- [356] Izquierdo-Vega, J.A., et al. (2010). NADPH oxidase participates in the oxidative damage caused by fluoride in rat spermatozoa, Protective role of α-tocopherol, *Journal of Applied Toxicology*, 31(6).
- [357] Reddy, P.S., et al. (2007). Suppression of male reproduction in rats after exposure to sodium fluoride during early stages of development, *Naturwissenschaften*, 94(7),607-11.
- [358] Jiang, C.X., et al. (2005). Relationship between spermatogenic cell apoptosis and serum estradiol level in rats exposed to fluoride, *Wei Sheng Yan Jiu (Journal of hygiene research)*, 34,32-4.
- [359] Cui, L.X., et al. (2003). Experimental study on effect of fluoride on reproductive system of male rats, *Chinese Journal of Endemiology*, 22:195-7
- [360] Kumar, N, et al. (2012). To Study the Effect of Vitamin D and E on Sodium-Fluoride-induced Toxicity in Reproductive Functions of Male Rabbits, *Toxicology International*,19(2), 182-87.
- [361] Sharma, J.D., et al. (2008). Amelioration of fluoride toxicity in rats through vitamins (C, D) and calcium, *Toxicology International*, 15,111-6.

- [362] Chen, S.J., et al. (2008). Testis damage induced by chronic fluorosis and antagonism of taurine-zinc, *Journal of Environment and Health*, (12)1
- [363] Candidate, T.A., Najafi, G., Nejati, Vahid. (2014). Protective effect of royal jelly on fertility and biochemical parameters in bleomycin- induced male rats, *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, 12 (3), 209-216.
- [364] Hashem, K., Abdelazem, A.Z., Abdelbaky, N.W. (2020). Royal Jelly ameliorates 6-mercaptopurine induced spermatogenesis impairment and testicular apoptosis by regulating PI3K/AKT pathway in male rats, March 19th, *Research Square*, DOI: <https://doi.org/10.21203/rs.2.20288/v2>.
- [365] Asadi, N., Kheradmand, A., Gholami, M., Saidi, S.H., Mirhadi, S.A. (2019). Effect of royal jelly on testicular antioxidant enzymes activity, MDA level and spermatogenesis in rat experimental Varicocele model, *Tissue and Cell*, 57,70–77.
- [366] Yıldırım, S., Belhan, S., Uyar, H., Huyut, Z., Oto, G., Sağlam, Y.S. (2018). Kronik Olarak Flor ve 7,12-Dimetilbenzantrasene (DMBA) Maruz Kalmanın Ratlarda Spermatogenezis ve Testisin Histopatolojisine Etkileri, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 13(2), 141-148.
- [367] Zhang, S., Jiang, C., Liu, H., Guan, Z., Zeng, Q., Zhang, C., Lei, R., Xia, T., Gao, H., Yang, L., Chen, Y., Wu, X., Zhang, X., Cui, Y., Yu, L., Wang, Z., Wang, A. (2013). Fluoride-elicited developmental testicular toxicity in rats: Roles of endoplasmic reticulum stress and inflammatory response, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 271,206–215.
- [368] Krasowska, A., Wlostowski, T., Bonda, E., (2004). Zinc protection from fluoride-induced testicular injury in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*), *Toxicology Letters*, 147, 229–235.
- [369] Kohguchi, M., Inoue, S., Ushro, S., Iwaki, K., Ikeda, M., Kurimoto, M. (2004). Effect of Royal Jelly Diet on the Testicular Function of Hamsters, *Food Science and Technology Research*, 10 (4), 420-423.
- [370] Manas, G.E., Najaf, IG. (2017). Protective effects of royal jelly on the histomorphologic, oxidative stress and sperm parameters in Ofloxacin treated rat, *Comparative Clinical Pathology*, 26,1111–1115 doi: 10.1007/s00580-017-2494-3.
- [371] Khazaei, M., Ansarian, A., Ghanbari, E. (2018). New Findings on Biological Actions and Clinical Applications of Royal Jelly: A Review, *Journal of Dietary Supplements*, 15,5, 757-775, doi: 10.1080/19390211.2017.1363843.
