

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA KADMIYUM İLE
OLUŞTURULAN HASAR ÜZERİNE PROPOLİSİN
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Kübra Tuğçe ÇİLENK**

**Danışman
Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ**

Yüksek Lisans Tezi

**Eylül 2015
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA KADMİYUM İLE
OLUŞTURULAN HASAR ÜZERİNE PROPOLİSİN
KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Hazırlayan
Kübra Tuğçe ÇİLENK**

**Danışman
Doç. Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ**

Yüksek Lisans Tezi

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TYL-2013-4662 nolu proje ile desteklenmiştir**

**Eylül 2015
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Kübra Tuğçe ÇİLENK

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

‘‘Sıçan Testis Dokusunda Kadmiyum İle Oluşturulan Hasar Üzerine Propolisin Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması’’adlı Yüksek Lisans Tezi Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Danışman

Kübra Tuğçe ÇİLENK

Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ

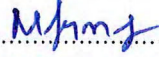
Histoloji-Embriyoloji AD Başkanı


Prof.Dr. Birkan YAKAN


Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ danışmanlığında **Kübra Tuğçe ÇİLENK** tarafından hazırlanan '**Sıçan Testis Dokusunda Kadmiyum İle Oluşturulan Hasar Üzerine Propolisin Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması** adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

..../..../2015

Jüri**İmza**

Danışman : Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ 
Erciyes Üniversitesi (Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Bülent YAKIŞAN 
Erciyes Üniversitesi (Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. S. Necat YILMAZ 
Mersin Üniversitesi (Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı)

Onay

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun/..../..... tarih vesayılı kararı ile onaylanmıştır.

..../..../2015

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim sırasında üzerimde büyük emeği olan ve teze dair yaptığım çalışmalarda bilgisini benden esirgemeyen tez danışmanım Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ'e,

Öneri ve eleştirileri ile desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Birkan YAKAN'a, ayrıca Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a, Yrd. Doç. Dr. Arzu YAY'a,

Ayrıca tezimin her aşamasında yanımda olan Dr. Derya KARABULUT'a ve bölüm arkadaşlarıma,

Maddi ve manevi anlamda hep benimle olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Kübra Tuğçe Çilenk

Eylül 2015, KAYSERİ

SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA KADMIYUM İLE OLUŞTURULAN HASAR ÜZERİNE PROPOLİSİN KORUYUCU ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Kübra Tuğçe ÇİLENK

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı
Yüksek Lisans Tezi, Eylül 2015
Danışman: Doç.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ**

ÖZET

Bu çalışmada kadmiyum ile testis dokusunda oluşturulan hasar üzerine propolisin koruyucu etkinliğinin araştırılması amaçlandı.

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 32 adet ergin erkek Wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Denekler rastgele 4 gruba ayrıldı. Grup I (n=8); kontrol grubu, Grup II (n=8); 1 mg/kg/gün (intraperitoneal) kadmiyum uygulanan sıçanlar, Grup III (n=8); 1 mg/kg/gün kadmiyum + 50mg/kg/gün propolis (intra gastrik), Grup IV (n=8); 50mg/kg/gün propolis (intra gastrik) uygulanarak oluşturuldu. Kadmiyum 10 gün boyunca uygulandı. Propolis kadmiyum uygulamasından bir hafta önce başlanarak deney sonuna kadar verildi. Uygulamadan 24 saat sonra denekler dekapite edilerek testis dokuları alındı. Deney sonunda testis dokusunda HIF-1 α ekspresyonu ve TUNEL, kan örneklerinde serum testosteron ve doku HIF-1 α seviyeleri için ELISA yapıldı.

Kadmiyum uygulanan grupta germinal epitelde düzensizlik, lümene epitel hücre dökülmesi, epitel hücreleri arasında vakuol oluşumu ve yer yer nekrotik tübüller gözlemlendi. Kadmiyum uygulanan grupta seminifer tübül çapları, Johnsen'in tübüller biyopsi skoru, serum testosteron seviyesi azalırken doku HIF-1 α düzeyinin ise arttığı belirlendi. Koruyucu amaçlı verilen propolisin ise tüm bu hasarları engellediği gözlemlendi.

Sonuç olarak kadmiyum uygulaması, testis dokusunda çok ciddi histopatolojik değişikliklere neden olmaktadır ve koruyucu amaçlı verilen propolisin bu hasarı engellediği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, Propolis, Testis, Sıçan, HIF-1 α

THE INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF PROPOLIS ON CADMIUM-INDUCED TESTICULAR DAMAGED IN RAT

Kübra Tuğçe Çilenk

**Erciyes University, Department of Histology and Embryoloji
MS Thesis, September 2015
Advisor: Asc.Prof.Dr. Mehmet Fatih SÖNMEZ**

ABSTRACT

In this study we established to investigate the protective effect of propolis on cadmium-induced testicular damage.

In this study, 32 adult male Wistar albino rats that raised in DEKAM (Erciyes University Experimental And Clinic Researches Centre) were used. Rats were separated into four random groups. Group 1; (n=8) control group, group 2; (n=8) 1 mg/kg/day (intraperitoneal) cadmium administered to rats, group 3; (n=8) 1 mg/kg/day cadmium + 50mg/kg/day propolis was administered to (intragastic), group 4; (n=8) 50 mg/kg/day propolis (intragastrik) was administered to rats. Propolis was dissolved in DMSO. On the first day of the experimental protocol, Group 3 and group 4 received 50mg/kg/day propolis (oral gavage) for 17 days. From the eighth day of the experiment, group 2 and group 3 received daily intraperitoneal injections of 1 mg/kg/day cadmium. The rats were decapitated under ketamine anesthesia and their testes tissues were removed HIF-1 α expression and TUNEL were examined in testis tissue, also blood samples were evaluated with ELISA for serum testosterone ve tissue HIF-1 α levels.

Germinal epithelium irregularities, epithelial cell loss in lumen, formation of the vacuoles between epithelial cells and necrotic tubules was observed to applied cadmium in the group. In the group 2, the diameters of seminiferous tubules, tubular biopsy score of Johnsen and serum testosterone levels were decreased compared to control group, but tissue HIF-1 α levels was higher in cadmium administered group than control group. These scores were improved by the propolis for protective purposes.

As a result of application of cadmium create a very serious change on testicular tissue and the propolis for protective purposes inhibited this damage.

Key Words: Cadmium, Propolis, Testis, Rat, HIF-1 α .

İÇİNDEKİLER

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	i
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	ii
Onay	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.TESTİS EMBRİYOLOJİSİ	3
2.2. TESTİSİN ANATOMİSİ.....	5
2.3. TESTİSİN HİSTOLOJİSİ.....	7
2.3.1. Seminifer tübüller.....	9
2.3.2.Spermatogenez	10
2.3.3.1 Golgi fazı	11
2.3.3.2 Akrozomal faz.....	11
2.3.3.3 Matürasyon(Olgunlaşma) fazı	12
2.3.4.Sertoli Hücreleri.....	13
2.3.5. İnterstisyel Alan	15
2.4. KADMİYUM	16
2.4.1. Kadmiyumun fiziksel ve kimyasal özellikleri.....	16
2.4.2.Kadmiyumun toksik etkisi	17
2.5. PROPOLİS.....	19
2.5.1 Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	20
2.5.2 Propolisin Biyolojik Özellikleri ve Antioksidan Etkileri	22
2.5.3 HIF-1 α (Hipoksi İndükleyici Faktör)	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1 DENEYSEL PROSEDÜR	27
3.2. SEMİNİFER TÜBÜL ÇAPLARININ ÖLÇÜMÜ (MSTD).....	29
3.3. JOHNSEN TESTİKÜLER BİYOPSİSKORU.....	29
3.4.TUNEL METODU	30

3.5 İMMÜNOHİSTOKİMYA METODU	30
3.6 ELISA METODU	32
3.7 MALONDİALDEHİD (MDA) SEVİYESİ TAYİNİ	32
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	34
4. BULGULAR	35
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	35
4.2. Seminifer Tübül Çapları Ölçüm (MSTD)Sonuçları	36
4.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) Sonuçları	36
4.4. İmmunohistokimya sonuçları	37
4.5. Apoptotik Bulgular	37
4.6. Biyokimyasal bulgular	38
4.7. ELISA Bulguları.....	38
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	48
6.KAYNAKÇA	54
EKLER	
ÖZGEÇMİŞ	

KISALTMALAR

ATP	: Adenozin trifosfat
ATSDR	: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
CAT	: Katalaz
Cd	: Kadmiyum
CdCl ₂	: Kadmiyum klorür
DAB	: Diaminobenzidin
DAPI	: 4',6-diamidino-2-phenylindole
DEKAM	: Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
G6PDH	: Glukoz-6-fosfat de-hidrojenaz
GP	: Glutasyon peroksidaz
GSH-Px	: Redükte Glutasyon Peroksidaz
GSSG-R	: Glutasyon redüktaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HE	: Hemotoksilen-Eozin
HIF-1 α	: Hypoxia-inducible factor
JTBS	: Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru
Kg	: Kilogram
LPO	: Lipit peroksidaz
LPS	: Lipopolisakkarit
ml	: Mililitre
mg	: Miligram
μ g	: Mikrogram
MDA	: Malondialdehit
MSTD	: Semifer Tübül Çapları Ölçümü

PBS	: Fosfat tamponu
RNA	: Ribonükleik asit
SOD	: Süperoksit Dismutaz
PHD	: Prolin hidroksilaz

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1. Propoliste Belirlenen Bileşik Grupları ve Sayıları	22
Tablo 3.1. Işık Mikroskobu Doku Hazırlama Tekniği	28
Tablo 3.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Tekniği.....	28
Tablo 3.3. Johnsen Testikuler Biyopsi Skolaması	29
Tablo 3.4. İmmünohistokimya boyama tekniği.	31
Tablo 3.5. Propolis ekstraktının fenolik bileşenleri.....	34
Tablo 4.1. Gruplara ait sıçan ve testis ağırlıkları.	35
Tablo 4.2: Seminifer túbül çapı ölçüm sonuçları.	36
Tablo 4.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Sonuçları.....	37
Tablo 4.4. Testis kesitlerinde HIF-1 α immünoreaktivite skoru.....	37
Tablo 4.5. Apoptotik indeks Sonuçları.....	38
Tablo 4.6. Testis doku MDA Sonuçları.....	38
Tablo 4.7. Testis doku HIF-1 α ve serum Testosteron Sonuçları	39

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	A. 3 haftalık embriyoda yolk kesesi duvarında, allantois bağlantısına yakın bir yerde primordiyal germ hücrelerini gösteren şematik çizim. B. Primordiyal germ hücrelerinin, son barsak ve dorsal mezenter boyunca genital kıvrıma doğru göç yolu.....	4
Şekil 2.2.	Testisin anatomisi	6
Şekil 2.3.	Testis ve üreme yollarını gösteren şematik çizim	8
Şekil 2.4.	Seminifer tübül epiteli.....	9
Şekil 2.5.	Olgun spermatozoon.....	13
Şekil 4.1.	Kontrol grubu sıçanlarına (grup I) ait testis dokusu.	39
Şekil 4.2.	Sadece propolis uygulanan sıçan grubuna (Grup IV) ait testis dokusu.	40
Şekil 4.3.	Sadece kadmiyum uygulanan sıçan grubuna (Grup II) ait testis dokusu....	40
Şekil 4.4.	Sadece kadmiyum uygulanan gruba (Grup II) ait testis dokusu	41
Şekil 4.5.	Sadece kadmiyum uygulanan gruba (Grup II) ait testis dokusu	41
Şekil 4.6:	Sadece kadmiyum uygulanan gruba (Grup II) ait testis dokusu.....	42
Şekil 4.7:	Sadece kadmiyum uygulanan gruba (Grup II) ait testis dokusu	42
Şekil 4.8:	Kadmiyum ile birlikte propolisin uygulandığı gruba (Grup III) ait testis dokusu	43
Şekil 4.9:	Kontrol grubuna (Grup I) ait testis dokusu.	43
Şekil 4.10:	Propolis grubuna(Grup IV) ait testis dokusu.....	44
Şekil 4.11:	Kadmiyum uygulanan(Grup II) gruba ait testis dokusu	44
Şekil 4.12:	Koruyucu amaçlı propolis verilen gruba (Grup) ait testis dokusu	45
Şekil 4.13:	Negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir boyanma gözlenmemekte.	45
Şekil 4.14:	Kontrol grubuna (Grup I) ait testis kesitinde TUNEL boyama.....	46
Şekil 4.15:	Kadmiyum grubuna (Grup II) ait testis kesitinde TUNEL boyama	46
Şekil 4.16:	Kadmiyum ile birlikte propolisin uygulandığı gruba (Grup III) ait testis kesitinde TUNEL boyama.....	47
Şekil 4.17:	Propolis grubuna (Grup IV) ait testis kesitinde TUNEL boyama	47

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Endüstriyel ve çevresel kirletici olarak kadmiyumun (Cd) önemi son yıllarda oldukça belirginleşmiştir. Birleşik Devletler Çevresel Koruma Komisyonunun öncelikli zararlı maddeler listesinde yer alan kadmiyuma, çoğu kez doğrudan solunum yolu veya besin zinciri aracılığıyla maruz kalınır (1).

İnsan yaşamını etkileyen önemli kadmiyum kaynakları, sigara dumanı, rafine edilmiş yiyecek maddeleri, su boruları, kahve, çay, kömürün yakılması sonucu açığa çıkan ürünler, kabuklu deniz ürünleri, kullanılan gübreler ve endüstriyel üretim aşamalarında oluşan baca gazlarıdır. Endüstriyel olarak kadmiyum zehirlenmesi, kaynak yapımı sırasında kullanılan alaşım bileşimleri, elektrokimyasal kaplamalar, kadmiyum içeren boyalar ve kadmiyumlu piller ile oluşur. Kadmiyum önemli miktarda gümüş kaynaklarda ve sprey boyalarda da kullanılmaktadır (2, 3). Kadmiyum hücrenin proliferasyonunu, diferansiyonunu, apoptozunu ve diğer hücresel aktivitelerini etkilemektedir. Ayrıca kadmiyumun gen transkripsiyonu ve translasyonu üzerine de etkilerinin olduğu bilinmektedir (4). Kadmiyum karaciğer, böbrek, akciğer, duodenum, pankreas, kemik dokularında birikip çeşitli sitolojik ve histolojik hasara sebebiyet vermektedir (5).

Ayrıca testisler kadmiyum toksisitesine aşırı derecede duyarlılık gösterir. Çeşitli memeli türleri üzerinde yapılan çalışmalarla; akut kadmiyum maruziyetinin testislerdeki kan-testis bariyerini tahrip ettiği, testiküler ödem ve hemorajiye yol açtığı, germ hücrelerinin kaybına ve nekroza sebep olduğu belirlenmiştir (6). Yine kadmiyumun spermatogenez olayında etkili olan sertoli hücreleri arasındaki bağlantı kompleksini bozarak spermatojenik seriye ait hücrelerin dejenerasyonuna sebep olduğu bilinir (7). Kadmiyumun sebep olduğu testiküler nekroz kalıcı infertiliteye yol açmakla birlikte testiküler kadmiyum seviyesi arttıkça apoptozis oranı artmaktadır (8).

Organizmada devamlı olarak serbest radikal niteliğinde bileşikler meydana gelir. Ancak bu radikallerin organizmaya zarar vermesi güçlü bir savunma sisteminin varlığı ile engellenir. Bu nedenle serbest radikallerin oluşum hızı ile etkisizleştirme hızının dengede tutulması son derece önemlidir. Bu denge bozulduğu zaman, serbest radikallerin zararlı etkileri ortaya çıkmakta ve çeşitli organ ve sistemleri olumsuz olarak etkilenmektedir (9). Organizmalar için oldukça zararlı olan kadmiyumun bu toksik etkilerinden antioksidan sistemler yoluyla korunulabilir (10).

Propolis, bal arıları (*Apis mellifera L.*) tarafından bitkilerden toplanan ve yüzyıllar boyunca halk arasında tedavi amaçlı kullanılmakta olan doğal bir üründür (11). Yapısında sayısız kimyasal bileşik, mineral madde, balmumu, reçine ve polen bulunmaktadır (12). Propolis bal arılarının bireysel temizliği ve kovan temizliği, koloni halinde yaşamaları, kovan içerisindeki şartların sağlıklı olması, fungus, virüs bakteri gibi mikroorganizmalardan korunması gibi farklı amaçlar için bal arıları tarafından kullanılan bir maddedir. Propolisin antibakteriyel, antiviral, antioksidan, antiinflamatuvar ve immünmodülatör gibi biyolojik aktivitelere sahip olduğu birçok bilimsel çalışma ile gösterilmiştir (11, 13). Özellikle de şifalı ürün propolisin içerisinde bulunan ve büyük önem taşıyan flavonoidler ve terpenler oldukça kuvvetli antioksidan ve steril etkili bileşiklerdir (12).

Propolisin insanlar üzerinde olumlu etkisini gösterdiği hastalıkların bazıları diş ağrısı, rinit, renal yetmezlik, mide ülseri, idrar yolları enfeksiyonları, kist, kötü huylu tümör (kanser), damar sertliği hastalıkları, diabet, kemik erimesi hastalığı, kırıkların kaynaması, sedef, sivilce, egzama, vagina ve rahim iltihaplanması, nefes darlığı, astım, bronşit, romatizmal ağrılar ve eklem hastalıkları, verem şeklinde sıralanabilir (12).

Bu çalışmanın amacı, testislerdeki kadmiyumun oluşturduğu hasar üzerine oral yolla uygulanan propolisin koruyucu etkisinin olup olmadığının ışık mikroskopik olarak belirlenmesidir.

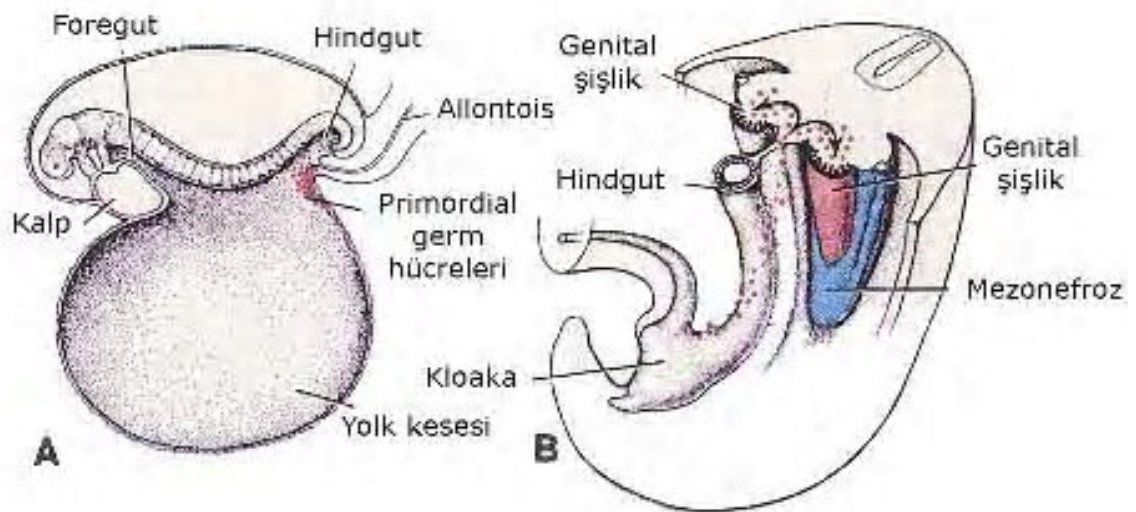
2.GENEL BİLGİLER

2.1.TESTİS EMBRİYOLOJİSİ

Kromozomal ve genetik cinsiyet fertilizasyon ile sağlanır, X kromozomuna sahip ovumun X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile döllenmesine bağlıdır. Gelişmekte olan gonadlar XX veya XY kromozom yapısına sahip olurlar. Erkek ve dişi morfolojik karakteristik özellikleri embriyonun 7. haftasına kadar gelişmeye başlamaz (14). Gonadlar başlangıçta bir çift uzunlamasına, sölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş genital veya gonadal kabartılar halinde ortaya çıkarlar. Gelişimin 6. haftasına kadar bu gonadal sırtlar içinde germ hücreleri yoktur. Primordiyal germ hücreleri, gelişimin erken evrelerinde vitellus kesesi duvarında endoderm hücreleri arasında ve allantoise yakın bir yerde belirirler. Ameboid hareketlerle son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler, 5. haftanın başında primitive gonadlara ulaşır ve 6. haftada genital kıvrımlara tamamen yerleşirler. Böylece henüz farklılaşmamış fötal gonad gebeliğin 6.haftasında ortaya çıkmış olur (14, 15). Yedinci haftadan önce gonadların görünümü her iki cinste de benzer olduğundan "farklanmamış gonadlar" olarak adlandırılırlar. Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomu gereklidir fakat bu kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için önemlidir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geninin, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleştiği saptanmıştır. Y kromozomu, farklanmamış gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir. Y kromozomu tarafından düzenlenen, TDF, testiküler farklılaşmayı sağlar bu faktörün etkisi altında, primer seks kordonları seminifer tubullere farklılaşırlar. Y kromozomunun yokluğu over gelişimiyle sonuçlanır. Sonuç olarak seks kromozomunun tipi farklılaşmamış gonadın hangi yönde gelişeceğini belirlemektedir.

Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar.

- Posterior abdominal duvarın mezotel epitelyumu (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri



Şekil 2.1. A. 3 haftalık embriyoda yolk kesesi duvarında, allantois bağlantısına yakın bir yerde primordial germ hücrelerini gösteren şematik çizim. B. Primordiyal germ hücrelerinin, son barsak ve dorsal mezenter boyunca genital kıvrıma doğru göç yolu. (Langman's Medikal Embriyoloji'den alınmıştır.)

