

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLESTEROLLÜ YÜKSEK YAĞLI DİYET İLE BESLENEN
SIÇANLARDA TİMOKİNON'UN TESTİS DOKUSUNDA GDNF
(GLİAL HÜCRE TÜREVİ NÖROTROFİK FAKTÖR)
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Hasan ASKER
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI

2017 - KARS

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLESTEROLLÜ YÜKSEK YAĞLI DİYET İLE BESLENEN
SIÇANLARDA TİMOKİNON'UN TESTİS DOKUSUNDA GDNF
(GLİAL HÜCRE TÜREVİ NÖROTROFİK FAKTÖR)
EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Hasan ASKER
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI

**Bu tez Kafkas Üniversitesi BAP tarafından 2015-TS-83 proje numarası ile
desteklenmiştir.**

2017 - KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tez Programı çerçevesinde Hasan ASKER tarafından hazırlanmış olan '**Kolesterollü Yüksek Yağlı Diyet İle Beslenen Sıçanlarda Timokinon'un Testis Dokusunda GDNF (Glial Hücre Türevi Nörotrofik Faktör) Ekspresyonu Üzerine Etkisi**' adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy ...*birliği*... ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24/03/2017

Adı Soyadı:	İmza:
Başkan:	Prof. Dr. Şahin ASLAN
Üye:	Prof. Dr. Enver BEYTUT
Üye:	Prof. Dr. Emrah SUR
Üye:	Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI
Üye:	Doç. Dr. Feyzullah BEYAZ

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../... gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Bu çalışma baharat olarak kullanılan ve aynı zamanda tıp alanında da kullanım alanı bulunan çörek otunun etken maddesi olan Timokinon'un intraperitoneal yolla uygulamasının kolesterollü yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçan testis dokusunda GDNF ekspresyonu üzerine etkilerinin araştırılması amacı ile yapılmıştır.

Doktora eğitimim boyunca bana bilgi ve deneyimlerini aktarıp yol gösteren, sabrı ve manevi desteği ile her daim yanımda olan değerli danışmanım Prof. Dr. Ebru KARADAĞ SARI'ya, tez çalışmam boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Şahin ASLAN, Doç. Dr. Turgay DEPREM ve Yrd. Doç. Dr. Serap KORAL TAŞÇI'ya, katkılarından dolayı Prof. Dr. Enver BEYTUT, Doç. Dr. Mahmut SÖZMEN, Yrd. Doç. Dr. Evren KOÇ, Yrd. Doç. Dr. Cem ÖZİÇ ve Yrd. Doç. Dr. Metin ÖĞÜN'e, laboratuvar çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Dr. Öğr. Serap İLHAN ve YL. Öğr. Ayşe AYDOĞAN'a, manevi desteği ile her daim yanımda olan Dr. Öğr. Yağmur YILDIZ'a, tüm sıkıntı ve zorluklarımda yanımda olup bugünlere gelmemi sağlayan aileme ve adını yazamadığım emeği geçen herkese çok teşekkürler ederim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	I
ŞEKİLLER	IV
RESİMLER	V
TABLolar.....	VI
1. ÖZET.....	VII
2. SUMMARY	IX
1. GENEL BİLGİLERİ	1
1.1. Testisin Histolojik Yapısı	1
1.2. Spermatogenezis.....	4
1.3. Erkekte İnfertilite	4
1.4. Timokinon	5
1.5. Glial Hücre Türevli Nörotrofik Faktör (GDNF)	7
1.6. Kolesterol.....	8
1.7. Leptin	11
1.8. Yüksek Yağlı Diyet ve Obezite.....	12
2. MATERYAL VE METOT.....	14
2.1. Deney Hayvanı Materyali.....	14
2.2. İmmünohistokimyasal Boyamada Kullanılan Çözeltiler.....	16
2.3. Western Blot Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler	17
2.4. Canlı Ağırlık Ölçümü ve Kan Alımı.....	19
2.5. Histolojik İnceleme	19
2.6. Seminifer Tübül Çaplarının Histometrik Hesaplanması	20
2.7. İmmünohistokimyasal İnceleme.....	20

2.8.	Western Blot Yöntemi	21
2.9.	Biyokimyasal Analizler	23
2.10.	İstatistiksel Değerlendirmeler.....	23
3.	BULGULAR.....	24
3.1.	Testis ve Canlı Ağırlık Bulguları.....	24
3.2.	Seminifer Tübül Çap Bulguları	26
3.3.	Histolojik Bulgular	27
3.4.	İmmünohistokimyasal Bulgular	30
3.5.	Western blot analizi ile doğrulanması	35
3.6.	Biyokimyasal Analizlerin Gruplar Arası İstatistiği	36
4.	TARTIŞMA VE SONUÇ	40
5.	KAYNAKLAR.....	49
6.	ÖZGEÇMİŞ	63

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGE	AÇIKLAMA
g	Gram
kg	Kilo Gram
ml	Mililitre
dl	Desilitre
lt	Litre
μ l	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Santigrat Derece
μ m	Mikrometre
mm	Milimetre
mol	Molar
m ²	Metrekare
%	Yüzde
<	Küçük
\leq	Küçük Eşit
>	Büyük
\geq	Büyük Eşit
\pm	Artı-Eksi
pH	Asitlik
kDa	Kilodalton

KISALTMA	AÇIKLAMA
GDNF	Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (Glial Hücre Türevi Nörotrofik Faktör)
TGF- β	Transforming Growth Factor- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü- β)
HDL	High Density Lipoprotein (Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein)
LDL	Low Density Lipoprotein (Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)
VLDL	Very Low Density Lipoprotein (Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)
TK	Total Kolesterol
TG	Trigliserid
YYD	Yüksek Yağlı Diyet
KYYD	Kolesterollü Yüksek Yağlı Diyet
KYYD+T	Timokinon Uygulanan Kolesterollü Yüksek Yağlı Diyet
HMG-KoA	3-hidroksi-3-metil-glutaril-KoA reduktaz
VKİ	Vücut Kitle İndeksi
WHO	World Healty Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
i.p.	İntrapertoneal
HCL	Hidroklorik asit
TBS	Tris Buffer Saline
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
SD	Standart Sapma
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
dH ₂ O	Distile su
BSA	Bovine Serum Albumin
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

PBS	Phosphate-Buffered Saline
DHEAS	Dehydroepiandrosterone Sulfate
PMSF	Phenylmethane Sulfonyl Fluoride
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
TEMED	Tetramethylethylenediamine



ŞEKİLLER

Şekil 1. Gruplar arası haftalık canlı ağırlık grafiği.....	25
Şekil 2. Gruplar arası Testis Ağırlığı grafiği.....	26
Şekil 3. Gruplar arası Seminifer Tübül Çapı grafiği.	27
Şekil 4. GDNF proteinin Western blot analizi ile desteklenmesi.....	35
Şekil 5. Kontrol ve deney grubuna ait Total Kolesterol düzeyleri.	37
Şekil 6. Kontrol ve deney grubuna ait LDL Kolesterol düzeyleri.....	37
Şekil 7. Kontrol ve deney grubuna ait HDL Kolesterol düzeyleri.	38
Şekil 8. Kontrol ve deney grubuna ait VLDL Kolesterol düzeyleri.	38
Şekil 9. Kontrol ve deney grubuna ait Trigliserid düzeyleri.....	39
Şekil 10. Kontrol ve deney grubuna ait Leptin düzeyleri.	39

RESİMLER

Resim 1. KYVD grubu için yem hazırlama.....	15
Resim 2. Kontrol grubu. Sıçan testis dokusu. Triple boyama.	28
Resim 3. Sham grubu. Sıçan testis dokusu. Triple boyama.	28
Resim 4. Timokinon grubu. Sıçan testis dokusu. Triple boyama.	29
Resim 5. KYVD grubu. Sıçan testis dokusu. Triple boyama.....	29
Resim 6. KYVD+T grubu. Sıçan testis dokusu. Triple boyama.	30
Resim 7. Kontrol grubu. Sıçan testis GDNF immünoreaktivitesi.....	31
Resim 8. Sham grubu. Sıçan testis GDNF immünoreaktivitesi.....	32
Resim 9. Timokinon grubu. Sıçan testis GDNF immünoreaktivitesi. .	32
Resim 10. KYVD grubu. Sıçan testis GDNF immünoreaktivitesi.	33
Resim 11. KYVD+T grubu. Sıçan testis GDNF immünoreaktivitesi...	33
Resim 12. Kontrol grubu, Sıçan testis Negatif kontrol.	34

TABLolar

Tablo 1. Hayvanlara verilen yem içerikleri (%) ve timokinon miktarı.	16
Tablo 2. Gruplar arası canlı ağırlık (g) sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	24
Tablo 3. Gruplar arası testis ağırlık (g) sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	25
Tablo 4. Gruplar arası seminifer tübül çap sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.....	26
Tablo 5. Gruplar arası GDNF immünoreaktivitesinin semikantitatif analiz sonuçları.....	31
Tablo 6. Gruplar arası biyokimyasal analiz değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.....	36

1. ÖZET

Bu çalışmada kolesterollü yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda çörek otunun (*Nigella sativa*) etken maddesi olan Timokinon'un intraperitoneal (i.p.) yolla uygulamasının testis dokusunda GDNF ekspresyonu üzerine etkisinin immunohistokimyasal ve Western blot yöntemleri ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

Araştırma materyali olarak daha önceden çiftleşmemiş 40 günlük 40 adet erkek sıçan (*Sprague Dawley*) kullanılmıştır. Sıçanlardan 1 haftalık alışma sürecinden sonra rastgele seçilerek kontrol (n=8), sham (n=8), timokinon (n=8), kolesterollü yüksek yağlı diyet (KYYD) (n=8) ve kolesterollü yüksek yağlı diyet + timokinon (KYYD+T) (n=8) olmak üzere 5 grup oluşturulmuştur. Kontrol, sham ve timokinon grubundaki sıçanlar standart pelet yem ve çeşme suyu ile KYYD ve KYYD+T grubundaki sıçanlar günlük enerji miktarının %65'i oranında tereyağı ve %2 kolesterol karıştırılmış pelet yem ile 8 hafta boyunca beslendi. 8 haftanın sonunda timokinon ve KYYD+T grubundaki sıçanlara 14 gün boyunca günlük olarak i.p. yolla 8 mg/kg oranından timokinon uygulaması yapılırken sham grubundaki sıçanlara aynı süre boyunca i.p olarak serum fizyolojik uygulandı. Deney süresi boyunca tüm gruplardaki sıçanların haftalık, timokinon, sham ve KYYD+T grubundaki sıçanların ise günlük olarak canlı ağırlıkları, deney sonunda ise tüm gruplardaki sıçanların canlı ağırlıkları alındıktan sonra servikal dislokasyon yolu ile testis dokuları alındı. Alınan testis dokularının da ağırlıkları ölçüldü. Biyokimyasal analizler için tüm gruplardaki sıçanlardan kan örnekleri alındı. Kontrol, sham, timokinon, KYYD ve KYYD+T gruplarına ait sıçanların testis dokularının normal histolojik yapıda olduğu görüldü.

Sonuç olarak, kolesterollü yüksek yağlı diyet ile beslenmenin, canlı ağırlık, testis ağırlığı ve seminifer tübül çapları ile serum total kolesterol, LDL, HDL, VLDL, trigliserid ve leptin gibi biyokimyasal değerleri arttırmasına rağmen timokinon uygulaması ile bu değerlerin istatistiksel olarak kontrol

grubuna benzer değerlere ulaşması timokinonun canlı ağırlık, testis ağırlığı ile biyokimyasal değerlerin normal değerlere gerilemesinde tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceğini düşündü. Hem kolesterolü yüksek yağlı diyet grubu hem de timokinon uygulanan gruptaki ratların testis dokusunda GDNF ekspresyonunun azalması kolesterol, yağlı diyet ve timokinonun bu büyüme faktörü üzerinde inhibe edici bir etkiye neden olduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Kolesterol, Yüksek yağlı diyet, Timokinon, GDNF, İmmünohistokimya, Western blot, Testis.



2. SUMMARY

The aim of this study was to determine the effect of intraperitoneal (i.p.) administration of thymoquinone (*Nigella sativa*), an active ingredient in the high fat diet with cholesterol, on GDNF expression in the testis by immunohistochemical and Western blot methods.

Forty male, 40 days rats (*Sprague Dawley*), previously unmated, were used the study as material. Control (n = 8), sham (n = 8), thymoquinone (n = 8), high fat diet with cholesterol (n = 8) and high fat diet with cholesterol + thymoquinone (KYYD + T) (n = 8). At the end of 8 weeks, the rats in the thymoquinone and KYYD + T groups were treated daily for 14 days with i.p. The rats in the sham group were given saline as i.p. for the same period of time with the administration of 8 mg / kg thymoquinone.

Body weights of rats in all groups were measured weekly throughout the experiment. The body weights of the rats in the thymoquinone, sham and KYYD + T groups were measured on a daily basis. At the end of the experiment, testis tissues were taken by cervical dislocation after the body weights of the rats in all groups were measured. Also, the weights of the testes were measured. Blood samples were taken from the rats in all groups for biochemical analyzes. Testicular tissues of control, sham, thymoquinone, KYYD and KYYD + T rats were found to be in normal histological structure.

As a result, cholesterol increased biochemical values such as serum total cholesterol, LDL, HDL, VLDL, triglyceride and leptin, as well as body weight, testis weight and seminiferous tubule diameter. However, with thymoquinone administration, these values were statistically similar to the control group. Thymoquinone could be used as a therapeutic agent that the body weight, testicular weight and biochemical values declining to normal values. The decrease in GDNF expression in testicular tissue of rats in both the high fat diet with cholesterol group and the thymoquinone group showed in an inhibitory effect of cholesterol, high fat diet and thymoquinone on GDNF.

