



**SIÇANLARDA LİTYUM İLE OLUŞTURULAN TESTİS
HASARI ÜZERİNE D-CARVONE'UN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Suna ARAÇ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Semin GEDİKLİ

Yüksek Lisans Tezi-2025



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

**SIÇANLARDA LİTYUM İLE OLUŞTURULAN TESTİS
HASARI ÜZERİNE D-CARVONE'UN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Suna ARAÇ

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Semin GEDİKLİ**

**ERZURUM
2025**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	V
ÖZET	VI
ABSTRACT.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	X
TABLolar DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Testis Anatomisi	4
2.2. Testis Embriyolojisi	6
2.3. Testis Histolojisi	8
2.3.1. Epididimis	9
2.3.2. Seminifer Tübüller	10
2.3.3. Spermatogenik Hücreler	11
2.3.4. Sertoli Hücreleri.....	12
2.3.5. Spermatogenez.....	13
2.3.6. Spermiyogenez.....	15
2.3.7. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri.....	17
2.3.8. Kan Testis Bariyeri	18
2.4. Testis Fizyolojisi.....	19
2.5. Lityumun Tarihçesi.....	20
2.5.1. Lityumun Etki Mekanizması	21
2.5.2. Farmakokinetik ve Farmakodinamik	22

2.5.3. Toksik Etkileri	22
2.6. D-Carvone.....	24
2.6.1. Carvone'un Anti-İnflamatuar Etkisi	25
2.6.2. Carvone'un Antioksidan Etkisi.....	26
2.6.3. Carvone'un Ülser Olmayan Dispepsiye Etkisi	26
2.6.4. Carvone'un Anti-Karsinogenik Etkisi	26
2.6.5. Carvone'un Solunum Sistemi ve Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi.....	27
2.6.6. Carvone'un Antimikrobiyal Etkisi.....	27
2.7. Apoptoz Markerları.....	27
2.7.1. Bcl-2.....	27
2.7.2. Bax	28
2.7.3. Kaspaz 3.....	29
2.8. İnflamasyon Markerları	30
2.8.1. NF- κ B	30
2.8.2. TNF- α	30
2.8.3. IL1 β	32
2.9. İnflamasyon ve Apoptoz Markerı	32
2.9.1. P2X7	32
3. MATERYAL VE METOT.....	35
3.1. Deney Etik Kurulu Onayı	35
3.2. Çalışmada Kullanılan Sıçanların Temini ve Bakımı	35
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	35
3.4. Testis Dokusunun Alınma ve Saklama Koşulları	37
3.5. Histopatolojik Analizler.....	38
3.5.1. Doku Takibi İşlemleri	38

3.5.2. Kesit Alma İşlemi	39
3.5.3. Hematoksilen ve Eozin Boyama Prosedürü.....	39
3.5.4. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü	40
3.5.4.1. İmmünreaktivite Skorlama (IRS) Yöntemi.....	42
3.6. Mikroskopik Görüntüleme ve Fotoğraflama	43
3.7. Biyokimyasal Analizler	43
3.7.1. MDA Analizi	43
3.7.2. GSH Analizi.....	43
3.8. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Analizleri	44
3.8.1. Total RNA İzolasyonu	44
3.8.2. cDNA Sentezi	44
3.8.3. qRT-PCR	45
3.9. Western Blot Analizi	45
3.9.1. Total Protein Tayini	46
3.9.2. Protein Profilinin Belirlenmesi (SDS-PAGE)	47
3.9.3. NF- κ B-p65, IL-1 β , TNF- α , P2X7, Kaspaz-3 ve Bcl-2 Proteinleri Ekspresyon Analizi (Western Blot).....	48
3.10. Sperm Analizi	50
3.10.1. Spermatolojik Muayeneler.....	50
3.10.2. Spermatozoon Motilitesi.....	51
3.10.3. Anormal Spermatozoon Oranı	51
3.11. İstatistiksel Analiz.....	51
4. BULGULAR.....	53
4.1. Histopatolojik Bulgular.....	53
4.2. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları	60

4.2.1. TNF- α ve IL-1 β Proteinlerinin IRS Değerlendirme Sonuçları.....	66
4.2.1.1. TNF- α Antikoru Ait IRS Bulguları	67
4.2.1.2. IL-1 β Antikoru Ait IRS Bulguları.....	68
4.3. Biyokimyasal Bulgular	69
4.3.1. Testis Dokularında Oksidatif Stres Belirteçleri Olan MDA ve GSH Seviyeleri..	69
4.4. Testis Dokularında İnflamasyon Belirteçleri Olan NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β Genlerinin Göre mRNA Transkript Seviyeleri.....	70
4.5. Testis Dokularında Apoptoz Belirteçleri Olan Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 Genlerinin Göre mRNA İfade Seviyeleri.....	71
4.6. Western Blot Analiz Sonuçları	72
4.7. Sperm Bulguları.....	73
5. TARTIŞMA.....	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90
KAYNAKLAR	92
EKLER	110
EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	110
EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU	111

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç. Dr. Semin GEDİKLİ'ye, deneylerimde ve tez yazım sürecinde yardımlarını esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Adem KARA, Prof. Dr. Ümit İNCEKARA, Doç. Dr. Songül KARAKAYA, Doç. Dr. Elif ERBAŞ, Doç. Dr. Cihan GÜR, Dr. Öğr. Üyesi Seda YAKUT, Dr. Öğr. Üyesi Recep Hakkı KOCA ve Araş. Gör. Deniz TEKİNER hocalarıma teşekkür ederim.

Yüksek lisans sürecinde bana destek olan arkadaşlarım Şükra CUYA, Fatoş TOKPINAR, Beyza Nur AYDEMİR, Emre ÖZTÜRK ve her koşulda benden yardımlarını esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

Suna ARAÇ

ÖZET

Sıçanlarda Lityum ile Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine D-Carvone'un Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Lityum, günümüzde bipolar bozukluk ve mani tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, lityum tedavisi uzun süreli kullanımlarda çeşitli organlarda toksik etkilere neden olmaktadır. Carvone, genellikle dereotu, nane ve kimyon gibi aromatik tıbbi bitkilerin esansiyel yağ özütlerinde bulunan doymamış bir monoterpenoid ketondur. Çeşitli çalışmalar, D-Carvone'un güçlü antioksidan ve anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, lityum kaynaklı testis hasarında D-Carvone'un oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz ve hücre hasarı üzerindeki terapötik etkilerinin araştırılması amaçlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda 24 adet erkek sıçan Kontrol, D-Carvone, Lityum ve Lityum+D-Carvone grubu olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Kontrol ve D-Carvone grupları 42 gün boyunca katkısız standart yemle, Lityum ve Lityum+D-Carvone grupları ise 42 gün boyunca Lityum klorür ilave edilmiş katkılı yemle beslendi. D-Carvone ve Lityum+D-Carvone gruplarına deneyin son 14 gününde intraperitoneal yolla 10 mg/kg dozunda D-Carvone uygulaması yapıldı. Deney sonunda sıçanlar anestezi altında dekapite edilerek testis dokuları alındı, histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler yapıldı, ayrıca MDA ve GSH seviyeleri biyokimyasal analizlerle ölçüldü. qRT-PCR yöntemiyle NF- κ B-p65, TNF- α , IL-1 β , kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 gen ekspresyonları ile Western blot yöntemiyle NF- κ B-p65, IL-1 β , TNF- α , P2X7, kaspaz-3 ve Bcl-2 protein ekspresyon seviyeleri belirlendi. Ayrıca sperm motilitesi, yoğunluğu ve morfolojisi de değerlendirildi.

Bulgular: Lityum grubuna ait testis kesitlerinde kontrol grubuna kıyasla yoğun bir dejenerasyon, seminifer tübüllerde hasar, apoptotik hücreler ve nekrotik alanlar göze çarpmaktaydı. Tedavi gruplarında ise kontrol grubuna yakın bir durum mevcuttu. Histolojik kesitlerde yaptığımız Johnsen skorları Lityum grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde düşüktü. İmmünohistokimyasal olarak, Lityum grubunda TNF- α ve IL-1 β proteinlerinin immünreaktivitesinin önemli ölçüde arttığını, Lityum+D-Carvone grubunda ise bu değerlerin anlamlı düzeyde azaldığını tespit ettik. Yapılan biyokimyasal analizlerde Lityum grubunda MDA seviyesinde önemli düzeyde artma, GSH seviyesinde ise önemli bir azalma olduğunu gördük. Yine Lityum grubuna ait dokularda diğer gruplara kıyasla qRT-PCR metoduyla değerlendirilen NF- κ B-p65, TNF- α , IL-1 β , kaspaz-3 ve Bax gen seviyelerinde anlamlı düzeyde artma, Bcl-2 gen seviyesinde ise anlamlı düzeyde azalma olduğunu belirledik. Western blot yöntemi ile değerlendirilen NF- κ B-p65, IL-1 β , TNF- α , P2X7 ve kaspaz-3 proteinlerinin ekspresyon seviyelerine bakıldığında Lityum grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı düzeyde artma, Bcl-2 gen seviyesinde ise anlamlı düzeyde azalma olduğunu belirledik. D-Carvone'un sperm kalitesi üzerinde olumlu etkileri olduğunu, sperm motilitesini, yoğunluğunu ve morfolojisini iyileştirdiğini gördük.

Sonuç: Elde edilen bulgular, D-Carvone'un lityum ile indüklenen testis hasarında oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz ve hücre hasarı anlamlı derecede azalttığını ortaya koymaktadır. Bu sonuçlar, D-Carvone'un, testis dokusunda lityum maruziyeti nedeniyle gelişen hasarın tedavisinde potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılabileceğini desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: D-Carvone, inflamasyon, lityum, testis, toksikasyon

ABSTRACT

Investigation of the Effects of D-Carvone on Lithium-Induced Testicular Damage in Rats

Aim: Lithium is widely used in the treatment of bipolar disorder and mania today. However, long-term use of lithium can lead to toxic effects in various organs. Carvone is an unsaturated monoterpenoid ketone typically found in the essential oil extracts of aromatic medicinal plants such as dill, mint, and cumin. Several studies have demonstrated that D-Carvone possesses strong antioxidant and anti-inflammatory properties. This study aimed to investigate the therapeutic effects of D-Carvone on oxidative stress, inflammation, apoptosis, and cellular damage in lithium-induced testicular injury.

Material and Method: In our study, 24 male rats were divided into 4 groups: Control, D-Carvone, Lithium, and Lithium+D-Carvone. The Control and D-Carvone groups were fed standard chow without additives for 42 days, while the Lithium and Lithium+D-Carvone groups were fed chow with added lithium chloride for 42 days. D-Carvone was administered intraperitoneally at 10 mg/kg for the last 14 days of the experiment in the D-Carvone and Lithium+D-Carvone groups. At the end of the experiment, the rats were decapitated under anesthesia, and testicular tissues were collected for histopathological and immunohistochemical evaluations. Additionally, MDA and GSH levels were measured through biochemical analyses. The expression levels of NF- κ B-p65, TNF- α , IL-1 β , caspase-3, Bax, and Bcl-2 genes were assessed by qRT-PCR, while the expression levels of NF- κ B-p65, IL-1 β , TNF- α , P2X7, caspase-3, and Bcl-2 proteins were determined using Western blot analysis. Additionally, sperm motility, density, and morphology were evaluated.

Results: In the testicular sections of the Lithium group, significant degeneration and damage to seminiferous tubules, apoptotic cells, and necrotic areas were observed compared to the control group. However, a condition closer to the control group was present in the treatment groups. The Johnsen scores obtained from histological sections were significantly lower in the Lithium group compared to the other groups. Immunohistochemically, we found that the immunoreactivity of TNF- α and IL-1 β proteins was increased dramatically in the Lithium group, while these values were significantly reduced in the Lithium+D-Carvone group. Biochemical analyses revealed a significant increase in MDA levels and a significant decrease in GSH levels in the Lithium group. Moreover, in the testicular tissues of the Lithium group, significant increases in the gene expression levels of NF- κ B-p65, TNF- α , IL-1 β , caspase-3, and Bax, and a significant decrease in Bcl-2 gene levels were observed when compared to the other groups, as determined by qRT-PCR. Western blot analysis of NF- κ B-p65, IL-1 β , TNF- α , P2X7, and caspase-3 protein expression levels revealed a significant increase in the Lithium group compared to the other groups, while Bcl-2 protein expression was significantly decreased. Additionally, D-Carvone was found to have beneficial effects on sperm quality, improving sperm motility, density, and morphology.

Conclusion: The findings indicate that D-Carvone significantly reduces oxidative stress, inflammation, apoptosis, and cellular damage in lithium-induced testicular injury. These results support the potential use of D-Carvone as a therapeutic agent in the treatment of damage caused by lithium exposure in testicular tissue.

Key Words: D-Carvone, inflammation, lithium, testis, toxicology

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AMH	: Anti müllerian hormon
ATP	: Adenozin trifosfat
Bax	: Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	: B-Cell lymphoma gene-2
Camp	: Siklik adenozin monofosfat
DAP	: Diamidofosfat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-Picrylhydrazyl
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
GH	: Büyüme hormonu
GSH	: İndirgenmiş glutatyon
H	: Hidrojen
He	: Helyum
IL1β	: İnterlökin 1 beta
IRS	: İmmünreaktivite skorlama
LH	: Lüteinize edici hormon
Li	: Lityum
MDA	: Malondialdehit
mRNA	: Mesajcı ribonükleik asit
NFκB	: Nuclear factor kappa B
PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR	: Revers-transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

SDS-PAGE : Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

SRY : Cinsiyet belirleyici faktör

TDF : Testis belirleyici faktör

TGF β -1 : Transforme edici büyüme faktör beta-1

TNF- α : Tümör nekrozis faktör-alfa

VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Erkek genital sistem	4
Şekil 2.2. Erkek üreme sistemi	5
Şekil 2.3. İnsan testisi sagital kesiti	6
Şekil 2.4. Testis ile epididimisin şematik görüntüsü	10
Şekil 2.5. İntratestiküler organizasyon ve kan testis bariyeri	13
Şekil 2.6. Spermatogenez süreci ve bu süreçte oluşan spermatogenik seri hücreleri.....	15
Şekil 2.7. Spermiyogenez süreci ve sperm oluşumu	17
Şekil 2.8. Kan testis bariyeri görseli.....	19
Şekil 2.9. Kimyon bitkisi ve tohumları.....	25
Şekil 2.10. D-Carvone'un kimyasal yapısı	25
Şekil 3.1. Sıçanların lityum ilaveli ticari yem ile beslenmesi	36
Şekil 3.2. Sıçanlara D-Carvone enjeksiyonu yapılması	37
Şekil 3.3. Sıçanlara anestezi uygulanması	38
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait seminifer tübül kesiti	53
Şekil 4.2. D-Carvone grubuna ait seminifer tübül kesiti	54
Şekil 4.3. Lityum grubuna ait seminifer tübül kesiti	55
Şekil 4.4. Lityum grubuna ait seminifer tübül kesiti	56
Şekil 4.5. Lityum grubuna ait seminifer tübül kesiti	57
Şekil 4.6. Lityum grubuna ait seminifer tübül kesiti	58
Şekil 4.7. Lityum+D-Carvone grubuna ait seminifer tübül kesiti	59
Şekil 4.8. Grupların Johnsen skorlarının karşılaştırılması.....	60
Şekil 4.9. Kontrol grubundaki ratların testis dokusunda TNF- α immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskop	61

Şekil 4.10. D-Carvone grubundaki ratların testis dokusunda TNF- α immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskop	61
Şekil 4.11. Lityum grubundaki ratların testis dokusunda TNF- α immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskop	62
Şekil 4.12. Lityum+D-Carvone grubundaki ratların testis dokusunda TNF- α immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskop	63
Şekil 4.13. Kontrol grubundaki ratların testis dokusunda IL-1 β immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskop	64
Şekil 4.14. D-Carvone grubundaki ratların testis dokusunda IL-1 β immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskop	64
Şekil 4.15. Lityum grubundaki ratların testis dokusunda IL-1 β immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskop	65
Şekil 4.16. Lityum+D-Carvone grubundaki ratların testis dokusunda IL-1 β immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskop	66
Şekil 4.17. Tüm gruplarda TNF- α antikorunun IRS değerlerini gösteren grafik	68
Şekil 4.18. Tüm gruplarda IL-1 β antikorunun IRS değerlerini gösteren grafik	69
Şekil 4.19. D-Carvone ve lityum uygulaması yapılan ratların testis dokularında MDA ve GSH seviyeleri	70
Şekil 4.20. D-Carvone ve lityum uygulaması yapılan ratların testis dokularında NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β genlerinin göreceli mRNA ifadenin seviyeleri	71
Şekil 4.21. D-Carvone ve lityum uygulaması yapılan ratların testis dokularında Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 genlerinin göreceli mRNA ifadenin seviyeleri	72
Şekil 4.22. Tüm gruplara ait testis dokusu relative protein ekspresyon seviyeleri ile Western blot bantları	73

TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Johnsen skorlaması	41
Tablo 3.2. İmmünreaktif skor (IRS) tablosu	42
Tablo 3.3. Primer dizilimleri	45
Tablo 3.4. Protein analiz metodu	47
Tablo 3.5. Antikorlar ve dilüsyon oranları	48
Tablo 4.1. Tüm gruplara ait IRS skorları	67
Tablo 4.2. Grupların sperm analiz sonuçları	74

1. GİRİŞ

Lityum (Li) metalinin tıp, endüstri, elektronik, kimya, metalürji gibi birçok alanda kullanıldığını bilmekteyiz. Tıptaki kullanımı 1800 yılına dayanmaktadır. İngiliz bilim insanı Alfred Baring Garrod, 1847 yılında gut hastalarının kanında ürik asit tespit etmiş ve bu hastalığı lityum ile tedavi etmeyi başarmıştır (Garrod, 1859). 1870 yılında Silas Weir Mitchell antiepileptik ilaç olarak lityum bromürü önermiştir (Mitchell, 1870). 1871 yılında New York'ta görev yapan Prof. William Hammond, mani için lityum reçetesi yazan ilk doktor olmuştur. Hammond, akut mani hastalarında lityum bromür kullandığını ve bu ilacın diğerlerine kıyasla daha iyi sonuçlar verdiğini bildirmiştir (Hammond, 1871). 1894 yılında Danimarkalı psikiyatrist Frederik Lange, depresyon tedavisinde özellikle lityum kullanmış ve hastalarını lityum karbonatla iyileştirmeyi başarmıştır (Schioldann, 2001; Shorter, 2009). 1949'da Jon Cade, manik hastalarının bazılarını lityum sitrat ve lityum karbonatla tedavi etmeyi başarmıştır (Cade, 1949). Lityumun özellikle psikiyatrik bozukluklarda kullanımı yaygınlaştıkça, yan etkileri de görülmeye başlanmıştır.

Lityumun devamlı kullanımında organlar üzerinde yan etkileri olduğu görülmüştür. Örneğin, lityum, tiroid bezini etkileyerek hipotiroidizme neden olmaktadır. Lityum kullananlarda hipotiroidizmin oluşması %47'lere ulaşmaktadır. Yine lityumun neden olduğu durumlar arasında hiperkalsemi, böbrek taşı, osteopeni ve osteoporoz, dispeptik şikayetler, peptik ülser, kardiyak aritmiler, dehidratasyon, hipertansiyon, kas güçsüzlüğü ve böbrek fonksiyonlarında azalma sayılabilir (Livingstone ve Rampes 2006). Diyabet, hipertansiyon, koroner kalp hastalığı ve kilo alımına bağlı artan felç riski de endişe duyulan diğer sorunlar arasındadır (Vieweg ve ark., 1998). Lityum kullanımının bir diğer yan etkisi de böbrek yetmezliğidir (Bedford ve ark., 2008). Lityumun, testis dokusu üzerinde toksik etki gösterdiği, bazal membranda ondülasyona, interstisyel boşlukta ödeme, tunika albuginea tabakasında kalınlaşmaya, spermatogonyumlarda

hasara, bazı seminifer tübül lümenlerinde kuyruk hasarlı spermilerin oluşmasına ve seminifer tübül lümeninde daralmalara neden olduğu belirlenmiştir (Kaya, 2014). Lityum, testis dokusunda seminifer tübül epitelinde düzensizlik ve bazal membranda ayrışmalar şeklinde de hasara neden olmaktadır (Mert, 2024). Farklı dozlarda, kısa ya da uzun süreli lityum kullanımının, testis dokusunda hasara ve sperm parametrelerinde bozulmalara neden olduğu da gösterilmiştir (Toghyani ve ark., 2013; Zarnescu ve Zamfirescu, 2006).

Carvone, çoğunlukla nane, kimyon ve dereotu gibi aromatik bitkilerin esansiyel yağ ekstraktlarında bulunur (Abbas ve Kathem, 2021). Biyolojik  zellikleri farklı olan iki enantiyomeri vardır. Bu enantiyomerler kimyon tohumlarında bulunan S-(+)-Carvone (D-Carvone) ve nane yapraklarında bulunan R-(-)-Carvone (L-Carvone)'dur (Abbas, Kandil, Abbas, 2020). D-Carvone, farmakolojik açıdan çeşitli biyolojik etkinlikler sergileyen bir bileşiktir. Bu etkinlikler arasında antimikrobiyal, antihiperlipidemik, antioksidan, antikanserojenik, antihipertansif, immünmodülatör, fungisidal ve anti-inflamatuar etkiler yer almaktadır (Alsane ve Liu, 2017; Lv ve ark., 2021; Zhao ve Du, 2020). Carvone'un insanlarda toksik etkisinin çok düşük olduğu bulunmuştur (Mahboubi, 2019). Yapılan  alışmalar D-Carvone'un kolondaki tümör gelişimini yavaşlattığını, glutasyon düzeylerini düşürdüğünü ve sıçan hepatositlerinde laktat dehidrojenaz düzeylerini artırdığını göstermiştir (Lima ve ark., 2004; Sharma, Gao ve Steele, 2010). Ayrıca D-Carvone'un sıçanlarda serebral iskemi reperfüzyon hasarında enfarktüs alanını azalttığı ve antioksidan, anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkiler yoluyla beyin iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Serebral iskemi reperfüzyon modeline tabi tutulan sıçanlarda beyin dokusunda IL-1, TNF- , IL-6, IL-4, IL-10 ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) düzeylerinin azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca NLRP3, Caspase 1, TNF- , IL-1 ve TLR4' n mRNA ekspresyonunu

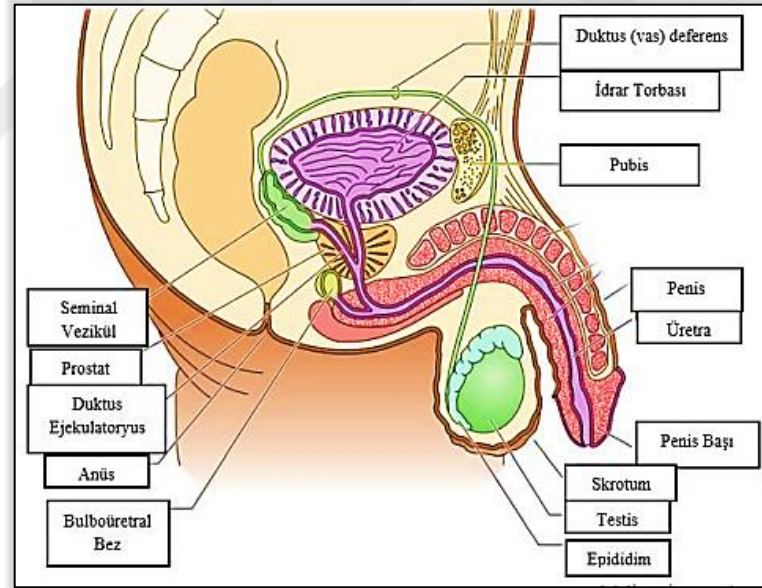
da azalttığı bulunmuştur (Dai ve ark., 2020). Diyabetik nefropatili sıçanlarda yapılan çalışmada Sadiq ve arkadaşları, ana bileşenlerinden biri Carvone olan Carum Carvi'nin sıvı ekstraktını 60 gün boyunca değerlendirmişlerdir. Carum Carvi ekstraktının idrardaki serum glikozu, üre, kreatinin, toplam protein ve mikrobiyal protein seviyelerinin yanı sıra diyabet nedeniyle artan günlük idrar çıkışını önemli ölçüde azalttığı bulunmuştur. Ogaly ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, D-Carvone'un karbon tetraklorürün neden olduğu karaciğer fibrozu üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. D-Carvone'un oksidatif stresi ve TGF- β 1/SMAD sinyal yolunu inhibe ederek karaciğer fibrozisini azalttığını tespit etmişlerdir (Ogaly ve ark., 2022). Zhao ve arkadaşları, lipopolisakkarid kaynaklı sepsisli fareler ile yapılan bir çalışmada, D-Carvone'un TNF- α , IL-1 β ve IL-6'nın serum düzeylerini önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır. Akciğerlerin ıslak/kuru oranını normal seviyelere indirerek, bronkoalveolar lavaj sıvısındaki makrofaj ve nötrofil sayısını azaltarak anti-inflamatuvar etkisinin ve sepsis ile ilişkili akciğer hasarı etkilerinin olduğunu göstermişlerdir (Zhao ve Du, 2020).

Bu çalışmanın amacı, literatür taramaları ve mevcut veriler doğrultusunda, D-Carvone'un testis hasarına karşı tedavi edici etkilerini incelemektir. Lityumun insanlar üzerindeki kullanımı, iyileştirici etkilerinin yanı sıra yüksek toksisite potansiyeli ile de ilişkilidir. Buna karşın, D-Carvone'un birçok çalışmada iyileştirici ve koruyucu özellikler sergilediği, ayrıca toksisite etkisinin düşük olduğu tespit edilmiştir. Bu bağlamda, D-Carvone'un testis hasarına karşı koruyucu etkilerini histopatolojik, immünohistokimyasal, biyokimyasal ve moleküler yöntemlerle değerlendirmek amacıyla bu çalışma tasarlanmıştır.

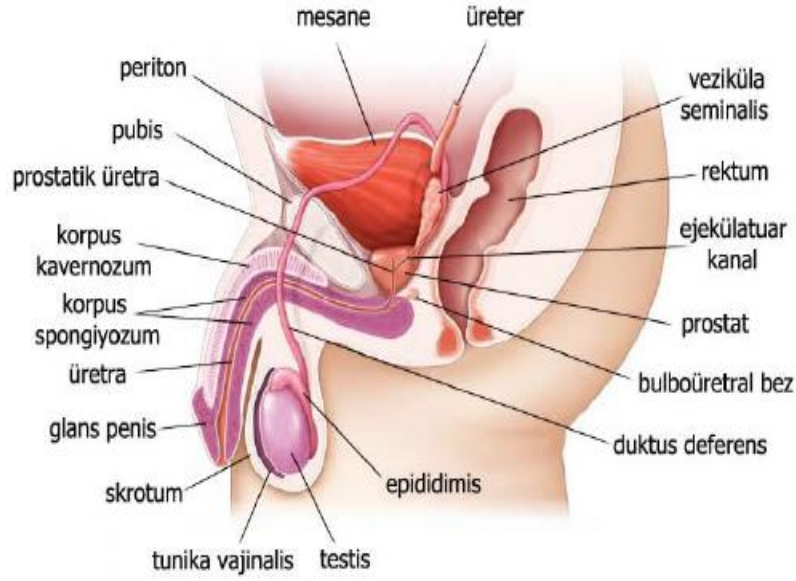
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Anatomisi

Testisin insan vücudundaki ana görevi, erkek üreme hücreleri olan spermatozoonların ve seks hormonları olarak adlandırılan androjenlerin üretimini sağlamaktır. Testisler, karın boşluğunun hemen altında, skrotum denilen deri bir kese içinde spermatik kord tarafından asılı halde bulunan bir çift organdır (Ross ve Pawlina, 2006; Tortora ve Derrickson, 2008). Oval görünümü olan testislerin şekli kişiden kişiye farklılık göstermektedir. 4-5 cm boya, 2-3 cm genişliğe, 2.5 cm derinliğe ve 10-30 gram ağırlığa sahip olan bir organdır (Şekil 2.1, Şekil 2.2) (Açıkel Elmas, 2018; Aşçı, 2013; Hassa, 2003; Middendorff ve ark., 2002; Ross ve Pawlina, 2006).



Şekil 2.1. Erkek genital sistem

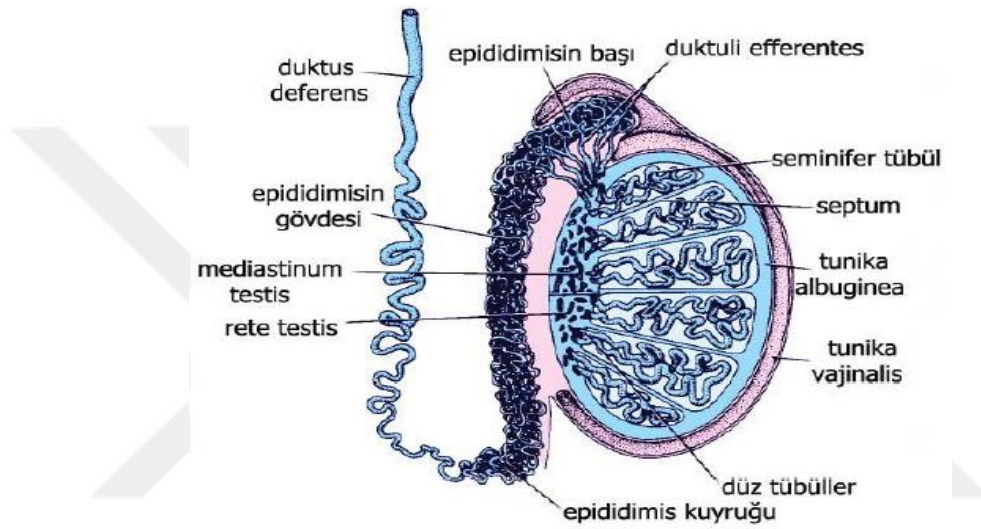


Şekil 2.2. Erkek üreme sistemi

Testisler, embriyonal gelişimin yedinci ayına kadar karın duvarının posterior kısmında gelişim gösterirler. Yedinci ay ile beraber anulus inguinalis profundusa yerleşen testisler, 8. ayda skrotuma doğru iner (Moore, 2011). Testisler skrotuma doğru inerken, karın ön duvarı tabakalarını da beraberlerinde götürürler. Böylece testisler skrotuma iner ve beş katmanla çevrilir. Bu katmanlar Tunika vajinalis, Musculus cremaster, Fascia spermatica interna, Fascia spermatica eksterna, Fascia cremasterica şeklindedir (Gürel, 2018; Sancak ve Cumhuri, 2002).

Testisler, tunika albuginea, tunika vajinalis ve tunika vaskülozayı içeren testis kapsülü ile çevrilidir. Bu katmanlar arasında tunika vajinalis, testis kapsülünün en dış katmanını oluşturan seröz bir membrandan oluşmuştur ve iki katmandan meydana gelmektedir. Bu iki katman lamina visseralis ve lamina pariyetalistir. Epiorchium olarak da bilinen lamina visseralis, tunika vajinalisin dış tabakasıdır ve testisin tamamını kaplamaktadır. Periorchium olarak bilinen pariyetal lamina, tunika vajinalisin iç tabakasıdır ve fascia spermatica internayı kaplar. Bu iki tabakanın arasında cavitas tunica vajinalis adı verilen bir boşluk bulunur. Testis kapsülünü oluşturan ikinci katman olan tunika albuginea, lamina visseralisin altında, sert, sıkı ve kalın bir katmandır.

Esneyemeyen ve genişleyemeyen bu tabaka testisin arkasında kalınlaşarak mediastinum testis yapısını oluşturur. Bu yapıdan çıkan lifli uzantılar testisin içini yaklaşık 250 lobüle böler. Bu lobüllerin her biri 1-4 seminifer tübül (Şekil 2.3) içerir (Açıkel Elmas, 2018). Bu tübüller, kan ve lenfatik damarlar, sinirler ve interstisyel hücreler açısından zengin olan tunika vasküloza adı verilen bağ dokusuna bağlıdır (Gürel, 2018; Ross ve Pawlina, 2006).



Şekil 2.3. İnsan testisi sagital kesiti

2.2. Testis Embriyolojisi

Memelilerde embriyonun genetik cinsiyeti, döllenme anında üreme hücreleri aracılığıyla üretilen gonozomal kromozomlar (XX, XY) tarafından belirlenir. Embriyonun fenotipik cinsiyeti ise yedinci haftadan itibaren görülebilmektedir (Cupp ve Skinner, 2005). Embriyonik gelişimin yedinci haftasına kadar olan evrede, genital organ taslakları birbirine benzerlik gösterir. Bu evre farklılaşmamış evre olarak adlandırılmaktadır (Moore, 2011). Seksüel gelişimin farklılaşmamış evresinde, gonadların gelişimi insanda gelişimin dördüncü haftasında, sıçanlarda ise 6.5 ila 7.5 günleri arasında sölomik epitelden oluşan büyük, yuvarlak primordiyal germ hücrelerinde meydana gelmektedir. Primordiyal germ hücreleri, allantoisin başlangıcına yakın, yolk

kesesinin duvarındaki endodermal hücreler arasında gelişir. İnsanda gelişimin beşinci haftasında bağırsağın arka kısmına giderek, sıçanlarda ise 10 ila 11. günler arasında mezotelyum ve alttaki mezenkimal hücrelerin çoğalmasıyla oluşan gonadal çıkıntılara ulaşırlar. Primordiyal germ hücreleri, gonadal çıkıntındaki mezenşime ulaştıktan hemen sonra gonadal çıkıntının artan mezotelyum hücreleri, mezenşim içine girerek, primer germ kordonları denilen yapıları meydana getirir. Böylece dış korteks ve iç medullar yapılardan oluşan farklılaşmamış gonadlar, insanda hamileliğin altıncı haftasında, sıçanlarda ise 11.5 ila 12.5 günleri arasında ortaya çıkmaktadır (Moore, 2011; Şeftalioğlu, 2003). Bu açıdan bakıldığında gonad gelişiminde üç spesifik yapının çok önemli olduğu görülebilir:

- Posterior abdominal duvarı örten mezotel
- Mezotelin altındaki mezenşim dokusu
- Primordiyal germ hücreleri

Farklılaşmamış gonadların morfolojik ve işlevsel farklılaşması, birçok genin birbiriyle etkileşime girdiği karışık bir süreçtir. Gonadal farklılaşmanın anahtarı, Y kromozomunun kısa kolunda yer alan testis belirleyici faktör TDF (Testicular Determining Factor) olarak adlandırılan proteinin üretilmesinden sorumlu olan cinsiyet belirleyici faktör SRY (Sex Determining Region on Y) genidir (Hess, 2009; Moore, 2011). Embriyo XY kromozoma sahipse, SRY geni insanlarda yedinci haftada, sıçanlarda ise on ikinci günden sonra ekspresyona başlar. Primer germ kordonları SRY geni aracılığıyla ifade edilen TDF'nin etkisiyle hızlıca artmaya başlar. Testis kordonları (medullar kordonlar) insanlarda 8. haftada sıçanlarda ise 14. günde ortaya çıkar. Bu kordonlar primer germ kordonlarından oluşur ve farklılaşmamış gonadların medullasının derinliklerine doğru uzanmaya başlar. Testis kordonları ağısı görünümüne sahip olan rete testisleri meydana getirir (Moore, 2011; Şeftalioğlu, 2003). Gelişimin ilerleyen

aşamalarında testis kordonları tunika albuginea epitelinden ayrılır ve testis dokusu genişlemeye başlar. Genişlemeye başlayan testisler, dejenere olmuş mezonefrozdaki ayrılır ve mezenter, mesorchium ile asılı şekilde geçer. Sonraki evrelerde testis kordonları, seminifer tübülleri ve tübülü rekti olarak ikiye ayrılır (Moore, 2011). Testis kordonlarının farklılaşması sonucu meydana gelen seminifer tübülleri, tunika albugineanın oluşumuyla mezenşimden ayrılarak fazlaca sıkışan kıvrımlar oluşturur. Kıvrımlaşan bu yapılar yeni doğanlarda seminifer tübülleri kapalı olmasına sebep olur. Testis kordonlarından kopan mezenşim, androjenlerin salgılanmasını sağlayan interstisyel Leydig hücrelerini meydana getirir. Leydig hücreleri, 8. hafta ile beraber androjenik hormonların üretimine başlar. Bu hormonlar vasıtasıyla mezonefrik kanallar ve dış cinsel organlar farklılaşarak erkek yönünde uyarılır. Sertoli hücreleri testis kordonlarının epitelinden oluşur ve testosteron salgısının yanında cinsiyet organlarının erkek yönünde farklılaşmasında rolü olan Anti Müllerian Hormon (AMH) üretimini başlatır. Glikoproteinli yapıya sahip olan bu hormon, tuba uterina ve uterusu farklılaşan paramezonefrik kanalların büyümesini baskılar. Seminifer tübülleri, fetal testiste en fazla bulunan hücre çeşidi Sertoli hücreleridir ve bu hücreler yetişkin testisin dış yüzündeki mezoteli meydana getirir. Rete testis, duktus efferentesi meydana getirir. 15 ila 20 mezonefrik tübül, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile birleşir (Gürel, 2018; Moore, 2011).

