

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TİMOL'ÜN SIÇANLARDA SUBKRONİK
KADMIYUM MARUZİYETİ İLE OLUŞAN TESTİS
TOKSİSİTESİNE ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Semanur IŞIK

TRABZON-2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TİMOL'ÜN SIÇANLARDA SUBKRONİK
KADMIYUM MARUZİYETİ İLE OLUŞAN TESTİS
TOKSİSİTESİNE ETKİSİ

Uzmanlık Tezi

Dr. Semanur IŞIK

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON-2024

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden başlayarak bugüne kadar desteğini hep yanımda hissettiğim, geniş bilgi birikiminden her daim faydalandığım saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Engin YENİLMEZ hocama; değerli katkıları ile ilk kez girdiğim tez yolculuğunda beni yalnız bırakmayan çok kıymetli Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Prof. Dr. Gökçen KERİMOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN hocalarıma; tez projemde ortak çalıştığımız Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Ahmet ALVER hocama sonsuz saygı ve şükranlarımı sunuyorum. Eğitim sürecim boyunca beni evimde gibi hissettiren değerli Uzm. Dr. Abdulkadir KUTLU, Uzm. Dr. Ayşe Firuze BIYIK, Uzm. Dr. Sedanur YILMAZ DOĞAN, Uzm. Dr. Tenzile Beyza DURMUŞ, Uzm. Dr. Elif KOYUN ALVUROĞLU, Arş. Gör. Ali KULABER, Moleküler Biyolog Ayşen Cemre AYDIN, Asist. Dr. Mustafa Mert SAĞLAM, Asist. Dr. Esmâ Betül KARA, Arş. Gör. Dr. Gülten AYDIN, Asist. Dr. Seval KUVVET KURT, Asist. Dr. Nadire Sevdener ERDOĞAN ve Asist. Dr. Şeyda TEKATLI başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma, tez projemde beraber çalıştığımız Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Arş. Gör. Dr. Neslihan SAĞLAM'a teşekkür ediyor, sevgilerimi sunuyorum.

Daha doğmadan kendileriyle ilk bağı kurduğum, onların varlığını yanımda hissetmeden asla kendimi gerçekleştiremeyecek olduğum, koşulsuz sevginin en saf ve temiz örneği olan kıymetli aileme; biricik anneciğim Elif IŞIK'a, babacığım Ali IŞIK'a, ağabeyim İrfan IŞIK'a, yengem Dilara BOZKURT IŞIK'a, minicik yeğenim İlteriş Baybars IŞIK'a, varlığıyla her daim gurur duyduğum biricik kardeşim Muhammed Furkan IŞIK'a, ailemden hiçbir zaman ayrı tutmadığım can dostum, hemdemim Asist. Dr. Fatmanur Dilruba BİNGÖL'e ve Arş. Gör. Mürüvvet ÇAĞLAR başta olmak üzere, üzerimde emeği olan tüm arkadaşlarıma en içten, en samimimi duygularıyla minnettarlığımı iletiyorum. Her biriniz iyi ki varsınız.

Dr. Semanur IŞIK

ÖZET

Timol'ün Sıçanlarda Subkronik Kadmiyum Maruziyeti ile Oluşan Testis Toksisitesine Etkisi

Amaç: Bu çalışmada kadmiyuma subkronik maruziyetle oluşabilecek testis hasarını, oluşan hasarda antioksan/oksidan dengenin önemini ve bu hasara karşı antioksidan özelliği olan timolün olası etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması amaçlandı.

Metod: Çalışmamızda; 40 adet, 6-7 haftalık Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan 4 gruba ayrılarak kullanılmıştır. Subkronik olarak nitelediğimiz çalışmamızda deney periyodu 90 gün olarak belirlenmiştir. Deney periyodu boyunca kontrol grubu %0,08 etanol, kadmiyum grubu 50 mg/L kadmiyum klorür, timol grubu 111,1 mg/L timol ve %0,08 etanol, kadmiyum+timol grubu ise 50 mg/L kadmiyum klorür ile 111mg/L timol ve %0,08 etanol içeren içme suyuna ad libitum olarak maruz bırakılmıştır. Deney periyodu boyunca denekler haftalık olarak tartılmıştır. 91. günde denekler ketamin anestezisi altında dekapitasyon ile sakrifiye edildiler. Deneklerin sol testisleri histolojik, sağ testisleri ise biyokimyasal analizlerde kullanıldı. Sol epididimisler sperm analizi için kullanılırken, histolojik analiz için de sağ epididimisler kullanıldı. Histolojik analizde epididimis dokularına hematoksilin&eoziin boyama, testis dokularına ise hematoksilin&eoziin, Masson trikrom, periyodik asit-Schiff ve TUNEL boyamaları yapıldı. Biyokimyasal analizde ise testis dokusunda testosteron, kaspaz-3, Tümör Nekroz Faktörü-alfa, total oksidan seviye, total antioksidan seviye, oksidatif stres indeksi, glutatyon peroksidaz seviyelerine bakıldı.

Bulgular: Elde edilen verilere göre; kadmiyum vücut ve testis ağırlığında azalmaya, sperm vitalitesi yüzdesinde azalmaya, teratozoospermik indekste ve anomalilerin dağılımında kuyruk anomalilerinde rölatif artışa, Johnsen skorunda azalmaya, immatür hücre dökülmüş lümen yüzdesinde artmaya, lümeninde azalmış spermatozoa içeren ve epitelinde ayrılma olan tübül yüzdesinde artmaya, total seminifer tübül hacminde azalmaya, total seminifer tübül uzunluğunda ve alanında azalmaya, germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapına oranında ve seminifer epitel alanının seminifer tübül alanına oranında azalmaya, total Sertoli hücresi

sayısında ve total yuvarlak spermatid sayısında azalmaya, interstisyel alan başına düşen Leydig hücresi ve gram testis başına düşen yuvarlak spermatid sayısında azalmaya, günlük sperm üretiminde ve gram testis başına düşen günlük sperm üretiminde azalmaya, bağ dokusu alanı yüzdesinde artmaya sebep olduğu izlenmiştir. Timol; kadmiyumun neden olduğu bu hasar parametrelerinden vücut kütlelerinde, sperm vitalitesi yüzdesinde ve Johnsen skorunda istatistiksel olarak anlamlı boyutta iyileşme sağlamıştır. Lümenine immatür hücre dökülmüş lümen, lümeninde azalmış spermatozoa içeren tübül ve epitelinde ayrılma olan tübül yüzdesinde; total seminifer tübül hacminde, germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapına ve seminifer epitel alanının seminifer tübül alanına oranında; bağ dokusu alanı yüzdesinde ise kısmi iyileşmeye sebep olmuştur.

Sonuçlar: Sonuç olarak kadmiyum; vücut ve testis ağırlığında, sperm vitalitesinde, Johnsen skorunda, tübüler doku hacminde, tübül uzunluğunda, tübül alanında, germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapına oranında, epitel alanının seminifer tübül alanına oranında, çeşitli testis hücrelerinde ve bağ dokusu yüzdesinde azalma; teratozoospermik indekste, immatür hücre dökülmüş lümen yüzdesinde, lümeninde azalmış spermatozoa içeren tübül yüzdesinde, epitelinde ayrılma olan tübül yüzdesinde artma yaparak hasar oluştururken timolün bu parametrelerden vücut ağırlığı, sperm vitalitesi yüzdesi ve Johnsen skorunda anlamlı bir iyileşmeye sebep olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, timol, testis, sperm analizi, apoptozis, oksidatif stres, morfoloji, morfometre

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2023-10989 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

SUMMARY

The Effect of Thymol on Testicular Toxicity Caused by Subchronical Cadmium Exposure in the Rats

Objective: The aim of this study was to investigate the testicular damage that may occur with subchronical exposure to cadmium, the importance of antioxidant/oxidant balance in this damage and the possible effects of thymol, which has antioxidant properties, against this damage histologically and biochemically.

Methods: In our study, 40 male Sprague-Dawley rats aged 6-7 weeks were divided into 4 groups. In our subchronic study, the experimental period was determined as 90 days. During the experimental period, the control group was exposed to 0.08% ethanol, the cadmium group to 50 mg/L cadmium chloride, the thymol group to 111.1 mg/L thymol and 0.08% ethanol, and the cadmium+thymol group to 50 mg/L cadmium chloride, 111 mg/L thymol and 0.08% ethanol containing drinking water ad libitum. The rats were weighed weekly during the experimental period. On day 91, the rats were sacrificed by decapitation under ketamine anaesthesia. The left and right testes were used for histological and biochemical analyses, respectively. The left epididymis was used for sperm analysis, while the right epididymis was used for histological analysis. In histological analysis, haematoxylin & eosin staining was performed on epididymis tissues and haematoxylin & eosin, Masson trichrome, periodic acid-Schiff and TUNEL staining were performed on testicular tissues. In biochemical analysis, testosterone, caspase-3, tumour necrosis factor-alpha, total oxidant status, total antioxidant status, oxidative stress index, glutathione peroxidase levels were determined.

Results: According to the data obtained; cadmium decreased body and testicular weight, decreased percentage of sperm vitality, increase in teratozoospermic index relative increase in tail anomalies in the distribution of anomalies, decreased Johnsen's score, increased percentage of lumen with immature cell shedding, increased percentage of tubules with reduced spermatozoa in the lumen and detached epithelium, decreased total seminiferous tubule volume, decreased total seminiferous tubule length and area, It was observed that germinal epithelium thickness to

seminiferous tubule diameter ratio and seminiferous epithelium area to seminiferous tubule area ratio decreased, total Sertoli cell count and total round spermatid count decreased, Leydig cell count per interstitial area and round spermatid count per gram testis decreased, daily sperm production and daily sperm production per gram testis decreased, connective tissue area percentage increased. Among these damage parameters caused by cadmium, thymol provided statistically significant improvement only in body mass, sperm vitality percentage and Johnsen score. It caused partial improvement in the percentage of lumen with immature cell shedding, tubules with reduced spermatozoa in the lumen and tubules with epithelial separation, total seminiferous tubule volume, ratio of germinal epithelial thickness to seminiferous tubule diameter and seminiferous epithelial area to seminiferous tubule area, and percentage of connective tissue area.

Conclusions: As a result, cadmium decreased body and testicular weight, sperm vitality, Johnsen score, tubular tissue volume, tubule length, tubule area, ratio of germinal epithelial thickness to seminiferous tubule diameter, ratio of epithelial area to seminiferous tubule area, percentage of various testicular cells and connective tissue; teratozoospermic index, percentage of lumen with immature cell shedding, percentage of tubules with reduced spermatozoa in the lumen, percentage of tubules with detached epithelium, while thymol caused significant improvement only in body weight, percentage of sperm vitality and Johnsen score.

Keywords: Cadmium, thymol, testis, sperm analysis, apoptosis, oxidative stress, morphology, morphometry

This study was supported by Karadeniz Technical University Scientific Research Coordination Unit as a project coded TTU-2023-10989.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
ÖZET.....	ii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
RESİMLER DİZİNİ.....	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Embriyolojisi	3
2.1.1. Erken Embriyonik Gelişim ve Primitif Gonadlar	3
2.1.2. İnguinal Kanalların Gelişimi ve Testisin İnmesi	7
2.2. Testis Anatomisi.....	9
2.3. Testis Histolojisi.....	14
2.3.1. Testis.....	14
2.3.2. İnterstisyel Doku.....	15
2.3.3. Seminifer Tübüller.....	16
2.3.4. Sertoli Hücreleri.....	18
2.3.5. Spermatositogenez ve Mayoz	20
2.3.6. Erkek Germ Hücrelerinin Klonal Karakteri.....	22
2.3.7. Spermiyogenez.....	23
2.3.8. Matür Spermatozoonun Yapısı	24
2.3.9. İntratestiküler Kanallar	25

2.3.10. Genital Boşaltım Kanalları	26
2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar.....	27
2.5. Apoptozis.....	31
2.6. Kadmiyum (Cd).....	33
2.6.1. Maruziyet.....	34
2.6.2. Toksikokinetik	35
2.6.3. Toksisite.....	36
2.6.4. Genital Sistem ve Fertilite Üzerine Etkileri.....	38
2.6.5. Diğer Sistemler Üzerine Etkileri.....	38
2.6.6. Karsinojenite	39
2.6.7. Tedavi	40
2.7. Timol	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	43
3.1. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği	43
3.2. Deney Hayvanları, Barınma Koşulları, Gruplar ve Deneysel Çalışma Planı..	43
3.3. Doku Numunelerinin Elde Edilmesi	45
3.4. Histolojik Önişlemler	46
3.4.1. Davidson Fiksatifinin Hazırlanışı	46
3.4.2. %10'luk Formaldehit Solüsyonunun Hazırlanması.....	46
3.4.3. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması.....	46
3.4.4. Hematoksilen & Eozin Boyama Yöntemi	47
3.4.5. Masson Trikrom Boyama Yöntemi	48
3.4.6. Periyodik asit-Schiff Boyama Yöntemi.....	50
3.4.7. İmmunohistokimyasal TUNEL Boyama Yöntemi	50
3.5. Histopatolojik Değerlendirme	51
3.5.1. Hematoksilen & Eozin ile Boyalı Preparatlar.....	51

3.5.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preparatlarda Değerlendirme	58
3.6. İmmünohistokimyasal İncelemeler	59
3.7. Sperm Analizi	59
3.8. Biyokimyasal Değerlendirme	60
3.8.1. Testis Dokusunun Homojenizasyonu	60
3.8.2. Testis Dokusunda Testosteron Seviyelerinin Ölçümü	60
3.8.3. Testis Dokusunda Kaspaz-3 Seviyelerinin Ölçümü	61
3.8.4. Testis Dokusunda TNF-alfa Seviyelerinin Ölçümü	62
3.8.5. Protein Miktar Tayini	62
3.8.6. Testis Dokusunda Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü ...	64
3.8.7. Toplam Oksidan Seviye Tayini	64
3.8.8. Toplam Antioksidan Seviye Tayini	64
3.8.9. Oksidatif Stres İndeksi Hesaplanması	65
3.9. İstatistiksel Analiz	65
4. BULGULAR	66
4.1. Vücut ve Testis Ağırlığı Ölçümleri	66
4.1.1. Vücut Ağırlığı Takibi	66
4.1.2. Testis Ağırlığı Ölçümü ve Gonadosomatik İndeks	68
4.2. Sperm Analizi ve Teratozoospermik İndeks	69
4.3. Histopatolojik ve Histomorfometrik Analiz	73
4.3.1. Hematoksilen & Eozin Boyalı Testis Kesitlerinin Histopatolojik ve Histomorfometrik Olarak Değerlendirilmesi	73
4.3.2. Masson Trikrom Boyalı Kesitlerin Histopatolojik ve Histomorfometrik Değerlendirilmesi	91
4.3.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Kesitlerin Histopatolojik ve Histomorfometrik Değerlendirilmesi	97
4.4. İmmünohistokimyasal Analiz	102

4.5. H&E Boyalı Epididimis Kesitlerinin Histopatolojik Bulguları	105
4.6. Biyokimyasal Analiz	108
5. TARTIŞMA	113
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	121
7. KAYNAKLAR	124



KISALTMALAR DİZİNİ

A_{EP}: Seminifer epitel alanı

AI: Apoptotik indeks

AMH: Anti Müllerian hormon

A_{ST}: Seminifer tübül alanı

ATP: Adenozintrifosfat

°C: Santigrat derece

CAT: Katalaz

Cd: Kadmiyum

cm: Santimetre

CdCl₂: Kadmiyum klorür

D: Ortalama nükleus çapı

DHT: Dihidrotestosteron

DNA: Deoksiribonükleik asit

dUTP: Deoksiüridintrifosfat

EFSA: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi

FasL: Fas ligand

FDA: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi

Fe⁺²: Demir

FSH: Folikül stimüle edici hormon

g: Gram

GEK: Germinal epitel kalınlığı

GPX: Glutasyon peroksidaz

GSH: Glutasyon

GSİ: Gonadosomatik indeks

GSSG: Glutasyon disülfid

GSÜ: Günlük sperm üretimi

H&E: Hematoksilen ve eozin

H₂O₂: Hidrojen peroksit

IARC: Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı

INSL-3: İnsülin benzeri faktör-3

JS: Jhonsen skoru

kg: Kilogram

L: Litre

LH: Lüteinizan hormon

L_T: Toplam seminifer tübül uzunluğu

M: Molar

m: Metre

mg: Miligram

mM: Milimolar

ml: Mililitre

MT: Metalloprotein

n: Hücre sayısı

NADP: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NADPH: İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

ng: Nanogram

nm: Nanometre

O₂¹: Singlet moleküler oksijen

O₂⁻: Süperoksit iyonu

O₃: Ozon

OH⁻: Hidroksil radikali

Ort: Ortalama

OSI: Oksidatif stres indeksi

PAS: Periyodik asit -Schiff

PBS: Fosfat tamponlu salin

RNA: Ribonükleik asit

ROS: Reaktif oksijen türleri

SD: Standart deviasyon

SE-BMA: Seminifer epitel ile bazal membran arasında ayrılma

-SH: Sülfidril (tiyol) grubu

SOD: Süperoksit dismutaz

SRY: Sex-determining region on Y

S_T: Toplam seminifer tübül yüzey alanı

STÇ: Seminifer tübül çapı

T: Testosteron

TAS: Toplam antioksidan seviye

TDF: Testis belirleyici faktör

THY: Timol

TNF: Tümör nekroz faktörü

TOS: Toplam oksidan seviye

TZI: Teratozoospermik indeks

UV: Ultraviyole

V_T: Total tübüler doku hacmi

µg: Mikrogram

µl: Mikrolitre

µm: Mikrometre

µmol: Mikromol

µM: Mikromolar

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Kadmiyumun Diğer Sistemler Üzerine Etkileri	39
Tablo 2: Doku Takibi Prosedürü.....	47
Tablo 3: H&E Boyama Prosedürü	48
Tablo 4: Deparafinizasyon Prosedürü.....	49
Tablo 5: Masson Trikrom Boyama Prosedürü.....	49
Tablo 6: Periyodik Asit-Schiff Boyama Prosedürü	50
Tablo 7: TUNEL Boyama Prosedürü.....	51
Tablo 8: Johnsen Skorlaması	57
Tablo 9: Grupların Haftalık Vücut Ağırlığı Takibi.....	67
Tablo 10: Grupların Deney Sonu Testis Ağırlıkları ve GSİ Değerleri	68
Tablo 11: Gruplara Ait Sperm Analizinin ve İlişkili Parametrelerin Sonuçları.....	70
Tablo 12: Semikantitatif Parametrelerin Gruplara Ait Analizi.....	74
Tablo 13: Gruplara Ait Özellikli Tübül Sayımına İlişkin Parametrelerin Analizi.....	76
Tablo 14: Metrik Parametrelerin Gruplara Ait Analiz Sonuçları.....	78
Tablo 15: Hücre Sayımı ve İlişkili Parametrelerin Gruplara Ait Analizi 1	81
Tablo 16: Hücre Sayımı ve İlişkili Parametrelerin Gruplara Ait Analizi 2	82
Tablo 17: Masson Trikrom ile Boyalı Kesitlerde % Bağ Dokusu Alanı ve Tunika Albuginea Kalınlığı.....	91
Tablo 18: PAS Boyalı Kesitlerde % PAS (+) Alan ve SE-BMA.....	97
Tablo 19: Grupların AI (%) Analizi.....	102
Tablo 20: Deney Gruplarına Ait Biyokimyasal Parametrelerin Analizi.....	108

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Erkek ve Kadında Gonadal Farklılaşmanın Morfolojisi (19)	4
Şekil 2: Skrotum ve Testisin Anatomisi (31)	9
Şekil 3: Testis ve Genital Kanallar (31)	11
Şekil 4: Timolün Moleküler Yapısı (111)	42
Şekil 5: Abercrombie'nin Düzeltme Faktörü (136)	55
Şekil 6: Testisteki Belirli Bir Hücrenin Toplam Sayısının Formülü (137)	56
Şekil 7: T Konsantrasyonu Standart Grafiği	61
Şekil 8: Kaspaz-3 Konsantrasyonu Standart Grafiği	61
Şekil 9: TNF-alfa Konsantrasyonu Standart Grafiği	62
Şekil 10: Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafiği	63
Şekil 11: Deney Periyodundaki Vücut Ağırlığı Takibi (g)	66
Şekil 12: Grupların Deney Sonu Testis Ağırlıkları	68
Şekil 13: Grupların Deney Sonu GSİ Değerleri	69
Şekil 14: Gruplara Ait Total ve Hareketli Sperm Sayısı ($\times 10^6$)	70
Şekil 15: Gruplara Ait Spermilerin % Vitalite ve % Motilite Değerleri	71
Şekil 16: Teratozoospermik İndeks	71
Şekil 17: Grupların, TZI'da Dağılımına Göre Sperm Anomalisi Yüzdeleri	72
Şekil 18: Semikantitatif Parametrelerin Gruplara Ait Analizi	74
Şekil 19: Gruplara Ait JS Değerlendirmesi	75
Şekil 20: Gruplara Ait Özellikli Tübül Sayımına İlişkin Parametrelerin Analizi -1..	76
Şekil 21: Gruplara Ait Özellikli Tübül Sayımına İlişkin Parametrelerin Analizi -2..	77
Şekil 22: Grupların STÇ Değerleri	78
Şekil 23: Grupların L_T Değerleri	79
Şekil 24: Grupların S_T Değerleri	79
Şekil 25: Gruplara Ait GEK/STÇ, A_{Ep}/A_{ST} Oranlarının Analizi	80
Şekil 26: Grupların V_T Sonuçları	80
Şekil 27: Grupların Total Sertoli Hücresi Sayısı ve Sertoli Hücresi Sayısı/g testis Değerlendirmesi	82
Şekil 28: Grupların Total Spermatogonya Sayısı ve Spermatogonya Sayısı/g testis Değerlendirmesi	83

Şekil 29: Grupların Total Primer Spermatosit Sayısı ve Primer Spermatosit Sayısı/g testis Değerlendirmesi	83
Şekil 30: Grupların Total Yuvarlak Spermatid Sayısı ve Yuvarlak Spermatid/g testis Değerlendirmesi	84
Şekil 31: Gruplara Ait Leydig Hücresi/İnterstisyel Alan Sonuçları	84
Şekil 32: Grupların GSÜ ve GSÜ/g testis Değerlendirmesi	85
Şekil 33: Gruplara Ait % Bağ Dokusu Alanı Değerlendirmesi	92
Şekil 34: Tunika Albuginea Kalınlığının Gruplara Ait Sonuçları	92
Şekil 35: Gruplara Ait % PAS (+) Alan Analizi	97
Şekil 36: Gruplara Ait SE-BMA Değerlendirme Sonuçları.....	98
Şekil 37: Gruplara Ait AI (%) Analizi	103
Şekil 38: Deney Gruplarının Doku T seviyeleri	109
Şekil 39: Deney Gruplarının Doku Kaspaz-3 Seviyeleri	109
Şekil 40: Deney Gruplarının Doku TNF-alfa Seviyeleri	110
Şekil 41: Deney Gruplarının Doku TAS Seviyeleri.....	110
Şekil 42: Deney Gruplarının Doku TOS Seviyeleri.....	111
Şekil 43: Deney Gruplarının OSİ Seviyeleri.....	111
Şekil 44: Deney Gruplarına Ait GPX/U Seviyeleri	112

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Seminifer Tübülün Histolojik Görüntüsü ve İhtiva Ettiği Hücreler (Hematoksilen & Eozin, 400x)	18
Resim 2: Standart Tıp III Kafeslerde, Gruplandırılmış Deney Hayvanları	44
Resim 3: Deneklere Ait Testis ve Epididimis Dokularının Çıkarılması	45
Resim 4: FIJI Programı Kullanılarak A _{ST} ve Lümen Alanlarının Hesaplanması	53
Resim 5: FIJI Programı Kullanılarak STÇ ve GEK Ölçümü	54
Resim 6: FIJI Programında Hücre Sayımı	55
Resim 7: Kontrol Grubuna Ait Canlı, Normal Morfolojili Spermatozoa Örnekleri (Eosin Y, 400x)	72
Resim 8: Cd Grubuna Ait Bozuk Morfolojili ve Ölü Spermatozoa Örnekleri (Eosin Y, 400x)	73
Resim 9: Kontrol Grubuna Ait Testis Kesitinden Genel Görünüm (H&E, 100x)	85
Resim 10: Cd Grubuna Ait Testis Kesitinde Genel Görünüm (H&E, 100x)	86
Resim 11: THY Grubuna Ait Testis Kesitinden Genel Görünüm (H&E, 100x)	86
Resim 12: Cd+THY Grubuna Ait Testis Kesitinden Genel Görünüm (H&E, 100x)	87
Resim 13: Kontrol Grubuna Ait Kesit (H&E, 200x)	87
Resim 14: Cd Grubuna Ait Kesit (H&E, 200x)	88
Resim 15: THY Grubuna Ait Kesit (H&E, 200x)	88
Resim 16: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (H&E, 200x)	89
Resim 17: Kontrol Grubuna Ait Kesit (H&E, 400x)	89
Resim 18: Cd Grubuna Ait Kesit (H&E, 400x)	90
Resim 19: THY Grubuna Ait Kesit (H&E, 400x)	90
Resim 20: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (H&E, 400x)	91
Resim 21: Kontrol Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 200x)	93
Resim 22: Cd Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 200x)	93
Resim 23: THY Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 200x)	94
Resim 24: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 200x)	94
Resim 25: Kontrol Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 400x)	95
Resim 26: Cd Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 400x)	95
Resim 27: THY Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 400x)	96
Resim 28: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 400x)	96

Resim 29: Kontrol Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 200x)	98
Resim 30: Cd Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 200x)	99
Resim 31: THY Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 200x)	99
Resim 32: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 200x)	100
Resim 33: Kontrol Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 400x)	100
Resim 34: Cd Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 400x)	101
Resim 35: THY Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 400x)	101
Resim 36: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 400x)	102
Resim 37: Kontrol Grubuna Ait Kesit (TUNEL Boyama, 200x)	103
Resim 38: Cd Grubuna Ait Kesit (TUNEL Boyama, 200x)	104
Resim 39: THY Grubuna Ait Kesit (TUNEL Boyama, 200x)	104
Resim 40: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (TUNEL Boyama, 200x)	105
Resim 41: Kontrol Grubuna Ait Epididimis Kesiti (H&E, 200x)	106
Resim 42: Cd Grubuna Ait Epididimis Kesiti (H&E, 200x)	106
Resim 43: THY Grubuna Ait Epididimis Kesiti (H&E,200x)	107
Resim 44: Cd+THY Grubuna Ait Epididimis Kesiti (H&E, 200x)	107

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Üreme; canlı sayısını artıran, türlerin hayatta kalması ve devamlılığı için gerekli olan temel bir biyolojik özelliktir. Kaliteli gametlerin üretimi ve farklılaşması üreme başarısı için esastır. Bununla birlikte, dünya çapında çiftlerin yaklaşık %15'inin infertiliteden etkilendiği ve vakaların yaklaşık yarısından erkek kısırlığının sorumlu olduğu bilinmektedir (1, 2). Erkek fertilité potansiyelindeki azalma; ürogenital anormallikler, varikosel, genital sistem enfeksiyonları, genetik anormallikler, endokrin bozukluklar, testis yetmezliği, immünolojik problemler, kanser, sistemik hastalıklar, değişen yaşam tarzı ve kadmiyum (Cd), alkol, tütün benzeri gonadotoksik faktörlere maruz kalma gibi konjenital veya edinsel durumlara bağlı olabilir (3). Yapılan çalışmalar, çevresel kirleticilerin infertilitenin artan sıklığına katkıda bulunduğunu göstermektedir (4). Çok sayıda çevresel kirletici bulunmaktadır ancak Cd dahil olmak üzere ağır metaller, dikkate değer oksidatif stres koşullarına neden olabilecekleri için en ciddi olanlarındandır.

Cd; piller, elektronik aletler, cam ve seramik de dahil olmak üzere çeşitli ürünlerin sanayileşmesinde, çelik kaplama ve tarımda kimyasal gübre kullanımında rol oynadığı için maruziyeti de ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelmektedir. Cd; toprağa, havaya ve suya kolayca boşaldığından bitkilere aktarılabilir bu da diyet kaynaklarından Cd maruziyeti riskini artırır (5). Bir insanın kadmiyuma günlük ortalama maruz kalma seviyesi inhalasyon yoluyla 0.15 mikrogram (μg) ve kontamine su ve yiyecek tüketiminden 1 μg 'dır (6). Diğer çevresel kirleticilerden farklı olarak Cd, insan vücudunda önemli bir birikime yol açan 20-40 yıllık uzun bir eliminasyon yarı ömrüne sahiptir. Bu, metali özellikle tehlikeli ve zorlu hale getirir (7). Cd; Uluslararası Kanseri Araştırma Ajansı (IARC) tarafından grup 1 insan kanserojeni olarak sınıflandırılmıştır (8). Cd zehirlenmesi küresel bir endişe kaynağıdır ve kanserler, diabetes mellitus, kronik böbrek hastalığı, akciğer hastalığı, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili olabilir. Cd maruziyetinin mortaliteyi %17 artırdığı bildirilmiştir. Bu metale bağlı sağlık sorunları oksidatif stres, inflamasyon, genomik instabilite ve endokrin sistem bozulmasının indüklenmesi ile açıklanabilir. Cd, glutatyon (GSH) ve proteine bağlı sülfidril (-SH) grupları gibi

antioksidan içeriğini tüketerek, süperoksit iyonları ($O_2^{\cdot-}$) ve hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$) de dahil olmak üzere reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesine neden olarak hücre hasarına neden olur (9). Hayvan çalışmaları, kadmiyumun kan-testis bariyerini bozan ve testis işleyişinde bozulma ile sonuçlanan testis-toksik bir madde olduğunu ortaya koymuştur. Bu bağlamda Cd maruziyeti spermatogenezi bozar, sperm miktarını ve kalitesini azaltır, testiste çeşitli yapısal ve fonksiyonel defektlere yol açar. Ayrıca, germ hücresi ölümü, Sertoli hücre disfonksiyonu, bozulmuş testis steroidogenezi ve düşük testosteron (T) seviyeleri, erkeklerde kadmiyuma bağlı üreme toksisitesinin özellikleri olarak kabul edilmiştir. Kadmiyumun testis dokusu üzerindeki iyi bilinen toksisitesine rağmen, altta yatan mekanizmalar tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır (10).

Birçok doğal ürün çevresel kirlenici maruziyetinin tehlikeli etkilerini hafifletmede potansiyel etkinlikleri nedeniyle araştırılmaktadır (11). Çok sayıda bitki kaynaklı diyet fitokimyasalı arasında, timol olumlu fizikokimyasal, farmakokinetik ve farmakolojik özellikleri nedeniyle dikkat çekmiştir (12). Timol (2-izopropil-5-metil-fenol), kekik esansiyel yağında ve Thymus vulgaris, Origanum vulgare, Thymus siliates ve Nigella sativa gibi çeşitli bitkilerde bulunan başlıca monoterpen fenolik bileşiktir (13). Timol; antimikrobiyal, antiinflamatuvar, antioksidan, antiapoptotik, antihepatotoksik, antihiperlipidemik, antihiperglisemik, nöroprotektif ve radyoprotektif aktiviteler gibi birçok farmakobiyolojik aktiviteye sahiptir (14). Yine timolün lökosit sayımlarında ve proinflamatuvar sitokinlerde bir azalmaya yol açtığı ve erken yara kapanmasını teşvik ettiği gösterilmiştir (15, 16). Deney hayvanlarında yapılan bir çalışmada timolün sperm konsantrasyonunu ve motilitesini artırdığı; ölü sperm oranını da belirgin olarak azalttığı görülmüştür (17). Ayrıca timol, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından güvenli bir madde olarak belgelenmiştir (18).

Literatürde kadmiyumun testis hasarına karşı timolün etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada kadmiyuma subkronik maruziyetle oluşabilecek testis hasarına karşı antioksidan özelliği olan timolün olası etkilerinin histolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

2.1.1. Erken Embriyonik Gelişim ve Primitif Gonadlar

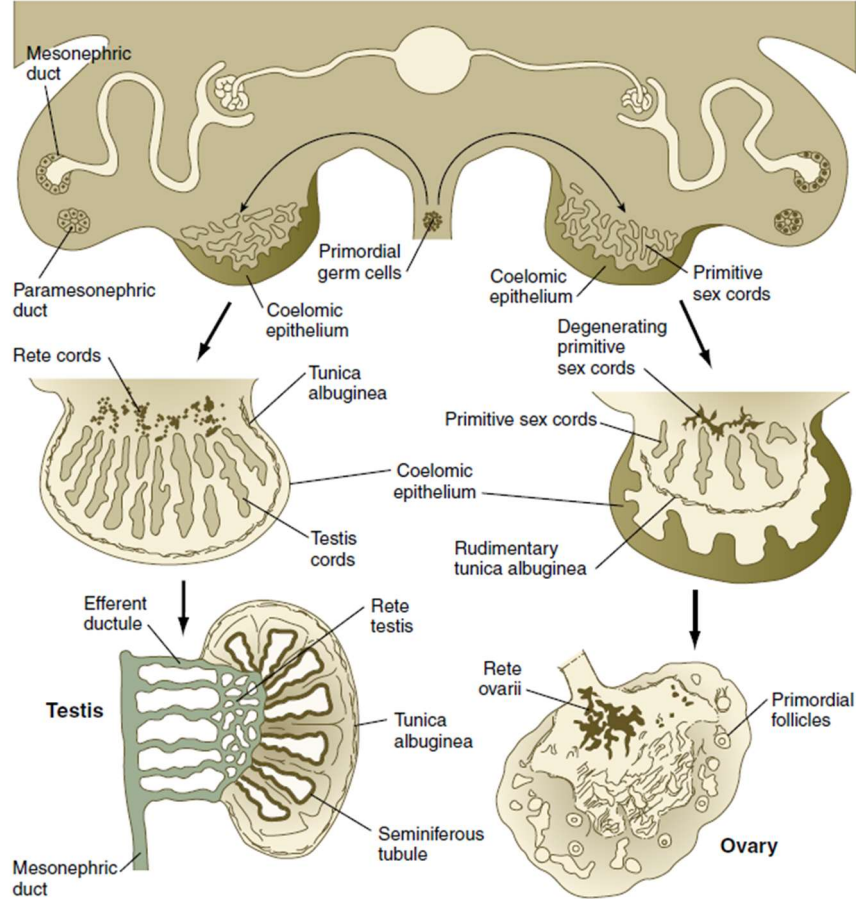
Embriyonun kromozomal cinsiyeti fertilizasyon sırasında ovumu dölleyen spermin genetik yapısıyla (X veya Y) belirlenir (19). Zira döllenen oosit zaten bir X kromozomu içermektedir (20). Embriyonik dönemin yedinci haftasına kadar dişi ya da erkek morfolojik karakter ayırt edilemez düzeydedir (19). Sadece dişi embriyolarda görülen X kromozomlarından birinin inaktif hale gelmesiyle oluşan Barr cisimciğinin varlığı bir indikatör olabilir (20). İki cinsiyetteki erken genital gelişim benzerdir, bu döneme seksüel gelişimin farkanmamış dönemi denir (19). İlk 6 hafta aynı zamanda bipotansiyel veya ambiseksüel dönem olarak da adlandırılır (21). Artık bu dönemden sonra embriyo, testis ve ovaryum gelişimi dönemine girecektir (22).

Cinsiyet kromozomlarının paterni dişi/erkek gelişim yolundaki tercihi belirlese de sonraki aşamalarda seksüel gelişim sadece cinsiyet kromozomları ile değil aynı zamanda birçoğu otozomal kromozomlarda kodlu olan hormonlarla ve diğer faktörlerle de belirlenir (21).

Gonad; kadında ovaryuma, erkekte ise testis dokusuna tekabül eder. Her iki cinsiyette de gonadlar 3 kaynaktan köken alırlar. Bunlar; mezotelyum (arka abdominal duvarı örter), altındaki mezenşim (embriyonik bağ doku) ve primordiyal germ hücrelerinden (en erken safhadaki diferansiye olmamış germ hücreleri) ibarettir (19). Mezotelyum ara mezoderminden köken alır (23). Primordiyal germ hücreleri ise epiblasttan farkanmaktadır (24).

Erken gonadal gelişim beşinci haftada mezonefrozun (kalıcı böbreğin primordiyumu) medial kenarında mezotelyumun kalınlaşması ile başlar. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefroz medialinde gonadal kabartılar oluşur (19). Gonadal kabartılar, genital kabartılar olarak da adlandırılır (25). Hemen ardından parmaksı yapıda epitel kordonlar olan gonadal kordlar mezenşim içinde büyür (19). Bu kordonlar primitif kordonlar olarak da bilinirler (22). Bu aşamada farklılaşmamış gonadlar dışta korteks ve içte medulla olmak üzere iki katmana

sahiptir. Cinsiyet kromozomu XX olan bir embriyoda korteks ovaryuma farklılaşırken medulla regrese olacak; XY olan bir embriyoda ise medulla testise farklılaşırken korteks regrese olacaktır (Şekil 1).



Şekil 1: Erkek ve Kadında Gonadal Farklılaşmanın Morfolojisi (19)

Primordiyal germ hücrelerinin çoğu birbiriyle uzun sitoplazmik çıkıntılarla bağlıdır (20). Bu hücreler küre şeklinde, iri hücrelerdir (19). Primordiyal germ hücreleri primitif çizgi boyunca göç ederler ve üçüncü haftada yolk kesesi duvarının allantoise yakın bir bölgesinde endodermal hücreler arasında yerleşirler (25). Embriyonun katlanması sırasında bu kısım vücut içine girer (19). Dördüncü haftada dorsal mezenter boyunca ameboid hareketlerle göç edip beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşarak genital kabartıları istila ederler. Eğer kabartılara ulaşamazlarsa gonadlar gelişmez (25). Gonadların gelişmeme nedeni germ hücreleri

ile çevre epitel arasındaki karşılıklı iletişimin gerçekleşmemesidir (26). Bu da germ hücrelerinin, gonaddan ovaryum ya da testis gelişiminde indükleyici bir rol üstlendiğini gösterir (25). Bu göç esnasında Nanos-3 sayesinde primordiyal germ hücreleri apoptozise girmekten korunurken; LIF (leukemia inhibitory factor) ve steel faktör gibi mitojenik faktörlerin etkisiyle de prolifer olurlar. Genital kabartıya ulaşan hücreler dişilerde mayoza girerken erkeklerde mitotik arreste uğrar. Geç embriyonik dönem, fetal periyodlar ve doğum sonrası dönemde testis içerisindeki primordiyal germ hücreleri yavaşça mitoz bölünür ancak fetal Sertoli hücreleri androjenlere duyarlı olmadığından olgunlaşamazlar. Sertoli hücreleri mayozu indükleyen retinoik asiti degrede eden CYP26B1 enzimini üreterek germ hücrelerindeki mitozu inhibe etmeye devam eder.

Seksüel dimorfizmde anahtar rolü; kısa kolunda, 35 kilobazlık bir bölgeyi teşkil eden, Sox transkripsiyon faktörü ailesinden testis belirleyici gen olan SRY (sex-determining region on Y) genini içeren Y kromozomu (Yp11) oynar (20). Bu genin protein ürünü rudimenter seksüel organların kaderini belirleyen bir dizi geni aktive eden bir transkripsiyon faktörüdür (26). SRY geni proteini testis belirleyici faktör (TDF)'dür (27). Erkek cinsiyet gelişimi bu faktörün etkisi altında gerçekleşir ve gonadal kordlar seminiferöz kordlara farklanır, yokluğunda ise dişi cinsiyet yönünde gelişim gerçekleşir ve gonad ovaryuma doğru farklanır (19). Örneğin erkek genital gelişimde ilk olarak somatik destek hücrelerinde SRY proteininin ekspresyonu olur ve bu faktörün etkisi altında destek hücreleri Sertoli hücrelerine, yokluğunda ise ovaryan folikül hücrelerine farklanır (21). Ayrıca T, dihidrotestosteron (DHT) ve anti Müllerian hormon (AMH) yedinci haftada başlayan testiküler gelişimin normal ilerleyişi için gereklidir.

TDF seminifer kordları indükleyerek farklanmamış gonad içerisinde bir araya gelip uzamalarını sağlar ki böylece kordlar birbirleriyle anastomozlar yaparak ve dallanarak kanallar ağı olan rete testisi oluştururlar. Mezenşimin yüzey epiteli altına göçüyle testiküler gelişimin karakteristik bir aşaması olan; fibröz, kalın kapsüler yapıda tunika albuginea gelişir. Böylece seminifer kordların yüzey epiteli ile ilişkisi kaybolur (19). Mezoderm aynı zamanda mediastinum testisi oluşturur. Mediastinumdan çıkan fibröz septa periferiye doğru uzanarak testisi çeşitli lobüllere

ayırır (22). Zamanla büyüyen testis dejenere olmakta olan mezonefroza ayrılır ve karın arka duvarına mezorşiyum olarak bilinen kendi mezenterisi ile asılı kalır.

Seminifer tübüller; Leydig hücrelerine farklılaşacak olan mezenşim tarafından birbirlerinden ayrılırlar. Sekizinci hafta itibarıyla bu hücreler mezonefrik kanalların ve dış genitalin maskülenize olmasını sağlayan androjenik hormonlar olan T ve androstenedion sentezine başlarlar. T üretimi özellikle 8 ve 12. haftalar arasında pik yapan insan koryonik gonadotropin (hCG) seviyeleri ile stimüle olur (19). Fetal ve postnatal hayatta iki ayrı Leydig hücresi popülasyonu bulunur; fetal hayattaki Leydig hücreleri dış genital organların erkek yönünde gelişmesi ve testis inişinde rol alırken postnatal hayatta bu hücreler geriler onların yerine interstisyel alandaki Leydig hücresi öncüllerinden yeni bir Leydig hücresi popülasyonu oluşur. Bu hücreler beynin maskülenleşmesinde ve spermatogenezi başlatmada rol oynarlar. Buna ek olarak bir glikoprotein olan AMH ya da diğer bir adıyla Müllerian inhibe edici substans (MIS) da fetal testisin yüzey epitelinden köken alan destek (sustentaküler) hücreler olan Sertoli hücreleri tarafından üretilir. AMH üretimi 8. haftada başlar (21). Bu hormonun üretimi puberteye kadar devam eder daha sonraki süreçte üretim azalır. AMH kadın genital organlardan olan uterus ve uterin tüpleri geliştiren paramezonefrik kanalların gelişimini baskılar.

Puberteye dek seminifer tübüller lümen ihtiva etmez ve seminifer tübül duvarı, Sertoli hücreleri ve spermatogonya olmak üzere iki tip hücre ile döşelidir. Sertoli hücreleri spermiyogenezi destekler, spermatogonyum ise primordiyal sperm hücresidir ve primordiyal germ hücrelerinden köken almaktadır. Sertoli hücreleri fetal testisin seminifer tübül epitelinin büyük kısmını doldurur (19).

Erkek gametlerinin gelişim sürecinin mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber Sertoli hücreleri ile primordiyal germ hücreleri arasındaki hücre-hücre temasının anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. Bu ilişki primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya göçünden kısa süre sonra gerçekleşir. Bu sayede Sertoli hücreleri germ hücrelerinin ileri mitoz bölünmesini inhibe eder ve mayoza girmelerini de engellerler. Postnatal 3. ayda tip A spermatogonyuma dönüşene kadar daha ileri bir gelişme basamağı oluşmaz. Kalan erkek gametogenezi aşamaları (tip B

spermatogonyuma dönüşme, ileri mitoz, mayoz ve spermatogenez) puberteye kadar ertelenir.

Mezonefroza komşu alanda germ hücrelerini içermeyen, sadece Sertoli hücrelerinden oluşmuş ince bir duvara sahip, puberteye dek kanalize olmayan rete testis isimli kanallar ileride duktuli efferentes olacak olan 15-20 adet mezonefrik tübülle devamlılık gösterirken bu tübüllerle bağlantılı olan mezonefrik kanal ise duktus epididimisi oluşturacaktır (21).

2.1.2. İnguinal Kanalların Gelişimi ve Testisin İnmesi

İnguinal kanallar; testisin arka karın duvarından başlayarak ön karın duvarı boyunca ilerleyip skrotuma inişi için yolu oluştururlar. İnguinal kanallar cinsiyet gelişimin farklanmamış evresinden dolayı her iki cinsiyette de gelişir. Mezonefroz dejenere olurken bir ligament olan gubernakulum, gonadın alt kutbundan başlayarak abdomenin her iki tarafında da gelişim gösterir. Gubernakulum gelecekteki inguinal kanal bölgesinde gelişmekte olan ön karın duvarı boyunca oblik bir biçimde seyreder. Gubernakulum kaudal olarak labioskrotal şişkinliklerin iç yüzeyine tutunur.

Peritonun bir evajinasyonu olan prosessus vaginalis ise gubernakulumun ventralinde gelişir ve gubernakulumun açtığı yolda ön karın duvarı boyunca herniye olur. Prosessus vaginalis ön karın duvarının katmanlarının uzantılarını da beraberinde taşıyarak inguinal kanalın duvarını oluşturur. Bu tabakalar aynı zamanda spermatik kordu ve testisi de sarar. Prosessus vaginalisin transvers fasyada oluşturduğu açıklık derin inguinal halkayı, eksternal oblik aponörozunda açtığı açıklık ise yüzeysel inguinal halkayı oluşturur (24).

Testisin inişini;

- Testisin büyümesi ve mezonefrik böbreklerin atrofisi ile testisin karın arka duvarı boyunca kaudal yönde hareketinin kolaylaşması,

- AMH'nin indüklediği paramezonefrik kanal atrofisi ile testisin transabdominal olarak derin inguinal halkalara hareketinin sağlanması,

- Prosessus vaginalisin büyüyerek testisin inguinal kanaldan geçip skrotum içerisine girmesine rehberlik etmesi

- Abdominal visseranın büyümesi ile intraabdominal basıncın artması (19),

- Erkek cinsiyet hormonları büyük ölçüde etkiler (22).

Testis retroperitoneal olarak abdominal bölgeden başlayarak iner (25). Bu inişin başladığı seviye 10. torasik vertebra seviyesine denk gelir (21). Testis inişini yaklaşık 4 santimetre (cm) uzunluğunda olan ve inguinal ligamentin medial yarısının üzerinde yerleşmiş olan inguinal kanaldan geçerek skrotuma varmak suretiyle tamamlar (25). Genellikle 26. haftada testis retroperitoneal olarak üst lomber bölgeden derin inguinal halkalara, 33. haftada ise skrotuma inmiş olur. Testisin transabdominal yer değişimi, abdomenin kraniyal kısmının gelecekteki pelvisten uzağa büyümesiyle gerçekleşen çoğunlukla göreceli bir harekettir (19). Bu hareket esnasında gubernakulumun boyunun değişmeyişi gubernakulumun boyunun rölatif olarak kısılmasına ve testisin görece inişine neden olur (22).

Testis peritonun ve prosessus vaginalisin dışından ilerler. Testisler skrotuma girdikten sonra inguinal kanal spermatik kord etrafında kasılır. Zamanında dünyaya gelen yenidoğan bebeklerin yaklaşık %97'sinde her iki testis de skrotumdadır. Doğumdan sonraki ilk üç ayda çoğu inmemiş testis de skrotuma iner.

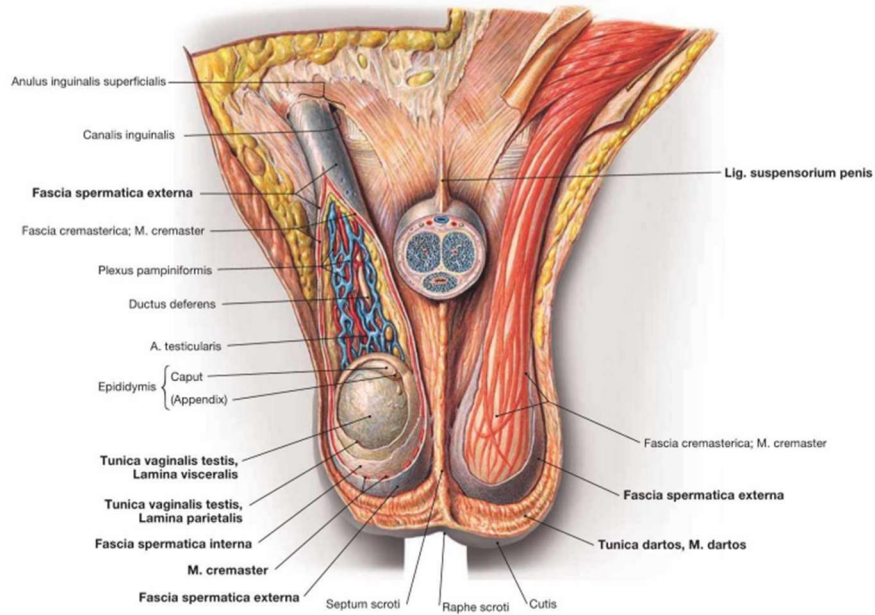
Testisin iniş modu; testiküler damarların seyrini ve duktus deferensin üretrayı neden önden çarprazladığını açıklar. Bu damarlar; testisler arka karın duvarında iken oluşur, testis inerken de duktus deferens ve damarları da kendiyle beraber taşır ve bunlar abdominal duvarın fasyaları tarafından kılıflanırlar. Bu fasyalardan transvers fasyanın uzantısı internal spermatik fasyayı, internal oblik kas ve fasyasının uzantısı kremasterik kas ve fasyayı, eksternal oblik aponevroz uzantıları ise eksternal spermatik fasyayı oluşturur.

Skrotum içerisinde testis, prosessus vaginalisin distal ucu içerisine doğru uzanır. Perinatal periyod sırasında, prosessus vaginalisin bağlayıcı sapı genellikle oblitere olarak, testisle ilişkili izole bir peritoneal kese olan tunika vaginalis olarak kalır (19).

2.2. Testis Anatomisi

Testisler sağı sollu bir çift erkek genital organıdır (28). Erişkinde boyu 4-5 cm, eni 2-3 cm ve ön-arka çapı 3-4 cm, ortalama hacmi 15-25 mililitre (ml)'dir (29). Ağırlığı 10-15 gram (g)'dır ve hareket edebilen bir organdır (30). Testisler beyzi biçimlidir (31). Sert yapıda organlardır (32). Kadınlarda homoloğu ovaryumdur (30).

Testisler karın duvarına spermatik kord ile, skrotuma ise gubernakulum kalıntısı olan skrotal ligamentler ile tutunur (33). Skrotum destekleyici bir kesedir (Şekil 2) (34). Skrotum içerisinde testisler aralarındaki fibröz, median skrotal septum ile ayrılırlar (29). Embriyonik dönemde sol testisin inişi daha erken başladığından sol spermatik kord sağdakine göre daha uzundur (30). Bu nedenle genellikle sol testis sağdakine göre yaklaşık 1 cm daha alçak yerleşimlidir (34).



Şekil 2: Skrotum ve Testisin Anatomisi (31)

Testis; üst ve alt olmak üzere konveks şekilli düz iki kutba, anterior ve posterior olmak üzere iki kenara, medial ve lateral olmak üzere hafif konveks ve pürüzsüz iki yüzeye sahiptir (30). Damarlar ve sinirler testise alt kutbundan girerler (35). Testislerin

üst kutupları anterolaterale, alt kutupları da anteromediale meyilli olduğundan her iki testis de oblik pozisyonudadır (29).

Testisler; tunika vasküloza; tunika albuginea ve dışta da seröz bir kese olan testisin ön ve yan yüzeylerini örten tunika vaginalisin oluşturduğu dirençli bir kapsül tarafından sarılmıştır (30). Tunika vasküloza en içtedir, kan damarı ağı ve gevşek bağ dokusu içerir (36). Aynı zamanda testisin lobüllerini de sarar (30). Tunika albuginea orta tabakadır, mavi-beyaz renklidir ve çoğunlukla kollajen liflerinden oluşur (29). Sıkı bağ dokusu yapısında fibröz bir kapsüldür (30). Tunika vaginalis dışta skrotumun iç yüzünü saran bir dış tabaka, içte ise tunika albugineayı ön ve lateral yanlardan saran bir iç tabaka içerir (37).

