



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BOR MARUZİYETİNİN İNSANLARIN ÜREME FONKSİYONLARI ÜZERİNDEKİ TOKSİK ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Can Özgür YALÇIN

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Yalçın DUYDU**

ANKARA

2017

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BOR MARUZİYETİNİN İNSANLARIN ÜREME
FONKSİYONLARI ÜZERİNDEKİ TOKSİK
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Can Özgür YALÇIN

**FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Yalçın DUYDU**

**ANKARA
2017**

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Bor Maruziyetinin İnsanların Üreme Fonksiyonları Üzerindeki Toksik Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir ve hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma ve araştırmalar tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı : Can Özgür YALÇIN

Tarih :

İmza :

Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalında

Can Özgür YALÇIN tarafından hazırlanan

“Bor Maruziyetinin İnsanların Üreme Fonksiyonları Üzerindeki Toksik Etkilerinin
İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak
OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 27/03/2017



Prof. Dr. Ayşe Nurşen BAŞARAN

Hacettepe Üniversitesi

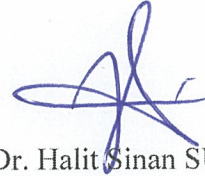
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Yalçın DUYDU

Ankara Üniversitesi

Raportör



Prof. Dr. Halit Şinan SÜZEN

Ankara Üniversitesi

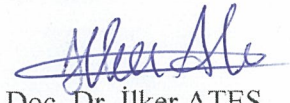
Üye



Doç. Dr. Sevtap AYDIN

Hacettepe Üniversitesi

Üye



Doç. Dr. İlker ATEŞ

Ankara Üniversitesi

Üye

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

Prof. Dr. K. Zafer KARAER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	viii
Çizelgeler	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Bor	1
1.1.1. Borun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	1
1.1.2. Borun Biyolojik, Tıbbi Özellikleri ve Sağlık Üzerine Olumlu Etkileri	4
1.1.3. Borun Üreme Sistemleri Üzerine Etkileri	7
1.1.4. Borun Türkiye İçin Önemi	9
1.2. Erkek Üreme Sistemi	10
1.2.1. Testisler	11
1.2.2. Spermatogenez	15
1.2.3. Üremenin Hormonal Kontrolü	18
1.2.4. Sperm DNA Bütünlüğünü Etkileyen Faktörler	21
1.3. Kromozom Anomalileri	22
1.3.1. Kromozom Yapısı Mutasyonları	22
1.3.1.1. Delesyon	22
1.3.1.2. İnversiyon (Ters Dönme)	23
1.3.1.3. Duplikasyon	23
1.3.1.4. Translokasyon	23
1.3.1.5. Yüzük (Ring) Kromozom	24
1.3.2. Kromozom Sayısı Mutasyonları	24
1.3.2.1. Öploidi	24
1.3.2.2. Anöploidi	24
1.4. Sperm DNA Bütünlüğünün Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler	24
1.4.1. Floresan <i>in situ</i> Hibridizasyon (FISH) Yöntemi	25
1.4.2. FISH Yönteminde Kullanılan Problar	26
1.4.2. FISH Yönteminin Aşamaları	27
2. GEREÇ VE YÖNTEM	29
2.1. Gereç	29
2.1.1. Kullanılan Gereçler	29
2.1.2. Kullanılan Kimyasallar	30
2.1.3. Kullanılan Problar	30
2.2. Yöntem	30
2.2.1. Çalışma Bölgesi ve Numune Alımı	30
2.2.1.1. Maruziyet Gruplarının Yeniden Belirlenmesi	31
2.2.2. Sitogenetik Analiz	32
2.2.2.1. Numunelerin Hazırlanması	32
2.2.2.2. FISH Tekniğinin Uygulanması	32

2.2.2.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	33
2.2.2.2.2. Preparatların Ön Yıkaması	34
2.2.2.2.2. Denatürasyon	37
2.2.2.2.3. Hibridizasyon	39
2.2.2.2.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar	40
2.2.2.2.5. Hibridize Olan Kromozomların Görüntülenmesi ve Değerlendirme	42
2.2.3. İstatiksel Analiz	44
3. BULGULAR	45
3.1. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular	45
3.2. Çalışmanın İstatiksel Bulguları	51
4. TARTIŞMA	57
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	68
ÖZET	70
SUMMARY	71
KAYNAKLAR	72
EKLER	82
Ek-1. Etik Kurul Raporu	83
ÖZGEÇMİŞ	84

ÖNSÖZ

“Bor Maruziyetinin İnsanların Üreme Fonksiyonları Üzerindeki Toksik Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı bu doktora tez çalışmasında yüksek konsatrasyonda bora maruz kalan erkeklerin sperm hücrelerinde Y:X kromozom oranlarının değişip değişmediği floresan *in situ* hibridizasyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bu çalışma Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü, Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü (BOREN) ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir.

Doktora eğitim sürecinde danışmanlığımı yapan ve akademik hayatımda bana güzel olanaklar verdiği için kendimi her zaman şanslı hissettiğim hocam Prof. Dr. Yalçın DUYDU’ya;

Laboratuvar çalışmalarımızda her daim bütün bilgi, özveri, sabır ve güler yüzüyle yanımda olan kıymetli hocam ve ablam Doç. Dr. Aylin ÜSTÜNDAĞ’a

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Mümtaz İŞCAN, Prof. Dr. Binay CAN EKE, Prof. Dr. Tülay ÇOBAN, Prof. Dr. Halit Sinan SÜZEN, Doç. Dr. Ahmet Oğuz ADA, Doç. Dr. İlker ATEŞ, Doç. Dr. Özge CEMİLOĞLU ÜLKER’e ve emekli hocalarım Prof. Dr. Mahbube Asuman KARAKAYA ile Prof. Dr. Aliye Gülin GÜVENDİK’e;

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı personeli Süleyman MERCAN, Sema SAPAN ve Güldane YENİCE’ye;

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’ndeki tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ve her zaman benim için çok değerli olan sevgili annem Fatma YALÇIN’a, kıymetli abim Emre Deniz YALÇIN’a ve şu anda bu dünyada olmayan babam Mehmet Hulki YALÇIN’a minnet ve şükranlarımı sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP	: Androjen bağlayıcı protein
BCNT	: Bor, bor nötron yakalama tedavisi
CAT	: Katalaz
CLP	: Classification, Labeling and Packaging
FISH	: Floresan <i>in situ</i> hibridizasyon
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
G-6-PD	: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
GST	: Glutasyon S-transferaz
IGF	: İnsülin-like growth faktör
LH	: Lüteinleştirici hormon
MN	: Mikroçekirdek
NADPH	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PRL	: Prolaktin
PSA	: Prostat özgü antijen
SCE	: Kardeş kromatit değişimi
SOD	: Süperoksit dismutaz
TAC	: Total antioksidan kapasite
TRH	: Tirotropin salgılatıcı hormone
US EPA	: United States Enviromental Protecting Agengy
VIP	: Vasoaktif intestinal peptid

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.	Amorf bor	1
Şekil 1.2.	Emet Bor İşletme Tesisi ve maden ocağı	3
Şekil 1.3.	Erkek üreme sistemi	10
Şekil 1.4.	Testisin yapısı	12
Şekil 1.5.	Seminifer tübül epiteli: Sertoli ve spermatogenik seri hücreleri ve spermatogenez	12
Şekil 1.6.	Spermatogenez	15
Şekil 1.7.	Olgun sperm hücresi ve kısımları	17
Şekil 1.8.	Hipotalamo-hipofizer-testiküler aks	19
Şekil 2.1.	Çalışmada kullanılan problemlerin kromozomlardaki hedef bölgeleri	33
Şekil 2.2.	Azottan çıkarılan sperm numunesi	35
Şekil 2.3.	Yıkama ve santrifüj sonrası hücreler	35
Şekil 2.4.	-20 °C’de bekletilen lamalar	36
Şekil 2.5.	Hücre yayılmış lamalar	37
Şekil 2.6.	2xSSC ve %70, %85, %100’lük alkol serisi	37
Şekil 2.7.	Kromozom X,Y,18 sayım probu	37
Şekil 2.8.	Prob, fiksasyonu tamamlanmış lamalar ve lameler inkübatörde 37 °C’ye getirildi	37
Şekil 2.9.	Prob yavaş devirde santrifüjlendi	38
Şekil 2.10.	Rubber cement kaplama	38
Şekil 2.11.	Hibridizasyona hazır lam	38
Şekil 2.12.	Hibridizasyon aşaması ısıtıcı yüzey	39
Şekil 2.13.	Hibridizasyon esnasında ısıtıcının üzeri kapatılarak karanlık ortam sağlandı	39
Şekil 2.14.	Nemli ve karanlık ortam	40
Şekil 2.15.	37 °C de 18 saat inkübasyon	40
Şekil 2.16.	Tween®20 ile köpürtülen 2xSSC	41
Şekil 2.17.	67°C’ye getirilen 0.4xSSC çözeltisi	41
Şekil 2.18.	DAPI- Antifade süspansiyon (4',6-diamidino-2-fenilindol)	41
Şekil 2.19.	Floresan mikroskop	42
Şekil 2.20.	100’lük immersiyon yağlı objektif	42
Şekil 2.21.	FISH görüntüsünde kırmızı sinyal: Kromozom Y, yeşil sinyal: kromozom X, aqua sinyal: kromozom 18 (kontrol) ve DAPI (mavi)	43
Şekil 2.22.	Değerlendirme dışı bırakılan hücreler	43
Şekil 2.23.	Sarı halka ile çevrili alanda kromozom Y, X ve 2 adet kromozom 18’e sahip lenfosit hücresi (2n= 46)	44
Şekil 3.1.	Kan bor konsantrasyonu (ng Bor/g kan) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin dağılım grafiği	51
Şekil 3.2.	Kan bor konsantrasyonu (ng Bor/g) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin regresyon denklemi	51
Şekil 3.3.	Meni bor konsantrasyonu (ng Bor/g) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin dağılım grafiği	52

Şekil 3.4.	Meni bor konsantrasyonu (ng Bor/g) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin regresyon denklemi	52
Şekil 3.5.	İdrar Bor/Kreatinin (mg Bor/g) miktarı ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin dağılım grafiği	53
Şekil 3.6.	İdrar Bor/Kreatinin (mg Bor/g) miktarı ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin regresyon denklemi	53
Şekil 3.7.	Günlük bor alım miktarı (mg Bor/gün) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin dağılım grafiği	54
Şekil 3.8.	Günlük bor alım miktarı (mg Bor/gün) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin regresyon denklemi	54
Şekil 3.9.	Yeniden oluşturulan gruplara göre kontrol, düşük, orta ve yüksek kan bor seviyelerinde sperm numunelerindeki Y:X oranları kutu grafiği	55
Şekil 3.10.	Çalışmamıza katılan gönüllü erkeklerin sahip oldukları erkek ve kız çocuk sayılarının kontrol ve maruziyet grupları arasında karşılaştırılması	55

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1. Dünya bor rezervleri	2
Çizelge 2.1. Meni örnekleri değerlendirilen kişilerin çocuklarının cinsiyet dağılımı	31
Çizelge 2.2. Kontrol ve işçi gruplarının kan bor miktarlarına göre yeniden gruplandırılması	32
Çizelge 3.1. Kontrol grubuna ait günlük bor alım miktarı (mgB/gün), idrar bor/kreatinin oranı (mgB/g), kan bor konsantrasyonu (B, ng/g), meni bor konsantrasyonu (B, ng/g), iş yerinde çalışma süresi (yıl), yaş, 1 mL meni sıvısındaki sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$), Y kromozomu sayısı, X kromozomu sayısı, toplam sayılan hücre sayısı (Y+X), Y:X kromozom oranı, sayılan toplam hücrede Y kromozomu oranı (%Y)	45
Çizelge 3.2. Bor maruziyet grubuna ait günlük bor alım miktarı (mgB/gün), idrar bor/kreatinin oranı (mgB/g), kan bor konsantrasyonu (B, ng/g), meni bor konsantrasyonu (B, ng/g), iş yerinde çalışma süresi (yıl), yaş, 1 mL meni sıvısındaki sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$), Y kromozomu sayısı, X kromozomu sayısı, toplam sayılan hücre sayısı (Y+X), Y:X kromozom oranı, sayılan toplam hücrede Y kromozomu oranı (%Y)	48
Çizelge 3.3. Gönüllülerin çocuk sayıları	56
Çizelge 3.4. Numunelerden elde edilen kan bor ve meni bor konsantrasyonları ile gönüllülerin sperm numunelerindeki Y:X oranları	56
Çizelge 3.5. Numunelerden elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri	56
Çizelge 4.1. Borun menide birikme oranı	66

1. GİRİŞ

1.1. Bor

1.1.1. Borun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Bor periyodik çizelgede B simgesi ile gösterilen atom numarası 5, atom ağırlığı 10,811 olan metalle ametal arası yarı iletken özelliğe sahip bir elementtir. Periyodik çizelgede 3A grubunda bulunur. Doğada bor ^{10}B (%19,8) ve ^{11}B (%80,2) olmak üzere iki kararlı izotopun karışımından oluşur (IPCS 1998, WHO 1998, U.S.EPA 2004). Fransız Kimyagerler J.L. Gay Lussac ve Baron L.J. Thenard ile İngiliz Kimyager H. Davy 1808 yılında bor oksiti potasyum ile ısıtarak saf bor elementi elde etmiştir (Greenwood ve Earnshaw, 1984). Amorf bor yoğunluğu $2,34 \text{ g/cm}^3$ olan kahverengi bir tozdur. Kristal formu ise siyah ve son derece sert (Mohs sertlik cetvelinde yaklaşık 9,5'tir) bir yapı olup, yoğunluğu $2,33 \text{ g/cm}^3$ 'tür. Kristal yapısı tetragonal - hekzagonaldır. Elementel borun erime noktası oldukça yüksek olup yaklaşık 2300°C , kaynama noktası ise yaklaşık 4000°C 'dir.



Şekil 1.1. Amorf bor.

Yerkabuğu, denizler, yeraltı ve yerüstü suları bor içerir. Bor toprakta yaklaşık 10 - 20 ppm arasında bulunur. Deniz suyunda 0,5 – 9,6 ppm, tatlı sularda ise 0,01 – 1,5 ppm arasındadır. Bor elementi doğada serbest halde bulunmaz. Bor daima oksijene bağlı halde bulunur ve bu bileşiğe borat adı verilmektedir (Çöl ve Çöl, 2003). Doğada 230 çeşitten fazla bor minerali vardır. Bu mineraller bileşimlerindeki kalsiyum, sodyum, magnezyum gibi metallerin oranlarına, içerdikleri su miktarına ve kristal yapılarına göre isimlendirilir. Sodyum kökenli bor minerallerine Boraks [Tinkal; $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot (10\text{H}_2\text{O})$], kalsiyum kökenli bor minerallerine Kolemanit [$\text{Ca}_2\text{B}_6\text{O}_{11} \cdot (5\text{H}_2\text{O})$], sodyum - kalsiyum kökenli bor minerallerine ise Üleksit [$\text{NaCaB}_5\text{O}_9 \cdot (8\text{H}_2\text{O})$] denir (US EPA, 1987; IEHR, 1997).

Türkiye, bor mineralleri rezervlerinin büyüklüğü, kalitesi ve çeşitliliği açısından dünyada ilk sırada yer alır ve dünya toplam bor rezervinin % 72'sinden fazlasına sahiptir. Çizelge 1.1'de dünya bor rezervleri dağılımı verilmiştir.

Çizelge 1.1. Dünya bor rezervleri (<http://www.etimaden.gov.tr>).

Ülke	Toplam Rezerv (Bin ton B_2O_3)	Toplam Rezerv (% B_2O_3)
Türkiye	864.500	72,1
A.B.D.	80.000	6,7
Rusya	100.000	8,4
Çin	47.000	3,9
Arjantin	9.000	0,8
Bolivya	19.000	1,6
Şili	41.000	3,4
Peru	22.000	1,8
Sırbistan	16.200	1,3
İran	1000	0,0
Toplam	1.199.700	100

Çizelgedeki ülkelere ek olarak bazı kaynaklar Kazakistan'ın yaklaşık 102 milyon ton rezerve sahip olduğunu yazmaktadır. Söz konusu veriler tutarsız olması ve kesin olmaması nedeniyle çizelgede verilmemiştir. Dünyadaki toplam bor rezervleri incelendiğinde Türkiye'nin ne kadar önemli bir paya sahip olduğu anlaşılabilmektedir (Mergan, 2006). Ülkemizdeki bor madeni rezervleri: % 37

Bigadiç (Balıkesir), % 34 Emet (Kütahya), % 28 Kırka (Eskişehir) ve %1 Kestelek (Bursa) şeklindedir (DPT, 1995).



Şekil 1.2. Emet Bor İşletme Tesisi ve maden ocağı (<http://www.etimaden.gov.tr>).

Bor mineralinin ve bor minerali içeren ürünlerin kullanımı giderek artmaktadır. Günümüzde cam ve seramik sanayi, bayazlatma ve temizleme, tarım, yanmayı önleyici maddelerin üretilmesi, maden mühendisliği, orman endüstrisi, otomotiv, tekstil, bilgisayar teknolojisi, elektrik - elektronik, uzay - havacılık ve

savunma sanayi, nükleer uygulamalar gibi birçok alanda kullanılmaktadır (<http://www.mta.gov.tr>).

1.1.2. Borun Biyolojik, Tıbbi Özellikleri ve Sağlık Üzerine Olumlu Etkileri

Bitkilerde bor bileşikleri ilk kez 1897 tarihinde Wittstein ve Apoiger tarafından belirlenmiştir. Bor, bitkilerin büyüme ve gelişmesi için gerekli olan bir esansiyel elementtir (Warrington, 1923). Borun, insanlar için de esansiyel olabileceği henüz tartışmalı olmakla beraber ABD Farmakopesi - Uluslararası Kodeksi ve İngiliz Farmakopesi borik asit ve sodyum boratları tıbbi açıdan önemli bileşikler olarak sınıflandırmıştır. Bor bileşiklerinin oral yolla alımında fizyolojik sıvılarda (kan, idrar, vb) borik asit bulunur (Usuda ve ark., 1998). Borik asit, pKa'sı 9,2 olan zayıf bir asittir. Fizyolojik pH'ta disosiyeye olamayan asitin sulu çözeltisi olarak bulunur (Woods, 1994). Borik asit olarak bor, gastrointestinal ve solunum sisteminden hızla emilir ve insan dokularında düşük konsantrasyonlarda bulunur. Vücuda alınan borun % 90 - 95'i vücutta birikmeden idrarla dışarı atılmaktadır. Yalnızca kemik, tırnak, kıl, karaciğer ve dalakta az miktarda birikmektedir (Murmu ve ark., 2001). Treinen ve Chapin (1991) borun testislerde ve epididimide birikim yapmadığını ortaya koymuştur.

Nielsen (1998) yaptığı bir çalışmada insanlar için kabul edilebilir güvenli bor alım miktarının günlük 1 - 13 mg olması gerektiğini bulmuştur.

Bor; immün sistem, iskelet - kas sistemi, sinir sistemi, üreme sistemleri ve enerji metabolizmasına olan etkileri açısından önemli bir mineraldir. Düşük dozda bor alımının; bu sistemlerde bozukluklara neden olabileceği bulunmuştur. Dolayısıyla günlük diyetle bora yer verilmelidir. Genel olarak meyve, sebze, baklagiller ve kuruyemiş açısından zengin bir diyetle bor alınabilir. Özellikle fındık, badem, hurma, elma, erik, üzüm, brokoli, domates, patates bol miktarda bor içeren besin maddeleridir (Nielsen, 2008). Borun, enzim sistemlerinde metabolizmayı düzenlediği bildirilmiştir (Nielsen, 1998). Borik asitin, D vitamini (Hunt, 1996), kalsiyum ve potasyum metabolizmasında (Meacham ve ark., 1994) etkili olduğu

gösterilmiştir. Besin kaynaklı bor alımının menopoz sonrası kadınlarda kalsiyum kaybı ve kemik demineralizasyonunu azalttığı (Nielsen ve ark., 1987), kemik dayanıklılığı üzerine olumlu etkiler olduğu (Chapin ve ark., 1997) ve dolayısıyla, osteoporoz ve artrit tedavisinde veya önleminde yararlı olduğu bulunmuştur (Grajeta, 2003).

Bor, dokularda oksidan/antioksidan dengenin sürdürülmesine yardım eder. Glutasyon ve türevlerinin vücuttaki stoklarını arttırarak veya diğer reaktif oksijen türlerini etkisizleştiren kimyasalları indükleyerek oksidatif hasarı engeller (Hunt ve Idso, 1999). Bor bileşiklerinin G-6-PD (glukoz-6-fosfat dehidrogenaz) aktivitesini arttırdığı, NADPH (nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) seviyelerinin düzenlenmesinde rol aldığı görülmüştür (Samman ve ark., 1998; Devirian ve Volpe, 2003). Borun eritrositlerdeki SOD (süperoksit dismutaz), CAT (katalaz), GSH-Px (glutasyon peroksidaz), GST (glutasyon S-transferaz) ve total antioksidan kapasiteyi (TAC) arttırdığı bilinmektedir (Türkez ve ark., 2007).

Yapılan çalışmalarda borun immün sistemde ve inflamatuvar yanıtta rol oynadığı (Hunt ve Idso, 1999; Armstrong ve Spears, 2003), insülin, östrojen, testosteron, T3, T4 hormonları üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir.

Bor bileşiklerinin bakterilerde ve memeli hücre kültürlerinde genotoksik etki potansiyelinin olmadığı gösterilmiştir (Moore, 1997). İnsan kan hücresi kültürü kullanarak yapılan bir çalışmada, ağır metal (arsenik trioksit, koloidal bizmut subsitrat, kadmium, civa ve kurşun) genotoksisitesinde bazı bor bileşiklerinin (borik asit, boraks, kolemanit ve üleksit) antioksidan etkili olup olmadığını araştırılmış test edilen bor bileşiklerinin düşük dozlardaki ağır metal genotoksisitesini azalttığı tespit edilmiştir (Türkez ve ark., 2012). Üstündağ ve ark. (2015) borik asitin düşük konsantrasyonlarda (< 300 µM) DNA hasarını indüklemediğini, buna karşın 2 ve 10 µM konsantrasyonda ise kurşun ve kadmiyum ağır metallerinin neden olduğu DNA hasarını azalttığı sonucuna varmışlardır.

Uçkun ve ark. (2009) kardeş kromatit değişimi (SCE) ve mikroçekirdek (MN) yöntemleri kullanılarak yaptıkları bir çalışmada, belli dozlarda bora maruz kalan bireylerin lenfosit hücrelerindeki DNA hasarları, maruz kalmayan bireylerle kıyaslamıştır. Bora maruz kalan bireylerdeki DNA hasarının kontrol grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir; borun oluşabilecek DNA hasarlarına karşı antigenotoksik etkinliğinin olabileceği vurgulanmıştır. Yılmaz ve ark. (2013) borik asitin, Chinese Hamster V79 hücre serilerinde hidrojen peroksit (H₂O₂) ile oluşturulan DNA hasarlarına karşı koruyucu (antigenotoksik) etkinliğinin olduğunu göstermiştir.

Borik asit; kadınlarda, azole dirençli non-albicans candida türleri için geleneksel tedavinin işe yaramadığı durumlarda vajinitin tekrarlayan kronik semptomlarında güvenli ve ekonomik bir alternatif olduğu bulunmuştur (Iavazzo ve ark., 2011).

Bor, bor nötron yakalama tedavisi (BNCT) yöntemi ile riskli beyin tümörlerinin tedavisinde uygulanmaktadır (Nakagawa ve Hatanaka, 1997). BCNT ilk kez 1968’de Japonlar tarafından bulunmuştur. Bu yöntemde nötron bombardımanı sonrasında kanserli dokuya ulaşan ve parçalanan bor kanser hücrelerini yok etmektedir. Düşük enerjili nötron ve çekirdekteki kararlı izotopu (¹⁰B) arasında meydana gelen reaksiyon sonucu yoğun iyonize ve yüksek biyolojik etkinliğe sahip bor Helyum (He) ve Lityum (Li) çekirdekleri meydana gelmektedir (Sauerweina ve ark., 2002). Tümör hücrelerini hedef alan yüksek enerjili çekirdekler, hücre DNA’sında hasar oluşturarak hücre bölünmesini durdurur (Yamamoto ve ark., 2009). BCNT, meme, tiroid, kolon, pankreas kanserlerinin tedavisinde de kullanılan bir yöntemdir (Yanagie ve ark., 1997; Yanagie ve ark., 2009).

Ayrıca yapılan çalışmalar borun insanlarda beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde rol aldığını, hafızanın güçlendirilmesi ve psikomotor becerilerin artmasını sağladığını göstermiştir. Borun günlük 3,25 mg alımının motor fonksiyonlarda, hafıza (kısa - uzun süreli) ve dikkat yeteneklerinde gelişme sağladığı; düşük seviyede alımda ise daha zayıf zihinsel ve psikomotor performans

neden olabileceği bulunmuştur. Borun, gerek zihinsel performans gerekse beyin fonksiyonları için ana elementlerden biri olduğu düşünülmektedir (Penland, 1994).

Gallardo - Williams ve ark. (2004) fareler üzerinde yaptıkları bir çalışmada borik asitin; prostat tümörlerinin büyümelerini yavaşlattığını, IGF (insulin - like growth faktör) ve PSA (prostat özgü antijen) düzeylerini düşürdüğünü tespit etmiştir. Bu çalışmayı destekler nitelikte Barranco ve ark. (2007) yeraltı ve içme sularından borik asit alınan bölgelerde artan kan borik asit konsantrasyonlarına bağlı olarak prostat kanseri insidansının ve mortalite riskinin azaldığı görülmüştür.

Borik asit ve borat tuzları, 2005 yılında US EPA tarafından kimyasalların karsinogenesitelerinin değerlendirildiği yönetmelikte “insanlarda karsinojenik olmayan” maddeler grubunda sınıflandırılmıştır. Hayvan deneyleri, mesleki maruziyetler ve epidemiyolojik çalışmalar neticesinde bor bileşiklerinin karsinojenik etkili olduğunu gösteren herhangi bir bilgi bulunmamaktadır (WHO, 1998).