2.3. Testis Histolojisi

Testis, skrotumda bulunan ekzokrin ve endokrin fonksiyonlara sahip bir çift oval şekilli organdır. Testislerin ekzokrin fonksiyonu sperm hücresi oluşumunu sağlamak, endokrin fonksiyonu ise androjen üretimini sağlamaktır. Androjenlerin en önemlisi testosterondur ve embriyonun erkek embriyoya dönüşmesini sağlar.

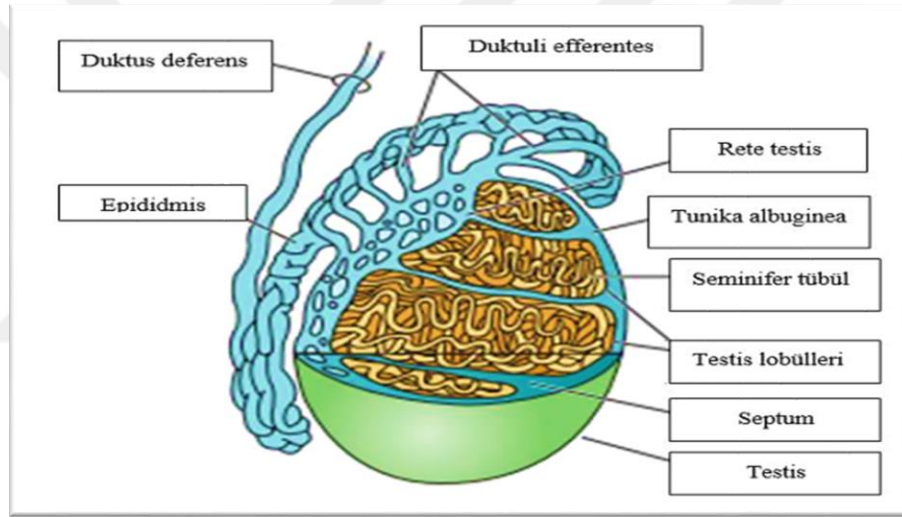
Testisler üç katmanlı bir zar ile sarılmıştır. Bu zarın tabanında kan damarları olan gevşek bağ dokusu yapısına sahip tunika vasküloza bulunmaktadır. Tunika albuginea

zarın en belirgin ve en kalın katmanıdır. Testise giren ve testisten çıkan kan, lenfatik damarlar ve kanallar tunika albugineanın arkasında kalınlaşırlar ve mediastinum testis adı verilen tabaka içerisinde kendilerine yer bulurlar. Tunika vaginalis, testislerin anterolateral yüzünde bulunur ve mezotel ile döşenmiş çift katlı periton katmanıdır. Testislerin içindeki zardan itibaren uzanmış septumlar aracılığıyla bölünen lobüllerde sinirler, kan damarları, interstisyel alan ve seminifer tübülleri bulunmaktadır. İnsanlarda bu lobüller 250'ye kadar ulaşır, bu lobüllerin her birinde 1-4 adet seminifer tübül bulunmaktadır. Lobüllerin altında olan tubuli recti düz uzanan tübül olarak bilinir. Düz uzanan tübüllerin devamında rete testis vardır. Rete testis, tek bir apikal silyuma ve mikrovillüslerle sahip tek katlı kübik epitel ile döşenmiştir. Rete testis kanalları duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanır. Buradaki kanalların epiteli yalancı çok katlı silyalı prizmatik epitel ile döşenmiştir. Epitel dokunun kısa boylu olan hücrelerinde mikrovillüsler bulunmaktadır. Hücre boyutundaki farklılık nedeniyle epiteller girinti çıkıntıya sahiptirler. Kanallardaki sirküler kas katmanı ve silyumlarla spermiyumlar kanal boyunca hareketli özellik kazanır. Duktuli efferentes hücreleri, seminifer tübülден salgılanan sıvının çoğunu yeniden emer (Bayramova, 2022).

2.3.1. Epididimis

Epididimis, testislerin posterior ile superior yüzleri boyunca uzanır, hilale benzer bir yapıya sahiptir, uzunluğu 7.5 cm'dir. Epididimis kanalı ve duktuli efferentesi içerir. Baş, gövdesi ve kuyruğu bulunmaktadır. Epididimis kanalı gövde ve kuyruk bölgesi oluştururken duktuli efferentes ise baş bölgesini meydana getirir. Epididimis kanalı kıvrımlı yapıdadır uzunluğu 4–6 m arasındadır (Şekil 2.4) (Gartner, 2007). Yeni üretilen sperm, 2–4 haftalık zaman diliminde epididimis kanalının içinden geçer, bu arada akrozom olgun hale gelir, bağımsız şekilde ileriye doğru hareket eder ve fertilite yeteneği kazanır (Algilani, 2022). Epididimis kanalı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile

kaplanmıştır. İki tip hücre bulunmaktadır. Bunlar; ana hücre ve bazal hücredir. Bazal hücreler, bazal lamina içinde bulunur, yuvarlak ve küçük hücrelere sahip olup kanalda bulunan epitel kök hücreleridir. Ana hücrelerin lümene bakan yüzlerinde modifiye mikrovilli denilen stereosilyalar bulunmaktadır. Bu yapılar aynı zamanda glikoprotein ile glikolipid salgılamaktadırlar. Epididimis kanal epitelinin içi ve dışı uzunlamasına düz kas hücre katmanıyla sarılmaktadır. Kuyruk bölümünde daire şeklinde kas tabakası bulunmaktadır. En dışı kısım ise kan damarı ve bağ dokuca zengin tunika vajinalisle çevrelenmiştir (Mescher, 2015; Sullivan ve ark., 2019).



Şekil 2.4. Testis ile epididimisin şematik görüntüsü

2.3.2. Seminifer Tübüller

Yaklaşık 150-250 mikrometre çapında ve 30-70 cm uzunluğunda olan bu tübüller çok katlı epitel doku ile kaplıdır ve her bir testiste 250-1000 adet bulunmaktadır. Seminifer tübüller kıvrımlıdır ve kör uçlu bir yapıya sahiptirler. Rete testise bağlanabilmek için bu tübül, tubuli rekti olarak uzanır. Rete testisle duktuli efferentes epididimisin başına bağlanmaktadır. Seminifer tübüller fibröz bağ, germinal epitel ve bazal lamina dokusundan meydana gelmektedir. Epitelin alt kısmında bulunan fibroblastı olmayan tunika propriya katmanında düz kas hücrelerine benzeyen, spermiyumların

lümene gitmesine aracı olan miyoid hücreler bulunur. İnsanda 3-5 sıra şeklinde bulunan bu katman kemirgenlerde ise tek katman şeklinde bulunmaktadır. Bu katman aynı zamanda peritübüler doku olarak da isimlendirilmektedir. Seminifer tübüllerde spermatogenik hücreler üretilmektedir. Seminifer tübüller germ hücrelerini destekleyen ve besleyen Sertoli hücrelerini de bulundurmaktadır (Bayramova, 2022).

2.3.3. Spermatogenik Hücreler

Her bir seminifer tübül spermatogenik veya germinal epitel olarak adlandırılan özelleşmiş, çok katlı bir epitel ile döşenmiştir. Bazal membran fibröz bağ dokusu ile sarılmıştır. En iç katmanda tübüllerin zayıf bir şekilde kasılmasını sağlayan düz kas hücresi özelliği gösteren yassı miyoid hücreler bulunur. Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olmak üzere germinal epitel iki çeşit hücre popülasyonundan oluşur. Spermatogenik hücreler olgun spermlere farklanarak çoğalan hücrelerdir. Gelişim aşamasında yolk kesesi aracılığıyla gonad taslaklarında kolonize olmuş primordiyal germ hücreleri bölünüp spermatogonyumlara, hemen sonrasında spermatogonyumlar primer spermatositlere dönüşür (Algilani, 2022).

Spermatosit fazında, diploid olan primer spermatositler kromozom ve DNA miktarlarını azaltmak için iki mayoz bölünme geçirirler. Birinci mayoz bölünme sonucu oluşan haploid hücrelere sekonder spermatosit denir. Sekonder spermatositler ikinci mayoz bölünmeyi geçirerek spermatidleri oluşturur. Spermiyogenez fazında, spermatidler başka bölünme geçirmeden olgun sperm hücresini oluşturmak için farklılaşma geçirirler. Sonucunda yine haploid hücreler oluşur ve bu önemli özellik, spermin oositi döllerken kromozom sayısının korunmasını sağlar. Olgunlaşma sürecinde spermatidler morfolojik değişiklikler geçirirler. Organellerin organizasyonunun değişmesi, flagellum oluşması ve sitoplazma hacminin değişmesi bu değişiklikler

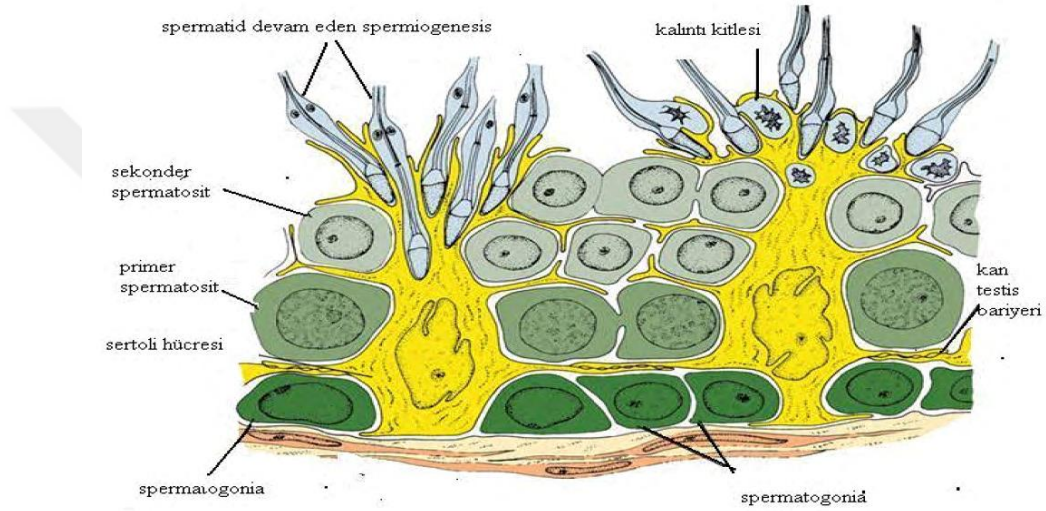
arasındadır. Sonuç olarak olgun spermatozoon denilen olgun spermler oluşur (Algilani, 2022).

Spermatogonyumlar bazal membranın üzerinde bulunur. Lümene yakın sırasıyla primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve lümen içinde gelişimini tamamlayan olgunlaşmış germ hücresi de denilen spermatozoonlar bulunur (Skinner ve Griswold, 2005).

2.3.4. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücrelerinin germ hücrelerini koruma, bariyer oluşturma, besleme ve fagositoz yapma gibi görevleri bulunmaktadır. Gelişme evresinde olan germ hücresini destekleyen, beslenmesini ve korunmasını sağlayan önemli hücrelerdir. Olgunlaşmamış spermatogenik hücrelerin fagosit edilmesi sağlarlar. Seminifer tübüldeki diğer hücrelerden farkları ise bölünmemeleridir. Bazal sitoplazması lümene doğru uzanan, belirgin şekilde yuvarlak ökromatik çekirdekli hücrelere sahiptirler. Soluk boyanmış sitoplazmanın apikal kısmında gelişme evresindeki spermatozoonların baş kısımları bulunur. Sertoli hücrelerinin ışık mikroskobu altında morfolojik özelliklerinin net bir şekilde ayırt edilmesi güçtür, çünkü bu hücreler çok sayıda girinti ve çıkıntıya sahip olup, bu yapılar hücrenin sınırlarının tam olarak anlaşılmasını engeller. Birbirine komşu Sertoli hücreleri zonula okludens ile birbirine bağlanırken, bazal laminaya da hemidesmozomlarla bağlanmaktadır. Primer spermatogenik hücrelerle Sertoli hücreleri desmozoma benzeyen bağlantılarla birbirine bağlanırlar. Bu bağlantılar kan testis bariyeri denilen bariyeri meydana getirmektedir (Şekil 2.5) (Yılmaz, 2009). Bazalde primer spermatositlerle spermatogonyumlar, lümende ise olgunlaşmış spermatositlerle spermatidler bulunmaktadır. Olgunlaştıktan sonra lümene doğru gitmeye çalışan spermatogenik hücrelerin Sertoli hücreleri arasında olan bariyeri aşması gerekir. Kan testis bariyeri, kandaki zararlı moleküllere karşı germ hücresinin korunmasını sağlar.

Yüksek düzeyde testosteron bağlanmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein, Sertoli hücreleri aracılığıyla sentezlenmektedir. Sertoli hücrelerinin bir diğer görevi, plazminojen aktivatörü olan transferin ile folikül uyarıcı hormon salınmasını inhibe eden inhibin sentezlemektir. Ayrıca erkek embriyoda parametonefrik kanalın gerilemesine neden olan Anti Müllerian Hormonun (AMH) da salgılanmasını sağlarlar. Özellikle bu kanal erkek cinsiyetinin gelişmesi için büyük öneme sahiptir (Bayramova, 2022).



Şekil 2.5. İntratestiküler organizasyon ve kan testis bariyeri

2.3.5. Spermatogenez

Spermatogenez olayı, diploid spermatogonyum hücrelerinin seminifer tübüller içerisinde haploid spermatozoa hücrelerine farkedildiği, karmaşık bir olaylar silsilesidir. Endokrin, otokrin ve parakrin faktörlerle düzenlenen ve gonadotropinlerin etkisiyle devam eden bir süreçtir. Sertoli hücrelerinin uyarıcı olan FSH hormonu ve Leydig hücrelerinin uyarılmasını sağlayan LH hormonu bu sürecin en önemli hormonlarıdır (Bayramova, 2022).

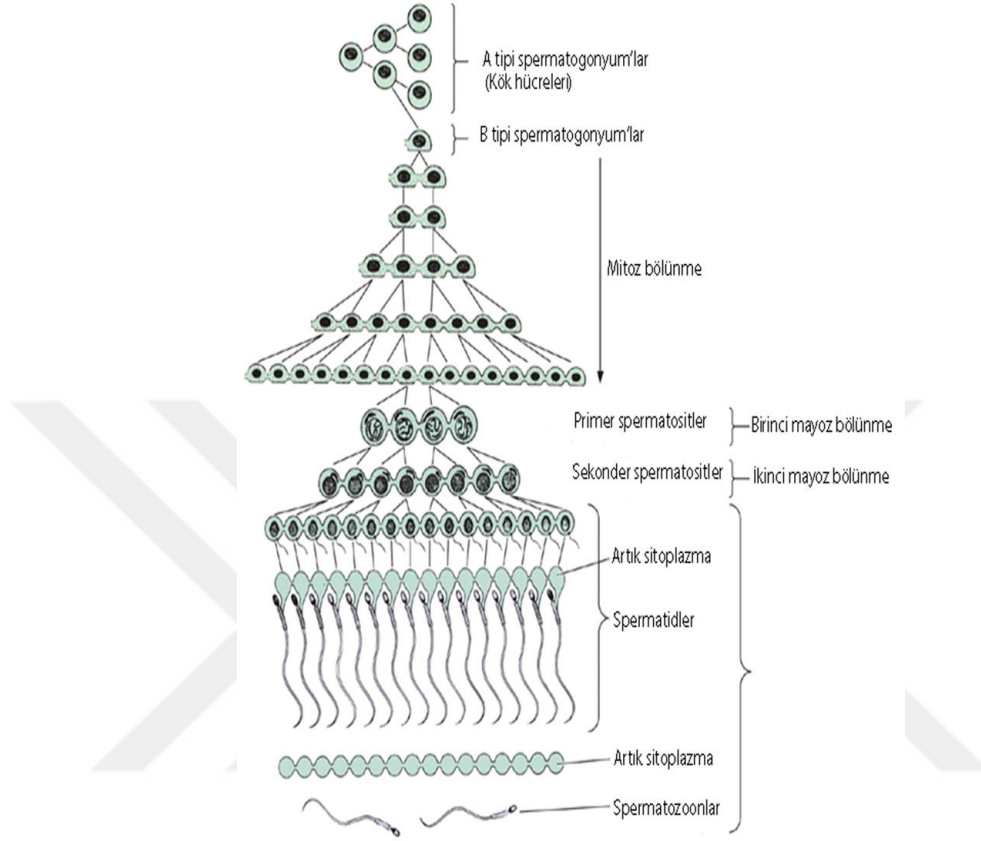
İnsanlarda spermatogenez ortalama olarak 74 gün sürmektedir. Spermatogonyal kök hücreler farkedilme ve kendini yenileme özellikleri olduğundan haploid yapıdaki spermatozoa hücrelerine dönüşürler. Germ hücreleri her evrenin sonunda, seminifer

tübüllere ait olan bazal kompartmandan ayrılıp lümene ilerlemeye başlar. Bu dönem puberte ile başlar ve genelde kişinin ölümüne kadar sürekli devam eder, fakat kişinin yaşının ilerlemesiyle birlikte oluşan sperm miktarında azalma görülebilir (Kızılay ve Altay, 2019).

Primordiyal germ hücrelerinden oluşan spermatogonyum hücreleri mitoz bölünme geçirerek spermatosit hücrelerini meydana getirir. Spermatogonyum üç tipe ayrılır. Tip A koyu renkli spermatogonyum, yoğun bazofilik çekirdeğe ve ince granüler kromatin yapıya sahip, kök hücre olarak kaldığına inanılan hücrelerdir. Tip A açık renk spermatogonyum, ince granüler yapıya ve açık boyanmış çekirdeğe sahip, fazla sayıda mitoz bölünme geçirip sayılarını arttıran hücrelerdir (Bayramova, 2022).

Tip B spermatogonyum, Tip A açık renkli spermatogonyumdan farklı olarak, çekirdek etrafında kümeler yapan yuvarlak şekilli çekirdeğe sahip hücrelerdir. Tip B spermatogonyum mitoz bölünme ile bölünüp primer spermatositleri meydana getirir. Normalden iki kat fazla kromozom ($4n$) ve iki kat fazla DNA'ya sahip olan primer spermatosit, DNA'sını eşleyerek mayoz için hazırlanmaya başlar. Büyük çekirdekleri ve geniş sitoplazmaya sahip primer spermatosit ışık mikroskopunda kolayca seçilebilmektedir. Primer spermatosit 1. mayoz bölünmeyi geçirdikten sonra sekonder spermatositi meydana getirir. Oluşan hücreler kısa sürede mayoz ikiye girdiğinden kesitlerde bu hücelere çok az rastlanmaktadır. Sekonder spermatositler, 22 otozom ve bir cinsiyet kromozomu (X ya da Y) içeren $2n$ kromozom sayısına sahip hücrelerdir. Bu hücreler, mayoz bölünmesinin I. evresi olan mayoz I'i tamamladıktan sonra, mayoz II'nin profaz evresine geçerler. Sekonder spermatositler, mayoz I'in sonunda kromozom sayısını yarıya indirerek, haploid hücreleri oluştururlar. Ancak, mayoz II'nin profaz evresine girmeden önce, DNA sentezi gerçekleşmez. Bu nedenle, sekonder spermatositlerin DNA miktarı, mayoz I'in sonrasındaki aşamaya kadar değişmeden kalır.

Sekonder spermatosit mayoz II'nin sonunda spermatidleri oluştururlar (şekil 2.6) (Gilbert, 2000; Bayramova 2022).



şekil 2.6. Spermatogenez süreci ve bu süreçte oluşan spermatogenik seri hücreleri

2.3.6. Spermiyogenez

Haploid spermatid, seminifer tübülün lümenine yakın olan adluminal boşluğa yerleşmiş ve Sertoli hücrelerinin sitoplazmasının içine gömülmüştür. Spermiyogenez, spermatidin hücre bölünmesini gerçekteştirmeden spermatozoona dönüştüğü süreçtir. Spermiyogenez dört safhada meydana gelmektedir (Junqueira ve Carneiro, 2009).

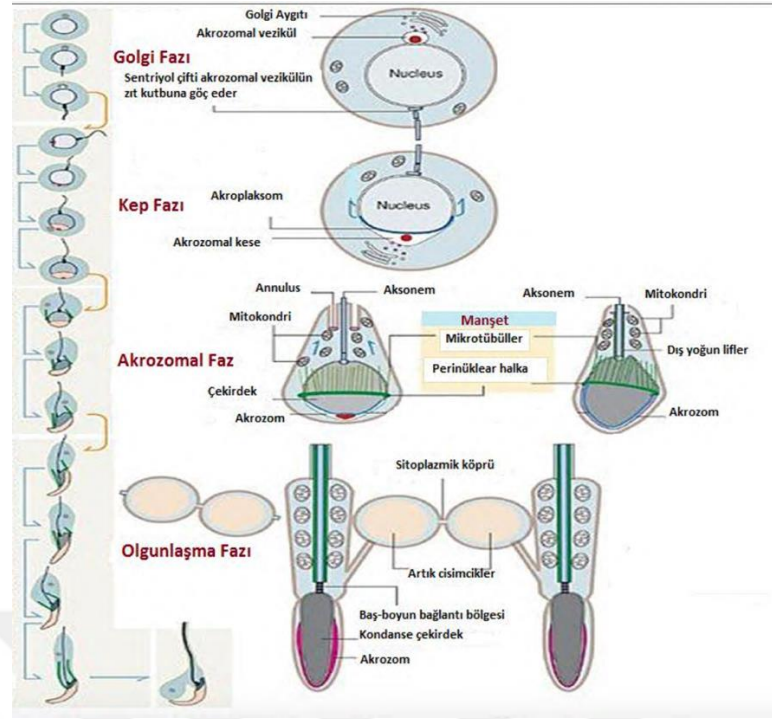
1. Golgi safhası: Çekirdeğin üst kutbuna yerleşik halde bulunan Golgi kompleksi, bir çift sentriyol, mitokondri, granüllü endoplazmik retikulum sisternaları ve serbest ribozomlardan oluşur. Proakrozomal granülleri golgi boşluğunda birikerek, zarla çevrili olan akrozom vezikülünde yer alan bir tane akrozom granülünü meydana getirir. Sentriyoller, akrozomun karşısına doğru ilerleyerek hücre yüzeyinin yakınına yerleşirler.

Kamçı aksonemi oluşum evresine girer, sentriyoller tekrar nukleusa doğru göç ettikçe aksonemin bileşenleri etrafına sarılır (Junqueira ve Carneiro, 2009; Yıldırım, 2015).

2. Kep safhası: Akrozom kesesi büyür ve çekirdeğin zarına tutunup bir kep meydana getirir. Bu kepin içinde akrozomda, nöraminidaz, hiyalüronidaz, tripsin, asit fosfata benzer hidrolitik enzimler bulunmaktadır. Bu enzimler oositleri saran korona radiata hücreleri ile zona pellusidayı eritip spermatozoonun oositi döllemesini sağlar (Yıldırım, 2015).

3. Akrozomal safha: Nukleusun zarı uzayıp yoğunlaşmaya başlarken, sentriyollerden birisi gelişir ve kamçıyı meydana getirir, diğeri hücrenin bölünmesini sağlayan sentriyölü oluşturur. Oluşan kep nukleusun etrafını çevrelemeye başlar, meydana gelen bu yapıya akrozomal kep ismi verilir. Bu sırada nukleus yoğunlaşmaya devam eder. Mitokondri, kamçının proksimal kısmını sararak kalınlık oluşturur. Bu bölgede mitokondriyle üretilen enerjiyle spermatozoon hareketli hale gelir (Junqueira ve Carneiro, 2009; Rajeswary ve ark., 2007).

4. Olgunlaşma safhası: Bu safhada spermatozoon olgunlaşarak kuyruklu şeklini alır. Kalan fazla sitoplazma parçalarını Sertoli hücreleri fagosite eder (Şekil 2.7) (Bayramova, 2015). Sonuçta spermatozoon seminifer tübüle bırakılır ve epididimiste depolanması için boşaltımı yapılır (Sadler, 2011). Spermatozoa, bir baş ve uzun bir kuyruğu olan haploid bir hücredir. Spermin baş bölümünde haploid bir çekirdek ve nükleer zarın plazma zarına temas ettiği, içi enzim dolu akrozom bulunur. Spermatozoon zona pellusidada bulunan ZP3 molekülü ile temas edince, spermin akrozom reaksiyonu başlar, hiyalüronidaz, nöraminidaz, aril, akrosin, sülfataz ve akrozom içinde bulunan asit fosfataz enzimleri serbest bırakılır. Bu enzimlerin asıl amacı spermatozoon yolu üzerinde bulunan zona pellusidayı bozup spermin yumurtaya ulaşip yumurtayı döllemesini kolaylaştırmaktır (Yıldırım, 2015).



Şekil 2.7. Spermiyogenez süreci ve sperm oluşumu

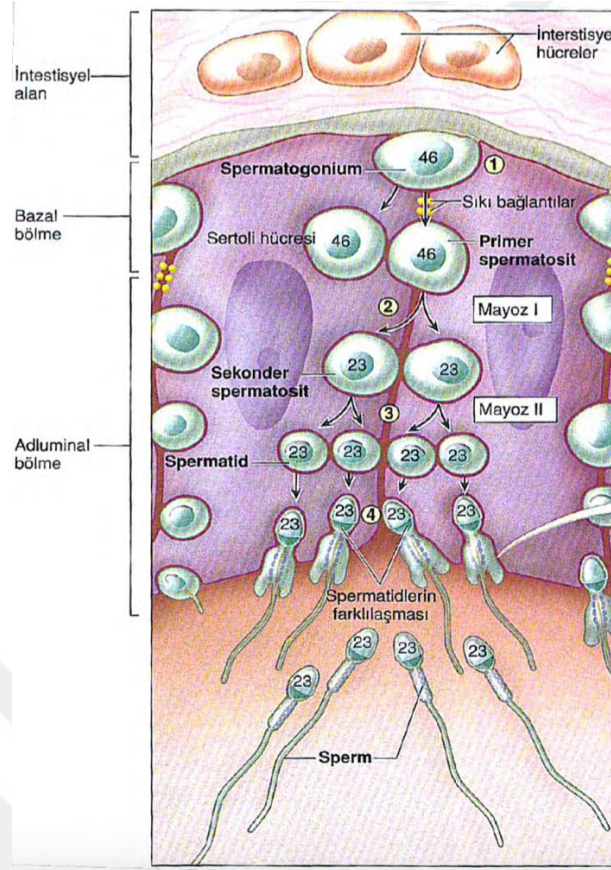
2.3.7. İnterstisyel Alan ve Leydig Hücreleri

Testisler, seminifer tübüller ve bunların arasını dolduran interstisyel bağ dokusundan meydana gelmektedir. İnterstisyel boşlukta seks steroid hormonu olarak da adlandırılan testosteronu üreten Leydig hücreleri bulunmaktadır. İnterstisyel alan birçok kompartmandan oluşmaktadır. Bunlar kan damarları, peritübüler miyoid hücreler, mast hücreleri, nörovasküler hücreler, lenfatikler, fibroblastlar ve makrofajlardır. Leydig hücrelerinin nükleusu yuvarlak, poligonal veya yuvarlak şekilli, asidofilik sitoplazmaya sahip hücrelerdir. Steroid sentezlediklerinden dolayı sitoplazmalarında fazla miktarda yağ damlacıkları bulunmaktadır. Leydig hücreleri aracılığıyla salgılanan testosteron hormonu kolesterolden üretilmektedir. Bu hormonun görevlerini sıralayacak olursak; gonadotropin salgılanması, embriyonik ve fetal yaşam döneminde meydana gelen cinsiyet farklanması, spermatogenez, erkeklerde penisin büyümesi, vücut kıllarının uzaması, erkek tipi sesin oluşması, kasların gelişip büyümesi gibi sekonder seks karakterlerinin oluşması ve sperm oluşumu şeklindedir. Ayrıca bu hücreler endokrin

fonksiyonlarını ürettikleri testosteron hormonunu kan ya da lenf dolaşımına boşaltmak kaydıyla tamamlarlar. Bu hücreler, testis hacminin %5 ila %12'sini meydana getirirler (Aşçı, 2013).

2.3.8. Kan Testis Bariyeri

Kan testis bariyeri, kan ve lenfatikler aracılığıyla gelen yabancı maddelerin seminifer tübülünden geçişini ayarlayan ve birincil koruma görevini üstlenen yapıdır (Şekil 2.8) (Algilani, 2022). Seminifer tübülün içi ile kan arasında bir koruma duvarının bulunması, testis sıvısında kandan gelen çok az maddenin bulunması anlamına gelir. Testis kapillerleri gözenekli bir yapıya sahiptir ve büyük boyuttaki moleküller bu gözeneklerden kolay şekilde geçebilmektedir. Sertoli hücreleri arasındaki engelleyici bağlantılar, bir bariyer oluşturup büyük molekülü yapıların Sertoli hücreleri arasında bulunan boşluğa taşınmasını engeller. Böylelikle spermatogenezin ileri safhalarındaki germ hücreleri, kanda bulunan zararlı maddelere karşı korunmuş olur (Junqueira ve Carneiro, 2009; Yıldırım, 2015). Ergenlik başlamadan önce testislerde, Sertoli hücrelerinin karşılıklı olan membranlarında iç içe geçmiş villusa benzeyen yapılar bulunmaktadır. Ergenlik başladıktan sonra bu uzantılar işlevsellik kazanır. Sertoli hücreleri bölünme özelliğini kaybeder ve spermatogenez başlayınca kan testis bariyeri de oluşur. İmmün sistemden sonra gelişen seksüel olgunlaşma sonucunda, farklanıp gelişen spermatozoon yabancı madde gibi algılanır. Bu da germ hücrelerinin yok olmasına sebep olacak immün cevap oluşturmaktadır. Bu bariyer, olgunlaşan spermatozoon ile immün sistem arasında oluşacak olumsuz bir durumu ortadan kaldırıp seminifer tübüllere immünoglobulinlerin geçmesini engellemektedir (Yıldırım, 2015).



Şekil 2.8. Kan testis bariyeri görseli

2.4. Testis Fizyolojisi

Testisler endokrin ve ekzokrin fonksiyonlara sahip birleşik tübüler özelliği olan bezlerdir. Ekzokrin işlevi spermatogenez sonrasında olgunlaşan spermatozoonların salgı olarak atılmasıdır. Endokrin işlevi Leydig hücreleri aracılığıyla testosteron hormonu üretilmesidir. Testosteronun %95'ini Leydig hücreleri, %5'ini adrenal korteks üretmektedir. Bu hormon spermatogenik hücrelerin büyüüp bölünebilmesini ve sekonder seks karakterlerinin devam ettirilmesini sağlar. Erkeklerde testosteron, çok küçük miktarlarda östrojen sentezine de dönüşebilir. Seminifer tübül sıvısında yüksek yoğunlukta bulunan östrojen hormonu, FSH'nin uyardığı Sertoli hücreleri içerisinde testosterondan yapılmaktadır, bu da spermiyogenez için gereklidir. Bununla beraber hipofiz ön lobunda üretilen LH ile FSH hormonları spermatogenezin düzenlenmesinde görev alır. LH, Leydig hücrelerine etki eder ve testosteron üretilmesini düzenler. FSH,

Sertoli hücrelerine etki ederek bu hücrelerin androjen bağlayan protein üretimini sağlar. Bu proteinin görevi seminifer tübül lümeni içinde testosteron birikimini sağlamaktır. Aynı zamanda, Sertoli hücrelerinin uyarılması spermatozoanın epididimise taşınmasından sorumlu testiküler sıvının üretiminde de önemlidir. Spermatogeneze etki eden bir diğer hormon büyüme hormonudur (GH, Growth Hormone). Bu hormonun en önemli özelliği spermatogonyumların bölünme yeteneğini hızlandırmasıdır. Salgılanma yeri hipotalamus olan GnRH (Gonadotropin salgılatıcı hormon), hipofize gider ve LH ile FSH'ın salgılanmasını uyarır. Bu hormonların yanında inhibin hormonu da testis fiziolojisi üzerine etkilidir. Sertoli hücreleri aracılığıyla salgılanan glikoprotein yapıya sahip bu hormon, direkt olarak ön hipofiz bezinde, FSH salgısını baskılar. Bunun yanında Leydig hücreleri aracılığıyla testosteronun salgılanmasını artırır ve inhibine zıt etki eden mekanizmasıyla da aktivin testosteron salgılanmasını azaltmaktadır. Kısacası FSH, inhibin ile aktivin sentezini etkiler ve Leydig hücrelerinin fonksiyonunu dolaylı yoldan etkiler. Aynı zamanda inhibin, hipotalamus ile hipofizyal FSH salınımına “negatif feedback” etki oluşturur (Gürel, 2018).

