



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**SIÇANLARDA TESTİS DOKUSUNDA NAF TOKSİSİTESİNE KARŞI
QUERCETİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

Tıpta Uzmanlık Tezi

Salih Yahya AKSANYAR

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Nigâr VARDI

MALATYA - 2018



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**SIÇANLARDA TESTİS DOKUSUNDA NaF TOKSİSİTESİNE KARŞI
QUERCETİNİN KORUYUCU ETKİSİ**

Tıpta Uzmanlık Tezi

Salih Yahya AKSANYAR

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Nigâr VARDI

Bu tez, T.C. İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından
2018/995 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA - 2018

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ.....	vii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Flor.....	3
2.2. Quercetin.....	7
2.3. Testis Embriyolojisi.....	10
2.4. Testis Histolojisi	13
2.5. Testis Anatomisi	18
2.6. Testis Fizyolojisi.....	20
3. MATERYAL VE METOT	22
3.1. Araştırma Tipi.....	22
3.2. Araştırma Yeri ve Ortamı	22
3.3. Deney Grupları	22
3.4. Anestezi:	22
3.5. Deneysel Uygulama.....	23
3.6. Işık Mikroskopik Teknikler	23
3.6.1. Doku Takibi.....	23
3.6.2. Mayers'in Hematoxylin&Eosin Metodu	24
3.6.3. Periodic Acid Schiff (PAS) Boyama Metodu	26
3.6.4. Caspase 3 İmmünohistokimya Boyama Metodu	26
3.7. Biyokimyasal Analiz.....	28
3.8. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Histolojik Bulgular	32
4.2. Biyokimyasal Bulgular	54

5. TARTIŞMA.....	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR	62
EKLER.....	74
EK 1: ÖZGEÇMİŞ.....	74



TEŞEKKÜR

Asistan olarak görev yaptığım süreç içerisinde uzmanlık eğitimime katkıda bulunmak ve tecrübelerini aktarmak için emek veren, tezim konusunda bana yol gösteren ve destek olan hocam Prof. Dr. Nigâr VARDI'ya, her türlü bilgi ve beceri kazanımlarımda desteklerini esirgemeyen hocam, Prof. Dr. Mehmet GÜL'e, anabilim dalımızdaki değerli öğretim üyelerinden; Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE ve Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE hocalarıma, biyokimya çalışmalarımında yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi M. Erman ERDEMLİ ve istatistiksel analizlerde desteğini esirgemeyen Dr. Öğr. Üyesi Harika GÖZÜKARA BAĞ hocalarıma saygılarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yetişip bu günlere gelmemde en çok emeği olan, hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme, her zaman destek bulduğum eşim Behiye AKSANYAR'a, görevim süresince güzel bir çalışma ortamında birlikte bulunduğumuz, her konuda yardımını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı mesai arkadaşlarım Arş. Gör. Semir GÜL, Arş. Gör. Dr. Emrah Zayman, Arş. Gör. Dr. Mehmet Mustafa ERDOĞAN'a, Arş. Gör. Azibe YILDIZ'a, Arş. Gör. C. Ceren GÜL'e, Arş. Gör. Birgül YİĞİTCAN'a, laboratuvarında her zaman yardımını esirgemeyen Sn. Leyla YURTSEVEN'e ayrıca teşekkür ederim.

ÖZET

Sıçanlarda Testis Dokusunda NaF Toksisitesine Karşı Quercetin'in Koruyucu Etkisi

Amaç: NaF'ın diş sağlığı için tedavi edici olarak kullanılması sonucu vücuda alınmasının yanısıra topikal uygulamalar, içme suyuna katılması veya tablet gibi sistemik kullanımları ile de NaF'e maruziyet oluşabilmektedir. Çalışmamızda, NaF maruziyeti sonucu testis dokusunda meydana gelebilecek hasar ve bu hasara karşı quercetin'in koruyucu etkinliğini histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelemeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda kontrol grubu, mısır yağı grubu, NaF grubu, quercetin grubu ve NaF+quercetin grubu sıçanların testis dokularında histolojik ve immunohistokimyasal yöntemler, testis dokusu ve serumda ise biyokimyasal yöntemler ile incelemeler yapılmıştır.

Bulgular: NaF grubu HE boyamalarda, seminifer tübüllerin sınırlarında düzensizlik, germinatif epitelde dejenerasyon, dökülme, lümende hücresele artefaktlar izlendi, bazal membrandan ayrılma gözlenirken, NaF+Qr grubunda bu bulguların gözlenmediği tespit edildi. NaF+Qr grubunda seminifer tübüller genellikle normal histolojik görünümde olmakla birlikte yer yer düzensiz sınırlı seminifer tübüller ve bazal membranlarında incelme, epitelde dökülme gibi bulgular da izlendi. Kontrol grubuna kıyasla C-3 boyanmada NaF grubunda pozitif boyanmada artış gözlemlendi. NaF+Qr grubunda ise kontrol grubuna kıyasla immunoreaktivite artışı mevcut olup NaF grubuna kıyaslandığında ise C-3 boyanma daha az olarak izlendi. NaF grubunda kontrol grubundan farklı olan biyokimyasal parametrelerin NaF+QR grubunda kontrol grubuna benzer olduğu tespit edildi. Biyokimyasal olarak oksidatif stres parametreleri NaF grubunda artmış olarak gözlenirken antioksidan sistem parametreleri ve hormon düzeyleri de azalmış olarak izlendi. NaF+QR grubunda ise bu değerlerde düzelme gözlemlendi.

Sonuçlar: Bulgular değerlendirildiğinde, NaF maruziyeti uyguladığımız grupta testis dokusunda histolojik ve biyokimyasal hasarların yanında kan testosteron, LH ve FSH hormon düzeylerinde azalma izlendi. NaF+QR grubu değerlendirildiğinde, quercetin uygulamasının, NaF maruziyetine bağlı testiküler hasarı azaltma ve bozulan hormonal düzeylerin dengelenmesi yönünde etkili olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Testis, Sodyum Florür, Quercetin, Mikroskop.

ABSTRACT

Protective Effect of Quercetin Against Naf Toxicity In Testicular Tissue of Rats

Objective: NaF is used as a therapeutic agent for dental health, as well as taken to body in many ways. NaF exposure may occur as a result of topical applications, introduction to drinking water or systemic use such as tablets. It has been stated that damage to various organs and tissues may occur as a result of this exposure. In our study, we aimed to investigate the protective effect of quercetin with the antioxidative, free radical scavenging and cytoprotective effects on the testis tissue as a result of NaF exposure and histological and biochemical methods.

Materials and Methods: In our study, histological and immunohistochemical methods, and serum biochemical methods were performed in testis tissues of control group, corn oil group, NaF group, quercetin group and NaF + quercetin group rats.

Results: Hematoxylin-eosin staining showed irregularity at the boundaries of the seminiferous tubules, degeneration of the germinative epithelium, separation from the basement membrane. Caspase 3 staining showed an increase in the Naf group whereas it was nearly normal in Q+Naf group.

Conclusions: When the findings were evaluated, blood testosterone, LH and FSH hormone levels were decreased in addition to histological and biochemical damages in the testis tissue in the NaF exposure group. For this reason, it is thought that the use of quercetin in people with endemic fluorosis due to shaip to source waters containing high fluoride in our country or due to dental treatment may be contributing to the prevention of the decrease of testosterone levels in histological and biochemical aspects of testicular tissue in individuals who have been exposed to NaF exposure.

Key Words: Testis, Sodium Fluoride, Quercetin, Microscopy.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

dk	: Dakika
C-3	: Caspase 3
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
g	: Gram
GSH	: Redükte Glutasyon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HE	: Hematoksilen&Eozin
İHC	: İmmunohistokimya
iNOS	: Nitrik Oksit Sentetaz
i.p.	: İntraperitoneal
K	: Potasyum
Kg	: Kilogram
LDL	: Düşük Dansiteli Lipoproteinler
MDA	: Malondialdehit
ml	: Mililitre
Mg	: Miligram
MY	: Mısır yağı
Na	: Sodyum
NaF	: Sodyum Florür
Ng	: Nanogram
NO	: Nitrik Oksit
PAS	: Periyodik Asit-Schiff
PBS	: Phosphate Buffered Saline
Qr	: Quercetin
SD	: Standart Sapma
SF	: Serum Fizyolojik
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
TAS	: Total Antioksidan Kapasite
TOS	: Total Oksidan Kapasite

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1: Quercetin'in moleküler yapısı	7
Şekil 2.2: Testis ve genital kanalların şematik gösterimi.	13
Şekil 2.3: Spermatogenik hücre serileri ve Sertoli hücrelerinin şematik gösterimi.....	18
Şekil 4.1: Kontrol grubu, Normal histolojik görünümde seminifer tübüller	33
Şekil 4.2: Kontrol grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller	33
Şekil 4.3: Kontrol grubu, normal histolojik görünümdeki seminifer tübül lümeninde spermatozoonlar, ve interstisiyel bağ dokusu	34
Şekil 4.4: Kontrol grubu, peritübüler alanda Leydig hücreleri.....	34
Şekil 4.5: Kontrol grubu, peritübüler bazal membran normal yapıda	35
Şekil 4.6: Kontrol grubu, seminifer tübüllerde düşük yoğunlukta, diffüz C-3 immünoreaktivite pozitifliği	36
Şekil 4.7: Mısır yağı grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller	37
Şekil 4.8: Mısır yağı grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller	37
Şekil 4.9: Mısır yağı grubu, normal histolojik görünümdeki seminifer tübül lümeninde spermatozoonlar, ve interstisiyel bağ dokusu	38
Şekil 4.10: Mısır yağı grubu, peritübüler alanda Leydig hücresi, damar	38
Şekil 4.11: Mısır yağı grubu, peritübüler bazal membran normal yapıda	39
Şekil 4.12: Mısır yağı grubu, seminifer tübüllerde düşük yoğunlukta, diffüz C-3 immünoreaktivite pozitifliği	39
Şekil 4.13: Quercetin grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller	40
Şekil 4.14: Quercetin grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller	40
Şekil 4.15: Quercetin grubu, normal histolojik görünümdeki seminifer tübül lümeninde spermatozoonlar, ve interstisiyel bağ dokusu	41
Şekil 4.16: Quercetin grubu, peritübüler alanda Leydig hücresi, damar	41
Şekil 4.17: Quercetin grubu, peritübüler bazal membran normal yapıda	42
Şekil 4.18: Quercetin grubu, seminifer tübüllerde düşük yoğunlukta, diffüz C-3 immünoreaktivite pozitifliği	42
Şekil 4.19: NaF grubu, seminifer epitelin tamamen yokluğu, seminifer tübüllerde hasar, seminifer tübül sınırlarında ondülasyon	43

Şekil 4.20: NaF grubu, seminifer tübüllerde total germinatif hücre kaybı, interstisyel alanda ödem.....	44
Şekil 4.21: NaF grubu, seminifer tübüllerde total germinatif hücre kaybı, interstisyel alanda ödem.....	44
Şekil 4.22: NaF grubu, seminifer tübüllerde total germinatif hücre kaybı, interstisyel alanda ödem, seminifer tübül lümeninde dejenere hücre artıkları.	45
Şekil 4.23: NaF grubu, peritübüler bazal membranında incelmeye ve ondülasyon, seminifer tübüllerde germinatif epitel dejenerasyonu.....	46
Şekil 4.24: NaF grubu, seminifer tübüllerde orta ve kuvvetli derece boyanma yoğunluğunda diffüz C-3 immünoreaktivite pozitifliği	47
Şekil 4.25: NaF + Quercetin grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller, seminifer tübül lümeninde dejenere hücreler.....	49
Şekil 4.26: NaF + Quercetin grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller, seminifer tübülde germinatif epitel dejenerasyonu.....	49
Şekil 4.27: NaF + Quercetin grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller, normal histolojik yapıda interstisyel bağ dokusu alan	50
Şekil 4.28: NaF + Quercetin grubu, peritübüler alanda Leydig hücresi	50
Şekil 4.29: NaF + Quercetin grubu, normal yapıda peritübüler bazal membran.....	51
Şekil 4.30: NaF + quercetin grubu, seminifer tübüllerde hafif ve orta derece boyanma yoğunluğunda diffüz C-3 immünoreaktivite pozitifliği.....	52
Şekil 4.31: Johnsen skoru grafiği.....	54

TABLolar DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Histolojik Doku Takip Prosedürü	24
Tablo 3.2. HE Boyama Prosedürü.....	25
Tablo 3.3. Johnsens's skoru değerlendirme kriterleri.....	25
Tablo 3.4. PAS Boyama Metodu	26
Tablo 3.5. İmmünohistokimya Boyama Metodu	27
Tablo 4.1. Tübül çapları	53
Tablo 4.2. Johnsens ve H Skor tabloları.....	54
Tablo 4.3. Oksidatif stres parametreleri	56
Tablo 4.4. Serum hormon düzeyleri.....	56

1. GİRİŞ

Flor insan vücudunda eser element olarak bulunur. Kalsiyuma karşı olan yüksek afinitesi nedeni ile en yoğun bulunduğu doku kemik ve dişlerdir (1). Günümüzde Flor diş çürüklerini engellemek amacıyla tüm dünyada yaygın olarak kullanılan, etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış tek ajan olarak kabul edilmektedir (2). Dünya Sağlık Örgütü tarafından diş çürüğü ile mücadelede birçok farklı alanda ve formda kullanılması önerilmektedir (3). Bu amaçla sodyum florür (NaF) en yaygın olarak diş macunlarının içerisine eklenerek ve içme suyuna eklemek şeklinde kullanılmaktadır (2,4,5). NaF ayrıca diş hastalıklarının tedavisinde (3), osteoporoz tedavisinde (6) ve medikal görüntüleme (7) gibi farklı alanlarda yaygın olarak kullanılır. Bununla birlikte aşırı flor alımının toksik etkilere sebep olduğu, bağırsak, mide, kalp, beyin, böbrek, sinir ve kaslarda hasar oluşturduğu, doku ve organlara zarar verdiği gösterilmiştir (8,9). Toksik etki mekanizması tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte erkek üreme sistemi üzerinde yapılan çalışmalarda başta sertoli hücreleri olmak üzere NaF'in, oksidatif strese neden olarak testis dokusunda hasarlayıcı etki oluşturduğu gösterilmiştir (10).

Quercetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) 3 halka ve 5 hidroksil grubundan oluşan flavonoidlerin en yaygın olanıdır (11). Yağda çözünebilen quercetin flavonoid adı verilen bileşikler grubuna dahildir ve bu flavonoidler bitkilerde yaygın şekilde bulunmaktadır. Quercetin, kırmızı soğan, üzüm, elma, çilek, kiraz, brokoli, narenciye (12) çay, kahve, eğreltiotu ve doğal boyalar gibi birçok bitki ve besin ürünüde bulunmaktadır (13). Flavonoid grubu fitokimyasalların biyosentezinin, bitkilerin kendi ortamlarında bir savunma cevabı olduğu bilinmektedir. Bitkilerde üretilen flavonoidler bitkileri UV güneş ışığından ve lipid peroksidasyonundan koruyucu etkiye sahiptir (14). Ayrıca quercetin, lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu etkinliği deneysel çalışmalarla deney hayvanlarında, ve insanlarda gösterilmiştir. Bununla birlikte quercetin, antihipertansif, antidepresan, antiaritmik, antihiperaljezik, hipokolesterolemik, antihepatotoksik, antikanserijenik, antiülser, antiviral, antitrombotik, antiiskemik, antiinflamatuvar ve antialerjik etkileri olduğu da gösterilmiştir (15) Günümüzde quercetin'in en iyi tanımlanmış olan etkisi antioksidan özelliğidir. Quercetin hücre ve dokuları serbest oksijen

radikallerine karşı korumada en güçlü flavonoidlerden biri olduğu görülmektedir. Toksik ajanlara maruziyet ve olağan metabolik süreçlerde ortaya çıkan serbest radikallerin aşırı artışının hücresel fonksiyonları etkilemesi açısından en önemli olay, hücre ölümüne yol açabilen lipid peroksidasyonudur. Canlı organizmalar bu hücresel ölümün gerçekleşmesini engellemek için bazı enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemlerine sahiptir. Bu savunmada yer alan enzimlerden en önemlileri de süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidazdır (GPx). Ayrıca diğer bir savunma sistemi de vitamin C, vitamin A ve oksidasyon zincirini kıran quercetin gibi flavonoid grubunda yer alan fitokimyasallardır (16,17).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda NaF toksisitesi sonucu erkek sıçan testislerinde meydana gelen değişikliklerin histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle gösterilmesi ve Quercetin uygulamasının bu değişiklikler üzerine koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Flor

Flor, 9 atom numarası, 19 atom ağırlığı olan, periyodik cetvelde halojenler olarak isimlendirilen 7A grubunda yer alan, kahverengimsi sarı renkte bir elementtir. Flor su, kaya, hava, toprak, bitkiler, hayvan ve insan vücudunda bulunur. Flor vücutta bulunan temel elementlerden biridir. İskelet sistemi ve dişlerin yapısında yer alır (1, 18, 19). Flor tüm elementler içerisinde elektonegatifliği en yüksek ve en aktif olan elementtir. Bu özelliği sayesinde doğadaki diğer elementlerle bileşikler yaparak tuz formunda bulunur ve bu tuz formu florid olarak adlandırılır. Bu tuzların başlıcaları sodyum florid (NaF) ve kalsiyum floriddir (CaF₂) (18) .

Toprağın jeokimyasal yapısına, iklime, toprak formuna, yağış miktarına, buharlaşmaya, toprağın floru emme ve süzme kapasitesine bağlı olarak sulardaki flor miktarı değişkenlik gösterir (20). Florun % 80-90'ı pasif difüzyonla Gastrointestinal sistemden'den emilir. Flor bileşiğinin çeşidine, dozuna, çözünübilirliğine ve Gastrointestinal sistemin içeriğine göre emilen flor miktarı değişir. Vücuttan böbrek, gis, ve deri yoluyla atılan flor, diğer vücut sıvılarında çok düşük miktarda bulunur. Böbreklerden atılan flor, içilen suyun konsantrasyonu <2 ppm iken 0.1 mg/saat olarak belirlenmiştir. Beslenme tarzı, fiziksel aktivite, bulunulan rakım gibi faktörler, idrar pH'sını değiştirdiği için, atılan flor miktarını değiştirebilmektedir. Asidik idrara neden olan etkenler flor atılımını azaltırken, bazik idrar pH'ı ise flor atılımını hızlandırmaktadır. Vücuda alınan Flor yumuşak dokularda çok az bulunur. Florun asıl depo edildiği yer kalsiyuma bağlanma isteği nedeniyle iskelet sistemi ve dişlerdir ve %95'inden fazlası iskelet sisteminde bulunur. Yaşa, alınan flor miktarına, kemik çeşidine göre, kemik dokudaki flor konsantrasyonları değişmektedir. Kişinin küçük yaşta olması ve kemik metabolizma hızı ne kadar yüksek ise, flor tutulumu o kadar fazla olur. Flor konsantrasyonları, uzun kemiklerde periosteal bölgede ve kompakt kemiklere kıyasla süngerimsi kemiklerde, daha yüksektir (21). Vücutta bulunan florun %95'i yaklaşık 2-3 gr kadardır ve iskelet sistemi ile dişlerde bulunur. Kanda ise 13 mg kadar flor vardır. (1)

Sodyum Florür, osteoporoz tedavisi (4), medikal görüntüleme (22) gibi farklı alanlarda yaygın olarak kullanılmakla birlikte en yaygın kullanımı diş çürüklerini önlemek amacıyla kullanımınıdır (3). Bu kullanımlar sistemik olarak tablet veya damla şeklinde yada topikal kullanımı şeklinde olabilir. Lokal NaF uygulamaları, profesyonel veya bireysel olabilir. Profesyonel olarak uygulanan lokal NaF uygulamaları; 5000 ve 19.000 ppm arasında konsantrasyona sahiptirler. Bunlar florür solüsyonları, florlu jeller, florlu vernikler, iyonoferez ve ağız içi flor salan cihazlar şeklinde sıralanır. Bireysel uygulamalar ise kişinin kendi tarafından alınan ürünlerdir. Bunlar, florlu gargaralar ve diş macunları gibi mililitresinde 0,2 ile 1 mg NaF içeren, 200 ile 1000 ppm aralığında NaF konsantrasyonuna sahiptir (23).

İnsanlarda ve hayvanlarda hızlı gelişen flor zehirlenmesinde başlıca bağırsak, mide, böbrek, akciğer, kalp, beyin, sinir ve kaslarda hasar medana getirip, çeşitli enzimlerde inhibisyona neden olabilir. Kalsiyum ile bağlanması sonucu oluşan düşük kalsiyum seviyesi, yüksek potasyum seviyesi ve hücrel oksijen kullanımının azalması sonucu çeşitli durumlar ortaya çıkabilmektedir. Kalsiyum düzeyindeki düşme sonucu miyokardın kasılma yeteneğinde azalma, düzensiz atımlar, sistolde ve diyastolde bozukluklar bu durumların en ciddi olanlarıdır. Uzun dönemde meydana gelen flor zehirlenmesinde bunlara ek olarak, kemik, tiroid bezi, hipofiz, hipotalamus, testis hasarı ile dişlerdeki bozukluklar dikkat çekmektedir (24).

Güney Afrika'da da içme sularında yüksek oranda floride maruz kalan 6–15 yaş çocuklarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda artmış guatr insidansına rastlanmıştır. (25)

Michael ve arkadaşlarının Hindistan'da yaptıkları bir çalışmada, sularda yüksek NaF bulunan bölgelerde yaşayanların tiroksin düzeylerinin önemli ölçüde arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada serum triiyodotironin (T3) ve tiroid stimüle edici hormon (TSH) düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar saptanmamıştır. Yine bu çalışmada serum epinefrin ve norepinefrin düzeylerine bakılmış ve yükselme saptanmıştır (26).

Isparta'da içme sularında yüksek düzeyde bulunan flor, nüfusun %69'ununun yüksek miktarda flor almasına sebep olduğu 1976 yılında yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Aynı zamanda bölgede dişlerde florozis görülme oranının yüksek olduğu bildirilmiştir (27).

Yapılan bir çalışmada akut flor zehirlenmesinin sonucunda koyalarda eritrosit sayısı, hemoglobin ve hematokrit değerlerindeki düşüş tespit edilmiş ve bu düşüşün istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde olduğu gösterilmiştir. Akut flor zehirlenmesi vakalarında florun enzim inhibitörü etkisi gösterdiği, hücrelerde aerobik glikoliz ve hücre sel solunumun bozulduğu, asidoz meydana geldiği, şok, koma ve kardiyak aritmi oluşabildiği bildirilmektedir. (20)

A. K. Susheela and A. Kumar çalışmalarında 29 ay boyunca tavşanlara oral yolla 10 mg / kg dozunda NaF verilmişlerdir. Çalışma sonunda uygulama yapılan tavşanlarda, testis dokusunda seminifer tübüllerin spermatozoonlardan yoksun olduğunu ve spermatogenezin durduğunu tespit etmişlerdir. Taramalı elektron mikroskopik incelemede spermatogenik seri hücrelerinde bozulma ve dejenerasyon, seminifer tübüller fibrotik nodüler yapıda izlenmiştir. Histolojik kesitlerde spermatogenik seri hücrelerinde eozinofilik boyanma yoğunluğunda artış, stoplazmik büzüşme ve piknoz izlenmiştir. Ayrıca bazı hücrelerin nükleus sınırları düzensiz, girintili çıkıntılı olup yoğun heterokromatik yapıda görülmüştür. Ductuli efferents epitel hücrelerinde silya kaybı saptanmıştır. (28)

Fizyolojik dozun üzerinde, kronik olarak flor alınması, flor toksisitesine sebep olmaktadır. Kronik flor toksisitesinde diş ve kemiklerde bozukluklar (florozis) görülebilmektedir. NaF'ün kemikte birikimiyle iskelet sistemi deformasyonu, büyüme geriliği görülebilenken, yumuşak dokuda ancak çok yüksek miktarlarda alındığında birikime bağlı zararlı etkiler oluşabilmektedir

İnsanlarda ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda kronik flor maruziyetinin oksidatif stresi arttırdığı gösterilmiştir. Oksidatif stresteki artışın glutatyon peroksidaz ve süperoksid dismütaz aktivitelerinin azalması ile oluştuğu bildirilmektedir. Akdoğan ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada NaF verilen tavşanlarda glutatyon peroksidaz ve süperoksid dismütaz aktivitelerinin azaldığını ve bunun miyokard hasarına yol açtığını göstermişlerdir. (25)

NaF kolinesteraz enzim aktivitesindeki azalmaya neden olduğu gösterilmiş, yüksek NaF ve düşük iyotun birlikte olduğu durumlarda kolinesteraz enzim aktivitesinde azalma daha belirgin olmaktadır.

Kronik florozis sonrası nöron membranlarında lipit peroksidasyonuna bağlı değişimler saptanmıştır. ROT oluşumu, MDA gibi lipit peroksidasyon ürünleri ve GSH gibi antioksidan savunma sistem belirteçlerinde azalmalar NaF'ün toksik etkisi gösteren

önemli noktalar. Beyin dokusu çoklu doymamış lipitlerden zengin olması nedeni ile oksidatif hasara diğer doku ve organlara göre daha duyarlıdır. Bu sebeple NaF'un hasar mekanizmasında en önemli etken olan oksidatif stres, ciddi nörotoksik etki gösterebilir. (29)

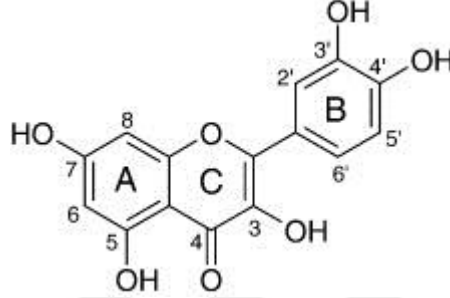
Sıçanlara 75 gün boyunca içme suları ile 4.5 ppm ve 9.0 ppm dozunda NaF uygulanan bir çalışmada sıçanlarda vücut ağırlığında kontrol grubu sıçanlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalma gözlenmiştir. Kontrol grubunda sıçanlarda, kauda epididimiste ortalama sperm sayısı $42 \pm 3,23$ milyon/g olarak tespit edilmiştir. 4.5 ppm NaF uygulanan sıçanlarda kontrol grubuna kıyasla sperm sayısında % 31.4 oranında azalma gözlenmiştir ($P < 0.001$). sperm sayısındaki bu azalma, 9.0 ppm NaF uygulanan sıçanlarda % 78.2 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada NaF uygulanan sıçanların sperm motilitesinde ($P < 0.001$) ve canlılığında belirgin bir azalma gösterilmiştir. Kontrol sıçanlarında tüm spermlerin morfolojisi normaldi. NaF uygulanan sıçanlarda, kontrol grubuna kıyasla, spermlerde yaygın olarak morfolojik değişiklikler gözlemlenmiştir. Bu değişikliklerin başlıcaları çift başlı, baş deformiteli, uzun kuyruklu ve çift kuyruklu spermler şeklinde görülmüştür (30)

Ruifen Wei ve arkadaşları farelere içme suyuna katarak 50 ve 100 mg/L dozunda uyguladıkları NaF maruziyeti çalışmasında, spermatozoon anomalilerinde önemli ölçüde artış olduğunu göstermişlerdir. NaF uygulanan grupta düzensiz seminifer tübül epiteli, spermatogenik seri hücrelerinde vakuolizasyon, seminifer tübül lümeninde spermatozoonların yokluğu ve yer yer seminifer tübül epitelinde dökülme ve dejenerasyon gözlemlenmişlerdir. Ayrıca aynı çalışmada kronik NaF maruziyetinin, testislerde interlökin-17 (IL-17), interlökin-17 reseptörü C (IL-17RC), tümör nekroz faktörü-a (TNF-a) ve transkripsiyonel seviyelerde interlökin-6 (IL-6) ve translasyonel seviyelerde IL-17 ve TNF-a seviyelerinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir.

