



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DOKTORA TEZİ

SODYUM FLORÜRÜN LEYDİĞ HÜCRELERİNDE
STEROİDOGENİK YOLAK ÜZERİNDE *İN VİTRO* ETKİLERİ

Banu ORTA YILMAZ

Biyoloji Anabilim Dalı

Zooloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Melike ERKAN

Mayıs, 2017

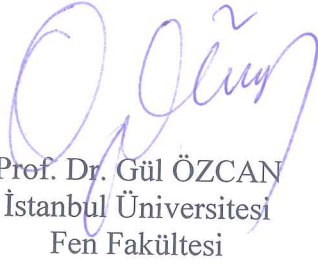
İSTANBUL

Bu çalışma 10.05.2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı Zooloji Programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

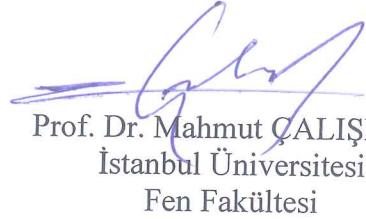
Tez Jürisi:



Prof. Dr. Melike ERKAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



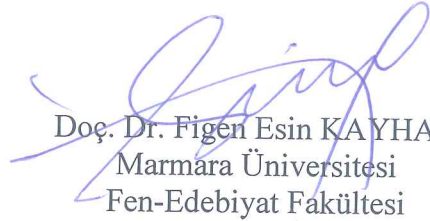
Prof. Dr. Gül ÖZCAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Mahmut ÇALIŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Tülay İREZ
Biruni Üniversite
Tıp Fakültesi



Doç. Dr. Figen Esin KAYHAN
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



20.04.2016 tarihli resmi gazetede yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi'nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 47732 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışma, sodyum florürün TM3 Leydig hücrelerinde testosteron biyosentezi üzerine yapmış olduğu etkileri araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Lisansüstü öğrenimim süresince emeği geçen, çalışmamın her aşamasında değerli fikirleri, bilgileri ve deneyimleri ile bana destek olan, yol gösteren çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Melike ERKAN'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, manevi desteğini esirgemeyen sevgili çalışma arkadaşlarım Araş. Gör. Dr. Yasemin AYDIN'a ve Uzman Biyolog Nebahat YILDIZBAYRAK'a en içten teşekkürlerimi sunarım. Yine tez çalışmam boyunca bana laboratuvarını açan Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ne ve Uzman Moleküler Biyolog Aslıhan ŞENGELEN'e çok teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sevgi ve desteklerini esirgemeyen, hayattaki en değerli varlığım canım aileme ve yine her zaman varlığıyla bana güç veren eşim Samet YILMAZ'a ve kızıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2017

Banu ORTA YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

| | |
|---|-----------|
| ÖNSÖZ..... | i |
| İÇİNDEKİLER | ii |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | v |
| TABLO LİSTESİ | vii |
| SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ | viii |
| ÖZET..... | ix |
| SUMMARY | xi |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL KISIMLAR | 4 |
| 2.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ | 4 |
| 2.1.1. Erkek Üreme Organlarının Yapısı ve İşlevleri | 4 |
| 2.1.2. Leydig Hücreleri | 6 |
| 2.1.3. Steroidogenez ve Testosteron Biyosentezi | 7 |
| 2.2. FLORÜR..... | 16 |
| 2.2.1. Florürün Genel Özellikleri | 16 |
| 2.2.2. Florüre Maruz Kalma Yolları | 17 |
| 2.2.3. Florürün Metabolizması..... | 19 |
| 2.2.4. Florür Toksisitesi | 20 |
| 2.2.5. Florürün Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkileri..... | 21 |
| 3. MALZEME VE YÖNTEM | 24 |
| 3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ..... | 24 |
| 3.1.1. Kullanılan Hücre Soyuna..... | 24 |
| 3.1.2. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı | 25 |
| 3.1.3. Hücre İnkübasyon Koşulları | 25 |
| 3.1.4. Hücrelerin Pasajlanması..... | 25 |
| 3.1.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması | 25 |
| 3.2. FLORÜR KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI | 26 |
| 3.3. MTT HÜCRE CANLILIĞI TESTİ | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4. BROMODEOKSİÜRİDİN (BRDU) YÖNTEMİ..... | 27 |
| 3.5. LAKTAT DEHİDROGENAZ (LDH) YÖNTEMİ | 27 |
| 3.6. SERBEST TESTOSTERON MİKTARININ BELİRLENMESİ..... | 28 |
| 3.7. SİKLİK ADENOZİN MONOFOSFAT (CAMP) DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ..... | 29 |
| 3.8. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İNCELEMELERİ | 30 |
| 3.8.1. Total RNA izolasyonu | 30 |
| 3.8.2. Total RNA'nın Komplementer DNA'ya (cDNA) Çevrilmesi..... | 31 |
| 3.8.3. Primerlerin Seçilmesi..... | 32 |
| 3.8.4. RT-PCR ile Genlerin İfade Düzeyinin Belirlenmesi | 33 |
| 3.8.5. $\Delta\Delta C_T$ Metodu ile Verilerin Değerlendirilmesi..... | 35 |
| 3.9. WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE PROTEİN MİKTARLARININ BELİRLENMESİ..... | 35 |
| 3.9.1. Western Blot Yönteminde Kullanılan Çözeltiler | 36 |
| 3.9.2. Örneklerin Hazırlanması | 37 |
| 3.9.3. Protein Ölçümü | 38 |
| 3.9.4. Proteinlerin Jelde Yürütülmesi..... | 38 |
| 3.9.5. Proteinlerin Membrana Aktarılması (Blotlanması)..... | 39 |
| 3.9.6. Membranın Bloklanması..... | 39 |
| 3.9.7. Birincil ve İkincil Antikorla İnkübasyon | 39 |
| 3.9.8. Proteinlerin Görüntülenmesi | 40 |
| 3.10. İSTATİSTİK ANALİZ | 40 |
| 4. BULGULAR | 41 |
| 4.1.MTT BULGULARI..... | 41 |
| 4.2.BRDU BULGULARI | 45 |
| 4.3.LDH BULGULARI | 46 |
| 4.4.SERBEST TESTOSTERON BULGULARI | 47 |
| 4.5.CAMP BULGULARI | 48 |
| 4.6.RT-PCR BULGULARI | 49 |
| 4.6.1. StAR Geni İfade Düzeyi | 49 |
| 4.6.2. Hsd3b Geni İfade Düzeyi..... | 50 |
| 4.6.3. Hsd17b Geni İfade Düzeyi..... | 51 |
| 4.6.4. Cyp11a1 Geni İfade Düzeyi..... | 52 |
| 4.6.5. Sf-1 Geni İfade Düzeyi | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 4.6.6. Gata-4 Gen İfade Düzeyi | 54 |
| 4.6.7. Nur77 Gen İfade Düzeyi | 55 |
| 4.6.8. Dax-1 Gen İfade Düzeyi | 56 |
| 4.7. WESTERN BLOT BULGULARI | 57 |
| 4.7.1. CYP11A1 protein miktarı | 57 |
| 4.7.2. LHR Protein Miktarı | 58 |
| 4.7.3. 3 β -HSD Protein Miktarı | 59 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 60 |
| KAYNAKLAR | 72 |
| ÖZGEÇMİŞ | 85 |



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1.1.1: Testisin genel yapısı (Franklin, 2014)..... | 4 |
| Şekil 2.1.1.2: Seminifer tübülün enine kesitinin şematik gösterimi (Ashley, 2012)..... | 5 |
| Şekil 2.1.2.1: Leydig hücrelerinin histolojik görüntüsü (Kierzenbaum, 2006)..... | 6 |
| Şekil 2.1.3.1: Testikular steroidogenezin LH aracılığıyla düzenlenmesi (Melmed ve Conn, 2007)..... | 8 |
| Şekil 2.1.3.2: Leydig hücrelerinde testosteron biyosentezi (Stojkov ve diğ., 2013)..... | 9 |
| Şekil 2.2.2.1: İnsanların maruz kaldığı florür kaynakları..... | 17 |
| Şekil 3.9.1: Western blot basamakları..... | 35 |
| Şekil 4.1.1: Florürün TM3 Leydig hücrelerinde 6 saat sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (**p<0,01, ***p<0,001)..... | 40 |
| Şekil 4.1.2: Florürün TM3 Leydig hücrelerinde 12 saat sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (**p<0,01, ***p<0,001)..... | 41 |
| Şekil 4.1.3: Florürün TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (***p<0,001)..... | 41 |
| Şekil 4.1.4: Florürün TM3 Leydig hücrelerinde 48 saat sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)..... | 42 |
| Şekil 4.1.5: Florürün TM3 Leydig hücrelerinde 72 saat sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (***p<0,001)..... | 42 |
| Şekil 4.2.1: Florürün 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde BrdU yöntemiyle belirlenen hücre çoğalması üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001)..... | 44 |
| Şekil 4.3.1: Florürün 24 saat sonunda TM3 Leydig hücreleri üzerinde laktat dehidrogenaz aktivitesinin konsantrasyona bağlı etkileri (*p<0,05, ***p<0,001)..... | 45 |
| Şekil 4.4.1: Florürün 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde serbest testosteron miktarı üzerine etkileri (*p<0,05, **p<0,01)..... | 46 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.5.1: Florürün 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde cAMP düzeyleri üzerinde florür konsantrasyonuna bağlı etkileri (*p<0,05, **p<0,01) | 47 |
| Şekil 4.6.1.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde <i>StAR</i> geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**p<0,01) | 48 |
| Şekil 4.6.2.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde <i>Hsd3b</i> geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**p<0,01, ***p<0,001) | 49 |
| Şekil 4.6.3.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde <i>Hsd17b</i> geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**p<0,01, ***p<0,001) | 50 |
| Şekil 4.6.4.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde <i>Cyp11a1</i> geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (*p<0,001) | 51 |
| Şekil 4.6.5.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde <i>Sf-1</i> geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**p<0,01, ***p<0,001) | 52 |
| Şekil 4.6.6.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde <i>Gata-4</i> transkripsiyon faktörünün mRNA ifade seviyesine etkisi (**p<0,01, ***p<0,001) | 53 |
| Şekil 4.6.7.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde <i>Nur 77</i> transkripsiyon faktörünün mRNA ifade seviyesine etkisi (**p<0,01, ***p<0,001) | 54 |
| Şekil 4.6.8.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde <i>Dax-1</i> transkripsiyon faktörünün mRNA ifade seviyesine etkisi (**p<0,01, ***p<0,001) | 55 |
| Şekil 4.7.1.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde CYP11A1 protein miktarına etkisi (**p< 0,01, ***p< 0,001) | 56 |
| Şekil 4.7.2.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde LHR protein miktarına etkisi (**p<0,01, ***p<0,001) | 57 |
| Şekil 4.7.3.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde 3β-HSD protein miktarına etkisi (**p< 0,01, ***p< 0,001) | 58 |

TABLO LİSTESİ

| | Sayfa No |
|--|-----------------|
| Tablo 2.1.3.1: Leydig hücrelerinde steroidogenik enzimler (Payne, 2007)..... | 10 |
| Tablo 2.1.3.2: Leydig hücrelerinde tanımlanan transkripsiyon faktörleri (Tremblay, 2007). | 18 |
| Tablo 2.1.3.3: Leydig hücrelerinde bulunan transkripsiyon faktörleri ve hedef genleri (Tremblay,2007) | 13 |
| Tablo 2.2.1.1: Flor elementinin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri (Beyhan, 2003) .. | 16 |
| Tablo 2.2.2.1: Farklı yiyecek türlerinde florür konsantrasyonları (Kanduti ve diğ., 2016) | 18 |
| Tablo 2.2.2.2: İçme sularında florür konsantrasyonu için ulusal ve uluslararası değerler (İski, 2004; Avcı ve diğ., 2009) | 19 |
| Tablo 3.8.3.1: RT-PCR işleminde kullanılan primer dizileri (F: Forward, R: Reverse).. | 31 |
| Tablo 3.8.4.1: Real Time PCR cihazı deney koşulları | 33 |
| Tablo 3.9.7.1: Kullanılan birinci ve ikinci antikorlar ve sulandırma katsayıları | 38 |
| Tablo 4.1.1: Florür maddesinin Leydig hücrelerinde zamana bağlı IC50 değerleri | 43 |

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

| Kisaltmalar | Açıklama |
|---------------------------------|--|
| 17β-HSD | : 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaz |
| 3β-HSD | : 3 β -hidroksidehidrogenaz |
| cAMP | : Siklik adenozin mono fosfat |
| CYP11A1 | : Kolesterol yan zincir kırıcı enzim |
| CYP17A1 | : 17 α -hidroksilaz/C17-20 liyaz |
| CYP2E1 | : Sitokrom P450 |
| DMSO | : Dimetil sülfoksit |
| GSH | : Glutatyon |
| EGF | : Epidermal Büyüme Faktörü |
| GAPDH | : Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz |
| HRP | : Horseradish peroksidaz |
| HSD3B | : Hidroksi delta 5 steroid dehidrogenaz geni |
| HSD17B | : 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaz geni |
| LH | : Luteinizan Hormon |
| MTT | : 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-difeniltetrazolium bromid |
| NaF | : Sodyum florür |
| PCR | : Polymerase Chain Reaction, Polimeraz zincir reaksiyonu |
| PKA | : Protein Kinaz A |
| RT-PCR | : Real time Polymerase Chain Reaction, Eş zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu |
| SF-1 | : Steroidogenik faktör 1 |
| SREBP | : Sterol düzenleyici element bağlayıcı protein |
| StAR | : Steroidogenik akut düzenleyici protein |
| DEPC | : Dietil Pirokarbonat |

ÖZET

DOKTORA TEZİ

SODYUM FLORÜRÜN LEYDİĞ HÜCRELERİNDE STEROİDOGENİK YOLAK ÜZERİNDE *İN VİTRO* ETKİLERİ

Banu ORTA YILMAZ

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Melike ERKAN

Nüfusun ve sanayileşmenin günden güne artması, çevreye zararlı kimyasalların girmesine neden olmuştur. İnsanların izin verilen miktarlardan çok daha fazla maruz kaldığı bu kimyasallar toksiktir ve genel sağlık durumları üzerine etkileri oldukça fazladır. Günümüzün en önemli çevresel konulardan biri, suların, besinlerin ve havanın kirlenmesidir. Kurşun (Pb), arsenik (As), kadmiyum (Cd) ve florür (F) gibi belli eser elementler insanlar ve hayvanlar üzerinde toksik etkiler gösterir. Bu nedenle çevrede artan toksik maddelerin etkilerini değerlendirmek oldukça önemlidir. Bu tez çalışmasında, florür maddesinin toksisitesi vurgulanmıştır. Florür alımının izin verilen limiti 1,5 ppm olmasına rağmen, insanların su, besin, hava, dış sağlığı için kullanılan ürünler gibi yollarla maruz kaldığı florür seviyesi bu limitin çok üzerine çıkmaktadır.

Bu çalışmada, florür 24 saat süreyle ve 0,01-200 ppm aralığında TM3 Leydig hücre soyuna uygulanmıştır. Deney süresi tamamlandıktan sonra, florür toksisitesini belirlemek amacıyla, hücre canlılık testi için MTT yöntemi, DNA sentez fazındaki hücreleri işaretlemek için BrdU yöntemi, hücre içi sitotoksisiteyi belirlemek için LDH yöntemi kullanılmış olup yine florür uygulaması sonrasında hücrelerde bulunan cAMP ve testosteron miktarı tayini yapılmıştır. Sodyum florür ile muamele edilen hücrelerde steroidogenik genlerin (*StAR*, *Cyp11a1*, *Hsd3b*, *Hsd17b*) ve bu genleri düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin (*Sf-1*, *Gata-4*, *Nur77*, *Dax-1*) ifade düzeyi RT-PCR analizi ile ve steroidogenik proteinlerin (LHR, StAR, CYP11A1, 3 β -HSD) üretim miktarı

Western blotlama yöntemi ile ölçülmüştür. Çalışmanın sonuçları, florürün Leydig hücrelerinde, hücre canlılığını azalttığı, hücre çoğalmasını baskıladığı, hücre sitotoksitesini arttırdığı, serbest testosteron ve cAMP miktarlarını azalttığını, transkripsiyon faktörlerinin ifade düzeyini değiştirerek steroidogenik genlerin ve proteinlerin ekspresyonunu baskıladığını göstermektedir. Bu tez çalışmasının sonuçları, florürün testosteron biyosentezini olumsuz yönde etkilediğini ortaya çıkarmıştır.

Mayıs 2017, 99 sayfa.

Anahtar kelimeler: Florür, Leydig hücreleri, steroidogenez, testosteron biyosentezi, erkek üreme toksisitesi



SUMMARY

Ph.D. THESIS

***IN VITRO* EFFECTS OF SODIUM FLUORIDE ON THE STEROIDOGENIC PATHWAY IN LEYDIG CELL**

Banu ORTA YILMAZ

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Melike ERKAN

Population and industrialization increase day by day has caused hazardous chemicals to enter into the environment. Chemicals which people have exposed to more than the permitted limits, are toxic and have many effects on general health. One of the most important environmental issues of today is water, nutrient and air pollution. Certain trace elements such as lead (Pb), arsenic (As), cadmium (Cd) and fluorine (F) have toxic effects on humans and animals. Therefore, in the environment, an assessment of the effects of increased toxic substances is critical. In this thesis, the toxicity of fluoride emphasized. Despite the permissible limit of fluoride is 1,5 ppm, the level of fluoride which humans are exposed, such as through water, food, air and products use for dental health, far exceeds this limit.

In this study, fluoride was applied to the TM3 Leydig cell line at the 0,01-200 ppm range for 24 hours. Following completion of the experimental period to determine the toxicity of fluoride, the MTT method was conducted for the cell viability test, the BrdU method was conducted to mark the cells at the DNA synthesis phase, the LDH method was conducted to determine cytotoxicity in the cell and again, following fluoride treatment, the amounts of cAMP and testosterone in the cells were assayed. In cells treated with sodium fluoride, the expression levels of the steroidogenic genes (StAR, Cyp11a1, Hsd3b, Hsd17b) and the transcription factors (Sf-1, Gata-4, Nur77, Dax-1) that regulate these genes, were measured using RT-PCR analysis and the amount of production of

steroidogenic proteins (LHR, StAR, CYP11A1, 3 β -HSD) were measured by Western blot analysis. The result of the studie show that fluoride decreased viability in Leydig cells, suppressed cell proliferation, increased cell cytotoxicity, decreased the amounts of testosterone and cAMP and suppressed the expression of steroidogenic genes and proteins, by changing the level of expression of the transcription factors. The results of this thesis study reveal that fluoride adversely affects the biosynthesis of testosterone.

May 2017, 99 pages.

Keywords: Fluoride, Leydig cells, steroidogenesis, testosterone biosynthesis, male reproductive toxicity.



1. GİRİŞ

İçme suyundaki yüksek florür düzeyleri, Avustralya, Asya, Afrika, Kuzey ve Güney Amerika gibi birkaç kıtadaki ülkelerde tespit edilmiştir (WHO, 2004). Milyonlarca insan, su ve besin aracılığıyla Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) izin verdiği limitlerin (1,5 ppm) çok üzerinde florür konsantrasyonlarına maruz kalmaktadır. Amerika Bileşik Devletleri, Afrika, Asya, Çin, Hindistan, Türkiye, Gana, Kenya, Tanzanya ve Sri Lanka gibi 20'den fazla gelişmiş veya gelişmekte olan ülke florürlü endemik alanlara sahiptir (Jagtap ve diğ., 2012; Susheela, 2007).

Flor metal olmayan en reaktif ve en elektronegatif elementtir. Bu sebepten dolayı doğada neredeyse hiç element olarak bulunmamaktadır. Oksijen ve soygazlar hariç birçok elementle birleşerek florür bileşiklerini oluşturur. Flor içme suyunda iyonik formda bulunur ve böylece hızlı bir şekilde pasif olarak bağırsak mukozasından geçer (Shanthakumari ve diğ., 2004). Florürdeki florun zehirliliği bileşiğin suda eriyebilirliği ile ilgilidir. Suda kolaylıkla eriyebilen sodyum florür, kalsiyum florür, kaya fosfatı veya kriyolitten daha zehirlidir (Akdoğan ve diğ., 2002).

İnsanlar florüre su, hava, gıda, ilaçlar, kozmetik ve endüstriyel olarak maruz kalırlar. Örneğin, çay (4.97 ppm), konserve balık (4.57 ppm), kabuklu deniz hayvanları (3.36 ppm) ve pişmiş buğday tahılı (1.02 ppm) gibi farklı gıdalarda yüksek florür miktarları rapor edilmiştir (ATSDR, 2001). Florür kirliliğinin temel kaynakları arasında, alüminyum endüstrisi, çelik üretimi, fosfatlı gübre üretimi, cam işleme ve yağ rafineleleri, kömür yakma enerji tesisleri gibi alanlarda sayılabilir (Haidouti, 1991; Gritsan ve diğ., 1985; Pickering, 1985; Polomski ve diğ., 1982). Mesleki maruziyetle fluorosid, yani fluorspar, kriyolit ve apatitin madenciliği ve işlenmesi için maruz kalınan florür, vücuda alınan miktarın önemli ölçüde artmasına neden olabilir. Florür ayrıca florlanmış diş macunları aracılığıyla da vücuda girer. Dünyada, son 30 yılda, diş macunları florlanmış sudan daha büyük bir florür kaynağı haline gelmiştir (WHO, 2006).

Yapılan çeşitli klinik araştırmalar ve hayvan deneyleri florürün aşırı mide bulantısı, kusma, tükürük salgısının artması, karın ağrısı, ishal ve bu belirtiler sonucu kardiyak aritmiler ve koma gibi akut, diş ve iskelet florozisi, renal etkiler gibi kronik etkilerinin yanı sıra karsinojenik ve genotoksik etkileri olduğu da bilinmektedir (Kaminsky ve diğ., 1990). Florürün erkek üreme fonksiyonu üzerinde de zararlı etkileri olduğunu gösteren pek çok çalışma bulunmaktadır. Yapılan bu çalışmalar, florürün yapısal ve fonksiyonel sperm kusurları, sperm sayısında azalma, üreme hormon düzeylerinde bozukluklar, epididimis ve yardımcı üreme bezlerinde değişimler ve kısırlık gibi erkek üreme fonksiyonları üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermektedir (Chinoy ve Sequeira, 1989; Chinoy ve diğ., 1995; Chinoy ve diğ., 1997; Dvora`kova`-Hortova` ve diğ., 2008; Ghosh ve diğ., 2002; Izquierdo-Vega ve diğ., 2008; Kwon ve diğ., 2014; Kumar ve Susheela, 1994; Kumar ve Susheela, 1995; Ortiz-Perez ve diğ., 2003; Pushpalatha ve diğ., 2005; Rahman ve diğ.leri, 2013; Spittle, 2009; Sun ve diğ., 2010). Buna ek olarak, florürün, normal endokrin işlevleri değiştiren bir endokrin bozucu olduğu ve bu etkisini spermatozoa üzerindeki reseptörlerine bağlayarak gösterebileceği yapılan bir çalışmada saptanmıştır (Shrader-Frechette, 2007). Bazı doku ve hücreler üzerinde yapılan çeşitli araştırmalara rağmen florürün *in vitro* ya da *in vivo* olarak erkek üreme sisteminde testosteron biyosentezi üzerinde etkilerini hangi yolak üzerinden yaptığını gösteren bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, sodyum florürün TM3 Leydig hücrelerinde testosteron biyosentezinde görevli steroidogenik yolakta *in vitro* etkileri araştırılmıştır. Tezin “Genel Kısımlar” bölümünde testis, Leydig hücreleri, testosteron biyosentezi, steroidogenez ve florür, ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Tezin “Malzeme ve Yöntem” bölümünde laboratuvarda uygulanan işlemler ayrıntılı şekilde anlatılmıştır.

Uygulanan yöntemler sonucunda elde edilen veriler tezin “Bulgular” bölümde belirtilmiştir.

Tezin “Tartışma ve Sonuç” bölümünde ise, elde edilen veriler değerlendirilmiş ve bu veriler mevcut literatür bilgisi ile yorumlanarak sonuca varılmıştır.

Bu çalışmada, florürün Leydig hücrelerinde testosteron biyosentezi üzerine etkileri araştırılmıştır. Testis TM3 Leydig hücre soyuna florür uygulanması sonucu oluşan hasarın, hücre sitotoksitesi, testosteron ve cAMP düzeyleri, steroidogenik genlerin (*StAR*, *Cyp11a1*, *Hsd3b*, *Hsd17b*) ve bu genleri düzenleyen transkripsiyon faktörlerinin (*Sf-1*, *Gata-4*, *Nur77*, *Dax-1*) ifade düzeyi ve steroidogenik proteinlerin (LHR, CYP11A1, 3 β -HSD) üretim miktarı ölçülerek ortaya çıkarılması amacıyla yapılmıştır.

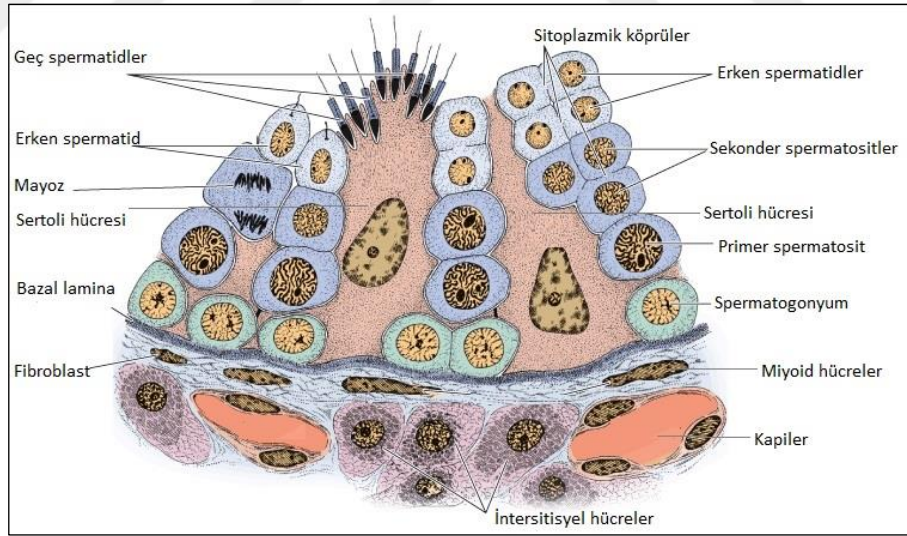


2. GENEL KISIMLAR

2.1. ERKEK ÜREME SİSTEMİ

2.1.1. Erkek Üreme Organlarının Yapısı ve İşlevleri

Erkek üreme sistemi, spermın üretilmesinden ve üreme fonksiyonunun çeşitli hormonlarla düzenlenmesinden sorumludur (Kierszenbaum, 2006). Erkek üreme sistemi temel olarak testisler, epididimis, vas deferens, ejakülasyon kanalları, üretra, seminal vezikül, prostat bezi, bulboüretal bezler ve penisten oluşur. Testisler, sperm üretiminin gerçekleştiği, testosteron başta olmak üzere erkek cinsiyet hormonlarının üretildiği organdır. Yardımcı cinsiyet bezleri olan prostat, bulboüretal bezler ve vesikula seminalisler, spermın içerisinde canlılığını sürdürdüğü ve ejakülasyon durumunda sperm ile birlikte atılan seminal sıvıyı üretirler (Gartner ve Hiatt; 2015). Testisin genel yapısı şekil 2.1.1.1’de verilmiştir (Franklin, 2014).

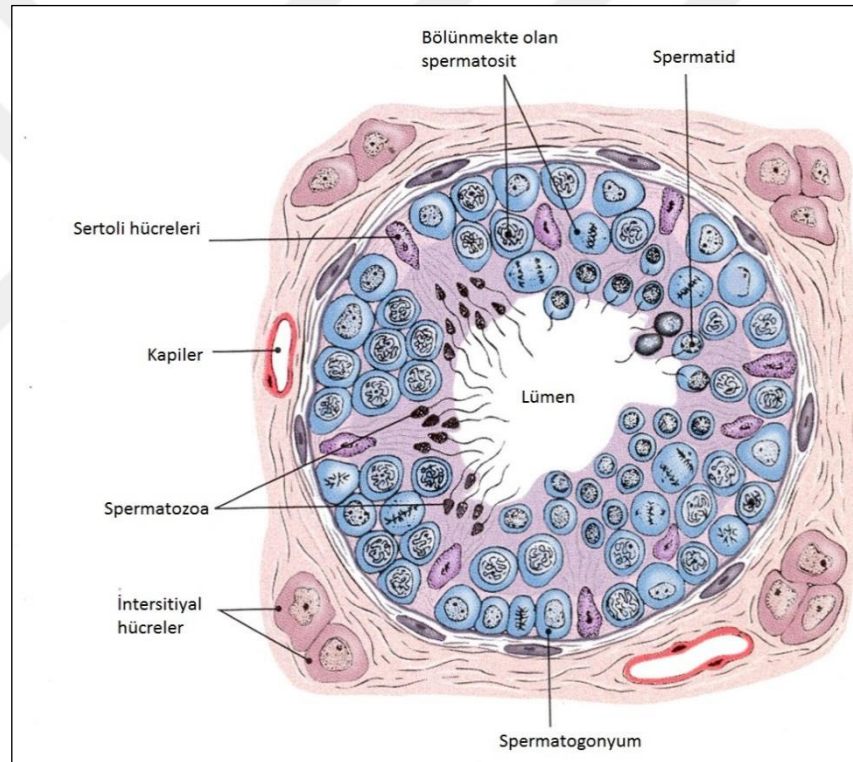


Şekil 2.1.1.1: Testisin genel yapısı (Franklin, 2014).

Testis, intersitsiyel hücreler ve seminifer tübülleri olmak üzere iki önemli kompartmandan oluşur ve seminifer tübülleri ise spermatogenez sürecinin gerçekleştiği bölümdür. Seminifer tübülleri lümeni epitel tabaka ile döşeli olup, spermatogenetik hücreler (spermatogonyumlar, spermatozoidler, spermatozoidler), çok fonksiyonlu Sertoli hücreleri ve tübülleri çevreleyen miyoid hücrelerinden oluşur (Bloom ve Fawcett, 1994; Junquera

ve Carnerio, 2005). Seminifer tübülün enine kesitinin şematik gösterimi şekil 2.1.1.2’de verilmiştir (Ashley, 2012).

Spermatogenetik hücrelerden farklı olarak Sertoli hücreleri bazal laminadan seminifer tübül lümenine uzanan, prizmatik hücrelerdir ve bu konumlarıyla spermatogenik hücrelere mekanik desteklik sağlarlar. Puberteden sonra Sertoli hücrelerinin bazal kısımlarında bulunan sıkı bağlantılar aracılığıyla seminifer tübül lümeni bazal ve adlüminal olmak üzere iki kısma ayrılır. Bu sıkı bağlantı kompleksleri gelişmekte olan spermatogenik hücreleri otoimmün reaksiyondan koruyan kan-testis bariyerini oluşturmaktan sorumludur (Edwart ve Brody 1995; Ross ve diğ. 2003).