2.5. Lityumun Tarihçesi

Lityum (Li) periyodik tabloda hidrojen (H) ve helyumdan (He) sonra gelir ve oldukça düşük yoğunluğa sahiptir. Yunanca kaya manasına gelir, atom numarası 3, atom ağırlığı 6.941'dir. Metal özelliğine sahiptir. Tıpta, endüstride, elektronikte, kimyada, metalürjide kullanılan 21. yüzyılın enerji metalidir. Tıptaki kullanımı 1800'lü yıllara dayanmaktadır. İngiliz bilim adamı Alfred Baring Garrod, 1847 yılında gut hastalarının kanında ürik asit varlığını tespit ederek bu hastalığı lityum ile tedavi etmeyi başarmıştır (Garrod, 1859). 1870 yılında Silas Weir Mitchell antiepileptik ilaç olarak lityum bromürü önermiştir (Mitchell, 1870). 1871'de New York Tıp Fakültesi Bellevue Hastanesi Ruh Sağlığı ve Sinir Hastalıkları Profesörü William Hammond, mani için lityum reçetesi yazan ilk doktor unvanına sahip

olmuştur. Hammond, akut mani hastalarında lityum bromür kullandığını ve bu ilacın diğerlerine kıyasla daha tatmin edici sonuçlar verdiğini bildirmiştir (Hammond, 1871). Danimarka, depresyonun tedavisinde ve önlenmesinde lityum kullanımını başlatan ülke olmuştur. 1894 yılında Danimarkalı psikiyatrist Frederik Lange depresyon tedavisinde lityum kullanmış ve hastalarını lityum karbonatla iyileştirmeyi başarmıştır (Schioldann, 2001; Shorter, 2009). Lityum kullanımının yaygınlaşması, John Cade'in teşvikiyle 1949'da Avustralya'daki Melbourne Bundoora Hastanesi'nde olmuştur. Jon Cade, manik hastalarını lityum sitrat ve lityum karbonatla tedavi etmiştir. Hastaların çoğu bu tedavi ile iyileşmiştir (Cade, 1949). Daha sonraki yıllarda lityum psikiyatri alanında kullanılmaya devam edilmiş ve lityum ile yapılan çalışmalar da literatüre girmiştir (Won ve Kim, 2017).

2.5.1. Lityumun Etki Mekanizması

Lityumun etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da üç ana yolla çalıştığı düşünülmektedir: İlk olarak hücredeki sodyum transportunu değiştirdiği, ikinci olarak hücresel sinyal iletim yollarını ve özellikle ikinci haberciler sistemini etkileyerek nörotransmisyon üzerinde düzenleyici bir rol oynadığı ve son olarak da katekolamin metabolizmasını düzenlediği tahmin edilmektedir. Katyon olması nedeniyle Na^+ , K^+ , Ca^{2+} ve Mg^{2+} ile benzer özelliklere sahiptir ve hücre içi iyon dengesini değiştirerek hücre zarında bulunan Na^+/K^+ ATPaz enziminin aktivitesini düzenler (Altınbaş ve ark., 2017). Lityum Na^+/K^+ ATPaz pompasının etkinliğini artırır, hücre içinde Ca^{2+} seviyesini düşürüp mani ile depresyonun nöron etkinliğini normal hale getirir (El-Mallakh ve Wyatt, 1995).

Lityumun hücre içerisinde inositol monofosfataz etkisini inhibe ederek protein kinaz C etkinliğini azalttığı ve fosfotidil inositol mekanizmasında G proteinleriyle ikinci haberci aracılığıyla etki ettiği, glikojen sentaz kinaz-3'ü baskılayarak hücre içinde iletiyi engellediği tahmin edilmektedir. Uzun süreli kullanıldığında asetilkolin sentezini ve geri Emilimini artırıp serotonerjik hücreleri etkileyerek serotonin salınımını arttırıcı etki gösterdiği

bulunmuştur (Yüksel, 2010). Yapılan araştırmalar neticesinde endojen büyüme faktörlerini aktivelediği, gen ekspresyonunu sağladığı, hücreleri koruyan proteinleri aktiveleştirerek nöroprotektif etki gösterdiği ve nörogenezi uyardığı bulunmuştur (Malhi ve ark., 2013).

2.5.2. Farmakokinetik ve Farmakodinamik

Ülkemizde lityum genellikle lityum sitrat ve lityum karbonat şeklinde kullanılmaktadır, karbonat formu daha fazla bulunmaktadır. Ağız ile alındığında bağırsaklardan hızla emilen lityum, plazmadaki yüksek miktarına 2-4 saatte ulaşabilir. Plazma proteinlerine bağlanamaz, aktif metaboliti de bulunmaz. Ortalama ömrü 18-24 saattir, bu süre yaşlılarda 36 saate çıkabilmektedir. Bundan dolayı yaşlılarda ilaç dozu düşük olmalıdır, ilaç düzeyinin ayarlanabilmesi uzun zaman almaktadır. Tüm dokulara yayılır ama her dokuda yoğunluğu aynı değildir. Böbrek ile tiroid bezinde yoğunluğu kan düzeyinden yüksek olurken; beyin omurilik sıvısı, alyuvar ve beyin dokusunda kan düzeyinden düşük olmaktadır. Lityum beyin dokusuna hızlı girerken diğer organlara daha yavaş girmektedir (Işık, Taner, Işık, 2013; Öztürk ve Uluşahin, 2008).

Lityumun çoğu idrarla atılır, geri kalan kısmı ise dışkı, sperm, ter, tükürük ve anne sütüyle atılmaktadır. Lityum böbreklerden atılırken %70 ila 80'i proksimal tübüllerden tekrar emilmektedir. Böbreklerde ilk 12 saatte atılım hızlı olur, sonraki 12 saatte ise atılım hızı azalır ve 48 saat içinde %90'dan fazlası atılır. Yaşlılık, böbrek yetmezliği, lohusalık, dehidratasyon, hiponatremi, anjiyotensin konverting enzim inhibitörleri ve diüretiklerle beraber kullanıldığında lityum toksikasyona neden olabilir (Eroğlu ve Özpoyraz, 2010; Işık ve ark., 2013).

2.5.3. Toksik Etkileri

Ağız yoluyla alındığında insan sağlığı açısından lityum toksik etki yaratmaktadır. Ancak vücut toleransı kişiden kişiye değişiklik gösterir. Lityum, manik depresyon tedavisinde membran taşıyıcı proteinlere dayalı terapötik şeklinde kullanılmaktadır.

Lityumun kimyasal yapısı sodyuma benzer ancak toksik etkisi daha fazladır (Aral ve Vecchio-Sadus, 2008). Lityumun özellikle psikiyatrik bozukluklarda kullanımı yaygınlaştıkça, yan etkileri de görülmeye başlanmıştır. Lityumun sürekli kullanımda çeşitli organ sistemleri üzerinde yan etkiler izlenmiştir. Örneğin, lityum tiroid bezi üzerinde hipotiroidizme neden olmaktadır. Lityum kullananlarda hipotiroidizmin ortaya çıkışı %47'lere ulaşmaktadır. Lityum kaynaklı guatr %5.6 ila yüzde 60 oranında değişmektedir. Guatr birkaç haftalık lityum kullanımından sonra gelişebileceği gibi birkaç yılda da gelişebilir. Lityumun neden olduğu hiperkalsemi, böbrek taşı, osteopeni ve osteoporoz, dispeptik şikayetler ve peptik ülser, kardiyak aritmiler, dehidratasyon, hipertansiyon, kas güçsüzlüğü ve böbrek fonksiyonlarında azalmaya neden olabilir (Livingstone ve Rampes, 2006). Diyabet, hipertansiyon, koroner kalp hastalığı ve kilo alımına bağlı artan felç riski de endişe duyulan diğer sorunlardır (Vieweg ve ark., 1988). Lityum kullanımının bir diğer yan etkisi de böbrek yetmezliğidir. Lityumun neden olduğu böbrek hasarının önemli bir kısmı, poliüri ve polidipsi ile karakterize nefrojenik diyabet insipidus olarak ortaya çıkmıştır (Bedford ve ark., 2008). Lityumun, testis dokusu üzerinde toksik etki gösterdiği, bazal membranda ondülasyona, interstisyel boşlukta ödeme, tunika albuginea tabakasında kalınlaşmaya, spermatogonyumlarda hasara, bazı seminifer tübül lümenlerinde kuyruk hasarlı spermilerin oluşmasına ve seminifer tübül lümeninde daralmalara neden olduğu belirlenmiştir (Kaya, 2014). Lityum, testis dokusunda seminifer tübül epitelinde düzensizlik ve bazal membranda ayrışmalar şeklinde de hasara neden olmaktadır (Mert, 2024). Farklı dozlarda, kısa ya da uzun süreli lityum kullanımının, testis dokusunda hasara ve sperm parametrelerinde bozulmalara neden olduğu da gösterilmiştir (Toghyani ve ark., 2013; Zarnescu ve Zamfirescu, 2006).

Lityum metali suyla reaksiyona girerek lityum hidroksit ve hidrojen oluşturur, genelde suda iyon formunda bulunur. Tuzlu su ve tatlı sudaki lityum miktarı mg/L

düzeyindedir. Lityum yüzey sularında 1-10 mg/L düzeyinde bulunur. Deniz suyunda lityum konsantrasyonu 0.17 mg/L iken bu oran atık sularda ve yeraltı sularında 3 mg/L'ye çıkabilmektedir. Bazen toprağın lityum içeriği 100 mg/L veya daha fazla olabilmektedir. Böylelikle çevreye çok fazla toksik etki yaratabilmektedir (Aral ve Vecchio-Sadus, 2008).

Yapılan araştırmalarda lityumun farklı organizmalarda farklı temel özelliklerinin olduğu bildirmiştir. Birbirinden farklı bitki türleri, büyüme ve gelişebilme adına çok önemli olmasa da lityum konsantrasyonunu absorbe edebilmektedir. Bununla beraber lityum toprakta yüksek yoğunlukta bulunuyorsa bu durum bitkiler için toksiktir. Yapılan başka bir araştırmada da lityumun bitkilerde inositol döngüsü ile kalsiyum sinyalinin baskılandığı bulunmuştur (Shahzad ve ark., 2016).

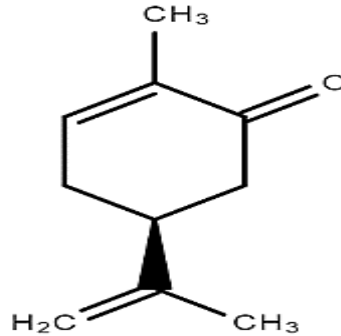
2.6. D-Carvone

İki yıllık bir bitki olan İran kimyonu Caraway (Apiaceae familyası) olarak isimlendirilir. Caraway her bölgede değişik isimlerle adlandırılmaktadır. Örneğin; Yunanca'da karon denilen bitki, Latince'de Cumin olarak isimlendirilmiştir. Son olarak Caraway şeklinde değiştirilmiştir. Bunun yanında mutfakta ve tıbbi amaçlarla da (bronşit, öksürük, baş ağrısı tedavisinde) kullanılmaktadır. Kimyon, Akdeniz bölgesi ile birlikte tüm Avrupa'da fazlasıyla kullanılan bir bitkidir (Şekil 2.9) (Altun, 2018). Dünyada en fazla kimyon üretimi Finlandiya'da yapılmaktadır. Geleneksel tıpta etkili bir nefes açıcı olarak kullanılmaktadır. Ortadoğu mutfağında kimyon ile yapılan puding Ramazan ayında tüketilmektedir. Günümüzde en fazla kimyon tüketen ülkeler arasında Fas, Hindistan ve Meksika bulunmaktadır. Milattan önceki çağlarda kimyonu en fazla kullananlar Yunanlılar ile Romalılar olmuştur. Aynı zamanda kimyon, Doğu Akdeniz bölgesinde bulunan ülkelerde ve Nil Nehri'nin çevresinde de yetiştirilmektedir. Sindirimi kolaylaştırmasının yanında yemeklere lezzet vermesi için de kullanılır. Kimyonun kullanım alanları et ürünleri, ekmek, şeker sanayisi, soslar, kozmetik sanayisi ve eczacılık şeklindedir (Erol ve Tuzlacı, 1997).



Şekil 2.9. Kimyon bitkisi ve tohumları

Çoğunlukla nane, kimyon ve dereotu gibi aromatik bitkilerin esansiyel yağ ekstraktlarında önemli bir fitokimyasal bileşen olarak bulunan Carvone siklik doymamış bir monoterpenoid ketondur ve kaynama noktası 230°C'dir (Şekil 2.10) (Gopalakrishnan ve ark., 2019; Abbas ve Kathem, 2021). Bu monoterpenin, biyolojik özellikleri farklı olan iki enantiyomeri vardır. Bu enantiyomerler kimyon tohumlarında bulunan S-(+)-Carvone (D-Carvone) ve nane yapraklarında bulunan R-(-)-Carvone (L-Carvone)'dur (Abbas ve ark., 2020).



Şekil 2.10. D-Carvone'un kimyasal yapısı

2.6.1. Carvone'un Anti-İnflamatuvar Etkisi

Geleneksel tıpta kimyonun eklem ve kas ağrılarını giderdiği (anti-inflamatuvar etki) daha öncesinde bildirilmiştir. Yapılan literatür araştırmasında, uçucu yağların (Carvone) kimyasal yapısına bağlı olarak, bu yağların anti-inflamatuvar etki gösterdiği ve sitokinler ile araşidonik asit metabolizması üzerinde etkiler yaratarak iltihaplanmayı azalttığı öne

sürülmüştür (Miguel, 2010). Yapılan başka bir çalışmada, b-epoksi-Carvone (EC) intraperitoneal şeklinde uygulanmış, asetik asit ile uyarılan nosiseptif yanıt üzerine farelere karın kıvrırma testi, sıcak plaka testi ve formalinde ölçü ile anti-inflamatuar etki ettiği görülmüştür (Altun, 2018).

2.6.2. Carvone'un Antioksidan Etkisi

Antioksidan aktivitesini aydınlatmak için 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH) ve beta-karoten agartma çalışmaları yapılmış ve deney sonunda Carvone'un güçlü bir antioksidan aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Jayaprakasha ve ark., 2002).

2.6.3. Carvone'un Ülser Olmayan Dispepsiye Etkisi

Enterik ile kaplanan kimyon ve nane yağı bulunan preparatlarda, non-ülser dispepsi semptomlarını daha aza indirmek için klinik çalışmalar yapılmıştır. Yapılan çalışmalarda spesifik olarak hazırlanan kimyon ve nane yağı ile birlikte diğer bitkisel özütler bulunduran preparatların fonksiyonel dispepsi tedavisi için etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak alt özofagus sfinkteri üzerinde abdominal basınç dengesini sağladığı ve yemek borusu ile midedeki şişkinliği azaltıcı etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Madisch, Holtmann ve Mayr, 2004).

2.6.4. Carvone'un Anti-Karsinogenik Etkisi

Kanseri önleyen bileşikler araştırılırken çeşitli yapılar üzerine odaklanılmıştır, bunlar farklı kanser tiplerine sebep olan veya indükleyen faktörler ile ilişkili olan, yaşam biçimi ve gıda maddelerindeki ajanlar olarak ifade edilmiştir. Farklı kanser hücre türlerinde, Carvone'un DNA sentezini inhibe ettiği, hücre döngüsünü engellediği ve güçlü bir inhibitör olduğu bulunmuştur. Yapılan bir çalışmada (R)-(-) ve (S)-(+) Carvone'un birçok kanser tipinde hücre çoğalmasını durduran etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte bilinen yan etkileri çok az olan bir maddedir (Aydın, Türkez ve Keleş, 2015). Yapılan bir başka çalışmada ise (R)-(-) ve (S)-(+) Carvone'un,

androjen reseptörü ve transkripsiyon faktörü E2F-1'i hedefleyerek prostat kanserini inhibe edici etki gösterdiği tespit edilmiştir (Altun, 2018).

2.6.5. Carvone'un Solunum Sistemi ve Kardiyovasküler Sistem Üzerine Etkisi

Kimyonun yapısındaki antiseptikler astım, sinüzit, zatürre, bronşit ve soğuk algınlığı gibi solunum sistemi rahatsızlıklarına yardımcı olmaktadır. Uçucu olan yağ asitlerinin kardiyovasküler sistem ve solunum sistemi üzerine etkisini anlamak yapılan deneylerden birinde Carvone ve Limonen'in kobay farelerinde aort, trakea ve düz kas üzerine etkilerine bakılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda, kalp-damar sistemi ve solunum yolu hastalıklarının tedavisi için Carvone'un tedavi edici etki gösterdiği sonucuna varılmıştır (Altun, 2018).

2.6.6. Carvone'un Antimikrobiyal Etkisi

Carvone'un farmakolojik etkileriyle ilgili son zamanlarda yapılan birçok çalışmada bu bitkinin farmakolojik etkilerinin yanında antimikrobiyal etkisinin de olduğu bulunmuştur. Carvone'un antimikrobiyal etkisi disk difüzyon metoduyla değerlendirilmiş, yapılan çalışmada 10 µg uçucu yağ, test disklerine uygulanmış ve Carvone uçucu yağlarının antimikrobiyal etkisi standart testler ile karşılaştırılmıştır. Bu uçucu yağların antimikrobiyal etkisinin standart testlere kıyasla daha iyi olduğu görülmüştür (Altun, 2018). Yapılan bir başka çalışmada Carvone uçucu yağının mayalara ve gram-pozitif bakterilere karşı yüksek antimikrobiyal etkiye sahip olduğu bulunmuştur (Ambrosio ve ark., 2017).

2.7. Apoptoz Markerları

2.7.1. Bcl-2

Bcl-2, mitokondriyal zarında bulunan, apoptoz (programlanmış hücre ölümü) mekanizmasında önemli etkisi olan bir proteindir. Stres gibi negatif durumlarda

hastalıkların meydana gelmemesi için Bcl-2, sitokrom-C'nin salınımını önleyerek apoptoz mekanizmasında oluşacak olumsuz durumları engellemektedir. Bcl-2, apoptozun mitokondri yolağında asıl düzenleyici etkisi olan proteindir. Apoptoza giren hücrelerde süreç, Bcl-2'nin heterodimer ve homodimer formlarına bağlı şekilde gelişmektedir. Anti-apoptotik ve proapoptotik proteinlerin hücredeki sayısına göre apoptoza karar verilmektedir. Bcl-2 proteini mitokondrinin dış membranına bağlı olan 25 kDa'luk proteinleri kodlamaktadır. Apoptozun başlaması için gerekli olan iyon kanallarının meydana gelmesini sağlar ve sağlıklı olan hücrelerin apoptoz evresine girmesini engeller. Bax proteini ise Bcl-2'nin tersi yönde hareket ederek, mitokondri dış zarında porların açılmasına neden olur ve bu da sitokrom C'nin plazmaya yayılmasını sağlar (Singh, Letai ve Sarosiek, 2019). Bcl-2'nin biyolojik fonksiyonları genellikle hücrenin ömrünü uzatmak, farklı apoptoz faktörlerinin uyarılmasını sağlamak ve uyarıcı faktörlere karşı direnç arttırmak olarak ifade edilebilir (Gobe, Rubin ve Williams, 2002). Yapılan araştırmalardan edindiğimiz bilgilere göre Bcl-2 proteininin apoptozu engellediği ve hücrelerin ömrünü uzattığı sonucuna varmaktayız. Bcl-2, Bax proteininin tersi yönünde etki ederek hücrelerin yaşamasını ya da geç ölmesini sağlamaktadır. Bunun neticesinde Bcl-2 proteini hücre ömrünün uzamasında etkili olduğu için birçok hastalığın araştırılmasında ve tedavisinde kullanılmaktadır.

2.7.2. Bax

Apoptozun uyarılması, hücresel lokalizasyondaki farklılık ve membran yapısındaki değişiklikler Bax (Bcl-2 Associated X) proapoptotik proteini aracılığıyla yapılmaktadır. Embriyonik dönemde etkilidir ve yetişkin dönemde dokunun şekillenmesi, bağışıklık sisteminin yürütülmesi, düzenlenmesi gibi fizyolojik süreçlerde etkin rol oynamaktadır. Apoptozun gerçekleşebilmesi için normal hücrelerde Bax proteini gereklidir. Bax proteini sağlıklı hücre içerisinde inaktif halde bulunmaktadır (Jaafar ve

ark., 2010). Apoptoz esnasında, mitokondri içinde farklı yerlerde birikir ve konformasyonel bir değişikliğe girer. Bax proteini oligomerleri, zarda genellikle dimer birimler şeklinde bulunur (Consentino ve ark., 2022). Yapılan araştırmalardan görüldüğü üzere Bax, programlanmış hücre ölümünde etkin rol alan bir proteindir. Bax'ın, Bcl-2 ailesinin bir üyesi olduğu, hücrelerin ölüm mekanizmalarını tetiklediği ve apoptozu uyardığı sonucuna varılmıştır (Jaafar ve ark., 2010).

2.7.3. Kaspaz 3

Kaspazlar sistein proteazlardır, proteinleri aspartat rezidülerinden kesmektedirler. Kaspazlar apoptotik mekanizmada hücrelerin parçalanmasını ve apoptotik ortamın oluşmasını sağlar (Li, Miao ve Zhuang, 2018). Apoptozda morfolojik ve biyokimyasal farklılıkların asıl sebebi kaspaz aktivasyonudur. Kaspazlar hücre içerisinde inaktif şekilde bulunurlar. Bazı durumlarda aktif halde bulunurlar. Proteinleri parçalayarak birbirlerini aktifleştirirler. Yaklaşık olarak 100 değişik hedef proteini belli bölgelerinden, özelliklerine göre keser ve apoptozun meydana gelmesini sağlarlar. Apoptoz kaspaza bağlı şekilde ilerlemektedir (Larsen ve Sorensen, 2017). Kaspaz-3, aktif olduktan sonra geri dönüşü mümkün olmayan döneme girilir ve hücre apoptoza girmeye mecbur hale gelir. Kaspazlar apoptoz sırasında farklı uyarılar aracılığıyla inaktif halden aktif hale geçerek süreci ilerletir. Kaspazlar ile ilgili yürütülen araştırmalardan edindiğimiz bilgilere göre Kaspaz-3'ün apoptozu yürüten bir enzim olduğunu görmekteyiz. Programlanmış hücre ölümü, vücudu hasarlı hücrelerden kurtaran önemli bir süreçtir. Kaspaz-3, bazı moleküler olayları uyararak hücrelerin parçalanmasını sağlamaktadır. Kaspaz-3'ün apoptoz için önemli bir belirteç olduğunu görmekteyiz, bundan dolayı hastalıkların teşhisinde ve araştırılmasında kullanılmaktadır (Dağdeviren, 2021).

2.8. İnflamasyon Markerları

2.8.1. NF-κB

1986 yılında Baltimore ve Sen'in keşfettiği Nükleer faktör kappa B (NF-κB) bir transkripsiyon faktörüdür (Baldwin, 2001). NF-κB'nin T lenfositler, B lenfositler, monositik makrofaj ve fibroblast gibi hücre çeşitlerinden sentezlenen düzenleyici bir protein olduğu bulunmuştur (Baeuerle, 1998; Blank ve ark., 1992). Aktif NF-κB, apoptoz, immüno-inflamatuar yanıtlar, hücre adezyonu, anjiyogenez hücre siklusu gibi olaylarda etkilidir ve 200'den fazla gende transkripsiyonu kontrol eder (Maeda ve Omata, 2008). NF-κB birden çok hücrede bulunmaktadır ve uyaran olmadığı zaman sitoplazmada yer almaktadır. Sitoplazmada inhibitör protein olarak bulunan inhibitör kappa B (IκB) ile kompleks oluşturan NF-κB inaktive olur. Organizma uyarıya maruz kalınca NFκB ile IκB ayrılır, NF-κB aktif forma geçer (Trinh ve ark., 2008). NF-κB'nin inflamasyondaki rolü TNF-α ve IL-1 gibi sitokinlerin transkripsiyonunu artırmasıdır (Atreya, Atreya ve Neurath, 2008). Kronik inflamasyon ve otoimmün hastalıklar gibi farklı hastalıkların patofizyolojisinde bu sitokinlerin önemli olduğu bilinmektedir (O'Shea ve Murray, 2008). NF-κB, birçok genin transkripsiyonunu düzenler ve TNF-α, immünglobulinler sitokinler, kemokinler ve hücre adezyon molekülleri gibi proteinlerin ekspresyonunu artırır, inflamatuvar hastalıklarda önemli rol oynar (Li ve ark., 2008). Yapılan araştırmalardan edindiğimiz bilgiler ışığında NF-κB, transkripsiyon faktöründen meydana gelen bir protein kompleksidir. Bu kompleks, özellikle inflamasyon ve bağışıklık sisteminde önemli rol oynamaktadır. Bu transkripsiyon faktörü hastalıkların teşhisinde ve araştırılmasında kullanılan önemli bir proteindir.

2.8.2. TNF-α

1975'de Lloyd Old ile arkadaşları tavşan ve farelerde "Basil Calmette-Guerin" (BCG) ile retiküloendotelyal sistemin indüklenmesi ile lipopolisakkarit (LPS)

enjeksiyonu sonucunda dolaşım sistemine protein salındığını buldular ve buna da ‘‘Tümör Nekrozis Faktör (TNF)’’ ismini verdiler (Carswell ve ark., 1975). Tümör nekrozis faktör (TNF) proteinin alfa ile beta adında iki yapısal şekli bulunmaktadır. TNF-  genellikle monosit makrofajlardan salınır (Neta, Oppenheim ve Gillis, 1987). Tümör nekrozis faktör alfa (TNF- ), kaşeksin veya kaşektin şeklinde de isimlendirilen 17 ila 70 kDa ağırlığa sahip bir sitokindir (Male ve ark., 1996). TNF-  sitokini genellikle makrofajlar, fibroblastlar, monositler, endotel hücreleri, B hücreleri ve adipositler aracılığıyla sentezlenir (Abbas, Lichtman ve Pober, 1994; Callard ve Gearing, 1994). 1985’de ilk defa insan kaynaklı TNF-  klonlanmasının ardından anti-TNF-  antikorları ve solubl TNF reseptörleri üretilmiştir. Bunlar da inflamatuvar hastalıkların tedavisinde kullanılmaya başlanmışır (Pennica ve ark., 1995).

TNF- , sitokinler ailesinin bir  yesi olup, aynı zamanda TNF ailesi içinde yer alan bir peptid mediyat r d r. TNF-  doğal bağışıklık, kazanılmış bağışıklık, apoptoz ve hücre proliferasyonunda rol alan proinflamatuvar özellikleri olan bir sitokindir (Bradley, 2008). TNF- ’nın özellikle iltihabi durumlarda görev yaptėđı, enfeksiyöz ajanların varlığında ya da doku hasarında 4 ila 8 saatte artış gösterip 16 ila 24 saatte ise en üst seviyeye ulaştığı ve uyarının devamlılığına bağlı olarak salınımının devam ettiği bildirilmektedir (Neta, Oppenheim ve Gillis, 1987). TNF-  ve IL-1  gibi proinflamatuvar sitokinlerin, inflamatuvar hastalıkların patogenezesinde önemli etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak tümör nekroz faktörü alfa, vücutta oluşan inflamatuvar süreçte önemli rol oynayan bir sitokindir. İnflamasyonun başlatılması ve devam ettirilmesinde ana etkiye sahiptir. TNF- , diğer inflamatuvar moleküllerin (IL-1, IL-6 gibi)  retimini indükleyerek inflamasyon yanıtını başlatır ve arttırarak devam ettirir (Lee ve Lau, 2011).

2.8.3. IL1 β

IL1 β geni interlökin 1 sitokin ailesine ait bir protein olarak bilinmektedir. Bu sitokin makrofaj aracılığıyla aktive edilir, proprotein haline dönüşür ve proteolitik kaspaz1 (CSP1/ICE) ile aktive olur. IL1 β sitokini, inflamatuvar yanıtta, farklı hücre aktivitesinde, hücre farklılaşmasında, hücre proliferasyonunda ve apoptozda önemli bir mediyatör olarak yer almaktadır (Pekkoç, 2016). IL1 β geni immün yanıtın erken safhalarında ifade edilen inflamatuvar sitokindir. IL1 β geni, IL6'nın üretilmesini ve karaciğerin akut faz yanıtını uyarmaktadır. IL1 β reseptörleri, fibroblast büyüme faktörleri ile yapısal olarak benzerlik gösterirler. Bu faktör de otizm, şizofreni ve embriyonik gelişimle ilişkili bulunmuştur (Goines ve Ashwood, 2013). Yapılan araştırmalardan edindiğimiz bilgiler doğrultusunda IL1 β geninin, vücutta meydana gelen inflamasyonda önemli rol üstlenen bir protein olduğu sonucuna varmaktayız. Bu protein, immün sistemimizin enfeksiyonlara ve hasarlı dokuya karşı verdiği yanıtta önemli bir rol oynamaktadır. Vücutta IL1 β seviyesinin artışı, inflamasyonun devam ettiğini göstermektedir. Bundan dolayı hastalıkların teşhisi ve tedavisinde kullanılan bir protein olmuştur.

2.9. İnflamasyon ve Apoptoz Markeri

2.9.1. P2X7

P2X7 reseptörü, ilk defa 1996 yılında fare makrofajı ve beyninden klonlanmıştır (North, 2002). 595 aminoasit uzunluğa sahip birden çok alt birimin bir araya gelip işlevsel formunu meydana getirdiği proteindir. P2X7 reseptörünün C-ucu 244 aa uzunluğa sahip iken, P2X reseptörün C-ucu 120 ila 200 aminoasit daha kısadır (Denlinger ve ark., 2001). C-terminal ucu hücresel lokalizasyon, posttranslasyonel modifikasyon, protein-protein etkileşimleri, oligomerizasyon ve sinyal yolağı aktivasyonu için çok önemlidir (Wickert ve ark., 2013). Önceden bu reseptörlerin dendritik hücreler, makrofajlar, monositler,

eritrositler, lenfositler, osteoklastlar, eozinofiller ve mast hücreleri ile sınırlı olduğu düşünüüyordu. Fakat, P2X7 reseptörleri osteoblastlar, endotel hücreleri, fibroblastlar ve epitel hücreleri üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Bununla beraber P2X7 reseptör merkezi ve periferik sinir sisteminde bulunan mikroglialar, oligodendrositler, astrositler ve Schwann hücreleri üzerinde de etkilidir (Sperlágh ve ark., 2006). P2X7 reseptör geni ile beraber eksprese edilen Enhanced Green Florescent Protein (EGFP)'yi taşıyan transgenik fareler üretilmiş ve bu transgenik fareler meydana gelen nöbetler sonrasında merkezi sinir sistemi içinde P2X7 reseptörünün ifade edilmesini lokalize etmek amacıyla kullanılmıştır. P2X7 reseptörünün nöronlarda ekspresyonunun arttığı fakat hipokampus ile neokortekste astrositler ve mikroglialar üzerinde ekspresyonunun artmadığı gözlemlenmiştir (Engel ve ark., 2012; Jimenez-Pacheco ve ark., 2013).

P2X7 memeli canlılarda yaygın olarak bulunmaktadır. Genelde mikroglia, lenfosit ve makrofajlarda yoğun şekilde bulunmaktadır. Bu reseptörün bağışıklık hücrelerinde fazla eksprese edilmesi sitotoksik cevaplara, hücre füzyonuna ve sitokin salınımına aracılık etmesinden dolayı bağışıklık sisteminde önemli yer tutmaktadır (Ferrari ve ark., 2000). P2X7 reseptörü, patolojik hasarlardan sonra mikrogliaların aktive edilmesinde ve TNF- α , IL-1 β , IL-18 gibi olgun pro-inflamatuar sitokinlerin salgılanmasında önemli etkisi olan bir proteindir (Sperlágh ve Illes, 2007). ATP'nin düşük olan afinitesinden dolayı P2X7 reseptörünün aktivasyon seviyesi patolojik, fizyolojik ve normal koşullarda farklılık gösterir. Örneğin, P2X7 reseptörü, serum ve hücre dışı ATP yokluğunda apoptotik hücreler ve bakteriler için serbest oksijen tutucu reseptördür (Wiley ve Gu, 2012).

İnflamasyon, metabolik stres, hücre ölümü gibi patolojik durumlarda ise hücre dışı ATP yoğunluğu artar. Bu sebepten dolayı reseptör aktivasyonunun artacağı tahmin edilmektedir (Cotrina ve Nedergaard, 2009; Sperlágh ve ark., 2006). P2X7 reseptörü,

apoptotik enzim olarak kaspaz-1 aktivasyonunu artırır ve pro-IL-1 β 'nın IL-1 β 'ya dönüşümünü sağlar. Bunun yanı sıra, hücre iskeletinde değişiklikler meydana gelir, membran yapısı zayıflar ve inflamasyon ile proliferasyon süreçleri tetiklenir (Illes ve ark., 2012). Yapılan araştırmalardan çıkarımlarımıza göre P2X7 reseptörü, hücre dışında ATP (adenozin trifosfat) molekülüne duyarlı olan iyon kanalıdır. Bu reseptör, genellikle sinir sistemi ve bağışıklık sistemi hücrelerinde bulunmaktadır. Bu reseptörün aktivasyonu hem inflamatuvar yanıtı indükler hem de apoptoz ve farklı biyolojik süreçlerin başlamasına neden olur. P2X7 reseptörünün aktivasyonu, sitokin ve kemokin salınımını artırır ve inflamasyona neden olur. Yüksek ATP, P2X7 reseptörünün gözenek oluşturmaya sebep olabilir. Oluşan bu gözenekler, hücre içinin dışı sızmasına ve hücre ölümüne sebep olabilir. Bu etkilerinden dolayı hastalık teşhisi ve tedavisinde kullanılan önemli reseptörlerden biridir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney Etik Kurulu Onayı

“Sıçanlarda Lityum ile Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine D-Carvone’un Etkilerinin Araştırılması” başlıklı yüksek lisans tez çalışması, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 25 Ocak 2024 tarihinde 01/26 karar numarası ile etik standartlara uygun bulunmuştur.

3.2. Çalışmada Kullanılan Sıçanların Temini ve Bakımı

Çalışmada Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (ATADEM) alınan, 9-10 haftalık ortalama 250-300 g ağırlığındaki 24 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı.

Deney öncesinde sıçanların ortama adaptasyonları sağlandı ve gruplara ayrıldı. Deney boyunca, sıçanlara herhangi bir kısıtlama olmaksızın yeteri kadar su ve pelet yem sağlandı. Sıçanlar, 21 ila 23°C arasında değişen sıcaklık ve %45 ila 50 nem seviyesine sahip, yarım gün aydınlık, yarım gün karanlık olan kontrollü bir laboratuvar ortamında tutuldular.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deneye başlamadan önce 24 adet sıçan, her grupta 6 sıçan olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı. Gruplar şu şekilde oluşturuldu:

1. Grup (Kontrol grubu) (n=6): 42 gün boyunca sıçanlar katkısız standart ticari yem ile beslendi.

2. Grup (Lityum grubu) (n=6): Sıçanlar 1 kg standart ticari yeme 80 mmol Lityum klorür (LiCl) ilave edilmiş katkılı yem ile 42 gün boyunca beslendi (Şekil 3.1).

3. Grup (Lityum+D-Carvone grubu) (n=6): Sıçanlar 1 kg standart ticari yeme 80 mmol Lityum klorür (LiCl) ilave edilmiş katkılı yem ile 42 gün boyunca beslendi (Şekil 3.1). Sıçanlar 1 kg standart ticari yeme 80 mmol LiCl ilave edilmiş katkılı yem ile

beslenirken deneyin son 14 gn, gruptaki her bir sana gnlk intraperitoneal yolla 10 mg/kg D-Carvone verildi (ekil 3.2).

4. Grup (D-Carvone grubu) (n=6): 42 gn boyunca sanlar katkısız standart ticari yem ile beslendi. Sanlar katkısız standart ticari yem ile beslenirken aynı zamanda deneyin son 14 gn, gruptaki her bir sana gnlk intraperitoneal yolla 10 mg/kg D-Carvone verildi (ekil 3.2).