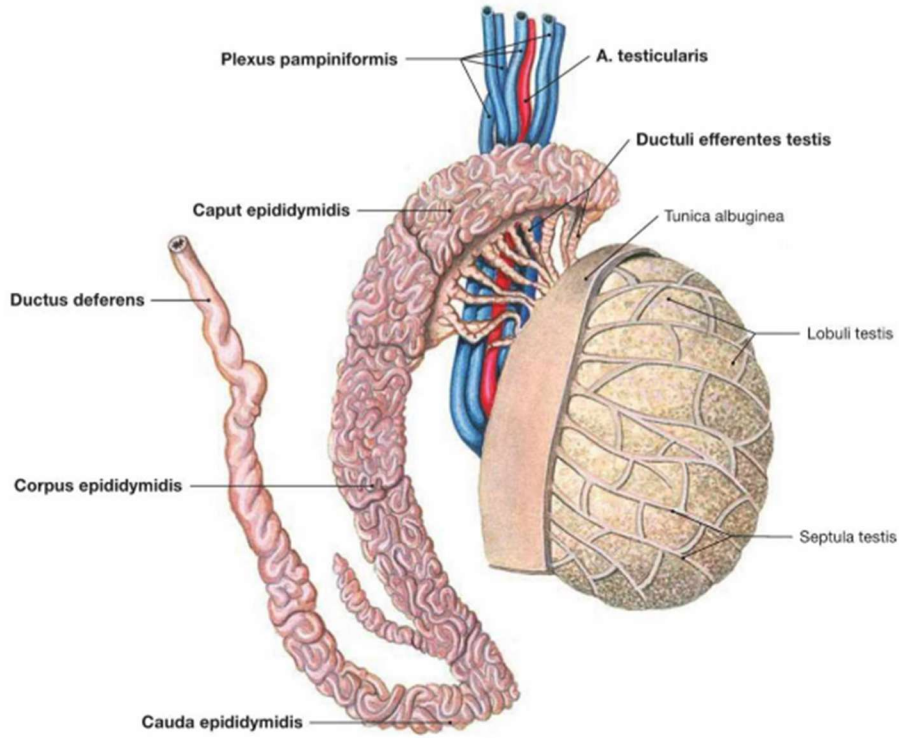
Tunika albuginea; mediastinum testis olarak adlandırılan, testise damar, sinir ve testiküler kanalların girişini sağlayan, testisin posteriorunda üst kutuptan alt kutba uzanan, kalın, tamamlanmamış bir septum oluşturur (29). Mediastinum testisten içeri, tunika albugineanın iç yüzüne doğru uzanan çok sayıda inkomplet fibröz septa ile testis; çok kıvrımlı seminifer tübülleri içeren 200-300 adet lobüle ayrılır (30). Lobüller koni şekillidir (34). Her lobülde spermin üretim yeri olan seminifer tübüllerden 2-4 adet bulunur (30). Seminifer tübüller çok küçük olmalarına karşın yaklaşık 75 cm uzunluğundadırlar (34).

Tunika vaginalis; testis yüzeyinden skrotumun iç yüzüne doğru reflekte olarak geri döndüğünden birbiriyle devamlı olan visseral ve paryetal yapraklar olarak isimlendirilen iki tabakaya sahiptir. Paryetal tabakanın iç kısmı düzgün yüzeyli, nemli mezotelyum ile çevrilidir. Tunika vaginalis kavitesi olarak da bilinen visseral ve paryetal tabakalar arasındaki potansiyel boşluk az miktarda, saman renkli, berrak bir sıvı içerir (29). Bu az miktardaki sıvı testisin skrotum içerisinde rahatça hareket etmesini sağlar (28). Testisin arka kısmı epididimis ve spermatik kord için bağlanma bölgesidir, bu nedenle bu kısımda tunika vaginalis bulunmaz (33). Tunika vaginalis buradan dışarıya doğru uzantı çıkararak epididimisi sarar (29).

İnce, ipliksi seminifer tübül kıvrımları mediastinum testise doğru ilerledikçe birleşerek düzleşirler ve spermatozoa üretmeyen ancak spermatozoanın iletiminde görev alan tubuli rektleri (düz tübülleri) oluştururlar. Seminifer tübüller daha sonra

bu düz tübüllerle mediastinumda tübüller ağı olan rete testise katılırlar (28). Rete testisin kanallarını epididimisin üst ucuna bağlayan yapı ise duktus efferentes olarak adlandırılır (30).

Epididimis; 7,5 cm uzunluğundadır (38). Sıkıca paketlenmiş kıvrımlı efferent duktüllerden oluşur, testisin posterolateraline yerleşir. Geniş bir baş (caput), gövde (corpus) ve dar bir kuyruk (cauda) olmak üzere üç parçadan oluşan virgül şeklinde bir organdır (30). Lateralinde testis ile arasında tunika vaginalisin visseral tabakasının örttüğü, sinüs epididimis denen derin bir oluk vardır (28). Baş kısmı testisin üst kutbuna 8-12 adet efferent duktus ile bağlanır (29). Efferent duktüller epididimis boyunca anastomozlaşarak korpus epididimis seviyesinde toplam uzunluğu 6 metre (m)'yi bulan, kıvrımlı tek bir tübüle dönüşür (35). Burada spermier olgunlaşmaya devam ederken aynı zamanda depo edilir. Epididimisin bir diğer önemli fonksiyonu ise sıvı absorpsiyonudur, ayrıca seminal sıvıya spermin olgunlaşmasına yardımcı olacak birtakım maddeler de salgılar (30). Epididimis skrotumu vas deferens olarak terk edip spermatik korda girer (Şekil 3) (36).



Şekil 3: Testis ve Genital Kanallar (31)

Testiküler kan damarları spermatik kordu geçerek testise ulaşırlar (34). Testis ve epididimis arteriyel dolaşımını 3 kaynaktan alır. Bunlar en çok katkısı olandan en aza göre; testiküler arter (testisin arteriyel dolaşımının 2/3'ü), vazal arter ve kremasterik arter şeklinde sıralanabilir.

İnternal spermatik arter olarak da bilinen testiküler arter, renal arterin çıktığı noktadan daha alt bir seviyede abdominal aortadan çıkar ve paryetal peritonun altında retroperitoneal olarak pelvise doğru psoas majör kası boyunca inferolateral yönde oblik bir seyir gösterir. Sağ tarafta inferior vena kavanın önünde orta kolik ve ileokolik arterlerin ve terminal ileumun arkasında seyrederken sol tarafta inferior mezenterik venin, sol kolik arter ve inen kolonun arkasında seyreder (29). Sağ ve sol testiküler arterler pelvise girince üreterleri ve eksternal iliak arterleri çaprazlarlar (28). Sonra her iki arter de derin inguinal halkadan girerek aynı taraflı spermatik kord ile inguinal kanal boyunca ilerler ve yüzeysel inguinal halkadan inguinal kanalı terk ederek testisi beslemek üzere skrotuma ulaşır ve testise ulaşana kadar geçirdiği yolculukta verdiği birçok dalla epididimisi de besler (29). Testiküler arter testisin arka kenarında birkaç küçük ve iki büyük (medial ve lateral) dal verir. Medial ve lateral dallar tunika albugineayı delerek tunika vaskülozayı oluşturmak üzere ileri dallanma gösterirler (30).

Vazal arter ise çoğunlukla internal iliak arterden köken alan süperior vezikal arterin, nadiren de inferior vezikal arterin bir koludur ve vaz deferensi besler.

Eksternal spermatik arter olarak da bilinen kremasterik arter; inferior epigastrik arterin bir dalıdır. Spermatik kordu ve kremaster kasını besler. Hem vazal arter hem de kremasterik arter testiküler arter ile derin inguinal halkadan girerek spermatik kord boyunca ilerler. Testiküler arter ve internal spermatik venler internal spermatik fasyada yer alırken kremaster kası ve damarları internal spermatik fasyanın dışında eksternal spermatik fasyanın içinde yerleşir.

Skrotum içerisinde; epididimisin başında, testiküler ve epididimal arterler arasında, epididimisin kuyruğunda ise testiküler, epididimal, vazal ve kremasterik arterler arasında zengin vasküler anastomozlar bulunur.

Testiküler venler testisin arkasından çıkarlar, epididimise dökülürler ve birleşip testis etrafında pampiniform pleksus olarak bilinen yüksek anastomozik kanalları oluştururlar (29). Bu 8-12 venden müteşekkil ağ duktus deferensin önüne yerleşir ve spermatik kord içerisinde testiküler arteri sarar. Pampiniform pleksus, amacı testisi sabit bir sıcaklıkta tutmak olan termoregülatuar sistemin bir üyesidir (28). Normal spermatogenez ancak testis sıcaklığı abdominal kavite sıcaklığının altında olursa gerçekleşebilir (32). Bu vasküler yapıda; akım yönleri farklı olan arter ve venler sadece duvar kalınlıkları kadar bir alanla birbirlerinden ayrılırlar ve bu sayede birbirleri arasında ısı ve bazı küçük moleküllerin değişimi gerçekleşir (29). Sonuçta abdominal bölgeden gelen sıcak arteriyel kan skrotumdan abdomene dönen soğuk ven ile soğutulmuş olur (32). Skrotal kesede düşük sıcaklığın korunmasına skrotumdan terleme ile buharlaşma olması, skrotumun ince dartos kasının gevşemesi veya kasılması ile spermatik kordun kremaster kasının testisi vücuda uzaklaştırıp yakınlaştırması da yardımcı olmaktadır (37, 39). Dartos kasındaki kasılma ve gevşeme genellikle istemsiz şekilde gerçekleşir (40). Pampiniform pleksus, vas deferensin önünden yükselir ve inguinal kanaldan 3-4 ven ile drene olur. Bu venler abdomene derin inguinal halkadan geçerek girerler ve birleşerek asimetrik olarak sağda renal venin girdiği seviyenin hemen altından yatay bir açıyla inferior vena kavaya solda ise dik bir açıyla sol renal vene drene olacak olan tek bir testiküler veni oluştururlar. Bu testiküler venler kapakçık içerirler.

Testiküler lenfatik akım yüksek hacimli ve devamlıdır (29). Testisin lenfatik damarları spermatik kord içerisinde testiküler damarlarla beraber yükselir ve L2 vertebra seviyesinde pre-aortik ve para-aortik lenf nodu gruplarına drene olurlar (30). Sağ testisin lenfatik damarları primer olarak inter-aortokaval, parakaval nodlara ve az bir kısmı da sol para-aortik nodlara dökülürken sol testisin lenfatik damarları sol para-aortik ve inter-aortokaval nodlara dökülür (29). İnguinal nodlara herhangi bir drenaj olmaz (35).

Testisin embriyolojik dönemde abdomende gelişip daha sonra pelvise inmesi nedeniyle testiküler arterler abdominal bölgeden köken alır, testiküler ven ve lenfatik damarlar ise abdomene dökülür (30).

Testis; testiküler damarlara eşlik eden onuncu ve onbirinci torasik spinal segmentlerden oluşan renal ve aortik pleksus dallarıyla veya vaz deferense eşlik eden ve pelvik pleksustan gelen dallarla innerve olmaktadır. İlginç bir şekilde bazı afferent ve efferent sinir liflerinin karşı pleksusa katıldığı gösterilmiştir. Bu da bir testiste görülen bir patolojinin diğerini neden etkilediğini açıklayabilir (29).

2.3. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi; skrotumda asılı duran iki testis, intratestiküler ve ekstratestiküler genital kanallar, aksesuar bezler ve penisten müteşekkildir (37). Spermatozoa olarak adlandırılan erkek gametlerinin üretim yeri olan testis aynı zamanda içerdiği endokrin hücrelerle T gibi hormonları sentezler, depolar ve salgılar (37, 41–43). T ve metaboliti olan DHT erkek genital sisteminin normal gelişiminde her safhada önemli rollere sahiptir (37, 43).

Aksesuar bezler bir çift seminal vezikül, bir çift bulboüretral bez ve bir adet prostat bezinden oluşur (36, 39, 40, 42). Aksesuar bezler sperm aktivitesi için gerekli olan sekresyonları salgılama, genital kanallar ise spermatozoa ve penil üretra içeriğini kasılarak ilerletme işlevine sahiptir. Bu sekresyonlar erkek genital sistem içerisinde bulunan spermatozoa için besinsel destek sağlar (37). Aynı zamanda da spermin kadın genital sisteme taşınması için de bir araç oluşturur (40). Aksesuar bezlerin salgısı ve spermatozoa beraberce semen olarak adlandırılır; semen penis yoluyla kadın genital sisteme ulaşacak olan sıvıdır (37). Semen içerisinde bir miktar da deskuame olmuş kanal epiteli hücresi bulunabilir (41).

2.3.1. Testis

Testislerin her biri sıkı bağ dokusu yapısındaki doku kapsülü olan tunika albuginea ile çevrilidir (37). Tunika albuginea kollajenöz ve düzensiz yapıdadır (40). Tunika albugineanın hemen derininde, yüksek oranda vaskülarize, gevşek bağ doku karakterinde testisin vasküler kapsülünü oluşturan tunika vasküloza yer alır (36, 39, 40). Tunika albuginea arka yüzeyde kalınlaşarak, organın içine doğru septalar vererek yaklaşık 250 adet piramidal şekilli testiküler lobül oluşturan, fibröz mediastinum testisi oluşturur (37, 39). Mediastinum testis kan ve lenfatik damarlar için giriş yolunu

oluşturur (36, 42). Genital kanallar için ise çıkış yoludur (36). Testiküler lobüller birbiri ile iletişim halindedir (39, 40). Her lobül sperm üretiminin olduğu 1-4 adet çok kıvrımlı seminifer tübülle beraber T sentezleyen endokrin fonksiyonlu interstisyel hücreleri (Leydig hücresi) içerir (37). Leydig hücreleri ise tunika vaskülozadan köken alan yüksek oranda vaskülarize ve innerve gevşek bağ dokusu içerisinde küçük kümeler halinde yerleşir (40). Seminifer tübül lümenini saran seminifer epitel tunika propria olarak bilinen çevre bağ dokudan bazal membranla ayrılır. Seminifer tübülün tunika propriası tip I kollajen ve kısmen de miyoid hücrelerden oluşur (44).

Ortalama santral vücut sıcaklığı olan 37 santigrat derece (°C)'de üretilen spermiler sterildir (40). Normal fonksiyonlu sperm üretimi için 34 °C gereklidir (37, 39, 40). Bu düşük sıcaklık spermatogenez için olmazsa olmaz olsa da steroidogenez için yani hormon üretimi için gerekli değildir (36).

2.3.2. İnterstisyel Doku

Testisin seminifer tübülleri arasındaki intersitisyel doku; fenestralı kapillerlerin de içinde bulunduğu kan damarlarını, lenfatikleri ve fibroblastları içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır. Puberte sırasında interstisyel hücreler ya da diğer bir adıyla Leydig hücreleri; santral yerleşimli nükleusa sahip, büyük poligonal ya da yuvarlak şekilli ve eozinofilik sitoplazmasında küçük lipid damlalarının bolca bulunduğu hücreler haline gelirler (37). Nükleusun periferinde bir veya iki adet nükleolus bulunur (41). Çapları yaklaşık 15 mikrometre (µm)'dir (40). Sitoplazmalarındaki lipid damlaları kolesterol esterleri ve T prekürsörlerini içerir (42). Leydig hücreleri çoğunlukla tek nükleuslu olsa da nadiren iki nükleuslu oldukları da vakidir. Sitoplazmalarında, insan interstisyel hücrelerinin karakteristik bir özelliği olan ve Reinke kristalleri olarak bilinen kristalize proteinler içerirler (40). Reinke kristallerinin fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (41). Bu kristaller puberteye kadar görülmez ve seksüel matürasyon yıllarında sayısını artırarak yaşlı hayatta en yaygın halini alır. Sarı veya kahverengi renkli lipofuskin pigmenti çoğu Leydig hücresinde mevcuttur (43). Bu hücrelerin eozinofilisine sebep olan düz endoplazmik retikulum ve mitokondrilerinde bulunan enzimler tarafından sentezlenen T, erkeklerde sekonder seks karakterlerinin gelişmesine yardımcı olur (37). Leydig hücreleri en çok

tübüler interstisyumda görülse de nadiren mediastinum testis, epididimis hatta spermatik kordda bile bulunabilir (43).

Bu hücreler tarafından sentezlenen bir diğer hormon ise insülin benzeri faktör-3 (INSL-3)'tür. Bu hormon fetal hayatta testisin skrotuma inişinde rol oynarken puberte ve erişkin çağda Leydig hücrelerinden T salınımını kolaylaştırarak sağlıklı spermatogenezin devamlılığına yardım eder (40). Aynı zamanda INSL-3 seminifer tübülde mayoz bölünmeleri teşvik eder. Erişkin erkekte dolaşımdaki INSL-3'ün esas kaynağı Leydig hücreleridir. INSL-3 seviyeleri Leydig hücrelerinin steroidogenetik kapasite indeksini verir. Leydig hücreleri aynı zamanda miyoid hücelere etki ederek onların kasılmasını stimüle eden oksitosini de sentezler (36).

İnterstisyel hücreler tarafından sentezlenen T, pitüiter bir gonadotropin olan interstisyel hücre stimüle edici hormon olarak da bilinen lüteinizan hormon (LH) tarafından tetiklenir (37, 41). T sentezi pubertede hipotalamusun gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH) sentezlemeye başlaması ile başlar. Geç embriyonik dönemde testisin interstisyel hücreleri, plasenta tarafından üretilen gonadotropinler ile stimüle edilerek erkek genital sistem duktus ve bezlerinin gelişimi için gereken T'yi sentezler. Bu fetal interstisyel hücreler gebeliğin 3-4. aylarında çok aktiflerdir; sonrasında puberteye dek gerileyerek fibroblast benzeri hücelere dönüşürler (37).

2.3.3. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller kalın bir seminifer epitel ve onu saran ince bir bağ dokusu olan tunika propriadan müteşekkildir. Tunika propria ve seminifer epitel birbirinden iyi gelişmiş bir bazal lamina ile ayrılırlar. Seminifer tübüller testis hacminin yaklaşık %85'ini oluşturur. Genç bir erkekte seminifer tübüller ortalama 200 milyon/gün hızında sperm üretir. Her bir testiste 250-1000 adet bulunabilen bu tübüller 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır. Bir testiste bulunan tüm tübüllerin toplam uzunluğu 250 m'yi bulur (37). Bu tübüller kör uçludur (40).

Her bir tübül daha dar ve çok kısa bir segment olan düz tübüllerle mediastinuma gömülü, epitel döşeli kanallar ağı olan rete testise bağlanır. Yaklaşık 10-20 adet olan efferent duktuslar da rete testisi epididimisin başına bağlar.

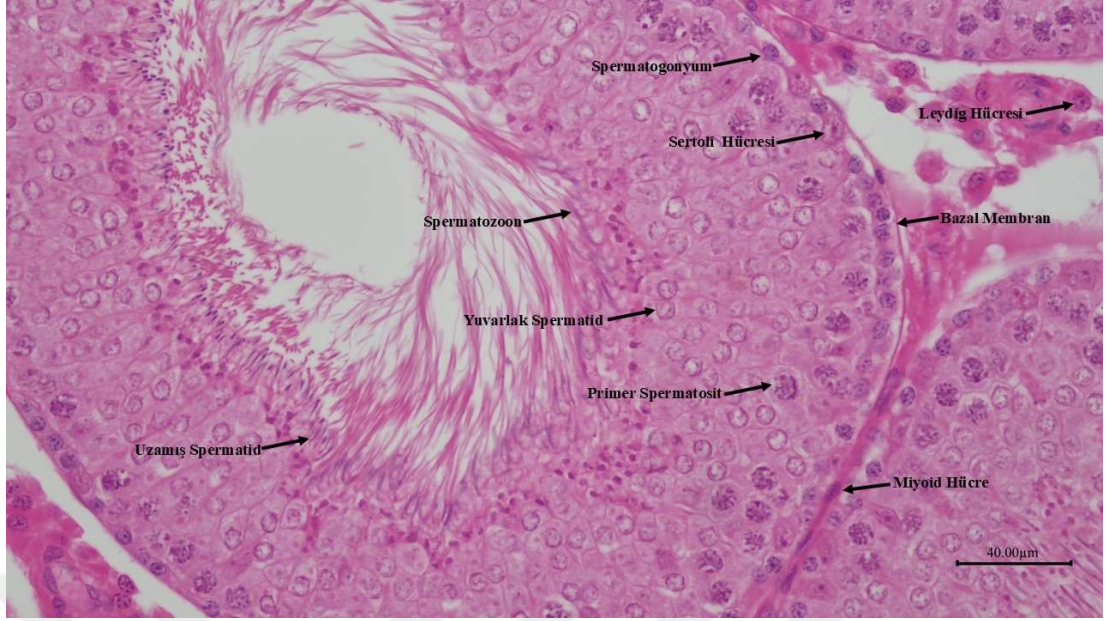
Her seminifer tübül, germinal ya da spermatogenik epitel olarak adlandırılan kompleks, özelleşmiş ve çok katlı bir epitelle döşelidir (37). Bu epitelin bazal membranı birkaç kat düz kas hücresi benzeri miyoid hücre ve kollajen içeren ba  dokusu yapısındaki tunika (lamina) propria olarak da bilinen ba  dokusu ile çevrilidir. Tunika propria peritübüler doku olarak da isimlendirilir ve tipik fibroblastlardan yoksundur. Miyoid hücrelerde granüllü endoplasmik retikulumun belirgin oluŐu, tipik fibroblastlar da bulunmadığından bu bölgede kollajen sentezinden miyoid hücrelerin sorumlu olabileceğini gösterir (36). Miyoid hücreler tübüllerin zayıfça kasılmasına yardımcı olur (36, 37). Bu peristaltik hareketler ile spermatozoanın seminifer tübül boyunca testiküler sıvı içerisinde ilerlemesine yardımcı olur. Tunika propria yaŐla beraber kalınlaŐırken seminifer epitel de sperm üretim oranının düşmesiyle inceler. Erken yaŐlarda görülen tunika propria kalınlığı infertilite ile ilişkili olabilir (36).

Germinal epitel birkaç hücre tabakası kalınlığındadır ve iki tip hücreden müteşekkildir (36, 37).

1-Büyük, bölünmeyen, gelişen sperm hücre prekürsörlerini fiziksel ve metabolik olarak destekleyen Sertoli hücreleri (37). Bu hücreler destekleyici hücreler olarak da bilinirler (36).

2-Spermatogenik serinin bölünen hücreleri (37). Bu hücreler farklı matürasyon evrelerinde olabilir (40).

Spermatogenik serinin hücreleri 4 ya da daha fazla konsantrik tabaka oluŐturacak Şekilde germinal epitele yerleşirler (Resim 1). Progenitör hücrelerden tam olgun sperme olgunlaŐma yaklaşık 10 haftada tamamlanır (37). Spermatogenez olarak bilinen ve farklı matürasyon evrelerinde hücreler içeren bu süreç kendi içinde üç fazda incelenir. İlk faz spermatogonyumların primer spermatositlere dönüştüğü spermatositogenezdır. İkinci faz diploid primer spermatositlerin haploid spermatidlere dönüştüğü mayoz fazıdır.    nc  faz ise spermatidlerin spermatozoaya dönüştüğü spermiyogenez fazıdır (40).



Resim 1: Seminifer Tübülün Histolojik Görüntüsü ve İhtiva Ettiği Hücreler (Hematoksilen & Eozin, 400x)

2.3.4. Sertoli Hücreleri

Bu hücreler isimlerini, fizyolojik önemlerini tarihte ilk kez vurgulayan Enrico Sertoli'den almışlardır. Enrico Sertoli bu hücreleri, spermatogenik hücreleri besleyen ve seminifer tübülleri bazal ve adluminal (lüminal) olarak iki kısma ayıran uzun prizmatik epitelial hücreler olarak tarif etmiştir. Spermatogenik serinin tüm hücreleri; Sertoli hücrelerinin genişlemiş yüzeyleri ile yakından ilişkilidirler, metabolik ve fiziksel destek açısından ona bağımlıdır (37). Puberteye kadar seminifer tübülün esas hücresi Sertoli hücreleridir (43). Sertoli hücreleri puberteden sonra daha fazla mitoz bölünmeye girmez (42). Bu nedenle de artık seminifer tübülün sadece %10'unu oluşturur. Ancak yaşlanmaya bağlı olarak görülen germinal epitel hücrelerinde azalma nedeniyle Sertoli hücreleri tekrar tübülün baskın hücresi haline gelir. Sertoli hücreleri germ hücrelerinden farklı olarak normal vücut ısısında hayatta kalabilirler (43).

Sertoli hücreleri bazal laminaya yapışık ve lümene kadar uzanırlar (37, 41). Lateral hücre membranları kompleks katlanmalar içerdiğinden ışık mikroskobu ile lateral sınırlarını seçmek neredeyse imkansızdır. Bu katlantılar spermatogenik hücre gruplarını sarar (40). Her Sertoli hücresi 30-50 adet gelişmekte olan germ

hücrelerini destekler. Ultrastrüktürel olarak bu hücrelerin yoğun miktarda düz endoplazmik retikulum, bir miktar granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksleri, çok sayıda mitokondri ve lizozom içerdiği görülmüştür (37). Aynı zamanda bol miktarda hücre iskeleti elemanı içermeleriyle gelişen gametlere yapısal destek sağladıkları da belirtilmektedir (40). Nükleusları genellikle üçgen biçimli ve ökromatiktir (37). Nükleolusları ise büyük ve santral yerleşimlidir (40). Sertoli hücreleri bu özellikleri sayesinde komşu germ hücrelerinden rahatlıkla ayırt edilebilirler (37). Sitoplazmasında kompozisyonu ve fonksiyonu net olarak bilinmeyen Charcot-Böttcher kristaloidleri isminde inklüzyon ürünleri içerir. Bazal hücre membranlarında folikül stimüle edici hormon (FSH) ve androjenler için reseptörler içerir (40).

Sertoli hücre fonksiyonunda önemli bir yer tutan ve hücrelerin bazolateral membranlarını birbirlerine bağlayan sıkı-tıkayıcı bağlantılar seminifer tübül epiteli içerisinde yer alan kan-testis bariyerini oluşturur (37). Bu bağlantılar sayesinde epitel; bazal ve adluminal olarak isimlendirilen iki izole kompartmana ayrılır. Bazal kompartman daha dar olup tıkayıcı bağlantıların bazalinde yer alırken adluminal kompartman daha geniştir ve bazal kompartman tarafından çevrelenir. Spermatogenez puberteden sonra başladığı ve farklılaşan yeni germ hücreleri vücudun diğer hücrelerinden farklı sayıda kromozom içerdiği ve aynı zamanda farklı yüzey antijenleri eksprese ettiği için immün sistem tarafından yabancı hücreler olarak değerlendirilirler (40). Bu sıkı bağlantılar; adluminal bölgede bulunan eşsiz spermatogenik hücreleri bağ doku etkisinden koruyarak bu hücelere karşı otoimmün saldırıyı önleyen en önemli mekanizmalardandır. Memelilerde immün sistem matür olduktan sonra oluşan en sıkı kan-doku bariyeridir (37). Kan-testis bariyeri aynı zamanda gelişmekte olan germinal epiteli, kanda bulunan zararlı maddelerden de korur (39).

Sertoli hücrelerinin görevleri üç madde ile genellenebilir: İlki gelişen spermatogenik hücreleri destekleme, koruma ve beslemedir. İkincisi ekzokrin ve endokrin sekresyondur. Üçüncüsü ise fagositozdur (37).

Spermatositler ve spermatidler kan-testis bariyerinin varlığından dolayı plazma protein ve besinlerinden izole oldukları için beslenme ve atıklarını uzaklaştırma

açısından Sertoli hücrelerine bağımlıdır. Bu sayede Sertoli hücreleri bir yandan immün sistemden spermatogenik hücreleri korurken bir yandan da hücre büyüme ve gelişimi için gerekli olan faktörleri temin ederler (37).

Sertoli hücreleri lümene sürekli fruktozdan zengin bir medyum bırakır, bu sayede yeni spermler bu medyum ile hem beslenir hem de taşınarak testis dışına atılır (37, 40). Besin maddelerinin ve T'yı mikroçevrede spermiyogenezin idamesi için gerekli düzeye kadar konsantre eden androjen bağlayıcı proteinin sentezi FSH ile uyarılır. Endokrin hücreler olarak; 39 kilodalton boyutunda, glikoprotein yapıda olan inhibini de sentezlerler. İnhibin, ön hipofizi FSH sentezini ve salınımını baskılaması için uyarır. Sertoli hücreleri fetüste 140 kDa glikoprotein yapıda olan AMH'yi sentezler bu sayede embriyonik Müllerian (paramezonefrik) kanallar geriler. AMH yokluğunda bu kanallar gerilemez ve dişi üreme sisteminin bir parçasını oluşturur (37). Sertoli hücrelerinin diğer bir endokrin fonksiyonu ise ön hipofizden FSH salınımını uyaran aktivin sentezidir. Testiküler transferrin de yine Sertoli hücreleri tarafından sentezlenip salınır, görevi ise serumdan demiri (Fe^{+2}) olarak gelişen gamet hücrelerine iletmektir (40).

Spermiyogenez esnasında rezidüel cisim olarak salınan fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve lizozomlarında sindirilir (37).

2.3.5. Spermatositogenez ve Mayoz

Spermatogonyumlar, Sertoli hücre yüzeyleri ile yakından ilişkili olarak sıkı bağlantıların altında, lenfosit ve diğer immün hücreleri içeren vaskülarize interstisyel dokudan bağımsız olmayan bazal kompartmana, tübüllerin epitel duvarında bazal membrana bitişik olarak mevkilenirler (37). Bunun dışında kalan primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoa gibi spermatogenik seri hücreleri adluminal kompartmanda yer edinirler (40, 44). Spermatogonyumlar daha fazla spermatogonyumu ya da bazal kompartmandan adluminal kompartmana göç edecek olan primer spermatositi oluşturmak üzere mitotik bölünmeye giren diploid hücrelerdir (40).

Spermatogenez; 12 μm çapında küçük, yuvarlak hücreler olan spermatogonyum olarak isimlendirilen kök ve progenitör hücrelerin prolifer

olmasıyla pubertede başlar (37). Seksüel matürasyon öncesi çok az sayıda bulunan spermatogonyum, puberteden sonra mitozla sayısını artırarak mayoza girecek olan hücreleri oluşturur. Spermatogonyumların mitoz bölünmesi spermatositogenez olarak da isimlendirilir (43).

Spermatogonyumlar pubertede T tarafından uyarılarak hücre siklusuna girerler (40). Üç tip spermatogonyum vardır ve spermatogonyum gelişiminin farklı aşamalarını gösteren bu hücreler nükleuslarının şekillerinde ve boyanma karakterlerinde görülen ufak değişiklikler ile ayırt edilirler. Koyu, oval şekilli nükleusu olan Koyu Tip A spermatogonyumlar kök hücre gibi davranarak ara sıra bölünürler; bölünmeler sonucu yeni kök hücreleri ya da daha soluk boyanan, oval nükleuslu, hızlı bölünen soluk tip A spermatogonyumu oluşturabilirler. Bu soluk tip A spermatogonyumların her biri, hücrelerin birbiri ile bağlantılı kaldığı birkaç klonal bölünmeye uğrayarak sinsityum oluşturur. Birkaç bölünmeden sonra hücreler daha yuvarlak biçimde, daha soluk boyalı nükleusa sahip tip B spermatogonyumlara dönüşürler (37). Bu hücreler spermatogenik serinin iyonize radyasyona en duyarlı olan hücreleridir (40).

Her bir tip B spermatogonyum son bir mitoz bölünmeye girerek iki hücre oluşturur. Boyutça büyüyen bu hücreler küresel şekilli, ökromatik nükleuslu primer spermatositlere farklılaşırlar (37).

Primer spermatositler oluşur oluşmaz bazal kompartmandan adluminal kompartmana doğru göç ederler; bu hücreler komşu Sertoli hücrelerinin arasından geçerken Sertoli hücreleri ile sıkı bağlantılar oluşturarak kan-testis bariyerinin bütünlüğünü korurlar (40). Adluminal göçün kan-testis bariyerinden taviz vermeyişi germ hücrelerinin birbirine interselüler köprüler ile bağlı olduğu düşünüldüğünde çok daha etkileyici bir hal almaktadır. Primer spermatosit ikisi cinsiyet kromozomu olmak üzere 46 kromozomludur, diploiddir ve deoksiribonükleik asit (DNA) içeriği 4N'dir (37). Primer spermatositler tübülün en büyük germ hücreleridir. Sitoplazmalarında büyük yumaklar veya ince iplikler şeklinde kromatin içeren büyük bir nükleus taşırlar (39). Oluşumlarından kısa süre sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin yaklaşık üç hafta sürecek olan profaz evresine girerler. Testis kesitlerinde görülen çoğu

spermatozit bu evrededir (37). Bu evrede gerçekleşen genetik rekombinasyonlar sayesinde her gametin eşsiz bir genomu oluşur.

Homolog kromozomlar ilk mitotik bölünmede ayrılırlar, bunun sonucunda sadece 23 kromozomlu ancak hala her bir kromozomunda iki kromatid olan yani DNA miktarının 2N olduğu daha küçük hücreler olan sekonder spermatozitler oluşur. Testis kesitlerinde sekonder spermatozitler nadiren görülür; çünkü bu hücreler interfazı çok kısa süren, hızlıca ikinci mayoz bölünmesini tamamlayan hücrelerdir (37). Bu aşamada kromozom replikasyonu yapılmaması da interfazın kısa olmasına sebebiyet verir (40).

Sekonder spermatozitin bölünmesi kromozomların kromatidlerini birbirinden ayırır; bu sayede iki adet, DNA miktarı N olan haploid (23 kromozomlu) spermatid oluşur (37). Spermatidler primer ve sekonder spermatozitlerden daha küçüktür (39). Fertilizasyon ile mayoz bölünme sonucu oluşmuş haploid ovum ile haploid sperm birleşerek diploid sayıda kromozom sayısına ulaşılmış olunur (37).

2.3.6. Erkek Germ Hücrelerinin Klonal Karakteri

Spermatogonyanın mitotik bölünmeleriyle üretilen kök hücreler ayrı hücreler olarak kalır (37). Spermatogenez yaklaşık 74 günde tamamlanır ve bu olay seminifer tübül duvarı boyunca siklik, ancak asenkronize bir biçimde gerçekleşir. Seminifer epiteldeki bu sikluslar gelişimin farklı aşamalarındaki hücrelerin tekrarlayan agregasyonlarından müteşekkildir. Her agregat birbirine interselüler bağlantılarla bağlı bir grup hücreden oluşup, lümene doğru ünite halinde göç eden bir sinsityum oluşturur (44). Bu spermatogenik sinsityumun tam önemi açık değildir, ancak sitoplazmik köprüler hücrelerin, haploid çekirdeklerinde eksik olan X veya Y kromozomu üzerindeki genler tarafından kodlanan proteinler ve ribonükleik asit (RNA) dahil olmak üzere tam diploid genomun ürünleri ile beslenmesini sağlar (37). Ayrıca bu bağlantı sayesinde spermatogenik hücreler birbiri ile iletişim halinde kalarak aktivitelerini senkronize ederler (40). İnterselüler bağlantılar matür spermler lümene salındığı zaman kopar (39).

2.3.7. Spermiyogenez

Sperm üretiminin son basamağı olan spermiyogenez; spermatidlerin, ovuma DNA taşımak üzere ileri derecede özelleşmiş olan spermatozoona dönüştüğü sıcaklığa duyarlı bir evredir. Bu aşamada hücre bölünmesi gerçekleşmez, ancak spermatogenezde görüldüğü gibi hücreler Sertoli hücreleri ile ilişkisini sürdürür (37). Benzer şekilde aynı soluk tip A spermatogonyumdan köken alan spermatidler de birbirine hala sitoplazmik köprüler ile bağlantılıdır (40).

Haploid spermatidler 7-8 µm çaplı, seminifer tübül lümenine yakın yerleşen küçük hücrelerdir. Spermiyogenez; akrozom oluşumunu, nükleusun uzayıp kondanse oluşunu, flagelyum oluşumunu ve sitoplazmanın büyük kısmının kaybını kapsar. Sonuçta Sertoli hücre yüzeyinden tübül lümenine salınan olgun spermatozoonlar oluşur (37). Spermiyogenez; golgi fazı, başlık fazı, akrozomal faz ve matürasyon fazı olmak üzere 4 fazda incelenir (40).

Golgi fazında sitoplazma; nükleusa, mitokondriye, sentriyole ve serbest ribozomlara yakın yerleşimli belirgin bir Golgi aparatüsü içerir (37). Golgi kompleksi içinde, periyodik asit-Schiff (PAS) pozitif granüller olan proakrozomal veziküller glikoproteinden zengindir ve birleşerek nükleer zarfa komşu bir alanda membranla çevrili akrozomal vezikülü oluştururlar. Akrozomal vezikülün lokalizasyonu gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler (36). Sentriyoller; akrozomal başlıktan en uzak noktaya göç ederek burada bazal cisimcik gibi hareket edip yapısal olarak da silyuma benzeyen flagelyumun aksonem yapısını oluştururlar (37).

Başlık fazında ise akrozomal vezikül nükleusun ön yarısını çevreler ve bu yeni şekliyle akrozomal başlık adını alır (36). Akrozom; esasen hiyalüronidaz ve tripsin benzeri bir proteaz olan akrozin gibi hidrolitik enzimler içeren özelleşmiş tipte bir lizozomdur. Spermatozoon bir oosit ile karşılaşınca akrozomal membranın spermin plazma membranı ile füzyonu sonucu bu enzimler salınır. Bu sayede oositi saran korona radyata hücreleri birbirinden ayrılır ve zona pellusida sindirilir. Akrozomal reaksiyon olarak adlandırılan bu aşama fertilizasyonun ilk basamaklarındandır.

Akrozom fazında; gelişen spermin aksonemi lümene doğru uzarken, akrozom ve kondanse nükleusu içeren başı hala Sertoli hücresine gömülü haldedir.

Nükleozomlardaki histon proteini yerine küçük basit peptidler olan protaminlerin geçmesiyle nükleus daha da uzar ve kondanse olur. Flagelyum uzaması kuyruğun distalinde devam ederken proksimal kısımda mitokondriler bir araya gelerek kalınlaşmış bir orta parça oluştururlar ki burada flagelya hareketi için gerekli olan adenozintrifosfat (ATP) üretilecektir (37). 9 kaba lif nükleusa yapışık olan sentriyollerden çıkar ve bu lifler nükleus ile flagelyayı birbirine bağlayan bağlantı parçasını oluştururlar (36).

Spermiyogenezin matürasyon fazında ise gerek duyulmayan sitoplazma spermatozoondan rezidüel cisim olarak uzaklaştırılır ve kalan interselüler köprüler de kaybolur (37). Tamamen formunu tamamlamış ancak henüz fonksiyon göstermeyen ve hareketsiz olan spermiler seminifer tübül lümenine salınırlar (37, 41). Bu olaya spermiyasyon denir (40). Spermiyasyon önde kuyruk olacak şekilde gerçekleşir (42). Testisteki spermiyasyon hızı semendeki sperm sayısını belirler (36).

Bu yeni üretilen spermatozoonlar hareketsizdir ve bir oositi dölleyemez. Spermatozoon epididimisi geçerken hareket yeteneğini, oositi dölleyebilme yetisini ifade eden, kapasitasyonu ise dişi genital yola girince kazanır (40).

2.3.8. Matür Spermatozoonun Yapısı

Spermatozoonlar nükleusa ev sahipliği yapan bir baş ve uzunluğunun çoğunu oluşturan bir kuyruktan oluşan yaklaşık 65 µm uzunluğunda hücrelerdir (40).

Spermatozoonun yassılaşmış ve sivrileşmiş başı yaklaşık 4,5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır (36). Sperm başı plazmalemma ile çevrilidir. Sperm başında 23 kromozom içeren kondanse nükleus ve nükleusun ön kısmını kısmen örten akrozom bulunur (40). Akrozom, başın %66-75'ini oluşturur (43).

Sperm kuyruğu boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 4 kısımdan oluşur. Başı çevreleyen plazmalemma kuyruk çevresinde de devamlılık gösterir (40). Kuyruk boyunca kuyruğun hareketinden sorumlu olan aksonem bulunur. Flagelya esasen 9 adet periferik yerleşimli mikrotübül çifti ve bir çift merkezi mikrotübülden oluşan aksoneme sahip özelleşmiş uzun bir silyumdur (43).

Boyun; 5 µm uzunluğunda olup başla, kuyruğun kalan kısmını bağlar (40). Boyun bir çift sentriyol ve bağlantı parçasını içerir (43).

Orta parça; 5 µm uzunluğunda olup boyun ile esas parçayı bağlar (40). Orta parçada merkezi olarak ilerleyen aksonemi bağlantı parçasından köken alan 9 kaba longitudinal lif çevrelerken en dış zonda da sıkıca paketli uzamış mitokondriler bulunur.

Esas parça; yaklaşık 45 µm olup kuyruğun en uzun parçasını oluşturur. Esas parça da 9 kaba lifle çevrili aksonem içerir ve bunlar da çevresel olarak yönlendirilmiş çok sayıda dış kılıf lifiyle çevrelenmiştir (43).

Son parça ise 5 µm olup kuyruğun sonlanma bölgesidir (40). Son parçada longitudinal lifler son bulur; bu nedenle burası sadece aksonem içerir (43).

2.3.9. İntratestiküler Kanallar

İntratestiküler kanallar; tubuli rekti (düz tübüller), rete testis ve efferent duktuslardan oluşur. Bu kanalların tümü seminifer tübüllerden epididimise sıvı ve spermatozoa taşır (37).

Seminifer tübüller; ilk yarısı sadece Sertoli hücreleri tarafından döşenen ikinci yarısında ise çoğunlukla tek flagellum içeren kısa mikrovilluslu basit kübik epitelle döşeli olan kısa düz tübüller ile rete testise bağlanır (40). Rete testis, epiteli düz tübüllere benzeyen kanallar ağıdır ve mediastinum testisin bağ dokusu ile desteklenmektedir.

Rete testis yer yer silsiz kübik epitel yer yer de prizmatik silli hücreler içeren sıradışı bir epitelle döşeli yaklaşık 20 adet efferent duktuslara boşalır. Epitelin bu yapısı efferent duktusların karakteristik fistolu görünümünü oluşturur. Silsiz hücreler seminifer tübülün Sertoli hücreleri tarafından sentezlenen sıvıyı kısmen absorbe ederler. Bu absorpsiyon ve siliyer aktivite sıvı akışı oluşturur, bu sayede sperm testisten epididimise doğru pasif bir şekilde taşınmış olur (37). Genellikle her iki hücrede de içeriği tam olarak bilinmeyen kahverengi pigmentasyonlar bulunur (41). Efferent duktusların duvarında yerleşen sirküler yerleşimli ince bir düz kas tabakası

bulunur ki bu da spermin epididimise doğru hareketine yardım eder (37). Efferent duktuslar testisin posterosüperior yüzeyinde mediastinumdan çıkarlar (39).

2.3.10. Genital Boşaltım Kanalları

Genital boşaltım kanalları epididimis, duktus (vaz) deferens ve üretradan oluşur. Ejakülasyon sırasında spermi skrotumdan penise taşırlar (37).

Epididimis

Duktus epididimis ve efferent duktuslar beraberce epididimisi oluştururlar (42). Uzun, yüksek oranda kıvrımlı duktus epididimis skrotumda testisin üst-arka kenarında yerleşir ve bağ dokusu ile çevrilidir (37). Epididimisin burada kapladığı yer 5 cm kadardır (40). Yaklaşık 6 m uzunluğundaki epididimis baş, gövde ve kuyruk olmak üzere üç parçaya ayrılır. Baş kısmı efferent duktüllerin girdiği, gövde kısmı spermin hafif modifikasyonlar gösterdiği, kuyruk ise ejakülasyona kadar spermin depolandığı yerdir (37). Gövde bölümünde epididimis yapıcı çok kıvrıntılıdır, kuyruk bölümünde, duktus deferensle birleşeceğinden kıvrımları kaybolur (40).

Epididimal kanal karakteristik uzun stereosilya içeren prizmatik esas hücrelerden ve küçük yuvarlak kök hücreler olan bazal hücrelerden oluşan psödostratifiye prizmatik epitel ile döşelidir (37). Bazal hücreler piramidal/polihedral şekillidir (40). Bu epitel epididimisin baş kısımlarında daha yüksekken, kuyruğa doğru kısalmaktadır (41). Esas hücreler apikal yüzlerinde hareketsiz ve dallanmalar gösteren stereosilyalar içerir (39). Stereosilyalar yapıcı mikrovillusların çok daha uzun halidir (41). Bu özelleşme sayesinde spermle beraber duktus epididimise giren suyun ve rezidüel cisimlerin büyük kısmını uzaklaştırır. Bunun dışında spermin süspanse olduğu sıvıya çeşitli ürünler sentezleyerek sıvıda ciddi düzeyde değişikliğe sebep olur. Bu salgılar epididimis boyunca farklı oranlarda salgılanmakla birlikte birçok farklı protein, glikoprotein, glikolipid ve lipid içerir (37). Esas hücreler bir çeşit glikoprotein olan gliserofosfolini de sentezlerler (40). Gliserofosfolin, yüzey aktivasyonlu dekapasitasyon faktörü olarak da bilinir (44). Bu faktör spermatozoonun kapasitasyonunu önler ve bu sayede spermin kadın genital sisteme girene dek dölleme yeteneği elinden alınmış olur (40). Spermin epididimisten geçişi normalde 2-4 hafta

kadar sürer. Bu süre içerisinde spermatozoa esas hücrelerden sentezlenen yapılar sayesinde fertilizasyonda rol oynayabilecek hale gelir.

Spermin ileri hareket yeteneği, akrozomun son modifikasyonları ve en önemlisi sperm başında bulunan hücre membranına akrozomal reaksiyonu engelleyen kolesterol ve diğer dekapasitasyon faktörlerinin eklenmesi ile membranın reorganizasyonu olayları epididimis içerisinde gerçekleşir.

Epididimal kanal dıştan ince bir tabaka şeklinde sirküler olarak organize olmuş düz kas hücreleri tarafından sarılıdır. Kuyruk kısmında bu tabakanın içine ve dışına longitudinal yerleşimli kas hücreleri de eklenir. Ejakülasyon sırasında bu kas tabakalarının peristaltik hareketi ile epididimisin kuyruk kısmında depolanan spermin hızla vaz deferense boşaltılması sağlanır (37).

Duktus/Vaz Deferens

Vaz deferens; uzun, düz ve tüp biçimli bir organdır. Kalın bir müsküler duvara sahip olup lümenin duvara göre küçük kaldığı erkek genital boşaltım kanalıdır (37). Bu kanal spermatik kord içerisinde skrotumdan çıkarak üretraya doğru devam eder (43). Yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşeli olan bu bölümde epididimise göre daha az stereosilyum bulunur. Mukozasında longitudinal katlantılar, lamina propriasında çokça elastik lif içerirken kalın müsküler tabakasında; içte longitudinal, ortada sirküler, dışta longitudinal olmak üzere üç kat kas tabakası bulunur. Kas tabakası ejakülasyon sırasında güçlü peristaltik hareketler oluşturarak epididimisten gelen spermi hızla ilerletir (37).

Her bir duktus deferensin genişlemiş son kısmına ampulla adı verilir. Buradan itibaren seminal veziküllerin kanallarının da katılması ile duvarında hiç kas içermeyen ejakülatuar kanal oluşur (40, 41).

2.4. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar

Oksidatif stres, oksidanlar ve antioksidanlar arasında oksidanlar lehine bir dengesizliktir. Oksidatif stres indirgenme-yükseltgenme yani redoks kontrolünün bozulmasına ve sonuçta moleküler hasara yol açar (45). İnsanlarda oksidatif stres, kanser, tip II diyabet, ateroskleroz, kronik inflamatuvar süreçler, iskemi/reperfüzyon

hasarı ve çeşitli nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere çok çeşitli patolojilerle ilişkilendirilmiştir (46).

Antioksidanlar ise ortamda bulunan oksidanları nötralize etme görevine sahiptirler, ortamda oksidan bulunmaması durumunda aktif değildirler (47).

ROS hücre hasarında rolleri iyi bilinen oksijen kökenli oksidanlardır (48). ROS normal hücre metabolizma sırasında ve hücre dışı süreçlerin bir sonucu olarak sürekli oluşur (49). Ancak normal şartlarda ROS oluşum ve yıkım hızına bağlı olarak oksidatif stres ile redoks durumu arasında muazzam bir denge vardır. ROS'lar sistem düzeyinde, kan basıncının düzenlenmesi, bilişsel ve bağışıklık işlevleri gibi karmaşık işlevlerde ya da büyüme faktörü uyarımına yanıt verilmesinde, inflamatuvar yanıtın oluşmasının sağlanmasında ve bağışıklık sisteminde hayati rollere sahiptir (50).

ROS bazal seviyeleri temel fizyolojik süreçler için gereklidir; ancak serbest radikallerin aşırı üretimi doku oksidatif hasarına neden olur. ROS'un neden olduğu oksidatif stres mitokondriyal disfonksiyonu, endoplazmik retikulum stresini ve inflamatuvar durumu indükler (51). ROS, DNA'da da çeşitli hasarlar yapar (49). Hücre içi redoks homeostazının korunması, etkili bir antioksidan sisteme bağlıdır (51).

ROS üretimi temelde iki yolla olur (48):

1. Oksidatif fosforilasyon; mitokondride gerçekleşen ve ROS üreten önemli bir metabolik yoldur (49). Mitokondriyal elektron taşıma zinciri, elektronları moleküler oksijene aktarabilen ve çoğu dokuda O_2^- üretiminin birincil kaynağı olarak hizmet veren birkaç redoks merkezi içerir (52). Mitokondride moleküler oksijen 4 elektronun eklenmesi ile aşama aşama indirgenir ve sonuçta su oluşur (48). Normal fizyolojik solunum sırasında tüketilen moleküler oksijenin yaklaşık %1-2'si O_2^- radikallerine dönüşür. Moleküler oksijenin tek elektronlu indirgenmesi, çoğu ROS'un öncüsü olarak hizmet eden, nispeten kararlı bir ara ürün olan $O_2^{\cdot-}$ 'ni üretir. $O_2^{\cdot-}$ 'nin süperoksit dismutazlar (SOD) tarafından dismutasyonu hidrojen peroksit (H_2O_2) üretimi ile sonuçlanır (52). H_2O_2 ; $O_2^{\cdot-}$ 'den daha karardır ve biyolojik membranları aşabilir (48). Fe^{+2} gibi metallerin varlığında H_2O_2 ; Fenton reaksiyonu ile yüksek reaktiviteye sahip $OH^{\cdot}$ 'ne dönüşür (52).

2. Diğer bir yol ise savunma hücrelerinde görülen inflamasyon ve hücrel savunma durumlarında silah olarak kullanılan ROS'un üretimidir (48).

ROS üreten ya da üretiminin artmasına sebep olan olaylar arasında peroksizomal metabolizma, nitrik oksitin enzimatik sentezi, fagositik lökositler, ısı, ultraviyole (UV) ışık, terapötik ilaçlar, iyonlaştırıcı radyasyon da sayılabilir (49). Serbest radikaller son yörüngesinde eşleşmemiş tek elektron içeren kimyasal türlerdir. Bu kimyasal yapılar oldukça kararsızdırlar ve inorganik ya da organik kimyasallarla hemen reaksiyona girerler. Eğer hücre içinde üretilmişlerse nükleik asitlere, hücrel proteinlere ve lipidlere saldırırlar. Ayrıca serbest radikaller başka moleküllerle etkileşerek onların da serbest radikallere dönüşmesine sebebiyet verirler ve bu da hasar boyutunun artmasına neden olur (48). ROS'lar serbest radikal halinde olabilecekleri gibi radikal olmadıkları durumlar da söz konusu olabilir (53).

Tümör nekroz faktörü (TNF)-alfa oksidatif stres cevabı oluşturduğu bilinen bir sitokindir bu nedenle bu sitokinindükleyeceği yolaklar ROS türlerini içerebilmektedir. Aynı zamanda apoptozisi de aktive ettiği bilinmektedir (54).

Serbest radikal halindeki ROS'lar: O_2^- , OH^- , peroksil radikali ($ROO^\bullet$) ve alkoksil radikali ($RO^\bullet$)'dir. Radikal olmayan ROS'lar ise: H_2O_2 , organik hidroperoksit ($ROOH$), singlet moleküler oksijen (O_2^1), elektronik olarak uyarılmış karboniller (RCO)^a ve ozon (O_3)'dur (53). En sık oluşan ROS'lar H_2O_2 , O_2^1 ve OH^- 'dir (49).

ROS hücelere 3 temel mekanizma ile hasar verir:

1. Mebranların lipid peroksidasyonu. Membranlardaki çoklu doymamış yağların çift bağları ROS'lar için saldırı alanlarıdır. Lipidle radikalin etkileşimi peroksitlerin oluşumuyla ve membran geçirgenliğini de bozarak hasarın boyutunu artışına sebep olur (48). Bu hasar sonucunda malondialdehit gibi reaktif aldehitler oluşur (55).

2. Proteinlerde çapraz bağlanmalar. Serbest radikaller -SH merkezli protein çapraz bağlanmalarını artırarak yıkımı artırır ve enzimatik aktiviteleri bozarlar (48).

3. DNA'daki oksidatif hasar; deoksiriboz omurgasının pürin ve pirimidin bazlarının modifikasyonuna, tek ve çift iplik kırılmalarına ve diğer moleküllere çapraz bağlanmalara neden olur (52). DNA modifikasyonları potansiyel olarak mutajeniktir; kansere, erken yaşlanmaya ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olur (49).

Hücreler serbest radikalleri uzaklaştırarak hasarı azaltmak üzere birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Serbest radikaller oldukça kararsızdırlar ve kendiliklerinden bozunurlar, ancak yine de bu inaktivasyona yardımcı olacak enzimatik ve enzimatik olmayan sistemler mevcuttur (48).

Başlıca enzimatik antioksidanlar; katalaz (CAT), SOD ve GSH redoks sistemidir (56). Glutasyon peroksidazlar (GPX) temel fonksiyonu hücreyi oksidatif stresten korumak olan bir enzim ailesidir. H_2O_2 'nin yıkımını sağlayan reaksiyonu katalizlerler. Bu reaksiyon aşağıdaki gibi formüle edilir;



GSSG (yükseltgenmiş GSH)'nin GSH'ye oranı bu enzimin aktivitesini ve bu yola da hücrenin serbest radikalleri katabolize edebilme gücünü gösterir (48).

