

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA GENTAMİSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
TESTİS HASARI ÜZERİNE KUERSETİN'İN ETKİLERİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Ayşe Firuze BIYIK

TRABZON – 2021

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SIÇANLARDA GENTAMİSİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL
TESTİS HASARI ÜZERİNE KUERSETİN'İN ETKİLERİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Ayşe Firuze BIYIK

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Esin YULUĞ

TRABZON – 2021

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimimin ve tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle, ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim tez danışmanım Prof. Dr. Esin YULUĞ hocama, geniş bilgi, deneyim ve imkânlarından faydalandığım çok değerli Prof. Dr. Engin YENİLMEZ, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN hocalarıma, Biyokimya Anabilim Dalından değerli hocam Prof. Dr. Ahmet ALVER'e, çalışmamın bütün aşamalarında benden desteğini esirgemeyen sevgili eşim Op. Dr. Mehmet Orbay BIYIK' a, tez deneyimin gerçekleşmesinde büyük katkıları olan çok değerli bölüm arkadaşlarım Uzm. Dr. Tuğba ZENGİN, Uzm. Dr. Dilan ÇETİNAVCI, Uzm. Dr. Ahmet Uğur AKMAN, Arş. Gör. Dr. Abdülkadir KUTLU, Doktora Öğrencisi Ali KULABER, Biyolog Birgül GÜR KUTLU, Biyolog Gamze BİLGİN, Biyokimya Anabilim Dalından Doktora Öğrencisi Şeniz DOĞRAMACI' ya ve tez çalışmamı TTU-2019-8461 no'lu proje olarak destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Tüm hayatım boyunca sevgi ve şefkatleriyle beni kucaklayan annem Zehra AKTÜRK, babam Osman AKTÜRK, kardeşlerim Elif ve Saffet Murat AKTÜRK'e, eşimin sevgili ailesine, hayatımın mucizeleri çocuklarım Fuat Kağan BIYIK ve Bilge Ece BIYIK' a da teşekkür eder, sevgilerimi sunarım.

Ayşe Firuze BIYIK

ÖZET

Sıçanlarda Gentamisin İle Oluşturulan Deneysel Testis Hasarı Üzerine Kuersetin'in Etkileri

Bu çalışmada gentamisinin testis üzerinde meydana getirdiği değişiklikler ve oksidatif stresin rolünün belirlenmesi; antioksidan olan kuersetinin koruyucu etkilerinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 24 adet erişkin erkek Sprague Dawley cinsi sıçan 4 gruba ayrıldı ve deney süresi 7 gün olarak belirlendi. Kontrol grubuna deneyin 1. gününden başlanarak 7 gün boyunca günlük intraperitoneal (i.p.) serum fizyolojik uygulandı. İkinci grup olan gentamisin grubuna (GEN) 7 gün boyunca günlük 80mg/kg dozunda i.p. gentamisin verildi. Üçüncü grup olan kuersetin grubuna (QUE) da aynı şekilde 7 gün boyunca günlük 50 mg/kg kuersetin i.p. uygulandı. Dördüncü grup olan gentamisin+kuersetin grubuna (GEN+QUE) ise deneyin 1. gününden itibaren 7 gün boyunca günlük i.p. 50 mg/kg olacak şekilde kuersetin ve 80 mg/kg dozunda i.p. gentamisin verildi. Deneyin sonunda (8. günde) sıçanlar anestezi altındayken (i.p. ketamin 90 mg/kg) kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edildi. Alınan kan örnekleri biyokimyasal parametreler için EDTA (etilen diamin tetra asetik asit)'li tüpe konuldu. Testis ve epididimis dokuları diseke edildi. Epididimden elde edilen sperm örneklerinden sperm sayısı, motilitesi, canlılığı ve morfolojisi analiz edildi. Elde edilen testis dokularının bir yarısından hematoksilin&eozen (H&E), Masson trikrom ve periyodik asit Schiff (PAS) boyama yöntemleriyle histopatolojik incelemeler yapıldı. Testis ve epididimisin doku örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak incelendi. Testiste seminifer tübül hasar değerlendirmesi için Johnsen skorum sistemi ve apoptozis değerlendirmesi için ise terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)- deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling assay (TUNEL) tekniği kullanıldı. Testis dokularının diğer yarısında ise biyokimyasal olarak doku malondialdehit (MDA), doku süperoksit dismutaz (SOD), doku katalaz (CAT), doku glutatyon peroksidaz ve plazma MDA düzeylerine bakıldı.

Yapılan değerlendirmeler sonucunda vücut ağırlığı ölçümlerinde QUE ve GEN+QUE grubunda istatistiksel olarak anlamlı azalma mevcut idi. Testis

ağırlıklarının ölçümlerinde gentamisin uygulanan gruplarda kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlendi. Histopatolojik değerlendirmelerde GEN grubu testis dokusunda gözlenen germinal epitel kalınlığında azalma, Johnsen skorunda düşme, immatür hücre dökülen tübül oranı artışı ve değerlendirilen apoptotik indekste artış gibi bulgulara QUE eklenmesiyle düzelme olduğu izlendi.

Yapılan sperm analizinde GEN grubunda sperm sayısının ve anormal morfolojiye sahip spermelerin kontrole göre arttığı, canlılık ve motilitenin azaldığı gözlemlendi. GEN+QUE grubunda QUE'nin sperm morfolojisi ve canlılığını artırdığı tespit edildi.

Biyokimyasal parametrelerde de GEN grubunda MDA seviyesinde artma, SOD, CAT ve GPx seviyelerinde ise azalma tespit edildi. GEN+QUE grubunda ise GEN grubuna göre MDA seviyesinin azaldığı, SOD, CAT ve GPx düzeylerinin de arttığı gözlemlendi.

Elde edilen bulgularımız gentamisinin testis yapısını ve fonksiyonunu bozduğunu, kuersetin tedavisinin ise bu olumsuz etkilenmeyi önleyebildiğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Gentamisin, Kuersetin, Testis, Apoptoz, Oksidatif stres

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: TTU-2019-8461

SUMMARY

Effects of Quercetin On Testicular Damage Experimentally Created With Gentamicin In Rats

In this study, it was aimed to determine the changes caused by gentamicin on the testicle and the role of oxidative stress; to investigate whether there are protective effects of quercetin, which is an antioxidant.

In our study, 24 adult male Sprague Dawley rats were divided into 4 groups and the duration of the experiment was determined as 7 days. The control group received intraperitoneal (i.p.) saline daily for 7 days starting from day 1 of the experiment. The second group, gentamicin (GEN), was administered i.p. at a daily dose of 80 mg/kg for 7 days. gentamicin was given. The third group, the quercetin group (QUE), was given 50 mg/kg quercetin i.p. daily for 7 days in the same way. The fourth group, Gentamicin+Quercetin (GEN+QUE), was given 50 mg/kg i.p. daily and 80 mg/kg i.p. gentamicin for 7 days from the first day of the experiment. At the end of the experiment (8th day) the rats under anesthesia (i.p. ketamine 90 mg/kg) were sacrificed by exsanguination. The blood samples taken were placed in a tube with EDTA (ethylene diamine tetra acetic acid) for biochemical parameters. Testis and epididymis tissues were dissected. Sperm count, motility, viability and morphology were analyzed from sperm samples obtained from the epididymis. Histopathological examinations were performed with hematoxylin&eosin (H&E), Masson trichrome and periodic acid Schiff (PAS) staining methods from one half of the testicular tissues obtained. Tissue samples of testis and epididymis were examined histopathologically under light microscope. Johnsen scoring system was used for the evaluation of seminiferous tubule damage in testis and terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT)- deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick end labeling assay (TUNEL) technique was used for the apoptosis assessment. Biochemically, tissue malondialdehyde (MDA), tissue superoxide dismutase (SOD),

tissue catalase (CAT), tissue glutathione peroxidase and plasma MDA levels were measured in the other half of the testicular tissues.

As a result of the evaluations, there was a statistically significant decrease in body weight measurements in the QUE and GEN+QUE groups. A statistically significant decrease was observed in the measurement of testicular weights in the gentamicin applied groups compared to the control. In the histopathological evaluations, it was observed that there was an improvement with the addition of QUE in the findings such as decrease in germinal epithelial thickness, decrease in Johnsen score, increase in immature cell shedding tubule rate and increase in the evaluated apoptotic index observed in GEN group testicular tissue.

In the sperm analysis, it was observed that sperm count and sperm with abnormal morphology increased in the GEN group compared to the control group, while viability and motility decreased. It was determined that QUE increased sperm morphology and viability in the GEN+QUE group.

In biochemical parameters, an increase in MDA levels and a decrease in SOD, CAT and GPx levels were detected in the GEN group. In the GEN+QUE group, it was observed that the MDA level decreased and the SOD, CAT and GPx levels increased compared to the GEN group.

Our findings show that gentamicin impairs testicular structure and function, and quercetin treatment can prevent this negative effect.

Keywords: Gentamicin, Quercetin, Testis, Apoptosis, Oxidative stress

This work was supported by Office of Scientific Research Projects of Karadeniz Technical University. Project number: TTU-2019-8461

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	ii
ÖZET.....	iii
SUMMARY	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Morfolojisi.....	3
2.1.1. Testis Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Testis Anatomisi	7
2.1.3. Testis Histolojisi	9
2.2. Epididimis Morfolojisi.....	19
2.3. Gentamisin	21
2.3.1. Genel Bilgiler.....	21
2.3.2. Antibakteriyel Spektrum.....	22
2.3.3. Etki Mekanizması	23
2.3.4. Kullanım Alanları ve Doz Uygulamaları.....	24
2.3.5. Yan Etkileri.....	25
2.4. Apoptozis	26
2.5. Oksidatif Stress ve Antioksidanlar	30
2.6. Kuersetin	33
3. MATERYAL VE METOD	37
3.1. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği.....	37
3.2. Deney Hayvanları, Barınma Koşulları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı	37
3.3. Kan ve Doku Numunelerinin Toplanması	39
3.4. Histolojik İşlemler	40

3.4.1. Bouin Tespitinin Hazırlanışı	40
3.4.2. Işık Mikroskopik İnceleme İçin Dokuların Hazırlanması	40
3.4.3. Hematoksilen & Eozin Boyama Yöntemi	41
3.4.4. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi	423
3.4.5. Masson Trikrom Boyama Yöntemi	44
3.4.6. Sperm Sayısı, Hareketlilik, Canlılık ve Morfoloji Değerlendirmesi	44
3.4.7. İmmünohistokimyasal İşlemler	44
3.5. Biyokimyasal Analiz	47
3.5.1. Plazma Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi	47
3.5.2. Testis Dokusu MDA Düzeyinin Belirlenmesi	49
3.5.3. Testis Dokusu Katalaz (CAT) Aktivite Tayini	50
3.5.4. Testis Dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Ölçümü	51
3.5.5. Testis Dokusu GPx Enzim Aktivitesinin Ölçümü	53
3.5.6. Protein Tayini	54
3.6. İstatistiksel Analiz	55
4. BULGULAR	56
4.1. Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular	56
4.2. Morfometrik Bulgular	58
4.3. Morfolojik Bulgular	61
4.3.1. Hematoksilen & Eosin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi	61
4.3.2. Masson Trikrom Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi	646
4.3.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi	68
4.3.4. TUNEL Boyama ve Apoptotik İndeks	71
4.4. Semen Analizine Ait Bulgular	714
4.5. Epididim Dokusuna Ait Hematoksilen & Eozin Boyalı Kesitlerin Bulguları	74
4.6. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular	83

4.6.1. Doku Biyokimyası	83
4.6.2. Serum Biyokimyası	86
5. TARTIŞMA	87
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	99
7. KAYNAKLAR	101



KISALTMALAR DİZİNİ

µm	: Mikrometre
µl	: Mikrolitre
AI	: Apoptotik indeks
AMH	: Antimüllerian hormon
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive eden faktör
CAT	: Katalaz
CCL₄	: Karbontetraklorür
CSL	: Kranial süspansiyonlu ligament
cm	: Santimetre
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dUTP	: Deoxyuridine triphospate
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
gr	: Gram
GEN	: Gentamisin
GEH	: Germinal epitel kalınlığı
GSH	: Glutasyon
GPx	: Glutasyon peroksidaz
H&E	: Hematoksilen eozin
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
İGH	: İmmatür germinal hücre
i.p.	: İntraperitoneal
LDL	: Low density lipoprotein
LH	: Lüteinizan hormon
LPO	: Lipid peroksit
MİK	: Minimum inhibe edici konsantrasyon
mL	: Mililitre
MDA	: Malondialdehid

°C	: Santigrad derece
OH[·]	: Hidroksil radikali
OS	: Oksidatif stres
O₂^{·-}	: Süperoksit radikali
¹O₂	: Singlet oksijen
PAS	: Periyodik asit Schiff
PAE	: Postantibiyotik etki
PGC	: Primordial germ hücreleri
QUE	: Kuersetin
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNT	: Reaktif nitrojen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
STD	: Seminifer tübül çapı
SRY	: Sex determining region on chromosome Y
TBA	: Tiobarbiturik asit
TBARS	: Tiobarbituric acid reactive substance
TDF	: Testis belirleyici faktör
TdT	: Deoxynucleotidyl transferase
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay
v	: Vena

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1. MDA seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan reaktifler ve miktarları	49
Tablo 2. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı	51
Tablo 3. SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları	52
Tablo 4. Deney gruplarına ait günlere göre ağırlık değişimi	56
Tablo 5. Deney gruplarına ait testis ağırlık verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri	58
Tablo 6. Deney gruplarına ait morfometrik bulguların ortalama ve standart sapma değerleri	60
Tablo 7. Deney gruplarına ait apoptotik indeks ortalama ve standart sapma değerleri	74
Tablo 8. Deney gruplarına ait sperm parametreleri ortalama ve standart sapma değerleri	76
Tablo 9. Deney gruplarına ait biyokimyasal parametrelerin ortalama ve standart sapma değerleri	85

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Plazma MDA standart grafiği	48
Şekil 2. Testis MDA standart grafiği	50
Şekil 3. Testis dokularında SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği	53
Şekil 4. Testis dokularında protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği	55
Şekil 5. Deney gruplarına ait vücut ağırlıkları	56
Şekil 6. Deney gruplarına ait sağ ve sol testis ağırlıkları	57
Şekil 7. Deney gruplarına ait seminifer tübül çapı	58
Şekil 8. Deney gruplarına ait germinal epitel kalınlığı ölçümleri	59
Şekil 9. Deney grupların ait lümeninde immatür hücre görülen tübül oranı.....	59
Şekil 10. Deney gruplarına ait Johnsen skorları.....	60
Şekil 11. Deney gruplarına ait apoptotik indeks	73
Şekil 12. Deney gruplarına ait sperm sayısı	75
Şekil 13. Deney gruplarına ait sperm morfolojisi	75
Şekil 14. Deney gruplarına ait sperm canlılık oranı.....	75
Şekil 15. Deney gruplarına ait hareketli sperm miktarı.....	76
Şekil 16. Doku MDA seviyesi.....	83
Şekil 17. Doku SOD aktivitesi	84
Şekil 18. Doku CAT aktivitesi	84
Şekil 19. Doku GPx aktivitesi	85
Şekil 20. Plazma MDA seviyesi.....	86

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1.	Testisin genel histolojik yapısı	15
Resim 2.	Deney hayvanlarının barındırılmasında kullanılan standart tip III kafesler	38
Resim 3.	Deney gruplarına i.p. enjeksiyon uygulaması	39
Resim 4.	Testis ve epididimisin diseksiyonu	40
Resim 5.	Makler sayım kamarası	45
Resim 6.	Kontrol Grubuna ait testis dokusu.....	62
Resim 7.	Kontrol Grubuna ait testis dokusu.....	62
Resim 8.	Gentamisin Grubuna ait testis dokusu.....	63
Resim 9.	Gentamisin Grubuna ait testis dokusu.....	63
Resim 10.	Kuersetin Grubuna ait testis dokusu	64
Resim 11.	Kuersetin Grubuna ait testis dokusu.....	64
Resim 12.	Gentamisin+Kuersetin Grubuna ait testis dokusu.....	65
Resim 13.	Gentamisin+Kuersetin Grubuna ait testis dokusu.....	65
Resim 14.	Kontrol Grubuna ait testis dokusu masson trikrom boyama	66
Resim 15.	Gentamisin Grubuna ait testis dokusu masson trikrom boyama.....	67
Resim 16.	Kuersetin Grubuna ait testis dokusu masson trikrom boyama.....	67
Resim 17.	Gentamisin+Kuersetin Grubuna ait testis dokusu masson trikrom boyama	68
Resim 18.	Kontrol Grubuna ait testis dokusu PAS boyama.....	69
Resim 19.	Gentamisin Grubuna ait testis dokusu PAS boyama.....	69
Resim 20.	Kuersetin Grubuna ait testis dokusu PAS boyama.....	70
Resim 21.	Gentamisin+Kuersetin Grubuna ait testis dokusu PAS boyama.....	70
Resim 22.	Kontrol Grubuna ait testis dokusu TUNEL boyama.....	71
Resim 23.	Gentamisin Grubuna ait testis dokusu TUNEL boyama	72
Resim 24.	Kuersetin Grubuna ait testis dokusu TUNEL boyama.....	72
Resim 25.	Gentamisin+Kuersetin Grubuna ait testis dokusu TUNEL boyama	73
Resim 26.	Kontrol Grubuna ait Makler ve sperm analizi görüntüleri	77
Resim 27.	Gentamisin Grubuna ait Makler ve sperm analizi görüntüleri.....	77
Resim 28.	Kuersetin Grubuna ait Makler ve sperm analizi görüntüleri.....	77

Resim 29. Gentamisin+Kuersetin Grubuna ait Makler ve sperm analizi görüntüleri	78
Resim 30. Kontrol Grubuna ait epididimis dokusu	79
Resim 31. Kontrol Grubuna ait epididimis dokusu	79
Resim 32. Gentamisin Grubuna ait epididimis dokusu	80
Resim 33. Gentamisin Grubuna ait epididimis dokusu	80
Resim 34. Kuersetin Grubuna ait epididimis dokusu	81
Resim 35. Kuersetin Grubuna ait epididimis dokusu	81
Resim 36. Gentamisin+Kuersetin Grubuna ait epididimis dokusu	82
Resim 37. Gentamisin+Kuersetin Grubuna ait epididimis dokusu	82



1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfertilite, çocuk sahibi olmak isteyen çiftlerin yaklaşık %15'ini etkileyen önemli bir sağlık problemidir ve çiftin 1 yıl boyunca herhangi bir kontraseptif yöntem kullanmadan kendiliğinden gebe kalınamadığı durumu tanımlamaktadır. Erkek infertilitesinin nedeni ise halen araştırılmakta olup altında yatan sebepler henüz anlaşılamamıştır. Özellikle pestisit gibi insan yapımı kimyasallar ile kontaminasyon, hormonal ajanlar, performans arttırıcı maddeler ve antibiyotikler de dahil olmak üzere terapötik ilaçlar, yaşam tarzı ve çevresel faktörler erkeklerde kısırlığa neden olabilmektedir (1, 2).

Antibiyotikler tedavi edici ajanlar arasında en çok kullanılan ilaç gruplarından biridir. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimini artırarak hücrel redoks durumuna zarar vermekte ve ayrıca testis dahil birçok organda toksik etkiler gösterebilmektedir. Yapılan son çalışmalarda da oksidatif stresin (OS) üremeyi olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (1).

Aminoglikozid türevi antibiyotikler klinik uygulamalarda sık olarak kullanılmaktadır. Aminoglikozid türü bir ilaç olan gentamisin (GEN), genellikle hayatı tehdit edici gram-negatif bakterilerin sebep olduğu hastalıkların tedavisinde kullanılır. Özellikle gram negatif bakterilere karşı geniş bakterisid spektruma sahip olması, beta laktamlara dirençli mikroorganizmalara karşı etkinliği ve maliyetinin düşük olması nedeni ile kullanım alanı oldukça geniştir (3). Ayrıca aminoglikozidler ürologlar ve doğurganlık uzmanları tarafından rutin olarak, in vitro fertilizasyondan önce veya bu hastaların semeninde yüksek lökosit konsantrasyonu ile ortaya çıkan bakteriyel enfeksiyon tedavisi için de kullanılmaktadır (4). İlacın kullanımını kısıtlayan başlıca sebeplerden biri ise toksisiteleridir. Gentamisin nefrotoksik ve ototoksik etkilerine ek olarak testiste yapısal ve sitotoksik değişiklikler de ortaya çıkarmaktadır. Gentamisinin erkek üreme sistemine etkileri üzerine az sayıda çalışma vardır. Kan-testis bariyeri boyunca zayıf taşınması nedeniyle gentamisinin testiste birikmeyeceği belirtilmiş; daha sonra yapılan bir çalışmada ise tersine testiste germ hücre bölünmesi ve protein sentezi inhibisyonu, ayrıca seminal vezikülde hücre ölümü indüksiyonu bildirilmiştir (5). Son zamanlarda yapılan birçok çalışma, gentamisinin, serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu artırarak testiste

oksidatif stresi indüklediğini ortaya koymuştur (5). Gentamisin özellikle deney hayvanlarının testisinde epitelde dökülme, germ hücrelerinde dejenerasyon, seminifer tübüllerde atrofik değişiklikler, interstisyel alanda boşluklar ve sperm üretiminde azalma gibi değişikliklere neden olmaktadır. Ayrıca oksidatif hasara ve nekroza neden olduğu bilinmektedir. Gentamisine maruz kalan sıçanlarda testosteron seviyesinin de düştüğü gözlenmiştir (3). Gentamisin ayrıca antioksidan enzim seviyelerini düşürdüğü, sperm sayısını, hareketliliğini ve canlılığını azalttığı da bilinmektedir (4).

Kuersetin temel diyet flavonoidlerinden olan güçlü bir antioksidandır. Kırmızı şarap, soğan, yeşil çay, elma, çilek vb. gibi birçok bitkide ve gıdada bulunur (6). Kuersetin, metal iyonlarını şelatlayarak ve oksijen radikallerini temizleyerek oksidatif hasar ile hücre ölümünü önleyebilir (7). Ayrıca lipoksijenaz, ksantin oksidaz ve siklooksijenazın enzimatik aktivitelerini de inhibe eder (8). Kuersetinin antiaterojenik, antiinflamatuvar, antikoagülatif, antihipertansif ve antikarsinojenik özelliklere de sahip olduğu gösterilmiştir. Erkek üreme sistemine etkileri üzerine ise tartışmalı raporlar vardır. Son çalışmalar, kuersetinin erkek kısırlığının tedavisinde alternatif bir ilaç olarak kullanıldığını bildirmiştir (9). Ayrıca yetişkin erkek sıçanlarda sperm kalitesi ve üreme organları üzerinde uyarıcı etkileri vardır (10).

Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda güçlü bir antioksidan olan kuersetinin sıçan testisinde gentamisinin indüklediği olumsuz etkilerin önlenmesi ve/veya iyileştirmesindeki rolü araştırılmıştır. Gentamisinin testis üzerinde oluşturabileceği yan etkilerinin azaltılmasında kuersetinin tedaviye ek olarak destek amaçlı verilip verilemeyeceğinin belirlenmesi çalışmamızın özgün değerini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızın, toplumda sık kullanılan bir ilaç olan gentamisinin komplikasyonlarına karşı kuersetinin kullanımı ile elde edilebilecek koruyucu etkiyle, insan sağlığında ve tedavi maliyetinde olumlu sonuçlar doğurabileceğini ve literatürde bu konudaki eksikliklerin giderilmesine katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Morfolojisi

2.1.1. Testis Embriyolojisi

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, fertilizasyon esnasında X kromozomuna sahip oositi dölleyen sperm ile belirlenmiş olsa da embriyonun morfolojik özellikleri 7. haftaya kadar gelişmeye başlamaz. Bu süre boyunca iki cinsiyetteki erken genital sistemler benzerdir. Bu yüzden genital gelişimin başlangıç dönemi seksüel gelişimin farklanmamış safhası olarak tanımlanır (11-15). Farklanmamış safha, dış görünüş olarak dişi ya da erkek embriyo ayrımının yapılamadığı dönemdir. Embriyonun genetik cinsiyeti ise farklanmamış gonadın hangi yönde gelişeceğini belirler.

Gonadlar seks hücrelerini üretirler ve üç yapıdan köken alırlar:

1. Posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitel)
2. Altındaki mezenkimal doku (embriyonik bağ dokusu)
3. Primordial germ hücreleri (en erken dönemde bulunan farklanmamış seks hücreleri) (11, 15)

Gonadların gelişimi ürogenital sırtın çöломik epiteli ve intermediate mezodermin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık (gonadal/genital kabartı) olarak 5. haftada başlar (11, 12, 14-17). Parmağa benzeyen epitelyal kordonlar (gonadal kordonlar), altta bulunan mezenkimal doku içine doğru büyürler. Zamanla farklanmamış gonad, dışta korteks ve içte medullayı oluşturur (11, 16). Embriyo XX seks kromozomuna sahipse farklanmamış gonadın korteksi overi oluşturacak şekilde gelişirken, medullası geriler. Eğer embriyo XY seks kromozomu içeriyor ise medulla testise farklanır, korteks de bazı kalıntılar dışında geriler ve dejenere olur (11). Bütün bu gelişmelere rağmen 6. haftaya kadar genital kabartılar içerisinde germ hücreleri bulunmamaktadır (17).

Erkek fenotipi gelişimi için bir Y kromozomu bulunmalıdır. Y kromozomunun kısa kolunda yerleşen SRY (sex determining region on chromosome Y) geninin transkriptleri testis farklılaşmasının erken döneminde, genital kabartıda

tespit edilir. SRY geni gonadın testis yönünde farklılaşmasını sağlayan bir testis belirleyici faktör (TDF) kodlar (11-15, 17). TDF primer seks kordonlarını uyarak, farklılaşmamış gonadın medullasının iç kısımlarına doğru uzamasına neden olur. Seminifer kordonların dış kısımları seminifer tübüllere farklılaşırken; içeriye doğru ilerledikçe tübüli rektiyi oluşturur. Seminifer kordonların en iç kısımları ise medullanın derinlerinde dallanıp birbirleriyle anastomoz yaparak ağ benzeri rete testisi oluştururlar. Rete testis efferent duktusları oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu kanallar duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar. Kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra primer seks kordonlarının yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Dens tunika albugineanın gelişimi testiküler gelişim için karakteristiktir (11, 15). 4. ayda testis kordonları primitif germ hücreleri ve yüzey epitelinden gelişen Sertoli hücrelerinden meydana gelir. Genital kabartının mezenşiminden köken alan interstisyel Leydig hücreleri ise testis kordonları arasında bulunur ve kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar (11, 12, 17).

Epiblasttan köken alan primordial germ hücreleri (PGC), primitif çizgi boyunca göç edip, fertilizasyondan 24 gün sonra yolk kesesi (umbilikal kese veya vitellüs kesesi) duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın endodermal hücreler arasına yerleşir. Embriyonun katlanmaları sırasında umbilikal kesenin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. 4. haftada ameboid hareketlerle son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek, 5. haftanın başında yolk kesesinden genital kabartılara göç etmiş olurlar (11, 16, 17).

PGC'ler büyük, küresel hücrelerdir. 6. haftada genital kabartıları işgal ederler. PGC primitif gonadlara ulaşmaları esnasında, TDF ve transkripsiyon faktörü SOX-9'un da etkisiyle genital kabartıdaki epitel hücreleri proliferasyonla altta bulunan mezenşimin içine gömülüp, gonadal kordon (primer seks kordonları) denilen düzensiz kordonları oluştururlar (11, 13, 16, 17). Primordial germ hücrelerinin göçünde Stella, BMP-4 ve Fragilis genleri de rol oynamaktadır (11, 13). Primer seks kordonları, yetişkinde sperm hücrelerinin gelişmelerine ve seminifer tübüller boyunca kasılarak tübül içeriğinin hareket etmesine yardımcı olan, lokal kökenli miyoid hücrelerle çevrilir. Ayrıca miyoid hücrelerin overde eş değeri bulunmamaktadır (13).

Seminifer kordonların oluşumu başlıca SOX-9 ve FGF-9 genlerinin ekspresyonu ile sağlanır. Y kromozomu yokluğu ise 12. haftada ovarian gelişim ile sonuçlanır (11, 12). Gonadın dişi ya da erkek yönde gelişmesine bağlı olarak genital kanallar ile dış genital organların primordiumları gelişir ve seksüel farklılaşma belirlenir.

Seminifer kordonlar puberteye kadar solid halde kalırken puberteden itibaren lümen gelişmeye başlar ve seminifer tübül olarak adlandırılırlar (11, 12, 16, 17). Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübüleriyle birleşir ve duktuli efferenteslere girerler.

Seminifer tübül duvarında iki tip hücre vardır:

1. Sertoli hücreleri: Destek hücreleri olan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler.

2. Spermatogonia: Primordial sperm hücreleri olan bu hücreler primordial germ hücrelerinden farklıdır.

Fetal testiste, seminifer epitelin çoğunluğunu Sertoli hücreleri oluşturur. Sertoli hücreleri 6-7. haftalarda antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde adı verilen bir glikoprotein hormon salgılamaya başlarlar. Hormonun salınması puberteye kadar devam eder ve daha sonra seviyesi azalır. AMH parametonefrik kanalın gerileyip kaybolmasına neden olur (11, 13-16). 8. haftadan itibaren de Leydig hücreleri androjenik hormonları (testosteron ve androstenedion) salgılamaya başlarlar (18). Bu hormonlar, erkeklerde mezonefrik kanallardan erkek genital kanalların oluşumunu ve dış genitalin farklılaşmasını sağlar (11, 13, 14, 17, 19). 17 ve 18. haftalardan sonra, fetal Leydig hücreleri yavaş etki eder ve spermatogenez uyardıkları ergenliğe kadar tekrar ortaya çıkmaz (13).

Fetal hayatta testisler retroperitoneal bölgede ortaya çıkar ve karın içinde fascia transversalis ile periton arasında gelişir (12, 17, 20). Gonadal farklılaşma oluşmadan önce testisler gevşek bir şekilde iki ligament tarafından tutularak, gelişmekte olan böbreğin yanında bulunur. Dorsal ligament kranial süspansiyonlu ligament (CSL) adını alır; ventral ligament ise kaudal genital ligament denilen ligamente dönüşerek daha sonra gubernakulum içinde gelişir (16, 17).

2. ayın bitiminde testis ve mezonefroz karın arka duvarına ürogenital mezenter ile asılı halde bulunmaktadır. Genişleyen testis, mezonefrozun

dejenerasyonu ile gonadın kendi mezenterisi olan mezorşiyum ile asılı hale gelir. Arka duvar boyunca testisin kaudal kutbundan çıkarak skrotuma uzanan ve ekstraselüler matriksten zengin yoğun mezenşimal yapı da gubernakulum olarak adlandırılır (11,12,15,17).

Zamanla karın ön duvarından, inguinal ligamentin medial yarısının biraz üstünde yer alan 4 cm uzunluktaki inguinal kanaldan geçip, aşağıya doğru skrotuma iner. Kanala derin halkadan (internal) girer ve yüzeysel (eksternal) halkadan çıkar (17).

Testisin inişi üç fazda gerçekleşmektedir. Birinci faz, testislerin genişleyip büyümesi ile mezonefrik böbreklerin eş zamanlı gerilemesinin olması ve testislerin posterior abdominal duvar boyunca kaudal yönde hareket etmesidir. Testislerin inguinal kanala geçmesinde karın içi organların büyümesi ile intraabdominal basınç artışının da etkisi olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda paramezonefrik kanalların atrofisi, testislerin transabdominal olarak derin inguinal halkaya doğru hareketini sağlamaktadır. Processus vaginalisin büyümesi de testislerin inguinal kanal boyunca skrotuma ilerlemelerinde yol göstermektedir (11, 13).

Fetal pelvisin genişlemesi ve embriyonun ebatlarının uzamasıyla testislerdeki pozisyonel değişiklikler birlikte olmaktadır. Androjenlerin etkisiyle kranial süspansiyon ligament geriler, testis diyafram yakınındaki konumundan serbest kalır ve testisler bir miktar daha yer değiştirir (11, 13).

Transabdominal iniş denilen ikinci fazda, testisler inguinal halka seviyesine iner fakat skrotuma girmez (13).

Transinguinal iniş denilen üçüncü fazdaysa, testisler genel olarak doğumdan birkaç hafta önce skrotuma inmiş olur (13). Testislerin inguinal kanaldan skrotuma inişi 26. haftada başlayıp bazı fetuslarda 2-3 gün devam eder ve genelde 32. haftada skrotum içine inmiş olurlar. Testisler periton ve processus vaginalis dışından geçerler. Skrotuma girdikten sonra inguinal kanal spermatik kord etrafında kasılır (11).

Retroperitoneal yerleşimli olan testisler skrotuma inerken karın ön duvarı tabakalarını da birlikte sürüklerler ve testislerin dış tarafında, bu tabakalarının uzantıları yer alır. Skrotumdan içe doğru deri, tunika dartos, fascia spermatica externa (eksternal spermatik fasya), fascia cremasterica ve bu fascianın sardığı m.

cremasterica, fascia spermatica interna (internal spermatik fasya) ve tunika vaginalis olarak sıralanır (20). Fascia transversalisin uzantısı fascia spermatica interna, m. obliquus abdominis internus ve fascia uzantıları m. cremasterica ile fascia cremasterica'ı, eksternal oblik aponevroz uzantıları ise fascia spermatica externayı oluşturur. Skrotum içerisinde testis processus vaginalisin distal ucu içerisine doğru uzanır. Perinatal periyotta vaginal processusun bağlayıcı sapı oblitere olarak testisle ilişkili bir peritoneal kese olan tunika vaginalis adını alır (11, 12, 14).

Testiküler damarlar, testisler posterior abdominal duvar seviyesindeyken oluşmaya başlarlar ve iniş sırasında aorta tarafından beslenmeye devam ederler. Skrotuma iniş esnasında duktus deferens ve damarları da beraberinde taşır (11, 17).

2.1.2. Testis Anatomisi

Testisler her biri ortalama 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm çapında, yaklaşık 10-14 gr ağırlığında olan oval şekilli, oblik yerleşim gösteren bir çift organdır (20-25).

Testislerin facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu, margo anterior ve margo posterior olmak üzere de iki kenarı vardır. Funiculus spermaticus aracılığıyla skrotum içinde asılı durumdadır (20-22). Üst ucu öne ve dışa, alt ucu arkaya ve içe doğru bakar. Sol taraftaki funiculus spermaticusun (spermatik kord) daha uzun olmasından dolayı sol testis sağa göre genellikle 1 cm daha aşağıda bulunur (20, 23, 26).

Testisler üç tabakadan oluşan bir kapsül ile sarılıdır. Dışta tunika vaginalis, altında tunika albuginea, en içte ise tunika vaskulosa yer alır. Dış kısımda bulunan tunika vaginalisin, lamina visseralis (epiorchium) ve lamina parietalis (periorchium) olarak adlandırılan iki yaprağı vardır. Lamina visseralis testisin ön kenarlarını ve iki yüzünü örter; arka kenarın medial ve lateral taraflarında ise kendi üstüne kıvrılarak lamina parietalis ile devam eder. Lamina parietalis ise testisin alt kısmından üste doğru, funiculus spermaticusun ön ve iç tarafını da kaplayacak şekilde yukarıya doğru uzanır. Lamina parietalis ve lamina visseralisi arasında potansiyel bir boşluk

(cavum serosum scroti) ve içinde de çok az miktarda seröz bir sıvı bulunur (20, 27, 28). Bu sıvı sayesinde testis skrotum içinde serbestçe hareket edebilmektedir (29).

Tunica vaginalis'in lamina visseralis altında tunika albuginea bulunmaktadır. Tunika albuginea testisi saran, elastikiyeti ve genişleme özelliği olmayan; kalın, sıkı, beyaz, fibröz bir bağ doku tabakadır. Bu tabaka testisin arka kenarından testis parankimi içine sokularak vertikal bir bölme oluşturur. Bu bölmeye mediastinum testis denir. Mediastinum testis, testisin extremitas superiorundan extremitas inferior yakınına kadar uzanır. Mediastinum testisin ön ve yan kısmından parankime doğru çıkan uzantılara septula testis adı verilir. Septula testisler, testis parankiminden geçerek tunika albuginea'nın iç yüzüne ulaşır ve testisi koni biçiminde lobuluslara böler (lobuli testis). Yaklaşık 300 ila 400 adet testis lobülü bulunmaktadır (20-24, 29, 30) Her bir lobül içinde bulunan, sıkıca sarılmış kıvrımlı şekliyle dolayı tübülü seminiferi contorti (kıvrıntılı seminifer tübül) adı verilen bir ila üç tübül yapısı oluşturur. Seminifer tübüller sperm hücrelerinin geliştiği yerlerdir (20-22, 24, 30). Her bir testis kanalcığı, mediastinum testis yakınında tübülü seminiferi recti adı verilen düz kanalcıklarla devam eder. Bütün lobuluslardan gelen bu kanalcıklar mediastinum testise sokulur ve burada rete testis denilen ağı oluşturur. Lobuli testislerde yapılan spermatozoonlar rete testisten duktuli efferentes testis adı verilen 15-20 tübülün içine boşalır ve bu kanallar aracılığıyla epididimise gelir (20, 21).

Tunica vaskulosa, tunika albuginea'nın uzantısı olan septulaların ve lobuli testislerin iç yüzünü örten, damar ağından oluşan vasküler bir bağ dokusu tabakasıdır (20, 31).

Testislerin arka kenarının dış kısmı boyunca epididimis yer alır; funiculus spermaticus da epididimisin medialinde olmak üzere, margo posteriorda bulunur (20).