- [372] Pavel, C.I., Al. Mărghițaș, L., Bobiș, O., Dezmirean, D.S. (2011). Agripina Șapcaliu, Ion Radoi, Mariana N. Mădaș, Biological Activities of Royal Jelly – Review, *Scientific Papers, Animal Science and Biotechnologies*, 44 (2).
- [373] Malekinejad, H., Ahsan, S., Delkhosh-Kasmaie, F., Cheraghi, H., Rezaei-Golmisheh, A., Janbaz-Acyabar, H. (2016). Cardioprotective effect of royal jelly on paclitaxel-induced cardio-toxicity in rats, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 19, 221-7.
- [374] Cavusoglu, A., Yap, K., Fast, E., Yalcin, E. (2011). *Journal of Medical Food*, 1229-1237.
- [375] Süllü, Y., Kandemir, B., Yıldız, L., Karagöz, F., Barış, S., Aydın, O. (2006). Germ hücreli testis tümörlerinde p53 ve bcl-2 ekspresyonu, *Türk Patoloji Dergisi*, 22(3), 181-186.
- [376] Aslan, A., Beyaz, S., Gok, O., Can, M.I., Parlak, G., Ozercan, I.H., Gundogdu, R (2021). Royal jelly abrogates fluoride induced oxidative damage in rat heart tissue by activating of the Nrf-2/NF-κB and Bcl-2/Bax pathway, *Toxicology Mechanisms and Methods*, 31, 9, 644-654 DOI: 10.1080/15376516.2021.1950249
- [377] Aslan, A., Can, M.I., Gok, O., Beyaz, S., Parlak, G., Ozercan, I.H. (2021). The Inducing of Caspase and Bcl-2 Pathway with Royal Jelly Decreases the Muscle Tissue Damage Exposed with Fluoride in Rats, *Environmental Science and Pollution Research*, 10.1007/s11356-021-16456-z.
- [378] Fulda S. (2009). Tumor resistance to apoptosis, *International Journal of Cancer*;124,511-5.
- [379] Canpolat, F. (2016). Hücre Siklusu ve Apoptoz, *Güncel Dermatoloji Dergisi*, 1,1.
- [380] Abu-Serie, M.M., NohaH, H. (2019). Two purified proteins from royal jelly with in vitro dual anti-hepatic damage potency, Major royal jelly protein 2 and its novel isoform X1, *International Journal of Biological Macromolecules*, 128, 782–795.

- [381] Baskaran R, Priya L.B, Kumar V.S, Padma V.V. (2018). Tinospora cordifolia extract prevents cadmium-induced oxidative stress and hepatotoxicity in experimental rats, *Journal of Ayurveda and Integrative Medicine*, 9, 252– 257.
- [382] Wang, H., Zhang, R., Song, Y., Li, T., Ge, M. (2019). Protective effect of ganoderma triterpenoids on cadmium-induced testicular toxicity in chickens, *Biological Trace Element Research*, 187,281–290.
- [383] Arab-Nozari, Milad, M., Ebrahim., Shokrzadeh, M., Ahangar, N., Talebpour Amiri, F., Shaki, F. (2020). Co-exposure to non-toxic levels of cadmium and fluoride induces hepatotoxicity in rats via triggering mitochondrial oxidative damage, apoptosis, and NF-kB pathways, *Environmental Science and Pollution Research*, 27,24048–24058.
- [384] Akdoğan, M., Yöntem, M., (2018). Sitokinler, *Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi*, 3(1), 36-45.
- [385] Özoran, K., Tülek, N., Düzgün, N. (1994). Romatoid artrit (ra) ve sitokinler: interlökin-1 (il-1), interlökin-6 (il-6), tümör nekrozis faktör alfa (tnf-a) ve interferon gama (ifn-y), *Ankara Tıp Mecmuası (The Journal Of The Faculty Of Medicine)*, 47, 495-504.
- [386] Kurtuluş, M., Pirim, İ. (2020). COVID-19 ve Sitokin Fırtınası, *Forbes Journal of Medicine*,1(3),55-60 doi: 10.5222/forbes.2020.79188.
- [387] Lysiak, J.J. (2004). The role of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 in the mammalian testis and their involvement in testicular torsion and autoimmune orchitis, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2,9.
