



**WİSTAR ALBİNO SIÇANLARDA 2,3,7,8 TETRACHLORODIBENZO P-  
DIOXİN (TCDD)'NİN TESTİKÜLER TOKSİSİTESİ ÜZERİNE  
THYMOQUINONE'UN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Birgöl YİĞİTCAN**

**İnönü Üniversitesi ve Fırat Üniversitesi**

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**Ortak Doktora Programı**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet GÜL**

**Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN**

**Doktora Tezi – 2019**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**WİSTAR ALBİNO SIÇANLARDA 2,3,7,8 TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXİN  
(TCDD)'NİN NEDEN OLDUĞU TESTİKÜLER TOKSİSİTESİ ÜZERİNE  
THYMOQUINONE'UN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Birgöl YİĞİTCAN**

**İnönü Üniversitesi ve Fırat Üniversitesi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Ortak Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Mehmet GÜL**

**Ortak Tez Danışmanı  
Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN**

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDK  
2018-962 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**MALATYA  
2019**


## KABUL VE ONAY SAYFASI

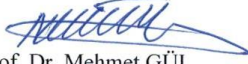
İnönü Üniversitesi ile Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüleri Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Ortak Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Birgül YİĞİTCAN'ın " Wistar Albino Sıçanlarından 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin ( TCDD )'nin Testiküler Toksisitesi Üzerine Tymoquinone'un Koruyucu Etkilerinin Araştırılması "** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 02/05/2019

  
Prof. Dr. Nigar VARDI  
İnönü Üniversitesi  
Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN  
Fırat Üniversitesi  
Ortak Tez Danışmanı  
Üye

  
Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU  
Fırat Üniversitesi  
Üye

  
Prof. Dr. Mehmet GÜL  
İnönü Üniversitesi  
Danışman  
Üye

  
Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE  
İnönü Üniversitesi  
Üye

### ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ....../....../2019 tarih ve 2019/.....sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ  
Enstitü Müdürü

# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	vi
ABSTRACT .....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	3
2.1.1. Testis.....	3
2.1.1.1. Testis Anatomisi .....	3
2.1.1.2. Testis Histolojisi .....	4
2.1.1.2.1. Seminifer Tübüller.....	4
2.1.1.2.2. Sertoli Hücreleri .....	5
2.1.1.2.3. Spermatojenik Seri Hücreleri .....	6
2.1.1.2.4. Olgun sperm (sperm yapısı) .....	8
2.1.1.2.5. İnterstisyel Doku (tunika propriya) .....	9
2.1.2. Testis Embriyolojisi.....	10
2.1.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar.....	10
2.2. Dioksinin (TCDD) Tanımı ve Özellikleri .....	11
2.2.1. Dioksin Kaynakları ve Maruziyeti .....	12
2.2.2. TCDD Etki Mekanizması .....	14
2.2.3. TCDD Üreme Sistemine Etkileri.....	16
2.2.3.1. TCDD-Endokrin Sistem Etki Mekanizması .....	17
2.2.4. TCDD ve MiRNA .....	17
2.2.5. MikroRNA nedir?.....	17
2.2.6. MiRNA Biyosentezi .....	18
2.2.7. MiRNA Fonksiyon ve Önemi.....	19
2.3. Nigella Sativa (Çörek Otu).....	20
2.3.1. Thymoquinon (TQ).....	21
2.3.2. Thymoquinon Etki Mekanizması .....	22
2.3.2.1. Thymoquinonun Hücre Döngüsü ve Çoğalmasına Etkisi .....	22



2.3.2.2. Thymoquinone'un Apoptoza Etkisi .....	22
2.3.2.3. Thymoquinone'un Oksidatif Strese Etkisi .....	23
2.3.2.4. Thymoquinone'un Üreme sistemi üzerine Etkisi.....	23
3. MATERYAL ve METOT .....	25
3.1. Deney Grupları .....	25
3.1.1. TCDD ve Thymoquinon Hazırlanışı .....	25
3.1.2. Deney Uygulama Süreci .....	25
3.2. Işık Mikroskopik Teknik .....	26
3.2.1. MAYERS'in Hematoxylen- Eozin Metodu .....	27
3.2.2. Periyodik Asit- Schiff (PAS) Boya Metodu .....	27
3.2.3. İmmunohistokimyasal Boyama .....	28
3.3. Testis Hasar Skorumlama Yöntemi .....	29
3.4. Biyoistatistik Yöntem .....	30
3.5. Biyokimya Yöntemi .....	30
4. BULGULAR .....	31
4.1. TCDD'nin Sıçan Vücut Ağırlıklarına Etkisi.....	31
4.1.1. Vücut İlk ve Son Ağırlıklarının Değerlendirilmesi .....	31
4.2. TCDD'nin Sıçan Testis Ağırlıklarına Etkisi .....	32
4.2.1. TCDD'nin Sıçan Testis Ağırlık İndeksine Etkisi.....	33
4.3. Histolojik Bulgular .....	33
4.3.1. Işık Mikroskopik Bulgular.....	33
4.3.2. Kontrol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları.....	33
4.3.3. Mısır Yağı Grubu Işık Mikroskopik Bulguları.....	36
4.3.4. Thymoquinone Grubu Işık Mikroskopik Bulguları .....	38
4.3.5. TCDD Grubu Işık Mikroskopik Bulguları .....	40
4.3.6. TCDD +TQ Grubu Işık Mikroskopik Bulguları.....	43
4.4. Morfometrik Bulgular.....	47
4.4.1. Johnsen Skoru.....	47
4.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümleri .....	48
4.4.3. Germinal Epitel Kalınlık Ölçümleri .....	49
4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular .....	50
4.5.1. Caspas-9 Antikor Boyanması .....	50
4.5.2. Dicer ve Drosha Antikor Boyanması.....	53
4.5.3. Aril Hidrokarbon Reseptör Antikor Boyanması.....	58

4.6. Biyokimyasal Bulgular .....	62
5. TARTIŞMA.....	64
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	73
KAYNAKLAR .....	74
EKLER .....	81
EK 1. ÖZGEÇMİŞ .....	81
EK 2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ.....	82



## ÖZET

### WISTAR ALBINO SIÇANLARDA 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN (TCDD)'NİN NEDEN OLDUĞU TESTİKÜLER TOKSİSİTESİ ÜZERİNE THYMOQUINONE'UN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Organik klorlu bileşikler olarak bilinen dioksinlerden en zehirli türü 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'dir. Uzun süre maruz kalınması sonucu kanser, immun sistem, hormon ve üreme sistemi bozuklukları, erkeklerin üreme organlarında morfolojik değişiklikler ve spermatogenesizin gerilemesi gibi etkilerin olduğu gösterilmiştir. Thymoquinone (TQ), *Nigella sativa* uçucu yağında bulunan, biyoaktif bileşendir. Orta ve Uzak doğuda geleneksel ilaç olarak kullanılmaktadır. Anti-inflamatuvar, anti-viral, anti-allerjik ve anti-kanserojen etkileri bilinen bioflavoiddir. Çalışmada Thymoquinon'un TCDD verilen sıçanların testislerinde oluşan histolojik ve hormonal değişiklikler üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Deney sonunda testis dokuları, doku takip işlemlerinden sonra boyanmasının ardından ışık mikroskopik yöntemle incelendi ve kan serumlarında biyokimyasal olarak hormon düzeyleri değerlendirildi.

**Bulgular:** TCDD grubunda vücut ortalama ağırlık farkı, johnsen ve sağlam tübül skorlarında azalış, hücre debris, konjesyon, tübüllerde dejenerasyon skorlarında artış, seminifer tübüllerin çaplarında ve germinal epitel kalınlığında artış kontrol grubuna göre anlamlı bulunmamıştır. Serum testosteron ve progesteron seviyelerinde azalma, estradiol seviyelerinde artış, immunohistokimyasal olarak Cas-9 ve AhR immunreaktivitelerinde artış, Dicer ve Drosha immunreaktivitelerinde azalma gözlemlenmiştir. TCDD+TQ grubunda vücut ortalama ağırlık farkı TCDD grubuna göre yüksek, kontrol, My, TQ gruplarına göre düşüktür. Histolojik parametrelerde düzelleme, testosteron ve progesteron TCDD grubuna göre artış, kontrol, My, TQ gruplarına göre düşük, estradiol seviyelerinde ise kontrol, MY gruplarına göre azalma izlenmiştir. Cas-9 ve AhR immunreaktivitelerinde azalış, Dicer ve Drosha immunreaktivitelerinde artış gözlemlenmiştir.

**Sonuç:** TCDD uygulamasının sıçanların testis dokularında oluşturduğu biyokimyasal ve histolojik testiküler hasara karşı TQ koruma sağlamıştır.

**Anahtar Kelimeler:** TCDD, Testis, Thymoquinone, Dicer, Drosha

## ABSTRACT

### PROTECTIVE EFFECTS OF THYMOQUINONE ON 2,3,7,8 TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN (TCDD) INDUCED TESTIS DAMAGE

The most toxic type of dioxins, known as organic chlorinated compounds, is 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD). Long-term exposure has been shown to have effects such as cancer, immune system, hormone and reproductive system disorders, morphological changes in reproductive organs of men and regression of spermatogenesis. Thymoquinone is a bioactive ingredient found in *Nigella sativa* essential oil. It is used as a traditional medicine in the Middle and Far East. Anti-inflammatory, anti-viral, anti-allergic and anti-carcinogenic effects are known bioflavoid. The aim of this study was to investigate the effects of Thymoquinone on histological and hormonal changes in testes of rats given TCDD. At the end of the experiment, testicular tissues were examined by light microscopy after staining after tissue follow-up and biochemical hormone levels were evaluated in blood sera.

**Results:** The mean weight difference in the TCDD group, the decrease in the johnsen and intact tubule scores, the increase in cell debris, congestion, degeneration scores in the tubules, the increase in the diameter of the seminiferous tubules and the thickness of the germinal epithelium were not significant compared to the control group. Serum testosterone and progesterone levels were decreased, estradiol levels increased, immunohistochemically increased Cas-9 and AhR immunoreactivity, Dicer and Drosha immunoreactivity decreased. In TCDD + TQ group, body mean weight difference is higher than TCDD group and control is lower than My, TQ groups. Decrease in histological parameters, increase in testosterone and progesterone compared to TCDD group were found to be lower than control, My, TQ groups, and estradiol levels were decreased compared to MY groups. A decrease in Cas-9 and AhR immunoreactivity and an increase in Dicer and Drosha immunoreactivity were observed.

**Conclusion:** The TQ has significantly improved biochemical and histological testicular damage induced by TCDD in testicular tissues of male rats.

**Key words:** TCDD, Testis, Thymoquinone, Dicer, Drosha

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>TCDD</b>	: 2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-P-Dioksin
<b>TQ</b>	: Thymoquinone
<b>PCDD</b>	: Poliklorlu Dibenzo-P-Dioksin
<b>PCDF</b>	: Poliklorlu Dibenzo Furanlar
<b>PCB</b>	: Poliklorlu Bifeniller
<b>AGER</b>	: Agranüler Endoplazmik Retikulum
<b>GER</b>	: Granüler Endoplazmik Retikulum
<b>FSH</b>	: Folikül Stimule Edici Hormon
<b>LH</b>	: Luteinleştirici Hornon
<b>ABP</b>	: Androjen Bağlayıcı Protein
<b>PGH</b>	: Primordiyal Germ Hücrelerin
<b>Type A Dark</b>	: Koyu Sitoplazmalı Spermatozonyum Ad
<b>Type A Pale</b>	: Spermatozonyum Ap
<b>Sex Determining Region On Y</b>	: SRY
<b>TBF</b>	: Testis-Belirleyici Faktörü
<b>AMH</b>	: Antimüllerian Hormon
<b>MİM</b>	: Müllerian İnhibitör Madde
<b>AhR</b>	: Aril Hidrokarbon
<b>ARNT</b>	: Aril Nükleer Translokaz
<b>Dioxin Response Element=DRE</b>	: Dioksin Cevap Elementi
<b>MİRNA</b>	: MikroRNA
<b>Pri-MİRNA</b>	: Primer Mirna
<b>Pre-MİRNA</b>	: Prekürsör-Mirna
<b>Ago 2</b>	: Argonaute 2
<b>RISC</b>	: Rna-İnduced Silencing Complex
<b>UTR</b>	: Untranslated Region
<b>ORF</b>	: Open Reading Frame Bölgesi
<b>ROS</b>	: Reaktif Oksijen Türleri
<b>MDA</b>	: Malondialdehitin
<b>TNF-A</b>	: Tümör Nekrozis Faktor-Alfa
<b>İ.P</b>	: İntraperitoneal
<b>H&amp;E</b>	: Hematoksilin-Eosin

<b>PAS</b>	: Periodic Acid-Schiff
<b>Cas-9</b>	: Caspaz-9
<b>TAİ</b>	: Testis Ağırlık İndeksi
<b>E2</b>	: Estradiol



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Erkek Üreme Sistemini Oluşturan Organ ve Kanalların Şematik Çizimi .....	3
Şekil 2.2. Seminifer Tübül Epitellerinin Şematik Çizimi.....	5
Şekil 2.3. Spermatogenezis ve spermiyogenezis .....	8
Şekil 2.4. Mature Sperm Yapısı.....	9
Şekil 2.5. Poliklorlu Dibenzo-P-Dioksin (PCDD) Kimyasal Yapısı.....	12
Şekil 2.6. Dioksinin İnsana ve Tüm Canlılara Bulaşma Yolları .....	14
Şekil 2.7. TCDD Metabolik Yol Şeması .....	15
Şekil 2.8. Dioksin Maruz Kalma (Metabolizma) Şeması.....	15
Şekil 2.9. Mirna Biyosentezinin Şematik Çizimi .....	19
Şekil 2.10. Nigella Sativa .....	21
Şekil 2.11. Çörek Otu Tohumu ve Thymoquinon Kimyasal Yapısı .....	22
Şekil 4.1. Hayvan ağırlıklarının gruplara göre dağılımı .....	32
Şekil 4.2. Kontrol grubu: Daire/oval yapıda ve çaplarının birbirine yakın seminifer tübül, spermatogenik seri hücreler ve interstisyel alan. H-E; x20 .....	34
Şekil 4.3. Kontrol grubu: Seminifer tübüllerde germ hücreleri spermatogonium, primer spermatosit , sertoli hücreleri , uzamış spermatid, interstisyel alan ve bu alandaki Leydig hücreleri H-E; x40 .....	35
Şekil 4.4. Kontrol. PAS x40 .....	35
Şekil 4.5. Mısır yağı grubu: Normal histolojik yapıda seminifer tübüller ve duvarını oluşturan spermatogenik hücreler. H-E; X20.....	36
Şekil 4.6. Mısır yağı grubu: Normal histolojik yapıda Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar interstisyel alandaki damar ve Leydig hücreleri H-E; X40. ....	37
Şekil 4.7. Mısır yağı grubu. PAS; X40. Bazal membran .....	37
Şekil 4.8. TQ grubu. H-E; X20.....	38
Şekil 4.9. TQ grubu. H-E; X40. Sertoli hücresi, primer spermatosit, spermatogonyum .....	39
Şekil 4.10. TQ grubu. PAS; X40 .....	39
Şekil 4.11. TCDD grubu: İnterstisyel alanda vasküler konjesyon (yıldız), dejenere seminifer tübül şekli (oklar). H-E; X10 .....	41

<b>Şekil 4.12.</b> TCDD grubu: Dejenere olmuş germ hücrelerinin dökülmesi nedeniyle tübül lümeninde hücre debrisleri (oklar). H-E; X20 .....	41
<b>Şekil 4.13.</b> TCDD grubu. İnterstisyel alanda ödem oluşumu (yıldız), spermatogenetik seriyi oluşturan hücrelerin düzensiz yerleşimi gözlemlendi. H-E; X40.....	42
<b>Şekil 4.14.</b> TCDD grubu. H-E; X40 .....	42
<b>Şekil 4.15.</b> TCDD grubu. Birden fazla nukleusun kaynaşmasıyla oluşmuş dev hücreler H-E; X40 .....	43
<b>Şekil 4.16.</b> TCDD grubu. PAS,X40.....	43
<b>Şekil 4.17.</b> TCDD+TQ grubu. H-E,X10.....	44
<b>Şekil 4.18.</b> TCDD+TQ grubu. H-E,X20.....	45
<b>Şekil 4.19.</b> TCDD+TQ grubu. seminifer tübül lümeninde azalmış hücre debrisleri (kalın ok), küçülmüş ve azalmış vakuoller (ince ok). H-E,X20.....	45
<b>Şekil 4.20.</b> TCDD +TQ grubu H-E, X40.....	46
<b>Şekil 4.21.</b> TCDD +TQ grubu: Histolojik yapıya uygun bazal lamina. PAS,X40.....	46
<b>Şekil 4.22.</b> Johnsen Skor Değerleri Grafiği .....	48
<b>Şekil 4.23.</b> Seminifer Tübül Çap Ölçümleri Grafiği .....	49
<b>Şekil 4.24.</b> Germinal Epitel Kalınlık Ölçümleri .....	50
<b>Şekil 4.25.</b> Kontrol grubu, caspas-9 aktivesi. X20 .....	51
<b>Şekil 4.26.</b> Mısır yağı grubu, caspas-9 aktivesi. X20 .....	51
<b>Şekil 4.27.</b> TQ grubu, caspas-9 aktivesi. X20 .....	52
<b>Şekil 4.28.</b> TCDD grubu, caspas-9 aktivesi. X20.....	52
<b>Şekil 4.29.</b> TCDD+TQ grubu, caspas-9 aktivesi. X20 .....	53
<b>Şekil 4.30.</b> Kontrol grubu Dicer aktivesi. X40 .....	54
<b>Şekil 4.31.</b> Mısır yağı grubu. Dicer aktivesi, (ok). X40 .....	54
<b>Şekil 4.32.</b> TQ grubu, Dicer aktivesi. X40 .....	55
<b>Şekil 4.33.</b> TCDD grubu, Dicer aktivesi. X40.....	55
<b>Şekil 4.34.</b> TCDD +TQ grubu: Dicer aktivesi. X40 .....	56
<b>Şekil 4.35.</b> Kontrol grubu: Drosha aktivesi. X40 .....	56
<b>Şekil 4.36.</b> Mısır yağı grubu, Drosha aktivesi. X40 .....	57
<b>Şekil 4.37.</b> TQ grubu Drosha aktivesi. X40 .....	57
<b>Şekil 4.38.</b> TCDD grubu: Drosha aktivesi. X40.....	58
<b>Şekil 4.39.</b> TCDD+TQ grubu: Drosha aktivesi. X40 .....	58
<b>Şekil 4.40.</b> Kontrol grubu, AhR aktivesi. X40 .....	59
<b>Şekil 4.41.</b> Mısır yağı grubu, AhR aktivesi. X40 .....	60



<b>Şekil 4.42.</b> TQ grubu, AhR aktivesi. X40 .....	60
<b>Şekil 4.43.</b> TCDD grubu, AhR aktivesi. X40.....	61
<b>Şekil 4.44.</b> TCDD+TQ grubu, AHR aktivesi. X40 .....	61
<b>Şekil 4.45.</b> Hormon Düzeyleri Grafiği .....	63



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo No</b>	<b>Sayfa No</b>
<b>Tablo 3.1.</b> Johnson Skorlama Tablosu .....	29
<b>Tablo 4.1.</b> Grup İçi İlk Ve Son Ağırlık Farklarının Değerlendirilmesi. a,b,c: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar.....	31
<b>Tablo 4.2.</b> Hayvan ağırlıklarının gruplara göre dağılımı, a,b,c,d: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar .....	32
<b>Tablo 4.3.</b> Testis Ağırlıklarının Gruplara Göre Dağılımı .....	33
<b>Tablo 4.4.</b> Gruplar Arasında TAI Değerlendirilmesi .....	33
<b>Tablo 4.5.</b> Testiküler Hasar Skoru .....	47
<b>Tablo 4.6.</b> Johnsen Skor Değerleri .....	48
<b>Tablo 4.7.</b> Tüm Grupların Seminifer Tübül Çap Ortalamaları .....	48
<b>Tablo 4.8.</b> Tüm Grupların Germinal Epitel Kalınlık Ortalamaları .....	49
<b>Tablo 4.9.</b> Antikor Boyanma Yoğunluğu Skor Değerlendirilmesi .....	62
<b>Tablo 4.10.</b> Hormon Düzeylerinin Değerlendirilmesi .....	62

# 1. GİRİŞ

Sanayinin hızla gelişmesine bağlı olarak endüstriyel üretim proseslerinin artışı sonucu açığa çıkan istenmeyen yan ürünler, canlılar için yaşam kaynağı olan hava, su, toprak ve besin kaynaklarını kontamine ederek, özellikle insan sağlığı üzerinde istenmeyen toksik etkilere sebep olmaktadır. Bu nedenle dioksinli bileşiklerin kaynakları, etki mekanizmaları, oluşturduğu sağlık problemleri ve zararlı etkilerini önleyici/azaltıcı maddelerin belirlenmesi oldukça önemlidir.

Dioksinler, özellikleri ve toksik etkileri birbirleri ile ilişkili olan çok geniş bir kimyasal madde grubudur. Dioksin, iki oksijen köprüsüyle birbirlerine bağlanmış iki klorlu benzen halkası içeren bileşen grubunun genel adı olup, bu grupta poliklorlu dibenzo-p-dioksin (PCDD), poliklorlu dibenzo furanlar (PCDF) ve poliklorlu bifeniller (PCB)'lerden oluşan 210 adet klorlu toksin bulunmaktadır (1). Doğada klorlanma derecesine bağlı olarak 75 PCDD, 135 PCDF ve 12 PCB türdeş dioksin bileşikleri bulunmaktadır. Dioksin ve benzeri bileşiklerin en toksik olanı PCDD grubunda yer alan 2,3,7,8, tetrachlorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'dir (1, 2).

TCDD ve diğer dioksinli bileşikler, laboratuvarlarda deneysel analizlerde kullanılmak için üretimi dışında endüstriyel işlemler sonucu istenmeyen son ürünler olarak, özellikle oksijenin az olduğu ortamlarda, organik maddelerin yanması sonucu oluşmaktadır (1, 2). İnsanlardaki dioksin zehirlenmesinin %90'ı besin zinciri yoluyla olduğu bildirilmektedir (2). Ayrıca evsel atıkların bilinçsiz ve uygun olmayan şekilde yakılması ile çevresel dioksin emilimi artmakta, (1) böylece kimyasal kararlılıkları ve lipofilik özellikleri nedeniyle çevredeki dioksin besin zincirinde birikerek insan sağlığını tehdit etmektedir (2). Kimyasal ve termal süreçler sırasında oluşan dioksinli bileşikler daha çok hava yolu ile taşınarak su, toprak ve bitkilerde birikirler. Yağda çözünürlükleri fazla olduğundan özellikle toprak ve bitkilerde yoğun olarak birirmektedir. Bitkiler yolu ile hayvanlar tarafından alınır ve hayvanların yağ dokularında birikerek kararlı hale geçerler. Dolayısıyla insanlar hayvansal ve bitkisel gıdalar yoluyla ayrıca su ve hava yolu ile dioksine maruz kalmaktadırlar (1, 2). Tüm bu bilgiler ışığında dioksin ve benzeri bileşikler gibi çevresel kirleticilerin insanlar üzerindeki zararlı etkileri araştırılmış özellikle erkeklerde infertiliteye sebep olabileceği

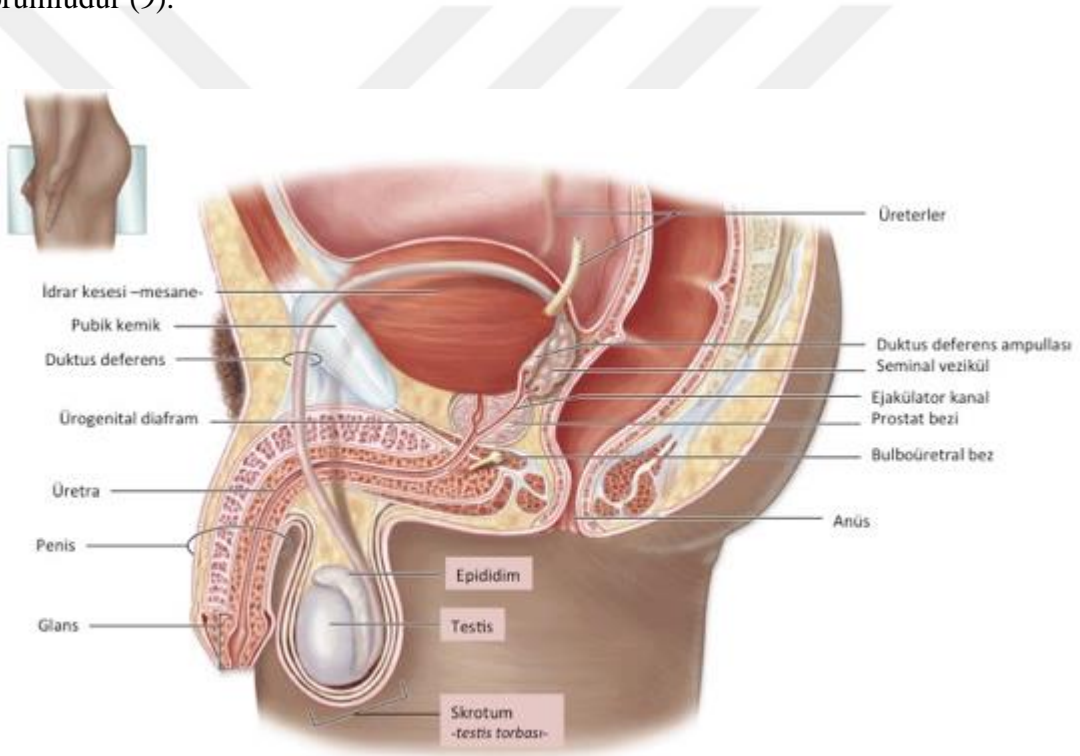
saptanmıştır. İçlerinde en toksik olan TCDD'nin özellikle steroidogenesisi ekileyerek embriyonik ve fetal dönemde testis gelişimi ve spermatogenezi bozduğu, yetişkin erkeklerde sperm sayısında azalma, testis boyutlarında küçülme ve testis kanserine yol açan bir endokrin bozucu olduğu kabul edilmektedir (3, 4). Ayrıca TCDD'ye maternal dönemde maruz kalan insan fetusların germ hücrelerinde apoptosiz, yetişkin rodentlerde ise seminifer tübül germinatif hücrelerinde apoptosize neden olduğu bildirilmiştir (5). Sonuç olarak, dioksinler arasında en zehirli bileşik olan TCDD dolaylı veya direkt olarak temas, hava, su ve besinler yolu ile alınarak vücutta birikmekte böylece doku ve organlarda hasara sebep olmaktadır.

Thymoquinon (TQ), *Nigella sativa* (çörek otu) bitkisinin en önemli biyoaktif bileşeni olup, birçok çalışmaya konu olmuştur. Hücre kültürü ve deneysel olarak hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda kanser, immunhastalıklar, üreme bozuklukları üzerine koruyucu ve tedavi edici etkileri gösterilmiştir. Yapılan birçok çalışmada böbrek, karaciğer, akciğerde TCDD ile oluşturulan doku hasarlarında Thymoquinon (TQ)'un koruyucu ve tedavi edici etkisi olduğu gösterilmiştir (6, 7). Hatta özellikle testis dokusunun germinal hücrelerinde oluşan hasara karşı spermatogenesisi yeniden destekleyip spermatozoaları koruduğu ve spermatozoa sayısını arttırdığı böylece testislerdeki histolojik hasar bulgularını azalttığı gösterilmiştir. Bu çalışmada TCDD ile oluşturulan testiküler hasara karşı thymoquinon'un spermatogenez, testiküler doku-hücre ve endokrin fonksiyonun korunması üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi, endokrin ve ekzokrin fonksiyonu olan bir çift testis, testis içi genital kanallar (tübülü rekti, rete testis, duktuli efferentes), genital boşaltım kanalları (duktus epididimis, duktus (vas) deferens, duktus ejakulatoryus, üretra), yardımcı genital bezler (vezikula seminalis, prostat, bulbouretral bez) ve penisten oluşmaktadır (8, 9). Bu sistem erkek gametin (spermatozoon) devamlı olarak üretilmesi, beslenmesi ve geçici olarak depolanması, erkek cinsiyet hormonlarının sentez ve salgılanmasından sorumludur (9).



Şekil 2.1. Erkek Üreme Sistemini Oluşturan Organ ve Kanalların Şematik Çizimi (10).

#### 2.1.1. Testis

##### 2.1.1.1. Testis Anatomisi

Testisler (orchis) karın boşluğunun dışında, skrotum içinde yer alan çift organlardır. Bu yerleşimleri sayesinde testisler vücut ısısından 2°C -3°C derece düşüktür (11, 12). Oval biçimli olup, 4-5 cm uzunluğunda, 2.5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında

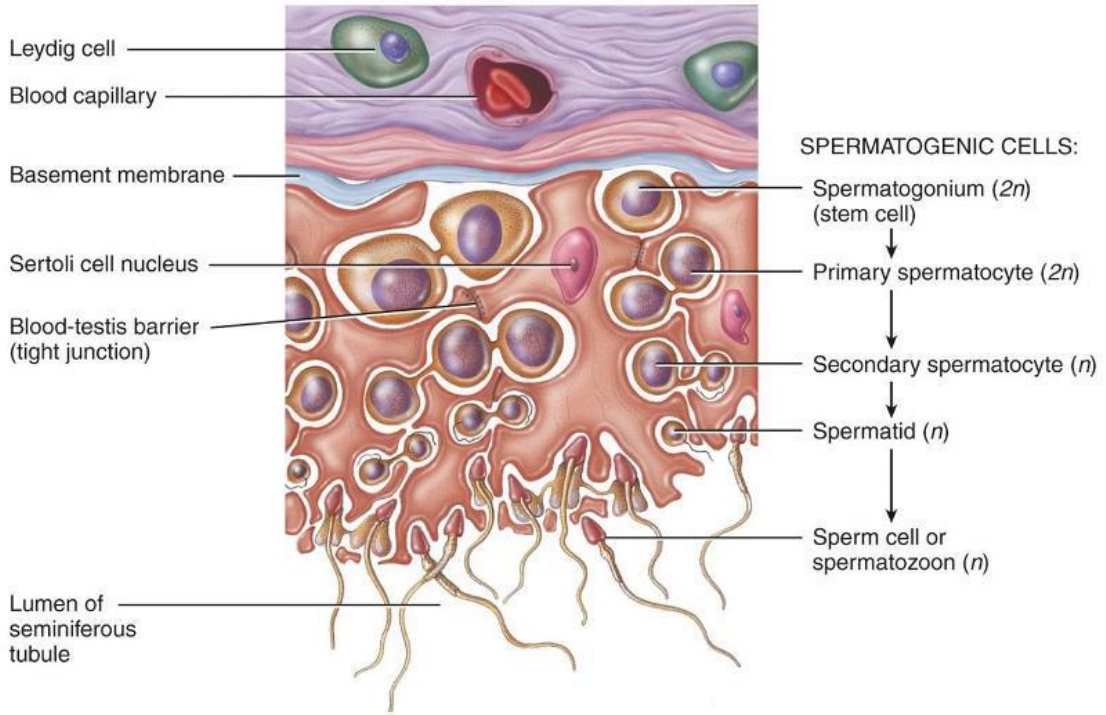
ve 10-14 gr ağırlığındadır. Skrotum testisleri dıştan saran kıvrımlı bir kese görünümündedir. Bu kese skrotal septum (**septum scrotum**) ile iç kısımda iki ayrı bölüme ayrılmakta ve her bölümde bir testis yer almaktadır. Büyüklükler yaklaşık olarak aynı olsa da sağ testisin ağırlığı sol testise göre %10 daha fazladır (13). Genellikle sol testis sağa göre 1 cm daha aşağıdadır (12, 13). Dış (**facies lateralis**) ve iç (**facies medialis**) iki yüzü, ön (**margo anterior**) ve arka (**margo posterior**) iki kenarı, alt (**extremitas inferior**) ve üst (**extremitas superior**) iki ucu vardır. Arka kenara epididimis tutunur (12).

### 2.1.1.2. Testis Histolojisi

Her bir testis, *tunica albuginea* adı verilen sıkı fibroelastik bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile sarıdır (8, 9). Bu kapsülün de etrafını tunika vajinalis sarmaktadır (8). Tunika albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşır ve *mediastinum testisi* oluşturur. Testise giren ve çıkan kan damarları, lenf damarları ve kanallar bu tabaka içinde seyrederler. Kapsülden ayrılan fibröz bölmeler her bir testisi yaklaşık 250 adet lobüle ayırır. Her bir lobül, içinde sperm üretilen, kıvrımlı yapıdaki 1-4 adet *seminifer tübül* ve *Leydig hücrelerini* içeren bağ dokusu yapısındaki *stromadan* oluşmaktadır (8, 9, 14). Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler içerir. Lobül içindeki her tübül kendi üzerinde katlanır ve mediastinumda önce kısa, düz seyir izleyerek *tübülü rekti* sonra anastomozlaşan kanal sistemi olan *rete testis* ile devam eder (9).

#### 2.1.1.2.1. Seminifer Tübüller

Her bir seminifer tübül yaklaşık 50 cm uzunluğunda (30-50 cm arasında) ve 150-250 µm çapındadır. Bu tübüller bazal lamina ve *tunica propriya* denilen, 3-5 tabaka *miyoid hücre* içeren, kollajen fibrillerinden oluşan ayrı bir bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bu bağ doku alanı içerisinde kan damarları ve lenfatik sinüsler görülür, ayrıca androjen üreten *Leydig hücreleri* ve makrofajlar bulunur (9, 15). Tübüllerin duvarını bazal laminadan lümeneye kadar 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş, *Sertoli (destek) hücreleri* ve düzenli olarak çoğalan *spermatogenik* (spermatogonyumlar, spermatosit-I, spermatosit-II ve spermatid) *hücreleri* içeren seminifer epitel oluşturmaktadır (8, 9, 14).