Testislerin arteriyel beslenmesi, renal arterlerin hemen altında abdominal aortanın anterolateral yönünden çıkan sağ ve sol testiküler arterlerden sağlanmaktadır (26, 29-32). Spermatik kord, epididimis ve testisi besleyen testiküler arter skrotum içinde duktus deferense eşlik eder (30). İnternal iliak arterden duktus deferens arter yoluyla, inferior epigastrik arterden cremasteric arter yoluyla ve femoral arterden eksternal pudendal arter yoluyla zengin bir kollateral arter kan akımı sağlamıştır (31).

Her bir testis ve epididimisin arka tarafından çıkan küçük venler birleşerek plexus pampiniformis adı verilen venöz ağı oluştururlar (32). Plexus pampiniformis, funiculus spermaticus içinde yükselir ve kanalis inguinalisten geçerek karın boşluğuna ulaşır. Plexus pampiniformisi oluşturan venler daha yukarıda birleşerek vena (v). testicularis'i oluşturur. V. testicularis dextra v. cava inferior'a; v. testicularis sinistra ise v. renalis sinistraya dökülür (20, 26, 29-31)

Yüzeyel lenf damarları tunika vaginalis testisin altında, derin lenf damarları ise testis ve epididimisin içinde yer alır. Bu damarlar funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna geçer (20, 26, 29). Derin inguinal lenf nodlarına, lomber (aort) ve preaortik lenf nodlarına drene olur. Skrotumdaki lenfatik damarlar ise yüzeysel inguinal lenf nodlarına boşalır (20, 30, 31).

Testisin otonomik sinirleri, vagal parasempatik ve visseral afferent lifler ile medulla spinalisin T10 –T11 segmentinden sempatik lifler içeren testiküler arterin üzerindeki testiküler pleksustan kaynaklanmaktadır. Bu sinirler plexus aorticus ve plexus renalisin içinden geçer ve testisleri besleyen damarların çevresinden organa ulaşır (20, 29, 30).

Sperm ve hormon üretimi normal vücut sıcaklığından daha düşük bir sıcaklık gerektirdiği için testisler skrotum adı verilen kese benzeri bir yapının içinde yer alırlar ve skrotum vücut boşluğunun dış kısmına doğru uzanır. Skrotumun dış kısmı deriden oluşur ve raphe scroti olarak adlandırılan ortadaki çıkıntısı ile ayrılmış bir deri torbası gibi görünür. İçeriden de bir bağ dokusu septum (skrotal septum) ile sağ ve sol olmak üzere iki keseye ayrılarak testisin yapısını destekler. Her kese tek bir testis içerir. Derinin altında gevşek bağ doku tabakası ve dartos kası adı verilen düz kas tabakası vardır (21, 22, 23).

2.1.3. Testis Histolojisi

Testisler holokrin tipte sekresyon ile spermatozoon üretimi ve atılımı yaparak ekzokrin fonksiyon; hormon üretimi yaparak da endokrin fonksiyon özelliği gösteren bir çift organdır (22, 28, 29, 30, 33-36).

Testiste üretilen başlıca hormon testosteron olmakla birlikte, erkek fizyolojisi için hem testosteron hem de metaboliti olan dihidrotestosteron gereklidir.

Testosteron spermatogenez, embriyo ve fetusun gelişimi sırasında oluşan cinsel farklılaşma ve gonadotropin salgısının kontrolü için önemlidir (28, 33, 35). Testislerin skrotum içerisindeki sıcaklığı, vücut sıcaklığının 2°C-3°C altındadır. Testise yakın bölgede oldukça kıvrıntılı olan testiküler arter, testisten abdominal venlere kanı taşıyan pampiniform venöz plexus tarafından çevrelenmiştir. Böylece kan damarları arasında karşılıklı ısı değişimi olur ve testislerin düşük sıcaklıkta tutulmaları sağlanmış olur (33, 34).

Skrotumdaki testisler dıştan üç tabakalı kalın bir kapsül ile çevrilidir. Tunika vaginalis, testislerin karın boşluğundan skrotuma inerken birlikte sürükledikleri iki katlı periton tabakasıdır. Dışta parietal, içte ise visseral bir tabakadan oluşur, testisin anterolateral yüzünde bulunur; tunika albugineayı örter ve mezotel ile döşelidir (28, 33, 35, 36). Tunika albuginea her bir testisi saran kapsülün en kalın ve belirgin tabakası olup, yoğun bir fibroelastik bağ dokusudur. Testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Testise giren ve çıkan kan damarları, lenf damarları ve kanallar bu tabakada seyrederek. Tunika vasküloza ise en içte yer alan, damardan zengin gevşek bağ dokusu özelliğindedir (28, 33, 35, 37).

Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar (septum), bezi testiküler lobüller/bölmeler denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırırlar (37). Bu uzantılar tam değildir ve bölmeler çoğunlukla birbiriyle ilişkilidir. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan damarları, lenf damarları, sinirler ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içerir (28, 33-35).

Seminifer Tübül

Seminifer tübüller, erkek üreme hücreleri olan spermatozoonların üretildiği, kör uçlu başlayıp, kıvrımlı seyreden tübül yapılarıdır. Lümenleri daralarak sonlanır ve düz tübüller ya da tübüli rekti denilen kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanır. Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur (28, 33). Her bir seminifer tübül karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşeli olup, 150-250 µm çapında ve 30-70 cm

uzunluğundadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir (27, 28, 33).

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıf, belirgin bir bazal lamina ve germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Epitel altında yer alan tunika propria ise özel bir bağ dokusudur (28, 33, 35). Peritübüler doku olarak adlandırılan fibroblast içermeyen bu tabaka, insanda seminifer epitelin bazal membranı altında, 3-5 sıra düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış miyoid hücre ve kollajen lifleri içermektedir. Kemiricilerde ise tek sıra yassı miyoid hücre tabakası olarak gözlenir. Miyoid hücreler elektron mikroskopik olarak düz kas hücrelerine benzer şekilde bazal lamina ile sarılı aktin filamentlerinden zengin hücrelerdir. Kontraksiyonu ile tübül lümenindeki olgun spermatozoonların kanallara iletilmesini sağlar. Bağ dokusunun kollajen lifleride bu hücrelerce sentezlenip salgılanır (33).

Seminifer epitel veya germinal epitel, germ hücreleri olan spermatogenik hücreler ve bu hücrelere destek olup onları besleyen Sertoli hücreleri (Sustentaküler hücreler ya da destek hücreleri) olmak üzere 2 farklı hücre grubu içermektedir (28, 33, 35).

Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, tabanları bazal membrandan apikal uçları tübül lümenine kadar uzanan, spermatogenik hücreleri saran, ince, uzun, piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin sıklıkla oval veya üçgen biçimde olan nükleusunda çok sayıda girintiler bulunurken, belirgin nükleolusu ve az miktarda ince, seyrek heterokromatini gözlenmektedir (28, 33, 37). Işık mikroskopunda, spermatogenik hücreleri çevreleyen çok sayıda yan uzantıları nedeniyle, Sertoli hücresinin sınırları iyi belirlenemez. Elektron mikroskopunda ise çok sayıda agranüler endoplazma retikulumu, az miktarda granüllü endoplazma retikulumu, belirgin Golgi kompleksi ve bol mitokondri ile lizozomlar içerdiği gösterilmiştir. Organelden zengin hücreler olup lipid damlaları ve glikojen granülleri içerir. İnsanlarda, Sertoli hücrelerinin bazal sitoplazmalarında Charcot-Böttcher cisimleri denilen özel inklüzyonlar bulunur (28, 33, 35).

Sertoli hücreleri, geniş ve sıkı bağlantılar içeren kavşak kompleksleri ile birbirine bağlanır. Komşu Sertoli hücreleri birbirlerine zonula okludens tipi bağlantı kompleksleri ile bağlanmışlardır. Sertoli hücreleri arasındaki bu bağlantı

kompleksleri, kan-testis bariyerini yaparak seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartmanlara ayırmaktadır (28, 33, 34, 36). Sertoli hücreleri ile erken dönem spermatogonik hücreler arasında desmozom benzeri bağlantı kompleksleri bulunurken; Sertoli hücreleri ile bazal lamina arasında ise hemidesmozomlar bulunur (33). Sertoli hücrelerinin bazal kısmında spermatogonyumlar ve erken dönem primer spermatositler yer alırken; adluminal bölümünde ise daha olgun spermatositler ve spermatidler bulunur (28, 33).

Sertoli hücreleri gelişmekte olan spermatogonik hücreleri destekleyen, koruyan ve besleyen hücrelerdir (33, 35). Tam olarak farklılaşıp olgunlaşmamış spermatogonik hücreleri ve gelişmekte olan spermatidlerin aşırı sitoplazmalarını (artık cisimler) fagosite ederek ortadan kaldırmasını sağlarlar. Bölünme özellikleri yoktur (19, 27, 28, 33). Seminifer tübüllerin lümeninin içine olgun spermatozoonların salınımı, beslenmesi ve dış kanallara taşınması için fruktozdan zengin testis sıvısının salgılanması, erkeklerde Müllerian kanalların gelişimini baskılayıp kadın üreme organlarının gelişimini engelleyen antimüllerian hormonun üretimi ve salınımı görevleri arasındadır. Yüksek oranda testosteron bağlayan androjen bağlayıcı protein sentezlerler (19, 27, 35). Bazal plazma membranlarında folikül uyarıcı hormon (FSH) reseptörleri bulunur (33, 34). Sertoli hücrelerinde ayrıca FSH salınımını baskılayan inhibin, plazminojen aktivatörleri ve transferrin de sentezlenir (27, 33-35).

Enfeksiyon, kötü beslenme, radyasyona maruz kalma gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklı hücrelerdir ve maruziyet durumlarında sağ kalım oranları spermatogonik seri hücrelerine göre çok daha yüksektir (28).

Kan-Testis Bariyeri.

Testiküler kapillerler pencereli kapiller özelliğinde olup büyük moleküllerin geçişine izin verir (28). Sertoli hücrelerinin bitişik sitoplazması, her bir seminifer tübülü bir bazal bölmeye ve bir adluminal bölmeye bölen bir kan-testis bariyeri üreterek, sıkı bağlantıların kapatılmasıyla birleştirilir (35). Seminifer tübüllerin iç kısmıyla kan arasında bir bariyerin bulunması, testiküler sıvıda kandan gelen çok az madde bulunmasına yol açar. Spermatogonyumlar kanda bulunan maddelere kolayca ulaşabilir. Ancak, Sertoli hücreleri arasında bulunan engelleyici bağlantılar, bir bariyer oluşturarak büyük moleküllerin Sertoli hücreleri arasındaki boşluğa

taşınmasını engeller (28). Seminifer tübüllerin iyon, aminoasit, karbonhidrat, protein içeriği kan ve lenfin içeriğinden oldukça farklıdır. Kan-testis bariyeri erkek germ hücrelerinin kan yoluyla gelen zararlı maddelere karşı korunmasını sağlar. Böylece haploid germ hücreleri kişinin immun sisteminden de izole edilmiş olur (27, 35).

Spermatogenez sırasında, spermatogonyumların bölünmesi sonucu oluşan bazı hücreler bu bağlantı noktalarından geçerek, bariyerin üzerinde yer alan adluminal kompartmana ulaşırlar. Spermatositler ve spermatidler, bariyerin üzerinde, Sertoli hücrelerinin yan ve üst kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin flagellar kuyrukları geliştikçe, Sertoli hücrelerinin üst uçlarından çıkan saçaklar halinde görülürler (28).

Seminifer tübüllerde, spermatogenik hücreler bölünür, olgunlaşır ve spermatozoon haline dönüşür. Spermatogenik hücreler birbiri üzerine sıralanmış farklı gelişim aşamasında olan 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş hücrelerdir (27, 33-35). Bazal membrana en yakın olanı spermatogonyumlardır. Lümene en yakın bulunan, daha olgun hücreler ise spermatidlerdir. Lümeninde ise spermatozoonlar izlenir (27, 28).

Spermatogonyum

Olgunlaşmamış, en immatur spermatogenik hücreler olup yaklaşık 12 µm çapında, küçük koyu renkli ovoid çekirdeklere sahip, yuvarlak hücrelerdir (28, 33, 35). Tübüllerin epitel duvarında, bazal membranın hemen üzerinde bulunan ve Sertoli hücre yüzeyleri ile yakından ilişkili diploid germ hücreleridir (27, 28, 34). Spermatogonyumlar mitoz bölünme ile diğer spermatogenik hücreleri oluşturan ana hücrelerdir. Nükleus özelliklerine göre 3 tip spermatogonyum bulunmaktadır (27, 36).

1. Tip A koyu spermatogonyum: Kök hücreler olduğu düşünülen, ince granüler kromatine sahip, yoğun bazofilik oval nükleuslu hücrelerdir. Düzensiz aralıklarla bölünerek ya tip A koyu spermatogonyum ya da tip A açık spermatogonyum oluştururlar. Tip A koyu spermatogonyumlar kök hücre olarak kalırken Tip A açık spermatogonyumlar farklılaşıp olgunlaşarak spermatozoon haline gelirler (18, 27, 33, 35).

2. Tip A açık spermatogonyum: İnce granüler, açık boyanan oval nükleusları bulunur. Mitoz geçirerek sayılarını artırır. Bu bölünmelerden sonra tip A spermatogonyumlar tip B spermatogonyumlara farklılaşırlar (27, 33, 35, 38).

3. Tip B spermatogonyum: Kromatini nüklear kılıf boyunca ve nükleolus çevresinde geniş, kaba kümeler yapan, yuvarlak nükleuslu hücrelerdir ve spermatogonyal dönemin son olaylarını temsil eder (27, 33, 35).

Spermatogenik hücrelerden olgun spermatozoon oluşması spermatogenez ve spermiyogenez olmak üzere iki süreçte izlenir (27, 28, 33, 35).

Spermatogenez

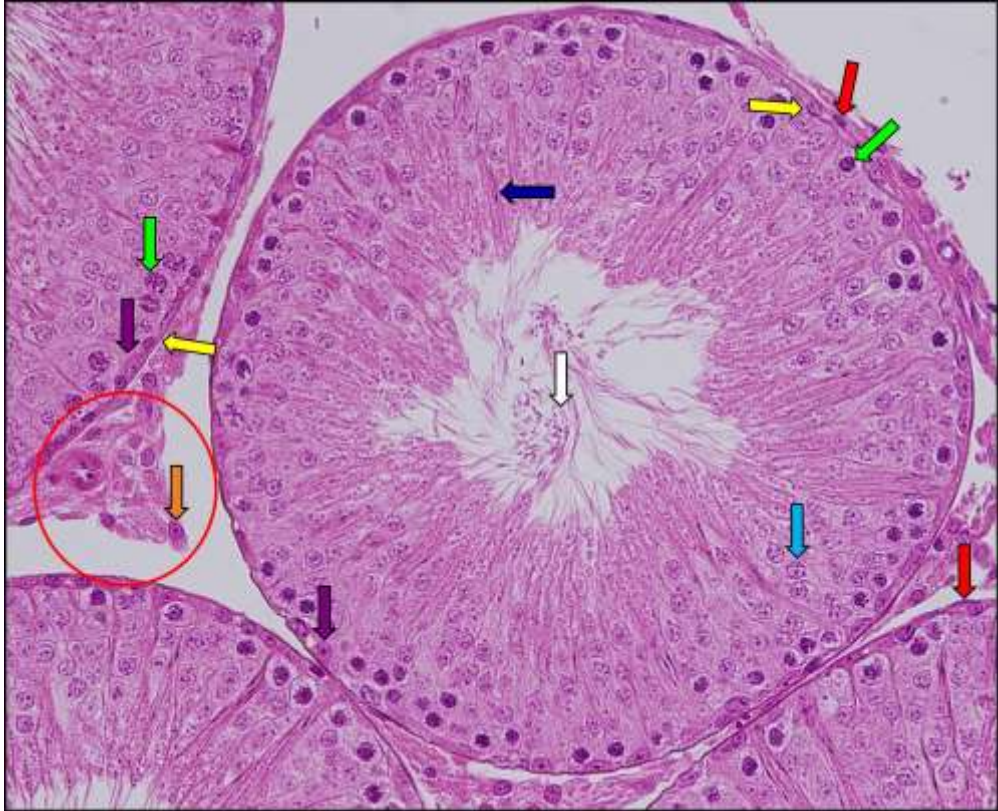
Pubertede öncü hücreler olan spermatogonyumların, testis tübüllerinde bölünüp farklılaşarak spermatidleri oluşturmaya spermatogenez denir (27, 28).

Pubertede, testosteronun etkisiyle spermatogonyum hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur. Yeni oluşan hücreler tip A koyu spermatogonyumlar yani kök hücreler olarak bölünmeyi sürdürebilir ya da mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluşturabilirler (27, 34).

Tip B spermatogonyumlar mitozla bölünmeye devam ederek **primer spermatositleri** oluştururlar. Primer spermatositler oluşuktan hemen sonra DNA'larını replike edip mayoz bölünmeye hazırlanırlar. İlk mayoz bölünmeye başlamadan hemen önce seminifer tübülün adluminal bölümüne taşınırlar. Her bir primer spermatosit normalin 2 katı kromozom sayısına ($4n$) ve iki katı DNA'ya ($2d$) sahiptir. Mayoz bölünmenin profaz safhasında gözlenen kromatin yoğunlaşmasından dolayı bu hücrelerin nükleuslarında kromatin iplikçikleri izlenir. Primer spermatositler, seminifer tübüllerdeki en büyük germ hücreleridir ve germinal epitelinin orta kısmında bulunurlar. Sitoplazmaları, kaba kümeler veya ince kromatin ipliklerinden oluşan büyük çekirdekler içerir. Primer spermatosit birinci mayoz bölünme ile iki adet **sekonder spermatosit** oluşturur. Böylece primer spermatositin diploid kromozom sayısı haploide inmiş olur. Sekonder spermatositler daha küçük hücrelerdir ve DNA sentezlemeden 2. mayoz profazına girerler. Diploid sayıda DNA'ya sahiplerdir ($2n$) ve 22 otozom ile bir adet seks kromozomu içerirler. Sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesi sonucunda ise iki eşit, haploid, daha küçük yuvarlak hücreler olan **spermatidler** oluşur. Birinci ve ikinci mayoz

bölünme arasında S fazı (DNA sentezi) görülmediğinden dolayı, ikinci bölünmeden sonraki her hücrede DNA miktarı yarıya iner ve haploid (1n) hücreler oluşur. Oluşan spermatidler 23 kromozom (1n) ve normalin yarısı DNA'ya (1n) sahiplerdir. İnsanlarda profaz safhası 22 gün sürerken, spermatogenez ve spermiyogenez yaklaşık 9 haftada tamamlanır. Herhangi bir tübülde bu dönemde yaşanan bütün aşamaları görmek genellikle mümkün olmaz (27, 28, 33, 35, 36, 38).

Spermatidler seminifer tübülün adluminal kısmında gruplanır ve Sertoli hücreleri ile yakından ilişkilidir. Germinal epitelde bulunan spermatogonik hücreler farklılaşma ve gelişim sırasında hücreler arası köprüler tarafından bir arada tutulurlar. Gelişen spermatidler, olgun spermatozoonlar olarak salındığında ise hücreler arası köprüler kırılır (35).



Resim 1. Testisin genel histolojik yapısı. Seminifer tübül içerisinde Sertoli hücresi (mor ok), spermatogonyum (sarı ok), primer spermatosit (yeşil ok), yuvarlak spermatid (açık mavi ok), uzamış spermatid (koyu mavi ok), spermatozoon (beyaz ok), interstisyel bağ dokusu (kırmızı daire), Leydig hücresi (turuncu ok) ve miyoid hücre (kırmızı ok) gösterilmektedir.

Spermiyogenez

Yuvarlak veya poligonal şekilli, yoğun nükleuslu spermatidlerin farklılaşarak hareketli, uzun spermatozoonlara dönüştürüldüğü sürece **spermiyogenez** denir (27, 28, 35). Spermiyogenez akrozom oluşumunu, nükleusun yoğunlaşarak küçülüp uzamasını, flagellum gelişmesini ve sitoplazmanın çoğunun kaybolması gibi boyut ve şekil değişimini içeren karmaşık bir dönemdir. Olgunlaşan spermatidlerin küçük, koyu renkli başları Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında, kuyrukları ise seminifer tübülün lümenine doğru uzanmaktadır (27, 35). Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermiyogenez aşamasında Sertoli hücreleri de önemli rol oynarlar. Sonuçta seminifer tübül lümenine salınan olgun spermatozoon oluşur (27, 28).

Spermiyogenez dört dönemde incelenir:

1. Golgi dönemi: Spermatid sitoplazması, nükleusun yakınında bulunan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondri, sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulumu içerir. Glikoproteinden zengin, küçük PAS (+) granüller Golgi kompleksinde birikir ve proakrozomal granül adını alırlar. Nükleus membranı yakınında bulunan akrozomal vezikül ile sonrasında birleşip akrozomal granülü oluştururlar. Sentriyoller arkaya doğru hareket etmeye başlarlar. Spermatozoon kuyruğunun aksonemini oluşturacak olan mikrotübüller sentriyollerden oluşmaya başlarlar. Flagellar aksonem oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden nükleusa doğru göç ederken hareket ettikçe aksonemal bileşenleri çevresine sarar (27, 28, 33-34).

2. Kep dönemi (şapka dönemi): Akrozomal vezikül, nükleusun ön kısmında genişleyip şapka gibi bu bölümü kuşatır (akrozomal kep). Nükleus membranının bu kısmında porlar kaybolur, membran kalınlaşır, nükleus yoğunlaşır (27, 33).

3. Akrozom dönemi: Spermatid seminifer tübülün tabanına yönelip, Sertoli hücrelerinin sitoplazmasının derinlerine gömülür. Aksonem lümene doğru uzanır, belirgin şekil değişikliği oluşur (27, 28, 35). Yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayan akrozomal vezikül ve granül akrozom adını alır (28).

Nükleus baş bölgesinde yoğunlaşır ve yassılaşır uzar (27, 34). Sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur (28). Kuyruk flagellumu iyice uzayıp seminifer tübül lümeninde belirgin olarak görülmeye başlar (27). Mitokondriler de flagellumun proksimali etrafında toplanıp spermatozoonun orta parça adını alan kalınlaşmış bölgesini meydana getirir ve spermatozoonun enerji

kaynağıdır (28, 34). Flagellumu oluşturan sentriyollerden kaynaklanan 9 adet kalın lif, aksonemin mikrotübül çiftlerinin periferinde dış kalın lifleri oluşturur. Bu liflerin başladığı bölge boyun (bağlayıcı parça) adını alır. Akrozom apikal plazma membranına iyice yaklaşır. Sitoplazmik mikrotübüller akrozomdan spermatidin arka kutbuna uzanarak silindirik kılıfı (manşet de denir) oluştururlar (27).

Esas parçanın distalinde kalan ve sadece aksonemin mikrotübüllerini içeren kısa son bölüm ise son parça olarak isimlendirilir (27, 35). Akrozomal faz, spermatidin, tübülün tabanına doğru akrozomun yönlendirilmesiyle sona erer (34).

4. Matürasyon olgunlaşma dönemi: Sitoplazma miktarının azaldığı son dönemdir. Spermatidin fazla sitoplazmayı içeren bölümü boğumlanıp kopar ve Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilip ortadan kaldırılır.

Spermatidler birbirleriyle olan bağlantılarını kaybederek Sertoli hücrelerinden ayrılıp lümeneye düşerler (27, 34). Seminifer tübül lümenine dökülen spermatozoonlar epididimisten çıkana kadar hareketsizdir (28, 34).

Spermatogenez tüm seminifer tübüllerde ve her seminifer tübül içinde uzunluğu boyunca aynı anda ya da eşzamanlı olarak gerçekleşmez (28, 34, 36). Seminifer epitel döngüleri denilen dalgalı olgunlaşma sekansları meydana gelir. Tübül duvarının ayrı ayrı her bölgesinde spermatogenezin komşu bölgelerden az ya da çok bağımsız olarak ilerlediği gözlenir. Bu nedenle, bir tübül kesitinin farklı alanlarında ve farklı tübül kesitlerinde, spermatogenezin farklı aşamaları izlenebilir (28, 34).

Olgun Spermatozoon Yapısı

Olgun insan spermi yaklaşık 55-60 µm uzunluğundadır. Sperm başı yassı, sivridir ve 4-5 µm uzunluğunda, 2,5-3,5 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır. Yoğun kromatinden oluşan nükleusu baş kısmının büyük çoğunluğunu oluşturur. Nükleusun ön üçte ikilik bölümünü saran akrozomda ise hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin olarak adlandırılan tripsin benzeri proteaz bulunmaktadır (33, 36, 39). Bu akrozomal enzimler ovumun zona pellusidasının delinmesi için gereklidirler.

Sperm kuyruğu boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere bölümlere ayrılır (33, 39). Boyun, başı kuyrukla birleştiren çok kısa bir segmenttir.

Kısa olan boyun, sentriyolleri ve kuyruğun geri kalan dokuz dış yoğun liflere bağlandığı bağlantı parçasını içerir (33, 34).

Orta parça boyundan halkaya kadar uzanır, yaklaşık 7 µm uzunluğundadır. Aksonemi, dokuz dış yoğun lifi, sarmal tarzda lifleri ve aksonemal kompleksi saran bir mitokondri kılıfını içerir. Mitokondriyonlar kuyruk hareketi için gerekli enerjiyi sağlar ve spermin hareketinden sorumludurlar (33, 34, 36). Aksonem, silyumlarda görülen standart dokuz artı iki mikrotübül ikili düzenine sahiptir. Plazma zarının altında bulunan halka adı verilen lifli bir kalınlaşma ise mitokondrinin ana parçaya kaymasını engeller (36).

Kuyruğun en uzun kısmı olan esas parça halkadan uç parçaya kadar uzanır, yaklaşık 40 µm uzunluğundadır. Yedi dış yoğun lifçe sarılı merkezi aksonem ve fibröz kılıfı bulunur (40). Kalın liflerin ve aksonemal kompleksin dışında fibröz kılıfı içerir (33, 34).

Son parça olgun spermde flagellumun son 5 µm'lik kısmıdır. Kuyruğun sadece aksonemi ve onu çevreleyen plazma zarından oluşan kısa kısmıdır (33, 34, 36).

İnterstisyel Doku

Testislerde seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, sinirler, kan ve lenf damarlarını içermektedir (27, 28, 30). Pubertede işlevsel olarak daha belirgin hale gelen, bağ dokusu içinde tek tek veya gruplar halinde yerleşim gösteren **interstisyel ya da Leydig hücreleri** bulunmaktadır. Leydig hücreleri yuvarlak veya poligonal şekilli, yuvarlak merkezi nükleuslu, asidofilik sitoplazmalı hücrelerdir. Sitoplazmalarında çok sayıda lipid damlası bulunur ve erkek cinsiyet hormonu olan testosteronu üretirler. Ek olarak tübüloveziküler kristallara sahip çok sayıda mitokondriyon, lipofuskin pigmenti, çubuk şeklinde bir inklüzyon olan Reinke kristalleri görülür (27, 28, 33-35).

Embriyonik interstisyel hücreler intrauterin 4. aya kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar ve sonrasında testosteron sentezinde bir azalmayla birlikte gerilerler. Gebeliğin geri kalan zamanında ve hipofizden salgılanan lüteinizan hormon (LH) ile testosteron sentezinin yeniden başladığı puberte öncesi döneme kadar dinlenmede kalırlar (28). Testosteron sentezi pubertede sperm üretimi,

aksesuar bezlerin sekresyonlarının başlaması ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi için gereklidir (4, 27).

Testis içi genital kanallar túbüli seminiferi rekti, rete testis ve duktuli efferenteslerdir. Bu kanallar, seminifer túbüllerden gelen sıvıyı ve spermatozoonları duktus epididimise taşır. Her seminifer túbül düz görünümlü túbüli seminiferi rekti denilen kısa bir bölümle sonlanır. Bu kısmın duvarında sadece Sertoli hücreleri bulunur; başlangıç bölümü, sıkı bağ dokusu kılıfı ile desteklenen ve silindirik epitel hücrelerini içeren ana kısım ile devam eder. Düz túbüllerin lümenleri ilerledikçe iyice daralır ve tunika albugineanın kalınlaşması ile oluşmuş mediastinumun zengin damarlı bağ dokusunda rete testise açılırlar. Rete testis tek katlı kübik veya alçak prizmatik epitel ile döşeli düzensiz, anastomozlaşan bir kanallar ağıdır. Epitel hücreleri tek bir apikal silyum ve birkaç kısa mikrovillus içerirler. Rete testis, epididimisin başına 10-20 adet olan 15-20 cm uzunlukta olup kıvrımlı seyreden duktuli efferenteslerle açılırlar. Duktuli efferentesler yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşelidir. Uzun boylu prizmatik hücreler genellikle silyumludur. Kısa hücreler silyum içermez, fakat bol miktarda mikrovillus bulundurlar. Bazal membrana komşu yerleşen kübik şekilli bazal hücreler kök hücrelerdir. Silyasız hücreler seminifer túbüllerden salgılanan sıvının çoğunu emer. Silyalı hücre aktivitesi ve sıvı emilimi, spermatozoonların epididimise doğru süpürülmesini sağlayan bir sıvı akımı sağlar. Epitelin bazal laminasının dışında elastik lif içeren ince sirküler düz kas tabakası kanalı çevreler (27, 28).

2.2. Epididimis Morfolojisi

Duktuli efferentesler birleşip tek, kıvrıntılı ve sıkıca sarılı bir kanal olan duktus epididimisi oluşturur. Epididimis, testisin posterolateral tarafı boyunca üst ucundan alt ucuna kadar ilerleyen, virgül şeklinde tek ve uzun sarmal bir yapıdır (21, 22, 29, 36, 41). Yaklaşık 6 m uzunluğunda ve çok küçük bir çapa sahiptir. Epididimis, sperm hücrelerinin depolandığı, korunduğu, olgunlaşmaya devam ettiği ve motilite kazandığı yerdir (36, 38).

Epididimis, testisin üst kutbunda bir baş, arka kenar boyunca uzanan bir gövde ve testisin alt kutbunda bulunan bir kuyruk (kaput, korpus ve kauda) yapısından oluşur (20, 22, 23, 25, 30, 31, 36, 41).

Testisten çıkan duktuli efferentes testis, spermleri rete testisten epididimisin kaput kısmına taşır. Kaput epididimisin kıvrımları distale doğru giderek küçülerek korpus ve kauda epididimisi yapar. Epididimisin kaudasında duktus deferens, epididimis kanalının devamı olarak başlar. Kaput epididimisin tam altında bulunan küçük oval cisme appendix testis denir. Kaput epididimisin ön ucundan aşağı doğru uzanan oluşuma ise appendix epididimis adı verilir. Epididimisin damarları ve sınırları ise testis ile aynıdır (20, 29). Appendix testis, paramesonefrik (Müllerian) kanalın üst ucuna ait bir kalıntıdır; appendix epididimis ise mezonefrozların bir kalıntısıdır (26).

Epididimisin korpus ve kauda bölümlerinde yer alan kıvrımlı, uzun bir kanal olan duktus epididimis ise kan damarlarından, düz kas hücrelerinden zengin sıkı bağ dokusu ile sarılıdır. Yüzey epiteli steriosilyumlu yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Burada bazal hücreler ve prizmatik esas hücreler bulunur. Esas hücreler çok sayıda uzun steriosilyumlara sahip uzun boylu hücreler olup sperm olgunlaşmasını sağlayan sialik asit, gliserofosfokolin ve glikoproteinleri salgırlar. Yuvarlak olan bazal hücreler ise kök hücre özelliğindedir (27, 28). Epididimide bulunan diğer hücrelerden apikal hücreler ise öncelikle epididimis epitelinin ilk segmentinde bulunup endositik aktiviteye sahiptir. Dar hücreler denilen hücreler de yalnızca ilk segment içinde bulunur ve bitişik esas hücrelerden daha dardır. Bu hücrelerin epididimis lümenine H^+ iyonları salgıladığı ve endositozdan sorumlu olduğu gösterilmiştir. Berrak hücreler, yüksek endositik aktiviteye sahip başka bir hücre türüdür. Bu hücreler epididimisin kaput, korpus ve kauda bölgelerinde özel olarak bulunur ve başlangıç segmentinde yer almaz. Berrak hücreler, epididimis lümeninde olgunlaşma sırasında sperm hücrelerinden salınan sitoplazmik damlacıkları almaktan sorumlu hücre tipidir. Berrak ve dar hücrelerin birlikte, luminal pH'ın düzenlenmesinden sorumlu birincil hücreler olduğu düşünülmektedir (38). Epitel, peristaltik kasılmalarıyla spermatozoonların kanallar boyunca ilerlemesine yardımcı olan düz kas hücreleri ve kapiller damarlardan zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş bir bazal lamina üzerine oturur. Duktus epididimis epiteli

spermatogenez süresince oluşan artık cisimciklerin ortadan kaldırılması ve sindirilmesine de katılır. Epididimis epiteli boyunca halo hücreleri adı verilen ve epididimisindeki birincil bağışıklık hücreleri olan lenfositlere rastlanabilir (38). Kaput ve korpusun büyük bölümünde bağ dokusu dışında sirküler seyirli düz kaslardan oluşan ince bir tabaka vardır. Kaudada bu tabakanın iç ve dış bölümüne longitudinal seyirli iki kas tabakası daha eklenir (27, 28, 34).

2.3. Gentamisin

2.3.1. Genel Bilgiler

Aminoglikozidler antibakteriyel etki mekanizmaları, spektrumları, kimyasal yapıları, farmakokinetik özellikleri ve toksik etkileri açısından birbirine benzeyen yapıya sahip bir antibiyotik grubudur (42, 43).

Aminoglikozidler 1940'lı yıllarda streptomisinin bulunması ile başlayarak Streptomyces veya Micromonospora türü mikroorganizmalardan elde edilen doğal veya yarı-sentetik maddeler olan gentamisin, tobramisin amikasin, netilmisin, neomisin, isepamisin, kanamisin, paromomisin, viomisin ve sisomisinden oluşur (42).

Aminoglikozid grubu ilaçlar merkezi konumda bulunan bir heksoz çekirdeğine glikosidik bağlarla birleştirilmiş iki veya daha fazla amino şekerden oluşur (43-45). Bu heksoz veya aminosiklitol, streptidin veya 2-deoksistreptamindir (44). Özel amino şekerleri ve amino gruplarının spesifik yerleri, bileşiklerin ayırımında, antibakteriyel etkilerinde ve toksisitelerinde önemlidir (45).

Aminoglikozidlerin en önemli özelliklerinden biri moleküllerinin fazla polar olmasından dolayı en az lipofilik antibiyotikler olmaları ve bakteri hücrelerine pasif difüzyonla girememeleridir. Görece güçlü bazlardır. Bazik ortamda iyonizasyon oranlarının azalmasıyla bakteri hücrelerine girişleri ve etkinlikleri artar. Genellikle sülfat tuzu şeklinde hazırlanırlar. Suda fazla çözünürler. Oral kullanımda gastrointestinal sistemden ya zayıf bir şekilde emilirler ya da emilmez; bu yüzden intramüsküler veya intravenöz enjeksiyon ile verilirler (42-44, 46). Vücutta ekstraselüler sıvıya kısıtlı bir dağılım gösterirler ve memeli hücreleri içine zor

girerler (42). Plasentayı geçerler, fetal plazma ve amniyon sıvısında birikebilir, ancak kan-beyin bariyerini geçemezler; eklem ve plevra sıvısından yüksek konsantrasyonlarda elde edilebilir. Hepsi normal böbrek tarafından nispeten hızlı bir şekilde atılır. Yağ dokusundaki düşük dağılımından dolayı gerçek vücut ağırlığına değil, yağsız vücut ağırlığına göre doz ayarlanmalıdır (43, 44, 46). Aminoglikozidlerin bakterisidal etkisi konsantrasyona bağlıdır (43, 44, 47).

Aminoglikozidler, ilaç seviyeleri minimum inhibe edici konsantrasyonunun (MİK) altına düştükten sonra bile bakteriyel baskılamaya devam eden postantibiyotik bir etki (PAE) sergilerler. Doz arttıkça, PAE de uzar. Günlük toplam aminoglikozid dozunun tek enjeksiyonu, bölünmüş dozlardan daha etkili olmakta ve daha az toksik olabileceği düşünülmektedir (47). Bu şekilde toksisite riski de azaltılmaktadır (43, 47). Parenteral aminoglikozidlerin %90'dan fazlası glomerüler filtrasyonla idrarda değişmeden atılır. 24 saat içindeyse bir dozun %50-60'ı değişmeden atılabilir (43, 46).

Gentamisin, klinik kullanım için sistemik olarak uygulanan 3. aminoglikozid antibiyotiktir ve 1964 yılında Micromonospora purpurea'dan türetilmiştir (4, 42, 47-49). Akut enfeksiyonlarda en yaygın kullanılan aminoglikozididir ve sınıfın prototipi olarak kabul edilebilir (47).

2.3.2. Antibakteriyel Spektrum

Gentamisin esas olarak *P. aeruginosa*, Enterobakter türleri, *Serratia marcescens*, *Proteus* türleri, *Acinetobakter* türleri ve *Klebsiella* gibi olasılıkla diğer ilaçlara dirençli gram-negatif bakterilerin sebep olduğu şiddetli enfeksiyonlarda (ör. sepsis ve pnömoni) kullanılır. Özellikle birçok ciddi gram-negatif basil enfeksiyonunda kullanılan önemli bir ajandır. Gentamisin, *Mycobacterium tuberculosis* ve diğer mikobakterilere karşı etkisizdir (4, 44, 47, 48). Aminoglikozidler içinde, amikasin'den sonra, spektrumu en geniş ve antibakteriyel etki gücü en yüksek ilaçtır. Kitlesine göre, streptomisin, kanamisin ve amikasin'den güçlüdür. Yapıca birbirine çok benzeyen üç gentamisin türünün (gentamisin C1, Cla ve C2) karışımından ibarettir (42). Düşük maliyeti ve en dayanıklı gram negatif aeroblar harici güvenilir etkinliği nedeniyle ilk tercih edilen aminoglikozididir (44).