- [388] De, S.K, Chen, H.L, Pace, J.L., Hunt, J.S., Terranova, P.F., Enders, G.C. (1993). Expression of tumor necrosis factor-alpha in mouse spermatogenic cells, *Endocrinology*, 133,389-396.
- [389] Hutson, J.C. (1993). Secretion of tumor necrosis factor alpha by testicular macrophages, *Journal of Reproductive Immunology*, 23,63-72.
- [390] Moore, C., Hutson, J.C. (1994). Physiological relevance of tumor necrosis factor in mediating macrophage-Leydig cell interactions, *Endocrinology*, 134,63-69.
- [391] Mauduit, C., Besset, V., Caussanel, V., Benahmed, M. (1996). Tumor necrosis factor α receptor p55 is under hormonal (follicle-stimulating hormone) control in testicular Sertoli cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 224,631-637.
- [392] Froysa, B., Ritzen, E.M. (1991). Production and secretion of an interleukin- 1-like factor is stage dependent and correlates with spermatogonial DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium, *International Journal of Andrology*, 14,223-231.
- [393] Gustafsson, K., Sultana, T., Zetterstrom, C.K., Setchell, B.P., Siddiqui, A., Weber, G., Soder, O. (2002). Production and secretion of interleukin-1 α proteins by rat testis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 297, 492-497.
- [394] Cudicini, C., Lejeune, H., Gomez, E., Bosmans, E., Ballet, F., Saez, J., Jegou, B. (1997). Human Leydig cells and Sertoli cells are producers of interleukins- 1 and -6, *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82,1426-1433.
- [395] Rozwadowska, N., Fiszer, D., Kurpisz, M. (2001). Interleukin-1 system in testis – quantitative analysis: Expression of immunomodulatory genes in male gonad, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 495,177-180.
- [396] Hales, D.B. (2002). Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis, *Journal of Reproductive Immunology*, 57,3-18.
- [397] He, X., Sun, Z., Manthari, R.K., Wu, P., Wang, J. (2018). Fluoride altered rat's blood testis barrier by affecting the F-actin via IL-1 α . *Chemosphere*, 211.
- [398] Quadria, J.A., Sarwara, S., Pinkya., Karb, P., Singha, S., Mallick, S.R., Aravac, S., Naga, T.C, Roy, T. S., Shariffa, A., (2018). Fluoride induced tissue hypercalcemia, IL-17 mediated inflammation and apoptosis lead to cardiomyopathy: Ultrastructural and biochemical findings, *Toxicology*, 406–407, 44–57.

- [399] Jovanovic, D. V., Battista, J. A., Di, J.M.P., Jolicoeur, F.C., He, Y., Zhang, M., Mineau, F., Pelletier, J. P. (1998). IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL- β and TNF- α , by human macrophages, *Journal of Immunology*, 160, 3513.
- [400] Thangapandiyan, S., Miltonprabu. (2015). Epigallocatechin gallate exacerbates fluoride induced oxidative stress mediated testicular toxicity in rats through the activation of Nrf2 signaling pathway, *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 4, 272–287.
- [401] Almeer, R.S., Soliman, D., Kassab, R.B., AlBasher, G.I., Alarifi, S., Alkahtani, S., Ali, D., Metwally, D., Abdel Moneim, A.E. (2018). Royal Jelly Abrogates Cadmium-Induced Oxidative Challenge in Mouse Testes: Involvement of the Nrf2 Pathway, *International Journal of Molecular Sciences*, 19, 3979; doi:10.3390/ijms19123979.
- [402] Aslan, Z., Aksoy, L. (2015). Anti-inflammatory effects of royal jelly on ethylene glycol induced renal inflammation in rats, *International Brazilian Journal of Urology*, 41(5), 1008–1013. doi: 10.1590/S1677-5538.IBJU.2014.0470.
- [403] Liew, S.H., Meachem, S.J., Hedger, M.P. (2007). A stereological analysis of the response of spermatogenesis to an acute inflammatory episode in adult rats, *Journal of Andrology*, 28(1), 176–85.
- [404] Kucukler, S., Darendelioğlu, E., Caglayan, C., Ayna, A., Yıldırım, S., Kandemir, F.M. (2020). Zingerone attenuates vancomycin-induced hepatotoxicity in rats through regulation of oxidative stress, inflammation and apoptosis, *Life Sciences*, 118382.