**Şekil 2.2.** Seminifer Tübül Epitellerinin Şematik Çizimi (16).

#### 2.1.1.2.2. Sertoli Hücreleri

Seminifer tübül epitelinde destek hücreleri olarak da bilinen bu hücreler, epitelin yaklaşık %10'unu kapsamaktadır (8). Sertoli hücrelerinin tabanları seminifer tübül epitelinin bazal laminasına tutunur, apikal yüzeyi ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine kadar uzanır (8, 15). Bu hücreler, şekil ve yerleşimi değişkenlik gösteren ökromatik nükleus, yaygın bir aER, gelişmiş bir gER ve Golgi aygıtı, yassı ve küre şekilli mitokondriyonları, mikrotübüller ve ara filamanlardan oluşan iyi gelişmiş bir hücre iskeletine sahiptirler (8, 9, 15). Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar morfolojik kan-testis bariyeri bölgesini oluşturmaktadır (8, 9, 14). Böylece hem tübül epiteli bazal ve adluminal bölgelere ayrılmış olur hem de spermatogonyumlar ve primer spermatositler daha üstteki sekonder spermatositler ve spermatidlerden izole edilmiş olurlar (8, 9). Her iki kompartmanda da spermatogenik hücreler Sertoli hücrelerinin uzantıları tarafından çevrilir. Böylece birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanmış olan spermatogenik seri hücrelerinin desteklenmesi, korunması ve beslenmesini sağlar. Bu yakın ilişki sayesinde spermatogenik hücreler ile dolaşım sistemi arasında metabolik substratlar ve atık maddelerin değişimi sağlanır (9, 15). En önemlisi, kan testis bariyeri, genetik olarak farklı olan ve buna bağlı olarak haploid germ hücrelerini immun sistemden korur (8, 9). Sertoli hücreleri folikül stimule edici hormon (FSH) ve

testosteron kontrolü altında androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılayarak seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlamaktadır (9). Aynı zamanda intratestiküler kanallar yönünde akan ve sperm taşınımını kolaylaştıran sıvı salgılar, olgunlaşmayı ve farklılaşmayı tamamlayamayan spermatogenez hücrelerini (8) ve spermiyogenezin sonunda oluşan rezidüel artıkları da fagosite eder (9, 15).

### 2.1.1.2.3. Spermatojenik Seri Hücreleri

Seminifer tübül epitelinde yerleşik olan diğer hücreler spermatogenez hücreleridir. Bazal lamina ve tübül lümeni arasında 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Primordiyal germ hücrelerinden köken alan bu hücreler puberten hemen önce düzenli olarak çoğalıp farklılaşarak spermatozoon adı verilen erkek germ hücrelerini oluştururlar. Olgun erkek gamet hücresi (spermatozoon) oluşum sürecinin ilk basamağından (spermatogonyumdan) son basamağına kadar izlenen sürekli bölünme ve farklılaşma süreci *Spermatogenez* olarak adlandırılır. Bu süreç adenohipofizden salgılanan Luteinleştirici hormon (LH) ve foliküler stimüle edici hormon (FSH) kontrolü altında gerçekleşir. Seminifer tübüller boyunca senkronize olmadan tekrarlandığından seminifer tübül epitelinde çeşitli gelişim evrelerindeki spermatogenez seri hücreleri görülmektedir (14). Erkek bireylerde puberteden itibaren primordiyal germ hücreleri mitoz ile çoğalarak spermatogonyumları meydana getirirler. Bunun yanı sıra primordiyal germ hücrelerin (PGH) de 4 yaşına kadar testis içinde bulunabilir oldukları bilinmektedir (17). Spermatogenez üç fazda incelenir (9, 14).

**I- Spermatozonyal Faz:** Primordiyal germ hücreleri, mitoz ile çoğalarak önce koyu sitoplazmalı spermatogonyum Ad (type A dark)'leri oluştururlar. Spermatogonyum Ad'ler de mitozla çoğalarak bir yandan kök hücrelerini oluştururken diğer yandan spermatogonyum Ap (type A pale)'leri oluştururlar (9, 17). Bu spermatogonyumların doğumdan sonra 3. ayda meydana geldikleri gösterilmiştir (17). Pubertede FSH ve LH hormonlarının etkisiyle *tip B spermatogonyumları* meydana gelir (9, 14, 17).

**II- Spermatozot Fazı:** Tip B spermatogonyumlar mitoz bölünme geçirir ve diploid yapıda *primer spermatozotleri* (kromozom:2n, DNA:4d) oluştururlar. Bu hücreler Sertoli hücrelerinin arasından seminifer epitel bazal bölgesinden tübülün lümenine doğru ilerlerler. Bu ilerleyiş sırasında spermatogonyum B'ler kan-testis bariyerinin lümenal yöndeki üst kompartmanına geçerek Primer spermatozot aşamasına



ulaşır. Bu geçiş sırasında hücreler arası bağlantı komplekslerinin hücre göçüne izin verecek şekilde yeniden düzenlenmesi sayesinde kan-testis bariyeri korunur (17). Primer spermatositlerin I.mayozu tamamlamasıyla kısa yaşam döngüsüne sahip *sekonder spermatositleri* (kromozom: n, DNA:2d) oluştururlar. Bunlar da II. mayozu tamamlayıp haploid (n) yapıda *genç spermatidleri* yaparlar (9, 14, 17). Mayoz bölünmenin tamamı Sertoli hücrelerinin kendi aralarında sitoplazmik uzantılarıyla oluşturdukları kan-testis bariyerinin arkasında yani vücudun immün sistem hücrelerinin bulunmadığı ortamda gerçekleşmektedir. Bu sayede yeni oluşan germ hücre serileri vücudun immün reaksiyonuna maruz kalmaz (8, 9).

**III. Spermatid Fazı (Spermiyogenez):** Bu süreç spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için özelleşmiş hücreler olan *spermatozoona (spermlere)* dönüşmesini kapsar. Spermatidler, küçük boyutları, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilebilirler ve spermatogenez sonucunda seminifer tübüllümenine bırakılan olgun spermatozona başkalaşırlar. Bu sırada spermatidin sitoplazmasında ve nükleusunda önemli morfolojik, fizyolojik ve moleküler değişiklikler gerçekleşmektedir. Bu değişiklikler spermatidin baş kısmında hücre çekirdeğini oluşturan genetik materyalin yoğunlaştırılması, kısmen çekirdeği kapsayan akrozom gelişimi, orta kısımda sıkı şekilde paketlenmiş mitokondri oluşumu ile birlikte kuyruk uzaması, sitoplazma kaybı, sitoplazma içinde bulunan organellerin yer değiştirmesi ve histon proteinlerinin protaminlerle yer değişimi ile karakterize olmaktadır (18).

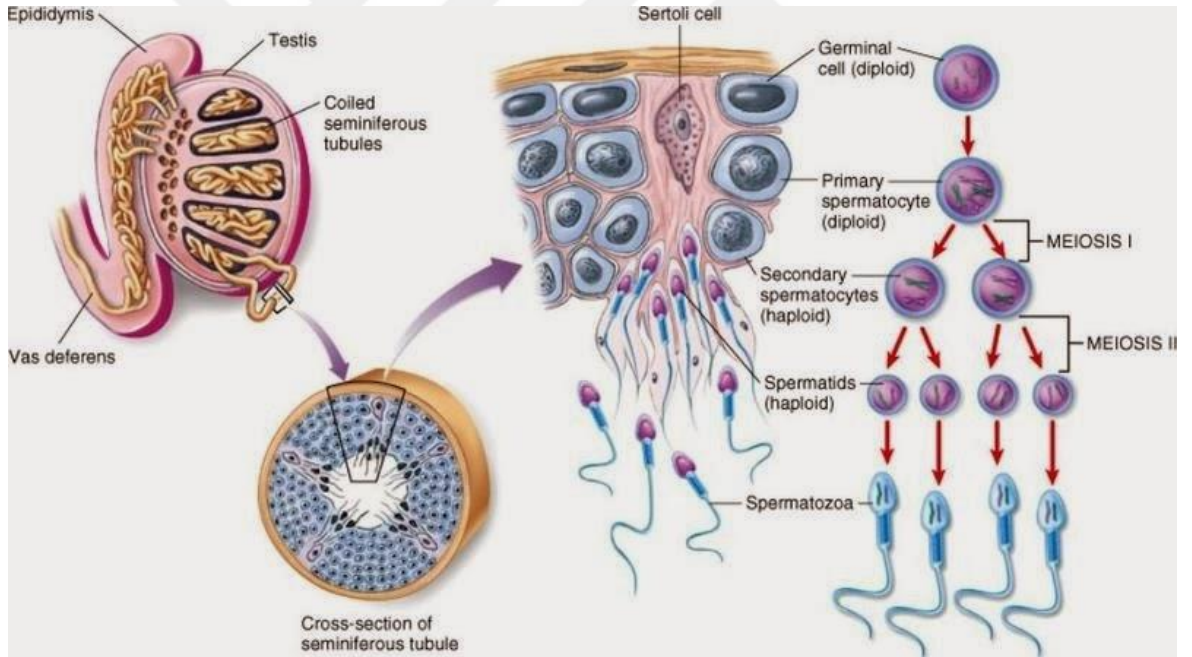
Spermiyogenez 4 evrede gerçekleşir:

**A. Golgi Fazı:** Spermatid sitoplazmasında; nukleusa yakın mitokondri, serbest ribozomlar, bir çift sentriol, Golgi kompleksi ve düz endoplazmik retikulum tübülleri bulunur. Endoplazmik retikulumda sentezlenen hidrolitik enzimler, Golgi kompleksine iletilir, değişikliğe uğrar ve Golgi kompleksinin trans yüzünden *proakrozomal granül* adı verilen PAS(+) granüller şeklinde salınırlar. Bu granüller birleşir ve çekirdek zarına yapışık şekilde olan ve spermin ön kutbunu belirleyen *akrozomal veziküller* oluşur. Bu aşamada sentrioller, çekirdek bölgesinden uzaklaşır ve flagellumun aksonemini (9 çift periferde, 2 tane merkezde mikrotubulus yapısı bulunan kuyruk iskeleti) oluşturmak üzere akrozomal bölgenin karşı kutbunda konumlanır (9, 15).

**B. Şapka Evresi:** Akrozomal vezikül genişleyerek büyür ve nukleusun ön yarısını kuşatır. Akrozomal vezikül son büyüklüğüne ulaştığı zaman *akrozom* adını alır ve yapısında hidrolitik enzimler bulunur (8, 9, 15).

**C. Akrozom Evresi:** Özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom içerisinde nöraminidaz, asit fosfataz, tripsin, hyalüronidaz ve akrozin benzeri proteazlar gibi hidrolitik enzimler bulunur. Bu enzimler, spermatozoonların bir oosit ile karşılaşmasında döllenmenin ilk basamaklarından birisi olan, akrozom reaksiyonunu başlatır (15). Spermatozoonların baş kısmı Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmaları içine iyice gömülürken, flagellum tübül lümenine doğru uzar. Nükleus yoğunlaşır ve uzarken mitokondriyonlar da flagellum proksimal parçasını kuşatarak spermatozoonun orta parçasını geliştirir ki bu parça spermatozoon hareketliliğini sağlar (9).

**C. Olgunlaşma Evresi:** Bu evrede *artık (rezidüel) cisimcik* adı verilen fazla sitoplazmik artıklar Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Sürecin sonuna doğru spermatozoonlar ile sertoli hücreleri arasında bağlantı kompleksleri ortadan kalkar ve uzamış spermatozoonlar sertoli hücrelerinden ayrılıp lümenine salıverilirler. Seminifer tübül lümenine atılan ancak hareket ve döllenme yetenekleri olmayan olgun spermatozoonlar gelişir. Bu olaya ise *spermiyasyon* denir (9, 18).



**Şekil 2.3.** Spermatogenezis ve spermiyogenezis (19).

#### 2.1.1.2.4. Olgun sperm (sperm yapısı)

İnsanlarda spermatogoniumlardan sperm oluşma süresi yaklaşık 64 gündür. Olgun sperm, ortalama 60-65 µm uzunluğunda olup baş ve kuyruk olmak üzere iki ana kısımdan oluşmaktadır (8, 9, 11, 20).

**Sperm Başı:** Yassı ve sivri olup, akrozomla sarılmıştır, yaklaşık 4.5-5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındaki kısımdır. Akrozom, hidrolitik enzimler (proteazlar, asit fosfatazlar, hiyaluridaz, akrosin, nöraminidazlar) içerdiğinden lizozomlara benzer (8, 9, 11, 20).

**Sperm Kuyruğu (Flagellum):** Silya yapısındadır. Başlangıç (boyun), orta, esas ve son parçalardan oluşur. **Başlangıç parçası;** Kuyruğun başa en yakın kısmıdır ve kısadır. **Orta parça;** Yaklaşık 7 µm uzunluğunda, 9+2 mikrotübül yapısında flagellum ve mitokondriyonları kapsar. **Esas parça;** Yaklaşık 45 µm uzunluğunda, kuyruğun en uzun parçasıdır. Aksonem kompleksi ve fibröz bir kılıftan oluşur. **Son parça;** yaklaşık 5 µm uzunluğunda olup sadece aksonem içeren, kuyruğun en kısa parçasıdır (9, 20).

## Normal Sperm Structure



Şekil 2.4. Mature Sperm Yapısı (21).

### 2.1.1.2.5. İnterstisyel Doku (tunica propriya)

Testisin seminifer tübülleri arasındaki bağ dokusu alanlardır ve sınırlar, kan damarları, lenf damarları içerir. İnterstisel bağ dokusunda değişik tipte hücreler bulunur. Bu hücreler fibroblastlar, mast hücreleri, myoid hücreler, makrofajlar ve indifferansiye hücrelerdir. Ergenlikte (puberte) ek bir hücre tipi daha işlevsel olarak belirgin hale gelir. Bu poligonol şekilli olan, nükleusu merkezde ve lipid damlacıkları içeren **Leydig hücreleri'**dir. Bu hücreler steroid sentezleyen hücre özelliklerini gösterdiklerinden dolayı bol aER ve eozinofilik sitoplazmaya sahiptirler. Erken fetal yaşam sırasında farklılaşarak erkek cinsiyet hormonu olan **testosteronu** üretirler. Gebelik sırasında plasentadan üretilen gonadotropik hormon, anneden fetusa geçer ve fetal testislerdeki Leydig hücrelerini uyarır (15). Böylece embriyo genital organları erkek yönünde gelişir. Daha sonra bu hücreler gebeliğin geri kalanı boyunca (5. ayından itibaren) ve puberte öncesine kadar dinlenmede kalırlar. Pubertede spermatogenesisin

başlatılması, aksesuar cinsiyet bezleri ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi, yetişkinde ise spermatogenesisin, sekonder seks karakterlerinin, aksesuar cinsiyet bezleri ve boşaltım kanallarının fonksiyonlarının devamı açısından oldukça önemlidir (9).

### 2.1.2. Testis Embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek veya dişi morfolojik özelliklerine sahip değildirler (22). Genital sistem, erken dönemde her iki cinsde de birbirine benzer; bu başlangıç dönemi, *seksüel gelişimin farklılaşmamış evresi* olarak adlandırılır (23).

#### 2.1.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar

Gonadlar, bir çift uzunlamasına, genital (gonadal) sırt halinde oluşmaya başlarlar (22).

Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar;

1. Mezodermal epitel,
2. Altında bulunan mezenşim veya embriyonik bağ dokusu,
3. Primordial germ hücreleri (22, 23).

Mezodermal sölom epitelinin poliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla *gonadal sırt* oluşmaktadır. Gelişimin 6. Haftasına kadar genital sırtlar içinde germ hücreleri yoktur. Vitellus kesesinin duvarından kaynaklanan Primordial germ hücreleri (23), primitif çizgi boyunca göç edip 3. haftada yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşirler. Dördüncü haftada son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında genital sırtlara ulaşır, 6. haftada da genital sırtları işgal ederler (22). Primordiyal germ hücrelerinin gonadal sırtlara ulaşmalarından hemen önce ve ulaştıkları sırada, genital sırttaki epitel hücreleri proliferasyon olarak altlarındaki mezenşimin içine gömülürler ve *primitif cinsiyet kordonlarını* oluştururlar (şekil 2). Hem erkek hem de dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır (22) ve 7. haftadan önce erkek veya dişi gonadların birbirinden ayrılması mümkün değildir. Bu evredeki gonada *farklanmamış gonad* denir (22, 23).

#### 2.1.2.2. Testis Gelişimi

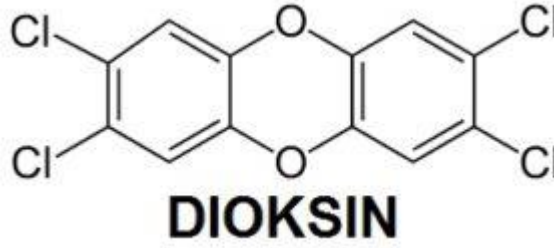
Embriyo genetik olarak erkeğe primordiyal germ hücreleri XY kromozom kompleksine sahiptir (22). Y kromozomunun kısa kolundaki SRY (sex determining

region on Y) geninin etkisiyle, Testis-belirleyici faktörü (TBF) sentezlenir. Testis-belirleyici faktör, primitif cinsiyet kordonlarını farklılaşmamış gonadın medullasına doğru uzamasını ve burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yapmaları yönünde uyarıp **testis kordonlarının** oluşmasını sağlar. Bu ağ şeklindeki kordonlar incelenerek **rete testisi** oluştururlar. Kalın fibröz kapsül olan **tunika albuginea** geliştikten sonra testis kordonlarının yüzey epiteli ile olan bağlantıları kesilir (22, 23). Testis aşamalı olarak genişler, mezonefroza ayrılır ve kendi mezenteri olan, mesonefrium ile asılı hale gelir (23). Bu durumda testis kordonları artık primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden gelişen **Sertoli destek hücrelerinden** meydana gelir (22). Kordonların farklılaşmaya başlaması ile Gonadal sırtın mezeneşiminden köken alan ve testis kordonlarının arasında bulunan interstisyel Leydig hücreleri gelişir (22). Gestasyonun 8. Haftasında, Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlar. Bu hormon mezonefroz kanallarının (Wolf) ve dış genitalerin erkek tipinde farklılaşmasını uyarır (23). Ayrıca fetal testislerde, glikoprotein yapıda bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MİM) adı verilen bir hormon salgılanmaktadır. Antimüllerian hormon, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır (23). Puberteye kadar solid halde kalan testis kordonları pubertede seminifer kordonlar (testis kordonları), seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklılaşırlar ve sonrasında duktülü eferentlere girerler (22, 23).

## 2.2. Dioksinin (TCDD) Tanımı ve Özellikleri

Dioksinler C, H, O ve Cl içeren renksiz, kokusuz, suda çözünmeyen, ticari ve endüstri amaçla üretilmeyen, özellikle oksijence fakir ortamlarda yanma sırasında istenmeden açığa çıkan geniş kimyasal yan ürünlerdir (1, 2, 24). Bu grupta poliklorlu dibenzo-p-dioksin (PCDD), poliklorlu dibenzo furanlar (PCDF) ve poliklorlu bifeniller (PCB)'lerden oluşan 210 adet klorlu toksin bulunmaktadır (1, 24). Günümüzde klorlanma derecesine bağlı olarak 75 PCDD, 135 PCDF ve 12 PCB türdeş dioksin bileşikleri tanımlanmıştır (1, 2) ve bunların içinden sadece 17 tanesinin yüksek toksik etki yönünden önemli olduğu bildirilmiştir. Bu bileşikler doğada kararlı formda kaldıklarından metabolik ve çevresel yıkımlara oldukça dayanıklı olup geniş yayılım alanına sahip çevresel kirleticilerdir. Dioksinler, yarılanma ömrünün uzun olduğundan doğada sürekli dir. Yağda kolay çözünebilir yan ürün olduğundan hayvan ve insan vücudunda yüksek oranda birikmektedir ve çok küçük dioksin yoğunlaşmaları bile çevre ve insanda zararlı yan etkilere neden olmaktadır (2).

Dioksin maddesinin kimyasal adı 2, 3, 7, 8 tetraklor dibenzo-para-dioksin olup, 4 klor, 2 oksijen ve 2 benzol halkasından ibaret bir organik aromatik bileşiktir. Dioksin ve benzeri bileşiklerin en toksik olanı PCDD grubunda yer alan 2, 3, 7, 8-TCDD'dir. Kimyasal olarak 2, 3, 7, 8 tetraklor dibenzo-para-dioksin, dört klor, iki oksijen ve iki benzol halkasından ibaret bir organik bileşiktir. Dibenzo kısmı 2 heksagondan (altıgen) gelmektedir. Her heksagonun tepesinde bir karbon atomu bulunmaktadır. İki benzol halkasının birleştiği noktada iki (5. ve 10.) oksijen atomu bulunur ve molekülün merkezi iki benzol halkasının birleştiği noktadır. Böylece iki oksijen atomu ile altılı halka olurlar. Dört klor, iki oksijen ve iki benzol halkasından ibaret bu organik bileşiğe, basitleştirmek için, dioksin ya da tetrakloro dibenzo -para- dioksin (TCDD) denmiştir (2).



**Şekil 2.5.** Poliklorlu Dibenzo-P-Dioksin (PCDD) Kimyasal Yapısı (25)

### 2.2.1. Dioksin Kaynakları ve Maruziyeti

Dioksinler, günlük hayatımızda deneysel araştırmalarda kullanım amacı dışında asla üretilmezler. Ancak çevredeki doğal olaylarda (örn; volkanik patlamalar, orman yangınları) veya endüstriyel işlemlerin (katı atık yakımı, kağıt beyazlaştırma işlemleri, pestisin üretimi vs.) istenmeyen yan ürünü olarak ortaya çıkmaktadır (1, 2, 4, 24). Dioksinler doğal olarak sadece beyaz rot mantarları tarafından üretilmektedir. Bu mantarlar kullanılmayan yapıların üzerinde oluşan küflerdir ve ligninden dioksinleri oluşturmaktadır (2). Dioksin bileşiklerinin en önemli ve başlıca kaynakları şunlardır (2, 24);

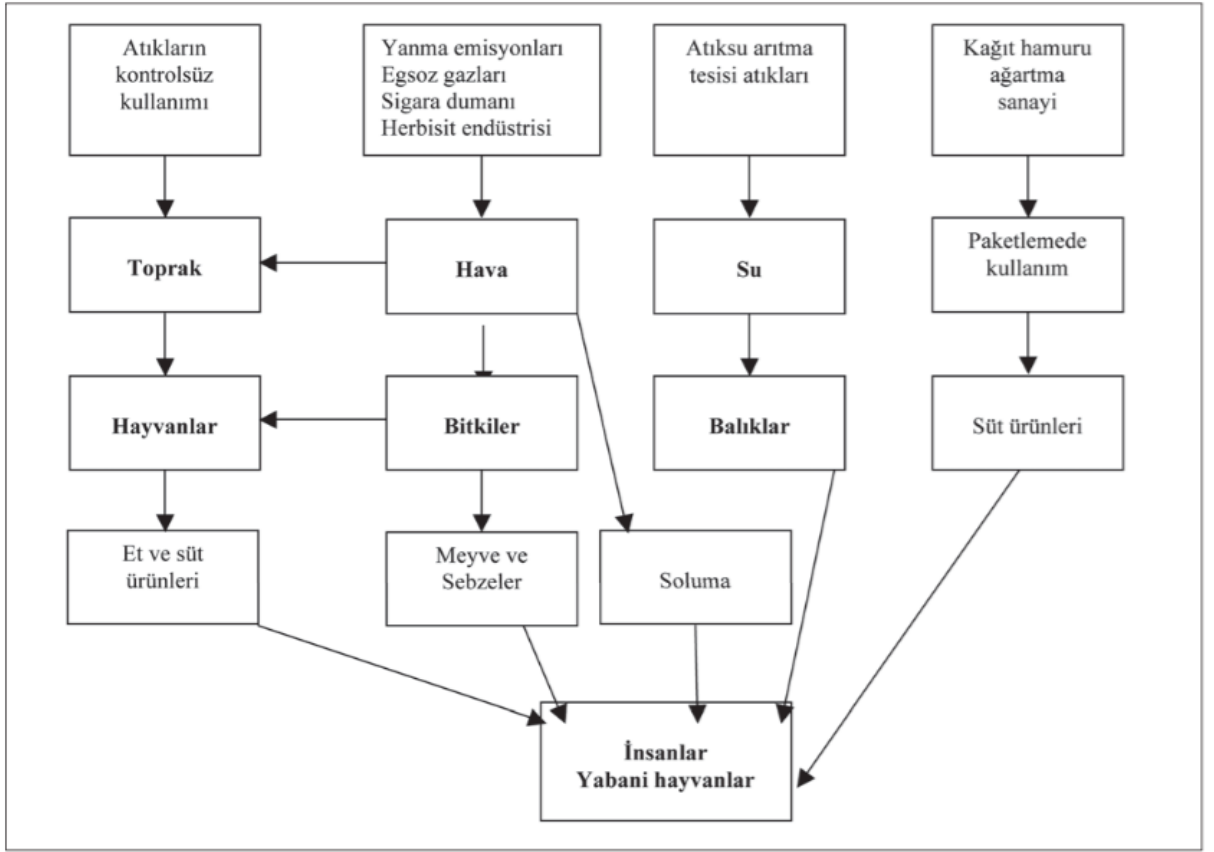
- ✓ Kontrolsüz atık yakılması
- ✓ Elektrik üretim santralleri ve ısınma
- ✓ Kimyasal ve tüketici hammaddelerin üretimi (kağıt, tekstil, plastik, deri vs.)
- ✓ Sigara dumanı
- ✓ Bakterisid, fungusid, herbisit üretimi

✓ Doğa olayları (orman yangınları, volkanik patlamalar vs)

Dioksin ve dioksin benzeri bileşikler suda az çözündüklerinden doğal yıkımlara oldukça dayanıklı ve kararlı durumdadır (1, 2). Düşük buhar basıncına sahip olduklarından gaz haline geçer ve çevreye yayılan dioksinin büyük bölümünü canlılar hava yolu ile almaktadır. Havadaki küçük partiküllere bağlanır böylece güneşten korunur. Bu şekilde uzun mesafeler katederek her yere taşınır. Bu durum dioksinin hayatımızda neden kaçınılmaz olduğunu açıklar.

Dioksin yağmur ile toprağa ve suya karışarak ciddi sağlık riski teşkil eder. Toprağın altında suda çözünmeden 25-100 yıl kalabilmektedirler. Ayrıca çeşitli kimyasal üreticilerinin atık suları, lağım sularının ve havadaki dioksinin yağmur ile su sistemlerine geçişi, suda yaşayan canlıların besin zincirinde birikmesine böylece yediğimiz tüm balık ve deniz ürünlerinden de bizlere ulaşmasını sağlamaktadır (1). Doğada bulunan dioksin ile kontamine olan toprakta yetişmiş bitkiler ile beslenen hayvanlar tarafından bu toksik maddeler alınır ve hayvanların yağ dokularında birikerek kararlı durumda bulunurlar. Dolayısıyla İnsanlar, dioksin bileşiklerini hayvansal ve bitkisel gıdalar yoluyla maruz kalırlar. İnsanlardaki dioksin zehirlenmelerinin %90'ının besin zinciri yoluyla olduğu bildirilmektedir. dioksin vücuda girdiğinde, yoğun olarak yağların içinde eriyip kan, kas, karaciğer ve yağ dokularına ulaşır ve yıllarca kalabilir. Dioksinin insan vücudundaki yarı ömrü 7-14 yıl arasında değişmektedir. Ancak en çok karaciğerin protein depoları ve yağ dokularında birikme eğilimindedirler. Dolayısıyla vücut yağ oranı fazla olan insan, daha çok dioksin depo ederler (1, 25).

Dioksinin insan için günlük tolere edilebilecek dozunun, 1-4 piko gram toxicity equivalent/kg olduğu ancak pek çok ülkede günlük alınan miktarın, tolere edilebilen miktardan daha yüksek olduğu belirtilmiştir (25). Yıkım süreçleri oldukça yavaş olduğundan en düşük dozda ancak sürekli alınan dioksin kısa zamanda çok tehlikeli boyutlara gelmektedir. Özellikle laktasyon döneminde anne sütünün yağındaki dioksin bebeğe geçmekte hatta bebek anneden daha çok dioksin barındırmaktadır (1, 24). Tüm bu bilgiler ışığında dioksin ve türevlerinin nasıl ve hangi şartlar altında meydana geldiğini anlamak bugün ve gelecekte canlı sağlığının korunması ve temiz çevre şartlarının sağlanması açısından oldukça önemlidir.

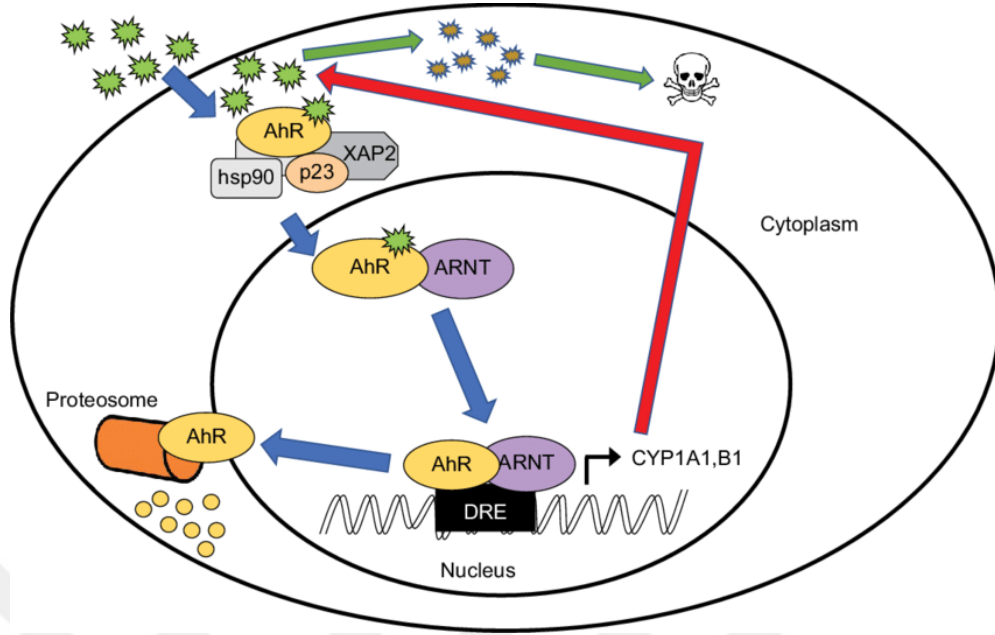


**Şekil 2.6.** Dioksinin İnsana ve Tüm Canlılara Bulaşma Yolları (24)

### 2.2.2. TCDD Etki Mekanizması

Dioksin vücuda hangi yolla girerse girsin, dayanıklı ve uzun yarı ömre sahip olduğundan vücutta birikir. Biriken bu toksik madde hücrede genetik bilgiyi taşıyan DNA'ları etkileyerek onların işlevlerini ya bloke eder ya da anormal yanıtlar vermesine sebep olmaktadır. Dioksinli bileşikler bu olumsuz etkilerini DNA transkripsiyon faktörlerinden olan, steroid reseptörler gibi hücre sitoplazmasında bulunan, aril hidrokarbon (AhR) reseptörleri aracılığıyla yaparlar. AhR reseptörleri normal şartlarda uyarıldıklarında sitoplazmadan nukleusa geçer, DNA'nın ilgili kısmına bağlanır ve gen transkripsiyonunu sağlarlar (27). Vücuda TCDD alındığında, hücre sitoplazmadaki HSP 90 geni aracılığıyla AhR reseptörüne bağlanarak uyarılmasına neden olurlar (28). Böylece oluşan bu AhR-TCDD kompleksi (dimer yapısı) nukleusa geçer ve aril nukleer translokaz (ARNT) ile bağlanarak heterodimer bir yapı oluşturur. Bu heterodimer yapı DNA üzerinde bulunan cevap elementine, dioksin cevap elementi (dioxin response element=DRE) bağlanır ve uyarılma sonucunda DNA'daki gen sentezini ya artırır ya da baskılar.





Şekil 2.7. TCDD Metabolik Yol Şeması (29).

Hücreye giren TCDD toksik etkilerini AhR reseptörlerine bağlandıktan sonra karaciğerde bulunan CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 ve diğer CYP genlerinin sentezini artırarak göstermektedir. CYP genlerinin artışı sitokrom P450 enzimlerini indükler, böylece organizmada reaktif oksijen türlerinin oluşması ve lipid peroksidasyonu artışına sebep olur. Bu mekanizmalar yolu ile dioksin gelişme bozuklukları, timus atrofisi, epitelyal bozuklar, karaciğer hasarı, bağışıklık yetmezliği ve kanser şekillenmesine sebep olabilir (30, 31).



Şekil 2. 8. Dioksin Maruz Kalma (Metabolizma) Şeması (4)

Ratlarda yapılan çalışmalarda seminifer tübüldeki AhR ekspresyonunun, spermatojenik döngüdeki primer pakiten spermatositler ve yuvarlak spermatidlerde sınırlandırıldığı araştırılmıştır. Ratlardaki bu durumun aksine AhR ve ARNT'nin, insan testislerinin tüm seminifer tübül aşamalarında ifade edildiği bildirilmektedir (32).

Yapılan çalışmalarda doğrudan bir mekanizma tanımlanmamış olsa da, bu bulguların kollektif olarak AhR ligand bağlanmaması ya da AhR aktivasyonundaki eksikliğin, spermatozoonlarda DNA hasarına yol açan inflamasyon, apoptoz ve oksidatif strese neden olabileceğini düşündürmektedir. Ancak düktif etkilerine rağmen, spermatogenezdeki rolü az ilgi görmüştür. Erkek fertilitesi, sperm sayısı, seminal vezikül ağırlığı ve prostat ağırlıkları Ahr-eksik farelerde azaldığı gösterilmiş olsa da henüz, Ahr fonksiyon kaybının spermatogenez üzerindeki histolojik ve gen ekspresyon sonuçları kesin olarak belgelenmemiştir (33).

### **2.2.3. TCDD Üreme Sistemine Etkileri**

Yapılan son çalışmalarda TCDD maruziyetinin, hem dişi hem de erkek bireylerin üreme organlarında olumsuz etkiler bıraktığını göstermiştir. Cinsel organların gelişiminde gecikme, üreme organlarının ağırlıklarında azalma, sperm sayısında düşüş gibi birçok olumsuz etkiye sebep olduğu bildirilmiştir. Dişilerde uterus ve laktasyonel dönemlerdeki TCDD maruziyeti sonucu gelişimsel ve reproduktif defektlerin ortaya çıkması TCDD toksisitesinin en hassas son noktasını ortaya koymaktadır. Canlılarda dioksine maruz kalmanın kaçınılmaz olması ve reproduktif sistemin bu kadar hassas olması nedeniyle TCDD'nin etkilerini araştırmak günümüzde dikkate değer konu olmuştur. Adamsan ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada erken gelişimsel TCDD maruziyeti sonuçlarını araştırmak için 19.5 günlük fetal erkek sıçanlara TCDD uygulayıp steroidogenesisi incelemişler ve TCDD'nin testiküler steroidogenezin azalmasına neden olduğunu göstermişlerdir (34). Bir başka çalışmada ise gestasyonun 15. gününde tek doz 0.064 µg TCDD/kg uygulanması ile epididimal sperm sayısının azalmış olduğunu söylemişler ve bunun sebebini ise GD15 döneminde spermatogenez üzerine laktasyonel etki olmayışına bağlamışlardır. Spermatogenez süresince, genler aşamalı olarak farklı bir şekilde ifade edilmektedir. AhR ve ARNT'ye ait transkriptleri sıçanlarda testis, epididimis, seminal vezikül, vas deferens ve prostatta gösterilmiştir. İnsanlarda, AhR ve ARNT, spermatozoidlerde eksprese edilir ve burada spermatozoidlerin apoptozunu düzenlemede rol oynadıkları düşünülmektedir. Bu nedenle, gerekli sinyalleşme yollarının hepsi, hem sıçanların hem de insanların testislerinde bulunmaktadır (31). Testiküler TCDD maruziyeti sonucu bu transkript faktörleri etkileneceğinden spermatogenez ve buna bağlı olarak spermiyogenez basamakları etkilenecek, böylece apoptozise bağlı olarak sperm sayısında azalma ve anormal spermiler oluşacaktır.