Keywords: Cholesterol, High fat diet, thymoquinone, GDNF, Immunohistochemistry, Western blot, Testis.



1. GENEL BİLGİLERİ

Erkek üreme sistemi, primer cinsiyet organları, testisler, boşaltım kanalları ve eklenik bezlerden oluşmaktadır (Aughey ve Frye 2001, Ovalle ve Nahirney 2013). Testis yaklaşık olarak 15 g ağırlığında oval görünüme sahip bir bezdir. Testisler, vücut boşluğunun dışında skrotum adı verilen bir kese içerisinde, germinal epitel, erkek germ hücreleri üreten küçük kıvrımlı seminifer tübüller (Tubulus seminiferus kontortus) ve interstisyel bağ dokusundan ve Leydig (interstisyel) hücrelerinden ibarettir. Leydig hücreleri erkek sekonder cinsiyet özelliklerinden sorumlu hormon olan testosteronu üretirler (Ergün 2012, Ovalle ve Nahirney 2013).

Testislerde; spermatozoon üretildikten sonra, seminifer tübüllerden rete testise, efferent kanallar (ductuli efferentis), epididimis, duktus (vaz) deferens ve ejakülatuar kanallar ile idrar yollarına oradan penis başına kadar uzun ve dolambaçlı bir yol izler. Eklenik bezler; iki vezikula seminalis, prostat bezi ve bulboüretal bezlerden ibarettir. Erkek üreme sisteminin, spermatozoon üretimi, spermatozoon'un semen aracılığı ile dişi üreme sistemine verilmesi ve testosteron üretimi olmak üzere 3 ana fonksiyonu vardır (Ovalle ve Nahirney 2013, Özer 2010).

1.1. Testisin Histolojik Yapısı

Karın boşluğunun dışında, skrotum adı verilen kese içerisinde funikulus spermatikus aracılığı ile asılı halde bulunan testisler, yarım ay biçimindeki epididimis'in eklenik olduğu kalın sıkı bir fibroelastik bağ doku kapsülü olan tunika albugineya ile sarılıdır. Tunika albugineya'yı dıştan tunika vaginalis testis çevreler (Ergün 2012, Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2013). Tunika albugineya, testisin sırt kısmında kalınlaşarak içerisinde genital kanallar, kan damarları, lenf damarları ve sinir bezleri bulunan mediastinum testisi oluşturur (Ovalle ve Nahirney 2013, Özer 2010).

Mediastinum içerisindeki seminifer túbüller 6 ila 8 efferentesin oluşturduğu tubuli rekti adı verilen kısa bir kanalla rete testise açılır (Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2013). Rete testisten ayrılarak testis dışına çıkan ve gevşek bağ dokusu ile sarılı olan kanallara duktus eferentes, duktus eferenteslerin kendi üzerlerine katlanarak oluşturdukları yapıya kaput epididimidis, duktus eferenteslerin birleşerek oluşturduğu kıvrımlı kanala ise duktus epididimidis denilmektedir. Duktus epididimisin kaput ve kavda epididimis arasındaki bir uçtan diğer uca doğru yaptığı kıvrımlı yapıya korpus epididimis adı verilmektedir. Duktus epididimis, kavda epididimisten çıkarken kalınlaşarak duktus deferensi oluşturur (Özer 2010). Spermatozoonlar üretildikten sonra seminifer túbüllerden rete testis, duktili eferentis, epididimis, vas deferans, ejakülatuar kanallar, idrar kanalı ve penis başına kadar uzun ve dolambaçlı bir yol izlerler (Ovalle ve Nahirney 2013).

Seminifer túbül, kan damarları ve interstisyel hücreler içeren gevşek bir bağ dokusu ile çevrilidir ve içerisinde spermatozoonlar üretilir. İnsanlarda yaklaşık olarak günde 2×10^8 adet spermatozoon üretilir (Junqueira ve Carneiro 2009). Her bir testis 250-300 arası lopçuk ve tunika albugineadan başlayarak testisin iç kısımlarına kadar 600-1200 arası seminifer túbüle ve bu túbüllerin arasını dolduran Leydig hücrelerine sahiptir. Bu túbüllerin toplam uzunluğu 280-400 m'dir (Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2013, Özer 2010). Etrafı bazal membran ile çevrili seminifer túbüllerin duvarı somatik Sertoli hücreleri ile 4-8 katman halindeki spermatogenik hücreler (spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon) olmak üzere iki belirgin hücre popülasyonundan oluşmaktadır (Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2013). Bazal membran, fibroblastlar ve kasılabilen yassılaştırmış miyoid hücrelerinden meydana gelmiş olan bağ dokusu kapsülü ile sarılıdır. Miyoid hücrelerinin kasılması ile hareketsiz spermatozoonlar rete testise iletilir (Kierszenbaum 2006).

Sertoli hücreleri; seminifer túbüllerin bazal membranına hemidezmozomlar ile bağlı olup, lümene kadar uzanan ve ışık mikroskopunda

sınırları ayırt edilemeyen sitoplazması ile gelişme aşamasındaki erkek eşey hücrelerini çevreleyen, üçgen veya oval görünümlü ökromatik bir çekirdeğe sahip, bölünme yeteneği olmayan hücrelerdir (Bacha ve Bacha 2012, Özer 2010). Bu hücreler spermatozoonların desteklenmesi ve olgunlaşmasında kritik bir rol oynarken, ergenlik sonrası, seminifer epiteldeki hücrelerin yaklaşık % 10'unu oluştururlar (Ovalle ve Nahirney 2013). Seminifer tübül lümenindeki içeriğin dolaşımdaki antijenlerden izole edilerek, spermatositleri ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan ve kan yoluyla bulaşan maddelerden korumaya yarayan kan-testis bariyerinin en önemli bileşeni de Sertoli hücreleridir (Ovalle ve Nahirney 2013, Özer 2010).

Sertoli hücrelerinden, spermatogenezis için gerek olan ABP (Androjen bağlayıcı protein), hipofizin ön lobundan salgılanan FSH'nin (Folikül uyarıcı hormon) baskılanmasını sağlayan inhibin, plazma içerisindeki demiri spermatogenezis hücrelere taşıyan testiküler transferin, Müller kanallarının gerilemesine neden olan AMH (Anti-Müllerian Hormon) salgılanmaktadır (Özer 2010).

Seminifer tübüllerin arasındaki Leydig hücrelerini saran gevşek bağ dokusu ise lenf ve kan damarları ile sınırlardan meydana gelmektedir. Gevşek bağ dokusu içerisinde Leydig hücreleri ya tek tek ya da kümeler halinde bulunurlar. Golgi kompleksi iyi gelişmiş olan bu hücreler mitokondriyonlardan ve granüllü endoplazma retikulumundan zengindir. Sitoplazması içerisinde yoğun lipid damlacıkları bulunur ve erkeklik hormonu olarak bilinen testosteronu salgılar. Testosteron seminifer tübüllere etki ederek spermatogeneziste görev alır. Kılcal damarlar aracılığı ile dolaşıma giren testosteron hormonu genital organların ve eklenik bezlerin gelişimini sağlayarak sesin kalınlaşması, sakalın büyümesi ve libidonun artması gibi sekonder erkeklik özelliklerinin ortaya çıkmasını da sağlar (Kierszenbaum 2006, Ovalle ve Nahirney 2013, Özer 2010).

1.2. Spermatogenezis

Spermatogenezis, erkek eşey hücresi olan spermatozoon oluşumu anlamına gelmektedir ve testisin seminifer tübül bölgesi içerisinde gerçekleşen karmaşık bir süreçtir (Hassa ve Aştı 2010, Hofmann 2008). Seminifer tübül içerisindeki spermatogenik hücrelerin gelişimi ve başkalaşması olarak da adlandırılabilir (Özer 2010). Spermatogenezis 3 basamakta gerçekleşir. Bunlar; çoğalma (goniyogenezis), büyüme-olgunlaşma (spermatositogenezis) ve başkalaşmadır (spermiyogenezis) (Hassa ve Aştı 2010, Özer 2010).

- **Çoğalma:** Bazal laminanın hemen üstünde yer alan spermatogonyumlar mitoz bölünmeler ile A ve B spermatogonyumları meydana getirir. Spermatogonyum A'ların bir kısmı kaynak hücresi olarak kalırken diğer bir kısmı ise farklılaşarak spermatogonyum B'leri (progenitör) oluştururlar.
- **Büyüme:** Spermatogonyum B'ler mitotik bölünme ile sayılarını arttırarak büyürler ve primer spermatositlere ($2n=46$ kromozom) şekillenirler.
- **Olgunlaşma:** Primer spermatositler birbirini takip eden iki mayoz bölünme gerçekleştirirler. I. Mayoz bölünme ile primer spermatositlerden daha küçük olan sekonder spermatositler ($n=23$ kromozom) oluşurken II. Mayoz bölünme ile spermatidler şekillenir.
- **Başkalaşma:** Spermatidlerin olgun sperm hücresi olan spermatozoona farklılaşma aşamasıdır. Başkalaşımını tamamlayan spermatozoon, baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç kısımdan meydana gelir (Hassa ve Aştı 2010, Kierszenbaum 2006, Özer 2010).

1.3. Erkeklerde İnfertilite

İnfertilite, üremeyi engelleyen ve her altı çiftten birini ilgilendiren önemli bir sorun ve hastalık olarak belirtilmiştir (Güleç ve ark. 2011, Topdemir Koçyiğit

2012). İnfertilite, gebeliğin en az 5 yıl boyunca hiç oluşmadığı durumda primer infertilite ve daha önce gebelik oluşmuş fakat sonra istendiği halde tekrar gebelik oluşmuyorsa sekonder infertilite olarak adlandırılmaktadır (Heidargholizadeh 2015, Mascarenhas ve ark. 2012).

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün 1999 yılında yapmış olduğu araştırmaya göre infertilite görülen çift sayısı 42 milyon iken 2010 verilerinde bu sayı 48,5 milyona ulaşmıştır (WHO 2000). Ülkemizde Sağlık Bakanlığının 2009 verilerine göre 2 milyon kişinin infertilite sorunu olduğu bildirilmiştir (Sağlık Bakanlığı 2014).

İnfertilite ile ilgili başvuruların %40-50 arasındaki sorunun erkek kaynaklı olduğu bildirilmiştir (Erdemir ve ark. 2011). Erkek infertilitesinin nedenlerinin çeşitli bozuklukları kapsayan oldukça geniş kapsamlı hastalıklar olabileceği öne sürülmüştür (Poongothai ve ark. 2009). En yaygın infertilite nedenleri olarak düşük spermatozoon sayısı, hareketsiz ya da anormal spermatozoon üretimi ve erkek üreme sistemi boyunca semenlerin normal verilmesini engelleyen tıkanıklıklar sayılabilir. Diğer nedenler arasında kriptorşizm (inmemiş testisler), orşit (testislerin iltihabı) ve varikozel (skrotal varikoz damarları) nedeniyle oluşan testiküler hasarlar yer alır. Radyasyon, aşırı tütün kullanımı veya alkol tüketimi, hormonal bozukluklar, yaş, ilişki zamanlaması, doğum kontrol yöntemleri hayat tarzı da buna katkıda bulunabilir (Ovalle ve Nahirney 2013, Topdemir Koçyiğit 2012).

Vücut kitle indeksi (VKİ) >25 olan kadın ve erkek bireylerde infertilite oranının arttığı hayvan deneyleri ve insan çalışmaları ile desteklenmiştir (Yılmaz ve Yardımcı 2015).

1.4. Timokinon

Çörek otu, Ranunculacea (Düğün çiçeğigiller) familyasının *Nigella sativa* türü olup, siyah tohum veya bereket tanesi olarak da bilinmektedir. Ortadoğu ve bazı Asya ülkelerinde tohumu ve tohumundan elde edilen özütler

pek çok hastalığın tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Yomogida ve ark. 2003, Zaoui ve ark. 2002).

Çörek otu doğal bitkisel ilaçlar grubunda olan bir bitki olarak yüz yıllardır sağlığı destekleyici ve hastalıkların tedavisinde doğal ilaç olarak kullanılmıştır (Salem 2005). Ayrıca, farmakolojik, fitokimyasal ve beslenme araştırmalarına da konu olmuştur (Zaoui ve ark. 2002, Baytop 1984).

Timokinon, çörekotu (*Nigella sativa*) tohumunun en önemli etken maddesidir ve anti-bakteriyel (Morsi 2000), anti-inflamatuvar (Houghton ve ark. 1995), anti-tümoral (Thabrew ve ark. 2005), anti-diabetik (Al-Hader ve ark. 1993) ve anti-oksidatif (El-Saleh ve ark. 2004) etkilere sahiptir.

Katalaz, glutasyon peroksidaz, glutasyon-S-transferaz gibi çeşitli antioksidan enzimlerin aktivitesini de koruduğu bildirilmiştir (Woo ve ark. 2012). Timokinon gibi aktif içerikli maddeler birçok kanser türüne karşı etkilidir (Khan ve ark. 2011). Yılan ve akrep zehirlerinin hemolitik etkisini önlediği, hücreleri kortizol tarafından indüklenen apoptosisten koruduğu gösterilmiştir (Salem 2005). Timokinonun *S. aureus* bakterilerine karşı 3 µg/ml oranının bakteriyostatik, 6 µg/ml oranında uygulamasının ise bakterisit etki oluşturduğu bildirilmiştir (Halawi 2009). Timokinon gastroprotektif, hepatoprotektif, nefroprotektif ve nöroprotektif etkilere sahiptir. Kardiyovasküler bozukluklar, diyabet, üreme bozuklukları ve solunum yolu rahatsızlıklarındaki olumlu etkilerinin yanı sıra kemik komplikasyonlarının ve fibroz tedavisinde de etkili olabileceği gösterilmiştir (Darakhshan ve ark. 2015).