Plazma proteinlerine hemen hemen hiç bağlanmaz. Kanda yaklaşık %10 oranında eritrositlere bağlanır; anemik hastalarda kandaki serbest gentamisin konsantrasyonu biraz daha yüksek olur (42).

2.3.3. Etki Mekanizması

Aminoglikozidler, bakterisidal antibiyotiklerdir; bakteri hücrelerine girip ve protein sentezini inhibe ederek konsantrasyona bağlı bir etki gösterir. Genel süreç iki ana adımdan oluşur:

1. Bakteriyel hücre duvarı ve sitoplazmik membrandan taşınma
2. Ribozomal bölgelere bağlanma, böylece protein sentezini inhibe etme (45, 47).

Gram-negatif bakterilerin dış duvarındaki porin kanallarından geçerek periplazmik aralığa girip yayılırlar veya gram pozitif bakterilerdeki peptidoglikan duvarının suyla doldurulmuş alanlarına nüfuz ederler (42, 43, 47). Sitoplazmik membran boyunca periplazmik boşluktan giriş, elektron taşıma zincirine bağlı taşıyıcı aracılığıyla oluşur. Bu nedenle penetrasyon, polarize membranın durumuna ve oksijene bağlı aktif işlemlere (enerjiye bağlı faz I veya EDP1 girişi) bağlıdır. Son olay, enerji gerektiren bir olaydır. Bu yüzden zorunlu anaerobik bakterilere giremezler ve etkisizdirler; fakültatif anaeroblar, O₂ kaynağı yetersiz olduğunda daha dirençlidir (42, 47). Ayrıca ortamın pH'sının düşük olması, hiperosmolaritesi, ortamda cerahat bulunması ve oksijen basıncının düşüklüğü gibi yerel durumlar da ilaç aktivitesinin düşük olmasına sebep olur (42, 48).

Bakteriyel hücre duvarı inhibitörleri (β -laktamlar, vankomisin gibi), aminoglikozidlerin hücreye girişini artırır ve sinerjik etki oluştururlar (43, 45, 47, 48).

Aminoglikozidler 30S ve 50S alt birimleri arasındaki birleşme noktasına bağlanır ve anormal protein üretimi ile sonuçlanan kodon tanınmasının bozulmasına ya da kodun yanlış okunmasına neden olur (43, 45, 47).

Aminoglikozid kullanımıyla bakteriler daha geçirgen hale gelir; iyonlar, amino asitler ve proteinler sızıntı yaparak hücre ölümüne sebep olur. Bu durum üretilen kusurlu proteinlerin hücre zarına eklenmesinden kaynaklanır (47).

Aminoglikozidlerin bakterisid aktivitesi, muhtemelen bozulmuş protein sentezi ve membran işlev bozukluğu kombinasyonundan kaynaklanır. Ca^{++} , Mg^{++} ve diğer iki değerli iyonlar, aminoglikozidlerin bakterilere taşınmasını inhibe ederler (45).

2.3.4. Kullanım Alanları ve Doz Uygulamaları

Genellikle ciddi enfeksiyonları tedavi etmek için ampirik olarak kombinasyon antibiyotik rejiminde spektrumu genişletmek amaçlı ikinci bir ajanla kombine edilerek kullanılır. Gentamisin yüksek toksisitesi ve terapötik indeksinin düşük olması nedeniyle kullanımı ciddi gram-negatif basil enfeksiyonları ile sınırlandırılmalı, böbrek yetmezliği olan hastalarda dozunun ayarlanması ve mümkünse serumdaki düzeyinin izlenmesi gereken bir ilaçtır (42, 47). Gentamisin preparatları parenteral, oftalmik ve topikal uygulamalar için kullanılabilir (44).

A. İntramuskuler / İntravenöz Uygulama

Gentamisin, sepsis, bozulmuş konak savunması olan hastalarda (AIDS'li hastalar, nötropenik hastalar, antikanser ilaçları veya yüksek doz kortikosteroid kullanımı gibi), trakeostomili veya solunum cihazına bağlı olan hastalarda, postoperatif pnömoniler; implantlı ve yoğun bakımda olan kritik hastalardaki solunum yolu enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisi için kullanılmaktadır (44, 47). Piyelonefritli ağır hastalarda geniş ve etkili bir tedavi başlangıcı sağlar. Ancak mikroorganizmanın izolasyonu ve antibiyotik duyarlılığı belirlendikten sonra başka bir ilaca geçilmelidir (44). Viridans streptokok, enterokok veya koagülaz-negatif stafilokok kaynaklı endokardit tedavisinde penisilin veya glikopeptidlerle birlikte gentamisin önerilmektedir (43-45, 48). Subakut bakteriyel endokardit (SABE) tedavisinde de gentamisin (1 mg/kg, 8 saatte bir intramüsküler) genellikle penisilin, ampisilin ya da vankomisin ile birleştirilir (47). Veba ve tularemi tedavisinde de gentamisin etkili ve tercih edilen ilaçtır (44).

Yetişkinler için önerilen doz uygulamasında günde bir kez intravenöz infüzyonla başlangıçta 5-7 mg/kg verilir ve tedavi süresi 7 günü geçmemelidir (42, 44).

B. Yerel ve Oküler Uygulama

Enfekte yanıklar, yaralar ya da deri lezyonlarının tedavisi, konjunktivit ve ven içi katater enfeksiyonlarını önlemek amacıyla kullanılmaktadır (44, 47, 48).

C. İntratekal Uygulama

Etkin dirençli gram-negatif bakteriler ise günde 1-10 mg gentamisin sülfat intratekal olarak kullanılabilirle birlikte menenjit tedavilerinde genel olarak aminoglikozid kullanımı azalmıştır (48).

Periton diyalizine bağlı peritonit olgularındaysa gentamisin periton diyalizatına eklenir (44, 47).

2.3.5. Yan Etkileri

Aminoglikozidlerin ciddi toksisitelerinin bulunması kullanım alanlarını sınırlamaktadır. Tedavi süresi 5 günden fazla olduğunda, yüksek dozlarda, yaşlılarda ve böbrek yetmezliği durumlarında ototoksisite ve nefrotoksisite daha sık gözlenmektedir (48, 49). Renal disfonksiyonu olan hastalarda, doz azaltımı ve / veya arttırılmış bir doz aralığı gereklidir (43, 46).

Nefrotoksisite geri dönüşümlü ve hafiftir; 3-5 günden daha uzun gentamisin kullanan hastaların %5-25'inde ortaya çıkar (48). Aminoglikozidler, renal yolla yıkılıp atıldığı için bu nefrotoksik etki kendi atılımlarını da bozabilir ve kısır bir döngü gelişebilir (5, 46) .

Ototoksisite, kulağın vestibüler organı ve kokleanın duyu hücrelerindeki ilerleyici hasar ve yıkımı ile gerçekleşir. Genellikle geri dönüşümsüz olan sonuç vestibüler hasar durumunda vertigo, ataksi ve denge kaybı; koklear hasar olduğundaysa işitsel rahatsızlıklar veya sağırılık olarak gözlenir (48).

Seyrek görülen ciddi bir toksik reaksiyon da nöromusküler blokajın neden olduğu felçtir (42). Deri döküntüleri, eozinofili, kan dispasileri, ateş, anjiyoödem, eksfoliyatif dermatit, stomatit ve anafilaktik şok dahil olmak üzere nadir aşırı duyarlılık reaksiyonları da gözlenmiştir (44).

Nefrotoksik etkilerine ek olarak yapılan bazı çalışmalar gentamisinin sperm hareketliliğini azaltabildiğini, üreme organ ağırlığını azalttığını, testiste apoptoza neden olabileceğini ve testis yetmezliğine yol açabileceğini göstermiştir (50, 51, 52).

Gentamisin spermatogenezi ve sperm fonksiyonunu bozduğu bilinen en yaygın kullanılan aminoglikozid antibiyotiklerden biridir (49, 50, 53-56).

Gentamisinin üreme sistemine etkileri üzerine yapılan ilk çalışmalarda kan testis bariyerinden çok az geçmesinden dolayı testiste birikmediğı rapor edilmiştir (57). Buna karşılık sonraki çalışmalarda tam tersine, gentamisinin testiste germ hücrelerinde hücre bölünmesini ve protein sentezini engellediğı; seminal vezikülde hücre ölümünü indüklediğı rapor edilmiştir (54).

Ayrıca gentamisinin üreme organında fosfataz aktivitesini inhibe ettiğı, testiste askorbik asiti, steroidogenik enzimleri ve kolestrol seviyesini azalttığı görülmüştür (49, 58).

Gentamisinin sperm sayısı, hareketliliğı ve canlılığını azalttığı bilinmektedir. Gentamisin kaynaklı testis toksisitesinin mekanizması net bir şekilde anlaşılmassa da birçok çalışmada gentamisinin, serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu artırıp, antioksidan enzim düzeylerini azaltarak testiste oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir (49, 50, 59, 60). Oksidatif stres ise üreme bozukluklarının patogeneğinde, kusurlu sperm fonksiyonunun etiyolojisinde ve erkeklerde infertilitede önemli bir rol oynar (61-63).

Gentamisin özellikle deney hayvanlarında testiste yapısal değişikliklere neden olup epitelde dökülme, germ hücrelerinde dejenerasyon, seminifer tübüllerde atrofik değişiklikler, interstisyel alanda boşluklar ve sperm üretiminde azalmaya sebep olmaktadır (49).

2.4. Apoptoz

Çok hücreli canlılarda döllenmeden başlayarak gözlenen hücre çoğalması, farklılaşma ve hücre ölümü belirli bir denge içindedir (64, 65). Bu dengenin içinde bazı zamanlarda hücreler hasarlanmakta ve hasarın devamlılığı halinde oluşan zedelenme geri dönüşsüz hale gelmektedir. Bu durumda iyileşmesi olanaksız olan hücre ise ölür. Temelde nekroz ve apoptoz olmak üzere iki tip hücre ölümü vardır (66- 68).

Apoptoz organizmanın ihtiyaç duymadığı, görevini tamamlamış, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş, genetik olarak hasarlı ya da onarılması mümkün

olmayan hücrelerin organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelerini sağlayan programlı hücre ölümüdür (67, 69, 70). Hücreler özellikle DNA'sını ve proteinlerini etkileyecek düzeyde hasar gördüğü zaman membran bütünlüğü tamamen kaybolmadan nükleer çözünme ile apoptoza neden olur (66, 67).

Apoptoz fizyolojik olarak embriyogeneze, dokulardaki rejenerasyon ile hücresel tamiri de içeren hücre popülasyonunun korunması ve yaşlanması gibi homeostatik mekanizmanın sağlanmasında, organ büyüklüklerinin korunması gibi durumlarda gözlenir. Patolojik apoptoz ise hücrelerin hastalıklar ve zararlı ajanlar tarafından etkilenmesinde veya immün reaksiyonlarda koruyucu bir mekanizma olarak ortaya çıkabilmektedir (67, 71- 74).

1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patologlar programlı hücre ölümü morfolojisini tanımlamış ve yunanca 'apo' = ayrı, 'ptosis' = düşen anlamına gelen "apoptosis" terimini ilk kez kullanmışlardır (68, 70, 75, 76).

Hücrelerin uyarılara verdiği yanıt hasarın tipi, hasarın devam süresi ve şiddetine bağlı olmakla birlikte hücrenin iç ortamından da etkilenir. Hücrenin vereceği yanıt ise belirleyen üç temel etken vardır: Besin maddelerinin varlığı ya da yokluğu, büyüme faktörlerinin varlığı ya da yokluğu, hücre dışından gelen ve hücredeki reseptörler aracılığıyla hücreye iletilen ölüm sinyallerinin varlığı ya da yokluğudur. Ek olarak hücrenin hasar görmesi veya DNA yapısının bozulması da hücrenin hangi yönde ilerleyeceğinin belirleyicisidir (77). Uyarının sonuçları ise hasar gören hücrenin tipine, durumuna, adaptasyon yeteneğine ve genetik yapısına bağlıdır (67).

Apoptozun temel morfolojik özelliği hücre sitoplazmasının küçülmesi ve çekirdeğin yoğunlaşmasıdır. Apoptoz tek bir hücre seviyesinde oluşur ve her hücre uyarıyı değerlendirip, hücrenin gidişatı için kendi kararını verir. Apoptoz enerji gerektiren ve spesifik enzimatik adımlarla düzenlenen bir durumdur (64, 75).

Apoptozda hücre içi veya dışından gelen sinyaller ile hücre ve çekirdeğin büzülmesi, nükleer kromatinin periferik kısımda yarım ay veya tam bir halka oluşturacak şekilde yoğunlaşmaya başlaması karakteristiktir. Alınan sinyaller ile hücrenin hacmi yarıya düşer, mikrovillusları kaybolur. Hücrenin küçülüp büzülmesinin nedeni ise Na, K, Cl taşıyıcı sistemin durması sonucu hücre içi ve dışı arasındaki sıvı hareketinin olmamasıdır (68, 75, 78, 79). Nükleer kromatinin

yoğunlaşmasının devamındaysa çekirdek yoğunlaşır ve parçalanır (karyoreksis). Hücre zamanla çevre dokularla bağlantısını kaybederek ayrılır, ana hatları kıvrılır ve uzantılar oluşur. Bu uzantılar ise organel ve çekirdek parçalarını içeren apoptotik cisimleri oluşturmak üzere ayrılırlar (75, 79). Apoptotik hücrelerde plazma membranı sağlam olsa bile fagositler için hedef olacak değişikliklere uğrar. Mitokondri zar potansiyeli bozulduktan sonra normalde hücre membranının iç tarafında bulunan fosfatidilserin hücre membranının dış tarafına çıkarak kollektin (C1q) adı verilen çeşitli proteinlerin apoptotik hücre zarına bağlanmasına yol açarlar. Apoptozda hücre zarında gizlenmiş bulunan N-asetil glikozamin ve N, N'-diasetilşitabroz moleküllerini de ortaya çıkarlar ve makrofajlar tarafından tanınırlar (80). Trombospondinin de ortaya çıkması makrofajlar tarafından tanınmayı kolaylaştırır (69). Ölen apoptotik hücre ve parçaları hızla makrofajlar ya da komşu hücreler tarafından fagosit edilmek ortadan kaldırıldığından konakta inflamatuvar yanıtı neden olmaz. Apoptoz 30 dakika ile 60 dakika arasında tamamlanır (27, 64, 67- 70, 75, 81-83). Geri dönüşün olmadığı kısım morfolojik özelliklerin ortaya çıkmasından birkaç saat önce ortaya çıkar (84, 85).

Apoptoz temel olarak iki yolla başlatılır:

Birincisi mitokondriyal yolak ya da intrinsek yolak olarak adlandırılan yoldur. Yaşam sinyallerinin kaybı, hatalı katlanmış proteinlerin birikmesi ve DNA hasarı ile tetiklenir (67). Mitokondri iç ve dış olmak üzere iki zarla çevrili bir organeldir. Apoptoziste iç mitokondriyal zar sağlam kalmasına rağmen dış mitokondriyal zarın proteinlere karşı geçirgenliği artar. Mitokondriyal hasar ve mitokondriyal proteinlerin açığa çıkması memeli hücrelerinde apoptotik sinyalleri oluşturur (33, 81). Apoptozis, mitokondri dış zarından pro-apoptotik proteinlerin sitoplazmaya sızması ve kaspaz adlı enzimlerin aktifleşmesiyle devam eder (67).

Mitokondri dış zarından sitoplazmaya çıkan sitokrom c inaktif halde olan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanıp apoptozom denilen yapıyı oluşturur (86). Apoptozom kaspaz 9'u, kaspaz 9 da diğer kaspazları aktifleştirerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar. Kaspazların aktivasyonunun sonucunda ise hücre çekirdeği parçalanır (33, 67, 81, 87).

Apoptoza sebep olan ikinci yol ise ölüm reseptörü yolağı ya da ekstrinsek yolağıdır. Ölüm reseptörü yolağı kendilerine karşı reaktif lenfositlerin ortadan

kaldırılmasında ve hedef hücrelerin sitotoksik T lenfositleri tarafından öldürülmesinde izlenmektedir. Birçok hücrenin yüzeyinde “ölüm reseptörleri” denilen ve apoptozu tetikleyen moleküller vardır. Ölüm reseptörleri hücre zarı içine tutunmuş bir ucu hücre dışına, diğer ucu hücre içine bakan; hücre içi tarafında ise prokaspaz 8’in aktiflenmesini sağlayan bir ölüm bölgesi (death domain) bulunan reseptörlerdir (67). Ölüm reseptörlerinin uyarılmasıyla hücre içinde prokaspaz 8 iki parçaya bölünür. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz 8, inaktif durumdaki kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7’i aktive eder. Aktiflenen tüm kaspazlar hücre makromoleküllerini parçalayarak tipik apoptoz morfolojisinin oluşumuna yol açarlar (33, 71).

Apoptozun en belirgin özelliği hücre içi Ca^{++} ve Mg^{++} bağımlı endojen endonükleaz enzim aktivasyonu ile seçici olarak DNA’yı kırarak küçük fragmanlar oluşturmasıdır. Nükleusta meydana gelen DNA fragmentasyonu ise hücrenin ölümüne neden olan geri dönüşümsüz bir olaydır (33, 64, 65, 75, 88-91).

Apoptotik hücrelerin gösterilmesinde en sık kullanılan yöntemler DNA hasarının saptanmasına dayanır (81). Işık mikroskopik değerlendirmede hematoksin-eozin boyama ile yoğun asidofil hücreler olarak hücrenin büzülmesi veya sitoplazmik küçülme, kromatinin kondanase olması ve nükleus zarının periferinde toplanması, koyu bazofil boyanan nükleusun küçülmesi veya parçalara bölünmesi gibi değişiklikler gözlenebilmektedir (75, 92, 93). Diğer yöntemler arasında Giemsa boyama, floresan mikroskopi, elektron mikroskopi, faz kontrast mikroskopi, anneksin V yöntemi, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) yöntemi, M30 yöntemi, kaspaz-3 yöntemi, agaroz jel elektroforezi, western blotting, flow sitometri gibi yöntemler de bulunmaktadır (65).

TUNEL yöntemi DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Apoptotik parçalanma sonucu oluşan DNA uçlarının deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve nonizotopik işaretli nükleotidler [sıklıkla biyotinli deoxyuridine triphosphate (dUTP)] kullanılarak yapılan in situ işaretleme ile floresan veya enzimatik görüntüleme sonucu apoptotik hücreler diğerlerinden ayırt edilebilmektedir. Bu yöntem “TdT-dUTP nick-end-labelling” sözcüklerinin kısaltılması olan “TUNEL” olarak adlandırılır (65, 94).

2.5. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Serbest radikaller dış yörüngesinde eşleşmemiş tek bir elektron bulunduran kimyasal maddelerdir. Aşırı kararsız olan bu maddeler organik ve inorganik kimyasallar ile reaksiyona girerler; hücre içerisinde olduğu zamanda hücrede bulunan nükleik asitlere, proteinlere ve lipitlere saldırırlar. Bu serbest radikaller, reaksiyona girdikleri moleküllerin de diğer tip serbest radikallere dönüşmesine sebep olarak hücre hasarının meydana gelmesine ve hasarın yayılmasına sebep olurlar (67).

Reaktif oksijen türleri (ROS) hücre hasarındaki rolleri iyi bilinen, bir çeşit oksijen kaynaklı serbest radikallerdir. Tüm hücrelerde mitokondri solunumu ve enerji üretimi sırasında gerçekleşen redüksiyon oksidasyon (redoks) reaksiyonları ile fagositoz yapabilen lökositlerde (nötrofillerde ve makrofajlarda); inflamasyon ve konak savunması sırasında hücre içerisine alınan mikropların ve diğer maddelerin yok edilmesi amacıyla üretilebildiği gibi yoğun fiziksel aktivite, sigara dumanı, alkol, iyonize veya UV ışınlar gibi radyasyon hasarı, oksijen ve diğer gazların toksik etkileri ve kimyasal hasar ile de üretilebilmektedir. İskemi reperfüzyon hasarı, hücre yaşlanması gibi pek çok hücre hasarlanmasının temelinde de serbest radikaller yer almaktadır (67, 95). En yaygınları süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve singlet oksijendir (1O_2) (96). ROS'ların organizmaya zararlı etkileri olduğu gibi, düşük/orta konsantrasyonlarda yararlı etkileri de bulunmaktadır ve hasara karşı hücre yanıtta fizyolojik rol oynar (97).

Serbest radikallerin yol açtığı hasar, üretilme ve bulundukları yerden uzaklaştırılma hızlarına bağlıdır. Serbest radikallerin üretimi artar ya da bunları temizleyen sistemler etkisiz kalırsa, fazla miktarda birikerek oksidatif stres denilen duruma yol açarlar. Oksidatif stres de hücrelerin yapılarının hasarlanmasına neden olur (95).

Reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını ve ortaya çıkardığı hasarları engelleyen savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” denir (97).

Antioksidanlar 4 farklı mekanizma ile oksidanları etkisiz hale getirirler (98).

1. Temizleme etkisi: Enzimler tarafından oksidanlar zayıf bir moleküle dönüştürülür.

2. Baskılama etkisi: Vitaminler ve flavonoidler tarafından oksidanlar bir hidrojen aktararak etkisiz hale getirilir.

3. Onarma etkisi

4. Zincir koparma etkisi: Hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından oksidanların bağlanarak fonksiyonlarını engelleyen ağır metaller şeklinde olan etkidir.

Antioksidanlar, organizmada hazır bulunan enzimatik ve nonenzimatik (endojen) antioksidanlar ile dışarıdan alınabilen ekzojen antioksidanlardır.

Reaktif oksijen türleri üretimi başlıca mitokondri ve bir plazma membran enzimi olan NADPH oksidaz aracılığıyla gerçekleşir ve hücrel ROS'ların yaklaşık %85'i normal oksidatif fosforilasyonun bir alt ürünüdür. Oksijen endoplazmik retikulum, mitokondri, plazma membranı, peroksizom ve sitoplazmada oksidatif enzimlerle O_2^- 'e dönüştürülür (99, 100).

Hücre içinde süperoksit ve hidrojen peroksit kaynaklı hasara karşı oluşan ilk savunma, antioksidan enzimler olan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz (GPx) ile gerçekleşir (97, 101- 103).

SOD, süperoksit serbest radikalının hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir (5, 67, 99, 100). Bakır-çinko SOD (Cu-Zn-SOD), mangan SOD (Mn-SOD) ve bakır SOD (Cu-SOD) olmak üzere üç farklı SOD izoformu bulunmaktadır. Yaygın olarak bulunan sitozolik SOD yapısında bakır ve çinko (Cu-Zn-SOD), mitokondride bulunan SOD yapısında mangan (Mn-SOD) formu bulunmaktadır. Cu-Zn-SOD, sitoplazmaya ek olarak nükleer bölme ve lizozomlarda da bulunurken, Cu-SOD ise plazma, lenf, sinovyal sıvı ve damar duvarlarında sıklıkla bulunur. Çinko stabiliteyi sağlamada, bakır ise aktivitesinden sorumludur. SOD aktivitesi yaşlanmayla beraber azalmaktadır (104).

Katalaz (CAT) tüm hücre tiplerinde değişik konsantrasyonlarda bulunan, dört hem grubu içeren bir hemoproteindir. Katalaz hücre içinde genel olarak peroksizomlarda az miktarda da mitokondrilerde bulunmaktadır (105, 106).

SOD enziminin dağılımı katalaz ile birlikte incelenmelidir. Çünkü SOD ile tepkime sonunda oluşan ürün, oksijenin toksik ürünlerinden biridir ve katalaz tarafından birikimi önlenmektedir (107).

GPx, hücrelerin sitoplazmasında bulunup H_2O_2 kaynaklı oksidatif hasara karşı hücreleri koruyarak, H_2O_2 'den $OH^\cdot$ 'nin oluşmasını engellemektedir. GPx, her biri bir selenyum atomu içeren dört alt protein biriminden oluşmaktadır (108). GPx düşük konsantrasyonlarda H_2O_2 'i parçalarken, yüksek konsantrasyonlarda ise CAT aktivite kazanır (109).

H_2O_2 , O_2 'den daha dayanıklıdır ve biyolojik membranlardan geçebilir. Eğer ortamda Fe^{2+} gibi metaller varsa, Fenton reaksiyonuna girerek ileri derecede reaktif hidroksil radikaline ($OH^\cdot$) dönüştürülür. Hidrojen peroksit (H_2O_2), lökositlerdeki miyeloperoksidaz enzimi tarafından reaktif bir bileşik olan hipoklorüre dönüştürülür (67).

Serbest radikaller, lipidleri, proteinleri ve DNA'yı olumsuz olarak değiştirebilir. Oluşan serbest radikaller hücre membranındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları ile reaksiyona girerek lipit peroksidasyonu oluşturur. Lipidlerin radikallerle etkileşimi kendileri de kararsız ve reaktif olan peroksitlerin ortaya çıkmasına yol açar ve otokatalitik (kendi kendini katalize eden) bir zincirleme reaksiyon gerçekleşir. Lipid peroksitler yıkıldığında ise açığa çıkan yıkım ürünleri (akrolein, malondialdehit, 4-hidroksinonenal) biyolojik olarak aktiftir. Lipid peroksidasyonunda MDA, araşidonik asidin ve daha büyük çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) enzimatik veya enzimatik olmayan yolla ayrışması sonucu oluşan son üründür. MDA lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir (104). Oluşan MDA, hücre membranlarında iyon alışverişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar, iyon geçirgenliğinin ve enzim aktivitesinin değişimi gibi olumsuz sonuçlara neden olur. MDA bu özelliği nedeniyle, DNA'nın nitrojen bazları ile reaksiyona girebilir ve DNA'nın yol açtığı hasar, mutagenез ve karsinogenез ile sonuçlanabilir (67, 110).

Proteinlerde oluşan serbest radikal hasarı ise enzimlerin aktivitesinde kayba neden olabilir. Serbest radikaller proteinlerin, sülfidril aracılığıyla gerçekleşen çapraz-bağlanmasını arttıırırlar. Bu şekilde proteinlerin yıkımını artırır veya enzimatik aktivitelerini kaybetmelerine neden olur. Serbest radikal reaksiyonları, direkt olarak polipeptidlerin parçalanmasına da yol açabilir (67, 111, 112).

ROS, oksidatif fosforilasyon ve testis gibi steroidojenik dokularda steroid sentezi gibi normal hücresel süreçlerin yan ürünleri olarak da üretilir.

Spermatozoanın oositi dölleme kapasitesi kazanması, zona pellusidaya penetrasyonu ve akrozom reaksiyonu için düşük ROS seviyeleri gereklidir. Oluşabilecek yüksek ROS düzeylerinin olumsuz etkilerini önlemek için erkek üreme sistemi de antioksidan savunmalara sahiptir (113).

Spermatozoada oksidatif stres ve lipid peroksidasyonu, spermatogenezde bozukluk, spermatozoada motilite kaybı ve canlılığın zarar görmesine neden olduğu için erkek infertilitesi ile yakın ilişkilidir. Spermatozoa, hücre membranlarında çoklu doymamış yağ asitlerinin fazla bulunmasından dolayı oluşabilecek oksidatif hasara karşı oldukça duyarlıdır (5, 49, 59, 113).

Spermatozoanın orta parçası ise ROS'un primer hedefidir. ROS'un esas etkisinin aksonemal hasara yol açan hücre içi ATP'nin hızlı kaybı ile sperm motilitesinde azalma olduğu düşünülmektedir (114). Spermatogenezdeki değişiklikler, olgunlaşmamış anormal spermlerin atılımına neden olabilmektedir. Olgunlaşmamış spermatozoa, yüksek miktarda DNA hasarı, protaminasyonda değişiklikler, kromatin paketleme ve aşırı reaktif oksijen türleri (ROS) üretimi gösterir (115).

2.6. Kuersetin

Flavonoidler, doğal olarak meyve ve sebzelerde glikozile edilmiş halde bulunan polifenolik bileşiklerdir. Flavonoidlerin flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, flavan-3-oller (kateşinler) ve antosiyanidinler olmak üzere altı alt sınıfı vardır (8, 116, 117).

Flavonoidlerin antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antimutagenik, antineoplastik, antialerjik, antitrombotik ve vazodilatör etki gibi aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir. Bulundurdukları antioksidan aktivitelerini ise hidroksil radikallerini, süperoksit anyonlarını ve lipid peroksil radikallerini temizleyerek sağlamaktadır. Flavonoid içeriği zengin gıdalarla beslenen popülasyonlarda da artan yaşam süresi ve azalan kardiyovasküler hastalık insidansı izlenmiştir (118, 119).

Kuersetin, izolasyonu ve biyolojik tanımlanması 1936 yılında Szent-Gyorgyi isimli bir araştırmacı tarafından yapılan bir flavonoldur (119).

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon), heterosiklik bir piron halkası ile bağlı, iki benzen halkası içeren, ortak bir flavon çekirdeği bulunan flavonoid ailesinin bir üyesidir. Başlıca domates, soğan, kiraz, ahududu gibi meyveler, sebzeler, tohumlar, çay, kahve, eğrelti otu, kırmızı şarap ve doğal boyalar dahil olmak üzere, çeşitli yiyeceklerde ve bitkilerde bulunan polifenolik bileşiklerden biridir (9, 120- 122).

Kuersetin, suda çözünmeyen, alkolde az çözünen, buzlu asetik asit ve sulu alkali solüsyonlarda çözünebilen, acı tadı olan sarı, kristal bir katıdır (120).

Flavonoidler, glikozitler (bağlı glikosil grupları ile) veya aglikonlar olarak görülse de kuersetinin diyet alımının çoğu glikozit formundadır (123).

Ulusal diyet kayıtlarına göre, ortalama günlük kuersetin alımı 5-40 mg arası olmakla birlikte, fazla miktarda meyve ve sebze ile beslenenlerde 200-500 mg seviyelerine kadar yükselebilmektedir (124). Kuersetin besin takviyesi olarak diyabet, obezite, dolaşım bozukluğu, inflamasyon ve duyu durum bozuklukları gibi çeşitli hastalıklar için bir fitokimyasal olarak da kullanılmaktadır (123).

Kuersetinin biyoyararlanımı zayıf olup, içerdği şeker kısımlarının tipine ve konumuna bağlıdır (125, 126). Kuersetin glikozitler, ince bağırsaklarda zayıf bir şekilde emilir. Alt bağırsağın mikroflorası, flavonid-glikozidi kuersetin ve şekere hidrolize eder, daha sonra kuersetin enterohepatik sistem tarafından emilir. Ratlarda yapılan çalışmalarda, oral alımdan sonra dozun %20'sinin sindirim sisteminden emildiği; 48 saat içinde safra ve idrara glukuronid veya sülfat konjugatları olarak atıldığı tespit edilmiştir (119, 120).

Yapılan çalışmalarda kuersetinin diyet glikozitlerinin bağırsak lümeninde β -glukozidazlar tarafından hidrolize edildiği, insanlarda aglikon kuersetinin pasif olarak bağırsak epitel bariyerinden geçtiği düşünülmektedir (123).

İnce bağırsak, kalın bağırsak, böbrekler ve karaciğer dahil olmak üzere birçok organ kuersetin metabolizmasına etki edip metil, glukuronid ve sülfat konjugatları haline gelmesini sağlamaktadır. Plazmada serbest kuersetin de bulunmaktadır (123, 125-127).

Kuersetin, araşidonik asidin metabolitlerine dönüşümünü katalize eden siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe eder (120). Düşük yoğunluklu lipoproteini oksidasyondan koruyarak ve lökosit immobilizasyonunu azaltarak

aterosklerotik plak oluşumunu önlediği, trombosit agregasyonunu önleyerek antitrombotik etki gösterdiği, kardiyovasküler düz kasın gevşemesini sağlayarak antihipertansif ve antiaritmik etki sağladığı düşünölmektedir. Ayrıca kuersetinin mast hücre stabilizasyonu ve antialerjik etkilerinin yanı sıra; antihepatotoksik aktivitesine ek olarak fertilizasyon üzerine de etkisi bulunmaktadır (9, 119, 122, 128).

Kuersetinin antiinflamatuvar ve antikarsinojenik özelliklere sahip olduğu da bilinmektedir (9).

Kuersetin, indöklenebilir nitrik oksit sentaz aktivitesine etki ederek iskemi-reperfüzyon hasarında da azalmaya neden olur (129). Aktive makrofajlar hem nitrik oksit hem de süperoksit anyonlarının üretimini artırır. Nitrik oksit, serbest radikallerle reaksiyona girip peroksinitrit üretir. Peroksinitrit ise LDL'leri doğrudan oksitleyerek hücre zarlarında irreversible hasara neden olabilir (130). Kuersetin, serbest radikallerin temizlenmesine sebep olarak nitrik oksit ile reaksiyonu engelleyip daha az hasara yol açar (120, 127). Radikalin reaktif bileşiği ile reaksiyona girerek reaktif oksijen türlerini stabilize eder. Flavonoidlerin antioksidatif kapasiteleri moleküllerin B halkasındaki katekol grubunun ve A halkasının 3. konumundaki hidroksil (OH) grubunun yüksek reaktivitesinden dolayı, radikaller etkisiz hale getirilir (123, 131).

Kuersetinin ksantin oksidaz aktivitesini de inhibe ederek oksidatif hasarı azalttığı düşünölmektedir (131).

Kuersetin, oksidatif stres ile modöle edilen ve kronik inflamatuvar hastalıkların patogeneğinde rol alan proinflamatuvar sitokinlerden biri olan TNF- α nın üretimini ve gen ekspresyonunu doza bağımlı bir şekilde inhibe eder. Bu inhibisyon flavonoidlerin bağışıklık tepkisini modöle etme kapasitesini ve potansiyel antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduklarını düşöndörmektedir (132).

Kuersetin kalmodulin antagonisti gibi davranıp hücre zarı seviyesinde, zar stabilize edici bir etki gösterir (133).

Ayrıca hücre içi glutatyon konsantrasyonlarında eşlik eden bir artışla glutatyon (GSH) biyosenteğinde yer alan bir enzim olan C-glutamilsistein sentetaz ekspresyonunu arttırdığı da bulunmuştur (134).

Diyabetik hayvan modelinde, kuersetinin lens opasitelerini önlediği veya geciktirdiği de bildirilmiştir (119, 135, 136). Kuersetinin aldoz redöktaz

reaksiyonları gibi katarakt oluşumuna yol açabilen reaksiyonları inhibe ettiği düşünülmektedir (119). Ayrıca insülin salınımını ve izole adacık hücrelerinden Ca^{++} alımını da artırmaktadır (137).

Yapılan çalışmalarda kuersetinin, diyabetik sıçanlarda sperm canlılığı, motilitesi ve serum total testosteronu üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (9, 138). Ancak, sağlıklı gönüllülerden elde edilen spermler üzerinde, kuersetinin spermin canlılığını ve hareketliliğini in vitro olarak bozduğu bulunmuştur (139, 140).

Kuersetinin antioksidan özelliğinin, testis dokusunda LPO düzeyinin artmasında ve antioksidanların azalmasında önemli gelişmeler sağladığı, ayrıca bozulmuş sperm parametrelerinde, testis histopatolojik lezyonlarında, DNA hasarlarında ve çeşitli kimyasalların neden olduğu azalmış testosteron düzeyinde iyileşmeler sağladığı bildirilmiştir, fakat bazı yazarlar ise kuersetinin prooksidan özelliğinin LPO seviyesinde artışa ve antioksidan enzimlerde azalmaya, spermatozoa ve diğer üreme parametrelerinde hasara neden olduğunu bildirmişlerdir (141).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

Çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul onayı alınarak başlanmış (Tarih: 04/07/2019; Protokol No: 2019/32) ve çalışma KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje kodu: TTU-2019-8461). Çalışma 30.06.2015 tarih etik kurul karar no: 4 (12.05.2016 tarih ve 272 sayı ile düzeltmeli) TDK- 2015-5331 no ile KTÜ Bilimsel Araştırma Projesi tarafından desteklenen “Sıçanlarda deneysel siyatik sinir hasarı üzerine kuersetinin etkilerinin morfolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirilmesi” isimli çalışmadan arta kalan kuersetin kullanılarak yapılmıştır.

3.2. Deney Hayvanları, Barınma Koşulları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı

Araştırmamızda 24 adet erişkin Sprague Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden sağlandı. Deney süresince sıçanların bakımı, beslenme ve barınması merkezde bulunan sıçan takip odalarında gerçekleştirildi. Deneyin bütün uygulamaları, sıçanların sakrifikasyonu ve dokuların elde edilmesi işlemleri de KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkez'inde özel olarak hazırlanmış cerrahi müdahale odalarında gerçekleştirildi. Böylece çevresel stres ve uyum probleminin yaşanmaması hedeflendi.

Deney boyunca sıçanların oda sıcaklığı $22\pm1^{\circ}\text{C}$, nem oranı $\%50\pm5$ ve 12 saatlik karanlık/aydınlık periyodu düzenli olarak kalacak şekilde ayarlama yapıldı. Çalışma süresince standart tip III kafeslerinde barındırılan sıçanlar, standart su ve yem ile ad libitum beslendi.

Araştırmada kullanılan 24 adet erişkin Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlardan, her grupta 6 tane hayvan olacak şekilde rastgele 4 grup oluşturuldu. Deney süresince (7 gün boyunca) uygulanan işlemler her gün aynı saatte (9-10 saatleri arası) gerçekleştirildi. Çalışmada uygulanacak olan Gentamisin (80 mg/2 ml

İbrahim Etem Ulagay İlaç Sanayi Türk A.Ş., Türkiye) ve Kuersetin (Sigma-Aldrich, Co, St. Louis, USA; CAS: 117-39-5 Q4951-100 g, $\geq 95\%$) dozları literatüre uygun olarak belirlendi (5, 142). Deneyin başlangıcı 1. gün kabul edildi ve tüm hayvanlar ilk gün uygulamalar yapılmadan önce tartıldı.



