



2017

DOKTORA

FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ (VETERİNER)

Serdar AKTAŞ



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ (VETERİNER)
DOKTORA PROGRAMI
VFT-2017-0002

**FARELERDE BORİK ASİDİN TESTİS DOKUSUNDA
OKSİDATİF STRES VE SPERMATOZOOM DNA HASARINA
OLAN ETKİSİNİN SAPTANMASI**

Serdar AKTAŞ
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Cavit KUM

AYDIN-2017

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMAKOLOJİ VE TOKSİKOLOJİ (VETERİNER)
DOKTORA PROGRAMI**

**FARELERDE BORİK ASİDİN TESTİS DOKUSUNDA
OKSİDATİF STRES VE SPERMATOZOON DNA HASARINA
OLAN ETKİSİNİN SAPTANMASI**

**SERDAR AKTAŞ
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Cavit KUM**

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-13013 proje numarası ile desteklenmiştir

AYDIN - 2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Doktora Programı çerçevesinde Serdar AKTAŞ tarafından hazırlanan “**Farelerde Borik Asidin Testis Dokusunda Oksidatif Stres ve Spermatozoon DNA Hasarına Olan Etkisinin Saptanması**” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 01/12/2017

Üye (T.D.)	: Prof. Dr. Cavit KUM	Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Ferda AKAR	Adnan Menderes Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Kadir SERVİ	Fırat Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Ahmet ATEŞŞAHİN	Fırat Üniversitesi
Üye	: Prof. Dr. Melih AKSOY	Adnan Menderes Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün tarih ve sayılı oturumunda alınan nolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

.....
Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tezimin tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen ve her zaman desteklerini hissettiğim danıőmanım Prof. Dr. Cavit KUM'a çok teşekkür ederim. Ayrıca Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı ğretim üyeleri Prof. Dr. Ferda AKAR, Doç. Dr. Selim SEKKİN, Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU'na gösterdikleri ilgi ve sabır için teşekkür ederim. Yine çalıőmamın laboratuvar analizlerinde bana yardımcı olan Anabilim Dalı Araő. Gör. Dr. Hande Sultan ŐAHİNER başta olmak üzere tüm yüksek lisans ve doktora öğrencilerine teőekkürlerimi sunarım. Sperm analizlerinde Dlerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Melih AKSOY ve Araő Gör. Dr. Niyazi KÜÇÜK'e katkılarından dolayı içtenlikle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
RESİMLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Borik Asidin Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri.....	7
2.2. Bor Bileşiklerinin Erkek Fertilitesine Olan Etkileri.....	10
2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar.....	12
2.4. Erkek Fertilitesinde Oksidatif Stres ve Antioksidanların Rolü.....	15
2.5. Tek Hücre Jel Elektrophrez (Comet) Yöntemi.....	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. Gereç.....	22
3.1.1. Hayvan Materyali.....	22
3.1.2. Deneysel Uygulama.....	22
3.1.3. Cihazlar.....	25
3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	25
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Örneklerin Alınması.....	26
3.2.1.1. Testis doku örneklerinin alınması.....	26
3.2.1.2. Sperm örneklerinin alınması.....	26
3.2.2. Sperm örneklerinin analizi.....	27
3.2.2.1. Motilite muayenesi.....	27
3.2.2.2. Ölü-Canlı spermatozoon muayenesi.....	27
3.2.2.3. Spermatozoonlarda membran bütünlüğünün belirlenmesi	27

3.2.2.4.	Spermatozoonlarda DNA hasarının belirlenmesi.....	28
3.2.3.	Testis Dokusunda Oksidan - Antioksidan Parametre Analizleri.....	29
3.2.3.1.	Malondialdehid (MDA) analizi.....	30
3.2.3.2.	Süperoksit dismutaz (SOD) analizi.....	30
3.2.3.3.	Katalaz (CAT) analizi.....	31
3.2.3.4.	Glutasyon (GSH) analizi.....	32
3.2.3.5.	Total protein analizi.....	32
3.3.	İstatistiksel Değerlendirme.....	33
4.	BULGULAR.....	34
4.1.	Ağırlık Değerleri.....	34
4.1.1.	Canlı Ağırlık.....	34
4.1.2.	Testis ve <i>Vesicula seminalis</i> Ağırlıkları.....	34
4.2.	Sperm Parametreleri.....	36
4.3.	Spermatozoonlarda DNA Hasarı.....	37
4.4.	Testis Dokusunda Biyokimyasal Parametreler.....	41
5.	TARTIŞMA.....	44
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	54
	KAYNAKLAR.....	56
	ÖZGEÇMİŞ.....	69

SİMGELER ve KISALTMALAR

Å	: Ångström
B	: Elementer bor
BA	: Borik asit
BOREN	: Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü
°C	: Santigrat derece
CA	: Canlı ağırlık
CAT	: Katalaz
cm	: Santimetre
Cd	: Kadmiyum
CuCl₂	: Bakır klorür
CTFA	: Kozmetik, Tuvalet ve Koku Bileşenleri Birliği (Cosmetic, Toiletries and Fragrances Association)
DAPI	: Diamino fenilindol
DBDC	: Dibromo diklorobütan
DDT	: Dikloro difenil trikloroethan
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
DTNB	: Dithiobis nitro benzoik asit
Etimaden	: Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü
g	: Gram
GSH	: Glutatyon
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
IL	: İnterleukin
kcal	: Kilokalori
LC₅₀	: Lethal konsantrasyon 50
LD₅₀	: Lethal doz 50
LOAEL	: Yan etkilerin görüldüğü en düşük doz (Lowest observable adverse effect level)
LMPA	: Düşük erime noktalı agaroz (Low melting point agarose)
MDA	: Malondialdehit

μg	: Mikrogram
Mg	: Magnezyum
mg	: Miligram
mmol	: Milimol
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NMA	: Normal erime noktalı agaroz (Normal melting agarose)
NOAEL	: Hiçbir yan etki göstermeyen doz (No observable adverse effect level)
NPIC	: Amerikan Ulusal Pestisit Kontrol Merkezi (National Pesticid Information Center)
PBS	: Fosfat buffer solüsyon
PCB	: Poliklorlu bifenil
pKa	: Logaritmik ölçüde asit ayrıştırma sabiti veya iyonizasyon sabiti
pm	: Pikometre
r	: Yarıçap
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
SO₂	: Sülfür dioksit
t_{1/2}	: Biyolojik yarı ömür
TBA	: Tiyobarbitürik asit
TMMOB	: Türkiye Mimarlar ve Mühendisler Odası Başkanlığı
<i>V. seminalis</i>	: Vesicula seminalis
WBC	: Lökosit
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
Zn	: Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Borun atomik kristal görünümü	4
Şekil 2.	Borik asidin açık kimyasal formülü.....	8
Şekil 3.	Serbest radikallerin oluşumu ve diğer reaktif türlerinin üretimi.....	15

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1.	Yaygın kullanılan ve bilinen bazı bor bileşikleri; A: Boraks (Tinkal), B: Kernit, C: Kolemanit, D: Üleksit.....	5
Resim 2.	Deney hayvanlarının bireysel kafeslerde barındırılması.....	24
Resim 3.	Farelere borik asidin gavaj uygulaması ile oral yoldan verilmesi.....	24
Resim 4.	Floresan mikroskop kullanılarak DNA hasarının derecelendirilmesi..	29
Resim 5.	Spermatozoonlarda pozitif kontrol, kontrol ve borik asit gruplarında 4 ve 6. hafta DNA hasarına ilişkin örnek fluoresan mikroskop görüntüleri.....	40

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1.	Borun bazı temel kimyasal özellikleri.....	3
Tablo 2.	Bor ihtiva eden bileşikler ve içerdikleri elementer bor düzeyleri.....	4
Tablo 3.	Değişik bileşiklerden borik asidin elde edilış şekilleri.....	8
Tablo 4.	Ratlarda borik asidin LD ₅₀ (mg/kg) ve LC ₅₀ (mg/L) düzeylerine göre toksisite sınıflandırması.....	9
Tablo 5.	Önemli antioksidanlar ve görevleri.....	14
Tablo 6.	Erkek fertilitasını olumsuz etkileyen faktörler.....	21
Tablo 7.	Çalışmada yer alan gruplar, borik asit uygulama dozları, borik asit düzeyine göre almış oldukları elementer bor (boron) düzeyleri, canlı ağırlık ortalaması ile uygulama süresi ve şekli.....	23
Tablo 8.	Testis doku süpernatantında MDA analizinin yapılışı.....	30
Tablo 9.	Testis doku süpernatantında SOD analizinin yapılışı.....	31
Tablo 10.	Testis doku süpernatantında CAT analizinin yapılışı.....	31
Tablo 11.	Testis doku süpernatantında GSH analizinin yapılışı.....	32
Tablo 12.	Testis doku süpernatantında total protein miktarının belirlenmesi.....	33
Tablo 13.	Çalışma öncesi ve borik asit uygulama sonrası canlı ağırlık değerleri.....	35
Tablo 14.	Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde 4 ve 6. hafta testis ve <i>v. seminalis</i> ağırlıkları.....	35
Tablo 15.	Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde 4 ve 6. hafta sperm parametreleri.....	37
Tablo 16.	Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde 4 ve 6. haftada sperm DNA hasar derecesi ve DNA hasar yüzdesi.....	38
Tablo 17.	Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde testis ve <i>v. seminalis</i> ağırlığı ile sperm parametrelerinin uygulama süresine göre karşılaştırılması.....	39
Tablo 18.	Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde 4 ve 6. hafta testis dokusunda MDA ve GSH düzeyleri ile SOD ve CATenzim aktivite değerleri.....	42
Tablo 19.	Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde testis dokusunda MDA ve GSH düzeyleri ile SOD ve CAT enzim aktivite değerlerinin uygulama süresine göre karşılaştırılması.....	43

ÖZET

FARELERDE BORİK ASİDİN TESTİS DOKUSUNDA OKSİDATİF STRES VE SPERMATOZOON DNA HASARINA OLAN ETKİSİNİN SAPTANMASI

Aktaş S., Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakoloji ve Toksikoloji (Veteriner) Programı, Doktora Tezi, Aydın, 2017.

Bu çalışmada, borik asidin erkek Swiss albino CD-1 farelere farklı dozlarda (115, 250 ve 450 mg/kg/gün) ve sürelerde (4 ve 6 hafta) oral yolla uygulanmasının canlı ağırlık, erkek fertilitesi (testis ve *vesicula seminalis* ağırlıkları), sperm kalitesi (motilite, ölü/canlı oranları ve membran bütünlüğü) ve testis dokusu oksidatif stress parametreleri (malondialdehid (MDA) ve glutatyon (GSH) düzeyleri ile süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) enzim aktiviteleri) ile spermatozoon DNA hasarına olası etkileri araştırıldı.

Çalışmada farelerde uygulama süresi sonunda (4 ve 6 hafta) v. *seminalis* ağırlıklarında azalmanın ($P<0.05$) olduğu, bunun en fazla 450 mg/kg borik asit verilen grupta olduğu görüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sperm örneklerinde motilite değerleri (%), 4 haftalık 450 mg/kg/gün ($P<0.05$), 6 haftalık 250 ve 450 mg/kg/gün borik asit uygulanan gruplarda azaldığı ($P<0.001$), canlı sperm oranları (%), 4 haftalık gruplarda doz arttıkça düştüğü ($P<0.01$), bunun 6 haftalık gruplarda daha yüksek düzeyde ($P<0.001$) olduğu, membran bütünlüğü değerlerinin (%) ise 4 ve 6 haftalık tüm gruplarda borik asit uygulaması ile azaldığı ($P<0.001$) tespit edildi. Spermatozoonlarda uygulama süresi içinde 4 hafta borik asit uygulanan tüm gruplarda DNA hasarı gözlenmezken, 6 haftalık gruplarda % 3.3-14.4 arasında değişen oranlarda DNA hasarı ($P<0.001$) olduğu görüldü. Testis dokusunda kontrol grubuna göre doz arttıkça MDA düzeylerinin yükseldiği ($P<0.001$ ve $P<0.05$), SOD enzim aktivitelerinin 6 haftalık 250 ve 450 mg/kg/gün doz gruplarında azaldığı ($P<0.01$), GSH aktivitelerinin ise 4 haftalık 450 mg/kg/gün ($P<0.05$), 6 haftalık 250 ve 450 mg/kg/gün doz gruplarında oldukça düşük ($P<0.001$) olduğu belirlendi.

Çalışmada uygulanan süre ve dozlar dikkate alındığında, uygulama süresinin bor bileşiklerinin fertilitate ve toksik etkilerinin değerlendirilmesinde etkin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca spermatozoonlarda olası DNA hasar düzeylerinin belirlenmesi ve değerlendirilmesinde farklı analiz metodları ve parametreleri de kapsayan multidisipliner çalışmaların yararlı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Borik asit, oksidatif stres, sperm parametreleri, spermatozoon DNA hasarı.

ABSTRACT

BORIC ACID EFFECTS OF DETECTION OXIDATIVE STRESS IN TESTIS TISSUE AND SPERMATOZONE DNA DAMAGE IN MICE

Aktas S., Adnan Menderes University, Health Sciences Institute, Pharmacology and Toxicology (Veterinary) Program, Doctoral Thesis, Aydın, 2017.

In this study, boric acid were administered male Swiss albino CD-1 mice at different doses (115, 250 and 450 mg/bw/day) and duration (4 and 6-weeks) of oral administration of body weight (bw), male fertility (testis and *vesicula seminalis* tissue weights), sperm quality (motility, dead/live ratios and membrane integrity), oxidative stress biomarkers (malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels as well as superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) enzyme activities) and possible effects on spermatozoon DNA damage were assessed.

During the study, all mice are in the application period (4 and 6-weeks) *v. seminalis* weight reduction ($P<0.05$), this is the most seen 450 mg/kg boric acid given group. When compared to the control group in sperm samples, motility values (%) reduction in boric acid administration groups which 450 mg/kg/day for 4-weeks ($P<0.05$), 250 and 450 mg/kg/day for 6-weeks ($P<0.001$), live sperm rates (%) were decreased when the dose was increased in the 4-week groups ($P<0.01$), this is higher in the 6-week groups ($P<0.001$), membrane integrity values (%) were found to be reduced by boric acid administration in all groups at 4 and 6-weeks ($P<0.001$). In spermatozoa, DNA damage was detected ranging from 3.3% to 14.4% in the 6-week groups ($P<0.001$), and DNA damage was not observed in all groups treated with boric acid for 4-weeks in the application period. According to the control group in the testicular tissue, MDA level increases as dose increases ($P<0.001$ and $P<0.05$), SOD enzyme activities were decreased at the 250 and 450 mg/kg/day dose groups at 6-weeks ($P<0.01$), also GSH activities was low in the 450 mg/kg/day in the 4-week group ($P<0.05$), and at the 250 and 450 mg/kg/day doses in the 6-week groups ($P<0.001$).

Considering the doses and durations applied in the study, the application period was found to be effective in evaluating the fertility and toxic effects of boron compounds. It has also been suggested that multidisciplinary studies involving different analysis methods and parameters may be useful in determining and assessing possible levels of DNA damage in spermatozoa.

Keywords: Boric acid, oxidative stress, sperm parameters, spermatozoon DNA damage.

1. GİRİŞ

“Bor” kelimesi etimolojik açıdan ele alındığında, ilk kullanımının Arap ve Fars dillerinde olduğu görülmektedir. Arapçada “Buraq”, Fars dilinde “Burah” olarak kullanıldığı görülmektedir. Yine yazılı tarihsel kayıtlara göre bor 4 bin yıl önce Tibet’te ve Güney Mezopotamya bölgesinde kullanılmaktaydı. Babillerin altın elde etmekte bor kullanılan bir teknik geliştirdikleri bilinmektedir. Ölüm sonrası yaşam inançları gereği Mısırlılar’ın mumyalamada bor kullandıkları, yine Roma ve eski Yunan kayıtlarında dövüş veya gösteri amaçlı kullanılan arenalarda borun temizlik maddesi olarak kullanıldığı, uzak doğu toplumlarında ise ilk defa Çinliler’in bor içeren bileşikler porselenlerin cilalanmasında, yine Arap topluluklarında M.S. 875 yılında bor bileşiklerinin ilaç hammaddesi olarak kullanıldığı tespit edilmiştir (Moseman, 1994).

Tabiatta borun saf olarak bulunmaması nedeniyle eski dönemlerde bu elementin değişik bileşikler kullanılmıştır. En çok tanınan ve kullanılan bor bileşiği borakstur (Moseman, 1994).

Borun endüstriyel anlamda ilk kullanımları, 13. yy’ da Marco Polo’nun bor tuzlarını Avrupa’ya getirmesiyle başlamıştır. Bu kapsamda ilk kez 1702 tarihinde boraks mineralinden borik asit üretimi yapılmıştır (Solis ve Githens, 1938). İtalya’da 1771’de sıcak su kaynaklarında sassolit bileşiğinin tespit edilmesiyle Avrupa kıtasında doğal bor rezervlerinin bulunduğu anlaşılmıştır (Baykal, 2003).

Modern kimyada 1808 yılında Louis Jacques Thenard, Sir Humphry Davy ve Joseph Louis Gay-Lussac adlı 3 araştırmacı, bor elementinin izolasyon ve identifikasyonunu başarmışlardır (Baykal, 2003). Günümüzde ise en yaygın bilinen bor bileşiklerinden borik asitin seri üretimi 1830’da İtalya’da başlamıştır. Güney Amerika ülkesi Şili’de 1852 yılında boraks madenciliği başlatılmış, sonraki yıllarda da Amerikanın değişik bölgelerinde (Nevada, California, Caliko Moutain ve Kramer yöresi) bor yatakları tespit edilmiş ve işlenmeye başlanmış olup, günümüze dek Amerika’nın bor madenciliğinde bir dünya lideri olmasına neden olmuştur (Etimaden, 2017).

Bor madeninin ülkemizde varlığının bilinmesi 1850’li yıllara rastlamaktadır. Sonraki yıllarda bor madenleri Avrupalı ve yabancı maden şirketleri tarafından “Alçı taşı” adı altında işletilmiş günümüzde ise bor madenlerinin işletimi Eti Maden İşletmeleri tarafından gerçekleştirilmektedir.

Dünyada bor rezervlerinin en çok bulunduğu ülkeler arasında birinci sırada bulunmamız nedeniyle, bor ürünlerinin teknolojik alanda kullanımının artırılması amacıyla 2003 tarihinde T.C Enerji ve Tabii Kaynaklar Bakanlığı'na bağlı bir kuruluş olan Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü (BOREN) faaliyetlerine başlamış olup, bu alandaki bilimsel çalışmalarını desteklemekte ve sürdürülebilir kılmaktadır.

Bor'un beyin sinirsel aktivitesinde önemli bir yere sahip olduğu ileri sürülmektedir. Yapılan bir çalışmada bor yoksunluğunda beyin elektiriksel aktivitesinde azalma, bilinç ve psiko-motor aktivite kaybı, hareket ve becerilerde azalma, kısa süreli hafızada zayıflık gibi bulgulara neden olduğu bildirilmiştir (Penland, 1998). Ayrıca metal iyonları ve toksik ajanların doza ve süreye bağlı olarak erkek fertilitesi üzerine olumsuz etkileri görülebilmektedir. Bu durum sperm miktar ve kalitesinde azalma, morfolojik bozukluklar ile DNA hasarına yol açarak fertilitede azalmaya neden olabilmektedir (Aitken, 1995; Harvey ve ark, 1999).

Bor içeren bileşiklerin artan oranlarda kullanımı, fertilitate problemlerinin günden güne artması, bu bileşikler kullanılarak yapılan hayvan denemelerinde fertilitate üzerine olumsuz etkilerinin bildirilmesi, birtakım şüpheleri beraberinde getirmiştir. Ancak sahip olduğu üstün özellikleri nedeniyle bor içeren bileşiklerden vazgeçilmeside mümkün gözükmemekte hatta kullanımının daha da artması öngörülmektedir. Bu nedenle insan ve hayvan sağlığı açısından doz ve süreye bağlı etkilerinin aydınlatılması, bor bileşiğine farklı düzeylerde maruziyetin erkek fertilitesi üzerine olan etkilerin değerlendirilmesi oldukça önemlidir. Bu kapsamda bor bileşiklerinden olan borik asidi farklı doz ve sürelerde uygulayarak; canlı ağırlık, fertilitate ve testis dokusuna oksidan ve antioksidan etkileri tespit edilerek bilimsel verilere katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

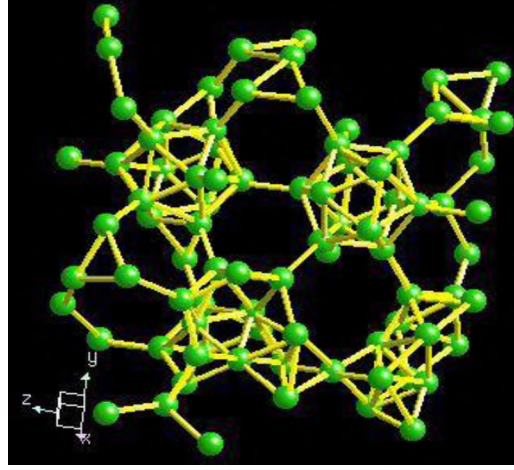
Bor, periyodik cetvelin 3A grubu elementleri arasında yerini alır. Yarı metalik özellik taşıyan kimyasal sembolü “B” ve atom numarası 5 olan bir elementtir. Rastlanma sıklığı olarak değerlendirildiğinde, güneş sisteminde ve yer kabuğunda düşük miktarda elementlerden biridir. Ancak, doğal ortamlarda bor bileşiklerinin suda kolay çözünmesi nedeniyle bazı yerlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunabilmektedir. Bu kapsamda en sık rastlanılan bor mineralleri boraks ve kernittir (Greenwood, 1984).

Bor doğada element halinde bulunmaz. Karbon ve diğer elementlerle bileşikler oluşturduğundan sanayide saf bor elde edilmesi çok pahalı ve zahmetli bir işlemdir. Borun değişik allotropları da mevcuttur; bunlardan amorf bor (şekilsiz katı hali) kahverengi görünümde iken, kristal bor siyah renkte olup, son derece sert (9,3 Mohs) ve oda sıcaklığında düşük iletken bir özellik gösterir. Element halindeki bor ise yarı iletken özelliğe sahip olduğundan sanayide genellikle katkı maddesi (dopant) olarak kullanılır (Gmelin, 1983; Baykal 2003).

Bor’un temel kimyasal özellikleri Tablo 1’de ve atomik kristal görüntüsü Şekil 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Bor’un bazı temel kimyasal özellikleri (Baykal, 2003).

Özellik	Değeri
Atom ağırlığı	: 10,811±0,005
Atom yarıçapı (r)	: 0,98 pm
Buharlaştırma ısı	: 128 kcal/g.atom
İyonlaşma enerjisi	: 191 kcal/g.atom
Kaynama noktası	: 4000 °C
Kristal yapısı	: Hexagonal
Oksidasyon sayısı	: 3
Sertliği	: 9,3 Mohs
Yoğunluğu	: 2,34 g/cm ³



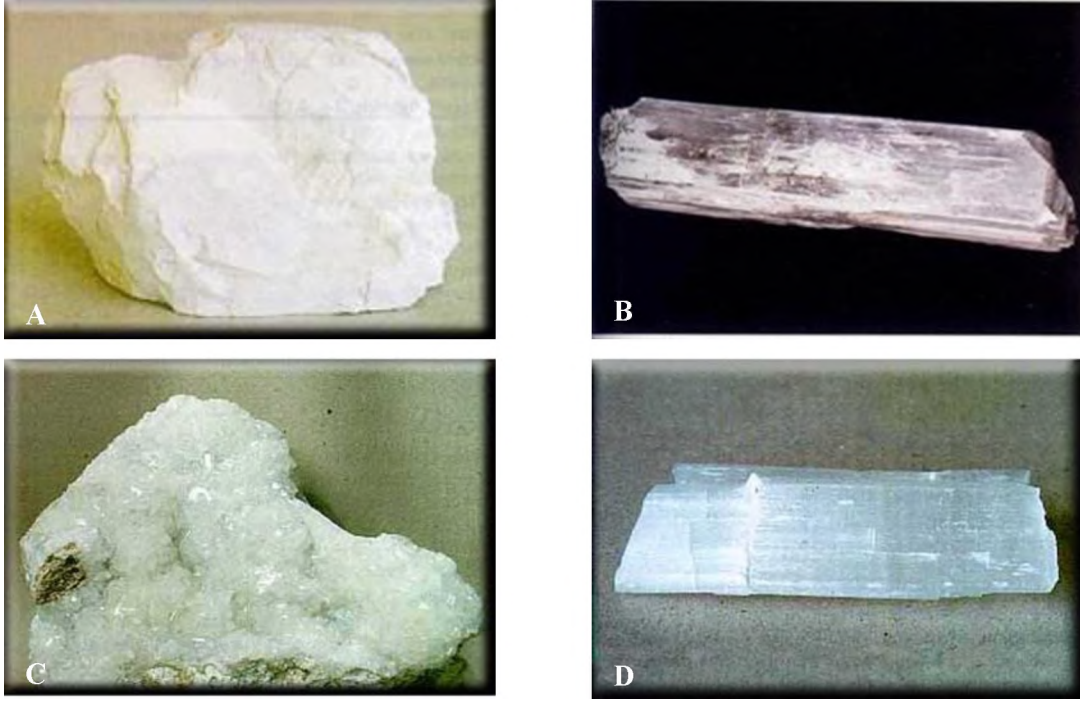
Şekil 1. Borun atomik kristal görünümü

Bor elementinin en yaygın rastlanılan bileşikleri; boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), kernit ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), kolemanit ($\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), aşarit (MgBO_2OH), hidroborasit ($\text{CaMgB}_6\text{O}_{11} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sasolit (H_3BO_3), üleksit ($\text{NaCaB}_5\text{O}_9 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$) pantermit ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_{22} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), borasit ($\text{Mg}_3\text{B}_7\text{O}_{13}\text{Cl}$) ve datolit (CaBSiO_4OH) gibi boratlardır. Ülkemizde en sık rastlanılan bor bileşikleri tinkal, kolemanit, pantermit olup sasolit sadece İtalya’da bulunmaktadır.