Günümüzde yüksek oranda yağ içeren gıdaların alınması ile birlikte artan kilo sebebiyle oluşan kolesterol, trigliserid ve şeker düzeylerinin timokinon uygulaması ile düştüğü gösterilmiştir (Bacak 2010, Zaoui ve ark. 2002).

Timokinon, yüksek yağlı diyet uygulamalarında pankreas dokusunda anti-inflamatuvar etki göstererek koruyucu rol oynamaktadır (Suguna ve ark. 2013). Yüksek fruktoz içeren diyetin neden olduğu bozulmuş glikoz toleransı

ve insülin direncini önlemede de timokinonun etkili olduğu bildirilmiştir (Prabhakar ve ark. 2015).

Timokinon uygulamasının sperm anomalilerini ortadan kaldırarak sağlıklı sperm hücrelerinin sayısını arttırdığı ve seminifer tübül yapıları üzerinde olumlu etkileri olduğu öne sürülmüştür (Sayed ve ark. 2014, Tüfek ve ark. 2015). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), kolesterolü kontrol altına almak için geleneksel bitki tedavilerini ve bu alandaki çalışmaları desteklemektedir (WHO 2016).

1.5. Glial Hücre Türevli Nörotrofik Faktör (GDNF)

Merkezi ve periferik nöronların gelişimi ve farklılaşması açısından oldukça önemli olan GDNF, TGF- β (Transforming Growth Factor- β / Transforme Edici Büyüme Faktörü- β) süper ailesinin bir üyesidir. GDNF, Lin ve arkadaşlarının 1993 yılında yaptığı bir çalışmada rat glial B49 hücreleri tarafından eksprese edilen bir protein olarak keşfedilmiştir (Lin ve ark. 1993). 134 amino asit içeren GDNF, 18-32 kDa molekül ağırlığına sahiptir (Vargas-Leal 2003).

GDNF'nin primer sinyal iletimi, RET (Rearranged during transfection) reseptör tirozin kinaz ve bir glikozilfosfatidilinositol'e bağlı RET coreseptörü olan GFR α -1'den oluşmaktadır (He ve ark. 2007, Tadokoro ve ark. 2002, Yomogida ve ark. 2003). Ayrıca GDNF RET'ten bağımsız olarak, GFR α -1 yüzey reseptörü vasıtasıyla bilinmeyen bir transmembran protein ile birlikte lipid yığınları halinde bulunur. GDNF'nin GFR α -1 reseptörüne bağlanması Src tipi kinazları aktive ederek harekete geçirir. Src kinazlar PLC γ 'yı fosforile eder ve böylece inositol trisfosfatın (IP $_3$) üretimini ve hücre içi Ca $^{+2}$ salınımını sağlarlar. GDNF ailesinin (GLFs), GDNF, Neurturin (NTN), Persephin (PSP) ve Artemin (ART) olmak üzere dört üyesi vardır (Vargas-Leal 2003).

GDNF, embriyonik gelişim sırasında dişler, kıl folikülleri ve nazal epitelin de dahil olduğu birçok memeli dokusu ile gelişmekte olan organlar ve ürogenital sistemlerden eksprese olmaktadır (He ve ark. 2007, Golden ve ark.

1999, Tadokoro ve ark. 2002). Nöronların veya astrositlerin toplam sayısını arttırmadan orta beyin embriyonik kültürlerindeki dopaminerjik nöronların hayatta kalmasını ve farklılaşmasını teşvik ettiği bildirilmiştir (Lin ve ark. 1993). Sinir sisteminde nöronların çeşitli tiplerinin farklılaşmasını ve çoğalmasını teşvik eden GDNF'nin ayrıca böbrek, gastrointestinal sistem oluşumu ve spermatogenezisin düzenlenmesinde de etkili olduğu öne sürülmüştür (Moore ve ark. 1996, He ve ark. 2007, Şahinkanat ve Okur 2007, Zeng ve ark. 2008). Alkole bağlı olmayan karaciğer yağlanması tedavisinde transgenetik farelerde GDNF'nin koruyucu rol oynadığı ve karaciğer transplantasyonu öncesinde karaciğerdeki yağlanmayı önemli ölçüde giderdiği bildirilmiştir (Mwangi ve ark. 2016, Taba Taba Vakili ve ark. 2016).

Memeli testisinde, GKH (Germinal Stem Cell / Germinal Kök Hücre) çoğalmasının GDNF/FSH yolu ile homeostatiksel olarak düzenlendiği düşünülmektedir (Hofmann 2008, Tadokoro ve ark. 2002). Hasarlı GKH farklılaşmasına sahip testislerde, GDNF'nin oldukça güçlü bir GKH büyüme faktörü olmaya aday olduğu bildirilmiştir (Tadokoro ve ark. 2002).

Aşırı GDNF salınımı olan farelerde farklılaşmamış spermatogonium benzeri hücrelerin çoğaldığı ve testis tümörlerinin meydana gelerek kısırlığa neden olduğu görülmüştür (Meng ve ark. 2000, 2001). GDNF; farklılaşmamış spermatogonium aktivitesinin arttığı 1. haftada farede bol miktarda ekspresyon olurken gelişim süresi ilerledikçe ekspresyon seviyesinde giderek azalma olur. GDNF ekspresyonunun farklılaşmamış spermatogoniumların yayılması ve germ hücrelerinin kaybolması ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Tadokoro ve ark. 2002).

1.6. Kolesterol

Kolesterolün yapısı, 1815 yılında Fransız bir kimyacı olan M.E. Chevreul tarafından keşfedilmiş ve günümüze kadar birçok bilim adamının araştırmalarındaki temel alanlardan biri olmuştur (Vance ve Van den Bosch 2000).

Kolesterol vücut organları ve sinir liflerinin yanı sıra hücre zarında bulunan, dokular için gerekli olan kan plazması içinde taşınan dört halkalı steroid nükleusu ve bir hidroksil grubu olan 27 karbonlu steroldür (Adam ve ark. 2013, Hergenç 2012). Vücuttaki kolesterolün çoğu hayvansal gıdalardaki doymuş yağlardan temin edilir (WHO 2002). Kolesterol hem serbest hem de uzun zincirli yağ asitlerinden biriyle esterleşmiş olarak da vücutta bulunabilir (Adam ve ark. 2013).

Kolesterol, hücre zarının yapısındaki fosfolipid molekülerinin polar baş grupların arasındaki boşluğu kaplayarak hücre zarının akışkanlığını azaltmaktadır (Charlton-Menys ve Durrington 2008). Organel membranları arasında lipid transfer sistemlerini ve hücresel sinyal ağını sıkı bir şekilde kontrol eder (Ikonen 2008).

Kan kolesterol seviyesini düşürmek için çeşitli diyet yönetimleri, yaşam tarzını değiştirme, düzenli egzersiz ve ilaç tedavisi uygulanmaktadır. Yüksek kolesterol seviyesi, nikotik asit, safra asidi sekansları ve statin gibi çeşitli farmakolojik ajanlar ile düşürülebilir. Ancak bunlar hem pahalı hem de ciddi yan etkilere sahiptirler (Bliznakov 2002, Lichtenstein 1998, Pereira ve Gibson 2002). Yüksek kolesterole bağlı koroner arter hastalıkları batı ülkelerindeki en önemli ölüm nedenlerinden birisidir (Tok ve Aslım 2007).

1.6.1. VLDL (Very Low Density Lipoproteins / Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)

Diyetle alınan eksojen lipidleri ve yağda çözünen vitaminleri taşımakla görevli olan lipoproteinlere şilomikronlar denilmektedir. (Hergenç 2012). Barsak epitel hücrelerinden yağlı yemek sonrasında sentezlenmeye başlarlar (Mergen ve ark. 2010). Açlık kanında şilomikronların varlığı lipid metabolizmasındaki bozukluğa işarettir (Hergenç 2012).

Çoğunlukla karaciğerden sentezlenen VLDL, yapısal olarak şilomikronlara benzese de yoğunluk olarak daha küçüktür (Mergen ve ark. 2010, Şengül 2012). VLDL'nin %90'ı lipid, %10'u proteinden oluşmakta;

trigliserid içeriği % 45-65, fosfolipid %10-15, kolesterol ise %20 civarındadır (Hergenç 2012). VLDL endojen trigliseridlerin transferinden sorumludurlar ve dolaşım sürecinde lipid içeriğinin gittikçe azalması nedeniyle LDL'lere dönüşürler (Adam ve ark. 2013, Mergen ve ark. 2010).

1.6.2. LDL (Low Density Lipoproteins / Düşük Yoğunluklu Lipoprotein)

Brown ve Goldenstein (1976), ailesel hiperkolesterolemi üzerine yaptığı çalışmada trigliserid açısından az kolesterol ve kolesterol esterleri bakımından zengin olan kolesterol ana taşıyıcısı LDL reseptörünü keşfetmişlerdir (Mergen ve ark. 2010, Vance ve Van den Bosch 2000). Plazmadaki kolesterolün neredeyse % 60-70'i LDL aracılığı ile taşınmaktadır ve plazmada LDL yarı ömrü 2-3 gündür (Hergenç 2012).

1.6.3. HDL (High Density Lipoproteins / Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein)

HDL partikülleri hem en küçük moleküllerdir hem de serum kolesterolünün dörtte bir miktarını içerir (Mergen ve ark. 2010). Şilomikronlar dolaşımdayken, lipoprotein lipazın etkisiyle yapısındaki serbest kolesterolün ve fosfolipidlerin bir kısmı HDL'ye dönüşmektedir (Adam ve ark. 2013). HDL, lipidlerin lipoproteinler ve hücreler arasında yeniden dağıtılmasında işlev görür. HDL, ateroskleroz ve kalp-damar hastalıklarına karşı koruyucu bir rol oynamaktadır (Vance ve Van den Bosch 2000). Damar duvarında biriken zararlı kolesterolün karaciğere taşınmasından sorumludur. Aynı zamanda LDL oksidasyonunu inhibe ederek, makrofajların arterial duvara yapışmalarını da azaltırlar (Mergen ve ark. 2010).

HDL'nin antiagregan, antitrombotik, antioksidan, anti-inflamatuvar, anti-apoptotik, antienfeksiyöz, vazorelaksan etkileri ve kök hücrelerin olgunlaşmasında rolü bulunmaktadır (Hergenç 2012).

1.6.4. Trigliserid

Üç karbonlu-üç hidroksil gruplu bir alkol olan "gliserol" ana yapısına üç yağ asidinin ester bağı ile bağlanması sonucunda oluşan trigliserid, hidrofobik özelliktedir (Hergenç 2012). Trigliseridler, nötral ve nonpolar karakterde lipidlerdir. Yağ asitlerinin depo şekli olarak bulunurlar. Metabolizma esnasında yakıt molekülleri olarak görev yaparlar. Hidrofobik karakterdeki trigliseridler hücre içerisinde yağ damlaları halinde bulunurlar. Trigliseridlere ayrıca nötral yağlar da denilmektedir (Adam ve ark. 2013).

1.7. Leptin

1994 yılında Friedman ve ark., tarafından keşfedilen, 16 kDa molekül ağırlığına ve 167 aminoasite (aa) sahip bir hormondur. Latince zayıf/ince anlamına gelen "leptos" kelimesinden türetilmiştir (Friedman ve Halaas 1998).

Memeliler için oldukça önemli olan ve çoğunlukla yağ dokusundan eksprese olan leptin az miktarda mide ve kalp gibi organlardan da salgılanır. (Campbell ve Reece 2008). Yağ dokusundaki leptin oranındaki artış kandaki leptin düzeyinde de artışa yol açmaktadır. Ayrıca beyni uyararak doyumluk hissi vermekte, kas etkinlikleri ve vücut ısısında artışa neden olmaktadır (Campbell ve Reece 2008, Klok ve ark. 2007).

Sürekli yemek yiyen kişilerde leptin direnci olarak da bilinen bir mekanizma gelişir. Bu mekanizma; kandaki leptin hormonu arttığında beynin hipotalamus bölgesini uyararak leptin salınımının normal olarak algılanmasını sağlar (Kolaczynski ve ark. 1996, Levine ve ark. 1999). Egzersiz yapan kişilerde leptin salınımı azalmaktadır (Hickey ve ark. 1997, Keller ve ark. 2005).

Leptin ile ters etkili olan grelin hormonu ise besin ve kilo alımını uyarmaktadır (Ueno ve ark. 2005). Grelini, çoğunlukla mideden salgılanmasının yanısıra pankreas, testis, dalak, barsak gibi birçok dokudan

eksprese edilmektedir (Gnanapavan ve ark. 2002). Aşırı kilolu kişilerde plazma grelin düzeyi azalmaktadır (Tschöp ve ark. 2001).

1.8. Yüksek Yağlı Diyet ve Obezite

Yağ, diyet ile vücuda alınan ve organizmanın yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli olan en önemli besin öğelerinden biridir. Yüksek enerji kaynağı olmalarının yanında yağda çözünebilen vitaminleri de barındırırlar. Proteinler ile birleşerek lipoproteinleri oluşturan yağlar kan lipid düzeylerinin belirlenmesinde de kritik bir rol oynamaktadır (Buettner ve ark. 2007).

Vücutta aşırı ölçüde yağ dokusu bulunması durumu obezite olarak adlandırılmakta ve günümüzde tedavi edilmesi gereken bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Park ve ark. 2010, WHO 2016).

Yüksek yağlı diyet ile beslenme sonucu vücut kitle indeksi (VKİ) artmaktadır. VKİ en basit tanımı ile boy-kilo arasındaki kg/m^2 oranıdır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre obezite sınıflandırması zayıf ($\text{VKİ} < 20$), normal ($20 < \text{VKİ} < 25$), obez ($\text{VKİ} > 30$) belirtilmiştir (WHO 2016).