Resim 2. Deney hayvanlarının barındırılmasında kullanılan standart tip III kafesler

Kontrol (K) grubu (n: 6): Deneyin 1. gününden başlanarak 7 gün boyunca günlük intraperitoneal (i.p.) serum fizyolojik uygulandı.

GEN grubu (n: 6): Deneyin 1. gününden başlanarak 7 gün boyunca günlük 80 mg/kg dozunda Gentamisin (GEN) intraperitoneal (i.p.) uygulandı.

QUE grubu (n: 6): Deneyin 1. gününden başlanarak 7 gün boyunca günlük 50 mg/kg olacak şekilde Kuersetin (QUE) i.p. uygulandı.

GEN + QUE grubu (n: 6): Deneyin 1. gününden başlanarak 7 gün boyunca günlük i.p. 50 mg/kg olacak şekilde QUE ve 80 mg/kg dozunda i.p. GEN uygulandı.

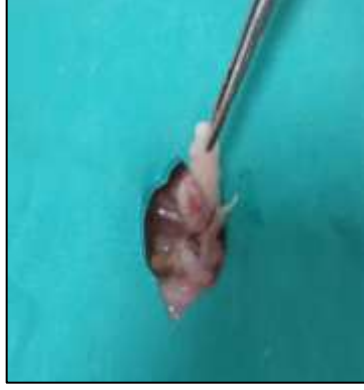


Resim 3. Deney gruplarına i.p. enjeksiyon uygulaması

3.3. Kan ve Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

Tüm denekler vücut ağırlığı takibi için, deneyin 1., 5. ve 8. günü tartıldı. Deney süresinin sonunda (8. günde) denekler i.p. 90 mg/kg ketamin ile derin anestezi altındayken, kansızlaştırma yoluyla sakrifiye edildi. Biyokimyasal parametreler için EDTA (etilen diamin tetra asetik asit)'lı tüplere kan örnekleri toplandı ve vakit geçirmeden hızlıca hayvanlar alt abdominal bölgeden, orta hattan kesildi. Her iki testis ve epididimisler çıkartıldı. Çevre dokularından iyice temizlenen testisler ayrı ayrı hassas terazide tartılarak, kayıt altına alınıp ikiye bölündü. Çıkarılan sol ve sağ (yedek) testis dokuları enine trimlendikten sonra her bir testisin aynı yarısı histolojik değerlendirmeler için Bouin solüsyonunda 3 gün tespit amaçlı bekletildi. Diğer yarıları ise biyokimyasal değerlendirmeler için serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra eppendorf tüp içerisine alınıp -80°C de derin dondurucuda saklandı. Biyokimyasal analizler için alınan tüm kan ve doku numuneleri için KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki soğutucular kullanıldı. Ayrıca sol testislere ait epididimisler sperm sayımı için Tris tampon solüsyonu içeren, vücut sıcaklığındaki petri kaplarına alınarak total sperm sayısı, motilite, vitalite ve morfoloji

değerlendirmeleri yapıldı. Sağ testislere ait epididimisler ise histolojik değerlendirmeler için %10'luk formaldehit içine alınarak fiksasyonu sağlandı.



Resim 4. Testis ile epididimisin diseksiyonu

3.4. Histolojik İşlemler

3.4.1. Bouin Tespitinin Hazırlanışı

Testis dokularının tespitinde kullanılan Bouin fiksatif 75 ml doymuş pikrik asit çözeltisi, 75 ml formaldehit (%37) ve 5 ml glasiyal asetik asit olacak şekilde hazırlandı.

Bouin fiksatif hazırlanırken ilk önce 75 ml doymuş pikrik asit çözeltisi ile 75 ml formaldehit (%37) karıştırıldı, ardından üzerine yavaşça 5 ml glasiyal asetik asit eklendi (143). Bouin fiksatifine alınan testisler 72 saat ışık almayan kuru ortamda ve oda sıcaklığında saklandı.

3.4.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması

Dokuların takibi, kesit alımı, boyanması ve bu işlemler için gerekli olan solüsyonların hazırlanması KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Işık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit içindeki epididimisler ve Bouin solüsyonuna alınan testis dokuları üç gün ışık almayan kuru ve oda sıcaklığındaki ortamda saklandı. Üçüncü günün sonunda testis dokuları, Bouin

solüsyonundaki pikrik asitin dokulardan uzaklaştırılması için gün boyunca %70'lik alkol ile belirli aralıklarla yıkandı. Bouin solusyonu kaynaklı sarı rengin giderilmesinin ardından aşağıdaki gibi sırası, süresi ve dereceleri verilen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen serilerinde saydamlaşması sağlanarak doku gömme cihazında (HistoCore Arcadia H-C Leica, Germany) parafin bloklar haline getirildi (144).

Dokuların takibi:

1. %70'lik etanol 1 gün
2. %90'lık etanol 1 gün
3. %96'lık etanol 1 gün
4. %100'lük etanol 1 gün
5. %100'lük etanol 1 saat
6. Ksilen 5 dakika (3 kez)
7. Dokular eritilmiş parafin içerisinde 58°C'de etüvde 3 kez 15 dakika olmak üzere ve sonrasında tekrar etüv içerisinde 2 saat bekletildi.
8. Dokular oda sıcaklığında bloklandı.

Elde edilen bloklar, tam otomatik mikrotom (Leica RM2255, Germany) ile dokuya ulaşana kadar 20 µm'lik kesitlerle trimlendi. Dokuya ulaşıncaya dokudan 5 µm'lik ince kesitler alındı. Kesitler benmari içinde 37°C'deki sıcak su üzerinde kırışıklıkların açılması için bekletildikten sonra lam üzerine alındı. Lam üzerine alınan dokulardan hematoksilin & eozin (H&E), Masson trikrom ve periyodik asid Schiff (PAS) boyaması yapıldı.

3.4.3. Hematoksilin Eozin Boyama Yöntemi

Kesit alma işleminden sonra, lam üzerine alınan doku kesitleri hematoksilin & eozin (H&E) boyama için zembile yerleştirildi. Parafinin erimesi için yaklaşık 45 dk boyunca tam otomatik doku boyama cihazının (LEICA Auto Stainer XL, Germany) 58 °C'lik fırınında bekletildi. Parafin eridikten sonra aynı cihazda sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi (143).

1. Ksilen 5 dakika
2. Ksilen 5 dakika

3. %100'lük etanol 5 dakika
4. %96'lık etanol 5 dakika
5. %70'lik etanol 5 dakika
6. Distile su..... 1 dakika
7. Hematoksilen..... 2,5 dakika
8. Musluk suyu 1 dakika
9. Asit alkol 1 kez batır-çıkart
10. Distile su..... 1 dakika
11. Amonyaklı su 10 saniye
12. Distile su..... 1 dakika
13. Eozin..... 2 dakika
14. Distile su..... 1 dakika
15. %96'lık etanol 5 dakika
16. %100'lük etanol 5 dakika
17. Ksilen 5 dakika
18. Ksilen 5 dakika
19. Entellan ile kapatıldı.

Hazırlanan preparatlarda testis kesitleri ışık mikroskobu ile X200 büyütmede değerlendirildi. Değerlendirme, 10 farklı alanda 20 seminifer tübül rastgele seçilerek yapıldı. Seçilen tübüllerde seminifer tübül çapı (STD) ve germinal epitel kalınlığı (GEH) ölçüldü. Lümeninde immatür germinal hücre (İGH) bulunan tübül sayısı analiz edilerek immatür germinal hücre dökülmesi yüzdesi belirlendi.

Ayrıca her testis kesitinde histolojik açıdan Johnsen Skorum kriterleri kullanılarak testis hasarı değerlendirildi.

Johnsen Skorum Sistemi (141, 145):

- 10: Birçok spermatozoanın bulunduğu tam spermatogenez
- 9: Hafif bozulmuş spermatogenez, birçok geç spermatid, düzensiz epitel
- 8: Tübül başına beşten daha az spermatozoa, birkaç geç spermatid
- 7: Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birçok erken spermatid
- 6: Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid,
- 5: Spermatozoa ve spermatid yok, pek çok spermatoit
- 4: Spermatozoa ve spermatid yok, birkaç spermatosit

- 3: Sadece spermatogonia
- 2: Germinal hücre yok, sadece Sertoli hücreleri
- 1: Seminifer epitel yok.

Seminifer tübüldeki spermatogenetik hücreler ve interstisyel alan, aynı mikroskopta incelenerek fotoğrafları çekilip dijital ortama aktarıldı.

Hematoksilen & eozin ile boyanan epididimis preparatlarında, her preparat için X200 büyütmede rastgele seçilen 10 farklı alan histopatolojik olarak analiz edilerek fotoğraflandı.

3.4.4. Periyodik Asit-Schiff Boyama Yöntemi

Seminifer tübül bazal membranının kalınlığı, bütünlüğü ve germinal hücrelerin bazal membranla ilişkisini kantitatif olarak değerlendirmek için yapılan PAS boyama öncesi parafin bloklara gömülen testis dokularından 5 µm'lik kesitler alındı. Otomatik boyama cihazının deparafinizasyon programında kesitler deparafinize edildi.

1. Fırın (60°C)..... 45 dakika
2. Ksilen 5 dakika
3. Ksilen 5 dakika
4. Ksilen 5 dakika
5. %100 Etanol 5 dakika
6. %96 Etanol 5 dakika
7. %70 Etanol 5 dakika
8. Distile su..... 30 saniye
9. Su Çıkış

Deparafinize edilen dokularda PAS boyama için Tek-Path Pas Stain Kit (lot no: 11233) kullanıldı. Üreticinin protokolüne uygun olarak aşağıdaki tabloda verildiği şekilde işlemler manuel olarak uygunlandı.

1. Preparatlar distile suda yıkandı
2. 10 damla A (Periodic Acid Solüsyonu): Solüsyon damlatılıp bekletildi..... 10 dakika
3. Distile suda yıkandı

4. 10 damla B (Schiff's Reagent Solüsyonu): Solüsyon damlatılıp bekletildi..... 30 dakika
5. Distile suda yıkandı
6. Preparatlar akarsuda yıkandı 5 dakika
7. 10 damla C (Harris Hematoksilen Solüsyonu): Solüsyon damlatılıp bekletildi 5 dakika
8. Preparatlar akarsuda yıkandı 2 dakika
9. Distile sudan geçirildi
10. Dehidrat alkolleri ve ksilenden geçirilip entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.4.5. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Organdaki bağ dokusu ve kollajen yoğunluğunu değerlendirmek için parafin bloklara gömülen testis dokularından alınan 5 µm'lik kesitler, otomatik boyama cihazının deparafinizasyon programında yukarıda anlatıldığı gibi deparafinize edildi.

Trikrom boyama için Bouin solüsyonu hazırlanışı: 750 ml pikrik asit, 50 ml glasiyel asetik asit ve 200 ml formaldehit karıştırılarak hazırlandı.

1. Bouin solüsyonunda 56°C'de etüvde 1 saat bekletildi
2. Suda tutuldu (dokuların rengi sarıdan beyaza dönene kadar)
3. Mayer Hematoksilende bekletildi 2 dk
4. Suda yıkandı
5. Trikrom Kombine boyasında bekletildi 5 dk
6. Suda yıkandı
7. Alkol serilerinden geçirildi
8. Kurutulup üzerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı (144).

3.4.6. Sperm Sayısı, Hareketlilik, Canlılık ve Morfoloji Değerlendirmesi

Sperm sayımında her bir deney hayvanı için 2 ml Tris tampon solüsyonu (pH: 7,5) içeren petri kapları hazırlanıp etüvde bekletildi. Disseke edilen sol epididimis petri kaplarına alınıp parçalara ayrıldı, spermatozoanın epididimal tübüllerden dışarı

ıkmasını sağlamak için 30 dakika süreyle 37° C'de etüvde inkübe edildi. Bu sıvıdan alınan örneklerde sperm sayımı, motilite (hareketlilik), vitalite (canlılık) ve morfoloji değerlendirmeleri ışık mikroskobu altında (Olympus DP 71, Japan) yapıldı.

Sperm sayımı ve hareketliliğini değerlendirmek için kullanılan Makler sperm sayım kamarasının (Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel) merkezine bir damla semen (5  l) konuldu ve kamaranın kapağı kapatıldı. Sperm sayımı X200 büyütmede Makler sperm sayım kamarası kullanılarak ışık mikroskop altında yapıldı.



Resim 5. Makler sayım kamarası

Işık mikroskobunda X200 büyütmede 10 kare içerisinde 10^6 ile çarpılarak mililitredeki ($\times 10^6/\text{mL}$) sperm sayısı milyon/ mililitre olarak belirlendi.

Sperm motilitesi için pipet yardımıyla Tris tamponunda dilue edilen semen örneğinden 1 damla lam üzerine konuldu ve lamel ile kapatıldı. Spermeler ışık mikroskop altında X400 büyütmede hareketli ve hareketsiz olarak değerlendirildi. Her örnekten 3 farklı alan seçildi ve bunlardan elde edilen verilerin ortalaması motilite skoru olarak kullanıldı. Motil sperm sayısının toplam sperm sayısına oranı hesaplanarak motilite yüzdesi (%) belirlendi. (146).

Vitalite (canlılık) değerlendirmesi için semen örneğinden 10  l alınarak yaklaşık iki katı hacimde %1'lik Eosin Y ile lamda 15 saniye süreyle karıştırıldı ve preparat lamel ile kapatıldı. Işık mikroskobunda gözlemlenip canlı spermeler (renksiz veya açık pembe) ve cansız spermeler (kırmızı veya koyu pembe) sayılarak analizi yapıldı. Her bir lam toplamda 200 sperm olacak şekilde sayıldı ve yüzdeleri hesaplanarak sperm vitalite yüzdeleri belirlendi. Ayrıca preparatlarda, morfolojik anormallikleri belirlemek için X400 büyütmede farklı alanlarda lam başına toplam 200 sperm hücresi incelenerek spermelere ait morfolojik bozukluklar tespit edildi.

Yapılan morfolojik incelemede hem baş hem de kuyruk yapısında gözlenen herhangi bir bozukluk anormal kabul edildi (147).

3.4.7. İmmünohistokimyasal İşlemler

Apoptozun değerlendirilmesi için terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay (TUNEL) tekniği kullanılarak seminifer tübül germinal hücrelerindeki DNA fragmentasyonları tanımlandı. Nekroz alanları bulunmayan, homojen boyanmış, kahverengi nükleuslu TUNEL (+) hücreler apoptotik hücre olarak değerlendirildi (36). Mor renkli boyanmış nükleuslu hücreler ise nonapoptotik TUNEL (-) hücreler olarak değerlendirildi. Her testis dokusunda X400 büyütmede boyalı ve boyasız toplam 100 germinal hücre sayılarak apoptotik indeks (AI) oluşturuldu (AI= TUNEL (+) hücre sayısı / toplam hücre sayısı: TUNEL (+) ve TUNEL (-) toplam 100 hücre). Seminifer tübül sayısı, seminifer tübül çapı, seminifer epitel kalınlığı, lümene dökülen immatür hücrelerin bulunduğu tübül sayısı açısından karşılaştırmalar yapıldı (148).

TUNEL boyama için parafin bloklardan 5 µm'lik kesitler pozitif şarjlı lamplara alındı ve bir saat boyunca 58 °C'lik etüvde yapılan deparafinizasyonun ardından in situ cell death detection kit, POD kiti kullanıldı (11684817910 Roche diagnostic, Mannheim, Germany). Boyanmış preparatlar ışık mikroskobu (Olympus BX-51, Tokyo, Japan) ile incelendi ve ışık mikroskobuna adapte kamera ataçmanı (Olympus DP71; Tokyo, Japan) ile fotoğraflandı. Bütün dijital görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı. Elde edilen bulgular ve hücre sayımları Analysis 5 Research programı (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany) kullanılarak yapıldı. TUNEL boyama aşağıdaki basamaklara göre sırasıyla yapılarak tamamlandı.

1. Ksilen 3x5 dakika
2. %100 etanol 2x5 dakika
3. %96 etanol 2x5 dakika
4. %70 etanol 2x5 dakika
5. Distile suda yıkama 5 dakika
6. H₂O₂ (%3) 15 dakika

7. Distile suda yıkama 5 dakika
8. PBS'de yıkama 2x5 dakika
9. Large volume UV (Ultra V) block 10 dakika
10. 75 µg terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve
50 µl TdT /dUTP karışımı(37 °C etüvde, nemli ortamda) 1,5 saat
11. PBS'de yıkama 2x5 dakika
12. 100 µl converter peroksidaz (37 °C'lik etüvde) 30 dakika
13. PBS'de yıkama 3x5 dakika
14. 100 µl 3,3'-diaminobenzidine including kit (DAB)
(karanlık ortamda) 5 dakika
15. Distile suda yıkama 5 dakika
16. H&E 2 dakika
17. Distile suda yıkama 5 dakika
18. %70 etanol 2x5 dakika
19. %95 etanol 2x5 dakika
20. %100 etanol 2x5 dakika
21. Ksilen 2x5 dakika
22. Entellan ile kapatma.

3.5. Biyokimyasal İncelemeler

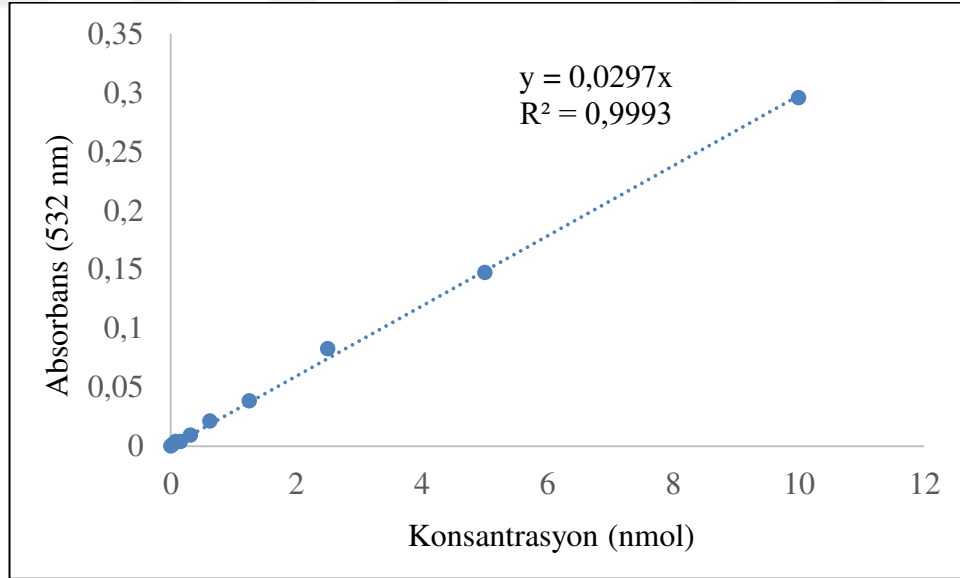
3.5.1. Plazma Malondialdehit (MDA) Düzeyinin Belirlenmesi

Plazma örneklerinde malondialdehit miktarı Yagi (1984) tarafından geliştirilen TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) metodu kullanılarak tayin edildi (149). Lipit peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için plazma lipitleri protein ile birlikte fosfotungstik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü.

Deneyin yapılışı:

1. Bir deney tüpüne 150 μ L plazma, 1.2 mL H_2SO_4 ve 150 μ L fosfotungstik asit eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika bekletildi.
2. Karışım 4000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
3. Geriye kalan çökelek üzerine 2 mL saf su eklendi ve yeniden çözününceye kadar vortekslendi.
4. Numunelere ve standartlara 500 μ L TBA eklendi ve 1 saat 100 $^{\circ}C$ 'de inkübe edildi.
5. İnkübasyonun ardından tüpler 4000 rpm'de 10 dk. santrifüjlendi.
6. Üstteki berrak kısım alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanlar okundu.

1 mmol 1,1,3,3-tetrametoksipropan 100 mL 0.01 M HCl içinde 50 $^{\circ}C$ 'de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.39, 0 nM çalışma standartları hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi. Bu grafikten yararlanarak plazma MDA miktarı nM olarak belirlendi.



Şekil 1. Plazma MDA Standart Grafiği

3.5.2. Testis Dokusu MDA Düzeyinin Belirlenmesi

Testis dokularından elde edilen protein fazlarda MDA seviyelerinin belirlenmesi, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asit ile oluşturduğu kompleksin renginin 532 nm'deki absorbansının ölçülmesi esasına dayanan metot modifiye edilerek yapıldı (150). MDA seviyelerinin belirlenmesinde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

% 1'lik H₃PO₄ Çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL % 85'lik H₃PO₄ eklendi ve son hacim saf su ile 250 mL'ye tamamlandı.

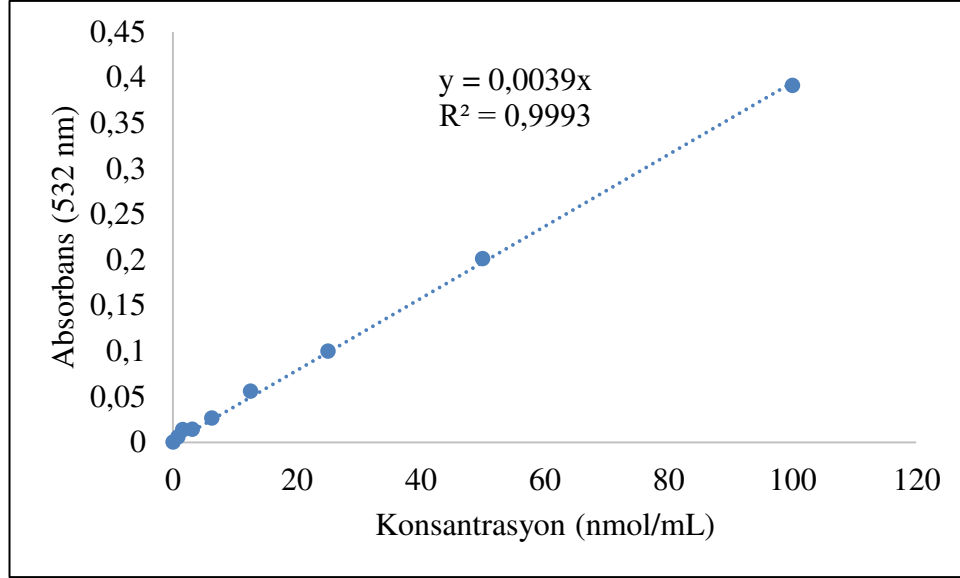
Tiyobarbitürik asit (TBA) Çözeltisi: 0.67 g TBA 50 mL asetik asitte manyetik bar yardımıyla 30 °C'de yaklaşık 20 dakika karıştırıldı. TBA çözeltisi tamamen soğuduktan sonra üzerine 50 mL saf su ilave edildi ve iyice karıştırılarak çalışmada kullanılan nihai çözelti elde edildi.

Standart çözeltiler: 82.5 µL tetrametoksipropan 50 mL 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50°C'de 1 saat inkübe edildi. Reaksiyon sonucu oluşan 10000 nmol/mL'lik stok MDA standardından 100 nmol/mL'lik ara stok çözelti hazırlandı. Ara stok çözeltilerden 100 nmol/mL'lik çözelti elde edildi ve bu çözeltilerden seri seyreltmeler yapılarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.39 ve 0 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1. MDA seviyelerinin belirlenmesi için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (µL)
Protein faz, Standart, Kör	500
%1'lik H ₃ PO ₄ Çözeltisi	3000
TBA Çözeltisi	1000
100 °C'de 1 saat inkübasyon	
532 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	



Şekil 2. Testis MDA standart grafiği

3.5.3. Testis Dokusu Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

CAT enzim aktivitesini belirlemede Aebi yöntemi kullanıldı (151). Bu yöntemin temeli H_2O_2 'nin enzimatik bozulması sonucu 240 nm'de absorbanstaki düşüşün takip edilmesine dayanır.

Kullanılan Çözeltiler:

- 1. Fosfat tamponu (pH=7,0; 50 mM):** 6.81 g KH_2PO_4 deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. 8.9 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ deiyonize suda çözülerek son hacmi 1 L'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve gerektiğinde asit veya baz ilavesi yapılarak pH=7,0 'ye ayarlandı.
- 2. Hidrojen Peroksit:** 240 μL %30'luk H_2O_2 'den alınarak son hacim fosfat tamponu ile 50 mL 'ye tamamlandı (günlük hazırlandı). Doku homojenatları fosfat tamponu ile 5 kat seyreltilerek ölçüm yapılacak numuneler oluşturuldu. Kuartz küvetlere Tablo 2'ye göre pipetlemeler kör ve numune karışımları için ayrı ayrı yapıldı.

Tablo 2. Katalaz aktivite tayini için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Fosfat tamponu	0.75	-----
Numune	1.5	1.5
H ₂ O ₂	-----	0.75

H₂O₂ eklenir eklenmez kuartz küvetler altüst edildi ve 240 nm’de 30 s süreyle her 10 s’de bir absorbanslar kaydedilerek meydana gelen düşüşler izlendi. Absorbanslardaki düşüşün dakikada 0.015 ile 0.100 arasında olmasına dikkat edildi. Eğer bu aralıkta düşüş olmazsa numune dilüsyonları yeniden ayarlanmalıdır. CAT aktivite tayininde birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslardaki 60 s’lik düşüş için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

$$k = (2.3/10) \times \log(A1/A2) \text{ s}^{-1}$$

Burada;

A1= Başlangıç absorbansı

A2= 60 s sonraki absorbanstır.

Yukardaki eşitliğe göre bulunan k değeri seyreltme faktörü ile çarpıldı. Ardından testis dokularında mg protein başına CAT aktivitesi hesaplandı. Sonuçlar k/mg protein olarak verildi.

3.5.4. Testis Dokusu Süperoksit Dismutaz (SOD) Enzim Aktivitesi Ölçümü

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley’in geliştirdiği yöntem modifiye edilerek belirlendi (152). Bu yöntem, ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan O₂’lerin nitroblue tetrazoliumu indirgemesi sonucu oluşan mor renkli formazan molekülünün 560 nm’de verdiği absorbansın ölçülmesi esasına dayanan bir yöntemdir.

SOD enzim aktivitesi ölçümünde kullanılan çözeltiler aşağıda verilmiştir.

SOD Reaktif Karışımı: 3.65 mg ksantin, 8.93 mg etilendiamintetraasetik asit, 1.01 g Na₂CO₃, 12 mg BSA tartıldı ve hacmi 156 mL'ye tamamlandı.

2 M (NH₄)₂SO₄ Çözeltisi: 2.64 g (NH₄)₂SO₄ 10 mL saf suda çözüldü. Ksantin oksidaz enziminin hazırlanmasında kullanıldı.

0.8 mM CuCl₂ Çözeltisi: 6.82 mg CuCl₂ alındı ve 50 mL deiyonize suda çözüldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

167 U/L Ksantin Oksidaz Çözeltisi: 3.3 U/mL'lik orijinal şişeden 101 µL alınıp 2 mL' ye (NH₄)₂SO₄ çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı.

150 µM Nitroblue Tetrazolium Çözeltisi: 4.9 mg nitroblue tetrazolium 40 mL deiyonize suda çözülerek elde edildi. Nitroblue tetrazolium çözeltisi ışıktan korundu.

100 U/mL'lik stok SOD standardından 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 U/mL' lik SOD standartları deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Testis dokularında 5 kat seyreltme yapıldı. SOD aktivitesi ölçümü Tablo 3'e göre gerçekleştirildi.

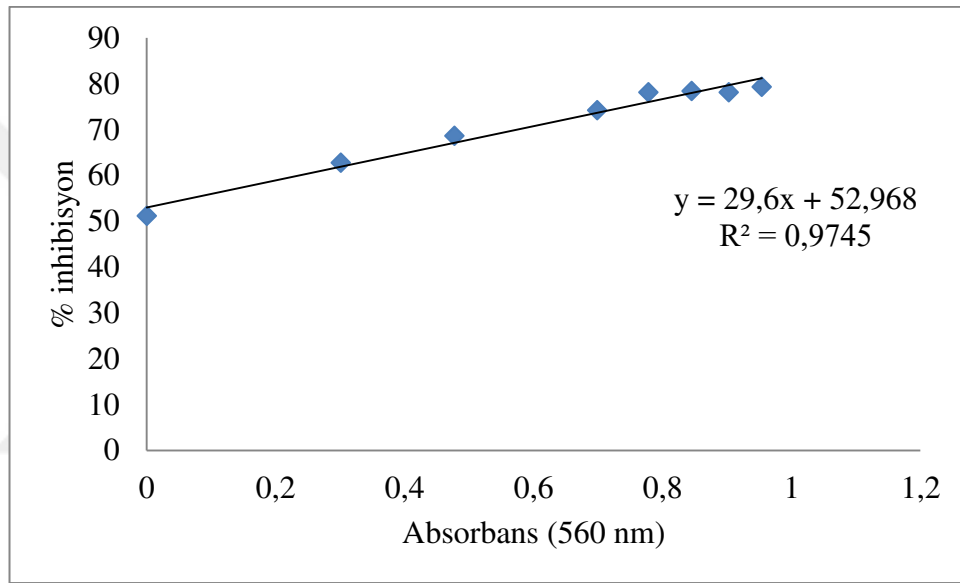
Tablo 3. SOD aktivitesi ölçümü için kullanılan reaktifler ve miktarları

Reaktifler	Hacim (µL)
Numune, Standart, Kör	200
SOD Reaktif Karışımı	796
Nitroblue Tetrazolium	204
Ksantin Oksidaz	20
25°C'de 20 dk inkübasyon	
CuCl ₂	400
560 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

SOD aktivitesi hesabında kullanılan % inhibisyonu belirlemek için aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = (Abs \text{ Kör} - Abs \text{ Numune}) \div (Abs \text{ Kör}) \times 100$$

Standart grafiği, % inhibisyona karşılık gelen konsantrasyonların logaritması belirlenerek şekil 3'te gşsterildiği gibi çizildi. Standart grafiğinde belirlenen denklem kullanılarak numunelerin % inhibisyonlarına karşılık gelen SOD aktivitelerinin logaritmik değeri hesaplandıktan sonra bunların anti logaritmaları alınarak numunelerin SOD aktiviteleri hesaplandı. Testis dokularından elde edilen protein fazlarda toplam SOD aktiviteleri şekil 3'teki standart grafikler kullanılarak hesaplandı. Belirlenen SOD aktiviteleri, toplam protein miktarına bşlşnerek sonuçlar U/mg protein olarak hesaplandı.



şekil 3. Testis dokularında SOD aktivitesini hesaplamak için kullanılan standart grafiği

3.5.5. Testis Dokusu GPx Enzim Aktivitesinin lşşmş

Testis dokularında GPx aktiviteleri Cayman Chemical (Michigan, ABD) firmasının şrettiği 703102 numaralı kitin prosedşşne uygun olarak belirlendi. Bu kit ile GPx aktivitesi lşşmşnşn esası Paglia ve Valentine'nin geliştirdiği metoda dayanır. Bu metotta GPx ve glutasyon redşktaz enzimleri kullanılır. Numunede bulunan hidroperoksitlerin varlığında indirgenmiş glutasyon, GPx enzimiyle yşkseltgenir. Bu yşkseltgenmiş glutasyon, NADPH varlığında glutasyon redşktaz enzimi ile indirgenmiş glutatyona dşnşştşrşlşrken ayrıca $NADP^+$ elde edilir. NADPH'ın $NADP^+$ 'ya yşkseltgenmesi sonucu 340 nm'deki absorbans dşşşşş, GPx

enzim aktivitesi ile orantılıdır. GPx aktiviteleri nmol/dakika/mg protein cinsinden hesaplandı.

3.5.6. Protein Tayini

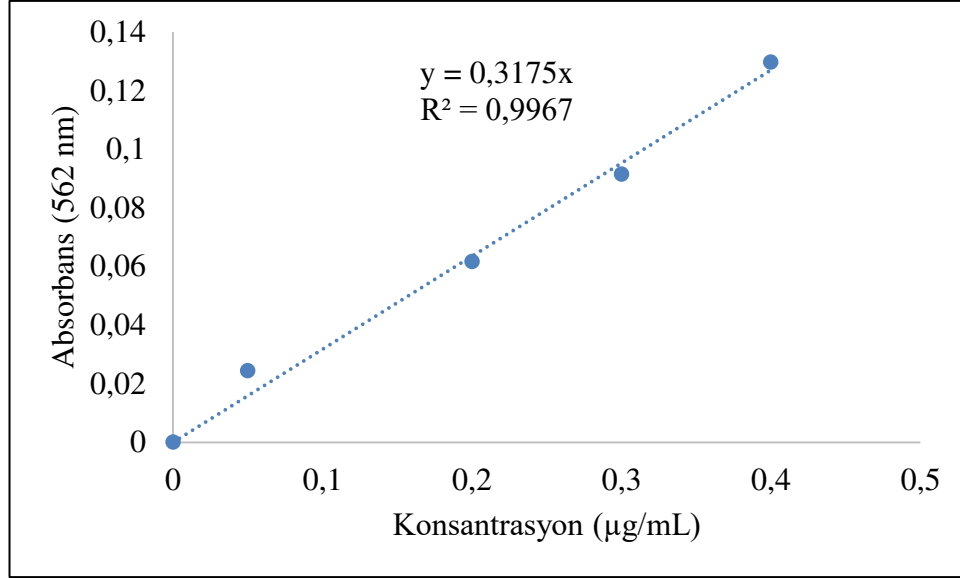
Protein ölçümleri 72285-3 katalog numaralı Merck Millipore (ABD) Bikinkoninik Asit (BCA) protein assay kit kullanılarak yapıldı. Protein tayini bikinkoninik asit (BCA) yöntemine göre yapıldı. Yöntemin esası biüret reaksiyonudur. Cu^{2+} iyonları peptid azotlarına bağlanır ve Cu^+ iyonunu indirgenirler. İkinci bir reaksiyonda ise bu indirgenmiş Cu^+ iyonları BCA ile renkli bir kompleks oluştururlar ve bu rengin şiddeti protein yoğunluğu ile orantılıdır. Oluşan bu renk kompleksi 562 nm’de maksimum absorbands gösterir.

Protein Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1. BCA working reagent: Her bir numune için 200 μL BCA çözeltisi ve 4 μL % 4’lük bakır (II) sülfat karıştırıldı ve BCA working reagent oluşturuldu.

2. Standartların hazırlanması: 2 mg/mL’lik BSA stok çözeltisinden seri dilüsyon yapılarak 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.63, 7.81, 3.90, 1.95 mg/mL’lik standartlar ve kör hazırlandı.

Numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 25 μL standart ve 25 μL numune pleyte yüklendi. Üzerine 200 μL BCA working reagent ilave edilip 30 sn çalkalayıcıda üzeri kapalı bir şekilde karıştırıldı. 37° C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve 562 nm’de absorbandsları okundu. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı.



Şekil 4. Testis dokularında protein miktarını hesaplamak için kullanılan standart grafiği

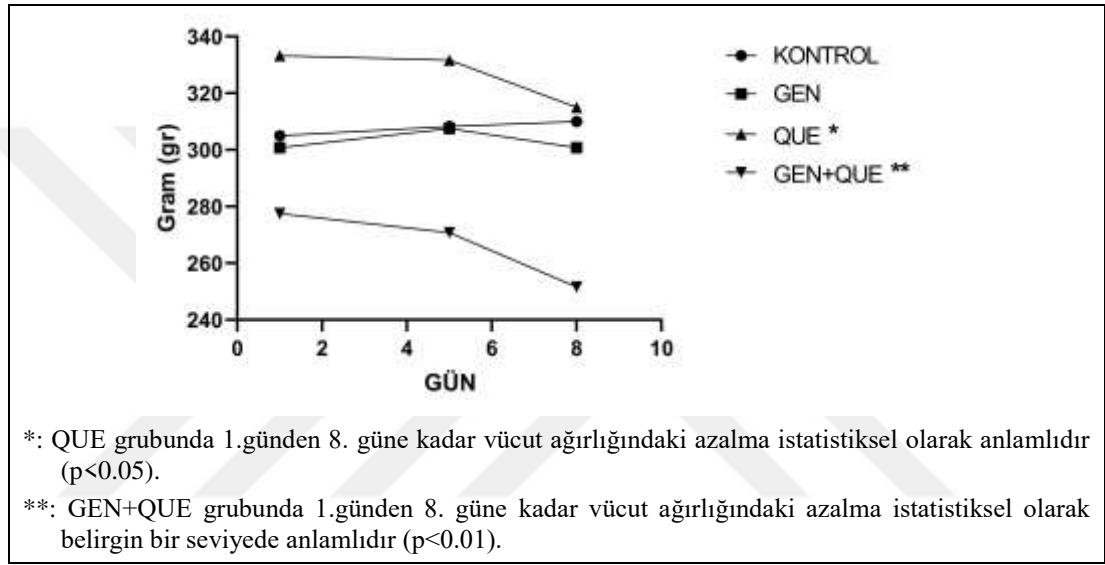
3.6. İstatistiksel Analiz

Sonuçların hesaplanması ve grafiklerin oluşturulmasında GraphPad Prism 8.0 yazılımı kullanılmıştır. İstatistiksel hesaplamalarda çoklu grup kıyaslamaları için ONE-WAY ANOVA yöntemi kullanılarak Tukey'in çoklu karşılaştırma testi uygulanmıştır. Gruplar arasındaki fark $p < 0.05$ seviyesinde anlamlı, $p < 0.01$ belirgin seviyede anlamlı ve $p < 0.001$ seviyesinde ise önemli seviyede anlamlı olarak değerlendirilmiş ve grup farklılıkları grafikler üzerinde simgelerle ifade edilmiştir. Tablo olarak değerler ortalama $\pm$ standart sapma (ORT $\pm$ SD) olarak gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Vücut ve Testis Ağırlığına Ait Bulgular

Deney gruplarına ait sıçanların çalışmanın 1. günü, 5. günü ve 8. günü yapılan ölçümleri sonucu vücut ağırlıklarının ve çıkarılan testis ağırlıklarının karşılaştırılması aşağıda verilmiştir.