Bor içeren bileşiklerden her biri değişik oranlarda elementer bor ihtiva ederler. Kullanımı en yaygın olan bor bileşiklerinin içerdiği elementer bor düzeyleri Tablo 2’de, yaygın kullanılan ve bilinen bazı bor bileşikleri de Resim 1’de gösterilmiştir.

Tablo 2. Bor ihtiva eden bileşikler ve içerdikleri elementer boron düzeyleri (NPIC, 2006).

Bileşik adı	Molekül formülü	İçerdiği elementer bor (Boron) düzeyi (%)	Molekül ağırlığı (g/mol)
Boraks (Tinkal, Na-tetraborat)	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	% 11.34	381.43
Borik asit	H_3BO_3	% 17.48	61.83
Disodyum oktoborat	$\text{Na}_2\text{B}_8\text{O}_{13}$	% 25.83	340.31
Kernit (Na- tetraborat anhidrat)	$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$	% 21.5	201.22
Kolemanit (Na-tetraborat penhidrat)	$\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	% 14.85	291.35



Resim 1: Yaygın kullanılan ve bilinen bazı bor bileşikleri; **A:** Boraks (Tinkal), **B:** Kernit, **C:** Kolemanit, **D:** Üleksit.

Bor'un izotopları da (^8B , ^{10}B , ^{11}B , ^{12}B ve ^{13}B) bulunmaktadır. Radyoaktif özellik gösteren izotopları (^8B ve ^{12}B) nükleer magnetik rezonans çalışmalarında kullanılır. Kristal formdaki bor, ısıya dayanıklı, hafif ve inert yapıya sahip, çizilmelere karşı çok mukavemetli olup ametal özellik göstermektedir. Normal sıcaklık değerlerinde su, hava ve asitlerle (hidroklorik ve hidroflorik) soy davranışlar sergilemektedir. Yalnızca konsantre nitrik asit ile uygun sıcaklık değerlerinde reaksiyon oluşturup borik asite dönüşebilmektedir (Baykal, 2003).

Borik asidin magnezyum kullanılarak indirgenmesiyle amorf biçimde ve % 95-98 safsızlıkta bor elde edilmektedir. Ortaya çıkan ürün daha sonra asit ve bazlar ile işleminden geçirilerek filtre edilir ve kristal yapıda oksit ihtiva eden, koyu kahve renkli görünümde son ürün elde edilir (Greenwood ve ark, 1975). Boru element olarak ele aldığımızda kimyasal yapısının, morfoloji ve tane büyüklüğüyle çok yakın ilişkili olduğu görülmektedir. Kristal formdaki bor reaksiyonlara girmezken, mikron boyuttaki amorf bor reaksiyonlara çok kolay girmektedir. Borik asidin ve yan ürünlerinin elde edilmesinde yüksek sıcaklıktaki borun su ile reaksiyona girmesi yeterlidir. Bir diğer borik asit oluşma şekli ise mineral asitleri ile olan reaksiyonudur. Bu reaksiyon konsantrasyon ve sıcaklığa bağlı olarak yavaş veya hızlı (patlama şeklinde) olabilmektedir (Baykal, 2003).

Bor, yer kabuğu üzerinde hemen hemen her ortamda (su ve toprakta) rastlanılan bir elementtir. Toprağın içerdiği bor düzeyleri coğrafyaya göre değişimler gösterebilmektedir. Ortalama olarak 10-20 ppm düzeylerinde olmakla birlikte bazı yörelerde (ABD, Türkiye ve Kazakistan gibi) yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Deniz suyunun içerdiği bor düzeyleri 0,5- 9,6 ppm kadardır. İçme ve kullanma sularında ise bor 0.01–1,5 ppm düzeylerinde bulunur. Maden rezervleri olarak bor dünyanın sadece belli yerlerinde yoğunlaşmıştır. Bu bölgeler başta ülkemiz olmak üzere ABD'nin kurak, sıcak su kaynaklarının bol olduğu, volkanik aktivitenin rastlandığı yerlerinde borun oksijenle oluşturduğu bileşikler şeklinde rastlanılmaktadır (Baykal, 2003).

Bor elementinin 1923 yılında bitkiler için esansiyel olduğu tespit edilmiştir. İnsan ve hayvanlar için esansiyel olabileceğine ilişkin bulgulara da yakın zamanda ulaşılabilmektedir; bor'un kemik (Benderdour, 1998; Armstrong ve ark, 2001), mineral (Hunt, 1989; Dupre 1994), lipid (Başoglu, 2003), immun sistem (Hunt, 1999; Armstrong ve ark, 2001) ve enerji metabolizması (Hunt, 1991; Hunt 1998) ile endokrin sistem (Nielsen ve ark, 1987; Beattie ve ark, 1993; Naghii ve ark, 1997) için esansiyel olabileceği bildirilmiştir. Ancak bu elementin insan ve hayvan metabolizmasına etkilerinin çok az bilinmesine karşın, muhtemelen cis-hidroksil grupları içeren türleri ile reaksiyon oluşturarak, hücrede zar fonksiyonu ve stabilitesinde, hormon reseptörleri ve transmembran sinyallerinde etkili olabileceği ileri sürülmüştür (Nielsen, 1991).

İnsanlarda ortalama bor ihtiyacının 0,5–1 mg arasında olduğu bildirilmişse de (Nielsen, 1991; WHO, 1996), bu konuda kesin ve kanıtlanmış bir veri bulunmamaktadır. En zengin bor kaynakları meyveler, lifli sebzeler, fındık, bakliyat, şarap, elma suyu ve bira olmasına karşın, et, balık, süt ürünleri ve çoğu tahıllar bor yönünden oldukça fakir kaynaklardır. WHO verilerine göre insanlar hava yoluyla günde ortalama 0.44 µg, içme suları ile 0,2–0,6 mg, besinler yoluyla 1,2 mg bor almaktadırlar (Rainey ve ark, 1999).

Bor bileşiklerinin sahip olduğu üstün özellikleri nedeniyle son yıllarda kullanımının artması öngörülmektedir. Bu kapsamda bor bileşiklerin günlük yaşamda bazı kullanım alanları aşağıda belirtilmiştir (Baykal, 2003; BOREN, 2016; Etimaden, 2017);

Cam endüstrisi: Bor içeren bileşikleri yoğun olarak kullanan sektörlerden biridir. Bor laboratuvar cam malzemeleri, yüksek ısıya dayanıklı fırın malzemeleri, otomobil far ve sinyallerinde, bilgisayar ekranları, uzay araçları bileşenleri, nükleer tesis malzemelerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Seramik endüstrisi: Bor, seramik imalatında genellikle sır ve fritlerde tercih edilmektedir. Seramik sırlarında bor oksit kullanılmakta olup, temel kullanım amacı cam ve

malzeme arasındaki uyumu sağlayarak sırrın genleşme kat sayısını düzenlemeye yardımcı olmasıdır. Seramik malzemelerde dayanıklılık ve çizilmelere karşı mukavemet oluşturan borun en çok kullanılan bileşiği kolemanittir.

Deterjan Endüstrisi: Sabun ve deterjan üretiminde en sık kullanılan bileşiği boraks oluşturmaktadır. Sodyum perboratta aktif oksijen kaynağı olarak %10-20 oranında kullanılmaktadır.

Yanma önleyici malzeme imalatı: Boratlar günlük yaşamda kullanılan birçok malzemenin (ahşap, PVC, tekstil, yalıtım malzemeleri gibi) kolay alev almaması sağlamak amacıyla kullanılmaktadırlar.

Pestisit ve koruyucu olarak kullanımı: Ahşap malzemelerin böcek ve mantarlardan korunarak uzun yıllar kullanımını sağlamak amacıyla disodyum oktaborat tetrahidrat kullanılmaktadır.

Tarımsal amaçlı kullanımı: Bitkilerin gelişiminde esansiyel bir önemi olan bor, sağlıklı büyüme, çiçek açma ve meyve kalitesi açısından vazgeçilmez bir yere sahiptir. Bu amaçla bor içeriği az olan topraklarda toprağın pH düzeyi gözetilerek bor içeren gübreler kullanılmaktadır.

Havacılık sanayisi: Uçak üretiminde kullanılan hafif ve dayanıklı kompozit madde üretiminde bor giderek artan oranlarda kullanılmaktadır. Ayrıca füze yakıtı olarak kullanılabileceği belirtilen hidrojen diboran ve hidrojen pentaboran gibi bileşikler mevcuttur.

Metalurji: Bor çeliğin sertliğini artırılması başta olmak üzere bakır alaşımları, altın analizleri ve çeşitli metal kaplamalarda kullanım alanı bulmaktadır.

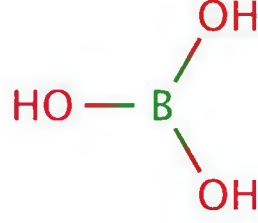
Nükleer enerji üretimi: Atom reaktörlerinde bor içeren çelikler, titan bor alaşımları ve bor karbürler kullanılmaktadır. Nötron absorbanı olarak kullanılması yanında, nükleer atıkların depolanmasında kolemanit kullanılmaktadır.

İnşaat sektörü: Çimento üretiminde kullanılan kolemanit ürün dayanıklılığını ve kalitesini artırmaktadır.

2.1. Borik Asitin Kimyasal Yapısı ve Fiziksel Özellikleri

Borik asit (ortoborik asit veya borasis), bor elementinin zayıf bir asit ($pK_a=9,15$) türevidir. Kimyasal formülü H_3BO_3 veya $(B(OH)_3)$, şeklinde ve beyaz toz halinde suda çözünebilir halde bulunur. Sudaki çözünürlüğü sıcaklıkla doğru orantılıdır. Borik asitin açık

kimyasal formülü Şekil 2’de, borik asidin diğer bileşiklerden elde edilmiş reaksiyonu Tablo 3’de verilmiştir.



Şekil 2. Borik asidin açık kimyasal formülü

Tablo 3. Değişik bileşiklerden borik asidin elde edilmiş şekilleri (Keskin, 2003)

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ Tinkal	+ H_2SO_4 Sülfürik asit	→	Na_2SO_4 + $4\text{H}_3\text{BO}_3$ + $5\text{H}_2\text{O}$ Sodyum sülfat Borik asit Su
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Sodyum pentaborat	+ H_2SO_4 Sülfürik asit	→	Na_2SO_4 + $4\text{H}_3\text{BO}_3$ Sodyum sülfat Borik asit
$\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Kolemanit	+ H_2SO_4 + $6\text{H}_2\text{O}$ Sülfürik asit Su	→	$2\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ + $6\text{H}_3\text{BO}_3$ Kalsiyum sülfat Borik asit
$\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Kolemanit	+ 4HNO_3 + $2\text{H}_2\text{O}$ Nitrik asit Su	→	$6\text{H}_3\text{BO}_3$ + $2\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ Borik asit Kalsiyum nitrit

Borik asidin içerdiği elementer bor düzeyi %17 kadardır. Borik asit zayıf asidik özellikte olup, sağlam deriden emilmez. Ancak solunum ve sindirim sisteminden kolaylıkla emilebilmektedir. Oral yolla alınan borik asit sindirim sisteminden %90 oranında emilir. Vücutta metabolize edilmez ve alınmasından sonra 96 saate kadar idrarda tespit edilebilir. Borik asidin metabolize edilememesinin muhtemel nedeni, bileşikteki bor ile oksijen arasındaki bağın kırılması için çok yüksek enerjiye (523 kJ/mol) gereksinim duyulmasının etkili olduğu ileri sürülmektedir. Plazma yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) yaklaşık 21 saat kadardır (Murray, 1998).

Borik asit ilaç sanayinde oftalmik preparatlarda ve kozmetik preparatlarda kullanım alanı bulmaktadır. Göz için %3’lük solüsyonları antiseptik olarak kullanılırken, alkolde %4’lük hazırlanan çözeltileri başta mantarlarla mücadele için olmak üzere kulak enfeksiyonlarında kullanım alanı bulmaktadır. Bazı veteriner ilaçlarında, hipokalsemi için hazırlanan kalsiyum preparatlarında da kullanılmaktadır (BOREN, 2016)

Borik asidin yaygın kullanım alanına sahip olması toksik etkilerinin ne ölçüde olduğu sorusunu beraberinde getirmiştir. Kozmetik malzemelerde (koku gidericiler ve günlük bakım

ürünleri) borik asitin güvenli üst limitinin ürün bazında % 5 olduğu, bu oranın aşılması gerektiği bildirilmiştir (CTFA, 1983). Borik asit tıpta uzun süreden beri kullanılan bir bileşik olup, bazı kullanımları sonrası toksik etkilere neden olabileceği rapor edilmiştir. Pfeiffer ve ark (1945) yanık ve yaralarda kullanılan borik asit içerikli merhemlerin hızlı bir şekilde emildiğini ve idrarda bu maddelere rastlandığını bildirmişlerdir.

İnsanlarda borik asidin akut yüksek miktarda alımıyla ilgili bilgileri oldukça sınırlıdır. Sadece intihar vakaları veya kazara yüksek miktarda alınmasında gözlemlenebilen az sayıda veri mevcuttur. Bulgular alınan miktar ve etkilenen organa göre değişmekle birlikte insanlarda borik asidin yetişkinlerde akut lethal dozunun 5-20 g, çocuklarda ise 3-6 g aralığında olduğu rapor edilmiştir (NTP, 1987). Borik asidin sağlıklı bir insanda kan düzeyi 0,3 mcg/ml iken, zehirlenme durumlarında 8 mcg/ml düzeyine kadar çıktığı, akut zehirlenmelerde koma ve konvulziyon gibi nörolojik bulgular izlenirken, yüksek miktarda ölüme neden olduğu belirtilmiştir. Borik asitin mutajenik bir madde olmadığı (Ames testiyle *Salmonella typhimurium* TA98 ve TA100) rat ve farelerde uzun süreli yedirme denemelerinde karsinojenik etkilerinin bulunmadığı gösterilmiştir (Vanhoe ve ark, 1995; Murray, 1998).

Yapılan deneysel çalışmalarda borik asidin ratlarda etkisiz en düşük dozunun (NOAEL) 55 mg/kg, en düşük etkili dozunun 76 mg/kg (LOAEL) olduğu tespit edilmiştir (Murray, 1998). Rodentlerde borik asidin toksisite düzeyleri ile ilgili yapılan diğer çalışmalarda, cinsiyete bağlı toksisitenin değişebildiği erkek ratlarda oral LD₅₀ dozu 3450 mg/kg iken, dişi ratlarda bu düzeyin 4080 mg/kg olduğu tespit edilmiştir. Borik asidin farelerde oral akut LD₅₀ düzeylerinin 3500 mg/kg olduğu bildirilmiştir (Fail ve ark, 1998).

Borik asit toksisite açısından düşük ve çok düşük toksik madde sınıfında yer almaktadır. Ratlarda borik asidin LD₅₀ ve LC₅₀ düzeyleri açısından toksisite sınıflandırması Tablo 4’de gösterilmiştir (WHO, 1998; NPIC, 2006).

Tablo 4. Ratlarda borik asidin LD₅₀ (mg/kg) ve LC₅₀ (mg/L) düzeylerine göre toksisite sınıflandırması (NPIC, 2006).

Toksisitesi	Yüksek	Orta	Düşük	Çok düşük
Akut oral LD ₅₀	≤ 50	> 50 - 500	> 500 - 5000	> 5000
İnhalasyon LC ₅₀	≤ 0.05	> 0.05 - 0.5	> 0.5 - 2.0	> 2.0
Dermal LD ₅₀	≤ 200	> 200 - 2000	> 2000 -5000	> 5000

LD₅₀: Lethal Doz-50, LC₅₀: Lethal Konsantrasyon-50

2.2. Bor Bileşiklerinin Erkek Fertilitesine Olan Etkileri

Canlılarda fizyolojik fonksiyonların normal olarak devam edebilmesi için gerekli elementler, günlük gereksinimlerinin üzerinde alınması durumunda erkek fertilitesi üzerine olumsuz etkiler doğurabilmektedir. Yanlış beslenme, kazara alınması, uzun sürelerde bu bileşiklere maruz kalma ve fazladan alınmaları gibi nedenlerle erkek fertilitesi üzerine (sperm üretimi ve kalitesinde) olumsuz etkilere neden olmaktadır (Dindyal, 2004).

Borun; organizmadaki işlevinin tam olarak bilinmemesine karşın, vücut fonksiyonlarının normal bir şekilde devam edebilmesi için, belirli miktarda alınması gerektiği ve belli düzeyler aşıldığı (0,3 mcg/ml/kan) zaman değişik doku ve sistemlerde zararlı etkileri ortaya çıkabildiği belirtilmektedir (WHO, 1996).

Weir ve Fisher (1972) adlı araştırmacılar ratlarda yaptıkları deneysel çalışmada 3 farklı dozda (170, 350 ve 1170 ppm/gün) borik asit ilave edilmiş yemlerin 3 nesil boyunca uygulanması sonucunda, 1170 ppm/gün borik asit uygulanan erkek ratlarda kısırlığa rastlanıldığını rapor etmişlerdir. Bu araştırmacılar hayvan denemelerinde borik asitin üreme sistemine yönelik toksik etkilerini ilk kez ortaya koyarak, bor içeren bileşiklerin üreme sağlığı üzerine olan olumsuz etkilerine dikkat çekmişlerdir.

Dixon ve ark (1976) ise erkek ratlarda yaptıkları bir çalışmada 3 farklı dozda (45, 150 ve 450 mg/kg) boraksı vererek tek doz toksisitetlerine bakmışlardır. Ratlarda akut sürede önemli bir değişimin olmadığını, aynı çalışmada 0.3, 1 ve 6 mg/L düzeyinde bor içeren içme suyunu 90 gün süreyle tüketen ratlarda bir değişime rastlanılmadığı rapor etmişlerdir.

Yüksek miktarda (9000 ppm/4 hafta) borik asit'e maruz kalınması durumunda testislerde atrofi gelişebileceği, sperm üretiminde azalma meydana gelebileceği, doz-süre ilişkisine bağlı olarak bu etkilerin geri dönüşümsüz olabileceği ileri sürülmüştür (Treinen ve Chapin, 1991). Deneme hayvanlarında borik asit kullanımı sırasında; riboflavinuri (B₂) geliştiği, testis dokusunda kalsiyum, fosfor, çinko düzeylerindeki azalma olduğu belirlenmiş, ancak elde edilen bu verilerin sperm üretimindeki azalma ile bağlantısı ortaya konamamıştır (Ku ve Chapin, 1994).

Borik asitin etki mekanizmasını *in vitro* ortaya konması için yapılan çalışmalarda; ratlardan testis dokusundan izole edilen Leyding hücre kültürlerine ilave edilen borik asitin, hormon üretiminde değişiklik yaratmadığı, sertoli hücre kültürlerinde ise leproten sprematosit/sertoli hücre oranını azalttığını tespit etmişlerdir (Ku ve Chapin, 1994).

Ku ve ark (1993) erkek ratlarda 9 hafta süreyle yemlere farklı dozlarda (3000, 4500, 6000 ve 9000 ppm/gün) borik asit uygulamış ve takip eden haftalarda normal diyete dönülerek sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmada düşük miktarlarda borik asit (3000 ve 4500 ppm/gün) uygulanan grupta sperm üretiminde azalma, yüksek doz alan gruplarda (6000 ve 9000 ppm) ise testis dokusunda atrofiler tespit edilmiştir.

Farelerde 42 gün süreyle normal musluk suyu (0,6 mg/L bor) ve ilave bor içeren (12mg/L) su uygulanması sonucunda; bor ilave edilen grupta testis dokusunda vakuolizasyon, epitel dejenerasyonları, tubuler ve morfometrik ölçümlerde değişiklikler, tunika albugineada hasar saptanmıştır. Aynı çalışmada bor ilavesinin testis dokusunda COX-2 düzeylerinde azalmalara neden olduğu bildirilmiştir (Obregon ve Olivares, 2012).

Ratlarda borik asitin akut, subkronik ve kronik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada 2, 14, 28, 57 gün süreyle 2000 mg/kg/gün borik asit uygulanarak, sperm örnekleri alınmıştır. Yirmisekizinci günde alınan sperm örneklerinde; kontrol grubuna göre, borik asit uygulanan ratlarda spermatozoon olgunlaşma bozuklukları ve morfolojik bozuklukların görüldüğü bildirilmiştir. Aynı çalışmada akut ve subkronik etkilerin ortaya konması için 14 gün süreyle 250, 500, 1000 ve 2000 mg/kg borik asit uygulanmıştır. 500 mg/kg borik asit uygulamasının akut etkilerinin olmadığı, 1000 mg/kg uygulanan grupta epidimal sperm morfolojisinde bozulma ve miktarında azalma olduğu, ayrıca 1000 ve 2000 mg/kg borik asit uygulanan farelerde düzensiz stoplazmik görünümdeki spermatitler ve olgunlaşma bozuklukları olduğu ifade edilmiştir (Linder ve ark, 1990).

El-Dakdokhy ve ark (2013) yaptığı başka bir çalışmada, erkek ratlara 3 farklı dozda (125, 250 ve 500 mg/kg) borik asiti 60 gün süreyle uygulamıştır. Çalışma sonucunda 125 mg/kg verilen grupta anlamlı bir değişikliğe rastlanılmazken, 250 ve 500 mg/kg borik asit uygulanan gruplarda testiküler atrofi, epididimiste küçülme, spermiasyonda bozulmalar ve testis dokusunda Mg ve Zn düzeyinde azalma tespit edilmiştir. Ayrıca testis dokusundan alınan örneklerde DNA düzeyinde azalma, çok az düzeyde DNA hasarları rapor edilmiştir

İnsanlarda borun infertilite üzerine olan etkileri konusunda Duydu ve ark (2011) yaptıkları çalışmada bor madeninde çalışan erkek işçilerden alınan kan ve sperm örneklerini incelemiştir. Kandaki bor düzeylerine göre 3 farklı şekilde gruplandırılmışlardır; gönüllü denekler (49 ng/g), düşük bor grubu (100 ng/g) orta maruziyet grubu (100-150 ng/g), ve yüksek maruziyet grubu (150 ng/g). Spermada olası DNA hasarının değerlendirildiği çalışmada, kontrol grubuna göre hiçbir grupta anlamlı bir değişimin olmadığı görülmüştür. Robinson ve ark (2010) tarafından Çin’de bor madeninde çalışan 192 işçide yapılan benzer bir çalışmada iş ve çalışma ortamı nedeniyle yoğun düzeylerde bora maruz kalınması sonucunda

sperma parametrelerinde ve spermatozoon DNA hasarı yönünden anlamlı değişikliklerin olmadığı bildirilmiştir.

2.3. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Hücrede aerobik metabolizmanın fizyolojik devamı sırasında elektron transportu aşamasının normal bir ürünü olarak ortaya çıkan serbest oksijen türleri (ROS) kimyasal yapıları dengeli olmayan reaktif özellik taşıyan bileşiklerdir. Hücre ve dokularda elektron transportundaki bozulma sonucu ROS düzeylerinde artma olabileceği gibi oluşan bu fazla ürünler; protein, lipid ve nükleik asitlerde hasar oluşturabilir. Bütün aerobik özellikteki organizmalar, mitokondrilerinde moleküler oksijenin indirgenmesi sırasında yan ürün olarak, kısa ömüre sahip reaktif atom ve moleküller üretirler. ROS yapıya sahip ürünlerin reaktivite özellikleri nedeniyle hücrede meydana getirdikleri hasar, oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır (Çavdar ve ark1997; Dünder ve Arslan, 1999).

Yaşlanma ile ilişkili fiziksel ve fizyolojik değişikliklerin nedeninin de hücre ve doku düzeyinde meydana gelen oksidatif stres kaynaklı olduğu kabul görmektedir. Yapılmış olan birçok çalışmada, serbest oksijen radikallerinin artması ve buna bağlı ortaya çıkan lipid peroksidasyonun birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir. Çağımızın en önemli hastalıklarından kanser başta olmak üzere yaşlanma, miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik problemler, alzheimer, parkinson, nöro-dejeneratif sinir sistemi hastalıkları, astım, diabetes mellitus ve romatoid artrit gibi hastalıkların oksidatif stres ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir.

ROS bileşikleri yapısal yönden incelendiğinde, moleküler ya da atomik yörüngesinde değişen sayıdaki reaktif eşleşmemiş elektrona sahip oldukları, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı olan moleküller olarak karşımıza çıkmaktadır (Halliwell, 1992; Hilmi, 1994; Akkuş, 1995; Halliwell ve ark, 1995; Çavdar ve ark 1997; Ihara ve ark, 1999).

Tedavide kullanılan ilaçlar ve ilaç toksikasyonları, zararlı kimyasallar, radyoaktivite, ultraviyole maruziyeti, immünolojik ve biyokimyasal reaksiyonlar ile sigara-alkol gibi maddeler hücrelerde serbest radikal oluşumu artırabilirler. Serbest radikal reaksiyonları makrofaj ve nötrofil gibi hücreleri normal görevlerini gerçekleştirmesinde vazgeçilmez bir yere sahip olsalar da, bu bileşiklerin fazla üretimi hücre ölümleri ve doku hasarlarına yol açabilmektedir. ROS düzeylerindeki artma, hücrelerin lipid, protein, karbohidratlar ve DNA gibi tüm önemli bileşenlerinde hasara neden olabilirler (Halliwell ve ark, 1992; Babior, 2000).

