



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA YÜKSEK DOZ GRAFEN
OKSİTLE İNDÜKLENEN OLASI TESTİS
HASARINA KARŞI E VİTAMİNİNİN
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Ali KULABER

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON 2025

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

17.07.2025

Ali KULABER

İthaf

Doktora tezimi, bu uzun ve meşakkatli sürecin her anında, maddi ve manevi desteğini üzerimden eksik etmeyen değerli ve kıymetli ailem, özellikle de şu sıralar tedavi sürecinde olan sevgili Anneme, yine her sıkıntıda ilk limanım olan, hayat arkadaşım ve nişanlıma, bölümde üzerimde emeği çok olan sevgili hocalarıma ve en önemlisi şu an sahip olduğum tüm donanımların temelini atan, bu noktaya gelmemde çok emeği geçen ve süreçte karşılaştığım zorluklarda hep ona verdiğim sözü motivasyon kaynağı olarak kullandığım, 2017 de kaybettiğimiz sevgili hocam Prof. Dr. Ersan ODACI 'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince edindiğim bilgi birikimi, bilimsel bakış açısı ve araştırma disiplini, sadece akademik bir kazanım değil, aynı zamanda entelektüel bir dönüşüm süreci olmuştur. Bu yolculukta, beni akademik anlamda yönlendiren, araştırma süreçlerime bilimsel katkı sağlayan ve kişisel gelişimime doğrudan ya da dolaylı olarak etki eden birçok değerli isimle çalışma fırsatı bulmuş olmak benim için büyük bir şanstır. Tez sürecimin her aşamasında rehberliği, yönlendirici eleştirileri ve akademik desteğiyle yolumu aydınlatan, aynı zamanda mesleki etik ve araştırma disiplinine dair örnek teşkil eden saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Engin YENİLMEZ'e, bilgi ve deneyimleriyle katkıda bulunan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Esin YULUĞ, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Prof. Dr. Gökçen KERİMOĞLU ve Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN'a, deneysel süreçteki yardımları ve işbirlikçi yaklaşımlarıyla desteğini her zaman hissettiren Anabilim Dalı asistanı Uzm. Dr. Semanur IŞIK'a ve Dr. Hüseyin ÇINKILIÇ'a, ayrıca bölümde yardımlarını benden esirgemeyen değerli mesai arkadaşlarıma; gerekli her yardımı sunmaktan geri durmayan, sevgili mühendis kardeşlerim; Arş. Gör. Serhat AKÇAY'a ve Furkan ALPTEKİN'e; bilgi, anlayış ve samimiyetini benimle paylaşan değerli ruh ikizi kardeşim Dr. Öğr. Üyesi Abdülkadir KUTLU' ya ve her zaman yanımda olan, akademik yaşantıma içtenlikle katkı sağlayan sevgili ablalarım Dr. Öğr. Üyesi Zehra TOPAL'a, Dr. Öğr. Üyesi Hatice HANCI'ya manevi desteği, sevgisi ve sabrıyla bu sürecin en güçlü motivasyon kaynaklarından biri olan nişanlım Aygün KELEŞ'e, hayatımın her döneminde bana koşulsuz destek sunan ve daima yanımda olduklarını hissettiren aileme ve özellikle bilimsel perspektifimi şekillendiren, lisansüstü sürecimin başından itibaren üzerimde büyük emeği bulunan kıymetli hocam Prof. Dr. Ersan ODACI'ya gönülden minnettarım. Ayrıca bu çalışmanın gerçekleştirilmesine olanak sağlayan ve maddi desteğini esirgemeyen Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (KTÜ BAP, Proje No: 10702) teşekkür ederim.

Ali KULABER

Trabzon, 2025

Bu doktora tezi Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 10702 nolu doktora tez projesi kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
RESİMLER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiii
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Testis Anatomisi	4
2.2. Testis Histolojisi ve Testis Embriyolojisi	6
2.3. İnsan ve Sıçan Testis Gelişiminin Karşılaştırılması	13
2.4. Nanoteknoloji	17
2.5. Nanobiyoteknoloji	19
2.6. Grafen Oksit (GO)	24
2.7. E Vitamini	27
2.8. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem	31
3. GEREÇ ve YÖNTEM	35
3.1. Çalışma Planı	35
3.1.1. Etik Kurul Onayı ve Proje Desteği	35
3.1.2. Sıçanların Temini ve Bakımı	35
3.1.3. Sıçanın Gruplandırılması	36
3.1.4. Deney Prosedürlerinin Uygulanması	37
3.2. GO'nun Karakterizasyonu	38
3.3. Histolojik İşlemler	39

3.3.1. Testis Dokusunun Temini	39
3.3.2. Testis Dokusunun Takibi	39
3.3.3. Sperm Analizi	40
3.3.4. Doku Gömme ve Dokulardan Kesit Alma	41
3.3.5. Kesitlerin Boyanması	42
3.3.6. Histopatolojik Değerlendirme	47
3.3.6.1. Hematoksilen & Eozin Boyalı Preparatlar	47
3.3.6.2. Masson Trikrom Boyalı Preperatlar	48
3.3.6.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preparatlar	48
3.3.7. İmmünohistokimyasal İncelemeler	49
3.4. Biyokimyasal İncelemeler	49
3.4.1. Testosteron Seviyelerinin lm	49
3.4.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi	50
3.4.3. SOD ve CAT Enzim Aktivitelerinin lm için Doku Homojenizasyonu	51
3.4.4. SOD Enzim Aktivitelerinin lm	51
3.4.4.1. Kullanılan zeltiler	51
3.4.5. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitelerinin lm	53
3.4.5.1. Kullanılan zeltiler	53
3.4.6. MDA Seviyelerinin Belirlenmesi	54
3.4.6.1. Kullanılan zeltiler	55
3.4.7. Protein Tayini	56
3.4.7.1. Kullanılan zeltiler	56
3.5. İstatistiksel Analiz	57
4. BULGULAR	59
4.1. Grafen Oksitin (GO) Karakterizasyon Sonuçları	59
4.1.1. X-ray Diffraction (XRD) Sonuçları	59
4.1.2. GO'nun Scaning Electron Microscope (SEM) Analiz Sonuçları	60
4.2. Hayvan Ağırlığı Sonuçları	61
4.3. Testis Ağırlığı Sonuçları	62
4.4. Testis Kütle İndeksi Sonuçları	63
4.5. Sperm Analiz Sonuçları	64
4.6. Testisin Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	66

4.6.1. Kontrol Grubunun H&E, Masson Trikrom ve Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preperatların Değerlendirilmesi	66
4.6.2. E vit Grubunun H&E, Masson Trikrom ve Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preperatların Değerlendirilmesi	69
4.6.3. GO Grubunun H&E, Masson Trikrom ve Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preperatların Değerlendirilmesi	72
4.6.4. GO+E vit Grubunun H&E, Masson Trikrom ve Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preperatların Değerlendirilmesi	75
4.7. Testisin İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları	78
4.8. Histolojik Ölçüm Sonuçları	81
4.9. Biyokimyasal Veri Sonuçları	85
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	91
6. KAYNAKLAR	102
EKLER	115
EK 1. Etik Kurul Onayı	116
ÖZGEÇMİŞ	117

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Sıçan ve insan testis gelişim sürecindeki önemli olayların gerçekleşme zamanı	14
Tablo 2. Hayvan gruplandırması ve yapılan işlemler	36
Tablo 3. Doku takip prosedürü	40
Tablo 4. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü	43
Tablo 5. Deparafinizasyon prosedürü	44
Tablo 6. TUNEL boyama protokolü	45
Tablo 7. Masson trikrom boyama protokolü	46
Tablo 8. Periyodik asit-Schiff (PAS) boyama protokolü	47
Tablo 9. Modifiye Johnsen skörlama kriterleri	48
Tablo 10. SOD enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve hacimleri	52
Tablo 11. Katalaz aktivite tayini için kullanılan reaksiyon karışımı	54
Tablo 12. MDA seviyesi için yapılan reaksiyon karışımı	55
Tablo 13. Protein tayini deney basamakları	57
Tablo 14. Gruplara ait deney başı, deney sonu ortalama ağırlık verileri, standart sapma değerleri ve değişim yüzdeleri	61
Tablo 15. Gruplara ait testis ağırlığı ve standart sapma değerleri	62
Tablo 16. Gruplara ait testis kitle indeksi ortalamaları (%) ve standart sapmaları	63
Tablo 17. Gruplara ait vitalite (%) oranları ve standart sapma değerleri	64
Tablo 18. Gruplara ait motilite (%) oranları ve standart sapma değerleri	65
Tablo 19. Gruplara ait apoptotik indeks ortalamaları ve standart sapmalar	78
Tablo 20. Gruplara ait seminifer tüböl çap ortalamaları ve standart sapma değerleri	81
Tablo 21. Gruplara ait germinal epitel kalınlık ortalamaları ve standart sapma değerleri	83
Tablo 22. Gruplara ait germinal epitel kalınlığının seminifer tüböl çapına oranının ortalamaları ve standart sapma değerleri	84
Tablo 23. Grupların modifiye Johnsen skörlama değerlerinin ortalaması ve standart sapma değerleri	85
Tablo 24. Gruplara ait doku MDA seviyeleri ve standart sapma değerleri	86

Tablo 25. Gruplara ait doku GSH Px aktivasyon seviyeleri ve standart sapma değerleri	86
Tablo 26. Gruplara ait doku SOD aktivasyon seviyeleri ve standart sapma değerleri	87
Tablo 27. Gruplara ait doku CAT aktivasyon seviyeleri ve standart sapma değerleri	88
Tablo 28. Gruplara ait kan testosteron seviyeleri ve standart sapma değerleri	89



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Sıçanların üreme sisteminin gelişim evrelerinin diyagramı	16
Şekil 2.	İnsanların üreme sisteminin gelişim evrelerinin diyagramı	17
Şekil 3.	Testosteron seviyesi standart grafiği	49
Şekil 4.	GSH-Px standart grafiği	50
Şekil 5.	SOD enzim aktivitesi standart grafiği	53
Şekil 6.	MDA standart grafiği	56
Şekil 7.	Protein standart grafiği	57
Şekil 8.	GO partiküllerine ait X-ışını kırınımı (XRD) analizi sonucunda elde edilen kırınım deseni	60
Şekil 9.	Gruplara ait kilo değişim grafiği	62
Şekil 10.	Grupların testis ağırlık grafiği	63
Şekil 11.	Gruplara ait testis kütle indeks yüzdeleri	64
Şekil 12.	Gruplara ait vitalite yüzde grafiği	65
Şekil 13.	Grupların ait motilite yüzde grafiği	66
Şekil 14.	Gruplara ait apoptotik indeks ortalamalarının grafiği	79
Şekil 15.	Gruplara ait seminifer tübül çap değerlerine ait grafik	82
Şekil 16.	Gruplara ait germinal epitel kalınlık değerlerine ait grafik	83
Şekil 17.	Gruplara ait germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapı oranına ait grafik	84
Şekil 18.	Grupların modifiye Johnsen skorumaya değerlerine ait grafik	85
Şekil 19.	Gruplara ait doku MDA seviye grafiği	86
Şekil 20.	Gruplara ait doku GSH Px aktivasyon seviye grafiği	87
Şekil 21.	Gruplara ait doku SOD aktivasyon seviye grafiği	88
Şekil 22.	Gruplara ait doku CAT aktivasyon seviye grafiği	89
Şekil 23.	Gruplara ait kan testosteron seviye grafiği	90

RESİMLER DİZİNİ

Resim No	Sayfa
Resim 1. Testisin genel histolojik görüntüsü	7
Resim 2. Grafen ve grafen oksitin moleküler yapısı	25
Resim 3. Grafen oksitin partiküler yapısı	25
Resim 4. E vitaminin moleküler yapısı	28
Resim 5. Sıçanların deney süresince içerlerinde tutulduğu kafesler	36
Resim 6. Sıçanlara gavaj yoluyla E vitamini verilışı	37
Resim 7. Sıçanlara intraperitoneal GO enjeksiyonu	38
Resim 8. Testislerin çıkarılması	39
Resim 9. Kesitlerin elde edildiği otomatik mikrotom cihazı	41
Resim 10. GO partiküllerine ait SEM görüntüleri	61
Resim 11. Kontrol grubuna ait genel testis görüntüsü	67
Resim 12. Kontrol grubuna ait genel testis görüntüsü	67
Resim 13. Kontrol grubuna ait Masson trikrom boyama	68
Resim 14. Kontrol grubuna ait PAS boyama	69
Resim 15. E vit grubuna ait genel testis görüntüsü	70
Resim 16. E vit grubuna ait genel testis görüntüsü	70
Resim 17. E vit grubuna ait Masson trikrom boyama	71
Resim 18. E vit grubuna ait PAS boyama	72
Resim 19. GO grubuna ait genel testis görüntüsü	73
Resim 20. GO grubuna ait genel testis görüntüsü	73
Resim 21. GO grubuna ait Masson trikrom boyama	74
Resim 22. GO grubuna ait PAS boyama	75
Resim 23. GO+E vit grubuna ait genel testis görüntüsü	76
Resim 24. GO+E vit grubuna ait genel testis görüntüsü	76
Resim 25. GO+E vit grubuna ait Masson Trikrom boyama	77
Resim 26. GO+E vit grubuna ait PAS boyama	78
Resim 27. Kontrol grubuna ait TUNEL boyama	79
Resim 28. E vit grubuna ait TUNEL boyama	80
Resim 29. GO grubuna ait TUNEL boyama	80
Resim 30. GO+E vit grubuna ait TUNEL boyama	81

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABP	: Androjen bağlayıcı protein
AGD	: Ano-Genital Distance
BTB	: Blood-Testis Barrier
CAT	: Catalase – Katalaz
CoQ10	: Coenzyme Q10 – Koenzim Q10
COVID-19	: Coronavirus disease 2019
DF	: Davidson fiksatifine
DMP	: Dimetil ftalat
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dER	: Düz endoplazmik retikulum
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
FTIR	: Fourier transform infrared spectroscopy - Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GD	: Gestasional day
GDNF	: Glial hücre kökenli nörotrofik faktör
gER	: Granüllü endoplazmik retikulum
GO	: Grafen oksit
GPx/GSH-Px	: Glutathione peroxidase – glutatyon peroksidaz
GW	: Gestasional week
H&E	: Hematoksilin ve eozin
hCG	: Human chorionic gonadotropin
HPG	: Hipotalamic pituitary gonadal axis
kDa	: Kilo Dalton
KTÜ	: Karadeniz Teknik Üniversitesi
KTÜ CAM	: Karadeniz Teknik Üniversitesi Cerrahi Araştırma Merkezi
LH	: Lüteinize edici hormon
LNP	: Lipit nanoparçacık
MAS NMR	: Magic angle spinning nuclear magnetic resonance – sihirli açı döndürmeli nükleer manyetik rezonans
MB	: Masculinization of the brain
MIF	: Müllerian inhibitör faktör

MIS	: Müllerian inhibe edici madde
MPW	: Masculinization programming window
m RNA	: Messenger ribonucleic acid
MTX	: Metotreksat
NADPH	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate – nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NEXAFS	: Near-Edge X-ray absorption fine structure – kenar yakını X-ışını soğurma ince yapısı
NF-κB	: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
OD	: oxidative debris – oksidatif kalıntılar
pg/mL	: Pikogram/mililitre
PKC	: Protein Kinase C
PND	: Postnatal Day
PUFA	: Polyunsaturated Fatty Acids – Çoklu doymamış yağ asitleri
rGO	: Reduced grafen oksit
RNA	: Ribonükleik asit
RNS	: Reactive nitrogen species – reaktif azot türleri
ROS	: Reactive oxygen species – reaktif oksijen türleri
SARS-CoV-2 mRNA	: Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2
SC/SP Prolif	: Sertoli cells/spermatogonia proliferation
SCF	: Kök hücre faktörü
SEM	: Scanning electron microscope
SOD	: Superoxide dismutase – süperoksit dismutaz
STXM	: Scanning transmission X-ray microscopy – taramalı geçirimli X-ışını mikroskopisi
TDF	: Testis belirleyici faktör
TKI	: Testis kitle indeksi
TNF-α	: Tumor necrosis factor-alpha – tümör nekroz faktörü alfa
Trx	: Thioredoxin – Tioeredoksin
TUNEL	: Terminal deoxynucleotidyl Uransferase dUTP Nick end labeling
U/mL	: Mililitredeki enzim aktivite birimi sayısı
UV-Vis	: Ultraviolet-visible spectroscopy – ultraviyole-görünür bölge spektroskopisi

Vb	: ve benzeri
VBP	: Virüs benzeri partiküller
VLDL	: Very low-density lipoprotein – çok düşük yoğunluklu lipoprotein
XPS	: X-ray photoelectron spectroscopy X-ışını fotoelektron spektroskopisi
XRD	: X-ray diffraction
α-TocH	: Alpha-tocopherol
α-TTP	: Alpha-tocopherol transfer protein
β-tocopherol (β-Toc)	: Beta-tocopherol
γ-tocopherol (γ-Toc)	: Gamma-tocopherol
δ-tocopherol (δ-Toc)	: Delta-tocopherol

Simgeler

%	: Yüzde
&	: ve
C	: Karbon
C=O	: Karbondioksit bağı (karbonil)
H	: Hidrojen
L	: Litre
m	: Metre
mg	: Miligram
nm	: Nanometre
$n \rightarrow \pi^*$	: Lone pair'den π orbitallerine geçiş
O	: Oksijen
O₂	: Oksijen molekülü
O₂⁻	: Süperoksit anyon radikali
$\pi \rightarrow \pi^*$	: π orbitallerinden π orbitallerine geçiş
¹H	: Proton (Hidrojen-1)
¹³C	: Carbon-13
μM	: Mikromolar

Formüller

C₁₈H₃₃O₉	: Yüksek oksitlenmiş 18 karbonlu organik kalıntı
C₁₉H₃₅O₆	: 13-[(3,6-Dideoksi- α -L-arabino-hekso-piranozil)oksi]tridekanoat
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H₂SO₄	: Sülfürik asit
H₃PO₄	: Fosforik asit / trihidrojen monofosfat
HNO₃	: Nitrik asit
KMnO₄	: Potasyum permanganat
KClO₄	: Potasyum perklorat
NaNO₃	: Sodyum nitrat
N₂O₄	: Dinitrojen tetraoksit
NO₂	: Azot dioksit

ÖZET

Sıçanlarda Yüksek Doz Grafen Oksitle İndüklenen Olası Testis Hasarına Karşı E Vitamininin Etkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmanın amacı, yüksek doz grafen oksit (GO) indüklediği testis hasarına karşı E vitamininin etkisinin değerlendirilmesidir. Çalışmada 32 adet 21 günlük Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldılar. Buna göre; Kontrol (n=8), GO (n=8), E vit (n=8) ve GO+E vit(n=8) olmak üzere gruplar belirlendi. Kontrol grubundaki hayvanlara stres etkisini ortadan kaldırmak amacıyla, 15 gün boyunca birer gün ara ile toplam 7 kez oral gavaj yoluyla zeytinyağı ve intraperitoneal (ip) yolla serum fizyolojik (SF) uygulandı. E vitamini grubuna aynı süre ve doz planlamasıyla, zeytinyağında çözünmüş E vitamini (100 mg/kg) oral gavajla verildi. GO grubuna, 10 mg/kg dozunda GO uygulandı. GO+E vitamini grubuna ise önce ip yolla GO (10 mg/kg), ardından oral gavajla E vitamini (100 mg/kg) verildi. Deney sonunda sol testisler histopatolojik değerlendirme, sol epididimler sperm analizi, sağ testisler ise biyokimyasal değerlendirme için alındı. Hayvan ağırlıkları, testis ağırlıkları ve testis ağırlığı/hayvan ağırlığı, sperm vitalite ve motilite değerleri, histopatolojik değerlendirme için; H&E, PAS ve Masson trikrom boyama, Johnsen skorlama, seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı, germinal epitel kalınlığı/seminifer tübül çapı, apoptotik indeks için; TUNEL boyama ve biyokimyasal değerlendirme için, kan testosteron ve doku MDA, CAT, SOD, GSH-Px seviyeleri parametreler olarak belirlendi. Sonuçlarına baktığımızda; GO'nun testis dokusunda, germinal epitel düzensizliği, vakualizasyon, mikro vezikül, interstisyel alanda düzensizlik ve ödem gibi patolojik bulgulara sebep olduğu; kontrol grubuna kıyasla, Johnsen skorlamada anlamlı düşüşe, germinal epitel kalınlığında ve germinal epitel/seminifer tübül oranında azalmaya, sperm canlılık (vitalite) oranında azalmaya sebep olduğunu gördük. Apoptoz indeksin kontrol grubuna göre önemli ölçüde arttı ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi. GO+E vit grubumuzda değerlerde iyileşme görülse de, istatistiksel olarak anlamlı değildi. Biyokimyasal verilerde anlamlı çıkan tek parametremiz MDA oldu; Kontrol grubu MDA seviyesi anlamlı olarak E vit grubu ve GO grubuna göre yüksekti. Sonuç olarak; yüksek doz GO uygulamasının sıçan testislerinde çeşitli histopatolojik bulgulara yol açtığı, sperm vitalitesini azalttığı, önemli oranda apoptozu arttırdığı ve E vitaminin bu olumsuz tabloyu istatistiksel olarak anlamlı derecede düzeltmediğini söylememiz mümkündür.

Anahtar Kelimeler: E vitamini, Grafen oksit, Sıçan, Testis

ABSTRACT

Investigation of the Effect of Vitamin E against Potential Testicular Damage Induced by High Dose Graphen Oxide in Rats

This study aimed to investigate the potential protective role of vitamin E against testicular damage induced by high-dose graphene oxide (GO) in rats. A total of 32 male Sprague Dawley rats (21 days old) were randomly assigned to four groups: Control, GO, Vitamin E, and GO+Vitamin E (n=8 per group). To account for stress, the control group received olive oil orally and physiological saline intraperitoneally (ip) every other day for 15 days (7 doses total). The Vitamin E group was given 100 mg/kg of vitamin E dissolved in olive oil via oral gavage following the same schedule. The GO group received GO at a dose of 10 mg/kg ip, while the GO+Vitamin E group received both GO (10 mg/kg, ip) and vitamin E (100 mg/kg, oral). At the end of the experiment, the left testis was collected for histopathological analysis, the left epididymis for sperm evaluation, and the right testis for biochemical studies. Parameters evaluated included body and testis weights, testis-to-body weight ratio, sperm motility and vitality, histological examinations (H&E, PAS, and Masson's trichrome), Johnsen score, seminiferous tubule diameter, germinal epithelium thickness, epithelium/tubule diameter ratio, apoptotic index via TUNEL assay, serum testosterone levels, and tissue levels of MDA, CAT, SOD, and GSH-Px. GO exposure led to germinal epithelial disorganization, vacuolization, microvesicles, and interstitial edema. It significantly reduced the Johnsen score, germinal epithelium thickness, and sperm vitality compared to controls. Although the apoptotic index increased in the GO group, this was not statistically significant. Partial improvements were observed in the GO+Vitamin E group, but these were not statistically significant either. Among the biochemical parameters, only MDA levels showed significant differences, being elevated in both GO and Vitamin E groups compared to controls. In conclusion, high-dose GO induced testicular damage, reduced sperm vitality, and increased apoptosis. Vitamin E showed partial protective effects but failed to produce statistically significant improvements.

Keywords: Vitamin E, Graphene oxide, Rat, Testis

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Nanoteknoloji, neredeyse her bilim alanında yapılan çığır açan keşifler ve bu çağda yaşamı kolaylaştıran teknolojiler sunmaktadır. Nanoteknoloji, atomlarının düzenlenmesi nedeniyle benzersiz özelliklere ve işlevlere sahip olan yapılar, cihazlar ve sistemleri içeren genişleyen bir araştırma alanını temsil eder; bu yapılar 1-100 nm ölçeğinde yer alır. Bu alan, 2000'lerin başlarında artan bir kamu farkındalığına ve tartışmaya konu olmuş ve bunun sonucunda nanoteknolojinin ticari uygulamalarının başlangıcı gerçekleşmiştir. Nanoteknoloji; fizik, malzeme bilimi, kimya, biyoloji, bilgisayar bilimi ve mühendislik dahil olmak üzere neredeyse her bilim alanına katkıda bulunmaktadır. Son yıllarda nanoteknolojilerin insan sağlığına özellikle kanser tedavisi alanında umut verici sonuçlar elde etmek için uygulandığına dikkat çekmek önemlidir (1-3).

Biyoloji alanındaki kullanım imkanları da nanoteknoloji alanının, özellikle sağlık sektöründe (tıp, biyoloji, eczacılık... vb.) büyük önem kazanmasına sebep olmuştur. Nanobiyoteknoloji alanı olarak isimlendirilen bu alt dal, günümüzde sağlık alanında birçok dalda çalışma odağı olmuştur. Teşhis ve tarama amaçlı nanoparçacıkların geliştirilmesi, yapay reseptörler, nano gözenekler kullanılarak deoksiribonükleik asit (DNA) dizinlemesi, benzersiz ilaç dağıtım sistemlerinin üretimi, gen tedavisi uygulamaları ve doku mühendisliğinin etkinleştirilmesi tıpta nanoteknolojinin kullanım alanlarının yaygın ve geniş olmasını sağlamıştır (4).

Karbondan oluşan tek atom kalınlığında bir tabakaya, yüksek elektrik ve ısı iletkenliğine, geniş yüzey alanına, biyolojik yapılarla yüksek etkileşim kapasitesine, yapısına nazaran yüksek mukavemet ve esneklik özelliğine sahip olan grafen, nanoteknoloji alanında kullanılmak için eşsiz işlevsellik sağlamaktadır (5). Yine, bir grafen türevi olan grafen oksit (GO), aynı özellikleri sergilemenin yanında kolay elde edilebilmesi sayesinde ilgi odağı olmuş ve birçok alanda kullanılmaya başlamıştır. Grafen ve türevleri, çok yönlülükleri nedeniyle önemli biyomedikal uygulamalar için umut verici adaylardır. Grafen bazlı malzemelerin biyolojik bir bağlamda ileriye dönük kullanımı, bu malzemelerin toksisitesinin ayrıntılı bir şekilde anlaşılmasını gerektirir. Ayrıca, nanoteknolojinin genişleyen uygulamaları nedeniyle, grafen bazlı nanomalzemelere insan ve çevre maruziyetlerinin gelecekte artması muhtemeldir. Grafen ile ilgili malzemelerin üretimi ve kullanımı ile ilişkili potansiyel risk faktörleri nedeniyle, bu bileşiklerin nano toksikolojik çalışmalarının sayısı son on yılda hızla artmaktadır. Bu çalışmalar, nano yapısal/biyolojik

etkileşimlerin biyomoleküllerden hayvanlara kadar canlı sistemin farklı organizasyon seviyeleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır (6).

Grafen ve grafen oksit bazlı nanomalzemeler, benzersiz fizikokimyasal özellikleri nedeniyle araştırmalarda geniş ilgi görmüştür. 2D allotropik yapısı, çeşitli biyolojik alanlarda kullanılmasına imkân sağlar. Grafen ve kompozitinin biyomedikal uygulamaları; gen ve küçük moleküler ilaç dağıtımında kullanımının yanı sıra kemik ve diş implantasyonu için bir antimikrobiyal ajan olarak, antikanser tedavisinde proteinin biyofonksiyonelizasyonu, gen aktarımı, biyosensör ve biyolojik görüntüleme vb. gibi geniş alanlarda kullanılır (7).

Böylesine işlevsel avantajlara sahip olan grafen/grafen oksitin canlılar üzerindeki etkisi merak konusu olmuş ve çeşitli araştırmalara konu olmuştur. Literatürde grafen oksitin çeşitli dokular üzerinde toksik etkiye yol açabileceğine dair çalışmalar bulunmaktadır. Grafen oksitin, intra-venöz, intra-trakeal, intra-peritoneal enjeksiyonlarında ve oral yolla, besinlerle karıştırılarak verilen durumlarda çeşitli hasarlara yol açtığı rapor edilmekle beraber, özellikle üreme sistemi üzerindeki çalışmalar kısıtlı ve birbiriyle çelişen sonuçlara sahiptir (8-13).

Erkek infertilitesinde testis işlevi ve sağlığı büyük önem arz etmektedir. Vücudumuza giren birçok yabancı madde ilgili dokuların yapısal işlevlerini ve morfolojisini bozabileceği gibi dokularda oksidatif stres kaynaklı hasarlara da yol açabilmektedir. Birçok amaçla kullanılan çeşitli maddelerde olduğu gibi grafen oksitin de testis üzerinde çeşitli hasarlara yol açtığı rapor edilmekle beraber bu durum hala tartışma konusudur. Hasara yol açtığını rapor eden çalışmalarda histopatolojik ve oksidatif stres kaynaklı hasarlar incelenmiş ve rapor edilmiştir (12, 13).

Reaktif oksijen türleri (ROS) spermatozoa, Leydig hücreleri ve genel testis fonksiyonuna saldırarak kısırlığa neden olabilir (14, 15).

E vitamini 1920'lerde keşfedilen temel bir besindir. Antioksidatif etkileri de dahil olmak üzere E vitamininin fizyolojik fonksiyonlarının çoğu yaklaşık 100 yıldır incelenmiştir. Hem endojen hem de eksojen olarak üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) tarafından indüklenen redoks dengesindeki değişiklikler, çeşitli hastalıklarda rol oynar ve aynı zamanda hayatta kalmak için gerekli olduğu düşünülen bir olgudur. E vitamininin yağda çözünen vitamin grupları arasındaki yüksek konsantrasyonu nedeniyle vücuttaki redoks dengesini düzenlediği bilinmektedir ve hücre zarları ve lipoproteinler dahil tüm vücutta her

yerde bulunur (16). Diyabetik sıçanların testislerini oksidatif hasara karşı önemli ölçüde koruduğu (17), siklofosfamid kaynaklı testiküler oksidatif stres ve bozukluklarına karşı koruyucu etkisinin bulunduğu da rapor edilmiştir (18).

Ayrıca, E vitamini sperm kalitesini arttıran ve testis gelişimini teşvik eden bir besin maddesi olarak nitelendirilmiştir. Daha sonra farelerde ve keçilerde testis ve epididimin ağırlığını, koyunlarda testis boyutunu ve sıçanlarda seminifer tübüllerin çapını arttırdığı bulundu. E Vitamini takviyesinin seminifer tübüllerdeki germ hücrelerinin sayısını da arttırdığı gözlemlendi. Ek olarak, önceki çalışmalar, E vitamininin koyun, yaban domuzu, horoz ve tavşanda sperm hareketliliği ve üretilen meni hacmi üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu göstermiştir (19).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Anatomisi

Erkek üreme sistemi, gonadlar (testisler), sperm kanalı, üremeye yardımcı bezler ve dış genital organlardan oluşur. Testisler hem spermatojenik hem de steroidojenik fonksiyonları yerine getirir. Üreme kanalının benzersiz anatomisi hem büyük hem de mikroskobik olarak, bu fonksiyonların etkili ve verimli bir şekilde yerine getirilmesi için optimal olarak tasarlanmıştır (20).

Testisler, sperm ve testosteron üretiminden sorumlu oval şekilli organlardır. Yetişkinlerde genellikle 4–5 cm uzunluğunda, 2–3 cm genişliğinde ve 3–4 cm çapında olup (21), ağırlıkları 12 ila 20 g arasında değişir. Ortalama testis hacmi 15 ila 25 cm³ arasında değişmektedir (22).

Testisler, spermatik kord tarafından skrotum içinde askıya alınmıştır. Sol testis genellikle sağ testisten daha aşağıda yer alır ve her iki testis de üst kutbu anterolateral, alt kutbu ise anteromedial yönde eğimli olacak şekilde oblik konumlanmıştır. Testislerin skrotumda bulunması, skrotal derinin özellikleri ve testiküler pampiniform pleksusun karşı akım ısı değişim mekanizması ile birleşerek testislerin vücut sıcaklığından 3–4°C daha düşük bir sıcaklıkta tutulmasını sağlar.

Testisler, üç katmandan oluşan sağlam bir kapsül ile çevrilidir: en içte tunica vasculosa, ortada tunica albuginea ve en dışta tunica vaginalis. Testisin arka yüzü, epididimin bağlandığı bölge olup sadece kısmen seroza ile örtülüdür. Bu bölgede tunica albuginea içe doğru uzanarak mediastinum testisi oluştururken, tunica vaginalis dışa doğru uzanarak epididimi kaplar. Skrotum içinde, testisler fibröz bir median septum ile birbirinden ayrılmıştır.

Tunica vasculosa, kan damarlarından oluşan bir pleksustan ve gevşek bağ dokusundan oluşur; tunica albuginea'nın iç yüzeyini örter ve testis içindeki tüm yüzeyleri ve bölmeleri sarar.

Tunica albuginea, esas olarak kollajen liflerden oluşan yoğun, mavi-beyaz bir tabakadır, tunica vasculosa'yı örter ve tunica vaginalis'in visseral tabakası tarafından çevrelenir. Testisin arka tarafında, içe doğru uzanarak kalın ancak tam olmayan bir fibröz septum olan mediastinum testisi oluşturur. Bu yapı, testisin üst kutbundan alt kutbuna kadar uzanır ve burada damarlar, sinirler ve testiküler kanallar testis kapsülünden geçer.

Tunica vaginalis, fetal testisin karından skrotuma inişinden önce oluşan peritoneal processus vaginalisin bir devamıdır. Testis skrotuma göç ettikten sonra, processus vaginalisin iç inguinal halkayla testis arasındaki kısmı daralarak kapanır ve testisi içeren bir distal kese bırakır. Tunica vaginalis, testisin yüzeyinden skrotumun iç yüzeyine doğru uzanarak visseral ve parietal tabakalar oluşturur. Bu iki tabaka testisin her iki kutbunda birleşerek süreklilik gösterir. Visseral tabaka, testisin arka yüzü hariç tüm yüzeylerini kaplar. Arka yüzde, epididime doğru dönüp parietal tabaka ile birleşir. Parietal tabakanın iç yüzeyi düz, nemli bir mezotelyum ile kaplıdır.

Visseral ve parietal tabakalar arasındaki boşluk tunica vaginalis boşluğu olarak adlandırılır ve normalde ince, berrak, saman renginde bir sıvı içerir. Ancak testisin lenfatik drenajının inflamasyon, travma veya tümör gibi nedenlerle engellenmesi durumunda bu sıvının miktarı artabilir ve hidrosel oluşumuna yol açabilir (20).

Testis ve epididimin arteriyel kan desteği üç kaynaktan sağlanmaktadır. Katkı miktarına göre azalan sırayla, bunlar testiküler arter (testis kan akımının yaklaşık üçte ikisini sağlar), vazal arter (vas deferens arteri, ductus deferens arteri, vazal arter, duktal arter olarak da bilinir) ve kremasterik arterlerdir (birlikte testis kan akımının yaklaşık üçte birini sağlar) (23).

Testiküler venler, testisin arkasından çıkar, epididimisi drene eder ve testisin etrafında yer alan, pampiniform pleksus olarak bilinen, çok sayıda yüksek oranda anastomoz yapmış kanal oluşturur. Pampiniform pleksus, spermatik kordun önemli bir bileşenidir. Bu damar yapısı, karşı akış yapan arterler ve venlerin sadece damar duvarlarının kalınlığıyla ayrılmasına olanak tanır, bu da ısı ve küçük moleküllerin değişimini mümkün kılar ve testiküler sıcaklıkların daha düşük tutulmasına yardımcı olur. Pampiniform pleksus, vas deferens'in önünde yükselir ve inguinal kanalda 3-4 venle drene edilir. Venler, derin inguinal halka aracılığıyla karına girer ve tek bir testiküler ven haline gelir. Bu ven, sağda inferior vena kava'ya, solda ise renal vene boşalır. Sağ testiküler ven, renal venlerin hemen altındaki keskin bir açıyla inferior vena kava'ya bağlanırken, sol testiküler ven, sol renal vene dik bir açıyla bağlanır. Testiküler venlerde kapakçıklar bulunur (20,24,25).

Testis, onuncu ve on birinci torasik spinal segmentlerden çıkan sinir lifleriyle innerve edilir bu lifler renal ve aort pleksusları aracılığıyla testiküler damarlarla birlikte seyrederek ve pelvik pleksustan çıkan ve vas deferens ile seyreden sinir lifleriyle innervasyon sağlanır

(26). Ek olarak, bazı afferent ve efferent sinirlerin, karşılıklı pelvik pleksusa geçtiği gösterilmiştir (27).

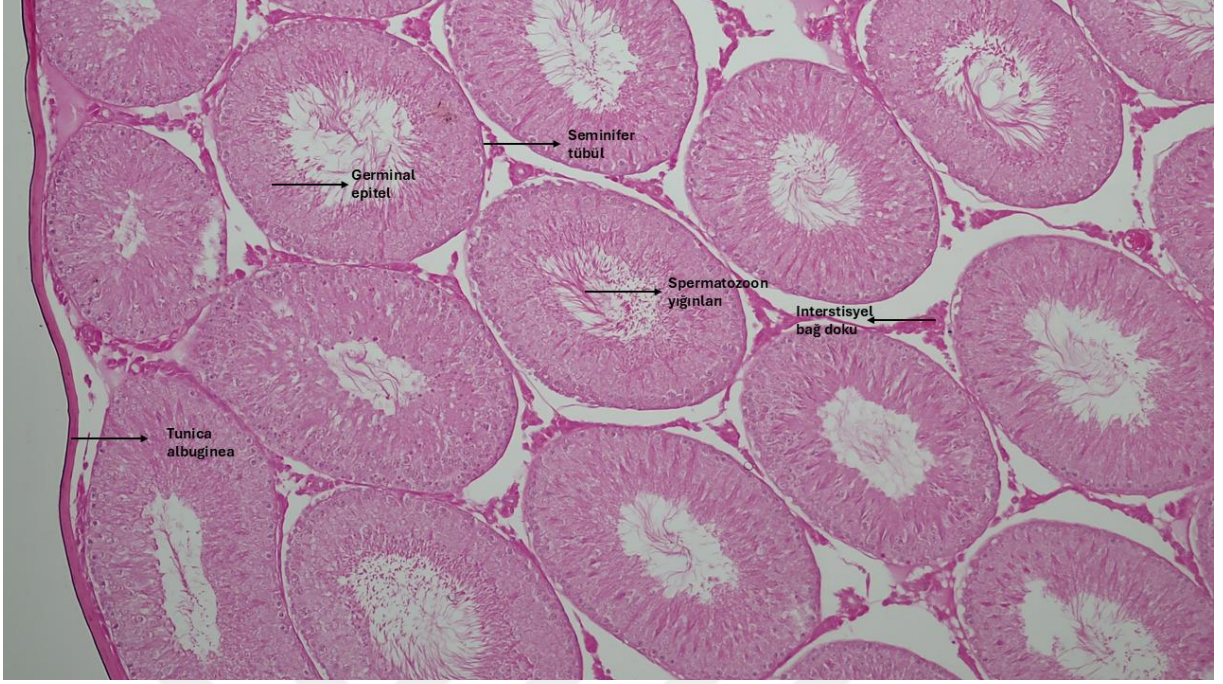
2.2. Testis Histolojisi ve Testis Embriyolojisi

Yetişkin testisleri, skrotum içinde yer alan, vücut boşluğunun dışında bulunan, çift ve oval şekilli organlardır. Her bir testis, kas ve fasya dokusundan oluşan, uzunlamasına bir kese içinde asılıdır. Bu kese, anterior abdominal duvarın katmanlarıyla sürekli olup, skrotuma doğru geri döner. Testisler, spermatik kordlar aracılığıyla abdominal duvara bağlanır ve skrotuma skrotal bağlar ile tutunur; bu bağlar, gubernakulumun kalıntılarıdır (28).

Testis, sert ve kollajen yapıda bir tunica albuginea ile çevrilidir ve posterior bölgede mediastinum testis olarak kalınlaşır. Kan damarları, lenf damarları ve genital kanallar, testise girerken veya testisten çıkarken mediastinum aracılığıyla geçer. Mediastinum testisten kaynaklanan septalar, testisi yaklaşık 250 lobüle ayıracak şekilde içeriye doğru uzanır; bu lobüller farklı boyutlarda olup, en büyük ve en uzun lobüller merkeze yakındır. Her lobül, 1-4 adet kıvrımlı seminifer tübül ve Leydig hücreleri, mast hücreleri, makrofajlar, sinirler ve kan damarlarından oluşan interstisyel doku içerir (20).

Seminifer tübüller, tunica propria ile çevrili bir seminifer epitel içerir. Her seminifer tübül yaklaşık 50 cm uzunluğundadır (aralık, 30 ile 80 cm arasında) ve 150 ile 250 mikrometre çapındadır. Seminifer epitel, iki temel hücre popülasyonundan oluşan sıra dışı bir epiteldir:

Sertoli hücreleri, destekleyici veya sustentaküler hücreler olarak da bilinir. Bu hücreler, ergenlik sonrası çoğalmazlar. Sertoli hücreleri, komşu spermatogenik hücreleri çevreleyen ve aralarındaki boşlukları kaplayan geniş apikal ve lateral uzantılara sahip silindirik hücrelerdir. Ancak, Sertoli hücrelerinin bu karmaşık yapısı, rutin hematoksilin ve eozin (H&E) boyamalarında belirgin bir şekilde görülemez. Sertoli hücreleri, seminifer epitelin tüm kalınlığı boyunca uzanarak tübüllere yapısal bir organizasyon sağlar.



Resim 1. Testisin genel histolojik görüntüsü

Spermatogenik hücreler, düzenli olarak bölünerek olgun sperm hücrelerine farklılaşan hücrelerdir. Bu hücreler, testisin erken gelişimi sırasında vitellüs kesesinden köken alan ve gonadal çıkıntılara göç eden primordial germ hücrelerinden türemiştir. Spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri arasında, belirgin olmayan gelişim evrelerine göre sıralanmış tabakalar halinde düzenlenmiştir.

Spermatogonyumlar: En immatur spermatogenik hücreler olup, bazal laminaya komşudurlar.

Spermatidler: En matür spermatogenik hücrelerdir ve Sertoli hücrelerinin apikal kısmına tutunarak tübül lümenine yakın bölgede bulunurlar.

Tunica (Lamina) Propria: Peritübüler doku olarak da adlandırılan tunica propria, tipik fibroblastları içermeyen çok katmanlı bir bağ dokusudur. İnsanlarda, seminiferöz epitelin bazal laminasının dış kısmında 3 ila 5 katman halinde miyoid hücreler (peritübüler kontraktıl hücreler) ve kollajen fibriller bulunur. Ayrıca, miyoid hücreler belirgin düzeyde granüllü endoplazmik retikulum (GER) içerir. Bu özellik, tipik fibroblastlar bulunmaksızın kollajen sentezinde görev aldıklarını gösterir. Miyoid hücrelerin ritmik kontraksiyonları, seminiferöz tübüllerde peristaltik dalgalar oluşturarak spermatozoa ve testiküler sıvının ekskren kanal sistemine (ductus excurrens) ilerlemesini sağlar.

Tunica propria'nın dış kısmında ayrıca kan damarları, geniş lenfatik damar ağı ve Leydig hücreleri bulunur. Fizyolojik yaşlanma süreciyle birlikte tunica propria kalınlığı artar. Bu kalınlaşma; sperm üretim hızında azalmaya, seminiferöz tübüllerin boyutlarında küçülmeye neden olur. Erken yaşta tunica propria'nın aşırı kalınlaşması, infertilite ile ilişkilidir (28).