### 2.2.3.1. TCDD-Endokrin Sistem Etki Mekanizması

Son yıllarda, yapılan araştırmalar, TCDD'nin çevrede kalıcı olan ve canlının endokrin homeostazını değiştirebilen endokrin bozucu olduğu bildirilmiştir. Bu özellikleri ile ciddi üreme ve gelişimsel bozukluklara neden olmaktadır (35). Testosteronun sentezlenmesinde ve spermatogenez sürecinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinen Leydig hücrelerinin TCDD maruziyeti ile hücre fonksiyonunun değiştirilmesi testiküler fonksiyonlar üzerinde olumsuz etkilere neden olabilir. Yapılan çalışmalarda sıçan Leydig hücre kültürlerinde TCDD uygulaması ile progesteron ve testosteron hormon seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir (36). Bunun yanı sıra dioksinlerin CYP1A1 veya CYP1B1 genlerini aktive ederek östrojen metabolizmasında bozukluklara neden olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur (37). Biz de çalışmamızda, kan serum örneklerinden TCDD'nin testosteron progesteron ve estrodiol sekresyonu üzerindeki etkisini açıklamayı amaçladık.

### 2.2.4. TCDD ve MiRNA

Dioksin toksisitesinde AhR reseptörleri, birçok genin ekspresyonunda azaltıcı ya da bloke edici yönde güçlü etkiler göstererek toksik hasarın ortaya çıkmasına aracılık eder. Aynı zamanda gen ekspresyonları ile ilgili olarak dioksinler ile yapılan birçok çalışmada AhR aracılı enzim indüksiyonu da söz konusudur. Bununla birlikte büyük ölçekli transkriptomik çalışmalar mRNA ürün seviyelerinin TCDD ile azaldığı gösterilmiştir. Günüzde dioksin benzeri kimyasalların mRNA seviyelerini ve mRNA bağlı protein sentezini nasıl baskıladığı tam bilinmemektedir. Ancak *AHR aracılı toksik cevap* yolunda mRNA yada protein seviyelerindeki azalma MikroRNA (MiRNA)'lardaki azalma ile açıklanabilir (38). Çünkü dioksinler miRNA'ların azalmasına sebep olmakta ve böylece hücrede hasarlı protein, hatalı mRNA transkripsiyonu ve buna bağlı yanlış protein sentezleri artmaktadır.

### 2.2.5. MikroRNA nedir?

MikroRNA'lar yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda protein kodlamayan ve gen ifadesini post-transkripsiyonel olarak düzenleyen, kısa RNA'ların bir sınıfıdır. İlk defa 1993 yılında, Lee ve arkadaşları tarafından *Caenorhabditis elegans* (solucan türü)' da yaptıkları bir çalışmada keşfedilmiştir (39, 40). MiRNA'lar hedef mRNA'ların ya yıkımını yada translasyonunu baskılayarak gen ifadelerini düzenler (39). Ayrıca

organizma gelişim sürecinde; farklılaşma, apoptosiz, hücre çoğalması vb birçok biyolojik olaylarda rol almaktadır (40).

### 2.2.6. MiRNA Biyosentezi

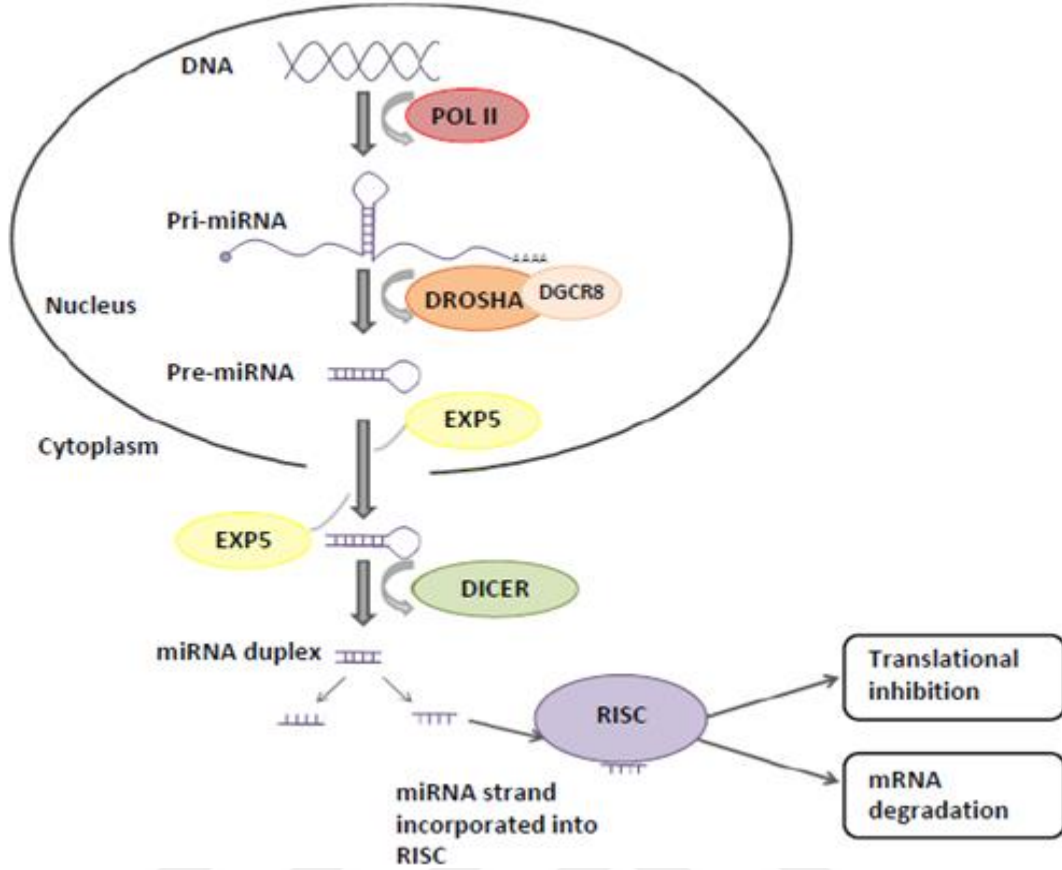
MiRNA'ların sentezi nukleusta başlayıp sitoplazmada sonlanan üç basamaklı işlemler sonucu gerçekleşmektedir.

1. Basamak: Nukleusta DNA'dan RNA polimeraz II tarafından primer MiRNA (pri-miRNA) transkribe edilmesi

2. Basamak: Nukleusta pri-MiRNA'lar RNAaz III enzim ailesine ait olan **Drosha** enzimi tarafından prekürsör-MiRNA (pre-miRNA) dönüşümü

3. Basamak: Sitoplazmada pre-MiRNA'ların exportin 5 tarafından sitoplazmaya taşınması ve **Dicer** (RNAaz III enzim ailesine ait) enzimi ile kesilip çift iplikli olgun MiRNA'lara dönüşümüdür.

*Dicer*, aynı zamanda RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksi (*RNA-induced silencing complex; RISC*) oluşumunu başlatır. RNA ile tetiklenmiş susturma kompleksinin içinde bulunan bir RNAz olan *Argonaute 2* (AGO 2) proteini sayesinde, sentezlenen çift iplikli MiRNA'ların bir tanesi RISC kompleksine katılır ve klavuz iplik olarak adlandırılırken diğer iplik anti-klavuz veya yolcu iplik olarak adlandırılır. Yolcu iplik RISC kompleksinin substratı olarak sindirilir. Klavuz iplik-RISC kompleksi ise ya hedef mRNA'nın yıkımına ya da protein translasyonunun baskılanmasına neden olarak fonksiyon görürler (40, 41). Etkilenen mRNA'lar, RISC proteinleri boyunca, granüler sitoplazmik 'P organları' içinde birikir ve mRNA miktarında azalma gerçekleşir (42). Yapılan bir çalışmada yetişkin kemirgen karaciğerinde mRNA seviyelerindeki azalmanın TCDD uygulamasına bağlı olarak MiRNA seviyelerinde azalmaya sebep olduğu gösterilmiştir (38). MiRNA hedef mRNA'nın 3' ucundaki translasyona uğramayan bölgesi (untranslated region-UTR) ya da hedef mRNA'nın açık okuma bölgesi (open reading frame bölgesine=ORF) bağlanarak gen ekspresyonunu etkiler. 3'UTR bölgesine bağlanma, kusurlu, tam olmayan, eksik komplementerliği ihtiva eder ve translasyonun baskılanması ile sonuçlanır. Açık okuma bölgesi içine bağlanma ise kusursuz, tam komplementerliği gösterir ve mRNA'nın yıkımı ile sonuçlanır (41).



**Şekil 2.9.** MiRNA Biyosentezinin Şematik Çizimi (43)

### 2.2.7. MiRNA Fonksiyon ve Önemi

MiRNA'ların gen ekspresyonunu etkilemesi, onların asıl fonksiyonlarının tanımlanmasında oldukça önemlidir. MiRNA'ların keşfedilmesi ile başlayan çok sayıda çalışmayla MiRNA'ların sentezi ve fonksiyonları hakkında bilgilerimiz de hızla artış göstermiştir. MiRNA sayesinde normal şartlarda hücrede sentezlenmemesi gereken mRNA'lar yok edilir ya da hücredeki mevcut veya değişen şartlara göre mRNA düzeyleri ayarlanır. Bu fonksiyonları ile MiRNA'ların herhangi bir patolojik ya da hasarlanma koşullarında ne kadar önemli rol aldıklarını ortaya koymaktadır (44). Günümüzde memeliler üzerinde yapılan birçok çalışmada eksiklikleri miRNA fonksiyonlarını bozan Dicer, Drosha enzimleri hedeflenerek, MiRNA'ların çeşitli gelişimsel süreçlerde ve patolojik durumlarda spesifik rolleri ortaya konmuştur. MiRNA'lar ve sentezine ilişkin enzimlerin son çalışmalarda post-mayotik erkek germ hücre fonksiyonuna katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir (45). Postmayotik erkek germ hücreleri, transkripsiyonel olarak aktif olduğundan, doğru post-transkripsiyonel düzenleyici mekanizmalara ihtiyaç duyar. Bu anlamda MiRNA'lar

özellikle spermatogenezin kontrolünde önemli bir role sahiptir. Yapılan birçok çalışmada Drosha ve Dicer'in canlılarda normal spermatogenez ve erkek fertilitesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (46). Dicer'in Sertoli hücrelerinin gelişimi ve spermatogenez ile olan ilişkisini değerlendirmek için embriyonik olarak Dicer aleli silinmiş (Dicer  $-/-$ ) Sertoli hücrelerinde Dicer inaktivasyonunun embriyonik 14.gün (E14.0) civarında meydana geldiği ve daha sonra spermatogenezin bozulmasına, primer infertiliteye neden olan testis tübüllerinin sayısında ciddi bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (47). Germ hücrelerinde Dicer  $-/-$  elimine edilmesiyle, MiRNA'ların erkek gonosit proliferasyonunun düzenlenmesi için gerekli olduğu gösterilmiştir (45). Spermatogenezde miRNA üretiminin rolünü araştırmak için, postnatal testislerin spermatogenik hücrelerinde Drosha ve Dicer knock-out (cKO) fareler kullanılmış ve oligospermiye veya azospermiye yol açan spermatitlerin tükenmesi ile karakterize edilen bozulmuş spermatogenez nedeniyle infertil olduğu görülmüştür. Hatta aynı çalışmada Drosha  $-/-$  fare testislerinin tübüllerindeki histopatolojik hasar, Dicer  $-/-$  olan testis tübüllerinkinden daha fazla olduğu da bildirilmiştir (48). Biz de çalışmamızda yetişkin sıçan testislerinde TCDD uygulamasına bağlı olarak germ hücrelerindeki miRNA sentezinde gerekli olan söz konusu Dicer ve Drosha enzim düzeylerindeki değişikliği belirlemeyi hedefledik.

### **2.3. Nigella Sativa (Çörek Otu)**

*Nigella sativa* Ranunculaceae familyasının bir türü olup, Güney Batı Asya, Avrupa, Kuzey Afrika'da yetişen otsu bir bitkidir. Ülkemizde çoğunlukla Afyon, Isparta, Burdur ve Konya yörelerinde yetiştirilen bu bitki siyah tohum olarak bilinir (49, 50). Çiçeği beyaz, açık mavi renkli olup, meyve kapsülünün içinde beyaz, trigonal şekilli tohumlar bulunur. Kapsül olgunlaşınca içindeki tohumlar hava ile temas eder ve siyah renge dönüşürler (49, 50, 51, 52).



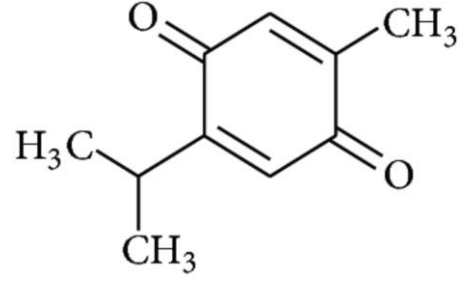
**Şekil 2.10.** Nigella Sativa (53)

Günümüzde de hala eskiden olduğu gibi bu tohumlar soğuk algınlığı, burun tıkanıklığı, diş ve baş ağrısı, ateş, grip, astım, bronşit, idrar söktürücü, sarılık, süt arttırıcı, bağırsak parazitlerinin tedavisi, romatizma, iltihabi hastalıklar ve egzema, gibi birçok hastalığın tedavisinde yaygın olarak alternatif tıpta kullanılmaktadır (49, 50, 51, 52). Aktif kimyasal bileşenler ve besin değeri bakımından oldukça yüksek olan çörek otu tohumlarının yapısında başlıca sabit yağlar (%31.0-35.5), uçucu yağlar (%0.4-0.45), karbonhidratlar (%33,0-34,0), proteinler (%16,0-19,9) bulunmaktadır (49, 50, 54). Nigella sativa'nın kanser hücrelerine karşı sitotoksik etkili olduğu, hücrel aktivasyonu ve hücre döngüsünün farklı noktalarında (G0/G1, G1/S, G2/M) devreye girme yeteneklerine sahip olduğu yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (49). Ayrıca tümöre özel antikorların üretimini artırarak antitümöral olarak etki ettiği (54), antimikrobiyal ve antioksidan (52) etkileri olduğu bildirilmiştir.

### **2.3.1. Thymoquinon (TQ)**

Thymoquinon ( $C_{10}H_{12}O_2$ ) N. sativanın tohumundaki uçucu yağında %18,4-24 oranında bulunup onun asıl farmakolojik ve biyolojik etkenliğini sağlayan önemli bir biyoaktif bileşendir. Thymoquinon hidrofobik bir moleküldür ve ışığa karşı yüksek duyarlılığa sahip olduğundan ışığa maruz kaldığında degradasyona uğramaktadır. Ayrıca bazik pH'da stabilitesinin azalması, asidik pH'da ise minimum degradasyon göstermesi başlıca fizikokimyasal özellikleridir (49).





Şekil 2.11. Çörek Otu Tohumu ve Thymoquinon Kimyasal Yapısı (55)

### 2.3.2. Thymoquinon Etki Mekanizması

Thymoquinonun patofizyolojik ve histopatolojik durumlarda birden fazla biyolojik etkiyi nasıl gösterdiği veya hangi faktörleri hedef aldığı hala karmaşık ve tartışmalıdır. Ancak bilinen başlıca etkileri; hücre döngüsü ve çoğalması, apoptoz ve oksidatif stres üzerinedir.

#### 2.3.2.1. Thymoquinonun Hücre Döngüsü ve Çoğalmasına Etkisi

Yapılan hücre kültürü çalışmalarında TQ'nun antitümoral, antianjiojenik özellikleri öne çıkmıştır (56). Meme, kolon, larinks, over, akciğer, kemik, prostat, serviks ve daha birçok tümörlü dokularda çoğalmayı engelleyerek antitümör etkileri gösterilmiştir (57, 58). Thymoquinone'un hücre döngüsü ve hücre çoğalmasını düzenleyen gen proteinlerinin ekspresyonunu ve miktarını etkileyerek ve hücre siklusunun belirli noktalarında devreye girerek (G0/G1, G1/S G2/M) kanser ve tümör hücrelerini öldürme yeteneklerine sahip olduğu rapor edilmiştir (49).

#### 2.3.2.2. Thymoquinone'un Apoptoza Etkisi

Thymoquinone kanserin baskılanmasında preapoptotik ve antiapoptotik faktörleri azaltarak, ayrıca kaspaz yolaklarını düzenleyerek önemli rol oynamaktadır. TQ'nun pankreatik adenokarsinom, insan rahim sarkomu ve lösemi dahil olmak üzere farklı insan tümör hücrelerine karşı, p53 protein ekspresyonu artışı ve antiapoptotik Bcl-2 protein inhibisyonuna denk gelen hücre döngüsünün G1 fazında devreye girip bu hücrelerin büyümesini durdurarak apoptosisi tetiklediği de bildirilmiştir (59).



### **2.3.2.3. Thymoquinone'un Oksidatif Strese Etkisi**

Çeşitli mekanizmalar ile TQ'un güçlü bir antioksidan olduğu bildirilmektedir. Bazı hastalıklarda reaktif oksijen türleri (ROS) düzeylerinin yükselmesinin neden olduğu hasarlayıcı etkileri TQ'un, oksidatif stresi azaltarak ve antioksidan savunmayı güçlendirerek azalttığı-önlediği bildirilmektedir. Thymoquinone'un antioksidan etki potansiyelinin, molekül yapısındaki kinonun redoks özellikleriyle ve TQ'un hücrelerin fizyolojik bariyerlerden difüzyonla kolayca geçmesi ile ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir. Thymoquinon tedavisinin sonucu olarak malondialdehitin (MDA) seviyesinin azaldığı, glutasyon seviyesinin arttığı ve böylece DNA'ya hasar veren serbest oksijen radikallerin azalmasına bağlı olarak oksidatif stresin azaltıldığı bildirilmiştir. Thymoquinone'un, reaktif genotoksik radikal türevleri aracılı birçok ksenobiyotik biyotransformasyonunda rol alan ve karaciğerde sentezlenen CYP1A1/A2 enzim aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (49). Thymoquinone'un vankomisin ile indüklenen böbrek hasarına karşı serum/kan üre nitrojen, kreatinin ve MDA seviyelerini düşürerek ve böbrek dokusunda SOD ve GPx aktivitelerini yükselterek koruyucu etki gösterdiği bildirilmiştir (60).

### **2.3.2.4. Thymoquinone'un Üreme sistemi üzerine Etkisi**

Günümüzde yapılan son çalışmalar TQ'un üreme sistemine olan etkilerini göstermiştir (61, 62, 63, 64). Javanshir ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada polikistik over sendromu oluşturulmuş dişi ratlarda iki farklı dozda TQ (8 ve 16 mg/kg) verilmesi ile ovaryum fonksiyonunun korunduğu ve buna bağlı olarak ovulasyonun düzenlediğini bildirmişlerdir (63). Sayed ve arkadaşları yaptığı çalışmada kadmiyum toksisitesine bağlı olarak oluşan sıçan testis hasarında TQ'un koruyucu etkilerini araştırmışlar ve kadmiyum uygulanan sıçanlarda canlı sperm sayısında azalma ve anomalilerinde önemli artış, epididimisinde histolojik hasar yönünde değişiklikler ve lenfoid hücre infiltrasyonu tespit etmişlerdir. Kadmiyum ve TQ'un birlikte uygulandığı sıçanlarda canlı sperm sayısı, sperm mortalitesinde artış ve sperm anomalilerinde azalma, normal bir epididimis ve daha düşük düzeyde ödem gözlemlemişlerdir (61). Başka bir çalışmada ise Thymoquinone, kadmiyuma bağlı olarak serum testosteron seviyesindeki düşüşü azaltmış, testis glutasyon ve SOD aktivitelerini yükseltmiştir. Ayrıca testis MDA, NO ve kadmiyum iyon seviyelerini düşürmüştür. Thymoquinone testis dokusunda kadmiyum ile indüklenen iNOS, tümör nekrozis faktor-alfa (TNF- $\alpha$ ),

COX-2 ve NF-κB'nin ekspresyonunu azaltmıştır. Benzer bir çalışmada ise yine TQ'un kurşun toksisitesine bağlı olarak gelişen sıçan testis işlev inhibisyonuna karşı düzeltici etkileri araştırılmış ve kurşun toksisitesine bağlı olarak gelişen testis steroidojenik ve spermatojenik işlev bozukluğunu önlediği, plazma testosteron seviyesini yükselttiği bildirilmiştir (49). Mukhallad ve arkadaşları ve Al-Sa'aidi ve arkadaşları N.sativa uygulanmasının sperm hareketliliğini, spermatogenezi arttırdığı ve tedavi gören erkek ratların emdirilmiş dişi sıçan sayısını artırdığını göstermiştir (62, 64).



### 3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 40 adet, erişkin, 250- 350 g ağırlığında *Wistar Albino* cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar havalandırması olan,  $22 \pm 2$  °C' lik ısı ve mevsimsel gün ışığı ritmindeki aydınlatmalı odalardaki özel kafeslerde dörtlü gruplar şeklinde konuldu. Bütün sıçanlar standart pelet sıçan yemi ve çeşme suyu ile beslendi. Sıçanlar 5 gruba (n=8) ayrıldı ve tartılarak deney başlangıcındaki ağırlıkları kaydedildi.

#### 3.1. Deney Grupları

Grup 1-Kontrol

Grup 2-Kontrol: Mısır yağı (1 ml/kg)

Grup 3-Thymoquinone: (50 mg/kg/gün, ip)

Grup 4-TCDD: (1µg/kg/gün, ip)

Grup5-TCDD+Thymoquinone: TCDD(1µg/kg/gün)+Thymoquinon (50mg/kg/gün),ip

##### 3.1.1. TCDD ve Thymoquinon Hazırlanışı

Deneyde 2.3.7.8.tetrachlorodibenzo-p-dioksin/TCDD (%98 saflık oranı (Wellington Laboratories, Canada) kullanıldı. TCDD dozu 1µg/kg olacak şekilde hesaplanılarak, 30 µg TCDD alınıp (stok: 60 µg/1,2 ml), 100 ml mısır yağı içerisinde çözülerek 3 haftalık stok çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan stoktan her bir hayvana 0,5 ml intraperitoneal (i.p) yolla 30 gün boyunca bir kez verildi. Stok çözeltisi bittikçe aynı prosedürle yeni TCDD stok solüsyonları hazırlandı.

Çalışmada kullanılan Thymoquinon (sigma-Aldrich-274666, St. Louis, USA) ise kg vücut ağırlığı başına 1 ml %0,9 serum fizyolojik (SF)'de çözülmüş 50 mg/kg Thymoquinon olacak şekilde intraperitoneal yolla verildi.

##### 3.1.2. Deney Uygulama Süreci

Çalışmamızda kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Yağ grubuna 1ml/kg mısır yağı i.p. verildi. TCDD grubuna 30 gün, günde bir kez i.p. 1µg/kg TCDD uygulandı. TQ grubuna ise i.p. olarak 50 mg/kg Thymoquinone uygulandı. TCDD+ TQ grubuna 1µg/kg TCDD ve 50 mg/kg Thymoquinone i.p. olarak günde 1 kez verildi. Deney uygulama süresi 30 gün olup, 31. gün tüm deney gruplarındaki

sıçanlar tartılıp ağırlıkları kaydedildikten sonra ketamin/ksilazin anestezi altında histolojik ve biyokimyasal incelemeler için intrakardiyak kan ve testis doku örnekleri alındı. Kan örnekleri santrifüj edilerek serumları ayrıldı. Alınan testis doku örneklerinin de sağ ve sol olmak üzere ağırlıkları ölçüldü ve ışık mikroskobik incelemeler için % 10'luk nötral tamponlu formaldehit solüsyonlarına alındı. Biyokimyasal incelemeler için alınan testis doku örnekleri -80 ° C'de donduruldu.

### 3.2. Işık Mikroskobik Teknik

Formaldehit ile tespit edilen testis doku örnekleri 48 saatlik tespit süresi sonunda Tissue-TEK VIP/ SAKURA otomatik doku takip cihazında aşağıdaki protokole göre doku takip basamaklarından geçirildi.

1-	% 10 formalin	40 dk
2-	% 10 formalin	40 dk
3-	%80 alkol	1 saat
4-	%96 alkol	1 saat
5-	%96 alkol	1 saat
6-	Absolü alkol	1 saat
7-	Absolü alkol	1 saat
8-	Ksilen	1 saat
9-	Ksilen	1 saat
10-	Ksilen	1 saat
11-	Parafin I	1 saat
12-	Parafin II	1 saat
13-	Parafin I	1 saat
14-	Parafin I	1 saat

Doku takip işlemleri tamamlanan testis doku örnekleri parafin bloklara gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan kesitlere Hematoksilen-eosin (H&E), Periodic acid-Schiff (PAS), immunohistokimyasal olarak Caspaz-9 (P10, H-83, Santa Cruse Biotechnology-7885), Antibady-Dicer (rabbit DICER1, Biont-YID1719), Antibady-Drosha (rabbit Drosha Polyclonal Antibody, Biont-YID5391) ve Antibady-AhR (rabbit Aryl Hydrocarbon Receptor, Biont-YID0444) boyama yöntemleri uygulandı.

### 3.2.1. MAYERS'in Hematoxylen- Eozin Metodu

Doku örneklerinden kesitlere otomatik boya cihazı (Leica Autostainer XL) ile aşağıdaki protokole göre H&E boyaması uygulandı. Alındıktan sonra kesitler etüvde bekletilerek parafinin erimesi sağlandıktan sonra aşağıdaki sıralandığı şekilde H&E boyaması uygulandı.

1- İnkübasyon	1 saat 60 °C
2- Ksilen	5 dakika x 3 defa
3- %96 alkol	3 dakika x 2 defa
4- Absolü alkol	3 dakika x 2 defa
5- çeşme suyunda yıkama	5 dakika
6- Mayer's Hematoxylen	10 dakika
7- Çeşme suyu	5 dakika x 3 defa
8- Eosin	2 dakika
9- %96 alkol	3 dakika x 2 defa
10- Absolü alkol	3 dakika x 2 defa
11- Ksilen	5 dakika x 3 defa

Bu işlemler uygulandıktan sonra lamaların üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

### 3.2.2. Periyodik Asit- Schiff (PAS) Boya Metodu

Doku örneklerinden kesitler alındıktan sonra kesitler 1 saat etüvde bekletilerek parafinin erimesi sağlandı. Daha sonra kesitlere sırası ile aşağıdaki boya metodu uygulandı.

1- Ksilen	5 dakika x 3 defa
2- %80 alkol	3 dakika
3- %96 alkol	3 dakika x 2 defa
4- Absolü alkol	3 dakika x 2 defa
5- Çeşme suyu	5 dakika
6- Periyodik asit	5 dakika
7- Distile suda yıkama	5 dakika
8- Schiff solüsyonu	15 dakika
9- Çeşme suyunda yıkama	10 dakika
10- Hematoxylen	5 dakika

11- Çeşme suyunda yıkama	5 dakika
12- %96 alkol	3 dakika x 2 defa
13- Absolü alkol	3 dakika x 2 defa
14- Ksilen	5 dakika x 3 defa

Boyama işlemleri sonunda kesitler lamel ile kapatılmıştır.

### 3.2.3. İmmunohistokimyasal Boyama

Testis dokularından alınan 5 µm'lik kesitler, immunohistokimyasal boyama için polizin kaplı lamalar üzerine alındı.

Xylol I	5 dakika
Xylol II	5 dakika
Xylol III	5 dakika
%100 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
%80 alkol	3 dakika
Distile su	5 dakika
Antijen Retrieval Aşaması	15 dakika
Oda ısısında soğutma	20 dakika
Distile su	5 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	5 dakika
H2O2 (Hidrojen Peroksit) Aşaması	10 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	5 dakika
Protein Bloke Aşaması (Süper Blok)	5 dakika
Primer Antikor Aşaması	2 saat
PBS (Phosphate Buffered Saline)	2x5 dakika
Sekonder Antikor	10 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	2x5 dakika
Streptavidin Peroksidaz (HRP) Aşaması	10 dakika
AEC Kromojen Aşaması	10 dakika
BS (Phosphate Buffered Saline)	5 dakika
Distile su	5 dakika
Mayers Hematoksilen	40 sn
Çeşme Suyu	5 dakika
Distile Su	5 dakika

Aqueous mount ile kapatma

Boyanan testis kesitleri Leica 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sistemi (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK) ile analiz sisteminde incelenerek, fotoğraflar alındı. Ayrıca seminifer tübül çap ölçümü, germinatif epitel kalınlığı ve hasar parametreleri (hücre debris, konjesyon, dejenere tübül sağlam tübül) skorlandı.

### 3.3. Testis Hasar Skorlama Yöntemi

Hematoksilen-eosin ile boyanan kesitlerde her gruplara ait preparatlarda rastgele 10 farklı alanda, transvers kesit düzleminde 100 adet seminifer tübül değerlendirilerek X20'lik büyütmede, ortalama seminifer tübül çapı, seminifer tübüllerde ortalama germinal epitel kalınlığı ölçüldü. Ayrıca her preparatta 100 adet seminifer tübülde X10'luk objektif büyütmede Johnson Skoru belirlendi (65). İmmunohistokimyasal boyama uygulanan preparatlarda kolormetrik olarak gözlenen immunreaktivite pozitifliği semikantitatif olarak 0 ile 3 arasında (0; boyanma yok, 1; hafif derecede boyanma, 2; orta derecede boyanma, 3; kuvvetli boyanma) derecelendirildi. Testis ağırlık indeksi (TAİ) hesaplaması ise deneyin son günü ölçülen vücut ağırlıkları ile aynı hayvana ait sağ ve sol testis ağırlıkları toplamı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak her bir hayvan için TAİ değerleri belirlendi (66).

$$TAİ: [(sağ+sol testis ağırlıkları toplamı)/vücut ağırlıkları] \times 100$$

**Tablo 3.1.** Johnson Skorlama Tablosu

Skor 1	Seminifer tübüllerde hücre yok
Skor 2	Germ hücreleri yok, sadece Sertoli hücreleri var.
Skor 3	Var olan tek germ hücresi spermatogonyumlardır.
Skor 4	Spermatozoa veya spermatid yok, 5'ten az spermatosit var.
Skor 5	Spermatozoa veya spermatid yok; ancak spermatositler var.
Skor 6	Spermatozoa yok, 10'dan az spermatid mevcut.
Skor 7	Bol spermatid mevcut; ancak spermatozoa yok.
Skor 8	Germinal epitel çok sıralı, ancak lümende 10'dan az sayıda spermatozoa var.
Skor 9	Germinal epitel çok sıralı, ancak disorganize görünüm, lümende obliterasyona yol açan hücre dökülmesi var.
Skor 10	Çok sıralı, bol spermatozoa ve santralde açık lümenler içeren tübüller var.

### **3.4. Biyoistatistik Yöntem**

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiştir. Skor verileri ve normal dağılım göstermeyen veriler medyan, minimum ve maksimum değerler ile gösterilmiştir. Karşılaştırmalarda Kruskal-Wallis testi ve sonrasında Conover ikili karşılaştırma yöntemi uygulandı. Normal dağılım gösteren sayısal veriler ortalama ve standart sapma ile özetlenmiş ve karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi kullanıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edildi.

### **3.5. Biyokimya Yöntemi**

Deney sırasında alınan kan örnekleri 1000 x g de 10 dakika santrifüj edilerek serumlara ayrıldı. Tam kandan elde edilen serum örnekleri çalışma gününe kadar -80 ° C'de muhafaza edildi. Serumlarda; Testesteron, Progesteron ve Estradiol (E2) ticari ELISA kitlerinden (HTA Co., Ltd, Shenzhen Larewen biomedical engineering technology Co., Ltd, Peking Kemei biotechnology Co., Ltd, respectively) kit prosedürlerine uygun olarak ELISA yöntemi ile Synergy H1 Microplate Reader'da çalışıldı.



## 4. BULGULAR

### 4.1. TCDD'nin Sıçan Vücut Ağırlıklarına Etkisi

#### 4.1.1. Vücut İlk ve Son Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney sonunda gruplar kendi arasında vücut son ağırlık yönünden kıyaslandığında TCDD grubundaki (285,13±19,76) sıçanların vücut ağırlıklarının kontrol (376,00±26,12), mısır yağı (367,88±17,00), Thymoquinone (381,50±26,73) ve TQ+TCDD (355,38±27,38) gruplarındaki sıçanların vücut ağırlıklarına göre daha düşük olduğu belirlendi. Gruplar kendi içlerinde ilk ve son ağırlık yönünden değerlendirildiklerinde ise kontrol, mısır yağı gruplarında deney öncesi ve sonrası vücut ağırlığında anlamlı fark görülmedi. TQ grubunda vücut son ağırlığında anlamlı artış, TCDD+TQ ve TCDD grubunda ise vücut ilk ve son ağırlığında ise anlamlı azalış olduğu tespit edildi (Tablo 4.1).