NaF konsantrasyonlarının artışına bağlı olarak sperm kalitesindeki bozulma önemli ölçüde artmıştır. Kontrol grubu ile kıyaslandığında 50 ve 100 mg/L NaF uygulanan farelerde anormal sperm görülme oranlarında anlamlı olarak artış saptanmıştır (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). (31)

2.2. Quercetin

Quercetin (3,3'',4'',5,6- pentahidroksiflavon), flavanoid grubu güçlü bir antioksidandır (32, 33)



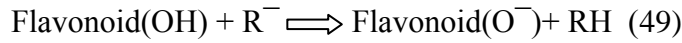
Şekil 2.1: Quercetin'in moleküler yapısı (34)

Antioksidan etkinliği quercetin'in kimyasal yapısındaki hidroksil (-OH) ve katekol tip B halkasının ve bulunduğu bölgeden kaynaklanmaktadır (35, 36). Birçok çalışmada quercetin antioksidan özellikleri sayesinde, oksidatif stres hasarına karşı kullanılan bir fenolik bileşiktir (37). Quercetin, bir ya da daha fazla şeker grubunun fenolik gruplara bağlanmasıyla oluşan bitkilerin temel olarak yapraklarında üretilir (38). Quercetin, vücutta reaktif oksijen türlerinin(ROT) meydana getirdiği hasarlara karşı kullanılabilir, yan etkisi çok az olan veya olmayan, antioksidan etkisi en güçlü flavonoidlerden birisi olarak bilinmektedir. Quercetin'in antioksidan yeteneği, endojen olarak da ROT'nin sebep olduğu hücre hasarını engellemekte etkilidir (39). Quercetin'in en iyi tanımlanmış olan etkisi antioksidan özelliği olmakla birlikte başka birçok yararlı özelliği de tanımlanmıştır. Bu etkilerini sıralamamız gerekirse; antihipertansif, antidepresan, antihiperalejik, antiaritmik, antihepatotoksik, antikanserojenik, hipokolesterolemik, antiülser, antiviral, antitrombotik, antiiskemik, antiinflamatuvar ve antialerjik etki (40). Hollman ve arkadaşları flavonoidlerin 23 mg günlük alımının olduğunu (41). Bununla birlikte Hollanda'da quercetin'in de günlük –alım miktarını 16 mg olarak bildirmişlerdir (42). Başka bir çalışmada da yiyeceklerle 26 mg/gün flavonoid alımının olduğu belirlenirken, baskın olarak bulunan flavonoidin quercetin olduğu saptanmıştır (43, 44).

Quercetin 3-8 saat dağılım yarı ömrü, 8-16 saat eliminasyon yarı ömrü olduğu gösterilmiştir. Diyetle alınan quercetin'in absorpsiyonundan önce %90'dan fazlası barsaklarda, %3'ü ise karaciğerde metabolize olmaktadır. Quercetin lipofilik

antioksidanlardandır. (35) Flavonoidler, yiyeceklerde genellikle glikozid şeklinde bulunur ve molekülleri büyük yapıdadır. Bundan dolayı bağırsaklarda emilimleri zordur. Gastrointestinal sistemde serbest fenolik kısım ayrılır. Çünkü bunların bağırsaktan emilebilmesi için küçük molekül ağırlıklı formlara dönüşmeleri gerekir. Bağırsak florasında bulunan mikroorganizmalar, flavonoid glikozidlerinin küçük molekül ağırlıklı formlara dönüşümünü gerçekleştirirler. Yaklaşık %1'i bozulmadan, büyük bir kısmı ise çeşitli hidroksiaromatik asitlere dönüştürülerek böbreklerden atılır. Quercetin'in taşınması % 98 oranda proteinlere bağlı olarak gerçekleşir. Plazma seviyesi 20-40 dk'da minimize olur, 54 dk'da tespit edilemeyecek seviyeye düşer (43, 45, 46) İnsanlarda sindirim sistemiyle önemli miktarlarda quersetinin emiliminin olduğu ve glukoz konjugasyonu ile absorpsiyonun arttığı bildirilmiştir (43) Quersetinin, en önemli öz serbest radikal süpürücü etkisi olmakla birlikte demir ve bakır gibi metalleri şelatlama etkisi de bulunan güçlü bir antioksidandır. Yapılan deneysel çalışmalarda, quersetinin kardiyovasküler sistemde, kan basıncını düşürücü etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca iskemi/reperfüzyon hasarına maruz kalan kalp dokusu üzerinde koruyucu etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (35, 36). İskemi reperfüzyon hasarında kardiyovasküler sistemin dışında testis dokusunda da iskemi-reperfüzyon hasarına karşı koruyucu rolü olduğu gösterilmiştir (47, 48).

Quercetin, serbest radikal süpürücüsü olarak ROT bileşikleri ile reaksiyona girer ve onları stabilize eder. Quersetindeki bulunan hidroksil grubu yüksek reaktiviteye sahiptir ve bu sayede ROT aşağıdaki reaksiyona göre inaktive olurlar.



Quersetin nitrik-oksit sentaz (iNOS) aktivitesi, iskemi reperfüzyon hasarını azalması yönünde etki gösterir. Nitrik oksit (NO) en çok endotel ve makrofajlar olmak üzere çeşitli hücrelerde üretilir. NO salınımı vasodilatasyonun için gereklidir. Bununla birlikte oksidatif hasar sonucu makrofajlarda NO sentazın etkisi ile yüksek konsantrasyonda NO üretilir. Aktive olmuş makrofajlar tarafından aynı zamanda hem NO hem de süperoksit anyonu salınır. NO ROT ile reaksiyona girer toksik etkisi yüksek bir madde olan peroksinitrit oluşur. Peroksinitrit Düşük Dansiteli Lipoprotein (LDL)'yi oksitleyerek plazmalemmada irreversible hasar oluşturur. Quercetin antioksidan olarak kullanıldığında serbest radikalleri azaltır, dolayısıyla NO ile reaksiyona girecek serbest radikal miktarı azaldığından oluşacak peroksinitrit ve sonucunda hasar da azalır. Ayrıca

NO kendi başına serbest radikal etkisi de gösterir ve NO'nunu quercetin tarafından direk temizlendiği de bildirilmiştir (50)

İskemi reperfüzyon hasarında, oksidatif yolda, ksantini ürik asit üretimi meydana gelen reaksiyonu ksantin dehidrogenaz ve ksantin oksidaz enzimleri katalize eder. Normal fizyolojik durumda enzim ksantin dehidrogenaz şeklinde etki gösterirken, iskemi durumundaki ise ksantin oksidazdır formunda etki gösterir. ROT'nin kaynağı iskemi reperfüzyon durumlarında Ksantin oksidazdır. Ksantin oksidaz reperfüzyon fazında moleküler oksijenle reaksiyon verir ve ROT oluşur. Quercetin, ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ederek de oksidatif hasarı azaltır (51)

Siklooksijenazlar ve lipooksijenazlar, genel inflamatuvar cevabı başlatan araşidonik asitin salınımını sağlarlar. Nötrofiller lipooksijenazlar ile araşidonik asitten kemotaktik bileşiklerin ve sitokinlerin salınımını indüklerler. Quercetin siklooksijenazları ve lipooksijenazları birlikte inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterir (49).

Flavonoidler serbest radikallerle reaksiyona girerek antioksidan etkilerini gösterirler. Bu reaksiyonların önemli örnekleri aşağıdaki gibidir;

Hidroksil radikalini (OH^{\cdot}), süperoksit radikali (O_2^{\cdot}) ve singlet oksijeni temizler (52,53),

Alkoksil (RO^{\cdot})'i ve peroksil radikalini (ROO^{\cdot}) yakalar, lipid peroksit (LOO^{\cdot}) zincirini kırar (54),

Siklooksijenazlar ve lipooksijenazları inhibe eder,

Geçiş metalleri şelatlar (55),

Hücrel regülasyonda önemli bir rol oynayan, enzim fonksiyonlarına bağımlı kalsiyum modülasyonu ile bilinen ve kalmodulin inhibisyonu,

Protein kinaz inhibisyonu,

Laktat transportunun engellenmesi (56).

Serbest radikal hasarının neden olduğu kanser, inflamasyon, artrit, alerji gibi durumlarda Quercetin'in etkisini inceleyen çok sayıda çalışma yapılmıştır (45,50) Deneysel olarak toksik maddeler verilen sıçanların testis ve epididimlerinde spermatogenezis, hormon düzeyleri ve lipid yapısında bozukluklar meydana geldiği bildirilmektedir. Bu ve çalışmalarda çeşitli antioksidanlar, bozulan spermatogenezisin, ortaya çıkan testiküler doku hasarının ve değişen hormon düzeylerinin düzeltilmesi yönünde etkileri olduğu

gösterilmiş, benzer şekilde quersetinin erkek üreme işlevlerine etkileri incelenmiş ve sıçanlarda sperm kalitesini artırdığı görülmüştür (35, 36, 57).

Quersetinin güçlü antioksidan etkisi ile solunum yollarını ve akciğerleri sigara ve kirli havanın olumsuz etkilerinden korumada yardımcı olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte özellikle quersetin astım tedavisinde ve alerji tedavisinde önerilmektedir. (58,59).

Şükrü ve ark. yaptıkları “Kangal köpeği spermasının dondurulmasında farklı antioksidanlar ve kriyoprotektanların etkisi” konulu çalışmalarında TGK50 (Temel sulandırıcı + %5 Gliserol + Quersetin 50 µg/ml), TEK50 (Temel sulandırıcı + %5 Etilen Glikol + Quersetin 50 µg/ml) ve TEK200 (Temel sulandırıcı + %5 Etilen Glikol + Quersetin 200 µg/ml) gruplarının DNA bütünlüğü üzerindeki etkilerini incelemişler ve TGK200 (Temel sulandırıcı + %5 Gliserol+Quersetin 200 µg/ml) grubunun koruyucu etkisinin, istatistiksel olarak diğer gruplardan daha üstün olduğunu bildirmişlerdir. Zribi ve ark. insan spermasının dondurulması ile ilgili yapmış oldukları bir başka çalışmada da benzer sonuçları elde ettiklerini bildirmişlerdir (60,61). Silva ve ark. 48 koça ait dondurulmuş sperma örneklerinin çözünme sonrasında mitokondriyal aktivitesini araştırdıkları çalışmada, %5 gliserollü temel sulandırıcıya 5, 10, 15 ve 20 µg/ml oranlarda quersetin ekledikleri gruplarda kontrol grubuna kıyasla quersetin konsantrasyonu ile orantılı olarak artan mitokondriyal aktivite tespit etmişlerdir (62).

2.3. Testis Embriyolojisi

Embriyonun genotip olarak cinsiyeti, sekonder oositi dölleyen spermin genotipik özelliğine göre fertilizasyonda belirlenir. X kromozomu bulunduran ovumu dölleyen spermin X veya Y kromozomu taşımasına bağlıdır. Gonadlar gelişirken hangi genotipte olursa olsunlar, yedinci haftadan önce gonadların her iki cinste de aynı şekildedir, dolayısıyla farketilmemiş gonadlar olarak isimlendirilir. Y kromozomu bulunan embriyoda erkek fenotipi gelişir. Farketilmemiş gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etki Y kromozomu sayesinde sağlanır. Cinsiyet belirleyici bölge Y kromozomunun kısa kolunda SRY genini yer alır ve bu bölge Testis belirleyici faktör (TBF) için gerekli bölgedir. Farketilmemiş gonadın testise farketilmesi, Y kromozomunda bulunan TBF'nin primer seks kordonlarındaki hücrelerde sentezlenmesi ile meydana gelir. X kromozomu olduğunda

ise over gelişimiyle sonuçlanır. Sonuçta fertilizasyonda embriyodaki genotip, gonadın hangi yönde gelişeceğini belirler ve farklanmasını sağlar (63).

Gelişimin 4. haftasında primordial germ hücreleri, allantoisin başlangıç yerine yakın, vitellüs kesesi duvarında yerleşimde, endodermal hücreler ile birlikte görülmeye başlarlar. Vitellüs kesesinin dorsal parçası, embriyonun katlanması sırasında embriyo içerisine doğru yerleşir. Primordial germ hücreleri de bu göçlerinde sırada son bağırsakta dorsal mezenter boyunca ameboid hareketlerle gonadal kabartılara doğru gelirler. Primordial germ hücreleri altıncı haftada, altındaki mezenşim içerisine doğru girerek primer seks kordonlarının yapısında yer alırlar (64).

Gonadlar kaynakları;

- Mezotel epiteli
- Mezenşim
- Primordial germ hücreleridir

Gelişimin 5. Haftasında mezonefrozun medialinde, sağında ve solundaki mezotel epitelinde kalınlaşma oluşur. Mezotel ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir gonadal kabartı meydana gelir. Gonadal kabartı, kısa sürede primer seks kordonları altındaki mezenşim içerisine doğru parmak şeklinde büyür. Farklanmamış gonad, yedinci haftadan önce her iki cinsten benzerdir ve bu şekilde dışta yer alan korteks ve içte medulladan meydana gelmektedir. Eğer embriyo XX cinsiyet kromozomlarını içeriyorsa, korteksi overe farklılaşır, medullası atrofiye olur. Embriyo XY cinsiyet kromozomlarını içermekteyse, medulla testise differansiye olur, korteks atrofi ve dejenere olur (63).

İlerleyen dönemlerde testis kordonları yüzey epiteli ile olan ilişkilerini kaybeder ve testisin yüzeyi fibroz bir bağ dokusu olan tunika albuginea ile epitelden ayrılır. Gestasyonun 16-20. haftaları arasında testis kordonları U şekline dönüşür ve bu kordonlar rete testis olarak devam eder. Bu dönemde testis kordonları, germ hücreleri ve sertoli hücrelerinden meydana gelir. Testis kordonları arasında yer alan, mezenşim kökenli leydig hücreleri gonadal kordonların differansiye olmaya başlamasından sonra ortaya çıkmaktadır. Sekizinci haftada leydig hücrelerinde testosteron hormonu üretilmeye başlar

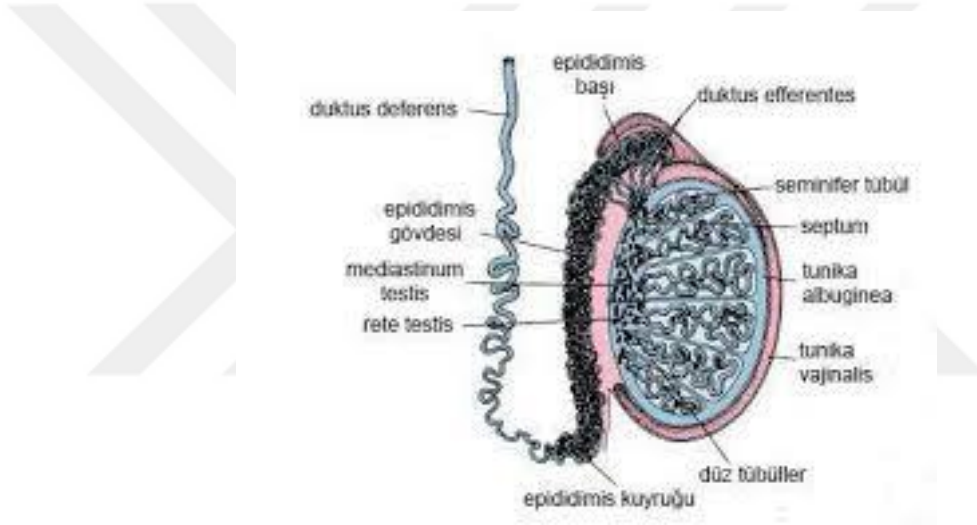
ve dış genital organların differansiye olması yönnde etki gösterir. Pubertede testis kordonlarının lümenleri açılarak seminifer tübüleri oluşturur. Seminifer tübüller kanalize olarak rete testis tübüllerine katılır ve sonrasında duktuli eferentesler ile devam ederler.

Mezonefrik (Wolffian) kanallar ana genital kanalları oluştururlar. Mezonefrik kanallar uzayarak eferent duktusların giriş yerinin hemen altından itibaren duktus epididimi meydana getirirler. Mezonefrik kanal epididimin kuyruk kısmından seminal vezikul tomurcuğuna kadar kalın bir kas kılıfı ile sarılıdır ve bu kısım duktus deferens adını almaktadır. Duktus deferensin seminal veziküllerden sonraki uzantısı ise ejakulatuar kanaldır. Erkeklerde paramezonefrik kanalın kranial ucundaki kısmı dışında tümü dejenere olmaktadır. Dejenere olmayan bölümden ise apendiks testis oluşur

Testis ve mezonefroz 2. ayın sonunda ürogenital mezenter ile karın arka duvarına bağlanır. Testisin kaudal kutbundan uzanan ekstrasellüler matriksten zengin mezenşimal yapı ise gubernakulumdur. Testisin inferiora inişini tamamlamasından önce gubernakulum inguinal bölgede internal ve eksternal abdominal oblik kaslar arasında son bulur. Testisin skrotum içine inmeye başlaması ile birlikte gubernakulumun ekstraabdominal kısmı oluşur ve inguinal bölgeden skrotal şişliğe doğru büyür. Testis inguinal kanaldan geçerken gubernakulum skrotum tabanına tutunmaktadır. Testisin inişini kontrol eden faktörler tam olarak bilinmemektedir. Testisler fetal dönemde glikoprotein bir hormon olan müllerian inhibe edici faktör (MIF) salgılamaktadır. MIF salgısını Sertoli hücreleri yapar ve puberteye kadar salgılamaya devam eder. Puberteden sonra ise seviyesi azalır. MIF, paramezonefrik duktusların gelişimini engeller. Bu dönem MIF ve androjen hormonların etkisi altında gerçekleşmektedir. Kolomik boşluğa ait periton karın ön duvarının her iki yanında vaginal proses adı verilen bir peritoneal cep oluşturur. Musküler ve fasiyal yapılarla birlikte skrotal şişliğe doğru ilerleyen vaginal prosesler inguinal kanalı meydana getirirler. Testisler inguinal kanaldan geçip skrotuma inerler ve sonrasında ise vaginal prosesin katlantısı ile sarılırlar. Testisi saran peritonun iç kısımda kalan parçası tunika vaginalisin viseral yaprağı, dış tarafta kalan parçası ise pariyetal yaprağıdır. İnternal spermatik fascia fascia transversalisten, kremaster internal oblik kastan ve eksternal spermatik fascia ise eksternal oblik kastan meydana gelir (64, 65).

2.4. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi, sperm üretiminden, sentezinden ve androjenlerin salınımından sorumlu olan testisler ve spermatozoa transferinden sorumlu olan dış kanallar sistemini meydana getiren epididimis, duktus deferens, ejakulatuar kanal, salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozoaya besinler sağlayan ek bezler, seminal vezikül, prostat bezi, bülboüretal bezlerden ve erektil dokudan oluşur. Testis deriyle kaplı bir kese olan skrotal içinde yer alır. Bu yerleşim testislerin vücut ısısından 2-3°C düşük ısıda olmalarını sağlar (66).



Şekil 2.2: Testis ve genital kanalların şematik gösterimi (67).

Her bir testis, tunika albuginea adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül tarafından çevrelenmiştir. Tunika albuginea testisin posterior yüzünde kalınlaşır, bu kalınlaşan bölgeye mediastinum testis adı verilir. Bu fibröz septa beze doğru ilerler ve testiküler lobül adı verilen yaklaşık 250 ila 300 piramidal lobüle böler. Bu lobüller arasında genellikle iletişim vardır. Her lobül etrafında gevşek bağ dokusu ile sarılı olmak üzere 1 ila 4 arasında değişen seminifer tübül içerir. Her birisi yaklaşık olarak 150 ila 250 µm çapında, 30 ila 70 cm uzunluğunda, ikili veya üçlü olarak birbiriyle anastomozlar yapan, kıvrımlı seyreden tübül oluşumlardır. Her iki testis dokusunda yaklaşık olarak 1000 tübül bulunur ve toplam uzunluk yaklaşık 500 m kadardır (21). Seminifer tübüller dışta lamina propri, iç kısımda seminifer epitel katmanı ve bu ikisi arasında bazal lamina'dan oluşur. Lamina propria yaklaşık 8 -10 µm kadardır. Tübüller arasındaki gevşek bağ dokuda, kan

damarları ve sinirler, Leydig hücreleri, ince kollajen lifler ve retiküler lifler, fibroblastlar bulunur. Seminifer epitelde temel olarak iki hücre tipi görülür. Bunlar Sertoli hücreleri ve farklı olgunlaşma seviyelerindeki spermatogenik seri hücrelerdir. Spermatogenik hücreler bazal lamina ile tübül lümeni arasını doldurmak üzere 4 ile 8 kat arası değişen şekilde düzenlenmişlerdir (66-69).

Sertoli hücreleri bazal membranın üzerine yerleşik, uzun ve piramidal biçimli apikal ve yan yüz özelleşmeleri bulunan hücrelerdir. Hücre lateral yüz membranları iç içe girintilerden oluştuğundan hücrenin lateral sınırları ışık mikroskobu ile ayırt edilemez. Lümene bakan apikal hücre yüzeyleri de oldukça girintili çıkıntılı olup seminifer tübül lümeni içine doğru çıkıntılar yapar. Sertoli hücreleri morfolojik olarak bazalde yerleşik, açık renkli olup, bir iki çentikli oval heterokromatid çekirdek ile merkezi yerleşimli büyük bir çekirdekçiğe sahiptirler (70,71).

Seminifer epiteldeki bağlantı kompleksleri; diğer bağlantılardan farklı olarak bazal membrana yakın konumu ile kendine özgü bir lokalizasyona sahiptir. Testis dokusundaki sıkı bağlantılar, seminifer epitelin üçte bir bazalinde bulunan sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarıyla oluşmaktadır ve bu kısım seminifer epiteli bazal ve abdominal kompartman olmak üzere iki kompartmana ayırır. Bazal kompartman bölgesinde spermatogonyumlar ve preleptoten spermatositler bulunurken, adluminal kompartman bölgesinde gelişmekte olan diğer germ hücreleri yer almaktadır. Bu hücreler arasında yer alan bağlantı kompleksleri nedeniyle lümen içinde bulunan hücreleri bağ dokusunun çeşitli etkilerinden koruyan bir kan-testis bariyeri oluşur. Eşeyssel olgunlaşmanın, immunolojik sistemin gelişmesinden uzun süre sonra ortaya çıkması nedeniyle farklılaşmakta olan sperm hücreleri organizma tarafından yabancı madde olarak algılanabilir ve germ hücrelerinin ölümüyle sonuçlanacak bir immün yanıtı tetikleyebilirler. Kan testis bariyeri sayesinde gelişmekte olan spermler ve immün sistem arasında ortaya çıkabilecek herhangi bir etkileşim ortadan kaldırır (67,72).

Sertoli hücreleri gelişmekte olan germ hücrelerine fiziksel ve besin desteği sağlanması, spermiyogenez sırasında ortaya çıkan fazla sitoplazmanın fagositozu, çeşitli moleküllerin sekresyonu, Anti-Müllerian Hormon sentezi gibi önemli fonksiyonları vardır. Spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar kan desteğinden kan testis bariyeri ile izole edildiğinden, bu spermatogenik hücreler, besin maddelerinin ve metabolitlerin alışverişinde sertoli hücrelerinin aracılığına ihtiyaç duyarlar. Sertoli hücrelerinin oluşturduğu

bariyer gelişen sperm hücrelerini immünolojik etkilerden korur. Fagositoz fonksiyonu; spermiyogenez sırasında ortaya çıkan fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde dökülür. Bu sitoplazmik kalıntılar sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve lizozomlar tarafından yıkılırlar. Sekresyon fonksiyonu; devamlı olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve spermilerin taşınması için kullanılan sıvıyı salgılamaktadırlar. Androjen bağlayıcı protein salgılanması, Sertoli hücreleri tarafından FSH ve testosteron etkisi altında gerçekleştirilir. Bu protein, spermatogenez için gereken testosteronun yoğunlaşmasını sağlamaktadır. Sertoli hücreleri ayrıca, testosteron hormonunu östradiyol formuna çevirebilmektedirler. Sertoli hücreleri aynı zamanda, adenohipofizden FSH sentez ve salınmasını engelleyen 'inhibin' adı verilen bir molekül salgılamaktadırlar. Anti-Müllerian Hormon Sentezi: Müllerian inhibe edici hormon olarak da isimlendirilen bu hormon embriyonik gelişim sırasında erkek fetusta Müller kanallarının gerilemesini sağlayan glikoprotein yapıda bir moleküldür. Testosteron ise Wolf kanallarından oluşan yapıların gelişmesini sağlamaktadır (67,68).

Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları granülsüz endoplazmik retikulumdan yoğundur ancak granüllü endoplazmik retikulum azdır. Mitokondriyondan zengin, Golgi kompleksi iyi gelişmiştir ve endolizozomların oluşturduğu çok sayıda veziküle sahiptir. Hücre iskeleti gelişmekte olan germ hücrelerine destek işlevi yaptıklarından bol miktardadırlar ve düşük molekül ağırlıklı sitokeratin 18 ve 19, vimentin, iyi gelişmiş aktin filamanları, ara filamanlar ve mikrotubullerden oluşur (68,71).