Ayrıca çeşitli endojen ve eksojen antioksidanlar da serbest radikal oluşumunu engelleyerek ya da oluştuklarında temizleyerek bu mekanizmalara katkı sağlayabilirler (48). Endojen antioksidanlara yukarıdaki üç enzim dışında tiyoller, ürik asit, bilirubin, melatonin, metal bağlayıcı proteinler, indirgenmiş koenzim Q, alfa lipoik asit ve endojen selenyum örnek verilebilir. Eksojen olarak ise askorbik asit, A vitamini, karotenoidler, lesitin, asetilsistein, çinko, eksojen selenyum ve timolün de içinde bulunduğu fenolik antioksidanlar sayılabilir.

Antioksidanların ROS üzerine müdahalesi, hidrojen bağış yoluyla radikal zincirinin kırılması, $O_2^{1'}$ 'in söndürülmesi, peroksit ayrışması, oksidatif enzim inhibisyonu veya UV radyasyon emiliminden oluşur.

Geçiş metal katyonları veya lipid hidroperoksitlerin varlığı gibi bazı durumlarda, antioksidanlar prooksidatif etkiler sergileyebilir, ROS'un ve özellikle de OH^- 'in oluşumuna neden olan redoks sistemlerinin bir parçası haline gelebilirler (55).

Oksidatif stres, erkek infertilitesinin etiyolojisinde merkezi bir rol oynamaktadır, ancak oksidatif stresin spermatozoadaki oksidatif DNA hasarı üzerindeki kesin etkileri henüz kapsamlı bir şekilde araştırılmamıştır (57).

Birçok yazar oksidatif stresin gecikmiş seksüel matürasyona ve puberte başlangıcına sebep olabileceğini belirtmiştir (58, 59). Bu durum serbest radikalleri ve oksidatif stresi arttırdığı iyi bilinen kadmiyuma prepubertal çağda maruziyeti olan çocuklarda da fetal hayatlarında maruz kalıp dünyaya gelen çocuklarda da gözlenmiştir (58, 59).

2.5. Apoptozis

Apoptozisin normal fizyolojideki rolü, mitozunki kadar önemlidir. Çeşitli hücre popülasyonlarının düzenlenmesinde mitoz ve hücre çoğalmasına tamamlayıcı, ancak zıt bir rol oynar (60).

Bir hücre ölümü yolağı olan apoptoziste hücreler kendi DNA'larını ve proteinlerini parçalayacak olan enzimleri aktive ederler. Hücre fragmentasyonlara ayrılarak dağılır ve bu da yolağın adının apoptozis 'dağılmak' oluşunu açıklar (48). Apoptotik hücre membranlarında, normal membranlarda iç yüzeyde bulunan fosfatidilserin gibi fosfolipidler dış yüzeye çıkarlar bu da fagositler için bir sinyal oluşturur ve hücre parçaları hızla temizlenir (61). Sonuç olarak apoptotik ölüm inflamatuvar yanıtı tetiklemez.

Apoptozis birçok fizyolojik veya patolojik durumda görülebilir. Fizyolojik durumlara embriyogenez sürecindeki programlı ölümler, hormon bağımlı dokularda hormon düşüklüğüne bağlı involüsyon, hücreleri rejenere olan dokularda hücre sayısını sabit tutmak için görülen ölümler, nötrofiller gibi görevini tamamlamış hücrelerin ölümü, timusta olgunlaşamayan self reaktif lenfositlerin imhası ve sitotoksik T lenfositlerinin indüklediği ölümler örnek verilebilir. Patolojik durumlara ise DNA hasarı, yanlış katlanmış proteinlerin birikimi, belli enfeksiyonlarda görülen hücre hasarı ve kanal tıkanıklığına bağlı parenkimde görülen patolojik atrofi örnek verilebilir (48).

Apoptotik hücrelerde morfolojik olarak hücre büzüşmesi, normal hücre-hücre bağlantılarının kaybı, yoğun kromatin, hücresel tomurcuklanma ve fragmentasyon görülür (62). Büzüşmesi ile hücrelerin boyutu küçülür, sitoplazma yoğunlaşır ve organeller daha sıkı bir şekilde paketlenir. Piknoz, kromatin yoğunlaşmasının bir sonucudur ve apoptozisin en karakteristik özelliğidir. Hematoksilen ve eozin (H&E) boyası ile histolojik incelemede apoptotik hücreler, tek tek veya küçük hücre kümeleri şeklinde görülür. Apoptotik hücre, koyu eozinofilik sitoplazma ve yoğun mor nükleer kromatin parçalarına sahip yuvarlak veya oval bir kitle olarak görünür. Geniş plazma membranı kabarmasını takiben karyoreksis ve "tomurcuklanma" adı verilen bir süreç sırasında hücre parçalarının apoptotik cisimlere ayrılması meydana gelir. Apoptotik cisimcikler, nükleer bir parçaya sahip olan veya olmayan, sıkıca paketlenmiş organellere sahip sitoplazmadan oluşur. Organel bütünlüğü hala korunur ve tüm bunlar sağlam bir plazma membranı içinde yer alır. Bu cisimler daha sonra makrofajlar, parenkimal hücreler veya neoplastik hücreler tarafından fagosite edilir ve fagolizozomlar içinde parçalanır. Apoptotik hücreleri yutup sindiren makrofajlara "tingible body makrofajları" adı verilir.

Apoptozis, "kaspaz" adı verilen bir grup sistein proteazının aktivasyonunu ve başlatıcı uyarımları hücrenin nihai ölümüne bağlayan karmaşık bir olaylar dizisini içeren koordineli ve genellikle enerjiye bağlı bir süreçtir (60). Kaspazların aktivasyonu proapoptotik ve antiapoptotik proteinlerin dengesine bağlıdır (48). Antiapoptotik proteinlerden bazıları Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl-XS, Bcl-w, BAG ve pro-apoptotik proteinlerden bazıları Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk'dir (60).

İki farklı apoptotik yol vardır: ekstrinsik yani ölüm reseptörü aracılı yol ve intrinsik yani mitokondriyal aracılı yol. İki yol birbiriyle bağlantılıdır ve iki yoldan birindeki moleküller diğerini etkileyebilir. Ekstrinsik yol dış uyarılara yanıt olarak, intrinsik yol ise DNA hasarı gibi iç uyarılara yanıt olarak apoptozisi tetikler.

Mitokondriyal yol; ROS artışına sebep veren UV radyasyonu, iyonize radyasyon ve Cd^{2+} gibi toksik uyarımlarla ilişkilidir. Bu stres uyarımları mitokondriyal dış membran permeabilizasyonuna yol açarak sitokrom-c'nin mitokondriyal intermembran boşluktan sitozole salınmasına, böylece kaspaz-9'un aktive olmasına ve apoptozise neden olur (63).

Sitokrom-c normalde anyonik fosfolipid kardiyolipin ile iç mitokondriyal membrana bağlanır. Fosfolipidler arasındaki benzersiz yapısı nedeniyle kardiyolipin mitokondriyal membrana akışkanlık ve stabilite kazandırır (52). Kardiyolipinin oksidasyonu ile kardiyolipinin sitokrom-c'ye bağlanma afinitesi azalır ve sitokrom-c'nin iç mitokondriyal membrandan mobilizasyonunu kolaylaştırır. Bu sonuçlara dayanarak, apoptozis sırasında sitokrom-c salınımının, önce iç mitokondriyal membrandan ayrılmasını, ardından dış mitokondriyal membranın permeabilizasyonunu ve sitokrom-c'nin ekstramitokondriyal ortama salınmasını içeren iki aşamalı bir süreçle gerçekleştiği düşünülüyor (64).

Ekstrinsik yol ise birçok hücrenin yüzeyinde bulundurduğu, apoptozisi indükleyen, çoğu TNF reseptör ailesine ait ölüm reseptörleri aracılı olan yoldur. Prototipik ölüm reseptörleri Tip 1 TNF reseptörü ve Fas (CD95)'tir. Fas ile bağlanacak olan Fas ligandları (FasL) özellikle aktive T lenfositlerde bulunan membran proteinidir. T lenfositler Fas eksprese eden bir hücreyle FasL üzerinden bağlanınca kaspaz-8 aktive olur ve apoptozis ilerler (48).

Kaspaz-8 ve kaspaz -9 gibi başlatıcı kaspazların indüklediği mitokondriyal ve ölüm reseptörü aracılı yolların her ikisi de kaspaz-3, -6, -7 gibi cellat kaspazların rol aldığı ortak bir yolla birleşirler (60). Bu aktive kaspazlar DNA, hücre iskeleti, nükleoproteinler, nükleer matriks gibi birçok hedefi parçalayarak hücreyi fragmente hale getirirler (48).

Apoptozisi histolojik kesitlerde görünür hale getirmek için kullanılan TUNEL (Terminal dUTP (deoksiüridintrifosfat) Nick End-Labeling) metodu DNA zinciri kırılmalarını enzimatik olarak işaretleyerek endonükleaz bölünme ürünlerini test etmek için kullanılır. Terminal transferaz, DNA parçalarının 3'-ucuna etiketli dUTP eklemek için kullanılır. dUTP daha sonra ışık mikroskobu, floresan mikroskobu veya akış sitometrisi ile tespit edilmesini sağlamak için çeşitli problemlerle etiketlenebilir. Testler kitler halinde mevcuttur ve çeşitli şirketlerden temin edilebilir (60).

2.6. Kadmiyum (Cd)

Cd, 1817 yılında Friedrich Stromeyer tarafından anormal renkli çinko cevheri örneğinden ayrılarak keşfedilmiş ve eski Yunanca'da çinko cevheri anlamına gelen

"cadmeia" olarak adlandırılmıştır (65). Cd, atom numarası 48, atom ağırlığı 112,411 g/mol, çoğunlukla +2 değerlik durumunda bulunan ve 25 °C'de yoğunluğu 8,65 g/cm³ olan yumuşak, bükülebilir ve gümüşü beyaz renkte ağır metaldir (66). Erime noktası 321 °C, kaynama noktası 765 °C'dir. Çinko ve civa ile periyodik tablonun IIB grubunda yer alan geçiş metalidir (67). Nadir bir elementtir ve doğada saf halde bulunmaz (68).

Cd korozyona dayanıklıdır, yanıcı değildir. Hidroklorik, sülfürik ve nitrik asitler sırasıyla kadmiyum klorür (CdCl₂), kadmiyum sülfat ve kadmiyum nitrat oluşturarak normalde suda çözünür olmayan kadmiyumu çözünür hale getirirler (63).

Cd yer kabuğunda çinko ve kurşun maden yataklarına karışık halde bulunur, bu nedenle özellikle çinko ve kurşun eritme işlemlerinde yan ürün olarak açığa çıkar (65, 69, 70). Son zamanlara kadar çok kısıtlı bir kullanım alanı olan Cd, şimdilerde birçok alanda kullanılan önemli bir metal haline gelmiştir (69). İlk olarak 19. yüzyılın sonlarında sarı renkli boya pigmenti olarak kullanılmıştır (65). Günümüzde üretilen kadmiyumun büyük kısmı özellikle nikel-Cd tipi olmak üzere pillerde kullanılıyor (68, 69). Kadmiyumun diğer nihai kullanım alanları arasında alaşımlar, antikorozyif kaplamalar, pigmentler, polivinil klorür stabilizatörleri yer almaktadır (65, 68).

Cd endüstride sıklıkla kullanılsa da besin zincirinde kolayca biriktiğinden insan sağlığına bir tehdit olarak karşımıza çıkmaktadır (65). Biyolojik yarılanma ömrü insanlarda 10-30 yıl ile oldukça uzun bir süredir (71). Cd, ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry)'nin 2022 yılında yayınladığı öncelikli toksik maddeler listesinde yedinci sırada yer almaktadır (69, 72).

2.6.1. Maruziyet

Cd, endüstriyel ve insan yapımı faaliyetler nedeniyle çevreye geniş ölçüde dağılmaktadır ve genel popülasyona maruziyeti temelde, bitkilerden yapılmış yiyeceklerin ve belli deniz ürünlerinin yenmesi, sigara dumanı ve endüstriyel dumanların solunması veya kontamine olmuş toprak ve toz yutulması yoluyla olur (69). Sigara içmeyen yetişkinlerde ve çocuklarda Cd maruziyetinin esas yolu diyetidir (70). Sigara içicilerinde ise tütün, depoladığı yüksek miktarda Cd ile önemli bir maruziyet sebebidir (68).

Cd çevreye; volkanik aktivite, erozyon, nehir taşımacılığı gibi doğal yollarla; tütün içilmesi, metal madenciliği ve eritilmesi, fosil yakıtların yakılması, fosfatlı gübre üretimi, elektronik aletlerin geri dönüşümü gibi insan aktiviteleriyle ya da madenlerden gelen drenaj sularının su kanallarını kirletmesiyle salınabilir. Cd atmosferik taşınma ile kaynağından uzakta bir yere taşınarak depolanabilir (73).

Toksik olan bu ağır metalin toprak, hava ve su arasında yer değiştirmesine sebep olan bağlantılar vardır (74). Cd havada çoğunlukla partikül formunda, nadiren de buhar halinde bulunur ve Cd nihayetinde atmosferik taşınma ile havadan düşerek toprakta veya yüzey sularında birikir (70). Cd toprağa düştükten sonra toprak katmanlarında kolayca hareket eder ve ıspanak, tütün gibi yapraklı sebzeler, kök bitkileri, tahıllar (örneğin pirinç ve buğday) ve benzeri gibi bitkiler tarafından besin zincirine alınır (69). Bitkilerin topraktan Cd alımı asit yağmurları gibi olayların sebep olduğu düşük toprak pH'sında daha da artar (68). Tütün yaprakları topraktan yüksek seviyelerde Cd biriktirir ve bu da sigara içmeyi kadmiyuma maruz kalmanın önemli bir kaynağı haline getirir (70). Sigara içmenin kadmiyumun yaşam boyu vücut yükünü kabaca iki katına çıkardığı düşünülmektedir (69). Hatta sigara içmeyen, ancak pasif olarak sigara dumanına maruz kalanlar bile kadmiyuma maruz kalabilir (70). Tütün yapraklarının kuru ağırlığında g başına düşen Cd miktarı 1-2 μg 'dır, bu durumda bir sigarada ortalama 0.5-1 μg Cd bulunmaktadır (75).

Dünya Sağlık Örgütü'nün Cd yönergesine göre aylık tolere edilebilir Cd alımı 25 μg /kilogram (kg) vücut ağırlığı olarak belirlenmiştir. Bu hesaplama epidemiyolojik çalışmaları esas alan bir meta-analizin ürünü Cd ve beta-2-mikroglobulin (renal tübüler etkiyi gösterir) seviyeleri arasındaki ilişkiyi gösteren verilerine dayanılarak yapılmış ve insanda Cd yarılanma ömrü çok uzun olduğundan aylık olarak hesaplanmıştır. Bu yönergeye içme suyu için tolere edilebilir limit 3 $\mu\text{g}/\text{L}$ iken, hava için tolere edilebilir limit yıllık ortalama bazda 5 nanogram (ng/m^3)'tür (73).

2.6.2. Toksikokinetik

Kadmiyumun hayvanlarda ve insanlarda bilinen biyolojik bir fonksiyonu olmasa da çeşitli esansiyel biyolojik fonksiyonları olan diğer divalent metalleri taklit edebilir. Cd çeşitli metal taşıyıcıları ile plazma membranlarını aşar ve hücre içerisinde

de kendisine özel afinite gösteren ligandlara bağlanır, ancak hücresel atım sistemleri çok verimli olmadığından kolayca atılamaz ve uzun seneler birikir (76).

Kadmiyumun emilimi solunum sisteminden, gastrointestinal sistemden ve çok az oranda da deriden olur (56, 63). Cd için günlük ortalama oral alım 10-35 µg'dır (77). Deney hayvanlarından ve insanlardan alınan verilere göre kimyasal kompozisyonuna, çözünürlüğüne göre değişmekle beraber oral alınan Cd bileşiklerinin yaklaşık %5'i emilmektedir (68). Cd emilimi diyetteki kalsiyum veya Fe⁺² eksiklikleri ve düşük proteinli diyetlerle artabilir (69). Fe⁺² eksikliği olan kişilerde emilim oranı %10'u bulabilir (56). Muhtemelen doğurganlık çağındaki kadınlarda nispeten düşük Fe⁺² depoları varlığı nedeniyle artmış oral Cd emilimi, genel popülasyonda kadınların erkeklerden daha yüksek kan Cd seviyelerine sahip olmalarına sebebiyet vermektedir (69).

Cd emildikten sonra hızla kandan temizlenir ve çeşitli dokularda birikir (56). Cd kanda albümin ve diğer yüksek molekül ağırlıklı proteinlere bağlanarak taşınır (69). Albümine bağlı Cd karaciğerde albüminden ayrılarak metallothioneine (MT) bağlanır (56). MT, küçük moleküler ağırlıklı, sisteinden zengin olduğundan, kükürt içeriği yüksek bir protein olup çinko ve Cd ile kompleks yapar (78). MT'ler çeşitli ağır metallere kaynaklanan iyon toksisitesine, DNA hasarına ve oksidatif strese karşı korunmada önemli rol oynar (79). Bu nedenle MT'ye bağlanmayan Cd'nin toksisitede rol oynadığı düşünülmektedir (68). Cd, GSH ve sistein gibi tiyol grubundan zengin düşük moleküler ağırlıklı başka amino asitlere ya da proteinlere de bağlanabilir (76). Günde kadmiyumun vücut yükünün sadece yaklaşık % 0,001'i çok zayıf bir şekilde idrarla ve feçesle atılır (69).

2.6.3. Toksikite

Cd çeşitli organlarda hasar oluşturan, çok düşük dozlarda maruz kalındığında dahi oldukça toksik etki gösteren önemli bir kirleticidir. Kadmiyumun sebep olduğu toksisitenin mekanizması multifaktöriyeldir (56). Cd hücre fonksiyonlarını gerek direkt gerek de indirekt olarak etkileyerek çeşitli sistemlerin çeşitli hücrelerinde toksisiteye sebep olur ki bu toksik etkiler de hücrelerde dejenerasyona hatta transmutasyona dahi sebep olabilir (80). Cd, oksidatif stresi indükleyerek ve ROS

üretmek, apoptozisi aktive ederek, mitokondriyal DNA'yı mutasyona uğratarak, gen ifadesini değiştirerek, solunum zinciri komplekslerini inhibe ederek, ATP sentezini azaltarak ve son olarak iç mitokondriyal geçirgenliği değiştirerek toksik etkilere sebep olmaktadır (81). Bu da çok sayıda hastalığın gelişmesine neden olur (63).

Cd, hücresel düzeyde redoks durumunun çok önemli bir rol oynadığı hem hasar hem de onarım süreçlerini indükler (82). Oksidatif stresin Cd sitotoksitesinde temel rolü oynadığı düşünülmektedir (56). Cd iki değerlikli bir katyon olduğundan direkt olarak ROS üretemez (82). Ancak Cd maruziyeti sonrası oksidatif stresin arttığını belgeleyen birçok çalışma bulunmaktadır (83–87). Kadmiyumun kritik hedefleri, proteinlerde bulunan sisteinlerin -SH gruplarıdır (88). -SH proteinleri hücresel antioksidan savunma ve redoks sinyalizasyonunda önemlidir ve ROS'un seçici -SH oksidasyonuna neden olduğu düşünülmektedir (89). Enzimlerin -SH gruplarının inaktivasyonu nükleusta, endoplazmik retikulumda ve mitokondride çeşitli fonksiyonel eksikliklere yol açabilir (88). Ayrıca Cd, ATPaz, laktat dehidrogenaz, SOD ve GPX aktivitelerini inhibe ederek ROS ve lipid peroksidasyon seviyelerini artırır (63).

Kadmiyumun en önemli etkilerinden biri vücuttaki seleniyumu tüketmesidir. Selenyum atomları Cd atomları ile birleşir ve safra sistemi yoluyla vücuttan dışarı atılır. Bu durumda GPX üretiminin düşmesiyle daha yüksek seviyelerde ROS ve H₂O₂ üretilir (56).

ROS üretimi, kalsiyumun birikmesi, kaspaz-3'ün yukarı regülasyonu, bcl-2'nin aşağı regülasyonu ve p-53'te eksiklik kadmiyumun indüklediği apoptozise ön ayak olurlar. Cd, CAT ve SOD enzimlerinin aktiviteleri ile de oynayabilir (63). Kadmiyumun makrofajları disfonksiyone ederek de hasar oluşturduğu bilinmektedir (75).

Cd otofajiyi de indükleyebilir (90). Otofaji, hücre içi ortamda dengeyi korumak için sitoplazmanın bir kısmının parçalanmak üzere lizozomlara aktarılması, hasarlı organellerin ve yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılması sürecidir (91). Aşırı otofaji hücrelere zarar verebilir ve hücre ölümü de fizyolojik hasara yol açabilir (92).

Cd, DNA tamir aşamalarında görevli birçok proteini hedef alarak hasarlı DNA bazlarının birikimine sebep olabilir. Bu durumda mutasyon hızında artışla beraber genomik instabilite ve hücre ölümü görülür (93). Cd, komutajen olarak etki ederek UV radyasyon, alkilasyon ve oksidasyon gibi mutajenlerin etkisini artırır (56).

2.6.4. Genital Sistem ve Fertilite Üzerine Etkileri

Giderek artan kanıtlar, kadmiyuma maruz kalmanın hormon seviyelerine etki etme, fertiliteyi etkileme, gebelik kayıplarına sebep olma gibi üreme sağlığına ilişkin çok sayıda olumsuz sonuçla ilişkili olabileceğini göstermektedir (94).

Cd, hipofiz bezinde birçok hücreyi etkileyerek hormon seviyelerinde düşüşe sebep olur; aynı zamanda hormonların sirkadiyen salınım paternini de bozar (69).

Yapılan hayvan çalışmalarında $CdCl_2$ uygulanan tavşanlarda hem spermatogenik hücrelerde hem de Leydig hücrelerinde ciddi hasar görülmüş olup, interstisyel alanda hiperemi ve kanama görülmüştür (95).

Wang ve ark. 'nın yaptığı bir çalışmada $CdCl_2$ 'ye intraperitoneal enjeksiyon ile maruz kalan sıçanlarda kontrol grubundakilere göre daha düşük vücut ve testis ağırlıkları görülmüştür. Çalışmada Cd maruziyeti olan ratlarda irritabilite, az yeme-içme ve şoka duyarlılık da dikkat çekmiştir. Yine aynı çalışmada histolojik kesitlerde testiküler seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücreler büzüşmüş, düzenleri bozulmuş, katman sayıları azalmış ve seviyeleri belirsizleşmiş, tübül lümeninde nispeten şişmiş, gevşek hücreler ve az sayıda sperm kaydedilmiştir (96).

Venditti ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise içme suyuna ilave edilen $CdCl_2$ maruziyeti sonucu ratlarda kontrol grubuna göre testis ağırlığında azalma görülürken vücut ağırlıklarında azalma görülmemiştir. Bu çalışmada Cd maruziyetli grupta otofaji belirteçlerinin arttığı, kan-testis bariyeri belirteçlerinin ise azaldığı görülmüştür. Ayrıca maruziyetli grupta sperm konsantrasyonu, canlılığı ve hareketliliği azalmış, morfolojisi ise bozulmuştur (4).

2.6.5. Diğer Sistemler Üzerine Etkileri

Kadmiyumun birçok sistem üzerinde toksik etkileri bulunmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1: Kadmiyumun Diğer Sistemler Üzerine Etkileri

Sistem	Etki
Sindirim Sistemi	Akut toksisite ile gastrointestinal epitelde tahriş, bulantı, kusma, karın ağrısı (69). Bağırsak mikrobiyotasında bozulma (97).
İmmün Sistem	T ve B hücre popülasyonunu baskılama, makrofaj fagositozunu artırma (69). Doza bağımlı olarak inflamatuvar cevabı baskılama ya da uyarma (69, 98). Nötrofil yüzdesinde düşme, lenfosit yüzdelerinde artma (98).
Üriner Sistem	Tübüler hücre nekrozu ve dejenerasyonu, interstisyel inflamasyon, fibrozis, proteinüri (69). Glomerüler filtrasyon hızında düşme, böbrek yetmezliği (76).
Solunum Sistemi	Pulmoner ödemli pnömoni (68). Öksürük, amfizem, kor pulmonale (69). Alveolar kanama, infiltrasyon, kapillerlerde konjesyon (99).
İskelet Sistemi	Osteomalazi, osteoporoz, osteoklast aktivitesini uyarma, kemikteki kalsifikasyonu ve yeniden şekillenmeyi önleme (100).
Kardiyovasküler Sistem	Hipertansiyon (101). Doza bağımlı olarak anjiogenezi indüklemeye veya vasküler endotele doğrudan hasar verme (102). Miyokard toksisitesi (103), koroner akımı bozma (104), aritmi (105), negatif inotropik ve dromotropik etki (69), kardiyak hipertrofi (106).
Sinir Sistemi	Anormal davranış, zeka azalması (69).

2.6.6. Karsinojenite

Cd ve bileşikler 2012 yılında IARC tarafından bilinen insan karsinojeni olarak sınıflandırılmıştır (107). Çeşitli Cd bileşiklerine maruziyeti olan Cd işçilerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda akciğer kanserinden ölüm riskinin arttığı bulunmuştur. Yine bazı epidemiyolojik kanıtlar da Cd maruziyeti ile prostat, böbrek, mesane, pankreas, meme ve endometriyum kanseri arasında ilişki olabileceğini göstermiştir (69). Cd tozu gibi bileşiklerin kas içi enjeksiyonlardan sonra kemirgenlerde lokal sarkomlar oluşabilmektedir (108).

Cd ayrıca testis tümörlerini, özellikle de iyi huylu Leydig hücre tümörlerini indükler, ancak bu muhtemelen akut testis nekrozu, dejeneratif testis atrofi ve ardından LH tarafından aşırı uyarılmayı içeren mekanizmadan kaynaklanmaktadır (109). Diğer bazı çalışmalarda kadmiyuma maruz kalmanın farelerde, sıçanlarda veya hamsterlerde pankreas, adrenal, karaciğer, böbrek, hipofiz ve hematopoetik sistem tümörlerine neden olabileceği bulunmuştur (69). Cd, hayvanlarda inhalasyon ile veya oral uygulamadan sonra veya çeşitli enjeksiyon yollarıyla kanserojen olabilir. Kadmiyumun karsinogenez mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır (109). Ancak doğrudan DNA hasarı veya genotoksisitenin rolü olduğu açıktır (69). Cd ile indüklenen karsinogenezin çoklu mekanizmaları arasında antioksidan enzimlerin inhibisyonu ile oksidatif stres, lipid peroksidasyonunun teşviki ve DNA onarım sistemlerine müdahale yer almaktadır (79). Birçok memeli hücre kültüründe de Cd bileşiklerinin gen mutasyonları, DNA zincir kırıkları, kromozomal hasar, hücre transformasyonu ve bozulmuş DNA tamiri gibi genetik hasara sebep olduğu görülmüştür (69).

2.6.7. Tedavi

Cd zehirlenmesi acil tıbbi yardım gerektirmektedir. Yutma yoluyla maruziyetten hemen sonra kusma ya da gastrik lavaj faydalı olabilir. Kadmiyumun etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), British Anti-Lewisite, dimerkaprol (BAL), 2,3-dimerkapto-süksinik asit (DMSA) ve 2,3-dimerkapto-1-propan sülfonik asit (DMPS) ile detoksifikasyonu da mümkündür.

Ayrıca, bitkilerde doğal olarak bulunan biyolojik aktif bileşikler, Cd da dahil olmak üzere ağır metallere maruz kalmaktan kaynaklanan zararlı sağlık etkilerini önlemek için yararlı olabilir. Bu biyolojik aktif bileşiklerden olan polifenollerin koruyucu etkisi, güçlü antioksidan özelliklerinden ve Cd iyonlarını şelatlama yeteneklerinden kaynaklanmaktadır. Cd iyonlarının hidroksil gruplarına olan yüksek bağlılığı ve bağırsak MT ekspresyonunu artırma kabiliyeti nedeniyle, polifenoller bu metalin gastrointestinal sistemden emilimini azaltır (63).

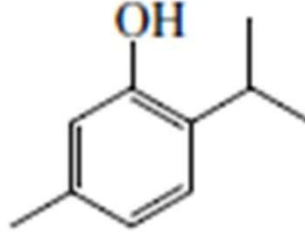
Net bir tedavisi bulunmayan bu ajandan korunmanın en doğru yolu maruziyetini minimuma indirmek olacaktır. Birçok Amerika Birleşik Devletleri sağlık

kurumu, içme suyunda maksimum 5 µg/litre (L) sınırı gibi çeşitli kaynaklardan gelen aşırı Cd maruziyetinden genel halkı korumak için maruziyet standartları belirlemiştir (69).

2.7. Timol

Son yıllarda, doğal antioksidan bileşiklerin faydalı etkilerine çok dikkat edilmektedir (110). Timol de bunlardan biridir. Moleküler formülü $C_{10}H_{14}O$, moleküler ağırlığı 150,217 g/mol'dür (Şekil 4) (111). Timol (2-izopropil-5-metil-fenol), Lamiaceae familyasına ait bitkilerden (Thymus, Ocimum, Origanum, Satureja, Thymbra, Monarda) elde edilen uçucu yağlarda bulunan bir monoterpen fenoldür (112). Kekiğe güçlü lezzetini, hoş aromatik kokusunu ve güçlü antiseptik özelliğini veren beyaz kristal bir maddedir (113). 25 °C'deki yoğunluğu 0,97 g/cm³ olup erime noktası 49 °C, kaynama noktası 232 °C'dir (111). Fenolün deprotonasyonu nedeniyle alkollerde, alkali çözeltilerde ve diğer organik çözücülerde yüksek oranda çözünür, ancak nötr pH'da suda az çözünür (114).

Timol, son zamanlarda, çoklu fonksiyonel aktiviteleri nedeniyle farklı alanlarda yaygın olarak çalışılmaktadır (110). Timol; antibakteriyel (115), antifungal (116), antiinflamatuvar (117), antioksidan (118), antimutajenik (119), larvisidal (120), analjezik (121), antimikrobiyal (122), akarisit (123), antikonvülsan, antiepileptojenik (124), yara iyileştirici (125), antihemolitik (126), antileishmanial (127) ve radyoprotektif (128) özelliklere sahiptir. Antioksidan etkisi yapısında bulunan ve serbest radikalleri temizleyip nötralize edebilen fenolik hidroksil grubunun varlığına bağlanmaktadır (129). Timol, düz kasları gevşeterek sindirimi iyileştirir, adet kramplarını önler, solunum problemlerini hafifletir ve gıda aromalarında, topikal merhemlerde, çeşitli sabunlarda, diş macunlarında, şampuanlarda, deodorantlarda ve ağız gargaralarında kullanılan aktif bileşendir (130, 131).



Şekil 4: Timolün Moleküler Yapısı (111)

Güvenç ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada timol uygulanan rat gruplarında kontrol grubuna göre sperm parametrelerinde; konsantrasyonda ve hareketlilikte artma, ölü spermatozoon oranında azalma gibi iyileşmeler görülürken histolojik incelemelerde de testis kesitlerinde kontrole göre bir değişiklik oluşmadığı görülmüştür. Biyokimyasal parametrelerde ise timol uygulanan ratların testis, karaciğer ve böbrek dokularında oksidan belirteç olan MDA düzeylerinde azalma mevcutken, antioksidan bir belirteç olan GSH'nin seviyeleri artmıştır (17).

Şaşırtıcı şekilde timol yüksek dozlarda kullanıldığında (100-500 mg/ml) doza bağlı olarak insan semeninde sperm sayısını, sperm hareketliliğini ve sperm canlılığını azaltmıştır.

Çevre Koruma Ajansı'na göre, hayvanlarda ve insanlarda kullanıldığında timol ile ilgili bilinen herhangi bir olumsuz etki yoktur. Timol, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi tarafından gıda katkı maddesi olarak kullanım için 'genel manada güvenli bilinen' şeklinde kataloglanmıştır, bu nedenle ihmal edilebilir toksisite ile güvenli olduğu düşünülmektedir (113).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

“Timol’ün Sıçanlarda Subkronik Kadmiyum Maruziyeti ile Oluşan Testis Toksisitesine Etkisi” başlıklı ve 2023/30 protokol numaralı araştırmamıza, Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 04.08.2023 tarihli, 53488718-486 sayı numaralı onayı ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi’nin desteği alınarak başlandı (Proje No: TTU-2023-10989).

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

Deneysel çalışmamızda 40 adet Sprague Dawley cinsi 6-7 haftalık erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların tamamı Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi’nden temin edildi ve üç aylık deney süresi boyunca da aynı merkezde barınmaları sağlandı. Ayrıca deney sonunda gerçekleştirilen sakrifikasyon ve doku eldesi işlemleri de bu merkezin özellikli cerrahi müdahale odalarında gerçekleştirilmiş olup bu sayede ortam kaynaklı oluşabilecek çevresel stres ve adaptasyon gibi problemlerin oluşumu engellenmeye çalışılmıştır.

Deneysel çalışma boyunca, sıcaklığı $22\pm1^{\circ}\text{C}$, nem oranı $\%50\pm5$ olan ve 12 saatlik karanlık/aydınlık periyodu düzenli işleyen odalarda standart tip III kafeslerde barınan sıçanların, standart sıçan yemine ve deneysel ilaçlar eklenerek hazırlanmış suya ad libitum erişimi sağlandı.

Çalışmada kullanılan 40 sıçan, grup başına rastgele 10 denek olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Gruplandırmanın ardından tüm sıçanlar tartılarak Resim 2’de görüldüğü gibi kafeslere yerleştirildi. Deneyin başlangıcı 1. gün kabul edildi ve deney ilaçları eklenmiş su kapları 90 günlük deney süresi boyunca her gün aynı saatte taze hazırlanarak su kaplarının dolu ve boşları tartıldı; bu sayede sıçanların 24 saatlik su alımı günlük olarak takip edildi. Deneklerin deney periyodunda haftalık tartımları da yapıldı. Bu sayede deney boyunca gruplar arasında, vücut kütlesi açısından fark olup olmadığı izlendi.

Araştırmamızda uygulanacak kadmiyumun dozu literatüre uygun olarak belirlenmiştir (1). Timol dozu, literatürde kullanılan 10 mg/kg gavaj dozu Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) (2012)'nın erkek ratlarda subkronik çalışmalar için önerdiği konversiyon faktörü (0,09) kullanılarak mg/L şeklinde hesaplanmıştır (111,1 mg/L) (17, 132).

1. Grup: Kontrol Grubu (n: 10): Deneyin 1. gününden başlanarak 90 gün boyunca, %0,08 etanol içeren içme suyuna sıçanların ad libitum erişimi sağlandı.
2. Grup: Cd Grubu (n: 10): Deneyin 1. gününden itibaren sıçanlar 90 gün boyunca, 50 mg/L CdCl₂ içeren içme suyuna ad libitum maruz bırakıldı.
3. Grup: THY Grubu (n: 10): Deneyin 1. gününden itibaren 90 gün boyunca, 111,1 mg/L timol içeren içme suyuna sıçanların ad libitum erişimi sağlandı. Timol stok solüsyonu ethanolde çözülerek oluşturuldu. Etanolün içme suyundaki son konsantrasyonu %0,08'dir.
4. Grup: Cd+THY Grubu (n: 10): Deneyin 1. gününden itibaren 90 gün boyunca, 111,1 mg/L timol+50 mg/L CdCl₂ içeren içme suyuna sıçanların ad libitum erişimi sağlandı. Etanolün içme suyundaki son konsantrasyonu %0,08'dir.



Resim 2: Standart Tip III Kafeslerde, Gruplandırılmış Deney Hayvanları

3.3. Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

90 günlük deney periyodunun tamamlanmasından sonra, 91. günde denekler intraperitoneal 90 mg/kg ketamin ile derin anestezi altındayken, dekapitasyon yoluyla sakrifiye edildi. Sıçanlar vakit kaybedilmeden alt abdominal orta hattan disseke edilerek bilateral testis ve epididimis dokuları Resim 3'te gösterildiği şekilde vücutları dışına çıkarıldı. Testisler çevre dokulardan temizlenerek hassas terazide tartıldı. Histolojik incelemeler için kullanılacak olan sol testis fiksatifin daha etkili olabilmesi için kutup bölgelerinden ve merkezi ekseninden, parenkime dokunulmayacak şekilde, birkaç yerden insülin enjektörü iğnesi ile delindi ve Davidson fiksatifi içine alındı. Biyokimyasal değerlendirmeler için kullanılacak olan sol testisler ise serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra üç parçaya bölünerek Eppendorf tüpler içerisinde Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan -80°C derin dondurucuda saklandı. Ayrıca sol testislere ait epididimisler sperm sayımı için Tris tampon solüsyonu içeren, vücut sıcaklığındaki petri kaplarına alınarak total sperm sayısı, motilite, vitalite ve morfoloji değerlendirmeleri yapıldı. Sağ testislere ait epididimisler ise histolojik değerlendirmeler için %10'luk formaldehit içine alınarak fiksasyonu sağlandı.



Resim 3: Deneklere Ait Testis ve Epididimis Dokularının Çıkarılması

3.4. Histolojik Önışlemler

3.4.1. Davidson Fiksatifinin Hazırlanışı

Testis dokularının tespitiinde kullanılan Davidson fiksatifi 50 ml formaldehit (%37'lik), 75 ml etil alkol (%96'lık), 75 ml musluk suyu ve 25 ml glasiyal asetik asit içermektedir. Fiksatif, herhangi patlamaya karşı, asit en son sırada eklenecek şekilde hazırlandı. Fiksatife konan dokular 20 saatlik tespit süresi sonrası daha ileri hazırlık aşamalarına alındı.

3.4.2. %10'luk Formaldehit Solüsyonunun Hazırlanması

100 ml %37-40 derişimli stok formaldehit çözeltisi, 900 ml musluk suyu ile seyreltilerek hazırlandı.

3.4.3. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması

Tespit süresinin tamamlanmasının ardından testis dokusu uzun eksenine dik olacak şekilde transvers (enine) olarak mikrotom bıçağı ile kesilerek dairesel doku parçaları elde edildi. Parçalar takip kasetleri ile kasetlendi ve üzerlerine tanımlayıcı bilgiler not edildi. Kasetler doku takip cihazına (Thermo Scientific Excelsior AS, İngiltere) yerleştirildi ve ayrıntıları Tablo 2'de belirtilen standart doku takip prosedürü uygulandı.

Tablo 2: Doku Takibi Prosedürü

Uygulama	Süre (dk)
Formaldehit	60
Etil Alkol (30 °C)	50
Etil Alkol (30 °C)	60
Etil Alkol (30 °C)	60
Etil Alkol (30 °C)	60
Etil Alkol (30 °C)	60
Etil Alkol (30 °C)	90
Ksilen (30 °C)	60
Ksilen (30 °C)	60
Ksilen (30 °C)	60
Parafin (58 °C)	60
Parafin (58 °C)	60
Parafin (58 °C)	90

Doku takibi tamamlandıktan sonra laboratuvarımızda bulunan bloklama cihazında (Leica HistoCare Arcadia H, Çin) doku parçaları parafin bloklara gömüldü ve soğuma ünitesine alındı. Soğuyan bloklar doku kalıplarından ayrılarak kategorize edildi ve depolandı.

Bloklar kesit alma günü +4°C buzdolabında en az 2 saat bekletildikten sonra tam otomatik mikrotom cihazıyla (Leica RM 2255, Almanya) 5 µm kalınlıkta olacak şekilde kesildi. Mikrotom cihazında biriken parafin şeritler bir fırça yardımıyla önceden ısıtılmış 40°C su içeren benmari (Apex Instruments, USA) üzerine serilerek 15-30 saniye kadar bekletildi. Bu sayede dokuda kesim sırasında oluşan kırıksıklıklar minimuma indirilmeye çalışıldı. Bu işlem sonrasında doku kesitleri lam üzerine aktarıldı. Kesitler kurutma kâğıdı üzerinde en az bir gece bekletilip iyice kurutulduktan sonra aşağıdaki prosedürlere uygun olarak boyamalar yapıldı.

3.4.4. Hematoksilen & Eozin Boyama Yöntemi

Üzerinde testis ve epididimis için doku kesitleri bulunan lamalar otomatik boyama cihazına (Leica Autostainer XL, Almanya) ait olan zembillere dizilerek

cihazın başlangıç haznesine yerleştirildi ve Tablo 3'teki adımları içerecek şekilde H&E boyaması gerçekleştirildi.

Tablo 3: H&E Boyama Prosedürü

Uygulama	Süre
Fırın (60 °C)	45 dakika
Ksilen 1	5 dakika
Ksilen 2	5 dakika
Ksilen 3	5 dakika
%100 Etil Alkol 1	5 dakika
%96 Etil Alkol 2	5 dakika
%70 Etil Alkol	5 dakika
Yıkama (Çeşme Suyu)	1 dakika
Hematoksilen	105 saniye
Yıkama (Çeşme Suyu)	1 dakika
Asit Alkol	1 saniye
Yıkama (Çeşme Suyu)	1 dakika
Amonyaklı Su	10 saniye
Yıkama (Çeşme Suyu)	1 dakika
Eozin	30 saniye
Yıkama (Çeşme Suyu)	1 dakika
%96 Etil Alkol 2	5 dakika
%100 Etil Alkol 2	5 dakika
Ksilen 4	5 dakika
Ksilen 5	5 dakika

Boyama sonunda lam üzerindeki doku kesitleri kapama medyumunu damlatılarak lamelle kapatıldı, üzerine ağırlık konarak kurumaya bırakıldı.

3.4.5. Masson Trikrom Boyama Yöntemi

Üzerinde testis kesitleri bulunan lamaları boyamaya başlayabilmek için gerekli ilk adım olan deparafinizasyon işlemi tam otomatik boyama cihazı (Leica Autostainer XL, Almanya) kullanılarak Tablo 4'teki adımları içerecek şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 4: Deparafinizasyon Prosedürü

Uygulama	Süre (dk)
Fırın (60°C)	45
Ksilen 1	5
Ksilen 2	5
Ksilen 3	5
%100 Etil Alkol	5
%96 Etil Alkol	5
%70 Etil Alkol	5
Yıkama (Çeşme Suyu)	0,5

Deparafinizasyon işlemi tamamlandıktan sonra ticari boyama kiti kullanılarak (Masson Trikrom Boyama Kiti, GBL, Türkiye, LOT: B9751) ve firmanın önerdiği protokolde modifikasyonlar yapılarak Tablo 5'teki adımlarla boyama yapıldı.

Tablo 5: Masson Trikrom Boyama Prosedürü

Uygulama	Süre (dk)
Pikrik Asit Alkolik Çözeltisi (C) (56 °C)	10
Yıkama (Çeşme Suyu)	10
Weigert'in Demirli Hematoksileni (A+B)	6
Yıkama (Çeşme Suyu)	5
Gelincik Kızılı Fuksin Çözeltisi (D)	3
Yıkama (Çeşme Suyu)	Daldır çıkar
Fosfomolibdik Asit Çözeltisi (E)	4
Masson Anilin Mavisi Çözeltisi (F)	4
Yıkama (Çeşme Suyu)	Daldır çıkar
%1 Asetik Asit	1
%96 Etil Alkol	Daldır çıkar
%100 Etil Alkol	Daldır çıkar
Ksilen 1	2
Ksilen 2	2

Boyama sonunda lam üzerindeki doku kesitleri kapama medyumunu damlatılarak lamelle kapatıldı, üzerine ağırlık konarak kurumaya bırakıldı.

3.4.6. Periyodik asit-Schiff Boyama Yöntemi

Üzerinde testis kesitleri olan lamaları boyamaya başlayabilmek için gerekli ilk adım olan deparafinizasyon işlemi Tablo 4’te bahsedildiği şekilde tamamlandı. Deparafinizasyon işlemi tamamlandıktan sonra PAS boyama, ticari kit ile (BESLAB BS-346 100 Testlik Boyama Kiti, LOT: 112023.096) firmanın önerdiği protokole uyularak Tablo 6’daki gibi yapıldı.

Tablo 6: Periyodik Asit-Schiff Boyama Prosedürü

Uygulama	Süre (dk)
Periyodik Asit Solüsyonu	5
Yıkama (Çeşme Suyu)	Daldır çıkar
Schiff Reaktif Solüsyonu	20
Suda Bekletme (Çeşme Suyu) (40 °C)	5
Harris Hematoksilen Solüsyonu	4
Yıkama (Çeşme Suyu)	Daldır çıkar
Mavileşme Solüsyonu	4
Yıkama (Çeşme Suyu)	2
%96 Etil Alkol	Daldır çıkar
%100 Etil Alkol	Daldır çıkar
Ksilen 1	2
Ksilen 2	2

Boyama sonunda lam üzerindeki doku kesitleri kapama medyumunu damlatılarak lamelle kapatıldı, üzerine ağırlık konarak kurumaya bırakıldı.

3.4.7. İmmunohistokimyasal TUNEL Boyama Yöntemi

Bu yöntem için boyanacak testis kesitleri şarjlı lam üzerine alındı. Boyamaya başlanabilmesi için gerekli ilk adım olan deparafinizasyon işlemi yukarıda bahsedildiği şekilde tamamlandı (Tablo 4). Sonrasında ticari boyama kiti (ABP Biosciences A049 TUNEL Chromogenic Apoptosis Detection Kit, LOT: AB2349A1) ve firmanın önerdiği protokol kullanılarak Tablo 7’deki prosedürle boyama yapıldı.

Tablo 7: TUNEL Boyama Prosedürü

Uygulama	Süre (dk)
%2 H ₂ O ₂	5
Fosfat Tamponlu Salin (PBS)	2x5
Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Reaksiyon Tamponu	10
Terminal Deoksinükleotidil Transferaz Reaksiyon Kokteyli (37 °C, nemli ortamda)	60-120
2X Sodyum Sitrat Tamponu	2X10
%3 Bovin Serum Albumin	2X10
Horseradish Peroksidaz-Streptavidin Boyama Solüsyonu	30-60
%3 Bovin Serum Albümin	2X5
Diaminobenzidin Boyama Solüsyonu	10-60
Hematoksilen	1
%96 Etil Alkol	Daldır çıkar
%100 Etil Alkol	Daldır çıkar
Ksilen 1	2
Ksilen 2	2

Boyama sonunda lam üzerindeki doku kesitleri kapama medyumunu damlatılarak lamelle kapatıldı, üzerine ağırlık konarak kurumaya bırakıldı.

3.5. Histopatolojik Değerlendirme

Mikroskopik incelemelerin tamamı Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı bünyesindeki Görüntüleme Laboratuvarı'nda dijital fotoğraf makinesi (ToupTek ToupCam XCAM 4K UHD Camera, Çin) ataçmanlı ışık mikroskopunda (Olympus BX 51, Japonya) gerçekleştirildi. Preparatlar fotoğraflandıktan sonra FIJI programı kullanılarak çeşitli değerlendirmeler gerçekleştirildi (133).

3.5.1. Hematoksilen & Eozin ile Boyalı Preparatlar

Her bir denek için ayrı ayrı, nihai hale getirilmiş testis kesitleri ışık mikroskobu ile 40x, 100x, 200x ve 400x büyütmelemlerde incelendi. 40x ve 100x büyütmelemlerde genel histolojik yapı değerlendirildi. 200x büyütmede ise rastgele seçilen 15 farklı alanda 30

tübül değerlendirmeye alındı. Seçilen tübüllerde histomorfometrik parametreler olan seminifer tübül çapı (STÇ), germinal epitel kalınlığı (GEK), seminifer tübül alanı (A_{ST}) ve lümen alanı ücretsiz bir görsel analiz programı olan FIJI kullanılarak; Johnsen skorlaması (JS), ödem, damar içi konjesyon, hemoraji, infiltrasyon, tübül lümenine immatür hücre dökülmesi, lümeninde azalmış spermatozoa içeren tübül, seminifer epitelde vakuol, ayrılma, karyoliz ve sperm retansiyonu gibi bir kısmı semikantitatif olan parametreler ise histolojik bakı ile değerlendirildi. Total tübüler doku hacmi (V_T), seminifer tübülün toplam uzunluğu (L_T), seminifer tübülün toplam yüzey alanı (S_T), GEK/STÇ, seminifer epitel alanının (A_{EP}) A_{ST} 'ye oranı parametreleri ise yukarıda bahsedilen parametrelerin elde edilmesiyle daha sonra bahsedilecek olan çeşitli formüllerle hesaplandı.

400x büyütmede 30 farklı alanın fotoğraflandığı görsellerde ise yine FIJI programı kullanılarak Sertoli hücresi, Leydig hücresi, spermatogonyum, primer spermatosit, yuvarlak spermatid sayımları yapıldı ve bu sonuçlardan hareketle günlük sperm üretimi (GSÜ), interstisyel alan başına düşen Leydig hücresi sayısı, total ve g testis dokusu başına düşen spermatogonyum, primer spermatosit, Sertoli hücresi ve yuvarlak spermatid sayıları aşağıda bahsedilecek olan formüllerle hesaplandı.

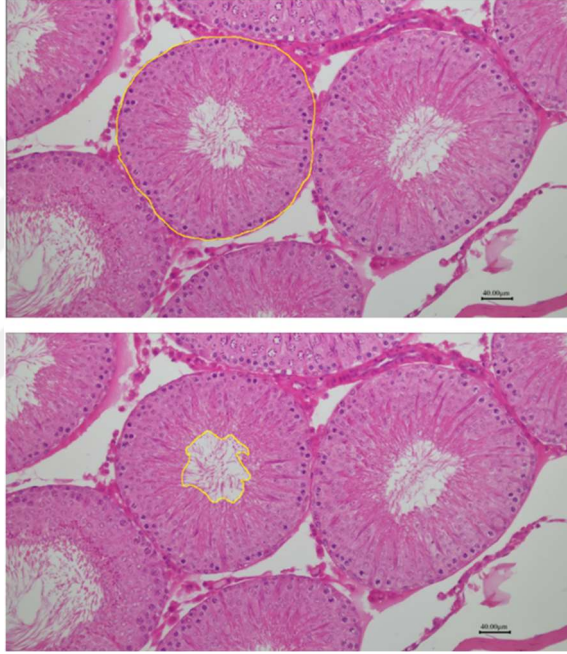
Elde edilen tüm verilerin gruplar arasındaki farkı istatistiksel olarak kıyaslandı.

Total Tübüler Doku Hacminin, Seminifer Tübül ve Lümen Alanının Hesaplanması

200x büyütmede rastgele seçilmiş 15 mikroskop alanı her bir denek için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Fotoğraflar öncelikle FIJI programında açılarak başlangıçta piksel olan ölçü fotoğraf üzerindeki skala çubuğu referans alınarak μm 'ye çevrilmiştir. Daha sonra görüntüdeki tüm seminifer tübüllerin etrafı olabildiğince hassas çizilip program üzerinden analiz komutu verilerek alanları hesaplanmıştır (Resim 4). V_T , Fetouh ve arkadaşlarının kullandığı yöntem modifiye edilerek hesaplanmıştır (134). Hesaplanan seminifer tübül alanları toplanarak tüm görüntü alanına oranlanmış ve bu sayede her fotoğraf için bir oran elde edilmiştir. Aynı işlem 15 görüntü için de tamamlandıktan sonra oranların ortalaması alınarak geçerli denek için bir oran oluşturulmuştur. Daha sonra bu oran deney sonunda ilgili deneğin ölçülmüş olan testis

ağırlığı ile çarpılarak total tübül doku hacmi (V_T) bulunmuştur. Testis yoğunluğu Predes ve ark.'nın yaptığı çalışmada da olduğu şekilde '1' olarak kabul edilmiştir (135). Bu nedenle de ağırlıkları hacimlerine eşit kabul edilmiştir.

A_{ST} hesaplanırken sadece, görüntüye bütünüyle dahil olan 30 adet seminifer tübülün alanı kullanılmıştır. Lümen alanı da aynı tübüllerde tek tek hesaplanmış ve A_{ST} 'den farkı alınarak A_{EP} hesaplanmıştır (Resim 4). A_{ST} , lümen alanı ve A_{EP} her hayvan için 30 tübülde hesaplandıktan sonra ortalamaları hesaplanarak gruplar arasında karşılaştırılmıştır. A_{EP}/A_{ST} oranı da ayrı bir parametre olarak değerlendirilmiştir.