Lityum uygulanan gruptaki tm ratlara 1 kg kuru yemde, 80 mmol LiCl olacak şekilde hazırlatılan katkılı ticari yem (80 mmol/kg yem) verildi. Katkılı ticari yem, bonkalitin iine Lityum klorr (LiCl) katılarak hazırlandı. Standart ticari yem ile LiCl ilaveli katkılı ticari yem, sertifikalı deney hayvanları yemi hazırlayan bir firma (Arden Yem Sanayi Ltd. ti, Ankara) tarafından hazırlandı.



Şekil 3.1. Sanların lityum ilaveli ticari yem ile beslenmesi



Şekil 3.2. Sıçanlara D-Carvone enjeksiyonu yapılması

3.4. Testis Dokusunun Alınma ve Saklama Koşulları

42 günlük deney sonunda tüm gruptaki sıçanlar tartılıp canlı ağırlıkları belirlendi ve genel anestezi (60mg/kg ketamine + 4mg/kg ksilazin) uygulamasını (Şekil 3.3) takiben dekapitasyon işlemi uygulandı. Ardından sıçanların testis dokuları alınarak epididimis kısımları sperm analizi için ayrıldı. Sağ testis dokusu, immünohistokimyasal analiz ve histopatolojik analizler için %10'luk formaldehit solüsyonunda immersiyon yöntemi ile tespit edildi, sol testis dokuları ise biyokimyasal, qRT-PCR ve Western blot analizleri için ilk 24 saat -20°C'lik derin dondurucuda daha sonra -80°C'lik derin dondurucuda saklandı.



Şekil 3.3. Sıçanlara anestezi uygulanması

3.5. Histopatolojik Analizler

Bütün histopatolojik analizler Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD. Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. %10'luk formaldehit çözeltisi, %37'lik formaldehitin 1/10 oranında distile su ile seyreltilmesiyle oluşturuldu. %80 ve %70 etanol, saf etanolün uygun oranlarda distile su ile seyreltilmesiyle elde edildi. %96 ve %99 etanoller doğrudan kullanıldı.

3.5.1. Doku Takibi İşlemleri

Deneyin tamamlanmasının ardından, testis dokuları %10'luk formaldehit solüsyonuna daldırıldı ve fiksasyonu sağlamak için 72 saat boyunca inkübe edildi. Düzenli aralıklarla, dokuların içine daldırıldığı formaldehit çözeltisi fiksasyon sırasında değiştirildi. Sabitlenen dokuların boyutları küçültüldü ve doku takibi için özel olarak tasarlanmış plastik kasetlere yerleştirildi. Her grubun özel adı kasetlerin üzerine yazıldı. Kasetler 4 saatlik süre boyunca akan suyun altında bekletildi. Suda bekleyen ve hidratlanmış olan dokuların dehidrasyonu, her biri 1 saat süreyle %70, %80, %96, %99 (absolü alkol-I) ve %99 (absolü alkol-II) etanol solüsyonlarında gerçekleştirildi. Dokularda daha şeffaf bir görüntünün oluşmasını sağlayabilmek için dokular birer saatlik süreler içerisinde ksilol I ve ksilol II solüsyonlarına daldırıldı ve ardından doku izleme

prosedürünü tamamlamak için 2 saat boyunca 60°C’de sıvı parafin içinde muhafaza edildi. Ardından dokular, kesit düzlemiyle aynı hizada olacak şekilde 60°C sıcaklıkta sıvı parafin içerisine yerleştirildi. Dokular oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılarak bloklaya prosedürü sonlandırıldı.

3.5.2. Kesit Alma İşlemi

Kesit almayı kolaylaştırmak için parafin bloklar bir süre +4°C sıcaklığa kadar soğutuldu. Kesit alma işlemi için hazırlanan su banyosu 37°C sıcaklığa kadar ısıtıldı. Parafin bloklardan Leica RM2125 RTS mikrotom kullanılarak 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı ve ardından sıcak su banyosuna daldırıldı. Bazı kesitler immünohistokimyasal boyama için pozitif şarjlı lamlara, bazıları da histopatolojik boyama için polilizinli lamlara alındı. Lam üzerine alınan dokular, parafin içeriğini gidermek amacıyla 60°C’ye ayarlanmış etüvde 1 saat bekletildi. Dokular 10 dakika boyunca ksilol I’e daldırıldı ve ardından parafinin tamamen ortadan kaldırılmasını sağlamak için 5 dakika boyunca ksilol II’de bekletildi. Rehidrate etmek için dokular her biri 5 dakika olmak üzere bir dizi dereceli etanol solüsyonundan geçirildi. Lamalar, dokulardaki alkol kalıntısını gidermek için 5 dakika boyunca distile suda bekletildi.

3.5.3. Hematoksilen ve Eozin Boyama Prosedürü

Distile suda 5 dakika bekletilen polilizinli lamalar çekirdek boyaması için yaklaşık 3 dakika hematoksilende tutuldu. Çekirdeklerin boyanmasından sonra, kalan boyayı temizlemek için lamalar 5 dakika boyunca distile su ile yıkandı. Lamalar 1-2 saniye boyunca %1’lik asit-alkol içerisine daldırılıp çıkarıldı. Ardından distile suda 3 dakika boyunca yıkanan lamalar sitoplazmanın boyanması için Eozin Y boyasında 3 dakika süreyle tutuldu. Distile su ile 5 dakika boyunca durulanan lamalar art arda kademeli etanol solüsyonları (%96, absolü alkol I ve absolü alkol II) ile muamele edildi. Her biri 5 dakika

süren üç ksilol serisine tabi tutuldular. Lamlar, üzerlerine entellan uygulanarak hazırlanan lamellerle kapatıldı.

3.5.4. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

Lityumun neden olduğu doku hasarı üzerine D-Carvone'un etkilerinin araştırılması amacıyla testis doku kesitleri IL1 β ve TNF- α proteinlerinin doku ekspresyonları immünohistokimyasal olarak incelendi. Bu amaçla streptavidin-biotin-peroksidaz metodu uygulandı. Kesitler etüvde 60 derecede 1 saat bekletildi. Adeziv lamlara alınmış olan kesitler 10'ar dakika süreyle ksilol I, ksilol II ve ksilol III içinde bekletildi. Ardından, sırasıyla %100 alkol (5 dk), %96 alkol (5 dk) ve %80 alkol (5 dk) içinde inkübe edildiler. Kesitler, bu işlemlerden sonra 5 dakika süreyle distile su içinde yıkandı. Metilasyonu önlemek için %3'lük H₂O₂ içerisinde 10 dakika bekletilen lamlar fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkandı. Daha sonra, sitrat tamponu içinde mikrodalga işlemi uygulandı. Defrost aşamasında 2 dakika, ardından düşük güçte (3500 watt) 2 dakika, orta güçte (5000 watt) 2 dakika ve yüksek güçte (7500 watt) önce 2 dakika, sonra 8 dakika süreyle işlem gerçekleştirildi. Bu işlemlerden sonra kesitler oda sıcaklığında 20 dakika süreyle soğutuldu. Ardından lamlar PBS ile yıkandı ve dokuların çevresi hidrofobik bariyer kalemi (PAP pen) ile çevrelendi. Lamların üzerine spesifik olmayan bağlanmaları engelleyebilmek için protein blok damlatılarak 10 dakika bekletildi. Bu aşamada IL1 β ve TNF- α primer antikorları üretici firmanın belirttiği oranlarda PBS ile dilüe edilerek hazır hale getirildi.

İmmünohistokimyasal boyama amaçlı kullanılan primer antikorlar: IL1 β (BTLAB IL1 β , Catalog No: BT-AP04469) ve TNF- α (BTLAB TNF- α antibody, Catalog No: BT-AP15035) antikorlarıdır. Kullanılan primer antikorlardan IL1 β 1:100 oranında, TNF- α 1:100 oranında dilüe edilerek uygulandı.

Protein blok lamlardan uzaklaştırıldıktan sonra, durulama yapılmadan her lama 100 mikrolitre primer antikor damlatıldı ve ardından yaklaşık 1 saat boyunca karanlık ve nemli bir ortamda bekletildi. Lamlar daha sonra PBS tamponunda her biri 5 dakika olmak üzere üç kez durulandı. Komplement (Thermo Fisher, DAB Substrat Sistemi) ile 30 dakikalık bir işlemin ardından kesitler PBS ile durulandı. Ardından konjugat (Thermo Fisher, DAB Substrat Sistemi) eklenerek 30 dakika beklendi. PBS ile yıkama işlemi her biri 5 dakika olacak şekilde üç kez tekrarlandı. Bu sırada DAB (3,3'diaminobenzidine) (Thermo Fisher, Catalog no:34002) solüsyonu taze olarak hazırlandı ve kesitlere uygulandı. 5 dk boyunca kontrollü olarak bekletildi ve kahverengi renk oluşur oluşmaz hemen distile su içinde 5 dk süreyle bekletilerek yıkandı. Daha sonra Mayer's hematoksilin kullanılarak kontrast boyama yapıldı. PBS ile yıkamanın ardından lamlar 1 dakika süreyle %96'lık alkolde, 5'er dakika süreyle saf alkolde ve 5'er dakika süreyle 2 seri halinde ksilolde bekletildi. Son olarak, lamlar entellan uygulanarak lamellerle kapatıldı. Lityum ile indüklenen testis hasarının seminifer tübüllerin yapısını ve spermatogenez sürecini nasıl etkilediğini değerlendirmek için Johnsen skorlama kriterleri referans alınarak kantitatif değerlendirme yapıldı (Johnsen, 1970; Özgüner ve ark., 2004). Bu amaçla sıçanlardan elde edilen her bir testise ait 100 seminifer tübül değerlendirildi ve Johnsen kriterlerine göre 1'den 10'a kadar skorlandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Johnsen skorlaması

Skor	Histolojik Bulgular
10	Germinal epitel çok sıralı ve organize olup çok sayıda spermatozoa var, tam spermatogenez mevcuttur.
9	Germinal epitel çok sıralı ve disorganize, spermatogenez hafifçe bozulmuş, çok sayıda spermatid, az sayıda spermatozoa var.
8	Germinal epitel çok sıralı, ancak tübüler kesit başına 10'dan az sayıda spermatozoa var.

Tablo 3.1. (Devamı)

7	Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid, spermatosit ve spermatogonium var.
6	Spermatozoa yok, 10'dan az spermatid, çok sayıda spermatosit ve spermatogonium var.
5	Spermatozoa ve spermatid yok, çok sayıda spermatosit ve spermatogonium var.
4	Spermatozoa ve spermatid yok, spermatosit sayısı 5'ten az, fakat çok sayıda spermatogonium var.
3	Germ hücresi olarak sadece spermatogonyumlar var.
2	Germinal hücreler hiç yok, sadece Sertoli hücreleri var.
1	Seminifer tübüllerde hiç hücre yok.

3.5.4.1. İmmünreaktivite Skorlama (IRS) Yöntemi

İmmünohistokimyasal olarak boyanan testis doku kesitlerinde, TNF- α , IL1 β proteinlerinin immünreaktivitesini değerlendirmek amacıyla immünpozitif boyamanın şiddeti ve yüzdesinin çarpılması esasına dayanan yarı-kantitatif bir skorlama yöntemi olan immünreaktivite skorlama (IRS) yöntemi kullanıldı (Fedchenko ve Reifenrath, 2014). Her gruptaki her bir sığana ait 6 kesit incelendi ve her kesitte rastgele seçilen ve birbirleriyle örtüşmeyen 5 alan değerlendirildi. İmmünpozitif hücrelerin dağılım yüzdesi ve yoğunlukları sayılarak kaydedildi ve IRS değerleri hesaplandı. IRS skorlama işlemleri Tablo 3.2'ye göre yapıldı.

Tablo 3.2. İmmünreaktif skor (IRS) tablosu

A (pozitif hücre yüzdesi)	B (boyanma yoğunluğu)	IRS skoru (A x B)
0 (Pozitif hücre yok)	0 (Boyanma yok)	0-1 (Negatif)
1 (Pozitif hücre %10'un altında)	1 (Hafif boyanma)	2-3 (Hafif)
2 (Pozitif hücre %10-50 arasında)	2 (Orta dereceli boyanma)	4-8 (Orta)
3 (Pozitif hücre %51-80 arasında)	3 (Yoğun boyanma)	9-12 (Şiddetli pozitif)
4 (Pozitif hücre %80'nin üzerinde)	IRS (AxB)=0-12	

3.6. Mikroskopik Görüntüleme ve Fotoğraflama

Tüm boyama işlemlerinin ardından hazırlanan preparatlar Zeiss AXIO Scope.A1 marka ışık mikroskopunda incelenerek değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi.

3.7. Biyokimyasal Analizler

Deneyin tamamlanmasını takiben, sıçanlardan alınan testis dokuları, dokudaki biyokimyasal, Kantitatif Real Time PCR ve Western blot analizleri için ilk 24 saat -20°C'lik derin dondurucuda daha sonra -80°C'lik derin dondurucuda saklandı. Analizlerin yapılacağı gün -80°C'den çıkarılan testis dokuları sıvı nitrojen ile bir homojenizatör (Tissue Lyser II, Qiagen, Netherlands) cihazında toz haline getirilerek işlemler gerçekleştirildi.

3.7.1. MDA Analizi

Testis dokuları sıvı nitrojen ile homojenizatör (Tissue Lyser II, Qiagen, Netherlands) cihazında toz haline getirildi. Daha sonra %1.15 fosfat tampon ile 1:10 oranında sulandırıldı ve yine aynı cihazda paslanmaz çelik bilyeler ile homojenize edildi. Homojenatların 3500 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmesi sonucu elde edilen süpernatantlar lipid peroksidasyonunun önemli bir göstergesi olan MDA düzeylerinin belirlenmesinde kullanıldı. MDA seviyeleri Ohkawa ve ark.'larının metodu kullanılarak belirlendi (Ohkawa ve ark.,1979).

3.7.2. GSH Analizi

Testis dokuları 1:10 oranında sulandırılarak homojenizatörde homojenize edildi ve ardından 10.000 rpm'de 20 dakika boyunca santrifüj işlemine tabii tutuldu. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlarda glutatyon (GSH) seviyeleri DTNB'nin [5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)] sülfhidril gruplarının bileşikleri yoluyla indirgenmesiyle oluşan sarı renkli reaksiyonun absorbansının ölçümü prensibine dayanan metot ile analiz edildi (Sedlak ve Lindsay, 1968).

3.8. Kantitatif Real Time PCR (qRT-PCR) Analizleri

3.8.1. Total RNA İzolasyonu

Tüm gruplara ait sıçanların testis dokularından RNA izolasyonu yapabilmek için 100 mg doku tartıldı ve 1 mL QIAzol Lysis Reagent (79306; Qiagen) ile homojenizatörde (Tissue Lyser II, Qiagen, Netherlands) bir dakika süreyle homojenize edildi. Homojenize edilen doku örnekleri beş dakika boyunca inkübe edildi. Ardından üzerlerine 200 µL kloroform eklenip vorteklenerek üç dakikalık başka bir inkübasyon işlemine daha tabi tutuldu. İnkübasyonun ardından numuneler 4°C’de ve 12000 g’de 15 dakika boyunca santrifüj edildi ve oluşan 3 fazdan en üstte kalan kısım yeni ependorf tüplere aktarıldı. Tüplere 500 µL izopropanol eklendi ve 10 dakikalık inkübasyonun ardından 12000 g ve 4 °C’de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası izopropanol dikkatlice uzaklaştırıldı ve tüplere %75’lik etanol eklenerek numuneler 4°C’de ve 7500 g’de 5 dakika santrifüj edildi. RNA izolasyonunun son aşamasında etanol uzaklaştırıldı ve pellet DNaz/RNaz içermeyen su ile çözündürülerek RNA konsantrasyonları NanoDrop (Bio-Tek Instruments Epoch, USA) cihazında ölçüldü. Elde edilen RNA’lar daha sonra cDNA sentezinde kullanıldı.

3.8.2. cDNA Sentezi

Total RNA’lardan cDNA sentezi iScript™ cDNA Synthesis Kiti (BIO-RAD, United States) ile gerçekleştirildi. Üreticinin talimatlarının bire bir uygulandığı işlemlerde 0.2 ml PCR tüplerine 10 µl total RNA, 5 µl 5x iScript Reaction Mix, 1 µl iScript Reverse Transcriptase ve 4 µl iScript Nuclease-free water eklendi. Daha sonra Rotor-Gene Q (Qiagen, Germany) cihazında numuneler 25°C’de 5 dakika, 46°C’de 20 dakika ve 95°C’de 1 dakika inkübe edilerek cDNA’lar sentezlenmiş oldu. cDNA konsantrasyonları NanoDrop (Bio-Tek Instruments Epoch, USA) cihazında ölçüldü.

3.8.3. qRT-PCR

NF- κ B-p65, TNF- α , IL-1 β , kaspaz-3, Bax ve Bcl-2 genlerinin görelî mRNA transkript seviyeleri qRT-PCR metodu ile analiz edildi (Tablo 3.3). Bunun için ilgili genlerin primerleri, cDNA'lar, DNaz/RNaz içermeyen su ve iTaQ Universal SYBR® Green Supermix (2x) ile üreticinin talimatları doğrultusunda 20 μ L'lik bir karışım hazırlanarak Rotor-Gene Q cihazında 95°C'de 30 saniye (1 döngü), 95 °C'de 5 saniye (40 döngü), 60°C'de 30 saniye (40 döngü) reaksiyon başlatıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra genler $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile β -aktine göre normalize edildi (Livak ve Schmittgen 2001).

Tablo 3.3. Primer dizilimleri

Gene	Sequences (5'-3')	Length (bp)	Accession No
Bcl-2	F: GACTTTGCAGAGATGTCCAG R: TCAGGTACTCAGTCATCCAC	214	NM_016993.2
Kaspaz-3	F: ACTGGAATGTCAGCTCGCAA R: GCAGTAGTCGCCTCTGAAGA	270	NM_012922.2
Bax	F: TTTCATCCAGGATCGAGCAG R: AATCATCCTCTGCAGCTCCA	154	NM_017059.2
NF-κB-p65	F: AGTCCCGCCCCTTCTAAAAC R: CAATGGCCTCTGTGTAGCCC	106	NM_001276711.1
IL-1β	F: ATGGCAACTGTCCCTGAACT R: AGTGACACTGCCTTCCTGAA	197	NM_031512.2
TNF-α	F: CTCGAGTGACAAGCCCGTAG R: ATCTGCTGGTACCACCAGTT	139	NM_012675.3
β-Actin	F: CAGCCTTCCTTCCTGGGTATG R: AGCTCAGTAACAGTCCGCCT	360	NM_031144.3

3.9. Western Blot Analizi

Western blot analizi ile testis dokusu örneklerindeki NF- κ B-p65, IL-1 β , TNF- α ,

P2X7, kaspaz-3 ve Bcl-2 proteinleri ekspresyon değişimi incelendi. Bunun için testis dokuları toplandı, soğuk PBS ile yıkandı ve proteaz/fosfataz inhibitörleri içeren bir Ripa tamponunda (Ecotech Biotech, Türkiye) lize edildi. 30 dakika buz üzerinde inkübe edilen lizat, 4°C’de 15 dakika 14.000 g’de santrifüj edildi ve üst sıvı toplandı. Protein konsantrasyonu bir BCA testi (Pierce BCA, Thermo Scientific, ABD) kullanılarak belirlendi. Eşit miktarda (30 µg) protein 4×SDS sample tamponuyla karıştırıldı, kaynatıldı ve %10 SDS-PAGE jelinde ayrıldı. Proteinler daha sonra 100V’da yarı kuru veya ıslak transfer sistemi kullanılarak bir PVDF membrana aktarıldı. Membranlar 1 saat boyunca TBS-T’de %5 yağsız kuru süt ile bloke edildi, ardından birincil antikorlarla 4°C’de bir gece inkübe edildi. Yıkamadan sonra, membranlar oda sıcaklığında 1 saat boyunca HRP-konjuge ikincil antikorlarla inkübe edildi. Blotlar ECL reaktifleri kullanılarak geliştirildi ve protein bantları bir görüntüleme sistemiyle görselleştirildi. Bant yoğunlukları, yazılım değerlendirmesi (Image Lab, Bio-Rad, ABD) için geliştirilmiş bir Western ECL substratı (3405, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile elde edildi.

3.9.1. Total Protein Tayini

Alkali bakır tartarat ayıracındaki Cu^{++} peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Her yedi veya sekiz aminoasit artığı bir atom, bakır bağlamaktadır. Bakır ile muamele edilmiş olan karışıma Fenol ayıracı eklendiğinde mor-mavi bir renk şekillenmektedir. Bu renk 750 nm’de okunur (Lowry ve ark., 1951).

1. Solüsyonların hazırlanması

- I. Alkali Bakır Ayıracı: Protein test kiti (P 5656) içerisindeki “Lowry Reagent Modified” (40g) şişeşine 40 mL distile su eklenip içerik eriyene kadar hafifçe karıştırıldı.
- II. Fenol Ayıracı: 2.0 N Folin-Ciocalteu-Phenol’den 18 mL alınarak üstüne 90 mL distile su eklendi.

III. Protein Standartları: 20, 40, 60, 80, 100 µg sığır serum albumin BSA/mL standartları kullanıldı.

IV. Örnekler: Homojenatlarda, toplam protein miktarı 100 µg/mL'den az olacak şekilde sulandırma yapıldı.

2. Yapılışı: Protein miktarları Tablo 3.4'teki protokole göre ölçüldü.

3. Hesaplama: Protein miktarları standart eğriye göre hesaplandı.

Tablo 3.4. Protein analiz metodu

	Örnek	Kör	Standart
Lowry Ayıracı (mL)	1	1	1
Distile Su (mL)	1	1	1
İlave edildi ve tüpler karıştırıldı.			
Karışım 20 dakika oda ısısında bekletildi.			
Folin&Ciocalteu Phenol Ayıracı (mL)	0.5	0.5	0.5
Eklenince tüpler hemen vortekslendi.			
İnkübasyon için 30 dakika beklendi.			
750 nm'de standart ve örneklerin absorbanşı köre karşı okundu.			

3.9.2. Protein Profilinin Belirlenmesi (SDS-PAGE)

Discontinuous SDS-PAGE, Laemmli metodu (Laemmli, 1970) BioRad mini protean TetraCell sistemine uyarlanarak gerçekleştirildi.

1. Solüsyonların hazırlanışı: Tris-Glisin Elektrod Tamponu: pH 8.3: 1.515 g tris, 7.2 g glisin ve 0.25 g sodyum dodesil sülfat (SDS) distile su ile balon jojede 500 ml'ye tamamlandı.

Örnek Tamponu: 4 mL distile su, 1 mL 0.5 mol tris-HCl (pH 6.8) (stacking jel tamponu), 0.8 mL gliserol, 1.6 mL %10 SDS, 0.4 mL 2-β-merkaptotanol, 0.2 mL %0.05 bromfenol blue karıştırılarak koyu renkli şişede, oda ısısında saklandı.

%10 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS): 10 g SDS 50 mL distile suda hafifçe karıştırılarak çözüldü ve toplam hacim distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

2. SDS-PAGE analizi: Elektroforez işlemi için 1 mm kalınlığında, 8x7 cm boyutlarında ve 10 adet kuyu bulunan hazır jeller kullanıldı. Jeldeki taraklar çıkarılarak, numunelerin uygulanacağı kuyucuklar 3 defa tris-glisin elektrot tamponuyla (pH 8.3) yıkandı ve 1/20 sample buffer ile sulandırılmış doku numuneleri kuyucuklara 10 µL (40 µg) uygulandı. 20 mA/jel sabit akım modunda yaklaşık 60 dakika süreyle elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası jeller PVDF membrana transfer edildi.

3.9.3. NF-κB-p65, IL-1β, TNF-α, P2X7, Kaspaz-3 ve Bcl-2 Proteinleri Ekspresyon Analizi (Western Blot)

Western blot analizi ile testis doku örneklerindeki NF-κB-p65, IL-1β, TNF-α, P2X7, Kaspaz-3 ve Bcl-2 proteinleri ekspresyon değişimi incelendi. Western blot analizinde avian ile spesifik reaktiviteye sahip antikor kullanıldı. Çalışmada kullanılması planlanan antikorların künyesi aşağıda sıralanmıştır (Tablo 3.5).

Tablo 3.5. Antikorlar ve dilüsyon oranları

Antikor	Katalog No	Western Dilüsyonu
Kaspaz-3	Santa Cruz, sc-56053	1/1000
IL-1β	Affinity Biotech, AF5103	1/1000
TNF-α	Affinity Biotech, AF7014	1/1000
P2X7	Affinity Biotech, AF4626	1/1000
NF-κB-p65	Santa Cruz, sc-109	1/1000
Bcl-2	Santa Cruz sc-7382	1/1000
Beta-actin	Santa Cruz, sc-47778	1/2000
Secondary antibody (Goat anti-rabbit IgG-HRP)	Santa Cruz, sc-2004	1/2000
Secondary antibody (Mouse anti-rabbit IgG-HRP)	Santa Cruz, sc-2357	1/2000

I. Solüsyonların hazırlanışı: 1x Fosfat Buffered Salin (PBS) (200ml): 1 tablet 200 mL deiyonize suda çözülünce 25°C sıcaklıkta 0.137 M sodyum klorit; 0.0027 M potasyum klorid, (0.01 M fosfat tamponu) pH 7.4'te hazırlanmış oldu. Fosfat Buffered Salin/Tween-20 (PBS-T) (500 mL): 500 mL PBS içerisine 0.25 mL Tween-20 eklenerek karıştırılarak hazırlandı. Tüm yıkama, tampon hazırlama işlemleri bu tampon ile yapıldı.

Bloklama tamponu: 5 gr BSA tartılarak, son hacim bir balon jojede PBS-T ile 100 mL'ye tamamlandı.

Primer antikor: Bloklama tamponu içerisinde 5 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı.

Sekonder antikor: Bloklama tamponu içerisinde 1 µg/mL konsantrasyonda hazırlandı.

HRP substratı: 5 ml konsantre West Femto luminol solüsyonu, 5 ml West Femto sulandırma solüsyonu ile sulandırıldı.

II. Transfer: Yürütülen serum proteinlerinin PVDF membrana transferi için “blotlama yığını” oluşturuldu. Bunun için öncelikle 8’li filtre kâğıdı yığını semi-dry “Turbo blotter” transfer kasetinin alt kısmına yerleştirilip 0.2 µm por büyüklüğüne sahip PVDF membran üzerine yerleştirildi. Daha sonra PVDF membranın üzerine SDS-PAGE jeli yerleştirildi ve küçük bir merdane yardımıyla jel ile membran ya da filtre kağıtları arasında kalması muhtemel hava kabarcıkları uzaklaştırıldı. Son olarak jel üzerine 8’li filtre kâğıdı yığını konup Turbo blotter kasetinin kapağı kapatılarak cihaza yerleştirildi ve 1.3 A, 25 V’ta 7 dk süreyle blotlama işlemi gerçekleştirildi. İşlem sonunda PVDF membran 1 saat süreyle bloklama tamponu ile inkübe edilip süre sonunda membran üzerine bloklama tamponu içerisinde hazırlanmış 5 µg/mL konsantrasyonda primer antikor eklendi ve buzdolabında, orbital karıştırıcı üzerinde, gece boyu inkübe edildi. Birincil antikor inkübasyonu bittiğinde, membran 5 dk süreyle 5 defa PBS-T ile yıkandı.

Daha sonra bloklama tamponu içerisinde hazırlanmış 1 µg/mL konsantrasyonda sekonder antikor eklendi ve oda sıcaklığında 1 saat süreyle inkübasyon işlemi gerçekleştirildi. Süre sonunda membran 5 dk süreyle 5 defa PBS-T ile yıkandı. Son olarak membran üzerine üretici önerilerine göre hazırlanmış olan kemilüminesan HRP substratı eklendi ve blotların jel görüntüleme sistemi ile (Bio-Rad) kemilüminesan modunda fotoğrafları çekildi ve blotlardaki yoğunluk düzeyleri TL 120 programı ile belirlendi (The Complete Guide to Western Blotting. https://www.ptglab.com/media/1474/wb-collection_for-web.pdf). Protein ekspresyon derecelerinin normalizasyonu için “total protein normalizasyonu” kullanıldı. Bu amaçla, bir örneğin, jel analizi sonucu elde edilen toplam protein miktarı, membran üzerindeki blotun miktarına bölünerek normalizasyon işlemi yapıldı (Gilda ve Gomes, 2013).

3.10. Sperm Analizi

3.10.1. Spermatolojik Muayeneler

Epididimal spermatozoon yoğunluğunu tespit etmek için petri kutusuna alınan sağ epididimis 1 ml fizyolojik tuzlu suda (%0.9'luk NaCl) parçalandı. Bu parçacıklar bir pens yardımıyla iki dakika süresince iyice ezildi. Ardından bu karışım epididimal doku içerisindeki tüm spermatozoonların sıvı ortama geçmesi için oda sıcaklığında 4 saat bekletildi. Bekleme işleminin ardından spermatozoon ihtiva eden bu karışım, alyuvar pipetinin 0.5 çizgisine kadar çekildi. Daha sonra eozin çözeltisi (5 g sodyum bikarbonat, 1 ml formalin, 25 mg eozin ve 100 ml distile su) 101 çizgisine kadar çekilerek karışım 1:200 oranında seyreltilti. Yaklaşık 10 µl sulandırılmış sperma önceden lamel yapıştırılmış Thoma lamının (0.1 mm derinlik, 0.0025 mm²'lik alan) her iki sayım alanına aktarıldı. Thoma lamı ışık mikroskobuna yerleştirildi. 5 dakika beklenerek tüm çözelti içerisindeki spermatozoonların her yere homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Her iki

sayım alanındaki tüm karelere düşen spermatozoonlar ışık mikroskopunun 200'lük büyütmesinde sayıldı ve hesaplandı.

3.10.2. Spermatozoon Motilitesi

Mikroskopun ısıtma tablasına yerleştirilen lamın sıcaklığının 37°C'ye ulaşması sağlandı. Daha sonra 200 µl Tris tampon çözeltisi [Tris (hidroksimetil) aminometan 3.63 g, glukoz 0.50 g, sitrik asit 1.99 g ve distile su 100 ml] ısıtma tablası üzerindeki lama damlatıldı. Sol kauda epididimisten kesit yapılarak alınan ve spermatozoon ihtiva eden 10 µl'lik süspansiyon Tris tampon çözeltisi üzerine damlatıldı ve lamel yardımıyla karıştırılarak homojenize edildi. Işık mikroskopunun 400'lük büyütmesinde manuel olarak motilite yüzdesi belirlendi. Motilite tahminleri için sperma direkt olarak kauda epididimisten alındı. Bu amaçla sol kauda epididimisten alınan bir damla süspansiyon için 3 farklı saha incelendi. Bu 3 farklı sahanın ortalama değerleri yüzde motilite oranı olarak hesaplandı.

3.10.3. Anormal Spermatozoon Oranı

Anormal spermatozoon oranını tayin etmek için motilite tayininde kullanılan Tris tampon spermatozoon karışımından 20 µl alınarak önceden ısıtılmış (37°C) bir lam üzerine damlatıldı. Bu karışım üzerine eozin-nigrozin boyasından (1.67 g eozin, 10 g nigrozin, 2.9 g sodyum sitrat, 100 ml distile su) 2 damla damlatıldı ve homojenize edildi. Daha sonra bu karışımdan ince frotiler çekilerek çok kısa sürede kuruması sağlandı, kurutma işleminden sonra frotiler ışık mikroskopunun 400'lük büyütmesinde incelendi ve bir frotide toplam 200 spermatozoon incelenip anormal spermatozoon oranı yüzde olarak ifade edildi.

3.11. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler SPSS yazılımı (sürüm 22.0, Chicago, IL, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Histopatolojik, Western blot ve sperm analizi verileri grup

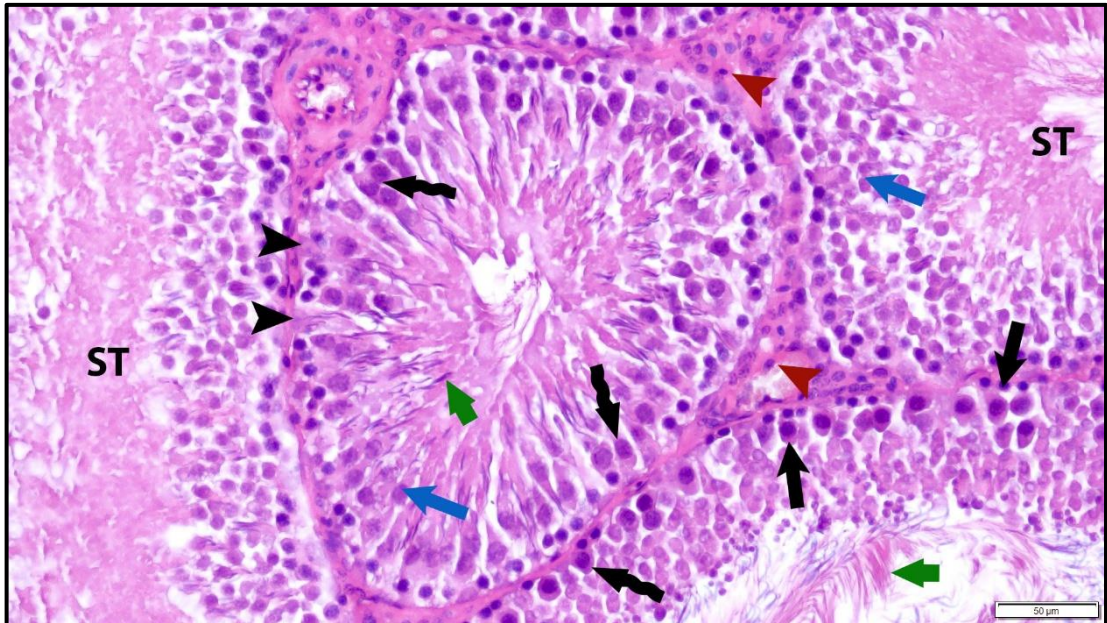
farklılıklarını değerlendirmek için Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edildi. Anlamlı farklılıklar tespit edildiğinde, çiftler arası karşılaştırmalar için Dunn testi (histopatolojik veriler için) ve Mann-Whitney U testi (sperm analizi için) kullanıldı. Biyokimyasal ve qRT-PCR analizleri tek yönlü ANOVA ve ardından Tukey testi kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar histopatolojik veriler için ortalama±standart sapma, diğer analizler için ortalama±standart hata olarak sunuldu. $P<0,05$ anlamlılık düzeyi istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

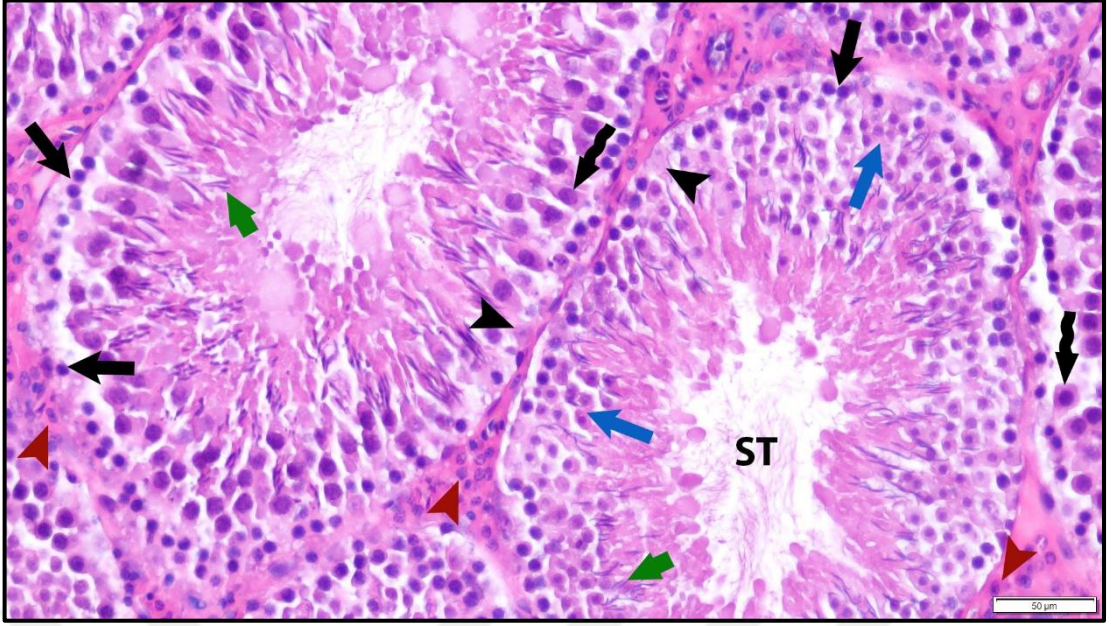
4.1. Histopatolojik Bulgular

Hematoksilen-Eozin ile boyanan testis dokularının histolojik değerlendirmesinde, kontrol grubunda dzenli seminifer túbül yapısı içeren normal testis morfolojisi izlendi. Seminifer túbüllerin duvarında bazal membran üzerine oturmuş spermatogonyum, primer spermatosit, spermatid ve sperm hücresi şeklinde dzenli bir şekilde sıralanan spermatogenik seri hücrelerinin varlığı açıkça görölmekteydi. Bu germ hücre dizisinin aralarında bazal membrandan başlayarak lümene kadar uzanan Sertoli hücrelerinin de olduğu gözlemlendi. Túbüllerin düzgün bir germinal epitel yapısına ve lümenlerinde olgun sperm hücrelerinin varlığıyla oldukça düzgün bir morfolojiye sahip oldukları göröldü (şekil 4.1). D-Carvone grubunda da kontrol grubuna benzer şekilde dzenli bir şekilde dizilmiş spermatogenik seri hücrelerinin ve morfolojinin korunduğu seminifer túbüllerin varlığı izlenmekteydi (şekil 4.2).