Seminifer epitelinin oluşturan hücreler Sertoli hücreleri ile birlikte çeşitli olgunlaşma aşamasındaki germ hücreleridir. Bu hücreler lümene doğru farklılaşma ve olgunlaşma evrelerine göre sıralanırlar. Bazalden lümene doğru; spermatogonium, primer spermatozoon, sekonder spermatozoon, erken ve geç spermatid ve spermatozoon şeklinde dizilirler. Spermatogenez puberteyle başlar ve yaşlılığa kadar sürer. Sperm olgunlaşması 70±4 günlük bir süreçte tamamlanmaktadır. Bazı lümenlerde serbest spermiyumlara rastlanırken bazılarında yalnızca spermatid gözlemlenebilir. Böylelikle her bölgesinde spermatogenezin farklı bir evresinin gözlemlendiği seminifer tübüllerde düzensiz bir görünüme yol açar. Sıçanlarda sperm gelişim döngüsü eş zamanlı olarak gerçekleşir. Her canlıda spermatogenezis evrelerinin sayısı farklıdır ve bu sayı farede 12, sıçanda 14, insanda ise 6'dır (69,72). Spermatogenezis, spermatogonyumdan başlamak üzere olgun spermiyum

oluşuncaya kadar geçen çoğalma, büyüme, maturasyon ve farklılaşma evrelerini içeren bir gelişim sürecidir. Bu hücreler arka arkaya gerçekleşen birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar.

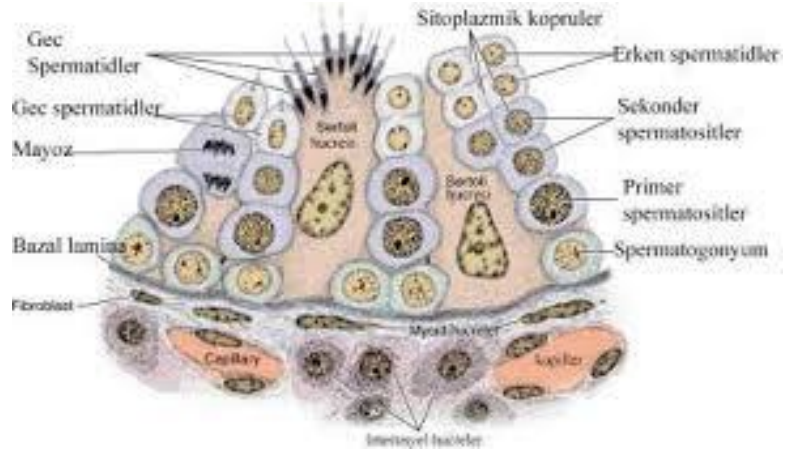
Spermatogenezis üç fazda gerçekleşir;

- Spermatositogenez: olarak adlandırılan evrede, spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatisitler meydana gelmektedir.

- Spermatosit evresi: Spermatisitlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu gerçekleşen ve spermatidlerin olduğu evre mayoz adını almaktadır.

- Spermatogenezis, bazal laminaya oturmuş bir germ hücresi olan, spermatogonyum ile başlar. Spermatogonyumlar ilkel germ hücresidir. Yaklaşık 12 µm çapında, soluk boyanan çekirdeği ile diploid germ hücreleridir. Pubertede testosteronun etkisi ile hücre döngüsüne (siklus) girer ve mitozla diğer spermatogonyumlar ve primer spermatisitleri oluştururlar. Spermatogonyumların Koyu ve Açık A Tipi ve B Tipi olmak üzere 3 tipi vardır. Koyu A Tipi spermatogonyumlar küçük, yuvarlak şekilli, 12 µm çapında hücreler olup fazlaca heterokromotin içerirler. Koyu A Tipi spermatogonyumlar yedek 16 hücrelerdir, mitozla bölünerek diğer Koyu A Tipi spermatogonyumları ve Açık A Tipi spermatogonyumları meydana getirirler. B tipi spermatogonyumlar primer spermatisitlere dönüşen öncül hücrelerdir. Oluştuktan hemen sonra bu hücreler birinci mayozun profazına girerler. 22 gün süren uzun bir profaz safhasından sonra hızlıca birinci mayoz bölünmelerini bitirerek sekonder spermatisit adı verilen ve yalnızca 23 kromozomdan oluşan daha küçük hücelere bölünürler. Sayıca bu azalma her hücredeki DNA miktarının azalmasıyla birlikte olur. Testis kesitlerinde sekonder spermatisitlerin interfazda kısa süre kalması ve hızlı bir şekilde ikinci mayotik bölünmeye girmesinden dolayı görülmesi zordur. Yaklaşık 8 saatlik bir yaşam süreleri vardır. Sekonder spermatisitlerin mayoz bölünmeyi bitirmesi ile 23 kromozoma sahip spermatidler oluşur. Fertilizasyonla bunlar normal diploid sayıya dönüşürler. Mayoz bölünme kromozom sayısının türler için sabit kalmasını sağlar. Yuvarlak spermatidler ortalama 8 µm çapında haploid hücrelerdir. Tek bir Açık A Tipi spermatogonyumdan gelişen tüm spermatidler sitoplazmik köprülerle birbirlerine tutunmuştur (67, 69). Spermatisitler bolca granüllü endoplazmik retikulum ve mitokondriyon ihtiva ederler. Golgi kompleksleri iyi gelişmiştir.

Spermatidler, spermiumlara dönüşürken bolca hidrolitik enzim depolar ve organellerinin miktarını azaltırlar. Sitoplazmalarının bir kısmı dökülür, filagellum ve diğer iskelet yapısı şekillenir. Spermiyogenezis olarak adlandırılan bu aşama, üç faza ayrılabilir; Golgi Fazı: Spermatidlerin sitoplazması, çekirdeğin yakınında belirgin bir Golgi kompleksi, bir çift sentriyol, mitokondri, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum (DER) içerir. Küçük PAS pozitif proakrozomal granüller golgi kompleksinde birikir ve hemen sonrasında birleşerek membranla sınırlı bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozom granülünü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek akrozomun olduğu bölgenin karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar ve sentriyoller yeniden nükleusa doğru geri dönerken hareket ettikçe aksonem komponentlerini çevresine sarar. Akrozomal Faz: Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş görür. Hyaluronidaz enziminin, korona radiata hücrelerini tubal mukozal enzimler ile birlikte birbirinden ayırdığı ve esteraz, akrozin, nörominidaz enzimlerinin zona pellusidayı erittiği bilinmektedir (74). Akrozomal faz sırasında hücrenin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına 17 doğru yönelir. Buna ek olarak nükleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler de flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge spermatozoonların hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve diynein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur. Matürasyon Fazı: Geriye kalan artık stoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlar tübülün lümenine doğru salınırlar. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatosit ile spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Bu süreç yaklaşık 70 gün sürer. Spermatid spermiyogenezis aşamasını Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma katlantılarında geçirir. Olgun spermium spermiyasyon denilen olayla tübül lümenine verilir.



Şekil 2.3: Spermatogenik hücre serileri ve Sertoli hücrelerinin şematik gösterimi (67).

Leydig Hücreleri çok köşeli ve 15 µm çapında hücrelerdir. Bir nükleus ve 1-2 nükleolus içerirler. Reinke kristalleri interstisyel hücelere spesifik olarak, sitoplazmada (69). Mitokondriyonlar tübüler kristaya sahiptir, granülsüz endoplazmik retikulum (AGER) sayısı fazla ve iyi gelişmiş golgi kompleksi bulundurur. Salgı vezikülleri yer almaz. Leydig hücreleri sayısı türe göre değişkenlik gösterir. İnsanlarda tek tek ya da küçük gruplar halinde damarlara yakın yerleşirler. Leydig hücreleri, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondriyon ve AGER' de bulunan enzimlerce gerçekleştirilir. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır(68, 75)

2.5. Testis Anatomisi

Testis ortalama 15-20 ml hacminde ve 4×3×2,5 cm boyutlarındadır. Sıklıkla sol testis sağdakine oranla yaklaşık 1cm daha aşağıda bulunmaktadır (76). Testis dıştan içe doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa olmak üzere 3 tabakadan oluşan bir kapsül ile sarılıdır. Tunika vaginalis visseral ve parietal olmak üzere 2 tabakadır. Bu iki tabaka arasındaki boşlukta seröz sıvı bulunur, bu sıvının artışı ile hidrosel oluşur. Ekstravaginal testis torsiyonu bu boşlukta oluşur (77, 78).

Tunika albuginea testis içeriğini sarar, yapısında kollajen doku içine dağılmış, dallanmış düz kas hücreleri bulunur. Bu lifler ejakülasyonda kasılarak sperm hücrelerinin efferent duktuslara doğru hareket etmesine yardımcı olur. Tunika albuginea septalarla seminifer tübülüsleri 250-300 lobüle böler. Tunika vaskulosa testisin septumlarının iç

yüzünü örter. Her bir septum seminifer tübül ve sentrifugal arter içerir. İnterstisyel doku, leydig hücreleri, mast hücreleri makrofajlar, sinir, kan ve lenfatik damarlardan meydana gelir. Seminifer tübüller; iki ucu da rete testiste sonlanan 'V' şeklinde tübüllerdir. Testiste yaklaşık 600- 1200 seminifer tübül bulunur). Rete testis 6-12 efferent kanalın birleşmesi ile oluşur, testiküler sıvı ve spermatazoanın epididim baş kısmına aktarılmasını sağlar. (68,69)

Erkek üreme bezleri olan testisler bir çift olup, scrotum'da asılı durumdadırlar ve birbirinden septum scroti denen bir bölme ile ayrılırlar. Scrotum'da testislerden başka epididimis ve funiculus spermaticus'un alt ucu bulunur. Scrotum'un duvarında; deri, yüzeysel fascia, m. dartos, m. obliquus externus abdominis'ten köken alan fascia spermatica externa, m. obliquus internus abdominis'ten köken alan fascia cremasterica, fascia transversalis'ten köken alan fascia spermatica interna ve en içte de peritoneum'un lamina parietalis (periorchium) tabakaları bulunur. Scrotum'un derisi ince, buruşuk ve pigmentlidir. Scrotum'da her iki yan labioscrotal şişkinlikler orta hatta birleşerek çok belirgin olmayan bir çizgi oluştururlar. Scrotum'un arterleri; a. pudenda externa scrotum'un ön tarafını, a. pudenda interna ise arka tarafını besler. Bunun yanında a. testicularis ve a. cremasterica'dan besleyici dallar alır. Scrotum'un venleri olan v. scrotalis'ler arterlere eşlik eder ve v. pudenda externa'ya katılır. Scrotum'un inervasyonu; ön tarafını, n. ilioinguinalis'ten köken alan nn. scrotales anteriores ve n. genitofemoralis'in genital dalı inerve eder. Arka tarafını ise, n. perinealis superficialis'in dalları olan nn. scrotales posteriores ve n. cutaneus femoris posterior'un perineal dalı inerve eder.

Testis kan akımı 100 mg doku için yaklaşık 9 ml/dk'dır. Testiküler arter abdominal aortadan renal arterin hemen altından çıkar. Kremasterik ve deferential arterler de hipogastrik arterin dallarıdır ve testisin kanlanmasına katkıda bulunur. Testiküler arter testise posteriyordan girer. Tunika albugineayı geçtikten sonra anteriyorda testis parankimi üzerinden transvers olarak geçecek şekilde dallanır, sonra posteriyora ve inferiyora doğru seyrederek. Testisin anterior ve inferior bölgeleri, medial ve lateral bölgelerine oranla daha çok damar içermektedir. Posteriyordan ilerleyen venler, mediastenden gelen küçük venlerle ve vas deferens venleri ile birleşir ve plexus pampiniformisi oluşturur. Plexus pampiniformis spermatik kordun içinde inguinal kanaldan geçerek sağda vena kava inferiora, solda ise renal vene dökülür.

Testiste 4-8 lenfatik damar, spermatik kord içinden geçerek paraaortik lenf nodlarına dökülerek lenfatik drenajı sağlanır. Testisin innervasyonu medulla spinalisin torakal 10-12 segmentlerinden gelen sempatik lifler ve nervus vagustan gelen parasempatik liflerden oluşan pleksus testikularis ile sağlanır. Pleksus testikularis testicüler arter ve deferential arter etrafında testise ulaşır (79-81).

2.6. Testis Fizyolojisi

Spermatogenezin sürecinde sıcaklık önem arz eder. Spermatogenez 37°C olan vücut sıcaklığının altında gerçekleşir. Testisin sıcaklığı yaklaşık 35°C'dir. Venöz ağdan zengin olan pampiniform pleksus testis arterlerini çevreler. Bu ağ testis sıcaklığının korunmasında önemlidir ve sıcaklığı kontrol etmede ters yönlü akım özelliğiyle sıcaklık değişimini yerine getirir. Soğuk durumunda, refleks olarak kasılan skrotum kası testisleri yukarı doğru çeker, testisin vücuda yaklaşması ile 2°C'lik fark korunmuş olur. Böylece, skrotum, testislere özgü soğutucu bir mekanizma gibi görev yapar. Endokrin faktörler spermatogenez üzerinde önemli bir rola sahiptir. (82-84) Spermatogenez, hipofiz hormonlarından foliküler stimulan (FSH) ve luteinleştirici hormon (LH) un testis üzerindeki etkilerine bağlıdır (67).

Luteinleştirici Hormon (LH): Hipotalamustan salgılanan gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH) hipofizin ön lobundan luteinize edici hormon (LH) un salgılanmasını uyarır. LH ise Leydig hücrelerindeki reseptörlerine bağlanarak bu hücrelerde kolesterolden spermatogenik serinin gelişimi için gerekli testosteron sentezini uyarır. Hipofizden LH salınımı negatif geri besleme ile kontrol edilir. Testosteron hormonunun artışı LH salınımı inhibe eder.

Folikül Uyarıcı Hormon (FSH): Hipotalamustan salgılanan gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH) hipofizin ön lobundan follikül uyarıcı hormonu (FSH) salgılatır. FSH sertoli hücrelerine etki ederek Adenil siklaz sentezini, siklik adenozin trifosfat (cAMP) in artışı uyarır. Ayrıca, Andojen bağlayıcı protein (ABP) 'nin sentez ve salgılanmasını uyarır. Daha sonra testosterona bağlanarak bu hormonu seminifer tübül lümenine tasır. Böylece spermatogenez indüklenmiş olur. Spermatogenez östrojen ve progesteronlarla inhibe edilirken testosteron ile uyarılır. Spermatozoonlar epididimise, testiküler sıvı içinde taşınırlar. Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilen Testiküler sıvı; proteinler, steroidler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içerir (67).

İnhibin: Bu hormon Sertoli hücrelerinde sentezlenir ve hipofizden FSH salınımını inhibe eden bir proteindir. İnhibin sürekli salınırsa FSH'ı baskılar. Üreme hücresi sayısı azalınca da FSH artar (68).

Kaspazlar

Kaspase-3 (C-3) bir enzimdir. Sistein aspartik asit proteaz ailesinden efektör bir kaspazdır. inaktif zimojen bir enzim olan C-3 32 kDa ağırlığındadır. Apoptotik sinyal gelince parçalanarak aspartik asit bölgesinden bölünür, 17 kDa ve 12 kDa ağırlığında iki alt üniteye ayrılır. Bu iki alt ünite kendi içinde tetrametrik bir yapıya dönüşerek C-3 enzimi aktifleşir (75).

Kaspazlar, sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptidi kırarlar. Hücrede aktif değildirler, fakat proteolitik yolla birbirlerini aktifleştirirler. Farklı 100 hedef proteinini parçalayarak apoptoza sebep olurlar. 3 tiptirler:

Başlatıcı kaspazlar (Kaspaz 2,8,9,10),

II- Efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7),

İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14).

DNA onarımı ve replikasyonu için gerekli olan enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini parçalayarak hücre membranının tomurcuklanmasına neden olurlar (86-88)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Araştırma Tipi

Çalışma, Wistar albino sıçanlar üzerinde yapılan deneysel bir çalışma olup, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde "National Institutes of Health, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" kurallarına uygun olarak gerçekleştirildi.

3.2. Araştırma Yeri ve Ortamı

Bu çalışmada kullanılan sıçanlar, İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi Araştırma Ünitesi'nden temin edilmiştir. Çalışmada, ortalama ağırlıkları 250–300 gr, 10-12 aylık, 40 adet Wistar Albino dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize seçilerek 5 grup oluşturuldu. Sıçanlar, deney süresince optimum laboratuvar koşullarında, (%50±10 nemli ortam, 21±2°C oda sıcaklığı, 12 saatlik aydınlık –12 saat karanlık periyodu) polikarbon kafeslerde tutuldu, deney süresince standart kuru pelet sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi.

3.3. Deney Grupları

Bu deneysel çalışma için temin edilen sıçanlar, rastgele seçilen 5 gruba (n=8) ayrıldı.

1. Kontrol grubu: Distile su (1 ml, gastrik gavaj)
2. Mısıryağı grubu: Mısır Yağı (1 ml, gastrik gavaj)
3. NaF grubu: 30 mg/kg NaF (1ml çözelti, gastrik gavaj)
4. Quercetin grubu: 50 mg/kg/gün Quercetin (1 ml çözelti, gastrik gavaj)
5. NaF+Quercetin grubu: 30 mg/kg NaF + 50 mg/kg/gün Quercetin (1+1 ml çözelti, gastrik gavaj)

3.4. Anestezi:

Bütün sıçanların anestezisi, 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent, İstanbul) ve 10 mg/kg xylazine hidrokloritin

(Rompun® Bayer, Şişli, İstanbul) ile aseptik şartlarda intraperitoneal yolla verilerek sağlandı.

3.5. Deneysel Uygulama

Anestezi altındaki sıçanların povidon iyot ile cilt antiseptisi sağlandıktan sonra, ameliyat düzeneğine ön ve arka bacakları tesbit edildi. Sıçanlara laparotomi yapıldıktan sonra testisleri total olarak çıkarıldı ve sıçanlar ötenazi edildi.

Testis örnekleri, tartıldıktan sonra histolojik inceleme için alınan örnekler %10 formaldehit solüsyonuna konuldu. Biyokimyasal işönceleme amacıyla, MDA, GSH, TAS ve TOS analizleri için testis doku örnekleri alındı, Testoosteron, LH ve FSH hormon ölçümleri için alınan kan örnekleri santirfüj edildikten sonra serum toplandı ve -80°C'de muhafaza edildi.

3.6. Işık Mikroskopik Teknikler

Deney sürecinde alınan testis doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde her bir grup için ayrı saklama kabında, 24 saat sonrasında formaldehit değişimi yapılarak 48 saat süreyle tespit edildi. Tespit sonunda çeşme suyunda yıkanan dokular, artan oranda etanol serileri ile (%50-99.9) dehidrasyon ve ksilen serileri ile parlatma işlemlerinden geçirildi. Sonra parsındaafin bloklar içerisine gömüldü. Parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2145) yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler lamalar üzerine alındı. Kesitler etüvde 56°C'de 1 saat bekletildi. Deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden geçirilen kesitlere hematoksilin&ezin (HE), periyodik asit schiff (PAS) teknikleri kullanılarak histokimyasal olarak boyandı. Streptevadin biotin yöntemi kullanılarak immünohistokimyasal (IHC) Caspase 3 (C-3) işaretlemesi yapıldı.

3.6.1. Doku Takibi

Formaldehit ile tespit edilen testis dokuları trimlenerek kasetlere yerleştirildikten sonra otomatik doku takip cihazında (Tissue-Tek VIP/SAKURA) aşağıdaki protokole göre doku takip basamaklarından geçirildi:

Tablo 3.1. Histolojik Doku Takip Prosedürü

1. Su	30 dk
2. Su	30 dk
3. %80 alkol	30 dk
4. %96 alkol	1 saat
5. %96 alkol	1 saat
6. Absolü alkol	1 saat
7. Absolü alkol	1.5 saat
8. Ksilen	45 dk
9. Ksilen	45 dk
10. Ksilen	1 saat
11. Parafin I	40 dk (62°C)
12. Parafin II	40 dk (62°C)
13. Parafin III	40 dk (62°C)
14. Parafin IV	40 dk (62°C)

3.6.2. Mayers'in Hematoxylin&Eosin Metodu

Doku örneklerinden alınan kesitlere otomatik boya cihazı (Leica Autostainer XL) ile aşağıdaki prosedürdeki şekilde HE boyaması uygulandı.

Tablo 3.2. HE Boyama Prosedürü

1. İnkübasyon	(60°C, 50 dk)
2. Ksilen	5 dk x 3 defa
3. %96 alkol	3 dk
4. %96 alkol	3 dk
5. Absolü alkol	3 dk
6. Çeşme suyunda yıkama	5 dk
7. Mayer's Hematoxylin	15 dk
8.Çeşme suyunda yıkama	5 dk x 4 defa
9. Eosin	5 dk
10. %96 alkol	3 dk x 2 defa
11. Absolü alkol	3 dk x 2 defa
12. Ksilen	5 dk x 3 defa

Uygulanan bu işlemlerin ardından lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Hematoksilen Eozin boyama yapılarak incelenen dokuların değerlendirilmesinde, seminifer tübül çap ölçümü ve Johnsen's testiküler histolojik hasar skoru (89) kullanıldı;

Tablo 3.3. Johnsen's skoru değerlendirme kriterleri

Skor	Histolojik Bulgular
10	Komplete spermatogenez, çok sayıda spermatozoa, düzgün yükseklikte germinal epitel, normal çaplı tubular lümen
9	Çok sayıda spermatozoa, disorganize germinal epitel, oblitere tubular lümen
8	Tubular kesit başına 5±10'dan daha az spermatozoa
7	Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid, spermatosit ve spermatogonia
6	Spermatozoa yok, 5±20 spermatid, çok sayıda spermatosit ve spermatogonia
5	Spermatozoa ve spermatid yok, çok sayıda spermatosit ve spermatogonia
4	Spermatozoa ve spermatid yok, spermatosit 5'den az, fakat çok sayıda spermatogonia
3	Sadece spermatogonia
2	Germinal hücreler yok, sadece Sertoli hücreleri var (Sertolicell-only sendromu)
1	Tübüllerde hiç hücre yok

Seminifer tübül çapları ölçümünde her grupta 6 adet preparatta, her preparattan 100 tübül ölçüldü. Ölçüm yapılırken 4lük büyütmede 2 adet periferlere yakın bölgeden; 2 adet de merkeze yakın bölgeden alan seçildi. Her bir tübülün 1 uzun ekseni 1 de kısa ekseni olmak üzere 2 farklı çapı ölçüldü ve ortalaması alındı.

3.6.3. Periodic Acid Schiff (PAS) Boyama Metodu

Deparafinizasyonu takiben distile suya alınan kesitlere sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

Tablo 3.4. PAS Boyama Metodu

Periyodi asit (0.5 g + 100 ml distile su)	5 dk
Distile su	3 dk
Schiff	20 dk
Çeşme suyu	15-20 dk
Distile su	3 dk
Hematoksilen	10 dk
Çeşme suyu	3 dk
Alkol %100	3 dk x 3 defa
Ksilen	3 dk x 3 defa

Uygulanan bu işlemlerin ardından lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

3.6.4. Caspase 3 İmmünohistokimya Boyama Metodu

Caspase 3 (CPP32, Ab-4, Rabbit Polyclonal Antibody, Thermo Scientific) immünohistokimya boyama için polilizinli lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere deparafinizasyon aşamasını takiben sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

Tablo 3.5. İmmünohistokimya Boyama Metodu

Antijen Retrieval (Sitrata tamponu içinde, pH=6.0)	121°C, 15 dk
Distile Su	1 kez yıkama
PBS	1 kez yıkama
Peroksit Blok (Hidrojen Peroksit)	10 dk
PBS	1 kez yıkama
Protein Blok (Süper Blok)	5 dk
Primer Antikor (Caspase 3)	30 dk
PBS	1 kez yıkama
Sekonder Antikor (Biotinylated Goat Anti-polyvalent)	20 dk
PBS	1 kez yıkama
Streptevadin Peroksidaz (HRP)	10 dk
PBS	1 kez yıkama
Kromojen (1 damla kromojen + 1 ml tampon)	10 dk
PBS	1 kez yıkama
Distile Su	1 kez yıkama
Hematoksilen	60 sn
Musluk Suyu	3 kez yıkama
Distile Su	1 kez yıkama

IHC uygulanan kesitler su bazlı kapatıcı kullanılarak lamel ile kapatıldı. Kesitler Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, Nikon DS-Fi2 kamera ve Nikon NIS-Elements Documentation görüntü analiz programı (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) ile incelenerek fotoğraflar alındı.

Testis dokusunda Caspaz-3 pozitif immünoreaktivitesini ölçmek için H-Skoru (90) kullanıldı. Bu immünohistokimyasal, yarı kantitatif yöntemde, pozitif boyanmış hücrelerin yüzdesi, boyama yoğunluğu ile çarpılır:

H Score = $\sum_{i=1}^n P_i (i+1)$, P_i , her yoğunluk kategorisindeki boyanmış alanın yüzdesidir (0–100%). Intensity (i), Spesifik boyanmanın yoğunluğu (0-3)

3.7. Biyokimyasal Analiz

Çalışma sonunda sıvı azot tankına alınan ve daha sonra -80 °C derin dondurucuda bekletilen testis dokularında MDA, GSH, TAK ve TOK düzeyleri, serumda ise LH, FSH ve Testosteron düzeyleri ölçüldü.

Dokuların Biyokimyasal analizlere hazırlanması

Derin dondurucuda saklanan testis dokuları çalışma günü çıkarılarak tartıldı. %10'luk homojenat oluşturacak şekilde fosfat tamponu (IKA, Germany) eklenerek buz içinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi. Doku homojenatları 5000 rpm'de, +4 derecede, 30 dakika santrifüj edilip süpernatant elde edildi.

Redükte Glutasyon (GSH) düzeyinin ölçümü

GSH analizi, Ellman'ın tarif ettiği yöntemle yapıldı (91). Analiz tüpünde bulunan GSH'nin 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşilimsi renk vermesi ve oluşan rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyunda spektrofotometrede bakılarak GSH konsantrasyonunun tayin edilmesi şeklinde yapıldı.

Malondialdehid (MDA) düzeyinin ölçümü

MDA analizi Uchiyama ve ark. (92) yöntemine göre yapıldı. MDA konsantrasyonu, süpernatandaki MDA'nın 95 °C'de tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli ürünün n-butanol fazından ekstrakte edilen süpernatanın spektrofotometre ile 535 ve 520 nm de ölçülmesiyle belirlendi.