**Tablo 4.1.** Grup İçi İlk Ve Son Ağırlık Farklarının Değerlendirilmesi. a,b,c: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar

Gruplar	Vücut İlk Ağırlık (Ort± std. sapma)	Vücut Son Ağırlık (Ort± std. sapma)	p
<b>Kontrol</b>	365,63±21,45 <sup>a,c</sup>	376,00± 26,12 <sup>a</sup>	0,259
<b>M. Yağı</b>	347,38±10,85 <sup>a</sup>	367,88±17,00 <sup>a</sup>	0,013
<b>TQ</b>	295,75±31,52 <sup>b</sup>	381,50±26,73 <sup>a</sup>	<0,001
<b>TCDD</b>	379,50±18,57 <sup>c</sup>	285,13±19,76 <sup>b</sup>	<0,001
<b>TQ+ TCDD</b>	376,25±21,99 <sup>a,c</sup>	355,38±27,38 <sup>a</sup>	0,179
<b>p</b>	<0,001	<0,001	

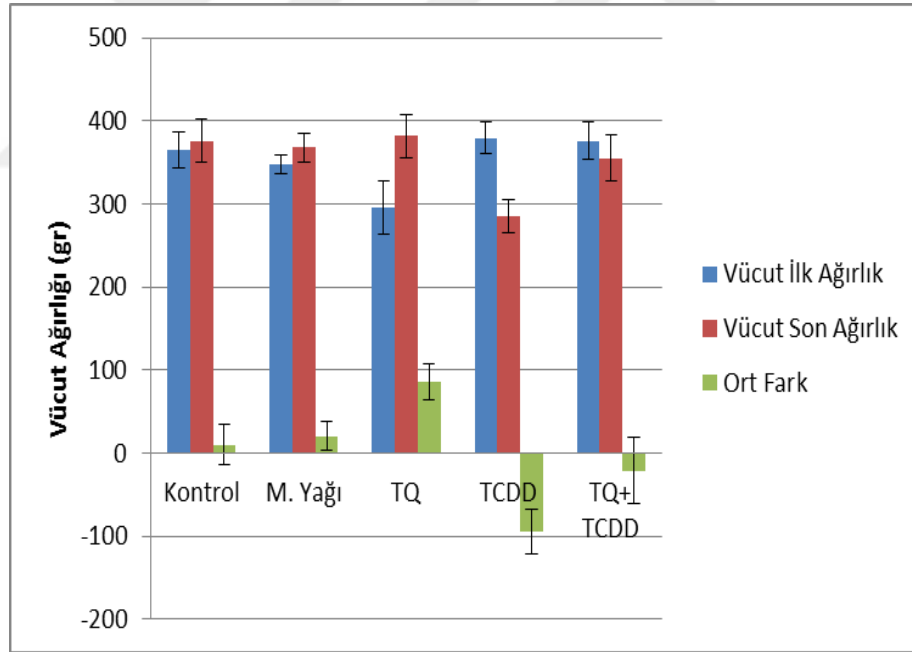
#### 4.1.2. Vücut Ortalama Ağırlık Farkının Değerlendirilmesi

Deneyin sonunda tüm gruplar kendi arasında ortalama ağırlık farkı yönünden değerlendirildi. Kontrol grubu (10,37± 23,90) ve mısır yağı grubu (20,50± 17,51) arasında ortalama ağırlık farkı bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. TQ grubunda (85,75± 21,17) ise deney başlangıcı ve deney sonundaki ortalama ağırlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kontrol ve mısır yağı gruplarındaki ortalamala ağırlık farkları TQ grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük

bulunmuştur. Ancak TCDD (-94,38 ±27,24) ve TCDD+ TQ (-20,88 ±39,54) gruplarında deney başlangıcı ve sonundaki ortalama ağırlık farkları düşük bulundu. TCDD ve TQ+TCDD grupları ortalama ağırlık farkı bakımından kontrol, mısır yağı ve TQ gruplarına göre istatistiksel düzeyde anlamlı düşüş tespit edildi (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Hayvan ağırlıklarının gruplara göre dağılımı, a,b,c,d: Farklı harfleri taşıyan gruplar arasındaki farklılıklar

Gruplar	Vücut Ağırlığı (sonra-önce) p (Ort± std. sapma)	
Kontrol	10,37± 23,90 <sup>a,d</sup>	
M. Yağı	20,50± 17,51 <sup>a</sup>	
TQ	85,75± 21,17 <sup>b</sup>	<0,001
TCDD	-94,38 ±27,24 <sup>c</sup>	
TCDD+TQ	-20,88 ±39,54 <sup>d</sup>	



**Şekil 4.1.** Hayvan ağırlıklarının gruplara göre dağılımı

#### 4.2. TCDD'nin Sıçan Testis Ağırlıklarına Etkisi

Gruplar arasında sağ ve sol testis ağırlığı ölçümleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p>0,05$ ).

**Tablo 4.3.** Testis Ağırlıklarının Gruplara Göre Dağılımı

<b>Gruplar</b>	<b>Sağ testis Ağırlık (Ort± std. sapma)</b>	<b>Sol testis Ağırlık (Ort± std. sapma)</b>
<b>Kontrol</b>	1,54± 0,20	1,69± 0,22
<b>M. Yağı</b>	1,45± 0,43	1,50± 0,41
<b>TQ</b>	1,52± 0,34	1,52± 0,27
<b>TCDD</b>	1,48± 0,18	1,39± 0,24
<b>TQ+ TCDD</b>	1,58± 0,33	1,67± 0,41
<b>p</b>	0,934	0,308

#### 4.2.1. TCDD'nin Sıçan Testis Ağırlık İndeksine Etkisi

Gruplar arasında testis ağırlık indeksi açısından istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunmadı ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.4.** Gruplar Arasında TAI Değerlendirilmesi

<b>Gruplar</b>	<b>Median</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>p</b>
<b>Kontrol</b>	0,88	0,66	1,01	
<b>M. Yağı</b>	0,85	0,27	0,98	
<b>TQ</b>	0,83	0,40	1,05	0,132
<b>TCDD</b>	1,02	0,71	1,21	
<b>TQ+ TCDD</b>	0,83	0,72	1,54	

### 4.3. Histolojik Bulgular

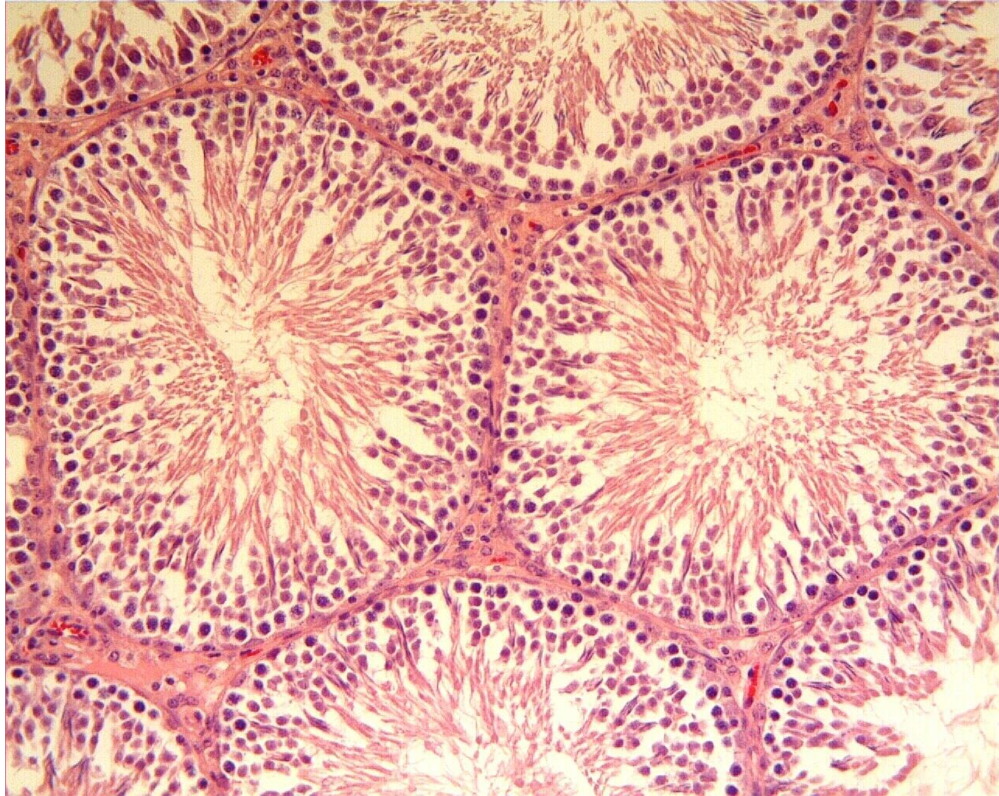
#### 4.3.1. Işık Mikroskopik Bulgular

Işık mikroskopik olarak tüm deney gruplarını oluşturan sıçanların testis kesitlerinin histolojik ve histomorfometrik değerlendirilmesi için H-E ve PAS boyamaları uygulandı.

#### 4.3.2. Kontrol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

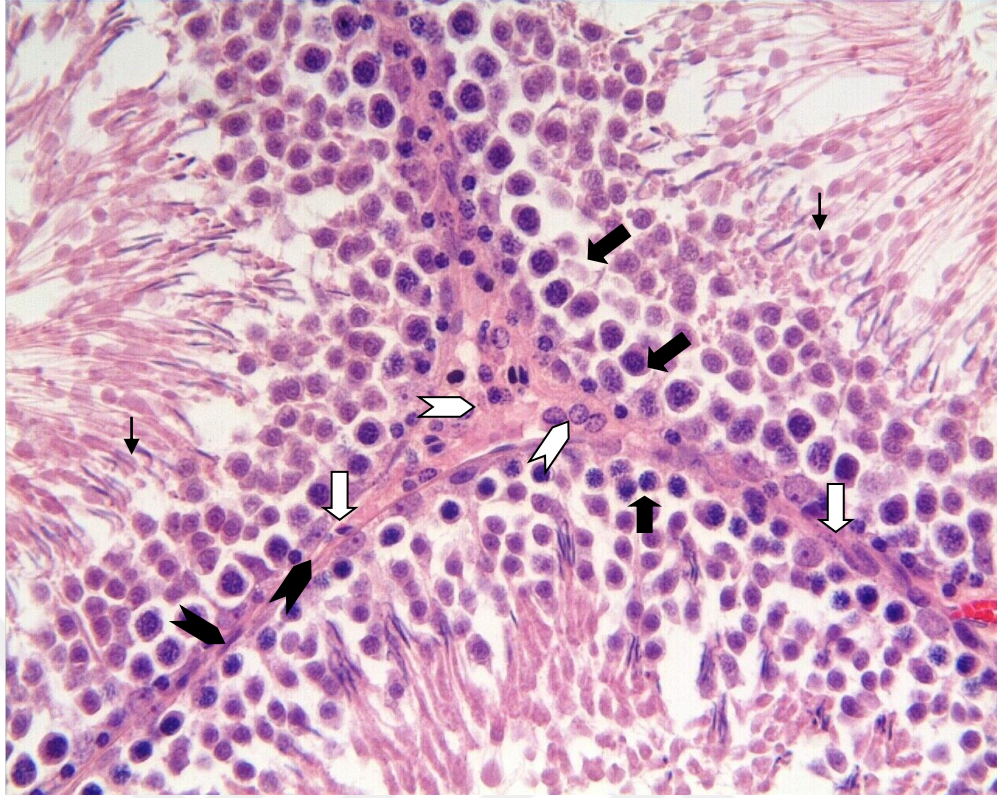
Kontrol grubunu oluşturan sıçanların H&E ile boyanmış testis kesitleri ışık mikroskopik incelemede normal histolojik yapıda izlendi. Seminifer tübüllerin transvers kesitleri dairesel/oval şekilli ve çapları birbirine yakın olarak gözlemlendi (Tablo 4.7).

Seminifer tübül duvarını döşeyen germinatif epitel hücrelerinin seminifer tübül bazalinden lümenine doğru düzgün ve normal tabakalanma gösterdiği izlendi (Tablo 4.8, Şekil 4.2). Sertoli hücreleri oldukça düzgün ve bazal membran üzerine yerleŐmiŐti. Spermatogonyumlar bazal membranın hemen üzerinde oturmuŐ, koyu nukleuslu olarak gözlendi. Primer spermatozoidler belirgin nukleusları, geniş sitoplazmaları ve spermatogenik seri hücreleri içinde en büyük hücre olma özelliklerinden dolayı kolayca ayırt edilebildi. Seminifer epitelin lümene yakın tabakalarında farklı gelişim aşamalarında spermatidler izlendi. Erken spermatidler dairesel/oval Şekilli, geç spermatidler uzamış, baş kısımları seminifer epitel içerisinde, kuyruk kısımları ise lümene yönelmiŐ olarak konumlanmıŐtı (Şekil 4.3). PAS boyanmış preparatlarda ise bazal membranın normal kalınlıkta ve tübülü düzgün Şekilde sarmakta olduğu, interstisyel alanda poligonall Şekilli ve eozinofilik sitoplazmalı Leydig hücrelerinin, bağ doku hücrelerinin ve kan damarlarının normal histolojik yapıda olduğu gözlendi (Şekil 4.4).

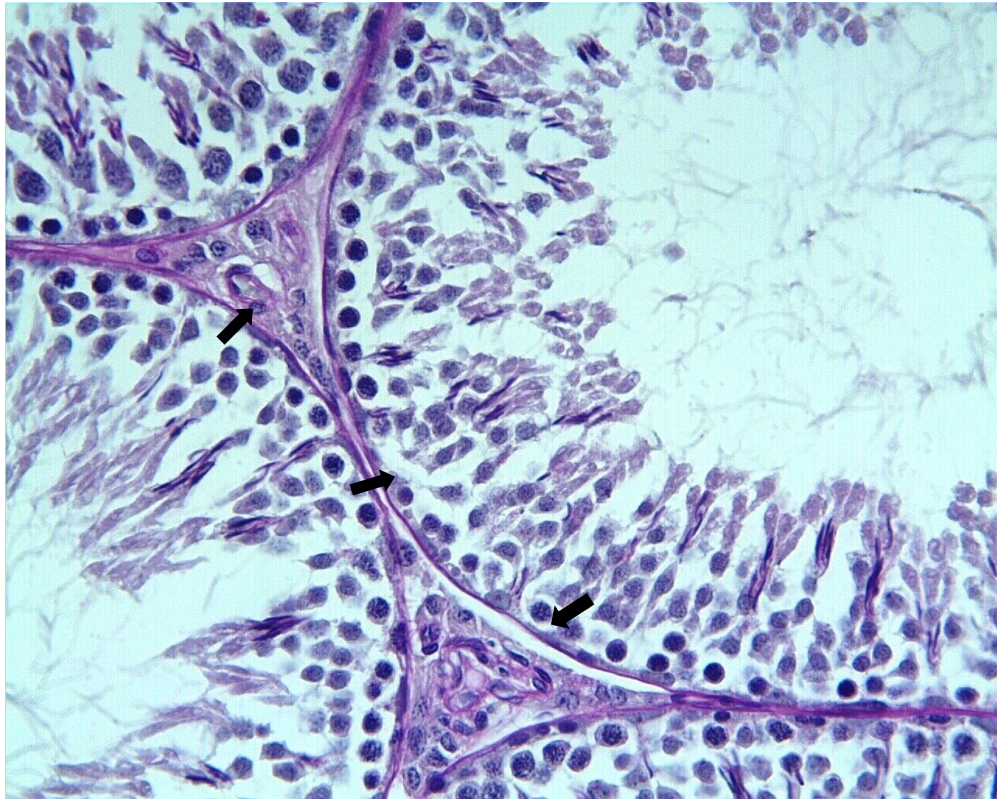


**Şekil 4.2.** Kontrol grubu: Daire/oval yapıda ve çaplarının birbirine yakın seminifer tübül, spermatogenik seri hücreler ve interstisyel alan. H-E; x20





Şekil 4.3. Kontrol grubu: Seminifer tübüllerde germ hücreleri spermatogonium (↻), primer spermatosit (↘), sertoli hücreleri (↙), uzamış spermatid (↗), interstisyel alan ve bu alandaki Leydig hücreleri (↕) H-E; x40

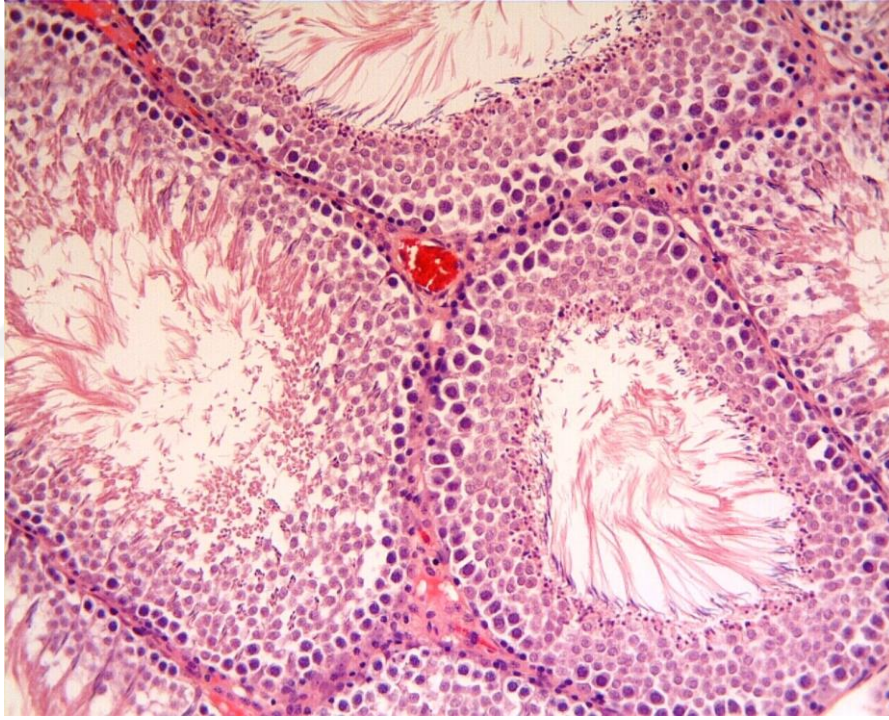


Şekil 4.4. Kontrol. PAS x40

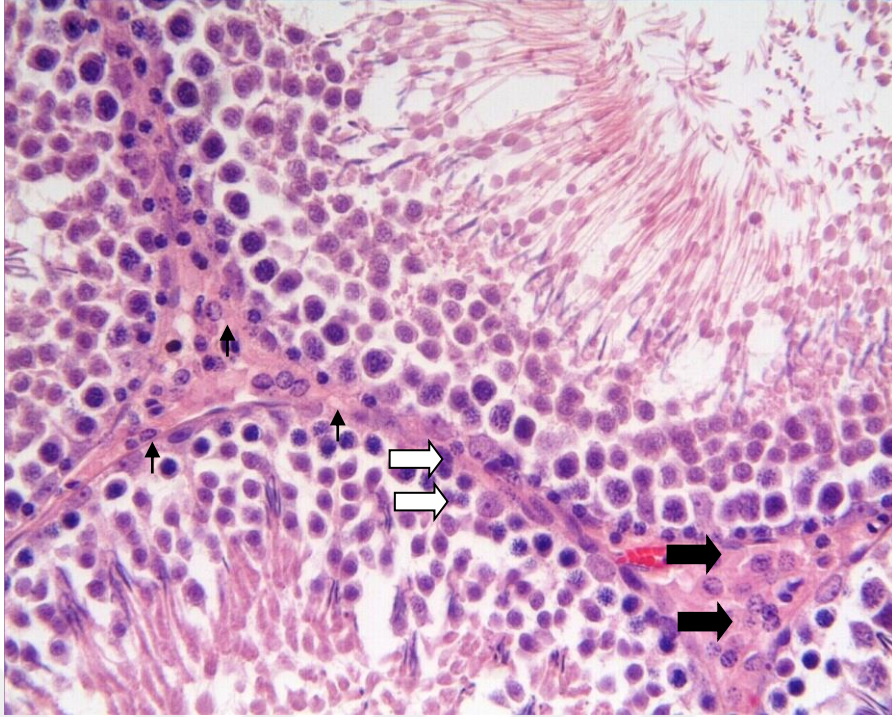


### 4.3.3. Mısır Yağı Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

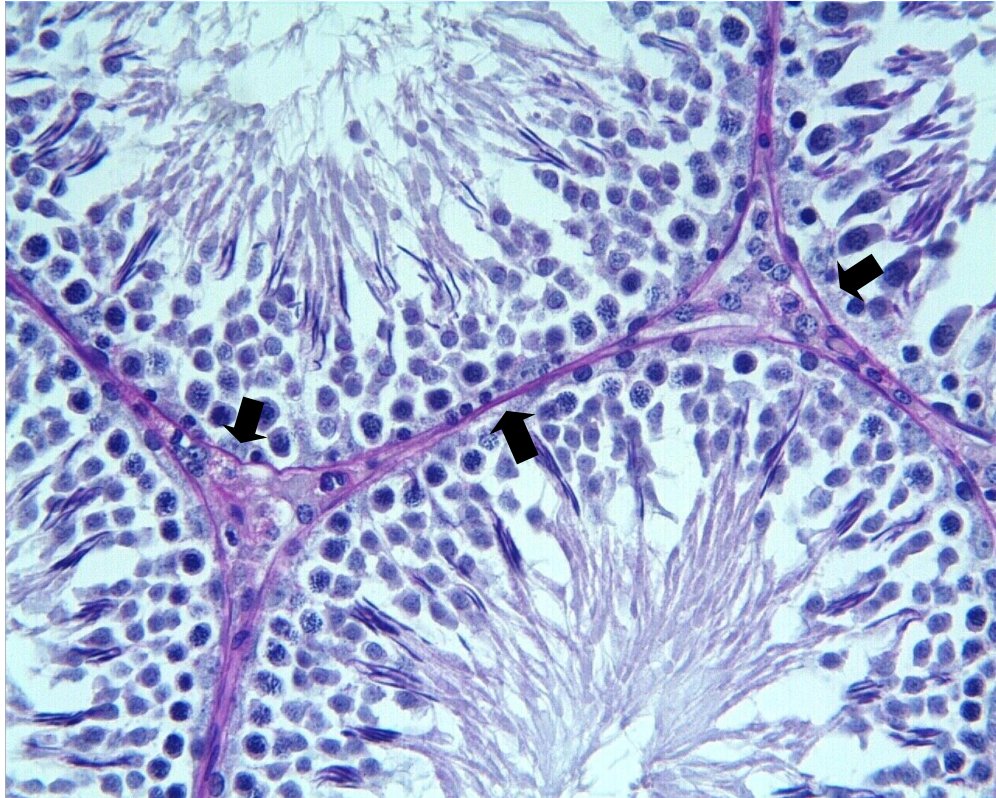
Mısır yağı grubuna ait sıçan testis kesitlerinin ışık mikroskopik incelemesinde, seminifer tübül ve tübüllerin arasını dolduran interstisyel bağ doku alanı kontrol grubuna benzer yapıda görüldü (Şekil 4.5). Seminifer tübül epitelini oluşturan germ hücreleri bazalden lümene doğru sırasıyla spermatogonyumlar, primer spermatositler ve spermatidler şeklinde sıralanmaktaydı. Bazal membran üzerine oturan Sertoli hücreleri normal yapıda gözlemlendi. İnterstisyel alanda poligonal şekilli Leydig hücreleri ve kan damarları normal histolojik yapıda değerlendirildi (Şekil 4.6). PAS boyanmış preparatlarda ise seminifer tübülleri çevreleyen bazal membran düzgün ve PAS(+) boyanmış olarak normal yapıda değerlendirildi (Şekil 4.7).



**Şekil 4.5.** Mısır yağı grubu: Normal histolojik yapıda seminifer tübüller ve duvarını oluşturan spermatogenik hücreler. H-E; X20.



Şekil 4.6. Mısır yağı grubu: Normal histolojik yapıda Sertoli hücreleri (↑) ve spermatogongumlar (↑) interstisyel alandaki damar ve Leydig hücreleri (→) H-E; X40.

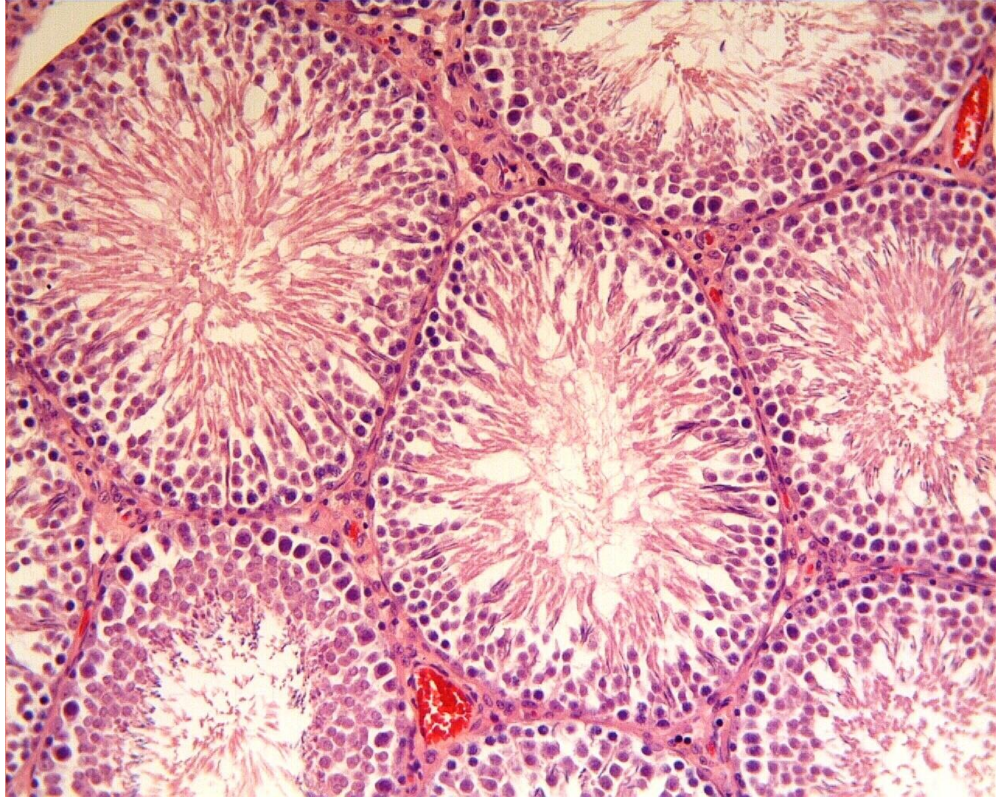


Şekil 4.7. Mısır yağı grubu. PAS; X40. Bazal membran (→)



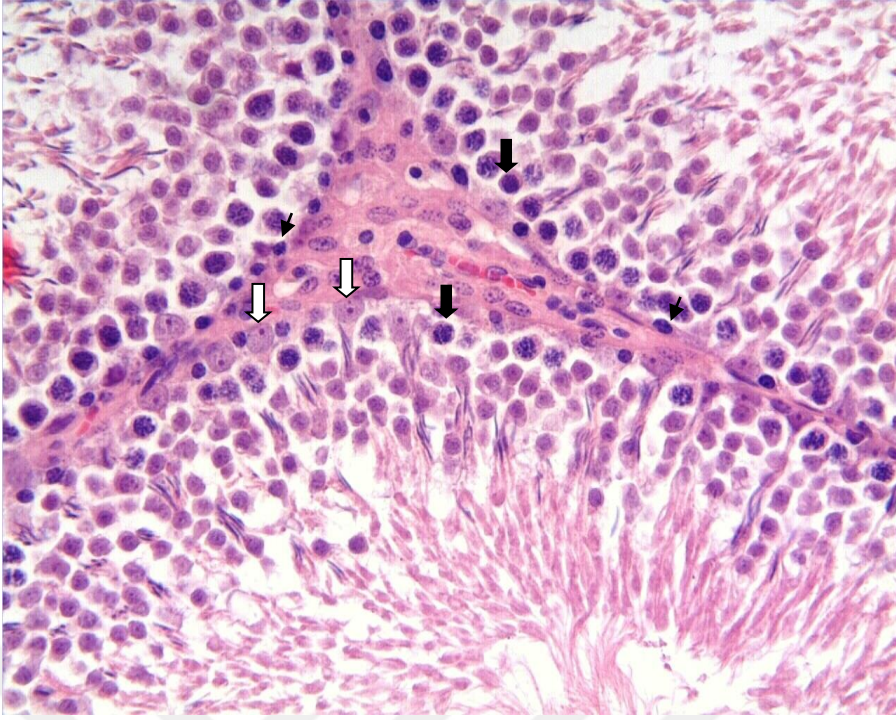
#### 4.3.4. Thymoquinone Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

Sadece Thymoquinone verilmiş olan sıçanların oluşturduğu grubun H&E ile boyanmış testis kesitlerinin ışık mikroskopik incelemelerinde, seminifer tübül yapısı ve tübül duvarını oluşturan germ hücreleri kontrol ve mısır yağı gruplarındakine benzer şekilde normal histolojik yapıda görüldü. Tübüllerin çoğunda lümeni dolduracak şekilde, uzamış spermatidlerin kuyrukları ve spermatozoonlar izlendi. Sertoli hücreleri kontürleri düzgün, ökromatik nukleuslu ve nukleolusları belirgin olarak normal yapıda değerlendirildi. İnteristisyum bağ dokusu, kan damarları ve Leydig hücreleri normal histolojik yapıda olup, kontrol ve mısır yağı grubuna benzerlik göstermekteydi (Şekil 4.8, 4.9). PAS boyaması yapılan testis kesitlerinde ise bazal membranın seminifer tübülleri kesintisiz olarak sarmış, belirgin sınırlı ve düzgün yapıda olduğu görüldü (Şekil 4.10).

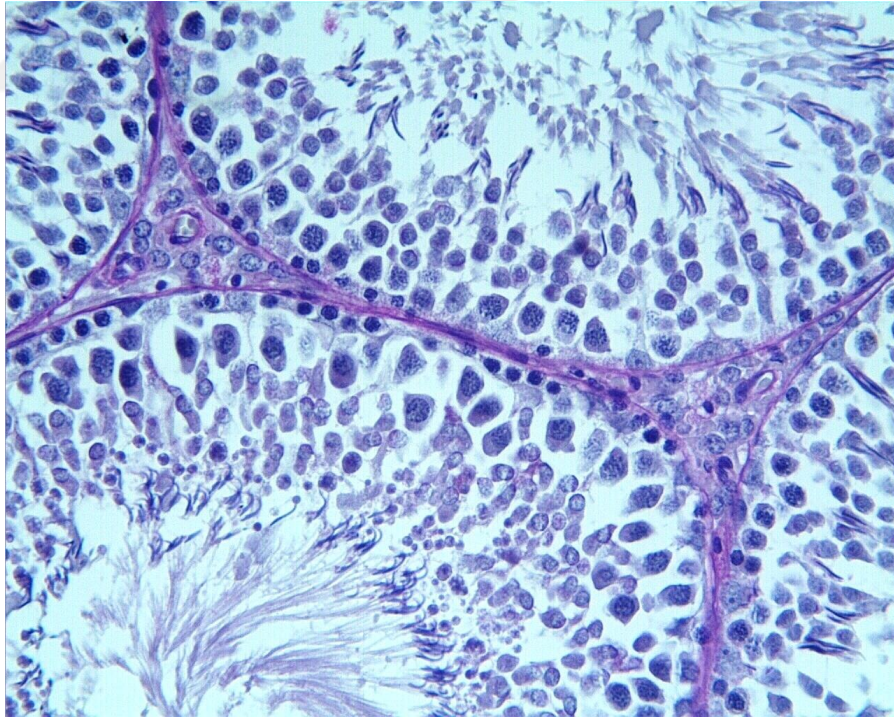


Şekil 4.8. TQ grubu. H-E; X20





Şekil 4.9. TQ grubu. H-E; X40. Sertoli hücresi (⇩), primer spermatosit(⇩), spermatogonyum (⇩)

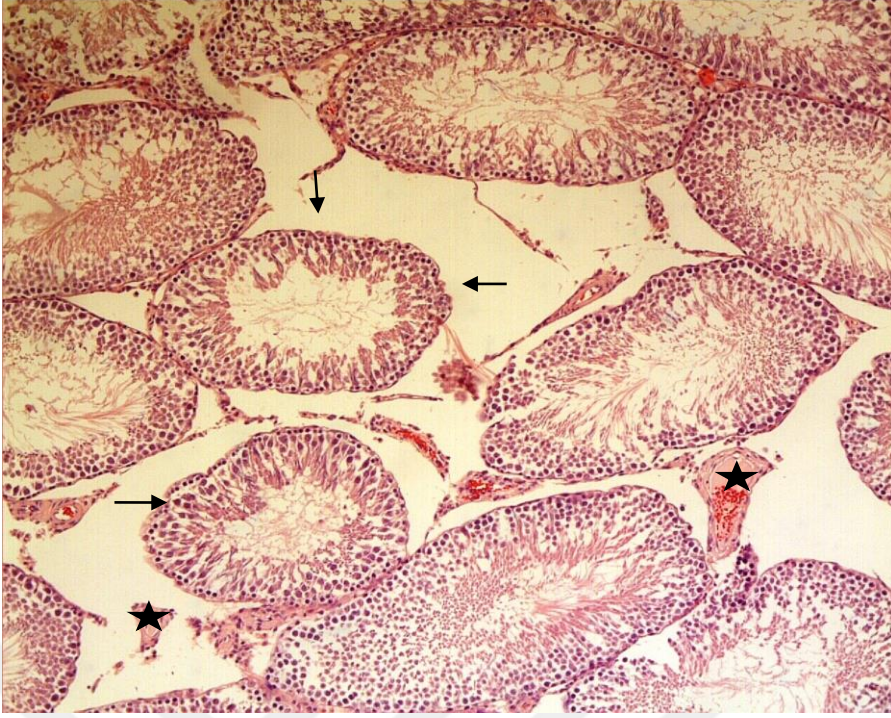


Şekil 4.10. TQ grubu. PAS; X40

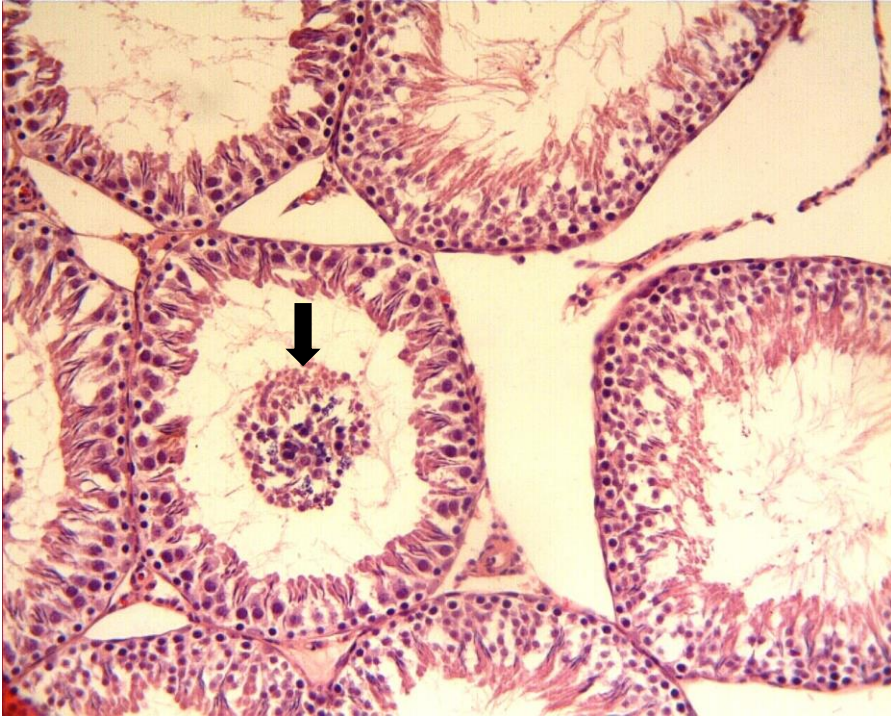
#### 4.3.5. TCDD Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

Sadece TCDD verilmiş olan sıçanların oluşturduğu grubun H&E ile boyanmış testis kesitlerinin ışık mikroskopik değerlendirilmesinde transvers kesit düzlemindeki seminifer tübüllerin çoğunda farklı düzeylerde şekil deformasyonları mevcut olup, dairesel/oval şekli bozulmuş çok sayıda seminifer tübül izlendi. Seminifer tübüllerin çoğunda farklı derecelerde atrofi tespit edildi. Atrofik tübüllerde tübül şekil bozukluğu ve çaplarında daralma dikkati çekti. İnterstisyel bağ doku alanlarında ödem mevcut olup, bu alanlarda tübüller arası mesafenin genişlediği görüldü. Bu grupta histolojik tekniğe bağlı tübüller arası ayrılma alanlarının daha yoğun ve daha geniş olması intersisyel bağ dokusundaki zayıflamaya bağlı olduğu yönünde yorumlandı. İnterstisyel alanlarda vasküler konjesyon ve ödem tespit edildi (Tablo 4.5, 4.7, Şekil 4.11). Seminifer tübül duvarı incelendiğinde germ hücre dejenerasyonu ve germ hücrelerinin dökülmelerine bağlı olarak germinatif epitel kalınlığında azalma, Sertoli ve spermatojenik seri hücreleri arasında ayrılmalar ve seminifer epitel tabakası içerisinde geniş boşluklar dikkati çekti (Tablo 4.8). Bazı tübüllerde seminifer tübül epitelindeki dejenerasyona bağlı olarak seminifer epiteli oluşturan hücrelerin tanınması ve ayrımı yapılamıyordu. Çok sayıda tübül lümeninde, gelişimin farklı aşamalarında dejenere olmuş ve dökülmüş germ hücreleri ve hücre debrisleri görüldü (Şekil 4.12). Bazı seminifer tübüllerde seminifer epitel içerisinde çok nukleuslu dev hücreler tespit edildi. Bu dev hücrelerin görüldüğü tübüllerde spermatozoo yoğunluğunun belirgin düzeyde daha az olduğu dikkati çekti (Şekil 4.15). Ödem içeren interstisyel bağ dokusu alanlarda Leydig hücrelerinin yoğunluğunun azaldığı görüldü (Şekil 4.13, 4.14). PAS boyamalarında ise tübüllerin etrafındaki bazal membranlarda düzensizlik, incelme ve yer yer de bazal membran dejenerasyonu saptandı (Şekil 4.16).