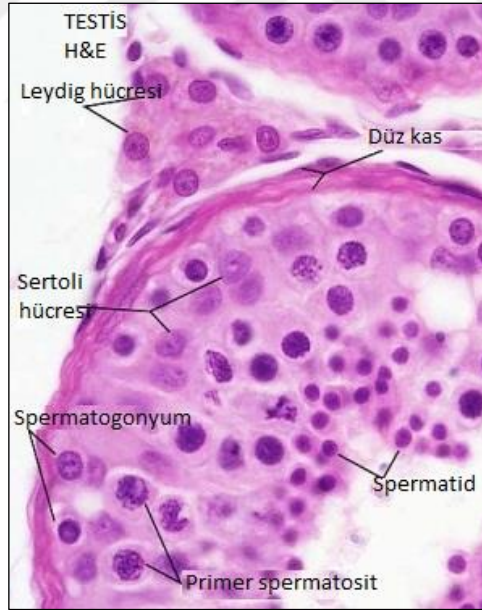
Şekil 2.1.1.2: Seminifer tübülün enine kesitinin şematik gösterimi (Ashley, 2012).

İntersitijyal alan, gevşek bağ dokusundan oluşmaktadır ve seminifer tübüller arasında yerleşir. Bu alanda, sinir lifleri, kan ve lenf damarları, mast hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar ve Leydig hücreleri bulunur (Aktümsek, 2006; Bozdoğan, 2000). Leydig hücreleri, hipofizden salgılanan luteinizan hormon aracılığıyla testosteron üreten ve salgılayan endokrin hücrelerdir. Leydig hücreleri salgıladıkları testosteron hormonu ile ses kalınlaşması, erkeğe özgü kas yapısı ile sakal ve bıyık gelişimi gibi ikincil cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden sorumludurlar aynı zamanda seminifer tübüllerde

spermatogenezin devam etmesini sağlarlar. Salgılanan testosteron hormonu kan yolu ile taşınarak erkek üreme sistemini destekleyen prostat, bulboüretal bezler ve vesikula seminalislerin işlevlerini etkiler (Kierszenbaum, 2006).

2.1.2. Leydig Hücreleri

Franz Leydig, 1850 yılında memeli testisinde, spermatogenez ve ikincil erkek cinsiyet özelliklerini kontrol eden testiküler hormonların kaynağı olduğu gösterilen bir grup hücreyi tanımladı (Christensen, 2007). İntersitisyel hücreler olarak da adlandırılan bu Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasında kümeler halinde bulunur. Leydig hücrelerinin histolojik olarak görünüşleri ve genel konumları şekil 2.1.2.1’de verilmiştir (Kierzenbaum, 2006). Leydig hücreleri, testisin mezenşimal stromasından köken alır ve hem yuvarlak hem de çok köşeli olabilen merkezi yerleşimli belirgin bir çekirdeğe sahiptir (Fawcett ve Bloom, 1994). Leydig hücreleri steroid üretme yeteneği nedeniyle, lipit damlacıkları, kristal mitokondri ve iyi gelişmiş düz yüzlü endoplazmik retikuluma sahiptir (Traniner, 1995).



Şekil 2.1.2.1: Leydig hücrelerinin histolojik görüntüsü (Kierzenbaum, 2006).

Memelilerdeki Leydig hücreleri iki farklı tip içerirler. Bunlar, fetal ve neonatal yaşam boyunca erkeğe ait primer seks karakterlerinin oluşmasından sorumlu fetal tip Leydig hücreleri ve pubertal erkeğe ait özelliklerden sorumlu yetişkin tip Leydig hücreleridir (Haider, 2004). Fetal Leydig hücreleri, embriyonik dönemde erkek fetüs maskülinizasyonu için temel olan androjenleri üretirler. Erken postnatal dönem boyunca

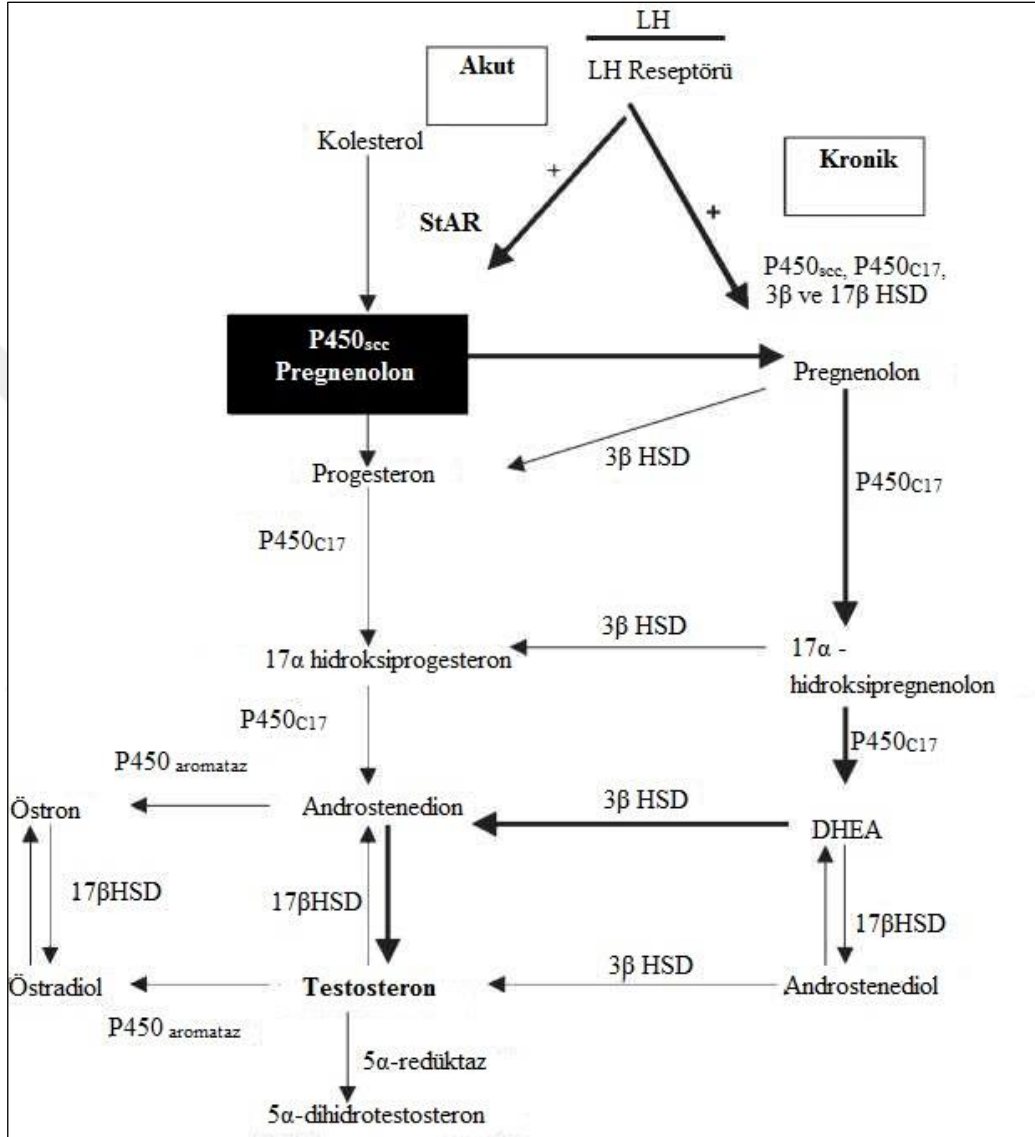
yetişkin Leydig hücreleri, fetal Leydig hücrelerinin yerini alır. Yetişkin Leydig hücreleri, erkeklerde seksüel farklılaşmanın tamamlanması ve üreme fonksiyonları için gerekli olan testosteronu üretir (Habert ve diğ., 2001). Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteronun ana fonksiyonları arasında seksüel isteğin (libido) belirmesi, genital bezlerin fonksiyonunun sürdürülmesi, sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkması, spermatogenezin kontrolü, hipofiz ve hipotalamusta negatif feedback sayılabilir (Payne ve Youngblood, 1995). Leydig hücre fonksiyonu ön hipofizin iki hormonu ile ayarlanır: luteinizan hormon (LH), testosteron üretimini uyarırken; prolaktin LH reseptör ekspresyonunu başlatır. Leydig hücrelerinden testosteronun sentezi ve sekresyonu, LH tarafından gönderilen uyarı ile gerçekleşir. LH, Leydig hücrelerinin farklılaşması ve fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için temel faktördür (Ge ve diğ 2005).

Leydig hücrelerinin testosteron üretimi ilerleyen yaşlarda azalmaktadır. Bu mekanizma tam olarak açıklanamamakla birlikte, Leydig hücre sayısında azalma, LH düzeylerinde azalma ve Leydig hücrelerinin testosteron üretme kapasitesinin azalması olası nedenler arasında sayılabilir (Chen ve diğ 1994).

2.1.3. Steroidogenez ve Testosteron Biyosentezi

Leydig hücrelerinin işlevi, erkek cinsel farklılaşmada, spermatogenezin sürdürülmesinde ve erkek sekonder cinsiyet özelliklerinin ifadesinde gerekli olan testosteron biyosentezini gerçekleştirmektir (Payne ve Youngblood, 1995). Serumda bulunan testosteronun yaklaşık %95'i Leydig hücreleri tarafından sentezlenir. Testosteronun %5'i ise adrenal korteks tarafından üretilir. Testosteron biyosentezi, Leydig hücrelerinin akut veya kronik olarak bir hipofiz hormonu olan LH tarafından uyarılmasına bağlıdır (Stocco, 2000). LH ile uyarılan Leydig hücrelerinde testosteronun akut ve kronik düzenlenmesi şekil 2.1.3.1'de verilmiştir. Luteinizan hormon, Leydig hücrelerinin yüzeyinde bulunan özelleşmiş ve yüksek afinite gösteren reseptörüne bağlanır. LH'nın reseptörüne bağlanması, adenilat siklazın aktivasyonu ve ardından hücre içi ikincil haberci olan cAMP'nin üretiminin artmasıyla sonuçlanır. LH'nın akut ve kronik etkileri cAMP'deki artışla ilişkilidir (Hales, 2002). Hücre iskeleti elemanları ve steroid taşıyıcı protein gibi çeşitli faktörler serbest hücre içi kolesterolün dış mitokondriyal membrana aktarılmasında rol alır. Kolesterol, zarla sarılı olmayan lipit damlacıklarında gerektiğinde kullanılmak üzere depolanır. Akut yanıt hızlıdır ve kolesterolün, kolesterolden testostereona giden yolda ilk enzimin bulunduğu alan olan iç mitokondriyal membrana taşınmasını içerir.

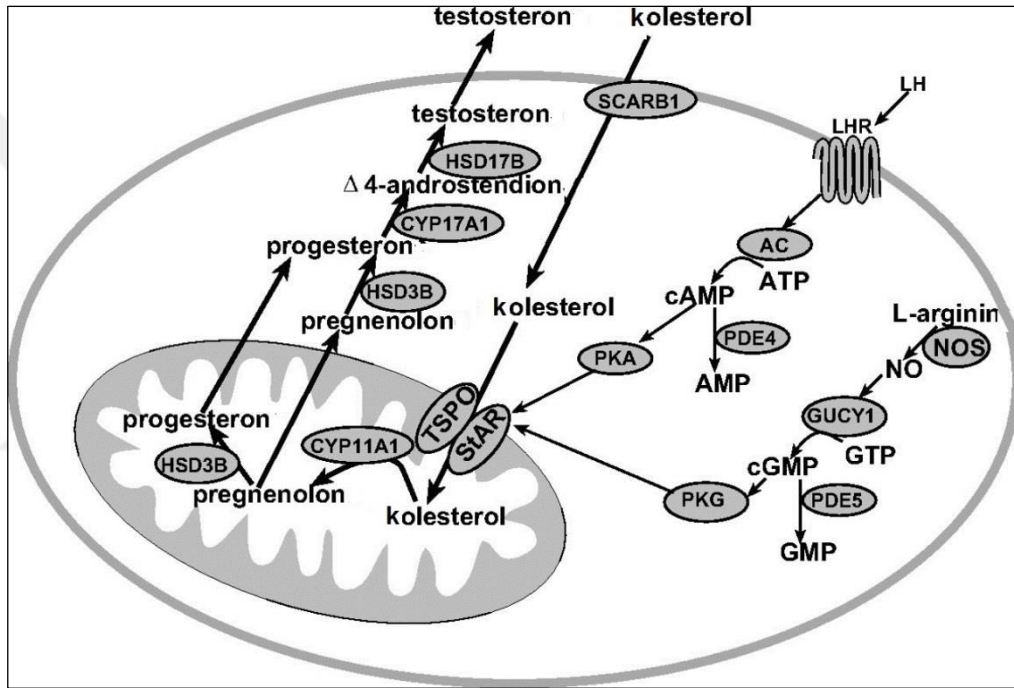
Kolesterolün mitokondirinin dış zarından iç zarına taşınmasında iki taşıyıcı protein vardır: 1- StAR, 2- Periferal-Tip Benzodiazepine Reseptör (Stocco, 2014).



Şekil 2.1.3.1: Testikular steroidogenezin LH aracılığıyla düzenlenmesi (Melmed ve Conn, 2007).

Leydig hücrelerinin LH veya cAMP tarafından kronik olarak uyarılması, kolesterolden testosteronun biyosentezi için gerekli enzimlerin en iyi şekilde ekspresyonunu gerektirir. Bu yolun ilk basamağı C27 kolesterolün C21 steroidine yani pregnenolona dönüştürülmesidir. Bu reaksiyon, sitokrom P450 enzimi olan kolesterol yan zincir kırıcı enzim (P450_{sc}) tarafından katalize edilir. Pregnenolon mitokondriyal membranlara

yayılr ve düz yüzlü endoplazmik retikulum ile ilişkili enzimler tarafından metabolize edilir. Pregnenolon 3 β -hidroksidehidrogenaz (3 β -HSD) enziminin etkisi ile progesteronu oluşturacağı yer olan düz yüzlü endoplazmik retikuluma geçer. Daha sonra progesteron 17 α -hidroksilaz/C17-20 liyaz (Cyp17a1) enzimi aracılığıyla önce 17 α -hidroksi progesterona arkasından da androstenediona dönüşür. Son basamakta androstenedion 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaz (17 β -HSD) enziminin etkisi ile testosteronu oluşturur (Hales, 2002). Leydig hücrelerinde gerçekleşen testosteron biyosentezinin şematik görüntüsü şekil 2.1.3.2’de verilmiştir.



Şekil 2.1.3.2: Leydig hücrelerinde testosteron biyosentezi (Stojkov ve diğ., 2013).

Testosteron biyosentezinde görevli enzimler iki büyük protein sınıfına ayrılabilir: sitokrom P450 heme içeren proteinler; CYP11A1 (P450_{scc}), CYP17A1 (P450_{c17}) ve P450_{arom} ve hidroksiteroid dehidrogenazlar; 3 β -hidroksiteroid dehidrogenaz (3 β -HSD) ve 17 β -hidroksiteroid Dehidrogenaz (17 β -HSD) (Sanderson, 2006). Leydig hücrelerinde bulunan steroidogenezi görevli enzimler tablo 2.1.3.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1.3.1: Leydig hücrelerinde steroidogenik enzimler (Payne, 2007).

| Gene | | Protein | | Hücre içi konumu | Sinonimi |
|---|----------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|-------------------------------------|
| İnsan | Fare | İnsan | Fare | | |
| Sitokrom p450 | | | | | |
| <i>CYP11A1</i> | <i>Cyp11a1</i> | CYP11A1 (56kd) | CYP11A1 (56kd) | Mitokondri | P450scc |
| <i>CYP17A1</i> | <i>Cyp17a1</i> | CYP17A1 (57kd) | Cyp17a1 (57kd) | Mikrozom | P450c17 17 α -Hidroksilaz |
| <i>CYP19A1</i> | <i>Cyp19a1</i> | CYP19A1 (58kd) | Cyp19a1 (58kd) | Mikrozom | Aromataz, P450arom |
| Hidroksisteroid Dehidrojenazlar | | | | | |
| <i>HSD3B1</i> | <i>Hsd3b6</i> | 3 β -HSDI (42 kd) | 3 β -HSD IV (42 kd) | Mikrozom | 3 β -HSD |
| <i>HSD3B2</i> | <i>Hsd3b2</i> | 3 β -HSDI (42 kd) | 3 β -HSD II (42 kd) | Mitokondri Mikrozom | 3 β -HSD |
| <i>HSD17B3</i> | <i>Hsd17b3</i> | 17 β -HSD3 (34,5 kd) | 17 β -HSD3 (34,5 kd) | Mikrozom | 17 β -HSD |
| Steroid 5α-redüktazlar | | | | | |
| <i>SRDA1</i> | <i>Srda1</i> | SRDA1 (29,5 kd) | SRDA1 (24,9 kd) | Mikrozom | 5 α -redüktaz |
| <i>SRDA2</i> | <i>Srda1</i> | SRDA2 (28,4 kd) | SRDA2 (24,9 kd) | Mikrozom | 5 α -redüktaz |

Gen ekspresyonunu kontrol eden mekanizmalar, sağlık ve hastalıkta birçok biyolojik sürecin temelini oluşturmaktadır. Bu mekanizmaları çözebilmek için, dokuya spesifik ve hormonal olarak düzenlenmiş gen ekspresyonunu yönlendiren transkripsiyon faktörlerinin anlaşılması gerekmektedir. Transkripsiyon faktörleri, gen üzerindeki ifadesini pozitif veya negatif düzenleyiciler olarak görev alarak, dokuya özgü gen ifadesini düzenleyen nüklear proteinlerdir (Tremblay, 2007). Ökaryotlarda yaklaşık 3000 transkripsiyon faktörü belirlenmiştir ve DNA bağlanma domainlerinin amino asit dizilimindeki benzerliklere dayalı olarak sınıflandırılmıştır. Transkripsiyon faktörleri, temel domainler, çinko bağımlı DNA bağlanma bölgesi olan domainler, sarmal-dönüş-sarmal ve β - scaffold olmak üzere dört temel alanda incelenir. Leydig hücrelerinde tanımlanan transkripsiyon faktörleri bağlı bulunduğu ailelerle birlikte tablo 2.1.3.2'de verilmiştir (Lacthman, 2008).

Tablo 2.1.3.2: Leydig hücrelerinde tanımlanan transkripsiyon faktörleri (Tremblay, 2007).

| Bağlı olduğu aile | Transkripsiyon faktörleri |
|---|---|
| Temel domainler | c-Jun, c-Fos, Fra-2, CREB CREB, CREM, C/EBP C/EBP- β , HLH Hairy SHARP-2, USF1, USF2, SREBP, Spz1, Ap-2 |
| Çinko bağımlı DNA bağlanma bölgesi olan domainler | GR, MR, AR, ER α and Er β , RAR α , RAR β , and RAR γ , RXR α , RXR β , and RXR γ , Nurr77 , (NGFI-B), Nurr1, SF-1 , LRH-1, PPAR α and PPAR β , TR4, COUP-TFI, GATA-4 , Sp1, Sp3, Egr-1 (NGFI-A), GIOT1, GIOT2 |
| Sarmal-dönüş-sarmal | Arx, Rhox4, Pbx1, Lhx9 |
| β - scaffold | NF- κ B, STAT5A, STAT5B, NF-Y |

Testis oluşumu, Leydig hücre gelişimi ve işlevi, organogenezin tüm yolları gibi, DNA'da kodlanmış transkripsiyonel bir ağa dayanır. Bu işlem, sinyal molekülleri, reseptörler ve transkripsiyon faktörleri gibi çeşitli etkenlerin birlikte çalışmasını gerektirir. Bahsedilen çeşitli ailelere ait birkaç transkripsiyon faktörü, testis oluşumu, Leydig hücresi gelişim ve fonksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Tremblay, 2007). Leydig hücrelerinde eksprese edildiği bilinen transkripsiyon faktörlerinin çoğu, bu hücrelerde eksprese edilen genlerin düzenleyici bölgelerinin analizleri ve özellikle testosteron sentezinde yer alan steroidogenik enzimleri kodlayan genlerin analizi ile tespit edilmiştir (Tremblay, 2007). Sf-1, Gata-4 ve Nur77 transkripsiyon faktörleri testosteron biyosentezi için steroidogenik yolda birden fazla geni kodlayan başlıca transkripsiyon faktörleridir (King ve LaVoie, 2012). Leydig hücrelerinde bulunan transkripsiyon faktörleri ve hedef genleri tablo 2.1.3.3'de verilmiştir.

Tablo 2.1.3.3: Leydig hücrelerinde bulunan transkripsiyon faktörleri ve hedef genleri (Tremblay, 2007).

| Tanskripsiyon Faktörleri | Hedef Genleri |
|---------------------------------|---|
| AP-2 | <i>mLH-R</i> |
| GATA-4 | <i>p, mStAR</i> <i>r, hCyp17</i> <i>hHSD3B2</i> <i>mSF-1</i> <i>mCyp19</i> |
| C/EBP β | <i>mStAR</i> |
| Sp1/Sp3 | <i>mLH-R</i> <i>m-Vascular endothelial growth factor</i> <i>mPBR</i> <i>r-Scavenger receptor class B type I</i> |
| SF-1 | <i>b, r, m, hStAR</i> <i>b, r, hP450scc</i> <i>b, r, hCyp17</i> <i>hHSD3B2</i> <i>r, hCyp19</i> <i>rLH-R</i> |
| LRH-1 | <i>r, hCyp19</i> <i>hStAR</i> <i>hHSD3B2</i> <i>hINSL3</i> <i>hP450scc</i> <i>hCyp17</i> |
| AP-1 (<i>c-Jun/c-Fos</i>) | <i>mStAR</i> |
| Nur77 | <i>hStAR</i> <i>hHSD3B2</i> <i>mHSD3B1</i> <i>rCyp17</i> <i>hINSL3</i> |
| SREBP | <i>rStAR</i> |
| CREB/CREM | <i>mStAR</i> |

Ad4BP veya NR5A1 olarak da bilinen steroidogenik faktör (SF) -1, steroidogenik enzimleri kodlayan birkaç genin temel düzenleyicisi olarak tanımlanan ilk transkripsiyon faktörüdür (Lala ve diğ., 1992; Honda ve diğ., 1993). SF-1, STAR, P450 yan zincir kırıcı enzim (P450_{scc}), 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (HSD), Cyp17, Cyp19, Luteinizan hormon reseptörü (LH-R), Müller inhibe edici faktör (MIF) Reseptör Tip II (RII), Vanin-1 ve İnsülin like faktör 3 (INSL)'ü içeren hedef genlerin promotör bölgesine bağlanır (Tremblay, 2007).

Önceki çalışmalar orfan nüklear reseptör SF-1'in yanı sıra Nur77'nin steroidogenik enzim genlerinin ekspresyonunu düzenlediğini öne sürmüştür (Mellon ve diğ., 1998; Parker ve Schimmer, 1997; Sadovsky ve Dorn, 2000; Zhang ve Mellon; 1996). NGFI-B, TR3 ve NAK-1 olarak da bilinen Nur77, orfan nüklear transkripsiyon faktörleri Nurr-1 ve NOR-1 içeren Nur77 gen ailesinin bir üyesidir. Bu faktörler, çinko parmak DNA bağlama domaininde yüksek derecede homologdur. Nur77 ailesi üyeleri, steroid 21 β -hidroksilaz, StAR, Hsd3b, P450c17 ve 20 α -hidroksisteroid dehidrogenazı kodlayan steroidogenik genleri düzenler (Stocco ve diğ., 2002; Wilson ve diğ., 1993; Zhang ve Mellon, 1997).

Transkripsiyon faktörü GATA-4, memeli testisindeki hücrelerin farklılaşması ve işlevinde rol oynamaktadır (Tevosian, 2014; Viger ve diğ., 2008). Fetal testis gelişimi sırasında GATA-4, Sertoli hücreleri, fetal Leydig hücreleri, fibroblast benzeri interstisyel hücreler ve peritubular miyoid hücrelerde ifade edilir (Bielinska ve diğ., 2007; Mazaud-Guittot ve diğ., 2014). Yetişkin testiste, GATA-4 Sertoli hücrelerinde, Leydig hücrelerinde ve Leydig kök hücrelerinde ifade edilir (Schrade ve diğ., 2015). Testiste yapılan destekleyici analizler ve ilgili çalışmalar, *Gata-4*'ün cinsiyet tayini (*Sry*, *Sox9*, *Dmrt1*), peptit hormonu üretimi (*Inha*, *Inhba*, *Amh*), gonadotropin sinyali verme (*Fshr*, *Lhcgr*), steroid sentezi (*Star*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1*) ve hücre-hücre etkileşimleri (*Clmp*, *Cldn11*, *Cx30.2*) ile ilişkili genler de dahil olmak üzere, birçok hedef gen grubu üzerinde rol oynadığını göstermiştir (Schrade ve diğ., 2015).

Dax-1 (X kromozomundaki konjenital kritik bölge, gen 1) nüklear reseptör ailesinin atipik bir üyesidir ve birtakım nüklear reseptörler üzerinde baskılayıcı olarak görev yapar. Dax-1 esas olarak adrenal korteks, yumurtalık ve Leydig hücreleri de dahil olmak üzere steroidogenik dokularda ifade edilmektedir (Lalli, 2014). Dax-1 transkripsiyon faktörü eksik olan farelerle yapılan çalışmalarda, *Dax-1* eksikliğinin farelerde germ hücrelerinin

kaybı, seminifer epitelin dejenerasyonu ile birlikte testiküler ve spermatogenik defektlere neden olduğu gözlenmiştir (Yu ve diğ., 1998). Dax-1'in *StAR*, *P450scc* ve *Hsd3b* ekspresyonunu baskılayarak steroid üretimini yüksek seviyelerde bloke ettiği gösterilmiştir (Lalli ve diğ., 1998).



2.2. FLORÜR

2.2.1. Florürün Genel Özellikleri

Flor elementi, ilk olarak 1886 yılında Joseph Henri Moisson tarafından, susuz hidrojen florür (HF) içinde potasyum biflorürün (KHF_2) elektrolizi ile az miktarda çok aktif bir gaz olarak elde edilmiştir. Flor, atmosferde normal şartlar altında, korozif, mat-yeşilimsi sarı renkte, keskin kokusu olan bir gazdır (WHO, 2000; Beyhan, 2003). Flor elementinin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri tablo 2.2.1.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.2.1.1: Flor elementinin bazı kimyasal ve fiziksel özellikleri (Beyhan, 2003).

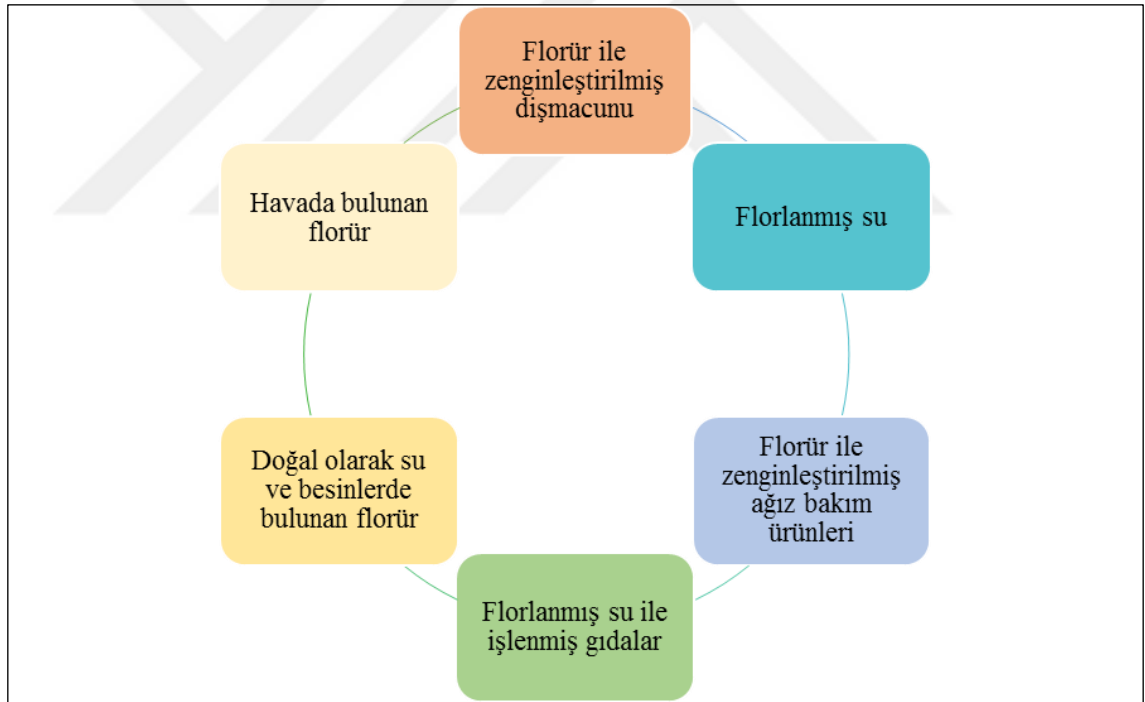
| | |
|--------------------------|--------------|
| Elementin Simgesi | F |
| Atom Numarası | 9 |
| Bağıl Atom Kütle | 18,9984 gram |
| Yoğunluk | 1,696 g/L |
| Kaynama Noktası | -188,13 °C |
| Erime Noktası | -219,61 °C |
| Molar Hacmi | 11,20 ml/mol |
| Özgül Isı | 0,824 j/gk |
| Isı İletkenliği | 0,0277 w/mk |

Flor elementi, diğer elementler içinde en fazla reaktif ve elektronegatiflik özelliğe sahip elementlerden biridir. Yeryüzünde en çok bulunan elementler arasında 13. sırada yer almaktadır. Çok uçucu bir element olduğu için yüksek sıcaklık şartları altında kolay taşınır. Flor elektronegatifliğinin yüksek olmasından dolayı doğada element olarak bulunmamaktadır. Flor, oksijen ve soy gazlar hariç tüm elementler ile basit florür bileşiklerini oluşturur ve birçok kompleks iyonlarda bulunur. Başlıca florür bileşikleri arasında; NaF , AlF_3 , CaF_2 , H_2F_2 , Na_2SiF_6 ve $(\text{NH}_4)_2\text{SiF}_6$ sayılabilir (Beyhan, 2003; WHO, 2003). İnorganik flor bileşikleri geniş amaçlar için kullanılırlar. Florür, çok sayıda ticari kimyasal üretiminde, cama etki eden tek bileşik olduğundan cam yüzeylerin aşındırma işleminde, yarı iletken özelliğe sahip ürünlerin üretiminde, buzdolabı, klimalarda ve deodorantlarda kullanılır (Küçükırmak, 2007). Yine florür kullanılmıyyla, çelik üretimi sırasında, demire eklenilmesi sonucunda ergime kolaylaştırılır ve istenmeyen maddelerin artık içinde kalması sağlanır. Florür, fosfatlı gübreler (ortalama %3,8 flor içeren), tuğla,

fayans ve seramik üretimi sırasında çevreye de salınabilir. Ayrıca, belediyelerin su fluoridasyon işlemlerinde florosilik asit, sodyum heksaflorosilikat ve sodyum florür kullanılmaktadır (IARC, 1982; IPCS, 2002).

2.2.2. Florüre Maruz Kalma Yolları

Florürün kullanıldığı alüminyum endüstrisi, çelik üretimi, fosfatlı gübre üretimi, cam işleme ve yağ rafineleri, kömür yakma enerji tesisleri gibi alanlarda çalışan insanlar mesleki maruziyetle yüksek florür düzeyleriyle karşı karşıya kalırlar (WHO, 2000). Bunun yanı sıra insanlar florüre hava, besin, su ve dental ürünlerin kullanımıyla da maruz kalırlar. İnsanların maruz kaldığı florür kaynakları şekil 2.2.2.1’de verilmiştir. Florür maruziyetinin yaklaşık olarak %80-85’i yiyeceklerden, %5’i içme sularından, %1-2’lik kısmı havadan, %10-15’lik kısmı ise diş ürünlerinden kaynaklanmaktadır (Dursun ve diğ., 2005).



Şekil.2.2.2.1: İnsanların maruz kaldığı florür kaynakları.

