

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**SIÇANDA YÜKSEK YAĞLI DİYETLE OLUŞTURULAN
OBEZİTE MODELİNDE İNDOL-3-KARBİNOL VE
TİMOKİNON'UN TESTİS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nur Hande TÜFEK

**Samsun
Ekim-2013**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**SIÇANDA YÜKSEK YAĞLI DİYETLE OLUŞTURULAN
OBEZİTE MODELİNDE İNDOL-3-KARBİNOL VE
TİMOKİNON'UN TESTİS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nur Hande TÜFEK

Danışman

Doç. Dr. Muhammed Eyüp ALTUNKAYNAK

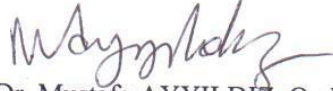
**Samsun
Ekim-2013**

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

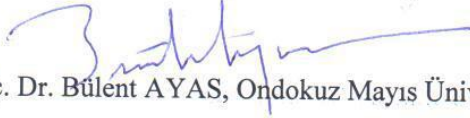
Yüksek lisans öğrencisi Nur Hande Tüfek tarafından Doç. Dr. Muhammed Eyüp Altunkaynak danışmanlığında hazırlanan “Sıçanda Yüksek Yağlı Diyetle Oluşturulan Obezite Modelinde İndol-3-Karbinol ve Timokinon’un Testis Üzerindeki Etkilerinin Stereolojik Yöntemlerle Araştırılması” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 08/10/2013 tarihinde yapılan sınav ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS Tezi olarak kabul edilmiştir.



Başkan : Prof. Dr. Süleyman KAPLAN, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Prof. Dr. Mustafa AYYILDIZ, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



Üye : Doç. Dr. Bülent AYAS, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Berrin Zühal ALTUNKAYNAK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi

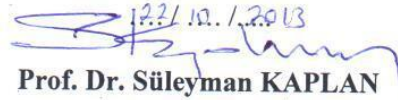


Üye : Doç. Dr. Muhammed Eyüp ALTUNKAYNAK, Ondokuz Mayıs Üniversitesi



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

12.10.2013

Prof. Dr. Süleyman KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince bilgilerini sunan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Süleyman KAPLAN'a, Sayın Doç. Dr. Berrin Zuhâl ALTUNKAYNAK'a ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Muhammed Eyüp ALTUNKAYNAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımız boyunca her konuda yardımlaştığımız, yol arkadaşım, Gamze TÜMENTEMUR'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında olduğu gibi eğitim hayatımda da büyük emeği olan, benden hiçbir fedakârlığı esirgemeyen, en değerli varlıklarım annem İlkay TÜFEK, babam Lütfullah TÜFEK, kardeşlerim Gözde TÜFEK, Gökçe TÜFEK, anneannem Havva KARABACAKLI ve canım dedem Emrullah KARABACAKLI'ya sonsuz teşekkürler, hepinize minnettarım.

Beni bu süreçte anlayışla karşılayan ve her zaman desteğini hissettiğim Oral ÖZTÜRK'e, çalışmalarım esnasında beni yalnız bırakmayan, hayatımın her anında yanımda olan can dostum Özey ÇAKMAK'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından desteklenmiştir.

NUR HANDE TÜFEK

Samsun, 2013

ÖZET

SIÇANDA YÜKSEK YAĞLI DİYETLE OLUŞTURULAN OBEZİTE MODELİNDE İNDOL-3-KARBİNOL VE TİMOKİNON'UN TESTİS ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN STEREOLOJİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Amaç: Bu çalışmada, obezite modeli oluşturulan sıçanlarda indol-3-karbinol ve timokinon'un testis üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlandı.

Materyal ve Metot: Bu amaçla 36 adet *Wistar albino* cinsi erkek sıçan 6 gruba ayrıldı. Obezite modeli oluşturulacak obez kontrol (OK), obez timokinon (OT) ve obez indol (Oİ) grupları %40 yağ içeren özel bir diyetle, non-obez kontrol (NK), non-obez timokinon (NT) ve non-obez indol (Nİ) grupları ise standart yem ile 9 hafta boyunca beslendi. Ardından NT, OT, Nİ, Oİ gruplarına timokinon ve indol-3-karbinol intraperitoneal olarak uygulandı. Deney sonrasında testislerde histolojik, stereolojik, biyokimyasal analizler ve sperm morfolojisi değerlendirmeleri yapıldı.

Bulgular: OK grubundaki kilo artışı, NK grubuna göre oldukça fazlaydı. NT ve OT grubundaki sıçanların ortalama ağırlıklarının NK ve OK grubuna; Oİ grubunda da OK grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı görüldü. Katalaz (CAT) aktivitesi bakımından deney grupları arasında fark bulunamadı. OK, OT ve Oİ gruplarındaki miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin, NK grubuna göre arttığı görüldü. NK ve OK gruplarındaki spermatogonyum sayısında farklılık yoktu fakat Nİ grubunda attığı görüldü. OK grubundaki spermatozoid sayısı NK grubuna göre azalmıştı. NT ve Nİ gruplarında ise spermatozoid ve spermatid sayısında önemli artışlar görüldü. Histolojik değerlendirmede OK grubunda ağır hasar saptandı. OT ve Oİ gruplarında bu hasarların önemli ölçüde azaldığı, germ hücre sayısının arttığı görüldü. İmmünohistokimyasal değerlendirmede NT ve Nİ gruplarındaki Leydig hücrelerinin; OT ve Oİ gruplarında ise Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında LH reseptörleri açısından güçlü pozitif boyanma görüldü. TUNEL değerlendirmesinde OK grubunda spermatogonyumlardaki apoptoz dikkat çekiciydi. OT ve Oİ grubunda ise apoptotik hücre sayısında azalma olduğu görüldü. OK grubunda azalan sperm sayısını takiben baş, boyun ve kuyruk anomalileri oldukça fazlaydı. Timokinon ve indol-3-karbinol tedavisiyle sperm sayısının arttığı ve anomalilerin önemli ölçüde düzeldiği görüldü.

Sonuç: Timokinon ve indol-3-karbinol'ün obezitenin sıçanlarda yol açtığı birçok olumsuz etkiyi düzelttiği görüldü. Antioksidan içerikli bitkilerin tüketiminin artmasıyla obezite ve infertilite başta olmak üzere birçok hastalığın önüne geçilebileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Antioksidan; İndol-3-Karbinol; İnfertilite; Obezite; Oksidatif Stres; Sıçan; Stereoloji; Testis; Timokinon

Nur Hande TÜFEK, Yüksek Lisans Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Ekim-2013

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF THYMOQUINONE AND INDOLE-3-CARBINOL USING THE STEREOLOGICAL METHODS IN HIGH-FAT DIET-INDUCED OBESITY MODEL ON RAT TESTIS

Objective: In this study, it was aimed to investigate the effects of indole-3-carbinol and thymoquinone on rat testis induced obesity model.

Material and Method: On this purpose 36 male rats which were *Wistar albino* kind, separated 6 groups. Obese control (OC), obese thymoquinone (OT) and obese indol (OI) groups taken form obesity were fed with a special diet contained 40% fat, however non-obese control (NC), non-obese thymoquinone (NT) and non-obese indol (NI) groups fed with standart feed during the 9 weeks. Then thymoquinone and indole-3-carbinol were applied being intraperitoneal. After the experiment, histologic, stereologic and biochemical analyses and sperm morphology evaluations were done.

Results: The weight increase in OC group was rather more compared with NC group. The average weights of rats in NT and OT groups reduced significantly compared with NC and OC groups; however, in OI group compared with OC group. There was no significant difference in catalase (CAT) activity between experimental groups. The myeloperoxidase (MPO) activity in OC, OT and OI groups increased compared with NC group. The spermatogonia number wasn't different between NC and OC groups but it was increased in NI group. The spermatogonia number in OC group was reduced compared with NC group. The number of spermatocyte and spermatid in NT and NI groups could be seen significant increases. In histological evaluation, there was heavy damage in OC group. This heavy damage reduced significantly in OT and OI groups but the increases of germ cell number was observed. In immunohistochemical evaluation, Leydig cell cytoplasm in NT and NI groups; Sertoli cell cytoplasm in OT and OI groups showed strong positive immunostaining connected LH receptors. In TUNEL evaluation, the apoptotic activity in spermatogonia of OC group was notable. It was seen that the number of apoptotic cell in OT and OI groups were reduced. Following the number of sperm reduced, anomalies in head, neck and tail were determined rather more in OC group. It was observed that the number of sperm increased and the anomalies get better significantly using thymoquinone and indole-3-carbinol treatment.

Conclusion: It could be seen that thymoquinone and indole-3-carbinol can treat many negative effects caused by obesity on rats. We consider that increase of consumption of plants contain antioxidants will be effective to avoid and prevent many diseases like obesity and infertility.

Keywords: Antioxidant, Indole-3-carbinol, Infertility, Obesity, Oxidative stress, Rat, Stereology, Testis, Thymoquinone

Nur Hande TÜFEK, Master Thesis

Ondokuz Mayıs University - Samsun, October-2013

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

- ABC:** Avidin-Biotin Kompleksi
ABP: Androjen Bağlayıcı Protein
AEC: Aminoetil karbazil
C₁₀H₁₀O₂: 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon
cAMP: Siklik Adenozin Monofosfat
CAT: Katalaz
Cl⁻: Klor
CMV: Sitomegalovirüs
CRP: C-reaktif protein
DAB: Diaminobenzidine
DIM: Diindolilmetan
DNA: Deokrisibo Nükleik Asit
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
DTQ: Ditimokinon
FSH: Folikül Stimüle Edici Hormon
GPx: Glutasyon Peroksidaz
GSH: Glutasyon
hCG: İnsan Koryonik Gonadotropin
HDL: High Density Lipoprotein
H₂O: Dihidrojen monoksit
H₂O₂: Hidrojen peroksit
HPLC: Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IVF: In Vitro Fertilizasyon
I3C: İndol-3-Karbinol
IgE: İmmunglobulin E
İ.p: İntraperitoneal
K⁺: Potasyum
LH: Luteinleştirici Hormon
LHr: Luteinleştirici Hormon Reseptör Antikoru
MM: Multipl Miyelom

MMP-9: Matriks Metaloproteinaz-9
MPO: Miyeloperoksidaz
mRNA: Mesajcı Ribo Nükleik Asit
Na⁺: Sodyum
NADPH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
NIH: National Institutes of Health (Ulusal Sağlık Enstitüleri)
NO: Nitrik Oksit
NOS: Nitrik Oksit Sentaz
NS: *Nigella sativa*
O₂⁻: Süperoksit Anyon Radikali
OH: Hidroksil Radikali
One Way ANOVA: Tek Yönlü Varyans Analizi
PBS: Fosfat Tamponu
pH: Potansiyel Hidrojen
PMNL: Polimorfonükleer Lökosit
ROT: Reaktif Oksijen Türleri
SF: Serum Fizyolojik
SHBG: Seks Hormon Bağlayıcı Globulin
SOR: Serbest Oksijen Radikalleri
SOD: Süperoksit Dismutaz
SPSS: Statistical Package for the Social Sciences
SRÖ: Sistematik Rastgele Örnekleme
SS: Standart Sapma
TdT: The Disapproving Tampon (Dengeleyici Tampon)
THQ: Timohidrokinon
THY: Timol
TQ: Timokinon
TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick End Labeling
TURDEP: Türkiye Diyabet Epidemiyoloji Projesi
VKİ: Vücut Kitle İndeksi

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Obezite	4
2.1.1. Obezite Tanımı ve Epidemiyolojisi.....	4
2.1.2. Obezitenin Sınıflandırılması ve Ölçüm Yöntemleri.....	5
2.1.3. Obezitenin Neden Olduğu Sağlık Sorunları	7
2.1.4. Obezitenin Tedavisi	8
2.1.5. Obezite ve Oksidatif Stres	8
2.1.6. Oksidatif Stres ve Antioksidan Mekanizma	9
2.2. Testis	10
2.2.1. Testis Embriyolojisi.....	11
2.2.2. Testis Anatomisi	12
2.2.3. Testis Histolojisi	12
2.2.4. Spermatogenez	16
2.2.5. İnterstisyel Alan.....	20
2.2.6. Sperm Analizi (Spermiyogram)	22
2.2.7. Erkek Kısırlığının Nedenleri	26
2.2.8. Obezite ve İnfertilite İlişkisi	27
2.3. <i>Nigella Sativa</i> (Çörek Otu).....	28
2.3.1. Timokinon (TQ)	29
2.3.2. Timokinon Toksisitesi	30
2.3.3. Anti-Diyabetik Etki	30
2.3.4. Anti-Bakteriyel Etki	31
2.3.5. Anti-Fungal Etki	31
2.3.6. Anti-Viral Etki	32
2.3.7. Anti-Allerjik Etki.....	32
2.3.8. Anti-İnflamatuar Etkiler	33

2.3.9. Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri (SSS).....	33
2.3.10. Anti-Hipertansif Etki	34
2.3.11. Analjezik Etki.....	34
2.3.12. Anti-Tümör Etki	34
2.3.13. Anti-Oksidan Etkiler	35
2.4. Cruciferae Bitkileri.....	36
2.4.1. İndol-3-Karbinol (I3C)	36
2.4.2. İndol'ün Kimyasal Özellikleri.....	37
2.4.3. İndol-3-Karbinol Etki Mekanizması.....	37
2.5. Stereolojik Metodlar.....	39
2.5.1. Sistematik Rastgele Örnekleme (SRÖ)	39
2.5.2. Tarafsız Sayım Çerçevesi	40
2.5.3. Disektör	40
2.5.4. Optik Parçalama	41
2.5.5. Cavalieri Prensibi ile Hacim Hesaplanması	42
3. MATERYAL VE METOT.....	43
3.1. Kullanılan Deneysel Hayvanları ve Hayvanların Bakımı	43
3.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar	43
3.3. Anestezi ve Cerrahi İşlemler	45
3.4. Biyokimyasal Ölçümler	46
3.4.1. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini	46
3.4.2. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini.....	47
3.5. Histolojik Çalışmalar	48
3.5.1. Sperm Yayma ve Boyama Çalışmaları.....	48
3.5.2. Işık Mikroskopik Takip Prosedürü	50
3.6. Stereolojik Yöntemler	55
3.6.1. Optik Parçalama ile Hücre Sayımı	56
3.6.2. Cavalieri Prensibi ile Hacim Hesabı.....	56
3.7. İstatistiksel Analiz.....	57
4. BULGULAR.....	58
4.1. Obezitenin Değerlendirilmesi	58
4.1.1. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Ortalama Vücut Ağırlığı Bulguları	60

4.1.2. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Yaş Ağırlıkları ve Testis Çevresi Yağ Dokusu Ağırlığı Bulguları.....	62
4.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları.....	63
4.2.1. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Katalaz Enzim Aktivite Bulguları.....	63
4.2.2. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Miyeloperoksidaz Enzim Aktivite Bulguları	64
4.3. Stereolojik Analiz Bulguları	65
4.3.1. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Spermatogonyum Sayısı Bulguları	65
4.3.2. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Spermatozoid Sayısı Bulguları.....	66
4.3.3. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Spermatozoid Sayısı Bulguları.....	67
4.3.4. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Leydig Hücreleri Sayısı Bulguları.....	68
4.3.5. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Ortalama Seminifer Tübül Hacmi Bulguları.....	69
4.3.6. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Toplam Testis Hacmi Bulguları.....	70
4.4. Sperm Morfoloji Değerlendirme Bulguları.....	71
4.4.1. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Semen Yayıma Örneklerindeki Sperm Morfoloji Değerlendirme Bulguları	71
4.5. Histolojik Bulgular.....	75
4.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyası ile Elde Edilen Bulgular	75
4.5.2. İmmünohistokimyasal Boyama ile Elde Edilen Bulgular	89
4.5.3. TUNEL Boyama ile Elde Edilen Bulgular	93
4.5.4. Sperm Morfoloji Değerlendirme Bulguları	97
5. TARTIŞMA.....	103
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	124
KAYNAKLAR	125
ÖZGEÇMİŞ	149

1. GİRİŞ

Sağlıklı ve uzun bir yaşam sürdürmek için dengeli beslenmeli ve düzenli egzersiz yapılmalıdır. Sağlıksız beslenme ve fiziksel aktivitedeki yetersizlik birçok hastalığı beraberinde getirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından en riskli 10 hastalıktan biri olarak kabul edilen obezite son yıllarda en önemli sağlık problemleri arasında yer almaktadır. Obezite; vücuda besinler ile alınan enerjinin, harcanan enerjiden fazla olması durumunda, vücut yağ kitlesinin yağsız vücut kitlesine oranla artması ile karakterize olan kronik bir hastalıktır (WHO, 1997).

Özellikle gelişmiş ülkelerde olmak üzere tüm dünyada obezite sıklığı gittikçe artmaktadır. DSÖ, 2015 yılında 15 yaş ve üzeri kilolu insan sayısının 2,3 milyara, obez birey sayısının ise 700 milyona ulaşmasının beklendiğini açıklamıştır (WHO, 1997).

Ülkemizde de son yıllarda enerjiden zengin gıdaların alımındaki artış, yağ ve şeker oranları fazla olan gıdaların tüketimi, fiziksel aktivitenin azalması, sedanter yaşamın yaygınlaşması sonucu obezite görülme oranlarında artış görülmektedir (Hatemi ve ark., 2002). Obezite, tedavi edilmesi gereken bir hastalıktır ve birçok hastalığı da beraberinde getirmektedir. Kalp hastalıkları, yüksek tansiyon, şeker hastalığı, yüksek kolesterol, solunum rahatsızlıkları, eklem hastalıkları, adet düzensizlikleri, kısırlık, safra kesesi hastalıkları, taş oluşumu, erkeklerde kolon, rektum, prostat, kadınlarda endometriyum, meme ve safra kesesi kanseri gibi bazı kanser tipleri obezite ile ilişkili hastalıklardan birkaçıdır (Altunkaynak ve Özbek, 2006; Annagür, 2010).

Testisler vücut boşluğunun dışında, skrotum içine yerleşmiş, ovoid yapıda hem ekzokrin hem de endokrin salgı yapan bir çift organdır. Testiküler sıvı ve spermatozoon testisin ekzokrin salgısını oluşturur ve seminifer tübüllerde yapılır. Testisin endokrin salgısı ise Leydig hücrelerinde yapılan steroid yapıdaki testosterondur. Testosteron, erkeğe özgü sekonder karakterlerin gelişmesinden sorumludur (Ross ve Pawlina, 2011). Testisin yapı ve fonksiyonunu bozan pek çok faktör, erkek infertilitesine neden olmaktadır. Bunların başında varikosel, kriptorşidizm, enfeksiyonlar, tıkaçıcı lezyonlar, kistik fibrozis, travma ve tümörler gelmektedir. Son dönemde erkek infertilitesi için sebep gösterilen oksidatif stres oldukça önem kazanmıştır (de Lamirande ve Gagnon, 1995). Oksidatif stres, oksidan ve antioksidan sistemler arasındaki dengenin oksidan sistemler lehine bozulması sonucu reaktif oksijen ürünlerinin açığa çıkması ve organizmada hücrel hasara yol açmasıdır. Bu hasar antioksidan maddelerle

giderilmeye çalışılır. Antioksidanlar, serbest radikal süpürücü etkinlik gösteren maddelerdir ve serbest radikallerle reaksiyona girerek hücelere zarar vermelerini önlerler (Peltola ve ark., 1992). Testiste serbest radikallerin herhangi bir nedenden dolayı artması oksidatif strese yol açar. Oksidatif stres testis fonksiyonlarını bozarak anormal spermatozoon üretimine neden olur ve sperm sayısını, motilitesini ve morfolojisini olumsuz yönde etkiler (Zalata ve ark., 2004; Puchau ve ark., 2010).

Serbest radikallerin oluşumunu artırarak oksidatif strese neden olan etkenler arasında obezitenin rolü büyüktür. Birçok araştırmacı obez hastalarda yaptıkları çalışmalarda, vücutta oksidatif stres belirteçlerinin yükseldiğini ve antioksidan savunma enzimlerinde ise azalma olduğunu göstermişlerdir (Martinet ve ark., 2002; Uzun ve ark., 2004; Vincent ve Taylor, 2006). Bu nedenle obezitenin vücutta inflamasyon ve kronik oksidatif strese neden olduğu belirtilmektedir (Higdon ve Frei, 2003; Urakawa ve ark., 2003).

Obezitede artan oksidatif stres erkek infertilitesinin etiyolojisindeki en önemli faktörler arasındadır. Özellikle son 5 yıldır obezite ve infertilite ilişkisi yoğun olarak incelenmektedir (Swan ve ark., 2000; Ramlau-Hansen ve ark., 2007; Bakos ve ark., 2010; Cabler ve ark., 2010; Tunc ve ark., 2011).

Timokinon, *Nigella sativa* (çörek otu) bitkisinin tohumlarının uçucu yağından elde edilen ve en fazla etkin olduğu düşünülen bileşenidir. Günümüzde ilaç, kozmetik ve gıda sektöründe bitkisel kaynaklı ürün olarak kullanılmaktadır. Çörek otu yağının yüksek oranda antioksidan (Burits ve Bucar, 2000), antitümör (Worthen ve ark., 1998), antiinflamatuvar (Houghton ve ark., 1995), antibakteriyel aktivitesi (Morsi, 2000) ve immün sistem üzerine uyarıcı etkisi (Salem ve Hossain, 2000) olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir.

İndol-3-karbinol yalnızca Cruciferae familyasına mensup bitkilerde bulunan ve bu bitkilerin sıkılması ya da pişirilmesi sırasında ortaya çıkan fitokimyasal bir maddedir (Broadbent ve Broadbent, 1998). Temel antikanserojen ve antioksidan maddelerden biri olduğu bilinen indol-3-karbinol'ün özellikle meme, rahim ve prostat kanserindeki tümör hücrelerinde etkili olduğu ve serbest radikaller üzerinde tutma etkisi yaratarak antioksidan etki gösterdiği çok sayıda bilimsel çalışmada gösterilmiştir (Bradlow ve ark., 1995; Arnao ve ark., 1996; Staub ve ark., 2002; Sarkar ve Li, 2004).

Bu çalışmayı yapmaktaki amacımız, yüksek yağlı diyet ile obezite modeli oluşturulan sıçanlarda indol-3-karbinol ve timokinon'un testis üzerindeki koruyucu etkilerinin histolojik, stereolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Obezite

2.1.1. Obezite Tanımı ve Epidemiyolojisi

Obezite, genelde fazla kilolu olma durumu olarak bilinmekle birlikte tıbbi olarak vücutta normalden fazla yağ dokusunun bulunması şeklinde tanımlanır. Besinlerle alınan enerji miktarının, metabolizma ve fiziksel aktivite ile tüketilen enerji miktarını aştığı ve vücuttaki yağ kitlesinin, yağsız vücut kitlesine oranla arttığı durumlarda ortaya çıkar (Hammoud ve ark., 2008). İlk kez 1620 yılında Thomas Venner isimli araştırmacının yazılarında rastlanan obezite tanımı gelişen ve gelişmekte olan ülkeler dâhil olmak üzere tüm dünyada epidemik bir sorun halini almıştır (Barnett, 2005; Villamor ve ark., 2006; Chavarro ve ark., 2010; Jones, 2011).

1997 yılında Dünya Sağlık Örgütü obeziteyi en riskli 10 hastalıktan biri olarak tanımlamış ve halk sağlığını artan diyabet, hipertansiyon ve koroner kalp hastalıkları riskine bağlı olarak ciddi bir şekilde tehdit ettiğini belirtmiştir (WHO, 1997). DSÖ'nün rakamlarına göre, fazla kilosu bulunanların sayısı 1,6 milyarı, obez sayısı ise 400 milyonu geçerken, dünya genelinde her yıl 2,6 milyon insan obeziteye bağlı sağlık sorunları nedeniyle yaşamını yitirmektedir (WHO, 1997). Türkiye'de 24788 olgunun incelendiği bir araştırmada (TURDEP, Türkiye diyabet epidemiyolojisi çalışması) obezite prevalansının kadınlarda %30, erkeklerde %13, genelde ise %22,3 olduğu gösterilmiştir (Björntorp, 1997; Satman ve ark., 2002). Yine Türkiye'de yapılan iki ayrı çalışmada erkeklerde obezite prevalansının sırası ile %21,5 ve %21,1 olduğu belirtilmektedir (Onat, 2001; Hatemi ve ark., 2002). Bu prevalans hızlarına göre 2015 yılında tüm dünyada 2,3 milyar insanın kilolu, 700 milyon insanın ise obez olacağı tahmin edilmektedir.

Obez bireylerdeki fazla yağlanma; insan vücudunda kardiyovasküler sistem, solunum sistemi, hormonal sistem, sindirim sistemi gibi sistemleri etkileyip birçok önemli rahatsızlığa zemin hazırlamaktadır (WHO, 2006). Kardiyovasküler hastalıklar, hipertansiyon, diyabet, hiperkolesterolemi, solunum rahatsızlıkları, eklem hastalıkları, tip 2 diyabet, menstural düzensizlikler, infertilite, impotans, safra kesesi hastalıkları, taş oluşumu, meme, over, endometriyum, prostat ve kolon kanseri obezite ile ilişkili hastalıklardan sadece birkaçıdır. Bu hastalıkların uzun süreli devam etmesi genellikle erken ölüm ve sakatlıkla sonuçlanır (Wright ve ark., 1994; Oldenburg ve Pijl, 2001;

Must ve Anderson, 2003; Galinier ve ark., 2005). Çocukluk ve adolesan döneminde de obezite sıklıkla görülmekte ve birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir. Amerikan Diyabet Derneğinin yaptığı araştırmaya göre, Tip 2 Diyabet tanısı konan çocukların %85'inin obez veya aşırı kilolu olduğu belirtilmiştir (American Diabetes Association, 2000). Obezitenin en önemli risk faktörlerini, fiziksel aktivitede azalma, beslenme alışkanlıkları, yaş, cinsiyet (kadın), eğitim düzeyi, doğum sayısı ve genetik faktörler oluşturmaktadır (Altunkaynak ve Özbek, 2007).

2.1.2. Obezitenin Sınıflandırılması ve Ölçüm Yöntemleri

Çalışmalar vücuttaki yağ dağılımının farklı iki bölgede yoğunlaştığını göstermiştir. Obeziteyle ilgili çalışmaların artması ile vücuttaki yağ birikimine göre iki tip obezite tanımlanmıştır.

-Jinoid Tip Obezite

Gluteal ve femur üzerinde yağ toplanması jinoid tip, kadın tipi, periferik tip, armut tipi veya femoral obezite olarak tanımlanmaktadır. Bu obezite tipi yağ hücre sayısındaki artış ile gelişen obezite modelidir. Hiperplastik obezite tipi olarak bilinir (Kopelman, 1994). Jinoid obezite ile venöz dolaşım bozuklukları arasında anlamlı bir ilişki varken, obeziteden kaynaklanan diğer komplikasyonlarla arasında herhangi bir anlamlılık bulunamamıştır (Despres, 1992).

-Android Tip Obezite

Her iki cinste de karın bölgesinde yağ toplanması (göbeklenme); android tip, erkek tipi, santral, abdominal, sentripedal, elma tipi veya visseral obezite olarak tanımlanmaktadır. Android obezitede ise yağ hücreleri büyümüştür. Yani hipertrofik bir obezite tipidir (Van der Kooy ve Seidell, 1993). Tipi ne olursa olsun obeziteyi teşhis etmek için geliştirilmiş birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler aşağıdaki tabloda özetlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1. Obezite ölçümünde kullanılan yöntemler

Obezite Ölçüm Yöntemleri
1. Vücut Kitle İndeksi
2. Vücut Yağ Oranı
3. Bel-Kalça Oranı
4. Deri Kalınlıkları Ölçümü
5. Toplam Vücut Suyu
6. Dual Enerji X-ray Absorbsiyometri
7. Biyoelektrik İmpedans Analizi
8. Potasyum İzotopu
9. Nötron Aktivasyon Analizi
10. Bilgisayarlı Tomografi
11. Manyetik Rezonans Görüntüleme
12. Ultrasonografi

Obezitenin tanımında en yaygın kullanılan antropometrik parametre vücut kitle indeksi (VKİ)'dir (Pi-Sunyer, 1993). İlk kez 1835 yılında Quetelet tarafından tarif edilen bu indeks, bir asırdan fazla süredir kullanılmaktadır. VKİ; boy ve ağırlık ölçümlerinden yararlanılarak kilogram cinsinden vücut ağırlığının, metre cinsinden boy uzunluğunun karesine bölünmesi ile hesaplanır; kg/m² (Black ve ark., 1983; Despre's, 1994).

$$\text{Vücut Kitle İndeksi} = \text{Vücut ağırlığı (kg)} / \text{Boy (m}^2\text{)}$$

DSÖ obeziteyi vücut kitle indeksinin 30 ve üzerinde olması olarak tanımlamaktadır (Tablo 2). Amerika'da yapılan bir çalışmada obeziteye bağlı hastalıktan ölenlerin % 80'inin, vücut kitle indeksinin 30 ve üzeri olduğu ve bu ölümlerin yıllık 280,000 kişiye ulaştığı belirtilmiştir (Allison ve ark., 1999).

Tablo 2. Dünya Sağlık Örgütüne göre obezite sınıflandırılması (WHO, 2004'dan uyarlanmıştır)

Grup	Vücut Kitle İndeksi (VKİ)
Normal kilo altı (Zayıf)	< 18,5
Normal kilo (Sağlıklı)	18,5 – 24,99
Kilolu (Pre-obez)	25,0 – 29,99
Obez	≥ 30,0
Sınıf 1	30,00 – 34,99
Sınıf 2	35,5 – 39,99
Sınıf 3 (Morbid obez)	≥ 40

2.1.3. Obezitenin Neden Olduğu Sağlık Sorunları

Obezite gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeler için önemli bir sağlık sorunu haline almıştır. Özellikle koroner kalp hastalığı, yüksek tansiyon, bazı kanser türleri, mide-bağırsak hastalıkları, uyku apnesi ve bazı romatizma türleri gibi hastalıklarla sıkı bir ilişkisi vardır (Tablo 3); (Kopelman ve Stock, 1998).

Tablo 3. Obezitenin neden olduğu sağlık sorunları (Kopelman, 2001'dan uyarlanmıştır)

Obezite ile İlişkili Sağlık Sorunları	
Kalp-Damar sistemi	-Yüksek tansiyon -Koroner kalp hastalığı -Serebrovasküler hastalık -Konjestif kalp yetersizliği -Tromboembolik hastalık
Solunum sistemi	-Solunum güçlüğü -Uykuya bağlı hipoventilasyon -Uyku apnesi - Obezite hipoventilasyon sendromu
Sindirim sistemi	-Hiatus hernia -Safra taşları -Yağlı karaciğer ve siroz -Kolonorektal kanser
Hareket sistemi	-Osteoartrit -Sinir sıkışması -Artmış karın içi basıncı, herni

Tablo 3 devam. Obezitenin neden olduğu sağlık sorunları (Kopelman, 2001'dan uyarlanmıştır)

Hormonal sistem	-Artmış Adrenokortikal aktivite -Polikistik over sendromu
Metabolik	-Dislipidemi -İnsülin direnci -Tip 2 Diyabets mellitus -Hiperürisemi
Kanser	-Meme -Kolon -Serviks, endometrium, over -Safra kesesi -Prostat
Böbrekler	-Proteinüri
Deri	-Akantozis nigrikans -Lenfödem -Ter döküntüleri
Göz hastalıkları	
Psiko-Sosyal Komplikasyonlar	-Psikolojik komplikasyonlar -Sosyal komplikasyonlar -Ekonomik etki
İmmün Sistem Disfonksiyonu	
Cerrahi Komplikasyonlar	

2.1.4. Obezitenin Tedavisi

Obezitenin tedavisi, enerji girişini enerji tüketiminin altına indirmekten ibarettir (Greenway ve Smith, 2000). Tedavideki genel amaçlar; daha fazla kilo alınmasının önüne geçilmesi, vücut ağırlığının azaltılması ve uzun dönemde sabit tutulması, kilo alınmasıyla ortaya çıkabilecek diğer hastalık risklerini kontrol edebilmektir. Obezite; diyet, egzersiz, davranışsal değişiklikler, ilaçlar ve cerrahi yöntemlerle ve genellikle de birden fazla yöntemin birlikte kullanılması ile tedavi edilebilir ancak yinede tedavisi zor bir hastalıktır (Colette ve ark., 2003).

2.1.5. Obezite ve Oksidatif Stres

Obeziteyle birlikte canlıda patolojik olaylar sırasında hücrede aşırı miktarda reaktif oksijen radikali oluştuğu bilinmektedir. Reaktif oksijen türlerinin dâhil olduğu

serbest radikaller; dış yörüngelerinde bulunan bir veya daha fazla paylaşılmamış elektrondan dolayı bağımsız olarak bulunabilen, oldukça reaktif, çok kısa yarı ömürlü kimyasal maddelerdir. Serbest radikaller, pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler. Biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi ile oluşmaktadır. İnsan vücudundaki bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan girebilme ve hücrenin tüm bileşenleri ile kolayca etkileşebilme özelliğine sahiptirler (Halliwell ve Gutteridge John, 2001). Son derece reaktif bir yapıya sahip olan serbest radikaller, eşlenmemiş elektronlarını eşlemek için diğer moleküllerle hızla reaksiyona girerek daha kararlı yapıları oluşturmak isterler (Reiter, 1995). Bu kararlı yapıyı oluşturmak için hücrelerdeki protein (enzimler ve kollajen), nörotransmitterler, nükleik asitler, DNA ve hücre membranlarının başlıca bileşenleri olan yağ asitlerine etki ederek, yapılarının bozulmasına neden olurlar (Davies, 1986; Halliwell ve Gutteridge, 1986; Valko ve ark., 2007).

Büyük ölçüde oksijen ve azot kaynaklı olan serbest radikaller, metabolizma sırasında doğal olarak oluşurlar. Metabolik faaliyetin yanı sıra radyasyon, ilaçlar, çeşitli kimyasallar gibi dış etkenler de serbest radikal oluşumuna neden olmaktadır. Oksijen içeren herhangi bir serbest radikal Reaktif Oksijen Türleri (ROT) olarak adlandırılır (Hasset ve ark., 1999). En yaygın reaktif oksijen türleri süperoksit anyon radikali (O_2^-) ve hidroksil radikalidir (OH) (Wilson ve ark., 2001). İnsan vücudunda en fazla oluşan serbest radikal O_2^- 'dir. Vücuttaki O_2^- 'nin en belirgin kaynakları olarak fagositik hücreler olan nötrofiller ve makrofajlar öne çıkmaktadır (Gutteridge ve ark., 1999). Son yıllarda yapılan çalışmalar, serbest oksijen radikallerinin ve lipit peroksidasyonunun artmasının birçok hastalığın patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. Örneğin serbest oksijen radikallerinin artması, nöronlarda ve schwan hücrelerinde hasara neden olmakta, damar endotel hücrelerinde hasar yaparak vasküler hastalıkların oluşmasına yol açmaktadır (Halliwell, 1993; Skalska ve ark., 2008).

2.1.6. Oksidatif Stres ve Antioksidan Mekanizma

Canlılar, serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek için hem hücre içerisinde hem de hücre membranında etki gösteren birçok mekanizma geliştirmişlerdir. Bu mekanizmaların amacı radikal üretimini engellemek ya da oluşan radikallerin zararlı etkilerini ortadan kaldırmaktır. Canlı organizmaların oluşturduğu bu sisteme

“antioksidan savunma sistemi” ya da kısaca “antioksidanlar” denilmektedir (McCord ve Fridovich, 1969; Fridovich, 1995). Normal koşullarda, reaktif oksijen türlerinin üretimi ve antioksidan savunma sistemleri vücutta bir denge halindedir. Bu dengeye “oksidatif denge” adı verilir. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma serbest radikallerin olumsuz etkilerinden zarar görmez (Halliwell ve Cross, 1994). Antioksidan savunma mekanizmasının yetersiz kalması veya serbest radikal oluşumunun artması nedeniyle oksidatif dengenin serbest radikaller yönüne kayması durumunda oksidatif stres meydana gelir (Hermes-Lima and Zenteno-Savin, 2002; Serafini ve Del Rio, 2004). Obez hastalar üzerinde yapılan birçok çalışmada vücutta oksidatif stres belirteçlerinin arttığı, antioksidan savunma enzimlerinde ise azalma olduğu, sonuç olarak obezitenin vücutta inflamasyon ve kronik oksidatif strese yol açtığı belirtilmektedir (Higdon ve Frei, 2003; Urakawa ve ark., 2003; Vincent ve Taylor, 2006). Obezitede artan oksidatif stres yine bu hastalarda ortaya çıkan doku ve fonksiyon bozukluklarının (endotel disfonksiyonu, artmış platelet agregasyonu, aterogenez vb.) başlıca sebebi olarak öne sürülmüştür (Martinet ve ark., 2002; Uzun ve ark., 2004).

Obez hastalarda oksidatif stresi arttıran etkenler arasında hiperglisemi, hiperleptinemi, doku lipit düzeylerinin artması, yetersiz antioksidan savunma, reaktif oksijen türevi oluşumunun artması ve kronik enflamasyon sayılabilir (Vincent ve Taylor, 2006). Bunların sonucu olarak miyokard enfarktüsü gibi kardiyolojik hastalıklar, nörolojik hastalıklar, astım, diyabetes mellitus, romatoid artrit gibi romatolojik hastalıklar, kanser ve obezite dahil birçok hastalığın oksidatif stres ile ilişkisi gösterilmiştir (Dröge, 2002; Uzun ve ark., 2004).

2.2. Testis

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmaktadır. Testisin başlıca iki görevi, hormon ve spermatazoon üretmektir. Testiste üretilen başlıca hormon testosterondur. Testosteron spermatogenez, embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşma ve gonadotropin salgısının kontrolü için önemlidir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

2.2.1. Testis Embriyolojisi

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovum ile birleşen sperm çeşidi ile fertilizasyon esnasında belirlenir; ancak erkek ve dişi morfolojik özellikleri embriyonal dönemin yedinci haftasına kadar gözlenmez (Moore ve Persaud, 1993). İntrauterin dönemde dördüncü haftanın başında insan embriyosunun 10-12. dorsal segmentleri arasından primordiyal gonadın mezenkimal kısmı gelişir. Primordiyal germ hücreleri ise gelişimin üçüncü haftasında vitellus kesesi duvarında endoderm hücreleri arasında ve allantoise yakın bir yerde belirir. Amibik hareketlerle son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerler, beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve altıncı haftada genital kıvrımlara (Plica genitalis) tamamen yerleşirler. Altıncı haftada, plica genitalis yüzey epitelinden (mezotel) ayrılan hücreler, altındaki mezenşim içerisine doğru gelişen parmak şeklindeki primer seks kordonlarını oluştururlar (Moore ve Persaud, 1993; Sadler, 1996). Primordial germ hücreleri bu kordonların içine girerler. Bu durumda farklılaşmamış gonad, dışta bir korteks ve içte bir medulladan oluşmaktadır. Gebeliğin yedinci haftasından önce, her iki cinsin gonadları benzerdir ve farklılaşmamıştır. Gonadların erkek ya da dişiliğe farklılaşmaları XX, XY kromozom kompleksine bağlıdır ve gebeliğin yedinci haftasında belli olur (Şeftalioğlu, 1998). Eğer embriyo XY seks kromozom çiftini içeriyorsa, medulla testise farklılaşır; korteks geriler ve dejenere olur. Testiste primordial germ hücrelerinden spermatogonyumlar, plica genitalis mezotelinden Sertoli hücreleri, bu mezotel altındaki mezenşimden ise Leydig hücreleri gelişir (Moore ve Persaud, 1993; England ve Waddell, 1996). Leydig hücreleri, 8-18. haftalar arasında interstisyel dokudaki mezenkimal hücrelerin hızla değişimi sonucu ortaya çıkar. Gebeliğin ortalarında, testisin %50'sini bu hücreler oluştururken doğuma doğru sayıları giderek azalır. Leydig hücreleri sekizinci haftadan itibaren testosteron ve androstenodion salgılamaya başlar. Bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genitalerin erkeklik yönünde farklılaşmasını sağlarlar. Başlangıçta lomber bölgede bulunan testisler, üçüncü fetal aydan itibaren skrotuma doğru inmeye başlarlar (Rozanski ve Bloom, 1995). Testis gebeliğin yedinci ayından sonra inguinal kanalı geçmiş ve doğumdan hemen önce de gelişimini tamamlamış halde skrotumdaki yerini alır (Junqueira ve ark., 2005).

2.2.2. Testis Anatomisi

Testisler yaklaşık 4-5 cm uzunluğa, 2,5 cm ene ve 3 cm genişliğe sahip oval şekilli, birleşik tübüler yapıda bir çift bezdir. Her birinin hacmi 30 ml kadardır. Testisin anterolateral 2/3'lük bölümü serbest iken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür (Snell, 1986). Funiculus spermaticus'la asılı olarak skrotum içinde bulunurlar (Dere, 1999). Testisler, gebeliğin yedinci ayına kadar karın içinde bulunur. Yedinci aydan, dokuzuncu aya kadar kasık bölgesinde bulunan canalis inguinalis'ten periton denilen zarla sarılmış olarak geçer ve skrotumdaki yerini alır. Testislerin ısısını, intra-abdominal ısının altında tutma gibi önemli görevi olan skrotum, deriden bir kılıftır. İnce ve seyrek kıllı olan bu deri kılıf altında gevşek bağ doku bulunur (Tanyolaç, 1999). Spermatogenez için, skrotum ısısının vücut ısısından daha düşük olması gerekmektedir (Ishii ve ark., 2005).

2.2.3. Testis Histolojisi

Testisler, dıştan testiküler kapsül ile sarılıdırlar. Testiküler kapsül, tunika vajinalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza olmak üzere 3 tabakadan meydana gelmiştir.

-Tunika Vajinalis

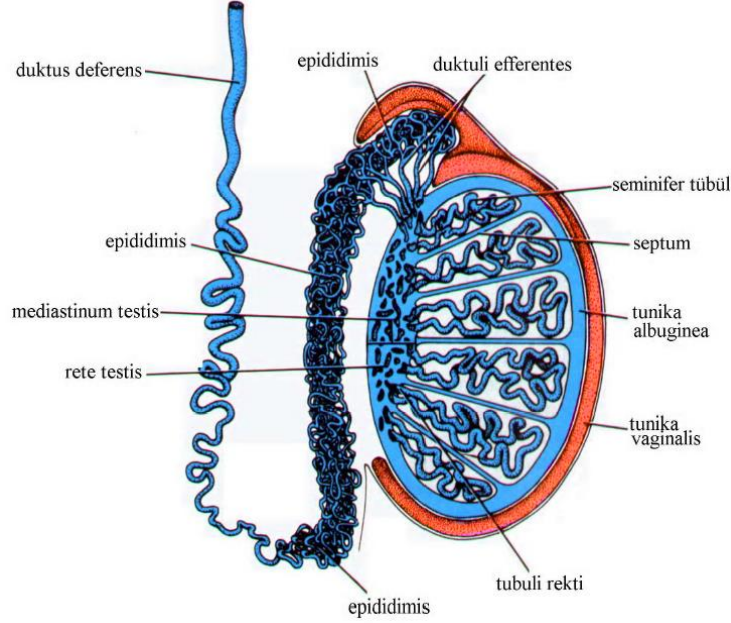
Mezotelyal hücrelerin oluşturduğu bu en dıştaki tabaka peritondan köken alan seröz bir kesedir. Testisin ön ve yan yüzeylerini çevreleyen visseral tabakası ve skrotum üzerine uzanan pariyetal tabakası bulunmaktadır (Leeson ve ark., 1988). Visseral ile pariyetal tabakalar arasında cavum scroti adı verilen bir boşluk bulunur. Gelişmenin başlangıç evresinde karın boşluğunda bulunan testislerin torbalara inmesi descensus testis bu yolla gerçekleşir (Trainer, 1987).

-Tunika Albuginea

Mavimsi-beyaz renkte, düzensiz, yoğun, sıkı bağ dokudan oluşan bir kapsüldür. Elastikiyeti az olan bu kapsül kollajen liflerden zengindir. Tunika vajinalis'in pariyetal yaprağı skrotuma yapışıktır, viseral yaprağı ise testis ve epididimisi örterek tunika albugineya ile temas halindedir (Dellmann ve Brown, 1987). Tunica albuginea, testis'in arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis'i oluşturur. Mediastinumdan testise doğru uzanan fibröz bağ dokusu septumları, testiküler dokuyu 250-300 lobüle ayırır. Her bir lobül 1-4 adet seminifer tübül içermektedir (Trainer, 1987; Kaya ve ark., 2006).

-Tunika Vasküloza

Kan damarları ağlarını içeren gevşek bağ dokusundan oluşan en iç tabakadır. Tunica albuginea'nın testis parankimasına doğru olan uzantılarının iç yüzünü örter. Böylece, organ içindeki tüm lobülleri de sarmış olur (Şekil 1); (Trainer, 1987; Leeson ve ark., 1988).



Şekil 1. Testisin genel yapısı ve erkek genital sisteme ait kanallar (Moore ve Dalley, 1995'den uyarlanmıştır)

Seminifer Tübül Histolojisi

Seminifer tübüller, yaklaşık 150-200 µm çapta ve 20-80 cm uzunlukta oldukça kıvrıntılı kanalcıklardır. Her testiste yaklaşık 250-1000 kadar seminifer tübül bulunur. Yetişkin sıçan testisinde ise yaklaşık 20 adet seminifer tübül vardır. Seminifer tübüller, anastomoz gösteren kıvrımlar şeklinde başlar, mediastinuma doğru birbirlerine yaklaşarak boşaltma kanalı olan tubuli rektiye oluştururlar. İki ucu U şeklinde olan bu tübüller de rete testise açılırlar (Abraham, 2006). Seminifer tübüller ile rete testis arasındaki bölgede, uzun geçiş hücreleri bulunmaktadır (Hermo ve Dworkin, 1988). Rete testis, 10-20 duktuli efferentes ile epididimis'in baş kısmına bağlanmaktadır (Stevens ve Lowe, 1997; Junqueira ve Carneiro, 2006). Rete testis, spermatozoonu tübüllerden epididimise taşımakla görevlidir (Krinke, 2000). Seminifer tübüller gevşek bağ dokusu ile sarılmışlardır. Bu tübülleri saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas

özellikleri de gösteren yassılaşımiş miyoid hücreler içerir (Junqueira ve Carneiro, 2006). Miyoid hücreler, hareketsiz spermleri rete testise ilerleten ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur (Abraham, 2006). Seminifer tübül duvarındaki hücreler, şekil, durum ve fonksiyon bakımından birbirlerinden farklı iki gruba ayrılırlar.

Bunlar;

1. Sertoli hücreleri
 2. Spermatogenik hücreler (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler)
- (Leeson ve ark., 1988).

-Sertoli Hücreleri

Şekil olarak dar ve uzun sütunlara benzerler. Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri desteklemektedirler. Tabanları bazal membrana oturmuş, tepeleri ise lümeneye doğru uzanan yüksek boylu piramidal hücrelerdir. Çekirdekleri, ince uzun, hücrenin uzun eksenine paralel konumlu ve kromatince fakirdir. Bu nedenle çekirdekçikleri belirgin olarak göze çarpar (Johnson, 1991). Sertoli hücrelerinin çok sayıdaki lateral uzantıları spermatogenik seri hücrelerini sardığı için bunların sınırları ışık mikroskobunda kolay ayırt edilemez (Junqueira ve Carneiro, 2006). Elektron mikroskobunda Sertoli hücrelerinde bol miktarda granülsüz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi kompleksi, çok sayıda lizozom ve özellikle bazalde daha bol bulunan krista tipi mitokondriyonlar içerir. Bunların yanında glikojen, lipit damlacıkları ve albumin kristalleri gibi çeşitli sitoplazma inklüzyonlarına da sahiptir (Tanyolaç, 1999). İnsanlarda ender olarak çekirdek yakınında yer alan protein yapısında olduklarına inanılan kristalloid cisimcikler olan Charcot-Böttcher kristali de görülebilir (Ross ve Pawlina, 2011). Sertoli hücreleri bazolateral bölgelerinde, komşu Sertoli hücreleriyle sıkı bağlantı tipi bağlantıları oluştururlar. Bazolateral okludens bağlantılar, seminiferöz epiteli, bazal ve adluminal kompartmana bölerler ve gelişmekte olan spermatositleri ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyerinin esas yapısını oluştururlar. Erişkin testisindeki Sertoli hücrelerinin bölünme yeteneği yoktur, bu yüzden puberteye kadar seminifer tübül epitelinin dominant hücreleridir. Puberteden sonra, seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10-15'ini oluştururlar. Daha ileri yaştaki erkeklerde spermatogenik hücre popülasyonu azaldığı zaman, Sertoli hücreleri tekrar seminiferöz epitelin ana elamanı haline gelir (Abraham, 2006; Ross ve

Pawlina, 2011). Sertoli hücre proliferasyonu erkek çocuklarda perinatal olarak meydana gelir. Daha sonraki proliferasyon ve olgun hücelere farklılaşma puberte döneminde tekrar başlar (Dalgaard ve ark., 2002). Sıçanlarda Sertoli hücrelerinin proliferasyon periyodu gebeliğin 17-19. günlerinde başlar ve postnatal 15-20. günlere kadar devam eder (Orth, 1982).

Sertoli hücreleri spermatogenezis'te önemli görevlere sahiptir (Johnson, 1991).

Bunlar;

1. Sertoli hücreleri gelişmekte olan spermatozoaları destekler, korur ve onların beslenmesini sağlar (Young ve ark., 2000; Junqueira ve Carneiro, 2006).
2. Spermiogenezis sırasında fazla spermatid sitoplazması, artık cisimcik şeklinde bulunur. Sertoli hücreleri bu sitoplazmik parçacıkları ve apoptoza giden spermatogenik hücreleri fagosite eder (Junqueira ve ark., 2005; Nakagawa ve ark., 2005).
3. Sertoli hücreleri seminifer tübül lümen sıvısı, inhibin ve androjen bağlayıcı protein (ABP)'i üretirler. Sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgırlar. Androjen bağlayıcı protein sekresyonu ise Sertoli hücreleri tarafından, folikül stimüle edici hormon (FSH)'nin kontrolü altında sekrete edilir. Bu protein, testosteronu bağlayarak, hormonun seminifer tübül içerisinde birikmesini sağlar (Hansson ve ark., 1974).
4. Seminifer tübüller içinde, spermatogenezin normal devamı için, çok fazla miktarda testosteron bulunmaktadır (Zirkin ve ark., 1989). Bu hücreler içerisindeki testosteron, seminifer epitel mikroçevresini kontrol ederek, germ hücre farklılaşmasını düzenlemektedir (Meng ve ark., 2005).
5. Sertoli hücreleri, embriyonal gelişim sırasında, erkek fetusta glikoprotein yapıdaki anti- Müllerian hormon sentezler (Tran ve ark., 1987).
6. Sertoli hücreleri, olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla, spermiasyon sürecinde, seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırır.
7. Seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgırlar.
8. Gelişmekte olan spermatositleri ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bariyer, Sertoli hücreleri sıkı bağlantıları tarafından, sıkı bağlantı organizasyonu ise hücre iskeleti tarafından düzenlenmektedir (Wiebe ve ark., 2000).