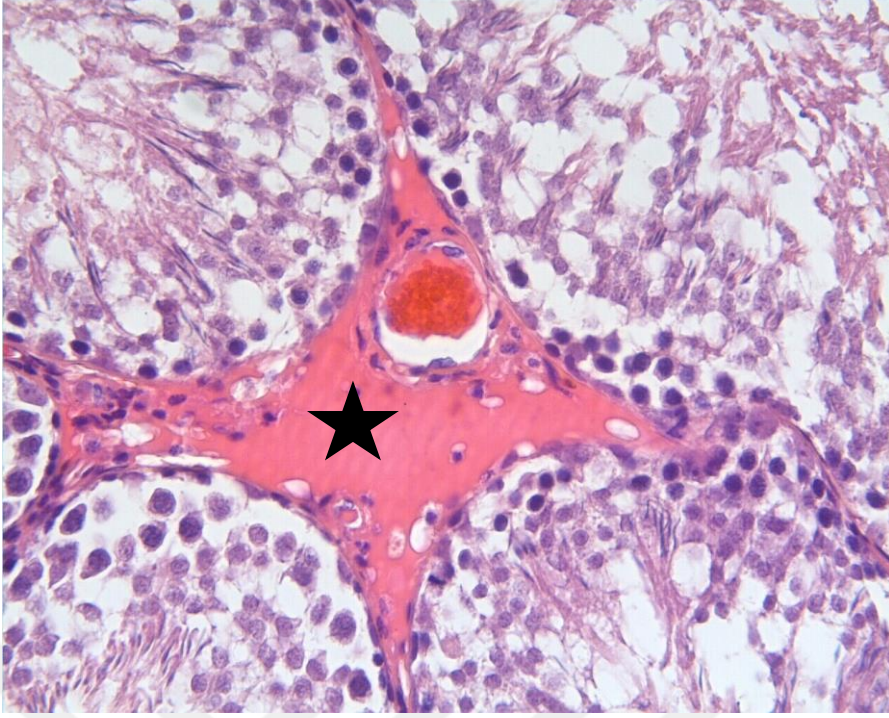


Şekil 4.11. TCDD grubu: İnterstisyel alanda vasküler konjesyon (yıldız), dejenere seminifer tübül şekli (oklar). H-E; X10

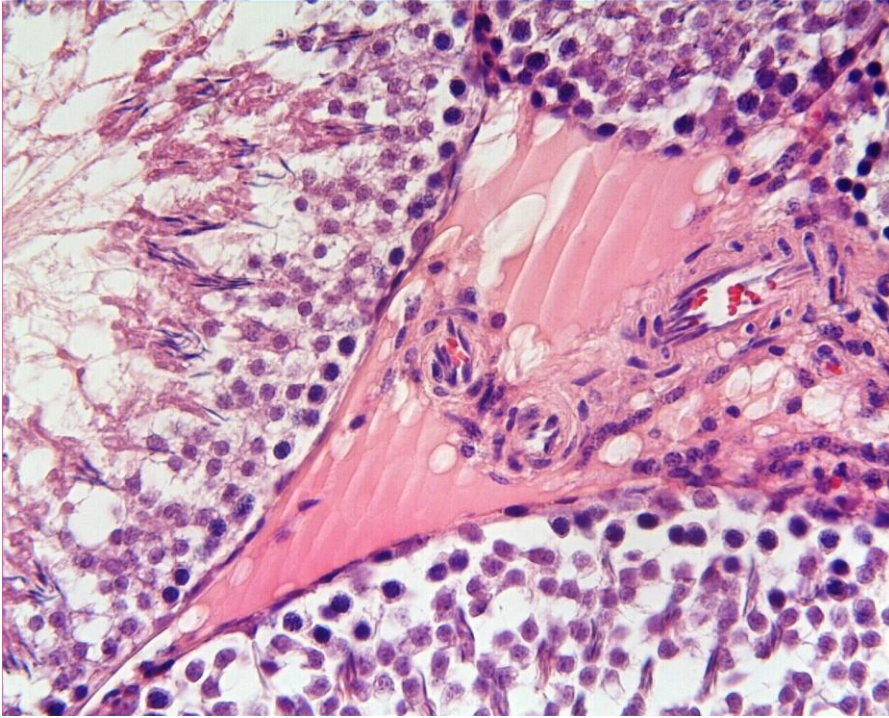


Şekil 4.12. TCDD grubu: Dejenere olmuş germ hücrelerinin dökülmesi nedeniyle tübül lümeninde hücre debrisleri (oklar). H-E; X20



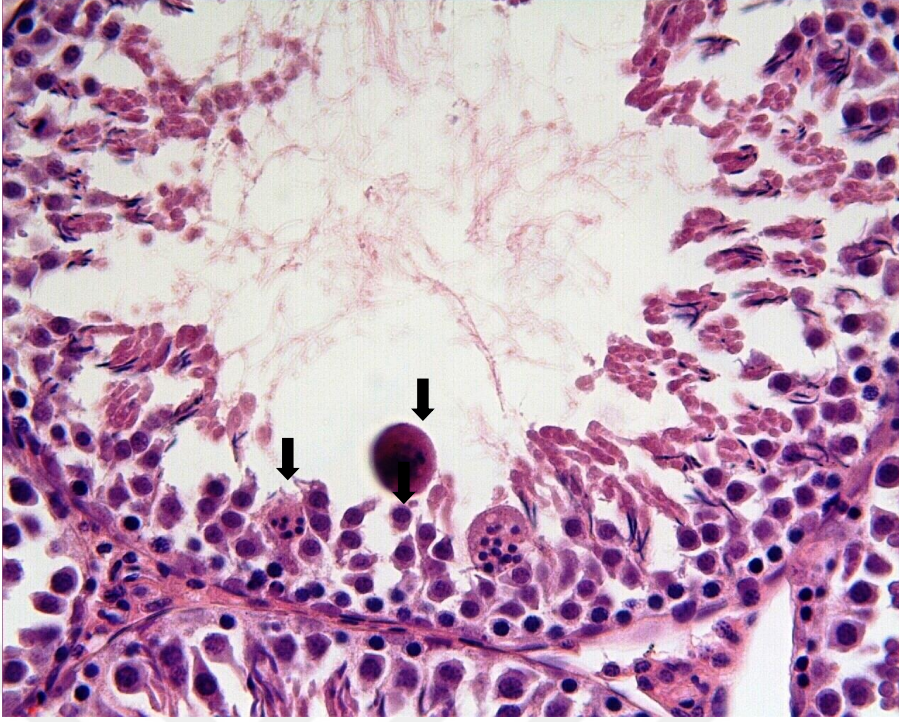


**Şekil 4.13.** TCDD grubu. İnterstisyel alanda ödem oluşumu (yıldız), spermatogenetik seriyi oluşturan hücrelerin düzensiz yerleşimi gözlemlendi. H-E; X40

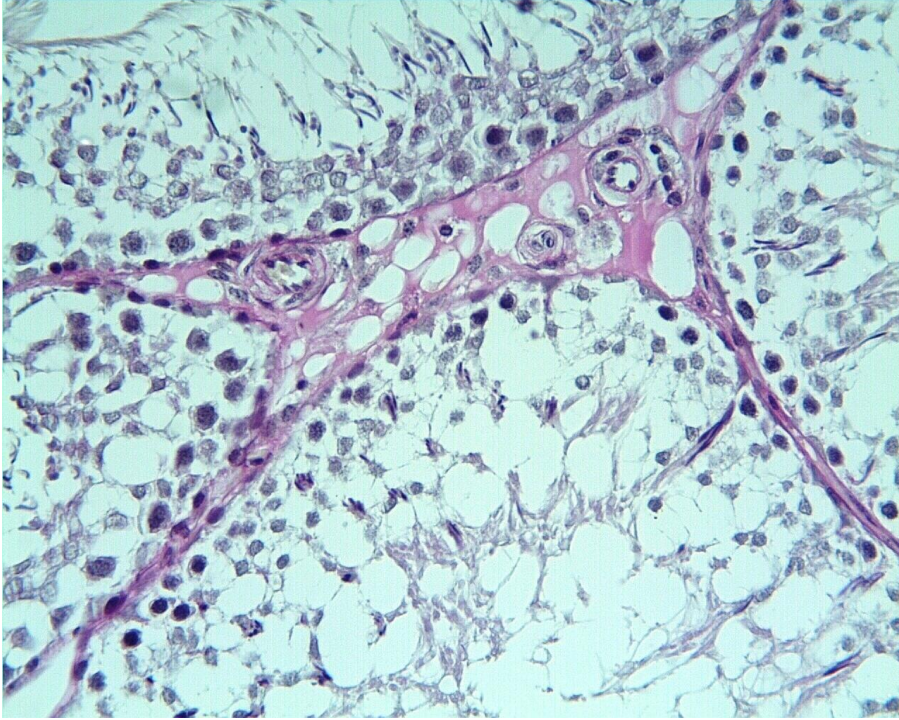


**Şekil 4.14.** TCDD grubu. H-E; X40





Şekil 4.15. TCDD grubu. Birden fazla nukleusun kaynaşmasıyla oluşmuş dev hücreler  
H-E; X40



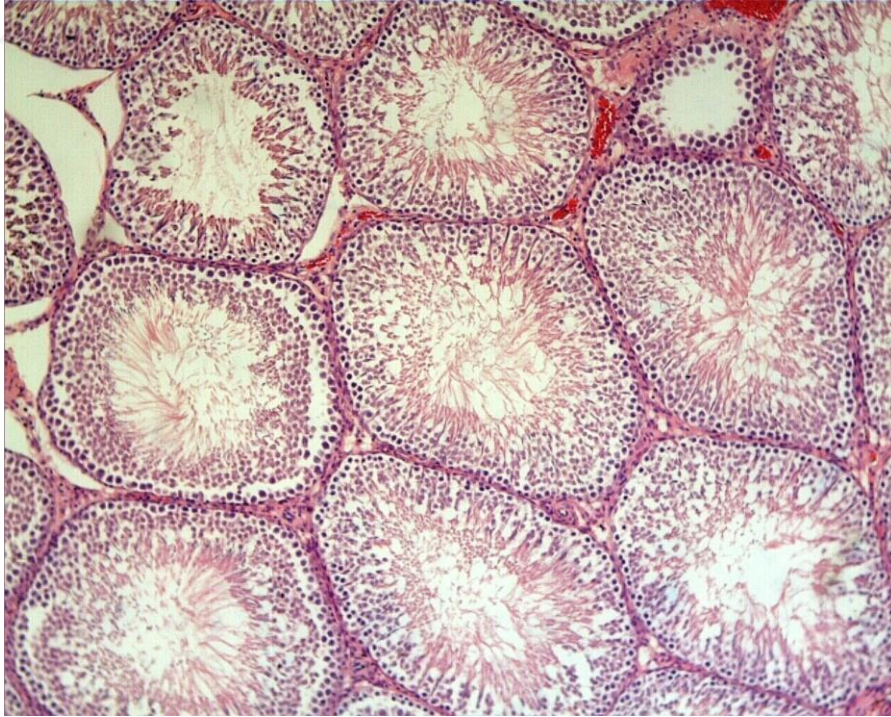
Şekil 4.16. TCDD grubu. PAS,X40

#### 4.3.6. TCDD +TQ Grubu Işık Mikroskobik Bulguları

TCDD+TQ grubunu oluşturan sıçan testis kesitlerinin ışık mikroskobik incelemelerinde, bazı tübüllerde şekil deformasyonu görülmekle birlikte, sıklığı ve

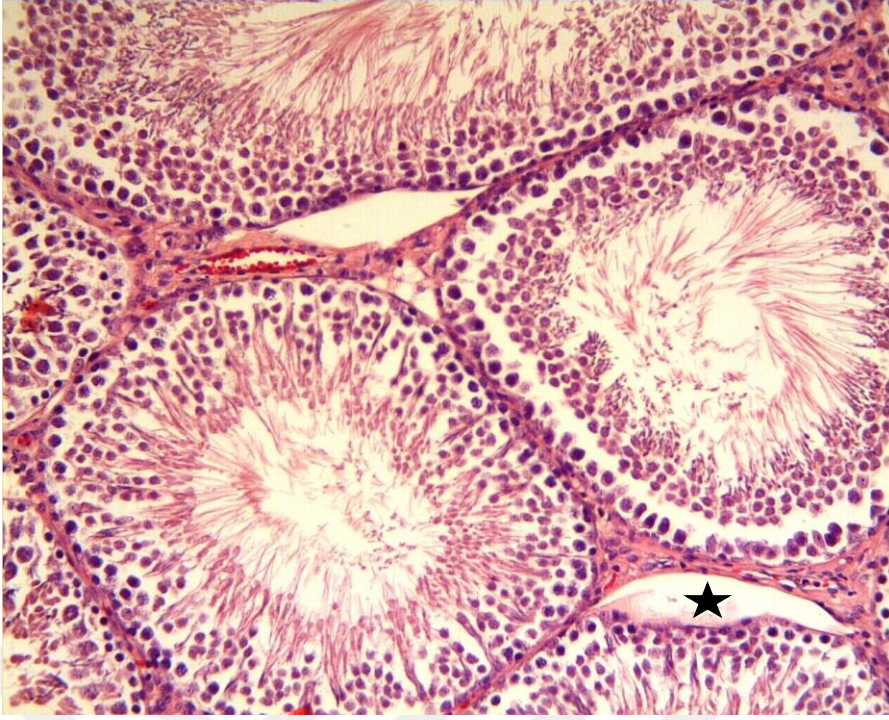


düzeyinin TCDD grubuna göre belirgin şekilde azaldığı tespit edildi. Seminifer epitelin ve spermatogenik hücrelerin tübüllerin çoğunda korunduğu ve bu tübüllerde spermatogenezin devam ettiği gözlemlendi. Bazı tübüllerde seminifer epitel içerisinde spermatogonyum- primer spermatozoid seviyesinde ayrılma dikkati çekti. Seminifer epitel içerisinde hücreler arasındaki ayrılma ve hücre dökülmesine bağlı boşlukların görülme sıklığı ve büyüklüğü azalmıştı. Seminifer tübül duvarını döşeyen epiteldeki spermatogenik hücrelerin, spermatogenezin hangi aşamasında olduğu kolaylıkla ayırt edilebiliyordu. Tübüllerin çoğunun lümeninde geç spermatitlere ait kuyruk yapıları ve spermatozoonlar mevcuttu (Şekil 4.17, 4.18). Bazı Tübüllerin lümeninde hücresel debrisler izlendi, bunların görülme sıklığı ve miktarları TCDD grubuna göre belirgin şekilde azalmıştı (Şekil 4.19). İnterstisyel alanda yer yer minimal düzeyde ödem, vasküler konjesyon tespit edildi (Tablo 4.5). İnterstisyel alanlarda Leydig hücreleri izlenmekte olup, genel olarak normal histolojik yapıda değerlendirildi. Tübüller arasındaki ayrılmalar yer yer minimal düzeyde görüldü (Şekil 4.20). PAS boyamalarında ise bazal membran yapıları kontrol grubuna benzer şekilde, düzgün yapıda olduğu görüldü (Şekil 4.21).

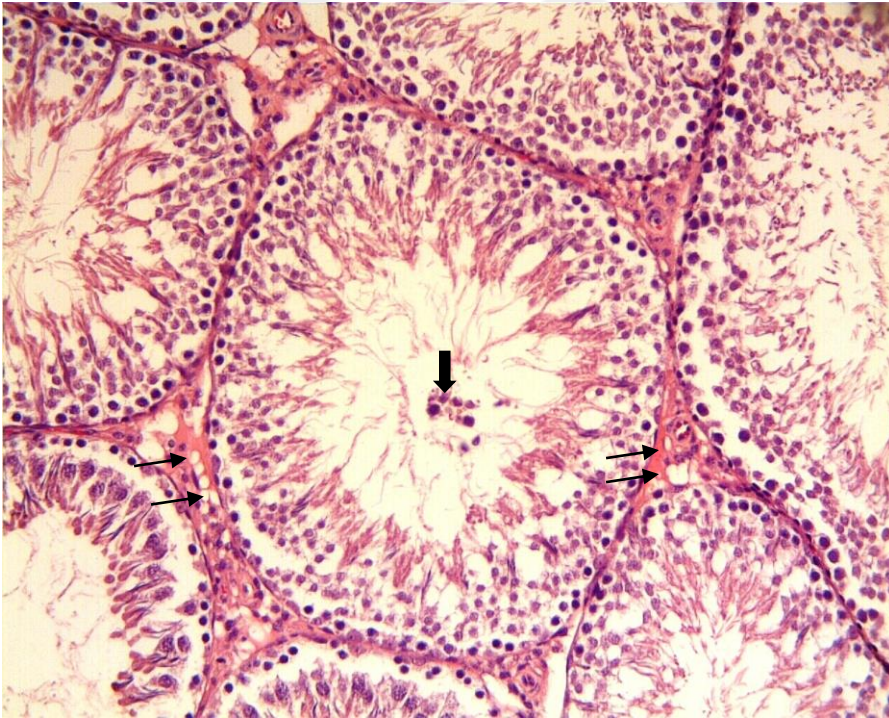


**Şekil 4.17. TCDD+TQ grubu. H-E,X10**



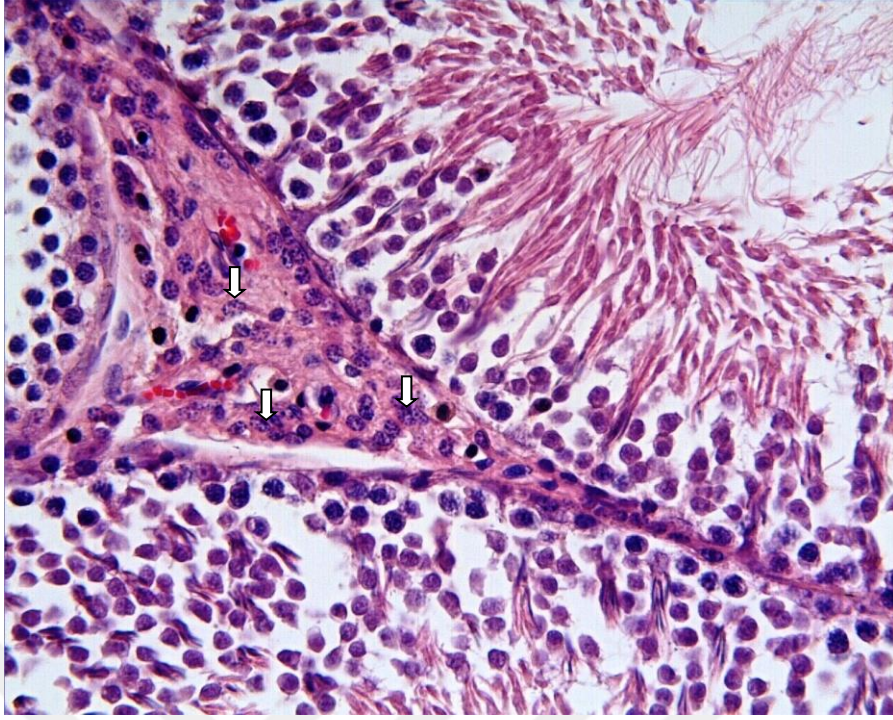


Şekil 4.18. TCDD+TQ grubu. H-E,X20

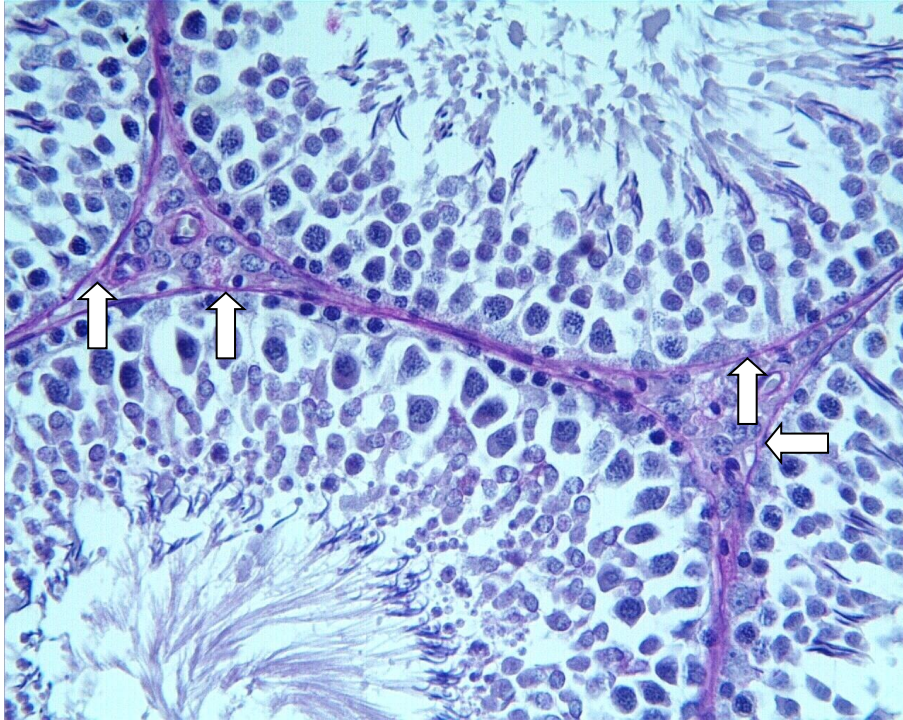


Şekil 4.19. TCDD+TQ grubu. seminifer tübül lümeninde azalmış hücre debrisleri (kalın ok), küçülmüş ve azalmış vakuoller (ince ok). H-E,X20





Şekil 4.20. TCDD +TQ grubu H-E, X40



Şekil 4.21. TCDD +TQ grubu: Histolojik yapıya uygun bazal lamina. PAS,X40



**Tablo 4.5.** Testiküler Hasar Skoru

<b>Grup</b>	<b>Hüc.Debris</b>	<b>Konjesyon</b>	<b>Dejenerasyon</b>	<b>Sağlam Tübül</b>
<b>Kontrol</b>	0 (0-0) <sup>a</sup>	0 (0-1) <sup>a</sup>	0 (0-1) <sup>a</sup>	3 (1-3) <sup>a</sup>
<b>M.yağı</b>	0 (0-0) <sup>a</sup>	0 (0-1) <sup>a</sup>	0 (0-1) <sup>a</sup>	3 (1-3) <sup>a</sup>
<b>TQ</b>	0 (0-0) <sup>a</sup>	0 (0-1) <sup>a</sup>	0 (0-1) <sup>a</sup>	3 (1-3) <sup>a</sup>
<b>TCDD</b>	1 (0-3) <sup>b</sup>	2 (1-3) <sup>b</sup>	3 (0-3) <sup>b</sup>	1 (0-2) <sup>b</sup>
<b>TCDD+TQ</b>	1 (0-2) <sup>b</sup>	1 (0-2) <sup>c</sup>	2 (1-2) <sup>b</sup>	2 (1-3) <sup>b</sup>
<b>p-değeri</b>	<0,001	<0,001	<0,001	0,001

Gruplar arasında hasar parametreleri (hücre debris, konjesyon,dejenerasyon) bakımından kontrol grubu [(H.Deb: 0 (0-0), Kon: 0 (0-1), Dej: 0 (0-1)] ile karşılaştırıldığında Mısır yağı [(H.Deb: 0 (0-0), Kon: 0 (0-1), Dej: 0 (0-1)] ve TQ [(H.Deb: 0 (0-0), Kon: 0 (0-1), Dej: 0 (0-1)] gruplarında anlamlı fark bulunmamıştır. TCDD grubunda [(H.Deb: 1 (0-3), Kon: 2 (1-3), Dej: 3 (0-3)] ise kontrol grubuna göre skor ortalaması anlamlı derecede artış, TCDD+TQ grubunda [(H.Deb: 1 (0-2), Kon: 1 (0-2), Dej: 2 (1-2)] ise, skor ortalaması kontrol grubuna yakın olarak hesaplanmıştır.

Gruplar arasında sağlam tübül bakımından kontrol grubu [(3 (1-3)] ile karşılaştırıldığında Mısır yağı [(3 (1-3)] ve TQ [(3 (1-3)] gruplarında anlamlı fark bulunmamıştır. TCDD grubunda [(1 (0-2)], kontrol grubuna göre skor ortalaması anlamlı derecede azalış, TCDD+TQ grubunda [(2 (1-3)] ise, kontrol grubuna yakın olarak hesaplanmıştır.

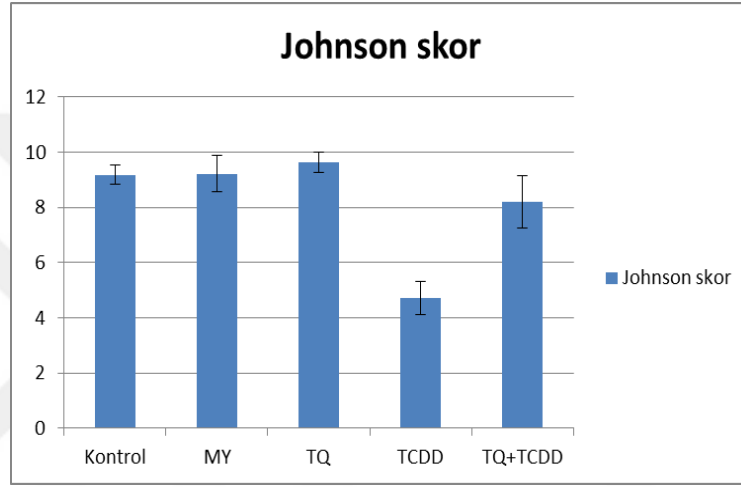
#### **4.4. Morfometrik Bulgular**

##### **4.4.1. Johnsen Skoru**

Gruplar arasında sağlam tübül bakımından kontrol grubu [9,18(8,77-9,74)] ile karşılaştırıldığında Mısır yağı [9,22(8,12-9,87)] ve TQ [9,63(8,87-9,74)] gruplarında anlamlı fark bulunmamıştır. TCDD grubunda [4,72(4,31-6,23)], kontrol grubuna göre skor ortalaması anlamlı derecede azalış, TCDD+TQ grubunda [8,2(7,23-9,62)] ise, kontrol grubuna yakın olarak hesaplanmıştır.

**Tablo 4.6.** Johnsen Skor Değerleri

Gruplar	Johnson skor	P
<b>Kontrol</b>	9,18(8,77-9,74) <sup>a</sup>	
<b>MY</b>	9,22(8,12-9,87) <sup>a</sup>	
<b>TQ</b>	9,63(8,87-9,74) <sup>a</sup>	<0,001
<b>TCDD</b>	4,72(4,31-6,23) <sup>b</sup>	
<b>TQ+TCDD</b>	8,2(7,23-9,62) <sup>c</sup>	



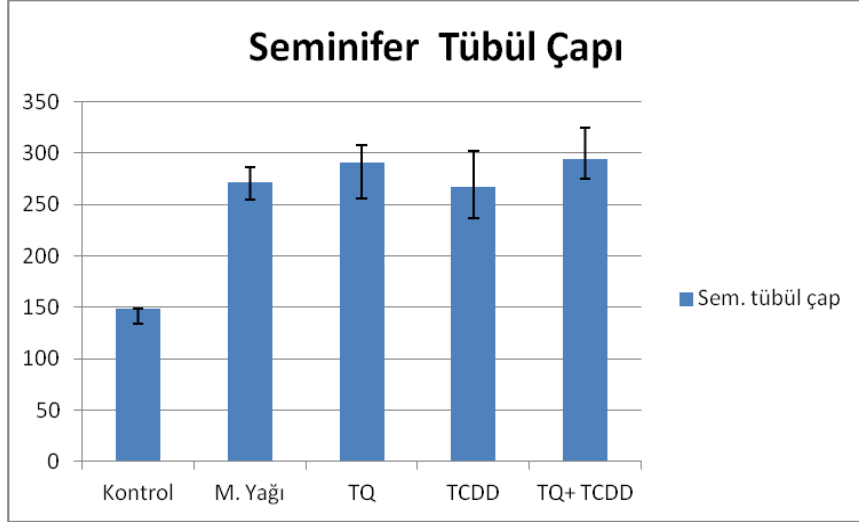
**Şekil 4.22.** Johnsen Skor Değerleri Grafiği

#### 4.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümleri

Tüm grupların seminifer tübül çap ölçümlerine bakıldığında kontrol grubuna ( $148,36 \pm 14,77$ ) göre; MY ( $271,89 \pm 17,25$ ), TQ ( $290,68 \pm 34,74$ ), TCDD ( $267,24 \pm 30,62$ ) ve TCDD+TQ ( $293,77 \pm 18,92$ ) gruplarında seminifer tübül çaplarında anlamlı bir artış bulundu.