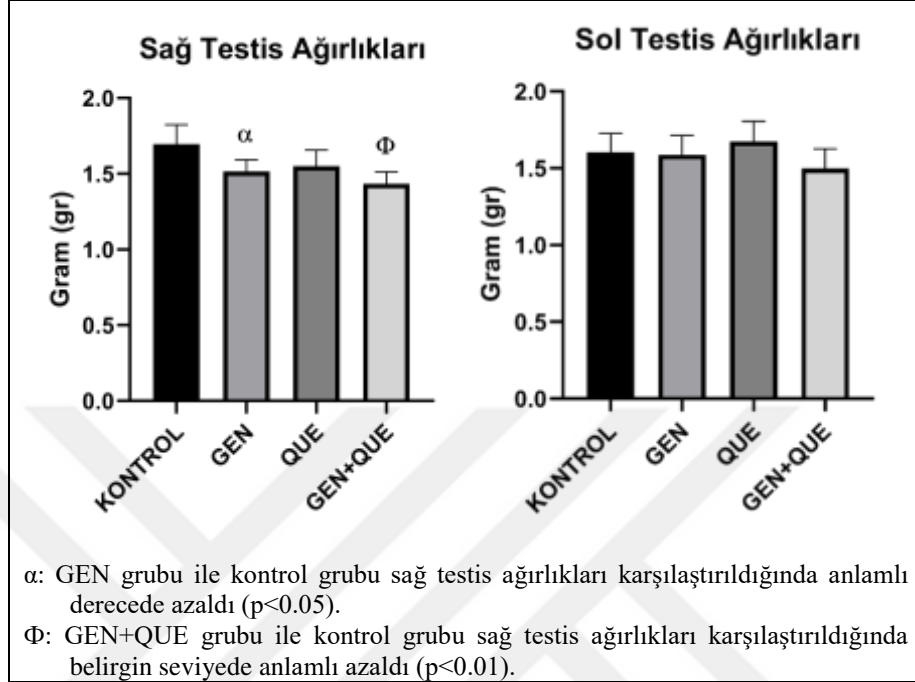
Şekil 5. Deney gruplarına ait vücut ağırlıkları

Tablo 4. Deney gruplarına ait günlere göre ağırlık değişimi

	Kontrol (gr) Ort±SD	GEN (gr) Ort±SD	QUE (gr) Ort±SD	GEN+QUE (gr) Ort±SD
1. Gün	305±18,44	300,83±14,29	333,33±14,72	277,50±22,97
5. Gün	308,33±18,07	307,50±17,82	331,67±12,91	270,83±25,58
8. Gün	310±17,61	300,83±17,44	315±13,78*	251,67±28,40**
*: 1.Gün vs 8. Gün $p<0.05$, **: 1. Gün vs 8. Gün $p<0.01$				

Deneyin 8 günlük sürecinde GEN grubunda ilk zamanlarda kilo alımı gözlenmiş olsa bile sonrasında azalma izlenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. İlk günden son güne kadar kontrol ve GEN gruplarının başlangıç ve sonuçtaki ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı belirlenmiştir ($p>0.05$). Diğer yandan QUE ve GEN+QUE uygulamalarında ilk

günden 8. güne kadar gerçekleşen azalmanın QUE grubunda anlamlı ($p<0.05$), GEN+QUE grubunda ise belirgin bir seviyede anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p<0.01$).



Şekil 6. Deney gruplarına ait sağ ve sol testis ağırlıkları

Sağ testis ağırlıklarında kontrol grubu ile kıyaslandığında GEN uygulamasının istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir ($p<0.05$). Aynı şekilde GEN ile birlikte QUE uygulanmış GEN+QUE grubunun da sağ testis ağırlıklarının kontrol grubuna göre belirgin seviyede anlamlı azaldığı gözlenmiştir ($p<0.01$). QUE grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$). Sol testis ağırlıklarında ise sağ testis ağırlıkları sonuçlarına benzer şekilde azalma gözlene de istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0.05$).

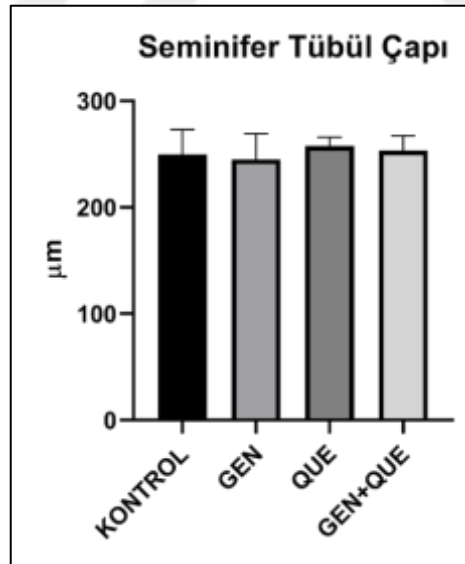
Tablo 5. Deney gruplarına ait testis ağırlık verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri

	Kontrol Ort±SD	GEN Ort±SD	QUE Ort±SD	GEN+QUE Ort±SD
Sol Testis Ağırlığı (gr)	1,603±0,125	1,588±0,127	1,674±0,132	1,500±0,129
Sağ Testis Ağırlığı (gr)	1,695±0,129	1,517±0,077 ^a	1,551±0,105	1,434±0,079 ^Φ

^a: GEN grubu sağ testis ağırlıkları kontrol grubu sağ testis ağırlıkları ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azaldı (p<0.05).
^Φ: GEN+QUE grubu ile kontrol grubu sağ testis ağırlıkları karşılaştırıldığında belirgin seviyede anlamlı azaldı (p<0.01).

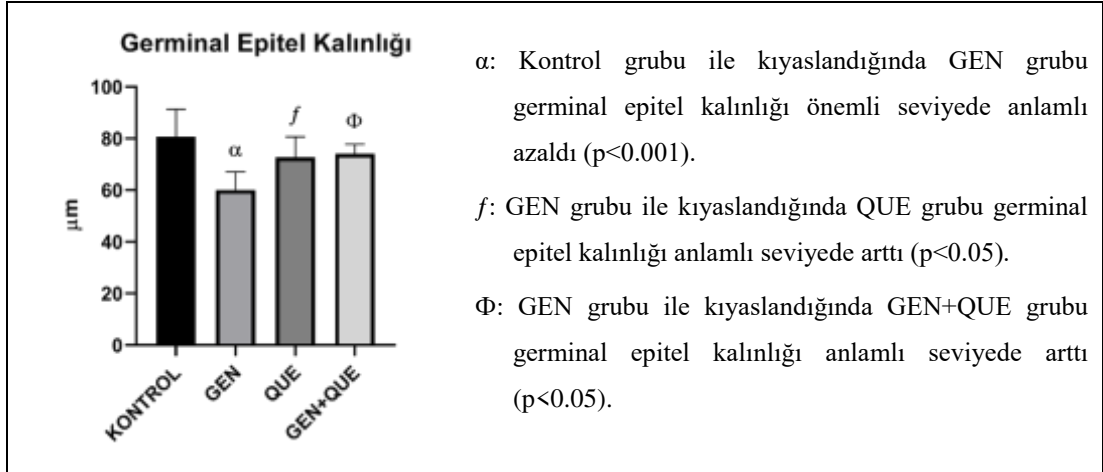
4.2. Morfometrik Bulgular

Deney gruplarına ait testis kesitlerinde seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı, lümeninde immatür hücre gözlenen tübül sayısı ve doku hasarı değerlendirilmesi amaçlı bakılan Johnsen skorlamasına ait yapılan ölçüm sonuçları aşağıda verilmiştir.



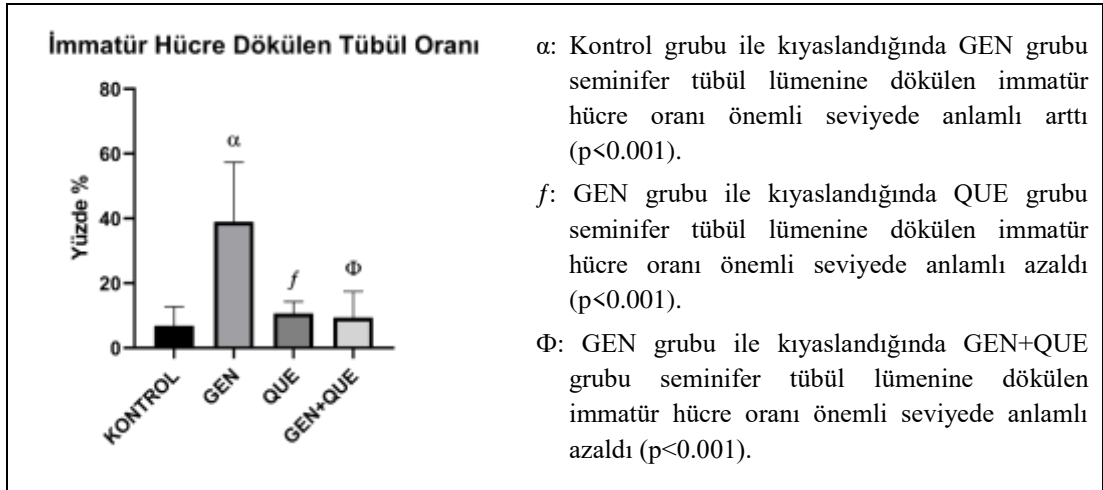
Şekil 7. Deney gruplarına ait seminifer tübül çapı

Seminifer tübül çapları karşılaştırıldığında kontrol grubu seminifer tübül çapı ile GEN, QUE ve GEN+QUE uygulamalarının seminifer tübül çapları arasında istatistiksel önemli bir fark tespit edilememiştir (p>0.05).



Şekil 8. Deney gruplarına ait germinal epitel kalınlığı ölçümleri

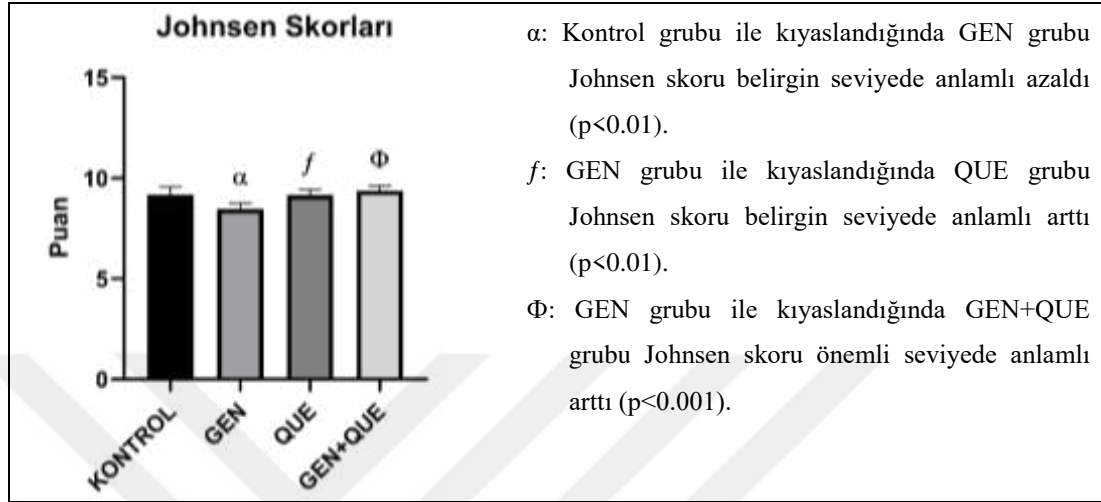
Şekil 8 incelendiğinde germinal epitel kalınlığının kontrol grubu ile kıyaslandığı zaman GEN grubunda önemli seviyede anlamlı azaldığı tespit edilmiştir ($p<0.001$). Kontrol grubu ile QUE uygulamasının yapıldığı grup arasında germinal epitel kalınlığı açısından önemli bir fark bulunmazken ($p>0.05$); QUE grubundaki germinal epitel kalınlığında artış GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Aynı şekilde GEN+QUE grubu ile GEN grubu arasındaki germinal epitel kalınlığı artışı da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).



Şekil 9. Deney grupların ait lümeninde immatür hücre görülen tübül oranı

Şekil 9 incelendiğinde seminifer tübüllere dökülen immatür hücre oranı açısından GEN grubunun kontrol grubuna kıyasla istatistiksel açıdan da önemli seviyede anlamlı artmış olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). QUE ve GEN+QUE

gruplarının da GEN grubundan önemli seviyede anlamlı azalmış olduğu ($p<0.001$), kontrol grubu ile kıyaslandıklarında ise aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$).



Şekil 10. Deney gruplarına ait Johnsen skorları

Şekil 10 incelendiğinde kontrol grubu Johnsen skorları ile kıyaslandığında GEN grubunda skorun belirgin şekilde anlamlı azaldığı belirlenmiştir ($p<0.01$). GEN grubu ile kıyaslandığında QUE grubunda belirgin ($p<0.01$), GEN+QUE grubunda ise önemli seviyede anlamlı artış olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$). Kontrol grubu, QUE ve GEN+QUE grupları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$).

Tablo 6. Deney gruplarına ait morfometrik bulguların ortalama ve standart sapma değerleri

	Kontrol Ort±SD	GEN Ort±SD	QUE Ort±SD	GEN+QUE Ort±SD
Seminifer Tübül Çapı (µm)	250,0±23,17	245,2±24,08	257,6±8,192	253,3±14,07
Germinal Epitel Kalınlığı (µm)	80,69±10,56	60,13±7,028 ^α	72,74±7,863 ^f	74,15±3,673 ^Φ
İmmatür Hücre Dökülen Tübül Oranı (%)	6,872±5,869	38,94±18,43 ^α	10,68±3,653 ^f	9,378±8,061 ^Φ
Johnsen Skorları	9,183±0,383	8,467±0,291 ^α	9,158±0,267 ^f	9,375±0,238 ^Φ
α: Kontrol vs GEN f: GEN vs QUE Φ: GEN vs GEN+QUE				

4.3. Morfolojik Bulgular

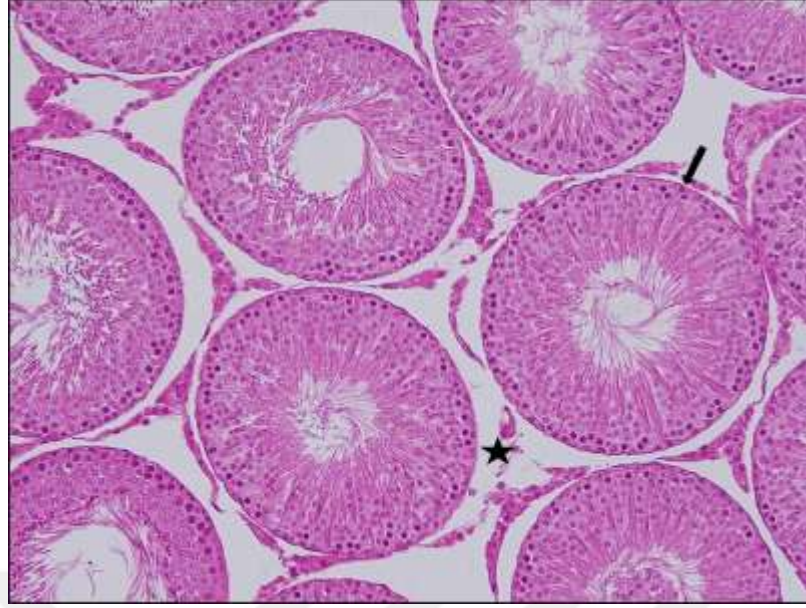
4.3.1. Hematoksilen & Eosin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Testis dokusunun histopatolojik olarak H&E ile boyanmış preparatları incelenip değerlendirildiğinde; kontrol grubuna ait kesitlerde, seminifer tübüllerin normal görünümde olduğu, spermatogenik seriye ait germinal hücrelerin normal döngüde seyrettiği, interstisyel alanın bütünlüğünü koruduğu ve normal morfolojide Leydig hücrelerinin bulunduğu gözlemlendi.

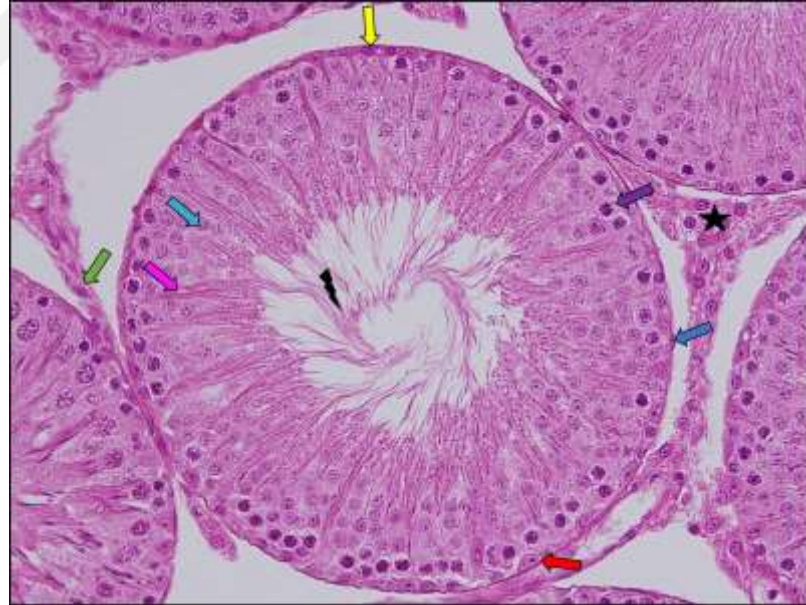
GEN grubuna ait testis kesitlerinde ise bol miktarda lümene dökülmüş immatür germinal epitel hücrelerin bulunduğu seminifer tübül yapıları, bazal membranlarında düzensizlik, interstisyel alanda ödem ve germinal epitel kalınlığında azalma izlendi. Bazı seminifer tübüllerde yer yer germinal epitelde ayrılmalar gözlenirken bazı tübül yapılarının bütünlüğünün bozulduğu, lümenlerinde azalmış spermatozoon olduğu izlendi.

QUE grubuna ait testis dokusu, damarlanma artışı ile beraber interstisyel alanda az miktarda ödem, bazal membranda minimal düzensizlik ve yer yer lümende immatür germinal epitel hücreleri içeren seminifer tübül yapıları gözlenmesine rağmen kontrole benzer görünüm sergilemekteydi.

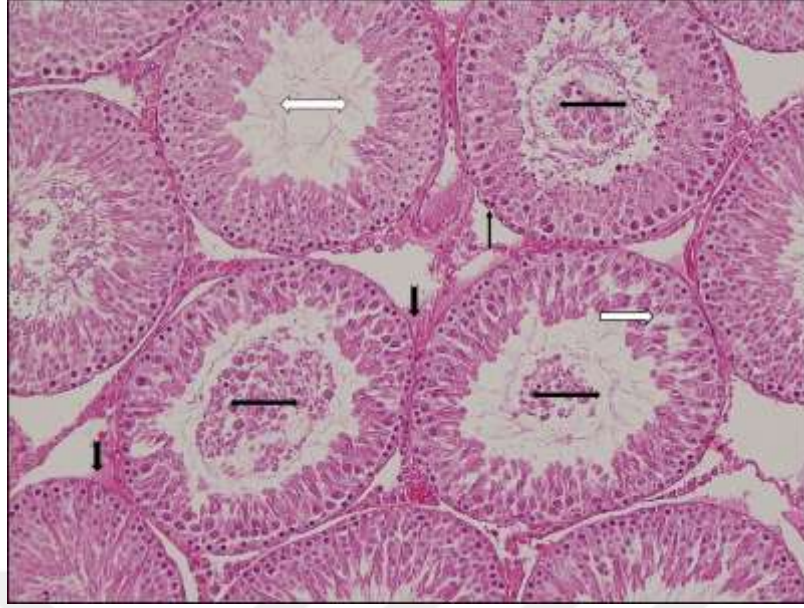
GEN+QUE grubundaysa lümene immatür germinal epitel hücrelerinin döküldüğü seminifer tübül sayısı, germinal epitel kalınlığı, germinal epitel hücreleri arasındaki ayrılmada GEN grubuna göre farkedilir bir şekilde azalma gözlemlendi. İnterstisyel alandaki ödemde, bazal membranlarda gözlenen düzensizliklerde de azalma mevcuttu.



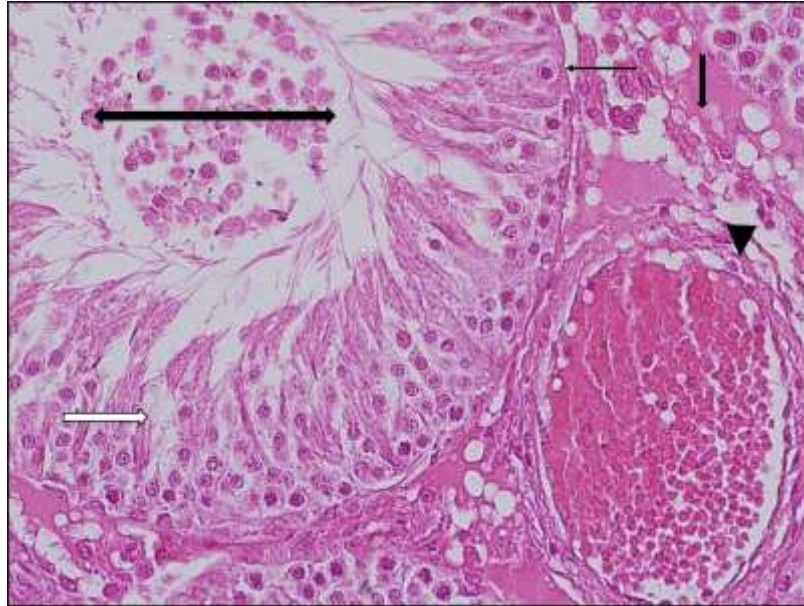
Resim 6. Kontrol grubuna ait testis dokusu. Kontrol grubuna ait testis dokusundaki normal seminifer tübül yapısı (siyah ok) ile aralarındaki interstisyel bağ dokusu (siyah yıldız) izlenmektedir (H&E, X200).



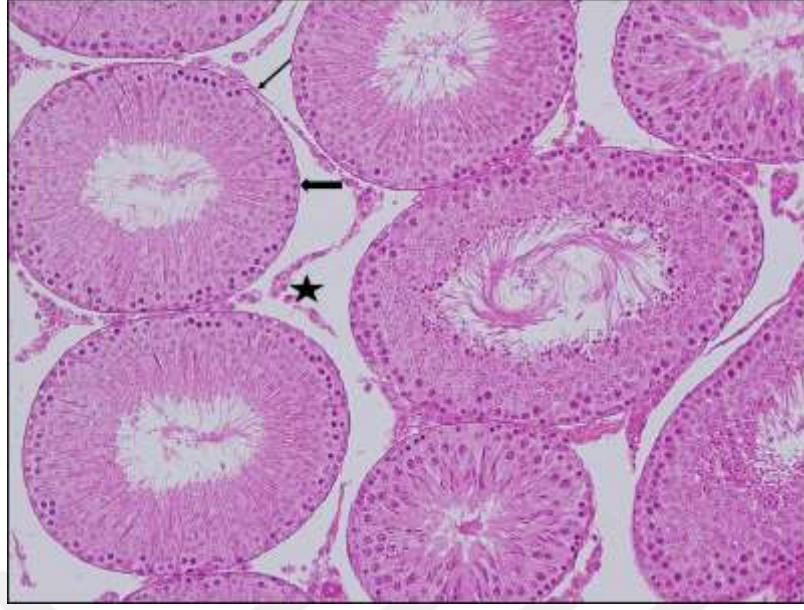
Resim 7. Kontrol grubuna ait testis dokusu. Kontrol grubuna ait testis dokusundaki miyoid hücre (mavi ok), Leydig hücresi (yeşil ok), Sertoli hücresi (kırmızı ok), spermatogonyum (sarı ok), primer spermatosit (mor ok), yuvarlak spermatid (açık mavi ok), uzamış spermatid (pembe ok), spermatozoon (şimşek) ve aralardaki interstisyel bağ dokusu (siyah yıldız) izlenmektedir (H&E, X400).



Resim 8. Gentamisin grubuna ait testis dokusu. Gentamisin grubuna ait testis dokusunda lümende immatür germinal hücre (çift başlı siyah ok), interstisyel ödem (çentikli ok), bazal membranda düzensizlik (siyah ince ok), epitelde ayrılma (beyaz ok) ve lümende spermatozoa azlığı (çift başlı beyaz ok) izlenmektedir (H&E, X200).



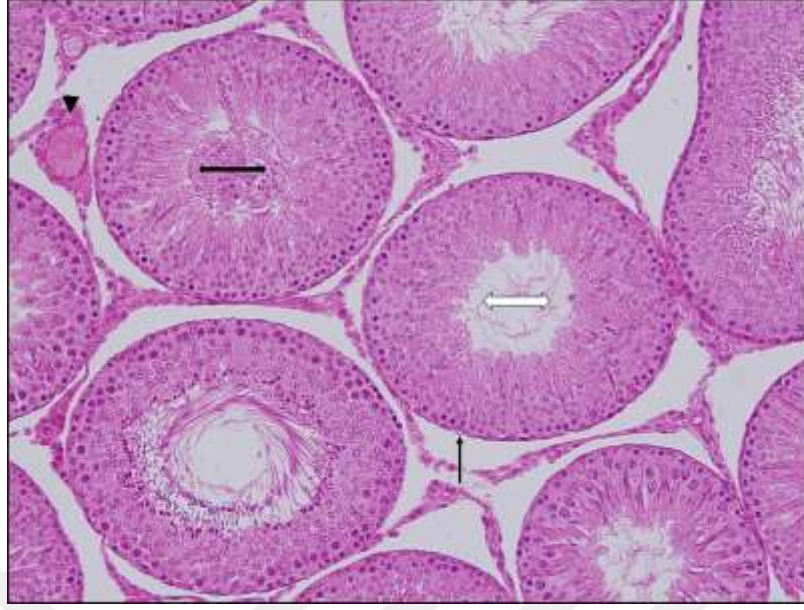
Resim 9. Gentamisin grubuna ait testis dokusu. Gentamisin grubuna ait testis dokusunda vasküler konjesyon (siyah aşağı bakan üçgen), interstisyel ödem (çentikli ok), lümende immatür germinal hücre (çift başlı siyah ok), bazal membranda düzensizlik (siyah ince ok) ve epitelde ayrılma (beyaz ok) izlenmektedir (H&E, X400).



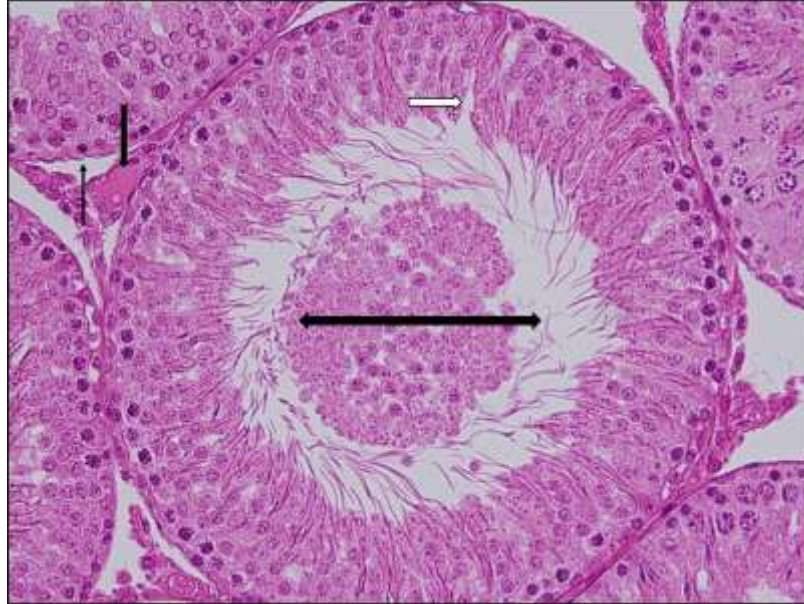
Resim 10. Kuersetin grubuna ait testis dokusu. Kuersetin grubuna ait testis dokusunda yer yer bazal membranda minimal düzensizlik (siyah ince ok) dışında seminifer tübül yapısı (siyah ok) ve interstisyel bağ dokusu (siyah yıldız) kontrole yakın görünümde izlenmektedir (H&E, X200).



Resim 11. Kuersetin grubuna ait testis dokusu. Kuersetin grubuna ait testis dokusunda bazal membranda minimal düzensizlik (siyah ince ok) ile kontrole yakın seminifer tübül yapısı (siyah ok) ve interstisyel bağ dokusu (siyah yıldız) izlenmektedir (H&E, X400).



Resim 12. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait testis dokusu. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait testis dokusunda lümende immatür germinal hücre (çift başlı siyah ok), vasküler konjesyon (siyah aşağı bakan üçgen), spermatozoon azalması (çift başlı beyaz ok) ve bazal membranda minimal düzensizlik (siyah ince ok) izlenmektedir (H&E, X200).

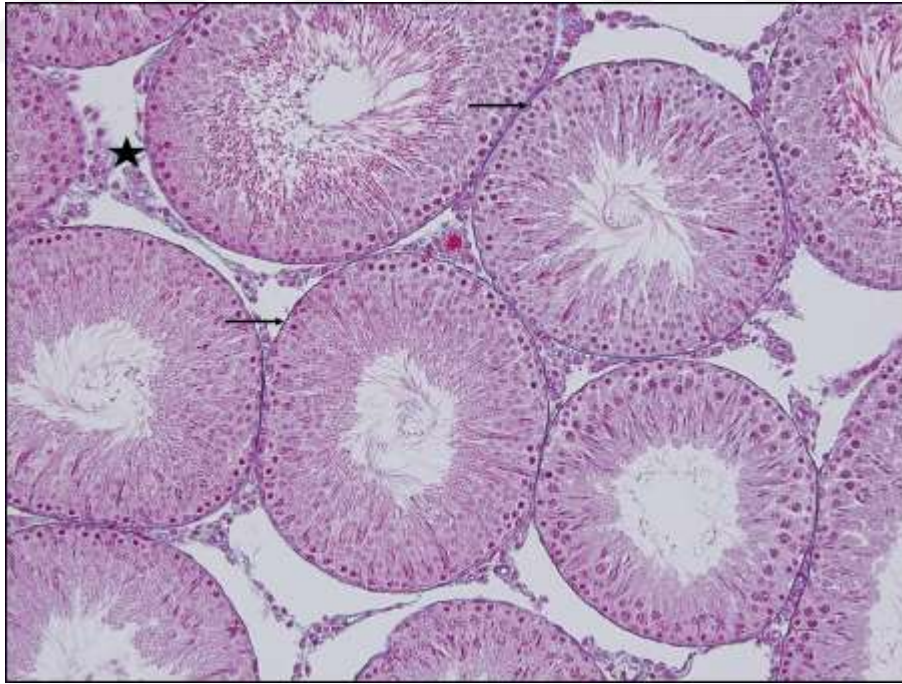


Resim 13. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait testis dokusu. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait testis dokusunda interstisyel ödem (çentikli ok), lümende immatür germinal hücre (çift başlı siyah ok), epitelde minimal ayrılma (beyaz ok) ve bazal membranda minimal düzensizlik (siyah ince ok) izlenmektedir (H&E, X400).

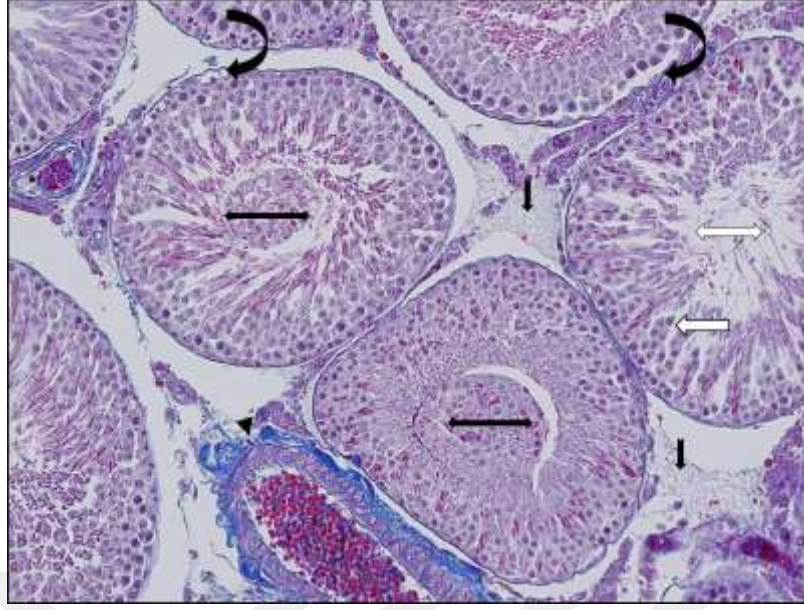
4.3.2. Masson Trikrom Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Testis dokusunun Masson Trikrom boyalı kesitlerinde yapılan değerlendirmede kontrol grubunda interstisyel bağ dokusu ve kollajen yoğunluğunun normal olduğu, diğer gruplarda da kontrol grubuna benzer interstisyel bağ dokusu ve kollajen yoğunluğu bulunduğu gözlemlendi. H&E ile boyalı preparatlarda olduğu gibi kontrol grubunda; seminifer tübüllerin, germinal epitelin ve peritübüler bağ dokusunun normal olduğu görüldü.

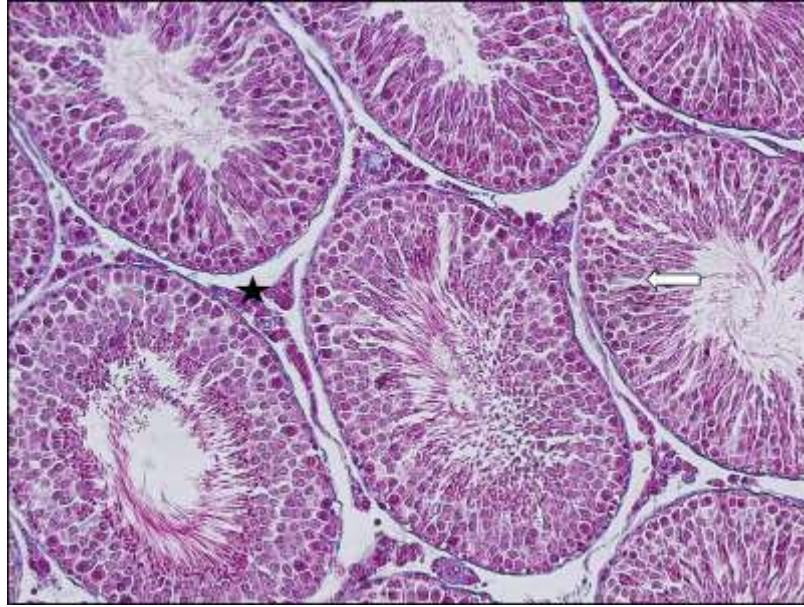
Özellikle GEN grubunda yer yer seminifer tübüllerin yapılarının ve bütünlüğünün bozulduğu; bazal membranda ve germinal epitelde ayrılmaların olduğu, tübül lümenlerinde immatür germinal epitel hücrelerin bulunduğu ve interstisyumda ödemin olduğu tespit edildi. QUE grubu kontrol grubuna benzer görünümdeydi. GEN+QUE grubunda ise hasar grubu olan GEN grubuna göre histopatolojik bulgularda düzelme olduğu tespit edildi.



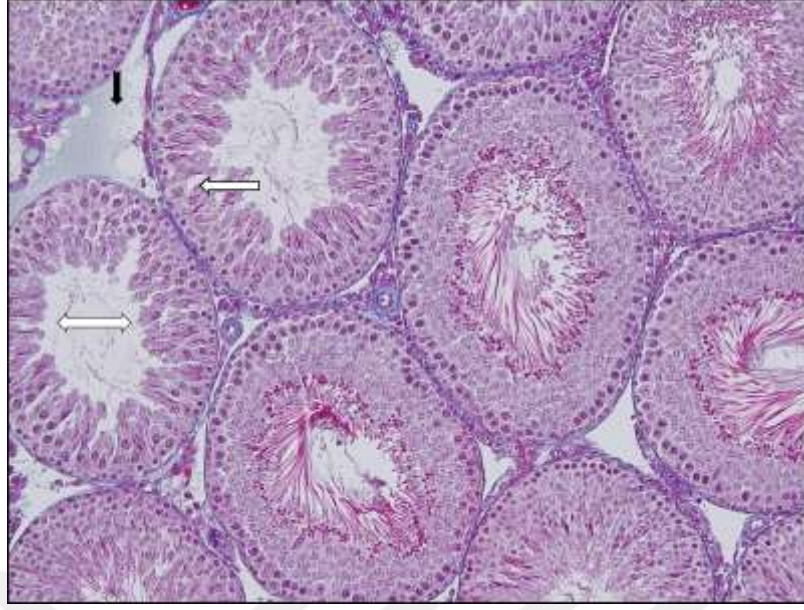
Resim 14. Kontrol grubuna ait testis dokusu Masson trikrom boyama. Kontrol grubuna ait testis dokusunda interstisyel bağ dokusu (siyah yıldız) ve peritübüler bağ dokusu (çizgi ok) normal olarak izlenmektedir (Masson Trikrom, X200).



Resim 15. Gentamisin grubuna ait testis dokusu Masson trikrom boyama. Gentamisin grubuna ait testis dokusunda lümende immatür germinal hücre (çift başlı siyah ok), interstisyel ödem (çentikli ok), epitelde ayrılma (beyaz ok), bazal membranda ayrılma (sola kıvrık siyah ok), spermatozoon azlığı (çift başlı beyaz ok) ve vasküler konjesyon (siyah aşağı bakan üçgen) izlenmektedir (Masson Trikrom, X200).