Leydig hücreleri, büyük, poligonal ve eozinofilik hücreler olup, genellikle lipid damlacıkları içerir. Bu hücrelerde ayrıca lipofuscin pigmenti sık görülür ve Reinke kristalleri olarak adlandırılan çubuk şeklinde sitoplazmik kristaller bulunur. Rutin histolojik kesitlerde, Reinke kristalleri kırılğan bir görünüme sahiptir ve yaklaşık $3 \times 20 \mu\text{m}$ boyutlarındadır. Bu kristallerin kesin yapısı ve fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, muhtemelen hücre kaynaklı protein ürünleri oldukları düşünülmektedir.

Diğer steroid sentezleyen hücreler gibi, Leydig hücreleri de gelişmiş düz endoplazmik retikulum (dER) içerir. Eozinofilik boyanma özellikleri, büyük ölçüde dER'in varlığına bağlıdır. Testosteron sentezi için gerekli enzimler, kolesterolden testosteron dönüşümünün gerçekleştiği dER ile ilişkilidir. Tubuloveziküler kristal mitokondriler, steroid sentezleyen hücrelerin bir diğer karakteristik özelliği olup, Leydig hücrelerinde de bulunur (29).

Leydig hücreleri, erken fetal dönemde farklılaşır ve testosteron salgılar. Testosteron sekresyonu, embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonlarının devamlılığı için gereklidir.

Sertoli hücreleri, seminifer epitelin gerçek epitelyal bileşenini oluşturur. Sertoli hücreleri (sustentaküler hücreler), seminifer epitelin kalın ve çok katmanlı bazal laminası üzerinde yer alan, uzun boylu, prizmatik ve postmitotik epitelyal hücrelerdir. Gelişmekte olan spermatozoalara destek görevi görerek, mayoz sonrası bu hücrelerin yüzeylerine tutunmasını sağlarlar. Sertoli hücreleri, iyi gelişmiş bir granüllü endoplazmik retikulum (GER) ve geniş bir granülsüz endoplazmik retikulum (GER) içerir. Ayrıca, annüle lamellerin yığınlar halinde bulunması ile karakterizedirler. Hücre sitoplazmasında çok sayıda küresel ve uzamış mitokondri, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi, değişken sayıda lizozom, lipid damlacıkları, veziküller ve glikojen granülleri bulunur.

Transmisyon elektron mikroskopuyla incelendiğinde, düzensiz dizilim gösteren, paralel veya birleşen, doğrusal ve yoğun 15 nm çapında filament demetleri olarak gözlemlenir. Kimyasal bileşimi ve fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte, son

alışmalar bunların lipoprotein reseptörü (CLA-1) proteinlerinin birikimi olduklarını tespit etmiştir. Bu durum, inklüzyon cisimciklerinin lipid taşınması ve Sertoli hücreleri tarafından kullanımı ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Sertoli hücreleri, seminifer tübüller boyunca olgunlaşan sperm hücrelerinin intratestiküler kanallara geçişini kolaylaştıran sıvıyı salgılayan yanı sıra, spermatogoniumların spermatozoaya dönüşümünü sağlamak için kritik faktörler üretir. Bu hücreler, 90 kDa moleküler ağırlığında androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılar. ABP, testosteronu seminifer tübül lümeninde yoğunlaştırarak gelişmekte olan sperm hücrelerinin normal maturasyonu için gerekli olan yüksek testosteron konsantrasyonlarının sağlanmasına katkıda bulunur.

Sertoli hücreleri üzerinde FSH (folikül uyarıcı hormon) ve testosteron reseptörleri bulunur; dolayısıyla, bu hücrelerin salgısal fonksiyonu hem FSH hem de testosteron tarafından düzenlenir. Sertoli hücreleri ayrıca, anterior hipofizden FSH salınımını inhibe eden geri bildirim mekanizmasında rol oynayan 32 kDa glikoprotein yapısında bir hormon olan inhibini salgılar.

Buna ek olarak, Sertoli hücreleri:

- Plazminojen aktivatörü sentezleyerek plazminojeni aktif proteolitik hormon plazmine dönüştürür.
- Transferrin (demir taşıyan bir protein) ve serüloplazmin (bakır taşıyan bir protein) üretir.
- Müllerian inhibitör faktör (MIF), kök hücre faktörü (SCF) ve glial hücre kökenli nörotrofik faktör (GDNF) gibi büyüme faktörleri veya parakrin faktörler olarak işlev gören çeşitli glikoproteinler salgılar.

Spermatogenez, spermatogonyumların spermatozoaya dönüşmesini sağlayan süreçtir. Spermatogenez, sperm hücrelerinin üretildiği karmaşık ve kendine özgü bir dizi olayı içeren bir süreçtir. Puberte öncesinde, hipofizden salınan gonadotropinlerin artışı ile başlar ve hayat boyu devam eder. Tanımsal olarak, spermatogenez üç temel evreye ayrılır:

- Spermatogoniyal faz: Spermatogonyumlar mitoz bölünme ile kendilerini yeniler ve sonunda primer spermatositlere dönüşecek olan farklılaşmış spermatogonyum popülasyonunu oluşturur.

- Spermatosit fazı (mayoz): Primer spermatositler iki ardışık mayoz bölünme geçirerek kromozom sayısını ve DNA miktarını azaltır ve haploid spermatidler oluşur.
- Spermatid fazı (spermiogenezis): Spermatidler, olgun sperm hücrelerine dönüşecek şekilde farklılaşır.

Spermatogenez tamamlandığında, spermatidler spermiyasyon adı verilen süreçle destekleyici Sertoli hücrelerinden ayrılarak seminifer tübül lümenine salınır.

Diferansiye olan spermatogonik hücreler, seminifer epitel içinde rastgele dağılmamış olup, belirli hücre tipleri birlikte gruplar halinde bulunur. Bu hücresel gruplaşmalar veya hücre birliktelikleri, her Tip A spermatogonyum çiftinin yavru hücreleri arasında bulunan sitoplazmik köprüler nedeniyle oluşur ve senkronize hücrelerin her olgunlaşma evresinde belirli süreler geçirmesi sonucu meydana gelir. Seminifer tübül içinde her bölgedeki diferansiyasyon evreleri, kök hücre yavru hücrelerinin sitoplazmik köprülerle birbirine bağlı kalması ve senkronize mitotik ve mayotik bölünmeler ile matürasyona uğraması sonucu sırasıyla gerçekleşir.

Her tanımlanabilir hücresel birliktelik, seminifer epitel döngüsünün bir evresi olarak kabul edilir. Aynı hücre birlikteliğinin seminifer tübülün herhangi bir bölgesinde ardışık olarak iki kez görülmesi arasındaki süreç, seminifer epitel döngüsünü oluşturur. Seminifer epitel döngüsü en ayrıntılı şekilde ratlarda incelenmiş olup, tübül boyunca ardışık 14 evre tanımlanmıştır. İnsanlarda ise seminifer epitel döngüsü içinde altı farklı hücresel birliktelik (evre) tanımlanmıştır. Ancak, bu evreler rodentlerde olduğu kadar belirgin değildir; çünkü insanlarda hücresel birliktelikler düzensiz yamalar halinde, mozaik bir patern oluşturur.

İnsanlarda spermatogenez süresi yaklaşık 74 gündür. Tritiated timidin enjeksiyonuyla belirli bir hücre jenerasyonu, ardışık seminifer tübül biyopsileri ile takip edilerek, etiketlenmiş hücrelerin farklı evrelerden geçiş süreleri belirlenebilir. Seminifer epitel kalınlığı içinde, herhangi bir bölgedeki belirli bir zamanda birkaç nesil gelişim aşamasındaki hücre bulunur ve bu durum karakteristik hücresel birliktelikleri oluşturur.

Otoradyografik çalışmalar, seminifer epitel döngüsünün süresinin sabit olduğunu ve insanlarda yaklaşık 16 gün sürdüğünü göstermiştir. Buna bağlı olarak, bir kök hücre tarafından üretilen bir spermatogonyumun spermatogenez sürecini tamamlaması için yaklaşık 4,6 döngüye (her biri 16 gün), yani toplamda 74 güne ihtiyaç vardır. Bunun

ardından, spermatozoanın epididimden geçişi yaklaşık 12 gün sürer. İnsan testisinde günlük yaklaşık 300 milyon sperm hücresi üretilir.

Spermatogenez süresi ve seminifer epitel döngüsünün uzunluğu her tür için sabit ve karakteristiktir (28).

Embriyonun kromozomal cinsiyeti, döllenme sırasında, oositin hangi sperm (X veya Y) tarafından döllendiğı ile belirlenir. Erkek ve dişi morfolojik özellikleri, yedinci haftaya kadar gelişmeye başlamaz. İki cinsiyetin erken genital sistemleri benzerdir; bu nedenle, genital gelişimin başlangıç dönemi, cinsel gelişimin belirsiz bir aşamasıdır.

Gonadlar (testisler veya overler), cinsiyet hücrelerini (spermiler veya oositler) üreten organlardır. Gonadlar üç kaynaktan türetilir:

- Karın arka duvarını döşeyen mezotel (mezoid epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri (en erken, farklılaşmamış cinsiyet hücreleri)

Gonadal gelişimin ilk evreleri, beşinci haftada, mezonefrozun medial tarafında, kalıcı bir böbreğin primordiumu olan kalınlaşmış bir mezotel alanının gelişmesiyle başlar. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu, mezonefrozun medial tarafında bir şişlik oluşturur, gonadal sırt parmağına benzer epitel kordları, gonadal kordlar, kısa süre içinde altındaki mezenşime doğru büyür. Belirsiz gonadlar (differansiyasyon öncesi primordial organlar) o esnada dış korteks ve iç medulladan oluşur.

XX cinsiyet kromozom kompleksi taşıyan embriyolarda, belirsiz gonadın korteksi, bir over olarak farklılaşırken, medulla geriler. XY cinsiyet kromozom kompleksi taşıyan embriyolarda ise medulla testis olarak farklılaşırken, korteks geriler.

Primordial germ hücreleri, döllenmeden 24 gün sonra, allantoisin başlangıcına yakın, umbilikal kesenin endodermal hücreleri arasında ilk kez tanınabilen büyük, yuvarlak cinsiyet hücreleridir. Embriyonun katlanması sırasında, umbilikal kesenin proksimal kısmı embriyoya dahil olur. Bu sırada, primordial germ hücreleri, arka bağırsaklarının dorsal mezenterini takip ederek gonadal sırtlara göç eder. Altıncı hafta sırasında, primordial germ hücreleri, altındaki mezenşime girer ve gonadal kordonlara dahil olur. Primordial germ hücrelerinin göçü, stella, fragilis ve BMP-4 genleri tarafından düzenlenir.

Testis belirleyici faktör (TDF), seminifer kordların yoğunlaşmasını ve farklılaşmamış gonadın medullasına doğru uzanmasını indükler. Bu yapı burada dallanarak ve anastomoz yaparak rete testisi, yani kanallardan oluşan bir ağ yapısını oluşturur. Tunica albuginea adı verilen kalın fibröz kapsül geliştiğinde, seminifer kordların yüzey epiteli ile bağlantısı kaybolur. Tunica albuginea'nın gelişimi, testis morfogenezinin karakteristik bir özelliğidir. Testis büyüdükçe dejenerasyona uğrayan mezonefroza ayrılır ve kendi mezenterisi olan mezorşium tarafından asılı tutulur.

Seminifer kordlar, ilerleyen gelişim sürecinde seminifer tübüllere, tubuli recti'ye (düz tübüller) ve rete testise dönüşür. Seminifer tübüller, mezenşim dokusu ile ayrılır ve bu mezenşim dokusundan interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) gelişir. Embriyonun sekizinci haftasında Leydig hücreleri, androjenik hormonlar olan testosteron ve androstenodion salgılamaya başlar. Bu hormonlar, mezonefrik kanalların ve dış genital organların maskülinizasyonunu indükler.

Testosteron üretimi, 8. ve 12. haftalar arasında en yüksek seviyeye ulaşan insan koryonik gonadotropini (hCG) tarafından uyarılır. Testosterona ek olarak, fetal testis müllerian inhibe edici madde hormon/madde (AMH/MIS) adlı bir glikoprotein hormon üretir. AMH, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır ve puberteye kadar üretimi devam eder, ardından seviyesi azalır. Bu hormon, uterus ve uterin tüplerin oluşumundan sorumlu olan parametonefrik kanalların gelişimini baskılar.

Seminifer tübüller, puberteye kadar lümene sahip değildir. Seminifer tübüllerin duvarı iki hücre tipinden oluşur:

- Sertoli hücreleri, spermiogenezi destekler; gonadal kabartının mezotelinden türemiştir.
- Spermatogonyumlar, primordial sperm hücreleridir ve primordial germ hücrelerinden köken alır.

Fetal testiste seminifer epitelin büyük bir kısmını Sertoli hücreleri oluşturur. Fetal gelişimin ilerleyen dönemlerinde, testisin yüzey epiteli yassılaşıp testisin dış yüzeyini kaplayan mezotelyumu (epitel hücre tabakasını) oluşturur. Rete testis, 15 ila 20 mezonefrik tübül ile devamlılık gösterir ve bu tübüller efferent kanalcıklara dönüşür. Bu kanalcıklar, epididimis kanalına farklılaşan mezonefrik kanal ile bağlantılıdır (30).

2.3. İnsan ve Sıçan Testis Gelişiminin Karşılaştırılması

Testis gelişimiyle ilgili olarak, tüm türlerde aynı genel olaylar dizisi meydana gelir, ancak önemli zamansal farklılıklar gösterir. Tüm memeli testislerinin olgunlaşma sürecinin temel sıralaması kronolojik olarak şu şekildedir:

- Gonositleri içeren spermatik kordların prenatal oluşumu;
- Gonositlerin spermatogonyaya dönüşümü;
- Sertoli hücreleri ve spermatogonyal hücrelerin yoğun çoğalması;
- Sertoli hücrelerinin olgunlaşması ve kan-testis bariyerinin (BTB) oluşumu;
- Spermatositlerin gelişimi (yani mayoz bölünme);
- Spermiogenez (yuvarlak ve uzamış spermatidlerin oluşumu).

Kemirgenlerde günler süren bu olaylar, insanda yıllar sürmektedir.

Testis cinsel olgunluğa ulaştığında, türler arasında spermatogenez açısından farklılıklar gözlemlenir. Bu farklılıklar arasında tübüllerin aşamaları, testis gramı başına sperm sayısı, bir tübülün bir döngüsünü tamamlaması için gereken gün sayısı, bazal konumlu bir spermatogoniumun olgun ve uzamış bir spermatid haline gelip serbest bırakılmaya hazır hale gelmesi için geçen süre ve spermin epididimi geçme süresi yer alır. Aşağıdaki tabloda sıçan ve insan testis gelişim sürecindeki önemli olayların gerçekleşme zamanı açıklanmıştır (Tablo 1).

Tablo 1. Sıçan ve insan testis gelişim sürecindeki önemli olayların gerçekleşme zamanı (31)

	Sıçan	İnsan
Gebelik süresi	21 gün	39 hafta
Cinsiyet belirlenmesi	GD 12	GW 7
Testosteron üretimi	Başlangıç: GD 14.5-15.5 (zirve: GD 18)	Başlangıç: GW 8 (zirve: GW 11-14)
LH üretim başlangıcı	GD 17.5	GW 12
HPG bileşenleri oluşumu	GD 19	GW12
Gonadotropinin testis üzerinde etki oluşturması	PND 10	hCG GW 7’de LH GW 20’den sonra
Gonosit mitotik hiatus	Var GD 18- Doğum (PND 3’ e kadar)	Yok
MPW	GD 15.5-17.5	GW 9-14
Erkek,Dişi AGD maksimum düzey	Doğum	GW 17-20
Testislerin inişi	Faz I (GD 19) Faz II (PND 15)	Faz I (GW 15) Faz II (GW 25-35)
Prepusyal ayrılma	43 gün	9 ay – 3 yıl
MB	GD 18-PND 10	Perinatal (tam zamanı bilinmiyor)
Mini ergenlik	0-6 saat	3-6 ay
Gelişim evreleri	Neonatal (0–PND 7) Infantile (PND 8–20) Juvenile (PND 21–32) Peripubertal (PND 33–60)	Neonatal (0–28 gün) Infantile (28 d–2 yıl) Juvenile (2–11 yıl) Peripubertal (11–14 yıl)
Spermatogonial/Sertoli hücre proliferasyonunun artması	PND 5–15	9–11 yıl
BTB oluşumu ve spermatosit Farklılaşmasının başlaması	PND 18	12–13 yıl
Sessizlik dönemi	Yok	3-9 yıl
Testis olgunlaşması	Dağınık	Lobül lobül
Epididimisin olgunlaşma aşamaları	Farklılaşmamış 0-PND 14 Farklılaşma PND 15-44 Genişleme PND 44’ ten sonra	Açıklanamamış
Prostat	Salgılamamanın başlaması PND 15 Yetişkin hal PND 28	Salgılamamanın başlaması GW 14-18

Tabloda ve diyagramlarda kullanılan kısaltmalar: GD (Gestasional Day): gebelik günü, GW (Gestasional Week): gebelik haftası, LH: Lüteinize edici hormon, HPG

(Hypothalamic Pituitary Gonadal axis): Hipotalamus hipofiz gonad eksenini, PND (Postnatal Day): postnatal gün, hCG (Human Chorionic Gonadotropin): insan koryonik gonadotropini, MPW (Masculinization Programming Window): Maskülinizasyon programlama penceresi, AGD (Ano-Genital Distance): Ano-genital mesafe, MB (Masculinization of the Brain): beyin maskülinizasyonu, BTB (Blood-Testis Barrier): kan-testis bariyeri, SC/SP Prolif (Sertoli Hücreleri/Spermatogonia Proliferasyonu).

Sıçan ve insana ait erkek üreme sisteminin karşılaştırmalı olarak gelişiminin gösterildiği diyagramlarda, sıçanlarda (Şekil 1) ve insanlarda (Şekil 2) prenatal ve postnatal yaşam boyunca meydana gelen gelişimsel olayları gösterilmektedir. Olayların kontrolü ve zamanlaması açısından önemli farklılıklar bulunmaktadır (31).

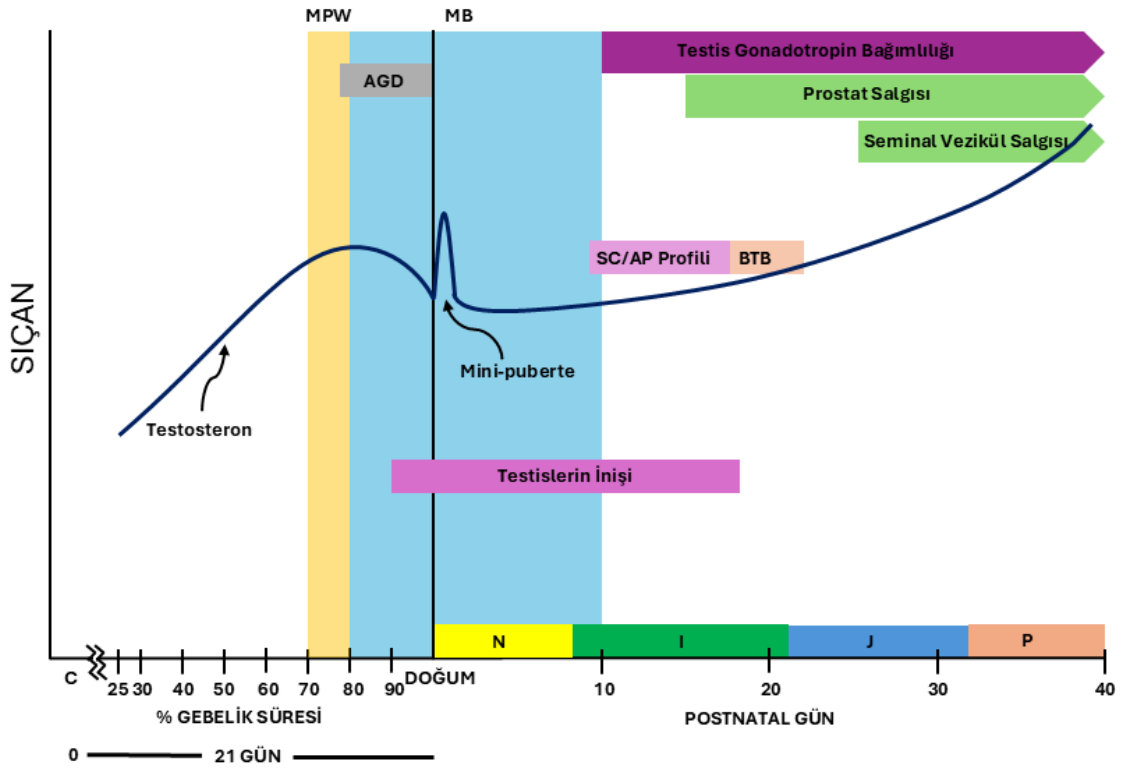
- Sıçanlarda, testis büyümesi gebelik süresince gonadotropinlerden bağımsızdır, ancak postnatal gün (PND) 10 civarında hipofiz kaynaklı gonadotropinlere bağımlı hale gelir.
- İnsanlarda, fetal testis büyümesi, prenatal yaşamın büyük bir kısmında gonadotropinlere bağımlıdır.
- Prenatal dönemin erken evrelerinde plasenta kaynaklı hCG tarafından,
- Orta gebelikten itibaren ise hipofiz gonadotropinleri tarafından kontrol edilir.

Testis İnişi ve Salgılar

- Sıçanlarda, inguinoskrotal testis inişi (inişin 2. fazı), prostat ve seminal vezikül salgıları postnatal dönemde gerçekleşirken,
- İnsanlarda bu olaylar prenatal dönemde tamamlanır.

Quiescent (Sessiz) Dönem

- Sıçanlarda herhangi bir quiescent (sessiz) dönem bulunmaz.
- İnsanlarda ise 3 ila 8 yaşları arasında uzamış bir sessizlik dönemi gözlenir.



Şekil 1. Sıçanların üreme sisteminin gelişim evrelerinin diyagramı (31)

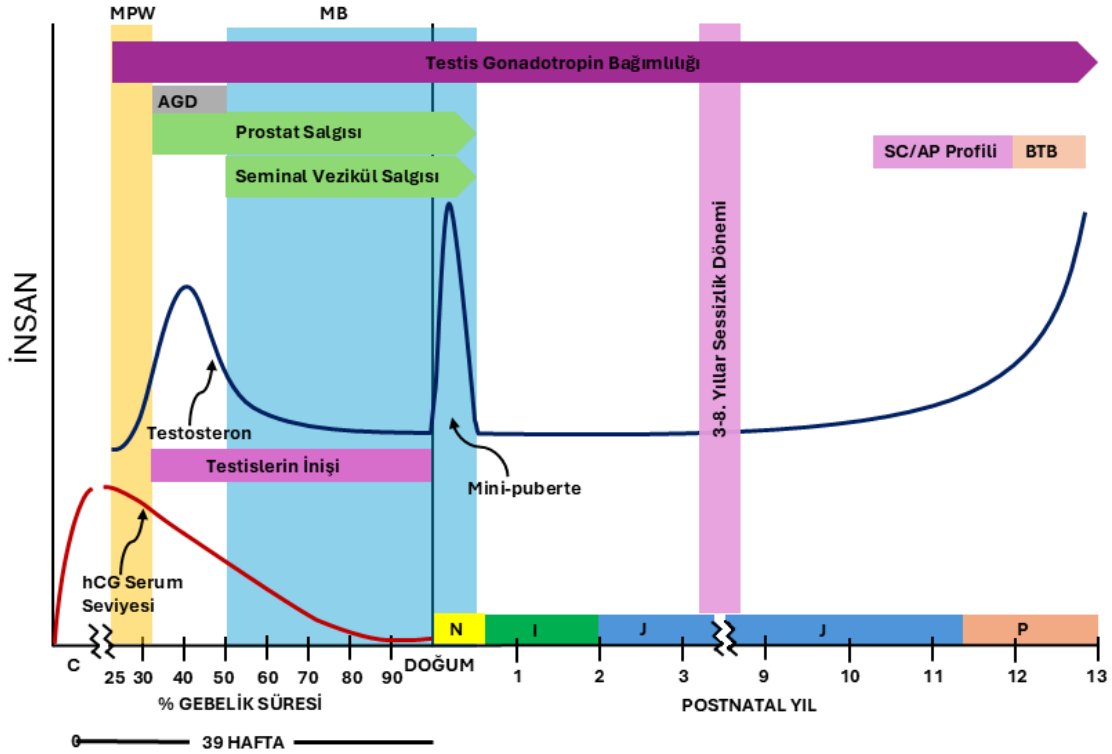
Dış Genital Programlama ve AGD Uzaması

- Dış genital organların programlandığı maskülinizasyon programlama penceresi (MPW), sıçanlarda gebeliğin daha geç evrelerinde gerçekleşirken, insanlarda daha erken ortaya çıkar.
- Anogenital mesafe (AGD) uzaması, sıçanlarda doğumda en yüksek cinsel dimorfizme ulaşır,
- İnsanlarda ise gebeliğin 20. haftasında (GW 20) tamamlanır.

Benzerlikler

- Erkek beyninin programlandığı maskülinizasyon (MB) penceresi hem sıçanlarda hem de insanlarda perinatal dönemi kapsar.
- Mini puberte hem sıçanlarda hem de insanlarda yenidoğan döneminde gerçekleşir ve her iki türde de beyin maskülinizasyonu için önemlidir.
- Testosteron (T) seviyelerinin dinamikleri sıçan ve insan arasında nispeten benzerdir:
 - ✓ Prenatal dönemin sonunda bir yükseliş,

- ✓ Doğumda düşük seviyelere dönüş,
- ✓ Mini puberte sırasında ikinci geçici bir artış gözlenir (31).



Şekil 2. İnsanların üreme sisteminin gelişim evrelerinin diyagramı (31)

2.4. Nanoteknoloji

Yunanca “nano” kelimesi (cüce anlamına gelir), boyut veya zamanın 10^{-9} kat küçülmesini ifade eder ve bu, bir mikrondan bin kat daha küçüktür. 1 nanometre (nm), bir metrenin milyarda biridir ve aynı zamanda 10 Angstrom’a (Å) eşittir. Yani, 1 nanometre = 10^{-9} metredir ve bir insan saçının çapından 50.000 kat daha küçüktür. İnsan saçının çapı yaklaşık 50 mikron’dur (μ), (yani 50×10^{-6} metre), bu da 50 nanometrelik bir nesnenin bir saç teli kalınlığının yaklaşık 1/50.000’i kadar olduğu anlamına gelir. Bir kübik nanometre (nm^3), yaklaşık olarak bir atomun hacminin 20 katı kadardır. Bir nanoölçekli eleman ile bir basketbol topu arasındaki fark, bir basketbol topunun dünya boyutuna oranı gibidir. Açıkça görülmektedir ki, nanobilim, nano mühendislik ve nanoteknoloji, çok küçük boyutlu nesne ve sistemlerle ilgilenir (32,33).

Nanoölçek, boyutsal ölçek üzerinde adeta sihirli bir noktadır; nanoölçekteki yapılar (nanoyapılar olarak adlandırılır), insan yapımı en küçük cihazlarla canlı sistemlerdeki en

büyük moleküller arasında sınırda yer alır. Nanoyapılar üzerinde kontrol ve düzenleme yeteneğimiz, atomlar, moleküller ve kütleli (makroskobik) malzemeler arasında boyutlara sahip sistemlerin yeni fiziksel, biyolojik ve kimyasal özelliklerinden faydalanmamıza olanak sağlayacaktır (32).

Nanoteknoloji; malzemeleri, cihazları ve sistemleri atomik hassasiyetle inşa etme yeteneğidir ve son yıllarda oldukça önem kazanmıştır (34-40). Nanoteknolojinin kısa ve genel bir tanımı, ABD Ulusal Bilim ve Teknoloji Konseyi'nin yaptığı tanımdır (34). Bu tanıma göre: "Nanoteknolojinin özü, moleküler düzeyde, atom atom çalışarak temelde yeni bir moleküler organizasyona sahip büyük yapılar oluşturma yeteneğidir. Amaç, bu özellikleri kullanmak için atomik, moleküler ve supramoleküler düzeylerde yapı ve cihazlar üzerinde kontrol sağlamak ve bu cihazları verimli bir şekilde üretmeyi ve kullanmayı öğrenmektir."

ABD Ulusal Bilim Vakfı (35), nanobilim/nanoteknolojiyi şu temel özelliklere sahip malzeme ve sistemlerle ilgilenen çalışmalar olarak tanımlar:

- Boyut: En az bir boyutu 1–100 nanometre (nm) arasında olan.
- Süreç: Moleküler ölçekli yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde temel düzeyde kontrol sağlayan yöntemlerle tasarlanmış.
- Yapı taşı özelliği: Daha büyük yapılar oluşturmak için birleştirilebilen.
- Nanobilim, genel anlamda, birçok biyoparçacığın (enzimler, virüsler vb. gibi) boyutları nanometre aralığında olduğundan mikrobiyolojik bilimlerde oldukça doğal bir konudur.

Nano ölçekli bilim ve teknolojinin vaadi ve özü, nano ölçekteki malzemelerin, kütleli (makroskobik) malzemelerden oldukça farklı özelliklere (kimyasal, elektriksel, manyetik, mekanik ve optik) sahip olduklarının gösterilmiş olmasına dayanır. Bu tür bazı özellikler, bir şekilde, bu malzemelerin yapıtaşlarını oluşturan en küçük elementler (atomlar ve moleküller) ile makroskobik malzemelerin özellikleri arasında bir yerde yer alır. Yığın (kütleli) malzemelere kıyasla, nanoparçacıkların benzer uygulamalarda kullanıldıklarında gelişmiş performans özellikleri gösterdikleri kanıtlanmıştır. Nanoteknolojinin mevcut ve beklenen pek çok uygulaması vardır; biyoloji, tıp, ilaç, elektronik, enerji ve çevre sanayilerinde hızla artan bir şekilde kullanılan tabandan yukarıya teknoloji (örneğin kendi kendine bir araya gelme – self-assembly) gibi yaklaşımlar da bu kapsamdadır (41).

Nanoölçek ve nanoteknolojinin bu denli önem arz etmesinin altında yatan özellikler ise şöyle sıralanabilir:

- Maddenin içindeki elektronların kuantum mekaniksel (dalga benzeri) özellikleri, nanoölçekteki değişimlerden etkilenir. Malzemelerin nanoölçekte tasarlanmasıyla, kimyasal bileşimleri değiştirilmeden yük kapasitesi, manyetizasyon ve erime sıcaklığı gibi mikro ve makroskobik özellikleri değiştirilebilir.
- Biyolojik varlıkların temel özelliklerinden biri, maddenin nanoölçekte sistematik olarak organize edilmesidir. Nanobilim ve nanoteknolojideki gelişmeler, insan yapımı nanoölçekli yapıların canlı hücrelerin içine yerleştirilmesine olanak tanıyacaktır. Ayrıca, doğanın kendi kendine bir araya gelme (self-assembly) özellikleri kullanılarak yeni malzemeler üretmek de mümkün hale gelecektir. Bu, biyolojinin malzeme bilimiyle güçlü bir şekilde birleşmesini sağlayacak bir gelişmedir.
- Nanoölçekli bileşenler, çok yüksek yüzey-hacim oranına sahiptir; bu da onları kompozit malzemeler, reaksiyon sistemleri, ilaç taşıma ve kimyasal enerji depolama (örneğin hidrojen ve doğal gaz gibi) alanlarında kullanım için ideal hale getirir.
- Nanoyapılardan oluşan makroskobik sistemler, mikroyapılardan oluşanlara göre çok daha yüksek yoğunluğa sahip olabilir. Ayrıca, elektrik iletkenlikleri daha yüksek olabilir (32).

2.5. Nanobiyoteknoloji

Nanobiyoteknoloji, tıbbi, teknolojik ve biyolojik araştırma ve geliştirme, tıp, ilaç geliştirme ve analitik bilimler için kilit birçok disiplinli alan olup, bunların ilerlemesini sağlayan önemli bir güçtür. Temeli; biyoteknoloji, kimyasal ve fiziksel nanoteknoloji, malzeme bilimleri, kimya, mühendislik, elektronik ve optroik gibi birçok alanın seçici bir şekilde entegrasyonuna dayanır. Amaç; DNA, RNA, proteinler ve metabolitlerin karmaşık karışımlarını analiz etmek için mikro ve nano diziler oluşturmak ve ultra hızlı dizileme cihazları, mikrobiyal yakıt hücreleri, implantlar, moleküler motorlar, yapay organlar ve nanorobotlar tasarlamaktır. Nanobiyoteknolojideki gelişmeler, kimyasal ve fiziksel nanoteknolojilerdeki bilimsel ilerlemelerden yararlanmakta ve aynı zamanda, özellikle malzemeler, kompozitler, nano yapılandırma teknikleri, karbon nanotüpler ve nanoelektronik gibi alanlara katkıda bulunmaktadır (42-44).

Nanobiyoteknolojiyle ilgili araştırma faaliyetlerinin son dönemdeki büyümesi ve kapsamının genişlemesi, teknolojinin olgunlaşmasını, biyolojik molekülleri anlama ve onları yönlendirme becerimizin artmasını ve doğal olaylara dair temel bilgi birikimimizin zenginleşmesini yansıtmaktadır (45). Aşağıda başlıklar altında toplanmış ve nanobiyoteknolojinin etkin olarak kullanıldığı, ilgi duyduğu ve hedeflediği alanlar ve bu alanlarla ilgili çalışmalar özetlenmiştir.

Nanomaterial Olarak DNA

DNA'nın canlı organizmalarda genetik bilgiyi taşıma gibi doğal işlevinin ötesinde nasıl kullanılabileceğine dair mükemmel bir genel bakış sunmaktadır. Klasik Watson-Crick çift sarmalının yanı sıra, DNA birçok farklı yapıyı da benimseyebilir ve bu yapılar, çeşitli işlevsel nanoyapılar ve nanomakineler oluşturmak için özel olarak tasarlanabilir. Bu nanomakineler, potansiyel olarak küçük robotlar gibi işlev görebilir (44,46,47).

Bu DNA tabanlı işlevsel düzenekler, hâlâ doğadaki olağanüstü protein veya RNA tabanlı makinelerle örneğin ATPaz kompleksi ya da ribozom ile kıyaslandığında onların seviyesine ulaşmaktan uzaktır. Ancak, nükleik asit tabanlı nanobiyoteknolojide son dönemde elde edilen dikkate değer ilerlemelere dayanarak, katalitik, mekanik ve algılama işlevi gören bazı DNA nanoyapılarının; yüzeylerle entegre edilmiş ya da topolojik nanomakineler şeklinde düzenlenmiş hâlleri, hem laboratuvar ortamında (in vitro) hem de canlı organizmalarda (in vivo) algılamayı güçlendiren etkili ve kullanışlı araçlara giden yolu şimdiden açmaktadır (44).

Proteinler ve Biyolojik Parçacıklar ve Bunların Kullanımları

DNA'nın ötesinde, çeşitli uygulamalarda büyük potansiyele sahip başka biyolojik olarak sentezlenmiş malzemeler de vardır. Peptit öz dizilimi alanına dinamik kovalent kimyanın sunduğu çeşitli faydalı katkılar bulunmaktadır. Bu katkı, biyonanoteknolojinin çok disiplinli karakterini mükemmel bir şekilde göstermektedir. Öz dizilim gösteren biyomoleküllerin bu durumda peptitlerin geri dönüşümlü ve kontrollü kimyasal modifikasyonlarının, adaptif ve kendini iyileştirme özelliklerine sahip yeni malzemeler tasarlamak amacıyla nasıl kullanılabileceğini göstermektedir.

Nanobiyoteknolojide, peptitlerin inorganik malzemelerle etkileşimi ve uygun peptit motiflerinin belirlenmesine yönelik stratejiler üzerine çeşitli fikirler vardır. Bazı peptit motifleri doğal proteinlerden tanımlanabilirken, alan, yapay evrim sistemleri kullanılarak yeni

motiflerin oluşturulmasıyla önemli bir ilerleme kaydedilmiştir. Ancak, yeni evrimleşmiş motiflerin performansı çoğunlukla ortama ve şartlara bağlıdır; bu da biyolojik karmaşıklığın, teknoloji odaklı alanımızda da önemli bir faktör olduğunu vurgulamaktadır (48,49).

Geniş tür yelpazesine sahip bakteri ve ökaryotlar, hassas bir şekilde kontrol edilen boyut ve şekillere sahip metalik nanoparçacıklar sentezleyebilir. Bu parçacıkların bazıları, hücre fonksiyonlarının kontrolü ve algılama gibi biyomedikal alanda ayrıca potansiyel olarak terapötik uygulamalarda kullanılabilecek işlevsel özelliklere sahiptir.

Buna ek olarak S-katmanları olarak bilinen yapılar da yine bu alanda oldukça ilgi görmektedir. Bu katmanlar, bazı bakteri ve arkealar çevreleyen tek molekül protein dizileridir. Biyolojik olarak bu proteinler; koruma, yapışma, tanıma ve enzimlerin iskele görevini görme gibi çeşitli işlevler üstlenir. Bununla birlikte, düzenli geometrilerle kendi kendine bir araya gelme (self-assembly) yetenekleri sayesinde, sensörler ve tanı sistemlerinin geliştirilmesi bağlamında faydalı olabilecek 2B protein ve peptit dizilerinin oluşturulmasında ilgi çekici adaylardır (50,51).

Aşılar

COVID-19 pandemisi, etkili bir aşılamanın önemini göstermiş ve bu alandaki çalışmaların önemini arttırmıştır. Aşılar, patojenlerle mücadele etmek ve hastalıkları önlemek için en umut verici ve maliyet etkin yaklaşım olmaya devam etmektedir. Özellikle, SARS-CoV-2 mRNA lipid nanoparçacık (LNP) aşılarının (mRNA-1273 ve BNT162b2) başarısı, bu umut verici aşı platformuna dikkati çekmiştir (43).

Bu bağlamda, bir mRNA–LNP aşısının etkinlik, stabilite ve toksisite açısından optimize edilmesinde yapılması gereken seçimlerin oldukça önemli olduğu çalışmalara konu olmaktadır. Özellikle, mRNA dizisi tasarımı ve nükleotid modifikasyon seçenekleri, LNP formülasyonunun optimizasyonu ve uzun süreli depolama ile stabiliteyi sağlama yaklaşımlarına odaklanmaktadır.

Buna ek olarak, solunabilir mRNA aşıları bu alandaki ilgi odağından bir diğeridir; bu aşılar, solunum yolu patojenlerinin neden olduğu hastalıklarla mücadelede büyük bir potansiyele sahiptir. Bu tür aşılar, maruz kalma bölgesinde uzun ömürlü ve dokuya özgü bellek yanıtları oluşturma potansiyeline sahiptir. Bu alanda önemli görülen unsurlardan olan akciğer biyolojik bariyerleri gibi zorlukların aşılması, aerosol ve akciğer dostu

formülasyonların tasarımı ve öngörücü modeller ile ölçüm tekniklerinin geliştirilmesi bu alandaki gelişmelerin ana temasını oluşturmaktadır.

Virüs benzeri partiküller (VBP'ler), bulaşıcı hastalıklar veya kansere karşı bağışıklık yanıtları uyandırmak için bir diğer önemli nano ölçekli platformdur. Bu alanda, VBP'lerin rasyonel tasarımında kaydedilen son gelişmeleri ve uzun süreli antikor ile T hücresi yanıtlarını uyandırmaya yönelik yeni yaklaşımlar açıklanmaktadır. Ayrıca, kapsüllenmiş adjuvanların etki mekanizmaları, VBP'lerin adjuvan olarak işlev görebilme yetenekleri ve sıtma ile COVID-19'a karşı geliştirilen VBP tabanlı aşılarda elde edilen klinik sonuçları da yine bu alandaki odak merkezlerinden biridir (52-54).

İlaç Taşıma Sistemleri

Geçmişte keşfedilen birçok ilaç, uygun bir ilaç taşıma yöntemi bulunmadığı için hastalarda kullanılamamıştır. Nanoteknoloji, ilaç taşıma işlemini kolaylaştırmak amacıyla da kullanılmaktadır. Elan Drug Delivery (King of Prussia, PA, ABD) şirketinin NanoCrystal® teknolojisini içeren bir ürünü, bağışıklık baskılayıcı sirolimusun katı dozaj formu olarak FDA tarafından 2000 yılında onaylanmıştır. Abraxane™ (Abraxis™ Oncology), paklitaksel içeren ve albümine bağlı partiküllerden oluşan enjekte edilebilir bir süspansiyon şeklindedir. Bu ilaç, metastatik hastalık için kombine kemoterapi başarısız olduktan sonra ya da adjuvan kemoterapiden sonraki altı ay içinde nüks eden meme kanserinin tedavisinde onaylanmıştır. Bu ilaç, biyouyumlu proteinlerin ilaçlarla entegre edilerek oluşturulan nanoparçacık teknolojisine dayanmaktadır; ilaç nanoparçacık formunda (~100–200 nm boyutlarında) sunulur, paklitakselin çözünmezlik sorunlarının üstesinden gelinmiştir.

Günümüzde eğilim, ilaç taşıma sorunlarını ilaç keşfi ve tasarımının daha erken aşamalarında dikkate almaktır. Nanoteknolojinin ilaç taşıma işlemini kolaylaştırmadaki potansiyel uygulamaları, ilaç tasarımı aşamasında değerlendirilebilir. Terapötik molekülle eş zamanlı olarak bir taşıyıcı nanoparçacık da tasarlanabilir.

Bu duruma bir örnek, Calando Pharmaceuticals (Duarte, CA, ABD) şirketinin, kanserle mücadelede kısa girişimci RNA'ları (siRNA) nanoparçacık taşıma sistemi kullanarak tasarlama yaklaşımıdır. Bu firmanın sahip olduğu teknoloji, etkili siRNA moleküllerini seçmek ve inşa etmek için dizi seçimi kullanır; bu moleküller siRNA ile bağlanarak kendiliğinden bir araya gelir ve yaklaşık 50 nm çapında, homojen kolloidal partiküller oluşturur. Bu partiküller damar içi enjeksiyon yoluyla verildiğinden, daha büyük

parçacıklar kandan çıkıp tümöre nüfuz edemez. Öte yandan, ilaç parçacıkları 10 nm'den küçükse böbrekler yoluyla hızla vücuttan atılır (55).