Örneğin 70 kg ve 175 cm boyundaki yetişkin bir bireyin VKİ'si 22,9'dur (WHO 2000).

$$\text{VKİ hesaplaması; } \text{VKİ} = \text{kg/m}^2$$

$$\text{VKİ} = 70/1.75^2 = 22.9$$

Obezite, ilk kez 1620 yılında Thomas Venner tarafından Latinceye yeme yoluyla tombullaşma anlamına gelen "obesus" kelimesinden türetilmiştir (Barnett, 2005). Obezite, sağlığı bozabilen anormal veya aşırı yağ birikmesi olarak tanımlanır (WHO 2016). Dünya genelinde oldukça hızlı bir şekilde artan obezite, özellikle 1980'den bu yana iki katından daha fazla miktarda artmaktadır. 2014 yılında 1,9 milyardan fazla 18 yaş üzeri yetişkinin aşırı kilolu olduğu bildirilmiş ve bunların 600 milyonuna obezite tanısı konulmuştur (WHO 2016).

TURDEP-I araştırmasında, çalışmaya katılan 24.788 kişiden elde edilen verilere göre ülkemizdeki kadınların %30'u obez iken bu oran erkeklerde %13 seviyesinde olduğu belirtilmiştir. Türkiye geneline bakıldığında ise nüfusun %22.3'nn obez olduğu görülmüştür. Yaşa göre ise 30 yaşından itibaren obezite oranının arttığı ve 45-65 yaş aralığında en yüksek seviyeye ulaştığı görülmüştür (Satman ve ark. 2002).

Aşırı kilonun yalnızca kronik hastalıklara değil aynı zamanda üreme problemlerine de neden olabileceği bildirilmiştir (Catalano 2007). Değişen testosteron, östradiol seviyesi, zayıf sperm kalitesi ve infertilite aşırı kilo alımı ile bağlantılı olabilir (Nguyen ve ark. 2007). Normal kilolu bir erkeğe ($VKİ \leq 25$) göre aşırı kilolu bir erkekte ($VKİ \geq 25$), östradiol oranında önemli bir lde azalma olduğu bildirilmiştir (Fejes ve ark. 2006). Ayrıca obez olan erkeklerde sperm kalitesinde önemli lde değişiklikler olduğu belirlenmiştir (Fejes ve ark. 2006, Kort ve ark. 2006, Magnusdottir ve ark. 2005).

Özellikle VKİ değeri 32-34 arasındaki kişilerdeki infertilite oranı, VKİ değeri 20-22 arasında olan bireylere oranla 2 kat daha fazladır (Sallmen ve ark. 2006). Danimarka Ulusal Doğum Kohortu (Kiliniği), aşırı kilolu ve normal kilolu erkekleri karşılaştırdığı bir çalışmada infertilite oranının %50 oranında arttığını görmüşlerdir (Ramlau-Hansen ve ark. 2007).

Bu çalışmada kolesterollü yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda çörek otu (*Nigella sativa*)'nun etken maddesi olan Timokinon uygulamasının testis dokusundaki GDNF ekspresyonu üzerindeki etkisi immünohistokimyasal ve Western blot yöntem ile incelenmesi amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

Bu çalışma için Kafkas Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan (Karar No: 26.02.2015/18) onay alınmıştır. Çalışmanın deney aşaması Kafkas Üniversitesi Hayvancılık Araştırma ve Uygulama Merkezi ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

2.1. Deney Hayvanı Materyali

Çalışmada kullanılan deney hayvanları Atatürk Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden temin edildi. Çalışmada daha önceden çiftleşmemiş ve herhangi bir çalışmada kullanılmamış 40 adet / 40 günlük *Spraqua Dawley* cinsi erkek sıçan kullanıldı. Hayvanlar 25 ± 2 °C sıcaklıkta, %60-65 düzeyinde nemin ve 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık döngüsünün uygulandığı koşullarda günlük temizliği yapılan kafeslerde ve her kafeste 4 hayvan olacak şekilde *ad libitum* olarak beslenerek barındırıldı. Hayvanlara verilen yem Erzurum Bayramoğlu Yem Fabrikası'ndan temin edildi. Yem içeriği Tablo 1'de verilmiştir.

Gruplar 1 haftalık alıştırmaya süresi sonunda rastgele seçilen sıçanlardan aşağıdaki gibi oluşturuldu.

- **Kontrol Grubu (n=8):** Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadı.
- **Sham Grubu (n=8):** Bu gruptaki sıçanlara 14 gün boyunca serum fizyolojik intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı.
- **Kolesterollü Yüksek Yağlı Diyet Grubu (KYYD) (n=8):** Bu gruptaki sıçanlar günlük enerji miktarının %65'i oranında tereyağı ve %2 kolesterol karıştırılmış pelet yem ile beslendi ve 8 hafta sonunda 8 adet sıçandan kan örnekleri alınarak biyokimyasal değerlere bakıldı (Yeğin 2012).
- **Kolesterollü Yüksek Yağlı Diyet ve Timokinon (KYYD+T) (n=8):** KYYD grubundaki sıçanlar ile aynı şekilde beslenen hayvanlara ayrıca 14 gün

boyunca serum fizyolojik içerisinde çözdürülen 8 mg/kg Timokinon (Sigma-Aldrich / 274666-5G) i.p. olarak uygulandı (Hawsawi ve ark. 2001).

- **Timokinon Grubu (n=8):** Bu gruptaki sıçanlara 14 gün boyunca serum fizyolojik içerisinde çözdürülmüş olan 8 mg/kg Timokinon i.p. olarak uygulandı (Hawsawi ve ark. 2001).



Resim 1. KYVD grubu için yem hazırlama. a) Toz haline getirilmiş yem, b) Eritilmiş tereyağı, c) Saf kolesterol d) Hazırlanmış yem

Tablo 1. Hayvanlara verilen yem içerikleri (%) ve timokinon miktarı.

Yem Maddeleri (*) (100 g)	Kontrol	Sham	Timokinon	KYYD	KYYD+T
Serum Fizyolojik	-	+	-	-	-
Timokinon	-	-	8 mg/kg	-	8 mg/kg
Kolesterol	-	-	-	2	2
Tereyağı	-	-	-	30,5	30,5
Nem	12,8	12,8	12,8	12,8	12,8
Ham protein	23	23	23	23	23
Ham yağ	2,8	2,8	2,8	2,8	2,8
Ham selüloz	5	5	5	5	5
Ham kül	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1
Sodyum	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

***Yem Bileşenleri:** Mısır, Soya fasülyesi küşpesi, Ayçiçek tohumu küşpesi, Mısır Gluteni, Şeker Pancarı melası, Kalsiyum karbonat, Mısır kepeği, Sodyum klorür, Bitkisel yağ, Sodyum bikarbonat, Dikalsiyum fosfat, Vitamin-Mineral.

***İz Elementler (kg):** Vitamin A 15001,18 mg, Mangan sülfat 144,78 mg, Demir sülfat monohidrat 375,58 mg, Çinko oksit 151,53 mg, Bakır sülfat 33,51 mg, Kobalt karbonat 0,41 mg, Sodyum selenit 1,07 mg, Kalsiyum iyodat anhidrit 2 mg.

2.2. İmmunohistokimyasal Boyamada Kullanılan Çözeltiler

2.2.1. Sodyum Sitrat Tampon Çözeltisi

Tri-sodium citrat (dihydrate) 2,94 g alınarak 1000 ml distile su içerisinde çözdürülüp pH'sı 1N HCl ile 6.0'a ayarlandıktan sonra içerisine 0.5 ml Tween 20 ilave edilerek karıştırıldı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

2.2.2. BSA Çözeltisi

3 g Bovine serum albümin 100 ml distile su içerisinde çözdürülerek +4 °C'de muhafaza edildi.

2.3. Western Blot Çalışmasında Kullanılan Çözeltiler

2.3.1. Ripa lizis buffer

5 ml %10'luk sodyum deoksikolat (SDS), 1.5 ml Tris HCl (pH 7.6), 0.5 ml %10 SDS, 0.5 ml Tween 20'ye distile su (dH₂O) eklenerek karışım 50 ml'ye tamamlandı.

2.3.2. PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) Hazırlama

17,4 mg PMSF 10 ml Isopropanol (2-propanol) içerisinde çözüldürüldü ve kullanım süresi boyunca -20'de muhafaza edildi.

2.3.3. Stacking (stoklama) jel tamponu (0.5 M Tris-HCl, pH6.8)

Tris Base	1,5 g
SDS	100 mg

Hazırlanan karışım 10 ml dH₂O içerisinde eritilerek pH'sı 6.8 olana kadar 1 M HCl çözeltisinden ilave edildi. Total hacim dH₂O ile 25 ml'ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.4. Sample (numune) Tamponu (0.0625 M Tris-HCl, pH 6.8)

Stacking jel tamponu	1.25 ml
SDS	195 mg
Gliserol (%99'luk)	1 ml
2-Merkaptoetanol	0,5 ml
Bromopheanol blue	1 mg

Hazırlanan karışım dH₂O ile 10 ml'ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.5. %30'luk Akrilamid Solüsyonu

7,5 g Akrilamid ve 200 mg Bisakrilamid hassas terazide tartılarak total hacmi 25 ml olacak şekilde dH₂O eklenerek eritildi ve koyu renkli şişede +4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.6. Resolving (ayırma) jel tamponu (3 M Tris-HCl, pH 8.8)

9,075 g Tris Base ve 200 mg SDS karışımı 7,5 ml dH₂O içerisinde eritilerek pH'sı 1M HCl ile 8.8'e ayarlandı ve total hacim dH₂O ile 25 ml'ye tamamlanarak +4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.7. Running (yürütme) tamponu (0.025 M Tris-HCl, 0.192 M Glisin)

Tris Base 3,03 g
Glisin 14,4 g
SDS 1 g

İlk önce Tris ve Glisin karışımı 750 ml dH₂O içerisinde eritildi. Daha sonra içerisine SDS eklendi ve total hacim dH₂O ile 1500 ml'ye ayarlanarak +4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.8. Coomassie blue çözeltisi hazırlama (Jel boyama)

Coomassie Brilliant Blue R250	125 mg
Ethanol	200 ml
Asetik Asit	35 ml

Hazırlanan çözelti +4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.9. Destaining (Jelden boya çıkartma)

% 5'lik Metanol çözeltisi (25 ml Metanol + 475 ml dH₂O) ve % 7,5'lik Asetik Asit çözeltisi (37,5 ml Asetik Asit + 462,5 ml). Hazırlanan karışım +4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.10. Transfer buffer

Tris Base	3,03 g
Glisin	14,4 g
dH ₂ O	800 ml
Metanol	200 ml

2.3.11. 10X TBS buffer

24,2 g Tris Base ve 80 g NaCl 1 litre dH₂O içerisinde çözülerek pH'sı 7.6'ya ayarlandı ve +4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.12. 1X TBS-Tween (Wash buffer)

100 ml 10X TBS buffer ile 900 ml ddH₂O karıştırılarak içerisinde 1 ml Tween-20 eklendi ve +4 °C'de muhafaza edildi.

2.3.13. %8'lik Bloking solüsyonu

Yağsız süt tozu	8 g
Wash buffer	100 ml

2.4. Canlı Ağırlık Ölçümü ve Kan Alımı

Deneye başlamadan önce ve deney süresince gruptaki sıçanların haftalık olarak ağırlıkları ölçüldü. Timokinon uygulaması esnasında ise grupların ağırlıkları günlük olarak ölçüldü. Deney sonunda 1 gece önceden aç bırakılan sıçanlar son kez tartılıp eter anestezi altındayken biyokimyasal analizler için kalpten kan örnekleri Lityum heparinli tüplere alındı.

2.5. Histolojik İnceleme

Eter anestezi uygulanan sıçanlar servikal dislokasyon yoluyla ötenazi edilerek testis dokuları alındı. Sağ testis dokuları Western blot yönteminde kullanılmak üzere -24 °C'de muhafaza edilirken sol testis dokuları ise

istatistiksel analiz için tartılarak histolojik ve immünohistokimya çalışmaları için %10'luk formaldehit solüsyonuna alındı.

Testis dokuları tespit edildikten sonra rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafinde bloklandı. Bloklarından alınan 5 µm'luk kesitlere dokunun genel yapısını göstermek amacıyla Crossman'ın üçlü boyama tekniği ve Hematoksilen-Eosin boyaması uygulandı.

2.6. Seminifer Tübül Çaplarının Histometrik Hesaplanması

Seminifer tübüllerin çaplarını ölçmek için her gruptan 8 adet sıçana ait 60'ar adet seminifer tübül Image J (v1.50i) adlı bilgisayar yazılımı kullanılarak ölçüldü (Collins 2007, Rasband 2016).

2.7. İmmünohistokimyasal İnceleme

İmmünohistokimyasal inceleme için krom alum jelatin ile kaplı lamlara 5 µm'luk kesitler alınarak deparafinizasyon ve dehidrasyon işlemleri uygulandı. Ardından endojen peroksit aktivitesini önlemek için hidrojen peroksitin metanoldeki (%3) çözeltisinde 20 dk bekletildi. Kesitler PBS (Fosfatlı Buffer Solüsyonu) (pH 7.4) ile yıkandıktan sonra antijenik reseptörlerin açığa çıkması için sodyum sitrat buffer (pH 6.0) solüsyonu içerisinde mikrodalga fırında 600 watt, 20 dk kaynatıldı. PBS ile yıkanan dokular Avidin-Biotin-Peroksidaz tekniği uygulamasına tabi tutuldu. Blocking Solüsyon A (İnvitrogen-Histostatın Plus Bulk Kit) ile 10 dk boyunca inkübe edilen dokulara PBS yıkaması yapılmadan rabbit anti-GDNF (1:200) (Abcam Ab18956) ile +4 °C'de 6 saat boyunca primer antikor uygulaması yapıldı. Daha sonra PBS ile yıkanan kesitler biotinli sekonder antikor ile 30 dk inkübe edildi. PBS ile yıkanarak Streptavidin preoksidaz solüsyonunda 30 dk bekletildi. Dokulardaki antikor reaksiyonunu göstermek için DAB kromojen solüsyonu eklendi ve ışık mikroskobu ile incelendi. İmmünoreaktivitenin durumu kontrol edilerek reaksiyon PBS ile durduruldu. Distile su ile yıkanan kesitler zıt boyama için Harris'in

hematoksilen boyamasına tabi tutuldu. Daha sonra kesitler dehidre edilerek entellan ile kapatıldı.