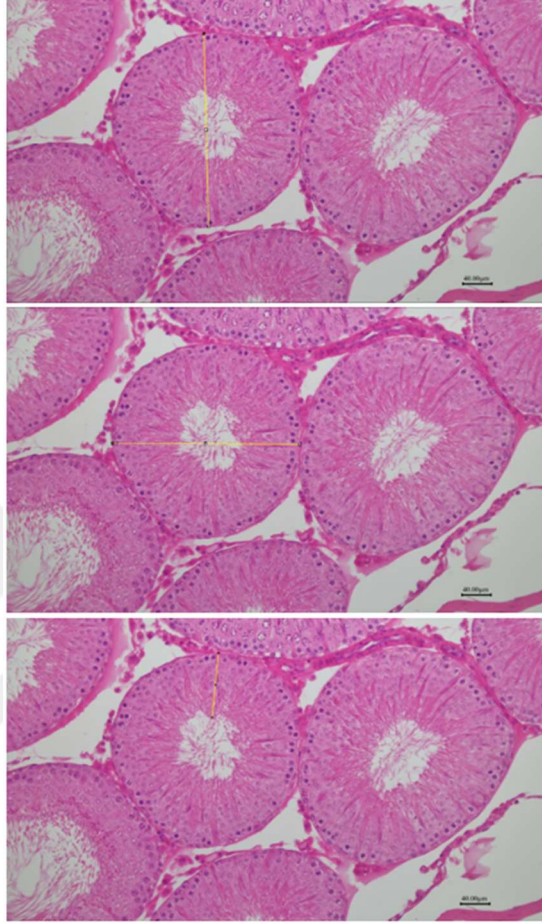


Resim 4: FIJI Programı Kullanılarak A_{ST} ve Lümen Alanlarının Hesaplanması

Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığı Ölçümü

STÇ ve GEK ölçümü de yine 200x'te fotoğraflanmış 15 görüntüde bulunan 30 tübül üzerinden FIJI programı kullanılarak hesaplandı (Resim 5). STÇ birbirine dik olacak şekilde ölçülen iki çapın ortalaması olarak belirlendi. GEK ise her tübülde 3 farklı yerden ölçülerek ölçümlerin ortalaması olarak belirlendi.

Ayrıca bu iki parametrenin birbirine oranı da ayrı bir parametre olarak değerlendirildi.



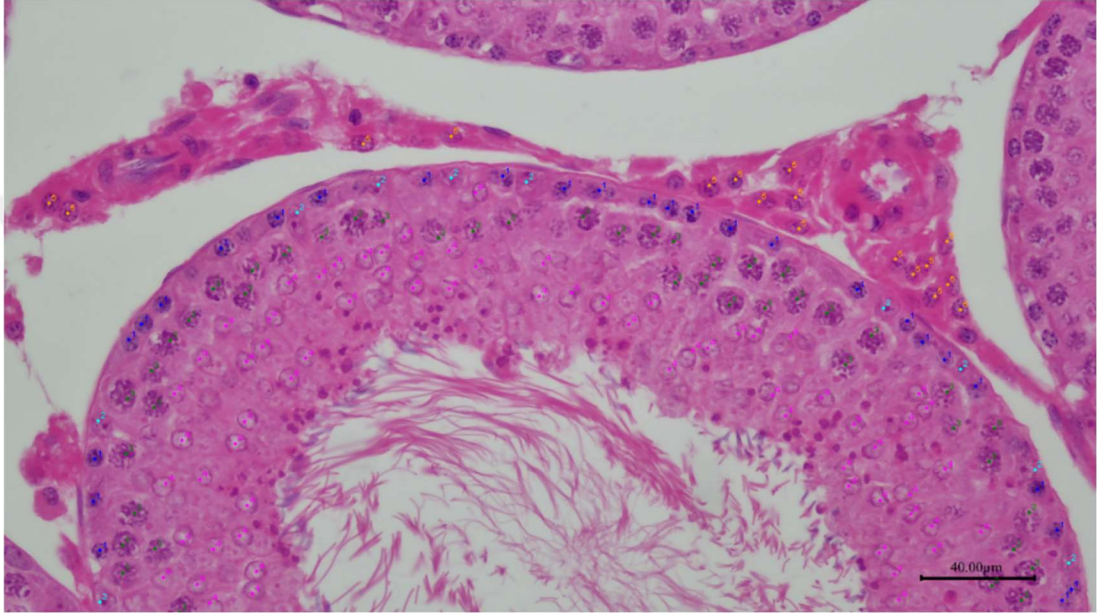
Resim 5: FIJI Programı Kullanılarak STÇ ve GEK Ölçümü

Toplam Seminifer Tübül Uzunluğunun ve Yüzey Alanının Hesaplanması

L_T ve S_T de yine Fetouh ve arkadaşlarının çalışmasından hareketle FIJI uygulaması ve silindire ait matematiksel formüller kullanılarak hesaplanmıştır (134). Öncelikle $V_T = \pi r^2 \cdot L_T$ olduğundan daha önceden hesapladığımız çap değerini ikiye bölüp cm'ye çevirerek, V_T değerini de aynen kullanarak L_T değerini yani toplam seminifer tübül uzunluğunu hesapladık. Toplam seminifer tübül yüzey alanı ise $S_T = 2\pi r \cdot L_T$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

Hücrelerin Sayımı

400x büyütmede seçilmiş 30 seminifer tübülde Sertoli hücresi, spermatogonyum, primer spermatosit ve yuvarlak spermatid nükleuslarının; 15 interstisyel alanda ise Leydig hücresi nükleuslarının sayımı, FIJI uygulamasının hücre sayımı aracı kullanılarak olarak gerçekleştirildi ve ortalamaları alındı (Resim 6).



Resim 6: FIJI Programında Hücre Sayımı

Bu sonuç kesit almaya bağlı oluşan hem nükleus hem de fragmanların sayımını içerdiğinden elde edilen sonuçlar Abercrombie'nin düzeltme faktörü (Şekil 5) kullanılarak düzeltildi (136).

$$n = \text{her bir tübüldeki hücre sayısı} \times \frac{\text{kesit kalınlığı}}{D + \text{kesit kalınlığı}}$$

Şekil 5: Abercrombie'nin Düzeltme Faktörü (136)

Formülde geçen ‘D’; sayımı yapılan hücrenin ortalama nükleus çapını ifade etmektedir. Ortalama nükleus çapı 400x görüntüde FIJI uygulaması ile ileri büyütme yapılarak ve her hayvanda 10 ölçüm yapıp ortalaması alınarak hesaplanmıştır.

Seminifer tübülde yerleşik hücrelerden seçilen herhangi bir hücre çeşidinin her testisteki toplam sayısı ise Şekil 6’daki formül üzerinden hesaplanmıştır (137).

$$\text{Toplam Hücre Sayısı} = n \times \frac{L}{\text{kesit kalınlığı}}$$

Şekil 6: Testisteki Belirli Bir Hücrenin Toplam Sayısının Formülü (137)

Bulunan son sayılar ilgili hayvanın testis ağırlığına bölünerek de seçilen hücrenin testis g’ı başına düşen sayısı hesaplanmıştır.

Leydig hücrelerinin interstisyel doku başına düşen sayısı ise her hayvan için belirlenmiş ve gruplar arasında kıyasa tâbi tutulmuştur.

Günlük Sperm Üretiminin Değerlendirilmesi

GSÜ’nün testis kesitlerinden kantitatif olarak hesaplanması spermiyogenez sırasında belirgin yuvarlak spermatid kaybının olmaması esasına dayanır. Bu nedenle total yuvarlak spermatid sayısının tip A koyu spermatogonyumdan yuvarlak spermatid oluşana dek geçen süreye bölünmesi ile GSÜ hakkında bilgi alabileceğimiz sayısal bir veriye ulaşabiliriz (138). Sprague Dawley cinsi ratlarda spermatogenez 51,6 gün sürmektedir (139). Tip A spermatogonyumdan yuvarlak spermatide dönüşüm ise siklusun %75,58’ini oluşturmaktadır bu da yaklaşık 39 güne tekabül eder (138).

Bu durumda her hayvan için hesaplanmış olan total yuvarlak spermatid sayısı 39’a bölünerek GSÜ, bulunan sonuç da ilgili deneğin testis ağırlığına bölünerek GSÜ/g testis hesaplanabilir.

Johnsen Skorlaması ve Diğer Histolojik Parametrelerin Değerlendirilmesi

Testis kesitlerinde histolojik açıdan JS sistemi kullanılarak testis hasarı değerlendirildi (Tablo 8) (140).

Tablo 8: Johnsen Skorlaması

Skor	Kriter
10	Tam spermatogenez, birçok spermatozoa
9	Hafif bozulmuş spermatogenez, birçok geç spermatid, düzensiz epitel
8	Tübül başına beşten daha az spermatozoa, birkaç geç spermatid
7	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birçok erken spermatid
6	Spermatozoa yok, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid
5	Spermatozoa ve spermatid yok, pek çok spermatosit
4	Spermatozoa ve spermatid yok, birkaç spermatosit
3	Sadece spermatogonyum
2	Germinal hücre yok, sadece Sertoli hücreleri
1	Seminifer epitel yok

Ayrıca kesitler ödem, damar içi konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, lümenine immatür hücre dökülmüş tübül, lümeninde azalmış spermatozoa içeren tübül, seminifer epitelde vakuol, ayrılma, karyoliz, sperm retansiyonu varlığı açısından da değerlendirildi.

Ödem, damar içi konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu parametreleri yarıkantitatif şekilde “0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3=ağır” olarak skorlandı. Lümenine immatür hücre dökülmüş, lümeninde azalmış spermatozoa içeren, seminifer epitelinde ayrılma (bazal veya adluminal alanda), vakuol, karyoliz ve sperm

retansiyonu olan tübüller ise yüzde değerleri hesaplanarak gruplar arasında kıyasa tâbi tutuldu.

3.5.2. Masson Trikrom Boyalı Preparatlarda Değerlendirme

Masson trikrom boyalı preparatlarda interstisyel bağ doku FIJI programı kullanılarak her denek için rastgele seçilmiş 200x'teki 10 alan üzerinden değerlendirildi. Programa yüklenen görüntüler Image>Color>Colour deconvolution>Masson trichrome komutları uygulanarak 3 ana renge ayrıldı, bağ dokuyu gösteren mavi renkli görsel alanlar üzerinden Image>Adjust>Treshold komutları takip edilerek baştaki görüntüde mavi renkte olan alanların seçilmesi sağlandı. Son olarak Analyze>Measure komutları ile seçili alanın tüm fotoğrafa yüzde olarak oranı hesaplandı. Her 10 fotoğraf için bu yüzde oluşturulduktan sonra ortalama değer o hayvan için kabul edildi ve en son gruplar arasında bu değerler açısından fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi.

Yine FIJI programı kullanılarak her hayvan için tunika albuginea kalınlığı 5 farklı yerden ölçülerek ortalaması alındı ve bulunan değerler gruplar arasında karşılaştırıldı.

3.5.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Preparatlarda Değerlendirme

PAS boyalı preparatlarda ise PAS (+) olarak boyanmış alanlar FIJI programı kullanılarak her denek için rastgele seçilmiş 200x'teki 10 alan üzerinden değerlendirildi. Programa yüklenen görüntüler Image>Color>Colour deconvolution>H PAS komutları uygulanarak 3 ana renge ayrıldı, PAS (+)'liği gösteren fuşya renkli görsel alanlar üzerinden Image>Adjust>Treshold komutları takip edilerek baştaki görüntüde fuşya renkte olan alanların seçilmesi sağlandı. Son olarak Analyze>Measure komutları ile seçili alanın tüm fotoğrafa yüzde olarak oranı hesaplandı. Her 10 fotoğraf için bu yüzde oluşturulduktan sonra ortalama değer o hayvan için kabul edildi ve en son gruplar arasında bu değerler açısından fark olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirildi.

PAS boyalı preparatlarda seminifer epitel ile bazal membran arasında açılma (SE-BMA) ise semikantitatif olarak (0=yok, 1=hafif, 2=orta, 3= ağır) skorlandı.

Skorlama her bir denekte, 200x büyütmede rastgele seçilmiş 15 alandaki 30 seminifer tübülün bazal membranı değerlendirilerek yapıldı.

3.6. İmmünohistokimyasal İncelemeler

TUNEL tekniği ile boyanarak apoptozise uğramış hücreleri açığa çıkarılan doku kesitlerinde, her denekten 200x'te rastgele seçilmiş 15 alanda 15 tübül değerlendirildi. Tübüllerdeki tüm hücreler TUNEL boyamada pozitif/negatif sonuç vermelerine göre sınıflandırıldı. TUNEL pozitif sonuçlu hücre sayısının toplam hücre sayısına oranı üzerinden apoptotik indeksler (AI) hesaplandı ve sonuçlar gruplar arasında kıyaslandı.

3.7. Sperm Analizi

Deneyin son günü her bir denek için 2 ml Tris tamponu (pH:7,5) içeren petri kapları 37 °C'ye ayarlanmış etüv içinde bekletilerek ısıtıldı. Deneklerden çıkarılan epididimisler her bir deneğe özgü petri kapları içine ivedilikle alınarak incelemenin yapılacağı laboratuvarımıza ulaştırıldı. Burada öncelikle iki adet lam yardımıyla dokunun parçalanması sağlandı, lam ile sıvazlama hareketleri yapılarak ve etüvde 30 dk kadar inkübasyon yapılarak spermelerin Tris tamponu içerisinde yüzmeleri kolaylandı.

İnkübasyon periyodunun sonunda spermeler; toplam sayı, hareket (motilite), canlılık (vitalite) ve görünüm (morfoloji) açısından değerlendirildi. Öncelikle spermelerin artık iyice yüzer halde bulunduğu sıvıdan 5 mikrolitre (μ l)'lik numuneler alınarak Makler sayım kamarasına bırakıldı ve kapağı kapatıldı. Işık mikroskopunda (Olympus BX-51) 200x büyütme altında 10 karedeki motil ve immotil sperm sayıları belirlendi ve motilite oranları hesaplandı. Motil ve immotil spermelerin toplamı olan sayı ise 10^6 /ml şeklinde total sperm sayısı olarak kaydedildi. Vitalite ve morfoloji değerlendirmeleri için ise spermelerin bulunduğu sıvıdan 10 μ l'lik örnekler 20 μ l miktarında %1'lik alkolik eozin y boyası eklendi ve 15 saniye kadar karışmaları sağlandı. Sonra bu sıvıdan alınan 10 μ l'lik örnekler lama yayıldı ve lamelle kapatılarak ışık mikroskopunda 400x büyütmede incelendi. Mikroskopik incelemede boya tutmayarak soluk kalan sperm başları canlı olarak kabul edilirken boya tutan yani

pembe gözüken sperm başları cansız olarak değerlendirildi. Her bir lamda en az 100 sperm bu şekilde değerlendirilerek vitalite yüzdeleri hesaplandı.

Son olarak morfolojik değerlendirmede her bir denek için hazırlanmış boyalı kesitlerde spermler; baş, boyun, sitoplazmik droplet ve kuyruk anomalileri açısından değerlendirildi. Bu anomalilerden en az birini içeren rastgele seçilmiş 100 sperm 400x büyütmede incelendi. Toplam anomali sayısı başta seçtiğimiz 100 sperme bölünerek teratozoospermik indeks (TZI) belirlendi. Ayrıca anomalilerin ayrı ayrı olarak da yüzdeleri belirlendi. Tüm bu sonuçlar gruplar arasında karşılaştırılarak değerlendirildi.

3.8. Biyokimyasal Değerlendirme

3.8.1. Testis Dokusunun Homojenizasyonu

Testosteron, Kaspaz-3, TNF-alfa, Toplam Antioksidan Seviye ve Toplam Oksidan Seviye Ölçümleri için Doku Homojenizasyonu

Yaklaşık 100 mg testis dokusu, 1000 µl soğuk PBS (0,01 molar (M), pH=7,4) tamponu ile 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde dokular tamamen parçalanana kadar homojenize edildi. Sonrasında, homojenat +4°C'de, 5000 xg hızında 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alındı ve T, kaspaz-3, TNF-alfa, total antioksidan seviye (TAS) ve total oksidan seviye (TOS) seviyeleri ile protein konsantrasyonları belirlendi.

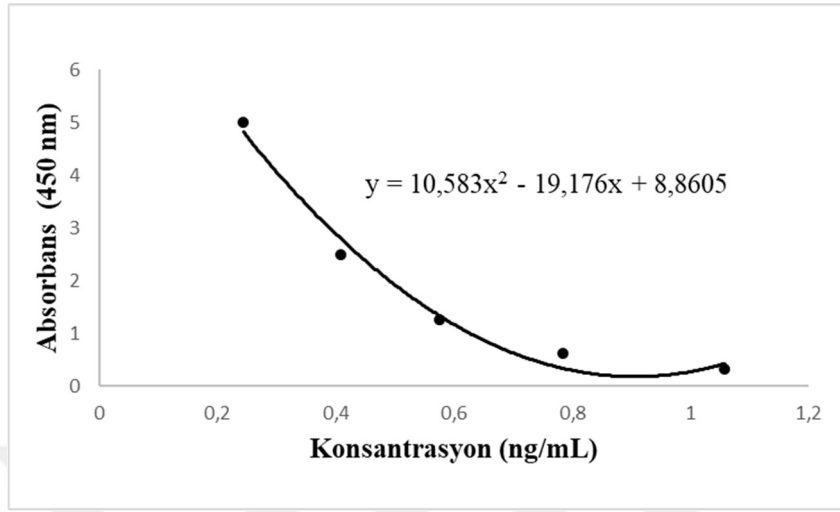
Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü için Doku Homojenizasyonu

Yaklaşık 100 mg testis dokusu tartılarak, ticari GPX aktivitesi tayin kitinde bulunan 1 ml soğuk homojenizasyon tamponu ile 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpünde, buz içinde dokular tamamen parçalanana kadar homojenize edildi. Daha sonra, +4°C'de, 10000 xg hızında 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant alındı ve GPX aktivitesi tayin kitinin prosedürüne göre analiz yapıldı.

3.8.2. Testis Dokusunda Testosteron Seviyelerinin Ölçümü

Testis dokusunda T seviyesi Reed Biotech (Wuhan, Çin) firmasının ürettiği A319686 katalog numaralı kitin prosedürüne uygun olarak belirlendi. Testis

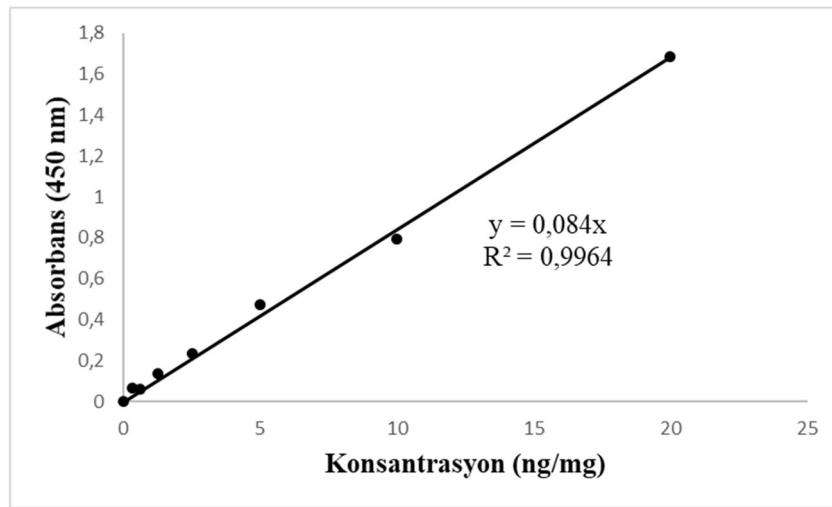
dokularına ait T konsantrasyonu Şekil 7’deki standart grafik kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar ng/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 7: T Konsantrasyonu Standart Grafiği

3.8.3. Testis Dokusunda Kaspaz-3 Seviyelerinin Ölçümü

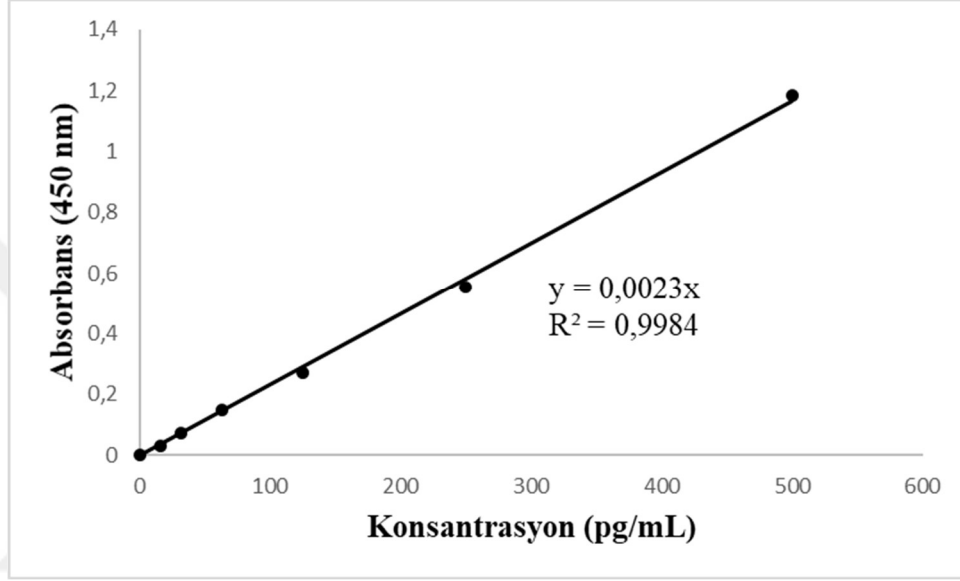
Testis dokusunda kaspaz-3 seviyesi Reed Biotech (Wuhan, Çin) firmasının ürettiği RE2850R katalog numaralı kitin prosedürüne uygun olarak belirlendi. Testis dokularına ait kaspaz-3 konsantrasyonu Şekil 8’deki standart grafik kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar pg/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 8: Kaspaz-3 Konsantrasyonu Standart Grafiği

3.8.4. Testis Dokusunda TNF-alfa Seviyelerinin Ölçümü

Testis dokusunda TNF-alfa seviyesi, Reed Biotech (Wuhan, Çin) firmasının ürettiği RE106R katalog numaralı kitin prosedürüne uygun olarak belirlendi. Testis dokularına ait TNF-alfa konsantrasyonu Şekil 9'daki standart grafik kullanılarak hesaplandı. Sonuçlar pg/mg protein olarak ifade edildi.



Şekil 9: TNF-alfa Konsantrasyonu Standart Grafiği

3.8.5. Protein Miktar Tayini

Dokularda ELISA kitleri ile ölçülen tüm biyokimyasal parametreler, standardize olması açısından hesaplanan örnek protein miktarlarına oranlanarak mg protein başına olacak şekilde verildi.

Protein miktarları, modifiye Bradford metodu (Coomassie Brilliant Blue yöntemi) ile belirlendi (141). Bu yöntem fosforik asitli ortamda Coomassie Brilliant Blue G250'nin proteinlere bağlanması ve oluşan mavi renkli kompleksin 600 nm'de maksimum absorbans vermesi esasına dayanmaktadır.

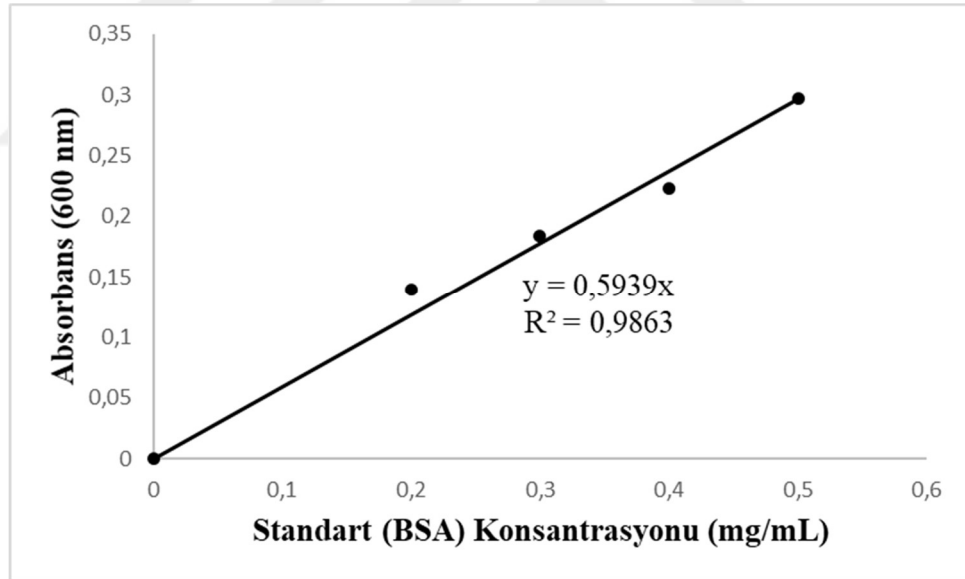
Kullanılan Çözeltiler

Bradford Reaktifi: 10 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 5 ml %95'lik etanolde çözüldü, üzerine 10 ml %85'lik fosforik asit eklendi. Son hacim 100 ml'ye tamamlandı.

Standart Çözeltileri: Standartlar Bovin Serum Albüminden 1, 0,9, 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05 mg/ml'lik konsantrasyonlarda hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

Protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 100 µl Bradford Reaktifi ve 10 µl numune alındı. Bu miktarlar pleyte yüklendikten sonra pipetaj yapılarak karıştırıldı. Mikropleyt okuyucu ile 600 nm'de absorbanlar okundu. Şekil 10'daki standart grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar hesaplandı. Sonuçlar mg/ml cinsinden ifade edildi.



Şekil 10: Protein Tayininde Kullanılan Standart Grafiği

3.8.6. Testis Dokusunda Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Testis dokusunda GPX aktivitesi Antibodies.com (Cambridge, United Kingdom) firmasının ürettiği A319686 numaralı kitin prosedürüne uygun olarak belirlendi. Bu yöntemde GPX, GSH'nin H₂O₂ ile oksidasyonunu katalize ederek GSSG üretir. Ardından glutasyon redüktaz, GSH'yi yeniden oluşturmak için GSSG'nin NADPH tarafından indirgenmesini katalize ederken indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP⁺) üretmek için oksitlenir. NADPH 340 nm'de karakteristik bir absorpsiyon pikine sahipken, NADP⁺ pik yapmaz. NADPH dehidrojenasyon hızı, 340 nm'deki absorbans azalma hızı ölçülerek belirlenir. Böylece GPX aktivitesinin hesaplanması sağlandı. GPX aktiviteleri U/mg protein cinsinden ifade edildi.

3.8.7. Toplam Oksidan Seviye Tayini

Testis dokusunda TOS seviyeleri üreticinin talimatlarına göre kolorimetrik bir kit (RL0024; Rel Assay Diagnostics, Gaziantep, Türkiye) kullanılarak belirlendi. Bu metodun yapılışı kısaca; 45 µl örnek, 25 mikromolar (mM) sülfirik asit, pH 1,75 içeren reaktif 1 ile karıştırıldı ve absorbans 530 nm'de (Versamax, Molecular Devices) bir mikrolaka okuyucu spektrofotometre kullanılarak okundu. Reaktif 2, 25 mM sülfirik asit, pH 1,75, 5 mM Fe⁺² iyonu ve 10 mM o-dianisidin içeren (45 µl) tüm kuyucuklara eklendi ve plaka oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Absorbans 530 nm'de bir mikrolaka okuyucu spektrofotometre kullanılarak tekrar okundu. İlk absorbans değeri ikinci absorbans değerinden çıkarılarak absorbans değişimi hesaplandı. H₂O₂, 10 mikromolar (µM), standart olarak kullanıldı. Örneklerin TOS seviyeleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (142).

$$TOS = (\Delta A \text{ Örnek}) / (\Delta A \text{ Standart}) \times 10 \text{ (mikromol (}\mu\text{mol)/L)}$$

Sonuçlar, µmol H₂O₂ eşdeğeri/L olarak ifade edildi.

3.8.8. Toplam Antioksidan Seviye Tayini

Testis dokusunda TAS seviyeleri üreticinin talimatlarına göre kolorimetrik bir kit (RL0017; Rel Assay Diagnostics) kullanılarak belirlendi. Kısaca, 18 µl numune 0,4

M asetat tamponu, pH 5,8 içeren reaktif 1 ile karıştırıldı ve absorbans 660 nm'de (Versamax, Molecular Devices) bir mikrolaka okuyucu spektrofotometre kullanılarak okundu. Tüm kuyucuklara 30 mM 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit çözeltisi içeren 45 µl reaktif 2 eklendi ve plaka oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Absorbans 660 nm'de bir mikrolaka okuyucu spektrofotometre kullanılarak tekrar okundu. İlk absorbans değerleri ikinci absorbans değerlerinden çıkarıldı. Her bir örnekte, standart ve su için tespit edilen absorbansların farkı alınarak absorbans değişimi hesaplandı. Hidrojen monoksit renksiz olduğu ve antioksidan içermediği için pozitif kontrol olarak kullanıldı. Trolox, 1 mmol/L, standart olarak kullanıldı. Örneklerin TAS seviyeleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (142).

$$TAS = (\Delta A_{H_2O}) - (\Delta A_{\text{Örnek}}) / (\Delta A_{H_2O}) - (\Delta A_{\text{Standart}})$$

Sonuçlar, mmol Trolox eşdeğeri/L olarak ifade edildi.

3.8.9. Oksidatif Stres İndeksi Hesaplanması

Oksidatif stres indeksi (OSI) değeri TOS/TAS oranıdır. Bu hesaplamayı gerçekleştirmek için TAS birimi olan mmol Trolox eşdeğeri/L, µmol Trolox eşdeğeri/L'ye dönüştürülmüş ve OSI değeri aşağıdaki formül üzerinden hesaplanmıştır (142).

$$\%OSI = (TOS, \mu\text{mol } H_2O_2 \text{ eşdeğeri/L}) / (TAS, \mu\text{mol Trolox eşdeğeri/L}) \times 100$$

3.9. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler SPSS 23.0 istatistik programına aktarıldı. Kruskal Wallis varyans analizi grupları karşılaştırmak için yapıldı. Post-hoc olarak Mann Whitney U testi kullanıldı. Gruplar arasındaki fark $p < 0,05$ seviyesinde anlamlı olarak kabul edildi.

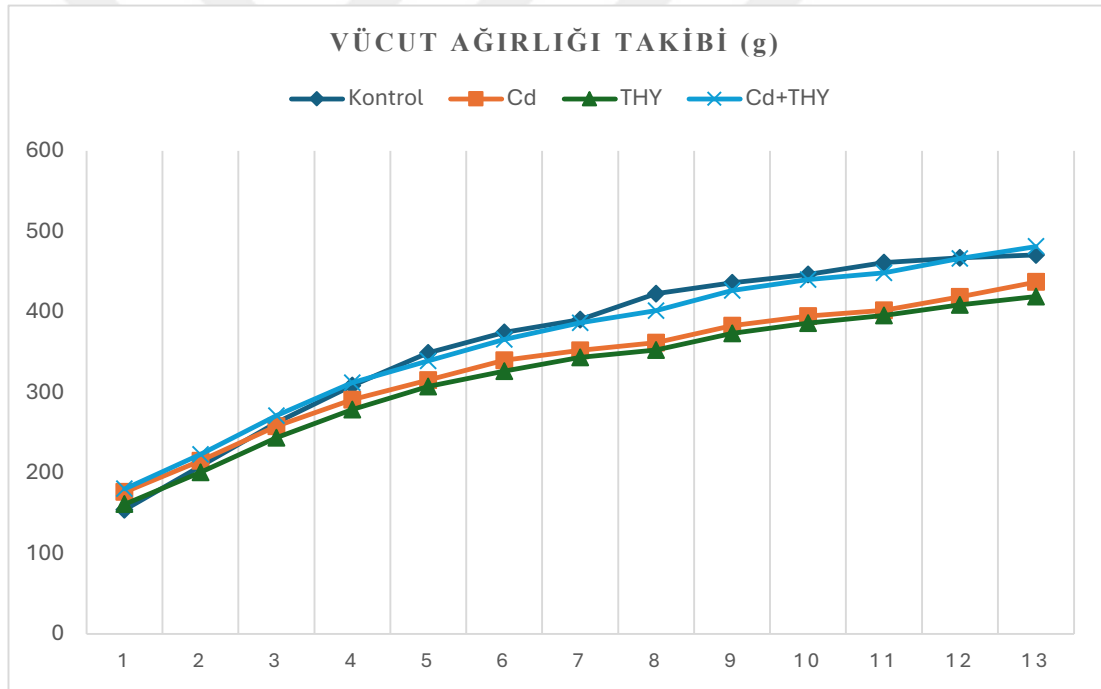
Tablolar üzerinde değerler ortalama $\pm$ standart sapma ($\text{Ort} \pm \text{SD}$) olarak gösterildi, aynı zamanda grup farklılıkları tablolar ve grafikler üzerinde simgelerle ifade edildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut ve Testis Ağırlığı Ölçümleri

4.1.1. Vücut Ağırlığı Takibi

Deney başlangıcında tüm sıçanlar deney tasarımında belirlenmiş olan hafta ve kiloya uygun olarak deneye dahil edildi. Grupların tamamında ilk haftalar kilo alımı hızlı bir şekilde gerçekleşirken daha sonra rat fizyolojisine uygun olarak bu artış azalmıştır. Bu hızlı artış kontrol ve THY gruplarında 5. haftada son bulurken Cd grubunda 6. haftada Cd+THY grubunda ise 4. haftada son bulmuştur (Şekil 11).



Şekil 11: Deney Periyodundaki Vücut Ağırlığı Takibi (g)

1. hafta ve 8-11. haftalarda kontrol grubunun vücut ağırlığı Cd grubuna göre belirgin yüksekti (sırasıyla $p=0,003$; $p=0,011$; $p=0,019$; $p=0,043$; $p=0,043$). 3-13. haftalarda ise kontrol grubunun vücut ağırlığı THY grubuna göre belirgin yüksekti (sırasıyla $p=0,035$; $p=0,029$; $p=0,009$; $p=0,007$; $p=0,023$; $p=0,001$; $p=0,004$; $p=0,007$; $p=0,005$; $p=0,009$; $p=0,009$). 1 ve 2. haftalarda kontrol grubunun vücut ağırlığı

Cd+THY grubuna göre anlamlı olarak düşüktü (sırasıyla $p=0,023$; $p=0,029$). Cd ve THY grubu karşılaştırıldığında sadece ilk hafta Cd grubu lehine bir fark izlenirken daha sonraki haftalarda bir fark görülmedi ($p=0,015$). Cd+THY grubunda Cd grubuna kıyasla 6. haftadan itibaren deney sonuna kadar vücut ağırlığı bakımından anlamlı bir yükseklik mevcuttu (sırasıyla $p=0,019$; $p=0,015$; $p=0,007$; $p=0,009$; $p=0,011$; $p=0,011$; $p=0,011$; $p=0,011$). Cd+THY grubunda ise THY grubuna kıyasla deney boyunca (sadece 5. haftada istatistiksel olarak anlamsız olmak üzere) vücut ağırlıkları belirgin olarak yüksekti (sırasıyla $p=0,019$; $p=0,019$; $p=0,019$; $p=0,015$; $p=0,002$; $p=0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$; $p=0,002$; $p=0,003$; $p=0,001$) (Tablo 9).

Tablo 9: Grupların Haftalık Vücut Ağırlığı Takibi

Vücut Ağırlığı (g)	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
1. hafta	154,3±15,27	176,2±32,56 ^a	161,2±20,35 ^b	180,2±43,51 ^{a,c}
2. hafta	208,1±21,85	214,9±34,44	200,8±19,03	223±43,89 ^{a,c}
3. hafta	262,4±28,73	257,8±35,4	243,4±19,52 ^a	270,9±43,88 ^c
4. hafta	308,5±34,76	290,9±33,28	278,7±18,54 ^a	311,7±41,23 ^c
5. hafta	348,7±35,75	314,9±32,2	307±19,13 ^a	338,8±39,06
6. hafta	374,7±38,41	339,8±38,23	326,3±19,27 ^a	365,5±32,95 ^{b,c}
7. hafta	390,3±44,7	352,2±40,12	343,1±22,05 ^a	386,4±33,77 ^{b,c}
8. hafta	422,5±43,98	361,6±42,22 ^a	352,3±21,21 ^a	401,5±32,85 ^{b,c}
9. hafta	436,1±46,66	382,7±47,6 ^a	373,2±24,09 ^a	426,3±36,04 ^{b,c}
10. Hafta	446,4±48,11	394,6±49,33 ^a	385,8±24,28 ^a	439,8±37,2 ^{b,c}
11. hafta	460,8±50,23	401,6±52,58 ^a	395,4±24,64 ^a	448,3±38,84 ^{b,c}
12. hafta	466,8±52,87	418,5±54,06	408,4±28,87 ^a	466,2±39,59 ^{b,c}
13. hafta	470,6±52,23	437±54,73	419±31,69 ^a	481,11±42,87 ^{b,c}

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,005$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,005$), c: THY grubuna göre anlamlı ($p<0,005$)

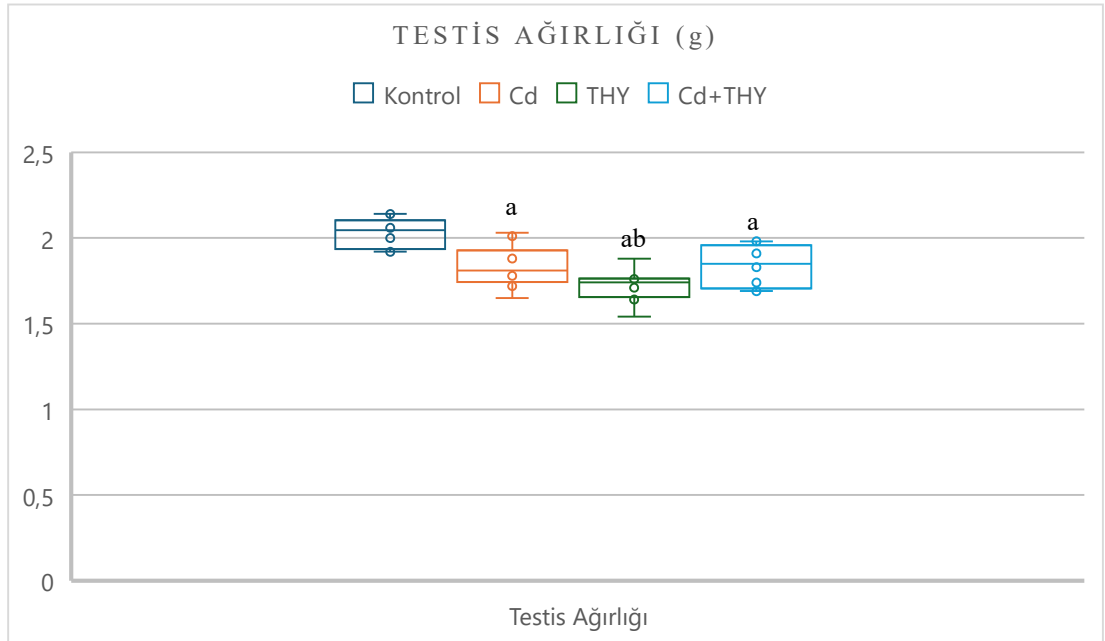
4.1.2. Testis Ağırlığı Ölçümü ve Gonadosomatik İndeks

Deney sonunda testisler, epididimis ve yağ dokusundan ayıklanıp hassas terazi kullanılarak her hayvan için ayrı ayrı tartıldı. Hem testis ağırlıkları hem de testis ağırlıklarının yine deney sonunda her hayvan için ölçülmüş olan vücut ağırlığına oranı ile yüzdelik şeklinde hesaplanan gonadosomatik indeks (GSİ), gruplar arasında kıyaslandı. Testis ağırlığı Cd, THY ve Cd+THY gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı azalmıştı (sırasıyla $p=0,001$; $p<0,001$; $p=0,001$), bu azalma THY grubunda Cd grubuna göre de anlamlıydı ($p=0,029$). GSİ ise Cd+THY grubunda hem kontrol hem de Cd grubuna göre belirgin olarak düşük bulundu (sırasıyla $p=0,003$; $p=0,007$) (Tablo 10) (Şekil 12,13).

Tablo 10: Grupların Deney Sonu Testis Ağırlıkları ve GSİ Değerleri

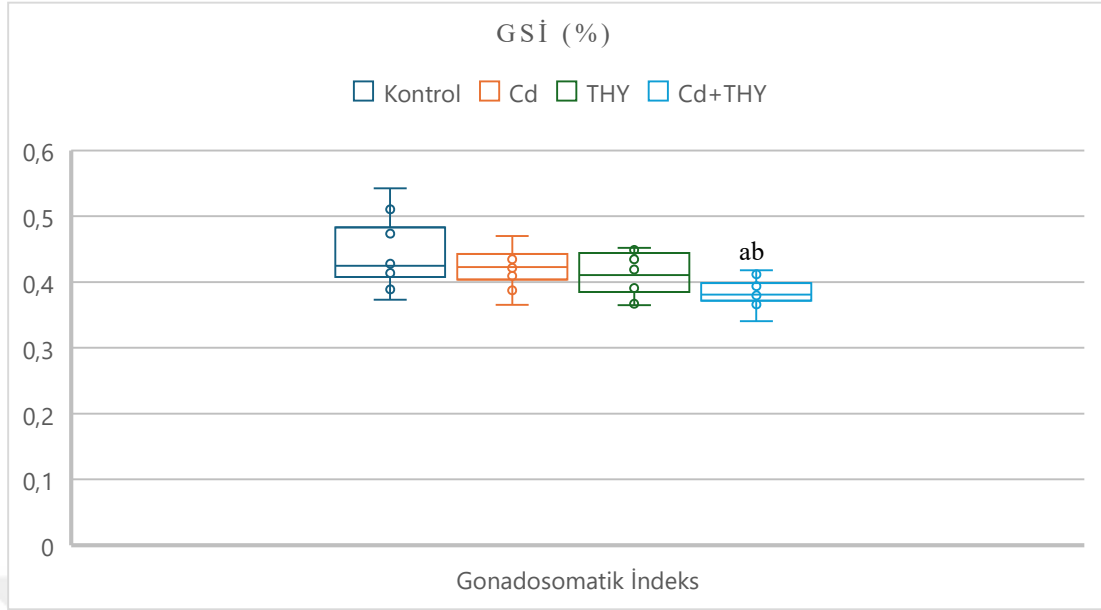
Testis Ağırlığı ve GSİ	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
Testis Ağırlığı (g)	2,03±0,08	1,83±0,12 ^a	1,72±0,09 ^{a,b}	1,83±0,11 ^a
GSİ (%)	0,44±0,05	0,42±0,02	0,41±0,03	0,38±0,02 ^{a,b}

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



Şekil 12: Grupların Deney Sonu Testis Ağırlıkları

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



Şekil 13: Grupların Deney Sonu GSİ Değerleri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

4.2. Sperm Analizi ve Teratozoospermik İndeks

Deney sonu yapılan sperm analizinde toplam sperm sayısı, hareketli sperm sayısı, % vitalite ve % motilite parametreleri değerlendirildi. Toplam sperm sayısı gruplar arasında kıyaslandığında Cd+THY grubunda sadece Cd grubuna kıyasla belirgin bir artış gözlenirken ($p=0,005$); hareketli sperm sayısına bakıldığında Cd+THY grubunda Kontrol, Cd ve THY gruplarına kıyasla anlamlı artış mevcuttu (sırasıyla $p=0,015$; $p=0,005$; $p=0,011$). % vitalite ise Cd grubunda Kontrol ve THY ve Cd+THY grubuna göre belirgin düşüktü (sırasıyla $p < 0,001$; $p=0,007$; $p=0,001$). % motilite ise gruplar arasında belirgin fark göstermedi (Tablo 11) (Şekil 14,15).

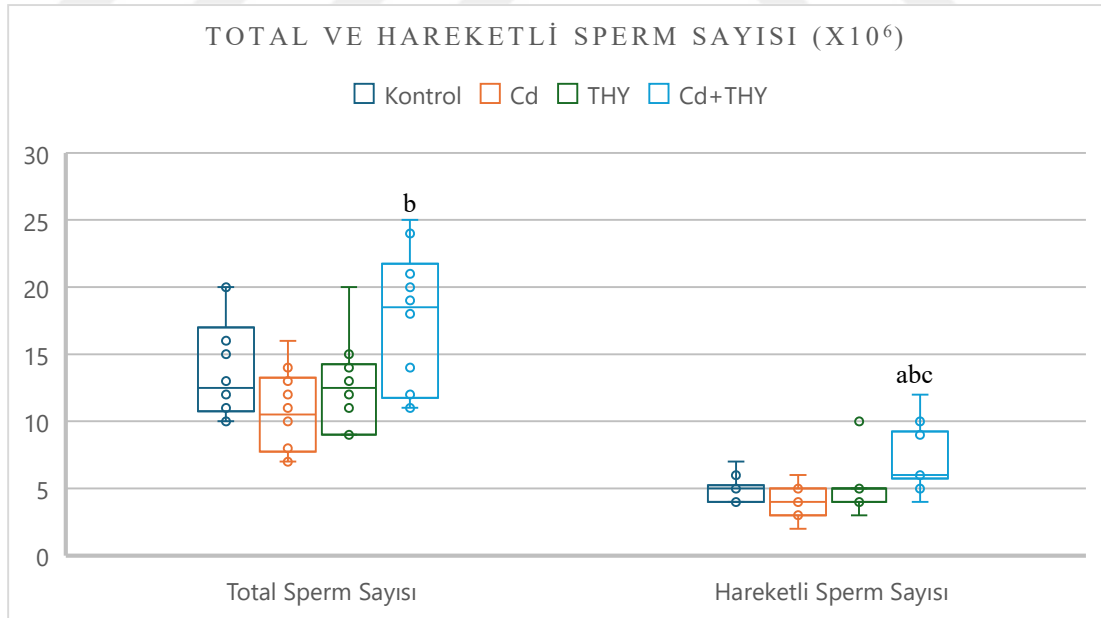
Morfoloji değerlendirmesinde her denek için 100 anomalili spermin tüm anomalileri toplanarak sperm sayısına bölünmesi ile elde edilen TZI gruplar arasında kıyaslandı. Sadece Cd ve Cd+THY gruplarında Kontrol grubuna kıyasla anlamlı yükseklik görüldü (sırasıyla $p=0,007$; $p=0,015$). Baş, boyun, sitoplazmik droplet ve kuyruk anomalileri tek tek yüzde olarak hesaplandığında ise Kontrol grubunda baş anomalisi Cd ve THY gruplarına göre belirgin (sırasıyla $p=0,029$; $p=0,001$) Cd, THY ve Cd+THY gruplarında ise kuyruk anomalileri Kontrol grubuna göre belirgindi ($p=0,003$; $p=0,001$; $p=0,002$). Ayrıca Cd+THY grubunda THY grubuna kıyasla baş

anomalileri artmıştı ($p=0,023$). Boyun ve sitoplazmik droplet anomali yüzdeleri açısından gruplar arasında anlamlı fark görülmedi (Tablo 11) (Şekil 16, 17).