Hava yoluyla: Kömürün yanması ve volkanik aktiviteler sonucu oluşan küllerin, endüstriyel üretimler sonucu açığa çıkan gazların rüzgar yoluyla dağılması sonucu atmosfer florür bakımından yüksek oranda kirlenir. Endüstriyel olmayan alanlarda ise, hava florür konsantrasyonu genellikle oldukça düşüktür. Florür içeren kömürün yakıldığı

veya fosfatlı gübrelerin üretildiği ve kullanıldığı alanlarda havadaki florür konsantrasyonu yükselir ve solunum yolu ile maruziyetin artmasına neden olur (WHO, 2000).

Besin yoluyla: Genellikle sebze ve meyvelerin florür düzeyleri düşüktür. Ancak arpa, pirinç, patates gibi çok tüketilen besinlerin florür düzeylerinin normalin üzerinde olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda deniz ürünleri, çay, süt ve süt ürünleri de florür düzeyi yüksek besinler arasında yer alır. Gıdalardaki florür içeriği aynı zamanda gıdanın hazırlanmasında kullanılan malzemelere de bağlıdır. Örneğin, teflon tencere kaplamaları, büyük oranda florür içermektedir (Peckham ve Awofeso, 2014). Beslenmede florür alımında en önemli faktörlerden biri de, florlanmış su, tuz ve sütlerdir. Florürlü tuz, 1955 yılından beri Almanya, Fransa ve İsviçre'de yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüzde pazarlanan tuzun %30 ile 80'i florülemeye tabi tutulmuştur. Tuz genellikle 250 ppm florür içerirken, süt ve süt ürünleri 2,5 ppm'den 5 ppm'e kadar florür içerir. Tablo 2.2.2.1, farklı yiyecek türlerinde florürün ortalama konsantrasyonlarını göstermektedir (Kanduti ve diğ., 2016).

Tablo 2.2.2.2: Farklı yiyecek türlerinde florür konsantrasyonları (Kanduti ve diğ., 2016).

| Yiyecek türü | F' konsantrasyonları |
|------------------------|----------------------|
| Siyah çay | 3-5 ppm |
| Kabuklu deniz ürünleri | 2-3 ppm |
| Şarap | 1-2 ppm |
| Yeşil çay | 1,2 ppm |
| Patates cipsi | 0,7 ppm |
| Ekmek | 0,39 ppm |
| Tavuk eti | 0,15 ppm |
| Makarna | 0,07 ppm |
| Elma | 0,03 ppm |
| Süt | 0,03 ppm |
| Havuç | 0,02 ppm |

Su yoluyla: 1945'ten bu yana içme sularına florür ilavesi yapılmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün belirlemiş olduğu yaklaşık olarak insanların 1,5 mg/L'lik doğal florür ihtiyacı tek başına içme suyu vasıtasıyla karşılanmaktadır (WHO, 2000). İçme sularında

bulunması gereken florür konsantrasyonu için ulusal ve uluslararası değerleri tablo 2.2.2.2'de verilmiştir.

Tablo 2.2.2.2: İçme sularında florür konsantrasyonu için ulusal ve uluslararası değerler (Avcı ve diğ., 2009; İski, 2004).

| Ulusal/Uluslararası değerler | Florür mg/L (ppm) |
|------------------------------|-------------------|
| Türk Standartları Enstitüsü | |
| TSE 266 (1997) | 1,5 |
| Dünya Sağlık Örgütü | |
| WHO (1999) | 1,5 |
| ABD Çevre Koruma Ajansı | |
| EPA (2002) | 0,7-2,4 |
| Avrupa Birliği | |
| EC (1998) | 1,5 |

Yüzey sularının flor iyon yoğunluğu ortalama 0,01-0,3 ppm (mg/L) arasındadır. Yeraltı sularında, flor iyonuna 1 ppm'den az olan konsantrasyonlardan 100 ppm konsantrasyonlara kadar rastlanmıştır. Birçok su kaynağında eser miktarda florür bulunmakla birlikte yeraltı kaynaklarında yüksek konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. Yağmur suyu 0.01 ppm civarında florür içerirken, deniz suyunda florür konsantrasyonu 1.3 ppm, florür içeren minerallerce zengin bölgelerde 10 ppm, en yüksek seviyenin ise 2800 ppm olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. (Chapman, 1996; WHO, 2003).

Dental ürünler yoluyla: Florürlü diş macunları, diş tozları, gargaralar ve diğer diş bakım ürünleri kullanımı da insanların günlük flor alımına katkı sağlamaktadır (Kanduti ve diğ., 2016).

2.2.3. Florürün Metabolizması

İnsanlarda ve hayvanlarda hava yoluyla maruz kalınan florür, hidroflorik asit olarak deri aracılığıyla emilir. Bu emilen florür kan aracılığıyla tüm vücuda hızlıca yayılır. Florürün suda çözünmeyen ya da kalsiyum klorür, kriyolit gibi suda az çözünen formları daha az emilirken, sodyum florür gibi suda iyi çözünen formları tüm vücut sistemlerince hızlıca emilir. Oral yolla alınan florürün ise yaklaşık %75-90'ı emilir. Emilimin yarılanama ömrü 30 dakika olduğundan, plazmada florür konsantrasyonu 30-60 dakika içinde en

yüksek seviyesine ulaşır. Mide tarafından florürün emilimi ise pH ile ters orantılı bir pasif difüzyon yoluyla olur, sonraki adımda ince bağırsaktan hızla yayılır. Florür yumuşak dokuda birikmez, hidrojen florür olarak yumuşak dokunun hücre içi sıvısına giriş yapar. Yumuşak dokuda florür konsantrasyonu kan tarafından düzenlenir. Florür böbrek tübüllerinde plazmadan daha yüksek konsantrasyonda bulunur. Bu yüzden yüksek florür konsantrasyonlarına maruz kalındığında böbrekler kronik florür toksisitesinin hedef ve potansiyel bölgesi olabilir (Ayoob ve Gupta, 2006; Fawell ve Nieuwenhuijsen, 2003; Whitford, 1997).

Gastrointestinal kanaldan veya akciğerlerden alınan florürün %90'ı albumine bağlı olarak kan dolaşımında bulunurken, %10'u ise biyolojik olarak aktif iyonize formdadır ve bu iyonize haldeki flor önemli hasarlara yol açar. Emilen florürün yaklaşık olarak yarısı gelişmekte olan kemik ve dişlerin yapısına katılırken, kalan kısmı idrarla vücuttan atılır. İdrarda pH'nın değişmesi flor mekanizmasını değiştirebilmekte, idrarı asidik yapan etkenler vücutta flor tutulumunu artırırken, bazik yapan etkenler flor atılımını hızlandırmaktadır (Angmar ve Whitford, 1990; Whitford ve Ekstrand, 1990; WHO, 2004).

2.2.4. Florür Toksisitesi

Son yıllarda insanlar üzerinde yapılan araştırmalarda, dünyada Türkiye'nin de arasında bulunduğu Hindistan başta olmak üzere Libya, Mısır, Irak, Arjantin, Meksika, Avustralya, Yeni Zelanda, Japonya gibi 25'ten fazla ülkede florürden kaynaklanan rahatsızlıkların gözlendiği rapor edilmektedir. Bu hastalıklardan etkilenen insanların sayısı tam olarak bilinmemekle birlikte, sayının 10 milyonlar seviyesinde olduğu tahmin edilmektedir (WHO, 2006). Yapılan çeşitli klinik araştırmalar ve hayvan deneyleri florürün aşırı mide bulantısı, kusma, tükürük salgısının artması, karın ağrısı, ishal ve bu belirtiler sonucu kardiyak aritmiler ve koma gibi akut; diş ve iskelet florozisi, renal etkiler gibi kronik etkilerinin yanı sıra karsinogenik ve genotoksik etkileri olduğu da bilinmektedir (Kaminsky ve diğ., 1990).

Florür, hücrelerde mikromolar konsantrasyonlarda etkin bir anabolik ajan olarak görev alırken, milimolar konsantrasyonlarda birçok hasara yol açabilir. Bu etkileri kolinesteraz, glutamin sentetaz, katalaz, alkalın fosfataz, fosforilaz, asit fosfotaz, pirofosfataz, akonitaz, esteraz, kreatin fosfokinaz, adenil siklaz, sitokrom c, laktat dehidrogenaz ve

karboksilaz gibi birçok hücrel enzimlerin aktivitelerini değiştirerek, hatta enzim inhibitörü gibi davranarak gösterir (Adamek, 2005; Mendoza-Schultz ve diğ., 2009). Florürün, birçok dokuda metabolik, fonksiyonel ve yapısal hasara yol açtığı bildirilmiştir. Araştırma verileri florürün, protein sekresyon ve/veya sentezini inhibe ettiğini, mitojen-aktive protein kinaz (MAPK), p53, aktivatör protein-1 (AP-1), nüklear faktör kappa B (NF- κ B) dahil apoptoz ve proliferasyon gibi farklı sinyal yolaklarını etkilediğini ortaya koymuştur (Karube ve diğ., 2009; Zhang ve diğ., 2007).

Florür toksisitesinin moleküler mekanizmasına bakıldığında bu etkilerini, gen ekspresyonunu, hücre döngüsünü, hücre çoğalmasını ve göçünü, solunum, metabolizma, iyon taşınması, salgı, endositoz, apoptoz/nekroz ve oksidatif stres gibi hücrel süreçlerde ve bu mekanizmaların sinyal yolaklarında çok çeşitli etkilere sebep olarak gösterdiği saptanmıştır (Barbier ve diğ., 2010).

2.2.5. Florürün Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkileri

Florür ile üreme sistemleri arasındaki ilişki ilk kez 1973 yılında Messer ve diğerleri tarafından bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada, florürün üremede önemli bir rol oynadığını ve eksikliğinin dişi farelerde doğurganlık oranlarını düşürdüğünü saptamışlardır. Ayrıca düşük üreme kapasiteli farelerin, yüksek florür konsantrasyonlarına maruz bırakıldığında üreme kapasitelerini geliştirdiklerini göstermişlerdir (Messer ve diğ., 1974). Günümüzde yapılan çeşitli klinik araştırmalar ve hayvan deneyleri florürün yapısal ve fonksiyonel sperm kusurları, sperm sayısında azalma, üreme hormon düzeylerinde bozukluklar, epididimis ve yardımcı üreme bezlerinde değişimler ve kısırlık gibi erkek üreme fonksiyonları üzerinde olumsuz etkileri olduğunu göstermektedir (Chinoy ve Sequeira, 1989; Chinoy ve diğ., 1995; Chinoy ve diğ., 1997; Ghosh ve diğ., 2002; Kumar ve Susheela, 1994; Kumar ve Susheela, 1995; Ortiz-Perez ve diğ., 2003; Pushpalatha ve diğ., 2005). Florürün sperm fonksiyonunu, morfolojisini, motilitesini, kapasitasyonunu ve akrozom reaksiyonu dahil tüm döllenme için anahtar süreçleri olumsuz etkilediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Chinoy diğ., 1994; Dvora'kova'-Hortova' diğ., 2008; Elbetieha diğ., 2000; Izquierdo-Vega diğ., 2008; Kwon ve diğ., 2014; Pushpalatha diğ., 2005; Rahman ve diğ., 2013; Spittle, 2009; Sun diğ., 2010).

Solanki ve diğerlerinin (2008) sıçanların içme suyuyla florüre 270 gün maruz bırakıldıktan sonra testiste yüksek oranda histopatolojik değişiklikler bildirmiştir. Tavşanlarda yapılan elektron mikroskobu çalışmaları, testisin florür maruziyeti ile yapısal bütünlüğünde spermatogenezi etkileyen değişiklikler olduğunu göstermiştir (Susheela ve Kumar, 1991). Zhang ve diğerlerinin (2006), florür uygulanan sıçanların testislerinde seminifer tübüllerde atrofi ve nekrozun arttığını, spermatozoidlerin farklılaşması ve olgunlaşmasında dejeneratif değişiklikler olduğunu göstermişlerdir (Zhang ve diğ., 2006). Erkek sıçanlarla yapılan bir çalışmada, 100 mg NaF'ın, sperm motilitesini ve serum testosteron seviyelerini düşürdüğü spermden yoksun seminifer tübüllere neden olduğu ve tübüllerin epitel hücre yüksekliğinde azalmaya neden olduğu bulunmuştur (Rao ve Bhatt, 2012). NaF (10 mg/kg) uygulanmış farelerde yapılan bir diğer çalışmada, prostat bezinin fonksiyonu için bir işaretleyici enzim olan siyalik asitte bir düşüş olduğu bulunarak, prostat metabolizmasında florüre bağlı değişiklikler ortaya konmuştur (Chinoy ve diğ., 1994; 2005) Sharma ve diğerlerinin (2008), sıçanlarda florür uyguladığında, seminal vezikül ağırlığında belirgin bir azalma olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca yapılan başka bir çalışma, sodyum florürün seminal veziküllerdeki fruktoz konsantrasyonunu düşürdüğünü ve yardımcı üreme bezlerinin işlevini de etkilediğini göstermiştir (Chinoy ve Sharma, 1998).

Testikuler androjen ve normal spermatogenez sürecinde testosteron, folikül stimüle edici hormon ve luteinizan hormon dahil olmak üzere çeşitli üreme hormonları gereklidir. Florür erkek üreme sisteminde rol alan birçok hormona da zarar verir. Yapılan araştırmalarda florürün artan folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH), azalan östrojen, testosteron ve tiroid hormon düzeyleri, dengesiz androjen/östrojen oranı ve bunların reseptör oranları üzerindeki etkileri açığa çıkarılmıştır (Bobek ve diğ., 1976; Chinoy ve diğ., 1992; Jiang ve diğ., 2005; Ortiz-Perez ve diğ., 2003; Tokar ve Savchenko, 1977). Zhou ve diğerlerinin yaptıkları bir çalışmada, florür uygulanan sıçanlarda FSH, LH, T, progesteron (P) ve östradiol (E2) hormon seviyelerinin önemli ölçüde düştüğünü göstermişlerdir (Ghosh ve diğ., 2002; Sarkar ve diğ., 2006; Zhou ve diğ., 2013). Florür steroidogenezi etkileyerek testosteron düzeylerinin azalmasına yol açar. Bu etkiyi steroidogeneze önemli enzimler olan 3β -hidroksisteroid dehidrogenaz (3β -HSD) ve 17β -hidroksisteroid dehidrogenaz (17β -HSD) aktivite düzeylerini azaltarak

meydana getirir (Ghosh ve diğ., 2002; Narayana ve Chinoy, 1994; Pushpalatha ve diğ., 2005; Sarkar ve diğ., 2006).



3. MALZEME VE YÖNTEM

Bu çalışmada, florür farklı süre ve konsantrasyonlarda TM3 Leydig hücre soyuna uygulanmıştır. TM3 Leydig hücreleri kontrol ve deney grupları olmak üzere gruplara ayrılarak, kontrol grubunda bulunan hücreler sadece hücre büyüme medyumuna ile, deney grubunda bulunan hücreler hücre büyüme medyumuna sodyum florürün farklı konsantrasyonlarının ilavesiyle 24 saat muamele edilmiştir. İnkübasyondan sonra, florür toksisitesini belirlemek amacıyla, hücre canlılık testi için MTT yöntemi, DNA sentez fazındaki hücreleri işaretlemek için BrdU yöntemi, hücre içi sitotoksiteyi belirlemek için LDH yöntemi kullanılmış olup yine florür uygulaması sonucunda hücrelerde bulunan cAMP ve testosteron miktarı tayini yapılmıştır. Sodyum florür ile muamele edilen hücrelerde stereoidogenik yolakta önemli rol oynayan bazı gen ve reseptörlerin anlatım miktarları RT-PCR analizi ile protein miktarları da Western blotlama yöntemi ile ölçülmüştür.

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

3.1.1. Kullanılan Hücre Soy

Deneyde kullanılan TM3 hücre soyu 11-13 günlük farelerin Leydig hücrelerinden elde edilmiş tümorogenik olmayan bir hücre soyudur. Genç BALB/c farelerinin testis dokusundan izole edilmiş olan bu hücreler, morfolojilerine göre karakterize edilmiş olup, hormonlara yanıt verme ve steroidleri metabolize etme yeteneğine sahiptir. TM3 Leydig hücre soyu, luteinizan hormon reseptörü, (LH-R), epidermal büyüme faktörü (EGF), androjen, östrojen ve progesteron reseptörlerine sahiptir. Ayrıca, bu hücre soyu cAMP üretimindeki bir artışla birlikte luteinizan hormona cevap verir ve luteinizan hormon varlığında kolesterolü metabolize edebilmektedir. Leydig hücre soyu laboratuvarımıza ATCC (American Type Culture Collection): The Global Bioresource Center'dan getirilmiş olup *in vitro* koşullarda yetiştirilmektedir.

3.1.2. Hücre Kültür Medyumunun Hazırlanışı

- %5 At Serumu,
- %2.5 Föetal Sığır Serumu,
- 2.5 mM L-Glutamin,
- 0.5 mM Sodyum Pirüvat,
- 1.2 g/L Sodyum Bikarbonat,
- 15 mM HEPES
- %1 PSA (Penisilin-Streptomisin-Amfoterin) ilave edilmiş 50:50 DMEM-F12 (Dulbecco'nun Modifiye edilmiş Eagle Medyumu, besleyici karışım F12 Ham medyumu) kullanıma hazır hücre kültür medyumu elde edilmiştir.

3.1.3. Hücre İnkübasyon Koşulları

Hazırlanan kültür medyumu içerisinde %5 CO₂ ve %95 hava içeren 37 °C sıcaklıktaki etüvde (Thermo marka) 75 cm²'lik kültür kaplarında steril şartlarda inkübe edilerek hücrelerin çoğalması sağlanmıştır.

3.1.4. Hücrelerin Pasajlanması

Deneylerde kullanılan hücreler, yetiştirildikleri kültür kapları içinde yeterli yoğunluğa (%70-80 yoğunluk) eriştiklerinde haftada iki-üç defa düzenli pasajları yapılmaktadır. Kültür kabından kültür medyumu uzaklaştırıldıktan sonra, hücreler %0,25 tripsin-0.53mM EDTA ile 37°C'de 3 dakika muamele edilir ve pipetaj işlemiyle toplanarak santrifüj tüpüne aktarılır. 1500 g'de 5 dakika oda ısısında santrifüj edildikten sonra, süpernatant atılır. Tüpte dipte kalan hücre çökeltisi üzerine uygun kültür medyumu ilave edilerek, pasajlanan hücreler 37 °C' de %5 CO₂'li etüvde inkübe edilir.

3.1.5. Hücrelerin Dondurulması ve Saklanması

Hücrelerde yapılan pasaj işleminden sonra hücre çökeltisi üzerine tekrar medyum ilave edilir ve pipetajla hücreler tek hücre süspansiyonu haline getirilir. Hemositometrede hücre sayımı yapılır ve dondurma tüpü başına 2,5x10⁶ hücre olacak şekilde saklanır. Hücre süspansiyonu, %95 kültür medyumu ve %5 DMSO içeren oranda dondurma tüplerine aktarılır. Dondurma tüpleri 1 gece -20 °C'de, 1 gece -80 °C'de bekletildikten sonra gerektiğinde tekrar kullanılmak üzere sıvı azot tankına alınır.

3.2. FLORÜR KONSANTRASYONLARININ HAZIRLANMASI

Florürün TM3 Leydig hücre soyu üzerine uygulanan konsantrasyonları, canlıların florüre maruz kaldıkları konsantrasyonlar ve çeşitli hücre soylarında yapılan *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda kullanılan konsantrasyonlar ele alınarak saptanmıştır. Florür %1 at serumu içeren kültür medyumunda 0,01 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm ve 200 ppm olacak şekilde 10 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır ve kontrol grubuna ise %1'lik at serumu içeren kültür medyumunu uygulanmıştır. Hazırlanan kontrol grubu ve florür grupları medyumları 0,2 µM çaplı porlara sahip enjeksiyon filtrelerinden geçirelerek steril edilmiştir. Tüm deneylerde, kontrol ve florür gruplarına 100 ng/ml olacak şekilde luteinizan hormon ilave edilerek hücrelere uyarım yapılmıştır (Adedara ve diğ., 2014).

3.3. MTT HÜCRE CANLILIĞI TESTİ

Hücre canlılığının belirlenmesinde, kolorimetrik ölçümüne dayanan hücre çoğalma miktarının tespit edildiği 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) testi kullanılmıştır [Cell Proliferation Kit I (MTT) Roche-Germany]. Test, sarı tetrazolyum tuzu olan MTT'nin metabolik olarak aktif hücreler tarafından mor formazan kristallerine dönüşmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan bu formazan kristalleri çözünür hale getirilir ve elde edilen renkli çözelti spektrofotometre kullanılarak hücrelerin optik yoğunluklarına göre absorbans vermesiyle ölçülür. Bu yöntemle kullanılacak olan herhangi bir toksik maddenin hücre üzerindeki sitotoksik ya da çoğalma üzerine etkileri belirlenebilmektedir.

Uygun koşullarda çoğalmaya bırakılan hücreler kültür kabının yüzeyini %70 oranında kapladıkları zaman Tripsin-EDTA ile muamele edilerek kültür kabının tabanından kaldırılmıştır. Pipetaj yardımıyla tek hücre süspansiyonu haline getirilen hücreler, Thoma lamı yardımıyla 3 kez sayılarak MTT hücre canlılık testi için 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekilmiştir. %1 at serumu içeren medyumda hazırlanmış florürün 10 farklı konsantrasyonu (0,01 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm ve 200 ppm), 6, 12, 24, 48 ve 72 saat uygulanarak 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla, her bir kuyucuğa 10 µl MTT I solüsyonu eklenmiştir ve kültür kapları MTT boyasının suda çözünmeyen formazan kristalleri haline dönüştürülebilmesi için 4 saat 37°C'de CO₂'li

etüvde inkübe edilmiştir. Canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristallerinin çözülmesi için her bir kuyucuğa 100 µl MTT II solüsyonu (SDS) eklenmiş ve bir gece boyunca CO₂ inkübatöründe bırakılmıştır. Bu süre sonunda hücrelerin optik yoğunlukları ELISA cihazında 540 nm dalga boyunda okutulmuştur. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol hücre canlılığı %100 olarak kabul edilerek, deney hücrelerinin canlılık oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test istatistik hesaplamalar için 3 kez tekrar edilmiştir.

3.4. BROMODEOKSİURİDİN (BrdU) YÖNTEMİ

The Cell Proliferation ELISA, BrdU (5-bromo-2'-deoxy-uridine) DNA sentezini belirlemek için kullanılan testlerden biridir. Bu test çoğalan hücrelerin genomik DNA'larına eklenmiş olan BrdU'nun bulunması esasına dayanır. Pasaj işleminden sonra, 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 5000 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. %1 at serumu içeren medyumda hazırlanmış florürün 10 farklı konsantrasyonu (0,01 ppm, 0,05 ppm, 0,1 ppm, 0,5 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm ve 200 ppm) 24 saat uygulanarak 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Deney sürelerinin tamamlanmasıyla büyüyen hücreler 24 saat süreyle BrdU işaretleme solüsyonunun eklenmesi ile işaretlenmiştir. Bu işaretleme süresinde BrdU, bölünen hücrelerin DNA'sında timidinin yerine geçerek yerleşir. İşaretleme medyumunu uzaklaştırdıktan sonra, hücreler FixDenat ilavesi ile denatüre edilmiştir. FixDenat'ın uzaklaştırılmasından sonra anti BrdU-POD eklenmiş ve bu BrdU'yu yeni sentezlenen hücre DNA'ya bağlanmıştır. Oluşan immün kompleks, substrat reaksiyonu sonucu ile belirlenmiştir. Reaksiyon ürünleri, spektrofotometrede absorbansın 450nm dalga boyunda ölçülmesi ile hesaplanmıştır. Test maddesi ile muamele edilmeyen kontrol grubundaki hücre çoğalması %100 kabul edilerek, deney gruplarının çoğalma oranları yüzde olarak ifade edilmiştir. Bu test istatistik hesaplamalar için 3 kez tekrar edilmiştir.

3.5. LAKTAT DEHİDROGENAZ (LDH) YÖNTEMİ

LDH hücre sitoplazmasında bulunan bir enzimdir. Hücre içi bir enzim olan LDH, hücre zarı parçalandığında hücre içinden dış ortama geçer. Kültürde hücrelerin ölümü ya da plazma zarındaki hasar LDH enzim aktivitesinin artışına yol açmaktadır. İlk basamakta LDH laktatı piruvata çevirmektedir. Bu dönüşümle NAD⁺, NADH/H⁺'ya indirgenmektedir. İkinci basamakta katalizör madde NADH/H⁺ dan H/H⁺ bir

tetrazolyum tuzunun kırmızı renkli formazan ürününe dönüşümünü gerçekleştirir. Oluşan renk miktarı, hücre zarındaki hasarın derecesiyle orantılıdır.

Pasaj işlemi sonucunda, 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. %1 at serumu içeren medyumda hazırlanmış florürün dört farklı konsantrasyonu (0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm ve 100 ppm) 24 saat uygulanarak 37°C 'de CO_2 'li etüvde inkübe edilmiştir. Deney süresinin tamamlanmasıyla boya ve enzim solüsyonlarından oluşturulan kit karışımı her kuyuya 100 μl olmak üzere eklenmiştir. 30 dakikalık inkübasyonun ardından oluşan sitotoksitesiye göre kırmızı formazan ürününün artan renginin 492 nm dalga boyunda spektrofotometrede verdiği absorbansın ölçülmesi ile sonuçlar elde edilmiştir. Absorbans değerleri elde edildikten sonra oluşan toksisite yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Bu test istatistik hesaplamalar için 3 kez tekrar edilmiştir.

$$\text{Sitotoksite (\%)} = \frac{\text{Deney absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol değeri (bazal LDH salınımı)}}{\text{Total LDH salınımına ait absorbans değeri} - \text{Negatif kontrol}} \times 100$$

3.6. SERBEST TESTOSTERON MİKTARININ BELİRLENMESİ

Hücre kültürü süpernatandındaki total testosteron miktarı, kompetitif immunoenzimatik renk ölçüm metodu ile belirlenmiştir. Total testosteron tayini, MyBioSource Rat Free Testosterone Elisa Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sırasında kullanılan kültür kaplarının kuyuları Keçi-anti-tavşan antikoru ile kaplıdır. Standart veya örnekler testosterona ve testosteron ile işaretlenmiş Horseradish peroksidaz (HRP) konjugatına spesifik antikorla kuyulara uygun şekilde eklenir ve inkübasyona bırakılır. Kompetitif inhibisyon reaksiyonu, HRP işaretli ve işaretli testosteron ile antikor arasında gerçekleşir.

Deneye başlamadan önce kullanılacak olan tüm solüsyonların oda ısısına getirilmesi sağlanmıştır. Florürün dört farklı konsantrasyonunu (0,1 – 1 – 10 – 100 ppm) içeren deney medyumları ile 24 saat süreyle 37°C 'de CO_2 'li inkübatörde inkübe edilen hücrelerin üzerinden medyumlar pipet ile çekilip santrifüj tüplerine aktarılmıştır. 15 dakika boyunca 1000 g'de santrifüj edildikten sonra süpernatant hızlıca toplanmış ve kültür kaplarına her

kuyuda 50µl olacak şekilde aktarılmıştır. Blank (kör) kuyusu hariç tüm kuyulara 50 µl HRP konjugat ve 50 µl antikor eklendikten sonra 37°C'de 1 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra her kuyu 200 µl Wash Buffer ile iki kere yıkanmıştır ve sıvı kalmadığından emin olmak için kültür kabı ters çevrilerek temiz bir peçeteye hafifçe vurulmuştur. Tüm kuyulara önce 50 µl Substrat A, arkasından 50 µl Substrat B eklenip renk değişimi kontrol edilerek 37°C'de karanlıkta 15dk süreyle inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için tüm kuyulara 50 µl Stop Solution eklenmiştir ve örneklerde oluşan optik yoğunluk 10 dakika içinde 540 nm dalga boyunda ELISA cihazında okunmuştur. Konsantrasyon değerleri standart grafiği oluşturularak belirlenmiştir. Bu test her gruptaki örnekler için üç kez tekrarlanmıştır.

3.7. SİKLİK ADENOZİN MONOFOSFAT (cAMP) DÜZEYLERİNİN BELİRLENMESİ

Adenozin 3', 5'-siklik monofosfat (siklik AMP; cAMP), fizyolojik süreçlerin düzenleyicisi olarak işlev gören en önemli "ikincil haberci" lerden biridir. cAMP aynı zamanda nöronal, glandüler, kardiyovasküler, bağışıklık ve diğer işlevlerin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Birçok hormon ATP'yi cAMP'ye dönüştüren enzim olan adenilat siklaz yoluyla cAMP'yi aktive eder. Bu hormonlar, kortikotropin (ACTH), glukagon, kalsitonin, tiroid uyarıcı hormon (TSH) ve luteinizan hormon (LH) gibi ön hipofizin çeşitli peptid hormonlarını içerir. cAMP, kardiyovasküler sistemde, sinir sisteminde, bağışıklık mekanizmalarında, hücre büyümesinde, hücre farklılaşmasında ve genel metabolizma üzerinde büyük rol oynadığından, dokularda ve hücre kültürlerinde hücre içi cAMP ölçümünün önemli yeri vardır. cAMP düzeylerinin belirlenmesi, birçok hastalık durumunun fizyolojisi ve patolojisini daha net anlamak için yardımcı olabilir.

Hücre kültürü süpernatandındaki ekstraselüler cAMP düzeyleri, *in vitro* kompetitif immunoenzimatik renk ölçüm metodu ile belirlenmiştir. Ekstraselüler cAMP düzeyleri, ABCAM Cyclic AMP Elisa Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Pasaj işlemi sonucunda, 96 kuyulu kültür kaplarına kuyu başına 10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. %1 at serumu içeren medyumda hazırlanmış florürün dört farklı konsantrasyonu (0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm ve 100 ppm) 24 saat uygulanarak 37°C'de CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Deney süresinin tamamlanmasıyla alınan örnekler ve hazırlanan standartlar, önceden keçi-anti-tavşan antikoruna ile kaplı olan kültür kaplarına konulmuştur. Standart ve örnekler

alkalin fosfotaz (AP) konjuge edilmiş cAMP antijeni ve cAMP'ye özgü bir poliklonal tavşan antikoru ile muamele edilmiştir. Daha sonra, iki saat oda ısısında çalkalayıcıda (500 rpm'de) inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra kültür kaplarının kuyuları fazla reaktiflerden arındırılmak için yıkama solüsyonuyla üç defa yıkanmış ve p-nitrofenil fosfat (pNpp) substratı ilave edilmiştir. Yine bir saatlik oda ısısında yapılan inkübasyondan sonra enzim reaksiyonu durdurulmuş ve üretilen sarı renk 405 nm'de spektrofotometre cihazında okunmuştur. Oluşan sarı rengin yoğunluğu ölçülen süpernatantta yakalanan cAMP miktarı ile ters orantılıdır. Konsantrasyon değerleri standart grafiği oluşturularak belirlenmiştir. Bu test her gruptaki örnekler için üç kez tekrarlanmıştır.

3.8. GERÇEK ZAMANLI POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (RT-PCR) İNCELEMELERİ

3.8.1. Total RNA izolasyonu

Hücre kültürü ortamında florürün dört farklı konsantrasyonuna (0,1 – 1 – 10 – 100 ppm) 24 saat boyunca maruz bırakılmış hücrelerden total RNA izolasyonu, QIAGEN RNeasy Mini Kit kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kit slika temelli seçici bağlanma özelliklerine sahip membranı hızlı mikrosipin teknolojisiyle birlikte kullanarak yüksek kalitede RNA saflaştırılmasını sağlar.