Kan-testis bariyeri, spermatogenezin daha ileri safhalarındaki germinal hücreleri kandan gelen zararlı ürünlere karşı korur. Spermatogonyumlar bu bariyerin altında yerleşmiş olup kandaki maddelerden serbestçe yararlanabilmektedirler. Kan-testis bariyeri gelişen spermiler ile immün sistem arasındaki doğrudan etkileşimi engeller. Bu bariyer seminifer tübüllere immüoglobulinlerin geçmesini önler ve bu sayede serumlarında yüksek düzeylerde sperm antikorları bulunan hastalarda, herhangi bir fertilitte bozukluğu görülmez. Sertoli hücre bariyeri, bu şekilde seminifer epiteli herhangi bir otoimmün reaksiyondan da korumuş olur (Junqueira ve Carneiro, 2006). Kan-testis bariyeri sıçanlarda doğumdan sonra 16-19. günlerde oluşur (Krinke, 2000).

2.2.4. Spermatogenez

İnsanda spermatogonyumdan spermatozoon oluşumu arasında geçen süre yaklaşık 64 gündür ve bu sürece spermatogenezis adı verilir. Spermatogenez, aktif seksüel yaşam dönemi boyunca ön hipofiz gonadotropik hormonlarının uyarısı sonucunda, tümüyle seminifer tübüllerde gerçekleşir. Spermatogenez yaklaşık 13 yaşında başlar ve ileri yaşlarda belirgin şekilde azalarak yaşam boyu devam eder (Krinke, 2000).

Spermatogenik Hücreler (Germ Hücreleri)

4-8 hücre tabakası halinde düzenlenerek seminifer tübülde çok katlı epitel oluştururlar (Şekil 2). Bazalden lümene doğru hücre tipleri;

1. Spermatogonyumlar

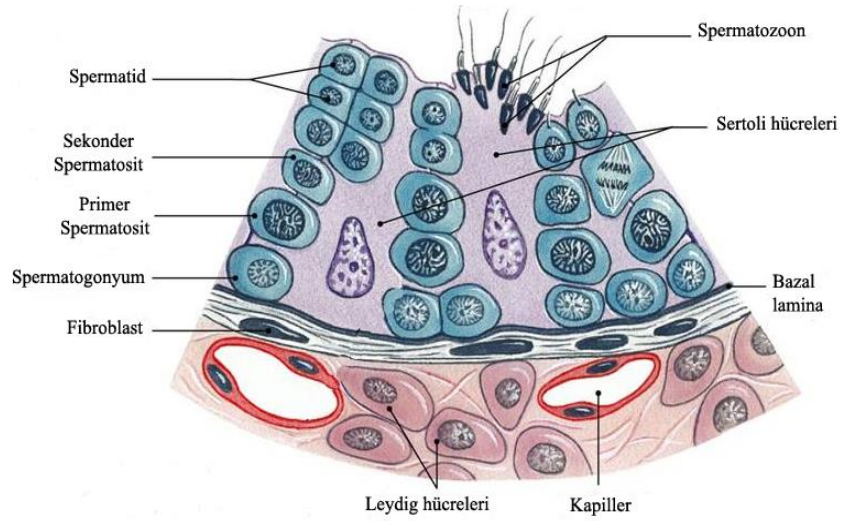
- a) Tip A koyu spermatogonyumlar
- b) Tip A açık spermatogonyumlar
- c) Tip B spermatogonyumlar

2. Spermatozoidler

- a) Primer spermatozoid
- b) Sekonder spermatozoid

3. Spermatozoidler

4. Spermatozoon



Şekil 2. Seminifer tübülde yer alan spermatogenik hücreler ve Sertoli hücreleri (Erkoçak, 1990'dan uyarlanmıştır)

1. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantıların altında yerleşim gösterdikleri için kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar (Ross ve Pawlina, 2011). Spermatogonyumlar, çekirdeklerinin büyüklüğü, biçimi, kromatin dağılımı ve histokimyasal özelliklerine göre Tip A ve Tip B olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Her çekirdek 46 kromozom içermektedir (Junqueira ve Carneiro, 2006).

Tip A koyu spermatogonyumlar: Seminiferöz epitelin kök hücreleridirler. Yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinli oval çekirdek içerirler. Puberteden itibaren mitotik hücre bölünmeleri geçirek ya tip A koyu spermatogonyumları ya da tip A açık spermatogonyumları oluştururlar.

Tip A açık spermatogonyumlar: Soluk boyanan, ince granüler kromatinli oval çekirdek içerirler. Mitoz ile çoğalan bu hücrelerin yarısı tip A olarak kalır, diğer yarısı da farklı olarak Tip B'ye dönüşür.

Tip B spermatogonyumlar: Merkezi yerleşimli çekirdekçik ve yuvarlak bir çekirdek içerirler. Çekirdek kromatini çekirdekçik çevresinde ve çekirdek kılıfı boyunca yoğunlaşma gösterir (Dellmann ve Brown, 1987). Tip B'nin mitozla çoğalmasıyla oluşan hücrelerin hepsi farklılaşarak primer spermatozitleri oluştururlar. Primer spermatozitler bazal membrandan uzaklaşır ve hacmi artar (Moore ve Persaud, 1993). Sıçanlarda doğumdan sonraki yaklaşık 50 gün olan puberte öncesinde erkek gonositler,

inaktif olarak dururlar. Pubertede bölünmeye başlar ve spermatogonyumları oluştururlar. Spermatogonyumlar canlı, spermatozoon üretme yeteneğini kaybedinceye kadar bölünmeye devam ederler (Krinke, 2000).

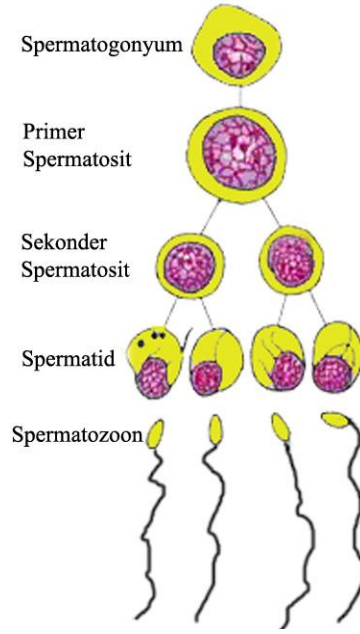
2. Spermatisitler

Tip B spermatogonyumlar mitozla çoğalır ve primer spermatisitleri oluştururlar. Hacim olarak en büyük olan bu hücreler, seminifer epitelin orta bölümünde bulunurlar ve oval şekillidirler. Primer spermatisitler, DNA sentez fazını tamamladıktan hemen sonra mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Bu sırada primer spermatisitin 46 (44+XY) kromozomu vardır ve DNA'sı 4 N'dir.

Primer spermatisitler oluştuktan hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girerler. Profaz safhası yaklaşık 22 gün sürdüğü için mikroskopta incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu primer spermatisitlerdir. İlk mayoz bölünme sonunda diploid kromozom sayısı haploid sayıya indirgenir ve böylece spermatogonyumlardaki 46 kromozom sayısı, I. mayoz bölünmenin sonunda oluşan sekonder spermatisitlere 23 kromozoma indirgenmiş olur. Hacim olarak daha küçük olan sekonder spermatisitler interfazda kısa süre kalıp hızla II. mayoz bölünmeye girdikleri için kesitlerde görülmeleri oldukça güçtür (Leeson ve Leeson, 1981; Junqueira ve ark., 2005; Kaya ve ark., 2006).

3. Spermatisidler

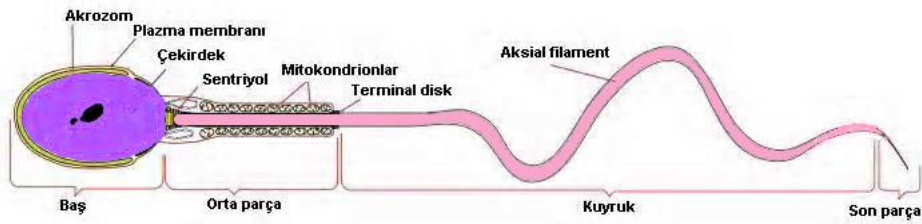
Sekonder spermatisitler mitoz bölünme ile 23 kromozomlu spermatisidleri oluştururlar. Spermatisidler, diğer hücrelerden daha küçük boyutları (7-8 µm çapında), yoğunlaşmış kromatin taşıyan çekirdekleri ve tübül lümenine yakın yerleşimleri ile tanınırlar (Junqueira ve Carneiro, 2006). Yeni meydana gelmiş spermatisid, merkezi yerleşimli bir çekirdek, iyi gelişmiş bir golgi kompleksi, çok sayıda mitokondriyonlara ve bir çift sentriole sahiptir (Bergman ve ark., 1996). Spermatisidler birbirleriyle sitoplazmik bağlantı yapan sınırsız hücre kümeleri oluştururlar. Bu hücreler bölünme sürecine girmez, Sertoli hücrelerinin derin çöküntüleri içerisine yerleşerek metamorfoza uğrar ve spermatozoona (spermium) dönüşürler (Şekil 3); (Leeson ve Leeson, 1981).



Şekil 3. Spermatogenez sırasında, spermatogonyumdan spermatozoona kadar devam eden hücresel farklılaşma evreleri (Gartner ve Hiatt, 2003'dan uyarlanmıştır)

4. Spermatozoon

Spermiyogenezis aşamasından sonra spermatisitler türe özgü biçimlerini kazanarak, spermatozoonlara dönüşürler (Dellmann ve Brown, 1987; Hassa ve Aştı, 1997). Spermatozoon olgun germ hücresidir. Erişkin insan spermatozoonu baş, gövde ve kuyruktan oluşur (Şekil 4); (Kaya ve Harrison, 1975).



Şekil 4. Spermatozoonun bölümlerini göstermektedir (Gartner ve Hiatt, 2003'dan uyarlanmıştır)

- **Baş**, akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek yassılaştı ve yoğun bir yapıdadır. Çekirdeğin ön yarısını akrozom örter ve hidrolitik enzimler (proteazlar, asit fosfatazlar, hyaluronidaz ve nöraminidaz) içerir. Genellikle akrozom, özel bir tip lizozom olarak kabul edilir ve döllenme sırasında oositi çevreleyen zona pellusida ve korona radiyata hücrelerinin aşılmasını sağlar (Leeson ve Leeson, 1981; Junqueira ve ark., 2005).

- **Gövde**, baş ve kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlayan bir çift sentriolün bulunduğu dar bir parçadır. Proksimal sentriol çekirdeğe tutunurken, distal sentriol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonemaya kaynaklık yapar.

- **Kuyruk**, yapısal yönden silyuma benzer. Kuyruk üç parçaya bölünmüştür; orta parça, esas parça ve son parça. Kuyruğun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonema ve aksonem ile mitokondriyal kılıf arasında 9 adet filamandan oluşan dış yoğun liflerden oluşur (Leeson ve Leeson, 1981; Ross ve Pawlina, 2011). Esas parça, kuyruğun en uzun parçasıdır. Orta parçadan farklı olarak yedi dış yoğun lif, fibröz kılıf ve merkezi aksonemden oluşur, mitokondriyon kılıf içermez. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturur. Son parça, sadece plazma membranı ile sarılmış 9+2 mikrotübüler aksonem içerir. Kuyruğun çok kısa bir parçasıdır (Junqueira ve ark., 2005; Kaya ve ark., 2006).

Normal olarak hareketli ve fertil sperm, flagellaların hareket yeteneği ile sıvı ortamda dakikada yaklaşık 1-4 mm hızla ilerleyebilir. Sperm aktivitesi ejakülat semeninde olduğu gibi, nötral ve hafif alkalik ortamda bir artış gösterir; ancak orta derecede asidik ortamda büyük ölçüde baskılanır. Kuvvetli asit ortam spermelerin hızla ölümüne neden olur. Sperm aktivitesi ısı artışı ile belirgin artış gösterir, ancak bu koşullarda metabolizma hızı da yükselerek spermin ömrünü önemli ölçüde kısaltır. Sperm testislerin genital kanallarında birkaç hafta canlı kalabildiği halde, kadın genital kanalında sadece 1 veya 2 gün yaşar (Ganong, 1999; Berne ve ark., 2008).

2.2.5. İnterstisyel Alan

İnterstisyel doku, testis dokusunun %25-30'unu oluşturur. Testisin serminifer tübülleri arasındaki alanlar; bağ dokusu elemanları, sinirler, kan damarları, lenfatik damarlar ve çeşitli hücreler tarafından doldurulmuştur. Bu hücreler fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, mezanşimal hücreler ve testisin interstisyel veya Leydig hücreleridir. Testiküler kapillerler pencereci tiptedir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine izin verirler (Junqueira ve ark., 2005; Ross ve Pawlina, 2011).

- Leydig Hücreleri

Testisin mezaşimal stromasından köken alan bu hücreler, hem yuvarlak hem de poligonal olabilen merkezi yerleşimli belirgin bir çekirdeğe ve çekirdekçiğe sahiptirler (Fawcett, 1966; Trainer, 1987). Yaklaşık olarak 15 µm çapında olan asidofilik hücrelerdir. Işık mikroskopunda vakuollü görünümüne sahip olan Leydig hücreleri, bazen iki çekirdek de içerebilmektedir (Abraham, 2006). Leydig hücreleri, interstisyel alanda tek tek ya da gruplar halinde yerleşmiştir (Ross ve Pawlina, 2011). Genellikle komşu Leydig hücreleri arasında 15-20 nm kalınlığında plazma membranı bulunur. Bununla beraber sık sık intersellüler alanda 2 nm kalınlığındaki darlıklarda oluklu bağlantılar (gap junction) gözlenir (Haider, 2004).

Leydig hücre sitoplazması, agranüler endoplazmik retikulum, küçük lipid damlacıkları, tübüler kristal mitokondriyonlar, lipofuksin granülleri ile Reinke kristallerine sahiptir. Reinke kristalleri sitoplazmada protein tabiatında bulunan çubuk şekilli kristalloidlerdir. Ancak bu kristallerin fonksiyonu bilinmemektedir (Leeson ve Leeson, 1981; Gartner ve Hiatt, 2003; Kaya ve ark., 2006). Leydig hücreleri sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler (Young ve ark., 2000). Testosteron sentezi mitokondriyon ve agranüler endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilir. Plazmada testosteronun %65'i androjen bağlayıcı protein olarak adlandırılan bir beta globuline, %33'ü ise albumine bağlı olarak bulunur (Junqueira ve Carneiro, 2006). Leydig hücrelerinde lüteinizasyon hormon (LH) reseptörleri bulunmaktadır. Bu reseptörlere LH'in bağlanmasıyla androjen salgısı başlamaktadır. LH, membrana bağlı olan adenilat siklazı stimule ederek siklik adenozin monofosfat (cAMP) yapımını katalize etmektedir. cAMP Leydig hücresinin sitoplazmasına girerek protein kinazların subünitlerine bağlanır ve kolesterolden pregnonolon ve androjen oluşmasını sağlar (Teerds ve ark., 1999; Kierszenbaum, 2006). Testosteron salgılanması lüteinizan hormon kontrolündedir. LH, Leydig hücrelerinin farklılaşması ve fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için temel faktördür (Ge ve ark., 2005). Serumda bulunan testosteronun yaklaşık %95'i seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG) ve diğer proteinlere tutunmuş halde Leydig hücreleri tarafından sentezlenir; kalan testosteron adrenal korteks tarafından üretilir (Bryniarski ve ark., 2005). Leydig hücreleri sentezledikleri testosteron hormonunu, birlikte buldukları kan veya lenf kapillerlerine boşaltarak endokrin sekresyon yaparlar (Eşrefoğlu, 2004).

LH, Leydig hücre proliferasyonunu direkt olarak veya indirekt olarak büyüme için destekleyen faktörlerin üretimini düzenleyerek uyarır. Yetişkin sıçan testislerinde ise Leydig hücre proliferasyonu az miktardadır (Teerds ve ark., 1999).

2.2.6. Sperm Analizi (Spermiyogram)

Sperm sayısı, hareketliliği ve morfolojisi gibi değerlendirmelerin yapıldığı teste sperm testi, sperm analizi veya spermiyogram denilmektedir. Sperm analizi, semenin hacmi, yoğunluğu, kıvamı, pH'ı, spermelerin sayısı, hareketlilik oranı, içerdiği akyuvar sayısı ve morfolojisi hakkında bilgi verir (Tablo 4); (Menkveld ve ark., 1990; Pryor ve Howards, 1997).

Tablo 4. Dünya Sağlık Örgütü kriterlerine göre normal semen kriterleri (WHO, 2002'dan uyarlanmıştır)

Semen Analizi Parametreleri	Normal Değerler
Volüm	2,0 ml veya daha fazla ejakulat
pH	7,2 – 8,0
Sperm konsantrasyonu	20 milyon spermatozoon/ml veya daha fazla
Total sperm sayısı	40 milyon spermatozoon/ejakulat veya daha fazla
Motilite	Ejakulasyonu takiben 60 dakika içerisinde, %50 veya daha fazlasının ileri hareket (progresyon) göstermesi veya %25 ya da daha fazlasının hızlı progresyon göstermesi
Morfoloji	%30 veya üzerinde normal formda sperm
Lökosit	1 milyon/ml' den az

Ejakulat Değerlendirilmesinde Terminoloji

- **Normozoospermi:** Sayı, hareket ve şekil bakımından normal spermeler >20 milyon/ml

- **Aspermi:** Ejakulatın (semenin) hiç gelmemesidir.

- **Azoospermi:** Ejakulatın olması fakat içerisinde hiç sperm olmamasıdır.

- **Oligospermi:** 20 milyon/mL 'den az sperm olmasıdır.

- **Şiddetli oligospermi:** 5 milyon/ml 'den az sperm olmasıdır.

- **Astenospermi:** Spermelerin motilitesi yani hareketlerinin zayıf olmasıdır.

- **Teratozoospermi:** Kruger kriterlerine göre normal şekilli sperm sayısı %4'ün altında olan spermeler için kullanılır.

- Polispermi:** Sperm sayısı 250 milyon'dan fazla olma durumudur.
- Hipospermi:** Ejakulat hacminin normalden az olmasıdır.
- Hiperspermi:** Ejakulat hacminin normalden fazla olmasıdır.
- Oligoastenozoospermi:** Hem sayı hem de hareket yönünden normal değerlerin altında olan sperm örnekleri için kullanılır.
- Oligoteratozoospermi:** Hem sayı hem de morfolojik yapı yönünden normal değerlerin altında olan sperm örnekleri için kullanılır.
- Oligoastenoteratozoospermi:** Hem hareket hem de morfolojik yapı yönünden normal değerlerin altında olan sperm örnekleri için kullanılır.
- **Hematospermi:** Ejakulatta kan hücrelerinin fazla olmasıdır.
- **Nekrospermi:** Ejakulat örneğinde ölü hücrelerin fazla olmasıdır (Makler, 1980; WHO, 2002).

Normal Sperm Morfolojisi

Morfolojik değerlendirmede DSÖ veya Kruger'in kesin kriterleri kullanılmaktadır. DSÖ kriterlerine göre, Kruger kriterleri daha prediktif olduğundan dolayı yardımcı üreme tekniklerinde sık kullanılmaya başlanmıştır. Gözlemci için daha kolay olması ve daha az subjektif klasifikasyonlar üzerine kurulduğu için Kruger kriterleri az varyasyonlar göstermektedir (Kruger ve ark., 1986). DSÖ kriterlerine göre normal değer $> \%30$ iken Kruger ve ark'larına göre, normal sperm morfolojisi $> \%14$ olmalıdır. Spermli $\%14$ ve üzerinde normal morfolojiye sahip olan erkekler in vitro fertilizasyon (IVF) sikluslarında normal fertilizasyon oranına sahiptir, $< \%4$ normal morfolojiye sahip olanlar ise düşük fertilizasyona sahiptir (Tablo 5; Şekil 5); (Kruger ve ark., 1986). Morfolojik değerlendirmede sperm baş, boyun ve kuyruk anomalileri yönünden dikkatle incelenmelidir (Duru, 1998). Sperm morfolojisi değerlendirilirken önce lam üzerine yayma yapılarak seçilen boya ile boyama yapılır. Değerlendirmede 100 veya 200 sperm incelenerek, % normal cinsinden sonuç verilir (Duru, 1998; Işık ve Vicdan, 1999).

Tablo 5. Kruger kriterlerine göre sperm morfoloji değerlendirmesi (Kruger ve ark., 1988'dan uyarlanmıştır)

Normal Sperm Morfolojisi	
Baş	Düz oval Uzunluk 5-6 μ Genişlik 2,5-3,5 μ
Akrozom	Başın %40 - %70'ini oluşturmali
Orta parça	Silindir şeklinde Genişlik 1 μ Uzunluk 1,5 x baş uzunluğu
Kuyruk	Boyu yaklaşık 45 μ Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış Kırık içermeyen
Sitoplazmik damlacık	Baş alanının %30-70'inden az Sadece orta parçada lokalize

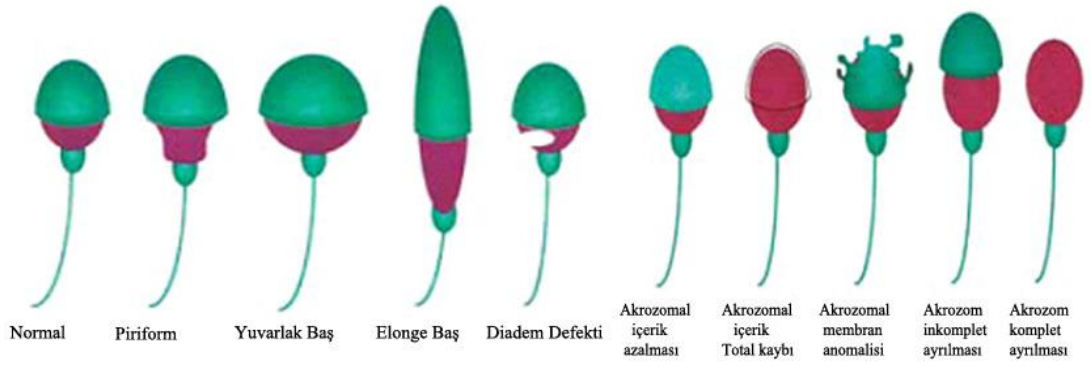


Şekil 5. Normal spermnin bölümleri görülmektedir (Orhon, 1995'dan uyarlanmıştır)

Sperm Anomalileri

- Baş Defektleri

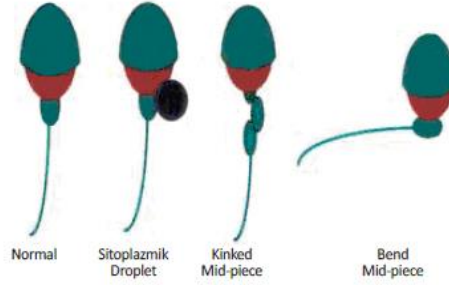
Büyük, küçük, incelmış (elonge), armut (piriform) şekilli, çift başlı, amorf, başsız (pinhead), vakuollü, büyük akrozomlu (baş hacminin % 70'inden daha büyük bir alanı kaplaması), küçük akrozomlu (baş hacminin % 40'ından daha küçük bir alanı kaplaması) olabilir (Şekil 6).



Şekil 6. Sperm baş defektleri görülmektedir (Orhon, 1995'dan uyarlanmıştır)

- Boyun ve Orta Kısım Defektleri

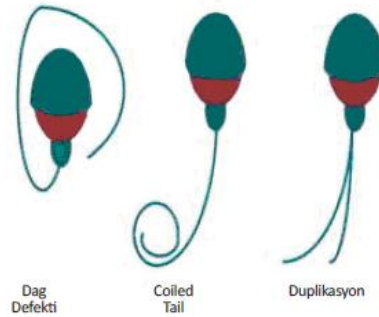
Kırık boyun (baş ile arasında 90 dereceden az açı olması) olabilir ve sitoplazmik atık içerebilir (Şekil 7).



Şekil 7. Sperm boyun defektleri görülmektedir (Orhon, 1995'dan uyarlanmıştır)

- Kuyruk Defektleri

Kısa, kalın, çift kuyruk, kıvrık kuyruk, halka kuyruk, dag defekti (kuyruğun baş etrafında daire çizmesi) veya bunların kombinasyonundan oluşabilir (Şekil 8); (Blom, 1966; Menkveld ve ark., 1990).



Şekil 8. Sperme ait kuyruk defektleri görülmektedir (Orhon, 1995'dan uyarlanmıştır)

Morfolojik değerlendirmenin başlıca amacı normal ve anormal spermatozoonların ayırt edilmesidir çünkü morfolojik bozukluğın yeri, türü ve miktarının fertilit ile sıkı bir ilişkisi olduğu ve anormal yapıdaki spermatozoonların fertilit yeteneklerinin olmadığı bilinmektedir (Menkveld ve ark., 1990).

İnfertilite (kısırlık), genel olarak üreme fonksiyonunun yerine getirilememesidir. Bir yıl içerisinde korunma yöntemi olmadan sürdürülen düzenli bir cinsel yaşama rağmen gebelik sağlanamamasına infertilite adı verilir (Poongathai ve ark., 2009).

İnfertilite olgularında, en önemli patolojik özelliklerden biri normal sperm morfolojisindeki sapmalardır. Günümüzde erişkin erkeklerin yaklaşık %6'sı infertilite ile karşı karşıyadır (Purvis ve Christiansen, 1992).

Erkek infertilite nedenlerinden bazıları; varikosel, kriptorēidizm (inmemiş testis), testis torsiyonu, seminal kanal enfeksiyonları, üreme kanallarının tıkanması, kistik fibrozis, travma ve tümörlerdir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda artmiş vücut kitle indeksinin semen parametreleri üzerinde olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (Kort ve ark., 2006). Son 50 yıldır sperm sayısında azalma olduğu dikkat çekmektedir. Araştırmalarda sperm sayısının ABD'de her yıl %1,5 oranında düştüğü belirtilmektedir. Sperm sayısındaki bu azalmanın özellikle obezitenin yüksek olduğu bölgelerde daha fazla olduğu görülmektedir (Swan ve ark., 2000). İbni Sina "The Canon of Medicine" adlı kitabında obezite infertilite ilişkisinden bahseden ilk kişidir. İbni Sina'nın kitabında "aşırı kilonun sağlıkla ilgili dezavantajları" başlıklı bölümünde bu kişilerin soğuk karakterlerde olduğu, bu nedenle düşük sperm sayısına sahip oldukları ve gebelik sağlayamadıkları bildirilmektedir (Abdel-Halim, 2005).

2.2.7. Erkek Kısırlığının Nedenleri

Hormonal etkenler: Beyinden salgılanan bazı hormonların eksikliği ya da fazla olması sperm yapımına etkileyebilir.

Metabolik sebepler: Diyabet, obezite, psikoseksüel bozukluklar.

İlacı bağlı sebepler: Anti-depresan tarzı ilaçların ogu kısırlığa neden olur. Tansiyon ilaçlarının bazıları da aynı etkiyi gösterebilir.

Genetik anomaliler ve bunlara bağlı bozukluklar (Klinefelter sendromu)

Testisin karın içinde olması (İnmemiş testis) nemli kısırlık nedenlerinden biridir.

Kabakulak: Ergenlik sonrası geçirilen kabakulak kısırlık nedenidir. Aşırı sıcaklık da spermi etkileyen sebepler arasındadır.

Kemoterapi geçirmiş olmak: Genelde kemoterapi öncesinde sperm dondurma işlemi yapılır.

Radyasyona maruz kalmak kalıcı kısırlık nedeni olabilir.

Varikosel: Testisten çıkan toplardamarların aşırı ve anormal olarak büyük oluşu genişlemiş olması

Torsiyon: Testislerin ani bükülmesi.

Bağışıklık sistemine bağlı sorunlar: Vücut spermi yabancı madde olarak kabul edebilir.

Epididimise bağlı nedenler: Epididimin olmaması, tıkalı olması veya iltihaplanmış olması ve enfeksiyon sonrası kanalların tıkanması (Yıldırım, 1994; Dere, 1999).

2.2.8. Obezite ve İnfertilite İlişkisi

Obezite endokrinolojik, termal ve genetik mekanizmalarla erkek fertilitasını olumsuz şekilde etkilemektedir. Obez erkeklerde vücut kitle indeksi arttıkça periferik yağ dokusunda daha fazla androjen östrojene dönüşmekte ve serum total testosteron seviyeleri düşmektedir (Kopelman, 1994; Zumoff ve ark., 2003). Östradiol, Leydig hücrelerinden ve periferik aromatazasyon ile androjenlerin östrojenlere dönüştürülmesi ile elde edilmektedir (MacDonald ve ark., 1979). Aromataz enzimi yağ dokusunda bulunur. Yağ dokusu periferik aromatazasyonun yapıldığı temel yerdir (Bolt ve Göbel, 1972).

Obez bireylerde yağ dokusunda aromataz enzim ekspresyonunun artmasına bağlı olarak daha fazla testosteron östradiol ve östronon dönüştürülür böylece obez bireylerde androjenlerin östrojene dönüşümünün de arttığı bildirilmektedir (Cohen, 2001). Yüksek östrojen seviyelerinin hayvan modellerinde spermatogenezde olumsuz etki gösterdiği belirtilmiştir (Hammoud ve ark., 2006). Bu konuyla ilgili yapılan çalışmada Hammoud ve arkadaşları obezite ile östradiol seviyeleri arasında denge sağlayan aromataz enzim polimorfizmi olduğunu bildirmişlerdir (Hammoud ve ark., 2010). Sonuçta obezite ile artmış östradiol ve buna bağlı olarak azalan total ve serbest testosteron seviyeleri fertilitayı olumsuz yönde etkilemektedir (Wu ve ark., 1982). Yapılan çalışmalarda VKİ'

deki artışla orantılı olarak Oligospermi görülme sıklığı normal kilolu erkeklerde % 5,3'den obez erkeklerde %15,6'ya; astenospermi normal kilolu erkeklerde % 4,5'den obez erkeklerde % 13,3' e çıktığı görülmektedir (Kort ve ark., 2006). Obezitenin skrotal ısıyı arttırması da infertilite ile ilişkili bulunmuştur (Hjollund ve ark., 2000; Jung ve Schuppe, 2007).

Obez erkeklerde vücudun diğer yerlerinde olduğu gibi skrotum civarındaki yağ dokusu da artacağı için toksinlerin bu bölgede birikerek doğrudan spermatogenezi etkileyebileceği bildirilmektedir. Skrotal ısı artışının infertilite ile ilişkili olduğu yapılan klinik ve deneysel çalışmalarla da ortaya konmuştur (Jung ve ark., 2008). Buna göre skrotal lipomatozis skrotal ısıyı artırarak spermatogenezi bozabilmektedir. Obez olguların belirgin artmış skrotal yağ oranlarının olduğu gösterilmiştir. Obez olgularda hem skrotal yağın artması hem de bu olgularda sedanter yaşamın hakim olması skrotal ısıyı arttırmaktadır (Shafik ve Olfat, 1981). Bunların yanında obez bireylerde artan serbest oksijen radikalleri (SOR) oksidatif strese neden olmakta ve sperm kalitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Tunc ve ark., 2011; Erdemir, 2013). Bir hipoteze göre, H₂O₂ hücre membranını geçmekte ve daha sonra spermatozoa tarafından SOR üretimini arttırmak için elektron kaynağı olarak NADPH oksidaz olarak bilinen enzim sistemi tarafından kullanılacak olan NADPH'nin hücre içinde elde edilmesini sağlayan heksoz monofosfat şantı yolu ile glukoz-6-fosfat dehidrojenaz gibi bazı vital enzimlerin işlevini engellemektedir (Aitken ve ark., 1997). Bir diğer hipotez ise aksonemal proteinlerin fosforilasyonunda ve sperm hareketliliğinde azalma ile sonuçlanan bir dizi olaya dayanır ki, her ikisi de sperm-oosit füzyonunda gerekli olan membran akışkanlığında azalmaya neden olmaktadır. Sonuç olarak hücre içinde artan SOR seviyeleri patolojik mekanizmalarda rol almaktadır (de Lamirande ve Gagnon, 1992).

2.3. *Nigella Sativa* (Çörek Otu)

Nigella (*Nigella sativa* L.) , Ranunculaceae (Düğün çiçeği) familyasına mensup (al-Gaby, 1998) ve çoğunlukla Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde yetişen otsu bir bitkidir. Halk arasında bilinen adıyla çörekotu, *Nigella sativa* (NS) türü bitkilerin kapsül içerisinde oluşan tohumudur. *Nigella* tohumu yağının insan sağlığı ve beslenmesinde çok önemli bir yeri vardır (Gad ve ark., 1963; al-Gaby, 1998). *N. sativa* tohumu gıda amaçlı olarak ve farmasötik alanda çeşitli kullanımlara sahiptir. Kapsül formdaki yağı,

sedef hastalığı ve egzema gibi deri rahatsızlıklarının tedavisinde, yağın balmumu ile karışımı ise yanıklar, deri enfeksiyonları, eklem ağrılarını azaltmada, nemlendirici ve kırışık önleyici olarak kozmetikte kullanılmaktadır. Tohumları doğal bir ilaç olarak kullanıldığı gibi baharat, karminatif, çeşni ve aromatik amaçlı kullanımlara da sahiptir. Tohum çay, kahve veya ekmeklere eklenmekte; konserve üretiminde kullanılmaktadır (D'Antuono ve ark., 2002). *N. sativa* tohumunun diğer maddelerle farklı kombinasyonlarda hazırlanan bileşikler ağız kokusunu gidermenin yanında diyare, hazımsızlık, iştah kaybı, kusma, ödem, lohusa dönemi ile ilgili hastalıklarda yararlı olduğu bilinmektedir. Tohumlar, obezite ve nefes darlığında, kronik baş ağrısı ve migrende faydalıdır. Civa zehirlenmesi, deri ülserleri ve leprada yararlıdır. Egzema, çil ve sivilce tedavisinde haricen kullanılmaktadır. Antihelmintik ve antibakteriyel ajan olarak kullanımları da mevcuttur (El-Dakhkhny ve ark., 2000; Ali ve Blunden, 2003; Ramadan, 2007). Bu denli önemli geleneksel kullanımlara sahip olan *N. sativa* üzerinde yapılmış çok sayıda fitokimyasal ve biyoaktivite araştırmaları mevcuttur (Khan, 1999; Ali ve Blunden, 2003; Salem, 2005; Ramadan, 2007).

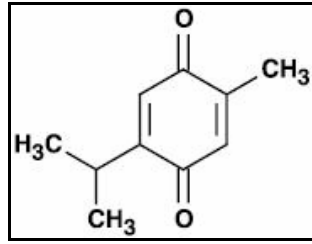
Nergiz ve Ötles (1993), çörekotu tohumlarında %32 yağ bulunduğunu ve yağ asiti bileşiminin % 1,2 miristik, % 11,4 palmitik, % 2,9 stearik, % 21,9 oleik, % 60,8 linoleik az miktarda araşidik ve % 1,7 eikosadienoik asitlerinden oluştuğunu bildirmişlerdir. *Nigella sativa* tohumları yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ile analizlenmiş ve temel bileşenlerinin timokinon (TQ), ditimokinon (DTQ), timohidrokinon (THQ) ve timol (THY) olduğu saptanmıştır (Omar ve ark., 1999).

Çörekotu yağı, çoklu doymamış yağ asitlerince özellikle de linoleik asitce zengin olup, Atta (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, linoleik asit miktarının diğer yağ asitlerine göre en fazla olduğu bildirilmiştir. Çörekotu sabit yağdan başka uçucu yağ da içermektedir. Uçucu yağ miktarı % 0,01-0,1 arasında değişmekte ve bileşimi çoğunlukla p-simen (% 31,7), timokinon (% 24,5), P-pinen (% 9,3)'den oluşmaktadır (Akgül, 1993). Yapılan fitokimyasal araştırmalarda uçucu yağda bulunan timokinonun birçok biyolojik etkiden sorumlu olduğu ortaya konmuştur.

2.3.1. Timokinon (TQ)

Timokinon, Ranunculaceae familyasına ait bir tür olan *Nigella sativa* bitkisinin tohumlarının uçucu yağından elde edilen ve en fazla etkin olduğu düşünülen bileşenidir

(Boskabady ve ark., 2004; Arslan ve ark., 2005). Kimyasal yapısı, $C_{10}H_{10}O_2$; 2-izopropil-5-metil-1,4-benzokinon, molekül ağırlığı 164,2'dir (Şekil 9). Uçucu yağda %27,8 – 57 oranında bulunur (Hosseinzadeh ve Parvardeh, 2004). Timokinon ilk olarak 1959 yılında sentez edilmiştir (Al-Ghamdi, 2001). Bu bitkinin tohumlarından elde edilen yağın içindeki etken maddeler ve onların izole bileşenleri antioksidan, antiinflamatuvar, antikanser, antimikrobiyal, immunomodulator özelliklerinden dolayı araştırılmakta ve çalışmalara devam edilmektedir (Salem, 2005).



Şekil 9. Timokinon'un kimyasal yapısını göstermektedir (Mahgoub, 2003'dan uyarlanmıştır)

2.3.2. Timokinon Toksisitesi

Son zamanlarda çörek otuna olan ilginin artması sonucu etken maddelerinden birisi olan timokinon'un toksik etkilerinin araştırılması ihtiyacı ortaya çıkmış ve bu etken madde yapılan bir çalışmada test edilmiştir. TQ'un LD50 değeri tespiti için biyokimyasal, hematolojik ve hispatolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla TQ değişik yollarla (ağız ve enjeksiyon yoluyla) verilmiş ve hayvanların karaciğer, kalp, böbrek ve akciğerleri histopatolojik olarak incelenmiş; sonuç olarak herhangi bir toksik etkiye rastlanmamıştır. Ayrıca ağız yoluyla alınan timokinonun toksisitesinin olmadığı ve kanda yeterli düzeye ulaştığı gösterilmiş, bu yolun en etkin ve güvenli olduğu belirtilmiştir (Al-Ali ve ark., 2008). Sonuç olarak TQ'un akut toksisitesinin çok düşük olduğu (LD50: 2,4 gr/kg) saptanmıştır. TQ'un sürekli verilmesi sonucu görülen tek etki hipoglisemidir (Hosseinzadeh ve Parvardeh, 2004). Ayrıca çalışmalarda *Nigella sativa* sabit yağı ile işlem yapılan farelerde vücut ağırlığının artışında yavaşlama olduğu tespit edilmiştir (Zaoui, 2002).

2.3.3. Anti-Diyabetik Etki

Diabetes Mellitus direk veya dolaylı olarak insülin noksanlığına bağlı bir sendromdur. Karaciğer kan şekeri homeostazında merkezi bir rol oynar. Diyabetik durumda, heksokinazın ve glukoz-6-fosfat dehidrogenazın aktiviteleri insülin eksikliği

veya yetersizliğine bağlı olarak azalır. Timokinon, insülin salınımıyla her iki enzimin de hepatik dokulardaki aktivitesini artırır. Buna bağlı olarak glukozun hücresel biyosentezde kullanımı artar ve plazma glukoz seviyelerinde belirgin bir düşüş gözlenir. Pari ve Sankaranarayanan (2009), kontrol ve deney fare gruplarında hekzokinaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimlerinin aktivitelerini ölçerek timokinonun bu enzimlerin aktivitelerini arttırdığını göstermişlerdir.

Çalışmalarda TQ'un antidiyabetik etkisinin kısmen hepatik glukoneogenez aracılığıyla olduğu gösterilmiştir (Fararh ve ark., 2005). Al-Hader ve arkadaşlarının yaptıkları bir araştırmada *N. sativa* tohum uçucu yağı 50 g/kg dozda intraperitoneal verilmiş 4-6 saat sonra normal ve hiperglisemik tavşanlarda kan glukoz konsantrasyonunda %15-23 oranında bir azalma saptanmıştır ve insülin konsantrasyonunun tedaviden etkilenmediği belirlenmiştir (Al-Hader ve ark., 1993).

2.3.4. Anti-Bakteriyel Etki

Yapılan çalışmalarda *N. sativa* uçucu yağının hem Gram(+) hem de Gram(-) mikroorganizmaların büyümesini inhibe ettiği görülmüştür. Fraksiyonlama işlemlerinden sonra yağın biyolojik aktivitesinin, fenolik içeriğinden kaynaklandığı ve *N. sativa*'nın sulu metanollü ekstresinin *Streptococcus mutans*'a karşı antibakteriyel aktivite gösterdiği açıklanmıştır. Bitki ekstresinin böylece diş çürümesi ve plakların önlenmesinde etkisi kanıtlanmıştır (Khan, 1999). *N. sativa*'dan elde edilmiş etilen glkoldeki çözeltisinin ve uçucu yağının invitro olarak bazı mikroorganizmalara (*Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *S. typhi*, *S. niger*, *Vibrio cholerae*) 1:100 dilüsyonda bile iyi bir antibakteriyel etki gösterdiği saptanmıştır. Yağın Gram(+) ve Gram(-) mikroorganizmalara karşı çok etkili olduğu ve ayrıca özellikle *Aspergillus penicillium* ve *Mikrosporium* türlerine karşı in vitro antifungal aktivitesi test edilmiş ve mükemmel antifungal aktivite gösterdiği bulunmuştur (Ali ve Blunden, 2003).

2.3.5. Anti-Fungal Etki

Nigella sativa tohumunun ve etkili bileşiği timokinon'un antifungal etkisi *Trichophyton rubrum*, *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes*, *Epidormophyton floccosum* ve *Mikrosporium canis*'e karşı test edilmiştir. Sonuçlar antifungal bir ilaç kaynağı olarak *Nigella sativa*'nın kullanılabileceğini göstermiştir ve mantar enfeksiyonlarında halk

ilacı olarak kullanılmasında yararlı olabileceği belirtilmiştir (Aljabre ve ark., 2005). Başka bir çalışmada fareler, *Candida albicans* ile enfekte edildiğinde karaciğer, dalak ve böbreklerde koloniler oluşturmaktadır. Böyle bir model kullanılarak *Nigella sativa* tohumlarının sulu ekstresinin antifungal etkisi incelendiğinde, *Candida albicans* enfeksiyonundan 24 saat sonra başlayarak 3 gün süreyle enfeksiyonlu farelerin her gün muayene edilmesi sonucu, incelenen bütün organlarda mantar büyümesinin belirgin bir şekilde inhibe olduğu gözlenmiştir (Khan ve ark., 2003).

2.3.6. Anti-Viral Etki

Yapılan bir çalışmada *N. sativa* yağının bir anti-viral ilaç olarak terapötik potansiyeline işaret edecek şekilde yağın sitomegalovirüs (CMV) enfeksiyonuna karşı güçlü bir anti-viral etki oluşturduğu in vivo denemelerle gösterilmiştir. Etkinin kalıtsal bağışıklık üzerine yağın potansiyel etkisi ile ilişkili olduğu öne sürülmüştür (Salem ve Hossain, 2000; Su ve ark., 2001; Salem, 2005).

2.3.7. Anti-Allerjik Etki

1965 yılında yapılan bir çalışmada *N. sativa* tohum uçucu yağından izole edilen nigellon, bronşiyal astımlı hastalara oral yoldan verilmiş ve semptomların baskılandığı saptanmıştır (El-Dakhakhny, 1965). Alerjik rinit, bronşiyal astım, atopik egzema gibi allerjik hastalıkları taşıyan hastalara *N. sativa* yağı verilmiş ve IgE'de ve eozonofil sayısında, plazma ve ürin endojen kortizol seviyelerinde azalma olduğu belirlenmiştir (Chakravarty, 1993). El-Tahir ve ark. (1993) yaptığı bir çalışmada kobayların solunum sistemi üzerinde *N. sativa* uçucu yağının ve timokinonun etkileri araştırılmıştır. Yağın intravenöz olarak verilmesi doza bağımlı bir yolla direkt olarak histaminerjik mekanizmalar ile histamin salınımı aracılığıyla ve muskarinik kolinerjik mekanizmaların indirekt aktivasyonu ile solunum oranı ve intratekal basıncın her ikisini de artırdığı görülmüştür. Mukozal histamin içeriğinde anlamlı bir artışa sebep olan etanolün gastrik ülser modellerinde ülser oluşumundan önce *N. sativa* yağının oral uygulanması ile sıçanlarda etanol gruplarıyla karşılaştırıldığında %53,56'lık bir koruma oranıyla gastrik mukozal histamin içeriğinde anlamlı bir azalma gözlenmiştir (El-Dakhakhny ve ark., 2000).

2.3.8. Anti-İnflamatuvar Etkiler

İnflamasyonun akut ve kronik fazlarının devamlılığı ve ilerlemesi bir miktar mediatör tarafından sağlanır. Bunlar, eikosanoidler, oksidanlar, sitokin, makrofaj ve nötrofil gibi inflamator hücreler tarafından salgılanan litik enzimlerdir (Lefkowitz ve ark., 1999). Başta nitrik oksit (NO) olmak üzere reaktif oksijen türleri, doku hasarına yol açan birçok toksik oksidatif reaksiyon başlatır. *Nigella sativa*'nın anti-inflamatuvar aktiviteleri hücrel NO oluşturma kapasitesinin inhibisyonu yolu ile belirlenmiştir. Pekçok dokuda nitrik oksit sentaz (NOS) aracılığıyla L-argininden sentezlenen NO birçok inflamatuvar hastalıkla ilişkilendirilir (Bourgou ve ark., 2010). *Nigella sativa* tohum yağı ve bileşenleri üzerinde yapılan çalışmaya göre timokinon, NO üretimini %95 oranında inhibe etmektedir. Timokinonun NO üretimi üzerindeki inhibisyon etkisi uyarılabilir SOR mRNA'sı ve protein ekspresyonunu azaltma yoluyla gerçekleşmektedir (El-Mahmoudy ve ark., 2002).

2.3.9. Santral Sinir Sistemi Üzerine Etkileri (SSS)

N. sativa tohumlarının SSS üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada NS tohumlarının sulu ve metanollü ekstresi, genel davranış biçimlerinde bir değişiklik, anlık hareketlilikte önemli azalışlar, vücut sıcaklığında düşüş, hot plate ve basınç testlerinde önemli analjezik etki, SSS üzerinde sakinleştirici etki ve kas gevşetici gibi SSS baskılayıcı etkileri olduğu saptanmıştır (Al-Naggar ve ark., 2003). Kanter'in yaptığı bir araştırmada NS ve TQ'un sıçanlarda kronik toluen maruziyetinden sonra hipokampusteki nörodejenerasyonu üzerine etkilerini çalışmıştır. Çalışmada kronik toluen maruziyeti sitoplazma büzülmesi, endoplazmik retikulum boşluğunda hafif genişleme, dejenerasyona uğramış krista ile belirgin bir şekilde şişmiş mitokondri ve hipokampus nöronlarındaki kromatin düzensizliği ile bozulmuş nükleer membran gibi güçlü dejeneratif değişikliklere neden olmuştur. Deforme olmuş sinir hücrelerine TQ ve NS tedavisi alan sıçanlarda büyük ölçüde rastlanmamıştır. Sonuçta TQ ve özellikle NS tedavisinin kronik toluene maruz kalmış sıçanların hipokampuslarındaki nörodejenerasyon üzerinde olumlu morfolojik gelişmeler sağladığı belirtilmiştir (Kanter, 2008).

2.3.10. Anti-Hipertansif Etki

NS tohumlarının diklorometan ekstresi hipertansiyonlu farelerde hipotansif etkisi araştırılmıştır. Farelere 0,6 mL/kg/gün dozda oral olarak NS ekstresi 15 gün boyunca verilmiş ve idrar sıklığını % 16-30 oranında artırdığı; Cl^- , Na^+ , K^+ ve ürenin idrarla atılması da arttığı gözlemlenmiştir. Aynı zamanda arter kan basıncı % 22 oranında düştüğü saptanmıştır. NS tohumlarının hipotansif etkisi kısmen idrar söktürme özelliğinden kaynaklanabileceği bildirilmiştir (Zaoui ve ark., 2000).

2.3.11. Analjezik Etki

NS'nin sulu ekstresinin farelerde hot-plate yöntemi ile analjezik etkisi ölçülmüş ve ekstrenin anlamlı derecede analjezik etkisinin olduğu saptanmıştır (Al-Ghamdi, 2001).

2.3.12. Anti-Tümör Etki

Kanserin gelişmesine neden olan temel değişiklik, kanser hücrelerinin sürekli ve kontrolsüz olarak çoğalmasdır. Hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu ortaya çıkan hücre topluluklarına tümör denir. Birçok in-vivo ve in-vitro çalışma ile NS tohumlarının ve aktif bileşenlerinin anti-tümör etkileri gösterilmiştir. NS tohumlarının uçucu yağının etkileri, insanlarda görülen farklı kanser türleri üzerinde araştırılmış ve yağın bazı türlere karşı sitotoksik etki gösterdiği bulunmuştur (Islam ve ark., 2004). Yapılan çalışmalarda timokinonun pek çok kanser türünde hücre çoğalmasını durdurucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir. Etkili olduğu kanser türleri; göğüs ve over adenokarsinoması (Shoieb ve ark., 2003), kolorektal kanser (Gali-Muhtasib ve ark., 2004), insan pankreatik adenokarsinomu, rahim sarkoması (Worthen ve ark., 1998), neoplastik keratinosit (Gali-Muhtasib ve ark., 2004), insan osteosarkoması (Roepke ve ark., 2007), fibrosarkoma, akciğer sarkoması (Kaseb ve ark., 2007) olarak sıralanabilir. Ayrıca timokinonun, androjen reseptörü ve transkripsiyon faktörü E2F-1'i hedefleyerek hormon-refraktör (cevap vermeyen) prostat kanserini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Kaseb ve ark., 2007). Swamy ve Tan (2000), MCF-7 göğüs kanseri hücrelerinin NS'nin sulu ve alkollü ekstraktlarının tek başına veya H_2O_2 ile birlikte muamele edilmesiyle, söz konusu hücre büyümesinin durduğunu göstermiştir. NS'nin ham ekstraktının anti-tümör etkilerinin yanında, timokinon, ditimokinon ve diğer aktif

bileşenlerinin de sitotoksik etkileri vardır. Timokinon ve ditimokinon farklı kanser hücre gruplarına karşı eşit sitotoksik etki gösterdiği düşünülmektedir (Salomi ve ark., 1992). Bu bileşenler, kanser hücrelerinin büyümesini, hücre döngüsü G₁ fazındayken apoptozu tetikleyerek durdurur. Radyoterapi kanser tedavisinde en sık kullanılan tedavilerden biridir. Pek çok çalışma, ışın tedavisinin hücrelerdeki radyasyon hasarında önemli rol oynayan serbest oksijen radikallerini oluşturduğunu göstermiştir. NS ve indirgenmiş glutatyonun (GSH) farklı dokular üzerinde antiperoksidatif etki ve SOR üzerinde süpürücü bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Cemek ve ark., 2006). Kumara ve arkadaşları NS yağının taşıdığı α -hederin'in de lösemiye ve akciğer karsinoma'sına karşı in-vivo antitümör aktivite gösterdiğini ve tümörlü farelerin ömrünü uzattığını bildirmiştir (Kumara ve Huat, 2001). El-Dakhakhny ve ark. (2002) timokinonun kolon kanseri hücrelerinin yaşayabilmesi için gerekli olan 5-hidroksieikosa-tetraenoik asit, 5-lipooksigenaz gibi ürünlerin oluşumunu inhibe ettiğini göstermiştir.

2.3.13. Anti-Oksidan Etkiler

Antioksidanlar, dokulardaki oksidasyonun zararlı etkilerini önlemekten sorumlu bileşiklerdir (Kuhn, 2003). Antioksidan sistemler, radikal oluşumunu önleme, tetikleri biyokimyasal reaksiyonları engelleme, oluşan radikalleri ortamdan uzaklaştırma, hasar gören molekülleri onarma ve temizleme gibi radikallere karşı meydana gelmiş mekanizmalardır. NS tohumları bileşenlerinden timol, timokinon ve ditimokinonun süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen (¹O₂) gibi radikal oksijen türlerinden meydana gelen reaksiyon üzerine etkisi test edilmiş ve bu bileşenlerin çeşitli SOR süpürücüsü olarak görev yaptıkları belirtilmiştir (Kruk ve ark., 2000). Birçok çalışmada timokinonun farklı mekanizmalarla antioksidan etkileri olduğu bildirilmiştir. Burits ve Bucar (2000), tarafından yapılan bir çalışmada NS tohumlarının uçucu yağının antioksidan aktivitesi üzerindeki etkisi çalışılmış ve sonucunda timokinon, karvakrol, *t*-anetol ve 4-terpineol'ün önemli ölçüde radikal süpürücü aktivite ve çeşitli antioksidan aktivite gösterdiği gözlenmiştir. Söz konusu bileşenler ve yağı aynı zamanda lipozomlardaki non-enzimatik lipid peroksidasyon deneyi ve deoksiriboz degradasyon deneyi için etkili bir OH radikal süpürücü ajan olarak rol oynamıştır.