Tablo 11: Gruplara Ait Sperm Analizinin ve İlişkili Parametrelerin Sonuçları

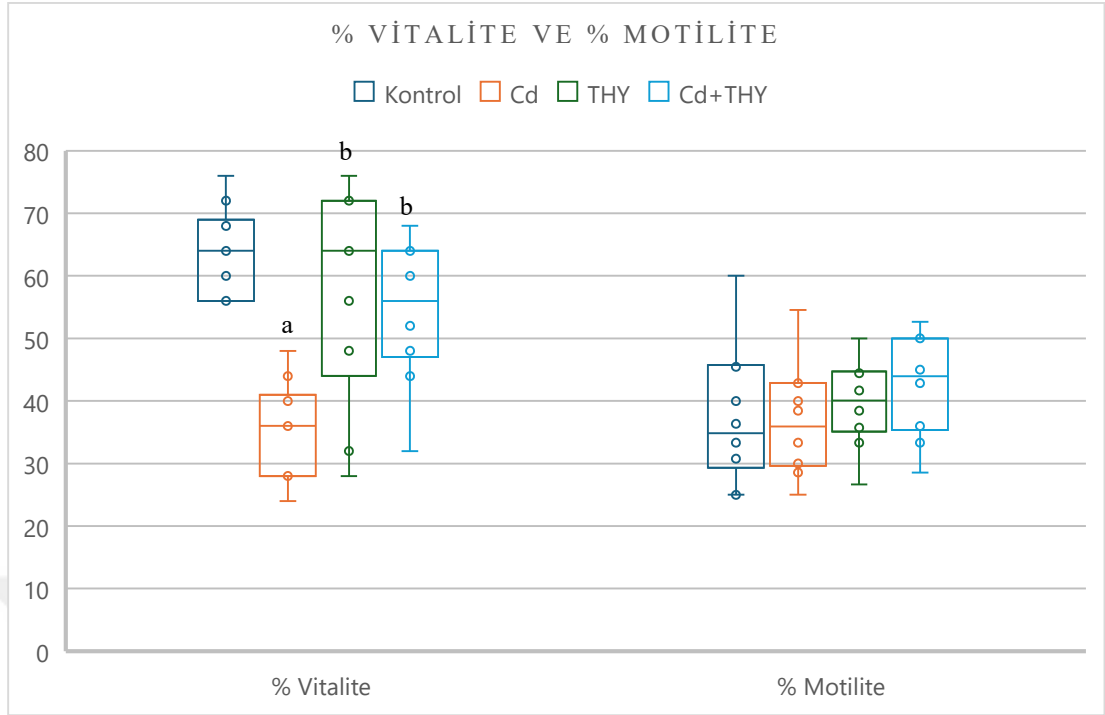
Sperm Analizi ve İlişkili Parametreler	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
Total Sperm Sayısı ($\times 10^6$)	13,8±3,82	10,8±3,01	12,6±3,43	17,5±5,23 ^b
Hareketli Sperm Sayısı($\times 10^6$)	4,9±0,99	3,9±1,19	5±1,88	7,3±2,54 ^{a,b,c}
% Vitalite	64±7,05	36±7,54 ^a	57,6±16,67 ^b	54±11,19 ^b
% Motilite	37,38±10,93	36,68±8,8	39,59±6,92	42,02±8,06
TZI	1,2±0,1	1,39±0,16 ^a	1,28±0,09	1,34±0,1 ^a
% Baş anomali	30,19±22,05	12,45±14,18 ^a	4,71±3,12 ^a	17,08±21,11 ^c
% Boyun anomali	49,29±19,2	51,1±10,84	56,5±9,03	45,71±15,15
% Sitoplazmik droplet anomali	0,79±1,62	0,15±0,31	0±0	0,16±0,51
% Kuyruk anomali	19,72±10,48	36,29±9,12 ^a	38,77±7,34 ^a	37,04±10,44 ^a

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), c: THY grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



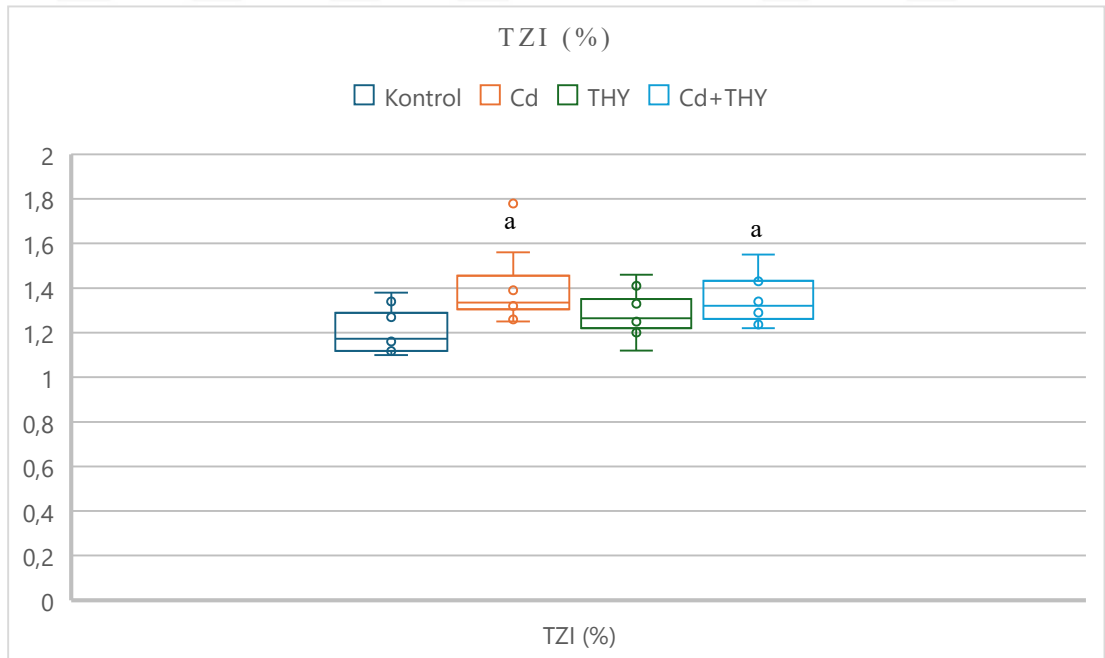
Şekil 14: Gruplara Ait Total ve Hareketli Sperm Sayısı ($\times 10^6$)

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), c: THY grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



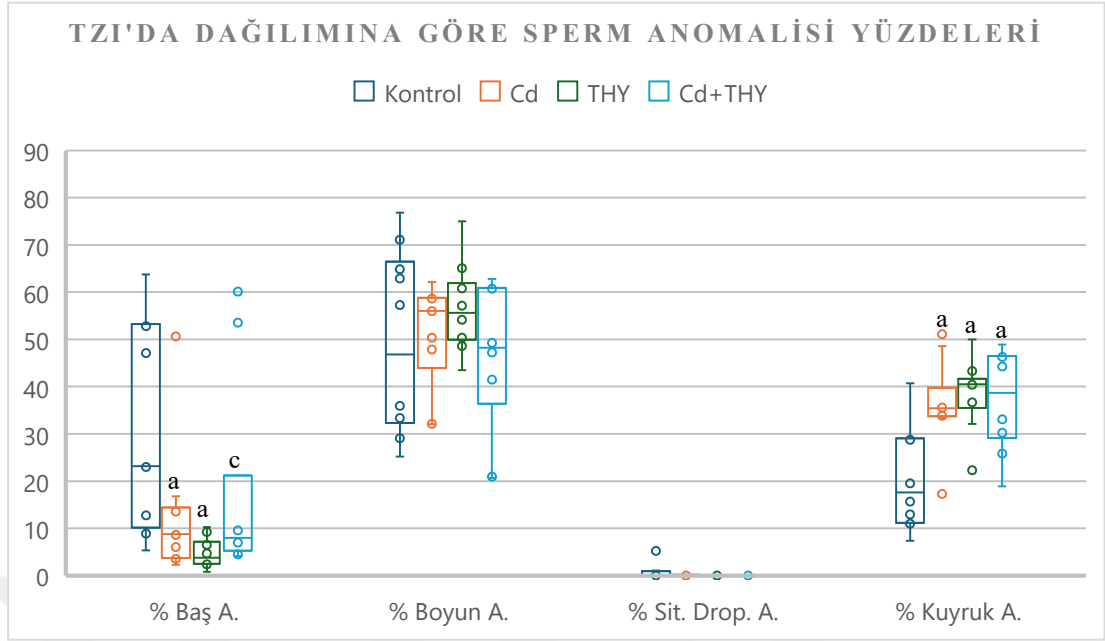
Şekil 15: Gruplara Ait Spermilerin % Vitalite ve % Motilite Değerleri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)



Şekil 16: Teratozoospermik İndeks

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

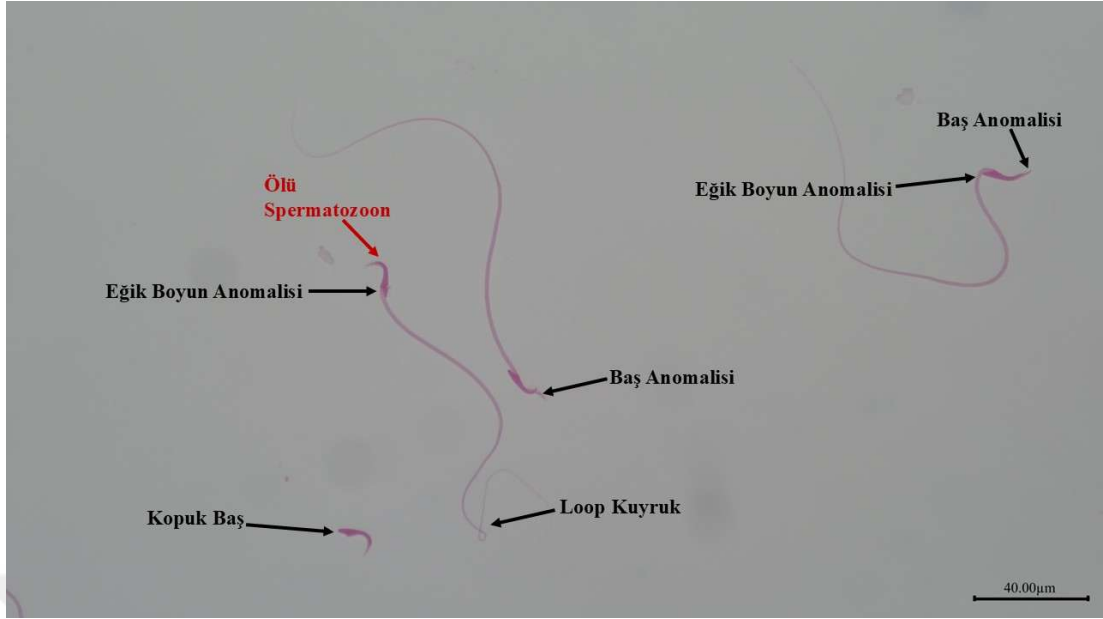


Şekil 17: Grupların, TZI'da Dağılımına Göre Sperm Anomalisi Yüzdeleeri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), c: THY grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



Resim 7: Kontrol Grubuna Ait Canlı, Normal Morfolojili Spermatozoa Örnekleri (Eosin Y, 400x)



Resim 8: Cd Grubuna Ait Bozuk Morfolojili ve Ölü Spermatozoa Örnekleri (Eosin Y, 400x)

4.3. Histopatolojik ve Histomorfometrik Analiz

4.3.1. Hematoksilen & Eozin Boyalı Testis Kesitlerinin Histopatolojik ve Histomorfometrik Olarak Değerlendirilmesi

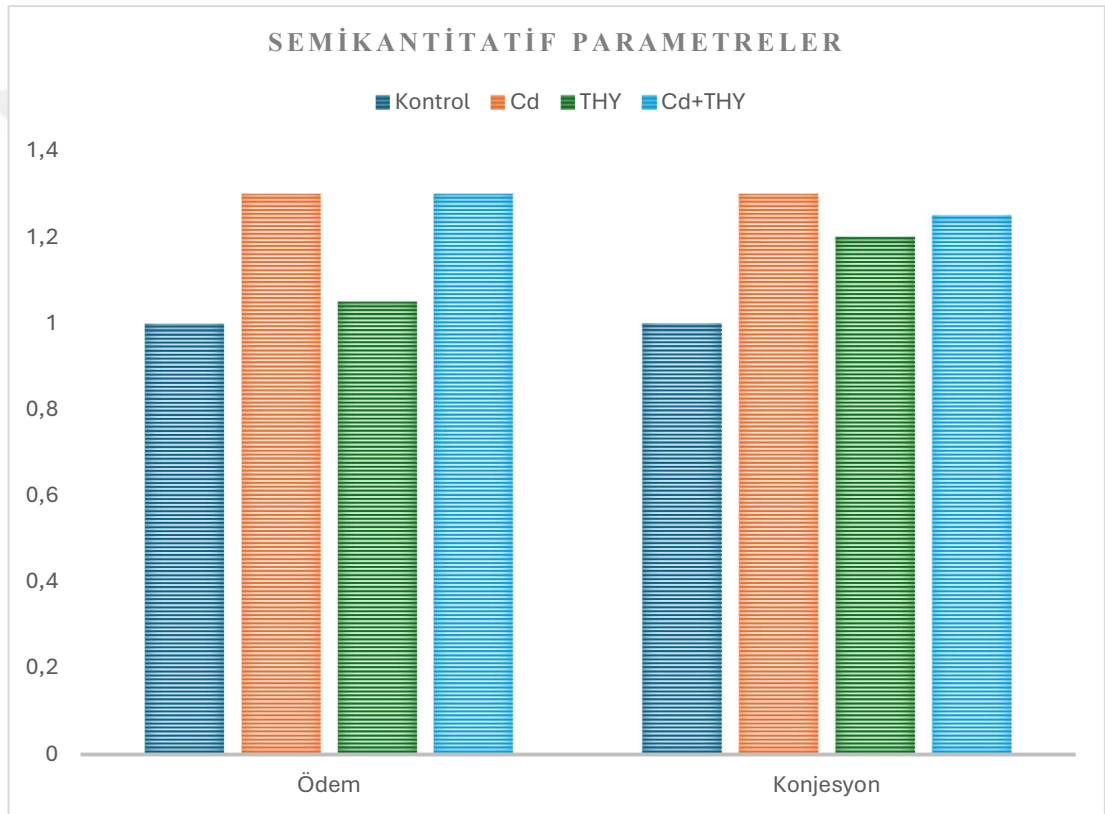
Semikantitatif Değerlendirmeler

Semikantitatif olarak; ödem, konjesyon, hemoraji, inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve JS değerlendirildi. Hemoraji ve inflamatuvar hücre infiltrasyonuna hiçbir grupta rastlanmadı. Ödem ve konjesyon parametrelerinde gruplar arasında fark gözlenmezken Cd grubunda Kontrol ve THY grubuna göre Johnsen skorunda anlamlı seviyede azalış ve Cd+THY grubunda da Cd grubuna göre skorda anlamlı seviyede artış görülmüştür (sırasıyla $p<0,001$; $p=0,029$; $p=0,009$). Ancak bu artış yine de Kontrol grubuna ulaşamamıştır ($p=0,015$) (Tablo 12) (Şekil 18,19).

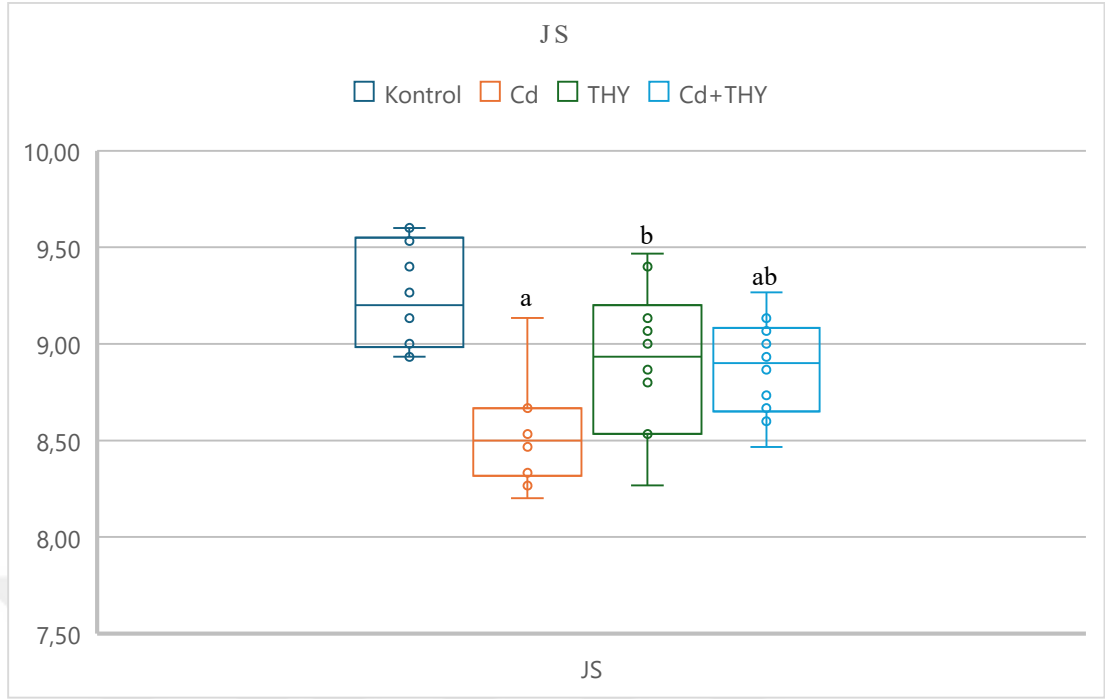
Tablo 12: Semikantitatif Parametrelerin Gruplara Ait Analizi

Semikantitatif Parametreler	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
Ödem	1,00±0,00	1,30±0,34	1,05±0,15	1,30±0,34
Konjesyon	1,00±0,00	1,30±0,42	1,20±0,25	1,25±0,26
JS	9,240±0,27	8,51±0,27 ^a	8,90±0,38 ^b	8,87±0,25 ^{a,b}

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



Şekil 18: Semikantitatif Parametrelerin Gruplara Ait Analizi



Şekil 19: Gruplara Ait JS Değerlendirmesi

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

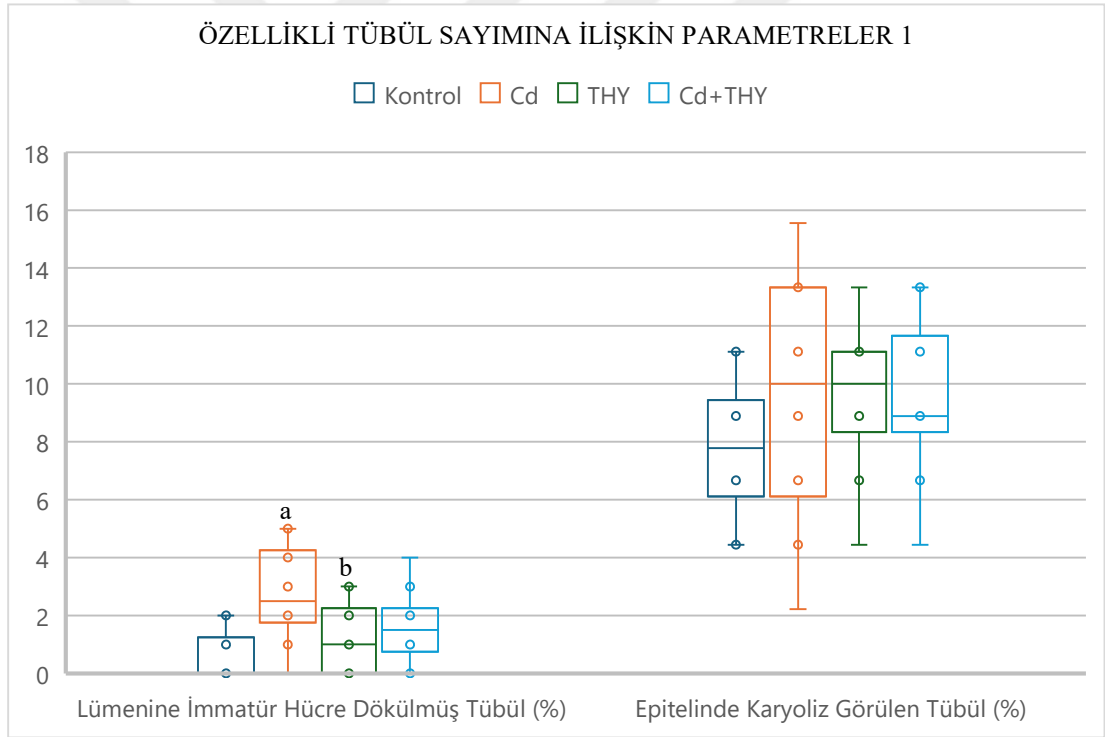
Özellikli Tübül Sayımına İlişkin Parametreler

Bu kategoride lümenine immatür hücre dökülmüş tübül, lümeninde azalmış spermatozoa içeren tübül, vakuol içeren tübül, epitelinde ayrılma olan tübül, karyoliz görülen tübül, sperm retansiyonu görülen tübül yüzdeleri incelendi. Lümenine immatür hücre dökülmüş tübül, lümeninde azalmış spermatozoa içeren tübül ve epitelinde ayrılma olan tübül yüzdeleri Cd grubunda kontrol grubuna göre artarken (sırasıyla $p=0,004$; $p=0,035$; $p=0,015$) tedavi grubunda bu sayılar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalmıştı. Yine lümenine immatür hücre dökülmüş tübül yüzdesinde THY grubunda Cd grubuna göre anlamlı bir azalma mevcuttu ($p=0,043$). Seminifer epitelinde vakuol, karyoliz veya sperm retansiyonu görülen tübül yüzdelerinde ise gruplar arasında fark izlenmedi (Tablo 13) (Şekil 20, 21).

Tablo 13: Gruplara Ait Özellikli Tübül Sayımına İlişkin Parametrelerin Analizi

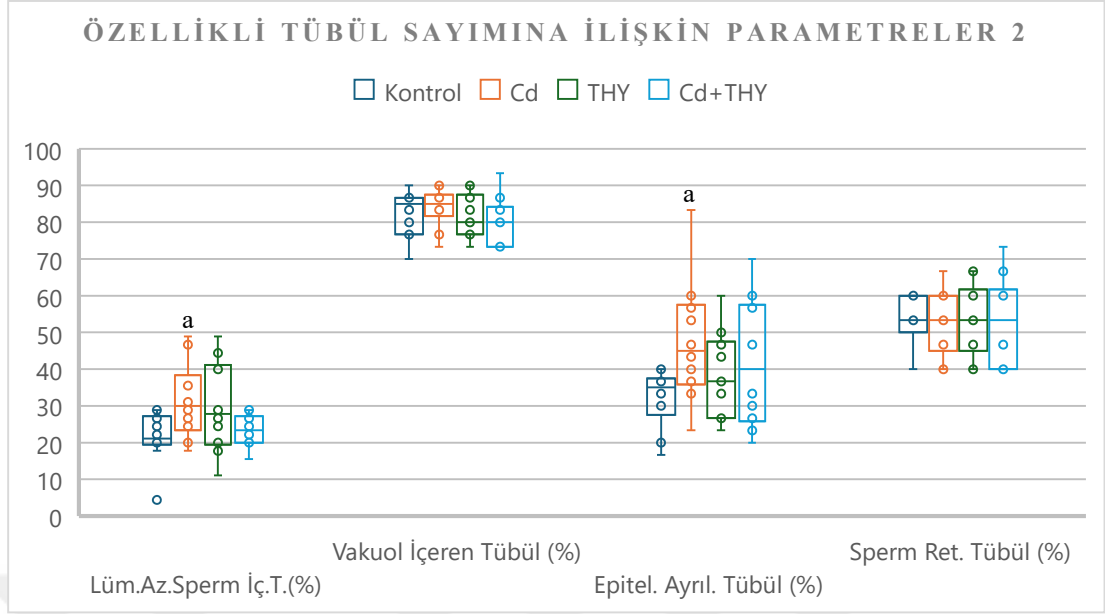
Özellikli Tübül Sayımına İlişkin Parametreler	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
Lümenine İmmatür Hücre Dökülmüş Tübül (%)	0,60±0,84	2,80±1,68 ^a	1,20±1,22 ^b	1,60±1,26
Lümeninde Azalmış Spermatozoa İçeren Tübül (%)	21,33±7,12	31,55±10,35 ^a	29,11±12,05	25,55±4,34
Vakuol Görülen Tübül (%)	82,33±6,29	84±5,39	81,66±5,71	80,66±6,44
Epitelinde Ayrılma Olan Tübül (%)	32,33±8,02	47,66±16,78 ^a	38,33±11,67	41,33±17,15
Karyoliz Görülen Tübül (%)	7,77±2,4	9,55±4,19	9,55±2,57	9,33±2,73
Sperm Retansiyonu Görülen Tübül (%)	52,66±7,33	52,66±8,57	52,66±9,66	52,66±12,74

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



Şekil 20: Gruplara Ait Özellikli Tübül Sayımına İlişkin Parametrelerin Analizi -1

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



Şekil 21: Gruplara Ait Özellikli Tübül Sayımına İlişkin Parametrelerin Analizi -2
a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

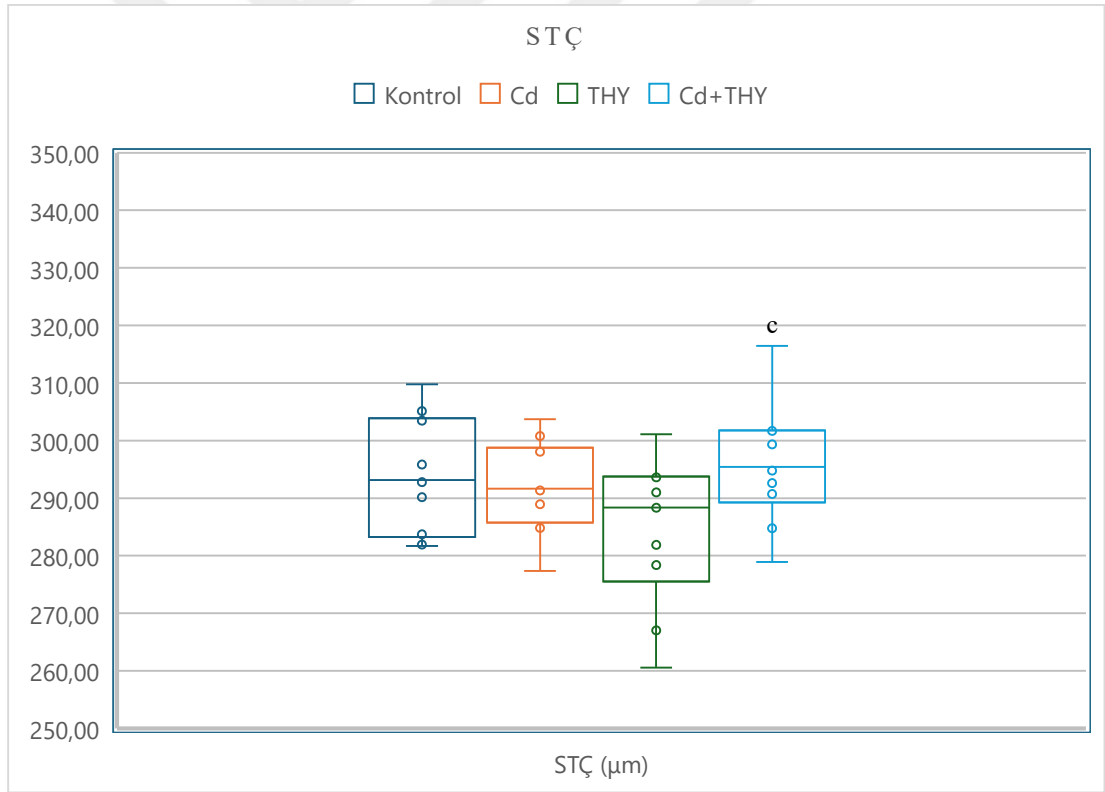
Metrik Parametreler

STÇ, V_T , L_T , S_T , GEK/STÇ, A_{EP}/A_{ST} parametreleri hesaplandı. STÇ parametresi için Cd+THY grubunda THY grubuna göre görülen anlamlı artış dışında gruplar arasında fark bulunmadı ($p=0,043$). V_T , L_T ve S_T parametreleri kontrol grubuna kıyasla Cd, THY ve Cd+THY gruplarında anlamlı olarak azalmıştı (V_T için sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$; L_T için sırasıyla $p=0,011$; $p=0,043$; $p=0,009$; S_T için sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$). Ayrıca sadece V_T parametresinde THY grubunda Cd grubuna göre anlamlı düşüş mevcuttu ($p=0,001$). GEK/STÇ parametresi Cd grubunda Kontrol ve THY gruplarına göre belirgin düşüktü (sırasıyla $p=0,009$; $p=0,023$), A_{EP}/A_{ST} parametresi sadece Kontrol grubuna kıyasla düşüktü ($p=0,035$) (Tablo 14) (Şekil 22-26).

Tablo 14: Metrik Parametrelerin Gruplara Ait Analiz Sonuçları

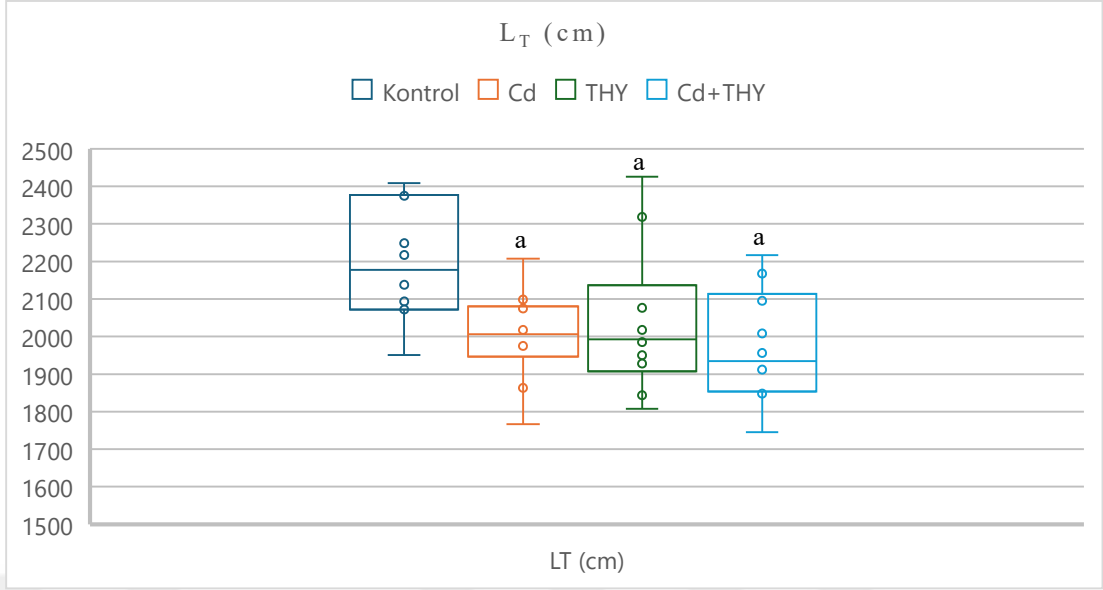
Metrik Parametreler	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
STÇ (μm)	293,79±9,91	291,57±7,89	284,44±12,68	295,74±10,3 ^c
V _T (cm ³)	1,48±0,03	1,33±0,02 ^a	1,28±0,02 ^{a,b}	1,34±0,05 ^a
L _T (cm)	2195,99±156,4	2000,17±121,85 ^a	2035,12±195,88 ^a	1966,55±153,35 ^a
S _T (cm ²)	202,16±8,14	182,86±6,59 ^a	181,08±9,14 ^a	182,25±9,57 ^a
GEK/STÇ	0,31±0,01	0,29±0,01 ^a	0,31±0,01 ^b	0,3±0,01
A _{Ep} /A _{ST}	0,86±0,01	0,84±0,01 ^a	0,86±0,02	0,85±0,01

a: Kontrol grubuna göre anlamlı (p<0,05), b: Cd grubuna göre anlamlı (p<0,05), c: THY grubuna göre anlamlı (p<0,05)



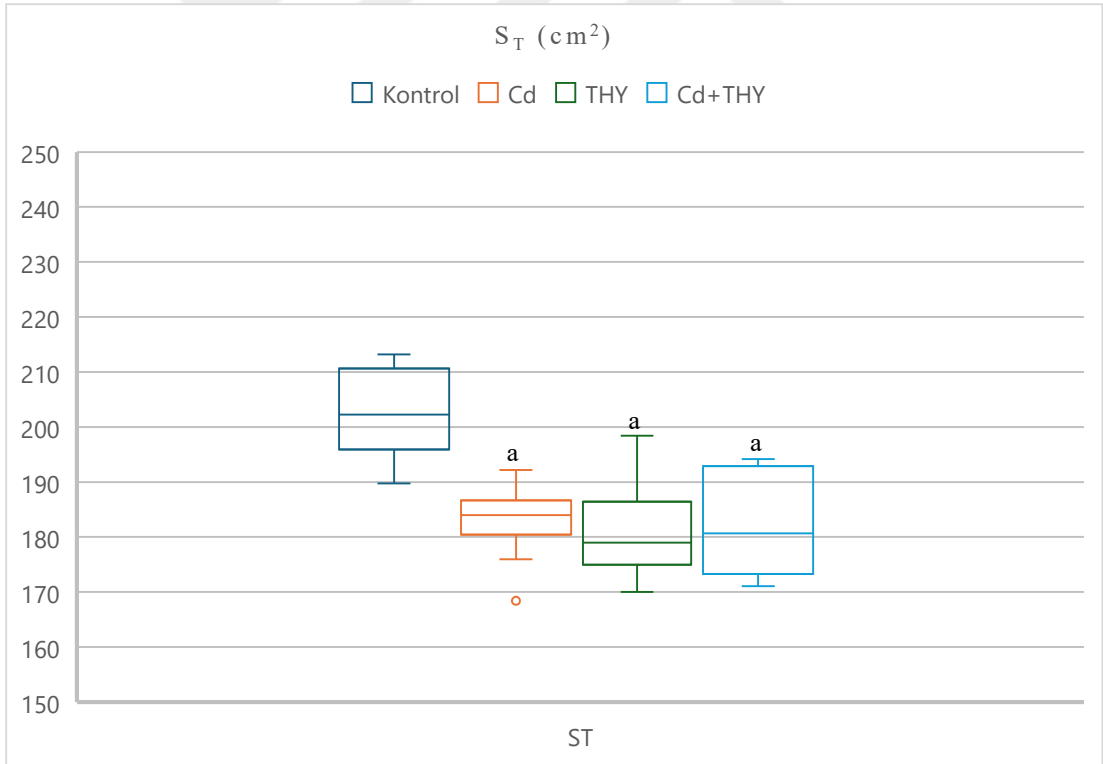
Şekil 22: Grupların STÇ Değerleri

c: THY grubuna göre anlamlı (p<0,05)



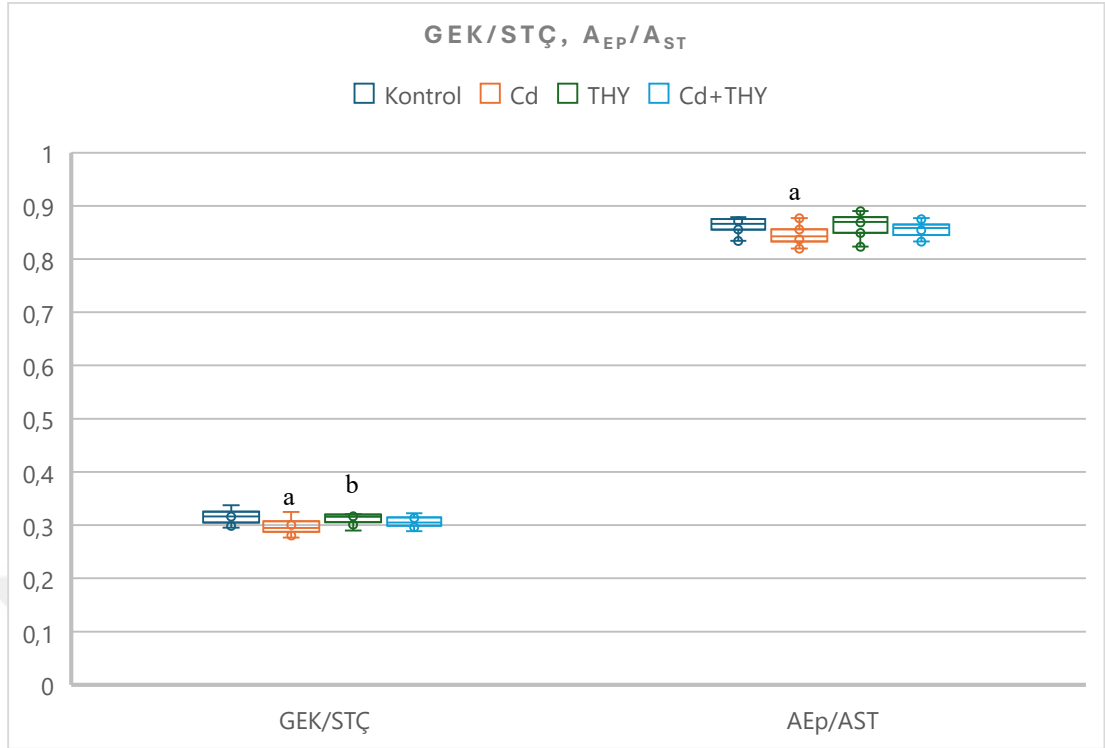
Şekil 23: Grupların L_T Değerleri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)



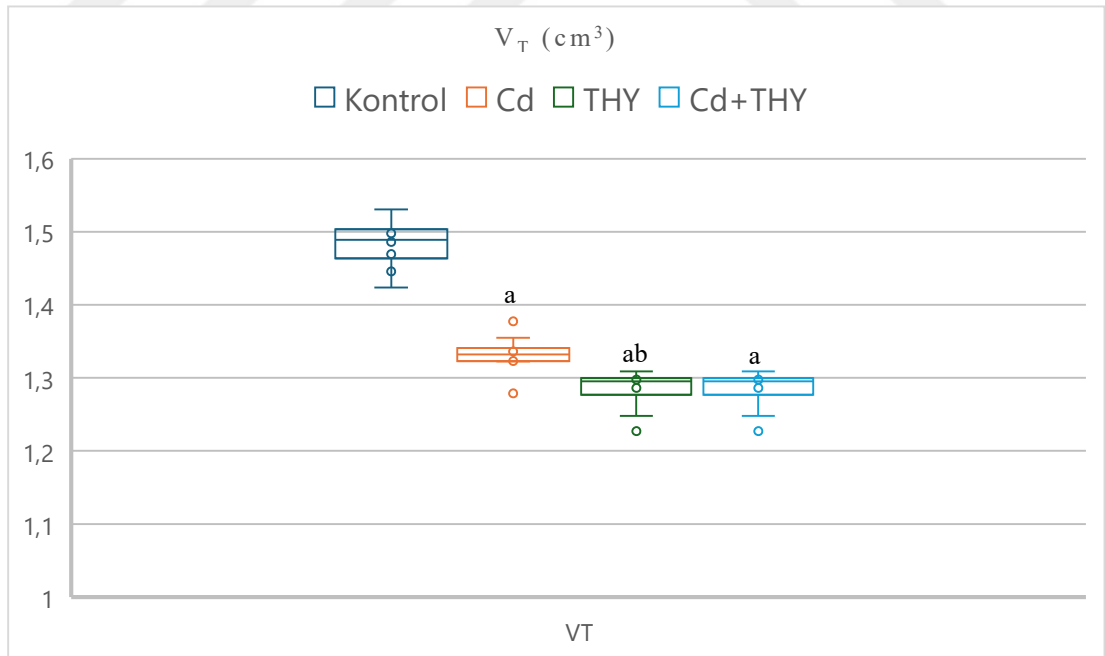
Şekil 24: Grupların S_T Değerleri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)



Şekil 25: Gruplara Ait GEK/STÇ, A_{EP}/A_{ST} Oranlarının Analizi

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)



Şekil 26: Grupların V_T Sonuçları

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

Hücre Sayımı ve İlişkili Parametreler

Total Sertoli hücresi, spermatogonya, primer spermatosit, yuvarlak spermatid sayıları ve bu sayıların testis g'ı başına düşen oranları; interstisyel alan başına düşen ortalama Leydig hücresi sayısı, GSÜ ve GSÜ/g parametreleri değerlendirildi. Total Sertoli hücresi, total yuvarlak spermatid ve interstisyel alan başına düşen ortalama Leydig hücresi sayıları Cd, THY ve Cd+THY gruplarında kontrole göre azalmıştı (total Sertoli hücresi sayısı için sırasıyla $p<0,001$; $p=0,001$; $p=0,002$; total yuvarlak spermatid sayısı için sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$; interstisyel alan başına düşen ortalama Leydig hücresi sayısı için sırasıyla $p=0,015$; $p=0,002$; $p=0,002$). Total primer spermatosit sayısı ise sadece THY grubunda kontrole kıyasla belirgin düşüktü ($p=0,029$). Yuvarlak spermatid/g testis, GSÜ ve GSÜ/g testis parametrelerinde de Cd, THY ve Cd+THY gruplarında kontrol grubuna göre belirgin düşüş mevcuttu (Yuvarlak spermatid/g testis için $p=0,007$; $p=0,043$; $p=0,019$; GSÜ için $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$; GSÜ/g testis için $p=0,007$; $p=0,043$; $p=0,019$). Total spermatogonya sayısı, testis g'ı başına düşen Sertoli hücresi, spermatogonya ve primer spermatosit parametrelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi (Tablo 15,16) (Şekil 27-32).

Tablo 15: Hücre Sayımı ve İlişkili Parametrelerin Gruplara Ait Analizi 1

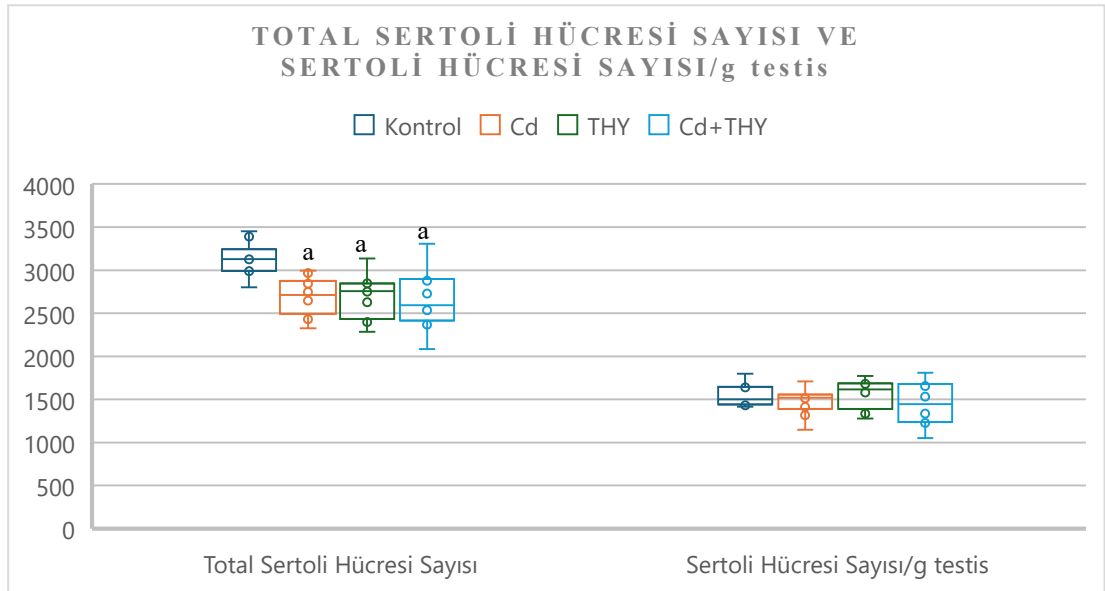
Hücre Sayımı ve İlişkili Parametreler	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
Total Sertoli Hücresi Sayısı	3124,85±192,33	2697,62±222,99 ^a	2686,67±252,98 ^a	2647,22±341,54 ^a
Total Spermatogonya Sayısı	7964,13±1174,4	7056,83±782,24	6729,59±1157,29	7991,18±1366,07
Total Primer Spermatosit Sayısı	10299,9±1344,72	9217,16±1086,59	9196,54±761,15 ^a	9471,26±1421,56
Total Yuvarlak Spermatid Sayısı	23725,76±1648,17	18021,87±3096,9 ^a	16840,94±2764,58 ^a	17272,93±3400,29 ^a

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

Tablo 16: Hücre Sayımı ve İlişkili Parametrelerin Gruplara Ait Analizi 2

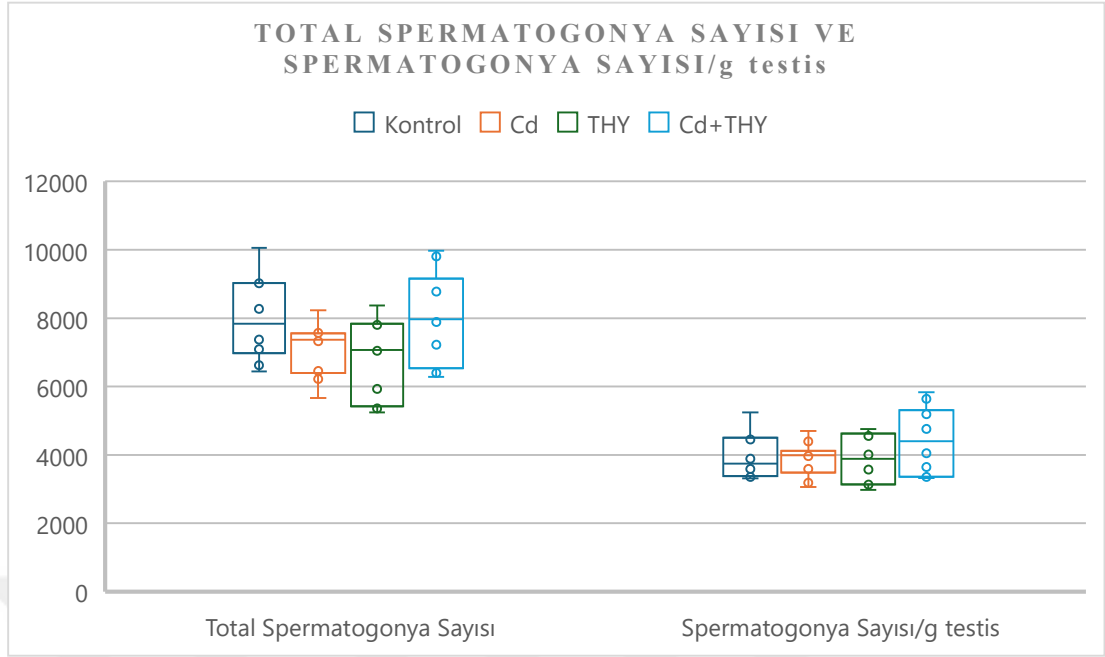
Hücre Sayımı ve İlişkili Parametreler	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
Leydig hücresi/İnter-stisyel Alan	4,35±0,23	3,9±0,37 ^a	3,81±0,35 ^a	3,72±0,41 ^a
Sertoli Hücresi Sayısı/g testis	1540,63±122,89	1476,93±153,94	1566,27±168,13	1454,42±249,28
Spermatogonya Sayısı/g testis	3930,42±654,51	3863,38±502,73	3923,20±709,25	4403,22±978,13
Primer Spermatosit Sayısı/g testis	5073,65±696,48	5045,83±681,44	5359,72±520,25	5211,08±1011,04
Yuvarlak Spermatid Sayısı/g testis	11683,19±777,45	9880,01±1929,01 ^a	9850,79±1913,21 ^a	9467,62±2045 ^a
GSÜ	928,96±64,53	705,63±121,25 ^a	659,39±108,24 ^a	676,3±133,13 ^a
GSÜ/g testis	457,44±30,44	386,84±75,52 ^a	385,7±74,91 ^a	370,69±80,07 ^a

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

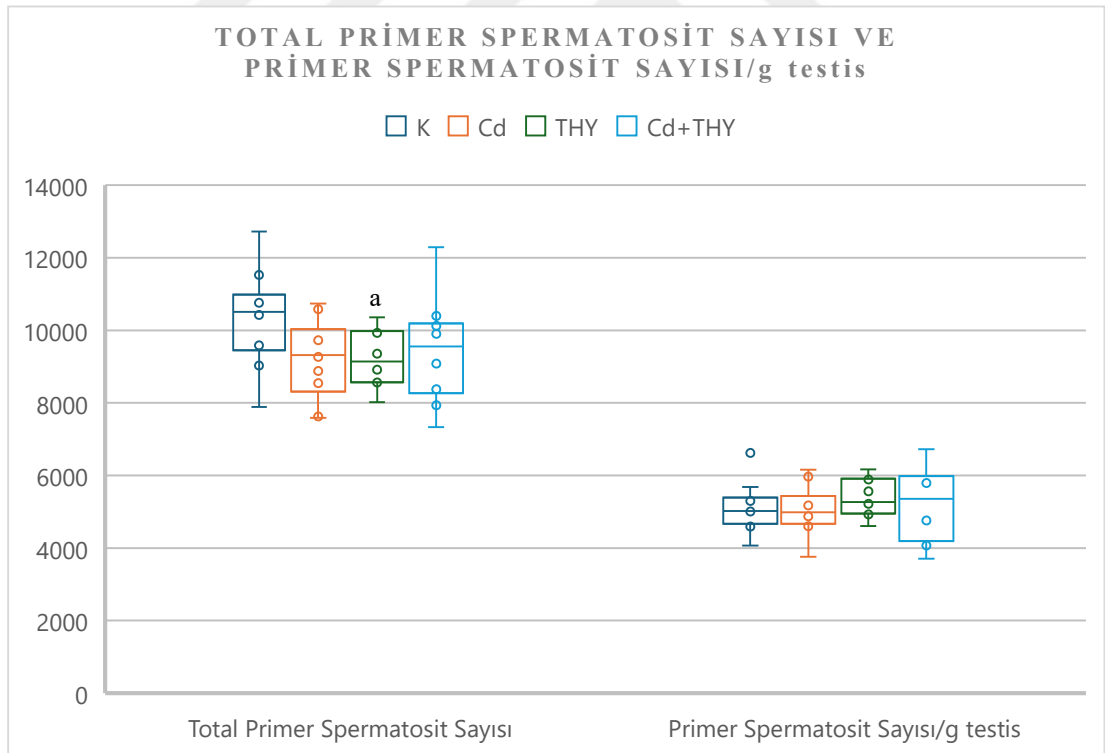


Şekil 27: Grupların Total Sertoli Hücresi Sayısı ve Sertoli Hücresi Sayısı/g testis Değerlendirmesi

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

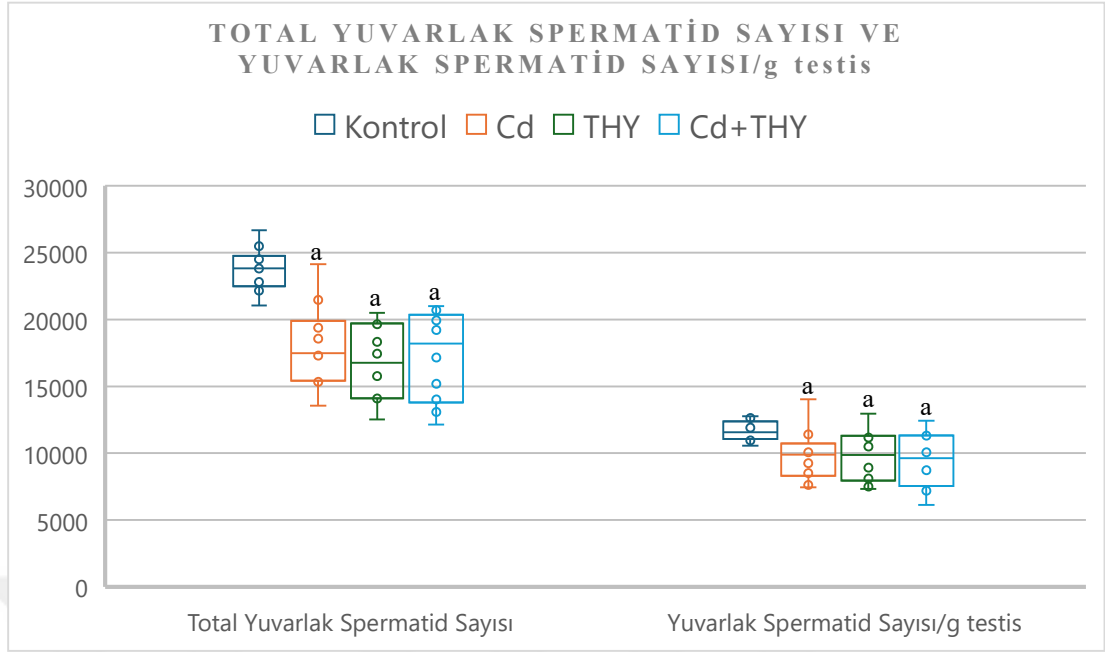


Şekil 28: Grupların Total Spermatogonya Sayısı ve Spermatogonya Sayısı/g testis Değerlendirmesi

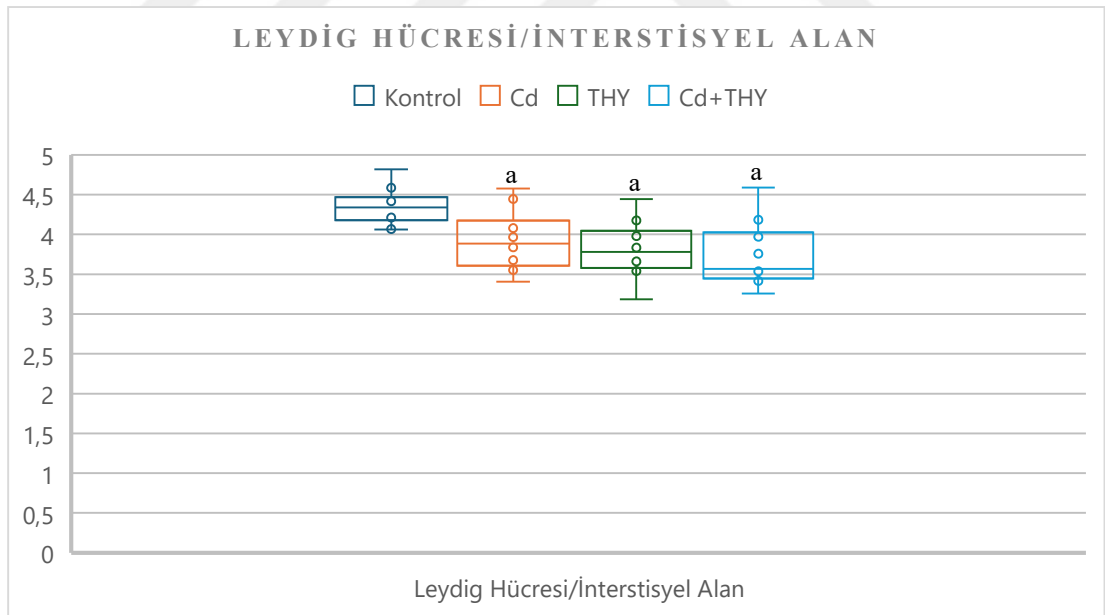


Şekil 29: Grupların Total Primer Spermatozoa Sayısı ve Primer Spermatozoa Sayısı/g testis Değerlendirmesi

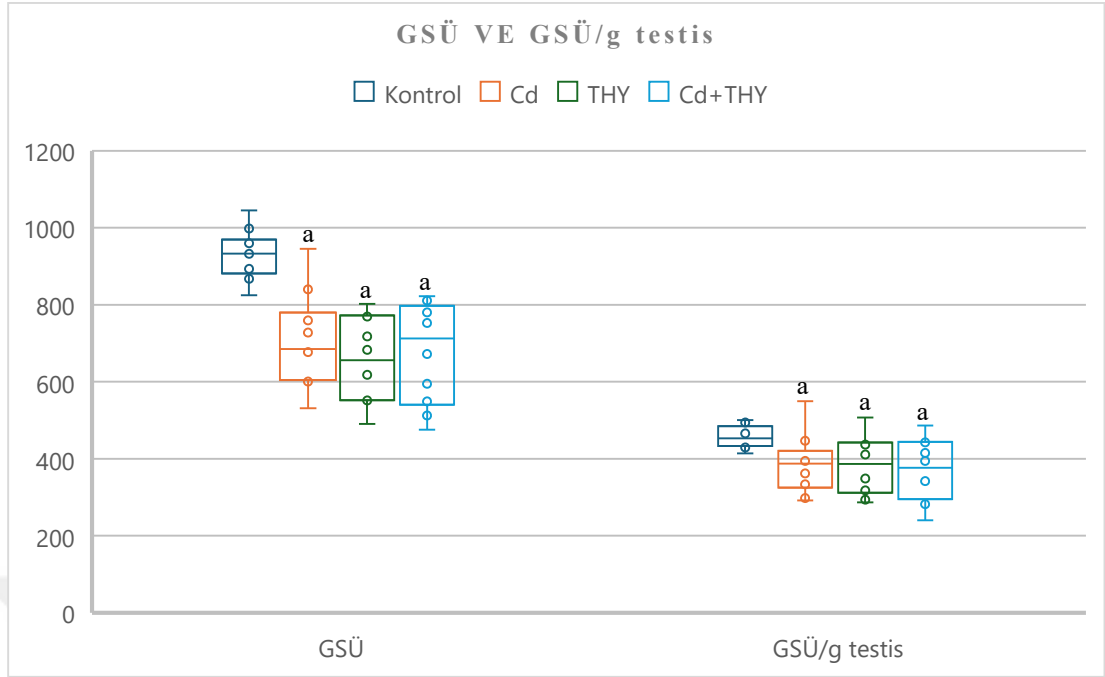
a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)



Şekil 30: Grupların Total Yuvarlak Spermatoit Sayısı ve Yuvarlak Spermatoit/g testis Değerlendirmesi
a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

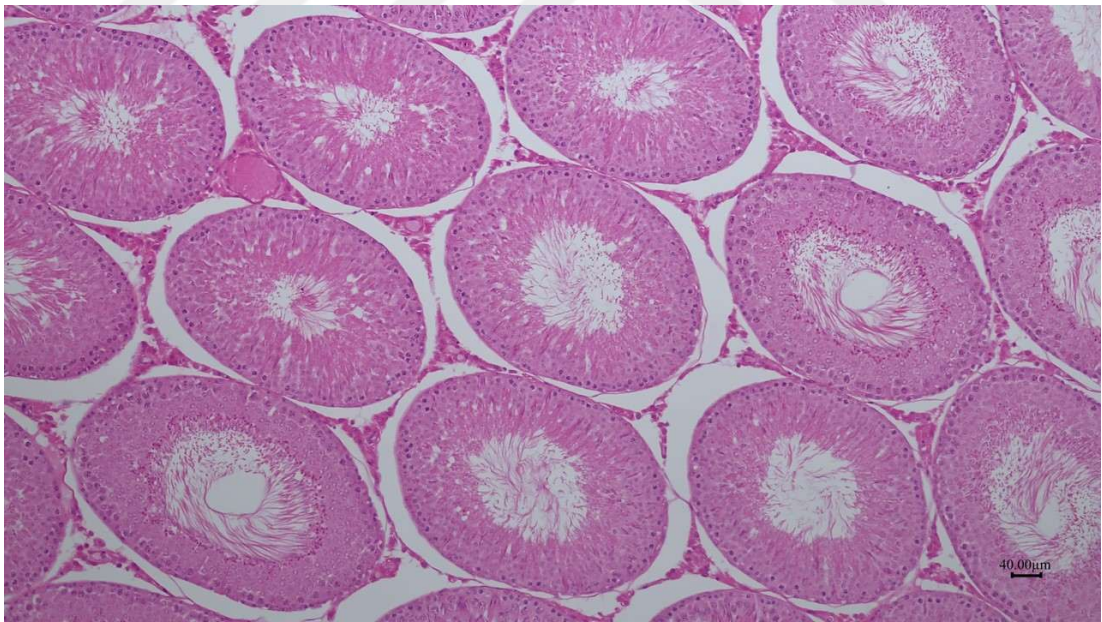


Şekil 31: Gruplara Ait Leydig Hücresi/İnterstisyel Alan Sonuçları
a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