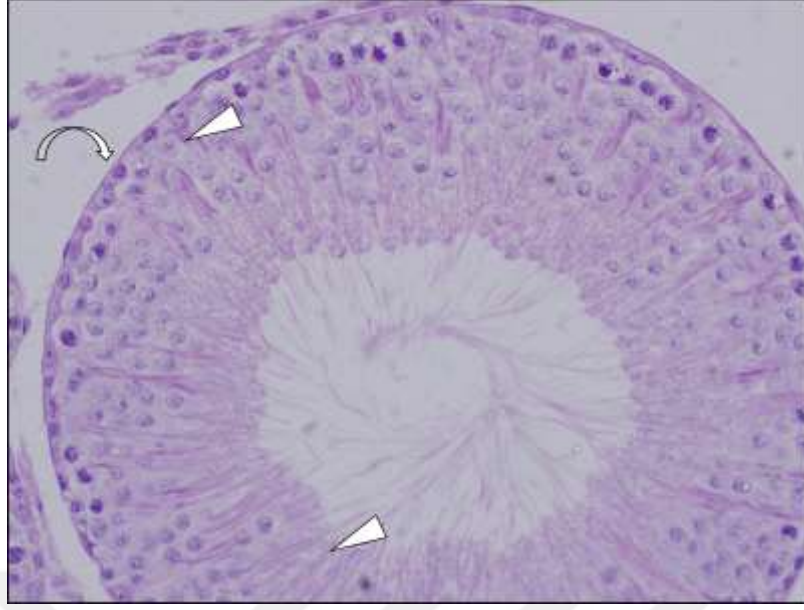
Resim 16. Kuersetin grubuna ait testis dokusu Masson trikrom boyama. Kuersetin grubuna ait testis dokusunda normal görünümde interstisyel bağ dokusu (siyah yıldız) ve yer yer epitelde ayrılma (beyaz ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X200).



Resim 17. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait testis dokusu Masson trikrom boyama. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait testis dokusunda interstisyel ödem (çentikli ok), spermatozoon azlığı (çift başlı beyaz ok) ve epitelde ayrılma (beyaz ok) izlenmektedir (Masson Trikrom, X200).

4.3.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

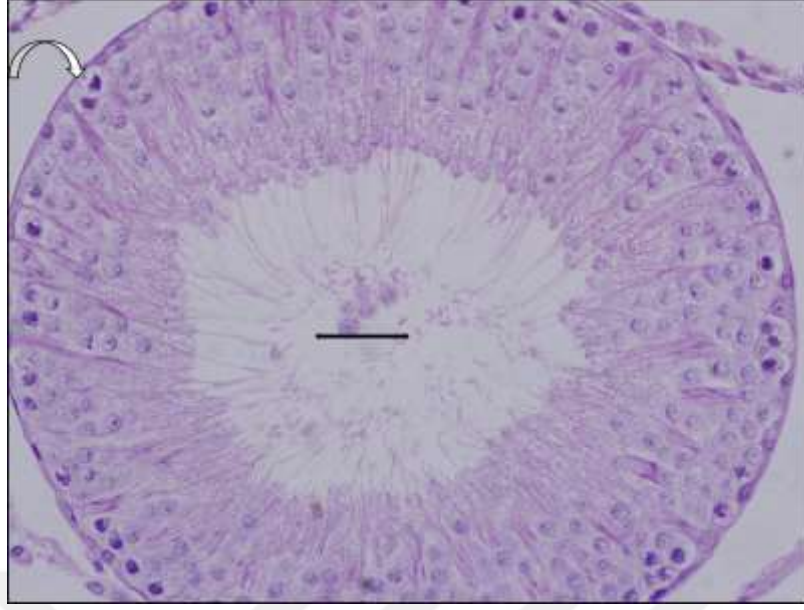
Değerlendirilen testis dokusuna ait PAS boyalı kesitlerde kontrol grubunda seminifer tübüllerin düzgün, kesintisiz PAS (+) bir bazal membranla çevrelendiği ve sperm akrozomlarının da PAS (+) boyandığı görüldü. GEN grubunda PAS (+) boyanmış bazal membranda düzensizlik ve ayrılmalar mevcuttu. Ayrıca seminifer tübül lümeninde immatür germinal epitel hücreleri, germinal epitelde ayrılma ile interstisyumda ödem tespit edildi. QUE grubu da kontrol grubuna benzer görünüm sergilemekle beraber yer yer seminifer tübül lümeninde immatür germinal epitel hücreleri ve ödem izlendi. GEN+QUE grubunda ise bazal membranda gözlenen düzensizlikte, ödem ve tübül lümenine dökülen epitel hücrelerinde azalma, germinal epitel ayrılmasında düzelme izlendi.



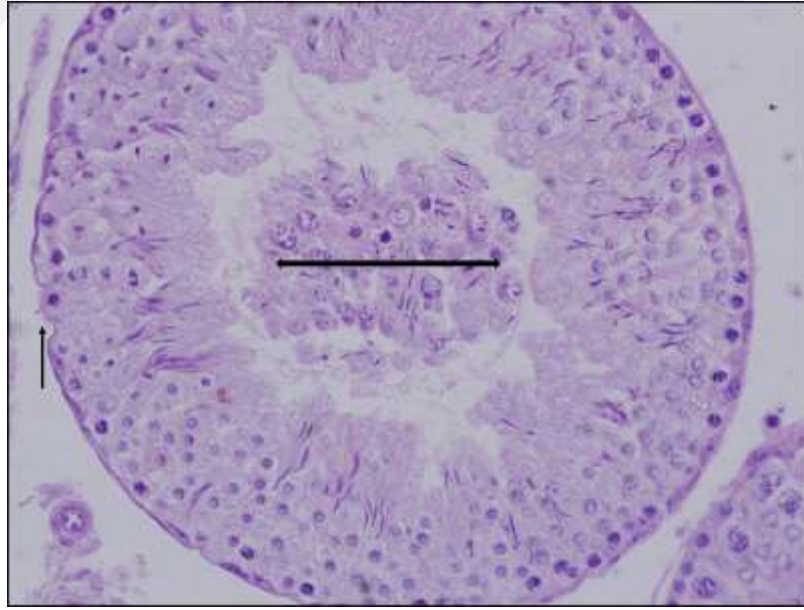
Resim 18. Kontrol grubuna ait testis dokusu PAS boyama. Kontrol grubuna ait testis dokusunda seminifer tübüle ait bütünlüğünü korumuş düzgün bazal membran yapısı (kıvrık beyaz ok) ve akrozomun (beyaz ok başı) PAS (+) boyandığı izlenmektedir (PAS, X400)



Resim 19. Gentamisin grubuna ait testis dokusu PAS boyama. Gentamisin grubuna ait testis dokusunda bazal membranda düzensizlik (siyah ince ok), lümende immatür germinal hücre (çift başlı siyah ok), interstisyel ödem (çentikli ok), germinal epitelde ayrılma (beyaz ok) izlenmektedir (PAS, X400)



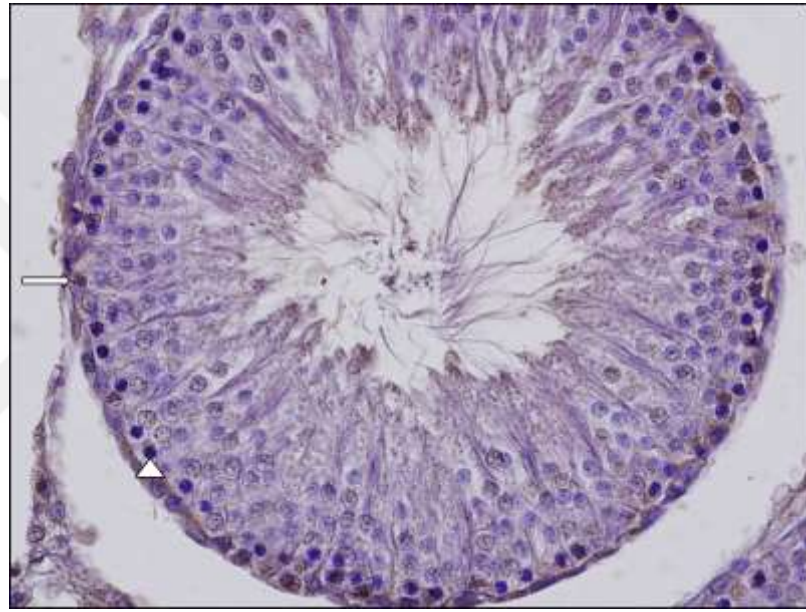
Resim 20. Kuersetin grubuna ait testis dokusu PAS boyama. Kuersetin grubuna ait testis dokusunda bazal membran yapısının bütünlüğünü koruduğu (kıvrık beyaz ok) ve yer yer lümende immatür germinal hücre (çift başlı siyah ok) bulunduğu izlenmektedir (PAS, X400)



Resim 21. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait testis dokusu PAS boyama. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait testis dokusunda bazal membranda düzensizlik (siyah ince ok) ve lümende immatür germinal hücre (çift başlı siyah ok) bulunduğu izlenmektedir (PAS, X400)

4.3.4. TUNEL Boyama ve Apoptotik İndeks

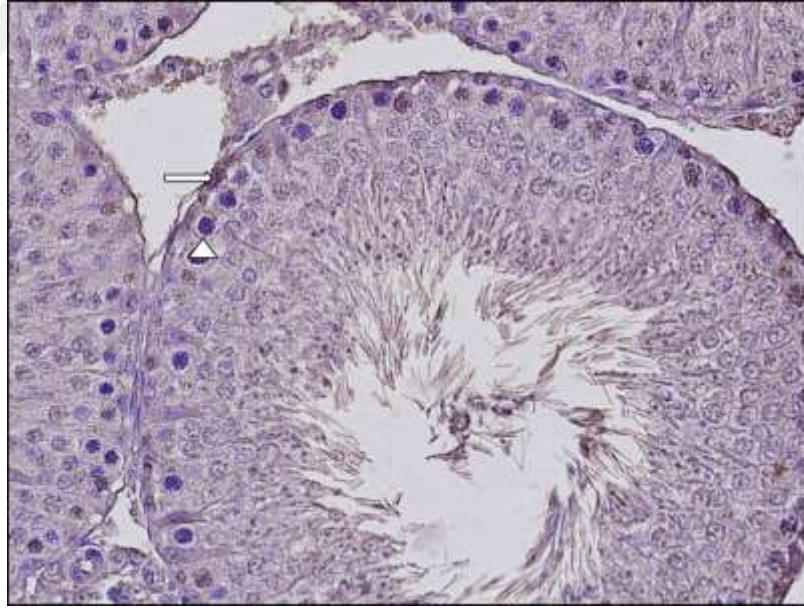
TUNEL boyama ile apoptoz değerlendirilen testis dokularında kontrol ve QUE grubunda germinal epitel hücrelerinde apoptoz az miktarda izlendi. GEN grubunda ise spermatogonyumlarda çoğunlukta olmak üzere germinal epitel hücrelerinde ve seminifer tübül lümeninde dökülen epitel hücrelerinde yaygın olarak izlendi. Tedavi grubu olan GEN+QUE grubundaysa spermatogonyumların yanı sıra kısmen diğer spermatogenik hücrelerde daha az miktarda apoptoz izlendi.



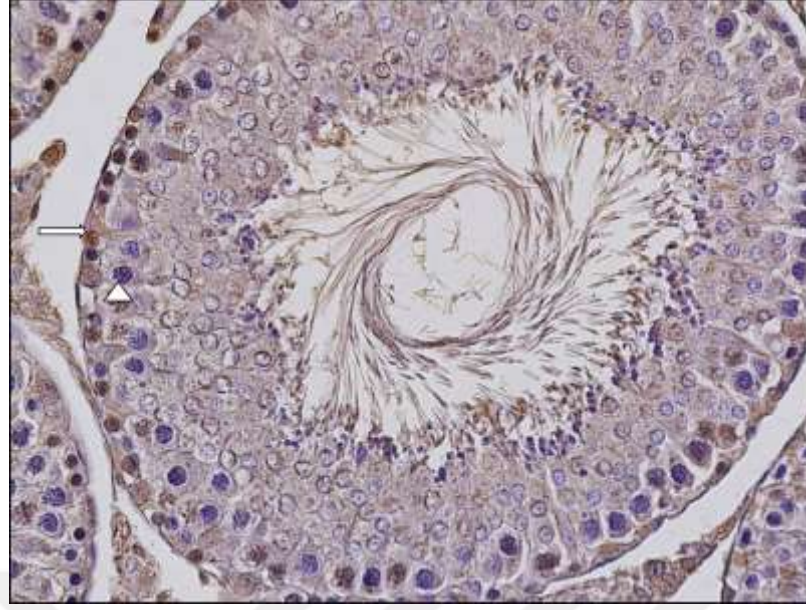
Resim 22. Kontrol grubuna ait testis dokusu TUNEL boyama. TUNEL (+) hücreler (beyaz ok) ve TUNEL (-) hücreler (beyaz ok başı) izlenmektedir (TUNEL, X400).



Resim 23. Gentamisin grubuna ait testis dokusu TUNEL boyama. TUNEL (+) hücreler (beyaz ok) ve TUNEL (-) hücreler (beyaz ok başı), lümende immatür germinal hücre (çift başlı siyah ok) izlenmektedir (TUNEL, X400).

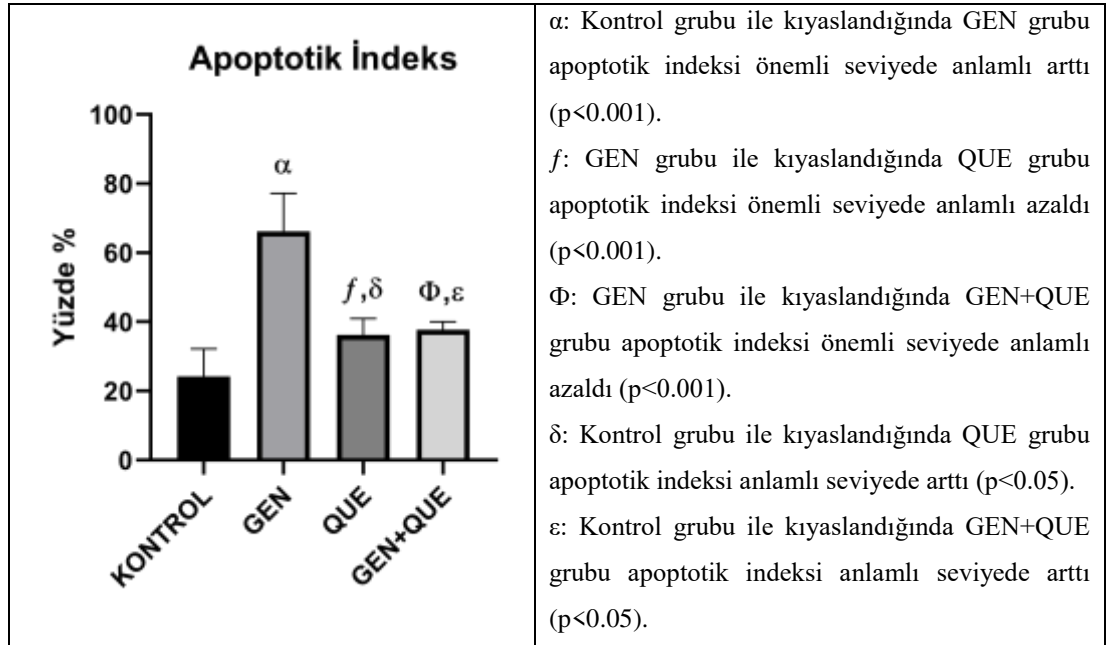


Resim 24. Kuersetin grubuna ait testis dokusu TUNEL boyama. TUNEL (+) hücreler (beyaz ok) ve TUNEL (-) hücreler (beyaz ok başı) izlenmektedir (TUNEL, X400).



Resim 25. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait testis dokusu TUNEL boyama. TUNEL (+) hücreler (beyaz ok) ve TUNEL (-) hücreler (beyaz ok başı) izlenmektedir (TUNEL, X400).

Deney grupları testis dokularında TUNEL tekniği ile değerlendirilen AI sonuçları aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 11. Deney gruplarına ait apoptotik indeks

Şekil 11 incelendiğinde kontrol grubu apoptotik indeksi ile kıyaslandığında GEN grubunda istatistiksel olarak önemli seviyede anlamlı artış olduğu belirlenmiştir ($p<0.001$). GEN grubunda artan indeks değeri, QUE ve GEN+QUE gruplarında birbirlerine benzer şekilde önemli seviyede anlamlı düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0.001$). QUE ile GEN+QUE grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamışken ($p>0.05$), bu grupların kontrol grubu ile karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$).

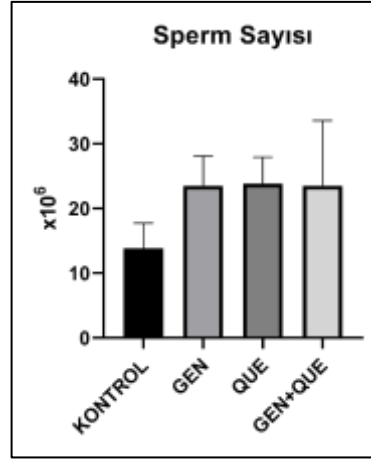
Tablo 7. Deney gruplarına ait apoptotik indeks ortalama ve standart sapma değerleri

	Kontrol Ort±SD	GEN Ort±SD	QUE Ort±SD	GEN+QUE Ort±SD
Apoptotik İndeks (%)	24,17±8,035	66,17±11,03 ^a	36,17±4,792 ^{f, δ}	37,67±2,338 ^{Φ, ε}
^a : Kontrol vs GEN ^f : GEN vs QUE ^Φ : GEN vs GEN+QUE ^δ : QUE vs Kontrol ^ε : GEN+QUE vs Kontrol				

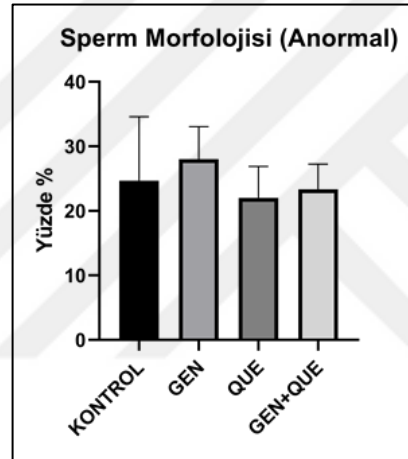
4.4. Semen Analizine Ait Bulgular

Semen analizi değerlendirmelerinde sperm sayımı sonucunda kontrol grubu sperm hücresi sayısı ile GEN, QUE ve GEN+QUE uygulamalarının sperm hücre sayıları arasında istatistiksel önemli bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$). Sperm morfolojisi değerlendirmesinde GEN grubunda yoğun olmak üzere kopuk baş, küçük baş, iri baş gibi baş anomalileri; kırık boyun gibi boyun anomalileri, kısa ve kıvrık kuyruk gibi kuyruk anomalilerini içeren anormal morfolojiler mevcuttu. Sperm anomalileri GEN grubunda diğer uygulama gruplarına göre fazla bulunmuştur. GEN+QUE grubunda GEN grubuna göre görülen anomalilerde azalma olmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel açıdan anlam bulunamadı ($p>0.05$).

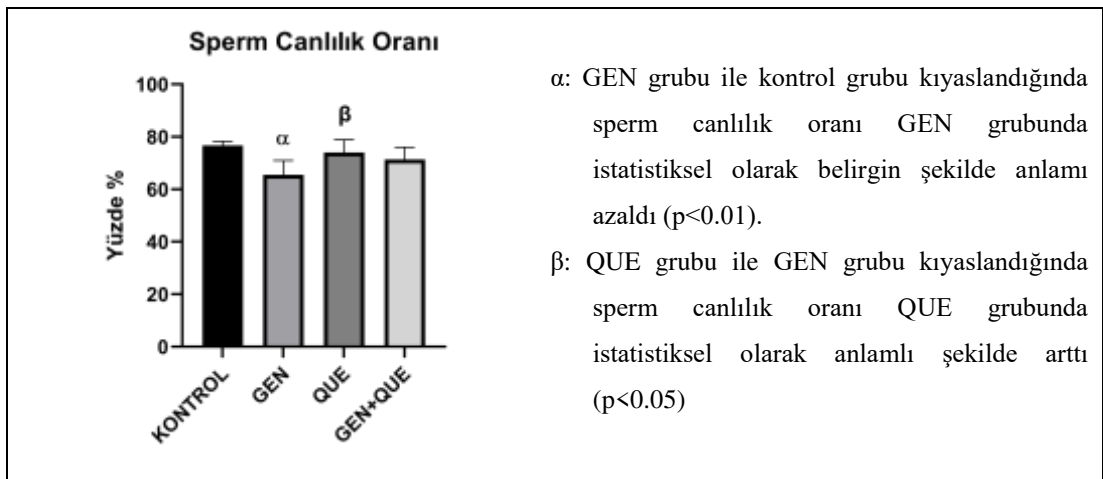
Sperm canlılığına bakıldığında GEN uygulaması yapılan grup ile kontrol grubu kıyaslandığında sperm canlılık oranının istatistiksel olarak belirgin şekilde anlamlı azaldığı belirlenmiştir ($p<0.01$). Çalışmada QUE grubu sperm canlılığının, GEN grubuna göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiş ($p<0.05$); GEN ile GEN+QUE grupları ve kontrol ile QUE grupları arasındaki farklar ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$).



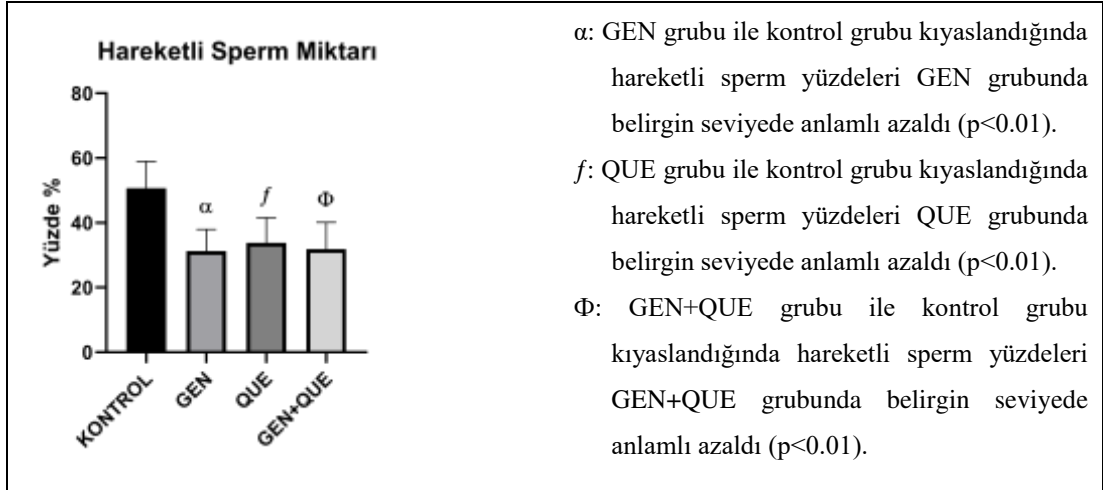
Şekil 12. Deney gruplarına ait sperm sayısı



Şekil 13. Deney gruplarına ait sperm morfolojisi



Şekil 14. Deney gruplarına ait sperm canlılık oranı

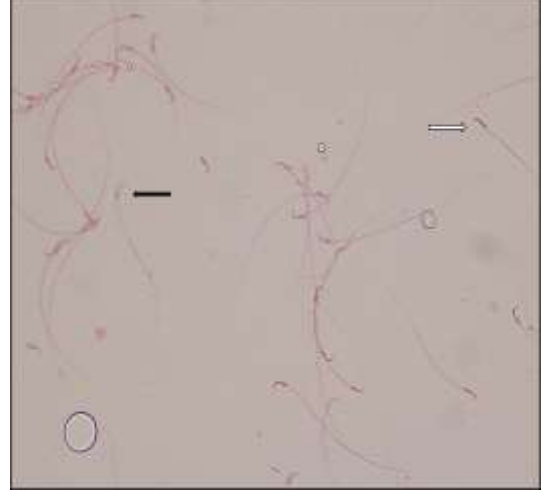
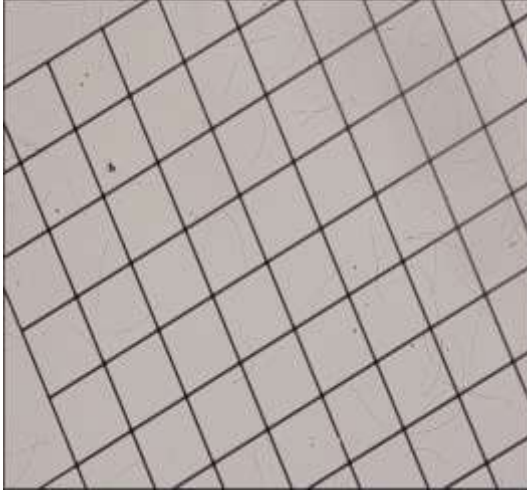


Şekil 15. Deney gruplarına ait hareketli sperm miktarı

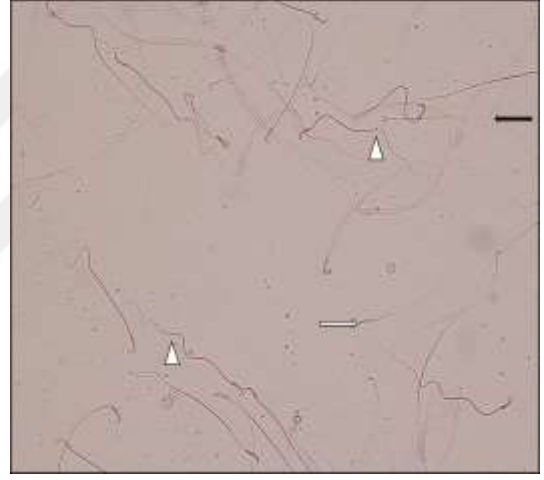
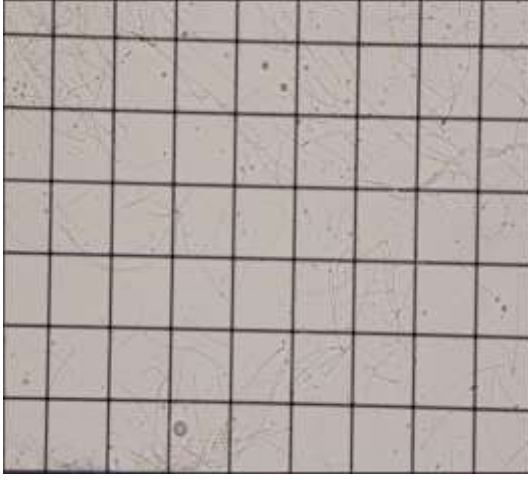
Hareketli sperm yüzdelerine (motilite yüzdelerine) bakıldığında GEN, QUE ve GEN+QUE gruplarının kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak belirgin seviyede anlamlı azaldığı belirlenirken ($p<0.01$), uygulama gruplarının kendi aralarında değerlerinin benzer şekilde olduğu, istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).

Tablo 8. Deney gruplarına ait sperm parametreleri ortalama ve standart sapma değerleri

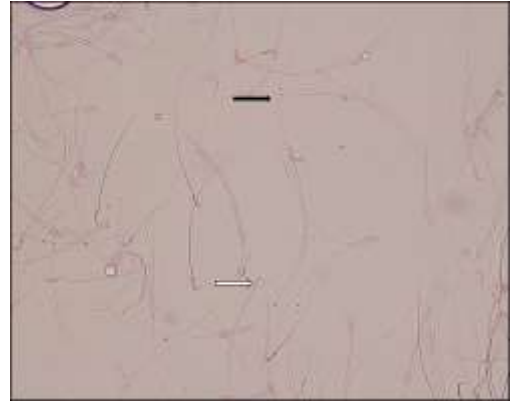
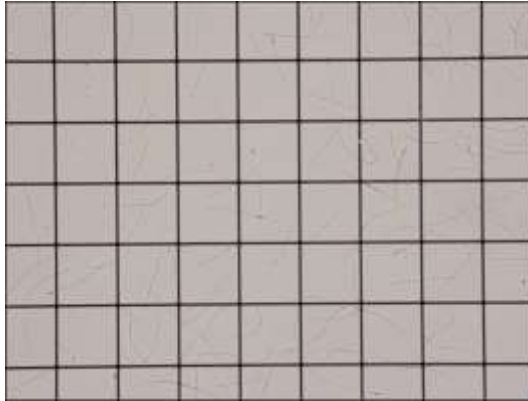
	Kontrol Ort±SD	GEN Ort±SD	QUE Ort±SD	GEN+QUE Ort±SD
Hareketli Sperm Miktarı (%)	50,70±8,282	31,22±6,731 ^α	33,75±7,792 ^f	31,80±8,293 ^Φ
Sperm Canlılık Oranı (%)	76,67±1,633	65,50±5,431 ^α	74,00±4,899 ^β	71,33±4,676
Sperm Morfolojisi (Anormal) (%)	24,67±9,933	28,00±5,060	22,00±4,899	23,33±3,933
Sperm Sayısı (x10⁶)	13,83±3,869	23,50±4,593	23,83±4,070	23,50±10,09
^α : GEN vs Kontrol ^β : QUE vs GEN ^f : QUE vs Kontrol ^Φ : GEN+QUE vs Kontrol				



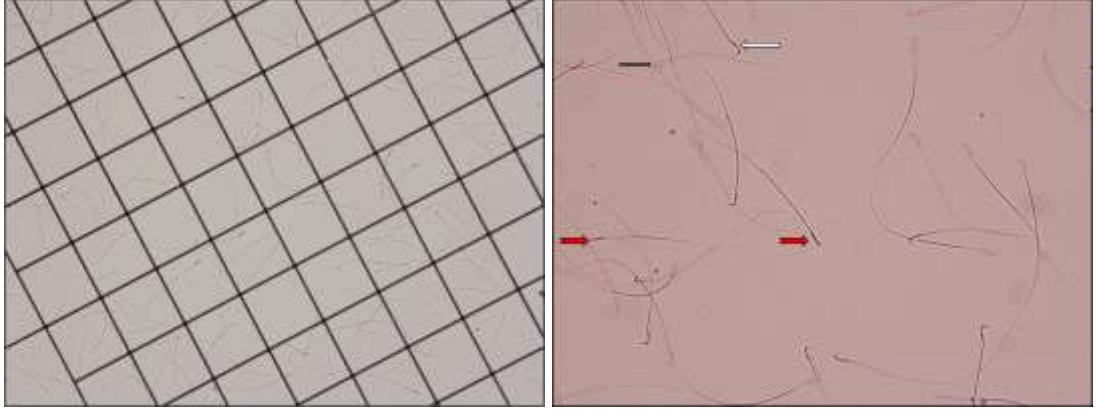
Resim 26. Kontrol grubuna ait makler ve sperm analizi görüntüleri. Canlı sperm (siyah ok), ölü sperm (beyaz ok) (eosin Y, X200)



Resim 27. Gentamisin grubuna ait makler ve sperm analizi görüntüleri. Canlı sperm (siyah ok), ölü sperm (beyaz ok), kuyruk anomalisi (beyaz ok başı) (eosin Y, X200)



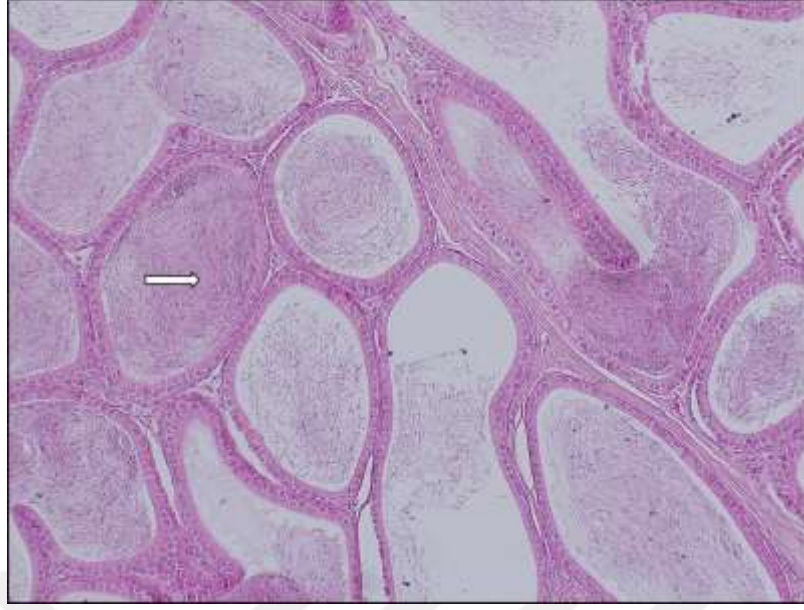
Resim 28. Kuersetin grubuna ait makler ve sperm analizi görüntüleri. Canlı sperm (siyah ok), ölü sperm (beyaz ok) (eosin Y, X200)



Resim 29. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait makler ve sperm analizi görüntüleri. Canlı sperm (siyah ok), ölü sperm (beyaz ok) ve baş boyun anomalisi (kırmızı çentikli sağ ok) (eosin Y, X200)

4.5. Epididimis Dokusuna Ait Hematoksilen & Eozin Boyalı Kesitlerin Bulguları

Epididimise ait kesitlerin incelenmesinde kontrol grubunda, spermatozoon ile dolu lümeni çevreleyen yalancı çok katlı stereosilyalı epitelin düzenli olduğu görüldü. GEN grubunda lümeni çevreleyen epitelde herhangi bir patoloji gözlenmez iken duktus epididimis kesitleri arasındaki bağ dokusu içinde yer yer vasküler konjesyon ve ödem izlendi. QUE grubunda bazı kesitlerde lümen içinde spermatozoon yığınlarında az miktarda azalma gözlenirse de genel itibariyle kontrol grubuna benzer görünüm sergilemekteydi. GEN+QUE grubunda ise GEN grubunda gözlenen ödemin miktarında azalma olmakla beraber yer yer mevcut olduğu, bazı duktus epididimis lümenlerindeyse spermatozoon yığınlarında seyrelme bulunduğu gözlemlendi.



Resim 30. Kontrol grubuna ait epididimis dokusu. Epididimis yapısının ışık mikroskopik görünümü, lümen içinde spermatozoon yığını (beyaz ok) izlenmektedir (H&E, X100).



Resim 31. Kontrol grubuna ait epididimis dokusu. Epididimis yapısının ışık mikroskopik görünümünde lümen içinde spermatozoon yığını (beyaz ok) izlenmektedir (H&E, X200).



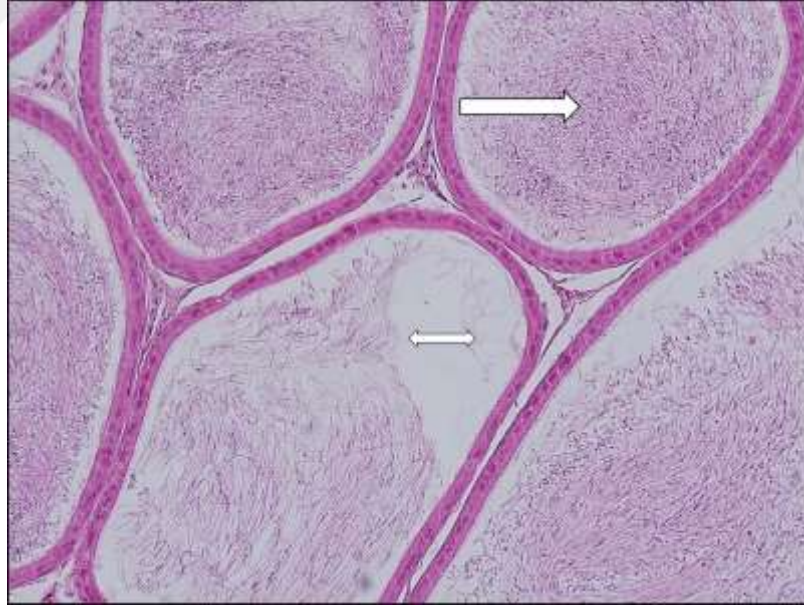
Resim 32. Gentamisin grubuna ait epididimis dokusu. Epididimis yapısının ışık mikroskopik görünümünde lümen içinde spermatozoon yığını (beyaz ok), vasküler konjesyon (siyah yıldız) ve interstisyel ödem (çentikli ok) izlenmektedir (H&E, X100).



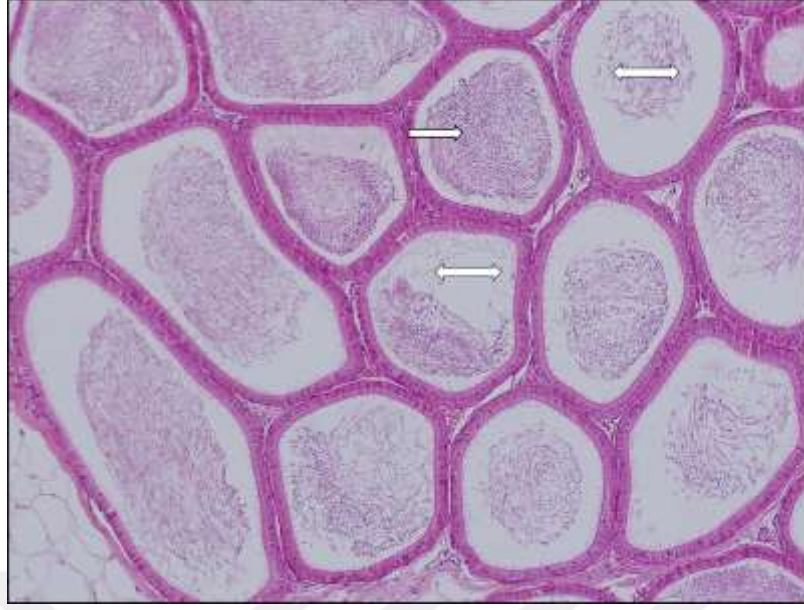
Resim 33. Gentamisin grubuna ait epididimis dokusu. Epididimis yapısının ışık mikroskopik görünümünde lümen içinde spermatozoon yığını (beyaz ok) ve interstisyel ödem (çentikli ok) izlenmektedir (H&E, X200).