Kesitlerde boyanma derecesi kriter alınarak semikantitatif yöntem ile skorlama yapıldı. Değerlendirmede zayıf boyanma (1), orta derecede boyanma (2) ve kuvvetli boyanma (3) özelliklerine göre derecelendirme yapıldı. İmmunohistokimyasal boyamanın spesifik olup olmadığını belirlemek amacıyla tüm gruplara bütün işlemler aynı olmak koşulu ile primer antikor ilave edilmeksizin (negatif kontrol) diğer işlemler aynen uygulandı.

Histolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olympus Bx53, Japan) ile değerlendirildikten sonra fotoğraflandırıldı.

2.8. Western Blot Yöntemi

2.8.1. Testis Dokusundan Protein Analizi

Çalışmamızda kontrol ve deney gruplarından alınan 100 mg ağırlığındaki testis dokuları x2 oranında RIPA lizis buffer solüsyonu ve proteaz inhibitörü (PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)) eklenerek homojenize (Winggen Hauser) edildi. Elde edilen homojenat ince cam tüplere aktarılarak +4 °C'de 15 dk boyunca 14000 rpm'de santrifüj (Nüve NF 800R) edilerek süpernatant kısımları yeni cam tüplere aktarıldı ve tekrar 4 °C'de 15 dk boyunca 14000 rpm'de santrifüj edilerek alınan süpernatant kısım -24 °C'de muhafaza edildi. Total protein analizi için her örnekten 1 µl alınarak nanodrop (AGT-01) cihazında ölçüldü.

2.8.2. SDS-Page (Sodyum Dodesil Sülfat-Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi) ve Membran Transferi

Homojenatlardan her bir well'e 100 µg oranında protein yüklenecek şekilde gerekli seyreltme yapılarak 15-20 sn boyunca vortekslendi (Grant-bio PV1). Daha sonra SDS'in protein denatürasyonunu arttırması ve disülfid

bağlarının ayrılması amacıyla (Thermo-Shaker TS-100) 100 °C'de 5 dk süreyle kaynatılarak hızlı bir şekilde buz içerisine alındı. Kontrol ve deney gruplarına ait testis dokularından elde edilen protein örnekleri SDS-Page yöntemi ile incelendi.

* **Koşturma tamponu (Running buffer):** 3.3 ml %30 Bis-akrilamid, 2.5 ml 1.5 M Tris HCl (pH:6,8), 0.1 ml %10 SDS, 4.1 ml dH₂O, 5 µl TEMED ve 50 µl amonyom persülfat ile hazırlanmıştır.

* **Ayırma tamponu (Stacking buffer):** 1.7 ml %30 Bis-akrilamid, 2.5 ml 0.5 M Tris HCl (pH:6,8), 0.1 ml %10 SDS, 5.7 ml dH₂O, 10 µl TEMED ve 50 µl amonyom persülfat ile hazırlanmıştır.

Hazırlanan jelin ilk well'ine protein marker'i 5 µl, diğer well'lere ise 25 µl örnekler yüklendi ve 200 V, 80 mA, 70 dk süreyle protein marker'i jelin kenarına gelene kadar koşturma işlemi gerçekleştirildi.

Jel boyutu büyüklüğünde kesilen PVDF membranı (Thermo, PVDF Transfer Membrane 88518) ilk önce 5 dk süreyle absolut metanol ile inkübe edildi ve sonrasında 5 dk süreyle dH₂O ile yıkanarak transfer buffer solüsyonu içerisine alınarak 5 dk süreyle bekletildi.

Jel ile aynı boyutta kesilen filtre kağıtları ve iki adet blot süngerleri de yine aynı şekilde 5 dk süresince transfer buffer ile ıslatıldı. Blot kasetinin siyah ve kırmızı katmanları arasına sırasıyla sünger, filtre kağıdı, jel, membran, filtre kağıdı ve sünger konularak sandviç modeli uygulandı. (Elektrik yükü kasetin siyah yüzünden kırmızı yüzüne (- →+ , jelden PVDF membrana) doğru olduğundan jel ve PVDF membranın doğru bir sırası ile konulması önemlidir.)

Kaset blot cihazına yerleştirilip 100 V, 500 mA ve 35 dk boyunca transfer işlemi gerçekleştirildi. Transfer işlemi sonrasında jel ve PVDF membran birbirinden ayrılarak jel protein transferinin doğru şekilde gerçekleştirilip gerçekleştirilmediğini anlamak için Coomassie blue çözeltisi ile

boyamaya alındı. PVDF membran ise 3x15 dk boyunca wash buffer ile yıkandı ve %8'lik bloking solüsyonu içerisinde 30 dk bekletildi.

Bloking işleminden sonra membran yıkanmadan primer antikor olan rabbit anti-GDNF (24 kDa) (Abcam ab18956) 1/200 oranında %8'lik bloking solüsyonu ile dilüe edilerek ve 20 saat boyunca +4 °C'de inkübe edildi. Kontrol amacı ile β -actin (42 kDa) (Abcam, ab8227) 1/1000 oranında dilüe edilerek 60 dk oda ısısında uygulandı.

Primer ve kontrol antikor uygulaması sonrasında 3x15 dk wash buffer ile yıkanan membran primer antikora uygun olarak seçilen Goat Anti Rabbit HRP ile 60 dk inkübe edildi. Tekrar 3x15 dk wash buffer ile yıkanan membran, 4-kloro-1-naphthol (60 μ l %30'luk H₂O₂, 20 ml metanol, 0.06 gr 4-kloro-1-naphthol ve dH₂O ile 100 ml tamamlanmıştır) eklenerek 15 dk bekletildi. Membran daha sonra Uvitec M02 4611 görüntüleme cihazı ile görüntülenerek fotoğraflandırıldı.

2.9. Biyokimyasal Analizler

Kalpten alınan kan örneklerinden santrifüj edilerek elde edilen serumdan total kolesterol (TK), HDL, LDL, VLDL, trigliserid (TG) ve leptin değerleri ölçüldü.

Serum HDL, LDL, VLDL ve TG düzeyleri ticari kit (Cell Biolabs, INC) kullanılarak belirlendi. Serum Leptin düzeyi ise ELISA yöntemi ile Rat Leptin ELISA Kit (Sigma Aldrich, UK) ile belirlendi. Tüm analizler Epoch, Biotek marka Plate okuyucusu ile spektrofotometrik olarak belirlendi.

2.10. İstatistiksel Değerlendirmeler

Çalışmada elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS (18.0) paket programı kullanıldı. Gruplar arasındaki farklılıkları belirlemek için normalite ve One Way ANOVA testi yapıldı. Gruplar arasındaki önemli farklılıkları karşılaştırmak için ise Duncan testi kullanıldı.

3. BULGULAR

Gruplar arasındaki normallik testi Tabachnick ve Fidell'in belirttiği şekilde yapılmıştır. Bu teste göre çarpıklık (Skewness/Kurtosis) ve basıklık değerlerin +1,5 ve -1,5 arasında olmalıdır. Bu çalışmadaki sonuçlar +1,5 ve -1,5 değer aralığında olduğu görülmüştür (Tabachnick ve Fidell 2013).

3.1. Testis ve Canlı Ağırlık Bulguları

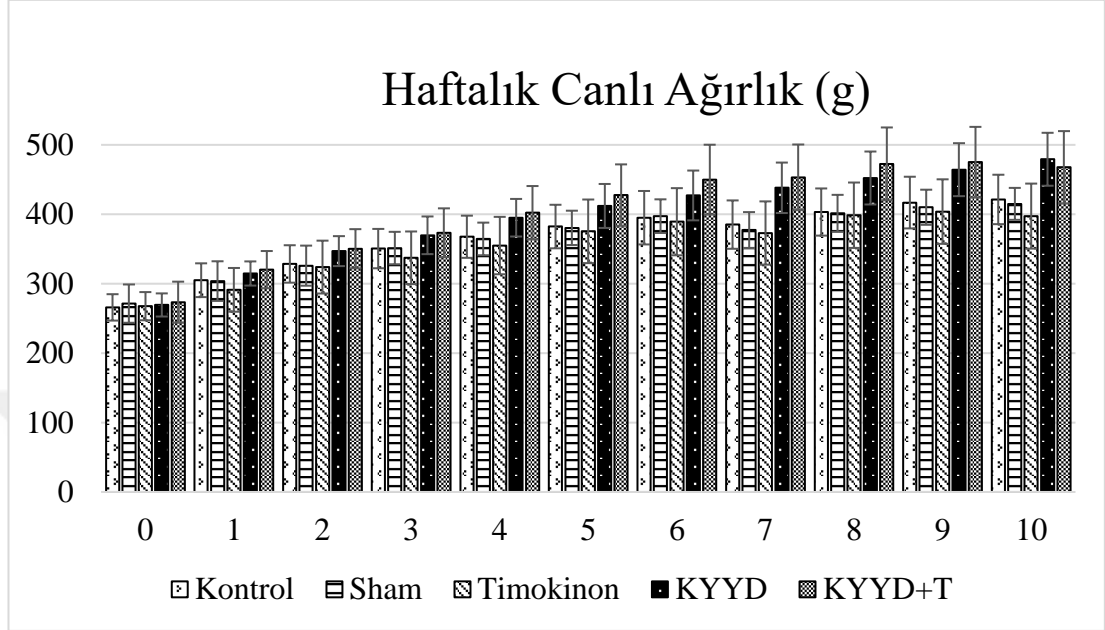
Tablo 2. Gruplar arası canlı ağırlık (g) sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi

	Kontrol	Sham	Timokinon	KYYD	KYYD+T	P
0. Gün	265,89 ^a	271,31 ^a	267,62 ^a	269,39 ^a	273,34 ^a	0,971
1. Hafta	305,02 ^a	303,75 ^a	291,15 ^a	314,71 ^a	320,24 ^a	0,234
2. Hafta	328,45 ^a	326,00 ^a	323,96 ^a	346,92 ^a	350,39 ^a	0,234
3. Hafta	350,56 ^{ab}	351,34 ^{ab}	337,32 ^b	369,71 ^{ab}	373,32 ^a	0,139
4. Hafta	367,64 ^{abc}	364,50 ^{bc}	354,95 ^c	395,04 ^{ab}	402,37 ^a	0,026
5. Hafta	382,34 ^b	380,44 ^b	375,47 ^b	411,99 ^{ab}	427,65 ^a	0,025
6. Hafta	395,07 ^b	397,30 ^b	389,27 ^b	427,12 ^{ab}	450,04 ^a	0,022
7. Hafta	385,12 ^b	377,25 ^b	373,00 ^b	438,12 ^a	453,25 ^a	0,000
8. Hafta	403,25 ^b	401,37 ^b	398,62 ^b	452,25 ^a	472,62 ^a	0,001
9. Hafta	416,87 ^b	410,12 ^b	403,87 ^b	464,25 ^a	475,12 ^a	0,002
10. Hafta	421,37 ^b	415,00 ^b	397,37 ^b	479,25 ^a	467,62 ^a	0,001

a,b,c: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel önemliliği ifade etmektedir. P<0,05

Canlı ağırlık bakımından ilk 2 hafta gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken 3. haftadan itibaren istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olduğu tespit edildi (P<0,05). Timokinon ile KYYD+T grubu arasında 3. ve 4. haftada, kontrol, sham ve timokinon grupları ile KYYD+T grubu ile karşılaştırıldığında ise 5. ve 6. haftada istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi (P<0,05). Kontrol, sham ve timokinon grupları KYYD ve KYYD+T grupları karşılaştırıldığında da 7. ile 10. haftalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (P<0,05). KYYD ile KYYD+T grupları arasında

deney süresi boyunca istatistiksel olarak bir fark belirlenmedi ($P < 0,05$). Kolesterolü yüksek yağlı diyetin kilo artışında etkili olduğu ancak timokinon enjeksiyonu ile kilo artışının yavaşlayarak gerilediği tespit edildi.



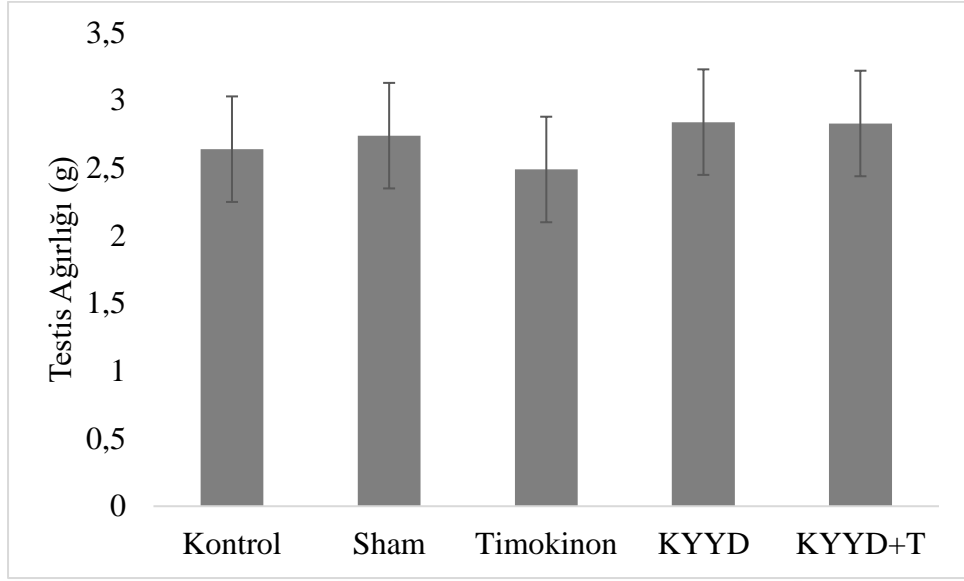
Şekil 1. Gruplar arası haftalık canlı ağırlık grafiği.