Nanocihazlar

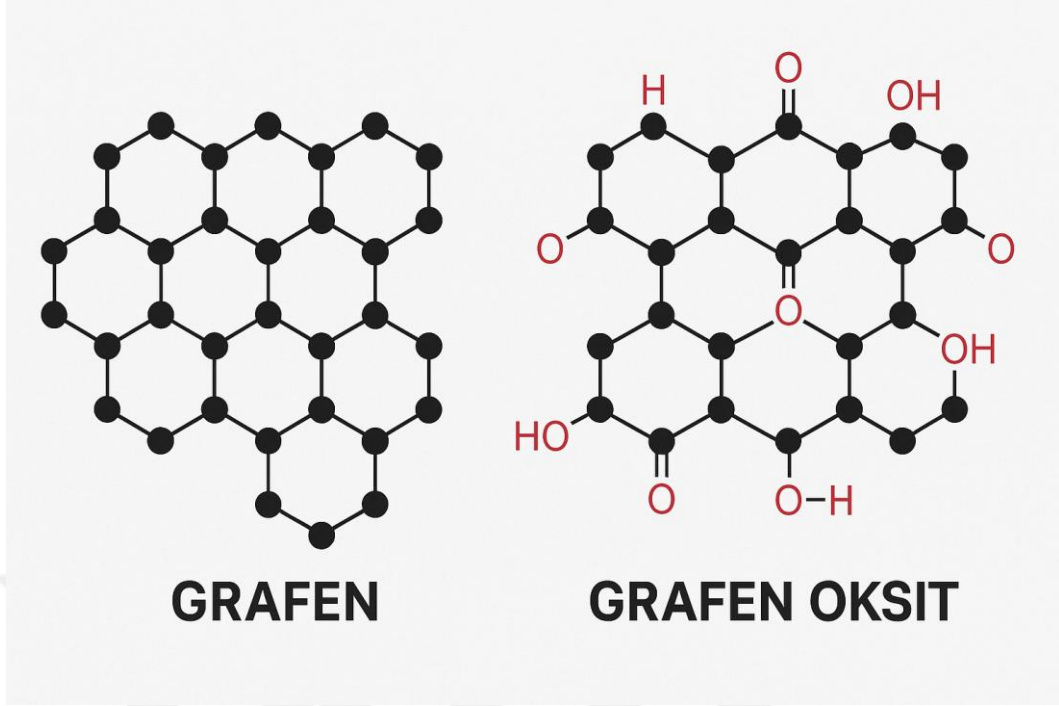
Biyosensörler günümüzde hedef tanımlama, doğrulama, test (assay) geliştirme, aday ilaç optimizasyonu ve emilim, dağılım, metabolizma, atılım ve toksisite (ADME-Tox) gibi alanlarda kullanılmaktadır. Bu sensörler, çözünebilir moleküllerle yapılan uygulamalara en uygun olanlardır ve hücre tabanlı testler karşılaşılan birçok sınırlamayı aşarlar. Özellikle, reseptörlerin incelenmesinde oldukça kullanışlıdırlar çünkü diğer test yöntemlerinde gerekebilecek şekilde reseptörün hücrenin lipid zarından ayrılmasına ihtiyaç duymazlar. Mevcut biyosensör teknolojilerinin başlıca kullanım alanlarından biri, sınırlı kapsamlı ilaç kütüphanelerinin belirli hedeflere karşı optimize edilmesidir. Biyolojik örneklerdeki telomeraz aktivitesinin hızlı taramaları için, manyetik nanoparçacıklara dayalı yeni bir nanobiyosensör geliştirilmiştir. Bu teknikte, telomeraz tarafından sentezlenen TTAGGG tekrar dizilerine bağlandıklarında manyetik durumlarını değiştiren nanoparçacıklar kullanılır. Bu değişim, manyetik okuyucular tarafından kolaylıkla tespit edilebilmektedir. Bu tekniğin, tespitte manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kullanılarak yüksek verimli bir uyarlaması sayesinde, yüzlerce örnek onlarca dakika içinde ultra yüksek hassasiyetle işlenebilmektedir. Bu çalışmalar, telomeraz aktivitesini hızlı bir şekilde tespit edebilen yeni ve güçlü bir aracı ortaya koymakta ve benzer manyetik nanoparçacıkların canlı organizmalarda (in vivo) algılama amacıyla geliştirilmesi için bilimsel bir temel sunmaktadır. Çünkü telomeraz düzeylerinin birçok kanser türünde yüksek olduğu bilinmektedir, bu teknik hem tanı koymada hem de terapötik müdahalede cazip bir hedefe erişim sağlamaktadır.

Küçük moleküllerin proteinlere özgü bağlanmalarını hızlı ve doğrudan analiz etmeyi mümkün kılan miniaturize cihazların geliştirilmesi, yeni ilaçların taranması ve keşfi açısından önemli olabilir. ATP'nin Abl proteinine bağlanmasını engelleyen küçük moleküllerin, etiketleme gerektirmeyen, hassas ve doğrudan elektriksel tespitine olanak sağlayan silikon nanotel alan etkili transistör cihazlarıyla ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmacılar, kronik miyeloid lösemiden sorumlu olan sürekli aktif protein tirozin kinaz Abl'yi, mikroakışkan kanallar içindeki silikon nanotel yüzeylerine kovalent olarak bağlayarak aktif elektriksel cihazlar oluşturmuşlardır. ATP'nin konsantrasyona bağlı bağlanmasını ve bu bağlanmanın Gleevec® adlı rekabetçi küçük molekülü bir antagonistle

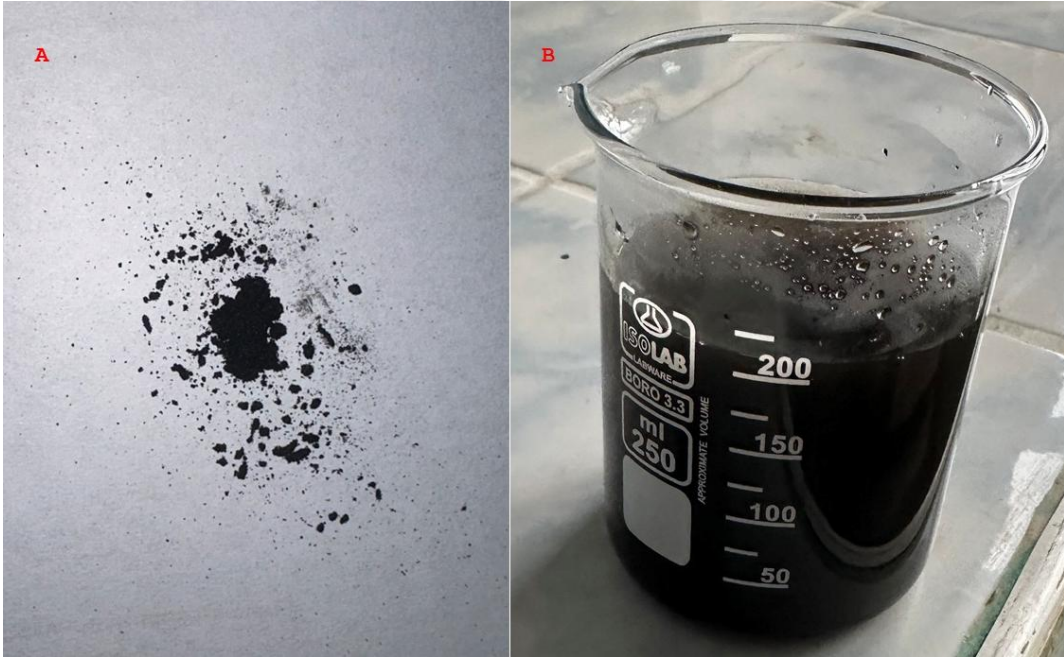
inhibisyonunu, nanotel iletkenliğini izleyerek değerlendirmişlerdir. Ayrıca, dördü daha önce bildirilen veya bildirilmemiş inhibitörler olan küçük moleküllerle ATP bağlanmasının konsantrasyona bağlı inhibisyonu da incelenmiştir. Bu çalışmalar, silikon nanotel cihazlarının farklı küçük molekülü inhibitörlerin bağlanma güçlerini kolayca ve hızla ayırt edebildiğini göstermiştir. Böylece, bu cihazlar ilaç keşfi için bir teknoloji platformu olarak kullanılabilir hale gelmiştir (55-57).

2.6. Grafen Oksit (GO)

Grafen Oksit (GO), doğal grafit veya karbon nanoliflerin güçlü oksidanlarla kimyasal oksidasyonu yoluyla elde edilen karbon bazlı bir nanomalzemedir. Bu malzeme, saf grafenden çok daha önce bilinmekteydi ve grafenin en önemli öncül malzemelerinden biri olarak kabul edilmektedir. GO, oksijenli (O) fonksiyonel gruplar içerdiğinden dolayı, grafen elde etmek için termal veya kimyasal işlemlerle indirgenmelidir. Ancak, bu işlemler grafenin yapısını tamamen geri kazandırmaz ve bazı oksijen grupları bazal düzlemde kalmaya devam ederek grafen oksidin özelliklerini değiştirir. Bu yeni malzeme, indirgenmiş grafen oksit (rGO) olarak adlandırılır ve iletken elektrotlar, ışık yayan diyotlar ve fotovoltaiik hücreler gibi uygulamalarda bileşen olarak kullanılabilir. Biyosensör, mürekkep tasarımı, ilaç taşıma vektörleri veya biyo-görüntüleme gibi uygulamalarda ise grafen oksit, oksijen gruplarının polimerler, nanoparçacıklar veya diğer moleküllerle bağ yapabilmesi sayesinde çeşitli avantajlar sunar. Bu sayede, farklı uygulamaların ihtiyaçlarına göre yeni malzemelerin özellikleri ayarlanabilir. Ayrıca, O-grupları grafen okside suda dağılılabileme özelliği kazandırır; bu da biyomedikal uygulamalarda önemli bir özelliktir (58-68).



Resim 2. Grafen ve Grafen oksitin moleküler yapısı



Resim 3. Grafen oksitin partiküler yapısı (A), salinle süspanse edilmiş görüntüsü (B)

Grafen oksidin ilk sentezi 1859 yılında Brodie tarafından gerçekleştirilmiştir. Brodie, grafit ve dumanlı nitrik asit karışımını, potasyum perklorat eşliğinde, 60 °C sıcaklıkta üç ila dört gün süreyle reaksiyona sokmuştur. Elde edilen malzeme yıkanmış, oksidasyon işlemi dört kez tekrarlanmış ve sonunda katı madde 100 °C’de kurutulmuştur. Elde edilen açık sarı

renkli katı maddenin C:H:O oranı şu şekildeydi: %61,04 karbon, %1,85 hidrojen, %37,11 oksijen. Bu katı madde su veya bazik sulu çözeltilerde dağılabiliyordu ve Brodie bu maddeye “grafik asit” adını vermiştir (69).

Staudenmaier, sentez yöntemini geliştirerek, potasyum perkloratı az miktarda eklemiş ve sülfürik asitle asitlendirme işlemi uygulamıştır. Bu yöntem, Brodie’nin elde ettiği ile aynı C/O oranını sağlarken, tekrarlanan oksidasyon adımlarını ortadan kaldırmıştır. Birkaç yıl sonra Hofmann, dumanlı nitrik asit yerine duman yapmayan nitrik asidi kullanmıştır. 1958’de ise Hummers ve Offeman, nitrik asit yerine potasyum permanganat ve konsantre sülfürik asit ile sodyum nitrat karışımını kullanarak yeni bir oksidasyon yöntemi geliştirmiştir. Bu yöntem, nitrik asidi reaksiyon sırasında yerinde (in situ) üretmekte olup günümüzde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (70-72).

Zehirli gazların (NO_2 ve N_2O_4) oluşumunu önlemek amacıyla, Tour bu yöntemdeki sodyum nitratı fosforik asitle değiştirmiştir. Yazarlar, bu yöntemin Hummers yöntemine kıyasla daha fazla oksitlenmiş GO elde ettiğini ve bazal düzlemin daha sağlam kaldığını belirtmişlerdir. Bu yöntemler yıllar boyunca birbirinin yerine kullanılmış, GO’nun özelliklerinin neredeyse aynı olduğu varsayılmıştır. Ancak, grafen oksitler X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), Raman spektroskopisi ve elektrokimyasal tekniklerle karakterize edildiğinde, oksijenli fonksiyonel gruplar ve elektron transfer hızları arasında büyük farklılıklar gözlenmiştir. Bu bulgular, farklı oksidasyon yöntemleriyle elde edilen grafen oksitler arasında büyük yapısal ve fonksiyonel farklar olduğunu ortaya koymuştur (73-75).

Tüm bu yöntemlerde başlangıç materyali olarak grafit kullanılmıştır; ancak, yakın zamanda yapılan çalışmada, aynı sentez yöntemi (Hummers yöntemi) kullanılsa bile başlangıç materyalinin değiştirilmesiyle grafen oksit levhalarının kimyasal bileşimi, yüzey yük yoğunluğu ve boyutunun ayarlanabileceği bildirildi. Buna göre, başlangıç malzemesi ve oksidasyon yöntemi, her uygulamanın ihtiyaçlarına uygun grafen oksit elde etmek için dikkatle seçilmelidir (76,77).

GO’nun sentezi 100 yıldan uzun süredir bilinmesine rağmen, yapısı hâlâ tartışma konusudur. Bunun nedeni, stekiyometrisinin (bileşim oranlarının) kullanılan başlangıç malzemesine ve uygulanan oksidasyon protokolüne bağlı olarak değişmesidir (76-79).

Grafen oksidin yapısı, bazal düzlemine çeşitli oksijen gruplarının bağlandığı grafen tabakalarından oluşur. ^{13}C ve ^1H sihirli açı dönmeli nükleer manyetik rezonans (MAS NMR)

ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) çalışmaları bu oksijen gruplarını hidroksil, karbonil, epoksi ve karboksil grupları olarak tanımlamıştır. En çok kabul gören model, Lerf ve Klinowski tarafından önerilmiş olup, karboksil ve keton gruplarının esas olarak tabakaların kenarlarında yer aldığını, 1,2-epoksi ve hidroksil gruplarının ise bazal düzleme bağlandığını öne sürmektedir. Yakın zamanda yapılan taramalı geçirimli X-ışını mikroskopisi (STXM) ve yüksek çözünürlüklü kenar yakınındaki X-ışını soğurma ince yapı (NEXAFS) spektroskopisi deneyleri, Lerf ve Klinowski tarafından önerilen GO yapısını doğrulamıştır (76, 80-83).

Son zamanlarda, grafen oksidin yapısı yeniden ele alınmıştır; çünkü grafit, nanotüpler ve diğer karbon bazlı malzemelerin oksidasyonunun, oksidatif kalıntılar (oxidative debris) (OD) olarak adlandırılan yüksek oranda oksitlenmiş organik parçacıklar oluşturduğu kanıtlanmıştır. Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi ile belirlenen OD bileşimi $C_{19}H_{35}O_6$ ve $C_{18}H_{33}O_9$ şeklindedir. Bu yüksek oranda oksitlenmiş parçacıklar, π - π etkileşimi yoluyla grafen oksit tabakalarına emilir ve alkali yıkama ile uzaklaştırılabilir (67,84).

Alkali yıkama ile saflaştırılan grafen oksit, saflaştırılmamış malzemeye göre daha az oksijenli grup içerir ve oldukça farklı yapısal özellikler sergiler. Ayrıca, grafen oksit tabakalarına emilmekte olan OD'nin, elektriksel iletkenliği yaklaşık beş mertebe azaltabildiği ve GO'nun suda dağılılabilirliğini artırdığı gösterilmiştir. Bunun yanı sıra, OD aynı zamanda grafen oksidin spektroskopik özelliklerini de değiştirir (76, 84-88).

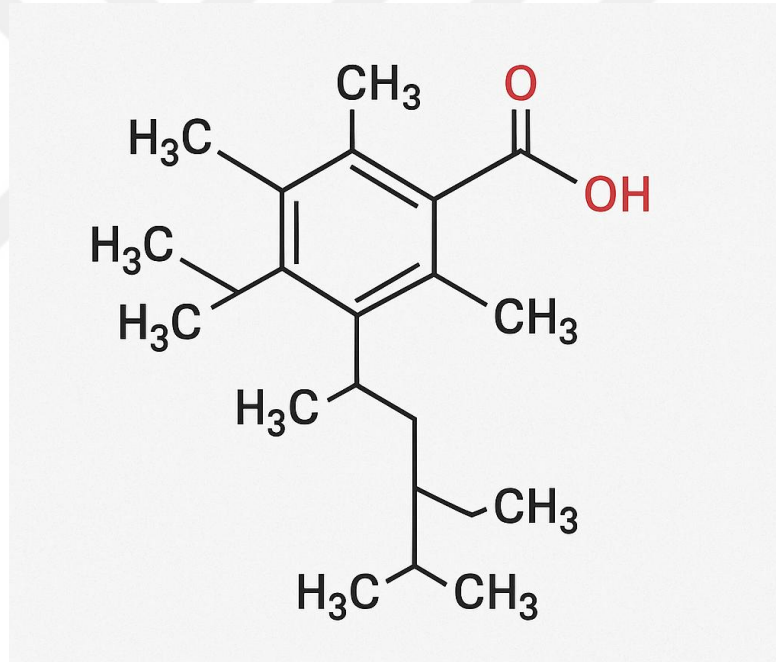
Bütün bu bilgiler ışığında görülmektedir ki; GO biyoteknolojik uygulamalara ve manipülasyonlara oldukça elverişli ve bu alandaki çalışmalarda kullanılması muhtemel ve avantajlı bir nano materyal olarak öne çıkmaktadır. Bu sebeple gelecekte sağlıkla ilgili birçok alanda kullanılması muhtemel olan GO'nun canlı üzerinde oluşturacağı etkiler merak uyandırmakta ve önem taşımaktadır. Literatürde sabit GO'nun canlı organizmalara etkisi ile alakalı çalışmalara bakıldığında; GO'nun intravenöz, intratrakeal, intraperitoneal enjeksiyonlar ya da oral yolla besinlere karıştırılarak verilmesi durumlarında dokularda çeşitli zararlara yol açabildiğine dair çalışmalar mevcuttur (8-13).

2.7. E Vitamini

E vitamini, ilk olarak 1922 yılında Evans ve Bishop tarafından keşfedilen ve sıçanların üreme fonksiyonlarındaki rolü nedeniyle başlangıçta “faktör X” veya “anti-kısırlık faktörü” olarak adlandırılan temel bir besin maddesidir. 1924 yılında Sure, bu

bileşiğı “E vitamini” olarak sınıflandırmıştır çünkü A, B, C ve D vitaminleri halihazırda tanımlanmıştı. On iki yıl sonra, Evans ve arkadaşları E vitaminini buğday tohumu yağından izole ederek “ α -tokoferol (α -TocH)” adını vermişlerdir. Bu isim, Yunanca tocos (doğum), phero (taşımak) ve ol (Etanol) kelimelerinden türetilmiştir. α -TocH’un kimyasal yapısı ve sentez yöntemi ise 1938 yılında geliştirilmiştir (16, 89-93).

Buna karşılık, doymamış E vitamini türü olan ve izoprenoid yan zincir içeren toko-trienol, ilk olarak 1966 yılında Whittle ve arkadaşları tarafından kauçuk ağacı (*Hevea brasiliensis*) lateksinden izole edilmiştir. E vitamini ailesi, dört tokoferol (α -, β -, γ - ve δ -tokoferol) ve dört toko-trienol (α -, β -, γ - ve δ -toko-trienol) olmak üzere sekiz izomer içerir. Tokoferol ve toko-trienollerin farklı izomerik formları, kromanol halkasındaki metil gruplarının sayısı ve konumuna bağlıdır (94-98).



Resim 4. E vitaminin moleküler yapısı

E vitamini ailesi insan vücudu tarafından sentezlenemediğinden, bu besinler mutlaka dışarıdan, yani diyetle alınmalıdır. Son dönemde yapılan araştırmalar, E vitamininin insan sağlığı üzerinde birçok potansiyel yararlı etkisi olabileceğini ortaya koymuştur. Bunlar arasında: anti-alerjik (99), anti-aterojenik (100), anti-kanser (101-103), anti-diyabetik (104), anti-lipidemik (105,106), anti-hipertansif (107), anti-inflamatuvar (108), anti-obezite (109),

nöroprotektif (110) ve telomeraz aktivitelerinin düzenlenmesi (111), sperm kalitesini arttırıcı ve testis gelişimine olumlu katkı sunan (19) etkiler yer almaktadır.

E vitamininin başlıca diyet kaynakları bitkisel yağlardır. Kuruyemişler de E vitamini açısından iyi kaynaklardır. Soya, ayçiçeği, mısır, ceviz, pamuk tohumu, palmiye, buğday tohumu yağları, diğer yağlara kıyasla daha yüksek miktarda (yaklaşık 100 g yağda 50 mg'dan fazla) E vitamini içerir.

Yağ türüne bağlı olarak α -, β -, γ - ve δ - tokoferol oranları farklılık gösterir:

- Aspir ve ayçiçeği yağları $\rightarrow$ yüksek oranda α - tokoferol içerir,
- Soya ve mısır yağları $\rightarrow$ çoğunlukla γ - tokoferol içerir,
- Pamuk tohumu yağı $\rightarrow$ α - ve γ - tokoferol açısından benzer oranlara sahiptir.

Bu nedenle, diyetle tüketilen yağ türleri, bireylerin α - tokoferol alım düzeylerini doğrudan etkiler. E vitamini takviyeleri oldukça popülerdir ve bazı topluluklarda E vitamini alımına önemli katkı sağlar. Takviyelerde hem doğal hem de sentetik α - tokoferol formları kullanılır.

Her ne kadar diyetle γ - tokoferol alımı α - tokoferolden daha fazla olsa da dolaşımdaki başlıca E vitamini formu α - tokoferoldür. Bunun nedeni, α - tokoferol transfer proteini (α - TTP)'nin, α - tokoferole özel olarak yüksek bağlanma eğilimi göstermesidir. α - TTP, α - tokoferolün plazma zarına taşınmasında rol oynar (97, 112, 113).

E vitamini, başlıca yağda çözünen antioksidanlardan biridir ve peroksil radikalleri temizleyerek çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA'ların) oksidasyonunu durdurur. E vitamini varlığında, peroksil radikalleri lipid hidroperoksit yerine α - tokoferol ile reaksiyona girer; böylece peroksil radikal üretiminin zincirleme reaksiyonu durdurulur ve hücre zarındaki PUFA'ların daha fazla oksidasyonu önlenir.

Tokoferoksil radikalleri, α - tokoferol ile peroksil radikallerinin etkileşimi sonucu oluşur. Bu radikaller, C vitamini veya glutatyon tarafından indirgenebilir, tokoferol dimerleri oluşturabilir, daha fazla okside olabilir ya da pro-oksidan (oksidan etkili) davranabilirler.

E vitamininin antioksidan aktivitesi, sinyal iletiminde görevli çeşitli enzimlerin düzenlenmesinden sorumlu olabilir. Çünkü bu enzimlerin aktivitesi, hücrenin redoks durumuna bağlı olarak düzenlenir.

E vitamini, protein kinaz C (PKC) enzimini protein fosfataz 2A'yı aktive ederek PKC'nin defosforilasyonunu artırmak suretiyle inhibe eder. E vitamini ile PKC inhibisyonu çeşitli hücrelerde bildirilmiştir. Bu durumun sonuçları şunlardır:

- Trombosit agregasyonunun (pıhtılaşma) inhibisyonu,
- Monosit, makrofaj, nötrofil ve damar düz kas hücrelerinin proliferasyonunun azalması,
- Nötrofiller ve makrofajlarda süperoksit üretiminin azalması.

E vitamini, ayrıca lipid mediatörlerinin üretiminde görevli enzimlere ya da sinyal iletiminde görevli taşıyıcı proteinlere doğrudan bağlanabilir. Ayrıca, zar proteinlerinin etkileşimlerini ve bu enzimlerin plazma zarına taşınmasını etkileyerek, sinyal iletim enzimlerinin aktivitesini değiştirebilir (112, 114, 115).

Besin yoluyla alınan E vitamini formları, bağırsak mukozasından serbest fenolik formda emilir; çünkü ester formları, emilimden önce pankreatik esterazlar tarafından hidrolize edilir. E vitamini formları, şilomikronlara dahil edilerek lenfatik sistem yoluyla subclavian vene oradan da karaciğere taşınır. Diyetle alınan yağ hem E vitamini emilimini hem de lenfatik sisteme transferini teşvik eder.

Farklı E vitamini formlarının karaciğere alımı muhtemelen özgül olmayan bir süreçtir, ancak bu formların karaciğerden çok düşük yoğunluklu lipoproteinlere (VLDL) aktarımı, özgül bir α -T transfer proteini (α -TTP) tarafından gerçekleştirilir. Karaciğerde bulunan α -TTP, özellikle α -tokoferolü (α -T) VLDL'ye tercihi olarak aktarır ve bu nedenle α -T, dolaşıma öncelikli olarak salınır ve karaciğer dışı dokulara taşınır.

γ -T, δ -T ve tokotrienoller, α -TTP'ye daha düşük bağlanma afinitesine sahip olduklarından, bu formlar karaciğerden VLDL'ye daha az verimli bir şekilde aktarılır. Bu nedenle, bu E vitamini formlarının kan ve dokulardaki oranları daha düşüktür ve büyük bir kısmı karaciğer ve diğer organlarda parçalanır (yıkıma uğrar).

İnsan serum plazmasındaki α -T düzeyi genellikle 20 ila 25 μ M (8,6-10,8 mg/L) arasında değişirken, γ -T düzeyi çok daha düşüktür ve genellikle 1 ila 3 μ M seviyesindedir. Ancak, γ -T ve δ -T3 takviyesi alındığında, bu bileşiklerin plazma konsantrasyonu sağlıklı bireylerde sırasıyla 20 μ M'nin ve 5 ila 10 μ M'nin üzerine çıkabilir (96, 116-118).

2.8. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Canlı hücreler, dışsal (eksojen) ya da içsel (endojen) olarak üretilen son derece reaktif oksitleyici moleküllerin zararlı etkilerine sürekli olarak maruz kalırlar. Bu moleküller radikal ya da radikal olmayan (örneğin H_2O_2) yapıda olabilir; ancak ortak özellikleri, temas ettikleri moleküllerden kolayca elektron alabilmeleri (oksitleyebilmeleri) ve bu sayede tüm hücrel biyomoleküllerle etkileşime girerek zincir reaksiyonları başlatmaları ve nihayetinde hücre yapısında hasara yol açmalarıdır.

Bu molekül sınıfları arasında, reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türlerinden (RNS) türeyenler biyolojik olarak en büyük etkiye sahiptir. Çünkü bu moleküller hücre içinde en yüksek yoğunlukta üretilenlerdir. Bu nedenle, oksidatif stres kavramı daha geniş bir çerçevede değerlendirilerek “nitro-oksidatif stres” şeklinde de adlandırılabilir (119,120).

Terimin erken kullanımı 1956 yılında kauçuk kimyası alanında başlamış gibi görünmektedir. 1970 yılında, “hücreler oksidatif strese maruz bırakıldı” ifadesi, eritrositlere H_2O_2 (hidrojen peroksit) eklenmesini tanımlamak için kullanılmıştır (10, s. 456). 1985 yılından itibaren ise terim, hücrelere ve organlara yönelik oksidatif hasarı ifade etmek için kullanılmaya başlanmıştır.

Oksidatif stres kavramı ilk kez 1985 yılında yayımlanan Oxidative Stress adlı kitabın giriş bölümünde, “pro-oksidan ve antioksidan dengesi pro oksidan lehine bozulduğunda ortaya çıkan bir durum” olarak tanımlanmıştır (12, s. 1). “Biochemistry of Oxidative Stress” başlıklı derleme, pro-oksidanlar ve antioksidanlar ile bunların endojen ve eksojen kaynakları ve metabolik yolları hakkında mevcut bilgileri sunmuştur. Redoks sinyal iletiminin rolünün ortaya çıkmasıyla birlikte, kavramın güncellenmesine ihtiyaç duyulmuş ve bu süreç burada verilen tanımla sonuçlanmıştır.

Pro-oksidan ve antioksidan enzimler ile bileşiklerin çeşitliliği ve geniş yelpazesi göz önünde bulundurularak, oksidatif stresin alt türlerini sınıflandırmaya yönelik girişimlerde bulunulmuş ve fizyolojik oksidatif stres (eustress) ile aşırı ve toksik oksidatif yük (distress) arasında değişen bir şiddet ölçeği kavramsal olarak tanımlanmıştır. Akut, kronik ve tekrarlayan oksidatif stres türleri incelenmiştir. Redoks homeostazi “sağlıklı yaşamın altın ortası” olarak tanımlanmıştır (121).

Oksidatif stresin çağdaş tanımı, iki farklı mekanizmanın sonuçlarını dikkate alacak şekilde yeniden şekillendirilmiştir; makromoleküler hasar ve tiyol redoks devrelerinin

bozulması, bu da anormal hücre sinyallemesine ve işlevsiz redoks kontrolüne yol açar. Makromoleküler hasar genellikle serbest radikallerle ilişkili oksidatif mekanizmalar bağlamında ele alınır. Serbest radikaller, çoğu biyolojik molekülden farklı olarak eşleşmemiş bir elektrona sahip küçük, dağılabilir moleküllerdir. Genellikle reaktiftirler ve zincir reaksiyonlarına katılarak tek bir serbest radikal başlatma olayıyla birçok molekülü hasara uğratabilirler.

Hücre zarlarında bol miktarda bulunan çoklu doymamış yağ asitleri, serbest radikal zincir reaksiyonları yoluyla, iz miktarda metal iyonlarının varlığında O_2 ' ye maruz kaldıklarında oksidatif olarak hasara uğrarlar. Bu süreç lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır. Artırılmış kimyasal sistemlerde yapılan çalışmalar, tek bir başlatıcı olayın, iki radikalın birbirleriyle reaksiyona girip eşleşmemiş elektronlarını ortadan kaldırarak, zincir reaksiyonunu sonlandırmadan önce 200 ila 400 lipid molekülünü oksidatif olarak hasara uğratabileceğini göstermiştir. Erken dönem araştırmalar, karbon tetraklorürün serbest radikale dönüştüğünü, lipid peroksidasyonuna yol açtığını ve karaciğer toksisitesine serbest radikal mekanizmasıyla neden olduğunu ortaya koymuştur (122, 123).

Hücredeki reaktif oksijen türlerinin (ROS) başlıca kaynağının mitokondriyal solunum zinciri olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir. Gerçekten de mitokondriyal kompleksler (özellikle kompleks I ve III), elektron sızdırabilir ve bu durum oksijenin kısmi indirgenmesine yol açarak süperoksit anyonu (O_2^-) oluşmasına neden olur. Bu radikal türü ya kendiliğinden ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi aracılığıyla çok hızlı bir şekilde H_2O_2 ' ye (hidrojen peroksit) dönüşür. Mitokondriler tarafından üretilen ROS miktarının, toplam oksijen tüketim oranının yaklaşık %1–2'si kadar olduğu tahmin edilmektedir.

İlk bakışta bu oran çok düşük gibi görünebilir; ancak insan vücudundaki her bir hücrenin ortalama oksijen tüketim hızı yaklaşık $2,5 \times 10^{-18}$ mol/s (bu da günde $2,2 \times 10^{10}$ molekül anlamına gelir) olduğundan, hücre içinde günlük olarak üretilen ROS miktarı yaklaşık 1 milyar moleküle ulaşır. Bu değeri insan vücudundaki toplam hücre sayısı (yaklaşık 50 trilyon) ile çarptığımızda, fizyolojik olarak maruz kaldığımız ROS akısının büyüklüğü hakkında fikir edinmek mümkün olur.

Ayrıca, bazı durumlarda mitokondriyal solunum zincirinden geçen elektron akışı artabilir (örneğin enerji ihtiyacının arttığı zamanlarda) ya da mitokondriyal verimlilik azalabilir (örneğin yaşlanma sırasında). Buna ek olarak, UV ışınları gibi dışsal ve oksidazlar ile oksijenazlar gibi içsel kaynaklardan gelen ROS üretimi de göz önüne alındığında,

hücrel bileşenleri korumak ve mümkün olduğunca muhafaza etmek üzere evrimsel olarak oldukça etkili bir antioksidan yanıt sisteminin seçilmiş olması olası görünmektedir (119, 124).

Bütün bu oksidatif stres kaynaklarına karşı organizmaların kendini savunma sistemi bulunmaktadır. Antioksidanlar, serbest radikalleri dengeleyebilir ve oksidanları nötralize edebilir. Genel endojen antioksidan sistemi, SOD, katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) ve Thioredoxin system (Trx) gibi enzimatik antioksidanlardan; urat, askorbat, glutatyon ve flavonoidler gibi hidrofobik antioksidanlardan; tokoferol, karotenoid ve ubiquinol gibi lipofilik radikal antioksidanlardan oluşur. Antioksidanlar ayrıca kaynaklarına göre sınıflandırılabilir, bunlar arasında endojen sentez (örneğin enzimler ve küçük moleküller) ve dışsal diyetler (örneğin fenolikler, flavonoidler, fenolik asitler, karotenoidler, vitaminler ve mineraller) bulunur (125-128).

Enzimatik antioksidanlar, SOD, CAT, GPx ve Trx sisteminden oluşur. Enzimatik antioksidanlar, ROS'u (reaktif oksijen türleri) parçalama yetenekleri sayesinde aktif ve yoğun oksidatif saldırılara karşı daha etkili koruyucu etkilere sahiptir. Bu nedenle, bu antioksidanlar, akut hiperoksi yaralanması, radyasyon yaralanması, akciğer nakli ve iltihaplanma gibi hastalık durumlarında önemli roller oynar.

SOD ve CAT, canlıda en iyi antioksidanlardır. İnsanlarda bulunan SOD, şu şekilde sınıflandırılabilir: sitozolik CuZn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve ekstrasellüler SOD. SOD, süperoksidi oksijene ve hidrojen peroksite dönüştürebilir. SOD, oksijen kaynaklı serbest radikallere karşı savunmanın ilk hattı gibi görünmektedir ve oksidatif strese maruz kaldığında bazı koşullarda hızla uyarılabilir. CAT, hidrojen peroksidi moleküler oksijen ve suya parçalayarak nötralize edebilir (129-131).

Bunun haricinde enzimatik olmayan antioksidanlara bakılacak olursa, A vitamini veya retinol, karaciğerde üretilen ve β -karotenin parçalanmasından ortaya çıkan bir karotenoiddir. A vitamini, peroksil radikallerini, lipidlerde peroksidasyonu yaymadan önce doğrudan bağlayabilir. CoQ10, lipid peroksil radikallerinin oksidatif etkisini nötralize edebilir ve E vitaminiyle yeniden üretilir. C vitamini, süperoksit radikal anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikali, tekli oksijen ve reaktif azot oksidi temizlemede etkilidir. E vitamini, lipid peroksidasyonunu durduran 8 izoformu olan bir bileşiktir. E vitamini, fenolik hidrojeni peroksil radikallerine bağışlayarak, oksidatif zincir reaksiyonunun devam etmesini

engelleyen, reaktif olmayan tocopheroxyl radikalleri oluşturur. E vitamini, C vitamini aracılığıyla yeniden üretilebilir, böylece antioksidan potansiyellerini sürdürebilirler.

Mineraller, diyet antioksidanlarının küçük bir kısmını oluşturur. Antioksidan işlevi olan en önemli mineraller selenyum ve çinkodur. Mineraller, enzimlerin aktivite bakımının önemli olduğu antioksidan enzimlerin bileşenleridir. Çinko, NADPH oksidazlarının inhibitörüdür, bu enzimler, NADPH'yi bir elektron donörü olarak kullanarak oksijenden tekli oksijen radikalinin üretimine katalizörlük eder. Çinko aynı zamanda, tekli oksijen radikalini hidrojen peroksite dönüştüren önemli bir antioksidan enzim olan süperoksit dismutazın bir bileşenidir. Çinko, hidroksil radikalinin temizleyicisi olan metalloproteinin üretimini teşvik eder. Çinko ayrıca, TNF- α tarafından tetiklenen NF- κ B aktivasyonunu inhibe eden etkili bir anti-inflamatuar ve antioksidan ajan olarak da görev yapar (132-137).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Planı

3.1.1. Etik Kurul Onayı ve Proje Desteği

Bu araştırma Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanan çalışma (Tarih: 07/12/2022; Karar No: 5; Dosya No: 2022/53) ve KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından da desteklenmiştir (Proje No: TDK-2023-10702).

3.1.2. Sıçanların Temini ve Bakımı

Çalışma için temin edilen hayvanlar KTÜ Cerrahi Araştırma Merkezi'nden (KTÜCAM) sağlanmıştır. Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar, doğumlarından 21 gün sonra anne sütünden kesildiklerinde dişi ve erkek olarak ayrıt edildiler. Çalışma için 32 erkek sıçan kullanıldı. Erkek sıçanlar rastgele gruplara ayrılarak tartıldı ve deneye dahil edildiler. Çalışma süresince sıçanlar KTÜCAM'da muhafaza odası diye adlandırılan odada, diplerine odun talaşı serilerek, Tip III sıçan kafeslerinde tutuldular (Resim 7). Standart şartlar (22 ± 2 °C sıcaklık, $50\% \pm 10$ nem ve 12'şer saatlik aydınlık ve karanlık döngüde) tutulan sıçanlar sadece deney uygulama sırasında odadan çıkarıldılar. Sıçanlar deney sonlanıncaya kadar standart sıçan yemi ve musluk suyuna serbest ulaşım sağlayacakları şekilde tutuldular. Çalışma süresince hayvanlar bu yem ve musluk suyu dışında herhangi bir yiyecek ya da içecek beslenmedi. Sıçan bakımı, deney uygulamaları ve sakrifikasyon işlemleri KTÜCAM'da gerçekleştirildi.



Resim 5. Sıçanların deney süresince içerlerinde tutulduğu kafesler

3.1.3. Sıçanın Gruplandırılması

Çalışmaya dahil edilen 32 sıçan önce tartıldı sonra da rastgele gruplandırıldı. Hayvanlar rastgele seçilerek 4' e bölündü ve her gruba 8 hayvan düşecek şekilde gruplandırma yapıldı. Buna göre; Kontrol (n=8), GO (n=8), E vit(n=8) ve GO+E vit(n=8) olmak üzere gruplar belirlendi. Grupları ve gruplara uygulanan işlemler tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2. Hayvan gruplandırması ve yapılan işlemler

Gruplar/İşlemler	Gavaj (E Vit)	İntraperitoneal enjeksiyon (GO)
Kontrol (n=8)	-	-
E Vit (n=8)	+	-
GO (n=8)	-	+
GO+E Vit (n=8)	+	+

Kontrol grubuna ait hayvanlara deney süresi boyunca, diğer gruplara uygulanacak işlemlerin stres faktörünü ortadan kaldırmak için uygulamalar yapıldı. Buna göre; bu gruba 15 gün boyunca birer gün ara ile toplamda 7 kere olacak şekilde oral gavaj yoluyla zeytinyağı ve intraperitoneal (ip) yolla serum fizyolojik (SF) verildi. Diğer gruba ait hayvanlara tabloda belirtilen işlemler birer gün ara ile uygulama odasında uygulandı; daha sonra hayvanlar saklama odalarına geri alındı.

3.1.4. Deney Prosedürlerinin Uygulanması

Kontrol grubuna ait sıçanlara deney süresi boyunca prosedüre uygun şekilde saklama odalarından çıkartılıp işlem odasında 15 gün boyunca birer gün ara ile toplamda 7 kere olacak şekilde oral gavaj yoluyla zeytinyağı ve intraperitoneal yolla SF verildi. Uygulamanın ardından deney hayvanları kafeslerine konarak saklama odalarına geri götürüldü.

Antioksidan grubu hayvanlar, deney prosedürüne uygun olarak her gün aynı saatte (10:00-12:00) saklama odasından işlem odasına getirildi ve bunlara oral gavaj yoluyla 15 gün boyunca, birer gün arayla, toplamda 7 doz zeytinyağında çözünmüş (1 ml/kg), E Vitamini (100 mg/kg) verildi (Resim 6).



Resim 6. Sıçanlara gavaj yoluyla E vitamini verilışı

GO grubuna ait hayvanlar, günün aynı saatlerinde (10:00-12:00), toplamda 7 doz olmak üzere birer gün ara ile 15 gün boyunca uygulama odasına alındı ve literatüre göre hesaplanan salinde süspanse edilmiş yüksek doz GO (500 mg/L), (10 mg/kg) intraperitoneal olarak verildi (Resim 7).



Resim 7. Sıçanlara intraperitoneal GO enjeksiyonu

Tedavi grubuna ait hayvanlar deney prosedürüne uygun olarak her gün aynı saatte (10:00-12:00) toplamda 7 doz olmak üzere birer gün ara ile 15 gün boyunca saklama odasından işlem odasına alındı; önce salinde süspanse edilmiş yüksek doz GO (500 mg/L, 10 mg/kg) intraperitoneal olarak verildi, ardından oral gavaj yoluyla zeytinyağında çözünmüş (1 ml/kg), E Vitamini (100 mg/kg) verildi.

3.2. GO'nun Karakterizasyonu

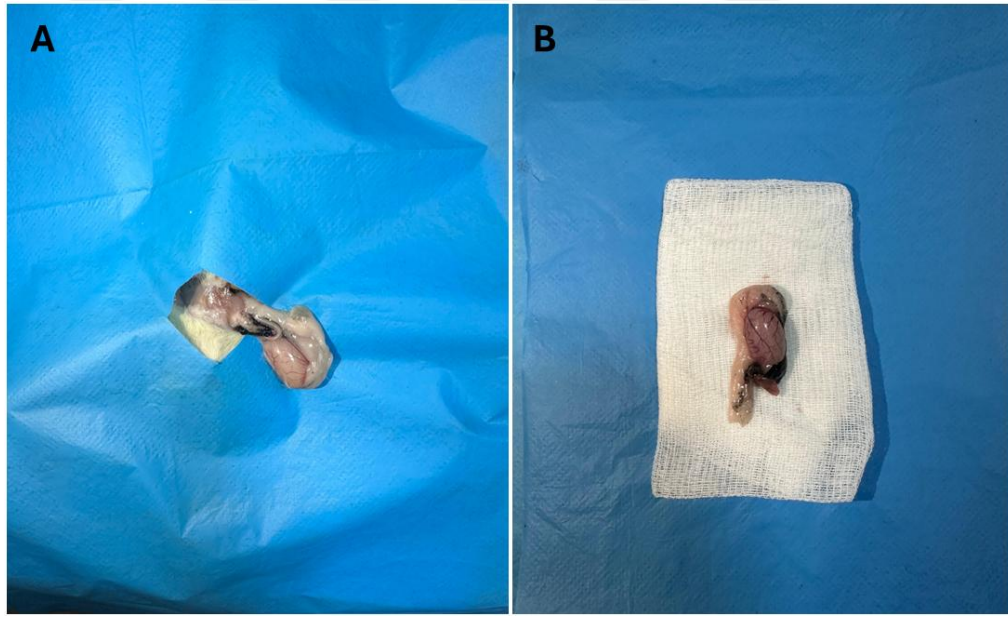
Çalışmamızda kullandığımız GO'nun karakterizasyonu için GO'dan alınan numuneye iki işlem uygulanarak literatürdeki çalışmalarda kullanılan GO ile uyumluluğu karşılaştırıldı. Bu minvalde; GO'nun kristal yapısını analiz etmek için kullanılan X-ışını kırınımı (X-ray diffraction) (XRD) (PANalytical X'Pert3 Pro, Hollanda) tekniğiyle, malzemenin yapısal kimliği analiz edilirken, nano parçacıklı yapısının tespiti içinse Scanning

Electron Microscopy (SEM) (Thermo Scientific Apreo 2S, Hollanda) incelemesi gerçekleştirildi.

3.3. Histolojik İşlemler

3.3.1. Testis Dokusunun Temini

Deney sürecinin ardından her gruba ait hayvanlar sırayla işlem odasına getirilerek sakrifiye edildi. Abdomen bölgesinden önce deri daha sonra periton açıldı, akabinde testis dokusu etrafındaki yağ dokusundan pensle nazikçe tutularak çıkarıldı, hayvanların sol testisleri histopatolojik değerlendirme için sağ testis ise biyokimyasal değerlendirme için alındı, etrafındaki yağ dokuları temizlendi, epididimis dikkatlice testis dokusundan spermiyogram için ayrıldı.