**Tablo 4.7.** Tüm Grupların Seminifer Tübül Çap Ortalamaları

Gruplar	Sem. tübül çap (Ort± std. sapma)	p
<b>Kontrol</b>	$148,36 \pm 14,77$ <sup>a</sup>	
<b>M. Yağı</b>	$271,89 \pm 17,25$ <sup>b</sup>	
<b>TQ</b>	$290,68 \pm 34,74$ <sup>b</sup>	<0,001
<b>TCDD</b>	$267,24 \pm 30,62$ <sup>b</sup>	
<b>TQ+ TCDD</b>	$293,77 \pm 18,92$ <sup>b</sup>	



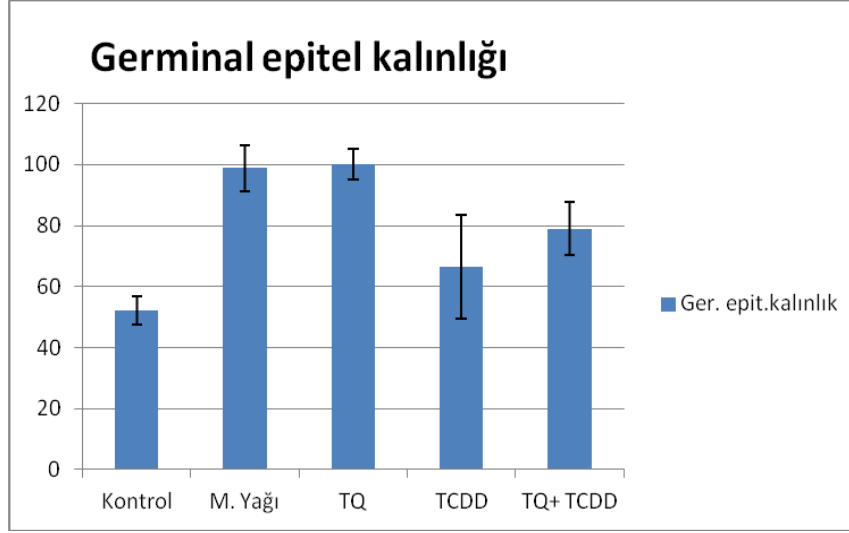
Şekil 4.23. Seminifer Tübül Çap Ölçümleri Grafiği

#### 4.4.3. Germinal Epitel Kalınlık Ölçümleri

Tüm grupların germinal epitel kalınlık ölçümlerine bakıldığında kontrol grubuna ( $52,16 \pm 4,51$ ) göre; MY ( $98,88 \pm 7,49$ ), TQ ( $100,19 \pm 4,97$ ) ve TCDD+TQ ( $78,97 \pm 8,79$ ) gruplarında germinal epitel kalınlığı anlamlı bir artış bulundu. Ancak kontrol ile kıyaslandığında germinal epitel kalınlığı TCDD ( $66,55 \pm 17,11$ ) grubunda artmış ancak anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.8. Tüm Grupların Germinal Epitel Kalınlık Ortalamaları

Gruplar	Ger. epit.kalınlık (Ort± std. sapma)	p
<b>Kontrol</b>	$52,16 \pm 4,51^a$	
<b>M. Yağı</b>	$98,88 \pm 7,49^b$	
<b>TQ</b>	$100,19 \pm 4,97^b$	<0,001
<b>TCDD</b>	$66,55 \pm 17,11^{a,c}$	
<b>TQ+ TCDD</b>	$78,97 \pm 8,79^c$	

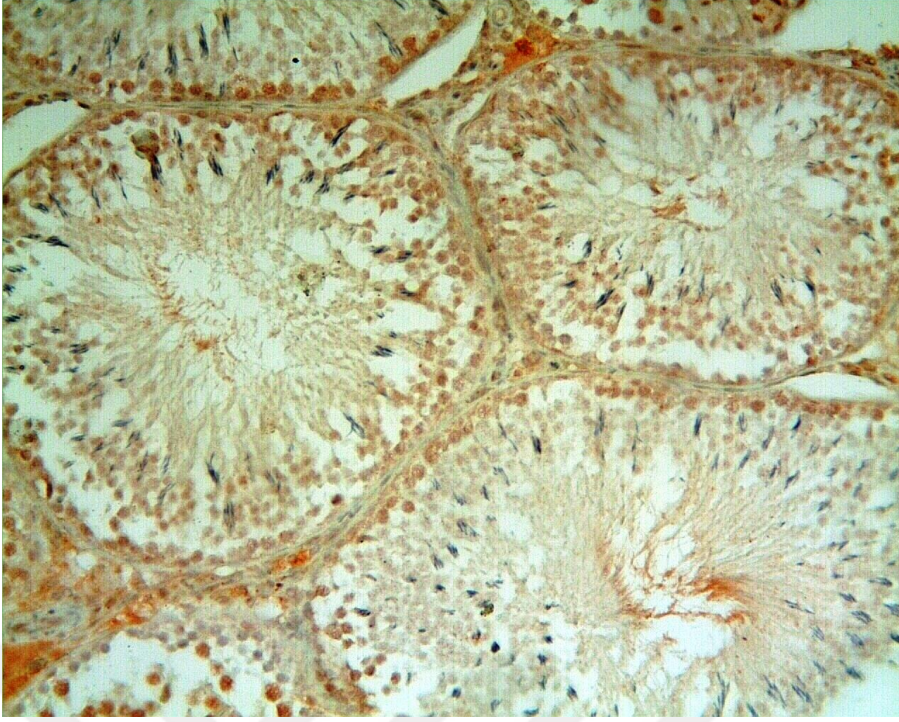


**Şekil 4.24.** Germinal Epitel Kalınlık Ölçümleri

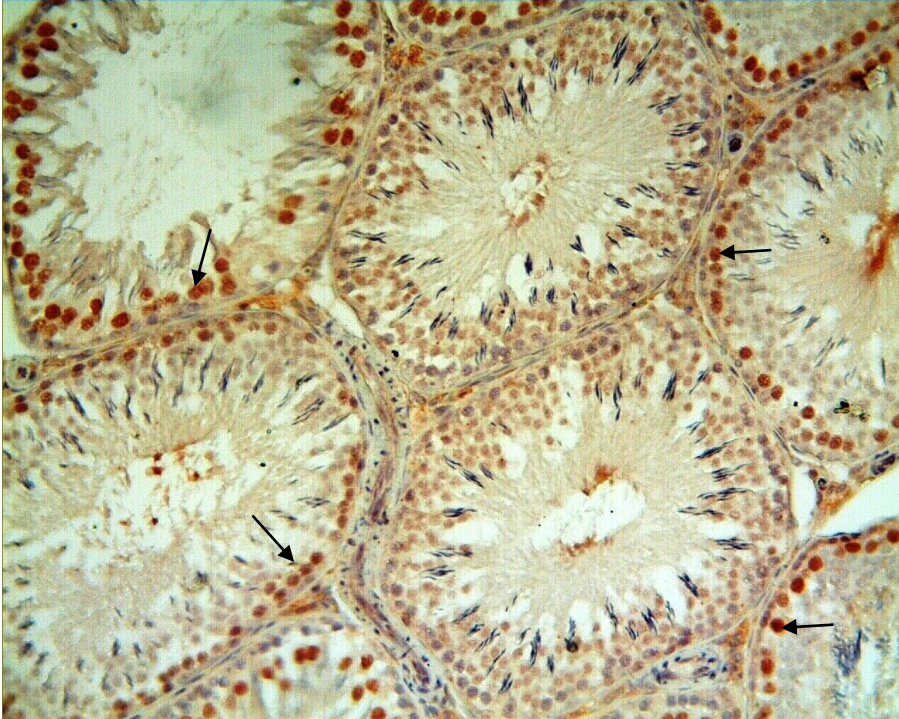
## 4.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

### 4.5.1. Caspas-9 Antikor Boyanması

Kontrol, Mısır yağı ve TQ gruplarına ait testis kesitlerde immunohistokimyasal Caspas-9 boyamalarında benzer şekilde seminifer tübül epiteli bazal tabakasındaki ve primer spermatozoid seviyesindeki hücrelerde diffüz, zayıf ve yer yer orta derece yoğunlukta Caspas-9 immunreaktivite pozitifliği saptandı (Şekil 4.25, 4.26, 4.27). TCDD grubuna ait testis kesitlerinin immunohistokimyasal Caspas-9 boyamalarında, seminifer tübül epitelinin tüm tabakalarındaki spermatogenik seri hücrelerinde yoğun Caspas-9 immunreaktivite pozitifliği belirlendi (Şekil 4,28). TCDD+TQ grubu testis kesitlerinde immunohistokimyasal Caspas-9 boyaması uygulanan preparatlarda seminifer tübül epiteli bazal bölgesindeki spermatogonyumlarda ve yer yer primer spermatozoidlerde orta derece yoğunlukta Caspas-9 immunreaktivite pozitifliği saptandı (Şekil 4.29). Kontrol, Mısır yağı ve TQ gruplarına ait immunreaktivite pozitiflik skorları benzer olup, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (kont: 1(0-2), m.y.: 1(0-2), TQ: 1(0-2)). TCDD grubu immunreaktivite skoru kontrol, mısır yağı ve TQ gruplarındakinden yüksek olup istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (TCDD: 3(2-3)). TCDD+TQ grubu immunohistokimyasal Caspas-9 immunreaktivite skoru kontrol, mısır yağı ve TQ gruplarındakinden yüksek, TCDD grubundakinden ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük tespit edildi (TCDD+TQ: 2(1-2)), (Tablo 4.9).

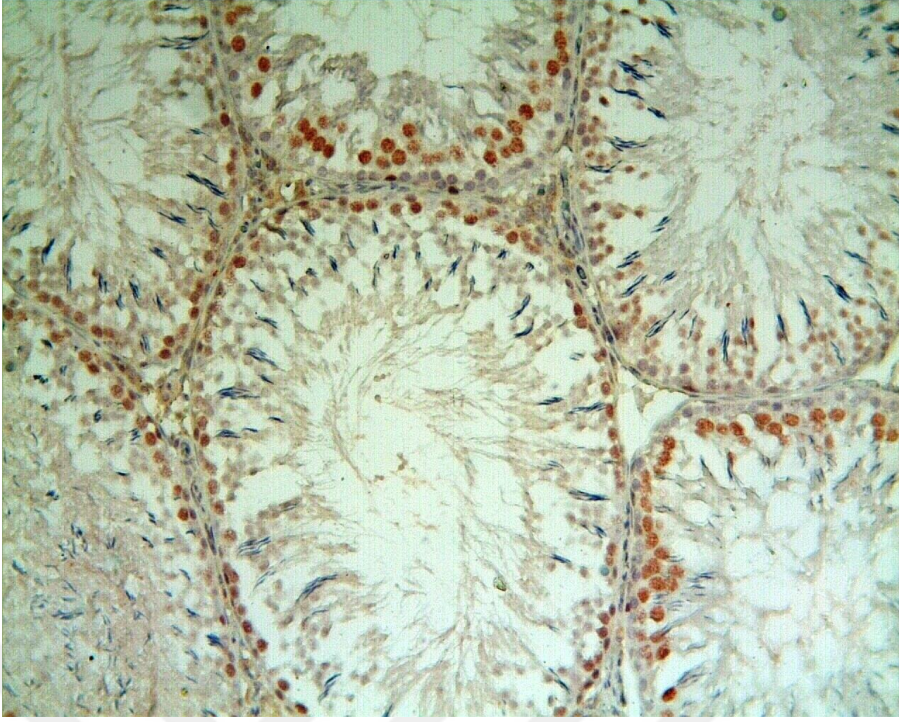


Şekil 4.25. Kontrol grubu, caspas-9 aktivesi. X20

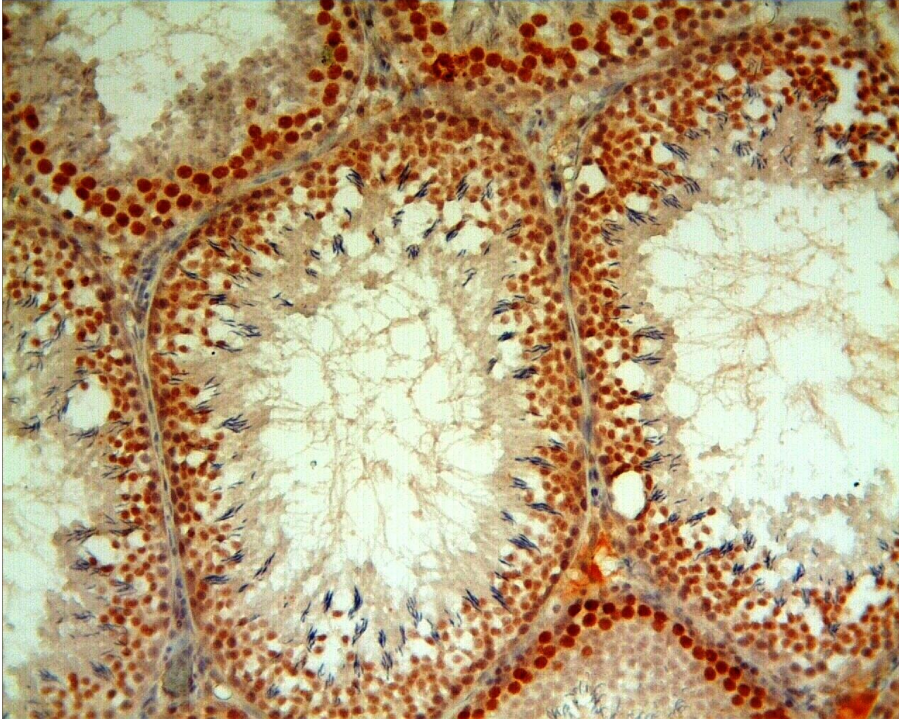


Şekil 4.26. Mısır yağı grubu, caspas-9 aktivesi. X20



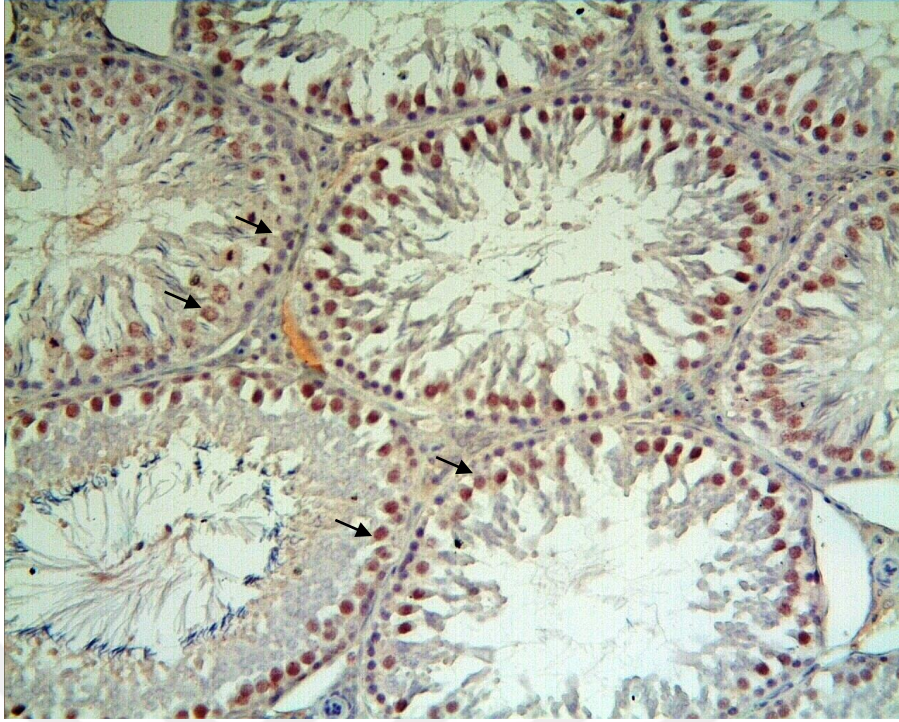


Şekil 4.27. TQ grubu, caspas-9 aktivesi. X20



Şekil 4.28. TCDD grubu, caspas-9 aktivesi. X20





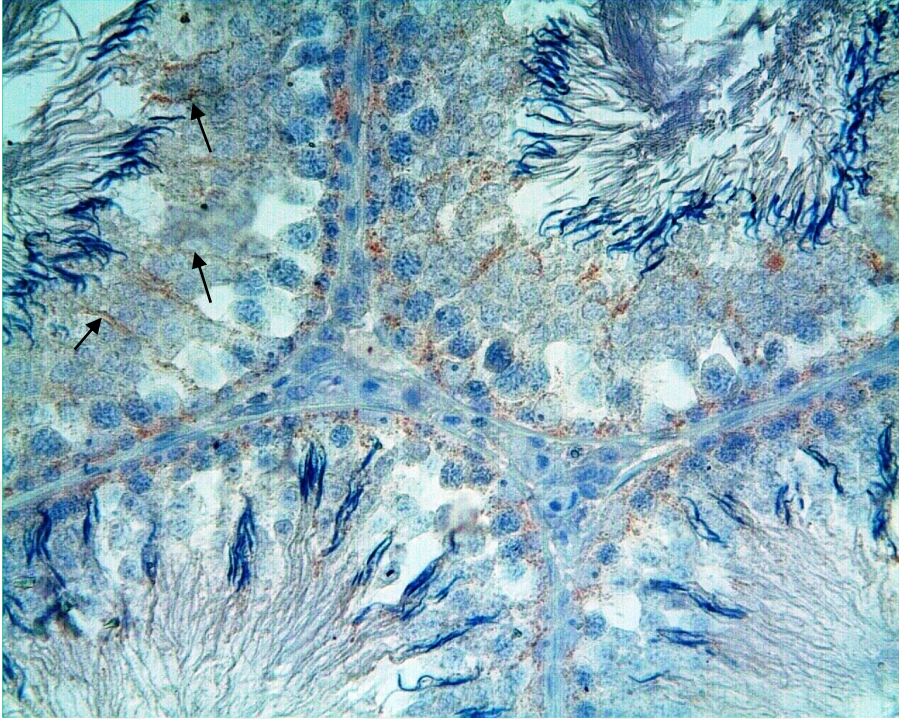
**Şekil 4.29.** TCDD+TQ grubu, caspas-9 aktivesi. X20

#### **4.5.2. Dicer ve Drosha Antikor Boyanması**

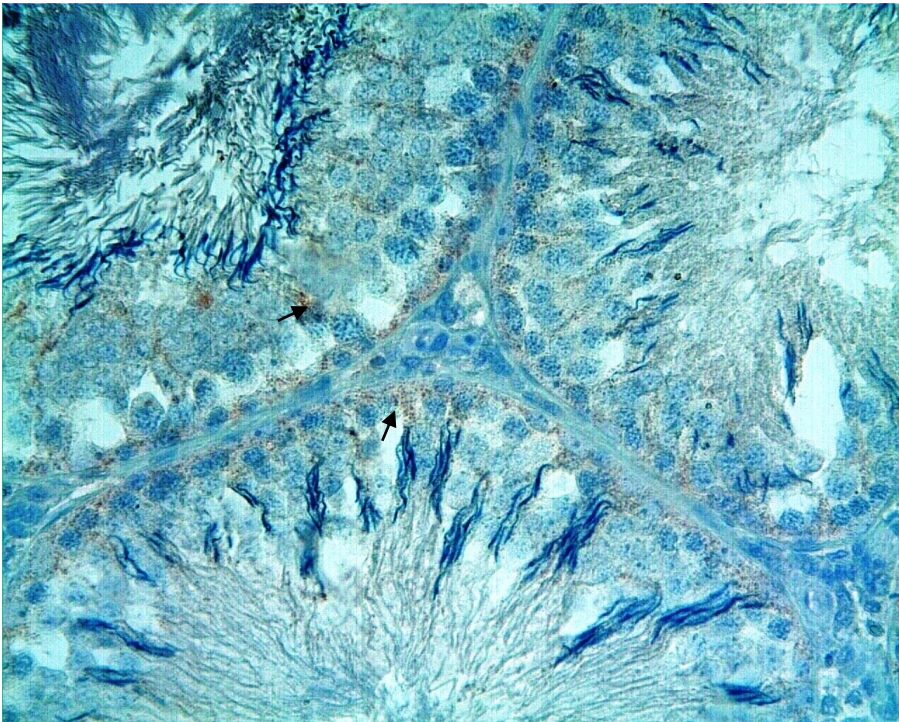
Kontrol, Mısır yağı ve TQ gruplarına ait testis kesitlerde immunohistokimyasal Dicer ve Drosha boyamalarında seminifer tübül epitel hücrelerinin genelinde sitoplazmik Dicer (+) ve drosha (+) immunreaktivitesi gözlemlendi. Bu gruplardaki Dicer ve Drosha (+) immunreaktivite yoğunluklarının benzer şekilde orta derece yoğunluk ve şiddette olduğu gözlemlendi (Şekil 4.30, 4.31, 4.32, 4.35, 4.36, 4.37). TCDD gruba ait kesitlerde immunohistokimyasal Dicer ve Drosha immunreaktivite pozitifliği genel olarak düşük yoğunluk ve yaygınlıkta olup yer yer orta düzeyde immunreaktivite pozitifliği saptandı (Şekil 4.33, 4.38). TCDD+TQ grubu immunohistokimyasal Dicer ve Drosha boyamalarında seminifer tübül epitel hücrelerinde genel olarak orta derece yoğunluk ve şiddette Dicer ve Drosha immunreaktivite pozitifliği (Şekil 4.34, 4.39) saptandı. Kontrol, Mısır yağı ve TQ gruplarına ait immunreaktivite pozitiflik skorları benzer olup, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (kont dicer: 2(1-2), dros: 2(1-2), MY dicer: 2(2-3), dros: 2(1-2), TQ dicer: 2(2-2), dros: 2(2-2)). TCDD grubu immunreaktivite skoru kontrol, mısır yağı ve TQ gruplarından düşük olup istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (TCDD dicer: 1(0-1), dros: 1(0-1)). TCDD+TQ grubu immunohistokimyasal Dicer ve Drosha immunreaktivite skoru kontrol, mısır yağı ve TQ gruplarından düşük, TCDD grubundakinden ise



istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek tespit edildi (TCDD+TQ dicer: 1(1-2), dros: 1(1-2)), (Tablo 4.9).

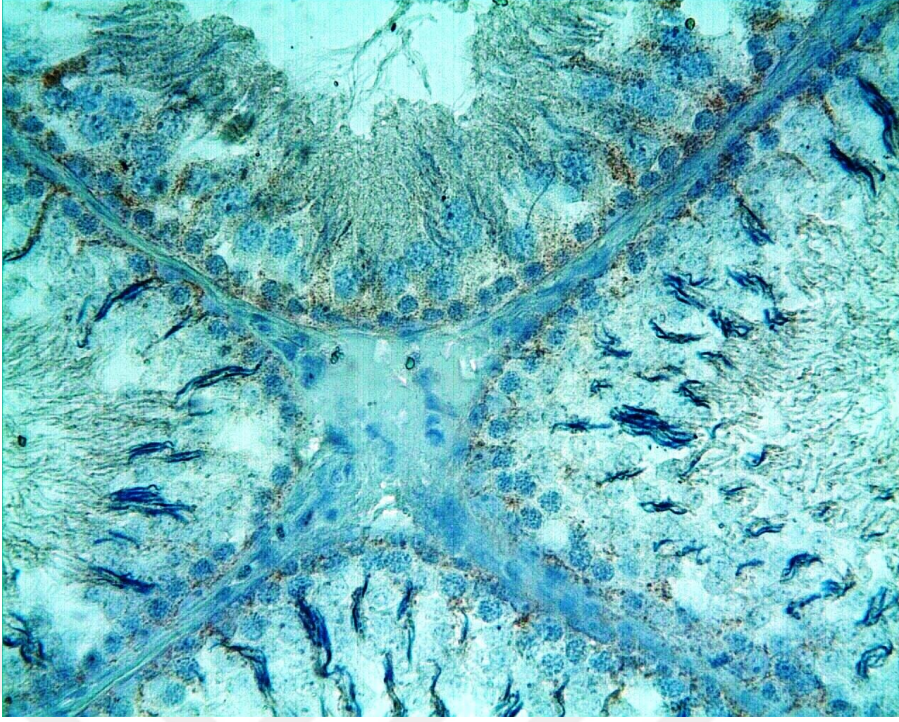


Şekil 4.30. Kontrol grubu Dicer aktivesi. X40

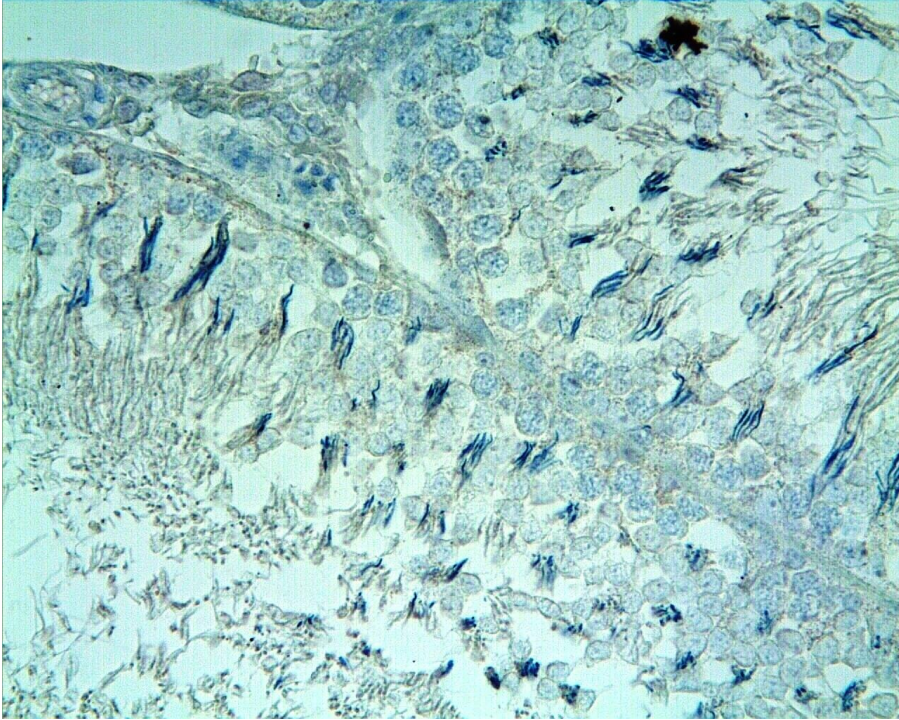


Şekil 4.31. Mısır yağı grubu. Dicer aktivesi, (ok). X40



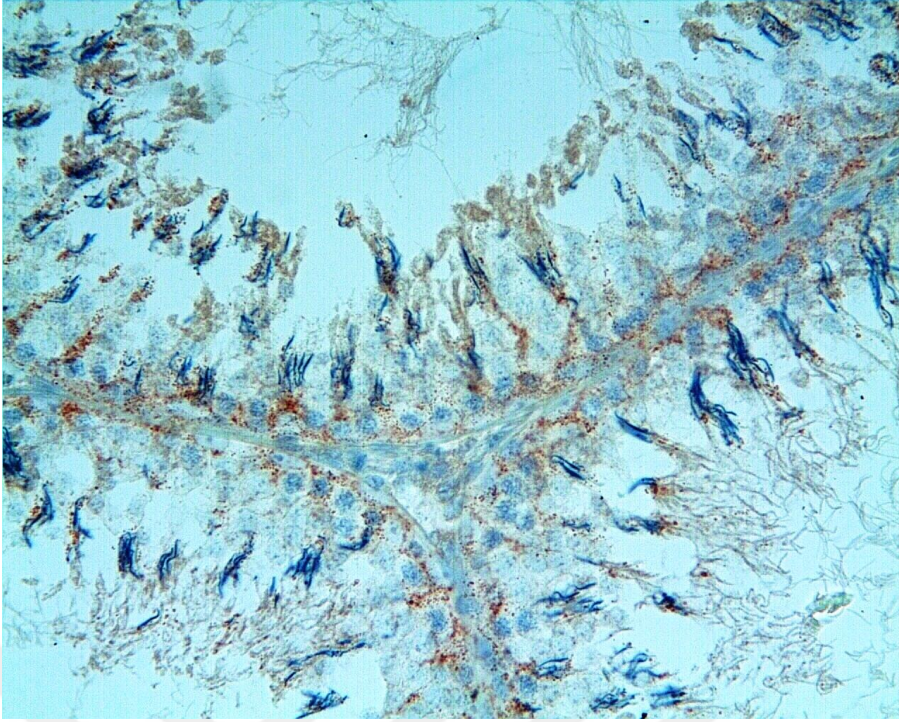


Şekil 4.32. TQ grubu, Dicer aktivesi. X40

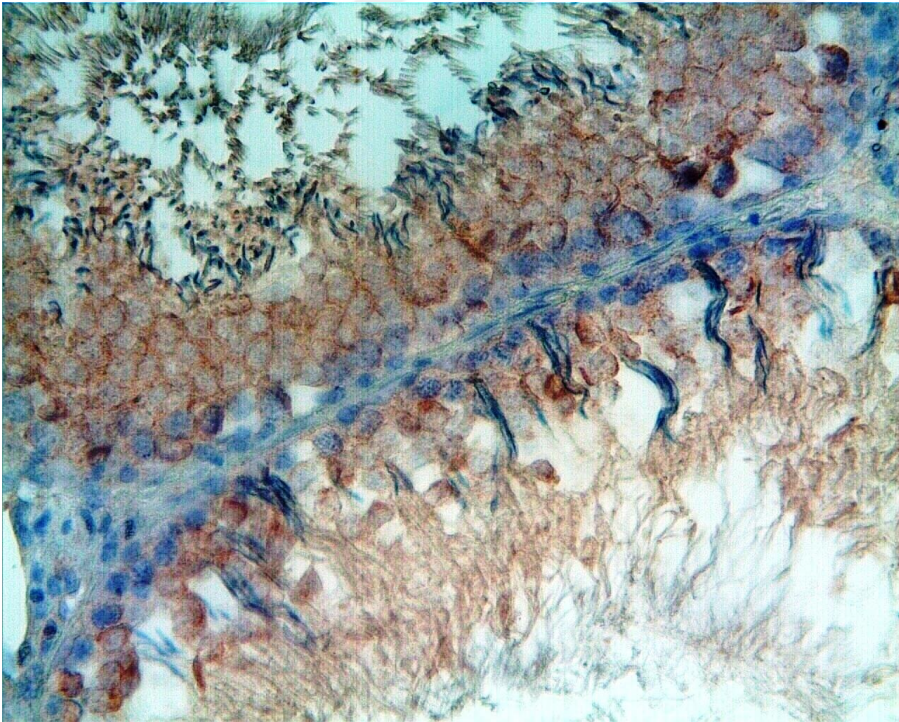


Şekil 4.33. TCDD grubu, Dicer aktivesi. X40



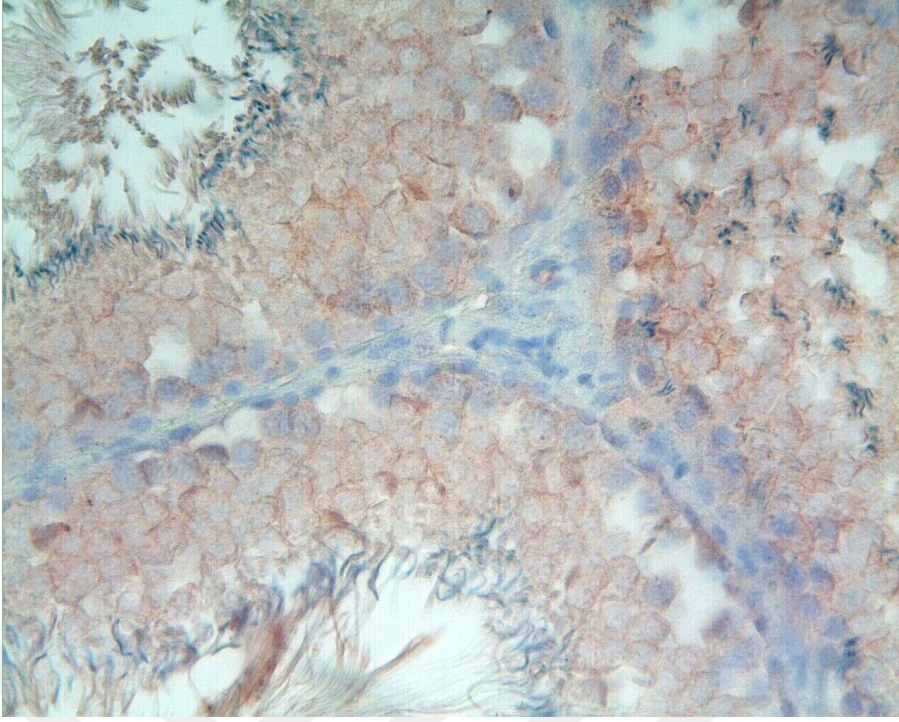


**Şekil 4.34.** TCDD +TQ grubu: Dicer aktivesi. X40

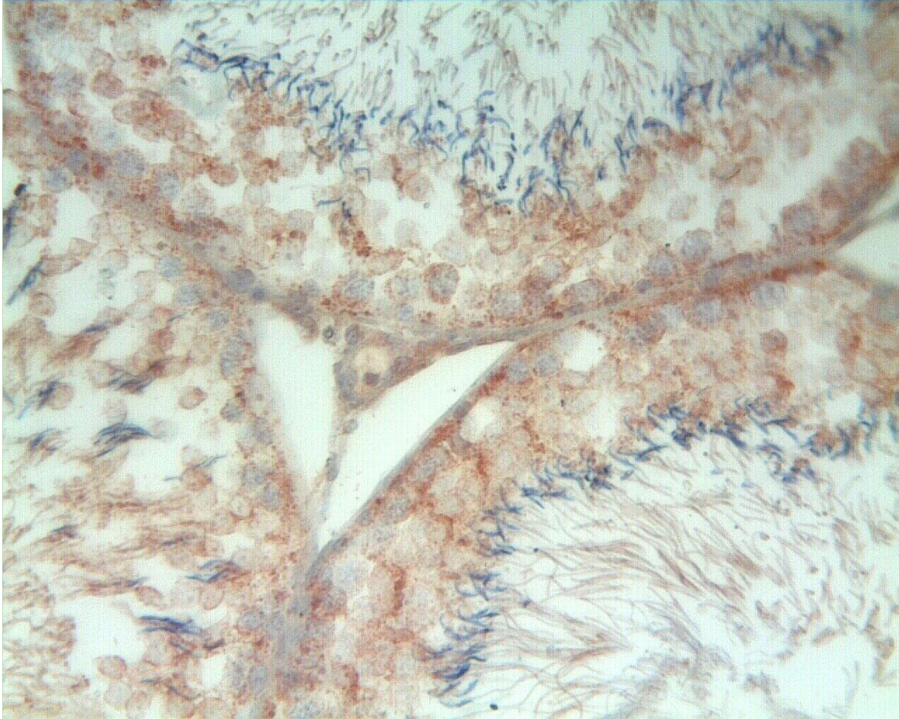


**Şekil 4.35.** Kontrol grubu: Drosha aktivesi. X40



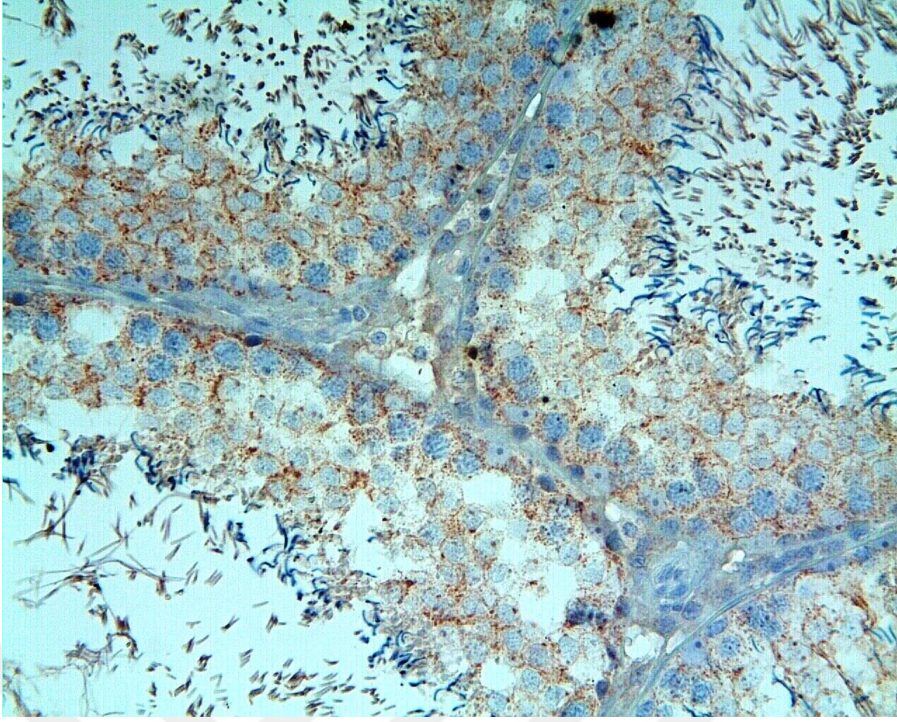


**Şekil 4.36.** Mısır yağı grubu, Drosha aktivesi. X40

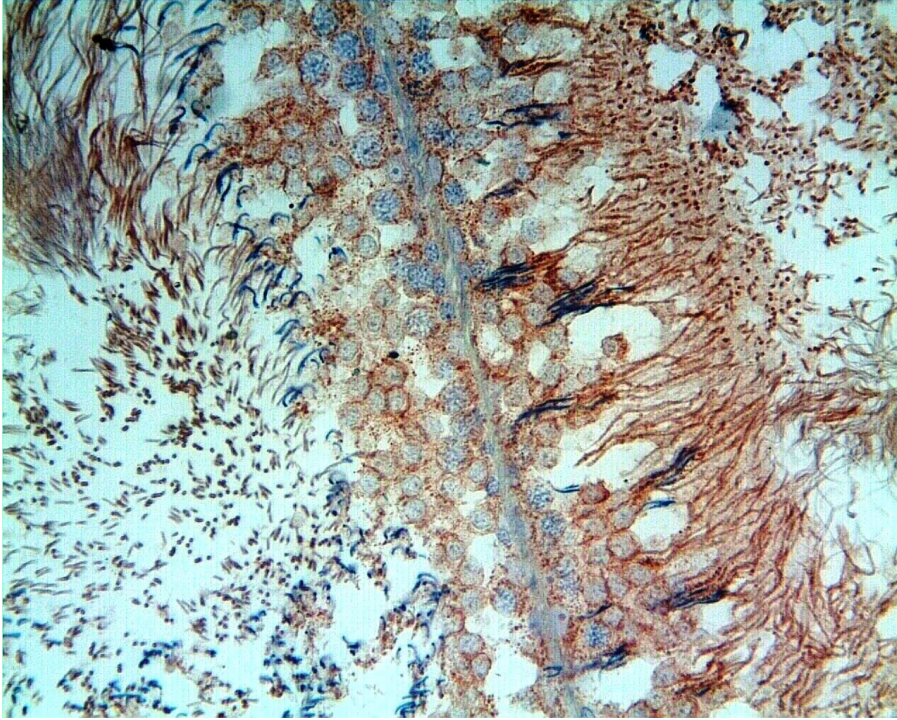


**Şekil 4.37.** TQ grubu Drosha aktivesi. X40





Şekil 4.38. TCDD grubu: Drosha aktivesi. X40



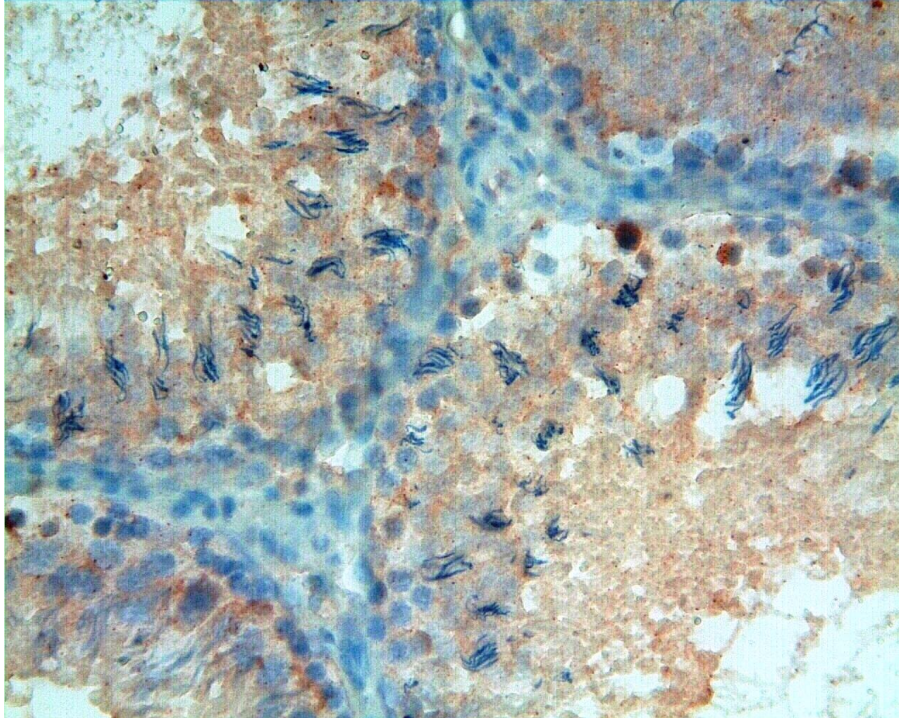
Şekil 4.39. TCDD+TQ grubu: Drosha aktivesi. X40