Deneye başlamadan önce kullanılacak olan tüm solüsyonların oda ısısına getirilmesi sağlanmıştır. Altı kuyulu hücre kültür kaplarında florür içeren deney medyumları ile 24 saat süreyle 37°C'de CO₂'li inkübatörde inkübe edilen hücrelerin üzerinden medyum çekilip atılır. Hücrelerin yapıştıkları zeminden kalkmaları için tripsin ile muamele edilir. Kalkan hücrelerin üzerine medyum eklenir ve RNase-free santrifüj tüplerine toplanır. 300 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilir. Santrifüj işleminden sonra süpernatant atılır ve hücre duvarlarının ve organel zarlarının parçalanması için 350 µl RLT solüsyonu eklenir. Pipetaj yapılarak veya vorteks ile iyice karışması sağlanır. Hücre lizatının homojenizasyonu için lizat 20 gauge iğneden RNase free şırınga kullanılarak en az 5 kere geçirilir. Homojenize olmuş hücrelere RNA'nın çökmesi için eşit hacimde %70 etanol eklenir. İyice karıştırıldıktan sonra 700 µl örnek 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiş RNeasy spin kolona aktarılır ve 8000 g'de 15 sn süreyle santrifüj edilir. Bu basamaktan sonra yıkama adımlarına geçilir. RNeasy spin kolonun membranında kalmış RNA'lar için

700 µl RW1 solüsyonu, kullanılan diğer solüsyonlardan kalan tuz kalıntılarını yıkamak için de 500 µl RPE solüsyonu eklenir, her solüsyon eklendikten sonra 800 g'de 15 sn süreyle santrifüj edilir. Her santrifüj işleminden sonra toplama tüpü spin kolumdan dikkatlice ayrılıp boşaltılır ve bir sonraki adımda tekrar kullanılmak üzere spin koluma takılır. RPE solüsyonuyla yapılan son santrifüjün ardından spin colum 1.5 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilir ve 50 µl RNase free su eklenerek 1 dakika süreyle 8000 g'de santrifüj edilir. Bu adımın sonunda elde edilmek istenen total RNA 1.5 ml'lik toplama tüpünde elde edilir. Örnekler -80°C'de muhafaza edilir.

Elde edilen RNA örneklerinin içerdiği nükleik asit konsantrasyonları (ng/µl) ve saflık derecelerinin (A260/230) ölçümü için nanodrop cihazı kullanılmıştır.

3.8.2. Total RNA'nın Komplementer DNA'ya (cDNA) Çevrilmesi

Hücrelerden izole edilen RNA'lar Biomatik marka First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Turbo-1 Reverse (ters) transkriptaz yeni nesil bir transkriptazdır ve tek iplikli RNA veya DNA kalıplarından cDNA ipliklerinin sentezini katalizler.

Reverse transkripsiyon reaksiyonlarının RNase-free ortamda gerçekleşmesi gerektiği için çalışma alanı DEPC'li su ile silinir. Elde edilen RNA örnekleri nükleaz free su ile konsantrasyonları eşit olacak şekilde sulandırılır. Uygun konsantrasyonlara getirilmiş RNA örnekleri hızlıca çözdürülür ve buz üzerinde çalışmak koşuluyla reaksiyon karışımı hazırlanır. Reaksiyon karışımına her örnek için uygun hacimde RNA eklendikten sonra sırasıyla 1 µl Random primer, 1 µl dNTP karışımı ve toplam hacim 14,5 µl olacak şekilde nükleaz free su eklenir. Karışım 65°C'de 5 dakika süreyle inkübe edildikten sonra en az bir dk buz üzerinde bekletilir ve kısa bir santrifüj işleminden geçirilir. Reaksiyon karışımına sırasıyla 4 µl 5X RT Tamponu, 0,5 µl RNase inhibitörü ve 1 µl Turbo-1 Reverse transkriptaz eklenir. Toplam hacmi 20 µl olan karışım kısa bir santrifüj işleminden geçirildikten sonra cDNA sentezinin tamamlanması için önce 42°C'de 50 dakika sonra 85°C'de 5 dakika süreyle inkübe edilir. İnkübasyonların ardından tüpler buz üzerine alınır ve reaksiyon durdurulur. Yeni sentezlenmiş cDNA'lar -20°C'de muhafaza edilir.

Elde edilen cDNA örneklerinin içerdiği nükleik asit konsantrasyonları (ng/μl) ve saflık derecelerinin (A260/280) ölçümü için nanodrop (Thermo Scientific 2000) cihazı kullanılmıştır.

3.8.3. Primerlerin Seçilmesi

Ekspresyon çalışmalarında kullanılan genlerin primer çiftleri tablo 3.8.3.1’de belirtilen kaynaklar baz alınarak Integrated DNA Technologies firmasına sentezletirilmiştir.

Tablo 3.8.3.1: RT-PCR işleminde kullanılan primer dizileri (F: Forward, R: Reverse).

| GEN ADI | PRİMER DİZİSİ | BAZ ÇİFTİ | Kaynak |
|----------------|--|-----------|-------------------------|
| <i>StAR</i> | F: 5'-CTGCTAGACCAGCCCATGGAC-3' R: 5'-TGATTCCTTGACATTTGGGTCC-3' | 109 | Horstman ve diğ., 2012 |
| <i>Cyp11a1</i> | F: 5'-CGTGACCAGAAAAGACAACA-3' R: 5'-AGGATGAAGGAGAGGAGAGC-3' | 152 | Liu ve diğ., 2014 |
| <i>Hsd3b</i> | F: 5'-TAGTATTGCTTTTATTTCCCCT-3' R: 5'-ATTTATTGCTGTTTTTGTTC-3' | 91 | Liu ve diğ., 2014 |
| <i>Hsd17b</i> | F: 5'-TGGGGCTGGAGGGAGAGT-3' R: 5'-TATTTGGGGGGAGGGGTTC-3' | 228 | Liu ve diğ., 2014 |
| <i>Sf-1</i> | F: 5'-GCCCTGTTGGATTACACCTTG-3' R: 5'-GTTGCCAAATGCTTGTGGTA-3' | 382 | Matzkin ve diğ., 2012 |
| <i>Nur77</i> | F: 5'-CGGGATCCGCTACTACCTAGCTTAGTGACC-3' R: 5'-CTGGTACCGCGTGCCTCTGCAATCCTTC-3' | 1013 | Martin ve diğ., 2008 |
| <i>Gata-4</i> | F: 5'-CTCTGGAGGCGAGATGGGAC-3' R: 5'-CGTCGTCACCTTCTCTACGCG-3' | 414 | Liu ve diğ., 2014 |
| <i>Dax-1</i> | F: 5'-GCCGAGGGCCCCCTGGTGGGAC-3' R: 5'-GATCTGGAAGCAAGGCAAGT-3' | 354 | Sadasivam ve diğ., 2015 |
| <i>β-Actin</i> | F: 5'-CGTTGACATCCGTAAGAC-3' R: 5'-TGGAAGGTGGACAGTGAG-3' | 201 | Liu ve diğ., 2014 |

3.8.4. RT-PCR ile Genlerin İfade Düzeyinin Belirlenmesi

Günümüzde en yaygın olarak kullanılan ve kesin sonuçlar veren nicel PCR yöntemi gerçek zamanlı PCR'dır (Bustin, 2000). RT-PCR, floresan ışığa yapan haberci moleküller kullanarak PCR reaksiyonunun her döngüsünde çoğalan DNA miktarını eş zamanlı olarak görüntülenmesini sağlayan bir tekniktir, böylece nükleik asit çoğalması ve belirlenmesi adımlarını tek bir basamakta yapılmasına olanak sağlar (Wong ve Medrano, 2005). Hedef genin çoğalmasının ilk belirlendiği zaman genellikle döngü eşik değeri (cycle threshold C_T) ile ifade edilir. Hedef gen için belirlenen floresan yoğunluğunun geçmiş PCR döngülerine göre en kuvvetli olduğu değer cycle threshold C_T değerini verir. Reaksiyonun C_T değeri başlangıçtaki kalıp DNA'nın miktarıyla orantılıdır. Başlangıçta fazla miktarda kalıp DNA bulunuyorsa PCR reaksiyonunun erken döngülerinde floresan sinyali verilebilmesi için yeterli ürün çoğaltılır; ancak reaksiyona az miktarda kalıp DNA ile başlanılırsa kuvvetli floresan sinyalinin görülebilmesi için daha fazla döngü gerçekleşmiş olması gerekir (Bustin ve diğ., 2005). C_T değerleri arasındaki bu ilişki RT-PCR'in kantitatif olarak değerlendirilmesinde önemli bir yere sahiptir. Farklı miktarlardaki başlangıç ürünlerinden kaynaklanacak hatalardan kaçınmak için ve elde edilen sonuçların normalizasyonu için internal kontrol kullanılması gereklidir. Internal kontrol olarak, temel hücresel fonksiyonların yerine getirilmesi için gerekli olan ve her durumda ekspresyonu gerçekleşmekte olan referans gen veya housekeeping gen olarak adlandırılan genler kullanılır (Bustin, 2000).

Bu tez çalışmasında seçilen steroidogenik genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için LightCycler® 480 Real-Time PCR (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) Sistemi ve LightCycler® 480 DNA Master SYBR Green 1 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) kiti kullanılmıştır. PCR ürünlerinin oluşması SYBR Green 1 floresan sinyalinin ölçülmesiyle saptanır. SYBR Green 1 DNA çift sarmalına eklenir. Solüsyondaki DNA'ya bağlanmamış SYBR Green 1 boyası çok az floresan gösterirken DNA bağlanmasına bağlı olarak floresan miktarı oldukça artar. Bu nedenle PCR sırasında, SYBR Green 1 floresanının artması doğrudan çift iplikli DNA oluşumu ile orantılıdır.

Real time PCR yönteminde DNA kalıbı olarak florürün dört farklı konsantrasyonu (0.1-1-10-100 ppm) uygulanmış hücrelerden elde edilen cDNA örnekleri kullanılmıştır. Master karışımı hazırlamak için kit içeriğinde bulunan enzimden (tag DNA polimeraz) 14 µl çekilip reaksiyon karışımı etiketli tüpe eklenir. Pipetaj yapılarak karışması sağlanır ve hazırlanan master karışım ışıktan korunur. Her bir örnek için hazırlanan 20 µl hacimli reaksiyon karışımı 5 µl cDNA, 9 µl PCR grade su, son konsantrasyonları 0.5 µM olacak şekilde hazırlanmış mRNA'ya özgü 2 µl primer ve 4 µl Master karışım içerir. PCR tüplerinde hazırlanan örnekler Light Cycler cihazına yerleştirilir. LightCycler® 480 cihazı dört farklı program içerir: DNA polimerazın aktivasyonu ve DNA'nın denatürasyonunun gerçekleşmesi için ön-inkübasyon, hedef DNA'nın çoğaltılması (amplifikasyon), PCR ürünlerinin tanımlanması ve rotor ile termal kısmın soğuması (inkübasyon). Reaksiyon koşullarına uygun sıcaklıklar ve döngü sayıları ayarlandıktan sonra PCR başlatılır (Tablo 3.8.4.1).

Tablo 3.8.4.1: Real Time PCR cihazı deney koşulları.

| Program | Döngü Sayısı | Hedef Sıcaklık | | Süre |
|---------------|--------------|----------------|------|-------|
| Ön İnkübasyon | 1 | 95°C | | 10 dk |
| Çoğalma | 45 | Denatürasyon | 95°C | 10 sn |
| | | Bağlanma | 54°C | 30 sn |
| | | Uzama | 72°C | 25 sn |
| İnkübasyon | 1 | 40°C | | 30 sn |

3.8.5. $\Delta\Delta C_T$ Metodu ile Verilerin Değerlendirilmesi

$2^{-\Delta\Delta C_T}$ metodu bağıl gen ekspresyonu analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Hedef genlere ve referans genlere ait C_T değerleri RT-PCR cihazından alınır. Öncelikle hedef genin C_T değeri referans gene göre normalize edilir, bu işlem hem madde uygulaması yapılmış test geni için hem de kontrol grubu için gerçekleştirilir:

$$\Delta C_{T(\text{test})} = C_{T(\text{hedef,test})} - C_{T(\text{referans,test})}$$

$$\Delta C_{T(\text{kontrol})} = C_{T(\text{hedef,kontrol})} - C_{T(\text{referans,kontrol})}$$

İkinci adım olarak uygulama yapılmış test geninin ΔC_T değeri kontrol grubunun ΔC_T değerine göre normalize edilir:

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T(\text{test})} - \Delta C_{T(\text{kontrol})}$$

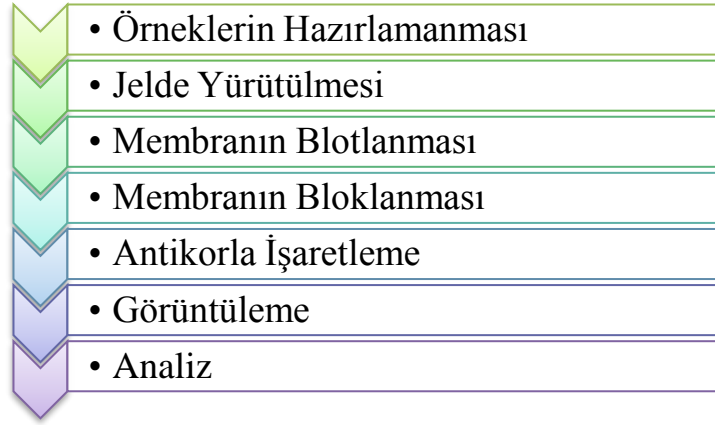
Son olarak ekspresyon oranı hesaplanır:

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \text{Normalize edilmiş ekspresyon oranı}$$

Sonuç, referans genin ekspresyonuna göre normalize edilmiş madde uygulaması yapılmış test geninin ifadesinin kontrol grubuna göre kaç kat azaldığını veya arttığını verir (Livak ve Schmittgen, 2001).

3.9. WESTERN BLOT YÖNTEMİYLE PROTEİN MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

Western blotlama yöntemi ilk kez 1979'da tanımlanmış ve bilimsel araştırmalarda kullanılan en yaygın yöntemlerden biri haline gelmiştir. Jelden elektroforez ile ayrılmış olan proteinlerin blotlama olarak da adlandırılan, özellikle de görselleştirilebilen bir membrana aktarılmasını içeren bir teknik üzerine kurulmuştur. Prosedür ilk kez H. Towbin ve arkadaşları tarafından 1979'da (Towbin, Staehelin, ve Gordon, 1979) tanımlanmış ve iki yıl sonra ise adı W. Neal Burnette (Burnette, 1981) tarafından verilmiştir. Yöntem temel olarak yedi basamaktan oluşur (Şekil 3.9.1).



Şekil 3.9.1: Western blot basamakları.

Çalışılan numunedeki SDS-polipeptit kompleksleri, poliakrilamid jele yüklenir ve elektroforez esnasında negatif yüklü proteinler pozitif yüklü anota doğru hareket eder. Proteinleri daha ayrıntılı olarak analiz etmek için, blotlama denilen bir prosedürle proteinler bir membran üzerine aktarılır. Aktarımdan sonra membran, istenmeyen membran-protein etkileşimini önlemek için bloke edilir. İlgilenilen proteini görselleştirmek için membran ilk önce birinci protein spesifik bir antikorla muamale edilir, takiben tespit için kullanılan bir ikinci antikor ile muamale edilir. Membran görüntülenir ve sonuçlar analiz edilir.

3.9.1. Western Blot Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

Hücre lizis tamponu: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF ve proteaz inhibitör tablet saf su içerisinde hazırlandı.

%10 SDS Çözeltisi: (100 mL) 10 g SDS, 100 ml'lik beherde saf su ile çözülüp, 100 ml'ye tamamlandı.

Yürütme Transfer Tamponu: (1 L, 10X) 0,25 M 30 g Tris-baz, 144 g glisin 600 ml saf suda çözülüp, pH=7.4'e ayarlandı. Çözelti saf su ile 1 litreye tamamlandı.

Yürütme Tamponu: (1L, 1X) 100 ml stok 10X yürütme transfer tamponu üzerine 900 ml saf su eklendi. Bu karışımın içine 1ml %10'luk SDS eklenerek 1X yürütme tamponu hazırlandı.

Transfer Tamponu: (1L) 200 ml Metanol, 100 ml stok 10X yürütme transfer tamponu ve 700 ml saf su ile 1 litre transfer tamponu hazırlandı.

TBS: (1L, 10X) 0,2 M Tris-Baz (24,2 g) ve 80 g sodyum klorür (NaCl) 600 ml saf suda çözülüp, pH=7,4'e ayarlandı. Çözelti saf su ile 1 litreye tamamlandı.

TBST (1L, 1X) Hazırlanan TBS stoğundan 100 ml alınarak, 900 ml su ile 1 litreye tamamlandı. Daha sonra 1ml TWEN-20 eklenerek çözelti hazırlandı.

Laemmlı Yükleme tamponu için: 1,5 M Tris-Baz (3,64 g) 15 ml saf suda çözülerek pH=6,8'e ayarlandı. Çözeltiye saf su eklenerek hacim 20 ml'ye tamamlandı.

4X Laemmlı Tamponu: 1,5 ml'lik eppendorf tüpüne 167 µl 1,5 M tris çözeltisi (pH 6.8), 23 µl saf su, 400 µl gliserol, 200 µl %40'luk SDS, 200 µl β-merkaptotanol, 10 µl %0,1'lik brom fenol mavisi eklenerek hazırlandı.

Süt Tozu Çözeltisi: (%5, 100ml) (Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad Blotting-Grade Blocker 170-6404) 100 ml TBST çözeltisi içinde 5 g süt tozu çözülerek hazırlandı.

Striping Buffer (Sıyırma Tamponu): 20 ml %10 SDS, 12,5 ml 0,5 M Tris HCl (pH 6.8)çözeltisi, 67,5 ml ultra saf su, 0,8 ml 2-mercaptoethanol karıştırılarak hazırlandı.

3.9.2. Örneklerin Hazırlanması

Altı kuyulu hücre kültür kaplarına kuyu başına 10^6 hücre olacak şekilde ekim yapılır. Hücrelere, florürün dört farklı konsantrasyonunu (0,1-1-10-100 ppm) içeren deney medyumları ilave edilir ve hücreler 24 saat süreyle 37°C 'de CO_2 'li inkübatörde inkübe edilir. Deney süresinin tamamlanmasıyla, hücrelerin üzerinde bulunan deney medyumunu atılır ve hücreler deney medyumunu artıklarının temizlenebilmesi için PBS solüsyonuyla yıkanır. Her kuyuya hazırlanan hücre lizis tamponundan (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 mM Na₃VO₄, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF ve proteaz inhibitör tablet) 300 µL eklenir ve buz üzerinde beş dakika inkübe edilir. İnkübasyondan

sonra hücreler kültür kaplarından santrifüj tüplerine aktarılarak, hızlıca kısa süreli bir sonikasyon işleminden geçirilerek, 10 dakıda boyunca 14.000 x g 'de soğutmalı santrifüjde santrifüj edilir. Hücreler parçalandıktan sonra yüksek hızda yapılan santrifüj işlemi hücre zarı kalıntıları ve diğer bazı çözülmemiş hücre içeriklerinin çökmesi için gerçekleştirilir. Elde edilen süpernatant çözünür halde bulunan proteini içerir. Santrifüj işleminden sonra süpernatantlar çalışılmak üzere ayrı tüplere alınır.

3.9.3. Protein Ölçümü

Protein izolasyonu adımından sonra örneklerde elde edilen protein miktarını saptamak için total protein tayini yapılır. Bu işlem için The SMART™ BCA protein assay kit kullanılmıştır. SMART™ BCA protein test kiti, total proteinin kolorimetrik tespiti ve miktarının tayini için bikinkoninik asite (BCA) dayanan bir metottur. Bu testte, mor renkli reaksiyon ürünü, bir bakır iyonu ile iki BCA molekülünün bağlanmasıyla oluşur. Bu suda çözünür kompleks 562 nm'de geniş bir çalışma aralığında (20-2000 µg / ml) artan protein konsantrasyonları ile güçlü bir absorbans sergilemektedir.

Proteinlerin makromoleküler yapısı, peptit bağlarının sayısı ve belirli dört amino asidin (sistein, sistin, triptofan ve tirozin) varlığı BCA ile renk oluşumundan sorumludur. Buna göre, protein konsantrasyonları genellikle sığır serum albümini (BSA) gibi ortak bir proteinin standartlarına referansla belirlenir. Bilinen konsantrasyondaki bir standart protein çözeltisinden seyreltilerek oluşturulan farklı konsantrasyonlardaki standartlar referans alınarak bir standart eğri çizilir ve bilinmeyen konsantrasyondaki örneğin protein içeriği hesaplanır. Protein örneklerinin konsantrasyonları kitin önerdiği protokole göre yapılmış ve örneklerin konsantrasyonunun belirlenmesinde 0 µg/ml (Blank) ile 2000 µg/ml konsantrasyonları arasında standartlar oluşturularak hesaplanmıştır.

3.9.4. Proteinlerin Jelde Yürütülmesi

Proteinlerin jelde yürütülmesi için BioRad marka Mini-PROTEAN® TGX™ Precast jeller kullanılmıştır. Kuyu hacmi 30 µl olan ve 10 kuyudan oluşan jellere protein örnekleri yüklenmiştir. Yukarıda açıklandığı gibi protein izolasyonu yapılan örnekler vorteksledikten sonra 4:1 oranında her gruptan 30 µg örnek üzerine laemmlı sample buffer eklenmiştir. Örnekler 100°C'de 5 dakika ısıtılmış ve santrifüj edilmiştir. Kuyucuklara 30 µg örnek ve 5 µl marker (Precision Plus Protein Standart 10-250 kd,

BioRad) yüklenmiştir. Örnekler 80 voltta (400mA) 10 dakika yürütüldükten sonra 120 voltta 2 saat yürütülmüştür.

3.9.5. Proteinlerin Membrana Aktarılması (Blotlanması)

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra camlar küçük bir spatula yardımıyla ayrılarak jel çıkartılmıştır. Watmann filtre kağıdı, membran, jel ve Watmann filtre kağıdı olacak şekilde sandviç oluşturulmuş ve sandviçte oluşabilecek tüm hava boşluklarının giderilmesi için yuvarlak bir silindir ile hafif basınç uygulanmıştır. Blotlama 25 voltta, 2,5 mA'de 7 dakikada BioRad Trans Blot Turbo cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.9.6. Membranın Bloklanması

Bloklama için %5 yağsız süt tozu içeren Tris Buffer Saline- Tween 20 (TBST) solüsyonu hazırlanmıştır. Transfer edilen membran hazırlanan bloklama solüsyonunda 1 saat çalkalayıcıda inkübe edilmiştir.

3.9.7. Birincil ve İkincil Antikorla İnkübasyon

Blotlanan membran, daha önce hazırlanmış olan birinci antikor %5 yağsız süt tozu içeren TBST solüsyonu içerisinde çalkalayıcıda +4°C'de gece boyunca inkübe edilmiştir. Birincil antikor inkübasyonundan sonra membran 5 defa 5'er dakika TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır. Kullanılan birinci ve ikinci antikorlar ve sulandırma katsayıları tablo 3.9.7.1'de verilmiştir. Kullanılan tüm birinci ve ikinci antikorlar SantaCruz Biotechnology'den temin edilmiştir.

Tablo 3.9.7.1: Kullanılan birinci ve ikinci antikorlar ve sulandırma katsayıları.

| Kullanılan antikorlar | Sulandırma katsayıları |
|---|-------------------------------|
| Goat polyclonal StAR primer antikor (30 kD) | 1:500 |
| Goat polyclonal CYP11A1 primer antikor (60 kD) | 1:1000 |
| Goat polyclonal 3 β -HSD primer antikor (42 kD) | 1:1000 |
| Rabbit polyclonal LHR primer antikor (85 kD) | 1:5000 |
| Rabbit polyclonal β -Aktin primer antikor (43 kD) | 1:1000 |
| Rabbit anti-Goat Sekonder HRP konjugat | 1:5000 |
| Goat anti-Rabbit Sekonder HRP konjugat | 1:5000 |

Daha sonra membran birincil antikora uygun ikincil antikor 1:5000 oranında eklenmiş ve %5'lik yağsız süt tozu içerisinde çalkalayıcıda 1,5 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu inkübasyondan sonra membran tekrar 5 defa 5'er dakika TBST içerisinde çalkalayıcı üzerinde yıkanmıştır.

3.9.8. Proteinlerin Görüntülenmesi

Yıkamalardan sonra membran fazla sıvıdan arındırılmış ve temiz bir kaba aktarılmıştır. Membranlarda protein bantlarını görünür hale getirmek için hazırlanan 7 ml ECL solüsyonu ile beş dakika muamele edilmiştir. Bu aşamadan sonra ChemiDoc (Bio-Rad) cihazı ile oluşan bantların resimleri 150 saniyede 40 fotoğraf olacak şekilde çekilmiştir.

Görüntüleme işleminin ardından membran kurumadan önce membrandaki primer ve sekonder antikorun kaldırılması için sıyırma (stripping) işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem hazırlanan stripping buffer ile yapılmıştır. Sıyırma işleminde ilk olarak membran kemilüminesans substratlarından arındırılmak için TBST solüsyonuyla 5 dakika yıkanmıştır. Daha sonra hazırlanan stripping buffer da 45 dakika 50°C'de etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminden sonra membran 4 kez 15'er dakika boyunca ultra suyla çalkalayıcı da yıkanmış, ardından 5 kez 5'er dakika TBST solüsyonuyla yıkanmıştır. Yıkamaların ardından bloklama işlemi yapılmış ve daha sonra referans protein seçilen beta aktin ile daha sonra da ikinci antikor ile muamele edilerek tekrar yıkama ve görüntüleme basamakları gerçekleştirilmiştir.

3.10. İSTATİSTİK ANALİZ

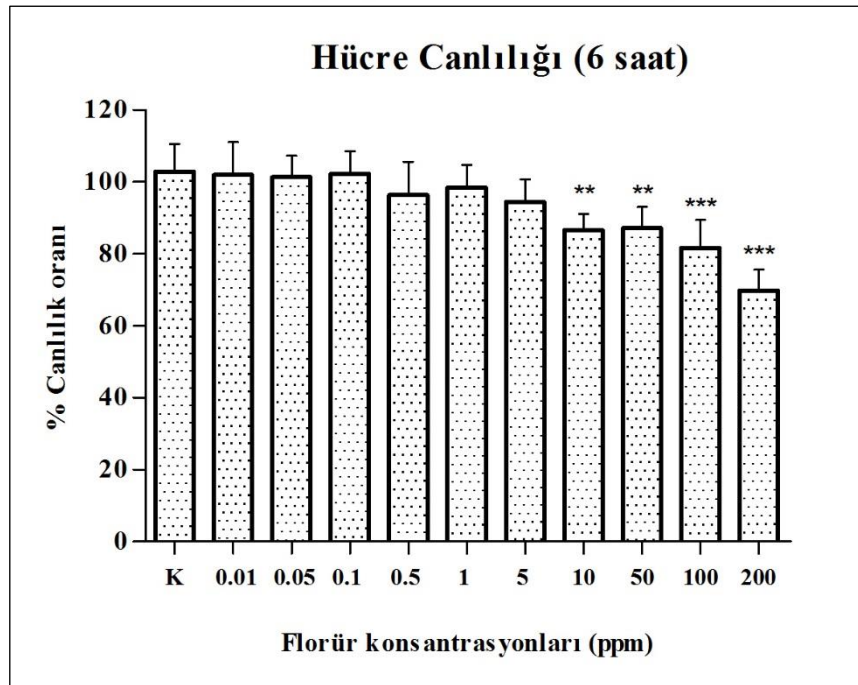
Deney gruplarında uygulanan konsantrasyona bağlı olarak hücre canlılığı, hücre çoğalması, hücre sitotoksitesi, serbest testosteron ve steroidogenik protein miktarlarının konsantrasyona bağlı değişen verilerinin istatistik değerlendirilmesinde Graphpad Prism 5. 0 programı kullanılmıştır. İstatistiksel analizler için One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey's testi uygulanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde $p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.001$ anlamlılık seviyesi temel alınmıştır.

Steroidogenik genlerin ve transkripsiyon faktörlerinin mRNA düzeylerindeki, uygulanan florür konsantrasyonuna bağımlı değişimlerin istatistiksel olarak değerlendirmesi Livak ve Schmittgen 2001'e ait $2^{-\Delta\Delta Ct}$ metoduna göre One-Way ANOVA yöntemi ve Tukey's test (Ct değeri olarak belirlenmiş) sonuçları referans gen olan β -actin ve kontrol koşullarına göre anlamlılık ($p<0.05$, $p<0.01$, $p<0.001$) dereceleri belirlenmiştir.

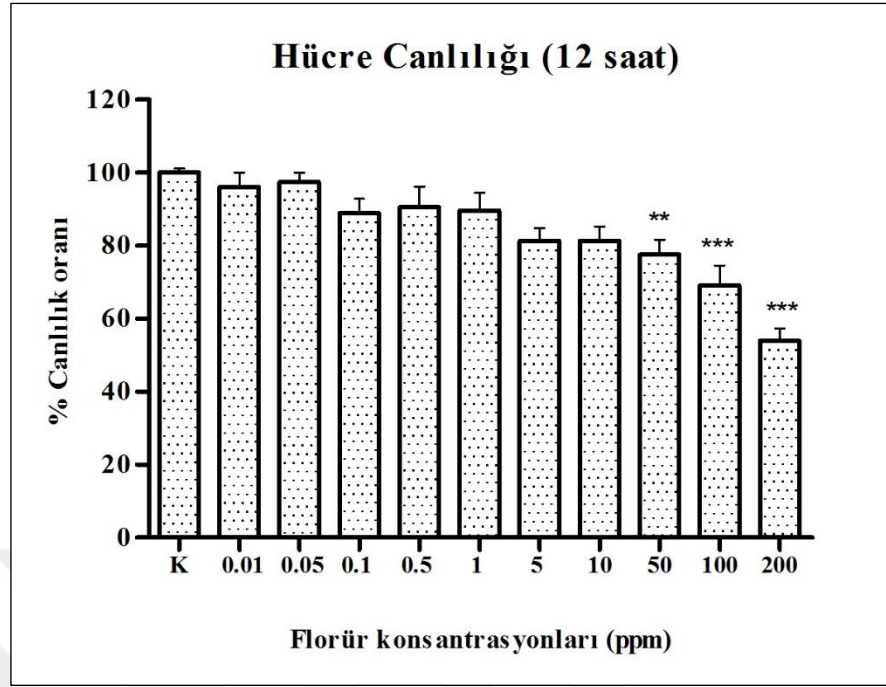
4. BULGULAR

4.1.MTT BULGULARI

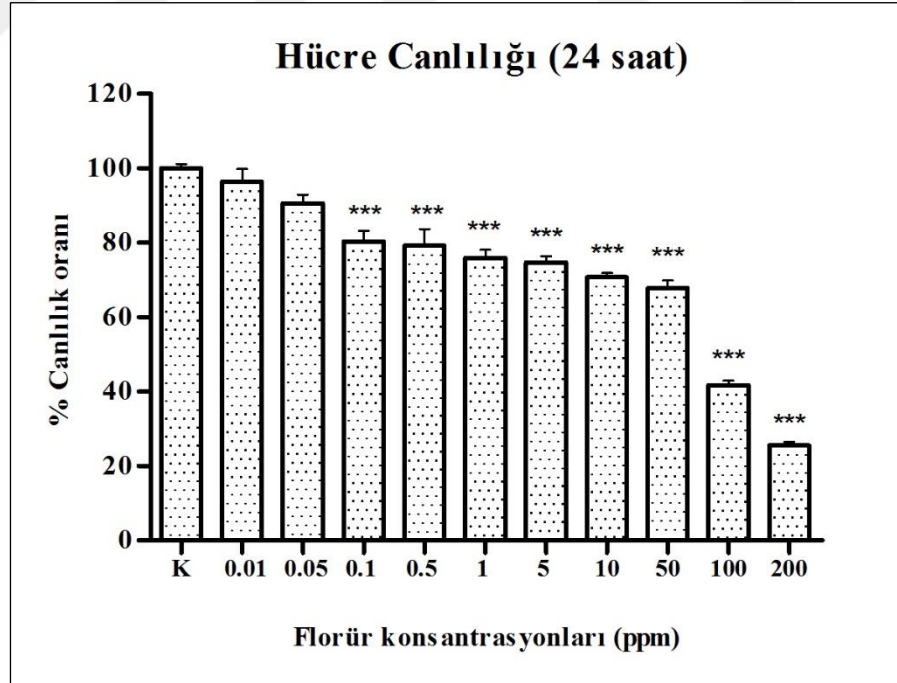
Florürün on farklı konsantrasyonu (0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 5 - 10 - 50 - 100 ve 200 ppm) LH uyarımlı olarak testis TM3 Leydig hücrelerine 6, 12, 24, 48 ve 72 saat süresince uygulandı ve hücre canlılığına etkisi MTT testiyle spektrofotometrik olarak tespit edildi. Kontrol grubu ve florürün on farklı konsantrasyonu MTT değerleri bakımından 6 saat sonunda karşılaştırıldığında 10 ppm konsantrasyonundan sonra anlamlı bir azalma gözlenirken (şekil:4.1.1.), 12 saat sonunda 50 ppm konsantrasyonundan sonra MTT değerleri bakımından anlamlı bir azalma bulundu (şekil:4.1.2). Florürün Leydig hücrelerine 24 saat uygulanması sonucunda, hücre canlılığında kontrol gruplarına göre 0,1 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda anlamlı bir azalma saptanırken (şekil:4.1.3.), 48 ve 72 saat uygulama sonucunda florürün tüm konsantrasyonlarında kontrole göre anlamlı bir azalma gözlemlendi (şekil:4.1.4. ve şekil:4.1.5).