Resim 8. Testislerin çıkarılması. A; testisin çıkartılması, B; çıkarılan testisin izole edilmesi (GO grubuna ait)

3.3.2. Testis Dokusunun Takibi

Çıkarılan testis ekvator bölgesi boyunca ince bir iğne ile kapsülü geçecek kadar delinerek solüsyonun organ içerisine girmesi sağlandı. Aynı işlem organın alt ve üst kutup bölgesine de uygulandı. Delme işleminden sonra testisler her grup için ayrı ayrı hazırlanmış Davidson fiksatifine (DF) doku kasetleri içerisinde konuldu. Akabinde 24 saat geçtikten sonra dokular %10'luk Formaldehit solüsyonuna konularak 3 gün daha bekletilerek

fiksasyonu tamamlandı. Ardından dokular solüsyonlardan çıkartılarak kasetlerle beraber doku takip cihazına (Thermo Scientific Excelsior AS, İngiltere) konuldu. Doku takip prosedürü Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Doku takip prosedürü

İşlem	Süre
Formaldehit	1 saat
Etanol (30°C)	50 dakika
Etanol (30°C)	1 saat
Etanol (30°C)	1 saat
Etanol (30°C)	1 saat
Etanol (30°C)	1 saat
Etanol (30°C)	1,5 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Ksilen (30°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1 saat
Parafin (58°C)	1,5 saat

3.3.3. Sperm Analizi

Epididimis dokularından çıkarılan sperm hücrelerinin vitalite ve motilitesini değerlendirmek için; önceden hazırlanmış ve 37 °C' ye ısıtılan 2 ml tris tamponu (tris-hydroxymethylaminomethane) (138) içeren petri kaplarına alınan dokular kullanıldı. Diseksiyon esnasında çıkartılıp bu petri kaplarına konulan epididimis dokuları diseksiyon odasından değerlendirmenin yapılacağı laboratuvara avuç içerisinde ısısı muhafaza edilerek getirildi. Yine aynı ısıyı ayarlayan ısıtma tablası üzerinde petri kabı içerisinde epididimis dokusu iki lam aracılığıyla nazikçe parçalanarak spermelerin dışarı çıkması sağlandı. Tampona geçen sperm hücrelerinin aynı petri kabında ve aynı ısıya sahip etüv içerisinde 30 dk inkübasyonu sağlandı.

Motilite değerlendirmesi için inkübasyonda tris tamponu ile bekletilen örnekten 5 µl alınarak Makler sayım kamarasına konuldu. Motil ve immotil spermeler ışık mikroskobu

(Olympus BX-51) aracılığıyla 200X büyütmede 10 kare içerisinde hesaplandı. Spermilerin motil ve immotil toplam sayısı 10^6 / ml olacak şekilde total sperm sayısı belirlendi.

Yine petri kabından tris tamponu ve sperm sıvısı karışımından 10 µl alınarak üzerine 20 µl eozin y damlatıldı ve 15 sn boyunca karışmaları sağlandı. Bu karışımdan alınan 10 µl'lik örnekler aynı ışık mikroskopunda 400X büyütme altında canlı ve cansız hücre değerlendirmesi yapmak için 50 hücre sayıldı. Sonuç olarak sperm hücrelerinin genel morfolojisi, vitalite ve motilitesi değerlendirilerek normal ve anormal hücre sayısı tespit edildi.

3.3.4.Doku Gömme ve Dokulardan Kesit Alma

Doku takip işleminin ardından takip cihazından çıkarılan dokular, doku gömme cihazında (Leica Histo Care Arcadia H, Çin) parafin bloklara gömüldü ve cihazın soğutma kısmında kalıplardan kolay çıkarılabilmesi için soğumaya bırakıldı. Yeteri kadar soğuyan bloklar kalıplardan çıkartılarak kesit alma işlemi gerçekleşinceye kadar +4 °C de tutuldular. Yeteri kadar beklemiş parafin bloklara gömülü dokulardan tam otomatik mikrotom ile (Leica RM 2255, Almanya) 5 µm'lik kesitler alındı.



Resim 9. Kesitlerin elde edildiği otomatik mikrotom cihazı

Kesitler alındıktan sonra parafindeki büzüşmeleri ve kırışıkları gidermek için kesitler, içerisinde 40 °C sıcaklıkta su bulunan benmaride konuldu. Bir süre benmaride tutulan kesitler daha sonra; hematoksin & eozin (H&E), Masson trikrom, periyodik asit-

Schiff (PAS) ve TUNEL boyamaları yapılmak üzere, birer tanesi pozitif şarjlı olacak şekilde, lamlara alındı.

3.3.5. Kesitlerin Boyanması

Lamlar üzerine alınan 5 µm'lik kesitlerin bir kısmı ile testis dokusundaki genel histopatolojik değerlendirme için hematoksilin-eozin (H&E) boyaması yapıldı. Boyama, her gruptan alınan preparatların zembillere dizilerek otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) Tablo 4'teki prosedüre göre boyanması ile gerçekleştirildi. Boyaması tamamlanan preparatlar kapatma medyumunu ve lamelle kapatıldıktan sonra kurumaya bırakıldı. Ardından KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan dijital fotoğraf ataçmanlı (Olympus, DP 71, Japonya) ışık mikroskobu (Olympus BX 51, Japonya) ile incelenip değerlendirilmeler yapıldı.

Tablo 4. Hematoksilen & Eozin boyama protokolü

İşlem	Süre
Fırın (60°C)	45 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100 Etanol	5 dakika
%96 Etanol	5 dakika
%70 Etanol	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Hematoksilen	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Asit Etanol	1 saniye
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Amonyaklı Su	10 saniye
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
Eozin	1,5 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika
%96 Etanol	5 saniye
%100 Etanol	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika

Testis dokusunda apoptozis değerlendirmesi için pozitif şarjlı lamlara alınan 5 µm'lik kesitler önce otomatik boyama cihazında (Leica Autostainer XL, Almanya) tanımlanan ve Tablo 5'te belirtilen prosedürlü deparafinizasyon programında deparafinize edilip daha sonra Tablo 6'daki prosedüre uygun olarak boyandı ve aynı ışık mikroskopunda incelemeye hazır hale getirmek için kapatma işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 5. Deparafinizasyon prosedürü

İşlem	Süre
Fırın (60°C)	45 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
Ksilen	5 dakika
%100 Etanol	5 dakika
%96 Etanol	5 dakika
%70 Etanol	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	1 dakika

Tablo 6. TUNEL boyama protokolü

Adım	İşlem	Süre/Koşul
1	Ksilen	5 dk
2	Ksilen	5 dk
3	%100 Etanol	5 dk
4	%100 Etanol	5 dk
5	%90 Etanol	3 dk
6	%80 Etanol	3 dk
7	%70 Etanol	3 dk
8	TBS veya PBS ile yıkama	5 dk
9	Proteinaz K dilüsyonu (1:100)	20 dk RT
10	PBS yıkama	5 dk
11	%3 H ₂ O ₂ + Metanol (1:10)	5 dk RT
12	PBS yıkama	5 dk
13	TdT Equilibration Buffer	30 dk RT
14	TdT Labeling Reaksiyon Karışımı	1,5 saat 37°C
15	PBS yıkama	5 dk
16	Stop Buffer	5 dk RT
17	PBS yıkama	5 dk
18	Blocking Buffer	10 dk RT
19	Conjugate (1:25, Blocking Buffer ile)	30 dk RT
20	PBS yıkama	5 dk
21	DAB (1:30 dilüe, taze hazırlanmalı)	15 dk RT
22	Distile su ile yıkama	-
23	Metil green boyama	1-3 dk RT
24	%100 Etanol x2	Kurutulur
25	Ksilen x2, entellan ile kapatılır	Kurutulur

Masson trikrom boyama için; normal lamlara alınan 5 µm'lik kesitler aynı cihaz ile deparafinize edildikten sonra kit kullanılarak (Masson trikrom boyama kiti, GBL, Türkiye) kitin kullanım talimatına uygun şekilde boyama gerçekleştirildi. Prosedür Tablo 7'de verilmiştir. Ardından lamalar kapatılarak Masson trikrom boyalı preparatlar aynı ışık mikroskobunda incelemeye hazır hale getirildi.

Tablo 7. Masson trikrom boyama protokolü

İşlem	Süre
Weigert'in Demirli Hematoksileni (A+B)	10 dakika
Kurutma	45 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Pikrik Asit Etanolik Çözeltisi (C)	4 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Gelincik Kızılı Fuksin Çözeltisi (D)	4 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Fosfomolibdik Asit Çözeltisi (E)	10 dakika
Kurutma	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 saniye
Masson Anilin Mavisi Çözeltisi (F)	5 dakika
Distile Su (Yıkama)	30 saniye
%70 Etanol	30 saniye
%96 Etanol	30 saniye
%100 Etanol	30 saniye
Ksilen	1 dakika

PAS boyama için; normal lamlara alınan 5 µm'lik kesitler aynı cihaz ile deparafinize edildikten sonra boyama kiti (PAS McManus Boyama Kiti, GBL, Türkiye) ile verilen prosedüre uygun şekilde boyamalar gerçekleştirilip, aynı ışık mikroskobu ile incelenmek üzere preparatlar kapatılarak incelemeye hazır hale getirildi. Boyama protokolü Tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. Periyodik asit-Schiff (PAS) boyama protokolü

İşlem	Süre
Periyodik asit-Schiff Çözeltisi (A)	10 dakika
Distile Su (Yıkama)	2 dakika
Schiff Ayıracı McManus (B)	20 dakika
Distile Su (Yıkama)	2 dakika
Sodyum Metabisülfid Çözeltisi (C)	2 dakika
Tespit Çözeltisi (D)	2 dakika
Distile Su (Yıkama)	2 dakika
Mayer Hemalum Çözeltisi (E)	3 dakika
Distile Su (Yıkama)	5 dakika
%70 Etanol	30 saniye
%96 Etanol	30 saniye
%100 Etanol	30 saniye
Ksilen	1 dakika

3.3.6. Histopatolojik Değerlendirme

Deney hayvanlarının, deney öncesi ve sakrifiye edilmeden önce ağırlıkları not edildi; akabinde çıkarılan testisler de hassas terazi ile tartıldı ve gerekli kıyaslamalar yapıldı. Bu bağlamda; hayvanların ağırlık değişimleri ve vücut testis oranları belirlenmek suretiyle histopatolojik değerlendirmelere başlandı ve gruplar arası karşılaştırmalar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Histopatolojik değerlendirmeler KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Görüntüleme Laboratuvarı'nda bulunan dijital fotoğraf ataçmanlı (Olympus, DP 71, Japonya) ışık mikroskobu (Olympus BX 51, Japonya) ve Analysis Research (Olympus Soft Imaging Solution, Almanya) programı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3.6.1. Hematoksilen & Eozin Boyalı Preparatlar

Değerlendirme, H&E boyalı preparatların genel histopatolojik değerlendirilmeleri yapılarak başlatıldı. Bu bağlamda; her bir gruba ait deney hayvanına ait boyalı preparatlarda dokunun genel histopatolojik durumu incelenmiş ve tespit edilen bulgular not edilmiştir. Ayrıca modifiye Johnsen skorlaması Tablo 9'daki gibi gerçekleştirildi (139). Histomorfometrik olarak seminifer tübülün çapları, germinal epitelin kalınlığı ve tübül

çapının germinal epitele oranı ve son olarak germinal epitelin lümene dökülme oranı da hesaplanıp veriler kaydedilmiştir. Bu incelemeler için her bir hayvana ait preparatlardan rastgele seçilen 25 seminifer tübül değerlendirilmiştir.

Tablo 9. Modifiye Johnsen skorum kriterleri

Skor	Kriter
10	Tam spermatogenez, birçok spermatozoon
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, birkaç erken spermatid
6	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid
5	Spermatozoa ve spermatid yok, pek çok spermatosit
4	Spermatozoa ve spermatid yok, birkaç spermatosit
3	Sadece spermatogonyum
2	Germinal hücre yok, sadece Sertoli hücreleri
1	Seminifer epitel yok

3.3.6.2. Masson Trikrom Boyalı Preparatlar

Masson Trikrom boyalı preparatlar değerlendirilirken interstisyel bağ dokusunun durumu göz önüne alınarak aşağıdaki gibi skorum gerçekleştirildi.

- 1- Normal bağ doku
- 2- Hafif düzensiz/hasarlı bağ doku
- 3- Orta düzeyde düzensiz/hasarlı bağ doku
- 4- Yüksek düzeyde düzensiz/hasarlı bağ doku
- 5- Çok yüksek düzeyde düzensiz/hasarlı bağ doku

Değerlendirme, her bir deney hayvanından elde edilen preparatlardan rastgele seçilen 25 seminifer tübülde yapıldı.

3.3.6.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preparatlar

PAS boyalı preparatların değerlendirilmesinde göz önünde bulundurulacak unsur; seminifer tübül bazal membranının durumu, buna göre:

- 1- Normal bağ doku

- 2- Hafif düzensiz/hasarlı bağ doku
- 3- Orta düzeyde düzensiz/hasarlı bağ doku
- 4- Yüksek düzeyde düzensiz/hasarlı bağ doku
- 5- Çok yüksek düzeyde düzensiz/hasarlı bağ doku

Değerlendirme, her bir deney hayvanından elde edilen preparatlardan rastgele seçilen 25 seminifer tübülde yapıldı.

3.3.7. İmmünohistokimyasal İncelemeler

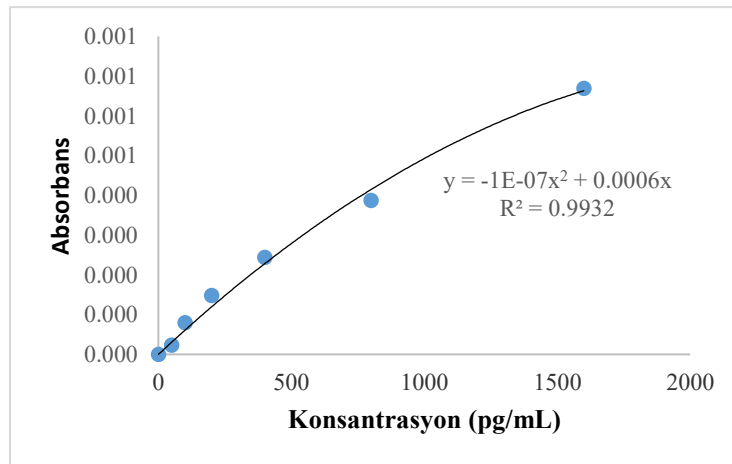
Apoptozis değerlendirilmesi gerçekleştirilirken deoksiribonükleik asit (DNA) fragmantasyonları dikkate alındı (Abcam, ab206386). Buna göre; kahverengi boyalı hücre çekirdeklerine sahip hücreler TUNEL (+) apoptotik hücre olarak kabul edildi (140). Her hayvana ait kesitlerde 5 ayrı bölgede apoptotik ve normal hücreler sayıldı ve apoptotik indeks (AI) hesaplandı (141).

$$AI = \text{TUNEL (+)} / \text{toplam hücre sayısı} \times 100$$

3.4. Biyokimyasal İncelemeler

3.4.1. Testosteron Seviyelerinin Ölçümü

Sıçanlarda serum testosteron seviyeleri ticari testosteron ELİSA kiti (SunRed, Katalog Numarası: 201-11-5126, Çin) kullanılarak ölçüldü. Ölçüm kit prosedürüne uygun olarak gerçekleştirildi. Sıçanların serum testosteron konsantrasyonları, 450 nm de kolorimetrik ölçüm yapılarak Şekil 3'teki standart grafiğe göre pg/mL cinsinden belirlendi.



Şekil 3. Testosteron seviyesi standart grafiği

3.4.2. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi

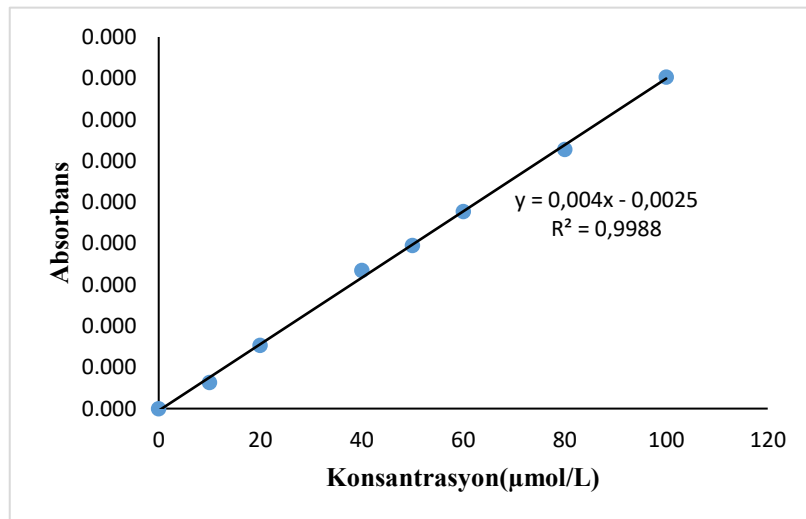
Sıçanların testis dokularında GSH-Px enzim aktiviteyi ticari olarak satın alınan GSH-Px aktivite tayin kiti (Elabscience, Katalog No: E-BC-K096-M) kullanılarak ölçüldü. Reaktiflerin hazırlanması ve GSH-Px enzim aktivitesinin ölçümü kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

GSH-Px, hidrojen peroksit (H_2O_2) ve indirgenmiş glutasyon (GSH) reaksiyonunu katalizleyerek H_2O ve yükseltgenmiş glutasyon (GSSG) üretir. GSH-Px aktivitesi, GSH tüketimi ölçülerek hesaplanabilir. GSH, sarı renkli 5-tiyo-dinitrobenzoik asit anyonu üretmek için dinitrobenzoik asitle reaksiyona girer. Absorbansı 412 nm'de ölçülür ve GSH miktarı hesaplanır.

Doku Homojenizasyonu

Yaklaşık 100 mg testis dokusu tartılıp 1 mL soğuk PBS tamponu (0.01M, pH=7.4) içerisinde el homojenizatörü ile dokular tamamen parçalanıncaya kadar homojenize edildi. Daha sonra $+4^{\circ}C$, 10000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alınarak GSH-Px aktivitesi tayini yapıldı.

GSH-Px enzim aktivitesi Şekil 4'teki standart grafik ve Eşitlik 1 kullanılarak hesaplandı.



Şekil 4. GSH-Px standart grafiği

$$\text{GSH-Px Aktivitesi (U/mg protein)} = (\Delta A_{412} - b) / a * ((0.23 + V) / (0.03 + V)) / (V * C_{pr}) * f \text{ Eşitlik (1)}$$

a: Standart eğrinin eğimi, b: Standart eğrinin kesimi, ΔA_{412} : ($A_{enzimsiz\ tüp} - A_{enzim\ tüp}$), V: Reaksiyon sistemine ilave edilen örneğin hacmi, C_{pr} : Örneklerin protein konsantrasyonu (mg/mL), f: Dilüsyon faktörü

3.4.3. SOD ve CAT Enzim Aktivitelerinin Ölçümü için Doku Homojenizasyonu

Yaklaşık 100 mg testis dokusu tartıldı; 2 mL'lik ependorf tüp içerisinde üzerine 1 mL soğuk homojenizasyon tamponu ilave edildi; el homojenizatörü kullanılarak dokular tamamen parçalanıncaya kadar buz içerisinde 30 sn homojenize edildi. Homojenize edilen dokular 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlar protein tayini ve katalaz (CAT) aktivitesi ölçümü için kullanıldı. SOD ölçümü için, süpernatantlardan 400 μ L alınıp 1.5 mL'lik ependorflara koyuldu. Üzerlerine 2:3 oranındaki etanol:kloroform karışımından 320 μ L ilave edildi. Karışım vorteksledikten sonra +4 °C'de 10.000xg'de 30 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlar süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi ölçümü için kullanıldı.

Homojenizasyon tamponu (500 μ L/L Triton X100 içeren 50 mM Tris/HCl Tamponu)

1.514 g Tris yaklaşık 200 mL saf suda çözüldükten sonra 1 M HCl kullanılarak karışımın pH'sı 7.4'e düşürüldü. Üzerine 125 μ L Triton X100 ilave edilerek son hacim 250 mL'ye tamamlandı.

3.4.4. SOD Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

SOD enzim aktivitelerini belirlemek için Sun ve Oberley tarafından geliştirilen yöntem modifiye edilerek kullanıldı (142). Yöntemin esası, ksantin-ksantin oksidaz sistemiyle oluşturulan süperoksit radikallerinin ($O_2^{\cdot-}$) nitro mavi tetrazolyumu indirgemesi ile meydana gelen mor renkli formazan molekülünün 560 nm'de absorbansının ölçülmesine dayanır.

3.4.4.1. Kullanılan Çözeltiler:

SOD Reaktif Karışımı

8,93 mg etilendiamintetraasetik asit, 1.01 g Na_2CO_3 , 3,65 mg ksantin, 12 mg BSA tartıldı, üzerine 156 mL saf su ilave edilip çözüldü. Bu çözelti deney esnasında taze hazırlandı.

2 M $(NH_4)_2SO_4$

1.32 g $(NH_4)_2SO_4$ tartılıp son hacim 5 mL olacak şekilde saf suda çözüldü. Hazırlanan bu çözelti ksantin oksidaz çözeltisinin hazırlanmasında kullanıldı.

0.8 mM CuCl₂

6,82 mg CuCl₂ tartıldı ve saf suda çözülüp son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu çözelti spektrofotometrik ölçümden önce reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

167 U/L Ksantin Oksidaz

4,59 U/ mL'lik ksantin oksidaz orijinal şişesinden 72,6 µL alınıp daha önce hazırlanan 2M (NH₄)₂SO₄ çözeltisi ile 2 mL'ye tamamlandı. Bu çözelti deney esnasında taze hazırlandı.

150 µM Nitro Mavi Tetrazolyum

4,9 mg nitro mavi tetrazolyum saf suda çözülerek hacmi 40 mL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu Nitroblue tetrazolium çözeltisi bozulmaması için ışıktan korundu. Bu çözelti deney esnasında taze hazırlandı.

SOD Standartları:

100 U/mL'lik stok SOD standardından saf su ile seyreltilerek 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 U/mL' lik SOD standartları hazırlandı. SOD enzim aktivitesi ölçümleri için süpernatantlar homojenizasyon tamponu ile 3 kat seyreltildi. SOD enzim aktivitesi ölçümleri Tablo 10'a göre gerçekleştirildi.

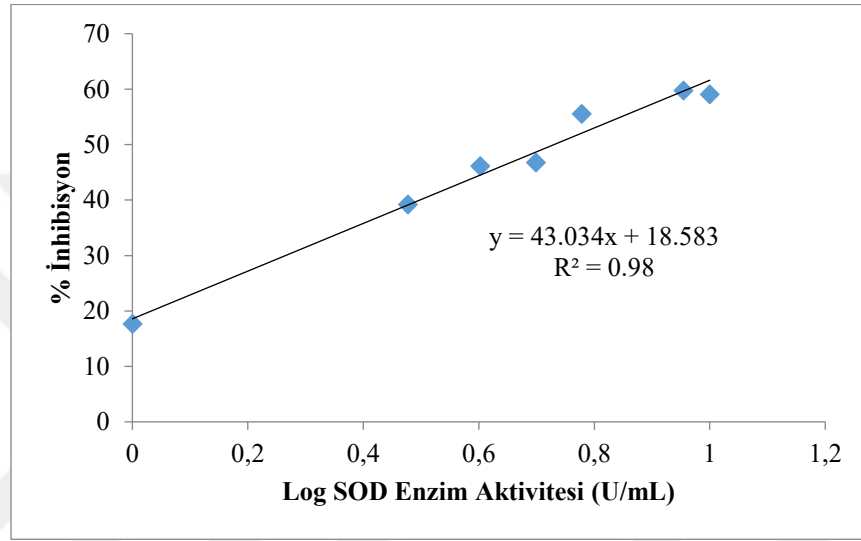
Tablo 10. SOD enzim aktivitesi ölçümü için kullanılan çözeltiler ve hacimleri

Reaktifler	Hacim (µL)
Standart, Kör, Numune	200
SOD Reaktif Karışımı	796
Nitro Mavi Tetrazolyum	204
Ksantin Oksidaz	20
25 °C'de 20 dk inkübe edildi.	
CuCl ₂	400
Spektrofotometrede 560 nm'de absorbanslar ölçüldü.	

SOD enzim aktivitesi hesabında % inhibisyonu belirlemek için kullanılan formül Eşitlik 2'de verildi.

$$\% \text{ İnhibisyon} = (\text{Kör Absorbansı} - \text{Numune Absorbansı}) / (\text{Kör Absorbansı}) \times 100 \text{ Eşitlik (2)}$$

Standartların SOD enzim aktivitesinin logaritmasına karşı % İnhibisyon değerleri kullanılarak standart grafiği çizildi (Şekil 5). Standart grafikte belirlenen denklem kullanılarak, numunelerin % inhibisyonlarına karşılık gelen SOD enzim aktivitelerinin logaritmik değerleri hesaplandı. Bulunan bu değerlerin anti logaritmaları alınarak numunelerin SOD enzim aktiviteleri belirlendi ve seyreltme faktörü ile çarpıldı. Hesaplanan SOD enzim aktiviteleri, protein miktarına bölünüp sonuçlar mg protein başına enzim aktivitesi (U/mg) cinsinden verildi.



Şekil 5. SOD enzim aktivitesi standart grafiği

3.4.5. Katalaz (CAT) Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

CAT enzim aktivitelerini belirlemek için Aebi tarafından geliştirilen yöntem kullanıldı (143). Bu yöntemin esası, hidrojen peroksitin (H_2O_2) enzimatik bozulması sonucu 240 nm'deki absorbans düşüşünün ölçülmesine dayanır.

3.4.5.1. Kullanılan çözeltiler:

50 mM Fosfat Tamponu (pH:7.0)

3,41 g KH_2PO_4 tartılıp saf suda çözüldü ve son hacmi 500 mL'ye tamamlandı. 4,45 g $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$ tartılıp saf suda çözüldü ve son hacmi 500 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiler sırasıyla 1:1,5 oranında karıştırıldı ve karışımın pH sı 7.0'ye ayarlandı.

H_2O_2

%30'luk H_2O_2 'den 240 μL alınarak 50 mM fosfat tamponu ile son hacim 50 mL' ye tamamlandı. Bu çözelti deney esnasında taze hazırlandı.

Testis doku homojenatları 50 mM fosfat tamponu ile 50 kat seyreltildi. Kuvars küvetlere Tablo 11'e göre pipetlemeler yapıldı ve ölçüm gerçekleştirildi.

Tablo 11. Katalaz aktivite tayini için kullanılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Kör (mL)	Numune (mL)
Numune	0.750	0.750
Fosfat Tamponu	0.375	-
H ₂ O ₂	-	0.375
240 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.		

H₂O₂ eklenir eklenmez kuvars küvetler karıştırıldı ve 240 nm'de 30 sn boyunca her 10 sn'de bir absorbanslardaki düşüşler ölçüldü. 30 sn'deki absorbans düşüşünün 0.015 ile 0.100 arasında olmasına dikkat edilerek numune dilüsyonları ayarlandı.

CAT enzim aktivitelerinin belirlenmesi için birinci mertebede reaksiyon hız sabiti (k) kullanıldı. Absorbanslardaki 10 s'lik düşüş için aşağıdaki formül kullanılarak katalaz enzim aktiviteleri hesaplandı.

$$k = (2.3/10) \times \log(A1/A2) \text{ s}^{-1} \quad \text{Eşitlik (3)}$$

A1= Başlangıç absorbansı

A2= 10. sn'deki absorbans

Hesaplanan k değerleri seyreltme faktörü (50) ile çarpıldı. Ardından testis dokularında mg protein başına CAT enzim aktivitesi hesaplandı ve sonuçlar U/mg protein cinsinden verildi.

3.4.6.MDA Seviyelerinin Belirlenmesi

Yaklaşık 100 mg testis dokusu tartılıp üzerine 1 mL soğuk homojenizasyon tamponu ilave edildi. Dokular tamamen parçalanıncaya kadar yaklaşık 30 sn el homojenizatörü ile buz içerisinde homojenize edildi. Homojenatlar 3.000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant alındı ve MDA seviyesi belirlendi.

Bu yöntemin esası, asidik ortamda MDA'nın tiyobarbitürik asit ile oluşturduğu kompleksin absorbansının 532 nm'de ölçülmesine dayanmaktadır (144).

3.4.6.1. Kullanılan çözeltiler:

Homojenizasyon tamponu

%1.15'lik KCl çözeltisine %0.05'lik Triton X-100 eklenerek hazırlandı.

%1'lik H₃PO₄ Çözeltisi

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

Tiyobarbitürik asit (TBA) Çözeltisi

0.335 g TBA tartılıp üzerine 25 mL saf su ilave edildi. Manyetik karıştırıcıda ısıtılarak çözünene kadar karıştırıldı. Hazırlanan TBA çözeltisi tamamen soğuduktan sonra üzerine 25 mL asetik asit ilave edildi. Bu çözelti deney esnasında taze hazırlandı.

Standart çözeltiler

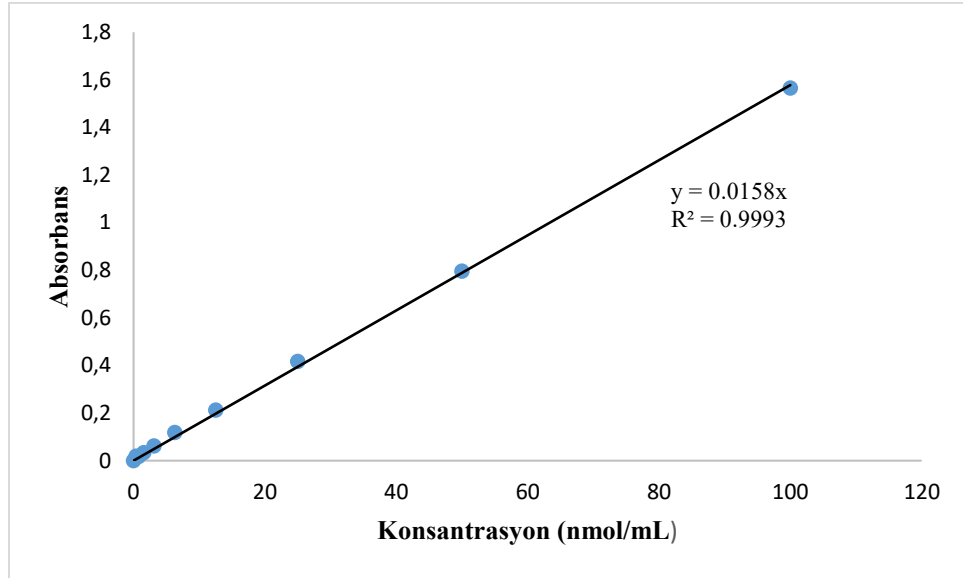
50 mL 0.01 M HCl çözeltisine 82.5 µL tetrametoksipropan eklendi ve 50°C'de 1 saat inkübe edildi. Elde edilen bu 10000 nmol/mL'lik stok MDA standardından 1000 nmol/mL'lik ara stok MDA standardı hazırlandı. Ara stok çözeltiden seyreltmeler yapılarak 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125 ve 1,56 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

MDA ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. MDA seviyesi için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Hacim (µL)
Numune, Standart, Kör	200
%1'lik H ₃ PO ₄ Çözeltisi	1200
Tiyobarbitürik asit (TBA) Çözeltisi	400
100 °C'de 1 saat inkübasyon	
532 nm'de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.	

Şekil 6'daki standart grafik kullanılarak MDA konsantrasyonları hesaplandı. Testis dokularında mg protein başına MDA konsantrasyonları hesaplandı ve sonuçlar nmol/mg protein cinsinden verildi.



Şekil 6. MDA standart grafiği

3.4.7. Protein Tayini

Testis doku homojenatlarında protein düzeyleri Bradford yöntemi ile belirlendi (145). Bu yöntemin esası, fosforik asitli ortamda organik bir boya olan Coomassie Brilliant Blue G250'nin proteinlere bağlanmasıyla oluşan mavi renkli kompleksin 600 nm'de maksimum absorbans vermesine dayanmaktadır.

3.4.7.1. Kullanılan Çözeltiler

Bradford Reaktifi

10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 mL %95'lik etanolde çözüldü. Üzerine 10 mL %85'lik H_3PO_4 eklendi ve son hacim saf su ile 100 mL'ye tamamlandı.

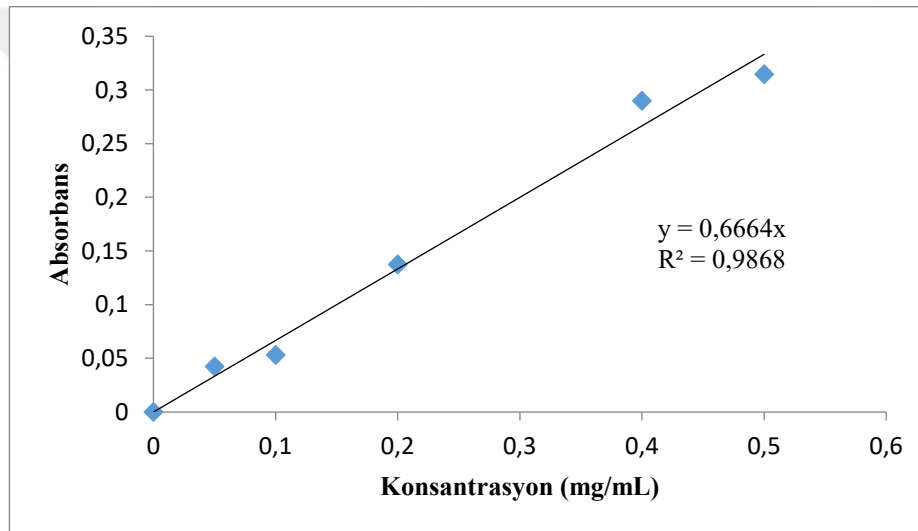
Standartlar

1, 0.9, 0.8, 0.7, 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.05 mg/mL konsantrasyonlarında sığır serum albümin (BSA) standartları hazırlandı.

Bradford yönteminin hassasiyeti 1-100 μg arasındadır. Bu nedenle protein tayini için testis dokuları 10 kat seyreltilti. Tablo 13'e göre pipetlemeler yapıp 600 nm'de absorbanslar okunarak Şekil 7'deki standart grafik yardımıyla sonuçlar hesaplandı.

Tablo 13. Protein tayini deney basamakları

	Kör (µL)	Standart (µL)	Numune (µL)
Saf Su / Tampon Çözelti	10	-	
Standart	-	10	-
Numune	-	-	10
Bradford Reaktifi	100	100	100
Oda sıcaklığında 10 dk. karanlıkta inkübe edildi.			
600 nm' de spektrofotometrik ölçüm yapıldı.			



Şekil 7. Protein standart grafiği

3.5. İstatistiksel Analiz

Tüm veriler, SPSS 23.0 istatistik programına aktarılmış ve analiz edilmiştir. Niteliksel veriler sayı ve yüzde ile özetlenirken, nicel veriler için ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerler kullanılmıştır. Nicel verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiştir.

Normal dağılım gösteren veriler arasında karşılaştırma yapılırken tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulanmıştır. Varyansların homojenliği Levene testi ile kontrol edilmiştir. Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanan durumlarda post hoc analizler gerçekleştirilmiştir. Varyansların homojen olduğu durumlarda Tukey testi, homojen olmadığı durumlarda ise

Tamhane's T2 testi kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen verilerin analizinde ise Kruskal-Wallis testi tercih edilmiştir. Tüm analizlerde $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

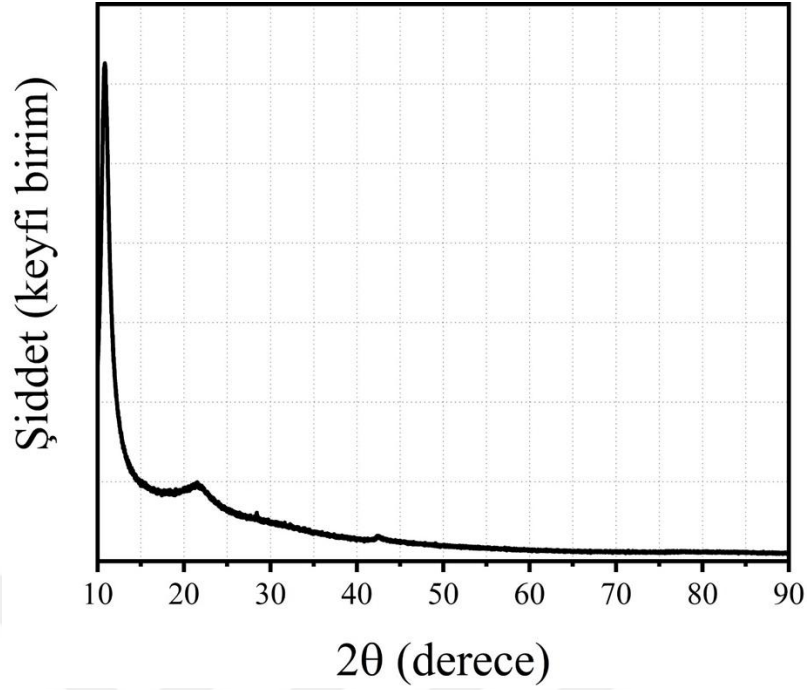
4.1. Grafen Oksitin (GO) Karakterizasyon Sonuçları

Grafen oksitin (GO) karakterizasyonunda iki unsur kullanılmaktadır. Bunlardan biri olan X-ray Diffraction (XRD); bir maddenin kristal yapısının belirlenmesinde kullanılır. Bir diğer yöntem ise Scanning Electron Microscopy (SEM)'dir; bu da materyalin nanoparçacıklı yapısının doğrulanması için kullanılmaktadır.

4.1.1. X-ray Diffraction (XRD) Sonuçları

Şekil 8, bu çalışma kapsamında kullanılan grafen oksit (GO) partiküllerine ait X-ışını kırınımı (XRD) analizi sonucunda elde edilen kırınım desenini göstermektedir. Şekil 8 dikkatle incelendiğinde, yaklaşık olarak 11° , 22° ve 42° civarında belirgin kırınım piklerinin olduğu görülmektedir. Bu pikler arasında, en yüksek şiddete sahip kırınımın yaklaşık 11° 'de yer aldığı tespit edilmiştir. Bu pik, grafen oksit için karakteristik olan (001) düzlemiyle ilişkilendirilmekte olup, GO yapısındaki oksijenli fonksiyonel grupların varlığına bağlı olarak grafen katmanları arasındaki mesafenin arttığını göstermektedir. Bu durum, grafen oksidin başarılı bir şekilde oksitlenmiş olduğunu ve katmanlar arası düzenin bozulduğunu desteklemektedir. Buna karşılık, 22° ve 42° civarında gözlemlenen kırınımlar daha düşük şiddette ve daha geniş olup, örneğin kristal yapısının düşük derecede düzenli olduğunu göstermektedir. Bu da elde edilen GO tozunun amorf veya düşük kristallikte bir yapıya sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Literatürdeki benzer çalışmalar da bu bulguları desteklemektedir.

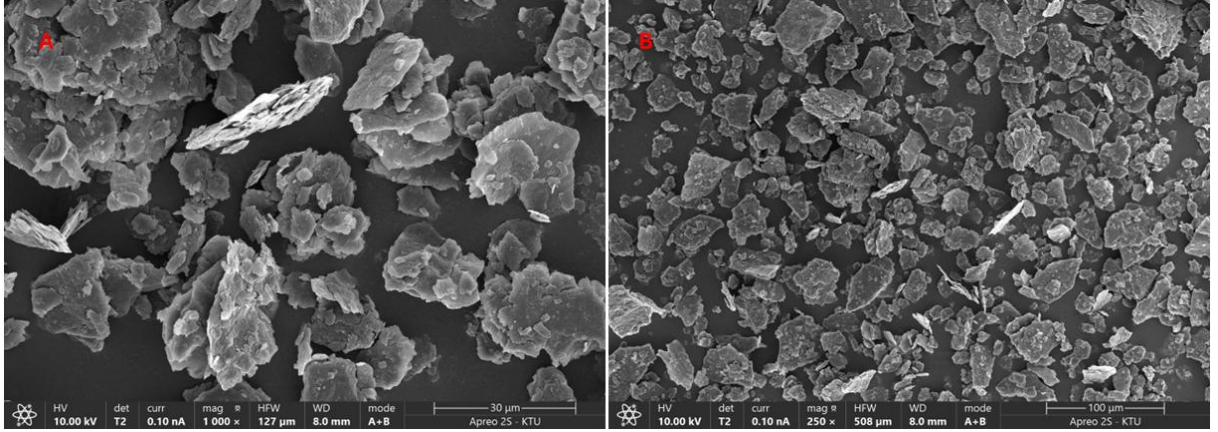
Örneğin, Stobinski ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, GO için sırasıyla 9.98° , 23.76° ve 42.26° kırınım açılarında benzer paternler rapor edilmiştir (146). Bu kırınım açıları, grafen oksit yapısının karakterizasyonunda yaygın olarak kabul edilen referans değerlerle örtüşmekte olup, bu çalışmada elde edilen verilerin literatürle tutarlılığını ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, XRD analizi ile elde edilen kırınım desenleri, grafen oksidin yapısal özelliklerine dair önemli bilgiler sunmakta; özellikle (001) düzlemiyle ilişkili 11° civarındaki karakteristik pik, GO'nun başarılı bir şekilde sentezlendiğini ve oksijenli grupların varlığıyla katmanlar arası mesafenin arttığını doğrulamaktadır.



Şekil 8. GO partiküllerine ait X-ışını kırınımı (XRD) analizi sonucunda elde edilen kırınım deseni

4.1.2. GO'nun Scanning Electron Microscope (SEM) Analiz Sonuçları

Resim 10' da bu çalışma kapsamında kullanılan grafen oksit (GO) partiküllerine ait SEM görüntülerini içermektedir. Resim 10'da görüldüğü üzere GO partikülleri oldukça düşük kalınlığa sahiptir. SEM görüntüsünde gözlemlenen grafen oksit (GO) parçacığı, tipik olarak GO' ya özgü olan ince, tabakamsı ve dalgalı bir morfoloji sergilemektedir. Yüzeyde görülen kıvrımlar, kırışıklıklar ve kenar düzensizlikleri, GO' nun çok katmanlı yapısı ve oksijenli fonksiyonel gruplarla zenginleştirilmiş yüzey özelliklerini yansıtmaktadır. GO parçacıkları, büyük oranda ince levhamsı yapılardan oluşmakta olup bu yapılar yer yer katlanmış, üst üste binmiş ya da kenarlarından kıvrılmış şekilde gözlemlenmektedir. Yüzeyde belirgin olan bu kıvrımlar ve kırışıklıklar, GO'nun esnek doğasına ve yüksek yüzey alanına işaret ederken; yüzeydeki düzensizlikler, yapısal heterojenliği artırarak potansiyel fonksiyonel yüzey etkileşimlerine zemin hazırlamaktadır. Ayrıca parçacıkların kenarlarında gözlenen yırtılmalar ve keskin konturlar, yapısal kırılabilirlik ve çok katmanlılık hakkında fikir vermektedir. Bu morfolojik yapı, GO'nun ileri uygulamalar için sunduğu fiziksel uygunluk ve yüzey etkileşim potansiyelini açıkça yansıtmaktadır. Literatür çalışmalarında da GO parçacıklar için benzer morfolojik görüntüler elde edilmiştir (147).