Vitellus kesesi duvarındaki endodermal primordial germ hücrelerinin 3. haftada allantoisi aşarak barsağın arka kısmında mezenter kökü (Radix mesenterii)"nün sağında ve solunda mezonefrozun medialindeki mezoteldeki gonadal kabartı (Plica genitalis) içine girmesi ve buradaki hücreleri indüklemesi (5. hafta başı) ile gonad taslakları gelişmeye başlar. Embriyonun erkeklik veya dişilik yönünde gelişmeye başlaması 7. haftadan itibaren gerçekleşir. Erkekte veya dişide primordial hücrelerin etrafını plika içindeki mezodermal hücreler sarar. Endodermal primordial hücrelerden germinal hücreler (gonositler = erkekte spermatogoniumlar, dişide oogoniumlar), mezodermal hücrelerden ise destek hücreleri (erkekte Sertoli hücreleri, dişide ise folikül hücreleri) gelişir (14). Testisler, genellikle, seks kromozom kompleksinde normal bir Y

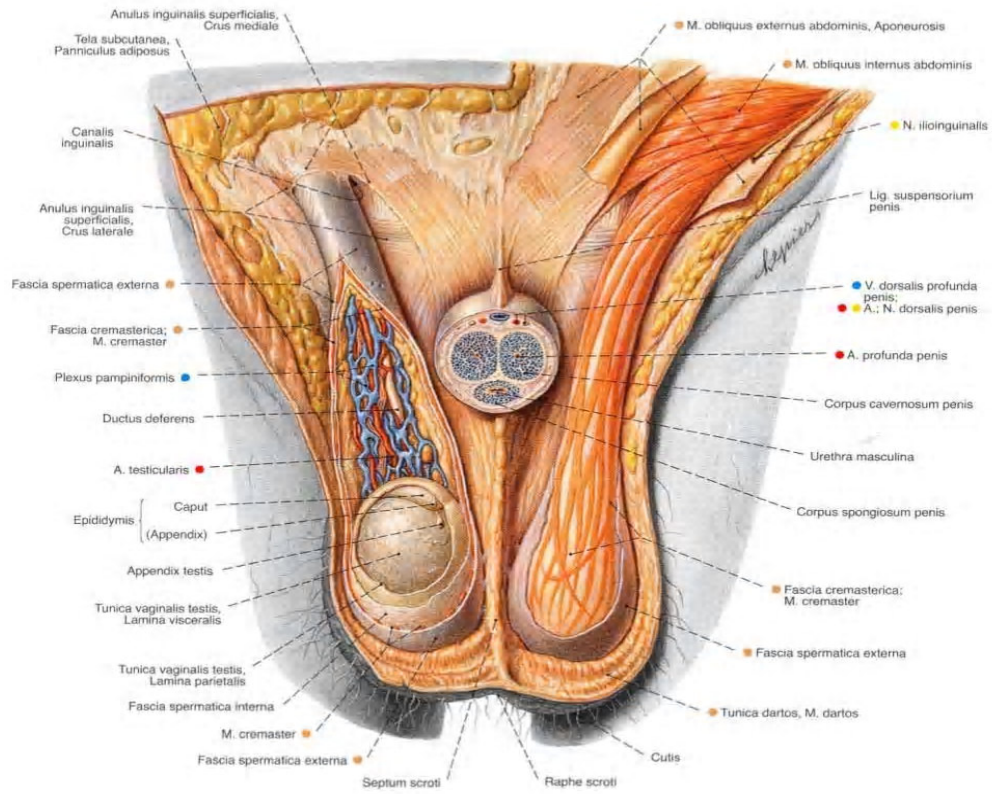
kromozomu taşıyan embriyolarda gelişir (16). Primer seks kordonları uzayarak farklılaşmamış gonad medullasına kadar iner. Kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomozlar yapar ve rete testisi oluştururlar.

Gonad taslakları dışında Tunica albuginea geliştikten sonra seks kordonları seminifer tübüllere ve düz tübüllere (Tubuli recti) farklılaşırlar. Seminifer tübüller, (Leydig'in) intertisyal hücreleri oluşturan mezenşim ile ayrılmışlardır. 8. haftada, bu hücreler mezonefrik kanalların ve dış genital organların erkeklik yönünde farklılaşmasını uyaran androjenik hormonlar olan testosteron ve androstenodion salgırlar. Testosteron üretimi, embriyonik ve fetal gelişimin 8. ile 12. haftaları arasındaki dönemde en yüksek miktarlara ulaşan human koryonik gonadotropin tarafından uyarılır. Fötal testis ayrıca, antimüllerian hormon veya müllerian inhibe edici madde (MIS) olarak bilinen bir glikoprotein üretir.

Sertoli hücreleri, destek hücreler olan bu hücreler testisin yüzey epitelinden gelişir. Spermatoğonia, primordiyal sperm hücreleri olan bu hücreler primordiyal germ hücrelerinden farklılırlar (14). Fötal testiste seminifer epitelin büyük bir kısmını oluşturur. Rete testis, efferent kanalcıklara dönüşen 15-20 kadar mezonefrik tübül ile devam eder. Bu kanalcıklar, duktus epididimise dönüşen mezonefrik kanalla bağlantı kurar (16).

2.2. TESTİSİN ANATOMİSİ

Testis scrotum içinde yer alan ve erkek üreme hücrelerinin (sperm) yapıldığı yumurta şeklinde bir çift organdır. Her bir testis'in facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı, extremitas superior ve extramitas inferior olmak üzere iki ucu vardır (Şekil 2.2). Testisler funiculus spermaticus aracılığı ile scrotum içinde oblik pozisyonda asılı durumdadır. Testisin her biri yaklaşık 10 – 14 gr ağırlığındadır (17). Ayrıca insanlarda yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda ve 2,5 cm enindedir (18).



Şekil 2.2. Testisin anatomisi (Sobotta İnsan Anatomisi Atlası'ndan alınmıştır).

Testisin anterolateral 2/3 bölümü serbest iken, posterolateral yüzü epididimis, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür (19). Testis parankimi dıştan içe doğru, en dışta tunika vaginalis, ortada tunika albuginea ve en içte tunika vaskulosa olmak üzere 3 tabakadan oluşan bir kapsül ile sarmalanmıştır.

Tunica vaginalis testis, testis'i kuşatan kapalı bir periton kesesidir ve lamina visceralis (epiorchium) ve lamina parietalis (periorchium) olmak üzere iki yaprağı vardır (17,20).

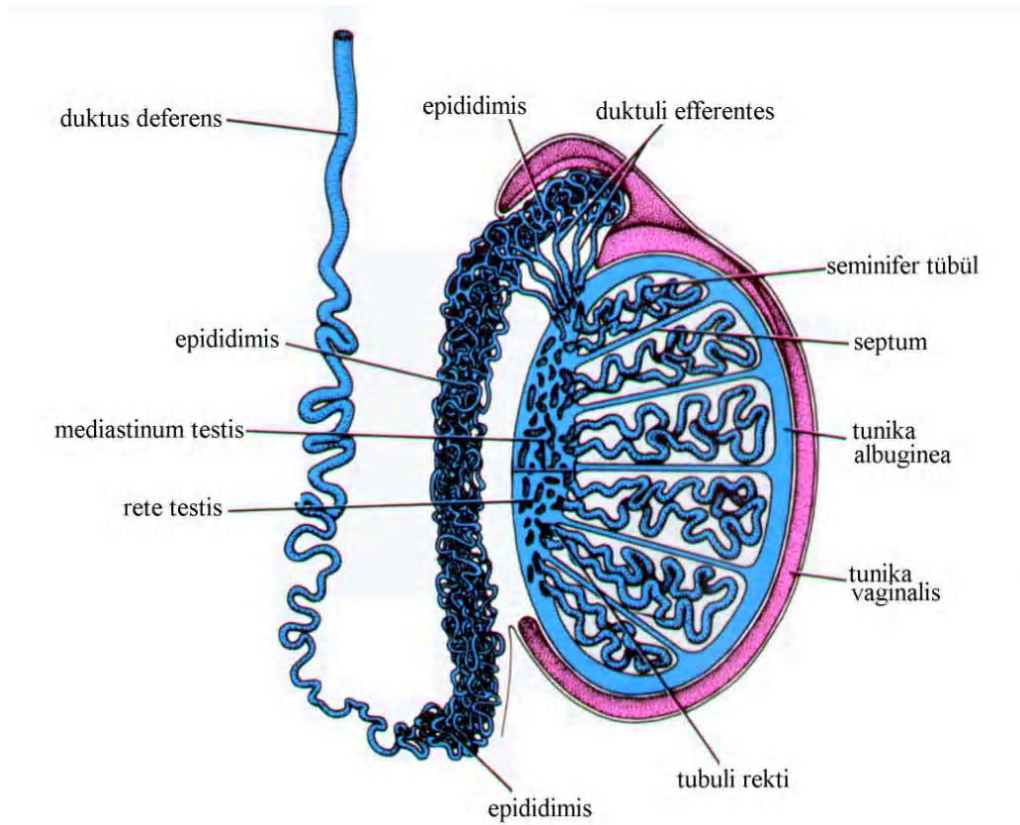
Tunica vaginalis testis'in lamina visceralis'i, kaygan şeffaf seröz bir membran olup testis'e, epididimis'e ve ductus deferens'in alt kısmına sıkıca yapışmıştır. Tunica vaginalis testis'in lamina parietalis'in lamina visceralis'ten daha kalın olup, fascia spermatica interna'ya yapışmıştır. Lamina parietalis, funiculus spermaticus'un distal kısmı içerisinde lamina visceralis'ten biraz daha yukarıya uzanır. Tunica vaginalis testis'in iki yaprağı arasındaki cavum scroti'de az miktarda sıvı bulunur. Bu sıvı testislerin scrotum içerisinde kolayca hareket etmelerini sağlar (20).

Tunica albuginea kalın, sert fibröz bir tabaka olup testis içeriğini sarar. Tunica albugineanın yapısında, esas olarak kollajen doku içine dağılmış çok sayıda, dallanmış, düz kas hücreleri vardır ve bu lifler otonomik innervasyon sonrasında kasılarak oluşan sperm hücrelerinin efferent duktuslara doğru hareket etmesinde yardımcı olur (21). Tunica albuginea, testis'i saran mavimsi beyaz renkli, sıkı yapılı fibröz bir tabakadır. Bu tabakayı oluşturan beyaz fibröz demetler, farklı yönlerde uzanarak birbiri içine girerler. Tunica albuginea'yı, arka kenarı hariç olmak üzere, dıştan tunica vaginalis testis'in lamina visceralis'i (epiorchium) örter. Peritonun bulunmadığı arka kenara epididimis tutunur ve buradan testis'in damar ve sinirleri girip çıkar. Tunica albuginea, arka kenarda testisin içine doğru kalın ve vertikal yarım bir bölme şeklinde uzantı gönderir. Bu bölmeye mediastinum testis denir (22).

Tunica vasculosa, tunica albugineanın iç yüzünde bulunan damar ağı tabakasıdır (17). Tunica vaskulosa, tunica albugineanın hemen altında yer alır. Testisin septumlarının iç yüzünü örttüğü için testis kompartmanları etrafında uzanmaktadır. Testis kapsül aracılığıyla septalarla 250-300 kompartmana bölünür. Her bir septum ayrı bir seminifer tübül ve en az bir sentrifugal arter içerir. Her bir septum, interstisyel doku ve gelişmekte olan germ hücreleri içeren seminifer tübülleri bulundurur. İnterstisyel doku sinir, kan ve lenfatik damarlar ile birlikte Leydig hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlardan meydana gelir. Seminifer tübüller her iki ucu da sıklıkla rete testiste sonlanan "V" şeklinde tübüller olarak uzanırlar (22).

2.3. TESTİSİN HİSTOLOJİSİ

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşur. Genital kanallar ve yardımcı bezler düz kas kasılmalarının da yardımı ile spermatozoonları dışarıya doğru sürükleyen salgılar üretir. Bu salgılar aynı zamanda erkek üreme sistemi içinde bulunan spermatozoonlara gerekli besinleri sağlar. Spermatozoonlar ile birlikte genital kanallar ve yardımcı bezlerin salgısı, penis yoluyla dışı üreme sistemine bırakılan semeni oluşturur (23)(Şekil 2.3).



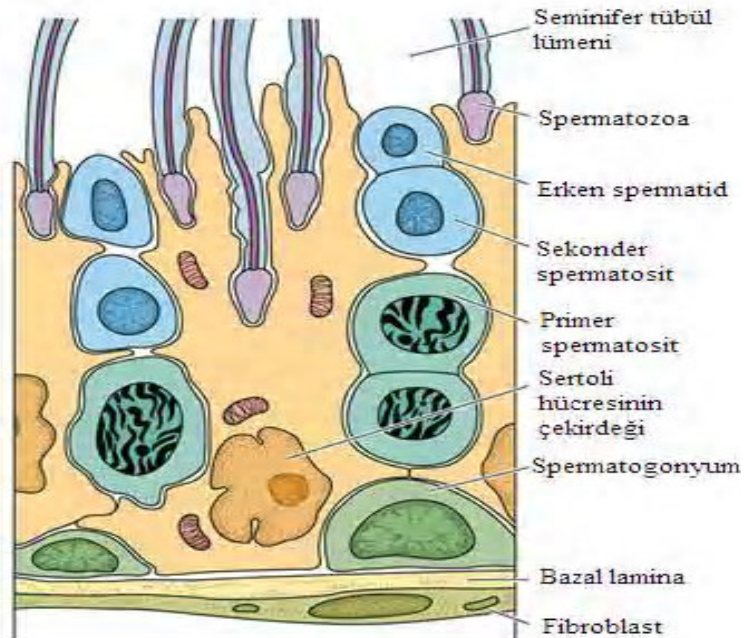
Şekil 2.3. Testis ve üreme yollarını gösteren şematik çizim (Ross, Romrell, Histoloji. A Textand Atlas, 5th ed.'dan modifiye edilmiştir.)

Testisler, tunika albuginea adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidir. Tunika albugineanın testisin arka yüzünde kalınlaşmasıyla mediastinum testis adı verilen yapı oluşur. Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar (septum), bezi testis lopçukları/bölmeleri denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırır. Bu uzantılar kesintisiz değildir ve çoğunlukla bölmeler birbirleriyle bağlantılıdır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve Leydig hücreleri adı verilen interstisyel hücreleri içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testis androjenlerini salgılar (24,25).

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fetüsün gelişmesi sırasında göç ederler ve skrotum içinde spermatik kordonların uçlarında asılı olarak bulunurlar. Skrotuma doğru gerçekleştirdikleri bu göç nedeniyle her testis tunika vaginalis adı verilen ve peritondan gelişmiş olan seröz bir kese taşır. Skrotum, testislerin karın içinekinden daha düşük bir ısıda tutulmalarında önemli bir rol oynar (23).

2.3.1. Seminifer tübüller

Spermatozoonlar seminifer tübüllerde üretilir. Her testiste yaklaşık 250-1000 kadar seminifer tübül bulunur. Her seminifer tübül karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşeli olup, yaklaşık 150-250 μm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve uçlarına doğru lümeni daralarak düz tübüller ya da tubuli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eden kanallar şeklinde uzanır. Bu düz tübüller, seminifer tübülleri rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlar (23). Rete testis seminifer epitelyumun ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır (25). Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmaktadır. Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran ince fibröz tabakaya tunica propria denir. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Miyoid hücreler hareketsiz spermleri rete testise iletiren ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur (23).



Şekil 2.4. Seminifer tübül epiteli (Gartner Color Textbook Histoloji, 2th ed.'dan modifiye edilmiştir.)

Seminifer túbül iki belirgin hücre popülasyonu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli merkezi bir lümeden oluşur:

1-Spermatogenik hücreler (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler)

2-Somatik Sertoli hücreleri (25).

2.3.2.Spermatogenez

Spermatogenez, spermatozoon üretim sürecidir. Süreç ilkel bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Spermatogonyum, yaklaşık 12 µm çapında, bazal laminanın hemen üstünde yer alan küçük bir hücredir. Cinsel olgunluk çağında spermatogonyum hücreleri mitoz bölünme ile çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur. Yeni oluşan hücreler iki yoldan birini izleyebilir. A tipi spermatogonyumlar olarak da adlandırılan kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da süregiden mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak B tipi spermatogonyumları oluştururlar. B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan öncül (progenitör) hücrelerdir. Primer spermatositler 46 kromozom (44+XY) içerir. Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu bölünmenin profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamada olacaktır. Primer spermatositler spermatogenik serinin en büyük hücreleridir ve nükleuslarında kangal oluşturma sürecinin değişik safhalarında kromozomların bulunması ile tanınırlar. Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatositler olarak adlandırılan ve yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur çünkü bunlar interfazda çok kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi 23 kromozom içeren iki hücrenin yani spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanır (23).

2.3.3.Spermiyogenez

Spermiyogenez spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNAsını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatazoon dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidler, küçük boyutları (7-8 µm çapında) yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilebilirler.

Seminifer túbüllerde lümen yakınında (jukstalüminal) yerleşmişlerdir. Spermioyenez, akrozom oluşumunu, nükleus yoğunlaşmasını ve uzamasını, flagellum gelişmesini, sitoplazmanın çoğunun kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Sonuçta, daha sonra seminifer túbül lümenine salınan olgun spermatozoon oluşur. Spermioyenez üç faza ayrılabilir.

2.3.3.1 Golgi fazı

Spermatid sitoplazması, nükleusun yakınında yer alan belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazma retikulumu túbüllerini içerir. Proakrozomal granüller olarak adlandırılan küçük PAS pozitif granüller Golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek membranla sınırlı bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal granülü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden nükleusa doğru göç ederken hareket ettikçe aksonemal bileşenleri çevresine sarar.

2.3.3.2 Akrozomal faz

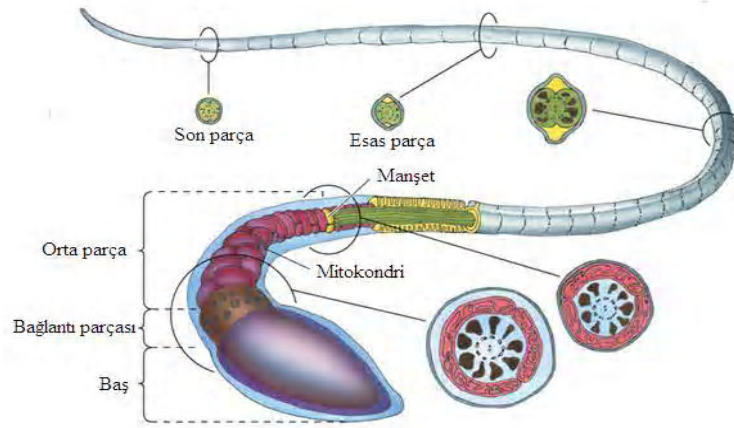
Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş görür. Bu enzimlerin, oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Spermatozoonlar bir oosite karşılaştığında, akrozomun dış membranı birçok bölgede spermatozoonun plazma membranı ile kaynaşarak akrozomal enzimlerin hücre dışına boşalmasını sağlar. Bu işlem akrozomal reaksiyon olarak bilinir ve döllenmenin ilk basamaklarından biridir.

Spermioyenezin bu fazı sırasında spermatid seminifer túbülün tabanına doğru yönelir ve aksonem lumene doğru uzanır. Ayrıca, nükleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler de flagellumun proksimal kısmı etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge, spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur.

Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein adı verilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur (23).

2.3.3.3 Matürasyon(Olgunlaşma) fazı

Spermatidlerin arasındaki protoplazmik köprülerin ortadan kalkmasıyla oluşan “artık cisimcik” adı verilen fazla sitoplazmik kısımlar, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilirler. Spermatitteki değişiklikler sonucu; seminiferöz tübül lümenine atılan ancak hareket ve dölleme yetenekleri olmayan, türe has genetik özellikleri taşıyan olgun spermatozoonlar gelişir. Altmış beş-yetmiş iki gün süren spermiyogenez sonucu spermiyasyon olayıyla Sertoli hücrelerinden ayrılıp, seminiferöz tübül lümenine geçen spermatozoonlar, morfolojik olarak olgun germ hücresi olmasına rağmen, fonksiyonel olarak henüz olgun değildir. Hareket yeteneklerini yardımcı bezlerin salgıları ile duktus epididimiste ve dölleme yeteneklerini dişi genital kanallarında kapasitasyon geçirerek kazanırlar. Tamamen olgunlaşan sperm; baş, orta parça ve kuyruk olmak üzere 3 parçadan oluşur. Baş bölgesi anterior yarısına kadar akrozomla sarılı olup yoğun kromatin içeren yassı şekilli bir çekirdek içerir. Baş bölgesini kuyruk bölgesine bağlayan bir çift sentriolün bulunduğu boyun bölgesinden başlayan aksonem, kuyruk boyunca uzanırken, özellikle boyun bölgesinde çok sayıda mitokondriyon ile çevrilidir. Boyun bölgesinin son kısmında spermin hareketinde rol alan “annulus” adı verilen bir kalınlaşma yer alır. Yapısal olarak silyuma benzeyen spermin en uzun parçası olan kuyruk 3 parçadan oluşmuştur; orta parça, esas parça, son parça. Orta parça; sarmal dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu bir tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve spermin boynundan başlayıp kuyruk boyunca uzanan, dokuz adet dış yoğun lifler adı verilen filamandan meydana gelmiştir. Kuyruğun en uzun parçası olan esas parça, yedi dış yoğun lifle sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşmaktadır. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıf spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan keratin proteinlerini bulundurmaktadır. Kuyruğun en kısa parçası olan son parça ise dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın sonlanması nedeniyle sadece aksonem içerir (26,27).

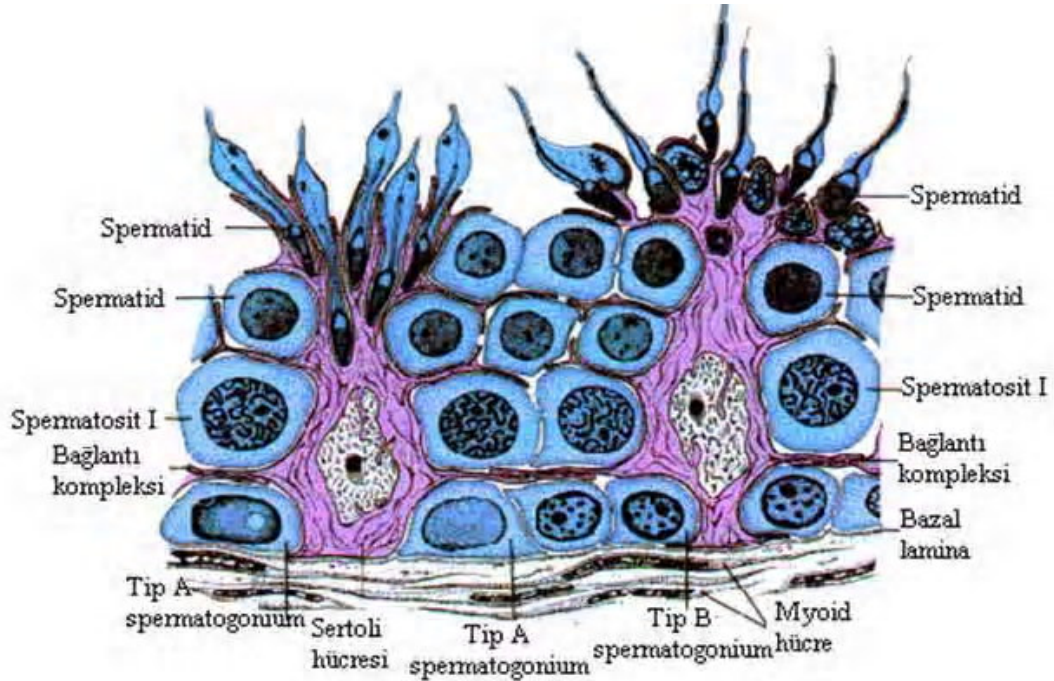


Şekil 2.5. Olgun spermatozoon (Gartner Color Textbook Histoloji, 2th ed.'dan modifiye edilmiştir.)

2.3.4.Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri testislerin işlevi açısından oldukça önemlidir. Bu hücreler spermatogenik serideki hücreleri saran uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Işık mikroskopunda, spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda yan uzantı nedeniyle, sertoli hücrelerinin sınırları iyi belirlenemez. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin çok sayıda düz endoplazmik retikulumu, az sayıda granüllü endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozomlar içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış nükleusunda çok sayıda girintiler, belirgin nükleolus bulunur. Yan yana bulunan Sertoli hücreleri, hücrenin alt yan yüzlerinde (bazolateral) engelleyici sıkı ilişkiler ile birbirine zonula okludens (sıkı bağlantı) tipi bağlantılar bağlanarak kan-testis bariyeri oluşturular. Spermatogonyumlar, bu bariyerin altında yer alan bazal kompartmanda yerleşmiştir. Spermatogenez sırasında, spermatogonyumların bölünmesi sonucu oluşan bazı hücreler bu bağlantı noktalarından bir şekilde geçerek bariyerin üzerinde yer alan adluminal kompartmana ulaşırlar. Spermatisitler ve spermatidler, bariyerin üzerinde Sertoli hücrelerinin yan ve üst kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatisitlerin flagellar kuyrukları geliştikçe, bunlar Sertoli hücrelerinin üst uçlarından çıkan saçaklar halinde görülürler. Sertoli hücreleri gap

junction adı verilen birleşmelerle de bağlanmıştır. Bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır (23).



