

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL ERİŞKİN SIÇAN HİPERTİROİDİ
MODELİNDE QUERCETİNİN TESTİS
DOKUSUNDAKİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK
OLARAK İNCELENMESİ**

MELTEM AVCI

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2018

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970174

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DENEYSEL ERİŞKİN SIÇAN HİPERTİROİDİ
MODELİNDE QUERCETİNİN TESTİS
DOKUSUNDAKİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK
OLARAK İNCELENMESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

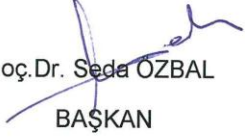
MELTEM AVCI

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Seda ÖZBAL

(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
SAG.BİL.059 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2013970174

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Meltem AVCI, **DENEYSEL ERİŞKİN SIÇAN HİPERTİROİDİ MODELİNDE QUERCETİNİN TESTİS DOKUSUNDAKİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ** konulu yüksek Lisans tezini **30.05.2018** tarihinde başarılı/başarısız olarak tamamlamıştır.


Doç. Dr. Seda OZBAL

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Işıl TEKME

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Meltem KURUŞ

ÜYE

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Ülker CANKURT

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Selen BAHÇECİ

YEDEK ÜYE

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
KISALTMALAR.....	viii
TEŞEKKÜRLER.....	ix
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	9
2.1. Testis	9
2.1.1. Testis Anatomisi.....	9
2.1.2. Testis Fizyolojisi.....	10
2.1.3. Testis Histolojisi	11
2.1.3.1. Seminifer Tübül	12
2.1.3.2. Sertoli Hücreleri	13
2.1.3.3. Spermatogenik Seri Hücreleri.....	15
2.1.3.3.1. Spermatogonyumlar	15
2.1.3.3.2. Spermatozitler	16
2.1.3.3.3. Spermatidler	17
2.1.3.3.4. Spermin Yapısı ve Şekli	18
2.1.3.4. Spermatogenez	19
2.1.3.5. Leydig Hücreleri.....	22
2.1.3.6. İntratestiküler Kanallar	22
2.1.3.7. Boşaltım Kanal Sistemi.....	23
2.2. Aksesuar Cinsiyet Bezleri	23
2.2.1. Vezikula Seminalis.....	23
2.2.2. Prostat Bezi	24
2.2.3. Bulboüretral Bezler	25
2.3 Tiroid Hormonu	26
2.3.1. Tiroid Hormonu ve Testiküler Fonksiyon.....	27

2.4. Hipertiroidizm	28
2.5. Serbest Radikaller	29
2.6. Antioksidanlar	30
2.6.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar	31
2.6.2. Eksojen Antioksidanlar	32
2.6.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları	34
2.7. Quercetin	35
2.8. Apoptoz	36
2.8.1. Apoptozun Düzenlenmesi	37
2.8.2. Apoptoz Mekanizması	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Araştırmanın Tipi	40
3.2. Araştırmanın Yeri Ve Zamanı	40
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	40
3.4. Çalışma Materyali	42
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	42
3.6. Veri Toplama Araçları	42
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler	42
3.6.2. Araştırmada Kullanılan L-tiroksin ve Quercetin hazırlanması	42
3.6.2.1. L-Tiroksinin Hazırlanması	42
3.6.2.2. Quercetin hazırlanması	43
3.6.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler	43
3.6.3.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	43
3.6.3.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	43
3.6.3.3. Histokimyasal İncelemeler	44
3.6.3.3.1. Rutin Doku Takibi	44
3.6.3.3.2. Hematoksilen–Eozin Boyama Yöntemi	45
3.6.3.3.3. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü	46
3.6.3.3.4. Masson-Trikrom Boya Protokolü	47
3.6.3.4. Histolojik Skolama	49
3.6.3.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skolaması	49
3.6.3.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü	49

3.6.3.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü	50
3.6.3.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler	50
3.6.3.5.1. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP nick end labeling) Boya Protokolü	50
3.6.3.5.2. Aktif Kaspaz-3 Boya Protokolü	52
3.6.3.6. Ultrastrüktürel İncelemeler	54
3.6.3.7. Biyokimyasal İncelemeler	55
3.6.3.7.1. Serumda Yapılan Analizler	55
3.6.3.7.1.1. Serum TSH Düzeyinin Belirlenmesi	55
3.6.3.7.1.2. Serum T3 Düzeyinin Belirlenmesi	55
3.6.3.7.1.3. Serum T4 Düzeyinin Belirlenmesi	56
3.6.3.7.1.4. Serum Testosteron Düzeylerinin Belirlenmesi.....	56
3.6.3.7.2. Doku Homojenat Hazırlanması.....	57
3.6.3.7.2.1. MDA Düzeyinin Belirlenmesi	57
3.6.3.7.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Düzeyinin Belirlenmesi .	57
3.6.3.7.2.3. Glutasyon Peroksidaz (Gpx) Aktivite Düzeyinin Belirlenmesi .	58
3.6.3.7.3. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi.....	58
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	59
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	60
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	60
3.10. Etik Kurul Onayı	60
4. BULGULAR	61
4.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	61
4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	62
4.3. Histokimyasal Bulgular	64
4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Değerlendirmesi	64
4.3.2. Masson-Trikrom Boyama Değerlendirmesi	67
4.3.3. Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyama Değerlendirmesi	70
4.4. Morfometrik Bulgular	73
4.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması	73
4.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü.....	73
4.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü.....	75

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	76
4.5.1. TUNEL Boyama Değerlendirmesi.....	76
4.5.2. Aktif Kaspaz-3 İmmunhistokimyasal Değerlendirme	80
4.6. Ultrastrüktürel Bulgular	84
4.7. Biyokimyasal Bulgular	87
4.7.1. Serumda Yapılan Analizler	87
4.7.1.1. Serum TSH Düzeyi Değerlendirmesi	87
4.7.1.2. Serum T3 Düzeyi Değerlendirmesi	88
4.7.1.3. Serum T4 Düzeyi Değerlendirmesi	89
4.7.1.4. Serum Testosteron Düzeyi Değerlendirmesi	90
4.7.2. Doku Homojenat Analizi.....	91
4.7.2.1. MDA Değerlendirmesi.....	91
4.7.2.2. SOD Değerlendirmesi.....	91
4.7.2.3. GPx Değerlendirmesi.....	92
5.TARTIŞMA.....	94
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	100
7. KAYNAKLAR.....	101
8. EKLER.....	110

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Enzimatik endojen antioksidanlar	31
Tablo 2: Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar.....	32
Tablo 3: Vitamin eksojen antioksidanlar	33
Tablo 4: İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar.....	33
Tablo 5: Doku takip protokolü.....	44
Tablo 6: Hematoksilen-Eozin boyama protokolu	45
Tablo 7: Periyodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü.....	47
Tablo 8: Masson Trikrom boya protokolü.	48
Tablo 9: Johnsen testiküler biyopsi skorlaması	49
Tablo 10:TUNEL boyama protokolü.	51
Tablo 11: Aktif kaspaz-3 boya protokolü.	52
Tablo 12 :Elektron mikroskobik doku takip protokolü.	54

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1:Erkek üreme sistemi şematik diyagramı	12
Şekil 2 :Testisin histolojik görüntüsü.....	13
Şekil 3: Sertoli hücresi şematik diyagramı.	15
Şekil 4: Spermatogenik hücreleri gösteren şematik diyagram.	17
Şekil 5 :Olgun spermin yapısı.	18
Şekil 6: Spermiyogenez şematik diyagramı.....	21
Şekil 7: İnsan prostat bezinin histolojik görüntüsü.	24
Şekil 8: İnsan bulboüretral bezhistolojik görüntüsü.....	25
Şekil 9: Quercetin bileşiğinin açık formülü.	36
Şekil 10: Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları.	39
Şekil 11 Deney sonunda testislerin elde edilmesi.....	41
Şekil 12 Grupların deney başlangıç ve sonundaki ortalama ağırlıkları.	61
Şekil 13: Grupların delta denek ağırlıkları.	62
Şekil 14: Deneklerin deney sonundaki ortalama testis ağırlıkları.....	63
Şekil 15: Kontrol grubu testis kesiti,H&E.....	65
Şekil 16: Sham grubu testis kesiti, H&E.....	65
Şekil 17: Quercetin grubu testis kesiti, H&E	66
Şekil 18: Hipertiroidi grubu testis kesiti, H&E.....	66
Şekil 19: Hipertiroidi+Quercetin grubu testis kesiti, H&E.....	67
Şekil 20: Kontrol grubu testis kesiti, Masson Trikrom.....	67
Şekil 21: Sham grubu testis kesiti, Masson Trikrom.....	68
Şekil 22: Quercetin grubu testis kesiti, Masson Trikrom.....	68
Şekil 23: Hipertiroidi grubu testis kesiti, Masson Trikrom.....	69
Şekil 24: Hipertiroidi+Quercetin grubu testis kesiti, Masson Trikrom.....	69
Şekil 25: Kontrol grubu testis kesiti, PAS.....	70
Şekil 26: Sham grubu testis kesiti, PAS.....	70
Şekil 27: Quercetin grubu testis kesiti, PAS.....	71
Şekil 28: Hipertiroidi grubu testis kesiti, PAS.....	71
Şekil 29: Hipertiroidi+Quercetin grubu testis kesiti, PAS.....	72
Şekil 30: Johnson testiküler biyopsi skorlaması.	73

Şekil 31: Seminifer tübül çap ölçümleri.....	74
Şekil 32: Seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri	75
Şekil 33: Grupların TUNEL (+) hücre sayısı	77
Şekil 34: Kontrol grubu testis kesiti, TUNEL.....	77
Şekil 35: Sham grubu testis kesiti, TUNEL.....	78
Şekil 36: Quercetin grubu testis kesiti, TUNEL.....	78
Şekil 37: Hipertiroidi grubu testis kesiti, TUNEL.....	79
Şekil 38: Hipertiroid+Quercetin grubu testis kesiti, TUNEL.....	79
Şekil 39: Grupların Aktif Kazpas-3 (+) hücre sayısı	80
Şekil 40: Kontrol grubu testis kesiti, Aktif Kazpas-3.....	81
Şekil 41: Sham grubu testis kesiti, Aktif Kazpas-3.....	81
Şekil 42: Quercetin grubu testis kesiti, Aktif Kazpas-3.....	77
Şekil 43: Hipertiroidi grubu testis kesiti, Aktif Kazpas-3.....	77
Şekil 44: Hipertiroid+Quercetin grubu testis kesiti, Aktif Kazpas-3.....	77
Şekil 45: Kontrol grubu testis kesiti, Uranil Asetat-Kurşun Sitrata.....	84
Şekil 46: Sham grubu testis kesiti, Uranil Asetat-Kurşun Sitrata.....	77
Şekil 47: Quercetin grubu testis kesiti, Uranil Asetat-Kurşun Sitrata.....	77
Şekil 48: Hipertiroidi grubu testis kesiti, Uranil Asetat-Kurşun Sitrata.....	77
Şekil 49: Hipertiroid+Quercetin grubu testis kesiti, Uranil Asetat-Kurşun Sitrata.....	77
Şekil 50: Grupların serum TSH ölçüm değerleri.	87
Şekil 51: Grupların serum T3 ölçüm değerleri	88
Şekil 52: Grupların serum T4 ölçüm değerleri	89
Şekil 53: Grupların serum testosteron ölçüm değerleri.....	90
Şekil 54: Gruplara göre MDA değerleri.....	91
Şekil 55: Gruplara göre SOD değerleri.....	92
Şekil 56: Gruplara göre GPx değerleri.....	93

KISALTMALAR

TBF: Testis Belirleyici Faktör

AMP: Adenozin Mono Fosfat

GPx: Glutasyon Peroksidaz

SOD: Süperoksit Dismutaz

MDA: Malondialdehit

GSH: Glutasyon

GST: Glutasyon S Transferaz

CAT: Katalaz

HP: Hipertiroidi

AIF: Apoptoz İndükleyici Faktör

DNA: Deoksiribonükleik Asit

MIF: Müllerien İnhibi Edici Faktör

DHT: Di hidro Testosteron

H&E: Hematoksilen- Eozin

PAS: Periyodik Asit- Schiff

LH: Lüteinizan Hormon

FSH: Folikül Stimülan Hormon

T3: Triiyodotronin

T4: Tetraiyodotronin

TRH: Tirotropin Uyarıcı Hormon

Q: Quercetin

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimime katkılarını sağlayan Prof.Dr. Güven ERBİL, Prof.Dr. H. Alper BAĞRIYANIK, Prof.Dr. Ülker CANKURT, Prof.Dr. Çetin PEKÇETİN, Prof.Dr. Işıl TEKMEK, Prof. Dr. Bekir ERGÜR, Prof. Dr. Kazım TUĞYAN, Doç.Dr. Başak BAYKARA, Doç.Dr. Serap CİLAKEK MICİLİ'ya,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen biyolog Özcan ÜSTÜN'e

Tez çalışmaları döneminde yardımlarından dolayı Moleküler Tıp Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Zahide ÇAVDAR'a,

Yüksek lisansa başladığım günden beri her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım; Selma AYDEMİR, Yavuz GENÇ, Hüseyin KISAOĞLU, Merve AKSOY, Merve TATLI, Cemre URAL başta olmak üzere diğer bölüm arkadaşlarıma,

Histoloji ve Embriyoloji eğitimim boyunca daima yol gösterici olan, tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen, tüm deneylerin yapılmasında ve tezimin tamamlanıp yazılmasında her konuda desteğini hissettiğim değerli danışman hocam Doç.Dr. Seda ÖZBAL'a,

Tüm eğitim hayatım boyunca ve attığım her adımda beni yalnız bırakmayan, daima destekleyen aileme teşekkür borç bilirim.

DENEYSEL ERİŞKİN SIÇAN HİPERTİROİDİ MODELİNDE QUERCETİNİN TESTİS DOKUSUNDAKİ ETKİSİNİN HİSTOLOJİK OLARAK İNCELENMESİ

MELTEM AVCI

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı,
Narlidere, İzmir**

ÖZET

Amaç:

Çalışmamızda deneysel olarak hipertiroidi oluşturulan sıçanlarda, testiste oluşan hasara karşı güçlü bir antioksidan olan quercetin'in etkisi histokimyasal, immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Yöntem:

Çalışmamızda Wistar suşu erkek sıçanlar 5 gruba ayrıldı (n=7). I. Kontrol grubu, II. Sham grubu: 2 cc mısır yağı verilen grup (21 gün oral gavaj), III. Quercetin grubu: 20 mg/kg/gün 2 cc mısır yağı içinde çözdürülerek verilen grup (21 gün oral gavaj), IV. Hipertiroidi grubu: 0,3 mg/kg/gün L-tiroksin verilen grup (21 gün ip), V. Hipertiroidi+Quercetin grubu: 0,3 mg/kg ip L-tiroksin+ 20 mg/kg/gün oral gavaj Quercetin 2 cc mısır yağı içinde çözdürülerek verilen grup. 21 günün sonunda tüm denekler sakrifiye edildi.

Işık mikroskopik incelemeler için elde edilen kesitler Hematoksilen & Eozin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Masson Trikrom ile boyandı. Kesitlerde Johnsen skoru, seminifer tübül çapı ve bazal membran kalınlığı değerlendirildi. Apoptozisi saptamak için TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları yapıldı. Testis yapısı ultrastrüktürel olarak incelendi. Biyokimyasal incelemeler için kan TSH, T3, T4 ve testosteron düzeyleri, testis dokusunda ise süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri incelendi.

Bulgular:

Yapılan ışık mikroskopik ve ultrastrüktürel incelemelerde kontrol grubunda normal testis yapısı gözlemlendi. Hipertiroidi grubunda spermatogenik seri hücre diziliminde düzensizlik, germ hücre kaybı ve vakuolizasyon, seminifer tübül bazal membran kalınlığı ve çapında azalma ve intertisyel alanda bağ doku artışı gözlemlendi. Hipertiroidi+Quercetin grubunda ise testis yapısı normale yakın morfolojide görüldü.

Yapılan immunohistokimyasal incelemelerde hipertiroidi grubunda kontrol grubuna göre seminifer tübüllerinde TUNEL pozitif ve aktif kaspaz-3 immunpozitif boyanan hücre sayısının arttığı, hipertiroidi+quercetin verilen grupta ise immunpozitif boyanan hücre sayısının azaldığı gözlemlendi.

Biyokimyasal analizlerde, hipertiroidi grubunda kontrol grubuna göre T3, T4, düzeylerinin arttığı, TSH düzeyinin azaldığı, ancak hipertiroidi+quercetin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı değildi. Testesteron düzeylerinde istatistiksel anlamlılık gözlenmedi. Testis dokusunda kontrol grubu ile hipertiroidi grubu kıyaslandığında MDA düzeylerinde anlamlı artış, SOD düzeylerinde ise anlamlı bir azalma gözlemlendi. Hipertiroidi+quercetin grubunda ise hipertiroidi grubuna kıyasla MDA düzeylerinde anlamlı azalış ve SOD düzeylerinde anlamlı artış saptandı. GPx düzeylerinde ise istatistiksel anlamlılık gözlenmedi.

Sonuç:

Elde ettiğimiz verilere dayanarak hipertiroidinin testis doku hasarı oluşturduğu, oksidatif stresi ve apoptozu arttırdığı, Quercetin'in ise oluşan doku hasarını ve biyokimyasal değişiklikleri azalttığı görüldü.

Anahtar Kelimeler: testis, hipertiroidizm, quercetin, rat

THE HISTOLOGIC OBSERVATION OF THE EFFECT OF QUERCETIN ON THE EXPERIMENTALLY GENERATED ADULT RAT TESTIS HYPERTHYROIDISM MODEL

Meltem AVCI

Dokuz Eylul University, Medical Faculty, Department of Histology and Embriology, Narlıdere, İZMİR

ABSTRACT

Objective:

In our study, it was aimed to investigate histochemical, immunohistochemical, ultrastructural and biochemical effects of quercetin, a potent antioxidant against testicular damage, in experimental hyperthyroid rats.

Method:

In this study, male rats of Wistar strain were separated into 5 groups (n=7). I. Control group, II. Sham group; treated with only 2 cc maize oil (21 days oral gavage), III. Quercetin group; treated with 20 mg/kg/day quercetin dissolved in 2 cc of maize oil (21 days oral gavage), IV. Hyperthyroid group; treated with 0.3 mg/kg/day L-thyroxine (21 days ip) and V. Hyperthyroidism+Quercetin group; treated with 0.3 mg/kg ip L-thyroxine+20 mg/kg/day quercetin dissolved in 2 cc of corn oil. At the end of 21 days, all the test subjects were sacrificed.

The sections obtained for light microscopic examinations were stained with Hematoxylin & Eosin (H&E), Periodic Acid Schiff (PAS) and Masson Trichrome. Johnsen score, seminiferous tubule diameter and basal membrane thickness were evaluated in these sections. In order to detect apoptosis. TUNEL and active caspase-3 staining were performed. The testis structure was also examined ultrastructurally. For biochemical analyzes TSH, T3, T4 and testosterone levels in blood samples, and superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA) levels in testicular tissue were examined.

Results:

Microscopic and ultrastructural examinations showed normal testicular structure in the control group. In the hyperthyroid group, irregularity in spermatogenic serial cell viability, germ cell loss and vacuolization in seminiferous tubules, with decrease in basal membrane thickness and diameter while increase in connective tissue in interstitial region were observed. In the hyperthyroid+quercetin group, the testis showed almost normal morphology.

On the immunohistochemical studies, the numbers of cells with TUNEL positive and active caspase-3 immunoprecipitated in the seminiferous tubules were increased in the hyperthyroid group compare to control group, whereas the number of immunopositive cells in the hyperthyroidism+quercetin group were decreased.

In the biochemical analysis, hyperthyroidism group showed T3 and T4 levels were increased and TSH level was decreased compare to the control group. However, the levels of hyperthyroidism+quercetin groups were not changed statistically significant. Also testosterone levels were not statistically significant.

A significant increase in MDA levels and a significant decrease in SOD levels were observed when the control group and hyperthyroid group were compared in testicular tissue. Significant decrease in MDA levels and a significant increase in SOD levels were observed in hyperthyroidism+quercetin group compared to hyperthyroidism group. There was no statistical significance in GPx levels.

Conclusion:

Based on the obtained results, we found that hyperthyroidism caused testicular tissue damage, increased oxidative stress and apoptosis, and that Quercetin appears to reduce tissue damage and biochemical changes.

Key Words: testis, hyperthyroidism, quercetin, rat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hipertiroidi, günümüzde toplumlarda oldukça sık görülen endokrin hastalıklardan biridir. Hipertiroidizm, tiroid bezinden aşırı tiroid hormonlarının (T4 ve T3) salgılanmasına bağlı olarak bu hormonların hücrel etkileri sonucu ortaya çıkan klinik tablodur. Tiroid hormonları normal doğum sonrası büyüme ve gelişme için gerekli olmakla birlikte neredeyse tüm memeli dokularında, enerji metabolizmasının düzenlenmesinde temel rol oynamaktadır. Sağlıklı bireylerde tiroid hormonları sayesinde organizmanın metabolik faaliyetleri, toplam enerji kullanımı, hücrel solunumu, doku büyüme ve gelişmesi, hormon, vitamin kullanımı, besin ve inorganik iyon metabolizması, ısı dengesi diğer hormonların salgılanma, yıkılma hızlarını ve hücrelerin bu hormonlara olan duyarlılığını düzenleyerek vücut homeostazının sürdürülmesini sağlamaktadır.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, tiroid hormon seviyelerinde meydana gelen düşük veya yüksek değerlerin; kardiyovasküler sistem, ürogenital sistem, endokrin sistem gibi bir çok sistem üzerinde çeşitli olumsuz etkileri ortaya konmuştur (1-8).

Memelilerde değişken tiroid durumu birçok organ ve dokuları olumsuz yönde etkilemektedir. Hipertiroidizm, genellikle kardiyovasküler hastalıklar karşısında morbidite ve mortalite artışı ile ilişkilendirilmektedir (1-3).

Tiroid hormon fonksiyon bozukluğuna bağlı olarak gelişen kronik böbrek hastalıkları, glomerülonefrit ve tubulointerstisyel hastalıkların birbirleriyle olan ilişkileri gösterilmiştir (8).

Tiroid hormonunun seyreden hastalıklarında, metabolik sendrom ile alakalı olan kan basıncı, plazma lipit düzeyleri, glikoz ve vücuttaki yağ oranı gibi parametrelerde patolojik değişiklikler sıklıkla gözlenmektedir. LDL kolesterol ve apoprotein-B ve trigliserit düzeylerinde artışa neden olmaktadır (4).

Testis tiroid hormonu için hedef organlardan biridir. Olgunlaşmamış sertoli hücre çekirdekleri, yüksek afinite ile tiroid hormonuna bağlanırlar. Sertoli hücrelerinde, folikül stimüle edici hormon (FSH), ana enerji metabolizması düzenleyicisidir. Gonodotropinler olan lüteinizan hormon (LH) ve FSH testiste leydig

hücreleri ve sertoli hücrelerinin normal gelişimi ve farklılaşması için gereklidir. Gonodotropinlerden ayrı olarak, tiroid hormon düzeyindeki değişiklikler de ayrıca testis gelişimini etkilemektedir.

Sertoli hücreleri desteklik ve gelişmekte olan germ hücrelerinin devamlılığını sağlamaktadır. Pubertede ortaya çıkan sertoli hücrelerinin sayısı; yetişkin testis boyutu ile gelecekteki erkek fertilizasyonu ile yakın ilişkilidir. Sertoli hücrelerinin olgunlaşması ve proliferasyonunda her ne kadar çeşitli faktörlerin rol aldığı düşünülürse de T3 testiküler gelişim boyunca sertoli hücre proliferasyonu için başlıca hormonal sinyal göndermektedir. T3, sertoli hücre differasyonunu uyarmakta ve böylelikle sertoli hücrelerinin mitotik olarak aktif oldukları dönemin azalmasına neden olmaktadır (9-16).

Hipertiroidinin testis üzerindeki olumsuz etkisi pek çok çalışmada gösterilmiştir. Hipertiroidi, erkeklerde spermatogenez ve seks steroid hormon metabolizmasında değişikliklere yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda infertil erkeklerde tiroid ve antikor testi yapılmış ve çıkan sonuçların semen analizinin sonuçları ile ilişkili olduğu görülmüştür. Ancak hipertiroidinin infertilite üzerine etkisi için etkili bir medikal tedavi yöntemi mevcut değildir. Hipertiroidi, oksidatif hasara neden olarak, spermatogenik seri hücrelerinin yapısında değişikliğe neden olmaktadır. Ayrıca oksidatif hasara bağlı olarak intersitisyel alanda yer alan Leydig hücrelerinin işlevlerini inhibe etmektedir (16-18).

Hipertroidizm'in, insan ve hayvanlarda erkek gonadal dokularının gelişimi üzerinde, tiroid hormon nükleer reseptör (TRs) ve tiroid hormonlarının rolü olduğu giderek artan kanıtlarla desteklenmektedir.

Quercetin (3,3,4,5,7, pentahidroksi flavon); fotokimyasallar ailesine ait olup serbest radikalleri uzaklaştırma özelliği bulunan ve biyoyararlanımı oldukça yüksek olan güçlü bir antioksidandır. Antioksidatif ve antikarsinojenik özellikleri bulunmaktadır. Meyve ve sebzelerde oldukça fazla bulunan bir flavanol olmakla beraber in vitro ve in vivo olarak reaktif oksijen türlerinin azaltılmasında etkili güçlü antioksidanlardan biridir (19).

Yapılan birçok araştırmalarda quercetin'in anti-inflamatuar, antioksidan, kardiyoprotektif, vazodilatör, karaciğer koruyucusu, anti-viral, anti-allerjik, ve anti-kanser aktiviteleri gibi bir çok biyolojik özellikleri gösterilmiştir (20).

Yapılan karaciğer çalışmalarında genellikle deneysel siroz modellerinde quercetin'in anti-nekrotik ve anti-inflamatuar özellikte olduğu hepatik fibrosis hasarı azalttığı ve koruyucu olduğu gösterilmiştir.

Hepatik iskemi reperfüzyon modellerinde ise artan inflammatuar sitokinleri azaltarak ve anti-apoptotik markerların inhibisyonunu sağlayarak apoptozisi regüle ettiği gösterilmiştir. Ayrıca quercetin'in organ transplantasyonu gibi cerrahi operasyonu öncesi ve sonrası tedavisel ilaç uygulaması sayesinde doku hasarının minimize edilebileceği öne sürölmektedir (21-24).

Dünyadaki ölümlerin başlıca nedenlerinden biri olan kardiyovasküler hastalıklarda quercetin, vasküler düz kas hücrelerine doğrudan etki ederek endotel hücrelerinden bağımsız olarak sistolik basınçta düşüşe neden olabilmektedir. Endotel disfonksiyonu, pre-hipertansiyon, ateroskleroz gibi birçok kardiyovasküler patolojide quercetin'in potansiyel olarak vazoreleksan aktivite yoluyla endotel tabakasını sağlıklı ve oksidan hasarın indüklediği endotel disfonksiyonu önleyebilir (25-26).

Pankreas üzerine yapılan çalışmalarda ise oksidatif strese maruz kalan pankreatik dokularda quercetin'in endojen antioksidanlarının üretimini artırarak antioksidan savunma mekanizmasını desteklemesi ile pankreatik β -hücre bütönlüğünü koruması sayesinde kan glikoz miktarını dolaylı olarak regüle edebileceği böylelikle Diabetes Mellitus hastalığında koruyucu etkisi olduğu ileri sürölmektedir (27-29).

Güçlü bir antioksidan olan quercetin'in STZ ile oluşturulmuş diabet modelinde, uzun süreli DM de artan glukoz miktarı, karaciğer ve böbrek hasar belirteçlerini azalttığı oksidan hasarı önlediği bildirilmiştir (30-32).

Quercetin uygulamasının antioksidan enzim düzeylerine etkileri üzerine yapılan çalışmalarda lipit peroksit düzeyini önemli ölçüde azalttığı, SOD ve GSH enzim aktivitelerini artırdığını gösterilmiştir.

Mitokondriyal disfonksiyonda quercetin'in potansiyel koruyucu etkisi, mitokondriyal membran geçirgenliğini engellediği ve yapısal olarak ilişkili olduğu flavonoidler arasında mitokondriyal disfonksiyona karşı en etkili flavonol grubu olduğu gösterilmiştir (33-34).

Son çalışmalar, quercetin'in kanser hücrelerinin büyümesini yavaşlatabileceği ve birçok kanser hücrelerinde pro-apoptotik belirteçlerin aktivasyonunu sağladığı düşünülmektedir.

Özellikle kolon kanseri üzerine yapılan araştırmalarda quercetin'in, kolon kanserine neden olan hücrelerin çoğalma ve büyümesini önlediği ve bunun yanı sıra kolon kanserine neden olan hücrelerde apoptozisin uyarılmasını sağladığı kanıtlanmıştır (35).

Günümüzde geleneksel tıpta, quercetine karşı ilgi her geçen gün biraz daha artmakta ve yapılan araştırma sonuçları doğrultusunda, quercetin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirtilmektedir (19-35).

Biz de yapmış olduğumuz literatür araştırmaları neticesinde, testis dokusunda hipertoidi sonucu artan oksidan hasarında quercetin'in koruyucu etkisi hakkında herhangi bir kaynağa rastlamadık.

Bu veriler doğrultusunda çalışmadaki amacımız, deneysel olarak hipertiroidi oluşturulan sıçanlarda, hipertiroidiye bağlı olarak testis yapısındaki histolojik değişimleri, immünohistokimyasal, elektron mikroskopik ve ışık mikroskopik olarak inceleyerek, güçlü bir antioksidan olan quercetin'in testis dokusu üzerindeki etkisini araştırmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

2.1.1. Testis Anatomisi

Erkek üreme sistemini oluşturan testisler; funiculus spermaticus'a asılı olarak skrotum içine yerleşmiş olan oval şekilli bir çift üreme organıdır. Birbirinden septum scroti denilen bir bölme ile ayrılmışlardır. Skrotum'un dıştan-içe tabakaları deri, tunica dartos (camper fasiyası), fasiya spermatika eksterna, fasiya cremasterica, fascia spermatica interna (fascia transversalis) ve tunika vaginalis testistir.

Yetişkin bir erkekte testisler, 10-14 gr ağırlığında, 4-5 cm uzunluğunda ve 3 cm genişliğindedir. Her testisin, **facies medial** ile **facies lateral** olarak adlandırılan iki yüzü, **margoanterior** ile **margoposterior** olmak üzere iki kenarı; **ekstramitas inferior** ve **ekstramitas superior** olarak isimlendirilen iki ucu bulunmaktadır.

Arteriyal ve venöz dolaşım; testisin kan akımı 100 mg doku için yaklaşık olarak 9ml/dk'dır. Arteria hipogastrika'nın dalları olan kremasterik ve deferential arterler, testisin kanlanmasına katkıda bulunurlar. Testiküler arter, testisin posteriyor yüzünden testise girerek, tunika albuginayı geçer. Transvers olarak testis parankimi üzerinden geçecek şekilde anteriorda dallanarak, posteriyor ve inferiora doğru ilerler. Testisin medial ve lateral bölgelerine kıyasla, anterior ve inferior bölgeleri daha çok damar içermektedir. Mediastenden gelen küçük venlerle, vas deferens venleri ve posteriyordan gelen venler birleşerek plexus pampiniformisi oluşturur. Plexus pampiniformis, spermatik kord içerisindeki kanalis inguinalis'ten geçerek, solda vena renalis, sağda ise vena kava inferiora boşalır.

Testis'in lenf drenajı, intertübüler bölgelerden kaynaklanan kör uçlu lenf damarları spermatik kord içinde ilerleyerek nodi paraaortici'ye drene olmaktadır. Seminifer tubüllerde ise lenf drenajının bulunmadığı öngörülmektedir. Bundan dolayı lenf akımının kesintiye uğraması durumunda interstisiumda dilatasyon olurken, seminifer tubüller bu durumdan etkilenmezler. Testis ve epididim arasında lenfatik damarlar yolu ile bir ilişki olup olmadığı bilinmemektedir.

Sinirsel innervasyonu; medulla spinalisin torakal 10-12 segmenterinden kaynaklanan sempatik ve nervus vagustan kaynaklanan parasempatik liflerden meydana gelen plexus testikularis ile innerve edilir. Somatik innervasyonu yoktur. Plexus testikularise ait sinirler; arteria testikularis ve deferential arter etrafında arterleri izleyerek testise varır. Leydig hücrelerini besleyen kapillerler sempatik sinir sistemine ait lifler tarafından uyarılır (36-37).

2.1.2. Testis Fizyolojisi

Testislerin seks hormonu olan testosteronu sentezlemek, depolamak, sağlamak ve erkek germ hücresi olan spermiumları üretmek şeklinde iki temel görevi bulunmaktadır. Puberte döneminde bu işlevleri yerine getirmeye başlayan testis, hipotalamo-hipofizer aksın kontrolü altındadır. Endokrin faktörler, spermatogenez oluşumu için oldukça önemli bir etkiye sahiptir. Spermatogenez, hipofiz bezinden salgılanan folikül stimulan hormon ile lüteinleştirici hormonların, testis hücrelerindeki etkisi ile düzenlenir.

Lüteinleştirici Hormon (LH);

Hipotalamustan sekresyonu yapılan gonodotropin releasing hormon (GnRH) hipofiz bezinden, lüteinleştirici hormonun sekresyonunu stimüle eder. Adeno hipofizden LH salgısı sürekli değil özellikle gece 90 dakikalık aralıklar şeklinde olmaktadır. LH, Leydig hücrelerindeki reseptörlere tutunarak, hücrelerde kolesterolden; spermatogenik seri hücrelerinin gelişimi için önemli olan testosteron salgılanmasını stimüle eder. LH dışında prolaktin ve LH releasing hormonlar da leydig hücrelerini etkileyerek testosteron salgılanmasında fonksiyon görmektedir.

Folikül Stimulan Hormon (FSH);

Hipotalamustan sekresyonu olan gonodotropin serbstleştirici hormon, hipofiz bezinin ön lobundan folikül stimulan hormon salınımını stimüle eder. Sertoli hücrelerine etkisiyle adenilat siklaz üretimini uyaran FSH, cAMP'nin artmasına yol açarak androjen bağlayıcı proteinin (ABP) sentezlenmesini ve salgılanmasını uyarır. Bu protein testosterona bağlanır ve seminifer tübül lümenine taşır. Böylelikle spermatogenez uyarılmış olur. Germ hücrelerini azalması ise FSH salgısını

uyarmaktadır. FSH salgılanması feed-back mekanizmasıyla sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hormonunun negatif geri bildirim ile durdurulur. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, progesteron ve östrojenlerle inhibe edilir (38) .

2.1.3. Testis Histolojisi

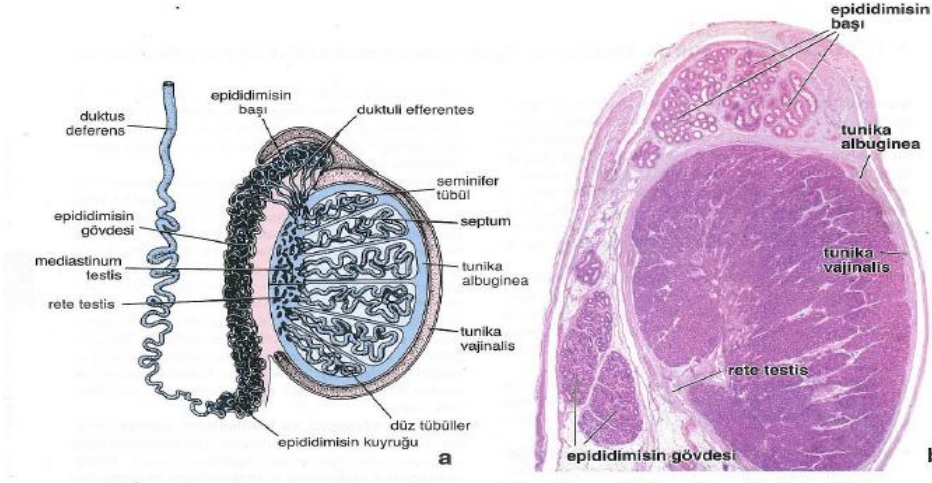
Hem egzokrin hem de endokrin yapısında bir bez olan testis, üç tabaklı bir kapsül ile sarılmıştır. Bu yapı testiküler kapsül olarak adlandırılır ve sırasıyla tunika vasküloza, tunika albuginea ve tunika vaginalis'den meydana gelir. Tunika albuginea düz kas hücrelerini içeren oldukça kalın sıkı bağ dokusu yapısında olan kapsülün en belirgin tabakasıdır. Bazal lamina ile mezotelyal hücrelerin oluşturduğu tunika vaginalisten ayrılmıştır. Kapsülün en iç tabakası olan tunika vasküloza, damarlarca zengin bir ağ yapısından oluşan gevşek bağ dokusundan oluşmaktadır.

Tunika albugineanın testisin posterior yüzü boyunca kalınlaşmasıyla mediastinum testisten çıkan septumlar testisi ortalama 250-300 tane lobüle böler ve bu lobüllerin her birine testiküler lobül adı verilir. Her lobülde çok katlı germinal ya da seminifer epitel ile döşeli 1-4 adet seminifer bulunmaktadır. Epitel ince bir bazal lamina ile tübülü çevreleyen fibröz dokudan ayrılmaktadır. Fibröz tabakanın iç tabakası, tübülleri kuşatan kasılabilir özellik gösteren yassılaştırmış miyoid hücrelerden oluşmaktadır. Fibröz dokuya peritübüller bağ doku denir. Peritübüller doku fibroblast hücreleri ve miyoid hücrelerden oluşmaktadır.

İnterstisyel doku; Leydig hücreleri, kan ve lenf damarları, fibroblast, mast hücreleri, makrofajları ve diğer bağ doku hücrelerini içerir. Testis kapillerleri pencere tipte ve kan proteinlerinde olduğu gibi büyük proteinlerin kolayca geçişine izin verirler.