ROS ürünlerine karşı hücrede en duyarlı yapıya sahip komponent lipidler olup özellikle membran lipidlerindeki doymamış yağ asitleri ve kolesterolün etkilenmesi sonucunda lipid peroksidasyon olarak tanımlanan bir dizi zincir reaksiyonu başlatılabilirliği bilinmektedir. Hücrede araşidonik asit metabolizması sebebiyle ortaya çıkan serbest radikallerin neden olduğu lipid peroksidasyonuna “enzimatik lipid peroksidasyonu”, diğer radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ise “enzimatik olmayan lipid peroksidasyonu” şeklinde tanımlanmaktadır (Haber ve Weiss, 1984).

Lipid peroksidasyonu sonunda serbest radikaller ve diğer reaktif türler doymamış yağ açıl zincirinden bir H⁺ atomu açığa çıkararak başlattığı bir dizi reaksiyon sonucu lipid peroksitleri, malondialdehid (MDA), 4-hidroksinonenal (4-HNE), konjuge dienler oluşabildiği belirtilmiştir (Haber ve Weiss 1984, Kavas 1994,). Reaksiyon sonucu şekillenen lipid peroksitleri, MDA, 4-HNE gibi aldehit yapıli bileşikler, organizmada yer alan protein ve enzim yapılarının bozulmasına, DNA’da zincir kırılmalara ve membran lipidlerine zarar vererek hücre yapısının bozulmasına, hücre ölümüne kadar gidebilen bir dizi reaksiyona neden olabileceği belirtilmiştir (Kavas, 1994, Tokaç, 2007).

Canlı organizmayı oluşturan hücreler, gerek fizyolojik olaylar sırasında, gerekse de tüm dış etkenler sonucu oluşabilecek ROS bileşenlerini inhibe edebilen, olası hasarı giderebilecek savunma mekanizmalarına sahiptirler. Bu sistemlerde yer alan ve radikallerle oldukça çabuk reaksiyonlara girerek peroksidasyon ve otooksidasyonun ilerlemesini önleyebilen maddeler “antioksidan” olarak isimlendirilmektedir. Ortaya çıkan ROS metabolitlerinin üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin ortamdaki uzaklaştırılması, olası hücre harabiyetinin onarılması, yeniden radikal üreten reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan savunma kapasitenin artırılması olarak tanımlanan savunma mekanizmaları da “antioksidan savunma sistemi” şeklinde tanımlanmaktadır (Gutteridge, 1995; Dündar ve Arslan, 1999).

Antioksidan savunma sisteminleri “enzimatik” veya “enzimatik olmayan” antioksidanlar olarak gruplandırılabilirliği gibi, yapı ve işleyiş mekanizmalarına göre görev aldıkları yapılaraya göre “intraseküler” (SOD, CAT, GPx, sitokrom oksidaz gibi), “ekstraseküler” (albümin, transferrin, serüloplazmin, laktoferrin gibi) ve “membran” (vitamin E, koenzim Q, β -karoten gibi) antioksidanları şeklinde de sınıflandırılabilirliği (Stadtman 1993; Byung, 1994; Gutteridge, 1995; Halliwell ve ark, 1995; Dündar ve Arslan, 1999). Önem arz eden antioksidan savunma sistemleri ve görevleri Tablo 5’de, ROS ve diğer reaktiflerin üretimi Şekil 3’de verilmiştir.

Tablo 5. Önemli antioksidanlar ve görevleri (Dündar ve Aslan, 1999).

Antioksidan	Görev
<i>Intraselüler</i>	
Glutasyon (GSH)	GSH redoks substratı
Glutasyon peroksidaz (GSH-Px)	H ₂ O ₂ 'nin düşük konsantrasyonunun giderilmesinde katalizör
Glutasyon redüktaz (GSSG-R)	Okside glutasyonun redükte glutatyona dönüşümünde katalizör
Glutasyon S-transferaz (GST)	Glutasyonun konjugasyonunu sağlayan katalizör
Katalaz (CAT)	H ₂ O ₂ 'nin yüksek konsantrasyonunun giderilmesinde katalizör
Stokrom oksidaz	O ₂ 'nin indirgenme basamaklarında toksik madde oluşumu önleyicisi
Süperoksit dismutaz (SOD)	Süperoksidin giderilmesi reaksiyonunda katalizör
<i>Ekstraselüler</i>	
Albumin	HOCl radikal topalyıcısı, hem proteini ve bakır iyonları bağlayıcısı
Askorbat (Vitamin C)	Hidroksil radikal giderici ve tokoferolü indirgeyici antioksidan
Bilirubin	Peroksil radikal topalyıcısı
Ferritin	Doku demir bağlayıcısı
Glikoz	Hidroksil radikallerini giderici antioksidan molekülü
Haptoglobinler	Hemoglobini bağlayarak hem'in salınımını önler
Hemopeksin	Serbest hem proteinlerini bağlayarak oksidasyonunu inhibe eder
Laktoferrin	Düşük pH'da demir iyonları bağlayıcısı
Mukus	Hidroksil radikal topalyıcısı
Serüloplazmin	Süperoksit radikalini nötralize eder ve bakır iyonları bağlayıcısı
Sistein	Organik bileşik indirgeyicisi
Transferrin	Serbest demir iyonlarını fenton tepkimesi ile inhibe eder
Ürat	Metal bağlayıcısı ve değişik radikal topalyıcısı
<i>Membran</i>	
Koenzim Q10	Enerji metabolizmasında antioksidan
α-Tokoferol (Vitamin E)	Lipidlerde çözünerek peroksidasyon zincir kırıcısı
β-Karoten (Vitamin A)	Singlet oksijen oluşumunu inhibe eder ve çeşitli radikal topalyıcısı
Ubiquinol	Lipoproteinlerin otooksidasyon önleyicisi

değişimlere neden olma riskini de beraberinde getirirler. En büyük tehlike de hasarın DNA üzerinde meydana gelmesidir ki yeni jenerasyona zarar verme olasılığını beraberinde getirir (Stohs ve Bagchi, 1995; Samanta, 1997).

Spermada ROS düzeyi düşük veya normal seviyede olduğunda spermatozoonlar fonksiyonel ve iyi durumda olmasına karşın, ROS ve lökosit miktarının artması spermatozoonlarda olgunlaşma bozuklukları ve hasarlara neden olabilir (Aitken, 1994). İnsan spermalarının oksidatif strese duyarlı oldukları bilinmektedir. Bu duyarlılığın sperm hücre duvarının zengin doymamış yağ asidi düzeyinden kaynaklandığı bilinmektedir. Akrozon reaksiyonları ve sperm-yumurta interaksiyonlarında önemli rol alan endojen ve ekzojen kaynaklı olarak ortamda artan miktarda ROS, önce sperm membranına zarar vererek, sonraki aşamada DNA molekülüne ulaşarak hasar oluşturabilir (Alvarez ve ark, 1987; Fraga ve ark 1991; Twigg ve ark, 1998). Meydana gelen DNA hasarı sadece spermatogenezis sırasında değil, üreme teknolojileri geliştirme aşamalarında veya hücreleri dondurma işlemleri sonucunda da (*in vitro* hasar ve post testiküler hasar gibi) oluşabilir (Watson, 2000). Ortaya çıkan DNA hasarı mekanizmaları tam olarak bilinmemekle birlikte sebebi (yaşlanma, çevresel koşullar, genetik ve metabolik nedenler) ne olursa olsun DNA'da görülecek bir hasar infertiliteyle sonuçlanabilmektedir (Cohen Bacrie ve ark, 2009; Aitken ve Deluliis, 2010).

Olgunlaşmasını tamamlamış bir spermatozoon tam anlamıyla DNA hasarı tamiri gerçekleştiremez. Meydana gelen hasar sadece oocyt içine girdikten sonra ve uygun koşullarda şekillenebilir. Dolayısı ile ileri düzeylerde oluşan DNA hasarı oosit içine giren spermatozoonunda tam olarak tamir edilemeyerek yeni gelişen yavruda perinatal bozukluklara ve erken embriyonik ölümlere neden olabilir. Bunun doğum sonrasında erken dönem (çocukluk dönemi) kansellere ve ruhsal hastalıklara (şizofreni gibi) zemin hazırlayabileceği ifade edilmiştir (Zini, 2009).

Sperma önemli bir antioksidan kaynağı olup, içerisindeki antioksidan bileşikler spermatozoonların oksidatif strese karşı korunmasında yardımcı olurlar (Jeulin ve ark, 1989; Gagnon ve ark, 1991; Zini ve ark, 1993). Spermatozoonlarda endojen antioksidan enzim aktivitesi olduğuda bildirilmiştir. Bu enzimler SOD, CAT ve GSH-Px'dir (Zini ve ark, 1993; Zini ve ark, 1997). Bu enzimlerden az miktarda da sperma içerisinde olduğu bildirilmiştir (Sanocka ve ark, 1997). Sperma içerisinde enzimatik olmayan önemli bazı antioksidanların da (Vitamin-E, taurin, hipotaurin, L-karnitin, likopen) bulunduğu ve bunların total antioksidan kapasite hesaplanmasında önemli olduğu bildirilmiştir (Holmes ve ark, 1992, Zini ve ark, 1993).

Günümüzde dahi sperma içerisindeki antioksidanların DNA hasarına yönelik koruyucu etkinlikleri tartışmalı bir konudur. Yapılan bir çalışmada fertil ve infertil erkeklerden alınan sperm örneklerinde; seminal oksidan/antioksidan denge ve spermatozoon DNA hasarı incelenmiş; söz konusu çalışmada infertil grupta (n=30), fertil gruba kıyasla (n=32) parametrelerde istatistiksel anlamlı değişikliğin olmadığı ifade edilmiştir (Verit ve ark, 2006). Bazı araştırmacılar antioksidanların ROS kaynaklarını azalttığı için DNA hasarı oluşumunu önlediğini ileri sürerken, bazı araştırmacılar hasara ilişkisinin koruyucu etkinliklerinin olmadığını savunmaktadırlar (Fraga, 1991; Xu ve ark, 2003; Song ve ark, 2008). Doğruluğu kabul gören görüşe göre, GSH sperm üretimi ve saklanmasında önemli rol oynadığı, *cauda epididymis* içerisinde üreme hücrelerini oksidatif stres ve DNA hasarına karşı güçlü koruyucu etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Williams ve ark, 1998; Chabory ve ark, 2009; Noblanc ve ark, 2012).

In vitro olarak oksidatif stres oluşturduğu bilinen hidrojen peroksitle yapılan bir çalışmada erkek farelere 1, 2, 3 ve 5 hafta süreyle, t-butil ve c-butil peroksitler 100 g canlı ağırlığa sırasıyla 30 ve 60, 15 ve 30 mmol miktarında uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlarda hidrojen peroksit uygulanan farelerde lipit peroksidasyonun doza göre artış gösterdiği, testis dokusunda DNA hasar oranlarının %35-47 arasında değiştiği vurgulanmıştır. Aynı çalışmada testiste patolojik bulguya rastlanmazken, spermatozoonlarda yapılan morfolojik incelemede kafa ve kuyruk anormallikleri ile hücrelerin post mayotik safhada etkilendiği tespit edilmiştir (Kumar ve ark, 2002).

Organik fosfolu pestisitlerin üreme sistemi üzerine oksidan etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Afifi ve ark, 1991; Ferdinand ve ark, 2014). Jallouli ve ark (2015) erkek farelere 30 gün 20 mg/kg dozda dimethoate vererek yaptığı çalışmada dimethoate uygulaması sonucu erkek farelerin sperm parametrelerinde (miktar, motilite, ölü canlı oranı) %49-62 oranında değişen azalmanın meydana geldiği, anormal sperm sayısında artış olduğu belirlenmiştir. Aynı çalışmada lipit peroksidasyon (MDA) açısından anlamlı düzeyde artma olduğu ve antioksidan enzim düzeylerinin hem testis dokusunda hem de spermatozoonlarda azaldığı bildirilmiştir. Organik fosforlu bir insektisit olan metamidofos ile yapılan bir diğer akut çalışma modelinde erkek farelere 3,75 ile 5 mg/kg dozunda 4 gün süreyle uygulanmış daha sonra 1, 28 ve 45. günlerde sperm analizleri, testis dokusunda oksidatif stres parametreleri ve DNA hasarı açısından incelenmiştir. Alınan sperm örneklerinde bahsedilen dozlarda herhangi bir DNA hasarı tespit edilmemiş ancak; fertilizasyon kapasitesinde düşme görülmüş ve spermatozoonların etkilenme oranlarının üretim safhasına göre değişebildiği (mitoz, mayoz ve depolanma aşaması gibi) bildirilmiştir (Acosta ve ark, 2014).

Hava kirliliğinin erkek fertilitesine olumsuz etkilere neden olduğu, genç bireylerde sperm miktarını etkilemeden sperm kalitesini düşürdüğü tespit edilmiştir (Selevan ve ark, 2000). Yapılan bir çalışmada; 7 gün süreyle 22, 56 ve 112 mg/m³ düzeylerinde sülfür dioksit (SO₂)'e günde 6 saat maruz bırakılan erkek farelerin, kontrol gruplarına kıyasla testis dokularında lipit peroksidasyonda artışla birlikte, antioksidan enzim düzeylerinde azalmaların görüldüğü saptanmıştır (Meng ve Bai, 2004). Yine benzer bir şekilde, Maestra ve ark (2015) sigaranın erkek fertilitesine olumsuz etkilerine yönelik yaptıkları bir çalışmada 10 hafta günde 12 saat sigara dumanına maruz bırakılan farelerde, kontrol grubuna göre sperm anormallikleri, testis dokusunda histopatolojik değişimler ve spermatozoon DNA hasarı görüldüğü, ayrıca oksidatif stres parametrelerinde kontrol grubuna göre artış olduğu belirtilmiştir.

Etanolün farklı dozlarda sperm parametrelerine olası etkilerinin değerlendirildiği çalışmada; 36 adet erkek fareye, 35 gün süreyle %5 ve %10 alkol içeren diyetler sakkarin ile kombine edilerek oral yoldan uygulanmıştır. Çalışma sonunda *cauda epididymis*'ten alınan sperm örneklerinde; sperm miktardaki azalma, morfolojik bozukluklar, motilitedeki azalmalar bildirilmiştir. Aynı çalışmada Tunnel metodu kullanılarak sperm hücrelerinde apoptosis düzeyleri incelenmiş; kontrol, sakkarin, %5 etanol + sakkarin, %10 etanol + sakkarin, gruplarında bulunan değerler sırasıyla (%) 6.57, 20.14, 42.85 ve 51.57 olarak bulunmuştur. Doza bağlı değişen oranlarda alkolün farelerde sperm anormallikleri ve DNA bütünlüğünde bozulmaya neden olduğu tespit edilmiştir (Rahimipour ve ark, 2013).

Ağır metallerin fertilizasyon üzerine olası etkileri incelendiğinde de önemli olumsuzluklar dikkati çekmektedir. Örneğin kadmiyumun erkek fertilitesindeki etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada; nano partüküller halinde kadmiyum sülfid 50 mg/kg ve 100 mg/kg dozda 45 gün süreyle oral olarak uygulanmıştır. Çalışma sonunda tüm gruplarda kontrol grubuna göre kadmiyumun testis dokusunda önemli düzeyde arttığı, buna bağlı olarak testesteron düzeyi ve hormonların üretiminden sorumlu gen (CYP11A1 mRNA) düzeyinde azalma olduğu, sadece 100 mg/kg uygulanan grupta epididimal sperm miktarında azalmayla birlikte anormal görünümlü spermelerde artış ve testis dokusunda histopatolojik değişimler bildirilmiştir. Sonuç olarak kadmiyumun doza bağlı olarak erkek fertilitisini olumsuz etkilediği tespit edilmiştir (Jiang ve ark, 2014).

Nikel tuzları karsinojenik etkileri olan bileşiklerdir. Bu bileşiklerin yaygın olduğu ortamlarda çalışan insanlarda burun ve akciğer kanserlerine yüksek oranlarda karşılaşılmaktadır. Bu nedenle insan ve hayvanlarda potansiyel kanser oluşumuna neden olan bir madde olarak kabul edilmektedir (Venugopal, 1978). Nikel tuzlarının erkek farelerde üreme sistemine etkisine yönelik yapılan çalışmada nikel klorür 100 g canlı ağırlığa 5 µmol

tek doz ve 0.625, 1.25, 2.5 ve 5.0 µmol 3 gün süreyle intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Tek ve yüksek doz (5.0 mmol) verilen gruplarda spermatozoonlarda önemli düzeyde DNA hasarları gözlenlenmiş olup, diğer gruplarda doza bağlı artan oranlarda anormal sperm yüzdesinin yükseldiği, testis dokusunda oksidatif stres parametrelerinde artışların olduğu vurgulanmıştır (Doreswamy, 2004).

Benzer şekilde Zhang ve ark (2016) bakır tuzlarının erkek üreme sistemine yönelik etkilerinin belirlenmesi amaçlı çalışmalarında; erkek farelere 30 gün süreyle haftada 2 kez periton içi olarak 1.25, 2.5 ve 5 mg/kg dozlarda bakır klorür (CuCl₂) uygulayarak; sperm motilitesi, anormal sperm miktarı, serum testesteron düzeyi ile GSH üretiminden sorumlu gen (GSHx5 mRNA) düzeyi, androjen reseptör (AR-mRNA) düzeyleri incelenmiştir. Yüksek doz (5 mg/kg) alan grupta sperm anomalilerinin ve GSHx5 mRNA düzeyinin arttığı, AR-mRNA düzeylerinde ve testesteron düzeylerinde azalma görüldüğü; tüm gruplarda motilitede, spermatozoon ölü/canlı oranları, akrozom bütünlüğü, testis ve canlı ağırlıkta anlamlı değişimler olmaksızın, anormal sperm miktarını artırdığı, antioksidan enzim düzeylerini azalttığı testis dokusunda oksidatif stresin geliştiği tespit edilmiştir.

2.5. Tek Hücre Jel Elektroforez (Comet) Yöntemi

Comet yöntemi ilk kez 1978 yılında Östling ve Johanson tarafından tanımlanmış olup, Singh ve arkadaşları 1988'de bunu geliştirerek alkali Comet yöntemini modifiye etmişlerdir (Lemay ve Wood, 1999; Tice ve ark, 2000; Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010). Daha sonraki yıllarda bu yöntem; çeşitli ajanların yol açtığı DNA tek ve çift zincir kırıklarının tespiti için kullanılan hassas, hızlı ve güvenli bir metod olarak tercih edilmiştir. Diğer bir adı da "Tek Hücre Jel Elektroforez" yöntemi olup, günümüzde DNA hasarı ve onarım bozukluğunun tayinini amaçlayan çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Genotoksinleri ilk etki başlattıkları alanda değerlendirebilen, ökaryotik tüm hücrelerde kullanım imkânı bulan, düşük hasar seviyesini ölçebilen, az sayıda hücre ile hızlı ve basit bir şekilde sonuca ulaştıran avantajlı ve güvenilir bir yöntemdir (Blasiak ve Treciak, 1998; Tice ve ark, 2000; Liao ve ark, 2009).

Comet yöntemi, alkali pH'da farklı molekül ağırlığına ve elektrik yüküne sahip DNA moleküllerinin elektriksel ortamda değişik düzeylerde hareket etme esasına göre çalışmaktadır. Bu yöntemde göre, hücreler ve çekirdekçikler agaroz konmakta, sonrasında lizis ve alkali elektroforez tamponunda yürütme ve nötralizasyon aşamalarını tamamlayarak

floresan boyayla boyanmaktadır (Blasiak ve Treciak, 1998). Floresan mikroskop ile incelenen preparatlarda zarar görmemiş DNA'lar Comet (kuyruk) oluşturmazken hasar gören DNA moleküllerindeki fragmentler farklı molekül ağırlığına ve yüküne sahip olacaklarından, elektriksel ortamda değişken biçimlerde hareket ederek çekirdekten dışarı doğru "kuyruklu yıldız" gibi hareket ederler. Bu şekildeki görünümünden dolayı "Comet" adı verilmiştir. Bu test ile yapılan kantitatif değerlendirmede; kuyruk momenti, kuyruktaki DNA yüzdesi ve kuyruk uzunluğu gibi parametreler değerlendirilmektedir (Dikilitaş ve Koçyiğit, 2010).

Metal iyonları ve toksik ajanların doza ve süreye bağlı olarak erkek fertilitesi üzerine olumsuz etkileri görülebilmektedir (Tablo 6). Bu durum sperm miktar ve kalitesinde azalma, morfolojik bozukluklar ile DNA hasarına yol açarak fertilitede azalmaya neden olabilmektedir. Bor içeren bileşikler; son yıllarda artan oranlarda günlük yaşamda kullanılıyor olması, fertilitate problemlerinin günden güne artması, bu bileşikler kullanılarak yapılan hayvan denemelerinde fertilitate üzerine olumsuz etkilerinin olduğunun rapor edilmiş olması, şüphelerin devam etmesine neden olmaktadır. Ancak sahip olduğu üstün özellikleri nedeniyle de bor ve bor içeren bileşiklerden vazgeçilmeside mümkün gözükmemekte hatta kullanımının daha da artması öngörülmektedir. Bu nedenle insan ve hayvan sağlığı açısından doz ve süreye bağlı etkilerinin tam olarak aydınlatılması, bor bileşiğine farklı düzeylerde maruziyetin erkek fertilitesi üzerine olan etkilerin aydınlatılması oldukça önemlidir. Bu kapsamda borun farklı doz ve sürelerde uygulanması sonrası; canlı ağırlık, testis ve *v. seminalis* ağırlıkları, testis dokusuna olası oksidan ve antioksidan düzeyleri ile spermatozoon DNA hasarına olası etkilerinin değerlendirilerek bilimsel verilere katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Tablo 6. Erkek fertilitasını olumsuz etkileyen faktörler (Harvey ve ark, 1999).

Etmenler	Adı	Etki şekli
Çevresel faktörler		
Organik yapılmı kimyasallar ve Pestisitler	- DBCB	- Fertilitte ve libidoda azalma
	- DDT	- Embriyo ve fetüs kaybı
	- PCB	- Doğmasal defektler
	- Dioksinler	- Sperm kalitesinde düşüklük
	- Metilklorid	- Östrojenik etki
Ağır metaller	- Kurşun	- Kanser
	- Civa	- Spermatogenezizde azalma
	- Kadmiyum	- Santal sinir sistemi defektleri
	- Kobalt	- Testikuler hasar
Bağımlılık yapan maddeler	- Nikotin	- Hipotalamo-hipofiz adrenal aksta düşüş
	- Alkol	- Spermatogenezisde azalma
	- Marijuana	- Zayıf sperm fonksiyonu
	- Steroidler	- Hipotalamo-hipofiz adrenal aksta düşüş
İlaçlar		
Antimikrobiyaller	- Tetrasiklinler	- Spermatogenezisde azalma
	- Sülfonamidler	- Zayıf sperm fonksiyonu
	- Gentamisin	- Testikuler hasar
	- Neomisin	
	- Nitrofurantoin	
Antineoplastikler	- Siklofosfamid	- Sperm motilitesinde azalma
	- Sisplatin	
	- Prokarbazin	
	- Nitrojen mustard	
Radyasyon	- X ışınları ve gama radyasyon	- Germ hücrelerde ve leyding hücrelerinde hasar
Diğer ilaçlar	- Simetidin	- Hipotalamo-hipofiz adrenal aksta düşüş
	- GnRH analogları	- Sperm miktarında azalma
	- Ketokonazol	- Libidoda azalma
	- Leoprolid	- Spermatogenezisde azalma
	- Siklosporin	
	- Lityum	
	- Flutamid	
	- Gossipol	
Biyolojik ajanlar		
	- Hipertermi	- ROS'da artış
		- Spermatogenezisde azalma
		- Testikuler hasar
	- İnfeksiyon/İnflamasyon	- ROS'da artış
		- WBC'de artış
		- SOD'da azalma
		- IL-8'de artış
		- Sperm fonksiyonlarında azalma
	- Oksidatif stres yaratan maddeler	- ROS'da artış
		- Lipit peroksidasyonda artma
		- Sitokinlerde artış
		- Sperm fonksiyonlarında azalma
	- Yaşlanma	- ROS'da artış
		- Hipotalamo-hipofiz adrenal aksta düşüş
		- Lipit peroksidasyonda artma
		- Sperm üretiminde azalma

DBCB: Dibromo klorobütan, **DDT:** Dikloro difenil trikloroethan, **GnRH:** Gonadotropin salıveren hormon, **PCB:** Poliklorlu bifenil, **ROS:** Reaktif oksijen türleri, **SOD:** Süperoksit dismutaz, **WBC:** Lökosit, **IL-8:** İnterleukin-8

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Hayvan Materyali

Çalışmada 35-40 gram ağırlıklarında 3-4 aylık sağlıklı 80 adet erkek Swiss albino CD-1 fare kullanıldı. Denemede kullanılan fareler Bornova Veteriner Araştırma Enstitüsü'nden temin edildi. Deneysel çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Üretim ve Deneysel Araştırma Laboratuvarı'nda, ADÜ-HADYEK (Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu) 04.10.2012 tarih ve 2012/084 sayılı onayı ile gerçekleştirildi.