Tablo 3. Gruplar arası testis ağırlık (g) sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

Gruplar	n	Testis Ağırlığı (g)	P
Kontrol	8	2,64±0,13 ^{ab}	0,04
Sham	8	2,74±0,28 ^a	
Timokinon	8	2,49±0,18 ^b	
KYVD	8	2,83±0,23 ^a	
KYVD+T	8	2,82±0,18 ^a	

a,b: Aynı sütundaki farklı harfler istatistiksel önemliliği ifade etmektedir. $P < 0,05$.

Testis ağırlığı bakımından sham ile KYVD ve KYVD+T grupları arasında istatistiksel açıdan bir fark gözlenmedi ($P > 0,05$). Sham, KYVD ve KYVD+T grupları, timokinon grubu ile kıyaslandığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($P < 0,05$).



Şekil 2. Gruplar arası Testis Ağırlığı grafiği.

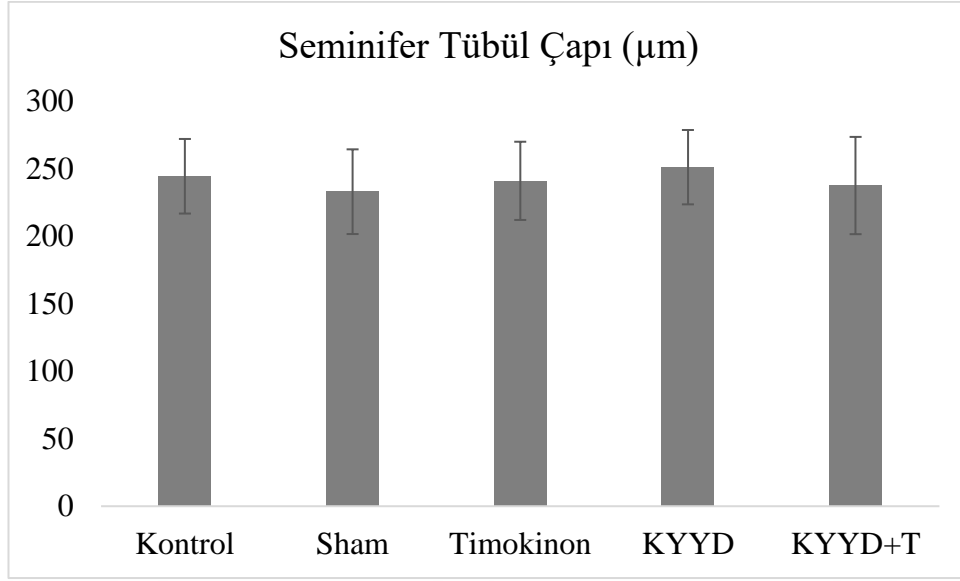
3.2. Seminifer Tübül Çap Bulguları

Tablo 4. Gruplar arası seminifer tübül çap sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

Grup	n	Seminifer tübül çapı (μm)	P
Kontrol	480	244 \pm 28 ^b	0,000
Sham	480	233 \pm 31 ^d	
Timokinon	480	241 \pm 29 ^b	
KYVD	480	251 \pm 28 ^a	
KYVD+T	480	237 \pm 36 ^c	

a,b,c,d: Farklı harfler istatistiksel önemliliği ifade etmektedir. $P < 0,05$.

Seminifer tübül çapı bakımından kontrol, sham, KYVD ve KYVD+T grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($P < 0,05$). Kontrol ile timokinon grupları arasında ise istatistiksel açıdan fark gözlenmedi ($P > 0,05$).

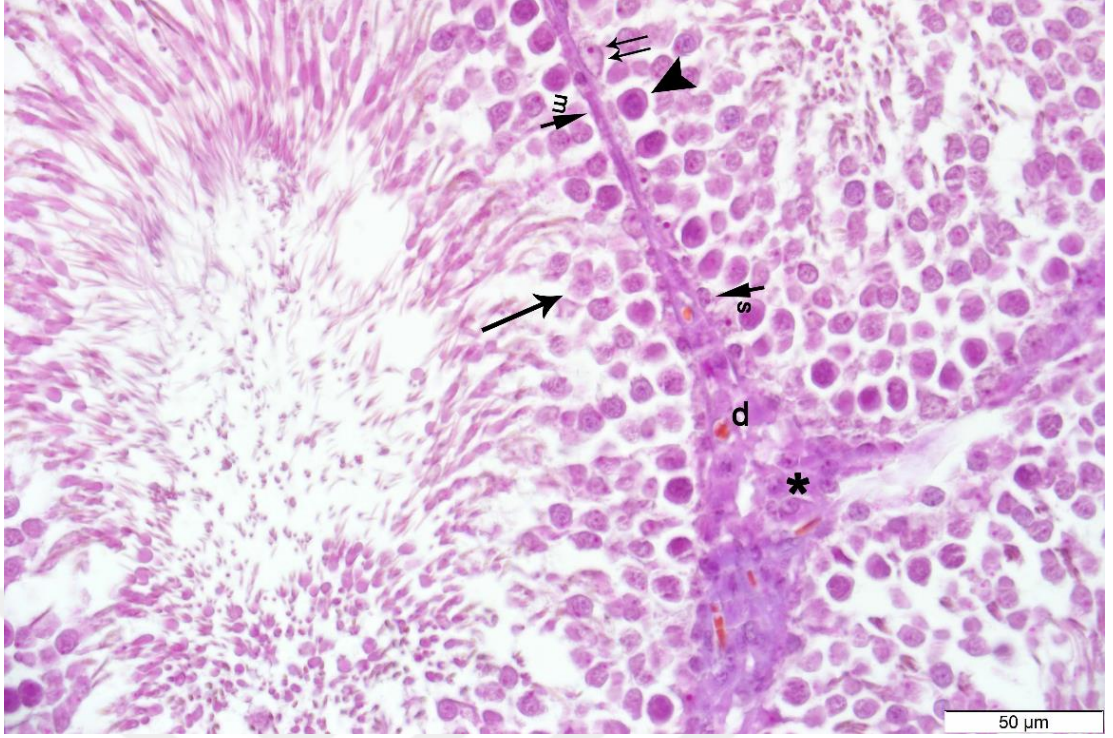


Şekil 3. Gruplar arası Seminifer Tübül Çapı grafiği.

3.3. Histolojik Bulgular

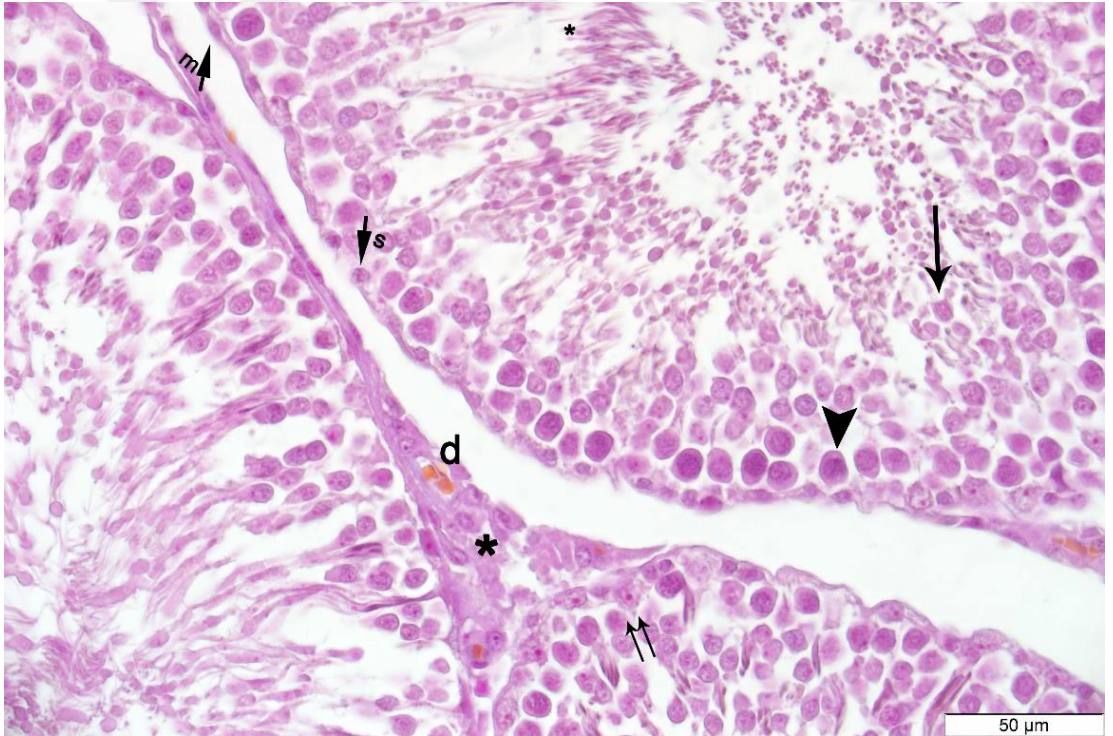
Kontrol grubu sıçanların testis dokuları incelendiğinde seminifer tübüllerin ve bu tübüllerde bulunan spermatogonium, primer spermatosit, spermatidlerin ve Sertoli hücrelerinin normal yapıda olduğu görüldü. Seminifer tübüllerin arasında intersitisyel bağ dokusu, bağ dokusu içerisinde Leydig hücreleri ve kan damarları ile seminifer tübülün bazal membranında yer alan kasılabilen peritübüler miyoid hücrelerin bulunduğu belirlendi.

Sham, timokinon, KYVD ve KYVD+T gruplarına ait sıçanların testis dokularının kontrol grubu ile benzer şekilde normal histolojik yapıya sahip olduğu gözlemlendi (Resim 2-6).



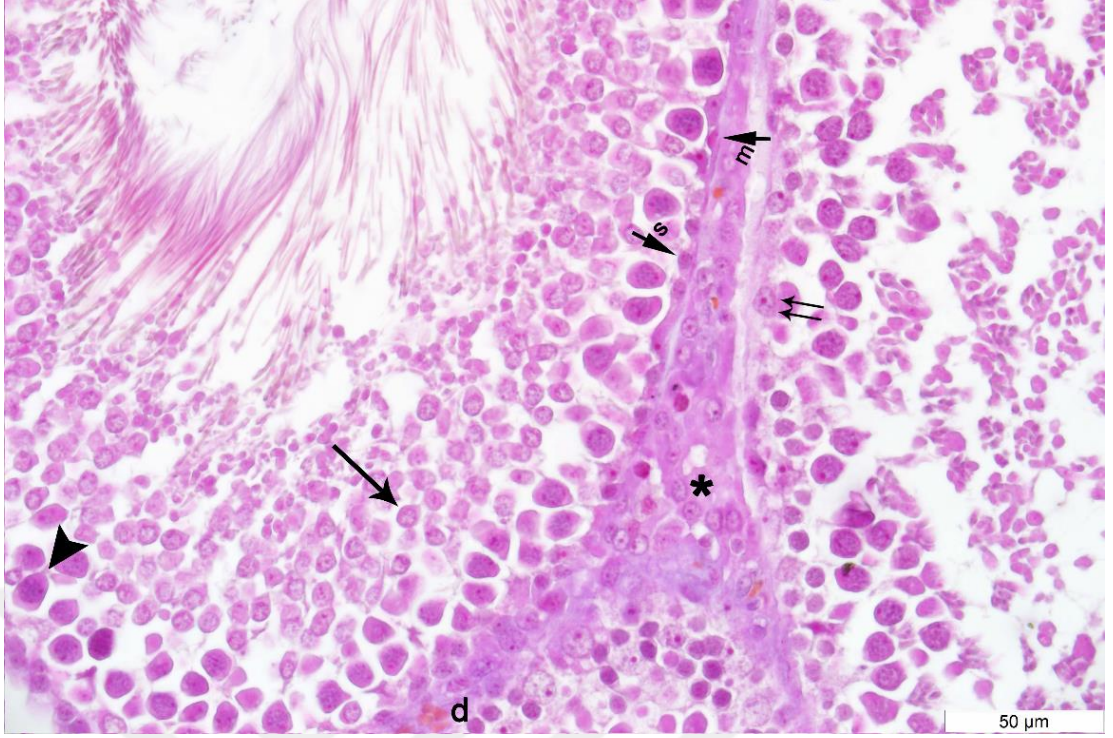
Resim 2. Kontrol grubu. Sıçan testis dokusu. Triple boyama.

Spermatogonium (ok S), Primer spermatozit (okbaşı), Spermatozid (ok), Sertoli hücresi (çift ok), Peritübüler miyoid hücre (ok m), Leydig hücresi (*), Damar (d).