Leydig hücreleri; merkezi yerleşimli, poligonal biçimli tek bir nukleusa, ayırt edici stoplazmik kristaller olan Reinke kristallerine ve lipid damlacıklarından zengin eozinofilik sitoplazmaya sahiptirler. Sekonder seks karakterleri gelişimi için gerekli olan testosteron hormonunu Leydig hücreleri üretmektedir. Erken fetal dönemde Leydig hücrelerinin farklılaşması sonucu testosteron salgılanması gerçekleşir. Testosteron salgılanması, embriyoda gonadların gelişimini, pubertede spermatozoa üretiminin başlatılmasını, sekonder seks karakterlerinin gelişimini, yetişkinde ise spermatogenezin devamlılığını sağlamaktadır. Ön hipofiz bezinin iki hormonu olan

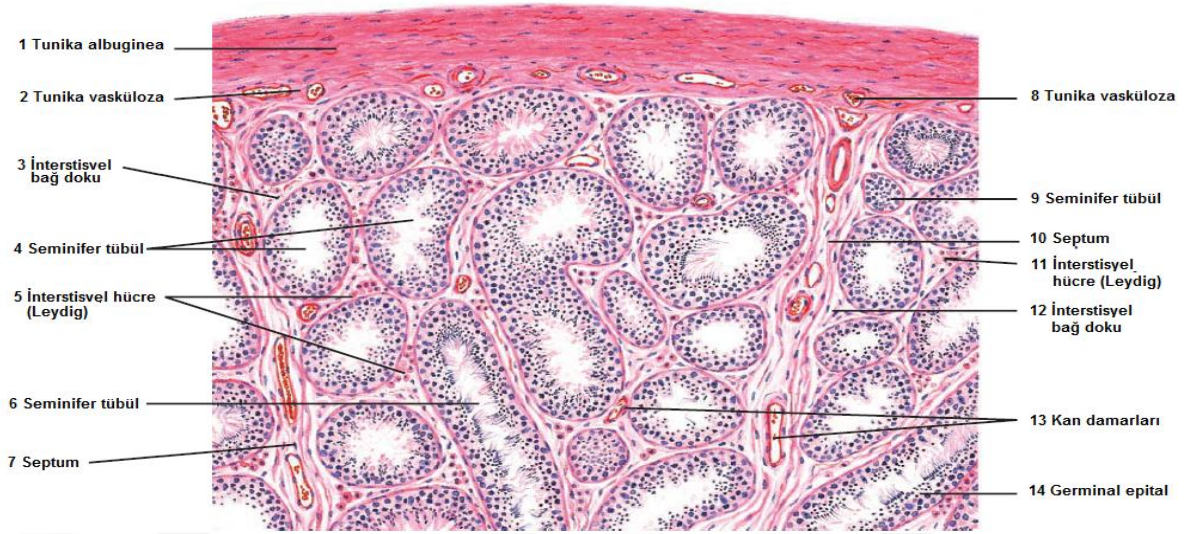
LH ve prolaktin hormonları ile düzenlenmektedir. LH, testosteron üretimini uyarırken, prolaktin ise LH reseptör ekspresyonunun başlamasından sorumludur (9-14).



Şekil 1: Erkek üreme sistemi şematik diyagramı (9)

2.1.3.1. Seminifer Tübül

Testisin her bir lobülünde birbirleri arasında ilişkileri olan 1-4 seminer tübül yer almaktadır. Her bir seminifer tübül ortalama olarak 150-200 μ m çap ve 50 cm uzunluğa sahiptir. Her seminifer tübül fibröz yapıda peritübüler bağ doku ve yassı miyoid hücrelerden oluşan bir tabaka, bir bazal membran ve semifer epitelden oluşmaktadır (11). Seminifer epitel iki temel hücre popülasyonundan oluşan kompleks, çok katlı epitel görünümündedir. Epiteli oluşturan hücreler; sertoli hücreleri ve spermatogenik hücrelerdir (9-14).



Şekil 2 : Testisin hisyolojik görüntüsü (39)

2.1.3.2. Sertoli Hücreleri

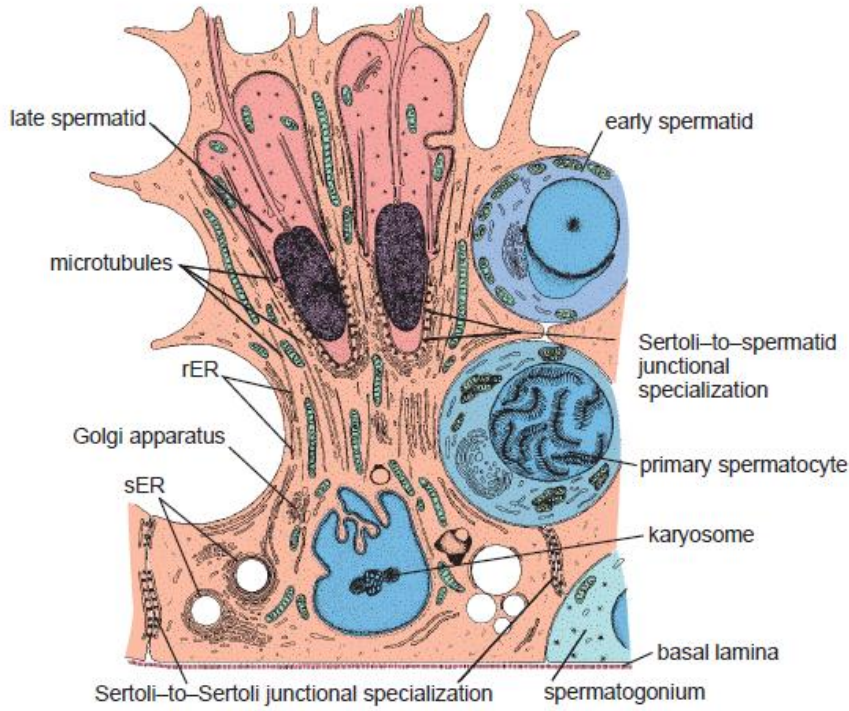
Sertoli hücreleri; destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da bilinmektedir. Bazal lamina üzerine oturmuş, seminifer epitelin bütün kalınlığına uzanan, apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir (9-11). Her hücrenin sınırları düzgün olmayan ökromatik bir çekirdeği ve belirgin bir çekirdekçiği bulunur. Sertoli hücre nükleusları bazı türlerde karyozom adı verilen üç loblu yapısındadır ve nükleolusları RNA ve DNA içeren cisimcik çifti içermektedir. Sitoplazmalarında mikofilamentler ve ara filaman ile mikrotübüllerden meydana gelen hücre iskeleti bulunur. Ayrıca içerisinde lipofuskin ve oldukça fazla sayıda lipid damlacığı bulunan lizozomlar vardır. Ayrıca insanlarda, sertoli hücrelerinin bazal sitoplazmalarında karakteristik Charcot-Böttcher adı verilen inklüzyon cisimcikleri bulunmaktadır. Işık mikroskopisi ile bu yapılar 10-25 mikrometre uzunluğunda 1 mikrometre genişliğinde ince fuziform şeklinde görülebilmektedir. Transmisyon elektron mikroskopisinde ise birbirine paralel, düz yoğun filament demetleri olarak ayırt edilebilirler. Inklüzyon cisimciklerinin fonksiyonları hakkında, lipid transportunda ve sertoli hücreleri tarafından lipidlerin kullanımında görevli olabilecekleri ileri sürülmektedir.

Seminifer tübül epitelinin %10'luk kısmını puberteden sonra sertoli hücreleri oluşturmaktadır. Sertoli hücreleri, spermatogenik seri hücrelerinin desteklenmesinde ve gelişiminde önemli rol oynar.

Sertoli hücreleri, bazal ve lateral yüzeylerindeki bağlantı kompleksleri ile birbirlerine tutunurlar. Lateral yüzeydeki tutunma kompleksleri, seminifer tübül epitelinin bazal ve adluminal olmak üzere 2 farklı kompartmana ayrılmasını sağlar. Bazal kompartman, spermatogonyum ve primer spermatositleri içerir. Adluminal kompartman ise sekonder spermatosit ve spermatidler içerir. Buna bağlı olarak sertoli-sertoli hücre bağlantı kompleksi **kan-testis bariyerini** oluşturmaktadır. Bu bariyer sayesinde dolaşımdaki antikorların ve plazma proteinlerinin spermatogenik hücelere ulaşarak immün cevabın oluşması engellenir. Kan-testis bariyeri seminifer epitelde karbonhidrat, protein ve iyon içeriği bakımından fizyolojik kompartmanlaşmanın olması için gereklidir (9-14).

Sertoli hücrelerinin görevleri;

- Gelişmekte olan spermatogenik seri hücrelerini korumak, beslemek ve desteklemek.
- Folikül stimüle edici hormon (FSH) etkisi altında, seminifer tübüllerde spermatogenezin başlaması için testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı proteini (ABP) sentezlemek.
- Embriyonik gelişim esnasında, erkek fetusta paramezonefrik (m ller) kanalların gerilemesini ve mezonefroz kanalların gelişimini sağlayan Anti-Müllerian Hormon (AMH)  retmek.
- Spermiyogenez sonucunda açığa çıkan rezidüel cisimcikleri fagosite etmek.
- Kan-testis bariyerini oluşturmak.
- Salgı fonksiyonları, FSH saliverilmesini inhibe eden inhibin hormonu, plasminojeni aktif proteolitik hormon olan plazmine dönüştüren plazminojen aktivatör, transferrin ve seruloplazmin sentezlerler.
- Büyüme faktörleri, parakrin faktörler, kök hücre faktörü (SCF), gliyal hücre hattı kaynaklı nörotropik faktör gibi glikoproteinleri de salgılamaktadır (9-15).



Şekil 3: Sertoli hücresi şematik diyagramı (9)

2.1.3.3.Spermatogenik Seri Hücreleri

Spermatogenik hücreler, seminifer tübül epitelinde yer alan ve çeşitli olgunlaşma evrelerinde bulunan 4-8 tabakalı hücrelerdir. Bazaldan lümene doğru farklılaşmanın farklı evrelerindeki hücre tipleri sırasıyla; spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiumlardır (12-15).

2.1.3.3.1. Spermatogonyumlar

Bazal kompartmanda olan ve bazal lamina ile ilişkili hücrelerdir. Spermatogonyal kök hücreler çok sayıda bölünme geçirirler ve rutin H&E preparatlarında nüklear görünümde farklılık gösteren spermatogonyal soyları üretirler.

Nükleus görünümü göz önüne alınarak 3 farklı spermatogonyum tanımlanmıştır.

TİP A Koyu: Oval nükleuslara sahip, ince granüllü kromatinli ve oldukça bazofilik hücrelerdir. Seminifer epitel için kök hücre oldukları düşünülmektedir. Düzensiz periyotlarla bölünmeleriyle ya kök hücre olarak kalıp tip A koyu spermatogonyum ya da bir çift tip A açık spermatogonyumları oluştururlar.

TİP A Açık: İnce granülleri olan kromatinli oval nükleusları bulunur. Spermi üreten farklılaşma evresine yönlendirilmişlerdir. Ardışık mitoz bölünme ile sayıları artar.

TİP B Spermatogonyum: Yoğunlaşmış kromatinli ve yuvarlak nükleuslu hücrelerdir. Birkaç bölünme geçirip, tip A spermatogonyumlar tip B spermatogonyumlara dönüşürler. Tip B spermatogonyumların görünümü spermatogonal aşamadaki son evreyi oluşturur (9).

2.1.3.3.2. Spermatositler

Tip B spermatogonyumların mitotik bölünmesi primer spermatositleri üretir. Primer spermatositler, diploid kromozom sayısı ile $2n$ DNA miktarı içerirler. Meydana geldikten bir süre sonra ve mayotik bölünme başlamadan hemen önce DNA sayılarını iki katına çıkarırlar. Bu şekilde, her primer spermatosit normal sayıda kromozom ($2n$) ve iki katı sayıda DNA ($4d$) içerir.

Mayoz I, kromozom sayısını azaltır ve DNA miktarını diploid duruma getirir. Böylece sekonder spermatosit, haploid kromozom sayısı ($1n$) ve $2d$ miktarda DNA ile karakterizedir. Mayoz II'den önce DNA replikasyonu olmaz, bu bölünmeden sonra her bir spermatid haploid ($1n$) sayıda kromozoma sahiptir ve her bir kromozom tek bir kromatid içerir.

Dört kromatidden oluştukları için tetrad adı verilen homolog kromozom çiftleri, crossing-over olarak adlandırılan süreç ile genetik materyal değişimi yaparlar. Genetik değişim yoluyla, her spermatositin ürettiği dört spermatid birbirinden ve diğer spermatidlerden farklı olur. Gen değişimi tamamlandıktan sonra homolog kromozomlar ayrılır ve mayoz mekiğinin zıt kutuplarına göç ederler.

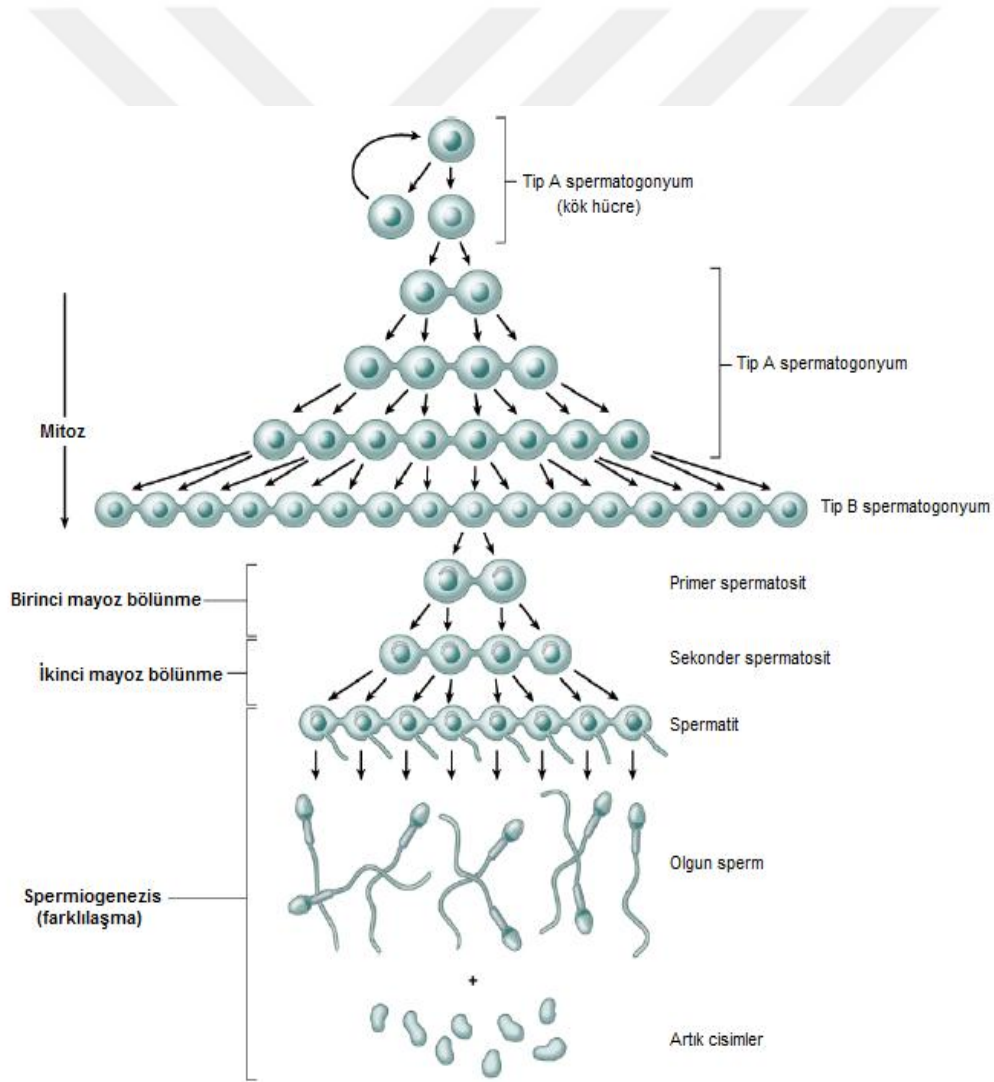
Birinci mayotik bölünme ile oluşan hücreler, sekonder spermatositler olarak isimlendirilmektedir. Bu hücreler yeni DNA sentezlemeden hemen ikinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Sekonder spermatosit diploid DNA miktarına ($2d$) sahiptir.

İkinci mayoz bölünme metafaz safhasında, kromozomlar ekvatorda sıralanırlar. Kardeş kromatidler ayrılır ve zıt kutuplara doğru giderler. Mayoz II bittiğinde ve

nüklear membranlar tekrar meydana geldiğinde her sekonder spermatositten, her biri 23 kromozoma sahip ($1n$) ve $1d$ miktarında DNA'ya sahip iki adet haploid spermatid meydana gelir (9-14).

2.1.3.3.3. Spermatidler

İkinci mayotik çoğalmanın metafaz safhasında, kromozomlar metafaz plağında sıralanırlar. Kardeş kromatidler ayrılır ve zıt kutuplara doğru giderler. Mayoz II bittiğinde ve nüklear membranlar tekrar meydana geldiğinde her bir sekonder spermatositten, her biri 23 kromozoma sahip ($1n$) ve $1d$ miktarında DNA içeren iki adet haploid spermatid meydana gelir (9-13).

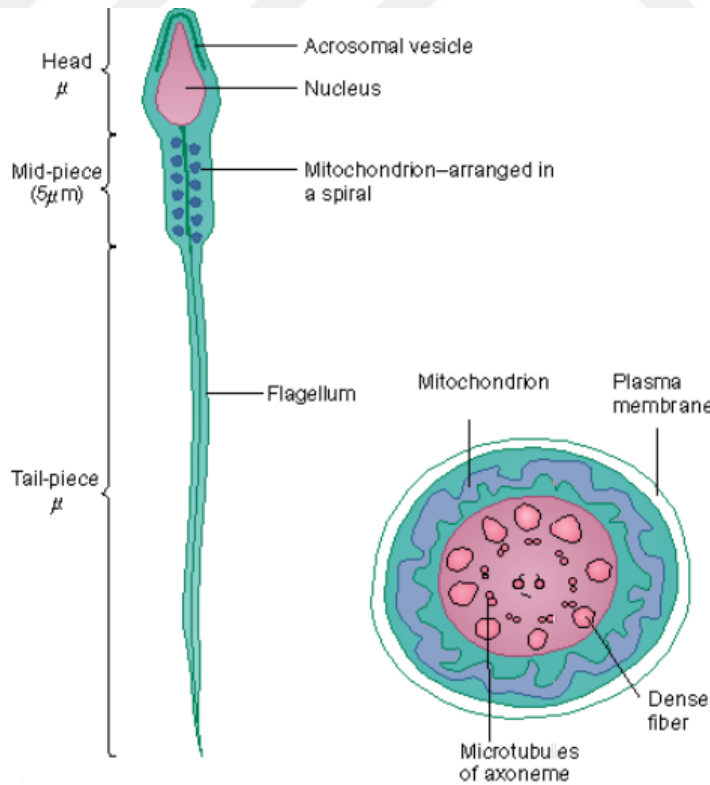


Şekil 4: Spermatogenik hücreleri gösteren şematik diyagram (40)

2.1.3.3.4. Spermin Yapısı ve Şekli

Olgun insan spermi ortalama 60 μm uzunluğundadır. Spermin baş kısmı yassı şekilde ve 4,5 μm uzunluğunda, 3 μm genişliğinde ayrıca 1 μm kalınlığındadır. Büyük bir kısmını nukleus oluşturur. Nukleusun anterior üçte ikilik bölümünü saran akrozomal kep, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin içeren tripsine benzer proteazlara sahiptir. Bu enzimler oosit 2 zona pellusidasının delinmesi için gereklidir.

Sperm kuyruğu; Yaklaşık olarak 55 μm uzunluğundadır. Boyun, orta, esas ve son parça olarak bölümlere ayrılır. Kısa olan boyun, sentriyol, aksonem ve fibril başlangıçlarını içerir. Orta parça ise yaklaşık olarak 7 μm uzunluğundadır; aksonem ve mitokondriyonları içerir. Mitokondriyonlar, kuyruğun hareketi için gerekli enerjiyi sağlarlar. Esas parça, yaklaşık olarak 40 μm uzunluğundadır. Aksonem ve fibröz kılıfı içermektedir. Son parça ise, olgun spermde flagellumun yaklaşık son 5 μm 'lik kısmıdır. Ortada aksonem ve üzerinde hücre zarı bulunur. Aksonemin 9 çift mikrotübülü, incelen kuyruk ucunun çeşitli seviyelerinde, türden türe değişiklik göstererek sona erer (9-14).



Şekil 5: Olgun spermin yapısı (9)

2.1.3.4. Spermatogenez

Spermatogenez bir gelişme olgusu olup, farklanmamış ilkel erkek cins hücrelerinin (spermatogonyumlar), ileri derecede farklanmış spermiumlara dönüşmesidir (14). Spermilerin üretildiği süreç olan spermatogenez, puberteden kısa bir süre önce gonodotropin seviyelerinin artmasıyla başlar ve hayat boyunca devam eder (9). Üç farklı safhada incelenmektedir.

1. Spermatogonyal Evre (Mitoz); Bu evrede spermatogonyumların mitoz bölünmeleri ile primer spermatositler meydana gelmektedir.

2.Spermatosit Evresi (Mayoz); Primer spermatositler, diploid kromozom sayısına ve $2n$ DNA miktarına sahiptirler. Meydana geldikten çok kısa bir süre sonra ve mayotik bölünme başlamadan hemen önce DNA miktarlarını replike ederler. Böylece, her primer spermatosit normal sayıda kromozom ($2n$) ve iki katı sayıda DNA ($4d$) içerir (9-14).

Mayoz I, kromozom sayısını azaltır ve DNA miktarını diploid duruma getirir. Böylece sekonder spermatosit, haploid kromozom sayısı ($1n$) ve $2d$ miktarda DNA ile karakterizedir. Mayoz II'den önce DNA replikasyonu olmaz, bu bölünmeden sonra her bir spermatid haploid ($1n$) sayıda kromozoma sahiptir ve her bir kromozom tek bir kromatid içerir.

Mayoz 1'de dört kromatidden oluştukları için tetrad adı verilen homolog kromozom çiftleri, crossing-over olarak adlandırılan süreç ile genetik materyal değişimi yaparlar. Genetik değişim yoluyla, her spermatositin ürettiği dört spermatid birbirinden ve diğer spermatidlerden farklı olur. Gen değişimi tamamlandıktan sonra homolog kromozomlar ayrılır ve mayoz mekiğinin zıt kutuplarına göç ederler.

Birinci mayotik bölünme ile oluşan hücreler, 'sekonder spermatositler' olarak isimlendirilmektedir. Bu hücreler yeni DNA sentezlemeden hemen ikinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Sekonder spermatosit diploid DNA miktarına ($2d$) sahiptir.

İkinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde, kromozomlar ekvatorda sıralanırlar. Kardeş kromatidler ayrılarak mekiğin zıt kutuplarına doğru hareket ederler. Mayoz II tamamlanıp nüklear membranlar tekrar meydana geldiğinde her bir

sekonder spermatositlerden, her biri 23 kromozom (1n) ve 1d miktarında DNA'ya sahip iki haploid 'spermatid' oluşur (9).

3. Spermiyogenez (Spermatid) Evresi; Spermatidler, spermiyogenez olarak adlandırılan karmaşık bir olgunlaşma süreci geçirir. Yuvarlak şekilli, hareketsiz spermatidlerin uzayarak, spermatozoonlara dönüştüğü sıralı değişimler gerçekleşir (11).

İkinci mayotik bölünmenin sonucunda oluşan her spermatid DNA içeriği olarak haploiddir (1d) ve (1n) olan kromozom sayısı 22 otozom ve bir X ya da Y kromozomu tarafından temsil edilmektedir. Haploid spermatidler, olgun spermi oluşturan bir farklılaşma sürecine uğrarlar. Matür sperm de haploiddir. Sperm bir oositi fertilize ettiği zaman normal diploid durum yeniden oluşur.

Spermatid popülasyonunun olgun sperme farklılaşması sırasında meydana gelen yeniden şekillenme dört fazdan oluşmaktadır (9).

Golgi Fazı: İlk değişiklik spermatidin Golgi kompleksinde görülür. Periyodik asit-Schiff (PAS) ile pozitif boyanan proakrozom granülleri, akrozomal vezikül denen ve nüklear zarfa komşu, membranla sınırlandırılmış bir vezikülü oluşturmak üzere bir araya gelirler. Akrozomal vezikülün pozisyonu, gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler. Sentriyoller de jukstanüklear bölgeden spermatidin arka kutbuna göç ederler.

Sentriyol sperm kuyruğunun aksonemini meydana getiren dokuz periferik mikrotübül çifti ile iki merkezi mikrotübül parçalarının bir araya gelmesini başlatır (9-14).

Kep Fazı: Akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısını ya da 2/3'sini saracak şekilde yayılır. Bu, yeniden şekillenmiş yapıya akrozomal kep denmektedir. Akrozomal kepin altındaki nüklear içerik yoğunlaşır.

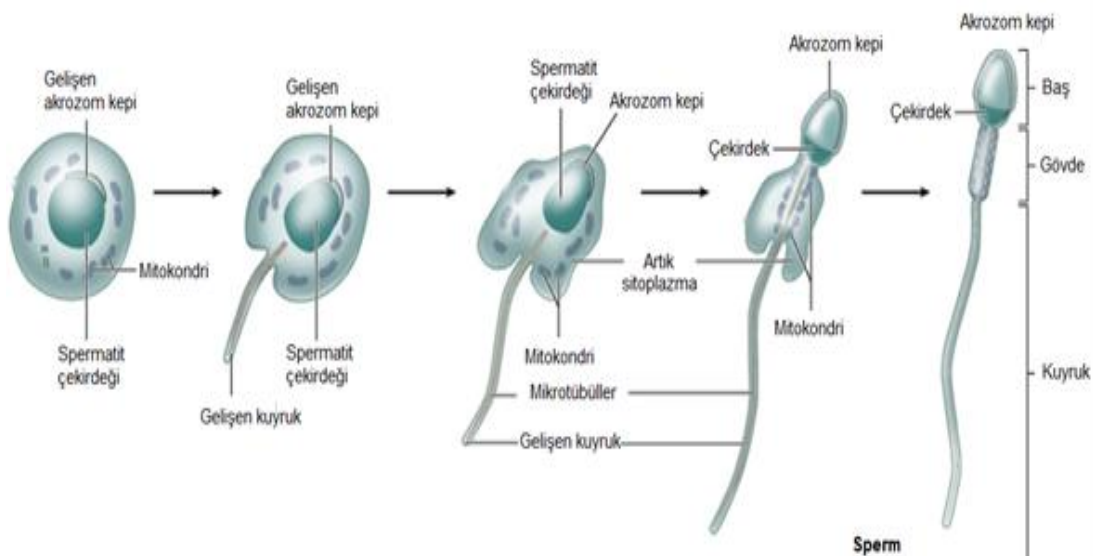
Akrozom Fazı: Bu fazda, spermatid kendini yeniden hizalar. Baş, Sertoli hücrelerinin içine gömülür ve bazal laminaya doğru yönelir. Gelişmekte olan flagellum ise seminifer tübül lümenine doğru uzanır. Spermatidin kondanse olan nükleusu yassılaşır ve uzar. Nükleus ve onu çevreleyen akrozom da plazma membranına komşu bir pozisyona taşınır ve sitoplazma posteriyora doğru yer değiştirir. Sitoplazmik mikrotübüller, çekirdeğin çevresinde manşet adı verilen bir bant

oluştururlar. Bu bant, akrozomun arka kısmından spermatidin arka kutbuna kadar uzanan silindirik kılıf şeklindeki bir yapıdır.

Flagellum gelişiminin daha önce başlamasını sağlayan sentriyollerden bir tanesi, nukleusun arka kısmına göç eder ve gelişmekte olan spermin bağlantı parçasını ya da boyun bölgesini meydana getirmek üzere değişime uğrarlar. Nukleusa tutunmuş olan bu sentriyolden dokuz kalın fibril gelişerek aksonem mikrotübüllerinin perifer kısmında bulunan dış yoğun fibriller şeklinde sperm kuyruğunun içerisine doğru uzanır. Bu fibriller, nukleusu flagellum ile birleştirerek bağlantı parçası adını almaktadır.

Plazma membranı gelişmekte olan flagellumu sarmak üzere posteriyora doğru hareket ederken, mitokondriyonlar, boyun bölgesinin posteriyor uzantısında sıkı, heliks şeklinde saran bir kılıf oluşturmak üzere sitoplazmanın kalan kısmından göç ederler. Bu bölge spermin kuyruğunun orta parçasıdır. Orta parçanın distalinde ise, uzunlamasına iki sütundan ve çok sayıda bağlantıdan oluşan bir fibröz kılıf, esas parçanın dokuz longitudinal fibrilini çevreler. Kuyruğun, distalinde kalan segment ise son parça olarak isimlendirilmektedir.

Olgunlaşma Fazı: Bu fazda, flagellumun etrafındaki fazla sitoplazma atılır ve olgun (matür) spermatozoon oluşur. Rezidüel cisimcik olarak isimlendirilen fazla sitoplazma sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir (9-14).



Şekil 6: Spermiyogenez şematik diyagramı(40)

2.1.3.5. Leydig Hücreleri

Seminifer tübüllerin arasında yer alan gevşek bağ dokusunda (interstisyel alan) bulunurlar. Bu hücreler büyük, poligonal ve eozinofilik hücrelerdir (9). Bu hücrelerin sitoplazmasının köpük benzeri görünümü, testosteron sentezi için depolanan kolesterole bağlı olarak yüksek düzeyde lipid içermesinden kaynaklanır (11).

Büyük olan çekirdeği çoğunlukla eksentriktir. Azorkarmin gibi uygun bir boyama yöntemiyle sitoplazmada çubuk biçimli kristaloidler (Reinke kristalleri) görülür (12). Rutin histolojik preparatlarda bu kristaller refraktirdirler ve yaklaşık 3x20 µm boyutlarındadırlar.

Sitoplazmalarında steroid salgılayan hücrelerin özelliği olan, sıkı paketlenmiş agranüler endoplazmik retikulum (aER) yer alır. Nispeten daha az miktarda ribozom ve çok sayıda tübüloveziküler kristalleri bulunan dağınık durumda mitokondriyon ve değişken boylarda çok sayıda lipid damlacığı bulunmaktadır (11,12).

Leydig hücreleri, erken fetal yaşam sırasında farklılaşarak testosteron salgırlar. Sentezlenen testosteron, erkek genital organların embriyolojik farklılaşması ve üreme fonksiyonu için gereklidir. (9,11-12) Testosteron üretimi embriyoner yaşamın 12. haftasında en üst sınırdadır ki bu da; epididimis, vas deferens ve aksesuar bezlerin (prostat, vezikula seminalis, bulbuüretal) farklılaşmalarını sağlar. Testosteron 5-alfa-redüktaz enzimi ile dihidro testosteroon (DHT) çevrilir ve DHT dış genital organların farklılaşmasında etkilidir (13).

Gelişimin 5. ayında, leydig hücreleri hızla yok olmaya başlar. Bu sebeple 6. aya kadar testosteron en düşük seviyelerdedir ve leydig hücreleri inaktif oldukları bir sürece girmiş olurlar. Pubertede gonodotropik uyarıya maruz kaldıklarında, tekrar androjen salgılayan hücrelere dönüşerek hayat boyunca aktif kalırlar (9-13).

2.1.3.6. İntratestiküler Kanallar

Her seminifer tübülün ucunda düz tübüllere ya da tubuli rektive ani bir geçiş vardır (9). Seminifer tubul epiteli tubuli rektile doğru biraz değişiklik göstermeye başlar. Spermatogenik hücreler azalırken, sertoli hücreleri sayıca artar (12). Son kısma yakın düz tübüller daralır ve tek katlı kübik epitel ile döşenir.

Düz tübüller mediastinum içine yerleşmiş, oldukça vasküler olan bağ dokusu içinde birbirleriyle anastomozlaşan kanallardan oluşan rete testise boşalırlar. Rete testisin kanallarını, tek katlı kübik ya da alçak prizmatik epitel döşer. Spermiumlar tubuli rekti ve rete testisten hızla geçtiğinden, histolojik kesitlerde lümende spermiuma çok nadir rastlanır (9-12).

2.1.3.7. Boşaltım Kanal Sistemi

Leydig hücrelerinin ilk gelişimi ve testosteron salgılanmasının başlaması, mezonefrik (Wolf) kanalın gelişmekte olan testis için boşaltım kanal sistemine farklılaşmasını stimüle eder. Gelişmekte olan testise bitişik mezonefrik kanal kıvrımlı bir hale gelerek duktus epididimise farklılaşır. Bu bölgede kalan mezonefrik tübüllerden yaklaşık olarak 20 tanesi gelişmekte olan seminifer kordonlar ile temas ederek duktuli effrentese gelişirler. Mezonefrik kanalın distal parçasına kalın bir düz kas örtüsü eklenir ve duktus deferens haline gelir. Distal mezonefrik kanalın ucu ise ejakülatuar kanalı ve vezikula seminalisi meydana getirir (11).

2.2. Aksesuar Cinsiyet Bezleri

2.2.1.Vezikula Seminalis

Mesannenin posteriyor duvarının üzerinde, duktus deferensin ampullasına paralel olarak yer alan bir çift, yüksek oranda katlantılı tübüler bezlerdir. Vezikula seminalisin kanalları, ejakülatuar kanalı oluşturmak üzere duktus deferens çiftinin distal ucuyla birleşir ve ejakülatuar kanallar prostat içine girerek prostatik üretrada sonlanır (11).

Bez duvarı, mukoza, ince bir düz kas tabakası ve fibröz bir kılıf içermektedir. Yalancı çok katlı epitel, silyumsuz prizmatik hücreler ve bazal lamina üzerinde uzanan yuvarlak hücreler içermektedir (9).

Vezikula seminalislerin salgısı, beyazımsı sarı renkte ve vizköz bir haldedir. Bu salgı, sperm için temel subsrat olan früktozu ve diğer şekerleri, aminoasitleri, prostaglandinleri içermektedir.

2.2.2. Prostat Bezi

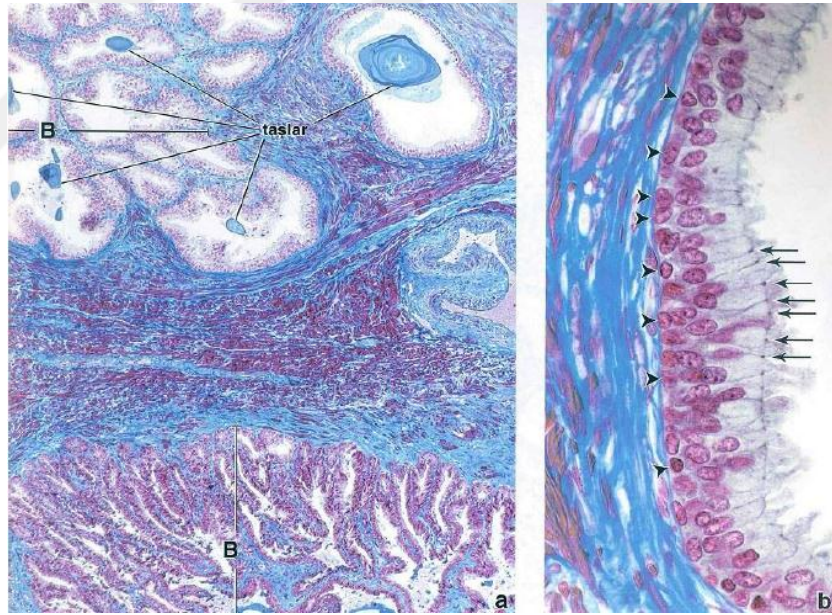
Erkek aksesuar bezlerinin en büyüğüdür. Retroperitoneal yerleşim gösteren bu bez, üretranın mesaneden başlayan ilk bölümünü saran, bileşik tübüloalveolar bir bezdir (11,12). Histolojik kesitlerde lobüler görünüm yoktur. Loblar belirsiz olduğundan ve normal erişkin insanlarda prostat içi içe zonlara ayrılmakta ve bu zonlar en iyi sagittal düzlemde ayırt edilebilmektedir (11).

Merkezi Zon: Prostatın %25'ini oluşturur ve submukozal bezlerden ibarettir.

Periferik Zon: Prostatın %70'ini oluşturur ve ana bezleri içerir.

Tranzisyonel Zon (Geçiş Zonu) : Prostatın %5'ini oluşturur ve prostatik üretrayı çevrelemektedir.

Periüretral Zon: Mukozal ve submukozal bezleri içermektedir (9,11-12).

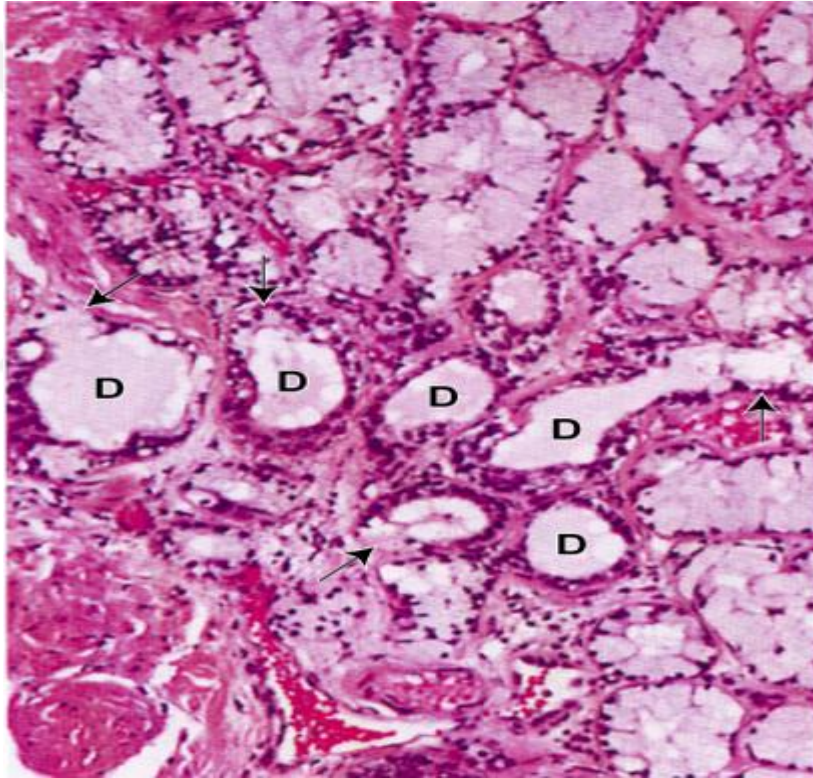


Şekil 7: İnsan prostat bezi histolojik görüntüsü (9).