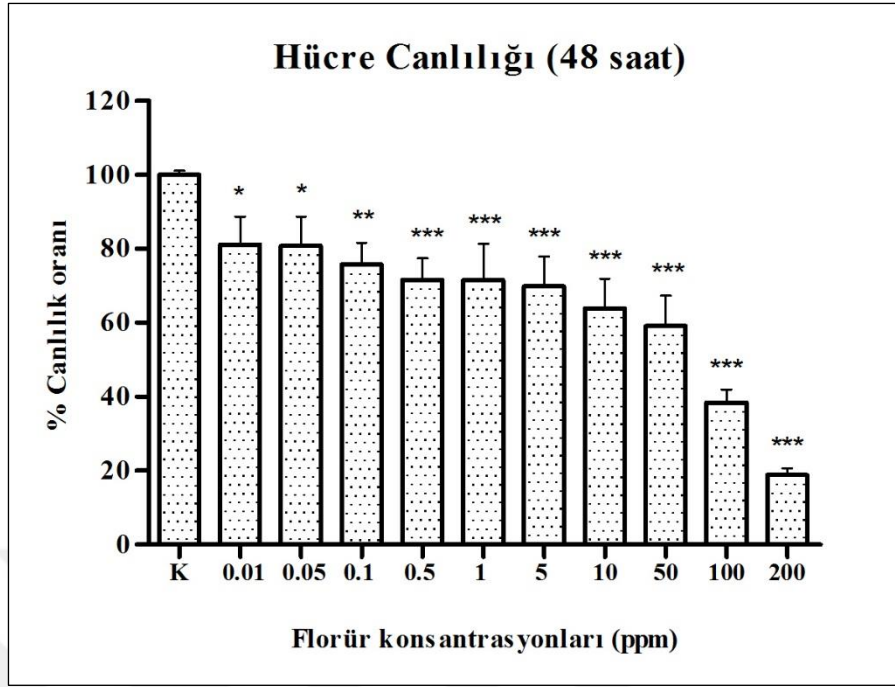
Şekil 4.1.1: Florürün TM3 Leydig hücrelerinde 6 saat sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (**p<0,01, ***p<0,001).



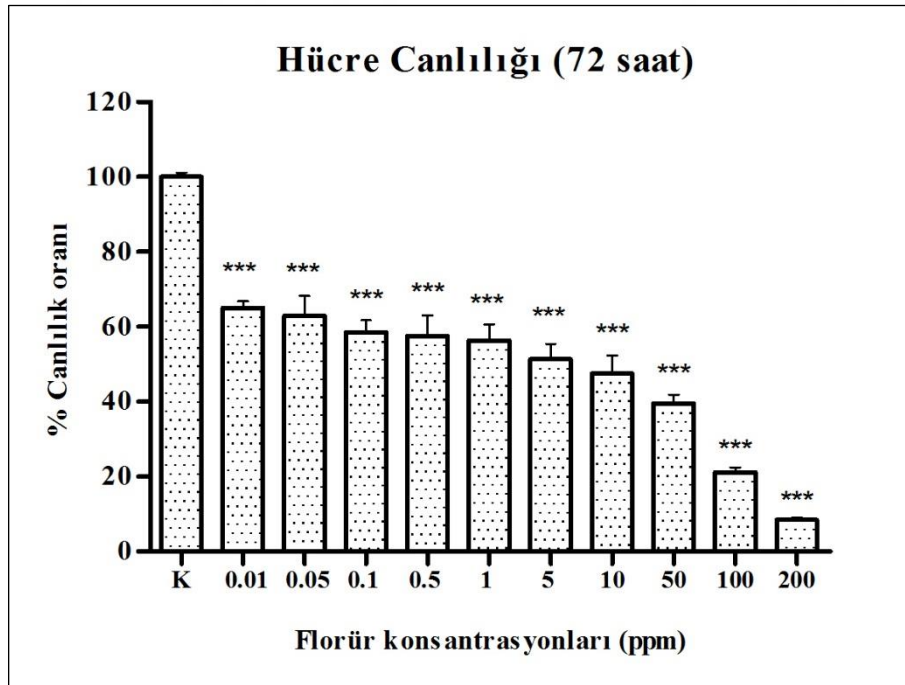
Şekil 4.1.2: Florürün TM3 Leydig hücrelerinde 12 saat sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (**p<0,01, ***p<0,001).



Şekil 4.1.3: Florürün TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (***p<0,001).



Şekil 4.1.4: Florürün TM3 Leydig hücrelerinde 48 saat sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Şekil 4.1.5: Florürün TM3 Leydig hücrelerinde 72 saat sonunda % canlılık üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (*** $p < 0,001$).

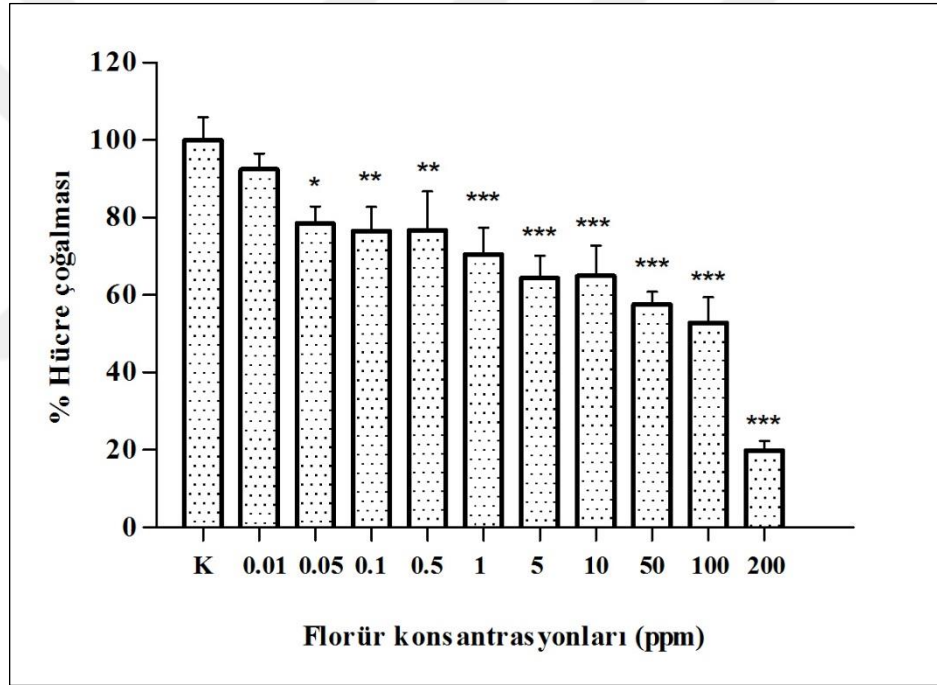
Florürün 0,01 ppm ile 200 ppm aralığındaki 10 farklı konsantrasyonuyla yapılan konsantrasyon denemeleri sonucunda, MTT sonuçlarına dayanılarak 6, 12, 24, 48 ve 72 saat için %50 inhibisyon konsantrasyonu (IC50) değerleri tablo 4.1.1’de verilmiştir. IC50, bir maddenin belirli bir biyolojik ya da biyokimyasal fonksiyonun yarısını inhibe edici konsantrasyon ölçüsüdür. Bu niceliksel ölçüm belirli bir biyolojik işlemi (örneğin bir enzim, hücre, hücre reseptörü veya mikroorganizma bileşenini) yarıya kadar inhibe etmek için belirli bir ilacın veya maddenin ne kadarının gerekli olduğunu gösterir. Çalışmada, florür grupları ile kontrol grubunun absorbans değeri kıyaslanarak % cinsinden ölen hücre sayısı (IC50 değeri) hesaplandı. Bu tez çalışmasında kullanılacak olan dört farklı (0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm ve 100 ppm) florür konsantrasyonuna, hücre canlılığı sonuçları temel alınarak karar verilmiştir.

Tablo 4.1.1: Florür maddesinin Leydig hücrelerinde zamana bağlı IC50 değerleri.

| Florürün uygulanma süresi | IC50 değeri |
|---------------------------|------------------------|
| 6 saat | 1393.65 ppm (33.19 mM) |
| 12 saat | 846.94 ppm (20.17 mM) |
| 24 saat | 60.21 ppm (1.43 mM) |
| 48 saat | 27.55 ppm (0.65 mM) |
| 72 saat | 1.81 ppm (0.04 mM) |

4.2.BRDU BULGULARI

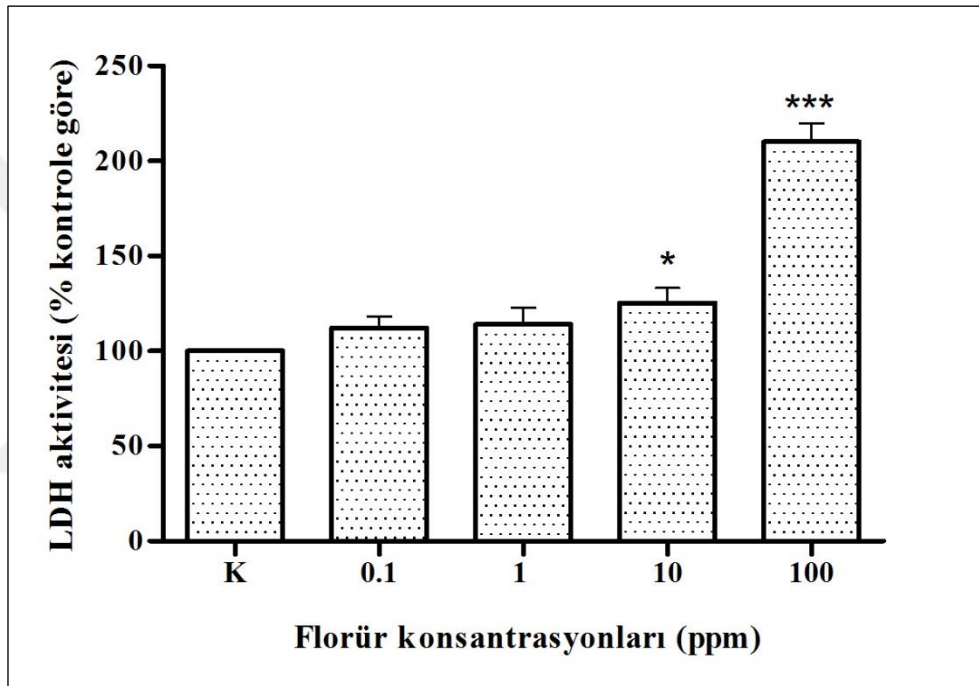
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak sentez fazındaki hücrelerin işaretlenmesi esasına dayanan Bromodeoksiuridin (BrdU) değerleri şekil 4.2.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve florürün on farklı konsantrasyonu ile oluşturulan gruplar BrdU değerleri bakımından karşılaştırıldığında 0,01 konsantrasyonunda anlamlı bir farklılık gözlenmezken, diğer tüm konsantrasyonlarda kontrol gruplarına göre anlamlı bir azalma saptandı.



Şekil 4.2.1: Florürün 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde BrdU yöntemiyle belirlenen hücre çoğalması üzerine konsantrasyona bağlı etkileri (*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001).

4.3.LDH BULGULARI

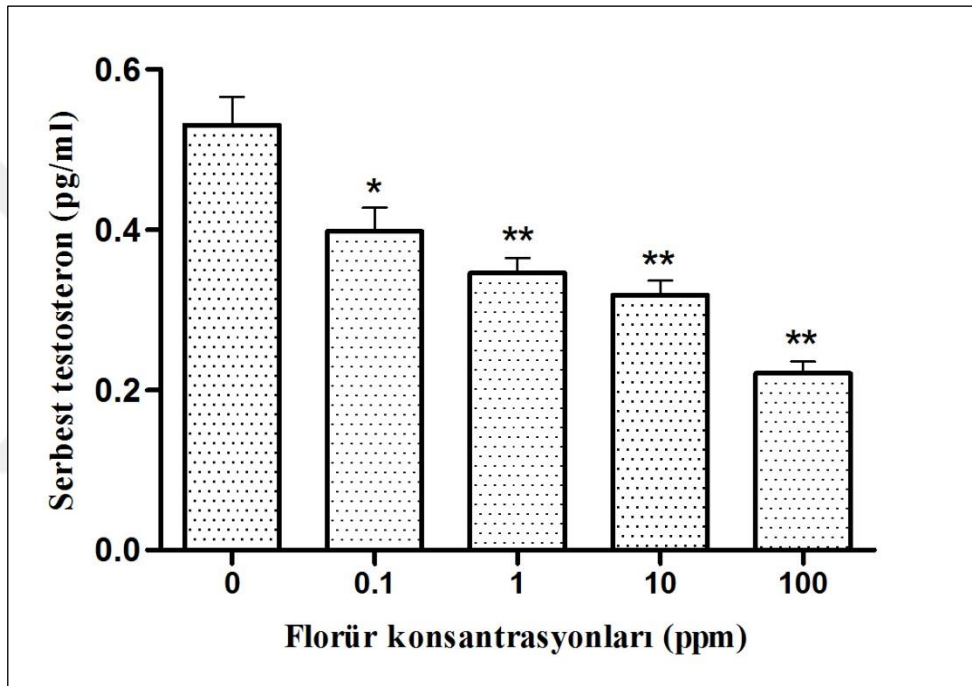
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında spektrofotometrik yöntem kullanılarak NADPH⁺'daki azalma hızı oranına bağlı olarak hesaplanan laktat dehidrogenaz (LDH) miktarı şekil 4.3.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve florürün dört farklı konsantrasyonu LDH miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre 10 ve 100 ppm konsantrasyonlarında anlamlı bir artış saptandı.



Şekil 4.3.1: Florürün 24 saat sonunda TM3 Leydig hücreleri üzerinde laktat dehidrogenaz aktivitesinin konsantrasyona bağlı etkileri (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$).

4.4.SERBEST TESTOSTERON BULGULARI

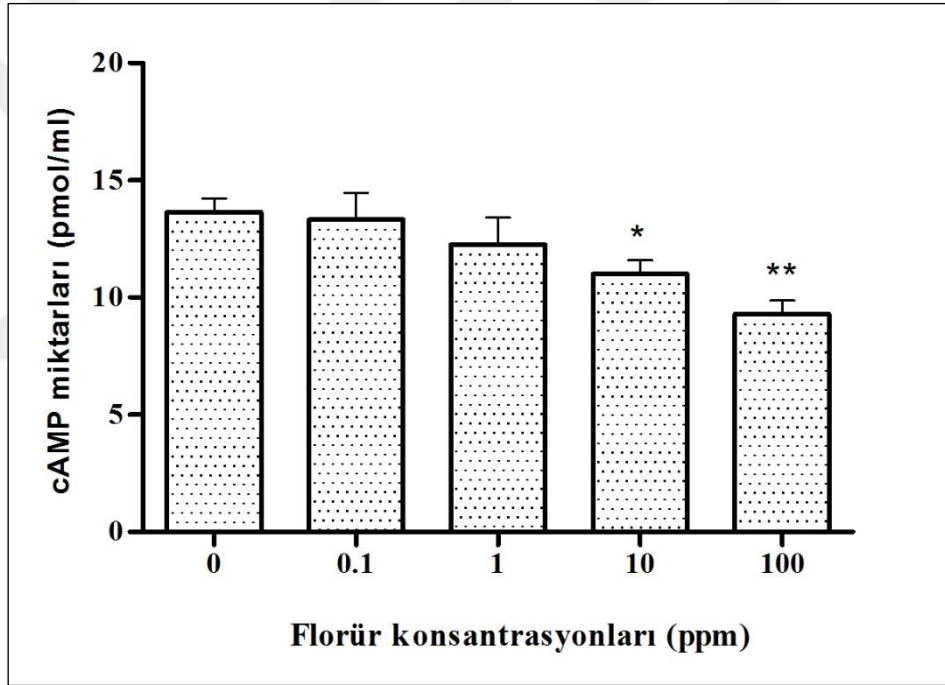
TM3 Leydig hücrelerinin 24 saat sonunda kontrol ve deney gruplarında kompetitif immunoenzimatik renk ölçüm metodu kullanılarak hesaplanan testosteron miktarları şekil 4.4.1'de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve florürün dört farklı konsantrasyonu serbest testosteron miktarı bakımından karşılaştırıldığında tüm gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma saptandı.



Şekil 4.4.1: Florürün 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde serbest testosteron miktarı üzerine etkileri (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

4.5.cAMP BULGULARI

Florürün dört farklı konsantrasyonu uygulanmış TM3 Leydig hücre kültürü süpernatandında *in vitro* kompetitif immünoenzimatik renk ölçüm metodu ile belirlenen ekstraselüler cAMP düzeyleri şekil 4.5.1’de verilmiştir. 24 saat sonunda kontrol grubu ve florürün dört farklı konsantrasyonu cAMP miktarı bakımından karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre 24 saat sonunda 0,1 ppm ve 1 ppm konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık görülmezken, 10 ppm ve 100 ppm konsantrasyonlarında anlamlı bir azalma görüldü.



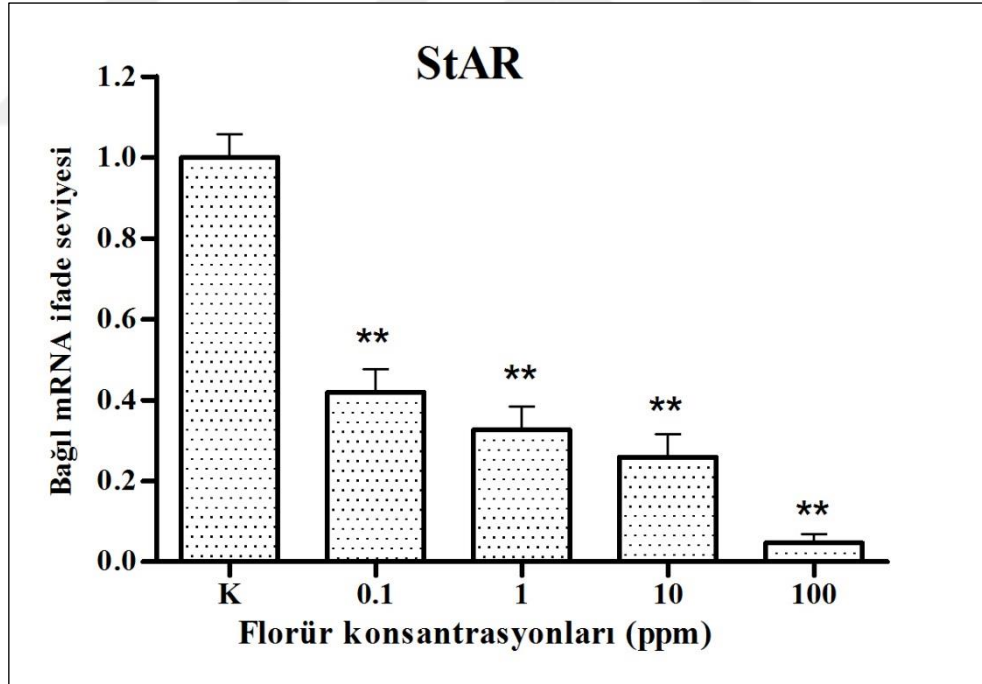
Şekil 4.5.1: Florürün 24 saat sonunda TM3 Leydig hücrelerinde cAMP düzeyleri üzerinde florür konsantrasyonuna bağlı etkileri (*p<0,05, **p<0,01).

4.6.RT-PCR BULGULARI

Florürün, TM3 Leydig hücrelerinde steroidogenik genler (*StAR*, *Cyp11a1*, *Hsd3b* ve *Hsd17b*) ve bu genlerde işlev gören transkripsiyon faktörlerinin (*Sf-1*, *Gata-4*, *Nur77*, *Dax-1*) gen anlatım seviyeleri üzerindeki etkileri SYBR Green I floresans boyası ile RT-PCR cihazı kullanılarak belirlenmiştir. Florür 24 saat süreyle 0,1, 1, 10 ve 10 ppm konsantrasyonlarında LH uyarımı yapılarak TM3 Leydig hücrelerine uygulanmış ve seçilen genlerin mRNA seviyeleri belirlenmiştir. Tüm sonuçlar referans gen olarak kullanılan β -aktin'e göre normalize edilmiştir.

4.6.1. *StAR* Geni İfade Düzeyi

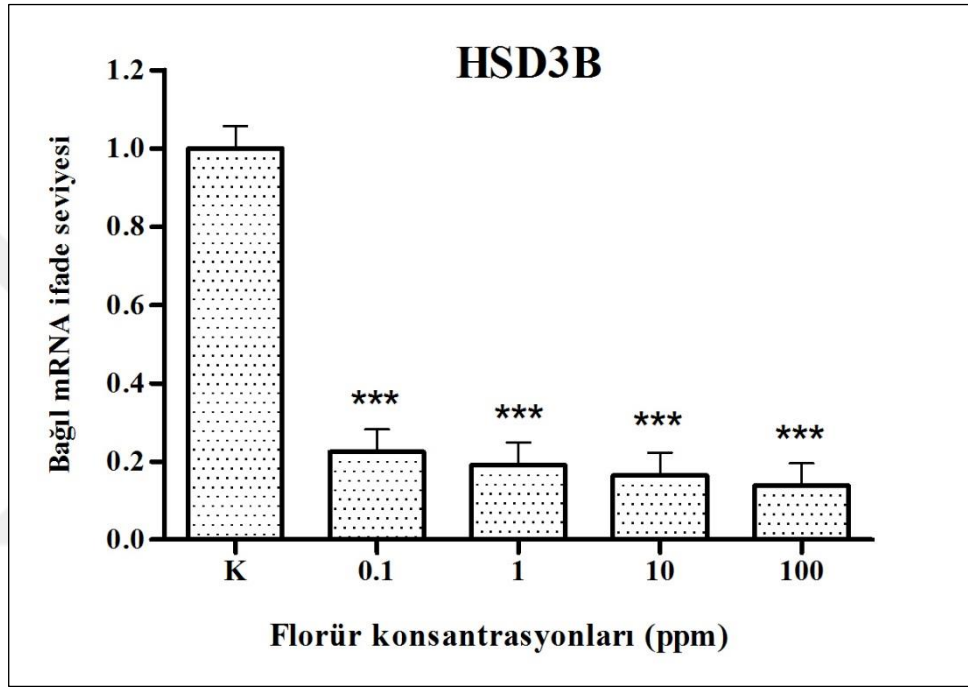
TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sonunda florür uygulanan grupları kontrol grubuna göre *StAR* gen ifadeleri bakımından karşılaştırıldığında konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir azalma göstermiş ve bulgular şekil 4.6.1.1'de verilmiştir.



Şekil 4.6.1.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde *StAR* geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (**p<0,01).

4.6.2. *Hsd3b* Geni İfade Düzeyi

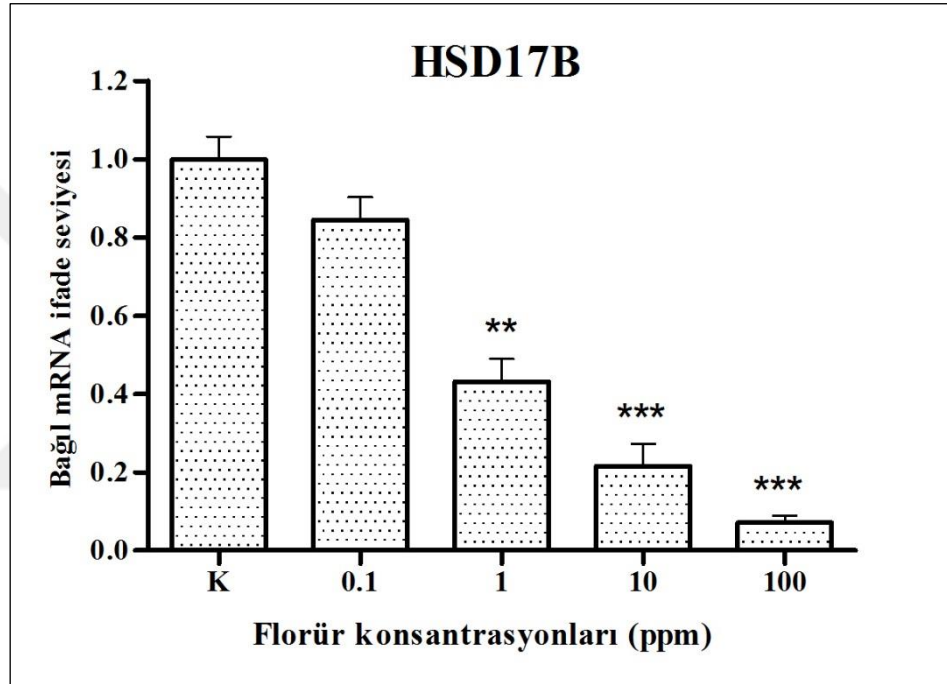
Şekil 4.6.2.1’de Leydig hücrelerinde 24 saat florür uygulaması sonucu *Hsd3b* geninin ifade düzeylerindeki farklılıklar gösterilmiştir. Florür uygulanan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında florür uygulanan tüm gruplarda *Hsd3b* geninin ifade düzeyinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (** $p < 0,001$).



Şekil 4.6.2.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde *Hsd3b* geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (** $p < 0,001$).

4.6.3. *Hsd17b* Geni İfade Düzeyi

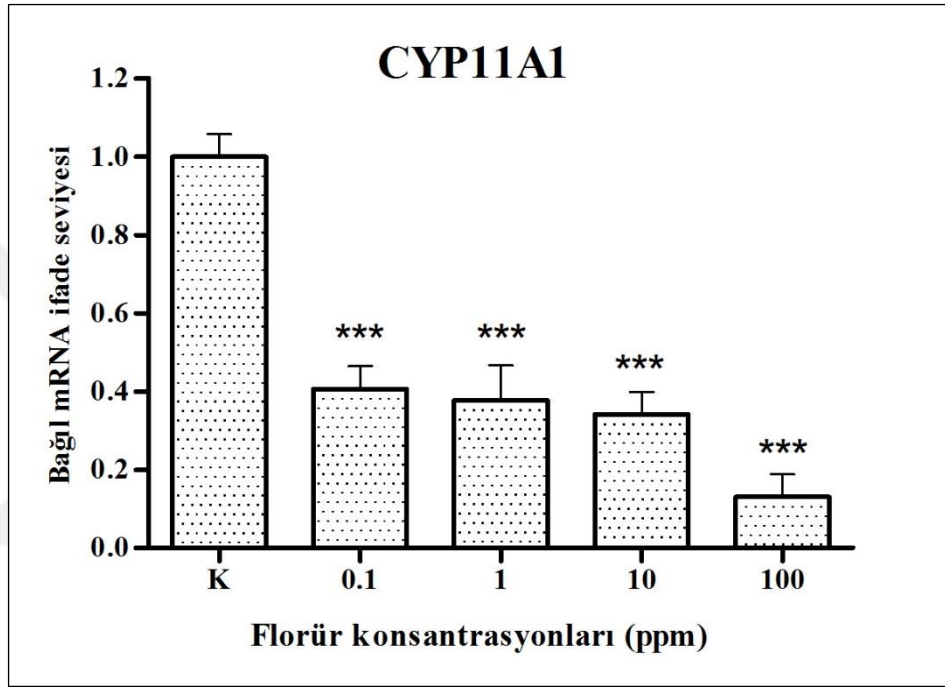
TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sonunda florür uygulanan grupların kontrol grubuna göre *Hsd17b* gen ifade düzeyleri şekil 4.6.3.1’de verilmiştir. Florür uygulanan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 0,1 ppm florür konsantrasyonunda anlamlı bir farklılık bulunmazken, diğer üç florür uygulanan grupta konsantrasyona bağlı olarak *Hsd17b* gen ifade düzeyleri anlamlı bir azalma gözlenmiştir (** $p < 0.01$, $p < 0.001$).



Şekil 4.6.3.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde *Hsd17b* geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.6.4. *Cyp11a1* Geni İfade Düzeyi

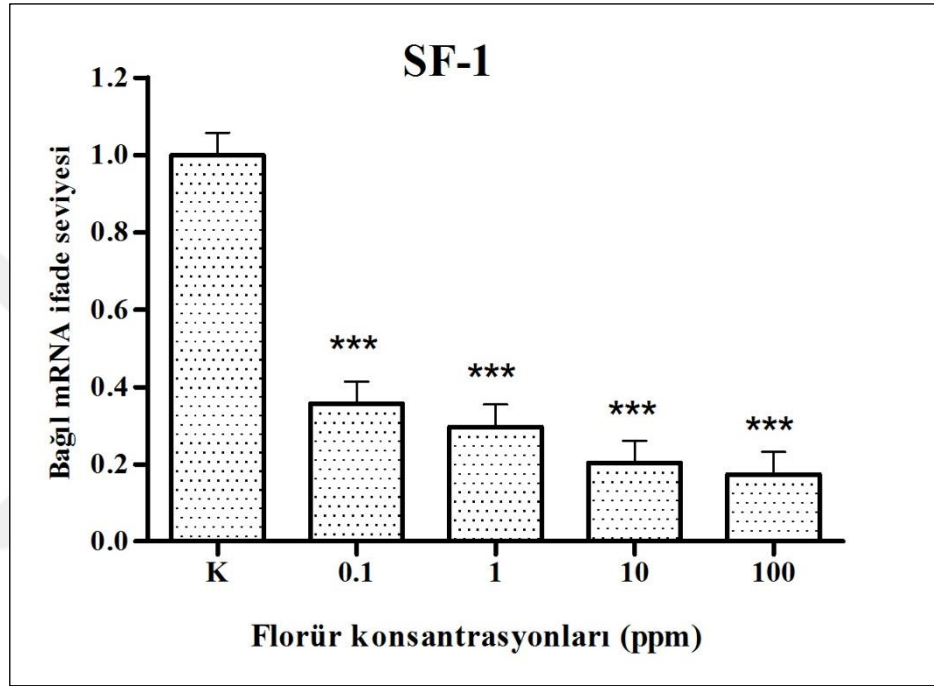
Leydig hücrelerinde 24 saat florür uygulaması sonucu *Cyp11a1* geninin ifade düzeylerindeki farklılıklar şekil 4.6.4.1’de gösterilmiştir. Florür uygulanan gruplar kontrol grubuyla *Cyp11a1* geninin ifade düzeyi bakımından karşılaştırıldığında florürün dört farklı konsantrasyonunda da anlamlı olarak azalma gözlenmiştir (** $p < 0,001$).