- [405] Aprioku, J.S. (2013). Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. *Journal of Reproduction & Infertility*, 14(4), 158.
- [406] Kandemir, F.M., Yıldırım, S., Kucukler, S., Caglayan, C., Darendelioğlu, E., Dortbudak, M.B. (2020). Protective effects of morin against acrylamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity: A multi-biomarker approach, *Food and Chemical Toxicology*, 138, 111190.
- [407] Çomaklı, S., İleritürk, M., Kirman, E.M. (2020). Rutinin Ratlarda Kolistin Kaynaklı Testis Hasarında Oksidatif DNA Hasarı, NF- κ B Aracılı Enflamasyon ve Apoptoz Üzerindeki Koruyucu Etkileri, *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9(2), 83-90.
- [408] Shishodia, S., Majumdar, S., Banerjee, S., Aggarwal, B.B. (2003). Ursolic acid inhibits Nuclear factor- κ B activation induced by carcinogenic agents through suppression of I κ B α kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1, *Cancer Research*, 63(15), 4375-83.
- [409] Kumar, J., Halder, C., Verma, R. (2020). Fluoride Compromises Testicular Redox Sensor, Gap Junction Protein, and Metabolic Status: Amelioration by Melatonin, *Biological Trace Element Research*, 196, 552–564.
- [410] Luo, Q., Cui, H., Deng, H., Kuang, P., Liu, H., Lu, Y., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., Zhao, L. (2017). Sodium fluoride induces renal inflammatory responses by activating NF- κ B signaling pathway and reducing antiinflammatory cytokine expression in mice, *Oncotarget*, 8(46), 80192-80207.
- [411] Tak, P.P., Firestein, G.S., (2001). NF- κ B: a key role in inflammatory diseases, *Journal of Clinical Investigation*, 107, 7–11.
- [412] Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P.O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., (2004). A physical and functional map of the human TNF- α /NF- κ B signal transduction pathway, *Nature Cell Biology*, 6(2), 97-105.
- [413] Hayden, M.S., Ghosh, S., (2014). Regulation of NF- κ B by TNF Family Cytokines, *Seminars in Immunology*, June ;26(3), 253–266. doi: 10.1016/j.smim.2014.05.004.
- [414] Shabab, T., Khanabdali, R., Moghadamtousi, S.Z., Kadir, H.A., Mohan, G. (2017). Neuroinflammation Pathways: a General Review, *International Journal of Neuroscience*, 127, 624-633.
- [415] Almeer, R.S., Ialbasher, G., Alarif, S., Alkahtani, S., Ali, D., Moneim, A.E.A (2019). Royal jelly attenuates cadmium induced nephrotoxicity in male mice, *Scientific Reports*, 9, 5825 | <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42368-7>.

- [416] Poligone, B., Baldwin, A.S. (2001). Positive and negative regulation of NF- κ B by COX-2. Roles of different prostaglandins, *Journal of Biological Chemistry*, 276, 38658–38664.
- [417] Frungieri, M.B., Calandra, R.S., Mayerhofer, A., Matzkin, M.E (2015). Cyclooxygenase and prostaglandins in somatic cell populations of the testis, *Reproduction*, 149, 169–180.
- [418] Mostafa, T., Rashed, L., Taymour, M. (2016). Seminal cyclooxygenase relationship with oxidative stress in infertile oligoasthenoteratozoospermic men with varicocele, *Andrologia*, 48, 137–142.
- [419] Perrotta, I., Santoro, M., Guido, C., Avena, P., Tripepi, S., Amicis, F.D., Gervasi, M. C., Aquila, S. (2012). Expression of cyclooxygenase-1 (COX-1) and COX-2 in human male gametes from normal patients, and those with varicocele and diabetes: A potential molecular marker for diagnosing male infertility disorders. *Journal of Anatomy*, Sep;221(3):209-20. doi: 10.1111/j.1469-7580.2012.01534.x.
- [420] Alhusaini, A., Faddaa, L., Hanaa, M.A., Iman, H., El Orabi, N.F., Bassiouni, Y. (2017). Amelioration of the Protein Expression of Cox2, NF κ B, and STAT-3 by Some Antioxidants in the Liver of Sodium Fluoride–Intoxicated Rats, *Oncotarget*, 8(46), 80192–80207.