2.2.3. Bulboüretral Bezler

Bir çift halindeki bulboüretral bezler; küçük, yuvarlak, sarı renkli ve 1 cm kadar çapı olan bileşik tubuloalveoler bezlerdir. Membranöz üretranın arkasında bulunur ve bezlerden her birinin kanalı ürogenital diyaframın inferiyor fasiyasının içinden geçerek penil üretranın başlangıç parçası ile birleşir. Boyu bezin fonksiyonuna bağlı olarak değişen tek katlı prizmatik epitel testosteronun kontrolü altındadır.

Salgısı; seksüel stimülasyon ile boşaltılır. Taze iken kaygan, akıcı ve mukusa benzer görünümündedir. Yüksek miktarda, galaktoz ve galaktozamin, sialilik asit ve metilpentoz içermektedir (9-12).



Şekil 8: İnsan bulboüretral bezhistolojik görüntüsü (9)

2.3. Tiroid Hormonu

Tiroksin (3,5,3',5'-tetraiyodotironin, T4) tiroid bezinden sistemik dolaşıma salınan ana tiroid hormon formudur. Bununla birlikte tiroksin, öncelikle karaciğer ve böbrekte triiyodotironin (3,5,3'-T3) haline dönüştürülmesi gereken bir pro-hormondur (41). T3, nüklear tiroid hormon reseptörleri (TRs) için yüksek affiniteye sahip tiroid hormonunun biyoaktif formudur (41-42). Bu iki hormon öncelikle karaciğer olmakla beraber, kalp, böbrek, beyin gibi farklı hedef dokularda bazal metabolizma hızının düzenlenmesinde oldukça önemlidir (43). Tiroid hormonları yalnızca protein degradasyonu değil aynı zamanda protein sentezini etkilemektedir. Bu nedenle vücudun protein dönüşümü hızlanır. Tiroid hormonlarının enzimler üzerindeki etkileri kas, karaciğer ve böbrek gibi organların protein metabolizmasında rol oynayan enzimler ile ilgilidir (44).

Tiroid hormonlarının fonksiyonları ve metabolizması hücre içinde gerçekleşir. Bu hormonların yapımı öncelikle vücuda alınan iyot miktarına bağlıdır. İyot ihtiyacı ile ilgili olarak WHO tarafından önerilen günlük gereksinim yaşamın ilk yılında 50 gr-gün, 1-7 yıl arası 90 gr-gün, 7-12 yaş oranı 120 gr-gün, 12 yaş sonrası 150 gr-gün, gebelerde 200 gr-gündür. Hücre içerisine serbest hormon olarak nufuz eder. Tiroid hormonunun reseptörleri hücrenin çekirdeği ve mitokondriumda yer alır. T3'ün etkinliği hücrelerde oldukça hızlı ve süre olarak kısa etkiye sahiptir. T4'ten ise 4-6 kez daha baskın ve reseptör duyarlılığı oldukça yüksektir (45).

Karaciğerde katabolize edilen tiroid hormonları glukuronik asit ve sülfatla birleşmektedir. Glukuronat bileşikleri ise karaciğerden safra ve sülfat bileşikleri şeklinde açığa çıkarak böbrekten atılımı gerçekleşir.

Tiroid hormonları, normal büyüme ve gelişme için DNA ve RNA sentezi yardımıyla doku büyüme elemanlarının sentezini oldukça hızlandırmaktadır. Hipofize direk etki eder ve büyüme hormonu gen ifadesini uyarır. Böylece büyüme hormonu sentezini hızlandırırlar (46).

Tiroid hormonu, hipotalamus ve tiroid stimülan hormon (TSH) tarafından, hipotalamus-hipofiz-tiroid aksında bir geri besleme döngüsü olarak işlev görecektir. Hipofiz bezi tarafından tirotropin uyarıcı hormon (TRH) salınımını düzenler.

Böylelikle tiroid hormonunun sistemik dolaşımdaki fizyolojik seviyesi korunmuş olur (42).

Yıllardır tiroid hormonlarının (THs) üreme endokronolojisi üzerine olan etkileri araştırılmaktadır. Yapılan çalışmalarda özellikle erkek üreme sistemi üzerine tiroid hormonunun rolü histolojik ve steroidogenik bakış açılarıyla değerlendirilmiştir. Deneysel olarak yapılan çalışmalarda, tiroid hormonunun erkek üreme başarısızlığı üzerinde oldukça büyük bir etkisi bulunduğu kanıtlanmıştır (17).

2.3.1. Tiroid Hormonu ve Testiküler Fonksiyon

Testisler, intersitisyel gevşek bağ dokusunun desteklediği, birbirine sıkıca sarılmış seminifer tübüllerden oluşmaktadır. İnterstisyel alanda, leydig hücreleri bulunmaktadır. Seminifer tübüllerin bazal membranında germ hücreleri ve somatik sertoli hücrelerinden oluşan özelleşmiş epitel bulunmaktadır (47).

Sertoli hücreleri; memeli testisinde seminifer epitelin ana yapısal bileşenlerini oluştururken, spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesinde anahtar rol oynamaktadır (48). Gelişmekte olan germ hücrelerini destekleyerek gelişimlerini sürdürmelerini sağlamaktadır. Her sertoli hücresi, gelişmekte olan sınırlı sayıdaki germ hücresini desteklemektedir. Sertoli hücrelerinin germ hücrelere oranı, insanlarda sırasıyla 1:11 iken, sıçan testisinde bu oran 1:50'dir. Sertoli hücre sayısı, yetişkin testis fonksiyonu, sperm üretimi ve gelecekteki erkek fertilitesi ile yakından ilişkilidir. Sertoli hücrelerinin olgunlaşması ve proliferasyonunda her ne kadar çeşitli faktörlerin rol aldığı düşünülürse de T3'ün testiküler gelişim boyunca sertoli hücre proliferasyonu için başlıca hormonal sinyal gönderdiği bilinmektedir. Tiroid hormonu, sertoli hücre differasyonunu uyararak, sertoli hücrelerinin mitotik olarak aktif oldukları dönemin azalmasına sebep olmaktadır (47).

Leydig hücreleri hem fetal hem erişkin leydig hücre popülasyonuna ait kök hücreler, testis intersitisyumundaki mezenkimal hücreler olup bu hücreler iğ şeklinde ve non-steroidogenik hücrelerdir. Bazı mezenkimal hücreler fetal leydig hücrelerine farklılaşırken, diğerleri postnatal testis içindeki yetişkin leydig hücrelerinin prekürsörlerini oluştururlar (49).

Leydig hücre salgılarının, erkek sekonder sex karakterlerinin kontrolü üzerinde önemli endokrin rolü bulunmaktadır. Tiroid hormonu, fetal tip leydig hücre atrofisini ve mezenşimal hücrelerin erişkin tip leydig hücrelerine diferansiyonunu uyarmaktadır.

Testis; gametogenez ve steroidogenez olmak üzere iki temel fonksiyona sahiptir. Anterior hipofiz, gonadotropinlerin salgılanmasıyla, folikül stimulan hormonun (FSH) doğrudan sertoli hücrelerine, luteinizan hormonun (LH) interstisyel leydig hücrelerine tutulumu ile bu işlevlerin her ikisinin de kontrolüne katılır. Gonadotropinler olan LH ve FSH, testiste leydig hücre ve sertoli hücrelerinin normal gelişim ve farklılaşması için oldukça önemli etkiye sahiptir. LH'e yanıt olarak üretilen ve esas androjen olan testosteron, seminifer tübüllere düffüz ederek, spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi için FSH ile birlikte gereklidir (47).

2.4. Hipertiroidizm

Vücut homeostazının devamlılığının sağlanması için, tiroid hormon miktarının kanda belirli aralıkta olması gerekir. Bu değerlerin normal olduğu aralık ise ötiroid durumu olarak adlandırılır. Tiroid hormonlarının (T3,T4) dolaşımında normal değerlerden daha fazla olması ise hipertiroidizm olarak isimlendirilir (46). Hipertiroidizm üreme sistemiyle birlikte, birçok sistemi de içeren tiroid hormonlarının sentezinin artışıyla oluşan klinik bir tablodur. Özellikle tiroid hormonu ve testiküler fonksiyon arasındaki ilişki hala tartışılmaktadır. Tiroid hormonunun yıllarca testis üzerinde etki göstermediği düşünülürken, son yapılan çalışmalar testis gelişmesinde oldukça önemli rol üstlendiğini göstermiştir (50). Semen kalitesindeki değişiklikler ile üreme yetersizliği ve normalin altındaki sperm sayısı ve hareketliliği vücudun hipertiroidi durumu ile yakın ilişkilidir. Hipertiroidizm; fonksiyon bozukluğuna, genellikle gonadotropin salınımı, sex steroid metabolizması ve testis fonksiyon anormallikleri neden olmaktadır (49). Erken klinik gözlemler hipertiroidi erkeklerde, oligospermi, astenospermi ve anormal sperm morfolojisinin görülmesine neden olduğunu göstermiştir (44-47,51).

Gonadotropinlerden ayrı olarak tiroid hormon düzeyindeki değişiklikler, sertoli ve leydig hücre çoğalması, testis olgunlaşması ve steroidogenez kontrolüne T3'ün katılımıyla testis gelişimini etkilemektedir. Tiroid hormonunun aşırı salgılanması ile

ortaya çıkan hipertiroidi, mezenşimal hücrelerin progenitör leydig hücrelerine farklılaşmasını stümüle eder ve prepubertal dönemde testiste üretilen mezenkimal hücrelerin sayısını artırmaktadır.

Vücut metabolizmasının hızlanması ile karakterize edilen hipertroidinin sebepleri arasında Plummer hastalığı, Graves hastalığı, toksik adenoma, trofoblastik hastalıklar, stroma ovary, iyoda bağımlı hipertroidi ve troid kanserleri başta olmaktadır (47).

2.5. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, yapılarında eşleşmemiş bir elektrona sahip olan ve bu sebeple reaktif özelliği olan molekülerdir. Serbest radikallerin elektron ile proton sayıları eşit değildir ve bu nedenle dayanıksızdırlar. Radikaller başka molekülden elektron alması sonucu elektron çifti oluşturabilir ve bu olay oksidasyon olarak isimlendirilir. Sadece bir elektronunu başka bir moleküle vermesine ise redüksiyon adı verilir. Radikal olmayan böyle bir yapının radikal hale gelmesine sebep olan moleküllere ise; serbest radikaller ya da reaktif oksijen türevleri (ROS) adı verilir.

Serbest radikaller metabolizmanın optimal olduğu zamanda ortaya çıkabildikleri gibi, radyasyon, inflamasyon, yüksek sıcaklık gibi etkenlere maruziyeti sonucunda da oluşabilir. Serbest radikallerin aşırı üretimi hücre disfonksiyonuna, doku hasarına ve inflamasyona neden olur. En önemli reaktif oksijen türevleri; süperoksit radikalleri (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), peroksil radikalleri (LOO) ile hidroksil (OH) radikalleridir (52).

Süperoksit radikali (O_2^-)

Moleküler oksijenin tek elektron almasıyla, tüm aerobik hücrelerde indirgenmesi sonucu meydana gelir. İndirgenmemiş geçiş metalleri (Demir, bakır, çinko) otooksidasyon sonucu süperoksit radikalini oluşturabilmektedir. Süperoksit radikalinin ise oksitleyici ve indirgeyici özelliği bulunur.

Süperoksit radikalleri direkt olarak hücreye zarar vermemektedir. Bu radikaller hidrojen peroksitler için kaynak ve geçiş metalleri iyonlarının indirgecisidirler.

Süperoksit radikalinin oksidan hasarına karşı antioksidan bir enzim olan süperoksit distmutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksite indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmeyen elektron içermediğinden dolayı tek halde radikal olmamaktadır.

Hidrojen peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit etrafındaki moleküllerden tek bir elektron alımı ya da moleküler oksijen etrafındaki moleküllerden ise iki elektron alımı ile meydana gelen peroksitin iki proton (H^+) ile birleşmesiyle oluşur. Hidrojen peroksit serbest radikal değildir ancak buna rağmen reaktif oksijen türlerine (ROS) girer. Çünkü Fe^{+2} ya da geriye kalan geçiş metallerinin var olduğu zaman Fenton reaksiyonunun sonucunda, süperoksit radikali (O_2^-) olduğu zaman Haber-Weiss reaksiyonunun sonucunda zarar veren serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^-) meydana getirir. Ayrıca oldukça reaktiftir.

Hidroksil radikali fazlasıyla reaktif ve toksiktir. Büyük molekül yapısından ve elektronegativitesinden dolayı DNA, lipit, karbonhidrat ile proteinler gibi makromoleküller ile birlikte reaksiyona girer ve oksidatif dejenerasyona yol açar. Makromoleküller hücre içinde az miktarlarda bulundukları için bu yapılarda meydana gelen hasar çok önemlidir (52).

2.6. Antioksidanlar

Farklı mekanizmalar sebebiyle oluşan serbest radikallere karşı vücutta doğal bir savunma sistemi bulunur. Serbest radikalleri ve bunların verdiği zararı önleyen maddeler, antioksidanlar olarak isimlendirilirler.

Canlı organizmalar, glutatyon peroksidaz, süperoksit dismutaz, glutatyon, katalaz ve bilirubin gibi antioksidan savunma sistemi (enzimatik olan ve olmayan) ve asıl kökeni diyet olan C vitamini, E vitamini ile karotenoidler gibi eksojen antioksidanları içerir. GSH sayesinde E vitamininin yenilenmesi veya C vitamini tarafından lipit peroksidasyonunun önüne geçilmesinde olduğu gibi, endojen ve eksojen kökenli antioksidanlar redoks reaksiyonunu dengelemek amacıyla birlikte çalışırlar (53).

Antioksidanlar; endojen ve eksojen kaynaklı olabilirler.

2.6.1. Endojen Kaynaklı Antioksidanlar

Endojen kaynaklı antioksidanlar; enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki şekildedir.

Tablo 1: Enzimatik endojen antioksidanlar (54)

Antioksidan	Reaksiyonu
Süperoksit Dismutaz (SOD)	Süperoksit serbest radikali ve hidrojen peroksit radikallerini moleküler oksijene dönüştüren antioksidan bir enzimdir. $(2O_2 + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2)$
Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px)	Hidroperoksitlerin indirgenmesini sağlar. Başta eritrositlerde olmak üzere oksidatif strese karşı en etkili antioksidan enzimdir. $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$
Glutatyon Redüktaz	GSH-Px aracılığı ile hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucunda Oksidlenmiş Glutatyonu (GSSG) tekrar indirgenmiş Glutatyona (GSH) dönüşümünü gerçekleştirir.
Glutatyon S-Transferaz (GST)	Lipid peroksitlere karşı GSH-Px aktivitesi sergileyerek antioksidan savunma mekanizmasını meydana getirirler.
Katalaz	Hidroksil (OH) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) radikallerinin oluşumunu önlemek için suya ve oksijene parçalanmasını sağlar.
Mitokondriyal Sitokrom Oksidaz	Solunum zincirinin son enzimidir. Süperoksidin (O_2) detoksifiye olmasını sağlar.

Tablo 2: Enzimatik olmayan endojen antioksidanlar (54)

Antioksidan	Reaksiyonu
Melatonin	Lipofilik karakteri sebebiyle hücrenin tüm organel ve hücrelerine kadar ulaşarak oldukça fazla dağılım gösterir, etkisini hidroksil ve süperoksit radikallerini tutarak gösterir.
Seruloplazmin	Ferro demiri (Fe^{2+}) ferri demire (Fe^{3+}) yükseltir ve fenton reaksiyonu ve hidroksil radikali oluşumunu engeller.
Transferrin	Serbest olan demir iyonlarını bağlar ve böylelikle fenton reaksiyon oluşumunu önlemektedir.
Laktoferrin	pH'ı düşük ortamlarda bulunan demir iyonlarını bağlar.
Glutatyon (GSH)	Karaciğerde sentez edilen bir tripeptittir. Hemoglobinin oksitlenerek methemoglobine dönüşmesini engeller. Eritrosit, lökosit ve gözün lensini oksidatif hasara karşı korur.
Sistein	Süperoksit ve hidroksil radikalini toplayıcısıdır.
Ürik Asit	Genellikle metal bağlar, aynı zamanda farklı radikalleri de toplar.
Glikoz	Hidroksil radikali gidericisidir.
Albumin	HCl radikalini toplar. Proteinleri ve metal iyonlarının bağlanmasını sağlar.
Bilirubin	Peroksil radikal toplayıcısıdır.

2.6.2. Eksojen Antioksidanlar

Vitaminler ve ilaç antioksidanları olarak sınıflandırılırlar.

Antioksidan aktiviteleri iyi bilinmesine rağmen eksojen kaynaklı antioksidanlar, yüksek miktarlarda ve başlıca bakır ve demir gibi iyonlar olduğu zaman pro-oksidan davranış da sergilerler. Pro-oksidan reaksiyon, antioksidanların konsantrasyonları ve moleküler yapılarıyla ilişkilidir. Son yıllarda gösterilen hücre modelleme çalışmalarında, quercetin, gallik asit ve ayrıca kateşin gibi antioksidan olarak tanımlanmış olan birkaç polifenolik bileşiklerin hali hazırda pro-oksidatif özellikleri de belirgin hale gelmeye başlamıştır. Örnek olarak flavonoidler üzerinde yapılan (quercetin, fisetin) bir çalışma ile, düşük konsantrasyonlarda (10-20 Mm) apoptozu

önlemesine karşın, yüksek konsantrasyonlarda (50-250 Mm) apoptoza ve DNA hasarına yol açtığı belirtilmiştir (53).

Tablo 3: Vitamin eksojen antioksidanlar (54)

Antioksidan	Reaksiyonu
E vitamini (a-tokoferol)	Süperoksit ve hidroksil radikallerini indirger. Membran yapısında bulunan lipidlerde çözünür ve peroksidasyon zincirini yok eder.
B-karoten	Serbest radikal türlerini toplanmasını sağlar.
C vitamini (askorbikasıit)	Hidroksil radikalleri yok eder. Tokoferolün indirgenmesini sağlar. Kollagen sentezi için prolinin ve lizin hidroksilasyonu için oldukça önemlidir.
Koenzim Q (ubikinon)	Tüm canlılarda farklı oranlarda olan vitamin benzeri antioksidandır ve mitokondriyal enerji metabolizmasında görev alır. DNA tamirinde rol almaktadır. B3 vitamini ile birlikte görev alır. Vücut kendisi de sentezleyebilir veya besin yardımıyla da alınabilir.

Tablo 4: İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar (54)

Antioksidan	Reaksiyonu
Oksipurinol, allopurinol, aldehit, pterin, tungsten	Ksantin oksidaz tepkimesinde süperoksit oluşumunu baskılar.
Lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvarlar	NADPH oksidazın inhibitörü olarak görev yaparlar.
Trolox-C	Vitamin E2'nin benzeri olarak işlev görür.
Asetilsistein, ebselen,	Glutatyon peroksidazın aktivitesini artırır.
Mannitol	Hidroksil radikalının toplanmasını sağlar.
Desferroksamin	Serbest ferri demiri (Fe ³⁺) bağlar
Demir Şalatörleri	Hücre içerisine nüfuz ederek serbest demiri bağlar, fenton reaksiyonu ve hidroksil radikal oluşmasını önler.

İnsanlar bazı vitaminleri sentez edemedikleri için, besinlerle almak mecburiyetindedirler. Bitkisel kaynaklı gıdalar (muz, elma, soğan, patates ve domates gibi) antioksidanlar için doğal kaynaklardır. Bitkisel besinler içerisinde yer alan en önemli antioksidan bileşikler vitaminlerin yanısıra fenol ve polifenol yapıdaki bileşiklerdir. Başlıca sebze ve meyvelerde olan flavonoidler, güçlü antioksidan özelliği bulunan bileşiklerdir. Yapılmış olan in vitro deneyler ile polifenol bileşiklerde olduğu gibi bitkisel kökenli moleküllerin, oksidatif stres ile karşılaşan hücrelerde anti-sitotoksik etkiye sahip oldukları gösterilmiştir (53).

2.6.3. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Toplayıcı etki; Etkisini serbest oksijen radikalleri tutması ya da daha güçsüz moleküllere dönüştürmesi ile etkisiz hale getirmesiyle gösterir. Antioksidan yapısındaki enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.

Bastırıcı etki; Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen eklenmesiyle inaktif hale dönüşümü sonucu etkilerini gösterirler. Vitaminler ve flavonoidler bu özelliğe sahip olan antioksidanlardır.

Zincir kırıcı etki; Serbest oksijen radikallerindeki zincirleri kırarak etki ederler. Serüloplazmin, hemoglobin ile ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlayarak inaktive ederler.

Onarıcı etki; Serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif hasarı onararak etki ederler.

Hücrel kinaz kayıplarını önleme; Oksidasyon reaksiyonlarının durmasını sağlayarak etki gösterirler.

Enzimatik etki; Antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini artırarak etki ederler (53,55).

2.7. Quercetin

Quercetin (3,3',4',5,6- pentahidroksiflavon), meyve ve sebzelerde oldukça fazla bulunan bir flavanoid ve in-vitro/in-vivo olarak reaktif oksijen radikallerinin azaltılmasında etkili olan güçlü bir antioksidandır. Quercetin'in başlıca doğal kaynakları, domates, kiraz, ahududu, çay bitkisi, soğan ve şarap gibi gıda türleridir (56-57). Günlük normal bir diyetle 50-500 mg arasında vücuda alınan quercetin miktarıdır. Quercetin'in gastrointestinal sistemdeki absorpsiyonunun karışık bir halde olması ve biyoyararlanımının sınırlı olması sebebi ile besinlerle alımı yapıldıktan sonra quercetin'in plazmada içerisindeki konsantrasyonu 100 nanomolardan oldukça düşük seviyelerdedir. Quercetin distribüsyon (dağılım) yarı ömrünün 3-8 saat, eliminasyon yarı ömrünün 8-16 saat olduğu gösterilmiştir.

Diyet sonrası quercetin'in metabolizması %3 karaciğer dokusunda, %90'dan fazlası ise absorpsiyondan önce barsaklarda metabolize olmaktadır.

Diyetlerdeki önemli bir flavonoid olan quercetin lipofilik antioksidanlardandır. Antioksidan etkinliği quercetin'in kimyasal yapısında ki hidroksil (-OH) ve katekol tip B halkasının ve lokasyonununundan kaynaklanmaktadır. Quercetin ayrıca gastrointestinal sistemden pasif diffüzyonla kalın barsak, böbrek, akciğer, kas, beyin gibi çeşitli dokulara geçer ve bu lokasyonlarda birikir.

Quercetin; antikanser, antiviral, antihistamin, antitümör, antiinflamatuvar, antialerjik, antitrombotik, hücresel immünitenin stimülasyonu, aterosklerosis ve koroner kalp hastalıklarında koruma gibi geniş farmakolojik özelliklere sahiptir. Yapılan deneysel çalışmalarda, quercetin'in kardiyovasküler sistemde, kan basıncını düşürücü etkisi olduğu gösterilmiştir. Ayrıca iskemi/reperfüzyon hasarına maruz kalan kalp dokusu üzerinde koruyucu etkisinin olduğu kanıtlanmıştır (58,59).

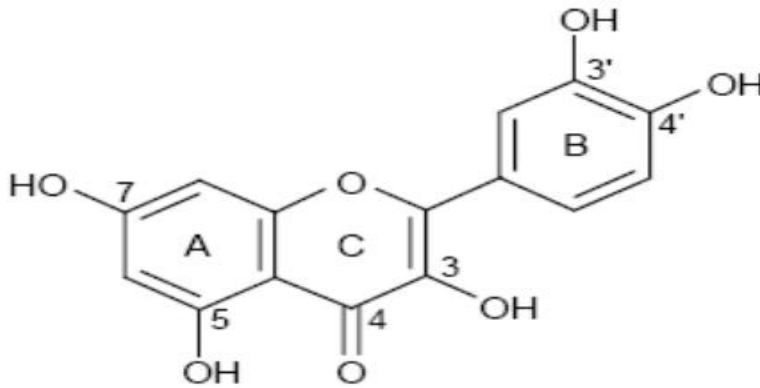
İnsan vücudundaki hücrelerde yıkım meydana getiren lipid peroksidasyonunu önleme özelliğine sahip olan quercetin'in, doza bağlı olarak hücrelerdeki peroksid üretiliminin inhibisyonuna ve peroksid radikallerin azalmasına neden olmaktadır. Ayrıca paraquat kaynaklı akciğer hasarını antioksidan aktivitesi aracılığı ile inhibe ettiği yapılan son çalışmalarda ortaya koyulmuştur (59).

Quercetin, enflamasyonun oluşması için gereken enflamatuar yanıt öncesi araziidonik asit metabolitlerini etkisizleştirir.

Quercetin hücresel sinyal iletim yollakları üzerine yapılan çalışmalarda COX-1 ve COX-2 gen ifadesini engelleyerek, NFkB sayesinde Bcl-2 molekülünü baskılayarak ve p53 ve AMPK sinyal iletimini indükleyerek apoptotizisini uyarmaktadır.

Quercetin ayrıca beta katenin molekülünün TCF-4'e bağlanmasını önleyerek hücrenin büyümesini inhibe eder. Hücre döngüsündeki diğer bir görevi ise survivin ve siklin D (CCND1) gen ifadelenmesini inhibe ederek hücre döngüsünün G2/M safhasında durmasını sağlamaktadır.

Quercetin testis üzerindeki etkisi, deneysel olarak hasara maruz bırakılan deneklerin testis ve epididimisinde toksik etkisi sonucu spermatogenezis, hormon düzeyleri ve lipid yapısında bozukluklar meydana gelmektedir. Quercetin spermatogenezisin, testiküler doku hasarını ve hormon düzeylerinde koruyucu etki sağlamaktadır (58,59).



Şekil 9: Quercetin bileşiğinin açık formülü (60)

2.8. Apoptoz

Apo: ayrı, Ptoxis düşme anlamına gelen Yunancadan köken alan bir kelimedir. Bu terim ilk defa 1972'de Avusturalyalı bir patolog tarafından kullanılmıştır Apoptoz, onarılmayacak şekilde zarar görmüş veya artık vücutta gerekli olmayan hücrelerin,

yok edilmesine yardımcı olan programlanmış hücre ölümünün doğal bir fizyolojik sürecidir. Embriyonik gelişim ve ergin doku homeostazisinde kritik rol oynamaktadır (61-63).

2.8.1. Apoptozun Düzenlenmesi

Kalsiyum, Bcl-2 ailesi gibi bazı moleküller ile p53, kaspazlar, sitokrom-C gibi bazı protein ve mitokondriler apoptozun düzenlenmesinde rol oynamaktadır.

Bcl-2 Ailesi; Bcl-2 ailesi genlerinin heterodimer formu veya homodimer formuna bağlı olarak bir hücre apoptoza girip girmeyeceğine karar vermektedir. Bcl-2 ailesi şimdiye kadar 25 üyesi tanımlanmış ve birbirine zıt proapoptotik ve antiapoptotik üyelerden oluşan bir gen ailesidir.

Hücre içerisinde proapoptotik proteinler çok ise hücre apoptoza daha eğilimli, antiapoptotik olan proteinler fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimli olmaktadır.

Proapoptotik olan, Bcl-10, Bax, Bid, Bak, Bim, Puma, Blk ve Noxa gibi üyeler programlı hücre ölümünü indüklemektedir. Sitolde yer alan bu proteinler, sitokrom-C ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını artırarak apoptozun indüksiyonunu sağlar. Antiapoptotik elemanlar olan Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XS, Bcl-XL, Bcl-w, BAG ise mitokondri dışı membranında, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında yer alır. Özellikle hücredeki Ca^{++} oranını düzenlemekle birlikte iyon transportunun düzenlenmesinden sorumludurlar.

p-53; Hücrede meydana gelen DNA hasarında hücre döngüsünün G1 fazında durmasını sağlayarak, hücre DNA'sının onarımı için olanak sağlayan bir transkripsiyon faktörüdür. Hücredeki dejenerasyon onarılmayacak şekilde olursa; Bax, Apaf-1 üretimini artırarak, Bcl-2 ve Bcl-XL'yi baskılayarak apoptozu uyarır.

FAS (APO-1 veya CD95); TNF ailesine ait olup en çok bilinen elemanıdır. İmmün sistemde hücre ölümünün kontrol edilmesini sağlayan Fas hücre reseptörü sitotoksik T hücrelerinin ve doğal öldürücü hücrelerin üzerinde yer alır. Aktive olmuş reseptörler FADD reseptörü ile birleşerek karboksil ucuna yakın bölgenin uyarılmasıyla apoptoz başlamasını sağlarlar.

Kaspazlar; Aktif kısımlarında sistein amino asiti içermeleri ve substratlarını aspartik asitten sonra kesmelerinden dolayı “Caspase” şeklinde isimlendirilmişlerdir. Hücre içerisinde inaktif olarak bulunurlar. Başlatıcı olan kaspazlar (Kaspaz 2,8,9,10), efektör etkili kaspazlar (Kaspaz 3,6,7) ve inflamatuvar etkili kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14) olmak üzere 3 tipte bulunurlar.

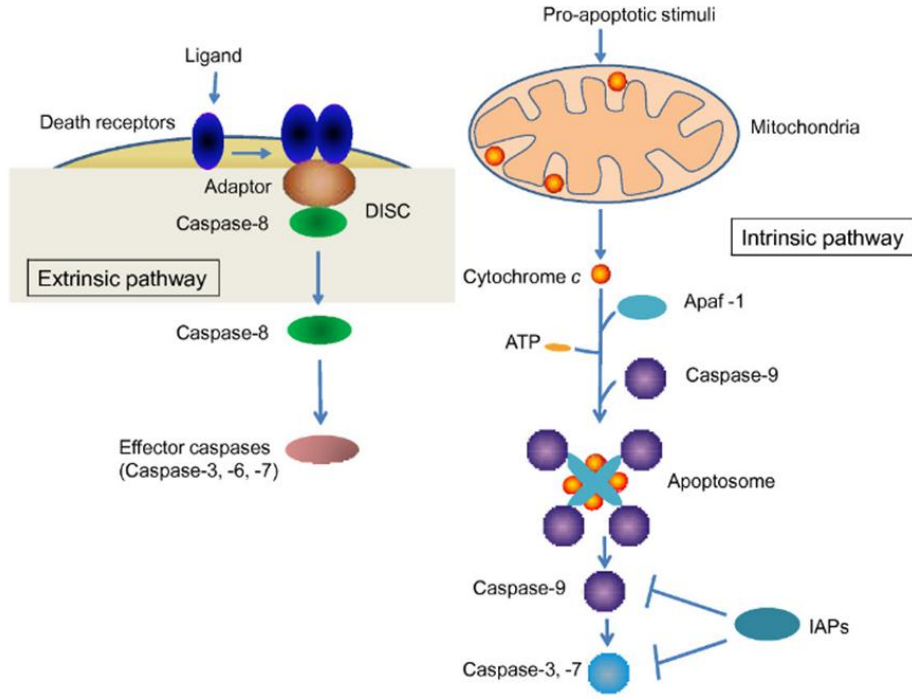
2.8.2. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz, kaspaz ailesinin sistein proteazlarının sıralı aktivasyonu ile farklı, ancak birbirine yakın iki temel moleküler sinyal yolağı ile gerçekleşmektedir.

Ekstrinsik yolak; Plazma zarındaki tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin “ölüm reseptörlerinin” ligand aracılı trimerizasyonu, bağdaştırıcı protein FADD’yi ve kaspazı çoklu protein komplekslerine sokarken, kaspaz-8’i (insanlarda kaspaz-10) harekete geçirir.

İntrinsik yolak; Bu yolak, sitokin yoksunluğu ve DNA hasarı da dahil olmak üzere çeşitli streslere yanıt olarak, hasar gören mitokondriden sitokrom-C salınmasıyla kaspaz-9’u iskelet proteini olan Apaf-1 üzerinde harekete geçirir. Bu başlatıcı kaspazlar, çok kritik hücrel proteinleri parçalayarak, hücre yıkımına aracılık eden efektör kaspazları (kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7) parçalayabilir veya aktive edebilir.

Her iki yolak da, apoptotik hücre ölüm programına aracılık eden sayısız proteolitik olayı gerçekleştiren enzimatik kaspaz kaskadını aktive eder (61-63).



Şekil 10: Ekstrinsik ve intrinsik apoptoz yolları (64)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Prospektif deneysel bir araştırma

3.2. Araştırmanın Yeri Ve Zamanı

Araştırma Mayıs 2015 tarihinde literatür tarama ile başlamış olup; etik kurul onayı 24 Kasım 2015 tarihinde alınarak, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Anabilim Dalında ilaç uygulama ve sakrifikasyon yapılmasını takiben, alınan testis dokuları histolojik analizler için Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalına, kan ve testis dokuları ise biyokimyasal analizler için Biyokimya Anabilim dalına getirilerek gerekli işlemler yapılmıştır. Araştırma Mayıs 2018'de tez savunmasıyla sonlanmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada 5 deney grubu olmak üzere 250-300 gr 35 adet rat kullanıldı ve deney grupları aşağıdaki gibi düzenlendi.

1.Grup, Kontrol Grubu: Hiçbir şey uygulanmayan testis doku örnekleri alındı, bazal değerler için kullanıldı. 21 günün sonunda sakrifiye edildi (n=7).

2.Grup, Sham Grubu: Deneklere 21 gün boyunca p.o. olarak günde bir defa mısır yağı verildi. 21 günün sonunda sakrifiye edildi (n=7).

3.Grup, Quercetin Grubu: Deneklere günde bir defa p.o. yolla 20 mg/kg quercetin mısır yağında çözündürülerek verildi ve 21 günün sonunda sakrifiye edildi (n=7).

4.Grup, Hipertiroidi Modeli Grubu: Deneklere 21 gün boyunca i.p. yolla 0,3 mg/kg L-tiroksin enjekte edildi ve 21 günün sonunda sakrifiye edildi (n=7).

5.Grup, Hipertiroidi+Quercetin Grubu: Deneklere 21 gün boyunca günde bir defa i.p. yolla 0,3 mg/kg L-tiroksin ve p.o. yolla 20 mg/kg quercetin verilerek 21 günün sonunda sakrifiye edildi (n=7).

21 gün sonunda her bir deneğin ağırlıkları ölçülerek ketamin-ksilazin anestezisi (80-100 mg/kg ketamin ve 5-10 mg/kg ksilazin) uygulandı. Anestezinin derinleşmesini takiben denekler operasyon masasına sabitlendi. Skrotal bölge traş edilerek temizlenmesinden sonra povidon-iyot solüsyonu ile dezenfekte edildi ve skrotal orta hat insizyon uygulandı. İnsizyon sonrası tunika vaginalise ulaşıldı. Tunika vaginalis iki pens yardımıyla tutup kaldırılarak bir makas yardımıyla keskin diseksiyonla geçilerek testislere ulaşıldı. Testis skrotumdan doğurtularak parmakla künt diseksiyonla kord ve gubernakulum serbestleştirildi ve spermatik kord kesilerek testislere orşioktomi uygulandı. Çıkarılan testislerin ağırlık ölçümleri yapıldı. Sağ testis dokusu histolojik analizler için %10'luk formaldehit solüsyonu içeren doku kaplarına alındı. Sol testisin bir kısmı biyokimyasal analizler için ependorf tüplere alındı ve dokular ölçüm yapılana kadar derin dondurucuda (-80°C) muhafaza edildi. Diğer kısmı ise elektron mikroskopik analizler için karnovsky solüsyonu olan tüplere alınarak +4°C derecede muhafaza edildi. Anestesi altındaki her bir denekten intrakardiyak olarak kan örnekleri alındı ve ölçüm yapılana kadar aynı koşullarda muhafaza edildi.



Şekil 11:Deney sonunda testislerin elde edilmesi

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı'ndan temin edilen, Wistar Albino suşu 35 erkek sıçan (250-300gr) kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olmasından dolayı bu tür seçilmiştir. Tüm denekler deney sonlanıncaya dek $21^{\circ}\text{C}\pm 1$ oda sıcaklığı, %50-60 nisbi nem ve 12 saat gündüz/12 saat gece aydınlatma periyotlarında bulunan standart hayvan oda ve kafeslerinde barındırılmıştır. Denekler adlibitum olarak dinlendirilmiş su ve standart pellet yem ile beslenmiştir. Hayvanlara uygulanan deneysel uygulamalar ve sakrifikasyon, DEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Bağımsız değişken: Madde uygulamaları (Quercetin, L-tiroksin)

Bağımlı değişken: Ölçülen ürünler (MDA, GPx, SOD, T3, T4, TSH, Testosteron)

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada deney başlangıcında ve deney sonunda denek ağırlıklarını ölçmek için terazi, deneklerin doku takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom, boyamalarda kullanılması gerekli olan distile su ihtiyacı için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikropipetler, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrüfuj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, homojenizatör, eliza cihazı ve buzluk kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan L-tiroksin ve Quercetin'in Hazırlanması

3.6.2.1. L-Tiroksinin Hazırlanması

L-tiroksin Sigma Aldrich'den (T-2376) temin edilmiştir. L-tiroksin 21 gün boyunca günde bir defa olmak üzere 0,3mg/kg intraperitoneal olarak deneklere uygulanmıştır. Hipertiroidi ve hipertiroidi+quercetin gruplarındaki her bir deneğe toplamda 1ml intraperitoneal enjeksiyon yapılacak şekilde verilmiştir.

3.6.2.2. Quercetin'in hazırlanması

Quercetin ($\geq 95\%$ HPLC, Q4951 Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Quercetin 21 gün boyunca günde bir defa olmak üzere 20mg/kg oral gavaj olarak deneklere uygulanmıştır. Quercetin ve hipertiroidi+quercetin gruplarındaki her bir deneğe toplamda 1 ml olacak şekilde quercetin miktarı çözücüsü olan mısır yağında 1 ml'ye tamamlanarak verilmiştir.