şekil 4.1. Kontrol grubuna ait seminifer túbül kesiti

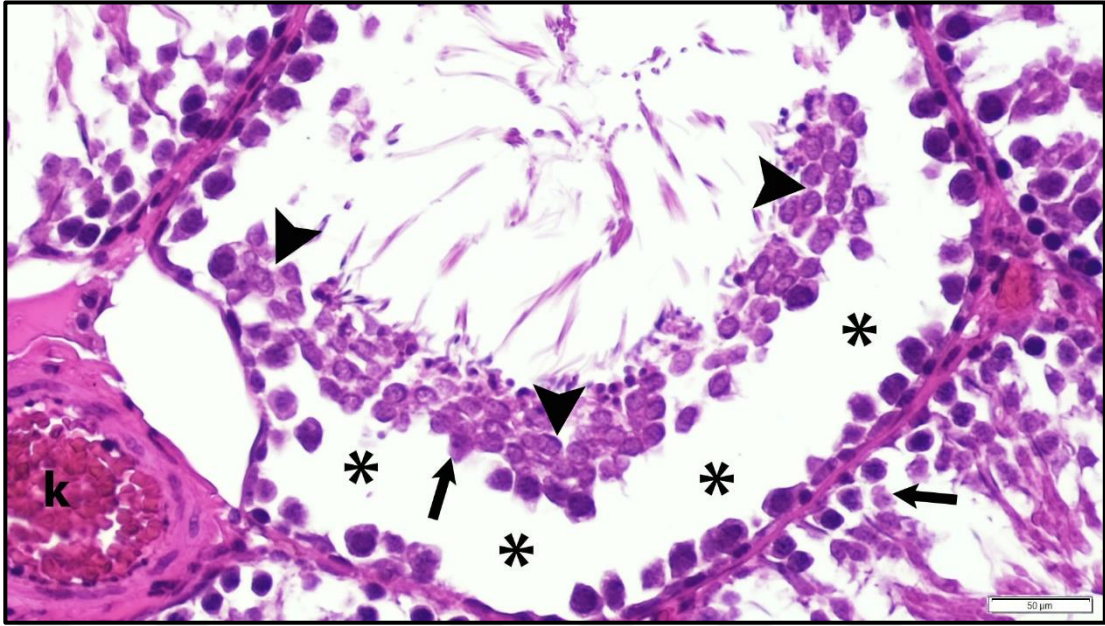
Testislerde seminifer túbüller (ST), Sertoli hücreleri (siyah ok başı), spermatogonyumlar (siyah ok), primer spermatositler (kıvrımlı ok), spermatidler (mavi ok), sperm hücreleri (yeşil ok) ve Leydig hücreleri (kırmızı ok başı) seçilebilmektedir. Boya: H-E. Objektif 20X, Ölçek: 50 μm



Şekil 4.2. D-Carvone grubuna ait seminifer tübül kesiti

Testislerde seminifer tübüller (ST), Sertoli hücreleri (siyah ok başı), spermatogonyumlar (siyah ok), primer spermatositler (kırıklı ok), spermatidler (mavi ok), sperm hücreleri (yeşil ok) ve Leydig hücreleri (kırmızı ok başı) seçilebilmektedir. Boya: H-E. Objektif 20X, Ölçek: 50 µm

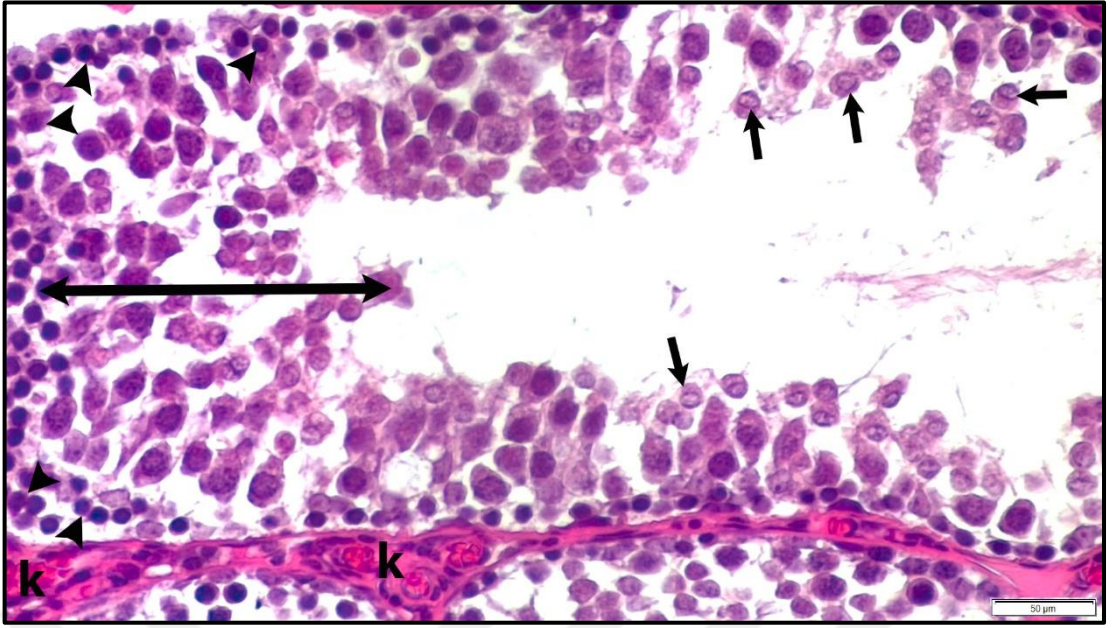
Lityum grubuna ait testis kesitlerinin histolojik incelemesinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin patolojik değişiklikler göze çarpmaktaydı. Lityum verilen bu grubun testis kesitlerinde seminifer tübüllerde yoğun dejenerasyon alanları dikkat çekmekteydi. Seminifer tübüllerde spermatogenik hücrelerin organizasyonunun bozulduğu, tübüllerde hem germ hücrelerinin hem de Sertoli hücrelerinin tübül duvarından koparak tübüllerin lümenine doğru döküldükleri tespit edildi. Tübüllerin arasındaki intertisyel alanda bulunan damarlarda da dilatasyon ve konjesyon görülmekteydi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Lityum grubuna ait seminifer tübül kesiti

Spermatogenik hücrelerin organizasyonunun bozulduğu, tübüllerde germ hücrelerinin tübül duvarından ayrıştığı (yıldız), germ hücrelerinin tübül lümenine döküldüğü (ok başı), intertisyal alanda damarlarda konjesyon ve dilatasyonun meydana geldiği (k) ve tübül duvarından ayrılmış Sertoli hücrelerinin (siyah ok) varlığı dikkat çekmektedir. Boya: H-E. Objektif 20X, Ölçek: 50 µm

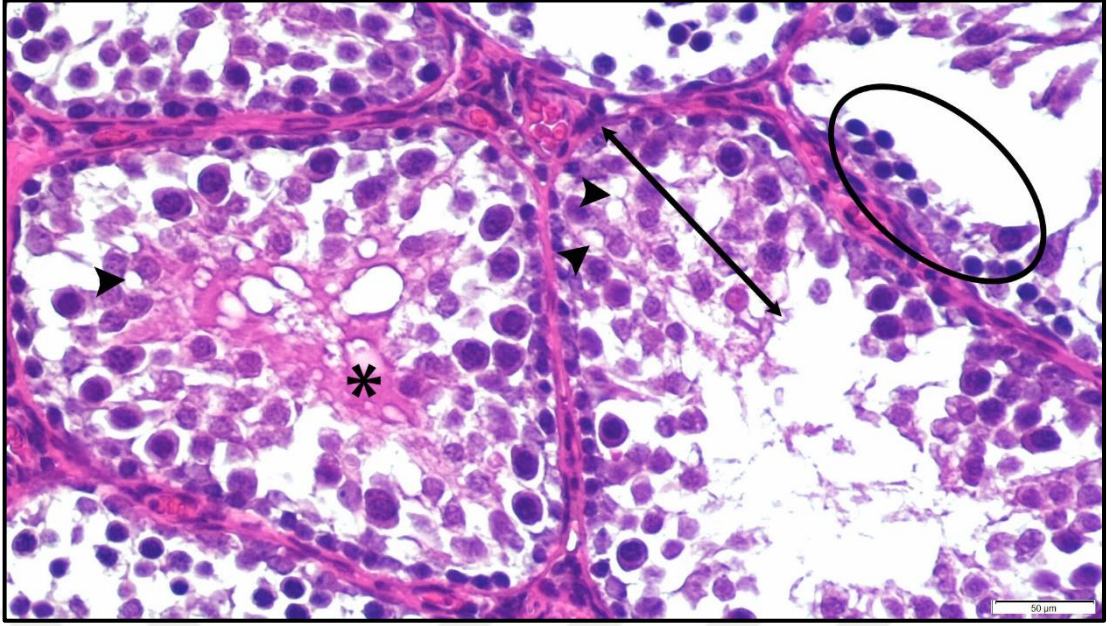
Lityum grubuna ait testis kesitlerinde bazı seminifer tübüllerde nekrotik değişiklikler mevcuttu. Seminifer tübüllerde eozinofilik sitoplazmalı, piknotik çekirdekli apoptotik hücreler bariz şekilde görülmekteydi. Yine seminifer tübüllerde spermatogenik hücre dizisinde düzensizlik mevcuttu. Birbirlerinden koparak lümene doğru dökülmeye başlayan ve nukleus yapıları bozulmuş dejeneratif hücreler de göze çarpmaktaydı (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Lityum grubuna ait seminifer tübül kesiti

Seminifer tübüllerde eozinofilik sitoplazmalı, piknotik çekirdekli dejeneratif hücreler (ok başı), spermatogenik hücre dizisinde düzensizlik ve birbirlerinden ayrılmalar (çift başlı ok), lümene doğru dökülmeye başlayan nukleus hasarı meydana gelmiş hücreler (siyah ok) ve intertisyel alanda damarlarda konjesyon (k) görülmektedir. Boya: H-E. Objektif 20X, Ölçek: 50 µm

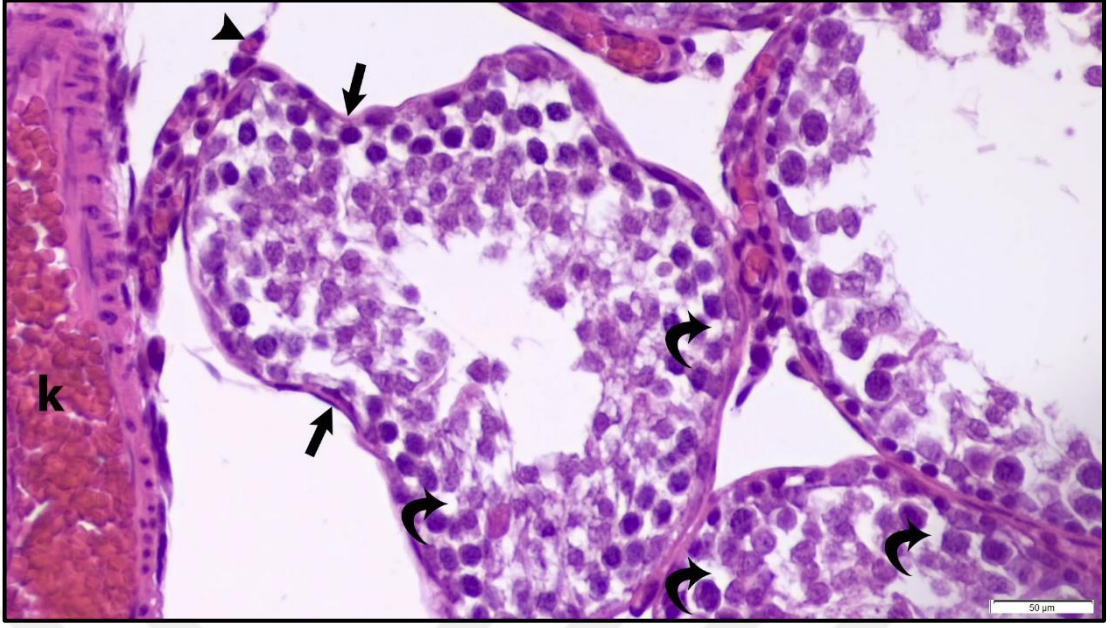
Lityum grubuna ait testis kesitlerinde seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerinin sayısındaki azalma ile birlikte hem düzeni bozulmuş hem de kalınlığı azalmış ve atrofiye uğramış germinal epitel varlığı dikkat çekmekteydi. Bazı seminifer tübüllerde epitel kalınlığındaki azalmaya eşlik edecek şekilde lümende hiç olgun sperm hücrelerinin bulunmaması da göze çarpıyordu. Ayrıca seminifer epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve seminifer tübül lümeninde ise hiyalinizasyon belirgin bir şekilde görülmekteydi (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Lityum grubuna ait seminifer tübül kesiti

Germinal epitel kalınlığında azalma (elips), spermatogenik hücre dizisinde düzensizlik ve tübül duvarından ayrılmalar (çift başlı ok), epitel hücrelerinde vakuolizasyon (ok başı) ve seminifer tübül içerisinde hiyalinizasyon (yıldız) görülmektedir. Boya: H-E. Objektif 20X, Ölçek: 50 µm

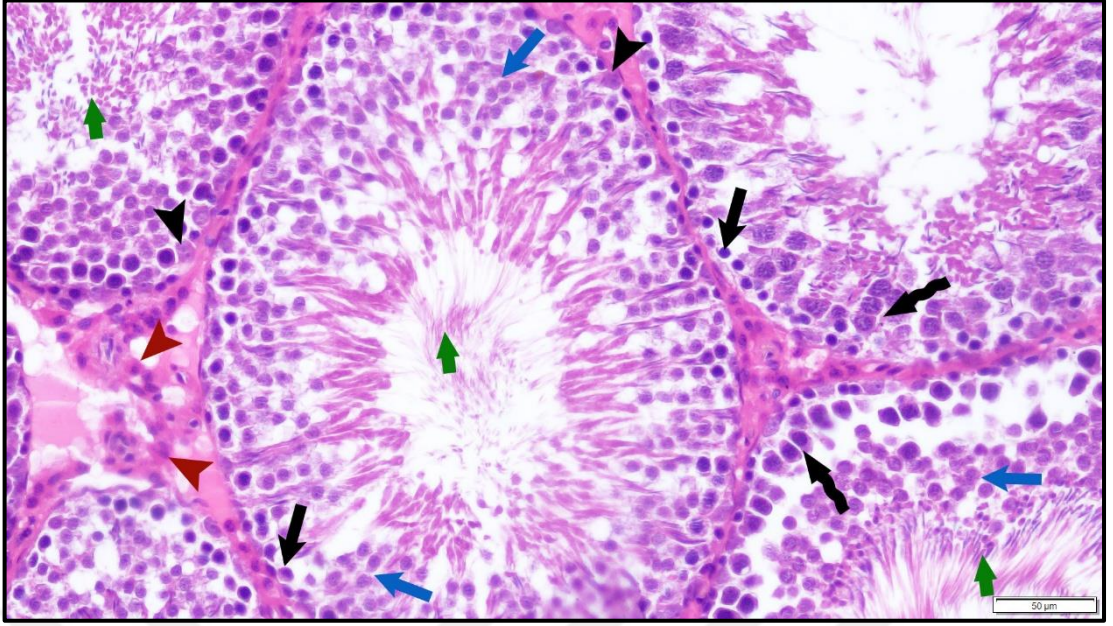
Yine lityum grubuna ait testis kesitlerinde yer yer interstisyel alanlarda eozinofilik sitoplazmalı, piknotik çekirdekli Leydig hücrelerinin varlığı tespit edildi. Germinal epitel hücreleri arasında dilatasyon ve hücreler arası vakuol oluşumu izlendi. Seminifer tübülleri çevreleyen bazal membran yapısında da düzensizlik ve ondülasyon görülmekteydi (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Lityum grubuna ait seminifer tübül kesiti

İnterstisyel alanda eozinofilik sitoplazmalı, piknotik çekirdekli Leydig hücreleri (ok başı), spermatogenik hücre dizisinde düzensizlik, vakuolizasyon ve dejenerasyon (kıvrık ok), seminifer tübülleri çevreleyen bazal membranda düzensizlik, ondülasyon (siyah ok) ve interstisyel alanda damarlarda konjesyon ve dilatasyon (k) görülmektedir. Boya: H-E. Objektif 20X, Ölçek: 50 µm

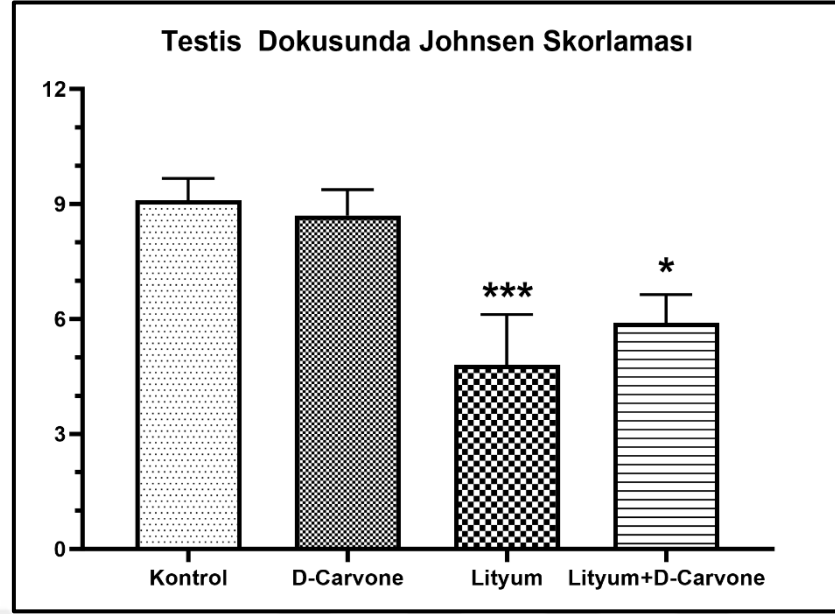
Lityum+D-Carvone grubuna ait testis kesitlerinde histolojik görüntünün Lityum grubu kesitlerine kıyasla daha normal bir histolojik yapıya sahip olduğu tespit edildi. Seminifer tübül morfolojisi tübüllerin bir kısmında normaldi. Bazı seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerinin tamamı izlenirken, tübüllerin bir kısmında ise atipik lümen görünümü, hücrelerde vakuolizasyon görülmekteydi. Spermatogenik seri hücrelerinin tamamının izlenemediği tübüller ise Lityum grubuna kıyasla azalmıştı (Şekil 4.7).



Şekil 4.7. Lityum+D-Carvone grubuna ait seminifer tübül kesiti

Seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri (ok başı), spermatogonyumlar (siyah ok), primer spermatositler (kıvrımlı ok), spermatidler (mavi ok), sperm hücreleri (yeşil ok) ve interstisyel alandaki Leydig hücreleri (kırmızı ok başı) seçilebilmektedir. Boya: H-E. Objektif 20X, Ölçek: 50 µm

Bütün deney gruplarına ait testis örneklerinin Hemetoksilen-Eozin ile boyanmış histolojik kesitlerinde Johnsen skorlamasına göre değerlendirmeler yapılmış ve her bir denek için toplam Johnsen skoru hesaplanmıştır. Seminifer tübüllerin Johnsen skorlaması sonuçlarına göre kontrol grubunda ortalama değer 9.10 ± 0.57 olarak ölçülürken, D-Carvone grubunda bu değer 8.70 ± 0.67 olarak bulunmuştur. Lityum grubunda ortalama değer belirgin bir şekilde azalarak 4.80 ± 1.32 olarak tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Lityum+D-Carvone grubu ise 5.90 ± 0.74 ile Lityum grubuna göre daha yüksek bir ortalama göstermiştir ($p < 0.05$). Bu bulgular, lityumun etkisinin D-Carvone ile kısmen hafifletilebileceğini düşündürmektedir (Şekil 4.8).



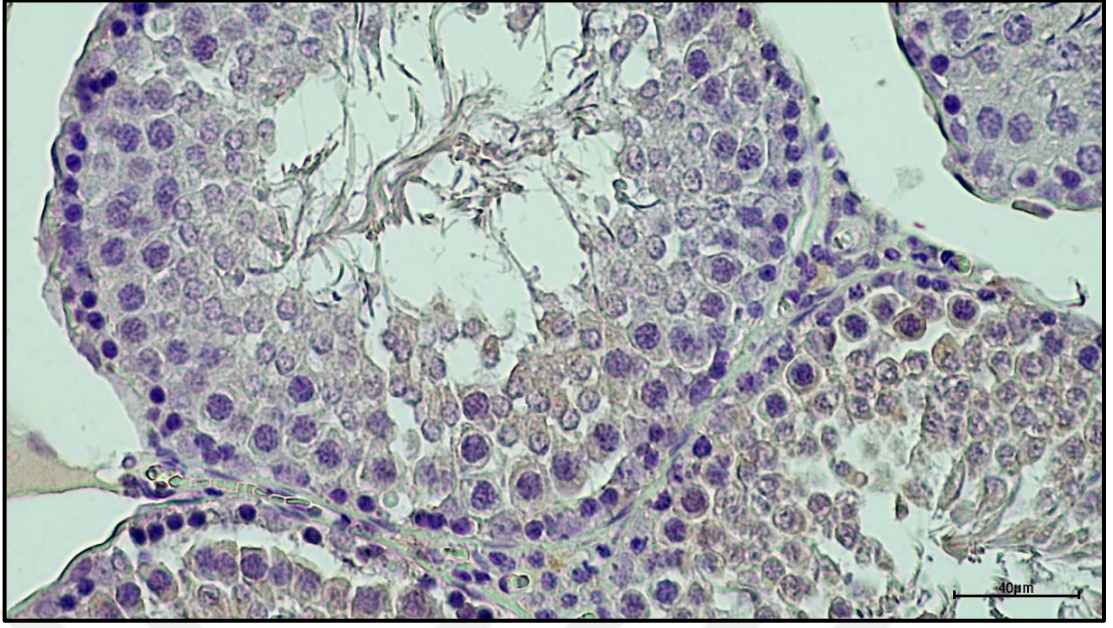
Şekil 4.8. Grupların Johnsen skorlarının karşılaştırılması.

Değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. *, $p<0.05$ anlamlılığı ifade ederken; ***, $p<0.001$ anlamlılığı ifade etmektedir

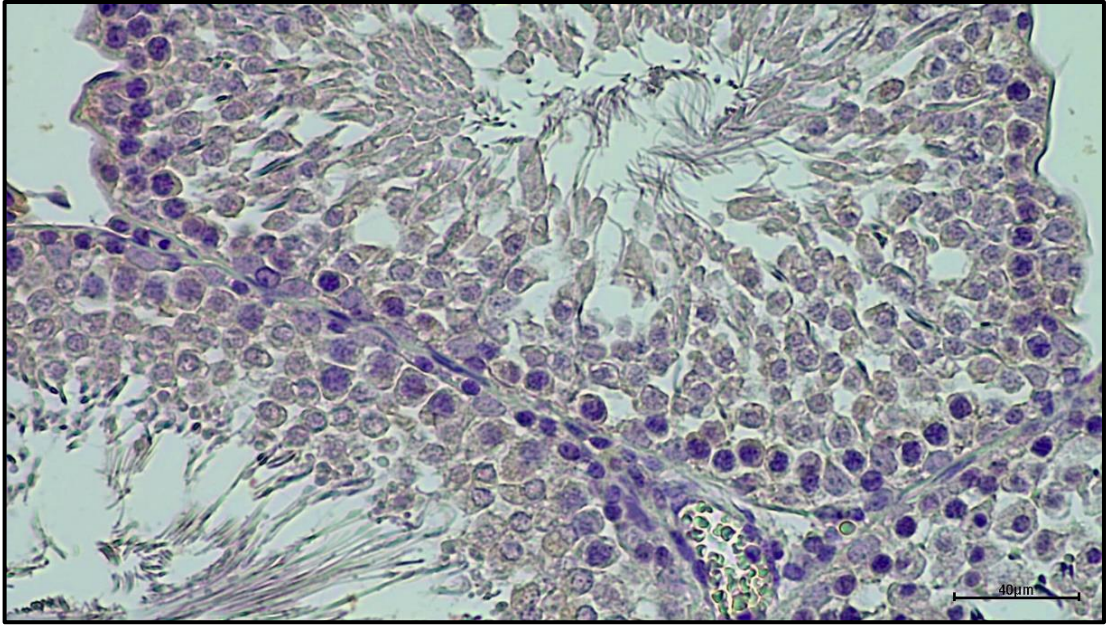
4.2. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

Dokulardaki inflamasyon sürecinde rol oynayan pro-inflamatuar sitokin ailesinden olan TNF- α ve IL-1 β antikorları kullanılarak tüm grupların testis kesitleri üzerinde immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. Pozitif immünreaksiyon gözlenen alanlar kahverengi olarak tespit edildi. İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan antikorların immünopozitifliğinin değerlendirilmesi immünreaktivite skoru hesaplanarak gerçekleştirildi.

TNF- α (Tümör Nekrozis Faktör- α) antikoruyla yapılan immünohistokimyasal boyamalar neticesinde, kontrol grubunda immünopozitif boyanmanın negatif düzeyde olduğu tespit edildi (Şekil 4.9). D-Carvone grubundan elde edilen testis kesitlerinde de kontrol grubuna benzer şekilde negatif düzeyde immünopozitif boyanmanın olduğu görüldü (Şekil 4.10).



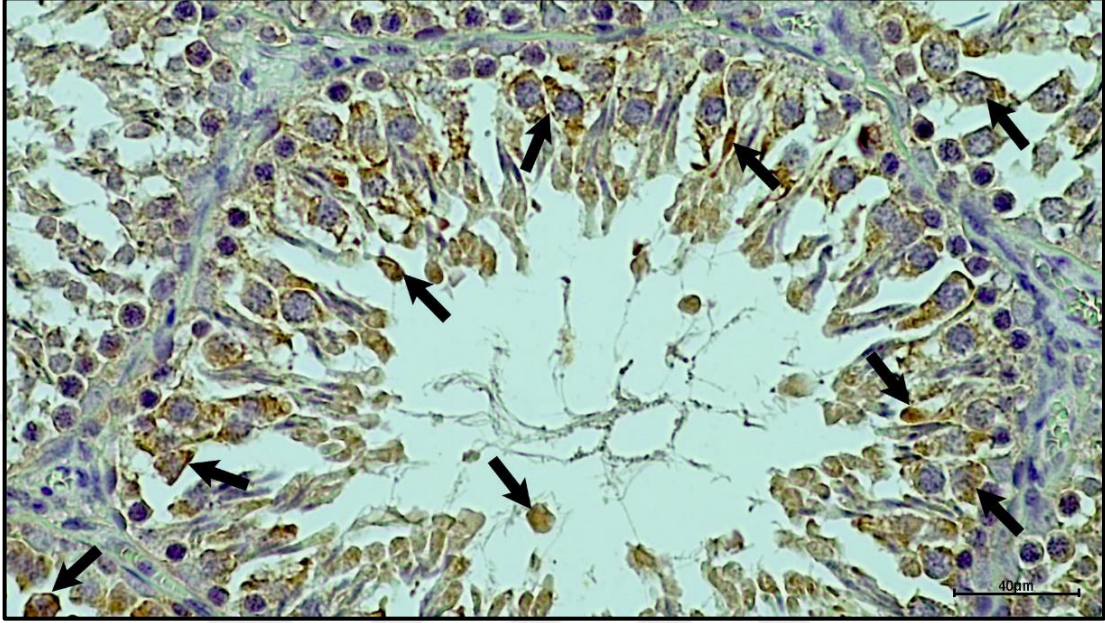
Şekil 4.9. Kontrol grubundaki ratların testis dokusunda TNF- α immünpozitifliğini gösteren ışık mikrogramf
Boyama: Avidin-biotin Metot. Objektif 20X, Ölçek: 40 μ m



Şekil 4.10. D-Carvone grubundaki ratların testis dokusunda TNF- α immünpozitifliğini gösteren ışık mikrogramf
Boyama: Avidin-biotin Metot. Objektif 20X, Ölçek: 40 μ m

Lityum grubundan elde edilen testis kesitlerinde inflamasyon süreçlerinin bir göstergesi olan TNF- α antikorunun immünohistokimyasal boyanması neticesinde immünpozitif boyanmanın neredeyse tüm kesitte diğer tüm gruplara oranla oldukça

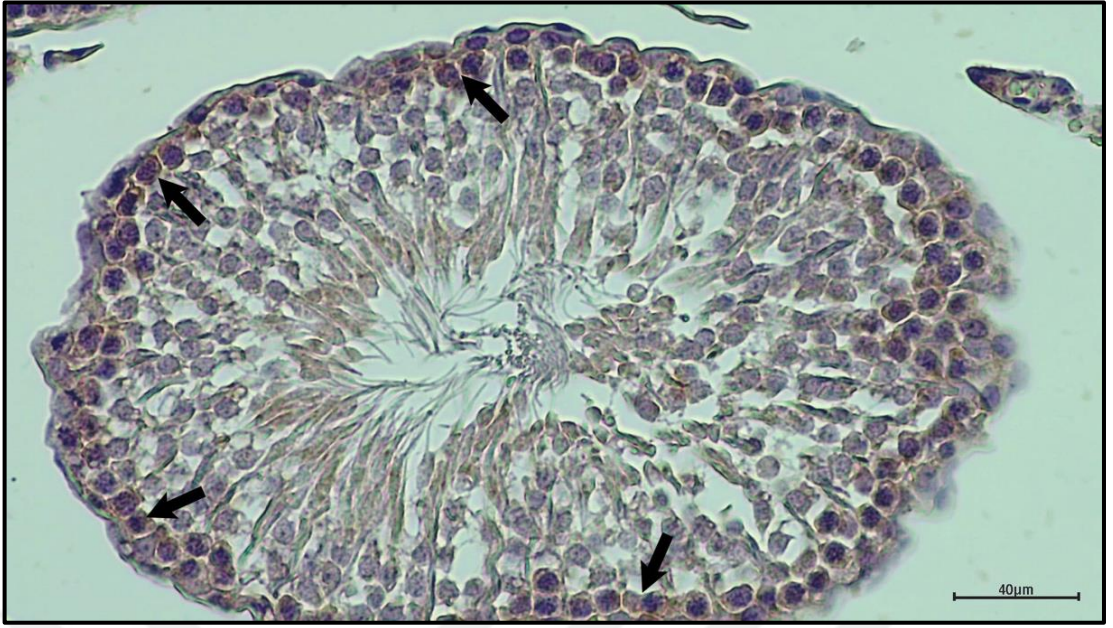
yoğun olduğu izlendi. Yoğun immünpozitif boyanmanın tüm seminifer tübüllerde özellikle germ hücre serisinde olduğu tespit edildi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Lityum grubundaki ratların testis dokusunda TNF- α immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskop

ok: TNF- α immünpozitif hücreleri göstermektedir. Boyama: Avidin-biotin Metot. Objektif 20X, Ölçek: 40 μ m

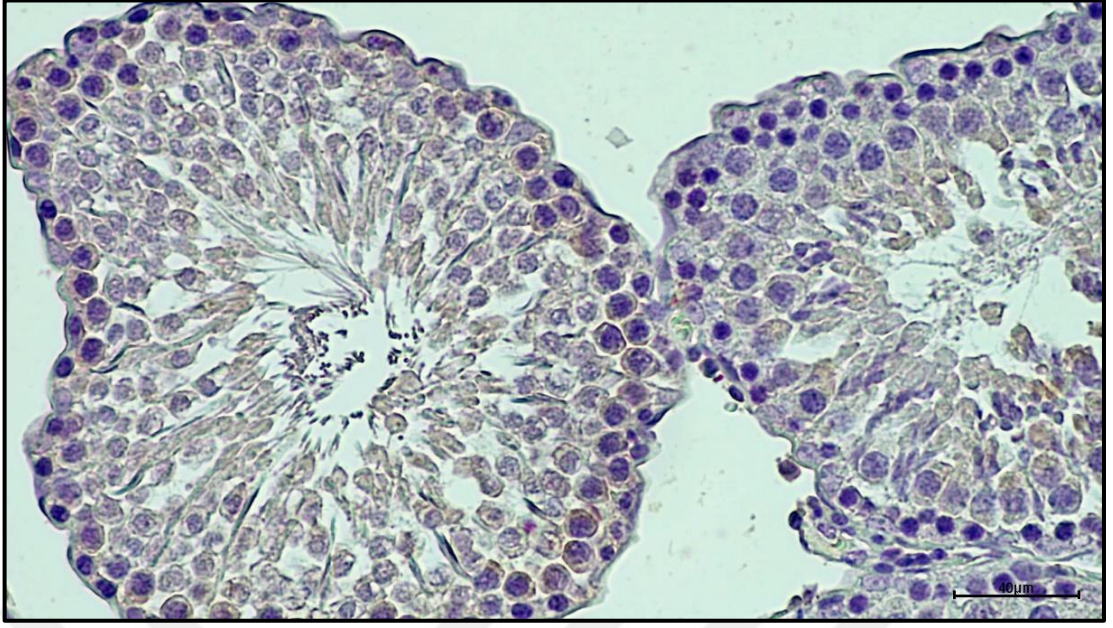
Lityum+D-Carvone grubundaki sıçanlardan elde edilen testis dokusuna ait kesitlerde, TNF- α antikorunun immünpozitifliğinin tüm kesitlerde belirgin bir şekilde azalmış olduğu görüldü. İmmünreaktivite özellikle primer spermatositlerde yoğunlaşmış olup, bu durum TNF- α düzeyinin dokuda daha düşük düzeylerde ifade edildiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, lityumun neden olduğu inflamatuvar sürecin modülasyonu üzerinde D-Carvone'un olumlu bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin, TNF- α 'nın dokudaki ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir (Şekil 4.12).