Deney gruplarında kullanılan fareler 22-24°C oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık 12 saat karanlıkta kalacak şekilde, Tip-1 ve Tip-2 kafeslerde tutuldu (Resim 2). Farelerde çalışma süresince standart fare yemi ve çeşme suyu *ad libitum* olarak verildi.

3.1.2. Deneysel Uygulama

Çalışma öncesi denemede kullanılan hayvanların ortama uyum sağlayabilmeleri için 2 hafta beklendi. Bu süre sonunda, farelerin canlı ağırlıkları, grup ortalamaları ve uygulanacak borik asit miktarları hesap edildi. Hayvanlar 4 hafta ve 6 haftalık gruplara ve bunlarda kendi içinde 4'erli alt gruplara (kontrol, 115 mg/kg, 250 mg/kg, 450 mg/kg/gün borik asit) ayrıldı. Uygulanan borik asidin doz ve süresi, Dixon ve ark (1976) ile El-Dakdoky ve ark (2013)'nin yapmış oldukları deneysel çalışmalar gözetilerek modifiye edildi.

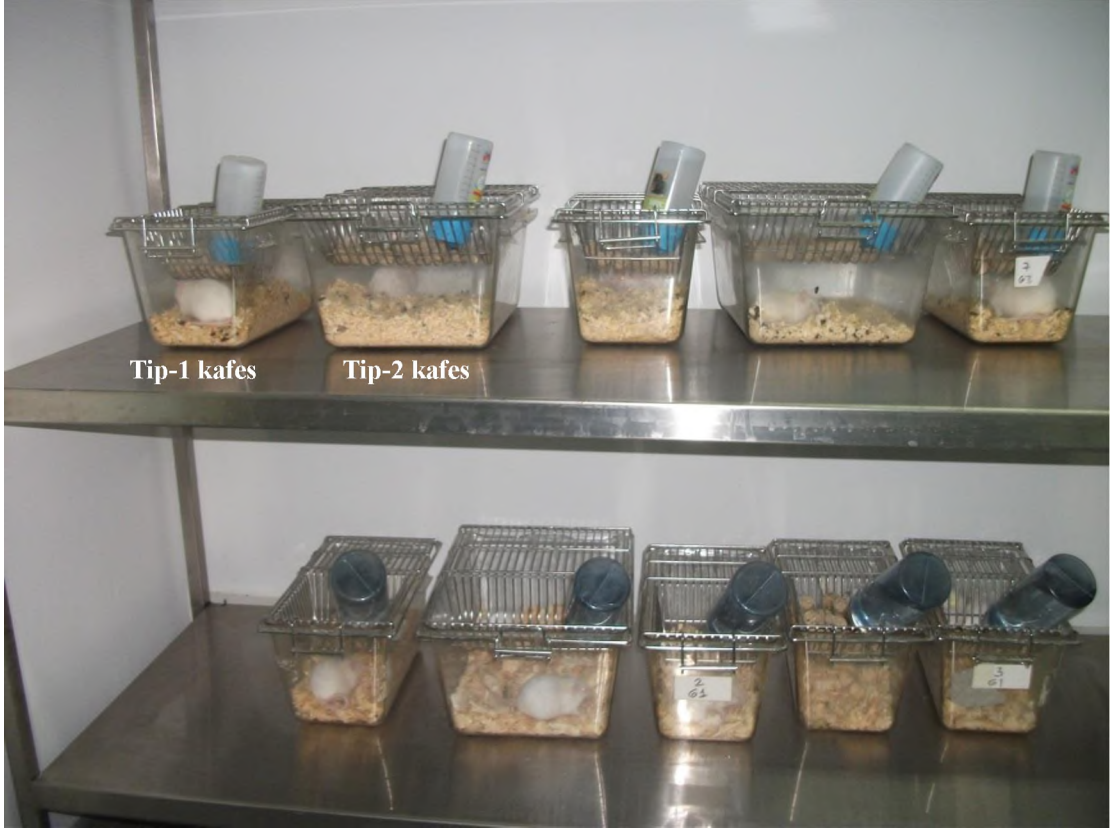
Gruplar oluşturulurken hayvanların canlı ağırlıklarının homojen olmalarına dikkate edildi. Adaptasyon süreci tamamlandıktan sonra farelere oral yolla günlük verilecek borik asit, uygun miktarda distile suda eritilerek, düz gavaj kullanılarak (Harvard Apparatus, 20 G ve 24 G) 4 ve 6 hafta süreyle uygulandı.

Deneme süresi boyunca canlı ağırlık değişimleri olabileceği öngörüldüğünden haftalık ölçümler yapılarak uygulanan borik asit miktarları düzenlendi. Çalışmada yer alan borik asit grupları, uygulama dozları, borik asit düzeyine göre almış oldukları elementer bor (boron) düzeyleri, canlı ağırlık ortalamaları ile uygulama süresi ve şekli Tablo 7’de, farelerin barındıkları ortam ve borik asit uygulama şekline ait resimler Resim 2 ve 3’de verilmiştir.

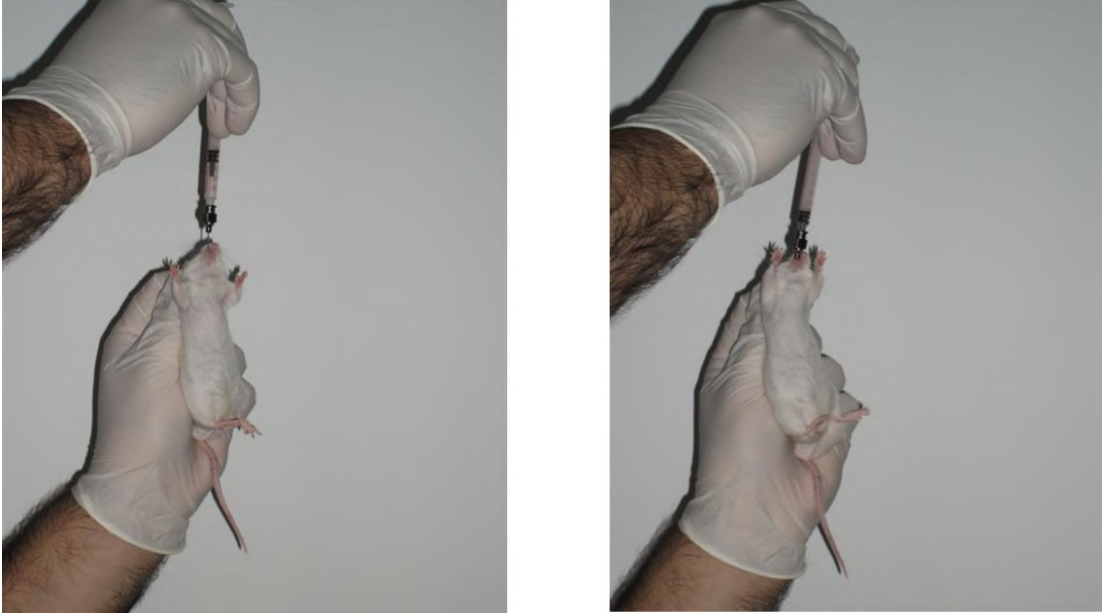
Tablo 7. Çalışmada yer alan gruplar, borik asit uygulama dozları, borik asit düzeyine göre almış oldukları elementer bor (boron) düzeyleri, canlı ağırlık ortalaması ile uygulama süresi ve şekli.

Gruplar ve uygulama dozu	Uygulama dozundaki elementer bor düzeyi	Gruptaki hayvan sayısı (n)	Uygulama öncesi CA ortalaması (gr)	Uygulama süresi ve şekli
Kontrol	-	10	40,20 ± 0,84	4 hafta, günde 1 kez, oral serum fizyolojik
115 mg/kg	19,5 mg/kg	10	38,37 ± 0,83	4 hafta, günde 1 kez, oral borik asit
250 mg/kg	42,5 mg/kg	10	38,97 ± 1,60	
450 mg/kg	76,5 mg/kg	10	41,65 ± 1,45	
<i>P</i>			AD	
Kontrol	-	10	36,90 ± 2,38	6 hafta, günde 1 kez, oral serum fizyolojik
115 mg/kg	19,5 mg/kg	10	42,83 ± 1,48	6 hafta, günde 1 kez, oral borik asit
250 mg/kg	42,5 mg/kg	10	42,06 ± 1,56	
450 mg/kg	76,5 mg/kg	10	41,34 ± 1,10	
<i>P</i>			AD	

CA: Canlı ağırlık, AD: Anlamlı değil.



Resim 2: Deney hayvanlarının bireysel kafeslerde barındırılması.



Resim 3: Farelere borik asidin gavaj uygulaması ile oral yoldan verilmesi.

3.1.3. Cihazlar

Bu çalışmada ADÜ Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalında bulunan; spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japan), buz dolabı/derin dondurucu (Samsung RL62ZBSW), soğutmalı santrifüj (Hettich Zentrifugen, Mikro 200R, Almanya), teflon başlıklı homojenizatör (IKA Overhead Stirrer, Almanya), ısıtmalı manyetik karıştırıcı (IKA RH Basic 2 ve Nüve MK 418), dijital pH metre (Denver model 225), etüv (Nüve FN 500), 10-20 lam kapasiteli yatay elektroforez tankı (Cleaver Scientific), kesintisiz güç kaynağı (MGE Evolution 650), floresans mikroskop (Olympus IX71), dispenserler (Ependorf, Scorex, Brand), farklı boyutlarda deney tüpü, balon joje ve beher glas (Isolab), endorf tüpü (1,5 ml'lik, Isolab) vorteks (Nüve NM110 ve IKA MS3 Basic), dikey tüp karıştırıcı (P Selecta) hassas terazi (Shimadzu AX 120), su banyosu (Mettler WNB 10), cerrahi makas ve pens (FST Germany), cerrahi eldiven (Beybi), polietilen insülin enjektörü (Beybi) ile çeşitli laboratuvar gereçlerinden yararlanıldı.

3.1.4. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmanın deneysel bölümünde kullanılan borik asit (Sigma-B0252) uygun miktarda distile suda suda çözdürülerek uygulanmıştır. Dokuların homojenizasyonunda potasyum dihidrojen fosfat (Sigma 04243), sodyum fosfat dibazik (Sigma S-9763), sodyum klorür (Sigma S-9625) ve potasyum dihidrojen fosfat (Merck 104936) kullanılarak fosfat tampon hazırlandı. Antioksidan ve oksidan analizlerde kullanılan diğer kimyasallar Sigma-Aldrich, Merck ve Archem'den temin edildi.

MDA analizleri için; trikloro asetik asit (Sigma S-27242), tiobarbiturik asit (Sigma T-5500 MDA), hidroklorik asit (Sigma 30721) kullanılmıştır. SOD analizleri için; ksantin oksidaz (Sigma X-1875), ksantin (Sigma X-0626), nitroblue tetrazolium (Sigma N-6876), kloroform (Merck 102444), etanol (Merck 100986), amonyum sülfat (Merck 101217), Bakır klorür (Merck 818247), sodyum karbonat (Sigma S-7795), sığır albümini (Sigma A-7906), sodyum fosfat dibazik dihidrat (Sigma-71643) kullanılmıştır. CAT analizinde; hidrojen peroksit (Merck-108597) ve total protein analizinde "Total Protein kiti (ARCHEM)" den yararlanılmıştır. GSH analizlerinde ise; EDTA (Sigma E-9884), glutasyon (Merck 104090), metafosforik asit (Merck 100546), DTNB (Sigma D-8130), sodyum sitrat (Sigma S-4641) kullanılmıştır.

DNA hasarını belirlemek için yapılmış olan tek hücre jel elektroforez (Commet) yöntemi için kullanılan kimyasallar ise; agarose (low melting point agarose (LMPA), Sigma-A9414), agarose (normal melting point agarose (NMA), Sigma-A9539), tris-HCL (trizma hydrochloride, Sigma-T3253), EDTA (Sigma-EDS), sodyum hidroksit (NaOH pellet, Sigma-06203), dithiothreitol (DTT Sigma-D9779), proteinase K (Sigma-P6556), triton X-100 (Sigma-T8787), β -mercaptoethanol (Sigma-M6250), DAPI floresan DNA boyası (Sigma-D9542), tris (hydroxymethylaminomethane, Sigma-252859), sodyum n-lauryl sarcosine (Sigma-131776), etil alkol (Sigma-459836) kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerinin Alınması

3.2.1.1. Testis doku örneklerinin alınması

Çalışma süresinin bitiminde (4 hafta ve 6 hafta) farelerin tüm testis doku ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Diseksiyon ile çıkarılan testis dokusu ve *v seminalis* hassas terazide tartıldı. Ağırlıkları kaydedildikten sonra dokular fosfat tamponu (PBS, 150 mM pH 7,4) içerisine alındı. Elde edilen dokular aynı gün içinde teflon başlıklı homojenizatör kullanılarak, buz kalıbında PBS (pH 7,4) içerisinde 2000 devir ve 1 dk süreyle homojenize edildi. Homojenatlar, soğutmalı santrifüj cihazında 7000 devirde 10 dk ve 4°C’de santrifüj edildi ve süpernatantlar analizleri yapılmaya kadar -80°C’de (NU 9668E, Nuair, Japonya) saklandı.

3.2.1.2. Sperm örneklerinin alınması

Testis dokularının çıkarılmasının ardından farelerin *cauda epididymis*’leri dikkatli bir şekilde ortaya çıkartılarak, uygun bir makas ve penset yardımıyla dokudan bir miktarı alınarak, önceden hazırlanmış ısıtılmalı düzenek üzerine konmuş petri kabındaki PBS solüsyonu içerisine bırakıldı. Sıvı içerisinde bulanık biçimde görünen örneklerden sperm alınarak analizleri yapıldı.

3.2.2. Sperma Örneklerinin Analizi

Alınan sperm örnekleri bekletilmeden analizleri yapılmış olup; motilite muayenesi, ölü/canlı oranları, membran bütünlükleri ve DNA hasarı oranları ve yüzdeleri belirlendi.

3.2.2.1. Motilite muayenesi

PBS ile sulandırılmış sperma örneklerinden 10 µl alınarak daha önceden ısı 37 °C ye ayarlanan ısıtma tablalı faz kontrast mikroskop üzerindeki lama konulmuş ve üzeri lamel ile kapatılarak en az 5 farklı alan değerlendirilerek motil olan spermatozoon oranı belirlendi. Sonrasında bu değerlendirmede her bir örnek için yüzde (%) değer verildi. Tüm değerlendirmeler tek bir kişi tarafından yapıldı.

3.2.2.2. Ölü-Canlı spermatozoon muayenesi

Her bir farede ayrı ayrı yapılan ölü-canlı spermatozoon oranı supravital boyama tekniğiyle belirlendi. 10 µl sperma 10 µl eosin-nigrosin boya (% 3 sodyum sitrat, % 3 nigrosin ve % 1 eosin) ile dikkatlice karıştırıldı. Daha sonra lamel yardımıyla froti çekilerek preparatlar hazırlandı. Işık mikroskobu altında değerlendirilen her bir preparatta toplamda 200 spermatozoon olacak şekilde boya alan ölü ve boya almayan canlı spermatozoonlar sayılarak, her bir fareye ait canlı spermatozoon oranı yüzde değer (%) olarak belirlendi.

3.2.2.3. Spermatozoonlarda membran bütünlüğünün belirlenmesi

Spermatozoonların membran bütünlüğü değerlendirmesinde daha önceki literatür verileri dikkate alınarak değerlendirildi (Correa, 1994). Eosin nigrosin boyama tekniğiyle kombine edilen hypo-osmotic swelling test (HE-test) kullanıldı. Bu amaçla her fareye ait 20 µl sperma örneği osmotik basıncı 80 mOsm/L'ye ayarlanmış 180 µl früktoz solüsyonu içinde 37°C de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası farelere ait örnekler eosin nigrosin boyaması yapılarak preparatlar hazırlanarak her bir preparattan; toplam 200 spermatozoon

ışık mikroskop altında sayıldı ve her grupta kıvrık kuyruklu (membrane bütünlüğünü korumuş) spermatozoon oranı yüzde olarak (%) belirlenmiştir.

3.2.2.4. Spermatozoonlarda DNA hasarlarının belirlenmesi

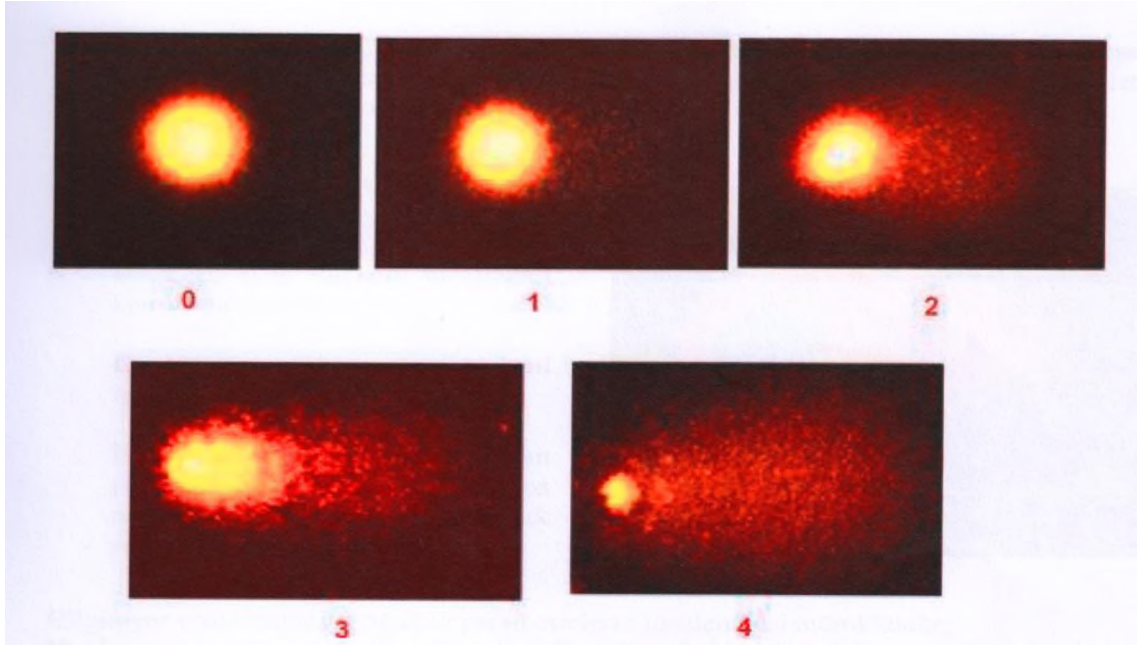
DNA hasarlı spermatozoonların belirlenmesi amacıyla tek hücre jel elektroforez (Commet) yöntemi kullanılmıştır. Daha önceden PBS içerisinde çözündürülerek hazırlanan %0,75 (w/v) Düşük erime noktalı agaroz (LMPA)'dan 190 µl alınarak üzerine 10 µl sperma ilave edilmiştir. Daha önceden üzerleri PBS içerisinde çözündürülmüş %1 (w/v) normal erime noktalı agaroz (NMA) ile kaplanmış lam üzerine 200 µl sperma LMPA karışımı yayıldıktan sonra üzerine lam kapatılarak 4°C de 5 dakika katılaşımaya bırakılmıştır. Daha sonra üstteki lam dikkatlice çekilerek ayrılmıştır. Bu şekilde her fare için hazırlanan preparatlar gece boyunca içerisinde 1% n-lauroylsarcosine, 1 M tris-HCl, 0,5 M ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) ve 0,3 M mercaptoethanol bulunan (sodyum hidroksit peletleri kullanılarak pH>10 ayarlanmış) lizis solüsyonu içerisinde bekletilmiştir (Chen ve ark 2002). Lizis solüsyonundan çıkarılan preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra, elektroforez tankına yerleştirilip 300 mM sodyum hidroksit ve 1 mM EDTA bulunan elektroforez solüsyonu içerisinde 4°C de 20 dakika inkube edildikten sonra 40 dakika süresince 50 volt elektrik akımına maruz bırakılmıştır. Elektroforez işleminden sonra preparatlar sırasıyla 0.4 M tris (pH=7) içeren nötralizasyon solüsyonundan ve %50, %70 ve %90 methanol içeren solüsyonlardan geçirilerek fikze edilmiştir. Preparatlar kuruduktan sonra 70 µl DAPI (40,6-diamidino-2-phenyindole-dilactate) ile boyanarak üzerleri lamelle kapatılmıştır (Hughes ve ark, 1996).

Spermatozoonlar DNA'ları hasarlı (kırık DNA parçalarının elektrik akımı yönünde sürüklenmesine bağlı olarak önde asıl DNA yuvarlağı ile arkada DNA serpintilerinin oluşturduğu kuyruk nedeniyle oluşan kuyruklu yıldız görüntüsü) veya DNA hasarı bulunmayan (asıl DNA'nın bir bütün şekilde görüldüğü) hücreler belirlenerek (Anderson ve ark, 1998) DNA hasarlı spermatozoon oranları belirlenmiştir. Görüntülerin değerlendirilmesinde “Image J” yazılım (Version 1.47v, NIH, USA) programından faydalanılmıştır. Floresan mikroskopta her bir lam için sayılan 100 hücrede DNA hasarı çekirdekten uzayan kuyruk uzunluğunun seviyelerine göre “hasarsız (0)”, “az hasarlı (1)”, “orta derecede hasarlı (2)”, “yüksek derecede hasarlı (3)” ve “hasarlı (4)” olmak üzere 5 kategoride (Tip'te) değerlendirilerek (Resim 4), preparat başına her bir kategorideki DNA

hasarı aşağıda belirtilen formül ile tanımlanan “*Arbitrary Units (AU)*” değerleri hesaplanarak, hasarlı hücrelerin kategori numarası (0 - 4 arası) ve yüzdesi (%) hesaplanmıştır (Collins ve ark, 1995; Collins ve Harvathova 2001).

Arbitrary Units (AU) = [(0 × hasarsız hücre sayısı) + (1 × az hasarlı hücre sayısı) + (2 × orta derecede hasarlı hücre sayısı) + (3 × yüksek derecede hasarlı hücre sayısı) + (4 × hasarlı hücre sayısı)]

Pozitif kontrol için uygun miktardaki sperm örnekleri 42°C de sıcak su banyosunda 10 dk bekletildikten sonra yukarıda belirtildiği şekilde agar kaplanmış lamlara aktarılıp diğer hücreler ile aynı işlemlere tabi tutuldu ve “*pozitif kontrol grubu*” olarak çalışmaya ilave edildi (Stephen ve ark, 1995).



Resim 4: Floresan mikroskop kullanılarak DNA hasarının derecelendirilmesi (0: Hasarsız, 1: Hafif hasar, 2: Orta düzeyde hasarlı 3: Yüksek düzeyde hasar, 4: Ağır hasar).

3.2.3. Testis Dokusunda Oksidan - Antioksidan Parametre Analizleri

Farelerden alınan testis doku örneklerinden elde edilen 80 adet doku süpernatantında malondialdehit (MDA) düzeyi, süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi, glutatyon (GSH) düzeyi ve katalaz (CAT) enzim aktivitesi ile total protein (TP) miktarı değerlendirildi.

3.2.3.1. Malondialdehid (MDA) analizi

MDA analizi, Yoshioka ve ark (1979) ile Draper ve Hadley (1990) tarafından belirtilen tiyobarbitürik asit (TBA) yöntemine dayalı olarak yapıldı (Tablo 8). Bu metoda göre MDA, aerobik ortamda TBA ile 90°C’de inkübasyonu sonucu pembe renkli kompleks oluşturur. Bu kompleksin (MDA konsantrasyonu) absorbansının spektrofotometrede 532 nm dalga boyunda okunması temeline dayanır. Sonuçların hesaplanmasında reaksiyon ortamında bulunan MDA-TBA kompleksinin 532 nm’deki ekstinksiyon katsayısından ($\epsilon=1.56 \times 10^5 / \text{M/cm}$) faydalanıldı ve nmol/ml cinsinden MDA konsantrasyon değerleri hesaplanarak, sonuçlar *nmol/mg doku protein* olarak verildi.

Tablo 8. Testis doku süpernatantında MDA analizinin yapılışı.

	Kör	Örnek
<i>Distile su</i>	0.5 mL	-
<i>Doku süpernatant</i>	-	0.5 mL
<i>TBA (% 0.675’lik)</i>	1 mL	1 mL
<i>TCA (% 10’luk)</i>	3 mL	3 mL
Vortekste karıştırıldı ve tüplerin ağzı kapatıldı		
Tüpler 90 °C’liki su banyosunda 30 dk bekletildi		
Tüpler buz dolu kap içersinde 15 dk bekletildi		
<i>n-butanol</i>	4 mL	4 mL
Vortekste karıştırıldı		
3000 rpm’de 10 dakika santrifuj edildi		
Ayrı temiz tüpe n-butanol’lu kısımdan aktarıldı (en az 2.5 mL)		
532 nm’de okundu		

3.2.3.2. Süperoksit dismutaz (SOD) analizi

SOD analizi, Sun ve ark’nın (1988) metoduna dayalı olarak yapıldı (Tablo 9). Yöntem ksantin ve ksantin oksidaz enzimini kullanarak reaksiyon ortamında enzimatik bir tepkime ile oluşturulan süperoksit radikalinin, ortamda bulunan NBT’u indirgemesi ile oluşan ve maksimum 560 nm’de absorbans veren kırmızı formozon oluşum inhibisyonunun belirlenmesinde SOD aktivite miktarının indirekt olarak saptanması temeline dayanır. Sonuçlar reaksiyon ortamında bulunan doku SOD enzim aktivitesi ünite (U) cinsinden hesaplandı ve *U/mg doku protein* olarak verildi.