1.1.3. Borun Üreme Sistemleri Üzerine Etkileri

Borun üreme ve gelişim sistemi üzerine toksik olup olmadığını araştıran çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda borun üreme üzerine olan toksik etkileri sadece hayvan deneylerinde ve yüksek dozlarda gösterilmiştir. İnsanlarda bor maruziyeti ile ilişkili reproduktif veriler son derece kısıtlıdır. Weir ve Fisher (1972), günlük ile 90 gün boyunca verdikleri borik asit ve boraksın (44 mg/kg) köpeklerde tiroit ve testis ağırlıklarının azalmasının yanısıra çeşitli testiküler atrofilerde neden olduğunu göstermiştir. Silaev ve ark. (1977), sıçanların 15 gün boyunca 175 mg Bor/kg borik asit maruziyeti sonucu seminifer tübüllerinin çaplarında azalmaların görüldüğünü rapor etmişlerdir. Sıçanlar üzerinde yapılan bir diğer çalışmada ise diyet yoluyla verilen 50 ve 100 mg Bor/kg dozundaki boraksın doza bağlı olarak hayvanların karaciğer, testis ve epididimislerinin ağırlıkları ile seminifer tübüllerinin çaplarında azalmalara yol açtığı kaydedilmiştir (Dixon, 1979). Fail ve ark. (1989) 27 hafta boyunca 4500 ve 9000 mg/kg dozunda borik asit verilen hayvanlarda testiküler atrofi ve sperm üretiminde azalmaların oluştuğunu; 4500 mg/kg borik asit verilen grupta

fertilite azalırken, 9000 mg/kg borik asit uygulanan grupta fertilitenin tamamen kaybolduğunu ortaya koymuştur. Linder ve ark. (1990), Sprague - Dawley sıçanları üzerinde yapmış oldukları araştırmalarında ağız yoluyla verilen borik asitin (350 mg Bor/kg) sperm oluşumunu ve sperm morfolojisini olumsuz etkilediğini gözlemlemişlerdir. Treinen ve Chapin (1991), 28 gün boyunca diyet yoluyla alınan borik asitin (60 mg/kg) sıçan seminer tübüllerinde hasarlara yol açtığını rapor etmişlerdir. Ku ve ark. (1993) F-344 sıçanları üzerinde yaptıkları bir araştırmada 63 gün oral yolla 26 mg Bor/kg dozunda verilen borik asitin sperm salınımını inhibe ettiği ve testiküler atrofilere yol açtığı tespit edilmiştir.

İnsanların, hayvanlarda test edilen dozlarda bora maruz kalması pratikte mümkün değildir. Bu nedenle bu güne kadar insanlarda borun üreme üzerine toksik etkilerinin olduğunu gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Whorton ve ark. Amerika'da 753 boraks maden işçisinde yaptıkları epidemiyolojik çalışmalarla erkek işçilerin biyolojik fertilitelerini araştırmışlar ve maruziyet gruplarında maruz kaldıkları bor miktarına bağlı olarak fertilitede bir farklılık gözlemlememişlerdir (Whorton ve ark., 1994a; Whorton ve ark., 1994b). Türkiye'de Şaylı ve ark. (1998a) yaptıkları epidemiyolojik çalışmalarda erkek işçilerin fertilite durumunu çocuk sahibi olmalarına göre değerlendirmişlerdir. Bu çalışmalarda, 1068 aile yüksek bor maruziyeti ve 610 aile düşük bor maruziyeti olacak şekilde gruplandırılmış ve her iki grup arasında fertilitede bir farklılık olmadığı sonucuna varılmıştır. Türkiye'de yapılan bir diğer çalışma da 799 bor işçisinde infertilite oranı, düşük sayısı, erkek çocuk oranı, prematüre doğum gibi parametrelere bakılarak yürütülmüştür. Bu çalışmanın sonuçları da bor maruziyetinin, değerlendirilen fertilite parametreleri üzerinde herhangi bir advers etkisinin bulunmadığını desteklemektedir (Çöl ve ark., 2000). Son yıllarda Çin'deki bor madeni çalışanlarında (Xing ve ark., 2008; Robbins ve ark., 2010) ve Türkiye'de Bandırma Borik asit fabrikası çalışanlarında gerçekleştirilmiş (Duydu ve ark., 2011; Duydu ve ark., 2012) olan iki önemli çalışma vardır. Her iki çalışma sonucunda da bor maruziyetine bağlı üreme toksisitesi yüksek düzeyde bora maruz kalan işçilerde dahi gözlenmemiştir. Balıkesir Bandırma Borik Asit Fabrikası'nda yapılan çalışmada erkek işçilerde eksternal ve internal bor maruziyetini tanımlamak için biyolojik sıvılarda (kan, idrar, sperm), çalışma alanı

havasında, yemeklerde ve su kaynaklarında bor miktarları belirlenmiştir. Bora günlük en yüksek düzeyde maruz kalan grup için miktarın günde $14,45 \pm 6,57$ mg olduğu bulunmuştur. En yüksek düzeyde maruziyyetin gözlemlendiği bu seviye; deney hayvanlarında üremeye olumsuz etkilerin tespit edildiği düzeyden çok daha az olduğu görülmüştür. Sonuç olarak maruz kalınan günlük bor konsantrasyonlarına göre erkek işçilerin üreme sistemleri üzerine borun herhangi bir toksik etkisi bulunmamıştır. Kandaki LH, FSH ve total testosteron oranı; sperm konsantrasyonu, hareketliliği ve morfolojisi gibi sonuçlarda da herhangi bir toksisite bulunmamıştır. Bu durumun tersine fabrikada maruz kalınan dozlarda kandaki bor konsantrasyonu arttıkça, işçilerin sperm DNA'larındaki hasarın azaldığı görülmüştür (Duydu ve ark., 2011 ve Duydu ve ark., 2012).

Bora maruz kalan insanlarda yapılmış olan bazı epidemiyolojik çalışmalar yüksek oranda bor maruziyyetinin işçilerin sahip oldukları kız çocuk oranını artırdığını iddia etmektedir. Bu oranın değişip değişmediğini araştıran ve bora maruz kalmış insan sperm hücrelerinde Y:X oranını araştıran tek bir çalışma mevcuttur. Bu çalışma, bora yüksek oranda maruz kalan erkeklerin spermelerinde Y kromozomu oranının, daha çok kız çocuk sahibi olmaları yönünde farklılık yani Y kromozomunda azalma yönünde gösterdiğini iddia etmektedir (Robbins ve ark., 2008).

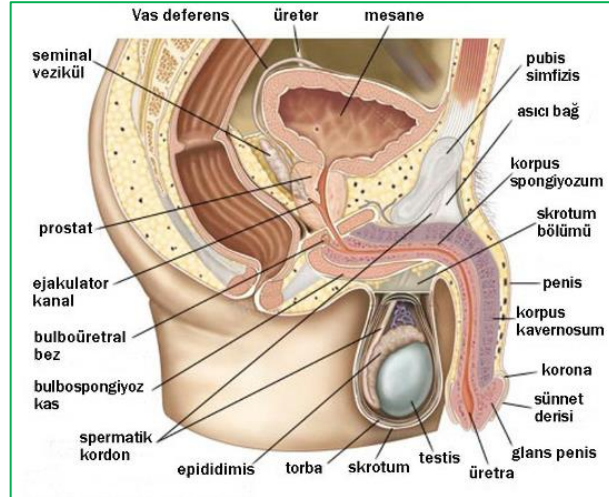
1.1.4. Borun Türkiye İçin Önemi

Dünyadaki bor rezervlerinin % 72'ine sahip olan ülkemiz için borik asit ve sodyum boratlar en önemli madencilik ihracat ürünlerindendir. Hayvan çalışmalarında borik asit ve sodyum boratların yüksek dozlarda üreme ve gelişim üzerinde olumsuz etkileri gösterilmiştir. Buna karşılık günümüzde insanlarda bor maruziyyeti ile ilişkili reproduktif veriler son derecede kısıtlıdır. Borik asit ve sodyum boratlar hayvan deneylerinde yüksek dozlarda ortaya çıkan üreme fonksiyonu üzerindeki toksik etkileri nedeniyle Avrupa Birliği, "General classification and labeling requirements for dangerous substances and preparations (67/548/EEC)" kapsamında kategori 2 altında sınıflandırmıştır. Avrupa Birliğinin bu konudaki

yönetmelikleri uyumlaştırma kapsamında borik asit ve sodyum boratlar, Maddelerin ve Karışımların Sınıflandırılması, Etiketlenmesi ve Ambalajlanması Yönetmeliği (Classification, Labeling and Packaging - CLP)'ne göre kategori 1B altında insan üremesi ile ilgili muhtemel toksikan (presumed human reproductive toxicant) olarak sınıflandırılmaktadır. Kategori 1A ve 1B altında sınıflanmış olan kimyasal maddelerin kullanımının izne tabi olması dünyadaki bor rezervlerinin %72'sinden fazlasına sahip olan ülkemizin borik asit ve sodyum borat ihracatında önemli kurallar ve kısıtlamalar ile karşılaşmasına neden olmaktadır.

1.2. Erkek Üreme Sistemi

Memelilerde erkek üreme sistemi, birlikte çalışan ancak farklı görevlere sahip olmakla beraber, asıl görevleri spermatozoon üretmek, beslemek, geçici olarak depolamak ve bunları dişi üreme organına bırakmak olan birçok organdan oluşur. Bu organlar testis, epididimis, vas deferens, salgı bezleri (seminal veziküller ve prostat) ve penistir (Hebert ve ark., 1995). İnsan testis ve epididimis yapısı Şekil 1.3'de gösterilmektedir.

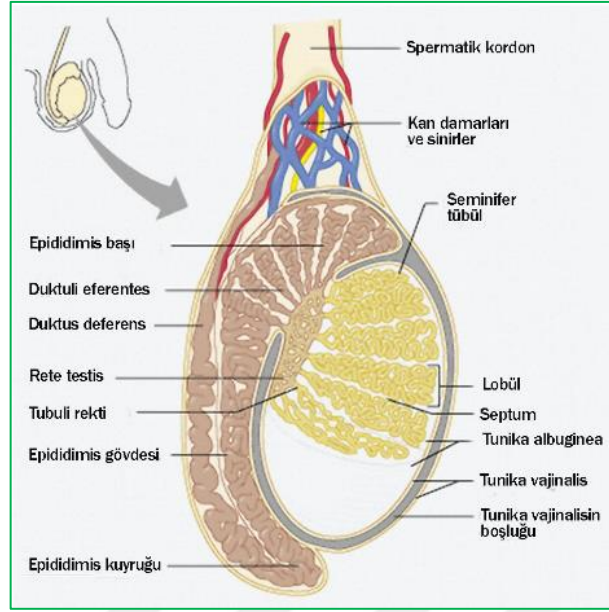


Şekil 1.3. Erkek üreme sistemi (Marieb, 2001).

1.2.1. Testisler

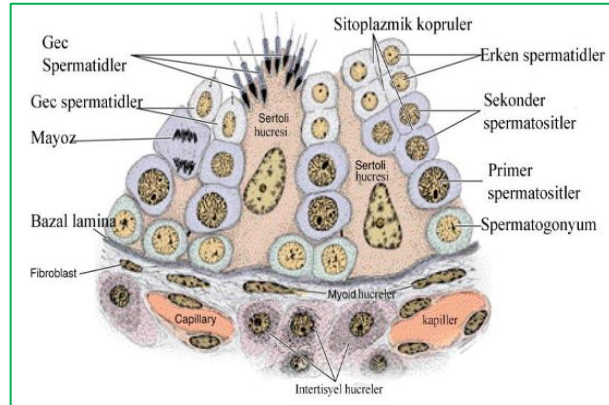
Testis, epididimis ve duktus deferensin başlangıç kısmı tunika vaginalis denilen mezotelyum döşeli boşluğu içine skrotal kese içerisinde yerleşir. Bu şekilde bir yerleşim testislerin normal spermatogenez için gerekli vücut ısısı olan 34 – 35 °C arasında olmalarını sağlar. Testisler, tunika albuginea adı verilen kalın bağ dokusu kapsülü ile sarılmıştır. Testislerin arka yüzünde kalınlaşan tunika albuginea mediastinum testisi meydana getirir. Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar bezi testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırır. Bu bölmeler aralarında ilişki içerisinde. Her bölmede gevşek bağ dokusu ile sarılı 1 - 4 seminifer tübül bulunur. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve Leydig hücrelerinden oluşur (Jangueria ve ark., 1998). Leydig hücrelerinin görevi steroid yapıda bir hormon olan testosteron salgılanmasıdır (Jiang ve ark., 2014).

Seminifer tübüller, spermatozoonların üretildiği yerdir. Testiste, 150 - 250 µm çapında ve 30 - 70 cm uzunlukta olan 250 - 1000 kadar seminifer tübül bulunur. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçlu olan tübüller kıvrımlı yapıya sahiptir ve sonlanırken lumeni daralır. Tübüller, kısa segmentler (tübüli rekti) veya düz tübüller şeklinde uzar. Düz tübüller, seminifer tübülleri rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlar. Rete testis, 10 - 20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmını bağlanır (Şekil 1.4) (Ross ve Romrell, 2006).



Şekil 1.4. Testisin yapısı (Marieb, 2001).

Seminifer tübüller; bazal lamina, kompleks bir seminifer veya germinal epitel ve fibröz bir bağ dokusu kılıfından meydana gelir. Sertoli hücreleri ve spermatogonik seriyi (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler) oluşturan hücreler seminifer tübül epitelini meydana getiren hücrelerdir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Seminifer tübül epiteli: Sertoli ve spermatogonik seri hücreleri ve spermatogenez (Jangueria ve ark., 1998).

Sertoli hücrelerinin önemli fonksiyonları vardır. Bunlar:

1. Spermatozoların beslenme ve korunmasının sağlar.

2. Fagositoz: Sertoli hücrelerinin lizozomları spermiyogenez sırasında artık cisimcikler şeklinde atılan spermatid stoplazmasının artık cisimlerinin fagositozunu gerçekleştirilir.
3. Salgı: Sertoli hücreleri spermilerin taşınmasında kullanılan bir sıvı salgılar. Bu sıvı sürekli olarak seminifer tübüllerden genital kanallar yönünde akar. FSH ve testosteron kontrolü altında Androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılar. ABP, spermatogenezde gerekli testosteronun seminifer tübüllerin içerisinde yoğunlaşmasını sağlar. Ayrıca Sertoli hücreleri testosteronu östradiole çevirebilir. Son olarak Sertoli hücreleri FSH'ın sentezini ve salgılanmasını engelleyen bir peptid olan inhibin salgılar.
4. Anti - Mülleriyan hormon yapımı: Bu hormon embriyojenik gelişme sırasında görev alan bir glikoproteindir. Amacı erkek fetusta Müller kanallarının gerilemesini sağlamaktır.

Sertoli hücreleri hayvanlar ve insanlarda üreme dönemi boyunca bölünmeden kalırlar. Sertoli hücreleri yetersiz beslenme, radyasyon ve enfeksiyon gibi olumsuz etkilere karşı çok dirençlidir. Stoplazmalarında bol miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri, lizozom ve vimentin, aktin ve mikrotübüllerden oluşan zengin bir hücre iskeletine sahiptirler. Bazolateral bölgelerinde Sertoli hücreleri komşu diğer Sertoli hücreleri ile spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bazolateral sıkı bağlantılar, seminifer epiteli bazal ve ad luminal kompartman olmak üzere iki kompartmana bölerler. Spermatogonyumlar ve erken birincil spermatositler, bazal kompartmana yerleşirler. Bazal kompartman içerisine kanda bulunan maddeler girebilir. Spermatogenez sırasında spermatogonyum seri hücreleri boşluklardan geçerek ad luminal kompartmana çıkarlar (Jangueria ve ark., 1998; Ross ve Romrell, 2006).

Spermatogonyumlar farklılaştıkça sperme özgü proteinler meydana gelir. Bağışıklık sisteminin gelişmesinden uzun bir süre sonra cinsiyet olgunlaşması gerçekleşmesi sebebiyle spermatogenez sırasında farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir. Bunun sonucu gelişen immün yanıt germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilir. Farklılaşarak gelişen germ hücreleri ve immün sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimin bertaraf edilebilmesi için sperm ve Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantıların oluşturduğu kan - testis bariyeri mevcuttur. Sertoli hücrelerinden meydana gelen bariyer sonucu seminifer tübüllerin epiteli oluşabilecek bir otoimmün reaksiyonlardan korunur. Seminifer tübüllerin içi ve kan arasında bir bariyerin varlığı, kandan çok az miktarda maddenin geçmesini sağlar. Böylece erkek üreme hücreleri kandan gelebilecek olan zararlı kimyasallara karşı korunmuş olur (Pelletier ve ark., 1997). Sertoli hücrelerinin tepesindeki ve yanındaki kenarlarda bulunan derin girintilerine spermatositler ve spermatidler yerleşmişlerdir. Spermatidlerde bulunan kuyruklar (flagellalar) geliştikçe; Sertoli hücrelerinin tepe bölgelerinden uzayan saçaklar püsküller gibi çıkıntılar şeklinde görülürler. Germ hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi gap junction olarak adlandırılan Sertoli hücreleri ile birleşme yerlerinde gerçekleştirilir. Bu seminifer epitelyum döngüsünün koordinasyonu için önemli bir olaydır.

Spermatogenik seri hücreleri 4 - 8 tabaka halinde bazal lamina ve tübül lümenine yerleşmişlerdir. Spermatogenik seri hücreleri belirli sayıda bölünmeden sonra farklılaşarak spermatozoonları oluşturur. Bu olaya spermatogenez adı verilir. Testosteron hormonu spermatogenezi uyarırken, östrojen ve progesteron hormonu süreci inhibe eder (Jangueria ve ark., 1998; Ross ve Romrell, 2006).

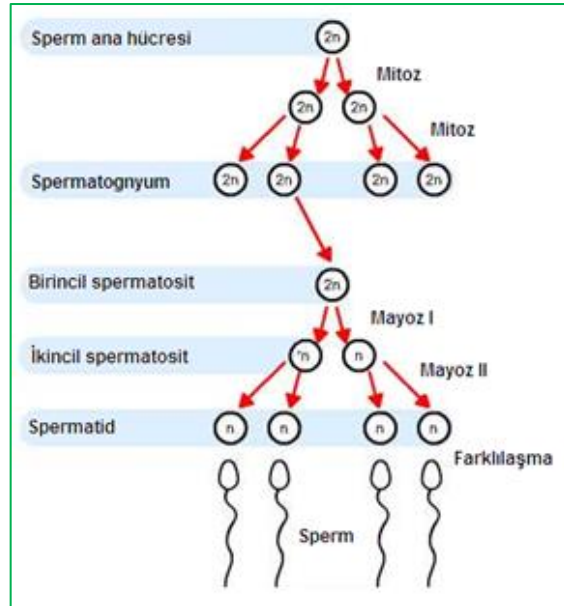
Epididimis spermilerin depolandığı, dolayısıyla memeli erkek üreme sisteminin çok önemli bir parçası olan bir organdır. Baş (caput), gövde (corpus) ve kuyruk (cauda) olmak üzere üç kısımdan oluşur. Testiste oluşan spermatozoonlar caput epididimise girerler ve cauda epididimise geçip burada depolanırlar. Spermatozoonlar epididimise, Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilen; steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içeren testiküler sıvı ile taşınır. Girişte olgunlaşması ve motilitesi tam olmayan sperm bu taşınma

esnasında hareket yeteneği kazanırlar ve vas deferense peristaltik hareketlerle taşınırlar. Spermier ejakülasyon esnasında vas deferenstan üretraya aktarılır (Jangueria ve ark., 1998; Jones, 1999).

1.2.2. Spermatogenez

Spermatogenez erkek üreme hücrelerinin çoğaltılma ve farklılaştırılma sürecidir. Sperm ana hücresi olan spermatogonyal kök hücrelerin bölünmesi ve farklılaşması ile başlar. Daha sonra birbirini takip eden spermatositogenez, mayoz ve spermiyogenez evreleri ile devam eder (Huleihel ve ark., 2007).

Spermatositogenez olarak adlandırılan ilk evrede spermatogonyumlar ardı ardına iki mitoz bölünme sonucunda spermatositleri meydana getirir. Sonraki evre spermatositler peş peşe iki bölünme geçirir. Böylelikle kromozom sayıları ve DNA miktarı eşit olarak her hücrede yarıya iner. Spermatidlerin oluştuğu bu evreye mayoz evresi denilir. Son evre olan spermiyogenez evresin de ise spermatidler hücre farklılaşma süreci geçirerek spermatozoonları oluşturur (Abraham, 2002).



Şekil 1.6. Spermatogenez.

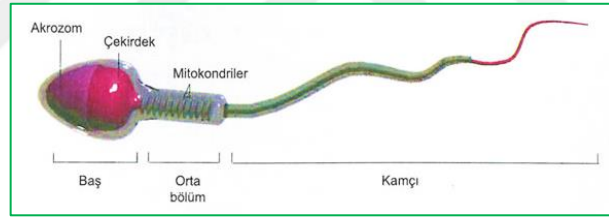
Spermatositogenez; spermatogonyum hücresi ile başlar. Spermatogonyumlar, diploid, yaklaşık 12 µm çapında, bazal lamina ile doğrudan ilişkide olan spermatogenik hücrelerdir. Bulundukları konum kan - testis bariyerinin dışıdır. Spermatogonyal kök hücreden köken alırlar ve cinsiyet olgunlaşmasıyla bu hücreler bir seri mitoz geçirirler (Abraham, 2002). Sağlıklı yetişkin insanlarda yenilenme ve çoğalma şekillerine göre 3 tip spermatogonyum tanımlanmıştır. Bunlar koyu tip A spermatogonyum (koyu renkli boyananlar), açık tip A spermatogonyum (soluk renkli boyananlar) ve tip B spermatogonyumlardır (Clermont, 1966). Spermatogenik serinin kök hücreleri tip A spermatogonyumlardır. Ayrıca tip B spermatogonyuma farklılaşabilen açık tip A spermatogonyuma da bölünebilirler. Tip B spermatogonyumlar mitoz bölünme sonucu birincil spermatositleri oluştururlar. Birincil spermatositler mayoz bölünmenin profaz evresinde DNA sentezinin tamamlanması ile tetraploid hale gelirler. Herbir birincil spermatosit birinci mayoz bölünmeyi geçirerek iki adet diploid ikincil spermatositi meydana getirir. İkincil spermatositlerde belirgin bir DNA sentezi olmayan, sadece tamir DNA sentezinin meydana geldiği ikinci mayoz bölünmeye girer. İkinci mayoz bölünme sonucu her bir ikincil spermatosit iki tane haploid spermatid meydana getirir (Abraham, 2002).

Spermatositler, seminifer tübülün ad luminal kompartmanında Sertoli hücrelerinin aralarındaki sıkı bağlantıların üzerinde yer bulunur. Mayoz bölünmeler kan - testis bariyerinin içerisinde vuku bulur. Spermatogonyumlar bölünürken meydana gelen hücreler tamamen ayrılmaz. Bu hücreler sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlıdır. Tek bir spermatogonyumdan köken alan her birincil ve ikincil spermatositle, spermatid arasındaki iletişim bu köprüler yardımıyla sağlar. Spermatogenezdeki olaylar zincirinin düzenlenmesinde hücreden hücreye bilgi aktarımına mücade etmesi sebebiyle önemli bir rol oynarlar. Spermatogenez sona erdiğinde sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülür. Bunun sonucu spermatidler arasında ayrılma gerçekleşir (Şekil 1.5. Seminifer tübül epiteli: Sertoli ve spermatogenik seri hücreleri ve spermatogenez) (Abraham, 2002).

İnsanda spermatogenezin süresi yaklaşık olarak 64 gündür ve her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez. Spermatogenez aynı zamanda farklı aşamalarda

(dalgalanma) şeklinde gerçekleşir. Bu nedenle sağlıklı testis dokusunun histolojik incelenmesi esnasında seminifer tübüller düzensiz bir şekilde gözlemlenir. Bu durum seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonlar varken neden diğer kısımlarda yalnız spermatidlerin olduğunun sebebidir. Seminifer epitelyum döngüsü germinal epitelyumda belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her bir döngü yaklaşık 16 ± 1 gün sürer ve spermatogenez 4 döngüden sonra sona erir (Abraham, 2002).

Spermatogenez sonrası görülen spermiyogenez, spermatidlerin farklılaşarak özelleşmiş hücreler olan spermatozoonlara (olgun sperm hücresi) dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatitten olgun sperm oluşumuna kadar geçen süreç Sertoli hücresi sitoplazmasında gerçekleşir (Abraham, 2002). Bu gelişim ve farklılaşma evreleri golgi, başlık, akrozomal ve olgunlaşma (matürasyon) fazı şeklindedir.



Şekil 1.7. Olgun sperm hücresi ve kısımları.

Olgun sperm hücrelerinin somatik hücrelerden iki temel farkı vardır. Bu farklar protaminasyon ve DNA tamirinden yoksun olmalarıdır. Spermiyogenezin ilk evrelerinde n kromozomlu (haploid) spermatidler tipik bir nükleozomal kromatin yapısındadırlar. Başlangıçta bol miktarda ribozomal olmayan RNA transkripsiyon aktivitesine sahipken spermiyogenez ilerledikçe kromatin yapısı yerini düz kromatin liflerine bırakır. Yanyana iplikçikler şeklinde toplanan kromatinler artık transkripsiyon yapmazlar. Spermatozoonlar da DNA tamirinin olmaması epididimiste taşınmaları ve/veya ejakülasyon sonrasında oluşabilecek herhangi bir hasarın tamir edilemeyeceği anlamına gelir. Buna karşın DNA hasarına sahip bir sperm hücresi dölleme yeteneğini henüz kaybetmemiş olabilir. Bu durum fertilité için son derece önemlidir (Gonzales – Marin ve ark., 2012). Genetik olarak hatalı

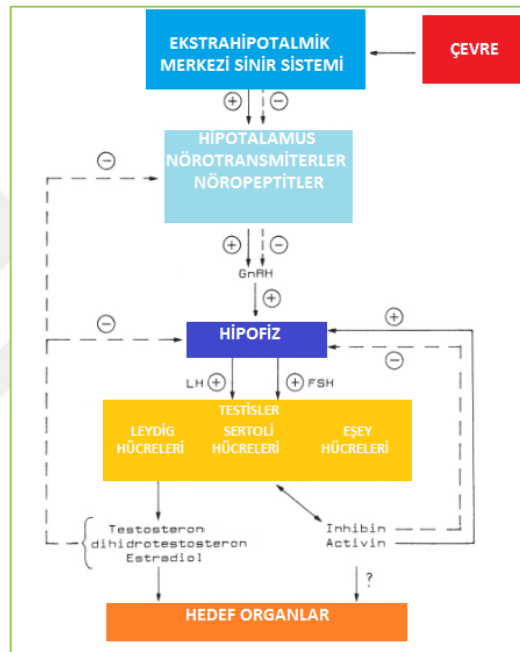
hücrelerin embriyo oluşturmalarını engellemek için tek mekanizma apoptozis ile yok edilmesidir (Singh ve ark., 2003). Yetişkin erkek ratlar üzerinde yapılan çalışmalar apoptozis ile germ hücrelerinin yaklaşık % 75'e kadar ortadan kaldırılabilceğini göstermiştir. Spermatogenez sırasında olağan ve sürekli germ hücresi ölümü gerçekleşmektedir. Spermatogenez sürecinde apoptozisin iki önemli amacı vardır. Bunlar morfolojik ve/veya genetik olarak hatalı olan germ hücrelerinin yok edilmesi ve Sertoli hücrelerinin destekleme kapasitesi kadar hücre popülasyonunun sağlanmasıdır (Huckins, 1978). Enfeksiyon durumu olmadığı halde seminal sıvıda lökosit hücrelerinin varlığı apoptoza uğramış olan germ hücrelerini ortadan kaldırmak için olduğu düşünülmektedir (Ricci ve ark., 2002). Spermatogenez ve spermiyogenez sırasında kromozomal proteinler üzerinde yapılan araştırmalarda, spermatosit ve erken evre spermatid kromatinleri üzerinde önce somatik histonların bulunduğu görülmüştür. Daha sonra bunlar testise özgü histonlar ile ve ileri evre spermatidlerde TP1 ve TP2 geçiş (transition) proteinleri ile yer değiştirmektedir. En son olarak geçiş proteinleri; arjinin ve sistein aminoasitlerince zengin, küçük pozitif yüklü proteinler olan protamin P1 ve P2 proteinleri ile yer değiştirmektedir (Nanassy ve ark., 2011). Bu değişim ve paketlenme sonucu sperm hücrelerinin DNA'sı vücut hücrelerine göre 6 kat daha yoğun ve yaklaşık 1:40 daha az hacim kaplayacak hale gelirken depolanması ve genital sistemde taşınması kolaylaşır. Fertilizasyon öncesi ekzojen ajanların genetik materyale ulaşma ihtimali minimize edilmiş olur. Ayrıca genomun transkripsiyonel olarak inaktif tutulması sağlanır (Singh ve ark., 2003).