3.6.3. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen sağ testise ait doku örneklerine rutin doku takibi prosedürü uygulanmış, ince kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen-Eozin (H-E), Periyodik Asit- Schiff (PAS) ve Masson Trikrom boyamaları, apoptozun belirlenebilmesi için TUNEL ve Aktif Kaspaz-3 boyamaları yapılmıştır. Sol testise ait doku örneklerinin bir kısmından biyokimyasal olarak GPx, SOD, MDA ölçümleri ve diğer kısmından ise elektron mikroskopik analizler yapılmıştır. Alınan kan örneklerinden ise T3, T4, TSH ve testosteron düzeyleri ölçülmüştür.

3.6.3.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneyin başlangıcında ve deneyin sonunda deneklerin ağırlıkları ölçülmüştür. Veriler SPSS 17,0 programında, Wilcoxon sıralı işaretler testi kullanılarak değerlendirilmiş ve gruplar arası karşılaştırmada $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.6.3.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney sonunda kurban edilen deneklerin testis ağırlıkları alınmıştır. Sonuçlar SPSS 17,0 programında Wilcoxon sıralı işaretler testi kullanılarak değerlendirilmiş ve gruplar arası karşılaştırmada $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.6.3.3. Histokimyasal İncelemeler

Sakrifikasyon sonunda alınan sağ testis, histolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonunda fikse edildi. Sol testisin bir kısmı biyokimyasal incelemeler için ependorf tüplere alınarak -80°C'ye kaldırıldı. Diğer kısmı elektron mikroskopik analizler için karnovsky solüsyonu içine alınarak +4°C de muhafaza edildi.

3.6.3.3.1. Rutin Doku Takibi

Alınan testis dokusu %10'luk formaldehit solüsyonu ile 3 gün fikse edildi. Ardından fiksatifin uzaklaştırılması için 1 gece akarsu altında yıkama yapıldı. Dehidratasyonu sağlamak için sırasıyla %70, %80, %96'lık etil alkol serilerin içinde 20'şer dakika bekletildi. Şeffaflandırma için 30'ar dakika olacak şekilde iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saat iki defa parafin içinde bekletilerek immersiyonu sağlandı. Tüm bu işlemler 60°C'lik etüv içerisinde gerçekleştirildi. Daha sonra tüm dokular parafin bloklara gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığıyla bloklardan 5 µm'lik parafin kesitlerin bir kısmı normal lamlara, bir kısmı ise poly-L lysine kaplı lamlara alındı (Tablo 5).

Tablo 5: Doku takip protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Fiksasyon	%10'luk formol	48-72 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.3.3.2. Hematoksilen–Eozin Boyama Yöntemi

Alınmış olan kesitler, deparafinizasyonu sağlamak için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Daha sonra ilki 20 dakika (etüvde) daha sonrakiler 10'ar dakika üç farklı ksilende bekletildi. Dehidratasyon işlemi için 5 değişik azalan alkol serisinden geçirilip distile su ile çalkalandı ve hematoksilen boyası (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Böylece nükleusların boyanması sağlandı. Boyamadan sonra, 10 dakika akarsu altında kesitler yıkanarak boya fazlası uzaklaştırıldı. Eozin boyası (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile 2 dakika boyandı. Böylece hücre sitoplazmasının boyanması sağlandı.

Boyamanın ardından %70, %80, %96 şeklinde azalan alkol serilerinden ve 2 kez absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırmanın sağlanması için 3 kez 20 dakika süreyle ksilende tutuldu ve Entellan (UN 1886, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. (Tablo 6).

Tablo 6: Hematoksilen-Eozin boya protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C'lik etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (60 °C'lik etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda sıcaklığında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda sıcaklığında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika

Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.3.3. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü

Alınmış olan parafin kesitler deparafinizasyonun sağlanması amacıyla 1 gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Sonra önce 20 dakika (60°C'lik etüvde) daha sonra iki kez 20'şer dakika oda sıcaklığında üç kez ksilene tabii tutuldu. Sonra rehidratasyonu sağlamak için 2 defa absolü alkol, %96, %80, %70'lik alkol sıralarından geçirilen kesitler distile suda çalkalandı. PAS (Periyodik Asit Schiff) boyama kiti (Bio-optica, 04-130802 Milano, İtalya) içerisinde periyodik asit solüsyonundan 10 damla damlatıp 10 dakika bekletilerek oksidasyon işlemi sonucunda aldehit gruplarının oluşması sağlandı. Ardından kesitler distile suda çalkalanarak üzerlerine 10 damla schiff reagent damlatılarak 20 dakika bekletildi.

Böylece schiff reagentin içerdiği sülfür fuksin, bazik fuksine benzer çözünmeyen işaretli bileşiklerdeki 2 komşu aldehit gurubunun değişmesini sağladı. Daha sonra kesitler distile suda yıkanarak üzerlerine potasyum metabisülfid solüsyonundan 10 damla damlatılarak 2 dakika bekletildi. Kesitler yıkanmadan üzerlerine 10 damla fiksatif solüsyonundan damlatılarak 2 dakika bekletildi.

Kesitler distile suda iyice çalkalandıktan sonra mayers hematoksilen solüsyonundan 10 damla damlatılarak 3 dakika bekletildi. Böylece nukleusların boyanması sağlandı. Sonrasında 5 dk akarsuda yıkandı. Daha sonra dehidratasyonun sağlanması için artan alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflandırmak için 3 değişim halinde 20 dakika süreyle ksilende bekletildi ve entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 7).

Tablo 7: Periyodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C'lik etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (60 °C'lik etüvde)	1 saat
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (oda ısısında)	30 dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent A	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent B	20 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent C	2 dakika
Boyama	Reagent D	2 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	3 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	%60-70-80-96-100'luk alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.3.4. Masson-Trikrom Boya Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler, üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirildi. Distile suda çalkalanarak Masson Trikrom boyama kiti (GBL, 2049, İstanbul, Türkiye) ile boyandı. Önce 4 damla Weigert hematoksilen ve 4 damla ferrik klorür damlatılarak 10 dakika beklendi. Distile suda yıkama yapıldı. 2 damla asit-alkol solüsyonunda 4 dakika tutuldu. Tekrar distile su ile yıkandı. Sonra 2 damla Ponceau asit fuksin azoflaksin solüsyon ile kesitler 5 dakika bekletildi. 2 damla fosfomolibdik asit turuncu G

boyasında 10 dakika bekletildi ve tekrar distile su ile yıkandı. Açık yeşil boya 5 dakika 8 damla olacak şekilde uygulandı. Son olarak akarsu ile kesitler yıkandı, alkol serilerinde çalkalanma yapıldı. Ksilende şeffaflaştırma yapılarak entellan ile kapatıldı (Tablo 8).

Tablo 8: Masson Trikrom boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C'lik etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (60 °C'lik etüvde)	1 saat
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (oda ısısında)	30 dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent A	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent B	20 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent C	2 dakika
Boyama	Reagent D	2 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	3 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	%60-70-80-96-100'luk alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.3.4. Histolojik Skolama

3.6.3.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skolaması

Kesitler PAS ile boyandıktan sonra her bir denek için ayrı ayrı 100 adet túbül değerdendirildi. Tüm túbüller Johnson Testiküler Biyopsi Skolaması ile skorlandı (65). Skora ait tablo Tablo 9'da gösterilmiştir. Değerdendirilen túbül skolamalarının ortalaması alınarak gruplar arası istatistiksel karşılaştırma Kruskal Wallis Varyans Analiz Testi, grupların ikişerli karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi ile yapıldı. $p<0,05$ olan değerdeler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo 9).

Tablo 9: Johnsen testiküler biyopsi skolaması (65).

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

3.6.3.4.2. Seminifer Túbül Çap Ölçümü

Kesitlerden her denek için rastgele seçilen 3 farklı alandan her alanda 10 túbül olacak şekilde, 10x'lik büyütme kullanılarak Image J görüntü analiz programında çap ölçümleri yapıldı (66). Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analiz Testi, grupların ikişerli karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi yapıldı. $p<0,05$ olan değerdeler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.3.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

PAS boyası ile boyanmış kesitlerden her denek için rastgele seçilen 3 farklı alanda her alanda 10 tübül olacak şekilde, 10x'lik büyütme kullanılarak Image J görüntü analiz programında bazal membran kalınlık ölçümü yapıldı (66). Gruplar arası istatistiksel karşılaştırma Kruskal Wallis Varyans Analiz Testi, grupların ikişerli karşılaştırılması Mann-Whitney U Testi ile yapıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.3.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi ve hücrelerdeki DNA fragmentasyonunun gösterilmesi için TUNEL boyama yöntemi ve kaspaz-3 immünohistokimyasal yöntemler uygulandı.

Apoptotik uyarılar DNA'da kırık oluşumuna neden olmaktadır. Kırık sonucu ortaya çıkan DNA parçacıklarında serbest uçlarına hem biotin ile işaretlenen hem de işaretlenmeyen deoksinekleotidler terminal deoksinekleotidil transferaz (TdT) yolu ile eklenir. Ardından biotinle işaretlenen nükleotidler, streptavidin horseradish peroksidaz konjugatıyla tespitlenir. Diaminobenzidine (DAB), işaretlenen örnek ile etkileşerek DNA kırığının olduğu bölgede çözünemeyen bir substrat meydana getirir. Hematoksilenle art alan boyaması yapılır ve işlem sonlandırılır. İmmünohistokimyasal yöntemlerle fragmente nükleuslar veya sitoplazma koyu kahverengi renge boyanır.

3.6.3.5.1. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP nick end labeling) Boya Protokolü

Bu işaretleme için In situ Cell Death Detection Kit (Roche, 11684817910, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. Alınan kesitler deparafinizasyonu sağlamak için 60°C'de etüvde 1 gece bekletildi. Sonra önce 20 dakika (etüvde) sonra iki kez 20'er dakika oda ısısında 3 kez ksilen içinde 3 bekletildi. Sonra rehidratasyon için 2 defa absolü alkol, %96, %80, %70'lik azalan alkol serilerinden geçirildi, distile su ile çalkalanıp dokuların etrafı pap pen ile sınırlandırıldı. Ardından distile su ile hazırlanan Proteinase-K ile 15 dakika etüvde bekletilip PBS ile yıkandı. Ardından TUNEL kitindeki TdT enzim solüsyonu ile reaksiyon solüsyonu karıştırılarak TdT enzim karışımı hazırlanır (%30 TdT enzim solüsyonu ve %70 reaksiyon solüsyonu). Kesitler

enzim karışımında 1 saat 37°C'de etüvde bekletildi. Kesitlerin ışık mikroskopik görüntülenmesinin sağlanması için converter solüsyonu ile muamele edilerek etüvde 30 dakika bekletildi. Reaksiyonun görünür hale getirmek için DAB uygulanan kesitler distile su ile yıkanarak Mayers Hematoksilen ile artalan boyaması yapıldı ve akarsuda yıkandı. Ardından artan alkol serilerinden geçirilip, şeffaflandırmak için de 3 seri ksilende beletildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı (Tablo 10).

Tablo 10: TUNEL boyama protokolü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C'lik etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (60 °C'lik etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 ve 3 (oda sıcaklığında)	30'ar dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dokuların etrafını çizme	PapPen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Proteinaz K (etüvde)	15 dk
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	TdT Enzim solüsyonu (etüvde)	1 saat
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Converter (etüvde)	30 dakika
Art alan boyama	Mayer Hematoksilen	5 dakika
Yıkama	Akarsu	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lik alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	30'ar dakika
Kapama	Entellan	

TUNEL Boyama Değerlendirmesi

Deney gruplarında bulunan her bir denek için 10 ayrı tübüldeki TUNEL pozitif hücre sayımı yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analiz Testi, grupların ikişerli karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi yapıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (67-68).

3.6.3.5.2. Aktif Kaspaz-3 Boya Protokolü

Alınan kesitler 60°C'de etüv içerisinde 1 gece bekletildi. Sonrasında deparafinizasyon amacıyla 30'ar dakika üç kez değiştirilerek ksilolde tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Ardından mikrodalgada sodyum sitrat solüsyonu (Bio-optica, 15-M103, Milano, ITA) içerisinde, 600 watta 5 dakika tutuldu. Dokular PBS ile yıkandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi. Soğuması için 20 dakika bekletildi. 3 kez PBS ile yıkanan kesitler 10 dk %3 H₂O₂ ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile 3 defa yıkama yapıldı ve 30 dakika bloklama solüsyonu ile bekletildi. Primer antikor olarak rata spesifik aktif kaspaz-3 (1:100; Millipore) ile +4°C'de 1 gece bekletildi. Ertesi gün kesitler oda ısısına gelene kadar bekletildikten sonra PBS ile 3 defa yapılan yıkamadan sonra biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikorunda (Histostain Plus Kit, 85-9043 San Francisco, USA) 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile 3 defa kesitler yıkandı. immunohistokimyasal reaksiyonu görünür hale getirmek için DAB (Roche, Darmstadt, Almanya) ile muamele edildi. Distile suda yıkanan kesitlere mayer's hematoksilen kullanılarak artanda boyama sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 11).

Tablo 11: Aktif kaspaz-3 boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60 °C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 ve 3 (oda sıcaklığında)	30 dakika

Dehidratasyon	%100-96-80-70'lik alkol serisi	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
	Sitrat solüsyonu	5 dakika, 600 watt
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Dokuların etrafını çizme	PapPen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	H ₂ O ₂ %3	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blocking solüsyonu	30 dakika
Primer antikor	Enzim solüsyonu	+4°C'de 1 gece
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Sekonder antikor	Biotin	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Sekonder antikor	Streptavidin HRP	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	1 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Ard alan boyaması	Mayers hematoksilen	1 dakika
Dehidratasyon	%80-%96-%100'lük alkol serileri	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	30'ar dakika
Kapama	Entellan	

Kaspaz-3 İmmünohistokimya Değerlendirmesi

Deney gruplarında bulunan her bir denek için 10 ayrı tübüldeki aktif Kaspaz-3 pozitif hücre sayımı yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analiz Testi, grupların ikiyeşerli karşılaştırılmasında Mann-Whitney U Testi yapıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (69).

3.6.3.6. Ultrastrüktürel İncelemeler

Karnovski solüsyonuna (Ph 7.4) konulan dokular +4 °C'de 48 saat bekletildi. Örnekler daha sonra 3 kez 15'er dakika 0,1 M sodiumphosphate buffer ve 0,1 M sucrose karışımında bekletildi. Post fiksasyon için %2 sodiumphosphate buffered tetraoxide (Ph 7.4) çözeltisinde 90 dk bekletildi. 0,1 M sodiumphosphate buffer (ph 7.4) ile 3 kez 15 dk yıkandı. %50 oranında hazırlanmış aseton ile 2 kez 15 dk dehidratasyon işlemi uygulandı. Dokular kontrastlama için %70'lik aseton, %0,5'lik uranyasetate ve %1'lik phosphotungstic acid karışımında 1 gece +4°C'de bekletildi. Ardından %80, %90 ve %96'lık aseton serilerinde 2 kez 15 dk, %100'lük aseton ise 2 kez 20 dk bekletildi. Dokular önce propilen oksitte 2 kez 15 dk, sonrasında sırasıyla 2:1, 1:1, 1:2 oranında hazırlanan propilen oksit: epon karışımlarında 30 dk bekletildi. Epon solüsyonunda 48 saat 65°C'lik etüvde polimerizasyon için bekletildi (Tablo 12).

Yarı ince kesitler alındı ve böylelikle alan belirlendi. Belirlenmiş olan bölgelerden ince kesitler formvarlı gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlanarak transmisyon scanning elektron mikroskopunda (Zeiss Sigma 500 STEM) incelendi.

Tablo 12 : Elektron mikroskopik doku takip protokolü

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	Karnovski	1-48 saat (+4°C)
Yıkama	Sorenson Fosfat Buffer	15-20 dk.
Post fiksasyon	Sorenson Fosfat Buffer +Osmium Tetraoksit 1/1	1 saat karanlıkta
Yıkama	Sorenson Fosfat Buffer	15-20 dk.
Dehidratasyon	Propylene Oxid x2	1 saat
İnfiltrasyon	Propylene Oxid + Araldit 1/1 Saf Araldit Yeni Araldit	1 saat 6-12 saat 2 saat
Gömme	Saf Araldit+DMP	
Polimerizasyon		48 saat, 60°C'lik etüvde

3.6.3.7. Biyokimyasal İncelemeler

3.6.3.7.1. Serumda Yapılan Analizler

Sıçanlardan alınan kan örnekleri 15 dakika 1000g de santrifüj edilip serumları elde edildi. Serumlar tüm analizler için ayrılarak -80°C' ye kaldırıldı.

3.6.3.7.1.1. Serum TSH Düzeyinin Belirlenmesi

Serum TSH düzeyi, ticari olarak satın alınan ELISA temelli kit (Cusabio, CSB-E05115r, Hubei, China) ile ölçüldü. Kitin ölçüm aralığı 0.6-24 µIU/ml arasındadır. Sensitivitesi ise 0.3 µIU/ml dir. Ölçüm prensibi, TSH düzeylerinin kantitatif olarak değerlendirme için hazırlanmış “sandwich tip enzim immünoassay” tekniğine dayanır. İlk inkübasyon boyunca, standart/örnek içinde bulunan TSH, daha önceden antikor ile kaplanmış tarafından tutuldu. Yıkamadan sonra TSH'a spesifik monoklonal antikor eklendi. İkinci inkübasyon boyunca, monoklonal antikor immobilize olmuş antikora bağlandı. Bağlanmamış olan sekonder antikorların uzaklaştırılması için yapılan yıkama işlemi yapılır. Daha sonradan horseradish–peroksidaz (HRP) işaretli enzim eklenir. Bu enzim antikora bağlanır. Bağlanmayan enzimler yıkama işlemi ile uzaklaştırıldı. Ortama substrat eklenip renk oluşumu gerçekleşti. Oluşan rengin şiddeti, örnekte bulunan TSH seviyesi ile doğru orantılıdır. Multiplak okuyucuda (Synergy HT, BioTek Ins., USA) 450 nm absorbans ölçümleri alındı. Standart kalibrasyon eğrisi baz alınarak örneklerdeki TSH miktarları hesaplandı. Sonuçlar µIU/ml ile ifade edildi.

3.6.3.7.1.2. Serum T3 Düzeyinin Belirlenmesi

Serum T3 düzeylerinin belirlenmesi için ticari olarak satın alınan enzim immünoassay kiti (Biovision, K7422-100) kullanıldı. Testin ölçüm aralığı 0.25 ng/ml ile 7.5 ng/ml arasında ve sensitivitesi ise 0.186 ng/ml dir. Testin prensibi yarışmalı enzim immünoassay temeline dayanmaktadır. Örnek içindeki mevcut T3'ü tutmak amacıyla 96 kuyucuklu plaklar daha önceden ikincil bir antikor ile kaplanmış. HRP işaretli T3 konjugatı (yarışan ligand), örnek/standart ile T3 spesifik antikor bölgelerine bağlanmak için yarışır. Sonuçta; örnek içindeki T3 konsantrasyonu arttıkça, antikor tarafından yakalanan HRP işaretli T3 miktarı azalır. Analiz, ortama substrat

konulmasından sonra multiplak okuyucuda (Synergy HT, BioTek Ins, USA) 450 nm absorbans değerleri alınarak değerlendirildi. Oluşturulan standart kalibrasyon eğrisi ile örnek içerisindeki T3 miktarı hesaplandı ve sonuçlar ng/ml ile ifade edildi.

3.6.3.7.1.3. Serum T4 Düzeyinin Belirlenmesi

Serum T4 düzeylerinin belirlenmesi için ticari olarak satın alınan enzim immünoassay kiti (Biovision, K7421-100) kullanıldı. Kitin ölçme aralığı 1 µg/ml ile 25 µg/ml arasındadır. Sensitivitesi ise 0.467 µg/ml dir. Testin ilkesi yarışmalı enzim immünoassay temeline dayanmaktadır. 96 kuyucuklu plaklar örnek içindeki mevcut T4'ü tutmak amacıyla daha önceden ikincil antikor ile kaplanmıştır. HRP işaretli T4 konjugatı, örnek/standart ile T4 spesifik antikor bölgelerine bağlanmak için yarışır. Sonuç olarak; örnek içindeki T4 konsantrasyonu arttıkça, antikor tarafından yakalanan HRP işaretli T4 miktarı azalmaktadır. Analiz, ortama substrat konulmasından sonra kolorimetrik olarak multiplak okuyucuda (Synergy HT, BioTek Ins., USA) 450 nm absorbans ölçümleri alınarak değerlendirilir. Standart kalibrasyon eğrisi oluşturulup, örnek içerisindeki T4 miktarı hesaplandı. Sonuçlar µg/ml ile ifade edildi.

3.6.3.7.1.4. Serum Testosteron Düzeylerinin Belirlenmesi

Ticari olarak satın alınan kolorimetrik kit (Biovision, K7418-100, Milpitas, CA, USA) ile değerlendirildi. Testin ölçüm aralığı 0.1 ng/ml ile 18 ng/ml arasındadır. Kitin çalışma prensibi yarışmalı enzim immünoassay prensibine dayanmaktadır. 96 kuyucuklu plaklar örnek içindeki var olan testosteronu tutmak için daha önceden ikincil bir antikor ile kaplandı. HRP testosteron konjugatı (yarışan ligand), örnek/standart ile testosteron spesifik antikor bölgelerine bağlanmak için yarışır. Analiz, ortama substrat konulmasından sonra kolorimetrik olarak multiplak 450 nm absorbans değerleri alınarak değerlendirildi. Oluşturulmuş olan standart kalibrasyon eğrisi sayesinde örnek içerisindeki testosteron miktarı hesaplandı. Sonuçlar ng/ml ile ifade edildi.

3.6.3.7.2. Doku Homojenat Hazırlanması

Cerrahi işlem sonunda toplanan testisler serum fizyolojik ile yıkandı. Testis dokuları, 1mM EDTA, 210 mM süktroz içeren 50 mM Tris-HCl, pH 7.4 tamponu ile 1:8 oranında (w/v) homojenize edildi. Homojenizasyon, Tissue Lyser cihazında gerçekleştirildi (TissueLyser II; Qiagen, West Sussex, UK). Elde edilen homojenatlar MDA için 2500 xg 10 dakika; SOD analizi ve GPx için 10000 xg 15 dakika 4°C' de santrifüj edildi ve elde edilen süpernatantlar analiz süresine kadar -80°C de saklandı. Tüm basamaklar +4 °C de (buz üzerinde) yapıldı.

3.6.3.7.2.1. MDA Düzeyinin Belirlenmesi

MDA düzeyleri ölçülerek, testis dokusundaki lipid peroksidasyon belirlendi. Ölçüm, (HPLC) yüksek performanslı sıvı kromatografi (Shimadzu VP Series, Tokyo, Japan) cihazı ile gerçekleştirildi. Yöntem, MDA'nın asit katalizi ile iki molekül tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu kompleksin floresans dedektör ile tespiti prensine dayanmaktadır. 150-4.6 mm, C18 100-5 (Macherey-Nagel) özelliğindeki kolonda mobil faz 10 mM, %30 metanol içeren fosfat tampon (pH 7) çözeltisi kullanıldı. Ultraviyole detektörün dalga boyu 532 nm'ye, floresan detektörün eksitasyon dalga boyu 515 nm ye, emisyon dalga boyu ise 553 nm'ye ayarlandı. Standart olarak 1,1,3,3-tetraetoksipropan (Sigma, 85H2501) kullanıldı. Standart konsantrasyonları 0.75, 1.5, 3, 5, 10, 20, 40, 50 µmol/L olarak kullanıldı. (1). Doku MDA değerleri µmol/mg protein olarak gösterildi.

3.6.3.7.2.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Düzeyinin Belirlenmesi

Kolorimetrik temelli kit (Cayman Kat. No. 706002, Michigan, USA) ile değerlendirildi. Kullanılan kit süperoksit anyonunun SOD tarafından indirgenmesiyle suda çözünebilen renkli formazan boya oluşum prensibine dayanır. Ticari kit prosedürüne göre çalışıldı ve ölçüm 450 nm' de mikropate okuyucu (BioTek, Synergy HT, KC4) ile spektrofotometrik olarak yapıldı. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.6.3.7.2.3. Glutasyon Peroksidaz (Gpx) Aktivite Düzeyinin Belirlenmesi

GPx aktivite ölçümü için ticari olarak alınmış olan, kolorimetrik kit (Cayman Kat No. 703102) ile değerlendirilmesi yapıldı. Testin yöntemi, glutasyonun (GSH) glutasyon disülfite (GSSG) oksitlenmesi süresince GPx'in kümen hidroperoksit miktarını azaltmasına dayanır. GSSG, NADPH tüketimi ile üretilir ve NADPH miktarının azalması GPx aktivitesi ile aynı orandadır. Kit son aşamasından sonra, 5 dakika süresince 340 nm'de spektrofotometrede kinetik ölçüm alındı. Sonuçlar hesaplanarak, mU/mg protein olarak gösterildi.

3.6.3.7.3. Protein Düzeylerinin Belirlenmesi

Bütün testis dokularında yapılmış olan analiz sonuçları mg proteine orantılanmıştır. Örneklerde protein ölçümünde biçinkonik asit (BCA) prensibine sahip olan Thermo marka (Kat No: BCA, Protein assay Kit, 2325) protein analiz kiti kullanıldı. Kitin prensibi bakır sülfat BCA çözeltisine ilave edildiğinde rengin yeşil olduğu görülür; yeşil çözelti protein çözeltisinin içerisine eklendiğinde, proteinin peptid bağları ile etkileşir. Alkali koşullarda iki değerli olan Cu^{2+} iyonları bir değerli olan Cu^{+} iyonlarına indirgenir ve mavi-mor renkli kompleks oluşmaktadır. Mavi rengin şiddeti ile protein konsantrasyonu orantılıdır (2). Protein standartları olarak 25, 125, 250, 500, 1000, 1500, 2000 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarında sığır serum albumini (BSA) hazırlandı. Protein konsantrasyonları standart grafiği yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar $\mu\text{g/MI}$ şeklinde ifade edildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler SPSS 17.0 yazılımı yardımıyla gerçekleştirildi. Deneklerin ilk ve son ağırlıklarının istatistiksel analizinde Wilcoxon İşaretli Sıralar testi kullanıldı. Değerlendirmede ortalama, ve standart hata belirlendi. Deneydeki diğer veriler için gruplar arasındaki farklılık Kruskal Wallis testi kullanılarak, gruplar arasındaki farklı değerlerin hangi gruptan dolayı olduğu ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, herhangi bir sorunla karşılaşmamıştır. Araştırmada herhangi bir sınırlılık durumu meydana gelmemiştir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 24 Kasım 2015 tarihinde gerçekleştirilen 03/23/2015 no'lu toplantıda, 48/2015 protokol numarası ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

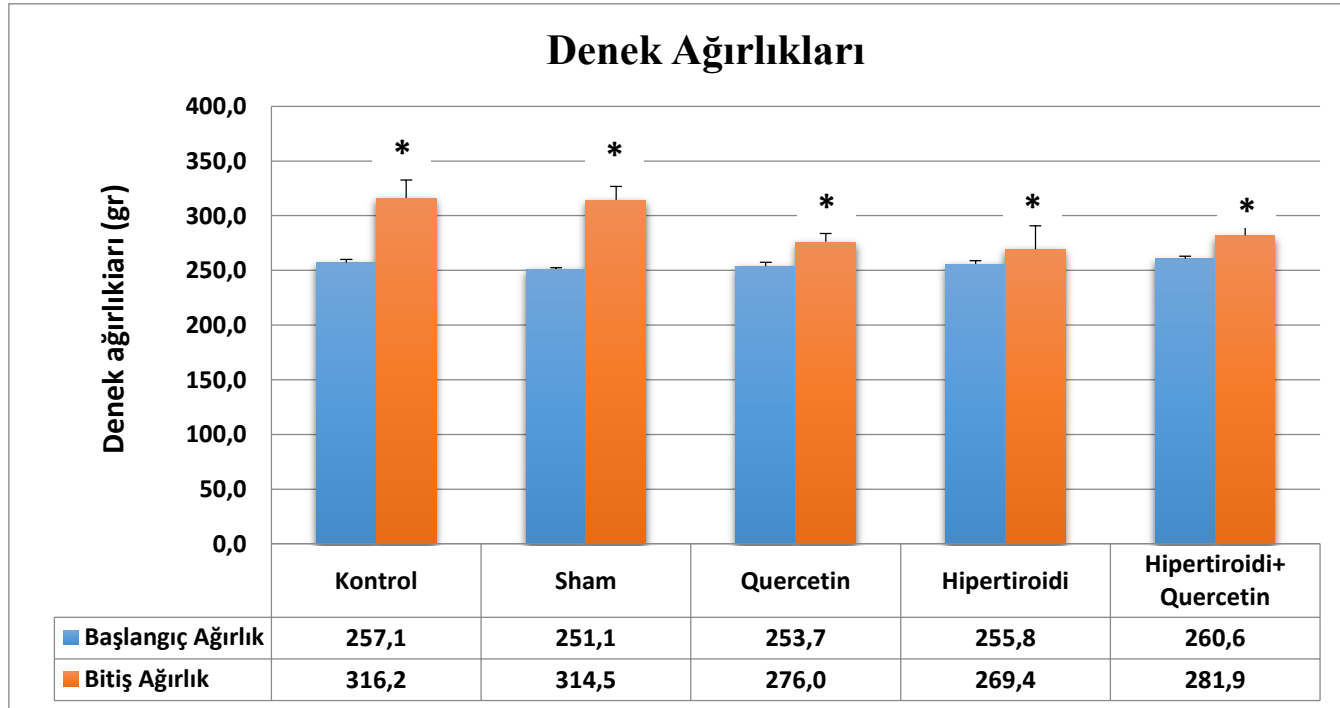
Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4.BULGULAR

4.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Grupların deney başlangıç ağırlık ortalamaları; Kontrol grubunda $257,12 \pm 2,91$ gr, Sham grubunda $251,14 \pm 1,24$ gr, Quercetin grubunda $253,74 \pm 3,09$ gr, Hipertiroidi grubunda $255,82 \pm 3,78$ gr, Hipertiroidi+Quercetin grubunda $260,57 \pm 2,28$ gr olarak bulundu. Grupların deney bitiş ağırlık ortalamaları ise; Kontrol grubunda $316,24 \pm 16,30$ gr, Sham grubunda $314,45 \pm 4,65$ gr, Quercetin grubunda $276,0 \pm 8,03$ gr, Hipertiroidi grubunda $269,42 \pm 2,87$ gr, Hipertiroidi+Quercetin grubunda $281,9 \pm 5,12$ gr olarak bulundu.

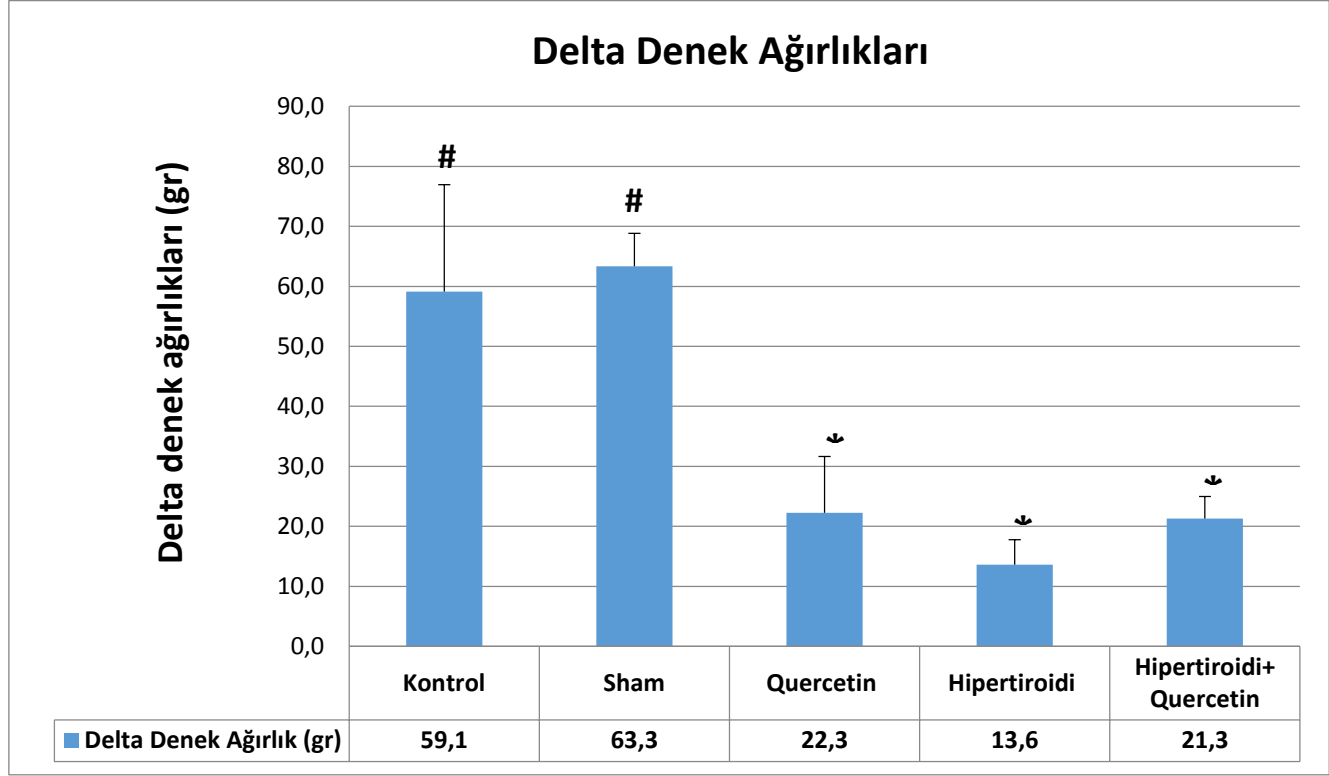
Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; Kontrol grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlemlendi ($p=0,018$). Sham grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlemlendi ($p=0,018$). Quercetin grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlemlendi ($p=0,018$). Hipertiroidi grubu başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlemlendi ($p=0,028$). Hipertiroidi+Quercetin grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gözlemlendi ($p=0,043$). (Wilcoxon Sıralı İşaretler Testi) (Şekil 12)



Şekil 12: Grupların deney başlangıç ve sonundaki ortalama ağırlıkları

* Başlangıç ağırlığına göre anlamlı artış gösteren grup ($p<0,05$)

Grup içinde deneklerin kilo artışını değerlendirmek için (son ağırlık ve ilk ağırlık arasındaki farkı) 'Δ' delta ağırlık değerleri olarak hesaplandı (Şekil 13).



Şekil 13: Grupların delta denek ağırlıkları

*; Kontrol ve sham grupları ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Grupların testis ağırlık ortalamaları;

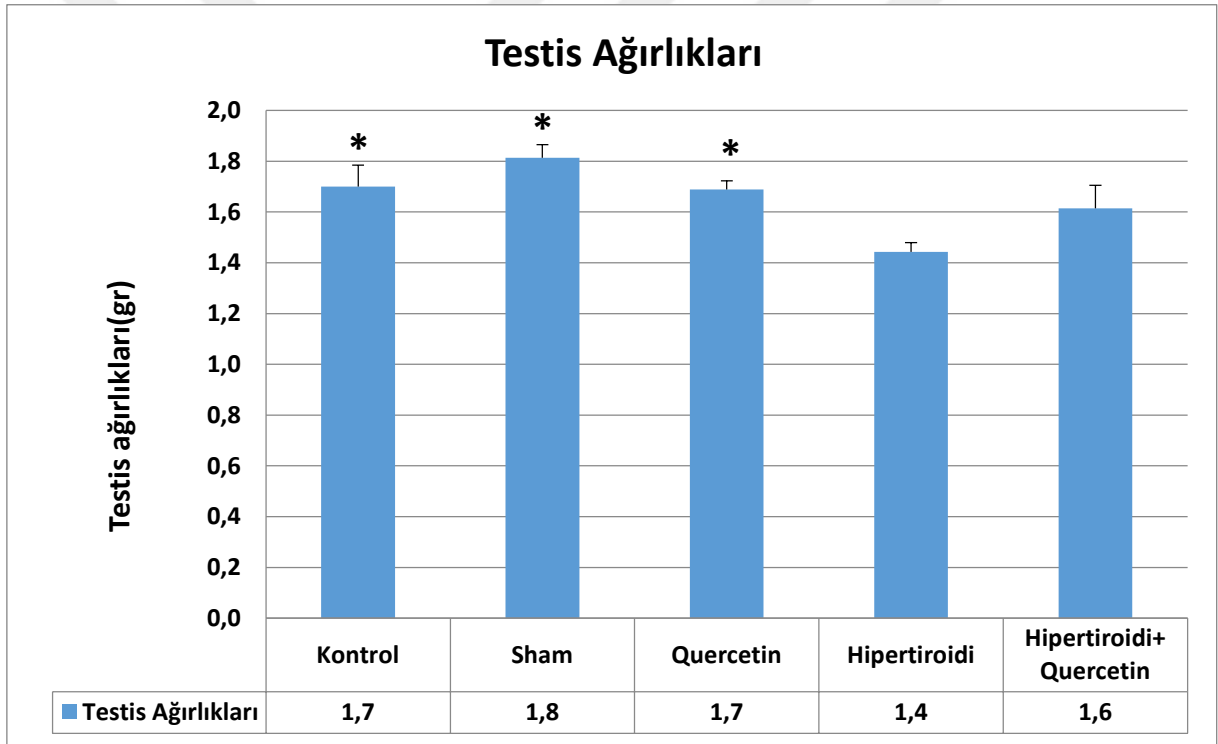
Kontrol grubunda $1,70\pm0,08$ gr, Sham grubunda $1,81\pm0,05$ gr, Quercetin grubunda $1,68\pm0,03$, Hipertiroidi grubunda $1,44\pm0,03$ gr, Hipertioridi+Quercetin grubunda $1,61\pm0,09$ şeklinde bulundu. Bulunan değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,47$, $p=0,74$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,036$, $p=0,002$, $p=0,003$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,477$, $p=0,090$, $p=0,434$).