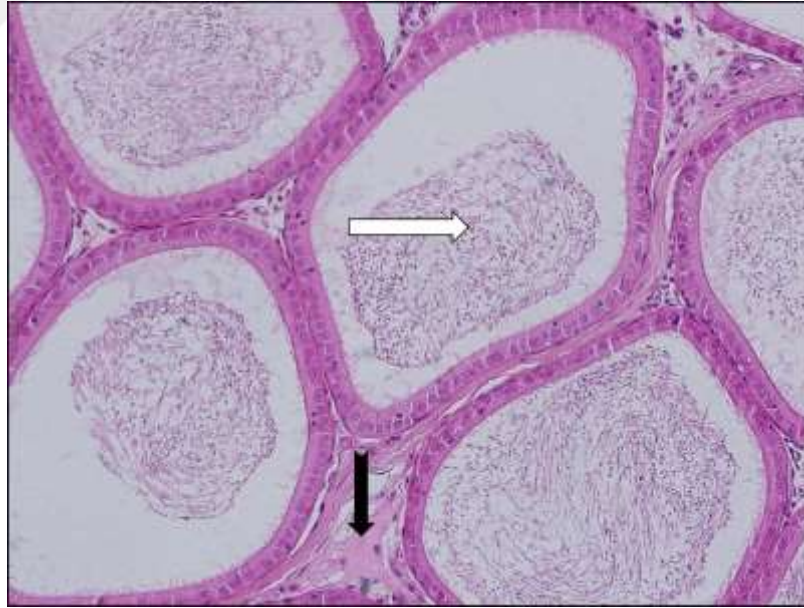
Resim 34. Kuersetin grubuna ait epididimis dokusu. Epididimis yapısının ışık mikroskopik görünümünde lümende spermatozoon yığını (beyaz ok) ve yer yer spermatozoon azlığı (çift başlı beyaz ok) izlenmektedir (H&E, X100).



Resim 35. Kuersetin grubuna ait epididimis dokusu. Epididimis yapısının ışık mikroskopik görünümünde lümende spermatozoon yığını (beyaz ok) ve yer yer spermatozoon azlığı (çift başlı beyaz ok) izlenmektedir (H&E, X200).



Resim 36. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait epididimis dokusu. Epididimis yapısının ışık mikroskopik görünümü, lümende spermatozoon yığı (beyaz ok), yer yer spermatozoon azlığı (çift başlı beyaz ok) izlenmektedir (H&E, X100).



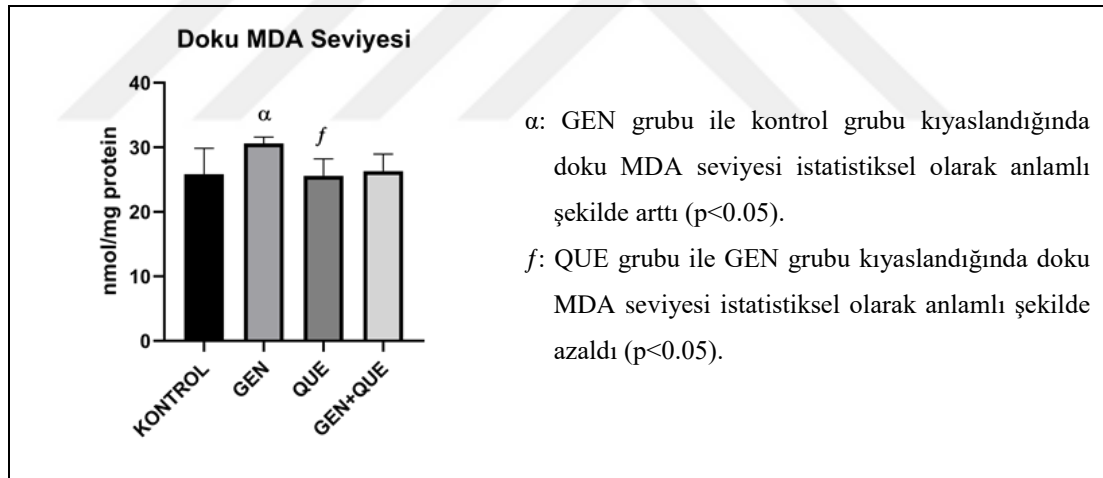
Resim 37. Gentamisin+Kuersetin grubuna ait epididimis dokusu. Epididimis yapısının ışık mikroskopik görünümü, lümende spermatozoon yığı (beyaz ok), interstisyel ödem (çentikli ok) izlenmektedir (H&E, X200).

4.6. Biyokimyasal Parametrelere Ait Bulgular

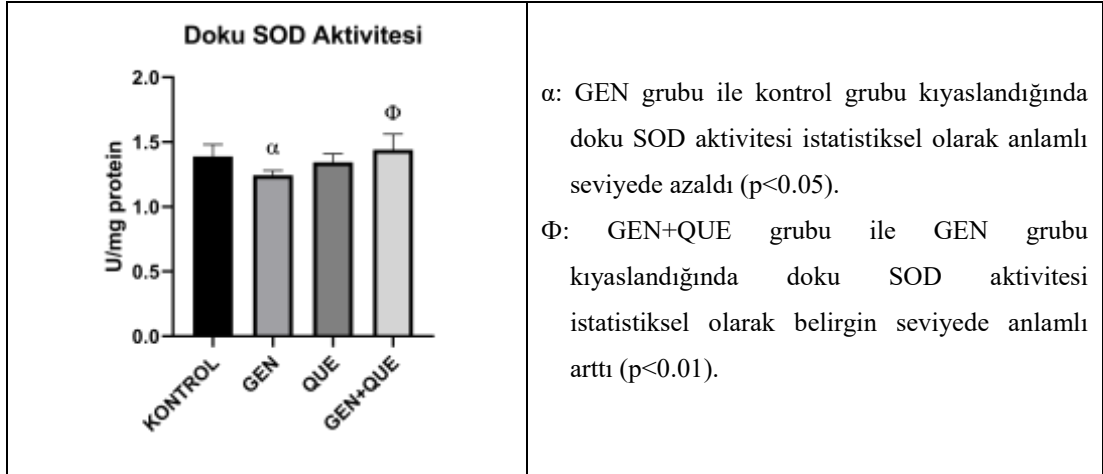
4.6.1. Doku Biyokimyası

Çalışmamızdaki deney gruplarından alınan testis doku örneklerinden çalışılan doku MDA, doku SOD, doku CAT, doku GPx değerlendirilmiş ve sonuçlarına ilişkin bilgiler aşağıda verilmiştir.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında GEN grubu MDA seviyesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ($p<0.05$); QUE grubu MDA seviyesinin GEN grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde düşük olduğu belirlenirken ($p<0.05$), kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel bir fark tespit edilememiştir ($p>0.05$). Ayrıca GEN+QUE grubu incelendiğinde GEN uygulamasının arttırdığı MDA seviyesine QUE tedavisinin bir miktar azalma sağlasa da bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür ($p>0.05$).

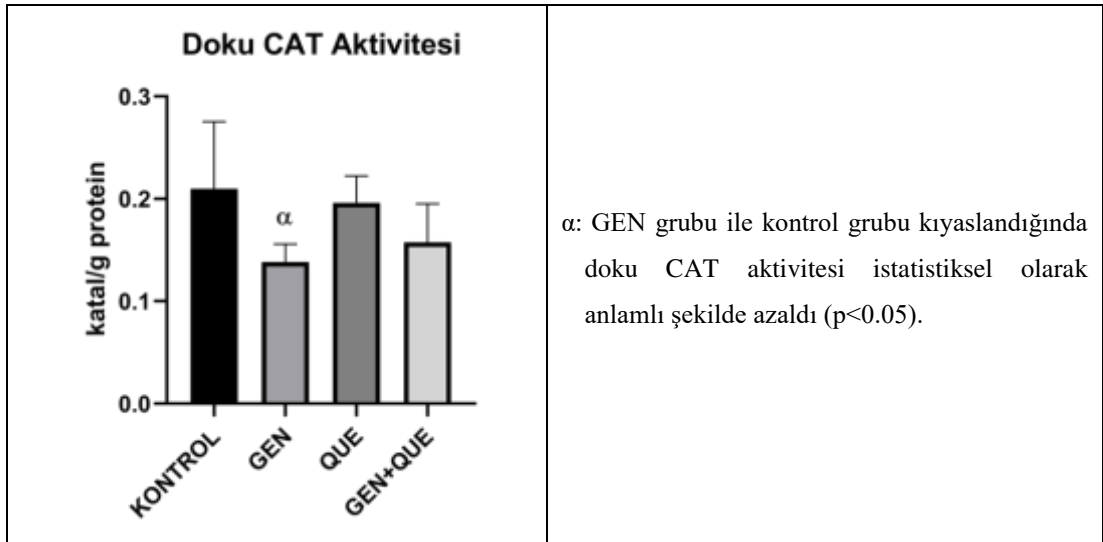


Şekil 16. Doku MDA seviyesi



Şekil 17. Doku SOD aktivitesi

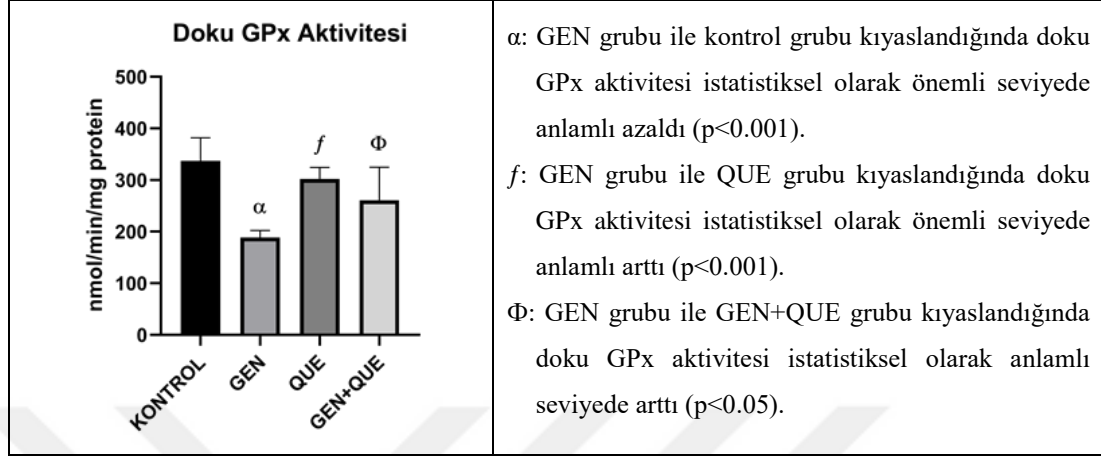
Şekil 17 incelendiğinde doku SOD aktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GEN grubunda istatistiksel olarak anlamlı seviyede azaldığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Çalışmada QUE grubunun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında SOD aktivitesinde bir fark oluşturmadığı tespit edilmiş ($p>0.05$); GEN grubu ile kıyaslandığında GEN+QUE grubunun SOD aktivitesinin belirgin seviyede anlamlı arttığı gözlenmiştir ($p<0.01$).



Şekil 18. Doku CAT aktivitesi

Şekil 18 incelendiğinde kontrol grubu ile kıyaslandığında GEN grubunda doku CAT aktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı belirlenmiştir

($p<0.05$). QUE ve GEN+QUE grubunda ise artış gözlenmesine rağmen GEN grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir fark oluşmadığı tespit edilmiştir ($p>0.05$).



Şekil 19. Doku GPx aktivitesi

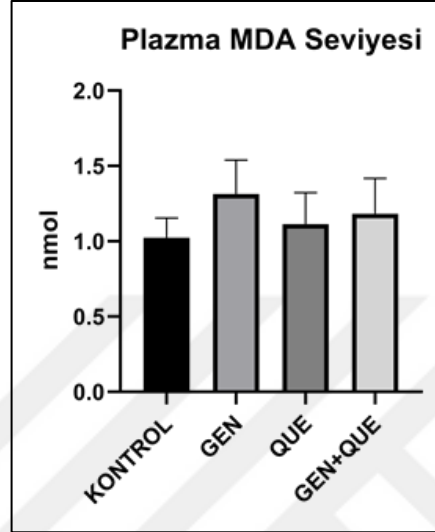
Yapılan değerlendirmeler sonucunda GEN uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doku GPx aktivitesinin istatistiksel olarak önemli seviyede anlamlı azaldığı belirlenmiştir ($p<0.001$). Çalışmada doku GPx aktivitelerinin GEN grubu ile kıyasla sadece QUE uygulamasında istatistiksel olarak önemli seviyede anlamlı arttığı ($p<0.001$); tedavi grubu olarak GEN+QUE uygulamasında ise anlamlı seviyede artış olduğu tespit edilmiştir ($p<0.05$). Kontrol grubuna göre kıyaslamada ise QUE ve GEN+QUE gruplarının aktiviteleri arasında anlamlı fark olmadığı gözlenmiştir ($p>0.05$).

Tablo 9. Deney gruplarına ait biyokimyasal parametrelerin ortalama ve standart sapma değerleri

	Kontrol Ort±SD	GEN Ort±SD	QUE Ort±SD	GEN+QUE Ort±SD
MDA (nmol/mg protein)	25,86±4,005	30,60±0,981 ^{α}	25,58±2,633 ^{f}	26,30±2,640
SOD (U/mg protein)	1,388±0,092	1,244±0,034	1,345±0,064	1,411±0,120
GPx (nmol/min/mg protein)	337,3±44,77	188,7±13,65 ^{α}	302,2±22,17 ^{f}	261,1±63,67 ^{Φ}
CAT (katal/g protein)	0,210±0,066	0,138±0,018 ^{α}	0,196±0,026	0,158±0,038
^{α} : Kontrol vs GEN ^{f} : GEN vs QUE ^{Φ} : GEN vs GEN+QUE				

4.6.2. Serum Biyokimyası

Deney gruplarından alınan kan örneklerinden bakılan plazma MDA değerlerinde gruplar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır ($P>0.05$).



Şekil 20. Plazma MDA seviyesi

5. TARTIŞMA

İnfertilite, 1 yıl boyunca herhangi bir kontraseptif yöntem kullanmadan, korunmasız cinsel ilişkiye rağmen gebeliğin elde edilemediği durum olarak tanımlanmaktadır (2, 59, 153). Kadın veya erkek kaynaklı olabilen ve günümüzde giderek sıklığı artan infertilite, nedensel olarak primer ya da sekonder infertilite şeklinde sınıflandırılmakta, tedavileri de sebeplerine göre şekillenmektedir. Erkek kaynaklı infertilite halen araştırılmakta olup altta yatan sebepler henüz anlaşılamamıştır (1). Erkek infertilitesinin %40-90'ının sperm üretimindeki kusur kaynaklı olabileceği düşünülmekte ve sperm ile ilgili diğer faktörler arasında anormal sperm morfolojisi ile yetersiz sperm motilitesi bulunmaktadır (153). Sperm üretimi, olgunlaşması ve dölleme yeteneğindeki problemler erkek kısırlığının en yaygın nedenidir (19).

Yapılan çalışmalarda, zamanla üretilen semen kalitesinde azalma olduğu gösterilmiş; bu değişimin kimyasallar ile temas, hormonal ajanlar, performans artırıcı maddeler, sigara, enfeksiyon, radyasyon, beslenme, reaktif oksijen türleri, östrojenler, ağır metaller, skrotal sıcaklık, sperm antikorları, antibiyotikler de dahil olmak üzere terapötik ilaçlar gibi yaşam tarzı ve çevresel faktörlerden kaynaklı olduğu bildirilmiştir (1, 49, 153).

Terapötik ilaçlar arasında bulunan antibiyotikler, özellikle semende lökosit gözlenen hastalarda ya da in vitro fertilizasyon işleminden önce bakteriyel enfeksiyon tedavisinde ürologlar, androloglar veya fertilizasyon uzmanları tarafından başlanabilir (56).

Gentamisin, 100'den fazla ülkeden onay almış ve halen kullanılmakta olan aminoglikozid grubu bir antibiyotiktir. Özellikle Gram negatif (-) bakterilere ve Streptococcus aureus'a karşı etkindir. Bununla birlikte ilaca bağlı nefrotoksisitenin en yaygın nedenlerinden birisidir. Nefrotoksik etkilerine ek olarak testis toksisitesi de meydana getirip terapötik pencereyi daraltmaktadır (50). Yapılan çalışmalarda Gentamisinin sperm hareketliliğini azalttığı, sperm sayısında ve morfolojisinde bozulmaya sebep olduğu, sperm fonksiyonlarını ve spermatogenezi olumsuz etkilediği, üreme organ ağırlığında azalmaya yol açtığı, testiste apoptoza neden olup testiküler yetmezliğine kadar hasar oluşturabileceği belirtilmiştir (49, 51-53, 55, 56).

Gentamisin kaynaklı testis toksisitesinin kesin mekanizması net olmamakla birlikte; toksik reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu ve oksidatif stres patofizyolojisinde yer almaktadır (154, 155).

Sıçanlara ve insanlara Gentamisin uygulamasının, primer spermatosit mayozunda aksaklık ile spermatogonal bölünmenin kesilmesi ve spermatogenik duraksamayla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu durumun da spermilerin ve çekirdeklerindeki protein sentezinin azalmasından kaynaklı olabileceği düşünülmüştür (54).

İlk zamanlarda gentamisinin kan testis bariyerinden zayıf geçişi ile testiste birikmeyeceği bildirilmiş (57), sonrasında ise germ hücresinin bölünmesinde inhibisyon, testiste protein sentezinin engellenmesi ile seminal vezikülde hücre ölümünü indüklediği bildirilmiştir (54). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda gentamisinin serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu artırarak testiste oksidatif stres artışı ve nekrotik hasar yarattığı açıklanmıştır (50, 51, 60). GEN tedavisinin antioksidan enzimler olan SOD ve CAT değerlerini azalttığı, doku MDA seviyelerini ise artırdığı bildirilmiştir (59).

Gentamisinin apoptoz ve oksidatif hasarın indüksiyonunda da etken olduğu bildirilmiştir (155). Hasarlı DNA'nın varlığının açıklanması için farklı mekanizmalar öne sürülmüş olup; anormal kromatin paketlenme, oksidatif stres ve apoptoz en çok üzerinde çalışılan konular olmuştur (19).

Oksidatif stres, erkek üreme disfonksiyonu için en önemli faktörlerden biridir. ROS membran bütünlüğünü değiştirerek, sperm hareketliliğinin yanı sıra sperm canlılığını da bozabilir ve gelişmekte olan germ hücreleri üzerine zararlı etkileri nedeniyle infertiliteye sebep olabilmektedir (5, 156).

QUE kırmızı şarap, çay ve soğan gibi birçok besinde bol miktarda bulunan en yaygın diyet polifenolik bileşiklerinden biridir. QUE'in anti-inflamatuar, antikoagülatif, anti-aterojenik, anti-hipertansif ve antikarsinojenik özellikler gibi pek çok özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir (9). Serbest radikalleri temizleyerek ve geçiş metal iyonlarını şelatlayarak düşük yoğunluklu lipoproteinlerin oksidasyonunu önleyerek ROS'a karşı etkili bir antioksidandır (157).

Bununla birlikte QUE'in erkek üreme sistemi üzerindeki etkileri hakkında tartışmalı çalışmalar vardır (9, 139). Ayrıca QUE'in kullanımına erkek infertilite tedavisinde alternatif bir ilaç olarak bakıldığı da bildirilmektedir (158).

Ortamda QUE mevcutsa serbest radikaller etkin bir şekilde temizlenir ve oluşan DNA hasarı iyileştirilir. Bu esnada QUE oksitlenir, glutatyon ve protein tiyol gruplarını arilleyerek glutatyon tüketimine, sitozolik kalsiyum konsantrasyonunda artışa ve LDH sızıntısına yol açar (159, 160). Hücre içi kalsiyumdaki artış, sperm motilitesindeki düşüşten sorumlu olan Ca^{+2} -ATPaz enziminin aktivitesini azaltır (139). Artan sitozolik serbest kalsiyum seviyeleri, sitotoksositeye neden olabilir veya apoptozu tetikleyebilir (161).

Başlangıçta QUE testiste serbest radikalleri temizlemesine ve bir antioksidan görevi görerek DNA hasarını, kromozom anormalliklerini, sperm başı anormalliklerini ve germ hücre azalmasını önlemesine rağmen, sperm motilitesinde ve germ hücrelerinde bir düşüşe de yol açar. QUE 'in çelişkili biyolojik etkilerinin, dozu ve hücrenin redoks durumu ile ilgili olabileceği düşünülmektedir (162).

QUE'nin, konsantrasyonuna bağlı olarak insan sperm mitokondrisi üzerinde hem antioksidan hem de prooksidan aktiviteler sergilediği gösterilmektedir (141, 163). İnsan semen numunelerinde yapılan bir *in vitro* çalışma, QUE'nin insan sperm motilitesinde irreversible ve doza bağlı bir azalmaya yol açtığını göstermiştir (139). Ayrıca sperm canlılığının da artan QUE dozuyla azaldığı tespit edilmiştir (160).

Çalışmamızda gentamisin'in sıçan testisi üzerinde oluşan olumsuz etkilerine karşı kuersetinin etkisinin olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Narayana ve ark. çalışmalarında GEN'i 3 mg/kg ve 5 mg/kg olacak şekilde iki dozda 10 gün boyunca i.p. uygulayıp; tedavi sonrası her çalışma grubundan ikişer grup olacak şekilde 1. ve 35. günlerde kurban edip değerlendirilmiştir. Gentamisin'in serbest radikal oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu artırarak; antioksidan rezervlerini azaltıp, testiste yapısal ve sitotoksik değişikliklere neden olan oksidatif stres durumunu tetiklediğini belirtmişlerdir. Çalışma sonucunda deneklerin vücut ağırlıklarının etkilenmediğini, yüksek doz gentamisin ile tedavi edilen grupta ise testis ağırlıklarının yapısal değişikliklere bağlı olarak azaldığını bulmuşlardır (49).

Rivera ve ark. metabolik sendrom ile ilgili yaptıkları çalışmalarında 2 mg/kg ve 10 mg/kg QUE uyguladıkları obez Zucker sıçanları ve zayıf heterozigot yavrularında, 10 haftalık QUE tedavisi sonrasında yüksek doz uygulamasında iki grupta da vücut ağırlıklarında azalma tespit etmişlerdir. Vücut ağırlıklarında görülen bu azalmanın yağ dokusundan üretilen antiinflamatuvar etkilerine bağlı olabileceği düşünülmüş; kilo kaybı ve adinopektin artışı arasında ilişki bulunmuştur (164).

Bizim çalışmamızda Gentamisin uygulanan grupta vücut ağırlıklarında azalma gözlenmesine rağmen bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. QUE ve GEN+QUE uygulanan gruplarda vücut ağırlıklarında GEN+QUE grubunda daha bariz olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edildi. Çalışmamızda Rivera ve ark. çalışmalarındaki gibi QUE uygulanan iki grupta da vücut ağırlığında azalma görüldü; Narayana ve ark. çalışma sonucunda buldukları gibi GEN+QUE grubunda QUE'nin yaptığı kilo kaybıyla beraber GEN'in de etkisiyle belirgin bir şekilde vücut ağırlığında azalma tespit edildi.

Başka bir çalışmada Aly ve ark. GEN'i daha yüksek dozlarda 60 mg/kg, 80 mg/kg ve 100 mg/kg olacak şekilde uygulamışlar. Çalışmalarının sonucundaysa testis ağırlıklarının azaldığını ve sperm özelliklerinin değiştiğini belirtmişlerdir. 60 mg/kg'lık dozda bazı fokal seminifer tübüllerde fokal olarak spermatogenik serinin durduğu; 80 mg/kg'lık doz seviyesinde dejenerasyon gözlemlendi, spermatogenezin olmadığı ve tübüler lümen içinde dev spermatogonial hücrelerin görüldüğü; 100 mg/kg'lık dozda ise atrofi, dejenerasyon ve spermatogenez kaybı olduğu gözlenmiştir (5).

Narayana ve ark. çalışmasında GEN tedavisinin 35. günde daha belirgin olmak üzere sperm sayısı ve motilitesinde azalma, anomali sıklığında artma; histolojik olarak bakıldığında seminifer tübül çapında ve germinal epitel kalınlığında azalma, germinal epitelde boşluk, germ hücre dejenerasyonu ve az sayıda da olsa 35. günde atrofik tübüller izlenmiştir (49).

Fetouh ve ark. yaptığı çalışmada GEN uygulanan grupta seminifer tübül çaplarında ve germinal epitel kalınlığında azalma gösterilmiştir. Bazal membran kalın, düzensiz ve dejenere olarak görülmüş; geniş interstisyel boşluklar arasında ise az miktarda Leydig hücresi izlenmiştir. GEN uygulanan grupta yapılan sperm

analizinde de sperm sayısı, motilite ve canlılığında azalma, testis ağırlıklarında düşüş gözlenmiştir (4).

Artıran ve ark.nın GEN'in etkilerine karşılık C vitamininin koruyuculuğunu değerlendirmek için yaptıkları çalışmada 14 gün boyunca 5 mg/kg i.p. GEN uygulamışlardır. Histolojik olarak seminifer tübül epitelinde dökülme, vakuoller, epitelde boşluklar, nükleer piknoz ve birkaç tübülde atrofik değişiklikler tespit etmişlerdir. Ayrıca GEN bazal laminada kalınlaşma, seminifer tübül duvarındaki hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve hücresel kayıplara neden olmuştur. İnterstisyel alanda genişlemeye ve damarlarda konjesyona rastlanılmış; Leydig hücrelerindeyse önemli bir değişiklik bulunmamıştır. Spermatogenik hücrelerde hasara ve hücresel dökülmelere neden olarak spermatogenezi olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir (3).

Akondi ve ark. GEN uygulamasında testis hasarı üzerine rutin ve naringenin etkilerine baktıkları bir çalışmada GEN grubunda sperm miktarında, canlılığında ve motilitesinde azalma; spermatosit ve spermatid nekrozu ile seminifer tübülde dejenerasyon, germinal epitelde boşluklar gözlenmiştir. Normal testis yapısının bozulduğu, uygulanan tedavi ile düzeldiği izlenmiştir (59).

Nouri ve ark. yaptıkları bir çalışmada da 24 günlük i.p. 5 mg/kg gentamisin uygulanmasına karşı havuç tohumu özünün koruyuculuğuna bakılmıştır. GEN uygulamasının epididimal sperm rezervini azalttığı, spermatositlerde belirgin olmak üzere germinal hücrelerde azalma ve nekroz, spermatogenik hücrelerde dejenerasyon, lümende hücre artıkları, seminifer tübüllerde atrofi, interstisyel alanda boşluklar ve konjesyon izlenmiş verilen havuç tohumu özü ile düzelmeye gözlenmiştir (51).

Saber ve ark.nın çalışmalarında, 70 gün boyunca gavaj yoluyla 20 mg/kg fenitrotyon verilen ratlarda 50 mg/kg QUE'in tedavisinin uygulanmasıyla fenitrotyonun yol açtığı testiküler hasarın QUE ile beraber verildiğinde hafif konjesyon gözlenmesinin dışında diğer bulguların azaldığı gözlenmiştir (165).

Testis ağırlıklarının değerlendirilmesinde literatürdeki çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da GEN uygulanan gruplarda anlamlı bir azalma söz konusudur. Üreme organlarının ağırlıklarında gözlenen azalma germinal epitel hücrelerinde dökülme ve seminifer tübüllerde parankimal atrofi gibi durumların

geliştiğini göstermektedir (49, 54). Çalışmamızda GEN grubunda seminifer tübül çapında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalma izlenmiş olup, germinal epitel kalınlığında azalma, bol miktarda tübül lümenine dökülen immatür germinal epitel hücresi izlenmiş ve istatistiksel olarak da desteklenmiştir. Ayrıca yer yer vasküler konjesyona da rastlanmıştır. Bu haliyle bulgularımız Narayana, Aly ve Artıran'ın yaptıkları çalışmalarla örtüşmektedir (3, 5, 49). Literatürdeki (Narayana, Artıran, Akondi ve ark.) çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da GEN grubunda epitel arasında boşluklar oluştuğu ve seminifer tübül yapısının yer yer bozulduğu tespit edilmiştir (3, 49, 59). GEN+QUE uygulanan tedavi grubundaysa GEN grubunda gözlenen bulguların çoğunlukla düzelmiş olduğu; ödem ve lümende izlenen immatür germinal epitel hücrelerin bulunduğu tübül sayılarında azalmayla beraber görülmeye devam ettiği belirlendi.

Fetouh ve ark. ile Artıran ve ark. çalışmaları gibi bizim çalışmamızda da diğer bulgulara ek olarak GEN grubunda bazal membranda düzensizlik, ondülasyon ve yer yer dejenerasyon izlendi (3, 4). GEN+QUE grubunda bazal membranda görülen ondülasyonun azaldığı gözlemlendi.

Khaki ve ark. antibiyotiklerin sperm parametreleri ve testis üzerine etkilerine baktıkları bir çalışmada 14 gün boyunca i.p. 5 mg/kg GEN uygulamasının sperm canlılığını, motilitesini ve sayısını azalttığını belirtmişlerdir. Testis, epididimis ve seminal vezikül ağırlıklarını azalttığı, testiste apoptotik hücre yüzdesini artırdığı izlenmiştir. Histolojik değerlendirmelerinde özellikle spermatogonyumlarda bariz olmak üzere germinal hücre nekrozu, germ hücrelerinde azalma; lümende hücre debrisleri, lenfosit ve plazma hücresi varlığı gözlenmiştir. İnterstisyel ve intertübüler alanda genişleme, seminifer tübül çapında azalma belirtilmiştir (56). Khaki ve ark. GEN'nin özellikle spermatogonia olmak üzere sıçan germ hücrelerinde apoptoza ve nekroza neden olduğunu bildirmişlerdir. Yaptıkları başka bir çalışmadaysa elektron mikroskopik değerlendirmede yukarıdaki ışık mikroskobu bulgularına ek olarak komşu Sertoli hücreleri aralarında anormal boşluklar, Sertoli hücrelerinde daha fazla lizozom ve mitokondrilerinde krista kaybı izlenmiştir (56, 166).

Zahedi ve ark.nın 2012 yılında 30 gün boyunca 50 mg/kg i.p. GEN ile 100 mg/kg gavajla zencefil vererek yaptıkları çalışmaları sonucunda, GEN'in apoptotik hücre yüzdesini artırdığını belirtmişlerdir (60).

Bizim çalışmamızda da TUNEL tekniği ile yapılan değerlendirme sonucunda kontrol ve QUE grubunda az miktarda germinal epitel hücreleri içinde apoptotik TUNEL (+) hücreler izlendi. Khaki ve ark. ile Zahedi ve ark. çalışmalarında bulunduğu gibi bizim çalışmamızda da GEN grubunda spermatogonyumlarda çoğunlukla olmasıyla beraber germinal epitel hücrelerinde ve lümenine dökülen epitel hücrelerinde yaygın apoptotik TUNEL (+) hücreler izlendi. GEN+QUE grubundaysa spermatositlerde ve lümene dökülmüş hücrelerde apoptotik TUNEL (+) hücrelerde azalma gözlenmesine rağmen spermatogonyumların çoğunlukla TUNEL (+) olduğu izlendi.

Sönmez ve ark. testiste karbontetraklorürün (CCL₄) yaptığı testis hasarı üzerinde QUE etkilerini incelemişlerdir. CCL₄ 0,25 ml/kg/hf gavaj ile verilmiş, tedavi grubunda da QUE 150 mg/kg/gün gavaj yoluyla 10 hafta uygulamışlardır. Histolojik değerlendirmede ise CCL₄ grubunda seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve Johnsen skorunda azalma izlendi. Tübüler atrofi, bazal membran kalınlaşması, ödem, konjesyon, germinal epitel disorganizasyonu ve apoptotik indekste artış gözlenen CCL₄ grubu ile QUE ve CCL₄ uygulanan grup karşılaştırıldığında QUE etkisiyle genel olarak bulgularda düzelme gözlenmiştir (141). Çalışmamızda da QUE eklenmesiyle beraber düzelme gösteren diğer bulgulara ek olarak hasar değerlendirilmesinde kullanılan Johnsen skorlamasında iyileşme ve GEN tedavisi ile artan apoptotik indekste QUE eklenmesiyle azalma gözlenmiştir.

Kim ve ark. 2013 yılında GEN'in testis toksisitesine karşı melatoninin etkilerini değerlendirmiş; 6 gün boyunca 100 mg/kg i.p. GEN verilen sıçanlara 15 mg/kg melatonin i.p. uygulamışlardır. GEN'in seminal vezikül ve prostat ağırlıklarında azalmaya sebep olduğunu, epididimal sperm sayısı ve motilitesini azalttığını; morfolojik anomalilerinde anlamlı farklılık olmadığı bildirmişlerdir. Testiste ise spermatogonia ve spermatositlerin dejenerasyonu ve vakuolizasyonu ile karakterize hasarlanma gözlenmiştir (50).

Khaki ve ark. diyabet modeli oluşturdukları bir çalışmalarında 4 hafta süreyle i.p. QUE 15 mg/kg vermişlerdir. Çalışma sonunda sperm sayısı, canlılık ve motilitesinin QUE verilen gruplarda artmış olduklarını bildirmişlerdir (138).

Taepongsorat ve ark. 30, 90 ve 270 mg/kg QUE'in dozlarını kullanarak; 3 gün, 7 gün ve 14 günlük karşılaştırmalı yaptıkları çalışmada; 90 mg/kg ve 270 mg/kg uygulama gruplarındaki sperm motilite, canlılık ve konsantrasyonun, tedavi süresi 7 ve 14 güne uzatıldığında kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. QUE'in üreme organları ve sperm kalitesi üzerindeki etkilerinin, tedavi dozuna ve süresine bağlı olduğu bildirmişlerdir. Yüksek doz ve 14 günlük tedavi sonrasında testis, epididimis ve vas deferens ağırlıklarında artış; prostat bezi ve seminal vezikül ağırlıklarında azalma gözlemişlerdir. 14 günlük 90 ve 270mg/kg lık tedavi gruplarında seminifer tübüllerde gözlenen spermatozoa retansiyonu diğer gruplara oranla yüksek bulunmuştur. Seminifer tübüllerin ölçülen tübüler alanı da doza ve zamana bağlı olarak artış göstermiştir (158).

Çiftçi ve ark. çalışmalarında 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) verilen sıçanlarda oluşan testis hasarına karşı 20 mg/kg QUE gavaj yoluyla 60 gün boyunca kullanmışlardır. TCDD verilen grupta artan TBARS seviyeleri QUE verilmesiyle azalmış; azalan testis SOD, GPx, CAT ve GSH düzeyleri ise QUE ile artmıştır. QUE tedavisi ile oksidan ve antioksidan parametrelerde düzelme izlenmiştir. Ayrıca sperm parametreleri üzerine olan TCDD'nin olumsuz etkileri QUE ile düzelmiş; azalan sperm motilitesi artmış, artmış anormal sperm oranı ise azalmıştır. Histopatolojik bulgulara seminifer tübüllerde dejenerasyon ve atrofi izlenmiştir (10). Bizim çalışmamızda da QUE eklenmesiyle anormal morfolojiye sahip sperm sayısı azaldı; canlılık ve motilite arttı, fakat bu artış istatistiksel olarak desteklenmedi.

Ranawat ve ark. yaptıkları çalışmalarında farelere QUE'nin 2 mg/kg, 8 mg/kg ve 20 mg/kg dozları 2 hafta süreyle uygulamışlardır. Çalışmalarında orta ve yüksek dozda uyguladıkları QUE gruplarında sperm motilite ve konsantrasyonunda azalma olduğu izlenmiştir. Histolojik değerlendirmelerinde düşük dozda seminifer tübüllerde spermatozoon azlığı-yokluğu, seminifer tübül yapılarında parçalanma; orta doz tedavisinde tübül yapısında tam spermatid kaybı, seminifer tübüllerde atrofi, vakuolizasyon, ödem, germinal epitel kalınlığında azalma ve maturasyon durması gözlenmiştir. Yüksek dozda ise diğer bulgulara ek olarak kalsifikasyon gözlenmiştir. Özellikle orta ve yüksek dozlarda doza bağımlı olarak seminifer tübül çapında artış ve germinal epitel kalınlığında azalma izlenmiştir (9). Bizim çalışmamızda yapılan

değerlendirmeler sonucunda ise QUE'in histopatolojik olarak yer yer spermatozoon azlığı-yokluğu ve ödem gözlenmesi dışında bu etkileri gözlenmedi. Sperm motilitesinde azalma haricinde de sperm parametrelerinde bu çalışmaya benzer sonuçlar alınmadı.

Çalışmamızda sperm parametrelerine bakıldığında sperm sayılarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemesine rağmen, kontrol grubu dışındaki gruplarda sperm sayısında artış izlendi. Sperm morfolojisi değerlendirmelerindeyse morfolojik anomaliye sahip sperm sayılarında GEN grubunda artma, diğer gruplarda GEN grubuna göre azalma bulunmuş olsa da bu azalma istatistiksel açıdan anlamlı değildi. Canlılık oranlarının GEN grubunda kontrole göre anlamlı azaldığı; QUE grubundaysa GEN'e göre anlamlı arttığı tespit edildi. Motilitenin kontrole göre tüm gruplarda istatistiksel olarak da anlamlı azaldığı fakat gruplar arasında anlamlı fark bulunmadığı gözlemlendi.