Endokrin sistem hormonları ve testiküler parakrin/otokrin büyüme faktörleri spermatogenezin düzenlenmesinden sorumludur. Bu faktörler Sertoli hücreleri, germ hücreleri, peritübüler hücreler, Leydig hücreleri ve makrofajlar tarafından üretilir. Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde bulunan germ hücreleri arasındaki sayısal oran ve etkileşim başarılı bir spermatogenez için önemlidir (Huleihel ve ark., 2007).

1.2.3. Üremenin Hormonal Kontrolü

Reproduktif performans için gerekli olan cinsiyet hormonlarının fizyolojik miktarlarda salgılanmasının kontrol edilmesi ve sağlıklı spermatogenetik hücrelerin

oluş ve olgunlaşmasını sağlanması hipotalamo - hipofizer - testiküler aks ile gerçekleştirilir. Erkeklerde bu aks hipotalamus, ön hipofiz ve testis olmak üzere üç kompartmandan oluşur. Hipotalamusta peptid hormon yapısında olan GnRH (gonadotropin salgılatıcı hormon) sentezlenir. Bu hormon kısa bir portal venöz sistem ile hipofize taşınır. GnRH hipofizde LH (luteinleştirici hormon) ve FSH (folikül uyarıcı hormon) sentezini ve salınımını uyarır (Şekil 1.8. Hipotalamo - hipofizer - testiküler aks). Bu iki hormon genel dolaşıma katılarak testislere ulaşırlar. Testislerde gonadal steroid sentezini ve spermatogenezi uyarırlar.



Şekil 1.8. Hipotalamo - hipofizer - testiküler aks (Swerdloff ve Wang, 1997).

Hipotalamus, anteriorda optik kiazma, posteriorda mamiller cisimler, lateralde temporal lob ve superiorda talamus ile bağlantılıdır. Hipotalamus, merkezi sinir sisteminin nöral mesajları ve testislerin hormonal mesajları ile GnRH salgılar. Bu nedenle hipotalamus, hipotalamus - hipofiz - testis aksının en önemli elemanlarından birisidir. GnRH kısa bir döngü ile otonegatif geri beslenme yoluyla kendi salgılanmasını inhibe eder. GnRH hipotalamusta nörosekretuar nöronlarda sentez edilir. GnRH çift taraflı akım özelliğine sahip mikrovasküler portal dolaşım yardımıyla pulsatil salgılanır. Yaklaşık salınım hızı 70 - 90 dakikada bir atım hızıdır. Kandaki yarılanma ömrü 2 - 5 dakika kadardır. Buradan hipofize gelen GnRH

fonksiyonel bakımdan LH ve FSH'nin pulsatil salınımına neden olur. GnRH'nin pulsatil salınımı önemlidir. Pulsatil olmayan GnRH salınımı gonadotropinler üzerinde uyarıcı değil; tam tersi inhibitör etki yapmaktadır. GnRH'nin ritmik salınımı üç farklı şekilde gözlemlenir. İlki; haziran – temmuz aylarında GnRH seviyesinin en üst düzeye çıkması ile sonuçlanan mevsimsel salınımdır. İkinci olarak; sabah erken saatlerde en yüksek seviyeye çıkmasıdır. Bu durumun melatonin ile ilişkili olduğu düşünülen sirkadyen ritim sayesinde gerçekleştiği tahmin edilmektedir. Üçüncü ve son olarak; 90 ile 120 dakika arayla GnRH pulsatil ritim ile salınır. Bu salınım esnasında pulsatil atım sıklığındaki değişiklikler, periferik dolaşımdaki LH ve FSH oranını etkilemektedir. Kısa aralıklarla GnRH salınımı, LH/FSH oranını artırırken; uzun aralıklarla GnRH salınımında, bu oran azalmaktadır.

LH ve FSH, anterior hipofizdeki bazofilik gonadotropik hücrelerden salgılanan, glikoprotein yapısında olan iki kritik heterodimerik hormondur. Alfa ve beta olmak üzere iki polipeptit zincir içermektedir. Kovalent olmayan bağlarla alfa ve beta altbirimleri bağlanarak aktif heterodimerik gonadotropik molekülü oluştururlar ve reseptör aracılığıyla etki gösterirler. Endoplazmik retikulumda sentezlendikten sonra bazı modifikasyonlar oluşur. Bu modifikasyonlar bir takım oligosakkarit komponentlerinin ilave edilmesi veya çıkarılması şeklindedir. Ayrıca LH molekülünde terminal karbonhidrat, sialik asit ve sülfat ilaveleri biyokimyasal izoform oluşturmaktadır. Gonadotropinler hipofizden episodik olarak salgılanırlar. LH, erkeklerde 60 - 120 dakika arayla salgılanır. Bir günlük LH salınımına bakılınca sabah erken saatlerde, ilerleyen saatlere göre % 5 - 15 daha yüksek serum seviyeleri görülür. LH'nin yarı ömrü 1 saattir. Erkeklerde hipotalamik GnRH salınımı ile LH salınımı ve testiküler testosteron salınımları arasında uyum vardır. Erkeklerde LH salınımı testosteron tarafından inhibe edilir. Diğer androjenler ve östrojenler de LH salınımını inhibe edebilir. FSH, Sertoli hücrelerini uyararak seminifer tübül epitelindeki spermatogenezi uyarır. Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin B ise FSH salgısını baskılar. Follistatin, testis ve hipofizden salgılanarak, yüksek derecede aktivin bağlayıcı protein olarak fonksiyon görür. Böylece dolaylı olarak FSH salınımı inhibe eder. Ayrıca aktivin de Sertoli hücresi ve hipofizden salgılanarak FSH sekresyonunu uyarır. Hipofizden gonadotropinlerin dışında PRL (prolaktin)

hormonu da salgılanmaktadır. PRL salınımı dopamin ile inhibe edilir. Hipotalamustan salgılanan TRH (tirotropin salgılatıcı hormon) ve VIP (vasoaktif intestinal peptit) ise hipofizden prolaktin salınımını uyarır. PRL, hipotalamustan GnRH ve hipofizden gonadotropik hormonların salınımını inhibe ederek; dolaylı olarak testiküler fonksiyonları etkilemektedir. Ayrıca doğrudan Leydig hücrelerine ve testislere de etki etmektedir (Vale ve ark., 1977; Kalra ve Crowley, 1984; Ying, 1988).

Testosteron erkeklerde testislerde Leydig hücreleri ve kadınlarda yumurtalıklarda üretilen androjen grubundan bir steroid hormondur. Testosteron aynı zamanda her iki cinsiyette adrenal bezlerde de üretilir. Kadınlardaki testosteron üretimi erkeklerin yaklaşık % 5'i kadardır. Hipotalamusta üretilen gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ile kontrol edilen hipofiz bezi LH hormonu salgılayarak, testislerin Leydig hücrelerinden testosteron yapımını uyarır (Kartalıcı, 2010) (Şekil 1.8. Hipotalamo - hipofizer - testiküler aks).

Testosteron erkeklerde prenatal hayatta skrotum oluşumunu, prostat, seminal veziküller ve fallik mesanenin gelişmesini ve doğumdan sonra cinsiyet organlarının özellikle de penisin gelişimini sağlar (Brook, 1999). Ergenlikte ikincil cinsiyet karakterleri olarak bilinen ses kalınlaşması, yüz ve vücudun diğer bölgelerinde kıllanmanın oluşmasını sağlar. Spermatogenezi başlatır (Sinisi ve ark., 2003). Anabolik etkilerinin arasında kas kitlesini ve gücünü artırmak, kemik yoğunluğu ve gücünü artırmak, uzamayı sağlamak ve kemik olgunlaşmasını sağlamak sayılabilir (Jiang ve ark., 2014). Her iki cinsiyette de libidonun ve enerjinin artmasını sağlar (Bain, 2007). Eritrosit üretiminde rolü vardır (Shahidi, 1973).

1.2.4. Sperm DNA Bütünlüğünü Etkileyen Faktörler

Sperm DNA bütünlüğünün bozulması sonucu fertilizasyon başarısında azalma, düşük embriyo kalitesi, düşük gebelik oranı ve düşük riskinde artış görülmektedir (Zhang ve ark., 2013). Sperm hücrelerinde görülen DNA hatalarının oluşum nedenleri hakkında üzerinde durulan 3 temel mekanizma vardır. Bunlar:

1. İntresik faktörler: Sperm kromozom paketlenmesi sırasında ortaya çıkan hatalar, yetersiz protaminasyon ve replikasyon hataları.
2. Ekstrinsik faktörler: İlerlemiş baba yaşı, yetersiz kalorili diyet, çevresel kirlleticiler, pestisit maruziyeti, sigara kullanımı, varikosel, kanser, hipertermi, hava kirliliği, genital sistemde ortaya çıkan enfeksiyonlar sonucu artmış oksidatif stress.
3. Başarısızlıkla sonuçlanan apoptozisdir (Schulte ve ark., 2010).

1.3. Kromozom Anomalileri

Kromozomlarda görülen anomaliler yapısal ya da sayısal kromozom anomalileri olmak üzere iki şekildedir. Yapısal kromozomal anomalileri delesyon, inversiyon, bir kromozomun bir kısmının dublikasyonu ya da bir kromozomun diğer kromozoma bir parçasının translokasyonunu ve ring kromozom yapısını içerir. Sayısal kromozom anomalileri anöploid (bir ya da daha fazla kromozomun ilavesini veya delesyonunu içeren hücreler) ya da poliploid (tüm kromozomların multipl kopyalarını içeren hücreler) olarak sınıflandırılır (Özçelik, 1999).

1.3.1. Kromozom Yapısı Mutasyonları

1.3.1.1. Delesyon

Kromozoma ait küçük bir parçanın koparak uzaklaşmasıdır. Bu durum iki farklı şekilde gerçekleşebilir. Birincisi; darbe sonucu kromozomun terminal parçası koparak kromozomdan ayrılır. Bu duruma terminal delesyon denir. İkinci durumda ise iki darbe neticesinde kopan parça uzaklaştıktan sonra kromozomun iki parçası yeniden kaynaşır. Bu duruma ise insersiyonel delesyon denilir. Terminal delesyon pek mümkün görülmemektedir. Çünkü kopan uç yapışkan uç halini alır ve delesyondan sonra translokasyon gerçekleşme ihtimali çok yüksektir (Özçelik, 1999).

1.3.1.2. İnverson (Ters Dönme)

Bir kromozoma gelen iki darbe neticesinde kopan parçanın delesyona uğramadan kendi ekseni etrafında 180 derece dönerek yine eski yerine yapışması olayıdır. Perisentrik ve parasentrik inverson olmak üzere iki farklı şekilde gerçekleşebilir. Kromozomun uzun ya da kısa kollarının herhangi birisinde kırılma olan sentromerlerin dışındaki ters dönmelere parasentrik inverson denir. Bunun sonucunda kromozomun görünümü değişmez fakat gen sırası değişir (Özçelik, 1999).

Perisentrik inverson, iki darbenin kromozomun kısa ve uzun kollarına gelmesi ve kırılan parçanın sentromeri de içermesi durumudur. Kırılan parçanın kendi ekseni etrafında 180 derece ters dönerek yapışması sonucu hem gen sırası hem de kromozomun yapısı değişir (Özçelik, 1999).

1.3.1.3. Duplikasyon

İki darbe sonucu homolog iki kromozomdan birinden kopan parça diğerinde tek darbe sonucu kopan boşluğa girerek kaynaşırsa duplikasyon gerçekleşir. Duplikasyon daha çok mayoz bölünme sırasında eşit olmayan krossing-over sonucu oluşur. Duplikasyon kendini iki şekilde gösterir. Tandem duplikasyonda genler ardı ardına dizilirken ters tandem duplikasyonda artan parça kendi ekseni etrafında ters dönerek yeni yerine eklenir (Özçelik, 1999).

1.3.1.4. Translokasyon

Heterolog iki kromozomdan birinden kopan bir parçanın diğerinin kırılan parçasının üzerine yapışmasıdır. İki grup içerisinde incelenebilirler. Birinci tip homolog yada homolog olmayan iki kromozom arasında kopan parçaların karşılıklı yer değiştirmesi olayıdır. Resiprokal (karşılıklı) translokasyon denir. İkinci tip translokasyonda ise akrosentrik kromozomlar arasında kromozomların birinde

sentromere yakın kısa kolda diğesinde ise sentromere yakın fakat uzun kolda birer kırılma olur. Sonra iki kromozomun uzun ve kısa kolları birleşerek translokasyon kromozomlarını oluştururlar. Ayrıca bu tip translokasyona sentrik kaynaşma tipi translokasyon veya Robertsonian translokasyon denmektedir (Özçelik, 1999).

1.3.1.5. Yüzük (Ring) Kromozom

Bir kromozomun iki ucunda oluşan iki kırılma sonucunda, kırık uçların birbiri ile kaynaşması sonucunda halka şeklinde bir kromozom oluşur. Bu kromozoma yüzük veya ring kromozom denir (Özçelik, 1999).

1.3.2. Kromozom Sayısı Mutasyonları

1.3.2.1. Öploidi

Kromozomlardaki sayısal düzensizlikler olarak bilinirler. İnsan eşey hücrelerinde haploid sayı da bulunan 23 adet kromozomun haploid sayının tam katları kadar ($n=23$ ve $3n, 4n, 5n \dots$) artması olayıdır (Özçelik, 1999).

1.3.2.2. Anöploidi

Temel kromozom sayısının tam katları kadar olmayan artma ya da eksilmelere denir ve görülme sıklığı öploididen daha fazladır (Özçelik, 1999).

1.4. Sperm DNA Bütünlüğünün Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Sperm DNA bütünlüğünün ve sağlıklı spermelerin tespitinde birçok doğrudan ve dolaylı yöntemler kullanılmaktadır. Dolaylı yöntemler meni analizleri (sperm konsantrasyon, motilite, morfoloji gibi meni analizleri) ve sperm fonksiyon testleridir (anti- sperm antikör testi, akrozom reaksiyonu testi, hemizona bağlanma testi, sperm penetrasyon testi). Doğrudan yöntemler yapısal ve sayısal kromozomal anomalilerin

tespiti için kullanılan sperm karyotipleme ve floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) teknikleridir. Sperm DNA fragmentasyonlarının doğrudan incelenmesinde COMET, “DNA Breakage Detection - Flourescence *in situ* Hybridization (DBD - FISH)” testi, akridin oranj testi, toludin mavisi testi, TUNEL yöntemi, “*in situ* Nick Translation (ISNT)” yöntemi, halosperm testi, “Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA)”, “Sperm Chromatin Dispersion (SCDt)” testi kullanılmaktadır (Zhang ve ark., 2013). Tüm bu yöntemlerin sperm DNA’sının durumu hakkında bilgiler vermesine karşın; DNA hasarının döllenme üzerine olan etkisi yumurta hücresindeki DNA tamir enzimlerinin erken evre embriyoda devreye girmesiyle daha da karışık hale gelmektedir (Gonzales – Marin ve ark., 2012).

1.4.1. Floresan *in situ* Hibridizasyon (FISH) Yöntemi

Floresan problemlerin uygulandığı doku ve hücre örneklerinde translokasyon, inversiyon, delesyon ve diğer yapısal ve sayısal kromozom anomalileri gibi özgün DNA veya RNA dizilerinin belirlenmesi için kullanılan birçok teknikten biridir. Hem bölünen hem de bölünmeyen hücrelere uygulanabilir (Wagner ve ark., 2003).

FISH yönteminde nükleik asit dizileri kendi hücresel ortamlarında farklı renklerde işaretli problemler kullanılarak görüntülenebilir. Bu sayede hücredeki hedef nükleik asit dizisi belirlenir (Emanuel, 1993). Prob, belirlenmek istenen nükleik asit dizisine eşlenik olan ve tanımlayıcı amaçla seçilen tek iplikli özgün nükleik asit dizileridir (Bishop, 2010). DNA’nın üç boyutlu yapısı bozulmaksızın interfaz nükleusunda ve metafaz kromozomlarında DNA dizilerinin yerinin saptanması, kullanılan probun uzunluğuna ve yapısına bağlı olarak belli bir türün tüm genomunu, p terminalden q terminale dek kromozomları, kromozomlardaki tekrarlayan bölgeleri ya da tek kopya dizileri belirlenebilir. FISH yöntemi, kromozom haritalanmasında, kromozomların ve genomun yapı, işlev ve evriminin araştırılmasında, kromozomların yapılarının ve kromozomal hatalarının incelenmesinde, gen ifadesinin araştırılmasında, cinsiyet belirlenmesinde, dokulardaki bakteri ve virüslerin tanımlanmasında, onkogenlerin ve transformasyon dizilerine ait konumların belirlenmesinde kullanılabilir. Günümüzde işaretleme molekülleri ile

floresan maddelerin satışa sunulmuş olması, yöntemin kolay ve güvenilir olarak uygulanabilmesi, floresan mikroskopların gelişmesi, FISH tekniğinin biyolojide yaygın olarak kullanılmasına temel olmuştur (Trask, 1991).

ACM - FISH (Alpha Centromere Multicolor - FISH), Arm - FISH (Chromosome Arm - FISH), CAT - FISH (Cellular Compartment Analyses of Temporal Activity by FISH), CO - FISH (Chromosome Orientation - FISH), CARD - FISH (Catalyzed Reporter Deposition - FISH), CB - FISH (Cytochalasin B - FISH), COBRA - FISH (Combined Binary Ratio - FISH), COD - FISH (Chromosome Orientation and Direction - FISH), COMET - FISH, D - FISH (Detection of Translocation - FISH), COMBO - FISH (Combinatorial Oligonucleotide - FISH), cryo - FISH, DBD - FISH (DNA Breakage Detection - FISH), Halo - FISH, Flow - FISH, e - FISH gibi birçok modifiye şekli bulunmaktadır (Volpi ve Bridger, 2008)

1.4.2. FISH Yönteminde Kullanılan Problar

FISH yönteminde prob seçimi son derece önemlidir. Seçilen prob belirlenmek istenen kromozomal bölge veya DNA dizisine özgü olmak zorundadır. Problar, hedef DNA veya RNA molekülüne karşı tamamlayıcı özellikteki floresan kimyasallarla işaretlenmiş birer nükleik asit dizileridir. Günümüzde florokromlarla doğrudan işaretli problar kullanılmaktadır. Bu problar pratik ve ticari olarak satıldığı için sık tercih edilmektedir. Özellikle hematolojik malign hastalıkların teşhisinde kullanılan çok sayıda sentromere özgü, lokusa özgü ve translokasyon durumuna özgü prob mevcuttur. Ayrıca, tüm kromozomlara özgü, telomer ve α -satellit bölgelere işaretleyebilen problarda vardır. Günümüzde kullanım şekilleri ve özelliklerine göre hazırlanmış ticari olarak satılan tek ve/veya çift renkli, üç ve/veya beş farklı renkli işaretli prob setleri vardır (Durak, 2005 ve Durak, 2006).

FISH tekniğinin uygulamasında en önemli ve ilk basamak prob seçimidir. Kullanılacak probun incelenecek materyale, değerlendirilecek anomali tipine ve bölgesine uygun olması gerekir. Probon hangi yöntemle işaretlendiği, uzunluğu, RNA veya DNA kaynaklı olması, tek veya çift sarmallı olması özgün olmayan

sinyalleri arttırabilir. FISH tekniğinde sitogenetik alanda kullanılan başlıca proplar; tekrarlayan dizi proplar (satellit proplar), lokusa özgü proplar, tüm kromozoma özgün proplar, banda özgü proplar ve telomer bölgesine özgü proplardır (Artan, 1996a).

Kromozoma özgün DNA proplar 1990’larda sperm hücrelerinde kromozom anöploidilerinin belirlenebilmesi için geliştirilmiştir. Spermlerdeki fonksiyon bozuklukları FISH yöntemiyle belirlenememektedir. Sperm FISH ejakulat içerisinde genellikle X, Y, 13, 18 ve 21 kromozomlarının; kromozomal aberasyon frekansının belirlenmesinde kullanılır. Bu kromozomlar cinsiyet kromozomları anöploidilerinin belirlenmesinde Klinefelter Sendromu, Turner Sendromu) ya da Patu Sendromu, Edward Sendromu, Down Sendromu (Trizomi 21) gibi durumların belirlenmesinde kullanılır (Ramasamy ve ark., 2014).

1.4.2. FISH Yönteminin Aşamaları

FISH yönteminin prosedürü 6 aşamada gerçekleştirilir;

1. Preparatların hazırlanması
2. Preparatların ön yıkaması
3. Prob ve hedef DNA denatürasyonu
4. Prob ve hedef DNA hibridizasyonu
5. Hibridizasyon sonrası yıkamalar
6. Görüntüleme ve inceleme

Moleküler hibridizasyona dayalı yöntemlerin ana mekanizması iki komplementer daldan çift sarmal yapının oluşmasıdır. DNA - DNA hibridizasyonunda prob ve hedef DNA’nın denatürasyonunu takiben oluşan DNA fragment karışımı, tek dal halindeki fragmentlerin tekrar birleşmesini sağlayacak koşullarda gerçekleştirilir. Bu koşullarda etkili olan dört parametreler; ısı, pH,

monovalent katyon konsantrasyonu ve organik solvent varlığıdır. Hibridizasyonda üç temel aşama önemlidir. Bu aşamalar:

1. Hedef dizilerin hibridizasyon sırasında geçirgenliklerini korumaları,
2. Proba hedefin yüksek etkinlikle birbirlerine bağlanması,
3. Hibridizasyonun özgün aktivitesi yüksek bir reporter ile en az zemin sinyali olacak biçimde en parlak şekilde görüntülenmesidir.

FISH sonrası problemlerin bağlanması sonucu elde edilecek sinyaller floresan mikroskop altında uygun filtreler kullanılarak görüntülenir. Doğru prob setleri ve uygun filtrelerin seçilmesi son derece önemlidir (Artan, 1996b).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Gereçler

Floresan Mikroskop (DAPI, AQUA, G/R filtre, kamera, bilgisayar ve kamera yazılımı donanımı)

Buzdolabı

Cam şaleler

Derin Dondurucu (-20 °C)

Düz yüzeyli ısıtıcı

Ependorf tüpler (0,5 - 1,5 mL)

Falkon tüpler (15 mL - 50 mL)

Hassas terazi

Işık mikroskobu

Otomatik pipet uçları (5 - 10 - 100 - 1000 µL)

Otomatik pipetler

pH ölçüm cihazı

Saklama şişeleri

Santrifüj

Sıvı azot tankı

Steril pastör pipetleri

Su banyosu

Termometre

2.1.2. Kullanılan Kimyasallar

Potasyum klorür

Sodyum klorür

Sodyum sitrat

% 70, % 85 ve % 100 etanol çözeltileri

Rubber Cement

Tween®20

DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) - Antifade süspansiyon (0.125 mg/mL)

Phosphate-buffered saline (PBS) tablet

2.1.3. Kullanılan Problar

Kromozom X sayım probu [DXZ1 (p11.1 - q11.1) Spektrum Green]

Kromozom Y sayım probu [DYZ3 (p11.1 - q11.1) Spektrum Orange]

Kromozom 18 sayım probu [D18Z1 (p11.1 - q11.1) Spektrum Aqua]

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışma Bölgesi ve Numune Alımı

Bu doktora tez çalışmasında 2008 yılında Ulusal Bor Araştırma Enstitüsü (BOREN) tarafından desteklenerek yürütülmüş olan proje ile toplanmış meni numuneleri kullanılmıştır. Bahsedilen proje ülkemizde Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü'na bağlı olan Bandırma Bor ve Borik Asit Fabrikaları'nda yürütülmüştür. Bandırma ilçesi bor madeninin çıkartıldığı bölgeye uzak olmasına rağmen borik asit ve sodyum boratların üretiminin ve ihracatının yapıldığı yerdir. Çalışmada yer alan maruziyet grubu borik asit üretiminde çalışan işçilerden oluşurken; kontrol grubu ise aynı işletme içerisinde faaliyet gösteren fakat üretim tesislerinde çalışmayan (dolayısıyla da mesleki olarak bora maruz kalmayan) işçilerinden seçilmiştir. 2008 yılındaki çalışmaya, bor ürünleri üretiminde görev alan 102 gönüllü işçi ve üretim

tesislerinde çalışmayan 102 gönüllü işçi katılmıştır. Gönüllülerden idrar, kan ve meni örnekleri alınmıştır. Bu örneklerde bulunan bor miktarları ve işyeri ortamında solunum yolu, yiyecek ve içecekler yoluyla maruz kalınan bor düzeyleri günlük bor alım miktarı olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada meni örnekleri gönüllülerden Dünya Sağlık Örgütü (2003) kriterlerine uygun olarak alınmıştır. Örneklerin sperm konsantrasyonu ve canlılık parametreleri bilgisayar destekli sperm analiz cihazında (SQA-V Gold Sperm Quality Analyzer, USA) ölçülmüştür. Sonrasında kriyojenik çubuklar içerisine alınarak sıvı azot tankına kaldırılmıştır. Bu tez çalışmasında 2008 yılındaki çalışmadan geriye kalan (artan) toplam 163 adet gönüllüye ait meni örneği kullanılmıştır.

2.2.1.1. Maruziyet Gruplarının Yeniden Belirlenmesi

2008 yılında Bandırma’da yapılmış olan çalışmada alınmış olan meni numunelerinden, maruziyet grubu (borik asit fabrikasında çalışan) işçilerine ait 86 numune ve kontrol grubu (bor üretim tesislerinde çalışmayan) işçilerine ait 77 numuneden oluşan toplam 163 adet numunenin bu tez çalışmasında kullanılabilir durumda olduğu görülmüştür. Yapmış olduğumuz bu tez çalışmasında kullanılabilir durumda olan 163 meni numunesinde Y:X kromozom oranları tespit edilmiştir. Daha sonra tespit edilmiş olan Y:X oranlarının kontrol ve maruz kalan gruplar arasında farklı olup olmadıkları incelenmiştir. Bu tez çalışmasında meni numuneleri kullanılmış olan gönüllülerin sahip oldukları erkek:kız çocuk sayılarında (Çizelge 2.1) kontrol ve maruziyet grubu arasında farklılık gösterip göstermedikleri araştırılmıştır.

Çizelge 2.1. Meni örnekleri değerlendirilen kişilerin çocuklarının cinsiyet dağılımı.

	Toplam çocuk sayısı	Erkek	Kız
Kontrol grubu (n= 77)	136	66	70
Maruziyet grubu (n= 86)	150	81	69

2008 yılındaki çalışmada işçilerin kan bor konsantrasyonlarına göre yeniden oluşturulmuş olan gruplar (Duydu ve ark., 2011; Duydu ve ark., 2012) (Çizelge 2.2) ile Y:X kromozom oranları arasında fark olup olmadıkları da incelenmiştir.

Çizelge 2.2. Kontrol ve işçi gruplarının kan bor miktarlarına göre yeniden gruplandırılması.