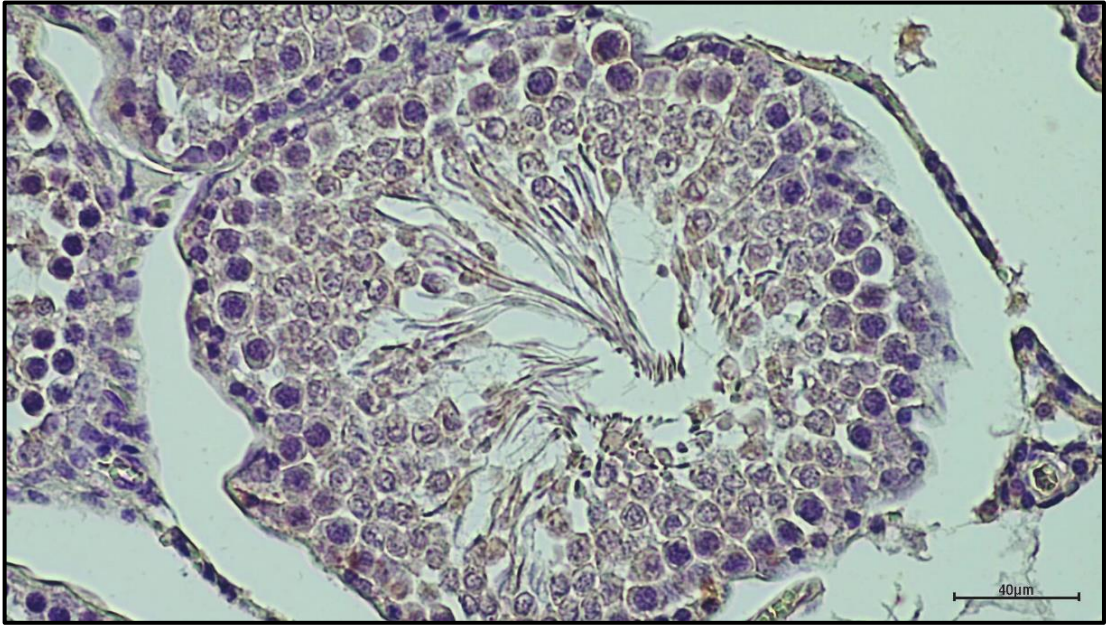
Şekil 4.12. Lityum+D-Carvone grubundaki ratların testis dokusunda TNF- α immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskopik görüntü

ok: TNF- α immünpozitif hücreleri göstermektedir. İmmünpozitif hücre sayısının bu grupta Lityum grubuna kıyasla daha az olduğu görülmektedir. Boyama: Avidin-biotin Metot. Objektif 20X, Ölçek: 40 μ m

Pro-inflamatuar sitokinlerden biri olan ve dokudaki inflamasyon süreçlerini gösteren IL-1 β (İnterlökin-1 β) antikoruyla yapılan immünohistokimyasal boyamalar neticesinde immünpozitif boyanmanın kontrol grubunda negatif düzeyde olduğu tespit edildi (Şekil 4.13). D-Carvone grubundan elde edilen testis kesitlerinde de kontrol grubuna benzer şekilde negatif düzeyde immünpozitif boyanmanın olduğu görüldü (Şekil 4.14).



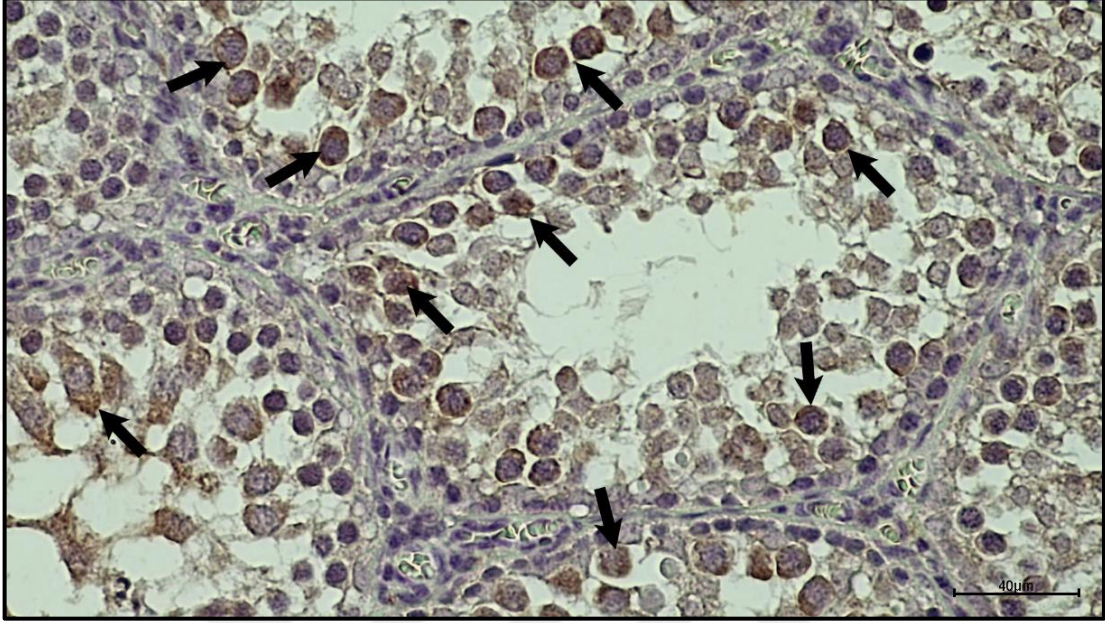
Şekil 4.13. Kontrol grubundaki ratların testis dokusunda IL-1 β immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskopu
Boyama: Avidin-biotin Metot. Objektif 20X, Ölçek: 40 μ m



Şekil 4.14. D-Carvone grubundaki ratların testis dokusunda IL-1 β immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskopu
Boyama: Avidin-biotin Metot. Objektif 20X, Ölçek: 40 μ m

Lityum grubundan elde edilen testis kesitlerinde inflamasyon süreçlerinin bir göstergesi olan IL-1 β antikorunun immünohistokimyasal boyanması neticesinde immünpozitif boyanmanın neredeyse tüm kesitte diğer tüm gruplara oranla oldukça

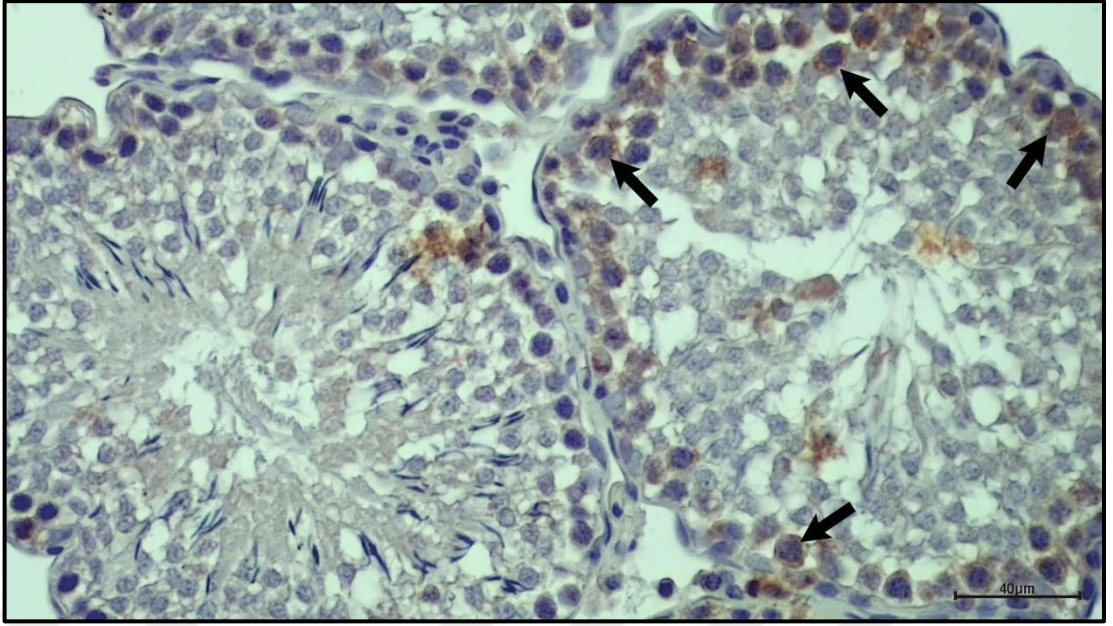
yoğun olduğu izlendi. Yoğun immünpozitif boyanmanın tüm seminifer tübüllerde özellikle germ hücre serisinde olduğu tespit edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Lityum grubundaki ratların testis dokusunda IL-1 β immünpozitifliğini gösteren ışık mikroskop

Ok: IL-1 β immünpozitif hücreleri göstermektedir. Boyama: Avidin-biotin Metot. Objektif 20X, Ölçek: 40 μ m

Lityum+D-Carvone grubundaki sıçanlardan elde edilen testis dokusuna ait kesitlerde, IL-1 β antikorunun immünpozitifliğinin tüm kesitlerde belirgin bir şekilde azalmış olduğu görüldü. İmmünreaktivite özellikle primer spermatositlerde yoğunlaşmış olup, bu durum IL-1 β düzeyinin dokuda daha düşük düzeylerde ifade edildiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, lityumun neden olduğu inflamatuvar sürecin modülasyonu üzerinde D-Carvone'un olumlu bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin, IL-1 β 'nın dokudaki ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Lityum+D-Carvone grubundaki ratların testis dokusunda IL-1 β immünpozitifliğini gösteren ışık mikrograf

Ok: IL-1 β immünpozitif hücreleri göstermektedir. İmmünpozitif hücre sayısının bu grupta Lityum grubuna kıyasla daha az olduğu görülmektedir. Boyama: Avidin-biotin Metot. Objektif 20X, Ölçek: 40 μ m

4.2.1. TNF- α ve IL-1 β Proteinlerinin IRS Değerlendirme Sonuçları

İmmünohistokimyasal olarak boyanan testis kesitlerinde, TNF- α ve IL-1 β proteinlerinin immünreaktivitesini değerlendirmek için ve immünpozitif boyanmanın şiddetine ve yüzdesine göre gruplar arasında yapılan değerlendirmelerin anlaşılır olması amacıyla yarı-kantitatif bir skorum yöntemi olan IRS skorum yöntemi kullandık. Her gruptaki her bir sıçandan rastgele seçilen 6 kesitte birbiriyle örtüşmeyen 5 alan incelendi ve immünpozitif hücrelerin dağılım ve yoğunlukları kaydedildi. İmmünohistokimyasal olarak boyanan TNF- α ve IL-1 β proteinlerinin testis dokusundaki IRS skorlarına ait sonuçlar Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4.1. Tüm gruplara ait IRS skorları

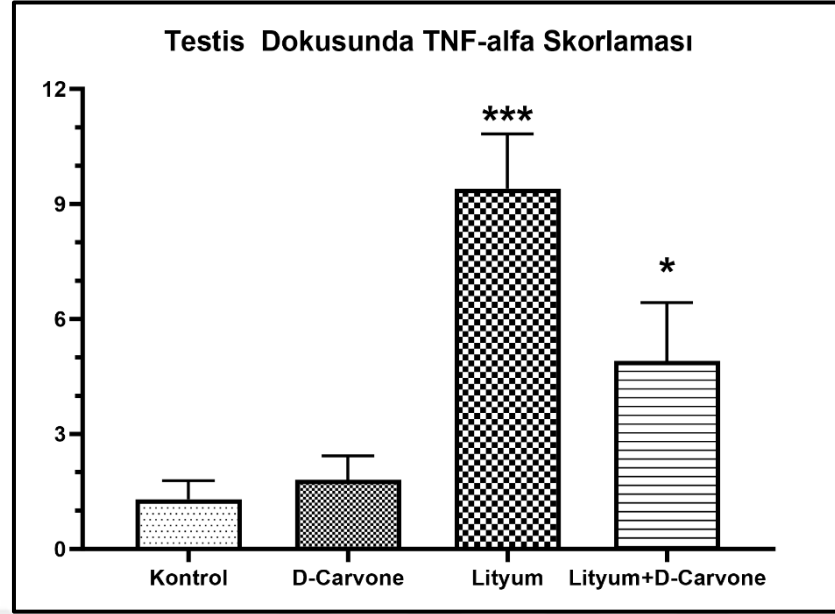
Gruplar	Kontrol	D-Carvone	Lityum	Lityum+D-Carvone
Antikorlar				
TNF-α	1.3 $\pm$ 0.48 ^{c,d}	1.8 $\pm$ 0.63 ^{c,d}	9.4 $\pm$ 1.43 ^{a,b,d}	4.9 $\pm$ 1.52 ^{a,b,c}
IL-1β	1.4 $\pm$ 0.70 ^{c,d}	2.2 $\pm$ 1.03 ^{c,d}	9.3 $\pm$ 1.49 ^{a,b,d}	5.8 $\pm$ 1.14 ^{a,b,c}

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak ifade edilmiştir. a: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, b: D-Carvone grubu ile karşılaştırıldığında, c: Lityum grubu ile karşılaştırıldığında, d: Lityum+D-Carvone grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark vardır.

4.2.1.1. TNF- α Antikoru Ait IRS Bulguları

TNF- α antikoru immünreaktivitesini belirlemek için elde ettiğimiz IRS değerlerinin yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar aşağıda belirtildiği şekliyle bulunmuştur.

Kontrol ve D-Carvone grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Ancak Kontrol ve D-Carvone grupları ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda, Lityum grubunda güçlü pozitif bir boyanmanın olduğu ve IRS skorunun kontrol grubundan anlamlı derece yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). İstatistiksel olarak ortaya çıkan bu fark, lityum ile indüklenen testis hasarının TNF- α proteininin ekspresyonunu artırdığını dolayısıyla hücrel stres yanıtında ve inflamasyonda artışa neden olduğunu göstermektedir. D-Carvone tedavisi uygulanan Lityum+D-Carvone grubunda, TNF- α immünpozitifliği hafif derecedeydi ve Lityum grubuna göre TNF- α IRS seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Bu bulgular, bize D-Carvone'un, lityumun neden olduğu doku inflamasyonunu kısmen azaltabileceğini göstermektedir (Şekil 4.17).



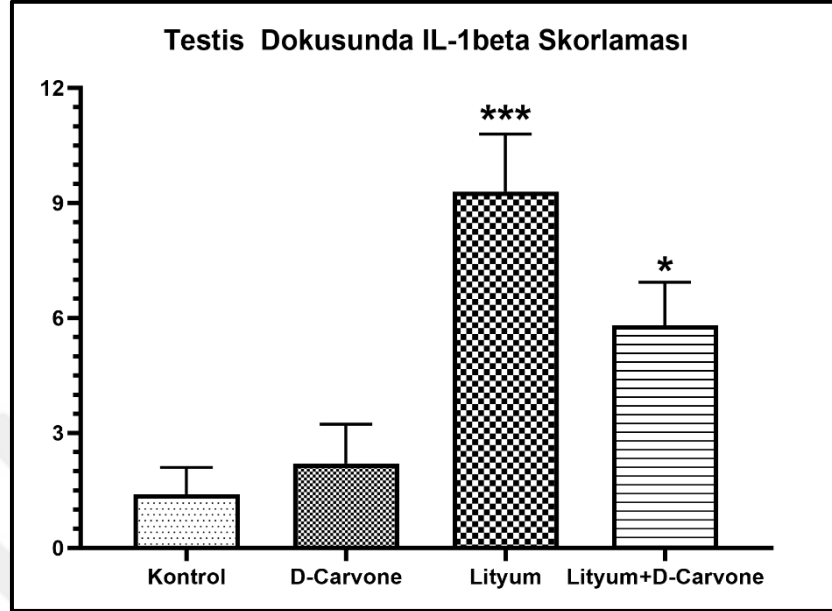
Şekil 4.17. Tüm gruplarda TNF- α antikorunun IRS değerlerini gösteren grafik
Değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. *, $p<0.05$ anlamlılığı ifade ederken; ***, $p<0.001$ anlamlılığı ifade etmektedir

4.2.1.2. IL-1 β Antikoru Ait IRS Bulguları

IL-1 β antikorunun immünreaktivitesini belirlemek için elde ettiğimiz IRS değerlerinin yapılan istatistiksel analiz sonuçlarına göre, gruplar arasındaki istatistiksel farklılıklar aşağıda belirtildiği şekliyle bulunmuştur.

Kontrol ve D-Carvone grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, bu iki gruba diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda, Lityum grubunda güçlü pozitif bir boyanmanın olduğu ve IRS skorunun kontrol grubundan anlamlı derece yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). İstatistiksel olarak ortaya çıkan bu fark, lityum ile indüklenen testis hasarının IL-1 β proteininin ekspresyonunu artırdığını dolayısıyla hücrel stres yanıtında ve inflamasyonda artışa neden olduğunu göstermektedir. D-Carvone tedavisi uygulanan Lityum+D-Carvone grubunda, IL-1 β immünpozitifliği hafif derecedeydi ve Lityum grubuna göre IL-1 β IRS seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Bu bulgular, bize D-Carvone'un,

lityumun neden olduğu doku inflamasyonunu kısmen azaltabileceğini göstermektedir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Tüm gruplarda IL-1 β antikorunun IRS değerlerini gösteren grafik Değerler ortalama±standart sapma olarak ifade edilmiştir. *, $p<0.05$ anlamlılığı ifade ederken; ***, $p<0.001$ anlamlılığı ifade etmektedir

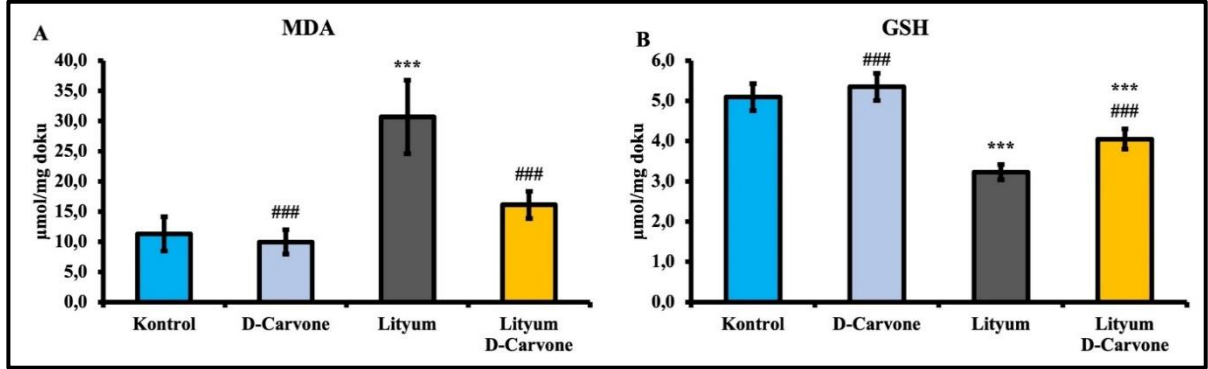
4.3. Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. Testis Dokularında Oksidatif Stres Belirteçleri Olan MDA ve GSH Seviyeleri

Testis dokularında D-Carvone ve Lityum uygulamalarından sonra oksidatif stres durumunu belirlemek için MDA ve GSH seviyeleri analiz edildi. Elde edilen verilere göre lityum uygulamasının testis dokularında lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve kontrol grubuna göre MDA seviyelerinde artış meydana geldiği görüldü ($p<0.001$). Bununla birlikte D-Carvone tedavisi lipid peroksidasyonunu hafifleterek MDA seviyelerini Lityum grubuna göre önemli derece azaltmıştır ($p<0.001$).

GSH önemli bir antioksidan tripeptiddir ve çalışmada lityum uygulamasının testis dokularında GSH depolarını azalttığı görülmüştür ($p<0.001$). Ratlara önemli bir antioksidan olan D-Carvone verildikten sonra ise GSH depolarının yenilendiği ve Lityum

grubuna göre GSH seviyelerinde artış meydana geldiği belirlendi ($p<0.001$). Testis dokularından elde edilen MDA ve GSH seviyeleri Şekil 4.19’da sunulmuştur.

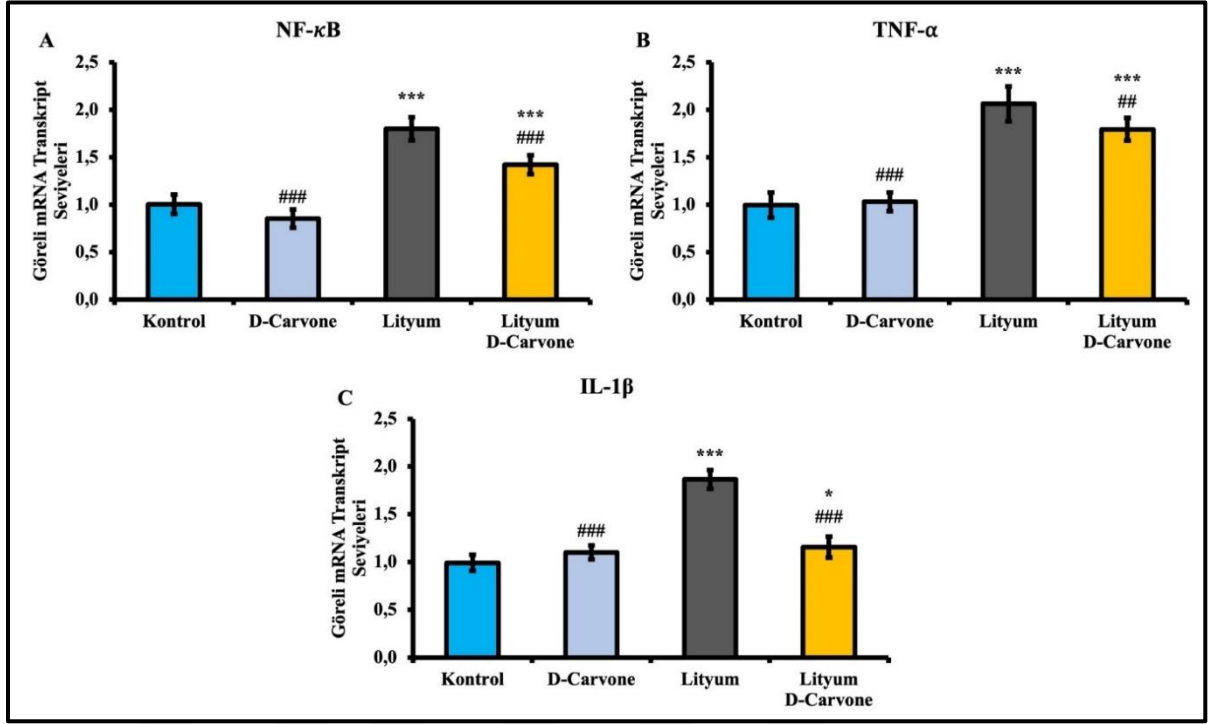


Şekil 4.19. D-Carvone ve lityum uygulaması yapılan ratların testis dokularında MDA ve GSH seviyeleri

Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel önem; Kontrol ve diğerleri: * $P < 0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, Lityum ve diğerleri: # $P < 0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$

4.4. Testis Dokularında İnflamasyon Belirteçleri Olan NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β Genlerinin Göre mRNA Transkript Seviyeleri

Testis dokularında inflamatuvar durumu değerlendirmek için inflamatuvar genler olan NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β 'nın görel mRNA transkript seviyeleri qRT-PCR yöntemi ile analiz edildi ve elde edilen veriler Şekil 4.20’de özetlendi. Buna göre lityum verilen ratların testis dokularında NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β genlerinin yukarı yönlü düzenlendiği ($p<0.001$) ve inflamasyonun tetiklendiği belirlendi. D-Carvone ise anti-inflamatuvar etki göstererek bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B ve pro-inflamatuvar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β genlerini baskıladığı görüldü (NF- κ B; $p<0.001$, TNF- α ; $p<0.01$ ve IL-1 β ; $p<0.001$).

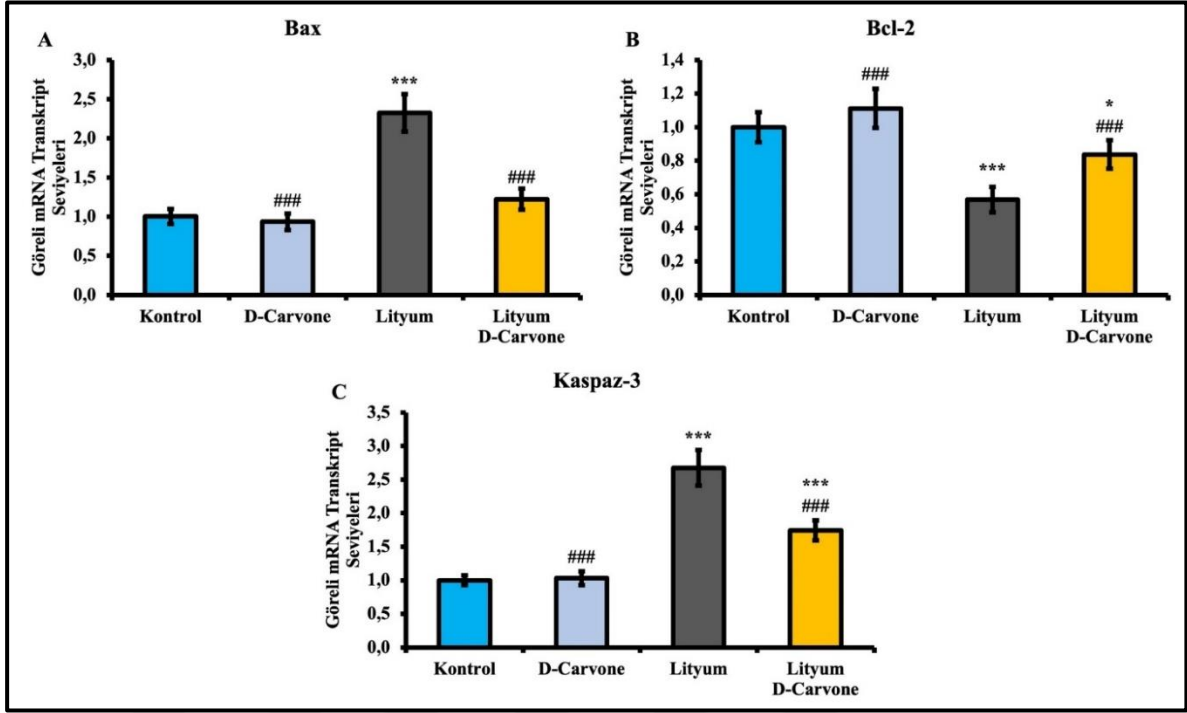


Şekil 4.20. D-Carvone ve lityum uygulaması yapılan ratların testis dokularında NF-κB, TNF-α ve IL-1β genlerinin görel mRNA ifadenme seviyeleri
Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel önem; Kontrol ve diğerleri: * P < 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, Lityum ve diğerleri: # P < 0.05, ## p<0.01, ### p<0.001

4.5. Testis Dokularında Apoptoz Belirteçleri Olan Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3

Genlerinin Göre mRNA İfadenme Seviyeleri

Lityum ve D-Carvone uygulamalarının ratların testis dokularında apoptotik yola etkisini değerlendirmek için Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 genlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edildi. Şekil 4.21’de özetlenen verilere göre lityum uygulaması testis dokularında apoptotik genler olan Bax ve Kaspaz-3’ü tetikleyerek ve anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 genini baskılayarak apoptoza neden olmuştur (p<0.001). Öte yandan lityum ile birlikte D-Carvone verilen ratların testis dokularında Bax ve Kaspaz-3 genlerinin aşağı yönlü düzenlendiği ve Bcl-2 geninin ise tetiklendiği ve böylece D-Carvone’un testis dokularında apoptoza karşı koruma sağladığı görülmüştür (Tüm genler için p<0.001).

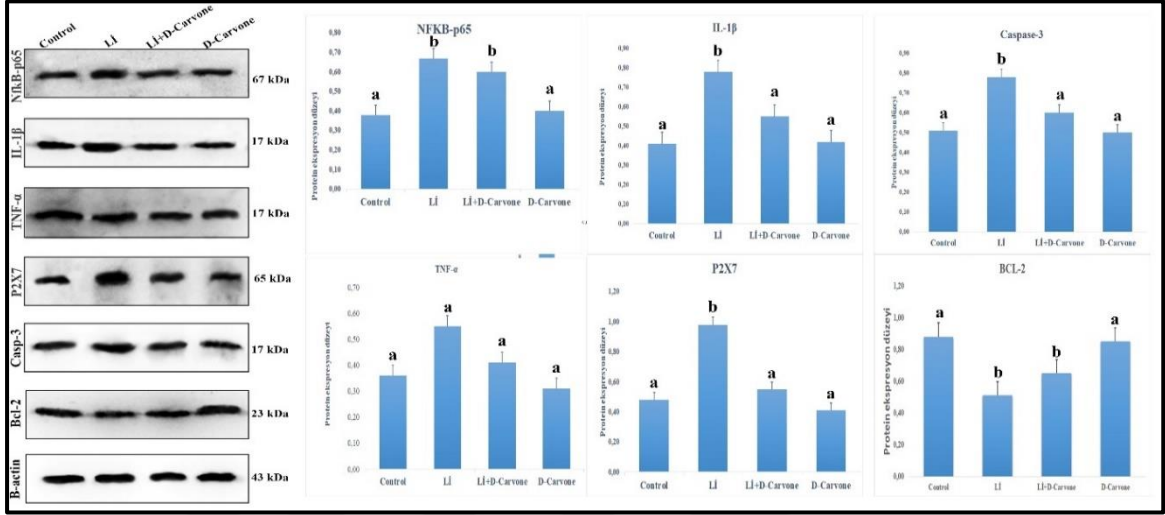


Şekil 4.21. D-Carvone ve lityum uygulaması yapılan ratların testis dokularında Bax, Bcl-2 ve Kaspaz-3 genlerinin görel mRNA ifadenme seviyeleri
Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. İstatistiksel önem; Kontrol ve diğerleri: * P < 0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, Lityum ve diğerleri: # P < 0.05, ## p<0.01, ### p<0.001

4.6. Western Blot Analiz Sonuçları

Testis dokusu protein ekspresyonu analizinde, kontrol grubu, Lityum grubu, Lityum+D-Carvone kombinasyonu ve yalnızca D-Carvone uygulaması yapılan gruplar arasında karşılaştırılmıştır. NFκB-p65, IL-1β, TNF-α, P2X7 ve Caspase-3 proteinlerinin Lityum grubunda anlamlı şekilde ($p<0.05$) arttığı görülmektedir. Ancak, Lityum+D-Carvone gruplarında bu proteinlerin ekspresyon düzeyleri anlamlı şekilde azalmış ($p<0.05$) ve kontrol grubu seviyelerine yaklaştığı belirlenmiştir. Yalnızca D-Carvone uygulaması, kontrol grubuna yakın sonuçlar vermiştir ve inflamatuvar proteinlerde belirgin bir artış gözlenmemiştir. Bcl-2 protein seviyelerinin değerlendirmesinde, lityum uygulaması Bcl-2 seviyesini kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde azaltmıştır. Lityum ile birlikte D-Carvone uygulanması, Bcl-2 seviyesini artırarak kontrol grubuna yakın bir değere getirmiştir. Tek başına D-Carvone uygulaması ise kontrol grubuna benzer bir Bcl-2 seviyesi göstermiştir. Bu sonuçlar, D-Carvone'un inflamatuvar yanıtı baskıladığını ve

hücresel stresi azaltma eğilimi gösterdiğini vurgulamaktadır. Tüm gruplara ait Western blot band görüntüleri, bant yoğunlukları değerleri ve karşılaştırmaları Şekil 4.22’de sunulmuştur.



Şekil 4.22. Tüm gruplara ait testis dokusu relative protein ekspresyon seviyeleri ile Western blot bantları

Doku NFκB-p65, IL-1β, TNF-α, P2X7, Bcl-2 ve Kaspaz-3’ün ekspresyon yoğunlukları ve değerleri. Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Harflendirmeler (a,b,c) gruplar arasındaki protein ekspresyonundaki farklılıkları göstermektedir. İstatistiksel analizler Kruskal-Wallis testi ile gerçekleştirilmiş ve gruplar arasındaki önemli farklılıklar belirtilmiştir

4.7. Sperm Bulguları

Lityum ile oluşturulan testis hasarına karşı D-Carvone’un etkilerini araştırmak için yaptığımız çalışmada tüm gruplardaki sıçanların sperm kalitesi üzerindeki etkilerini karşılaştıran sonuçlara baktığımız zaman, incelenen parametreler arasında sperm motilite (hareketlilik), yoğunluk, anormal baş ve kuyruk spermatozoa oranları ve toplam anormal spermatozoa oranları Tablo 4.2’de sunulmaktadır. D-Carvone grubunda en yüksek motilite oranı gözlemlenmiştir. Bu, D-Carvone’un sperm hareketliliğini anlamlı derecede artırdığı anlamına gelmektedir. Lityum+D-Carvone grubu da Lityum grubuna göre daha yüksek motilite değerlerine sahip olmuştur. Bu da D-Carvone’un lityumun sperm hareketliliği üzerindeki olumsuz etkilerini azaltabileceğini göstermiştir. D-Carvone grubunda en yüksek sperm yoğunluğu tespit edilmiştir. Bu, D-Carvone’un sperm

üretimini artırdığını ve sperm kaybını azalttığı anlamına gelmektedir. Lityum+D-Carvone grubu da Lityum grubuna göre daha yüksek sperm yoğunluğuna sahip olmuştur. Tüm gruplarda anormal sperm oranları benzer bulunmuştur. Ancak, istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte, D-Carvone ve Lityum+D-Carvone gruplarında anormal baş ve kuyruk spermatozoa oranları Lityum grubuna göre biraz daha düşük çıkmıştır. Bu da D-Carvone'un sperm morfolojisi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre, D-Carvone'un sperm kalitesi üzerinde olumlu etkileri olduğunu söyleyebiliriz. D-Carvone, sperm motilite, yoğunluk ve morfolojisini iyileştirmektedir. Lityumun sperm kalitesi üzerindeki olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir ve bu çalışmada da bu durum kısmen doğrulanmıştır. Ancak, D-Carvone'un etkisi ile lityumun toksik etkileri kısmen azaltılmıştır. Çalışmamız D-Carvone'un sperm kalitesi üzerindeki potansiyel faydalarını ortaya koymaktadır. Ancak, bu bulguların klinik uygulamalara dönüştürülmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Tablo 4.2. Grupların sperm analiz sonuçları

Grup (n:6)	Motilite (%)	Yoğunluk (x10 ⁶ /ml)	Anormal Baş Spermatozoa (%)	Anormal Kuyruk Spermatozoa (%)	Anormal Toplam Spermatozoa (%)
Kontrol	41.12±14.44 ^{ab}	69.33±10.97 ^a	8.00±3.50 ^a	11.33±3.28 ^a	19.33±6.88 ^a
D-Carvone	75.56±2.33 ^b	108.67±6.76 ^b	8.17±0.88 ^a	8.00±1.15 ^b	12.67±1.20 ^b
Lityum	26.11±1.81 ^a	58.00±6.53 ^a	8.17±0.91 ^a	11.33±0.88 ^a	19.50±1.69 ^a
Lityum+ D-Carvone	36.66±9.06 ^a	67.20±11.91 ^a	3.40±0.92 ^b	8.60±0.51 ^b	12.00±1.41 ^b

*Değerler ortalama±standart hata olarak ifade edilmiştir. Harflendirmeler (a, b); aynı sütundaki istatistiksel farklılığı gösterir (P<0.05).