Tablo 9. Testis doku süpernatantında SOD analizinin yapılışı.

	Kör	Örnek
<i>Distile su</i>	0.5 mL	-
<i>Doku süpernatant</i>	-	0.5 mL
<i>Etanol</i>	250 µL	250 µL
<i>Kloroform</i>	150 µL	150 µL
Vortekste karıştırıldı		
Karışım +4 °C’de 5 dk 12 000 rpm/dk hızda santrifüj edildi		
Ayrı temiz tüplere		
<i>Reaktif karışımı</i>	2.45 mL	2.45 mL
Santrifüj sonrası		
her bir tüpte üstteki berrak kısımdan 0.5 mL aktarıldı		
<i>Ksantin oksidaz</i>	50 µL	50 µL
Karışım 25 °C’lik sıcak su banyosunda 20 dk inkube edildi		
<i>CuCl₂</i>	1 mL	1 mL
560 nm’de okundu		

3.2.3.3. Katalaz (CAT) analizi

CAT analizi, Bergmeyer ve ark’nın (1974) yöntemine dayalı olarak yapıldı (Tablo 10). Bu metoda göre ışık spektrumunun ultraviyole dalga boyunun azalmasıyla, ortamdaki hidrojen peroksit (H₂O₂) artan bir absorban verir. CAT enzim aktivitesi numunede bulunan CAT enziminin etkisiyle uygun bir tampon içinde yer alan H₂O₂’nin yıkılması sonucu, 240 nm’de ölçülebilen absorbansta saptanan azalma hızı ile doğru orantılı olması prensibine dayanır. Yöntemde belirtilen süre içerisinde absorbanstaki azalma tespit edilerek, reaksiyon ortamında bulunan doku CAT enzim aktivitesi hız sabitesi (k) cinsinden hesaplandı ve sonuçlar *k/mg doku protein* olarak verildi.

Tablo 10. Testis doku süpernatantında CAT analizinin yapılışı.

	Kör	Örnek
<i>Fosfat buffer</i>	2.95 mL	-
<i>Fosfat bufferli H₂O₂</i>		2.95 mL
<i>Doku süpernatant</i>	50 µL	50 µL
Quartz küvetin kapakları kapatıldı		
Küvetler alt-üst edilerek karıştırıldı		
240 nm’de 15 saniye arayla 2 kez okundu		

3.2.3.4. Glutasyon (GSH) analizi

Bir tripeptit olan GSH (glutasyon, γ -glutamilsisteinilglisin) analizi, Tietz'in (1969) metoduna dayalı olarak yapıldı (Tablo 11). Bu yönteme göre tüm non-sülfidril grupları indirgenmiş GSH formundadır. DNTB (5,5'-ditiyobis, 2-nitrobenzoik asit) disülfid kromojen yapısında olup sülfidril bileşikler tarafından indirgenerek sarı renkte bileşik oluşturması ve 412 nm absorbansta okunan GSH konsantrasyonun, bu indirgenmiş kromojenin ile doğru orantılı olmasına dayanır. Örneklerin absorbanları standart eğride yerine konularak değerler mg/dL olarak bulundu ve sonuçlar *mg/g doku protein* olarak verildi.

Tablo 11. Testis doku süpernatantında GSH analizinin yapılışı.

	Kör	Standart	Örnek
<i>Distile su</i>	2 mL	1.8 mL	1.8 mL
<i>Standart</i>	-	200 μ L	-
<i>Doku süpernatant</i>	-	-	200 μ L
<i>Presipitasyon solüsyonu</i>	3 mL	3 mL	3 mL
Vortekste karıştırıldı			
Oda ısısında 5 dk inkübe edildi			
İnkübasyon sonrası her bir tüpe 2 ml filtrat alındı			
<i>Na₂HPO₄ çözeltisi</i>	8 mL	8 mL	8 mL
<i>DTNB solüsyonu</i>	1 mL	1 mL	1 mL
Alt – üst ederek (3 kez) karıştırıldı			
Quartz küvette 412 nm'de 4 dk içinde okundu			

3.2.3.5. Total protein analizi

Doku süpernatantında total protein miktarı belirlenmesinde ve buna ait hesaplamalarda ticari test kitinde (Referans kot-A2300, Archem Health Ind. Co., Türkiye) belirtilen yöntemler dikkate alındı (Tablo 12). Bu yöntem proteinlerin peptidik bağları absorbanı 520 - 560 nm'de ölçülebilen mavi - mor renkte kompleks oluşturmak için alkali bakır (II) solüsyonu ile etkileşme reaksiyonu oluşturması temeline dayanır. Doku total protein miktarı test kitinde belirtildiği şekilde hesaplandı ve sonuçlar *mg/mL* olarak MDA ve GSH düzeyi ile SOD ve CAT enzim aktivitesinin hesaplanmasında kullanıldı.

Tablo 12. Testis doku süpernatantında total protein miktarının belirlenmesi.

	Kör	Standart	Örnek
<i>Ayıraç I</i>	1 mL	1 mL	1 mL
<i>Standart</i>	-	10 µL	-
<i>Doku süpernatant</i>	-	-	10 µL
<i>Distile su</i>	10 µL	-	-
Vortekste karıştırıldı			
Elde edilen karışım 30 °C'lik sıcak su banyosunda 10 dk inkübe edildi			
546 nm'de 30 dk içinde okundu			

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen parametrelerin dağılımı Shapiro-Wilk, varyans homojenitesi Levene's testi ile belirlendi. Gruplar arasındaki istatistiksel değerlendirmeler verilerin normal dağılıma uygunluğuna göre Kruskal-Wallis veya tek yönlü ANOVA, verilerin zamana bağlı istatistiksel değerlendirmeleri ise t-testi veya Mann-Whitney testi ile belirlendi. Gruplar arasındaki farklılıkların belirlenmesinde Duncan's testi veya Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. Veriler SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 11.5) programında değerlendirildi ve $P < 0.05$ olanlar önemli olarak kabul edildi (Conover, 1980).

4. BULGULAR

4.1. Ağırlık Değerleri

4.1.1. Canlı Ağırlık

Çalışmada 4 hafta süreyle oral yolla borik asit alan farelerin final canlı ağırlıkları, kontrol, 115, 250 ve 450 mg/kg'lık gruplarda sırasıyla 41,20±0,84, 39,59±1,15, 39,99±1,17, 40,86±1,15 g olarak tespit edilmiştir. Altı hafta süre borik asit uygulanan farelerde ise canlı ağırlık değerleri sırasıyla; 39,40±2,25, 44,32±1,41, 42,97±1,28, 40,30±1,00 g olarak belirlenmiştir. Canlı ağırlıkları karşılaştırıldığında uygulama öncesi ve uygulama sonrası ağırlıklar arasında farklılık bulunmamıştır (Tablo 13).

4.1.2. Testis ve *Vesicula seminalis* Ağırlıkları

Dört hafta sonunda ölçülen testis ağırlıkları kontrol, 115, 250 ve 450 mg/kg'lık gruplarda sırasıyla; 192,60±5,98, 171,80±4,43, 174,10±5,98, 178,40±9,73 mg olduğu tespit edilmiştir. Doz arttıkça testis ağırlıklarında azalma olduğu ancak meydana gelen değişimin istatistiksel anlamlılık taşımadığı belirlenmiştir. Altı haftalık gruplarda ise değerlerin sırasıyla; 194,30±6,85, 207,90±3,88, 180,80±0,07, 177,20±1,54 mg olduğu yine 4 haftalık gruplar gibi anlamlı değişimlerin olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 14).

Vesicula seminalis ağırlıklarında doza bağlı bir azalma gözlemlenmiş olup kontrol grubu, 115, 250 ve 450 mg/kg borik asit alan gruplarda sırasıyla; 356,90±7.44, 270,50±8.43, 311,00±17,57 ve 268,90±0,63 mg bulunmuştur ($P<0.05$). Bu değerler 6 haftalık sürede ise sırasıyla; 280,30±25,65, 342,10±17,83, 320,70±15,76, 264,60±12,52 mg olarak tespit edilmiştir ($P<0,05$) (Tablo 14).

Tablo 13. Çalışma öncesi ve borik asit uygulama sonrası canlı ağırlık değerleri (n=10).

Zaman	Gruplar	Canlı ağırlık (g)		P
		Çalışma öncesi	Çalışma sonunda	
4. hafta	Kontrol	40,20 ± 0,84	41,20 ± 0,84	AD
	115 mg/kg/gün	38,37 ± 0,83	39,59 ± 1,15	AD
	250 mg/kg/gün	38,97 ± 1,60	39,99 ± 1,17	AD
	450 mg/kg/gün	41,65 ± 1,45	40,86 ± 1,15	AD
	P	AD	AD	
6. hafta	Kontrol	36,90 ± 2,38	39,40 ± 2,25	AD
	115 mg/kg/gün	42,83 ± 1,48	44,32 ± 1,41	AD
	250 mg/kg/gün	42,06 ± 1,56	42,97 ± 1,28	AD
	450 mg/kg/gün	41,34 ± 1,10	40,30 ± 1,00	AD
	P	AD	AD	

AD: Anlamli değil.

Tablo 14. Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde 4 ve 6. hafta testis ve *v. seminalis* ağırlıkları (n=10).

Zaman	Gruplar	Parametre	
		Testis ağırlığı (mg)	<i>V. seminalis</i> ağırlığı (mg)
4. hafta	Kontrol	192,60 ± 5,98	356,90 ± 7,44 ^a
	115 mg/kg/gün	171,80 ± 4,43	270,50 ± 8,43 ^b
	250 mg/kg/gün	174,10 ± 5,98	311,00 ± 17,57 ^{a,b}
	450 mg/kg/gün	178,40 ± 9,73	268,90 ± 20,63 ^b
	P	AD	*
6. hafta	Kontrol	194,30 ± 6,85	280,30 ± 25,65 ^{b,c}
	115 mg/kg/gün	207,90 ± 3,88	342,10 ± 17,83 ^a
	250 mg/kg/gün	180,80 ± 0,07	320,70 ± 15,76 ^{a,b}
	450 mg/kg/gün	177,20 ± 1,54	264,60 ± 12,52 ^c
	P	AD	*

a, b, c: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

*: $P < 0,05$, AD: Anlamli değil.

4.2. Sperm Parametreleri

Motilite oranları 4 haftalık gruplarda; kontrol, 115, 250 ve 450 mg/kg borik asit alan gruplar sırasıyla (%); 77.50 ± 2.38 , 79.00 ± 1.94 , 73.00 ± 1.85 , 69.00 ± 2.66 olarak bulunmuştur ($P < 0.05$). Bu değerler 6 haftalık gruplarda ise sırasıyla (%); $78,00 \pm 1,52$, $72,50 \pm 4,36$, $68,50 \pm 2,24$, $54,00 \pm 4,33$ olarak tespit edilmiştir ($P < 0.001$). Ayrıca fiziksel incelemelerde dikkati çeken bir diğer husus ise hem 4 hemde 6 haftalık sürelerde yüksek doz (450 mg/kg) borik asit alan gruplardaki farelerde progresif motilitenin (ileri yönde hareketli spermatozoon oranı) düştüğü gözlemlenmiştir.

Canlı sperm oranları incelendiğinde 4 haftalık gruplarda kontrol, 115, 250 ve 450 mg/kg borik asit uygulanan gruplar sırasıyla (%); 73.50 ± 2.00 , 78.80 ± 1.44 , 74.30 ± 1.39 , 70.70 ± 1.57 olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.01$). 6 hafta süreyle borik asit uygulanması sonucu ise bu değerlerin sırasıyla (%); $74,00 \pm 0,93$, $68,00 \pm 2,33$, $68,20 \pm 1,93$, $57,00 \pm 3,09$ olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.001$). Borik asit uygulamada süre arttıkça canlı sperm oranında azalma dikkati çekmektedir (Tablo 15).

Membran bütünlüğü açısından değerlendirildiğinde ise 4 haftalık gruplarda sırasıyla, kontrol, 115, 250 ve 450 mg/kg borik asit alan gruplar (%); 75.60 ± 1.78 , 67.90 ± 2.20 , 62.00 ± 2.16 , 64.30 ± 1.85 olduğu tespit edilmiştir ($P < 0.001$). Bu değerler membran bütünlüğü açısından 6 haftalık sürede kontrol, 115, 250 ve 450 mg/kg borik asit alan gruplarda sırasıyla (%); 74.70 ± 1.32 , 58.30 ± 2.25 , 60.00 ± 1.54 , $55.10 \pm 3,26$ olarak belirlenmiştir ($P < 0.001$). Uygulama süresi ve dozun artması, membran bütünlüğü değerlerini azalttığı görülmektedir (Tablo 15).

Görüldüğü gibi 4 ve 6 hafta borik asit uygulaması kontrol grubu değerleriyle kıyaslandığında testis v. *seminalis* ağırlıkları, canlı sperm oranı (%) ve membran bütünlüğü (%) parametrelerinde değişik derecelerde anlamlı farklılıklara neden olmuştur.

Tablo 15. Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde 4 ve 6. hafta sperm parametreleri (n=10).

Zaman	Gruplar	Parametre		
		Motilite (%)	Canlı sperm (%)	Membran bütünlüğü (%)
4. hafta	Kontrol	77,50 ± 2,38 ^{a,b}	73,50 ± 2,00 ^{b,c}	75,60 ± 1,78 ^a
	115 mg/kg/gün	79,00 ± 1,94 ^a	78,80 ± 1,44 ^a	67,90 ± 2,20 ^b
	250 mg/kg/gün	73,00 ± 1,85 ^{b,c}	74,30 ± 1,39 ^{b,c}	62,00 ± 2,16 ^b
	450 mg/kg/gün	69,00 ± 2,66 ^c	70,70 ± 1,57 ^c	64,30 ± 1,85 ^b
	<i>P</i>	*	**	***
6. hafta	Kontrol	78,00 ± 1,52 ^a	74,00 ± 0,93 ^a	74,70 ± 1,32 ^a
	115 mg/kg/gün	72,50 ± 4,36 ^{a,b}	68,00 ± 2,33 ^b	58,30 ± 2,25 ^b
	250 mg/kg/gün	68,50 ± 2,24 ^b	68,20 ± 1,93 ^b	60,00 ± 1,54 ^b
	450 mg/kg/gün	54,00 ± 4,33 ^c	57,00 ± 3,09 ^c	55,10 ± 3,26 ^b
	<i>P</i>	***	***	***

a, b, c: Aynı sütündeki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.001$.

4.3. Spermatozoonlarda DNA Hasarı

Comet assay testi uygulanarak yapılan yapılan incelemede, borik asit alan 4 haftalık grupların tüm dozlarında herhangi bir DNA hasarı oluşmadığı tespit edilmiştir. Dört haftalık 450 mg/kg alan gruplarda DNA görüntüsü etrafında hale oluşumu bazı resimlerde gözlemlenmiştir.

Altı haftalık gruplarda 4 haftalıkların aksine DNA hasarının oluştuğu tespit edilmiştir. Bu hasar düzeyi doza bağlı olarak değişmekle birlikte, oluşan hasarın derecesi (0: hasarsız, 1. derece, 2. derece, 3. derece ve 4. derece hasar) değerlendirildiğinde; kontrol, 115, 250 ve 450 mg/kg borik asit alan gruplarda sırasıyla; 0.00, 0.12±0.04, 0.32±0.07, 0.66±0.14 olduğu belirlenmiştir ($P < 0.001$). Kontrol grubunda herhangi bir hasar tespit edilemezken doz arttıkça hasar düzeyinde artışın şekillendiği tespit edilmiştir. DNA hasarının olduğu hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı açısından değerlendirildiğinde ise; kontrol, 115, 250 ve 450 mg/kg borik asit uygulanan farelerde sırasıyla (%); 0.00, 3.30±1.43, 6.20±1.84, 14.40±2.89 olduğu belirlenmiştir ($P < 0.001$) (Tablo 16). Borik asitin 6 hafta sürede spermatozoonlarda DNA hasarı düzeyleri; 450 mg/kg alan gruplarda genellikle orta ve ileri düzeyde hasar (3. ve

4. derece) gözlemlenirken, 115 ve 250 mg/kg'lık gruplarda hafif ve orta düzey (2. ve 3. derece) hasar tespit edilmiştir ($P<0.001$). Buna ait spermatazoon DNA hasar derecesi ve hasarlı hücrelerin uygulama süresine göre karşılaştırılması Tablo 17'de, pozitif kontrol ve uygulama gruplarının sperma DNA hasar görüntüleri Resim 5'de verilmiştir.

Tablo 16. Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde 4 ve 6. haftada sperm DNA hasar derecesi ve DNA hasar yüzdesi (n=10).

Zaman	Gruplar	Parametre	
		DNA hasar derecesi (0-4)	DNA hasarlı hücre (%)
4. hafta	Kontrol	0,00	0,00
	115 mg/kg/gün	0,00	0,00
	250 mg/kg/gün	0,00	0,00
	450 mg/kg/gün	0,00	0,00
	<i>P</i>	AD	AD
6. hafta	Kontrol	0,00 ^d	0,00 ^d
	115 mg/kg/gün	0,12 ± 0,04 ^c	3,30 ± 1,43 ^c
	250 mg/kg/gün	0,32 ± 0,07 ^b	6,20 ± 1,84 ^{b,c}
	450 mg/kg/gün	0,66 ± 0,14 ^a	14,40 ± 2,89 ^a
	<i>P</i>	***	***

a, b, c, d: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.

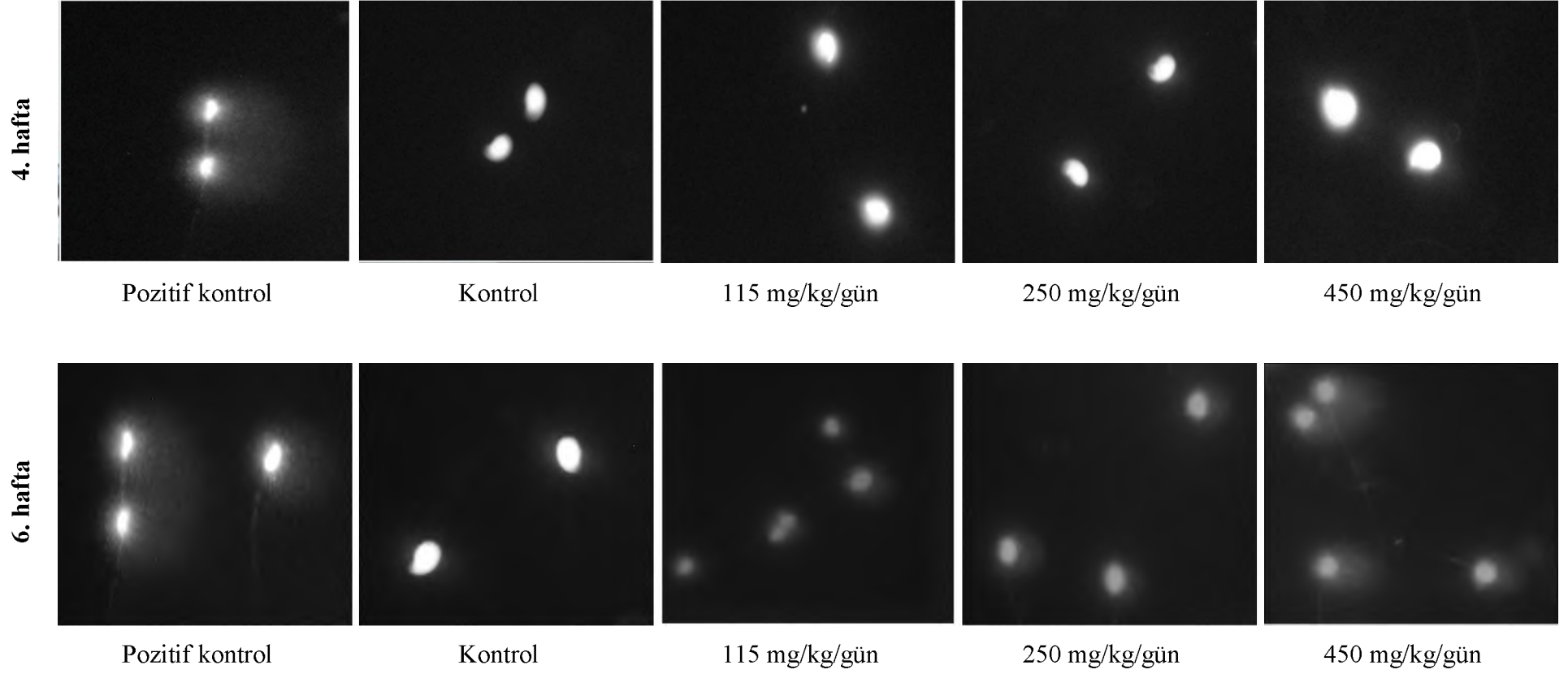
***: $P<0.001$, AD; Anlamlı değil.

Tablo 17. Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde testis ve *v. seminalis* ağırlığı ile sperm parametrelerinin uygulama süresine göre karşılaştırılması (n=10).

Parametre	Zaman	Gruplar			
		Kontrol	115 mg/kg/gün	250 mg/kg/gün	450 mg/kg/gün
Testis ağırlığı (mg)	4. hafta	192,60 ± 5,98	171,80 ± 4,43	174,10 ± 5,98	178,40 ± 9,73
	6. hafta	194,30 ± 6,85	207,90 ± 3,88	180,80 ± 0,07	177,20 ± 1,54
	<i>P</i>	AD	AD	AD	AD
<i>Vesicula seminalis</i> ağırlığı (mg)	4. hafta	356,90 ± 7,44	270,50 ± 8,43	311,00 ± 17,57	268,90 ± 20,63
	6. hafta	280,30 ± 25,65	342,10 ± 17,83	320,70 ± 15,76	264,60 ± 12,52
	<i>P</i>	AD	*	AD	AD
Motilite (%)	4. hafta	77,50 ± 2,38	79,00 ± 1,94	73,00 ± 1,85	69,00 ± 2,66
	6. hafta	78,00 ± 1,52	72,50 ± 4,36	68,50 ± 2,24	54,00 ± 4,33
	<i>P</i>	AD	AD	AD	*
Canlı sperm oranı (%)	4. hafta	73,50 ± 2,00	78,80 ± 1,44	74,30 ± 1,39	70,70 ± 1,57
	6. hafta	74,00 ± 0,93	68,00 ± 2,33	68,20 ± 1,93	57,00 ± 3,09
	<i>P</i>	AD	***	*	**
Membran bütünlüğü (%)	4. hafta	75,60 ± 1,78	67,90 ± 2,20	62,00 ± 2,16	64,30 ± 1,85
	6. hafta	74,70 ± 1,32	58,30 ± 2,25	60,00 ± 1,54	55,10 ± 3,26
	<i>P</i>	AD	**	AD	*
Spermatozoa DNA hasar derecesi (0-4)	4. hafta	0,00	0,00	0,00	0,00
	6. hafta	0,00	0,12 ± 0,04	0,32 ± 0,07	0,66 ± 0,14
	<i>P</i>	AD	**	***	***
Spermatozoa DNA hasarlı hücre (%)	4. hafta	0,00	0,00	0,00	0,00
	6. hafta	0,00	3,30 ± 1,43	6,20 ± 1,84	14,40 ± 2,89
	<i>P</i>	AD	**	***	***

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, AD; Anlamli değil.

Resim 5. Sperma hücrelerinde pozitif kontrol, kontrol ve borik asit uygulama gruplarında 4 ve 6. hafta DNA hasarına ilişkin örnek fluoresans mikroskop görüntüleri (büyütme x 50)



4.4. Testis Dokusunda Biyokimyasal Parametreler

Dört hafta ve 6 hafta süreyle borik asit uygulandıktan sonra elde edilen testis dokusu örneklerinden yapılan biyokimyasal analiz sonuçları toplu halde Tablo 18’de ve belirtilen değerlerin zamana bağlı değişimleri ise Tablo 19’da verilmiştir.

MDA değerleri 4 haftalık gruplarda kontrol ve 115, 250 ve 450 mg/kg’lık borik asit uygulaması sonucu sırası ile 143.97 ± 5.16 , 128.84 ± 12.23 , 183.39 ± 6.24 , 192.07 ± 11.32 nmol/mg protein olduğu belirlendi. 250 ve 450 mg/kg borik asit verilen grupta MDA değerinin arttığı ve kontrol ve 115mg/kg’lık gruba göre anlamlı olduğu saptandı ($P < 0.001$). 6 hafta süreyle borik asit uygulanması sonucu kontrol ve 115, 250 ve 450 mg/kg’lık gruplarda MDA düzeyleri; $149,29 \pm 13,90$, $167,00 \pm 16,50$, $157,53 \pm 8,70$, $216,91 \pm 35,34$ nmol/mg protein olarak tespit edildi. İlaç uygulanan gruplar kontrol grubuyla kıyaslandığında 450 mg/kg borik asit alan grupta farklılığın anlamlı olduğu saptandı ($P < 0.05$) (Tablo 18).

Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde 4 haftalık gruplar kontrol ile karşılaştırıldığında tüm uygulama gruplarında SOD ve CAT enzim aktivitesi, 6 haftalık gruplarda ise CAT aktivitesi anlamlı bulunmamıştır (Tablo18).

SOD açısından incelediğimizde ise 6 haftalık borik asit uygulaması sonucu kontrol ve 115, 250 ve 450 mg/kg’lık gruplar sırasıyla; 7.04 ± 0.31 , 7.03 ± 0.52 , 5.62 ± 0.39 ve 5.47 ± 1.22 U/mg protein olarak tespit edildi. Borik asidin 250 ve 450 mg/kg uygulanan grupları, kontrol ve 115 mg/kg grubuna göre SOD enzim aktivitesinin yüksek düzeyde olduğu ve aralarındaki farkın anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.01$) (Tablo 18).