Şekil 4.6.4.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde *Cyp11a1* geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (* $p < 0,001$).

4.6.5. *Sf-1* Geni İfade Düzeyi

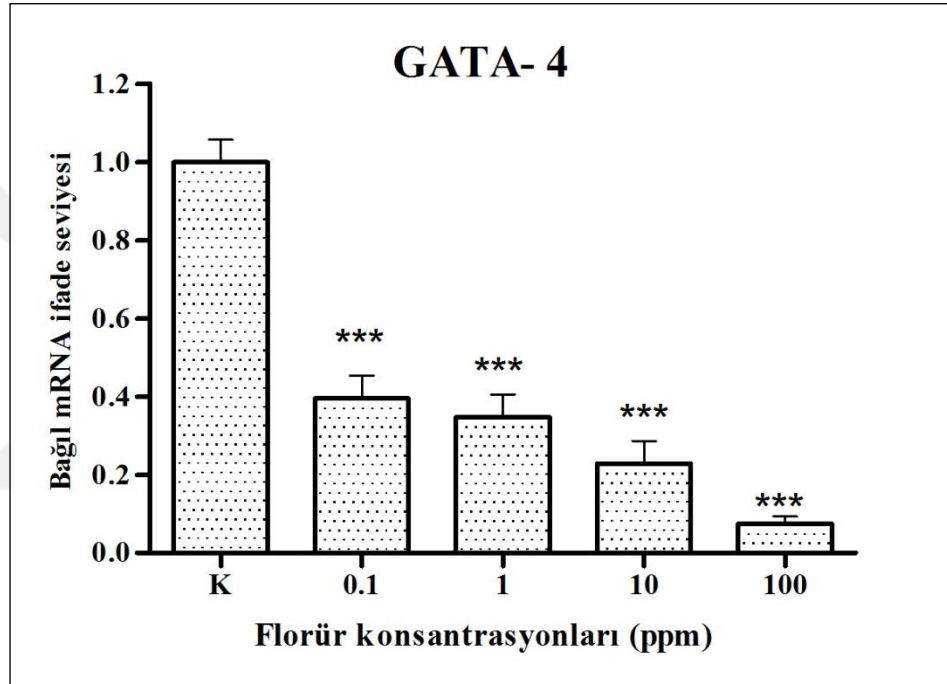
Şekil 4.6.5.1’de Leydig hücrelerinde 24 saat florür uygulaması sonucu *Sf-1* transkripsiyon faktörünün ifade düzeylerindeki farklılıklar gösterilmiştir. Florür uygulanan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında florür uygulanan tüm gruplarda *Sf-1* transkripsiyon faktörünün ifade düzeyinin anlamlı olarak azaldığı gözlenmiştir (***) $p < 0,001$).



Şekil 4.6.5.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde *Sf-1* geninin mRNA ifade seviyesine etkisi (***) $p < 0,001$).

4.6.6. *Gata-4* Gen İfade Düzeyi

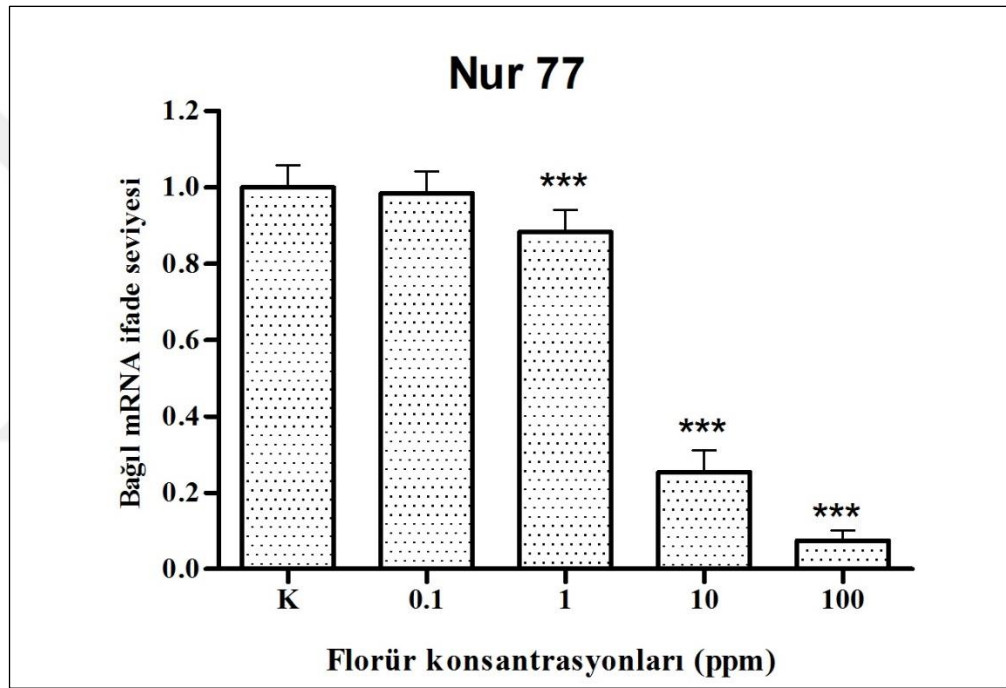
TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sonunda florür uygulanan grupların kontrol grubuna göre *Gata-4* transkripsiyon faktörünün ifade düzeyleri şekil 4.6.6.1’de verilmiştir. Florür uygulanan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında florür uygulanan tüm gruplarda konsantrasyona bağlı olarak *Gata-4* transkripsiyon faktörü ifade düzeylerinde anlamlı bir azalma bulunmuştur (** $p < 0.001$).



Şekil 4.6.6.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde *Gata-4* transkripsiyon faktörünün mRNA ifade seviyesine etkisi (** $p < 0,001$).

4.6.7. *Nur77* Gen İfade Düzeyi

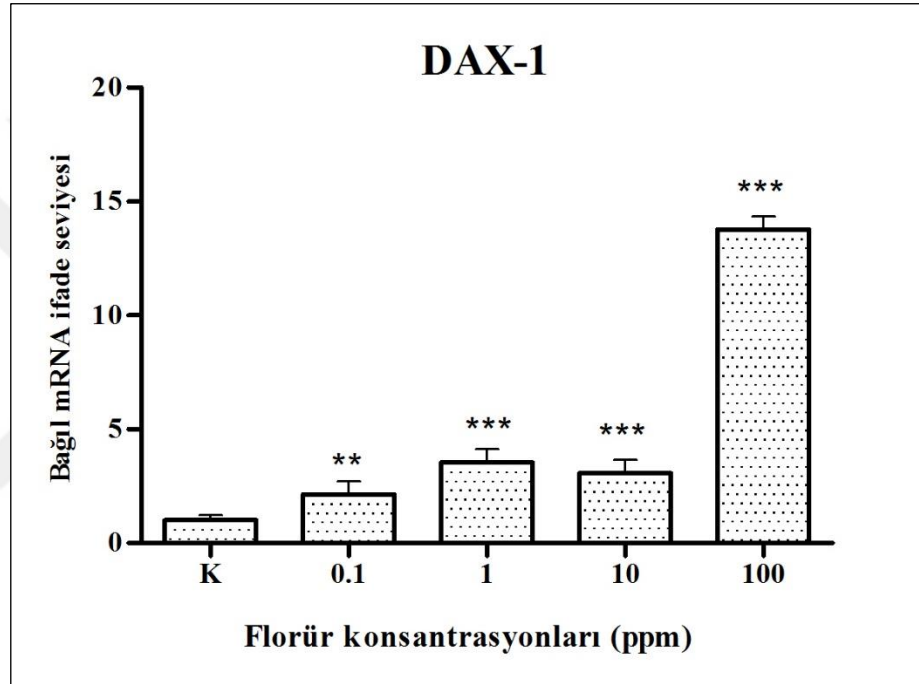
TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sonunda florür uygulanan grupların kontrol grubuna göre *Nur77* transkripsiyon faktörü ifade düzeyleri şekil 4.6.7.1’de verilmiştir. Florür uygulanan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 0,1 ppm florür konsantrasyonunda anlamlı bir farklılık bulunmazken, diğer üç florür uygulanan grupta konsantrasyona bağlı olarak *Nur77* transkripsiyon faktörü ifade düzeylerinde anlamlı bir azalma bulunmuştur (** $p < 0,001$).



Şekil 4.6.7.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde *Nur 77* transkripsiyon faktörünün mRNA ifade seviyesine etkisi (** $p < 0,001$).

4.6.8. *Dax-1* Gen İfade Düzeyi

Şekil 4.6.8.1'de Leydig hücrelerinde 24 saat florür uygulaması sonucu *Dax-1* transkripsiyon faktörünün ifade düzeylerindeki farklılıklar gösterilmiştir. Florür uygulanan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında florür uygulanan tüm gruplarda *Dax-1* transkripsiyon faktörünün ifade düzeyinin anlamlı olarak arttığı gözlenmiştir (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).



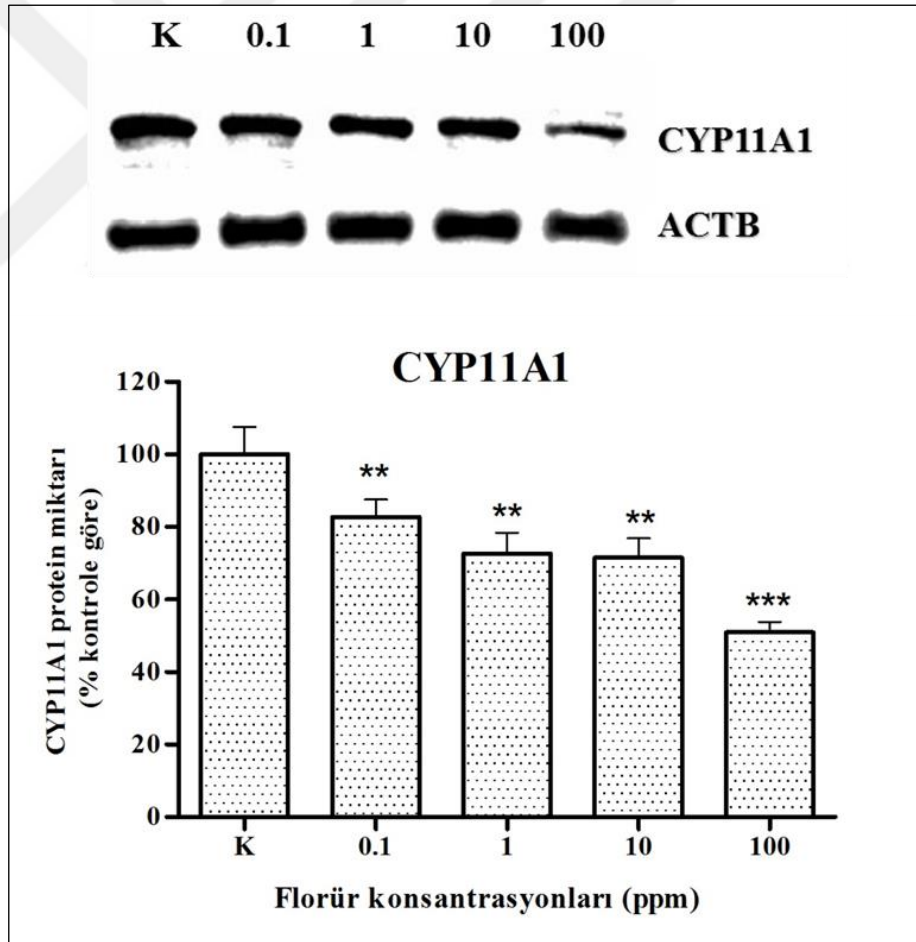
Şekil 4.6.8.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde *Dax-1* transkripsiyon faktörünün mRNA ifade seviyesine etkisi (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.7.WESTERN BLOT BULGULARI

Florürün, TM3 Leydig hücrelerinde steroidogenik protein (CYP11A1, 3 β -HSD ve LHR) miktarları üzerindeki etkileri Western blot yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Florür 24 saat süreyle 0,1, 1, 10 ve 100 ppm konsantrasyonlarında LH uyarımı yapılarak TM3 Leydig hücrelerine uygulanmış ve seçilen proteinlerin miktarı belirlenmiş ve sonuçlar hem protein bantları hem de kontrole göre % ekspresyon değerleri grafik olarak verilmiştir. Tüm sonuçlar referans olarak kullanılan β -AKTIN'e göre normalize edilmiştir.

4.7.1. CYP11A1 protein miktarı

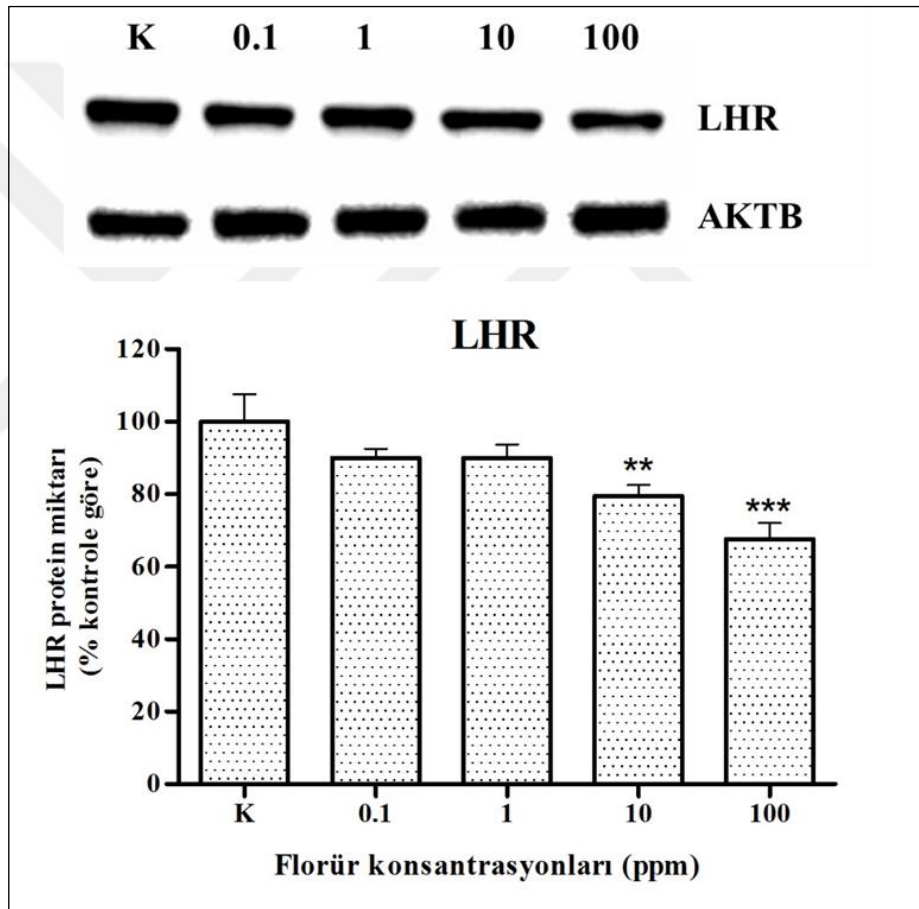
TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sonunda florür uygulanan grupları kontrol grubuna göre CYP11A1 protein miktarı bakımından karşılaştırıldığında konsantrasyona bağlı olarak anlamlı bir azalma göstermiş ve bulgular şekil 4.7.1.1'de verilmiştir.



Şekil 4.7.1.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde CYP11A1 protein miktarına etkisi (**p< 0,01, ***p< 0,001).

4.7.2. LHR Protein Miktarı

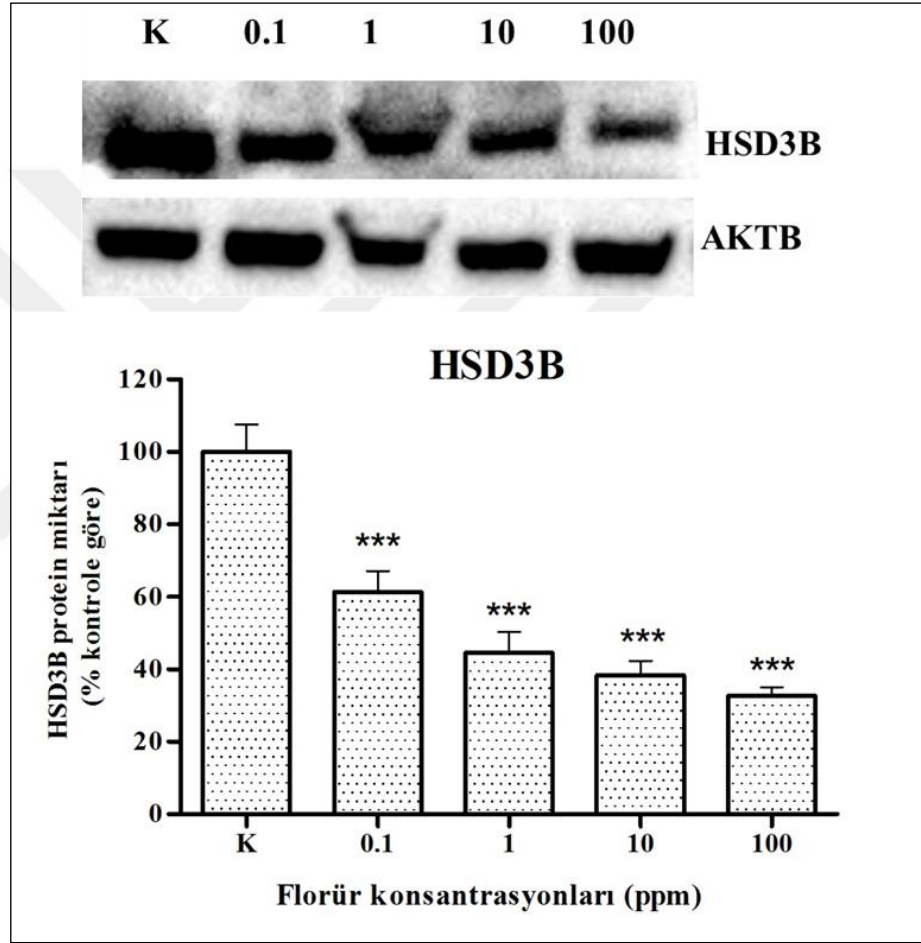
TM3 Leydig hücrelerinde 24 saat sonunda florür uygulanan grupların kontrol grubuna göre LHR protein miktarları şekil 4.7.2.1’de verilmiştir. Florür uygulanan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında 0,1 ve 1 ppm florür konsantrasyonlarında anlamlı bir farklılık bulunmazken, 10 ve 100 ppm florür uygulanan gruplarda konsantrasyona bağlı olarak LHR protein miktarlarında anlamlı bir azalma bulunmuştur (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).



Şekil 4.7.2.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde LHR protein miktarına etkisi (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

4.7.3. 3 β -HSD Protein Miktarı

Şekil 4.7.3.1’de Leydig hücrelerinde 24 saat florür uygulaması sonucu 3 β -HSD protein miktarları üzerindeki farklılıklar gösterilmiştir. Florür uygulanan gruplar kontrol grubuyla karşılaştırıldığında florür uygulanan tüm gruplarda 3 β -HSD protein miktarlarının anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur (**p<0,001).



Şekil 4.7.3.1: Florürün TM3 Leydig hücreleri üzerinde 3 β -HSD protein miktarına etkisi (**p<0,001).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Florür, memeli canlılar ve insanlar için önemli bir mineraldir ve vücudun farklı doku ve organlarında çeşitli etkilere sahiptir. En son verilere göre, dünya çapında 25 ülkeden yaklaşık 200 milyon insan florür toksisitesinden etkilenmektedir (Jagtap ve diğ., 2012; Trevors ve Saier, 2009). Florürün insan ve çevre sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE) tarafından içme sularında bulunabilecek maksimum florür miktarı 1,5 mg/L (ppm) ile sınırlandırılmıştır (İski, 2004; WHO, 2006). Ancak gerek besinlerden gerekse içme sularından maruz kaldığımız florür miktarı bu limitlerin çok üzerine çıkmaktadır (Kanduti ve diğ., 2016).

Florür beyin, böbrek, karaciğer, testis ve epididimis dahil olmak üzere yumuşak dokular üzerinde ciddi toksik etkilere sahip, yaygın bir şekilde bulunan doğal kirletici olduğu kabul edilmektedir (Doull ve diğ., 2006). Üreme sistemi florür toksisitesinin en fazla etki gösterdiği sistemlerden biridir. Sodyum florürün (NaF) birçok klinik ve laboratuvar çalışmasında fizyolojik etkileri ortaya çıkarılmış olup, test edilen hayvan türlerinde NaF toksisitesinin infertiliteyle sonuçlandığı gösterilmiştir (Freni, 1994, Ortiz-Perez ve diğ., 2003). Yapılan literatür araştırmalarında, florürün sperm morfolojisi, hareketliliği, kapasitasyonu ve akrozom tepkimesi dahil olmak üzere hem *in vitro* hem de *in vivo* döllenmede temel süreç olan sperm işlevini olumsuz yönde etkilediği ortaya konmuştur (Chinoy ve diğ., 1994; Elbetieha ve diğ., 2000; Dvora`kova`-Hortova` ve diğ., 2008; Izquierdo-Vega ve diğ., 2008; Kwon ve diğ., 2014; Pushpalatha ve diğ., 2005; Rahman ve diğerleri, 2013; Spittle, 2009; Sun ve diğ., 2010) Buna ek olarak, florürün, normal endokrin işlevleri değiştiren bir endokrin bozucu olduğu ve bu etkisini spermatozoa üzerindeki reseptörlerine bağlayarak gösterebileceği yapılan bir çalışmada saptanmıştır (Shrader-Frechette, 2007). NaF'in spermatozoa ve erkek infertilitesi üzerindeki etkisini araştıran çalışmalar, son on yılda artmış olmasına rağmen (Dvora`kova`-Hortova` ve diğ., 2008; Pushpalatha ve diğ., 2005; Spittle, 2009; Sun ve diğ., 2010; Zhang ve diğ., 2007), erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerini hangi yolakla gösterdiği konusunda bilgi eksikliği mevcuttur.

Florürün üreme sisteminde görevli çeşitli hücreler (sperm, Leydig ve Sertoli hücresi gibi) üzerinde yapılan çalışmalara bakıldığında, florürün hücre canlılığına etkisiyle ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır (Chinoy ve Sharma, 1998; Dong ve diğ., 2016; Elesawy ve diğ., 2016; Gupta ve diğ., 2007; Izquierdo-Vega ve diğ., 2008; Kumar ve diğ., 2010; Pushpalatha ve diğ., 2005; Song ve diğ., 2014; Wan ve diğ., 2006; Yang ve diğ., 2015; Yılmaz ve Erkan, 2015).

Chinoy ve Sharma 1998 yılında farelerle yaptıkları bir çalışmada su ve besinlerine karıştırarak 30 gün süreyle 10 mg/kg NaF, bu doza ek olarak sonraki 30 gün ayrı ayrı ve birlikte hayvan başına 0,002 µg vitamin D ve yine hayvan başına 2 µg vitamin E uygulamışlardır. Çalışma sonucunda tek başına NaF uygulanan gruplarda sperm canlılığının anlamlı olarak azaldığı, vitamin D ve E'nin ayrı ayrı ve birlikte NaF'a ilave olarak verildiği gruplarda ise hücre canlılığının tek başına NaF uygulanan gruplara göre anlamlı olarak arttığı bildirilmiştir. Başka bir çalışmada albino sıçanlara oral olarak 75 gün boyunca 4,5 ppm ve 9 ppm dozlarında NaF uygulanması sonucunda tüm dozlarda sperm canlılığının anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Pushpalatha ve diğ., 2005). 2006 yılında Wan ve diğerlerinin yaptığı çalışmaya göre 150 mg/L NaF dozu sıçanlara içme suyuyla 50, 80, 100 ve 120 gün boyunca uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda epididimal spermler alınarak sperm canlılığına bakıldığında uygulanan tüm gruplarda anlamlı olarak azalma bulunmuştur. 2007 yılında yapılan NaF'ın 2, 4 ve 6 ppm dozlarının altı ay boyunca sıçanlara uygulandığı diğer bir çalışmada altı ay sonunda testis dokuları alınarak Sertoli hücreleri sayılmış ve tüm dozlarda NaF'ın Sertoli hücre sayısını anlamlı olarak azalttığı tespit edilmiştir (Gupta ve diğ., 2007). Izquierdo-Vega ve diğerlerinin (2008) yaptıkları bir çalışmada ise, sıçanlara 24 saat süreyle 5 mg/kg dozunda NaF oral yolla sekiz hafta boyunca verilmiş, sekiz hafta sonunda spermatozoa izolasyonu sonucu yapılan hücre canlılığı araştırmasında NaF'ın hücre canlılığını etkilemediği rapor edilmiştir. Erkek Gine domuzlarıyla yapılan bir çalışmada, florür 150 ppm dozunda 13 hafta boyunca içme suyuyla hayvanlara uygulanmış, sperm sayısı ve canlılığında anlamlı bir azalma bulunmuştur (Dong ve diğ., 2016). Yine florürün 20 mg/kg dozunda tavşanlara oral yolla uygulandığı iki farklı çalışmada, florürün sperm sayısında anlamlı bir azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Elesawy ve diğ., 2016; Kumar ve diğ., 2010).

Sodyum florürün 5, 10 ve 20 ppm konsantrasyonları Leydig hücrelerine 24, 48, 72, 96 ve 120 saat boyunca uygulanmış ve çalışma sonucunda florürün tüm saat ve konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığı sonucuna ulaşımlardır (Song ve diğ., 2014). Yang ve diğ. 2015 yılında yaptığı çalışmaya göre, florürün 12 ve 24 ppm dozlarında Sertoli hücrelerinde hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı sonucuna varılmıştır. Yine Sertoli hücreleriyle yapılan bir çalışmada, 4 ve 20 ppm konsantrasyonlarında florürün 24 ve 48 saat uygulanması sonucunda hücre canlılığını doz ve zamana bağlı olarak azalttığı gösterilmiştir (Yılmaz ve Erkan, 2015).

Yukarıda bahsedilen çalışmalarda yüksek florür dozlarında hücre canlılığında anlamlı azalmalar görülürken, yapılan bu *in vitro* çalışmada, TM3 Leydig hücrelerinde NaF'ın 0,01-100 ppm konsantrasyon aralığında uygulanması sonucunda, florürün on farklı konsantrasyonunun da TM3 Leydig hücrelerinin canlılığını azalttığı bulunmuştur. Florürün 6 ve 12 saat boyunca uygulanması sonucunda 10 ppm konsantrasyonundan sonraki konsantrasyonlarda anlamlı azalma görülürken, 24 saat sonundan 0,1 ppm konsantrasyonu ve üzeri konsantrasyonlarda anlamlı bir azalma bulunmuştur. 48 ve 72 saat gibi uzun süreli maruziyetlerde ise 0,01 ppm gibi düşük konsantrasyonlarda da hücre canlılığını %80'inin altına düşürmüştür. Yapılan çalışmalar (Gupta ve diğ., 2007; Son ve diğ., 2014; Yang ve diğ., 2015) florürün yüksek konsantrasyonlarda hücre canlılığını azalttığını gösterirken, bu çalışmada florürün düşük konsantrasyonlarda bile Leydig hücre canlılığını anlamlı olarak azalttığı saptanmıştır.

Florürün hücrelerin sentez fazına geçişini durdurarak hücre çoğalmasını engellediği bilinmektedir (Chang ve Chou, 2001; Mendoza-Schulz ve diğ., 2009; Riksen ve diğ., 2011; Song ve diğ., 2002; Yan ve diğ., 2007; Yılmaz ve Erkan, 2015). İnsan pulpa (dişözü) hücreleri ile yapılan *in vitro* bir çalışmada florürün doz ve zamana bağlı olarak hücrelerdeki DNA sentezini 5×10^{-4} , 10×10^{-4} ve 20×10^{-4} mM dozlarında inhibe ettiği bildirilmiştir (Chang ve Chou, 2001). Promiyelositik lösemi hücreleriyle (HL-60) yapılan bir çalışmada, hücrelere 24 saat boyunca 50, 100, 150, 200 ve 250 ppm dozlarında NaF uygulanmıştır. Bu çalışma sonucunda 100 ppm NaF uygulanan grupta sentez fazındaki hücrelerin %87 oranına ve 150 ppm NaF uygulanan grupta ise %16 oranına kadar düştüğü tespit edilmiştir (Song ve diğ., 2002). Yan ve diğerlerinin, (2007) yaptıkları çalışmada, ameloblast hücre soyuna 48 saat süreyle 4, 16, 64, 256, 1024 ve 4096 μM dozlarında NaF

vermişlerdir. Bu çalışma sonucunda 16 ve 64 μM gibi oldukça düşük dozlarda hücre çoğalmasında anlamlı bir artış görülürken, 1024 ve 4096 μM gibi yüksek dozlarda hücre çoğalmasında anlamlı bir azalma meydana geldiği bulunmuştur. Mendoza-Schulz ve diğerlerinin (2009) GH4C1 hipofiz tümör hücreleriyle yaptıkları çalışmada 24 saat süreyle 0,23, 1,2, 2,4, 10,7, 107 ve 1072 $\mu\text{mol/L}$ florür uygulamışlardır. Bu çalışma sonucunda 10,7 $\mu\text{mol/L}$ dozunda sentez fazındaki hücre oranında anlamlı bir artış gösterirken, 1072 $\mu\text{mol/L}$ florür uygulanan dozda anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. 2011 yılında ameloblast kökenli hücre soyu ile 24 ve 72 saat süreyle yapılan bir *in vitro* çalışmada ise, 0,46 ve 2,25 ppm dozlarında NaF uygulanmış ve sonuçta sadece 2,25 ppm NaF'in 72 saat süreyle uygulandığı durumda hücre çoğalmasında anlamlı bir azalma bulunmuştur (Riksen ve diğ., 2011). Yılmaz ve Erkan'ın yaptıkları bir çalışmada, Sertoli hücrelerine 4 ve 20 ppm konsantrasyonlarında NaF 24 ve 48 saat boyunca uygulanmış, sonuçta sadece 20 ppm dozunda anlamlı bir azalma bulunmuştur (Yılmaz ve Erkan, 2015).

Yapılan bu çalışmada, TM3 Leydig hücrelerine NaF'in 0,01 ile 200 ppm arasında 10 farklı konsantrasyonunun 24 saat boyunca uygulandığı gruplarda, florürün 0,05 ppm ve üzeri konsantrasyonlarda TM3 Leydig hücrelerinde DNA sentez fazındaki hücreleri anlamlı derecede azalttığı bulunmuştur. Çalışılan diğer hücre soylarında da (Chang ve Chou, 2001; Mendoza-Schulz ve diğ., 2009; Riksen ve diğ., 2011; Yan ve diğ., 2007) olduğu gibi düşük florür konsantrasyonlarının Leydig hücrelerinde DNA sentezini anlamlı olarak baskıladığı ve böylelikle hücre çoğalmasını engellediği sonucuna varılmıştır.