Total Oksidan Kapasitenin (TOK) ölçümü

Total oksidan kapasitenin ölçümünde, ticari TOK ölçüm kiti (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensibi, örnekteki oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesine ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromojen madde ile renk oluşturması esasına dayanır (93). TOK ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, ELİZA 25 °C'ye ayarlanarak, 500 µL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 75 µL serum karıştırılıp 530 nm'de absorbansı ölçüldü. Karışıma 25 µL reaktif 2 (pro-kromojen solüsyon) ilave edilerek 10 dk. İnkübasyon sonrası tekrar 530 nm'de absorbans ölçülmesiyle TOK düzeyleri belirlendi.

Total Antioksidan Kapasitenin (TAK) ölçüm

Ticari TAK ölçüm kiti (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensipi, örnekteki antioksidanların, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz ABTS formuna indirgemesine dayanır (94). TAK ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, ELİZA cihazı 25 °C'ye ayarlanarak, 500 µL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 30 µL serum karıştırılıp 660 nm'de absorbansı ölçüldü. Karışıma 75 µL reaktif 2 (renkli ABTS solüsyonu) eklenerek 10 dk. inkübasyondan sonra tekrar 660 nm'de absorbans ölçülmesiyle TAK düzeyleri belirlendi.

Kan serum hormon düzeylerinin (LH, Testosteron, FSH) ölçümü

Kesim sırasında kalp dokusundan alınan kan örnekleri 1000 x g de 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazma şeklinde ayrıldı. Serumlar çalışma gününe kadar -80 °C de derin dondurucuda muhafaza edildi. Çalışma günü serumlarda ELİSA ölçüm yöntemi ile Sunred marka (95) Rat spesifik ELİSA kitleri ile LH, Testesteron ve FSH parametreleri çalışıldı.

LH

SunRed marka Rat spesifik 201-11-0180 katalog no'lu LH ELİSA kiti ile LH parametresi bakıldı. 32 mIU/mL ,16 mIU/mL,8 mIU/mL ,4 mIU/mL ve 2 mIU/mL 'lik standart solüsyonlarından 50µL ve numunelerden 40 µL ve blank 50 µL olmak üzere her bir plate kuyucuğuna pipetlendi. Ardından sadece numunelerin bulunduğu kuyucuklara 10 µL LH-antibody solüsyonundan eklendi. Ardından Standart ve numunelerin bulunduğu her bir kuyucuğa 50 µL Streptavidin-HRP solüsyonundan eklenirken blank'in bulunduğu kuyucuğa eklenmedi. Üzeri kapatılan plate 37°C'de 1 saatlik inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından 350 µL'lik yıkama hacmi olacak şekilde 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından blank kuyucukları da dahil her bir kuyucuğa 50 µL Chromogen A Solüsyonu eklendi ve ardından Chromogen B Soüsyonu eklenerek plate in üzeri kapatılıp 37°C'de 10 dk inkübasyon yapıldı. 10 dk'lık inkübasyonun ardından stop solüsyonu 50 µL her bir kuyucuğa ilave edilip 450 nm'de nm'de Synergy H1 Microplate Reader'da okuma yapıldı.

Testosteron

SunRed marka Rat spesifik 201-11-5126 katalog no'lu Testosteron ELİSA kiti ile Testosteron parametresi bakıldı.100 pg/mL ,200 pg/mL,400 pg /mL ,800 pg/mL ve 1600 pg/mL 'lik standart solüsyonlarından 50µL ve numunelerden 40 µL ve blank 50 µL olmak üzere her bir plate kuyucuğuna pipetlendi. Ardından sadece numunelerin bulunduğu kuyucuklara 10 µL T-antibody solüsyonundan eklendi. Ardından Standart ve numunelerin bulunduğu her bir kuyucuğa 50 µL Streptavidin-HRP solüsyonundan eklenirken blank'in bulunduğu kuyucuğa eklenmedi. Üzeri kapatılan plate 37⁰C'de 1 saatlik inkübasyona bırakıldı.1saatlik inkübasyonun ardından 350 µL'lik yıkama hacmi olacak şekilde 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından blank kuyucukları da dahil her bir kuyucuğa 50 µL Chromogen A Solüsyonu eklendi ve ardından Chromogen B Solüsyonu eklenerek plate in üzeri kapatılıp 37⁰C'de 10 dk inkübasyon yapıldı. 10 dk'lık inkübasyonun ardından stop solüsyonu 50 µL her bir kuyucuğa ilave edilip 450 nm'de nm'de Synergy H1 Microplate Reader'da okuma yapıldı.

FSH

SunRed marka Rat spesifik 201-12-1002 katalog no' lu FSH ELİSA kiti ile FSH parametresi bakıldı. 50 mIU/mL, 25 mIU/mL, 10 mIU/mL, 5 mIU/mL ve 2.5 mIU/mL' lik standart solüsyonlarından 50µL ve numunelerden 40 µL ve blank 50 µL olmak üzere her bir plate kuyucuğuna pipetlendi. Ardından sadece numunelerin bulunduğu kuyucuklara 10 µL FSH-antibody solüsyonundan eklendi. Ardından Standart ve numunelerin bulunduğu her bir kuyucuğa 50 µL Streptavidin-HRP solüsyonundan eklenirken blank'in bulunduğu kuyucuğa eklenmedi. Üzeri kapatılan plate 37⁰C'de 1 saatlik inkübasyona bırakıldı.1saatlik inkübasyonun ardından 350 µL'lik yıkama hacmi olacak şekilde 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından blank kuyucukları da dahil her bir kuyucuğa 50 µL Chromogen A Solüsyonu eklendi ve ardından Chromogen B Solüsyonu eklenerek plate in üzeri kapatılıp 37⁰C'de 10 dk inkübasyon yapıldı. 10 dk'lık inkübasyonun ardından stop solüsyonu 50 µL her bir kuyucuğa ilave edilip 450 nm'de nm'de Synergy H1 Microplate Reader'da okuma yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi, grup varyansların homojenliği Levene testi ile incelendi. Grup karşılaştırmalarında varyanslar homojen olduğunda tek yönlü varyans analizi ve Tukey ikili karşılaştırma yöntemi, varyanslar homojen olmadığında Welch testi ve Tamhane's T2 ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Skor verilerinin karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis testi ve sonrasında Conover ikili karşılaştırma yöntemi uygulandı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0.05 olarak kabul edildi.



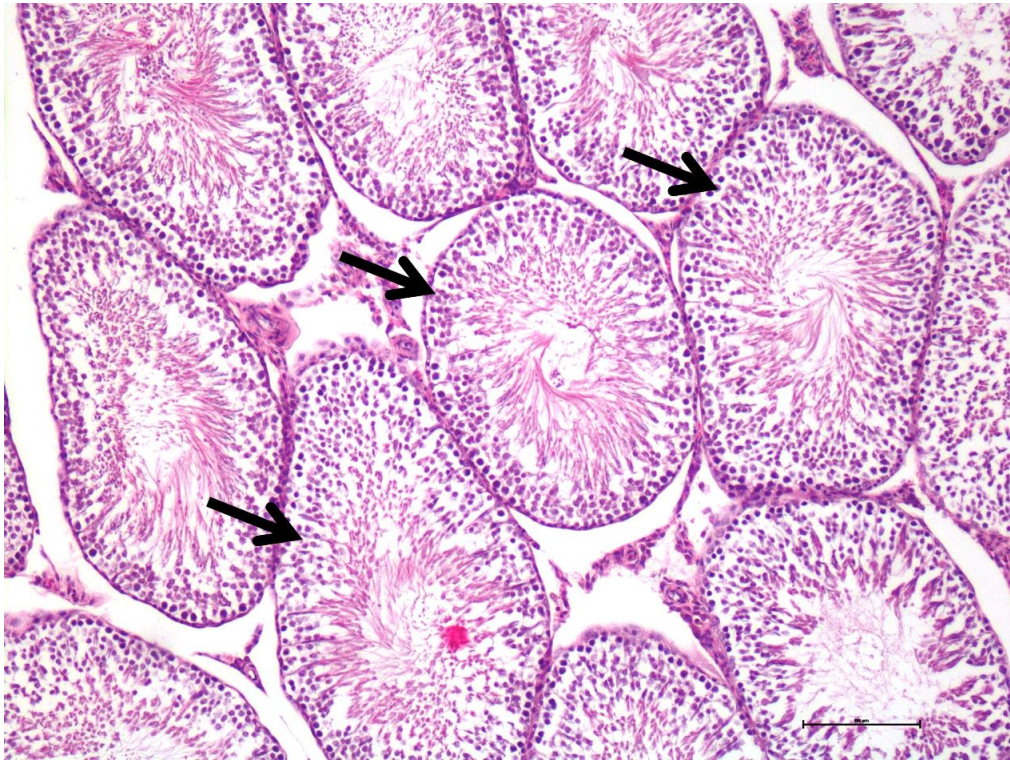
4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

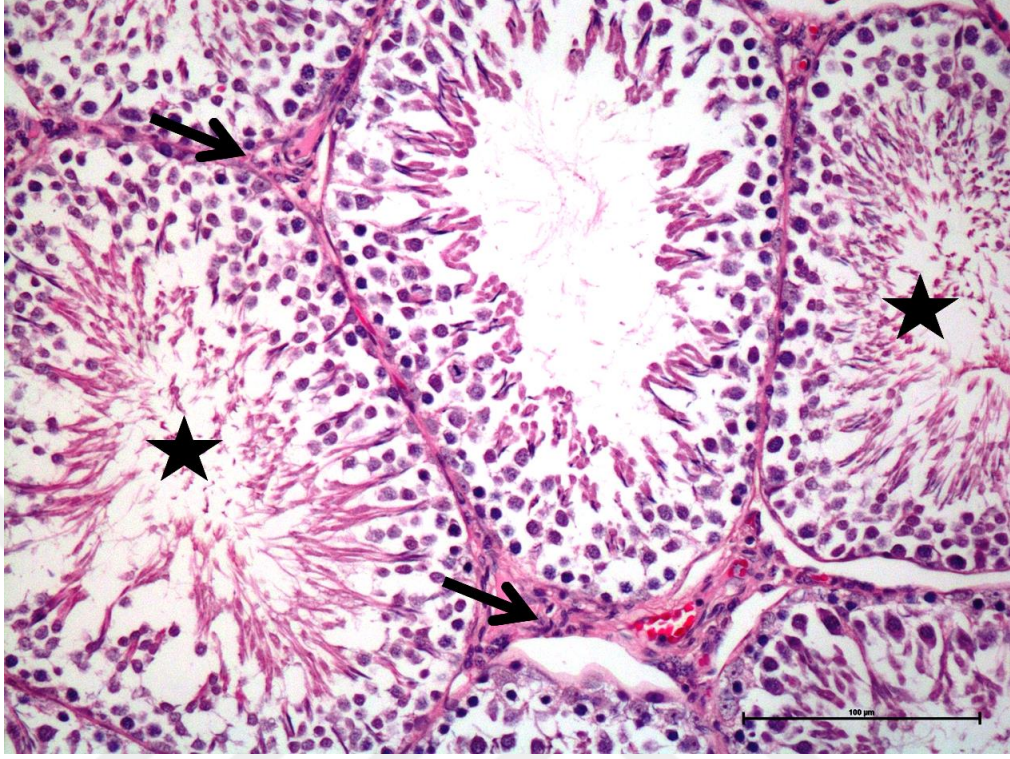
Distile Su, Mısır Yağı ve Quercetin gruplarında Hematoksilen Eozin ile boyanmış kesitlerde seminifer tübüllerin konturlarının düzgün olduğu, seminifer tübül epitelinin düzenli, spermatogenetik seriye ait hücre gruplarını içerdiği görüldü. Seminifer tübül epiteli bazalinde spermatogonyumlara ait hücre nükleusları tek tabaka şeklinde sıralanmış olup, heterokromatik nükleus görünüşleri ile belirgin şekilde ayırt edilebiliyordu. Primer spermatositler, iri, ökromatik nükleusları ile seminifer tübül epitelinde spermatogonyum hücre tabakası üzerinde birkaç sıralı olarak izlendi. Primer spermatositlerden sonra lümenal yönde daha üst seviyede erken ve geç spermatidler, normal yapıda ve yoğunlukta izlendi. Seminifer tübüllerin çoğunluğunda lümeninde çok sayıda spermatozoon izlenmekle birlikte bazı seminifer tübüllerin lümenlerinde spermatozoon yoğunluğunun az olduğu, bazılarında da spermatozoon bulunmadığı izlendi. Seminifer tübül lümeninde spermatogonyum nükleusları seviyesinde, belirgin nükleoluslu, piramidal - poligonal şekilli nükleuslar sertoli hücre nükleusları olarak değerlendirildi. Sertoli hücrelerinin sitoplazmik sınırları seçilemiyordu. Seminifer tübüller arasında ince-kıt peritübüler bağ dokusu izlendi. Bu bağ dokusu içerisinde yuvarlak, ökromatik nükleuslu, vakuoler sitoplazmalı, iri hücreler normal histolojik görünümde leydig hücreleri olarak değerlendirildi. Seminifer tübüller arasındaki şeffaf alanların histolojik teknik sırasında intertübüler alanların genişlemesine bağlı olduğu düşünüldü.



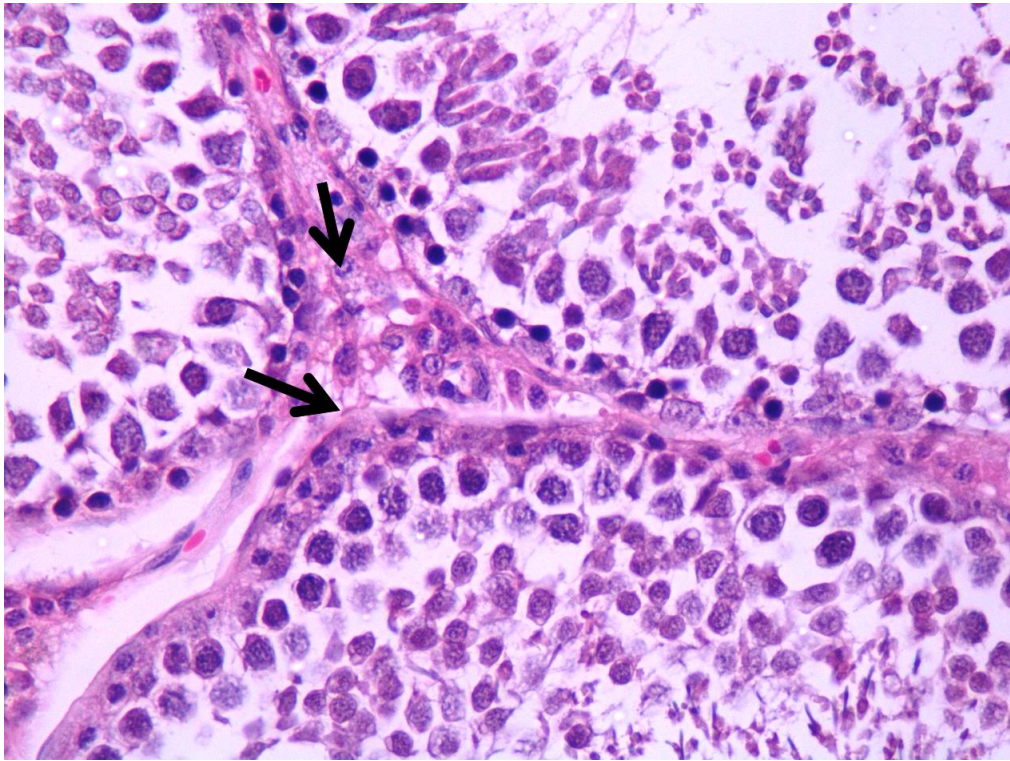
Şekil 4. 1: Kontrol grubu, Normal histolojik görünümde seminifer tübüller (ok). H-E, x4



Şekil 4. 2: Kontrol grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller (ok). H-E, x10

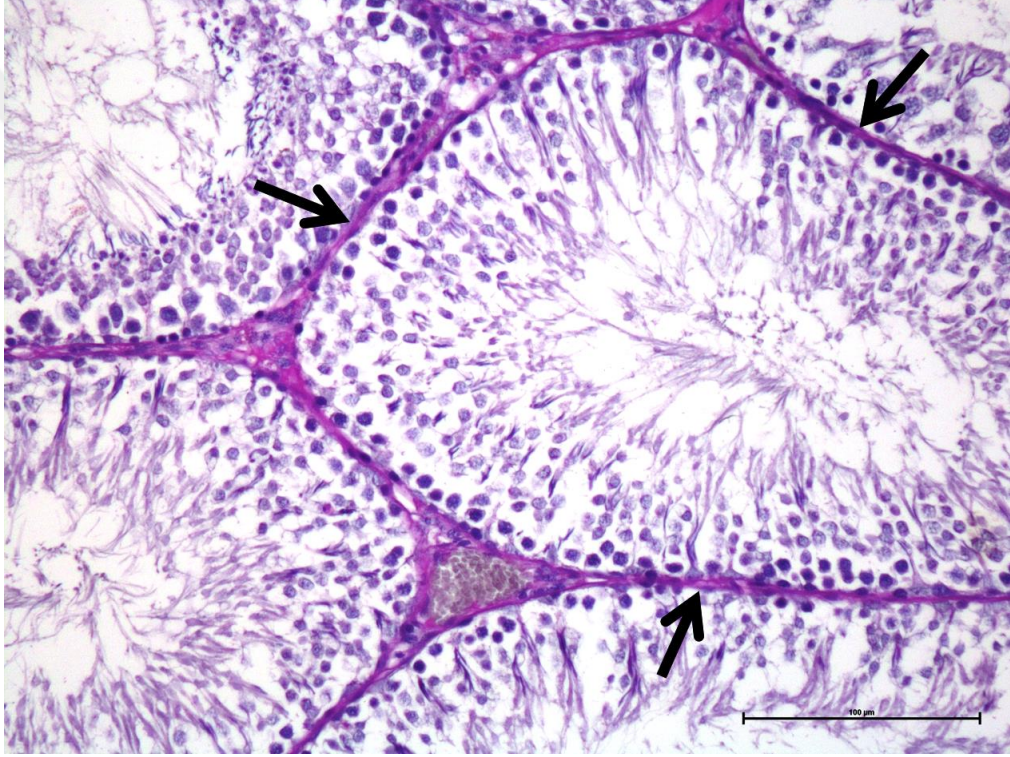


Şekil 4. 3: Kontrol grubu, normal histolojik görünümdeki seminifer tübül lümeninde spermatozoonlar (yıldız), ve interstisiyel bağ dokusu(ok). H-E, x20



Şekil 4. 4: Kontrol grubu, peritübüler alanda Leydig hücreleri (ok). H-E, x40

Distile Su, Mısır Yağı ve Quercetin gruplarında Periyodik asit schiff (PAS) ile boyanmış kesitlerde seminifer tübül bazal membranları olağan kalınlıkta ve düzgün olarak menekşe renginde boyanmış olarak izlendi. Peritübüler bağ dokusu içerisindeki leydig hücreleri PAS pozitif boyanma gösteriyordu. Pas pozitif boyanan preparatlardaki yapılar normal histolojik ve histokimyasal görünümde değerlendirildi.

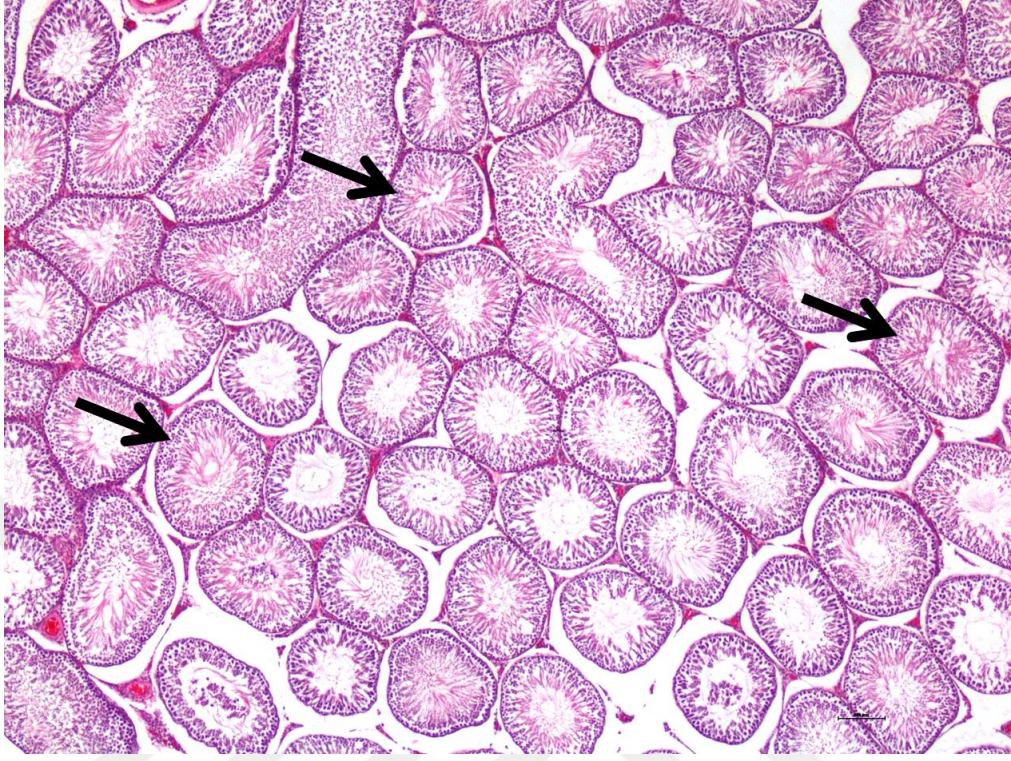


Şekil 4. 5: Kontrol grubu, peritübüler bazal membran normal yapıda (ok). PAS, x40

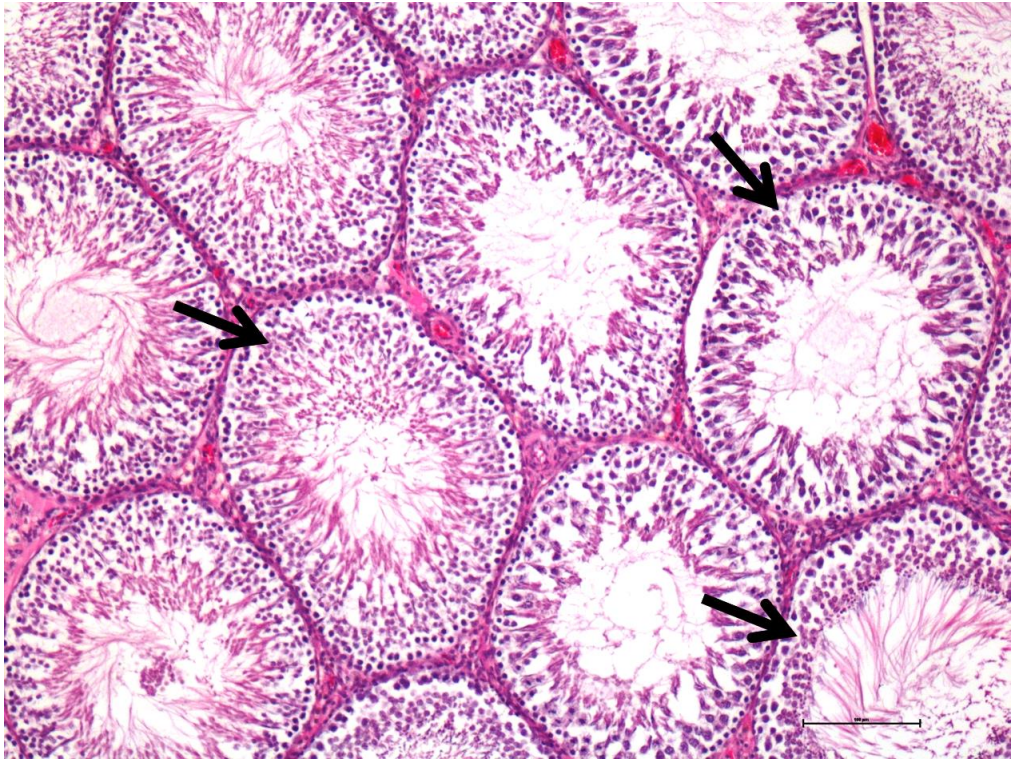
Distile Su, Mısır Yağı ve Quercetin gruplarında Caspase-3 (C-3) İmmuno histokimyasal (IHC) boyama uygulanan kesitlerin değerlendirilmesinde seminifer tübüllerde diffüz, minimal yoğunlukta, C-3 immun reaktivite pozitifliği saptandı. İnterstisyel bağ dokusu içerisinde seyrek olarak, orta derece yoğunlukta, C-3 immun reaktivite pozitifliği gösteren hücrelerin leydig hücreleri olduğu değerlendirildi. Bu grupların C-3 immun reaktivite pozitifliği H skoru ortalamaları; Kontrol Grubu(80), Mısır Yağı Grubu (80), Quercetin Grubu (80) olarak tespit edildi. Gruplar arasında C-3 immun reaktivite pozitifliği istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi.