GSH sonuçları değerlendirildiğinde 4 haftalık gruplarda kontrol, 115, 250 ve 450 mg/kg’lık borik asit uygulanan gruplarda elde edilen değerler sırasıyla; 15.40 ± 2.25 , 20.90 ± 8.09 , 7.31 ± 2.02 , 9.77 ± 1.54 mg/g protein olarak belirlendi. Yüksek dozda (450 mg/kg) borik asit verilen grupta GSH değerinin azaldığı kontrol ve 115 mg/kg’lık gruba göre farkın anlamlı olduğu tespit edildi ($P < 0.05$). GSH değeri 6 haftalık gruplarda ise kontrol grubu, 115, 250 ve 450 mg/kg’lık gruplarda sırasıyla; 16.78 ± 1.40 , 7.62 ± 1.19 , 8.20 ± 0.98 ve 11.85 ± 0.74 mg/g protein olduğu saptandı. Giderek azalan GSH seviyesinin kontrol grubu ile uygulama grupları arasında 6 haftalık uygulamada anlamlı olduğu belirlendi ($P < 0.001$). Çalışmada oksidan (MDA) ve antioksidan (SOD, CAT ve GSH) parametreleri 4 ve 6 haftalık uygulanma sürelerine göre karşılaştırıldığında sadece SOD enzim aktivitesi, 250 mg/kg borik asit uygulanan grupta zamana bağlı anlamlı değişkenlik ($P < 0.01$) gösterdiği tespit edildi. (Tablo 19).

Tablo 18. Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde 4 ve 6. hafta testis dokusunda MDA ve GSH düzeyleri ile SOD ve CAT enzim aktivite değerleri (n=10).

Zaman	Gruplar	Parametre			
		MDA (nmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)	CAT (k/mg protein)	GSH (mg/g protein)
4. hafta	Kontrol	143,97 ± 5,16 ^a	8,21 ± 1,52	0,91 ± 0,20	15,40 ± 2,25 ^a
	115 mg/kg/gün	128,84 ± 12,23 ^a	13,80 ± 5,39	1,11 ± 0,47	20,90 ± 8,09 ^a
	250 mg/kg/gün	183,39 ± 6,24 ^b	10,34 ± 2,29	0,98 ± 0,22	9,77 ± 1,54 ^{a,b}
	450 mg/kg/gün	192,07 ± 11,32 ^b	6,79 ± 0,62	0,61 ± 0,13	7,31 ± 2,02 ^b
	<i>P</i>	***	AD	AD	*
6. hafta	Kontrol	149,29 ± 13,90 ^b	7,04 ± 0,31 ^a	0,79 ± 0,17	16,78 ± 1,40 ^a
	115 mg/kg/gün	157,53 ± 8,70 ^b	7,03 ± 0,52 ^a	0,53 ± 0,07	11,85 ± 0,74 ^b
	250 mg/kg/gün	167,00 ± 16,50 ^{a,b}	5,62 ± 0,39 ^b	0,54 ± 0,10	8,20 ± 0,98 ^c
	450 mg/kg/gün	216,91 ± 35,34 ^a	5,47 ± 1,22 ^b	0,73 ± 0,10	7,62 ± 1,19 ^c
	<i>P</i>	*	**	AD	***

GSH; İndirgenmiş glutatyon, SOD; Süperoksit dismutaz, CAT; Katalaz, MDA; Malondialdehid.
a, b, c: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı göstermektedir.
*: $P < 0,05$, **: $P < 0,01$, *: $P < 0,001$.

Tablo 19. Farklı dozlarda borik asit uygulanan farelerde testis dokusunda MDA ve GSH düzeyleri ile SOD ve CAT enzim aktivite değerlerinin uygulama süresine göre karşılaştırılması (n=10).

Parametre	Zaman	Gruplar			
		Kontrol	115 mg/kg/gün	250 mg/kg/gün	450 mg/kg/gün
MDA (nmol/mg protein)	4. hafta	143,97 ± 5,16	128,84 ± 12,23	183,39 ± 6,24	192,07 ± 11,32
	6. hafta	149,29 ± 13,90	157,53 ± 8,70	167,00 ± 16,50	216,91 ± 35,34
	<i>P</i>	AD	AD	AD	AD
SOD (U/mg protein)	4. hafta	8,21 ± 1,52	13,80 ± 5,39	10,34 ± 2,29	6,79 ± 0,62
	6. hafta	7,04 ± 0,31	7,03 ± 0,52	5,62 ± 0,39	5,47 ± 1,22
	<i>P</i>	AD	AD	**	AD
CAT (k/mg protein)	4. hafta	0,91 ± 0,20	1,11 ± 0,47	0,98 ± 0,22	0,61 ± 0,13
	6. hafta	0,79 ± 0,17	0,53 ± 0,07	0,54 ± 0,10	0,73 ± 0,10
	<i>P</i>	AD	AD	AD	AD
GSH (mg/g protein)	4. hafta	15,40 ± 2,25	20,90 ± 8,09	9,77 ± 1,54	7,31 ± 2,02
	6. hafta	16,78 ± 1,40	11,85 ± 0,74	8,20 ± 0,98	7,62 ± 1,19
	<i>P</i>	AD	AD	AD	AD

MDA; Malondialdehid, SOD; Süperoksit dismutaz, CAT; Katalaz, GSH; İndirgenmiş glutatyon.

** : $P < 0,01$, AD: Anlamlı değil.

5. TARTIŞMA

Bor sahip olduğu önemli özelliklerinden dolayı yaşamının her alanında insan, hayvan ve bitkiler için önem arz eden bir elementtir. İnsanlar gündelik yaşamlarında, ilaçlardan kozmetik ürünlere, cam malzemelerden teknolojik aletlere kadar geniş bir yelpazede bor içeren birçok ürünü kullanmaktadır (Etimaden, 2011). Bu elementin geniş ölçüde kullanılıyor olması bor gibi bazı iz elementlere yönelik şüpheleri beraberinde getirmektedir. Bu bağlamda yapılan birçok deneysel çalışmada borun üreme sistemine olan olumsuz etkilerinin olduğu bu nedenle, Avrupa Birliği Konseyinin yayınladığı direktif (67/548/EC) doğrultusunda borik asit ve sodyum boratın, üreme üzerine zararlı etkileri bulunan şüpheli maddeler listesine alınmasına neden olmuş, kategori 1b sınıfında yerini almıştır (Duydu ve ark, 2011). Artan çevresel kirlilik, stres, beslenmenin giderek sanayileşmesi, tedavide kullanılan ilaçlar, su ve hava kirliliği, radyasyon ve elektromanyetik kirliliğin günden güne artması da üreme sağlığını olumsuz etkileyen başlıca faktörlerdir (Harvey ve ark, 1999). Dolayısı ile herhangi bir maddenin kullanım alanlarının yaygın olması, maruziyet düzeyini artırsa da meydana gelebilecek olumsuz etkiler doz-süre ilişkisinden bağımsız değerlendirilemez.

Bor elementinin büyüme inhibitörü ve merkezi sinir sistemi toksikantı olabileceği ileri sürülmüş, borun üreme sistemi üzerine de olumsuz sonuçlar doğurabileceği ifade edilmiştir. Bor bileşiklerinin üreme sistemine zararlı etkileri olabileceğini ilk kez Weir ve Fisher (1972) adlı araştırmacılar yaptıkları deneysel çalışmalarında, bu bileşiklerinin ratlarda erkek üreme sisteminde bazı olumsuz değişiklikler yapabildiği tespit etmişlerdir. Bu amaçla araştırmacılar 3 nesil boyunca Sprague dawley ırkı ratların diyetlerine günlük ekledikleri 117, 350 ve 1170 ppm düzeyindeki borik asitin, düşük doz gruplarında (117 ve 350 ppm) herhangi bir olumsuzluğa neden olmadığını; ancak, yüksek doz (1170 ppm) alan grupta erkek ratlarda kısırlığın (sterilite) gözlendiğini belirtmişlerdir.

Benzer şekilde bor bileşiklerinin üreme sistemi üzerine etkileriyle ilgili deneysel hayvan çalışmalarında, tek dozda veya düşük miktarlarda uzun süre kullanımlarında olumsuz etkilerin görülmediği (Dixon ve ark, 1976); ancak, yüksek dozlarda veya subkronik ve kronik kullanımlarında gelişebildiği bildirilmiştir (Treinen ve Chapin, 1991).

Bor bileşiklerinin doz-süre ilişkisi açısından testis dokusunda oksidatif stres parametrelerini ve sperm DNA'sı üzerine olası etkilerini ne ölçüde etkilediği üzerine sınırlı sayıda araştırmanın olduğu görüldüğünden, bu çalışmada borik asitin farklı doz ve uygulama sürelerinde erkek fertilesine olan etkileri hususunda katkı sağlanamak amacıyla canlı ağırlık,

testis ve *v seminalis* ağırlıkları, testis dokusuna olası oksidan ve antioksidan düzeyleri ile spermatozoon DNA hasarına olası etkilerinin değerlendirilerek bilimsel verilere katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Borik asitin yüksek doz ve uzun süreli kullanımlarında üreme üzerine olumsuz etkilerinin 7 ile 14. günlerden itibaren görüldüğü bildirilmektedir (Linder ve ark, 1990). Meydana gelen olumsuz etkilerin tam olarak nedeni belirlenemese de, hormon benzeri etki nedeniyle olabileceği (Ku ve Chapin, 1994) veya testis dokusunda sperm üretiminde önemli rol oynayan COX-2 düzeylerinde azalma yaparak oluşturabileceği ifade edilmiştir (Frungeri ve ark, 2002; Wang ve ark, 2003). Ayrıca oksidatif stresin etkilerine karşı spermatozoonu koruyan antioksidan enzim sistemlerinin yapısına katılan, bakır, çinko gibi iz element düzeylerinin testis dokusunda azaltmasının bir sonucu olabileceği vurgulanmıştır (El-Dakdokhy ve ark, 2013).

Bazı araştırmacılar testis dokusunda borik asidin antimitotik aktiviteyi olumsuz etkileyerek (Beyer ve ark, 1983; Hall ve ark, 1985; Ku ve ark, 1993) hücrede mitokondri düzeyinde ATP sentezini azalttığı (Silaev ve ark, 1977; Settimi ve ark, 1982; Hall ve ark, 1985) ya da enzim aktivitelerini etkileyerek (Medina, 1969, Nielsen, 1996) vücudun makromineral dengesini ve hücre membran fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyerek (Landauer, 1952) zararlı etkilerini oluşturduğunu ileri sürmektedirler.

Bor bileşiklerinin doz ve süreye bağlı olarak oral yolla alınması sonucu canlı ağırlık düzeylerinde değişimler yapabildiği bazı araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur. Borik asidin içme suyuna (0,28 mg/250 ml su) katılarak kısa sürede (5 günde) farelerde canlı ağırlık azalmasına neden olduğu, idrarda yüksek glikoz düzeyi ile birlikte lipid ve protein katabolizmasında artış gözlemlendiği belirtilmiştir (Aysan ve ark, 2011). Farelerde yapılan kısa ve uzun süreli bir çalışmada (NTP, 1987) 14 gün süreyle gıda içerisine yüzde 1.25, 2,5, 5 ve 10'luk oranda borik asit ilavesi sonucunda erkek farelerde; %2,5 ve 5'lik grupta, dişi farelerde ise %10'luk grupta kontrol grubuna göre canlı ağırlık kayıplarının meydana geldiği ifade edilmiştir. Uzun süreli uygulamada (32 hafta) ise gıdalara ilave edilen 275-550 mg/kg dozda borik asit uygulanan farelerin canlı ağırlığında %10-17 düzeyinde bir azalma olduğu belirtilmiştir (NTP, 1987). Ratlarda yapılan bir çalışmada ise 30 ve 60 gün süreyle 0,3, 1 ve 6 mg/L boron içeren sodyum borat bileşiğinin (yaklaşık 1,5, 5 ve 30 mg/kg borik asite eş değer) canlı ağırlık kaybının aksine, önemli değişimlere neden olmadığı vurgulanmıştır (Dixon ve ark, 1976). Yapılan bu çalışmada oral yolla uygulanan borik asitin sadece yüksek doz verilen grupların (450 mg/kg dozda 4 ve 6 hafta) canlı ağırlıklarında azalmaya neden olduğunu, diğer gruplarda (115 ve 250 mg/kg dozlarda 4 ve 6 hafta) ise az miktarda ağırlık artışlarına neden

olduğu, meydana gelen değişimlerin anlamlılık taşımadığı saptandı (Tablo 13). Bor içeren bileşiklerin meydana getirdiği bu canlı ağırlık değişimlerinin bazı araştırmacılarca borun ince bağırsak fonksiyonlarında yaptığı değişikliklere bağlı olduğu şeklinde izah edilirken (Bokina, 1976), bazı araştırmacılarca da ince bağırsaklarda gıda emilimini etkileyerek gerçekleştirdiğini iddia edilmektedir (Murray, 1998). Nedeni tam olarak ortaya konmasa da bor bileşiklerinin canlı ağırlık üzerinde meydana getirdiği değişimlerin uygulanma şekli, dozu, süresi ve cinsiyet ile yakından ilişkili olduğu görülmektedir. Araştırmalarda farklı görüşler bulunmakla birlikte borun yüksek dozlarda ve uzun sürede canlı ağırlık kaybına neden olduğu, kısa sürede ve düşük dozlarda bu değişimlerin daha çok su ve gıda alımında yarattığı artış ve azalışlara bağlı olabileceği, cinsiyet gibi diğer faktörlerin de etkisinin olabileceğini ortaya koymaktadır.

Bor bileşiklerinin canlı ağırlıkta yarattığı çoğunlukla azalma yönündeki değişimler, testis, prostat ve bazı eklenti bezlerinde de görülebilmekte, ancak meydana gelen bu değişimlerin doz ve süreye bağlı olduğu ifade edilmektedir (Weir ve Fisher, 1972). Swiss albino farelerine 1000 ppm dozda borik asitin 14 hafta süre ile yeme katılarak uygulanmasında herhangi bir urogenital değişikliğe yol açmazken, aynı sürede 9000 ppm düzeyindeki miktarların geri dönüşümsüz hasara neden olduğu bildirilmiştir (Ku ve Chapin, 1994). Yine Swiss farelerde 27 hafta boyunca 152, 636 ve 1262 mg/kg borik asit verilmesi sonucuda sadece yüksek doz alan farelerde (636 ve 1262 mg/kg) testis ağırlıklarında azalma olduğu gözlenmiştir (Fail, 1991). Ratlarda 60 gün 500 mg/kg borik asit uygulamasının ürogenital sistemde değişimlere neden olduğu belirtilerek (El-Daktoky, 2013), bu durum ratların borik aside farelerden daha duyarlı olmasıyla izah edilmiştir (Ku ve Chapin, 1994). Sprague Dawley ırkı erkek ratlarda yapılan bir çalışmada içme sularına 70 gün boyunca 300 mg/L sodyum boratın ilave edilmesiyle testis dokusunda bazı küçük histolojik farklılıklar (spermatogoniumlarda vakuolizasyon ve residual yapıların sayıca artması) dışında anlamlı bir değişime rastlanmamıştır (Burukçuoğlu, 2009). Ratlarda 60 gün süreyle 125, 250 ve 500 mg/kg borik asit uygulanmasında 250 ve 500 mg/kg alan gruplarda testis ağırlığında azalma olduğu bildirilmiştir (El-Daktoky, 2013). Ratlarda yapılan diğer bir çalışmada testis dokusunda bor birikimi ile üreme sistemi üzerine olumsuz etkiler arasında doğru bir orantı olduğu ifade edilmiştir (Ku ve ark, 1993). Ratlarda testis dokusunda elementer bor düzeyleri ortalama 2,26 µg/g düzeyinde olduğu (El-Dakdokhy ve ark, 2013), bu düzey 4 µg/g düzeyine ulaştığında hafif oranda spermiasyon azalması görülürken, 10 µg/g düzeyinde ciddi düzeyde azalmaya ve 14 µg/g düzeyinde ise testis dokusunda atrofi oluşarak olumsuz etkiler gözlendiği tespit edilmiştir (Ku ve ark, 1993; Murray, 1998). Yapılan bu çalışmada 4 ve 6

hafta süreyle borik asit uygulanan farelerde uygulama sonrasında testis dokusunda kontrol grubuna göre hafif düzeyde ağırlık azalması görüldüğü; ancak meydana gelen bu değişimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlenmiştir (Tablo 14). Görüldüğü gibi borik asitin testis dokusunda olası etkileri doz ve süreyle yakından ilişkilidir. Çalışmamızda testis ağırlığında tüm gruplarda azalma eğilimi olduğu görülmüş; ancak, bu değerlerin anlamlı olmaması, testis dokusunda etkili oranlarda veya uygulama süresi içinde bor birikiminin etkin olmadığı kanısına varılmıştır.

V. seminalis erkek eklenti bezi olup, boynuz şeklindeki yapısıyla prostat ve idrar kesesinin arkasında yer almaktadır. Farelerde 27 hafta boyunca oral yolla borik asitin 1000, 4500 ve 9000 ppm/gün uygulamasıyla, *v. seminalis* ve prostat bezi ağırlıklarında doza bağlı değişen miktarlarda azalmanın ve doku küçülmelerinin görüldüğü bildirilmiştir (Fail, 1991). Bizim çalışmamızda benzer şekilde borik asitin 4 ve 6 hafta süreyle uygulanmasında *v. seminalis* ağırlık değerlerinin her iki zaman diliminde de istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) bir azalmanın olduğu, en fazla düşüşün 450 mg/kg borik asit verilen grupta olduğu saptandı.

Borik asit uygulamaları sperm parametrelerinde de bazı değişikliklere neden olabilmektedir. Farelerde 27 hafta oral olarak 4500 ve 9000 ppm/gün borik asit uygulanmasında epididimal sperm miktarlarında ciddi azalmalar olduğu belirtilirken, 1000 ppm borik asit tüketiminin anlamlı olmasa da kontrol grubuna oranla artışların olduğu belirtilmiştir (Fail, 1991). Chapin ve Ku (1994) yaptıkları bir çalışmada Swiss albino erkek ve dişi farelerde borik asiti 9 hafta 1000, 4500 ve 9000 ppm düzeyinde uygulamaları sonucunda erkek farelerde kontrol ve ilaç gruplarında motilite oranlarını sırasıyla (%); 78.1, 69, 53.3 ve 42.9 olarak belirtmişlerdir. Ayrıca çalışmada 9000 ppm düzeyinde borik asit uygulanan gruplarda reproduktif faaliyetlerin tamamen durduğunu saptamışlardır. Çalışmamızda 4 ve 6 hafta borik asit uygulanan farelerde alınan sperm örneklerinde motilite değerleri (%) değerlendirilmiştir (Tablo 15). Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; 4 hafta süreyle 450 mg/kg gün ($P<0.05$) ile 6 hafta 250 ve 450 mg/kg/gün borik asit uygulanan ($P<0.001$) gruplarda şekillenen azalmanın anlamlı olduğu tespit edilmiştir. Bor elementinin vücuttaki olası toksik etkilerini hangi mekanizmalarla oluşturduğu tam anlamıyla bilinmemekle birlikte, toksikolojik çalışmalarda borik asitin hipotalamo hipofizial sistemi etkileyerek merkezi etkilerle veya testis dokusunda iz element düzeyini azaltarak dokuda oksidatif strese yol açarak etkisini oluşturabileceği düşünülmektedir (Chapin ve Ku, 1994; El-Dakdokhy ve ark, 2013). Elde ettiğimiz veriler ile uyumlu olarak, borik asidin doza bağlı oluşturduğu oksidatif stresin (MDA düzeyinde artışa bağlı olarak) motilitede azalmaya neden olabileceği kanısına varıldı.

Borik asit çalışmalarında spermatozoon membran bütünlüğü ve canlı sperm değerlerine olan olası etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Çalışmamızda borik asitin sperm motilitesinde göstermiş olduğu etkiler; canlı sperm oranları ve membran bütünlüğü değerlerinde de görülmektedir (Tablo 15). Canlı sperm oranları (%), 4 haftalık gruplarda doz arttıkça anlamlı olarak azalırken ($P<0.01$), 6 haftalık gruplarda daha yüksek düzeyde düşüşler görülmektedir ($P<0.001$). Membran bütünlüğü değerlerinin ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 ve 6 haftalık tüm gruplarda borik asit uygulaması ile önemli düzeyde ($P<0.001$) azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 15). Seminal sıvıda artan olası bor düzeyinin spermatozoonlara zarar vererek canlı sperm oranı ve membran bütünlüğünde olumsuz etkilerinin olabileceği kanısına varılmıştır.

MDA düzeyleri oksidatif strese önemli biyolojik belirteçlerden biri olup artışı biyolojik sistemde oksidatif stresin varlığının bir göstergesidir (Halliwell ve Gutteridge, 2007). Birçok çalışmada toksik maddelerin ve ağır metallerin, testis dokusunda oksidatif stresi artırdığı, MDA değerlerini yükselttiği bildirilmektedir (Wang ve ark, 2003; Li ve ark, 2016,). Farelere 2 mg/kg dozda sodyum arseniğin 2, 4, 6 ve 8 hafta oral olarak uygulanması sonucu; kontrol ve arsenik gruplarında serumdaki MDA düzeyleri sırasıyla; 1.7, 18.2, 31.6, 38.2 nmol/ml olarak bulunmuştur ($P<0.0001$). Aynı çalışmada sperm miktarında azalma ve kan testosteron düzeyinde anlamlı düşüş ($P<0.0001$) tespit edilmiştir (Nath ve ark, 2015). Bir diğer çalışmada C 57 ırkı siyah erkek farelerde 7 gün boyunca intra peritoneal enjekte edilen 2 mg/kg dozdaki kadmiyum uygulamasının testis dokusunda MDA değerlerini anlamlı olarak artırdığı ($P<0.05$), melatonin hormonunun kullanılmasıyla da azaldığı tespit edilmiştir (Li, 2016). Benzer şekilde molibdenin erkek fertilitesi üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, farelere içme suyuna 14 gün süreyle 12.5, 25, 50, 100 ve 200 mg/L molibden ilavesinin kontrol grubuna göre 100 ve 200 mg/L uygulanan gruplarda, MDA düzeyindeki artışın anlamlı ($P<0.05$) olduğu bildirilmiştir (Zhai ve ark, 2013).

Farelerde borik asit uygulaması yapılarak, testis dokusunda MDA düzeylerine nasıl etki oluşturduğuna yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. İnce ve ark (2010) ratlarda 28 gün boyunca 100 mg/kg dozda borik asit ve boraks uygulanması sonrası, karaciğer, kalp ve böbrek dokusu ile serum örneklerinde MDA düzeylerini değerlendirmişlerdir. Böbrek dokusu hariç; karaciğer ve kalp dokusu ile kan serumunda, MDA düzeylerinin azaldığını, boraks uygulanmasında azalmanın daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Meydana gelen bu azalma ile borik asit ve boraksın antioksidan etkinliğinin olduğunu, böbrek dokusunda ise MDA'daki artışın bileşiklerin idrarla atılması ve yüksek enerji gereksinimi olmasına bağlamışlardır. Turkez (2007) borik asitin değişik

konsantrasyonlarda (5-500 mg/L arası) eritrosit süspansiyonlarına ilave edilmesinin eritrosit MDA düzeylerine etkilerinin *in-vitro* değerlendirildiği çalışmada; 5-50 mg/L dozlarda uygulamanın MDA düzeylerini etkilemediği; ancak, 100-500 mg/L doz aralığındaki uygulamanın MDA değerini artırdığını tespit etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada MDA değerleri 4 haftalık sürede; kontrol ve 115 mg/kg gruplarına göre, 250 ve 450 mg/kg uygulanan gruplarda, anlamlı artış gösterdiği ($P<0.001$), 6 haftalık sürede ise sadece 450 mg/kg borik asit alan grupta diğerine göre artışların anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($P<0.05$). MDA düzeyinde doz arttıkça değerlerin yükseldiği, ancak bu artışın uygulama süreleri arasında (4 veya 6 hafta olması) anlamlılık taşımadığı görüldü (Tablo 19). Görüldüğü gibi MDA düzeyinin doza bağlı olarak değişiklikler gösterebildiği, borik asit uygulamasının diğer dokularda olduğu gibi testis dokusunda da oksidatif strese neden olduğu ancak tüm gruplarda borik asit uygulaması ile artan MDA değerlerinin süreye bağlı olmadığı ortaya konmuştur.