- [421] Karaca, T., Bayiroglu, F., Yoruk, M., Kaya, M. S., Uslu, S., Comba, B., Mis, L. (2010). Effect of royal jelly on experimental colitis Induced by acetic acid and alteration of mast cell distribution in the colon of rats, *European Journal of Histochemistry*, EJH, 54 (4), Article e35. <https://doi.org/10.4081/ejh.2010.e35>.
- [422] Karaca, T., Simsek, N., Uslu, S., Kalkan, Y., Can, I., Kara, A., Yoruk, M. (2012). The effect of royal jelly on CD3(+), CD5(+), CD45(+) T-cell and CD68(+) cell distribution in the colon of rats with acetic acid-induced colitis, *Allergologia Et Immunopathologia*, 40(6), 357–361.
- [423] Karaca, T., Uz, Y. H., Demirtas, S., Karaboga, I., Can, G. (2015). Protective effect of royal jelly in 2,4,6 trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 18(4), 370–379.
- [424] Inoue, Y., Hara, H., Mitsugi, Yukari., Yamaguchi, E., Kamiya, T., Itoh, A., Adachi, T. (2018). 4-Hydroperoxy-2-decenoic acid ethyl ester protects against 6- hydroxydopamine-induced cell death via activation of Nrf2-ARE and eIF2 α -ATF4 pathways, *Neurochemistry International*, 112, 288-296.
- [425] Kobayashi, M., Yamamoto, M. (2006). Nrf2 Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species, *Advances in Enzyme Regulation*, 46, 113-140.
- [426] Tebay, L.E., Robertson, H., Durant, S.T., Vitale, S.R., Penning, T.M., Dinkova- Kostova, A.T., Hayes, J.D., (2015). Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease, *Free Radical Biology and Medicine*, 88, 108-146.
- [427] Hara, H., Ohta, M., Adachi, T. (2006). Apomorphine protects against 6- hydroxydopamine-induced neuronal cell death through activation of the Nrf2-ARE pathway, *Journal of Neuroscience Research*, 84, 860-866.
- [428] Hara, H., Ohta, M., Ohta, K., Kuno, S., Adachi, T. (2003). Increase of antioxidative potential by tert-butylhydroquinone protects against cell death associated with 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress in neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Brain research Molecular brain research*, 119, 125-131.
- [429] Lee, J.-M., Calkins, M.J., Chan, K., Kan, Y.W., Johnson, J.A. (2003). Identification of the NF-E2-related factor-2-dependent genes conferring protection against oxidative stress in primary cortical astrocytes using oligonucleotide microarray analysis, *Journal of Biological Chemistry*, 278, 12029-12038.
- [430] Chen, J., Shaikh, Z.A. (2009). Activation of Nrf2 by cadmium and its role in protection against cadmium-induced apoptosis in rat kidney cells, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 241, 81–89.
- [431] Liang, M., Wang, Z., Hui, L., Liang, C., Pan, J., He, H., Wu, Q., Tang, Y., Ma, J., Yang, L. (2018). L-Arginine induces antioxidant response to prevent oxidative stress via stimulation of glutathione synthesis and activation of Nrf2 pathway, *Food and Chemical Toxicology*, 115, 315–328.

- [432] Almeer, R.S., Alarifi, Saud., Alkahtani, Saad., Ibrahim, S.R., Daou, A., Moneim, A. (2018). The potential hepatoprotective effect of royal jelly against cadmium chloride-induced hepatotoxicity in mice is mediated by suppression of oxidative stress and upregulation of Nrf2 expression, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1490–1498.
- [433] Chouhan, S., Flora, S.J.S. (2008). Effects of fluoride on the tissue oxidative stress and apoptosis in rats: biochemical assays supported by IR spectroscopy data, *Toxicology*, 254(1–2), 61-67.
- [434] Shanthakumari, D., Srinivasalu, S., Subramanian, S. (2004). Effect of fluoride intoxication on lipidperoxidation and antioxidant status in experimental rats, *Toxicology*, 204, 219-228.