Şekil 2.6: Bir seminifer tübülde Sertoli hücrelerinin yerleşimi, birbirleri ile bağlantıları ve gelişimin farklı dönemlerindeki spermatojenik hücreleri gösteren çizim (Ross, Romrell, Histology A Text and Atlas'tan).

Sertoli hücrelerinin işlevleri:

- Gelişmekte olan spermatojenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek.
- Oluşturdukları bariyer ile gelişen sperm hücrelerini immünolojik saldırıdan korumak.
- Seminifer tübül lümenine genital kanallar yönünde akan ve sperm taşınması için kullanılan bir sıvı salgılamak.
- Seminifer tübülde spermatogenez için gerekli olan testosteronunun yoğunlaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı proteini (ABP) salgılamak.

- Testosteronu östradiol haline çevirmek
- Ön hipofiz bezinden folikül uyarıcı hormon (FSH) sentez ve salınmasını önleyen inhibin adlı peptidi ve FSH salınımı üzerine olumlu bir etki gösteren aktivini salgılamak.
- Embriyo gelişimi sırasında erkek fetüste Müller (paramezonefroz) kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoprotein olan AMH'yi salgılamak.
- Üreme hücrelerine demir taşıdığına inanılan testiküler transferinin sentezlenmesi ve salgılanmasında görev almak (28).

2.3.5. İnterstisyel Alan

Testisin serminiferöz tübülleri arasındaki boşluklar; Leydig hücreleri, bağ dokusu elemanları, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillerler pencere tiptedir ve bu kapiller kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler. İnterstisyel alanın, lenf damarlarından zengin olması, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. İnterstisyum Leydig hücreleri, fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajları içermektedir. Leydig veya testisin interstisyel hücreleri, yuvarlak ya da poligonal şekilli olup, eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptir. Merkezi yerleşimli çekirdek kaba kromatin granülleri ve belirgin çekirdekcik içerir. Steroid sentez eden hücre özellikleri taşıyan sitoplazma, yaygın agranüler endoplazmik retikulum, küçük lipid damlacıkları, tübüler kristal mitokondriyonlar, lipofuksin granülleri ile Reinke kristali ve prekürsörlerine sahiptir. Leydig hücreleri, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondriyon ve agranüler endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilir. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır (25).

2.4. KADMİYUM

Günümüzde artan nüfus, kentleşme ve endüstrileşme tüm canlıların ağır metaller ile olan temasını artırmıştır (29). Ağır metaller yaygın kullanımları nedeniyle en zararlı çevresel kirleticilerdendir. Kurşun, civa ve kadmiyum (Cd^{2+}) Toksik Madde ve Hastalık Kayıt Ajansı (Agency for Toxic Substances and Disease Registry: ATSDR)'nin en son 2007'de bildirdiği öncelikli tehlikeli maddeler içerisinde ilk 10'a aldığı toksik ağır metallerdir (30).

Besin zincirinin en üstünde yer alan insan giderek artan düzeylerde ağır metallerle temas etmektedir. Bu nedenle son 30 yıldır ağır metallerin toksik ve istenmeyen etkilerini inceleyen çalışmalara ağırlık verilmiştir (29). Cd^{2+} canlılarda herhangi bir fizyolojik işlevi olmayan, kanserojenik ve mutajenik etkileri bilinen ağır metallerdendir (31,32).

2.4.1. Kadmiyumun fiziksel ve kimyasal özellikleri

Cd^{2+} , 1817 yılında Friedrich Stromeyer adlı bir Alman kimyacı tarafından çinko elde etmek için yapılan çalışmalar sırasında keşfedilmiştir (33). Çinko üretiminde ortaya çıkıncaya kadar havaya, yiyeceklere ve suya doğal süreçlerle önemli miktarlarda karışmamıştır. Fakat günümüzde Cd^{2+} 'da çevre kirliliğine sebep olan ağır metaller arasında yerini almıştır (34). Cd, atom numarası 48 ve atom ağırlığı 112.40 olan bir metal elementtir. Cd^{2+} , rölatif olarak yüksek buhar basıncına sahip olup atmosfere hızla Cd oksit olarak oksitlenir Cd sulfit, karbonat ve oksit gibi bazı Cd^{2+} bileşikleri, pratik olarak suda çözünmezler. Bu suda çözünmeyen Cd^{2+} bileşikleri, doğada oksijen ve asitlerin etkisi altında, Cd^{2+} sülfat ve Cd^{2+} nitrat gibi suda çözünür bileşiklere dönüşebilirler (35). Bileşik formatında bulunabilen Cd özel bir tadı ve kokusu olmayan bir maddedir (36).

Cd^{2+} , diğer ağır metallerle içinde suda çözünme özelliği en yüksek olan elementtir. Bu nedenle doğada yayılım hızı yüksektir ve insan yaşamı için gerekli elementlerden değildir. Suda çözünebilir özelliğinden dolayı Cd^{2+} halinde bitki ve deniz canlıları tarafından biyolojik sistemlere alınır ve akümüle olma özelliğine sahiptir (37). Cd^{2+}

yıllık doğaya yayılım miktarı 25,000 – 30,000 tondur ve bunun 4,000 –13,000 tonu insan faaliyetlerine bağlı olarak ortaya çıkar. Günümüzde Cd^{2+} endüstriyel olarak nikel/ Cd^{2+} pillerde korozyona karşı, özellikle gemicilikte dayanımı nedeniyle gemi sanayinde çeliklerin kaplanmasında, boya sanayinde, PVC stabilizatörü olarak, alaşımlarda ve elektronik sanayinde kullanılır. Cd^{2+} empürite olarak fosfatlı gübrelerde, deterjanlarda ve rafine petrol türevlerinde bulunur ve bunların çok yaygın kullanımı sonucunda da önemli miktarda Cd^{2+} kirliliği ortaya çıkar (34). Cd^{2+} , metallerin kaplanmasında, karışım şeklinde alkali pil ve plastik madde üretiminde, elektronik sanayinde, cam endüstrisinde, fotoğrafçılıkta X ışınlarının yansıtılmasında ve bunlarla birlikte antiparaziter ve diş hekimliğinde amalgam olarak kullanım alanıda bulunmaktadır (38). Ayrıca Cd^{2+} batarya yapımında, reaktör kontrol çubuklarının üretiminde, boya ve plastik yapımında da kullanılır (39).

2.4.2.Kadmiyumun toksik etkisi

Cd^{2+} 'un toksik etki göstermesi, çevredeki geniş dağılımı ve çok düşük miktarlarda bile canlılarda çeşitli yan etkilere sebebiyet vermesiyle çalışmalarda oldukça yaygın olarak kullanılan bir metaldir (40). Direkt ve indirekt yollarla meydana gelebilecek çevre ve toprak kirliliğinden besin zinciri yolu ile bütün canlı sistemlerinin etkilenmesi Cd^{2+} gibi ağır metallerle olan maruziyetin tehlikesini daha da artırmaktadır (41). Zararlı metal olan Cd^{2+} tarımsal topraklarda bulunması ana materyal kaynaklı olabildiği gibi aynı zamanda sanayi faaliyetleri, fosforlu gübreler, kanalizasyon atıkları ve atmosferik depozitler gibi insanil faaliyetler neticesinde de olabilmektedir (42). Cd^{2+} toprakta hareketli bir element olarak bilinip, bitkiler tarafından ise oldukça kolay alınabilmektedir. Bitkiler tarafından alınmasıyla besin zincirine girmesi veya topraktan yıkanarak su ortamına ulaşma olasılığı önemli bir çevre sorunu teşkil eder. Ayrıca Cd^{2+} topraktaki şelatlayıcı ajanlarla topraktan aşağı taşınması hızlanır, yeraltı suyuna karışarak içme ve sulama sularında kirliliğe neden olmaktadır(43).

Cd^{2+} mevcut yarılanma ömrü ortalama 15-1100 yıldır ve bu uzunluk Cd^{2+} her ortamda kontrol altına alınıp toksik etkisinin minimum seviyeye indirilmesini gerekli kılar (44). Ağır metallerden Cd^{2+} kirliliğin olduğu topraklarda yetişen bitkiler ve bu bitkilerle beslenen hayvanlardan üretilen hayvansal gıdalar ve içme sularına karışan sanayi artıkları aracılığıyla en sonunda insan bünyesine ulaşır (45). Bir günde yaklaşık olarak

18-200 $\mu\text{g Cd}^{2+}$ besinlerle, sigara ve hava yolu ile alındığı ortaya konmuştur. Bir paket sigara içildiğinde de yaklaşık olarak 2-4 μg kadmiyumun solunum yoluyla alındığı tespit edilmiştir (36). Diyetle kalsiyum, protein, çinko, demir ve bakırın az olması bağırsaktan Cd^{2+} emilimini arttırmaktadır (46). Cd^{2+} insanlarda ve diğer memelilerde başta primer iki organ olarak karaciğer ve böbrek dahil akciğer, plasenta, pankreas, testis ve kemik üzerinde olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (47- 49).

Kadmiyuma çok düşük düzeylerde uzun süreli olarak maruz kalındığında böbreklerde birikip böbrek hastalıklarına sebebiyet verir (36). Ayrıca kronik Cd^{2+} toksikasyonunun insanda oluşturduğu rahatsızlıklardan en önemlilerinden biri nefropatidir (50, 51). Bununla birlikte Cd^{2+} yüksek oranda proksimal tübülün fonksiyonunu olumsuz yönde etkilemektedir (52, 53).

Cd^{2+} çoğunlukla ortam havasından solunumla alınır ve bu ağır metal tüm solunum yollarını etkiler. Öksürük ve boğazda yanma Cd^{2+} maruziyetin ilk belirtisidir. Maruziyet süresi ve miktarı arttıkça ileriki dönemlerde ise akciğer ödemeine sebebiyet verir. Çok yüksek düzeyde Cd^{2+} solunması akciğer hasarına bağlı olarak ölüme yol açabilmektedir (36).

Ağız yolu ile alındığında ise bu metal hızla emilmektedir. Yine ilk belirtiler kanlı kusma ve ishaldir. Cd^{2+} sistemik etkileri kas ve iskelet sistemi üzerinde de görülür. Cd^{2+} kronik maruz kalma, kalıcı kemik ve ekstremitelerde deformasyonlarına yol açarak yürüme sorunlarına neden olmaktadır (54-56).

İn vitro ortamda yapılan çalışmalar da Cd^{2+} direkt olarak osteoblast ve osteoklast aktivitesini etkilediğini göstermiştir (57). Birçok araştırmacı ise Cd^{2+} kemik üzerindeki etkilerini kollajen metabolizmasını bozarak gösterdiğini ileri sürmüştür (58). Bu araştırmacılara göre Cd^{2+} kemikteki kollajen içeriğini ve kollajenin çözünebilirliğini azaltmaktadır (58).

Üreme sistemi üzerine Cd^{2+} iki etkisi söz konusudur. Bu hem doğrudan (testiküler ve hipofiz-hipotalamus toksisitesi) olan etki hem de dolaylı (hormon salgılanmasını değiştirerek) yolla yaptığı etkidir. Cd^{2+} Leydig hücrelerinden gonodotropinin stimüle

ettiği testosteron üretimini azalttığı ve aynı zamanda hipotalamus ve hipofizde toksik olarak birikerek prolaktin seviyesini de düşürdüğü saptanmıştır (59).

Erkeklerde spermatogenezisin erken evresinde spermatozoalarda hasar meydana getirirken, tek sefer bile maruz kalınması halinde birkaç saat içinde apoptozis, nekroz, kısırlaşma ve spermanın tamamen kaybı meydana gelir. Dişilerde ise uterus ödemine ve ovaryumda folliküler atreziye yol açabilir (60-62). Cd^{2+} plasenta yapısını bozarak gebeliği de olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (63).

Ağır metaller organizmada direk ya da bağışıklık sistemi gibi homeostatik mekanizmaları etkileyerek toksik etkilerini göstermektedir (64). Cd^{2+} gibi ağır metallerin dokularda meydana getirdiği hasarın antioksidan savunma sisteminde meydana gelen bir harabiyet neticesinde olduğu düşünülmektedir. Çünkü Cd^{2+} uygulaması ardından katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSSG-R) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) gibi antioksidan enzimlerinin miktarında belirgin bir azalma meydana gelmektedir (65). Diğer taraftan Cd^{2+} canlı organizmalarda lipid peroksidasyonuna (LPO) sebep olur ve ana metabolit olan MDA (malondialdehit) miktarında artış meydana gelir (66-68).

2.5. PROPOLİS

İnsanlığın başlangıcından beri var olan, son yıllarda tam anlamıyla önem kazanan Apiterapi adı verilen arı ürünleri ile tedavi yöntemleri pek çok hastalığın önlenmesinde ve tedavisinde etkili olmaktadır (69).

Son yıllarda yapılan birçok çalışma ile arı ürünlerinin içeriği ve etkileri belirlenip kullanım alanlarının artırılması sağlanmıştır. Propolis çok eski çağlarda keşfedilerek ilaç özellikleri nedeniyle birçok alanda kullanılmıştır. Propolisin farmakolojik özellikleri Yunan ve Romalı fizikçiler, Dioscoroides, Aristoteles, Pliny ve Galen tarafından tanımlanmıştır. Bilim insanlarının yaptığı tanıma göre propolis yaraların tedavisinde ve ağız enfeksiyonunda bir antiseptik olarak kullanılabilir. İbranice eski vasiyetnamelerde mucizevi madde propolis “Tzori” olarak geçmektedir ve tedavi edici özelliklerinden bahsedilmektedir (70). İnkalar ise bu şifalı ürünü ateş düşürücü

olarak kullanılmaktaydı. Propolisin bu özellikleri Orta Çağda ve Arabistan da kullanılmıştır. On yedinci yy da Londra da propolis resmi ilaçlar listesine dahil edilmiştir ve yine bu yıllarda Avrupa da önemide artmıştır (70). Propolis geleneksel tıpta yaygın kullanım alanına sahiptir fakat modern tıpta çoğunlukla sentetik ilaçların kullanılmasıyla önemini kaybetmiştir. Son yıllar içerisinde sentetik ilaçların yan etkilerinin ortaya çıkması ve hastalık etmenlerinin bu ilaçlara karşı dirençli hale gelmesi neticesinde doğal ilaçların kullanımına karşı eğilim artmıştır (71).

2.5.1 Propolisin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Propolis çam, meşe, okaliptüs, kavak, kestane gibi ağaçlardan ve bazı otsu bitkilerin tomurcuk, yaprak ve benzeri kısımlarından bal arıları tarafından toplanan ve mumla karıştırılarak kovan içerisinde birçok amaca yönelik olarak kullanılan zambak benzeri bir maddedir. Arı bu özel maddeyi başı ve toraksı arasında mevcut olan bezlerden salgıladığı enzimlerle özel kimyasal bir süreçten geçirerek pellet haline getirir (72, 73). Arılar kovandaki kırık ve çatlakları kapatmak, kovan içerisindeki mikroorganizmaların gelişimini engellemek için kovanın iç yüzeyini propolisle kaplamaktadırlar. Petek gözündeki yavruların (larva ve pupa) çeşitli enfeksiyonlardan korunması amacıyla peteği ince bir tabaka halinde propolis ile sıvarlar. Nektar ve polen toplayan işçi arılar kovan dışında çeşitli mikroorganizmalardan etkilenebilmektedir. Kovan içi görev yapan arılar, kovan giriş deliğinde dışardan gelen işçi arılara propolisle özel fırçalama işi yaparak çeşitli enfeksiyonların kovana girmesini engellerler (74). Sonbahar mevsiminde ise kovanın giriş deliğini propolis ile küçülterek soğuk havanın kovana girişini önlemektedirler (75). Arılar propolisi ayrıca kovanın delik ve çatlaklarının kapatılmasında, peteklerin tamir edilmesinde, peteklerin birbirlerine yapıştırılmasında, petek gözlerinin parlatılmasında da kullanırlar.

Genel itibariyle propolis 15-25 °C arasında mum kıvamında elastik bir yapı göstermekte olup soğukta ise katı kırılğan bir şekle dönüşmektedir. Yüksek sıcaklıklarda 30-40°C yumuşayıp yapışkan bir durum almakta, 80°C de kısmen erimektedir. Propolis, kloroform, eter, aseton ve diğer organik çözücülerde kısmen çözünürken, %95'lik alkolde büyük ölçüde erimekte, suda çok az veya hiç erime göstermemektedir (74). Propolisin rengi, toplandığı kaynağa ve yaşına bağlı olarak sarı-yeşil den koyu kahverengine kadar değişmekte olup kendisine has aromatik, özel bir kokuya sahiptir

(76). Mevsime yıla, iklime ve toplandığı yere göre propolisin içeriği farklılık gösterebilir (77). İçerisinde 300'den fazla değişik madde vardır. Şu ana kadar 180'den fazla bileşik propolisin bileşeni olarak tanımlanmıştır (78). Fakat genel itibariyle propolisin içeriğini %50'sini reçine ve bitkisel balsam, %30'unu balmumu, %10'unu esansiyel ve aromatik yağlar, %5'ini polen ve % 5'ini diğer organik maddeler oluşturur (72, 73).

Propolisin ağırlığının gaz kromatografik (GC-MS) yöntemi ile incelendiğinde % 60 fazlasını fenolik (flavonoidler: flavonlar, flavononlar ve flavonoller) ve ilgili bileşikler (fenolik asitler ve esterleri, kumarinler, ketonlar) ile en az 4 çeşit kaffeik asit esterleri (kaffeik asit benzil ester, salisilik asit benzil ester, sinnamik asit benzil ester, kaffeik asit fenetil ester-CAPE-) oluşturmaktadır (79-81). Lipidler yaklaşık olarak % 60 oranında propolisde yer alırlar. Bunların %49.09'unu yağ asitleri %50.91' ini ise streoller, hidrokarbonlar ve uzunzincirli alkoller oluşturmaktadır. Palmitik asit ve steraik asit propolisin içinde bulunan doymuş yağ asitlerine örnek olarak verilirken nervolik, araşidonik, oleik, linoleik, linolenik asitler ise propolisden izole edilen doymamış yağ asitlerine örnektir (79). Propolisin yapısında fruktoz, glukoz ve sukroz gibi şekerler de mevcuttur (79, 80). Propoliste bulunan bazı mineral maddeler ise son yıllarda yapılan araştırma sonuçlarına göre kalsiyum, magnezyum, potasyum, sodyum, demir, bakır, çinko ve mangan olarak belirlenmiştir (74). Propolis örneklerini içerisindeki bileşik grupları elde edildiği kaynağa göre farklılık göstermektedir. (82). Bu gruplara ait tanımlanan bileşik sayıları ile propolisin yapısındaki maddeler ve miktarları Tablo 2.1'de gösterilmektedir (83).

Ağırlıklı olarak flavonoid ve sinnamik asit türevi fenolik bileşik içeren propolisler genellikle ılıman bölgelerden elde edilmektedir. Terpenler ve prenilatlı bileşikler ılıman bölge propolislerinde çok az bulunmaktayken; Güney Amerika'dan elde edilen tropikal propolislerde lignan, flavonoidler ve diğer gruptan bileşiklerle birlikte bulunduğu rapor edilmiştir.

Propolisde birçok vitamin bulunmaktadır. Bunlar B1, B2, B6, A, C, E, niasin, pantotenik asit gibi vitaminlerdir. Propolis ayrıca karoten (provitamin A) açısından da zengindir. Propolisin içeriğini % 0.7 oranında Aspartik, glutamik, triptofan,

fenilalanin, lösin, sistin, metiyonin, valin, serin, histidin, arginin, prolin, tirozin, treonin, alanin ve lizin gibi amino asitler oluşturur (84).

Tablo 2.1. Propoliste Belirlenen Bileşik Grupları ve Sayıları (83).

Bilesikler Tanımlanan Bileşik Sayısı (adet)	Tanımlanan Bileşik Sayısı (adet)
Flavanoidler	38
Hidroksiflavonlar	27
Hidroksiflavononlar	11
Kalkonlar	2
Benzoik Asit ve Türevleri	12
Asitler	8
Esterler	4
Benzaldehit Türevleri	2
Sinamil ve Sinamik Asit ile türevleri	14
Alkoller, Ketonlar, Fenoller	8
Heteroaromatik Bilesikler	12
Terpen ve Sekuterpen ve Türevler	7
Alifatik Hidrokarbonlar	6
Sekuterpen ve Triterpen Hidrokarbonlar	11
Steroller ve Steroid Hidrokarbonlar	6
Mineraller	22
Seker	7
Aminoasitler	24

2.5.2 Propolisın Biyolojik Özellikleri ve Antioksidan Etkileri

Son 40 yılda propolisın biyolojik ve sağlığı artırıcı özelliklerinden bahseden yüzlerce çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar propolisın kullanım alanlarına ve biyolojik etkinliğine ışık tutmuştur (85). Propolisın antimikrobik (86-88) antiinflamatuvar (86-90) ve rejeneratif etkisinin (91) yanında immunomodülatör (7, 92) antioksidan (90, 93-94), antimutajenik (95) ve karsinostatik (96-98) etkileri bilinmektedir. Propolisın

antimikrobik etkisi bakterileri (86, 87), virüsleri (88), mantarları (86) ve parazitleri (96) kapsamaktadır. Ayrıca propolisin, lokal anestetik, antiülser, antitümör, immüno-stimülatör gibi biyolojik etkileri de mevcuttur (97). Araştırmacıların birçoğu propolisden elde edilen ekstraktın gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel etkisini incelemiş ve gram pozitif çubuk bakterilere karşı geniş etkili olduğunu fakat gram negatif basillere karşı kısıtlı etkiye sahip olduğu sonucuna varmıştır (98). Propolis preparatlarının *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella pullorum*, *Salmonella gallinarum*, *Escherichia coli* ve *Bacillus larvae* gibi bakteriler üzerinde etkili olduğu belirlenmiştir (74). Propolisin antibakteriyel aktivitesinin flavonoidler ile reçine içinde mevcut olan aromatik asitler ve esterler nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Pinosebrin, galangin ve pinostrobin bakterilere karşı en etkili flavonoidler olarak belirlenmişlerdir. Ferulik ve kafeik asit de propolisin bakterisit etkisinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır (85). Yine pek çok araştırmacı propolisin bitkiler (tütün benek, salatalık mosaik, tütün kangren gibi), hayvanlar (HSV-1, varicella zoster ve influenza) ve insanlar (human immunodeficiency-HIV) üzerinde virüslerin neden olduğu enfeksiyonun gelişmesini engelleyici olduğu sonucuna varmıştır. Bunun neticesinde de propolis viral hastalıklara karşı önerilebilir bir hal almıştır (99). Belli başlı flavanoidlerin propolis içerisindeki çok sayıda RNA ve DNA virüsüne karşı etkili olduğu bilinmektedir (100). Galangin, kamferol, prosiyanidin, pelargonidin ve luteolin gibi flavanoidler HSV ye karşı virüsidal etkilidir (101). Birçok araştırmacı propolisin invitro ve invivo şartlarda antitümör etkisini araştırmışlardır. Propolisin tümör hücreleri üzerinde gelişmeyi önleyici etkisi bulunmuş ve bundan sorumlu bazı bileşikler izole edilmiştir (102). Propolis içeriğindeki sinamik asit ve terpenoidlerin sitotoksik aktivitesi sebebiyle yoğun şekilde bağırsak, böbrek, meme, burun ve farenks gibi çeşitli kanser türlerinde tedavi amaçlı kullanılmaktadır (103). Ayrıca Propolis antioksidan terapiye yardımcı bir kombinasyonla birlikte antitümör amaçlı kullanıldığında ise, kemoterapinin etkinliğini artırır ve lökositlerin karaciğer ve böbrekler üzerindeki yan etkinin giderilmesini sağlar. Böylece kemoterapinin yüksek doz uygulanmasına imkân sağlar (104).