Laktat dehidrogenaz (LDH) hücre zarı parçalandığında hücre içinden dış ortama geçen ve hücre sitoplazmasında bulunan bir enzimdir. *In vitro* çalışmalarda hücrelerin ölümü ya da plazma zarındaki hasar LDH enzim aktivitesinin artışına yol açmaktadır (Hassan ve Yousef, 2009). Florür toksisitesi hücrelerin zar bütünlüğünün bozulmasına ya da hücrelerin ölümüne yol açmaktadır. Florürün neden olduğu süper oksit anyonu ve hidroksil düzeylerinin artması da hücre zarının oksidatif hasarına yol açtığından LDH seviyesinin artması ile sonuçlanır (Kaczor ve diğ., 2005). Sıçan hipokampal nöronlarının kültüre edilmesi ile yapılan bir çalışmada, 24 saat süreyle 20, 40 ve 80 mg/L dozlarında NaF uygulanmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre 40 ve 80 mg/L uygulanan dozlarda

NaF'in laktat dehidrogenaz aktivitesini hem kontrole hem de 20 mg/L uygulanan doza göre anlamlı olarak arttırdığı bulunmuştur (Zhang ve diğ., 2007). Riksen ve diğelerinin (2011) ameloblast kökenli hücre soyu ile yaptıkları bir *in vitro* çalışmada NaF'ın 0,46 ve 2,25 ppm dozlarında laktat dehidrogenaz aktivitesini etkilemediğini tespit etmişlerdir. Zakrzewska ve diğelerinin (2002) yaptıkları çalışmada koç semenini 5 saat kültüre ederek 20, 100, 200 µmol/L ve 0.1 mol/L NaF uygulamışlardır. Bu çalışma sonucunda 20, 100 ve 200 µmol/L yapılan uygulamalarda NaF'ın laktat dehidrogenaz aktivitesini anlamlı olarak azalttığı, 0.1 mol/L dozunda ise anlamlı olarak arttırdığı saptanmıştır. Zhang ve diğ., (2006) tarafından Wistar albino sıçanlarla yapılan bir çalışmada 2, 4, 6, 8 hafta süreyle 100 mg/L NaF uygulanmış ve testis dokusunda laktat dehidrogenaz aktivitesi ölçülmüştür. Çalışmanın sonuçlarına göre, 2 ve 4 hafta NaF uygulanan grupta kontrole göre laktat dehidrogenaz aktivitesinde anlamlı bir artış meydana geldiği bulunmuştur. Yapılan bir başka çalışmada, fareden alınan sperm süspansiyonuna 90 dakika boyunca 2,5-5 ve 10 mM NaF uygulaması sonucunda laktat dehidrogenaz aktivitesi ölçülmüş ve gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Kim ve diğ.,2015).

Yapılan bu çalışmada, 24 saat süreyle 0.1, 1, 10 ve 100 ppm NaF uygulanan konsantrasyonlarda TM3 Leydig hücrelerindeki laktat dehidrogenaz aktivitesini yüksek konsantrasyonlarda arttırması, florürün *in vivo* yapılan çalışmalarda (Zhang ve diğ., 2006; ve diğ. hücre tiplerinde (Riksen ve diğ., 2011; Zhang ve diğ., 2007) olduğu gibi Leydig hücrelerinde de sitotoksositeye neden olduğunu düşündürmektedir.

Testiste üretilen en önemli androjenlerden biri olan testosteron, spermatogenezin başlatılması için büyük önem taşımaktadır (Pushpalatha ve diğ., 2005). Yüksek florür maruziyetinin, üreme toksisitesi, spermatogenez (Pushpalatha ve diğ. 2005), sperm morfolojisi ve motilitesi (Spittle, 2009), sperm hiperaktivasyonu (Sun ve diğ., 2011), sperm dölleme yeteneği (Dvoráková-Hortová ve diğ., 2008) ve üreme hormonlarının salgısı (Ortiz-Pérez ve diğ., 2003; Susheela ve Jethanandani, 1996) üzerine toksik etkisi birçok epidemiyolojik ve laboratuvar çalışmaları ile gösterilmiştir. Testiküler androjen ve normal spermatogenez için testosteron (T), follükül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) da dahil olmak üzere üreme hormonları gereklidir (Niu ve diğ., 2015). Bu hormonların salgılanmasının hem hipotalamus-hipofiz düzenleme hem de

testiküler steroidogenez ile ilişkili olduğu iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, florürle uyarılan üreme işlev bozukluğunda hipotalamus-hipofiz-testis eksenindeki hangi doku, hormon ve temel enzimlerin rol aldığı büyük oranda bilinmemektedir (Niu ve diğ., 2015). Florürün, üretilen testosteron miktarı üzerindeki etkisi daha önce yapılan çalışmalarda incelenmiş ve florür konsantrasyonuna bağlı olarak değişiklik gösterdiği bulunmuştur (Cao ve diğ., 2016; Das ve diğ., 2006; Dong ve diğ., 2016; Feng ve diğ., 2015; Han ve diğ., 2015; Ghosh ve diğ., 2002; Gupta ve diğ., 2007; Niu ve diğ., 2015; Ortiz-Perez ve diğ., 2003; Reddy ve diğ., 2007).

Feng ve diğerlerinin 2015 yılında yaptıkları bir çalışmaya göre, sıçanlara oral yolla 25 mg/kg sodyum florür 50 gün boyunca uygulanmıştır. Uygulama sonunda serum testosteron düzeylerine bakıldığında, NaF uygulanan grup kontrol grubuyla karşılaştırılmış ve testosteron seviyesinin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. Farelerle yapılan başka bir çalışmada, sodyum florür içme suyuyla 25, 50 ve 100 mg/L dozunda 11 hafta boyunca farelere uygulanmış ve deney süresi tamamlandığında kandaki ve testisteki testosteron miktarları hesaplanmıştır. Elde edilen veriler hem testisteki hem de kandaki testosteron seviyelerinin NaF dozuna bağlı olarak azaldığını göstermektedir (Cao ve diğ., 2016). Das ve diğerlerinin, albino sıçanlarla yaptıkları bir çalışmada, hayvanlara 20 mg/kg florür 28 gün boyunca oral yolla verilmiş ve plazma testosteron, FSH ve LH seviyeleri ölçülmüştür. Sonuç olarak, sıçanlarda florürün plazma testosteron, FSH ve LH seviyelerini anlamlı olarak azalttığı belirtilmiştir (Das ve diğ., 2006).

2007 yılında yapılan başka bir çalışmada, ergin dişi Wistar sıçanlara hamilelikleri ve laktasyon süresi boyunca (21 gün) 4,5 ve 9 ppm sodyum florür içme suyuyla birlikte verilmiştir. Doğan erkek sıçanlar laktasyon döneminden sonra annelerinden ayrılmış ve 90 günlük olduklarında kan örnekleri toplanarak testosteron seviyelerine bakılmıştır. Toplanan örneklerdeki testosteron seviyeleri karşılaştırıldığında NaF alan annelerden doğan erkek sıçanlarda doza bağlı olarak testosteron seviyesinin önemli ölçüde azaldığı görülmüştür (Reddy ve diğ., 2007). Gupta ve diğerlerinin, 2007 yılında yaptıkları bir çalışmada, 2, 4 ve 6 ppm dozlarında NaF altı ay boyunca erkek sıçanlara uygulanmış ve serum testosteron düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, florür uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre doza bağlı olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır. Florürün hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde etkisini açığa çıkarmak

amacıyla yapılan bir çalışmada, 25, 50 ve 100 mg/L sodyum florür 180 gün boyunca farelere içme suyuyla verilmiştir. Deney süresi tamamlandığında, plazma testosteron düzeylerine bakılmış ve kontrole göre sadece yüksek florür grubunda (100 mg/L) anlamlı bir azalma saptanmıştır (Niu ve diğ., 2015).

Yapılan bu çalışmada TM3 Leydig hücrelerine LH uyarımlı olarak 0,1, 1, 10 ve 100 ppm florür konsantrasyonlarının uygulandığı deney gruplarında serbest testosteron miktarlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmesi yapılan *in vivo* çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Cao ve diğ., 2016; Das ve diğ., 2006; Dong ve diğ., 2016; Han ve diğ., 2015; Ghosh ve diğ., 2002; Gupta ve diğ., 2007; Reddy ve diğ., 2007). Niu ve diğerlerinin (2015) yaptıkları çalışmada testosteron miktarında sadece yüksek dozlarda anlamlı bir azalma gözlenirken, Leydig hücreleriyle yapılan bu çalışmada, düşük konsantrasyonlarda bile testosteron seviyelerinde anlamlı bir azalma saptanmıştır.

Leydig hücrelerinde, steroidogenez, uygun seviyedeki cAMP'ye bağımlı olan birkaç basamakta gerçekleştirilir (Beavo ve Brunton, 2002; Lin ve diğ., 2001). cAMP, ATP'den adenil siklaz enziminin etkisiyle üretilir, bu nedenle adenil siklaz enziminin düzgün işleyişi dengeli bir steroidogenezin sürdürülmesi için çok önemlidir. Steroidogenik yolda önemli bir basamak olan, dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana kolesterol taşınması, bir transmembran protein olan StAR proteini tarafından uygun bir seviyedeki cAMP'nin varlığıyla gerçekleşir (Privalle ve diğ., 1983; Stocco ve Clark, 1997). Aktif steroidogenik hücrelerde, StAR geninin ekspresyonu ve aktivasyonu LH'nin maksimum uyarımı altında cAMP'ye bağımlıdır (Andrew ve diğerleri, 2007). Yapılan çalışmalarda, çeşitli endokrin bozucu kimyasalların Leydig hücrelerinde azalan cAMP miktarına bağlı olarak StAR gen ekspresyonunun anlamlı olarak azalttığı ve buna bağlı olarak testosteron biyosentezinin olumsuz yönde etkilendiği bildirilmiştir (Fa ve diğ., 2013; Kumar ve diğ., 2008; Liu ve diğ., 2014; Pogrmic ve diğ., 2009; Zhang ve diğ., 2011).

Liu ve diğerlerinin 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada, Leydig hücrelerine çeşitli konsantrasyonlarda zearalenon maddesi uygulanmış ve cAMP düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen veriler zearalenonun cAMP düzeylerini anlamlı olarak azalttığını ve bunun sonucunda, StAR geninin ekspresyonundaki anlamlı azalmayla testosteron biyosentezini

baskıladığını göstermektedir. Yapılan başka bir çalışma, herbisit olarak kullanılan atrazin maddesinin Leydig hücrelerinde doza bağlı olarak cAMP miktarlarını ve cAMP bağımlı steroidogenik genlerin ekspresyon seviyelerini anlamlı olarak azalttığını saptamışlardır. Çevresel kirlenici olduğu bilinen polibromine difenil eter ve kadmiyumla yapılan çalışmalarda, kadmiyum maruziyetinin hücre içi cAMP miktarında anlamlı bir azalmaya, polibromine difenil eter maruziyetinin ise cAMP miktarında anlamlı bir artışa neden olduğunu bildirilmiştir (Wang ve diğ., 2011; Zhang ve diğ., 2011).

Yapılan bu çalışmada TM3 Leydig hücrelerine LH uyarımlı olarak 0,1, 1, 10 ve 100 ppm florür konsantrasyonlarının uygulandığı deney gruplarında cAMP miktarlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmesi, diğer maruz kaldığımız çevresel kirlenicilerle yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Fa ve diğ., 2013; Kumar ve diğ., 2008; Liu ve diğ., 2014; Pogrmic ve diğ., 2009; Zhang ve diğ., 2011). Florürün düşük konsantrasyonlarında bile görülen cAMP miktarlarındaki azalış, steroidogenezde görevli genlerin ekspresyon seviyelerindeki düşüşü açıklığa kavuşturmaktadır.

Testosteron biyosentezi, Leydig hücrelerinde kolesterol taşınımı ve steroid biyosentezi sürecini tamamlamak için StAR, P450_{scc}, 3 β -HSD, CYP17, 17 β -HSD ve CYP19 gibi birçok fonksiyonel molekülün iş birliğini gerektirir (Jana ve Samanta, 2006). StAR, Leydig hücresinde dış mitokondriyal membrandan iç mitokondriyal membrana kolesterol taşınmasından sorumludur ve testosteron biyosentezi için hız sınırlayıcı bir faktör olarak düşünülmüştür (Stocco ve Clark, 1996). Kolesterol iç mitokondriyal membrana aktarıldıktan sonra, steroidogenezde ilk adım olan P450_{scc} ile pregnenolona dönüştürülür (Stocco ve Clark, 1996). Sonra pregnenolon 3 β -HSD ile hemen progesterona dönüştürülür. Bunu takiben, progesteron, CYP17 tarafından androstenediona, son olarak, androstenedion 17 β -HSD ile testosterona dönüştürülür. Testosteron biyosentezinde mitokondri önemli rol oynar. Florür tarafından indüklenen mitokondrideki morfolojik lezyonlar, timus ve sperm dahil olmak üzere farklı organlarda gözlenmiştir (Sun ve diğ., 2011; Wang ve diğ., 2009). Mitokondrideki bu hasarın testosteron biyosentezinin bozukluğuna, böylelikle testisin fonksiyonunu yerine getirememesine yol açabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Niu ve diğ., 2015). Yine yapılan birçok çalışmada, florür uygulanan sıçanlarda FSH, LH, testosteron, progesteron (P) ve östradiol (E2) hormon seviyelerinin önemli ölçüde düştüğü gösterilmiştir (Ghosh ve diğ., 2002; Sarkar

ve diğ., 2006; Zhou ve diğ., 2013). Florür steroidogenezi etkileyerek testosteron düzeylerinin azalmasına yol açabileceği ve bu etkiyi steroidogenezde önemli enzimler olan 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (3 β -HSD) ve 17 β -hidroksisteroid dehidrogenaz (17 β -HSD) aktivite düzeylerini azaltarak meydana getirebileceği yapılan çalışmalarla saptanmıştır (Ghosh ve diğ., 2002; Narayana ve Chinoy, 1994; Pushpalatha ve diğ., 2005; Sarkar ve diğ., 2006). Çevresel toksinlerin ve endokrin bozucu kimyasalların testosteron biyosentezinde görevli genlerin ifade düzeylerine etkisini gösteren birçok çalışma bulunmaktadır (Abarikwy ve diğ., 2013; Adedara ve diğ., 2014; Han ve diğ., 2015; Dong ve diğ., 2016; Feng ve diğ., 2012; Li ve diğ., 2016; Nanjappa ve diğ., 2014; Niu ve diğ., 2015; Raucci ve diğ., 2014; Zhang ve diğ., 2017).

Ergin sıçanlarla yapılan bir çalışmada deney gruplarına 14 gün boyunca bisfenol AF maddesi 2, 10, 50 ve 200 mg/kg dozlarında gavaj yoluyla uygulanmıştır. Bisfenol AF'nin kolesterol taşınmasında ve steroidogenezde rol alan genler üzerine etkisine bakıldığında 200 mg/kg uygulama yapılan grupta *StAR*, *Cyp11a1* ve *Hsd17b* genlerinin ifade düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmektedir. Ancak, bisfenol AF uygulanan gruplarla kontrol grupları karşılaştırıldığında *Hsd3b* ve *Cyp17a* genlerinin anlatımında anlamlı bir değişiklik görülmemektedir (Feng ve diğ.; 2012).

Chen ve diğerleri (2013) dibütil ve monobütil fitalatların Leydig tümör hücrelerinde (MLTC-1 hücre soyu) steroidogenik yolaktaki etkilerini incelemek için yaptıkları çalışmada hücrelere 24 saat boyunca 0,01, 1, 100 μ mol/l dozlarında dibütil fitalat ve 0,1, 10, 1000 μ mol/l dozlarında monobütil fitalat uygulamışlardır. Her iki maddede de artan uygulama dozlarına bağlı olarak *P450scc*, *Hsd3b* ve *P450c17* genlerinin mRNA seviyelerinde kontrol grubuna göre azalma tespit etmişlerdir. Yapılan bir diğer çalışmada da fare Leydig tümör hücrelerine hCG uyarımı yapılarak 0, 10⁻⁹, 10⁻⁸, 10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M monobütil fitalat 24 saat süreyle uygulanmıştır. StAR mRNA seviyesi ve protein miktarında 10⁻⁹ ve 10⁻⁸ M konsantrasyonlarında bir değişiklik gözlenmezken, 10⁻⁷ ve 10⁻⁶ M monobütil fitalat hem mRNA seviyesinde hem de protein miktarında artışa sebep olmuştur. 3 β -HSD ve p450scc protein miktarlarında ise 24 saatin sonunda bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı çalışmada SF-1 ve GATA-4 transkripsiyon faktörlerinin de DNA'ya bağlanma oranlarına ve protein miktarlarına bakılmış ve düşük doz gruplarında

(10^{-6} M) bu transkripsiyon faktörleri ile StAR promotör bölgelerinin DNA'ya bağlanma oranlarında artış gözlenmiştir (Hu ve diğ., 2013).

Farelerden izole edilen Leydig hücreleriyle yapılan bir çalışmada 1, 5, 10, 20 µg/ml zearalenon 1, 6, 12 ve 24 saat boyunca hücrelere uygulanmıştır ve tüm gruplar 0,2 nmol cAMP ile inkübe edilmiştir. *Cyp11a1*, *Cyp17a1* ve *Hsd17b* genlerinin mRNA seviyelerinde artan zearalenon konsantrasyonuna ve zamana bağlı olarak anlamlı bir azalma görülmüştür. *StAR* geninin ekspresyonunda ise uygulama dozu ve süresinden bağımsız olarak artış tespit edilmiştir. *Hsd3b* geninin mRNA seviyesinde de artan doza ve zamana bağlı olarak yükselme gözlenmiştir (Liu ve diğ., 2014). Khan ve diğ. (2013) sıçanlarla yaptıkları çalışmada deney grubundaki hayvanlara 28 gün süreyle 40 ppm arsenik uygulamışlardır. Deney grubundaki sıçanlardan izole edilen Leydig hücrelerinde *StAR* ve *Cyp11a1* genlerinin ekspresyonlarının kontrol grubuna göre anlamlı düşüş gösterdiği tespit edilmiştir. 60 gün boyunca 4 ve 8 mg/kg akrilamid uygulanmış sıçanlardan elde edilen testis dokularıyla yapılan bir çalışmada *StAR*, *Cyp11a1*, *Cyp17a1* ve *Hsd3b* genlerinin ifade düzeylerine bakılmıştır. Deney sonucunda, 8 mg/kg dozunda *StAR* ve *Cyp11a1* genlerinin ifade düzeyinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlenmiştir. *Cyp17a1* ve HSD3B genlerinin mRNA seviyelerinde ise bir etki görülmemiştir (Camacho ve diğ., 2012).

Florürün steroidogenezde önemli rol oynayan 3β -HSD ve 17β -HSD enzim düzeylerini anlamlı olarak azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Ghosh ve diğ., 2002; Orta ve Erkan, 2014; Pushpalatha ve diğ., 2005; Reddy ve diğ., 2007). Ergin sıçanlarla yapılan bir çalışmada deney gruplarına 29 gün boyunca florür 20 mg/kg dozunda gavaj yoluyla uygulanmıştır. Florürün steroidogenezde rol alan 3β -HSD ve 17β -HSD enzim düzeylerine etkisine bakıldığında florür gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma görülmüştür (Ghosh ve diğ., 2002). Pushpalatha ve diğ. (2005) yılında yaptıkları çalışmaya göre, florür 4,5 ve 9 ppm dozlarında 75 gün boyunca sıçanlara uygulanmıştır. Deney süresi sonunda, homojenize edilen testis dokularında 3β -HSD ve 17β -HSD enzim miktarlarına bakılmış ve sodyum florürün her iki dozda da 3β -HSD ve 17β -HSD enzim miktarlarını anlamlı olarak azalttığı bulunmuştur.

Ayrıca florürün steroidogenik yolakla ilgili genlerin ifade düzeylerini nasıl etkilediğini gösteren sınırlı sayıda *in vivo* çalışma (Dong ve diğ., 2016; Niu ve diğ., 2015) bulunurken

in vitro çalışma yoktur. Niu ve diğerlerinin, farelerle yaptıkları bir çalışmada, hayvanlara 25, 50 ve 100 mg/L sodyum florür 180 gün boyunca uygulanmış steroidogenezde görevli olan *LH-R*, *FSH-R*, *StAR*, *P450scc*, *CYP17*, *CYP19*, *3 β -HSD* ve *17 β -HSD* genlerin ifade düzeyi RT-PCR ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, florür uygulaması sonucunda *LH-R*, *FSH-R*, *P450scc* ve *3 β -HSD* mRNA düzeylerinde anlamlı bir azalma görülürken, *StAR*, *CYP17* ve *17 β -HSD* mRNA düzeylerinde anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Niu ve diğ., 2015). Yapılan diğer bir çalışmada, Gine domuzlarına 150 mg/L hidrojen florür 13 hafta boyunca içme suyuyla uygulanmış, *StAR* ve *P450scc* genlerinin ve proteinlerinin ekspresyon seviyeleri belirlenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, florür uygulanan grupta kontrole göre *StAR* ve *P450scc* genlerinin ve proteinlerinin ekspresyon seviyesinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (Dong ve diğ., 2016).

Bu tez çalışmasında 0,1, 1, 10 ve 100 ppm konsantrasyonlarında florüre 24 saat süreyle maruz kalan TM3 Leydig hücrelerinde deney sonunda *StAR* geni ifade düzeyinde tüm gruplar da kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma gözlenmesi Dong ve diğerlerinin 2016 yılında yaptıkları çalışma ile paralellik göstermektedir. *StAR* geninin ekspresyonundaki bu artış *Sf-1*, *Gata-4* ve *Nur77* transkripsiyon faktörlerinin gen anlatımındaki artan florür konsantrasyonuna bağlı düşüştür kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca yine *Sf-1* transkripsiyon faktörüne zıt çalışan *StAR* gen ekspresyonunu baskılayan bir transkripsiyon faktörü olan *Dax-1*'in florür uygulanan gruplardaki artışı da, *StAR* geninin ekspresyon seviyesindeki azalmayı desteklemektedir. Florür uygulanan gruplarda, steroidogenik yolakta mitokondriye taşınan kolesterolden pregnenolon oluşturulmasında görevli *Cyp11a1* geninin ifade düzeyinde azalmada, Dong ve diğerlerinin (2016) florür maruziyetinde *Cyp11a1* gen ekspresyonunun azaldığını gösteren çalışmasıyla benzerlik göstermektedir. Pregnenolonun progesterona çevrilmesinde görevli *Hsd3b* geni ve steroidogenik yolakta son basamakta androstenediondan testosteron oluşmasını sağlayan *Hsd17b* genlerinin ifade düzeylerinde 24 saatin sonunda 0,1, 1, 10 ve 100 ppm florür uygulanan gruplarda kontrole göre anlamlı bir düşüş görülmektedir. Bu yaptığımız çalışma, florürün uygulanan tüm konsantrasyonlarında görülen *Hsd3b* ve *Hsd17b* genlerinin ifade düzeyindeki azalışa bakıldığında, florürün testosteron miktarına etkisini gösteren çalışmalardaki (Cao ve diğ., 2016; Das ve diğ., 2006; Feng ve diğ., 2015; Ortiz-Perez ve diğ., 2003) testosteron seviyesindeki düşüşün, bu genlerin ifade düzeyindeki değişiklikler sonucu olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, steroidogenezin başlaması

için gerekli olan LH'nın bağlanacağı reseptörü LH-R'nin, ve yukarıda bahsedilen CYP11A1 ve 3 β -HSD protein miktarlarının florür maruziyeti sonucunda azalması, florürün translasyon basamağında da etkili olduğunu düşündürmektedir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, testiste steroidogenezden sorumlu Leydig hücreleri florürün erkek üreme sistemi üzerindeki toksisitesinde model olarak kullanılmış ve Dünya Sağlık Örgütü'nün ve Türk Standartları Enstitüsü'nün florür alımı için izin verilen konsantrasyonların çok altında uygulanan florürün testosteron biyosentezini olumsuz yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Elde edilen veriler, florürün testosteron ve cAMP seviyelerini azaltarak, steroidogenezde görevli Sf-1, GATA-4, Nur77 transkripsiyon faktörlerinin mRNA ekspresyonlarını baskıladığı, bu transkripsiyon faktörlerine zıt çalışan Dax-1 transkripsiyon faktörünün mRNA seviyelerini arttırdığını göstermektedir. Transkripsiyon faktörlerindeki bu değişiklik ile birlikte, florür Leydig hücrelerinde steroidogenezde anahtar rol oynayan *StAR*, *Hsd3b*, *Hsd17b*, *Cyp11a1* genlerinin ve LH-R, CYP11A1, 3 β -HSD proteinlerinin ekspresyonunu baskılamaktadır. Sonuç olarak, Leydig hücrelerinde testosteron ve cAMP miktarındaki azalma, steroidogenezde rol oynayan genlerin ekspresyon seviyelerinin ve protein düzeylerinin azalması, testislerin florür maruziyetinde birincil hedef organı olabileceğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

- Abarikwu, S. O., Pant, A. B., & Farombi, E. O., 2013, Effects of quercetin on mRNA expression of steroidogenesis genes in primary cultures of Leydig cells treated with atrazine, *Toxicology in Vitro*, 27 (2), 700-707.
- Adamek, E., 2005, İn vitro and in vivo effects of fluoride ions on enzyme activity, *Annals Academy of Medicine Singapore*, 51, 69-85.
- Adedara, I. A., Nanjappa, M. K., Farombi, E. O., & Akingbemi, B. T., 2014, Aflatoxin B 1 disrupts the androgen biosynthetic pathway in rat Leydig cells, *Food and Chemical Toxicology*, 65, 252-259.
- Akdoğan, M., Bilgili, A., Karagöz, E., Gökçimen, A., Erarslan, G., Üstüner, E., 2002, Flor zehirlenmesi oluşturulmuş tavşanların böbrek dokusunda yapısal ve biyokimyasal değişiklikler, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 26, 71-77.
- Aktümsek, A., 2006, *Anatomi ve Fizyoloji İnsan Biyolojisi*, Nobel Yayıncılık, Ankara.
- Andrew, S., June Liu, Barry, R.Z., Haolin, C., 2007, Effect of myxothiazol on Leydig cell steroidogenesis: inhibition of luteinizing hormone mediated testosterone synthesis but stimulation of basal steroidogenesis, *Endocrinology*, 148 (6), 2583–2590.
- Angmar-Mansson, B. and Whitford, G.M., 1990, Environmental and physiological factors affecting dental fluorosis, *Journal of Dental Research*, 69, 706-13.
- Ashley, F., 2012, *Male reproductive system*, <http://www.studyblue.com/notes/n/4-male-reproductive-system/deck/4878686>, [Ziyaret tarihi: 20 Ekim 2016].
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry), 2001, *Toxicological Profile for Fluorides, Hydrogen Fluoride, and Fluorine*, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA
- Avcı, B., Baysal, S.U., Gökçay, G., 2009, Çocuklarda flor kullanımının yarar ve zararlarının değerlendirilmesi, *Çocuk Dergisi*, 9, 8-15.
- Ayoob, S. and Gupta, A.K., 2006, Fluoride in Drinking Water: A Review on the Status and Stress Effects, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 36, 433–487.
- Barbier, O., Arreola-Mendoza, L., Razo, L.M.D., 2010, Molecular mechanisms of fluoride toxicity, *Chemico-Biological Interactions*, 188, 319-333.

- Beavo, J.A., Brunton, L.L., 2002, Cyclic nucleotide research – still expanding after half a century, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 710–718.
- Beyhan, M., 2003, *Atık çamurlar ve doğal malzemeler ile sulardan florür iyonu gideriminin araştırılması*, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Bielinska, M., Seehra, A., Toppari, J., Heikinheimo, M., Wilson, D.B., 2007, GATA-4 is required for sex steroidogenic cell development in the fetal mouse, *Developmental Dynamics*, 236:203–213.
- Bloom, W. and Fawcett, D.W., 1994, *A Textbook of Histology*, ed. 12, Chapman & Hall, New York.
- Bobek, S., Kahl, S., Ewy, Z., 1976, Effect of long-term fluoride administration on thyroid hormones level blood in rats, *Endocrinologia Experimentalis*, 10 (4), 289-95.
- Bozdağın, Ö., 2000, *Fizyoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Burnette, W. N., 1981, “Western blotting”: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Analytical biochemistry*, 112(2), 195-203.
- Bustin S.A., 2000, Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays, *Journal of molecular endocrinology*, 25:169-193.
- Bustin S.A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M.W., 2005, Quantitative real-time RT-PCR – a perspective, *Journal of Molecular Endocrinology*, 34:597-601.
- Camacho L., Latendresse J.R., Muskhelishvili L., Patton R., Bowyer J.F., Thomas M., Doerge D.R., 2012, Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats, *Toxicology Letters*, 1; 211(2):135-43.
- Cao, J., Chen, Y., Chen, J., Yan, H., Li, M., & Wang, J., 2016, Fluoride exposure changed the structure and the expressions of Y chromosome related genes in testes of mice. *Chemosphere*, 161, 292-299.
- Chang, Y.C. and Chou, M.Y., 2001, Cytotoxicity of fluoride on human pulp cells cultures in vitro, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 91, 230-234.
- Chapman, D., 1996, *Water Quality Assesments*, Second Edition.
- Chen, H., Hardy, M.P, Huhtaniemi, I., Zirkin, B.R., 1994, Age-related decreased Leydig cell testosterone production in the brown Norway rat, *International Journal of Andrology*, 15 (6): 551-557.

- Chen X., Zhou Q.H., Leng L., Chen X., Sun Z.R., Tang N.J., 2013, Effects of di(n-butyl) and monobutyl phthalate on steroidogenesis pathways in the murine Leydig tumor cell line MLTC-1, *Environmental toxicology and pharmacology*, 36(2):332-8.
- Chinoy, N.J. and Sequeira, E., 1989, Effects of fluoride on the histoarchitecture of reproductive organs of the male mouse, *Reproductive Toxicology*, 3, 261–267.
- Chinoy, N.J. and Sharma, A., 1998, Amelioration of fluoride toxicity by vitamins E and D in reproductive functions of male mice, *Fluoride*, 31 (4), 203-216.
- Chinoy, N.J., Narayana, M.V., Dalal, V., Rawat, M., Patel, D., 1995, Amelioration of fluoride toxicity in some accessory reproductive glands and spermatozoa of rat, *Fluoride*, 28, 75–86.
- Chinoy, N.J., Narayana, M.V., Sequeira, E., Joshi, S.M., Barot, J.M., Purohit, R.M., 1992, Studies on effects of fluoride in 36 villages of Mehsana District, North Gujarat. *Fluoride*, 25 (3), 101-10.
- Chinoy, N.J., Reddy, V.V.P.C., Mathews, M., 1994, Beneficial effects of ascorbic acid and calcium on reproductive functions of fluoride treated prepubertal male rats, *Fluoride*, 27, 67–75.
- Chinoy, N.J., Shukla, S., Walimbe, A.S., Bhattacharya, S., 1997, Fluoride toxicity on rat testis and cauda epididymal tissue components and its reversal, *Fluoride*, 30 (1), 41-50.
- Chinoy, N.J., Sorathia, H.P., Jhala, D.D., 2005, Fluoride+aluminium induced toxicity in mice testis with giant cells and reversal by vitamin C, *Fluoride*, 38 (2), 109-114.
- Christensen A.K., 2007, *History of Leydig cell Research*, Contemporary Endocrinology: The Leydig Cell in Health and Disease In: Payne A. H., Hardy M. P. (ed.), Part 1 Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 3-33.
- Das, S., Maiti, R., & Ghosh, D., 2006, Management of fluoride induced testicular disorders by calcium and vitamin-E co-administration in the albino rat, *Reproductive Toxicology*, 22(4), 606-612.
- Dong, C., Cao, J., Cao, C., Han, Y., Wu, S., Wang, S., & Wang, J., 2016, Effects of fluoride and aluminum on expressions of StAR and P450scc of related steroidogenesis in guinea pigs' testis, *Chemosphere*, 147, 345-351.
- Dong, C., Cao, J., Cao, C., Han, Y., Wu, S., Wang, S., Wang, J., 2016, Effects of fluoride and aluminum on expressions of StAR and P450scc of related steroidogenesis in guinea pigs' testis, *Chemosphere*, 147, 345-351.
- Doull, J., Boekelheide, K., Farishian, B.G., Isaacson, R.L., Klotz, J.B., Kumar, J.V., Limeback, H., Poole, C., Puzas, J.E., Reed, N.M.R., Thiessen, K.M. & Webster, T.F., 2006, Committee on Fluoride in Drinking Water, Board on Environmental Studies and Toxicology, Division on Earth and Life Studies, National Research

Council of the National Academies, *Fluoride in drinking water: a scientific review of EPA's standards*, Washington, DC: The National Academies Press.