- [435] Krechniak, J., Inkielewicz, I. (2005). Correlations between fluoride concentration and free radical parameters in soft tissues of rats, *Fluoride*, 38, 293-296.
- [436] Shivarajashankara, Y.M., Shivashankara, A.R., Gopalakrishna, B.P., Rao, S.H. (2001). Oxidative stress in children with endemic skeletal fluorosis, *Fluoride*, 34, 108-113.



Bildiriler:

1. **Parlak, G.**, Aslan, A., Kuloglu, T., Beyaz, S., Gok, O. and Turkoglu, G. (2021). Investigation of the Protective Effects of Royal Jelly Against Testicular Damage Caused by Fluoride in Rats, Oral Presentation, Eurasia 8th International Applied Sciences Congress, Uzbekistan.
2. Beyaz, S., Gok, O., **Parlak, G.**, Can, M.I. and Aslan, A. (2020). The Effect of Royal Jelly on Bax / Bcl-2 Protein Signaling Pathways Against Fluoride-Induced Brain Damage in Rats, Oral Presentation, 2nd International Congress on Medical Sciences and Biotechnology, Usak, Turkey.
3. Beyaz, S., Gok, O., **Parlak, G.**, Can, M.I. and Aslan, A. (2020). The Effect of Royal Jelly on Some Protein Signal Pathways Against Heart Damage Exposed by Fluoride in Rats, Oral Presentation, 9th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Kars, Turkey.
4. Beyaz, S., Gok, O., **Parlak, G.**, Can, M.I. and Aslan, A. (2020). The Investigation of the Effect of Royal Jelly Against Liver Damage Through Some Protein Signaling Pathways, Oral Presentation, 9th International Molecular Biology and Biotechnology Congress, Kars, Turkey.
5. Gok, O., Beyaz, S., **Parlak, G.**, Can, M.I. and Aslan, A. (2020). The Effect of Royal Jelly on Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-6 Protein Signaling Pathways in Rats with Muscle Damage with Fluoride, Oral Presentation, International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry, Ankara, Turkey.
6. Gök, O., Beyaz, S., **Parlak, G.** and Aslan, A. (2021). The Effect of Royal Jelly on GSK-3, BDNF, Nrf-2 and NF- κ B Protein Signal Pathways Against Liver Damage Exposed by Fluoride in Rats, Oral Presentation, 3rd International European Conference on Interdisciplinary Scientific Researches, Comrat State University, Comrat, Moldova.
7. Beyaz, S., Gök, O., **Parlak, G.** and Aslan, A. (2021). The Effect of Royal Jelly on Caspase-3, Caspase-6, Bax, Bcl-2 and VEGF Protein Signaling Pathways Against Fluoride-Induced Kidney Damage in Rats, Oral Presentation, 8th International Multidisciplinary Cancer Research Congress, Turkey.
8. Beyaz, S., Gok, O., **Parlak, G.**, Can, M.I. and Aslan, A. (2021). The Effect of Royal Jelly on Some Protein Signaling Pathways Against Fluoride-Induced Kidney Damage in Rats, Oral Presentation, International Icontech Symposium-3 on Innovative Surveys in Positive Sciences, Mohammed First University, Oujda, Morocco.
9. Beyaz, S., Gok, O., **Parlak, G.** and Aslan, A. (2021). The Investigation of the Effect of Royal Jelly Against Heart Damage Through BDNF, Caspase-9, GSK-3, Nrf-2 and NF- κ B Protein Signaling Pathways, Oral Presentation, Ejons 11th International Conference on Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences, Karak, Jordan.
10. Gok, O., Beyaz, S., **Parlak, G.** and Aslan, A. (2021). The Effect of Royal Jelly on Some Apoptotic Protein Signal Pathways in Rats with Lung Injury with Fluoride, Oral Presentation, International Congress on Biological and Health Science (ICBH), Afyon Kocatepe University, Afyon, Turkey.
11. Gok, O., Beyaz, S., **Parlak, G.**, Can, M.I. and Aslan, A. The Effect of Royal Jelly on the Expression of Some Apoptotic Protein Markers, Oral Presentation, 3rd International African Conference on Current Studies of Science, Technology & Social Sciences, University of Abomey-Calavi, Benin, Africa.