Antioksidan enzimleri ele aldığımızda; SOD hücre içi antioksidan enzim sistemlerinden biri olup, reaktif oksijen moleküllerini hidrojen iyonu kullanarak H_2O_2 ve O_2 'ye dönüştürür. Ortaya çıkan H_2O_2 ise CAT ve GSH-Px vasıtasıyla su ve O_2 'ye dönüştürülür. Ancak bu sistemin sağlıklı bir şekilde işleyebilmesi için ortamda; bakır, selenyum, çinko ve mangan gibi bazı iz elementler gereklidir. Antioksidan enzim sistemleri görevlerini düzenli yapabilmeleri için ortamda bu iz elementlerin bulunması zorunludur (Thomas, 1995). Ratlarda 125, 250 ve 500 mg/kg borik asitin 60 gün süreyle uygulandığı bir çalışmada, yüksek doz alan grupta testis dokusunda iz elementlerden çinko ve magnezyum düzeyleri anlamlı şekilde ($P<0.05$) azalırken, kalsiyum ve bor oranlarının arttığı tespit edilmiştir (El-Daktoky ve ark, 2013). Mohora ve ark (2002) yavru ratlarda borik asitin 40 ve 80 ppm düzeyinde yeme katılarak 90 gün süreyle uygulanmasıyla karaciğerde SOD aktivitesinde hafif düzeylerde artış meydana geldiğini ancak bu değer anlamlılık taşımadığını bildirmişlerdir. Comba ve ark (2016) ratlara içme suyuna 300 mg/L boraks ilavesinin 150 gün süreyle uygulanmasında serum total antioksidan düzeylerinde azalmaya ($P<0.05$) neden olduğunu belirtmişlerdir. Yaptığımız çalışmada ise 6 haftalık sürede farelerde SOD enzim aktivitesi; kontrol grubuna göre 250 ve 450 mg/kg doz gruplarında düşüşün daha fazla ve anlamlı olduğu ($P<0.01$) tespit edildi. SOD enzim aktivitesi, oksidatif stressin uzun süre devam etmesi nedeniyle giderek tükenmesi, çinko ve bakır gibi iz elementlere benzer şekilde borik asitin de testis dokusunda azalmayı tetikleyebileceği, dolayısıyla enzim üretimindeki kısıtlama nedeni ile dokudaki değerlerinin azaldığı düşünülmektedir.

Yaygın bir şekilde hayvan ve bitki dokularında bulunan antioksidan sistemlerden biri de CAT aktivitesidir. Bu enzim protein yapısında olup toksik H_2O_2 'yi hücrelerden

uzaklaştırmada da önemli bir role sahiptir. Çalışmamızda 4 ve 6 haftalık gruplarda borik asit uygulanmasının doza bağlı CAT aktivitesini düşürdüğü (115 mg/kg 4 hafta hariç); ancak, anlamlı olmadığı tespit edildi (Tablo 18). Borik asidin uygulanmasının testis dokusunda olası CAT enzim etkinliği ile ilgili çalışmalara rastlanmamakla birlikte, 100 mg/kg dozda boraks ve borik asit uygulamasının eritrositlerde, kalp ve karaciğer dokusunda CAT aktivitesine istatistiksel değişikliğe neden olmadığını, ancak böbrek dokusunda ise azalttığı açıklanmıştır. Böbrek dokusundaki bu etkilerin borik asitin atılım yolunun böbrek üzerinden olmasıyla açıklanmıştır (İnce ve ark, 2010).

Önemli bir indirgeyici ajan ve antioksidan olan glutasyon, hücrenin oksido-redüksiyon dengesini sağlayarak hücreleri endojen ve ekzojen kaynaklı oksidanların olası zararlı etkilerine karşı korumaktadır (Mitchell ve Russo, 1987). Ayrıca proteinlerdeki sülfidril (-SH) gruplarının korunması ve bazı reaksiyonlarda koenzim olarak görev almasının yanı sıra aminoasitlerin transportunda, protein ve DNA sentezinde de önemli rol oynar. Bu nedenle GSH düzeyindeki azalma DNA hasarlarına neden olabilmektedir. GSH'ın spermanın dondurulmasında bile kriyoprotektan amaçla kullanılabileceği, bu amaçla 1 nM ve 5 nM GSH ilavesinin yararlı sonuçlar doğurduğu bildirilmiştir (Gadea ve ark, 2013). GSH'ın canlı organizma içerisinde de sperm üretimi ve saklanmasında önemli rol oynadığı, *cauda epididymis* içerisinde üreme hücrelerini oksidatif stres ve DNA hasarına karşı koruduğu ortaya konmuştur (Williams ve ark, 1998; Chabory ve ark, 2009; Noblanc ve ark, 2012). İnce ve ark (2010) ratlara 100 mg/kg dozda verilen borik asit ve boraksın kanda anlamlı düzeyde GSH aktivitesini artırdığını, böbrek ve kalp dokusunda herhangi bir değişime neden olmadığını, karaciğerde ise boraksın GSH düzeyini azalttığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda antioksidan öneme sahip olan GSH aktivitesi 4 haftalık grupta 115 mg/kg dozdaki değerlerin kontrol grubuna göre yüksek olmasının antioksidan etkinliğe işaret ettiğini; ancak anlamlı olmadığını diğer dozlarda ($P<0.05$) ve 6 haftalık gruplarda elde edilen değerlerin ise kontrol grubuna göre düşük olduğu ($P<0.001$) görülmektedir. Bu durumun artan oksidan etkiye bağlı olarak GSH'ın giderek tükenmesinin uygulama dozu ve süresi ile doğru orantılı olduğu kanısına varıldı (Tablo 18).

Ayrıca çalışmamızda 115 mg/kg dozda uygulanan borik asidin 4 haftalık sürede anlamlı düzeyde olmasa da SOD ve GSH enzim aktiviteleri açısından antioksidan etkilere yol açarken, 6 haftada bu etkilerin kaybolduğu görülmüştür. İnce ve ark (2010) yaptıkları bir araştırmada 100 mg/kg sodyum borat uygulanan ratlarda kanda antioksidan enzim değerlerinin kontrol grubuna göre yükseldiğini, Kızılay ve ark (2016)'da ratlarda deneysel siyatik sinir hasarında aynı dozdaki (100 mg/kg) borik asitin akut dönemde (0, 24, 48 ve 72.

saat uygulanması) myelin ve aksonal hasarı azalttığını, bunu da sinir dokusundaki oksidatif stresi azaltarak sağladığını bildirmişlerdir. Borik asit belirli dozlarda (100 mg/kg) belirli bir zamana kadar (4 haftaya kadar) antioksidan etkinlik yapabilmektedir.

Görüldüğü gibi borik asit ve diğer bor bileşiklerinin bizim çalışmamızda olumsuz etkileri daha çok doz ile yakından ilgilidir. Borik asidin deney hayvanlarında sperm parametrelerinde yaratmış oldukları olumsuz etkilerin sadece yüksek doz ve sürelerde meydana geldiği görülmektedir. Bahsedilen dozlarda insanların bor bileşiklerine maruz kalması mümkün gözükmemekle birlikte bor bileşiklerinin insanlarda erkek fertilitesi üzerine yapılan çalışmalar daha çok bor madenlerinde çalışan işçilerle sınırlı kalmaktadır. Çin’de bor üretimi yapan madenlerde çalışan 192 işçi üzerinde yapılan bir çalışmada, bora maruz kalan işçilerin kontrol grubuna göre, sperm parametrelerinde (motilite, morfoloji gibi) ve spermatozoon DNA hasarı ile ilgili anlamlı değişiklikler rastlanılmadığı, sadece spermde Y/X oranında düşüş olduğu belirtilmiştir (Robbins ve ark, 2010). Türkiye’de bor madenlerinde çalışan işçilerde yapılan çalışmada da düşük, orta ve yüksek düzeylerde bor maruziyetine (kan bor düzeylerine göre) kalan işçilerin sperm parametrelerinde, maruz kalmayanlara göre anlamlı bir farkın olmadığı belirtilmiştir (Duydu ve ark, 2011).

Spermatozoonlar açısından değerlendirildiğinde biyolojik membranlarındaki oksidatif bozulmada esas olan madde fosfolipid bileşikleridir. Söz konusu fosfolipitlerdeki yapısal değişiklikler membranın yapısal harabiyetine ve hücre bütünlüğünün bozulmasına yol açmaktadır. Bu nedenle fosfolipitlerde çoklu doymamış bağlı yağ asitlerini bulduran membranlar özellikle lipid peroksidasyonuna dayanıksızdır (Combs ve ark, 1975). Doymamış yağ asidi içeren membrana sahip spermatozoonlar, artan oksidan ürünlerden olumsuz etkilenebildiği gibi oluşabilecek hasarı somatik hücreler gibi kolay tamir edemediklerinden (Aitken, 1994), sahip oldukları hücre içi ve hücreler arası antioksidanlarla meydana gelebilecek olumsuz etkileri dengelenmeye çalışırlar. Oksidan/antioksidan dengenin bozulması halinde hücre membranı hasarı, mitokondriyal elektron kaçakları ve DNA hasarı gibi istenmeyen sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (Aitken ve Deluliis, 2010).

Oksidatif stresin, farklı mekanizmalar ile DNA üzerinde baz ve şeker modifikasyonları, tek ve çift zincir kırıkları, abazik bölgeler, DNA-protein çapraz bağlanması gibi bir takım lezyonlara neden olarak DNA hasarına yol açtığı bilinmektedir (Williams ve Jeffrey, 2000; Cooke ve ark, 2003; Sancar ve ark, 2004).

Spermatozoonlarda hücre stoplazmasının çok az yer kaplaması, beraberinde az sayıda antioksidan enzim bulundurmasına bağlı olarak, DNA hasarı mekanizması ve tamiri somatik hücrelerden farklılık göstermekte, oluşan hasarlar hızlı bir şekilde tamir edilememektedir.

Genetik materyalin aktarımında meydana gelebilecek DNA hasarında gerekli tamir mekanizmalarının yetersiz kalması durumunda; mutasyon, erken embriyonik ölümler veya çocukluk dönemi kanserleri ya da şizofreni gibi hastalıkların gelişimine zemin hazırlayabileceği belirtilmektedir (Zini ve ark, 1993; Aitken ve Deluliis, 2010; Noblanc ve ark, 2013).

Spermatozoonlarda DNA hasarının ortaya konmasında günümüzde değişik metodlar kullanılmaktadır. Bu testlerin herbirinin çalışma prensipleri ve hassasiyetleri farklı olup başlıcaları; sperm kromatin yapısı testi, akridin turuncu testi, tolidin mavisi, anilin mavisi, tunnel testi, asıl çentik okuma tayini, tek hücre jel elektroforezi (Comet) ve sperm kromatin ayrılma testi'dir (Koyuncu, 2011). Comet testi hücrede DNA hasarının belirlenebildiği basit, hızlı ve güvenilir bir analiz yöntemidir (Singh ve ark, 1988). Meydana gelen DNA hasarlarını basit ve doğru bir biçimde ve her bir hücre için ayrı ayrı belirlenebilmesine olanak sağladığı gibi en önemli avantajı DNA hasarlarında tespiti zor olan tek sarmal kırıklarının alkali ortamda belirlenebilmesidir (Kumaravel, 2009).

Bor/borik asit uygulamalarında spermelerde olası DNA hasarının değerlendirildiği çalışmalar oldukça sınırlı kalmakla birlikte, ratlarda 8 hafta süreyle 125, 250 ve 500 mg/kg dozlarda borik asit uygulanmasının testis dokusunda DNA düzeyinde azalmaya (250 ve 500 mg/kg gruplarında) ve DNA'da minör kırıklar şekillendirdiği bildirilmiştir (El-Dakdokhy ve ark, 2013). Benzer şekilde borik asit ve boraksın ratlara 4 hafta 100 mg/kg dozlarda uygulanması sonrası lenfositlerde Comet metoduyla DNA hasar oranı (%) incelendiğinde borik asit ve boraksın kontrol grubundan daha düşük ($P<0.05$) DNA hasarı oluşturmada etkin antioksidan özelliğine dikkat çekilmiştir (Ince ve ark, 2010). Aksine bor madenlerinde çalışan 192 işçi üzerinde yapılan diğer bir çalışmada ise yüksek düzeyde bora maruziyet sonucu (kandaki bor oranı 499 ppm, kontrol'de:49,7 ppm) spermatozoonlarda comet assay metoduyla yapılan analizlerde anlamlı farklılık yaratan DNA hasarı bildirilmemiştir (Robbins ve ark, 2010). Çalışmamızda ise farelerde Comet metoduyla spermatozoonlarda olası DNA hasarı tespiti gerçekleştirildi ve buna göre 4 haftalık sürede borik asit uygulanan tüm gruplarda DNA'da hasar gözlenmezken, 6 haftalık gruplarda (%3-14 arasında değişen) DNA hasarı olduğu görüldü ($P<0.001$). Analiz sonuçlarının da ortaya koyduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı ($P<0.05$) artış gösteren MDA düzeyleri ve doku düzeylerinde etkisiz kalan antioksidan enzimler (Tablo 16), 6 hafta süreyle borik asit alan grupta DNA hasarının oluşumunu engelleyememişlerdir. Çalışmamızda DNA hasarlı hücreler, meydana gelen hasar derecesi açısından değerlendirildiğinde 450 mg/kg dozlarda borik asit uygulamalarında ileri düzeyde (3 ve 4. derece hasar), 115 ve 250 mg/kg dozlardaki gruplarda ise daha düşük (1 ve

3. derece) oranda gözlemlenmiştir. Yapılan önceki çalışmalarla karşılaştırıldığında borik asitin spermatozoonlarda DNA hasarı oluşturmasının doz ve uygulama süresi ile yakından ilişkili olduğu kanısına varılmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bor; bitkiler için esansiyel, insanlar ve hayvanlar için ise önemli bir iz elementtir. Yaşanılan coğrafi bölgelere göre canlıların maruz kalabildiği bor düzeyleri değişebilmekle birlikte, vücut fonksiyonlarının normal olarak devam edebilmesi için belirli miktarda borun alınması önerilmektedir. Ancak, bor elementine aşırı veya uzun süreli maruziyette canlı türlerine göre değişebilen düzeylerde toksik etkilerin ortaya çıktığı da bildirilmektedir.

Bu çalışmada, rafine bor ürünü olan borik asitin, erkek farelere farklı dozlarda (115, 250 ve 450 mg/kg/gün) ve sürelerde (4 ve 6 hafta) oral yolla uygulanmasının hayvanları canlı ağırlık, erkek fertilitesi üzerine testis ve *v. seminalis* doku ağırlıkları, testis dokusuna oksidan (MDA) ve antioksidan (SOD, CAT ve GSH) enzim düzeyleri ile sperm kalitesi (motilite muayenesi, ölü/canlı oranları, membran bütünlükleri) ve spermatozoon DNA hasarına olası etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışma sonunda erkek farelerde;

- Uygulama süresi içinde (4 ve 6 hafta) canlı ağırlık ve testis doku ağırlıklarında meydana gelen değişimlerin anlamlılık taşımadığı, *v. seminalis* ağırlıklarında anlamlı ($P<0.05$) bir azalmanın olduğu, bunun en fazla 450 mg/kg borik asit verilen grupta olduğu,

Sperm örneklerinde;

- Motilite değerleri (%) kontrol ile karşılaştırıldığında, 4 hafta süre ile 450 mg/kg/gün ($P<0.05$), 6 hafta süre ile 250 ve 450 mg/kg/gün borik asit uygulanan ($P<0.001$) gruplarda şekillenen azalmanın anlamlı olduğu,
- Canlı spermatozoon oranları (%), 4 haftalık gruplarda doz arttıkça anlamlı olarak azalırken ($P<0.01$), bunun 6 haftalık gruplarda daha yüksek düzeyde ($P<0.001$) olduğu,
- Membran bütünlüğü değerlerinin (%) ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4 ve 6 haftalık tüm gruplarda borik asit uygulaması ile önemli düzeyde ($P<0.001$) azaldığı,

Spermatozoonlarda;

- Uygulama süresi içinde 4 hafta borik asit uygulanan tüm gruplarda DNA hasarı gözlenmezken, 6 haftalık gruplarda %3.3-14.4 arasında değişen oranlarda DNA hasarı ($P<0.001$) olduğu ve sürenin önemli olduğu,

Testis dokusunda;

- Doz arttıkça MDA düzeyinin yükseldiği ($P<0.001$); ancak, bu artışın uygulama süreleri arasında (4 veya 6 hafta olması) anlamlılık taşımadığı,
- SOD değerlerinin 6 haftalık sürede kontrol grubuna göre 250 ve 450 mg/kg/gün doz gruplarında daha fazla düştüğü ve anlamlı olduğu ($P<0.01$),
- Borik asit uygulanmasının doza bağlı CAT aktivitesini düşürdüğü (4 hafta, 115 mg/kg/gün hariç); ancak, anlamlı olmadığı,
- GSH aktivitesinin, kontrol grubuna göre 4 haftalık grupta 450 mg/kg/gün ($P<0.05$), 6 haftalık gruplarda ise 250 ve 450 mg/kg/gün dozda düşük ve anlamlı ($P<0.001$) olduğu,
- Ayrıca 115 mg/kg/gün borik asidin 4 haftalık sürede anlamlı düzeyde olmasa da SOD ve GSH enzim aktiviteleri açısından antioksidan etkilere yol açarken, 6 haftada bu etkilerinin kaybolduğu tespit edildi.

Çalışmamızda uygulanan süre ve dozlar dikkate alındığında, uygulama süresinin bor bileşiklerinin fertilité ve toksik etkilerinin değerlendirilmesinde etkin olduğu tespit edilmiştir. İnsanların bor bileşiklerine bu oranlarda maruz kalması mümkün olmamakla birlikte, fertilité üzerine meydana gelebilecek olası toksik etkilerinin değerlendirilmesi açısından, multidisipliner anlayış içerisinde, farklı parametrelerin de dâhil edildiği kapsamlı deneysel çalışmaların yapılmasının yararlı olacağı kanısındayız. Ayrıca, spermatozoonlarda belirlenecek olası DNA hasar düzeylerinin farklı analiz metodları ile karşılaştırılması, sonuçların değerlendirilmesi açısından daha uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- Acosta AU, Ochoa IH, Gutiérrez MS, Guzmán BP, Vázquez LR, Heredia MJ, Aguilar GM, Vega BQ.** Methamidophos alters sperm function and DNA at different stages of spermatogenesis in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2014, 15(3), 391-400.
- Afifi NA, Ramadan A, El-Aziz Mİ, Saki EE.** Influence of dimethoate on testicular and epididymal organs, testosterone plasma level and their tissue residues in rats. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 1991, 98(11), 419-423.
- Aitken RJ.** A free radical theory of male infertility. *Reproduction and Fertility* 1994, 6(1), 19-24.
- Aitken RJ.** Free radicals lipid peroxidation and sperm function. *Reproduction and Fertility* 1995, 7(4), 659-668.
- Aitken RJ, DeIuliis GN.** On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. *Molecular Human Reproduction* 2010, 16(1), 3-13.
- Akkuş İ.** Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı, Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
- Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT.** Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology* 1987, 8(5), 338-348.
- Anderson DL, WC Cunningham and TR Lindstrom.** Concentrations and intakes of H, B, S, K, Na, Cl and NaCl in foods. *Journal of Food Composition and Analysis* 1994, 7(1-2), 59-82.
- Anderson D, Yu TW, Wright J, Ioannides C.** An examination of DNA strand breakage in the comet assay and antioxidant capacity in diabetic patient. *Mutation Research*, 1998, 398(1-2), 151-161.
- Armstrong TA, Spears JW Lyord KE.** İnflammatory response, growth and thyroid hormone concentrations are affected by long-term boron supplementation in gilts. *Journal of Animal Science* 2001, 79(6), 1549-1556.
- Aslan R.** Homeostatik mekanizmanın korunması ve sağaltımda antioksidanlar. *İlaç ve Tedavisi Dergisi* 1999, 12(8), 475-480.

- Auger J, Kunstmann JM, F Czyglik, Jouannet P.** Decline in semen quality among fertile men in paris during the past 20 years. *New England Journal of Medicine* 1995, 332(5), 281-285.
- Aysan E, Sahin F, Telci D, Yalvac ME, Emre SH, Karaca C, Muslumanoglu M.** Body weight reducing effect of oral boric acid intake. *International Journal of Medical Sciences*, 2011, 8(8):653-8.
- Babior BM.** Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* 2000, 109(1), 33-44.
- Baker DM, Bogema SC.** Ingestion of boric acid by infants. *American Journal of Emergency Medicine* 1986, 4(4), 358-361.
- Başoğlu A, Sevinc M, Birdane FM, Boydak M.** Efficacy of sodium borate in the prevention of fatty liver in dairy cows. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2002, 16(6), 732-735.
- Baykal ED.** Hidrotermal ve mikrodalga enerjiiyle, lityum içeren boratlı fosfatlı bileşiklerin sentezlenmesi, kristal yapı ve termokimyasal özelliklerinin incelenmesi. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2003, 1-30.
- Beattie J, Peace H.** The influence of a low boron diet and boron supplementation on bone, major mineral and sex steroid metabolism in postmenopausal women. *British Medical Journal* 1993, 69(3), 871-884.
- Benderdour M, Bui-Van T, Dicko A, Belleville F.** In vivo and in vitro effects of boron and boronated compounds. *Journal of Trace Element Medical Biology* 1998, 12(1), 2-7.
- Bergmann W.** Nutritional disorders of plants, Gustav Fischer, New York 1992, 204-239.
- Bergmeyer H, Gawehn K, Grasse M.** Enzyme as biochemical reagents. In Bergmeyer, HV editor, *Methods of enzyme analysis*, Academic Press 1974, 438-458.
- Beyer KH, Bergfield WF, Berndt WO, Boutwell RK, Carlton WW, Hoffman DK, Schroeter AL.** Final report on the safety assessment of sodium borate and boric acid. *Journal of American Collage of Toxicology* 1983, 2(7), 87-125.
- Blasiak J, Trzeciak A.** Single cell gel electrophoresis (comet assay) as a tool for environmental biomonitoring an example of pesticides. *Polish Journal of Environmental Studies* 1998, 7(4), 189-194.
- Bokina AI, Fadeeva VK, Vikhrova EM.** Study of calcium metabolism in the children of the city of Shevchenko. *Gigiena i Sanitariia* 1976, 6, 15-17.
- Burukçuoğlu D, Bayçu C.** Borun sıçan testis dokusuna etkileri, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi* 2009, 10, 145-150.

- Byung PY.** Cellular defences against damage from reactive species. *Physiological Review* 1994, 74, 139-172.
- Carlson E, Giwercman A, Keiding N, Skakebaek NE.** Evidence for decreasing quality of semen during last 50 years. *British Medical Journal* 1992, 305(6854), 609-613.
- Chabory E, Damon C, Lenoir A, Kauselmann G, Kern H, Zevnik B, Garrel C, Saez F, Cadet R, Henry-Berger J, SchoorM, Gottwald U, Habenicht U, Drevet JR, Vernet P.** Epididymis seleno independent glutathione peroxidase 5 maintains sperm DNA integrity in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2009, 119(7), 2074-2085.
- Chen H, Cheung MPL, Chow PH, Cheung ALM, Liu W, O WS.** Protection of sperm DNA against oxidative stress in vivo by accessory sex gland secretion in male hamsters. *Reproduction* 2002, 124(4), 491- 499.
- Cohen-Bacrie P, Belloc S, Menezo YJ, Clement P, Hamidi J, Benkhalifa M.** Correlation between DNA damage and sperm parameters: a prospective study of 1,633 patients. *Fertility and Sterility* 2009, 91(5), 1801-1805.
- Comba B, Oto G, Mis L, Özdemir H, Comba A.** Effects of borax on inflammation, haematological parameters and total oxidant-antioxidant status in rats applied 3-methylcholanthrene. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 2016, 22(4), 539-544.
- Collins AR, Ma AG, Duthie SJ.** The kinetics of oxidative DNA damage (strand breaks and pyrimidines) in human cells. *Mutation Research*, 1995, 336, 69-77
- Collins AR, Dusinska M, Horska A.** Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochimica Polonica*, 2001, 48, 611-614.
- Combs GF Jr, Scott ML.** Antioxidant effects on selenium and vitamin E function in the chick. *Journal of Nutrition* 1974, 104(10), 1297-1303.
- Conover WJ.** Practical non-parametric statistics (2nd ed.). John Wiley, New York, 1980.
- Cooke MS, Podmore ID, Mistry N, Evans MD, Herbert KE, Griffiths HR, Lunec J.** Immunochemical detection of UV-induced DNA damage and repair. *Journal of Immunological Methods* 2003, 280(1-2), 125-33.
- Correa JR, Zavos PMT.** The hypoosmotic swelling test: Its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology* 1994, 42(2), 351-360.
- Culver BD, JR Coughlin.** Daily boron intake from the American diet. *Journal of the American Dietetic Association* 1999, 99(3), 335-340.
- Culver BD, Strong PL.** Boron. In: Bingham E, Cohns B, Powell CH, eds. *Patty's toxicology*. Vol. 3. 5th ed, New York, NY: John Wiley & Sons, 2001, 519-582.

- Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T.** Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997, (3-4), 92-95.
- Dikilitaş M, Koçyiğit A.** Canlılarda “ tek hücre jel elektroforez” yöntemi ile DNA hasar analizi (teknik not): comet analiz yöntemi. *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2010, 14(2), 77-89.
- Dindyal S.** The sperm count has been decreasing steadily for many years in western industrialised countries: is there an endocrine basis for this decrease. *Journal of Urology* 2004, 2(1), 1-10.
- Dixon RL, Lee IP, Sherins RJ.** Methods to assess reproductive effects of environmental chemicals: studies of cadmium and boron administered orally. *Environmental Health Perspectives* 1976, 13, 59-67.
- Draper HH, Hadley M.** Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* 1990, 186, 421-431.
- Doreswamy K, Shrilatha B, Rajeshkumar T, Muralidhara.** Nickel-induced oxidative stress in testis of mice: evidence, of DNA damage and genotoxic effects. *Journal of Andrology* 2004, 25(6), 996-1003.
- Dupre JN, Keenan MJ, Hegsted M, Brudevold AM.** Effects of dietary boron in rats fed a vitamin D-deficient diet. *Environmental Health Perspectives* 1994, 102 (7), 55-58.
- Duydu Y, Başaran N, Ustündağ A, Aydın S, Undeğer U, Ataman OY, Aydos K, Düker Y, Ickstadt K, Waltrup BS, Golka K, Bolt HM.** Reproductive toxicity parameters and biological monitoring in occupationally and environmentally boron-exposed persons in Bandırma, Turkey. *Archives of Toxicology* 2011, 85(6), 589-600.
- Dündar Y, Aslan R.** Hücre moleküler statusünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller-antioksidanlar, Understanding of cellular molecular status and physiological importance of antioxidants, *Cerrahi Tıp Bilimleri Dergisi* 1999, (2), 134-142.
- El-Dakdoky MH, Abd El-Wahab HM.** Impact of boric acid exposure at different concentrations on testicular DNA and male rats fertility. *Toxicology Mechanisms and Methods* 2013, 23(5), 360-367.
- Fail PA, George JD, Seely JC, Grizzle TB, Heindel JJ.** Reproductive toxicity of boric acid in Swiss (CD-1) mice: assessment using the continuous breeding protocol. *Fundamental and Applied Toxicology* 1991, 17(2), 225-239.
- Ferdinand N, Watcho P, Kenfack A, Manga JN, Defang HF, Pierre K, Joseph T.** Effect of dimethoate (an organophosphate insecticide) on the reproductive system and fertility of adult male rat. *American Journal of Pharmacology and Toxicology* 2014, 9(1), 75-83.

Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, Helbock HJ, Jacob RA, Ames BN. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, 88(24), 11003-11006.

Frungieri MB, Weidinger S, Meineke V, Köhn FM, Mayerhofer A. Proliferative action of mast-cell tryptase is mediated by PAR-2, COX-2, prostaglandins, and PPAR gamma: possible relevance to human fibrotic disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, 99(23), 15072-15077.

Gadea J, Gumbao D, Gómez-Giménez B, Gardón JC. Supplementation of the thawing medium with reduced glutathione improves function of frozen-thawed goat spermatozoa. *Reproductive Biology* 2013, 13(1), 24-33.

Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande E, Kovalski N. Reactive oxygen species and human spermatozoa. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1991, 637, 436-444.

Gmelin. Handbook of Inorganic Chemistry, Boron Supplement, Elemental Boron, Boron Carbides, Vol.2, 1983, 7-10.

Greenwood NN. Boron, Pergamon Press. Oxford, also as Chap. 11 in *Comprehensive Inorganic Chemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1975, 139-151.

Greenwood NN. Earnshaw A. *Chemistry of the Elements*. Pergamon Pres. New York, 1984, 195-213.

Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 1995, 41, 1819-1828.

Haber F, Weiss JJ. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London Series* 1984, 147, 332-351.

Hall IH, Gilbert CJ, McPhail AT, Morse KW, Hassett K, Spielvogel BF. Antineoplastic activity of a series of boron analogs of α -amino acids. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1985, 74(7), 755-758.

Halliwell B. Oxygen radicals as key mediators in neurological disease. *Fact or Fiction Annals of Neurology* 1992, (32), 10-15.

Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free Radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1995, (35) 7-20.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2007, 270-337.

Harvey PW, Rush KC, Cockburn A. *Endocrine and Hormonal Toxicology*, John Wiley and Sons Press England. 1999, 339-344.

- Hilmi Ş.** Oksidanlar ve antioksidanlar. *Türk Hastane Tıp Dergisi* 1994, 48(1-2), 44-49.
- Holmes RP, Goodman HO, Shihabi ZK, Jarow JP.** The taurine and hypotaurine content of human semen. *Journal of Andrology* 1992, 13(3), 289-292.
- Hughes CM, SEM L, McKelvey-Martin VJ, Thompson W.** A comparison of baseline and induced DNA damage in human spermatozoa from fertile and infertile men, using a modified comet assay. *Molecular Human Reproduction* 1996, 2(8), 613-619.
- Hunt CD.** Dietary boron modified the effects of magnesium and molybdenum on mineral metabolism in the calciferol-deficient chick. *Biological Trace Element Research* 1989, 22(2), 201-220.
- Hunt CD, Shuler T, Mullen L.** Concentration of boron and other elements in human foods and personal-care products. *Journal of the American Dietetic Association* 1991, 91(5), 558-568.
- Hunt CD** One possible role of dietary boron in higher animals and humans. *Biological Trace Element Research* 1998, 66(1-3), 205-225.
- Hunt CD, Idso JP.** Dietary boron as a physiological regulator of the normal inflammatory response: a review and current research progress. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 1999, 12(3), 221-233.
- Ihara Y, Toyokuni S, Uchida K.** Hyperglycemia causes oxidative stress in pancreatic β cells of GK rats, a model of type 2 diabetes, *Diabetes* 1999, 48(4), 927-932.
- Ince S, Kucukkurt I, Cigerci IH, Fatih Fidan A, Eryavuz A.** The effects of dietary boric acid and borax supplementation on lipid peroxidation, antioxidant activity, and DNA damage in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 2010, 24(3), 161-164.
- Iwasaki A, Gagnon C.** Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertility and Sterility* 1992, 57(2), 409-416.
- Jallouli M, Dhouib IEB, Dhouib H, Gharbi N, Fazaa SE.** Effects of dimethoate in male mice reproductive parameters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2015, 73(3), 1-6.
- Jeulin C, Soufir JC, Weber P, Laval-Martin D, Calvayrac R.** Catalase activity in human spermatozoa and seminal plasma. *Gamete Research* 1989, 24(2), 185-196.
- Jiang S, Zhou Q, Liu Y, Zhang L, Zhao C, Wang X, Zhang D, Zhang J.** Effects of nanosized cadmium sulfide on male reproductive system in mice, *Article in Chinese* 2014, 32(12), 921-923.
- Kavas G.** Reaktif oksijen metabolitlerine fizyopatolojik yaklaşım. *Ankara Tıp Mecmuası* 1994, 47, 579-592.

- Kaya E.** Klorprifos ve deltamethrin'in kan ve beyin lipid peroksidasyon ve antioksidan enzim aktivitelerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, Türkiye 2005.
- Keskin B.** Borik asit ve sodyum peroksoborat sentezi, Yıldız Teknik Üniversitesi Anorganik kimya laboratuvarı Ders Notları, 2013.
- Kızılay Z, Erken HA, Çetin NK, Aktaş S, Abas Bİ, Yılmaz A.** Boric acid reduces axonal and myelin damage in experimental sciatic nerve injury. *Neural Regeneration Research* 2016, 11(10), 1660-1665.
- Koyuncu H.** Sperm DNA hasarı tespit yöntemleri “ Methods for The Determination of Sperm DNA Damage” Türk üroloji seminerleri, Yeditepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Kliniği, İstanbul Türkiye, 2011, 2, 18-23.
- Ku WW, Chapin RE, Wine RN, Gladen BC.** Testicular toxicity of boric acid (BA): relationship of dose to lesion development and recovery in the F344 rat. *Reproductive Toxicology* 1993, 7(4), 305-319.
- Ku WW, Chapin RE.** Mechanism of the testicular toxicity of boric acid in rats: in vivo and in vitro studies. *Environmental Health Perspect* 1994, 102(7), 99-105.
- Kumar TR, Doreswamy K, Shrilatha B. Muralidhara.** Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice: induction of abnormal sperms and effects on fertility. *Mutation Research* 2002, 513(1-2), 103-111.
- Kumaravel TS, Vilhar B, Faux SP, Jha AN.** Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology* 2009, 25(1), 53-64.
- Lamirande E, Jiang H, Zini A, Kodama H, Gagnon C.** Reactive oxygen species and sperm physiology. *Reviews of Reproduction* 1997, 2(1), 48-54.
- Landauer W.** Malformations of chicken embryos produced by boric acid and the probable role of riboflavin in their origin. *Journal of Experimental Zoology* 1952, 120(3), 469-508.
- Lemay M, Wood K.** Detection of DNA damage and identification of UV-induced photoproducts using the comet assay kit, *Bio Techniques*, 1999, 27, 846-851.
- Li R, Luo X, Li L, Peng Q, Yang Y, Zhao L, Ma M, Hou Z.** The protective effects of melatonin against oxidative stress and inflammation induced by acute cadmium exposure in mice testis. *Biological Trace Element Research* 2016, 170(1), 152-164.
- Liao W, McNutt MA, Zhu WG.** The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells, *Methods* 2009, 48, 46-53.

- Linder RE, Strader LF, Rehnberg GL.** Effect of acute exposure to boric acid on the male reproductive system of the rat. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1990, 31(2), 133-146.
- Maestra SL, Flora SD, Micale RT.** Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2015, 218(1), 117-122.
- Medina MA, Landez JH, Foster LL.** Inhibition of tissue histamine formation by decaborane. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1969, 169(1), 132-137.
- Meng Z, Bai W.** Oxidation damage of sulfur dioxide on testicles of mice. *Environmental Research* 2004, 96(3), 298-304.
- Mitchell JB, Russo A.** The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *British Journal of Cancer* 1987, 55(8), 96-104.
- Mohora MBL, Boghianu L, Muscurel C, Duta C, Dumitrache C.** Effects of boric acid on redox status in the rat liver. *Romanian Journal of Biophysics* 2002, 12(3-4), 77-82.
- Moseman RF.** Chemical disposition of boron in animals and humans. *Environmental Health Perspectives* 1994, 102(7), 113-117.
- Murray FJ.** A Comparative review of the pharmacokinetics of boric acid in rodents and human. *Biological Trace Element Research* 1998, 66(1-3), 331-342.
- Naghii MR, Samman S.** The effect of boron supplementation on its urinary excretion and selected cardiovascular risk factors in healthy male subjects. *Biological Trace Element Research* 1997, 56(3), 273-286.
- Nath A, Sinha P, Kumari K, AK Anshu, Singh A, Kumar S, Anand P.** Effect of arsenic toxicity in testis of swiss albino mice leading to low testosterone and high MDA level. *International Journal of Pharmaceutical Sciences* 2015, 30(2), 69-73.
- Nielsen FH, Hunt CD, Mullen LM, Hunt JR.** Effect of dietary boron on mineral, estrogen, and testosterone metabolism in postmenopausal women. *The Federation of American Societies for Experimental Biology* 1987, 1(5), 394-397.
- Nielsen FH.** Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel and arsenic: current knowledge and speculation. *The Federation of American Societies for Experimental Biology* 1991, 5(12), 2661-2667.
- Nielsen FH.** Evidence for the nutritional essentiality of boron. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 1996, 9(4), 215-229.

Noblanc A, Peltier M, Damon-Soubeyrand C, Kerchkove N, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Janny L, Pons-Rejraji H, Conrad M, Drevet JR, Kocer A. Epididymis response partly compensates for spermatozoa oxidative defects in snGPx4 and GPx5 double mutant mice. *Plos One* 2012, 7(6), e38565.

Noblanc A, Damon-Soubeyrand C, Karrich B, Henry-Berger J, Cadet R, Saez F, Guiton R, Janny L, Pons-Rejraji H, Alvarez JG, Drevet JR, Kocer A. DNA oxidative damage in mammalian spermatozoa: where and why is the male nucleus affected. *Free Radical Biology & Medicine* 2013, 65, 719-723.

Obregon EB, Olivares C. Boron as a testicular toxicant in mice. *International Journal of Morphology* 2012, 30(3), 1106-1114.

Penland JG. The importance of boron nutrition for brain and psychological function. *Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 1998, 66(1-3), 299-317.

Pfeiffer LCC, Hallmann ELF, Gersh LI: Boric acid ointment: a study of possible intoxication in the treatment of burns. *Journal of the American Medical Association* 1945, 128, 266-274.

Rahimipour M, Talebi AR, Anvari M, Sarcheshmeh AA, Omidi M. Effects of different doses of ethanol on sperm parameters, chromatin structure and apoptosis in adult mice. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 2013, 170(2), 423-428.

Rainey CJ, Nyquist LA, Christensen RE, Strong PL and Culver BD, Coughlin JR. Daily boron intake from the American diet. *Journal of the American Dietetic Association* 1999, 99(3), 335-340.

Robbins WA, Xun L, Jia J, Kennedy N, Elashoff DA, Ping L. Chronic boron exposure and human semen parameters. *Reproductive Toxicology* 2010, 29(2), 184-190.

Samanta L, Chainy GBN. Comparison of hexachlorocyclohexane induced oxidative stress in testis of immature and adult rats. *Comparative Biochemistry and Physiology* 1997, 118(3), 319-327.

Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kaçmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* 2004, 73, 39-85.

Sanočka D, Miesel R, Jedrzejczak P, Chelmonska-Soyta AC, Kurpisz M. Effect of reactive oxygen species and the activity of antioxidant systems on human semen; association with male infertility. *International Journal of Andrology* 1997, 20(5), 255-264.

- Selevan, SG, Borkovec L, Slott, VL, Zudova, Z, Rubes J, Evenson DP, Perreault SD.** Semen quality and reproductive health of young czech men exposed to seasonal air pollution. *Environmental Health Perspectives* 2000, 108(9), 887-894.
- Settimi L, Elovaara E, Savolainen H.** Effects of extended peroral borate ingestion on rat liver and brain. *Toxicology Letter* 1982, 10(2), 219-223.
- Silaev A, Kasparov A, Korolev V, Nebstrueva V.** Electronmicroscopic investigation of the effect of boric acid on the seminiferous tubules of albino rats. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 1977, 83(4), 588-591.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL.** A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 1988, 175(1), 184-191.
- Solis S, Githens TS.** Pharmacotherapeutics. D. Appleton and Company, 1938, 581-586.
- Song GJ, Lewis V.** Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. *Fertility and Sterility* 2008, 90(6), 2238-2244.
- Sun Y, Oberley LW, Li YA** Simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 1988, 34, 497- 500.
- Stadtman ER.** Oxidation of free aminoacids and aminoacids residues in protein by radiolysis and metal catalyzed reactions. *Annual Review of Biochemistry* 1993, 62, 797-821.
- Stephen B, King SA, Irvine DS, Saunders PTK.** Impact of mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction Resaarch*, 2005, 129, 505-514.
- Stohs SJ, Bagchi D.** Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 1995, 18(2), 321-336.
- Thomas MJ** The role of free radicals and antioxidants: how do they know that they are working. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1995, 35(1-2), 21-34.
- Tice RR, Agurel E, Anderson D, Burlinson B, Hartman A, Kobayashi H, Miyamae Y, Tietze F.** Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Annals of Biochemistry* 1969, 27(3), 502-522.
- Tokaç D.** Bitkisel kaynaklı fenolik bileşiklerin oksidatif DNA hasarına etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ankara, Türkiye 2007.
- Treinen KA, Chapin RE.** “Development of testicular lesions in F-344 rats after treatment with boric acid” *Toxicology and Applied Pharmacology* 1991, 107(2), 325–335.
- Turkez H.** Bazı Bor bileşiklerinin in vitro şartlarda periferel insan kanı üzerine genetik ve biyokimyasal etkileri. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Ensitüsü, Doktora tezi, 2007, 1-40.

Twigg J, Fulton N, Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Human Reproduction* 1998, 13(6), 1429-1436.

Vanhoe HJ, Moens VL, Dams R. Role of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in the assessment of reference values for ultra-trace elements in human serum, 1995. *Trace Elements and Electrolytes* 12(2), 81-88.

Venugopal B, Luckey TD. Metal Toxicity in Mammals, New York, NY: Plenum Press. 1978, 289-297.

Verit FF, Verit A, Kocyigit A, Ciftci H, Celik H, Koksall M. No increase in sperm DNA damage and seminal oxidative stress in patients with idiopathic infertility. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2006, 274(6), 339-344.

Wang, XJ, Dyson MT, Jo Y, Eubank DW, Stocco DM. Involvement of 5-lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in cyclic AMP-stimulated steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein gene expression. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2003, 85(2-5), 159-166.

Watson PF. The cause of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science* 2000, 60-61, 481-492.

WEB_1. (1983). CTFA (Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association), Cosmetic Ingredient Review. <http://gov.personalcarecouncil.org/ctfa-static/online/lists/cir-pdfs/PRN513.pdf> (Erişim tarihi: 14. 08. 2017).

WEB_2. (1987).NTP (National Toxicology Program) https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr324.pdf (Erişim tarihi: 06. 05. 2017).

WEB_3. (1992) ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service <https://www.atsdr.cdc.gov/> (Erişim tarihi: 10.08.2017).

WEB_4. (1996) WHO (World Health Organization) <http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/9241561734/en/> (Erişim tarihi: 10.08.2017).

WEB_5. (1998) WHO (World Health Organization) http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/boron.pdf (Erişim tarihi 09.08.2017).

WEB_6. (2006). NPIC <http://npic.orst.edu/ingred/boricacid.html> (Erişim tarihi: 06. 06. 2017).

WEB_7. (2016). BOREN Bor Araştırma Enstitüsü, <http://www.boren.gov.tr/tr> (Erişim tarihi: 06. 06. 2017).

WEB_8. (2017). TMMOB (Türk Mühendis ve Mimar Odaları Birliği) www.tmmob.org.tr/sites/www.tmmob.org.tr/files/bor_0.pdf (Erişim tarihi: 06. 06. 2017).

WEB_9. (2017). Etimaden. <http://www.etimaden.gov.tr/tr/page/bor-turkiye-tarihcesi> (Erişim tarihi: 06. 03. 2017).

Weir RJ Jr, Fisher RS. Toxicologic studies on borax and boric acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1972, 23(3), 351-364.

Williams K, Frayne J, Hall L. Expression of extracellular glutathione peroxidase type 5 (GPX5) in the rat male reproductive tract. *Molecular Human Reproduction* 1998, 4(9), 841-848.

Williams GM, Jeffrey AM. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2000, 32(3), 283-292.

Xu DX, Shen HM, Zhu QX, Chua L, Wang QN, Chia SE. The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutation Research* 2003, 534(1-2), 155-163.

Yoshioka T, Kawada K, Shimada. Lipid peroxidation in maternal and cord blood and protective mechanisms against activated oxygen toxicity in the blood. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1979, 135(3), 372-376.

Zhai XW, Zhang YL, Qi Q, Bai Y, Chen XL, Jin LJ, Ma XG, Shu RZ, Zi-Jun Yang ZG, Liu FJ. Effects of molybdenum on sperm quality and testis oxidative stress. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2013, 59(5), 251-255.

Zhang ZW, Tan ZG, Qiao N, Kang ZL, Chen ZL, Hu LM, Yang ZM, Li Y. Copper-induced spermatozoa head malformation is related to oxidative damage to testes in CD-1 mice, 2016. *Biological Trace Element Research* 2016, 173(2), 427-432.

Zini A, Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *International Journal of Andrology* 1993, 16(3), 183-188.

Zini A, Schlegel PN. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *Journal of Andrology* 1996, 17(5), 473-480.

Zini A, Schlegel PN. Expression of glutathione peroxidases in the adult male rat reproductive tract. *Fertility and Sterility* 1997a, 68(4), 689-695.

Zini A, Schlegel PN. Identification and characterization of antioxidant enzyme mRNAs in the rat epididymis. *International Journal of Andrology* 1997b, 20(2), 86-91.



I.C.

ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 4 Ekim 2012

Oturum : Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 2012 Yılı X. Oturumu
Sayı : B.30.2.ADÜ.0.00.00.00/050.04/2012/084
Proje Başlığı : Farelerde borik asidin testis dokusunda oksidatif stres ve spermatozoon DNA hasarına olan etkisinin saptanması
Proje Yürütücüsü : Cavit KUM
Proje Ekibi : Serdar AKTAŞ

Bu çalışmanın hiçbir bölümünde:

İnsan embriyosu ve fötüsü kullanılması
İnsan embriyosu ve fötüsü dokularının kullanılması
Diğer insan doku ve hücrelerinin kullanılması

Hayvan Çalışması İnsanlarda araştırma
İnsan olmayan primatların kullanılması
Transgenik hayvanların kullanılması
Hayvanlarda genetik modifikasyon öngörülmemiştir.

Bu çalışmanın yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmamaktadır.

Doç. Dr. İbrahim CEMAL

(Üye)

İzinli

Vet. Hek. Ufuk SAYIN

(Üye)

Doç. Dr. Turhan DOST

(Başkan)

Yrd. Doç. Dr. Cengiz ÜNSAL

(Üye)

İzinli

Dr. Nurten ATALAY

(Üye)

Şevket AKYOL (Raportör)

Doç. Dr. Yücel KOCA

(Üye)

Vet. Hek. Serdar AKTAŞ

(Üye)

Bu rapor sadece Adnan Menderes Üniversitesi birimlerinde yapılacak deneyler için geçerlidir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı, Soyadı : SERDAR AKTAŞ
Uyruk : T.C
Doğum yeri ve tarihi : Pertek / 19.08.1981
Telefon : 0 555 559 3824
E-mail : serdaraktas81@gmail.com
Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece:	Kurum:	Mezuniyet tarihi:
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	2004
Yüksek Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2007
Doktora	Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2017

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

Demir Ş, Ünübol M, Aypak SÜ, İpek E, Aktaş S, Ekren GS, Yılmaz M, Tunca R. Güney E. "Hipotiroidizm modeli oluşturulmuş ratlarda alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığının değerlendirilmesi" En İyi Deneysel Araştırma Ödülü. 17. Ulusal İç Hastalıkları Kongresi, Belek/Antalya 14-18 Ekim 2015.

İŞ DENEYİMİ

Yıl:	Yer/Kurum:	Ünvan:
2000-2004	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	Veteriner Sağlık Teknisyeni
2004-2012	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi	Veteriner Hekim
2012-.....	Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi	Uzman Veteriner Hekim

AKADEMİK YAYINLAR

MAKALELER

- **Demir Ş, Ünübol M, Aypak SÜ, İpek E, Aktaş S, Ekren GS, Yılmaz M, Tunca R. Güney E.** Histopathologic evaluation of nonalcoholic fatty liver disease in hypothyroidism-induced rats. *International Journal of Endocrinology* 2016, 5083746.
- **Kızılzay Z, Cetin NK, Ismailoglu O, Yılmaz A, Omurlu IK, Coskun ME, Aktaş S.** The effects of rifampin, povidone-iodine and hydrogen peroxide on the formation of epidural fibrosis in the experimental epidural fibrosis model. *Inflammation* 2016, 39(4), 1495-502.
- **Kızılzay Z, Erken HA, Çetin NK, Aktaş S, Abas BI, Yılmaz A.** Boric acid reduces axonal and myelin damage in experimental sciatic nerve injury. *Neural Regeneration Research* 2016, 11(10), 1660-1665.
- **Kızılzay Z, Kahraman Çetin N, Topcu A, Ismailoğlu O, Kurt Ömürlü İ, Aktaş S, Yılmaz A.** Effect of etanercept on the formation of epidural fibrosis in an experimental model. *Turkish Neurosurgery* 2016, doi: 10.5137/1019-5149.
- **Suzen A, Tekin L, Erdemli ME, Erturk N, Aksungur Z, Aktas S.** Protective effects of *hypericum perforatum* and quercetin in a rat model of ischemia/reperfusion injury of testes. *European Journal of Pediatric Surgery*, 2017 Aug 24. doi: 10.1055/s-0037-1604397.
- **Kızılzay Z, Kahraman Çetin N, Aksel M, Abas BI, Aktaş S, Erken HA, Topçu A, Yılmaz A, Yenisey C.** Ozone partially decreases axonal and myelin damage in an experimental sciatic nerve injury model, *Journal of Investigative Surgery*, 2017 Sep 19:1-10. doi: 10.1080/08941939.2017.1369606.
- **Kızılzay Z, Aktas S, Kahraman Cetin N, Bakay Ilhan D, Ersoy G, Erken HA.** Effect of systemic application of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on healing of peripheral nerve injury in an experimental sciatic nerve injury model. *Turkish Neurosurgery*, 2017 Jul 12. doi: 10.5137/1019-5149.JTN.20811-17.1.

DEVAM EDEN PROJELER

- *Myocoptes musculus* tedavisinde eprinomektin ve flumetinin etkinliğinin karşılaştırılması, Münferit araştırma projesi, Proje yürütücüsü.
- Maling mezotelioma tedavisinde kök hücrenin tedavide etkinliği, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi (TPF-14015), Yardımcı araştırmacı.
- Selenyumun periferik sinir yaralanmasına olan etkisi, Münferit araştırma projesi, Yardımcı araştırmacı.
- Farens yara iyileşmesine topikal insulinin etkisinin araştırılması, Münferit araştırma projesi, Yardımcı araştırmacı 2015.

- Renal iskemi ve reperfüzyon uygulanan sıçanlarda curcuminin etkinliğinin değerlendirilmesi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Proje No:15/137, Yardımcı araştırmacı.
- Tiroid nodülü ve adrenal adenom oluşumunda metabolik sendromun rolünün rat modelinde değerlendirilmesi, Münferit araştırma projesi, Yardımcı araştırmacı.
- Alkolik olmayan yağlı karaciğer hastalığı oluşturulan ratlarda aldosteronun etiolojisindeki yerinin ve spirinolaktonun önleyici etkisinin araştırılması, Münferit araştırma projesi, Yardımcı araştırmacı.
- Sıçan overlerinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarına sildenafilin ve resveratrolün histopatolojik etkilerinin araştırılması ve karşılaştırılması, Münferit araştırma projesi, Yardımcı araştırmacı.

BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

- Comparison of *Hipericum perforatum* and quercetin protective role against ischemia/reperfusion injury of the testis in rats. *18th European Paediatric Surgeons Association Congress*, Poster Sunumu, Limasol-Kıbrıs, 2017.

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

- Dehidre köpeklerde bikarbonatlı sodyum klorür ve Laktatlı ringerin kan parametrelerine olan etkisi” *9. Veteriner İç Hastalıkları Kongresi*, Poster Sunumu, Selçuk-İzmir, 2009.
- Sancılı atlarda Urothiasis olgusu” *9. Veteriner İç Hastalıkları Kongresi*, Poster Sunumu, Selçuk-İzmir, 2009.