Maruziyet grupları	Kan bor miktarı	Gruptaki kişi sayısı (n)
Kontrol	48.5 ng Bor/g kan'a kadar	35
Düşük seviyeli maruziyet	48.5-100 ng Bor/g kan	58
Orta dereceli maruziyet	100-150 ng Bor/g kan	37
Yüksek seviyeli maruziyet	150 ng Bor/g kan'a kadar	33

2.2.2. Sitogenetik Analiz

2.2.2.1. Numunelerin Hazırlanması

Sperm numuneleri sıvı azottan çıkarıldıktan sonra PBS çözeltisine alınarak 5 dak. 500x g'de santrifüj edildi. Üst faz atıldıktan sonra alt fazda kalan yıkanmış sperm hücreleri FISH prosedürü için hazır hale getirildi.

2.2.2.2. FISH Tekniğinin Uygulanması

FISH tekniğinde Robbins ve ark. (1995) tarafından yapılmış olan çalışmanın protokolü uygulanmıştır. Kromozomu X işaretlemek için DXZ1 (p11.1 - q11.1) Spektrum Green, kromozom Y için DYZ3 (p11.1 - q11.1) Spektrum Orange ve kromozom 18 için D18Z1 (p11.1 - q11.1) Spektrum Aqua sayım probu kullanıldı.



Şekil 2.1. Çalışmada kullanılan problemlerin kromozomlardaki hedef bölgeleri (<http://www.cytocell.com>).

2.2.2.2.1. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

KCl Çözeltisi, 0,075 M, 1000 mL

5.58 g KCl tartıldı distile suda çözüldü ve 1000 mL'ye tamamlanarak 0,075 M'lik hipotonik çözeltisi hazırlandı.

Carnoy's Fiksatif Çözeltisi, 120 mL

3:1 hacim oranında metanol ve asetik asit karıştırılarak hazırlandı. Mezür ile 90 mL metanol ve 30 mL asetik asit ölçüldü. Cam şale içerisinde karıştırılarak -20 °C'ye kaldırıldı. Kullanılma esnasında beklemelerde -20 °C'de saklandı. Her seferinde taze olarak hazırlandı.

2xSSC (Saline Sodium Citrate) Çözeltisi, pH 7.4, 100 mL

8,77g NaCl ve 3,87g C₆H₅Na₃O₇ (trisodyum sitrat) tartıldı 500 mL distile suda çözüldü. pH metre ile pH 7.4 olarak kontrol edildi.

0.4 x SSC Çözeltisi, 100 mL

2xSSC çözeltisinden 20 mL alındı ve 80 mL distile su ile cam şale içerisinde karıştırılarak hazırlandı.

2 x SSC + Tween 20 Çözeltisi, 100 mL

2xSSC çözeltisinden 100 mL mezür ile ölçüldü. Cam şale içerisine dökülerek içerisine 2 damla Tween®20 çözeltisi damlatıldı.

%70 Etanol, 100 mL

%100 Etanol çözeltisinden 70 mL alındı ve mezürde distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

%85 Etanol, 100 mL

%100 Etanol çözeltisinden 85 mL alındı ve mezürde distile su ile 100 mL'ye tamamlandı.

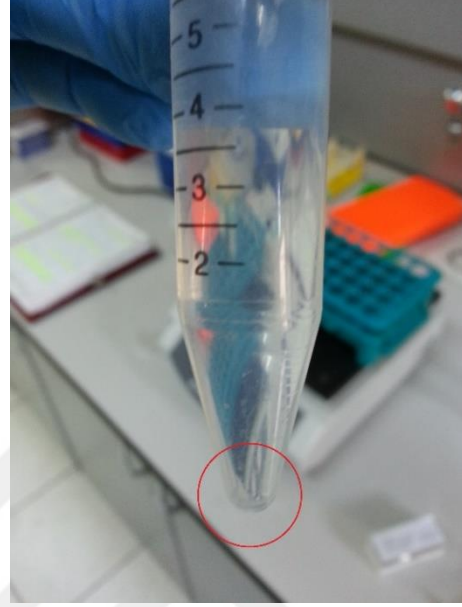
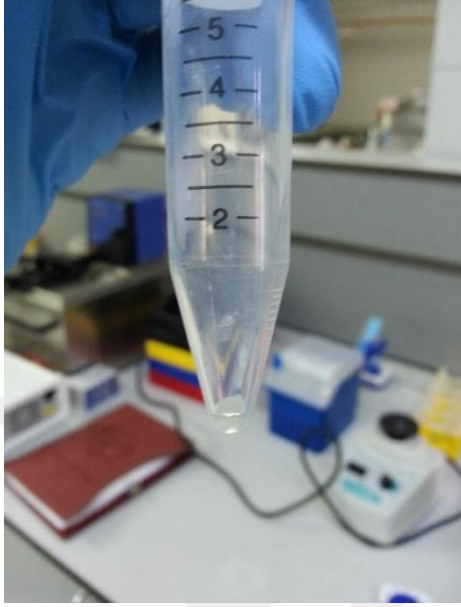
%100 Etanol, 100 mL

%100 Etanol çözeltisi mezürde 100 mL olarak ölçüldü ve doğrudan kullanıldı.

2.2.2.2.2. Preparatların Ön Yıkaması

Sıvı azot tankında kılcal içerisine alınmış olarak muhafaza edilen meni numuneleri çıkartıldı. Kılcallar 15 mL falkon tüp içerisine ters yerleştirildi ve 30 dk bekletilerek oda sıcaklığına gelmeleri sağlandı. Meni örneklerinin tüp içerisine tamamen akabilmesi için 500x g'de 10 sn santrifüj yapıldı. Daha sonra numuneler 1

gün +4 °C’ de bekletildi. Bekleme süresi sonunda sperm hücreleri çıkartılarak vorteks karıştırıcıda homojenize edildi.



Şekil 2.2. Azottan çıkarılan sperm numunesi. **Şekil 2.3.** Yıkama ve santrifüj sonrası hücreler.

Tüplerin üzerine su banyosunda 37 °C’ye getirilen 0,0075 M hipotonik KCl çözeltisinden damla damla damlatılarak hacim 10 mL’ye tamamlandı ve ağızları parafilmle sarılarak 37 °C’de su banyosunda sperm hücrelerinin şişmesi için 1 saat bekletildi. Bekleme süresi sonunda numuneler 500x g’de 5 dk santrifüj yapıldı. Alt faz 0,5 mL kalıncaya kadar üst faz çekilerek atıldı. Kalan kısım vorteks karıştırıcıda homojenize edildi. -20 °C’den çıkartılan Carnoys çözeltisinden her bir numune üzerine yavaş yavaş 6 damla ilave edildi 1 dk beklendikten sonra 5 mL’ye tamamlandı ve 500x g’de 10 dk santrifüj yapıldı. Alt faz 0,5 mL kalacak şekilde üst faz çekilerek ve atıldı. Carnoys çözeltisi 5 mL olacak şekilde tekrar damla damla ilave edildi. Bu ön yıkama işlemi 3 sefer tekrar edildi. 3. Santrifüj sonunda alt faz 1 mL’deki sperm sayısına göre son hacim 20 - 100 µL olacak şekilde üst faz çekilerek atıldı. Böylece sperm hücreleri lam üzerine yayılacak hale (fiksasyon) getirilmiş oldu.

Numunelerin yayıldığı lamalar fabrika üretimi esnasında camlar üzerindeki kir kalıntılarının temizlenmesi için şale içerisine dizilerek önce distile su ile daha sonra

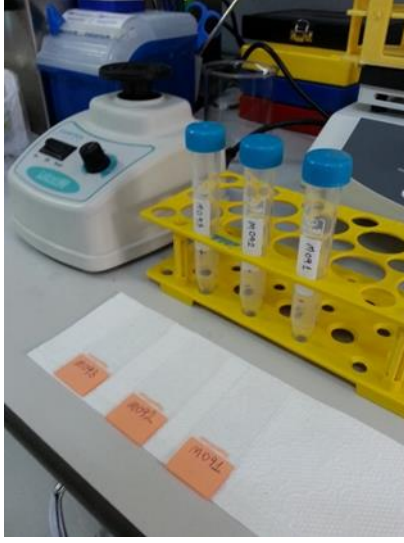
etil alkol ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Soğuk lam üzerinde hücreler daha iyi yayıldığı için şale ile -20 °C'ye kaldırıldı.



Şekil 2.4. -20 °C'de bekletilen lamlar.

Fiksasyon için hazır hale getirilen sperm hücreleri homojenize edildikten sonra soğuk lamlar üzerine 2 - 3 cm yükseklikten 10 µL numune olacak şekilde damlatıldı. Oda sıcaklığında yaklaşık 10 dk kurumaya bırakıldı. Preperata ışık mikroskopunda bakılarak hücrelerin üst üste gelmemiş olmasına ve ortamın kirli olmamasına dikkat edildi.

Lamlar kuruduktan sonra şaleye dizilerek sırasıyla 2 x SSC içerisinde 3 dk; % 70 etanol içerisinde 3 dk; % 85 etanol içerisinde 3 dk ve son olarak % 100 etanol içerisinde 3 dk bekletildi. Oda sıcaklığında 10 dk kurumaya bırakılarak fiksasyon işlemi sona ermiş oldu ve işaretleyici prob uygulamasına geçildi.



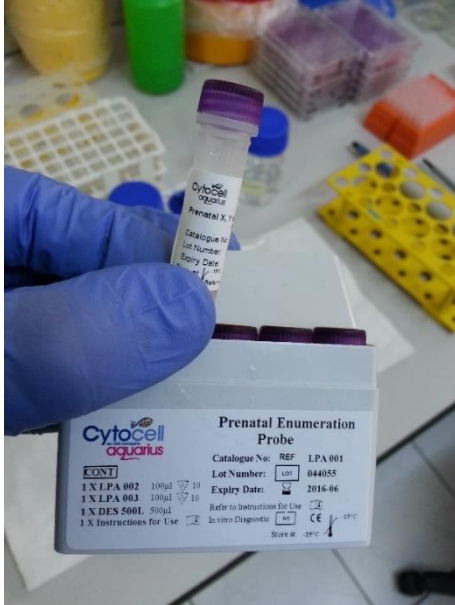
Şekil 2.5. Hücre yayılmış lamalar.



Şekil 2.6. 2xSSC ve %70, %85, %100'lük alkol serisi.

2.2.2.2. Denatürasyon

Bu aşamadan sonra deney karanlık ortamda yürütüldü. Önce işaretleyici prob -20 °C'den çıkartılarak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. Daha sonra lamalara yayılmış numuneler ve problemlerin aynı sıcaklıkta olmaları için 37 °C'de inkübatörde 10 dk bekletildi.



Şekil 2.7. Kromozom X,Y,18 sayım probu.

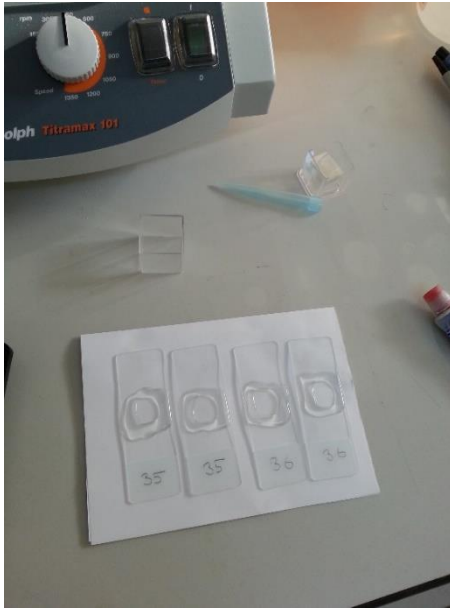


Şekil 2.8. Prob, fiksasyonu tamamlanmış lamalar ve lameler inkübatörde 37 °C'ye getirildi.

Bekleme süresi sonunda çıkartılan işaretleyici prob karışımı önce 30 sn kadar santrifüjlendi ardından iyice vortekslenerek homojen hale gelmesi sağlandı. Her bir numunenin üzerine 10 μ L prob karışımı damlatıldı ve lamaların üzeri lamel ile kapatıldı. Lamalardaki hava kabarcıkları üzerine bastırma ve kenarlara itilme suretiyle giderildi. Hemen sonrasında lamellerin etrafı rubber cement yapıştırıcısı ile hava almaması için çerçevelenerek kapatıldı.



Şekil 2.9. Prob yavaş devirde santrifüjlendi.



Şekil 2.10. Rubber cement kaplama.



Şekil 2.11. Hibridizasyona hazır lam.

Denatürasyon işlemi için hazır hale getirilen lamalar 80 °C'ye ayarlanmış sıcak yüzeyli ısıtıcı üzerine dizildi ve 5 dk bekletildi. Hassas olan bu işlemde denatürasyon süresine azami dikkat gösterildi.

2.2.2.2.3. Hibridizasyon

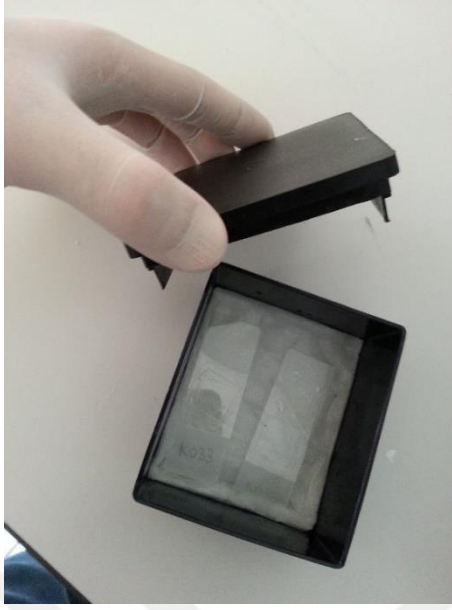
Denatürasyon süresi tamamlandıktan sonra lamalar ışık geçirmeyen kapaklı bir kutuya koyuldu. Kutunun zeminine ortamın nemli olması için ıslak peçete koyuldu. Sonrasında 37 °C'de 18 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 2.12. Hibridizasyon aşaması ısıtıcı yüzey.



Şekil 2.13. Hibridizasyon esnasında ısıtıcının üzeri kapatılarak karanlık ortam sağlandı.



Şekil 2.14. Nemli ve karanlık ortam.



Şekil 2.15. 37 °C de 18 saat inkübasyon.

2.2.2.2.4. Hibridizasyon Sonrası Yıkamalar

Hibridizasyon süresi dolduktan sonra lamalar karanlık ortamda kutulardan çıkartıldı. Rubber cementler yavaşça kopartıldı. Lameller hafifçe yerlerinden kaydırılarak uzaklaştırıldı. Bu aşamadaki amaç bağlanmayan işaretleyici problemlerin yüksek sıcaklık ve deterjan olarak kullanılan Tween®20 yardımıyla uzaklaştırılmasının sağlanmasıdır.

Preperatlar 67 °C'ye ayarlanmış su banyosundaki 0,4 x SSC çözeltisi içerisinde 30 sn süreyle ve bu süreyi kesinlikle geçmeyecek kadar bekletildi. Çözeltinin içerisindeki sıcaklık termometre ile kontrol edilerek 67 °C olmasına azami dikkat gösterildi. Yüksek sıcaklık sperm hücrelerinde DNA ile bağlanan problemlerin kopmasına ve sinyal kaybına neden olurken düşük sıcaklık preperatın kirli kalmasına neden olduğundan dolayı bu çalışmada sıcaklık ve bekleme süresi 67 °C'de 30 sn olarak optimize edildi. Hemen sonrasında 2 x SSC + Tween®20 karışımına 30 sn bekletildi ve bu süre sonunda 4 - 5 kez batırılıp çıkarılarak kurutma kağıdı üzerinde dikey olacak şekilde dizildi. Üzerlerindeki köpüklerin kuruması için 10 dk kadar beklendi.



Şekil 2.16. Tween®20 ile köpürtülen 2xSSC.



Şekil 2.17. 67 °C'ye getirilen 0.4xSSC çözeltisi.

-20 °C'den çıkartılarak oda sıcaklığına getirilmiş olan DAPI- Antifade (0,125 mg/mL) süspansiyonundan 15 µL her bir lam üzerine damlatıldı. Lameller hava kabarcığı kalmayacak şekilde kapatıldı. Lamalar, dik bir şekilde ışık almayan kutulara yerleştirilerek 15 dk bekletildi.



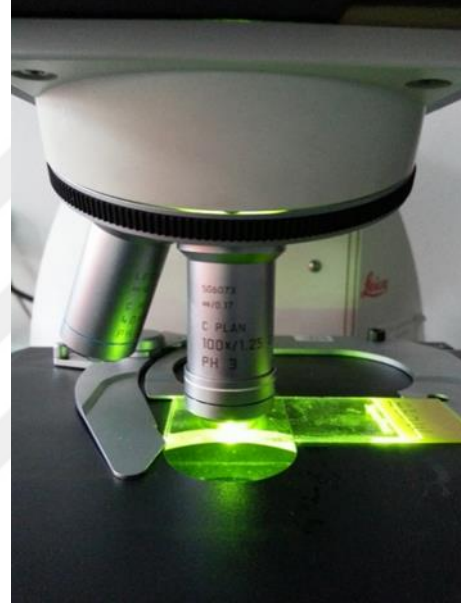
Şekil 2.18. DAPI- Antifade süspansiyon (4',6-diamidino-2-fenilindol).

2.2.2.2.5. Hibridize Olan Kromozomların Görüntülenmesi ve Değerlendirme

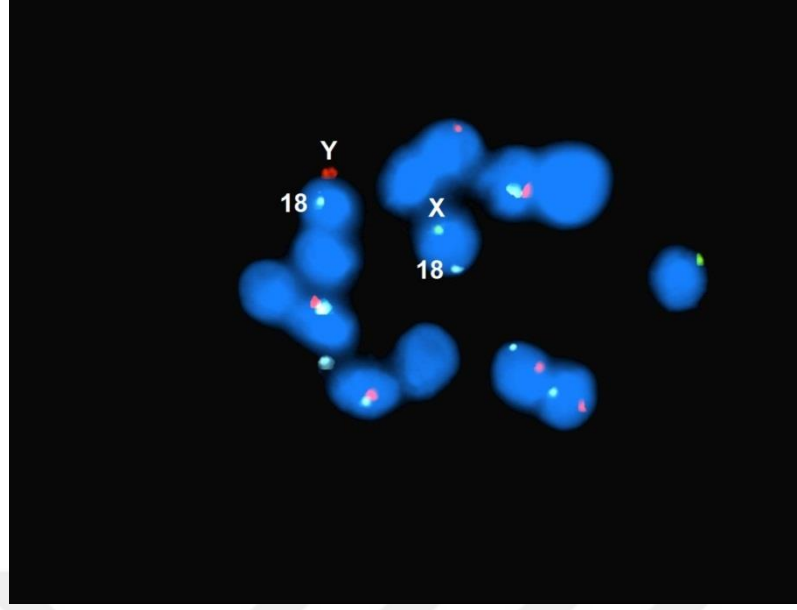
Süre bitiminde mikroskop ile analize başlandı. Sayımlar DAPI, G/R ve AQUA filtreli floresan mikroskop altında gerçekleştirildi. Herbir preparat için toplam 5000 hücre sayıldı. 5000 hücre sayısına ulaşamayan preparatlarda istenilen hücre sayısına ulaşılabilmek için kalan numunelerden tekrar yayma işlemi yapılarak FISH yöntemi uygulandı.



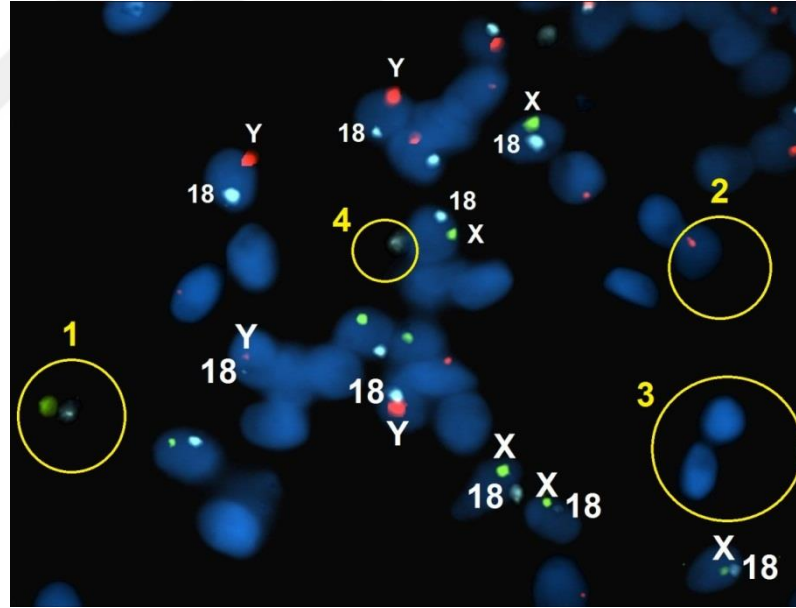
Şekil 2.19. Floresan mikroskop.



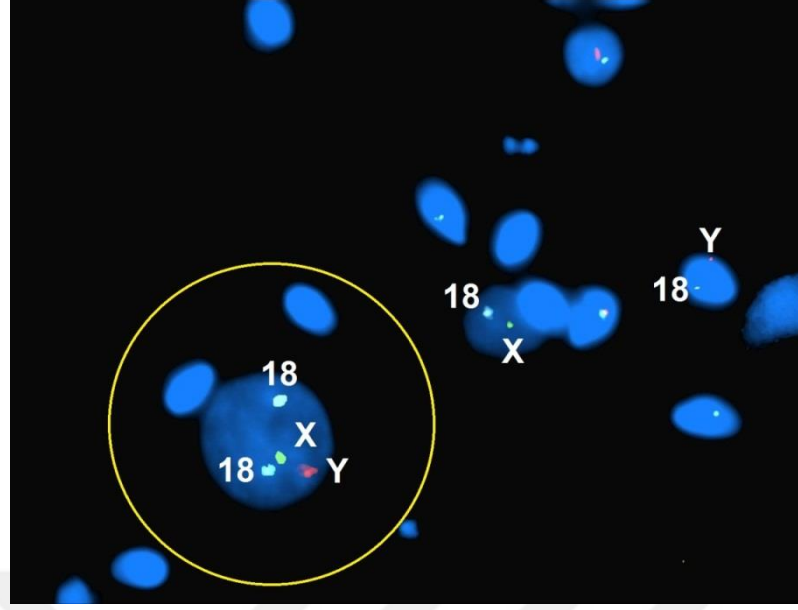
Şekil 2.20. 100'lük immersiye yağlı objektif.



Şekil 2.21. FISH görüntüsünde kırmızı sinyal: Kromozom Y, yeşil sinyal: kromozom X, aqua sinyal: kromozom 18 (kontrol) ve DAPI (mavi) ile boyalı hücre çekirdekleri görülmektedir.



Şekil 2.22. Değerlendirme dışı bırakılan hücreler sarı halka ile çevrilmiştir. 1- yeşil ve aqua sinyal var fakat hücre çekirdeği belli değil. DAPI yok, 2- Sadece kırmızı sinyal var. Kromozom 18 (kontrol) sinyali yok, 3- Hücre çekirdekleri DAPI ile boyanmış fakat kromozom sinyalleri yok, 4-Boşlukta bir adet aqua sinyal görülmektedir. Bir hücreye ait olabileceği gibi sinyal kalıntısı da (kirlilik) olabilir.



Şekil 2.23. Sarı halka ile çevrili alanda kromozom Y, X ve 2 adet kromozom 18'e sahip lenfosit hücresi ($2n=46$) görülmektedir. Lenfositler meni sıvısında bulunabilir. Enfeksiyon durumlarının haricinde meni içerisindeki lenfosit varlığının nedeni kesin olarak bilinmemektedir.

2.2.3. İstatiksel Analiz

Kontrol grubu ile yüksek düzeyde bora maruz kalan gönüllülerden alınan sperm örneklerindeki Y:X kromozomlarının oranı arasında anlamlı bir fark olup olmadığının değerlendirilmesinde Ki-kare testi (χ^2 test) uygulandı. Deneklerin kan bor konsantrasyonları, idrar bor konsantrasyonları, meni bor konsantrasyonları ve günlük bor alım miktarları ile meni numunelerindeki Y:X oranı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyonun olup olmadığının gösterilmesinde “Pearson Correlation” ve “Spearman’s Rank Correlation” testleri uygulandı. Testler “SPSS Statistics Version 23” programı kullanılarak yapıldı. $p < 0,05$ istatistiksel anlamlı değer olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Yöntem ve Değerlendirmeye İlişkin Bulgular

Çizelge 3.1. Kontrol grubuna (n=77) ait günlük bor alım miktarı (mgB/gün), idrar bor/kreatinin oranı (mgB/g), kan bor konsantrasyonu (B, ng/g), meni bor konsantrasyonu (B, ng/g), iş yerinde çalışma süresi (yıl), yaş, 1 mL meni sıvısındaki sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$), Y kromozomu sayısı, X kromozomu sayısı, toplam sayılan hücre sayısı (Y+X), Y:X kromozom oranı, sayılan toplam hücrede Y kromozomu oranı (%Y).

Kontrol Grubu Örnek Numarası (K)	Günlük Bor alım miktarı (mgB/gün)	İdrar Bor/Kreatinin (mgB/g)	Kan Bor Kons. (B, ng/g)	Meni Bor Kons. (B, ng/g)	Çalışma süresi (yıl)	Yaş	1 mL menide sperm kons. ($\times 10^6$)	Y Kromozomu sayısı	X Kromozomu sayısı	Y+X	Y:X	% Y
K003	0,20	2,71	0,0	52	11	44	68,2	2556	2545	5101	1,004	50,11
K073	0,20	3,19	0,0	158	20	48	33,9	2575	2556	5131	1,007	50,19
K004	3,79	1,93	30,3	65	22	45	60,7	915	968	1883	0,945	48,59
K005	3,79	3,15	34,6	90	21	43	122,6	2528	2546	5074	0,992	49,82
K006	3,79	1,42	0,0	117	21	42	47,8	194	206	400	0,942	48,50
K009	3,79	3,60	79,1	970	22	46	15,7	2519	2563	5082	0,983	49,57
K010	3,79	1,13	23,7	1107	26	48	137,2	2570	2590	5160	0,992	49,81
K011	3,79	7,98	82,6	7870	23	47	10,2	2513	2574	5087	0,976	49,40
K012	3,79	1,08	36,4	1839	21	39	91,9	2539	2542	5081	0,999	49,97
K013	3,79	0,78	0,0	0	15	47	90,1	2500	2571	5071	0,972	49,30
K015	3,79	3,08	95,3	774	21	45	72,8	2506	2522	5028	0,994	49,84
K016	3,79	6,45	59,0	2524	23	46	120,2	2530	2517	5047	1,005	50,13
K017	3,79	5,81	61,6	1826	19	49	89,2	2577	2529	5106	1,019	50,47
K018	3,79	9,44	65,5	2347	20	46	71,2	2529	2509	5038	1,008	50,20
K030	3,79	2,17	36,3	2290	24	48	118,9	2531	2528	5059	1,001	50,03
K032	3,79	4,11	48,9	2498	22	48	63,7	2563	2611	5174	0,982	49,54
K038	3,79	3,34	23,2	67	19	42	44,6	2509	2501	5010	1,003	50,08

Çizelge 3.1. (Devam) Kontrol grubuna (n= 77) ait günlük bor alım miktarı (mgB/gün), idrar bor/kreatinin oranı (mgB/g), kan bor konsantrasyonu (B, ng/g), meni bor konsantrasyonu (B, ng/g), iş yerinde çalışma süresi (yıl), yaş, 1 mL meni sıvısındaki sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$), Y kromozomu sayısı, X kromozomu sayısı, toplam sayılan hücre sayısı (Y+X), Y:X kromozom oranı, sayılan toplam hücrede Y kromozomu oranı (%Y).