12. Beyaz, S., Gok, O., **Parlak, G.** and Aslan, A. (2021). The Effect of Royal Jelly on Caspase-9, BDNF, Nrf-2, NF- κ B, Akt and Erk Gene Expressions Against Brain Damage Induced by Fluoride, Oral Presentation, Mas 14th International European Conference on Mathematics, Engineering, Natural & Medical Sciences, Széchenyi István University, Hungary.
13. Beyaz, S., Gok, O., **Parlak, G.**, Can, M.I. and Aslan, A. (2021). The Investigation of the Effect of Royal Jelly on TNF- α and IL-1 α Protein Expressions Against Muscle Tissue Damage Induced by Fluoride, Oral Presentation, 2. International Baku Scientific Researches Conference, Baku, Azerbaijan.
14. Gok, O., Beyaz, S., **Parlak, G.**, Can, M.I. and Aslan, A. (2021). Investigation of The Effects of Royal Jelly Against Pancreas Damage with NF- κ B and Tnf-Alpha Expressions, Oral Presentation, 2nd Al Farabi International Applied Sciences Congress, Nakhchivan University, Nakhchivan, Azerbaijan.
15. Beyaz, S., Gök, Ö., **Parlak, G.**, Can, M.I. and Aslan, A. (2020). Florür ile Oluşturulan Pankreas Hasarına Karşı Arı Sütünün Koruyucu Etkilerinin Moleküler Biyolojik Yönden Araştırılması, Sözlü Bildiri, 4. Ulusal İmmünoterapi ve Onkoloji Kongresi, Türkiye.
16. Kumbak B, Özkan ZS, Timurkan H, Ekinci M, **Parlak G**, Ebil E, Atılgan R, Kandemir Y. Yardımcı üreme tekniklerinde başarıyı etkileyen faktörler. 5. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi. 27-30 Eylül 2012. İzmir, Türkiye.
17. Özkan ZS, Ekinci M, **Parlak G**, Timurkan H, Kumbak B, Atılgan R, Kandemir Y. Zona pellucida kalınlığı ve fertilizasyon. 5. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi. 27-30 Eylül 2012. İzmir, Türkiye.
18. Özkan ZS, Ekinci M, **Parlak G**, Ebil E, Atılgan R, Kumbak B, Timurkan H, Kandemir Y. ICSI sikluslarında polar body büyüklüğünün döllenmeye etkisi. 5. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi. 27-30 Eylül 2012. İzmir, Türkiye.
19. Özkan ZS, Ekinci M, **Parlak G**, Ebil E, Atılgan R, Kumbak B, Timurkan H, Kandemir Y, Sapmaz E. Oosit sitoplazma çapı ve ICSI başarısı. 5. Ulusal Üreme Endokrinolojisi ve İnfertilite Kongresi. 27-30 Eylül 2012. İzmir, Türkiye.
20. **Parlak, G.**, Çolakoğlu, N. Prepubertal Dönemde Uygulanan Cyfluthrinin Oluşturduğu Testiküler Hasar Üzerine Benfotiaminin Koruyucu Etkileri, XIII. Uluslararası katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30.04-03.05.2016. Çeşme, İzmir, Türkiye.
21. Colakoglu, N., Kuloglu, T., Ozan, E., Kocaman, N., Dabak, D.O., **Parlak, G.** Sıçanlarda D-Galaktozamin ile Oluşturulmuş Karaciğer Hasarına Karşı Vitamin D3'ün Koruyucu Etkileri XIII. Uluslararası katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 30.04-03.05.2016. Çeşme, İzmir, Türkiye.

Projeler:

1. FÜBAP2057: Prepubertal Dönemde Uygulanan Cyfluthrinin Oluşturduğu Testiküler Hasar ve Sperm Karakteristiği Üzerine Benfotiaminin Koruyucu Etkileri (Yüksek Lisans Tez araştırma projesi), 2010-2012.
2. FUBAP, F.F. 19.16: Florür İle Oluşturulan Testiküler Hasara Karşı Arı Sütünün Koruyucu Etkilerinin Moleküler Biyolojik Yönden Araştırılması (Doktora Tez araştırma projesi) 2016- 2022.