5. TARTIŞMA

Lityum (Li) periyodik tabloda Hidrojen ve Helyum'dan sonra gelen ve düşük yoğunluğa sahip, atom numarası 3, atom ağırlığı 6.941 olan bir enerji metalidir. Tıpta, endüstride, elektronikte, kimyada, metalürjide yaygın olarak kullanılmaktadır. Tıptaki kullanımı 1800'lü yıllara dayanmaktadır. İngiliz bilim adamı Alfred Baring Garrod, 1847 yılında gut hastalarının kanında ürik asit varlığını tespit etmiştir. Garrod gut hastalığını lityum ile tedavi etmeyi başarmıştır (Garrod, 1859). 1894 yılında Danimarkalı psikiyatrist Frederik Lange depresyon tedavisinde lityum kullanmış ve hastalarını lityum karbonatla iyileştirmeyi başarmıştır (Schioldann, 2001; Shorter, 2009).

Lityum, genellikle lityum sitrat ve lityum karbonat şeklinde kullanılmaktadır. Ağız ile alındığında bağırsaklardan hızla emilen lityum, plazmadaki yüksek miktarına 2-4 saatte ulaşabilir. Plazma proteinlerine bağlanmaz, aktif metaboliti de bulunmaz. Tüm dokulara yayılır ama her dokuda yoğunluğu aynı değildir. Böbrek ile tiroid bezindeki yoğunluğu kan düzeyinden yüksek olurken; beyin omurilik sıvısı, alyuvar ve beyinde kan düzeyinden düşük olmaktadır. Lityum beyin dokusuna hızlı girerken diğer organlara daha yavaş girmektedir (Işık, Taner, Işık, 2013; Öztürk ve Uluşahin, 2008).

Lityum, geçmişte tıbbi amaçlarla yaygın bir şekilde kullanılmış olsa da ağız yoluyla alındığında insan sağlığı üzerinde toksik etkiler yaratabileceği artık bilinmektedir. Ancak vücut toleransı kişiden kişiye değişiklik gösterebilmektedir (Aral ve Vecchio-Sadus, 2008). Lityumun özellikle psikiyatrik bozukluklarda kullanımı yaygınlaştıkça, yan etkileri de görülmeye başlanmıştır. Örneğin, lityum tiroid bezi üzerinde hipotiroidizme neden olmaktadır. Lityum, hiperkalsemi, böbrek taşı, osteopeni ve osteoporoz, dispeptik şikayetler, peptik ülser, kardiyak aritmiler, dehidratasyon, hipertansiyon, kas güçsüzlüğü ve böbrek fonksiyonlarında azalma gibi sorunlara da neden olabilmektedir (Livingstone ve Rampes, 2006). Diyabet, koroner kalp hastalığı ve felç

riski de endişe duyulan diğer hastalık türleridir (Vieweg ve ark., 1988). Lityumun neden olduğu böbrek hasarının önemli bir kısmı, poliüri ve polidipsi ile karakterize nefrojenik diyabet insipidus olarak ortaya çıkmıştır (Bedford ve ark., 2008). Lityumun, çeşitli organlar üzerinde olduğu gibi üreme sisteminde testis dokusu ve sperm hücreleri üzerinde oksidatif strese bağlı mekanizmalarla bir takım yan etkilere neden olabileceğini gösteren çalışmalar da mevcuttur (Ghajari, Nabiuni ve Amini, 2021; Ommati ve ark., 2021; Saad ve ark., 2017).

D-Carvone iki yıllık bir bitki olan İran kimyonunun özüdür ve Caraway (Apiaceae familyası) şeklinde isimlendirilmektedir. Caraway her bölgede değişik isimlerle adlandırılmıştır. Örneğin; Yunancada Karon, Latince’de Cumin olarak isimlendirilmiştir. Bunun yanında mutfakta ve tıbbi amaçlı (bronşit, öksürük, baş ağrısı tedavisi v.b.) olarak da kullanılmaktadır. Geleneksel tıpta etkili bir nefes açıcı olduğu da bilinmektedir (Altun, 2018). Kimyonun kullanım alanları et ürünleri, ekmek, şeker sanayisi, soslar, kozmetik sanayisi ve eczacılık şeklindedir. Çoğunlukla nane, kimyon ve dereotu gibi aromatik bitkilerin esansiyel yağ ekstraktlarında fitokimyasal bileşen olarak bulunur (Abbas ve Kathem, 2021; Gopalakrishnan ve ark., 2019). Yapılan bir araştırmada, uçucu olan yağların (Carvone) kimyasal yapısına bağlı olacak şekilde sitokinleri veya araşidonik metabolizmayı etkileyerek anti-inflamatuar özellikte hareket ettiği sonucuna varılmıştır. Antioksidan aktivitesini aydınlatmak için 1,1-difenil-2-picrylhydrazyl (DPPH) ve beta-karoten ağartma çalışmaları yapılmış ve deney sonunda Carvone’un antioksidan aktivitesinin olduğu tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada spesifik olarak hazırlanan kimyon ve nane yağı ile birlikte diğer bitkisel özütler bulunduran preparatların fonksiyonel dispepsi tedavisi için etkili olduğu sonucuna varılmıştır. Farklı kanser hücre türlerinde, Carvone’un DNA sentezini inhibe ettiği ve hücre döngüsünü durdurduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada (R)-(-) ve (S)-(+) Carvone’un birçok kanser

tipinde hücre çoğalmasını durduran etkiye sahip olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte bilinen yan etkileri çok az olan bir maddedir. Kimyonun yapısındaki antiseptikler astım, sinüzit, zatürre, bronşit ve soğuk algınlığı gibi solunum sistemi rahatsızlıklarına iyi gelmektedir. Uçucu olan yağ asitlerinin kardiyovasküler sistem ve solunum sistemi üzerine etkisini anlamak için de deneyler yapılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda, kalp-damar sistemi ve solunum yolu hastalıklarının tedavisinde Carvone'un tedavi edici etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Altun, 2018).

Yapmış olduğumuz literatür taraması sonucunda, lityumun insanlar üzerinde uygulandığı çalışmalarda, iyileştirici etkilerinin yanı sıra yüksek toksisite potansiyeline sahip olduğunu gördük. Ayrıca, D-Carvone'un çeşitli araştırmalarda kullanıldığını, iyileştirici ve koruyucu etkilerinin bulunduğunu, lityumun aksine toksisite etkisinin ise oldukça düşük olduğunu tespit ettik. Bu bağlamda, çalışmamızda D-Carvone'un koruyucu ve iyileştirici etkilerini göz önünde bulundurarak, lityumun toksik etkilerini değerlendirerek D-Carvone'un testis hasarına karşı potansiyel koruyucu etkilerini incelemeyi amaçladık.

2014 yılında yapılan bir çalışmada lityumun, testis dokusu üzerinde toksik etki gösterdiği, bazal membranda ondülasyona neden olduğu, interstisyel boşlukta ödem oluşturduğu, tunika albugineanın kalın bir tabaka haline gelmesine neden olduğu, interstisyel boşluktaki damarlarda konjesyona neden olduğu, spermatogenik seri hücre serisini dejenerasyona uğrattığı, spermatogonyum, spermatosit ve spermatid hücrelerinde vakuollere, spermatogonyumlarda hasara ve bazı seminifer tübül lümenlerinde az kuyruklu spermlerin oluşmasına neden olduğu, seminifer tübül lümeninin daralmasına neden olduğu sonucuna varılmıştır (Kaya, 2014). 2024 yılında yapılan bir başka çalışmada lityumun testis dokusunda seminifer tübül epitelinde düzensizlik ve bazal membranda ayrışmalar şeklinde hasara neden olduğu gösterilmiştir (Mert, 2024). Yapılan

başka bir çalışmada lityum verilen sıçanların testis dokusu kesitlerinde, seminifer tübüllerin germinal epitelinde düzensizlik ve ayrışmalar tespit edilmiştir. Ayrıca tübül lümeninde deskuamasyon, tübül lümeninde matür sperm yokluğu, bazal membranda ayrışmalar, intertübüler alanda genişlemeler gibi sonuçlar da elde edilmiştir (Saad ve ark., 2017; Toghiani ve ark., 2012; Zarnescu ve ark., 2006). Yapılan başka çalışmalarda ise farklı dozlarda, kısa ya da uzun süreli lityum kullanımının, testis dokusunda hasara neden olduğu, sperm parametrelerinde bozulmalar meydana getirdiği görülmüştür (Toghiani ve ark., 2013; Zarnescu ve Zamfirescu, 2006).

Çalışmamızda Hematoksilen-Eozin ile boyanan testis dokularının histolojik değerlendirmesinde, kontrol grubunda düzenli seminifer tübül yapısı olduğunu gözlemledik. Seminifer tübüllerin duvarında spermatogonyum, primer spermatosit, erken spermatid, geç spermatid şeklinde düzenli bir şekilde sıralanan spermatogenik seri hücrelerinin olduğunu gördük. Bu germ hücre dizisinin arasında Sertoli hücreleri de seçilebilmekteydi. Tübüllerin düzgün germinal epitel yapıya sahip olduğunu ve lümenlerinde olgun sperm hücrelerinin varlığını gözlemledik. D-Carvone grubunda da kontrol grubuna benzer şekilde düzenli bir şekilde dizilmiş spermatogenik seri hücrelerinin ve morfolojinin korunduğu seminifer tübüllerin varlığını gözlemledik.

Lityum grubuna ait testis kesitlerinin histolojik incelemesinde, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin patolojik değişiklikler göze çarpmaktaydı. Seminifer tübüllerde yoğun dejenerasyon alanları mevcuttu. Tübüllerde spermatogenik hücrelerin organizasyonunun bozulduğu, intertisyal alandaki damarlarda dilatasyon ve konjesyon olduğunu gözlemledik. Seminifer tübüllerde eozinofilik sitoplazmalı, piknotik çekirdekli apoptotik hücrelerin varlığı dikkat çekmekteydi. Birbirlerinden kopmuş ve nukleus yapıları bozulmuş dejeneratif hücreler göze çarpmaktaydı. Seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerinin sayısındaki azalma ile birlikte hem düzeni bozulmuş hem

de kalınlığı azalmış ve atrofiye uğramış germinal epitel hücrelerinin olduğunu gözlemledik. Bazı seminifer tübüllerde olgun sperm hücresinin bulunmaması da dikkat çekiciydi. Ayrıca seminifer epitel hücrelerinde vakuolizasyon ve seminifer tübül lümeninde hiyalinizasyon görülmekteydi. Germinal epitel hücreleri arasında dilatasyon ve hücreler arası vakuol oluşumu mevcuttu. Seminifer tübülleri çevreleyen bazal membran yapısında da düzensizlik ve ondülasyon görülmekteydi.

Lityum+D-Carvone grubuna ait testis kesitlerinde histolojik görüntünün Lityum grubu kesitlerine kıyasla daha normal bir histolojik yapıya sahip olduğunu tespit ettik. Seminifer tübüllerin morfolojisi tübüllerin bir kısmında normal olarak görünmekteydi. Bazı seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerinin tamamı izlenirken, tübüllerin bir kısmında ise atipik lümen görünümü, hücrelerde vakuolizasyon görülmekteydi. Spermatogenik seri hücrelerinin tamamının izlenemediği tübüller de ise Lityum grubuna kıyasla azalma mevcuttu.

Johnsen skorlaması, seminifer tübül epitelindeki hücreleri sayı ve organizasyon anlamında değerlendirmektedir, bu skorlama sisteminde her tübüle 1 ila 10 arasında bir değer verilir. Testiste spermatogenezin nicel olarak değerlendirildiği bu skorlama sistemi erkek üreme kapasitesinin prognozunu belirlemek adına güvenilir ve kolay elde edilen bir sistemdir (Johnsen, 1970; Nguyen ve ark., 2020). Toghiani ve ark.'nın yaptığı çalışmada 48 gün boyunca uyguladıkları 10, 20, 30 mg/kg dozlarındaki lityumun Johnsen skorlamasında, diğer gruplarda kontrole göre düşüşe sebep olduğu tespit edilmiştir (Toghiani ve ark., 2012). Biz de yapmış olduğumuz çalışmada, bütün deney gruplarına ait testis örneklerinin Hematoksilen-Eozin boyaması ile boyanmış histolojik kesitlerinde Johnsen skorlamasına göre değerlendirmeler yaptık. Seminifer tübüllerin Johnsen skorlaması sonuçlarına göre Lityum grubunda kontrol ve D-Carvone gruplarına oranla anlamlı düzeyde düşük ($p<0.001$) Johnsen skorunun olduğunu tespit ettik. Lityum+D-

Carvone grubunda ise Lityum grubuna oranla anlamlı düzeyde yüksek ($p<0.05$) Johnsen skorunun olduğunu gözlemledik. Bu da lityumun etkisinin D-Carvone ile kısmen hafifletilebileceğini bizlere göstermiş oldu.

Sitokinler, lokal ve sistemik bağışıklık tepkilerini düzenleyen sinyal molekülleridir (Matur ve ark., 2024). TNF- α ve IL-1 β ise sitokin ailesine dahil olan iltihaplanma, hücre proliferasyonunun kontrolü, farklılaşma ve bağışıklık yanıtının düzenlenmesinde pleiotropik işlevler gören güçlü pro-inflamatuar sitokinlerdendir (Guloksuz ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarda lityum uygulanan bireylerde TNF- α ve IL-1 β gibi pro-inflamatuar sitokinlerin arttığı tespit edilmiştir (Himmerich ve ark., 2005; Petersein ve ark., 2015).

Bipolar bozukluk da dahil olmak üzere psikosomatik hastalıkların tedavisinde lityumun ruh hali dengeleyicisi olarak kullanıldığı durumlarda bireylerin sitokin düzeylerinin değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. Lityumla tedavi edilen insanlardan elde edilen monositlerde TNF- α üretiminde doza bağlı olarak bir artış görüldüğü bildirilmiştir. Dahası, plazma TNF- α düzeylerinin, lityum tedavisi gören bipolar hastalarda hem ilaçsız bipolar hastalara hem de sağlıklı kontrol deneklerine kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir (Hull ve ark., 2014; Liu ve ark., 2011; Matsebatlela, Gallicchio ve Becker, 2012). Benzer şekilde lityumun IL-1 β , IL-6 ve IL-2 üretimini artırdığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (Kucharz ve ark., 1988; Matur ve ark., 2024).

Çalışmamızda inflamasyon sürecinde rol oynayan TNF- α ve IL-1 β antikorlarını kullanarak tüm grupların testis kesitleri üzerinde immünohistokimyasal boyamalar yaptık. Pozitif immünreaksiyon gözlenen alanları kahverengi olarak tespit ettik. TNF- α antikoruyla yapılan immünohistokimyasal boyamalar neticesinde immünpozitif boyanmanın Kontrol ve D-Carvone grubunda negatif düzeyde olduğunu tespit ettik.

Lityum grubundan elde edilen testis kesitlerinde inflamasyon süreçlerinin bir göstergesi olan TNF- α antikorunun immünohistokimyasal boyanma neticesinde immünpozitif boyanmanın neredeyse tüm kesitte diğer tüm gruplara oranla oldukça yoğun olduğunu gördük. Boyanmanın tüm seminifer tübüllerde özellikle germ hücre serisinde olduğunu tespit ettik. Lityum+D-Carvone grubundaki sıçanlardan elde edilen testis dokusuna ait kesitlerde, TNF- α antikorunun immünpozitifliğinin tüm kesitlerde belirgin bir şekilde azalmış olduğu gördük. İmmünreaktivite özellikle primer spermatositlerde yoğunlaşmış olup, bu durum TNF- α düzeyinin dokuda daha düşük düzeylerde ifade edildiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, lityumun neden olduğu inflamatuvar sürecin modülasyonu üzerine D-Carvone'un olumlu bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin, TNF- α 'nın dokudaki ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir.

TNF- α antikorunun immünreaktivitesini belirlemek için elde ettiğimiz IRS değerlerinin istatistiksel analiz sonuçlarına göre Kontrol ve D-Carvone grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu. Kontrol ve D-Carvone grupları ile diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda, Lityum grubunda güçlü pozitif bir boyanmanın olduğunu ve IRS skorunun kontrol grubundan anlamlı derece yüksek olduğu belirlendi ($p<0.001$). Ortaya çıkan bu fark, lityum ile indüklenen testis hasarının TNF- α proteininin ekspresyonunu artırdığını dolayısıyla hücrel stres yanıtında ve inflamasyonda artışa neden olduğunu göstermektedir. D-Carvone tedavisi uygulanan grupta, TNF- α immünpozitifliği hafif derecedeydi ve Lityum grubuna göre TNF- α IRS seviyesinde anlamlı bir azalma olduğunu tespit ettik ($p<0.05$). Bu bulgular, bize D-Carvone'un, lityumun neden olduğu doku inflamasyonunu kısmen azaltabileceğini göstermektedir.

IL-1 β antikoruyla yapılan immünohistokimyasal boyamalar neticesinde immünpozitif boyanmanın kontrol grubunda negatif düzeyde olduğunu tespit ettik. D-Carvone grubundan elde edilen testis kesitlerinde de kontrol grubuna benzer şekilde

negatif düzeyde immünpozitif boyanmanın olduğunu gördük. Lityum grubundan elde edilen testis kesitlerinde inflamasyon süreçlerinin bir göstergesi olan IL-1 β antikorunun immünohistokimyasal boyaması neticesinde immünpozitif boyanmanın neredeyse tüm kesitte diğer tüm gruplara oranla oldukça yoğun olduğunu gördük. Yoğun immünpozitif boyanmanın tüm seminifer tübüllerde özellikle germ hücre serisinde olduğunu tespit ettik. Lityum+D-Carvone grubundaki sıçanlardan elde edilen testis dokusuna ait kesitlerde, IL-1 β antikorunun immünpozitifliğinin tüm kesitlerde belirgin şekilde azalmış olduğunu gördük. İmmünreaktivite özellikle primer spermatositlerde yoğunlaşmış olup, bu durum IL-1 β düzeyinin dokuda daha düşük düzeylerde ifade edildiğini ortaya koymaktadır. Bu bulgular, lityumun neden olduğu inflamatuvar sürecin modülasyonu üzerinde D-Carvone'un olumlu bir etkiye sahip olduğunu ve bu etkinin, IL-1 β 'nın dokudaki ekspresyonunun azalmasıyla ilişkili olduğunu göstermektedir.

IL-1 β antikorunun immünreaktivitesini belirlemek için elde ettiğimiz IRS değerlerinin analiz sonuçlarına göre Kontrol ve D-Carvone grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, bu iki gruba diğer gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda, Lityum grubunda güçlü pozitif bir boyamanın olduğunu ve IRS skorunun kontrol grubundan anlamlı derecede yüksek olduğunu belirledik ($p<0.001$). İstatistiksel olarak ortaya çıkan bu fark, lityum ile indüklenen testis hasarının IL-1 β proteininin ekspresyonunu artırdığını dolayısıyla hücresel stres yanıtında ve inflamasyonda artışa neden olduğunu göstermektedir. D-Carvone tedavisi uygulanan grupta, IL-1 β immünpozitifliği hafif derecedeydi ve Lityum grubuna göre IL-1 β IRS seviyesinde anlamlı bir azalma olduğunu tespit ettik ($p<0.05$). Bu bulgular, bize D-Carvone'un, lityumun neden olduğu doku inflamasyonunu kısmen azaltabileceğini göstermektedir.

Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyonun bir göstergesidir ve oksidatif stres durumunda yükselmektedir. 2024 yılında yapılan bir çalışmada lityum karbonat verilen grupta kontrol grubuna göre testis dokusu MDA düzeyinde artış olduğu gözlenmiştir. Bu durum uygulanan lityumun testis dokusunda oksidatif stres oluşturduğunu göstermektedir (Mert, 2024). Çomaklı ve ark. yapmış oldukları çalışmada, kolistin verilerek oluşturulan testis hasarında MDA düzeyinin arttığını tespit etmişlerdir (Çomaklı, 2020). Yine yapılan çalışmalarda lityumun karaciğerde lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit konsantrasyonunda önemli bir artışa yol açtığı gösterilmiştir (Joshi ve ark., 2013; Li ve Long, 2001). Lityumun böbrek fonksiyonları üzerine olumsuz etkileri olduğu, böbrek tübüllerinde hasara ve MDA düzeyinde artışa neden olduğu da tespit edilmiştir (Oktem ve ark., 2005). Lityum kaynaklı mitokondriyal bozulma ve oksidatif stresin, erkek üreme sistemi üzerinde olumsuz etkileri olduğu artık bilinmektedir. Spermatozoa işlevselliğindeki birçok anormallik, DNA'nın ciddi şekilde bozulması, plazma membran bütünlüğünün bozulması ve proteinlerin denatürasyonu yoluyla testis ve semende ROS düzeyinin artmasına neden olmaktadır. Artan doku hasarı ve ROS düzeyi de GSH seviyesinde azalmaya neden olmaktadır (Ommati ve ark., 2021). Saad ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada lityum karbonat verilen sıçanların kalp ve testis dokularında GSH seviyesinde anlamlı bir azalma olduğu tespit edilmiştir (Saad ve ark., 2017). Zhao ve ark. Lipopolysaccharide (LPS) ile indüklenen akciğer hasarında TNF- α ve IL-1 β sitokin düzeylerinde, MDA seviyesinde artış olduğunu, GSH seviyesinde ise azalma olduğunu göstermişlerdir. Aynı çalışmada tedavi amacıyla verilen D-Carvone'un LPS'nin başlattığı, akciğer hasarını ve iltihabını ciddi şekilde düşürerek TNF- α ve IL-1 β sitokin düzeylerinde, MDA seviyesinde azalmaya, GSH seviyesinde ise artmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir. Bu durum da D-Carvone'un güçlü bir immünomodülatör ve anti-inflamatuar değerlere sahip bir ajan olduğunu göstermektedir (Zhao ve Du, 2020).

Çalışmada testis dokularında D-Carvone ve lityum uygulamalarından sonra oksidatif stres durumunu belirlemek için MDA ve GSH seviyelerini analiz ettik. Elde ettiğimiz verilere göre lityum uygulamasının testis dokularında lipid peroksidasyonuna neden olduğu ve kontrol grubuna göre MDA seviyelerinde artış meydana geldiğini gördük ($p<0.001$). Bununla birlikte D-Carvone tedavisi lipid peroksidasyonunu hafifleterek MDA seviyelerini Lityum grubuna göre önemli derece azaltmıştı ($p<0.001$). GSH'nin önemli bir antioksidan tripeptid olduğunu bilmekteyiz. Çalışmamızda lityum uygulamasının testis dokularında GSH depolarını azalttığı sonucuna vardık ($p<0.001$). Ratlara önemli bir antioksidan olan D-Carvone verildikten sonra GSH depolarının yenilendiğini ve lityum grubuna göre GSH seviyelerinde artış meydana geldiğini belirledik ($p<0.001$).

Oksidatif stres, bir organizmanın içinde serbest radikallerin ve diğer reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve temizlenmesi arasındaki dengenin bozulduğu ve hücrelerde aşırı ROS birikmesine yol açan fizyolojik bir durumdur. Hücrenin hayatta kalması ve bağışıklık tepkisi dahil olmak üzere çeşitli yönlerden önemli olan karmaşık bir süreçtir. Oksidatif stres, nükleer faktör kappa beta (NF- κ B) sinyal yolu dahil olmak üzere bir dizi hücre içi sinyalleme kaskadını başlatma kapasitesine sahiptir ve NF- κ B iltihaplanmayı yönlendiren sinyal yollarının temel düzenleyicisidir. Araştırmalar, NF- κ B aktivasyonunun, IL-1 β ve IL-6 gibi temel inflamasyon araçlarının yukarı regülasyonunu tetiklediğini göstermektedir (Seo ve ark., 2016; Zhang, Li ve Zhang, 2021). 2024 yılında yapılan bir çalışmada, oldukça toksik etkiye sahip ağır bir metal olan kadmiyum ile testis hasarı oluşturulmuş ve oluşan toksikasyon sonucunda canlıda oksidatif stresin geliştiği tespit edilmiştir. Bu durumun sonucu olarak da kontrol grubuna kıyasla kadmiyum verilen grupta NF- κ B, IL-1 β , IL-6 mRNA ekspresyonlarında belirgin bir artış gözlenmiştir (Li, Wang ve Wang, 2024). 2021 yılında yapılan başka bir

çalışmada, yine kadmiyum klorürün neden olduğu testis disfonksiyonu sonucunda IL1 β , TNF- α , p53 ve Bax'ın mRNA düzeyinin arttığı, Bcl-2'nin mRNA düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir (Ferlazzo ve ark., 2021). Ghajari ve ark.'ları yapmış oldukları çalışmada, lityum ile testis hasarı oluşturmuş, çalışma sonucunda elde ettikleri testis dokularında yapmış oldukları q-PCR analiz sonuçlarına göre pro-apoptotik proteinlerden olan Bax'ın mRNA ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir (Ghajari, Nabiuni ve Amini, 2021). Dokuda oluşan oksidatif stresin Bax geninin ekspresyonunu artırarak, mitokondriyal zarın geçirgenliğini bozduğu, bunun sonucunda sitokrom C'nin sitoplazmaya salındığı, ardından kaspaz-3 ve kaspaz-9 gibi kaspazların aktivasyonunun gerçekleştiği ve sonuçta apoptozun aktive edildiği bilinmektedir (Tan ve ark., 2018). 2024 yılında yapılan, lityum kaynaklı karaciğer hasarında D-Carvone'un apoptoz, inflamasyon ve hücre hasarı üzerine koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada lityumun karaciğer dokusunda hasara neden olduğu ve Bax, Nf κ B-p65 ekspresyonunu artırdığı, Bcl-2 ekspresyonunu ise azalttığı görülmüştür D-Carvone uygulamasının bu değişiklikleri tam tersi duruma çevirdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak, D-Carvone uygulamasının lityum ile oluşturulan karaciğer doku hasarını önlediği ve bu etkiyi inflamasyonu ve apoptotik süreci baskılayarak gösterdiği tespit edilmiştir (Erbaş ve ark., 2024). Yapılan başka bir çalışmada sıçanlarda testis iskemi/reperfüzyon (I/R) hasarına karşı obestatinin potansiyel koruyucu etkisi araştırılmış, elde edilen sonuçlara göre kaspaz-8, kaspaz-3 ve Bax seviyelerinde yükselme olduğu, Bcl-2 protein ifadesinde ise azalma olduğu görülmüştür (Moursi ve ark., 2021).

Bu çalışmada, testis dokularında inflamatuvar durumu değerlendirmek için inflamatuvar genler olan NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β 'nın göreceli mRNA transkript seviyelerini qRT-PCR yöntemi ile analiz ettik. Lityum verilen ratların testis dokularında NF- κ B, TNF- α ve IL-1 β genlerinin yukarı yönlü düzenlendiği ($p < 0.001$) ve inflamasyonun

tetiklendiğini belirledik. D-Carvone'un ise anti-inflamatuar etki göstererek bir transkripsiyon faktörü olan NF- κ B ve pro-inflamatuar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β genlerini baskıladığını gördük (NF- κ B; $p < 0.001$, TNF- α ; $p < 0.01$ ve IL-1 β ; $p < 0.001$). Yine çalışmamızın devamında lityum ve D-Carvone uygulamalarının ratların testis dokularında apoptotik yola etkisini değerlendirmek için Bax, Bcl-2 ve kaspaz-3 genlerinin ekspresyon seviyelerini analiz ettik. Lityum uygulaması testis dokularında apoptotik genler olan Bax ve kaspaz-3'ü tetikleyerek ve anti-apoptotik bir gen olan Bcl-2 genini baskılayarak apoptoza neden olmuştur ($p < 0.001$). Öte yandan lityum ile birlikte D-Carvone verilen ratların testis dokularında Bax ve kaspaz-3 genlerinin aşağı yönlü ve Bcl-2 geninin ise yukarı yönlü düzenlendiği ve böylece D-Carvone'un testis dokularında apoptoza karşı koruma sağladığını gördük (Tüm genler için $p < 0.001$).

Sıçan testislerine uygulanan iskemi reperfüzyon hasarında elde edilen doku proteinleri, Western blot analizinde kullanılmış, kaspaz-1, kaspaz-2, kaspaz-3 ve Bax mRNA'sının sürekli olarak yukarı yönlü düzenlendiği tespit edilmiştir (Jeffrey ve ark., 2000). Zaki ve ark.'ları yapmış oldukları çalışmada lityum ile tiroid bezinde hasar oluşturmuşlar ve oluşan hasar sonucunda yaptıkları Western blot analizinde apoptotik sinyal yolunda önemli rol oynayan kaspaz-3 ve Bax ifadelerinde artma, Bcl-2 ifadesinde ise azalma olduğunu tespit etmişlerdir (Zaki ve ark., 2022). Sıçanlarda lityum ile indüklenen nefrotoksisite ile ilgili bir çalışmada elde edilen Western blot analizi sonuçlarına göre kaspaz-3, NF- κ B-p65, IL-1 β ve TNF- α protein ifadelerinde yükselme, Bcl-2 ifadesinde ise azalma olduğu tespit edilmiştir (Erbaş ve ark.,2024). Hong ve ark.'ları yaptıkları çalışma ile lityum-pilokarpin kaynaklı epileptik sıçanlarda depresyon ve anksiyete benzeri davranışların önemli ölçüde arttığını ve özellikle mikroglialarda P2X7 reseptörü ekspresyonunun belirgin şekilde arttığını göstermişlerdir (Hong ve ark., 2020).

Çalışmamızda testis dokusu protein ekspresyonu analizinde, gruplar arası karşılaştırmalar yapılmış, NFκB-p65, IL-1β, TNF-α, P2X7 ve kaspaz-3 proteinlerinin Lityum grubunda anlamlı şekilde ($p<0.05$) arttığını, Bcl-2 proteinin ise anlamlı şekilde azaldığını gözlemledik. Ancak, Lityum+D-Carvone gruplarında bu proteinlerin ekspresyon düzeylerinin anlamlı şekilde tam tersi duruma dönerek ($p<0.05$) kontrol grubu seviyesine yaklaştığını belirledik. Yalnızca D-Carvone uygulaması, kontrol grubuna yakın sonuçlar vermiştir ve inflamatuvar proteinlerde belirgin bir artış görülmemiştir. Bu sonuçlar, D-Carvone'un inflamatuvar yanıtı baskıladığını ve hücresel stresi azaltma eğilimi gösterdiğini vurgulamaktadır.

Lityum iyonu kan testis bariyerinden geçebildiğinden, gelişen cinsiyet hücrelerini etkiler ve spermatozoonların seminifer epitelden olgunlaşmasını ve salınımını bozarak, hücre farklılaşma ve büyüme döngüsünü durdurur, sonuç olarak toplam sperm sayısının azalmasına neden olur (Banerji ve ark., 2001). Çeşitli çalışmalar, uzun süreli lityum tedavisi gören erkeklerde, azalmış steroidojenik aktivite ve spermatogenez sürecindeki verimliliğin düşüşü gibi komplikasyonların gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Bir Viscacha türü (*Lagostomus maximus maximus*) üzerinde yapılan araştırmada, 35 gün süresince lityum enjeksiyonu uygulamasının, Leydig hücrelerinde dejenerasyona yol açtığı, bunun sonucunda plazma testosteron seviyelerinin belirgin şekilde düştüğü ve sperm solüsyonunda sperm hareketliliği ve canlılığının anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Garacia Aseff, Fuentes, 1995; Thakur ve ark., 2003). 2024 yılında yapılan başka bir çalışmada lityum karbonat verilen sıçanlarda epididimal sperm canlılık oranının azalmış olduğu, sperm morfolojik değerlendirmesinde anormal sperm yüzdesinde ve kuyruk anomali yüzdesinde artış olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar literatürde lityum uygulamasının sperm canlılık oranı ve morfolojisinde oluşturduğu hasarla benzerlik göstermektedir. Lityum, hücrede kolesterol agregasyonunu uyarır, membran kolesterolü

yükseldiğinde, hücre zarının akışkanlığı azalır. Bunun sonucunda akrozom reaksiyon indeksi azalır ve anormal sperm sayısının artması gibi zara bağlı fonksiyonlar bozulur (Mert, 2024). 2023 yılında yapılan çalışmada sisplatin ile meydana gelen testis hasarında silymarinin, koruyucu etkileri morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmiştir. Yapılan analizlere göre germinal epitel kalınlığı, tubulus seminiferi contorti çapı, bazal lamina kalınlığı, bazal tabaka kalınlığı, tunica albuginea kalınlığı, arter çapı, peritübüler atrofi oranı değerleri, sperm morfolojisi, sperm sayısı, sperm ölü-canlı oranı, inhibin A seviyeleri açısından gruplar arasında anlamlı farklılıklar olduğu görülmüştür (Şahmelikoğlu, 2023).