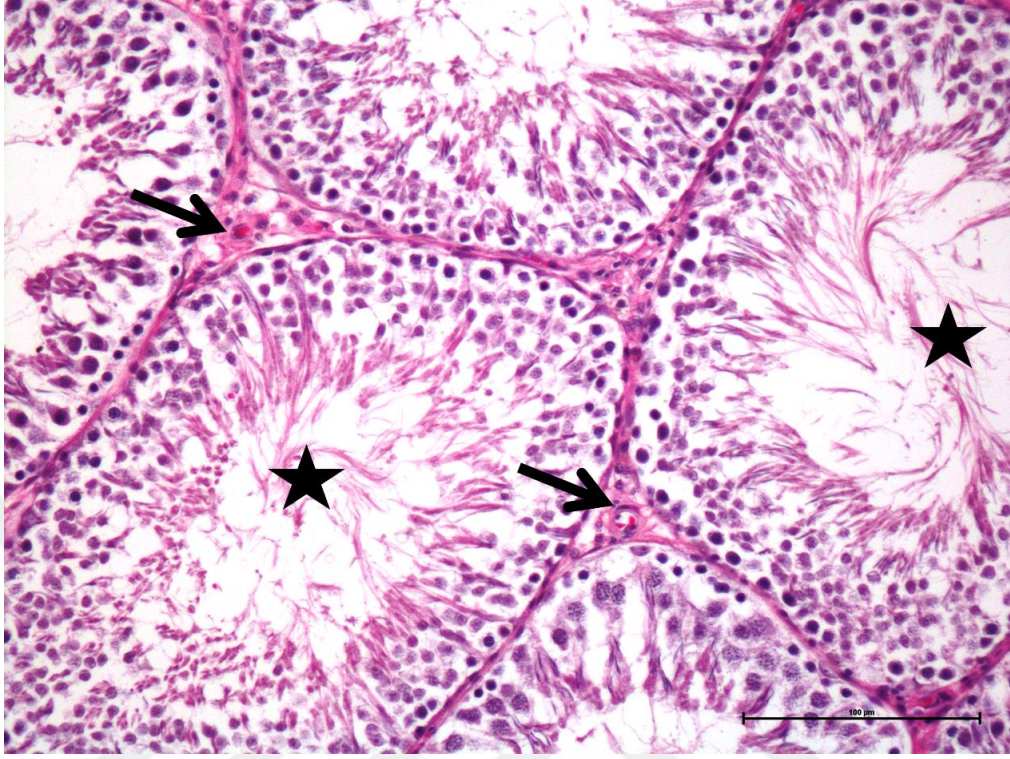
Şekil 4. 6: Kontrol grubu, seminifer tübüllerde düşük yoğunlukta, diffüz C-3 immünoreaktivite pozitifliği (yıldız). C-3, x10



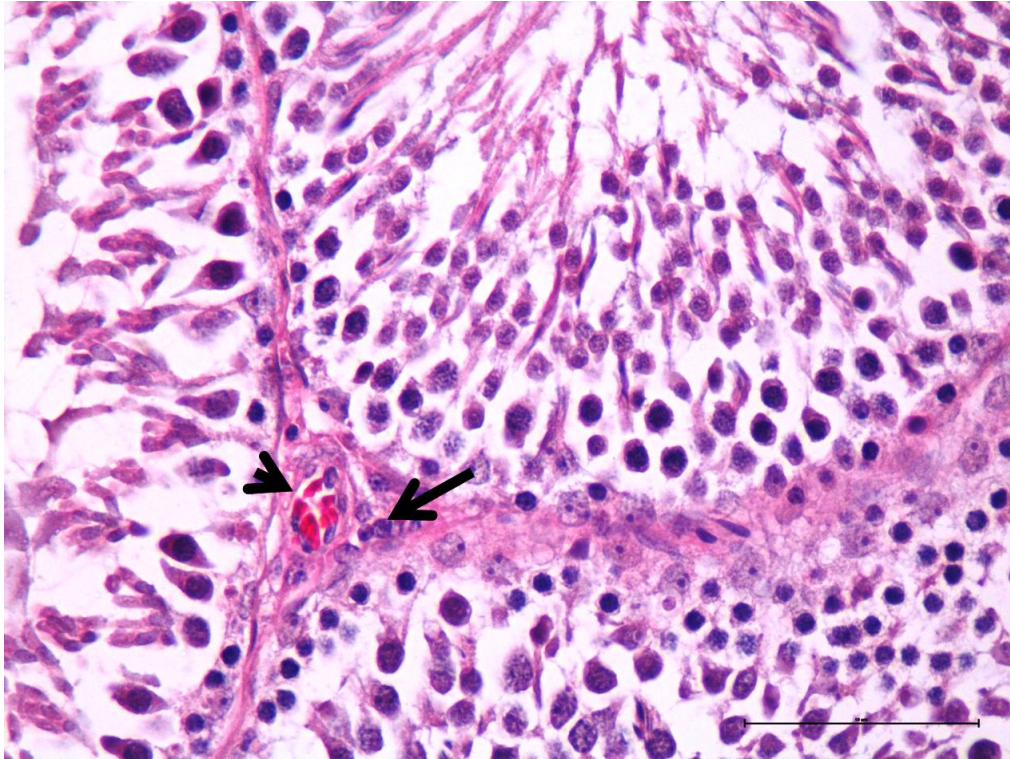
Şekil 4. 7: Mısır yağı grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller (ok). H-E, x4



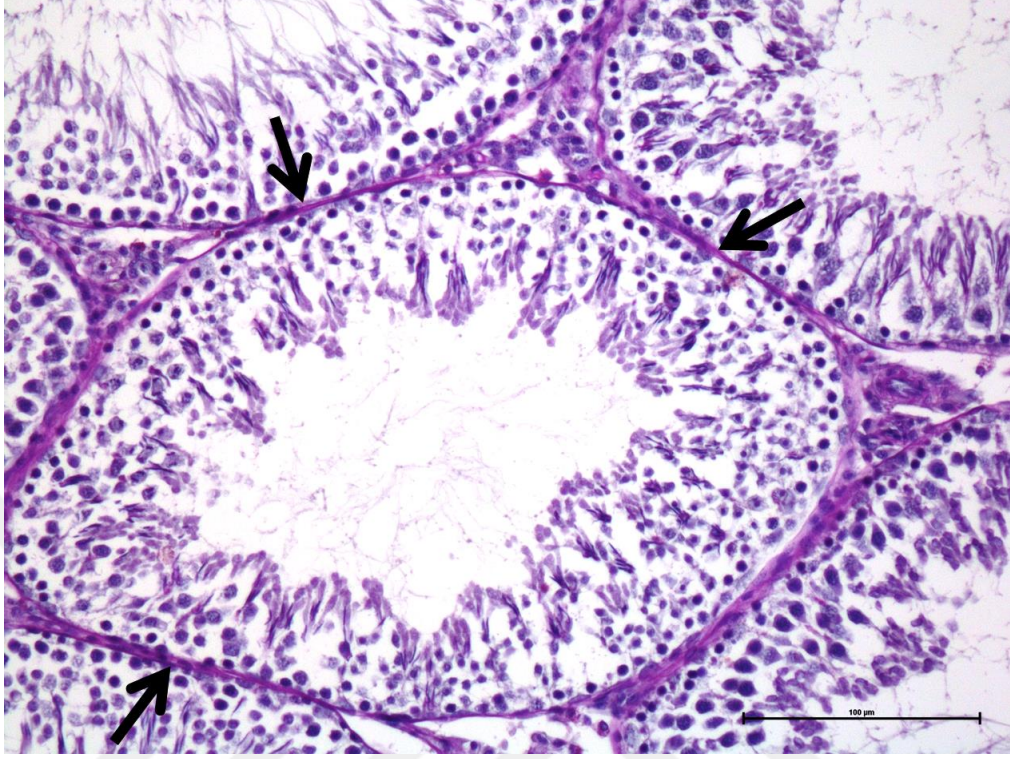
Şekil 4. 8: Mısır yağı grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller (ok). H-E, x10



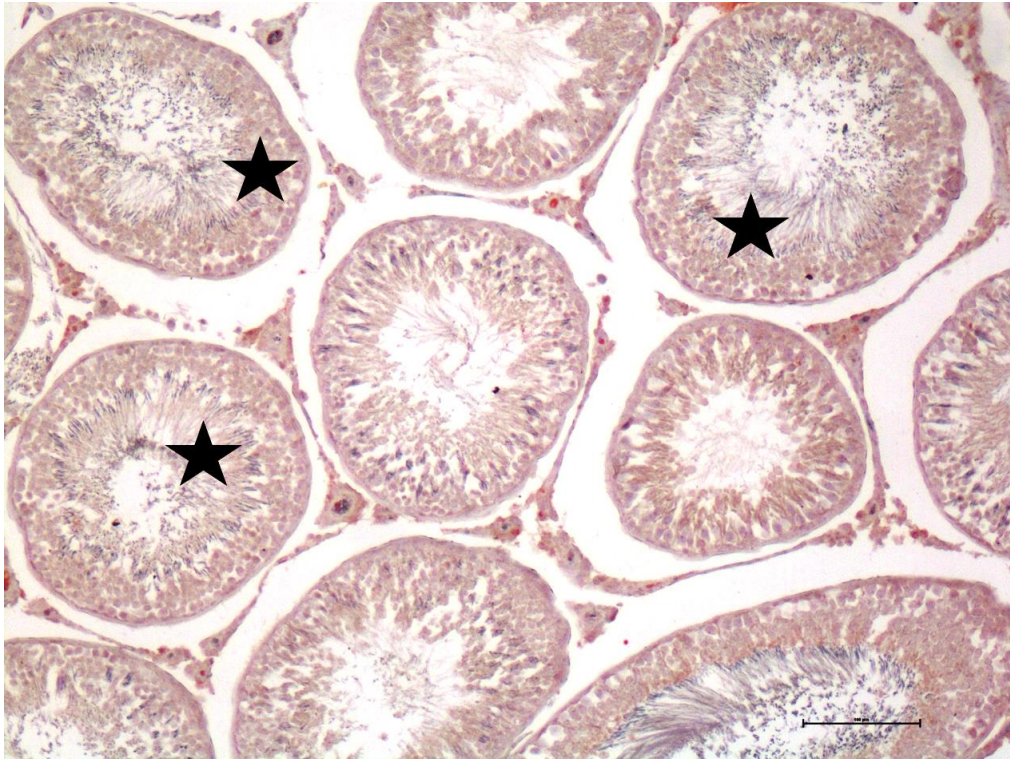
Şekil 4. 9: Mısır yağı grubu, normal histolojik görünümdeki seminifer tübül lümeninde spermatozoonlar (yıldız), ve interstisiyel bağ dokusu (ok). H-E, x20



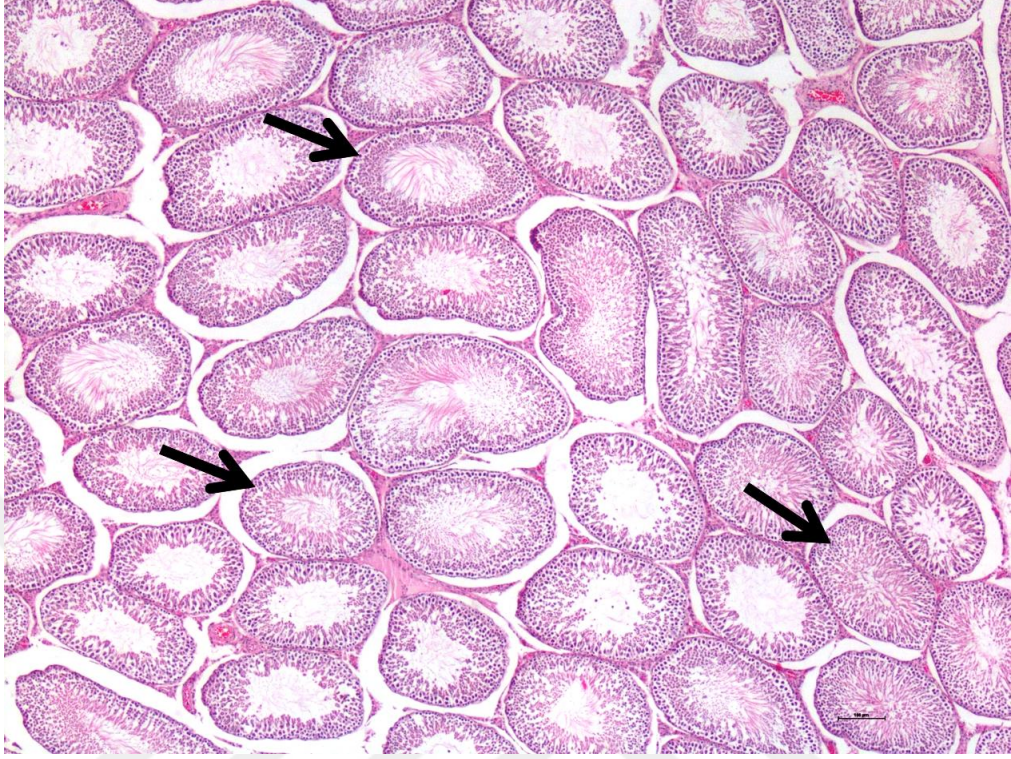
Şekil 4. 10: Mısır yağı grubu, peritübüler alanda Leydig hücresi (ok), damar (ok başı). H-E, x40



Şekil 4. 11: Mısır yağı grubu, peritübüler bazal membran normal yapıda (ok). PAS, x40



Şekil 4. 12: Mısır yağı grubu, seminifer tübüllerde düşük yoğunlukta, diffüz C-3 immünoreaktivite pozitifliği (yıldız). C-3, x10



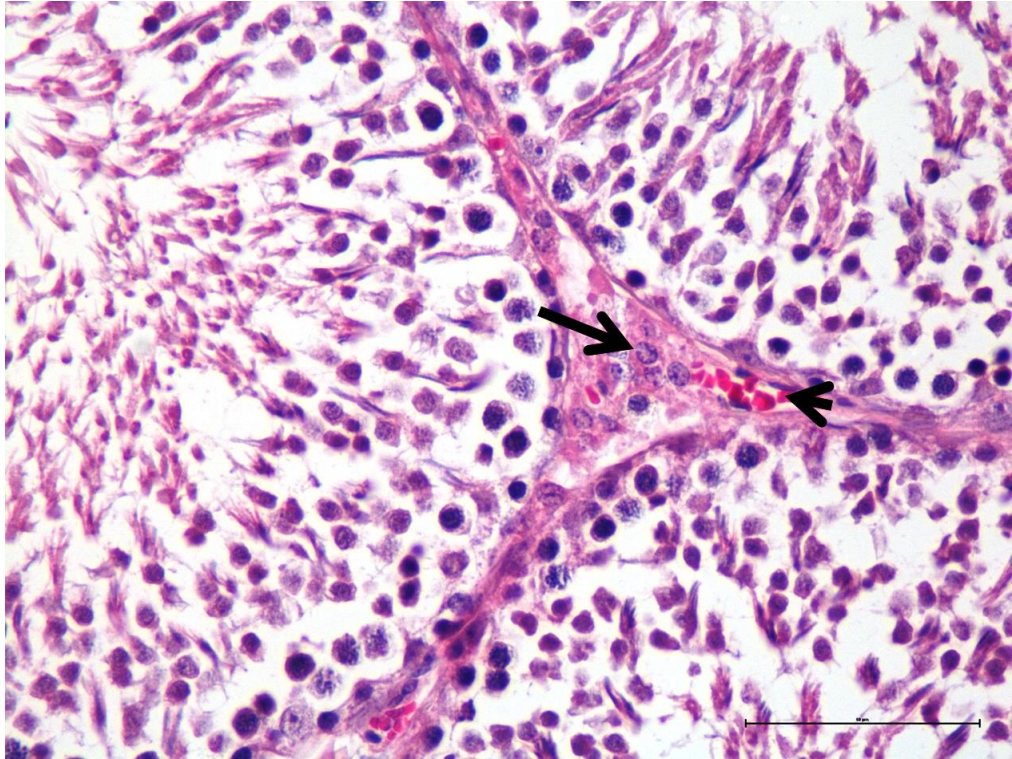
Şekil 4. 13: Quercetin grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller (ok). H-E, x4



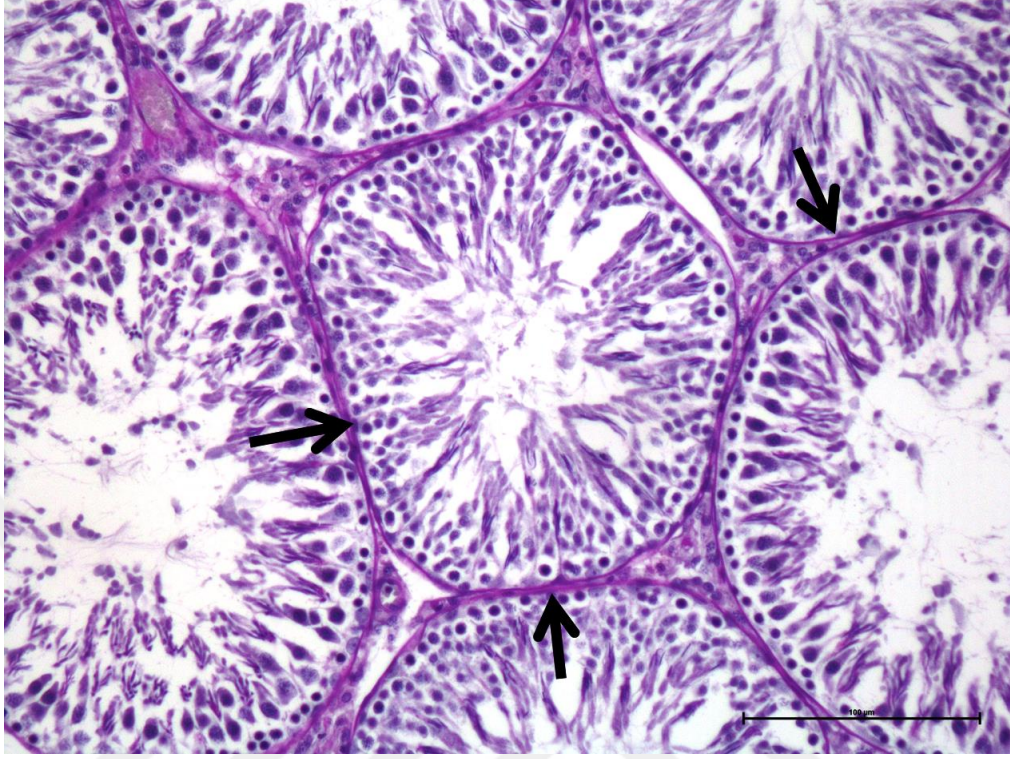
Şekil 4. 14: Quercetin grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller (ok). H-E, x10



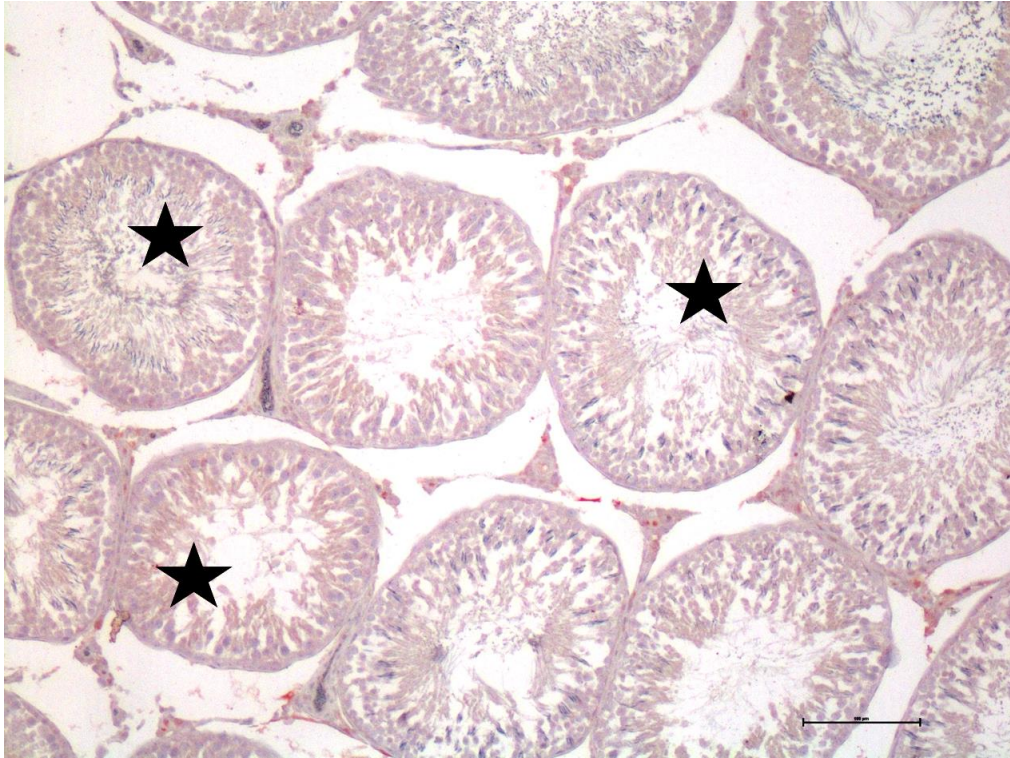
Şekil 4. 15: Quercetin grubu, normal histolojik görünümdeki seminifer tübül lümeninde spermatozoonlar (yıldız), ve interstisiyel bağ dokusu(ok). H-E, x20



Şekil 4. 16: Quercetin grubu, peritübüler alanda Leydig hücresi (ok), damar (ok başı). H-E, x40

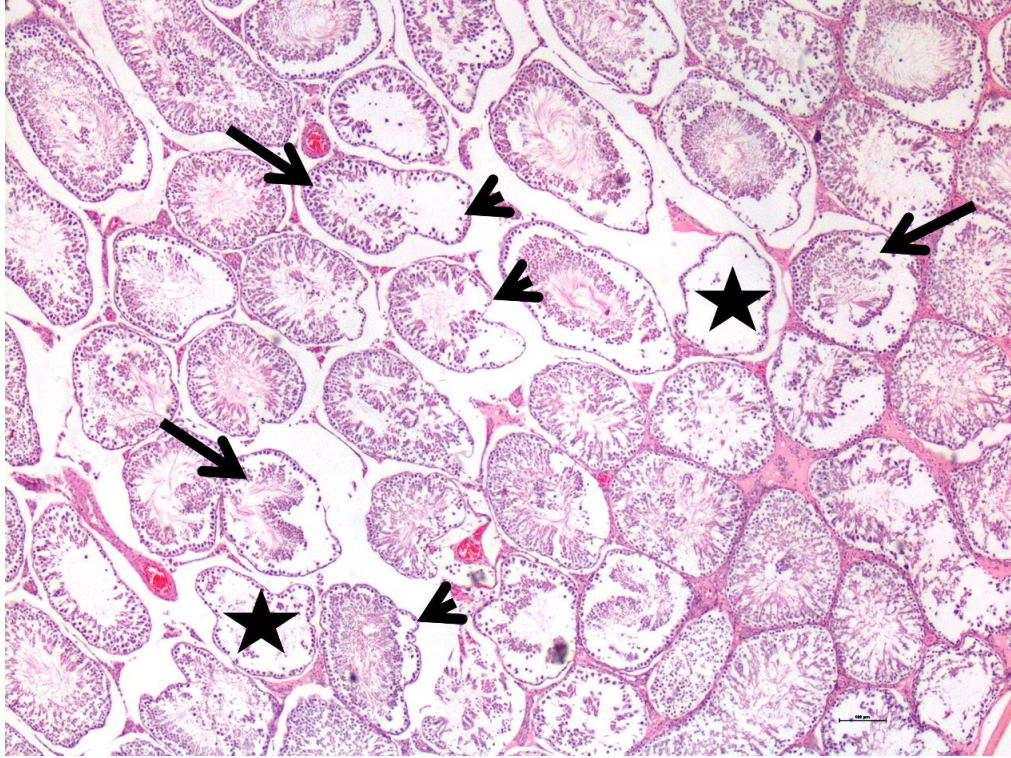


Şekil 4. 17: Quercetin grubu, peritübüler bazal membran normal yapıda (ok). PAS, x40

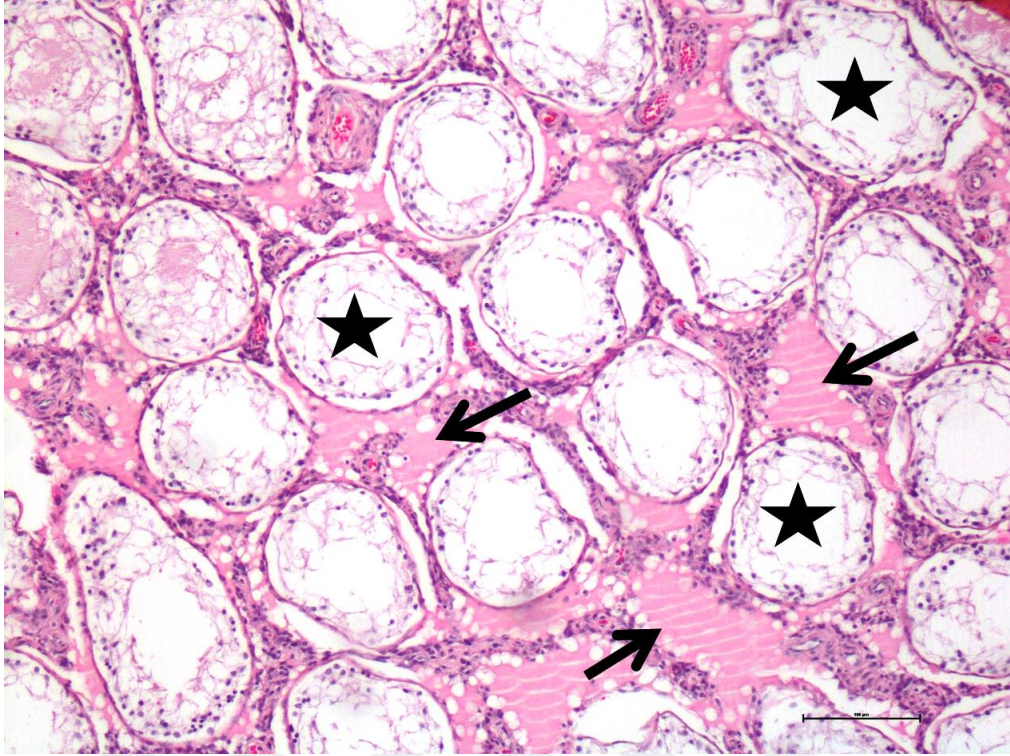


Şekil 4. 18: Quercetin grubu, seminifer tübüllerde düşük yoğunlukta, diffüz C-3 immünoreaktivite pozitifliği (yıldız). C-3, x10

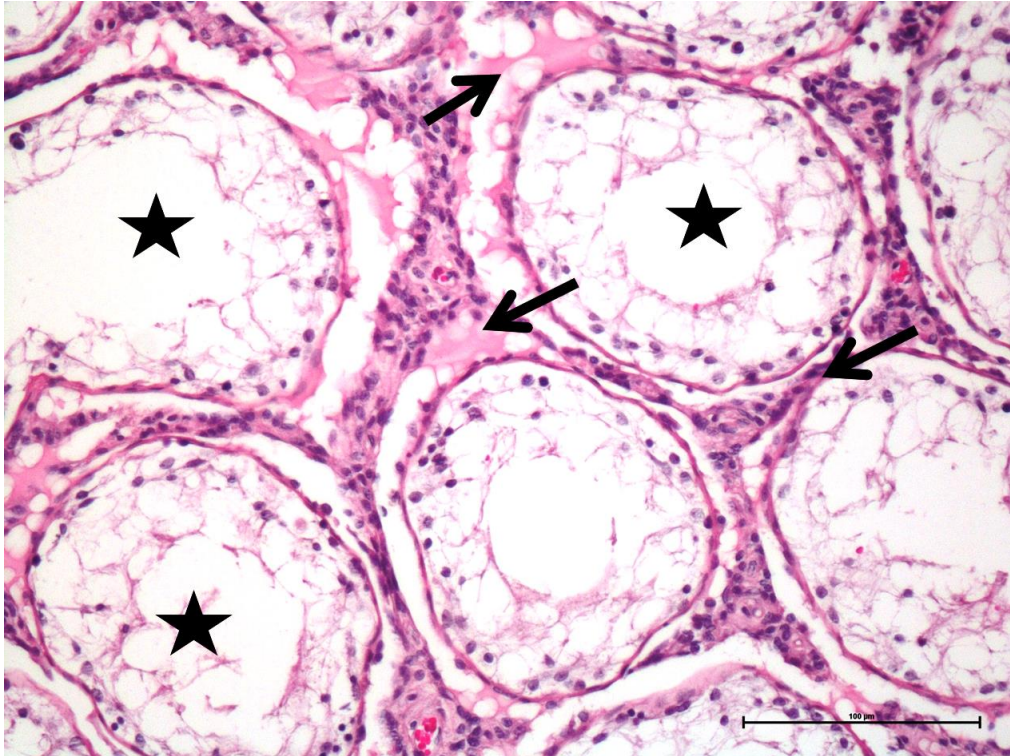
NaF grubu sıçanlarra ait testis kesitlerinde, seminifer túbüllerin sınırlarında düzensizlik, germinatif epitelde dejenerasyon, dökülme, bazal membrandan ayrılma görüldü. Bazı seminifer túbüllerde seminifer epitelin tamamen kaybolduğu izlendi. Yine bazı seminifer túbül lümenlerinde hücresel artefaktlar izlendi. Peritübüler alanda, hafif eozinofilik boyanan asellüler materyal birikim alanları ödem yönünde değerlendirildi. Peritübüler bağ dokusunda minimal düzeyde inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlendi. Leydig hücrelerinde piknotik nükleus yapısı ve sitoplazmik büzüşme dikkati çekti. Bu grubun Jansen skoru (5,05) olarak tespit edildi. Kontrol grubuyla arasında istatikselsel fark görüldü. Pas boyama uygulanan kesitlerde seminifer túbül bazal membranlarında girinti ve çıkıntılılar şeklinde düzensizlik, yer yer bazal membranda incelmeye ve odaklar şeklinde pas pozitif boyanma yoğunluğunda azalma izlendi. Peritübüler alanlarda kuvvetli pas pozitif boyanan asellüler alanlar interstisyel ödem yönünde değerlendirildi. Leydig hücreleri vakuoler sitoplazmalı, zayıf pas pozitif boyanmış olarak izlendi.