Hücrelerde oksidatif hasarı önleyen, yok eden veya kısmen azaltan bazı mekanizmalar mevcuttur. Bu mekanizmayı aktif hale getiren maddeler antioksidan olarak adlandırılmaktadır (105). Antioksidanlar, diğer moleküllerin oksidasyonunu önlemeyi

veya yavaşlatmayı hedef alan moleküllerdir. Antioksidan etki mekanizması, anti inflamatuvar ve karaciğer koruyucu etki ile ilişki içindedir. Propolisin fenolik içeriği botaniksel orijine göre değişebilsede pek çok propolis türünün antioksidan etkisi rapor edilmiştir. Çeşitli coğrafik bölgelerden elde edilen propolisler üzerine yapılan bir çalışmada toplam fenol miktarı ile antioksidan etkinliğinin doğru orantı gösterdiği belirlenmiştir. Daha yüksek fenolik içeriğine sahip olan kavak propolisinin antioksidan etkinliği, daha az fenolik içeriğe sahip Brezilya propolisinden yüksek olduğu saptanmıştır (104). Propolisin temel bileşiklerinden olan flavonoidlerin ve bunlarla irtibatlı serbest radikalleri temizleme etkisinin oldukça fazla olduğu gösterilmiştir (106). Bununla ilgili olarak Şili'den elde edilen propolis örneklerinde yapılan çalışmada propolisin kimyasal içeriği ile serbest radikalleri süpürme kapasitesi arasındaki ilişki saptanmıştır (107).

Serbest radikal olarak adlandırılan oksidant moleküller hücrede normal metabolizma esnasında üretilirler. Lipid membranlarının oksidasyonu, lipit peroksidasyonuna ve onların neden olduğu hasara yol açarlar. SOD, CAT ve GP gibi enzimler savunma mekanizması sırasında üretilirler. Özellikle savunma mekanizmasında hücresele antioksidan enzimlerin önemi büyüktür ve bu enzimlerin yetersizliği veya enzim aktivitelerindeki azalmalar hücre bileşenlerinde onarılmaz hasarlara yol açabilir (108). Propolis ve diğer antioksidan maddelerle yapılan çalışmalarda propolisin lipit peroksidasyonunu düşürdüğü ve serbest radikal oluşumunu büyük ölçüde engellediği belirlenmiştir (109, 110). Propolisin yapısında bulunan ve antioksidan olarak kullanılan flavanoidlerin lipit peroksidasyonunu önlediği bildirilmektedir. Flavanooidler, iz elementlerle veya radikallerle şelat yaparak antioksidan özellik göstermektedirler (111, 112). Propolisin ana bileşenlerinden birisi olan CAPE, reaktif oksijen türlerinin üretimini bloklamaktadır. Propolisin temel aktif bileşiklerinden olan CAPE'in ısı ile yanık oluşturulan sıçanların plazmasındaki lipit peroksidasyon ve nitrik oksit düzeyleri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada CAPE eklene grubun SOD aktivitesinin tüketilmesini önlediği, ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ettiği, MDA ve nitrik oksit düzeyini düşürdüğü tespit edilmiştir (113).

2.5.3 HIF-1 α (Hipoksi İndükleyici Faktör)

HIF-1 α ; anjiogenez, eritropoez, glukoz taşınması, anaerobik glikoliz, vazodilatasyon, antiapoptotik ve proapoptotik cevap olarak iskemi ve hipoksi gibi birçok hücrel süreçleri içeren 100 farklı hipoksiye duyarlı genden daha fazlasının aktivasyonu ile restore eden oksijen homeostazisindeki kıvrım dönüş kıvrım özelliğinde olan transkripsiyon faktörüdür (114). HIF-1 α hipoksiye cevabın ana regülatörü olarak bilinir (115,116). Memelilerin hücreleri oksijen gerilimine bilhassa lokal oksijen kaynağındaki azalmaya (hipoksiye) aşırı şekilde duyarlıdır. Hipoksi ile indüklenen oksijen yetmezliğinde oksijen homeostazisini içeren çoğu hücrelerdeki spesifik genlerin transkripsiyonu hızlı bir şekilde artmaktadır (117). Birçok araştırmacı embriyogenezis, tümör vaskülarizasyonu ve ilerleyişi, felç, miyokardial enfarktüsde meydana gelen iskemi ve hipoksi sürecini ve klinik öneme sahip diğer iskemi ve hipoksi süreçlerinin birçoğunun altında ki HIF-1 fonksiyonunu çalışmaktadır (118, 119). Kanserin ilerlemesinde HIF-1'in rolüne ait bilgiler, insan kanser biyopsi örnekleri ve deney hayvanları çalışmalarına dayanmaktadır. İmmünohistokimyasal analizler ile HIF-1'in kolon, meme akciğer, over, prostat, deri ve mide dahil olmak üzere birçok insan malign kanserlerinde aşırı ekspresyonu belirlenmiştir. Ayrıca kolon ve meme kanserine ait metastazların bir çoğunda HIF-1 α birikimine rastlanmış ve kötü yaşam sonuçlarıyla da ilişkilendirilmiştir (120, 121). Bu görüş yetersiz HIF-1 α 'ya sahip fare ve insan kanser hücre serilerinde yapılan deneylerle desteklenmiştir. HIF-1 α protein seviyelerinin çeşitli kanserlerde, yeni tedavi yöntemleri belirlenirken bir biyomarkır olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (122, 123). İnsanda hipoksiyle indüklenen genleri aktive eden HIF-1 α gen proteini, HIF-1 gen ailesinin en iyi bilinen temel elemanlarından biridir. HIF-1 α geni; 14q23.2 kromozom bölgesinde bulunan 15 ekzon ve 14 introndan oluşan bir gendir (124). HIF-1 α subüniteleri yaygın bir şekilde hemen hemen bütün organizmaların dokularında ifade edilmektedir. HIF-1 heterodimeri oksijen bağımlı α subünitesinden ve oksijen gerilimi aracılığı ile düzenlenmeyen arilhidrokarbon olarak adlandırılan β subünitesinden temel olarak meydana gelir (119,125). HIF-1 β temel olarak eksprese edilirken, HIF-1 α ise hipoksiye cevap olarak upregülatördür (126, 127). HIF-1 α hidroksi indükleyici faktörün bir subünitesidir ve HIF-1 aktivatörü olarak belirlenir. Normoksi altında HIF-1 α aşırı şekilde kararsızdır. HIF-1 α tahribat sırasında işaretlenir ve sonunda ubiquitin-proteasome sistem aracılığı ile hızlı bir şekilde bozulur. Prolin hidroksilaz (PHDs) aynı zamanda HIF prolin hidroksilaz olarak bilinmektedir ve substrat olarak O₂ ve 2-

oksoqlutarat (2-OG), kofaktör olarak da vitamin C ve Fe barındıran oksijen bağımlı HIF-1 α nin baskın hidroksilat prolil kısmındaki 402 ve 564 kalıntısıdır. HIF-1 α yıkım için işaretlenir ve neticede proteozomdaki hidroksilaz tarafından bozulmaya başlar (128-130). Hipoksi altındayken HIF-1 α PHDs nin bir substratı olarak O₂ nin eksikliğinden ötürü stabil hale gelir ve neticede onun mevcut proteini birikir (125,131-132). HIF-1 α ya ek olarak, 2 diğer HIF α (HIF-2 α ve HIF-3 α) olarak tanımlanmıştır . HIF-2 α ve HIF-3 α nin fonksiyonları, HIF-1 α ile karşılaştırıldığında bilinen fonksiyonları daha azdır (133,134).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen 250-300 gr ağırlığında ergin erkek Wistar albino türü sıçanlar kullanıldı. Kafesler içinde tutulan sıçanlara günün normal düzeninde 21⁰C ve 12 saatlik aydınlık/karanlık ortamında bakım odalarında izin verilen ölçüde standart besin ve su ile yetiştirildi. Denekler rastgele 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 (n=8); kontrol grubu,

Grup 2 (n=8); 1 mg/kg (intraperitoneal) Cd²⁺ uygulanan sıçanlar,

Grup 3 (n=8); 1 mg/kg Cd²⁺ + 50mg/kg/gün propolis (intrastrik)

Grup 4 (n=8); 50mg/kg/gün propolis (intrastrik) uygulanarak oluşturuldu.

3.1 DENEYSEL PROSEDÜR

Cd²⁺ 1 mg/kg/gün intraperitoneal olarak 10 gün boyunca uygulandı. Propolis günlük hazırlandı ve 50mg/kg/gün olacak şekilde deneklere intrastrik olarak Cd²⁺ uygulamasından bir hafta önce başlanarak deney sonuna kadar verildi. Propolis DMSO içinde çözüldü. Deney sonunda tüm denekler ketamin + xylazin anestezisi altında dekapite edilerek testis dokuları çıkarıldı. Tüm prosedürler etik kurallara uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Dekapite edilen sıçanlardan alınan testislerin bir bölümü histolojik incelemeler, diğer bölümleri ise biyokimyasal incelemeler için kullanıldı. Biyokimyasal analiz için alınan testis dokuları -80 ⁰C'de saklandı. Histolojik incelemeler için alınan testis dokuları ise %4'lük formaldehit ile tespit edildi. Tespit

solusyununda 48 saat bekleyen testisler bir gece akan musluk suyunda bırakıldıktan sonra artan alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarıldı ve ksilol ile şeffaflandırıldıktan sonra parafine gömülerek bloklandı. Yapılan bu işlemler aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 3.1. Işık Mikroskobu Doku Hazırlama Tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	%4 Formaldehid	72 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
2	Musluk suyu	1 gece	9	Absolü Alkol	1 saat
3	%50 Alkol	1 saat	10	Ksilen	20 dakika
4	%70 Alkol	1 saat	11	Ksilen	20 dakika
5	%80 Alkol	1 saat	12	Ksilen	20 dakika
6	%96 Alkol	1 saat	13	Eriyik parafin (60°C)	1 gece
7	Absolü Alkol	1 saat	14	Bloklama	

Parafin bloklardan alınan 5-6 µm'lik kesitler polilizin kaplı lamlara yayıldı. Hazırlanan lamalar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler hematoksilin-eozin (H+E) (Tablo 3.2) boyası ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra ksilolden geçirilerek kapatıldı.

Tablo 3.2. Hematoksilin-Eozin Boyama Tekniği

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	1 saat	13	Akarsu	5 dakika
2	Ksilen I	20 dakika	14	Eozin	3-5 dakika
3	Ksilen II	20 dakika	15	Akarsu	5 dakika
4	Ksilen III	20 dakika	16	%50 Alkol	20 dakika
5	Absolü Alkol I	20 dakika	17	%70 Alkol	20 dakika
6	Absolü Alkol II	20 dakika	18	%80 Alkol	20 dakika
7	%96 Alkol	20 dakika	19	%96 Alkol	20 dakika
8	%80 Alkol	20 dakika	20	Absolü Alkol I	20 dakika
9	%70 Alkol	20 dakika	21	Absolü Alkol II	20 dakika
10	%50 Alkol	20 dakika	22	Ksilen I	10 dakika
11	Akarsu	5 dakika	23	Ksilen II	10 dakika
12	Hematoksilen	5-8 dakika	24	Kapatma	

3.2. SEMİNİFER TÜBÜL ÇAPLARININ ÖLÇÜMÜ (MSTD)

Testisteki hasarın bir göstergesi olarak Seminifer Tübül Çaplarının ölçümü de kullanıldı. Hematoksilen-Eozin ile boyalı kesitlerde, Olympus BX51 mikroskopundaki Analysis LS Reserach programı kullanılarak seminifer tübül çapları ölçüldü ve ortalama tübül çapları hesaplandı. Seminifer tübül çapı ölçümü, her bir deneğe ait preparattan 10 farklı alandaki tübül çapları 20'lik objektifteki farklı alanlardan ölçülerek yapıldı. İstatistiksel analizler için SPSS paket programı kullanıldı.

3.3. JOHNSEN TESTİKÜLER BİYOPSİ SKORU

Bu skorlamaya göre, hasarlanmaya neden olan herhangi bir olay sonrasında, tübülün içindeki hücrelerin dağılımı belli bir sıra takip ederek progresif bir şekilde kaybolur. Tübüllerdeki bu hasarlanmanın derecesinin değerlendirilmesinde Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) kullanıldı (Tablo 3.3). Histolojik incelemelerin sonuçları Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında iki uzman histolog tarafından değerlendirildi. Her gruptan rastgele seçilmiş 10 farklı preparattan 20'şer farklı tübül 20'lik objektifle incelendi. Her grup için ayrı ayrı 200 adet tübül değerlendirilerek ortalama JTBS hesaplandı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar için SPSS paket programı kullanıldı. Elde edilen veriler önceden hazırlanan bir forma işlendi.

Tablo 3.3. Johnsen Testikuler Biyopsi Skolaması

Skor	Histolojik Bulgular	Skor	Histolojik Bulgular
1	Tübüler kesitte hiçbir hücre yoktur.	6	Az sayıda (5/ tübül) spermatid mevcuttur.
2	Sadece sertoli hücreleri vardır.	7	Farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır.
3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyumlar vardır.	8	Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur.
4	Az sayıda (5/ tübül) spermatisit vardır.	9	Az sayıda (5/ tübül) spermatozoa vardır.
5	Fazla sayıda spermatisit mevcuttur.	10	Fazla sayıda spermatozoanın görüldüğü tam spermatogenez mevcuttur.

3.4.TUNEL METODU

Deneklere ait tüm kesitlerde apoptotik hücreleri belirlemek için Roche marka In Situ Cell Detection Apoptosis Fluorescein Kit'i kullanıldı ve boyama işlemi, kitin prosedürüne göre yapıldı. Kısaca özetleyecek olursak, 5-6 µm kalınlığında alınan testis dokuları deparafinize ve ardından rehidrate edildikten sonra PBS ile yıkandı. Daha sonra antijen geri kazanımı için 0.01 M sodyum sitrat tamponunda mikrodalga fırında 350 W'de 5 dakika bekletildi ardından oda ısısında 20 dakika soğumaya bırakıldı. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan dokular daha sonra kitin içinden çıkan TUNEL reaksiyon karışımı ile 37 °C'de nemli ve karanlık ortamda 60 dakika inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkanan dokulara 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile zıt boyama yapıldı. Gliserollü kapatma solüsyonu ile kapatılan dokular Olympus BX-51 floresan mikroskopta 450-500 nm dalga boyunda görüntülendi. Apoptotik indeks için her kesitte on farklı alandaki apoptotik hücreler sayıldı.

3.5 İMMÜNOHİSTOKİMYA METODU

Deneydeki sıçanlara ait testis dokularında HIF-1α proteinini belirlemek için avidin-biotin-peroksidaz yöntemi ile immunohistokimya uygulandı. Bir gece 60°C'de tutulan önce ksilen sonra dereceli alkol serilerinden geçirilerek rehidrate edilen kesitler daha sonra distile su ile yıkandı. Daha sonra antijen geri kazanımı için %5'lik sitrat tamponu ile mikrodalga fırında 600W'de 3X5 defa kaynatılan kesitler 20 dakika oda ısısında aynı tampon solüsyon içinde bekletildi. Bekletilen kesitler endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için 10 dakika %3 hidrojen peroksit (H₂O₂) ile muamele edildi. Bundan sonraki aşamalar için Millipore boyama kiti kullanıldı. Kesitler rinse buffer adı verilen yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı. Yıkanan kesitlere daha sonra tekrar 2-3 damla rinse buffer damlatılarak 1-2 dakika bekletildi. Kesitlere antijenik alanların dışında kalan bölgelerin kapatılmasını sağlamak için oda sıcaklığında 5 dakika blok serum uygulandı. Hemen ardından kesitler tavşan poliklonal birincil antikor HIF-1α ile 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Negatif kontrol için, birincil antikor yerine rinse buffer kullanıldı. Yıkama işleminden sonra kesitler biotin-sekonder antikor ile 10 dakika inkübe edildi ve ardından yıkama işlemi tekrarlandı. Daha sonra AB enzim ayracı ile 10 dakika muamele edilen kesitler yıkanarak immunreaktiviteyi görünür hale getirmek için diaminobenzidin (DAB) özelliği gösteren kitteki peroksidaz substrat ile

10 dakika muamele edildikten sonra distile su ile yıkandı. Gill hematoksilen ile 1 dakika muamele edildikten sonra zıt boyanan kesitler birkaç kez distile su ile yıkandı. Son olarak artan alkol serileri ile suyu uzaklaştırılarak ksilenden geçirilen kesitler kapatma solüsyon (Entellan®, Merck) ile kapatılarak ışık mikroskobunda incelendi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 3.4). İmmun reaktivite açısından boyanan sıçan testis dokularının değerlendirilmesi birbirinden bağımsız iki uzman histolog tarafından yapıldı. İmmunohistokimya uygulanan kesitlerdeki HIF-1 α ekspresyonu görülmeyen negatif (-), zayıf reaksiyon (+), orta yoğunlukta reaksiyon (++) ve çok yoğun reaksiyon (+++) olarak değerlendirildi.

Tablo 3.4. İmmunohistokimya boyama tekniği.

Sıra	Yapılan işlem	Süre	Sıra	Yapılan işlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	18	Rinse buffer	3x1 dakika
2	Ksilen I	5 dakika	19	Streptavidin Peroksidaz	10 dakika
3	Ksilen II	5 dakika	20	Rinse buffer	3x1 dakika
4	Ksilen III	5 dakika	21	DAB kromojen	10dakika
5	Absolü Alkol	5 dakika	22	Distile su	Yıka
6	%96 Alkol	5 dakika	23	Hematoksilen	1 dakika
7	%80 Alkol	5 dakika	24	Musluk suyu	5 dakika
8	%70 Alkol	5 dakika	25	Distile su	Yıka
9	Distile Su	3 kez yıka	26	%70 Alkol	5 dakika
10	%3 Sitrata Buffer	20 dakika	27	%80 Alkol	5 dakika
12	%3 H ₂ O ₂	10 dakika	28	%96 Alkol	5 dakika
13	Rinse buffer	3x1 dakika	29	Absolü Alkol	5 dakika
14	Normal Serum	5 dakika	30	Ksilen I	5 dakika
15	Primer Antikor	10 dakika	31	Ksilen II	5 dakika
16	Rinse buffer	3x1 dakika	32	Ksilen III	5 dakika
17	Sekonder Antikor	10 dakika	33	Kapatma	

3.6 ELISA METODU

Deneklerden alınan kanlar sitrat içermeyen tüplere alındı ve 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlardan ELISA kitleri ile Serum testosteron (201-11-5126, SunRedBio) seviyeleri belirlendi. Doku HIF1- α (MBS262533, MyBioSource) ekspresyonunu belirlemek için alınan testis dokularından homojenizasyon ile elde edilen süpernatantlar kullanıldı. Her iki ELISA çalışması kitleri üreten firmanın önerdiği protokollere göre yapıldı.

3.7 MALONDİALDEHİD (MDA) SEVİYESİ TAYİNİ

Deney sonunda -80°C derecede saklanan doku örnekleri oda ısısında bir süre bekletildikten sonra PBS içinde homojenize edildi. Daha sonra soğutmalı santrifüjde $+4$ derecede 12000rpm de 30 dakika santrifüj edildi ve süpernatantları alındı. Alınan süpernatantlar MDA analizi için kullanıldı. Metodun temel prensibi, lipid peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA'ın tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek 532 nm'de absorbans veren pembe renkli bir kompleks oluşturması esasına dayanır. Kısaca; 0,2 ml doku homojenatı, 0,8 ml fosfat tamponu (pH:7.4) ve 0.025 ml bitüle hidroksitoluen solüsyonu ile karıştırıldı 0,5 ml %30'luk TCA (trikloroasetik asit) eklendi, 120 dk buz üzerinde inkübe edildi ve akabinde 2000 x g'de 15 dk santrifüj edildi. 1ml süpernatant, 0,075 ml 0,1 M EDTA ve 0,25 ml %1'lik Tiyobarbitürik asit (TBA), (0.05 NaOH içinde hazırlanmış) ile karıştırıldı, tüpler 15 dk su banyosunda kaynatılıp oda sıcaklığına kadar soğutularak, absorbansları 532 nm'de tayin edildi (135).

3.8. PROPOLİSİN ETANOLİK EKSTRAKSİYONU

Propolis başlangıç olarak soğutuldu ve öğütücü blendır aracılığı ile toz haline getirildi. (Warning Products, Torrington, CT, USA). Propolis ekstraktı oda sıcaklığında (%96) lık ethanol kullanılarak bir haftalık bir sürede elde edildi. 30 gr propolis ekstraktı 100 ml ethanolde çözüldü. Ekstraksiyon işleminden sonra örnek, kağıt filtre aracılığı ile filtrelendi ve filtrelenen ekstrakt çözücünün kalıntılarını ortadan kaldırmak amacıyla döner buharlaştırıcı ile 40°C de buharlaştırıldı. Kuru ekstrakt ise sonrasında fenolik bileşimi analizlemek amacıyla kullanıldı.

3.8.1. LC-MS/MS ile kuru propolis ekstraktının hazırlanması

Kuru propolis ekstraktı 1000 mg/L metanol ile dilüe edildi. Daha sonra karışım LC–MS/MS analizleme işlemini uygulamadan önce 0.2 µm mikrofiber filtre ile filtrelendi.

3.8.2. LC-MS/MS cihazının kullanım koşulları

Propolisin fenolik bileşiminin LC–MS/MS analizlenmesi, Nexera model Shimadzu UHPLC cihazı ile gerçekleştirildi. Likit kromatografi LC-30AD ikili pompalar, DGU-20A3R gaz giderici, CTO-10ASvp sütun ocak ve SIL-30AC otomatik numune alma cihazı ile donatılmıştır. Kromatografik ayırım C18 ters-faz Inertsil ODS-4 (150 mm × 4.6 mm, 3 µm) analitik sütunda gerçekleşti. Sütunun sıcaklığı 40°C de sabitlendi. Seyrelme eğimi hareketli faz A (su, 5 mM amonyum format ve 0.1% formik asit) ve hareketli faz B (metanol, 5 mM amonyum format ve 0.1% formik asit) den oluşmaktadır. Çözücü B nin derecelenme programı B%: (0, 40), (20, 90), (23.99, 90), (24, 40), (29, 40) oranları takiben uygulandı. Çözücünün akış hızı 0.5 mL/min de ayrıca püskürtmeli hacim ise 4 µL de sürdürüldü. MS belirlenmesinde hem pozitif hemde negatif iyonizasyon modunu çalıştıran ESI kaynak ile döşenmiş Shimadzu LCMS 8040 model triple quadropole kütle spektrometre cihazı kullanılmıştır. LC–MS/MS data verileri toplanmıştır ve Lab Solutions software (Shimadzu, Kyoto, Japan) ile işlenmiştir. Çoklu reaksiyon monitorü (MRM) araştırılan bileşiklerin tayinini analizlemek için kullanılmıştır (136). Propolis ekstraktının fenolik bileşikleri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Tablo 3.5. Propolis ekstraktının fenolik içerikleri.