Literatürde GEN tedavisinin belirgin olarak sperm sayısı, canlılığı ve motilitesinde azalmaya, görülen morfolojik anomali sıklığında artmaya sebep olduğu vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda GEN grubunda sperm sayısı ve anormal sperm morfolojisinde artma; sperm canlılık ve motilitesinde ise azalma gözlemlendi. Sperm sayısı ve anormal sperm morfolojisindeki bu artış diğer gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sperm canlılığı ve motilitesindeki azalma ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı idi. Sperm sayısı ve canlılığında QUE grubunda GEN grubuna göre artış olduğu gözlemlendi. Sperm canlılığındaki artış GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sperm motilitesi ise kontrole göre anlamlı bir şekilde azaldı. QUE grubunda sperm morfolojisinde kontrole göre azalma gözlenirse de istatistiksel olarak anlamlı değildi. GEN+QUE grubunda anormal morfolojili sperm sayısı GEN grubuna göre azaldı. Sperm canlılığı ise arttı. Sperm motilitesi kontrol grubuna göre azalmasına rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi. GEN uygulaması sonrası sperm morfolojisi, sperm canlılığı ve motilitesinde QUE eklenmesiyle düzelmenin sağlandığı görüldü. Kontrol grubu dışındaki gruplarda sperm sayısında istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artış izlenmiştir. Fakat GEN grubunda sperm sayısında artış olmasına rağmen anormal morfolojili sperm sayısı artmıştır. QUE ve GEN+QUE gruplarında ise anormal morfolojili sperm sayısı

kontrol grubu ve GEN grubuna göre azalmıştır. Bu da QUE tedavisinin sperm sayısı ve morfolojisi üzerinde olumlu etkisi olduğunu göstermektedir.

Uygur ve ark. etanolün sıçan testisi üzerindeki etkilerine karşı QUE ve balık omega-3 yağ asitlerinin etkilerini karşılaştırmıştır. Bu çalışmada etanol ile seminifer tübüllerde oluşan dejeneratif ve patolojik değişimlerin, balık omega-3 yağ asitleri ve gavaj yoluyla QUE uygulamasını takiben azaldığını gözlemişlerdir. TUNEL boyamada etanol grubunda artmış TUNEL (+) hücre sayılarının QUE ile balık omega-3 yağ asitleri uygulanan gruplarda azaldığı gözlenmiştir. Biyokimyasal olarak bakıldığında SOD, GPx, CAT ve ksantin oksidaz etanol grubunda azalmış; QUE ile balık omega-3 yağ asitleri uygulanan tedavi gruplarında ise artmıştır. MDA ve nitrik oksit seviyelerinde gözlenen artış tedavi gruplarında azalma göstermiştir (167).

Kai-Kai Chi ve ark. 2017 yılındaki çalışmalarında testiste yaptıkları torsiyon/detorsiyon hasarına karşı intraperitoneal ve intraepididimal 20 mg/kg QUE tedavisi sonuçları karşılaştırılmıştır. QUE ile tedavi edilen gruplar, torsiyon/detorsiyon grubundakilerle karşılaştırıldığında daha az ciddi patolojik değişiklikler göstermiştir. Yapılan Johnsen skorlamasında torsiyon/detorsiyon grubunda çok düşük bulunurken; QUE ile tedavi edilen gruplarda anlamlı derecede daha yüksek skorlar gözlenmiş intraperitoneal ve intraepididimal QUE uygulamaları arasında grupları arasında Johnsen skoru ve histopatolojik özelliklerde anlamlı fark bulunmamıştır. Apoptoz değerlendirmelerinde QUE tedavi gruplarında anlamlı azalma görülürken QUE farklı uygulamaları arasında fark gözlenmemiştir. Yapılan çalışma sonucunda hasar grubundaki MDA, TOS ve OSI seviyeleri sham grubundakilerden anlamlı derecede yüksek ölçülmüş; QUE'in oksidan parametreleri önemli ölçüde azaltmış ve hasar grubuna kıyasla GPx ve TAS seviyelerini kısmen geri kazanmıştır (168).

Abdel-Raheem ve ark. GEN nefrotoksisitene karşı QUE etkilerini araştırdıkları çalışmalarında biyokimyasal olarak da GEN grubunda artan TBARS seviyelerinin QUE kullanımıyla azaldığı; azalan GSH, SOD ve CAT gibi antioksidan seviyelerinin ise arttığı izlenmiştir (169). Akondi ve ark. çalışmalarında benzer şekilde bakılan MDA değerlerinde ise artış, CAT ve SOD değerlerinde de azalma gözlenmiştir (59). Saber ve ark.nın çalışmalarında biyokimyasal olarak fenitrotiyonun grubunda azalan CAT ve SOD seviyelerinin ise QUE eklenmesiyle

arttığı belirtilmiştir (165). Kim SH ve ark.nın çalışmalarında da biyokimyasal parametrelerde MDA seviyelerinde artış; GSH, glutatyon redüktaz, glutatyon-S-transferaz ve CAT seviyelerinde ise azalma izlenmiştir (50). Aly ve ark. çalışmasında biyokimyasal parametrelerde de testiküler MDA'da artma, SOD ve CAT aktivitelerinde anlamlı azalma bulunurken; GPx ve GR aktivitelerinde de önemli ölçüde azalma olduğu belirtilmiştir (5). Ranawat ve ark. yaptıkları çalışmalarında MDA seviyelerinde artış; SOD ve CAT değerlerinde de doza bağlı azalma tespit edilmiştir (9).

Bizim çalışmamızda da GEN grubu dokularında MDA seviyeleri arttı; SOD, CAT ve GPx değerleri anlamlı derecede azaldı. Bu haliyle bulgularımız literatürde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak izlendi. Çalışmamızda GEN grubunda plazma MDA değerlerinde artış olmakla birlikte bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. GEN+QUE grubunda doku MDA seviyelerinde GEN grubuna göre azalma izlendi fakat bu azalma istatistiksel olarak desteklenmedi. Doku SOD değerleri ise GEN+QUE grubunda GEN grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdi. Doku CAT seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı çıkmasa da artış gösterdi. GEN+QUE grubunda doku GPx seviyelerinde GEN grubuna göre anlamlı olarak artış izlendi. Bu durum QUE tedavisinin biyokimyasal olarak da olumlu etki sağladığını literatür ile uyumlu olarak desteklemektedir.

Germ hücresi, zarında bulundurduğu bol miktarda çoklu doymamış yağ asitleri sebebiyle ROS kaynaklı oksidatif strese, şiddetine ve süresine bağlı olarak geçici veya kalıcı testis disfonksiyonuna neden olan lipid peroksidasyonuna karşı daha duyarlıdır. ROS'un aşırı üretimi ve antioksidan seviyelerindeki azalma nedeniyle oluşan oksidatif stres, organizmalarda SOD, CAT, GPx ve GSH'yi içeren antioksidan savunma sistemleri tarafından engellenir veya baskılanır (170). MDA düzeylerinde artış lipid peroksidasyonu ve oksidatif hasarı göstermektedir (167). SOD, süperoksit anyonunun H_2O_2 'ye dönüşümünü katalize ederken, CAT ve GPx, H_2O_2 'nin su moleküllerine dönüşümünü sağlar; bununla birlikte, GPx bu reaksiyonlarda GSH'yi kullanır (10). GPx, hidroperoksitlerin detoksifikasyonu için en önemli peroksidazdır (167).

Yapılan çalışmalar dokuların GEN tedavisinden sonra CAT aktivitesindeki azalma sonucu, üretilen H_2O_2 'i elimine edemediğini ve biriken H_2O_2 'nin SOD'un

inaktivasyonuna neden olduğunu göstermiştir. Fazla H_2O_2 , sperm zarında oksidatif hasara neden olacak toksik radikallere dönüştürülür (5).

Bu nedenlerle GEN grubunda SOD'un azalması süperoksit iyonlarının devamlı üretilmesine sebep olabilir. Düşük GPx aktivitesi, daha fazla H_2O_2 'in toksik hidroksil radikallerine dönüştürülmesine ve mitokondriyal membranlarda oksidatif strese ciddi artışa sebep olabilir.

Çalışmamızın sonucunda elde ettiğimiz bulgular gentamisin'in oksidatif stres oluşturduğu, testis yapısını ve spermatogenezi bozduğunu, kuersetin uygulamasının ise oluşan bu hasarı önlemede biyokimyasal ve histopatolojik olarak olumlu etki yaptığını göstermiştir. Bu etkinin farklı tedavi doz ve tedavi sürelerinin uygulandığı ileri tekniklerin kullanıldığı çalışmalar ile desteklenmesi gerektiği kanaatindeyiz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Deneyssel olarak gentamisin ile indüklenen sıçan testis dokusunda oluşan hasarı önleme ve/veya iyileştirmede kuersetinin rolünün araştırıldığı çalışmamızda:

Gentamisinin;

1. Sperm motilite ve canlılık oranını azalttığı, anormal morfoloji oranını artırdığı,
2. Seminifer tübül yapılarında Johnsen skorunda düşüşe, lümene dökülen immatür germinal epitel hücrelerinde artışa ve germinal epitel kalınlığında azalmaya neden olduğu, apoptotik indeksi artırdığı,
3. Testis dokusunun histolojik yapısında bozulmaya sebep olduğu ve testis ağırlıklarını azalttığı,
4. Doku SOD, CAT ve GPx düzeylerini azaltıp; doku MDA seviyelerini artırdığı

Kuersetinin;

1. Vücut ağırlığını azalttığı,
2. Gentamisinin bozduğu sperm morfolojisi ve canlılığını düzelttiği, fakat motilitesini etkilemediği,
3. Gentamisinin hasar verdiği testis dokusunda histolojik olarak iyileşme sağladığı,
4. Testis dokusunda gentamisinin azalttığı doku SOD, CAT ve GPx düzeylerini artırıp; doku MDA seviyesini azalttığı tespit edildi.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda;

1. Kuersetinin etkisinin daha iyi değerlendirilebilmesi için farklı doz ve süre uygulamalarının yapılabileceği,
2. Dokularda çalışılan oksidan ve antioksidan parametreler genişletilip, ek olarak hormonların da bakılabileceği,
3. Daha uzun süreli tedavi ile beraber oluşabilecek bağ dokusu ve kollajen artışı bulgularının daha net incelenebileceği,
4. Epididim dokusu ve diğer genital glandlar üzerinde oksidatif strese yönelik değerlerin ve apoptozun araştırılabileceği,

5. Elektron mikroskopik çalışma ile hücre içi değişimlerin, hücreler arası bağlantıların ve kan-testis bariyerinin değerlendirilmesinin yapılabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; gentamisin oksidatif stres ile beraber testiküler fonksiyonu bozduğunu ve kuersetin uygulamasının oluşan hasarı önlemede olumlu etki yaptığını göstermektedir. Kuersetinin prooksidan ve antioksidan özelliği bulunmasından dolayı bu konu ile ilgili farklı doz ve sürelerde yeni çalışmaların yapılması gerektiği kanaatindeyiz.



7. KAYNAKLAR

1. Karaman M, Budak H, Çiftci M. Amoxicillin and gentamicin antibiotics treatment adversely influence the fertility and morphology through decreasing the Dazl gene expression level and increasing the oxidative stress. *Archives of Physiology and Biochemistry*. 2019 Oct 20;125(5):447-55.
2. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British medical journal*. 1992 Sep 12;305(6854):609-13.
3. Artıran M Ö,Dönmez D B,Bayçu C,Yılmaz H Gentamisin'le Testis Hasarı Oluşturulan sıçanlarda C Vitamininin Koruyucu Etkisi. *Osmangazi Tıp Dergisi*. 2017; 39(2): 31 - 39.
4. Fetouh FA, Azab AE. Ameliorating effects of curcumin and propolis against the reproductive toxicity of gentamicin in adult male guinea pigs: Quantitative analysis and morphological study. *American Journal of Life Sciences*. 2014 May 30;2(3):138-49.
5. Aly HA, Hassan MH. Potential testicular toxicity of gentamicin in adult rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018 Feb 26;497(1):362-7.
6. Samova S, Patel CN, Doctor H, Pandya HA, Verma RJ. The effect of bisphenol A on testicular steroidogenesis and its amelioration by quercetin: an in vivo and in silico approach. *Toxicology Research*. 2018 Jan 1;7(1):22-31.
7. Bu TL, Jia YD, Lin JX, Mi YL, Zhang CQ. Alleviative effect of quercetin on germ cells intoxicated by 3-methyl-4-nitrophenol from diesel exhaust particles. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*. 2012 Apr;13(4):318-26.
8. Aldemir M, Özgün G, Önen E, Okulu EM, Kayıgil Ö. Quercetin has a protective role on histopathological findings on testicular ischaemia–reperfusion injury in rats. *Andrologia*. 2012 May;44:479-83.
9. Ranawat P, Kaushik G, Saikia UN, Pathak CM, Khanduja KL. Quercetin impairs the reproductive potential of male mice. *Andrologia*. 2013 Feb;45(1):56-65.
10. Ciftci OS, Aydin M, Ozdemir I, Vardi Nİ. Quercetin prevents 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced testicular damage in rats. *Andrologia*. 2012 Jun;44(3):164-73.
11. Moore KL. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 10th edition. Elsevier, Philadelphia; 2016. 260-281

12. Dudek Ronald W. Embryology BRS. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. 182-184.
13. Carlson BM. Human Embriyology and Developmental Biology. 5. Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia 2014 sf 383-406
14. Cochard LR. Netter's Atlas of Human Embryology. Updated Edition. Saunders Elsevier: Philadelphia; 2012 sf 171-184
15. Moore KL, Persaud TVN and Torchia MG. Before We Are Born. 9. Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia; 2016. 174-176, 187
16. Park JM. Embryology of the genitourinary tract in Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW and Peters CA. Campbell-Walsh Urology. 11.edition. Elsevier: Philadelphia; 2016. 2836-2845
17. Sadler TW. Langman's Medical Embriyology. 13. Edition. Lippincott Williams & Wilkins, USA; 2015. 261-277
18. Soraggi S, Riera M, Meyts RD, Schierup MH, Almstrup K. Evaluating genetic causes of azoospermia: What can we learn from a complex cellular structure and single-cell transcriptomics of the human testis? Human Genetics. 2021 Jan;140(1):183-201.
19. Sikka SC, Wang R. Endocrine disruptors and estrogenic effects on male reproductive axis. Asian Journal of Andrology. 2008 Jan;10(1):134-45.
20. Sancak B, Cumhur M. Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar. 10. Baskı. Ankara. ODTÜ Yayıncılık, 2016. 286-,291-293
21. VanPutte C, Regan J, Russo A. Seeley's Essentials of Anatomy & Physiology. 9. edition. McGraw-Hill Education: New York; 2016. 529-534
22. Rizzo DC. Fundamentals of Anatomy and Physiology. 4th Edition. Cengage Learning: Boston; 2015. 454-460.
23. Patton KT and Thibodeau GA. Anthony's Textbook of Anatomy and Physiology. 20. edition. Mosby, Elsevier: Missouri; 2013. 1046-1051
24. Betts JG, Desaix P, Johnson E, Johnson JE, Korol O, Kruse D, Poe B, WiseJA, Womble M, Young KA. Anatomy and Physiology. OpenStax Rice University: Houston; 2017. 1280-1285
25. Scanlon VC and Sanders T. Essentials of Anatomy and Physiology. 5. edition. F. A. Davis Company: Philadelphia; 2007. 457-460
26. Ellis H. Clinical Anatomy A revision and applied anatomy for clinical students 11. Edition Blackwell publishing 2006. 119-122

27. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. 2. Baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2016. 333-350
28. Mescher, A. L. Junqueira's Basic Histology: text and atlas. 14th. ed. United States of America: Mcgraw-Hill; 2016. 439-451
29. Moore KL, Dalley AF, Agur AMR. Clinically Oriented Anatomy. 7th edition. Lippincott Williams & Wilkins: USA; 2014.4-205,206-209-210-216,376.
30. Chung KW and Chung HM. Gross Anatomy. 7. edition. Lippincott Williams & Wilkins: USA; 2012; 13-189-218-263-264-265
31. Dudek RW, Louis TM. High-yield Gross Anatomy. 5. Edition. Lippincott Williams & Wilkins: USA; 2015. 172-176
32. Olaniyan OT, Dare A, Okotie GE, Adetunji CO, Ibitoye BO, Bamidele OJ, Eweoya OO. Testis and blood-testis barrier in Covid-19 infestation: role of angiotensin-converting enzyme 2 in male infertility. Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology. 2020 Nov 1;31(6).
33. Pawlina W, Ross MH. Male Reproductive System. In: Histology: A Text and Atlas: With Correlated Cell and Molecular Biology. 7th ed. Wolters Kluwer Health; 2016. 790–833.
34. Gartner Leslie P., Hiatt James L. Cell Biology & Histology BRS 7th Edition . Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2015. 350-359
35. Eroschenko VP, Di Fiore MS. DiFiore's atlas of histology with functional correlations. 2003; diFiore'nin Histoloji Atlası, Fonksiyonel İlişkileriyle. 12. baskı. Çeviren: Demir R. Ankara: Palme Yayıncılık; 2013. 477-501.
36. Young B, Woodford P, O' Dowd G. Wheater's Functional Histology: A Text and Colour Atlas. Sixth Edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2014. 337-350, 430, 431
37. Trainer TD. Histology of the normal testis. The American Journal of Surgical Pathology. 1987 Oct 1;11(10):797-809.
38. James ER, Carrell DT, Aston KI, Jenkins TG, Yeste M, Salas-Huetos A. The role of the epididymis and the contribution of epididymosomes to mammalian reproduction. International Journal of Molecular Sciences. 2020 Jan;21(15):5377.
39. Fawcett DW. Bloom and Fawcett A Textbook of Histology. 11. Edition. Chapman & Hall: New York; 1994. 796-848.
40. Kierszenbaum AL (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Çeviren Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 544

41. Drake RL, Vogl AW and Mitchell AWM. Gray's Basic Anatomy. 2. Edition. Elsevier: Philadelphia; 2018. 225-255
42. Kayaalp O. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 13. Baskı. Pelikan Yayıncılık; Ankara; 2012. 233-241
43. Whalen K. Lippincot's Illustrated Reviews: Pharmacology. 6. Edition. Wolters Kluwer: Philadelphia; 2015. 503-505
44. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. 11th Ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division: New York; s. 2005. 1155-1166
45. Wecker L, Crespo L, Dunaway G, Faingold C, Watts S. Brody's Human Pharmacology-E-Book. Elsevier Health Sciences; 2009 Apr 1.544-558
46. Ritter JM, Lewis LD, Mant TGK and Ferro A. A Textbook of Clinical Pharmacology and Therapeutics.5.edition. Hodder Arnold: London; 2008. 327-328
47. Tripathi KD. 2013. Essentials of Medical Pharmacology. 7. edition. Jaypee Brothers Medical Publishers: New Delhi; 2013.743-747
48. Katzung BG. Basic and Clinical Pharmacology. 14. Edition. McGraw-Hill Education: USA; 2018. 826-831
49. Narayana K. An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. J Toxicol Sci. 2008 Feb;33(1):85-96.
50. Kim SH, Lee IC, Baek HS, Shin IS, Moon C, Kim SH, Yun WK, Nam KH, Kim HC, Kim JC. Melatonin prevents gentamicin-induced testicular toxicity and oxidative stress in rats. Andrologia. 2014 Nov;46(9):1032-40.
51. Nouri M, Khaki A, Fathiazar F, Rashidi MR. The protective effects of carrot seed extract on spermatogenesis and cauda epididymal sperm reserves in gentamicin treated rats. Cell Journal (YAKHTEH). 2009 [cited 2021October07];11 (3 (43)):327-333. Available from: <https://www.sid.ir/en/journal/ViewPaper.aspx?id=151759>
52. Zahedi A, Khaki A, Ahmadi-Ashtiani HR, Rastegar H, Rezazadeh SH. Zingiber officinale protective effects on gentamicin's toxicity on sperm in rats. Journal of Medicinal Plants. 2010 Oct 15;3(35):93-98.
53. Ahmad K, Foote RH, Kaproth M. Antibiotics for bull semen frozen in milk and egg yolk extenders. Journal of dairy science. 1987 Nov 1;70(11):2439-43.
54. Timmermans LM. Modifications in spermatogenesis following antibiotic therapy. Acta Urologica Belgica. 1989;57(1):35-46.

55. Segovia M, Jenkins JA, Paniagua-Chavez C, Tiersch TR. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology*. 2000 Apr 15;53(7):1489-99.
56. Khaki A, Novin MG, Khaki AA, Nouri M, Sanati E, Nikmanesh M. Comparative study of the effects of gentamicin, neomycin, streptomycin and ofloxacin antibiotics on sperm parameters and testis apoptosis in rats. *Pak J Biol Sci*. 2008 Jul 1;11(13):1683-9
57. Kataoka N. Concentration of antimicrobial agents in male genital organs. *Hinyokika kyo. Acta urologica Japonica*. 1983 Oct;29(10):1219-30.
58. Ghosh S, Dasgupta S. Gentamicin induced inhibition of steroidogenic enzymes in rat testis. *Indian J Physiol Pharmacol*. 1999 Apr;43(2):247-50.
59. Akondi RB, Akula A, Challa SR. Protective Effects of Rutin and Naringin on Gentamycin Induced Testicular Oxidative Stress. *Eur J Gen Med*. 2011;8(1):57-64.
60. Zahedi A, Fathiazad F, Khaki A, Ahmadnejad B. Protective effect of ginger on gentamicin-induced apoptosis in testis of rats. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 2012 Dec;2(2):197.
61. Sikka SC. Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*. 1996 Aug 1;1:e78-86.
62. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol*. 2010 May;48(5):425-35.
63. Kim SH, Lee IC, Lim JH, Moon C, Bae CS, Kim SH, et al. Spermatotoxic effects of α -chlorohydrin in rats. *Lab Anim Res*. 2012 Mar;28(1):11-6.
64. Mak T. The E. Donnall Thomas Lecture--apoptosis: "tis death that makes life live". *Biol Blood Marrow Transplant*. 2003 Aug;9(8):483-8.
65. Güleş Ö, Eren Ü Apoptozun belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008; 19(2): 73 - 78.
66. Kumar V, Abbas AK and Fausto N. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 7.Edition. Elsevier Saunders: Philadelphia; 2005. 3-46
67. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 2013; Robbins Temel Patoloji. 9. baskı, Çeviren: Tuzlalı S, Güllüoğlu M, Çevikbaş U, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2014. 1-28.
68. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251-306.

69. Mohan H. Textbook of Pathology. 6th. ed. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers; 2010. 21-60
70. Öztürk F (2002). Apoptozis. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 9(2) 143- 148.
71. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007 Jun;35(4):495-516.
72. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995 Mar 10;267(5203):1456-62
73. Vaux DL, Flavell RA. Apoptosis genes and autoimmunity. Curr Opin Immunol. 2000 Dec;12(6):719-24.
74. Akşit H. , Bildik A. Apoptozis. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2008; 19(1): 55-63.
75. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972 Aug;26(4):239-57.
76. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. Cell. 1999 Jan 22;96(2):245-54.
77. MacFarlane M, Williams AC. Apoptosis and disease: a life or death decision. EMBO Rep. 2004 Jul;5(7):674-8.
78. Tomatır A G Apoptoz: Programlı hücre ölümü. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2003; 23(6): 499 - 508.
79. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer. 1994 Apr 15;73(8):2013-26
80. Haldun Diniz. Apoptosis: The Death Decision. Tepecik Eğit Hast Derg. 2004; 14(1): 1-20
81. Eşrefoğlu M. Genel Histoloji. 2. baskı. İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi; 2016. 83-87.
82. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. Cardiovasc Res. 2000 Feb;45(3):528-37.
83. Trump BF, Berezsky IK, Chang SH, Phelps PC. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. Toxicol Pathol. 1997 Jan-Feb;25(1):82-8
84. Messam CA, Pittman RN. Asynchrony and commitment to die during apoptosis. Exp Cell Res. 1998 Feb 1;238(2):389-98.

85. Brunet CL, Gunby RH, Benson RS, Hickman JA, Watson AJ, Brady G. Commitment to cell death measured by loss of clonogenicity is separable from the appearance of apoptotic markers. *Cell Death Differ.* 1998 Jan;5(1):107-15.
86. Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Jul;9(7):532-42.
87. Kemp WL, Burns DK, Brown TG. *Pathology The Big Picture.* Mc Graw-Hill Education: USA; 2008. 5-6
88. Bortner CD, Oldenburg NB, Cidlowski JA. The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.* 1995 Jan;5(1):21-6.
89. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 Mar;9(3):231-41.
90. Sakahira H, Enari M, Nagata S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 1998 Jan 1;391(6662):96-9.
91. Cohen JJ. Apoptosis: the physiologic pathway of cell death. *Hosp Pract (Off Ed).* 1993 Dec 15;28(12):35-43.
92. Mountz JD, Hsu HC, Matsuki Y, Zhang HG. Apoptosis and rheumatoid arthritis: past, present, and future directions. *Current Rheumatology Reports.* 2001 Feb;3(1):70-8.
93. Ulukaya E (2003). Apoptozis ders notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, 15-26.
94. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology.* 1992 Nov 1;119(3):493-501.
95. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2013 Oct;2013.
96. Yin B, Barrionuevo G, Batinic-Haberle I, Sandberg M, Weber SG. Differences in reperfusion-induced mitochondrial oxidative stress and cell death between hippocampal CA1 and CA3 subfields are due to the mitochondrial thioredoxin system. *Antioxidants & Redox Signaling.* 2017 Sep 20;27(9):534-49.
97. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2007 Jan 1;39(1):44-84.
98. Memişoğulları R (2005). Diyabette Serbest Radikallerin Rolü ve Antioksidanların Etkisi. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 3: 30-39

99. Puigserver P. Signaling Transduction and Metabolomics. In: Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JI, Anastasi J, Salama M, editors. Hematology: Basic Principles and Practice. 7th. ed. Philadelphia: Elsevier; 2018. 68-78
100. Baynes JW, Dominiczak MH. Oxygen and Life. In: Baynes JW, Dominiczak MH, editors. Medical Biochemistry. 4th. ed. Philadelphia: Elsevier; 2014. 486-495.
101. Sen S, Chakraborty R, Sridhar C, Reddy YS, De B. Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2010 Aug;3(1):91-100.
102. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. International Journal of Biomedical Science: IJBS. 2008 Jun;4(2):89.
103. Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. In Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy 2011 (pp. 1-37). American Chemical Society. (Sen S, Chakraborty R. The role of antioxidants in human health. Oxidative stress: diagnostics, prevention, and therapy. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. 2011; 1083: 1-37.)
104. Aslankoç R. , Demirci D. , İnan Ü. , Yıldız M. , Öztürk A. , Çetin M. , Savran E. Ş. , Yılmaz B. Oksidatif stres durumunda antioksidan enzimlerin rolü - Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPX). SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 2019; 26(3): 362-369.
105. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of structures and properties among catalases. Cell Mol Life Sci. 2004 Jan;61(2):192-208.
106. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem. 2004 Apr;37(4):277-85.
107. Breckta A, Greenstock CL, Tambo M. Advances on oxygen radicals, and radioprotectors: Mavelli, I: Ratilio. G: Enzymatic Protection Against Intracellular Oxidative Processes. 1984:65-80.
108. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radical Biology and Medicine. 1999 Nov 1;27(9-10):951-65.
109. Cöngöloğlu MA (2003). Metilfenidatın Sıçanlarda Beyin Nitrik Oksit Ve Antioksidan Enzim Düzeyleri Üzerine Etkisi. Çocuk Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanlık Tezi, GATA Çocuk Psikiyatrisi Anabilim Dalı, Ankara
110. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2004; 15(1): 91-96.

111. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003 Jan;91 Spec No(2):179-94.
112. Devasagayam TP, Tilak JC, Boloor KK, Sane KS, Ghaskadbi SS, Lele RD. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India.* 2004 Oct;52:794-804.
113. Nakamura BN, Lawson G, Chan JY, Banuelos J, Cortés MM, Hoang YD, et al. Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. *Free Radic Biol Med.* 2010 Nov 15;49(9):1368-79.
114. Sikka SC. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Current Medicinal Chemistry.* 2001 Jun 1;8(7):851-62.
115. Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, Abdel-Hafez MA, Thomas AJ, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod.* 2004 Jan;19(1):129-38.
116. Hertog MG, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in The Netherlands. *Nutr Cancer.* 1993;20(1):21-9.
117. Thilakarathna SH, Rupasinghe HP. Flavonoid bioavailability and attempts for bioavailability enhancement. *Nutrients.* 2013 Aug 28;5(9):3367-87.
118. Allan L, Miller ND. Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage. *Alternative Med. Rev.* 1996;1:111.
119. Formica JV, Regelson W. Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995 Dec;33(12):1061-80.
120. Baghel SS, Shrivastava N, Baghel RS, Agrawal P, Rajput S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. *World J Pharm Pharmaceutical Sci.* 2012 May 1;1(1):146-60.
121. Materska M. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2008, Vol. 58, No. 4, pp. 407-413 Materska M. Quercetin and its derivatives: chemical structure and bioactivity-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences.* 2008;58(4).
122. Chen H, Lu C, Liu H, Wang M, Zhao H, Yan Y, et al. Quercetin ameliorates imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice via the NF-κB pathway. *Int Immunopharmacol.* 2017 Jul;48:110-7.
123. D'Andrea G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications?. *Fitoterapia.* 2015 Oct 1;106:256-71.

124. Bigelman KA, Fan EH, Chapman DP, Freese EC, Trilk JL, Cureton KJ. Effects of six weeks of quercetin supplementation on physical performance in ROTC cadets. *Military Medicine*. 2010 Oct 1;175(10):791-8.
125. Moon YJ, Wang L, DiCenzo R, Morris ME. Quercetin pharmacokinetics in humans. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*. 2008 Jan;29(4):205-17.
126. Hollman PC, Bijlsman MN, van Gameren Y, Cnossen EP, de Vries JH, Katan MB. The sugar moiety is a major determinant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in man. *Free Radic Res*. 1999 Dec;31(6):569-73.
127. Boots AW, Wilms LC, Swennen EL, Kleinjans JC, Bast A, Haenen GR. In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. *Nutrition*. 2008 Jul-Aug;24(7-8):703-10.
128. Nijveldt RJ, Van Nood EL, Van Hoorn DE, Boelens PG, Van Norren K, Van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2001 Oct 1;74(4):418-25.
129. Shoskes DA. Effect of bioflavonoids quercetin and curcumin on ischemic renal injury: a new class of renoprotective agents. *Transplantation*. 1998 Jul 27;66(2):147-52.
130. Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, et al. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol*. 1999 Jan 15;57(2):199-208.
131. Chang WS, Lee YJ, Lu FJ, Chiang HC. Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase. *Anticancer Res*. 1993 Nov-Dec;13(6A):2165-70.
132. Calamia KT. Current and future use of anti-TNF agents in the treatment of autoimmune, inflammatory disorders. *Adv Exp Med Biol*. 2003;528:545-9.
133. Busse WW, Kopp DE, Elliott Jr M. Flavonoid modulation of human neutrophil function. *Journal of Allergy and Clinical immunology*. 1984 Jun 1;73(6):801-9.
134. Myhrstad MC, Carlsen H, Nordström O, Blomhoff R, Moskaug JØ. Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the gamma-glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Radic Biol Med*. 2002 Mar 1;32(5):386-93.
135. Havsteen B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. *Biochem Pharmacol*. 1983 Apr 1;32(7):1141-8.
136. Varma SD. Inhibition of aldose reductase by flavonoids: possible attenuation of diabetic complications. *Prog Clin Biol Res*. 1986;213:343-58.

137. Hii CS, Howell SL. Effects of flavonoids on insulin secretion and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ handling in rat islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology*. 1985 Oct 1;107(1):1-8.
138. Khaki A, Fathiazad F, Nouri M, Khaki A, Maleki NA, Khamnei HJ, Ahmadi P. Beneficial effects of quercetin on sperm parameters in streptozotocin-induced diabetic male rats. *Phytotherapy Research*. 2010 Sep;24(9):1285-91.
139. Khanduja KL, Verma A, Bhardwaj A. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. *Andrologia*. 2001 Sep;33(5):277-81.
140. Nass-Arden L, Breitbart H. Modulation of mammalian sperm motility by quercetin. *Mol Reprod Dev*. 1990 Apr;25(4):369-73.
141. Sönmez M, Türk G, Çeribaşı S, Çiftçi M, Yüce A, Güvenç M, Özer Kaya Ş, Cay M, Aksakal M. Quercetin attenuates carbon tetrachloride-induced testicular damage in rats. *Andrologia*. 2014 Oct;46(8):848-58.
142. Al-Omair MA, Sedky A, Ali A, Elsayy H. Ameliorative potentials of quercetin against lead-induced hematological and testicular alterations in Albino rats. *Chin J Physiol*. 2017 Feb 28;60(1):54-61.
143. Demir R, Yılmaz S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G. *Histolojik Boyama Teknikleri -Başvuru Kitabı-*. 4th. ed. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001. 1-50.
144. Bancroft JD, Cook HC, Turner DR *Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application*. 2nd. Ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. 425-427
145. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*. 1970;1(1):2-25.
146. Türk G, Çeribaşı AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reproduction, Fertility and Development*. 2010 Apr 28;22(4):587-96.
147. Torabi F, Malekzadeh Shafaroudi M, Rezaei N. Combined protective effect of zinc oxide nanoparticles and melatonin on cyclophosphamide-induced toxicity in testicular histology and sperm parameters in adult Wistar rats. *Int J Reprod Biomed*. 2017 Jul;15(7):403-12.
148. Potten CS. What is an apoptotic index measuring? A commentary. *British Journal of Cancer*. 1996 Dec;74(11):1743.
149. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. *Methods Enzymol*. 1984;105:328-31.

150. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978 May;86(1):271-8.
151. Aebi HE. Catalase. In; Bergmeyer, HU *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol III, Verlagchemie Gmbh. 1987. 273-285
152. Sun YI, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry.* 1988 Mar 1;34(3):497-500.
153. Khaki A. Assessment on the adverse effects of Aminoglycosides and Flouroquinolone on sperm parameters and male reproductive tissue: A systematic review. *Iranian Journal of Reproductive Medicine.* 2015 Mar;13(3):125.
154. Pedraza-Chaverri J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macías-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, et al. S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. *BMC Clin Pharmacol.* 2004 Apr 30;4:5.
155. Hong SH, Park SK, Cho YS, Lee HS, Kim KR, Kim MG, et al. Gentamicin induced nitric oxide-related oxidative damages on vestibular afferents in the guinea pig. *Hear Res.* 2006 Jan;211(1-2):46-53
156. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Yüce A, Çeribaşı AO. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. *Theriogenology.* 2007 Mar 1;67(4):778-85.
157. Bentz AB (2009) A review of quercetin: chemistry, antioxidant properties, and bioavailability. *J Young Investig* 19:1–14.
158. Taepongsorat L, Tangpraputgul P, Kitana N, Malaivijitnond S. Stimulating effects of quercetin on sperm quality and reproductive organs in adult male rats. *Asian J Androl.* 2008 Mar;10(2):249-58.
159. Boots AW, Li H, Schins RP, Duffin R, Heemskerk JW, Bast A, Haenen GR. The quercetin paradox. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2007 Jul 1;222(1):89-96.
160. Breitbart H, Rubinstein S, Nass-Arden L. The role of calcium and Ca²⁺-ATPase in maintaining motility in ram spermatozoa. *J Biol Chem.* 1985 Sep 25;260(21):11548-53.
161. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link. *Nature reviews Molecular cell biology.* 2003 Jul;4(7):552-65.
162. Ranawat P, Pathak CM, Khanduja KL. A new perspective on the quercetin paradox in male reproductive dysfunction. *Phytotherapy Research.* 2013 Jun;27(6):802-10.

163. Ferramosca A, Lorenzetti S, Di Giacomo M, Lunetti P, Murrieri F, Capobianco L, Dolce V, Coppola L, Zara V. Modulation of human sperm mitochondrial respiration efficiency by plant polyphenols. *Antioxidants*. 2021 Feb;10(2):217.
164. Rivera L, Morón R, Sánchez M, Zarzuelo A, Galisteo M. Quercetin ameliorates metabolic syndrome and improves the inflammatory status in obese Zucker rats. *Obesity*. 2008 Sep;16(9):2081-7.
165. Saber TM, Abd El-Aziz RM, Ali HA. Quercetin mitigates fenitrothion-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia*. 2016 Jun;48(5):491-500.
166. Khaki A, Novin MG, Khaki A, Fathiazad F, Khaberi M, Hossinchi J, Sehizadeh R. Ultra structural study of gentamicin and ofloxacin effect on testis tissue in rats: Light and transmission electron microscopy. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009 Apr 30;3(4):105-9.
167. Uygur R, Yagmurca M, Alkoc OA, Genc A, Songur A, Ucok K, et al. Effects of quercetin and fish n-3 fatty acids on testicular injury induced by ethanol in rats. *Andrologia*. 2014 May;46(4):356-69
168. Chi KK, Zhang WH, Wang GC, Chen Z, He W, Wang SG, et al. Comparison of Intraperitoneal and Intraepididymal Quercetin for the Prevention of Testicular Torsion/Detorsion-induced Injury. *Urology*. 2017 Jan;99:106-11
169. Abdel-Raheem IT, Abdel-Ghany AA, Mohamed GA. Protective effect of quercetin against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2009 Jan 1;32(1):61-7.
170. Altintas R, Ciftci O, Aydin M, Akpolat N, Oguz F, Beytur A. Quercetin prevents docetaxel-induced testicular damage in rats. *Andrologia*. 2015 Apr;47(3):248-56.