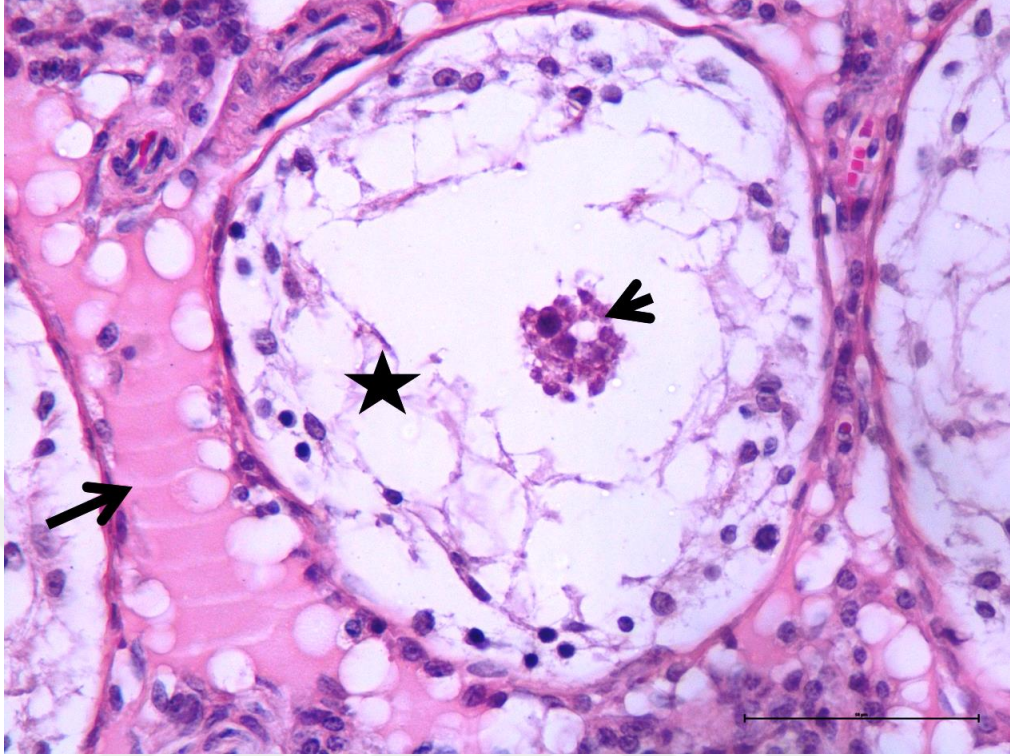
Şekil 4. 19: NaF grubu, seminifer epitelin tamamen yokluğu (yıldız), seminifer túbüllerde hasar(ok), seminifer túbül sınırlarında ondülasyon (ok başı). H-E, x4



Şekil 4. 20: NaF grubu, seminifer tübüllerde total germinatif hücre kaybı (yıldız), interstisyel alanda ödem (ok). H-E, x10

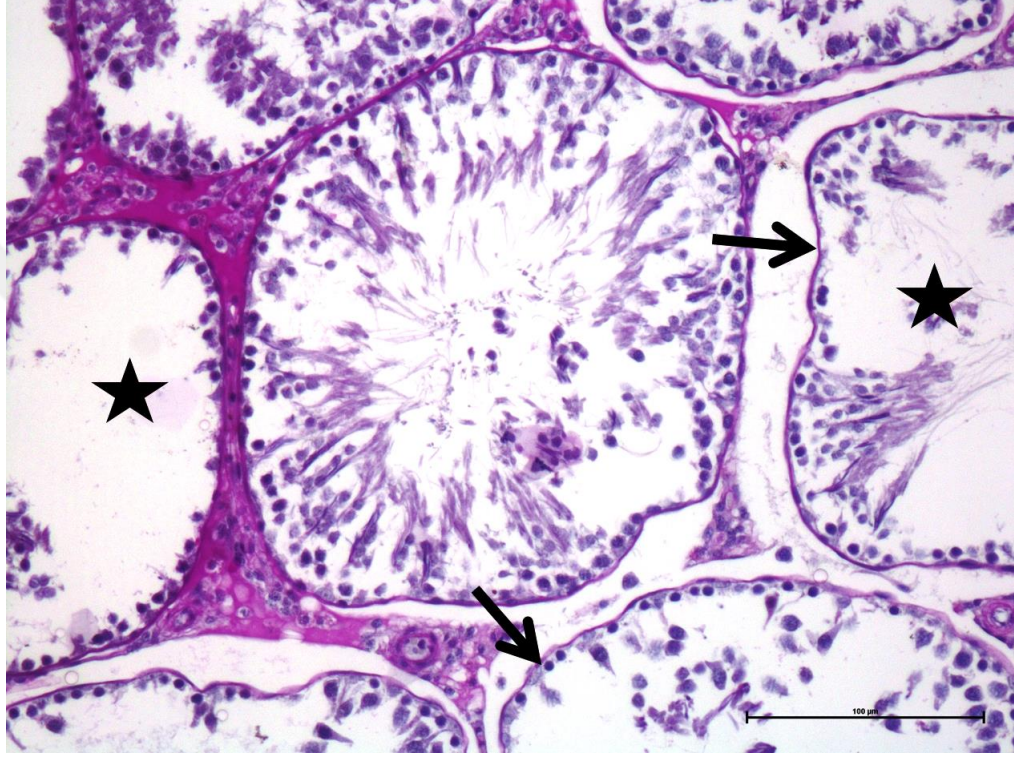


Şekil 4. 21: NaF grubu, seminifer tübüllerde total germinatif hücre kaybı (yıldız), interstisyel alanda ödem (ok). H-E, x20



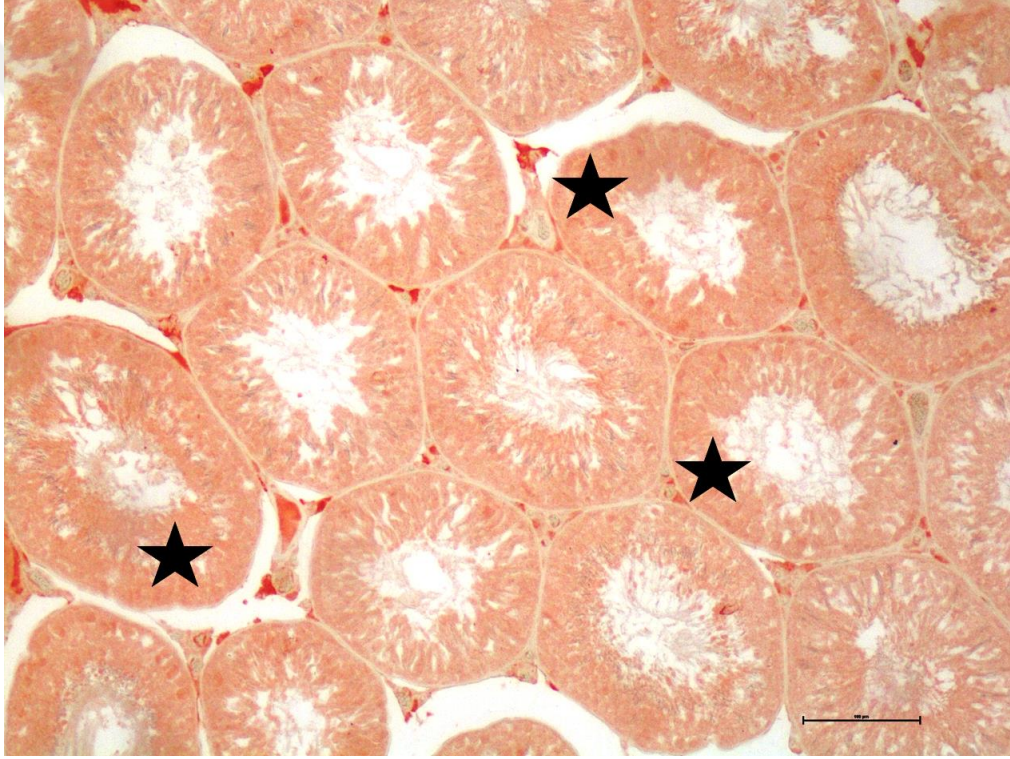
Şekil 4. 22: NaF grubu, seminifer tübüllerde total germinatif hücre kaybı (yıldız), interstisyel alanda ödem (ok), seminifer tübül lümeninde dejenere hücre artıkları (ok başı). H-E, x40

NaF grubunda Periyodik asit schiff (PAS) ile boyanmış kesitlerde seminifer tübül bazal membranlarında incelme, ondulasyon ve yer yer kesintiye uğradığı alanlar izlendi. İnterstisyel bağ dokusu içerisinde PAS pozitif boyanma gösteren ödematöz materyal birikimi, ve piknotik nükleuslu Leydig hücreleri izlendi.



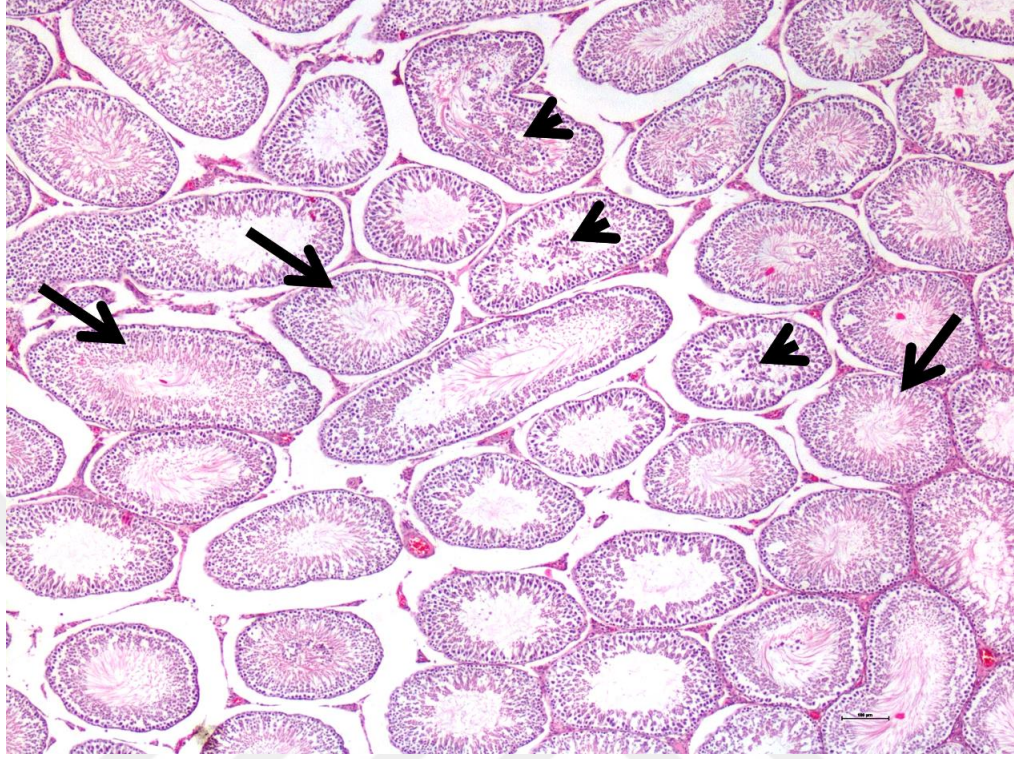
Şekil 4. 23: NaF grubu, peritübüler bazal membranında incelme ve ondülasyon (ok), seminifer tübüllerde germinatif epitel dejenerasyon (yıldız. PAS, x40

NaF grubunun C-3 IHK boyama uygulanan kesitlerin değerlendirilmesinde seminifer tübüllerde diffüz, çoğunlukla orta dereceli, yer yer kuvvetli boyanma yoğunluğuna sahip, C-3 immun reaktivite pozitifliği saptandı. İnterstisyel bağ dokusu içerisinde, leydig hücrelerinde orta ve kuvvetli derecede boyanma yoğunluğunda, C-3 immun reaktivite pozitifliği saptandı. Bu grubun C-3 immun reaktivite pozitifliği H skoru (200) olarak tespit edildi. Kontrol grubu kıyaslandığında C-3 immun reaktivite pozitifliğinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı görüldü.



Şekil 4. 24: NaF grubu, seminifer tübüllerde orta ve kuvvetli derece boyanma yoğunluğunda diffüz C-3 immnorektivite pozitifliği (yıldız). C-3, x10

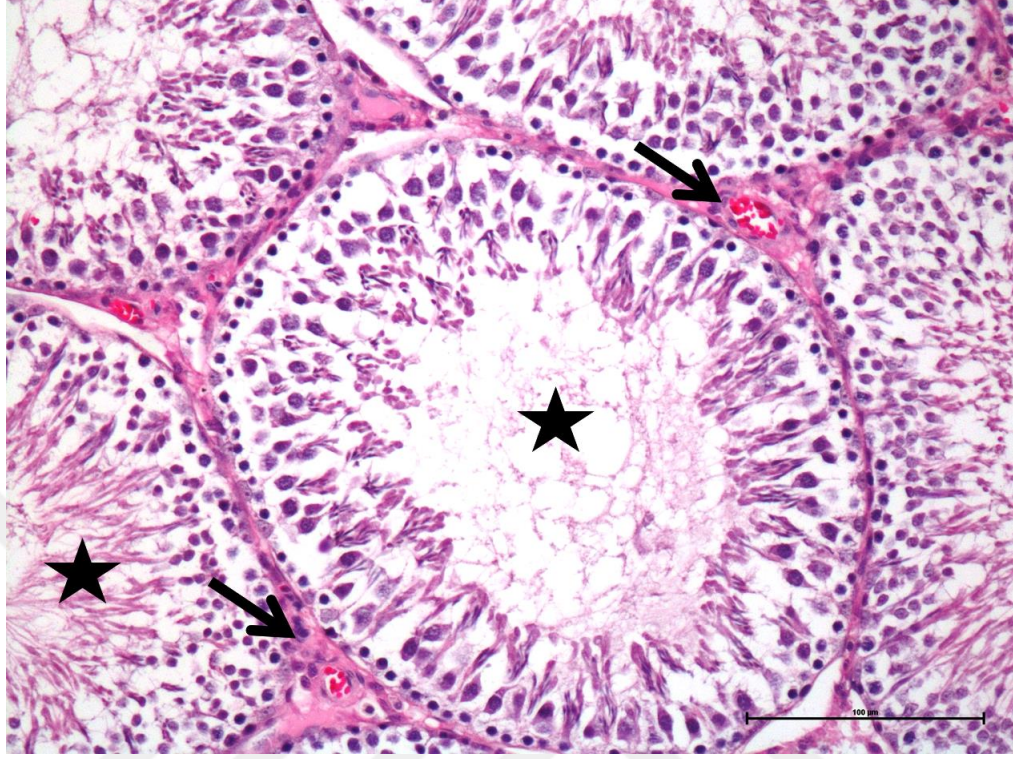
NaF + Quercetin grubundaki sıçanlara ait testis kesitlerinde, seminifer túbüllerin sınırları genel olarak düzgün olup, transvers kesitlerde dairesel görünümde izlendi. Seminifer túbüllerin çoğunda, seminifer epitel, normal histolojik görünümde ve kalınlıkta izlenmekle birlikte bazı túbüllerde seminifer epitelin túbül bazal membranından ayrıldığı ve kalınlığının azaldığı görüldü. Lümeninde farklı yoğunluklarda spermatozoa toplulukları olan túbüller olduğu gibi lümeni boş gözüken túbüller de izlendi. Bazı túbüllerde seminifer epitel normal yapıda izlenmekle birlikte túbül lümeninde dejeneratif hücresel artıklar tespit edildi. Peritúbüler alanların genişleme gösterdiği ve bu şeffaf alanlar içerisinde interstisyel bağ dokusu alanları izlendi. İnterstisyel bağ dokusu alanlarındaki genişleme boyanan bir materyal izlenmemesinedeni ile histolojik tekniğe bağlı olduğu yönünde değerlendirildi. Bununla birlikte yer yer interstisyel alanlarda minimal düzeyde ödem izlendi. Leydig hücreleri kontrol, mısır yağı ve quercetin gruplarındakine benzer şekilde normal histolojik görünümde değerlendirildi.. NaF + Q grubun Jansen skoru (6,44) olarak tespit edildi. Johnsen's skoru kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NaF+quercetin grubunda anlamlı derece düşük olup, NaF grubuna kıyasla bir miktar yüksek olsa da istatistiksel olarak fark görülmedi. Seminifer túbül çapları ortalaması değerlendirildiğinde de gruplar arası anlamlı fark görülmedi.



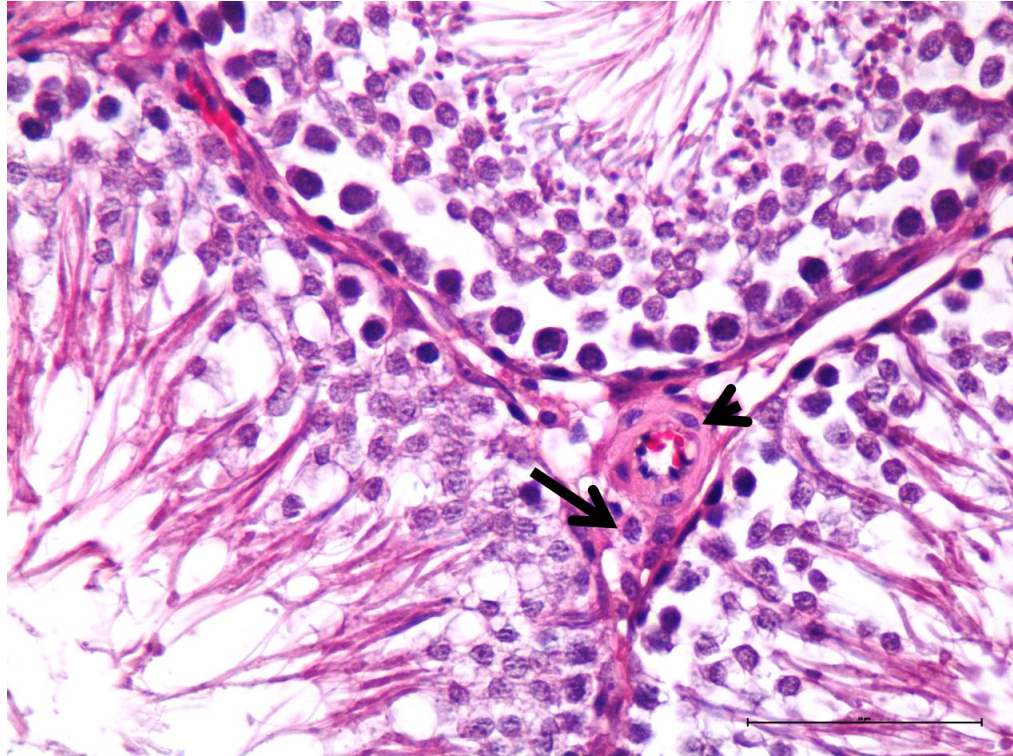
Şekil 4. 25: NaF + Quercetin grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller (ok), seminifer tübül lümeninde dejenere hücreler(ok başı. H-E, x4



Şekil 4. 26: NaF + Quercetin grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller (ok), seminifer tübülde germinatif epitel dejenasyonu(yıldız). H-E, x10

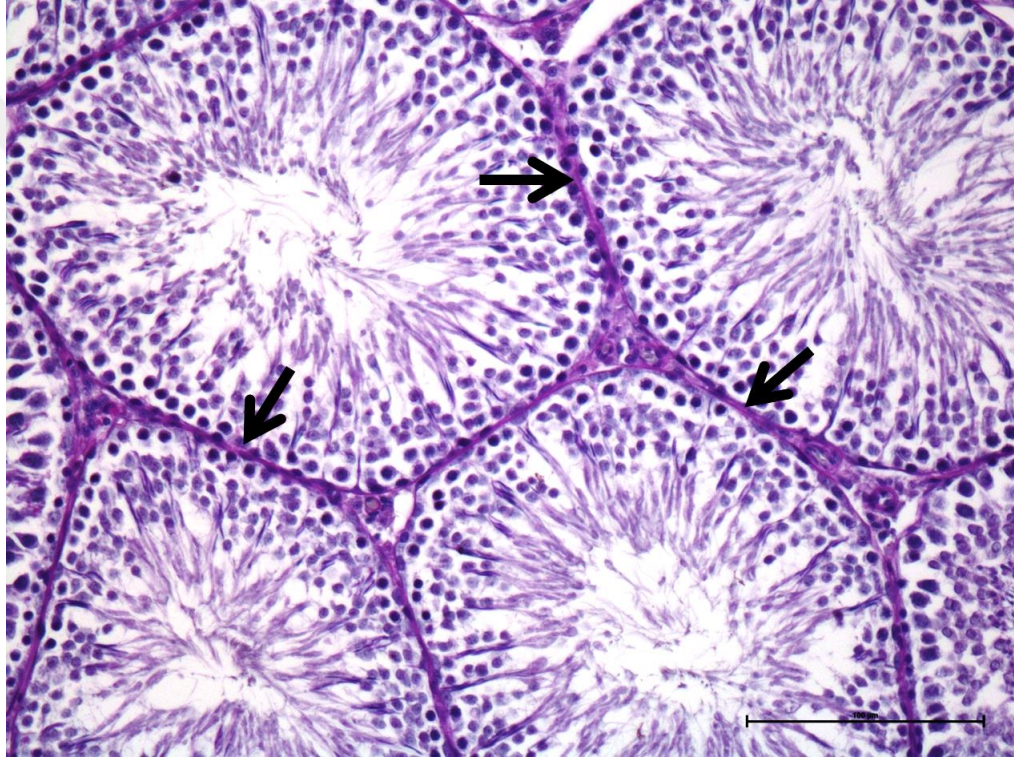


Şekil 4. 27: NaF + Quercetin grubu, normal histolojik görünümde seminifer tübüller (yıldız), normal histolojik yapıda interstisyel bağ dokusu alan (ok). H-E, x20



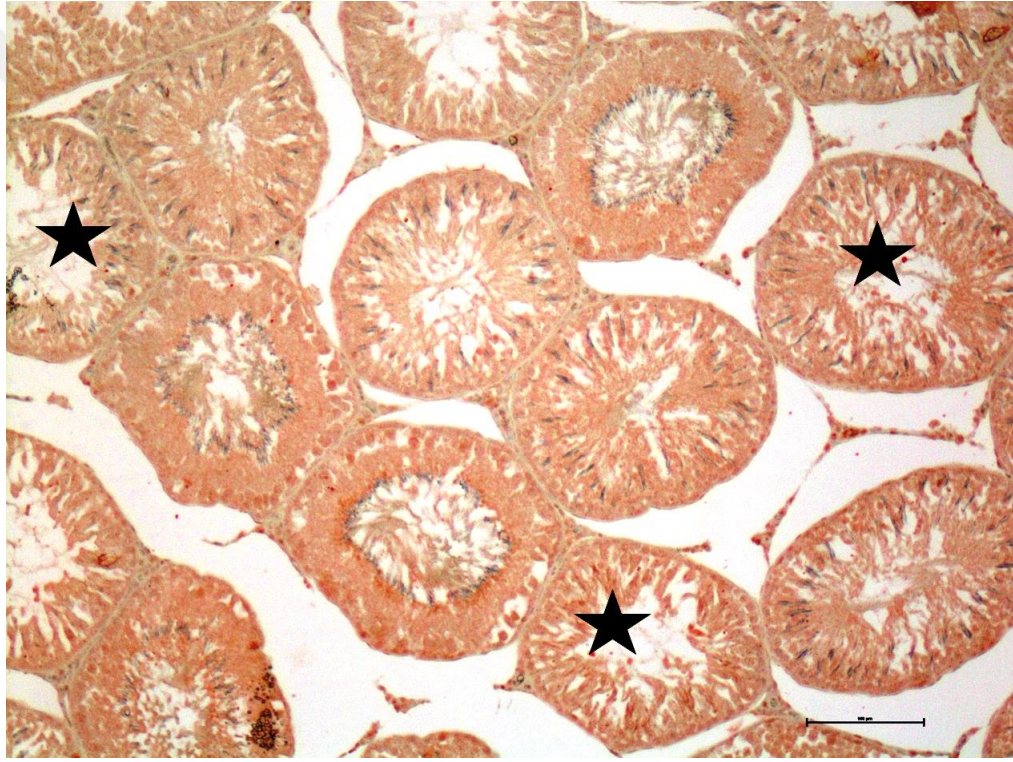
Şekil 4. 28: NaF + Quercetin grubu, peritübüler alanda Leydig hücresi (ok), damar (ok başı). H-E, x40

Pas boyama uygulanan kesitlerde seminifer tübül bazal membranlarının düzgün, olağan kalınlıkta ve PAS pozitif boyanma yoğunluğunda olduğ görüldü. Bazı seminifer tübüllerin epitelleri içerisinde, farklı seviyelerde, nadir olarak, heterokromatik nükleuslu PAS pozitif boyanan hücreler görüldü. Bu hücreler dejenerasyona giden spermatogenik seri hücreleri olarak değerlendirildi. Peritübüler bağ dokusu alanlar ve Leydig hücreleri genel olarak normal histolojik görünümde değerlendirildi.