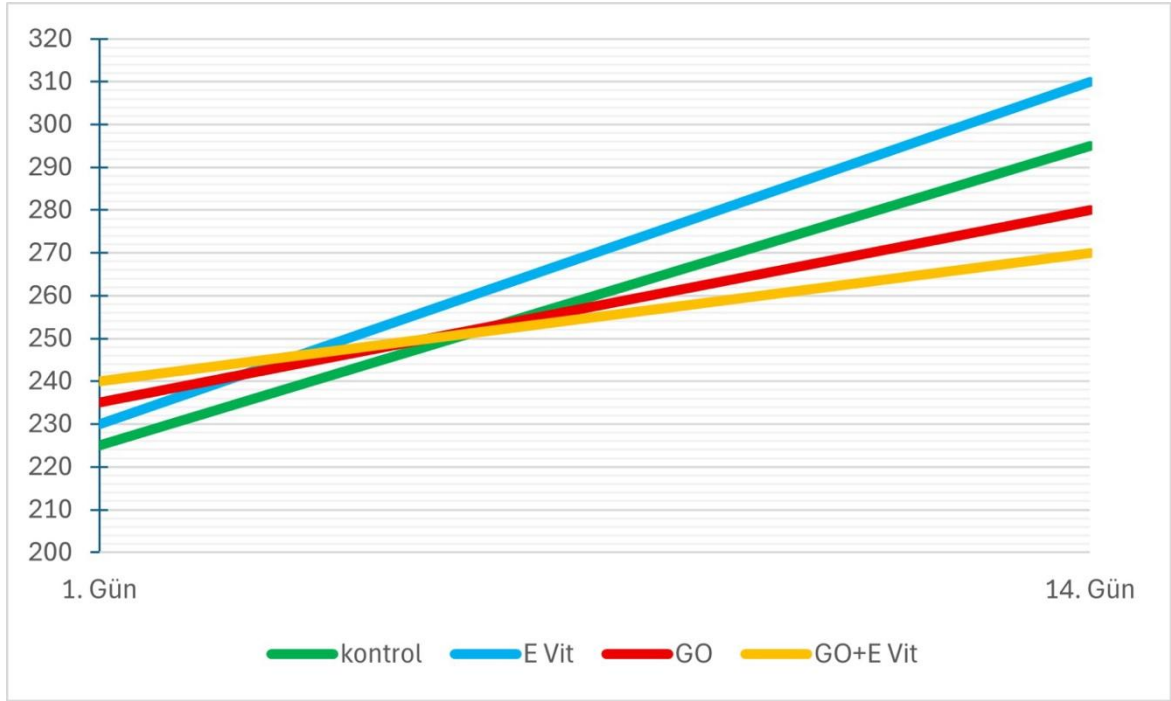
Resim 10. GO partiküllerine ait SEM görüntüleri. A: 1000x büyütme, B: 250x büyütme.

4.2. Hayvan Ağırlığı Sonuçları

Deneye tabi tutulan hayvanların, deneyin başlangıç günü (1. Gün) ve deneyin son günü (14. Gün), ağırlık değerleri kaydedilmiştir. Grupların kilolarındaki değişime bakıldığında hiçbir grubun kilo değişimi negatif yönde değildi ancak gruplar arasındaki kilo değişimi arasında fark görüldü. En çok pozitif yönde değişim kontrol grubunda gözlenirken, bu grubu sırasıyla; E vit grubu, GO grubu ve GO+E vit grubu izledi. Ancak değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Gruplara ait deney başı ve deney sonu ortalama ağırlık verileri, standart sapma değerleri ve değişim yüzdeleri Tablo 14’te, değişim grafiği ise Şekil 9’da özetlenmiştir.

Tablo 14. Gruplara ait deney başı, deney sonu ortalama ağırlık verileri, standart sapma değerleri ve değişim yüzdeleri

Grup	1. Gün Ort(gr) $\pm$ SD	14. Gün Ort(gr) $\pm$ SD	Değişim %
Kontrol	321.63 $\pm$ 5.92	387.00 $\pm$ 16.18	+20.32
E Vit	275.88 $\pm$ 9.47	308.88 $\pm$ 12.73	+11.96
GO	292.25 $\pm$ 4.58	317.00 $\pm$ 6.01	+8.47
GO+E Vit	323.13 $\pm$ 7.58	348.75 $\pm$ 7.87	+7.93



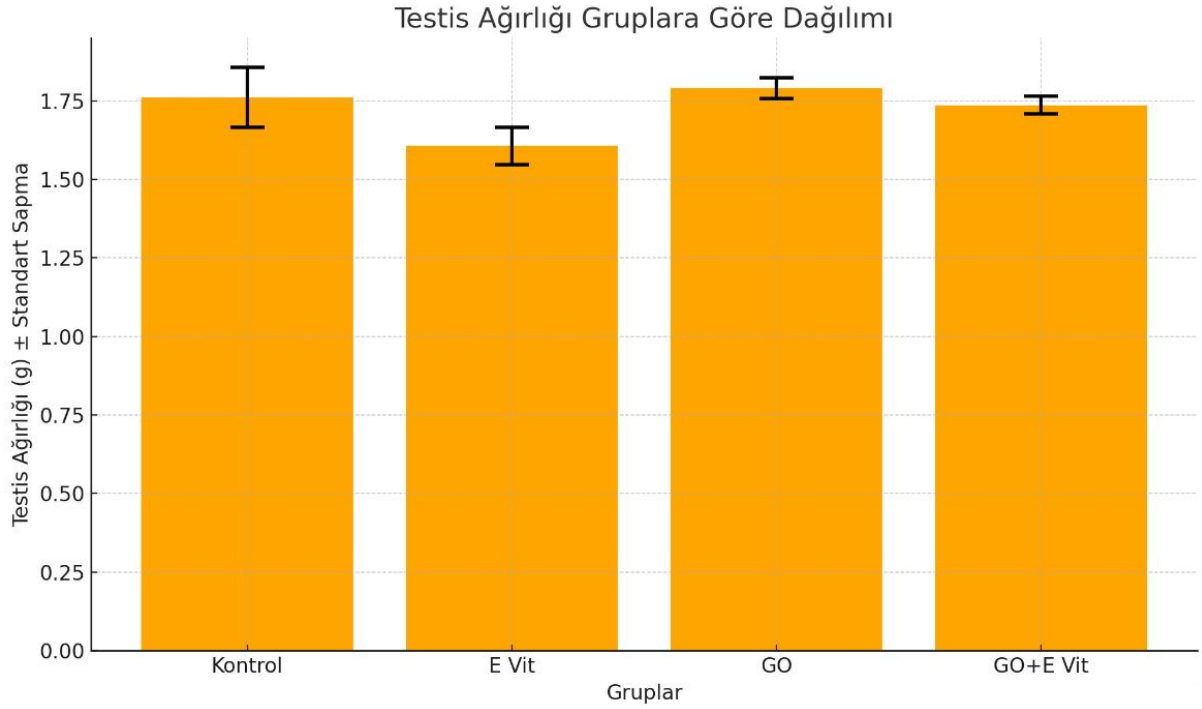
Şekil 9. Gruplara ait kilo değişim grafiği

4.3. Testis Ağırlığı Sonuçları

Hayvanların sakrifiye edilmesinin ardından çıkarılan ve tartılan testisler hassas terazi ile tartılarak sonuçlar not edildi. Buna göre E vit ve GO+E vit gruplarının ortalama testis ağırlığında kontrol grubuna göre azalma görülürken, GO grubunda testis ağırlık ortalaması kontrol grubuna kıyasla arttı. Ancak bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0.05$). Verilere ait tablo ve grafik; Tablo 15 ve Şekil 10' da özetlenmiştir.

Tablo 15. Gruplara ait testis ağırlığı ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Testis Ağırlığı (gr)±SD	1.761±0.10	1.606±0.06	1.790±0.03	1.736±0.03



Şekil 10. Grupların testis ağırlık grafiği

4.4. Testis Kütle İndeksi Sonuçları

Hayvanların sakrifiye edilmesinden sonra ayrıca testis kütle endeksleri (TKİ) hesaplanarak gruplar arasındaki karşılaştırılması yapıldı. Buna göre; GO grubuna ait TKİ en yüksek çıkarken, sırasıyla bu grubu takip eden gruplar E vit, GO+E vit ve kontrol grubu idi. TKİ aşağıdaki formüle göre hesaplandı (146). TKİ verilerine ait veriler Tablo 15 ve Şekil 11’ de özetlenmiştir.

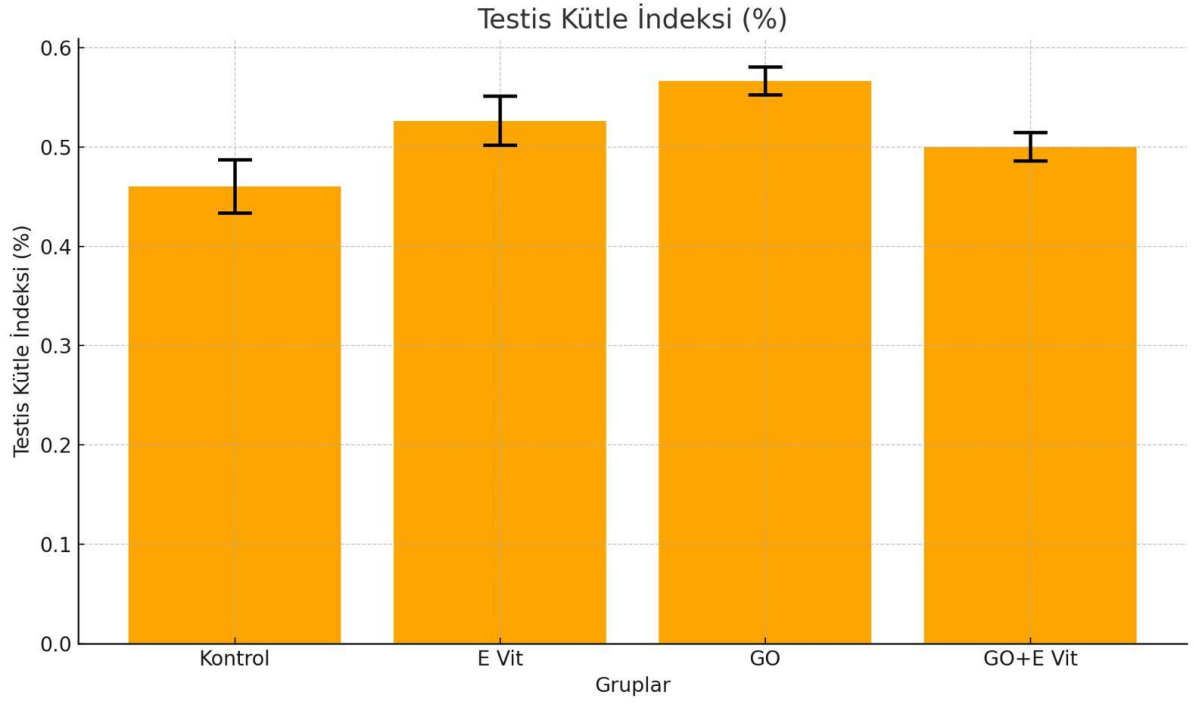
$$\text{Testis Kütle İndeksi} = (\text{Testis Kütlesi} / \text{Vücut Kütlesi}) \times 100$$

Tablo 16. Gruplara ait testis kitle indeksi ortalamaları (%) ve standart sapmaları

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
TKİ %±SD	0.46±0.03	0.53±0.02	0.57 ^a ±0.01	0.50 ^b ±0.01

^a : GO grubunun TKİ, kontrol grubuna kıyasla yüksekti (p<0,0083)

^b : GO+E Vit grubunun TKİ, GO grubuna kıyasla düşüktü (p<0,0083)



Şekil 11. Gruplara ait testis kütle indeks yüzdeleri

4.5. Sperm Analiz Sonuçları

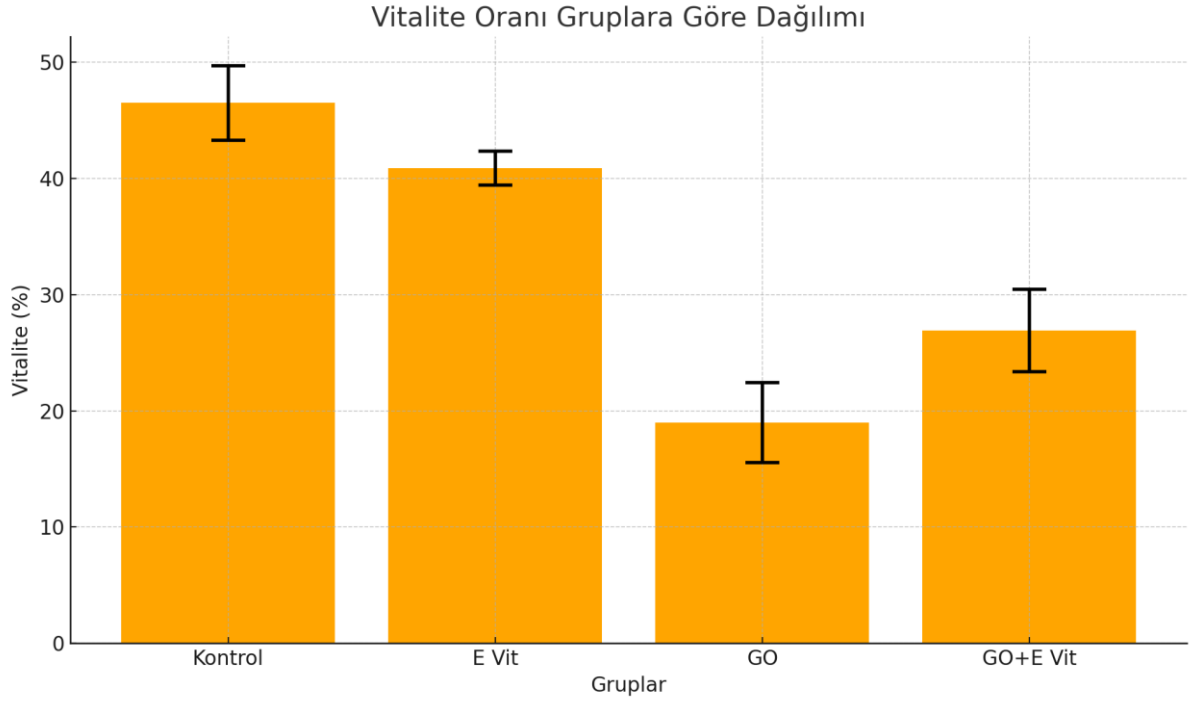
Deney hayvanlarından alınan sperm örneklerinin analiz sonuçlarına göre grupların sperm canlılık (vitalite) yüzdelerine bakıldığında, kontrol grubuna kıyasla E vit grubunun hafif azalma gösterdiği, GO ve GO+E vit grubunda ise daha fazla azalma belirlendi. Kontrol grubuna kıyasla en çok azalma gösteren grup ise GO grubu oldu. Gruplara ait veriler Tablo 17 ve Şekil 12’de özetlenmiştir.

Tablo 17. Gruplara ait vitalite (%) oranları ve standart sapma değerleri.

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Vitalite%±SD	46.5 ^a ±3.20	40.89 ^b ±1.48	19±3.44	26.9±3.56

^a : Kontrol grubunun vitalite oranı, GO ve GO+E vit grubuna kıyasla yüksekti ($p<0,0083$)

^b : E vit grubunun vitalite oranı, GO ve GO+E vit grubuna kıyasla yüksekti ($p<0,0083$)

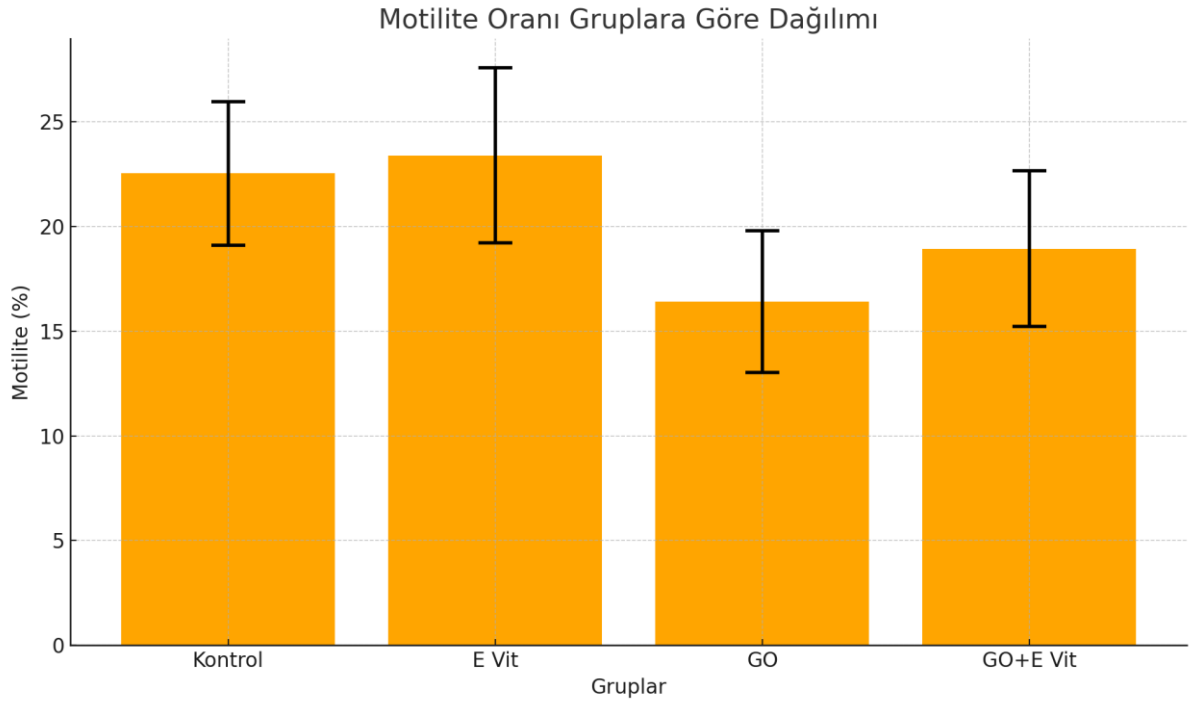


Şekil 12. Gruplara ait vitalite yüzde grafiği

Bu verilere ek olarak hayvanlardan alınan sperm örneklerinde hareketlilik (motilite) yüzdesi de hesaplandı ve gruplar arasında kıyaslama yapıldı. Buna göre; en yüksek motiliteye sahip grup E vit grubu olurken, bu grubu sırasıyla kontrol grubu, GO+E vit grubu ve GO grubu takip etti. GO grubu motilitesi en düşük grup olarak gözlemlendi; ancak gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$). Gruplara ait veriler Tablo 18 ve Şekil 13'te özetlenmiştir.

Tablo 18. Gruplara ait motilite (%) oranları ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Motilite % $\pm$ SD	22,54 $\pm$ 3,44	23,40 $\pm$ 4,19	16,41 $\pm$ 3,39	18,94 $\pm$ 3,71

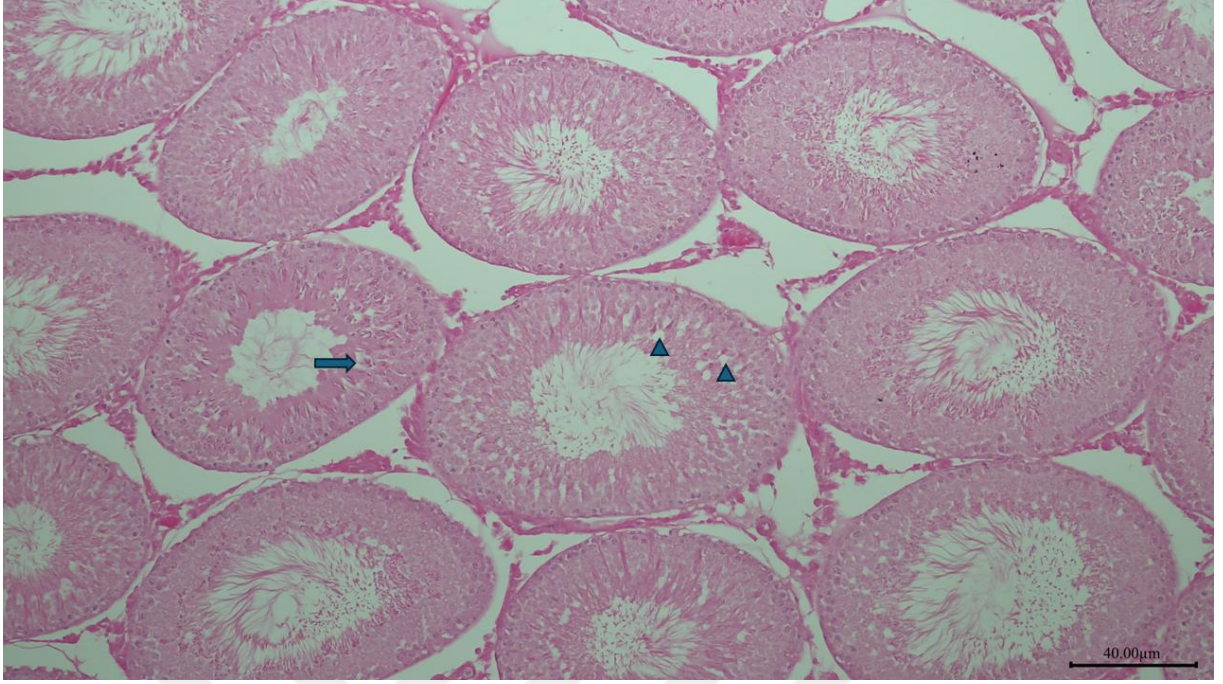


Şekil 13. Grupların ait motilite yüzde grafiği

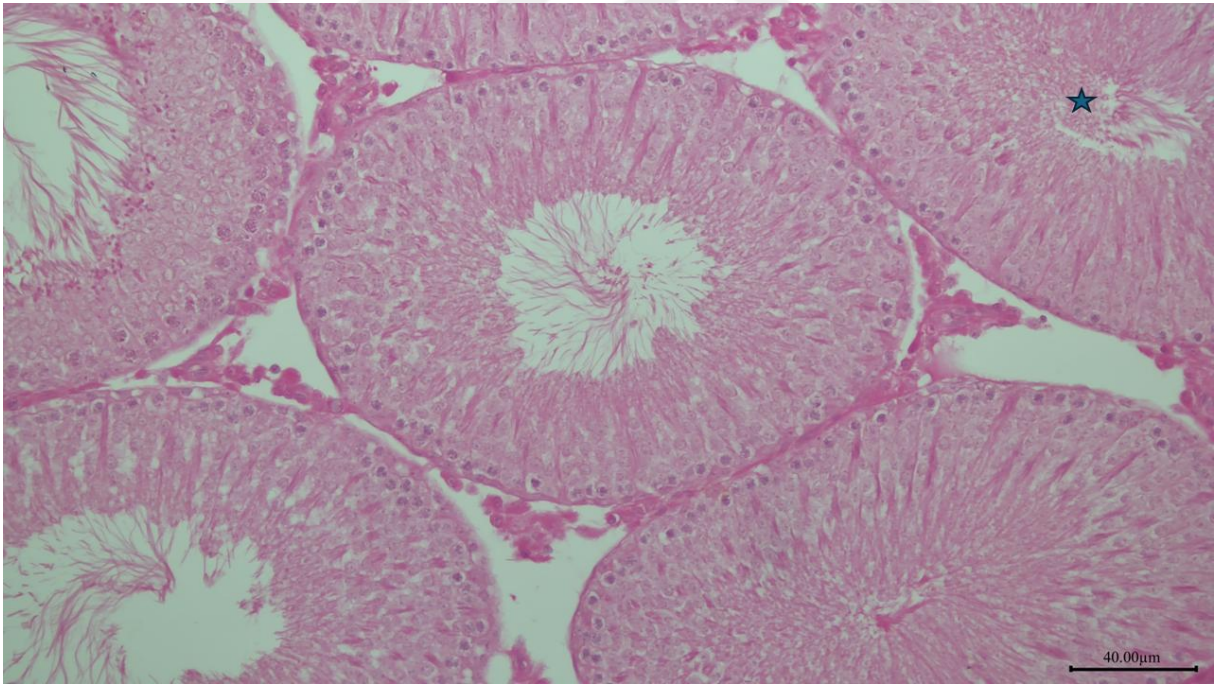
4.6. Testisin Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları

4.6.1. Kontrol Grubunun H&E, Masson Trikrom ve Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preperatların Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna ait H&E boyalı preperatlarda yapılan incelemede genel testis dokusunun düzenli ve sağlıklı olduğu gözlemlendi. Seminifer tübüllerin bazılarında yer yer mikroveziküller, nadiren germinal epitel hücrelerinin tübüle dökülmesi ve çok nadir epitel düzensizliği görünse de genel itibari ile doku bütünlüğü tam ve sağlam olup fazlaca patolojik bulguya rastlanmadı (Resim 11, 12).



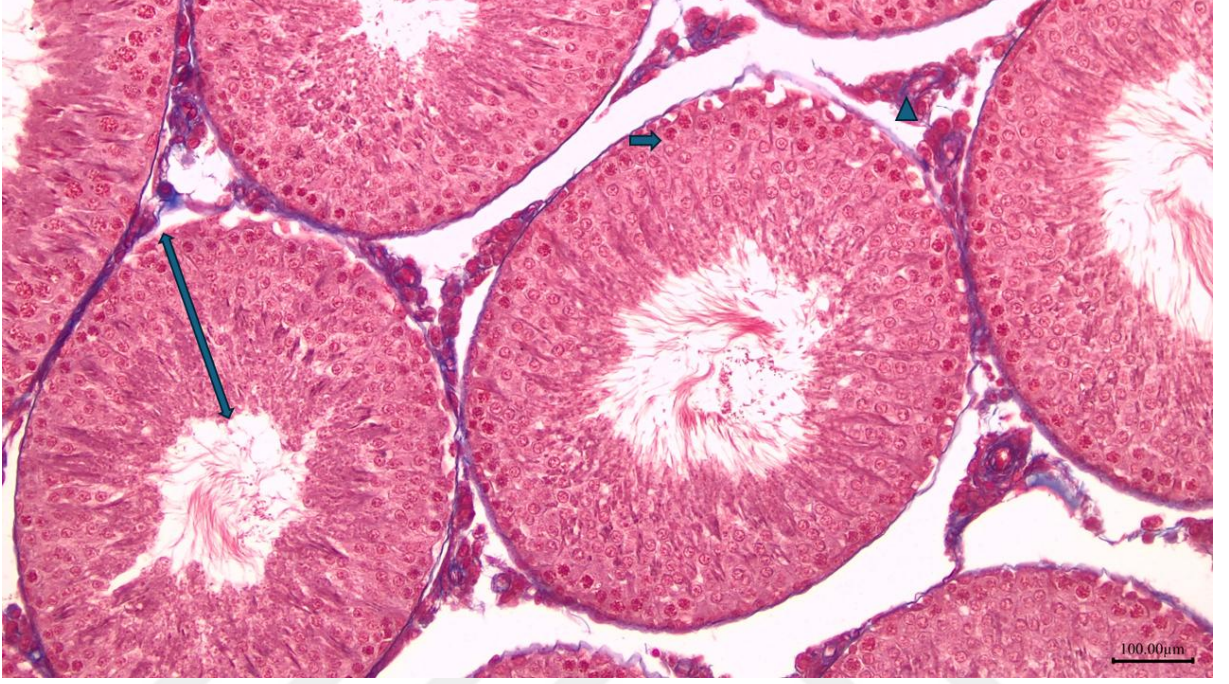
Resim 11. Kontrol grubuna ait genel testis görüntüsü. Mikrovezikül (ok başı), epitelde hafif ayrılma (sağ yönlü ok) görünmekte (H&E 100x)



Resim 12. Kontrol grubuna ait genel testis görüntüsü. Germinal epitelin tübüle dökülmesi (yıldız) görünmekte (H&E 200x)

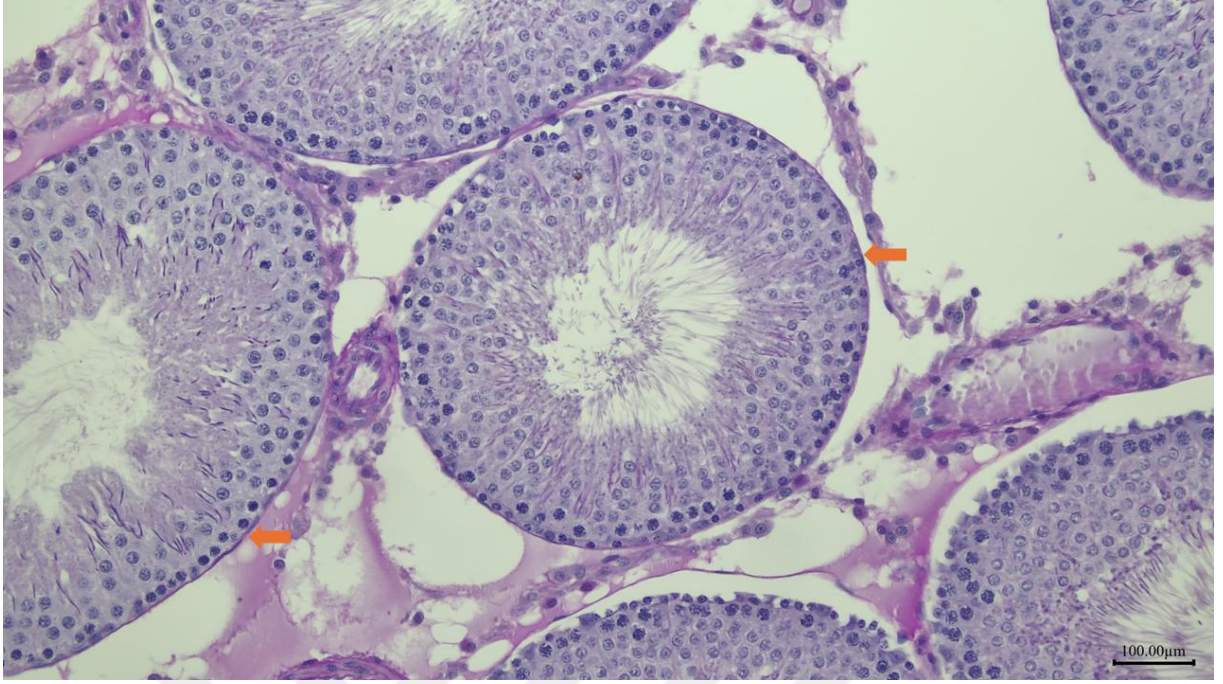
Kontrol grubuna ait Masson trikrom boyalı preparatlarda öncelikle interstisyel bağ dokusu, akabinde de seminifer tübüllerin genel yapısı değerlendirildi. Gruba ait denek

preparatları incelendiğinde interstisyel bağ dokusu olağan yapıda, germinal epitele ait spermatogenetik seri hücreleri düzgün ve germinal epitel kalınlıkları normal olarak gözlemlendi (Resim 13).



Resim 13. Kontrol grubuna ait Masson trikrom boyama. Germinal epitel kalınlığı (çift başlı ok), spermatogenetik seriye ait hücreler (sağa ok), interstisyel bağ dokusu (ok başı) normaldi (200x)

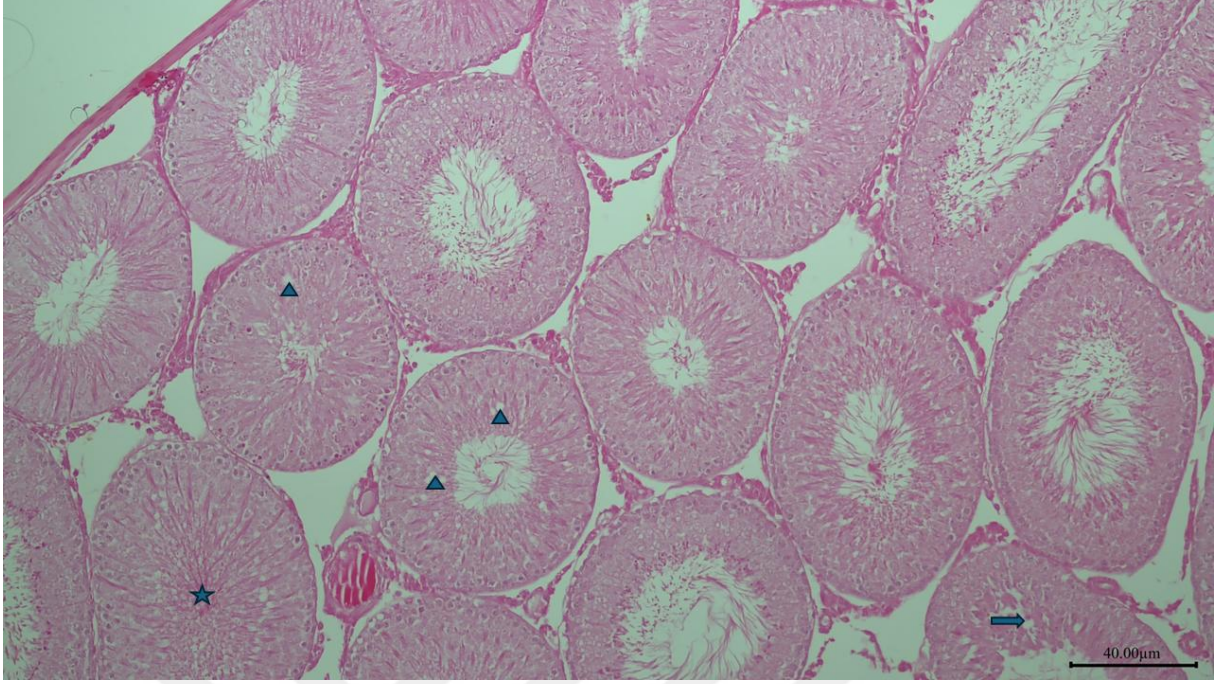
Kontrol grubuna ait PAS boyalı preparatlar incelendiğinde, seminifer tübüllerin bazal membran yapısı düzenli ve normal kalınlıktaydı (Resim 14).



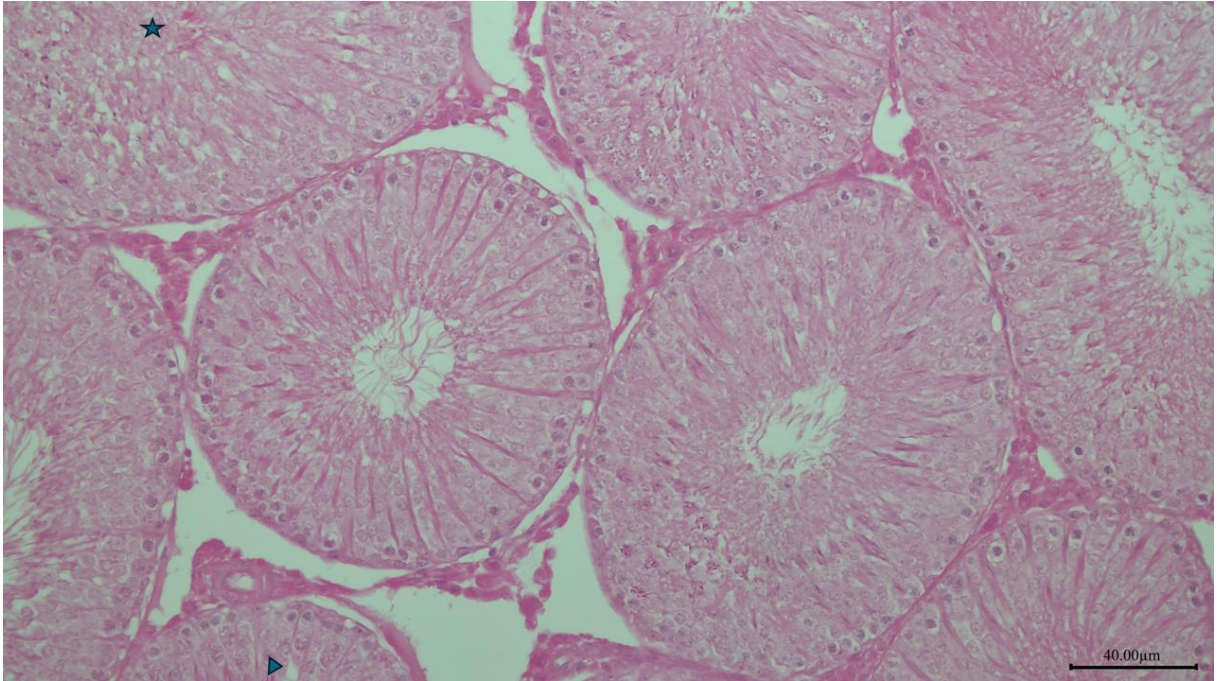
Resim 14. Kontrol grubuna ait PAS boyama. Bazal membran düzgün ve normal kalınlıkta idi (200x)

4.6.2.E vit Grubunun H&E, Masson Trikrom ve Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preperatların Değerlendirilmesi

E vit grubuna ait H&E boyalı preperatlarda yapılan incelemede; testis dokusunun genel görünümünde ciddi bir patolojik bulguya rastlanmadı. Seminifer tübül yapısı genel olarak düzgündü; ancak yer yer mikrovezikül, nadiren epitelde düzensizlik ve yine nadiren germinal epitel hücrelerinin lümene dökülmesi gözlemlendi (Resim 15, 16).



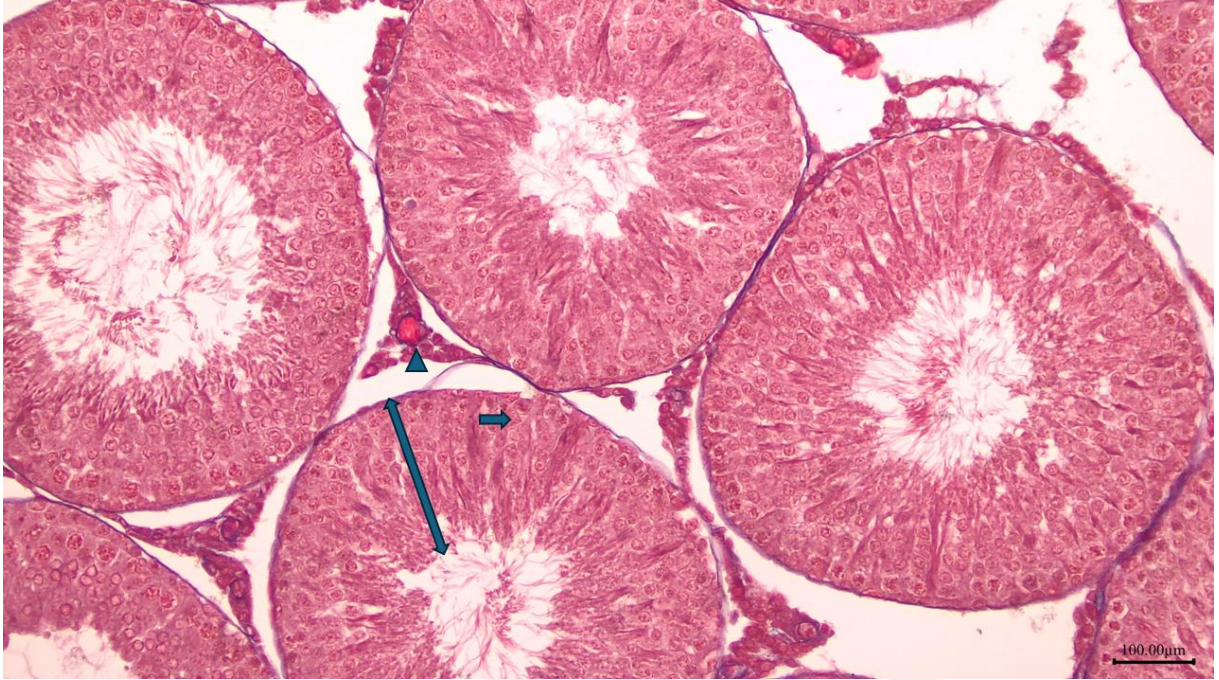
Resim 15. E vit grubuna ait genel testis görüntüsü. Mikrovezikül (ok başı), epitelde hafif ayrılma (sağ yönlü ok), germinal epitelin tübül lümenine dökülmesi (yıldız) görünmekte (H&E 100x)



Resim 16. E vit grubuna ait genel testis görüntüsü. Mikrovezikül (ok başı), germinal epitelin tübüle dökülmesi (yıldız) görünmekte (H&E 200x)

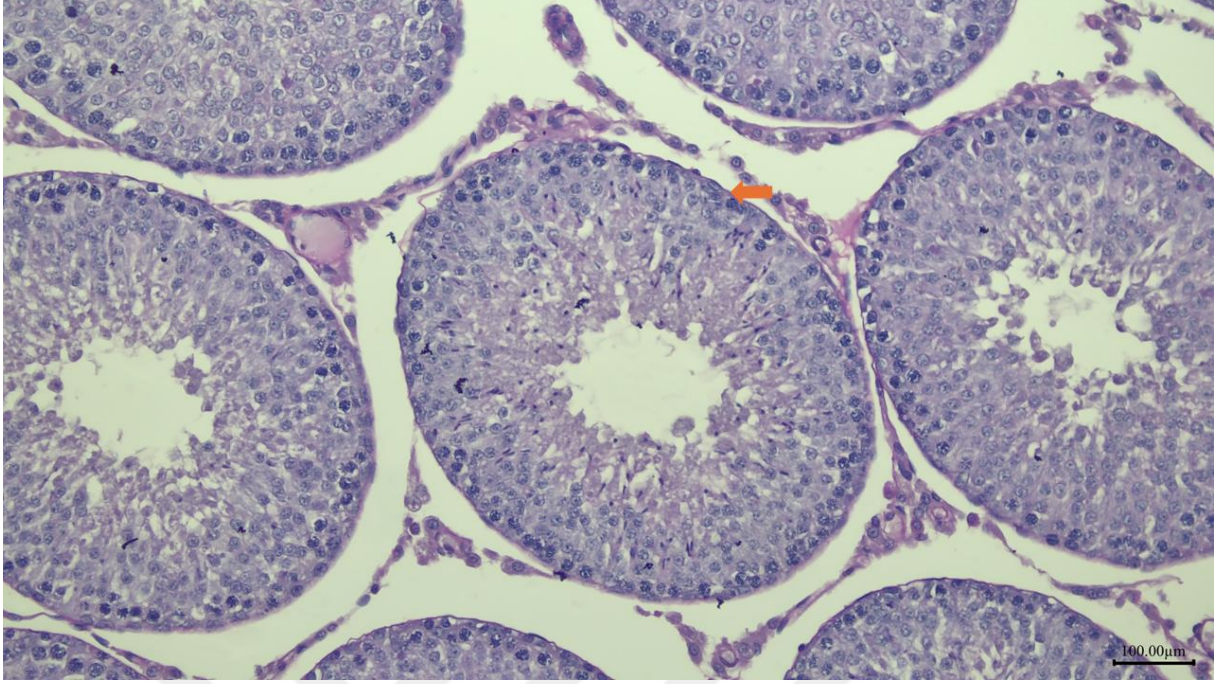
E vit grubuna ait Masson trikrom boyalı preparatlar incelendiğinde; interstisyel bağ dokusunda önemli bir patolojik unsura rastlanmadı. Kontrol grubuna kıyasla germinal

epitelde kısmi incelme gözlemlendi. Germinal epitel ve spermatogenetik hücre serisinde önemli bir bozulma gözlemlenmedi (Resim 17).