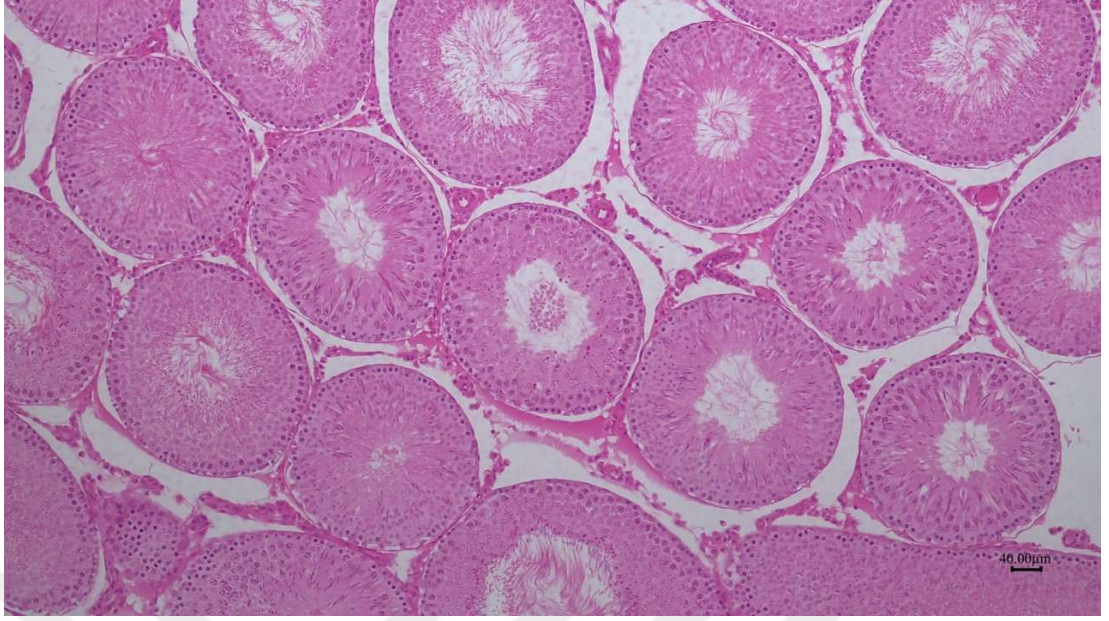


Şekil 32: Grupların GSÜ ve GSÜ/g testis Değerlendirmesi

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)



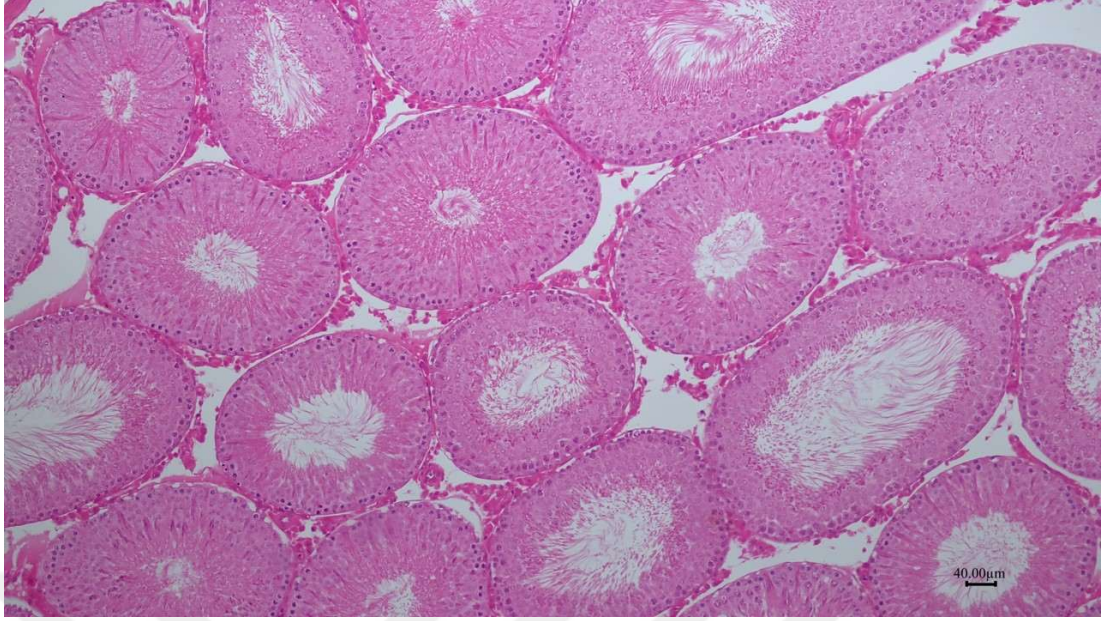
Resim 9: Kontrol Grubuna Ait Testis Kesitinden Genel Görünüm (H&E, 100x)



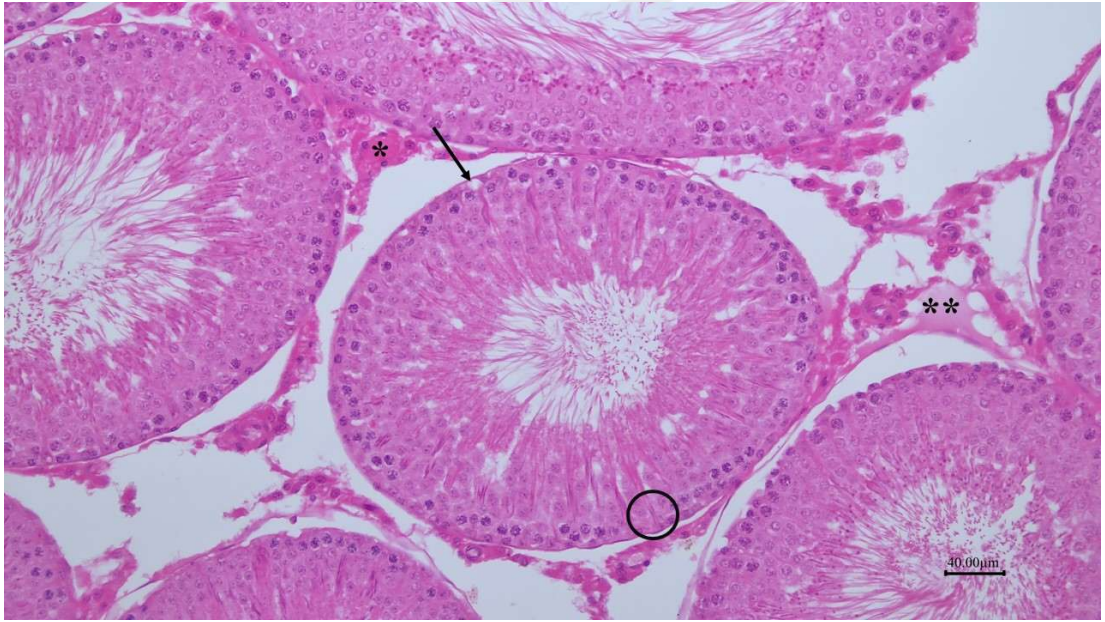
Resim 10: Cd Grubuna Ait Testis Kesitinde Genel Görünüm (H&E, 100x)



Resim 11: THY Grubuna Ait Testis Kesitinden Genel Görünüm (H&E, 100x)



Resim 12: Cd+THY Grubuna Ait Testis Kesitinden Genel Görünüm (H&E, 100x)



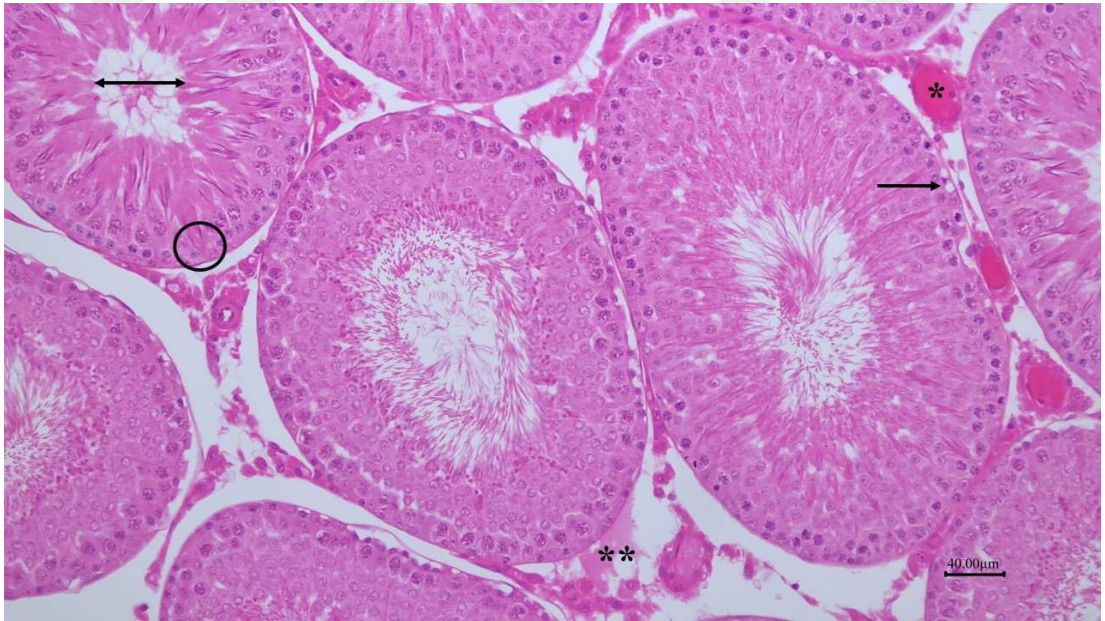
Resim 13: Kontrol Grubuna Ait Kesit (H&E, 200x)

*: Damar içi konjesyon, **: İnteristisyel ödem, Siyah ok: Vakuol, Siyah çember: Sperm retansiyonu



Resim 14: Cd Grubuna Ait Kesit (H&E, 200x)

*: Damar içi konjesyon, **: İnterstisyel ödem, Siyah ok: Vakuol, Siyah çember: Sperm retansiyonu, Siyah çift taraflı ok: Lümeninde azalmış spermatozoa, Siyah düz çizgi: Lümenine dökülmüş immatür germ hücreleri



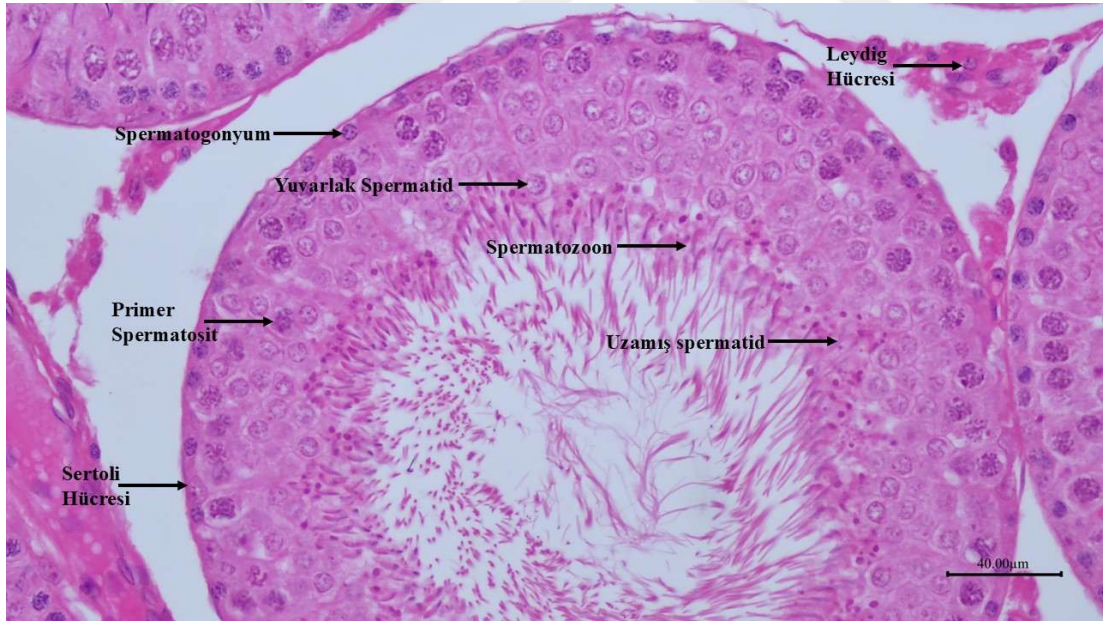
Resim 15: THY Grubuna Ait Kesit (H&E, 200x)

*: Damar içi konjesyon, **: İnterstisyel ödem, Siyah ok: Vakuol, Siyah çember: Sperm retansiyonu, Siyah çift taraflı ok: Lümeninde azalmış spermatozoa



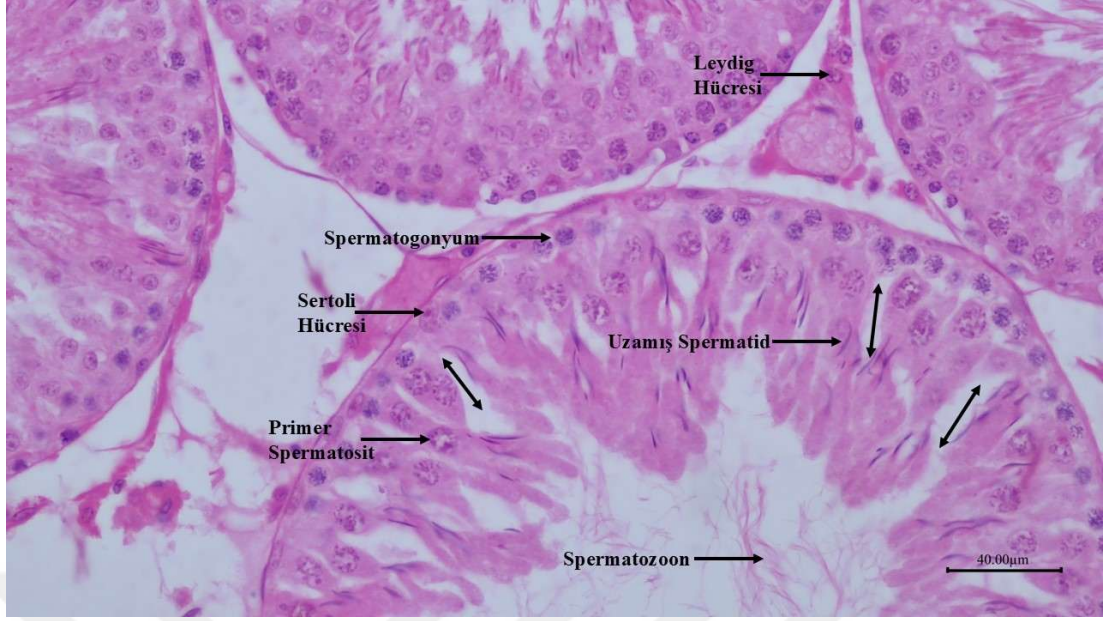
Resim 16: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (H&E, 200x)

*: Damar içi konjesyon, **: İnterstisyel ödem, Siyah ok: Vakuol, Siyah çember: Sperm retansiyonu, Siyah çift taraflı ok: Lümende azalmış spermatozoa



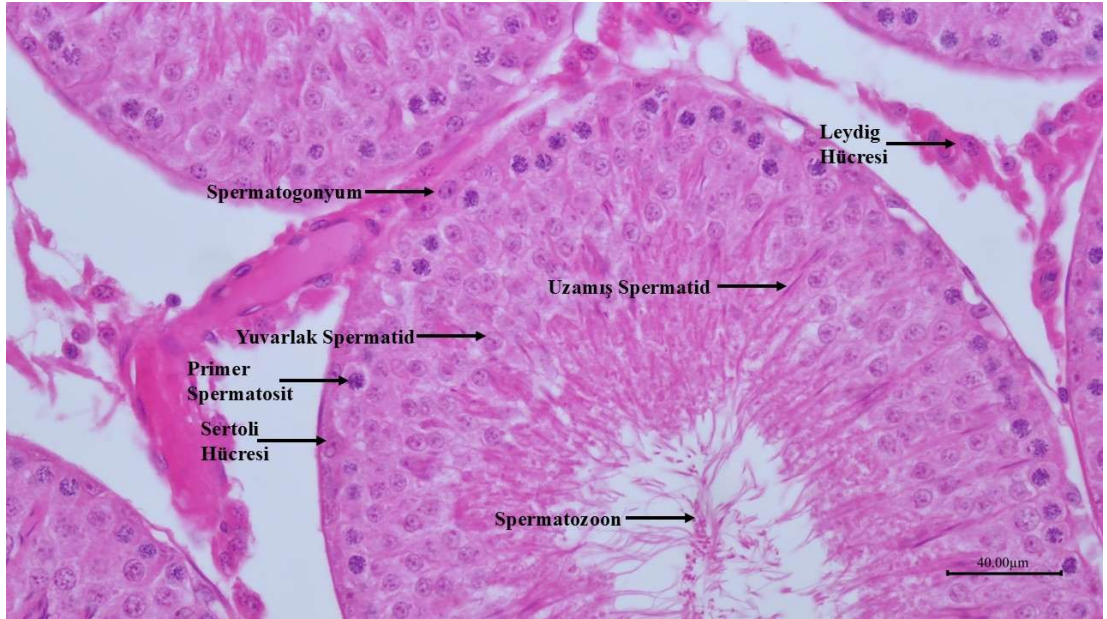
Resim 17: Kontrol Grubuna Ait Kesit (H&E, 400x)

Oklarla seminifer tübüle ve interstisyel alana ait hücreler gösterilmiştir.



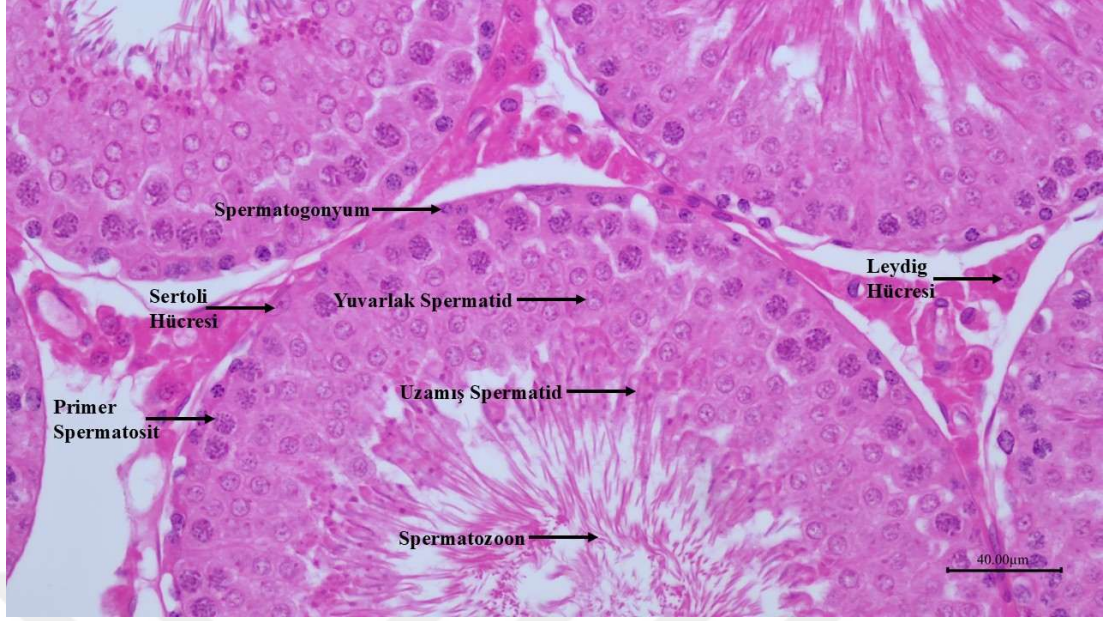
Resim 18: Cd Grubuna Ait Kesit (H&E, 400x)

Oklarla seminifer tübüle ve interstisyel alana ait hücreler gösterilmiştir. Çift başlı ok: Germinal epitelde ayrılma



Resim 19: THY Grubuna Ait Kesit (H&E, 400x)

Oklarla seminifer tübüle ve interstisyel alana ait hücreler gösterilmiştir.



Resim 20: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (H&E, 400x)

Oklarla seminifer tübüle ve interstisyel alana ait hücreler gösterilmiştir.

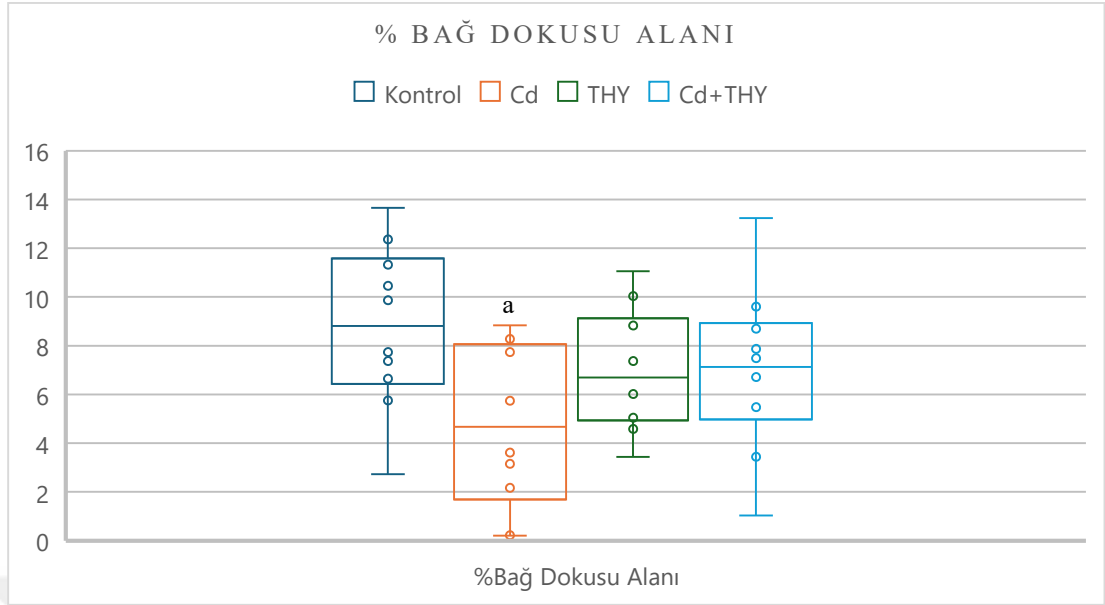
4.3.2. Masson Trikrom Boyalı Kesitlerin Histopatolojik ve Histomorfometrik Değerlendirilmesi

Masson trikrom boyalı kesitlerde bağ dokuyu gösteren mavi renkli alan yüzdesi ve tunika albuginea kalınlığı FIJI programı kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar gruplar arasında kıyas edildi. Tunika albuginea kalınlığı ölçümünde gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi. Bağ dokusu alanı yüzdesinde ise Cd grubunda kontrol grubuna göre belirgin azalma olması dışında gruplar arasında fark izlenmedi ($p=0,003$) (Tablo 17) (Şekil 33,34).

Tablo 17: Masson Trikrom ile Boyalı Kesitlerde % Bağ Dokusu Alanı ve Tunika Albuginea Kalınlığı

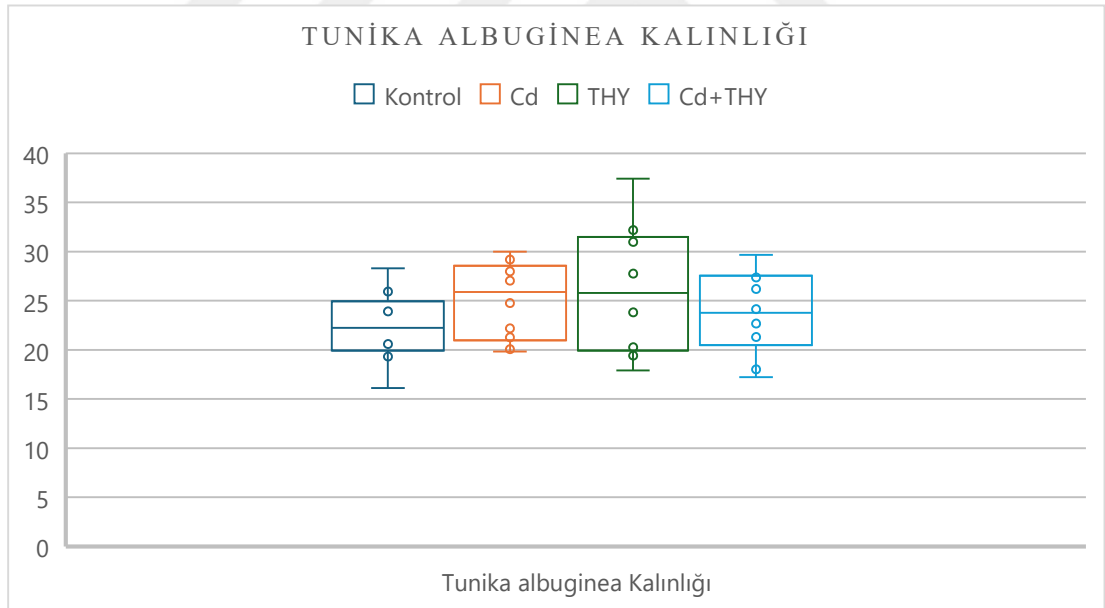
Masson Trikrom ile Boyalı Kesitlerde % Bağ Dokusu Alanı ve Tunika Albuginea Kalınlığı	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
% Bağ Dokusu Alanı	8,79±3,34	4,79±3,35 ^a	6,91±2,5	7,03±3,33
Tunika Albuginea Kalınlığı (µm)	22,33±3,66	25,06±3,93	26,11±6,71	23,80±4,15

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

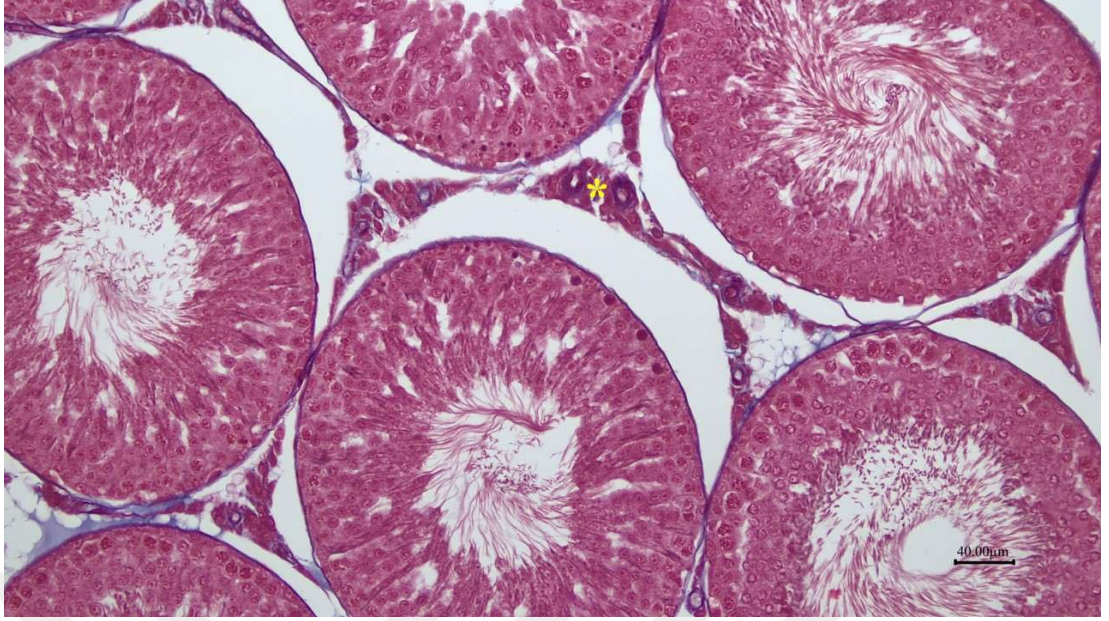


Şekil 33: Gruplara Ait % Bağ Dokusu Alanı Değerlendirmesi

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

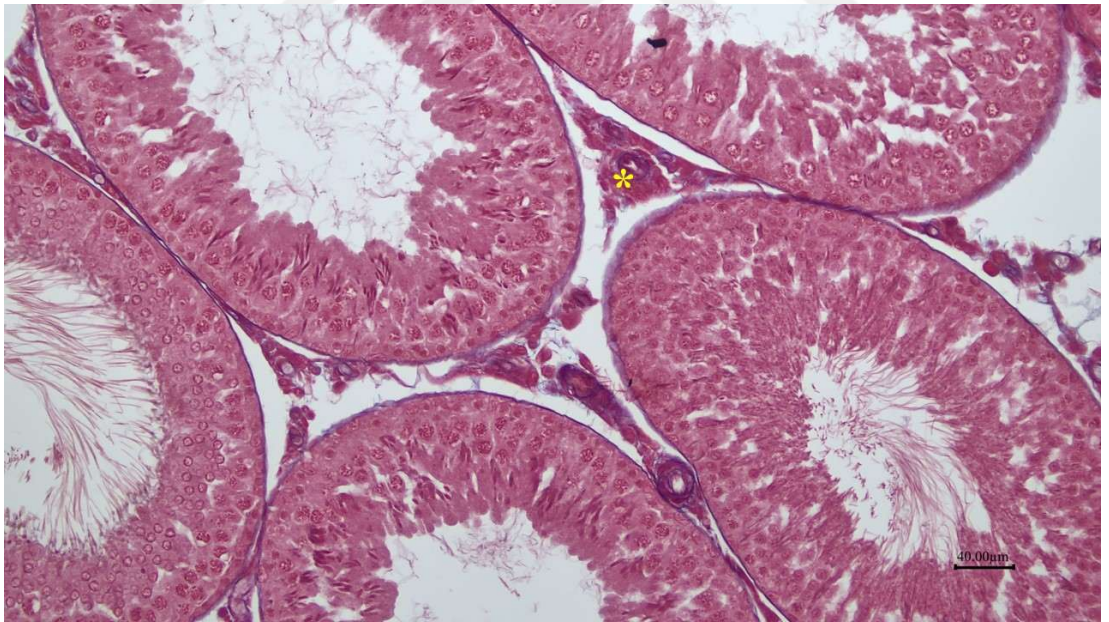


Şekil 34: Tunika Albuginea Kalınlığının Gruplara Ait Sonuçları



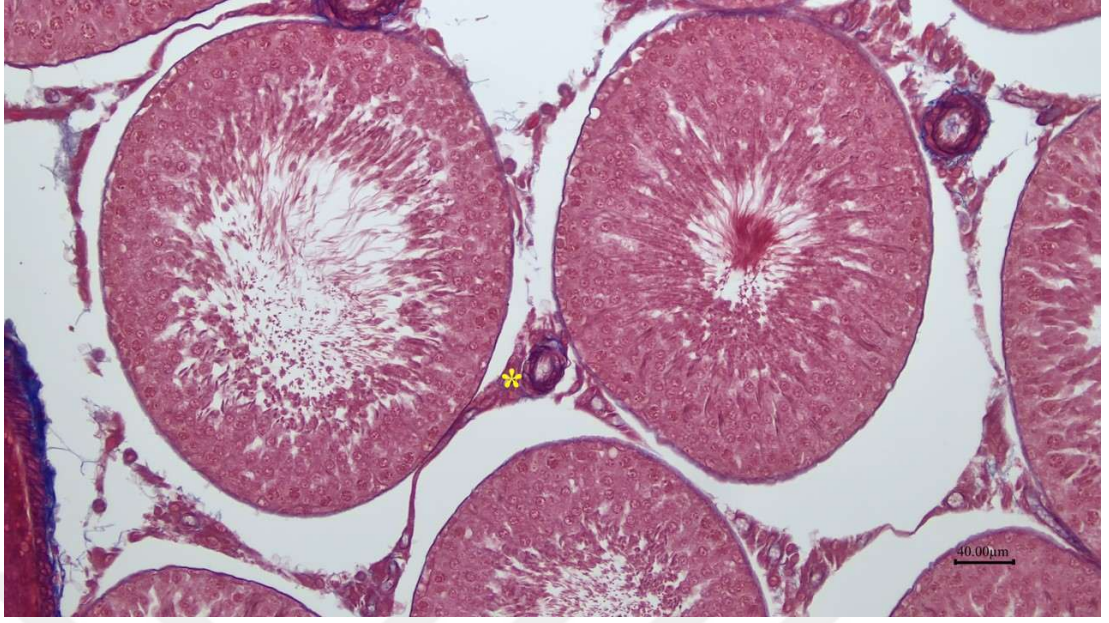
Resim 21: Kontrol Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 200x)

Sarı yıldız: İnterstisyel alan



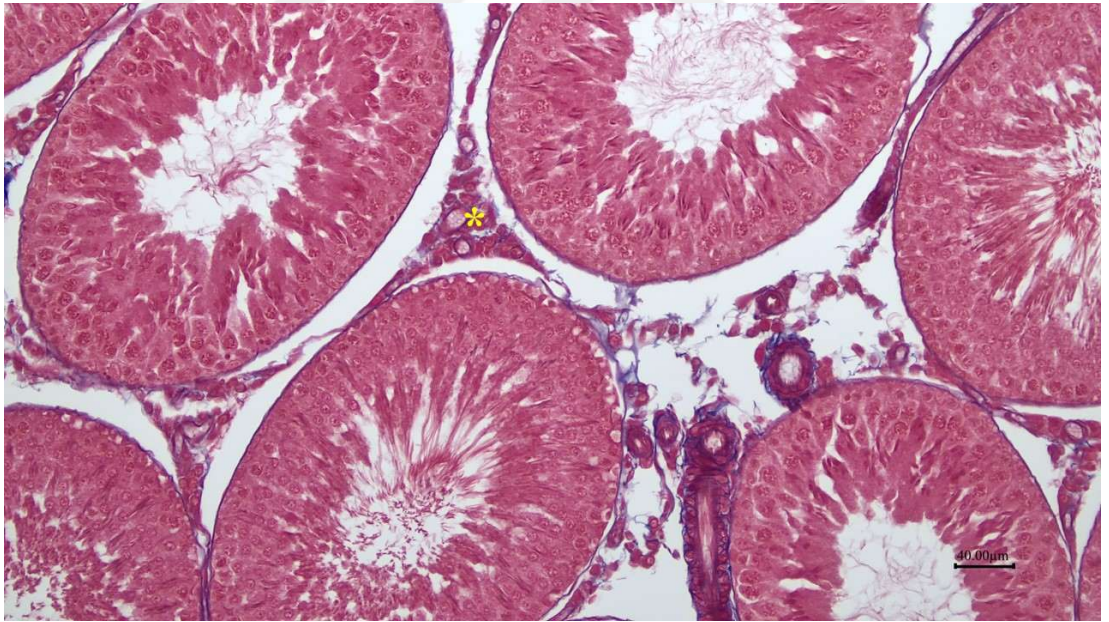
Resim 22: Cd Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 200x)

Sarı yıldız: İnterstisyel alan



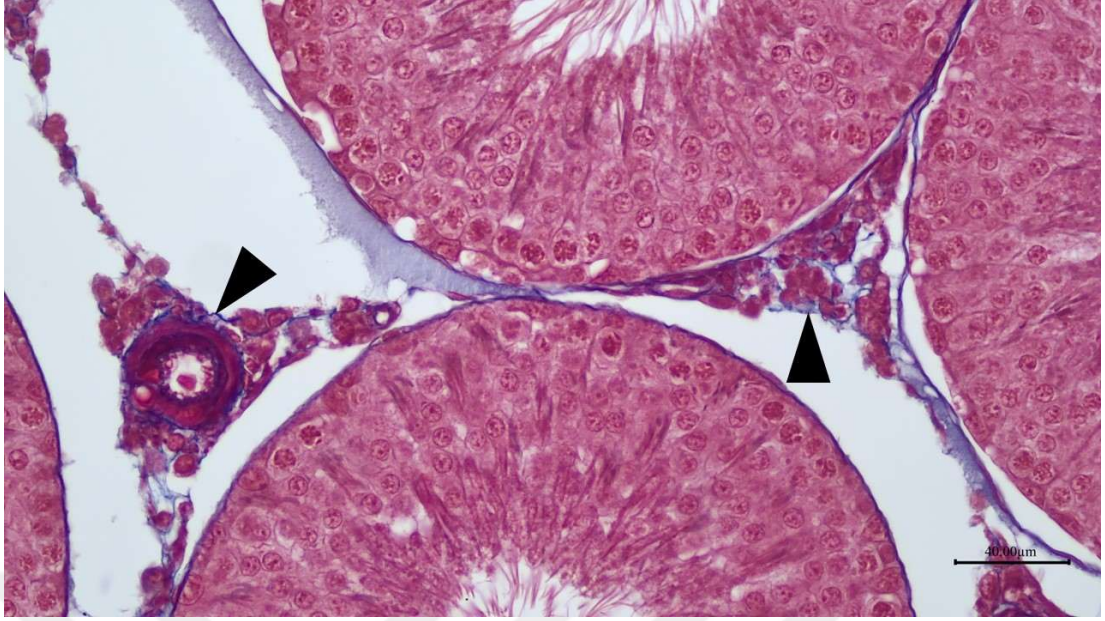
Resim 23: THY Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 200x)

Sarı yıldız: İnterstisyel alan



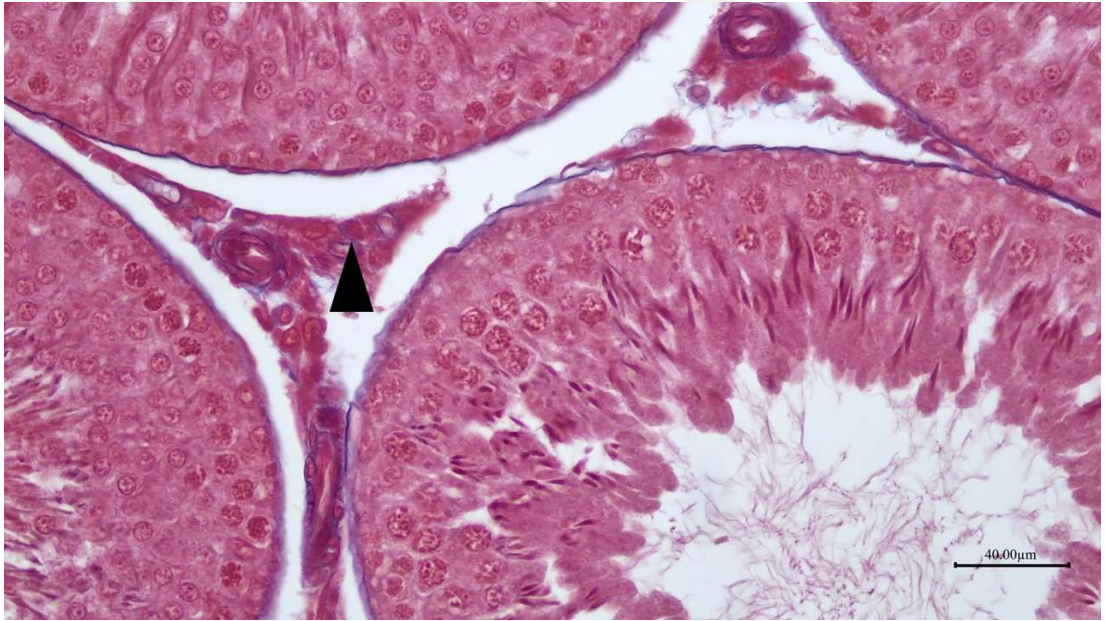
Resim 24: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 200x)

Sarı yıldız: İnterstisyel alan



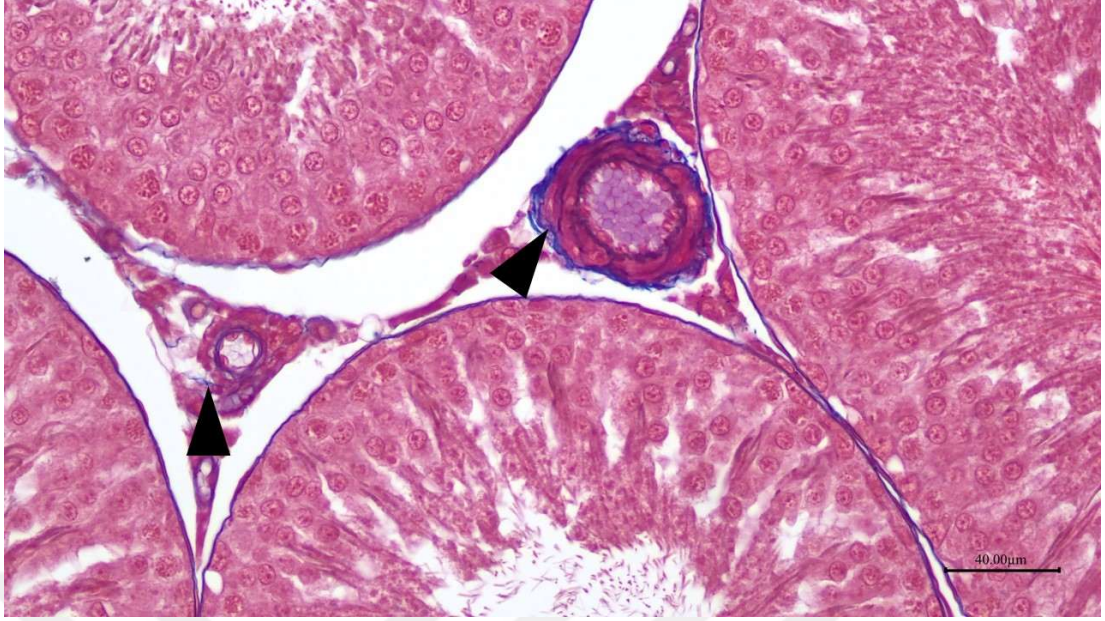
Resim 25: Kontrol Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 400x)

Siyah ok başı: Bağ dokusu lifleri



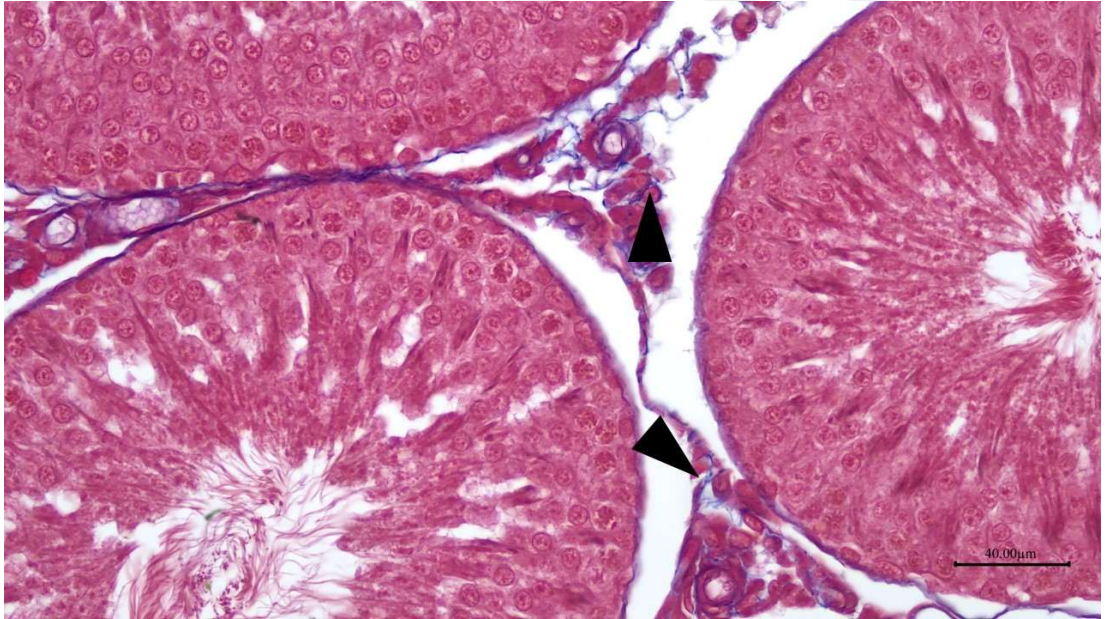
Resim 26: Cd Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 400x)

Siyah ok başı: Bağ dokusu lifleri



Resim 27: THY Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 400x)

Siyah ok başı: Bağ dokusu lifleri



Resim 28: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (Masson Trikrom Boyama, 400x)

Siyah ok başı: Bağ dokusu lifleri

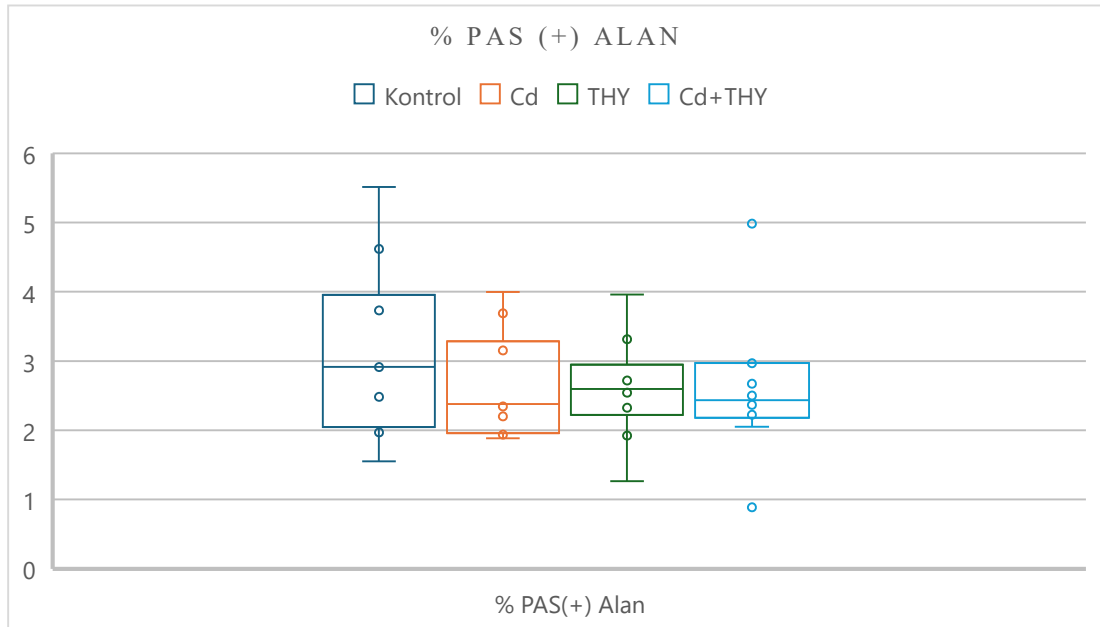
4.3.3. Periyodik Asit-Schiff Boyalı Kesitlerin Histopatolojik ve Histomorfometrik Değerlendirilmesi

PAS boyalı kesitlerde PAS (+)'liği gösteren fuşya renkli alan yüzdesi FIJI programı kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar gruplar arasında kıyas edildi. Gruplar arasında fark izlenmedi.

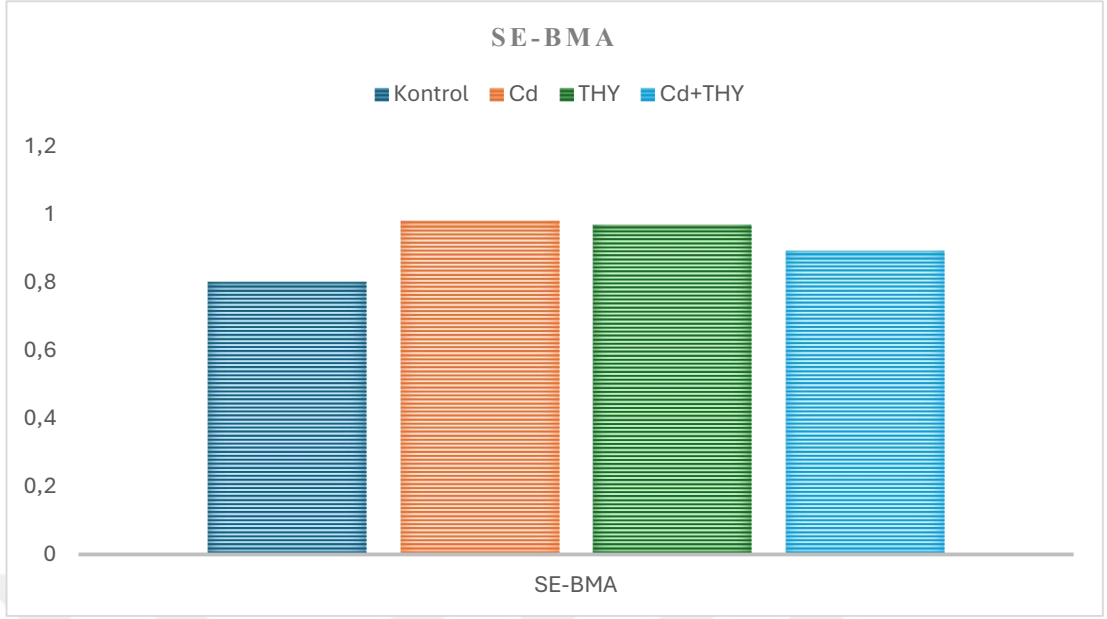
Ayrıca yine PAS boyalı kesitlerde SE-BMA yarıkantitatif olarak skorlanarak sonuçlar gruplar arasında kıyaslandı ve gruplar arasında anlamlı fark izlenmedi (Tablo 18) (Şekil 35,36).