Epidemiyolojik çalışmalarda antioksidanlarca zengin gıdaların tüketilmesiyle kanser riskinin azaltılabildiği gösterilmiştir (Borek, 2004). Badary ve ark. (2007)

timokinonun karsinogenezdeki potansiyel koruyucu rolü üzerinde çalışmışlardır. Buna göre timokinon, lipid peroksidasyonu ve hücresel antioksidan çevreyi modüle ederek karsinogenez prosesini inhibe etmektedir. Sonuçlar timokinonun etkili bir süperoksit anyon süpürücü olarak rol oynadığını ve güçlü bir antioksidan olduğunu göstermiştir (Badary ve ark., 2003).

2.4. Cruciferae Bitkileri

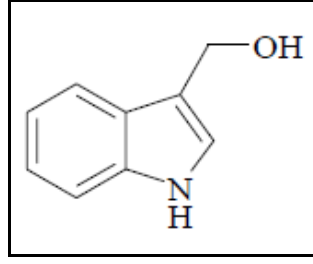
Yüksek oranda tedavi amaçlı kullanılan bileşikler içeren Cruciferae bitkileri son yıllarda büyük öneme sahip olmuştur ve bu bitkilerle yapılan çalışmaların sayısı devamlı artmaktadır (Baytop, 1999; Çubukçu ve ark., 2002). Cruciferae familyasında bulunan sebzelerin dünyada en çok tüketilen sebzeler arasında olduğu ve yapılan çalışmalarda tüketiminin böbrek, prostat, kolon, idrar kesesi, akciğer ve rektum kanser riskini azalttığı saptanmıştır (Bonnesen ve ark., 2001; Conaway ve ark., 2002).

Günlük yaşantımızda bolca tükettiğimiz Cruciferae familyasına ait bazı bitkiler şunlardır; *Brassica oleracea* var. *italica* (Brokoli), *B. oleracea* var. *acephala* (Karalâhana), *B. oleracea* var. *capitata* (beyaz lahanası), *B. oleracea* var. *botrytis* (Karnabahar), *B. oleracea gemmifera*, (Brüksel lahanası), *B. rapa* (şalgam), *B. nigra* (siyah hardal), *Sinapis alba* (beyaz hardal), *Raphanus sativus* (Turp), *Eruca sativa* (Roka), *Lepidium sativum subsp. sativum* (Tere)'dir.

Bu bitkilerle yapılan fitokimyasal araştırmalar, bitkilerin glukosinolatlar ve indol-3-karbinol bileşiklerince zengin olduklarını ortaya çıkarmıştır. Glukosinolatlar ve indol-3-karbinol, özellikle kanser tedavisinde ve kanser oluşmasının önlenmesinde etkili olduğu düşünülen ve üzerlerinde halen çalışmaların devam ettiği önemli bileşiklerdir (Verhoven ve ark., 1996; Verhoeven ve ark., 1997).

2.4.1. İndol-3-Karbinol (I3C)

İndol (1H-indol), benzen ve pirol halkalarının birleşmesinden oluşan bir benzopirol halkası olup, farmakolojik ve biyokimyasal olarak aktif birçok doğal ve sentetik bileşiğin ana yapısını oluşturmaktadır (Broadbent ve Broadbent, 1998); (Şekil 10).



Şekil 10. İndol-3-karbinol'ün kimyasal yapısını göstermektedir (Broadbent ve Broadbent, 1998'den uyarlanmıştır)

2.4.2. İndol'ün Kimyasal Özellikleri

İndol'ün erime noktası 52 °C, kaynama noktası ise 254 °C'dir. Yüksek oranda uçucu olan indol birçok organik çözücüde kolayca çözünebilen, suda kristallenebilen, saf haldeyken çok hoş ve kalıcı bir kokusu olan bir kimyasaldır. Kozmetik sanayide parfümlere baz olarak kullanılır (Acheson, 1976; Broadbent ve Broadbent, 1998). İndol-alkol türevleri içinde en önemlilerinden biri olan indol-3-karbinol (3-indolmetanol), gramin ve metil iyodür ile metanol solüsyonunda kimyasal reaksiyon sonucu oluşturulabilir (Elderfield, 1960).

2.4.3. İndol-3-Karbinol Etki Mekanizması

Yalnızca Cruciferae familyasına özgü olan I3C özellikle son yıllarda araştırmacıların daha da dikkatini çekmektedir. Bu madde, bitkilerin sıkılması ya da pişirilmesi sırasında ortaya çıkmaktadır. I3C, vücuttaki doğal detoksifikasyon enzimlerinin antioksidanı ve güçlü bir uyarıcısıdır. DNA'nın yapısını korur. Hücre zarındaki östrojen reseptörlerini bloke eder. Testosteron seviyesini artırır (Broadbent ve Broadbent, 1998; Riby ve ark., 2000). Bunların yanında indol-3-karbinolün temel antikanserojen maddelerden biri olduğu da bilinmektedir (Stoewsand, 1995). Bu maddenin özellikle meme, rahim ve prostat kanserindeki tümör hücrelerinde etkili olduğu ve serbest radikaller üzerinde tutma etkisi yaratarak antioksidan etki gösterdiği birçok bilimsel araştırmada saptanmıştır (Bradlow ve ark., 1995; Arnao ve ark., 1996; Staub ve ark., 2002; Sarkar ve Li, 2004). Araştırmalar özellikle turpgillerin östrojeni baskı altında tutmada oldukça başarılı olduğunu ve testosteron üretimini desteklediğini göstermektedir. Bu bitkilerdeki I3C, anti-östrojenik etki gösterir ve etkinliğini östrojenle yarışarak ortaya çıkarır (Liu ve ark., 1994; Yuan ve ark., 1999).

Kadınlarda östrojenin fazla salgılanması adet düzenini bozar, yumurtlamayı engeller ve kısırlığa neden olur. Östrojen fazlalığı yağ dokusu sentezine sebep olarak obeziteye neden olur. Yağ dokusunun artmasıyla armut tipi şişmanlık başlar, kalça ve bacaklarda yağ birikir, orantısız bir vücut açığa çıkar. Yağ dokusu erkeklik hormonlarını (testosteronu) kadınlık hormonlarına (östrojene) çevirme kapasitesine sahiptir. Artan yağ dokusunda daha fazla testosteron östrojene çevrilir, bu da yağ dokusu miktarını daha da artırır. Sonuçta kısır bir döngü oluşur. Erkeklerde östrojen fazlalığı kas kitlesinin azalmasına, vücut konturlarının deforme olmasına, göbek ve kalçanın büyümesine, bacakların genişlemesine ve lenfödem gelişimine neden olur. Vücut kıllarının incelik azalması, sesin incilmesi, testislerin küçülmesi, cinsel isteksizlik de östrojen hormonunun artışıyla doğru orantılıdır (Auborn ve ark., 2003). Morbid obez dediğimiz ileri derecede kilolu erkeklerde kadınlık hormonu artışına bağlı memelerde büyüme, sperm sayısında azalma, iktidarsızlık ve kısırlık gelişir. Bu erkeklerde meme kanserine yatkınlık oldukça fazladır. Kadınlık hormonu yüksek erkeklerde dış olaylardan çabuk etkilenme ve en ufak problem karşısında çözüm üretmemeye sonucunda obsesyon veya depresyon sorunlarına rastlanılır. Erkek psikolojisi olumsuz etkilenir. Östrojeni fazla olan erkekler daha sevecen, sakin ve anlayışlı olur. Fazla östrojenin en kötü sonucu ise kanser hücrelerini uyarmasıdır. Östrojen düzeyinin kanda yüksek olması rahim ve meme kanseri için direk bir risk faktörüdür (Can, 2001). Diyetle alınan I3C'ün östradiol mekanizmasında etkili olduğu ve östrojen kaynaklı hastalıklara karşı yeni bir chemopreventive (kansere karşı koruyucu) özellik gösterebileceği kanıtlanmıştır (Michnovicz ve Bradlow, 1990).

Besinlerle alınan I3C'ün büyük bir kısmı ince bağırsakta, diindolilmetan (DIM) olarak adlandırılan bir dimer oluşturarak emilir. DIM, indol-3-karbinol içeren besinlerin sindirimi sırasında vücudumuzun oluşturduğu bir bileşiktir. DIM, östrojen reseptörlerine seçici olarak bağlanır ve fizyolojik konsantrasyonlarda, östrojen antagonisti olarak davranabilir. DIM yüksek olması durumunda, östrojen/testosteron oranını normal sınırlarına getirmekte etkilidir. Kısaca, DIM östrojen hormonunun metabolize olmasında yardımcıdır (Riby ve ark., 2000). Le ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada DIM'in androjen reseptörüne düşman hücreleri bağlayarak prostat kanserini önlediği bildirilmiştir (Le ve ark., 2003; Wang ve ark., 2012).

I3C'ün birden fazla etki mekanizması olduğu düşünülmektedir. Bunlar; hücre zarlarında kısmen östrojen reseptör bölgelerini bloke ederek, alfa ve beta reseptör ekspresyonlarını normal düzeylere ulaştırarak, yüksek aktivasyonlu östrojen formları ve yan ürünlerini daha güvenli bileşenlere dönüştürerek, diğer kanser büyütücü reseptör alanlarını bloke ederek ve doğrudan kanser hücrelerini öldürerek etki göstermektedir (Meng ve ark., 2000).

Cruciferae familyasına ait bitkilere özgü olan indol-3-karbinol'ün östrojen düzenleyici aktivitesinden dolayı, antikarsinojenik, antioksidan, antiaterojenik etkileri olduğu bilinmektedir (Michnovicz ve Bradlow, 1990).

2.5. Stereolojik Metodlar

Stereoloji, İki Boyutlu doku kesitlerinden elde edilen görüntülere dayanarak, kapiller yüzey alanı, damar uzunluğu veya organdaki toplam spesifik hücre sayısı gibi üç boyutlu parametrelerin tarafsız ve kesin olarak hesaplanması tekniğidir (Howell ve ark., 2002; Altunkaynak ve ark., 2012). Uygulanması kolay olan stereolojik metotlar, etkin ve tarafsız olma özelliğindedir. Etkinlik, sadece gerektiği kadar birey ve örnek kullanılarak, yeterli doğrulukta ve daha az değişkenlik gösteren sonuçların kısa bir zaman diliminde elde edilmesinin sağlanmasıdır (Altunkaynak ve ark., 2012). Tarafsızlık ise ölçümlerin herhangi bir varsayıma dayanmadan gerçekleştirilmesidir. Ölçümler tekrarlandıkça gerçek değere daha da yaklaşmış olur. Günümüzde kullanılan stereolojik metotlar daha önce kullanılan ve ön kabullere dayanılarak gerçekleştirilen metotların aksine tarafsız ve etkin bir sonuç sağlar (Howard ve Reed, 1998; Bartheld, 2002).

2.5.1. Sistemik Rastgele Örnekleme (SRÖ)

Stereolojik metotlarda kullanılan yöntem ve prensipler, sistemik rastgele örnekleme mantığıyla gerçekleştirilmektedir. Tanecik sayımı, alan hesaplamaları, alan ve hacim oranları gibi hesaplamalardaki ilk şart, çalışılan yapının her aşamasında sistemik ve rastgele olarak örnekleme yapılmasıdır (Sterio, 1984; Gundersen, 1986).

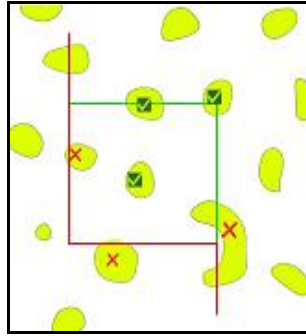
Biyolojik yapılar, genellikle çok büyük olduklarından, yapıdan elde edilen tüm kesitlerin çalışmaya dâhil edilerek değerlendirilmesi, pratik olarak mümkün olmamaktadır. Sistemiklik, önceden belirlenen sabit bir aralıkla örneklemenin

yapılması, rastgelelik ise başlangıç noktasının rastgele seçilmesini ifade eder. Böylece incelenen yapının her tarafına eşit derecede örnekleme olasılığı sağlanmış olur (Gundersen ve ark., 1999).

2.5.2. Tarafsız Sayım Çerçevesi

Stereolojide gerçeğe en yakın sonuçların elde edilmesi için, sayım sırasında her bir taneciğin sadece bir kez örnekleme gerekmektedir. 1977’de Gundersen tarafından geliştirilen tarafsız sayım çerçevesinden önce değişik sayım çerçeveleri kullanılmıştır. Ancak, bunların kullanımı sırasında taneciklerin bir defadan çok sayılabilmesi gibi hatalar ortaya çıkmıştır (Mayhew ve Gundersen, 1996; Howard ve Reed, 1998).

Tarafsız sayım çerçevesi, bir kalın ve düz, bir de ince ve kesikli iki tip çizgiden oluşan dörtkenara sahip basit bir dikdörtgen veya karedir. Sayım kuralları açısından diğer sayım çerçevelerinden farklıdır. Temel olarak, ince ve kesikli çizgiler (yeşil kenar) “dâhil veya serbest” kenarlar, kalın ve devamlı çizgiler de (kırmızı kenar) “hariç” veya “yasak” kenarlardır. Yani kesikli çizgilere rastlayan tanecikler sayılırken, devamlı çizgilere isabet eden tanecikler sayım dışı bırakılır. Tarafsız sayım çerçevesi, tanecik sayımı için en etkin ve güvenilir sayım çerçevesidir. Bu çerçevenin tanecik izdüşümlerini en doğru biçimde saymayı sağladığı, geometrik hesaplamalarla da kanıtlanmıştır (Şekil 11); (Gundersen, 1977).



Şekil 11. Tarafsız sayım çerçevesinde sayılabilir (√) ve sayılamayan (x) hücreleri göstermektedir (Gundersen, 1977’den uyarlanmıştır)

2.5.3. Disektör

Disektör ilk kez 1984 yılında Sterio tarafından tarif edilmiştir. Disektör sayım metodu, gerçekte üç boyutlu olan yani uzunluk, genişlik ve derinliğe sahip biyolojik yapıları, sahip oldukları boyut özelliklerini göz ardı etmeden saymaktadır. Disektörün

temel mantığı, taneciklerin kesit alma doğrultusu boyunca ilk ortaya çıktıkları veya son görüldükleri kısımları, yani taneciklerin “uçlarını” bulmaktır. Disektör, optik ve fiziksel disektör olmak üzere ikiye ayrılır (Sterio, 1984). Bu çalışmada kullanılmasından dolayı sadece optik disektör yöntemine değineceğiz.

Optik Disektör

Optik disektör, kalın kesitlerde (20-25 μ m) uygulanması gereken bir yöntemdir. Kalın kesit içerisinde z ekseni boyunca odaklama ile ilerleyerek tarafsız sayım çerçevesi kuralı gereğince tanecik sayımı yapılır. Çerçevenin iç kısmına ve serbest kenarına isabet eden tanecikler sayılırken, çerçevenin dışına ve yasak kenarlara isabet eden tanecikler sayıma dahil edilmez. Odaklama ekseni boyunca yapılan doku içindeki ilerleme miktarı yani sayım yapılacak kesitin kalınlığı, mikroskop tablasına yerleştirilmiş bir mikrokator yardımı ile ölçülür. Kesit alınması sırasında oluşan fiziksel bozukluklardan sakınmak için, kesitin alt ve üst yüzlerinde belli bir mesafe bırakılarak, sayım işlemi bu mesafelerin haricindeki orta kısımda yani güvenlik mesafesinde gerçekleştirilir. Bu sayım metodu “optik disektör sayım metodu” olarak tarif edilmiştir (Gundersen, 1986; Braendgaard ve ark., 1990; Mayhew ve Gundersen, 1996; Howard ve Reed, 1998).

2.5.4. Optik Parçalama

Optik parçalama, bir organda veya belirli bir yapıdaki toplam taneciklerin tarafsız ve etkin bir biçimde hesaplanmasını sağlayan metottur. Optik parçalama, incelenecek bölge hacminin sistematik rastgele örneklemeyle elde edilen belli bir bölümünde, optik disektörle hücre veya hücre topluluklarının oluşturduğu taneciklerin sayımından ibarettir (West ve ark., 1991).

Optik parçalama, histolojik işlemlerin fiksasyon, takip, gömme, kesit alma, boyama gibi herhangi bir aşamasında tanecikler arası mesafeden veya taneciklerde oluşabilen büzüşme ya da genişlemeden etkilenmez. Ayrıca optik parçalamada, organ ya da yapıdaki taneciklerin büyüklüğünden, şeklinden, yöneliminden, kesit alma yönünden etkilenmemesi açısından stereolojinin en çok kullanılan tanecik sayma veya alan, hacim, uzunluk hesaplama yöntemidir (West ve ark., 1991).

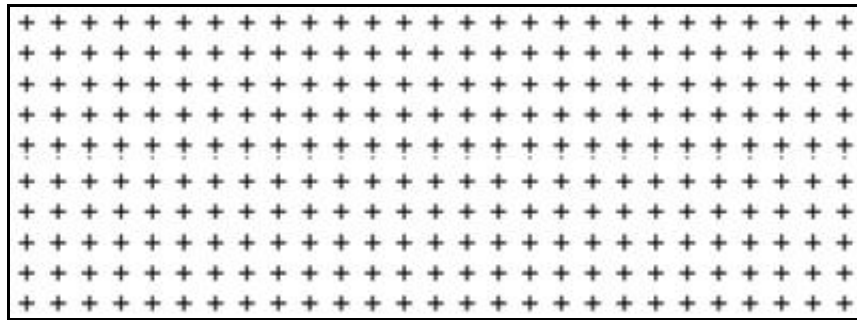
2.5.5. Cavalieri Prensibi ile Hacim Hesaplanması

Cavalieri prensibini uygulamak için, hacmi hesaplanmak istenen yapı eşit aralıklı ve birbirine paralel kesitlerle başından sonuna kadar dilimlere ayrılır. Daha sonra her bir kesitin aynı yöne bakan yüzeylerinin alanları hesaplanır. Alan hesaplaması için ise en basit ve tarafsız yöntem bir noktalı alan ölçüm cetveli kullanmaktır (Şekil 12). Noktalı alan ölçüm cetveli, birbirlerinden eşit aralıklarla ayrılmış noktaları temsil eden sistematik (+) işaretlerinden oluşan sistematik nokta dizgeleridir. Bu noktalardan her biri ise, dört adet noktanın arasında kalan bir birim cetvel alanını temsil etmektedir ($P(a)$). Alanı hesaplanmak istenen herhangi bir kesit görüntüsü üzerine rastgele yerleştirilen böyle bir cetvelin noktalarından kaç tanesinin ilgililen görüntü üzerine isabet edeceği, kesit alanının büyüklüğüne ve noktalar arası mesafeye bağlıdır. Yani, kesit alanı ne kadar büyükse, içine o kadar fazla sayıda (+) isabet edecektir. Bu artışların her birinde tespit edilen sabit bir nokta, sayım için kullanılır. Tüm kesitlerden elde edilen toplam yüzey alanı değeri, dilimlerden kullandığımız ortalama kesit kalınlığı (t) ile çarpılırsa, yapının toplam hacminin tarafsız bir hesaplaması elde edilir. Bunu matematiksel olarak şu şekilde formüleştirebiliriz (Gundersen ve ark., 1999).

Bir kesit görüntüsünün alanı (A), alana düşen toplam nokta sayısı (Σp) ile bir noktanın temsil ettiği alanın [$a(p)$] çarpımı ile hesaplanabilir (Gundersen ve Jensen, 1987; Gundersen ve ark., 1988; Royet, 1991).

$$A = \Sigma p \times [a(p)] \quad \Sigma V = \Sigma A \times t$$
$$V = t \times a/p \times \Sigma P$$

V: Hacim; **t:** Kesit kalınlığı; **a/p:** Noktalı alan ölçüm cetvelinde her bir noktanın temsil ettiği alan; **ΣP :** Kesit yüzey alanındaki toplam nokta sayısını göstermektedir.



Şekil 12. Noktalı alan ölçüm cetveli örneğini göstermektedir

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Deney Hayvanları ve Hayvanların Bakımı

Çalışmamız Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen 300-350 gr ağırlığında, 11-12 haftalık 36 adet erkek *Wistar albino* cinsi sıçan kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışma protokolü ve deneysel metod Ondokuz Mayıs Üniversitesi Etik Kurul tarafından onaylandı (HADYEK/35, 27.04.2011). Deneyler süresince Etik Kurul şartlarının sağlanmasına özen gösterildi. Hayvanların bakımı, beslenme süreci Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde, diğer tüm histolojik çalışmalar Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi.

Sıçanlar deney süresi boyunca Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde oda sıcaklığı 24 ± 20 °C'de, 12 saat gece 12 saat gündüz sirkadyen ritimde, tel kapakları olan plastik kafesler içerisinde, üzeri hava alabilecek şekilde tutuldu. Hayvanlar standart ve yüksek yağ içerikli yem ile beslenirken, su ihtiyaçları çeşme suyundan karşılandı. Tüm hayvanların besin ve suya serbest olarak ulaşabilmeleri sağlandı.

3.2. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar

Çalışmamızdaki 36 sıçan rasgele 6 gruba ayrıldı. Üç grup %40 yağ içeren özel bir diyetle, diğer üç grup ise standart ticari yem ile 15 hafta boyunca beslendi. Çalışma grupları şu şekilde oluşturuldu;

1. Grup: Non-obez kontrol grubu (NK), n=6: Deney süresi boyunca hiçbir işlem yapılmadan standart yem ile beslenen hayvanları içeren gruptur.

2. Grup: Obez kontrol grubu (OK), n=6: Deney süresince %40 yağ içeren yüksek yağlı diyet ile beslenen hayvanları içeren gruptur.

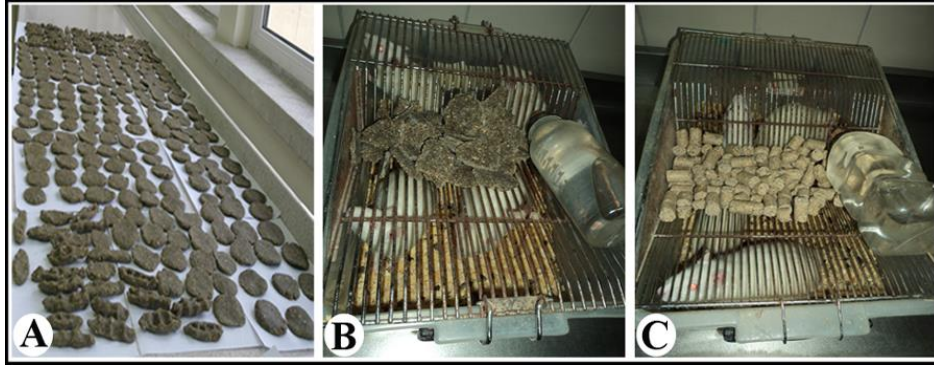
3. Grup: Non-Obez-Timokinon grubu (NT), n=6: Deney süresi boyunca standart diyet ile beslenen ve 6 hafta süreyle günde bir kez olmak üzere 10mg/kg intraperitoneal olarak timokinon enjeksiyonu yapılan hayvanları içeren gruptur.

4. Grup: Obez-Timokinon grubu (OT), n=6: Deney süresi boyunca %40 yağ içeren yüksek yağlı diyet ile beslenerek obez olmaları sağlanan ve sonrasında 6 hafta süreyle günde bir kez olmak üzere 10mg/kg intraperitoneal olarak timokinon enjeksiyonu yapılan hayvanları içeren gruptur.

5. Grup: Non-Obez-İndol grubu (Nİ), n=6: Deney süresi boyunca standart diyet ile beslenen ve sonrasında 6 hafta süreyle haftada üç kez olmak üzere 5mg/kg intraperitoneal olarak indol-3-karbinol enjeksiyonu yapılan hayvanları içeren gruptur.

6. Grup: Obez-İndol grubu (Oİ), n=6: Deney süresi boyunca %40 yağ içeren yüksek yağlı diyet ile beslenerek obez yapılan ve sonrasında 6 hafta süreyle haftada üç kez olmak üzere 5mg/kg intraperitoneal olarak indol-3-karbinol enjeksiyonu yapılan hayvanları içeren gruptur.

%40 yağ içeren yem; standart toz haldeki kanatlı yemine hayvansal yağ ilave edilerek hazırlandı. Hayvansal yağ eritilerek kanatlı yem ile karıştırıldı ve karışım pellet haline getirildi. Kurutulduktan sonra obezite modeli oluşturulacak gruplara verildi. Deney süresince obez gruplar %40 yağ içeren diyetle, obez olmayan gruplar ise standart diyet ile beslendi (Şekil 13). Obez ve nonobez gruplardaki deneklerin kilo alımları haftalık periyotlarla takip edildi.



Şekil 13. A, Yüksek yağ içerikli yemi; B, Yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanları; C, Standart diyet ile beslenen sıçanları göstermektedir

Toplam 15 hafta boyunca bu şekilde takip edilen deneklerin 9 hafta sonunda vücut kitle indeksi hesaplamaları yapılarak obez olup olmadıkları değerlendirildi. VKİ hesaplamasında; burun ucundan kuyruk başlangıcı arası mesafe boy olarak kabul edildi. Ölçülen ağırlık ve boy parametreleri VKİ formülü kullanılarak hesaplandı ve VKİ sonuçları 5 kg/m^2 'den büyük olan deneklerin obez olduğu kabul edildi (Altunkaynak ve ark., 2008).

Dokuz hafta sonunda yüksek yağlı diyet ile beslenip obez olduğuna karar verilen Obez-TQ, Obez-I3C grupları ve standart yem ile beslenen Nonobez-TQ, Nonobez-I3C gruplara eş zamanlı olarak 6 hafta boyunca enjeksiyon uygulamaları yapıldı. Bu sürede obez gruplar yüksek yağlı diyet ile beslenmeye devam etti. Aynı şekilde obez olmayan

gruplar da standart diyet ile beslendi. Deney ve kontrol grubundaki sıçanların haftalık kilo tartımına devam edildi.

Obez-TQ ve Nonobez-TQ gruplarına; 0,04 ml serum fizyolojik (SF) içerisinde çözülmüş timokinon (Sigma-Aldrich, katalog no: 274666), 10mg/kg/gün olmak üzere 6 hafta boyunca intraperitoneal olarak uygulandı.

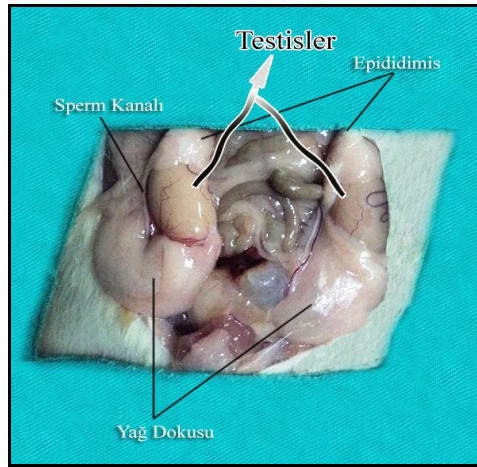
Obez-I3C ve Nonobez-I3C gruplarına; 0,09 ml SF’de çözülmüş indol-3-karbinol (Sigma-Aldrich, katalog no: 17256), 5mg/kg/haftada 3 kez olmak üzere 6 hafta boyunca intraperitoneal olarak uygulandı. Şekil 14’te örnek bir enjeksiyon uygulaması görülmektedir.



Şekil 14. İntraperitoneal enjeksiyon yapılan denek

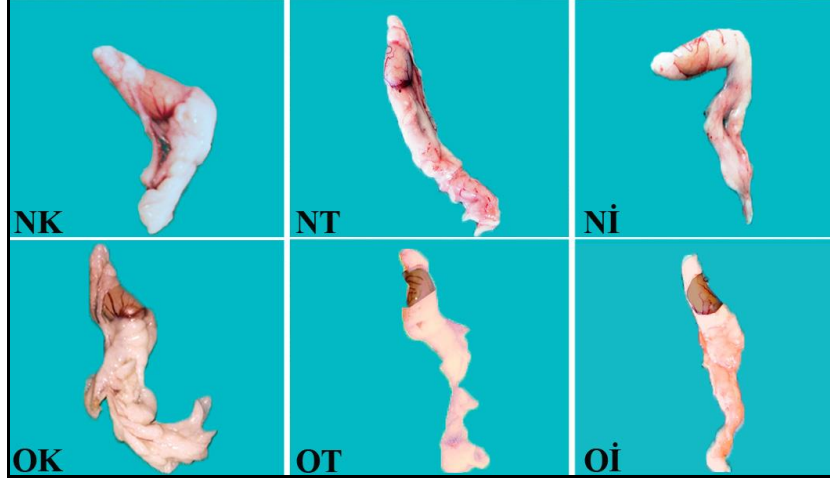
3.3. Anestezi ve Cerrahi İşlemler

Altı haftalık tedaviden sonra sıçanlara 0,1 ml/300 gr ksilazin ve 0,5 ml/300 gr ketamin karışımı intraperitoneal olarak verildi ve anestezi altında testisleri çıkarıldı (Şekil 15).



Şekil 15. Anestezi sonrası çıkarılan testisleri göstermektedir

Önce sağ testisler çıkarılıp histolojik çalışmalar için %10'luk formaldehit içerisine konuldu. Daha sonra sol testisler çıkartılıp 1/4 'lük kısmı sperm morfolojisi incelemeleri için bistüri yardımıyla kesilerek önceden hazırlanmış ve içine 1 ml serum fizyolojik konulmuş ependorflara alındı. Geriye kalan testis ise biyokimyasal ölçümler için analiz gününe kadar -80°C 'lik dondurucuda bekletildi (Şekil 16).



Şekil 16. Tüm gruplara ait testisler ve periferik yağ dokusunu göstermektedir

3.4. Biyokimyasal Ölçümler

Biyokimyasal analizlerin başlangıcında -80°C 'deki testis dokularının yaş ağırlıkları tartıldı. Testis dokularının homojenizasyonunda ve biyokimyasal çalışmalarda pH:7,4 olan 0,05M fosfat tamponu (PBS) kullanıldı. Dokuların soğukluğu muhafaza edilerek cam tüplere konuldu. Dokuların üzerine 4 ml fosfat tampon ilave edildi. Plastik kaplar içine buz dolduruldu ve cam tüpteki dokular plastik kapların içerisine yerleştirilerek 16,000 devir/dakika hızda 3 dakika boyunca homojenize (Heidolph Silentcrusher M.) edildi. Homojenantlardan süpernatant kısımları alınarak 5000 devir/dakikada, 5 dakika boyunca santrifüj (Hettich EBA-20 Microcentrifuge) edilerek süpernatantlar ependorf tüplerine konuldu. Süpernatantta enzim aktiviteleri tayini yapıldı.

3.4.1. Katalaz (CAT) Aktivitesinin Tayini

Katalaz, dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. CAT bütün hücrelerde özellikle de peroksizomlarda bulunur. Peroksizomlar toksik maddeleri detoksifiye etmek için oksijen kullanan ve sonuçta hidrojen peroksit (H_2O_2) üreten hücre

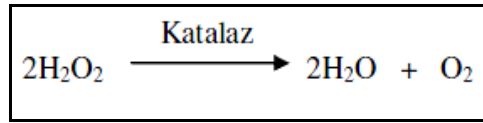
yapılarıdır. Katalaz, hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalayarak biyolojik sistemleri H₂O₂'nin zararlarına karşı korur.

Katalaz, kataliz görevini iki farklı yolla gerçekleştirir; (Mavelli ve Rotilio, 1984).

1- H₂O₂ in parçalanması (katalitik reaksiyon)

2- Alifatik alkollerin peroksidasyonu (peroksidik reaksiyon)

Katalaz aktivitesinin belirlenmesinde Aebi, (1984) metodu kullanılmıştır. Katalaz ölçümü, H₂O₂'nin katalaz enzimi vasıtasıyla H₂O'ya dönüşümü sağlanırken meydana gelen absorbans azalmasının 240 nm'de ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Birim zamanda absorbsiyonda izlenen fark katalaz aktivitesinin ölçütüdür.



Deneyin Yapılışı

Kör ve numune olmak üzere 3 ml'lik iki küvet kullanıldı. Körün ölçüleceği küvete %30'luk H₂O₂'den 0,34 ml alınarak fosfat tamponu ile 100 ml'ye tamamlanan 30 mM'luk H₂O₂'den 2,8 ml alındı ve üzerine 0,2 ml fosfat tamponu (pH: 7,0) ilave edildikten sonra spektrofotometrede (Shimadzu BioSpec-mini UV-VIS Spectrophotometers) 240 nm'de 30. saniye ve 60. saniyedeki absorbans değerleri okundu. Örnek için kullanılan küvete ise 2,8 ml 30 mM H₂O₂ ve üzerine 0,2 ml süpernatant eklenerek aynı şekilde 240'nm de 30. saniye ve 60. saniyedeki absorbansları okundu. İlk okuma A₁, ikinci okuma A₂ olarak adlandırıldı.

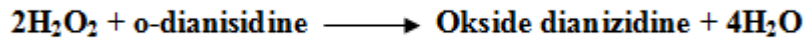
$$U = (2,3 / \Delta t) \times (\log A_1 / A_2) \times (\text{seyrelme faktörü} / \text{gr doku})$$

Formülü ile hesaplanarak katalaz aktivitesi U/gr doku olarak ifade edildi (Aebi, 1984).

3.4.2. Miyeloperoksidaz (MPO) Aktivitesinin Tayini

Miyeloperoksidaz, polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) azurofil granüllerinde fazla miktarda bulunur. Özellikle nötrofil ve monositlerin primer lizozomal granüllerinde bolca bulunan bir hem proteindir (Brennan ve Hazen, 2003). Miyeloperoksidaz, normal nötrofil fonksiyonu için gerekli olduğu gibi bakterilerin fagositozunda önemli rol oynamaktadır. Nötrofiller inflamasyon alanında süperoksit ve hidrojen peroksit üretmektedirler (Winterbourn, 2002). Miyeloperoksidazın görevi nötrofiller tarafından fagosite edilen bakterileri sindirecek ürünleri oluşturan bazı

tepkimleri katalizlemektir (Cryer ve Feldman, 1998). Bu yüzden MPO aktivitesinin ölçümü dokuya PMNL toplanmasını göstermede oldukça yararlıdır (Krawisz ve ark., 1984). Miyeloperoksidaz pek çok farmakolojik ajanın ve ksenobiyotiklerin de dahil olduğu çok çeşitli substratları radikal ara ürünlere okside etmek için hidrojen peroksiti kullanmaktadır (Panassenko ve ark., 2003). Hidrojen peroksit, düşük pH'da renksiz o-dianisidine molekülü ile reaksiyona girerek sarı-kahverengi renkte okside olmuş dianizidine oluşturur. Ancak örneklerdeki antioksidanlar bu oksidasyon reaksiyonlarını baskılayarak renk oluşumunu azaltmaktadır. Çalışmamızda bu renk değişimi 410 nm'de spektrofotometrik olarak ölçüldü (Krueger ve ark., 1990).



Deneyin Yapılışı

Testis örnekleri 1 gr olarak tartıldı. Kör ve numune olmak üzere 3 ml'lik iki küvet kullanıldı. Körün ölçüleceği küvete 2 ml fosfat tamponu (pH: 6,0) ve 100 ml H_2O_2 'de çözülmüş 0,5 gr o-dianizidin'den (Sigma-Aldrich) 1 ml eklenerek spektrofotometrede 410 nm'de 0. saniye ve 60. saniyedeki absorbans değerleri okundu. Örnek için kullanılan küvete ise 0,1 ml süpernatant, 1,9 ml fosfat tamponu ve 1 ml o-dianisidine eklenerek aynı şekilde spektrofotometrede 410 nm'de 0. saniye ve 60. saniyedeki absorbans değerleri okundu. İlk okuma A_1 , ikinci okuma A_2 olarak adlandırıldı.

$$U = \Delta A (A_2 - A_1) \times 1 \text{ gr doku} / \Delta t$$

Formülü ile hesaplanarak miyeloperoksidaz birimi $\Delta A/\text{dk}/\text{gr}$ doku olarak ifade edildi (Bradley ve ark., 1982).

3.5. Histolojik Çalışmalar

3.5.1. Sperm Yayma ve Boyama Çalışmaları

Anestezi altında çıkarılan sol testislerin $\frac{1}{4}$ 'lik kısmı petri kabına konularak Stereo mikroskop (Labomed Luxeo 4Z Stereomicroscope) altında diseksiyon işlemi yapıldı.

Testis Diseksiyonu

1. Sperm yayması yapılacak testislerin ¼' lik kısmı petri kabına alındı.
2. Testis doku örnekleri insülin enjektörü ile spermlerin tübüllerden çıkmasını sağlamak için 0,1-0,2 ml fosfat tamponu (pH: 7,4) içinde iyice diseke edildi.
3. Tamamen diseke edildikten sonra sıvı, mikropipet yardımıyla falkon tüplerine alındı.
4. 1200 devirde 1 dakika boyunca vortekse (Velp Scientifica Vortex) konuldu.
5. Peletin dibine çöküp, spermlerin üst yüzeye çıkması için 10 dakika bekletildi.
6. Mikropipete alınan süpernatant kısmından lamlara birer damla damlatılarak bir lam yardımıyla sperm yayma preparatları hazırlandı.
7. Preparatlar havada kurutulduktan sonra, spermleri boyamak için hematoksilen-eozin boyaması yapıldı.

Sperm Boyama Protokolü (Hematoksilen-Eozin)

Havada kurutulan yayma preparatları fiksasyon amacıyla azalan alkol serilerinden geçirildi.

1. %95 Alkol.....45 dk
2. %70 Alkol.....4 dk
3. %50 Alkol.....4 dk
4. Distile su.....3 dk
5. Hematoksilen.....3 dk
6. Çeşme suyu.....5 dk
7. Eozin.....6 sn
8. %70 Alkol.....10 sn
9. %96 Alkol.....10 sn
10. Ksilen.....10 sn

Havada kurutulmuş entellan ile kapama yapıldı.

Hazırlanan preparatların resimleri çekilerek Kruger'in kesin kriterlerine göre morfolojik değerlendirme yapıldı. Her bir sıçanda 200 sperm; normal sperm ve baş, boyun, kuyruk anomalili sperm olmak üzere dikkatlice incelenerek % normal cinsinden değerlendirildi (Kruger ve ark., 1986).

3.5.2. Işık Mikroskopik Takip Prosedürü

Histolojik çalışmalar için alınan sağ testisler hemen %10'luk formaldehit solüsyonu içerisine konularak 1 hafta süreyle tespit edildi. Tespit işleminden sonra rutin ışık mikroskopik takibe başlandı. Dokular, formalinin uzaklaştırılması amacıyla 4-5 saat akarsuda yıkandı ve doku takibine geçildi.

Doku Takibi, Kesitlerin Alınması ve Hematoksilen-Eozin ile Boyanması

Doku Takip Prosedürü

%70'lik Alkol..... 1 saat

%80'lik Alkol..... 15 saat

%96'lık Alkol..... 1 saat

%96'lık Alkol..... 1 saat

%100'lük Alkol..... 1 saat

%100'lük Alkol..... 1 saat

Artan alkol serilerinden geçirilerek dokulardaki suyun uzaklaştırılması sağlandı.

Ksilen.....30 dakika

Ksilen.....30 dakika

Şeffaflaştırma işleminden sonra dokular paraplasta alındı (65 °C).

Paraplast..... 1 saat

Paraplast..... 1 saat

Paraplast..... 1,5 saat

Dokular taze paraplast içinde bloklandı.

Kesitlerin Alınması

Hazırlanan testis bloklarından mikrotom (Shandon Finesse ME Microtome, Thermo Scientific) aracılığıyla histolojik incelemeler için transvers kesitler alındı.

Stereolojik analizler için 20 µm kalınlığındaki kesitler sistematik ve rastgele örnekleme kuralına uyularak 1/250 örnekleme oranıyla, numaralandırılmış lamlara alındı. Her 20 µm'lik kesitten sonra hematoksilen-eozin, TUNEL ve immünolojik boyamalar için 6-7 µm'lik ince kesitler numaralandırılmış bir başka lama alındı. Kesitlerin lam üzerine yapışmasını sağlayan toz jelatin önceden hazırlanmış 30-35 °C'deki su banyosunda iyice eritildi.

Tübüllerin bütünlüğünün bozulmaması için su sıcaklığının yüksek olmamasına dikkat edildi. Alınan kesitler jelâtinli sıcak su banyosuna konularak açılmaları sağlandı. Kalın ve ince kesitler olarak iki ayrı sepete alınan lamlar parafinin uzaklaştırılması amacıyla 65 °C'lik etüve konularak deparafinizasyon işlemi gerçekleştirildi. Boyama için hazır hale gelen preparatlarda boyamalar yapıldı.

Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Ksilen.....5 dk
Ksilen.....5 dk
Ksilen.....5 dk
%100'lük Alkol.....5 dk
%96'lık Alkol.....5 dk
%80'lik Alkol.....5 dk
%70'lik Alkol.....5 dk
Akarsuda yıkama.....5 dk
Hematoksilen.....2-8 dk
(7 µm'lik kesitler 8 dk, 20 µm'lik kesitler 2 dk)
Akarsuda yıkama.....5 dk
Asit-Alkol.....1-2 sn
Akarsuda yıkama.....5 dk
%80'lik Alkol.....1 sn
Eozin.....30-60 sn
%80'lik Alkol.....1-2 sn
%96'lık Alkol.....1-2 sn
%96'lık Alkol.....1-2 sn
%100'lük Alkol.....15-20 sn
Havada kurutma.....4-5 dk
Ksilen.....10 dk
Ksilen.....1 saat
Entellan damlatılarak lamel ile kapama işlemi yapıldı.

İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal boyama, işaretlenmiş antikor ile antijenin birleşmesi reaksiyonuna dayanan çok hassas ve özgün bir yöntemdir. Hücrelerde yerleşmiş olan bir molekülün belirlenmesi ve gösterilmesi amacıyla, bu moleküle spesifik olarak hazırlanan işaretli antikorların gösterilmesi esasına dayanır (Osborn, 1994). Leydig hücrelerinde testosteron yapımı primer olarak LH'a bağımlı olarak gerçekleşir. Hücre içine LH'ın girişi reseptörler aracılığı ile olur. Bu LH transmembran reseptörüdür. Leydig hücre plazma zar reseptörlerine bağlanan LH, adenilat siklazı stimule ederek siklik AMP yapımını katalize eder. c-AMP Leydig hücrelerinin sitoplazmasına girerek protein kinazların sub-ünitlerine bağlanır ve kolesterolden pregnenolon ve androjen (testosteron) üretimini uyarır (Shan ve ark., 1997). Human chorionic gonadotropin (hCG) ve LH' ın etkisi birbirine benzerdir. hCG, LH hormonunu tetikleyen bir peptid hormondur. LH, Leydig hücrelerini uyararak gonadal steroid hormonlarının üretimini uyarmaktadır.

Yaptığımız immünohistokimyasal çalışmada hücre zarında LH reseptörleri bulunan bölgeler ve Leydig hücrelerinin boyanması planlanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda primer antikor olarak poliklonal antikor olan Anti-LH hormon reseptörü kullanıldı (Rabbit Anti-Luteinizing Hormone/Choriogonadotropin Receptor Antibody, rb x-50ug Millipore, 1:500).

Parafin bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitlerde immünohistokimyasal boyama Avidin-Biotin Metodu (ABC) ile gerçekleştirildi. Bu boyama metodunda, öncelikle primer antikorun antijene bağlanması gerçekleşir. Daha sonra, işaretlenmiş olan sekonder antikor devreye sokulur. Sekonder antikor, primer antikor-antijen kompleksini “antijen” olarak kabul eder ve bağlanır. Biotin ihtiva eden sekonder antikorun üzerine peroksidaz enzimiyle işaretli avidin-biyotin kompleksi ilave edilir. Bu ikili antikor yapısının üzerine substrat kromojen solüsyonu eklenerek doku antijeni görünür hale getirilir (Hsu ve ark., 1981).

İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü

Anti-Luteinizan Hormon / Koryo gonadotropin (LH/CG) Reseptör Antikoru

1. Deparafinizasyon işlemi için 37 °C etüvde.....1 gece
2. Ksilen.....10 dk
3. Ksilen.....10 dk
4. Ksilen.....10 dk
5. %100'lük Alkol.....10 dk
6. %90'lık Alkol.....10 dk
7. %80'lik Alkol.....10 dk
8. Distile su.....10 dk
9. Hidrojen peroksit (%3 H₂O₂).....10 dk

Endojen Peroksidazları bloke etmek için kesitler %3'lük H₂O₂ 'de muamele edildi.

10. Fosfat tomponu.....2x5 dk
11. Ficin solüsyonu.....15 dk

Endojen Peroksidaz aktivitesini bloke etmek için kesitler 37 °C'de Ficin solüsyonunda (İnvitrogen) inkübe edildi.

12. Fosfat tomponu.....3x5 dk
13. Süper blok.....7 dk

Non-spesifik immünreaktiviteyi ortadan kaldırmak için süper blok (ScyTek Laboratories) uygulandı.

14. Anti-LH reseptörü.....2 saat

37 °C'de nemli ortamda primer antikoru bağlanması sağlandı.

15. Fosfat tomponu.....3x5 dk
16. Biotinli sekonder antikoru (ScyTek Laboratories).....30 dk
17. Fosfat tomponu.....3x5 dk
18. Streptavidin Peroksidaz.....20 dk

Primer antikora bağlı biotin' in görünür hale gelmesi için streptavidin peroksidaz (ScyTek Laboratories) ile 20 dk muamele edildi.

19. Fosfat tomponu.....4 kez batır-çıkar
20. AEC Kromojen (İnvitrogen)30-60 dk

AEC (3-amino-9- etil karbazil) kromojen ile kırmızı renk sağlanana kadar inkübe edildi.

21. Fosfat tomponu.....3x5 dk
22. Mayer's hematoksilen.....1 dk
23. Distile su.....5-10 sn
24. Fosfat tomponu.....3x5 dk
25. %80, %90, %100 Alkol.....2-3 sn
26. Havada kurut.....15-20 sn
27. Distile su.....2-3 sn
28. İmmün boya kapaticısından 1 damla damlatılarak lamel ile kapama yapıldı.

TUNEL Boyama

Apoptozisi saptamak için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Histokimyasal yöntemlerden biri olan TUNEL boyama metodu da bu yöntemlerden biridir. TUNEL (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick end Labeling) boyama hücredeki DNA kırıklarının *in situ* olarak tanınmasını sağlar. Biz de çalışmamızda testislerdeki apoptozisi değerlendirmek için standart yöntem olan TUNEL boyama metodunu kullandık.

TUNEL Boyama Protokolü

1. Parafin bloklardan alınan 6 µm kalınlığındaki kesitler bir gece 60 °C etüvde tutuldu.
2. Kesitler soğuduktan sonra 2X30 dk ksilende tutuldu.
3. Kesitler sırasıyla; %96, %80, %70 ve %60'lık etil alkolde 2'şer dk bekletildi.
4. Kesitler PBS ile 5 dk yıkandı.
5. Kesitler 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu ile 15 dk oda sıcaklığında tutuldu.
6. PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkandı.
7. 5 dakika boyunca % 3 H₂O₂ ile Endojen peroksit blokajı yapıldı.
8. PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkandı.
9. Equilibration tampon solüsyonu ile 5 dk oda sıcaklığında yıkandı.
10. Her kesit için 100 µl TdT solüsyonu hazırlanarak (77 µl reaksiyon tampon solüsyonu + 33 µl TdT), kesitler üzerine damlatıldı.
11. TdT konmuş kesitler üzerine plastik lamel kapatılarak 37°C'de 1 saat bekletildi.
12. Reaksiyon durdurma tampon solüsyonu hazırlanarak (1 ml Stop washing buffer + 34 ml distile su) 10 dk oda sıcaklığında yıkandı.

13. Anti-digoxigenin konjugatı ile 30 dakika oda ısısında bekletildi.
14. PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkandı.
15. Her bir kesit üzerine DAB solüsyonu damlatıldı, lamalar 5-10 dk kapalı nemli kutuda bekletildi.
16. PBS solüsyonu ile 3X5 dk yıkandı.
17. Lamalar distile su ile yıkandı.
18. Mayer'in hematoksileni ile çekirdek boyanması kontrol edilerek 1-2 dk boyama yapıldı.
19. Lamalar distile su ile yıkandı.
20. Sırasıyla %80, %96 ve %100'lük etil alkolde 1'er dakika bekletildi.
21. Kesitler kuruduktan sonra 2 kez 5'er dakika ksilende şeffaflaştırıldı.
22. Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kesitler kapatıldı.

3.6. Stereolojik Yöntemler

Stereolojik sayımlar için, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında bulunan Stereo investigator analiz sistemi (Stereoinvestigator® 9.0; Microbrightfield, WILLISTON; USA) kullanıldı (Şekil 17).

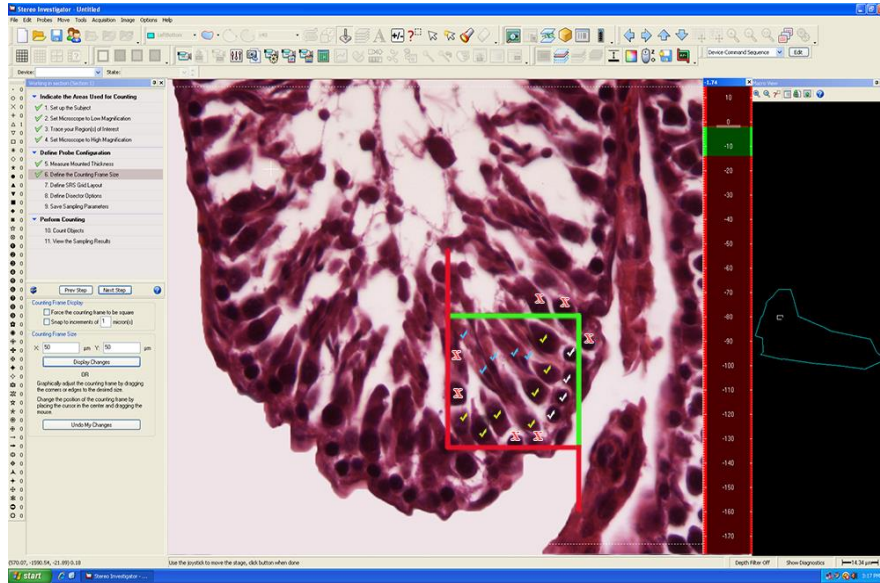


Şekil 17. Stereolojik işlemlerin yapıldığı Stereo investigator analiz sistemini göstermektedir

Analizlere başlamadan önce pilot çalışma yapılarak uygun bir strateji belirlendi ve sayımlar gerçekleştirildi. Testiste spermatogonyum, spermatozoid, spermatid ve Leydig hücreleri optik parçalama yöntemiyle sayıldı. Testis hacmi ve ortalama tübül hacmi Cavalieri prensibi ile hesaplandı.