Resim 17. E vit grubuna ait Masson trikrom boyama. Germinal epitel kalınlığı (çift başlı ok), spermatogenetik seriye ait hücreler (sağa ok), normal interstisyel bağ dokusu (ok başı) gözlemlendi (200x)

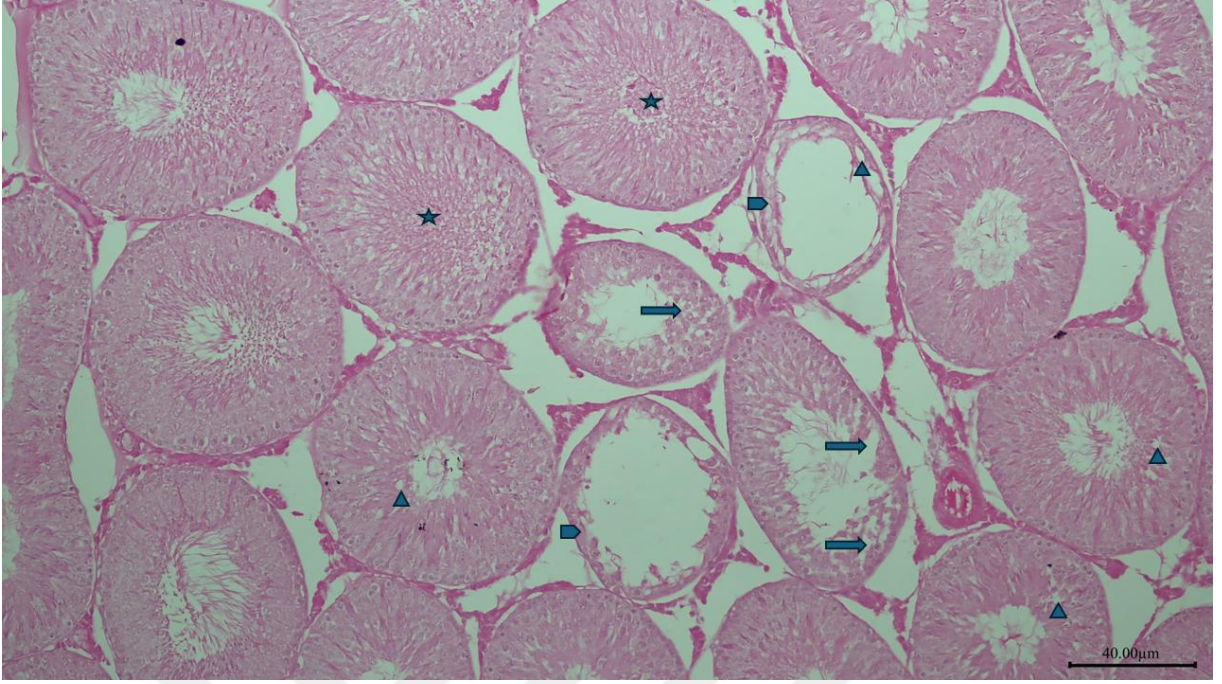
E vit grubuna ait PAS boyalı preparatlarda yapılan incelemede; seminifer tübüllere ait germinal epitelin bazal membranları düzenli ve normal kalınlıktaydı (Resim 18).



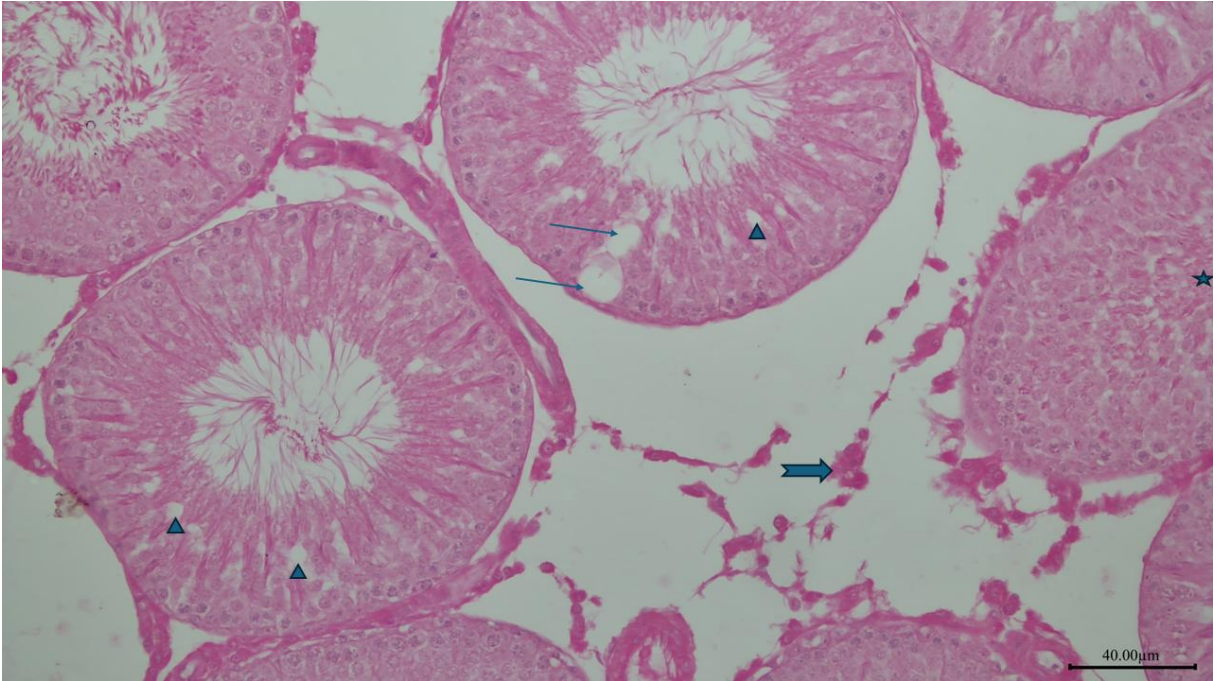
Resim 18. E vit grubuna ait PAS boyama. Düzgün ve normal kalınlıkta bazal membran (200x)

4.6.3.GO Grubunun H&E, Masson Trikrom ve Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preperatların Değerlendirilmesi

Grafen oksit (GO) grubuna ait H&E boyalı preparatlar incelendiğinde, seminifer tübüllerde bol miktarda mikrovezikül tespit edildi. Bu mikroveziküllerin yanı sıra, vakuolizasyon ve tübül lümenine hücre dökülmesi de gözlemlendi. Ayrıca, germinal epitelde ve interstisyel bağ dokuda belirgin düzensizlikler saptandı. Bazı seminifer tübüllerde ise şiddetli hasar ve germinal epitel kayıpları gözlemlendi (Resim 19, 20).

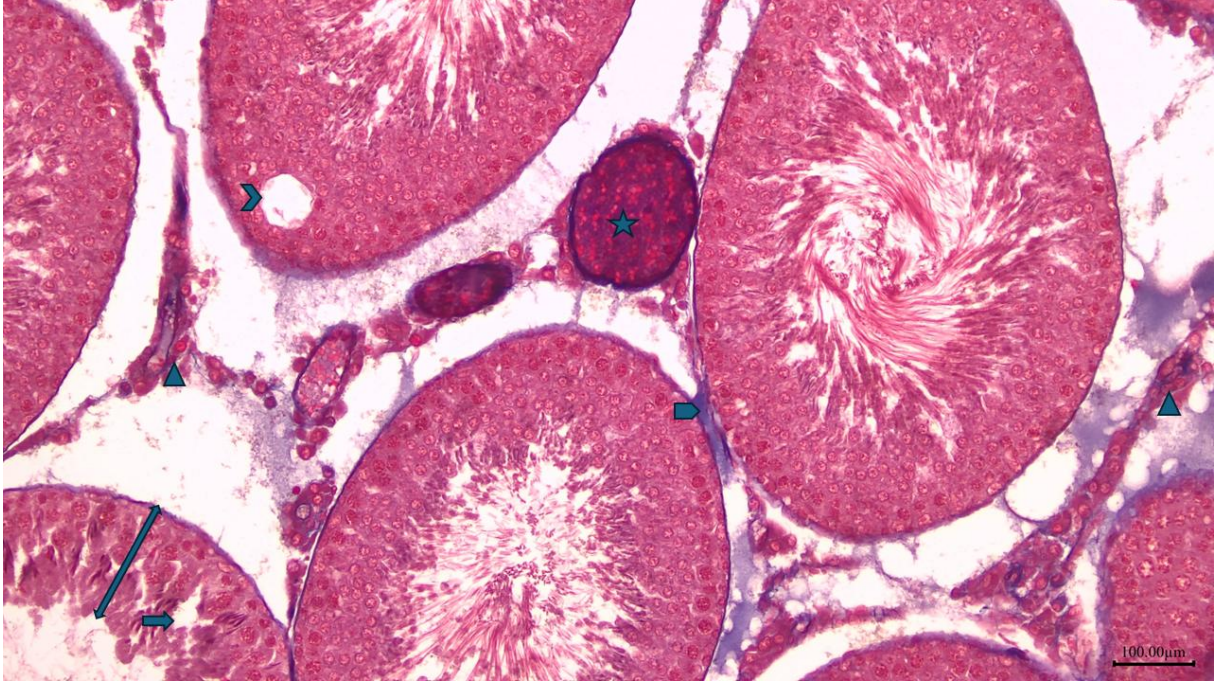


Resim 19. GO grubuna ait genel testis görüntüsü. Mikrovezikül (ok başı), epitelde ayrılma (sağ yönlü ok), germinal epitelin tübüle dökülmesi (yıldız), seminifer tübülde şiddetli hasar ve germinal epitel kaybı (kare ok başı) görünmekte (H&E 100x)



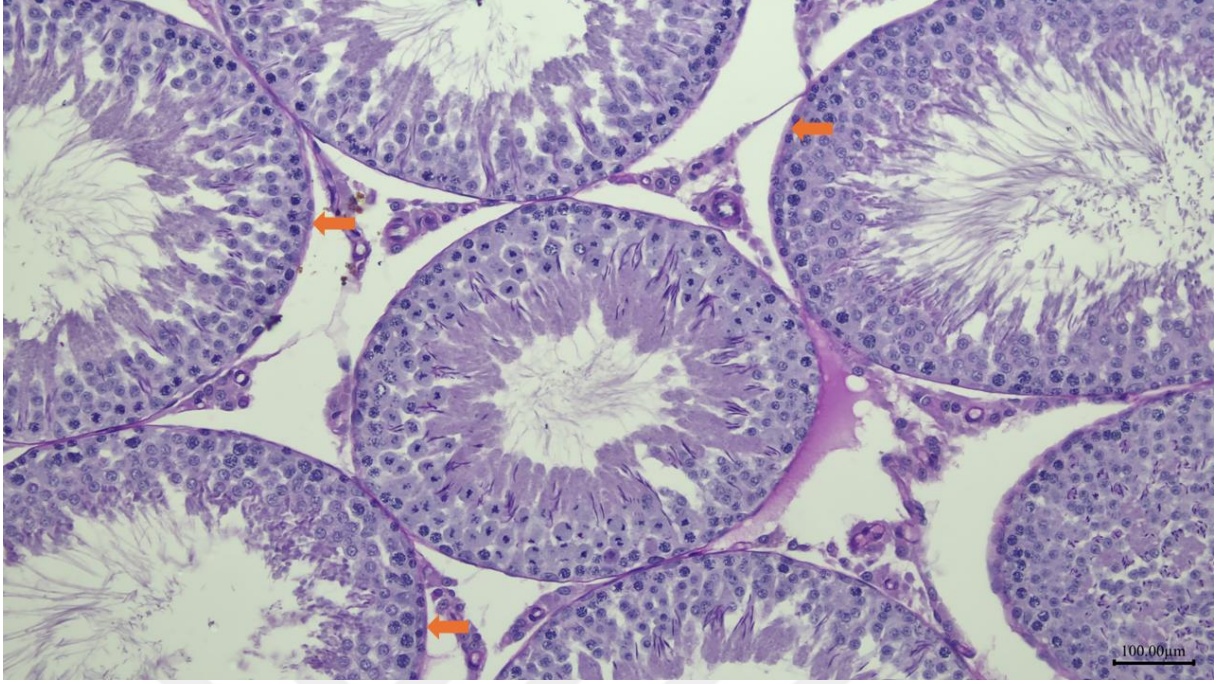
Resim 20. GO grubuna ait genel testis görüntüsü. Mikrovezikül (ok başı), vakuolizasyon (çizgi ok), germinal epitelin tübüle dökülmesi (yıldız), interstisyel alanda düzensizlik (çentikli ok) görünmekte (H&E 200x)

GO grubuna ait Masson trikrom boyalı preparatlarda yapılan incelemede; diğer gruplara nazaran germinal epitel kalınlığında azalma, epitel düzeninde bozulma ve vakuolizasyon görüldü. İnterstisyel bağ dokusuna bakıldığında ise bağ dokuya ait hücrelerde düzensizlik, bağ dokusundaki damarlarda genişleme (vasküler konjesyon) ve bağ dokusunda ödem izlendi (Resim 21).



Resim 21. GO grubuna ait Masson trikrom boyama. Germinal epitel kalınlığı (çift başlı ok), spermatogenetik seriye ait hücrelerde düzensizlik (sağa ok), dağılmış interstisyel bağ dokusu (ok başı), germinal epitelde vakuolizasyon (çentikli ok başı), vasküler konjesyon (yıldız), interstisyel bağ doku ödemi (kare ok başı) gözlemlendi (200x)

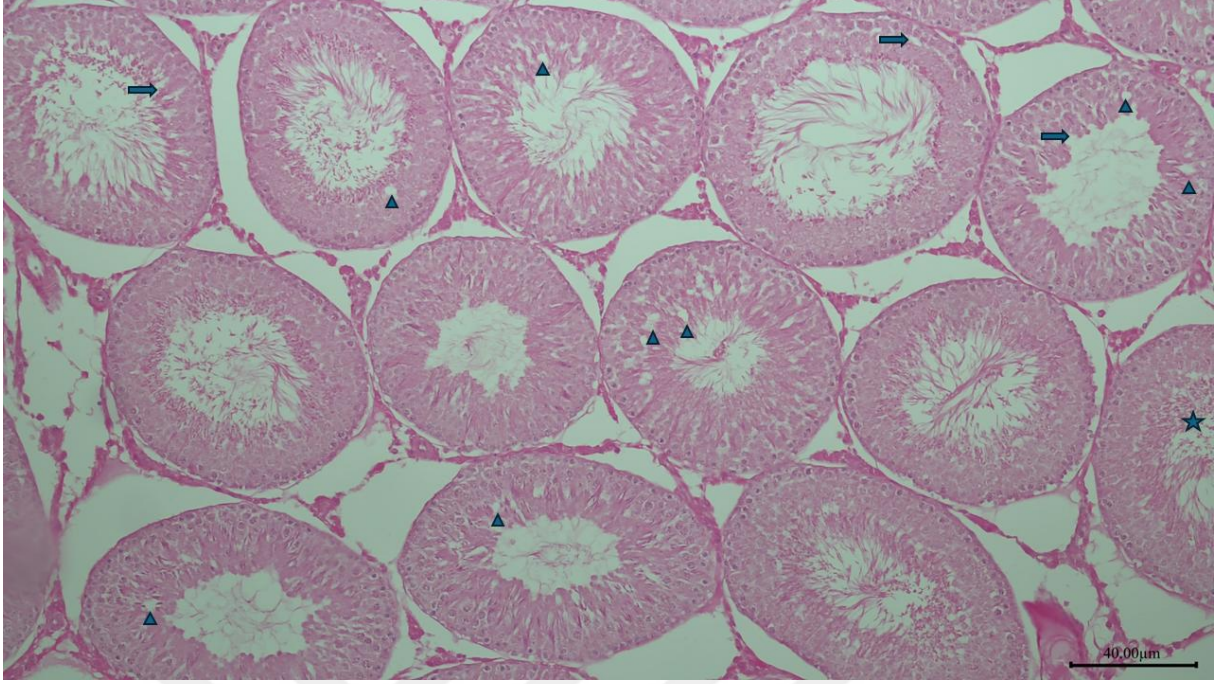
GO grubuna ait PAS boyalı preparatlara bakıldığında; germinal epitel bazal membranlarında düzensizlik ve kısmi kalınlaşma gözlemlendi (Resim 22).



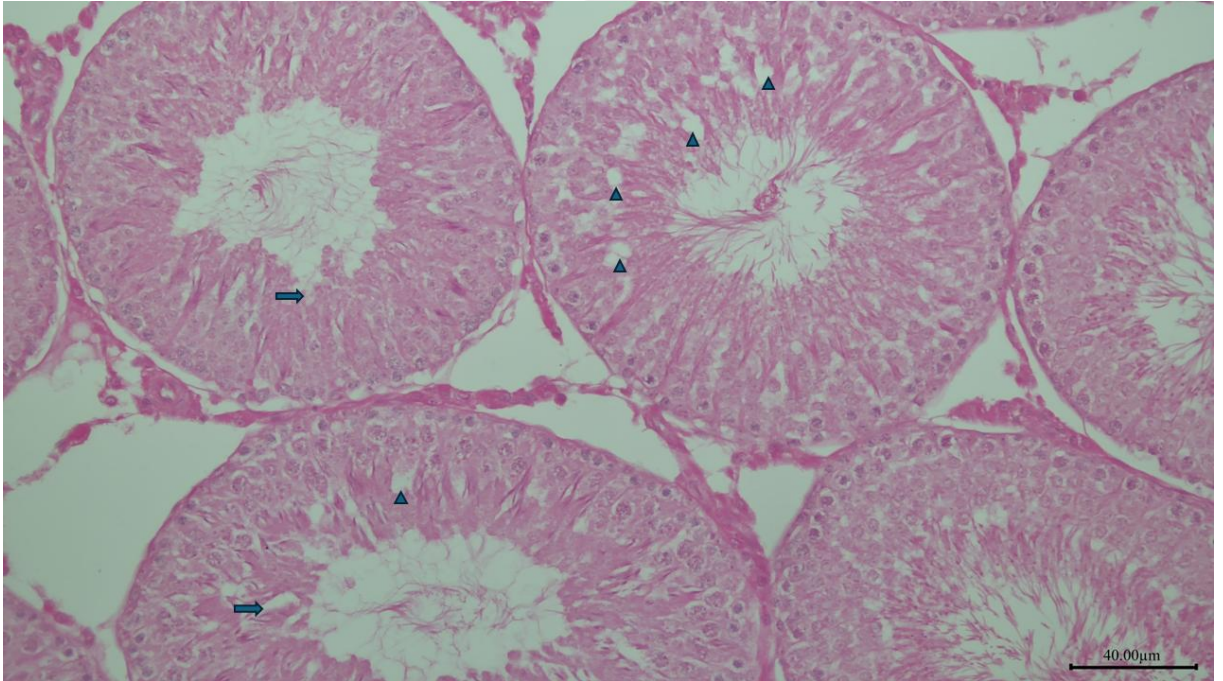
Resim 22. GO grubuna ait PAS boyama. Düzensiz ve kısmi kalınlaşmış bazal membran (200x)

4.6.4.GO+E vit Grubunun H&E, Masson Trikrom ve Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preperatların Değerlendirilmesi

Gruba ait H&E boyalı preparatlar incelendiğinde yoğun miktarda mikrovezikül gözlemlendi. Buna ek olarak çok sayıda germinal epitelde düzensizlik ve nadiren görülen germinal epitelin lümene dökülmesi gözlemlendi (Resim 23, 24).



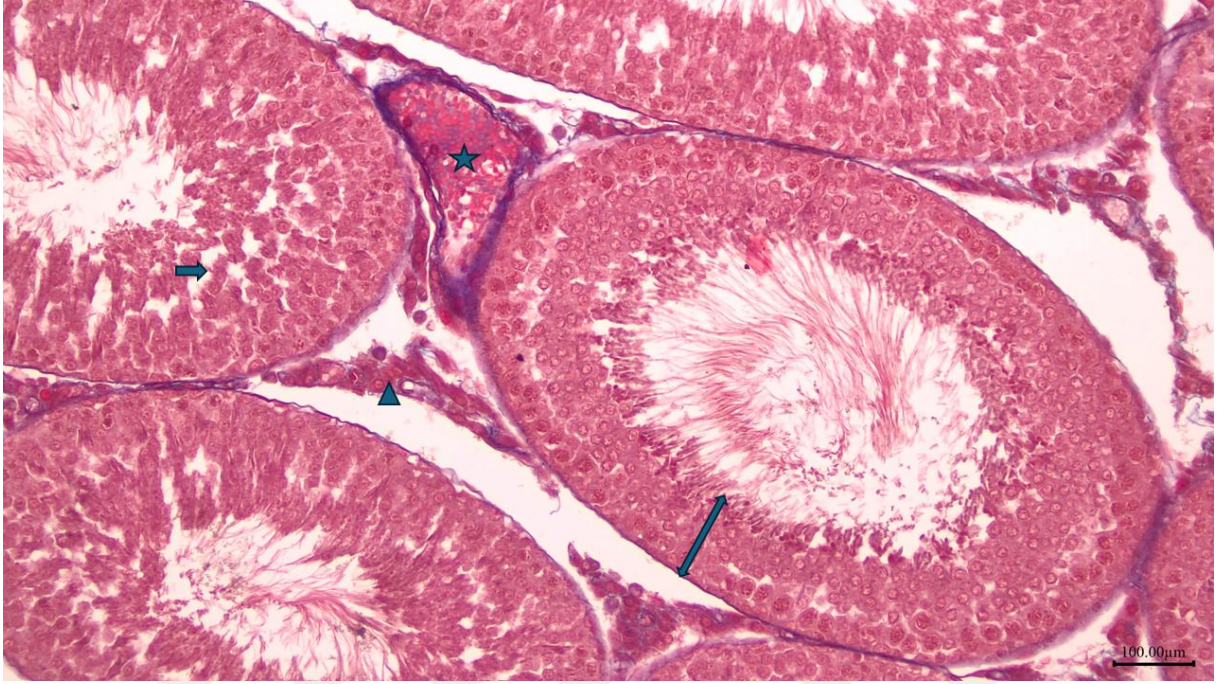
Resim 23. GO+E vit grubuna ait genel testis görüntüsü. Mikrovezikül (ok başı), epitelde ayrılma (sağ yönlü ok), germinal epitelin tübüle dökülmesi (yıldız) görünmekte (H&E 100x)



Resim 24. GO+E vit grubuna ait genel testis görüntüsü. Mikrovezikül (ok başı), epitelde ayrılma (sağ yönlü ok) görünmekte (H&E 200x)

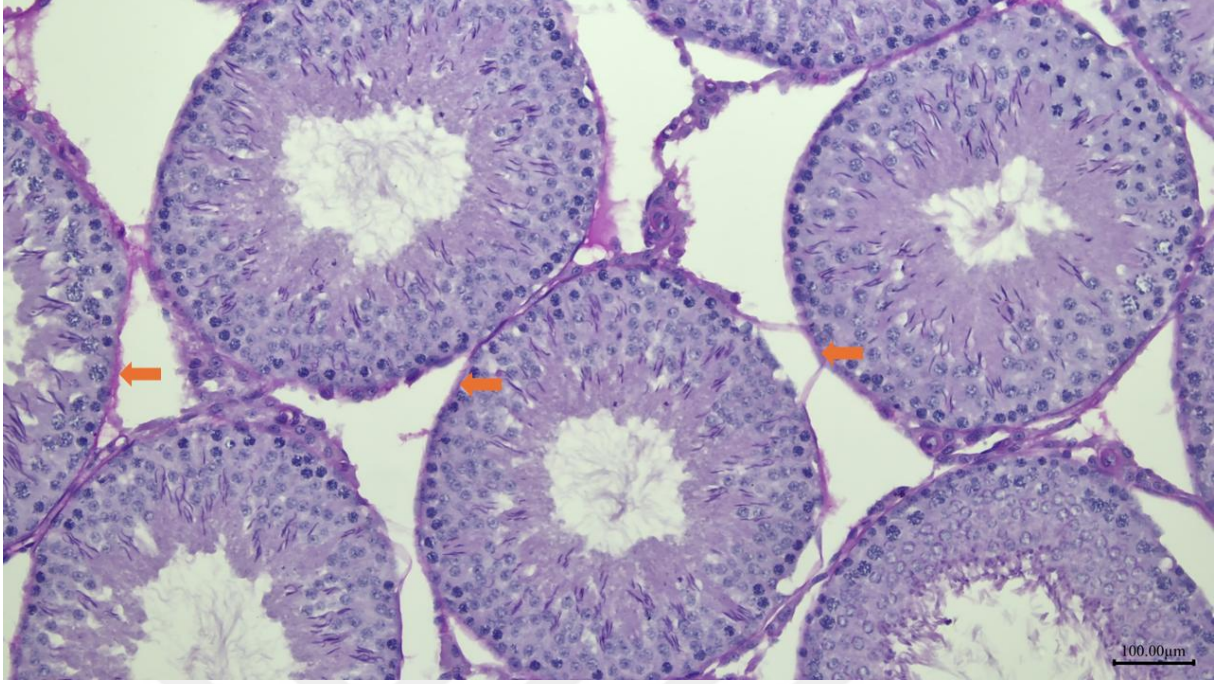
GO+E vit grubuna ait Masson trikrom boyalı preparatlar değerlendirildiğinde; germinal epitel kalınlığının kontrol ve E vit grubuna göre daha ince GO grubuna göre ise

daha kalın olduğu gözlemlendi. Germinal epitel düzeni kısmen bozuktu. İnterstisyel bağ dokusuna bakıldığında ödem ya da hücresel yapıda bozulma görünmezken, bağ dokuya ait damarlarda kısmi genişleme (vazokonjesyon) izlendi (Resim 25).



Resim 25. GO+E vit grubuna ait Masson Trikrom boyama. Germinal epitel kalınlığı (çift başlı ok), spermatogenetik seriye ait hücrelerde kısmi düzensizlik (sağa ok), interstisyel bağ dokusu (ok başı), vasküler konjesyon (yıldız) gözlemlendi (200x)

GO+E vit grubuna ait PAS boyalı preparatlarda yapılan incelemede; kısmi düzensiz ve kısmi kalınlaşma gösteren germinal epitel bazal membranı gözlemlendi (Resim 26).



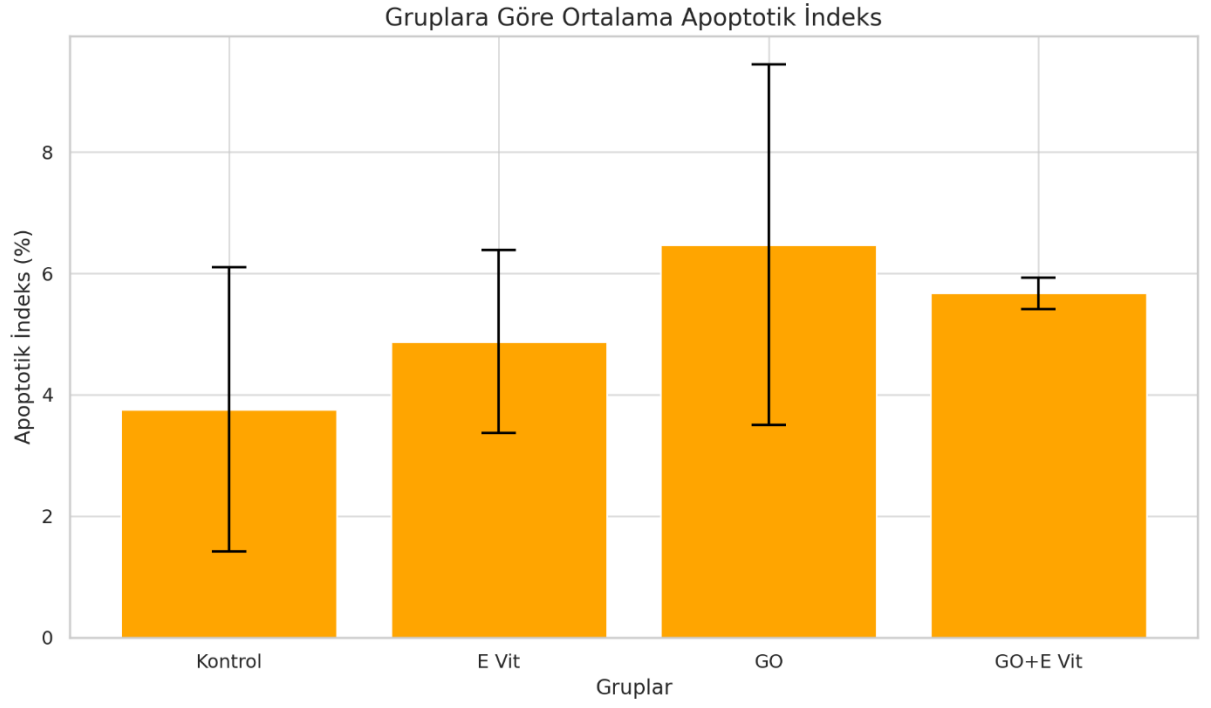
Resim 26. GO+E vit grubuna ait PAS boyama. Kısmi düzensiz ve kısmi kalınlaşmış bazal membran görüldü (200x)

4.7. Testisin İmmünohistokimyasal Değerlendirme Sonuçları

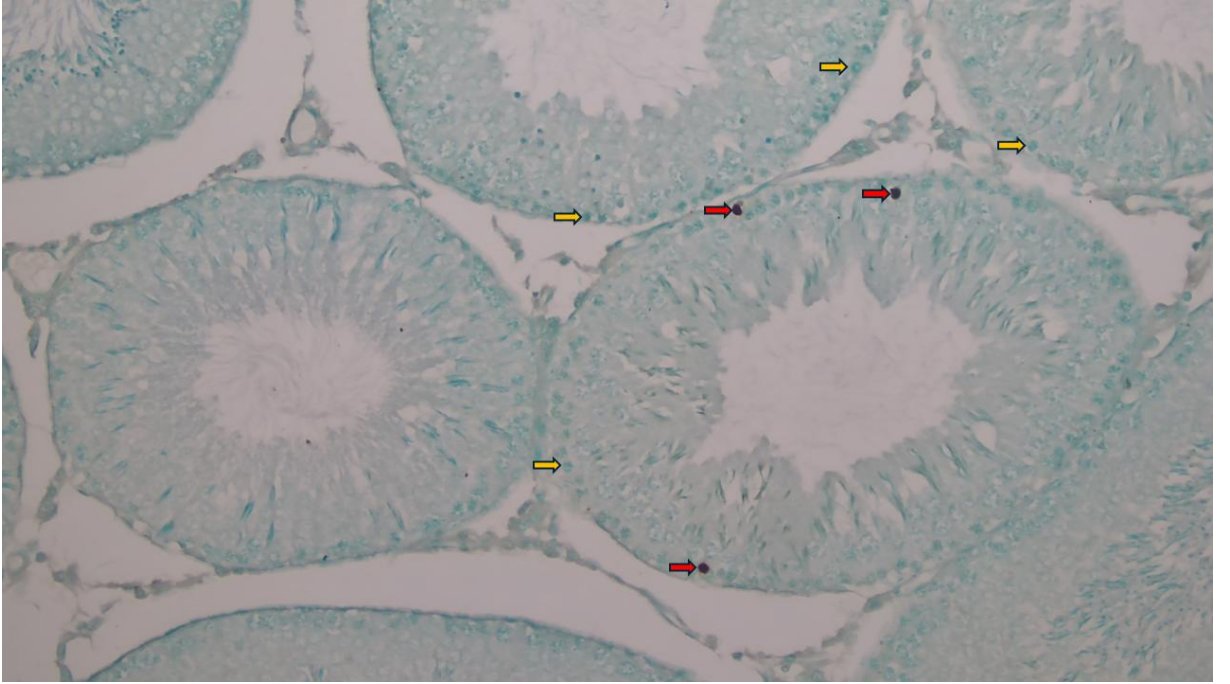
Deney hayvanlarından temin edilen testis preparatlarının TUNEL boyalı kesitlerinde yapılan incelemede; GO grubuna ait kesitlerde yapılan sayımda gruba ait belirlenen apoptotik indeksin, diğer bütün gruplardan yüksek çıktığı görülmüştür. GO grubundan sonraki en yüksek apoptotik indeks değeri ise GO+E vit grubunda daha sonra E vit grubunda, en düşük apoptotik indeks seviyesi ise kontrol grubunda gözlemlendi. Her ne kadar gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmasa da ($p>0,05$) GO grubunun istatistiksel anlamlılığı sınırda çıktığı için ileri analizler ve gruplar arası karşılaştırma yapıldı; ancak burada da anlamlı bir fark çıkmadı. Sonuç olarak deneklere uygulanan GO hayvanlarda apoptozu arttırmıştır; GO ile verilen E vit, bu değeri aşağı çekse de bu değişimler istatistiksel olarak anlamlı değildi. Gruplara ait apoptotik indeks verilerini özetleyen tablo, grafik (Tablo 19, Şekil 14) ve TUNEL boyalı preparatlar aşağıda verilmiştir (Resim 27-30).

Tablo 19. Gruplara ait apoptotik indeks ortalamaları ve standart sapmalar

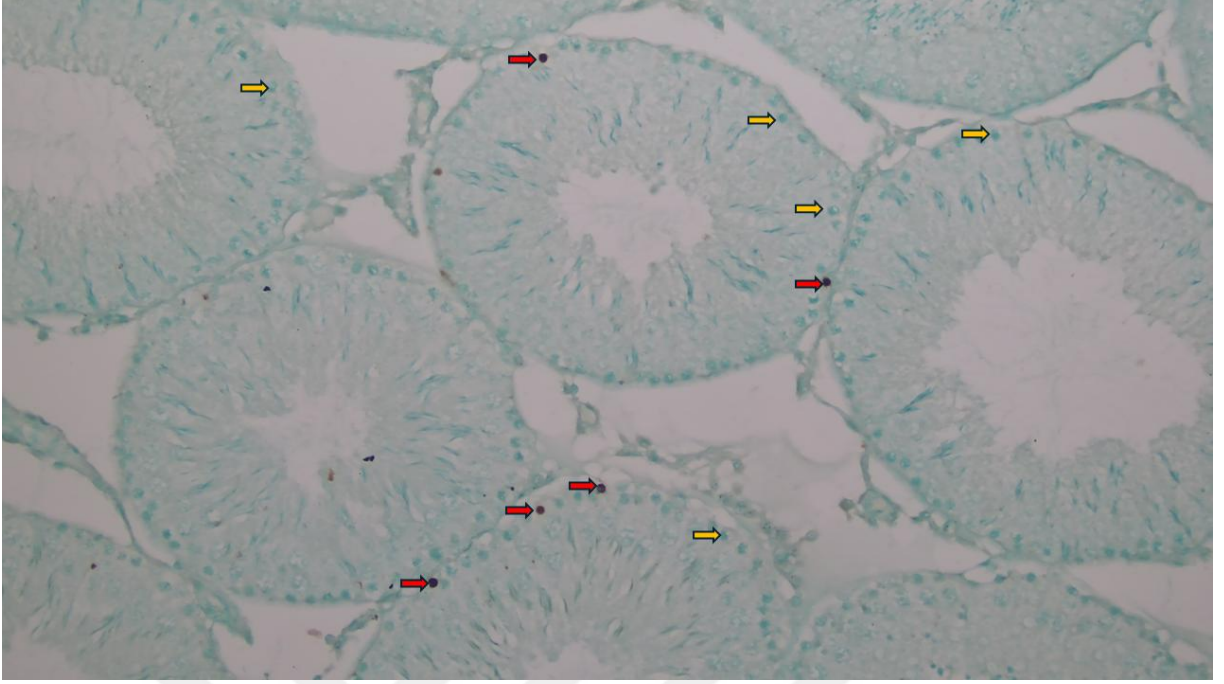
Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Apoptotik İndeks(%)±SD	3.76±0.82	4.88±0.53	6.47±1.05	5.67±0.09



Şekil 14. Gruplara ait apoptotik indeks ortalamalarının grafiği



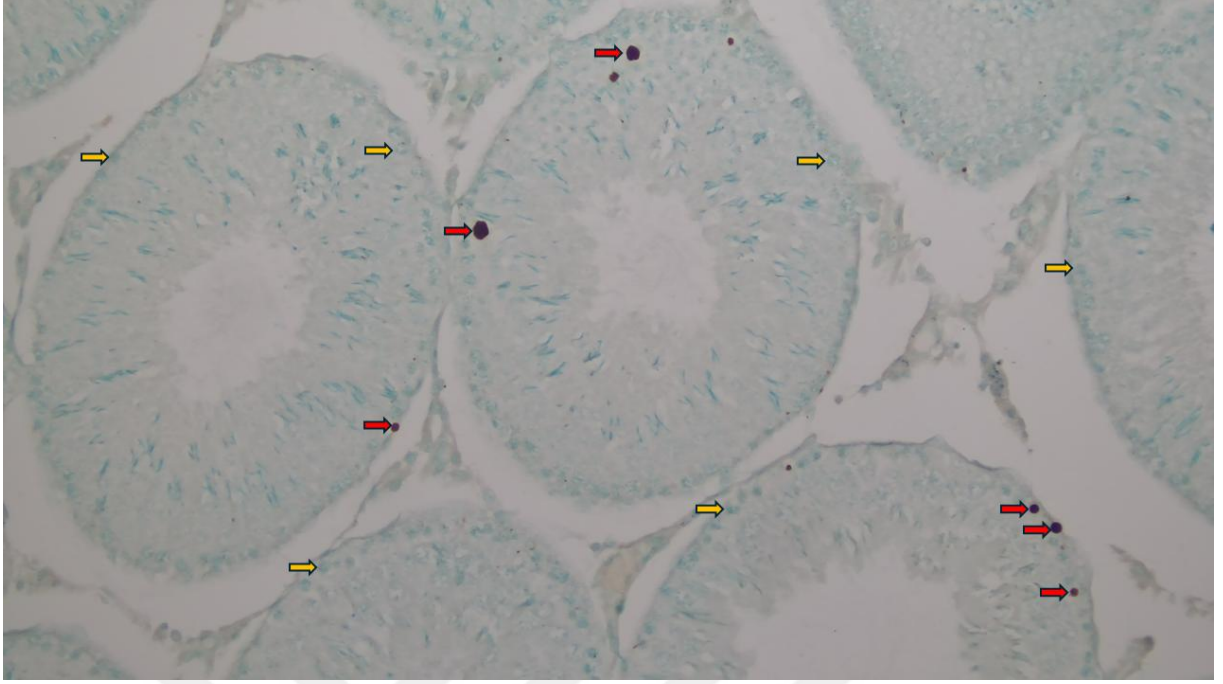
Resim 27. Kontrol grubuna ait TUNEL boyama. Apoptotik hücreler (kırmızı ok), normal hücreler (sarı ok) gözlemlendi (200x)



Resim 28. E vit grubuna ait TUNEL boyama. Apoptotik hücreler (kırmızı ok), normal hücreler (sarı ok) gözlemlendi (200x)



Resim 29. GO grubuna ait TUNEL boyama. Apoptotik hücreler (kırmızı ok), normal hücreler (sarı ok) gözlemlendi (200x)



Resim 30. GO+E vit grubuna ait TUNEL boyama. Apoptotik hücreler (kırmızı ok), normal hücreler (sarı ok) gözlemlendi (200x)

4.8. Histolojik Ölçüm Sonuçları

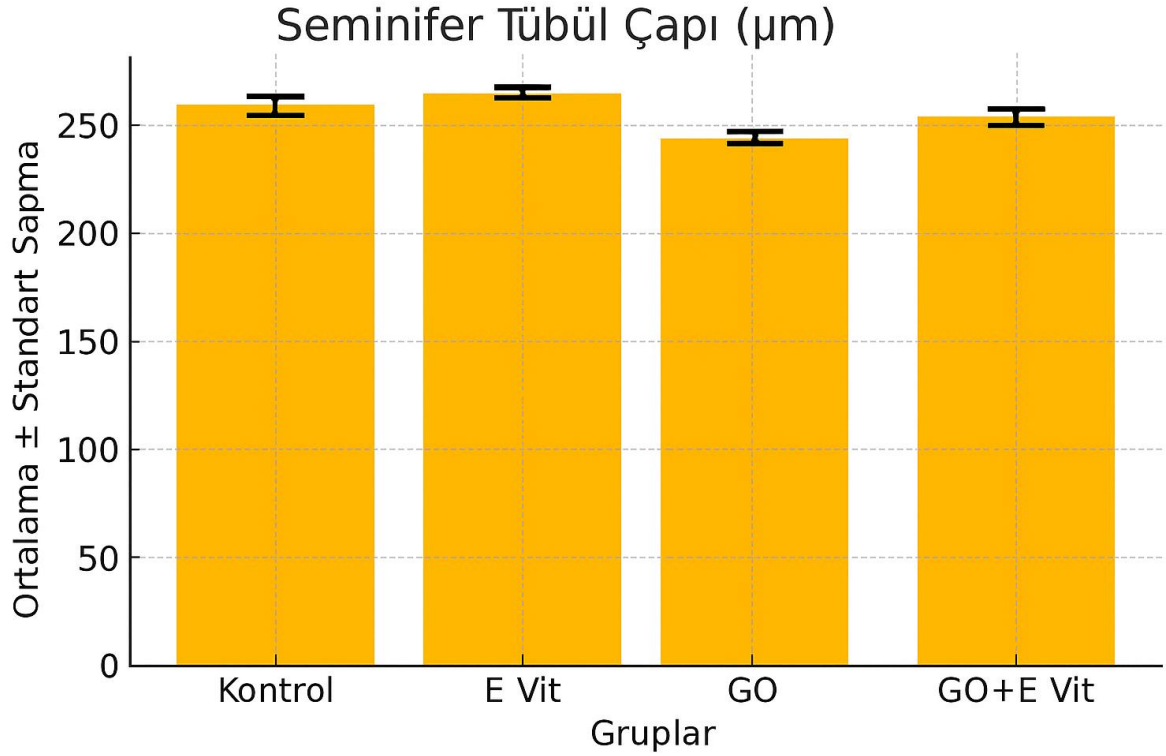
Histolojik ölçümlere, ilk olarak seminifer tübül çap ölçümü yapılarak başlandı. Çap ölçüm değeri en yüksek çıkan grup E vit grubu olarak belirlendi; bu grubu kontrol grubu, akabinde GO+E vit grubu takip etmiş; çap değeri en düşük grup ise GO grubu olarak tespit edilmiştir. İstatistiksel analiz sonuçlarına göre; grupların seminifer tübül çapları arasında anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir ($p<0,05$). E vit grubunun seminifer tübül çapı; GO ve GO+E vit grubununkine kıyasla anlamlı olarak daha büyüktü ($p<0,0083$). Gruplara ait seminifer tübül çaplarını veren değerler Tablo 20 ve Şekil 15 özetlenmiştir.

Tablo 20. Gruplara ait seminifer tübül çap ortalamaları ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Seminifer Tübül (μm) $\pm$ SD	260.57 $\pm$ 4.53	265.59 $\pm$ 2.18	250.08 ^a $\pm$ 4.51	253.76 ^b $\pm$ 3.65

^a: GO grubuna ait seminifer tübül çap değeri kontrol ve E vit grubuna kıyasla düşük bulundu ($p<0,0083$).

^b: GO+E vit grubuna ait seminifer tübül çap değeri, kontrol ve E vit grubuna kıyasla düşük bulundu ($p<0,0083$)



Şekil 15. Gruplara ait seminifer tübül çap değerlerine ait grafik

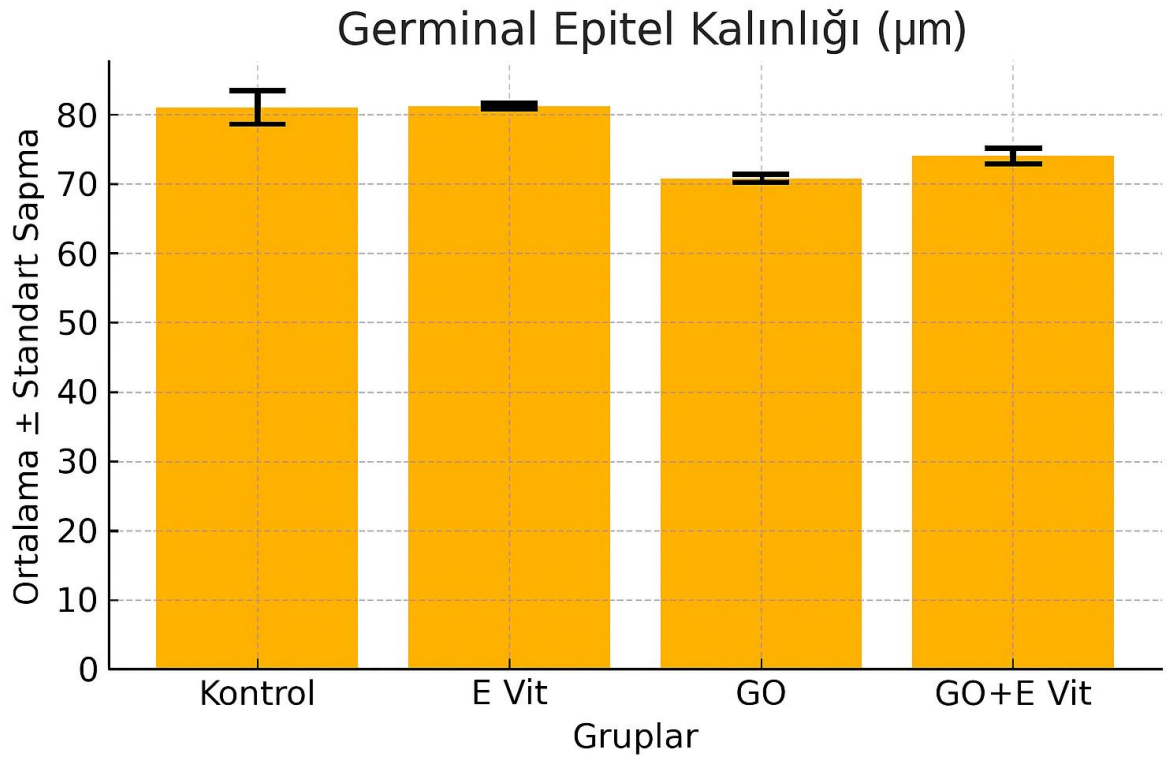
Daha sonra seminifer tübüllerin germinal epitel kalınlıkları ölçüldü. Veri sonuçlarına bakıldığında, germinal epitel kalınlığı en yüksek grup E vit grubu, akabinde kontrol grubu, GO+E vit grubu ve en düşük olan grubun yine GO grubu olduğu görüldü. İstatistiksel değerlendirmede gruplar arasında fark anlamlıydı ($p < 0,05$); GO grubunun germinal epitel kalınlığı kontrol ve E vit grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük ($p < 0,0083$), GO+E vit grubunun germinal epitel kalınlığı E vit grubuna kıyasla anlamlı olarak düşüktü ($p < 0,0083$). Gruplara ait germinal epitel kalınlık değerleri Tablo 21 ve Şekil 16 da özetlenmiştir.