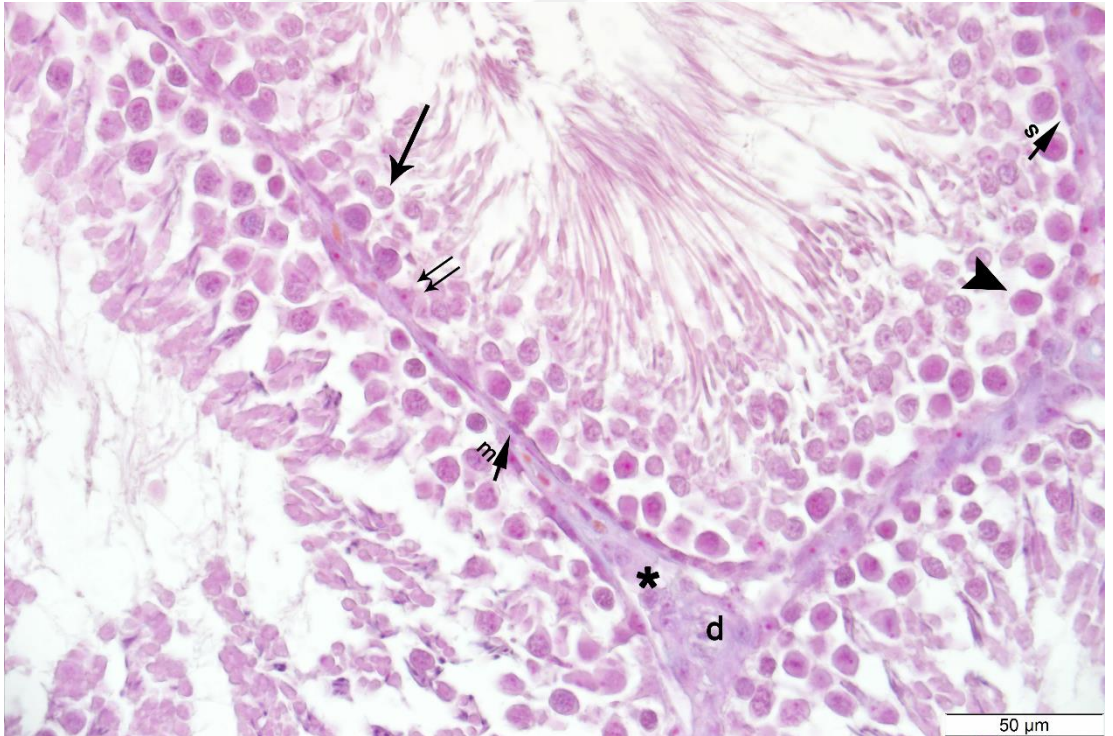
Resim 3. Sham grubu. Sıçan testis dokusu. Triple boyama.

Spermatogonium (ok S), Primer spermatozit (okbaşı), Spermatozid (ok), Sertoli hücresi (çift ok), Peritübüler miyoid hücre (ok m), Leydig hücresi (*), Damar (d).



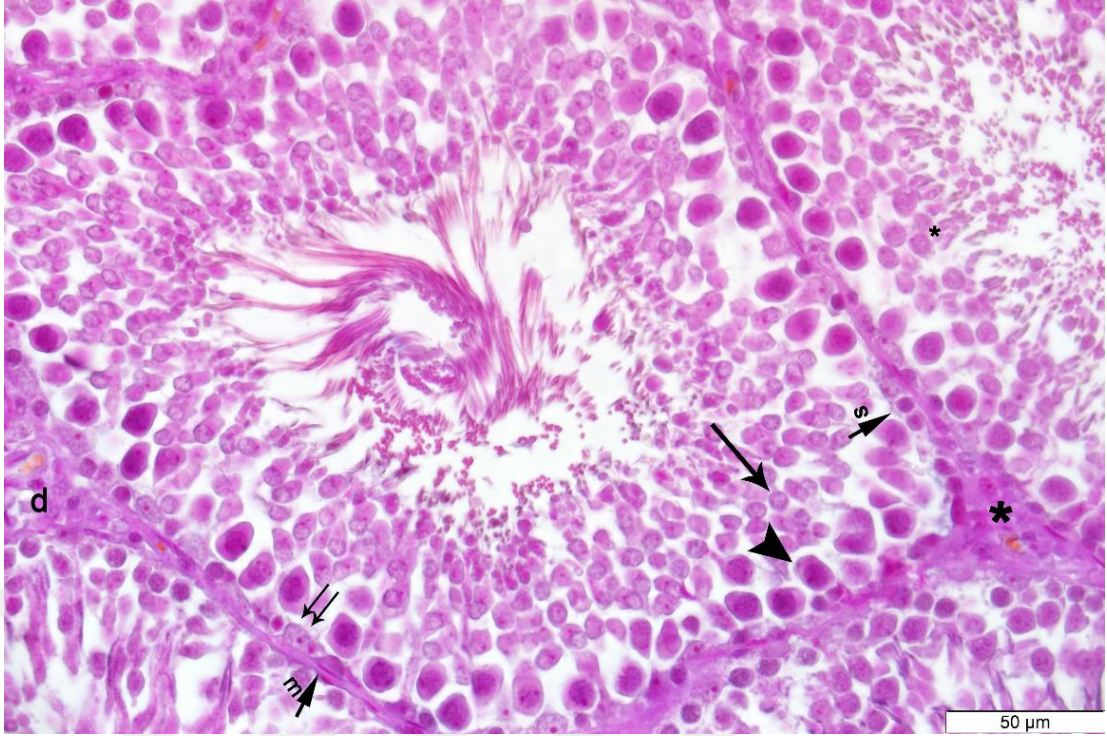
Resim 4. Timokinon grubu. Sıçan testis dokusu. Triple boyama.

Spermatogonium (ok S), Primer spermatozit (okbaşı), Spermatozit (ok), Sertoli hücresi (çift ok), Peritübüler miyoid hücre (ok m), Leydig hücresi (*), Damar (d).



Resim 5. KYD grubu. Sıçan testis dokusu. Triple boyama.

Spermatogonium (ok S), Primer spermatozit (okbaşı), Spermatozit (ok), Sertoli hücresi (çift ok), Peritübüler miyoid hücre (ok m), Leydig hücresi (*), Damar (d).



Resim 6. KYVD+T grubu. Sıçan testis dokusu. Triple boyama.

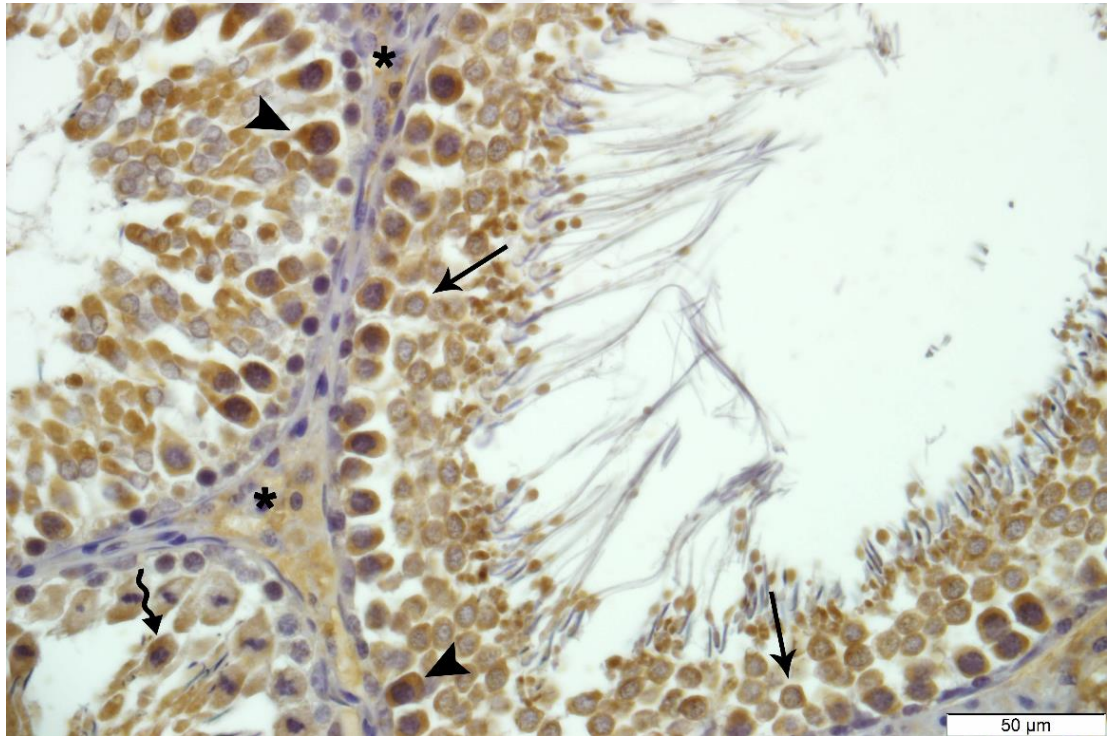
Spermatogonium (ok S), Primer spermatozit (okbaşı), Spermatozid (ok), Sertoli hücresi (çift ok), Peritübüler miyoid hücre (ok m), Leydig hücresi (*), Damar (d).

3.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Tüm gruptaki sıçanların testis dokusu GDNF'nin immünohistokimyasal olarak dağılımı ve immünoaktivite derecesi yönünden incelendi. Kontrol (Resim 7) ve sham (Resim 8) grubundaki sıçanların testis dokusunda seminifer tübüllerdeki primer spermatozitler ile spermatozidlerde kuvvetli, Leydig hücrelerinde orta derece sitoplazmik GDNF immünoaktivitesi görüldü. Timokinon (Resim 9) grubundaki sıçanların testis dokularında primer spermatozitlerde ve spermatozidlerde zayıf GDNF immünoaktivitesi tespit edildi. KYVD (Resim 10) grubundaki sıçanların testis dokularında primer spermatozitlerde ve spermatozidlerde orta derecede sitoplazmik GDNF immünoaktivitesi belirlendi. KYVD+T (Resim 11) grubundaki sıçanların testis dokularında ise primer spermatozitlerde ve Leydig hücrelerinde zayıf, spermatozidlerde ise orta derece sitoplazmik GDNF immünoaktivitesi görüldü.

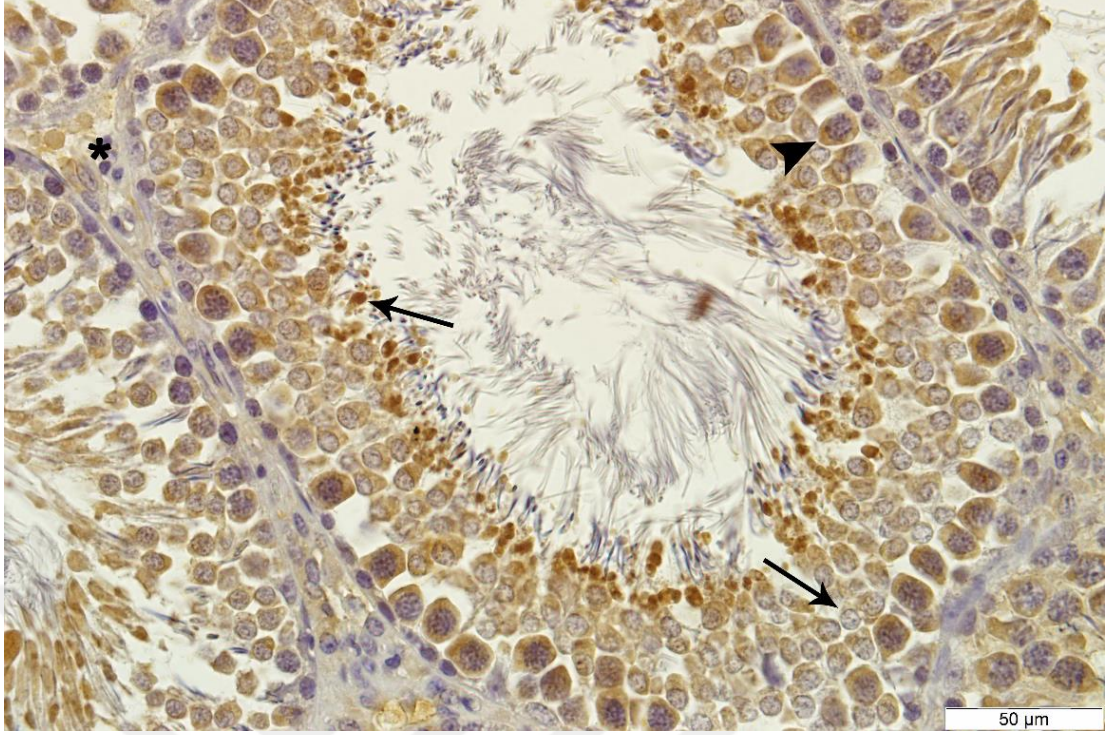
Tablo 5. Gruplar arası GDNF immünoreaktivitesinin semikantitatif analiz sonuçları.