3.6.1. Optik Parçalama ile Hücre Sayımı

Çalışmaya başlamadan önce testis dokusunda yapılan ön çalışmada optik parçalama için gerekli strateji belirlendi. Buna göre; kesit kalınlığı 20 µm ve kesit örnekleme payı 1/250 olarak belirlendi. Bu örnekleme sonucunda her bir hayvandan ortalama 16 kesit elde edildi. Sistematik rastgele örnekleme yaklaşımı ile örneklenen yapının her yerine eşit örnekleme şansı tanıyan bu uygulama ile örnekleminin sistematik olması, alınacak ilk kesitin rastgele bir biçimde belirlenmesi ile de, örnekleminin rastgele olması sağlandı. Her bir tarafsız sayım çerçevesi içerisine sayılabilir 6 spermatozoid düşecek şekilde hesaplanarak bir kenarı 40 µm olacak şekilde çerçeve alanı 1600 µm² olarak belirlendi (40x40). Adım aralığı (x,y) 2000 µm x 2000 µm, optik disektör yüksekliği (h) 12 µm, üst ve alt güvenlik aralığı ise 2 µm olarak belirlendi. Sayımlar 40x'lık objektif altında yapıldı. Farklı dört adet işaretleyici (spermatogonyum, spermatozoid, spermatid ve Leydig hücreleri sayımı için) seçilerek her adımda çerçeve içerisine düşen hücreler daha önceden bahsedilen sayım kurallarına uygun olarak sayıldı (Şekil 18; Sayım kuralları için bkz Syf 40).



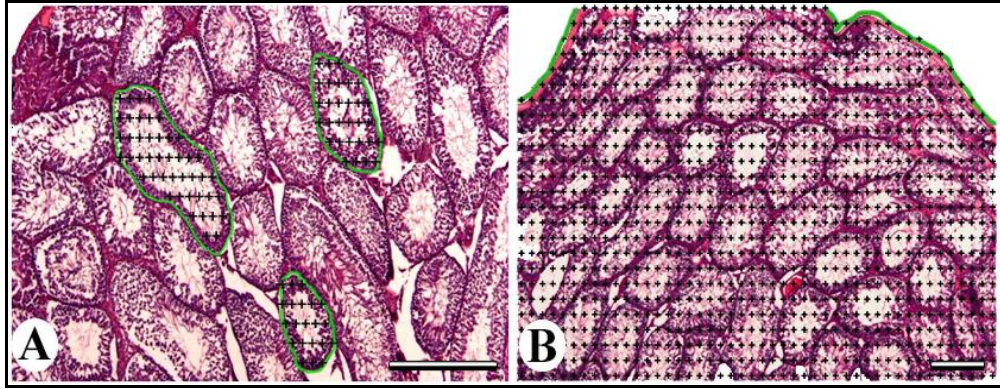
Şekil 18. Sayım çerçevesi kuralları gereği farklı renkte işaretleyiciler (✓) kullanılarak sayılabilir ve sayılmayan hücreler (X) gösterilmektedir

3.6.2. Cavalieri Prensibi ile Hacim Hesabı

Cavalieri Prensibi ile nokta sayım yöntemi kullanılarak hacim ve alan hesabı yapıldı. Sistematik rastgele örneklemeyle 1/250 örnekleme oranıyla alınan 7 µm'lik

kesitlerde alan ve hacim hesabı yapıldı. Testis hacim hesabı için öncelikle 5x'lik objektifte testis alanının sınırları çizildi daha sonra noktalı alan ölçüm cetvelinde nokta aralığı 150 µm olarak belirlendi. Sınırları belirlenmiş testis görüntüsü üzerine noktalı alan cetveli rastgele olarak atıldı ve testis üzerine isabet eden noktalar sayıldı. Kesit yüzeyine düşen toplam nokta sayısı ile kesit kalınlığı çarpılarak kesitin hacmi hesaplandı.

Ortalama seminifer tübül hacim hesabı için her kesitte rastgele seçilen 10 tübülün sınırları çizildi ve noktalı alan ölçüm cetvelinde nokta aralığı 50 µm olarak belirlendi. Kesit görüntüsü üzerine noktalı alan cetveli rastgele olarak atıldı ve seçilen tübüller üzerine isabet eden noktalar sayıldı (Şekil 19). Tübüller üzerine düşen toplam nokta sayısı ile kesit kalınlığı çarpılarak ortalama tübül hacmi hesaplandı.



Şekil 19. A, Sınırları çizilen ve üzerine noktalı alan ölçüm cetveli atılan tübüller; B, Sınırları çizilmiş ve üzerine noktalı alan ölçüm cetveli atılmış testis alanını göstermektedir (Boya: HE; Barlar: 250µm)

3.7. İstatiksel Analiz

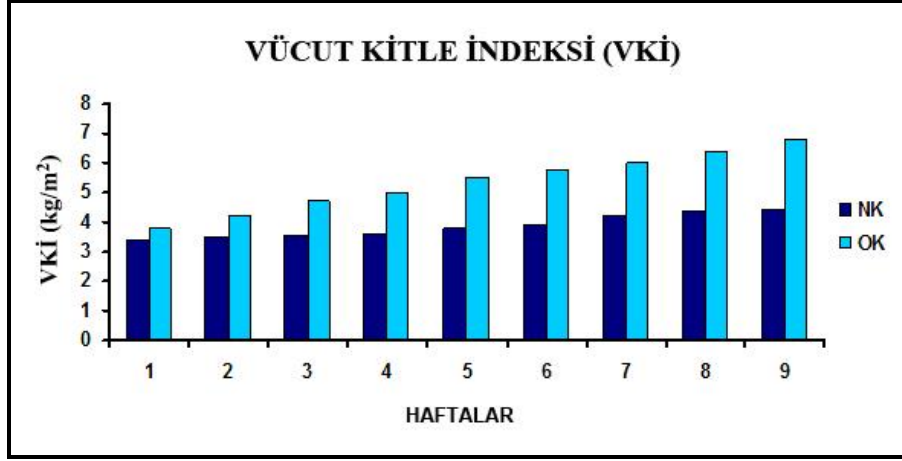
Bu çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 15,0 for Windows® programı ile yapıldı. Grupların birbirleri ile karşılaştırmalarında One Way ANOVA ve Bonferroni Post Hoc test kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık açısından $p < 0,01$ ve $p < 0,001$ değerleri ileri derecede anlamlı, $p < 0,05$ olan değerler ise anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada nonobez-kontrol (NK), obez-kontrol (OK), nonobez-timokinon (NT), obez-timokinon (OT), nonobez-indol (Nİ), obez-indol (Oİ) olmak üzere 6 grup kullanıldı. OK, OT ve Oİ grupları 9 hafta boyunca yüksek yağlı diyet ile beslenerek obezite modeli oluşturuldu. Bu süreçte NK, NT ve Nİ grupları standart yem ile beslendi. Dokuzuncu hafta sonunda NT, OT, Nİ, Oİ gruplarına 6 hafta boyunca timokinon ve indol-3-karbinol uygulaması yapıldı ve 6. hafta sonunda tüm deneklerin testisleri anestezi altında çıkarılarak stereolojik, histokimyasal ve biyokimyasal açılardan değerlendirildi. Biyokimyasal çalışmalar için sol testis dokularında katalaz ve miyeloperoksidaz tayini yapıldı. Sağ testislerde ise histolojik takip sonrası stereolojik ve histokimyasal analizler yapıldı. Optik disektör yöntemiyle testislerdeki spermatogonyum, spermatozoid, spermatid ve Leydig hücre sayıları; Cavalieri yöntemiyle de ortalama seminifer tübül hacmi ve toplam testis hacmi hesaplandı. Ayrıca testis dokuları üzerinde sperm morfoloji değerlendirmesi, histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler de yapıldı. Tüm bu çalışmalar sonucu elde edilen bulgular aşağıda sunulduğu gibidir.

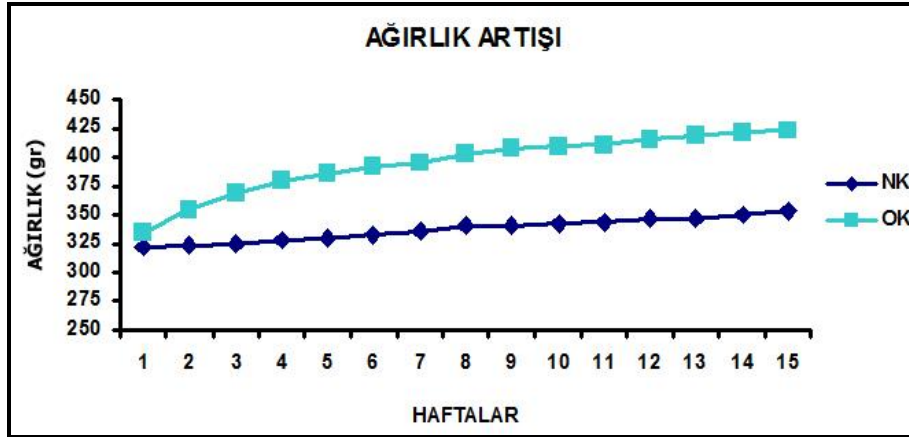
4.1. Obezitenin Değerlendirilmesi

Obez ve nonobez gruplarının deney süresi boyunca haftalık ağırlık ölçümleri yapıldı. Dokuz hafta sonunda deneklerin VKİ ölçümleri yapılarak obezite oluşup oluşmadığı değerlendirildi. Buna göre VKİ hesaplamasında; burun ucundan kuyruk başlangıcı arası mesafe boy olarak kabul edildi. Ölçülen ağırlık ve boy parametreleri VKİ formülü kullanılarak hesaplandı ve VKİ sonuçları 5 kg/m²'den büyük olan deneklerin obez olduğu kabul edildi (Şekil 20); (Altunkaynak ve ark., 2008).



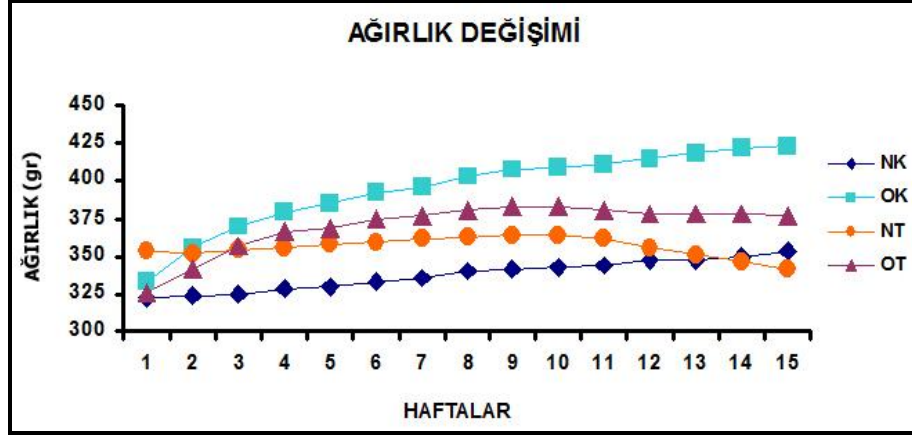
Şekil 20. Obez ve kontrol grubu VKİ değişim grafiği görülmektedir

Deney süresince yüksek yağlı diyet ile beslenen OK grubundaki kilo artışı, standart yem ile beslenen NK grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı (Şekil 21; $p < 0,001$).



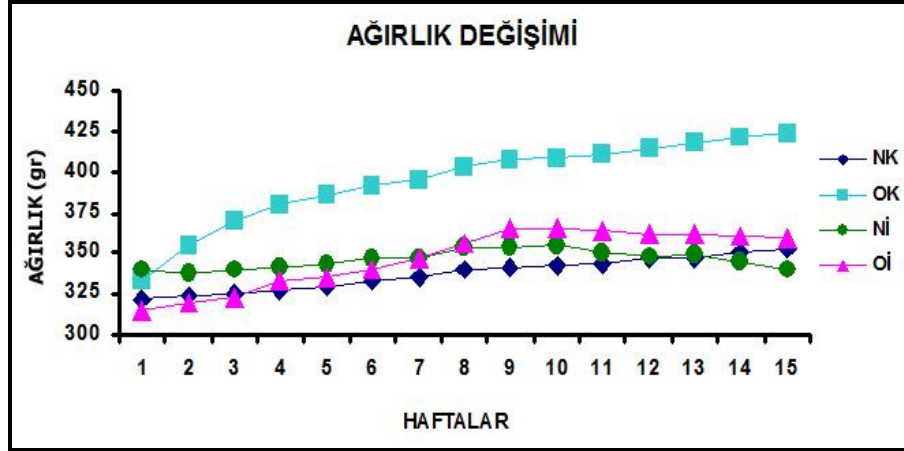
Şekil 21. Deney süresince obez ve kontrol grubu arasında ağırlık değişim grafiği görülmektedir

OK ve OT grubundaki sıçanların başlangıçtaki ağırlıkları (1-9. hafta) ile enjeksiyon süresi boyunca (9-15. hafta) ölçülen ağırlıkları kıyaslandığında, timokinon uygulanması ile OT grubundaki sıçanların ağırlık ortalamasının istatistiksel olarak ileri derecede azaldığı görüldü ($p < 0,01$). Aynı şekilde NK ve NT grubunun ağırlık ölçümlerinde de timokinon uygulanmasıyla NT grubundaki sıçanların ağırlık ortalamasının istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü (Şekil 22; $p < 0,05$).



Şekil 22. Obez ve nonobez gruplara timokinon uygulama öncesi ve sonrası ağırlık değişimi görülmektedir

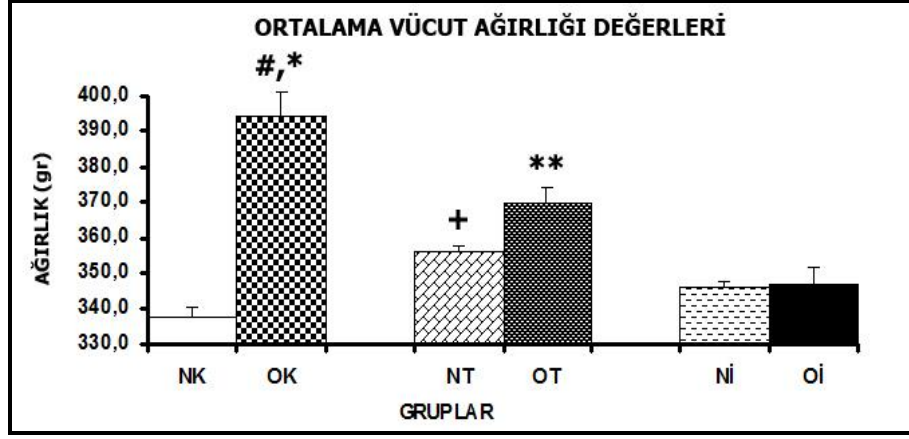
OK ve Oİ gruplarındaki sıçanların başlangıçtaki ağırlıkları ile enjeksiyon süresince ölçülen ağırlıkları kıyaslandığında, indol-3-karbinol uygulanması ile Oİ grubundaki sıçanların ağırlık ortalamasının birkaç hafta sabitlendiği ve uygulamanın devam etmesiyle OK grubuna göre istatistiksel olarak ileri derecede azaldığı görüldü (Şekil 23; $p < 0,001$).



Şekil 23. Obez ve nonobez gruplara indol-3-karbinol uygulama öncesi ve sonrası ağırlık değişimi görülmektedir

4.1.1. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Ortalama Vücut Ağırlığı Bulguları

Gruplara ait deneklerin deney süresince ölçülen ortalama ağırlık değerleri aşağıdaki şekil ve tabloda görülmektedir (Şekil 24, Tablo 6). Tablolardaki ortalama (Ort) ve standart sapma (SS) olarak $Ort \pm SS$ şeklinde verilmiştir.



Şekil 24. Tüm gruplara ait deneklerin deney süresince ölçülen ağırlık ortalamalarının karşılaştırmasını gösteren grafik. +; NT ve NK grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark, #; OK ve NK, NT, Nİ, Oİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, *; OK ve OT grupları arasında $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı fark, **; OT ve Nİ, Oİ grupları arasında $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmiştir

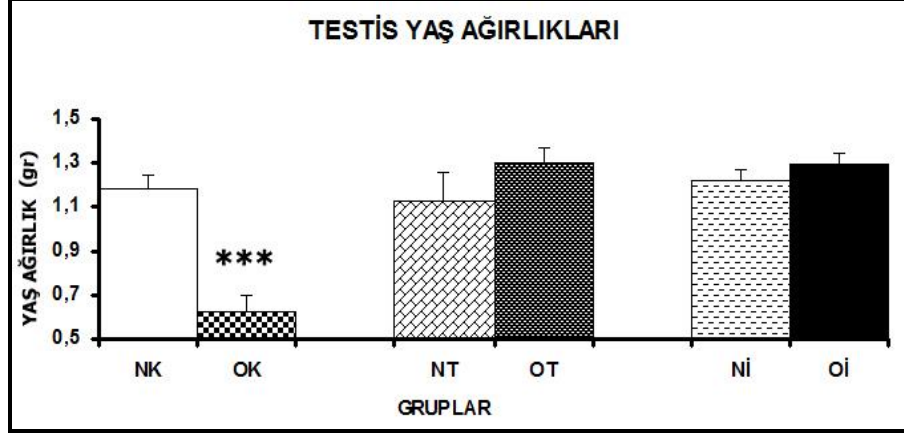
Tablo 6. Tüm gruplara ait deney süresi sonunda ölçülen ortalama vücut ağırlığı değerleri (Ort ± SS)

Grup (n=6)	Ortalama Vücut Ağırlığı (gr) Değerleri
NK	337,50 ± 2,59
OK	394,51 ± 0,14
NT	356,01 ± 1,67
OT	369,80 ± 4,22
Nİ	346,12 ± 1,45
Oİ	347,11 ± 4,63

Nİ ve Oİ gruplarındaki ağırlık ortalaması OT grubuna göre azalmıştı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,01$). NT grubundaki ağırlık ortalaması NK grubuna göre artmıştı ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$). OK grubundaki ağırlık ortalaması NK, NT, Nİ ve Oİ gruplarına göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). OT grubundaki ağırlık ortalaması OK grubuna göre azalmıştı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu ($p < 0,01$).

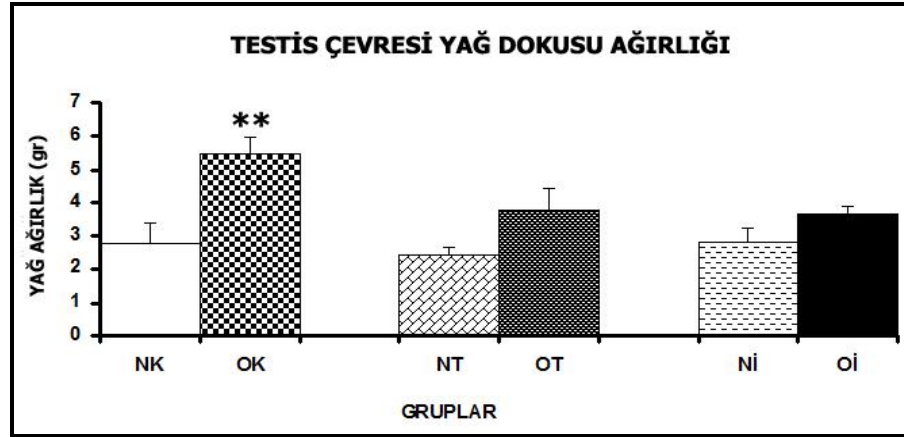
4.1.2. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Yaş Ağırlıkları ve Testis Çevresi Yağ Dokusu Ağırlığı Bulguları

Gruplara ait deneklerin testis yaş ağırlıkları ve testis çevresi yağ dokusu ağırlık değerleri aşağıdaki şekil ve tabloda görülmektedir (Şekil 25 ve 26, Tablo 7).



Şekil 25. Tüm gruplara ait deneklerin deney sonundaki testis yaş ağırlıklarının karşılaştırmasını gösteren grafik. ***; OK ve NK, NT, OT, Nİ, Oİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmektedir

Deney sonunda çıkarılan testisler yaş ağırlıkları açısından karşılaştırıldığında OK gurubunun ortalama yaş testis ağırlığı diğer deney gruplarına göre oldukça azalmıştı ve istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir farklılık vardı ($p < 0,001$).



Şekil 26. Tüm gruplara ait deneklerin deney sonundaki testis çevresinden alınan yağ ağırlıklarının karşılaştırmasını gösteren grafik. **; NK ve OK grupları arasında $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmiştir

Testis çevresi yağ dokusu değerlendirmesinde OK grubundaki testis çevresi yağ ağırlık ortalaması diğer gruplara göre fazlaydı. NK ve OK grupları arasında istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir farklılık vardı ($p < 0,01$).

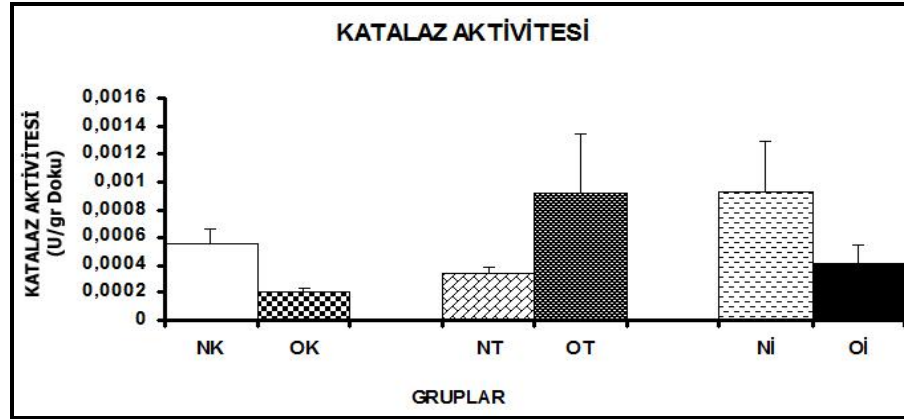
Tablo 7. Tüm gruplara ait testis yaş ağırlık ve testis çevresi yağ dokusu ağırlık değerleri (Ort \pm SS)

Grup (n=6)	Testis Yaş Ağırlık (gr)	Testis Çevresi Yağ Ağırlık (gr)
NK	1,181 \pm 0,064	2,766 \pm 0,640
OK	0,633 \pm 0,065	5,491 \pm 0,469
NT	1,130 \pm 0,123	2,401 \pm 0,278
OT	1,300 \pm 0,061	3,808 \pm 0,617
Nİ	1,223 \pm 0,046	2,816 \pm 0,455
Oİ	1,293 \pm 0,052	3,648 \pm 0,272

4.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları

4.2.1. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Katalaz Enzim Aktivite Bulguları

Gruplara ait deneklerden alınan testis dokuları üzerinde yapılan katalaz enzim aktivitesi değerleri aşağıdaki şekil ve tabloda görülmektedir (Şekil 27, Tablo 8).

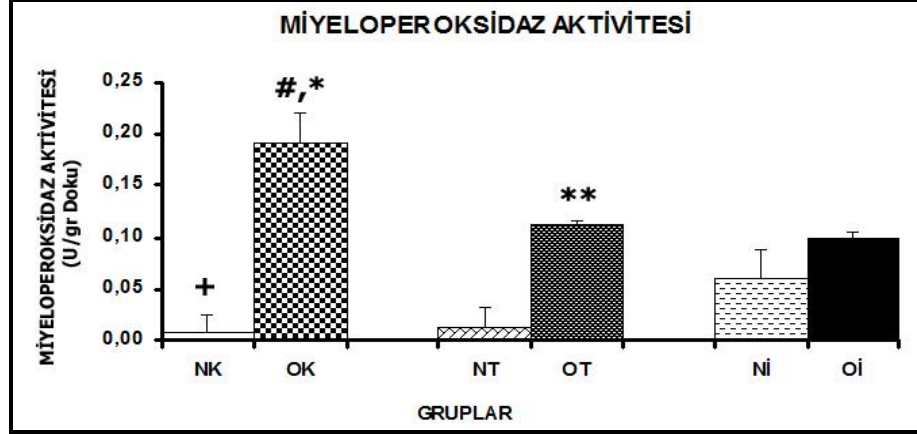


Şekil 27. Tüm gruplardaki deneklerin testis doku örneklerindeki katalaz enzim aktivitesinin gruplar arasındaki karşılaştırmasını gösteren grafik. Gruplar arasında katalaz aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$)

Gruplar arasında katalaz aktivitesi bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$).

4.2.2. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Miyeloperoksidaz Enzim Aktivite Bulguları

Gruplara ait deneklerden alınan testis dokuları üzerinde yapılan miyeloperoksidaz enzim aktivitesi değerleri aşağıdaki şekil ve tabloda görülmektedir (Şekil 28, Tablo 8).



Şekil 28. Tüm gruplardaki deneklerin testis doku örneklerindeki miyeloperoksidaz enzim aktivitesinin gruplar arasındaki karşılaştırmasını gösteren grafik. +; NK ve OT, Oİ grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark, #; OK ve NK, NT grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, *; OK ve Oİ grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark, **; OT ve NT grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmiştir

Tablo 8. Tüm gruplara ait testis doku örneklerindeki katalaz ve miyeloperoksidaz enzim aktivite değerleri (Ort \pm SS)

Grup (n=6)	KATALAZ (U/gr doku)	MPO (U/gr doku)
NK	0,0006 \pm 0,00026	0,0083 \pm 0,04011
OK	0,0002 \pm 0,00009	0,1907 \pm 0,07357
NT	0,0003 \pm 0,00011	0,0123 \pm 0,04933
OT	0,0009 \pm 0,00103	0,1116 \pm 0,01197
Nİ	0,0009 \pm 0,00089	0,0609 \pm 0,06645
Oİ	0,0004 \pm 0,00031	0,0991 \pm 0,01722

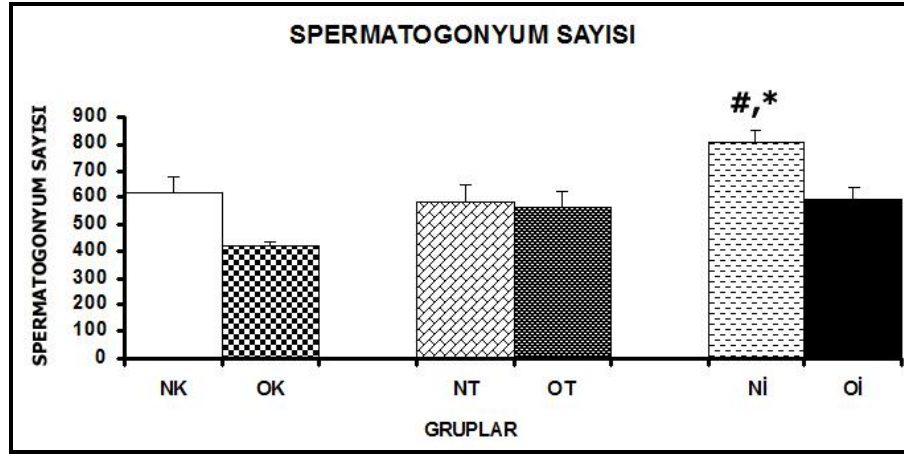
Miyeloperoksidaz aktivitesi istatistiksel değerlendirmelerinde, OK grubundaki miyeloperoksidaz enzim aktivitesi NK, NT ve Nİ gruplarına göre artmıştı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). OT ve Oİ gruplarındaki miyeloperoksidaz enzim aktivitesi, NK grubuna göre artmıştı ve fark istatistiksel olarak

anlamlıydı ($p < 0,05$). OT grubundaki miyeloperoksidaz enzim aktivitesi, NT grubuna göre artmıştı ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). OK grubundaki miyeloperoksidaz enzim aktivitesi, Oİ grubuna göre artmıştı ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$).

4.3. Stereolojik Analiz Bulguları

4.3.1. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Spermatogonyum Sayısı Bulguları

Gruplara ait deneklerden elde edilen testis dokularının ışık mikroskopik kesitleri üzerinde yapılan stereolojik değerlendirme bulguları aşağıdaki şekil ve tabloda görülmektedir (Şekil 29, Tablo 9).



Şekil 29. Tüm gruplardaki deneklerin testis doku örneklerindeki spermatogonyum sayısının gruplar arasındaki karşılaştırmasını gösteren grafik. #; Nİ ve OK grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, *; Nİ ve NT, OT grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmiştir

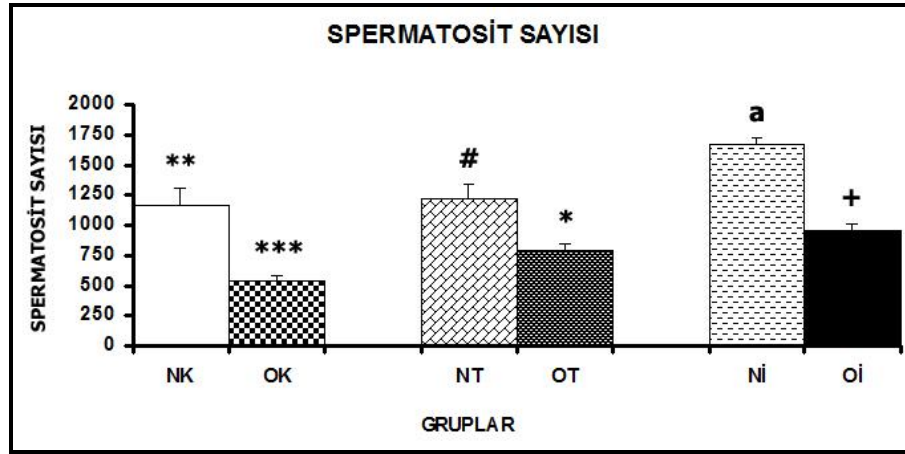
Tablo 9. Tüm gruplara ait testis doku örneklerindeki spermatogonyum sayısı değerleri (Ort ± SS)

Grup (n=6)	Spermatogonyum Sayısı Değerleri
NK	621 ± 57,3
OK	415 ± 21,2
NT	586 ± 58,2
OT	563 ± 57,0
Nİ	808 ± 39,5
Oİ	597 ± 42,3

Gruplara ait spermatogonyum sayısı istatistiksel değerlendirmelerinde, NT ve OT grubundaki spermatogonyum sayısı Nİ grubuna göre azdı ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). OK grubundaki spermatogonyum sayısı, Nİ grubuna göre azalmıştı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu ($p < 0,001$). OK grubundaki spermatogonyum sayısı, NK grubuna göre farklı değildi ($p = 0,07$).

4.3.2. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Spermatozoid Sayısı Bulguları

Gruplara ait deneklerden alınan testis dokuları üzerinde yapılan spermatozoid sayısı değerleri aşağıdaki şekil ve tabloda görülmektedir (Şekil 30, Tablo 10).



Şekil 30. Tüm gruplardaki deneklerin testis doku örneklerindeki spermatozoid sayısının gruplar arasındaki karşılaştırmasını gösteren grafik. **, NK ve Nİ grupları arasında $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı fark, ***, OK ve NK, NT, Nİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, #; NT ve Nİ grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark, *, OT ve NK, NT grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark, a; Nİ ve Oİ, OT grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, +; Oİ ve OK grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmektedir

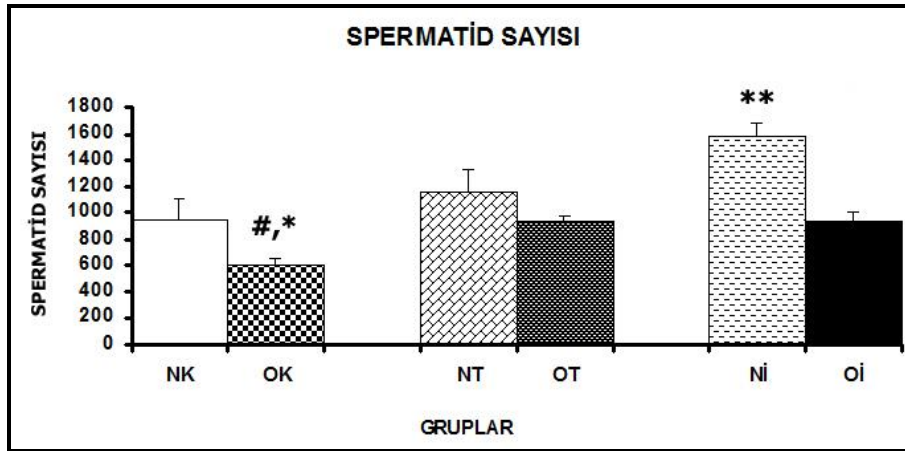
Tablo 10. Tüm gruplara ait testis doku örneklerindeki spermatozoid sayısı değerleri (Ort ± SS)

Grup (n=6)	Spermatozoid Sayısı Değerleri
NK	1171 ± 140,0
OK	542 ± 38,7
NT	1227 ± 112,4
OT	787 ± 58,2
Nİ	1673 ± 53,1
Oİ	959 ± 49,1

Gruplara ait spermatoisit sayısı istatistiksel değerlendirmelerinde, OK grubundaki spermatoisit sayısı NK, NT ve Nİ grubuna göre azalmıştı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). Nİ grubundaki spermatoisit sayısı, Oİ ve OT grubuna göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). Nİ grubundaki spermatoisit sayısı, NK grubuna göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,01$). Nİ grubundaki spermatoisit sayısı, NT grubuna göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). OK grubundaki spermatoisit sayısı, Oİ grubuna göre azdı ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). OT grubundaki spermatoisit sayısı, NK ve NT grubuna göre azdı ve fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$).

4.3.3. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Spermatoisit Sayısı Bulguları

Gruplara ait deneklerden alınan testis dokuları üzerinde yapılan spermatoisit sayısı değerleri aşağıdaki şekil ve tabloda görölmektedir (şekil 31, Tablo 11).



şekil 31. Tüm gruplardaki deneklerin testis doku örneklerindeki spermatoisit sayısının gruplar arasındaki karşılaştırmasını gösteren grafik. #; OK ve Nİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, *; OK ve NT grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark, **; Nİ ve NK, OT, Oİ grupları arasında $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmektedir

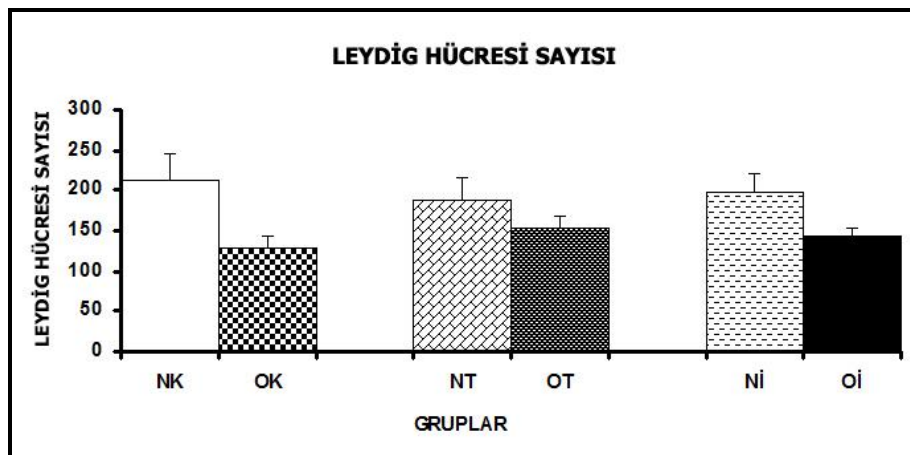
Tablo 11. Tüm gruplara ait testis doku örneklerindeki spermatid sayısı değerleri (Ort ± SS)

Grup (n=6)	Spermatid Sayısı Değerleri
NK	958 ± 142,0
OK	609 ± 50,0
NT	1153 ± 175,9
OT	936 ± 46,7
Nİ	1585 ± 94,2
Oİ	938 ± 62,5

Gruplara ait spermatid sayısı istatistiksel değerlendirmelerinde Nİ grubundaki spermatid sayısı, OT, Oİ ve NK gruplarına göre fazla bulundu ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,01$). Nİ grubundaki spermatid sayısı, OK grubuna göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). NT grubundaki spermatid sayısı, OK grubuna göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$).

4.3.4. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Leydig Hücreleri Sayısı Bulguları

Gruplara ait deneklerden alınan testis dokuları üzerinde yapılan Leydig hücreleri sayısal değerleri aşağıdaki şekil ve tabloda görülmektedir (Şekil 32, Tablo 12).



Şekil 32. Tüm gruplardaki deneklerin testis doku örneklerindeki Leydig hücreleri sayısının gruplar arasındaki karşılaştırmasını gösteren grafik. Gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu ($p > 0,05$)

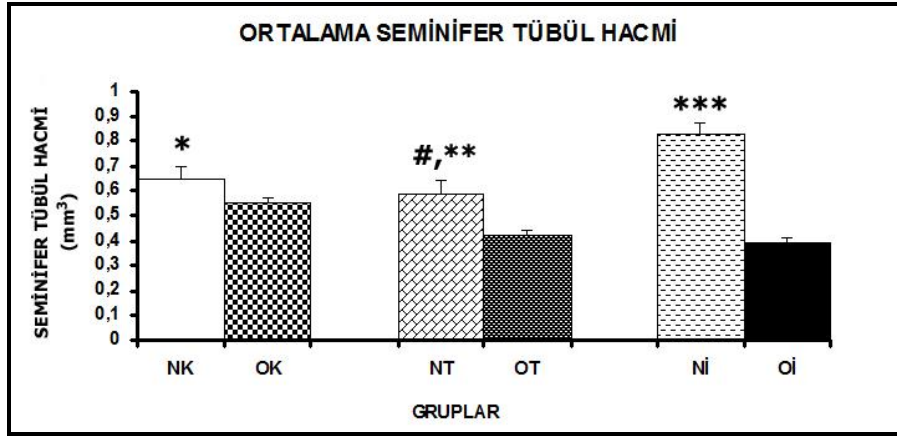
Tablo 12. Tüm gruplara ait testis doku örneklerindeki Leydig hücresi sayısı değerleri (Ort ± SS)

Grup (n=6)	Leydig Hücresi Sayısı Değerleri
NK	213 ± 33,3
OK	129 ± 14,7
NT	189 ± 26,4
OT	155 ± 15,0
Nİ	198 ± 23,9
Oİ	143 ± 11,0

Leydig hücresi sayısının istatistiksel değerlendirmesinde OK grubunda azalma olduğu görüldü, fakat gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$).

4.3.5. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Ortalama Seminifer Tübül Hacmi Bulguları

Gruplara ait deneklerden alınan testis dokuları üzerinde yapılan ortalama seminifer tübül hacmi değerleri aşağıdaki şekil ve tabloda görülmektedir (Şekil 33, Tablo 13).



Şekil 33. Tüm gruplardaki deneklerin testis doku örneklerindeki ortalama seminifer tübül hacminin gruplar arasındaki karşılaştırmasını gösteren grafik. *; NK ve Nİ grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark, #; NT ve Nİ grupları arasında $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı fark, **; NT ve OT grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark, ***, Nİ ve OK, OT, Oİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmektedir

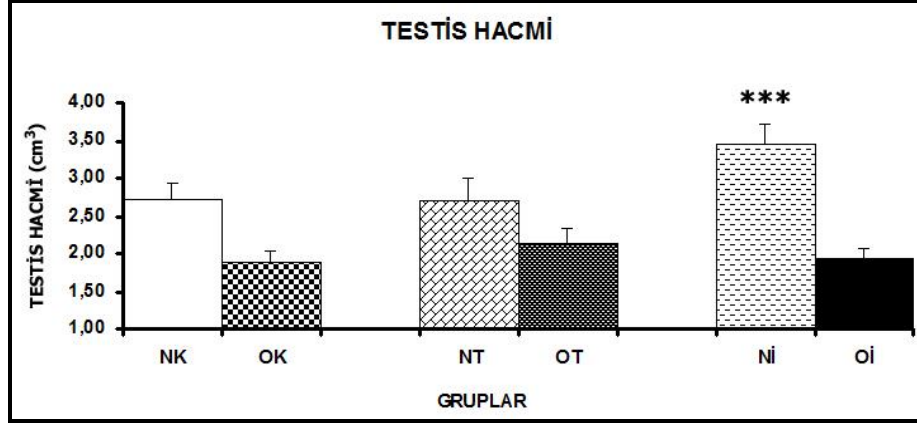
Tablo 13. Tüm gruplara ait testis doku örneklerindeki ortalama seminifer tübül hacmi değerleri
(Ort \pm SS)

Grup (n=6)	Seminifer Tübül Hacmi (mm³) Değerleri
NK	0,650 \pm 0,048
OK	0,550 \pm 0,021
NT	0,590 \pm 0,048
OT	0,420 \pm 0,020
Nİ	0,830 \pm 0,044
Oİ	0,390 \pm 0,023

Gruplara ait ortalama seminifer tübül hacmi istatistiksel değerlendirmelerinde Nİ grubundaki ortalama seminifer tübül hacmi, OK, OT ve Oİ gruplarına göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). Nİ grubundaki ortalama seminifer tübül hacmi, NT grubuna göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,01$). Oİ-NK ve Oİ-NT ikili karşılaştırmasında Oİ grubundaki ortalama seminifer tübül hacmi azalmıştı ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri sırasıyla ($p < 0,001$; $p < 0,01$) bulundu. Nİ grubundaki ortalama seminifer tübül hacmi, NK grubuna göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). OT-NK ve OT-NT ikili karşılaştırmasında OT grubundaki ortalama seminifer tübül hacmi azalmıştı ve istatistiksel olarak anlamlılık dereceleri sırasıyla ($p < 0,01$; $p < 0,05$) bulundu.

4.3.6. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Testis Örneklerindeki Toplam Testis Hacmi Bulguları

Gruplara ait deneklerden alınan testis dokuları üzerinde yapılan toplam testis hacmi değerleri aşağıdaki şekil ve tabloda görülmektedir (Şekil 34, Tablo 14).



Şekil 34. Tüm gruplardaki deneklerin testis doku örneklerindeki toplam testis hacminin gruplar arasındaki karşılaştırmasını gösteren grafik. ***; Nİ ve Oİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark gözlemlendi

Tablo 14. Tüm gruplara ait testis doku örneklerindeki toplam testis hacmi değerleri (Ort ± SS)

Grup (n=6)	Testis Hacmi (cm ³) Değerleri
NK	2,73 ± 0,21
OK	1,90 ± 0,14
NT	2,70 ± 0,28
OT	2,13 ± 0,19
Nİ	3,45 ± 0,27
Oİ	1,94 ± 0,12

Gruplara ait testis hacmi istatistiksel değerlendirmelerinde, OK ve Oİ gruplarındaki testis hacmi, Nİ grubuna göre azdı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). Nİ grubundaki testis hacmi, OT grubuna göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulundu ($p < 0,01$).

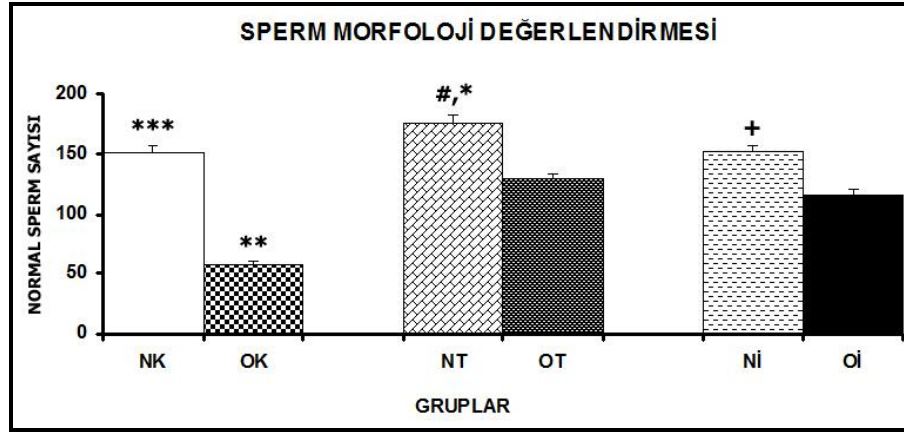
4.4. Sperm Morfoloji Değerlendirme Bulguları

4.4.1. Tüm Gruplardaki Deneklere Ait Semen Yayma Örneklerindeki Sperm Morfoloji Değerlendirme Bulguları

Gruplara ait semen yayma örneklerindeki sperm morfolojik değerlendirme sonuçları aşağıdaki şekillerde ve tabloda görülmektedir (Tablo 15, Şekil 35-38).

Tablo 15. Tüm gruplara ait semen yayma örneklerindeki sperm morfoloji sayısal değerleri
(Ort ± SS)

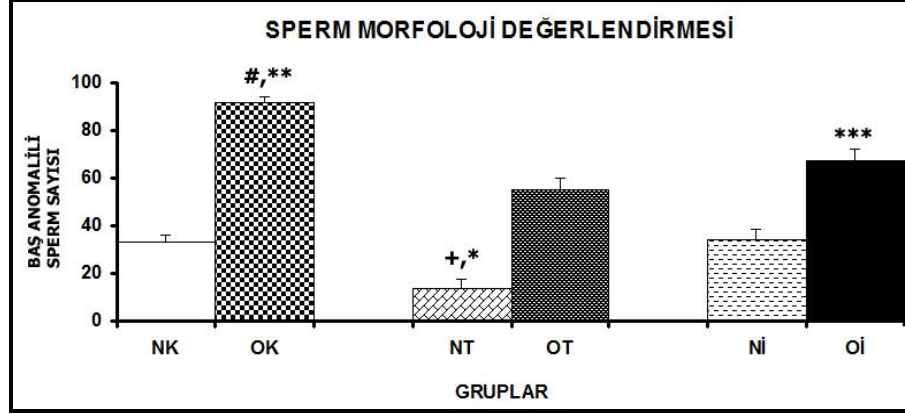
	NK	OK	NT	OT	Nİ	Oİ
Normal	151,5 ± 6,1	58,1 ± 2,2	176,6 ± 6,1	129 ± 4,7	152 ± 5,5	116,1 ± 4,4
Baş Anomali	33,0 ± 3,5	91,6 ± 2,6	13,8 ± 3,7	55 ± 4,7	34,1 ± 4,3	67,5 ± 4,8
Boyun Anomali	12,8 ± 2,6	31,8 ± 2,6	6,3 ± 1,5	13,1 ± 0,8	11,1 ± 2,2	13,6 ± 1,0
Kuyruk Anomali	2,6 ± 0,6	20,0 ± 4,2	3,1 ± 1,1	2,8 ± 0,5	2,6 ± 0,5	2,6 ± 0,4



Şekil 35. Tüm gruplardaki deneklerin semen yayma örneklerindeki normal sperm değerlendirmesinin gruplar arasında karşılaştırmasını gösteren grafik. ***; NK ve OK, Oİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, **; OK ve OT, Oİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, #; NT ve OT, Oİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, *; NT ve NK, Nİ grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark, +; Nİ ve OK, Oİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmektedir

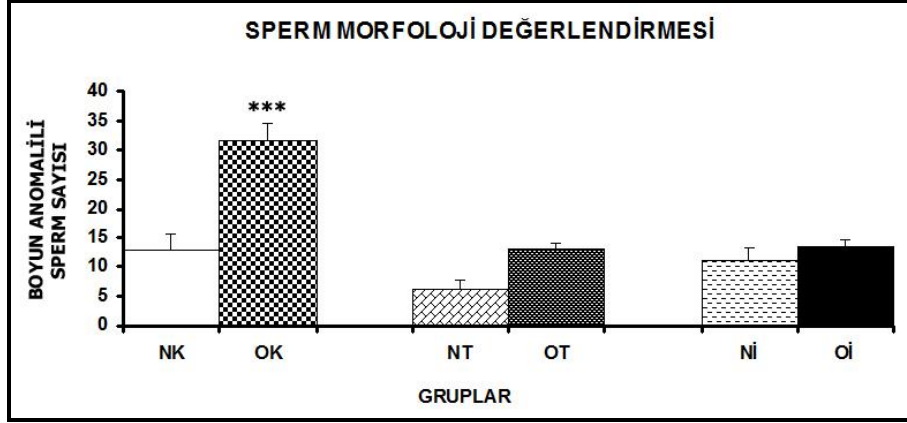
Gruplara ait sperm morfolojisi istatistiksel değerlendirmelerinde, NK grubundaki normal sperm sayısı OK ve Oİ gruplarına göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). OT ve Oİ gruplarındaki normal sperm sayısı, OK grubuna göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). NT grubundaki normal sperm sayısı, OT ve Oİ gruplarına göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). NT grubundaki normal sperm sayısı, NK ve Nİ gruplarına göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı

($p < 0,05$). Nİ grubundaki normal sperm sayısı, OK ve Oİ gruplarına göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$).



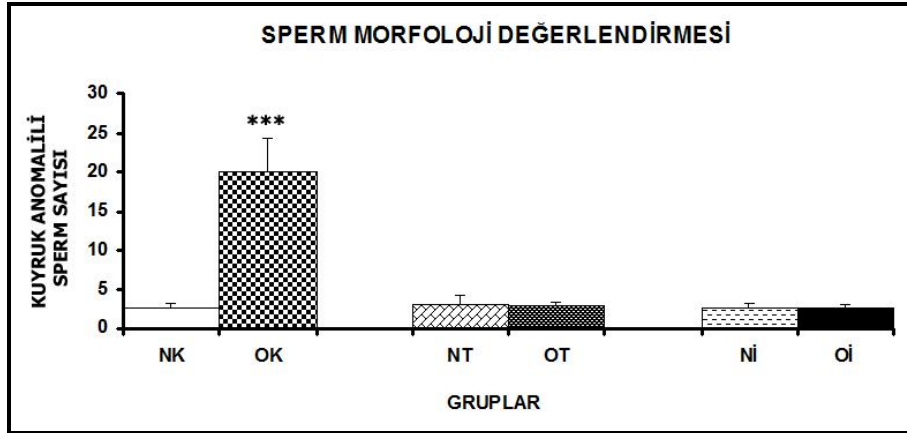
Şekil 36. Tüm gruplardaki deneklerin semen yayma örneklerindeki baş anomalili sperm değerlendirmesinin gruplar arasında karşılaştırmasını gösteren grafik. #; OK ve NK, NT, OT, Nİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, **; OK ve Oİ grupları arasında $p < 0,01$ düzeyinde anlamlı fark, +; NT ve OT, Oİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark, *; NT ve NK, Nİ grupları arasında $p < 0,05$ düzeyinde anlamlı fark, ***; Oİ ve NK, Nİ grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmektedir

OK grubundaki baş anomalili sperm sayısı, NK, NT, Nİ ve OT gruplarına göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). Oİ grubundaki baş anomalili sperm sayısı, OK grubuna göre azalmıştı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,01$). NT grubundaki baş anomalili sperm sayısı, OT ve Oİ gruplarına göre azalmıştı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). NT grubundaki baş anomalili sperm sayısı, NK ve Nİ gruplarına göre azalmıştı ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,05$). Nİ ve NK gruplarındaki baş anomalili sperm sayısı, Oİ grubuna göre azalmıştı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$).



Şekil 37. Tüm gruplardaki deneklerin semen yayma örneklerindeki boyun anomalili sperm değerlendirmesinin gruplar arasında karşılaştırmasını gösteren grafik. ***; OK ve NK, NT, Nİ, Oİ, OT grupları arasında $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı fark gözlenmektedir

OK grubundaki boyun anomalili sperm sayısı, NK, NT, Nİ, Oİ ve OT gruplarına göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$).



Şekil 38. Tüm gruplardaki deneklerin semen yayma örneklerindeki kuyruk anomalili sperm değerlendirmesinin gruplar arasında karşılaştırmasını gösteren grafik. ***; OK ve NK, NT, Nİ, Oİ, OT grupları arasındaki $p < 0,001$ düzeyinde anlamlı farkı göstermektedir

OK grubundaki kuyruk anomalili sperm sayısı, NK, NT, Nİ, Oİ ve OT gruplarına göre fazlaydı ve fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$).