Tablo 21. Gruplara ait germinal epitel kalınlık ortalamaları ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Germinal Epitel (μm) $\pm$ SD	81.00 $\pm$ 2.39	81.16 $\pm$ 0.41	71.05 ^a $\pm$ 0.62	73.98 ^b $\pm$ 1.17

^a : GO grubuna ait germinal epitel kalınlık değeri kontrol ve E vit grubuna kıyasla düşüktü ($p<0,0083$)

^b : GO+E vit grubuna ait germinal epitel kalınlık değeri, E vit grubuna kıyasla daha düşüktü ($p<0,0083$)



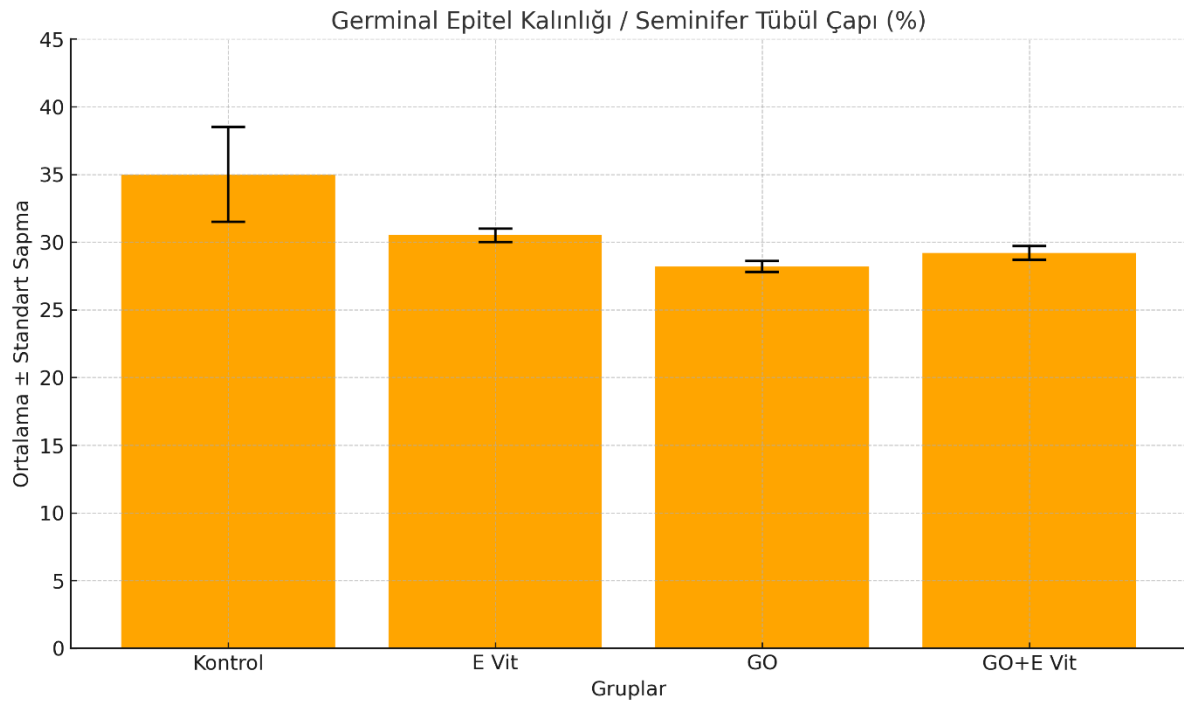
Şekil 16. Gruplara ait germinal epitel kalınlık değerlerine ait grafik

Değerlendirmelere germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapına oranı ile devam edildi. Yapılan hesaplamalarda en yüksek oran kontrol grubunda, takiben E vit grubundaydı. En düşük oran GO grubunda gözlemlendi. GO+E vit grubu ise GO grubunun ardından en düşük orana sahipti. İstatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark tespit edildi ($p<0,05$). Bu fark, GO grubunun kontrol ve E vit grubuna göre anlamlı derecede düşük olması şeklinde idi ($p<0,0083$). Gruplara ait germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapına oranını veren değerler Tablo 22 ve Şekil 17 de özetlenmiştir.

Tablo 22. Gruplara ait germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapına oranının ortalamaları ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Germinal Epitel / Seminifer Tübül çapı (%) $\pm$ SD	35.04 $\pm$ 3.46	30.40 $\pm$ 0.08	28.19 ^a $\pm$ 0.49	29.13 $\pm$ 0.55

^a: GO grubuna ait germinal epitel / seminifer tübül çap oran değeri kontrol ve E vit grubuna kıyasla düşüktü ($p < 0,0083$)



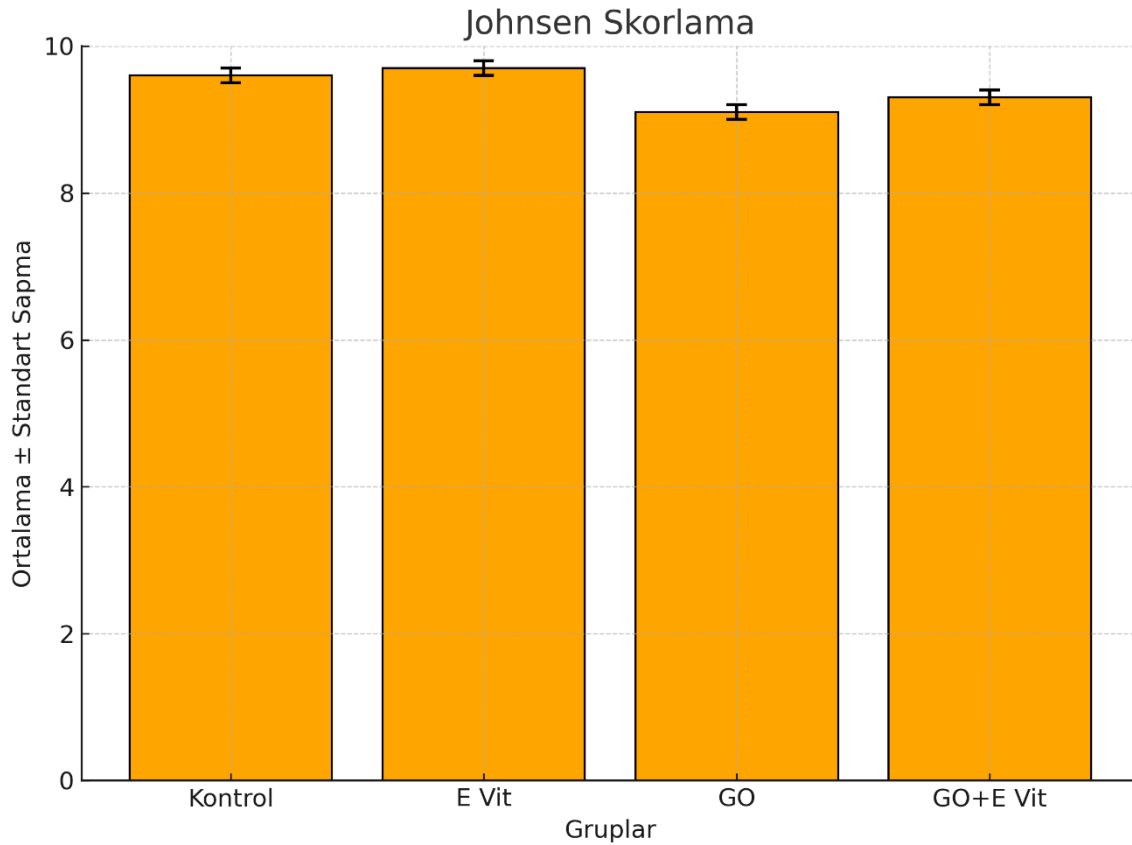
Şekil 17. Gruplara ait germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapı oranına ait grafik

Bu alandaki son değerlendirme parametresi ise modifiye Johnsen skorlamasıydı. Grupların bu parametre açısından değerlendirilmesi sonucunda; en yüksek skor değeri E vit grubunda ardından, kontrol grubu, onun ardından da GO+E vit grubunda gözlemlendi. Skorlamada en düşük değeri alan grup ise GO grubuydu. İstatistiksel değerlendirmede gruplar arasında anlamlı farklar izlendi ($p < 0,05$). GO grubunun skor değeri anlamlı şekilde kontrol ve E vit grubundan daha azdı ($p < 0,0083$). Her ne kadar GO+E vit grubunun skor değeri önemli miktarda hasar grubunun (GO) etkisini iyileştirmiş olsa da fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmadı ($p > 0,0083$). Gruplara ait modifiye Johnsen skorlarının değerleri Tablo 23 ve Şekil 18’de özetlenmiştir.

Tablo 23. Grupların modifiye Johnsen skarlama değerlerinin ortalaması ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Modifiye Johnsen Skarlama $\pm$ SD	9,52 $\pm$ 0,03	9,61 $\pm$ 0,03	9,07 ^a $\pm$ 0,06	9,32 $\pm$ 0,11

^a : GO grubuna ait modifiye Johnsen skor deęeri kontrol ve E vit grubuna kıyasla dūřuktū (p<0,0083)



şekil 18. Grupların modifiye Johnsen skarlama değerlerine ait grafik

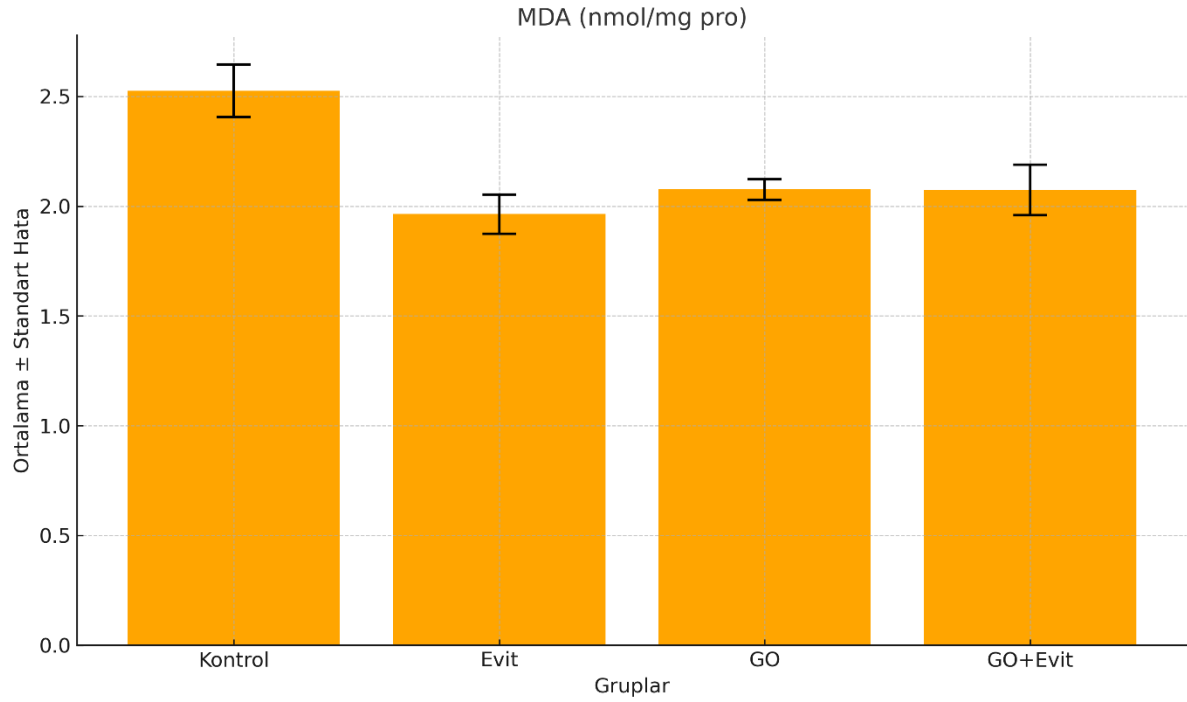
4.9. Biyokimyasal Veri Sonuęları

Biyokimyasal parametrelerden testise ait doku MDA seviyeleri deęerlendirildięinde; en yūksək MDA seviyesi kontrol grubunda gōrūlūrken, bu grubu GO, GO+E vit grubu takip etti; en dūřuk MDA seviyesi ise E vit grubunda ōlęūldū. İstatistiksel deęerlendirmede gruplar arasında farklar anlamlı idi (p<0,05). Bu baęlamda; kontrol grubu MDA seviyesi anlamlı olarak E vit grubu ve GO grubundan daha yūksekti (p<0,0083). Grublara ait veriler Tablo 24 ve řekil 19’da ōzetlenmiřtir.

Tablo 24. Gruplara ait doku MDA seviyeleri ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Doku MDA seviyesi $\pm$ SD	2.53 ^a $\pm$ 0.12	1.96 $\pm$ 0.09	2.08 $\pm$ 0.05	2.07 $\pm$ 0.11

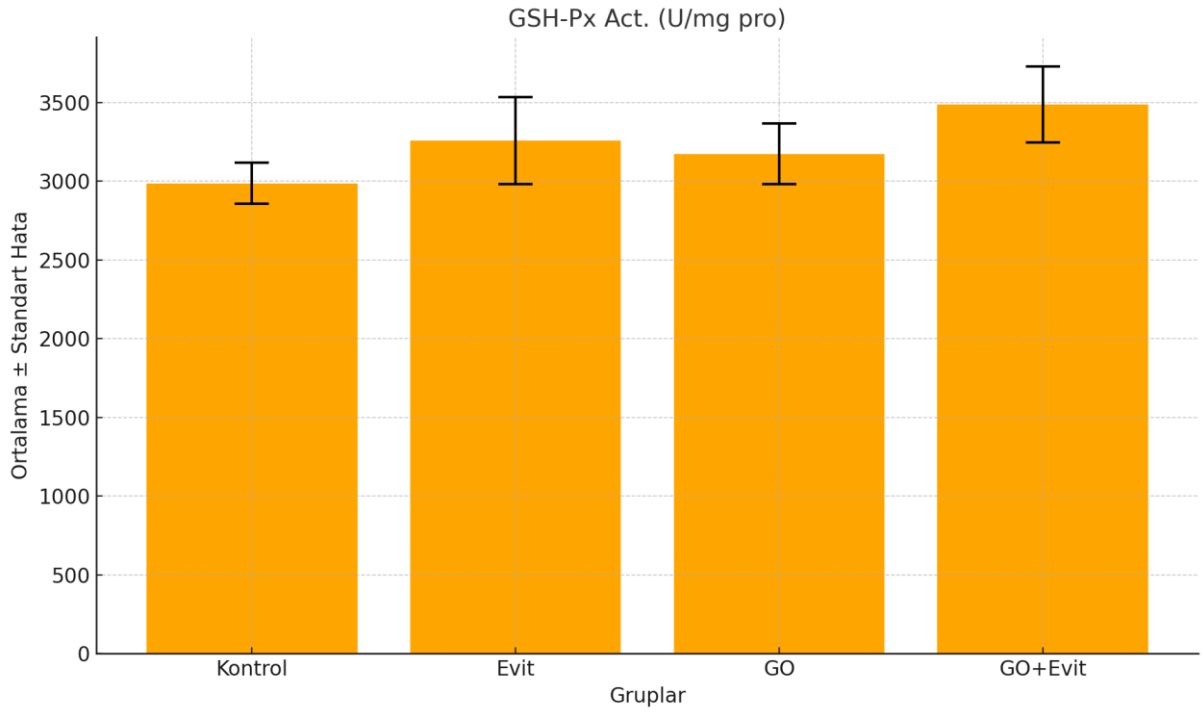
^a : Kontrol grubuna ait doku MDA seviyesi E vit ve GO grubuna kıyasla yüksekti (p<0,0083)

**Şekil 19.** Gruplara ait doku MDA seviye grafiği

Aynı şekilde değerlendirilen GSH Px aktivitesi değerlendirildiğinde; en yüksek seviye GO+E vit grubunda, akabinde E vit grubunda ve takiben GO grubunda; en düşük seviye ise kontrol grubunda ölçüldü. Ancak gruplar arasındaki farklar, istatistiksel olarak anlamlı değildi (p>0,05). Gruplara ait veriler Tablo 25 ve Şekil 20’de özetlenmiştir.

Tablo 25. Gruplara ait doku GSH Px aktivasyon seviyeleri ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
GSH Px aktivasyon seviyeleri	2986.94	3256.20	3173.48	3488.11
$\pm$ SD	$\pm$ 129.67	$\pm$ 276.21	$\pm$ 191.49	$\pm$ 241.93

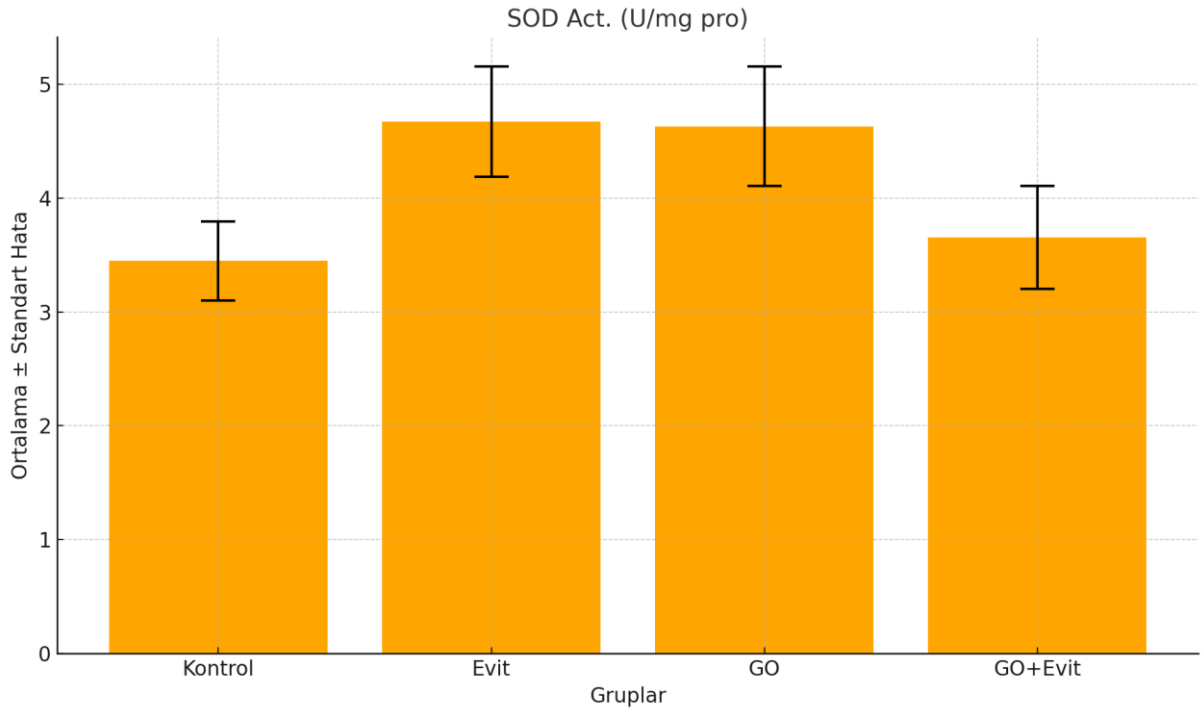


Şekil 20. Gruplara ait doku GSH Px aktivasyon seviye grafiği

Doku SOD aktivitesine bakıldığında en yüksek seviye; E vit grubunda, ardından az bir farkla GO grubunda, akabinde GO+E vit grubunda ve en düşük seviyede kontrol grubunda ölçüldü. İstatistiksel analizde ise gruplar arasındaki farklar anlamlı değildi ($p>0,05$). Gruplara ait veriler Tablo 26 ve Şekil 21’de özetlenmiştir.

Tablo 26. Gruplara ait doku SOD aktivasyon seviyeleri ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Doku SOD aktivasyon seviyeleri±SD	3.45±0.35	4.67±0.49	4.63±0.52	3.65±0.45

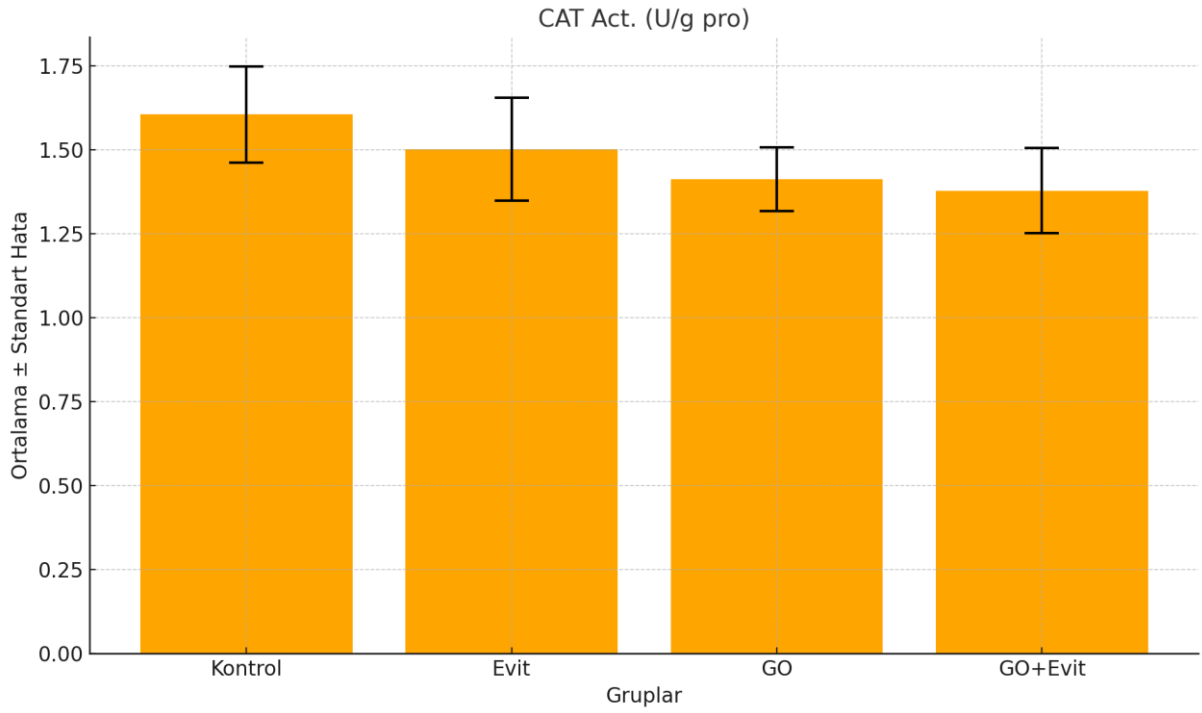


Şekil 21. Gruplara ait doku SOD aktivasyon seviye grafiği

Doku CAT aktivitesi seviyeleri değerlendirildiğinde en yüksek seviye kontrol grubunda ölçülürken; bunu sırasıyla E vit grubu, GO grubu, GO+E vit grubu ve kontrol grubu takip etmekteydi. İstatistiksel değerlendirme sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0,05$). Gruplara ait veriler Tablo 27 ve Şekil 22’de özetlenmiştir.

Tablo 27. Gruplara ait doku CAT aktivasyon seviyeleri ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Doku CAT aktivasyon seviyeleri±SD	1.61±0.14	1.50±0.15	1.41±0.09	1.38±0.13

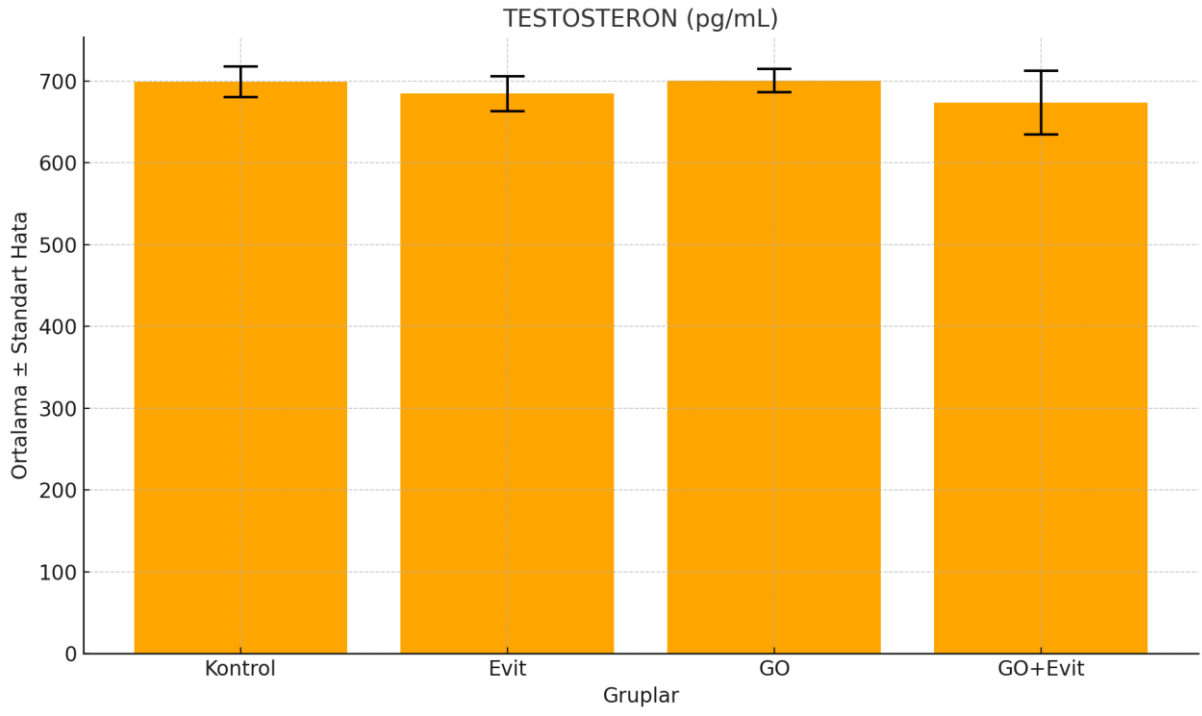


Şekil 22. Gruplara ait doku CAT aktivasyon seviye grafiği

Biyokimyasal parametrelerden kan testosteron seviyesi verilerine bakıldığında en yüksek seviye; GO grubunda ölçüldü, bu grubu çok az bir farkla kontrol grubu, bu grubu takiben E vit grubu ve GO+E vit grubu takip etti. İstatistiksel değerlendirme sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0,05$). Gruplara ait veriler Tablo 28 ve Şekil 23'te özetlenmiştir.

Tablo 28. Gruplara ait kan testosteron seviyeleri ve standart sapma değerleri

Grup	Kontrol	E Vit	GO	GO+E Vit
Kan testosteron seviyeleri	699.49	684.86	700.91	673.73
±SD	±18.82	±21.43	±14.06	±39.05



Şekil 23. Gruplara ait kan testosteron seviye grafiği

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Teknolojik gelişmeler, tarih boyunca insanoğlunun hayatını kolaylaştırmak ve yaşamlarını konforlu bir halde sürdürebilmelerini sağlamak amacı ile insanlığa sürekli hizmet etmekte ve gelişimin bu amaç doğrultusunda aralıksız olarak sürdürmektedir. Çağımızda, insanlığa her alanda seviye atlatacak bir bilim dalı olan nanoteknoloji de bütün teknolojik gelişmeler gibi her dalı ile bu alana hizmet etmektedir. Nanoteknoloji: nano boyutlardaki parçacıkların amaçlarına uygun şekilde tasarlanması ve işlevsellik göstermesi ile özetlenebilir. Birçok bilim dalında önemli işlevlere sahip olup ilgili alanlarda çığır açan yenilikleri beraberinde getiren bu bilim dalı, mühendislikten sağlığa kadar her alanda etkin olarak insanlığa kolaylık sağlamaktadır (1-3, 33-35) .

Yine nanobiyoteknoloji de nanoteknolojinin bir dalı olarak bu alanın biyolojik bilimlerle ilgili kanadında araştırma, analiz ve uygulama potansiyeliyle öne çıkmaktadır. Nanobiyoteknoloji, tıp, ilaç geliştirme, analitik bilimlerle tıbbi, teknolojik ve biyolojik araştırma-geliştirme alanlarında çok disiplinli bir yapıya sahip olup, bu alanların gelişimine yön veren temel bir itici güç konumundadır. Bu alan; biyoteknoloji, kimyasal ve fiziksel nanoteknoloji, malzeme bilimi, kimya, mühendislik, elektronik ve optoelektronik gibi farklı disiplinlerin seçici biçimde entegrasyonuna dayanmaktadır. Nanobiyoteknolojinin temel hedefi; DNA, RNA, protein ve metabolit gibi biyomoleküllerin kompleks karışımlarını analiz edebilecek mikro ve nano düzeyde diziler geliştirmek, bunun yanında ultra hızlı dizileme sistemleri, mikrobiyal yakıt hücreleri, implantlar, moleküler motorlar, yapay organlar ve nano robotlar gibi ileri teknolojik çözümler tasarlamaktır (42-44).

Grafen Oksit (GO), karbon temelli bir nanomalzeme olup, doğal grafit ya da karbon nanoliflerin güçlü oksidanlar kullanılarak kimyasal olarak oksitlenmesiyle elde edilir. Bu yeni form, indirgenmiş grafit oksit (rGO) olarak adlandırılmakta olup, iletken elektrotlar, ışık yayan diyotlar (LED'ler) ve fotovoltaiik hücreler gibi birçok elektronik uygulamada işlevsel bir bileşen olarak kullanılabilir. Öte yandan, grafit oksit, yüzeyinde bulunan oksijenli fonksiyonel gruplar sayesinde polimerler, nanoparçacıklar ve diğer moleküllerle kimyasal bağ kurma yeteneğine sahiptir; bu özellik, biyosensörler, mürekkep formülasyonları, ilaç taşıyıcı sistemler ve biyo-görüntüleme uygulamaları gibi birçok biyomedikal ve nanoteknolojik alanda önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu fonksiyonel yapısı sayesinde, grafit türevlerinin özellikleri farklı uygulama alanlarının gereksinimlerine göre modifiye edilebilir hale gelmektedir (58-63).

Tüm bu bilgiler doğrultusunda, grafen oksit (GO) biyoteknolojik uygulamalara ve çeşitli manipülasyonlara son derece uygun bir yapıya sahip olup, bu alandaki araştırmalarda kullanım potansiyeli yüksek ve avantajlı bir nanomalzeme olarak öne çıkmaktadır. Bu bağlamda, özellikle sağlıkla ilişkili alanlarda gelecekte yaygın olarak kullanılması öngörülen GO'nun canlı organizmalar üzerindeki olası etkileri hem bilimsel merak konusu olmakta hem de önem arz etmektedir. Literatürde sabit formda kullanılan GO'nun biyolojik sistemler üzerindeki etkilerine dair çalışmalara bakıldığında; intravenöz, intratrakeal, intraperitoneal enjeksiyonlar ya da oral yolla besinlerle verilmesi durumlarında içerisinde testisin de bulunduğu farklı dokularda çeşitli biyokimyasal ve histopatolojik hasarlara neden olabileceğini bildiren çalışmaların mevcut olduğu görülmektedir (8-13, 148, 149).

Erkek infertilitesinde testislerin yapısal ve işlevsel bütünlüğü hayati öneme sahiptir. Vücuda alınan çeşitli yabancı maddeler, hedef dokuların morfolojik yapısını ve fizyolojik işlevlerini bozabileceği gibi, oksidatif stres aracılığıyla hücresel düzeyde hasarlara da neden olabilmektedir. Bu bağlamda, pek çok alanda kullanım potansiyeli bulunan grafen oksitin (GO) testis dokusu üzerinde zararlı etkiler oluşturabileceğine dair bulgular literatürde yer almaktadır; ancak bu durum hâlen bilimsel olarak tartışmalıdır. Testiküler hasar oluşturduğunu bildiren çalışmalarda, histopatolojik değişiklikler ile oksidatif stres göstergeleri değerlendirilmiş ve bu parametreler üzerinden GO'nun toksik etkileri rapor edilmiştir (12, 13, 150, 151).

E vitamini, 1920'li yıllarda keşfedilen temel bir besin maddesi olup, antioksidan etkileri de dahil olmak üzere fizyolojik işlevleri yaklaşık bir asırdır araştırılmaktadır. Hem endojen hem de eksojen kaynaklı reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu redoks dengesindeki değişiklikler, çeşitli hastalıkların gelişiminde rol oynamakta ve aynı zamanda yaşamın sürdürülebilirliği için gerekli kabul edilmektedir. Yağda çözünebilen vitaminler arasında yüksek konsantrasyona sahip olan E vitamini, hücre zarları ve lipoproteinler dahil olmak üzere vücudun birçok bölgesinde bulunur ve redoks dengesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar. Yapılan araştırmalarda, E vitamininin diyabetik sıçanların testislerini oksidatif hasara karşı anlamlı düzeyde koruduğu ve siklofosamid kaynaklı testiküler oksidatif stres ile yapısal bozukluklara karşı koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca, E vitamini sperm kalitesini artıran ve testis gelişimini destekleyen bir besin maddesi olarak tanımlanmıştır. Fare ve keçilerde testis ve epididim ağırlığında, koyunlarda testis boyutunda ve sıçanlarda seminifer tübül çapında artış sağladığı; buna ek olarak seminifer

tübüllerdeki germ hücresi sayısını artırdığı gösterilmiştir. Önceki çalışmalar, E vitamini takviyesinin koyun, yaban domuzu, horoz ve tavşan gibi farklı türlerde sperm hareketliliği ve ejakülat hacmi üzerinde olumlu etkiler yarattığını ortaya koymuştur (16-19).

Ancak literatür incelendiğinde, GO'nun organizma üzerindeki potansiyel zararlarının açıklanmasında literatür boşluğu olduğu görünmektedir. Özellikle GO'nun memeli üreme sistemi üzerine olan etkileri üzerine yapılan çalışmalar oldukça kasıtlı ve muhalif sonuçlara sahiptir. Ek olarak, GO'nun etkisine karşı denenilen bir antioksidan etkisini inceleyen çalışma göze çarpmamıştır. Tüm bu sebeplerden ötürü çalışmamızın çıkış noktası bu nokta olup, GO'nun erkek sıçanların testis üzerine olası etkilerine karşı E vitaminin koruyucu ve iyileştirici etkisinin incelenmesi konusundadır. Ayrıca çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla, GO'nun memeli üreme sistemi üzerindeki etkisi konusundaki literatür açığının doldurması amaçlanmıştır.

Çalışmamızın sonuçlarını değerlendirecek olursak; hayvan, testis ağırlıkları ve testis kütle indeksi sonuçlarında değişimler yaşandığını gördük. Deneyin başında ve sonunda yapılan tartımlar sonucunda; hiçbir grubun kilo kaybına uğramadığı, her grupta kilo artışı olduğu gözlemlenmiş, ancak bu artışın gruplara göre farklı oranlarda olduğu görülmüştür. En çok kilo artışı kontrol grubunda görülürken, artış miktarı sırasıyla E vit grubu, GO grubu ve en az görülen GO+E vit grubunda idi, ancak gruplar arasındaki bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Li ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, 8-9 haftalık erkek Sprague Dawley sıçanlara yedi günlük alıştırma süreci sonrası, grafen oksit (GO) 2.5, 5 ve 10 mg/kg dozlarında kuyruk veninden günde bir kez enjeksiyon yoluyla uygulamıştır. Deney sonucu elde ettikleri verilerde hayvan ağırlıklarında anlamlı bir fark bulamamışlardır (152). Bu sonuç ile çalışmamızda vardığımız sonuç örtüşmektedir. Bu sebeple GO'nun vücut ağırlığında önemli sayılabilecek bir değişime yol açmadığı sonucunu düşündük.

Diğer bir sonucumuz testis ağırlıkları ile alakalıydı. Deney sonunda tartımlardan elde ettiğimiz sonuçlara baktığımızda en yüksek testis ağırlık ortalamasına sahip olan grup GO grubu olurken bu grubu sırasıyla, kontrol, GO+E vit ve en düşük ortalamaya sahip olan E vit grubu izlendi; ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmadı. Liang ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada farelere intravenöz yüksek doz (25 mg/kg) uyguladıkları GO'nun fare testis kütlelerinde anlamlı bir azalmaya neden olmadığı sonucuna varmışlardır (10). Bu sonuç çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarla paralellik göstermektedir ancak Alsahib ve ark. (2023) yaptıkları çalışmada sıçanlara oral yolla verdikleri (20-60 mg/kg),

GO'nun ise sıçan testis ağırlıklarında anlamlı bir düşüşe sebep olduğu sonucuna ulaşmışlardır (153). Bu sonuçlar çalışmamızda bulduğumuz sonuçlarla örtüşmemektedir.

Bir diğer parametremiz olan testis kitle indeksi sonuçlarına baktığımızda ise, bu alandaki en yüksek oran GO grubunda tespit edildi. Bundan sonra sırasıyla E vit grubu, GO+E vit grubu ve en düşük seviyeye sahip olan kontrol grubu ile devam etti. Bu parametrenin önemi; ayrı ayrı değerlendirilen hayvan ya da testis ağırlığından ziyade, testislerin ağırlığının vücut ağırlığına oranını tespit ederek daha isabetli veri elde etmemizi sağlamaktır. Buna göre; istatistiksel olarak gruplar arasında en yüksek oranı olan GO grubu, kontrol ve GO+E vit grubuna göre daha yüksekti. Bu alanda bu parametreyi kullanan herhangi bir çalışma literatürde bulunmadığı için parametrenin kullanıldığı çalışmadaki sonuçlarla karşılaştırma yaptık. Kutlu ve ark. (2022) yaptıkları çalışmada, Metotreksat (MTX), uyguladıkları sıçanlarda quercetin, rosmarinik asit ve quercetin ve rosmarinik asit kombinasyonunun metotreksata bağlı testis hasarına etkilerini araştırmışlar ve MTX grubuna ait sıçanların testis ağırlık indeksinin diğer gruplardan anlamlı şekilde düşük olduğunu raporlamışlardır (154). Bu sonuçlar bizim verilerimizle örtüşmemektedir. Çalışmamızdaki testis kütle indeksinin GO grubunda diğer gruplara göre anlamlı çıkmasındaki nedenin, testis dokusunda oluşan olası ödemin, testis kütlelerinde yapabileceği artış kaynaklı olabileceği düşüncesindeyiz.

Sperm motilite ve vitalite sonuçlarına bakıldığında; motilite sonuçlarında kontrol grubuna göre E vit grubunda artış, GO grubunda en düşük seviyede azalma, GO+E vit grubunda ise GO grubuna göre artış görüldü. Bu tabloda; E vitaminin sperm motilitesine pozitif yönde etki ettiği, GO' nun sperm motilitesini düşürdüğü, GO+E vit grubunda ise GO'nun düşüşünün kısmi oranda pozitif yönde değiştiğini görsek de bu sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Sperm vitalitesine baktığımızda; en yüksek oran kontrol grubunda görüldü. Akabinde E vit grubu en yüksek orana sahipken daha sonra GO+E vit grubu ve son olarak da en düşük seviyede bulunan GO grubu gelmekteydi. Buna göre; GO sperm vitalitesi anlamlı şekilde kontrol ve E vit grubuna göre düşüktü. Yine GO+E vit grubu da istatistiksel olarak E vit ve kontrol grubuna göre anlamlı şekilde düşüktü; fakat tedavi grubumuz olan GO+E vit grubu ile deney grubu olan GO grubu arasında anlamlı bir fark yoktu. Yani GO'nun etkilediği sperm vitalitesini, GO ile verilen E vitaminin kısmi olarak arttırmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde artış sağlayamamıştır. Qing Chen ve ark. (2023) yaptıkları çalışmada, insan spermi üzerinde in vitro ortamda GO dozları:

0, 10, 20, 40 µg/ml ve inkübasyon süresi: 1, 3, 6 saat olarak tertipledikleri çalışmada GO'nun sperm motilite ve vitalitesini anlamlı şekilde düşürdüğünü rapor etmişlerdir (155). Nirmal ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada, Wistar cinsi sıçanlara farklı dozlarda (0.4, 2.0, 10.0 mg/kg) intraperitoneal uygulanan GO'nun sperm vitalite ve motilitesini anlamlı derecede düşürdüğü rapor edilmiştir (13). Bu çalışmalar sperm vitalite sonuçları açısından çalışmamızda bulduğumuz sonuçlarla örtüşürken, motilite sonuçları açısından baktığımızda ise her ne kadar bizim çalışmamızda da GO sperm motilitesini düşürse de bu fark anlamlı olmadığı için literatürden örnek verdiğimiz sonuçlarla örtüşmemektedir.

Histopatolojik sonuçlarımıza baktığımızda; Nirmal ve ark. (2017), Abd Alsahib ve ark. (2023) yaptıkları çalışmalarda, uygulanan GO' nun seminifer tübül çapında azalma, germinal epitelde incelleme, germ hücre kaybı, ödem ve vakuolizasyon gibi histopatolojik bulgulara yol açtığını rapor etmişlerdir (13,153). Çalışmamızda da GO grubunun histopatolojik değerlendirmesinde; seminifer tübüllerde ve germinal epitelde vakuolizasyon ve mikroveziküllerle beraber interstisyel alanlarda ödemler görülmüştür. Ayrıca yapılan istatistiksel analizlere göre; GO grubuna ait, tübül çapı verilerinin, E vit grubuna göre anlamlı azaldığını, yine GO grubuna ait germinal epitel kalınlık verilerinin, kontrol ve E vit grubuna göre anlamlı olarak azaldığını gördük. GO' nun seminifer tübül yapısına, çapına ve germinal epitel yapısına olumsuz etki ettiği sonucumuz literatürdeki diğer çalışmaların sonuçları ile örtüşmekteydi. Bununla beraber tedavi grubumuz olan GO+E vit grubunun seminifer tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı değerlerinde kısmi iyileşmeye yol açsa da bu değişim istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi. Bu alandaki bir diğer değerli parametre olan germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapına oranının yüzdesi verisine bakıldığında da GO' nun istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde bu oranı, kontrol ve E vit gruplarına kıyasla düşürmüştür. Yine tedavi grubumuzda kısmi bir düzelme gözlemlense de bu artışta istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ek olarak, seminifer tübülün genel değerlendirme parametresi olan Johnsen skorlama sonuçları da çalışmamızın önemli sonuçlarından biriydi. Bu parametre sonuçlarına bakıldığında da GO grubunun değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı şekilde kontrol ve E vit grubuna kıyasla düşük olduğu sonucunu edindik. GO+E vit grubundaki kısmi düzelme ise yine istatistiksel olarak anlamlı çıkmadı. Şunu da eklemliyiz ki çalışmamızda, GO' nun testis dokusuna verdiği hasarın en belirgin sonuçları bu kısımda karşımıza çıkmıştır.