- Dursun, Ş., Karataş, M. ve Öztürk, E., 2005, Konya İl Merkezinde Kuyu İçme Sularının Florür Seviyelerinin Tespit Edilmesi, *Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 26, 63–70.
- Dvoráková-Hortová, K., Sandera, M., Jursová, M., Vasinová, J., Peknicová, J., 2008, The influence of fluorides on mouse sperm capacitation, *Animal Reproduction Science*, 108, 157–170.
- Edwards, R.G., Brody, S.A., 1995, *Principles and Practice of Assisted Human Reproduction*. W.B. Saunders Company, Pennsylvania, 55-58.
- Elbetieha, A., Darmani, H., Al-Hiyasat, A.S., 2000, Fertility effects of sodium fluoride in male mice, *Fluoride*, 33 (3), 128-134.
- Elesawy, B. H., Abd Al Rahman, N., El-Askary, A., & Salih, M. M., 2016, Evaluation of the effect of vitamin D on sodium fluoride-induced toxicity in reproductive functions of male rabbits. *National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology*, 6(3), 222-225.
- Fa, S., Pogrmic-Majkic, K., Dakic, V., Kaisarevic, S., Hrubik, J., Andric, N., ... & Kovacevic, R., 2013, Acute effects of hexabromocyclododecane on Leydig cell cyclic nucleotide signaling and steroidogenesis in vitro. *Toxicology letters*, 218(1), 81-90.
- Fawcett, D. W., & Bloom, W., 1994, *Bloom and Fawcett, a textbook of histology*. New York: Chapman & Hall. 6th edition
- Fawell, J. and Nieuwenhuijsen, M.J., 2003, Contaminants in drinking water, *British Medical Bulletin*, 68, 199-208.
- Feng, Y., Yin, J., Jiao, Z., Shi, J., Li, M., Shao, B., 2012, Bisphenol AF may cause testosterone reduction by directly affecting testis function in adult male rats, *Toxicology letters*, 211(2):201-9.
- Franklin, J., 2014, *Male reproductive system*, <http://www.studyblue.com/notes/note/n/4-male-reproductive-system/deck/10263205>, [Ziyaret tarihi: 17 Ekim 2016].
- Freni, S.C., 1994, Exposure to high fluoride concentrations in drinking water is associated with decreased birth rates, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 42, 109–121.
- Gartner L.P., Hiatt J.L., 2015, *BRS Cell Biology and Histology*, Seventh Edition, Wolters Kluwer Health, Baltimore, MD 21201
- Ge, R.S., Dong, Q., Sottas, C.M., Chen, H., Zirkin, B.R., Hardy, M.P., 2005, Gene expression in rat Leydig cells during development from the progenitor to adult, *Biology of Reproduction*, 2005, 104: 037499.

- Ghosh, D., Das(Sarkar), S., Maiti, R., Jana, D., Das, U.B., 2002, Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress, *Reproductive Toxicology*, 16, 385-390.
- Gritsan, N.P., Miller, G.W., Schumatkov, G.G., 1985, Correlation among heavy metals and fluoride in soil, air and plants in relation to environmental damage, *Fluoride*, 28 (4), 180-188.
- Gupta, R.S., Khan, T.I., Agrawal, D., Kachhawa, J.B.S., 2007, The toxic effects of sodium fluoride on the reproductive system of male rats, *Toxicology and Industrial Health*, 23, 507-513.
- Habert, R., Lejeune, H., Saez, J.M., 2001, Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 179, 47-74.
- Haider, S.G., 2004, Cell biology of Leydig cells in the testis, *International Review of Cytology*, 233, 181-241.
- Haidouti, C., 1991, Fluoride distribution in soils in the vicinity of a point emission source in Greece, *Geoderma*, 49, 129-136.
- Hales, D.B., 2002, Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis, *Journal of Reproductive Immunology*, 57, 3-18.
- Han, H., Sun, Z., Luo, G., Wang, C., Wei, R., Wang, J., 2015, Fluoride exposure changed the structure and the expressions of reproductive related genes in the hypothalamus-pituitary-testicular axis of male mice, *Chemosphere*, 135, 297-303.
- Hassan, H.A. and Yousef, M.I., 2009, Mitigating effects of antioxidant properties of black berry juice on sodium fluoride induced hepatotoxicity and oxidative stress in rats, *Food and Chemical Toxicology*, 47, 2332-2337.
- Honda, S., Morohashi, K., Nomura, M., Takeya, H., Kitajima, M., Omura, T., 1993, Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily, *The Journal of Biological Chemistry*, 268:7494-7502.
- Hu Y., Dong C., Chen M., Lu J., Han X., Qiu L., Chen Y., Qin J., Li X., Gu A., Xia Y., Sun H., Li Z., Wang Y., 2013, Low-dose monobutyl phthalate stimulates steroidogenesis through steroidogenic acute regulatory protein regulated by SF-1, GATA-4 and C/EBP-beta in mouse Leydig tumor cells. *Reproductive biology and endocrinology*, 11, 72.
- IARC, 1982, Some aromatic amines, anthraquinones and nitroso compounds, and inorganic fluorides used in drinking-water and dental preparations, Lyon, *International Agency for Research on Cancer*, pp. 237-303 (IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Vol. 27).
- IPCS, 2002, *Fluorides*. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety (Environmental Health Criteria 227).

İSKİ, 2004, İstanbul Su Kalitesi Raporu.

Izquierdo-Vega, J.A., Sanchez-Gutierrez, M., Razo, L.M.D., 2008, Decreased in vitro fertility in male rats exposed to fluoride-induced oxidative stress damage and mitochondrial transmembrane potential loss, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 230, 352-357.

Jagtap, S., Yenkie, M. K., Labhsetwar, N., & Rayalu, S., 2012, Fluoride in drinking water and defluoridation of water. *Chemical reviews*, 112(4), 2454-2466.

Jana, K., Samanta, P.K., 2006, Evaluation of single intratesticular injection of calcium chloride for nonsurgical sterilization in adult albino rats, *Contraception*, 73, 289–300.

Jiang, C.X., Fan, Q.T., Cheng, X.M., Cui, L.X., 2005, Relationship between spermatogenic cell apoptosis and serum estradiol level in rats exposed to fluoride, *Wei Sheng Yan Jiu*, 34 (1), 32-4.

Junqueira, L. C., & Carneiro, J., 2005, *Basic Histology: Text & Atlas*. 11 International Editionth edition.

Kaczor, J.J., Ziolkowski, W., Popiński, J., and Tarnopolsky, A.M., 2005, Anaerobic and aerobic enzyme activities in human skeletal muscle from children and adults, *International Pediatric Research Foundation*, 57, 3.

Kaminsky, L.S., Mahoney, M.C., Leach, J., Melius, J., Miller, M.J., 1990, Fluoride: benefits and risks of exposure, *Critical Reviews in Oral biology and Medicine*, 1 (4), 261-81.

Kanduti, D., Sterbenk, P., & Artnik, B., 2016, Fluoride: A review of use and effects on health. *Materia socio-medica*, 28(2), 133.

Karube, H., Nishitai, G., Inageda, K., Kurosu, H., Matsuoka, M., 2009, NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells, *Journal of Dental Biology*, 88 (5), 461-465.

Khan, S., Telang, A. G., & Malik, J. K., 2013, Arsenic-induced oxidative stress, apoptosis and alterations in testicular steroidogenesis and spermatogenesis in wistar rats: ameliorative effect of curcumin, *WJPP*, 2, 33-48.

Kierszenbaum, A.L., 2006, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Özkan Matbaacılık Gazetecilik San. Tic. Lts. Şti, Ankara, 0-323-01639-1

Kim, J., Kwon, W. S., Rahman, M. S., Lee, J. S., Yoon, S. J., Park, Y. J., ... & Pang, M. G., 2015, Effect of sodium fluoride on male mouse fertility, *Andrology*, 3(3), 544-551.

King, S. R., & LaVoie, H. A., 2012, Gonadal transactivation of STARD1, CYP11A1 and HSD3B, *Frontiers in Bioscience*, 17(597), 824-846.

- Küçükırmak, G., 2007, *Florun fizyolojik ve toksikolojik karakteristikleri*. Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, Bitirme Tezi, İzmir.
- Kumar, A. and Susheela, A.K., 1994, Ultrastructural studies of spermiogenesis in rabbit exposed to chronic fluoride toxicity, *International Journal of Fertility Menopausal Studies*, 39, 164–171.
- Kumar, A. and Susheela, A.K., 1995, Effects of chronic fluoride toxicity on the morphology of ductus epididymis and the maturation of spermatozoa of rabbit, *International Journal of Experimental Pathology*, 76, 1–11.
- Kumar, N., Sood, S., Arora, B., & Singh, M., 2010, Effect of duration of fluoride exposure on the reproductive system in male rabbits. *Journal of human reproductive sciences*, 3(3), 148.
- Kumar, V., Balomajumder, C., & Roy, P., 2008, Disruption of LH-induced testosterone biosynthesis in testicular Leydig cells by triclosan: probable mechanism of action. *Toxicology*, 250(2), 124-131.
- Kwon, W.S., Rahman, M.S., Pang, M.G., 2014, Diagnosis and prognosis of male infertility in mammal: the focusing of tyrosine phosphorylation and phosphotyrosine proteins, *Journal of Proteome Research*, 13, 4505–4517.
- Lala, D.S., Rice, D.A., Parker, K.L., 1992, Steroidogenic factor 1, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the Mouse homolog of fushi tarazu-factor I, *Molecular Endocrinology*, 6, 1249–1258.
- Lalli, E., Melner, M.H., Stocco, D.M., Sassone-Corsi, P., 1998, DAX-1 blocks steroid production at multiple levels, *Endocrinology*, 139, 4237–43.
- Lalli, E., 2014, Role of orphan nuclear receptor DAX-1/NR0B1 in development, physiology, and disease, *Advances in Biology*, 2014:582749.
- Latchman, D.S., 2008, *Families of DNA Binding Transcription Factors, Eukaryotic transcription factors* In: Latchman D.S. (ed.), Chapter 4, Academic Press Elsevier, New York, 96-154.
- Li, M., Cao, J., Chen, J., Song, J., Zhou, B., Feng, C., & Wang, J., 2016, Waterborne fluoride exposure changed the structure and the expressions of steroidogenic-related genes in gonads of adult zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere*, 145, 365-375.
- Lin, Ho., Wang, S.W., Wang, R.Y., Paulus, S., 2001, Stimulatory effect of lactate on testosterone production by rat Leydig cells, *Journal of Cellular Biochemistry*, 83, 147–154.
- Liu, Q., Wang, Y., Gu, J., Yuan, Y., Liu, X., Zheng, W., ... & Bian, J., 2014, Zearalenone inhibits testosterone biosynthesis in mouse Leydig cells via the crosstalk of estrogen receptor signaling and orphan nuclear receptor Nur77 expression, *Toxicology in Vitro*, 28(4), 647-656.

- Livak K.J., Schmittgen T.D., 2001, Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method, *Methods*, 25, 402–408.
- Mazaud-Guittot, S., Prud'homme, B., Bouchard, M.F., Bergeron, F., Daems, C., Tevosian, S.G., Viger, R.S., 2014, GATA4 autoregulates its own expression in mouse gonadal cells via its distal 1b promoter, *Biology of reproduction*, 90, 25.
- Mellon, S. H., Compagnone, N. A. and Zhang. P., 1998, Orphan receptors, proto-oncogene and other nuclear factors regulate P450C17 gene transcription, *Endocrine Research*, 24, 505–513.
- Melmed, S., Conn, P.M. (Eds), 2007, *Endocrinology: basic and clinical principles*, Springer Science & Business Media.
- Mendoza-Schulz, A., Solano-Agama, C., Arreola-Mendoza, L., Reyes-Márquez, B., Barbier, O., Razo, L.M.D., Mendoza-Garrido, M.E., 2009, The effects of fluoride on cell migration, cell proliferation, and cell metabolism in GH4C1 pituitary tumour cells, *Toxicology Letters*, 190, 179-186.
- Messer, H.H., Armstrong, W.D., and Singer, L., 1974, *Essentiality and function of fluoride*. In: *Trace Element Metabolism in Animal*, (Eds.) Hoekstra, W.G., Sutti E, J.W., Ganther, H.E. and Mertz. W., University Park. Press, Baltimore. PP-425-437.
- Nanjappa, M. K., Ahuja, M., Dhanasekaran, M., Coleman, E. S., Braden, T. D., Bartol, F. F., ... & Akingbemi, B. T., 2014, Bisphenol A regulation of testicular endocrine function in male rats is affected by diet, *Toxicology letters*, 225(3), 479-487.
- Narayana, M.V. and Chinoy, N.J., 1994, Reversible effects of sodium fluoride ingestion on spermatozoa of the rat, *International Journal of Fertility and Menopausal Studies*, 39 (6), 337-46.
- Niu, R., Zhang, Y., Liu, S., Liu, F., Sun, Z., Wang, J., 2015, Proteome alterations in cortex of mice exposed to fluoride and lead, *Biology Trace Element Research*, 164, 99–105.
- Orta, B., & Erkan, M., 2014, Effects of vitamin C on antioxidant systems and steroidogenic enzymes in sodium fluoride-exposed TM4 Sertoli cells, *Fluoride*, 47(2), 139-151.
- Ortiz-Perez, D., Rodríguez-Martínez, M., Martínez, F., Borja-Aburto, V.H., Castelo, J., Grimaldo, J.I., Cruz, E.D.L., Carrizales, L., Díaz-Barriga, F., 2003, Fluoride-induced disruption of reproductive hormones in men, *Environmental Research*, 93, 20-30.
- Parker, K. L., and B. P. Schimmer., 1997, Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function, *Endocrine Reviews*, 18, 361– 377.
- Payne, A.H., 2007, *Steroidogenic Enzymes in Leydig Cells*, Contemporary Endocrinology: The Leydig Cell in Health and Disease In: Payne A.H., Hardy M.P. (ed.), Part 10, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 160-161.

- Payne, A.H., Youngblood, G.L., 1995, Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells, *Biology of Reproduction*, 52, 217-225
- Peckham, S., Awofeso, N., 2014, Water fluoridation: a critical review of the physiological effects of ingested fluoride as a public health intervention, *The Scientific World Journal*, Article ID 293019: 10 pages.
- Pickering, W.F., 1985, The mobility of soluble fluoride in soil, *Environmental Pollution*, 9, 281-308.
- Pogrmic, K., Fa, S., Dakic, V., Kaisarevic, S., & Kovacevic, R., 2009, Atrazine oral exposure of peripubertal male rats downregulates steroidogenesis gene expression in Leydig cells, *Toxicological sciences*, 111(1), 189-197.
- Polomski, J., Fluhler, H. and Blaser, P., 1982, Fluoride-induced mobilization and leaching of organic matter, iron, and aluminium, *Journal of Environmental Quality*, 11, 452-456.
- Privalle, C.T., Crivello, J.F., Jefcoate, C.R., 1983, Regulation of intramitochondrial cholesterol transfer to side-chain cleavage cytochrome P450_{scc} in rat adrenal gland, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80, 702-706.
- Pushpalatha, T., Srinivas, M., Reddy, P.S., 2005, Exposure to high fluoride concentration in drinking water will affect spermatogenesis and steroidogenesis in male albino rats, *BioMetals*, 18, 207-212.
- Rahman, M.S., Lee, J.S., Kwon, W.S., Pang, M.G., 2013, Sperm proteomics: road to male fertility and contraception, *International Journal of Endocrinology*, 360986.
- Rao, M. V., & Bhatt, R. N., 2012, Protective effect of melatonin on fluoride-induced oxidative stress and testicular dysfunction in rats, *Fluoride*, 45(2), 116.
- Raucci, F., D'Aniello, A., & Di Fiore, M. M., 2014, Stimulation of androgen production by D-aspartate through the enhancement of StAR, P450_{scc} and 3 β -HSD mRNA levels in vivo rat testis and in culture of immature rat Leydig cells, *Steroids*, 84, 103-110.
- Reddy, P. S., Pushpalatha, T., & Reddy, P. S., 2007, Suppression of male reproduction in rats after exposure to sodium fluoride during early stages of development. *Naturwissenschaften*, 94(7), 607-611.
- Riksen, E.A., Kalvik, A., Brookes, S., Hynne, A., Snead, M.L., Lyngstadaas, S.P., Reseland, J.E., 2011, Fluoride reduces the expression of enamel proteins and cytokines in an ameloblast-driven cell line, *Archives of Oral Biology*, 56, 324-330.
- Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina, W., 2003, *Histology: A Text and Atlas*, 4th ed., Lippincott Williams-Wilkins, Philadelphia, 696-701.

- Sadovsky, Y., and C. Dorn., 2000, Function of steroidogenic factor 1 during development and differentiation of the reproductive system, *Reviews of Reproduction*, 5:136–142.
- Sanderson, J.T., 2006, The steroid hormone biosynthesis pathway as a target for endocrine-disrupting chemicals, *Toxicological sciences*, 94 (1), 3-21
- Sarkar, S.D., Maiti, R., Ghosh, D., 2006, Management of fluoride induced testicular disorders by calcium and Vitamin-E co-administration in the albino rat, *Reproductive Toxicology*, 22, 606-612.
- Schrade, A., Kyrönlähti, A., Akinrinade, O., Pihlajoki, M., Häkkinen, M., Fischer, S., ... & Heikinheimo, M., 2015, GATA4 is a key regulator of steroidogenesis and glycolysis in mouse Leydig cells, *Endocrinology*, 156(5), 1860-1872.
- Shanthakumari, D., Srinivasalu, S., Subramanian, S., 2004, Effects of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats, *Toxicology*, 204, 219-228.
- Sharma, J.D., Solanki, D., Solanki, M., 2008, Amelioration of fluoride toxicity in rats through vitamins (C, D) and calcium, *Toxicology International*, 15 (2), 111-116.
- Shrader-Frechette K., 2007, EPA's 2006 human-subjects rule for pesticide experiments, *Accountability in Research*, 14, 211–254.
- Solanki, M., Sharma, J.D., Solanki, D., 2008, Antifertility activity of fluoride contaminated potable water in male albino rats (*Rattus Norvegicus*). *Free radicals & Natural Products is Health' & 7th Annual Meeting of SFRR-India*, P-197.
- Song, G., Wang, R. L., Chen, Z. Y., Zhang, B., Wang, H. L., Liu, M. L., ... & Yan, X. Y., 2014, Toxic effects of sodium fluoride on cell proliferation and apoptosis of Leydig cells from young mice, *Journal of physiology and biochemistry*, 70(3), 761-768.
- Song, J.S., Lee, H.Y., Lee, E., Hwang, H.J., Kim, J.H., 2002, Cytotoxicity and apoptosis induction of sodium fluoride in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 11, 85-91.
- Spittle, B., 2009, Halting the inertia of indifference: fluoride and fertility revisited [editorial], *Fluoride*, 42, 159–161.
- Stocco D.M., 2000, Intramitochondrial cholesterol transfer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1486(1):184-97.
- Stocco, C. O., Lau, L. F. and Gibori, G., 2002, A calcium/calmodulin-dependent activation of ERK1/2 mediates JunD phosphorylation and induction of nur77 and 20-hsd genes by prostaglandin F₂ in ovarian cells, *Journal of Biological Chemistry*, 277:3293–3302.
- Stocco, D. M., 2014, The role of PBR/TSP0 in steroid biosynthesis challenged, *Endocrinology*, 155 (1), 6-9.

- Stocco, D.M., Clark, B.J., 1996, Role of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in steroidogenesis, *Biochemical Pharmacology*, 51, 197–205.
- Stocco, D.M., Clark, B.J., 1997, The role of the steroidogenic acute regulatory protein in steroidogenesis, *Steroids* 62 (29), 36.
- Stojkov, N. J., Janjic, M. M., Baburski, A. Z., Mihajlovic, A. I., Drljaca, D. M., Sokanovic, S. J., ... & Andric, S. A., 2013, Sustained in vivo blockade of α 1-adrenergic receptors prevented some of stress-triggered effects on steroidogenic machinery in Leydig cells, *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 305(2), 194-204.
- Sun, Z., Niu, R., Su, K., Wang, B., Wang, J., Zhang, J., Wang, J., 2010, Effects of sodium fluoride on hyperactivation and Ca^{2+} signaling pathway in sperm from mice: an in vivo study, *Archives of Toxicology*, 84, 353–361.
- Sun, Z., Niu, R., Wang, B., Jiao, Z., Wang, J., Zhang, J., Wang, S., Wang, J., 2011, Fluoride-induced apoptosis and gene expression profiling in mice sperm in vivo, *Archives of Toxicology*, 85, 1441–1452.
- Susheela, A.K., 2007, Fluorosis: Indian Scenario. In: A treatise on Fluorosis. Fluorosis Research and Rural Development Foundation, Delhi, India.
- Susheela, A.K. and Kumar, A., 1991, A study of the effect of high concentrations of fluoride on the reproductive organs of male rabbits, using light and scanning electron microscopy, *Journal of Reproduction and Fertility*, 92 (2), 353-60.
- Susheela, A.K., Jethanandani, P., 1996, Circulating testosterone levels in skeletal fluorosis patients, *Journal of Toxicology Clinical Toxicology*, 34, 183–189.
- Tevosian, S.G., 2014, Transgenic mouse models in the study of reproduction: insights into GATA protein function, *Reproduction*, 148, 1–14.
- Tokar, V.I. and Savchenko, O.N., 1977, Effect of inorganic fluorine compounds on the functional state of the pituitary-testis system, *Probl Endokrinology*, 23 (4), 104-7.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J., 1979, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(9), 4350-4354.
- Trainer T.D., 1995, *Testes and Excretory Duct System, Histology for Pathologists*, In: Mills S.E. (ed.), Chapter 37, Raven Press, Philadelphia.
- Tremblay J.J., 2007, *Transcription Factors as Regulators of Gene Expression During Leydig Cell Differentiation and Function*, Contemporary Endocrinology: The Leydig Cell in Health and Disease In: Payne A.H., Hardy M.P. (ed.), Part 4, Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 333-345.
- Trevors, J.T., Saier, M.H.Jr., 2009, Where is the global environmental bailout? *Water Air Soil and Pollution*, 198:1–3

- Viger, R.S., Guittot, S.M., Anttonen, M., Wilson, D.B., Heikinheimo, M., 2008, Role of the GATA family of transcription factors in endocrine development, function, and disease, *Molecular Endocrinology*, 22:781– 798.
- Wan, S., Zhang, J., Wang, J., 2006, Effects of high fluoride on sperm quality and testicular histology in male rats, *Fluoride*, 39(1), 17-21.
- Wang, K. L., Hsia, S. M., Mao, I. F., Chen, M. L., Wang, S. W., & Wang, P. S., 2011, Effects of polybrominated diphenyl ethers on steroidogenesis in rat Leydig cells, *Human reproduction*, 26(8), 2209-2217.
- Whitford, G.M. and Ekstrand, J., 1990, Summary of Session I: Metabolism of fluoride, *Journal of Dental Research*, 69, 513.
- Whitford, G.M., 1997, *Determinants and mechanism of enamel fluorosis*, Ciba Foundation symposium, 205, 226-245.
- WHO, 2000, Regional Office for Europe, Air Quality Guidelines, Second Edition, Chapter 6.5 Fluorides, Denmark.
- WHO, 2003, “*Fluoride in Drinking Water*”, Background Document for Development of Guidelines for Drinking-Water Quality, WHO/SDE/WSH/03.04/06.
- WHO, 2004, *Guidelines for drinking-water quality*, Vol 1 Recommendations. 3rd; Geneva, World Health Organization
- WHO, 2006, *Fluoride in drinking-water*, WHO Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th edition. Washington, D.C.
- WHO, 1984, Guidelines for drinking water quality (Vol II): Health criteria and supporting information. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wilson, T. E., A. R. Mouw, C. A. Weaver, J. Milbrandt, and K. L. Parker., 1993, The orphan nuclear receptor NGFI-B regulates expression of the gene encoding steroid 21-hydroxylase, *Molecular and Cellular Biology*, 13:861–868.
- Wong, M.L., Medrano, J.F., 2005, Real-time PCR for mRNA quantitation, *Biotechniques*, 39(1): 75.
- Yan, Q., Zhang, Y., LI, W., Denbesten, P.K., 2007, Micromolar fluoride alters ameloblast lineage cells *in vitro*, *Journal of Dental Research*, 86(4), 336-340.
- Yang, Y., Huang, H., Ba, Y., Cheng, X. M., & Cui, L. X., 2015, Effect of oxidative stress on fluoride-induced apoptosis in primary cultured Sertoli cells of rats. *International journal of environmental health research*, 25(1), 1-9.
- Yılmaz, B. O., & Erkan, M., 2015, Effects of vitamin C on sodium fluoride-induced oxidative damage in Sertoli cells. *Fluoride*, 48(3), 241-51.

- Yu, R.N., Ito, M., Saunders, T.L., Camper, S.A., Jameson, J.L., 1998, Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis, *Nature Genetics*, 20:353–7.
- Zhang, J.H., Liang, C, Ma, J.J., Niu, R.Y., Wang, J.D., 2006, Effects of sodium fluoride and sulfur dioxide on oxidative stress and antioxidant defenses of testis in male rats, *Fluoride*, 39, 185-190.
- Zhang, M., Wang, A., He, W., He, P., Xu, B., Xia, T., Chen, X., Yang, K., 2007, Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons, *Toxicology*, 236, 208-216.
- Zhang, P., and S. H. Mellon., 1996, The orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1 regulates the cyclic adenosine 3,5-monophosphate-mediated transcriptional activation of rat cytochrome P450c17 (17 alpha-hydroxylase/ c17–20 lyase), *Molecular Endocrinology*, 10:147–158.
- Zhang, P., and S. H. Mellon., 1997, Multiple orphan nuclear receptors converge to regulate rat P450c17 gene transcription: novel mechanisms for orphan nuclear receptor action, *Molecular Endocrinology*, 11:891–904.
- Zhang, Q., Zou, P., Zhan, H., Zhang, M., Zhang, L., Ge, R. S., & Huang, Y., 2011, Dihydrolipoamide dehydrogenase and cAMP are associated with cadmium-mediated Leydig cell damage, *Toxicology letters*, 205(2), 183-189.
- Zhou, Y., Zhang, H., He, J., Chen, X., Ding, Y., Wang, Y., Liu, X., 2013, Effects of sodium fluoride on reproductive function in female rats, *Food and Chemical Toxicology*, 56, 297–303.

ÖZGEÇMİŞ

| Kişisel Bilgiler | |
|------------------|---|
| Adı Soyadı | Banu ORTA YILMAZ |
| Doğum Yeri | İVRİNDİ |
| Doğum Tarihi | 25.01.1988 |
| Uyruğu | X T.C. <input checked="" type="checkbox"/> Diğer: |
| Telefon | 05557133063 |
| E-Posta Adresi | banu.yilmaz@istanbul.edu.tr |
| Web Adresi | http://aves.istanbul.edu.tr/banu.yilmaz/ |



| Eğitim Bilgileri | |
|------------------|------------------------|
| Lisans | |
| Üniversite | Marmara Üniversitesi |
| Fakülte | Fen-Edebiyat Fakültesi |
| Bölümü | Biyoloji |
| Mezuniyet Yılı | 10.07.2009 |

| Yüksek Lisans | |
|------------------|-------------------------|
| Üniversite | İstanbul Üniversitesi |
| Enstitü Adı | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Anabilim Dalı | Biyoloji Anabilim Dalı |
| Programı | Zooloji Programı |
| Mezuniyet Tarihi | 26.12.2012 |

| Doktora | |
|------------------|-------------------------|
| Üniversite | İstanbul Üniversitesi |
| Enstitü Adı | Fen Bilimleri Enstitüsü |
| Anabilim Dalı | Biyoloji Anabilim Dalı |
| Programı | Zooloji Programı |
| Mezuniyet Tarihi | 10.05.2017 |

| Makale ve Bildiriler |
|---|
| Orta Yılmaz B., Yıldızbayrak N., Aydın Y., Erkan M.B., "Evidence of acrylamide- and glycidamide-induced oxidative stress and apoptosis in Leydig and Sertoli cells", HUMAN & EXPERIMENTAL TOXICOLOGY, pp.1-11, 2016 |

- Orta Yilmaz B., Erkan M.B., "Effects Of Vitamin C On Sodium Fluoride-Induced Oxidative Damage In Sertoli Cells", *FLUORIDE*, pp.241-251, 2015
- Orta Yilmaz B., Erkan M.B., "Effects Of Vitamin C On Antioxidant Systems And Steroidogenic Enzymes In Sodium Fluoride-Exposed Tm4 Sertoli Cells", *FLUORIDE*, pp.139-151, 2014
- Tunali Ayun Y., Orta Yilmaz B., Erkan M., "Antioxidant Activity Of Genistein On Polychlorinated Biphenyl (Aroclor 1260) Induced Toxicity In Tm3 Cell Line", in: *Perspectives in Animal Ecology and Reproduction Vol.9*, Gupta V. K., Verma A. K., Singh G. D., Eds., Daya Publishing House, New Delhi, pp.467-489-, 2013
- Orta Yilmaz B., Erkan M.B., "Effects of Fluoride on the Expression of Steroidogenesis Genes in TM3 Leydig Cells", *18TH EUROPEAN SYMPOSIUM ON FLUORINE CHEMISTRY*, Kiev, UKRAYNA, 7-12 Ağustos 2016, pp.111-111
- Orta Yilmaz B., Yıldızbayrak N., Erkan M.B., "ARSENIC CAN EFFECT LEYDIG CELL VIABILITY AND OXIDATIVE DAMAGE *IN VITRO*", 51st Congress of European societies of toxicology bridging science for safety, Porto, PORTEKIZ, 13 Eylül - 16 Kasım 2015, pp.134-135
- Orta Yilmaz B., Yıldızbayrak N. , Erkan M.B., "Acrylamide And Glycidamide Can Effect Leydig And Sertoli Cell Viability, Oxidative Damage And Apoptosis *In vitro* ", 9th World Congress on Alternatives and Animal Use in the Life Sciences, Prag, CEK CUM., 24-28 Ağustos 2014, pp.136-137