Hipertiroidi grubu ile Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,152$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 14)



Şekil 14: Deneklerin deney sonundaki ortalama testis ağırlıkları.

*; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$).

4.3. Histokimyasal Bulgular

4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Değerlendirmesi

Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde; normal morfolojide, tunika albuginea'dan itibaren tübül organizasyonunun ve intersitisyel alanın düzgün yapıda olduğu gözlemlendi. İntersitisyel alanda kan damarları, kan damarlarına yakın yerleşimde bulunan leydig hücreleri ve bağ doku hücreleri gözlemlendi. Leydig hücreleri poligonal şekli olan, büyük eksantrik yerleşimli nukleusa sahipti. Seminifer tübül çaplarının birbirine yakın olduğu, tübül epitelini oluşturan spermatogenik hücre serilerinin düzgün olarak sıralandığı ve tübül lümeninde gelişmekte olan sperm hücrelerinin varlığı gözlemlendi. Tübül duvarında bazal membrana oturmuş spermatogonyumlar, tübüle sıralı yerleşmiş spermatositler ve spermatidler görüldü. Aralarında Sertoli hücreleri yer almaktaydı. Tübüllerin merkezinde ise spermatidler görüldü (Şekil 15).

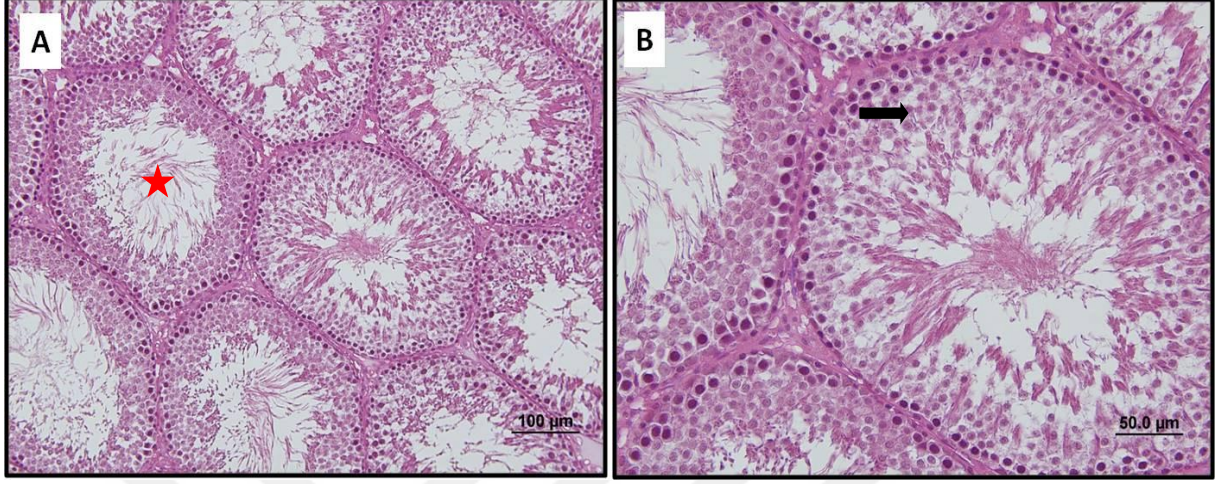
Sham grubuna ait kesitler incelendiğinde kontrol grubu ile benzer görüntülere sahip olduğu gözlemlendi. Seminifer tübül organizasyonunun ve intersitisyel alanın düzgün yapıda olduğu gözlemlendi. Tübül çaplarının birbirine yakın olduğu ve tübül epitelini oluşturan spermatogenik hücre serilerinin düzgün olarak sıralandığı gözlemlendi. (Şekil 16)

Quercetin grubu incelendiğinde seminifer tübül organizasyonunun ve intersitisyel alanın düzgün yapıda olduğu gözlemlendi. Tübül çaplarının birbirine yakın olduğu ve tübül epitelini oluşturan spermatogenik hücre serilerinin düzgün olarak sıralandığı gözlemlendi. İntersitisyel alanda kan damarları, kan damarlarına yakın yerleşim gösteren leydig hücreleri ve bağ doku hücreleri gözlemlendi (Şekil 17).

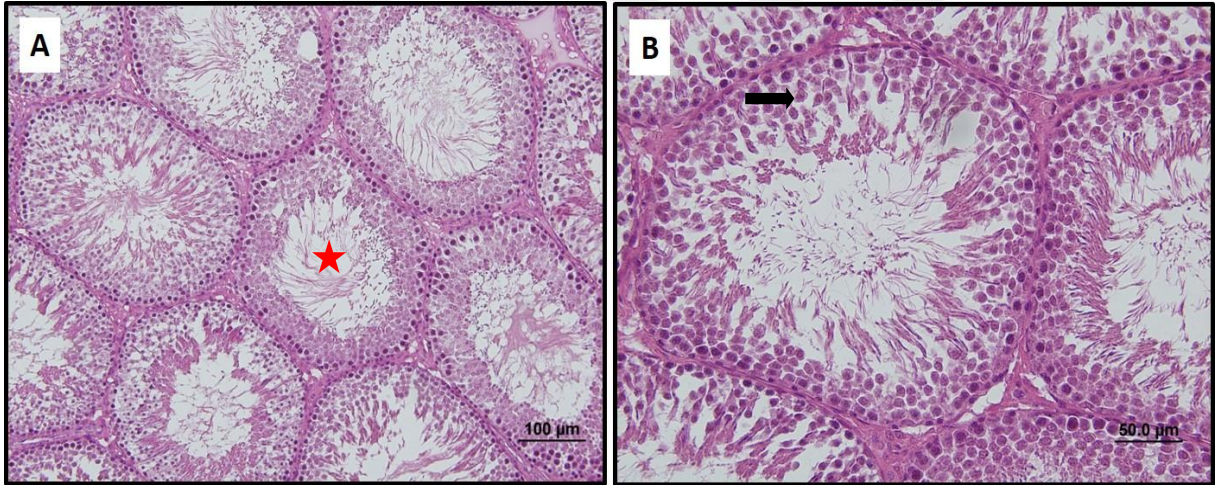
Hipertiroidi grubu incelendiğinde, kontrol grubuna göre seminifer epitelde daha düzensiz bir yapı gözlemlendi. Seminifer epiteli oluşturan germ hücre diziliminde bozukluk ve kayıp, bazal membrandan yer yer ayrılma ve sertoli hücrelerinde kayıplar görüldü. Hücresel kayıp nedeniyle seminifer tübül çaplarında da azalma ve tübüllerde büzülme gözlemlendi. Ayrıca seminifer tübül epitelinde germ hücrelerinin dökülmesi sonucu ortaya çıkan vakuolizasyonlar gözlemlendi. (Şekil 18)

Hipertiroidi+Quercetin grubunda Hipertiroidi grubuna göre hasarlı tübül sayısının daha az olduğu ve çok sayıda tübülün normale yakın morfolojide olduğu gözlemlendi. Tübül epitelinde germ hücre kayıplarının ve vakuolizasyonun azaldığı,

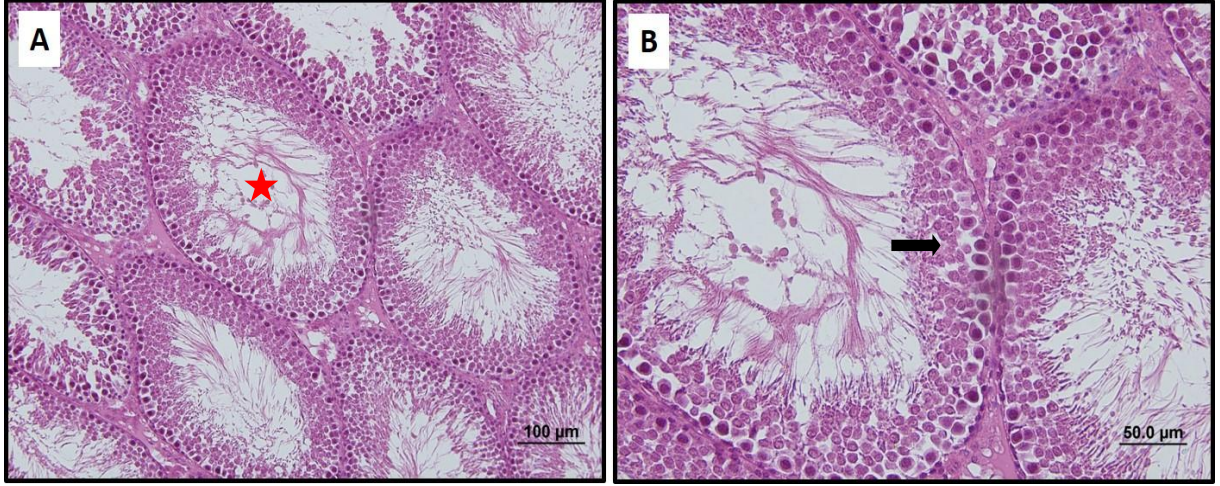
seminifer tübüller çaplarının normale yakın olduğu, intertisyal alanın da genelde normale yakın morfolojide olduğu gözlendi ( ekil 19).



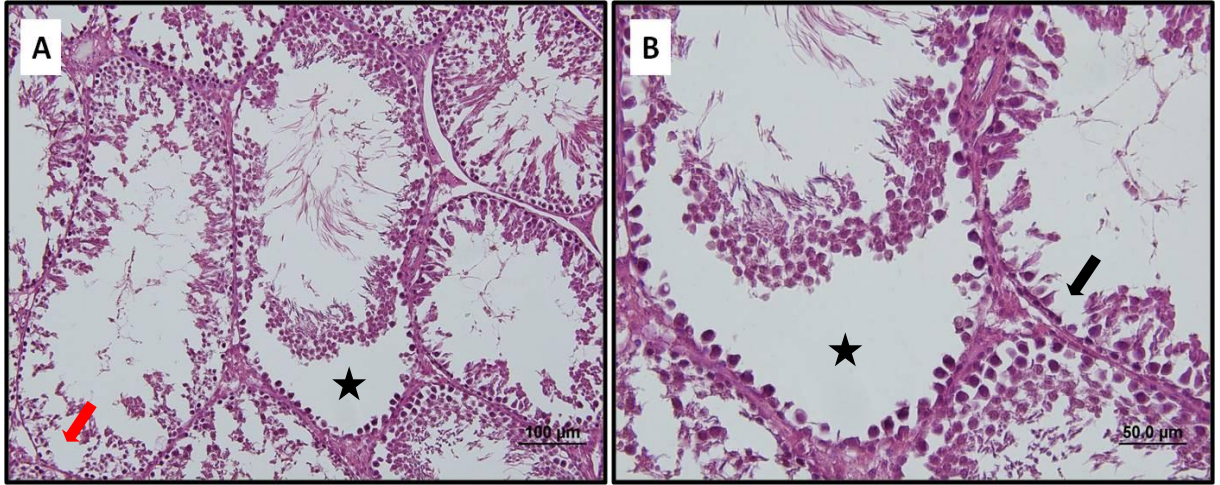
Şekil 15: Kontrol grubu testis kesiti. Düzgün sınırlı seminifer tübüller ( ) ve düzenli dizilmiş germ hücreleri (   ). H&E **A**, x20 **B**, x40



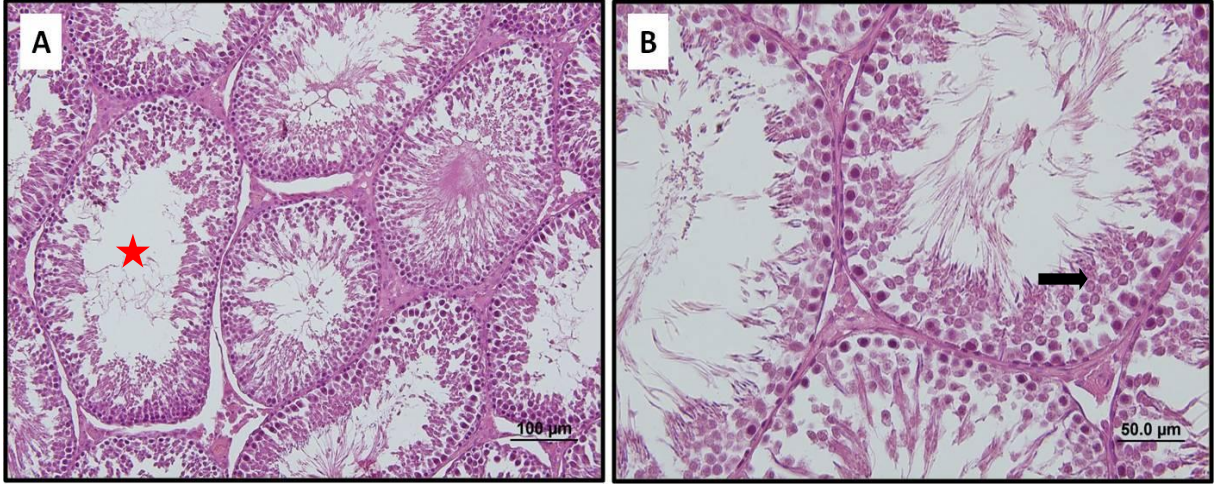
Şekil 16: Sham grubu testis kesiti. Düzgün sınırlı seminifer tübüller ( ) ve düzenli dizilmiş germ hücreleri (   ). H&E **A**, x20 **B**, x40



Şekil 17: Quercetin grubu testis kesiti. Düzgün sınırlı seminifer tübüller (★) ve düzenli dizilmiş germ hücreleri (➡). H&E A, x20 B, x40



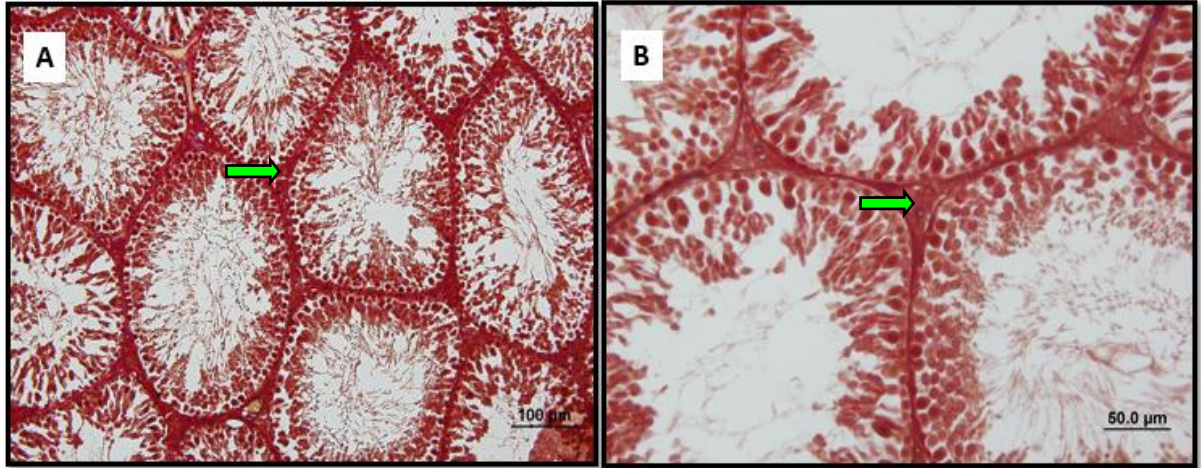
Şekil 18: Hipertiroidi grubu testis kesiti. Germ hücrelerinde (➡) ve sertoli hücrelerinde kayıp, tübül lümenine dökülme (★) ve tübüllerde vakuolizasyon (➡) gözlenmektedir. H&E A, x20 B, x40



Şekil 19: Hipertiroidi+Quercetin grubu testis kesiti. Normale yakın, düzgün sınırlı seminifer tübüller (—) ve düzenli dizilmiş germ hücreleri (★). H&E A, x20 B, x40

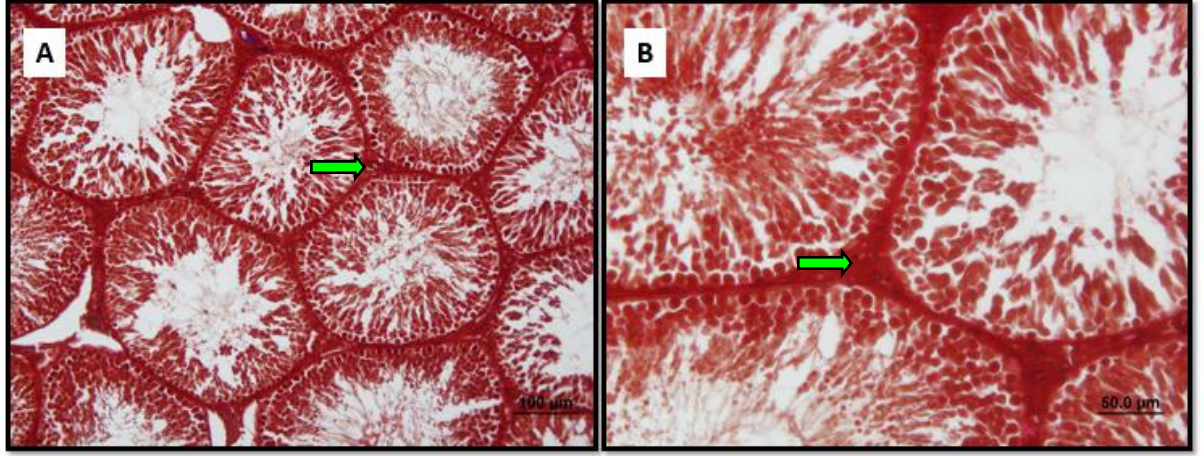
4.3.2. Masson-Trikrom Boyama Değerlendirmesi

A- Kontrol grubu; Masson Trikrom yöntemi ile kesitler incelendiğinde normal yapıdaki interstisyel alan gözlemlendi (Şekil 20).



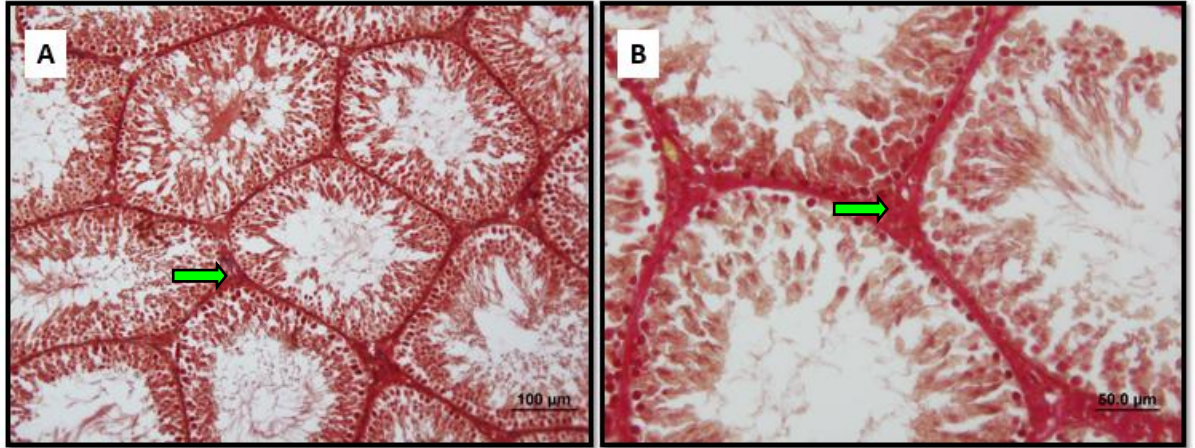
Şekil 20: Kontrol grubu testis kesiti. Normal yapıdaki interstisyel alan (→).Masson Trikrom, x20 ve x40

B- Sham grubu; Bu gruba ait kesitler incelendiğinde normal yapıdaki intersitisyel alan gözlemlendi (Şekil 21).



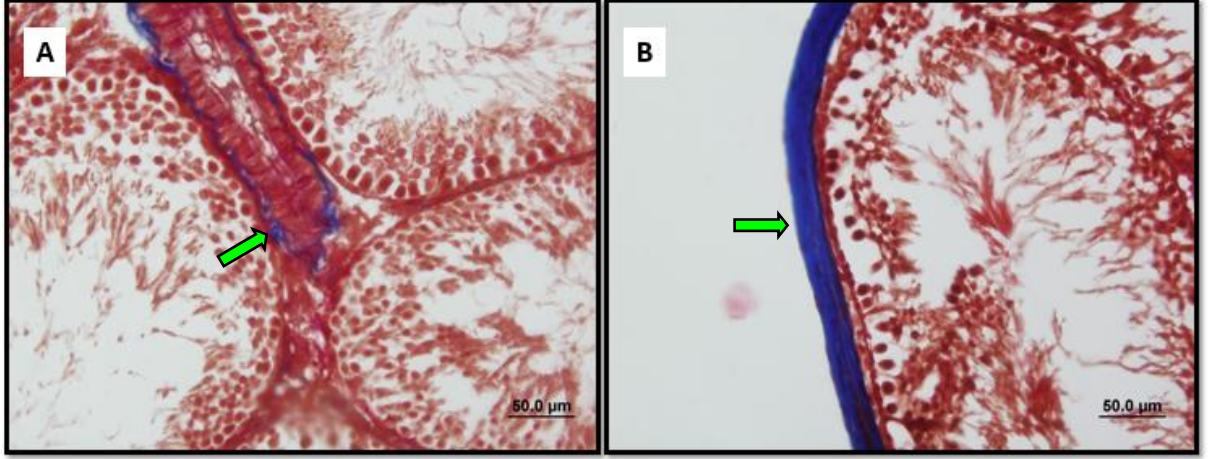
Şekil 21: Sham grubu testis kesiti. Normal yapıdaki intersitisyel alan (→). Masson Trikom, x20 ve x40

C- Quercetin grubu; Bu gruba ait kesitler incelendiğinde normale yakın morfolojide intersitisyel alan gözlemlendi (Şekil 22).



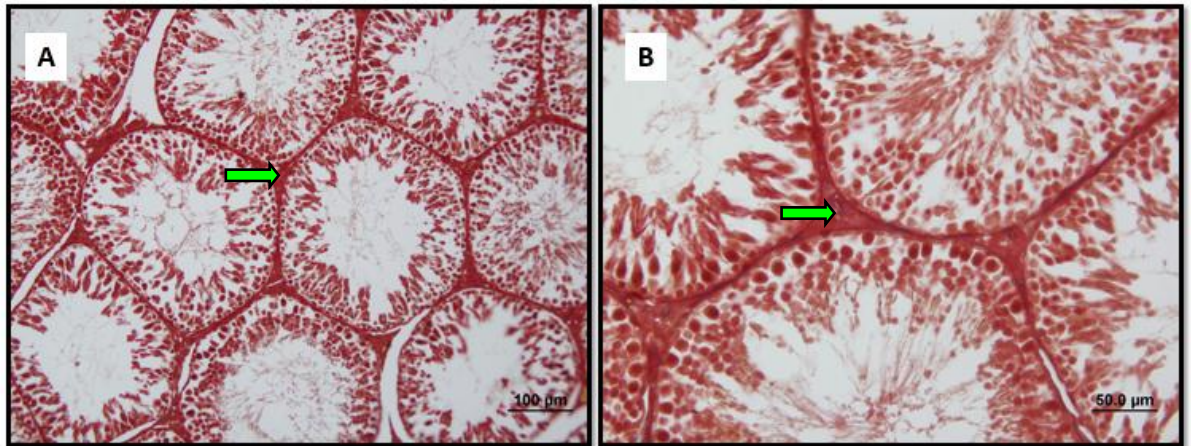
Şekil 22: Quercetin grubu testis kesiti. Normal yapıdaki intersitisyel alan (→). Masson Trikom, x20 ve x40

D-Hipertiroidi grubu; Bu gruba ait kesitler incelendiğinde tunika albugineada ve intersitisyel alanda bağ doku artışı gözlemlendi (Şekil 23).



Şekil 23: Hipertiroidi grubu testis kesiti. Bağ doku artışı (→). Masson Trikrom, x40 ve x40

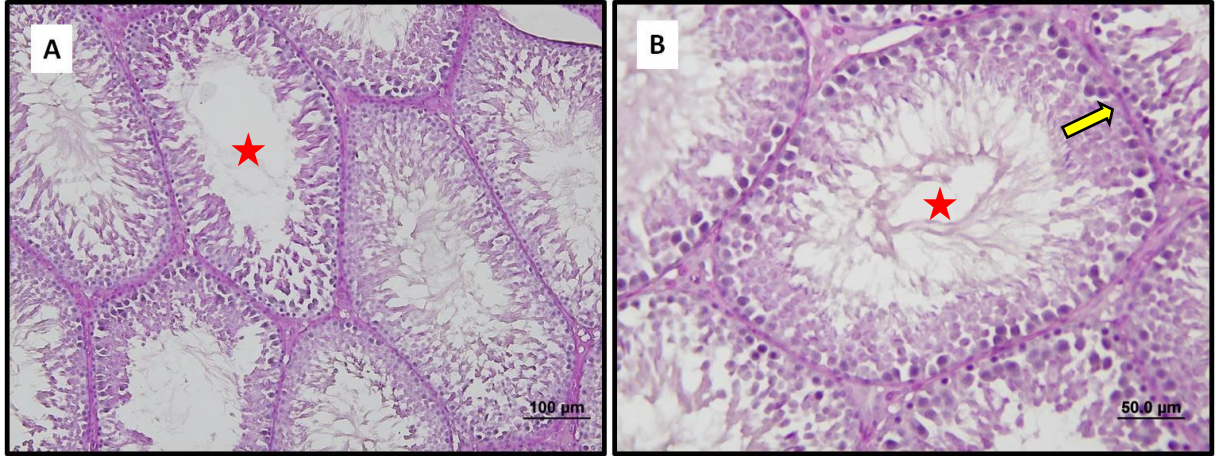
E- Hipertiroidi+Quercetin grubu; Bu gruba ait kesitler incelendiğinde hipertiroidi grubuna göre intersitisyel bağ doku artışının azaldığı, normale yakın morfolojide intersitisyel alan gözlemlendi (Şekil 24).



Şekil 24: Hipertiroidi+Quercetin grubu testis kesiti. Normale yakın yapıdaki intersitisyel alan (→). Masson Ttrikrom, x20 ve x40

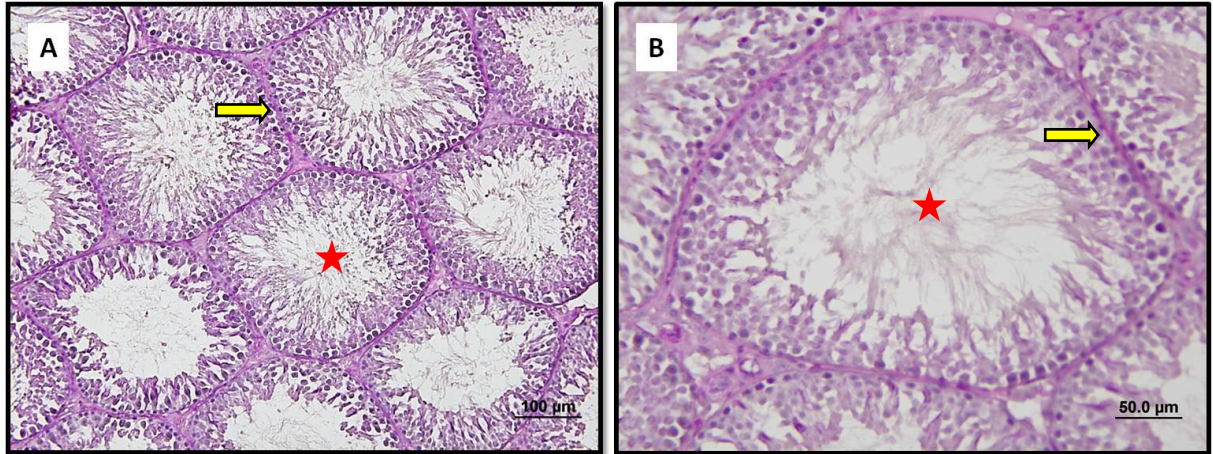
4.3.3. Periyodik Asit-Schiff (PAS) Boyama Değerlendirmesi

A- Kontrol grubu; Kontrol grubundaki deneklerin kesitleri incelendiğinde, testis yapısı histolojik olarak düzgün gözlemlendi. Seminifer tübül yapısı incelendiğinde ise bazal membranın kalınlıklarının ve seminifer tübül çaplarının normal olduğu gözlemlendi. (Şekil25).



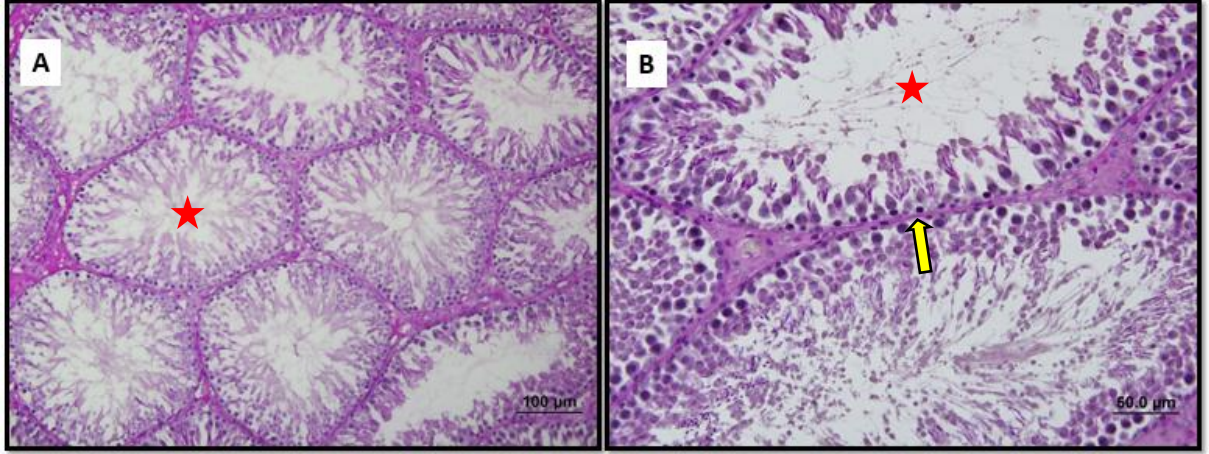
Şekil 25: Kontrol grubu testis kesiti. Normal çaptaki seminifer tübül lümeni (★), ve normal kalınlıkta bazal membran (➡). PAS, A, x20 B, x40

B- Sham grubu; Bu gruba ait kesitler incelendiğinde kontrol grubuna benzer görüntüler gözlemlendi (Şekil 26).



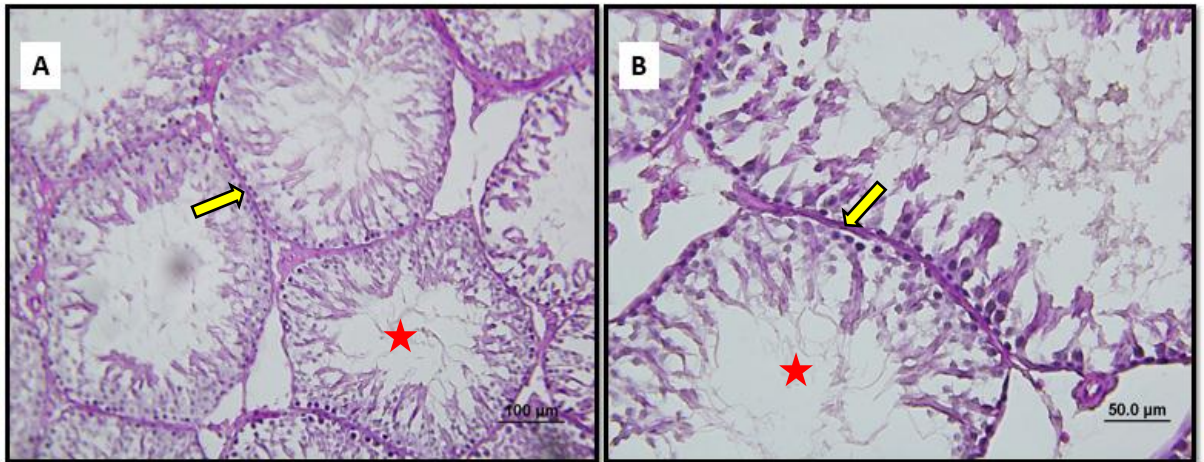
Şekil 26: Sham grubuna ait testis kesiti. Normal çaptaki seminifer tübül lümeni (★), normal kalınlıkta bazal membran (➡). PAS, A, x20 B, x40

C-Quercetin grubu; Bu gruba ait kesitler incelendiğinde seminifer tübül etrafını saran bazal membranda kontrol ve sham grubuna yakın sonuçlar gözlemlendi (Şekil 27)



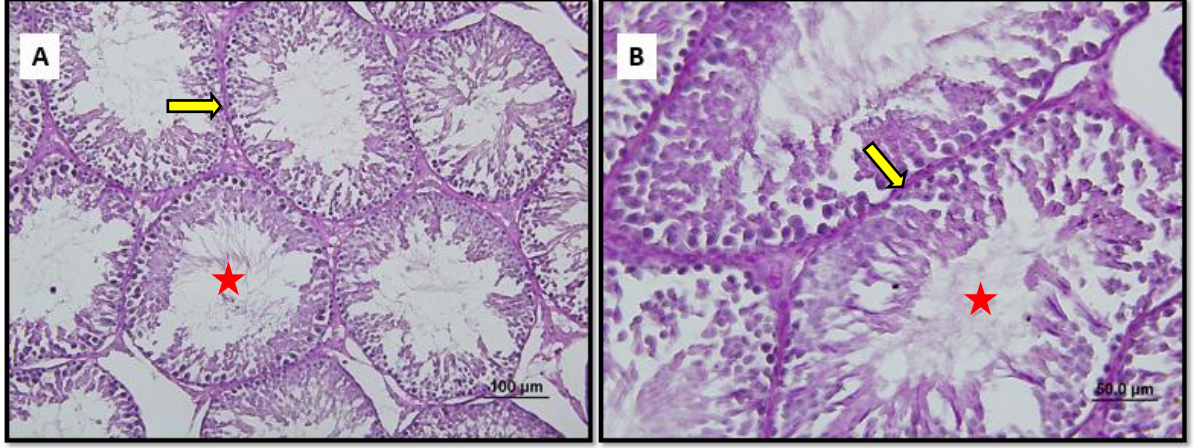
Şekil 27: Quercetin grubu testis kesiti. Normal çaptaki seminifer tübül lümeni (★), ve normal kalınlıkta bazal membran (➡). PAS, **A**, x20 **B**, x40

D-Hipertiroidi grubu; Bu gruba ait kesitler incelendiğinde seminifer tübüllerin çoğunda dejenerasyon ve tübül epitelinin düzensiz yapıda olduğu gözlemlendi. Seminifer tübül bazal membranında, kontrol grubuna göre incelmeler ve tübül çaplarında azalmalar gözlemlendi. (Şekil 28)



Şekil 28: Hipertiroidi grubu testis kesiti. Bazal membranda incelme (★), seminifer tübül çaplarında azalma (➡)(x20). PAS, **A**, x20 **B**, x40

E-Hipertiroidi+Quercetin grubu; Bu grupta kontrol grubuna yakın kalınlıkta bir bazal membran ve kontrol grubuna yakın seminifer tübül çapları gözlemlendi (Şekil 29).



Şekil 29: Hipertiroidi+Quercetin grubu testis kesiti. Normale yakın çaptaki seminifer tübül lümeni (), ve normale yakın kalınlıkta bazal membran (). PAS, **A**, x20 **B**, x40

4.4. Morfometrik Bulgular

4.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Gruplar arası ortalamalar;

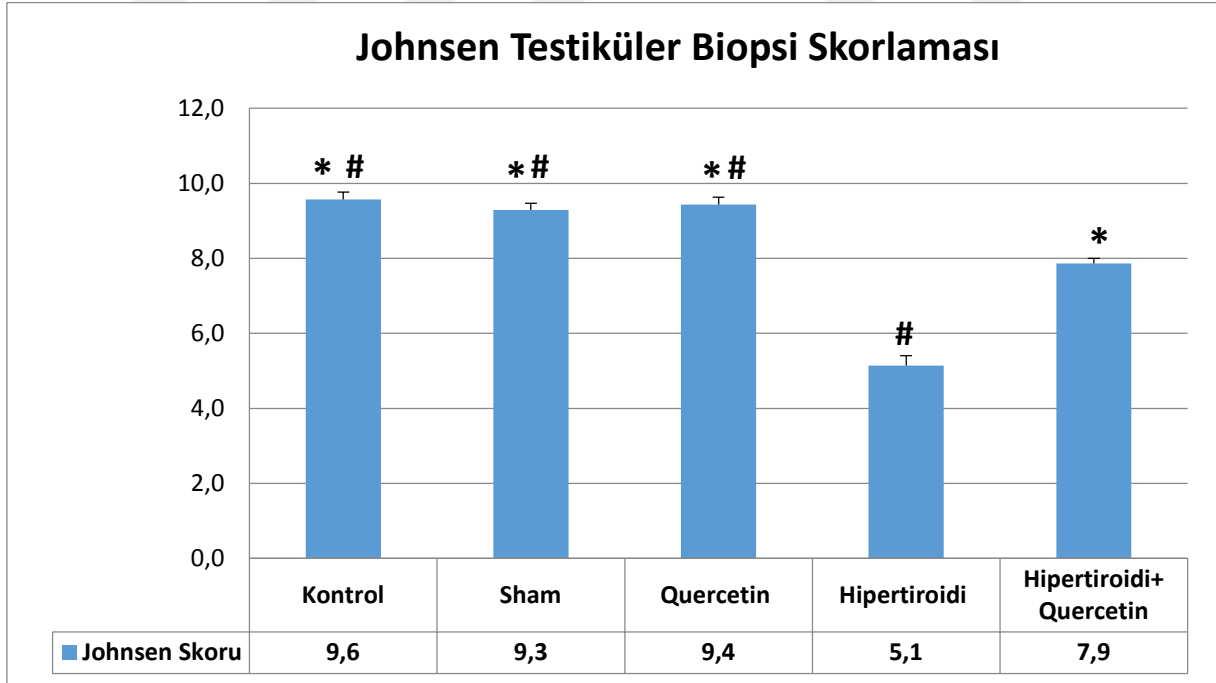
Kontrol grubu $9,57 \pm 0,20$ Sham grubu $9,29 \pm 0,18$, Quercetin grubunda $9,43 \pm 0,20$, Hipertiroidi grubunda $5,14 \pm 0,26$ ve Hipertiroidi+Quercetin grubunda $7,86 \pm 0,14$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,29$, $p=0,60$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi+Quercetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$).