K039	3,79	1,83	22,9	66	22	45	88,5	2503	2545	5048	0,983	49,58
K053	3,79	1,65	27,4	0	20	46	110,6	500	586	1086	0,853	46,04
K054	3,79	1,72	28,5	216	20	44	74,7	2512	2532	5044	0,992	49,80
K063	3,79	0,87	0,0	-	21	43	18,9	160	183	343	0,874	46,65
K067	3,79	5,56	44,5	191	21	43	74,5	2670	2682	5352	0,996	49,89
K074	3,79	1,76	0,0	54	20	46	115,4	2551	2562	5113	0,996	49,89
K076	3,79	3,80	28,9	109	23	45	8,5	2503	2507	5010	0,998	49,96
K001	6,16	2,65	50,2	0	14	43	129,8	2555	2561	5116	0,998	49,94
K002	7,54	8,89	73,2	111	19	41	172,5	2571	2554	5125	1,007	50,17
K008	7,34	6,08	56,9	1331	22	44	18,6	2573	2625	5198	0,980	49,50
K020	6,16	2,93	90,1	5706	10	48	5,2	543	547	1090	0,992	49,82
K021	7,34	8,52	57,9	4020	7	35	144,2	2713	2700	5413	1,004	50,12
K022	8,52	3,77	99,9	1979	20	42	84,5	2686	2675	5361	1,004	50,10
K023	7,34	2,99	80,3	2964	21	42	103,7	2557	2519	5076	1,015	50,37
K024	6,16	3,29	26,2	6838	20	44	60,9	2543	2558	5101	0,994	49,85
K025	6,16	2,50	22,0	2572	21,5	46	5,2	2529	2587	5116	0,978	49,43
K026	4,97	5,16	72,4	2656	22	44	99,8	2539	2509	5048	1,011	50,30
K027	6,16	4,59	61,5	3089	21	45	63	2524	2510	5034	1,006	50,14
K028	7,34	14,05	173,2	6192	23	53	123,4	2517	2542	5059	0,990	49,75
K031	6,36	13,54	87,7	4230	21	43	13,8	2689	2741	5430	0,981	49,52
K034	6,16	9,65	102,5	3980	21	42	42,7	2510	2545	5055	0,986	49,65
K035	7,48	4,71	95,7	251	19	42	68	2506	2520	5026	0,994	49,86
K036	7,34	4,65	123,9	189	16	45	23,5	2511	2680	5191	0,937	48,37
K037	6,36	8,63	73,8	391	21	43	116,9	2501	2659	5160	0,941	48,47
K041	6,16	12,67	128,2	445	8	33	13,8	432	436	868	0,991	49,77
K042	6,30	5,33	49,2	173	15	42	24,5	2641	2611	5252	1,011	50,29
K044	6,16	1,67	18,6	77	22	47	89,8	2538	2517	5055	1,008	50,21
K046	6,16	5,55	63,6	249	21	45	103,4	2562	2616	5178	0,979	49,48
K047	8,52	5,73	93,2	495	21	39	69	2543	2510	5053	1,013	50,33
K048	4,97	4,16	53,6	223	21	39	143,9	2621	2533	5154	1,035	50,85
K049	8,52	4,41	94,5	129	1,5	35	49,6	401	424	825	0,946	48,61
K050	7,48	3,05	79,7	296	21	44	67	2540	2507	5047	1,013	50,33
K051	7,34	7,12	109,1	415	1,5	36	39,7	2509	2551	5060	0,983	49,59
K052	8,52	3,86	65,5	513	20	44	48,4	2606	2581	5187	1,010	50,24
K058	6,16	3,85	18,1	831	21	44	32,8	2516	2552	5068	0,986	49,64
K059	6,16	4,32	31,5	112	18	38	93,7	2570	2524	5094	1,018	50,45
K060	7,34	9,74	110,1	-	23	46	23,9	2505	2521	5026	0,994	49,84

Çizelge 3.1. (Devam) Kontrol grubuna (n= 77) ait günlük bor alım miktarı (mgB/gün), idrar bor/kreatinin oranı (mgB/g), kan bor konsantrasyonu (B, ng/g), meni bor konsantrasyonu (B, ng/g), iş yerinde çalışma süresi (yıl), yaş, 1 mL meni sıvısındaki sperm konsantrasyonu (x106), Y kromozomu sayısı, X kromozomu sayısı, toplam sayılan hücre sayısı (Y+X), Y:X kromozom oranı, sayılan toplam hücrede Y kromozomu oranı (%Y).

K061	6,16	8,53	121,7	0	21	46	122,9	773	794	1567	0,974	49,33
K062	8,52	3,12	85,6	264	23	46	40,3	2535	2592	5127	0,978	49,44
K064	5,17	7,63	79,7	158	19	42	41,6	2516	2551	5067	0,986	49,65
K065	5,11	8,06	125,7	441	20	44	27,6	2618	2648	5266	0,989	49,72
K066	6,30	5,38	39,1	526	23	45	90,1	2509	2547	5056	0,985	49,62
K069	5,17	4,18	48,5	99	25	48	20,5	2585	2568	5153	1,007	50,17
K070	4,97	2,49	58,4	333	22	47	86,7	2628	2591	5219	1,014	50,35
K071	6,30	1,58	20,9	2050	23	46	47,8	2545	2559	5104	0,995	49,86
K072	6,36	4,49	32,1	252	10	43	80,4	2538	2564	5102	0,990	49,75
K075	8,52	5,71	252,0	439	21	44	11,5	2518	2532	5050	0,994	49,86
K077	4,97	9,56	78,6	321	22	44	41,3	2576	2570	5146	1,002	50,06
K078	6,36	5,32	99,9	-	23	46	68,6	2559	2530	5089	1,011	50,28
K079	7,34	4,26	71,9	215	23	46	37,1	2563	2542	5105	1,008	50,21
K080	6,16	3,47	54,2	0	10	32	-	2603	2646	5249	0,984	49,59
K081	8,66	11,42	140,9	557	20	46	117,4	2473	2259	4732	1,095	52,26
K082	7,54	3,52	36,4	235	19	42	74,9	2508	2581	5089	0,972	49,28
K084	6,36	6,10	55,6	154	3	35	44,3	2503	2529	5032	0,990	49,74
K085	3,79	1,86	19,7	329	2	43	96,1	2666	2615	5281	1,020	50,48
K087	7,34	12,41	157,4	531	20	41	6,3	2551	2576	5127	0,990	49,76
K099	8,66	6,07	76,6	362	4	23	-	2508	2523	5031	0,994	49,85
K100	5,11	6,37	52,5	143	0,17	33	150,5	2550	2604	5154	0,979	49,48
K101	6,16	6,57	53,9	126	3	33	43,2	2597	2506	5103	1,036	50,89
K102	6,16	1,27	41,8	234	2	26	31,8	2511	2507	5018	1,002	50,04
Ort.	5,66	5,01	63,56	1127,78	18,02	42,86	68,08	2338,14	2348,36	4686,51	0,99	49,77
St. Sap.	1,84	3,13	43,89	1713,97	6,58	5,06	41,37	640,22	635,55	1274,79	0,03	0,79
Min	0,20	0,78	0,00	0,00	0,17	23,00	5,20	160,00	183,00	343,00	0,85	46,04
Mak	8,66	14,05	252,00	7870,00	26,00	53,00	172,50	2713,00	2741,00	5430,00	1,10	52,26

Çizelge 3.2. Bor maruziyet grubuna (n= 86) ait günlük bor alım miktarı (mgB/gün), idrar bor/kreatinin oranı (mgB/g), kan bor konsantrasyonu (B, ng/g), meni bor konsantrasyonu (B, ng/g), iş yerinde çalışma süresi (yıl), yaş, 1 mL meni sıvısındaki sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$), Y kromozomu sayısı, X kromozomu sayısı, toplam sayılan hücre sayısı (Y+X), Y:X kromozom oranı, sayılan toplam hücrede Y kromozomu oranı (%Y).

Maruziyet Grubu Örnek Numarası (M)	Günlük Bor alım miktarı (mgB/gün)	İdrar Bor/Kreatinin (mgB/g)	Kan Bor Kons. (B, ng/g)	Meni Bor Kons. (B, ng/g)	Çalışma süresi (yıl)	Yaş	1 mL menide sperm kons. ($\times 10^6$)	Y Kromozomu sayısı	X Kromozomu sayısı	Y+X	Y:X	% Y
M000	15,50	7,25	140,3	4249	21	45	94,4	2505	2533	5038	0,989	49,72
M001	6,86	3,14	41,5	1653	22	48	166,3	2504	2549	5053	0,982	49,55
M003	6,20	2,54	61,4	1130	21	43	36,7	333	345	678	0,965	49,12
M004	-	8,27	165,8	-	18	43	33,4	2507	2527	5034	0,992	49,80
M005	2,85	4,01	53,5	1685	2	36	16,8	550	562	1112	0,979	49,46
M006	6,89	6,94	80,4	1086	21	45	29,3	200	224	424	0,893	47,17
M007	5,63	4,58	81,6	2379	4	30	224,2	2532	2564	5096	0,988	49,69
M008	5,45	6,89	103,4	0	21	42	15,3	2518	2539	5057	0,992	49,79
M010	6,00	2,38	68,5	877	11	42	77	2501	2580	5081	0,969	49,22
M011	20,60	13,69	345,6	2654	22	47	24,8	514	526	1040	0,977	49,42
M012	19,99	5,37	218,5	984	20	41	38,3	2519	2448	4967	1,029	50,71
M013	17,87	8,75	246,3	2715	18	47	60,1	2503	2531	5034	0,989	49,72
M014	14,28	7,18	168,5	437	11	44	31,5	2557	2585	5142	0,989	49,73
M015	21,84	4,83	83,8	544	9	33	53,2	2530	2589	5119	0,977	49,42
M016	20,88	6,45	129,7	712	21	45	63	2502	2599	5101	0,963	49,05
M017	29,24	13,89	175,6	925	12	45	2	92	107	199	0,860	46,23
M018	13,51	9,34	137,4	694	4	32	150,8	2569	2531	5100	1,015	50,37
M019	10,57	5,72	200,3	100	10	46	51,7	2550	2520	5070	1,011	50,30
M021	16,10	8,62	176,2	1732	11	46	39,8	2510	2533	5043	0,991	49,77
M022	14,25	10,92	214,6	537	20	42	40,3	2530	2516	5046	1,006	50,14
M023	13,36	10,63	208,8	619	3	29	67,4	2570	2586	5156	0,994	49,84
M024	14,21	6,91	95,4	634	21	46	53,2	2534	2594	5128	0,977	49,41
M026	9,56	8,30	138,3	1411	20	40	64,3	2532	2585	5117	0,980	49,48
M027	14,13	11,12	169,1	1545	22	44	38,2	2577	2622	5199	0,983	49,57
M028	35,62	10,45	286,5	1332	20	41	31,7	2505	2561	5066	0,978	49,48
M029	15,48	6,88	145,3	1408	14	41	29,1	2592	2714	5306	0,955	48,85

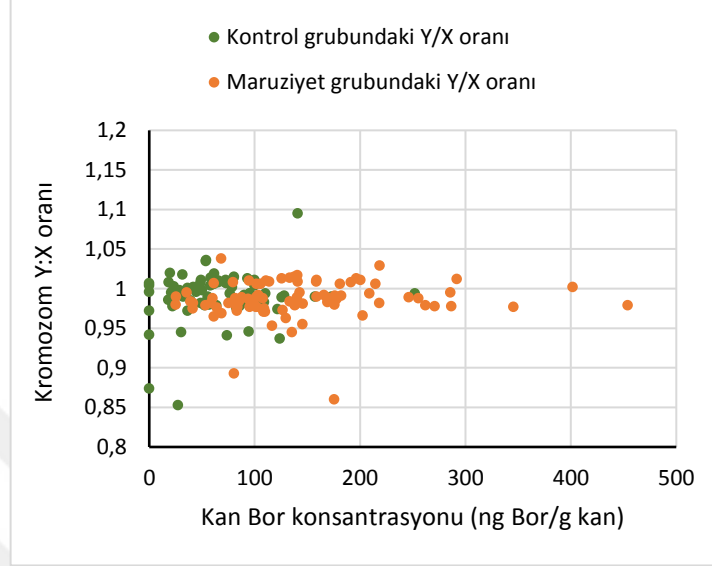
Çizelge 3.2. (Devam) Bor maruziyet grubuna (n= 86) ait günlük bor alım miktarı (mgB/gün), idrar bor/kreatinin oranı (mgB/g), kan bor konsantrasyonu (B, ng/g), meni bor konsantrasyonu (B, ng/g), iş yerinde çalışma süresi (yıl), yaş, 1 mL meni sıvısındaki sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$), Y kromozomu sayısı, X kromozomu sayısı, toplam sayılan hücre sayısı (Y+X), Y:X kromozom oranı, sayılan toplam hücrede Y kromozomu oranı (%Y).

M030	15,85	3,34	454,0	461	20	42	64,5	2523	2576	5099	0,979	49,48
M031	2,87	2,45	39,0	472	23	45	73,9	2533	2575	5108	0,984	49,59
M032	6,87	18,91	270,7	1189	22	45	144,2	2514	2570	5084	0,978	49,45
M034	6,82	9,06	158,5	1935	21	45	46,7	2527	2505	5032	1,009	50,22
M035	8,59	3,77	82,7	720	5	40	10,2	2504	2561	5065	0,978	49,44
M036	2,69	3,89	93,8	-	12	43	36,2	2500	2532	5032	0,987	49,68
M038	13,89	2,57	113,7	436	22	46	41,9	2680	2655	5335	1,009	50,23
M039	7,87	4,15	85,2	0	21	46	30,3	2527	2568	5095	0,984	49,60
M041	25,01	9,47	175,9	1047	8	46	38,2	2492	2543	5035	0,980	49,49
M042	16,35	9,13	196,4	3220	22	50	138,9	2549	2516	5065	1,013	50,32
M043	19,57	6,09	140,6	895	22	43	57,6	2591	2547	5138	1,017	50,43
M044	17,47	6,12	108,5	0	20	44	73,3	2503	2579	5082	0,971	49,25
M046	20,25	9,94	202,4	1131	4	33	58,3	2532	2620	5152	0,966	49,15
M047	17,05	9,81	140,9	1068	21	42	5,9	2558	2536	5094	1,009	50,22
M048	14,76	5,62	182,2	1710	1	43	29,6	2517	2540	5057	0,991	49,77
M049	15,82	6,48	126,6	1779	22	44	14,5	2509	2578	5087	0,973	49,32
M050	14,08	9,38	109,1	0	21	44	22,9	1739	1784	3523	0,975	49,36
M051	15,46	5,86	107,8	555	21	44	78,5	2510	2541	5051	0,988	49,69
M052	13,01	11,56	218,4	1567	0,5	47	292,3	2525	2571	5096	0,982	49,55
M053	14,39	5,57	133,2	776	20	43	32,4	2534	2500	5034	1,014	50,34
M054	12,97	4,11	255,5	602	22	47	113,5	2524	2554	5078	0,988	49,70
M055	12,97	3,89	178,0	0	20	43	25,5	2563	2596	5159	0,987	49,68
M056	8,71	5,14	158,9	777	22	49	25,5	2549	2521	5070	1,011	50,28
M057	9,63	7,91	191,3	1456	20	42	53,4	2522	2501	5023	1,008	50,21
M059	13,58	4,36	101,3	2403	23	45	162,7	2514	2542	5056	0,989	49,72
M062	-	2,09	35,4	719	20	42	159,1	2598	2610	5208	0,995	49,88
M063	8,34	2,59	68,4	1683	10	41	5,5	741	714	1455	1,038	50,93
M066	6,64	1,60	25,6	8597	8	34	120	2570	2595	5165	0,990	49,76
M068	7,11	2,51	60,1	3854	21	49	34,2	2519	2550	5069	0,988	49,69
M069	4,87	3,60	103,1	2722	25	48	33,2	2512	2535	5047	0,991	49,77
M070	6,56	3,68	75,4	1168	23	49	21,3	859	875	1734	0,982	49,54
M071	14,09	3,72	101,7	4897	21	43	63,7	2547	2531	5078	1,006	50,16
M072	16,19	5,30	94,7	854	20	43	79,1	2527	2501	5028	1,010	50,26
M073	8,52	5,34	87,8	1554	21	46	59,6	2509	2538	5047	0,989	49,71
M074	12,97	3,87	109,9	1516	7	33	67,4	812	836	1648	0,971	49,27
M075	4,97	1,33	25,2	1676	5	33	38,5	2523	2574	5097	0,980	49,50
M076	14,68	5,67	83,1	423	20	43	66,4	2505	2577	5082	0,972	49,30

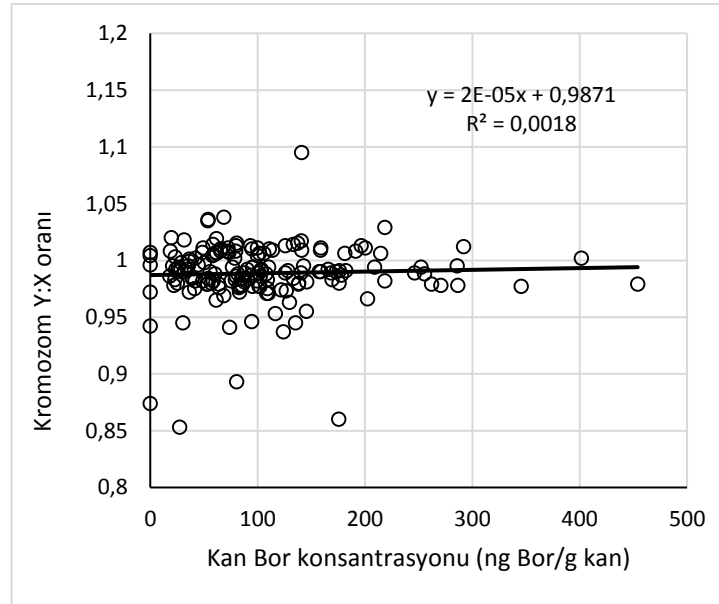
Çizelge 3.2. (Devam) Bor maruziyet grubuna (n= 86) ait günlük bor alım miktarı (mgB/gün), idrar bor/kreatinin oranı (mgB/g), kan bor konsantrasyonu (B, ng/g), meni bor konsantrasyonu (B, ng/g), iş yerinde çalışma süresi (yıl), yaş, 1 mL meni sıvısındaki sperm konsantrasyonu ($\times 10^6$), Y kromozomu sayısı, X kromozomu sayısı, toplam sayılan hücre sayısı (Y+X), Y:X kromozom oranı, sayılan toplam hücrede Y kromozomu oranı (%Y).

M077	13,26	3,67	105,6	661	21	44	61,8	2554	2540	5094	1,006	50,14
M078	15,13	5,83	110,8	869	20	43	17,7	2526	2501	5027	1,010	50,25
M079	8,56	4,16	102,1	2402	18	40	25,6	2500	2559	5059	0,977	49,42
M080	12,97	7,21	138,0	0	1,5	32	84,1	2506	2559	5065	0,979	49,48
M081	24,01	11,61	401,6	8086	10	45	105,4	2666	2660	5326	1,002	50,06
M082	12,97	5,97	181,1	2522	1,08	37	28,3	2528	2514	5042	1,006	50,14
M083	14,51	13,73	291,8	0	4	46	157	2617	2584	5201	1,012	50,32
M085	12,97	7,43	135,4	2188	22	47	40,3	947	1002	1949	0,945	48,59
M086	14,68	7,90	116,6	2352	21	44	59,2	2448	2569	5017	0,953	48,80
M087	15,42	11,30	158,7	812	10	42	49,4	2502	2527	5029	0,990	49,75
M088	14,25	6,38	142,6	2151	13	43	41,1	2509	2522	5031	0,995	49,87
M089	13,65	6,09	79,6	8615	20	41	112,8	2601	2580	5181	1,008	50,20
M090	17,05	32,68	285,7	0	6	40	16,1	2550	2564	5114	0,995	49,86
M091	6,82	8,01	101,3	1410	17	36	152,3	2539	2599	5138	0,977	49,42
M092	9,63	8,41	125,7	2278	18	44	77	2540	2507	5047	1,013	50,33
M093	2,56	6,39	133,2	0	22	45	277,2	2526	2567	5093	0,984	49,60
M094	2,56	2,52	41,2	959	20	42	2	2502	2567	5069	0,975	49,36
M095	11,84	2,41	61,2	0	16	43	-	2570	2552	5122	1,007	50,18
M097	3,51	4,55	145,8	4160	8	33	34,2	2592	2641	5233	0,981	49,53
M098	2,56	2,52	64,1	540	18	44	33,4	2504	2565	5069	0,976	49,39
M099	24,72	4,87	99,1	7777	12	46	87,6	2554	2602	5156	0,982	49,53
M100	7,39	2,73	58,5	2715	21	47	15,2	2514	2559	5073	0,982	49,56
M101	3,32	10,69	262,1	6686	0,58	39	91,9	2546	2600	5146	0,979	49,48
Ort.	12,53	6,77	141,55	1703,42	15,76	42,45	64,96	2319,05	2343,69	4662,73	0,99	49,65
St. Sap.	6,35	4,35	80,43	1895,09	7,16	4,62	56,09	618,74	621,80	1239,95	0,02	0,63
Min	2,56	1,33	25,20	0,00	0,50	29,00	2,00	92,00	107,00	199,00	0,86	46,23
Mak	35,62	32,68	454,00	8615,00	25,00	50,00	292,30	2680,00	2714,00	5335,00	1,04	50,93

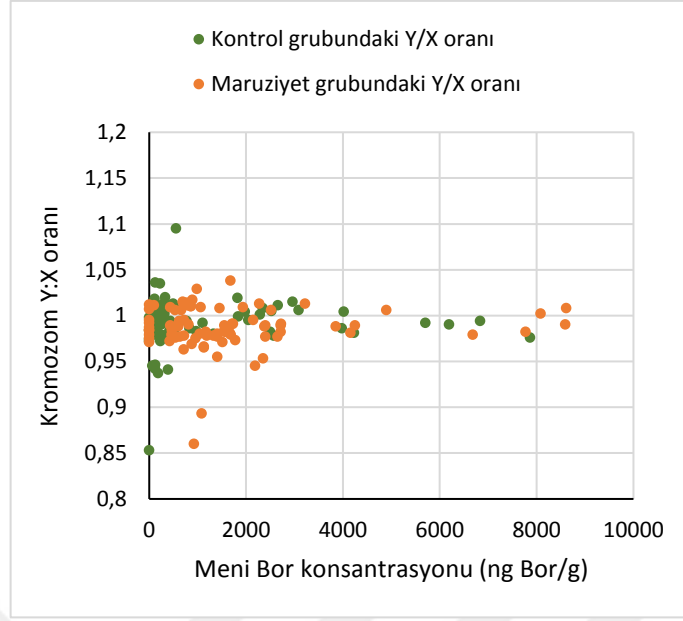
3.2. Çalışmanın İstatistiksel Bulguları



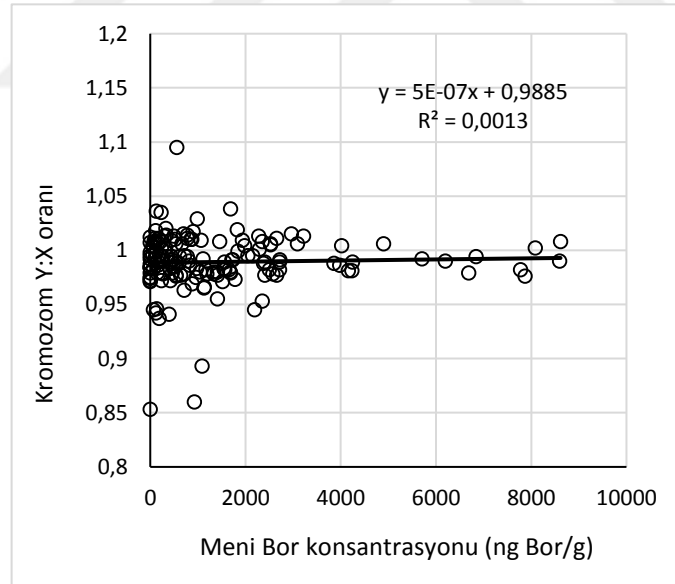
Şekil 3.1. Kan bor konsantrasyonu (ng Bor/g kan) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin dağılım grafiği.



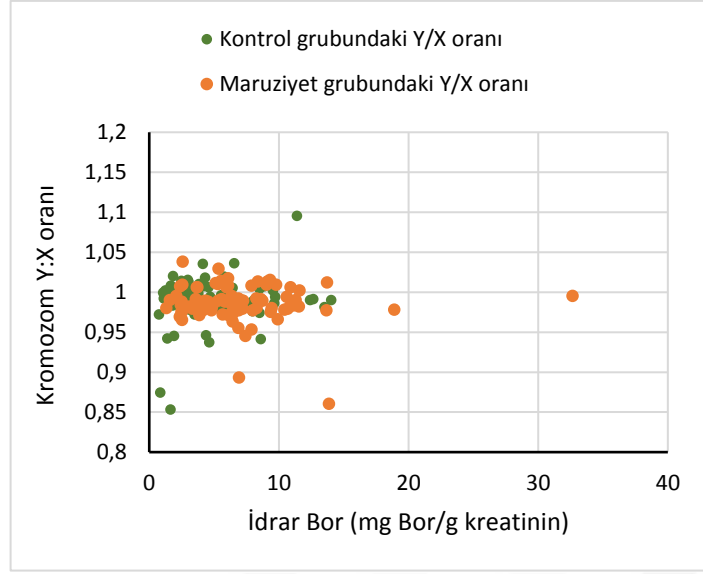
Şekil 3.2. Kan bor konsantrasyonu (ng Bor/g) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin regresyon denklemi ($R^2 = 0,0018$, Pearson kor. $p > 0,05$, Spearman's Rank kor. $p > 0,05$).



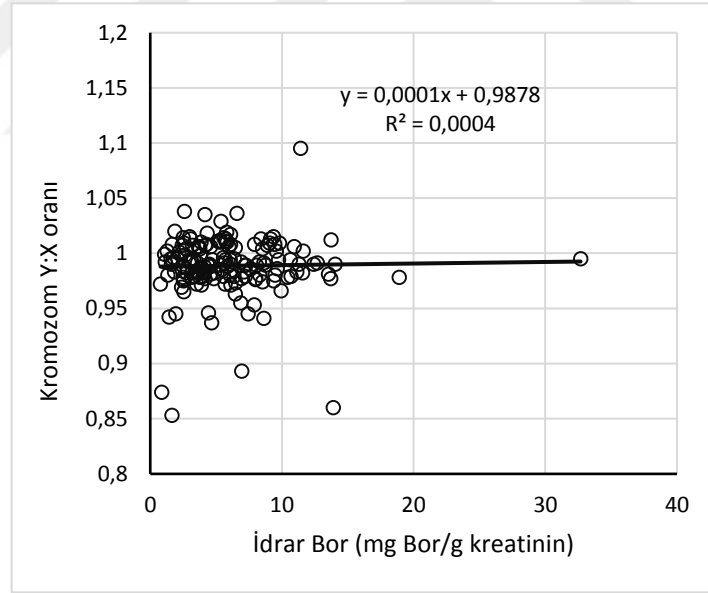
Şekil 3.3. Meni bor konsantrasyonu (ng Bor/g) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin dağılım grafiği.