Tablo 18: PAS Boyalı Kesitlerde % PAS (+) Alan ve SE-BMA

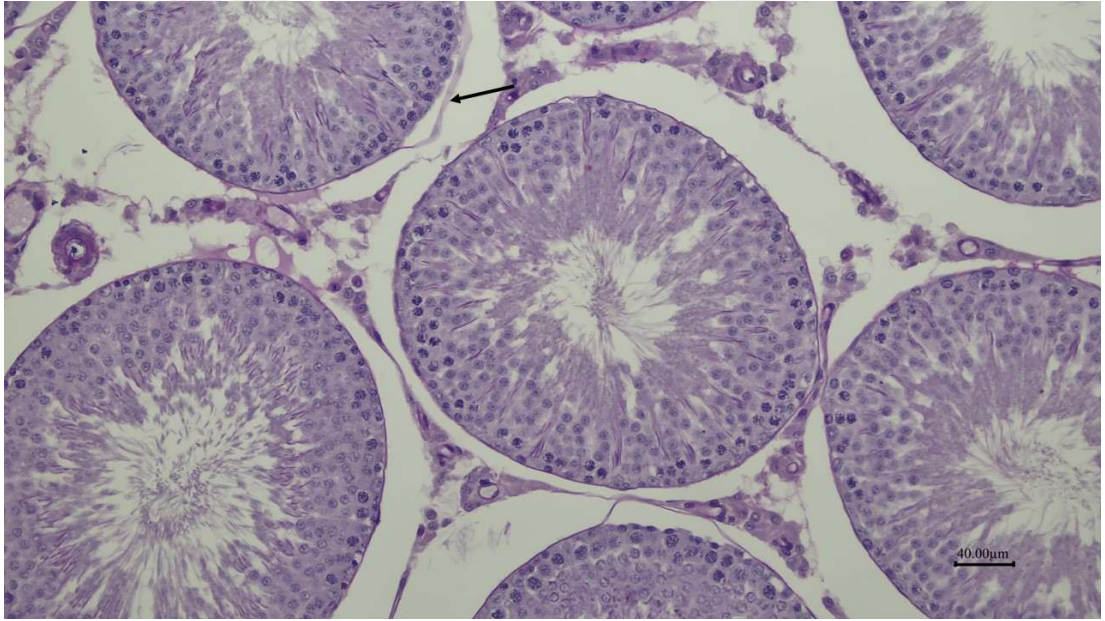
PAS Boyalı Kesitlerde % PAS (+) Alan ve SE-BMA	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
% PAS (+) Alan	3,07±1,23	2,6±0,75	2,59±0,72	2,59±1,02
SE-BMA	0,8±0,38	0,98±0,27	0,97±0,26	0,89±0,14



Şekil 35: Gruplara Ait % PAS (+) Alan Analizi

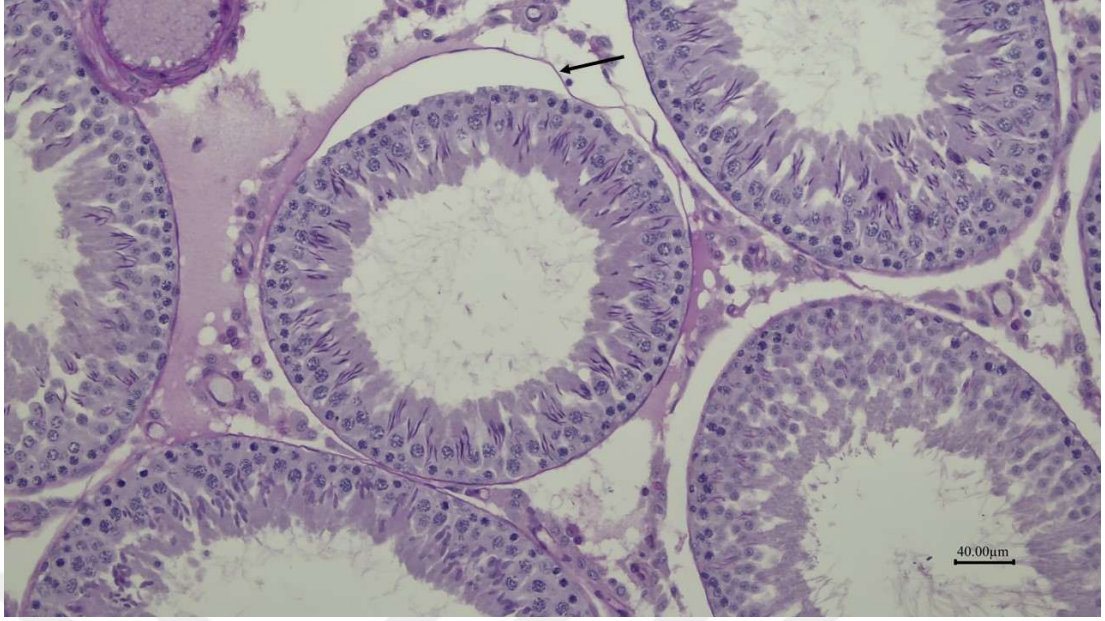


Şekil 36: Gruplara Ait SE-BMA Değerlendirme Sonuçları



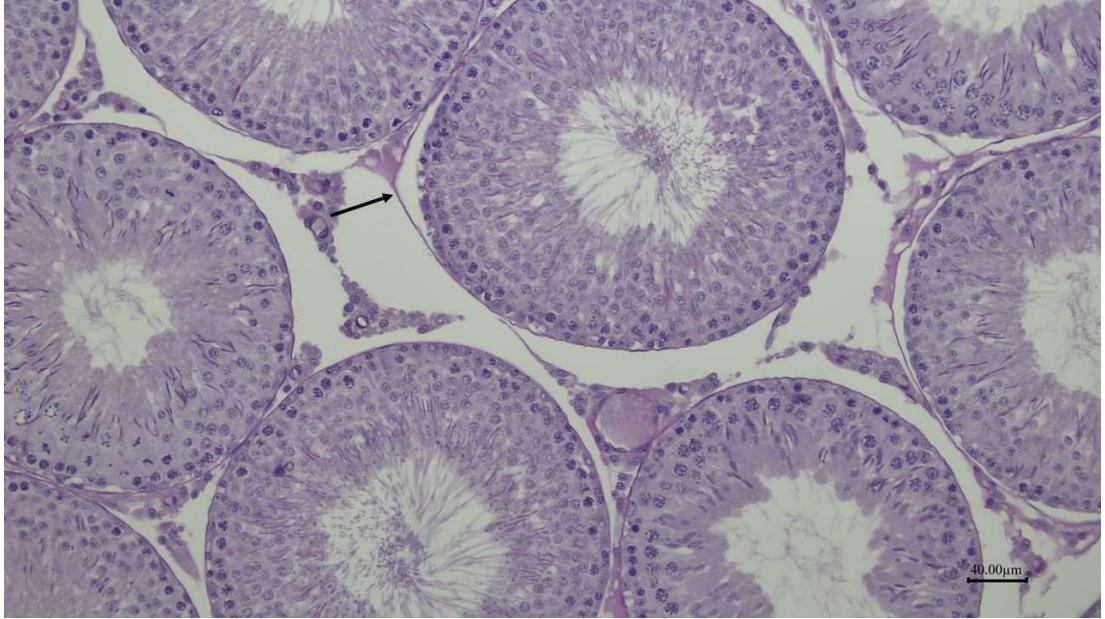
Resim 29: Kontrol Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 200x)

Siyah ok: Seminifer epitel ile bazal membran arasında açılma



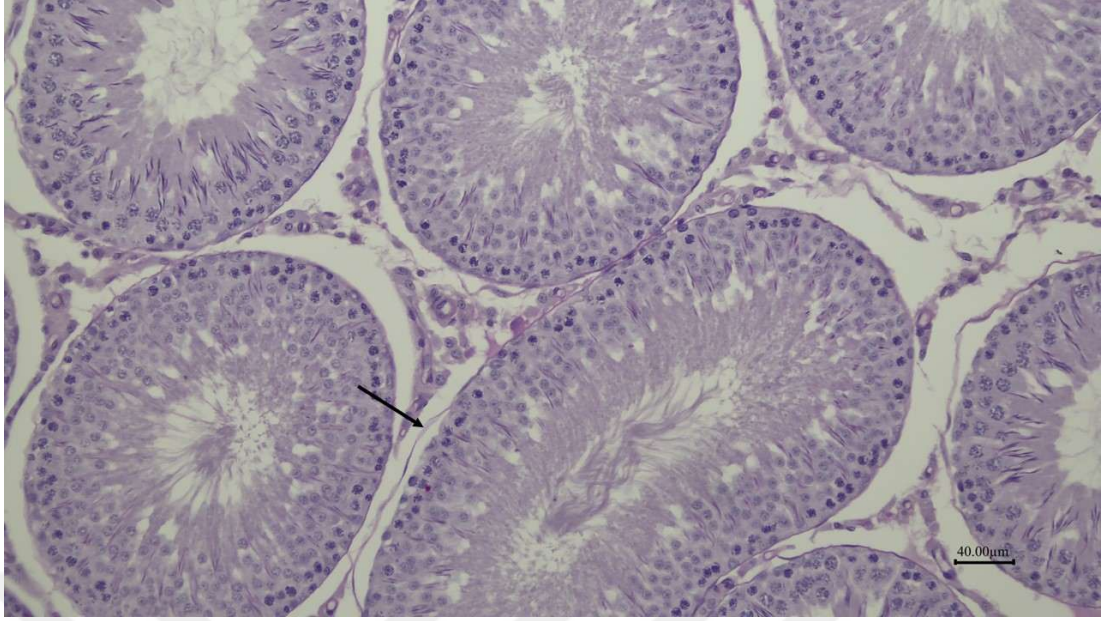
Resim 30: Cd Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 200x)

Siyah ok: Seminifer epitel ile bazal membran arasında açılma



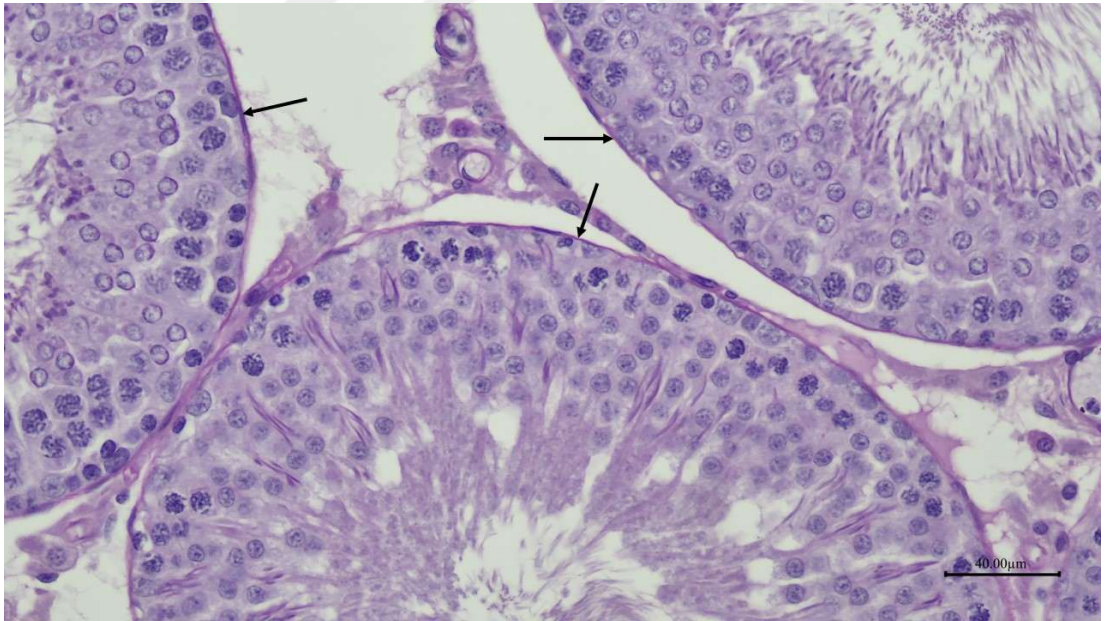
Resim 31: THY Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 200x)

Siyah ok: Seminifer epitel ile bazal membran arasında açılma



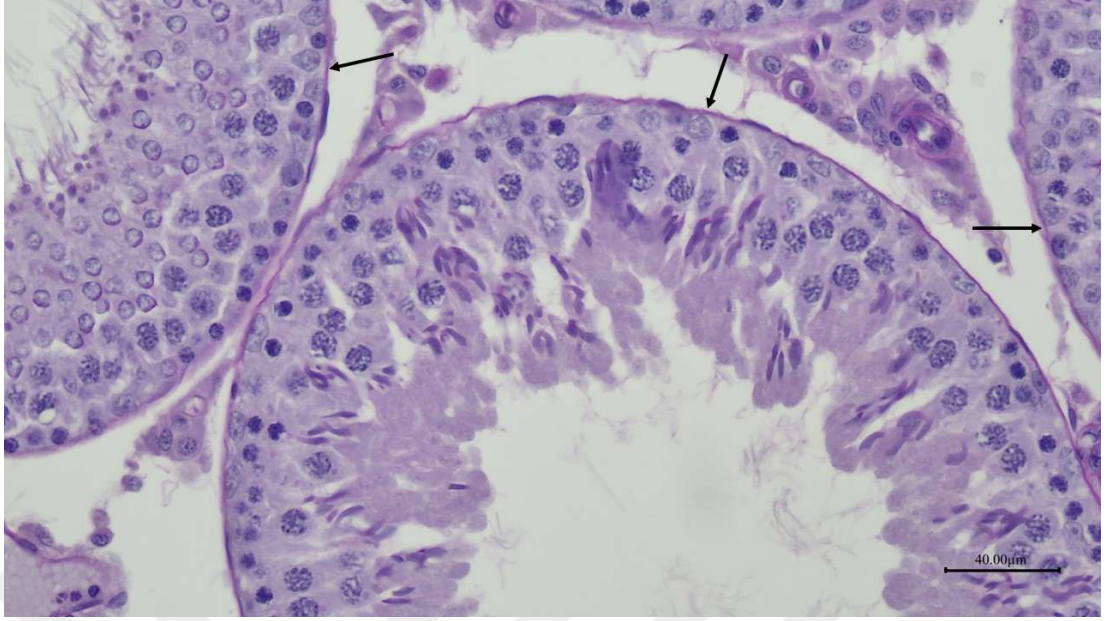
Resim 32: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 200x)

Siyah ok: Seminifer epitel ile bazal membran arasında açılma



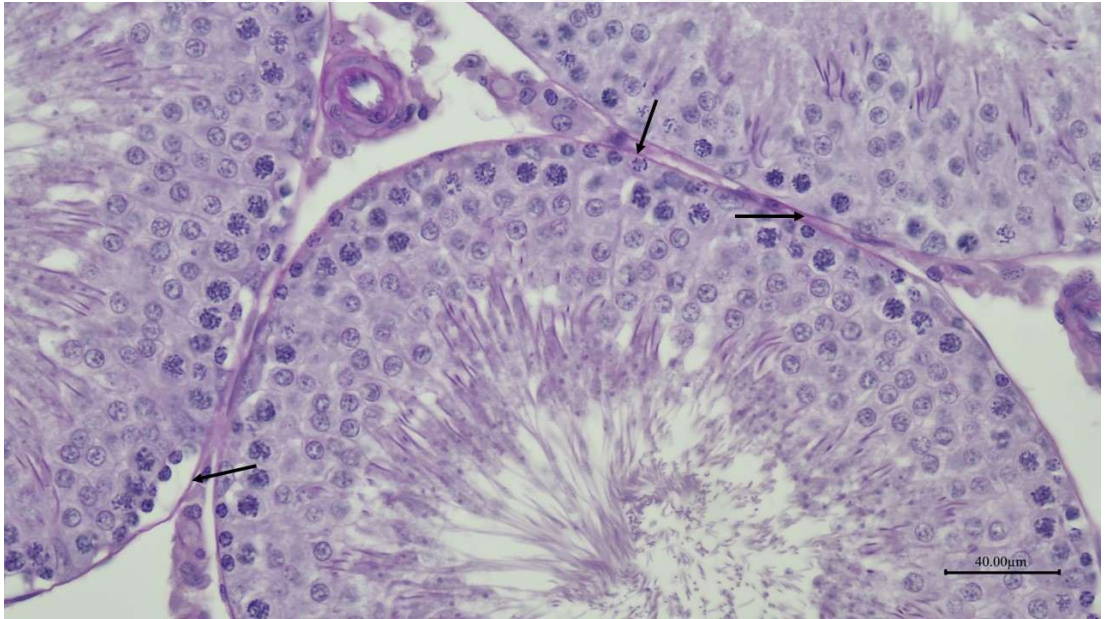
Resim 33: Kontrol Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 400x)

Siyah ok: Bazal membran



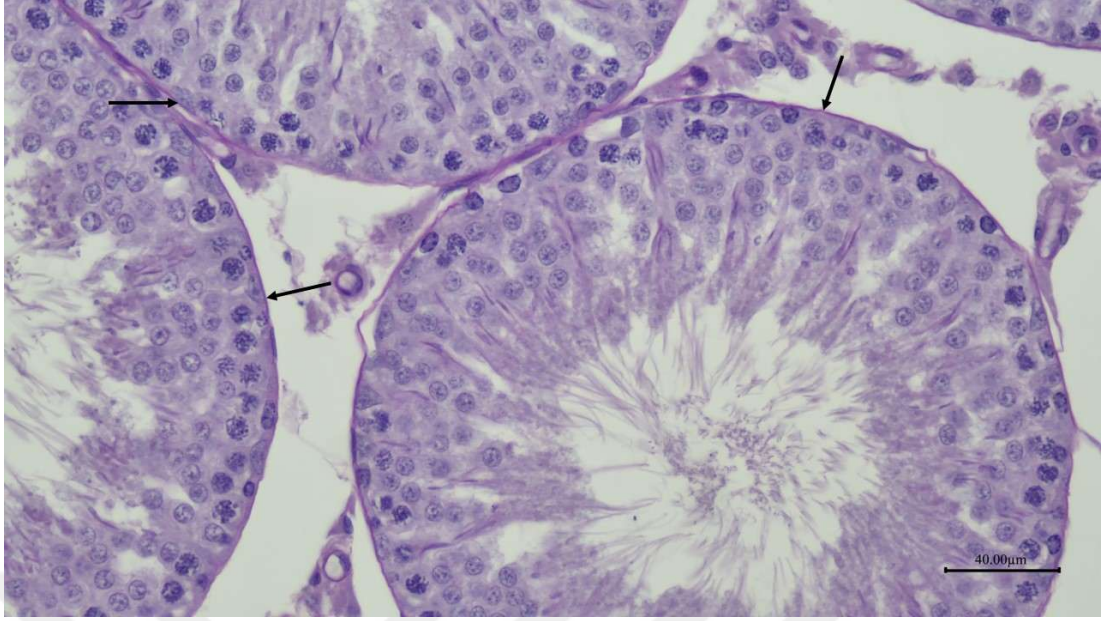
Resim 34: Cd Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 400x)

Siyah ok: Bazal membran



Resim 35: THY Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 400x)

Siyah ok: Bazal membran



Resim 36: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (PAS Boyama, 400x)

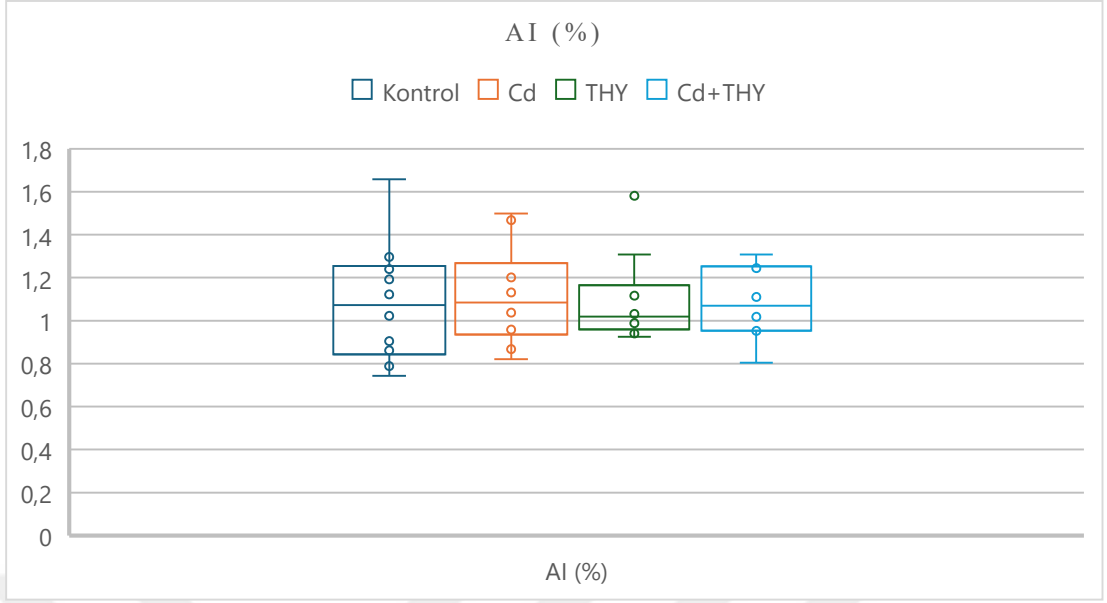
Siyah ok: bazal membran

4.4. İmmünohistokimyasal Analiz

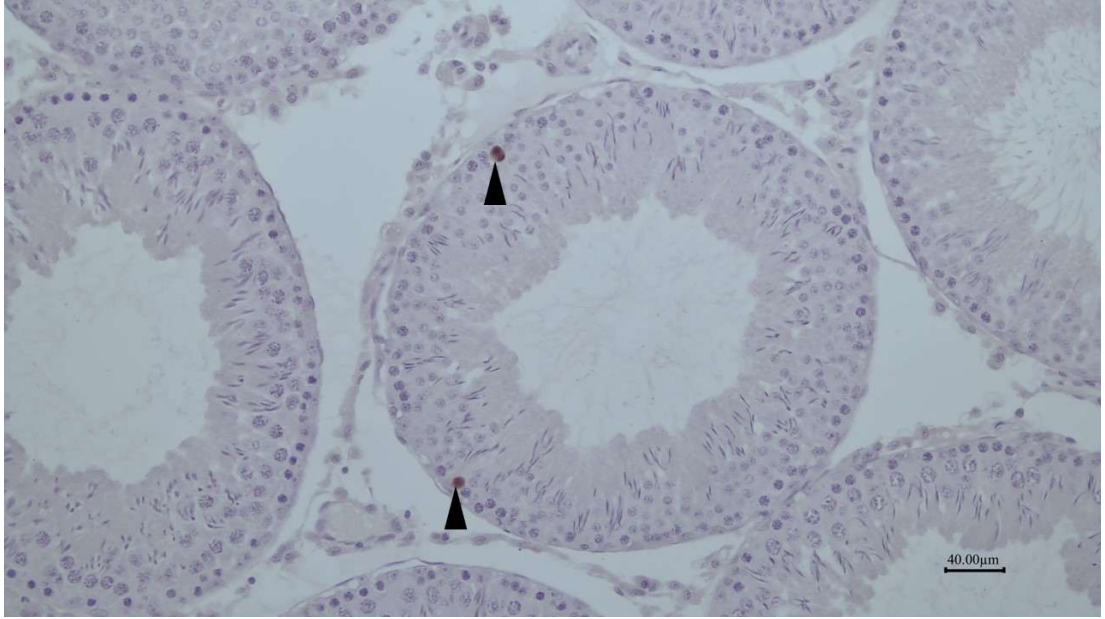
İmmünohistokimyasal analizde TUNEL boyası ile her bir denek için apoptotik indeks hesaplandı ve gruplar arasında istatistiksel kıyasa tâbi tutuldu. AI değeri açısından gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi (Tablo 19) (Şekil 37).

Tablo 19: Grupların AI (%) Analizi

AI (%)	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
AI (%)	1,08±0,27	1,10±0,23	1,08±0,20	1,08±0,16

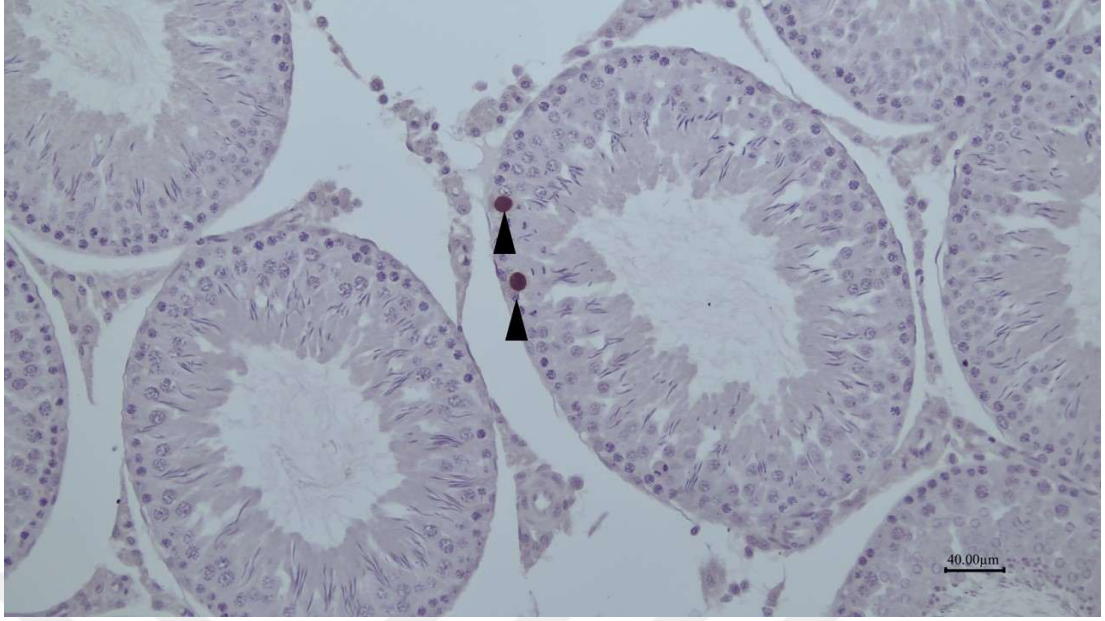


Şekil 37: Gruplara Ait AI (%) Analizi



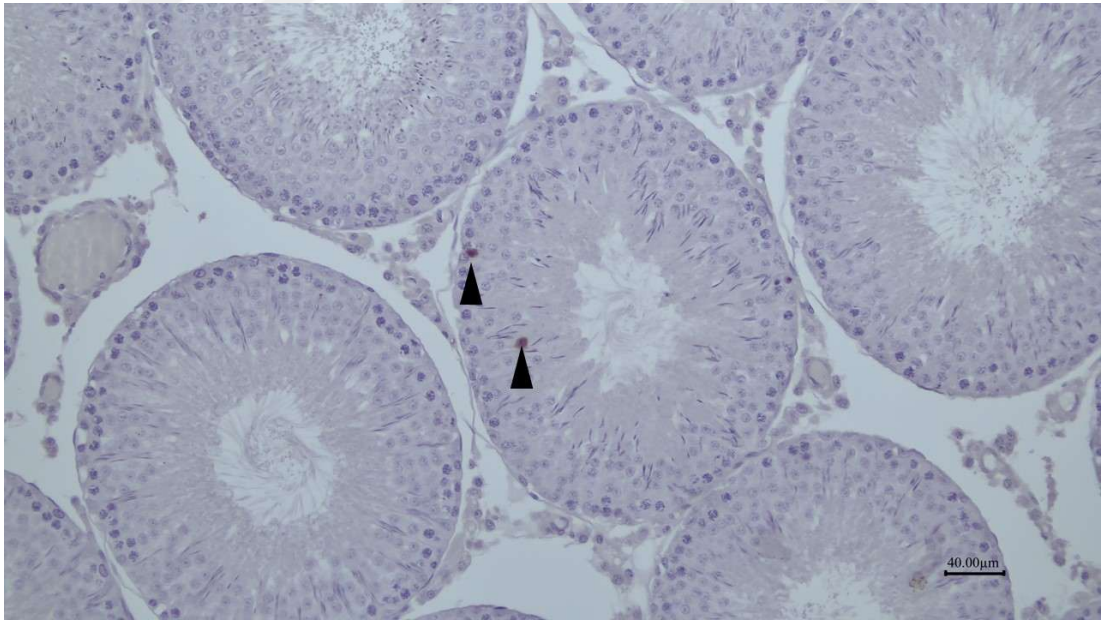
Resim 37: Kontrol Grubuna Ait Kesit (TUNEL Boyama, 200x)

Siyah ok başı: Apoptotik hücre



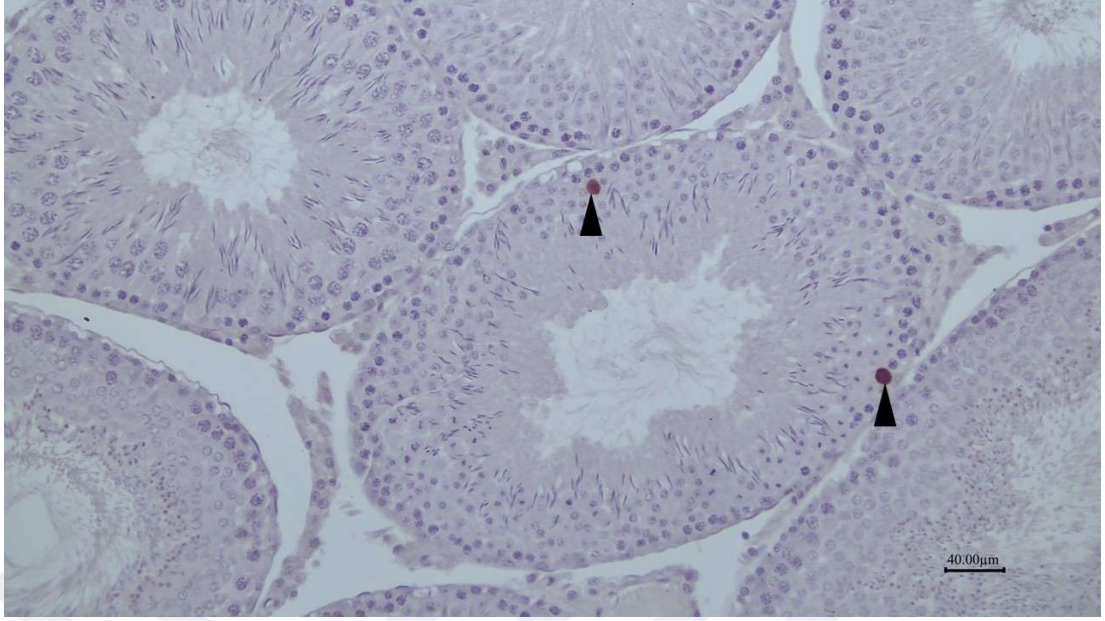
Resim 38: Cd Grubuna Ait Kesit (TUNEL Boyama, 200x)

Siyah ok başı: Apoptotik hücre



Resim 39: THY Grubuna Ait Kesit (TUNEL Boyama, 200x)

Siyah ok başı: Apoptotik hücre

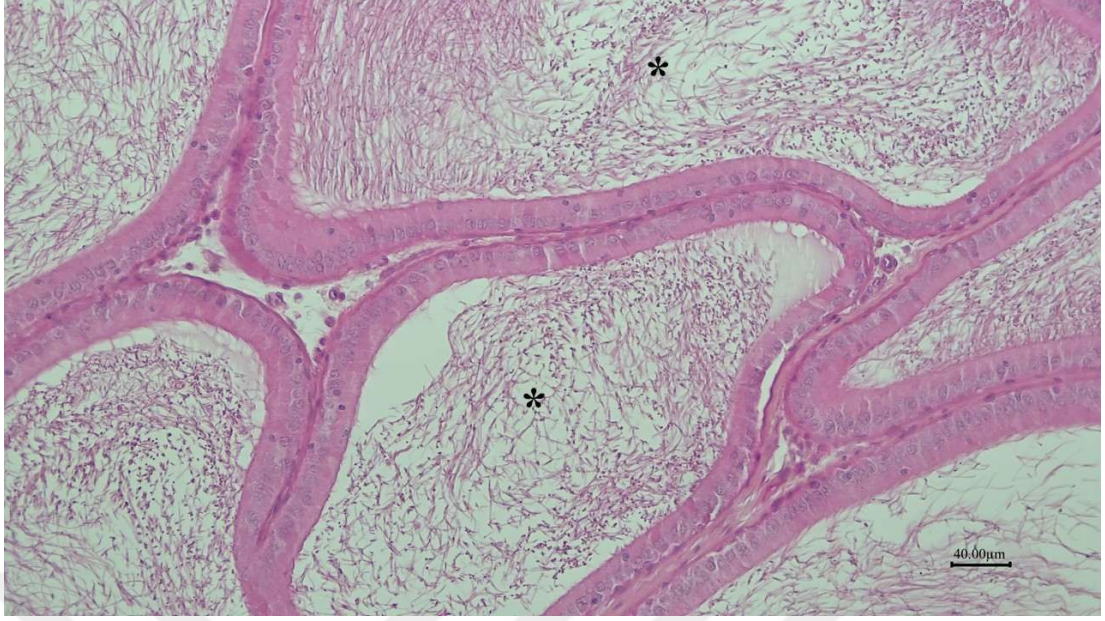


Resim 40: Cd+THY Grubuna Ait Kesit (TUNEL Boyama, 200x)

Siyah ok başı: Apoptotik hücre

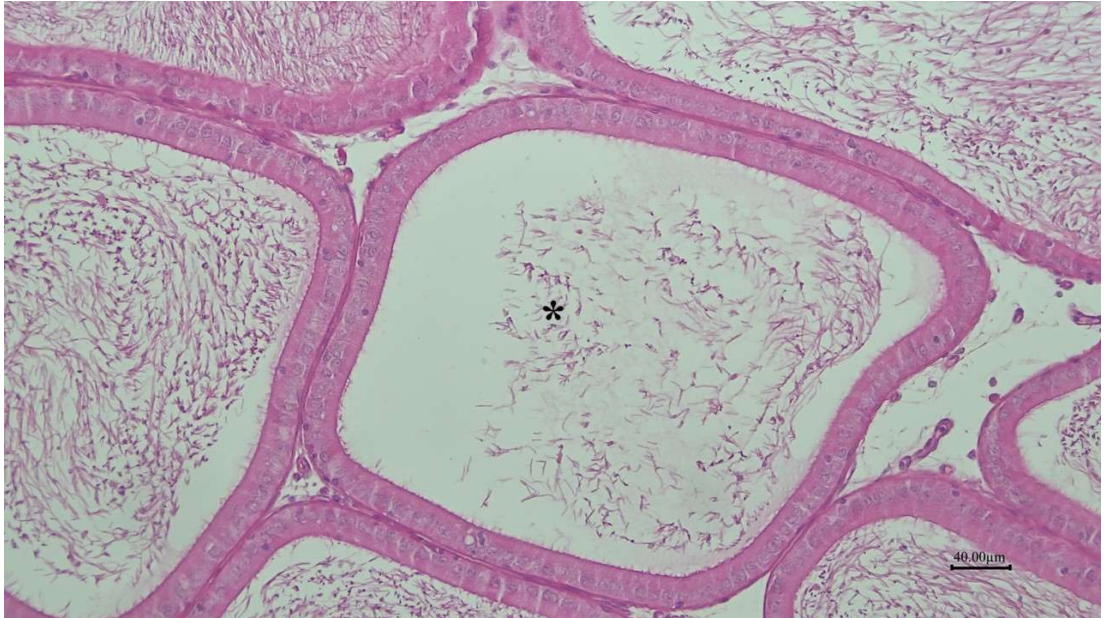
4.5. H&E Boyalı Epididimis Kesitlerinin Histopatolojik Bulguları

Epididimislerin H&E ile boyanmış kesitleri gruplar arasında mukayese edildiğinde Cd grubunda epididimis lümeninde azalmış spermatozoa görünümü mevcutken; diğer gruplarda kontrole benzer şekilde normal tübül yapısı ve içeriği gözlemlendi.



Resim 41: Kontrol Grubuna Ait Epididimis Kesiti (H&E, 200x)

*: Lümen içerisindeki spermatozoa yığını



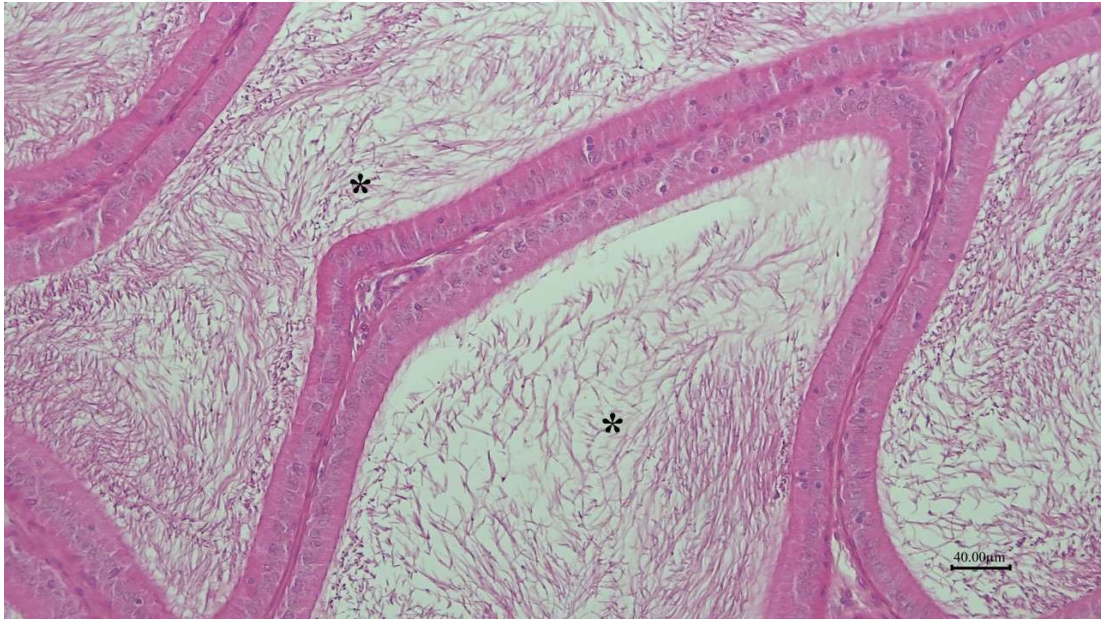
Resim 42: Cd Grubuna Ait Epididimis Kesiti (H&E, 200x)

*: Lümen içerisindeki spermatozoa yığını. Cd grubunda azalmış olarak gözlenmektedir.



Resim 43: THY Grubuna Ait Epididimis Kesiti (H&E,200x)

*: Lümen içerisindeki spermatozoa yığını



Resim 44: Cd+THY Grubuna Ait Epididimis Kesiti (H&E, 200x)

*: Lümen içerisindeki spermatozoa yığını

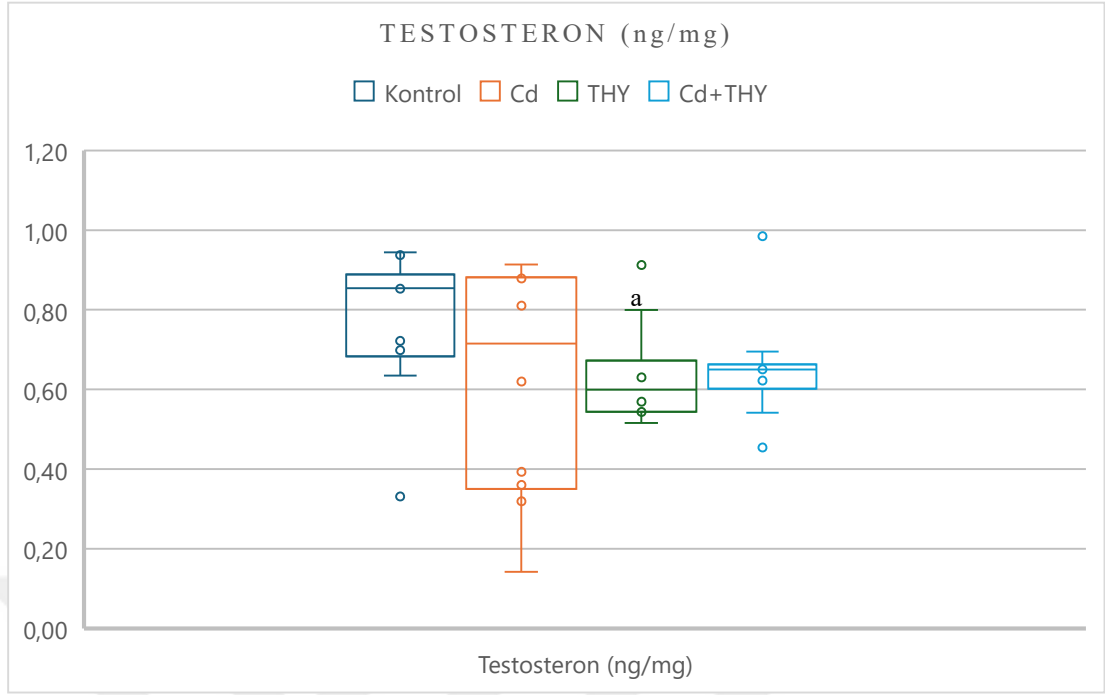
4.6. Biyokimyasal Analiz

Biyokimyasal olarak testis dokusunda T, kaspaz-3, TNF-alfa, TOS, TAS, OSI seviyeleri ve GPX aktivitesi ölçümleri yapıldı. T seviyesinin THY grubunda kontrol grubuna göre belirgin olarak azaldığı görüldü ($p=0,029$). Kaspaz-3 seviyesi için gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. TNF-alfa seviyesi Cd+THY grubunda kontrol, Cd ve THY gruplarına göre belirgin olarak yüksekti (sırasıyla $p<0,001$; $p=0,004$; $p=0,019$). TOS değerleri THY ve Cd+THY gruplarında kontrole göre düşük seyrederken (sırasıyla $p=0,011$; $p=0,035$); TAS değerleri Cd+THY grubunda kontrol, Cd ve THY gruplarına göre anlamlı olarak yüksekti (sırasıyla $p=0,011$; $p<0,001$; $p=0,003$); TOS ve TAS sonuçları üzerinden hesaplanan OSI değeri ise Cd+THY grubunda kontrol ve Cd gruplarına göre belirgin olarak düşük seyretmekteydi (sırasıyla $p<0,001$; $p=0,001$). GPX aktivite ölçüm sonuçlarında ise THY grubunda kontrol Cd ve Cd+THY grubuna göre anlamlı artış gözlemlendi (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$; $p=0,002$) (Tablo 20) (Şekil 38-44).

Tablo 20: Deney Gruplarına Ait Biyokimyasal Parametrelerin Analizi

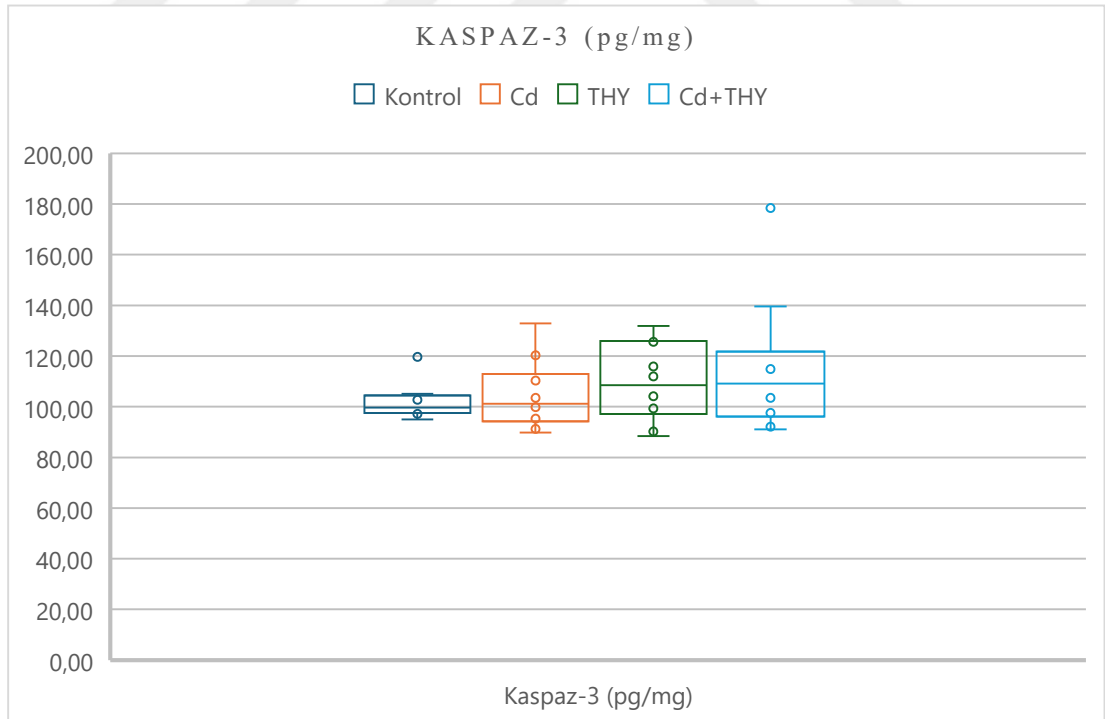
Biyokimyasal Parametreler	Kontrol Ort±SD	Cd Ort±SD	THY Ort±SD	Cd+THY Ort±SD
T (ng/mg)	0,77±0,18	0,61±0,29	0,63±0,12 ^a	0,65±0,13
Kaspaz-3 (pg/mg)	101,85±7,05	104,56±13,38	109,95±15,19	114,80±26,63
TNF-alfa (pg/mg)	2,65±0,27	2,8±0,3	2,86±0,4	3,5±0,65 ^{a,b,c}
TOS (μmol/g)	1,55±0,25	1,39±0,25	1,21±0,23 ^a	1,33±0,16 ^a
TAS (mmol/g)	0,18±0,02	0,17±0,01	0,17±0,02	0,21±0,02 ^{a,b,c}
OSI	84,15±8,91	80,83±12,36	69,82±21,78	61,7±8,77 ^{a,b}
GPX/U	1,46±0,14	1,55±0,14	1,88±0,19 ^{a,b}	1,58±0,14 ^c

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), c: THY grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)

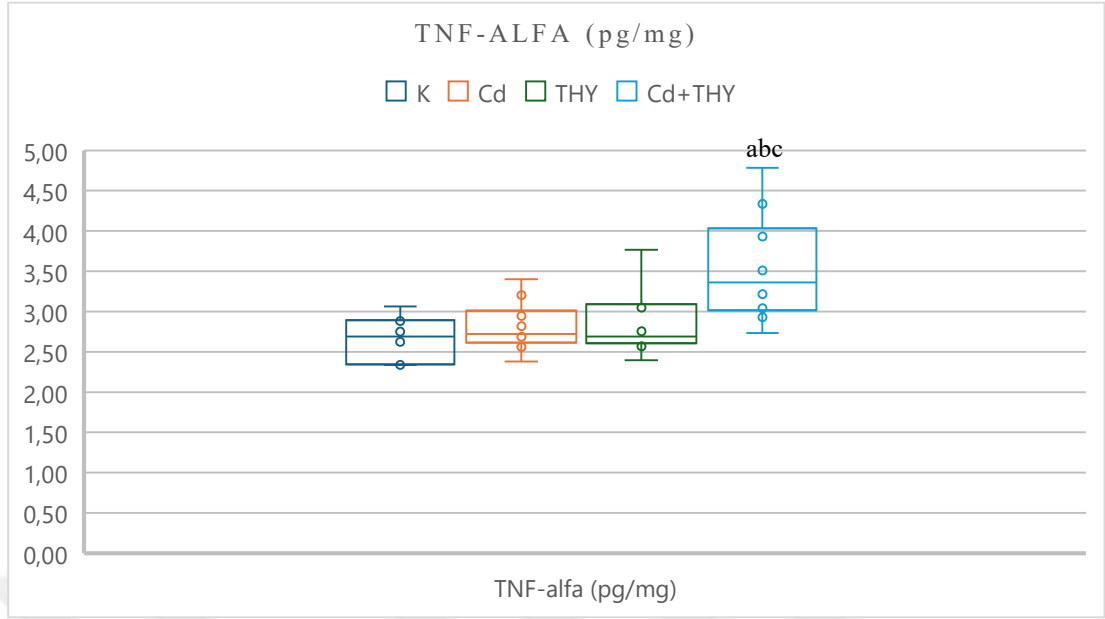


Şekil 38: Deney Gruplarının Doku T seviyeleri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

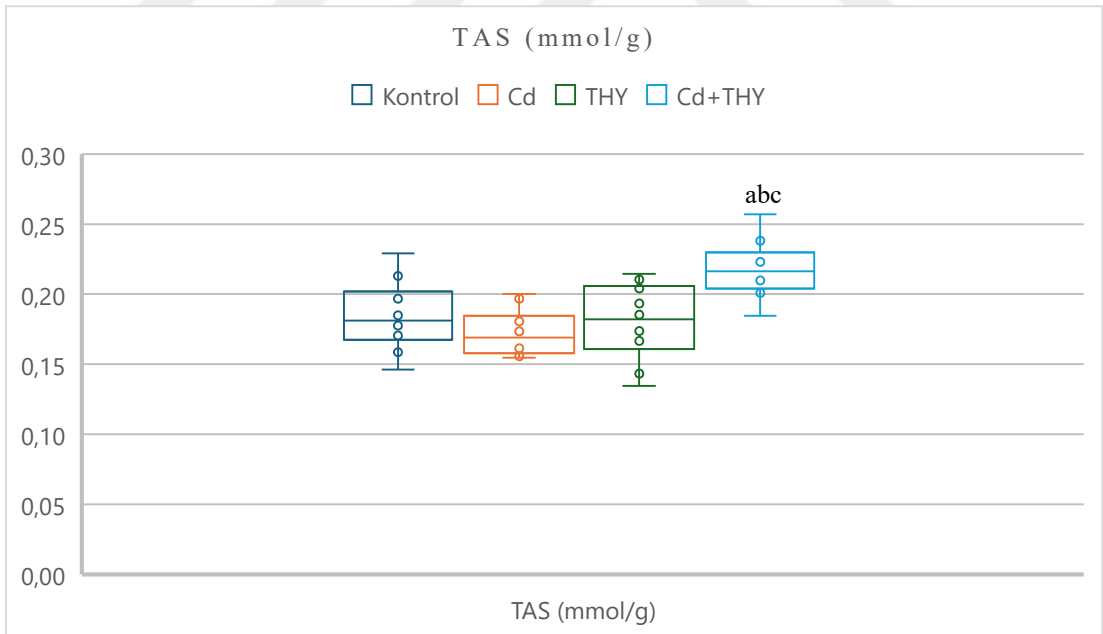


Şekil 39: Deney Gruplarının Doku Kaspaz-3 Seviyeleri



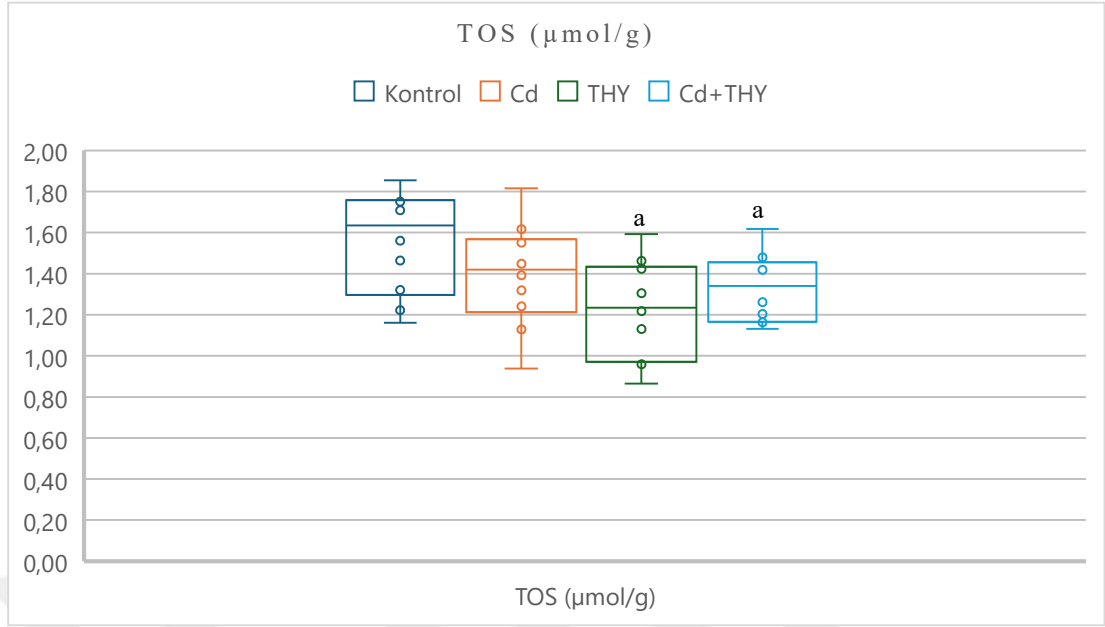
Şekil 40: Deney Gruplarının Doku TNF-alfa Seviyeleri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), c: THY grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



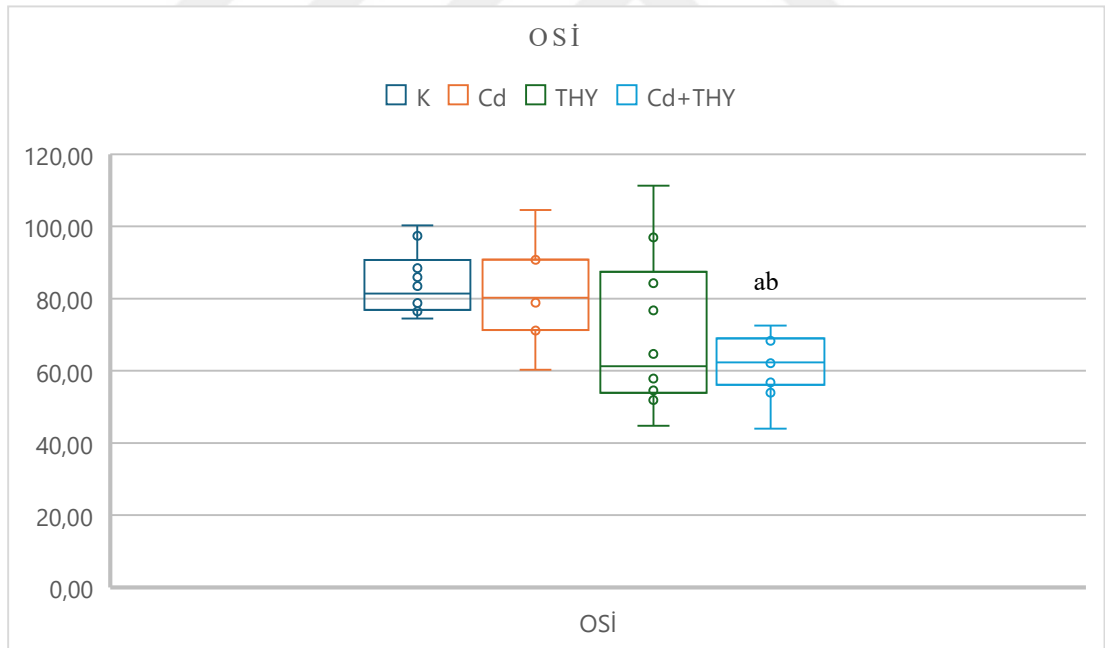
Şekil 41: Deney Gruplarının Doku TAS Seviyeleri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), c: THY grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



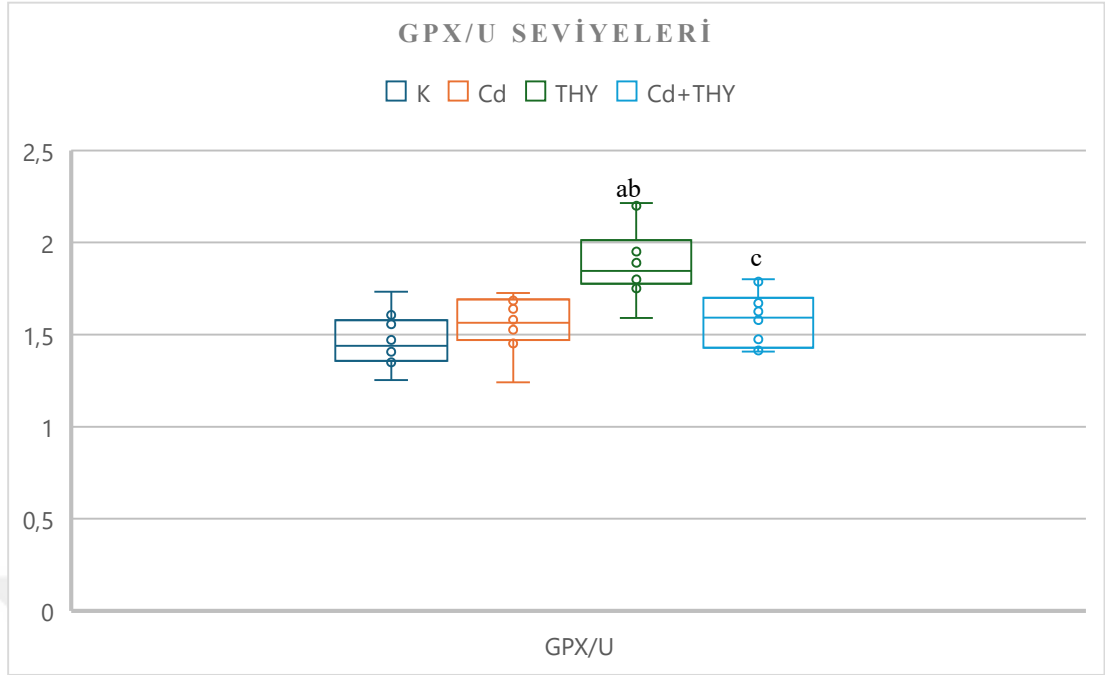
Şekil 42: Deney Gruplarının Doku TOS Seviyeleri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



Şekil 43: Deney Gruplarının OSI Seviyeleri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p<0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p<0,05$)



Şekil 44: Deney Gruplarına Ait GPX/U Seviyeleri

a: Kontrol grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$), b: Cd grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$), c: THY grubuna göre anlamlı ($p < 0,05$)

5. TARTIŞMA

Üreme sisteminde görülen bir çeşit hastalık olan infertilite, en az 12 ay boyunca düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen klinik gebeliğe ulaşamama olarak tanımlanmaktadır (143). Çiftlerin yaklaşık %15'i infertiliteden etkilenirken erkek faktörlü infertilite bu oranın %20'sinde sadece erkek partnerden kaynaklanmak üzere toplamda %50'sinde rol oynamaktadır. Erkek infertilitesi ile onkolojik, kardiyovasküler, otoimmün ve diğer kronik hastalıklar gibi medikal problemlerin varlığı arasındaki ilişkiyi inceleyen kayda değer sayıda yayın bulunmaktadır (3). Bunun yanında semen parametrelerinde yıllar geçtikçe görülen kötüleşme; bozuk diyet, obezite oranlarında artma ve çevresel toksinlere maruziyet ile ilişkilendirilmiştir (144).