Şekil 4. 29: NaF + Quercetin grubu, peritübüler bazal membran normal yapıda (ok).
PAS, x40

NaF + Q grubunun C-3 IHK boyama uygulanan kesitlerinin değerlendirilmesinde seminifer tübüllerde diffüz, minimal ve yer yer orta dereceli, boyanma yoğunluğu tespit edildi. İnterstisyel bağ dokusu içerisinde nadir olarak orta düzeyde boyanma yoğunluğuna sahip C-3 immün reaktivite pozitifliği gösteren Leydig hücreleri izlendi. Bu grubun C-3 immün reaktivite pozitifliği H skoru (100) olarak belirlendi. Gruplar arasında C-3 immün reaktivite pozitifliği NaF grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olmakla birlikte kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görüldü.



şekil 4. 30: NaF + quercetin grubu, seminifer tübüllerde hafif ve orta derece boyanma yoğunluğunda diffüz C-3 immünoreaktivite pozitifliği (yıldız). C-3, x10

Seminifer tübül çapları ortalamaları karşılaştırıldığında guruplar arasındda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

Tablo 4.1. Tübül apları

	Tübül apı
Kontrol (n=6)	137,99±5,69
Mısır yağı(n=6)	147,79±12,15
Quercetin (n=6)	139,59±6,54
NaF (n=6)	140,54±3,53
Quercetin+NaF (n=6)	140,32±8,59
p değeri	0,264

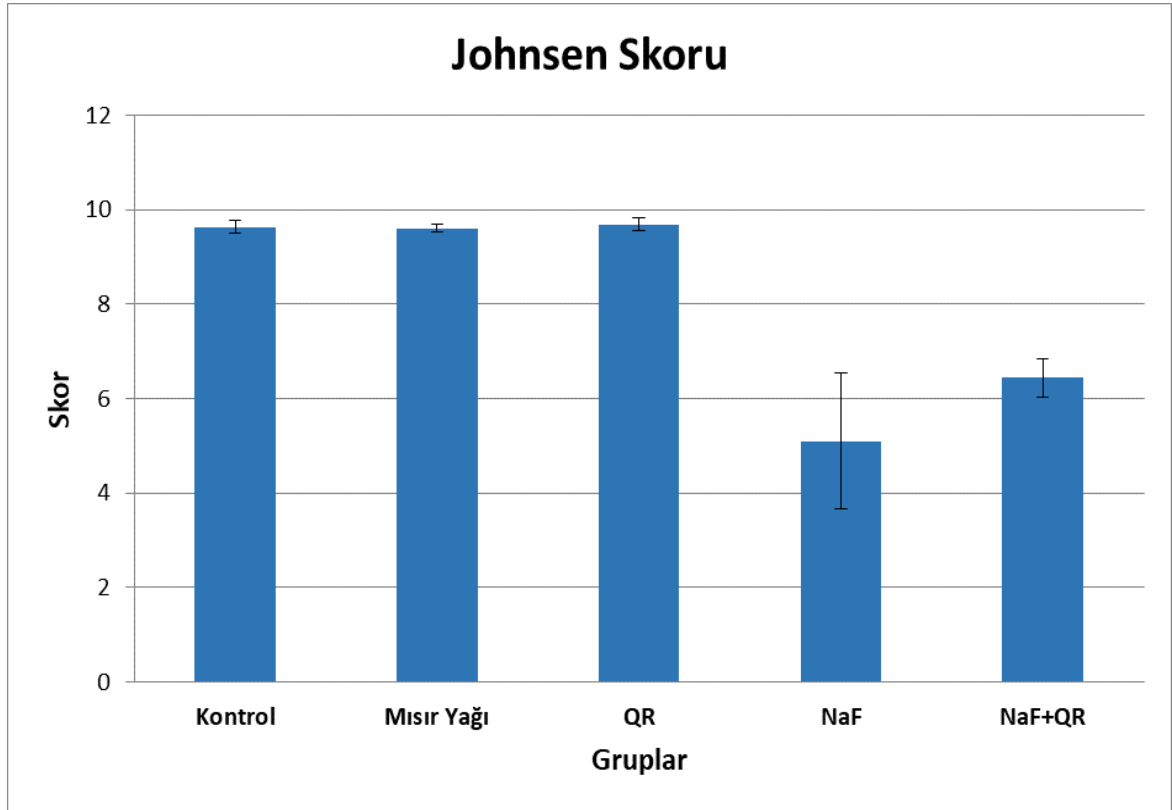
Johnsen's hasar skoru ortalama değerleri karşılaştırıldığında kontrol (9,67), mısır yağı (9,61) ve quercetin (9,73) gurupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş olup, NaF (5,05) ve NaF+quercetin (6,35) guruplarının skor ortalaması kontrol grubunda göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. NaF grubunun Johnsen's skor ortalaması NaF+quercetin grubunun skor ortalamasından daha düşük olsa da bu iki grubun skor ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

H skoru ortalama değerleri karşılaştırıldığında ise, kontrol (80), mısır yağı (80) ve quercetin (80) gurupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmayıp, NaF (200) ve NaF+quercetin (100) guruplarının skor ortalaması kontrol grubunda göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Ayrıca NaF grubunun H skor ortalaması NaF+quercetin grubunun skor ortalamasından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu da tespit edilmiştir.

Tablo 4.2. Johnsen ve H Skor tabloları

	Johnsen's skor	H skoru
Kontrol (n=7)	9,67(9,39-9,76) ^a	80(50-100) ^a
Mısır yağı (n=7)	9,61(9,47-9,71) ^a	80(50-100) ^a
Quercetin (n=7)	9,73(9,5-9,88) ^a	80(50-100) ^a
NaF (n=6)	5,05(2,71-7,11) ^b	200(200-300) ^b
NaF + Quercetin (n=6)	6,35(5,96-6,98) ^b	100(80-160) ^c
p değerleri	<0,001	<0,001

*Ortalama (minimum-maximum)



Şekil 4. 31: Johnsen skoru grafiği. Kontrol grubu, mısır yağı grubu, quercetin grubu farksız, NaF ve NaF+Quercetin grubu aralarında farksız.

4.2. Biyokimyasal Bulgular

MDA ortalama değerleri karşılaştırıldığında kontrol (847,16), mısır yağı (848,30) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş olup, quercetin grubu (568,58) MDA istatistiksel olarak anlamdı düzeyde düştüğü gözlenmiştir. NaF (1101,18) ve

NaF+quercetin (961,33) gruplarının MDA ortalama değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştır. Ayrıca NaF grubunun MDA değer ortalaması NaF+quercetin grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı dereceye yüksek bulunmuştur.

Benzer şekilde TOS ortalama değerleri karşılaştırıldığında kontrol grubu (10,71), mısır yağı grubu (10,71) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş olup, quercetin grubu (7,80), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamdı düzeyde düştüğü gözlenmiştir. NaF (13,57) ve NaF+quercetin (11,66) gruplarının TOS ortalama değerleri, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olup, NaF grubunun MDA değer ortalaması NaF+quercetin grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı dereceye yüksek bulunmuştur.

GSH değerleri ortalaması kontrol (1711,07) grubu ile mısır yağı (1727,70) grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi. Quercetin grubu GSH ortalama değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artış tesbit edildi. NaF ve NaF+quercetin gruplarında GSH ortalama değerleri kontrol grubuna oranda azalma mevcut olup NaF grubundaki azalma NaF+quercetin grubu ile karşılaştırıldığında da istatistiksel olarak anlamdı düzeyde olduğu görüldü.

TAS ortalama değerleri de GSH'da olduğu gibi kontrol (2,88), mısır yağı (2,86) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiş olup, quercetin grubu (6,51), kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamdı düzeyde arttığı gözlenmiştir. NaF (1,56) ve NaF+quercetin (2,40) gruplarının TAS ortalama değerleri, kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artmış olup, NaF grubunun TAS değer ortalaması NaF+quercetin grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı dereceye düşük bulunmuştur.

Tablo 4.3. Oksidatif stres parametreleri

	MDA nmol/g wet tissue	GSH nmol/g wet tissue	TAS mmol/L	TOS μmol/L
Kontrol	847,16±21,69 ^a	1711,07±38,09 ^a	2,88±0,14 ^a	10,71±0,28 ^a
Mısır Yağı	848,30±14,91 ^a	1727,70±84,47 ^a	2,86±0,14 ^a	10,71±0,44 ^a
Quercetin	568,58±21,69 ^b	2146,56±21,29 ^b	6,51±0,19 ^b	7,80±0,19 ^b
NaF	1101,18±39,90 ^c	1246,91±49,45 ^c	1,56±0,18 ^c	13,57±0,27 ^c
Quercetin+NaF	961,33±21,17 ^d	1522,65±48,65 ^d	2,40±0,24 ^d	11,66±0,34 ^d
p değerleri	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

*ortalama±standart sapma

Tüm değişkenler için kontrol ve mısır yağı farksız, ikisi dışında tüm gruplar birbirinden farklıdır.

Tablo 4.4. Serum hormon düzeyleri

	LH (mIU/mL)	Testosteron (pg/mL)	FSH (mIU/mL)
Kontrol	2,91±0,10 ^a	76,58±1,26 ^a	3,57±0,07 ^a
Mısır Yağı	2,91±0,10 ^a	76,79±0,98 ^a	3,56±0,08 ^a
Quercetin	4,73±0,28 ^b	102,82±4,59 ^b	5,73±0,08 ^b
NaF	1,71±0,09 ^c	56,68±1,44 ^c	2,45±0,08 ^c
Quercetin+NaF	2,55±0,09 ^d	67,12±1,66 ^d	3,01±0,04 ^d
p değerleri	<0,001	<0,001	<0,001

*ortalama ± standart sapma

Tüm değişkenler için kontrol ve mısır yağı farksız, ikisi dışında tüm gruplar birbirinden farklıdır.

5. TARTIŞMA

Flor kaynakları arasında volkanik gazlar, florür ihtiva eden minerallerin endüstride işlenmesi, okyanus spreyi, yanmış kömür dumanı, çeşitli endüstriyel işlemler sayılabilmektedir. Çevredeki florür iyonuna, florürün yüksek olduğu gübre, tuğla, çimento, demir ve çelik gibi endüstrilerin atık suları sebep olmaktadır. Balık ve diğer deniz ürünleri, deniz suyunda flor bulunması nedeniyle flor açısından zengin kaynaklardır (96,97). Halojenler grubunda en reaktif element olan flor, öncelikle diş ve iskelet sistemi olmak üzere diğer doku ve organlarda da hasarlar meydana getirerek sağlık sorunları oluşturabilmektedir (98-102). Deney hayvanları ile yaptığımız bu kontrollü çalışma ile NaF maruziyeti sonucu erkek sıçanların testis dokularında oluşabilecek hasarlara karşı, quersetinin, tanımlanmış antioksidatif, serbest radikal süpürücü ve sitoprotektif etkileri sayesinde, koruyucu etkinliğini histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelemeyi amaçladık.

Tsuneri ve ark. yüksek doz flor verilen prepubertal tavşanlarda seminifer tübüllerin gerilediğini ve çok çekirdekli dev spermatid hücrelerinin oluştuğunu bildirmiştir. Direk testis içerisinde 150, 175, 250 ppm flor injeksiyonunun seminifer tübüllerde hasara yol açtığı fakat leydig hücrelerinin etkilenmediği rapor edilmektedir(103). İçerisinde 50 mg/kg/gün flor ihtiva eden suyu 100 gün alan sıçanların testisinde spermatogenezisin durduğu ve seminifer tübüllerin nekroze olduğu bildirilmektedir. Gökçimen ve ark. Yaptığı çalışmada ise yüksek doz flor uygulanan sıçanların testis dokusu ile kontrol grubundaki testis dokusu arasında yapısal bir patolojiye ve farklılığa rastlanmadı. Ayrıca daha önceki çalışmalarda belirtilen testis bulgularına da rastlanmadığı ifade edilmiş(104)

Gubari S. yaptığı bir tez çalışmasında karbosulfan uyguladığı sıçanlarda ışık mikroskopik seviyede, kontrol grubunda testis doku örneklerinde belirgin bir yapısal bozukluğa rastlamamış, deney grubunda ise testis doku örneklerinde germinatif epitelde dökülmeden tübüler atrofiye kadar değişen bulgular izlendi (105). Biz de yaptığımız çalışmada sıçan testis dokularında 30mg/kg gün dozda NaF'ün testis dokusu üzerinde histolojik ve biyokimyasal zararlı etkilerini belirledik. Bu etkiler histolojik olarak, seminifer tübül epitelinde dökülme, dejenerasyon, interstisyel ödem, Leydig hücrelerinde nükleer koromatin yoğunlaşması, sitoplazmik eozinofili artışı, seminifer tübül bazal

membranlarında düzensizlik ve testis dokusunda C-3 immunreaktivite artışı olarak gözlemlendi.

NaF ile yapılmış çalışmalar ile ilgili literatür taramamızda Johnsen's skoru uygulanarak değerlendirme yapılmış çalışmaya rastlanmamıştır, Histolojik bulgularımız üzerinde yapmış olduğumuz Johnsen's histolojik hasar skoru ortalamaları, kontrol grubunda (9,67), mısır yağı grubunda (9,61) ve quercetin grubunda (9,73), NaF grubunda (5,05) ve NaF+quercetin grubunda (6,35) olarak bulunmuştur. Literatürdeki çalışmalarda Johnsen's skoru yapılmamış olsa da, bulgularımız bu çalışmalardaki belirtilen bulgular ile önemli derecede benzerlik göstermektedir.

Leydig hücrelerinde testosteron sentezini yürütmek için gerekli olan enerji üretiminde mitokondriyal elektron transfer sistemine bağlı olarak oksidatif stres meydana gelir ve sonucunda ROT üretilir(106, 107) ve Oksidatif strese maruz kalan Leydig hücrelerinde antioksidan enzimlerin, örn. katalaz, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) aktiviteleri azalır, lipid peroksidasyon ürünü olan malon dialdehid (MDA) sekresyonu artar (108-111) DNA'nın oksidatif modifikasyonu testosteron sentezi için gerekli olan mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya neden olur (112, 113). Oksidatif hasar gören Leydig hücrelerinde hücre başına düşen LH reseptör ekspresyonu azalır ve sonucunda LH reseptör duyarlılığı azalmış olur. Ayrıca CYP11A1, 3 β -HSD, CYP17A1 hydroxylase, CYP17A1 lyase, 17 β -HSD gibi birkaç enzimin azaltılmış aktiviteleri testosteron biyosentetik yolunun aktivasyonunu azaltılması sonucu testosteron sentezi baskılanmış olur. (114-116). Sonuç olarak sistemik oksidatif stres, Leydig hücrelerinde testosteron sentezini inhibe eder. Sistemik oksidatif stres salınımının azaltılması, testosteron sentezinin oksidatif inhibisyonun etkilenmesinin azaltılmasını sağlar. Bu hipotezlerle uyumlu olarak, besinsel antioksidanlar, oksidatif streste sistemik ve yerel bir azalmaya katkıda bulunarak testosteron sentezinin inhibisyonunun veya tersine çevrilmesi yönünde etki ederek testosteron sentezinin artırılmasını sağlayabilir. Çalışmamızda NaF'ün testiküler histolojik ve biyokimyasal hasarlayıcı etkilerine karşı koruyucu olarak quercetin uyguladık. Quercetin hem kontrol ve mısır yağı gruplarında, hem de NaF grubunda serum testosteron düzeylerinin anlamlı derecede yükselmesini sağlamıştır.

Spermatogenezde spermatozoon gelişiminin ve aynı süreçteki testiküler germ hücre ölümünün hormonal bir kontrol mekanizması altında gerçekleştiği bildirilmiştir (117, 118) Seminifer tübül epitelinin radyasyon, ısı veya soğuk gibi fiziksel etkenlere ve toksik ajanlara karşı olan hassaslığı da germ hücrelerinin apoptozisini arttıran önemli bir faktördür (119). Sonuç olarak testiküler fizyolojiyi bozan çevresel uyarıların varlığında patolojik düzeyde apoptozis gerçekleşir ve bu durum spermatogenezde bozulmalara, spermatozoon gelişim potansiyelinin azalmasına dolayısıyla da infertiliteye neden olabilir (120).

Spermatogenezde, spermatogenik seri hücreler normal gelişiminde optimum sayıda programlı hücre ölümü meydana gelmektedir (121-4). Bu normal gelişimin dışında germ hücrelerinin artmış ya da azalmış apoptozisi anormal spermatogenezin oluşumuna ve buna bağlı olarak erkek infertilitesine sebep olabileceği önceki çalışmalarda bildirilmiştir (1245-7). Deneysel olarak laboratuvar hayvanlarında farklı testiküler toksik ajanlardan sonra germ hücrelerinde apoptozisin arttığı gösterilmiştir (128). Yüksek oranda antioksidanlara sahip olmakla birlikte testis, toksik ajanlara ve stres etkenlerine hassastır, bunun sonucunda germ hücrelerinde programlı hücre ölümü indüklenir (129)

Cisplatinin testisin morfolojik yapısında meydana getirdiği değişiklikler ile hormon düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, tek doz (5 mg/kg) cisplatin uygulamasının, erişkin sıçanlarda 3. ve 21. günlerde, testiküler hasarlar ile birlikte serum testosteron düzeyinde de belirgin bir düşmeye neden olduğu gösterilmiştir (130). Araştırmacılar, cisplatinin Leydig hücre disfonksiyonu aracılığı ile serum testosteron düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (131, 132). NaF maruziyetinin insanlarda ve deneysel çalışmalarda Testosteron düzeyine etkisini bildiren herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ancak Cisplatin, testiküler toksisitesi gösterilmiş maddelerin testosteron seviyesinde azalmaya neden olduğu bildirilmektedir. Çalışmamızda uyguladığımız NaF sıçanların serum testosteron düzeyinde Kontrol grubu ve mısıryağı grubuna göre NaF grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüşe neden olduğunu belirledik. NaF'ün diğer toksik ajanlar gibi farklı seviyelerde olmakla birlikte serum testosteron düzeyini azaltıcı etkisi gösterilmiştir. Toksik maruziyete bağlı serum testosteron seviyesindeki azalmayı engelleyecek antioksidan etkili L-carnitinin serum testosteron düzeyini koruyucu etkinliği gösterilmiştir (133). Çalışmamızda NaF'ün

testiküler histolojik ve biyokimyasal hasarlayıcı etkilerine karşı koruyucu olarak quercetin etkileri değerlendirildi. Quercetin hem kontrol ve mısır yağı gruplarında, hem de NaF grubuna kıyasla serum tetstosteron düzeylerinin anlamlı derecede yükselttiği saptandı.

Oksidatif stresin, erkek germ hücre serisinde nükleus ve mitokondriyonlarda fonksiyon kaybına, bunun sonucu olarak da spermatozoada hasara neden olduğu bilinmektedir. Sperm patofizyolojisinde önemli rol oynayan ROT, erkek infertilitesine neden olan faktörler arasında ön sırada yer alır. İnfertil erkeklerin seminal sıvılarında, fertil erkeklere göre daha yüksek seviyelerde ROT bulunduğu bilinmektedir. Seminal plazmada yüksek oranda SOD ve Katalaz gibi antioksidan maddeler bulunmaktadır (134). ROT ve antioksidan sistem arasındaki dengenin oksidan sistem tarafındabozulması sonucunda oksidatif stres meydana gelir ve DNA, lipid ve proteinlerde oksidatif hasarlar oluşur (135). SDO, katalaz, GSH gibi enzimler ve glutasyon antioksidan savunma sistemi içerisinde görev alırlar (136). Çalışmamızda NaF toksikasyonunda Quersetinin antioksidan etkilerini incelemek için testis dokusunda MDA, GSH, TAS ve TOS değerleri incelendi. GSH ve TAS seviyelerinde kontrol grubu ile kıyaslandığında mısır yağı gurubu benzer, flor grubu daha çok olmak üzere flor ve flor+quersetin gruplarında azalma, quercetin grubunde ise artış ($P < 0,001$) gözlemlendi. MDA ve TOS seviyelerinde ise kontrol grubu ile kıyaslandığında mısır yağı gurubu benzer, flor grubu daha çok olmak üzere flor ve flor+quersetin gruplarında artış, quercetin grubunde ise azalma ($P < 0,001$) gözlemlendi. NaF maruziyeti sonucu artan ROT zararlarına karşı quercetin kullanımı özellikle antioksidan ve oksidan parametreler arasında bozulan dengeyi düzelterek etkili olduğu gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, sıçanlarda NaF maruziyeti sonucu testislerinde meydana gelen değişikliklerin histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle gösterilmesi, serum testosteron, LH ve FSH seviyelerinin değerlendirilmesi ve Quercetin uygulamasının bu değişiklikler üzerine koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen histolojik bulgulara göre, Bazı seminifer tübüllerde seminifer epitelin tamamen kaybolduğu izlendi. Yine bazı seminifer tübül lümenlerinde hücrel artefaktlar izlendi. Bu değerlendirmeler yarı kantitatif olarak değerlendirmek için Johnson's histolojik hasar skoru hesaplanarak değerlendirildi ve kontrol grubu ile NaF ve NaF+quercetin grupları arasında anlamlı derecede fark gözlemlendi. C-3 immünreaktivite açısından yarı kantitatif değerlendirme yapılabilmek için H skoru hesaplandı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubu ile NaF ve NaF+quercetin grupları arasında, ayrıca NaF ve NaF ve NaF4quercetin grupları arasında da anlamlı düzeyde fark saptandı. Yapılan biyokimyasal analizlerde, oksidan sistem göstergesi olarak değerlendirilebilecek MDA ve TOS düzeylerinin kontrol ve mısır yağı gruplarında benzer, quercetin grubunda anlamlı derecede düşük tespit edilmiş olup NaF ve NaF+quercetin gruplarında kontrol grubuna kıyasla artmış olarak bulunmakla birlikte NaF grubunda en yüksek değerde saptanmıştır. Antioksidan sistem parametresi olarak değerlendirilebilecek GSH ve TAS düzeyleri ise kontrol ve mısır yağı gruplarında benzer, quercetin grubunda anlamlı derecede yüksek tespit edilmiş olup NaF ve NaF+quercetin gruplarında kontrol grubuna kıyasla azalmış olarak bulunmakla birlikte NaF grubunda en düşük değerde bulunmuştur.

Çalışmamızda elde edilen tüm bulgular değerlendirildiğinde, quercetin, NaF maruziyetine bağlı testiküler hasarı azaltma ve bozulan hormonal düzeylerin dengelenmesi yönünde etkili olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, ülkemizde de yüksek florür içeren kaynak sularına sahip olması nedeni ile endemik florozis görülen bölgelerde veya dış tedavisi nedeni ile NaF maruziyetine uğrayan kişilerde quercetin kullanımının testis dokusunun histolojik ve biyokimyasal açıdan korunmasında, testosteron düzeylerinde azalmanın önlenmesi yönünde katkıları olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. AVCI B, Baysal SU, Gökçay G. Çocuklarda Flor Kullanımının Yarar Ve Zararlarının Değerlendirilmesi. Çocuk Dergisi. 2009;9:8-15.
2. Tekçiçek M. Okul Sağlığı Programlarında Ağız Diş Sağlığının Önemi Ve Kapsamı. İçind: Şaşmaz T, Karadağçaman Ö, Editörler; Halk Sağlığı Günleri III. Ulusal Okul Sağlığı Sempozyumu, Ankara, Halk Sağlığı Uzmanları Derneği, 2014, 8-14
3. WHO Model Formulary 2008 (PDF). World Health Organization. 2009. P. 501-502.
4. British National Formulary: BNF 69 (69 Ed.). British Medical Association. 2015. P. 699-700
5. Saha, Ashok Kumar (2016). Otolaryngology & Middle Ear Surgery. JP Medical Ltd.
6. Haguenaer, D; Welch, V; Shea, B; Tugwell, P; Wells, G (2000). "Fluoride For Treating Postmenopausal Osteoporosis.". The Cochrane Database Of Systematic Reviews (4): CD002825. PMID 11034769.
7. Klein R, Pourmoghaddas A, Mc Ardle B, Chow BJ. Use Of Radiolabeled Compounds And Imaging As Cardiac Biomarkers. General Methods In Biomarker Research And Their Applications. 2014:1-23.
8. Zhang J, Zhang Y, Liang C, Wang N, Zheng H, Wang J. Choline Supplementation Alleviates Fluoride-Induced Testicular Toxicity By Restoring The NGF And MEK Expression In Mice. Toxicol Appl Pharmacol. 2016 Nov
9. Akdoğan M, Bilgili A, Karaöz E, Gökçimen A, Eraslan G, Üstüner E. The Structural And Biochemical Changes Of Kidney Tissue On Fluorosis In Rabbits. Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences. 2002 Feb 6;26(1):71-7.
10. Yang Y, Huang H, Ba Y, Cheng XM, Cui LX, Effect Of Oxidative Stress On Fluoride-Induced Apoptosis In Primary Cultured Sertoli Cells Of Rats., Int J Environ Health Res. 2015;25(1):1-9
11. Moskaug, J.O., Et Al., Molecular Imaging Of The Biological Effects Of Quercetin And Quercetin-Rich Foods. Mech Ageing Dev, 2004. 125(4): P. 315-24.
12. Altintas R, Ciftci O, Aydin M, Akpolat N, Oguz F, Beytur A. Quercetin Prevents Docetaxel-Induced Testicular Damage In Rats. Andrologia. 2015 Apr;47(3):248-56.