Hipertiroidi grubu ile Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi+Quercetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,001$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 30)



Şekil 30: Johnsen testiküler biyopsi skorlaması

*; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#, Hipertiroidi+Quercetin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

4.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Gruplar arası seminifer tübül çap ölçümü ortalamaları;

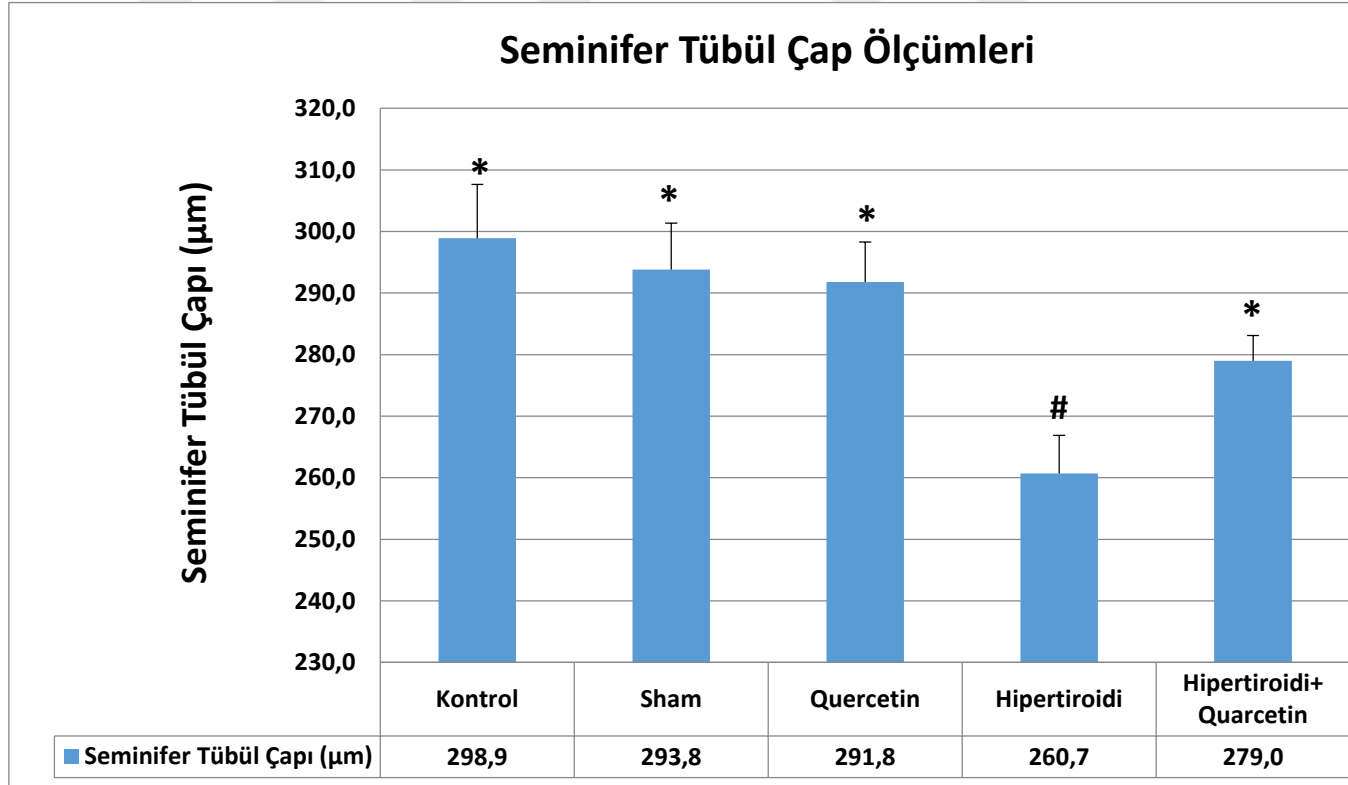
Kontrol grubunda $298,92 \pm 8,71 \mu\text{m}$, Sham grubunda $293,78 \pm 7,54 \mu\text{m}$, Quercetin grubunda $291,78 \pm 6,50 \mu\text{m}$, Hipertiroidi grubunda $260,68 \pm 6,17 \mu\text{m}$ ve Hipertiroidi+Quercetin grubunda $278,98 \pm 4,10 \mu\text{m}$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,70$, $p=0,56$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,004$, $p=0,006$, $p=0,004$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,096$, $p=0,201$, $p=0,277$).

Hipertiroidi grubu ile Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi+Quercetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,018$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 31)



Şekil 31: Seminifer tübül çap ölçüm ortalamaları

*; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#,Hipertiroidi+Quercetin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup($p<0,05$)

4.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

Gruplar arası seminifertübül bazal membran kalınlığı ortalamaları;

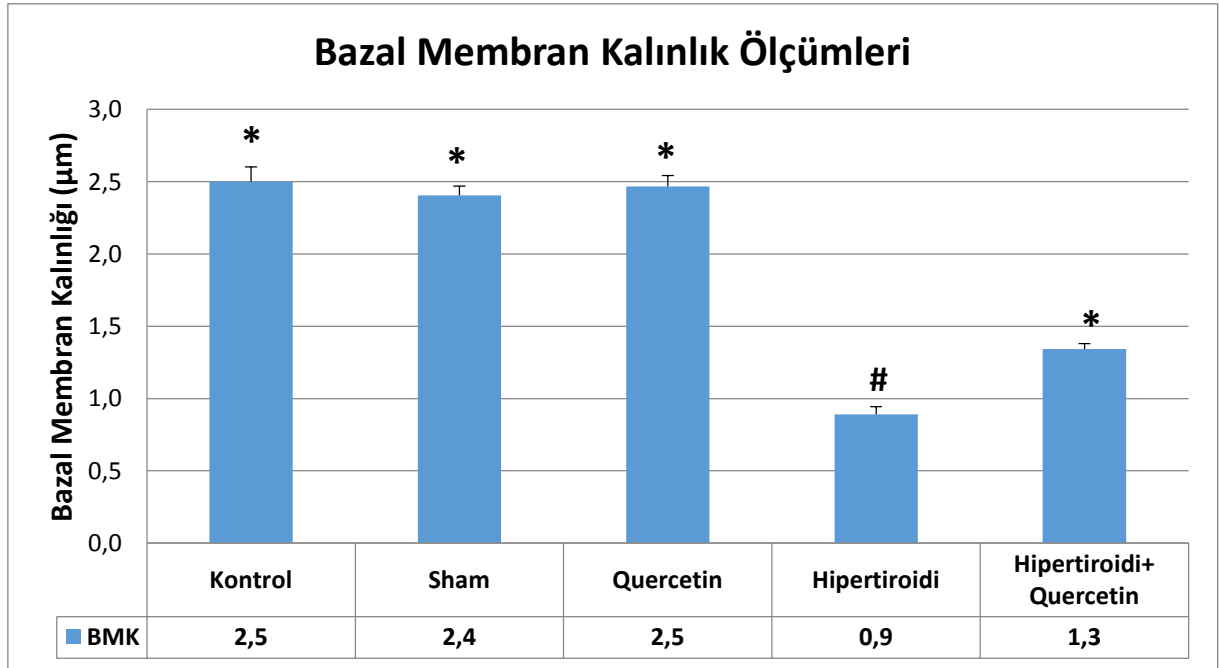
Kontrol grubu $2,50\pm0,10$ μm , Sham grubu $2,40\pm0,06$ μm , Quercetin grubu $2,46\pm0,07$ μm , Hipertiroidi grubu $0,89\pm0,05$ μm , Hipertiroidi+Quercetin grubu $1,34\pm0,03$ μm olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,4$, $p=0,65$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,002$, $p=0,002$, $p=0,002$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,002$, $p=0,002$, $p=0,002$).

Hipertiroidi grubu ile Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi+Quercetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,002$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 32)



Şekil 32: Seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri

*; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#,Hipertiroidi+Quercetin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup($p<0,05$)

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

Seminifer tübüllerde bulunan spermatogenik hücrelerinde apoptozun değerlendirilmesi için TUNEL ve Aktif Kaspaz-3 boyaması yapıldı. Her gruptaki deneklerin testis kesitlerinde 10 ayrı alandaki 100 spermatogenik hücrede TUNEL pozitif ve Aktif Kaspaz-3 pozitif boyanan hücreler sayıldı.

4.5.1. TUNEL Boyama Değerlendirmesi

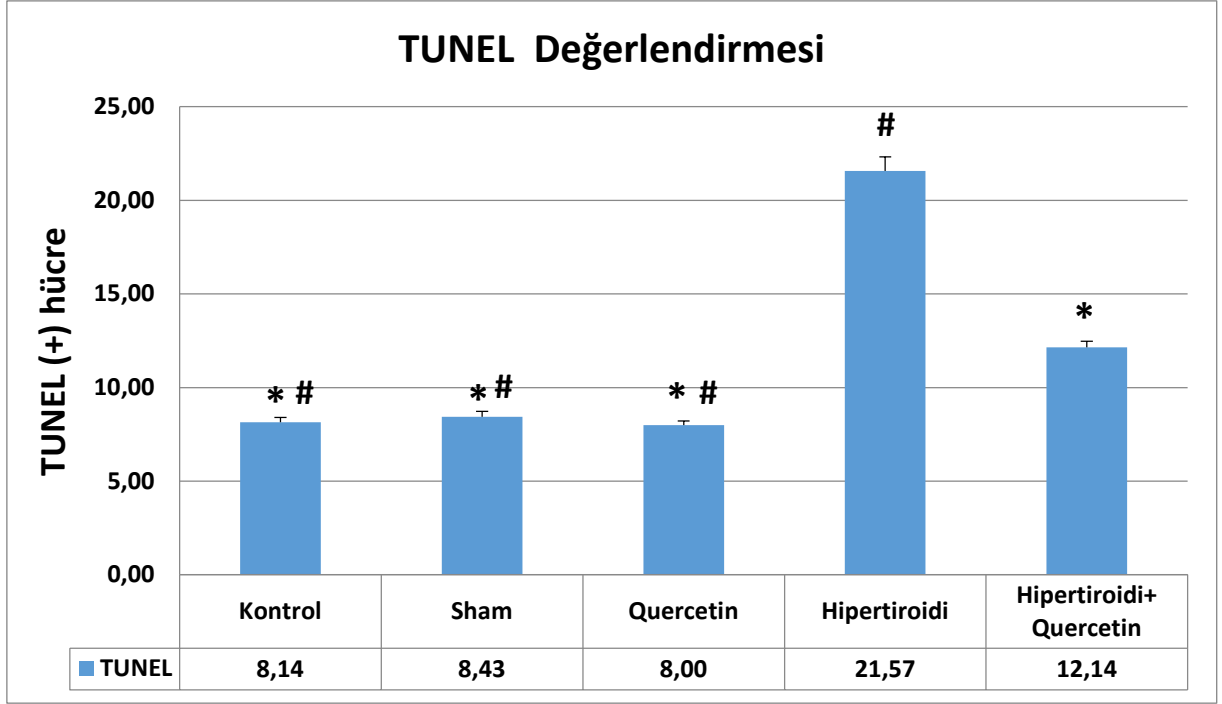
Testis dokusuna ait kesitlerde TUNEL pozitif hücre sayıları değerlendirildiğinde; Gruplar arası TUNEL pozitif hücre sayı ortalamaları; Kontrol grubunda $8,14\pm0,26$, Sham grubunda $8,43\pm0,29$, Quercetin grubunda $8,00\pm0,21$, Hipertiroidi grubunda $21,57\pm0,75$, Hipertiroidi+Quercetin grubunda $12,14\pm0,34$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,40$, $p=0,65$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi+Quercetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,001$, $p=0,001$, $p=0,001$).

Hipertiroidi grubu ile Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi+Quercetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p=0,002$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 33)

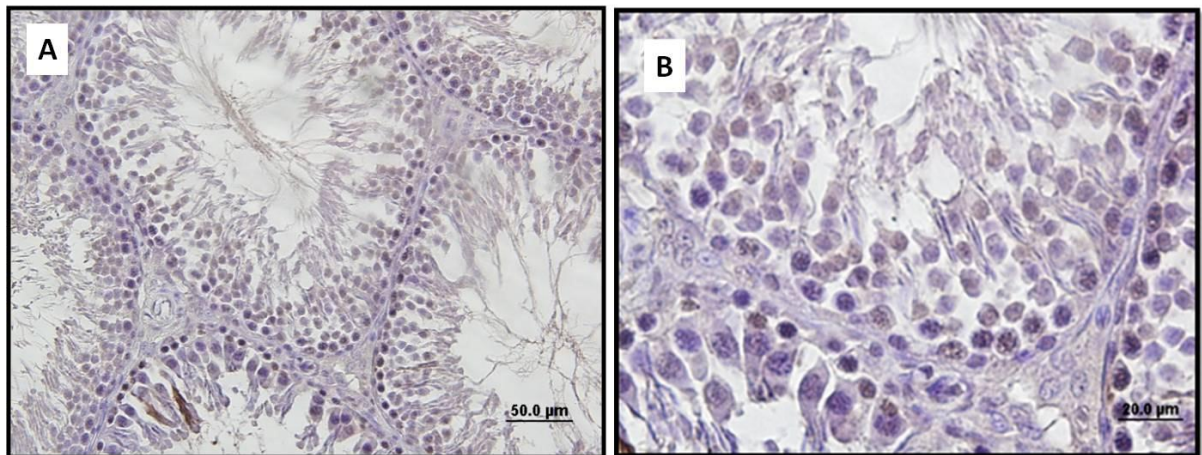


Şekil 33: Grupların TUNEL (+) hücre sayısı

*; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

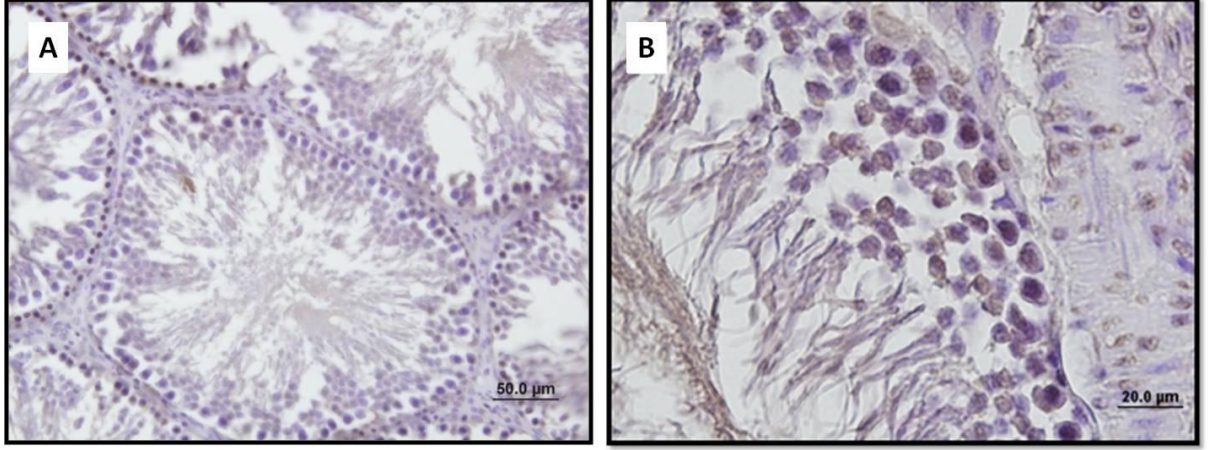
#,Hipertiroidi+Quercetin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup($p<0,05$)

A-Kontrol Grubu; Kontrol grubuna ait kesitleri incelediğimizde, tübüllerin normal yapıda olduğu ve birkaç tübülde apoptotik hücrelerin varlığı gözlemlendi.



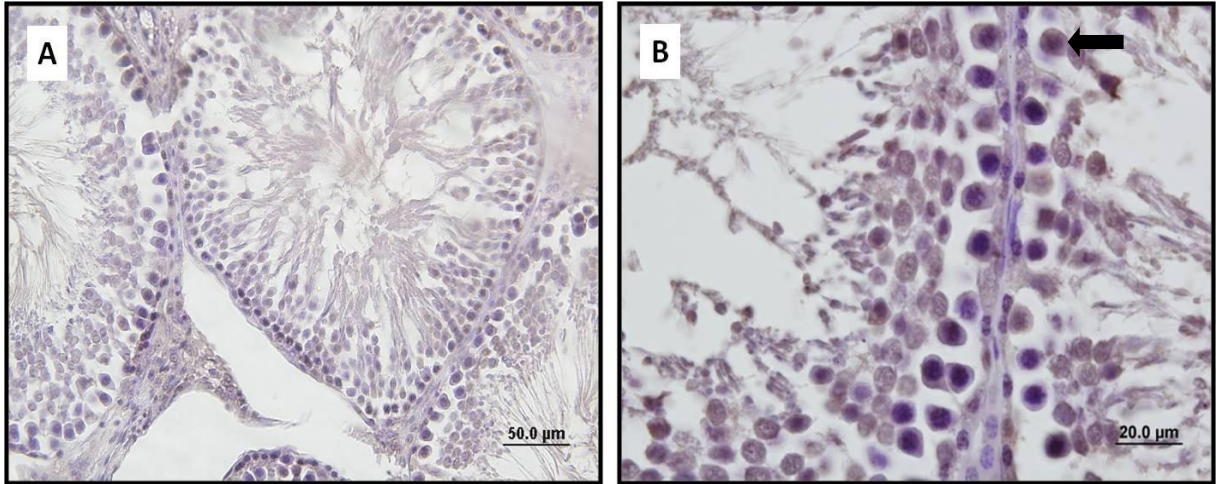
Şekil 34: Kontrol grubu testis kesiti. TUNEL, **A**,x40 ve **B**,x100

B- Sham Grubu; Yalnızca mısır yağı verdiğimiz bu gruba ait kesitler incelendiğinde, seminifer tübüllerin düzgün yapıda olduğunu ancak tübüllerde nadir TUNEL (+) hücrelerin olduğunu belirledik.



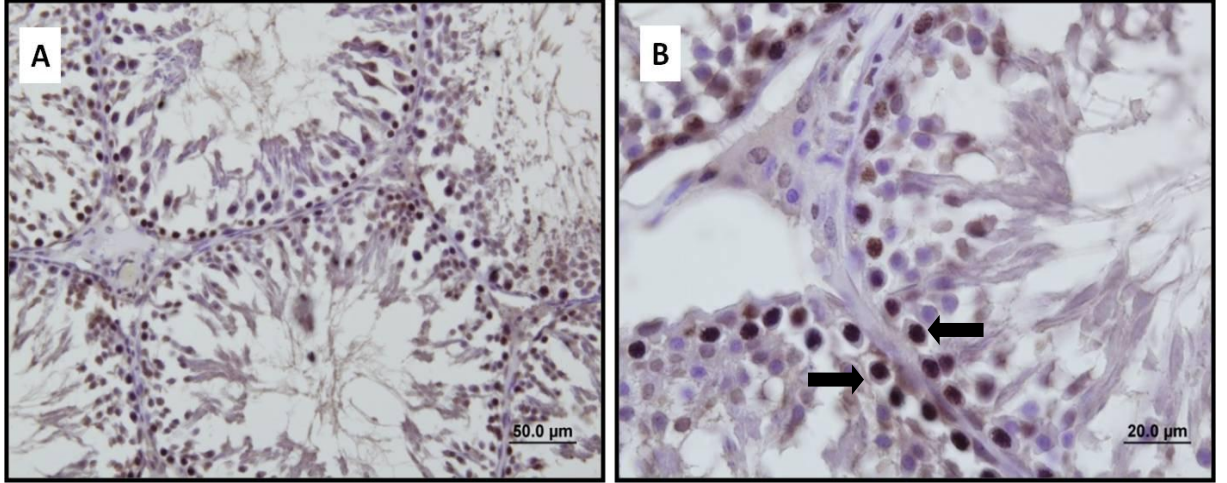
Şekil 35: Sham grubu testis kesiti. **A**,x40 ve **B**,x100

C-Quercetin Grubu; Bu gruba ait kesitler incelendiğinde, kontrol grubuna benzer sayıda apoptotik hücreleri gözlemledik.



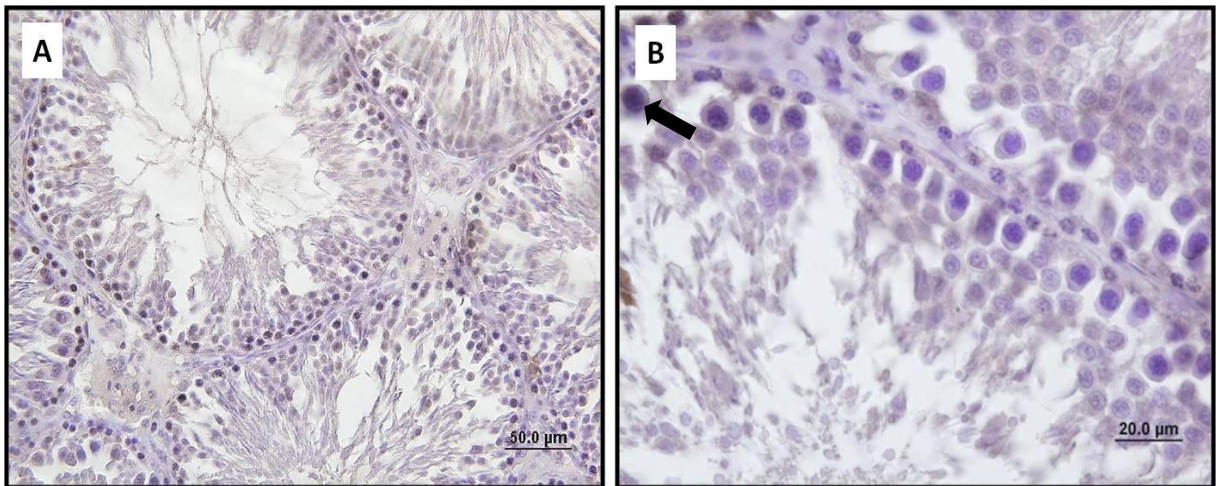
Şekil 36: Quercetin grubu testis kesiti. TUNEL (+) olan hücreler (**→**), TUNEL, **A**,x40 ve **B**,x100

D- Hipertiroidi Grubu; L-tiroksin uygulaması ile oluşturduğumuz bu gruba ait deneklerin kesitleri incelendiğinde, bir çok tübülde dejenerasyon ve oldukça fazla sayıda TUNEL (+) hücre olduğunu gözlemledik.



Şekil 37: Hipertiroidi grubu testis kesiti. TUNEL (+) hücrelerde (➡) artış, TUNEL, A,x40 ve B,x100

E- Hipertiroidi+Quercetin Grubu; Quercetin uygulayarak tedavi etmeyi amaçladığımız bu gruba ait kesitleri incelediğimizde, apoptotik hücre oranının hipertiroidi grubuna göre azalmış olduğunu gözlemledik.



Şekil 38: Hipertiroidi/Quercetingrubu testis kesiti. Az sayıda görülen TUNEL (+) hücreler (➡), TUNEL, A,x40 ve B,x100

4.5.2. Aktif Kaspaz-3 İmmunhistokimyasal Değerlendirme

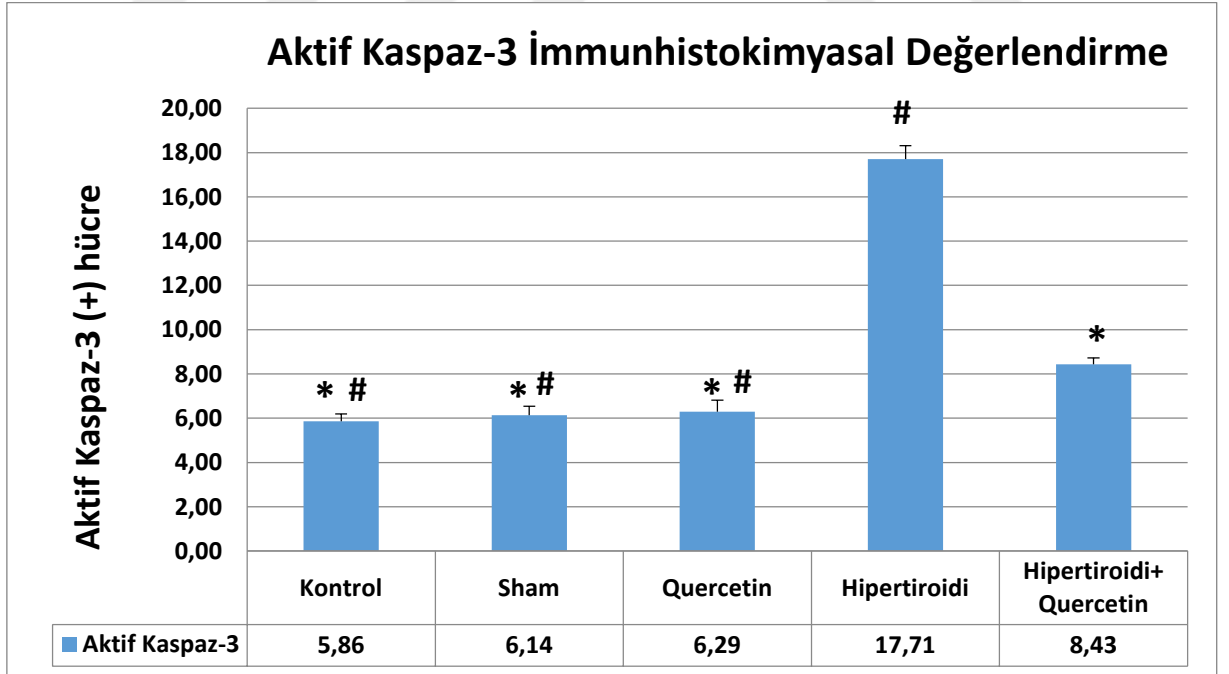
Testis dokusuna ait kesitlerde Aktif Kaspaz-3 pozitif hücre sayıları değerlendirildiğinde; Gruplar arası Aktif Kaspaz-3 pozitif hücre sayı ortalamaları; Kontrol grubunda $5,86 \pm 0,34$, Sham grubunda $6,14 \pm 0,40$, Quercetin grubunda $6,29 \pm 0,52$, Hipertiroidi grubunda $17,71 \pm 0,60$, Hipertiroidi+Quercetin grubunda $8,43 \pm 0,29$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,63$, $p=0,59$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,002$, $p=0,002$, $p=0,002$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi+Quercetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,002$, $p=0,004$, $p=0,009$).

Hipertiroidi grubu ile Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi+Quercetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,001$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 39)

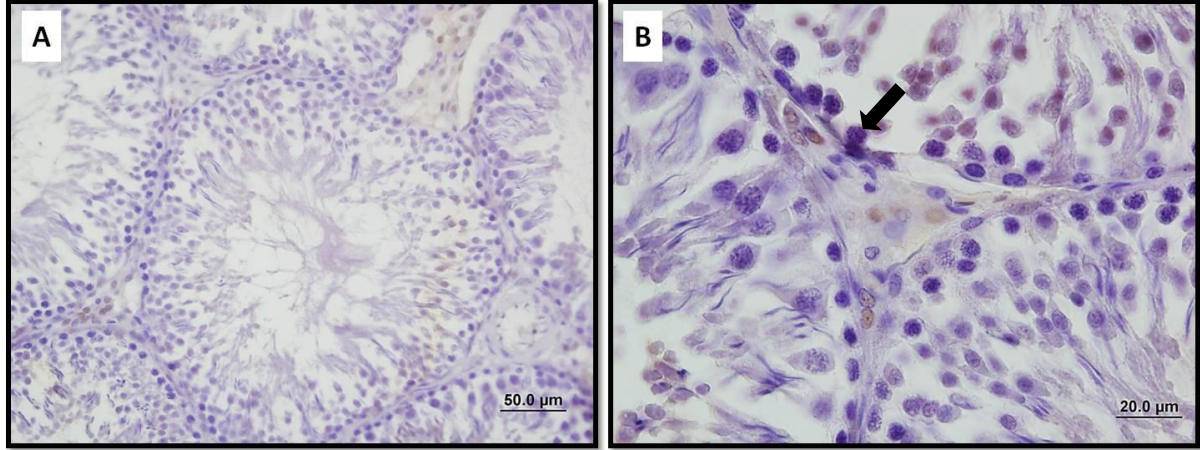


Şekil 39: Grupların Aktif Kaspaz-3 (+) hücre sayısı

*; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

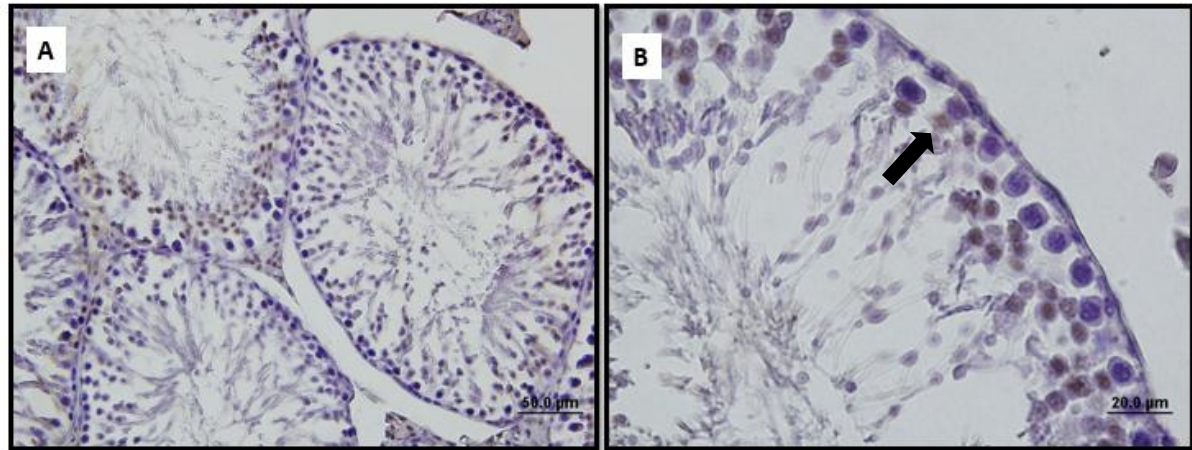
#, Hipertiroidi+Quercetin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

A- Kontrol grubu; Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde bazı tübül epitellerinde apoptotik hücre olduğunu gözledik. Seminifer tübül yapısı düzgün bir şekilde görünmekteydi. Spermatogenik seri hücrelerinin lokalizasyonunun düzgün olduğunu ve bazı tübüllerin epitellerinde vakuolizasyonlar olduğu görüldü (Şekil 40).



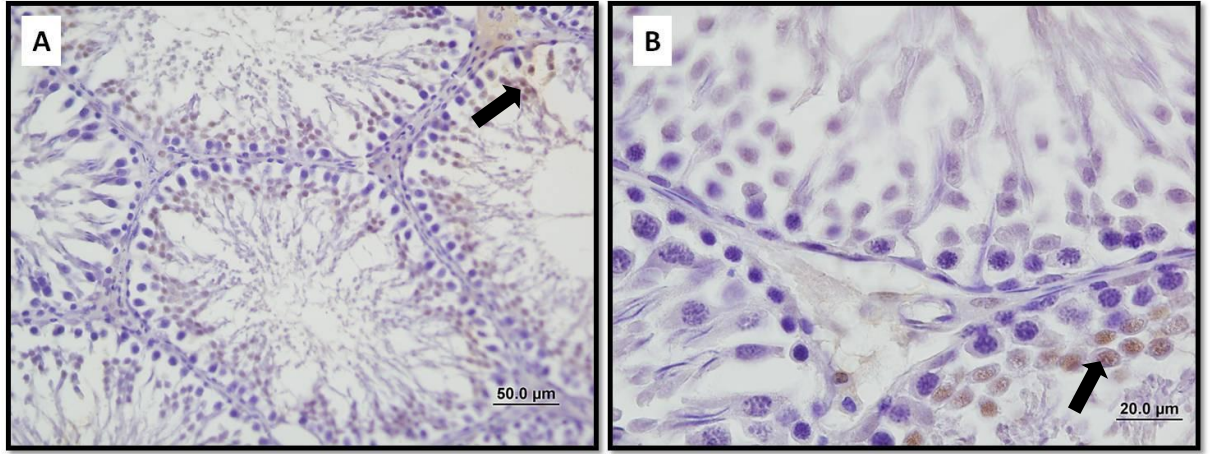
Şekil 40: Kontrol grubu testis kesiti. Aktif Kaspaz 3 (+) hücreler (➡) görülmektedir. Aktif Kaspaz-3, A, x40 ve B, x100

B- Sham grubu; Bu gruba ait kesitleri incelediğimizde düzgün şekilde görülen seminifer tübül yapısı ve bazı tübüllerde tunel (+) hücreler gözlemlendi.



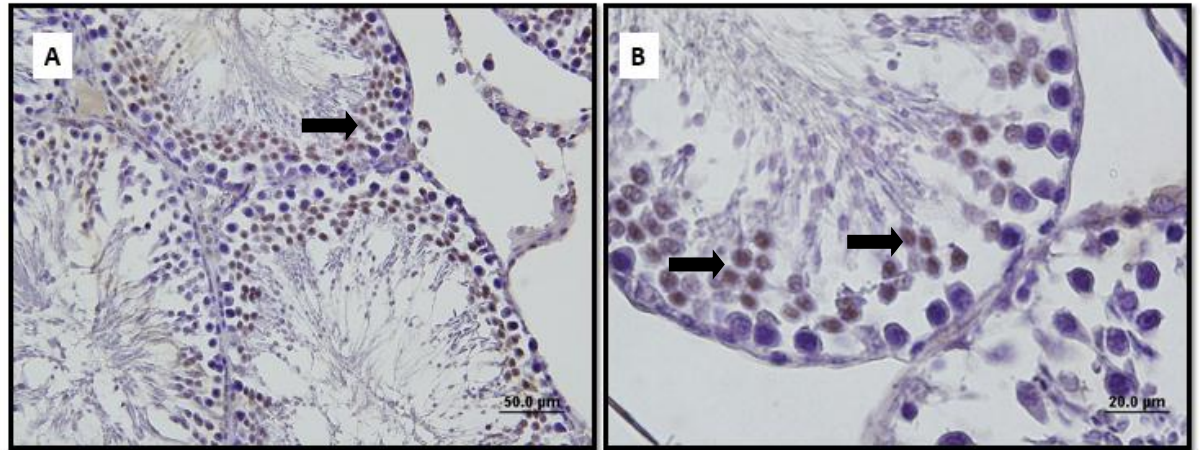
Şekil 41: Sham grubu testis kesiti, Az sayıda aktif Kaspaz 3 (+) hücreler (➡) görülmektedir. Aktif Kaspaz-3, A, x40 ve B, x100

C-Quercetin Grubu; Bu grupta kontrol grubuna göre daha az olmakla beraber apoptotik hücreleri saptadık.



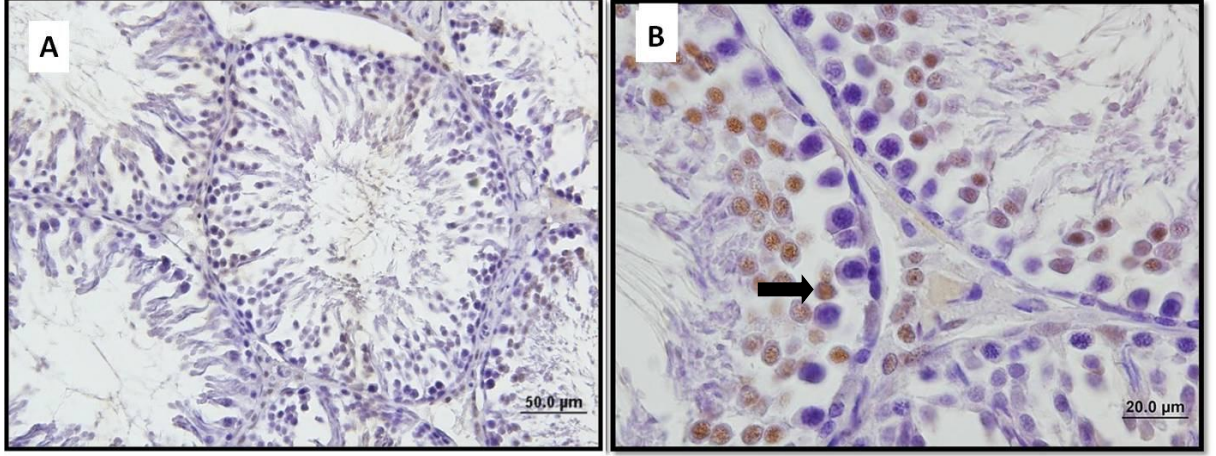
Şekil 42: Quercetin grubu testis kesiti. Az sayıda aktif Kaspaz 3 (+) hücreler (➡) görülmektedir. Aktif Kaspaz-3, A, x40 ve B, x100

D-Hipertiroidi Grubu; Bu gruba ait kesitleri incelediğimizde, dejenere olmuş çok sayıda seminifer tübül yapısı ve çok sayıda tunel (+) hücreler gözledik.



Şekil 43: Hipertiroidi grubu testis kesiti. Aktif Kaspaz 3 (+) hücre (➡) sayısında artış görülmektedir. Aktif Kaspaz-3, A, x40 ve B, x100

E- Hipertiroidi+Quercetin Grubu; Bu gruba ait kesitleri incelediğimizde, kaspaz(+) hücrelerin olduğunu ancak hipertiroidi grubuna göre büyük oranda azaldığını gözlemledik.