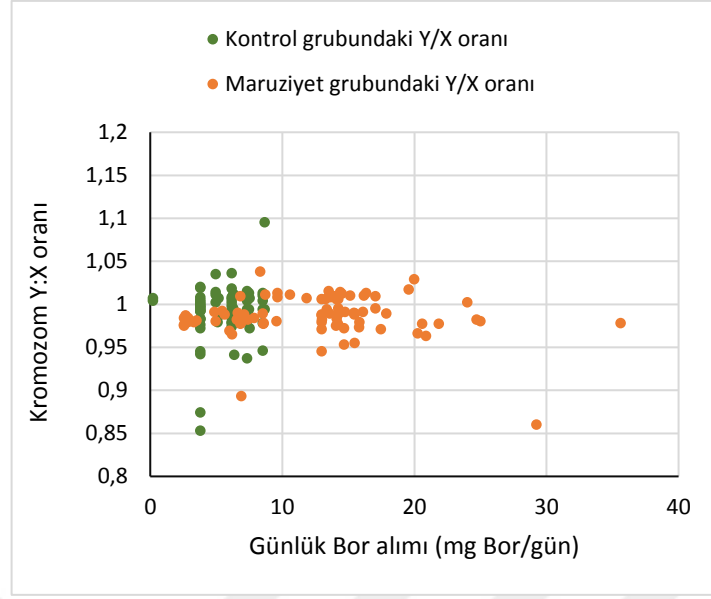
Şekil 3.4. Meni bor konsantrasyonu (ng Bor/g) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin regresyon denklemi ($R^2 = 0,0013$, Pearson kor. $p > 0,05$, Spearman's Rank kor. $p > 0,05$).



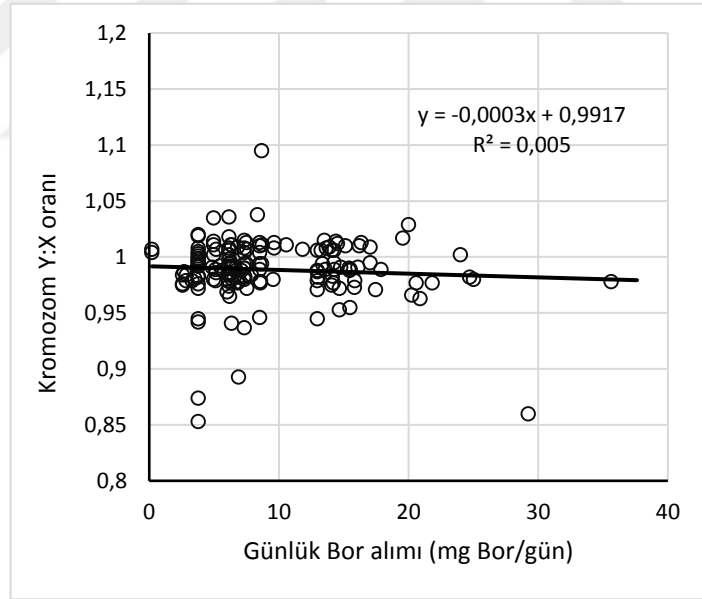
Şekil 3.5. İdrar Bor/Kreatinin (mg Bor/g kreatinin) miktarı ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin dağılım grafiği.



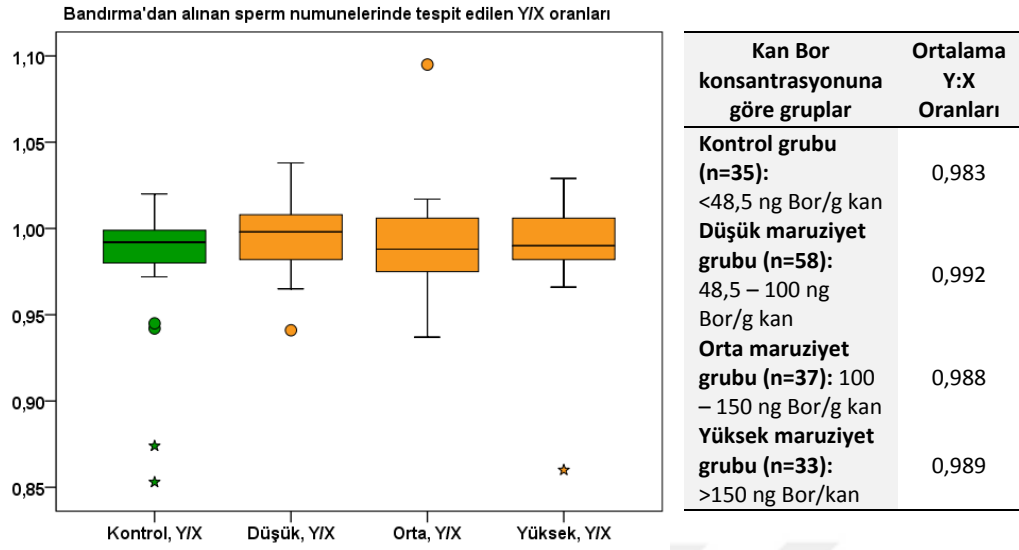
Şekil 3.6. İdrar Bor/Kreatinin (mg Bor/g kreatinin) miktarı ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin regresyon denklemi ($R^2 = 0,0004$, Pearson kor. $p > 0,05$, Spearman's Rank kor. $p > 0,05$).



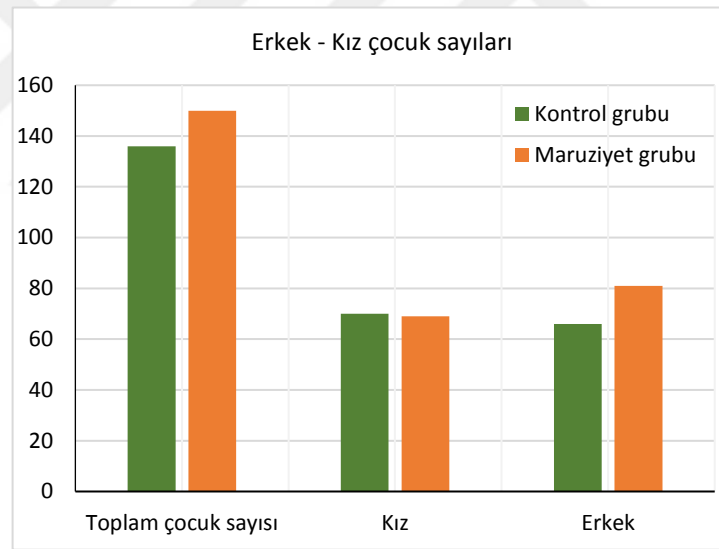
Şekil 3.7. Günlük bor alım miktarı (mg Bor/gün) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin dağılım grafiği.



Şekil 3.8. Günlük bor alım miktarı (mg Bor/gün) ve kromozom Y:X oranı arasındaki ilişkinin regresyon denklemi ($R^2=0,005$, Pearson kor. $p>0,05$, Spearman's Rank kor. $p>0,05$).



Şekil 3.9. Yeniden oluşturulan gruplara göre kontrol, düşük, orta ve yüksek kan bor seviyelerinde sperm numunelerindeki Y:X oranları kutu grafiği ($p > 0,05$). Uç değer (*), aykırı değer (°).



Şekil 3.10. Çalışmamıza katılan gönüllü erkeklerin sahip oldukları erkek ve kız çocuk sayılarının kontrol ($n = 73$) ve maruziyet ($n = 83$) grupları arasında karşılaştırılması.

Çizelge 3.3. Gönüllülerin çocuk sayıları.

	Toplam çocuk sayısı	Kız	Erkek
Kontrol grubu (n= 73)	136	70	66
Maruziyet grubu (n= 83)	150	69	81

Kontrol ve Maruz kalan grubun Kız ve erkek çocuk sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır ($\chi^2 = 0,275$; $p > 0,05$).

Çizelge 3.4. Numunelerden elde edilen kan bor ve meni bor konsantrasyonları ile gönüllülerin sperm numunelerindeki Y:X oranları.

	Kan Bor Konsantrasyonu ng Bor/g kan	Meni Bor Konsantrasyonu ng Bor/g meni	Sperm numunesi Y:X oranı
Kontrol grubu (n= 77)			
Kan Bor konsantrasyonu	63,56 ± 43,89* (<LOQ ^a – 252)		
Meni Bor konsantrasyonu		1127,78 ± 1713,97 (<LOQ – 7870)	
Y:X oranı			0,99 ± 0,03 (0,85 – 1,10)
Maruziyet grubu (n= 86)			
Kan Bor konsantrasyonu	141,55 ± 80,43 (25,20 – 454)		
Meni Bor konsantrasyonu		1703 ± 1895,09 (<LOQ – 8615)	
Y:X oranı			0,99 ± 0,02 (0,86 – 1,04)

* Sonuçlar; Ortalama ± St. Sapma (Minimum – Maksimum) olarak verilmiştir.

^a LOQ: Limit of Quantification (Duydu ve ark., 2011).

Çizelge 3.5. Numunelerden elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri.

	Pearson correlation <i>p</i> - değeri	Spearman's rank correlation <i>p</i> - değeri	χ^2 Test <i>p</i> - değeri
Parametreler arası korelasyon			
Kan Bor – Y:X kromozom oranı	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	
Meni Bor – Y:X kromozom oranı	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	
Parametreler arası farklılık			
Kontrol grubu Y:X oranı – Maruziyet grubu Y:X oranı			<i>p</i> > 0,05
Kız çocuk (Kontrol grubu) – Kız çocuk (Maruziyet grubu)			<i>p</i> > 0,05

4. TARTIŞMA

Günümüzde teknolojinin hızla gelişmesi ve endüstrileşme her nekad hayatımızı kolaylaştırırsa da sağlığımız üzerine birçok olumsuz etkilerinin de olduğu bilinen bir gerçektir. Çevresel faktörler karşısında hasas bir yapıya sahip olan üreme sistemimiz bu durumdan en çok etkilenen sistemlerdendir.

Toplumun üreme sağlığının gözlenmesi açısından doğumlardaki erkek:kız oranı (doğum cinsiyet oranı) önemli bir değişkendir. Doğum cinsiyet oranlarındaki farklılıklar ve zaman içerisinde meydana gelen değişimler araştırmacılar için uzun yıllardan beri merak konusu olmuştur. Trivers ve Willard (1973) anne adayının kötü yaşam, beslenme, sağlık koşulları gibi baskılar altında kaldığında, kız çocuk sahibi olmaya daha yatkın ve böylece neslin devamını daha az risk olarak sürdürme eğiliminde olduğunu; çevre şartlarının iyi olduğu durumlarda ise tam tersi bir önyargıyı iddia ettikleri hipotezlerini öne sürmüşlerdir. Zaman içerisinde birçok bağımsız araştırmacı tarafından popülasyonlardaki cinsiyet oranı ile ilgili gözlemler yapılmıştır (Dickinson ve Parker, 1996; Moller, 1996; Moller, 1998; Allan ve ark., 1997; Parazzini ve ark., 1998). Dünya genelinde doğumlarda erkek:kız cinsiyet oranının 107/100 (1,07) olduğu tahmin edilmektedir (CIA - The World Factbook, 2014).

Endokrin bozucular gibi kimyasal maddelerin (Mocarelli ve ark., 1996; Mocarelli ve ark., 2000), savaş veya deprem gibi doğal afetlerin neden olduğu yıkımların (Fukuda ve ark., 1998), testiküler kanser gibi özellikle erkek üreme sistemini ilgilendiren hastalıkların (Moller, 1998) doğumlardaki cinsiyet oranını etkilediği düşünülmektedir. Ayrıca, ebeveyn yaşı, doğum sayısı, sigara, alkol tüketimi, ebeveynlerin askerlik, pilotluk gibi stress oranı yüksek mesleklerde çalışması, genetik, sosyal, psikolojik ve ekonomik faktörler, koitus zamanı, doğal

seleksiyon gibi farklı etkenlerin doğumlardaki cinsiyet oranını değiştirebileceği düşünülmektedir.

İtalyanın Seveso kasabasında 1976 yılında 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-*p*-dioksin (TCDD) üretimi yapan bir fabrikada kaza sonucu çevreye çok miktarda TCDD yayılmış; tesis işçilerinde ve yakın çevrede yaşayan halkta kimyasala bağlı bazı istenmeyen durumlar gelişmiştir. Mocarelli ve ark. (1996) ve Mocarelli ve ark. (2000) tarafından yapılan iki çalışma neticesinde Seveso kazası sonrası özellikle 19 yaşın altına olduğu dönemde TCDD'ye maruz erkeklerin daha fazla kız çocuğuna sahip olduğunu görmüştür. Potashnik ve ark. (1984) 1,2-dibromo-3-kloropropan (DBCB) üretiminde çalışan erkek işçilerin daha fazla kız çocuğu olduğunu rapor etmiş; Goldsmith ve ark. (1984) bu duruma neden olan mekanizmayı Y kromozomu taşıyan spermelerde homolog kromozomların birbirinden ayrılamama yani “nondisjunction” durumunun daha yaygın görülmesi olarak açıklamıştır. Rylander ve ark. (1995) düşük konsantrasyonda ve uzun süreli PCB maruziyeti sonucu doğumlarda erkek:kız oranında azalma gözlemlemiştir. del Rio Gomez ve ark. (2002) yaptıkları çalışmalarında PCB ve poliklorodibenzofuran (PCDF) maruziyetinin doğumlardaki erkek:kız oranını azalttığını desteklemektedir. Michalek ve ark. (1998) Vietnam Savaşında ABD ordusunun biyolojik silah olarak kullandığı Turuncu Ajan nedeniyle dioksine maruz kalan erkek askeri personelde yaptıkları bir çalışmada görev bitiminden sonra 1 ay içerisinde hamile kalan eşlerinin kız çocuğuna sahip olma oranında düşüş gösterilmiştir. Kız çocuğu oranları yüksek maruziyet grubunda % 38,9, düşük maruziyet grubunda % 50,0, arkaplan maruziyet grubunda % 51,9 ve kontrol grubunda % 56,9 bulunmuştur. Karmaus ve ark. (2002) Michigan bölgesinde diklorodifenildikloroetilen (DDE) ve PCB ile kontamine olan balıkların tüketilmesinin cinsiyet oranı üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında daha önce bulunan sonuçlardan farklı olarak yüksek PCB kan konsantrasyonu (> 8,1 µg/L) olan babaların erkek çocuk sahibi olmaya daha yatkın olduğunu bulmuştur (erkek çocuk oranı % 57,1). Garry ve ark. (2002) Minesota'da (Red River Valley) klorofenoksi bileşikleri başta olmak üzere yaklaşık 15 farklı tür pestisit kullanan tarım işçilerinin çocuklarındaki doğum anomalilerini ve cinsiyet oranlarını incelemiştir. 1532 doğumda erkek:kız cinsiyet oranı pestisit kullanan çiftçilerde 0,91 iken

kullanmayanlarda 1,13 bulunmuştur. Ikeda ve ark. (2005) dişi sıçanların *in utero* ve laktasyonel dönemde tekrarlayan dozlarda TCDD'ye maruz bırakılmasından sonra doğan erkek sıçanların (F1) gonadlarının etkilediğini; bu erkeklerin yetişkin olduktan sonra normal dişilerle çiftleştirilmesi sonucu doğan F2 neslinde dişi oranının arttığını bulmuştur (maruziyet grubu: % 38 erkek, % 62 dişi; kontrol grubu: % 52,2 erkek, %47,8 dişi).

Milham (1993) alüminyum endüstrisinde çalışan işçilerde yaptığı araştırmada işyeri ortamında kirli hava, yüksek ısı ve güçlü manyetik alana maruz kalan karbon anot dizicilerinin çocuklarının doğum cinsiyet oranını 0,62 bulurken; diğer bölümlerde çalışanların çocuklarında 1,05 (genel popülasyonla aynı değer) bulmuştur. Figa - Talamanca ve Petrelli (2000) İtalya'da darphane çalışanlarında krom ve nikel maruziyetini değerlendirmişlerdir. Maruziyetin artmasıyla beraber doğumlardaki cinsiyet oranının azaldığını; en yüksek maruziyet grubunda cinsiyet oranını 0,50 bulurken; maruziyetin olmadığı kontrol grubunda 1,40 olarak bulmuştur. Simonsen ve ark. (2006) Danimarka'da akü fabrikasında kurşuna maruz kalan işçilerle Belçika, İtalya, İngiltere ve Finlandiya'daki işçilerin çocuklarındaki doğum oranlarını karşılaştırmıştır. Kan kurşun konsantrasyonu > 60 µg/dL olan erkeklerin çocuklarında 26 doğum için cinsiyet oranını 0,86 bulurken; 0 - 20 µg/dL konsantrasyon aralığında olan işçilerde 1,24 bulmuşlardır.

Japonya'nın Minamata körfezinde 1950'lerde çevre kirliliği nedeniyle birçok kişi metil civaya maruz kamıştır. Maruz kalan bireylerde görülen nörolojik hastalık Minamata hastalığı olarak isimlendirilmiştir. Sakamoto ve ark. (2001) olayın meydana geldiği 1955 - 1959 yılları arasında Minamata şehrinde doğum cinsiyet oranını 0,97 bulurken; maruziyetin daha yüksek olduğu Minamata körfezinde 0,85 bulmuştur. Sadece annelerin Minamata hastalığı taşıdığı durumlarda çocuklarındaki cinsiyet oranı 0,65; sadece babaların hasta olduğu durumda 1,06; ebeveyleerin her ikisinin de hasta olduğu durumlarda ise 0,63 bulunmuştur. Maruziyetin en yüksek olduğu bölge balıkçıların çocuklarında en düşük doğum cinsiyet oranı (0,62) tespit edilmiştir.

İnsanların hayatta kalma mücadelesi verdiği doğal afetler ve savaşlar gibi yıkıcı olayların cinsiyet oranını etkilediği düşünülmektedir. 1952 yılında Londra şehrinin üzerinin aylarca dumanla kaplandığı büyük çaplı hava kirliliği (The Great London Smoke) ve 1965'deki Brisbane su baskını sonrasında cinsiyet oranında belirgin bir düşüş yaşanmıştır (Lyster, 1974). Japonya tarihinin son 50 yılının en güçlü ve yıkıcı depremi olan 1995 Kobe depreminden 9 ay sonra doğan çocuklarda erkek:kız cinsiyet oranında ciddi bir düşüş görülmüş; erkek oranı % 51,6'dan % 50,1'e inmiştir (Fukuda ve ark., 1998). Çernobil felaketinden sonra Çek Cumhuriyeti'nde Peterka ve ark. (2004) yapmış olduğu bir çalışmada 1950 - 1999 yılları arasında doğum cinsiyet oranlarına kıyasla 1986 yılının Kasım ayında erkek:kız oranının daha düşük olduğunu görmüştür. Erkek çocuk doğum sayısındaki düşüşün kazanın meydana gelmesinden sonraki 6 ay içerisinde negatif seçimle erkek fötüslerin elenmesi sonucu olduğunu iddia etmişlerdir. Benzer bir çalışmayı Sherb ve Voigt (2007) Çernobil - Ukrayna'ya komşu 8 ülkede 1982 - 1992 yılları arasındaki doğum istatistiklerini inceleyerek yapmış; farklı olarak az ve anlamlı bir sıçrama ile erkek doğum oranının arttığını bulmuşlardır.

Lichtenfels ve ark. (2007) Brezilya - Sao Paulo'da havadaki PM-10 (havada bulunan 10 µm ve daha küçük partikül maddeler) konsantrasyonunun ($< 30 \mu\text{g}/\text{m}^3$) düşük olduğu bölgelerde sekonder cinsiyet oranını 34.795 doğum için 106,8 [(erkek:dişi)x 100] bulurken; kirliliğin yüksek düzeyde (PM-10 kons.= 31 - 61 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) yaşandığı bölgelerde 48.023 doğumda 102,9 olarak bulmuştur. Buradan hareketle şehir havasını taklit eden düzenek yardımıyla erkek fareleri benzer özellikteki havaya 4 ay boyunca maruz bırakmış ardından normal dişilerle çiftleştirmişlerdir. Sonuç, kirli havaya maruz kalan erkek farelerin bir sonraki nesillerinde cinsiyet oranı (86,0) kontrol grubuna (134,0) göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p = 0,04$).

Snyder (1961) ABD ordusunda yüksek hız ve irtifalarda g- kuvvetine maruz kalan pilotların görev süreleri ve uçuş saatlerini dikkate alarak yapmış olduğu çalışmada erkek:kız cinsiyet oranını 0,59 bulmuştur (ABD popülasyonu 1,05). Goerres ve Gebert (1976) jet, kargo uçağı ve helikopter pilotlarında 1613 doğum

üzerinde yaptıkları araştırmada 1000 saatin altındaki uçuş süresinde cinsiyet oranını 1,31 bulurken; 1000 - 2000 saat arasında 0,73 bulmuştur. 2000 saatin üzerindeki uçuşlarda ise cinsiyet oranında bir önceki gruba göre daha fazla düşüş bulunmamıştır. Little ve ark. (1987) yüksek düzeyde g-kuvvetine maruz kalan 44 jet pilotu ve 18 astronot için cinsiyet oranını 0,66 bulurken diğer askeri personelin çocuklarında cinsiyet oranının 1,03 olduğunu görmüştür. Irgens ve ark. (1999) Norveç ordusunda görev yapan pilotların çocuklarında cinsiyet oranını 0,59 bulmuştur. Fujita ve ark. (1999) yaptıkları benzer bir çalışmada g- kuvvetine maruz kalan pilotların çocuklarındaki cinsiyet oranını 0,91 bulmuştur (Japonya popülasyonu 1,06).

Mesleki iyonizan radyasyona maruziyetin erkek:kız oranına etkisini araştıran Macht ve Lawrence (1957) ABD’de çalışan radyologların çocuklarında 4127 doğumda cinsiyet oranını 1,03 bulmuştur. Bu sonuç maruz kalmayanların 3390 çocuğunun erkek:kız oranıyla (1,09) karşılaştırıldığında anlamsız bulunmuştur. Tanaka ve Ohkura (1958) Japonya’da teknisyenlerle benzer bir çalışma yapmış ve maruz kalan babaların çocuklarında cinsiyet oranını 1,25 bulmuştur (Japonya popülasyonu 1,05). Kitabake (1967) Japonya’da benzer çalışmayı radyologlar ve X-ışını kullanan röntgen teknisyenleri arasında yapmıştır. İyonizan radyasyon maruziyet grubunda 246 doğumdaki erkek:kız oranını 1,14 bulurken; kontrol grubunda oranı 1,04 bulmuştur. Zadeh ve Briggs (1997) Britanya’da çalışan ve sürekli X-ışınına maruz kalan ortopedik cerrahların çocuklarında farklı olarak düşük cinsiyet oranı (0,89) bulmuştur. Hama ve ark. (2001) işyerinde radyasyona maruz kalan ve kişisel dozimetri kullanan erkeklerin çocuklarında 1015 doğum üzerinden erkek:kız cinsiyet oranını 0,94; en yüksek doza maruz kalan grupta ise 0,53 olarak bulmuştur. Machonochie ve ark. (2001) Birleşik Krallık’ta nükleer endüstride 1937 - 1996 yılları arasında çalışmış olan 46.000’den fazla kişiden elde ettiği verilere göre cinsiyet oranları arasında anlamlı bir fark bulamamıştır. Genel popülasyonda doğumlardaki erkek:kız oranı 1,03 iken bu oranın çalışanlarda 1,06 olduğu görülmüştür.

Doğumlardaki cinsiyet oranlarında meydana gelen farklılıklar sperm hücrelerinin taşıdığı Y ve X kromozomlarının dağılım oranında olabilecek farklılıklarla ilişkilendirilmeye çalışılmıştır. Hernekadar spermatogenez sonunda Y ve X kromozomu taşıyan gamet oranının (Y:X) 1:1 olması beklense de bu durum değişkenliğe açıktır. Yapılan çalışmalar spermatogenez sırasında sürekli ve olağan germ hücresi ölümü gerçekleştiğini ve hatta hücrelerin % 75 kadarının apoptoza uğrayabileceğini göstermiştir (Huckins, 1978). Moleküler sitogenetik tekniklerin gelişmesiyle birlikte cinsiyet oranı farklılıklarının araştırıldığı çalışmalarda sperm Y, X kromozom dağılım oranını belirlemek amacıyla FISH yöntemi kullanılmıştır. FISH tekniği ilk kez 1980'lerin başında geliştirilen ve günümüzde birçok farklı uygulama şekli ve uygulama alanı olan bir yöntemdir. Kolay, hibridizasyon aşamasının hızlı ve güvenilirliğinin yüksek olması tekniğin tercih edilebilirliğini arttırmaktadır. Buna karşın floresan mikroskop altında yapılan değerlendirme aşamasının görsel sayımla gerçekleştirilmesi, çalışma süresinin teknisyenin kapasitesi ile sınırlı olması ve floresan özellikli işaretleyici problemlerin görece olarak yüksek maliyetli olması yöntemin dezavantajı olarak kabul edilebilir.

Tiido ve ark. (2006) İsveç, Grönland, Ukrayna ve Polonya'da 2,2,4,4,5,5-hegzaklorobifenil (PCB-153) ve DDE kimyasallarına maruz kalan 547 erkeğin sperm Y:X kromozom oranlarını FISH yöntemi ile karşılaştırmışlardır. İsveç ve Grönland'da sırasıyla ortalama 260 ng/g ve 350 ng/g (lipid) serum PCB-153 konsantrasyonu olan erkeklerin sperm Y:X kromozom oranları sırasıyla 22 ng/g ve 54 ng/g PCB-153 konsantrasyonu olan Polonya ve Ukrayna'daki erkeklerden daha yüksek bulunmuştur.

Perez - Crespo ve ark. (2008) farelerin skrotum ısılarını 42 °C'ye 30 dk süreyle çıkartarak; 6 saat, 7, 14, 21, 28 ve 60 gün sonra spermilerin konsantrasyon, canlılık, motilite DNA bütünlüğü ve ısı artışının doğum cinsiyet oranı üzerine etkileri incelemiştir. Isı maruziyetinin olduğu gün gerçekleştirilen çiftleştirmelerden doğan nesilde erkek oranı anlamlı düzeyde düşük bulunurken (~% 40); PCR yöntemi kullanılarak sperm Y ve X kromozom dağılımlarının incelenmesi neticesinde anlamlı fark çıkmamıştır.

Stone ve ark. (2013) ilerleyen yaşın sperm parametrelerine etkilerini araştırdıkları alışlarında 4822 meni rneği incelemiş ve 259 FISH analizi yapmıştır. Sonuç olarak 34 yaşına kadar ölçülen parametrelerin değişiklik göstermediği sonrasında ise toplam sperm sayısı ve motil sperm sayısında gerileme olduğu görülmüştür. 40 yaşından sonra sperm konsantrasyonunda ve normal morfolojiye sahip sperm oranında düşüş gözlenmiştir. Ejekülat hacminde 45 yaşından sonra azalma gözlenmiştir. 55 yaşından sonra sperm Y:X kromozom oranının düşmesi (1,00) anlamlı bulunmuştur (~ 34 yaş grubu sperm Y:X kromozom oranı 1,08).