#### 4.5.3. Aril Hidrokarbon Reseptör Antikor Boyanması

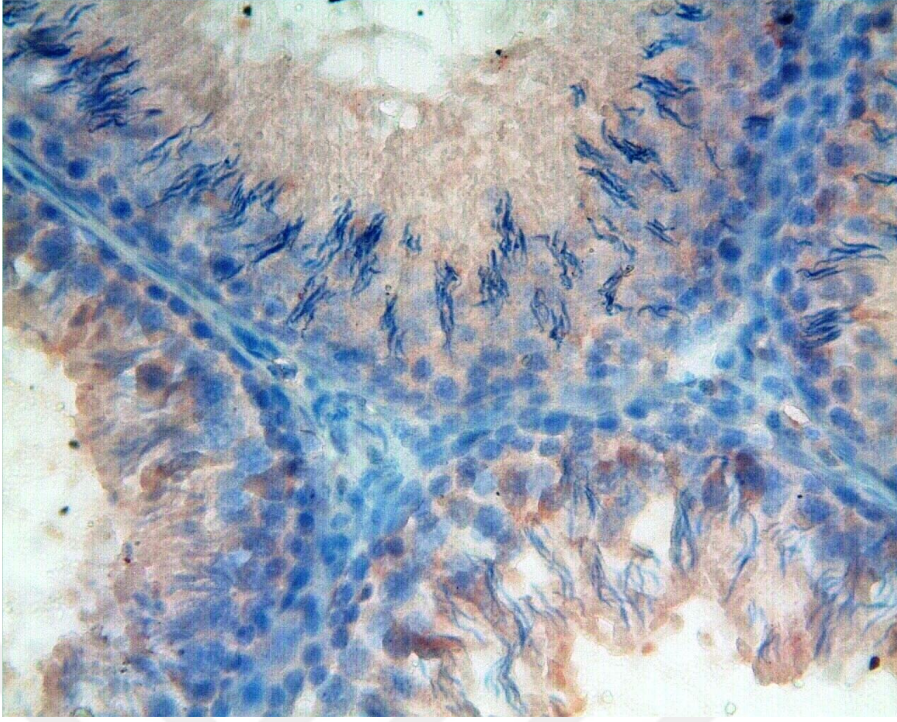
Kontrol, Mısır yağı ve TQ gruplarına ait testis kesitlerinde immunohistokimyasal Ahr boyamalarında seminifer tübül epitel hücrelerinin genelinde sitoplazmik Ahr (+)



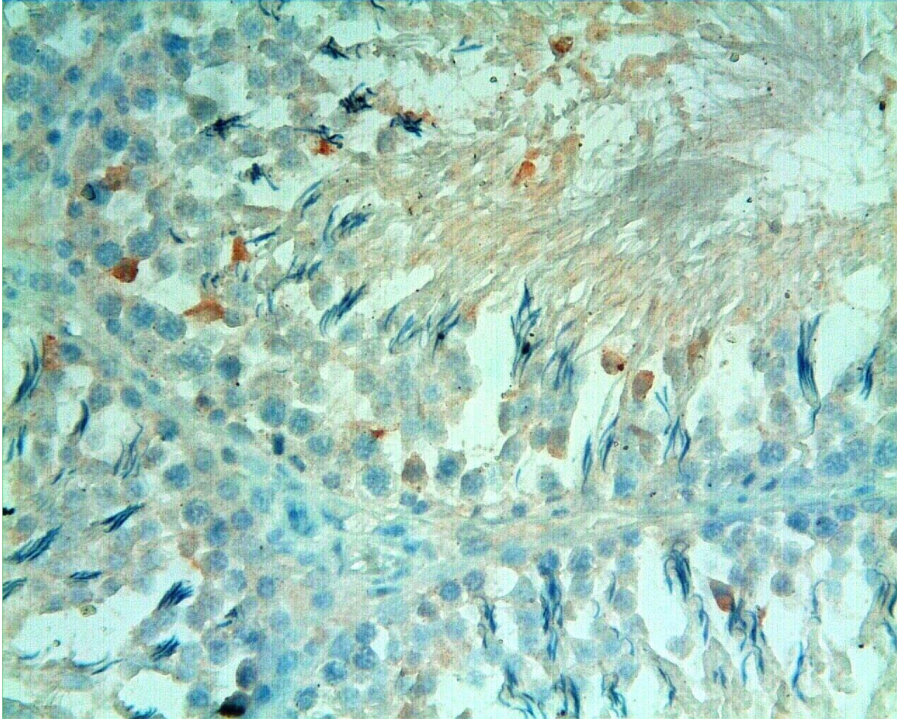
immunreaktivitesi gözlemlendi. Bu gruptaki Ahr (+) immunreaktivite yoğunluklarının benzer şekilde orta derece yoğunluk ve şiddette olduğu gözlemlendi (Şekil 4.40, 4.41, 4.42). TCDD gruba ait kesitlerde immunohistokimyasal Ahr immunreaktivite pozitifliği genel olarak yüksek yoğunluk ve yaygınlıkta olup yer yer orta düzeyde immunreaktivite pozitifliği (Şekil 4.43) saptandı. TCDD+TQ grubu immunohistokimyasal Ahr boyamalarında seminifer tübül epitel hücrelerinde genel olarak orta derece yoğunluk ve şiddette Ahr immunreaktivite pozitifliği (Şekil 4.44) saptandı. Kontrol, Mısır yağı ve TQ gruplarına ait immunreaktivite pozitiflik skorları benzer olup, aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (kont Ahr: 1(0-2), MY ahr: 1(0-2), TQ ahr: 1(0-2)). TCDD grubu immunreaktivite skoru kontrol, mısır yağı ve TQ gruplarından yüksek olup istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildi (TCDD Ahr: 3(2-3) ). TCDD+TQ grubu immunohistokimyasal Ahr immunreaktivite skoru kontrol, mısır yağı ve TQ gruplarından yüksek, TCDD grubundan ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük tespit edildi (TCDD+TQ Ahr: 2(1-2)). (Tablo 4.9).



**Şekil 4.40.** Kontrol grubu, AhR aktivesi. X40

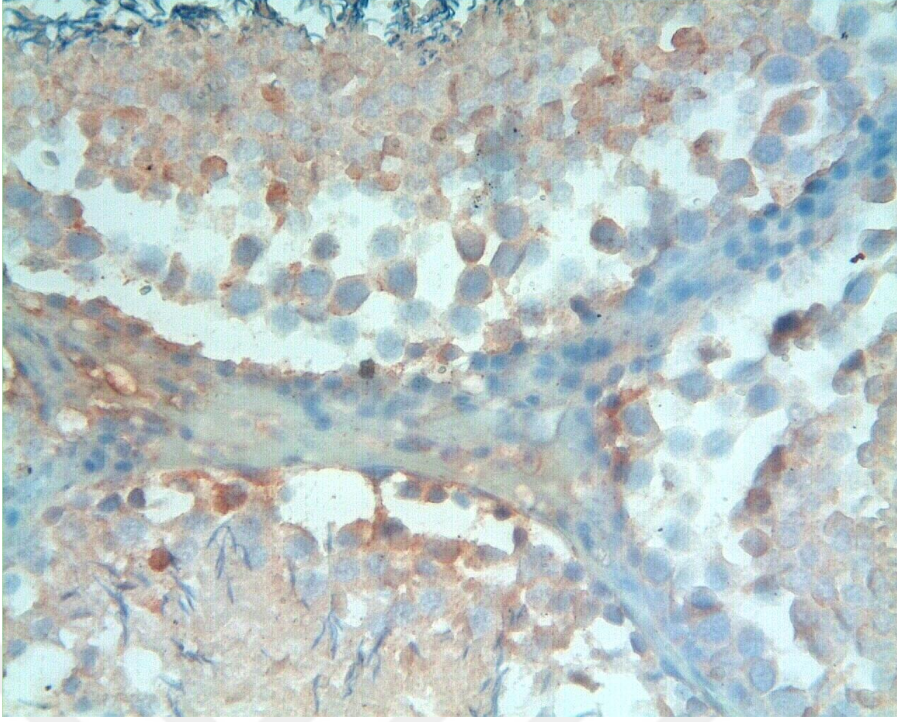


**Şekil 4.41.** Mısır yağı grubu, AhR aktivesi. X40

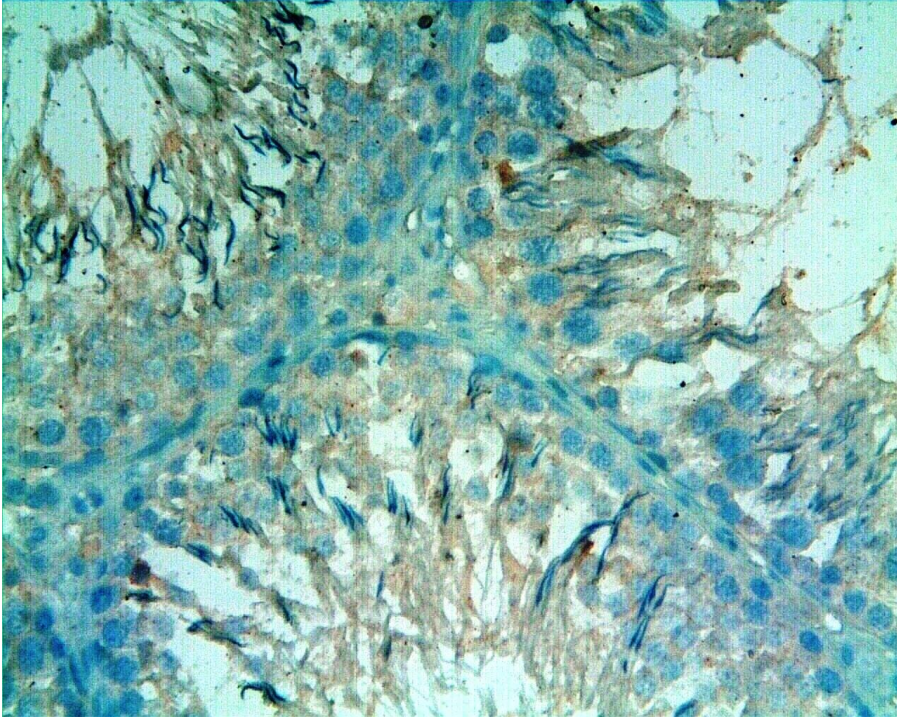


**Şekil 4.42.** TQ grubu, AhR aktivesi. X40





**Şekil 4.43.** TCDD grubu, AhR aktivesi. X40



**Şekil 4.44.** TCDD+TQ grubu, AHR aktivesi. X40

**Tablo 4.9.** Antikor Boyanma Yoğunluğu Skor Değerlendirilmesi

	<b>Kontrol</b>	<b>MY</b>	<b>TQ</b>	<b>TCDD</b>	<b>TQ+TCDD</b>	<b>p</b>
<b>Caspas</b>	1(0-2) <sup>a</sup>	1(0-2) <sup>a</sup>	1(0-2) <sup>a,c</sup>	3(2-3) <sup>b</sup>	2(1-2) <sup>c</sup>	<0,001
<b>Ahr</b>	1(0-2) <sup>a</sup>	1(0-2) <sup>a</sup>	1(0-2) <sup>a</sup>	3(2-3) <sup>b</sup>	2(1-2) <sup>a</sup>	<0,001
<b>Dicer</b>	2(1-2) <sup>a,d</sup>	2(2-3) <sup>b</sup>	2(2-2) <sup>a,b</sup>	1(0-1) <sup>c</sup>	1(1-2) <sup>d</sup>	<0,001
<b>Drosha</b>	2(1-2) <sup>a,c</sup>	2(1-2) <sup>a,c</sup>	2(2-2) <sup>a</sup>	1(0-1) <sup>b</sup>	1(1-2) <sup>c</sup>	<0,001

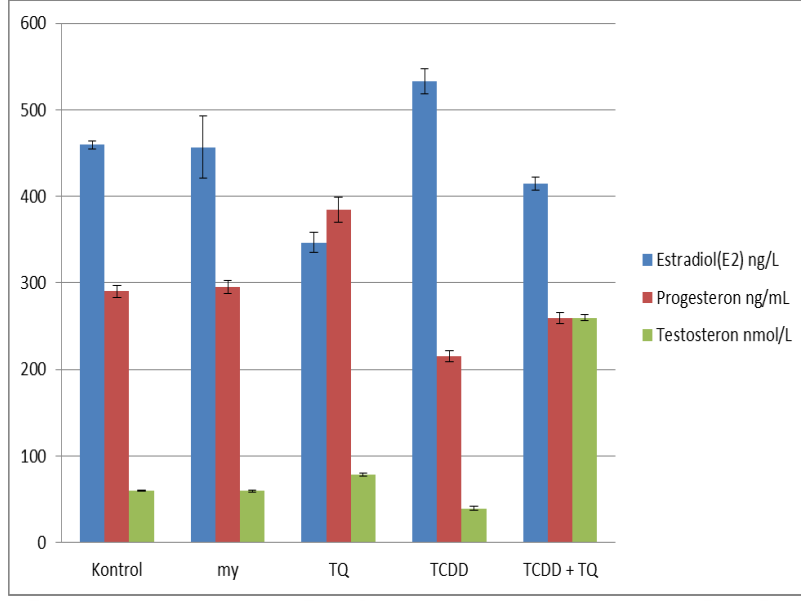
#### 4.6. Biyokimyasal Bulgular

Tüm gruplara ait kan serumlarında estradiol, progesteron ve testosteron düzeyleri belirlendi. Kontrol ve mısır yağı grupları ile karşılaştırıldığında estradiol (E2) hormonu TCDD grubunda oldukça yüksek, TQ grubunda ise oldukça düşük düzeyde ancak TCDD + TQ grubunda ise TQ grubundan yüksek ancak kontrol ve mısır yağı gruplarına göre düşük düzeyde belirlenmiştir. Kontrol ve mısır yağı grupları ile karşılaştırıldığında progesteron ve testosteron hormonları TCDD grubunda oldukça düşük, TQ uygulanması ile bu hormonların düzeyleri artmış ancak kontrol ve mısır yağına göre düşük düzeyde belirlenmiştir. TQ grubunda ise oldukça yüksek düzeyde ölçülmüştür (Şekil 56, Tablo 4.10).

**Tablo 4.10.** Hormon Düzeylerinin Değerlendirilmesi

<b>Gruplar</b>	<b>Estradiol(E2) ng/L</b>	<b>Progesteron ng/mL</b>	<b>Testosteron nmol/L</b>
<b>Kontrol</b>	459,41(451,11-463) <sup>a</sup>	290,25(285,93-305,52) <sup>a</sup>	59,84(58,28-60,51) <sup>a,d</sup>
<b>My</b>	457,01(356,31-463) <sup>a</sup>	294,99(281,34-303,23) <sup>a</sup>	59,75(58,23-61,64) <sup>a</sup>
<b>TQ</b>	346,54(324,76-359,79) <sup>b</sup>	384,36(363,88-403,94) <sup>b</sup>	78,35(74,21-79,83) <sup>b</sup>
<b>TCDD</b>	533,21(516,98-559,94) <sup>c</sup>	215,58(201,35-223,92) <sup>c</sup>	39,67(36,53-42,37) <sup>c</sup>
<b>TCDD + TQ</b>	414,94(402,8-419,19) <sup>d</sup>	259,57(244,92-265,13) <sup>d</sup>	56,85(52,69-62,42) <sup>d</sup>
<b>p</b>	<0,001	<0,001	<0,001





Şekil 4.45. Hormon Düzeyleri Grafiği

## 5. TARTIŞMA

Gelişen endüstri ve sanayi ile birlikte çevresel kirleticilerin de hızla artması ve bunlara maruz kalınması günümüz şartlarında kaçınılmaz olmuştur. Bilinçsiz yakma işlemleri ve fosil yakıtların eksik yanması gibi işlemlerle oluşan yüksek derecede toksik çevresel kirleticiler olan dioksinler, başta kanser, bağışıklık sistemi ve endokrin sistem fonksiyonlarının bozulması gibi bir dizi olumsuz etkilere sahiptir (33). Bu dioksin bileşiklerinin içinde en toksik olanı ise TCDD'dir. Suda çözünmeyen ve çevremizde uzun yıllar kararlı olarak kalan bu toksik madde kolayca besin zincirine de girerek insan ve hayvanların yağ dokularında kolayca çözünerek birikir. TCDD'nin maruziyeti ve dokularda birikmesi birçok sistemle ilişkili önemli sağlık problemlerine yol açar (1, 2). Günümüzde TCDD ve diğer toksik ve zararlı maddelerin olumsuz etkilerinden hem korunmak hem de tedavi amaçlı bitkisel ilaç ve besin takviyeleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle üreme sistemi fonksiyon bozuklukları ve yetersizlikleri için kullanılan bazı kimyasal ilaçların yetersiz etkinlikleri ve yan etkileri nedeniyle yeni doğal kaynaklı madde ve moleküllere olan ilgi son yıllarda giderek artmaktadır. Bu moleküllerin özellikle antioksidan etkilerinin spermatogenez, stereidogenez ve normal sperm morfolojisini destekleyici olduğu bilinmektedir. Yeterli miktarlarda doğal antioksidan desteği, üreme sistemi fonksiyonları üzerine zararlı etkilere neden olabilecek TCDD gibi bir takım toksik ajanların etkenlerini engelleme ve azaltma yönünde faydalıdır. Bu şekilde spermatogenez sürecindeki spermatogenik seri hücrelerinin genetik materyalini oksidatif stres hasarından koruyabilir ve fertilizasyon kapasitesini arttırabilir. Son yıllarda *Nigella sativa* anti-oksidan, anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-mikrobiyal ve immüno-modülatör etkiler dahil olmak üzere birçok yararlı terapötik etkileri ile ön plana çıkmış bir bitkidir (67). *Nigella sativa*'nın bu etkin farmakolojik ve biyolojik özellikleri içeriğindeki başlıca etken maddesi olan Thymoquinon'a bağlıdır. Thymoquinon'un üreme sisteminde antioksidan ve antiinflamatuvar etki göstererek testis ve diğer üreme organlarında iyileştirici etkiler gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir (49, 68, 69, 70).

Çalışmamızda TCDD'nin testis dokusunda toksik etkilerine karşı TQ'un etkinliğinin histolojik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlere araştırmayı amaçladık. TCDD'nin vücut ve organ ağırlıklarında kayba neden olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (71, 72). Bir tür içinde üreme organları ve vücut ağırlıklarının değerleri belirli sınırlar içinde stabildir. Dolayısıyla testis ve vücut ağırlıklarında

herhangi bir azalma ya da artış bize testis fonksiyonu ve genel sağlık konusunda anormal bir durumu işaret edebilir. Çalışmamızda vücut ağırlıklarını incelediğimizde, kontrol ve mısır yağı gruplarına göre TQ grubunda ortalama vücut ağırlık farklarının arttığını, ancak TCDD uygulanmış grupta ise ortalama vücut ağırlık farklarının kontrol grubuna göre oldukça düştüğü tespit edildi. TCDD+TQ grubunda bu ağırlık kaybı farkının azaldığı saptandı. TCDD uygulaması sıçanlarda gastrointestinal sistemi etkileyerek beslenme bozukluğuna ve yetersizliğine neden olmuş olabilir. Çalışmamızda TCDD'nin testis ağırlıkları üzerine etkisini belirlemek için sağ ve sol testis ağırlıkları ölçüldü ve testis ağırlık indeksi (TAİ) hesaplandı. Bulgularımızda testis ağırlık ölçümleri sonucuna göre TCDD (sağ:1,48± 0,18, sol:1,39± 0,24) grubunda sağ ve sol testis ağırlıklarının kontrol grubuna göre azaldığı, TQ (sağ:1,52± 0,34, sol:1,52± 0,27) grubunda ise kontrol (sağ:1,54± 0,20, sol:1,69± 0,22) ve mısır yağı (sağ:1,45± 0,43, sol:1,50± 0,41) grupları ile benzer olduğunu tespit ettik. Ancak testis ağırlıkları açısından gruplar arası karşılaştırmada istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. TCDD+ TQ grubu (sağ:1,58± 0,33 sol:1,67± 0,41) testis ağırlıkları ile TCDD ve diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Testis ağırlık indeksi; TAİ:  $[(\text{sağ}+\text{sol testis ağırlıkları toplamı})/\text{vücut ağırlıkları}]\times 100$  değerleri açısından TCDD grubunda artış olmakla birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark tespit edilmemiştir. Bu sonuca göre TCDD grubundaki istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmamakla birlikte TAİ'nin artışı sıçanların son vücut ağırlıklarındaki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkmış olarak olabilir. Ju-Han Lee ve arkadaşları Sprague-Dawley cinsi erkek ratlarda 1 aylık süren deneysel çalışmalarında haftada bir kez TCDD uygulaması yapılan grupta kontrol grubuna göre vücut ağırlıklarının oldukça düşük olduğunu bildirmişlerdir (71). Jong- soon ve arkadaşları TCDD'nin testiküler dokulardaki hasarlarını araştırmak için 4 hafta boyunca TCDD (50µg/kg) uygulanmış ratların kontrol grubuna göre testis (%53.9) ve vücut ağırlıklarının (%65.2) oldukça azaldığını bildirmişlerdir (72). Zohra Ghilissi ve arkadaşları ise deneysel olarak diyabet oluşturulmuş sıçanların üreme sistemine Nigella sativa'nın etkisini araştırmak için 30 gün sonunda vücut ve testis ağırlıklarının diyabetik gruba göre arttığını söylemişler. Bu durumu ise tohumun içindeki testosteron artışını sağlayan magnezyum, protein, A,B,C vitaminleri, alkaloidlere bağlı olduğunu bildirmişlerdir (73). Rahmatollah ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışma da ise Nigella sativa tohumunun alkollü ekstratının fertilitte potansiyeli üzerindeki arttırıcı etkilerini araştırmak için sıçanlara 2 ay boyunca 200 ve 400 mg/kg olmak üzere iki farklı doz uygulamışlar ve deney sonunda vücut

ağırlıklarında farklılık olmadığını ancak 400 mg/kg verilen grupta testosteron ve androjenlerin artışına bağlı olarak testisteki somatik ve germinal hücrelerin sayı ve fonksiyonunun artmasına böylece söz konusu grupta testis ağırlıklarının arttığını söylemişlerdir (74). Bir başka çalışma da ise erkek Sprague Dawley türü sıçanlarda 1 ay boyunca nigella sativa yağının (250 mg/kg), sodyum valproate (SV) toksik maddesinin neden olduğu testis toksisitesine karşı koruyucu etkilerini araştırmışlar ve testis ağırlıklarının SV grubuna göre arttığını göstermişler ve sebebini ise N. sativa' nın içeriğindeki TQ'un direkt sitoprotektif etkisi ve/veya indirekt antioksidant ve androjen benzeri aktivitesine bağlı olduğunu bildirmişlerdir (75). Çalışmamızda elde ettiğimiz vücut ağırlıkları değişimi literatür bilgisi ile benzer olduğu görülmektedir.

Gruplara ait histolojik kesitlerde seminifer tübüllerdeki spermatogenez aktiviteleri ve hasar bulgularını değerlendirmek için Johnson Skoru değerlerini belirledik. Kontrol, mısır yağı, ve TQ grupları Johnson skor değerleri benzer olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde fark saptanmamıştır (kont: 9,18(8,77-9,74), MY: 9,22(8,12-9,87), TQ: 9,63(8,87-9,74), TCDD: 4,72(4,31-6,23), TCDD+TQ: 8,2(7,23-9,62)). TCDD grubunda ise Johnson skor değerinin diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görülmüştür. TCDD+TQ grubu Johnson skor değerinin TCDD grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olmakla birlikte kontrol, mısır yağı, ve TQ gruplarına göre de istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlara göre TCDD'nin seminifer tübüllerde spermatogenezin tüm aşamalarında seminifer tübül epitel hücrelerinde ve spermatozoonlarda hasara, gelişimlerinin ve sayılarının azalmasına neden olmuştur. TCDD spermatogenezin tüm aşamalarında hücre hasarına neden olmakta ve hücre bölünmesini olumsuz etkilemektedir. Jong- soon ve arkadaşları TCDD'nin testiküler dokulardaki hasarlarını araştırmak için 4 hafta boyunca TCDD (50µg/kg) uygulanmış ratlarda johnsen skoru, seminifer tübül çapı ve sperm içeren tübül oranlarının kontrol grubuna göre oldukça düşük olduğunu bildirmişlerdir (72). Yapılan birçok çalışmada testiküler hasara karşı TQ'un testiküler hasarı iyileştirdiği ve koruyucu etkileri olduğu bildirilmiştir. Gökçe ve arkadaşları C57B2/6 türü farelerde 4 gün boyunca metatreksat uygulamasının neden olduğu seminifer tübül çapındaki daralma, etkilenmiş spermatojenik hücrelerde hasar, interstisyel alanda ödem ve dilatasyona karşı TQ uygulamasının tüm histolojik hasar parametrelerinde farklı derecelerde iyileşme sağladığını vurgulanmıştır (76). Aynı şekilde Hala ve arkadaşları da N. sativa' nın (250 mg/kg) içeriğindeki TQ'a bağlı olarak Sprague Dawley türü sıçanlarda sodyum

valproate (SV) toksik maddesinin neden olduğu histolojik testiküler hasarların azaldığını söylemişlerdir (75).

Çalışmamızın TCDD grubunda histolojik incelemelerde bazı seminifer tübüllerin lümenlerinde dev hücelere rastladık. Bu dev hücelerin görünmesiyle ilgili olarak, Rotter ve arkadaşları çalışmalarında DNA tamir mekanizmalarında görev alan P53 genini daha az ifade eden transgenik fareler kullanmışlar ve genin ifadesindeki azalmaya bağlı olarak dev hücelerin oluştuğunu vurgulamışlardır. Araştırmacılar transgenik farelerde dev hücre oluşumunun mekanizmasını iki şekilde açıklamışlardır. İlk mekanizma, dev hücelerin 4N primer spermatositlerin mayoz bölünme sırasında haploid sperm hüceleri üretememesinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Haploid spermatositleri üretemediklerinden primer spermatositler bir kez daha DNA'larını eşleyerek çok çekirdekli dev hücelere oluşturmuşlardır. İkinci mekanizma ise spermatositler arası sitoplazmik bağlantıların kopmaması ve bu bağlantıların daha çok genişlemesiyle büyük hücre gruplarının dev hücelere dönüşmesidir (77). Yapılan çalışmalarda TQ'un apoptoz mekanizmasını indüklemek için P53 geninin ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (78). Çalışmamızda TQ ve TQ+TCDD gruplarında apoptozun azaldığını tespit ettik. Bu durumda deney süresi 30 gün olan çalışmamızda primer spermatositlerin düzgün mayoz bölünme geçirebilmesi için TQ yeterli doz ve sürede verilmemiş olabilir. Ayrıca bu dev hüceleri seminifer tübül lümeninde (spermatitlerin arasında ve/veya üzerinde) gördüğümüzden Rotter ve arkadaşlarının da belirttiği gibi spermatositler arası sitoplazmik bağlantıların kopmaması ve buna bağlı olarak büyük hücre gruplarının oluşması dev hücelere oluşmasında muhtemel mekanizma olarak görülmektedir. Zaten söz konusu dev hücelerin spermatidlerin arasında ve üzerinde bulunması bu ihmali güçlendirmektedir.

Organizmadaki hücelerin birçoğu, toksik hasara karşı bir madde en önemli savunma mekanizması olan apoptoz yolunu seçerler. Hasarlanan hücelerin bir kısmı apoptoz yolu ile diğer hücelerin etkilenmeyeceği şekilde, kontrollü olarak canlılığını sona erdirir, parçalanır ve makrofajlara sunulurlar. Bu durum; DNA hasarı, MiRNA eksikliğine bağlı olarak hatalı protein sentezi veya AhR aracılı toksik cevap sonucu oluşan oksidatif stres mekanizmalarının oluşumunda devreye girer. Hücrenin enerji üretimi için gerekli organel olan Mitokondri sitokrom c proteinlerini ihtiva eder. Hücredeki toksik stres durumunda mitokondri membranındaki Bcl-2 proteinleri membran geçirgenliğini arttırarak sitokrom c'nin sitoplazmaya geçmesini ve apoptoz için tetikleyici caspaslardan olan caspas-9 (cas-9) ile bağlanarak apoptozun

gerçekleşmesini sağlar. Çalışmamızda gruplar arasındaki apoptotik immunreaktivite düzeylerini belirlemek immunohistokimyasal olarak cas-9 boyaması uyguladık. Yaptığımız incelemede TCDD uygulanan sıçanların testis kesitlerinde cas-9 immunreaktivite düzeyinin kontrol, mısır ve TQ gruplarındakinden daha yüksek olduğu tespit edildi. Buna karşılık TQ+TCDD uygulanan gruptaki cas-9 immunreaktivite düzeyinin TCDD uygulanan gruptakine göre daha düşük olduğu tespit edildi. TCDD, testis dokusu hücrelerinde AhR aracılı toksik cevap yollarının aktive olmasına ve hücre içinde oksidatif stres mekanizmalarının sonucu serbest radikallerin oluşumunu artırarak hücre hasarına neden olmuş olabilir. Yapılan bir çalışmada bu reseptörün apoptozisin düzenlenmesindeki olası rollerini araştırmak için TCDD'nin seminifer tübüllerin üzerindeki etkilerini iki farklı konsantrasyonda incelenmiştir. Söz konusu çalışmada 1 ve 100 nm TCDD'de inkübe edilmiş seminifer tübüllerde, 100 nm TCDD içeren kültür ortamında apoptotik hücrelerin miktarında artış olduğu bildirilmiş ve bu AhR'nin apoptozisi indüklemesine bağlanmıştır (32). Başka bir çalışmada insan nöronlarında TCDD'nin mitokondriyal membran potansiyelini azaltıp, apoptoza neden olduğu vurgulanmıştır (79). TQ, konsantrasyonuna bağlı olarak antioksidan veya prooksidan özellik göstermektedir. TQ düşük konsantrasyonlarda antioksidan olduğuna dair oldukça fazla çalışma bulunmaktadır, ancak TQ'nun yüksek konsantrasyonlarda prooksidan olarak etki gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (49). Yapılan birçok çalışmada TQ'nun p53 bağımlı ve bağımsız apoptoz mekanizmalarını indüklediği böylece kanserin baskılanmasında preapoptotik faktörleri ve/veya antiapoptotik proteinleri azaltarak ve caspaz yollarının düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları bildirilmiştir (78). Ancak bizim çalışmamızda TQ ve TCDD+TQ gruplarında testis kesitlerinde immunohistokimyasal olarak apoptoz belirteçlerinden birisi olan cas-9 immunreaktivite düzeyinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu veriler çalışmamızın diğer bulgularıyla uyumlu olup, çalışmamızda uyguladığımız TQ dozu (50 mg/kg/gün) ve süresinin testis dokusunda TCDD uygulaması ile artan apoptotik bulguların baskılanması için uygun olduğu söylenebilir.