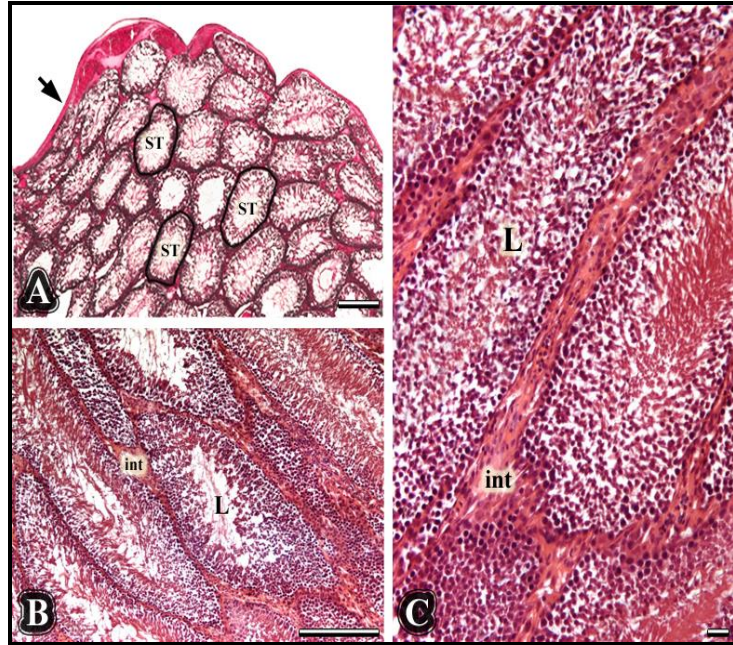
4.5. Histolojik Bulgular

4.5.1. Hematoksilen-Eozin Boyası ile Elde Edilen Bulgular

Histolojik ve histopatolojik bulgular kapsamında kontrol ve deney gruplarından elde edilen testis doku örneklerinin hematoksilen-eozin ile boyanmış kesitlerinin ışık mikroskopuyla incelenmesi sonucunda elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.

Non-Obez Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

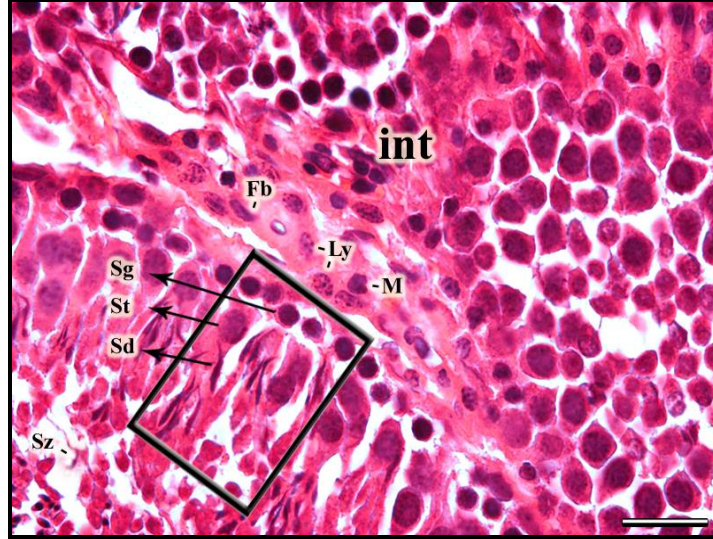
Non-obez kontrol grubundaki testislerin yapısını oluşturan tunika albuginea, seminifer tübül, interstisyel bağ dokusu ve Leydig hücreleri normal histolojik görünümdeydi. Spermatogenik seriye ait hücreler düzenli olarak tübül duvarında dizilmiş durumdaydı (Şekil 39).



Şekil 39. Non-obez kontrol grubuna ait testis kesitlerinin farklı büyütmelelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. **A'daki Ok;** Tunika albuginea'yı, **ST;** Seminifer tübülleri, **B ve C'deki L;** Tübül lümenini, **İnt;** İnterstisyel alanı göstermektedir (**Barlar:** A-B, 250 μm ; C, 25 μm)

NK grubunda spermatogonyumlar, primer spermatositler ve spermatidlerden oluşan spermatogenik hücre serisi seminifer tübüllerde düzenli bir dizilime sahipti. Tübüllerin arasını dolduran interstisyel bağ dokusu ve buradaki Leydig hücreleri normal morfolojide izlenmekteydi. Spermatogonyumlar bazal lamina üzerine yerleşmiş koyu yuvarlak çekirdekleriyle, primer spermatositler ise açık renkli oval bir çekirdeğe ve

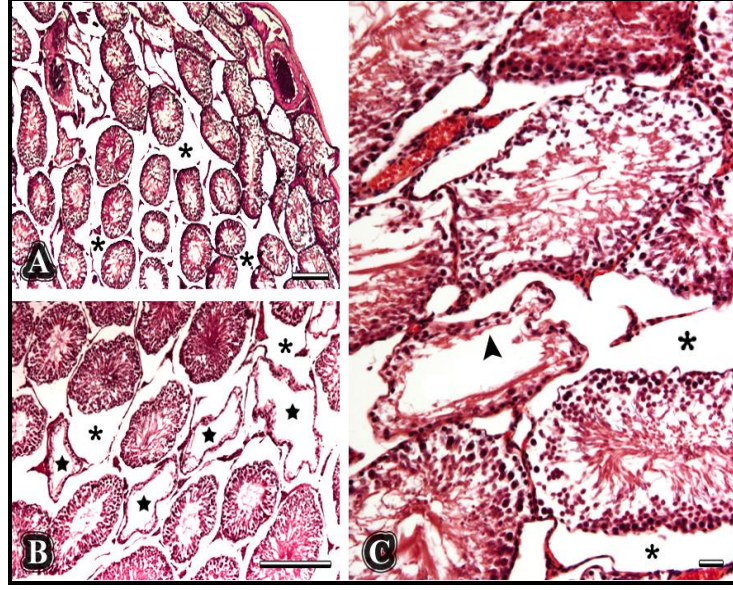
geniş sitoplazmaya sahip olmalarıyla ayırt edildiler. Spermatidler lümene yakın yerleşen ve koyu boyanan küçük bir çekirdeğe sahipti. Spermatozoon uzun, iğ şeklindeki çekirdekleri ile lümende gözlenmekteydi. Genelde poligonal şekilli olan Leydig hücreleri, düzgün yuvarlağa yakın oval biçimli çekirdeği ve eozinofilik boyanan sitoplazması ile ayırt edildi. İnterstisyumda Leydig hücrelerinin dışında bağ dokusu hücrelerinden fibroblast ve makrofajlar da izlenmekteydi (Şekil 40).



Şekil 40. Non-obez kontrol grubuna ait testis kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. Spermatozoonlardan spermatozoonlara kadar spermiyogenezin tüm evrelerindeki germ hücreleri görülmektedir. **Çerçevesiz alan;** Spermatojenik seriye ait hücreleri, **Sg;** Spermatozoonu, **St;** Spermatositi, **Sd;** Spermatidi, **Sz;** Spermatozoonu, **İnt;** İnterstisyel alanı, **Ly;** Leydig hücrelerini, **Fb;** Fibroblastı, **M;** makrofajı göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

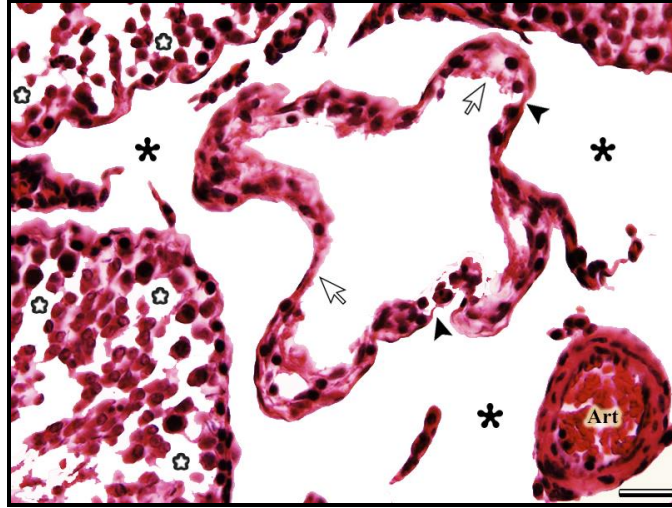
Obez Kontrol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

OK grubuna ait sıçanların testislerinde; seminifer tübüllerde ve spermatojenik seri hücrelerinde önemli hasarlar saptandı. Özellikle çok fazla sayıda atrofiye uğramış seminifer tübüller dikkat çekmekteydi. Obez kontrol grubundaki seminifer tübül duvarı non-obez kontrol grubuna göre oldukça incelmışti ve duvar yapısı bozulmuş durumdaydı. İnterstisyel alandaki ayrılmalar ve bağ dokusundaki artış dikkat çekiciydi (Şekil 41).

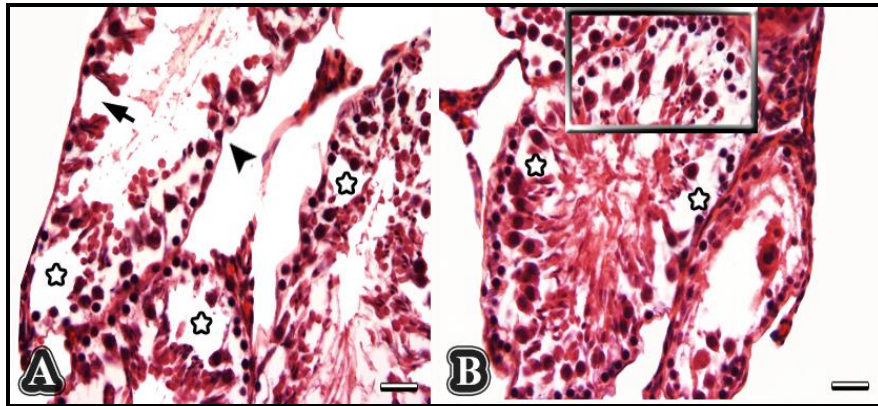


Şekil 41. Obez kontrol grubuna ait testis kesitlerinin farklı büyütmelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. **A, B, C'deki *;** Artmış bağ dokusunu, **B'deki Yıldızlar;** Atrofik seminifer tübüleri, **C'deki Ok başı;** Dejenere olmuş seminifer tübül epitelinin göstermektedir (**Barlar: A-B, 250 µm; C, 25 µm**)

OK grubuna ait kesitlerde seminifer tübüllerde spermatogenik seriye ait hücre sırasında azalma ve hücreler arasında açılmalar gözlemlendi. Birçok seminifer tübülde spermatogenik hücre dizisine rastlanmazken, tübüllerin duvar yapısı oldukça incelmışti ve tübül epitelinin birçok yerinde sadece peritübüler myoid hücreleri ayırt edilmekteydi. OK grubuna ait bazı seminifer tübüllerin duvarında myoid hücrelerin yanında spermatogonyumlar da bulunmaktaydı, fakat spermatosit, spermatid ve spermatozoonun bulunmadığı bölgeler yoğunlukta idi. Spermatogenez duraksamış durumdaydı. Genel olarak seminifer tübüllerde germinal hücre sayısında azalma dikkat çekmekteydi (Şekil 42 ve 43).

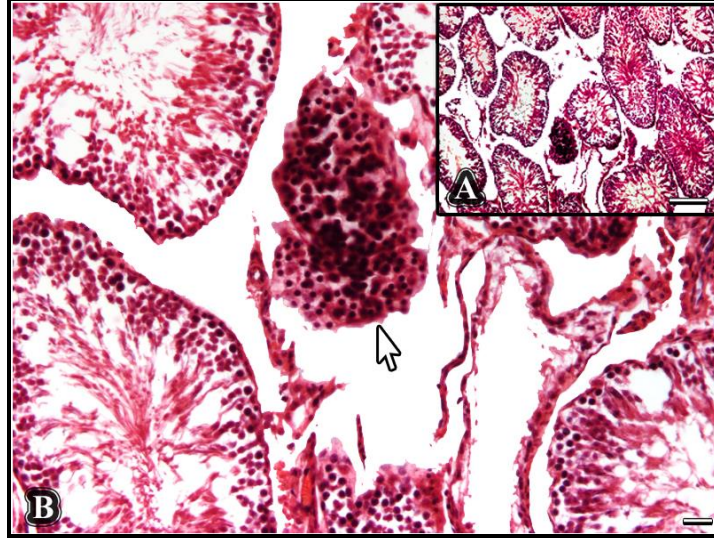


Şekil 42. Obez kontrol grubuna ait testis kesitindeki atrofik seminifer tübül görülmektedir. *; Artmış bağ dokusunu ve interstisyel alandaki ayrılmaları, **Ok başları**; İncelmiş seminifer tübül duvarını, **Oklar**; Spermatogenik hücrelerin olmadığı tübül epitelini, **Yıldızlar**; Bozulmuş spermatogenik hücre serisini, **Art**; Arteriolü göstermektedir (**Bar: 25 µm**)



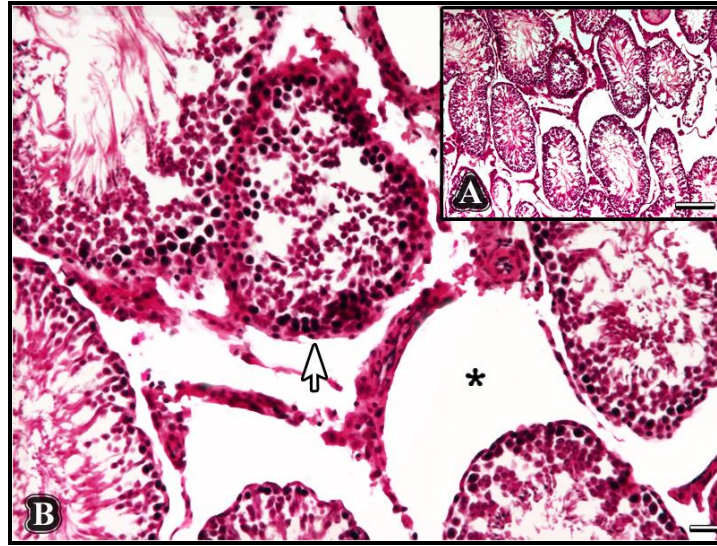
Şekil 43. Obez kontrol grubuna ait iki farklı testis kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. **A ve B'deki yıldızlar**; Spermatogenezin duraksadığı alanları, **A'daki Ok**; Germ hücresinin bulunmadığı tübül epitelini, **Ok başı**; İncelmiş tübül duvarını, **B'deki çerçelenmiş alan**; Spermatogenik hücreler arasındaki ayrılmaları göstermektedir (**Barlar: 25 µm**)

OK grubunda spermatogenik hücrelerin bulunmadığı tübüllerin yanında tamamen tübül yapısı bozulmuş, ölü hücre artığı olası yapılar izlenmekteydi (Şekil 44).



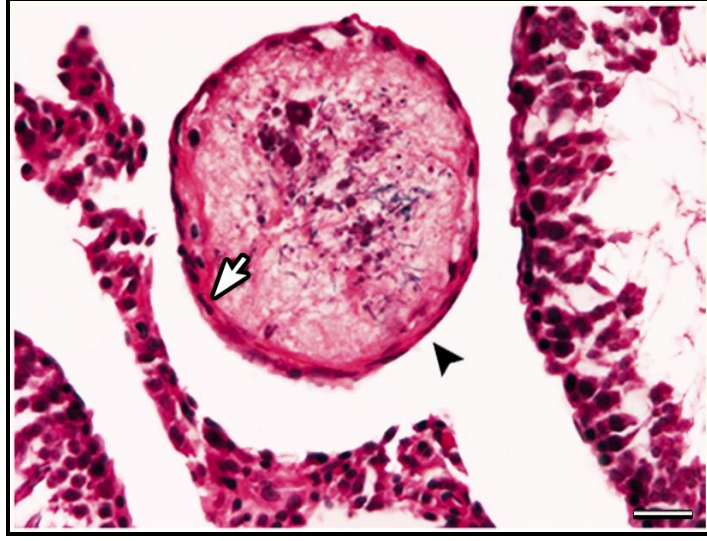
Şekil 44. Obez kontrol grubuna ait testis kesitinin iki farklı büyütmadaki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. **Ok;** Nekrotik tübülü göstermektedir (**Barlar:** A, 250 μm ; B, 25 μm)

OK grubundaki örneklerin bazı bölgelerinde seminifer tübül lümeninde spermatogenik hücre döküntüleri görülmekteydi. Duvarı incelmış tübüllerin yanında normalden daha kalın duvar yapısına sahip tübüller de izlenmekteydi (Şekil 45).



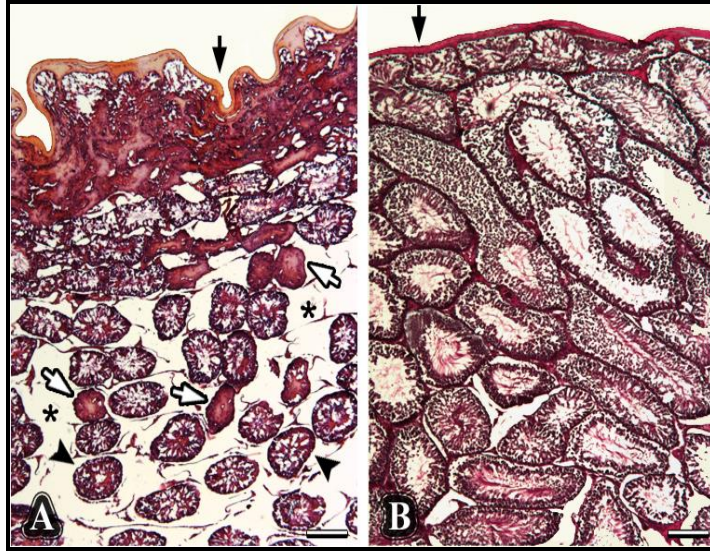
Şekil 45. Obez kontrol grubuna ait testis kesitinin iki farklı büyütmadaki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. *; Artmış bağ doku alanını, **Ok;** Kalınlaşmış tübül duvarını göstermektedir (**Barlar:** A, 250 μm ; B, 25 μm)

OK grubuna ait kesitlerde spermatogenik hücre dizisinin olmadığı, sadece myoid hücrelerden oluşan tübüller de izlenmekteydi. Ayrıca tübül lümeninde ödem bulunmaktaydı (Şekil 46).



Şekil 46. Obez kontrol grubuna ait testis kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. **Ok başı;** İncelmiş tübül duvarını, **Ok;** Sadece peritübüler myoid hücrelerin bulunduğu tübül epitelinin göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

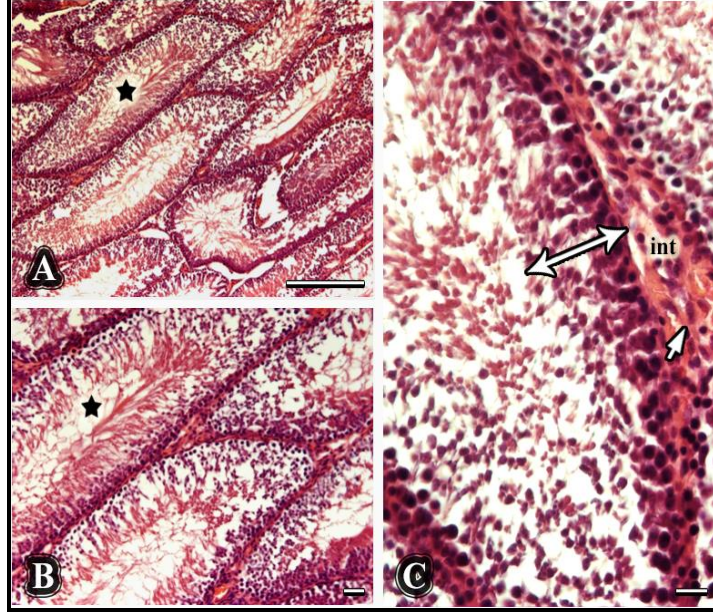
OK grubuna ait kesitlerde tübüllerde olduğu gibi tunika albugineadaki büzüşmeler dikkat çekiciydi (Şekil 47).



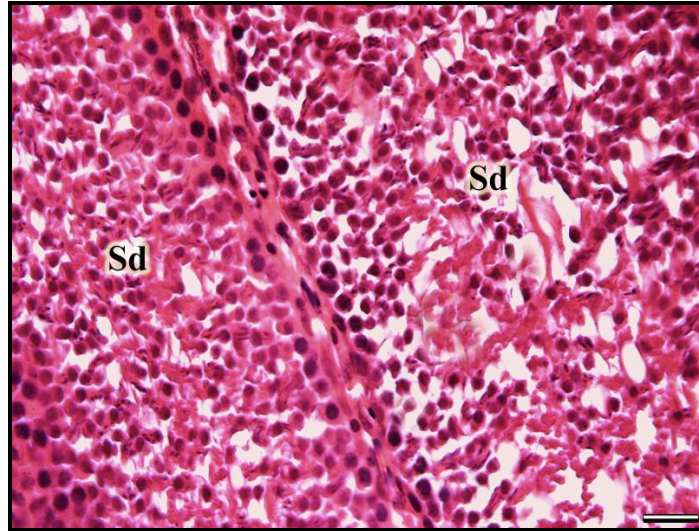
Şekil 47. Sırasıyla obez kontrol ve non-obez kontrol grubuna ait testis kesitlerinin ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. **A'daki Siyah ok;** Büzüşmeler olan tunika albugineayı, *****; Artmış bağ dokusunu, **Ok başları;** Büzüşmüş ve küçülmüş tübülleri, **Beyaz oklar;** Atrofik tübülleri, **B'de Normal morfolojideki seminifer tübüller** görülmektedir ve **Ok;** Düzenli seyreden tunika albugineayı göstermektedir (**Barlar: 250 µm**)

Non-Obez Timokinon Grubuna Ait Histolojik Bulgular

NT grubundaki testis kesitleri normal görünüme sahipti. Seminifer tübüller, spermatogenik hücre serisi, interstisyel bağ dokusu ve Leydig hücreleri normal morfolojide izlendi (Şekil 48 ve 49).

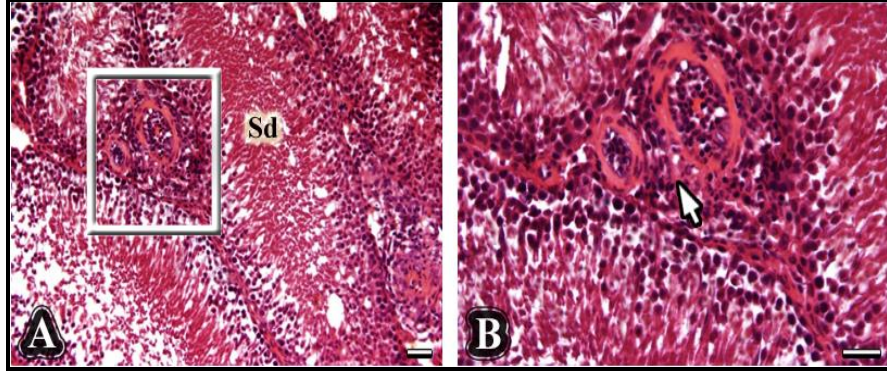


Şekil 48. Non-obez timokinon grubuna ait testis kesitinin farklı büyütmelelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A, B'deki Yıldız; Tübül lümenindeki sperm yoğunluğunu, C'deki Çift ok; Spermatogenik hücre serisini, İnt; İnterstisyel alanı, Ok; Leydig hücrelerini göstermektedir (Barlar: A, 250 µm; B-C, 25 µm)



Şekil 49. Non-obez timokinon grubuna ait testis kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. Sd; Tübül lümeninde yoğunlaşmış spermatidleri göstermektedir (Bar: 25 µm)

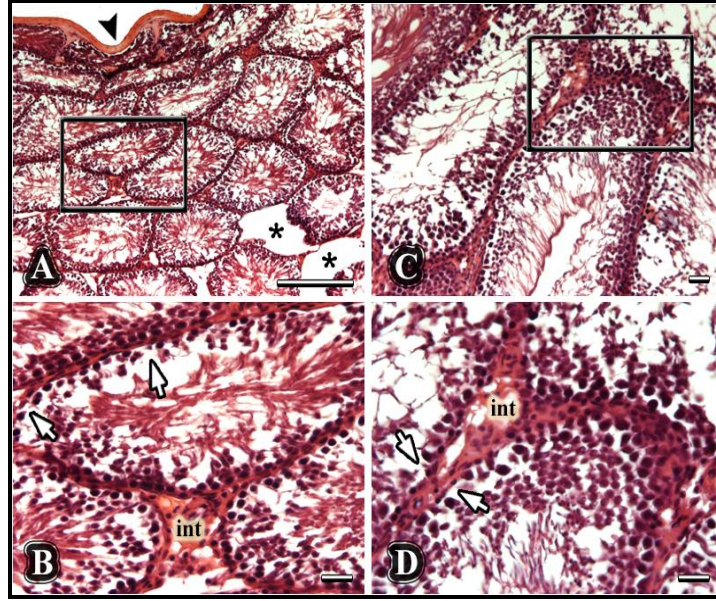
NT grubundaki testis kesitlerindeki interstisyel alan diğer gruplara göre daha düzenliydi. Bağ dokusu hücrelerinin fazlalığı ve damarlanmanın yoğun olması dikkat çekiciydi (Şekil 50).



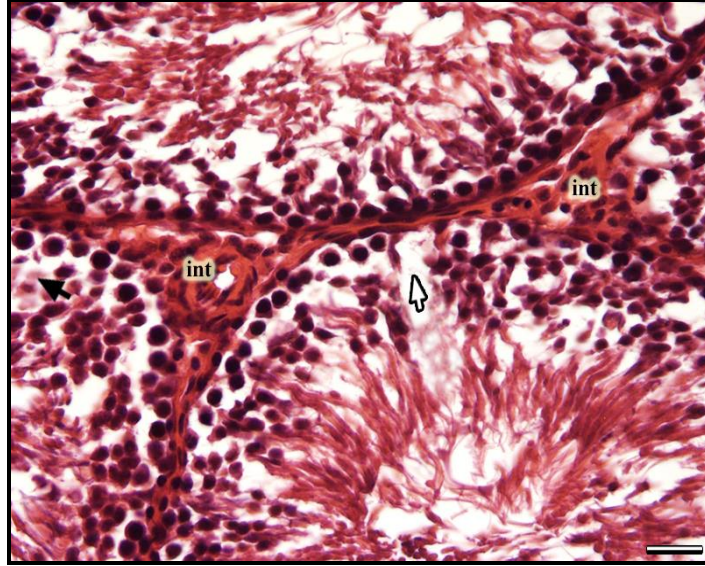
Şekil 50. Non-obez timokinon grubuna ait testis kesitinin iki farklı büyütmedeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. **A'daki Sd;** Tübül lümeninde yoğunlaşmış spermatozoidleri, A'daki çerçeveli alanın büyütülmüş görüntüsünde **B'deki Ok;** İnterstisyel alandaki arteriolleri göstermektedir (**Barlar: 25 µm**)

Obez Timokinon Grubuna Ait Histolojik Bulgular

OK ve Oİ gruplarında olduğu gibi OT grubunda da obezitenin verdiği hasar izlenmekteydi. Germ hücreleri arasında açılmalar vardı. Yer yer spermatogenik hücre dizisinin bozulduğu ve spermatogenezin duraksadığı görüldü. NT grubuna kıyasla tübül lümenindeki spermatozoid ve spermatozoon yoğunluğunun azaldığı izlendi. İnterstisyel alan diğer obez gruplara kıyasla düzenli bir görünüme sahipti (Şekil 51 ve 52).

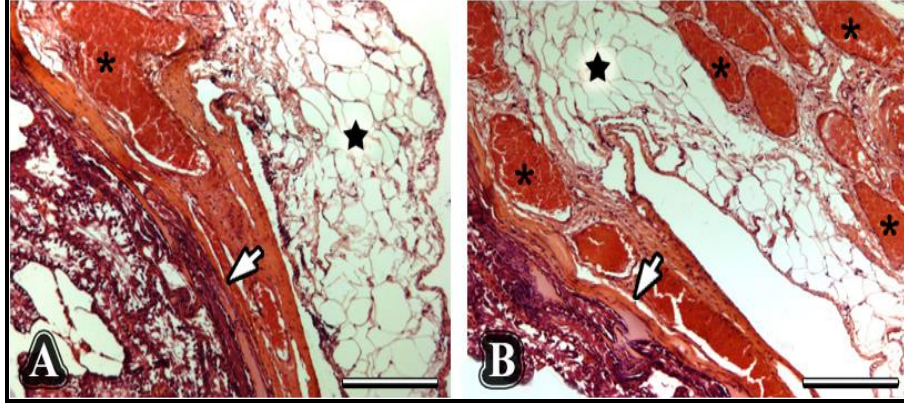


Şekil 51. Obez timokinon grubuna ait testis kesitinin farklı büyütmelelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. **A'daki Ok başı;** Tunika albugineayı, *****; Kopmaların olduğu interstisyel alanı göstermektedir. A ve C'deki çerçeveli alanların büyütülmüş görüntüsü sırasıyla B ve D'de izlenmektedir. **B ve D'deki Oklar;** Germ hücre kayıplarının olduğu bölgeleri, **İnt;** İnterstisyel alanı göstermektedir. (Barlar: A, 250 µm; B-C-D, 25 µm)



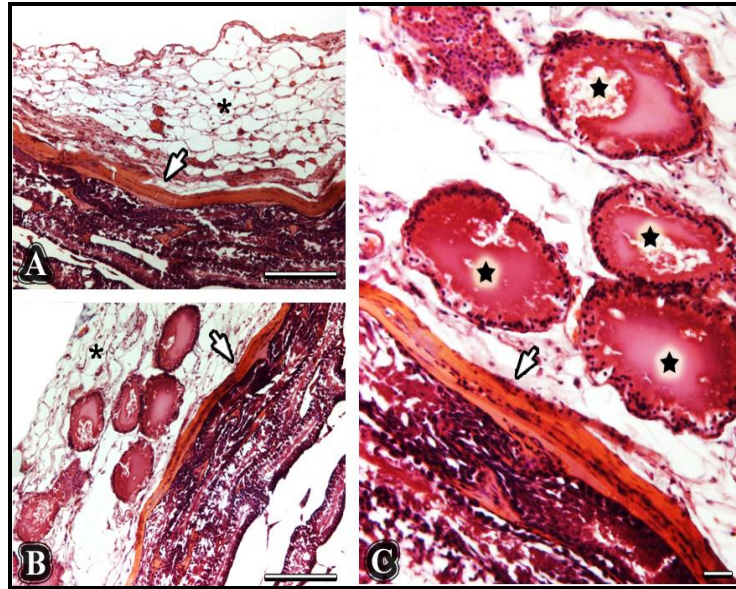
Şekil 52. Obez timokinon grubuna ait testis kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. **Siyah ok;** Spermatogenik hücre serinin bozulduğu bölgeleri, **Beyaz ok;** Germ hücresi olmayan tübül epitelinin, **İnt;** İnterstisyel alanları göstermektedir (Bar: 25 µm)

OT grubunda diğer deney gruplarından farklı olarak tunika albuginea'nın dışında kalın bir yağ dokusu tabakası bulunmaktaydı. Yağ doku içerisinde ve tunika albuginea boyunca yoğun bir damarlanma izlenmekteydi (Şekil 53).



Şekil 53. Obez timokinon grubuna ait testis kesitinin iki farklı ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A ve B'deki Yıldızlar; Yağ dokuyu, *; Kan damarlarını, Oklar, Tunika albugineayı göstermektedir (Barlar: 250 µm)

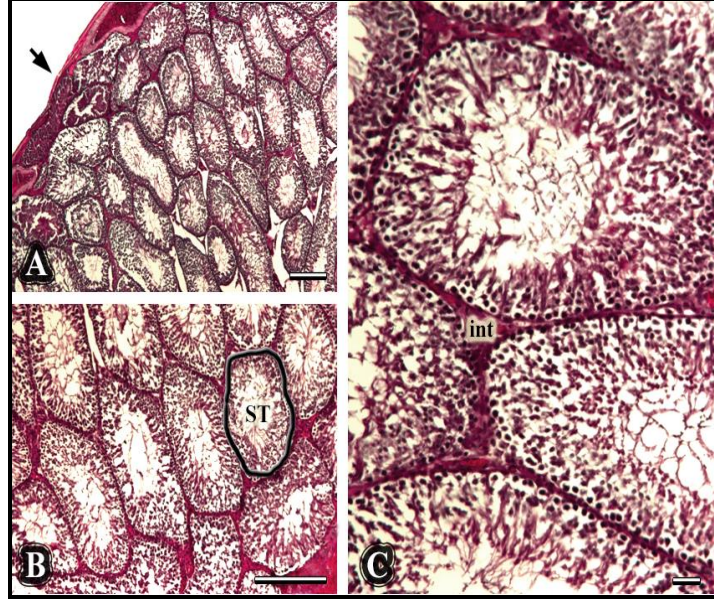
OT grubunda yine diğer deney gruplarında rastlanmayan bir yapı ilgi çekiciydi. Tunika albuginea dışında yağ dokusu içerisinde birkaç tane tübül bulunmaktaydı. Spermatogonyum hücre tabakasından oluşan tübüllerin lümeninde spermatozoid ve spermatid'e rastlanmadı. Lümeninde yoğun bir şekilde ödem bulunmaktaydı (Şekil 54).



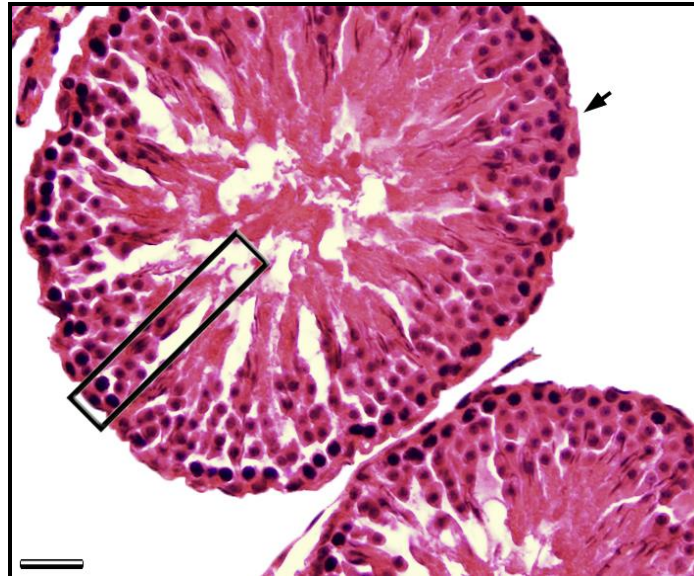
Şekil 54. Obez timokinon grubuna ait testis kesitinin farklı büyütme derecelerindeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A ve B'deki *; Yağ dokusunu, A, B, C'deki Oklar; Tunika albugineayı, C'deki Yıldızlar; Atrofik tübüllerini göstermektedir (Barlar: A-B, 250 µm; C, 25 µm)

Non-Obez İndol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Nİ grubunu histolojik bulgular açısından değerlendirdiğimizde tunika albuginea NK grubundaki gibi düzenli bir yapı göstermekteydi. Tübüller ve spermatogenik hücre dizini normal görünümdeydi (Şekil 55 ve 56).



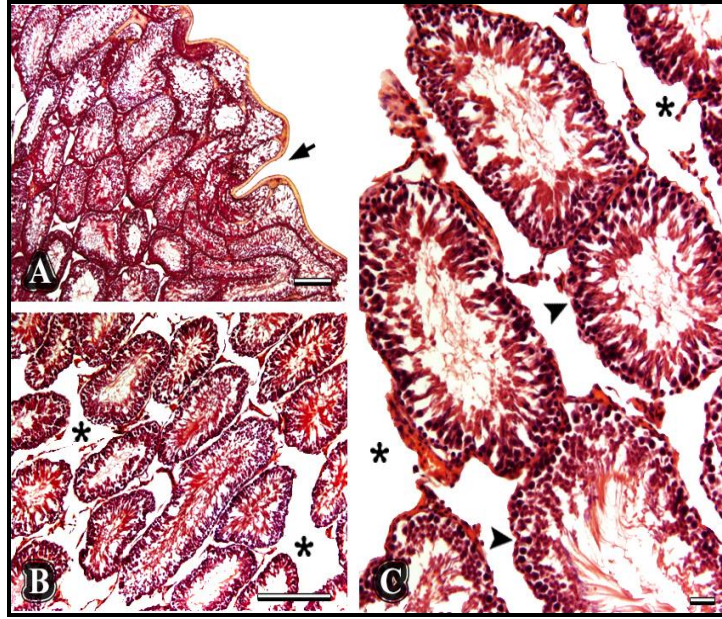
Şekil 55. Non-obeze indol grubuna ait testis kesitinin farklı büyütme düzeyindeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A'daki Ok; Tunika albugineayı, B'deki ST; Seminifer tübülü, C'deki İnt: İnterstisyel alanı göstermektedir (Barlar: A-B, 250 µm; C, 25 µm)



Şekil 56. Non-obeze indol grubuna ait testis kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. Çerçevesiz alan; Spermatogonyumdan spermataide kadar olan spermatogenik hücre dizinini, Ok; Normal morfolojideki tübül duvarını göstermektedir (Bar: 25 µm)

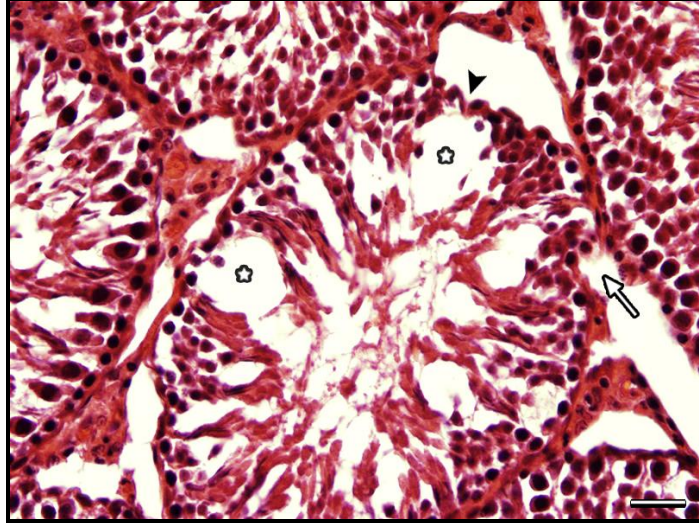
Obez İndol Grubuna Ait Histolojik Bulgular

Oİ grubunu histolojik bulgular açısından değerlendirdiğimizde OK grubundaki tunika albugineadaki büzüşmeler Oİ grubunda da izlenmekteydi. Oİ grubundaki seminifer tübül ve spermatogenik hücre yoğunluğu OK grubuna göre oldukça fazlaydı. İnterstisyel alandaki ayrılmalar ve bağ doku yoğunluğu OK grubuna göre azalmıştı. OK grubunda sıkça gördüğümüz tamamen boşalmış olan tübül yapısına Oİ grubunda rastlanmadı (Şekil 57).



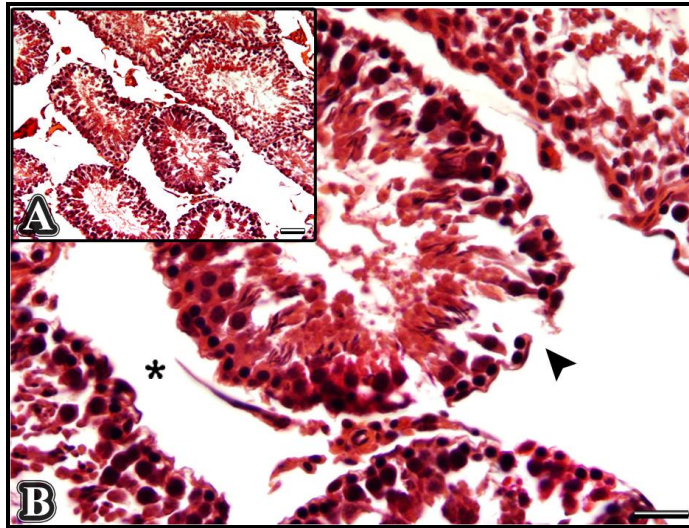
Şekil 57. Obez indol grubuna ait testis kesitinin farklı büyütmeledeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. **A'daki Ok;** Büzüşmelerin olduğu tunika albugineayı, **B ve C' deki *;** Artmış bağ doku alanlarını, **C'deki Ok başları;** Yer yer büzüşmüş ve incelmış tübül duvarını göstermektedir (**Barlar: A-B, 250 µm; C, 25 µm**)

Oİ grubundaki spermatogenik hücre yoğunluğu OK grubuna kıyasla fazlaydı fakat obezitenin neden olduğu hasarlar az da olsa bazı bölgelerde izlenmekteydi. Oİ grubuna ait kesitlerdeki bazı seminifer tübüllerde spermatogenik hücreler arasında ayrılmaların olduğu, bazı bölgelerde yalnızca spermatogonyumların bulunduğu izlendi. Seminifer tübüllerin duvarı OK grubundaki kadar olmasa da incelmışti ve hücre kayıplarının olduğu bölgelerde spermatogenez duraksamış durumdaydı (Şekil 58).



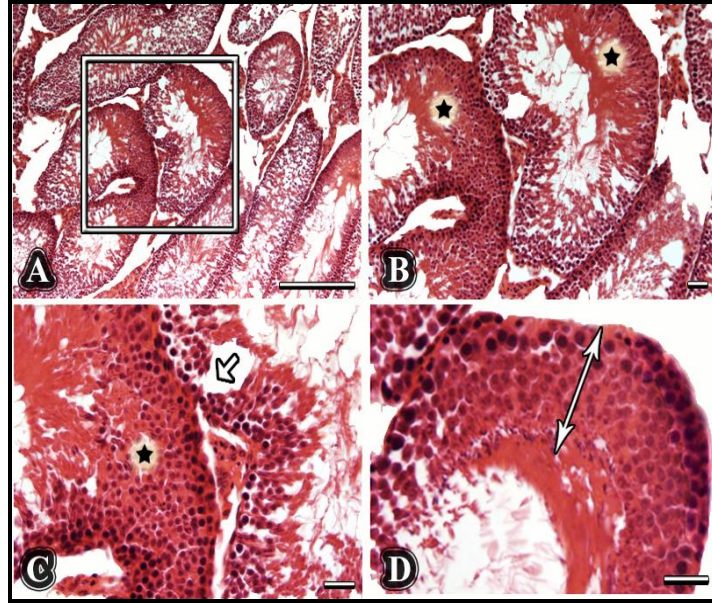
Şekil 58. Obez indol grubuna ait testis kesitinin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. **Yıldızlar;** Spermatogenezin duraksadığı alanları, **Ok başı;** İncelmiş tübül duvarını, **Ok;** İncelmiş tübül epitelinin koptuğu bölgeyi göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Oİ grubuna ait bazı kesitlerde incelmiş seminifer tübül duvarında ayrılmaların olduğu görüldü. Tübülün diğer bölgelerinde spermatogenez devam ederken kopmanın olduğu yerde duraksamış durumdaydı (Şekil 59).



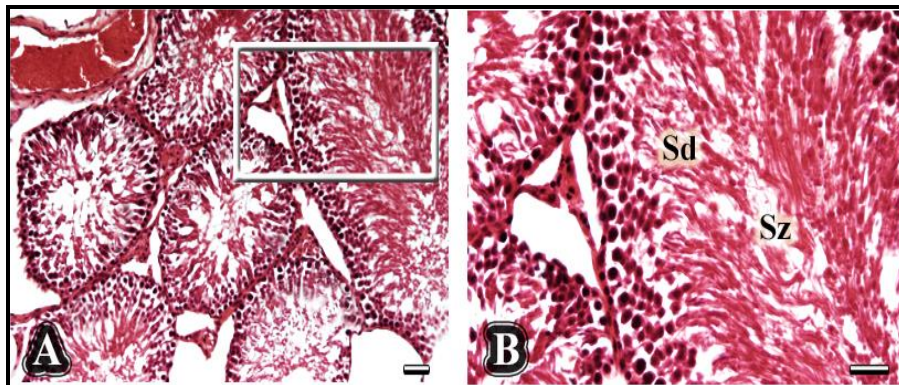
Şekil 59. Obez indol grubuna ait testis kesitinin farklı iki büyütmedeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. *****; Genişlemiş bağ doku alanını, **Ok başı;** Kopmuş tübül epitelini göstermektedir (**Barlar: 25 µm**)

Oİ grubunda bazı tübüllerde kontrolsüz mitotik bölünmelerin olduğu bölgeler dikkat çekmekteydi (Şekil 60).

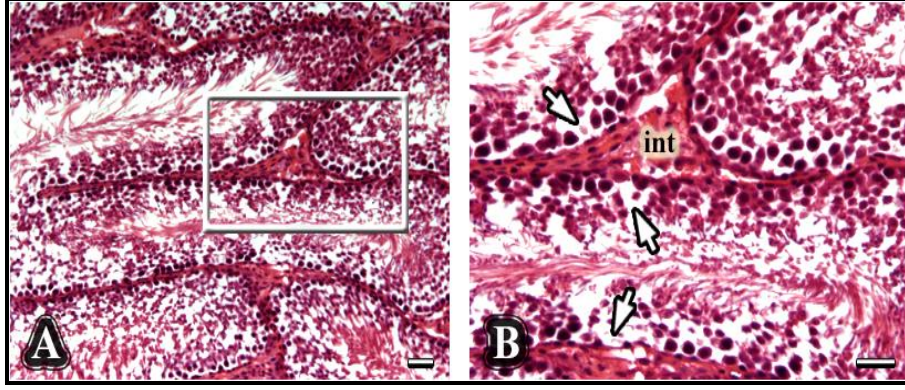


Şekil 60. Obez indol grubuna ait testis kesitinin farklı büyütmelelerdeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A'daki çerçeveli alanın büyütülmüş görüntüleri B, C ve D'de görülmektedir. **B ve C'deki Yıldızlar;** Kontrolsüz mitotik bölünmelerin olduğu bölgeleri, **C'deki Ok;** Spermatogenezin duraksadığı bölgeyi, **D'deki Çift ok;** Yoğun mitotik bölünmeyi göstermektedir (**Barlar: A, 250 µm; B-C-D, 25 µm**)

Histolojik kesitlerde Nİ grubunda lümendeki spermatozoon oldukça yoğundu (Şekil 61). Oİ grubunda ise bu yoğunluk kısmen azalmış durumdaydı. Bazı bölgelerde spermatogonik hücreler arasında ayrılmalar izlendi ve germ hücre dizisinin bozulduğu görüldü (Şekil 62).



Şekil 61. Non-obez indol grubuna ait testis kesitinin iki farklı büyütmedeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A'daki çerçeveli alanın büyütülmüş görüntüsünde **B'deki Sd;** Spermatidleri, **Sz;** Spermatozoon yoğunluğunu göstermektedir (**Barlar: 25 µm**)



Şekil 62. Obez indol grubuna ait testis kesitinin iki farklı büyütmadaki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A'daki çerçevesi alanın büyütülmüş görüntüsünde B'deki Oklar; Germ hücrelerinin bulunmadığı tübül epitelinin, İnt; İnterstisyel alanı göstermektedir (Barlar: 25 μm)

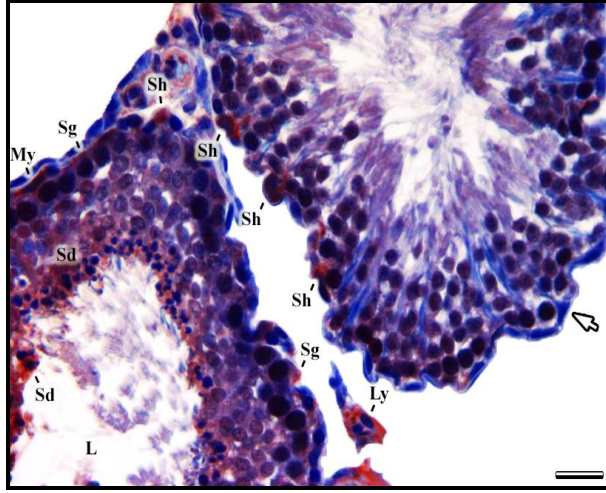
4.5.2. İmmünohistokimyasal Boyama ile Elde Edilen Bulgular

LH Reseptör Antikoru (LHr)

Çalışmamızdaki LH reseptör antikoru kullanılarak yapılan immünohistokimyasal incelemelerde tüm testis gruplarına ait örneklerde kırmızı boyanan alanlar pozitif olarak değerlendirildi. LH reseptör boyaması ile immünoreaktivite yalnızca hücrelerin sitoplazmasında gözlemlendi. Çekirdeklerde herhangi bir immünboyanma şekillenmedi. Hücre sitoplazmasındaki boyanma yoğunluğu hücreden hücreye değişim göstermekteydi. Spermatogonik hücrelerinin bir kısmında immünoreaktivite şekillenirken bazılarında gözlenmedi (Şekil 63).

Non-Obez Kontrol Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

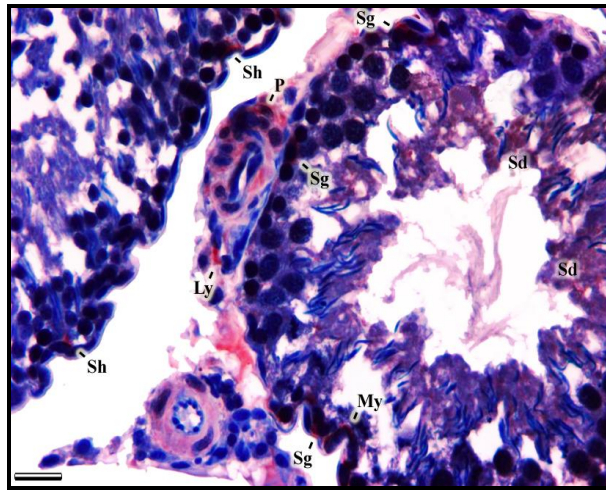
NK grubuna ait testis kesitlerinin immünohistokimyasal değerlendirmesinde Sertoli, Leydig, spermatogonyum, spermatid ve peritübüler myoid hücre sitoplazmalarında LHr immünboyanma pozitif iken hücre çekirdekleri negatif boyanmıştı. Bazı Sertoli hücre sitoplazmasında güçlü pozitif immünoreaktivite gözlenirken bazılarında ise negatif boyanma gözlemlendi (Şekil 63).



Şekil 63. Non-obez kontrol grubuna ait testis kesitinin LH reseptör antikoruna ile boyanmış ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. İmmünreaktivitesi pozitif olan hücrelerden **Sh**; Sertoli hücrelerini, **Sg**; Spermatogonyum hücrelerini, **My**; Peritübüler Myoid hücreyi, **Ly**; Leydig hücrelerini, **Sd**; Spermatidleri, **L**; Tübül lümenini, **Ok**; Negatif boyanan Sertoli hücrelerini göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Obez Kontrol Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

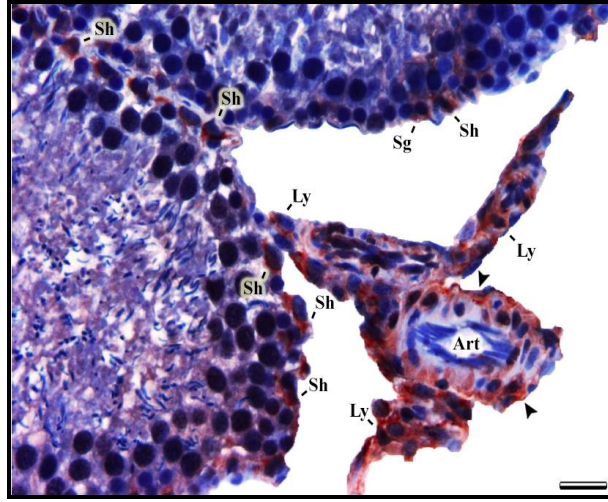
OK grubuna ait testis kesitlerinin immünohistokimyasal değerlendirmesinde spermatogonyum, Sertoli, Leydig, peritubuler myoid hücre ve perisit hücre sitoplazmalarında hafif pozitif bölgeler izlendi. Spermatozoid hücrelerinde immünreaktivite şekillenmezken interstisyel alanda kan damarı çevresi, bağ dokusu ve tübül lümenine uzanmış spermatid sitoplazmasında hafif pozitiflik göstermekteydi (Şekil 64).