Lityum ile oluşturulan testis hasarına karşı D-Carvone'un etkilerini araştırmak için yaptığımız çalışmada gruplardaki sıçanların sperm kalitesi üzerindeki etkilerini karşılaştıran sonuçlara baktığımız zaman, D-Carvone grubunda en yüksek motilite oranını gözlemledik. Lityum+D-Carvone grubu da Lityum grubuna göre daha yüksek motilite değerlerine sahip olmuştur. Bu durum bize D-Carvone'un lityumun sperm hareketliliği üzerindeki olumsuz etkilerini azaltabileceği göstermiş oldu. D-Carvone grubunda ise sperm yoğunluğunun en yüksek düzeyde olduğunu tespit ettik. Lityum+D-Carvone grubu da Lityum grubuna göre daha yüksek sperm yoğunluğuna sahipti. Bu durum, D-Carvone'un sperm üretimini artırdığı ve sperm kaybını azalttığı anlamına gelmektedir. Tüm gruplarda anormal sperm oranlarını benzer bulduk. Ancak, D-Carvone ve Lityum+D-Carvone gruplarında anormal baş ve kuyruk spermatozoa oranlarını Lityum grubuna göre biraz daha düşük çıkmıştır. Bu da D-Carvone'un sperm morfolojisi üzerinde olumlu bir etkiye sahip olabileceğini düşündürmektedir. Çalışmamızın sonuçlarına göre, D-Carvone'un sperm kalitesi üzerinde olumlu etkileri olduğunu söylenebiliriz. D-Carvone, sperm motilitesini, yoğunluğunu ve morfolojisini iyileştirmektedir. Lityumun sperm kalitesi üzerinde olumsuz etkileri olduğunu

bilmektedir ve çalışmamızda da bu durum kısmen doğrulanmış oldu. D-Carvone'un etkisi ile lityumunun toksik etkileri kısmen azaltılmış oldu. Ancak, bu bulguların klinik uygulamalara dönüştürülmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Lityum tıp alanında ilk olarak 1800'lü yıllarda depresyon tedavisinde kullanılmaya başlanmış ve lityum karbonat ile tedavi edilen hastalarda iyileşme sağlanmıştır. Ancak, psikiyatrik bozukluklarda lityum kullanımının yaygınlaşması ile birlikte, tedaviye bağlı yan etkiler de artmıştır. Uzun süreli lityum kullanımı sonucunda, üreme sistemi de dahil olmak çeşitli organlarda hasarların olduğu bilinmektedir. Yaptığımız bu tez çalışmasında, lityum ile indüklenen testis hasarına karşı D-Carvone'un tedavi edici etkilerini histopatolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle araştırdık. Lityumun neden olduğu hasarda oksidatif stres, inflamasyon ve apoptozun rolünü ve D-Carvone'un bu mekanizmalar üzerindeki etkisini inceledik.

Yaptığımız histopatolojik incelemelerde, D-Carvone tedavisinin testis dokusundaki yapısal bozulmaları kısmen düzelttiğini, özellikle germ hücrelerinin düzeninde ve morfolojilerinde iyileşmenin olduğunu ve tübüler morfolojinin de daha düzgün bir hale geldiğini belirledik. Yine yapmış olduğumuz immünohistokimyasal boyamalarda kullandığımız TNF- α ve IL-1 β antikoru ile yapılan immünreaktivite skorlamasına göre D-Carvone'un, lityumun neden olduğu doku inflamasyonunu ve oksidatif hasarı azalttığını tespit ettik.

Biyokimyasal analizlerde D-Carvone'un tedavi edici etkisini doğrular nitelikteydi. Lityum ile oluşturulan testis hasarına karşı uyguladığımız D-Carvone tedavisi, lipid peroksidasyonu ile ilişkili olan MDA seviyesinin azalmasına, ayrıca glutatyon (GSH) depolarının yeniden yükselmesine neden olmuştu. D-Carvone'un anti-inflamatuar etkileri doğrultusunda, NF- κ B transkripsiyon faktörünün ve pro-inflamatuar sitokinler olan TNF- α ve IL-1 β genlerinin baskılanmasına neden olduğunu gözlemledik. Bunun yanı sıra, D-Carvone'un apoptozla ilişkili Bax ve kaspaz-3 genlerinin ekspresyonunu azalttığını, Bcl-2 geninin aktivasyonunu artırdığını ve böylece testis dokusunda apoptozu engellediğini

tespit ettik. Testis dokusunda yapılan protein ekspresyon analizleri de D-Carvone'un inflamatuvar yanıtı baskıladığını ve hücrel stresi azaltma eğiliminde olduğunu göstermiştir. Son olarak, D-Carvone'un sperm kalitesi üzerinde olumlu etkiler gösterdiği, sperm motilitesi, yoğunluğu ve morfolojisini iyileştirdiği tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışma, D-Carvone'un lityumun toksik etkilerinden kaynaklanan testis hasarını kısmen iyileştirme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. D-Carvone'un anti-inflamatuvar, antioksidan ve anti-apoptotik etkileri sayesinde, lityum hasarının yan etkilerini hafifletilebileceği ve böylece testis sağlığının korunabileceği ortaya konulmuştur. Bu bulgular, D-Carvone'un, lityumun yan etkilerini azaltmak amacıyla potansiyel bir terapötik ajan olarak kullanılabileceğini işaret etmektedir. Ancak, bu bulguların klinik uygulamalara dönüştürülebilmesi için daha fazla araştırmaya ve daha geniş kapsamlı klinik denemelere ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pober, J. S. (1994). *Cellular and Molecular Immunology* (2nd ed.). Philadelphia, PA: W. B. Saunders.
- Abbas, B. W., & Kathem, S. H. (2021). Carvone attenuates irinotecan-induced intestinal mucositis and diarrhea in mice. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(2), 58–63.
- Abbas, M. M., Kandil, Y. İ., & Abbas, M. A. (2020). R-(-)-carvone attenuated doxorubicin-induced cardiotoxicity in vivo and potentiated its anticancer toxicity in vitro. *Balkan Medical Journal*, 37(2), 98–103.
- Açıkel Elmas, M. (2018). Diyetle indüklenen obezitede egzersizin testis morfolojisi, hücre proliferasyonu ve kan testis bariyeri üzerine etkilerinin incelenmesi (Doktora Tezi). Marmara Üniversitesi. <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/283278>
- Algılanı, S. A. (2022). *Monosodyum glutamat ile oluşturulan testis hasarında aposininin iyileştirici etkisi* (Yüksek Lisans Tezi). Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi.
- Alsanea, S., & Liu, D. (2017). BITC and S-carvone restrain high-fat diet-induced obesity and ameliorate hepatic steatosis and insulin resistance. *Pharmaceutical Research*, 34(11), 2241–2249. <https://doi.org/10.1007/s11095-017-2177-y>
- Altınbaş, K., Yeşilbaş, D., İnce, B., Cansız, A., Silan, F., & Gülöksüz, S. (2017). İki uçlu bozukluk hastalarında lityuma yanıt ile GSK-3 β polimorfizmi ilişkisinin değerlendirilmesi. *Türk Psikiyatri Dergisi*, 28(1), 1-6.
- Altun, S. (2018). *Sıçanlarda (R)-(+ ve (S)-(-) Carvone'un Penisilin ile Oluşturulmuş Epileptiform Aktivite Üzerine Etkisi* (Yüksek Lisans Tezi). Düzce Üniversitesi, Düzce. <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/86589>

- Ambrosio, C. M., de Alencar, S. M., de Sousa, R. L., Moreno, A. M., & Da Gloria, E. M. (2017). Antimicrobial activity of several essential oils on pathogenic and beneficial bacteria. *Industrial Crops and Products*, 97, 128–136.
- Aral, H., & Vecchio-Sadus, A. (2008). Toxicity of lithium to humans and the environment—a literature review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3), 349-356.
- Aşçı, R. (2013). *Erkek üreme sistemi hastalıkları ve tedavisi* (1. Basım). İstanbul: Medikal Sağlık ve Yayıncılık Hiz. Tic. Ltd.
- Atreya, I., Atreya, R., & Neurath, M. F. (2008). NF-kappaB in inflammatory bowel disease. *Journal of Internal Medicine*, 263, 591-596.
- Aydın, E., Türkeş, H., & Keleş, M. S. (2015). Potential anticancer activity of carvone in N2a neuroblastoma cell line. *Toxicol Ind Health*, 31(8), 764–772. <https://doi.org/10.1177/0748233713484660>
- Baeuerle, P. A. (1998). Pro-inflammatory signaling: Last pieces in the NF-κB puzzle? *Current Biology*, 8(1), 19-22.
- Banerji, T. K., Maitra, S. K., Dey, M., & Hawkins, H. K. (2001). Gametogenic responses of the testis in spotted munia (*Lonchura punctulata*, Aves) to oral administration of lithium chloride. *Endocrine Research*, 27(3), 345-356.
- Baldwin, A. S. (2001). The transcription factor NF-κB and human disease. *The Journal of Clinical Investigation*, 107(1), 3-6.
- Bayramova, A. (2022). *Karbon tetraklorür uygulanan sıçanlarda kurkuminin testis üzerindeki koruyucu etkisi* (Yüksek Lisans Tezi). Bülent Ecevit Üniversitesi, Zonguldak.

- Bedford, J. J., Weggery, S., Ellis, G., McDonald, F. J., Joyce, P. R., Leader, J. P., et al. (2008). Lithium-induced nephrogenic diabetes insipidus: Renal effects of amiloride. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 3(3), 1324-1331.
- Blank, V., Kourilsky, P., & Israël, A. (1992). NF- κ B and related proteins: Rel/dorsal homologues meet ankyrin-like repeats. *Trends in Biochemical Sciences*, 17(4), 135-140.
- Bradley, J. R. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *Journal of Pathology*, 214, 149-160.
- Cade, J. F. J. (1949). Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. *Medical Journal of Australia*, 2, 349-352.
- Callard, R., & Gearing, A. (1994). *The cytokine facts book*. Academic Press.
- Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N., & Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 3666-3670.
- Constentino, K., Hertlein, V., Jenner, A., Mund, M., Ries, J., & Saez, G. A. J. (2022). The interplay between Bax and Bak tunes apoptotic pore growth to control mitochondrial DNA-mediated inflammation. *Molecular Cell*, 82, 933-949.
- Cotrina, M. L., & Nedergaard, M. (2009). Physiological and pathological functions of P2X7 receptor in the spinal cord. *Purinergic Signal*, 5, 223-232.
- Cupp, A. S., & Skinner, M. K. (2005). Embryonic Sertoli cell differentiation. *Sertoli Cell Biology*, 1, 43-70.

- Çomaklı, S., İleritürk, M., & Manavoğlu Kirman, E. (2020). Rutinin ratlarda kolistin kaynaklı testis hasarında oksidatif DNA hasarı, NF-κB aracılı enflamasyon ve apoptoz üzerindeki koruyucu etkileri. *Türk Doğa ve Fen Dergisi*, 9(2), 83-90. <https://doi.org/10.46810/tdfd.809231>
- Dağdeviren, T. (2021). Programlı hücre ölümü; apoptoz. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3), 120-135.
- Dai, M., Wu, L., Yu, K., Xu, R., Wei, Y., Chinnathambi, A., Alahmadi, T. A., & Zhou, M. (2020). D-Carvone inhibit cerebral ischemia/reperfusion induced inflammatory response TLR4/NLRP3 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 132, 110870. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110870>
- Denlinger, L. C., Fiset, P. L., Sommer, J. A., Watters, J. J., Prabhu, U., Dubyak, G. R., et al. (2001). Cutting edge: the nucleotide receptor P2X7 contains multiple protein- and lipid-interaction motifs including a potential binding site for bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of Immunology*, 167, 1871-1876.
- El-Mallakh, R. S., & Wyatt, R. J. (1995). The Na, K-ATPase hypothesis for bipolar illness. *Biological Psychiatry*, 37, 235-244.
- Engel, T., Gomez-Villafuertes, R., Tanaka, K., Mesuret, G., Sanz-Rodriguez, A., Garcia-Huerta, P., et al. (2012). Seizure suppression and neuroprotection by targeting the purinergic P2X7 receptor during status epilepticus in mice. *The FASEB Journal*, 26, 1616-1628.
- Erbaş, E., Gelen, V., & Öztürk, E. (2024). Sıçanlarda lityumla oluşturulan karaciğer hasarı modelinde D-karvonun enflamasyon, apoptoz ve hücre hasarı üzerindeki terapötik etkisi. *Türk Veterinerlik Araştırmaları Dergisi*, 8(2), 95-101. <https://doi.org/10.47748/tjvr.1428357>

- Erbaş, E., Üstündağ, H., Öztürk, E., Parlak, S. N., & Atcalı, T. (2024). Astaxanthin treatment reduces kidney damage and facilitates antioxidant recovery in lithium-intoxicated rats. *Toxicon*, 241, 107664.
- Eroğlu, M. Z., & Özpoyraz, N. (2010). Bipolar bozuklukta koruyucu tedavi. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 2(2), 206-236.
- Erol, M. K., & Tuzlacı, E. (1997). Eğirdir (Isparta) yöresinin geleneksel halk ilacı olarak kullanılan bitkileri. XI. Bitkisel Hammaddeleri Toplantısı, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Ankara.
- Fedchenko, N., & Reifenrath, J. (2014). Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue—a review. *Diagnostic Pathology*, 9, 1-12.
- Ferlazzo, N., Micali, A., Marini, H. R., Freni, J., Santoro, G., Puzzolo, D., Squadrito, F., Pallio, G., Navarra, M., Cirmi, S., & Minutoli, L. (2021). A Flavonoid-Rich Extract from Bergamot Juice, Alone or in Association with Curcumin and Resveratrol, Shows Protective Effects in a Murine Model of Cadmium-Induced Testicular Injury. *Pharmaceuticals*, 14(5), 386. <https://doi.org/10.3390/ph14050386>
- Ferrari, D., La Sala, A., Chiozzi, P., Morelli, A., Falzoni, S., Girolomoni, G., et al. (2000). The P2 purinergic receptors of human dendritic cells: identification and coupling to cytokine release. *The FASEB Journal*, 14, 2466-2476.
- Garacia Aseff, S., & Fuentes, L. B. (1995). Lithium effect on testicular tissue of adult male and female viscacha. *Acta Physiologica et Pharmacologica*, 45(1), 87-95.
- Garrod, A. B. (1859). *The nature and treatment of gout and rheumatic gout*. Walton and Maberly.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2007). *Erkek genital sistemi* (3. Basım, s. 490). Saunders.

- Ghajari, G., Nabiuni, M., & Amini, E. (2021). The association between testicular toxicity induced by Li₂Co₃ and protective effect of Ganoderma lucidum: Alteration of Bax & c-Kit genes expression. *Tissue & Cell*, 72, 101552.
- Gilbert, S. F. (2000). *Gelişimsel Biyoloji* (6. Basım,) Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Gilda, J. E., & Gomes, A. V. (2013). Stain-Free total protein staining is a superior loading control to β -actin for Western blots. *Analytical Biochemistry*, 440(2), 186-188.
- Gobe, G., Rubin, M., & Williams, G. (2002). Apoptosis and expression of Bcl-2, Bcl-XL and Bax in renal cell carcinomas. *Cancer Investigation*, 20, 324-332.
- Goines, P. E., & Ashwood, P. (2013). Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment. *Neurotoxicology and Teratology*, 36, 67-81.
- Gopalakrishnan, T., Ganapathy, S., Veeran, V., & Namasivayam, N. (2019). Preventive effect of d-carvone during DMBA induced mouse skin tumorigenesis by modulating xenobiotic metabolism and induction of apoptotic events. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111, 178–187.
- Guloksuz, S., Altinbas, K., Cetin, E. A., Kenis, G., Gazioglu, S. B., Deniz, G., ..., & van Os, J. (2012). Evidence for an association between tumor necrosis factor-alpha levels and lithium response. *Journal of Affective Disorders*, 143(1-3), 148-152.
- Güleryüz, N. (2019). Suprafizyolojik dozda kullanılan nandrolon decanoate'ın oluşturduğu testis hasarına karşı curcumin'in etkisi. *Açık Bilim Veritabanı*. <https://acikbilim.yok.gov.tr/handle/20.500.12812/253870>
- Gürel, Ç. (2018). *Doksorubisin ile indüklenen sıçan testis hasarı modelinde fluvastatinin olası koruyucu ve tedavi edici etkilerinin histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi* (Yüksek Lisans Tezi). Ege Üniversitesi.

- Hammond, W. A. (1871). *A Treatise on Diseases of the Nervous System*. New York: Appleton.
- Hassa, H. (2003). *İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve in vivo laboratuvar uygulamaları*. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basımevi.
- Hess, R. A., & de Franca, L. R. (2009). Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* (pp. 1-15). Springer New York.
- Himmerich, H., Koethe, D., Schuld, A., Yassouridis, A., & Pollmächer, T. (2005). Plasma levels of leptin and endogenous immune modulators during treatment with carbamazepine or lithium. *Psychopharmacology*, 179, 447-451.
- Hong, S., Xin, Y., JiaWen, W., ShuQin, Z., GuiLian, Z., HaiQin, W., ... & YongNan, L. (2020). The P2X7 receptor in activated microglia promotes depression-and anxiety-like behaviors in lithium-pilocarpine induced epileptic rats. *Neurochemistry International*, 138, 104773.
- Hull, M., Lee, E., Lee, T., Anand, N., LaLone, V., & Parameswaran, N. (2014). Lithium chloride induces TNF α in mouse macrophages via MEK-ERK-dependent pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*, 115, 71-80.
- Illes, P., Verkhratsky, A., Burnstock, G., & Franke, H. (2012). P2X receptors and their roles in astroglia in the central and peripheral nervous system. *Neuroscientist*, 18(5), 422-438.
- Işık, E., Işıkk, U., & Taner, Y. I. (2013). *Depresif ve bipolar bozukluklar* (ss. 327-474). Rotatıp Yayınları.
- Jaafar, H., Yusof, M. I., Din, T. A. D., & Rashid, F. A. (2010). Relationship between apoptotic markers Bcl-2, Bax, and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus. *Singapore Medical Journal*, 51(1), 5-9.

- Jayaprakasha, G. K., Jena, B. S., Negi, P. S., & Sakariah, K. K. (2002). Evaluation of antioxidant activities and antimutagenicity of turmeric oil: A byproduct from curcumin production. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 57(9-10), 828–835. <https://doi.org/10.1515/znc-2002-9-1013>
- Jimenez-Pacheco, A., Mesuret, G., Sanz-Rodriguez, A., Tanaka, K., Mooney, C., Conroy, R., et al. (2013). Increased neocortical expression of the P2X7 receptor after status epilepticus and anticonvulsant effect of P2X7 receptor antagonist A-438079. *Epilepsia*, 54(9), 1551-1561.
- Johnsen, S. G. (1970). Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*, 1(1), 2-25.
- Joshi, D. K., Chauhan, D. S., Pathak, A. K., Mishra, S., Choudhary, M., Singh, V. P., & Tripathi, S. (2013). Lithium potentiate oxidative burden and reduced antioxidant status in different rat organs system. *International Journal of Toxicology and Pharmacology Research*, 5(1), 9-14.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2009). *Temel histoloji: Text & Atlas* (11. basım). (S. Solakoğlu, Y. Aytekin, Çev.). Nobel Tıp Kitabevleri. (Orijinal eser, 2009, Basic histology, text & atlas).
- Kaya, H. (2014). *Erişkin erkek sıçanlarda lityum karbonat ile oluşturulan testis hasarı üzerine E vitamininin etkisi*. (Yüksek lisans tezi). Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye.
- Kızılay, F., & Altay, B. (2019). Spermatogenez, spermiyogenezis ve klinik yansımaları. *Androloji Bülteni*, 21(4), 177-184. <https://doi.org/10.24898/tandro.2019.27443>

- Koca, R. H., Hürkul, M. M., Kurt, S., & Koroğlu, A. (2020). Wistar Albino Sıçanlarda *Michauxia campanuloides* L'Hér.'in Bazı Sperma Parametreleri Üzerine Etkisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 15(2), 138-144.
- Kucharz, E. J., Sierakowski, S., Staite, N. D., & Goodwin, J. S. (1988). Mechanism of lithium-induced augmentation of T-cell proliferation. *International Journal of Immunopharmacology*, 10, 253-259.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage-T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Larsen, B. D., & Sorensen, C. S. (2017). The caspase 3 activated dnase, apoptosis and beyond. *FEBS Journal*, 284(8), 1164.
- Lee, D. C. W., & Lau, A. S. Y. (2011). Effects of Panax ginseng on Tumor Necrosis Factor- α -Mediated Inflammation: A Mini-Review. *Molecules*, 16(4), 2802-2816.
- Li, D., Miao, S., & Zhuang, K. S. C. (2018). PI3K/Akt and caspase 3 pathways mediate oxidative stress-induced chondrocyte apoptosis. *Cell Stress and Chaperones*. Springer.
- Li, H., Gao, L., Shen, Z., Li, C. Y., Li, K., et al. (2008). Association study of NFKB1 and SUMO4 polymorphisms in Chinese patients with psoriasis vulgaris. *Archives of Dermatological Research*, 300(8), 425-33.
- Li, S., & Long, S. (2001). Effects of manganese, zircon, and lithium alone on rat liver lipid peroxidation. *Wei Sheng Yan Jiu*, 30(3), 142-143.
- Li, Y., Wang, H., & Wang, Y. (2024). Cadmium Exposure Induces Inflammation Through Oxidative Stress-Mediated Activation of the NF- κ B Signaling Pathway and Causes Heat Shock Response in a Piglet Testis. *Biological Trace Element Research*, 1-11.

- Lima, C. F., Carvalho, F., Fernandes, E., Bastos, M. L., Santos-Gomes, P. C., Fernandes-Ferreira, M., et al. (2004). Evaluation of toxic/protective effects of the essential oil of *Salvia officinalis* on freshly isolated rat hepatocytes. *Toxicology in Vitro*, 18, 457–465.
- Liu, K. J., Lee, Y. L., Yang, Y. Y., Shih, N. Y., Ho, C. C., Wu, Y. C., Huang, T. S., Huang, M. C., Liu, H. C., Shen, W. W., & Leu, S. J. (2011). Modulation of the development of human monocyte-derived dendritic cells by lithium chloride. *Journal of Cellular Physiology*, 226, 424-433.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402-408.
- Livingstone, C., & Rampes, H. (2006). Lithium: A review of its metabolic adverse effects. *Journal of Psychopharmacology*, 20(3), 347-355.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
- Lv, L., Yang, N., Cao, Y., Dang, J., Cheng, L., El-Sheikh, M. A., et al. (2021). D-carvone inhibits the JAK/STAT3 signaling pathway and induced the apoptotic cell death in the human gastric cancer AGS cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(5), 1–7.
- Lysiak, J. J., Turner, S. D., & Turner, T. T. (2000). Sıçan testisinin iskemi/reperfüzyonunu takip eden germ hücre apoptozunun moleküler yolu. *Üreme Biyolojisi*, 63(5), 1465-1472. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1465>

- Madisch, A., Holtmann, G., Mayr, G., et al. (2004). Treatment of functional dyspepsia with a herbal preparation. A double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *Digestion*, 69(1), 45–52.
- Maeda, S., & Omata, M. (2008). Inflammation and cancer: Role of nuclear factor-kappaB activation. *Cancer Science*, 99, 836-42.
- Mahboubi, M. (2019). Caraway as important medicinal plants in management of diseases. *Natural Products and Bioprospecting*, 9(1), 1-11.
- Male, D., Cooke, A., Owen, M., Trowsdale, J., & Champion, B. (1996). *Advanced Immunology*. St. Louis, MO: Mosby.
- Malhi, G. S., Tanious, M., Das, P., Coulston, C. M., & Berk, M. (2013). Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder. *CNS Drugs*, 27(2), 135-153.
- Matsebatlela, T., Gallicchio, V., & Becker, R. (2012). Lithium modulates cancer cell growth, apoptosis, gene expression and cytokine production in HL-60 promyelocytic leukaemia cells and their drug-resistant sub-clones. *Biological Trace Element Research*, 149, 323-330.
- Matur, E., Akyol, S., Toplan, S., Ozdemir, S., Akyazı, I., & Dariyerli, N. (2024). Impact of Lithium on the Immune System: An Investigation of T-Cell Subpopulations and Cytokine Responses in Rats. *Biological Trace Element Research*, 1-9.
- Mert, F. (2024). *Erişkin erkek sıçanlarda lityum karbonat ile oluşturulan üreme toksisitesinde quercetinin koruyucu etkisinin araştırılması*. (Doktora tezi). Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye.
- Mescher, A. L. (2015). *Junqueira's basic histology: Text and atlas* (14. baskı). McGraw Hill Medical. <https://www.researchgate.net/publication/283490690>

- Middendorff, R., Müller, D., Mewe, M., Mukhopadhyay, A. K., Holstein, A. F., & Davidoff, M. S. (2002). The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87(7), 3486-3499.
- Miguel, M. G. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. *Molecules*, 15(12), 9252–9287.
<https://doi.org/10.3390/molecules15129252>
- Mitchell, S. W. (1870). On the use of bromide of lithium. *American Journal of the Medical Sciences*, 60, 443-445.
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2011). *The developing human: Clinically oriented embryology* (9th ed.). Elsevier Health Sciences.
- Moursı, S. M. M., Narm, M., & Ashour, M. D., W. M. (2021). Obestatinin sıçanlarda testis iskemi/reperfüzyon yaralanması üzerindeki koruyucu etkisi. *Kahire Üniversitesi Tıp Dergisi*, 89(6), 797-805.
<https://doi.org/10.21608/mjcu.2021.168014>
- Neta, R., Oppenheim, J. J., & Gillis, S. (1987). The in-vivo effects of interleukin-1. I. Bone marrow cells are induced to cycle after administration of interleukin-1. *Journal of Immunology*, 139(6), 1861.
- Nguyen Thanh T., Phuoc D., Thuan D., Le M. T., & Nguyen Vu Quoc H. (2020). Assessment of testis histopathological changes and spermatogenesis in male mice exposed to chronic scrotal heat stress. *Journal of Animal Behaviour and Biometeorology*, 8, 174-180.
- North, R. A. (2002). Molecular physiology of P2X receptors. *Physiological Reviews*, 82, 1013-1067.

- Ogaly, H. A., Aldulmani, S. A. A., Al-Zahrani, F. A. M., & Abd-Elsalam, R. M. (2022). D-Carvone attenuates CCl4-induced liver fibrosis in rats by inhibiting oxidative stress and TGF- β 1/SMAD3 signaling pathway. *Biology*, 11(5), 739. <https://doi.org/10.3390/biology11050739>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
- Oktem, F., Ozguner, F., Sulak, O., Olgar, Ş., Akturk, O., Yilmaz, H. R., & Altuntas, I. (2005). Lithium-induced renal toxicity in rats: protection by a novel antioxidant caffeic acid phenethyl ester. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 277, 109-115.
- Ommati, M. M., Arabnezhad, M. R., Farshad, O., Jamshidzadeh, A., Niknahad, H., Retana-Marquez, S., ... & Heidari, R. (2021). The role of mitochondrial impairment and oxidative stress in the pathogenesis of lithium-induced reproductive toxicity in male mice. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 603262.
- O'Shea, J. J., & Murray, P. J. (2008). Cytokine signaling modules in inflammatory responses. *Immunity*, 28(4), 477-487.
- Özgüner, M., Şenol, A., Ural, M., & İşler, M. (2004). Deneysel hipertiroidinin erişkin sıçan testis dokusunda oluşturduğu histolojik değişiklikler. *Medical Journal of Süleyman Demirel University*, 11(4).
- Öztürk, M. O., & Uluşahin, A. (2008). *Ruh sağlığı ve bozuklukları* (11. Baskı). Nobel Tıp Kitabevi.
- Pekkoç, Ç. U. (2016). *IL6 ve IL1B genlerindeki belirli varyantların otizmle ilişkisi* (Yayınlanmamış Yüksek Lisans Tezi). İstanbul Üniversitesi.

- Pennica, D., Hayflick, J. S., Bringman, T. S., Palladino, M. A., & Goeddel, D. V. (1985). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the cDNA for murine tumor necrosis factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82, 6060-6064.
- Petersein, C., Sack, U., Mergl, R., Schönherr, J., Schmidt, F. M., Lichtblau, N., ... & Himmerich, H. (2015). Impact of lithium alone and in combination with antidepressants on cytokine production in vitro. *Journal of Neural Transmission*, 122, 109-122.
- Rajeswary, S., Mathew, N., Akbarsha, M. A., Kalyanasundram, M., & Kumaran, B. (2007). Protective effect of vitamin E against carbendazim-induced testicular toxicity: Histopathological evidences and reduced residue levels in testis and serum. *Archives of Toxicology*, 81, 813-821.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2006). *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Saad, A. B., Rjeibi, I., Alimi, H., Ncib, S., Smida, A., Zouari, N., et al. (2017). Lithium-induced oxidative stress and related damages in testes and heart in male rats: The protective effects of *Malva sylvestris* extract. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 86, 127-135.
- Sadler, T. W. (2011). *Langman tıbbi embriyoloji* (A. C. Başaklar, Çev.). (11. baskı). Palme Yayıncılık. Ankara.
- Sancak, B., Cumhuri, M., & Vakfi, O. G. (2002). *Fonksiyonel anatomi: Baş-boyun ve iç organlar*. ODTÜ Geliştirme Vakfı.
- Schioldann, J. A. (2001). *The Lange theory of "periodical depressions"*. Adelaide Academic Press.
- Sedlak, J., & Lindsay, R. H. (1968). Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, 25(1), 192-205.

- Seo, S., Lee, K. G., Shin, J. S., Chung, E. K., Lee, J. Y., Kim, H. J., & Lee, K. T. (2016). 60-O-Caffeoyldihydrosyringin isolated from *Aster glehni* suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression via NF- κ B and AP-1 inactivation in RAW 264.7 macrophages. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26(33), 4592-4598.
- Shahzad, B., Tanveer, M., Hassan, W., Shah, A. N., Anjum, S. A., Cheema, S. A., & Ali, I. (2016). Lithium toxicity in plants: Reasons, mechanisms, and remediation possibilities—A review. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 104-115.
- Sharma, S., Gao, P., Steele, V. E. (2010). Quantitative morphometry of respiratory tract epithelial cells as a tool for testing chemopreventive agent efficacy. *Anticancer Research*, 30(3), 737-742.
- Shorter, E. (2009). The history of lithium therapy. *Bipolar Disorders*, 11(1), 4-9.
- Singh, R., Letai, A., & Sarosiek, K. (2019). Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(3), 175-193.
- Skinner, M. K., & Griswold, M. D. (Ed.). (2005). *Sertoli cell biology*. Elsevier Academic Press.
- Sperlagh, B., & Illes, P. (2007). Purinergic modulation of microglial cell activation. *Purinergic Signal*, 3(1-2), 117-127.
- Sperlágh, B., Vizi, E. S., Wirkner, K., & Illes, P. (2006). P2X7 receptors in the nervous system. *Progress in Neurobiology*, 78(6), 327-346.
- Sullivan, R., Légaré, C., Lamontagne-Proulx, J., Breton, S., & Soulet, D. (2019). Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology*, 7(5), 748-757.

- Şahmelikoğlu, A. G. (2023). *Sıçanlarda sisplatin ile oluşturulan testis hasarı üzerine silymarin'in olası etkilerinin morfolojik olarak incelenmesi* (Yayımlanmamış yüksek lisans tezi). Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Aydın. adudspace.adu.edu.tr
- Şeftalioğlu, A. (2003). *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi* (4. Baskı). Alp Ofset Matbaacılık. Ankara.
- Tan, P. P., Zhou, B. H., Zhao, W. P., Jia, L. S., Liu, J., & Wang, H. W. (2018). Mitochondria-mediated pathway regulates C2C12 cell apoptosis induced by fluoride. *Biological Trace Element Research*, 185(2), 440-447.
- Thakur, S. C., Thakur, S. S., Chaube, S. K., & Singh, S. P. (2003). Subchronic supplementation of Lithium carbonate induces reproductive system toxicity in male rat. *Reproductive Toxicology*, 17, 683-690.
- Toghiani, T., Gholami, M., Zendedel, A., & Assadollahi, V. (2012). The effects of low-dose lithium carbonate on the spermatogenic parameter in the adults male wistar rats. *Life Sciences Journal*, 9(4), 4360-4367.
- Toghyani, S., Dashti, G. R., Roudbari, N. H., Rouzbehani, S., & Monajemi, R. (2013). Lithium carbonate inducing disorders in three parameters of rat sperm. *Advances in Biomedical Research*, 2, 55-81.
- Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2008). *Principles of Anatomy and Physiology*. John Wiley & Sons.
- Trinh, D. V., Zhu, N., Farhang, G., Kim, B. J., & Huxford, T. (2008). The nuclear I κ B protein I κ B ζ specifically binds NF- κ B p50 homodimers and forms a ternary complex on κ B DNA. *Journal of Molecular Biology*, 379(1), 122-135.

- Vieweg, W. V., Godleski, L. S., Hundley, P. L., & Yank, G. R. (1988). Lithium, polyuria and abnormal diurnal weight gain in psychosis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 78(4), 510-514.
- Wickert, L. E., Blanchette, J. B., Waldschmidt, N. V., Bertics, P. J., Denu, J. M., Denlinger, L. C., et al. (2013). The C-terminus of human nucleotide receptor P2X7 is critical for receptor oligomerization and N-linked glycosylation. *PLoS One*, 8(5), e63789.
- Wiley, J. S., & Gu, B. J. (2012). A new role for the P2X7 receptor: a scavenger receptor for bacteria and apoptotic cells in the absence of serum and extracellular ATP. *Purinergic Signalling*, 8(3), 579-586.
- Won, E., & Kim, Y. K. (2017). An oldie but goodie: lithium in the treatment of bipolar disorder through neuroprotective and neurotrophic mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(12), 2679.
- Yıldırım, Ö. (2015). *Sıçanlarda sisplatin kaynaklı testis hasarına karşı propolisin koruyucu etkisinin araştırılması* (Yüksek lisans tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi.
- Yılmaz, A. (2009). Spermatogonial kök hücreleri ve transplantasyonu. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 46(2), 145-154.
- Yüksel, N. (Editör). (2010). *Temel Psikofarmakoloji* (ss. 719-788). Türkiye Psikiyatri Derneği Yayınları.
- Zaki, S. M., Hussein, G. H. A., Helal, G. M., Arsanyos, S. F., & Abd Algaleel, W. A. (2022). Green tea extract modulates lithium-induced thyroid follicular cell damage in rats. *Folia Morphologica*, 81(3), 594-605.

- Zarnescu, O., & Zamfirescu, G. (2006). Effects of lithium carbonate on rat seminiferous tubules: an ultrastructural study. *International Journal of Andrology*, 29(6), 576-582.
- Zhang, Y., Li, Y., & Zhang, J. (2021). Cadmium induced inflammation and apoptosis of porcine epididymis via activating RAF1/MEK/ERK and NF- κ B pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 415, 115449.
- Zhao, M., & Du, J. (2020). Anti-inflammatory and protective effects of d-carvone on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in mice. *Journal of King Saud University- Science*, 32(2), 1592-1596.

EKLER

EK-1. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

	SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ Graduate School of Health Sciences	
ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹		
Öğrencinin Adı ve Soyadı		
Öğrencinin Numarası		
Ana Dilim Dalı		
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Yüksek Lisans	
Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.		
Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 1	% 15
II. Genel Bilgiler	% 7	% 35
III. Materyal ve Metod	% 34	% 35
IV. Bulgular	% 7	% 15
V. Tartışma	% 3	% 20
<i>Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.</i>		
¹ Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp tezin Ekler kısmına EK-1 olarak eklenmelidir.		

EK-2. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük



Sayı :
Konu : HADYEK Kararı.

02.02.2024

VETERİNER FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 25.01.2024 tarihli ve 2024/01 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 26 no'lu kararı ile sözkonusu araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, katılanların oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhüname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.

TOPLANTI TARİHİ :

TOPLANTI SAYISI : 2024/01

KARAR N0 26: Atatürk Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Veteriner Hekimliği Temel Bilimleri Bölümü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi I yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülecek olan "**Sıçanlarda Lityum ile Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine D-Carvone'un Etkilerinin Araştırılması**" başlıklı tez çalışması ile ilgili Veteriner Fakültesi Dekanlığının 23.01.2024 tarih ve E-36643897-000-2400024632 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen araştırma çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, katılanların oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.