Kvist ve ark. (2014) FISH yöntemi kullanarak Danimarka'nın Farore adasında yüksek düzeyde PCB ve DDE'ye maruz kalan erkeklerin Y kromozomu taşıyan sperm oranını % 50; maruziyetin düşük olduğu Grönland ve İşve balıkçılarının ise % 51,2 bulmuştur ($p < 0,001$). Bununla 449 kişinin katıldığı çalışmada üreme sistemi üzerine herhangi bir olumsuz etki gözlenmemiştir.

Jurewicz ve ark. (2016) FISH yöntemi kullanarak çevresel endokrin bozucu kimyasallardan olan ftalatlar, sentetik pretroidler ve polisiklik aromatik hidrokarbonların (PAH) insan vücudundaki metabolitlerinin artan konsantrasyonlarının Y kromozomu taşıyan sperm sayısındaki azalma ile ilişkili olabileceğini göstermiştir.

Çevresel endüstriyel kirleticiler (PCB, TCDD, DDE, ağır metaller), fizikokimyasal (radyasyon) ve fiziksel (sıcaklık artışı, g- kuvveti) etkilerin yanısıra yüksek konsantrasyonlarda bora maruz kalmanın da üreme sistemi ve cinsiyet oranı üzerine muhtemel etkilerininin araştırıldığı çalışmalar mevcuttur. Yapılan hayvan deneylerinde yüksek dozlardaki borik asit ve sodyum boratların üreme sistemi üzerinde toksik etkilere neden olabileceği görülmüştür (Weir ve Fisher, 1972; Silaev ve ark., 1977; Dixon ve ark., 1979; Fail ve ark., 1989; Linder ve ark., 1990; Ku ve ark., 1993; Price ve ark., 1997). Bu nedenle işyeri ortamı (zellikle bor maden işçileri) ve yaşadığı coğrafyadan dolayı (su, toprak) yüksek miktarda bora maruz kalan insanların üreme fonksiyonları ve üreme sistemleri üzerindeki olası etkiler araştırılmıştır. Whorton ve ark. (1994a) ABD Kaliforniya'da boraks üretim tesisinde

görev yapan 542 erkek işçinin çocuklarında cinsiyet dağılım oranını % 47,3 erkek ve % 52,7 kız olarak bulmuştur. Bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı fakat tam sınırdaki bir değer olduğu belirtilmiştir. Şaylı ve ark. (1998a) ülkemizde içme suyunda yüksek miktarda bor içeren yerleşim yerlerinde bor alımının fertilité üzerine etkilerini incelemiştir. Bölgeleri 8,5 - 29 mg Bor/L (Bölge-I); 2,05 - 2,5 mg Bor/L (Bölge-II) ve 0,03 - 0,40 mg Bor/L olacak şekilde üç bölgeye ayırmıştır. Bölge-I'de bulunan 1068 aile ve Bölge-II'de bulunan 610 aileden elde edilen verilere göre fertilité oranı Türkiye ortalamasında bulunmuştur. Bölge-I'de doğan tüm çocukların erkek:kız oranı 0,89 bulunmuş; Bölge-II'de bu oranın 1,04 olduğu görülmüştür. İçme sularındaki artan bor konsantrasyonuna bağlı olarak borun üreme üzerine etkisi olabileceği düşünülmüştür. Şaylı ve ark. (1998b) Balıkesir, Kütahya ve Eskişehir il sınırlarında bulunan bor cevherince zengin 6 alanda yaptıkları bir başka çalışmada içme suyunda 0,7 - 29 mg Bor/L ve 0,05 - 0,45 mg Bor/L olan yerlerde yaşayan kişilerin üreme fonksiyonları araştırılmıştır. 927 vaka üzerinden yürütülen çalışmada infertilité, düşükler, ölü doğumlar, malformasyonlar gibi etkiler araştırılmıştır. Borun fertilité ve üreme üzerine olumsuz etkisi görülmemiştir. Doğumlardaki erkek:kız cinsiyet oranı 0,989 olarak bulunurken Türkiye popülasyonu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark görülmemiştir. Çöl ve ark. (2000) ülkemizdeki 3 bor işletme tesisinde görevli 642 üretim çalışanı ve 157 ofis personelinin katıldığı çalışmalarından elde ettikleri fertilité ve cinsiyet oranları (1,12) değerlerinde anlamlı bir fark bulmamıştır (Türkiye genel popülasyonu 1,08). Şaylı (2003) Bandırma boraks ve borik asit fabrikalarında çalışan 191 kişi ile yaptığı bir çalışmada meslek maruziyetine bağlı olarak üreme fonksiyonları üzerinde herhangi bir olumsuz etkinin olmadığını vurgularken; toplam 307 doğumun cinsiyet oranını 1,0 olarak bulmuştur. Yazbeck ve ark. (2005) Kuzey Fransa'da içme sularında 0,30 mg/L ve daha fazla bor içeren bölgelerde yaşayanların, 0,00 – 0,09 mg/L'ye kadar bor içeren bölgelerde yaşayanlara göre nispeten daha fazla kız çocuğuna sahip olduğunu rapor etmişlerdir. Bor konsantrasyonu yüksek su tüketen bölgedeki 72.993 doğumda kız oranı % 49,1 bulunurken; düşük maruziyet olan bölgedeki oran 84.305 doğumda kız oranı % 48,8 bulunmuştur. Sonuçlara göre aradaki fark anlamlı çıkmamıştır ($p = 0,45$). Chang ve ark. (2006) Çin'de bor madeni çıkarılması ve işlenmesinde çalışan 936 işçi ve 251 kişilik kontrol grubunu dahil ettikleri çalışmalarında maruziyet grubunda doğum

cinsiyet oranının % 52,45 erkek; kontrol grubunda ise aynı oranı % 54,35 bulmuştur. Maruziyet grubunda (n= 843) erkek çocuğu daha fazla olan aile oranı % 55,52; kontrol grubunda (n= 244) %60,31 bulunmuştur (p= 0,234). Robbins ve ark. (2008) Çin’de bor endüstrisinde çalışan yüksek dozda bora maruz kalan 63 işçi, çalışmayan fakat yüksek düzeyde bora maruz kalan 39 kişinin ve kontrol grubu olarak daha az bora maruz kalan 44 işçinin sperm Y:X kromozom oranlarını FISH yöntemi kullanarak karşılaştırmışlardır. Çalışmada yüksek dozda maruz kalan işçilerin sperm Y:X kromozom oranı (0,93) kontrol grubuna (0,99) göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur (p< 0,05). Yapılan anketlerde ise yüksek seviyede bora maruz kalan işçi grubunda toplam erkek çocuk sayısının daha fazla olduğu görülürken bu durumun kontrol grubuna göre anlamlı olmadığı sonucuna varılmıştır. Zaman içerisinde bu çalışmanın çok sayıda eleştirisi olması nedeniyle veriler Scialli ve ark. (2010) tarafından tekrar değerlendirmeye alınmıştır. İkinci değerlendirmede Robbins ve ark. (2008)’dan farklı olarak tüm bulgular kontrol grubuyla birlikte tek bir veri havuzu oluşturacak şekilde sıralanmıştır. Sonuç olarak kan ve meni bor konsantrasyonlarının artmasına karşı sperm Y:X kromozom oranında anlamlı bir değişimin olmadığı görülmüştür. Laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalarda borun erkek üreme sistemi üzerine olumsuz etkiler gösterdiği bulunmasına rağmen; Çin’de işyeri ortamında yüksek düzeyde bora maruz kalan çalışanlarda benzer olumsuz etkilerin olduğuna dair net bir bulgunun olmadığı vurgulanmıştır.

Ülkemizde konu ile ilgili yapılan detaylı araştırmalar, bor maruziyetinin erkeklerde üreme toksisitesi oluşturmadığını göstermektedir (Duydu ve ark. 2011; Duydu ve ark., 2012). Ancak ülkemizde bor maruziyetinin erkeklerde sperm Y:X kromozom oranlarını etkileyip etkilemediği yönünde bir araştırma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamız ülkemizde bu konuda yapılmış olan ilk çalışmadır. Dünyada ise Robbins ve ark. (2008) tarafından yapılmış olan benzer araştırmadan sonraki ikinci çalışma niteliğindedir. Dünyada bu konuda fazla veri bulunmadığı düşünüldüğünde çalışmamız literatüre önemli bir katkıda bulunmuştur.

Araştırmamızda Bandırma Borik Asit Fabrikası’nda çalışan işçilerden alınan meni numunelerinde tespit edilen sperm Y:X kromozom oranlarının yüksek bor

maruziyetinden etkilenip etkilenmediği incelenmiştir. Elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre kan bor konsantrasyonu ortalaması $63,56 \pm 43,89$ ng Bor/g kan olan kontrol grubu işçilerinin sperm Y:X kromozom oranının, kan bor konsantrasyonu ortalaması $141,55 \pm 80,43$ ng Bor/g kan olan maruziyet grubu işçilerinden istatistiksel olarak farklı olmadığı ($p > 0,05$) bulundu (Çizelge 3.4 ve 3.5). Buna ilave olarak kan bor konsantrasyonu ile sperm Y:X kromozom oranı arasında anlamlı bir korelasyonun olmadığı da tespit edildi (Çizelge 3.5). Kan bor konsantrasyonun, maruz kalınan bor miktarının en önemli biyogöstergesi (exposure biomarker) olduğu göz önünde bulundurulduğunda; yüksek seviyedeki bor maruziyetinin erkek gönüllülerdeki sperm Y:X kromozom oranını etkilemediği görülmektedir. Diğer taraftan, yapmış olduğumuz çalışmada sperm Y:X kromozom oranlarının erkek gönüllülerin menilerinde tespit edilen bor konsantrasyonlarından etkilenip etkilenmediği de araştırılmıştır. Elde etmiş olduğumuz sonuçlara göre meni bor konsantrasyonu ortalaması $1127,78 \pm 1713,97$ ng Bor/g meni olan kontrol grubu işçilerinin sperm Y:X kromozom oranlarının, meni bor konsantrasyonu ortalaması $1703 \pm 1895,09$ ng Bor/g meni olan maruziyet grubu işçilerinden istatistiksel olarak farklı ($p > 0,05$) olmadığı bulundu (Çizelge 3.4 ve 3.5). Buna ilave olarak meni bor konsantrasyonu ile sperm Y:X kromozom oranları arasında anlamlı bir korelasyonun olmadığı tespit edildi (Çizelge 3.5). Bu son derece önemli bir bulgu olarak karşımıza çıkmaktadır.

Çizelge 4.1. Borun menide birikme oranı.

	Meni Bor / Kan Bor	Menide birikme oranı
Kontrol grubu (n= 77)	1127,78 / 63,56	17,73
Maruziyet grubu (n= 86)	1703 / 141,55	12,03

Çizelge 4.1’de borun kontrol grubundaki meni örneklerinde ortalama 17,73 kat, maruziyet grubundaki meni örneklerinde ise ortalama 12,03 kat biriktiği (konsantre) görülmektedir. Bu yüksek orandaki birikme eğilimi menide oldukça yüksek bor konsantrasyonlarının oluşmasına sebep olmaktadır. Ancak meni örneklerinde oluşan bu yüksek bor konsantrasyonlarına rağmen sperm Y:X kromozom oranlarının etkilenmediği bulundu (Çizelge 3.5).

Çalışmamızda kontrol ve maruziyet grubundaki işçilere ait çocukların erkek ve kız sayıları da karşılaştırılmıştır (Grafik 3.10 ve Çizelge 3.3). İstatistiksel analiz sonucunda, kontrol ve maruziyet grubunda yer alan gönüllülerin erkek ve kız çocuk sayılarının birbirinden anlamlı bir farklılık göstermediği bulundu (χ^2 ; $p > 0,05$).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Avrupa Birliği, “General Classification and Labeling Requirements for Dangerous Substances and Preparations (67/548/EEC)” kapsamında borik asit ve sodyum boratları hayvan deneylerinde yüksek dozlarda ortaya çıkan üreme fonksiyonu üzerindeki toksik etkileri nedeniyle kategori 2 altında sınıflandırmıştır. Sonradan yönetmelikler arasında yapılan uyumlaştırmalar neticesinde, şu anda borik asit ve sodyum boratlar CLP yönetmeliğine göre kategori 1B altında “presumed human reproductive toxicant” olarak sınıflandırılmaktadır. Yönetmelik kategori 1A ve 1B altında sınıflanmış olan kimyasal maddelerin kullanımının izne tabi olmasını (authorization) gerektirmektedir. Bu gereklilik nedeni ile şu anda borik asit ve sodyum boratlar “authorization” için aday kimyasal maddeler listesinde yer almaktadır.

Bu gelişmeler devam ederken Avrupa Birliği “WA. Robbins ve arkadaşlarının” 2008 yılında yayınlamış olduğu bir araştırma sonucunu temel alarak, yüksek düzeyde bor maruziyetinin erkek sperm hücrelerindeki Y:X kromozom oranını X kromozomunun lehine bozduğunu gündeme getirmişlerdir. Bor maruziyetinin yüksek olduğu bölgelerde kız çocuk doğumlarının erkek çocuk doğumlarına göre daha fazla olduğu ve bu durumun da bor maruziyetinin istenmeyen önemli etkilerinden biri olduğu vurgulanmıştır.

CLP yönetmeliği kapsamında borik asit ve sodyum boratların yukarıdaki şekilde sınıflandırılmış (kategori 1B) olması ve sperm Y:X kromozom oranının bor maruziyeti ile etkileniyor olması şeklinde yeni ortaya atılmış olan iddialar, ülkemizde üretilmekte olan bor ürünlerinin pazarlanmasında önemli sıkıntıları beraberinde getirmektedir. Konuya bu açıdan yaklaşıldığında bu doktora tezi kapsamında yapılan çalışmanın önemi bir kat daha artmaktadır.

Bu doktora tez çalışması neticesinde iş yeri ortamında yüksek düzeyde bor maruziyetinin erkeklerde sperm Y:X kromozom oranını değiştirmediği ve maruz kalan kişilerde kız çocuk sayısının erkek çocuk sayısına gre farklılık gstermediği bulundu. Bu sonuç, Avrupa Birliği'nin bu konudaki iddiasının doğru olmadığını açık bir şekilde gstermektedir.



ÖZET

Bor Maruziyetinin İnsanların Üreme Fonksiyonları Üzerindeki Toksik Etkilerinin İncelenmesi

Bor, atom numarası 5, atom ağırlığı 10.81 g/mol, kimyasal sembolü B ile gösterilen bir 3A grubu elementidir. Oksijen ve diğer elementlerle oluşturduğu bileşiklere borat denir. Doğada 230 çeşit bor minerali vardır. Genellikle sodyum (Na), kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) gibi metallerle bileşikler halinde bulunur. Kolemanit, üleksit, tinkal gibi kalsiyum veya sodyum boratlar en önemlileridir. Bu bor bileşikleri doğada su ile çözünerek borik asit formuna dönüşür. Bor bileşiklerinin oral alım sonucu fizyolojik sıvılarda (kan, idrar, vb) gözlenen formu borik asittir. Borik asit ve sodyum boratlar ülkemizin en önemli madencilik ihracat ürünlerindendir. Borun bitkiler için esansiyel olduğu bilinmekte; insanlar için de esansiyel olabileceğini destekleyen çalışmalar olmasına rağmen bu durum henüz tartışmalıdır. Borik asit ve sodyum boratların hayvan deneylerinde yüksek dozlarda üreme sistemi üzerinde toksik etkileri olduğu görülmüştür. İnsanlarda bor maruziyeti ile ilişkili reproduktif veriler son derece kısıtlıdır.

Bu doktora tez çalışmasında yüksek seviyede bora (borik asit ve sodyum borat) maruz kalmış olan erkek işçilerin sperm hücrelerindeki Y:X kromozom oranları floresan *in situ* hibridizasyon (FISH) yöntemi kullanılarak incelendi. Bu yöntemle, maruziyet ve kontrol grubu sperm örneklerindeki Y:X kromozom oranları karşılaştırıldı.

İşçilerin biyolojik sıvılarındaki bor seviyeleri (kan, meni ve idrar) ve sperm Y:X kromozom oranı arasındaki korelasyon anlamlı bulunmadı. Sperm Y:X oranı yeniden oluşturulmuş kontrol, düşük, orta ve yüksek maruziyet gruplarıyla karşılaştırıldığında sonuçlar anlamlı bulunmadı. Ayrıca maruziyet ve kontrol gruplarının çocuklarının cinsiyet oranları (erkek çocuk sayısı ve kız çocuk sayısı) arasındaki fark anlamlı bulunmadı.

Anahtar Kelimeler: Bor, Erkek:kız doğum cinsiyet oranı, Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH), Sperm kromozom Y:X oranı, Üreme toksisitesi.

SUMMARY

Evaluation of Toxic Effects of Boron Exposure on Human Reproductive Function

Boron is a group 3A element with atomic number of 5, atomic weight of 10.81 g/mol, and a chemical symbol of B. The compounds with oxygen and other elements (K, Na, etc.) are called borates. There are 230 types of boron minerals found in nature. Colemanite, ulexite and tincal are the most common forms of sodium/calcium borates. Boron compounds when solve in water transforms to boric acid. Boric acid is the detected form of borates in biological fluids (blood, urine etc.) when ingested. Sodium borates and boric acid are among the most important exportation products of Turkey. It is well known that boric acid is essential for plants. However the essentiality of boric acid for humans is still under negotiation. Boric acid and sodium borates have been considered as being toxic to reproductive system in animal experiments. Reproductive data of boron exposure is very limited.

The ratio of Y:X chromosome in semen samples of occupationally boron exposed male workers were investigated by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH) assay in this doctoral thesis. The Y:X ratios determined in the boron exposed group were compared with the Y:X ratios determined in the control group in order to assess the boron mediated effects on the Y:X ratio.

The correlation between the Y:X ration and the boron concentrations in biological fluids (semen, blood and urine) were statistically not significant. On the other hand, the Y:X sperm ratios were compared between the re-constituted control, low, medium and high-exposure groups. However the difference in Y:X ratios between the exposed and control groups were again statistically not significant. Additionally, the offspring sex ratios at birth in exposure and control group (the number of boys and girls) was statistically not different from each other.

Key words: Boron, Flourescence *in situ* hybridization (FISH), Male:female birth sex ratio, Reproductive toxicity, Sperm kromozom Y:X ratio.

KAYNAKLAR

- ABRAHAM L (2002). Kierszenbaum Histology and Cell Biology, 2th Ed. Mosby, s.: 529-550.
- ALLAN BB, BRANT R, SEIDEL JE, JARREL JF (1997). Declining sex ratios in Canada. *Can Med Assoc Journal*, **156**: 37–41.
- ANONİM (1995). Kimya Sanayi Hammaddeleri Çalışma Grubu Raporu, DPT, Madencilik Özel İhtisas Komisyonu Endüstriyel Hammaddeler Alt Komisyonu, Bor Mineralleri, Ankara.
- ARMSTRONG TA, SPEARS JW (2003). Effect of boron supplementation of pig diets on the production of tumor necrosis factor-alpha and interferon-mamma. *Anim Sci J*, **81(10)**: 2552-2561.
- ARTAN S (1996a). FISH tekniğinde kullanılan probalar ve özellikleri, Teorik ve Pratik Floresan *in situ* Hibridizasyon, Ed.Başaran, N.; Etam, 14-25, Eskişehir.
- ARTAN S, (1996b). Rutin FISH uygulamaları, Teorik ve Pratik Floresan *in situ* Hibridizasyon, Ed. Başaran, N.; Etam, 51-59, Eskişehir.
- BAIN J (2007). The many faces of testosterone. *Clinical Interventions in Aging*, **2**: 567-576.
- BARRANCO WT, HUDAK PF, ECKHERT CD (2007). Evaluation of ecological and *in vitro* effects of boron on prostate cancer risk (United States). *Cancer Causes&Control*, **18(1)**: 71-77.
- BISHOP R (2010). Applications of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in detecting genetic aberrations of medical significance. *Bioscience Horizons*, **3(1)**: 85-95.
- BROOK CG (1999). Mechanism of puberty. *Hormonal Response*, **51**: 52-54.
- CHANG BL, ROBBINS WA, WEI F, XUN L, WU G, LI N (2006) Boron workers in China: Exploring work and lifestyle factors related to boron exposure. *American Association of Occupational Health Nurses J*, **54**: 435-543.
- CHAPIN RE, KU WW, KENNEY MA, McCOY H, GLADEN B, WINE RN, WILSON R, ELWELL MR (1997). The effects of dietary boron on bone strength in rats. *Fundamental Appl Toxicol*, **35**: 205-215.
- CIA THE WORLD FACTBOOK (2014). Erişim Adresi: [https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/fields/2018.html]. Erişim Tarihi: 07/05/2016.
- CLERMONT Y (1966). Renewal spermatogenesis in man. *Am J Anat*, **118**: 509–524.
- ÇÖL M, ÇÖL C (2003). Environmental boron contamination in waters of Hisarcik area in the Kütahya Province of Turkey, *Food Chem Toxicol*, **41**: 1417-1420.

- ÇÖL M, ŞAYLI BS, GENÇ Y, ERÇEVİK E, ELHAN AH, KEKLİK A (2000). An assesment of fertility in boron-exposed workers in Turkey: An epidemiological Approach. *Türkiye Klinikleri J Med Res*, **18(1)**: 10-16.
- DEL RIO GOMEZ I, MARSHALL T, TSAI P, SHAO YS, GUO YL (2002). Number of boys born to men exposed to polychlorinated byphenyls. *Lancet*, **360(9327)**: 143-144.
- DEVIRIAN TA, VOLPE SL (2003). The physiological effects of dietary boron. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **43**: 219-231.
- DICKINSON HO, PARKER L (1996). Why is the sex ratio falling in England and Wales? *J. Epidemiol Commun Health*, **50**: 227-228.
- DIXON RL, SHERINS RJ, LEE IP (1979). Assessment of environmental factors affecting male fertility. *Environ Health Perspect*, **30**: 53-68.
- DURAK B (2005). Hematolojide FISH. Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kurs Kitapcığı. Taksim International Otel 12-13 Mart, Mersin.
- DURAK B (2006). Akut Lösemilerde FISH Paneli ve Prognoz. Türk Hematoloji Derneği'nin Eğitim Çalışmalarından Bilimsel Alt Komite Kursları, Akut Lösemi Kursu, Anemon Otel 8-9 Nisan, Aydın. Kurs Kitapcığı 15-18.
- DUYDU Y, BAŞARAN N, BOLT HM (2012) Exposure assessment of boron in Bandırma boric acid production plant. *J Trace Elem Med Biol*, **26**: 161-164.
- DUYDU Y, BAŞARAN N, ÜSTÜNDAĞ A, AYDIN S, ÜNDEĞER Ü, ATAMAN OY, AYDOS K, DÜKER Y, ICKSTADT K, WALTRUP BS, GOLDKA K, BOLT HM (2011). Reproductive toxicity parameters and biological monitoring in occupationally and environmentally boron-exposed persons in Bandırma, Turkey. *Arch Toxicol*, **85**: 589-600.
- DUYDU Y, BAŞARAN N, ÜSTÜNDAĞ A, AYDIN S, ÜNDEĞER Ü, ATAMAN OY, AYDOS K, DÜKER Y, ICKSTADT K, WALTRUP BS, GOLDKA K, BOLT HM (2012). Assessment of DNA integrity (COMET assay) in sperm cells of boron-exposed workers. *Arch Toxicol*, **86**: 27-35.
- EMANUEL BS (1993). The use of flourescence *in situ* hybridization to identify human chromosomal anomalies. *Growth: Genetics and Hormones* **9(1)**: 6-12.
- FIGA-TALAMANCA I, PETRELLI G (2000). Reduction in male births among workers exposed to metal fumes. *Int J Epidemiol*, **29**: 381-383.
- FUJITA M, KOBAYASHI H, ARAI T, KIKUCHI M, YOSHIZU H, TANAKA S (1999). Sex ratio in offspring of fighter-pilots and fighterradar-technicians. *Nat Defense Med J*, **46**: 12-16.
- FUKUDA M, FUKUDA K, SHIMIZU T (1998). Decline in sex ratio at birth after Kobe earthquake. *Human reproduction*, **13**: 2321-2322.
- GALLARDO-WILLIAMS MT, CHAPIN RE, KING PE, MOSER GJ, GOLDSWHORTY TL, MORRISON JP, MARONPOT RR (2004). Boron supplementation inhibits the

- growth and local expression of IGF-1 in human prostate adenocarcinoma (LNCaP) tumors in nude mice. *Toxicologic Pathology*, **32(1)**: 73-8.
- GARRY VF, HARKINS ME, ERICKSON LL, LONG-SIMPSON LK, HOLLAND SE, BURROUGHS BL (2002). Birth defects, season of conception, and sex of children born to pesticide applicators living in the Red River Valley of Minnesota, USA. *Environ Health Perspect*, **110(3)**: 441-449.
- GOERRES HP, GEBERT K (1976). Sex ratio in offspring of pilots: A contribution to stress research. *Aviat Space Environ Med*, **47**: 889-892.
- GOLDSMITH JR, POTASHNIK G, ISRAELI R (1984). Reproductive outcomes in families of DBCP-exposed men. *Arch Environ Health*, **39(21)**: 85-89.
- GONZALEZ - MARIN C, GOSALVEZ J, ROY R (2012). Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci*, **13**: 14026-14052.
- GRAJETA H (2003). Nutrition in prevention and treatment of osteoporosis. *Przegl Lek*, **60(10)**: 649-653.
- GREENWOOD NN, EARNSHAW A (1997). Chemistry of the elements. (2nd Ed). Vol. Butterworth-Heinemann, Oxford, Boston.
- HAMA Y, UEMATSU M, SAKURAI Y, KUSANO S (2001). Sex ratio in the offspring of male radiologists. *Acad Radiol*, **8**: 421-424.
- HEBERT DC, SUPAKAR PC, ROY AK (1995). Male Reproduction. Witorsch RJ (Ed.), Reproductive Toxicology, New York: Raven Press, s.: 3-21.
- HUCKINS C (1978). The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec*, **190**: 905-926.
- HULEIHEL M, ABUELHIJA M, LUNENFELD E (2007). *In vitro* culture of testicular germ cells: Regulatory factors and limitations. *Growth factors*, **25(4)**: 236-252.
- HUNT CD (1996). Biochemical effects of physiological amounts of dietary boron. *J Trace Elem Exp Med*, **9**: 185-213.
- HUNT CD, IDSO JP (1999). Dietary boron as a physiological regulator of the normal inflammatory response: a review and current research progress. *The Journal Trace Elements in Experimental Medicine*, **12**: 221-233.
- IAVAZZO C, GKEGKES ID, ZARKADA IM, FALAGAS ME (2011). Boric acid for recurrent vulvovaginal candidiasis: the clinical evidence. *Journal of Women's Health (Larchmt)*, **20(8)**: 1245-55.
- IEHR (Institute for Evaluating Health Risks). (1997). An assessment of boric acid and borax using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents.