Şekil 64. Obez kontrol grubuna ait testis kesitinin LH reseptör antikoruna ile boyanmış ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. İmmünreaktivitesi pozitif olan hücrelerden **Sh**; Sertoli hücrelerini, **Sg**; Spermatogonyum hücrelerini, **My**; Peritübüler Myoid hücreyi, **Ly**; Leydig hücrelerini, **P**; Perisiti göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Non-Obez Timokinon Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

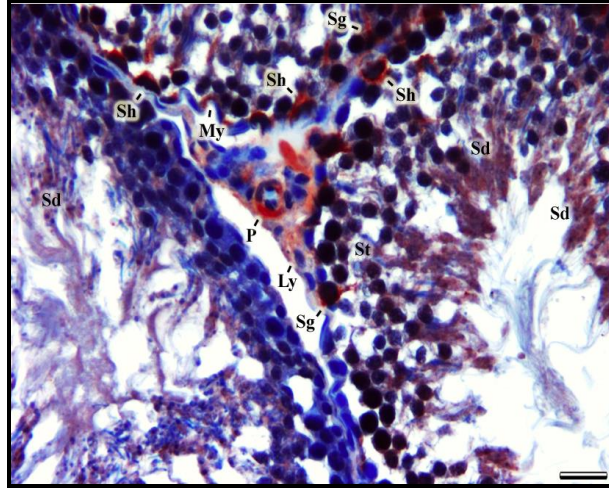
NT grubuna ait testis kesitlerinin immünohistokimyasal değerlendirmesinde Sertoli ve Leydig hücre sitoplazmasında yoğun immünreaktivite gözlenirken, spermatogonyum sitoplazmasında hafif pozitif bölgeler izlendi. NT grubunda özellikle damar çevresi, bağ dokusu ve Leydig hücre sitoplazmasının güçlü immünreaktivite gösterdiği gözlemlendi (Şekil 65).



Şekil 65. Non-obez timokinon grubuna ait testis kesitinin LH reseptör antikoruna ile boyanmış ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. İmmünreaktivitesi pozitif olan hücrelerden **Sh**; Sertoli hücrelerini, **Sg**; Spermatogonyum hücrelerini, **Ly**; Leydig hücrelerini, **Art**; Arterioli, **Ok başları**; Damar duvarını göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Obez Timokinon Kontrol Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

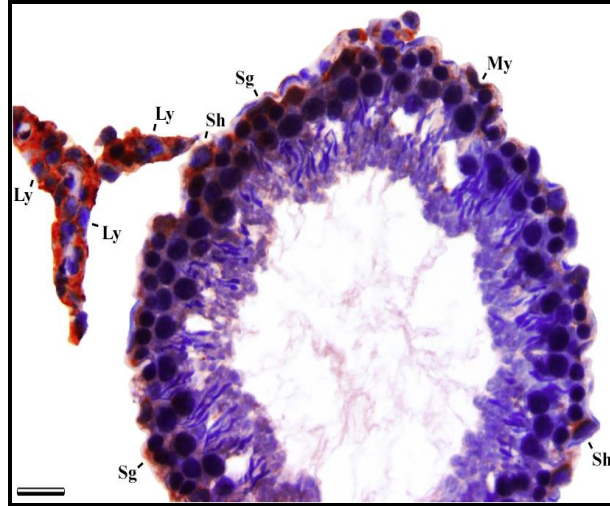
OT grubuna ait testis kesitlerinin immünohistokimyasal değerlendirmesinde NT grubunda olduğu gibi Sertoli hücre sitoplazması yoğun immünreaktivite göstermekteydi. Yer yer spermatogonyum ve myoid hücre sitoplazmasında pozitif bölgeler izlendi. İnterstisyel alandaki kapiller duvarındaki düz kas hücreleri olan perisitler güçlü immünreaktivite gösterirken, Leydig, spermatozoid ve spermatozoid hücre sitoplazmasında hafif pozitiflik izlenmekteydi (Şekil 66).



Şekil 66. Obez timokinon grubuna ait testis kesitinin LH reseptör antikoruna ile boyanmış ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. İmmünreaktivitesi pozitif olan hücrelerden **Sh**; Sertoli hücrelerini, **Sg**; Spermatogonyum hücrelerini, **St**; Spermatositleri, **Sd**; Spermatidleri, **Ly**; Leydig hücrelerini, **My**; Peritübüler Myoid hücreyi **P**; Perisiti göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Non-Obez İndol Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

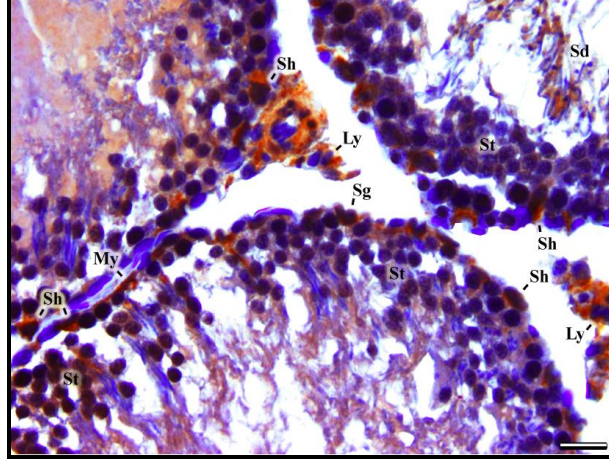
Nİ grubuna ait testis kesitlerinin immünohistokimyasal değerlendirmesinde Sertoli, spermatogonyum ve myoid hücre sitoplazması hafif pozitif immün boyanma gösterirken, spermatosit ve spermatidlerde immün boyanma gözlenmedi. Leydig hücre sitoplazması çok güçlü pozitif immünreaktivite göstermekteydi (Şekil 67).



Şekil 67. Non-obez indol grubuna ait testis kesitinin LH reseptör antikoruna ile boyanmış ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. İmmünreaktivitesi pozitif olan hücrelerden **Sh**; Sertoli hücrelerini, **Sg**; Spermatogonyum hücrelerini, **Ly**; Leydig hücrelerini, **My**; Peritübüler Myoid hücreyi göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Obez İndol Grubuna Ait İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

Oİ grubuna ait testis kesitlerinin immünohistokimyasal değerlendirmesinde Sertoli hücre sitoplazmasında güçlü pozitif boyanma izlenmekteydi. Damar çevresi ve Leydig hücre sitoplazmasının yoğun immün pozitif boyandığı, spermatosit ve spermatid hücre sitoplazmasının ise hafif immün pozitif reaktivite gösterdiği görüldü (Şekil 68).



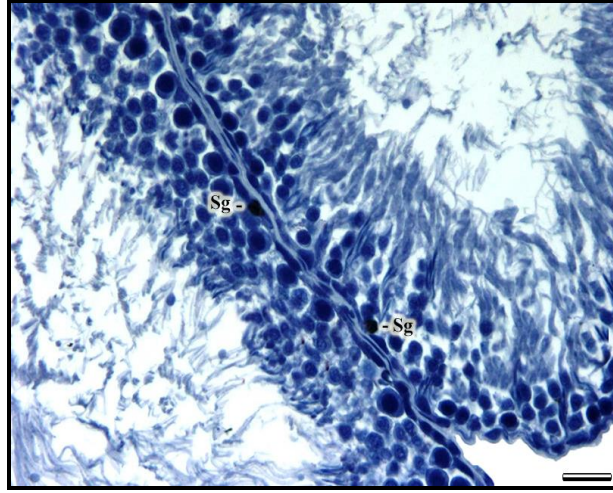
Şekil 68. Obez indol grubuna ait testis kesitinin LH reseptör antikoru ile boyanmış ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. İmmünreaktivitesi pozitif olan hücrelerden **Sh**; Sertoli hücrelerini, **Sg**; Spermatogonyum hücrelerini, **St**; Spermatositleri, **Sd**; Spermatidleri, **Ly**; Leydig hücrelerini, **My**; Myoid hücreyi göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

4.5.3. TUNEL Boyama ile Elde Edilen Bulgular

Çalışmamızda testis örnekleri üzerinde yaptığımız TUNEL boyamada siyah boyanan hücreler apoptotik hücreler olarak değerlendirildi.

Non-Obez Kontrol Grubuna Ait Tünel Boyama Bulguları

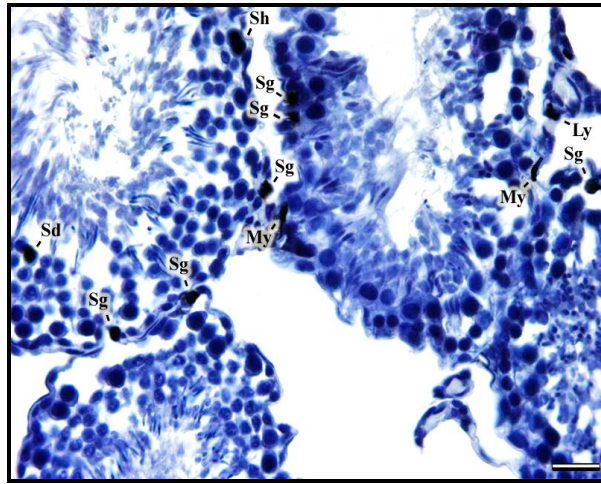
NK grubuna ait testis kesitlerinin TUNEL boyama sonrası değerlendirmesinde apoptozisin spermatogonyumlarda olduğu gözlemlendi (Şekil 69).



Şekil 69. Non-obez kontrol grubuna ait testis kesitinin TUNEL boya ile boyanmış ışık mikroskobik görüntüsü izlenmektedir. Apoptotik aktivite gösteren **Sg**; Spermatogonyum hücrelerini göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Obez Kontrol Grubuna Ait TUNEL Boyama Bulguları

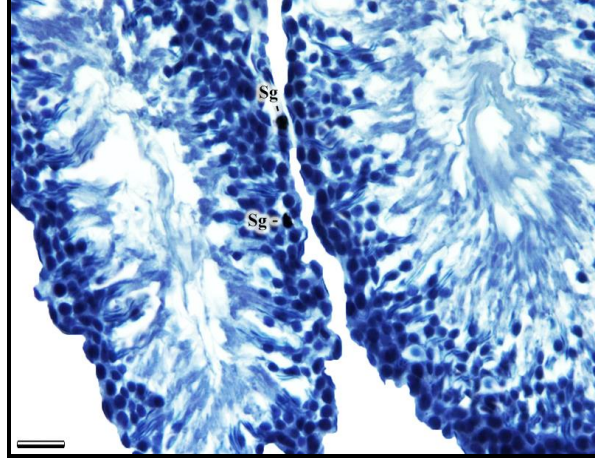
OK grubuna ait testis kesitlerinin TUNEL boyama sonrası incelendiğinde obezitenin verdiği hasar dikkat çekiciydi. NK grubuna kıyasla apoptozisin belirgin bir şekilde arttığı görüldü. Germ hücrelerinin yanında Leydig, Sertoli ve peritübüler myoid hücrelerinde de apoptotik aktivitenin olduğu izlendi (Şekil 70).



Şekil 70. Obez kontrol grubuna ait testis kesitinin TUNEL boya ile boyanmış ışık mikroskobik görüntüsü izlenmektedir. Apoptotik aktivite gösteren **Sg**; Spermatogonyum hücrelerini, **Sh**; Sertoli hücrelerini, **Sd**; Spermatidi, **Ly**; Leydig hücrelerini, **My**; Myoid hücreleri göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Non-Obez Timokinon Grubuna Ait TUNEL Boyama Bulguları

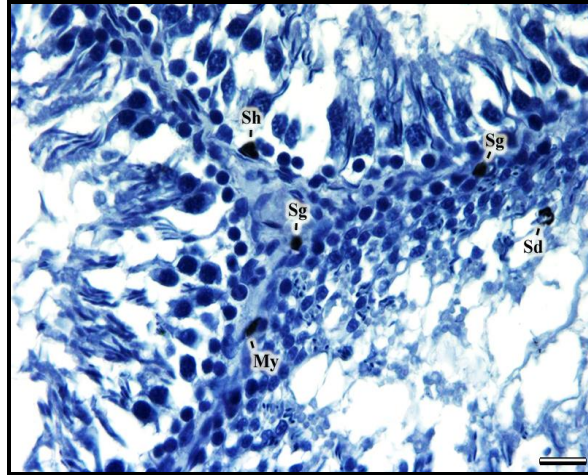
NT grubuna ait testis kesitlerini TUNEL boyama sonrası değerlendirdiğimizde NK grubuyla benzer görünümde olduğu ve birkaç spermatogonyumun apoptotik aktivite gösterdiği görüldü (Şekil 71).



Şekil 71. Non-obez timokinon grubuna ait testis kesitinin TUNEL boya ile boyanmış ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. Apoptotik aktivite gösteren **Sg**; Spermatogonyum hücrelerini göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Obez Timokinon Grubuna Ait TUNEL Boyama Bulguları

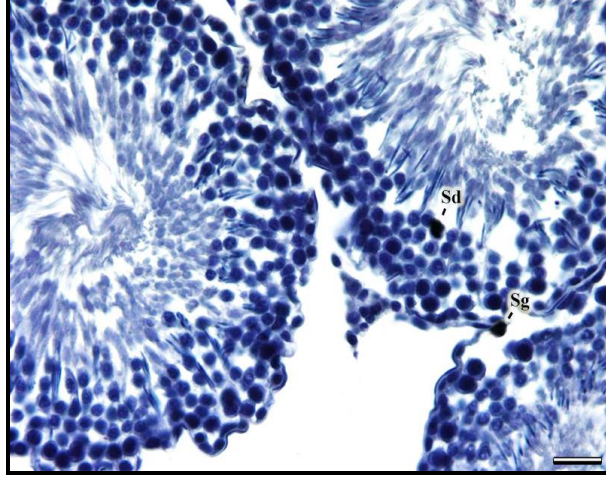
OT grubuna ait testis kesitlerini TUNEL boyama sonrası değerlendirdiğimizde OK grubuna kıyasla germ hücrelerindeki özellikle de spermatogonyumlardaki apoptozisin azaldığı izlendi (Şekil 72).



Şekil 72. Obez timokinon grubuna ait testis kesitinin TUNEL boya ile boyanmış ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. Apoptotik aktivite gösteren **Sg**; Spermatogonyum hücrelerini, **Sh**; Sertoli hücrelerini, **Sd**; Spermatidi, **My**; Peritübüler myoid hücreyi göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Non-Obez İndol Grubuna Ait TUNEL Boyama Bulguları

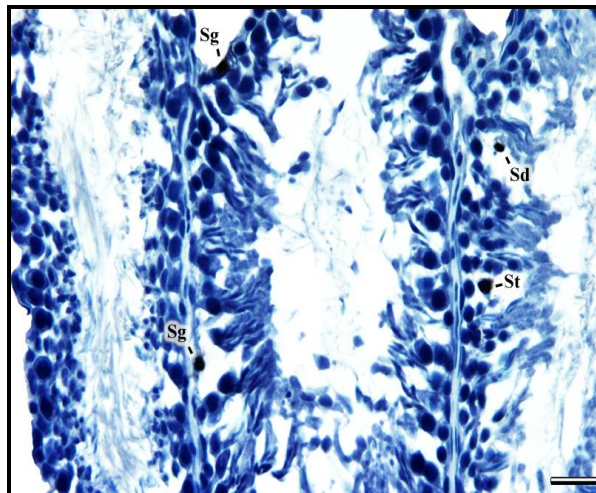
Nİ grubuna ait kesitleri TUNEL boyama sonrası değerlendirdiğimizde NK ve NT grubundaki gibi apoptotik aktivitenin fazla olmadığı izlenmekteydi (Şekil 73).



Şekil 73. Non-obez indol grubuna ait testis kesitinin TUNEL boya ile boyanmış ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. Apoptotik aktivite gösteren Sg; Spermatogonyumu, Sd; Spermatidi göstermektedir (Bar: 25 µm)

Obez İndol Grubuna Ait TUNEL Boyama Bulguları

Oİ grubuna ait kesitleri TUNEL boyama sonrası değerlendirdiğimizde obezitenin tübüllerde ve spermatogonik hücrelerde verdiği hasar bu grupta da görüldü. OK grubundaki kadar yoğun olmamakla beraber apoptosiz spermatogonik hücrelerde izlenmekteydi (Şekil 74).

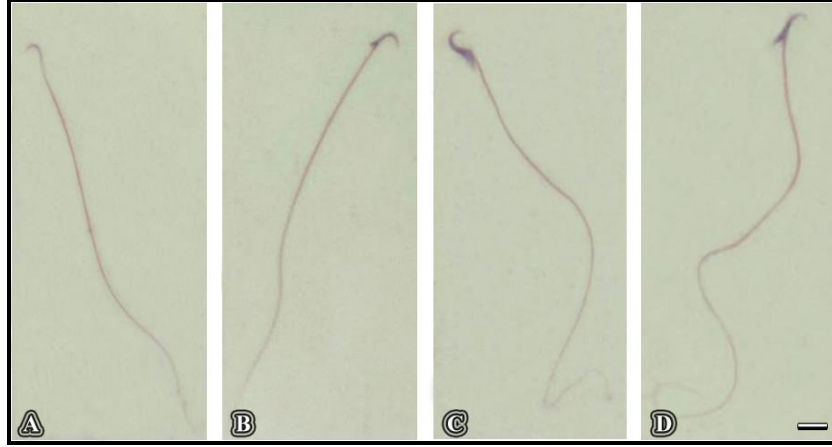


Şekil 74. Obez indol grubuna ait testis kesitinin TUNEL boya ile boyanmış ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. Apoptotik aktivite gösteren Sg; Spermatogonyumları, Sd; Spermatidi, St; Spermatoziti göstermektedir (Bar: 25 µm)

4.5.4. Sperm Morfoloji Değerlendirme Bulguları

Normal Sperm Morfoloji Değerlendirmesi

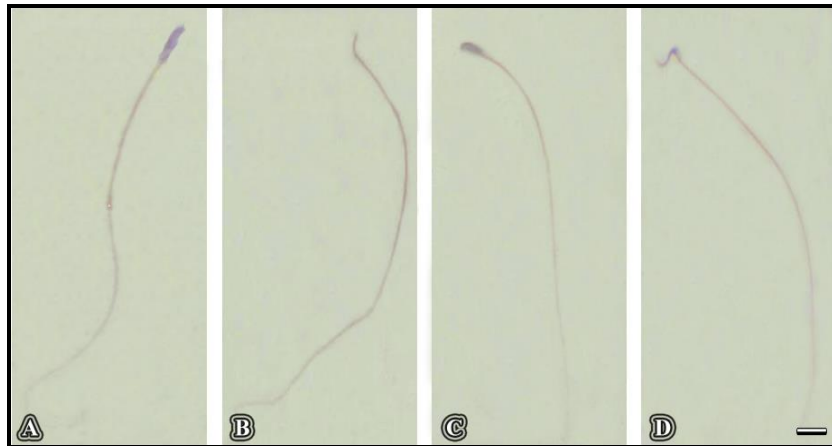
Semen yayma preparatlarında yaptığımız sperm morfoloji değerlendirmesinde baş, boyun ve kuyruk yapısı normal görünümde olan spermeler görülmektedir. Resimlerde çengel şeklinde bir başa, uzun bir kuyruklu spermeler normal morfolojiye sahip spermeler olarak değerlendirildi (Şekil 75).



Şekil 75. A, B, C ve D' de Normal morfolojiye sahip spermelerin aynı büyütmedeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir (Bar: 25 µm)

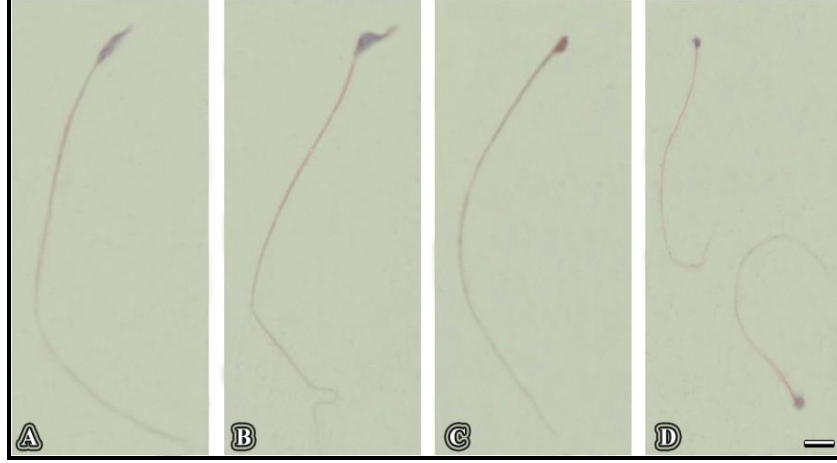
Sperm Baş Anomalileri

İncelenen örneklerde özellikle obez gruplarda baş defekti oldukça fazlaydı. Normalden daha uzun başlı (Elonge) olan spermeler, başsız, normalden daha küçükbaşlı ve amorf başlı spermeler izlenmekteydi (Şekil 76).

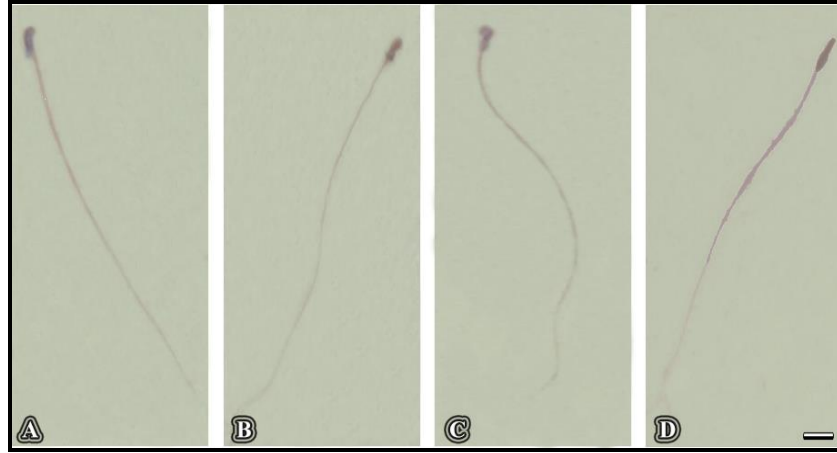


Şekil 76. Baş anomali olan spermelerin aynı büyütmedeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A'da Normalden uzun başlı sperm, B'de Başsız sperm, C'de Normalden küçükbaşlı sperm, D'de Amorf başlı sperm örnekleri görülmektedir (Bar: 25 µm)

Sperm yayma örneklerinde başı uzun ve sivrilmiş olan (Tapered) sperm, toplu iğne ucu şeklinde (Pin-head) başa sahip olan sperm ve anormal şekilli baş defektleri olan spermler görülmekteydi (Şekil 77 ve 78).



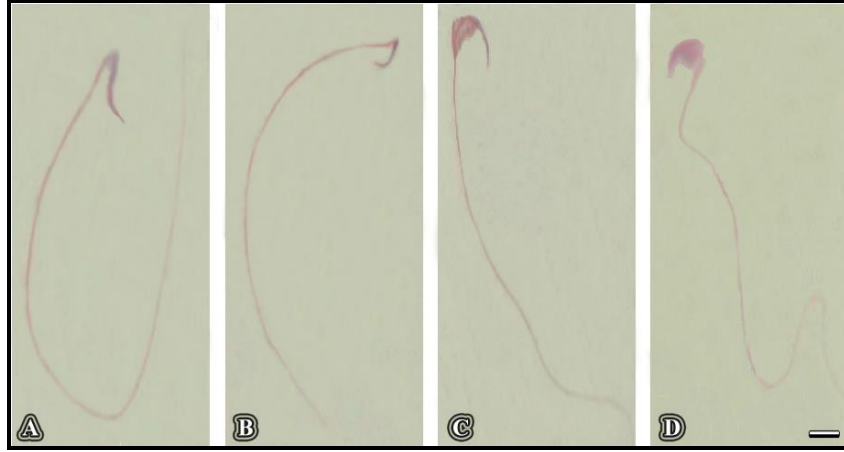
Şekil 77. Baş anomalisi olan spermilerin aynı büyütmedeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A ve B’de **Uzun ve sivrilmiş başa sahip sperm**, C ve D’de **Yuvarlak başlı sperm** örnekleri görülmektedir (**Bar: 25 µm**)



Şekil 78. A, B, C ve D’ de çeşitli şekillerde baş anomalisi olan spermilerin aynı büyütmedeki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir (**Bar: 25 µm**)

Sperm Boyun Anomalileri

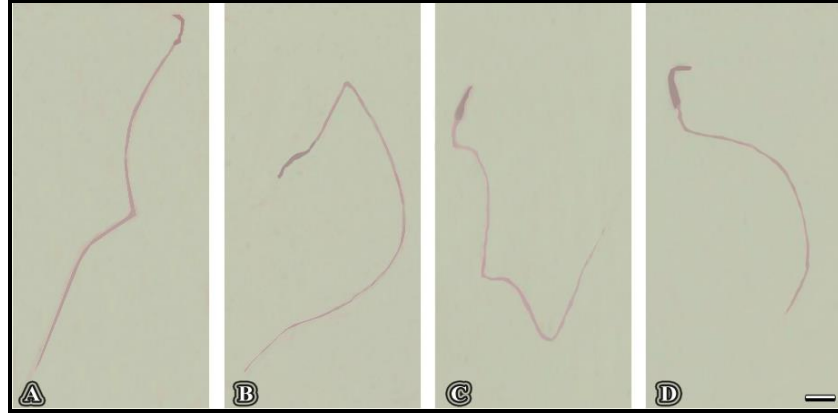
İncelenen semen yayma örneklerinde, kuyruğun başın uzun eksenine 90° açı ile bağlandığı (Bend) sperm, boyun kısmının normalden daha kalın olduğu spermler görülmekteydi ve bu sperm boyun anomalili sperm olarak değerlendirildi (Şekil 79).



Şekil 79. Boyun anomalisi olan spermelerin aynı büyütmadaki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A ve B’ de **Bend anomalisi olan sperm**ler, C ve D’ de **Kalınlaşmış boyun yapısına sahip sperm** örnekleri görülmektedir (**Bar: 25 µm**)

Sperm Kuyruk Anomalileri

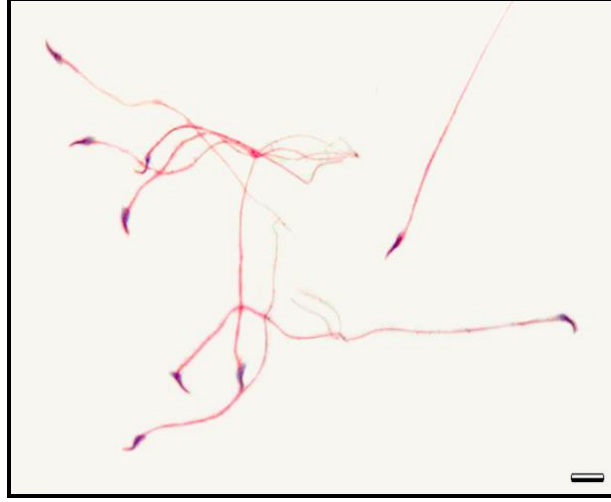
İncelenen örneklerde kuyruğu bir veya birkaç yerden kırılmış olan sperm, kısa kuyruklu sperm izlenmekteydi (Şekil 80).



Şekil 80. Kuyruk anomalisi olan spermelerin aynı büyütmadaki ışık mikroskopik görüntüleri izlenmektedir. A, B ve C’ de **Kırık kuyruklu sperm**ler, D’ de **Normalden daha kısa kuyruğa sahip sperm** örnekleri görülmektedir (**Bar: 25 µm**)

Non-Obez Kontrol Grubuna Ait Sperm Morfoloji Bulguları

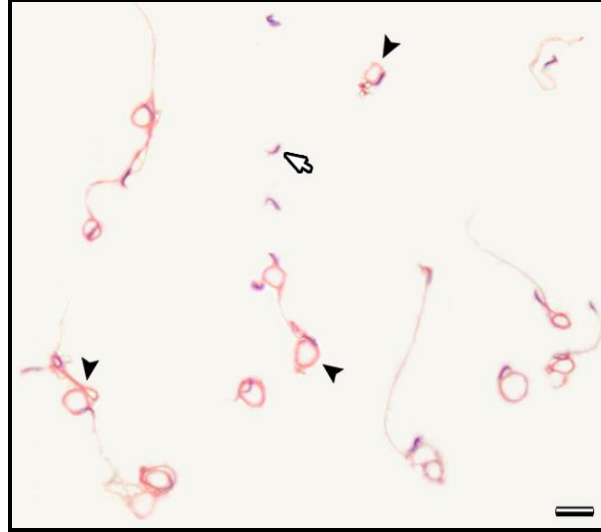
NK grubunda genel olarak sperm normal morfolojiye sahipti. Çok nadir de olsa baş, boyun ve kuyruk anomalilerinin bulunduğu spermere de rastlandı (Şekil 81).



Şekil 81. Non-obez kontrol grubunda normal morfolojiye sahip spermelerin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir (**Bar: 25 µm**)

Obez Kontrol Grubuna Ait Sperm Morfoloji Bulguları

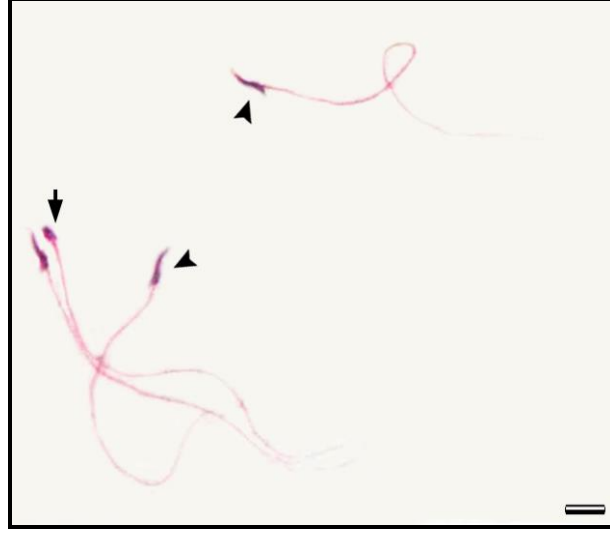
OK grubunda sperm kuyruklarının baş etrafında daire çizmesi dikkat çekiciydi. Koil şekilli, dag defektli ve kuyruksuz spermeler yoğun olarak izlenmekteydi (Şekil 82).



Şekil 82. Obez kontrol grubunda anormal morfolojiye sahip spermelerin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. **Ok başları;** Dag defektli görünümüne sahip spermeleri, **Ok;** Kuyruksuz spermeleri göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Non-Obez Timokinon Grubuna Ait Sperm Morfoloji Bulguları

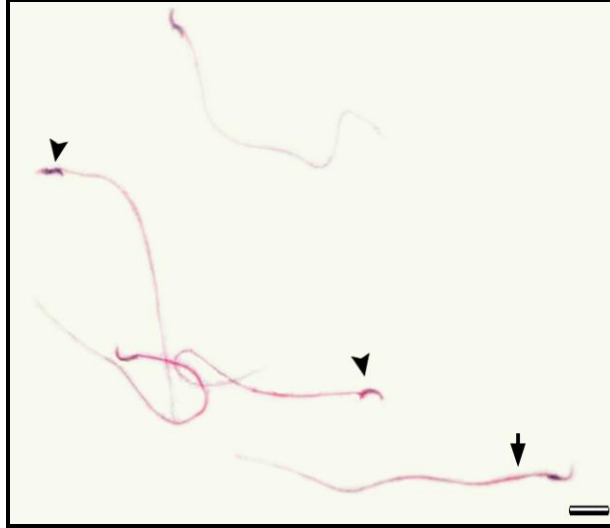
NT grubunda genel olarak spermeler normal morfolojiye sahipti. Çok nadir de olsa baş, boyun ve kuyruk anomalilerinin olduğu spermeler de izlenmekteydi (Şekil 83).



Şekil 83. Non-obez timokinon grubunda normal morfolojiye sahip spermelerin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. **Ok başları;** Normal morfolojiye sahip spermeleri, **Ok;** Baş anomalili sperm göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Obez Timokinon Grubuna Ait Sperm Morfoloji Bulguları

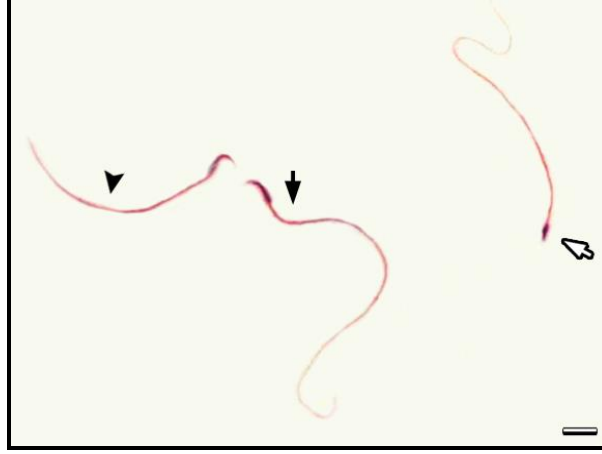
Obez kontrol grubundaki yoğun sperm anomalileri OT grubunda oldukça azalmış durumdaydı. OK grubundaki dağ defektli spermelere OT grubunda rastlanmadı. Normal morfolojideki spermelerin yanında baş anomalili spermeler de izlenmekteydi (Şekil 84).



Şekil 84. Obez timokinon grubunda normal ve anormal morfolojiye sahip spermelerin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. **Ok;** Normal morfolojiye sahip spermeleri, **Ok başları;** Baş anomalisi olan spermeleri göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Non-Obez İndol Grubuna Ait Sperm Morfoloji Bulguları

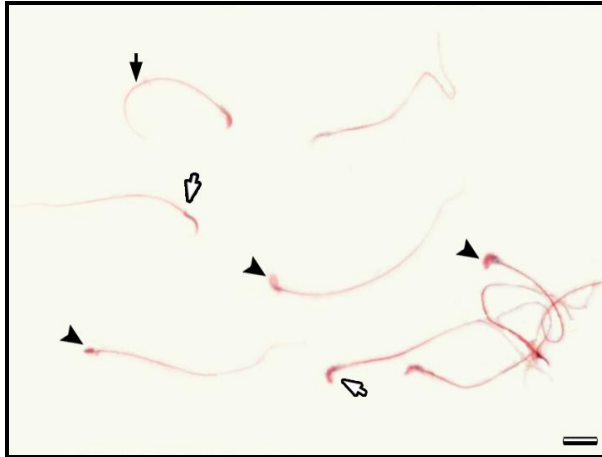
Nİ grubunda genel olarak spermler normal morfolojiye sahipti. Kuyruk ve baş anomalilerinin olduğu spermler de izlenmekteydi (Şekil 85).



Şekil 85. Non-obez indol grubunda normal ve anormal morfolojiye sahip spermlerin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. **Ok;** Normal morfolojiye sahip spermi, **Ok başı;** Kısa kuyruklu spermi, **Beyaz ok;** Baş anomalisi olan spermi göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

Obez İndol Grubuna Ait Sperm Morfoloji Bulguları

Obez İndol grubunda normal morfolojideki spermlerin yanında baş anomalisi olan spermlere de sıkça rastlanmaktaydı (Şekil 86).



Şekil 86. Obez İndol grubunda normal ve anormal morfolojiye sahip spermlerin ışık mikroskopik görüntüsü izlenmektedir. **Beyaz oklar;** Normal morfolojiye sahip spermleri, **Ok başları;** Baş anomalili spermleri, **Siyah ok;** Kısa kuyruğa sahip spermi göstermektedir (**Bar: 25 µm**)

5. TARTIŞMA

Obezite; sosyal, kültürel, genetik, metabolik, fizyolojik, davranışsal ve psikolojik bileşenleri olan karmaşık, kronik bir hastalıktır. Birkaç yüzyıl önce obezite, "güzellik" sembolü olarak kabul edilirken, artık günümüzde hem estetik açıdan kabul görmemekte, hem de sağlığı tehdit eden önemli bir problem olarak kabul edilmektedir (Heysmfield ve ark., 1989). Son yirmi yıldan bu yana büyük bir artış hızı göstererek küresel ölçekte milyonlarca insanı etkileyen pandemik bir hastalık halini almıştır. Şişmanlık, vücutta lokalize veya yaygın bir şekilde aşırı yağ bulunması olarak tanımlanmakta ve birçok hastalıkla ilişkilendirilmektedir (Mahan ve Escott-Stump, 1996; Bagchi ve Preuss, 2007). Obezitenin sağlık açısından önemi kuşkusuzdur. Olumsuz etkileri ilk olarak Hipokrat, Galen ve İbni Sina tarafından bildirilmiş olup obezitenin kanser, tip 2 diyabet, safra kesesi hastalıkları, yüksek kolesterol, ateroskleroz, kalp hastalığı, hipertansiyon, felç, depresyon, böbrek taşları, uyku apne sendromu ve böbrek yetmezliği gibi birçok kronik hastalıkla ilişkili olabileceği belirtilmiştir (Abdel-Halim, 2005; Buschemeyer ve Freedland, 2007; Gupta ve ark., 2010; Kutlutürk ve ark., 2011; Logue ve ark., 2011; Zimmerman ve ark., 2011).

Bu hastalıkların yanı sıra klinik çalışmalarda obezite ve infertilite ilişkisi özellikle son yıllarda yoğun olarak incelenmeye başlanmıştır. Obezite ve kadın infertilitesi arasındaki ilişki daha iyi bilinirken obezite ve erkek infertilite ilişkisi tam olarak açıklığa kavuşmamıştır (Abdel-Halim, 2005; Hammoud ve ark., 2012).

Erkek üreme sisteminin spermatozoonların yapımından sorumlu kısmı olan testis yapılarının ve fonksiyonlarının bilinmeyen yönlerinin açıklığa kavuşturulmasına yönelik çalışmalar yıllar öncesinde başlamış ve halen de devam etmektedir. Testislerin temel fonksiyonu testosteron ve spermatogenez ile spermatozoon üretmektir. Spermatogenezis, birçok hücrel faktörlerin eşlik etmesi ile gerçekleşen kompleks bir olay olmakla birlikte kimyasal ajanlara, çevresel faktörlere karşı çok hassastır bu yüzden testis fonksiyonları dış etkilerden kolaylıkla etkilenebilmektedir (Young ve ark., 2000; Junqueira ve Carneiro, 2006). Yapılan çalışmalarda son 50 yıldır sperm sayısında ciddi bir düşüş olduğu ve bu azalmanın özellikle obezitenin yüksek olduğu bölgelerde daha fazla görüldüğü bildirilmektedir (Swan ve ark., 2000).

Obezitenin uzun süreli devam etmesiyle ortaya çıkan komplikasyonların en önemli nedenlerinden biri olarak artmış oksidatif stres öne sürülmektedir. Çalışmalarda

obezitenin insülin rezistansı ve dislipidemi gibi durumlarla ilişkili olarak oksidatif stresi artırdığı gösterilmiştir. Buna bağlı oluşan serbest oksijen radikalleri olası patolojik mekanizmada rol almaktadır (Bakos ve ark., 2010; Tunc ve ark., 2011). Birçok çalışmada obezlerde endojen antioksidan savunma mekanizmalarındaki yetersizliğin, obeziteye bağlı çeşitli komplikasyonlara katkıda bulunabileceği bildirilmiştir (Colette ve ark., 2003; Stefanović ve ark., 2008; Puchau ve ark., 2010; Tunc ve ark., 2011). Sonuçta antioksidan savunma mekanizmasındaki yetersizlik oksidatif strese neden olmakta ve pek çok hastalığın patogenezinde önemli rol oynamaktadır. Bu yüzden antioksidan tedavi birçok hastalık için potansiyel tedavi yöntemidir ve son yıllarda oldukça önem kazanmıştır (Puchau ve ark., 2010).

Yaptığımız literatür taramasında obezitenin yol açtığı oksidatif stresin erkek infertilitesi üzerinde ne derece etkili olduğu konusunda yeterli çalışmanın olmadığı görüldü. Bu nedenle yüksek yağlı diyet ile obezite modeli oluşturduğumuz sıçanlarda antioksidan özellikleri olduğu bilinen timokinon ve indol-3-karbinol'un testis üzerindeki etkileri araştırıldı. Çalışmamız kapsamında, obez ve obez olmayan gruplara timokinon ve indol-3-karbinol uygulama öncesi ve sonrası testis üzerindeki stereolojik ve biyokimyasal parametreler değerlendirildi. Tedavi öncesi ve sonrası bulgular ile normal sağlıklı kontrol grubu ve obez kontrol grubu değerleri birbirleriyle karşılaştırıldı.

Diyetteki dengenin obezite etiyojisi üzerindeki önemi hakkında farklı görüşler olsa da yüksek yağlı diyetle beslenmenin obezite ile çok yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir (Dyck, 2000). Kamara ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yüksek yağ içeriği (soya ve mısır yağı) ile beslenen *Sprague-Dawley* cinsi sıçanlarda, obezite gelişmesinin yanında artmış glukoz toleransı varlığı gösterilmiştir (Kamara ve ark., 1998). Aynı şekilde Gu ve arkadaşları yüksek yağlı diyet ile 22 hafta besledikleri sıçanların standart diyet ile beslenen gruba göre vücut ağırlıklarının, visseral yağ/vücut ağırlığı oranının, visseral yağ ve insülin rezistans indekslerinin arttığını bildirmişlerdir (Gu ve ark., 2012). Literatürde yağlı diyetle beslenen sıçanlarda kilo alımı bildiren çalışmaların yanında Cha ve ark. (2000), yağlı diyetle beslenmeye rağmen kilo alımı bildirilmeyen çalışmalar da vardır. Gao ve ark. (2002) yaptığı çalışmada 6 ay süreyle %45 yağ içeren diyet ile beslenen sıçanların 4'ünde ağırlık artışıyla diyete bağlı obezite gelişirken, diğer 4 sıçanda ağırlık artışı gözlenmemiştir ve diyete dayanıklı oldukları bildirilmiştir. Başka bir çalışmada ise 7 ay süre ile yüksek yağ içerikli diyet ile beslenen

dişi sıçanlarda beslenme döneminin sonunda bir grup sıçanda obezite gelişmesine rağmen, bir grubunda da gelişmediği görülmüştür (Cattaneo ve ark., 1997).

Çalışmamızda yüksek yağlı diyet (%40) ile beslediğimiz sıçanların haftalık ağırlık tartımlarını takiben 9 hafta sonunda VKİ değerlendirmelerine göre obez oldukları gözlemlendi (Altunkaynak ve ark., 2008). Buna göre yaptığımız istatistiksel değerlendirme neticesinde yüksek yağlı diyet ile beslenen OK grubundaki kilo artışı, standart yem ile beslenen NK grubuna göre ileri derecede anlamlıydı ($p < 0,001$). Testis çevresinden alınan yağ dokusu değerlendirmesinde ise OK grubundaki yağ ağırlık ortalaması, NK grubuna göre oldukça fazlaydı ($p < 0,01$). Değerlendirme neticesinde yüksek yağ içerikli diyet ile beslenmenin obez kontrol grubunda kilo artışını takiben testis çevresinde yağ artışına da neden olduğu gözlemlendi. Testisler yaş ağırlıkları açısından karşılaştırıldığında, OK grubunun ortalama yaş testis ağırlığı diğer deney gruplarına göre oldukça azalmıştı ve istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bir farklılık vardı ($p < 0,001$). Bu sonuçlar bize obeziteyle birlikte azalmış sperm sayısından dolayı testis yaş ağırlığının da azalmış olabileceğini düşündürdü.

Obezite ve infertilite ilişkisinin klinik çalışmalarda yoğun olarak araştırıldığı görülmekte olup bu konudaki deneysel çalışmalar oldukça azdır. Yapılan klinik araştırmalardan Danimarka'da Ramlau-Hensen ve ark. (2007) 47835 kadın olguyu inceledikleri bir çalışmada erkek partnerleri aşırı kilolu olan kadınlarda çocuk sahibi olamama olasılığı, normal ağırlıktaki erkek partneri olan bireylere göre 1,49 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Benzer tarzda Norveç'te yapılan bir başka çalışmada ise 26303 kadın değerlendirilmiş olup, eşlere göre yapılan incelemede VKİ 25-29,9 kg/m² arasında olan erkeklerin çocuk sahibi olmama olasılığının normal ağırlıktaki bireylere göre 1,19 kat fazla olduğu belirtilmektedir. Ancak en büyük riskin VKİ 35 kg/m² ve üzerinde olduğu durumlarda ortaya çıktığı görülmüştür (Nguyen ve ark., 2007). Magnusdottir ve ark. (2005) 72 çifti inceledikleri bir başka çalışmada VKİ'nin 30 kg/m² ve üzerinde olmasının subfertilite riskini yaklaşık 3 kat arttırdığını saptamışlardır. Farklı çalışmalarda ise her iki eşin obez olmasının tek bir eşin obez olmasına göre infertilite riskini daha fazla arttırdığı bildirilmiştir (Ramlau-Hansen ve ark., 2007).

Obezite ve semen parametreleri arasındaki ilişkinin sperm sayısı, motilite ve volümü açısından yapılan incelemelerde farklı sonuçların alındığı görülmektedir. Aggerholm ve ark. (2008) VKİ ile sperm konsantrasyonu arasında anlamlı bir ilişkinin

olmadığını bildirmişlerdir. Sperm sayısı ve obezite arasında ilişki olmadığı benzer çalışmalarda da gösterilmiştir (Pauli ve ark., 2008; Nicopoulou ve ark., 2009). MacDonald ve ark. (2010) yaptıkları bir metaanalizde VKİ ile sperm konsantrasyonu ve sperm sayısı arasında ilişki bulunmadığını belirtmektedirler. Ancak bu metaanalizde incelenen 31 çalışmanın sadece 5'inin verilerinin tam olarak uygun olması önemli bir eksiklik olarak değerlendirilmiştir. Buna karşın Jensen ve ark. (2004) çalışmasında 1558 olgu incelenmiş ve VKİ >25 kg/m² olanların %22'sinde sperm konsantrasyon ve sayısı normal bireylere göre düşük olduğu saptanmıştır. Jarow ve ark. (1993) çalışmasında 120 olgu fertil obez olmayan, infertil obez olmayan, fertil obez ve infertil obez olanlar olmak üzere 4 gruba ayrılmışlardır. Bu gruplar arasında infertil obez grupta testosteron seviyeleri diğer gruplara göre oldukça düşük bulunmuştur. Yapılan farklı çalışmalarda oligosperminin normal VKİ'si olanlardaki oranı %21,7 olarak saptanırken bu oranın VKİ >25 kg/m² olanlarda %24,4 olduğu belirtilmiştir. Bu durum birçok araştırmacının sonuçlarında da gösterilmiştir (Fejes ve ark., 2006; Hofny ve ark., 2010; Martini ve ark., 2010).

Obezite ile ilişkili olarak incelenen bir diğer semen parametresi sperm motilitesidir. Bir araştırmada obez fertil grup ve obez infertil grupta sperm motilitesi sırası ile %57,5 ve %13,25 olarak belirtilmektedir. Sonuç olarak VKİ ile sperm motilitesi arasında negatif bir ilişki olduğu ortaya konulmuştur (Fejes ve ark., 2006). Sallmen ve ark. (2006) VKİ artması ile DNA kırılmalarının arttığını buna karşın motilitenin azaldığını saptamışlardır. Bu durumun kötü kaliteli spermatogenez ve dolayısı ile azalmış sperm sayısı ve motilitesi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Birçok araştırmacı özellikle VKİ >30 kg/m² olduğunda sperm motilitesinin etkilendiğini belirtmesine karşın bazı çalışmalarda obezitenin sperm motilitesine etki etmediği belirtilmiştir (Magnusdottir ve ark., 2005). Fakat yapılan çalışmalar incelendiğinde geniş olgu sayısına sahip araştırmalarda obezite ve infertilitenin ilişkili olduğu dikkat çekmektedir. Sperm sayısı ve VKİ ilişkisinin incelenmesinde en çelişkili sonuçların özellikle olgu sayısı 100 ve altında olan çalışmalarda elde edildiği anlaşılmaktadır. Hammoud ve ark. (2010) obezite ile östradiol seviyeleri arasında denge sağlayan aromataz enzim polimorfizmi olduğunu bildirmişlerdir. Bununla bağlantılı olarak Fernandez ve ark. (2011) obezite ve kısırlıkla ilgili yaptıkları bir çalışmada yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda östradiol düzeyinin arttığı, sperm hareketliliğinin azaldığı

ve sperm kalitesinin düştüğü belirtilmiştir. Bu sonuçların obez erkeklerde üreme bozukluklarına yol açacağı ve kişilerin fertilitate potansiyelini etkileyebileceği öne sürülmüştür. Obezite ve infertilite üzerine yapılmış klinik araştırmaların yanında deneysel çalışmalar da vardır. Wang ve ark. (2007) çalışmalarında yüksek yağlı diyet ile besledikleri sıçanlarda 3. haftanın sonunda standart diyet ile beslenen sıçanlara kıyasla ağırlıklarının arttığını ($p < 0,05$), 6. haftanın sonunda ise obez grubun ağırlığının kontrol grubundan %26,6 oranında daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı olduğu belirtilmiştir ($p < 0,01$). Ghanayem ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanların vücut yağ yüzdelerinin normal diyetle beslenen sıçanlara göre oldukça fazla olduğu, serum leptin ve insülin düzeylerinin obez sıçanlarda 5 kat daha yüksek olduğu bunların yanında obez erkeklerde sperm motilitesinin azaldığı belirtilmiştir. Shalaby ve ark. (2004) çalışmalarında yüksek kolesterol ile beslenen sıçanlarda kontrol grubuna göre fertilitate oranlarının azaldığı, sperm karakteristiklerinin ise bozulduğu gösterilmiştir.

Obezite ile sperm parametreleri arasındaki ilişkiyi incelemek amacıyla testis doku örnekleri üzerinde yaptığımız stereolojik değerlendirmelerde optik parçalama yöntemiyle saydığımız spermatogonyum, spermatozoid, spermatid ve Leydig hücreleri sayısının NK ve OK grupları arasındaki karşılaştırmaları yapıldı. Buna göre OK grubundaki spermatogonyum sayısı, NK grubuna göre azalmıştı, fakat fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p = 0,07$). OK grubundaki spermatozoid sayısı ise NK grubuna göre oldukça azalmıştı ($p < 0,001$). Spermatid ve Leydig hücresi sayısında ise NK ve OK grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$). Bu sonuçlara göre kontrol grubuna kıyasla obez grupta özellikle spermatozoid hücre kaybının çok ileri derecede olması yüksek yağ içerikli diyet ile beslenmenin sıçanlarda spermatogenezin mayoz I safhasında hasara yol açtığını düşündürmekteydi.

Bizim çalışmamızla bağlantılı olarak Chen ve ark. (2011) yaptığı bir çalışmada 10 hafta yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda spermatogonik hücrelerin apoptoza uğradığını özellikle spermatogonyum ve spermatozoidlerin daha fazla etkilendiği belirtilmiştir. Liu ve ark. (2009) seminifer tübül hacminin ölçümünde stereolojik tekniklerin kullanılabilirliğini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada testiste yaklaşık 50 tübülün hacminin ortalama değeri tüm yapının değerlendirmesinde iyi sonuçlar verdiğini belirtmiştir. İki gözlemciyle yaptıkları çalışmada hacim ölçümünde iki sonuç

arasında anlamlı fark olmadığını ($p > 0,05$), stereolojik yöntemlerin tekrarlanabilirliğinin iyi olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca seminifer tübül alan ölçümlerinde stereolojik teknikler ile planimetrik teknikler arasında anlamlı bir fark olmadığını ($p > 0,05$), fakat stereolojik tekniklerle %45 daha az zaman harcandığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar stereolojik yöntemlerin etkin ve tarafsız olduğunu göstermektedir.