Şekil 44: Hipertiroidi+Quercetin grubu testis kesiti. Aktif Kaspaz 3 (+) hücrelerde (➡) azalma görülmektedir. Aktif Kaspaz-3, A, x40 ve B, x100

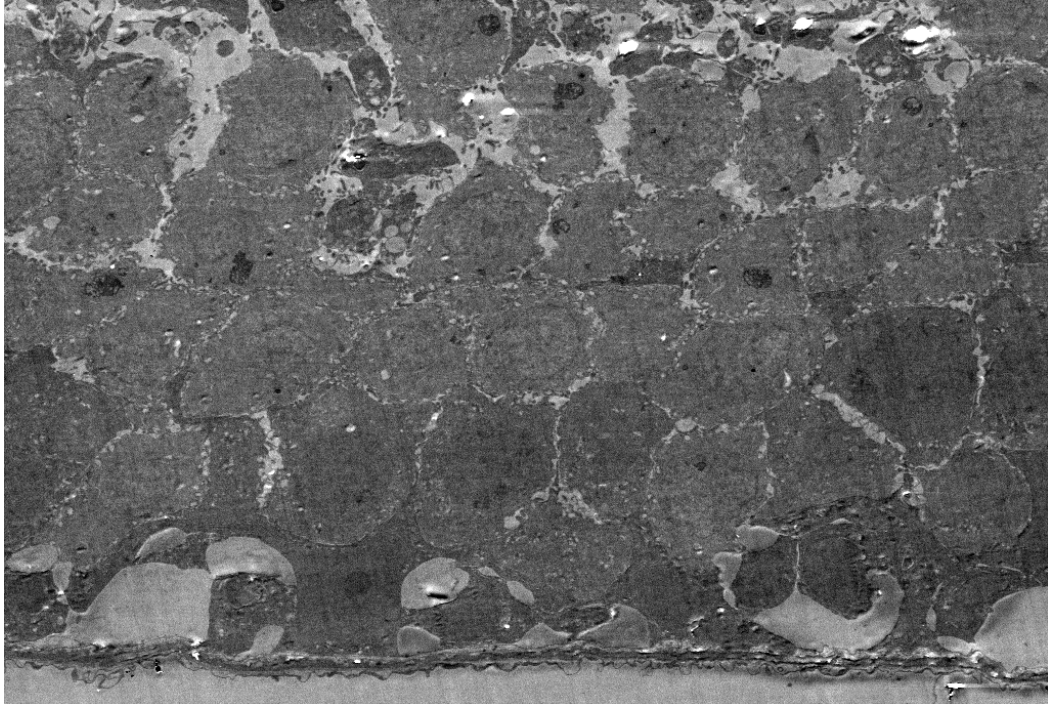
4.6. Ultrastrüktürel Bulgular

Kontrol grubuna ait elektron mikroskopik kesitlerin incelemesinde bazal membran üzerine oturan düzenli morfolojide spermatogonyumlar ve sertoli hücreleri gözlemlendi. Sertoli hücreleri arasında morfolojileri düzgün sıkı bağlantılar da mevcuttu. Primer spermatositler sertoli hücre sitoplazmalarıyla sarılı olarak gözlemlendi (Şekil 45).

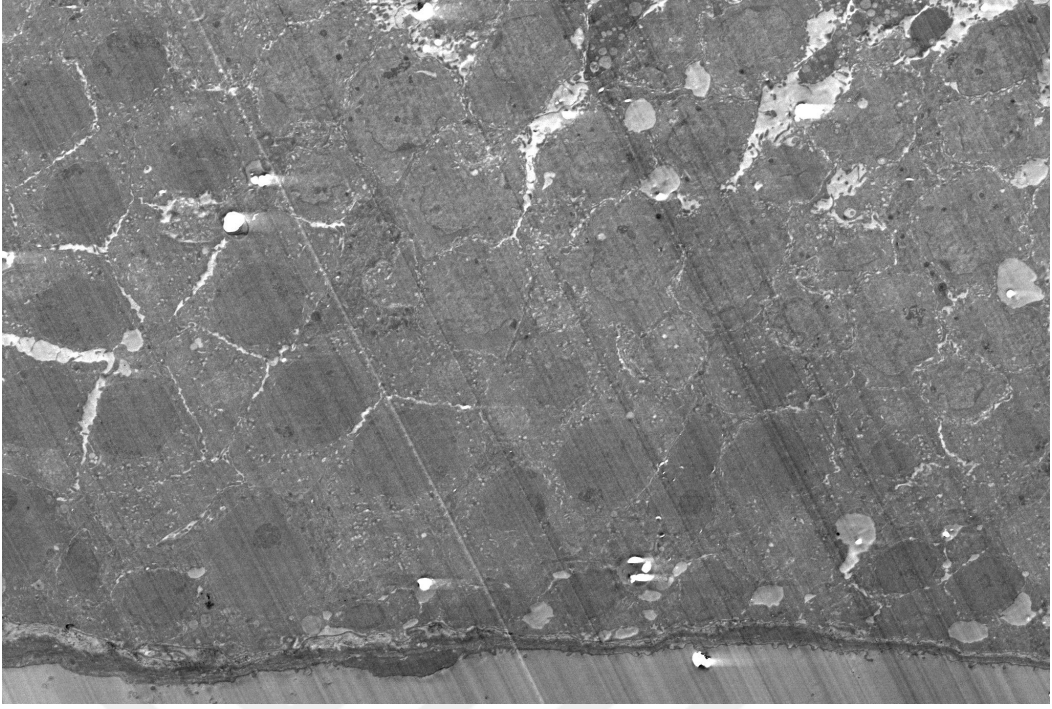
Sham ve Quercetin gruplarına ait kesitler incelendiğinde kontrol grubuna benzer bulgular gözlemlendi (Şekil 46-47).

Hipertiroidi grubuna ait kesitlerde birbirine komşu hücrelerin arasında boşluklar olduğu saptandı. Spermatogonyum, primer spermatositler ve sertoli hücrelerinde, sitoplazma ve hücre organellerinin kaybı sonucu büzüşme, ayrıca sitoplazmada lipid damlacıkları ile veziküller gözlemlendi (Şekil 48).

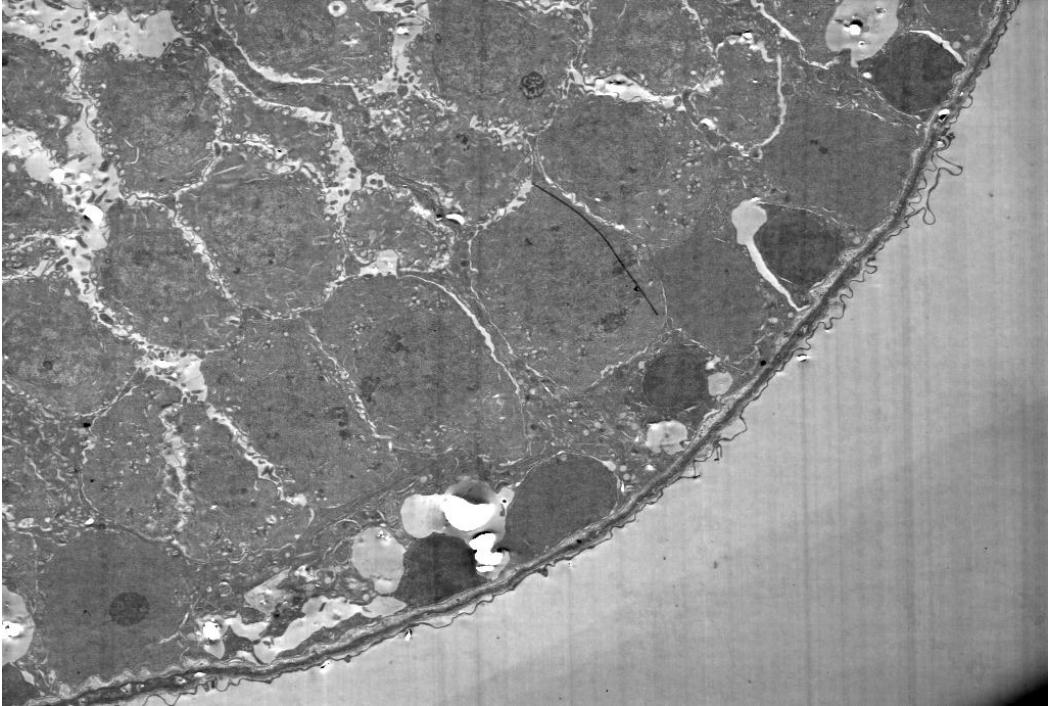
Hipertiroidi+Quercetin grubuna ait kesitlerde kontrol grubuna yakın görünüm olduğu saptandı. Bazal membranın kalınlığının normal olduğu ve hücreler arasında da boşlukların azaldığı gözlemlendi. Spermatogonyum, primer spermatositler ve sertoli hücrelerinde sitoplazmada lipid damlacıkları ve veziküllerin azaldığı gözlemlendi (Şekil 49).



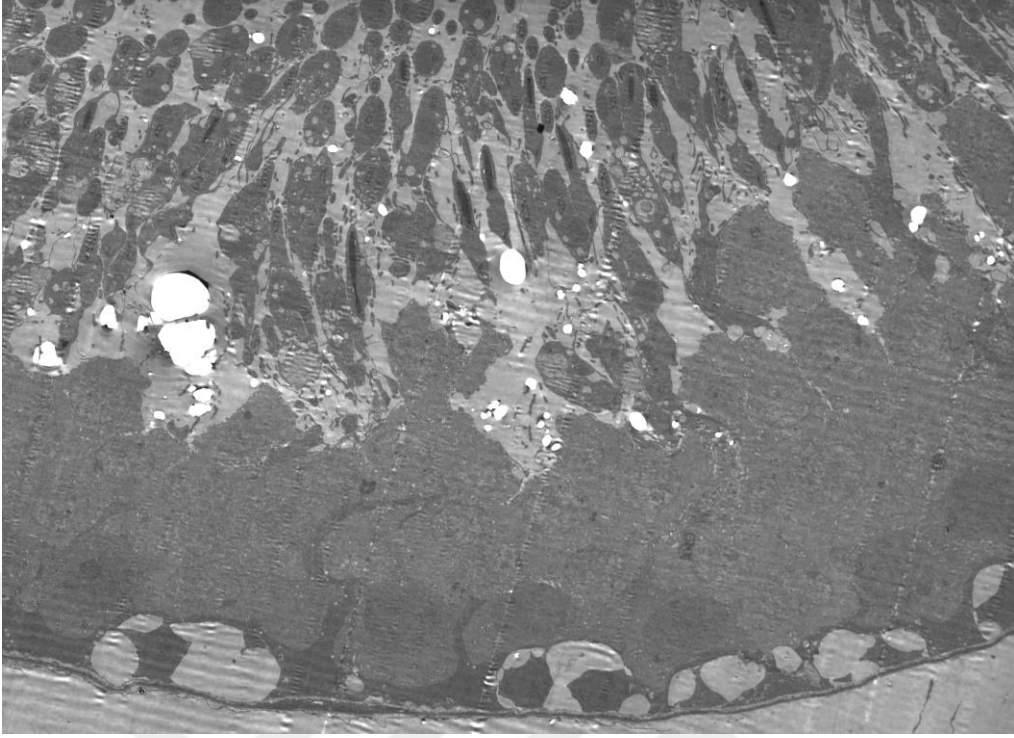
Şekil 45: Kontrol grubu testis kesiti. Bazal membran üzerine oturan sertoli hücresi, spermatogonyum ve primer spermatosit görülmektedir. Uranil Asetat-Kurşun Sitrat, X1000 büyütme.



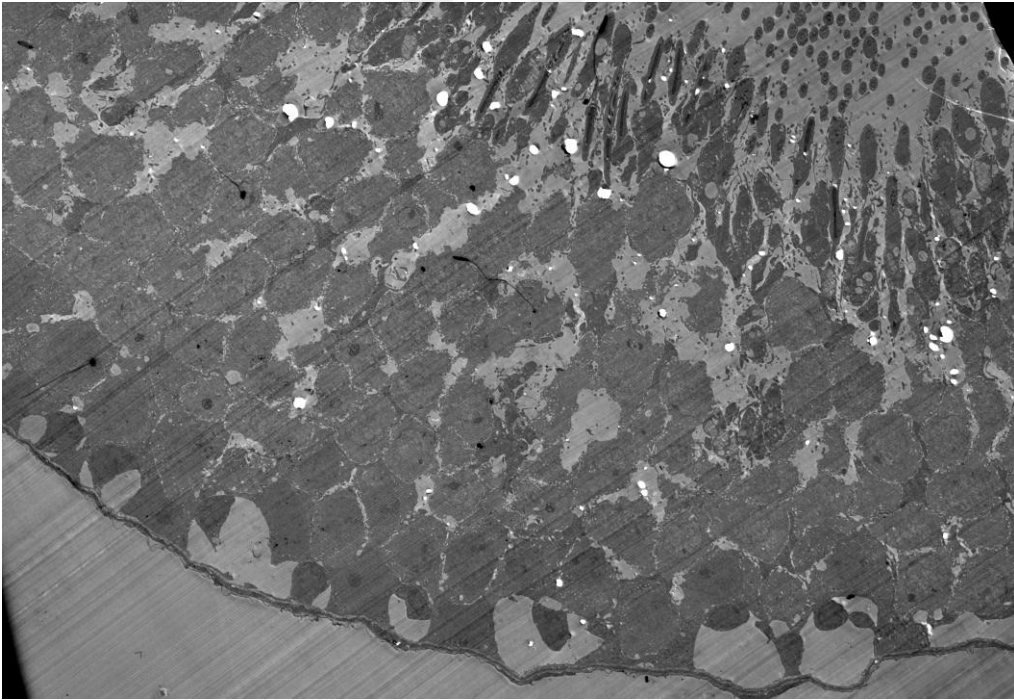
Şekil 46: Sham grubu testis kesiti. Bazal membran üzerine oturan sertoli hücresi, spermatogonyum ve primer spermatosit görülmektedir. Uranil Asetat-Kurşun Sitrat, X1000 büyütme.



Şekil 47: Quercetin grubu testis kesiti. Bazal membran üzerine oturan sertoli hücresi, spermatogonyum ve primer spermatosit görülmektedir. Uranil Asetat-Kurşun Sitrat, X1000 büyütme.



Şekil 48: Hipertiroidi grubu testis kesiti. Bazal membran incelmesi ve hücreler arasında boşluklar gözlenmektedir. Uranil Asetat-Kurşun Sitrata, X1000 büyütme.



Şekil 49: Hipertiroidi+Quercetin grubu testis kesiti. Bazal membran kalınlığının normal ve komşu hücrelerin hipertroidi grubuna göre birbirine daha yakın olduğu gözlenmektedir. Uranil Asetat-Kurşun Sitrata, X1000.

4.7. Biyokimyasal Bulgular

4.7.1. Serumda Yapılan Analizler

4.7.1.1. Serum TSH Düzeyi Değerlendirmesi

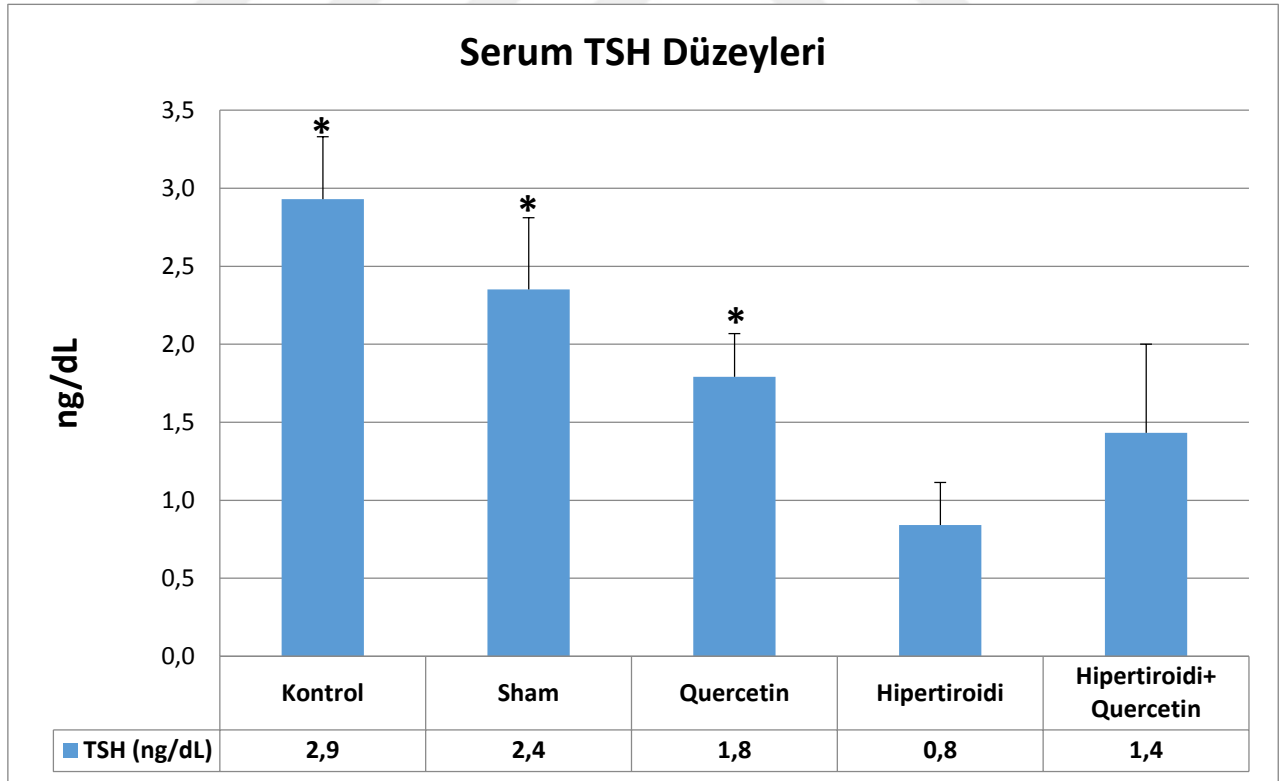
Serum TSH ölçümleri gruplar arası ortalamalar; Kontrol grubu $2,93 \pm 0,40$ ng/dl, Sham grubu $2,35 \pm 0,46$ ng/dl, Quercetin grubu $1,79 \pm 0,27$ ng/dl, Hipertiroidi grubu $0,84 \pm 0,27$ ng/dl ve Hipertiroidi+Quercetin grubu $1,43 \pm 0,57$ ng/dl olarak bulundu.

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,40$, $p=0,07$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,004$, $p=0,018$, $p=0,018$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,025$). Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Sham grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,064$).

Hipertiroidi ile Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,406$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 50)



Şekil 50: Grupların serum TSH düzeyleri

*; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$).

4.7.1.2. Serum T3 Düzeyi Değerlendirmesi

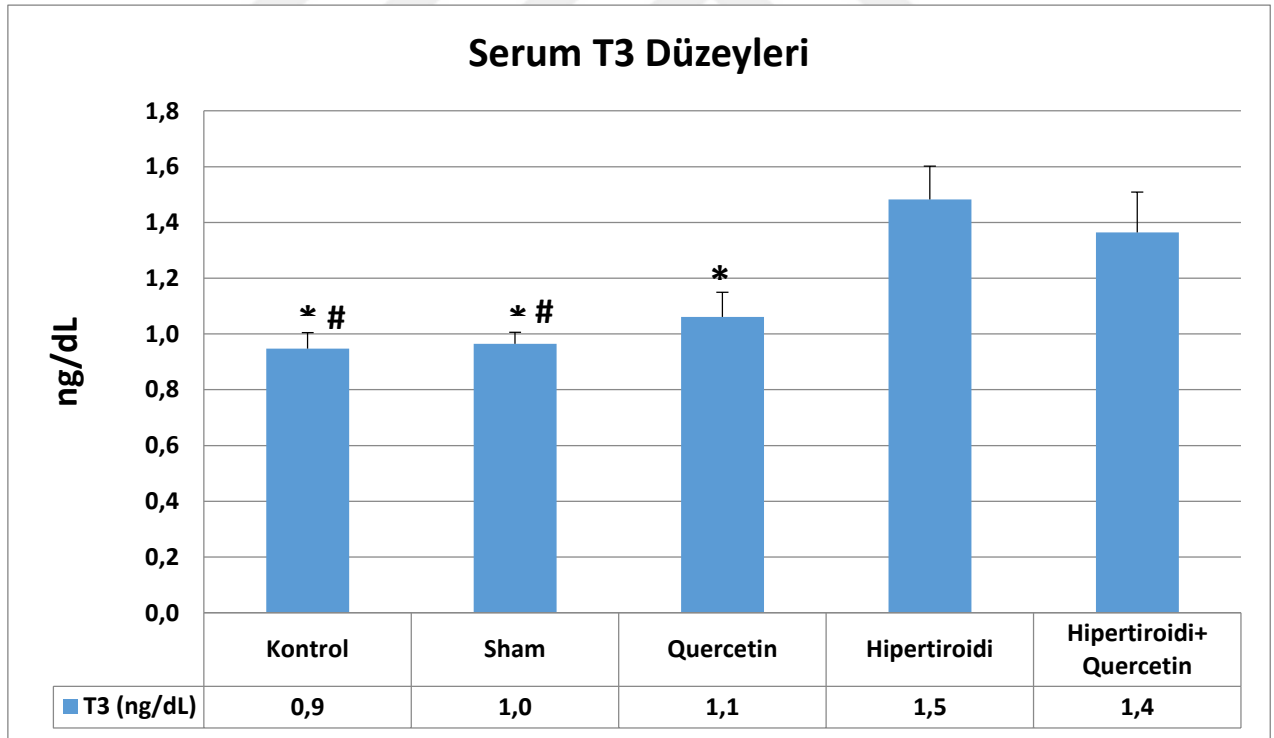
Gruplar arası serum T3 düzeyi ortalamaları; Kontrol grubu $0,94 \pm 0,05$ ng/dl, Sham grubu $0,96 \pm 0,04$ ng/dl, Quercetin grubu $1,06 \pm 0,08$ ng/dl, Hipertiroidi grubu $1,48 \pm 0,11$ ng/dl ve Hipertiroidi+Quercetin grubu $1,36 \pm 0,14$ ng/dl olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,52$, $p=0,24$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,04$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol ve Sham grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,035$, $p=0,04$).

Hipertiroidi grubu ile Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,74$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil51)



Şekil 51: Grupların serum T3 düzeyleri

*; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#,Hipertiroidi+Quercetin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup($p<0,05$)

4.7.1.3. Serum T4 Düzeyi Değerlendirmesi

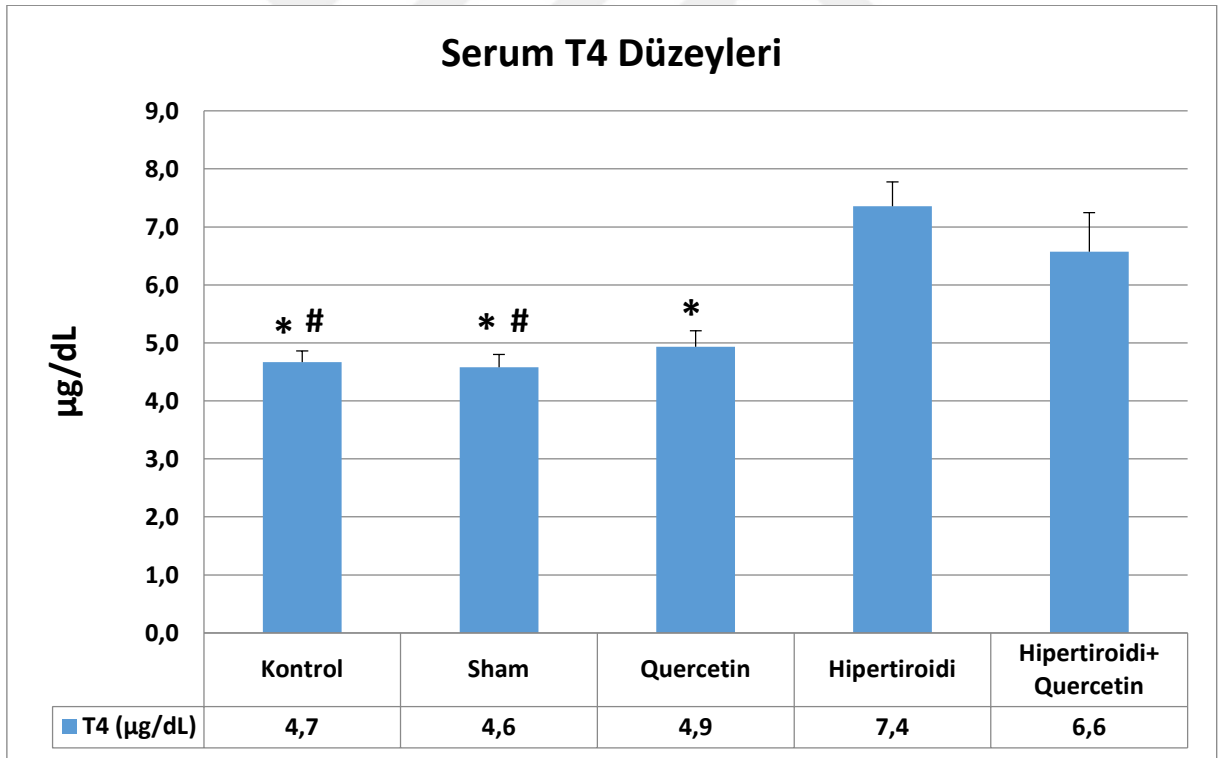
Gruplar arası serum T4 düzeyi ortalamaları; Kontrol grubu $4,66 \pm 0,19$ $\mu\text{g/dl}$, Sham grubu $4,57 \pm 0,22$ $\mu\text{g/dl}$, Quercetin grubu $4,93 \pm 0,27$ $\mu\text{g/dl}$, Hipertiroidi grubu $7,35 \pm 0,41$ $\mu\text{g/dl}$ ve Hipertiroidi+Quercetin grubu $6,57 \pm 0,67$ $\mu\text{g/dl}$ olarak bulundu.

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,84$, $p=0,27$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,002$, $p=0,002$, $p=0,015$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol ve Sham grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,018$, $p=0,015$).

Hipertiroidi grubu ile Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,27$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil52)



Şekil 52: Grupların serum T4 düzeyleri

*, Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#, Hipertiroidi+Quercetin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

4.7.1.4. Serum Testosteron Düzeyi Değerlendirmesi

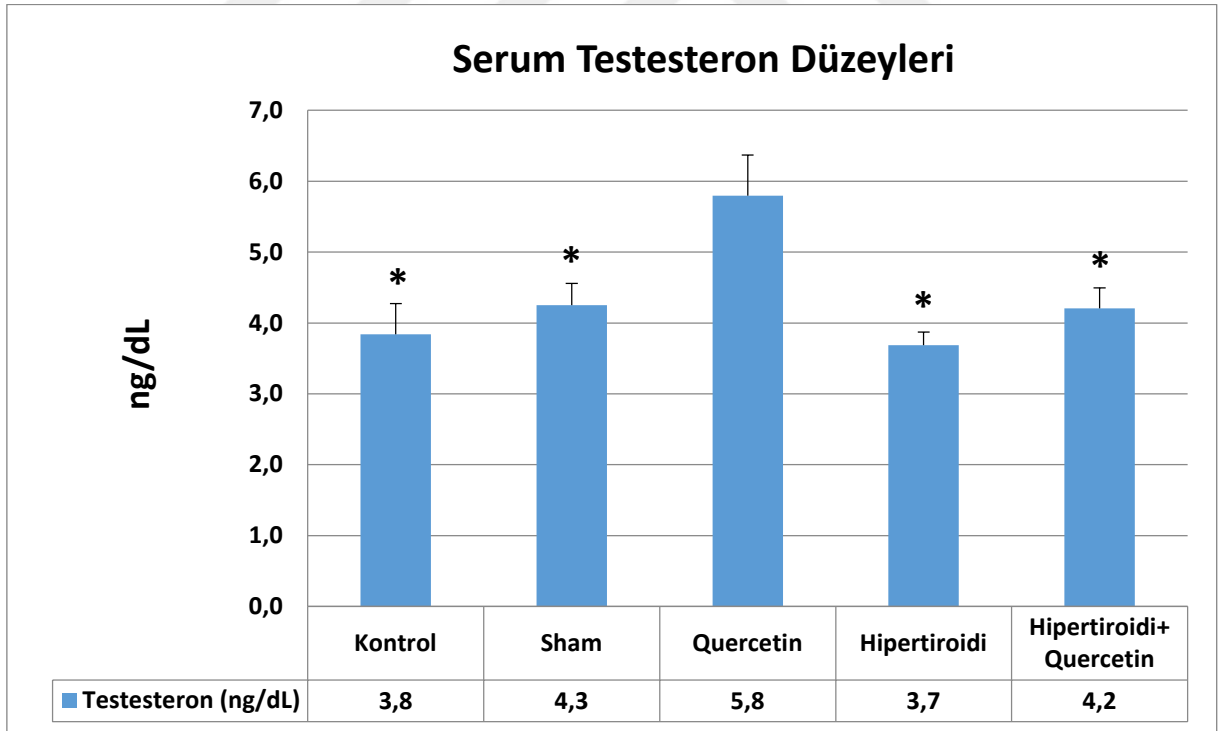
Gruplar arası serum testesteron düzeyi ortalamaları;

Kontrol grubunda $3,83 \pm 0,43$ ng/dl, Sham grubunda $4,25 \pm 0,30$ ng/dl, Quercetin grubunda $5,79 \pm 0,57$ ng/dl, Hipertiroidi grubunda $3,68 \pm 0,18$ ng/dl ve Hipertiroidi+Quercetin grubunda $4,20 \pm 0,28$ ng/dl olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu ile Sham, Hipertiroidi ve Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,338$, $p=0,565$, $p=0,338$).

Quercetin grubu ile Kontrol, Sham, Hipertiroidi ve Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında Quercetin grubunda diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,025$, $p=0,025$, $p=0,025$, $p=0,035$).

Hipertiroidi grubu ile Sham ve Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,225$, $p=0,110$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 53)



Şekil 53: Grupların serum testesteron ölçüm değerleri.

*; Quercetin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$).

4.7.2. Doku Homojenat Analizi

4.7.2.1. MDA Değerlendirmesi

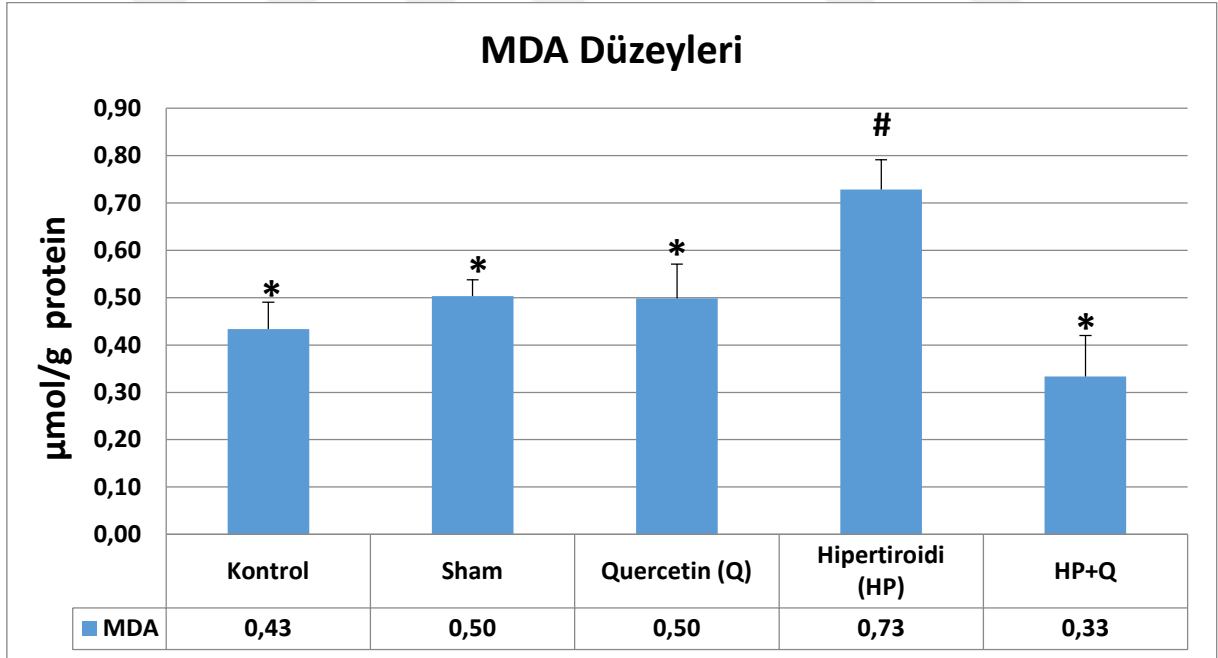
Gruplar arası MDA düzeyi ortalamaları; Kontrol grubu $0,43 \pm 0,05$ $\mu\text{mol/g}$ protein, Sham grubu $0,50 \pm 0,03$ $\mu\text{mol/g}$ protein, Quercetin grubu $0,49 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/g}$ protein, Hipertiroidi grubu $0,72 \pm 0,06$ $\mu\text{mol/g}$ protein, Hipertiroidi+Quercetin grubu $0,33 \pm 0,08$ $\mu\text{mol/g}$ protein olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,14$, $p=0,33$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,006$, $p=0,006$, $p=0,048$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,224$, $p=0,141$, $p=0,110$).

Hipertiroidi grubu ile Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi+Quercetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,009$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 54)



Şekil 54: Gruplara göre MDA değerleri

*; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$).

#, Hipertiroidi+Quercetin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

4.7.2.2. SOD Değerlendirmesi

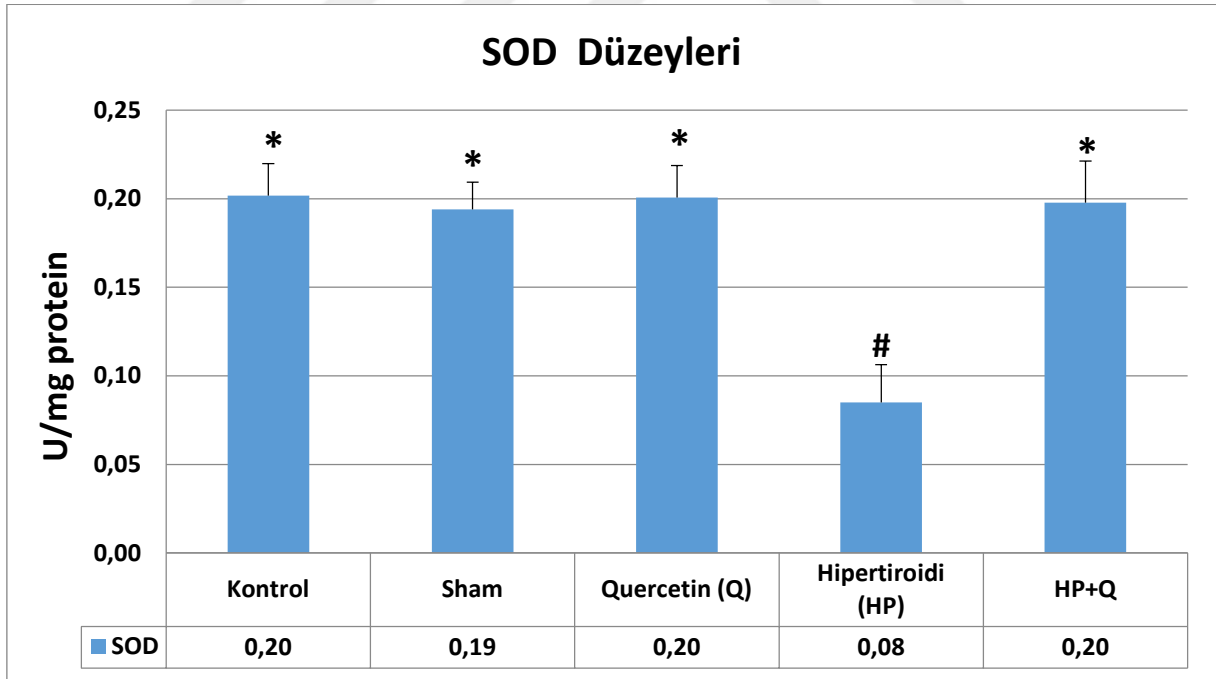
Gruplar arası SOD düzeyi ortalamaları; Kontrol grubu $0,2\pm0,01$ U/mg, Sham grubu $0,19\pm0,01$ U/mg, Quercetin grubu $0,2\pm0,01$ U/mg, Hipertiroidi grubu $0,08\pm0,02$ U/mg, Hipertiroidi+Quercetin grubu $0,19\pm0,02$ U/mg olarak bulundu.

Kontrol grubu ile Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,94$, $p=1,00$).

Hipertiroidi grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında Hipertiroidi grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma bulundu ($p=0,003$, $p=0,003$, $p=0,003$).

Hipertiroidi+Quercetin grubu ile Kontrol, Sham ve Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,84$, $p=0,74$, $p=0,65$).