- IPCS (International Programme on Chemical Safety) (1998). Boron, Environmental Health Criteria (EHC), WHO, Geneva, Switzerland, 204: 1-192.
- IRGENS A, IRGENS LM (1999). Male proportion in offspring of military air pilots in Norway. *Nor Epidemiol*, **9**: 47-49.
- JANGUERIA LC, CARNEIRO J, KELLEY OR (1998). Temel histoloji, Çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S, Ahışhalı B, Barış kitabevi, s.: 407-422.
- JIANG MH, CAI B, TUO Y, WANG J, ZANG ZJ, TU X (2014). Characterization of Nestin-positive stem Leydig cells as a potential source for the treatment of testicular Leydig cell dysfunction. *Cell Research*, **24**: 1466-1485.
- JONES R (1999). To store or mature spermatozoa? The primary role of the epididymis. *International Journal of Andrology*, **22**: 57-67.
- JUREWICZ J, RADWAN M, SOBOLA W, RADWAN P, JAKUBOWSKI L, WIELGOMAS B, LIGOCKA D, BREZEZNICKI S, WOJCIECH H (2016). Exposure to widespread environmental endocrine disturbing chemicals and human sperm sex ratio. *Environmental Pollution*, **213**: 732-740.
- KALRA SP, CROWLEY WR (1984). Norepinephrine-like effects of neuropeptide – Y on LH release in the rat. *Life Sci*, **35**: 1173-1176.
- KARMAUS W, HUANG S, CAMERON L (2002). Parental concentration of dichlorodiphenyl, dichloroethene and polychlorinated biphenyls in Michigan fish eaters and sex ratio in offspring. *J Occup Environ Med*, **44(11)**: 8-13.
- KARTALCI Ş (2010). Testosteron ve depresyon. *Psikiyatriye Güncel Yaklaşımlar*, **2(4)**: 457-472.
- KITABAKE T (1960). Sterility, stillbirth, infant death, and sex-ratio of offspring of X-ray workers. *Nagoya J Med Sci*, **1960**: 227-237.
- KU WW, CHAPIN RE, WINE RN, GLADEN BC (1993). Testicular toxicity of boric acid (BA): Relationship of dose to lesion development and recovery in the F344 rat. *Reproductive Toxicology*, **7**: 305-319.
- KVIST L, GIWERCMAN A, WEIHE P, JENSEN KOLD T, GRANDJEAN P, HALLING J, SKAALUM P, GIWERCMANN LUNDBERG Y (2014). Exposure to persistent organic pollutants and sperm sex chromosome ratio in men from the Faroe Islands. *Environment International*, **73**: 359-364, 2014.
- LEE IP, SHERINS RJ, DIXON RL (1978). Evidence for induction of germinal aplasia in male rats by environmental exposure to boron. *Toxicol Appl Pharmacol*, **45**: 577-590.
- LICHTENFELS AJ, GOMES JB, EL KHOURI MIRAGLIA SG, HALLAK J, SALDIVA PH (2007). Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in Sao Paulo, Brazil. *Fertil Steril*, **87(1)**: 230-232.
- LINDER RE, STRADER LF, REHNBERG GL (1990). Effect of acute exposure to boric acid on the male reproductive system of the rat. *J Toxicol Environ Health*, **31**: 133-146.

- LITTLE BB, RIGSBY CH, LITTLE LR (1987). Pilot and astronaut offspring: Possible G-force effects on human sex ratio. *Aviat Space Environ Med*, **58**: 70-79.
- IKEDA M, TAMURA M, YAMASHITA J, SUZUKI C, TOMITA T (2005). Repeated *in utero* and lactational 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin exposure affects male gonads in offspring, leading to sex ratio changes in F2 progeny. *Toxicol Appl Pharmacol*, **206 (31)**: 351-355.
- LYSTER WR (1974). Altered sex ratio after the London smog of 1952 and the Brisbane flood of 1965. *J Obstet Gynaecol Br Commonwlth*, **81**: 626-631.
- MACHT SH, LAWRENCE PS (1955). National survey of congenital malformations resulting from exposure to roentgen radiation. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, **73**: 442-466.
- MACONOCHIE N, ROMAN E, DOYLE P, DAVIES G, SMITH PG, BERAL V (2001). Sex ratio of nuclear industry employees' children. *Lancet*, **357**: 1589-1591.
- MARIEB EN (2001). Human Anatomy and Physiology, 5th Ed, Benjamin Cummings, San Francisco. s.: 567-588.
- MEACHAM SL, TAPER LJ, VOLPE SL (1994). Effects of boron supplementation on bone mineral density and dietary, blood, and urinary calcium, phosphorus, magnesium, and boron in female athletes. *Environmental Health Perspectives*, **102**: 79-82.
- MERGAN A, CÜCE S, TÜRKÖZ KOCABAŞ M, YILMAZ O (2006). Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü Tarafından Borun İnsan Sağlığı Üzerine Etkilerine Yönelik Yapılan Çalışmalar. III. Uluslararası Bor Sempozyumu, Kasım, Ankara.
- MICHALEK JE, RAHE AJ, BOYLE CA (1998). Paternal dioxin and the sex of children fathered by veterans of Operation Ranch Hand. *Epidemiology*, **9**: 474-475.
- MILHAM S (1993). Unusual sex ratio of births to carbon setter fathers. *Am J Ind Med*, **23**: 829-831.
- MOCARELLI P, BRAMBILLA P, GERTHOUX PM, PATTERSON DG, NEEDHAM LL (1996). Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet*, **348(90241)**: 409-420.
- MOCARELLI P, GERTHOUX PM, FERRAI E, PATTERSON DG, KIESZAK SM, BRAMBILLA P (2000). Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet*, **355(9218)**: 1858-1863.
- MOLLER H (1996). Change in male: female ratio among newborn infants in Denmark. *Lancet*, **348**: 828-829.
- MOLLER H (1998). Trends in sex ratio, testicular cancer and male reproductive hazards: are they connected? *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, **106**: 232-238.
- MOORE JA (1997). Expert Scientific Committee. An assessment of boric acid and borax using the IEHR evaluative process for assessing human developmental and reproductive toxicity of agents. *Reproductive Toxicology*, **11**: 123-160.

- MURMU N, MITRA S, DAS M, GOMES A, VEDASIROMONI JR, GHOSH M, BHATTACHARYA M, GHOSH P, BISWAS J, BHATTACHARYA S, SUR P (2001). Boron compounds against human leukemic cells. *J Exp Clinical Cancer Research*, **20(3)**: 511-515.
- NAKAGAWA Y, HATANAKA H (1997). Boron neutron capture therapy, Clinical brain tumor studies. *Journal of Neuro-Oncology*, **33**: 105-115.
- NANASSY L, LIU L, GRIFFIN J, DOUGLAS T (2011). The Clinical Utility of the Protamine 1/Protamine 2 Ratio in Sperm. *Protein & Peptide Letters*, **18(3)**: 1-6.
- NIELSEN FH (1998). The justification for providing dietary guidance for the nutritional intake of boron. *Biological Trace Element Research*, **66(1-3)**: 319-330.
- NIELSEN FH (2008). Is boron nutritionally relevant? *Nutrition Review*, **66(4)**: 183-191.
- NIELSEN FH, HUNT CD, MULLEN LM, HUNT JR (1987). Effect of dietary boron on mineral, estrogen and testosterone metabolism in postmenopausal women. *Faseb J*, **1(1)**: 394-397.
- ÖZÇELİK N (1999). Tıbbi Biyoloji, s.: 103-111.
- PARAZZINI F, LA VECCHIA C, LEVI F, FRANCESCHI S (1998). Trends in male: female ratio among newborn infants in 29 countries from five continents. *Hum Reprod*, **13**: 1394-1396.
- PELLETIER RM, OKAWARA Y, VITALE ML, ANDERSON JM (1997). Differential distribution of the tight-junction-associated protein ZO-1 isoforms a+ and a- in Guinea Pig Sertoli Cells: A Possible Association with F-Actin and G-Actin. *Biol Reprod*, **57**: 367-376.
- PENLAND JG (1994). Dietary boron, brain function, and cognitive performance. *Environmental Health Perspectives*, **102**: 65-72.
- PEREZ-CRESPO M, PINTADO B, GUTIERREZ-ADAN A (2008). Sperm DNA integrity, and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development*, **75**: 40-47.
- PETERKA M, PETERKOVA R, LIKOVSKY Z (2004). Chernobil: prenatal loss of four male fetuses in the Czech Republic. *Reprod Toxicol*, **18**: 75-79.
- POTASHNIK G, GOLDSMITH J, INSLER V (1984). Dibromochloropropane-induced reduction of the sex-ratio in man. *Andrologia*, **16(31)**: 213-218.
- RAMASAMY R, BESEDA S, DOLORES JL (2014). Fluorescent *in situ* hybridization of human sperm: diagnostics, indications, and therapeutic implications. *Fertility and Sterility*, **102(6)**: 1534-1539.
- RICCI G, PERTICARARI S, FRAGONAS E, GIOLO E (2002). Apoptosis in humansperm: Its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod*, **17(10)**: 2665-2672.

- ROBAIRE B (2002). Epididymal Cell Types and Their Functions. B.T. Hinton, B.Robaire (Ed). The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice: A Comprehensive Survey of the Efferent Ducts, the Epididymis, and the Vas Deferens. New York: Springer-Verlag, s.: 81-103.
- ROBBINS WA, BAULCH JE (1995). Three-probe fluorescence *in situ* hybridization to assess chromosome X, Y, and 8 aneuploidy in sperm of 14 men from two healthy groups: evidence for a paternal age effect on sperm aneuploidy. *Reprod Fertil Dev*, **7(4)**: 799-809.
- ROBBINS WA, WEI F, ELASHOFF DA, WU G, XUN L, JIA J (2008). Y:X sperm ratio in boron-exposed men. *J Androl*, **29**: 115-121.
- ROSS HM, ROMRELL JL (2006). Histology: a text and atlas. Section 21: Male reproductive system. 2nd Ed. S.: 603-625.
- RYLANDER L, STRÖMBERG U, HAGMAR L (1995). Decreased birth-weight among infants born to women with a high dietary intake of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Scand J Work Environ Health*, **21(51)**: 368-375.
- SAKAMOTO M, NAKANO A, AKAGI H (2001). Declining Minamata male birth ratio associated with increased male fetal death due to heavy methylmercury pollution. *Environ Res*, **87**: 92-98.
- SAMMAN S, NAGHII MR, LYONS W, VERUS AP (1998). The nutritional and metabolic effects of boron in humans and animals. *Biol Trace Elem Res*, **66**: 227-235, 1998.
- SAUERWEINA W, ZURLOB A (2002). The EORTC Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) Group: achievements and future projects, *European Journal of Cancer*, **38**: 31-34.
- SCHERB H, VOIGT K (2007). Trends in the human sex odds at birth in Europe and the Chernobyl Nuclear Power Plant accident. *Reprod Toxicol*, **23**: 593-599.
- SCHULTE RT, OHL DA, SIGMAN M, SHITH GD (2010). Sperm DNA damage in male infertility: etiologies, assays and outcomes. *J Assist Reprod Genet*, **27**: 3-12.
- SCIALLI AR, BONDE JP, BRÜSKE-HOHLFELD I, CULVER BD, LI Y, SULLIVAN FM (2010). An overview of male reproductive studies of boron with an emphasis on studies of highly exposed Chinese workers. *Reproductive Toxicology*, **29(1)**: 10-24.
- SHAHIDI NT (1973). Androgens and erythropoiesis. *The New England Journal of Medicine*, **289**: 72-80.
- SILAEV AA, KASPAROV AA, KOROLEV VV, NEBSTRUEVA VV (1977). Electron-microscopic investigation of the effect of boric acid on the seminiferous tubules of albino rats. *Bull Exp Biol Med*, **83**: 588-591.
- SIMONSEN CR, ROGE R, CHRISTIANSEN U, LARSEN T, BONDE JP (2006). Effects of paternal blood lead levels on offspring sex ratio. *Reprod Toxicol*, **22**: 3-4.
- SINGH NP, MULLER CH, BERGER RE (2003). Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril*, **80(6)**: 1420-1230.

- SINISI AA, PASQUALI D, NOTARO A, BELLASTELLA A (2003). Sexual differentiation. *Journal of Endocrinological Investigation*, **26(3)**: 23-28.
- SNYDER RG (1961). The sex ratio of offspring of pilots of high performance military aircraft. *Hum Biol*, **33**: 1-10.
- STONE BA, ALEX A, WERLIN LB, MARRS RP (2013). Age thresholds for changes in semen parameters in men. *Fertil Steril*, **100(4)**: 952-958, 2013.
- SWERDLOFF RS, WANG C (1997). Physiology of hypothalamic-pituitary function. In Walsh PC, Wein AJ, Retik AB, Vaughan ED, Campbell's Urology, 7th Ed. Philadelphia, WB Saunders s.:1239-1253.
- ŞAYLI BS, TÜCCAR E, ELHAN AH (1998a). An assessment of fertility in boron- exposed Turkish subpopulations. *Reproductive Toxicol*, **12(3)**: 297- 304.
- ŞAYLI BS (1998b). An assessment of fertility in boron-exposed Turkish subpopulations: 2. Evidence that boron has no effect on human reproduction. *Biol Trace Elem Res*, **66**: 409-422.
- ŞAYLI BS (2003). Low frequency of infertility among workers in a borate processing facility. *Biol Trace Elem Res*, **93**: 19-30.
- TANAKA K, OHKURA K (1958). Evidence for genetic effects of radiation in offspring of radiological technicians. *Jpn J Hum Genet*, **3**: 135-145.
- TIIDO T, RIGNELL-HYDBOM A, JÖNSSON BOG, GIWECMAN YL, PEDERSEN HS, WOJTNIAK B, LUDWICKI JK (2006). Impact of PCB and *p,p'*-DDE Contaminants on Human Sperm Y:X Chromosome Ratio: Studies in Three European Populations and the Inuit Population in Greenland. *Environmental Health Perspect*, **114(5)**: 718-724.
- TRASK B (1991). Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics*, **7**: 149-149.
- TREINEN KA, CHAPIN RE (1991). Development of testicular lesions in F344 rats after treatment with boric acid. *Toxicol Appl Pharmacol*, **107**: 325-335.
- TÜRKEZ H, GEYİKOĞLU F, TATAR A, KELEŞ S, ÖZKAN A (2007). Effects of some boron compounds on peripheral human blood. *Z Naturforsch C*, **62**: 889-896.
- TÜRKEZ H, GEYİKOĞLU F, TATAR A, KELEŞ MS, KAPLAN I (2012). The effects of some boron compounds against heavy metal toxicity in human blood. *EXP Toxicol Pathol*, **64 (1-2)**: 93-101.
- US EPA (1987). Health effects assessment for boron and compounds. Prepared by the Office of health and environmental assessment, environmental criteria and assessment Office, Cincinnati, OH for the Office solid waste and emergency response, Washington, DC. [<http://www.epa.gov>]. Erişim Tarihi: 01/06/2016.
- US EPA (2004). Toxicology review of boron and compounds in support of summary information on integrated risk information (IRIS). National Center for Enviromental

Assessment, Washington, DC. Erişim Adresi: [<http://www.epa.gov>]. Erişim Tarihi: 01/06/2016.

- UÇKUN Z, ÜSTÜNDAĞ A, KORKMAZ M, DUYDU Y (2009). Micronucleus levels and sister chromatide exchange frequencies in boron exposed and control individuals. *J Fac Pharm Ankara*, **38(2)**: 79-88.
- USUDA K, KONO K, ORITA Y, DOTE T, IGUCHI K, NISHIURA H, TOMINAGA M, TAGAWA T, GOTO E, SHIRAI Y (1998). Serum and urinary boron levels in rats after single administration of sodium tetraborate. *Arch Toxicol*, **72**: 468-74.
- ÜSTÜNDAĞ A, BEHM C, FÖLLMANN W, DUYDU Y, DEGEN GH (2014). Protective effect of boric acid on lead- and cadmium- induced genotoxicity in V79 cells. *Arch Toxicol*, **88(6)**: 1281-1289.
- VALE W, RIVIER C, BROWN M (1977). Regulatory peptides of the hypothalamus. *Annu Rev Physiol*, **39**: 473-527.
- VOLPI EV, BRIDGER JM (2008). FISH glossary: an overview of the fluorescence *in situ* hybridization technique. *BioTechniques* **45**: 385-409.
- WAGNER M, HORN M, DAIMS H (2003). Fluorescence *in situ* hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, **6**: 302-309.
- WARINGTON K (1923). The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants, *Ann Bot*, **37**: 629-672.
- WEIR RJ, FISHER RS (1972). Toxicologic studies on borax and boric acid. *Toxicol Appl Pharmacol*, **23**: 351-364.
- WHO (1998). Boron in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Geneva, Switzerland.
- WHORTON D, HAAS J, TRENT L (1994a). Reproductive effects of inorganic borates on male employees: birth rate assessment. *Environ Health Perspect* **102(7)**:129-131.
- WHORTON MD, HAAS JL, TRENT L, WONG O (1994b). Reproductive effects of sodium borates on male employees: birth rate assessment. *Occup Environ Med*, **51**: 761-767.
- WOODS WG (1994). An introduction to boron: history, sources, uses, and chemistry. *Environmental Health Perspectives*, **102(7)**: 5-11.
- XING X, WU G, WEI F, LIU P, WEI H, WANG C, XU J, JIA J, KENNEDY N, ELASHOFF D, ROBBINS W (2008). Biomarkers of environmental and workplace boron exposure. *J Occup Environ Hyg*, **5**: 141-147.
- YAMAMOTO T, NAKAI K, KAGEJI T, KUMADA H, ENDO K, MATSUDA M, SHIBATA Y, MATSUMURA A (2009). Boron neutron capture therapy for newly diagnosed glioblastoma, *Radiotherapy and Onchology*, **91**: 80-84.

- YANAGIE H, KUMADA H, SAKURAI Y, NAKAMURA T, FURUYA Y (2009). Dosimetric Evaluation of neutron capture therapy for local advanced breast cancer. *Applied Radiation and Isotopes*, **67**: 63-66.
- YANAGIE H, TOMITA T, KOBAYASHI H, FUJII Y, NONAKA Y, SAEGUSA Y, HASUMI K, ERIGUCHIL M, KOBAYASHI T, ONO K (1997). Inhibition of human pancreatic cancer growth in nude mice by boron neutron capture therapy. *British Journal of Cancer*, **75(5)**: 660-665, 1997.
- YAZBECK C, KLOPPMANN W, COTTIER R, SAHUQUILLO J, DEBOTTE G, HUEL G (2005). Health impact evaluation of boron in drinking water: A geographical risk assessment in northern France. *Environ Geochem Health*, **27**: 419-427.
- YILMAZ S (2013). Borik asitin antioksidan aktivitesinin hücre kültürlerinde araştırılması, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilimdalı, Yüksek Lisans Tezi.
- YING SY (1988). Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Rev*, **9**: 267-293.
- ZADEH HG, BRIGGS TW (1997). Ionising radiation: Are orthopaedic surgeons' offspring at risk? *Ann R Coll Surg Engl*, **79**: 214-220.
- ZHANG Y, TRUSSELL JC, CHOCAN KR (2013). Detecting and Minimizing Sperm DNA Damage. *Seminars in Reproductive Medicine*, **31(4)**: 267-273.

EKLER



Ek-1. Etik Kurul Raporu



T. C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi
Tıbbi Araştırmalar Yerel Etik Kurulu

Sayı : B.30.2.HAC.0.01.00.05/2059
Konu :

22 Ekim 2008

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 09 EKİM 2008 PERŞEMBE günü
Toplantı No : 2008/11
Proje No : HEK 08/167 (Değerlendirme Tarihi: 28.08.2008)
Karar No : HEK 08/167 -43

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Nürşen Başaran'ın sorumlu araştırmacısı olduğu, Prof. Dr. Yalçın Duydu, Op. Dr. Yalçın Düker, Doç. Dr. Ülkü Ündeğer, Uzm. Ecz. Aylin Üstündağ, Uzm. Ecz. Sevtap Aydın ve Uzm. Ecz. Ülfet Pınar Erkekoğlu ile birlikte çalışacakları HEK 08/167 kayıt numaralı ve "**Bor Maruziyetinin İnsanların Üreme Fonksiyonu Üzerindeki Toksik Etkilerinin Araştırılması**" başlıklı proje önerisi Kurulumuzda değerlendirilmiş olup, Tıbbi Etik açıdan uygun bulunmuştur.

1. Prof.Dr. E. Rüştü Onur (Başkan)
2. Prof.Dr. Murat Yurdakök (Üye)
3. Prof.Dr. Osman Abbasoğlu(Üye) KATILMADI
4. Prof.Dr. Mithat Haliloğlu (Üye)
5. Prof.Dr. Türkan Eldem (Üye)
6. Prof.Dr. Pınar Fırat (Üye) KATILMADI
7. Prof.Dr. Erdem Aydın (Üye)
8. Prof.Dr. H. Asuman Özkara (Üye)
9. Prof.Dr. Tanju Besler (Üye)
10. Prof.Dr. Haydar A. Demirel(Üye)
11. Prof.Dr. Bülent Sivri (Üye) KATILMADI
12. Doç.Dr. Bilgehan Yalçın (Üye) KATILMADI
13. Doç.Dr. Ümit Yaşar (Üye)
14. Doç.Dr. Zafer Çehreli (Üye)
15. Doç.Dr.Mutlu Hayran (Üye)

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Cerrahi ve İlaç Araştırmaları Etik Kurulu 60100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: (0312) 305 10 82 Faks: (0312) 310 05 80 E-posta: hums@hacettepe.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı : Can Özgür
Soyadı : YALÇIN
Doğum yeri ve tarihi : Trabzon/1983
Medeni durumu : Bekar
İletişim adresi : Karadeniz Teknik Üniversitesi
Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji AbD
Ortahisar/TRABZON
Telefon : 0536 264 1077
E-Posta Adresi : canozguryalcin@hotmail.com

II- Eğitimi

Doktora : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmasötik Toksikoloji ABD (Eczacılık) 2012-2017
Tez adı : Bor maruziyetinin insanların üreme fonksiyonu üzerindeki
toksik etkilerinin araştırılması (2017)
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yalçın DUYDU

Yüksek Lisans : Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya ABD (Tezli) 2009-2012
Tez adı : Türk propolis ekstraktlarının iyonizan (y-Gama) radyasyonla
uyarılmış insan lenfositleri üzerine olası radyoprotektif etkisinin
değerlendirilmesi (2012)
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU

Lisans : Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi 2002-2006.

III- Mesleki Deneyim

- Kurum Eczacısı, Trabzon Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi, 2007-2012.
- Araştırma Görevlisi Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 2012-2013.
- Araştırma Görevlisi Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı (35.madde görevlendirme), 2013-2016.
- Araştırma Görevlisi Karadeniz Teknik Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Eczacılık Meslek Bilimleri Bölümü Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı, 2016-...

IV- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- Türk Toksikoloji Derneği

V- Bilimsel İlgi Alanları

• Uluslararası dergilerde yayınlanan makaleler:

YALÇIN CAN ÖZGÜR, ALİYAZICIOĞLU YÜKSEL, DEMİR SELİM, TURAN İBRAHİM, BAHAT ZÜMRÜT, MISIR SEMA, DEĞER ORHAN (2016). Evaluation of the radioprotective effect of Turkish propolis on foreskin fibroblast cells. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, **12(2)**: 990-994.

GÖKER ALİ HAKAN, KARAASLAN ÇİĞDEM, PÜSKÜLLÜ MUSTAFA ORHAN, YILDIZ SULHİYE, DUYDU YALÇIN, ÜSTÜNDAĞ AYLİN, YALÇIN CAN ÖZGÜR (2016). Synthesis and *In Vitro* Activity of Polyhalogenated 2-phenylbenzimidazoles as a New Class of anti-MRSA and Anti-VRE Agents. *Chemical Biology and Drug Design*, **87(1)**: 57-68.

- **Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

KARAKAYA MAHBUBE ASUMAN, ÜLKER ÖZGE, ÜSTÜNDAĞ AYLİN, YALÇIN CAN ÖZGÜR, DUYDU YALÇIN (2016). *In vitro* Cytotoxic and Genotoxic Studies of Titanium Dioxide Nanoparticles. 55th Annual Meeting and ToxExpo, New Orleans, Louisiana, ABD (Poster).

KARAKAYA MAHBUBE ASUMAN, ÜLKER ÖZGE, ÜSTÜNDAĞ AYLİN, YALÇIN CAN ÖZGÜR, DUYDU YALÇIN (2015). Comparison of TiO₂ nanoparticles genotoxicity in two different cell lines by using Comet Assay. TURKHELTOX, İzmir, TÜRKİYE (Poster).

ÜSTÜNDAĞ AYLİN, YALÇIN CAN ÖZGÜR, DUYDU YALÇIN (2015). Assesment of the protective effects of boric acid on the DNA strand breaks induced by TiO₂ nanoparticles. TURKHELTOX, İzmir, TÜRKİYE (Poster).

GÖKER ALİ HAKAN, KARAASLAN ÇİĞDEM, PÜSKÜLLÜ MUSTAFA ORHAN, SULHIYE YILDIZ, DUYDU YALÇIN, ÜSTÜNDAĞ AYLİN, YALÇIN CAN ÖZGÜR (2015). Synthesis and invitro activity of polyhalogenated 2-pheylbenzimidazoles as a new class of anti-mrsa and anti-vre agents.. Recent Developments In Pharmaceutical Analysis (RDPA), Perugia, İTALYA (Poster).

YALÇIN CAN ÖZGÜR, ÜSTÜNDAĞ AYLİN, ÜLKER ÖZGE, DUYDU YALÇIN, KARAKAYA MAHBUBE ASUMAN (2015). Investigation of the TiO₂ solid nanoparticles safety for human health by using *in vitro* tests. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), 09-12 Haziran 2015, Ankara, Türkiye.. 11th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara, TÜRKİYE (Poster).

DEMİRBÜĞEN MERVE, YILMAZ SEZEN, YALÇIN CAN ÖZGÜR (2014). Toxicology, pharmacology, detection and legal status of synthetic cannabinoids. I. International Congress and Workshop of Forensic Toxicology, Ankara, TÜRKİYE (Poster).

YALÇIN CAN ÖZGÜR, ALİYAZICIOĞLU YÜKSEL, DEMİR SELİM, TURAN İBRAHİM, DEĞER ORHAN, BAHAT ZÜMRÜT (2014). Evaluation Of Radioprotective Effect of Turkish Propolis Extracts On γ -Ray-Induced Human Fibroblast Cell Lines. The XIII. International Congress of Toxicology, Seul, GÜNEY KORE (Poster).

- **Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:**

GÖKER ALİ HAKAN, KARAASLAN ÇİĞDEM, PÜSKÜLLÜ MUSTAFA ORHAN, YILDIZ SULHİYE, DUYDU YALÇIN, ÜSTÜNDAĞ AYLİN, YALÇIN CAN ÖZGÜR (2014). Synthesis and invitro activity of polyhalogenated 2-pheylbenzimidazoles as a new class of anti-mrsa and anti-vre agents. International Multidisciplinary Symposium on Drug Research and Development, Eskişehir, TÜRKİYE.

VI- Bilimsel Etkinlikleri

- **Projeleri:**

- Bor maruziyetinin insanların üreme fonksiyonu üzerindeki toksik etkilerinin araştırılması - II, Yükseköğretim Kurumları tarafından destekli bilimsel araştırma projesi, Bursiyer, 01/01/2016- ... (ULUSAL).
- Borik asitin ve çinko boratın etkilerinin insan Sertoli hücre serilerinde değerlendirilmesi, TÜBİTAK PROJESİ, Bursiyer, 01/11/2015 - ... (ULUSAL).
- Protez üretiminde çalışan personelde mesleki maruz kalmaya bağlı etkilerin toksikolojik yönden araştırılması, TÜBİTAK PROJESİ, Araştırmacı, 15/08/2014 - 15/08/2015 (ULUSAL).