Cavalieri yöntemiyle hesapladığımız ortalama seminifer tübül hacmi ve toplam testis hacmi değerlendirmelerinde obez gruptaki her iki parametrenin de kontrol grubuna göre anlamlı derecede fark göstermediği gözlemlendi ($p > 0,05$).

Obeziteyle ilgili yapılan biyokimyasal çalışmalar obezitenin uzun süreli devam etmesinin oksidatif stresi artırdığını, katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidan enzimlerde düşüşe neden olduğunu göstermiştir (Amirkhizi ve ark., 2007). Bu konuyla ilgili yazılan bir derlemede obezitenin multifaktöriyel orjinli kronik bir hastalık olduğu ve vücutta yağ birikiminin artışıyla karakterize olduğu belirtilmiştir. Obezitede artan beyaz yağ dokusunun adipokinler denen bazı biyoaktif maddelerin üretiminde rol oynadığı adipokinlerin de reaktif oksijen türlerinin üretimini indüklediği, yağ dokusu artışı ile süperoksit dismutaz (SOD), CAT ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi antioksidan enzimlerin önemli ölçüde azaldığı ve böylece oksidatif stres oluştuğu bildirilmiştir (Fernández-Sánchez ve ark., 2011). Chen ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada 6 hafta %20 yağ içeren yüksek yağlı diyet ile beslenen grupta, %5 yağ içeren normal diyet ile beslenen gruba göre sperm konsantrasyonu, canlılığı ve hareketliliğinde anlamlı bir azalma olduğunu, yüksek yağlı diyet ile beslenen grupta lipid peroksidasyonunda önemli bir artış olduğunu, GSH ve SOD enzim aktivitelerinde azalmalar olduğunu göstermişlerdir.

Sonuç olarak yüksek yağlı diyet ile beslenmenin antioksidan enzimlerde azalmalara neden olduğu bunun da oksidatif strese yol açtığı bildirilmiştir. Yapılan bir diğer çalışmada ise obezite varlığında SOD, GPx ve CAT gibi antioksidan enzimlerin sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında oldukça düşük olduğu, obezitenin uzun süreli devam etmesi durumunda ise bu enzimlerin tükenebileceği belirtilmiştir (Ozata ve ark., 2002). Bu çalışmaların yanı sıra Rindler ve ark. (2013) yüksek yağlı diyet ile beslenmenin vücutta aşırı yağ artışına neden olduğunu ve artmış yağ metabolizması tarafından üretilen mitokondriyal H_2O_2 'nin de arttığı buna bağlı olarak katalaz aktivitesinde artış olduğunu bildirmiştir.

Çalışmamızda testis dokuları üzerinde yaptığımız biyokimyasal analizlerde antioksidan enzimlerden katalaz ve oksidan durum belirteci olan miyeloperoksidazın aktivitesini kontrol ve obez gruplarla karşılaştırıldı. Karşılaştırmalara göre deney grupları arasında katalaz aktivitesi bakımından anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$). Fakat OK grubunda katalaz enzim aktivitesinin NK grubuna göre bir miktar azaldığı gözlemlendi. Bu düşüşün sebebinin obezitenin neden olduğu oksidatif hasardan kaynaklandığını ve antioksidan enzim olan katalaz düzeylerinde azalmaya neden olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca deneklerin obez olarak yaşama süresinin daha da uzatılması durumunda katalaz seviyelerindeki düşüş daha da artarak anlamlı seviyelere ulaşabilir.

Arı ve ark. (2008) yapmış oldukları çalışmada yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda oksidan durum belirteçlerinden miyeloperoksidaz aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir. Bizim çalışmamızdaki miyeloperoksidaz aktivitesi değerlendirmesinde ise OK grubundaki MPO aktivitesi NK grubuna göre ileri derecede artmıştı ($p < 0,001$). Bu sonuç obezitenin vücutta inflamasyona yol açarak miyeloperoksidaz aktivitesinde önemli bir artışa sebep olduğunu gösterebilir. Olza ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada prepubertal obez çocuklarda miyeloperoksidaz aktivitesinin kardiyovasküler hastalık, akut ve kronik inflamatuvar hastalık riskinin erken belirteci olup olmadığını araştırmışlardır. Çalışmaya 6-12 yaş arası 223 normal kilolu, 223 obez çocuk dahil edilmiştir. Elde edilen bulgularda MPO aktivitesinin preobez çocuklarda yüksek olduğu ve bu enzimin C-reaktif protein (CRP), matriks metaloproteinaz-9 (MMP-9), resistin gibi proinflamatuvar ve kardiyovasküler risk biyobelirteçleriyle ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Erdemir ve ark. (2012) obezite ve testis hasarı üzerinde yaptıkları çalışmada obezitenin testosteron seviyesini azaltarak oksidatif strese neden olabileceğini bunun sonucunda da testis fonksiyonlarının bozularak kısırlık gelişebileceğini öne sürmüştür. Canlılar oksidatif stresin neden olduğu bu olumsuzlukları minimuma indirmek için bazı antioksidan sistem ve moleküllerle korunurlar. Vücuttaki antioksidan mekanizmanın yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif hasar oluşmaya başlar, bu bağlamda antioksidan diyet uygulanması önemli bir kriterdir. Bazı bitkiler ve onların saflaştırılmış bileşenleri yıllardan beri halk arasında tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Günümüzde klasik ilaç ile tedavide yan etkilerin çok fazla olması ve maliyetin yüksek olması sebebiyle, bitkisel

kaynaklı ilaçların araştırılmasına ve üzerlerinde çok fazla çalışma yapılmasına yol açmıştır. Bu amaçla biz de *Nigella sativa* bitkisinin tohumlarından elde edilen timokinon ve crusiferae familyasına ait bitkilerin pişirilmesiyle açığa çıkan indol-3-karbinol maddelerinin muhtemel antioksidan özelliklerinin oksidatif hasar üzerindeki etkilerini araştırdık.

Literatürde *Nigella sativa* ve en etkin bileşeni olduğu düşünülen timokinon ile ilgili yapılan çalışmalardan Burits ve Bucar, (2000) *N. Sativa* tohumlarının uçucu yağının antioksidan aktivitesi üzerinde çalışmışlardır. Araştırma sonucunda timokinon, karvakrol, *t*-anetol ve 4-terpineol'ün önemli ölçüde radikal süpürücü aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir. Birçok araştırmacı timokinon'un süperoksit radikal anyonu ve hidroksil radikalleri de dahil olmak üzere çeşitli oksijen türleri üzerinde radikal temizleyici etkisi olduğunu göstermiştir (Kruk ve ark., 2000; Badary ve ark., 2003). Ramadan ve ark. (2003) çalışmalarında *N. sativa* ham yağı ve bileşenlerinin (nötral lipitler, glikolipitler ve fosfolipitler) güçlü radikal süpürücü aktiviteleri saptanmıştır. Kruk ve ark. (2000) *N. sativa* tohumları bileşenlerinden. timol, timokinon ve ditimokinon'un süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali ve singlet oksijen gibi reaktif oksijen türlerinden meydana gelen reaksiyon üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmada bu bileşenlerin çeşitli radikal temizleyici etkisi olduğunu göstermişlerdir.

Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar oksidatif stresin farklı kanserlerin meydana gelmesi ve ilerlemesinde etkili olduğunu göstermektedir (Pathak ve ark., 2005). Birçok epidemiyolojik çalışmada antioksidanlarca zengin gıdaların tüketilmesiyle kanser riskinin azaltılabildiği gösterilmiştir (Borek, 2004). Moleküler Kanser Tedavisi' adlı dergide yayınlanan bir makalede deney farelerine insan prostat kanser hücreleri verilerek prostat kanseri oluşturulmuş ve yapılan deneylerle bu kanser hücrelerinin timokinon tarafından tedavi edildiği ayrıca kanser hücrelerinin çoğalmasının ve yayılmasının engellendiği tespit edilmiştir. Ayrıca timokinon'un tümör anjiyogenezini baskıladığı ve insan prostat tümörlerinin büyümesini engellediğini bildirmiştir (Yi ve ark., 2008). Prostat kanseri ile ilgili yapılan laboratuvar ve hayvan deneylerini içeren başka bir çalışmada timokinon'un hormona duyarlı ve dirençli olan 2 farklı tipteki prostat kanseri tedavisinde de etkili olduğu gösterilmiştir. Buna ilave olarak, prostat kanserinin oluşumunu da engelleyebileceği belirtilmiştir (Kaseb ve ark., 2007). Ayrıca, meme kanseri ile ilgili yapılan bir çalışmada, araştırmacılar *Nigella*

sativa'nın meme kanseri oluşumunu önlemede etkili olduğunu tespit etmişlerdir (el-Aziz ve ark., 2005). El-Abhar ve ark. (2003) yaptığı çalışmada; timokinon'un serbest radikal oluşturmak suretiyle mide hasarı meydana getirilmiş sıçanlar üzerinde, antioksidan özelliği ile mideyi koruduğu tespit edilmiştir. Arslan ve ark. (2005) yaptığı çalışmada etanol ile oluşturulmuş mide hasarında timokinon 'un koruyucu etkisi ve enzim düzeylerindeki değişiklikler tespit edilmiş, antioksidan özelliğın varlığı gösterilmiştir. Yine başka bir çalışmada, çörek otunun etken maddesi olan timokinon 'un enerji metabolizması üzerine etkisi araştırılmış ve çalışmanın sonucunda 4 haftalık timokinon tedavisi sonrasında kan şekeri, kolesterol ve trigliserid düzeylerinin önemli derecede düştüğü, insülin düzeyinin de yükseldiğı tespit edilmiştir. Ayrıca, kan hücrelerinde enerji metabolizması ile ilgili enzimlerin aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (Fararh ve ark., 2010). Le ve ark. (2004) çörek otunun kan şekeri regülasyonuna olan etkisini araştırdıkları bir çalışmada, deney hayvanları bir grup 4 hafta süreyle çörek otu ile diğer grup ise normal diyetle beslenmiş; sonuç olarak çörek otuyla beslenen grubun günlük besin tüketiminin %25 oranında azaldığı, yani iştahı azalttığı; ayrıca çörek otunun karaciğer hücrelerinin insüline olan hassasiyetini arttırdığı, kan trigliserit düzeyini azalttığı ve iyi kolesterol olarak bilinen HDL kolesterol düzeyini arttırdığı tespit edilmiştir. Burada, iştah azaltıcı etkisi, kan şekeri ve kan yağ seviyelerini düzenleyici etkisi özellikle günümüzün en önemli sağlık sorunlarından birisi olan obezite ve bu sorundan kurtulmak isteyenler için oldukça ilgi çekicidir.

Başka bir çalışmada ise çörek otu tüketimindeki artış ile dişilerde doğurganlık ve erişkin erkek sıçanlarda üreme sistemi üzerine olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Mukhallad ve ark., 2009). Literatür taramalarında görüldüğü gibi timokinon'un kanser tedavisi üzerindeki olumlu etkileri oldukça fazladır. Özellikle prostat kanseriyle ilgili çok fazla çalışmanın olması ve timokinonun bu kanser türü üzerindeki olumlu etkileri dikkat çekicidir.

Bizim çalışmamızda obez yapılan sıçanlarda timokinon'un testis üzerindeki antioksidan etkileri araştırıldı. Buna göre OK ve OT grubundaki sıçanların başlangıçtaki ağırlıkları ile deney süresince ölçülen ağırlıkları kıyaslandığında, timokinon'un 6 hafta boyunca intraperitoneal uygulanması ile OT grubundaki sıçanların ağırlık ortalamasının OK grubuna göre ileri derecede azaldığı görüldü ($p < 0,01$). Aynı şekilde NK ve NT grubunun ağırlık ölçümlerinde de timokinon uygulanmasıyla NT grubundaki sıçanların

ağırlık ortalamasının anlamlı ölçüde azaldığı gözlemlendi ($p < 0,05$). Daha önceki çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da ağırlık azalması timokinon'un iştah azaltıcı etkisinden ya da metabolizmayı hızlandırıcı etkisinden kaynaklandığını düşündürmekteydi. Spermatogonyum sayısı değerlendirmesinde timokinonun uygulanan gruplarda anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$). Spermatozoid sayısı istatistiksel değerlendirmesinde, NT grubundaki spermatozoid sayısı, OK ve OT gruplarına kıyasla artmıştı, anlamlılık dereceleri sırasıyla ($p < 0,001$; $p < 0,05$) bulundu. NT grubundaki spermatozoid sayısının ise OK grubuna göre fazla olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$). Ortalama seminifer tübül hacmi değerlendirmesinde, OT grubundaki ortalama seminifer tübül hacmi, NK ve NT grubuna göre azalmıştı, anlamlılık dereceleri sırasıyla ($p < 0,01$; $p < 0,05$) bulundu. Toplam testis hacmi değerlendirmesinde timokinon uygulanmasında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$). Bu sonuçlar timokinon uygulamasının sıçanlarda sperm sayısını artırarak seminifer tübül hacminde artışa neden olduğunu düşündürmekteydi.

Gökçe ve ark. (2011) testiküler toksisite üzerine timokinonun olası koruyucu etkisini araştırdıkları bir çalışmada, klinikte yaygın olarak kullanılan folik asit antagonisti olan metotreksat 20 mg/kg i.p tek doz uygulandıktan sonra timokinon 10 mg/kg i.p olmak üzere 3 gün boyunca enjekte edilmiştir. Deney sonunda yapılan biyokimyasal çalışmalarda metotreksat uygulanan grupta toplam antioksidan kapasitenin ve miyeloperoksidaz aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığını, timokinon tedavisi yapılan grupta ise toplam antioksidan kapasite ve miyeloperoksidaz aktivite artışının engellendiği belirtilmiştir. Işık mikroskopik çalışmalarda ise metotreksat uygulanan gruplarda seminifer tübüllerin küçüldüğü, çaplarının bozulduğu ve ödem olduğu gözlemlenmiş fakat timokinon tedavisi ardından bu etkilerin anlamlı derecede düzeldiği belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda timokinonun testis hasarlarına karşı koruyucu olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır.

Bizim çalışmamızda miyeloperoksidaz aktivitesinin gruplar arası karşılaştırmasında, NT grubundaki miyeloperoksidaz enzim aktivitesinin OK grubuna göre ileri derecede azaldığı gözlemlendi ($p < 0,001$). OT grubundaki miyeloperoksidaz enzim aktivitesi ise NK grubuna kıyasla artmıştı ($p < 0,05$). NT grubundaki miyeloperoksidaz enzim aktivitesinin ise OT grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı görüldü ($p < 0,05$). Bu sonuçlar bize timokinon uygulamasının obezitede artmış oksidatif

stres belirteçlerinden olan miyeloperoksidaz aktivitesinde anlamlı bir azalmaya neden olduğunu gösterdi. Badary ve ark. (2000) çalışmalarında timokinon'un, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi hepatik antioksidan enzimlerde kayda değer bir azalmaya neden olduğunu; doksorubisin-indüklü hiperlipidemik nefropatiden muzdarip sıçanlarda, demire bağımlı mikrozomal lipid peroksidasyonunu etkin bir şekilde inhibe edebildiğini belirtmiştir. Çalışmamızda katalaz enzim aktivitesi bakımından gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$).

Cruciferae bitkilerinden elde edilen indol-3-karbinol, özellikle kanser tedavisinde ve oluşmasının önlenmesinde etkili olduğu düşünülen ve üzerinde halen çalışmaların devam ettiği önemli bir bileşiktir (Verhoeven ve ark., 1996; Verhoeven ve ark., 1997). Michnovicz ve Bradlow, (1990) yalnızca Cruciferae familyasına özgü olan indol-3-karbinol'ün insanlarda diyetle alınmasıyla östradiol metabolizmasında yaptığı indüksiyonu incelemiş ve östradiol metabolizmasında etkili olduğunu ve östrojen kaynaklı hastalıklara karşı yeni bir kemopreventif özellik gösterebileceğini kanıtlamıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda indole-3-karbinol'ün obez kadınlarda artan östrojenin neden olabileceği kansere karşı koruyucu bir etkisi olduğu, rahim ve göğüs kanseri riskini azalttığı belirtilmiştir (Michnovicz, 1998). Stresser, (1995) indol-3-karbinol maddesinin kemopreventif etkisini sıçanda incelemiş ve I3C ve metabolitlerinin anti-kanserojen özellik gösterdiklerini bildirmiştir. I3C'ün göğüs Grubbs ve ark. (1995) endometrial; Kojima ve ark. (1994), servikal; Jin ve ark. (1999) ve El Bayoumy ve ark. (1996), akciğer kanserlerini önlediği bildirilmiştir. Choi ve ark. (2012) diyete bağlı obeziteye karşı indol-3-karbinol'ün koruyucu etkisini değerlendirdikleri çalışmada %40 yağlı diyet ile beslenen sıçanlara on hafta boyunca indol-3-karbinol 1 gr/kg olmak üzere diyetlerine takviye edilmiş ve canlı ağırlık artışında, visseral yağ oranında ve plazma lipid düzeylerinde önemli bir düzelme olduğunu belirtmişlerdir. Sonuçta indol-3-karbinol'ün şişmanlık ve metabolik bozuklukların önlenmesinde potansiyel bir etkisi olduğunu, yüksek yağlı diyet ile indüklenen sperm hasarına karşı termogenez aktivite ve koruyucu bir etki sağladığını, azalmış adipogenezis ve enflamasyon gibi birçok mekanizmada etkili olabileceğini bildirmişlerdir. Aynı şekilde Tayvan'da Chang ve ark. (2011) yüksek yağlı diyet ile beslenen farelerde indol-3-karbinol'ün etkisini inceledikleri çalışmada kontrol, yüksek

yağlı diyet ile beslenen grup (YY) ve yüksek yağlı diyet ile beslenen farelere indol-3-karbinol (YY + 5 mg/kg indol-3-karbinol) uygulaması yapılan grup (YYİ) olmak üzere 3 grup oluşturmuşlar. On iki hafta sonunda YY grubundaki vücut ağırlığının, epididimal adipoz doku ağırlığının YYİ grubuna göre daha fazla olduğunu ($p < 0,01$) ve adipositlerin YY grupta kontrol ve YYİ gruplarına göre daha büyük olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak obez farelerde indol-3-karbinol tedavisi ile vücut ağırlığının, epididimal yağ doku birikiminin ve infiltrate makrofaj birikiminin azaldığını, obezite ve ilişkili metabolik bozuklukların önlenmesinde etkili olabileceği bildirilmiştir.

Çalışmamızda obez sıçanlarda indol-3-karbinol'n testis üzerindeki antioksidan etkileri araştırıldı. Buna göre OK ve Oİ grubundaki sıçanların başlangıçtaki ağırlıkları ile deney süresince ölçülen ağırlıkları kıyaslandığında, indol-3-karbinol'n 6 hafta boyunca intraperitoneal uygulanması ile Oİ grubundaki sıçanların ağırlık ortalamasının OK grubuna göre ileri derecede azaldığı görüldü ($p < 0,001$). Nİ ve Oİ gruplarındaki ağırlık ortalamasının da OT grubuna göre ileri derecede azaldığı gözlendi ($p < 0,01$).

Sonuçlar bize kilo azalması üzerinde indol-3-karbinol uygulamasının timokinon'dan daha etkili olduğunu düşündürmekteydi. Spermatogonyum sayısı stereolojik değerlendirmesinde Nİ grubundaki spermatogonyum sayısı, NT ve OT grubuna göre anlamlı ölçüde artmıştı ($p < 0,05$). Bu sonuç I3C'n spermatogonyum sayısı üzerinde de timokinondan daha etkili olduğunu düşündürdü. OK grubuyla karşılaştırıldığında ise Nİ grubundaki spermatogonyum sayısı oldukça fazlaydı ve fark ileri derecede anlamlı bulundu ($p < 0,001$). Spermatozit sayısı değerlendirmesinde Nİ grubundaki spermatozit sayısı OK, OT ve Oİ gruplarına göre oldukça artmıştı ($p < 0,001$). NK grubuyla kıyaslandığında ise Nİ grubundaki spermatozit sayısı fazla bulundu ($p < 0,01$). Nİ ve NT grubu spermatozit sayısı karşılaştırmasında, Nİ grubundaki spermatozit sayısı fazlaydı ($p < 0,05$). Bu sonuç bize indol-3-karbinol'n timokinondan spermatozit sayısı üzerinde daha etkili olduğunu düşündürdü. Gruplara ait spermatid sayısı karşılaştırmasında Nİ grubundaki spermatid sayısı, OK, OT, Oİ ve NK gruplarına göre oldukça fazlaydı ($p < 0,001$; $p < 0,01$). Leydig hücre sayısı karşılaştırmasında ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p > 0,05$). Sonuçlar bize indol uygulamasının hem kontrol, hem de obez gruplarda sperm sayısı üzerinde olumlu etkileri olduğunu, timokinon uygulanan gruplara göre daha fazla etkin olduğunu ve spermatogenezi indüklediğini düşündürdü. Sperm sayısındaki bu denli artış, indol-3-karbinol'n obezitede artan östrojeni azaltıp

testosteron üretimini desteklemesinden kaynaklanmış olabileceğini düşündürdü. İndol grubu ortalama seminifer tübül hacmi değerlendirmesinde Nİ grubundaki ortalama seminifer tübül hacmi OK, OT ve Oİ gruplarına göre önemli derecede arttığı gözlemlendi ($p < 0,001$). Nİ-NK ve Nİ-NT grupları ikili karşılaştırmasında da Nİ grubunda ortalama seminifer tübül hacmi diğer gruplara kıyasla artmıştı ve anlamlılık dereceleri sırasıyla ($p < 0,05$; $p < 0,01$). Gruplara ait toplam testis hacmi istatistiksel değerlendirmesinde ise Nİ grubundaki testis hacminin OK ve Oİ gruplarına göre ileri derecede arttığı saptandı ($p < 0,001$). Bu sonuçlar bize, indol-3-karbinol uygulamasıyla sperm sayısal yoğunluğunda bir artış olduğunu buna bağlı olarak da ortalama seminifer tübül hacmi ve toplam testis hacminin arttığını göstermekteydi.

Biyokimyasal analiz değerlendirmesinde OT ve Oİ gruplarındaki miyeloperoksidaz enzim aktivitesi, NK grubuna göre yüksekti ($p < 0,05$). Oİ grubundaki miyeloperoksidaz enzim aktivitesi ise OK grubuna göre azalmıştı ($p < 0,05$). Bu sonuçlardan da anlaşılacağı gibi indol uygulanan obez sıçanlarda oksidan belirteç olan miyeloperoksidaz aktivitesi azalmaktaydı. Bu düşüş bize indol-3-karbinolün radikal süpürücü etkisinden kaynaklandığını düşündürmekteydi.

Hematoksilen-eozin boyama sonucu testis örnekleri üzerinde yaptığımız histolojik ve histopatolojik değerlendirmelerde deney süresi boyunca standart yem ile beslediğimiz obez olmayan gruplardaki sıçanların testislerinde seminifer tübül ve intersitisyel doku histolojik görünüşleri normaldi. Germinal epitelde; spermatogenik seriye ait hücreler normal morfolajiye sahipti. Timokinon ve indol uygulanan gruplarda özellikle de Nİ grubunda tübül lümenindeki spermatid ve spermatozoon yoğunluğu dikkat çekiciydi. NT grubundaki bağ doku ve kan damarı içeriği NK ve Nİ grubuna kıyasla oldukça artmış durumdaydı.

OK grubunda ise büyük hasar saptandı. Tübüllerin tamamen boş olduğu, spermatogenik hücrelerin bulunmadığı ve tübül epitelinin oldukça incelendiği alanlar yoğunlukta idi. OK grubunda duvar yapısı incelmış hatta yer yer kopmuş tübüllerin yanında normalden daha kalın olan tübül epiteline de rastlanmaktaydı. Tübüllerin bir kısmında spermatogonyum, primer spermatosit ve spermatid gibi spermatogenik hücreler mevcutken çoğunda seminifer epitel ileri derecede dejenere olmuştu ve sadece tek katlı peritübüler myoid hücrelerden oluşuyordu. OK grubunda otolize uğramış

hücrelerden oluşan nekrotik ve atrofik tübüller de sıkça görülmekteydi. Tedavi gruplarında ise bu yapıların azaldığı gözlemlendi.

Çalışmamızla bağlantılı olarak Wang ve ark. (2007) yaptığı çalışmada 6 hafta yüksek yağlı diyet ile besledikleri sıçanların mikroskopik incelemelerinde obez grupta spermatogenik hücre serisinde bozuklukların olduğu, hücre tabakalarında ve olgun spermelerde azalmalar olduğunu sonuç olarak sıçanların uzun süre yüksek yağlı diyet ile beslenmesinin obeziteye yol açacağını ve testis gelişimini olumsuz yönde etkileyebileceğini belirtmişlerdir.

OT ve Oİ gruplarında tübül duvar yapısının genellikle normal yapıda olduğu, tübül membran kalınlığının ve germ hücre diziliminin OK grubuna kıyasla daha düzenli bir yapıya sahip olduğu izlendi. Ancak spermatogenezin duraksadığı, germ hücreleri arasında ayrılmaların olduğu, hafif dejenere tübüllere de rastlanmaktaydı. Fakat OK grubunda sıkça rastladığımız spermatogenik hücrelerin bulunmadığı, tamamen boşalmış tübüller OT ve Oİ grubunda görülmedi. Obez gruplarda hücre sayısındaki azalmadan dolayı NT ve Nİ grubuna kıyasla OT ve Oİ gruplarında ortalama seminifer tübül ve testis çapındaki azalmalar dikkat çekiciydi. OT grubundaki bazı kesitlerde tunika albuginea çevresindeki bağ doku ve yağ dokusunun yoğun olduğu ve damarlanmanın diğer obez gruplara oranla arttığı izlendi. Özellikle timokinon uygulanan sıçanlarda obezitenin testis üzerinde oluşturduğu ağır hasar azalmış durumdaydı.

Bununla bağlantılı olarak timokinonun testis üzerindeki koruyucu etkisinin araştırıldığı çalışmalardan Gökçe ve ark. (2011) testiküler toksisiteye neden olan metotreksat uyguladıkları sıçanların testislerinde interstisyel dokuda boşlukların ve ödemin oluştuğunu, seminifer tübül çapının küçüldüğünü, tübül yapısının bozulduğunu belirtmiş olup timokinon tedavisi ile bu hasarın düzeldiği, bu maddenin testis üzerinde koruyucu bir etkisi olduğu bildirilmiştir. Yine Gökçe ve ark. (2010) yaptığı diğer bir çalışmada timokinon'un testis torsiyonu üzerindeki koruyucu etkisini araştırmışlardır. Bu çalışmada testis torsiyonu ile seminifer tübül epitelinin orta şiddetli bozulma gösterdiğini ve bu hasarın timokinon tedavisi ile en aza indirildiğini belirtmişlerdir.

Testis örnekleri üzerinde yaptığımız immünohistokimyasal çalışmada LH reseptör antikorunun tüm gruplardaki lokalizasyonu ve boyanma derecesi değerlendirildi. Önceden de bahsettiğimiz gibi Leydig hücrelerindeki testosteron yapımı primer olarak LH'a bağımlı gerçekleşir. Hücre içine LH'ın girişi ise Leydig hücrelerinde

bulunan reseptörler aracılığı ile olur. Bu reseptörlere LH'nin bağlanmasıyla androjen salgısı başlamaktadır (Shan ve ark., 1997). Çalışmamızda LH reseptör antikoru gruplar arasında pozitif boyanma derecesine göre değerlendirildi. Buna göre, bütün gruplara ait testis kesitlerindeki tüm hücrelerde immünoreaktivite yalnızca hücre sitoplazmasında gözlemlendi. Hücre çekirdeklerinde herhangi bir immünboyanma şekillenmedi.

NK grubunda LH reseptörü interstisyel alanda Leydig hücrelerinde, spermatogonyum ve peritübüler myoid hücrelerin sitoplazmasında güçlü pozitif immünoreaktivite gösterirken, OK grubunda Sertoli, spermatogonyum ve Leydig hücre sitoplazmasında hafif pozitif bölgeler izlendi. Her iki grupta da immünoreaktivite gösteren hücre sitoplazma boyanma yoğunluğu hücreden hücreye değişim göstermekteydi. Aynı tübül içinde pozitif boyanan hücrelerin yanında negatif boyanan hücreler de bulunmaktaydı. Myoid hücreler, spermatogonyumlar ve Leydig hücre sitoplazmasındaki immünoreaktivite; tübülde dejenerasyon olup olmamasına göre değişiklik gösteriyordu. İleri derecede dejenere tübüllerden oluşan OK grubunda Leydig hücrelerinde LH reseptör immünboyanma gözlenmezken, histolojik görünümü normal olan tübüllerde özellikle spermatogonyum, peritübüler myoid hücreler ve Leydig hücreleri hafif immünpozitif boyanma gösteriyordu.

Rajaniemi ve ark. (1981) yaptıkları çalışmada testiste LH reseptörlerinin lokalizasyonunu araştırmışlardır. Bu çalışmada Leydig hücreleri ve çevresinin pozitif boyandığını, fakat her bir hücrenin farklı yoğunlukta boyandığını belirtmişlerdir. Hücrelerin farklı yoğunlukta boyanmasını Leydig hücresi başına düşen reseptör sayısının farklı olmasıyla açıklamışlardır.

Bizim çalışmamızda NT ve OT gruplarındaki örneklerin immünohistokimyasal incelenmesinde NT grubunda interstisyel alanda güçlü pozitif boyanan Leydig hücreleri dikkat çekmekteydi. OT grubunda özellikle obezitenin verdiği hasarın görüldüğü bölgelerdeki Sertoli hücreleri yoğun pozitif immünboyanma göstermekteydi. Her iki grupta da spermatogonyumdan spermatide kadar uzanan hücre serisinde ve peritübüler myoid hücrelerde hafif pozitif boyanan alanlar da izlenmekteydi.

İncelenen tüm gruplar içerisinde Nİ grubundaki Leydig hücre sitoplazmasındaki LH reseptörleri immünboyanmanın en yoğun olduğu gruptu. Spermatogonyum ve Sertoli hücre sitoplazması immün boyanma bakımından Leydig hücrelerine göre hafif immünreaktiviteye sahipti. Oİ grubunu değerlendirdiğimizde OT grubundaki gibi

Sertoli hücre sitoplazması yoğun pozitif immünboyanma göstermekteydi. Tübül lümenine doğru ilerledikçe spermatozoid ve spermatozoid hücre sitoplazmasının da hafif immünreaksiyon gösterdiği görüldü. Sonuç olarak NK grubunda spermatogonik seriye ait hücreler, Sertoli, Leydig ve myoid hücre sitoplazmasının immünboyanma derecesi hücreden hücreye farklılık göstermekteydi. OK grubunda ise hücrelerdeki immünreaktivite diğer gruplara kıyasla oldukça azalmış durumdaydı. Bazı tübüllerdeki Sertoli ve spermatogonyum sitoplazmasında hafif pozitiflikler izlenmekteydi. NT ve Nİ grubundaki Leydig hücre sitoplazmasındaki immünboyanma yoğunluğu obez gruplara göre oldukça artmıştı. Bu durum bizlere timokinon ve indol uygulanan sıçanlarda özellikle de indol uygulamasının testosteron üretimi üzerinde bir artışa neden olduğunu düşündürdü. OT ve Oİ grubunda ise özellikle ileri derecede hasarlı tübüllerdeki Sertoli hücrelerinin sitoplazması yoğun immünreaktivite göstermekteydi. Bu durum bize dejeneratif tübüllerde Sertoli hücrelerinin aktivitesinin artmış olabileceğini düşündürmekteydi.

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda apoptozis yoluyla hücre oluşumunun artması ya da azalmasının birçok hastalığın patogeneğinde rol oynadığı gösterilmiştir (Coolsaet, 1980; Hetts, 1998; Kiess ve Gallaher, 1998).

Yapılan farklı çalışmalarda testiküler ısı artışı, inmemiş testis, radyasyona veya kemoterapiye maruz kalma, metabolik hastalıkların neden olduğu androjen seviyesindeki azalma gibi etkenlerin germ hücre apoptozunu arttırdığı gösterilmiştir (Shikone ve ark., 1994; Socher ve ark., 1997; Hasegawa ve ark., 1998). Özellikle serbest radikallerin hücreyi apoptozise götüren muhtemel nedenler arasında yer aldığı düşünülmektedir (Elmore, 2007). Apoptozis hem patolojik hem de fizyolojik şartlarda oluşabilen bir süreçtir ve vücudumuzda birçok dokuda düzenleyici rolü vardır. Normal spermatogenezin gerçekleşebilmesi için de gereklidir (Aitken ve Krausz, 2001). Testislerde apoptozis çeşitli oranlarda gerçekleşmekte ve germ hücrelerinin sayısı ve kalitesi kontrol altında tutulmaktadır (Huckins, 1978). Apoptozisin normal spermatogenez sürecinde iki önemli rolü vardır. Bunlardan ilki Sertoli hücreleri tarafından desteklenebilecek sayıda germ hücre popülasyonunu sınırlandırmak, ikincisi de anormal spermatozoonun azaltılmasında seçici olmaktır (Sakkas ve Moffat, 2002; Seli ve Sakkas, 2005). Apoptozis testislerde spermatogonyum, spermatozoidler ve spermatozoidlerde yaygın olarak araştırılmış ve birçok apoptotik faktör tanımlanmıştır

(Ricci ve ark., 2002). Lin ve ark. (1997) idiyopatik testiküler yetmezliği olan hastaların testislerinden aldıkları biyopsi materyallerinde germ hücrelerindeki apoptozisin yüksek çıkması, germ hücre apoptozisindeki artmanın testiküler fonksiyon bozukluğu ve infertiliteye neden olabileceği hipotezini ortaya çıkarmıştır. Histolojik çalışmalarda dokulardaki apoptozu belirlemek için TUNEL boyama yöntemi sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemde preapoptotik hücrelerin dahi boyanması yöntemin güvenilirliğini daha da arttırmaktadır. Bu yüzden TUNEL apoptozis değerlendirilmesinde standart yöntemdir (Kockx ve ark., 1998).

Çalışmamızda obezitenin neden olduğu serbest radikallerin muhtemelen etkilediği apoptozis ve bu sürece antioksidanların etkisinin tüm gruplara ait testis örneklerindeki germ hücrelerini ne derece etkilediğini araştırmak için TUNEL boyama yöntemi kullanıldı. Buna göre, NK grubunda hemen hemen her tübülde siyaha boyanmış birkaç spermatogonyum bulunmaktaydı. OK grubunda ise apoptotik germ hücre sayısı tübülde oluşan hasarla doğru orantılı olarak oldukça artmış durumdaydı. Spermatogenik seride özellikle spermatogonyumlardaki apoptotik aktivite diğer hücelere kıyasla çok fazlaydı. OK grubunda Sertoli hücrelerinde, peritübüler myoid hücelerde ve Leydig hücrelerinde de apoptozis sıkça görölmekteydi.

NT grubundaki apoptotik aktivite, NK grubuyla benzerlik göstermekteydi. Yer yer siyaha boyanan apoptotik spermatogonyumlar izlenmekteydi. OT grubunu incelediğimizde hasarlı bölgelerde spermatogonyumların ve Sertoli hücrelerinin apoptotik aktivite gösterdiği fakat OK grubuna kıyasla testiküler germ hücrelerinin apoptozisinde önemli ölçüde azalma olduğu görüldü. Timokinon tedavisiyle apoptozisin azalması bize timokinon'un testis hasarı üzerinde etkili olduğunu düşündürmekteydi.

Bununla bağlantılı olarak Kanter, (2011) yaptığı bir çalışmada toluen maruziyetine bırakılan sıçanlarda testiküler yaralanmaya timokinon'un etkisini araştırmıştır. Bu çalışmanın sonucunda 12 hafta boyunca toluen inhalasyonu yapılan sıçanlara daha sonra 12 hafta süreyle timokinon günde bir kez ağızdan 50 mg/kg verilmiş ve doku örnekleri histopatolojik olarak incelemiştir. Toluene uygulanan grupların testisleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ortalama seminifer tübül çapının azaldığı ve spermatogenezin duraksadığı görölmüş. Yapılan TUNEL boyamada da toluene uygulanan gruplarda apoptozisin fazla olduğu izlenmiş. TQ ile tedavi edilen

gruplarda ise hücreler arasındaki ayrılmaların azaldığı, toluenin testis üzerinde oluşturduğu hasarın büyük ölçüde düzeldiği bildirilmiştir.

Özellikle son yıllarda çeşitli kanser tedavisinde timokinon'un apoptozis üzerindeki etkilerinin araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır. Peng ve ark. (2013) yapmış oldukları çalışmada TQ'un çeşitli kanser hücre proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada TQ'un insan osteosarkom hücre büyümesini apoptozisi indükleyerek bloke ettiğini ayrıca TQ'un anti-tümör ve anti-anjiyogenetik etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Paramasivam ve ark. (2012) nöroblastom hücrelerinde timokinon'un sitotoksik etkisini araştırmış ve timokinon'un nöroblastom hücrelerinin canlılığını azalttığını, apoptotik yolağı tetikleyerek nöroblastom gibi çeşitli kanser hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Lei ve ark. (2012) çalışmalarında TQ'un mide kanseri üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmada TQ'un mide kanser hücrelerinde kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivasyonunu artırarak apoptoza neden olduğunu ve gastrik kanser hücrelerinin ölümüne yol açtığını göstermişlerdir. Badr ve ark. (2011) çalışmasında TQ'un multipl miyelom (MM) olarak bilinen malign plazma hücrelerine etkileri araştırılmış ve MM hastalardan izole edilen MM hücrelerinde TQ'un %80 oranında apoptozisi artırarak bu hücrelerin ölümüne yol açtığını ve TQ'un çok güçlü anti-miyelom aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir.

Nİ grubunda yaptığımız TUNEL boyamayı değerlendirdiğimizde spermatogonik hücrelerdeki apoptozis NK ve NT grubundaki gibi normal fizyolojik aktiviteden kaynaklanmaktaydı. Oİ grubunda ise apoptozisin Nİ grubuna kıyasla arttığı görüldü. Oİ grubunda özellikle spermatogenezin duraksadığı bölgelerdeki spermatogonyumların apoptotik aktivite gösterdiği izlenmekteydi. OK grubuyla karşılaştırdığımızda I3C ve TQ tedavisi sonucu testiküler hasarın ileri ölçüde düzeldiği, apoptotik germ hücre aktivitesinde azalma olduğu görüldü.

I3C'ün apoptozisi ne derece etkilediğiyle ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Özellikle son yıllarda timokinon gibi I3C ile ilgili yapılan çalışmalar kanser tedavisi üzerinde yoğunlaşmıştır.

Choi ve ark. (2012) I3C'ün kanser hücrelerinde apoptozisi indükleyerek çeşitli kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediğini belirtmişlerdir. Ayrıca I3C'ün son zamanlarda anti-obezite faktörü olarak dikkat çektiğini bildirmişlerdir. I3C'ün obezite

ve metabolik bozuklukları hangi yolla indüklediğinin tam olarak bilinmediğini ancak I3C'ün adipojenik genlerin mRNA seviyesini azalttığını bildirmişlerdir.

Hwang ve ark. (2011) I3C'ün bağışıklığı baskılanmış hastalarda (AIDS, kanser kemoterapisi, organ veya kemik iliği transferi durumlarında) sistemik mantarsal enfeksiyonlara ve ölüme neden olan mantarlardan biri olan *Candida albicans* tedavisi üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. *Candida albicans* mantarının I3C ile tedavisi sırasında reaktif oksijen türlerinin, hidroksil radikallerinin arttığını bildirmişlerdir. Çalışmanın sonunda oksidatif hasarın apoptozis yolunun son ürünü olduğu belirtilmiş olup I3C'ün hidroksil radikal üretimi, sitokrom c salınımı ve metacaspase aktivasyonu dahil olmak üzere, apoptoz etkileri olduğunu göstermişlerdir. Ping ve ark. (2011) domuz serumu ile karaciğer fibrozu oluşturdukları sıçanlarda I3C'ün tedavi edici etkisini araştırdıkları çalışmada I3C uygulanması ile karaciğer yağlanması azaldığı histopatolojik değişiklikler olarak nekroz, kollajen lif birikiminin de oldukça azaldığı bildirilmiştir. Apoptoz analizinin de yapıldığı çalışmada I3C'ün karaciğer fibrozu oluşturulmuş sıçanlarda apoptozisi arttırdığı ve tedavi edici etkisi olduğu belirtilmiştir. Lerner ve ark. (2012) I3C'ün insan kolon kanseri hücrelerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmada, I3C tedavisi ile kolon kanserli hücrelerde apoptozisin indüklendiğini, hücre canlılığının inhibe edildiğini açıklamışlardır.

Kim ve ark. (2011) çalışmasında I3C'ün ultraviyole B ile indüklenen insan melanoma hücrelerindeki apoptozis mekanizması araştırılmıştır. I3C tedavisi ile melanoma hücrelerinin canlılığının azaldığını buna karşın apoptotik sinyal yolları üzerinde etkili olmadığını belirtmişlerdir. Lu ve ark. (2012) lösemili fareler üzerinde yaptıkları çalışmada I3C'ün kemirgen lösemi hücrelerine (WEHI-3) apoptotik etkisi araştırılmıştır. I3C'ün WEHI-3 hücrelerinde G₀/G₁ fazında tutukluğa neden olduğunu sonuçta I3C'ün T hücrelerinin artmasına ve makrofaj seviyesinin azalmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Son yıllarda vücut kitle indeksi ile erkek infertilitesi ve bununla ilişkili olan sperm sayısı, hareketi ve morfolojisi ile ilgili araştırmaların klinik ve deneysel anlamda giderek artan oranlarda ortaya çıktığı görülmektedir (Mydlo, 2004; Cabler ve ark., 2010; Mitchell ve ark., 2011). Ahmad ve ark. (2008) obezite ve sperm parametresindeki değişiklikler adlı makalelerinde obeziteyle birlikte sperm sayısı ve motilitesinde azalma

olduğu, sperm morfolojisinin de olumsuz yönde etkilendiğini ve anormal morfolojideki sperm sayısında artış olduğunu bildirmişlerdir.

Sperm yayma preparatlarında yaptığımız morfolojik değerlendirmede spermler baş, boyun ve kuyruk anomalileri yönünden dikkatle incelendi. Değerlendirmede Kruger'in kesin kriterleri kullanıldı ve 200 sperm incelenerek, % normal cinsinden sonuç verildi (Kruger ve ark., 1988). Buna göre normal morfolojideki sperm sayısı, NT-%88,3; NK-%75,75; Nİ-%76; OT-%64,5; Oİ-%61,4; OK-%29 oranlarında bulundu. Baş anomalisi olan sperm sayısı, OK-%45,8; Oİ-%33,75; OT-27,5; Nİ-%17; NK-%16,5; NT-%6,91 oranlarındaydı. Boyun anomalisi olan sperm sayısı, OK-%15,9; Oİ-%6,83; OT-%6,58; NK-%6,41; Nİ-%5,58; NT-%3,16 oranlarındaydı. Kuyruk anomalisi olan sperm sayısı, OK-%10; NT-%1,58; OT-%1,41; Oİ-%1,33; Nİ-%1,33; NK-%1,33 oranlarında bulundu. Obez kontrol grubunda azalan sperm sayısını takiben baş, boyun ve kuyruk defekti diğer gruplara kıyasla yüksek oranlarda olduğu tesbit edildi. Özellikle Dag defektli sperm anomalisinin deney gruplarından sadece OK grubunda görülmesi dikkat çekiciydi.

Gruplar arası sperm morfolojisi istatistiksel değerlendirmesinde ise NT grubundaki normal sperm sayısı NK ve Nİ ($p < 0,05$); OT ve Oİ ($p < 0,001$) gruplarına göre daha fazlaydı. Non-kontrol ve non-indol gruplarına kıyasla timokinon grubunda normal morfolojideki sperm sayısının daha fazla olması dikkat çekiciydi. Bu sonuçlar bize timokinon uygulamasının sperm morfolojik yapısı üzerinde olumlu etkileri olduğunu gösterdi. OT ve Oİ gruplarındaki normal sperm sayısı, OK grubuna göre oldukça fazlaydı ($p < 0,001$). Nİ grubunda sayılan normal sperm sayısı ise OK ve Oİ gruplarına kıyasla daha fazla bulundu ($p < 0,001$). Sonuçlar indol uygulamasının obez gruplarda sperm morfolojisi üzerinde anlamlı ölçüde etkili olduğunu gösterdi.

Baş defekti istatistiksel değerlendirmesinde OK grubundaki baş anomalili sperm sayısı, NK, NT, Nİ, OT ($p < 0,001$) ve Oİ ($p < 0,01$) gruplarına kıyasla çok fazlaydı. Oİ grubundaki baş anomalili sperm sayısı, Nİ ve NK gruplarına göre fazlaydı ($p < 0,001$) fakat OK grubuna kıyasla oldukça azalmış olduğu görüldü ($p < 0,01$). NT grubundaki baş anomalili sperm sayısı, OT ve Oİ ($p < 0,001$), NK ve Nİ ($p < 0,05$) gruplarına kıyasla azaldığı gözlemlendi. Boyun defekti istatistiksel değerlendirmesinde OK grubundaki boyun anomalili sperm sayısının, NK, NT, Nİ, Oİ ve OT gruplarına göre çok fazla olduğu görüldü ($p < 0,001$). Kuyruk defekti istatistiksel değerlendirmesinde de OK grubundaki

kuyruk anomalili sperm sayısının NK, NT, Nİ, Oİ ve OT gruplarına kıyasla çok fazla olduğu gözlemlendi ($p < 0,001$).

Bu sonuçlardan yola çıkarak timokinon uygulaması ile obez sıçanlardaki sperm anomalilerinin yüksek oranlarda azaldığı, indol gruplarına kıyasla timokinon'un sperm kalitesi üzerindeki olumlu etkilerinin daha fazla olduğu görüldü.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız kapsamında incelediğimiz parametreleri değerlendirdiğimizde yüksek yağlı diyet ile 9 hafta boyunca beslenen sıçanlarda kilo artışını takiben testis çevresinde yağlanma, ileri derecede testiküler hasar, spermatogenezdeki duraksamayla beraber yoğun olarak nekrotik ve atrofik tübüller görülmekteydi. Obez kontrol grubu başta olmak üzere obez timokinon ve obez indol gruplarındaki oksidan durum belirteci olan miyeloperoksidaz aktivitesindeki artış da obezitenin verdiği hasarın göstergesiydi.

Güçlü antioksidan olduğu bilinen bitkisel kaynaklı indol-3-karbinol ve timokinon tedavisiyle bu etkilerin önemli ölçüde düzeldiği görüldü. İndol-3-karbinol'un timokinon'a kıyasla, özellikle obez sıçanlarda azalan sperm sayısını arttırdığını ve obez olmayan gruplarda da önemli artışlara neden olduğu gözlemlendi. Non-obez indol grubundaki ortalama tübül hacminin ve testis hacminin diğer gruplara oranla önemli ölçüde artmış olması toplam sperm sayısındaki artıştan kaynaklanmaktaydı.

Sperm morfolojisi değerlendirmelerinde ise timokinon'un indole kıyasla obez sıçanlardaki sperm defektleri üzerinde daha onarıcı bir etkiye sahip olduğu görüldü. İndol'un sperm sayısını artırıcı etkisinin yanında timokinon'un sperm kalitesi üzerindeki olumlu etkileri daha fazla dikkat çekiciydi. Biyokimyasal parametrelerden miyeloperoksidaz aktivitesinin timokinon uygulanan gruplarda azalması da bu düşünceyi desteklemekteydi.

Yapılan tüm bu analizlerin sonuçları bize timokinon ve indol'un obezitenin oluşturduğu oksidatif stres üzerinde etkili olduğunu ve bu etkiyi serbest radikalleri temizlemek suretiyle sperm sayısını artırarak ortaya koyduğunu düşündürdü. Biyokimyasal analizler de bu düşünceyi desteklemekteydi.

Bu antioksidanların daha uzun süreli uygulanmasıyla daha da iyi sonuçların alınabileceğini, obez sıçanlarda oluşan testiküler hasarın tamamen düzeltilebileceğini, azalan sperm sayısının normal seviyelere çıkarılabileceğini ve daha yüksek fertilitite kapasitesine sahip spermelerin elde edilebileceğini düşünmekteyiz.

Bu tarz antioksidan içerikli bitkilerin tüketiminin artması, birçok hastalıktan korunmanın yanında çağın sorunu haline gelen obezite ve infertilitenin önlenmesi ve tedavisinde etkili olabileceği kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Abdel-Halim RE. Obesity: 1000 years ago. *Lancet*. 2005;366:16-22.
- Abraham L. Üreme Sistemi. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. 1. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık. 2006; 531-564.
- Acheson RM. *An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds*. United States of America, John Wiley & Sons. 1976.
- Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol*. 1984;105:121-126.
- Aggerholm AS, Thulstrup AM, Toft G, Ramlau-Hansen CH, Bonde JP. Is overweight a risk factor for reduced semen quality and altered serum sex hormone profile? *Fertil Steril*. 2008;90:619-626.
- Ahmad O, Hammoud AO, Wilde N, Gibson M, Parks A, Carrell DT, Meikle AW. Male obesity and alteration in sperm parameters. *Fertil Steril*. 2008;90:2222-2225.
- Aitken RJ, Fisher HM, Fulton N, Gomez E, Knox W, Lewis B, Irvine S. Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine. *Mol Reprod Dev*. 1997;47:468-482.
- Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*. 2001;122:497-506.
- Akgül A. *Baharat Bilimi ve Teknolojisi*. Ankara, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları. 1993;15:451.
- Al-Ali A, Alkhawajah AA, Randhawa MA, Shaikh NA. Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *JAMC*. 2008;20:25-27.
- al-Gaby AM. Amino acid composition and biological effects of supplementing broad bean and corn proteins with *Nigella sativa* (black cumin) cake protein. *Nahrung*. 1998;42:290-294.
- Al-Ghamdi MS. The anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activity of *Nigella sativa*. *J Ethnopharmacol*. 2001;76:45-48.
- Al-Hader A, Aqel M, Hasan Z. Hypoglycemic effects of the volatile oil of *Nigella sativa* seeds. *Int J Pharmacog*. 1993;31:96-100.
- Ali BH, Blunden G. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res*. 2003;17:299-305.