Çevresel kirleticilerin önemli bir grubunu ise ağır metaller oluşturmaktadır. Cd de çeşitli türlerde testise olan toksisitesi kanıtlanmış olan bir çeşit ağır metaldir (145). Günümüzde kadmiyumun önemli bir kısmı nikel-Cd pillerde yer almaktadır. Cd, sanayi ve insan kaynaklı etkinlikler sonucunda çevreye yayılmakta ve sigara içmeyen bireylerde başlıca maruziyet beslenme yoluyla olmaktadır (69). Yarılanma ömrü insanlarda 13 ile 30 yıl arasında değişerek oldukça uzun bir süreyi kapsamaktadır (71). Kadmiyumun Sertoli hücresi, Leydig hücresi ve spermatozoa üzerinde direkt olarak reprotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir. Kadmiyumun bu etkiye pro-apoptotik olarak da davranabilen ROS'u indirekt olarak artırarak veya inflamatuvar süreç ile hipotalamo-hipofizer aksı bozarak ulaştığı düşünülmektedir. Özellikle biriken yüksek miktarda ROS, antioksidanlar tarafından uzaklaştırılmazsa ciddi hasarla sonuçlanabilmektedir. Her ne kadar farklı türlerde yapılan çalışmalarda çeşitli antioksidanlar ile Cd hasarı üzerinde iyileşmeler görülmüş olsa da daha derin analizlere her zaman ihtiyaç bulunmaktadır (145).

Timol, pek çok bitki kaynaklı diyet fitokimyasalı arasında olumlu fizikokimyasal ve farmakolojik özellikleri sayesinde öne çıkan bir antioksidandır (12). Timol başta kekik esansiyel yağı olmak üzere çeşitli bitkilerde bulunan monoterpen fenolik bir bileşendir (13). Timolün antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar, immünmodülatör etkilere sahip olduğu bilinmektedir (146). Deney hayvanlarında yapılan bir çalışmada timolün sperm konsantrasyonunu ve motilitesini artırdığı; ölü

sperm oranını da belirgin azalttığı görülmüştür (17). Ayrıca timol, FDA tarafından güvenli bir madde olarak belgelenmiştir (18).

Tüm bu bilgiler ışığında literatür taraması yapıldığında timolün testis üzerindeki etkilerinin incelendiği çok az sayıda yayına ulaşırken; timolün Cd tarafından oluşturulan testis toksisitesine karşı etkisinin incelendiği hiçbir yayına ulaşamadık. Bu nedenle kadmiyumun subkronik maruziyeti ile oluşabilecek testis toksisitesine karşı subkronik timol tedavisinin etkilerini histolojik ve biyokimyasal olarak araştırdık.

Kadmiyumun vücut kütlesi üzerine etkilerini araştıran bir çok çalışma bulunmaktadır (3–5, 7, 10, 147). Bu çalışmaların bir kısmında Cd ile kontrol grubu arasında vücut kütlesi veya kilo alımı açısından anlamlı fark gözlenmemiştir (4, 5, 10). Diğer bir kısmı ise deney sonu vücut kütlesinde veya kilo artış hızında azalma tanımlamışlardır (3, 7, 147). Biz de çalışmamızda vücut kütlesi tartımlarını haftalık olarak gerçekleştirdik ve verileri gruplar arasında kıyaslamaya tâbi tuttuk. Deneklerimizde deneyin başı ile sonu arasında kilo kaybı yaşanmazken belli haftalarda gruplar arasındaki farklar belirginleşti. Anlamlı farkları peşpeşe en az 3 hafta devam etmesi durumunda dikkate aldık. 8-11. haftalarda anlamlı olmak üzere 3. haftadan deney sonuna kadar Cd grubundaki sıçanların ağırlığını kontrol grubuna kıyasla literatürle uyumlu biçimde düşük bulduk. Çalışmamızda bazı haftalarda istatistiksel anlamlılık bulunmasa da Cd grubunda tespit ettiğimiz kilo artış hızındaki azalmanın Xie ve ark.'nın çalışmalarına benzer şekilde kadmiyumun bağırsak mukozal membranına hasar vermesi nedeniyle oluşmuş olabileceğini düşünüyoruz (148).

Literatürde timolün vücut ağırlığını azalttığını veya etkilemediğini söyleyen çalışmalar mevcuttur (11, 13, 149). Çalışmamızda 3. haftadan deney sonuna kadar THY grubundaki sıçanların vücut kütlesi kontrol grubuna kıyasla düşüktü. Çalışmamızda timolün, Haque ve ark.'nın belirttiği gibi kilo alımını azaltıcı şekilde davranmış olabileceğini düşünüyoruz (149). Cd+THY grubunda; 6. haftadan itibaren deney sonuna kadar Cd grubuna göre, neredeyse deney boyunca da THY grubuna göre vücut ağırlığında belirgin bir yükseklik gözlemlediğimiz için, timolün vücut kütlesi üzerine etkisinin Cd toksisitesi ile birlikte olduğunda tek başına kullanımından farklı bir karaktere büründüğünü söyleyebiliriz.

Cd veya timolün deney sonu testis ağırlığına veya GSI'ye etkisini araştıran birçok çalışma literatürde mevcuttur (3–7, 11, 13, 108, 147, 150). Biz de çalışmamızda bu çalışmalar ile korele olarak kadmiyumun testis ağırlığını kontrole kıyasla azalttığını gözlemledik (3–7, 108, 147, 150). Çalışmamızda THY grubunda da deney sonu testis ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı düşüş mevcuttu. Ancak literatüre benzer şekilde THY grubu ile kontrol arasında GSI açısından farklılık görülmedi (11, 13). Bu nedenle THY grubunda düşük gibi gözükken testis ağırlığının aslında denek ağırlığında azalma ile korele olduğunu düşünüyoruz. Deney sonu testis ağırlıkları açısından Cd grubunda görülen azalmanın Cd+THY grubunda sürdüğünü ve Cd+THY grubunda GSI'nin hem Cd hem de kontrol grubuna göre anlamlı düşük olduğunu belirledik. Bu durumda çalışmamızda timolün bu parametreler üzerinde iyileştirici etkisinin görülemediğini söyleyebiliriz.

Yaptığımız sperm analizi sonuçlarına göre, total sperm sayısı, hareketli sperm sayısı ve sperm motilitesi (%) Cd grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşüktü. Sperm vitalitesi (%) ve TZI ise Cd grubunda kontrole kıyasla belirgin bozulmuştu. THY grubunda ise belirtilen parametrelerde kontrole mukayese edildiğinde anlamlı farklılık gözlenmedi. Bulduğumuz bu sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalar ile uyum göstermektedir (3–6, 10, 11, 13, 147, 151) Total sperm sayısı, hareketli sperm sayısı, sperm vitalitesi (%) parametrelerinde anlamlı olmak üzere bahsedilen tüm parametrelerde Cd+THY grubunda Cd grubuna göre iyileşme gözlendi.

Tüm gruplarda boyun anomalileri, TZI'daki anomalilerin yaklaşık yarısını oluşturmaktaydı. Kuyruk anomalileri diğer tüm gruplarda kontrole göre yüksek bulundu. Baş anomalisinin ise Cd ve THY gruplarında anlamlı olmak üzere diğer tüm gruplarda kontrol grubuna göre beklenmedik şekilde düşük olduğu görüldü. THY grubunda ise baş anomalisi Cd+THY grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu. Tüm bu anomalilerin toplu olarak değerlendirildiği TZI'ya bakıldığında Cd grubunun kontrole göre anlamlı yüksek olması kadmiyumun sperm morfolojisini bozmuş olabileceğini gösterdi. Cd+THY grubunda ise TZI kontrole göre anlamlı yüksek olmakla beraber Cd grubuna göre anlamlı olmasa da düşüktü. Bu da bize timolün

literatüre benzer şekilde Cd'nin yol açtığı bozuk sperm morfolojisi üzerine olumlu etkisi olabileceğini düşündürdü.

Literatürde Cd verilen gruplarda hemoraji, interstisyel alanda inflamatuvar hücre infiltrasyonu, interstisyel kan damarlarında konjesyon gibi histopatolojik değişiklikler görülmüştür (1, 5, 10). Çalışmamızda ise Cd grubunda ödem ve konjesyonun anlamlı olmamakla birlikte literatüre benzer şekilde artmış olduğunu gördük. Bu artışın istatistiksel anlam göstermemesinin nedeninin literatürdeki diğer çalışmalarda kadmiyumun çalışmamızdan farklı olarak 5 mg/kg vücut ağırlığı dozunda (EFSA 2012'nin erkek ratlarda subkronik çalışmalar için önerdiği konversiyon faktörü ile hesaplandığında çalışmamızda kullanılan 50 mg/L CdCl₂; 4,5 mg/kg gavaj dozunda tekabül etmektedir) ve oral gavaj yoluyla verilmesi olabileceğini düşündük (5, 10).

JS değerlendirme sonuçlarımızda ise Cd+THY grubunda ve literatüre benzer olarak Cd grubunda kontrole göre belirgin düşüş mevcuttu (150–154). İlave olarak JS'nin THY ve Cd+THY gruplarında Cd grubuna göre anlamlı olarak arttığını gözlemledik. Literatürde timolün JS üzerine etkisini gösterir bir çalışma olmamakla birlikte timol izomeri polifenolik antioksidan bir madde olan karvakrolün JS üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (155). Bu nedenle biz de timol verilen gruplarda JS üzerinde görülen iyileştirici etkinin timol kaynaklı olabileceğini düşündük. Çalışmamızda lümenine immatür germ hücresi dökülmüş, lümeninde azalmış spermatozoa içeren ve seminifer epitelinde ayrılma olan tübül yüzdesi parametreleri kontrol grubuna kıyasla Cd grubunda belirgin olarak artış göstermiştir; sonuçlarımız literatürle uyumludur (1, 5, 6, 10, 147, 150). Bozulan tüm bu parametreler tedavi grubunda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da Cd grubuna göre iyileşme göstermiştir.

FIJI programını kullanarak hesapladığımız morfometrik parametrelerden olan STÇ'de sadece tedavi grubunda THY grubuna göre bir artış görülmüş olup, bunun dışında gruplar arasında belirgin bir fark görülmemiştir. Hem GEK/STÇ hem de AEP/AST oranında Cd grubunda kontrole göre belirgin azalma ve tedavi grubunda ise Cd grubuna göre anlamlı olmasa da kontrol grubuna benzer şekilde artış mevcuttu. Literatürde STÇ ve GEK'i inceleyen bir çok çalışma görülmektedir (1, 6, 86, 135, 152, 156). Bunların bir çoğunda Cd grubunda hem GEK'te hem de STÇ'de kontrole göre azalma bildirilmiştir (1, 6, 86, 152). Çalışmamızda da literatüre benzer şekilde Cd

grubunun GEK/STÇ oranında ve anlamlı fark görülmesi de STÇ'sinde kontrole göre azalma mevcuttu. İlave olarak literatür ile uyumlu şekilde THY grubunun GEK/STÇ oranı ve STÇ'si kontrol grubuna benzerdi (13).

Değerlendirdiğimiz diğer morfolometrik parametrelerden V_T , L_T ve S_T 'nin Cd grubunda kontrole kıyasla azaldığı görülmüş olup tedavi grubunda sadece V_T parametresinde anlamlı olmasa da bir iyileşme izlenmiştir. Morfolometrik parametrelere genel olarak baktığımızda Cd grubunda ciddi bozulma görülürken timolün bu hasarı iyileştirmedeki etkisinin sönük kaldığı söylenebilir.

Hücre sayımı ile ilgili parametrelerimize baktığımızda ise çalışmamızda total Sertoli hücresi sayısında tüm gruplarda kontrole kıyasla belirgin azalma görüldü. Total primer spermatosit sayısı sadece THY grubunda kontrole göre belirgin azalma gösterse de toplam sayı testis g'ına oranlandığı zaman bu fark kaybolmuştur. Dolaylı olarak sperm üretimi hakkında bilgi veren total yuvarlak spermatid sayısı tüm gruplarda kontrole kıyasla az bulunurken g başına düşen sayıya bakıldığında da sonucun değişmediği görülmüştür. Bu parametre ile oldukça korele olan GSÜ ve GSÜ/g testis parametreleri de benzer sonuçlar vermektedir. İnterstisyel alan başına düşen ortalama Leydig hücresi sayısı da tüm gruplarda kontrole kıyasla belirgin azalma gösterdi. Tüm bu bilgiler ışığında timolün, Cd kaynaklı hücre sayımı ve ilişkili parametrelerde görülen hasara cevap vermede yetersiz kalmış olabileceği sonucuna vardık. Motawee ve ark. yaptıkları çalışmada bizim çalışmamızla korele şekilde Cd uygulanan grupta hem ışık hem de elektron mikroskopik düzeyde Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve spermatogenik seri hücrelerinde azalma görmüşlerdir (6). Iqbal ve ark. ise günlük sperm üretiminin farklı dozlarda Cd alan sıçanlarda farklı oranlarda olmak üzere azaldığını belirtmişlerdir (156). Çalışmamıza benzer şekilde Cd verilen gruplarda Chen ve ark., primer spermatosit ve spermatogonyum sayısında; Nna ve ark. ise Leydig hücresi sayısında belirgin olarak azalma görmüşlerdir (147, 157).

Timolün tek başına verilmesiyle hücre sayımı parametrelerinde oluşturduğu denge bozukluğunu ve Cd hasarına karşı sessiz kalan etkisini son zamanlarda adını sıkça duyduğumuz antioksidatif stres olgusuna bağlayabileceğimizi düşündük. Antioksidatif stres, uygun olmayan antioksidan alımıyla meydana gelen bir çeşit hücresel strestir. Antioksidanlar ROS'u nötralize ederek etki göstermektedirler ancak

ROS'lar organizmada yararlı fizyolojik rollere de sahip moleküllerdir. Antioksidanlar, ROS'ların fizyolojik rolleri ve dokular için oksidatif stres oluşturma potansiyelleri arasında ayırım yapmayarak çalışmaktadırlar. Bu durumda fazla tüketilen antioksidan maddenin prooksidan şekilde davranabileceği bilinmektedir (158).

Masson trikrom boyalı preparatların incelenmesinde, Cd grubunda bağ dokusu miktarının kontrol grubuna göre belirgin azaldığı görüldü. Bağ dokuda görülen bu azalma Maretto ve ark.'nın çalışmalarında bahsettiği üzere Cd verilen grupta interstisyumda intertübüler dokunun organizasyonunda ve kollajen liflerin diziliminde bozulma ile açıklanabilir (159). Tedavi grubunda ise bağ dokusu miktarı Cd'ye göre anlamlı olmasa da artış gösterdi. Bu durum bize THY'nin bozulan intertübüler doku ve kollajen lifler üzerinde iyileştirici etkisi olabileceğini düşündürdü. PAS boyalı preparatlarda anlamlı fark olmasa da Cd grubunun SE-BMA skorunda kontrole göre artış olduğu tedavi grubunda ise bu artışın azalarak kontrol grubuna benzer seviyelere gerilediği görüldü. PAS pozitif boyanan alanların yüzdesi açısından gruplar arasında fark bulunmadı.

TUNEL immünohistokimyasal boyamasında da AI tüm gruplar arasında benzer bulundu. Apoptozis göstergelerinden biri olan kaspaz-3'ün de doku seviyeleri benzer şekilde bütün gruplarda benzer seviyelerde sonuçlanmış ve bu iki parametrenin birbirini desteklediği görülmüştür. Çalışmamızda kadmiyum alan grubun kaspaz-3 ve AI seviyelerinde kontrole göre hafif artış olmakla birlikte istatistiksel anlamlı fark olmayışı; literatürde Cd hasar mekanizmalarında sıklıkla anılan apoptozisin çalışmamızda çok fazla öne çıkmadığını gösteriyor. Bunun sebebinin çalışmamızda değerlendirmedığımız farklı hücre ölümü mekanizmalarının ve uzun deneysel periyot nedeniyle bu ölümleri kompanse eden mekanizmaların devreye girmesi olabileceğini düşünmekteyiz. İnflamasyon belirteçlerinden TNF-alfa ise tedavi grubunda diğer gruplara kıyasla yorumlayamadığımız şekilde belirgin olarak yüksek çıkmış, bunun dışında gruplar arasında fark görülmemiştir. Histolojik kesitlerde inflamatuvar hücre infiltrasyonuna rastlamayışımız TNF-alfa'nın tedavi grubu hariç gruplar arasında fark göstermeyişi ile uyumludur.

Doku T seviyesi tüm gruplarda kontrole kıyasla düşük bulunmakla birlikte THY grubunda anlamlı fark mevcuttu. Bu durum, tüm gruplarda T üretiminden

sorumlu Leydig hücre sayısının kontrole göre düşük olmasıyla açıklanabilir. Çalışmamıza benzer şekilde Cd verilen deneklerde doku veya serum T seviyelerini inceleyen bir çok çalışmada da T seviyesi Cd alan gruplarda kontrole göre düşük bulunmuştur (3–7, 10).

Tedavi grubunda TAS diğer gruplara göre anlamlı yükseklik göstermiş olup bunun dışında gruplar arasında bariz fark izlenmemiştir. Bu sonuç, kadmiyumun indüklediği oksidatif strese karşı organizmada oluşan antioksidan cevabın timolle desteklenmesinden kaynaklanmış olabilir. Cd grubunda TAS seviyesinin kontrole göre belirgin değişiklik göstermeyişi, literatürdeki benzer süreli deney periyoduna sahip çalışmalar ile benzerlik göstermektedir (160–162). Örneğin çalışmamıza benzer şekilde Nasiadek ve ark. da yaptıkları çalışmada kadmiyumun çeşitli dozlarına 90 gün maruziyet sonucunda TAS ve GSH seviyelerinde kontrole kıyasla fark görmemişlerdir (163). Bu durumun, organizmanın Cd ile indüklenmiş oksidatif stresi kompanse etmeye çalışması sırasında uzun vadede antioksidanların yoğun kullanımı ile açıklanabileceğini düşünmekteyiz. TOS ise, THY ve Cd+THY gruplarında kontrole göre belirgin azalmış olup; bu etkinin timol alan gruplarda ortak olarak görülmesi nedeniyle timolün antioksidan etkinliğini göstermesinden kaynaklanmış olabileceğini düşündük. TAS ve TOS üzerinden hesaplanan OSI de tedavi grubunda kontrol ve Cd gruplarına göre belirgin azalma göstermiştir. GPX aktivitesi de timolün antioksidan etkinliği ile korele şekilde THY grubunda kontrol ve Cd gruplarına kıyasla belirgin yüksek olarak izlenmiştir.

Her ne kadar Cd direkt olarak ROS üreten bir etken değilse de prooksidanları artırarak ve antioksidan seviyelerini azaltarak antioksidan savunma mekanizmalarını bozabilir (82, 163). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, Cd grubunda oksidan belirteçlerde anlamlı artma ya da antioksidan belirteçlerde anlamlı azalma gibi Cd toksisitesinin bilinen etkilerini tam olarak göremeyişimiz birçok nedene bağlanabilir. Bu nedenlerden birisi çalışmamızın 90 gün gibi uzun bir deney periyoduna sahip olması ve Cd'nin indüklediği oksidatif strese karşı organizmaya ait intrinsek antioksidan moleküllerin bu uzun süre boyunca savaşmaları olabilir (164, 165). Bir diğer nedenin ise oksidatif stresi azaltmaya çalışırken intrinsek antioksidanların

harcanmaları ve/veya uzun dönem devam eden oksidatif stresin bu antioksidanların üretimlerini baskılamaları olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak kadmiyum; vücut ve testis ağırlığında, sperm vitalitesinde, Johnsen skorunda, tübüler doku hacminde, tübül uzunluğunda, tübül alanında, germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapına oranında, epitel alanının seminifer tübül alanına oranında, çeşitli testis hücrelerinde ve bağ dokusu yüzdesinde azalma; teratozoospermik indekste, immatür hücre dökülmüş lümen yüzdesinde, lümeninde azalmış spermatozoa içeren tübül yüzdesinde, epitelinde ayrılma olan tübül yüzdesinde artma yaparak hasar oluştururken timolün bu parametrelerden vücut ağırlığı, sperm vitalitesi yüzdesi ve Johnsen skorunda anlamlı bir iyileşmeye sebep olduğunu söyleyebiliriz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Timolün sıçanlarda subkronik kadmiyum maruziyeti ile oluşan testis toksisitesine etkisini araştırdığımız çalışmamızda:

Kadmiyumun;

1. Uzamış maruziyette kilo alımını azalttığı,
2. Testis ağırlığını azalttığı,
3. Sperm analizinde % vitaliteyi azalttığı,
4. Teratozoospermik indeksi artırdığı,
5. Johnsen skorunda düşmeye sebep olduğu,
6. Lümenine immatür hücre dökülmüş seminifer tübül yüzdesini artırdığı,
7. Lümeninde azalmış spermatozoa içeren seminifer tübül yüzdesini artırdığı,
8. Germinal epitelde ayrılma olan seminifer tübül yüzdesini artırdığı,
9. Total seminifer tübül hacminde, total seminifer tübül uzunluğunda ve total seminifer tübül yüzey alanında azalmaya yol açtığı,
10. Germinal epitel kalınlığının seminifer tübül çapına oranını ve germinal epitel alanının seminifer tübül alanına oranını azalttığı,
11. Total Sertoli Hücresi, total yuvarlak spermatid, gram testis başına düşen yuvarlak spermatid, interstisyel alan başına düşen Leydig hücresi sayılarında azalmaya sebep olduğu,
12. Günlük sperm üretimini ve gram testis başına düşen günlük sperm üretimini azalttığı,
13. Bağ dokusu yüzdesini azalttığı tespit edilmiştir.

Timol'ün;

A) Tek başına kullanıldığında,

1. Kilo alımını azalttığı,
2. Testis ağırlığını azalttığı,
3. Total seminifer tübül hacminde, total seminifer tübül uzunluğunda ve total seminifer tübül yüzey alanında azalmaya yol açtığı,

4. Total Sertoli hücresi, total primer spermatosit, total yuvarlak spermatid, gram testis başına düşen yuvarlak spermatid, interstisyel alan başına düşen Leydig hücresi sayılarında azalmaya sebep olduğu,
5. Günlük sperm üretimini ve gram testis başına düşen günlük sperm üretimini azalttığı,
6. Doku testosteron seviyesini düşürdüğü,
7. Doku TOS seviyelerini azalttığı,
8. Doku GPX seviyelerini artırdığı tespit edilmiştir.

B) Kadmiyum ile kullanıldığında,

1. Cd ve timolün tek başlarına kullanıldıklarında görülen kilo alım hızı üzerine olan olumsuz etkilerini azalttığı,
2. Gonadosomatik indeksi azalttığı,
3. Total ve hareketli sperm sayısını artırdığı,
4. Kadmiyumun azalttığı sperm vitalitesini (%) artırdığı,
5. Kadmiyumun bozduğu Jhonsen skoru değerlerini iyileştirdiği,
6. Seminifer tübül çapında artışa sebep olduğu,
7. Doku TNF-alfa ve TAS seviyelerinde artışa; OSI seviyelerinde azalışa sebep olduğu görülmüştür.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda;

-Cd hasarının ve timolün bu hasara etkisinin daha iyi değerlendirilebilmesi için farklı ilaç dozu ve deney periyodları ile yeni deneyler tasarlanıp hayata geçirilebilir. Cd doku seviyeleri ölçülerek değerlendirilen dokudaki birikimin şiddeti öğrenilebilir.

-İstatistik sonuçlarını daha anlamlı hale getirebilmek adına denek örneklemini genişletilebilir.

-İlgi alanına giren hücrelerin detaylı incelenebilmesi için ultrastrüktürel ve immünohistokimyasal çalışmalar deneye eklenebilir.

-Hücresel düzeyde ölümü gösteren apoptozis dışındaki ölüm yollarına yönelik gerek biyokimyasal gerek de immünohistokimyasal belirteçler deneye eklenebilir.

-Malondialdehit gibi lipid peroksidasyonu gösteren, doku düzeyinde değerdendirilen antioksidan/oksidan belirteçler ve farklı hormonal parametreler eklenebilir.



7. KAYNAKLAR

1. Venditti M, Ben Rhouma M, Romano MZ, Messaoudi I, Reiter RJ, Minucci S. Altered Expression of DAAM1 and PREP Induced by Cadmium Toxicity Is Counteracted by Melatonin in the Rat Testis. *Genes (Basel)*. 2021;12(7):1016.
2. Choy JT, Eisenberg ML. Male infertility as a window to health. *Fertil Steril*. 2018;110(5):810-814.
3. Olaniyan OT, Ojewale AO, Eweoya OO, et al. Modulatory Role of Vitamin E on Proton Pump (ATPase) Activity of Cadmium Chloride-Induced Testicular Damage in Wistar Rats. Zeljezic D, ed. *Biomed Res Int*. 2021;2021(5):1-7.
4. Venditti M, Ben Rhouma M, Romano MZ, Messaoudi I, Reiter RJ, Minucci S. Evidence of melatonin ameliorative effects on the blood-testis barrier and sperm quality alterations induced by cadmium in the rat testis. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021;226:112878.
5. Abdel-Wahab A, Hassanin KMA, Mahmoud AA, et al. Physiological Roles of Red Carrot Methanolic Extract and Vitamin E to Abrogate Cadmium-Induced Oxidative Challenge and Apoptosis in Rat Testes: Involvement of the Bax/Bcl-2 Ratio. *Antioxidants*. 2021;10(11):1653.
6. Motawee ME, Damanhory AA, Sakr H, et al. An electron microscopic and biochemical study of the potential protective effect of ginger against Cadmium-induced testicular pathology in rats. *Front Physiol*. 2022;13(October):1-14.
7. Wu X, Guo X, Wang H, et al. A brief exposure to cadmium impairs Leydig cell regeneration in the adult rat testis. *Sci Rep*. 2017;7(1):6337.
8. Amadou A, Praud D, Coudon T, et al. Exposure to airborne cadmium and breast cancer stage, grade and histology at diagnosis: findings from the E3N cohort study. *Sci Rep*. 2021;11(1):23088.
9. Shojaeepour S, Dabiri S, Dabiri B, Imani M, Fekri Soofi Abadi M, Hashemi F. Histopathological Findings of Testicular Tissue Following Cadmium Toxicity in Rats. *Iran J Pathol*. 2021;16(4):348-353.
10. Arab HH, Elhemiel AA, El-Sheikh AAK, et al. Repositioning Linagliptin for the Mitigation of Cadmium-Induced Testicular Dysfunction in Rats: Targeting HMGB1/TLR4/NLRP3 Axis and Autophagy. *Pharmaceuticals*. 2022;15(7):852.
11. Tijani AS, Farombi EO, Olori DO. Thymol co-administration abrogates hexachlorobenzene-induced reproductive toxicities in male rats. *Hum Exp Toxicol*. 2023;42:1-15.
12. Javed H, Azimullah S, Meeran MN, Ansari SA, Ojha S. Neuroprotective Effects of Thymol, a Dietary Monoterpene Against Dopaminergic Neurodegeneration in Rotenone-Induced Rat Model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7):1538.

13. Saber TM, Arisha AH, Abo-Elmaaty AMA, et al. Thymol alleviates imidacloprid-induced testicular toxicity by modulating oxidative stress and expression of steroidogenesis and apoptosis-related genes in adult male rats. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2021;221(5):112435.
14. Geyikoglu F, Yilmaz EG, Erol HS, et al. Hepatoprotective Role of Thymol in Drug-Induced Gastric Ulcer Model. *Ann Hepatol.* 2018;17(6):980-991.
15. Jiji S, Udhayakumar S, Rose C, Muralidharan C, Kadirvelu K. Thymol enriched bacterial cellulose hydrogel as effective material for third degree burn wound repair. *Int J Biol Macromol.* 2019;122:452-460.
16. Khazdair MR, Ghorani V, Alavinezhad A, Boskabady MH. Pharmacological effects of *Zataria multiflora* Boiss L. and its constituents focus on their anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects. *Fundam Clin Pharmacol.* 2018;32(1):26-50.
17. Güvenç M, Cellat M, Gökçek İ, Yavaş İ, Yurdagül Özsoy Ş. Effects of thymol and carvacrol on sperm quality and oxidant/antioxidant balance in rats. *Arch Physiol Biochem.* 2019;125(5):396-403.
18. Michalska-Sionkowska M, Walczak M, Sionkowska A. Antimicrobial activity of collagen material with thymol addition for potential application as wound dressing. *Polym Test.* 2017;63:360-366.
19. Moore KL. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology.* 10th edition. Philadelphia: Elsevier; 2016.
20. Carlson BM. *Human Embryology & Developmental Biology.* 6th edition. Missouri: Elsevier; 2019.
21. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's Human Embryology.* 5th edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2015.
22. Singh V. *Textbook of Clinical Embryology.* 1st edition. New Delhi: Elsevier A Division of Reed Elsevier Private Limited; 2012.
23. Cochard LR. *Netter's Atlas of Human Embryology.* Updated 1st edition. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2012.
24. Moore KL, Persuad TVN, Torchia MG. *Before We Are Born Essentials of Embryology and Birth Defects.* 9th edition. Philadelphia: Elsevier; 2016.
25. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology.* 14th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019.
26. Webster S, Wreede Rd. *Embryology at a Glance.* 2nd edition. UK: Wiley Blackwell; 2012.
27. Dudek RW. *Embryology BRS.* 6th edition. Philadelphia: Wolter Kluwer Health; 2014.

28. Moore KL, Dalley AF, Agur AM. Clinically Oriented Anatomy. 8th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2018.
29. Gray H, Carter HV. Gray's Anatomy The Anatomical Basis of Clinical Practice. In: Standring S, editor. 41st edition. Philadelphia: Elsevier Limited; 2016.
30. Singh V. Textbook of Anatomy Abdomen and Lower Limb. 2nd edition. New Delhi: Elsevier A Division of Reed Elsevier Private Limited; 2014.
31. Sobotta J. Sobotta Atlas of Anatomy Internal Organs. In: Paulsen F, Waschke J, editor. 16th edition. Munich: Elsevier GmbH; 2018.
32. Wineski LE. Snell's Clinical Anatomy by Regions. 10th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019.
33. Waugh A, Grant A. Ross & Wilson Anatomy and Physiology. 13th edition. China: Elsevier; 2018.
34. Patton KT, Thibodeau GA. Anthony's Textbook of Anatomy & Physiology. 20th edition. Missouri: Mosby Elsevier; 2013.
35. Lumley J, Craven J, Abrahams P, Tunstall R. Bailey & Love's Essential Clinical Anatomy. 1st ed. Florida: CRC Press, Taylor & Francis Group; 2019.
36. Pawlina W, Ross MH. Histology A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology. 8th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2020.
37. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. 16th edition. New York: McGraw Hill; 2021.
38. Saladin KS. Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function. 3rd edition. USA; McGraw-Hill; 2003.
39. Eroschenko VP. diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 11th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
40. Gartner LP. Textbook of Histology. 4th edition. Philadelphia: Elsevier; 2017.
41. Young B, Woodford P, Geraldine O. Wheather's Functional Histology A Text and Colour Atlas. 6th edition. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2014.
42. Gartner LP. BRS Cell Biology & Histology. 8th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer; 2019.
43. Lowe JS, Anderson PG. Steven & Lowe's Human Histology. 4th edition. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2015.
44. Gartner LP, Hiatt JL. Color Atlas and Text of Histology. 6th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
45. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. Redox Biol. 2015;4:180-183.

46. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev.* 2002;82(1):47-95.
47. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. Free radical biology – terminology and critical thinking. *FEBS Lett.* 2004;558(1-3):3-6.
48. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Basic Pathology. 9th edition. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2013.
49. Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells^{1,2} 1Guest Editor: Miral Dizdaroglu 2This article is part of a series of reviews on “Oxidative DNA Damage and Repair.” The full list of papers in. *Free Radic Biol Med.* 2002;32(9):804-812.
50. Brieger K, Schiavone S, Miller J, Krause K. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;142(August):1-14.
51. Guo Q, Li F, Duan Y, et al. Oxidative stress, nutritional antioxidants and beyond. *Sci China Life Sci.* 2020;63(6):866-874.
52. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12(5):913-922.
53. Sies H, Berndt C, Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86(1):715-748.
54. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as Stimulators of Signal Transduction. *Free Radic Biol Med.* 1997;22(1-2):269-285.
55. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74.
56. Rani A, Kumar A, Lal A, Pant M. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a review. *Int J Environ Health Res.* 2014;24(4):378-399.
57. Bisht S, Faiq M, Tolahunase M, Dada R. Oxidative stress and male infertility. *Nat Rev Urol.* 2017;14(8):470-485.
58. Samuel JB, Stanley JA, Princess RA, Shanthi P, Sebastian MS. Gestational Cadmium Exposure-Induced Ovotoxicity Delays Puberty through Oxidative Stress and Impaired Steroid Hormone Levels. *J Med Toxicol.* 2011;7(3):195-204.
59. Interdonato M, Pizzino G, Bitto A, et al. Cadmium delays puberty onset and testis growth in adolescents. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2015;83(3):357-362.
60. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
61. Fadok VA, de Cathelineau A, Daleke DL, Henson PM, Bratton DL. Loss of Phospholipid Asymmetry and Surface Exposure of Phosphatidylserine Is

- Required for Phagocytosis of Apoptotic Cells by Macrophages and Fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001;276(2):1071-1077.
62. Hockenbery D. Defining apoptosis. *Am J Pathol.* 1995;146(1):16-19.
 63. Genchi G, Sinicropi MS, Lauria G, Carocci A, Catalano A. The Effects of Cadmium Toxicity. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(11):3782.
 64. Ott M, Robertson JD, Gogvadze V, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(3):1259-1263.
 65. Wang R, Sang P, Guo Y, et al. Cadmium in food: Source, distribution and removal. *Food Chem.* 2023;405(PA):134666.
 66. WHO. Safety evaluation of certain food additives and contaminants in food. Prepared by the Seventy-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). 2011. Geneva, World Health Organization (WHO Food Additives Series, No. 64); 305– 380
 67. Fleischer M, Sarofim AF, Fassett DW, et al. Environmental impact of cadmium: a review by the Panel on Hazardous Trace Substances. *Environ Health Perspect.* 1974;7:253-323.
 68. World Health Organization (WHO). Environmental health criteria, Vol. 134: Cadmium. World Health Organization, Geneva. 1992.
 69. Casarett L, Doull J. Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of the Poisons. 9th ed. (Klaassen C, ed.). New York: McGraw-Hill Education; 2019.
 70. Toxicological Profile for Cadmium. In: ATSDR's Toxicological Profiles. CRC Press; 2002.
 71. Nordberg GF. Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009;238(3):192-200.
 72. ATSDR. ATSDR's Substance Priority List. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry; 2015b. <https://www.atsdr.cdc.gov/spl/index.html>
 73. WHO. Preventing Disease through Healthy Environments: Exposure to Cadmium: A Major Public Health Concern. World Health Organization; 2019.
 74. MacGregor A. Analysis of control methods: mercury and cadmium pollution. *Environ Health Perspect.* 1975;12(December):137-148.
 75. Ganguly K, Levänen B, Palmberg L, Åkesson A, Lindén A. Cadmium in tobacco smokers: a neglected link to lung disease? *Eur Respir Rev.* 2018;27(147):170122.
 76. Cadmium in food - Scientific opinion of the Panel on Contaminants in the Food

- Chain. EFSA J. 2009;7(3).
77. WHO. Guidelines for Drinking-Water Quality.; 2022.
 78. Kagi J, Valee B. Metallothionein: a cadmium- and zinc-containing protein from equine renal cortex. J Biol Chem. 1960;235:3460-3465.
 79. Peana M, Pelucelli A, Chasapis CT, et al. Biological Effects of Human Exposure to Environmental Cadmium. Biomolecules. 2022;13(1):36.
 80. Zarros A, Skandali N, Al-Humadi H, Liapi C. Cadmium (Cd) as a Carcinogenetic Factor and Its Participation in the Induction of Lung Cancer. Vol 21.; 2008: 172-177.
 81. -Cannino G, Ferruggia E, Luparello C, Rinaldi AM. Cadmium and mitochondria. Mitochondrion. 2009;9(6):377-384.
 82. Cuypers A, Plusquin M, Remans T, et al. Cadmium stress: an oxidative challenge. BioMetals. 2010;23(5):927-940.
 83. Etemadi T, Momeni HR, Darbandi N, Abnosi MH. Silymarin modulates cadmium-induced oxidative stress in human spermatozoa. Andrologia. 2022;54(8):3-11.
 84. Szuster-Ciesielska A, Stachura A, Słotwińska M, et al. The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species (ROS) production in cell cultures. Toxicology. 2000;145(2-3):159-171.
 85. Sola E, Moyano P, Flores A, et al. Cadmium-promoted thyroid hormones disruption mediates ROS, inflammation, A β and Tau proteins production, gliosis, spongiosis and neurodegeneration in rat basal forebrain. Chem Biol Interact. 2023;375(3):110428.
 86. Ning W, Liao X, Dong X, et al. Protective effect of astragaloside IV on cadmium-induced spermatogenesis microenvironment damage in rats. Syst Biol Reprod Med. 2022;68(3):203-212.
 87. Chen N, Su P, Wang M, Li YM. Ascorbic acid inhibits cadmium-induced disruption of the blood-testis barrier by regulating oxidative stress-mediated p38 MAPK pathways. Environ Sci Pollut Res. 2018;25(22):21713-21720.
 88. Diep PTN, Denizeau F, Jumarie C. Kinetics of the early subcellular distribution of cadmium in rat hepatocytes. BioMetals. 2005;18(3):255-267.
 89. Gobe G, Crane D. Mitochondria, reactive oxygen species and cadmium toxicity in the kidney. Toxicol Lett. 2010;198(1):49-55.
 90. Wang SH, Shih YL, Ko WC, Wei YH, Shih CM. Cadmium-induced autophagy and apoptosis are mediated by a calcium signaling pathway. Cell Mol Life Sci. 2008;65(22):3640-3652.
 91. Kesidou E, Lagoudaki R, Touloumi O, Poulatsidou KN, Simeonidou C.

- Autophagy and neurodegenerative disorders. *Neural Regen Res.* 2013;8(24):2275-2283.
92. Levine B. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 2005;115(10):2679-2688.
 93. Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;213(3):282-290.
 94. Pollack AZ, Ranasinghe S, Sjaarda LA, Mumford SL. Cadmium and Reproductive Health in Women: A Systematic Review of the Epidemiologic Evidence. *Curr Environ Heal Reports.* 2014;1(2):172-184.
 95. CAMERON E, FOSTER CL. Observations on the histological effects of sub-lethal doses of cadmium chloride in the rabbit. I. The effect on the testis. *J Anat.* 1963;97(Pt 2):269-280.
 96. Wang J, Zhu H, Wang K, Yang Z, Liu Z. Protective effect of quercetin on rat testes against cadmium toxicity by alleviating oxidative stress and autophagy. *Environ Sci Pollut Res.* 2020;27(20):25278-25286.
 97. Jafarpour D, Shekarforoush SS, Ghaisari HR, Nazifi S, Sajedianfard J. Impact of synbiotic diets including inulin, *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus plantarum* on intestinal microbiota of rat exposed to cadmium and mercury. *Vet Sci Dev.* 2015;5(1).
 98. Ciarrocca M, Rosati M V., Tomei F, et al. Correlation Between Cadmium and Blood Counts in Workers Exposed to Urban Stressor. *Arch Environ Occup Health.* 2015;70(2):70-76.
 99. El-Ebiary AA, El-Ghaiesh S, Hantash E, Alomar S. Mitigation of cadmium-induced lung injury by *Nigella sativa* oil. *Environ Sci Pollut Res.* 2016;23(24):25356-25363.
 100. Kazantzis G. Cadmium, osteoporosis and calcium metabolism. *BioMetals.* 2004;17(5):493-498.
 101. Varoni MV, Palomba D, Gianorso S, Anania V. Cadmium as an Environmental Factor of Hypertension in Animals: New Perspectives on Mechanisms. *Vet Res Commun.* 2003;27(SUPPL. 1):807-810.
 102. Wei T, Jia J, Wada Y, Kapron CM, Liu J. Dose dependent effects of cadmium on tumor angiogenesis. *Oncotarget.* 2017;8(27):44944-44959.
 103. Liu J, Xie Y, Han Z, Wang H, Xu W. Protective effects of bisoprolol against cadmium-induced myocardial toxicity through inhibition of oxidative stress and NF- κ B signalling in rats. *J Vet Res.* 2021;65(4):505-511.
 104. Messner B, Knoflach M, Seubert A, et al. Cadmium Is a Novel and Independent Risk Factor for Early Atherosclerosis Mechanisms and In Vivo Relevance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009;29(9):1392-1398.

105. Faramawi MF, Liu Y, Caffrey JL, Lin YS, Gandhi S, Singh KP. The association between urinary cadmium and frontal T wave axis deviation in the US adults. *Int J Hyg Environ Health*. 2012;215(3):406-410.
106. Sundaresan S, John S, Paneerselvam G, Andiappan R, Christopher G, Selvam GS. Gallic acid attenuates cadmium mediated cardiac hypertrophic remodelling through upregulation of Nrf2 and PECAM-1 signalling in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2021;87(July):103701.
107. International Agency for Research on Cancer. Agents classified by the IARC monographs. Igarss 2014. 2012;1-105(1):1-5.
108. Heath JC, Daniel MR. The Production of Malignant Tumours by Cadmium in the Rat. *Br J Cancer*. 1964;18(1):124-129.
109. Waalkes M. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res Mol Mech Mutagen*. 2003;533(1-2):107-120.
110. Jafari A, Karimipour M, Khaksar MR, Ghasemnejad-Berenji M. Protective effects of orally administered thymol against titanium dioxide nanoparticle–induced testicular damage. *Environ Sci Pollut Res*. 2020;27(2):2353-2360.
111. Lide DR, ed. *Handbook of Chemistry and Physics*. 77th ed. CRC Press, Taylor & Francis Group; 1996.
112. Tuttolomondo T, Dugo G, Ruberto G, et al. Study of quantitative and qualitative variations in essential oils of Sicilian *Rosmarinus officinalis* L. *Nat Prod Res*. 2015;29(20):1928-1934.
113. Nagoor Meeran MF, Javed H, Al Tae H, Azimullah S, Ojha SK. Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development. *Front Pharmacol*. 2017;8(JUN):1-34.
114. Norwitz G, Nataro N, Keliher PN. Study of the steam distillation of phenolic compounds using ultraviolet spectrometry. *Anal Chem*. 1986;58(3):639-641.
115. Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenol on oral bacteria. *Pharm Acta Helv*. 1994;69(1):25-28.
116. Mahmoud ALE. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Lett Appl Microbiol*. 1994;19(2):110-113.
117. Aeschbach R, Löliger J, Scott BC, et al. Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol*. 1994;32(1):31-36.
118. Yanishlieva N V., Marinova EM, Gordon MH, Raneva VG. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. *Food Chem*. 1999;64(1):59-66.
119. Zahin M, Ahmad I, Aqil F. Antioxidant and antimutagenic activity of Carum

- copticum fruit extracts. *Toxicol Vitro*. 2010;24(4):1243-1249.
120. Pavela R. Larvicidal property of essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Ind Crops Prod*. 2009;30(2):311-315.
 121. Ozen T, Demirtas I, Aksit H. Determination of antioxidant activities of various extracts and essential oil compositions of *Thymus praecox* subsp. *skorpilii* var. *skorpilii*. *Food Chem*. 2011;124(1):58-64.
 122. Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER, Conway BR, Lambert PA. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine digluconate alone and in combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(5):1031-1036.
 123. Araújo LX, Novato TPL, Zeringota V, et al. Acaricidal activity of thymol against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) under semi-natural conditions. *Parasitol Res*. 2015;114(9):3271-3276.
 124. Sancheti J, Shaikh MF, Chaudhari R, et al. Characterization of anticonvulsant and antiepileptogenic potential of thymol in various experimental models. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 2014;387(1):59-66.
 125. Riella KR, Marinho RR, Santos JS, et al. Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2012;143(2):656-663.
 126. Alinezhad H, Azimi R, Zare M, et al. Antioxidant and Antihemolytic Activities of Ethanolic Extract of Flowers, Leaves, and Stems of *Hyssopus officinalis* L. Var. *angustifolius*. *Int J Food Prop*. 2013;16(5):1169-1178.
 127. Robledo S, Osorio E, Muñoz D, et al. In Vitro and In Vivo Cytotoxicities and Antileishmanial Activities of Thymol and Hemisynthetic Derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1652-1655.
 128. P.R A, Rao BN, Rao BSS. In vivo radioprotective potential of thymol, a monoterpene phenol derivative of cymene. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*. 2011;726(2):136-145.
 129. Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem*. 2007;105(3):940-949.
 130. Shapiro S, Meier A, Guggenheim B. The antimicrobial activity of essential oils and essential oil components towards oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol*. 1994;9(4):202-208.
 131. Manou I, Bouillard L, Devleeschouwer MJ, Barel AO. Evaluation of the preservative properties of *Thymus vulgaris* essential oil in topically applied formulations under a challenge test. *J Appl Microbiol*. 1998;84(3):368-376.
 132. Opinion S. Guidance on selected default values to be used by the EFSA Scientific Committee, Scientific Panels and Units in the absence of actual

measured data. *EFSA J.* 2012;10(3):1-32.

133. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 2012;9(7):676-682.
134. Ahmed Fetouh F. Ameliorating Effects of Curcumin and Propolis against the Reproductive Toxicity of Gentamicin in Adult Male Guinea Pigs: Quantitative Analysis and Morphological Study. *Am J Life Sci.* 2014;2(3):138.
135. De Souza Predes F, Diamante MAS, Dolder H. Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *Int J Exp Pathol.* 2010;91(2):125-131.
136. Abercrombie M. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec.* 1946;94(2):239-247.
137. Bielli A, Gastel MT, Pedrana G, et al. Influence of pre- and post-pubertal grazing regimes on adult testicular morphology in extensively reared Corriedale rams. *Anim Reprod Sci.* 2000;58(1-2):73-86.
138. Wing T, Christensen AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *Am J Anat.* 1982;165(1):13-25.
139. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972;52(1):198-236.
140. Johnsen SG. Testicular Biopsy Score Count – A Method for Registration of Spermatogenesis in Human Testes: Normal Values and Results in 335 Hypogonadal Males. *Horm Res Paediatr.* 1970;1(1):2-25.
141. Bradford M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72(1-2):248-254.
142. Yuluğ E, Türedi S, Karagüzel E, Kutlu Ö, Menteşe A, Alver A. The short term effects of resveratrol on ischemia–reperfusion injury in rat testis. *J Pediatr Surg.* 2014;49(3):484-489.
143. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertil Steril.* 2009;92(5):1520-1524.
144. Mann U, Shiff B, Patel P. Reasons for worldwide decline in male fertility. *Curr Opin Urol.* 2020;30(3):296-301.
145. Ikokide EJ, Oyagbemi AA, Oyeyemi MO. Impacts of cadmium on male fertility: Lessons learnt so far. *Andrologia.* 2022;54(9).
146. Salehi B, Mishra AP, Shukla I, et al. Thymol, thyme, and other plant sources: Health and potential uses. *Phyther Res.* 2018;32(9):1688-1706.
147. Nna VU, Ujah GA, Mohamed M, et al. Cadmium chloride–induced testicular

- toxicity in male wistar rats; prophylactic effect of quercetin, and assessment of testicular recovery following cadmium chloride withdrawal. *Biomed Pharmacother.* 2017;94:109-123.
148. Xie S, Jiang L, Wang M, et al. Cadmium ingestion exacerbates Salmonella infection, with a loss of goblet cells through activation of Notch signaling pathways by ROS in the intestine. *J Hazard Mater.* 2020;391(February):122262.
 149. Haque M, Ansari H. Anti-Obesity Effect of Arq Zeera and Its Main Components Thymol and Cuminaldehyde in High Fat Diet Induced Obese Rats. *Drug Res (Stuttg).* 2018;68(11):637-647.
 150. Çilenk KT, Öztürk İ, Sönmez MF. Ameliorative effect of propolis on the cadmium-induced reproductive toxicity in male albino rats. *Exp Mol Pathol.* 2016;101(2):207-213.
 151. El-Neweshy MS, El-Maddawy ZK, El-Sayed YS. Therapeutic effects of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) pollen extract on cadmium-induced testicular toxicity. *Andrologia.* 2013;45(6):369-378.
 152. Unsal C, Kanter M, Aktas C, Erboğa M. Role of quercetin in cadmium-induced oxidative stress, neuronal damage, and apoptosis in rats. *Toxicol Ind Health.* 2015;31(12):1106-1115.
 153. Yari A, Asadi MH, Bahadoran H, Dashtnavard H, Imani H, Naghii MR. Cadmium Toxicity in Spermatogenesis and Protective Effects of l-Carnitine in Adult Male Rats. *Biol Trace Elem Res.* 2010;137(2):216-225.
 154. Yari A, Sarveazad A, Asadi E, et al. Efficacy of *Crocus sativus* L. on reduction of cadmium-induced toxicity on spermatogenesis in adult rats. *Andrologia.* 2016;48(10):1244-1252.
 155. Balci CN, Firat T, Acar N, Kukner A. Carvacrol treatment opens Kir6.2 ATP-dependent potassium channels and prevents apoptosis on rat testis following ischemia–reperfusion injury model. *Rom J Morphol Embryol.* 2021;62(1):179-190.
 156. Iqbal T, Cao M, Zhao Z, et al. Damage to the Testicular Structure of Rats by Acute Oral Exposure of Cadmium. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(11):6038.
 157. Chen Z, Zuo Z, Chen K, et al. Activated Nrf-2 Pathway by Vitamin E to Attenuate Testicular Injuries of Rats with Sub-chronic Cadmium Exposure. *Biol Trace Elem Res.* 2022;200(4):1722-1735.
 158. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:1-11.
 159. Marettová E, Mareta M, Legáth J. Changes in the Peritubular Tissue of Rat Testis after Cadmium Treatment. *Biol Trace Elem Res.* 2010;134(3):288-295.

160. Liu F, Jan KY. DNA damage in arsenite- and cadmium-treated bovine aortic endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 2000;28(1):55-63.
161. Mężyńska M, Brzóska MM, Rogalska J, Piłat-Marcinkiewicz B. Extract from *Aronia melanocarpa* L. Berries Prevents Cadmium-Induced Oxidative Stress in the Liver: A Study in A Rat Model of Low-Level and Moderate Lifetime Human Exposure to this Toxic Metal. *Nutrients*. 2018;11(1):21.
162. Mężyńska M, Brzóska MM, Rogalska J, Galicka A. Extract from *Aronia melanocarpa* L. Berries Protects Against Cadmium-induced Lipid Peroxidation and Oxidative Damage to Proteins and DNA in the Liver: A Study using a Rat Model of Environmental Human Exposure to this Xenobiotic. *Nutrients*. 2019;11(4):758.
163. Nasiadek M, Danilewicz M, Klimczak M, Stragierowicz J, Kilanowicz A. Subchronic Exposure to Cadmium Causes Persistent Changes in the Reproductive System in Female Wistar Rats. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:1-17.
164. Imlay JA. Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide. *Annu Rev Biochem*. 2008;77(1):755-776.
165. SIES H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213-219.