Fenolik Bileşikler	mg/g Kuru Ekstrakt
Hesperidin	1.89±0.09
Quinic acid	0.39±0.02
Malic acid	0.45±0.02
<i>trans</i> -aconitic acid	0.08±0.00
Gallic acid	0.72±0.04
Chlorogenic acid	0.18±0.01
Protocatechuic acid	1.46±0.07
Tannic acid	0.23±0.01
<i>trans</i> -caffeic acid	37.97±1.97
Vanillin	50.18±2.46
<i>p</i> -coumaric acid	2.99±0.15
Rutin	0.01±0.00
Hyperoside	0.01±0.00
Myricetin	0.09±0.01
Fisetin	0.06±0.00
4-hydroxybenzoic acid	0.05±0.00
Salicylic acid	0.03±0.00
Quercetin	3.18±0.23
Kaempferol	2.09±0.11
Naringenin	10.61±0.58
Hesperetin	0.20±0.01
Luteolin	0.56±0.04
Apigenin	18.28±0.97
Rhamnetin	8.71±0.53
Chrysin	168.91±8.95

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tüm istatistiksel analizler SPSS yazılım programında yapıldı. Veriler ortalama \pm standart hata olarak belirlendi. Bütün skorlar ANOVA yöntemiyle değerlendirildi. Post hock analiz için Tukey testi kullanıldı. istatistiksel anlamlılık $P < 0.05$ olarak tanımlandı.

4. BULGULAR

Tüm gruplara ait deneklerin vücut ve testis ağırlıkları deney sonunda ölçüldü. Deney sonunda vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında herhangi bir fark gözlenmedi. Testis ağırlıklarına bakıldığı zaman ise Cd²⁺ uygulanan grup 2'nin testis ağırlığının grup 1'e göre anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Propolisin koruyucu amaçlı verildiği grup 3'de ise testis ağırlığının grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Gruplara ait sıçan ve testis ağırlıkları ortalama \pm standart hata olarak aşağıdaki tabloda verilmiştir. Grup 1 ile karşılaştırıldığında *P<0.05, Grup 2 ile karşılaştırıldığında **P<0.05.

	Vücut ağırlığı (gr)	Testis ağırlığı (gr)
Grup 1	243.37 \pm 14.80	1.16 \pm 0.04
Grup 2	237.87 \pm 25.87	0.78 \pm 0.04*
Grup 3	230.12 \pm 35.56	0.99 \pm 0.03**
Grup 4	239.71 \pm 20.68	1.16 \pm 0.02

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

Grup1'e ait testis dokusu kesitlerinde tunika albuginea, seminifer tübül kontürleri, seminifer tübüllerin germinal epiteli ve interstisyel alanda bulunan Leydig hücreleri normal yapıda gözlemlendi (Şekil 4.1). Sadece propolis uygulanan grup 4 sıçanların testis dokularında da kontrol grubuna benzer histolojik bulgulara rastlandı (Şekil 4.2).

Sadece Cd²⁺ uygulanan grup 2 sıçanların testis dokularında damarlarda konjesyon, hemoraji, interstisyel alanda bağ doku artışı ve mononükleer hücre infiltrasyonu

belirlendi (Şekil 4.3, 4.4). Ayrıca, seminifer tübüllerin kontürlerinde ve germinal epiteline düzensizlik, lümen epitel hücresi dökülmesi (Şekil 4.5), bazı tübüllerde çok çekirdekli hücreler (Şekil 4.6), nekrotik ve atrofik tübüllere rastlandı (Şekil 4.7). Cd^{2+} ile birlikte propolis uygulanan grup 3 sıçanların testis dokularındaki seminifer tübüllerin büyük kısmının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8).

4.2. Seminifer Tübül Çapları Ölçüm Sonuçları

Seminifer tübül çapları açısından testisler incelendiğinde, sadece Cd^{2+} uygulanan grup 2'deki seminifer tübül çapları grup 1 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştı. Cd^{2+} ile birlikte propolis uygulanan grup 3'de ise tübül çaplarının sadece Cd^{2+} uygulanan grup 2 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edildi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2: Seminifer tübül çapı ölçüm sonuçları. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. * Grup 1 ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$; ** Grup 2 ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Seminifer tübül çapı (μm) (n=100)	151.69 \pm 3.32	131.30 \pm 1.70*	140.95 \pm 1.74**	144.54 \pm 1.84

4.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) Sonuçları

Johnsen testiküler biyopsi sonuçları Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Seminifer tübüllerdeki germinal epitelin değerlendirildiği JTBS sonuçlarına göre grup 1 ve grup 4 birbirlerine yakın sonuçlar gösterdi. Cd^{2+} uygulanan grup 2'de JTBS skoru grup 1 ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış olarak belirlendi. Cd^{2+} ile birlikte propolis verilen grup 2'deki JTBS skoru sadece Cd^{2+} uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştı.

Tablo 4.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Sonuçları. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. * Grup 1 ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$; ** Grup 2 ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Johnsen biyopsi skoru (n:200)	8.04 \pm 0.17	2.33 \pm 0.14*	5.58 \pm 0.23**	8.45 \pm 0.23

4.4. İmmunohistokimya sonuçları

HIF-1 α ekspresyonunun belirlemek için yapılan immunohistokimyasal boyama skoru Tablo 4.4’de verilmektedir. Grup 1 (Şekil 4.9) ve grup 4 (Şekil 4.10) testis dokularında HIF-1 α intersitisyel alanda zayıf boyanma (+) gösterdi. Cd²⁺ uygulanan grup 2’de intersitisyel alanda zayıf boyanma devam etmesine rağmen, nekrotik tübüllerde +++ HIF-1 α ekspresyonu belirlendi (Şekil 4.11). Koruyucu amaçlı propolis verilen grup 3’de HIF-1 α ekspresyonu kontrol grubuna benzerlik gösterdi (Şekil 4.12). Negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir boyanma gözlenmedi (Şekil 4.13).

Tablo 4.4. Testis kesitlerinde HIF-1 α immunoreaktivite skoru. (-) negatif, (+) zayıf reaksiyon, (++) orta yoğunlukta reaksiyon ve (+++) çok yoğun reaksiyon.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
HIF-1α immunoreaktivitesi	+	+++	+	+

4.5. Apoptotik Bulgular

Testis dokusundan alınan kesitlerde apoptozis göstermek için TUNEL boyama yöntemi kullanıldı. Apoptoz pozitif hücreler çoğunlukla seminifer tübül epiteli içindeki germinal epitelde gözlemlendi. Cd²⁺ uygulamasıyla apoptotik hücre sayısında grup 1’e göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi. Koruyucu amaçlı verilen propolis apoptotik hücre sayısını azalttı, ancak bu istatistiksel olarak anlamlı değildi (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. Apoptotik indeks Sonuçları. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. * Grup I ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Apoptotik indeks	0.67 \pm 0.14	1.49 \pm 0.25*	1.02 \pm 0.24	0.81 \pm 0.19

4.6. Biyokimyasal bulgular

Cd^{2+} 'un testis dokusunda oluşturduğu hasarda doku MDA düzeyleri de incelendi ve sonuçlar Tablo 4.6'da verilmektedir. Cd^{2+} uygulamasıyla grup 2 testis dokusunda MDA düzeylerinin grup 1'e göre anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Koruyucu amaçlı propolis verilen grup 3'de doku MDA düzeylerinin sadece Cd^{2+} uygulanan grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Sadece propolis uygulanan grup 4'de doku MDA düzeyleri kontrol grubuna benzerlik gösterdi.

Tablo 4.6. Testis doku MDA Sonuçları. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. * Grup 1 ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$. ** Grup 2 ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

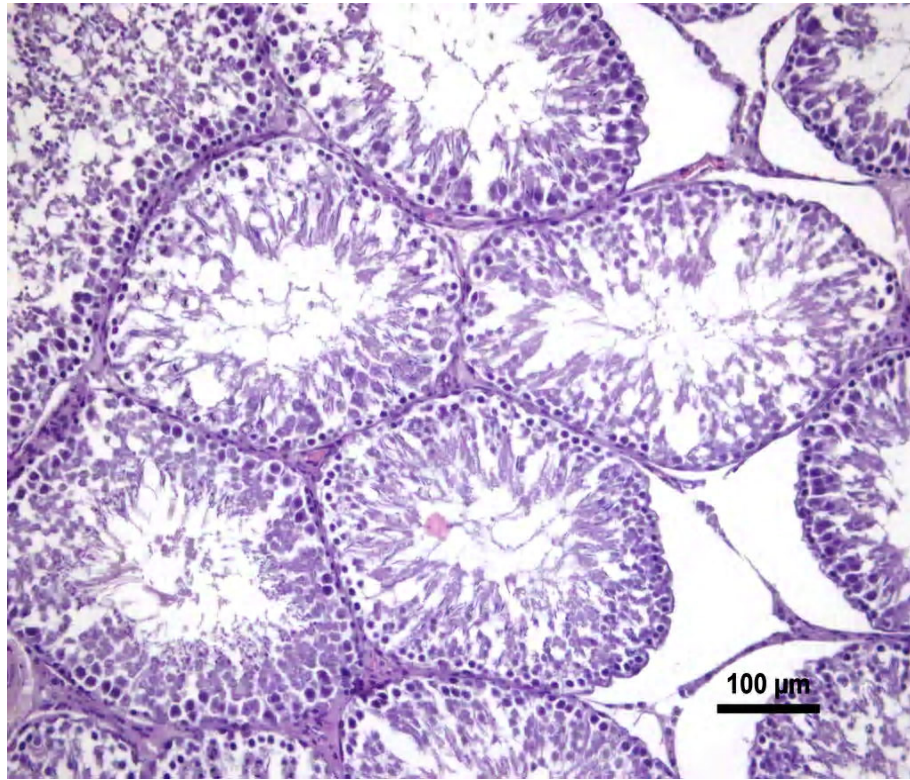
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Doku MDA (nmol/gr protein)	4.15 \pm 3.25	16.21 \pm 6.71*	5.84 \pm 0.2**	3.13 \pm 0.9

4.7. ELISA Bulguları

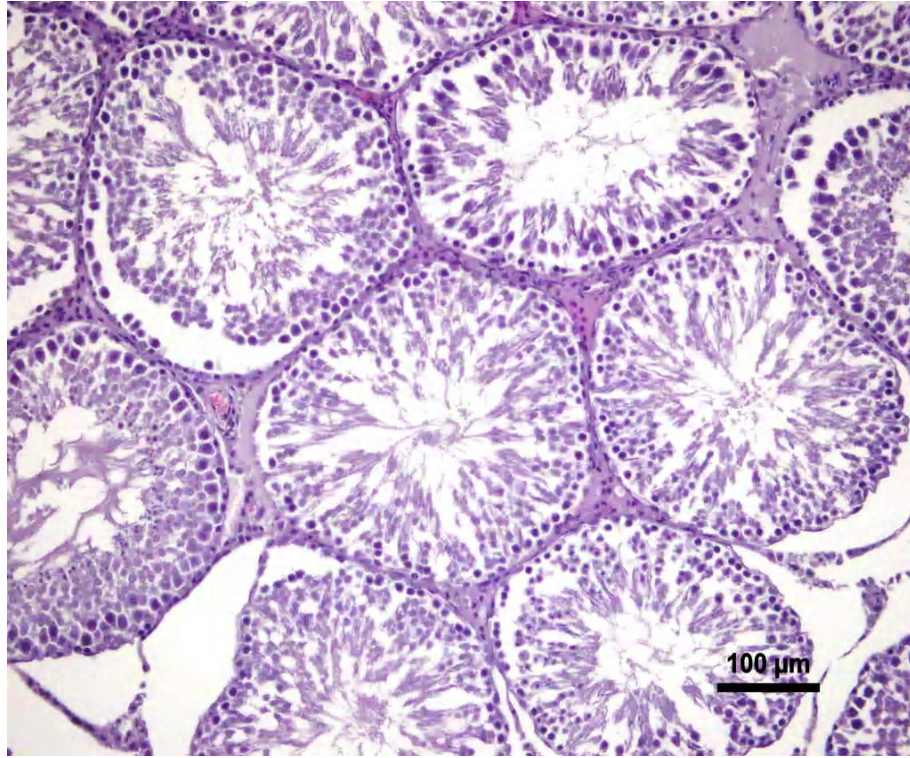
Cd^{2+} testis dokusunda oluşturduğu hasarda serum testosteron ve doku HIF-1 α düzeyleri ELISA yöntemiyle araştırıldı. Sadece Cd^{2+} uygulanan grup 2'de, grup 1 ile karşılaştırıldığında serum testosteron seviyesinin azaldığı ve doku HIF-1 α düzeyinin ise arttığı belirlendi. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Koruyucu amaçlı olarak verilen propolisin ise bu değişimleri düzelttiği belirlendi (Tablo 4.7.)

Tablo 4.7. Testis doku HIF-1 α ve serum Testosteron sonuçları. Değerler ortalama \pm standart hata olarak verilmiştir. * Grup 1 ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$. ** Grup 2 ile karşılaştırıldığında $p < 0.05$.

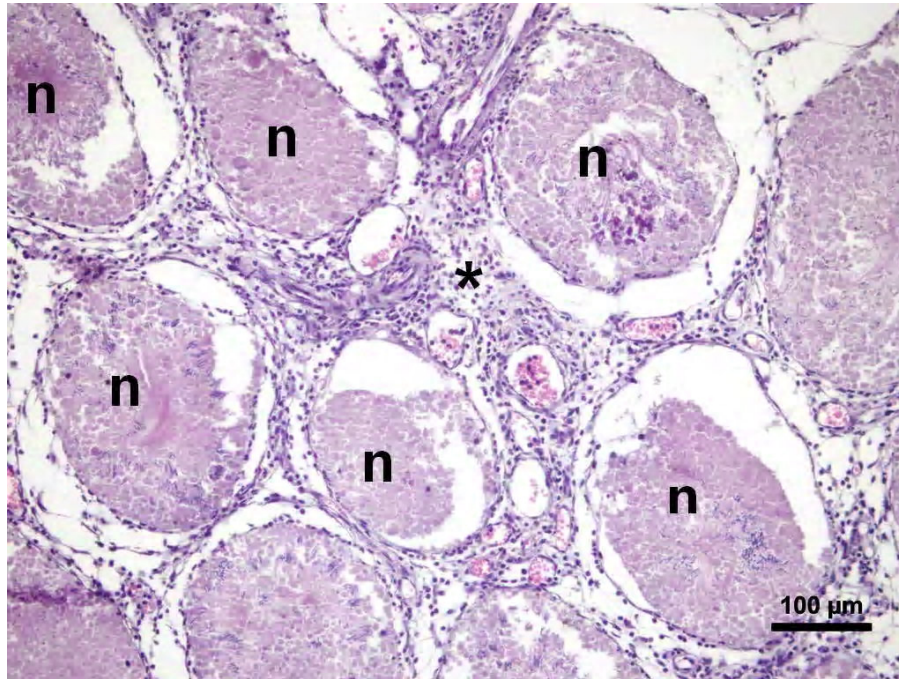
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Serum testosteron (ng/ml)	0.59 \pm 0.2	0.43 \pm 0.1	0.49 \pm 0.3	0.97 \pm 0.9
HIF1-α (ng/ml)	3.87 \pm 0.7	4.83 \pm 0.9	3.90 \pm 0.8	3.04 \pm 0.7



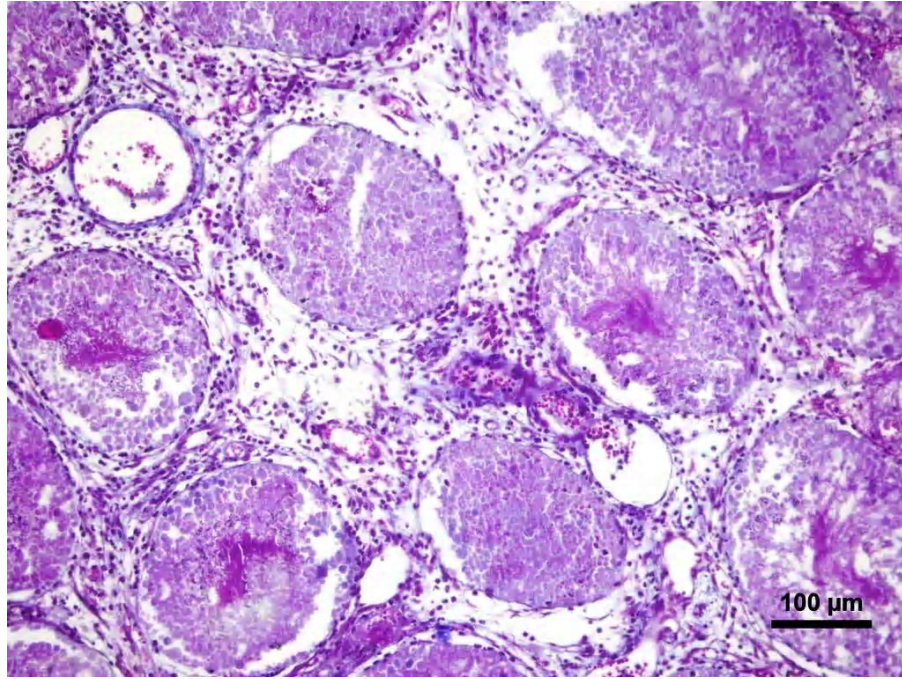
Şekil 4.1. Kontrol grubu sıçanlarına (grup 1) ait testis dokusu. Kesitlerde seminifer tübül kontürleri, seminifer tübüllerin germinal epiteli ve interstisyel alanda bulunan Leydig hücreleri normal yapıda gözlenmekte (H&E).



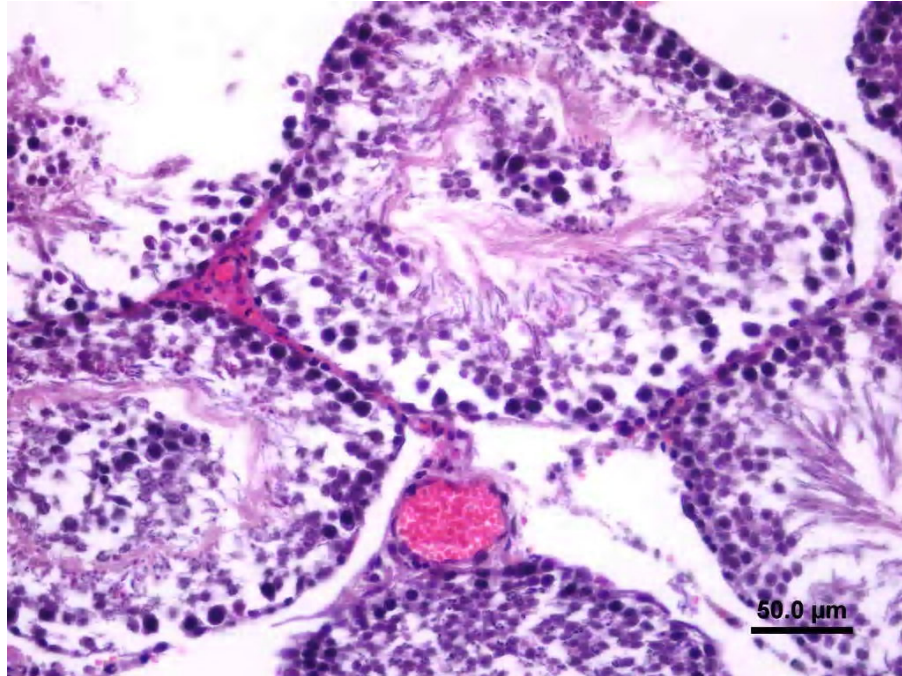
Şekil 4.2. Sadece propolis uygulanan sıçan grubuna (Grup 4) ait testis dokusu. Kesitlerde seminifer tübül kontürleri, seminifer tübüllerin germinal epiteli ve interstisyel alanda bulunan Leydig hücreleri normal yapıda gözlenmekte (H&E).



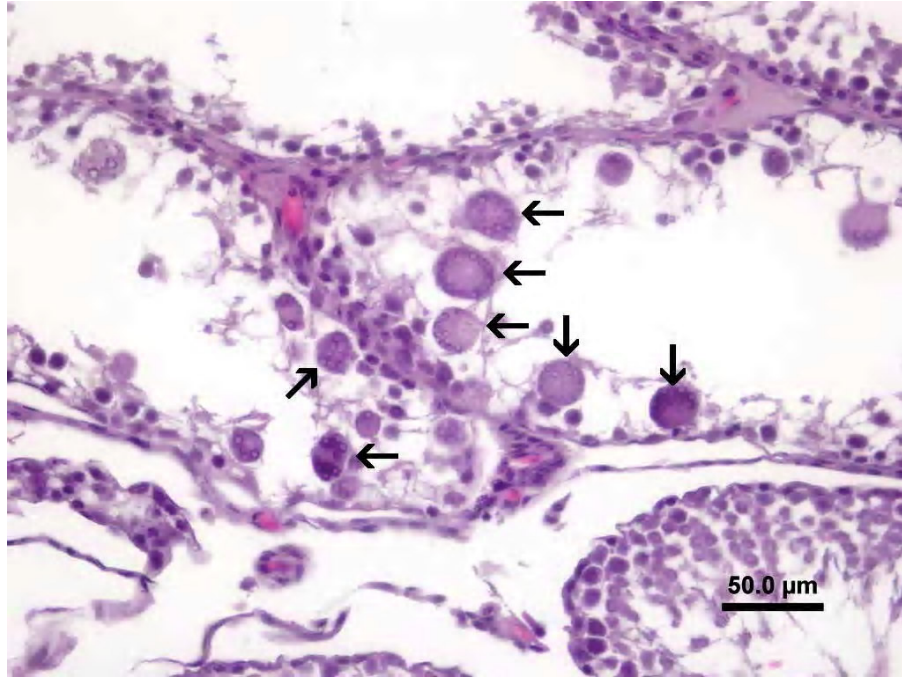
Şekil 4.3. Sadece Cd^{2+} uygulanan sıçan grubuna (Grup 2) ait testis dokusu. Damarlarda konjesyon, hemoraji, intersitisyel alanda bağ doku artışı (*) ve mononükleer hücre infiltrasyonu ve nekrotik tübüller (n) ayırt edilmekte (H&E).



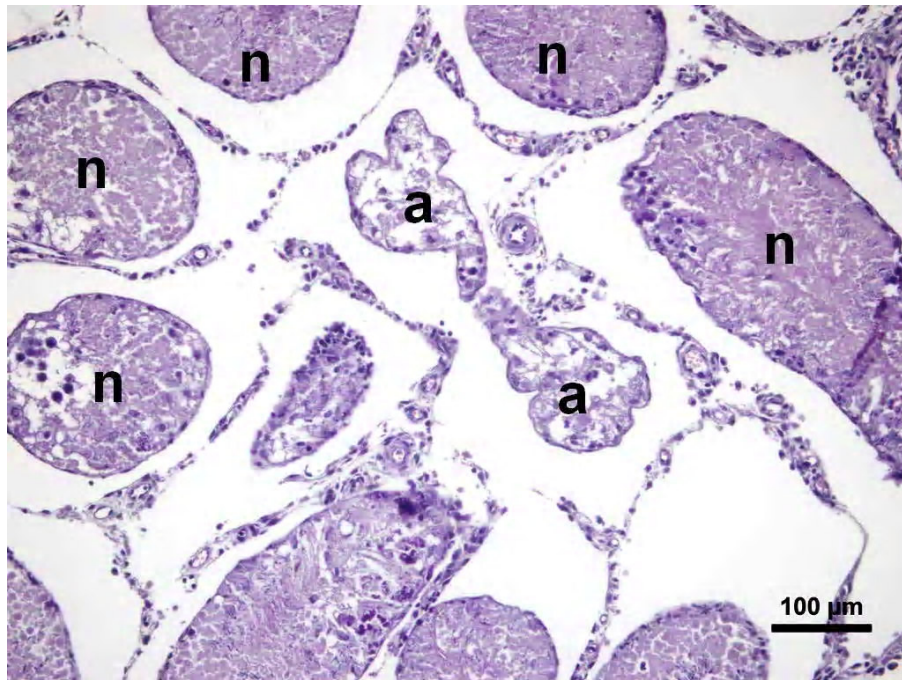
Şekil 4.4. Sadece Cd²⁺ uygulanan gruba (Grup 2) ait testis dokusu. Nekrotik tübüller ve mononuklear hücre infiltrasyonu gözlenmekte. (H&E).