Bilindiği gibi spermatogenez olayı diploid kromozom sayısına sahip spermatogonyumlardan haploid sayıda kromozom içeren spermatozoaların oluşumunu içeren süreçleri kapsamaktadır. Bu süreç sonunda farklılaşmış, olgun germ hücreleri oluşmaktadır. Spermatogenezin gelişim basamaklarındaki herhangi bir aksaklık testiküler disfonksiyona bağlı spermatosit, spermatid ve spermatozoonların sayı, morfoloji ve fonksiyonlarında anormalliklere neden olmaktadır. Spermatogenez, mitoz,

mayoz ve haploid/spermiogenez fazlarına bölünebilir. Bu üç ana hücreyel olay, seminifer epitel içinde eşzamanlı olarak meydana gelir ve gelişmekte olan germ-germ hücreleri ve germ-sertoli hücreleri arasında spesifik hücreyel bağlantılar kurulur. Dolayısıyla hücreyel süreçleri, transkripsiyon ve transkripsiyon sonrası işlev gösteren mekanizmaları gerektirmektedir (48). Spermatogenezdeki bu düzenleyici mekanizmaların başında ise MiRNA'lar gelmektedir. MiRNA'lar hücre bölünmelerinin biyolojik kontrolünü sağlamaktadır. MiRNA'ların üretiminde dicer ve drosha enzimleri anahtar rol oynamaktadır. Hücre içinde bu enzimlerin yetersiz eksprese edilmesi testis ve diğer üreme organlarında olgun MiRNA üretimini etkileyecektir. Hücrede eksik yada yanlış MiRNA üretimine bağlı olarak hatalı proteinler veya eksik transkripsiyon faktörleri sentezlenecek böylece söz konusu testislerin seminifer tübüllerde de başarısız bir spermatogenez ve spermiyasyon sonucu anomalili dejenere germ hücreleri ve spermatozoonlar oluşacaktır. Biz de çalışmamızda Dicer ve Drosha enzimlerinin aktivesini araştırmak için immunohistokimyasal yöntemle Dicer ve Drosha immunreaktivite düzeylerini belirledik. TCDD grubunda Dicer ve Drosha immunreaktivite pozitiflik düzeylerinin kontrol, mısır ve TQ gruplarındakine göre oldukça azalmış olduğunu tespit ettik. Buna karşılık TCDD+TQ grubunda ise Dicer ve Drosha immunreaktivite pozitiflik düzeylerinin TCDD grubundakinden daha yüksek ve kontrol, mısır yağı ve TQ gruplarındakine yakın düzeyde olduğunu belirledik. Dicer ve Drosha boyanma aktivitelerinin TCDD grubunda azalmış olması bize bu enzimlerin spermatogenezde özellikle mitoz ve mayoz bölünme aşamalarında rol aldığını düşündürmektedir. Wuq ve arkadaşları Dicer-/- ve Drosha-/- farelerde yaptıkları bir çalışmada Drosha-/- ve Dicer-/- testislerinin tübüllerinde uzamış spermatid sayısının az olduğunu göstermişler ve bu enzimlerin spermatogenik hücrelerin haploid fazlarını desteklediklerini söylemişlerdir (48).

Günümüzde üreme sistemi fonksiyonları üzerine olan etkilerine rağmen, AhR'nin spermatogenezis ve testis hasarındaki rolü az ilgi görmüştür. AhR, dokuya özgü ve gelişimsel aşamalar olan hücre döngüsü, kök hücre çoğalması ve hücre farklılaşması gibi normal hücreyel süreçleri düzenleyen bir moleküldür. Biz de çalışmamızda TCDD'nin testis dokusunda oluşturduğu hasarlara karşı koruyucu olarak uygulanan TQ'un AhR üzerine etkilerini immunohistokimyasal yöntemle AhR immunreaktivitesini belirleyerek gösterdik. Sadece TCDD verilmiş grupta AhR immunreaktivitesi kontrol, mısır yağı ve TQ gruplarına göre yüksek TCDD+ TQ grubunda ise AhR immunreaktivitesi TCDD grubundakinden düşük kontrol, mısır ve TQ gruplarındakine yakın düzeyde belirlendi.

TCDD toksik etkisini hücrede bulunan AhR reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. TCDD, AhR ile bağlanıp kompleks oluşturduktan sonra nükleusa geçmekte ve dioksin cevap elementi ile bağlanmaktadır. Böylece DNA'nın sitokrom (CYP1A1/A2) genlerini etkileyerek ekspresyonlarını arttırır. Hücre ne kadar çok TCDD'ye maruz kalırsa o kadar yüksek düzeyde AhR aracılı toksik cevap oluşacak dolayısıyla AhR immunreaktivitesinde artış meydana gelecektir. Hücrede oluşturulan AhR aracılı sitokrom genleri ekspresyonlarındaki artışın, germ hücrelerinde DNA hasarına yol açan inflamasyon, apoptoz ve oksidatif stres gibi olumsuz durumlara neden olabileceğini düşündürmektedir. Yapılan çalışmalarda tek doz TCDD enjeksiyonunun, farelerde germ hücreleri ve Sertoli hücreleri arasındaki bağlantıların zayıflaması ve kopmasına ve bunun sonucunda hücreler arasında genişlemiş boş alanların oluşmasına yol açtığı gösterilmiştir (80). Ayrıca Sertoli hücrelerinin 24 saat in vitro TCDD maruziyeti sonucunda Sertoli-germ hücre bağlantı noktalarında görev alan Testin proteininde down-regülasyonuna ve Cyp1A1 indüksiyonuna yol açarak AHR-sinyal yolunu aktivasyonunu başlattığı ve arttırdığı bildirilmiştir (81, 82). Bu veriler çalışmamızda TCDD uygulamasının neden olduğu AhR immunreaktivitesindeki artışı açıklamaktadır. Buna karşılık TQ antioksidan özellik göstererek seminifer tübül hücrelerinde ksenobiyotik yanıt oluşturmuş ve AhR immunreaktivitesini azaltmıştır. Thymoquinonun, reaktif genotoksik radikal türevleri aracılı birçok ksenobiyotik biyotransformasyonunda rol alan hepatic Cyp1A1/A2 gen aktivitesini inhibe ettiği bildirilmiştir (49).

Kadınlarda baskın cinsiyet hormonu olan Estradiol (E2), başlıca over olmak üzere böbrek üstü bezleri ve yağ dokuda sentezlenmektedir. Erkeklerde ise böbreküstü bezleri, yağ dokusu ve testislerde sentezlenmektedir. Estradiol testislerde herhangi bir hasar durumunda miktarları artan ve spermlerin erken ölmesini engelleyen bir tür östrojendir. Bu hormonun yaklaşık %20'si interstisyel bağ dokularda konumlanan Leydig hücrelerinde üretilirken geri kalan miktarı ise testosteronun östrojene dönüşmesiyle elde edilir. Yani testosteron ile E2 hormonları antagonistik etkilidirler. Çalışmamızın biyokimyasal analizlerinde TCDD uygulanmış grupta E2 seviyesinin kontrol, MY ve TQ gruplarındakine göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artmış olduğunu, testosteron seviyesinin ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğunu tespit ettik. Bu antagonist ilişki iki yönde ilerlemiş olabilir. TCDD grubunda testosteron seviyesinin azalması; ya interstisyel bağ dokuda bulunan Leydig hücrelerinin TCDD'nin hasarlayıcı etkisine bağlı olarak fonksiyonunu kaybetmesi ve sentezlenen testosteron miktarının azalmasına veya leydig hücre sayılarının azalmasına



bağlı olarak sentezlenen testosteron miktarının azalmasına ya da TCDD ile testislerdeki hasara yanıt olarak sentezlenen testosteronun E2'ye dönüştürülmüş olabileceği şeklinde açıklanabilir. Ayrıca testosteron seviyesindeki azalmanın yukarıdaki olası mekanizmaların her üçünün de birlikte ortaya çıkması da muhtemeldir. Jong- soon ve arkadaşları TCDD'nin testiküler dokulardaki hasarlarını araştırmak için 4 hafta boyunca TCDD (50µg/kg) uygulanmış ratlarda serum testosteron seviyelerinin kontrol grubuna göre TCDD grubunda azaldığını, buna karşılık estradiol seviyelerinin TCDD grubunda kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (72). Bu çalışmadaki testosteron seviyesi ile ilgili bulgular bizim bulgularımızla benzerlik göstermektedir. Sönmez ve arkadaşlarının Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar üzerine yaptığı çalışmada TCDD (100 ng/kg/gün) uygulanmış grupta plazma testosteron seviyeleri düşmüş ancak kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı fark bulamamışlardır (83). Bazı çalışmalarda ise TCDD'nin testislerde testosteron ve östrojen üretimini azalttığı gösterilmiştir (71). Bu bulguyu bazı çalışmalar TCDD'nin anti-östrojenik etkilerini sitoplazmik AhR'ye bağlanarak göstermesi ile açıklamışlardır. TCDD'nin AhR'ye bağlanması ile CYP1A1 ve CYP1B1'in indüklendiği ve bu yolla östrojen metabolizmasının (yıkımını) artarak hücre içi hormon seviyesinin azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmalarda yüksek sayıda klor atomuna sahip dioksinlerin de anti-östrojenik etki göstermeye eğilimli oldukları bildirilmiştir. AhR antagonistleri ile yapılan in vitro deneyler ve AHR knock-out (engellenmiş) farelerde yapılan çalışmalarda da benzer bulgular gözlemlenmiştir (86). Sheweita ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada testislerde benzo[a]pyrene (BaP) toksisitesine karşı TQ'nun koruyucu etkilerini araştırmak için 5 hafta boyunca BaP verilmiş sıçanlara TQ (0.5mg/kg) uygulamışlar. Söz konusu çalışmada TQ ve TQ+BaP gruplarında kontrol grubuna göre, testosteron ve progesteron değerleri düşük ancak estradiol seviyeleri ise yüksek çıkmıştır. Araştırmacılar testosteron ve progesteronun düşük çıkmasını testiküler dokulardaki serbest radikallerin oluşumu, histopatolojik değişiklikler ve inflamatuvar mediatörlerden (sitokin ve prostaglandin) kaynaklandığını, ayrıca testosteronu estradiole dönüştüren CYP19A1 genindeki artışa bağlı olarak yüksek estradiol ve düşük testosteron seviyelerinin gelişebileceğini vurgulamışlardır (84). Bu bulgular çalışmamızda elde ettiğimiz testosteron, estradiol ve progesteron seviyeleri açısından örtüşmemektedir. Rahmatollah ve arkadaşları ise Nigella sativa tohumunun alkollü ekstratının fertilité üzerindeki arttırıcı etkilerini araştırmak için 2 ay boyunca 200 ve 400 mg/kg olmak üzere iki farklı doz uygulanmış sıçanlarda her iki grupta plazma

testosteron seviyelerinin arttığını göstermişler ve bu etkinin LH hormon seviyesindeki artışa bağlı olduğunu belirtmişlerdir (74). Salahshoor ve arkadaşları morfin (20mg/kg) uygulanmış Balb/c türü farelere farklı dozlarda TQ (2, 10, 20 mg/kg) vermişler ve sadece TQ verilmiş grupta testosteron seviyesinin kontrol grubuna göre arttığını, morfin+TQ grubunda ise testosteron seviyesindeki artışın kontrol ve TQ gruplarından daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumu TQ verilen gruplarda testosteron seviyesindeki artışı N. sativa yağındaki doymamış yağ asitlerinin, testosteron sentezinde kullanılan  $\beta$ -hidroksisteroid dehidrojenaz aktivitesini uyarmasına bağlamışlardır (85). Assi ve arkadaşları ise Sprague-Dawley türü sıçanlarda 30 gün boyunca uyguladıkları kurşun asetat (LA, 10 mg/kg/gün) toksisitesine karşı koruyucu olarak nigella sativa (blenderdan geçirilmiş, 200 mg/kg/gün) uygulamışlar. LA grubunda testosteron ve estradiol seviyelerinin düşük, LA+NS grubunda ise bu hormonların LA grubundan daha yüksek, kontrol grubundakinden ise daha düşük olduğunu bildirmişlerdir (70).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmanın sonucunda Wistar albino sıçanlarda testis dokusunda TCDD'nin erkek üreme sisteminde oluşturduğu hasara karşı TQ'un koruyucu etkilerinin olduğu izlendi. TCDD grubunda seminifer tübüllerde şekil bozukluğu, atrofi, interstisyel alanlarda vasküler konjesyon, ödem tespit edildi. Tübül duvarındaki germ hücrelerinde dejenerasyon ve dökülmelere bağlı olarak germinatif epitel kalınlığında azalma, sertoli ve spermatojenik seri hücreler arasında ayrılma izlendi. TCDD+TQ grubunda ise bu bulguların belirgin derecede azaldığı gözlemlendi. Biyokimyasal verilerde; TCDD grubunda serum testosteron ve progesteron seviyelerinde azalma, estradiol seviyelerinde artış gözlenirken TCDD+TQ grubunda serum testosteron ve progesteron seviyelerinde artış, estradiol seviyelerinin düştüğü izlendi. İmmunohistokimyasal olarak ise TCDD grubunda, Cas-9 ve AhR immunreaktivitelerinde artış, Dicer ve Drosha immunreaktivitelerinde ise azalma gözlenirken TCDD+TQ grubunda Cas-9 ve AhR immunreaktivitelerinde azalma, Dicer ve Drosha immunreaktivitelerinde ise artış gözlemlenmiştir.

Tüm bu veriler ışında TQ'un yararlı etkileri göz önüne alındığında, TCDD ve diğer çevresel kirleticilerin neden olduğu toksik testiküler hasara karşı koruyucu ve sperm sayı ve kalitesini arttırmak amaçlı kullanılabilir. TQ ile ilgili olarak yapılacak benzer çalışmalarla üreme sistemi ve diğer organlarla ilgili koruyucu ve tedaviye yönelik etkilerinin açığa çıkartılması gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Hişmioğulları ŞE, Hişmioğulları AA, Aşkar TK. Dioksin ve Dioksin Benzeri Kimyasalların Toksik Etkileri. Toxic Effects Of Dioxin And Dioxin-Like Chemicals. *Balıkesir Sağlık Bilimleri Dergisi* 2012; 2146-9601.
2. Yörük GN, Güner A. Dioksin ve Besinlerdeki Varlığı. 2011; [https://www.researchgate.net/publication/280633126\\_Dioksin\\_ve\\_Besinlerdeki\\_Varligi](https://www.researchgate.net/publication/280633126_Dioksin_ve_Besinlerdeki_Varligi).
3. Çetinkaya S. Endokrin Çevre Bozucular ve Ergenlik Üzerine Etkileri. *Dicle Tıp Dergisi* 2009, 36(1): 59-66.
4. Baran A, Erdoğan A, Hayvansal Ürünlerde Dioksinler. *Tr. Doğa ve Fen Dergisi* 2015; 4(2).
5. Coutts SM, Fulton N, Anderson RA. Environmental Toxicant-Induced Germ Cell Apoptosis in The Human Fetal Testis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 22: 0268-1161.
6. Erdemli ME, Yigitcan B, Gul M, Bag HG, Gul S, Aksungur Z. Thymoquinone is protective against 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induced hepatotoxicity. *Biotechnic & Histochemistry*, 93(6): 453-462.
7. Şeflek HN. Deneysel Diyabette Nigella Sativa L. (Çörek Otu) Yağının Ovaryum Morfolojisi Ve Oksidan Sistem Üzerine Etkileri. *Türkiye Cumhuriyeti Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji (Tıp Anabilim Dalı)* 2015.
8. Ovale WK, Nahirney PC, *Netter Temel Histoloji*. (S. Müftüoğlu Çev.) Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri 2009; 377-398.
9. Ross MH, Wojciech P. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. (Baykal B. Çev.) Palme Yayıncılık 2014;784-813.
10. <https://Uroklirik.Com.Tr/Uzmanlik-Alanlarimiz/Erkek-Ureme-Sistemi>.
11. Abraham L, Kierszenbaum. Histoloji Ve Hücre Biyolojisi. Patolojiye Giriş. (Demir R. Çev. ) Palme Yayıncılık, Ankara, 2006, 531-563.
12. Unur E., Ülger H., Ekinci N. Anatomik Kuvvetsizlik Kitabevi, Kayseri, 2012, 167-173.
13. Arslan N.P., Nanopartiküllerin Fare Testis Dokusunda Mitokondri Stresi Üzerine Olan Etkileri. Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Erzurum, 2015.

14. Gartner L.P., Hiatt J.L. Renkli Histoloji Atlası. Güneş Tıp Kitabevi, Ankara, 2009, 369-374.
15. Junqueira L.C., Carneiro J.N Temel Histoloji, (Aytekin Y., Solakoğlu S. Çev.), Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2009, 418- 429.
16. [https://www.easynotecards.com/notecard\\_set/85751#&image](https://www.easynotecards.com/notecard_set/85751#&image).
17. Hasırcı E. Testis Dokusundaki Cajal Benzeri Hücrelerin Sperm Matürasyon Evrelerine Olası Etkilerinin Değerlendirilmesi. *Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı*. Ankara, 2012.
18. Cheng CY, Mruk DD. Regulation Of Spermiogenesis, Spermiation And Blood-Testis Barrier Dynamics 2011, 435(3):553-562.
19. <https://www.pelajaran.id/2015/22/proses-proses-yang-melibatkan-organ-reproduksi-pria>.
20. Bulduk O, Cengiz N. Morphological Overview Of Infertility: Sperm Head Defects And Fertilization İnfertiliteye Morfolojik Bakış: Sperm Baş Defektleri Ve Fertilizasyon. *Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıp Dergisi* 2015, 2(2): 78 - 87.
21. <http://keywordsuggest.org/gallery/897716.html>.
22. Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji, (AC. Başaklar Çev.), Palme Yayıncılık, Ankara, 2005, 328-337.
23. Moore K.L., Persaud T.V.N. Embriyoloji Ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Before We Are Born, Güneş Kitabevi, Ankara, 2009, 173-8.
24. Güler ÜA, Kundakçı Ö. Dioksin Ve Benzeri Bileşiklerin İnsan Ve Çevre Sağlığına Etkileri, Dioxin And Dioxin-Like Compounds And Their Effects On Human And Environmental Health, *Karaelmas Fen Ve Mühendislik Dergisi/Karaelmas Science And Engineering* 2014; 4(1): 71-5.
25. <http://www.sektortrend.com/dioksinin-sagliga-etkisi-ve-tespiti/>
26. Çalışlar S., Karaman M. Dioksinlerin Hayvan Beslemedeki Genel Etkileri. *Türk Tarım – Gıda Bilim Ve Teknoloji Dergisi* 2017, 5(6): 687-694,
27. WHO Executive Summary Report Of ‘Assessment Of Health Risks Of Dioxins; Re-Evaluation Of The Tolerable Daily İntake (TDI), 1998
28. Okey AB, Franc MA, Moffat ID, Tijet N, Boutros PC, Korkalainen M, Tuomisto J, Pohjanvirta R. Toxicological İmplications Of Polymorphisms İn Receptors For Xenobiotic Chemicals: The Case Aryl Hydrocarbon Receptor. *Toxicol App Pharmacol* 2005; 207:43-51.
29. <http://img2018wow.pw/canonical-ahr-pathway.html>.

30. Jonosek J, Hilscherova K, Blaha L, Holoubek I. Environmental Xenobiotics And Nuclear Receptors- Interactions, Effects And In Vitro Assessment. *Toxicology In Vitro* 2005.
31. Foster W.G., Briceño S. M., Cyr D. G. Dioxin-Induced Changes in Epididymal Sperm Count and Spermatogenesis. *Environ Health Perspect* 2010; 118:458–464.
32. Yamamoto J, Ihara K, Nakayama H, Hikino S, Satoh K, Kubo N, Iida T, Fujii Y, Hara T. Characteristic Expression Of Aryl Hydrocarbon Receptor Repressor Gene in Human Tissues: Organ-Specific Distribution And Variable Induction Patterns in Mononuclear Cells. 2004; 74, 0024-3205,
33. Hansen DA, Esakky P, Drury A, Lamb L, Moley KH. The Aryl Hydrocarbon Receptor Is Important for Proper Seminiferous Tubule Architecture and Sperm Development in Mice. *Biology Of Reproduction* 2014, 90(1):8, 1–12.
34. Adamsson A, Simanainen U, Viluksela M, Parankoş J, Toppari J. The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on foetal male rat steroidogenesis. *international journal of andrology*, 0105-6263.
35. Ohbayashi T, Oikawa K, Iwata R, Kameta A, Evine K, Isobe T, Matsuda Y, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Kuroda M, Mukai K. Dioxin induces a novel nuclear factor, DIF-3, that is implicated in spermatogenesis. *FEBS Letters* 2001; 508:341-344.
36. Lai KP, Wong MH, Wong CKC. Inhibition Of CYP450scc Expression in Dioxin Exposed Rat Leydig Cells. *Journal Of Endocrinology* 2005, 185: 519–527,
37. Spink DC, Lincoln DW, Dickerman HW, Gierthy JF. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin Causes An Extensive Alteration Of 17 $\beta$ -Estradiol Metabolism in Human Breast Cancer Cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1990; 87: 6917-6921.
38. Moffat ID, Boutros CP, Celius T, Jere Linde'n J. Pohjanvirta R., Okey A.B., microRNAs in Adult Rodent Liver Are Refractory to Dioxin Treatment., *Toxicological Sciences* 2007; 99(2): 470–487.
39. Yaroğlu HY, Görür A, Ayaz L, Balcı FŞ, Akbayır S, Doğruer ÜN, Kaplan E, Serin M. S, Buğdaycı R, Ateş NA. Mersin İlinde Sağlıklı Bireylerde Mikrona Ekspresyon Profili., *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2011, 4(3): 25-29.
40. Bağcı Ö. Mikrona'lar (Mirna) Ve Kanser. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2014; 40(2): 105-109,
41. Karagün B.Ş., Antmen B., Şaşmaz İ., Kılınç Y. Mikro RNA ve Kanser, *Türk Klinik Biyokimya Derg* 2014; 12(1): 45-56.



42. Çelik DA, Koşar PA, Özçelik N. MikroRNA'lar ve kanser ile ilişkisi, *S.D.Ü. Tıp Fak. Dergisi* 2013; 20(3): 121-127.
43. <https://www.ous-research.no/home/kristensen/Research%20projects/12836>.
44. Yıldırım SS. Diyabetik Kardiyomyopatiye Mikrona'ların Rolü, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, 2010, Ankara.
45. Buchold GM, Coarfa C, Kim J, Milosavljevic A, Gunaratne1, PH, Matzuk MM. Analysis of MicroRNA Expression in the Prepubertal Testis., doi:10.1371/journal.pone.0015317, PLoS ONE 5(12).
46. Korhonen HM, Yadav RP, Ros MD, Chalmel F, Zimmermann C, Toppari J, Nef S, Kotaja N. DICER Regulates the Formation and Maintenance of Cell-Cell Junctions in the Mouse Seminiferous Epithelium., *Biology Of Reproduction* 2015; 93(6):139.
47. Kim G, Georg I, Scherthan H, Merckenschlager M, Guillou F, Scherer G, Barrionuevo F. Dicer is required for Sertoli cell function and survival. *Int. J. Dev. Biol.* 2010; 54: 867-875.
48. Wu Q, Song R, Ortogero N, Zheng H, Evanoff R, Small CL. Griswold M.D., S.H. Namekawa, Royo H., Turner J.M., Yan W., The RNase III Enzyme DROSHA Is Essential for MicroRNA Production and Spermatogenesis. *The Journal Of Biological Chemistry* 2012; 287 (30):25173–25190.
49. Güzelsoy P, Aydın S, Başaran N. Çörek Otu (Nigella Sativa) Aktif Bileşeni Timokinonun İnsan Sağlığı Üzerine Olası Etkileri. 2018; DOI: 10.5336/pharmsci. -59816.
50. Şeflek HN. Deneysel Diyabette Nigella Sativa L. (Çörek Otu) Yağının Ovaryum Morfolojisi Ve Oksidan Sistem Üzerine Etkileri. *Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı*. 2015, Konya.
51. Usta C, Algin AK. Kardiyovasküler Hastalıklara Çörekotu (Nigella Sativa) İle Fitoterapötik Yaklaşım. *Ankara Akupunktur* 2016; 4 (1): 15-21.
52. Bacak E. Yağlı Diyet İle Beslenen Sıçanlarda Timokinon'un Plazma Leptin, Karnitin, Paraoksanaz, Tiroid Hormonları, İnsülin ve Glikoz İle Lipid Profiline Etkilerinin Araştırılması, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Tezi.
53. <https://www.flickr.com/photos/14646075@N03/7427890162>
54. Kaya MS, Kara M, Özbek H, Çörek Otu (Nigella Sativa) Tohumunun İnsan Hücresel Bağışıklık Sisteminin CD3+, CD4+, CD8+ Hücreleri ve Toplam Lökosit Sayısı Üzerine Etkileri, *Genel Tıp Dergisi* 2003;13(3):109-112.

55. <https://www.livestrong.com/article/325309-nutritional-value-of-black-seed>.
56. Yi T, Cho S-G, Yi Z, Pang X, Rodriguez M, Wang Y, Sethi G, Aggarwal BB, Liu M: Thymoquinone inhibits tumor angiogenesis and tumor growth through suppressing AKT and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol Cancer Ther [Internet]* 2008; 7:1789–1796.
57. Khan MA, Chen H, Tania M, Zhang D: Anticancer activities of *Nigella sativa* (black cumin). *Afr J Tradit Complement Altern Med [Internet]* 2011; 8:226–232.
58. Banerjee S, Padhye S, Azmi A, Wang Z, Philip P a, Kucuk O, Sarkar FH, Mohammad RM: Review on molecular and therapeutic potential of thymoquinone in cancer. *Nutr Cancer [Internet]* 2010; 62:938–946.
59. Salem M.L. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International Immunopharmacology* 5, 2005; 1749–1770.
60. Basarslan F, Yilmaz N, Ates S, Ozgur T, Tutanc M, Motor VK. Protective effects of thymoquinone on vancomycin-induced nephrotoxicity in rats. *Hum Exp Toxicol* 2012; 31(7):726-33.
61. Sayed MM, Hassanein KM, Senosy W. Protective effects of thymoquinone and L-cysteine on cadmium-induced reproductive toxicity in rats. *Tox Reports*. 204;1:612-620.
62. Mukhallad AM, Mohamad MJ, Mohamad, Hatham D. Effects of black seeds (*Nigella sativa*) on spermatogenesis and fertility of male albino rats. *Res J Med Med* 2009; 4: 386-390.
63. Javanshir S T, Yaghmaei P, Hajebrahimi Z. Thymoquinone ameliorates some endocrine parameters and histological alteration in a rat model of polycystic ovary syndrome. *Int J Reprod Bio Med* 2018; 16(4):275-284.
64. Al-Sa'aidi JAA, Al-Khuzai ALD, Al-Zobaydi NFH. Effect of alcoholic extract of *Nigella sativa* on fertility in male rats. *Iraq J Vet* 2009; 23: 123-8.
65. KARA İ, Streptozotosin ile Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Alfa Lipoik Asidin Testis Dokularına Etkisinin Histolojik Yönden İncelenmesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı 2010, KONYA
66. Sedat KS. Sıçanlarda Akrilamit İle Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine L- Sisteinin Etkisi Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 2015.
67. Vatansev H. Timokinon'un Meme Kanseri Hücrelerine Etkisi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, 2014, Konya.

68. Juma FT, Abdulrahman HMA. The effects of *Nigella sativa* oil administration on some physiological and histological values of reproductive aspects of rats. *Iraqi J. Vet. Med.* 2011; 35(2): 52 – 60.
69. Haseena S, Aithal M., Das K.K., Saheb S. H. Effect of *Nigella Sativa* Seed Powder on Testosterone and LH levels in Sterptozotocine Induced Diabetes male Albino Rats. *J. Pharm. Sci. & Res* 2015; 7(4): 234-7.
70. Assi M.A., Hezmee M.N.M. , Abba Y., Md. s. md. Yusof, Haron A.W., Rajion M.A., Al-Zuhairy M.A., Prophylactic effect of *Nigella sativa* against lead acetate induced changes in spermiogram, reproductive hormones and gonadal histology of rats 2016; 10(14202): 1305-1311.
71. Lee JH, Sul D, Oh E, Jung WW, Hwang KW, Hwang TS, Lee KC, Won NH. Panax Ginseng Effects On DNA Damage, CYP1A1 Expression and Histopathological Changes In Testes Of Rats Exposed To 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin, Food and Chemical Toxicology 2007; 2237–2244.
72. Choi JS, Kim W, Hwang SY, Shin BJ, Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo -p-dioxin on testicular spermatogenesis-related panels and serum sex hormone levels in rats <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2007.07202>.
73. Ghilissi Z, Hamden K, Saoudi M, Sahnoun Z., Zeghal KM, El Feki A, Hakim A. Effect of *Nigella sativa* seeds on reproductive system of male diabetic rats. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2012; 6(20): 1444-1450.
74. Parandin R, Yousofvand N, Ghorbani R. The enhancing effects of alcoholic extract of *Nigella sativa* seed on fertility potential, plasma gonadotropins and testosterone in male rats. *Reprod Med* 2012; 10(4): 355-362.
75. Hala MA, Wahba. Protective Effect of *Nigella Sativa*, Linseed and Celery Oils against Testicular Toxicity Induced by Sodium Valproate in Male Rats. Home Economics Department, Faculty of Specific Education, Minufiya University. *Journal of American Science*, 2011;7(5).
76. Gökçe A, Oktar S, Koç A, Yonden Z. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. *Human and Experimental Toxicology* 2010; 30(8) 897–903.
77. Rotter V., Schwartz D., Almon E., Goldfinger N., Kapon A., Meshorer A., Levine A. J.. Mice with reduced levels of p53 protein exhibit the testicular giant-cell degenerative syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90(19): 9075-9.

78. Gali-Muhtasib H, Kuester D, Mawrin C, Bajbouj K, Diestel A, Ocker M, et al. Thymoquinone triggers inactivation of the stress response pathway sensor CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68(14):5609-18.
79. Herna'Ndez AM, Sa'Nchez-Marti'N FJ, Hortigo'N-Vinagre MP, Henao F, Merino JM. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin İnduces Apoptosis By Disruption Of Intracellular Calcium Homeostasis in Human Neuronal Cell Line SHSY5Y, DOI 10.1007/s10495-012-0760-z.
80. Baba T, Shima Y, Owaki A, Mimura J, Oshima M, Fujii-Kuriyama Y, Morohashi KI. Disruption of aryl hydrocarbon receptor (AhR) induces regression of the seminal vesicle in aged male mice. *Sex Dev* 2008; 2: 1–11.
81. Karman B, Hernandez-Ochoa I, Ziv-Gal A, Flaws J. Involvement Of The AHR İn Development and Functioning Of The Female And Male Reproductive Systems. *In: Pohjanvirta R (Ed.), The AH Receptor In Biology And Toxicology. Hoboken, NJ: Wiley; 2012:437–466.*
82. Lai KP, Wong MH, Wong CK. Effects Of TCDD İn Modulating The Expression Of Sertoli Cell Secretory Products and Markers For Cell-Cell İnteraction. *Toxicology* 2005; 206:111–123.
83. Sönmez M, Türk G, Çeribaşı AO, Sakin F, Ateşşahin A. Attenuating Effect Of Lycopene and Ellagic Acid On 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin–Induced Spermotoxicity and Testicular Apoptosis. ISSN:0148-0545.
84. Sheweita SA, Al-Shora S, Hassan M. Effects of benzo[a]pyrene as an environmental pollutant and two natural antioxidants on biomarkers of reproductive dysfunction in male rats. 2016; 23(17):17226-35.
85. Salahshoor MR, Haghjoo M, Roshankhah S, Makalani F, Jalili C., Effect of Thymoquinone on Reproductive Parameter in Morphine-treated Male Mice. 2018; 30(7):18.
86. Seyran A., Erişir M. Poli Klorlu Bifeniller Ve Sağlık Üzerine Etkileri, Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı Elazığ, 2008; 22 (1): 33



## EKLER

### EK 1. ÖZGEÇMİŞ

**Adı:** Birgül

**Soyadı:** YİĞİTCAN

**Doğum Tarihi:** 03.11.1984

### ADRES

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Malatya/Türkiye

**TEL:** 5372372442

### EĞİTİM BİLGİLERİ

**Lisans:** İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü (2002- 2006).

**Yüksek lisans:** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı, Malatya (2009 – 2012)

**Tez Başlığı:** Karbon Tetraklorür İle Oluşturulan Akut ve Kronik Karaciğer Hasarına Karşı Resveratrol ve Melatoninin Etkileri

\* İç ve Dış Androloji Eğitimi, Memorial Hastanesi, İstanbul (02.01.2012 –15.02.2012)

**Doktora:** İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı, Malatya (2013- 2019)

**Tez Başlığı:** Wistar Albino Sıçanlarda 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin (Tcdd)'nin Testiküler Toksisitesi Üzerine Thymoquinone'un Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

**İletişim bilgileri:**[birgulyigitcan@hotmail.com](mailto:birgulyigitcan@hotmail.com)

## EK 2. ETİK KURUL ONAY BELGESİ



### İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

#### DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 29-12-2017  
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya  
Araştırma Protokol no.su : 2016/A-105  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Rat  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyu : Wistar Albino  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 Adet  
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 200-300 g

Prof. Dr. Mehmet GÜL'ün yürütücüsü olduğu "Wistar Albino Sıçanlarda 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)' nin Testiküler Toksikitesi Üzerine Thymoquinone'un Koruyucu Etkilerinin Araştırılması isimli 2016/A-105 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

 Prof. Dr. Davut ÖZBAĞ Başkan	 Prof. Dr. Tayfun GÜLDÜR Başkan Yardımcısı	 Prof. Dr. Metin ATAMBAY Üye
Prof. Dr. M. Çağatay TAŞKAPAN Üye Katılmadı	Prof. Dr. Başak KAYHAN Üye Katılmadı	Doç. Dr. Şengül YÜKSEL Üye
Vet.Hek.Özge ÖZYALIN Üye 	Akın ÖZ Sivil Üye Katılmadı	Dr.Mehmet DENİZ Sivil Üye Katılmadı