Çalışmamızın özgünlüğünü arttıran bir diğer parametremiz ise gruplara ait apoptotik indeks sonuçları idi. Zira literatürde, memeli testisine GO' nun sebep olduğu etkinin apoptotik indeks açısından değerlendirildiği çalışma ile karşılaşmadık. Çalışmamızda yaptığımız apoptotik indeks sonuçlarına bakıldığında GO grubu apoptotik indeks sonuçlarının diğer gruplara oranla arttığı görülmüştür. Bu oranın, kontrol ve E vit grubunda, GO+E vit grubuna kıyasla daha fazla olduğunu gördük. İstatistiksel anlamlılığın sınırında çıkan bu artış için ek istatistiksel değerlendirmeler yapılırsa da bu artış anlamlı çıkmamıştır. Ancak GO' nun sıçan testisinde apoptotik indeksi göz ardı edilmeyecek düzeyde arttırdığı sonucu ve bu alandaki kısıtlı verilerin artması manasında bu sonucun önemli olacağını düşündük. Her ne kadar GO' nun testis üzerindeki apoptotik etkisine örnek verebileceğimiz literatür örneği olmasa da Feng ve ark. (2022), Sprague Dawley cinsi sıçanlara ağız yoluyla (40 mg/kg), GO uyguladığı çalışmalarında; GO'nun ince barsak dokusunda apoptozu anlamlı ölçüde artırdığını rapor etmiştir (156). Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, GO'nun doku apoptozunda artış yaptığını göstermiş, ancak sonuçlarımız istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır. Bu açıdan bakıldığında istatistiksel sonuçlarımız bu araştırmayla tam olarak örtüşmemektedir.

Çalışmamızla ilgili dikkat çekici sonuçlardan biri de biyokimyasal değerler idi. Çalışılan parametrelere bakıldığında; kan testosteron seviyesinde gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı gibi, değerlerin birbirine yakın çıktığı görüldü; bu da bize, uygulanan GO'nun kan testosteron seviyesine önemli derecede etki etmediğini göstermektedir. SOD, CAT ve GSH-Px değerlerine bakıldığında ise her ne kadar verilerin artışı/azalışı bize, hayvanlara uygulanan GO'nun oksidatif stresi artırıcı etki gösterdiği hakkında ipucu verse de çıkan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildi; o nedenle bu konuda daha fazla denek bulunan ileri araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Patlolla ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada, uyguladıkları intraperitoneal GO'nun sıçan böbreklerinde SOD, CAT ve GSH-Px seviyelerini anlamlı ölçüde arttırdığını rapor etmişlerdir (157). Yine Nirmal ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada intraperitoneal uyguladıkları GO'nun sıçan testislerinde; SOD, GSH-Px ve MDA seviyesinin anlamlı derecede arttırdığını rapor etmişlerdir (13). Literatürdeki bu sonuçlara bakıldığında GO'nun dokularda stres belirteci olan parametrelerde anlamlı değişikliklere yol açtığı rapor edilmiştir. Çalışmamızda bu oksidatif stres belirteçlerinden CAT, SOD ve GSH-Px değerlerinin istatistiksel anlamlılık açısından bu çalışma sonuçlarıyla paralellik göstermese de çalışmamızdaki bu parametrelerin değişimleri, testis dokusundaki oksidatif stresin artma eğilimi gösterdiğini düşündürmektedir. Biyokimyasal

değerlendirmemizde anlamlı farklılık gösteren tek parametre MDA idi. Ancak bir stres belirteci olan MDA'nın kontrol grubunda E vit ve GO grubuna göre anlamlı seviyede yüksek çıkması literatürde çok rastlanmayan bir sonuç olmuştur. Buna göre; Kontrol grubunda gözlemlenen yüksek MDA seviyesinin, GO ve Evit grubuna kıyasla anlamlı çıkması bize, hem E vitamini hem de grafen oksit uygulamalarının, lipid peroksidasyonunu azaltarak membran stabilitesini koruyucu potansiyele sahip olabileceğini, düşündürdü. Bu bakış açısına ek olarak, Kontrol grubuna uygulanan sham uygulaması (gavajla zeytin yağı ve intraperitoneal salin) hayvanlardaki stres düzeyini arttırmış olabilir. E vitaminin MDA seviyesini düşürdüğünü destekleyen literatür çalışmaları bulunmaktadır. Demerdash ve ark. (2004) yaptıkları çalışmada; kadmiyumla oluşturulan oksidatif stres sonucu artan MDA düzeylerinin E vitamini uygulamasıyla anlamlı biçimde azaldığını rapor etmişlerdir (158). Aynı şekilde GO grubu MDA seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük olması durumu da bize, grafen oksitin tetiklediği antioksidan savunma mekanizmalarının (özellikle SOD ve GPx artışı, anlamlı düzeyde olmasa da) da lipid oksidasyonunu sınırlayıcı yönde etki gösterebileceği ve MDA seviyesini düşürebileceği ihtimalini düşündürdü. Nitekim; Cong ve ark. (2020) yaptıkları çalışmada yetişkin zebra balıklarına, 0.5 / 4.6 / 22.9 mg/L konsantrasyonlarında, 24, 48 ve 96 saat boyunca uyguladıkları dimetiltalitat'ın (DMP), düşük dozlarda (0.5 mg/L, 24 saat) SOD aktivitesini yükselttiği ve ardından MDA seviyesi azalttığını rapor etmişlerdir. Çalışmada, 96 saat içinde MDA'da azalma gözlenmiş ve bu durumun artan antioksidan savunmanın etkisiyle lipid peroksidasyonun sınırlanabileceğine dair bir kanıt olabileceği vurgulanmıştır (159). Bu literatürdeki DMP verilen grupta MDA sonuçlarının düşük çıkması, bizim çalışmamızdaki GO verilen gruptaki MDA düşüşü ile paraleldir; bu açıdan bu literatür bulguları bizim çalışmamızla örtüşmektedir. Bu nedenle grafen oksit ile ilgili daha ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Sıçanlarda yüksek doz grafen oksitle indüklenen olası testis hasarına karşı E vitamininin etkisini değerlendirdiğimiz 15 gün süren deneysel çalışmamızda;

1- Kontrol grubuna kıyasla, GO grubuna birer gün ara ile toplamda 7 doz intraperitoneal uygulanan yüksek doz (10mg/kg) grafen oksitin;

- ✓ Vücut kütle artış yüzdesini düşürdüğünü,
- ✓ Testis kütlesini artırdığını,
- ✓ Testis kütle indeksini artırdığını,
- ✓ Sperm motilitesini düşürdüğünü,
- ✓ Sperm vitalitesini düşürdüğünü,
- ✓ Seminifer tübül çapını azalttığını,
- ✓ Germinal epitel kalınlığını azalttığını,
- ✓ Germinal epitel kalınlığı / Seminifer tübül çapı oranını düşürdüğünü,
- ✓ Modifiye Johnsen skorunu düşürdüğünü,
- ✓ Apoptotik indeksi yükselttiğini,
- ✓ Doku MDA seviyesini düşürdüğünü,
- ✓ Doku SOD seviyesini artırdığını,
- ✓ Doku CAT seviyesini düşürdüğünü,
- ✓ Doku GSH-Px seviyesini artırdığını,
- ✓ Kan Testosteron seviyesini değiştirmediklerini gösterdik.

2- GO grubuna kıyasla, GO+E vit grubuna birer gün ara ile toplamda 7 doz intraperitoneal uygulanan yüksek doz grafen oksit (10mg/kg) ve birer gün ara ile toplamda 7 doz oral gavaj ile verilen E vitaminin (100 mg/kg);

- ✓ Vücut kütle artış yüzdesini düşürdüğünü,
- ✓ Testis kütlesini azalttığını,
- ✓ Testis kütle indeksini azalttığını,
- ✓ Sperm motilitesini yükselttiğini,
- ✓ Sperm vitalitesini yükselttiğini,

- ✓ Seminifer tübül çapını arttırdığını,
- ✓ Germinal epitel kalınlığını arttırdığını,
- ✓ Germinal epitel kalınlığı / Seminifer tübül çapı oranını yükselttiğini,
- ✓ Modifiye Johnsen skorunu yükselttiğini,
- ✓ Apoptotik indeksi düşürdüğünü,
- ✓ Doku MDA seviyesini değiştirmedini,
- ✓ Doku SOD seviyesini düşürdüğünü,
- ✓ Doku CAT seviyesini düşürdüğünü,
- ✓ Doku GSH-Px seviyesini arttırdığını,
- ✓ Kan Testosteron seviyesini düşürdüğünü gösterdik.

3- Kontrol grubuna kıyasla, E vit grubuna birer gün ara ile toplamda 7 doz oral gavaj ile verilen E vitaminin (100 mg/kg);

- ✓ Vücut kütle artış yüzdesini düşürdüğünü,
- ✓ Testis kütlesini azalttığını,
- ✓ Testis kütle indeksini arttırdığını,
- ✓ Sperm motilitesini yükselttiğini,
- ✓ Sperm vitalitesini düşürdüğünü,
- ✓ Seminifer tübül çapını arttırdığını,
- ✓ Germinal epitel kalınlığını değiştirmedini,
- ✓ Germinal epitel kalınlığı / Seminifer tübül çapı oranını azalttığını,
- ✓ Modifiye Johnsen skorunu yükselttiğini,
- ✓ Apoptotik indeksi arttırdığını,
- ✓ Doku MDA seviyesini azalttığını,
- ✓ Doku SOD seviyesini arttırdığını,
- ✓ Doku CAT seviyesini düşürdüğünü,
- ✓ Doku GSH-Px seviyesini arttırdığını,

- ✓ Kan testosteron seviyesini düşürdüğünü gösterdik.

4- Kontrol grubuna kıyasla, GO+E vit grubuna birer gün ara ile toplamda 7 doz intraperitoneal uygulanan yüksek doz grafen oksit (10mg/kg) ve birer gün ara ile toplamda 7 doz oral gavaj ile verilen E vitaminin (100 mg/kg);

- ✓ Vücut kütle artış yüzdesini düşürdüğünü,
- ✓ Testis kütlesini azalttığını,
- ✓ Testis kütle indeksini arttırdığını,
- ✓ Sperm motilitesini düşürdüğünü,
- ✓ Sperm vitalitesini düşürdüğünü,
- ✓ Seminifer tübül çapını azalttığını,
- ✓ Germinal epitel kalınlığını azalttığını,
- ✓ Germinal epitel kalınlığı / Seminifer tübül çapı oranını düşürdüğünü,
- ✓ Modifiye Johnsen skorunu düşürdüğünü,
- ✓ Apoptotik indeksi yükselttiğini,
- ✓ Doku MDA seviyesini düşürdüğünü,
- ✓ Doku SOD seviyesini arttırdığını,
- ✓ Doku CAT seviyesini düşürdüğünü,
- ✓ Doku GSH-Px seviyesini arttırdığını,
- ✓ Kan Testosteron seviyesini düşürdüğünü gösterdik.

Çalışmamızda ortaya koyduğumuz verilerin ve sonuçların ileride, bu alanda yapılacak çalışmalara yol gösterici bir rol üstleneceği kanaatindeyiz. Gerçekleştirdiğimiz bu çalışma, GO kaynaklı oluşan testis hasarına karşı E vitamininin etkilerinin araştırıldığı ilk çalışma olma niteliğindedir. Ayrıca yine GO'nun memeli üreme sistemindeki etkisinin açıklığa kavuşturulmasında literatürdeki açığı dolduracağını umut ediyoruz. Yine GO'nun memeli sistem üzerindeki etkisine karşı bir antioksidanın denendiği nadir çalışmalardan biridir. Bu konuda araştırmaları ilerletecek olan araştırmacıların;

- ✓ Bir nonoparçacık olan GO'nun olası hücresel düzeydeki etkilerini incelemek amaçlı elektron mikroskopik değerlendirme yapmaları,

- ✓ Etken maddenin etkinliğini arttırmak için dozu ve veriliş şeklinin farklı kombinasyon ve düzeylerini barındıran bir deney tasarımları,
- ✓ Literatürdeki çalışmaların sonuçlarına paralel seyreden ancak anlamlı çıkmayan sonuçların daha isabetli ve anlamlı istatistiksel sonuçların çıkabilmesine olanak sağlayacak denek sayılarını arttırmaları,
- ✓ Kullanılan antioksidanın farklı dozlarını ve farklı antioksidan türlerinin denenmesini,
- ✓ Daha zengin ve güvenilir veri setleri için, flow sitometri, stereoloji, konfokal mikroskopi ve elektron mikroskopi gibi ileri tetkik yöntemlerini kullanmalarını ve çalışmalarını olabildiğince zenginleştirme yoluna gitmelerini önermekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Hulla JE, Sahu SC, Hayes AW (2015). Nanotechnology: History and future. *Human & Experimental Toxicology* 34(12): 1318-1321.
2. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F (2019). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules* 25(1): 112.
3. Farokhzad OC, Langer R (2009) Impact of nanotechnology on drug delivery. *ACS Nano* 3(1): 16–20
4. Emerich DF, Thanos CG (2003) Nanotechnology and medicine. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 3(4): 655–663
5. Li X, Yu J, Wageh S, Al-Ghamdi AA, Xie J (2016) Graphene in photocatalysis: A review. *Small* 12(44): 6640–6696
6. Seabra AB, Paula AJ, de Lima R, Alves OL, Durán N (2014) Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. *Chemical Research in Toxicology* 27(2): 159–168
7. Priyadarsini S, Mohanty S, Mukherjee S, et al (2018) Graphene and graphene oxide as nanomaterials for medicine and biology application. *Journal of Nanostructure in Chemistry* 8: 123–137
8. Akhavan O, Ghaderi E, Hashemi E, Akbari E (2015) Dose-dependent effects of nanoscale graphene oxide on reproduction capability of mammals. *Carbon* 95, 309–317
9. Zhang D, Zhang Z, Wu Y, Fu K, Chen Y, Li W, Chu M (2019) Systematic evaluation of graphene quantum dot toxicity to male mouse sexual behaviors, reproductive and offspring health. *Biomaterials* 194: 215–232
10. Liang S, Xu S, Zhang D, He J, Chu M (2015) Reproductive toxicity of nanoscale graphene oxide in male mice. *Nanotoxicology* 9(1): 92–105
11. Skovmand A, Lauvås AJ, Christensen P, Vogel U, Hougaard KS, Goericke-Pesch S (2018) Pulmonary exposure to carbonaceous nanomaterials and sperm quality. *Particle and Fibre Toxicology* 15(1): 1–12
12. Dziewięcka M, Karpeta-Kaczmarek J, Augustyniak M, Rost-Roszkowska M (2017) Short-term in vivo exposure to graphene oxide can cause damage to the gut and testis. *Journal of Hazardous Materials* 328: 80–89
13. Nirmal NK, Awasthi KK, John PJ (2017) Effects of Nano-Graphene Oxide on Testis, Epididymis and Fertility of Wistar Rats. *Basic Clinical Pharmacology Toxicology* 121(3): 202–210

14. Gupta RS, Gupta ES, Dhakal BK, Thakur AR, Ahnn J (2004) Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Molecules and Cells* 17(1): 132–139
15. Chen H, Liu J, Luo L, Baig MU, Kim JM, Zirkin BR (2005) Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Experimental Gerontology* 40(8–9): 728–736
16. Miyazawa T, Burdeos GC, Itaya M, Nakagawa K, Miyazawa T (2019) Vitamin E: Regulatory redox interactions. *IUBMB Life* 71(4): 430–441
17. Nazıroğlu M (2003) Enhanced testicular antioxidant capacity in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biological Trace Element Research* 94(1): 61–71
18. Ghosh D, Das UB, Misro M (2002) Protective role of α -tocopherol-succinate (provitamin E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: A correlative approach to oxidative stress. *Free Radical Research* 36(11): 1209–1218
19. Gao Y, Lu W, Jian L, Machaty Z, Luo H (2022) Vitamin E promotes ovine Sertoli cell proliferation by regulation of genes associated with cell division and the cell cycle. *Animal Biotechnology* 33(2): 392–400
20. Goldstein M, Mehta A (2016) Male reproductive system. In: Standring S (ed) *Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice*. 41st ed., pp. 1272–1278. Elsevier
21. Tishler PV (1971) Diameter of testicles. *New England Journal of Medicine* 285(24): 1489
22. Prader A (1966) Testicular size: Assessment and clinical importance. *Triangle* 7(3): 240–243
23. Harrison RG, Barclay AE (1948) The distribution of the testicular artery (internal spermatic artery) to the human testis. *British Journal of Urology* 20(1): 57–66
24. Raman J, Goldstein M (2004) Intraoperative characterization of arterial vasculature in spermatic cord. *Urology* 64(3): 561–564
25. Harrison RJ (1949) The vascular supply to the human testis. *Journal of Anatomy* 83: 61.
26. Rauchenwald M, Steers WD, Desjardins C, et al (1995) Efferent innervation of the rat testis. *Biology of Reproduction* 52(5): 1136–1143
27. Taguchi K, Tsukamoto T, Murakami G (1999) Anatomical studies of the autonomic nervous system in the human pelvis by the whole-mount staining method: Left-right communicating nerves between bilateral pelvic plexuses. *Journal of Urology* 161(1): 320–325

28. Pawlina W (2016) Histology: A text and atlas. 7th ed. Wolters Kluwer Health
29. Zirkin BR, Papadopoulos V (2018) Leydig cells: Formation, function, and regulation. *Biology of Reproduction* 99(1): 101–111
30. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG (2016) The developing human: Clinically oriented embryology. 10th ed. Elsevier
31. Picut CA, Ziejewski MK, Stanislaus D (2018) Comparative aspects of pre- and postnatal development of the male reproductive system. *Birth defects research* 110(3): 190–227
32. Mansoori GA, Soelaiman TF (2005) Nanotechnology--An introduction for the standards community. Chicago IL USA: ASTM International
33. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F (2019) The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine. *Molecules* 25(1): 112
34. Drexler E (1987) Engines of creation: The coming era of nanotechnology. Anchor
35. Roco MC, Williams RS, Alivisatos P (2000) Nanotechnology research directions: IWGN workshop report: vision for nanotechnology in the next decade. Springer Science & Business Media
36. Bayda S, Adeel M, Tuccinardi T, Cordani M, Rizzolio F (2019) The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. *Molecules* 25(1): 112
37. Germain M, Caputo F, Metcalfe S, Tosi G, Spring K, Åslund AKO, Pottier A, Schiffelers R, Ceccaldi A, Schmid R (2020) Delivering the power of nanomedicine to patients today. *Journal of Controlled Release* 326: 164–171
38. Liu ZY, Luo JY, Lu Y, Du SY (2023) Application of traditional Chinese medicine theory in modern traditional Chinese medicine nano-preparation: Taking tumor treatment as an example. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 48(6): 1455–1462
39. Pan D (2013) Theranostic nanomedicine with functional nanoarchitecture. *Molecular Pharmaceutics* 10(3): 781–782
40. Han X, Gong X, Li J, Wen J, Li Y, Zhang Z (2022) Current approaches of nanomedicines in the market and various stage of clinical translation. *Acta Pharmaceutica Sinica B* 12(7): 3028–3048
41. Mansoori GA (2005) Principles of nanotechnology: molecular based study of condensed matter in small systems. World Scientific Publishing Company

42. Klefenz H (2004) Nanobiotechnology: from molecules to systems. *Engineering in Life Sciences* 4(3): 211–218
43. Tessier PM, Kane RS (2022) Editorial overview: Nanobiotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 78: 102824.
44. Hess H (2010) Editorial overview Henry Hess and Luc Jaeger. *Current Opinion in Biotechnology* 21: 1–3.
45. Dordick JS, Lee KH (2014) Editorial overview: Nanobiotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 28: iv–v.
46. Gu H, Chao J, Xiao SJ, Seeman NC (2010) A proximity-based programmable DNA nanoscale assembly line. *Nature* 465(7295): 202–205
47. Lund K, Manzo AJ, Dabby N, Michelotti N, Johnsen-Buck A, Nangreave J, Yan H (2010) Molecular robots guided by prescriptive landscapes. *Nature* 465(7295): 206–210.
48. Sadownik JW, Ulijn RV (2010) Dynamic covalent chemistry in aid of peptide self-assembly. *Current Opinion in Biotechnology* 21(4): 401–411
49. Shiba K (2010) Exploitation of peptide motif sequences and their use in nanobiotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 21(4): 412–425
50. Stanley S (2014) Biological nanoparticles and their influence on organisms. *Current Opinion in Biotechnology* 28: 69–74
51. Baneyx F, Matthaei JF (2014) Self-assembled two-dimensional protein arrays in bionanotechnology: from S-layers to designed lattices. *Current Opinion in Biotechnology* 28: 39–45
52. Kon E, Elia U, Peer D (2022) Principles for designing an optimal mRNA lipid nanoparticle vaccine. *Current Opinion in Biotechnology* 73: 329–336
53. Roh EH, Fromen CA, Sullivan MO (2022) Inhalable mRNA vaccines for respiratory diseases: a roadmap. *Current Opinion in Biotechnology* 74: 104–109
54. Hills RA, Howarth M (2022) Virus-like particles against infectious disease and cancer: guidance for the nano-architect. *Current Opinion in Biotechnology* 73: 346–354
55. Jain KK (2005) The role of nanobiotechnology in drug discovery. *Drug Discovery Today* 10(21): 1435–1442
56. Grimm J, Perez JM, Josephson L, Weissleder R (2004) Novel nanosensors for rapid analysis of telomerase activity. *Cancer Research* 64(2): 639–643

57. Wang WU, Chen C, Lin KH, Fang Y, Lieber CM (2005) Label-free detection of small-molecule–protein interactions by using nanowire nanosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(9): 3208–3212
58. Geim AK (2009) Graphene: status and prospects. *Science* 324(5934): 1530–1534
59. Rozada R, Paredes JI, López MJ, Villar-Rodil S, Cabria I, Alonso JA, Tascón JM (2015) From graphene oxide to pristine graphene: revealing the inner workings of the full structural restoration. *Nanoscale* 7(6): 2374–2390
60. Chua CK, Pumera M (2014) Chemical reduction of graphene oxide: a synthetic chemistry viewpoint. *Chemical Society Reviews* 43(1): 291–312
61. Martín-García B, Velázquez MM, Rossella F, Bellani V, Diez E, Garcia Fierro JL, Cirera A (2012) Functionalization of reduced graphite oxide sheets with a zwitterionic surfactant. *ChemPhysChem* 13(16): 3682–3690
62. Eda G, Lin YY, Miller S, Chen CW, Su WF, Chhowalla M (2008) Transparent and conducting electrodes for organic electronics from reduced graphene oxide. *Applied Physics Letters* 92(23).
63. Saha SK, Bhaumik S, Maji T, Mandal TK, Pal AJ (2014) Solution-processed reduced graphene oxide in light-emitting diodes and photovoltaic devices with the same pair of active materials. *RSC Advances* 4(67): 35493–35499
64. Liu J, Cui L, Losic D (2013) Graphene and graphene oxide as new nanocarriers for drug delivery applications. *Acta Biomaterialia* 9(12): 9243–9257
65. Yogesh GK, Shuaib EP, Roopmani P, Gumpu MB, Krishnan UM, Sastikumar D (2020) Synthesis, characterization and bioimaging application of laser-ablated graphene-oxide nanoparticles (nGOs). *Diamond and Related Materials* 104: 107733
66. Potts JR, Dreyer DR, Bielawski CW, Ruoff RS (2011) Graphene-based polymer nanocomposites. *Polymer* 52(1): 5–25
67. Loh KP, Bao Q, Eda G, Chhowalla M (2010) Graphene oxide as a chemically tunable platform for optical applications. *Nature Chemistry* 2(12): 1015–1024
68. Prezioso S, Perrozzi F, Giancaterini L, Cantalini C, Treossi E, Palermo V, Ottaviano L (2013) Graphene oxide as a practical solution to high sensitivity gas sensing. *The Journal of Physical Chemistry C* 117(20): 10683–10690
69. Brodie BC (1859) On the atomic weight of graphite. *Philos TR Soc London* 149: 249–259

70. Staudenmaier L (1898) Verfahren zur darstellung der graphitsäure. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft* 31(2): 1481–1487
71. Hofmann U, König E (1937) Untersuchungen über graphitoxyd. *Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie* 234(4): 311–336
72. Hummers WS Jr, Offeman RE (1958) Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society* 80(6): 1339–1339
73. Marcano DC, Kosynkin DV, Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev A, Tour JM (2010) Improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano* 4(8): 4806–4814
74. Marcano DC, Kosynkin DV, Berlin JM, Sinitskii A, Sun Z, Slesarev AS, Tour JM (2018) Correction to improved synthesis of graphene oxide. *ACS Nano* 12(2): 2078–2078
75. Chua CK, Sofer Z, Pumera M (2012) Graphite oxides: effects of permanganate and chlorate oxidants on the oxygen composition. *Chemistry–A European Journal* 18(42): 13453–13459
76. López-Díaz D, Lopez Holgado M, García-Fierro JL, Velázquez MM (2017) Evolution of the Raman spectrum with the chemical composition of graphene oxide. *The Journal of Physical Chemistry C* 121(37): 20489–20497
77. López-Díaz D, Merchán MD, Velázquez MM (2020) The behavior of graphene oxide trapped at the air water interface. *Advances in Colloid and Interface Science* 286: 102312.
78. Dimiev A, Kosynkin DV, Alemany LB, Chaguine P, Tour JM (2012) Pristine graphite oxide. *Journal of the American Chemical Society* 134(5): 2815–2822
79. Dimiev AM, Tour JM (2014) Mechanism of graphene oxide formation. *ACS Nano* 8(3): 3060–3068
80. He H, Riedl T, Lerf A, Klinowski J (1996) Solid-state NMR studies of the structure of graphite oxide. *The Journal of Physical Chemistry* 100(51): 19954–19958
81. Lerf A, He H, Riedl T, Forster M, Klinowski J (1997) ¹³C and ¹H MAS NMR studies of graphite oxide and its chemically modified derivatives. *Solid State Ionics* 101: 857–862.
82. Lerf A, He H, Forster M, Klinowski J (1998) Structure of graphite oxide revisited. *The Journal of Physical Chemistry B* 102(23): 4477–4482
83. Gao W, Alemany LB, Ci L, Ajayan PM (2009) New insights into the structure and reduction of graphite oxide. *Nature Chemistry* 1(5): 403–408

84. Rourke JP, Pandey PA, Moore JJ, Bates M, Kinloch IA, Young RJ, Wilson NR (2011) The real graphene oxide revealed: stripping the oxidative debris from the graphene-like sheets. *Angewandte Chemie International Edition* 50(14): 3173–3177
85. Su C, Acik M, Takai K, Lu J, Hao SJ, Zheng Y, Ping Loh K (2012) Probing the catalytic activity of porous graphene oxide and the origin of this behaviour. *Nature Communications* 3(1): 1298
86. Thomas HR, Day SP, Woodruff WE, Valles C, Young RJ, Kinloch IA, Rourke JP (2013) Deoxygenation of graphene oxide: reduction or cleaning? *Chemistry of Materials* 25(18): 3580–3588
87. Chen X, Chen B (2016) Direct observation, molecular structure, and location of oxidation debris on graphene oxide nanosheets. *Environmental Science & Technology* 50(16): 8568–8577
88. Guo Z, Wang S, Wang G, Niu Z, Yang J, Wu W (2014) Effect of oxidation debris on spectroscopic and macroscopic properties of graphene oxide. *Carbon* 76: 203–211.
89. Evans HM, Bishop KS (1922) On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* 56(1458): 650–651
90. Sure B (1924) Dietary requirements for reproduction: II. The existence of a specific vitamin for reproduction. *Journal of Biological Chemistry* 58(3): 693–709
91. Evans HM, Emeeson OH, Emerson GA (1936) The isolation from wheat germ oil of an alcohol, α -tocopherol, having the properties of vitamin E. *Journal of Biological Chemistry* 113: 319-332.
92. Karrer P, Fritzsche H, Ringier BH, Salomon H (1938) Synthesis of α -tocopherol. *Helvetica Chimica Acta* 21: 820-825.
93. Karrer P, Fritzsche H, Ringier BH, Salomon H (1938) Synthesis of α -tocopherol (vitamin E). *Nature* 141(3580): 1057–1057
94. Whittle KJ, Dunphy PJ, Pennock JF (1966) The isolation and properties of δ -tocotrienol from Hevea latex. *Biochemical Journal* 100(1): 138
95. Azzi A, Stocker A (2000) Vitamin E: non-antioxidant roles. *Progress in Lipid Research* 39(3): 231–255
96. Yang CS, Luo P, Zeng Z, Wang H, Malafa M, Suh N (2020) Vitamin E and cancer prevention: Studies with different forms of tocopherols and tocotrienols. *Molecular Carcinogenesis* 59(4): 365–389
97. Lee GY, Han SN (2018) The role of vitamin E in immunity. *Nutrients* 10(11): 1614

98. Donnelly J, Appathurai A, Yeoh HL, Driscoll K, Faisal W (2022) Vitamin E in cancer treatment: a review of clinical applications in randomized control trials. *Nutrients* 14(20): 4329
99. Tsuduki T, Kuriyama K, Nakagawa K, Miyazawa T (2013) Tocotrienol (unsaturated vitamin E) suppresses degranulation of mast cells and reduces allergic dermatitis in mice. *Journal of Oleo Science* 62(10): 825–834
100. Shibata A, Kobayashi T, Asai A, Eitsuka T, Oikawa S, Miyazawa T, Nakagawa K (2017) High purity tocotrienols attenuate atherosclerotic lesion formation in apoE-KO mice. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 48: 44–50.
101. Miyazawa T, Shibata A, Sookwong P, Kawakami Y, Eitsuka T, Asai A, Nakagawa K (2009) Antiangiogenic and anticancer potential of unsaturated vitamin E (tocotrienol). *The Journal of Nutritional Biochemistry* 20(2): 79–86
102. Abraham A, Kattoor AJ, Saldeen T, Mehta JL (2019) Vitamin E and its anticancer effects. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 59(17): 2831–2838
103. Ramanathan N, Tan E, Loh LJ, Soh BS, Yap WN (2018) Tocotrienol is a cardioprotective agent against ageing-associated cardiovascular disease and its associated morbidities. *Nutrition & Metabolism* 15: 1–15.
104. Valdés-Ramos R, Ana Laura GL, Beatriz Elina MC, Alejandra Donaji BA (2015) Vitamins and type 2 diabetes mellitus. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets* 15(1): 54–63
105. Burdeos GC, Nakagawa K, Kimura F, Miyazawa T (2012) Tocotrienol attenuates triglyceride accumulation in HepG2 cells and F344 rats. *Lipids* 47: 471–481.
106. Shibata A, Kawakami Y, Kimura T, Miyazawa T, Nakagawa K (2016) α -tocopherol attenuates the triglyceride-and cholesterol-lowering effects of rice bran tocotrienol in rats fed a western diet. *Journal of agricultural and food chemistry* 64(26): 5361–5366
107. Baradaran A, Nasri H, Rafieian-Kopaei M (2014) Oxidative stress and hypertension: Possibility of hypertension therapy with antioxidants. *Journal of Research in Medical Sciences* 19(4): 358
108. Wong WY, Ward LC, Fong CW, Yap WN, Brown L (2017) Anti-inflammatory γ - and δ -tocotrienols improve cardiovascular, liver and metabolic function in diet-induced obese rats. *European Journal of Nutrition* 56: 133–150.

109. Waniek S, Di Giuseppe R, Plachta-Danielzik S, Ratjen I, Jacobs G, Koch M, Lieb W (2017) Association of vitamin E levels with metabolic syndrome, and MRI-derived body fat volumes and liver fat content. *Nutrients* 9(10): 1143
110. Gugliandolo A, Bramanti P, Mazzon E (2017) Role of vitamin E in the treatment of Alzheimer's disease: Evidence from animal models. *International Journal of Molecular Sciences* 18(12): 2504
111. Eitsuka T, Nakagawa K, Kato S, Ito J, Otoki Y, Takasu S, Miyazawa T (2018) Modulation of telomerase activity in cancer cells by dietary compounds: a review. *International Journal of Molecular Sciences* 19(2): 478
112. Traber MG (2007) Vitamin E regulatory mechanisms. *Annual Review of Nutrition* 27(1): 347–362
113. Sheppard AJ, Pennington JA, Weihrauch JL (2023) Analysis and distribution of vitamin E in vegetable oils and foods. In: *Vitamin E in health and disease*. CRC Press: 9–32.
114. Traber MG, Atkinson J (2007) Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine* 43(1): 4–15
115. Zingg JM (2015) Vitamin E: a role in signal transduction. *Annual Review of Nutrition* 35(1): 135–173
116. Qian J, Morley S, Wilson K, Nava P, Atkinson J, Manor D (2005) Intracellular trafficking of vitamin E in hepatocytes: the role of tocopherol transfer protein. *Journal of Lipid Research* 46(10): 2072–2082
117. Morley S, Cecchini M, Zhang W, Virgulti A, Noy N, Atkinson J, Manor D (2008) Mechanisms of ligand transfer by the hepatic tocopherol transfer protein. *Journal of Biological Chemistry* 283(26): 17797–17804
118. Jiang Q (2019) Natural forms of vitamin E and metabolites—regulation of cancer cell death and underlying mechanisms. *IUBMB Life* 71(4): 495–506
119. Filomeni G, De Zio D, Cecconi F (2015) Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death & Differentiation* 22(3): 377–388
120. Jones DP, Sies H (2015) The redox code. *Antioxidants & redox signaling* 23(9): 734–746
121. Sies H, Berndt C, Jones DP (2017) Oxidative stress. *Annual Review of Biochemistry* 86(1): 715–748

122. Jones DP (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 295(4): 849–868
123. Jones DP (2002) Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. In: *Methods in enzymology*. Academic Press 348: 93–112.
124. Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR (2005) Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell Death & Differentiation* 12(12): 1555–1563
125. Nathan C, Cunningham-Bussel A (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nature Reviews Immunology* 13(5): 349–361
126. Bhattacharyya A, Chattopadhyay R, Mitra S, Crowe SE (2014) Oxidative stress: an essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. *Physiological Reviews* 94(2): 329–354
127. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI (2011) Reactive Oxygen Species (ROS)–Induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 711(1–2): 167–173
128. Ratnam DV, Ankola DD, Bhardwaj V, Sahana DK, Kumar MR (2006) Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release* 113(3): 189–207
129. Christofidou-Solomidou M, Muzykantov VR (2006) Antioxidant strategies in respiratory medicine. *Treatments in Respiratory Medicine* 5: 47–78.
130. He L, Eslamfam S, Ma X, Li D (2016) Autophagy and the nutritional signaling pathway. *Front Agr Sci Eng* 3(03): 222–230
131. Ma X, He P, Sun P, Han P (2010) Lipoic acid: an immunomodulator that attenuates glycinin-induced anaphylactic reactions in a rat model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58(8): 5086–5092
132. Jee JP, Lim SJ, Park JS, Kim CK (2006) Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 63(2): 134–139
133. Fan P, Tan Y, Jin K, Lin C, Xia S, Han B, Ma X (2017) Supplemental lipoic acid relieves post-weaning diarrhoea by decreasing intestinal permeability in rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 101(1): 136–146

134. Barros AI, Nunes FM, Gonçalves B, Bennett RN, Silva AP (2011) Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry* 128(1): 165–172
135. Burton GW, Traber MG (1990) Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annual Review of Nutrition* 10(1): 357–382
136. Tabassum A, Bristow RG, Venkateswaran V (2010) Ingestion of selenium and other antioxidants during prostate cancer radiotherapy: a good thing? *Cancer Treatment Reviews* 36(3): 230–234
137. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X (2017) Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cellular Physiology and Biochemistry* 44(2): 532–553
138. Kelly GS (2011) Quercetin. *Alternative Medicine Review* 16(2): 172–195
139. Nouri HS, Azarmi Y, Movahedin M (2009) Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia* 41(2): 105–110
140. Lowe J (1996) Techniques in neuropathology. In: Bancroft JD, Stevens A (eds) *Theory and practice of histological techniques*. New York, Churchill Livingstone: 341–383.
141. Odacı E, Özyılmaz C (2015) Exposure to a 900 mhz electromagnetic field for 1 hour a day over 30 days does change the histopathology and biochemistry of the rat testis *Int J Radiat Biol* 91: 547–554
142. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988) A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 34(3): 497–500
143. Aebi HE (1987) Catalase In: Bergmeyer HU (Ed), *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie 3: 273–285.
144. Mihara M, Uchiyama M (1978) Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 86(1): 271–278
145. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1): 248–254
146. Stobinski L, Lesiak B, Malolepszy A, Mazurkiewicz M, Mierzwa B, Zemek J, Bieloshapka I (2014) Graphene oxide and reduced graphene oxide studied by the XRD, TEM and electron spectroscopy methods. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* 195: 145–154.

147. Chuong YKN, Van Thang V, Vuong TTT, Vu PT, Phung TVB, Nguyen LP, Le PML (2025) MnO₂-decorated graphene oxide nanosheet composites as promising electrode materials for lithium-ion battery energy storage applications. *RSC Advances* 15(20): 16015–16027
148. Amrollahi-Sharifabadi M, Koochi MK, Zayerzadeh E, Hablolvarid MH, Hassan J, Seifalian AM (2018) In vivo toxicological evaluation of graphene oxide nanoplatelets for clinical application. *International Journal of Nanomedicine* 4757–4769.
149. AliAL-kazomy AS, Al-Bairuty GA, Jawad MM (2021) Effect of Graphene Nanoparticles on some Organs of Reproductive System in Male Albino Mice. *Indian Journal of Forensic Medicine & Toxicology* 15(3).
150. Thonneau P, Spira A, Ducot B, et al (1991) Incidence and main causes of infertility in a resident population (1850000) of three French regions (1988–1989). *Human Reproduction* 6(6): 811–816
151. Agarwal A, Mulgund A, Hamada A, Chyatte MR (2015) A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13(1): 37
152. Li Y, Wang Y, Tu L, Chen D, Luo Z, Liu D, et al (2016) Sub-acute toxicity study of graphene oxide in the Sprague-Dawley rat. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13(11): 1149
153. Abd-Alsahib EF, Faris SA (2023) Toxic Effects of Nanographene Oxide on Testes of Rats. *World's Veterinary Journal* (1): 222–233.
154. Kutlu A (2022) Quercetin, rosmarinik asitin ve quercetin & rosmarinik asit kombinasyonunun metotreksata bağlı testis hasarına etkileri (yayımlanmamış uzmanlık tezi). Karadeniz Teknik Üniversitesi, Trabzon
155. Chen Q, Li L, Zhao J, Zhang Y, Xue X (2023) Graphene oxide had adverse effects on sperm motility and morphology through oxidative stress. *Toxicology in Vitro* 92: 105653.
156. Feng W, Wang J, Li B, Liu Y, Xu D, Cheng K, Zhuang J (2022) Graphene oxide leads to mitochondrial-dependent apoptosis by activating ROS-p53-mPTP pathway in intestinal cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 146: 106206
157. Patlolla AK, Randolph J, Kumari SA, Tchounwou PB (2016). Toxicity evaluation of graphene oxide in kidneys of Sprague-Dawley rats. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 13(4): 380

158. El-Demerdash FM, Yousef MI, Kedwany FS, Baghdadi HH (2004). Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene. Food and Chemical Toxicology 42(10): 1563-1571
159. Cong B, Liu C, Wang L, Chai Y (2020). The impact on antioxidant enzyme activity and related gene expression following adult zebrafish (*Danio rerio*) exposure to dimethyl phthalate. Animals 10(4): 717





EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Ali KULABER
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi :
Telefon (İş) :
E-Posta :
Yazışma Adresi (İş) :

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	KTÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2025
Yüksek Lisans	KTÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2017
Lisans	KTÜ Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2014
Lise	Pazar 75. Yıl İMKB Anadolu Lisesi	2008

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre
1 Araştırma Görevlisi	KTÜ Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2017-2025

YABANCI DİL

İngilizce

UZMANLIK ALANI

-

YAYINLAR (Tez yazım kurallarına göre yazılmalıdır)

1. Kulaber A, Kerimoğlu G, Ersöz Ş, Çolakoğlu S, & Odacı E (2017). Alterations of thymic morphology and antioxidant biomarkers in 60-day-old male rats following exposure to a continuous 900 MHz electromagnetic field during adolescence. Biotechnic & Histochemistry, 92(5): 331-337

2. Okatan DÖ, Kulaber A, Kerimoglu G, Odacı E (2019). Altered morphology and biochemistry of the female rat liver following 900 megahertz electromagnetic field exposure during mid to late adolescence. *Biotechnic & Histochemistry*, 94(6): 420-428
3. Kerimoğlu G, Arıcı T, Bıyık AF, Kulaber A, Türkmen Alemdar N, Demir S, Yenilmez E (2023). Protective potential of pterostilbene against cyclophosphamide-induced nephrotoxicity and cystitis in rats. *International Urology and Nephrology*, 55(12): 3077-3087
4. Kanbolat Ş, Badem M, Şener SÖ, Korkmaz N, Kulaber A, Aliyazıcıoğlu R, Karaoğlu ŞA (2023). Investigation of wound healing potentials of *Lysimachia verticillaris* and *Lysimachia vulgaris*: In vivo and in vitro studies. *South African Journal of Botany*, 163: 770-776
5. Bulbul O, Mammadov R, Suleyman B, Kulaber A, Karaca Y, Yaman H, Ozer V (2025). Effect of elamipretide and methylprednisolone treatment on optic nerve, retina and brain damage in a methanol poisoning model: biochemical and histopathological evaluation. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, 44(1): 22-34
6. Karakus H, Bulbul O, Kulaber A, Yaman H, Pasli S, Imamoglu M, Ozer V (2025). Evaluation of the Neuroprotective Effects of Idebenone in an Experimental Carbon Monoxide Poisoning Model. *Journal of Applied Toxicology*, 45(4): 659-668
7. Alemdar NT, Demir S, Yulug E, Kulaber A, Demir EA, Erdogan NS, Aliyazicioglu Y (2025). Acetamidrid-induced testicular toxicity in mice: ameliorative effect and potential mechanisms of morin. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 25(1): 1-12.

BİLDİRİLER

- 1 D. Öztürk Okatan Et Al., "Acute alterations in the morphology and biochemistry of the female rat liver following continuous 900-megahertz electromagnetic field (1 hour per day) administration throughout middle and late adolescence.," 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2017)), Antalya, Turkey, pp.117, 2017
- 2 A. KULABER Et Al., "Alterations in thymic morphology and antioxidant biomarkers in 60 day old male rats following exposure to a continuous 900 MHz

- electromagnetic field during adolescence,” 6th World Congress of Oxidative Stress Calcium Signaling and TRP Channels Congress, Isparta, Turkey, 2016
- 3 S. IŞIK Et Al., "The Effect of Thymol on Liver Damage Caused by Subchronical Cadmium Exposure in Rats,” 16th National and 2nd International Congress of Histology and Embryology, Sakarya, Turkey, 2024
 - 4 G. KERİMOĞLU Et Al., "The effects of pterostilbene on cyclophosphamide-induced kidney and bladder injury in rats,” 1 st International Microscopy and Spectroscopy Congress (MSC2021) and 25th National Electron Microscopy Congress (EMK2021), Turkey, 2021

ÖDÜLLER / TEŞVİKLER/ BURSLAR

-

HOBİLER

-