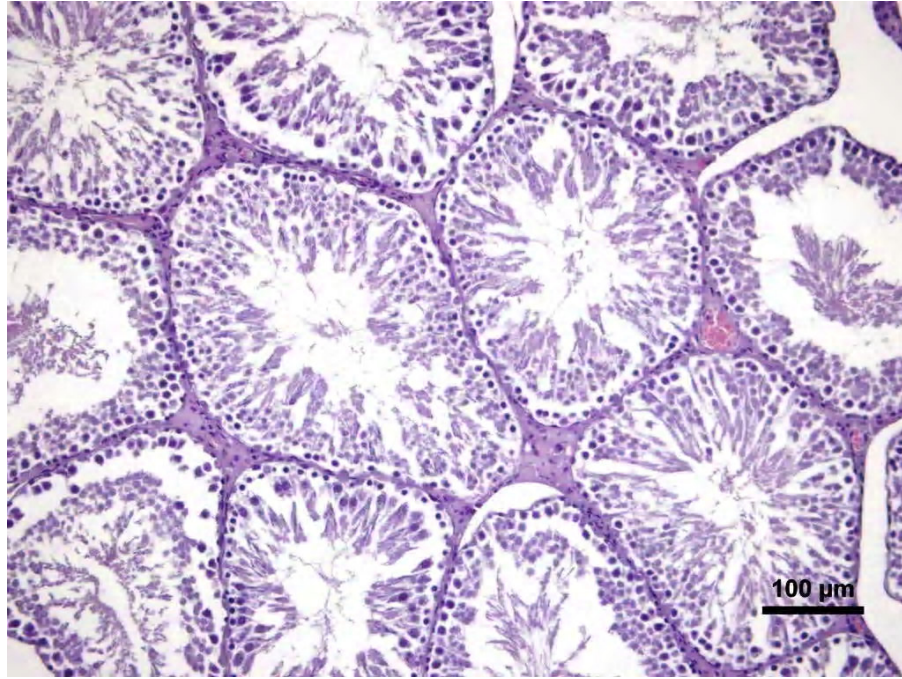
Şekil 4.5. Sadece Cd²⁺ uygulanan gruba (Grup 2) ait testis dokusu. Damarlarda konjesyon ve seminifer tübül içine epitel dökülmesi ayırt edilmekte (H&E).



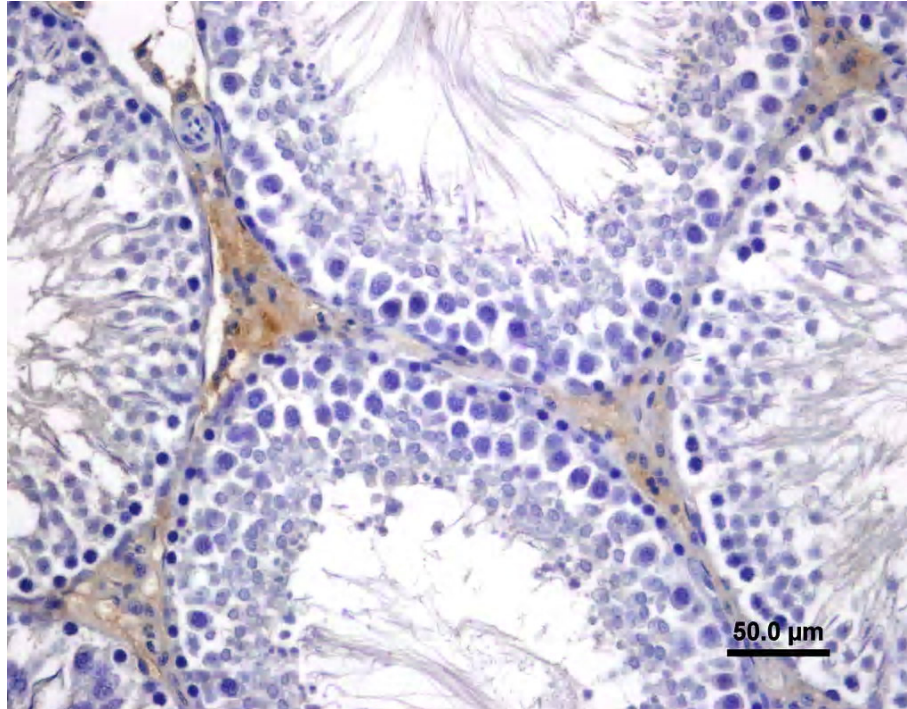
Şekil 4.6: Sadece Cd²⁺ uygulanan gruba (Grup 2) ait testis dokusu. Bazı tübüllerde çok çekirdekli hücreler (ok) ve epitel hücre düzeninin kaybolduğu görülmekte. (H&E).



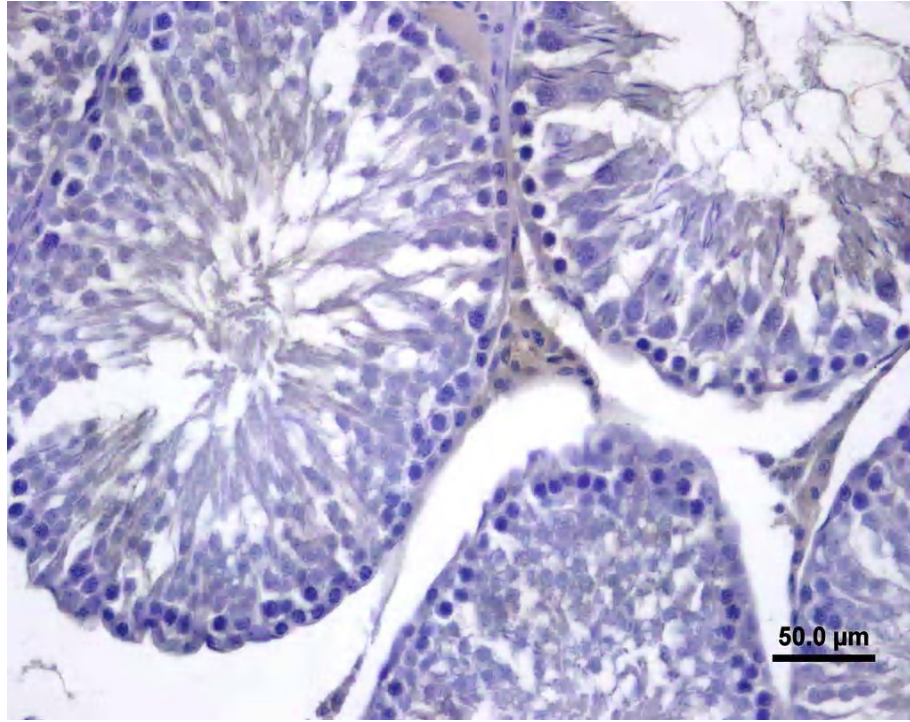
Şekil 4.7: Sadece Cd²⁺ uygulanan gruba (Grup 2) ait testis dokusu. Nekrotik (n) ve atrofik tübüller (a) ayırt edilmekte (H&E).



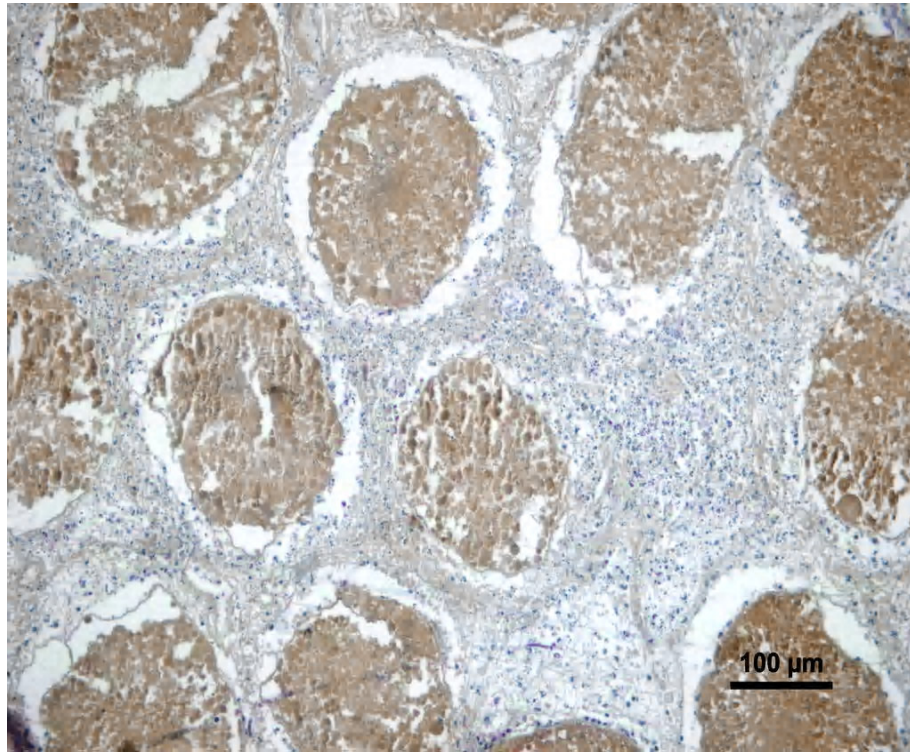
Şekil 4.8: Cd²⁺ ile birlikte propolisin uygulandığı gruba (Grup 3) ait testis dokusu. Normal testiküler histomorfoloji ayırt edilmekte. (H&E).



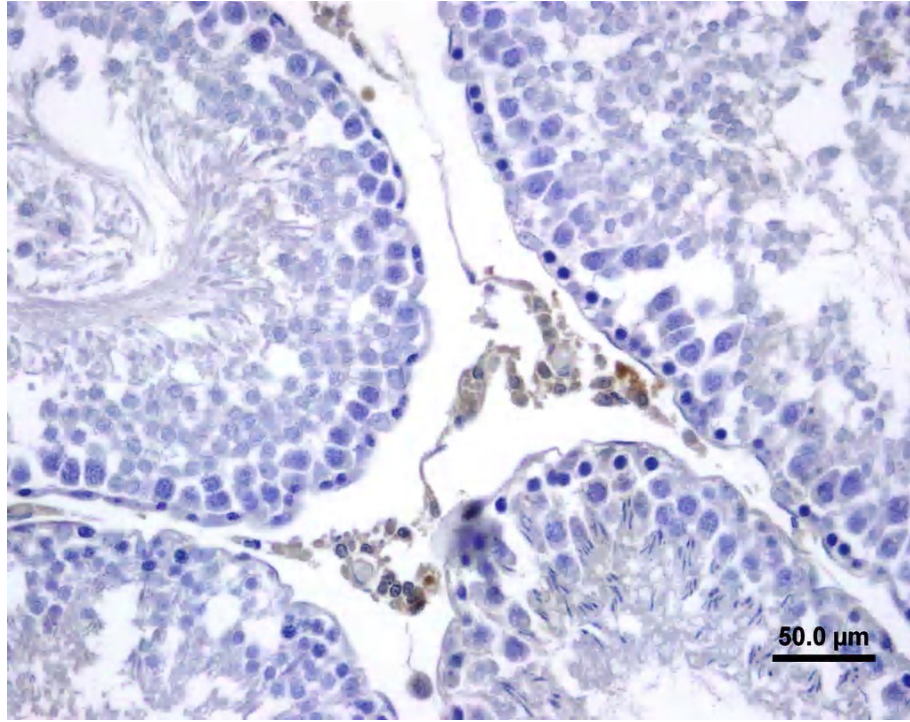
Şekil 4.9: Kontrol grubuna (Grup 1) ait testis dokusu. Testis dokularında HIF-1α ekspresyonu intersitisyel alanda zayıf boyanma (+) göstermekte. İmmunoperoksidaz.



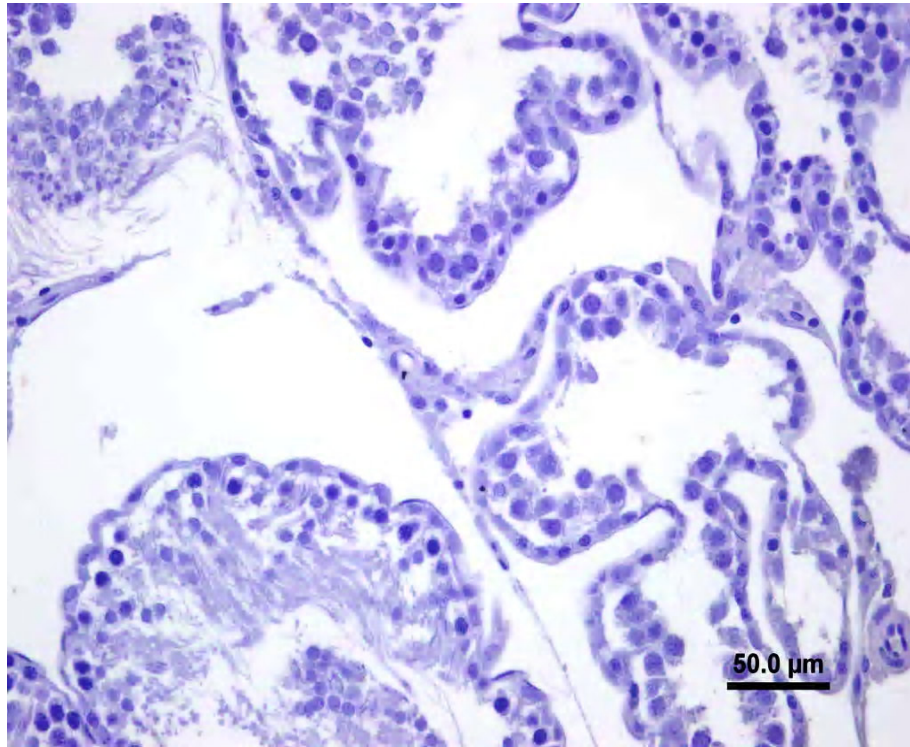
Şekil 4.10: Propolis grubuna (Grup 4) ait testis dokusu. Testis dokularında HIF-1 α ekspresyonu intersitisyel alanda zayıf boyanma (+) göstermekte.



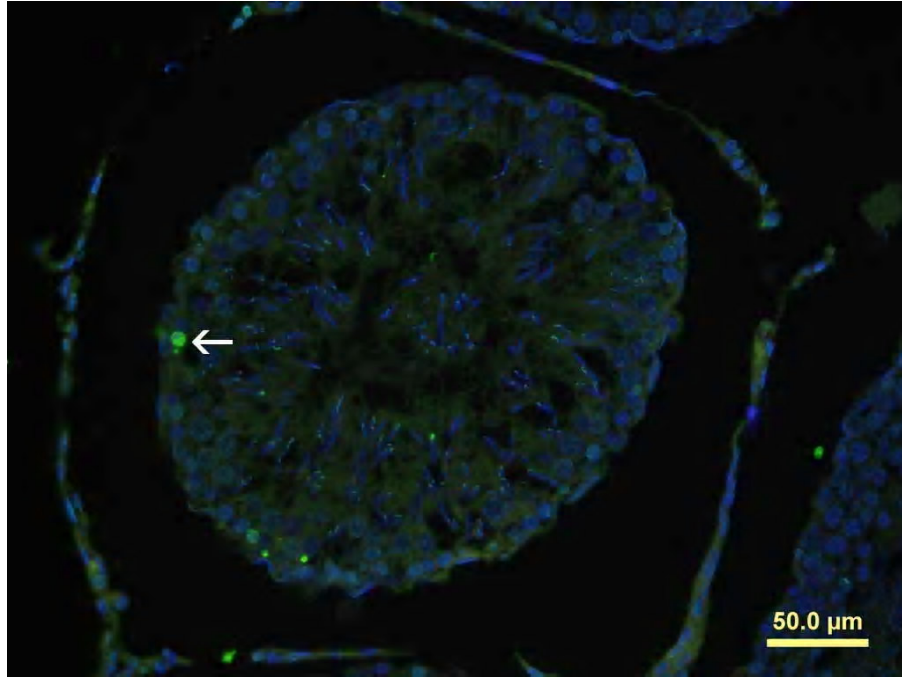
Şekil4.11: Cd²⁺ uygulanan (Grup 2) gruba ait testis dokusu. İntertisyel alanda zayıf boyanma devam etmesine rağmen, nekrotik tübüllerde HIF-1 α ekspresyonu +++ olarak belirlenmekte.



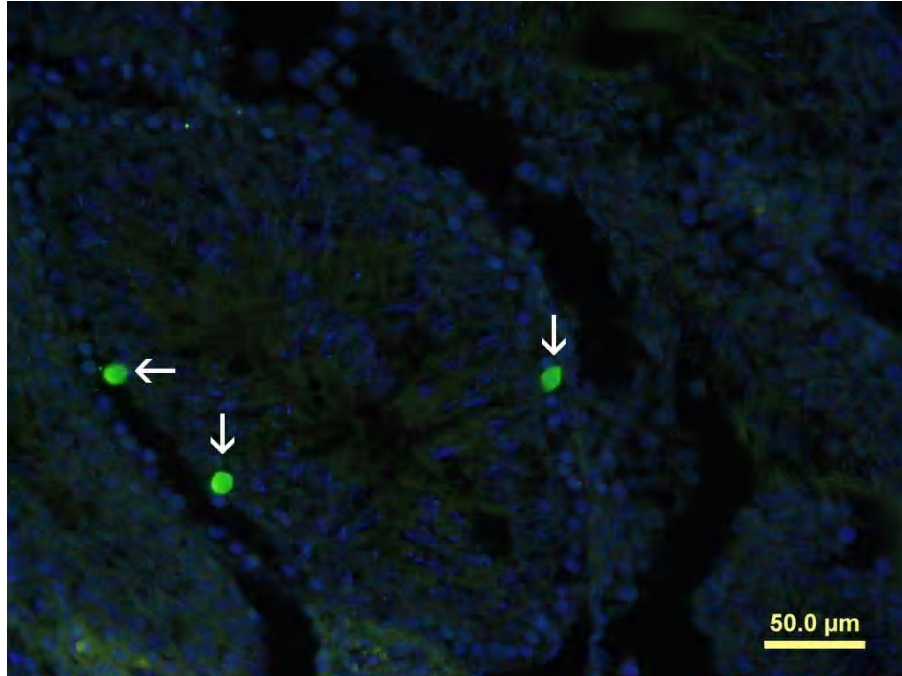
Şekil4.12: Koruyucu amaçlı proprylis verilen gruba (Grup 3) ait testis dokusu. HIF-1 α ekspresyonunun kontrol grubuna benzerlik göstermekte.



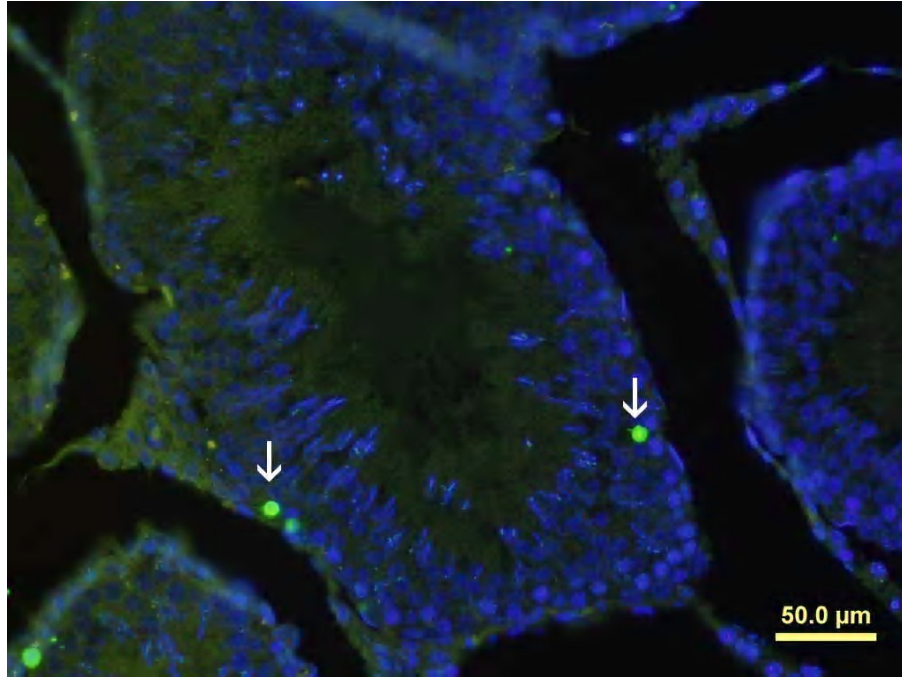
Şekil 4.13: Negatif kontrol kesitlerinde herhangi bir boyanma gözlenmemekte.



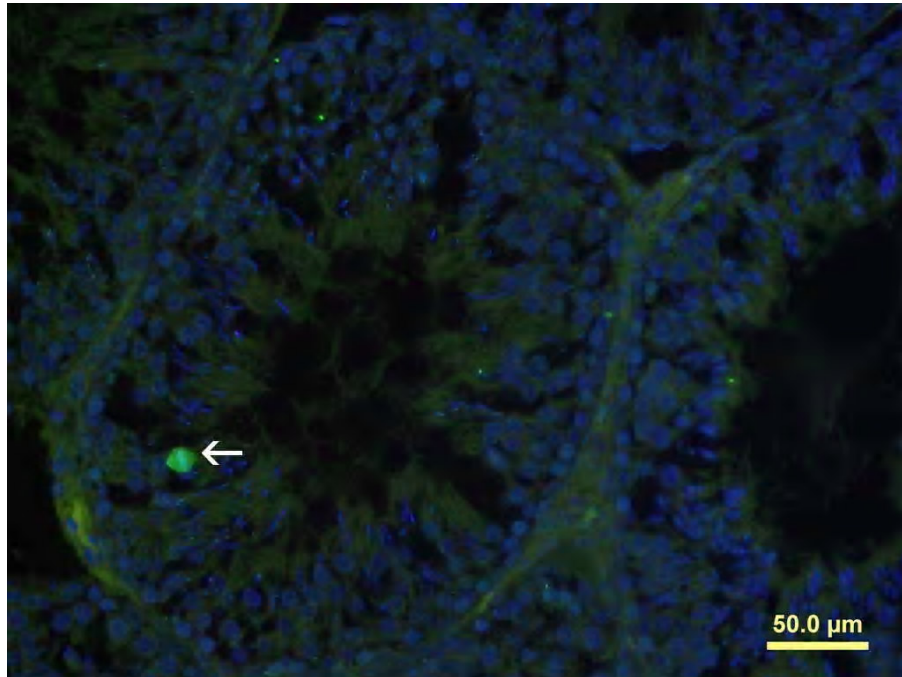
Şekil4.14: Kontrol grubuna (Grup 1) ait testis kesitinde TUNEL boyama. TUNEL pozitif hücreler (ok) seminifer tübül epiteli içinde ayırt edilmekte.