Hipertiroidi grubu ile Hipertiroidi+Quercetin grubu karşılaştırıldığında Hipertiroidi+Quercetin grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,005$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil55)



Şekil 55: Gruplara göre SOD değerleri

*; Hipertiroidi grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

#, Hipertiroidi+Quercetin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

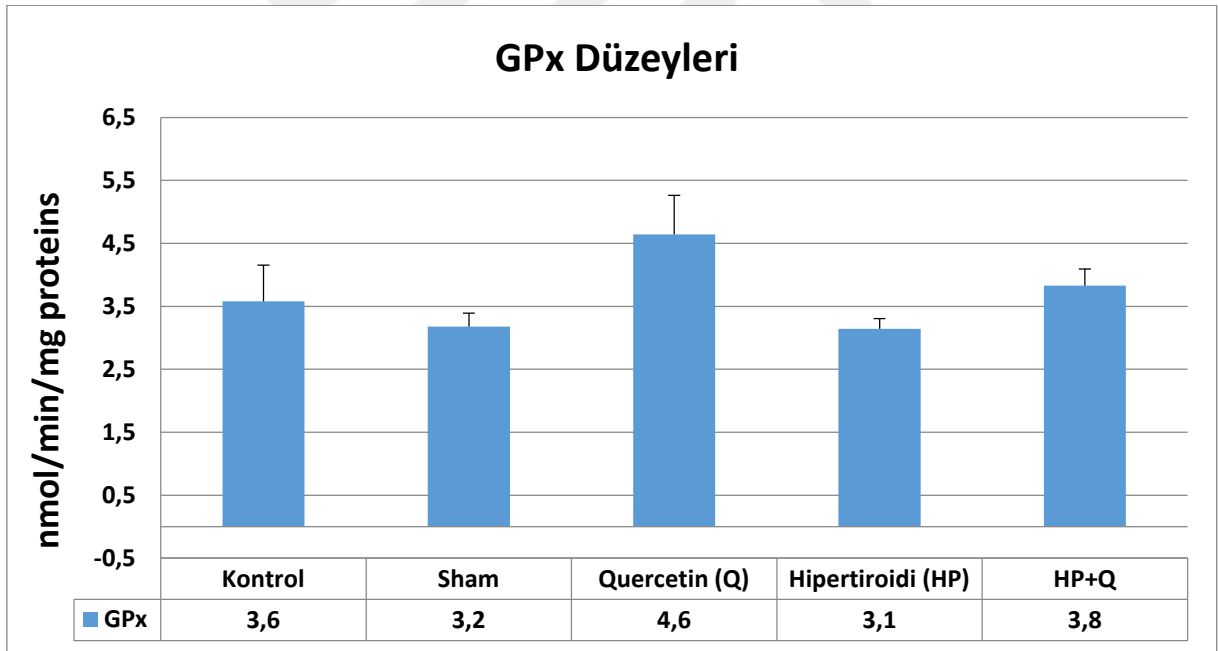
4.7.2.3. GPx Değerlendirmesi

Gruplar arası GPx düzeyi ortalamaları; Kontrol grubu $3,58 \pm 0,57$ nmol/min/mg protein, Sham grubu $3,17 \pm 0,21$ nmol/min/mg protein, Quercetin grubu $4,64 \pm 0,62$ nmol/min/mg protein, Hipertiroidi grubu $3,14 \pm 0,16$ nmol/min/mg protein ve Hipertiroidi+Quercetin grubu $3,82 \pm 0,26$ nmol/min/mg protein olarak belirlendi. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü.

Kontrol grubu ile Sham, Quercetin, Hipertiroidi ve Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,443$, $p=0,338$, $p=0,565$, $p=0,749$).

Hipertiroidi grubu ile Sham, Quercetin ve Hipertiroidi+Quercetin grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,749$, $p=0,18$, $p=0,11$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 56)



Şekil 56: Gruplara göre GPx değerleri

5.TARTIŞMA

Tiroid hormonları büyüme ve gelişme için gerekli olmakla birlikte neredeyse tüm memeli dokularında enerji metabolizmasının düzenlenmesinde temel rol oynar (70). Son yıllarda yapılan deneysel çalışmalar, tiroid hormonunun üreme yetersizliği üzerine önemli etkisinin olduğunu ortaya koymuştur (44,71).

Hipertiroidi üreme sistemi ile birlikte birçok sistemi içeren, tiroid hormon sentezinin artışıyla ortaya çıkan klinik bir tablodur (16). Yapılan çalışmalarda erişkin dönemde oluşan hipertiroidinin, testis dokusunda spermatogenez, spermiyogenez ve steroid hormon metabolizmasını olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir (49).

Quercetin antioksidatif ve antikarsinojenik özellikleri bulunan, in vitro ve in vivo olarak reaktif oksijen türlerinin azaltılmasında etkili güçlü antioksidanlardan biridir (72). Farmakolojik çalışmalarda kardiyoprotektif ve antiapoptotik ajan özelliklerinin olduğu gösterilmiş ve akciğer hasar modellerinde koruyucu ajan olarak kullanılmıştır (73). Sanders RA. ve ark. yaptıkları çalışmada quercetin'in etkilerinin histopatolojik olarak olumlu yönde değişikliğe neden olduğunu göstermişlerdir (74).

Biz de çalışmamızda deneysel erişkin sıçan hipertiroidi modelinde quercetin testis dokusundaki etkisini incelemeyi amaçladık. Deneysel çalışmalarda hipertiroidi oluşturulan erkek sıçanlarda testis ağırlığı, denek ağırlıkları, apoptoz belirteçleri ve biyokimyasal parametreler ile çalışmalar desteklenmiştir. Bizim çalışmamızda da bu öğeler testis yapısı, testis tübül hasarı ve antioksidan etkinliğini değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır.

Vücut metabolizmasının hızlanmasıyla ilgili karakterize edilen hipertiroidi çalışmalarında, Guilherme C. ve ark'larının yapmış oldukları çalışmada 14 gün boyunca Wistar suşu sıçanlara günde 10 µg/kg, 25 µg/kg ve 50 µg/kg olmak üzere farklı dozlarda intraperitoneal olarak L-Thyroxine uygulamışlardır. Deney sonunda 10 µg/kg ve 50 µg/kg uygulanan deneklerin başlangıç ağırlığına kıyasla vücut ağırlıklarında anlamlı bir artış gözlenmiştir (75).

Asker M.E. ve ark. yapmış oldukları deneysel çalışmalarında Wistar suşu erkek sıçanlara 3-8 hafta boyunca günde 300µg/kg olmak üzere intraperitoneal olarak L-T4

uygulamışlardır. Deney sonunda 3 hafta boyunca L-T4 uygulanan gruptaki deneklerin başlangıç ağırlığına kıyasla vücut ağırlıklarında artış olmuştur (16).

Na W. ve ark yapmış oldukları deneysel çalışmalarında Spraque Dawley sıçanlara 14 gün boyunca subkutan olarak günde 0,25 mg/kg T4 uygulamışlardır. 14.günde T4 uygulanan gruptaki deneklerin başlangıç ağırlıklarına göre kıyaslandığında vücut ağırlıklarında artış olduğu gözlenmiştir (76).

Gonzales C.R. ve ark yapmış oldukları çalışmalarında ötiroid sıçanların vücut ağırlıklarında normal bir artış gözlerken, T4 uygulanan gruptaki sıçanların 21 günlük uygulamadan sonra kilo artışında belirgin bir azalma olduğunu belirlemişlerdir (77).

7 gün boyunca intraperitoneal olarak, günde 80 µg/kg T3 uygulanmış olan deneklerde Zamoner A. ve ark. T3 uygulanan hipertiroidi grubundaki deneklerin deney sonunda başlangıç ağırlıklarına oranla vücut ağırlıklarında anlamlı azalma olduğunu belirlemişlerdir (78).

Biz de yapmış olduğumuz çalışmada Wistar suşu sıçanlara 21 gün boyunca 0,3 mg/kg T4 intraperitoneal olarak uyguladık. 21 gün sonunda hipertiroidi grubunda deneklerin başlangıç ağırlıklarına kıyasla vücut ağırlıklarında anlamlı artış olduğunu belirledik. Bu sebeple yapmış olduğumuz çalışma daha önce yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir.

Asker M.E. ve ark. çalışmalarında Wistar suşu erkek sıçanlara 3 ve 8 hafta boyunca 300 µg/kg L-T4 uygulaması yapmışlardır. L-T4 uygulanan gruptaki deneklerin deney sonunda testis ağırlıklarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak azaldığını gözlemlemişlerdir. (16)

Zamoner A. ve ark çalışmalarında Wistar suşu erkek sıçanlara 7 gün boyunca intraperitoneal olarak, günde 80 µg/kg T3 uygulamışlardır. Deney sonunda hipertiroidi grubundaki deneklerin testis ağırlıklarının, kontrol grubundaki deneklerin testis ağırlığına göre artmış olduğunu göstermişlerdir (78).

Korejo N.A. ve ark çalışmalarında 6 haftalık Mus musculus cinsi farelere intraperitoneal olarak 0,3 mg/kg L-T4 uygulamışlardır. Hipertiroidi grubuna ait deneklerin testis ağırlıklarında, kontrol grubuna kıyasla azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirtilmiştir (79).

Biz yapmış olduğumuz bu çalışmada, 21 gün sonunda hipertiroidi grubundaki deneklerin testis ağırlıklarının, kontrol ve sham grubuna göre anlamlı derecede azaldığını gözlemledik.

Özgüner M. ve ark yaptıkları deneysel çalışmaları Wistar suşu sıçanları kullanarak iki farklı hipertiroidi grubu oluşturmuşlardır. Bir hipertiroidi grubuna 10 gün boyunca günde bir defa subkutan olarak 250 mcg/kg L-tiroksin uygulamışlar, diğer gruba ise 20 gün boyunca günde bir defa subkutan olarak 250 mcg/kg L-tiroksin uygulaması yapmışlardır. Seminifer tübül epiteli sınırlarının düzgün olduğu ve germ hücrelerinin düzenli dizildiği kontrol grubuna göre, hipertiroidi gruplarında seminifer tübül epitelinin sınırlarının düzgün olmasına rağmen, germ hücre diziliminin bozulduğunu ve spermiyogenezin duraksadığını belirtmişlerdir (80).

Dahmani M. ve ark yapmış oldukları çalışmada, Wistar suşu sıçanlara 20 gün, 40 gün ve 60 gün olmak üzere 3 farklı sürede 20 mg/100mg olacak şekilde tiroksin uygulamışlardır. 20 ve 40 gün tiroksin uygulanan gruplarda, kontrol grubuna göre seminifer tübül çapında azalma olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca 20 gün tiroksin uygulanan grupta lümen çaplarında da azalma olduğunu belirtmişlerdir (67).

Fadlala MB ve ark yapmış oldukları deneysel çalışmaları, Sprague Dawley cinsi sıçanlara günde 20 µg /100g olacak şekilde L-tiroksini subkutan olarak uygulamışlardır. Prepubertal sıçanlara 20.günden başlayarak 70. güne kadar bu uygulamayı yapmışlardır. Seminifer tübül çapı değerlendirilmesinde tübül çapının kontrol grubuna göre hipertiroidi grubunda anlamlı bir artış olduğunu gözlemişlerdir. İnterstitiyel alanda Leydig hücrelerinde, kontrol grubuna göre hipertiroidi grubunda arttığı ve testiküler hasarla birlikte germ hücrelerinin sayısının azaldığını gözlemişlerdir (17).

Souhila DS. ve ark yaptıkları çalışmada, Wistar suşu sıçanlara 20 ve 40 günlük olmak üzere iki farklı periyotta günde 20 µg/100 g L-tiroksin uygulaması yapmışlardır. Histomorfometrik değerlendirmelerinde seminifer tübül çapı ve bazal membran kalınlığının her iki hipertiroidi grubunda kontrol grubuna göre azaldığı gözlenmiştir. Işık mikroskopi değerlendirmelerinde hipertiroidi gruplarında, germ hücre maturasyonunun bozulduğu, interstitiyel alanda ödem, Leydig hücrelerinde azalma, bağ dokusunda artış ve tübül dejenerasyonu gözlenmiştir (81).

Biz de yaptığımız çalışmada, yapılan çalışmalara benzer olarak histomorfometrik ve histolojik bulgulara hipertiroidi grubunda seminifer tübül çapı ve bazal membran kalınlığında azalma, bağ dokuda artış, germ hücreleri maturasyonunda dejenerasyon, germ hücre sitoplazmalarında şiddetli vakuolizasyon ve seminifer epitelinde dökülme olduğunu gözledik.

Faraone-Mennella M.R. ve ark yaptıkları deneysel çalışmalarında, Wistar suşu sıçanlara günde bir defa 10 µg/100 g T3 10 gün boyunca uygulanmıştır. T3 verilerek hipertiroidi oluşturulan bu gruptaki sıçanlarda tunel yöntemi ile apoptozis bulgularının kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğunu belirlemişlerdir (82).

Biz de çalışmamızda, sınırlı sayıdaki çalışmalara benzer olarak tunel yöntemi ile apoptozis bulgularının kontrol grubuna göre yüksek olduğunu gözledik.

Asker M.E. ve ark. yapmış oldukları çalışmalarında, L-T4 uyguladıkları hipertiroidi grubundaki deneklerin T3 ve T4 hormon seviyelerinde, kontrol grubuna göre anlamlı azalma olduğunu belirtirken, TSH hormon seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik olmadığını göstermişlerdir (16).

Guilherme C. ve ark. çalışmalarında T4 uyguladıkları hipertiroidi grubundaki deneklerin T3 ve T4 hormon seviyelerinde, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış olduğunu belirtmişlerdir (75).

Bhatt P.A. ve ark. yapmış oldukları deneysel çalışmalarında, Wistar suşu sıçanlara 3 hafta boyunca subkutan olarak 0,75 mg/kg L-tiroksin uygulamışlardır. 3 hafta sonunda hipertiroidi grubuna ait deneklerin serum T3 ve serum T4 hormon seviyeleri, kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, serum TSH hormon seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma olduğunu belirtmişlerdir (71).

Ourigue G.M. ve ark çalışmalarında Wistar suşu sıçanlara 6 hafta boyunca intraperitoneal olarak 100 µg/kg T3 uygulamışlardır. 6 hafta sonunda hipertiroidi grubuna ait deneklerin serum T3 değerleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak artarken, serum TSH değerlerinde kontrol grubuna göre bakıldığında hipertiroidi grubunda anlamlı olarak azaldığını belirtmişlerdir (83).

Özdemir S. ve ark yaptıkları deneysel çalışmalarında, Wistar albino cinsi sıçanlara 20 gün boyunca her gün 0,4 mg/100 g yem olacak şekilde L-tiroksin

uygulamışlardır. 20 günün sonunda hipertiroidi grubuna ait deneklerin serum T3 ve serum T4 hormon değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı derecede artarken, serum TSH değerlerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığını belirtmişlerdir (84).

Baltaci AK. ve ark çalışmalarında Spraque Dawley cinsi sıçanlara 2 hafta süreyle, günde 0.3 mg/kg intraperitoneal olarak T4 uygulaması yapmışlardır. Serum T3, T4 ve testosteron düzeylerinin kontrol grubuna göre hipertiroidi grubunda anlamlı olarak arttığını göstermişlerdir (85).

Keshavarz S. ve ark yapmış oldukları deneysel çalışmalarında Spraque Dawley suşu sıçanlara 4 hafta boyunca oral gavaj ile 300 µg/kg L-tiroksin uygulayarak hipertiroidi oluşturmuşlardır. Deney sonunda, vücut ağırlığının hipertirodi grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını göstermişlerdir. Serum T3 ve serum T4 seviyelerinde ise kontrol grubuna göre hipertiroidi grubunda anlamlı bir artış olduğunu belirtmişlerdir (86).

Biz de yaptığımız çalışmada benzer şekilde T4 uygulaması ile hipertiroidi grubunda serumda T3 ve T4 düzeylerinin kontrol ve sham grubuna göre anlamlı azaldığı, serum TSH düzeylerinin ise kontrol ve sham grubuna göre anlamlı arttığını gözledik. Çalışmamızda quercetin uygulamasının T3 ve T4 düzeylerini artırdığı, TSH düzeyini azalttığı ancak bu artış ve azalmanın anlamlı olmadığı görüldü.

Korejo NA ve ark yaptıkları çalışmada 6 haftalık Mus Musculus farelerine 0,3 mg/kg LT4 uygulayarak hipertiroidi oluşturmuşlardır. Serum testosteron düzeyinin kontrol grubuna göre hipertiroidi grubunda artmış olduğunu belirtmişlerdir (79).

Beltagy DM. ve ark çalışmalarında Spraq Dawley cinsi sıçanlara 4 hafta boyunca günde 100 µg/kg L-tiroksin uygulayarak hipertiroidi oluşturmuşlardır. Serum testosteron düzeyinin kontrol grubuna göre hipertiroidi grubunda arttığını gözlemlemişlerdir (87).

Fadlala MB ve ark deneysel çalışmalarında, deneklere 50 gün boyunca günde 20mg/100g L-T4 subkutan olarak uygulayarak hipertiroidi oluşturmuşlardır. Serum testosteron düzeyinin kontrol grubuna göre hipertiroidi oluşturulan grupta arttığını belirtmişlerdir (17).

Souhila DS ve ark çalışmalarında, wistar suşu sıçanlara 20 gün boyunca günde 20mg/100 mg tiroksin uygulaması yapmışlar ve serum testosteron düzeyinin kontrol grubuna göre hipertiroidi oluşturulan grupta anlamlı olarak azaldığını belirtmişlerdir (81).

Biz çalışmamızda, hipertiroidi ve kontrol gruplarında testosteron düzeyinin etkilenmediğini gördük.

Daha önce yapılan çalışmada quercetin uygulanan sıçanların, plazma MDA düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşük olduğu gösterilmiştir. Duarte ve ark. 5 hafta boyunca quercetin uygulamasından sonra sıçanlardaki MDA üretiminin azaldığını ortaya koymuşlardır (77-78, 88).

SOD ve GPx enzmi düzeylerinin ise quercetin uygulanan sıçanlarda enzim düzeylerinin arttığı bulunmuştur (89-92). Bizim de yapmış olduğumuz çalışma paralellik göstermektedir.

Auharek ve França, hipertiroidi ile gelişen testiküler hasarı elektron mikroskopi düzeyde incelediklerinde germ hücre sitoplazmalarında şiddetli vakuolizasyon, lamina propria kaybı ve yer yer kollajen artışı, spermatidlerde yapısal bozukluk, sertoli hücrelerin sitoplazmalarında lipid birikimi ve lipofuksin granüllerinde artış gözlemişlerdir (93).

Zamoner ve arkadaşları çalışmalarında intersitisyel alanda kan damarlarında kalınlaşmayı tespit etmişlerdir. Damarlarda artan kalınlaşma ile seminifer tübüllere kan akışının azalması nedeniyle tubülüs atrofi oluştuğunu saptamışlardır (92). Yaptığımız elektron mikroskobik incelemeler, ışık mikroskopi ve biyokimyasal analizlerden elde ettiğimiz bulguları desteklemektedir. Hipertiroidinin, literatürle benzer şekilde testis dokusunda hasar oluşturduğu tespit edildi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak oluşturulan hipertiroidi modelinin daha önce yapılan çalışmalarda olduğu gibi testis dokusunda hasar oluşturduğu yaptığımız bu çalışma ile gösterilmiştir.

Literatürde hipertiroidinin testiste oluşan hasara Quercetin'in etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız literatürdeki bu boşluğu dolduracaktır. Hipertiroidi modeli ile oluşan hasara karşı quercetin'in etkisi histokimyasal, immünohistokimyasal, ultrastrüktürel olarak ilk kez bizim çalışmamızda incelenmiştir.

Bu bilgiler ve bulgular, sıçanlarda deneysel olarak oluşturulan hipertirodi modeline bağlı hasarda, quercetin uygulamasının umut verici bir tedavi yöntemi olabileceğini göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Lim HJ, Ahn SH, Suh YJ. The Relationship between Subclinical Thyroid Disease and Cardiovascular Disease Risk Score in Koreans. *J Korean Med Sci.* 2017;32(10):1626-1632.
2. Beyer C, Plank F, Friedrich G. Effects of Hyperthyroidism on Coronary Artery Disease: A Computed Tomography Angiography Study. *Can J Cardiol.* 2017; 33(10):1327-1334.
3. Osuna PM, Udovcic M, Sharma MD. Hyperthyroidism and the Heart. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2017;13(2):60-63.
4. Hamlaoui ML, Ayachi A, et al. Relationship of metabolic syndrome and its components with thyroid dysfunction in Algerian patients. *Diabetes Metab Syndr.* 2017 ;10. pii: S1871-4021(17)30264-3.
5. Damiano F, Rochira A, et al. Action of thyroid hormones, T3 and T2, on hepatic fatty acids: Differences in metabolic effects and molecular mechanism. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4).
6. Báñez-López S, Guadaño-Ferraz A. Thyroid Hormone Availability and Action during Brain Development in Rodents. *Front Cell Neurosci.* 2017;11:240.
7. Williams GR, Bassett JHD, Thyroid diseases and bone health. *J Endocrinol Invest.* 2017 doi: 10.1007/s40618-017-0753-4. [Epub ahead of print]
8. Deng D, Sun L, Xia T, et al. Systemic lupus erythematosus and renal tubular acidosis associated with hyperthyroidism. *Neuro Endocrinol Lett.* 2016;37(3):169-173.
9. Ross MH, Pavlina W (Çeviri: Baykal B) *Histoloji* 6. Baskıdan çeviri Palme Yayıncılık 2014; 784-828.
10. Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi 8. Baskıdan çeviri; Nobel tıp yayınları 2008; 262-273.
11. William KO, Patrick CN (Çeviri; Müftüoğlu S, Kaymaz S, Atilla P). *Netter Temel*

Histoloji Saunders Elsevier, Güneş Kitabevleri 2009: 377-99.

12. Paker Ş, Genel Histoloji; Uludağ üniversitesi güçlendirme vakfı yayın UÜİBF işletme iktisadi ve muhasebe araştırma merkezi 1990; 32: 260-289.

13. Delilbaşı L, İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri, Güneş Kitabevleri 2008; 105-117.

14. Şeftalioğlu A, Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi 3.Baskı, Ankara Tıp ve Teknik yayıncılık Ltd Şti, 1998; 348-50.

15. L. Kierszenbaum A, Histoloji ve Hücre Biyolojisi, Palme Yayıncılık 2006; 531-563

16. Asker M.E. Hassan W.A, Kashlan A.M. Experimentally induced hyperthyroidism influences oxidant and antioxidant status and impairs male gonadal functions in adult rats. *Andrologia* 2015; 47(6):644-54.

17. Fadlalla MB, Wei Q, et al. Effects of hyper- and hypothyroidism on the development and proliferation of testicular cells in prepubertal rats. *Anim Sci J*. 2017 doi: 10.1111/asj.12883. [Epub ahead of print]

18. Aliyev E, Yıldırım A, et al. Hipertiroidili Rat Akciğer Dokusunda Oksidatif Stres Parametreleri Üzerine Egzersizin Etkisi. *Türk Klinik Biyokimya Deg* 2014; 12(1):9-14.

19. Chen H, Lu C, Liu H, Wang M, Zhao H, Yan Y, Han L. Quercetin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice via the NF- κ B pathway *2017*;48:110-117.

20. Huang S, Zhu X, Huang W, He Y, Pang L, Lan X, et al. Quercetin Inhibits Pulmonary Arterial Endothelial Cell Transdifferentiation Possibly by Akt and Erk1/2 Pathways. *Biomed Res Int*. 2017; 2017:6147294.

21. Wu L, Zhang Q, Mo W, Feng J, Li S, Li J, Liu T, Xu S, Wang W, et al. Quercetin prevents hepatic fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation and reducing autophagy via the TGF- β 1/ Smads and PI3K/Akt pathways. *Sci Rep*. 2017; (1):9289.

22. Casas-Grajales S, Vázquez-Flores LF, Ramos-Tovar E, et al. Quercetin reverses experimental cirrhosis by immunomodulation of the proinflammatory and profibrotic processes. *Fundam Clin Pharmacol*. 2017; 31(6):610-624.

23. Dogan Z, Elbe H, Taslidere E, Soysal H, Cetin A, et al. Effects of ciprofloxacin on fetal rat liver during pregnancy and protective effects of quercetin. *Biotech Histochem.* 2017; 24:1-6. doi: 10.1080/10520295.2017.1356469. [Epub ahead of print]
24. Esrefoglu M, Cetin A, Taslidere E, Elbe H, et al. Therapeutic effects of melatonin and quercetin in improvement of hepatic steatosis in rats through suppression of oxidative damage. *Bratisl Lek Listy.* 2017;118(6):347-354.
25. Bondonno NP, Bondonno CP, Hodgson M, Ward NC, et al. The efficacy of quercetin in cardiovascular health. *Curr Nutr Rep* 2015;4:290-303.
26. Larson A, Witman MAH, Guo Y, Ives S, et al. Acute, quercetin-induced reductions in blood pressure in hypertensive individuals are not secondary to lower plasma angiotensin-converting enzyme activity or endothelin-1:nitric oxide. *Nutrition Research* 2012;32:557-564.
27. Iskender H, Dokumacioglu E, Sen TM, Ince I, Kanbay Y, Saral S. The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress, NF- κ B and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model. *Biomed Pharmacother.* 2017;90:500-508.
28. Mahmoud MA, Hassan NA, Bassossy HM, Fahmy A. Quercetin protects against diabetes-induced exaggerated vasoconstriction in rats: effect on low grade inflammation. *PloS One* 2013;8(5):1-11.
29. Y. Chen, Z. Zhou, X.-X. Li, T. Wang. Research on the protective effects of antioxidants on metabolic syndrome induced by thyroid dysfunction. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017; 21(10):2489-2498.
30. Edremitlioğlu M, F. Andiç M, D. Beyza S, Quercetin, a powerful antioxidant bioflavonoid, attenuates renal dysfunction in long-term experimental diabetes mellitus. *Marmara Medical Journal* 2011; 24 (2):88-99.
31. Xu MX, Wang M, Yang WW, Gold-quercetin nanoparticles prevent metabolic endotoxemia-induced kidney injury by regulating TLR4/NF- κ B signaling and Nrf2 pathway in high fat diet fed mice. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:327-345.

32. Ren J, Li J, Liu X, et al. Fibroblast Activation and Kidney Fibrosis Involving the Suppression of Mammalian Target of Rapamycin and β -catenin Signaling. *Sci Rep*. 2016;6:23968.
33. Gao C, Chen X, Li J, Li Y, et al. Myocardial mitochondrial oxidative stress and dysfunction in intense exercise: regulatory effects of quercetin *Eur J Appl Physiol* 2014;114:695-705.
34. Qi L, Cao C, Hu L, et al. Metabonomic analysis of the protective effect of quercetin on the toxicity induced by mixture of organophosphate pesticides in rat urine. *Hum Exp Toxicol*. 2017;36(5):494-507.
35. Li QC, Liang Y, Hu GR, Tian Y, Enhanced therapeutic efficacy and amelioration of cisplatin-induced nephrotoxicity by quercetin in 1,2-dimethyl hydrazine-induced colon cancer in rats. *Indian J Pharmacol*. 2016;48(2):168-71.
36. Dere F, *Anatomi Atlası ve Ders Kitabı Cilt:2*. Nobel Kitabevi 1999; 621.
37. Yıldırım M, *İnsan Anatomisi*, Nobel Tıp Kitabevleri 2003; 226-236.
38. Widmaier EP, Raff H, et al. *Vander İnsan Fiziyojisi*, Nobel Kitabevi 2010;
39. Eroschenko VP. *Diflore Histoloji Atlası*, Palme Yayıncılık, 2013
40. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*. 10. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, 2006.
41. Stewart WB, Rizzolo LJ. Embryology and surgical anatomy of the thyroid and parathyroid glands. In: Oertli D, Udelsman R, editors. *Surgery of the Thyroid and Parathyroid Glands*. Springer-Verlag, 2007. Chapter 2, p. 13-20.
42. Gao Y, Lee WM, Cheng CY, Thyroid Hormone Function in the Rat Testis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2014;5:188.
43. Jung KY, Ahn HY, et al. Association between thyroid function and lipid profiles, apolipoproteins, and high-density lipoprotein function. *J Clin Lipidol*. 2017;11(6):1347-1353.
44. Teerds K.J, de Rooij D.G, de Jong F.H, VanHaaster L.H. Development of the adult-type Leydig cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. *Biol Reprod*. 1998;59(2):344-50.

45. Kabalak T. Tiroid El Kitabı. Nobel Kitabevi, 2010; 27
46. Yurt F, Bayıroğlu F, et all. Hipertiroidizm Oluşturulmuş Tavşanlarda Glukoz, Total Protein, Trigliserid, Total Kolesterol, HDL-Kolesterol ve LDL-Kolesterol Seviyelerinin Araştırılması. Van Tıp Dergisi, 1999; 6(2).
47. Wajner SM, Wagner MS, Mala AL, Clinical implications of altered thyroid status in male testicular function. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2009;53(8):976-82.
48. Wagner MS, Wajner SM, Mala AL, The role of thyroid hormone in testicular development and function. Journal of Endocrinology 2008; 199, 351–365.
49. Kumar A, Shekhar S, Dhole B, Thyroid and male reproduction. Indian J Endocrinol Metab. 2014; 18(1):23–31.
50. Canale D, Agostinin M, Giorgilli G, Thyroid Hormone Receptors in Neonatal, Prepubertal, and Adult Rat Testis Journal of Andrology, 2001; 22(2):284-8.
51. Arya A, Al-Obaidi MM, Shahid N, et all. Synergistic effect of quercetin and quinic acid by alleviating structural degeneration in the liver, kidney and pancreas tissues of STZ-induced diabetic rats: a mechanistic study. FoodChem Toxicol. 2014;71:183-96.
52. Büyükuslu N, Yiğitbaşı T. Reaktif Oksijen Türleri ve Obezitede Oksidatif Stres. MÜSBEDE 2015;5(3):197-203.
53. Koçyiğit A, Selek S, Eksojen Antioksidanlar İki Yönü Keskin Kılıçlardır. Bezmialem Science 2016; 2: 70-5.
54. Aydemir B, K. Sarı E, Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. Kocatepe Vet J 2009; 2 (2):5660
55. Gökpınar Ş, Koray T, et all. Algal Antioksidanlar. E.Ü. Su Ürünleri Dergisi 2006; 23 - Ek (1/1): 85-89.
56. Sotnikova R, Noslova, Navarova J. Efficacy of quercetin derivatives in prevention of ulcerative colitis in rats. Interdiscip Toxicol. 2013; 6(1): 9–12.
57. Mu X, Yuan X, Du L.D, Antagonism of quercetin against tremor induced by unilateral striatal lesion of 6-OHDA in rats. J Asian Nat Prod Res. 2016; 18(1):65-71.

58. Çiftçi U, Delen E, et al, Efficacy of resveratrol and quercetin after experimental spinal cord injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2016; 22(5):423-431.
59. Bartekova M, Radosinska J, et al, Cardioprotective Effects of Quercetin Against Ischemia-Reperfusion Injury Are Age-Dependent. *Physiol Res.* 2016; 65 Suppl 1:S101-7.
60. Ozgen S, Kilinc OK, et al. Antioxidant activity of quercetin: A mechanistic review. *Türk Tarım-Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi*,4(12): 1134-1138,2016
61. Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E. et al. Tissue distribution of the death ligand TRAIL and its receptors. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(6): 821-831.
62. Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol.* 2007; 19(5):488-96.
63. Ashkenazi A, Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Reviews* 2008; 19(3-4):325-31.
64. Li Z, Sheng M. Caspases in synaptic plasticity. *Molecular Brain* 2012; 14;5:15.
65. S. G. Johsen, "Testicular biopsy score count-a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males.," *Hormones*, vol.1, no. 1, pp. 2-25,1970.
66. Almasry SM, Hassan ZA, Elsaed WM, et al. Structural evaluation of the peritubular sheath of rat's testes after administration of ribavirin: A possible impact on the testicular function. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2017; 30(3):282-296.
67. Mohammadnejad D, Abedelahi A, et al. Degenerative effect of Cisplatin on testicular germinal epithelium. *Adv Pharm Bull.* 2012; 2(2):173-7.
68. Cheraghi E, Golkar A, Roshanaei K, et al, Aluminium-Induced Oxidative Stress, Apoptosis and Alterations in Testicular Tissue and Sperm Quality in Wistar Rats: Ameliorative Effects of Curcumin. *Int J Fertil Steril.* 2017; 11(3):166-175.
69. Elgawish RAR, et al. Effects of lead acetate on testicular function and caspase-3 expression with respect to the protective effect of cinnamon in albino rats. *Toxicology Report* 1(2014); 795-801.

70. Choudhury S, Chainy G.B.N, Mishro MM, et al. Experimentally induced hypo-and hyper-thyroidism in fluence on the antioxidant defence system in adult rat testis. *Andrologia* 2003 35(3):131-40.
71. Bhatt PA, Makwana D. Comparative influence of propranolol and verapamil on glycemic control and histamine sensitivity associated with L-thyroxine-induced hyperthyroidism - an experimental study. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008; 22(1):53-9.
72. Huang R, Zhong T, Wu H. Quercetin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats through of inflammation and oxidative stress. *ArchMedSci.* 2015; 25;11(2):427-32.
73. Suganya S, Selvakumar K, Krishnamoorthy G, et al. Protective Role of Quercetin on Polychlorinated Biphenyls (Aroclor-1254) Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Liver of Adult Male Rats. *J.biochem molecular toxicology.* 2012; 26(12):522-32.
74. Sanders RA, Rauscher FM, et al. Effects of quercetin on antioxidant defense in streptozotocin induced diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2001;15:143-149.
75. Cotomacci G, Sarkis JF, et al. Thyroid hormones are involved in 5' nucleotidase modulation in soluble fraction of cardiac tissue. *Life Science* 2012; 21;91(3-4):137-42.
76. Na W, Peng G, et al. RhoA/ROCK may involve in cardiac hypertrophy induced by experimental hyperthyroidism. *Toxicol Ind Health* 2012; 28(9):831-9.
77. Gonzalez CR, Martinez de Morentin PB, et al. Hyperthyroidism differentially regulates neuropeptide S system in the rat brain. *Brain Res.* 2012; 23; 1450:40-8.
78. Zamoner A, Baretto KA, et al. Hyperthyroidism in the developing rat testis is associated with oxidative stress and hyperphosphorylated vimentin accumulation. *Molecular and Cellular Endoc.* 2007; 15;267(1-2):116-26.
79. Korejo NA, Wei QM, et al. Effects of concomitant diabetes mellitus and hyperthyroidism on testicular and epididymal histoarchitecture and steroidogenesis in male animals. *J Zhejiang Univ Sci Biol.* 2016; 17(11):850-863.

80. Ozgüner M, Şenol A, et al. Deneysel hipertirodinin erişkin sıçan testis dokusunda oluşturduğu histolojik değişiklikler. S. DU. Tıp Fak. Derg 2004; 11(3):1-6.
81. Souhila DS, Zohra HS, Kamel A, Hadj-Bekkouché F. Effects of thyroxine treatment during lactation on the testicular function of rats across different ages. *Folia Histochem Cytobiol.* 2013;51(2):107-14.
82. Faraone-Mennella MR, Ferone A, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation of proteins and germ cell development in hyperthyroid rat testes. *Mol Cell Biochem.* 2009; 323(1-2):119-29.
83. Ourique GM, Finamor IA, et al. Resveratrol improves sperm motility, prevents lipid peroxidation and enhances antioxidant defences in the testes of hyperthyroid rats. *Reprod Toxicol.* 2013;37:31-9.
84. Ozdemir S, Yücel R, et al. The effects of experimental hyperthyroidism on hemorheology and plasma fibrinogen concentration. *Endocrine.* 2006; 30(2):203-5.
85. Baltacı AK, Mogulkoc R. Leptin, NPY, Melatonin and Zinc Levels in Experimental Hypothyroidism and Hyperthyroidism: The Relation to Zinc. *Biochem Genet.* 2017; 55(3):223-233.
86. Keshavarz S, Dehghani GA. Cerebral ischemia/reperfusion injury in the hyperthyroid rat. *Iran J Med Sci.* 2017; 42(1):48-56.
87. Beltagy DM, Mohamed TM, El Said AS, Tousson E. Beneficial role of ascorbic and folic acids antioxidants against thyroxine-induced testicular dysfunction in hyperthyroid rats. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016 Sep;23(17):17246-54.
88. König D, Wagner KH, Elmadfa L, Berg A. Exercise And Oxidative Stress: Significance, of antioxidants with reference to inflammatory muscular and systemic stress. *Exerc. Immunol Rev.* 2001; 7: 108–133.
89. Kanimozhi S, Bhavani P, Subramanian P. Influence of the Flavonoid, Quercetin on Antioxidant Status, Lipid Peroxidation and Histopathological Changes in Hyperammonemic Rats. *Indian J Clin Biochem.* 2017;32(3):275-284.

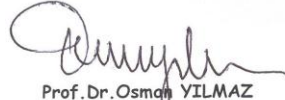
90. Kasmi S, Bkhairia I, Harrabi B, et al, Modulatory effects of quercetin on liver histopathological, biochemical, hematological, oxidative stress and DNA alterations in rats exposed to graded doses of score 250. *Toxicol Mech Methods*. 2017 25:1-11.
91. Chi KK, Zhang WH, Wang GC, et al. Comparison of Intraperitoneal and Intraepididymal Quercetin for the Prevention of Testicular Torsion/Detorsion-induced Injury. *Urology*. 2017;99:106-111.
92. Kocabaş N. Homosisteinin İndüklediği Oksidatif Stres Üzerinde quercetin'in Koruyucu Etkisi. Afyon Kocatepe Üniversitesi; 2008.
93. Auharek S.A., França L.R. Postnatal testis development, Sertoli cell proliferation and number of different spermatogonial types in C57BL/6J mice made transiently hypo- and hyperthyroidic during the neonatal period. *J Anat*. 2010 May; 216(5): 577–588.

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 03/23/2015
Toplantı Tarihi : 24 Kasım 2015

Sayın, Doç.Dr.Seda ÖZBAL
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

49/2015 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Deneysel erişkin sıçan hipertiroidi modelinde Quercetin'in testis dokusundaki etkisinin histolojik olarak incelenmesi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı

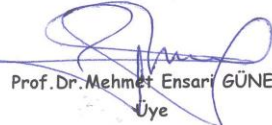

Prof.Dr.Ali Necati GÖKMEN
Başkan Vekili


Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye


Prof.Dr.Hüsnü Alper BAĞRIYANIK
Üye


Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye

Prof.Dr. Hatice Nur OLGUN
Üye (Topl.katılmadı)


Prof.Dr.Mehmet Ensari GÜNELİ
Üye

Prof.Dr.Günay KIRKIM
Üye
(topl.katılmadı)

Doç.Dr.Meral KARAMAN
Üye

Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Doç.Dr.Türkan ERTAY
Üye

Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye (Topl.Katılmadı)

Doç.Dr.Zekiye Sultan ALTUN
Üye

Yardı.Doç.Dr.Ophan KALEMCI
Üye


Zehra KINAM
Üye

Vet.Hekim Adrian SERPEN
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

ÖZGEÇMİŞ

MELTEM AVCI

TC Kimlik No / Pasaport No:	35456299722
Doğum Yılı:	1989
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Balçova/İzmir
Telefon :	(551)594 2454
Faks :	
e-posta :	eemeltem_avci@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
T.C	Ege	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2013

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı	
--	--

Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
☐			

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Düzenleme Tarihi: 13/12/2017