13. Kuhnau, J., The Flavonoids. A Class Of Semi-Essential Food Components: Their Role In Human Nutrition. *World Rev Nutr Diet*, 1976. 24: P. 117-91.
14. Mariani C, Braca A, Vitalini S, De Tommasi N, Visioli F, Fico G. Flavonoid Characterization And In Vitro Antioxidant Activity Of *Aconitum Anthora* L.(Ranunculaceae). *Phytochemistry*. 2008 Mar 1;69(5):1220-6.
15. De Souza SR, De Miranda Neto MH, Perles M, Colombo JV, Vieira Frez FC, Zignani I, Ramalho FV, Hermes-Uliana C, Bossolani GD, Zanoni JN. Antioxidant Effects Of The Quercetin In The Jejunal Myenteric Innervation Of Diabetic Rats. *Frontiers In Medicine*. 2017 Feb 7;4:8.
16. Grace PA. Ischaemia-Reperfusion Injury. *British Journal Of Surgery*. 1994 May;81(5):637-47.
17. Halliwell B. How To Characterize An Antioxidant: An Update. *Inbiochem Soc Symp* 1995 Nov 1 (Vol. 61, No. 1, Pp. 73-101).
18. Varol E, Varol S. Çevresel Bir Hastalık Olarak Florozis Ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkisi. *TAF Preventive Medicine Bulletin*. 2010 May 1;9(3):233-8.
19. Milli Eğitim Bakanlığı. 7A Grubu Elementleri. İçinde, Kimya Teknolojisi. Ankara, 2012, 4
20. Comba B. Hayvanlarda Florozis, Teşhis, Tedavi Ve Koruma. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*.;24(1):41-4.
21. Küçükeşmen Ç, Sönmez H. Dişhekimliğinde Florun, İnsan Vücudu Ve Dişler Üzerindeki Etkilerinin Değerlendirilmesi. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*. 2008;15(3):43-53.
22. Joshi NV, Vesey AT, Williams MC, Shah AS, Calvert PA, Craighead FH, Yeoh SE, Wallace W, Salter D, Fletcher AM, Van Beek EJ. 18F-Fluoride Positron Emission Tomography For Identification Of Ruptured And High-Risk Coronary Atherosclerotic Plaques: A Prospective Clinical Trial. *The Lancet*. 2014 Feb 22;383(9918):705-13.
23. Ercan E, Baglar S, Colak H. Diş Hekimliğinde Topikal Florür Uygulama Metotları. *Cumhuriyet Dental Journal*. 2010;13(1). 27-32
24. Akdoğan M, Bilgili A, Karaöz E, Gökçimen A, Eraslan G, Üstüner E. The Structural And Biochemical Changes Of Kidney Tissue On Fluorosis In Rabbits. *Turkish Journal Of Veterinary And Animal Sciences*. 2002 Feb 6;26(1):71-7.

25. Dede O, Altinbas A, Turker Y, Dogan A, Tayyar S, Ozaydin M. Koroner Arter Ektazili Olgularda Kronik Flor Maruziyetinin Arastirilmesi. XXIII. Ulusal Kardiyoloji Kongresi, Antalya, Turkiye 2007. Turk Kardiyol Dern Ars. 2007;2:141.
26. Michael M, Barot VV, Chinoy NJ. Investigations Of Soft Tissue Functions İn Fluorotic İndividuals Of North Gujarat. Fluoride. 1996 May 1;29:63-71.
27. Usmen E. Isparta İl, İlçe Ve Köylerinde Diş Fluorosisi. Journal Of Istanbul University Faculty Of Dentistry. 1976;10(4):285-96.
28. Susheela AK, Kumar A. A Study Of The Effect Of High Concentrations Of Fluoride On The Reproductive Organs Of Male Rabbits, Using Light And Scanning Electron Microscopy. Journal Of Reproduction And Fertility. 1991 Jul 1;92(2):353-60.
29. Ergin E, Eden E. Florun İnsan Sağlığına Olumsuz Etkisi Var Mı?. Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi.;38(1):13-20.
30. Pushpalatha T, Srinivas M, Reddy PS. Exposure To High Fluoride Concentration İn Drinking Water Will Affect Spermatogenesis And Steroidogenesis İn Male Albino Rats. Biometals. 2005 Jun 1;18(3):207-12.
31. Wei R, Luo G, Sun Z, Wang S, Wang J. Chronic Fluoride Exposure-İnduced Testicular Toxicity İs Associated With İnflammatory Response İn Mice. Chemosphere. 2016 Jun 1;153:419-25.
32. Sotnikova R, Nosalova, Navarova J. Efficacy Of Quercetin Derivatives İn Prevention Of Ulcerative Colitis İn Rats. Interdiscip Toxicol. 2013; 6(1): 9–12
33. Mu X, Yuan X, Du L.D, Antogonism Of Quercetin Against Tremor İnduced By Unilateral Striatal Lesion Of 6-OHDA İn Rats. J Asian Nat Prod Res. 2016; 18(1):65-71.
34. Wei R, Luo G, Sun Z, Wang S, Wang J. Chronic Fluoride Exposure-İnduced Testicular Toxicity İs Associated With İnflammatory Response İn Mice. Chemosphere. 2016 Jun 1;153:419-25.
35. Çiftçi U, Delen E, Vural M, Uysal O, Coşan DT, Baydemir C, Doğaner F. Efficacy Of Resveratrol And Quercetin After Experimental Spinal Cord İnjury. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2016 Sep 1;22(5):423-31.

36. Bartekova M, Radosinska J, Pancza D, Barancik M, Ravingerova T. Cardioprotective Effects Of Quercetin Against İschemia-Reperfusion İnjury Are Age-Dependent. *Physiological Research*. 2016 May 2;65.
37. Edremithioğlu M, Andiç MF, Sayin DB, Korkut O, Kisa Ü. Quercetin, A Powerful Antioxidant Bioflavonoid, Attenuates Renal Dysfunction İn Long-Term Experimental Diabetes Mellitus. *Marmara Medical Journal*. 2011 May 1;24(2).
38. Kalender, Y., Kaya, S., Durak, D., Uzun, F. G., Demir, F. (2012). Protective Effects Of Catechin And Quercetin On Antioxidant Status, Lipid Peroxidation And Testis-Histoarchitecture İnduced By Chlorpyrifos İn Male Rats. *Environ Toxicol Pharm* 33, 141-148.
39. Mlcek J, Jurikova T, Skrovankova S, Sochor J. (2016). Quercetin Ve Anti-Allerjik İmmün Yanıt. *Constantine The Philosopher University İn Nitra, Drazovska 4, SK-949 74 Nitra, Slovakia*. 2-3
40. De Souza SR, De Miranda Neto MH, Perles M, Colombo JV, Vieira Frez FC, Zignani I, Ramalho FV, Hermes-Uliana C, Bossolani GD, Zanoni JN. Antioxidant Effects Of The Quercetin İn The Jejunal Myenteric İnnervation Of Diabetic Rats. *Frontiers İn Medicine*. 2017 Feb 7;4:8.
41. Hollman, P. C., Gaag, M., Mengelers, M. J., Trijp J. M., Vries, J. H, Katan, M. B. (1996). Absorption And Disposition Kinetics Of The Dietary Antioxidant Quercetin İn Man. *Free Radical Biology And Medicine* Volume 21, Issue 5, 1996, Pages 703–70
42. Karaca, Ö., Pekmez, H., Kuş, M. A., Akpolat, N., Ögetürk, M., Kuş, İ. (2011). Deneysel Karbon Tetraklorür Toksisitesi Sonucu Karaciğerdeki IŞP70 İmmunoreaksiyon Artışı Üzerine Melatonin Hormonunun Etkisi. *F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg*. 2011: 25 (2): 73-76
43. Burak, M. Ve Çimen, Y. (1999). Flavonoidler Ve Antioksidan Özellikleri. *Türkiye Klinikleri, J Med Sci*, 19, 296-304.
44. Karakaya, S. Ve El, S. N. (1999). Quercetin, Luteolin, Apigenin And Kaempferol Contents Of Some Foods. *Food Chem.*, 66, 289-292.
45. Nijveldt R. J., Van Nood E., Van Hoorn D. E., Boelens P. G., Van Norren K., Van Leeuwen P. A. (2001). Flavonoids: A Review Of Probable Mechanisms Of Action And Potential Applications. *Am J Clin Nutr*. 2001 Oct;74(4):418-25

46. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000). The Effects Of Plant Flavonoids On Mammalian Cells: İmplications For İnflammation, Heart Disease, And Cancer. *Pharmacol Rev.* 2000 Dec;52(4):673-751.
47. Duman A. *Sıçanlarda Testis İskemi-Reperfüzyon Hasarında 3', 4'-Dihydroxyflavonol'un Lipid Peroksidasyona Etkisi* (Doctoral Dissertation, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü).
48. Polat C, Tokyol Ç, Kahraman A, Sabuncuoğlu B, Yılmaz S. The Effects Of Desferrioxamine And Quercetin On Hepatic İschemia–Reperfusion İnduced Renal Disturbance. *Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids.* 2006 Jun 1;74(6):379-83.
49. Kühnau, J. (1976). The Flavonoids. A Class Of Semi-Essential Food Components: Their Role İn Human Nutrition. *World Rev. Nutr. Diet*, 24, (1976) 117–191.
50. Middleton, E., Kandaswami, C., Theoharides, T. C. (2000). The Effects Of Plant Flavonoids On Mammalian Cells: İmplications For İnflammation, Heart Disease, And Cancer. *Pharmacol Rev.* 2000 Dec;52(4):673-751.
51. Öğütürk, M., Çolakoğlu, N., Kuş, M. A., Kuş, İ., Sarsılmaz, M. (2009). Karbon Tetraklorür İle Oluşturulan Deneysel Akciğer Hasarında Kafeik Asit Fenetil Esterin Koruyucu Etkinliği. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 23, 2, 57- 61
52. Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant And İron-Chelating Activities Of The Flavonoids Catechin, Quercetin, And Diosmetin On İron- Loaded Rat Hepatocyte Cultures. *Biochem. Pharmacol.* 1993; 45(1), 13-19.
53. Yetük G. Gıda Katkı Maddesi Sodyum Benzoat'ın İnsan Eritrositleri Üzerinde İn Vitro Toksik Etkisi Ve Kateshin Ve Kuersetinin Koruyucu Rolü. *Bozok Üniversitesi Fenbilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Yozgat.* 2013; 1-37.
54. Elengovan V, Sekar N, Govindasamy S. Chemopreventive Potential Of Dietary Bioflavonoids Against 20-Methylcholanthrene-İnduced Tumorigenesis. *Cancer Lett.* 1994; 87, 107-113.

55. Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult JRS. Selectivity Of Neutrophil 5Lipoxygenase And Cyclooxygenase, İnhibition By An Antiinflammatory Flovonoid Glycoside And Related Aglycone Flavonoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 1988; 40, 787792.
56. Formica JV, Regelson W. Review Of The Biology Of Quercetin And Related Bioflavonoids. *Food Chem. Toxic.* 1995; 33(12), 1061-1080
57. Abarikwu, S. O., Pant, A. B., Farombi, E. O. (2012). The Protective Effects Of Quercetin On The Cytotoxicity Of Atrazine On Rat Sertoli-Germ Cell Co-Culture: *International Journal Of Andrology*, 2012, 35, 590–600 Doi:10.1111/J.1365-2605.2011.01239.
58. Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary Antioxidant Flavonoids And Risk Of Coronary Heart Disease: The Zutphen Elderly Study. *Lancet.* 1993; 342: 1007-1011.
59. Ergüzel Tuğrul E. Quercetin (3,3',4',5,7pentahidroksiflavon)'In Bakır (II) Ve Çinko (II) Komplekslerin Kararlılık Sabitlerinin Tayini. *Kimya Ana Bilim Dalı Analitik Kimya Programı Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.* 2006.
60. Güngör Ş. Kangal Köpeği Spermasının Dondurulmasında Farklı Antioksidanlar Ve Kriyoprotektanların Etkisi. *Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme Ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya:Selçuk Üniversitesi, 2015.*
61. Zribi N, Chakroun FN, Abdallah BF, Elleuch H, Sellami A, Gargouri J, Rebai T, Fakhfakh F, Keskes AL. Effect Of Freze-Thawing Process And Quercetin On Human Sperm Survival And DNA İntegrity. *Criobiology*, 2012, 65:326-31.
62. Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Soares PC, Guerra MMP. Effect Of Antioxidants Resveratrol And Quercetin On İn Vitro Evaluation Of Frozen Ram Sperm. *Theriogenology*, 2012, 77, 17:22–26
63. Langman J, *Medical Embryology 4th Edn. Williams And Wilkins , Baltimore, 1996.*
64. Moore K., Persaud T.V.N.,(Çeviri Editörleri: Yıldırım M., Okar İ., Dalçık H.), *İnsan Embriyolojisi, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2002.*
65. Johnson EK. *Male Reproductive System: Histology And Embryology. Johnson EK A Wiley Medical Publication, New York (1984) 246 (5 Pt 2), 698–704.*

66. Kierszenbaum AL. (Çeviri Editörü: Demir R.): Histoloji Ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş, Palme Yayıncılık, Ankara, 2006.
67. Jangueria LC., Carneiro J., Kelley OR.: Temel Histoloji (Çev: Aytakin Y., Solakoğlu S., Ahışhalı B.) Syf: 407-419, 431-433, Barış Kitabevi, 1998.
68. Ross HM., Kaye GI. And Pawlina W.: Histology: A Text And Atlas. Section 21: Male Reproductive System. 4nd Edition. Syf: 683-710, 2003.
69. Gartner L.P., Hiatt J.L.: Color Textbook Of Histology. Second Ed.,487- 508 W.B Saunders Company, Philadelphia, (2001)
70. Erkoçak A. Özel Histoloji, Genital Sistem, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 2.Baskı,:166-194 Ankara (1990)
71. Tekelioğlu M. Özel Histoloji, İnce Yapı Ve Gelişme, Erkek Üreme Sistemi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 1. Baskı,:231-244 Ankara (2002)
72. Hermo Cyr D. G., Egenberger L., Mertineit N., Laird D.W.: Cellular Immunolocalization Of Occludin During Embryonic And Postnatal Development Of The Mouse Testis And Epididymis, Endocrinology, 140: 3815-3825, (1999)
73. Snell R.S. Uygulamalı Anatomi, 1. Baskı Türkiye Klinikleri Yayın Evi, Ankara 135-142 (1993)
74. Ateşşahin A, Karahan D, Türk: Protective Role Of Lycopene On Cisplatin-Induced Changes İn Sperm Characteristics, Testicular Damage And Oxidative Stress İn Rats. Reprod Toxicol. 2006 Jan;21(1):42-7. Epub 2005 Jun 24. (2008)
75. Özdamar S, Çetin N Sorkun H. Genel Embriyoloji, E.Ü.T.F Yayınları Kayseri:4-15. (2002)
76. Anafarta K, Baykara M, Baydınç C. Ürogenital Organların Anatomik Ve Histolojik Yapısı. Temel Üroloji, Ankara: Güneş Kitabevi; 1998. S.1-28.
77. In Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Jr, Wein AJ (Eds): Brooks JD. Anatomy Of The Lower Urinary Tract And Male Genitalia. Campbells Urology. 8th Ed. Philadephia: WB Saunders: 2002. P. 41-80
78. Snell RS. Clinical Anatomy. 3rd Ed. Boston: Brown And Company, 1986: 168-75.
79. Lennox B, Ahmad KN. The Total Lenght Of Tubules İn The Human Testis. J Anat 1970:107:19

80. Hinman F Jr. Testes. In: Hinman F Jr. Ed. Atlas Of Urosurgical Anatomy. Philadelphia: W.B Saunders Co, 1993: 472-483.
81. Moore KL. The Abdomen. In: Moore KL Ed. Clinical Oriented Anatomy (3rd Edt). Baltimore: Williams And Wilkins Co, 1992: 144-152.
82. Ganong, W.F., Ganong Tıbbi Fizyoloji, (Çev: Doğan A.), Barış Kitapevi, İstanbul- (1995)
83. Guyton, A.C. At Hall, J.E., Textbook Of Medical Physiology, Harcour Brace, 9th Edition – (1996)
84. Seeley, R.R., Stephens, T.D. At Tate, P., , Essential Of Anatomy And Physiology, Third Edition, MC Graw Hill, North America. (1999)
85. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Et Al. Identification And İnhibition Of The ICE/CED-3 Protease Necessary For Mammalian Apoptosis. Nature 1995;376(6535):37-43
86. Adams JM, Cory S. Life Or Death Decisions By The Bcl-2 Family. Trends. Biochem Sci 2001;26:61-6.
87. Adrain C, Martin SJ. The Mitochondrial Apoptosome: A Killer Unleashed By The Cytochrome C. Trends Biochem Sci 2001; 26:390-7.
88. Spierings DC, De Vries EG, Vellenga E. Et Al: Tissue Distribution Of The Death Ligand TRAIL And Its Receptors. J Histochem Cytochem 52(6): 821-831; 2004.
89. Johnsen SG. Testicular Biopsy Score Count- A Method For Registration Of Spermatogenesis İn Human Normal Values And Results İn 335 Hypogonadal Males. Hormones 1970; 1: 2-25
90. Barnes DM, Harris WH, Smith P, Millis RR, Rubens RD. Immunohistochemical Determination Of Oestrogen Receptor: Comparison Of Different Methods Of Assessment Of Staining And Correlation With Clinical Outcome Of Breast Cancer Patients. British Journal Of Cancer. 1996 Nov;74(9):1445.
91. Elman G L. Tissue Sulphydryl Groups. Arch Biochem Biophys 1979, 95: 351–8.
92. Uchiyama M, Mihara M. Determination Of MDA Precursor İn Tissue By TBA Test. Anal Biochem 1978, 36: 271-8.
93. Erel O. A New Automated Colorimetric Method For Measuring Total Oxidant Status. Clin Biochem 2005, 38(12):1103-11.

94. Erel O. A Novel Automated Direct Measurement Method For Total Antioxidant Capacity Using A New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. Clin Biochem 2004, 37(4): 277-85.
95. Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd. No.128 Lane 628, Jufengyuan Road, Baoshan District, 200444 Shangai, China.
96. Küçükırmak G. Florun Fizyolojik Ve Toksikolojik Karakteristikleri. Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir. 2007; 2-15.
97. Küçükırmak G. Florun Fizyolojik Ve Toksikolojik Karakteristikleri. Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir. 2007; 2-15.
98. Fidancı UR, Salmanoğlu B, Maraşlı Ş, Maraşlı N. İç Anadolu Bölgesinde Doğal Ve Endüstriyel Florozis İle Bunun Hayvan Sağlığı Üzerindeki Etkileri. Tr. J. Of Veterinary And Animal Sciences. 1998; 22: 537-544.
99. Kennedy DC. Pan-Asia-Pacific Conference On Fluoride And Arsenic Research. Fluoride. 1999; 32(4): 251-254.
100. Choubisa SL. Endemic Fluorosis İn Southhern Rajasthan, India, Fluoride. 2001; 34(1): 61-70
101. Ersan Y, Koç E, Arı İ, Karademir B. Kronik Florozisin Fare (Swiss Albino) Karaciğeri Üzerine Histopatolojik Etkisi. Turk J Med. Sci. 2010; 40 (4): 619-622 © TÜBİTAK E-Mail: Medsci@Tubitak.Gov.Tr Doi:10. 3906/Sag-0812
102. Jung JH, Kang JI, Kim HS. 'Effect Of Quercetin On İmpaired İmmune Function İn Mice Exposed To İrradiation', Nutr Res Prac. 2012; 6(4), 301-307
103. Tsunenari I, Kasta. Devolepmental And Regressive Changes İn Tetes Of Himalayan Rabbit. Lab Anim 1992, 26167-179.
104. Sprando RL, Black TN, Ames MJ. Effect Of İnstsıçanestesticuler İnjection Of Sodium Floride On Spermatogenesis. Food Chem Toxicol 1996, 377-84
105. Gubari S. Karbosulfanla Kontamine Besin Alımının Sıçan Testisi Üzerine Kronik Etkilerinin İnce Yapı Düzeyinde Araştırılması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Adana, 2008
106. Ye L, Su ZJ, Ge RS. Inhibitors Of Testosterone Biosynthetic And Metabolic Activation Enzymes. Molecules. 2011; 16: 9983-10001.

107. Miller WL, Auchus RJ. The Molecular Biology, Biochemistry, And Physiology Of Human Steroidogenesis And Its Disorders. *Endocr Rev.* 2011; 32: 81-151.
108. Cao L, Leers-Sucheta S, Azhar S. Aging Alters The Functional Expression Of Enzymatic And Non-Enzymatic Anti-Oxidant Defense Systems In Testicular Rat Leydig Cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 88: 61-67
109. Chen H, Ge RS, Zirkin BR. Leydig Cells: From Stem Cells To Aging. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 306: 9-16.
110. Chen H, Zhou L, Lin CY, Beattie MC, Liu J, Zirkin BR. Effect Of Glutathione Redox State On Leydig Cell Susceptibility To Acute Oxidative Stress. *Mol Cell Endocrinol.* 2010; 323: 147-154.
111. Chen H, Pechenino AS, Liu J, Beattie MC, Brown TR, Zirkin BR. Effect Of Glutathione Depletion On Leydig Cell Steroidogenesis In Young And Old Brown Norway Rats. *Endocrinology.* 2008; 149: 2612-2619.
112. Diemer T, Allen JA, Hales KH, Hales DB. Reactive Oxygen Disrupts Mitochondria In MA-10 Tumor Leydig Cells And Inhibits Steroidogenic Acute Regulatory (Star) Protein And Steroidogenesis. *Endocrinology.* 2003; 144: 2882-2891.
113. Allen JA, Shankara T, Janus P, Buck S, Diemer T, Hales KH, Et Al. Energized, Polarized, And Actively Respiring Mitochondria Are Required For Acute Leydig Cell Steroidogenesis. *Endocrinology.* 2006; 147: 3924-3935.
114. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant Systems And Oxidative Stress In The Testes. *Oxid Med Cell Longev.* 2008; 1: 15-24.
115. Zhou L, Beattie MC, Lin CY, Liu J, Traore K, Papadopoulos V, Zirkin BR. Oxidative Stress And Phthalate-Induced Down-Regulation Of Steroidogenesis In MA-10 Leydig Cells. *Reprod Toxicol.* 2013; 42: 95-101.
116. Othman AI, El-Missiry MA, Koriem KM, El-Sayed AA. Alfa-Lipoic Acid Protects Testosterone Secretion Pathway And Sperm Quality Against 4-Tert-Octylphenol Induced Reproductive Toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2012; 81: 76-83.
117. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal Control Of Apoptotic Cell Death In The Testis: Gonadotropins And Androgens As Testicular Cell Survival Factors. *Mol Endocrinol* 1993; 7: 643-650.

118. Yin Y, Hawkins KL, Devvolf WC, Morgantaler A. Heat Stress Causes Testicular Germ Celi Apoptosis In Adult Mice. *J Androl* 1997; 18: 159- 165.
119. Rodriguez JB, Garcia CM. Apoptosis Partern Elicited By Several Apoptogenic Agents On The Seminiferous Epithelium Of The Adult Rat Testis. *J Androl* 1998; 19: 487-497.
120. Korsmeyer SJ. Regulators Of Cell Death. *Reviews* 1995; 11: 101-105.
121. Allan DJ, Harmon BV And Roberts SA: Spermatogonial Apoptosis Has Three Morphologically Recognizable Phases And Shows No Circadian Rhythm During Normal Spermatogenesis In The Rat Cell Proliferation, 25:241-250, 1992
122. Bartke A: Apoptosis Of Male Germ Cells, A Generalized Or Cell Type Specific Phenomenon? *Endocrinology*, 136:3-4, 1995.
123. Clermont Y: Quantitative Analysis Of Spermatogenesis Of The Rat: A Revised Model For The Renewal Of Spermatogonia *Am J Anat* 111:111-129, 1962.
124. Huckins C And Oakberg EF: Morphological And Quantitative Analysis Of Spermatogonia In Mouse Testes Using Whole Mounted Seminiferous Tubules, I. The Normal Testes *Anat Rec*, 192:519-528, 1978
125. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsallo A, Rapola J And Dunkel L: Apoptotic Cell Death In The Normal And Cryptorchid Human Testis: The Effect Of Human Chorionic Gonadotropin On Testicular Cell Survival. *Pediatr Res*, 1996. 40:351-356
126. Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI And Kim ED: In Situ End-Labeling Of Human Testicular Tissue Demonstrates Increased Apoptosis In Conditions Of Abnormal Spermatogenesis *Fertil Steril*, 1997. 68: 1065-1069,
127. Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I And Vassalli P: An Early And Massive Wave Of Germinal Cell Apoptosis Is Required For The Development Of Functional Spermatogenesis *EMBO J*, 16:2262-2270, 1997.
128. Hu J.H., Jiang J., Ma Y. H., Yang N., Zhang M. H., Wu M., Fei J. And Guo L. H.: Enhancement Of Germ Cell Apoptosis Induced By Ethanol In Transgenic Mice Overexpressing Fas Ligand. *Cell Research*, 13(5): 361-367, 2003.
129. Rosenblum E., Gavaler J.S. And Van Thiel D.H.: Lipid Peroxidation: A Mechanism For Ethanol-Associated Testicular Injury In Rats. *Endocrinology* 116: 311-318, 1985

130. Aydıner A, Aytakin Y, Sayın Ü, Kuntsal L, Topuz E. Cisplatin'in Testis Dokusuna Etkisi: Ultrastrüktürel Ve Biyokimyasal Bir Çalışma. *Turk J Pathol* 1995;11(1):5-9.
131. Beytur A, Ciftci O, Oguz F, Oguztürk H, Yılmaz F. Montelukast Attenuates Side Effects Of Cisplatin Including Testicular, Spermatological, And Hormonal Damage İn Male Rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;69(1):207-13
132. Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeri M, Mohammadirad A, Abdollahi M. Protection Of Cisplatin-İnduced Spermatotoxicity, DNA Damage And Chromatin Abnormality By Selenium Nano-Particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 266(3):356-65.
133. Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Lipshultz LI And Kim ED: In Situ End-Labeling Of Human Testicular Tissue Demonstrates Increased Apoptosis İn Conditions Of Abnormal Spermatogenesis *Fertil Steril*, 68: 1065-1069, 1997
134. Lenzi A, Lombardo F, Sgrò P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F Et Al. Use Of Carnitine Therapy İn Selected Cases Of Male Factor İnfertility: A Double-Blind Crossover Trial. *Fertil Steril* 2003;79(2):292-300
135. Chandrasekara N, Shahidi F. Antioxidative Potential Of Cashew Phenolics İn Food And Biological Model Systems As Affected By Roasting. *Food Chemistry*. 2011.129(4), 1388–1396
136. Gul M, Kutay FZ, Temocin S, Hanninen O. Cellular And Clinical İmplication Of Glutathione. *Indian Journal Of Experimental Biology*. 2000. 38, 625–634.

EKLER

EK 1: ÖZGEÇMİŞ

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Salih Yahya AKSANYAR

Doğum tarihi ve yeri : 31/07/1986 – KEÇİÖREN

Uyruğu : T.C.

İletişim adresleri : syaksanyar@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Eskişehir Fatih Fen Lisesi

Lisans : Meram Tıp Fakültesi, 2004-2010, Konya

Yabancı Dil : İngilizce