Şekil4.15: Cd²⁺ grubuna (Grup 2) ait testis kesitinde TUNEL boyama. TUNEL pozitif hücreler (ok) seminifer tübül epiteli içinde ayırt edilmekte.



Şekil4.16: Cd^{2+} ile birlikte propolisin uygulandığı gruba (Grup 3) ait testis kesitinde TUNEL boyama. Tünel pozitif hücreler (ok) seminifer tübül epiteli içinde ayırt edilmekte.



Şekil 4.17: Propolis grubuna (Grup 4) ait testis kesitinde TUNEL boyama. Tünel pozitif hücreler (ok) seminifer tübül epiteli içinde ayırt edilmekte.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Sanayileşme artıkları, endüstriyel ve şehirselle faaliyetler, bilinçsiz gübreleme ve çeşitli ilaçların kullanımı aracılığıyla hava, toprak ve su ortamlarına yayılan Cd^{2+} farklı yollarla insanların ve hayvanların bünyelerine ulaşarak etkinlik gösterir (45).

Organizmalarda toksik etkili olan, alım, depolama ve salınım gibi olayların meydana geldiği doku ve organlarda metal bağlayıcı bileşikler tarafından esterleştirilmesi sonucu birikebilen Cd^{2+} kümülatif etkili ağır metaller arasındadır. Cd^{2+} toksisitesi, çevredeki zararlı dağılımı ve çok düşük düzeylerde bile organizmalarda yan etkilere yol açmasıyla bilinen bir metaldir (40). Cd^{2+} , arsenik ve kurşun gibi toksik metallerin hem çevresel hem de insan sağlığı üzerine zehirleyici etkisi bulunmaktadır (1). Günümüzde Cd^{2+} zehirlenmesinin en bariz örneği olarak; Japonya'nın Toyama kentinde aşırı Cd^{2+} karışan pirinçler nedeniyle 200 kişide ağır Cd^{2+} zehirlenmesine bağlı olarak kalıcı kemik ve böbrek rahatsızlıklarının ortaya çıkması gösterilmektedir (137). Genellikle popülasyonlardaki Cd^{2+} maruziyeti Cd^{2+} un günlük alımına ilişkin olarak büyük oranda besinlerden sağlanır. Bu maruziyete su kaynakları ve günlük soluduğumuz havada küçük oranda bir katkı sağlar (48). İnsanlar besin zincirinin yanı sıra demir işlenmesi, çimento üretimi, gibi fosil yakıt kullanım işlemleri ile havaya ve dolayısıyla çevreye yayılan Cd^{2+} , mu solunumla almaktadırlar. Bu bağlamda çimento tozlarına maruz kalan bir kırsal yerleşim alanında Cd^{2+} durumunu belirlemek amacıyla yapılan bir çalışmada yaşları 15-82 yaş üstü insanların kan Cd^{2+} konsantrasyonu ortalama 2.328 g/µl iken kontrol grubunda 1.308 g/µl düzeyinde olduğu bildirilmiştir (138). Cd^{2+} karaciğer, böbrek, akciğer, duodenum, pankreas, kemik ve testis dokularında birikip çeşitli sitolojik ve histolojik hasara sebebiyet vermektedir.(5).

Cd^{2+} , hücrelerde apoptozisi uyarmakta ve aynı zamanda yoğun şekilde nekroza yol açmaktadır (51). Kronik Cd^{2+} maruziyeti hipertansiyon ve kardiyomiyopati gibi çeşitli kardiovasküler hastalıklarla yakından ilişkilidir. Ayrıca akut Cd^{2+} maruziyeti testiste hemorajik hasara yoğun bir şekilde sebebiyet verir (1). İngiltere'de 1965 te pil yapımında çalışan işçilerde prostat karsinomlarının belirlenmesi üzerine yapılan çalışmalarda, Cd^{2+} karsinojenik aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (139). Genellikle Cd^{2+} toksisitesinde ortaya çıkan ilk etkileri akciğer ve prostat kanseridir. Ayrıca kemik erimesi, kansızlık, diş dökülmesi ve koku duyusunun yitirilmesi de görülen etkilerindendir (137).

Cd^{2+} 'nin üreme sistemi üzerine etkisini araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır. İnsanlarda mesleki olarak Cd^{2+} a maruz kalma sonucu, testiküler nekroz ile serum testosteron seviyesi ve sperm sayısında azalma meydana getirir (140). Sigara kullanımı önemli Cd^{2+} kaynaklarından. Hırvatistan'da yapılan bir çalışmada Jurasovic ve arkadaşları (141) Cd^{2+} düzeyini sigara içmeyen erkeklerin kanında $0.59 \mu g L^{-1}$, içenlerin ise $2.94 \mu g L^{-1}$ olarak saptamıştır. Yüksek kan Cd^{2+} değerinin, testis büyüklüğünde azalma, serum östradiol, FSH ve testosteron düzeyinde artış ile doğru orantılı olduğu bulunmuştur. Sigara kullanımı, serum prolaktin düzeyinde önemli derecede düşüş meydana getirmiştir. Saygı ve arkadaşları oral yoldan Cd^{2+} uygulaması sonucunda sıçanlarda testis dokusunda patolojik değişiklikler tespit etmişlerdir. Buna bağlı olarak sıçanların üreme kapasitelerinde %39.89 oranında bir azalma olduğunu rapor etmektedirler. Bu çalışmada Cd^{2+} 'un sıçan testis dokusunda önemli derecede hasar oluşturmasının, fertilité üzerine olumsuz sonuçlar doğuracağını düşündürmüştür (142).

Yapılan bir başka çalışmada $3.5 mg/kg$ kadmiyum klorür'ün deri altına verilmesi sonucu özellikle uygulamanın 3. gününden itibaren testis dokusunda şiddetli etkilenmenin olduğu saptanmıştır. Cd^{2+} a bağlı olarak tunika albuginea'da kalınlaşma, interstisiyel bağ dokusunda artış, tübüllerin çoğunda spermatogenik seriye ait olan hücrelerin önemli derecede azaldığı ve tübüllerin bazılarında spermatogenik hücrelerin yerini hiyalin maddeye bıraktığı saptanmıştır (143).

Aoki ve Hoffer (144), Cd^{2+} verilen sıçanların testislerinde damar endotel hasarı şekillendiğini ve buna bağlı olarak kapiller permeabilite artışı, ödem, bölgesel eritrosit

miktarında ve kan viskozitesinde artış görüldüğü, trombosit agregasyonu sonucu oluşan trombozun sirkülasyonu engellediği ve bunun sonucunda testislerde iskemik lezyonların oluştuğunu ifade etmişlerdir. El-Demerdash ve arkadaşları (145) Cd^{2+} sadece spermatogenezisi değil, aynı zamanda testosteron üretimini de inhibe ettiği, Cd^{2+} uygulaması sonucu Leydig hücrelerinin sayısında azalma ve paralel olarak serum testosteron düzeylerinde düşmenin gözlemlendiği bildirilmiştir.

Cd^{2+} gibi bazı ağır metallere uzun süre mesleki maruz kalmalar, oksidatif strese neden olabilir ki bu, biyolojik sistemlerdeki istenmeyen etkilerin altında yatan bir mekanizmadır. Oksidatif stres basit bir şekilde, vücudun antioksidan savunması ile hücrelerin lipid tabakasının peroksidasyonuna neden olan serbest radikal üretimi arasındaki dengesizlik şeklinde tanımlanabilir. Oksidatif stres, toksisitenin olası bir mekanizması olarak son yıllarda toksikolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir (146). Toksik metallerin bir kısmı kimi enzimlerin tiyol gruplarıyla etkileşerek enzimatik aktiviteyi azaltırlar. Cd^{2+} GSH-Px, SOD ve GSH düzeylerini azaltarak testislerin antioksidan sistemini bozmaktadır (60). Puri ve Saha (147) Cd^{2+} verilen sıçanlarda serum MDA seviyesinde artış tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Jihen ve arkadaşları (148), sıçanlara 35 gün boyunca 200 ppm dozunda Cd^{2+} vermiş karaciğer MDA düzeyinde artış, SOD, CAT ve GSH-Px aktivitesinde düşüş gözlemişlerdir.

Bizim yaptığımız çalışmada sadece Cd^{2+} uygulanan sıçanların testis dokularında damarlarda konjesyon, hemoraji, intersitisyel alanda bağ doku artışı ve mononükleer hücre infiltrasyonu, seminifer tübüllerin kontürlerinde ve germinal epitelinde düzensizlik, bazı tübüllerde çok çekirdekli hücreler ayrıca nekrotik ve atrofik tübüllere rastlandı. Ayrıca mevcut çalışmada Cd^{2+} uygulanan grup, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; seminifer tübül çapı ve tübüler biyopsi skorunun ve serum testosteron seviyesinin azaldığı, apoptotik hücre sayısının ve MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede arttığı belirlendi. Bizim elde ettiğimiz bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmalarla ve Cd^{2+} testis dokusunda meydana getirdiği hasarla benzerlik göstermektedir.

Antioksidanlar, çeşitli hastalıkların oluşmasında tetikleyici rol oynayan “oksidatif stres” sonucu açığa çıkan serbest radikallerin üretilmesini engellemekle görevlendirilmiştir. Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek

maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere antioksidanlar ve bu olaya antioksidan savunma denir. Vücutta bulunan antioksidan savunma sistemleri, serbest radikalleri etkisiz hale getirmeye çalışır. Ancak savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda güncel bir metod olarak erkek infertilitesinde de kullanılan antioksidan tedavi devreye girmektedir. Oksidatif stres kaynaklı rahatsızlığı bulunan hastalarda endojen kaynaklı antioksidanlar etkili olmadığından, oksidatif hasarı azaltabilecek diyet sadece dışarıdan alınacak antioksidanlardır (Örn: Vitamin E, C, Melatonin). Böylece uygulanan antioksidan terapi sperm kalitesini de geliştirmektedir. Antioksidan terapi ile lipid peroksidasyon potansiyelinin azaltılması; fertilizasyon oranlarının gelişmesiyle paralellik göstermektedir (149). Wang ve arkadaşlarının (150) yaptığı bir çalışmada düşük dozda Cd^{2+} uygulanan sıçanlarda karaciğer, böbrek ve epididimis ağırlıkları değişme göstermezken sperm yapısında bozulma ve testislerin endokrin fonksiyonlarında yetersizlik gözlenmiş buna karşı antioksidan olarak theaflavin uygulamasının Cd^{2+} ile meydana gelen oksidatif stresi önleyici etkisinin olduğu belirtilmiştir. Bir çalışmaya göre testiste Cd^{2+} 'un yol açtığı hemorajik nekrozla lipid peroksidasyonunun arasında bir ilişki olduğu düşünülmüş ve bunu ortaya koyabilmek amacıyla lipid peroksidasyonunda yer alan askorbik asit ve B12 gibi antioksidanların deney hayvanlarında kullanılarak Cd^{2+} toksik etkisinin önlenildiği ortaya konmuştur (151). Ognjanovic ve arkadaşları (152), Cd^{2+} önce uygulanan vitamin E'nin Cd^{2+} hematolojik değerler ve lipid peroksit konsantrasyonuna olan toksik etkileri üzerine koruyucu özelliğinin saptandığını bildirmişlerdir. Selenyumun varlığında testiste Cd^{2+} lipid peroksidasyonunu indükleyemediği hatta selenyumun Cd^{2+} toksisitesine karşı koruyucu özelliğe sahip olduğu bilinmektedir (153). Koyutürk ve arkadaşlarının (154) yaptığı bir çalışmaya göre selenyum, vitamin E, vitamin C nin kombinlenmiş ilaç formunun Cd^{2+} uygulaması ile hasar görmüş testise verilmesi neticesinde; testis dokusunda LPO seviyesi azalırken, GSH seviyesi artış gösterdiği anlaşılmıştır. Böylece antioksidan kombinasyonun tedavi edici özelliği ortaya konmuştur. Yapılan bir çalışmada Cd^{2+} meydana getirdiği testis ve spermatozoa hasarına karşı soğan veya sarımsak ekstraktının koruyucu nitelikte olduğu belirtilmektedir (155). Rajendar ve arkadaşları (156) Cd^{2+} ile oluşturulan testis hasarını birlikte verilen alfa-tokoferolün iyileştirdiğini rapor etmişlerdir. Sönmez ve arkadaşları (157) ise sıçan testis dokusu üzerinde Cd^{2+} ile hasar oluşturmuş ve koruyucu amaçlı

verilen üzüm çekirdeği ekstresinin testiste histopatolojik hasarı iyileştirdiğini göstermişlerdir.

Yaşadığımız yüzyılda propolis çok sayıda yararlı biyolojik aktivite göstermesi ile tıp alanında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle tıbbi etki açısından antibakterial, antiviral, antiseptik ve antioksidatif özelliği büyük önem taşımaktadır. Propolisin yapısında bulunan flavanoidler, hidroksiflavonlar, terpenler ve kafeik asit fenil ester (CAPE) gibi bileşikler oldukça kuvvetli antioksidanlardır (12). Sağlıklı bireylerde yapılan *in vivo* bir çalışmada, oral yolla propolis verilmesiyle kanın antioksidan seviyesinde artış meydana geldiği gözlenmiştir (158). Yapılan çalışmalarda propolisin inflamatuvar süreçte, nötrofiller tarafından oluşturulan serbest radikalleri yakaladığı bildirilmiştir (159). Liao ve arkadaşları (160) tarafından akciğer hücrelerinin metastatik kapasitesine, tümör invazyonuna ve anjiogenezis üzerine CAPE'nin inhibitör, azaltıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. Hoşnuter ve arkadaşları (161) da benzer şekilde sıçanlarda, propolisin önemli bir bileşiği olan CAPE uygulaması ile MDA değerlerinde kontrol grubuna oranla önemli düşüş tespit etmişlerdir. Bu açıklamalara ilave olarak, propolis ve diyabet ilişkisinin incelendiği çalışmalarda Okutan ve arkadaşları (162), şeker hastalığında hücre membranlarının oksidatif hasara karşı artan duyarlılıklarının değişik oranlardaki propolis ile beslenme sonucunda azaldığı, oksidatif parametrelerde azalma ile birlikte antioksidan enzim (SOD, CAT, GPx gibi) aktivitelerinin ise arttığı belirtilmiştir. Köksel ve arkadaşlarının (163) yaptığı çalışmada LPS uygulanan sıçanlarda serum ve akciğer dokusunda MDA düzeylerini anlamlı olarak arttırdığı ancak propolisin temel bir bileşeni olan CAPE'nin MDA düzeylerini anlamlı derecede düşürdüğü, inflamasyonu ve LPS'nin neden olduğu akciğer doku hasarını azalttığını bildirmişlerdir. Yine yapılan bir çalışmada birçok tümör hücrelerini yok etmek için bir seçenek olarak kullanılan antitümör ilacı doksorubisin ile indüklenmiş testis hasarına karşı propolis tedavi amaçlı kullanılmıştır. Bu kullanım neticesinde propolisin etkili bir şekilde bu hasarı hafiflettiği ve doksorubisin ile ilişkili apoptotik ve oksidatif hasarı engellediği anlaşılmıştır. Sonuçta klinik amaçlı kullanılan doksorubisin'in olumsuz etkilerinin propolisle engellendiği bildirilmiştir (164). Yousef ve arkadaşları (8) sıçan testis dokusunda alüminyum klorit'in testiküler disfonksiyona, serum testosteron seviyesinde ve semen kalitesinde ve antioksidan enzim seviyelerinde azalmaya sebep olurken, lipit peroksidasyonunda artışa yol açtığını bulmuş ve

propolisin ise bu toksisiteye karşı testisi koruduğunu belirtmiştir. Yapılan bu çalışmada ise Cd^{2+} ile oluşan hasarı engellemek için propolis kullanıldı. Cd^{2+} ile birlikte propolis uygulanan sıçanların testis dokularındaki seminifer tübüllerin büyük kısmının normal olduğu gözlemlendi. Koruyucu amaçlı verilen propolis grubunda testis ağırlığının, tübül çaplarının, biyopsi skorunun ve serum testosteron seviyesinin sadece Cd^{2+} verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi. Ayrıca apoptotik hücre sayısı, doku MDA düzeyi ise koruyucu amaçlı verilen propolisle azaldı.

Hipoksi indükleyici faktör (HIF-1) hipoksiye cevabın ana regülatörü olarak bilinir (115, 116). Memelilerin hücreleri oksijen gerilimine bilhassa lokal oksijen kaynağındaki azalmaya (hipoksiye) aşırı şekilde duyarlıdır. Hipoksi ile indüklenen oksijen yetmezliğinde oksijen homeostazisini içeren çoğu hücrelerdeki spesifik genlerin transkripsiyonu hızlı bir şekilde artmaktadır (117). Birçok araştırmacı embriyogenezis, tümör vaskülarizasyonu ve ilerleyişi, felç, miyokardial enfarktüs de meydana gelen iskemi ve hipoksi sürecini ve klinik öneme sahip diğer iskemi ve hipoksi süreçlerinin birçoğunun altında ki HIF-1 fonksiyonunu çalışmaktadır. Bizim yaptığımız çalışmada Cd^{2+} uygulanan grupta intersitisyel alanda zayıf boyanma devam etmesine rağmen, nekrotik tübüllerde +++ HIF-1 α ekspresyonu belirlendi. Koruyucu amaçlı propolis verilen grupta ise HIF-1 α ekspresyonu kontrol grubuna benzerlik gösterdi. Bu sonuçlar Cd^{2+} 'un testis dokusunda oluşturduğu hasarda HIF-1 α 'nin de etkin olarak rol aldığını ortaya koymaktadır. Ayrıca koruyucu amaçlı verilen propolis diğer tüm parametrelerde olduğu gibi HIF-1 α ekspresyonu üzerinde de yararlı etki göstermektedir.

Sonuç olarak Cd^{2+} birçok organı etkilediği gibi özellikle de testisler üzerinde ciddi anlamda histopatolojik değişiklikler oluşturmaktadır. Bu histopatolojik değişikliklerin erkek infertilitesine kadar götürebilecek şiddette olması halk sağlığı açısından oldukça önemlidir. Arıların kovani korumak için yaptığı propolisin Cd^{2+} ile testis dokusunda oluşan hasarı bütün parametreler düzeyinde iyileştirdiği gözlemlendi. Propolisin tüm bu faydalı özellikleri göz önüne alındığında, mesleki bir hastalık etkeni olan Cd^{2+} 'a maruz kalan kişilere besin takviyesi olarak propolis önerilebilir.

6. KAYNAKLAR

1. Prozialeck WC, Edwards JR, Woods JM. The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sci* 2006; 79: 1493-1506.
2. Kalay M, Karataş S. Kadmiyumun *Tilapia nilotica* (L.) Kas, Beyin ve Kemik (Omurga Kemiği) Dokularındaki Birikimi. *Tr. J.of Zoology Tübitak* 1999; 3: 985-991.
3. Güler Ç, Çobanoğlu Z. Pestisitler, Çevresel Etkenlere Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Hastalıklar, T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü Sağlık Projesi Genel Koordinatörlüğü, Çevre Sağlığı Kaynak Dizisi, No:52,Ankara, 1997:6.
4. Waisberg M, Joseph P, Hale B and et al. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003; 192: 95-117.
5. Merian M, Weinheim NY. Cadmium and their compounds in the environment, VCH, Basel, Cambridge 1991: 803-851.
6. Li L, Heindel J. Sertoli cell toxicants. In: Korach, Marcel Dekker, Reproductive and Developmental Toxicology Newyork 1998:220.
7. İlhan F, Evcil Hayvanlarda Testis Dejenerasyonları, YYÜ Vet. Fak. Derg 2003;14 (2):51-56.
8. Yousef MJ, Salama FA. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminum chloride in male rats. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47:1168-1175.
9. Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 1995; 41: 1819-1828.

10. Çolakoğlu N, Kükner A, Kara H ve ark. Sıçan testis dokusunda kadmiyum klorür'ün oluşturduğu yapısal değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine metallothionein'nin etkileri. *Türkiye Klinikleri, J Med Sci* 2004; 24201-206.
11. Bankova V, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: Recent Advances in Chemistry and Plant Origin. *Apidologie* 2000; 31: 3-15.
12. Kumova U, Korkmaz A, Avcı BC ve ark. Önemli Bir Arı Ürünü: Propolis, Çukurova University, Faculty of Agriculture, Adana-Turkey 2002: 10-23.
13. Dobrowolski JW, Vohora SB, Dandiya PC and et al. Antibakteriyal, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 1991; 35:77-82.
14. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (8. Baskı) ,Yıldırım M, Dalçık H (Çeviri Editörü) , İstanbul, Nobel Tıp Kitap Evleri, 2009: 262-265.
15. Sadler TW, Basaklar AC. Langman's Medikal Embriyoloji (9.baskı), Ankara, Palme Yayıncılık, 2005: 313-354.
16. Moore KL, Persaud TVN. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F (Çeviri Editörleri), Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009: 176-178.
17. Sancak B, Cumhuriyet M. Fonksiyonel Anatomi (2. Baskı) , Ankara, 2002: 291-292.
18. Aktümsek A. Anatomi ve fizyoloji insan biyolojisi (3. Baskı), Ankara, Nobel Yayın Dağıtım, 2006: 90.
19. Snell RS. Clinical anatomy (3rd ed), Boston, Brown and Company, 1986: 168-75.
20. Moore KL, Agur AMR. Temel Klinik Anatomi (2. Baskı), Elhan A. (Çeviri editörü), Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2006: 135.
21. Arda E. Testis iskemi reperfüzyonunda vitamin E ve koenzim Q10'unkoruyucu rolü, Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, Edirne, 2012.
22. Arıncı K, Elhan A. Anatomi(4. Baskı), Ankara, Güneş Kitabevi Ltd. Şti, 2006: 330-332.
23. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji (9.baskı), Solakoğlu S, Aytekin Y.(Çeviri editörü), İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2006:120.
24. Junqueira LC, Carneiro J.Temel Histoloji (10. Baskı), Solakoğlu S, Aytekin Y. (eviri editörü), İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2009: 135.

25. Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi, Demir R. (Çeviri editörü), Ankara Palme yayıncılık, 2006: 459-467.
26. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Pennsylvania, W.B. Saunders Company, 1997: 406-412.
27. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology: a Text and Atlas(4th edt), Lippincott Williams-Wilkins, Philedelphia, 2003: 689-696.
28. Gartner LP, Hiatt JL. Color text book of Histology(3.edition), Philadelphia,1997: 491-500.
29. Wong SL, Lye EJ. Lead, mercury and cadmium levels in Canadians. Health Rep 2008; 19: 31-6.
30. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2007. CERCLA Priority List of Hazardous Substances U.S.Department of Health and Human Services. Atlanta, GA (<http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>. (Erişim Tarihi: 20.02.2015).
31. Kay T, Thomas DG, Brown MW and et al. Cadmium Accumulation and Protein Binding Patterns in Tissues of Rainbow Tout, *Salmo gairdneri*. Environmental Health Perspectives 1986; 65: 133-139.
32. Tort L, Torres P. The Effects of Sublethal Concentrations of Cadmium on Haematological Parameters in the Dogfish, *Schyliorhinus canicula*. J. Fish Biol 1988; 32: 277-282.
33. Murugavel P, Pari L, Sitasawad SL and et al. Cadmium Induced Mitochondrial Injury and Apoptosis in Vero cells: Protective Effect of Diallyl Tetrasufide from Garlic. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2007; 39: 161-170.
34. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs5.html> (Erişim tarihi 25.04.2015)
35. Koçak M. Kronik Kadmiyum Toksisitesinin Hemostatik Sisteme Etkileri, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Fizyopatoloji Bilim Dalı, Doktora Tezi, Ankara, 2004
36. Güven K. Biyokimyasal ve Moleküler Toksikoloji. Dicle Üniv, Basımevi, Diyarbakır, 1999:182.
37. <http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/minimize/cadmium.pdf> (Erişim tarihi 05.05.2015)

38. Robarts K, Worsfold P. Cadmium, toxicology and analysis, A Review. *Analyst* 1991; 116: 549-568.
39. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2008. Toxicological Profile for Cadmium. Department of Health and Human Services, Atlanta,GA (<http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp5.pdf>) (Erişim tarihi 21.04.2015)
40. Almeida JA, Novelli ELB, DalPai-Silva M and et al. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Environ Pollut* 2001; 114:169-175.
41. Stresty TVS, Madhava Rao. Ultrastructural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cell of pigeonpea. *Environmental and Experimental Botany* 1999; 41: 3-13.
42. Assche FV, Clijsters H. Effects of metals on enzyme activity in plants. *Plant and Cell Environment*. 1990; 13: 195-206.
43. Köleli N, Kantar Ç. Fosfat Kayası, Fosforik Asit ve Fosforlu Gübrelerdeki Toksik Ağır Metal (Cd, Pb, Ni, As) Konsantrasyonu. *Ekoloji Dergisi* 2005;14: 55.
44. Kabata-Pendias A, Pendias H. Trace Elements in Soils and Plants(2nd Edition) ,CRC Press, Baton Rouge. 1992.
45. Aydoğdu N, Erbaş H, Kaymak K. Taurin, Melatonin ve N-Asetilsisteinin Kadmiyuma Bağlı Akciğer Hasarındaki Antioksidan Etkileri. *Trakya Üni. Tıp Fak. Dergisi* 2007; 24(1) :43-48.
46. Patrick L. Toxic metals and antioxidants: Part II. The role of antioxidants in arsenic and toxicity. *Altern Med Rev* 2003; 8: 112-116.
47. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 1999. Toxicological profile for Cadmium. Department of Health and Human Services Atlanta, GA. 1999.
48. Goyer RA, Cherian MG, Delaquerriere-Richardson L. Correlation of parameters of cadmium exposure with onset of cadmium-induced nephropathy in rats. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol* 1984;5: 89–100.
49. Kamiyama T, Miyakawa H, Li JP and et al. Effects of one-year cadmium exposure on livers and kidneys and their relation to glutathione levels. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1995; 88: 177–186.
50. Shohda AE, Mohamed ZG, Atef TF and et al. Effect of cadmium and aluminum intake on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat tissues. *Journal of Biochemistry Molecular Toxicology* 2001; 15: 207-214.

51. Kara H, Çolakoğlu N, Kükner A ve ark. Kadmiyum klorürün sıçan böbrek dokusunda oluşturduğu yapısal değişiklikler ve bu değişiklikler üzerine metallothioneinin etkileri, ışık mikroskopik çalışma. *Journal of Medical Sciences* 2004; 24: 592-597.
52. Inaba T, Kobayashi E, S Yasushi and et al. Estimation Of Cumulative Cadmium Intake Causing Itai-Itai Disease. *Toxicol Lett* 2005;159: 192-201.
53. Vahter M, Akesson A, Liden C and et al. Differences In The Disposition And Toxicity Of Metals. *Environ Res* 2007; 104 (1): 85-95.
54. Smedley J, Dick F, Sadhra S. *Oxford Handbook of Occupational Health*, Oxford University Press, 2007.
55. Türk Tabipleri Birliği, İşyeri Hekimliği Ders Notları, Türk Tabipleri Birliği Yayını, 5. Basım, Ankara, 2000.
56. Gezer H. Sıvı kaplamalarının çevre kalitesi ve insan sağlığına etkileri. <http://www.yapkat.com/images/> (Erişim tarihi 28.04.2015)
57. Iwami K, Moriyama T. Comparative effect of cadmium on osteoblastic cells and osteoclastic cells. *Arch Toxicol* 1993; 67: 352-357.
58. Galicka A, Brzoska MM, Sredzinska K and et al. Effect of cadmium on collagen content and solubility in rat bone. *Acta Biochim Pol* 2004;51: 825-9.
59. Wirth JJ, Mijal RS. Adverse effects of low level heavy metal exposure on male reproductive function. *Sys Biol Reprod Med* 2010; 56: 147-167.
60. Bu TL, Mi YL, Zeng WD, Zhang CQ. Protective effects of quercetin on cadmium induced oxidative toxicity on germ cells in male mice. *Anat Rec Adv Integ Anat Evol Biol* 2011; 294: 520-526.
61. Çevik M, Tuncer PB. Evcil hayvanlarda seminal plazmanın fiziko-kimyasal yapısı ve üreme fonksiyonları üzerindeki etkileri. *Lalahan Hay Arş Ens Derg* 2005; 45: 63-72.
62. Kaya S, Pirinççi İ, Bilgili A. *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*, Medisan, Ankara 1998.
63. Wier PJ, Miller RK, Maulik D and et al. Toxicity of cadmium in the perfused human plecenta. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; 105: 156-71.
64. Olabarrieta I, L'Azou B, Yuric S and et al. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicol In Vitro* 2001; 15: 511-7.

65. Asagba SO, Isamah GK, Ossai EK and et al. Effect of oral exposure to cadmium on the levels of vitamin A and lipid peroxidation in the eye. *Bulletin Enviromental Contamination and Toxicology* 2002; 68: 18-21.
66. Patra RC, Swarup D, Senapati SK. Effects of cadmium on lipid peroxides and superoxide dismutase in hepatic renal and testicular tissue of rats. *Veterinary Human Toxicology* 1999; 41: 65-66.
67. Konukoğlu D. *Biyokimya, TUS ve stajlar için (2. Baskı)* , Tumer Danışmanlık ve Yayıncılık, 2004: 267-273.
68. Zahir AS, Thanhtam T, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1999;154: 256-263.
69. Mercan N, Guvensan A, Çelik A ve ark. Antimicrobial activity and pollen composition of honey samples collected from different provinces in Turkey. *Nat. Prod. Res* 2007; 21:187-195.
70. <http://www.tab.org.tr/TR,251/propolis.html> (Erişim tarihi 22.04.2015)
71. Kutluca S, Genç F, Korkmaz A. *Propolis Samsun Tarım İl Müdürlüğü Çiftçi Eğitimi ve Yayım Şubesi, Samsun, 2006:57.*
72. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol* 2005; 100:114-7.
73. DaSilva Cunha IB, Sawaya AC, Caetano FM and et al. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J Braz Chem Soc* 2004; 15:964-70.
74. Anonymous:<http://www.mmm.ba/royal-jelly/Propolis-composition.html>(Erişim tarihi 25.05.2015)
75. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology* 1998; 36: 347-363.
76. Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee World* 1979; 60: 59-84.
77. Lairon D, Amiot MJ. Flavonoids in Food and Natural Antioxidants in wine. *Curr Opin Lipidol* 1999; 10:23-8.
78. Castaldo S, Capasso F. Propolis old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 2002; 73(1): 1-6

79. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR. The analysis of bud exsudate of populus X euramericana, and of propolis, by gas chromatography-mass spectrometry. Proc R Soc Lond B 1987; 232: 249-72.
80. Garcia-Viguera C, Ferreres F, Tomas-Barberan FA. Study of Canadian propolis by GC-MS and HPLC. Z Naturforsch 1993; 48: 731-35.
81. Gabrys J, Konecki J, Krol W and et al. Free amino acids in bee hive products (Propolis) as identified and quantified by gas-liquid chromatography. Pharmacol Res Comm 1986; 18: 513-18.
82. Gençay Ö, Sorkun K. Propolis Hakkında Neler Biliyoruz. Teknik Arıcılık 2002; 75: 17-21.
83. Karacaoğlu M. Propolisin Yapısı ve Kullanımı. Teknik Arıcılık 1997; 57: 18-25.
84. Banskota AH, Nagaoka T, Sumioka LY and et al. Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. In Journal of Ethnopharmacology 2002; 80: 67-73.
85. Marcucci MC. Propolis Chemical Composition, Biological Properties And Therapeutic Activity. In Apidologie 1995; 26: 83-9.
86. Dobrowolski JW, Vohoraq SB, Sharma K. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. J Ethnopharmacol 1991; 35: 77-82.
87. Focht J, Hansen SH, Nielsen JV and et al. Bactericidal effect of propolis in vitro against agents causing upper respiratory tract infections. Arzneim Forsch/Drug Res 1993; 43: 921-23.
88. Amaros M, Sauvager F, Girre L, Cormier M. In vitro antiviral activity of propolis. Apidologie 1992; 23: 231-40.
89. Khayyal MT, el-Ghazaly MA, el-Khatib AS. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. Drugs Exp Clin Res 1993; 19: 197-203.
90. Strehl E, Volpert R, Elstner EF. Biochemical activities of propolis extracts: III. Inhibition of dehydrofolate reductase. Z Naturforsch 1994; 49: 39-43.
91. Pascual C, Gonzales R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. J Ethnopharmacol 1994; 41: 9-13.
92. Dimov V, Ivanovska N, Bankova V and et al. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. Vaccine 1992; 10: 817.

93. Sud'ina GF, Mirzoeva OK, Pushkareva MA and et al. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 1993; 329: 21-4.
94. Krol W, Czuba Z, Scheller S and et al. Anti-oxidant property of etanolic extract of propolis (EEP) evaluated by inhibiting the chemilumin escence oxidation of luminol. *Biochem Int* 1990; 21: 593-97.
95. Edenharder R, von Petersdorff I, Rauscher R. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3 methylimidazol 4,5-f]quinoline(IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutat Res* 1993; 287: 261-74.
96. Starzyk J, Scheller S, Szaflarski J and et al. Biological properties and clinical application of propolis: II. Studies on the antiprotozoan activity of ethanol extract of propolis. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1977; 27: 1198-99.
97. Silici S, Kaftanoğlu O. Antimicrobial analysis of propolis samples from different regions of Turkey. *Uludağ Bee Journal* 2003; 3: 16-18.
98. Hegazi AG. Propolis an overview. *Congreso Internacional de Propóleos, Buenos Aires (1-2nd), September 1998; 2000:723-28.*
99. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. In *Journal of Ethnopharmacology* 2005; 99: 69–73.
100. Amaros M, Sauvager F, Girre L and et al. In vitro antiviral activity of propolis. *Apidologie* 1992; 23: 231-40.
101. Amoros M, Simoes CMO, Girre L and et al. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture: Comparison with the antiviral activity of propolis. *J Nat Prod* 1992; 55: 1732-40.
102. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. In *Journal of Ethnopharmacology* 2007; 113:1–14.
103. <http://apiterapi.uzerine.com/index.jsp?objid=320>, (Erişim Tarihi: 28/03/2015)
104. Bogdanov S. Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. *Bee Product Science*, 2012, www.bee-hexagon.net (Erişim Tarihi: 28/03/2015)
105. Haliwel B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free Radicals Antioxidants and Human Disease: Where are We Now? *J. La. Cli. Med* 1992;119: 598-620.
106. Scheller S, Wilczok T, Imielski S and et al. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *Int J Radiat Biol* 1990; 57: 461-65.

107. Kovalik PV. The use of propolis in the treatment of patients with chronic fungal sinusitis. *Vestnik otorindaringologii* 1979;6: 60-62.
108. Mahmoud Z, Edens FW, Eisen EJ and et al. Ascorbic acid decreases heat shock protein 70 and plasma corticosterone response in broilers (*Gallus gallus domesticus*) subjected to cyclic heat stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 2004; 137: 35-42.
109. Ichikawa H, Satoh K, Tobe T and et al. Free Radical Scavenging Activity of Propolis. *Redox Rep* 2002; 7: 347-350.
110. Sun F, Hayami S, Haruna S and et al. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxides in rats. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 1462-1465.
111. Prytyk E, Dantas AP, Salomão K. Flavonoids and trypanocidal activity of Bulgarian propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 2003; 88: 189-193
112. Wang BJ, Lien YH, Yu ZR. Supercritical fluid extractive fractionation study of the antioxidant activities of propolis. *Food Chem* 2004; 86: 237-243.
113. Hoşnuter M, Gürel A, Babuççu O. The effect of CAPE on lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns* 2004; 30: 121-125.
114. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell* 2007; 129:465–472.
115. Semenza GL. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88: 1474–1480.
116. Wenger R. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *J Exp Biol* 2000; 203:1253–1263.
117. Semenza GL. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15:551–578.
118. Maynard MA, Ohh M. The role of hypoxia-inducible factors in cancer. *Cell Mol Life Sci* 2007; 64: 2170–2180.
119. Wiesener MS, Maxwell PH. HIF and oxygen sensing; as important to life as the air we breathe. *Ann Med* 2003; 35:183–190.
120. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 2001; 294: 1337-1340.

121. Brusselmans K, Bono F, Maxwell P and et al. Hypoxia-inducible factor 2- α (HIF-2 α) is involved in the apoptotic response to hypoglycemia but not to hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276: 39192-39196.
122. Chen C, Pore N, Behrooz A and et al. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 2001; 276: 9519-9525.
123. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 507-521.
124. Dang CV, Semenza GL. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci* 1999; 24: 68-72.
125. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol. Med* 2001; 7: 345-50
126. Wang GL, Jiang BH, Rue EA and et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 5510-4.
127. Lee SH, Wolf PL, Escudero R. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 2000; 342: 626-33
128. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM and et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂- regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 2001; 292: 468-72.
129. Ivan M, Kondo K, Yang H and et al. HIF alpha targeted for VHL mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 2001; 292: 464-8.
130. Ke Q, Costa M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol. Pharmacol* 2006;70: 1469- 80
131. Bernaudin M, Tang Y, Reilly M and et al. Brain genomic response following hypoxia and re-oxygenation in the neonatal rat: identification of genes that might contribute to hypoxia-induced ischemic tolerance. *J. Biol. Chem* 2002; 277: 39728-38.
132. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 2011; 1813: 1263-8.

133. Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB and et al. Molecular characterization and chromosomal localization of a third alpha-class hypoxia inducible factor subunit, HIF3alpha. *Gene Expr* 1998;7:205–213.
134. Kietzmann T, Cornesse Y, Brechtel K and et al. Expression of the mRNA of the three hypoxia-inducible factor α -subunits, HIF1a, HIF2a and HIF3a, in rat liver. *Biochem J* 2001;354:531–537.
135. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95:351-8.
136. Ertaş A, Boğa M, Yılmaz M ve ark. A detailed study on the chemical and biological profiles of essential oil and methanol extract of *Thymus nummularius* (Anzer tea): Rosmarinic acid. *Industrial Crops and Products* 2015; 67: 336-345.
137. Yağmur B, Hakerlerler H, Kılınç R. Gübreler ve İnsan Sağlığı. *Çiftçi Dergisi* 2003; :2.
138. Işıklı B, Demir TA, Ürer SM. Bir Kırsal Alan Yerleşiminde Kadmiyum Maruziyeti 2007. <http://www.dicle.edu.tr/~halks/m68.htm> (Erişim tarihi 21.04.2015)
139. Klassen CD, Amdur MO, Doull J. *Toxicology* (3th Ed), Macmillan Publishing Company, Newyork, USA, 1986.
140. Amara S, Abdelmelek H, Garrel C. Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in rat testis. *J Reprod Dev* 2008; 54: 129-134.
141. Jurasovic J, Cvitkovic P, Pizent A and et al. Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects. *Biometals* 2004; 17: 735-743.
142. Saygı S, Deniz G, Kutsal O, Vural N. Chronic effects of cadmium on kidney, liver, testis and fertility of male rats. *Biol Trace Elem Res* 1991; 31: 209-14
143. Foote RH. Fertility of rabbit sperm exposed in vitro to cadmium and lead. *Reprod Toxicol* 1999; 13: 443-9.
144. Aoki A, Hoffer AP. Reexamination of the lesions in rat testis caused by cadmium. *Biol Reprod* 1978; 18: 579-591
145. El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS and et al. Cadmium induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene. *Food Chem Toxicol* 2004; 42: 1563-1571.

146. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B and et al. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. *Comp. Biochem. Physiol. C* 2003; 135: 331-336.
147. Puri VN, Saha S. Comparison of acute cardiovascular effects of cadmium and captopril in relation to oxidant and angiotensin converting enzyme activity in rats. *Drug Chem Toxicol* 2003; 26: 213–18.
148. Jihen H, Imed M, Fatima H and et al. Protective effects of selenium (Se) and zinc (Zn) on cadmium (Cd) toxicity in the liver of the rat: effects on the oxidative stress. *Ecotoxicol Environ Safe* 2009; 72: 1559-1564.
149. El-Missiry MA, Shalaby F. Role of beta-carotene in ameliorating the cadmium induced oxidative stress in rat brain and testis. *J Biochem Mol Toxicol* 2000;14: 238-243.
150. Wang W, Sun Y, Liu J and et al. Protective Effect of Theaflavins on Cadmium-Induced Testicular Toxicity in Male Rats. *Food And Chemical Toxicology* 2012; 50: 3243- 3250.
151. Karabulut ÖB, Koyutürk M, Bolkent S ve ark. Sıçan Tiroid Bezinde Kadmiyum Hasarına Karsı C Vitamini, E Vitamini ve Selenyumun Kombine Kullanımının Etkileri, *Cerrahpaşa Tıp Dergisi Cilt (Sayı) 35: 174.*
152. Ognjanovic BI, Markovic SD, Ethordevic NZ. Cadmium-induced lipid peroxidation and changes in antioxidant defense system in the rat testes: Protective role of coenzyme Q10 and Vitamin E. *Reproductive Toxicology* 2010; 29: 191–197.
153. Jamba L, Nehru B, Bansal MP. Selenium Supplementation During Cadmium Exposure: Changes in Antioxidant Enzymes and the Ultrastructure of the Kidney. *The Journal of Trace Elements in Experimental Medicine* 1997;10: 233–242.
154. Koyutürk M, Bolkent S, Özdil S. The protective effect of vitamin C, vitamin E and selenium combination therapy on ethanol-induced duodenal mucosal injury. *Hum. Exp. Toxicol* 2004; 23: 391.
155. Kikelomo F. Ola-Mudathir, Stephen M. Suru and et al. Protective roles of onion and garlic extracts on cadmium- induced changes in sperm characteristics and testicular oxidative damage in rats. *Food and Chemical Toxicology* 2008;46: 3604–3611.
156. Rajendar B, Bharavi K, Rao GS and et al. Protective effect of alpha-tocopherol on biochemical and histological alterations induced by cadmium in rat testes. *Indian J Physiol Pharmacol* 2011; 55: 213-20.

157. Sönmez MF, Tascioglu S. Protective effects of grape seed extract on cadmium-induced testicular damage, apoptosis, and endothelial nitric oxide synthases expression in rats. *Toxicol Ind Health* 2015; 193:80-6.
158. Orhan H, Marol S, Hepşen IF. Effects of some probable antioxidants on selenite induced cataract formation and oxidative stress related parameters in rats. *Toxicology* 1999;139: 219-232.
159. Volpert R, Elstner E. Biochemical activities of propolis extracts, II. Photodynamic Activities. *Z. Natuforsch* 1993; 48: 858-862.
160. Liao HF, Chen YY, Liu JJ. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on angiogenesis, tumor invasion, and metastasis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 7907–7912.
161. Hoşnüter M, Gürel A, Babucçu O. The effect of capcion lipid peroxidation and nitric oxide levels in the plasma of rats following thermal injury. *Burns* 2004; 30: 121-125.
162. Okutan H, Özçelik NH, Yılmaz R ve ark. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clinical Biochemistry* 2005; 38: 191-196.
163. Köksel O, Özdülger A, Tamer L ve ark. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipopolysaccharide-induced lung injury in rats. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2006; 19: 90-95.
164. Sherine MR, Hala FZ, Mary AM. Propolis Attenuates Doxorubicin-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Food and Chemical Toxicology* 2014; 67: 176–186.

**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI
KAYSERİ-TÜRKİYE**

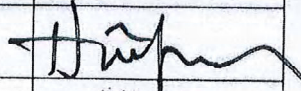

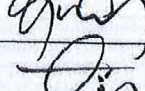
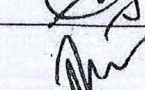
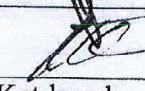
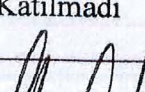

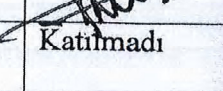
ETİK KURULUN ADI :Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneylei Yerel Etik Kurul Başkanlığı

ETİK KURULUN ADRESİ :Erciyes Üniversitesi

Tarih : 12.06.2013 **Toplantı Sayısı** :06 **Karar No** :13/84

Etik Kurul Toplantısı 12.06.2013 tarihinde Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneylei Yerel

Etik Kurul **Prof.Dr. Harun ÜLGER** Başkanlığında gerçekleştirilmiştir.

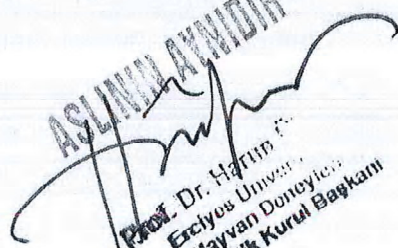
Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Harun Ülger	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Abdullah İnci	Prof. Dr.	Vet. Fakültesi	
Özlem Canöz	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Coşkun Tez	Prof. Dr.	Fen Fakültesi	
Füsün Ferda Erdoğan	Prof. Dr.	Tıp Fakültesi	
Ahmet Öztürk	Doç. Dr.	Tıp Fakültesi	
M. Betül Aycan	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	Katılmadı
Gökçen Yuvalı Çelik	Doç. Dr.	Ecz. Fakültesi	
Servet Kesim	Yard. Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fakültesi	
Aydın Alan	Yard. Doç. Dr.	DEKAM	Katılmadı
Serap A. Eroğlu	Avukat	Kurumla ilişkisi olmayan üye	Katılmadı
Asiye Gökbelen	Yar.Sevenler Der. Bşk.	Sivil Top. Kuruluşu Temsilcisi	Katılmadı

Üniversitemiz Tıp Fakültesinden Doç. Dr. M. Fatih SÖNMEZ tarafından sunulan "Sıçan Testis Dokusunda Kadmiyum ile Oluşturulan Hasar Üzerine Propolis'in Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması" adlı araştırma projesi incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih :12.06.2013

Etik Kurul Başkanı İmzası

Etik Kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÜLGER

ASLINA AYKIRDIR

Prof. Dr. Harun Ülger
Erciyes Üniversitesi
Hayvan Deneylei Yerel Etik Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Kübra Tuğçe ÇİLENK

Uyruğu: Türkiye (TC)

Doğum Tarihi ve Yeri: 23.12.1989-Kadıköy

Medeni Durumu: Bekar

Email: k.tugcee-clnk@hotmail.com

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans:	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji- Embriyoloji AD	2015
Lisans	: Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi-Biyoloji	2011
Lise	: Kartal Medine Tayfur Sökmen Lisesi	2007

YABANCI DİL

İngilizce