- Aljabre SH, Randhawa MA, Akhtar N, Alakloby OM, Alqurashi AM, Aldossary A. Antidermatophyte activity of ether extract of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. J Ethnopharmacol. 2005;101:116–119.
- Allison DB, Fontaine KR, Manson JE, Stevens J, VanItallie TB. Annual deaths attributable to obesity in the United States. JAMA. 1999;282:1530-1538.
- Al-Naggar TB, Gomez-Serranillos MP, Carretero ME, Villar AM. Neuropharmacological activity of *Nigella sativa* L. extracts. J Ethnopharmacol. 2003;88:63-68.
- Altunkaynak BZ, Önger ME, Altunkaynak ME, Ayrancı E, Canan S. A brief introduction to stereology and sampling strategies: Basic concepts of stereology. Neuroquantology. 2012;1:31-43.
- Altunkaynak BZ, Özbek E. Obezite: Nedenleri ve Tedavi Seçenekleri. Van Tıp Dergisi. 2006;13:138-142.
- Altunkaynak BZ, Özbek E. Obezite: Nedenleri ve Tedavi Seçenekleri. Dicle Tıp Dergisi. 2007;34:144-149.
- Altunkaynak ME, Özbek E, Altunkaynak BZ, Can İ, Ünal D, Ünal B. The effects of high-fat diet on the renal structure and morphometric parametric of kidneys in rats. J Anat. 2008;212:845-852.
- American Diabetes Association. Type 2 diabetes in children and adolescents. Pediatrics. 2000;105:671-680.
- Amirkhizi F, Siassi F, Minaie S, Djalali M, Rahimi A, Chamari M. Is obesity associated with increased plasma lipid peroxidación and oxidative stress in women. J Atheroscler Thromb. 2007;2:189-192.
- Annagür BB. Obezitede çeşitli risk faktörleri ve dürtüsellik. Current Approaches In Psychiatry. 2010;2:572-582.
- Arı Z, Ulman C, Taneli F, İşbilen B, Uyanık BS, Aldırmaz H, Çelik HT, Günay Ö. Yüksek yağ içerikli diyet ile beslenen sıçanların arka bacak kasında dehidroepiandrosteron sülfatın oksidan durum belirteçleri ile bakır ve çinko düzeylerine etkisi. Turk J Biochem. 2008;33:1-8.
- Arnao MB, Sances-Bravo J, Acosta M. Indole-3-carbinol as a scavenger of free radicals. Biochem Mol Biol Int. 1996;39:1125-1134.
- Arslan SO, Gelir E, Armutcu F, Coskun O, Gürel A, Sayan H, Çelik L. The protective effect of thymoquinone on ethanol-induced acute gastric damage in the rat. Nutr Res. 2005;25:673-680.

- Atta MB. Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chem.* 2003;83:63-68.
- Auborn KJ, Fan S, Rosen EM, Goodwin L, Chandraskaren A, Williams DE, Chen D, Carter TH. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen. *J Nutr.* 2003;133:2470-2475.
- Badary OA, Abdel-Naim AB, Abdel-Wahab MH, Hamada FM. The influence of thymoquinone on doxorubicin-induced hyperlipidemic nephropathy in rats. *Arch Toxicol.* 2000;143:219-226.
- Badary OA, Abd-Ellah MF, El-Mahdy MA, Salama SA, Hamada FM. Anticlastogenic activity of thymoquinone against benzo(a)pyrene in mice. *Food Chem Toxicol.* 2007;45:88-92.
- Badary OA, Taha RA, Gamal El-Din AM, Abdel-Wahab MH. Thymoquinone is a potent superoxide anion scavenger. *Drug Chem Toxicol.* 2003;26:87-98.
- Badr G, Lefevre EA, Mohany M. Thymoquinone inhibits the CXCL12-induced chemotaxis of multiple myeloma cells and increases their susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *Plos One.* 2011;6:23741.
- Bagchi D, Preuss HG. *Obesity: Epidemiology, Pathophysiology and Prevention.* CRC Pres. 2007.
- Bakos HW, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. The effect of paternal diet-induced obesity on sperm function and fertilization in a mouse model. *Int J Androl.* 2010; 1-9.
- Barnett R. Obesity. *Lancet.* 2005;365:1843.
- Bartheld CS. Counting particles in tissue sections: choices of methods and importance of calibration to minimize biases. *Histol Histopathol.* 2002;17:639-648.
- Baytop T. *Türkiye’de Bitkilerle Tedavi.* İstanbul, 2. Basım, Nobel Tıp Kitapları. 1999.
- Bergman RA, Afifi AK, Heidger PM. *Histology.* Philadelphia, WB Saunders Company. 1996.
- Berne RM, Levy MN, Kooppen BM, Stanton BA. *Fizyoloji.* 5. Baskı, İstanbul, Güneş Tıp Kitabevleri. 2008; 920-946.
- Björntorp P. Obesity. *Lancet.* 1997;9:423-426.
- Black D, James WPI, Besser GM. Obesity. *J Coll Physici.* 1983;17:5-65.
- Blom E. A new sterilizing and hereditary defect (the "Dag defect") located in the bull sperm tail. *Nature.* 1966;12:739-740.

- Bolt HM, Göbel P. Formation of estrogens from androgens by human subcutaneous adipose tissue in vitro. *Horm Metab Res.* 1972;4:312-313.
- Bonnesen C, Eggleston IM, Hayes JD. Dietary Indoles and isothiocyanates that are generated from Cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines. *Cancer Res.* 2001;61:6120-6130.
- Borek C. Dietary antioxidants and human cancer. *Integr Cancer Ther.* 2004;3:333-341.
- Boskabady MH, Shirmohammadi B, Jandaghi P, Kiani S. Possible mechanism(s) for relaxant effect of aqueous and macerated extracts from *Nigella sativa* on tracheal chains of guinea pig. *BMC Pharmacol.* 2004; 4:3.
- Bourgou S, Pichette A, Marzouk B, Legault J. Bioactivities of black cummin essential oil and its main terpenes from Tunisia. *S Afr J Bot.* 2010;76:210-216.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982;78:206-209.
- Bradlow HL, Sepkovic DW, Telang NT, Osborne MP. Ann NY. Indole-3-carbinol. A novel approach to breast cancer prevention. *Ann NY Acad Sci.* 1995;768:180-200.
- Braendgaard H, Evans SM, Howard CV, Gundersen HJG. The total number of neurons in the human neocortex unbiasedly estimated using optical disectors. *J Microsc.* 1990;157:285-304.
- Brennan ML, Hazen SL. Emerging role of myeloperoxidase and oxidant stress markers in cardiovascular risk assessment. *Curr Opin Lipidol.* 2003;14:353-359.
- Broadbent TA, Broadbent HS. The chemistry and pharmacology of indole-3-carbinol. *Curr Med Chem.* 1998;5:469-491.
- Bryniarski K, Szczepanik M, Ptak M, Ptak W. Modulation of testicular macrophage activity by collagenase. *Folia Histochem Cyto.* 2005;43:37-41.
- Burits M, Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother Res.* 2000;14:323-328.
- Buschemeyer WC 3rd, Freedland SJ. Obesity and prostate cancer: epidemiology and clinical implications. *Eur Urol.* 2007;52:331-343.
- Cabler S, Agarwal A, Flint M, du Plessis SS. Obesity: modern man's fertility nemesis. *Asian J Androl.* 2010;12:480-489.
- Can S. Obezitede Endokrinolojik Değerlendirme. *Obezite.* 2001;2:17-20.

- Cattaneo L, De Gennaro Colonna V, Zoli M, Muller EE, Cocchi D. Hypothalamo-pituitary-IGF-1 axis in female rats made obese by overfeeding. *Life Sci.* 1997;61:881-889.
- Cemek M, Enginar H, Karaca T, Ünak P. In Vivo Radioprotective effects of *Nigella sativa* L. oil and reduced glutathione against irradiation-induced oxidative injury and number of peripheral blood lymphocytes in rats. *Photochem Photobiol.* 2006;82:1691-1696.
- Cha MC, Chou CJ, Boozer CN. High-fat diet feeding reduces the diurnal variation of plasma leptin concentration in rats. *Metabolism.* 2000;49:503-507.
- Chakravarty N. Inhibition of histamine release from mast cells by nigellone. *Ann Allergy Asthma Im.* 1993;70:237-242.
- Chang HP, Wang ML, Chan MH, Chiu YS, Chen YH. Antiobesity activities of indole-3-carbinol in high-fat-diet-induced obese mice. *Nutrition.* 2011;27:463-470.
- Chavarro JE, Toth TL, Wright DL, Meeker JD, Hauser R. Body mass index in relation to semen quality, sperm DNA integrity, and serum reproductive hormone levels among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril.* 2010;1:2222-2231.
- Chen MM, Lan XX, Li CY, Tian ZM, Chen KF. Diet-induced obesity increases the apoptosis of testicular spermatogenic cells in pubertal male rats. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2011;17:342-347.
- Chen XL, Gong LZ, Xu JX. Antioxidative activity and protective effect of probiotics against high-fat diet-induced sperm damage in rats. *Animal.* 2012;24:1-6.
- Choi Y, Kim Y, Park S, Lee KW, Park T. Indole-3-carbinol prevents diet-induced obesity through modulation of multiple genes related to adipogenesis, thermogenesis or inflammation in the visceral adipose tissue of mice. *J Nutr Biochem.* 2012;23:1732-1739.
- Choi Y, Um SJ, Park T. Indole-3-carbinol directly targets SIRT1 to inhibit adipocyte differentiation. *Int J Obesity.* 2012; 158.
- Cohen PG. Aromatase, adiposity, aging and disease. The hypogonadal-metabolic-atherogenic-disease and aging connection. *Med Hypotheses.* 2001;56:702-708.
- Colette C, Percheron C, Pares-Herbute N, Michel F, Pham TC, Birillant L, Descomps B, Monnier L. Exchanging carbohydrates for monounsaturated fats in energy-restricted diets: effects on metabolic profile and other cardiovascular risk factors. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2003;27:648-656.
- Conaway C, Yang YM, Chung FL. Isothiocyanates as cancer chemopreventive agents: Their biological activity and metabolism in rodents and humans. *Curr Drug Metab.* 2002;3:233-255.

- Coolsaet BL. The varicocele syndrome: Venography determining the optimal level for surgical management. *Int J Urol*. 1980;124:833-838.
- Cryer B, Feldman M. Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med*. 1998;104:413-421.
- Çubukçu B, Meriçli AH, Mat A, Sarıyar G, Sütülpınar N, Meriçli F. *Fitoterapi Yardımcı Ders Kitabı*. İstanbul Üniversitesi Yayınları. 2002; 79.
- Dalgaard M, Pilegaard K, Ladefoged O. In utero exposure to diethylstilboestrol or 4-n-nonylphenol in rats: number of sertoli cells, diameter and length of seminiferous tubules estimated by stereological methods. *Acta Pharm Toxicol*. 2002;90:59.
- D'Antuono LF, Moretti A, Lovato AFS. Seed yield, yield components, oil content and essential oil content and composition of *Nigella sativa* L. and *Nigella damascena* L. *Ind Crop Prod*. 2002;15:59-69.
- Davies KJA. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defences: an hypothesis. *J Free Radic Biol Med*. 1986;2:155-173.
- de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J Androl*. 1992;13:379-386.
- de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod*. 1995;10:15-21.
- Dellmann HD, Brown EM. *Textbook of Veterinary Histology*, 3rd Ed., Lea & Febiger, Philadelphia. 1987; 286-312.
- Dere F. *Anatomi Atlası ve Ders Kitabı*. Adana, 3. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri. 1999; 987-1008.
- Despres JP. Obesity and lipid metabolism. Relevance of body fat distribution. *Curr Opin Lipidol*. 1992;2:5-15.
- Després JP. Dyslipidemia and obesity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*. 1994;8:629-660.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82:48.
- Duru NK. *Subfertil ve İnfertil Sperm Parametreleri*. Ankara, GATA Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Notları. 1998.
- Dyck DJ. Dietary fat intake, supplements and weight loss. *Can J Appl Physiol*. 2000;25:495-523.

- El-Abhar HS, Abdallah DM, Saleh S. Gastroprotective activity of *Nigella sativa* oil and its constituent, thymoquinone, against gastric mucosal injury induced by ischaemia/reperfusion in rats. *J Ethnopharmacol.* 2003;84:251-258.
- el-Aziz MA, Hassan HA, Mohamed MH, Meki AR, Abdel-Ghaffar SK, Hussein MR. The biochemical and morphological alterations following administration of melatonin, retinoic acid and *Nigella sativa* in mammary carcinoma: an animal model. *Int J Exp Pathol.* 2005;86:383-396.
- El Bayoumy K, Upadhyaya P, Desai DH. Effects of 1,4- phenylenebis (methylene) selenocyanate, phenethyl isothiocyanate, indole-3-carbinol, and d-limonene individually and in combination on the tumorigenicity of the tobacco specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)- 1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mouse lung. *Anticancer Res.* 1996;16:2709-2712.
- El-Dakhakhny M. Studies on the Egyptian *Nigella sativa* L: IV. Some pharmacological properties of the seeds' active principle in comparison to its dihydro compound and its polymer. *Arzneimittelforschung.* 1965;15:1227-1229.
- El-Dakhakhny M, Barakat M, El-Halim M, Aly SM. Effects of *Nigella sativa* oil gastric secretion and ethanol-induced ulcer in rats. *J Ethnopharmacol.* 2000;72:299-304.
- El-Dakhakhny M, Madi NJ, Lember N, Ammon HP. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats. *J Ethnopharmacol.* 2002;81:161-164.
- Elderfield RC. *Heterocyclic compounds.* London, John Wiley & Sons. 1960.
- El-Mahmoudy A, Matsuyama H, Borgan MA, Shimizu Y, El-Sayed MG, Minamoto N. Thymoquinone suppresses expression of inducible nitric oxide synthase in rat macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2002;2:1603-1611.
- Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-516.
- El-Tahir KE, Ashour MM, Al-Harbi MM. The respiratory effects of the volatile oil of the black seed (*Nigella sativa*) in guinea pigs: elucidation of the mechanism(s) of action. *Gen Pharmacol.* 1993;24:1115-1122.
- England MA, Waddell H. *Life Before Birth.* Mosby Wolf, London. 1996;2:166-170.
- Erdemir F. Evaluation of the relationship between obesity and male infertility. *J Clin Anal Med* 2013;4:76-82.
- Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O, Suha-Parlaktas B, Sahin S. The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters. *Actas Urol Esp.* 2012;36:153-159.

- Erkoçak A. Özel Histoloji. Genital Sistem. 2. Baskı, Ankara, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 1990; 166-194.
- Eşrefoğlu M. Genel ve Özel Histoloji. Malatya, Pelikan Yayıncılık. 2004; 310.
- Fararh KM, Ibrahim AK, Elsonosy YA. Thymoquinone enhances the activities of enzymes related to energy metabolism in peripheral leukocytes of diabetic rats. Res Vet Sci. 2010;88:400-404.
- Fararh KM, Shimizu Y, Shiina T, Nikami H, Ghanem MM, Takewaki T. Thymoquinone reduces hepatic glucose production in diabetic hamsters. Res Vet Sci. 2005;79:219-223.
- Fawcett DW. The cell: An atlas of fine structure, Philadelphia, London, W.B. Saunders Company. 1966.
- Fejes I, Koloszar S, Závaczki Z, Daru J, Szöllösi J, Pál A. Effect of body weight on testosterone/estradiol ratio in oligozoospermic patients. Arch Androl. 2006;52:97-102.
- Fernandez CD, Bellentani FF, Fernandes GS, Perobelli JE, Favareto AP, Nascimento AF, Cicogna AC, Kempinas WD. Diet-induced obesity in rats leads to a decrease in sperm motility. Reprod Biol Endocrin. 2011;11:32.
- Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González A, Esquivel-Chirino C, Durante-Montiel I, Sánchez-Rivera G, Valadez-Vega C, Morales-González JA. Inflammation, oxidative stress, and obesity. Int J Mol Sci. 2011;12:3117-3132.
- Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. Annu Rev Biochem. 1995;64:97-112.
- Gad AM, El-Dakhakni M, Hassan M. Studies on the chemical composition of Egyptian *Nigella sativa* L. oil. Planta Med. 1963;11:134-138.
- Gali-Muhtasib H, Diab-Assaf M, Boltze C, Al-Hmaira J, Hartig R, Roessner A, Schneider-Stock R. Thymoquinone extracted from black seed triggers apoptotic cell death in human colorectal cancer cells via a p53-dependent mechanism. Int J Oncol. 2004;25:857-866.
- Galinier M, Pathak A, Roncalli J, Massabuau P. Obesity and cardiac failure. Arch Mal Coeur. 2005;98:39-45.
- Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. 19. Baskı, İstanbul, Barış Kitabevi. 1999; 435-458.
- Gao J, Ghibaudi L, van Heek M, Hwa JJ. Characterization of diet-induced obese rats that develop persistent obesity after 6 months of high-fat followed by 1 month of low-fat diet. Brain Res. 2002;936:87-90.

- Gartner LP, Hiatt JL. Color Text of Histology. Second Edition, USA, WB Saunders Company. 2003; 496-499.
- Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Chen H, Zirkin BR, Hardy MP. Gene expression in rat Leydig cells during development from the progenitor to adult. *Biol Reprod.* 2005;72:1405-1415.
- Ghanayem BI, Bai R, Kissling GE, Travlos G, Hoffler U. Diet-induced obesity in male mice is associated with reduced fertility and potentiation of acrylamide-induced reproductive toxicity. *Biol Reprod.* 2010;82:96-104.
- Gökçe A, Oktar S, Koc A, Gonenci R, Yalcinkaya F, Yonden Z, Duru M. Protective effect of thymoquinone in experimental testicular torsion. *Urol Int.* 2010;85:461-465.
- Gökçe A, Oktar S, Koc A, Yonden Z. Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. *Hum Exp Toxicol.* 2011;30:897-903.
- Greenway FL, Smith SR. The future of obesity research. *Nutrition.* 2000;16:976-982.
- Grubbs CJ, Steele VE, Casebolt T, Juliana MM, Eto I, Whitaker LM, Dragnev KH, Kelloff GJ, Lubet RL. Chemoprevention of chemically-induced mammary carcinogenesis by indole-3-carbinol. *Anticancer Res.* 1995;15:709-716.
- Gu JJ, Gao FY, Zhao TY. A preliminary investigation of the mechanisms underlying the effect of berberine in preventing high-fat diet-induced insulin resistance in rats. *J Physiol Pharmacol.* 2012;63:505-513.
- Gutteridge DH, Gruber HE, Kermode DG, Worth GK. Thirty cases of concurrent Paget's disease and primary hyperparathyroidism: sex distribution, histomorphometry, and prediction of the skeletal response to parathyroidectomy. *Calcified Tissue Int.* 1999;65:427-435.
- Gundersen HJG. Notes on the estimation of the numerical density of arbitrary particles: the edge effect. *J Microsc.* 1977;111:219-223.
- Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles. A review of unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones, in memory of William R. Thompson. *J Microsc.* 1986;143:3-45.
- Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaard JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple, and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 1988;96:379-394.
- Gundersen HJG, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 1987;147:229-263.

- Gundersen HJG, Jensen EBV, Kieu K, Nielsen J. The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *J Microsc.* 1999;193:199-211.
- Gupta RK, Chandra A, Verm AK, Kumar S. Obstructive sleep apnoea: a clinical review. *J Ass Physicians India.* 2010;58:438-441.
- Haider SG. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol.* 2004;233:181-241.
- Halliwell B. Free radicals and vascular disease: how much do we know? *BMJ.* 1993;307:885-886.
- Halliwell B, Cross CE. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ Health Persp.* 1994;102:5-12.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: Some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys.* 1986;246:501-514.
- Halliwell B, Gutteridge John MC. *Free Radicals in Biology and Medicine.* Third Edition, New York, Oxford University Pres. 2001; 22-24.
- Hammoud A, Carrell DT, Meikle AW, Xin Y, Hunt SC, Adams TD, Gibson M. An aromatase polymorphism modulates the relationship between weight and estradiol levels in obese men. *Fertil Steril.* 2010;94:1734-1738.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrell DT. Obesity and male reproductive potential. *J Androl.* 2006;27:619-626.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Meikle AW, Carrell DT. Impact of male obesity on infertility: a critical review of the current literature. *Fertil Steril.* 2008;90:897-904.
- Hammoud AO, Meikle AW, Reis LO, Gibson M, Peterson CM, Carrell DT. Obesity and male infertility: A practical approach. *Semin Reprod Med.* 2012;30:486-495.
- Hansson V, Ritzen EM, French FS. Androgen transport mechanisms in the testis and epididymis. *Acta Endocrinol.* 1974;191:191-198.
- Hasegawa M, Zhang Y, Niibe H, Terry NH, Meistrich ML. Resistance of differentiating spermatogonia to radiation-induced apoptosis and loss in p53-deficient mice. *Radiat Res.* 1998;149:263-270.
- Hassa O, Aştı RN. *Embriyoloji.* 3. Baskı, Ankara, Yorum Basın Yayın. 1997; 7-10.

- Hassett DJ, Ma JF, Elkins JG, McDermott TR, Ochsner UA, West SE, Huang CT, Fredericks J, Burnett S, Stewart PS, McFeters G, Passador L, Iglewski BH. Quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* controls expression of catalase and superoxide dismutase genes and mediates biofilm susceptibility to hydrogen peroxide. *Mol Microbiol.* 1999;34:1082-1093.
- Hatemi H, Turan N, Arık N, Yumuk V. Türkiye Obezite ve Hipertansiyon Taraması Sonuçları. The Results of Obesity and Hypertension Screening in Turkey. *Endokrinolojide Yönelişler Dergisi.* 2002;11:1-15.
- Hermes-Lima M, Zenteno-Savin T. Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comp Biochem Phys C.* 2002;133:537-556.
- Hermo L, Dworkin J. Transitional cells at the junction of seminiferous tubules with the rete testis of the rat: their fine structure, endocytic activity, and basement membrane. *Am J Anat.* 1988;181:111-131.
- Hetts SW. To die or not to die: An overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA.* 1998;278:300-307.
- Heysmfield SB, Wang J, Lichtman S, Karnen Y, Kehayias J, Pierson RN Jr. Body composition in elderly subjects. A critical appraisal of clinical methodology. *Am J Clin Nutr.* 1989;50:1167-1175.
- Higdon JV, Frei B. Obesity and oxidative stress a direct link to CVD. *Arterioscl Throm Vas.* 2003;23:365-367.
- Hjollund NH, Bonde JP, Jensen TK, Olsen J. Diurnal scrotal skin temperature and semen quality. *Int J Androl.* 2000;23:309-318.
- Hofny ER, Ali ME, Abdel-Hafez HZ, Kamal Eel-D, Mohamed EE, Abd El-Azeem HG, Mostafa T. Semen parameters and hormonal profile in obese fertile and infertile males. *Fertil Steril.* 2010;94:581-584.
- Hosseinzadeh H, Parvardeh S. Anticonvulsant effects of thymoquinone, the major constituent of *Nigella sativa* seeds, in mice. *Phytomedicine.* 2004;11:56-64.
- Houghton PJ, Zarka R, De La Heras B, Hoult JRS. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* 1995;61:33-36.
- Howard CV, Reed MG. Unbiased Stereology. Three-dimensional measurements in microscopy. Bios Scientific Publishers. 1998.
- Howell K, Hopkins N, Mcloughlin P. Combined confocal microscopy and stereology: a highly efficient and unbiased approach to quantitative structural measurement in tissues. *Exp Physiol.* 2002;87:747-756.

- Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem.* 1981;29:577-580.
- Huckins C. The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rat: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium. *Anat Rec.* 1978;190:905-926.
- Hwang IS, Lee J, Lee DG. Indole-3-carbinol generates reactive oxygen species and induces apoptosis. *Biol Pharm Bull.* 2011;34:1602-1608.
- Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, Fujii J. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radical Res.* 2005;39:697-705.
- Islam SN, Begum P, Ahsan T, Huque S, Ahsan M. Immunosuppressive and cytotoxic properties of *Nigella sativa*. *Phytother Res.* 2004;18:395-398.
- Işık AZ, Vicdan K. *İn Vitro Fertilizasyon Uygulamalarında Laboratuvar.* Ankara, Çağdaş Medikal. 1999.
- Jarow JP, Kirkland J, Koritnik DR, Cefalu WT. Effect of obesity and fertility status on sex steroid levels in men. *Urology.* 1993;42:171-174.
- Jensen TK, Andersson AM, Jørgensen N, Andersen AG, Carlsen E, Petersen JH, Skakkebaek NE. Body mass index in relation to semen quality and reproductive hormones among 1,558 Danish men. *Fertil Steril.* 2004;82:863-870.
- Jin L, Qi M, Chen DZ, Anderson A, Yang GY, Arbeit JM, Auburn KJ. Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer Res.* 1999;59:3991-3997.
- Johnson KE. *Histology and Cell Biology.* 2nd Ed, Harwal Publishing Company. 1991; 295-304.
- Jones PH. Management of obesity in the prevention of cardiovascular disease. *Methodist Debaquey Cardiovasc J.* 2011;6:33-36.
- Jung A, Schuppe HC. Influence of genital heat stress on semen quality in humans. *Andrologia.* 2007;39:203-215.
- Jung A, Strauss P, Lindner HJ, Schuppe HC. Influence of heating car seats on scrotal temperature. *Fertil Steril.* 2008;90:335-339.
- Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Erkek Üreme Sistemi.* Aytekin Y, Solakoğlu S. *Temel Histoloji.* 1. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevi. 2005; 431-448.

- Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. 2006; 431-447.
- Kamara K, Eskay R, Castonguay T. High-fat diets and stress responsivity. *Physiol Behav.* 1998;64:1-6.
- Kanter M. *Nigella sativa* and derived thymoquinone prevents hippocampal neurodegeneration after chronic toluene exposure in rats. *Neurochem Res.* 2008;33:579-588.
- Kanter M. Thymoquinone reestablishes spermatogenesis after testicular injury caused by chronic toluene exposure in rats. *Toxicol Ind Health.* 2011;27:155-166.
- Kaseb AO, Chinnakannu K, Chen D, Sivanandam A, Tejwani S, Menon M, Dou QP, Reddy GP. Androgen receptor and E2F-1 targeted thymoquinone therapy for hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res.* 2007;67:7782-7788.
- Kaya M, Harrison RG. An analysis of the effect of ischaemia on testicular ultrastructure. *J Pathol.* 1975;117:105-115.
- Kaya M, Polat S, Mete UÖ, Tap Ö, Özgür H. Özel Histoloji Ders Notları. Adana, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 2006; 156-161.
- Khan MA. Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* Linn. *Inflammopharmacology.* 1999;7:15-35.
- Khan MA, Ashfaq MK, Zuberi HS, Mahmood MS, Gilani AH. The in vivo antifungal activity of the aqueous extract from *Nigella sativa* seeds. *Phytother Res.* 2003;17:183-186.
- Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Palme Yayıncılık. 2006; 547-548.
- Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrinol.* 1998;18:482-491.
- Kim SY, Kima DS, Jeong YM, Moon SI, Kwon SB, Park KC. Indole-3-carbinol and ultraviolet B induce apoptosis of human melanoma cells via down-regulation of MITF. *Pharmazie.* 2011;66:982-987.
- Kockx MM, Muhring J, Knaapen MWM, de Meyer GRY. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol.* 1998;152:885-888.
- Kojima T, Tanaka T, Mori H. Chemoprevention of spontaneous endometrial cancer in female donryu rats by indole-3-carbinol. *Cancer Res.* 1994;54:1446-1449.
- Kopelman PG. Hormones and obesity. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1994;8:549-560.

- Kopelman PG. Obezite ve İlişkili Hastalıkların Tedavisi. 1.Baskı. AND Danışmanlık, Eğitim, Yayıncılık ve Organizasyon. 2001; 1-11.
- Kopelman PG, Stock MJ. Clinical Obesity. Blackwell Science. 1998; 1-17.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA, Roudebush WE. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. J Androl. 2006;27:450-452.
- Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Gastroenterology. 1984;87:1344-1350.
- Krinke GJ. The Laboratory Rat. 1th Ed, Academic Pres. 2000; 311-312.
- Krueger AJ, Yang JJ, Roy TA, Robbins DJ, Mackerer CR. An automated myeloperoxidase assay. Clin Chem. 1990;36:158.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril. 1988;49:112-117.
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lombard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization. Fertil Steril. 1986;46:1118-1123.
- Kruk I, Michalska T, Lichszeld K, Kladna A, Aboul-Enein HY. The effect of thymol and its derivatives on reactions generating reactive oxygen species. Chemosphere. 2000;41:1059-1064.
- Kuhn MA. Oxygen free radicals and antioxidants. Am J Nurs. 2003;103:58-62.
- Kumara SS, Huat BT. Extraction, isolation and characterisation of antitumor principle, alpha-hederin, from the seeds of *Nigella sativa*. Planta Med. 2001;67:29-32.
- Kutlutürk F, Öztürk B, Yıldırım B, Özüğurlu F, Çetin İ, Etikan İ, Sazlıdere H, Tetikçok R, Akbaş A, Şahin İ. Obesity prevalence and its association with metabolic risk factors: Tokat province prevalence study. Int J Med Sci. 2011;31:156-163.
- Le HT, Schaldach CM, Firestone GL, Bjeldanes LF. Plant derived 3,3V-diindolylmethane is a strong androgen antagonist in human prostate cancer cells. J Biol Chem. 2003;278:21136-21145.
- Le PM, Benhaddou-Andaloussi A, Elimadi A, Settaf A, Cherrah Y, Haddad P. The petroleum ether extract of *Nigella sativa* exerts lipid-lowering and insulin-sensitizing actions in the rat. J Ethnopharmacol. 2004;94:251-259.
- Leeson CR, Leeson TS. Histology. 4th Ed, London, Toronto, Philadelphia, W.B. Saunders Company. 1981; 9-15.

- Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. Text/Atlas of Histology. WB. Saunders Co, Philadelphia. 1988;82:603-609.
- Lefkowitz DL, Gelderman MP, Fuhrmann SR, Graham S, Starnes JD 3rd, Lefkowitz SS, Bollen A, Moguilevsky N. Neutrophilic myeloperoxidase-macrophage interactions perpetuate chronic inflammation associated with experimental arthritis. *Clin Immunol.* 1999;91:145-155.
- Lei X, Lv X, Liu M, Yang Z, Ji M, Guo X, Dong W. Thymoquinone inhibits growth and augments 5-fluorouracil-induced apoptosis in gastric cancer cells both in vitro and in vivo. *Biochem Bioph Res Co.* 2012;417:864-868.
- Lerner A, Grafi-Cohen M, Napso T, Azzam N, Fares F. The indolic diet-derivative, 3,3'-diindolylmethane, induced apoptosis in human colon cancer cells through upregulation of NDRG1. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:256178.
- Lin WW, Lamb DJ, Wheeler TM, Abrams J, Lipschultz LI, Kim ED. Apoptotic frequency is increased in spermatogenic maturation arrest and hypospermatogenic states. *J Urol.* 1997;158:1791-1793.
- Liu H, Wormke M, Safe SH, Bjeldanes LF. Indole (3,2-b) carbazole: A dietary-derived factor that exhibits both antiestrogenic and estrogenic activity. *J Natl Cancer I.* 1994;86:1758-1765.
- Liu Z, Chang Q, Xu ZL, Zhang ZG. Stereological measurement of rat's seminiferous tubule. *Chin Med J.* 2009;122:2643-2646.
- Logue J, Murray HM, Welsh P, Shepherd J, Packard C, Macfarlane P, Cobbe S, Ford I, Sattar N. Obesity is associated with fatal coronary heart disease independently of traditional risk factors and deprivation. *Heart.* 2011;97:564-568.
- Lu HF, Tung WL, Yang JS, Huang FM, Lee CS, Huang YP, Liao WY, Chen YL, Chung JG. In vitro suppression of growth of murine WEHI-3 leukemia cells and in vivo promotion of phagocytosis in a leukemia mice model by indole-3-carbinol. *J Agr Food Chem.* 2012;60:7634-7643.
- MacDonald AA, Herbison GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update.* 2010;16:293-311.
- MacDonald PC, Madden JD, Brenner PF, Wilson JD, Siiteri PK. Origin of estrogen in normal men and in women with testicular feminization. *J Clin Endocr Metab.* 1979;49:905-916.
- Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M, Olafsdottir K. Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Hum Reprod.* 2005;20:208-215.

- Mahan LK, Escott-Stump S. Weight management and eating disorders. "Krause's food, nutrition and diet therapy, Ed: Mahan LK, Arlin M, WB Saunders Company, 9th Ed, Philadelphia. 1996; 315.
- Mahgoub AA. Thymoquinone protects against experimental colitis in rats. *Toxicol Lett.* 2003;143:133-143.
- Makler A. The improve ten mikrometer chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertil Steril.* 1980;33:337-338.
- Martinet W, Knaapen MW, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 2002;106:927-932.
- Martini AC, Tissera A, Estofán D, Molina RI, Mangeaud A, de Cuneo MF, Ruiz RD. Overweight and seminal quality: a study of 794 patients. *Fertil Steril.* 2010;94:1739-1743.
- Mavelli I, Rotilio G. Enzymatic protection against intracellular oxidative processes, advances on oxygen radicals and radioprotectors. *Edizioni Scientifiche.* 1984; 65-80.
- Mayhew TM, Gundersen HJG. If you assume, you can make an ass out of you and me: a decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *J Anat.* 1996;188:1-15.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. *J Biol Chem.* 1969;244:6049-6055.
- Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *P Natl Acad Sci USA.* 2005;46:16696-16700.
- Meng Q, Yuan F, Goldberg ID, Rosen EM, Auburn K, Fan S. Indole-3-carbinol is a negative regulator of estrogen receptor-alpha signaling in human tumor cells. *J Nutr.* 2000;130:2927-2931.
- Menkveld R, Stander FSH, Kotze TJV, Kruger TF, Zyl JA. The evaluation of morphological characteristics of human spermatozoa according to stricter criteria. *Hum Reprod.* 1990;5:586-592.
- Michnovicz JJ. Increased estrogen 2-hydroxylation in obese women using oral indole-3-carbinol. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 1998;22:227-229.
- Michnovicz JJ, Bradlow HL. Induction of estradiol metabolism by dietary indole-3-carbinol in humans. *J Natl Cancer I.* 1990;82:947-949.
- Mitchell M, Bakos HW, Lane M. Paternal diet-induced obesity impairs embryo development and implantation in the mouse. *Fertil Steril.* 2011;95:1349-1353.

- Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy. Williams & Wilkins. 1995; 278-281.
- Moore KL, Persaud TVN. The Developing Human. Fifth edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia. 1993; 281-301.
- Morsi NM. Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. Acta Microbiol Pol. 2000;49:641-649.
- Mukhallad AM, Mohamad MJM, Hatham D. Effects of black seeds (*Nigella sativa*) on spermatogenesis and fertility of male albino rats. JMMS. 2009;4:386-390.
- Must A, Anderson SE. Effects of obesity on morbidity in children and adolescents. Nutr Clin Care. 2003;6:4-12.
- Mydlo JH. The impact of obesity in urology. Urol Clin N Am. 2004;31:275-287.
- Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. Mol Reprod Dev. 2005;71:166-177.
- Nergiz C, Ötles S. Chemical composition of *Nigella sativa* L. seeds. Food Chem. 1993;48:259-261.
- Nguyen RH, Wilcox AJ, Skjaerven R, Baird DD. Men's body mass index and infertility. Hum Reprod. 2007;22:2488-2493.
- Nicopoulou SC, Alexiou M, Michalakis K, Ilias I, Venaki E, Koukkou E, Mitios G, Billa E, Adamopoulos DA. Body mass index vis-à-vis total sperm count in attendees of a single andrology clinic. Fertil Steril. 2009;92:1016-1017.
- Oldenburg B, Pijl H. Abdominal obesity: metabolic complications and consequences for the liver. Ned Tijdschr Geneesk. 2001;145:290-294.
- Olza J, Aguilera CM, Gil-Campos M, Leis R, Bueno G, Martínez-Jiménez MD, Valle M, Cañete R, Tojo R, Moreno LA, Gil A. Myeloperoxidase is an early biomarker of inflammation and cardiovascular risk in prepubertal obese children. Diabetes Care. 2012;35:2373-2376.
- Omar A, Ghosheh S, Abdulghani A, Houdi A, Crookscor PA. High performance liquid chromatographic analysis of thpharmacologically active quinones and related compounds in the oil of the black seed (*Nigella sativa* L). J Pharmaceut Biomed. 1999;19:757-762.
- Onat A. Risk factors and cardiovascular disease in Turkey. Atherosclerosis. 2001;156:1-10
- Orhon E. Sperm Morfoloji Atlası. Türkiye İnfertilite Vakfı Yayınları. 1995; 17-29.

- Orth JM. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anat Rec.* 1982;203:485-492.
- Osborn M. Immunofluorescence microscopy of cells. "cell biology: A laboratory handbook" J.E Celis. Academic Pres. 1994; 347-455.
- Ozata M, Mergen M, Oktenli C, Aydin A, Sanisoglu SY, Bolu E, Yilmaz MI, Sayal A, Isimer A, Ozdemir IC. Increased oxidative stress and hypozincemia in male obesity. *Clin Biochem.* 2002;35:627-631.
- Panasenko OM, Spalteholz H, Schiller J, Arnhold J. Myeloperoxidase-induced formation of chlorohydrins and lysophospholipids from unsaturated phosphatidylcholines. *Free Radical Bio Med.* 2003;34:553-562.
- Paramasivam A, Sambantham S, Shabnam J, Raghunandhakumar S, Anandan B, Rajiv R, Vijayashree Priyadharsini J, Jayaraman G. Anti-cancer effects of thymoquinone in mouse neuroblastoma (Neuro-2a) cells through caspase-3 activation with down-regulation of XIAP. *Toxicol Lett.* 2012;213:151-159.
- Pari L, Sankaranarayanan C. Beneficial effects of thymoquinone on hepatic key enzymes in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. *Life Sci.* 2009;85:830-834.
- Pathak C, Jaiswal YK, Vinayak M. Hypomodification of transfer RNA in cancer with respect to queuosine. *RNA Biol.* 2005;2:143-148.
- Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC, Lee PA. Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in men. *Fertil Steril.* 2008;90:346-351.
- Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J Androl.* 1992;13:450-455.
- Peng L, Liu A, Shen Y, Xu HZ, Yang SZ, Ying XZ, Liao W, Liu HX, Lin ZQ, Chen QY, Cheng SW, Shen WD. Antitumor and anti-angiogenesis effects of thymoquinone on osteosarcoma through the NF- κ B pathway. *Oncol Rep.* 2013;29:571-578.
- Pi-Sunyer FX. Medical hazards of obesity. *Ann Intern Med.* 1993;119:655-660.
- Ping J, Gao AM, Xu D, Li RW, Wang H. Therapeutic effect of indole-3-carbinol on pig serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Yao Xue Xue Bao.* 2011;46:915-921.
- Poongathai J, Gopenath TS, Mononayaki S. Genetics of human male infertility. *Singap Med J.* 2009;50:336.
- Pryor JL, Howards SS. Varicocele. *Urol Clin N Am.* 1997;14:499-513.

- Puchau B, Ochoa MC, Zulet MA, Marti A, Martínez JA, Members G. Dietary total antioxidant capacity and obesity in children and adolescents. *Int J Food Sci Nutr.* 2010;61:713-721.
- Purvis K, Christiansen E. Male infertility: current concepts. *Ann Med.* 1992;24:258-272.
- Rajaniemi H, Karjalainen M, Veijola M, Ritanen-Kaivamo S, Kellokumpu S, Metsikkö K. Immunocytochemical localization of receptor human chorionic gonadotropin complexes in rat leydig cells. *J Histochem Cytochem.* 1981;29:813-816.
- Ramadan MF. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview. *Int J Food Sci Tech.* 2007;42:1208-1218.
- Ramadan MF, Kroh LW, Mörsel JT. Radical scavenging activity of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils and oil fractions. *J Agr Food Chem.* 2003;51:6961-6969.
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, Bonde JP, Sorensen TI, Olsen J. Subfecundity in overweight and obese couples. *Hum Reprod.* 2007;22:1634-1637.
- Reiter RJ. Oxidative process and antioxidative defence mechanism in the aging brain. *FASEB J.* 1995;9:526-533.
- Riby JE, Chang GH, Firestone GL, Bjeldanes LF. Ligand-independent activation of estrogen receptor function by 3,3'-diindolylmethane in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol.* 2000;60:167-177.
- Riby JE, Feng C, Chang YC, Schaldach CM, Firestone GL, Bjeldanes LF. The major cyclic trimeric product of indole-3-carbinol is a strong agonist of the estrogen receptor signaling pathway. *Biochemistry.* 2000;39:910-918.
- Ricci G, Perticarari S, Fragnas E, Giolo E, Canova S, Pozzobon C, Guaschino S, Presani G. Apoptosis in human sperm: Its correlation with semen quality and the presence of leukocytes. *Hum Reprod.* 2002;17:2665-2672.
- Rindler PM, Plafker SM, Szweda LI, Kinter M. High dietary fat selectively increases catalase expression within cardiac mitochondria. *J Biol Chem.* 2013;288:1979-1990.
- Roepke M, Diestel A, Bajbouj K, Walluscheck D, Schonfeld P, Roessner A, Schneider-Stock R, Gali-Muhtasib H. Lack of p53 augments thymoquinone-induced apoptosis and caspase activation in human osteosarcoma cells. *Cancer Biol Ther.* 2007;6:160-169.

- Ross MH, Pawlina W. Histology A Text And Atlas. 6th Ed, Baltimore, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. 2011; 784-816.
- Royet JP. Stereology: A method for analysing images. Prog Neurobiol. 1991;37:433-474.
- Rozanski TA, Bloom DA. The undescended testis. Theory and management. Urol Clin N Am. 1995;22:107-108.
- Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji. 7. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık. 1996; 274-275.
- Sakkas D, Moffat O. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and possible involvement of apoptosis. Biol Reprod. 2002;66:1061-1067.
- Salem ML. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. Int Immunopharmacol. 2005;5:1749-1770.
- Salem ML, Hossain MS. In vivo acute depletion of CD8(+) T cells before murine cytomegalovirus infection upregulated innate antiviral activity of natural killer cells. Int Immunopharmacol. 2000;22:707-718.
- Sallmén M, Sandler DP, Hoppin JA, Blair A, Baird DD. Reduced fertility among overweight and obese men. Epidemiology. 2006;17:520-523.
- Salomi NJ, Nair SC, Jayawardhanan KK, Varghese CD, Panikkar KR. Antitumour principles from *Nigella sativa* seeds. Cancer Lett. 1992;63:41-46.
- Sarkar FH, Li Y. Indole-3-carbinol and prostate cancer. J Nutr. 2004;134:3493-3498.
- Satman I, Yilmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, Bastar I, Tütüncü Y, Sargin M, Dinççag N, Karsidag K, Kalaça S, Ozcan C, King H. Population-based study of diabetes and risk characteristics in Turkey: results of the turkish diabetes epidemiology study (TURDEP). Diabetes Care. 2002;25:1551-1556.
- Seli E, Sakkas D. Spermatozoal nuclear determinants of reproductive outcome: implications for ART. Hum Reprod Update. 2005;11:337-349.
- Serafini M, Del Rio D. Understanding the association between dietary antioxidants, redox status and disease: is the total antioxidant capacity the right tool? Redox Rep. 2004;9:145-152.
- Shafik A, Olfat S. Lipectomy in the treatment of scrotal lipomatosis. Int Braz J Urol. 1981;53:55-61.
- Shan LX, Bardin W, Hardy MP. Immunohistochemical analysis of androgen effects on androgen receptor expression in developing Leydig and Sertoli cells. Endocrinology. 1997;138:1259-1266.

- Shalaby MA, el-Zorba HY, Kamel GM. Effect of alpha-tocopherol and simvastatin on male fertility in hypercholesterolemic rats. *Pharmacol Res.* 2004;50:137-142.
- Shikone T, Billig H, Hsueh AJW. Experimentally induced cryptorchidism increases apoptosis in rat testis. *Biol Reprod.* 1994;51:865-872.
- Shoieb AM, Elgayyar M, Dudrick PS, Bell JL, Tithof PK. In vitro inhibition of growth and induction of apoptosis in cancer cell lines by thymoquinone. *Int J Oncol.* 2003;22:107-113.
- Skalska S, Kyselova Z, Gajdosikova A, Karasu C, Stefek M, Stolc S. Protective effect of stobadine on NCV in streptozotocin-diabetic rats: augmentation by vitamin E. *Gen Physiol Biophys.* 2008;27:106-114.
- Snell RS. *Clinical Anatomy.* 3rd ed, Boston, Brown and Company. 1986; 168-175.
- Socher SA, Yin Y, Dewolf WC, Morgentaler A. Temperature-mediated germ cell loss in the testis is associated with altered expression of the cell-cycle regulator p53. *J Urol.* 1997;157:1986-1989.
- Staub RE, Feng C, Onisko B, Bailey GS, Firestone GL, Bjeldanes LF. Fate of indole-3-carbinol in cultured human breast tumor cells. *Chem Res Toxicol.* 2002;15:101-109.
- Stefanović A, Kotur-Stevuljević J, Spasić S, Bogavac-Stanojević N, Bujisić N. The influence of obesity on the oxidative stress status and the concentration of leptin in type 2 diabetes mellitus patients. *Diabetes Res Clin Pr.* 2008;79:156-163.
- Sterio DC. The unbiased estimation of number and size of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.* 1984;134:127-136.
- Stevens A, Lowe J. *Human Histology.* Second edition, London, Mosby. 1997; 309-319.
- Stoewsand GS. Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetables. *Food Chem Toxicol.* 1995;33:537-543.
- Stresser DM. Mechanism of inhibition of chemical carcinogenesis by indole-3-carbinol in the rat. *Dissertation Abstracts International.* 1995;55:3268-3269.
- Su HC, Nguyen KB, Salazar-Mather TP, Ruzek MC, Dalod MY, Biron CA. NK cell functions restrain T cell responses during viral infections. *Eur J Immunol.* 2001;31:3048-3055.
- Swamy SM, Tan BK. Cytotoxic and immunopotentiating effects of ethanolic extract of *Nigella sativa* L. seeds. *J Ethnopharmacol.* 2000;70:1-7.

- Swan SH, Elkin EP, Fenster L. The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Persp.* 2000;108:961-966.
- Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. 3. Baskı, Ankara, Feryal Matbaası. 1998; 346-350.
- Tanyolaç A. Özel Histoloji. 3. Baskı, Ankara, Yorum Basın Yayın. 1999; 132-143.
- Teerds KJ, Boer-Brouwer M, Dorrington HJ, Balvers M, Ivell R. Identification of markers for precursor and Leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. *Biol Reprod.* 1999;60:1437-1445.
- Trainer TD. Histology of the normal testis. *Am J Surg Pathol.* 1987;11:797-809.
- Tran D, Picard JY, Camparque J, Josso N. Immunocytochemical detection of anti-müllerian hormone in sertoli cells of various mammalian species including human. *J Histochem Cytochem.* 1987;35:733-743.
- Tunc O, Bakos HW, Tremellen K. Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia.* 2011;43:121-128.
- Uzun H, Zengin K, Taskin M, Aydin S, Simsek G, Dariyerli N. Changes in leptin, plasminogen activator factor and oxidative stress in morbidly obese patients following open and laparoscopic Swedish adjustable gastric banding. *Obes Surg.* 2004;14:659-665.
- Urakawa H, Katsuki A, Yasuhiro S, Gabbaza EC, Murashima S, Morioka K, Maruyama N, Kitagawa N, Tanaka T, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. Oxidative stress is associated with adiposity and insulin resistance in men. *J Clin Endocr Metab.* 2003;88:4673-4676.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell B.* 2007;39:44-84.
- Van der Kooy K, Seidell JC. Techniques for the measurement of visceral fat. A practical guide. *Int J Obesity.* 1993;17:187-196.
- Verhoeven DT, Goldbohm RA, van Poppel G, Verhagen H, van den Brandt PA. Epidemiological studies on Brassica vegetables and cancer risk. *Cancer Epidem Biomar.* 1996;5:733-748.
- Verhoeven DT, Verhagen H, Goldbohm RA, van den Brandt PA, van Poppel G. A review of mechanisms underlying anticarcinogenicity by Brassica vegetables. *Chem Biol Interact.* 1997;103:79-129.

- Villamor E, Msamanga G, Urassa W, Petraro P, Spiegelman D, Hunter DJ, Fawzi WW. Trends in obesity, underweight, and wasting among women attending prenatal clinics in urban Tanzania, 1995-2004. *Am J Clin Nutr.* 2006;83:1387-1394.
- Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obesity.* 2006;30:400-418.
- Wang TT, Schoene NW, Milner JA, Kim YS. Broccoli-derived phytochemicals indole-3-carbinol and 3,3'-diindolylmethane exerts concentration-dependent pleiotropic effects on prostate cancer cells: comparison with other cancer preventive phytochemicals. *Mol Carcinogen.* 2012;51:244-256.
- Wang Y, Liu XP, Qin DN, Chen S, Li YS. Diet-induced obesity affects testis development in pubertal rats. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2007;13:514-519.
- West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec.* 1991;231:482-97.
- Wiebe JP, Kowalik A, Gallardi RL, Egeler O, Clubb BH. Glycerol disrupts tight junction-associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. *J Androl.* 2000;21:625-635.
- Wilson KE, Thompson JE, Huner NP, Greenberg BM. Effects of ultraviolet-A exposure on ultraviolet-B-induced accumulation of specific flavonoids in *Brassica napus*. *Photochem Photobiol.* 2001;73:678-684.
- Winterbourn CC. Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. *Toxicology.* 2002; 181-182.
- World Health Organisation. Prevention and management of the global epidemic of obesity. Report of the WHO Consultation on Obesity. Geneva, WHO. 1997; 3-5.
- World Health Organization. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-cervical Mucus Interaction. 4th edn, Cambridge, Cambridge University Press. 2002.
- World Health Organization. Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic, Report of a WHO Consultation. Singapore. WHO. 2004.
- World Health Organization. Obesity and Overweight. WHO. 2006.
- Worthen DR, Ghosheh OA, Crooks PA. The in vitro anti-tumor activity of some crude and purified components of blackseed, *Nigella sativa* L. *Anticancer Res.* 1998;18:1527-1532.
- Wright DT, Cohn LA, Li H, Fisher B, Li CM, Adler KB. Interactions of Oxygen radicals with airway epithelium. *Environ Health Persp.* 1994;102:85-90.

- Wu FC, Swanston IA, Baird DT. Raised plasma oestrogens in infertile men with elevated levels of FSH. *Clin Endocrinol.* 1982;16:39-47.
- Yıldırım M. Kronik İnfertilite. *Türk Fertilite Dergisi.* 1994;2:15-24.
- Yi T, Cho SG, 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.* 2008;7:1789-1796.
- Young B, Heath JW, Stevens A, Lowe JS, Deakin PJ. *Wheater's Functional Histology. A Text and Color Atlas.* Churchill Livingstone, Edinburgh. 2000; 328-336.
- Yuan F, Chen DZ, Liu K, Sepkovic DW, Bradlow HL, Auborn K. Anti-estrogenic activities of indole-3-carbinol in cervical cells: implication for prevention of cervical cancer. *Anticancer Res.* 1999;19:1673-1680.
- Zalata AA, Ahmed AH, Allamaneni SS, Comhaire FH, Agarwal A. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian J Androl.* 2004;6:313-318.
- Zaoui A, Cherrah Y, Lacaille-Dubois M, Settaf A, Amarouch H, Hassar M. Diuretic and hypotensive effects *Nigella sativa* in the spontaneously hypertensive rat. *Therapie.* 2000;55:379-382.
- Zaoui A, Cherrah Y, Mahassini N, Alaoui K, Amarouch H, Hasar M. Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine.* 2002;9:69-74.
- Zimmerman M, Hrabosky JI, Francione C, Young D, Chelminski I, Dalrymple K, Galione JN. Impact of obesity on the psychometric properties of the diagnostic and statistical manual of mental disorders, fourth edition criteria for major depressive disorder. *Compr Psychiat.* 2011;52:146-150.
- Zikrin BR, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. *Endocrinology.* 1989;124:3043-3049.
- Zumoff B, Miller LK, Strain GW. Reversal of the hypogonadotropic hypogonadism of obese men by administration of the aromatase inhibitor testolactone. *Metabolism.* 2003;52:1126-1128.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Nur Hande TÜFEK

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Tarihi: 28.05.1985

Medeni Hali: Bekâr

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lisans, Atatürk Üniversitesi, Biyoloji Bölümü, (2005-2009)

Yüksek lisans, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Histoloji-Embriyoloji AD. (2009-2013).

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji AD. (2010-2012).

E-posta: nurhandetufek@hotmail.com