	Kontrol	Sham	Timokinon	KYYD	KYYD+T
Primer Spermatozidler	3	3	1	2	1
Spermatidler	3	3	1	2	2
Leydig Hücreleri	2	2	0	0	1
Spermatogoniumlar	0	0	0	0	0
Peritübüler Miyoid Hücreler	0	0	0	0	0
Sertoli Hücreleri	0	0	0	0	0
Endotel Hücreleri	0	0	0	0	0

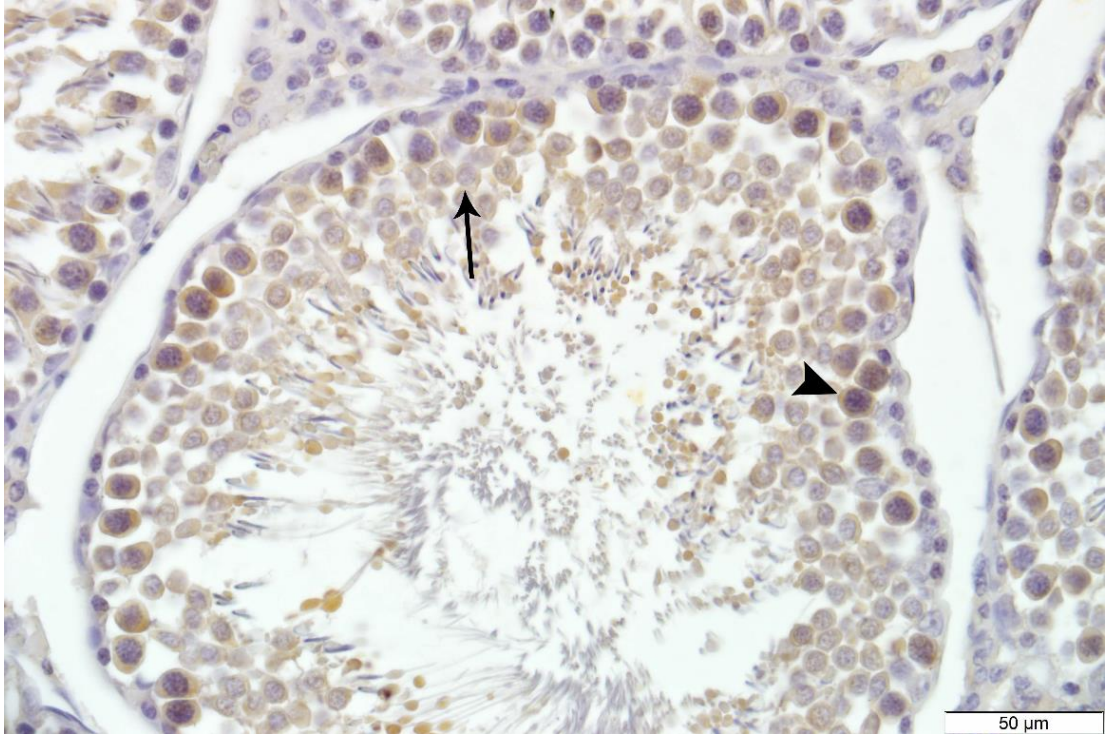


Resim 7. Kontrol grubu. Sıçan testis GDNF immünoreaktivitesi.

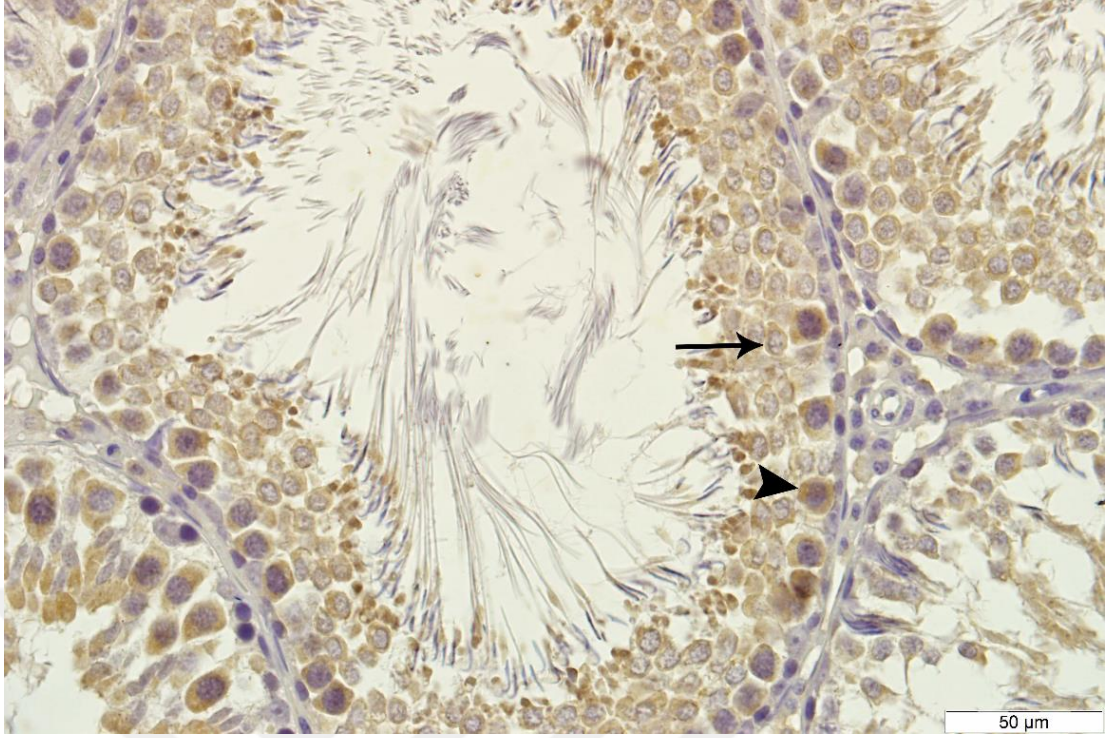
Primer spermatozid (okbaşları), Sekonder spermatozid (kivrık ok), Spermatozid (oklar), Leydig hücresi (*).



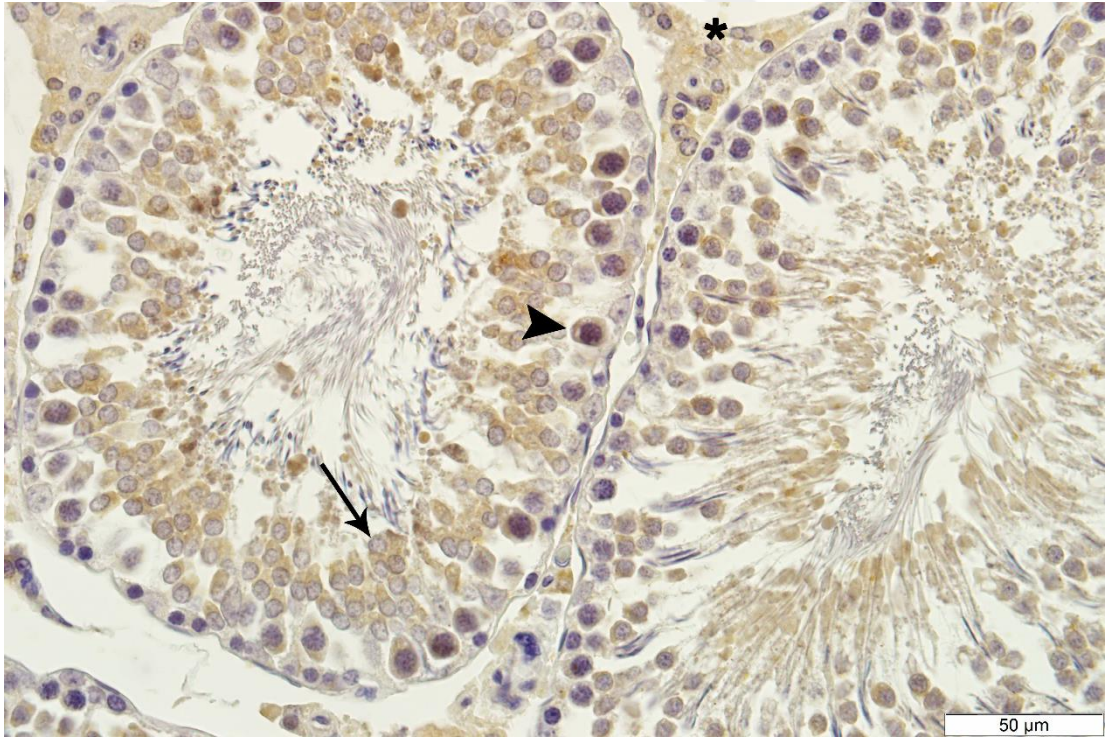
Resim 8. Sham grubu. Sıçan testis GDNF immünoreaktivitesi.
Primer spermatozoid (okbaşı), Spermatozoid (oklar), Leydig hücresi (*).



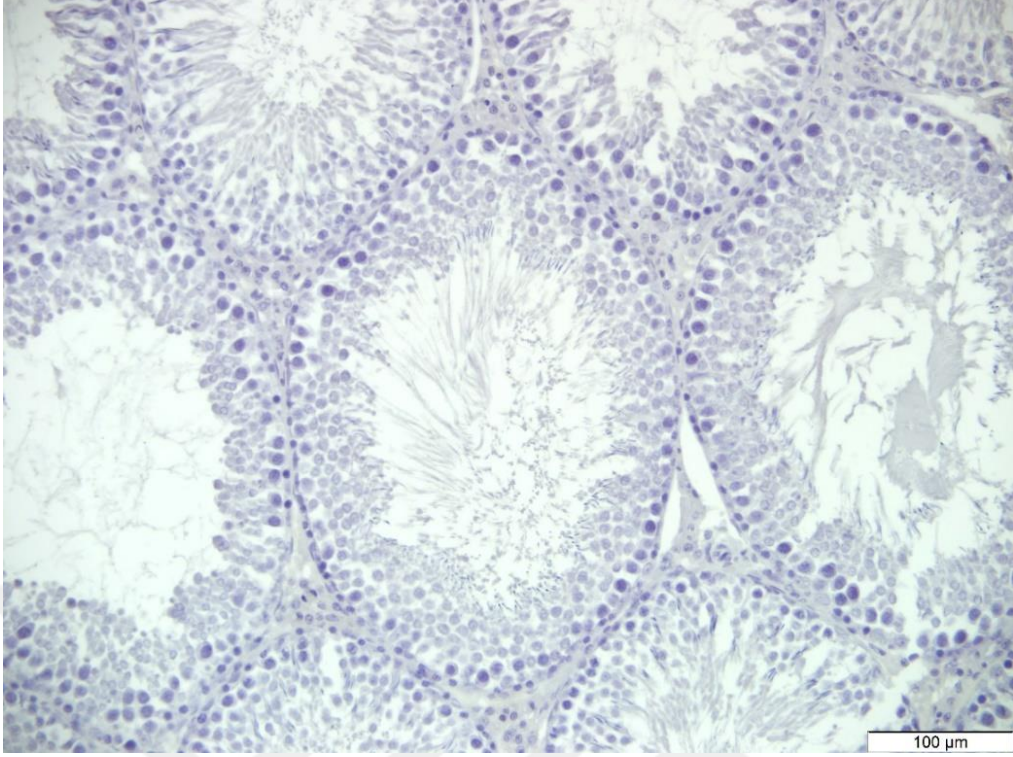
Resim 9. Timokinon grubu. Sıçan testis GDNF immünoreaktivitesi.
Primer spermatozoid (okbaşı), Spermatozoid (oklar), Leydig hücresi (*).



Resim 10. KYYD grubu. Sıçan testis GDNF immünoreaktivitesi.
Primer spermatozoid (okbaşı), Spermatozoid (oklar).



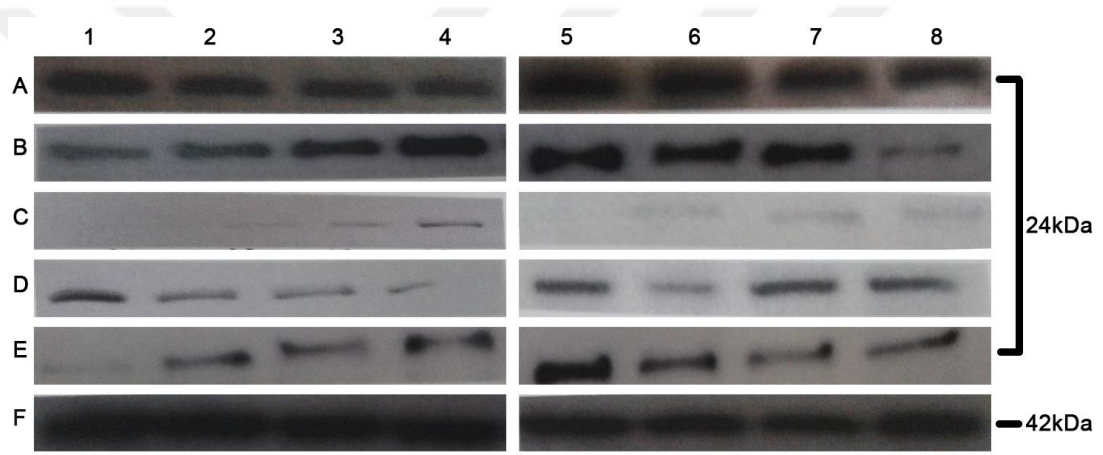
Resim 11. KYYD+T grubu. Sıçan testis GDNF immünoreaktivitesi.
Primer spermatozoid (okbaşı), Spermatozoid (İnce oklar), Leydig hücresi (*).



Resim 12. Kontrol grubu, Sıçan testis Negatif kontrol.

3.5. Western blot analizi ile doğrulanması

Kontrol, sham, timokinon, KYVD ve KYVD+T gruplarındaki sıçanların testis dokularında yapılan Western analizi sonucunda GDNF bulunduğu teyit edildi. Beklenen büyüklük olan yaklaşık 24 kDa enzim işaretlendi. Enzimin ekspresyon seviyesinin belirlenmesi için kontrol olarak housekeeping özellik gösteren β -actin kullanıldı. Timokinon grubu β -actin, sham ve kontrol grubu ile kıyaslandığında GDNF ekspresyonunun düşük olduğu belirlendi. KYVD ile KYVD+T grubu karşılaştırıldığında GDNF ekspresyonunun KYVD+T grubunda daha düşük olduğu görüldü. Sonuç olarak, timokinon uygulanan gruplarda GDNF ekspresyonunun belirgin bir biçimde azaldığı belirlendi.



Şekil 4. GDNF proteinin Western blot analizi ile desteklenmesi. Anti-GDNF ve ikincil antikor HRP kullanılarak yapılan analiz sonucunun görüntüsü (Kaleidoscope prestained Standards BİO-RAD).

A) Kontrol, B) Sham, C) Timokinon, D) KYVD, E) KYVD+T ve F) β -Aktin.

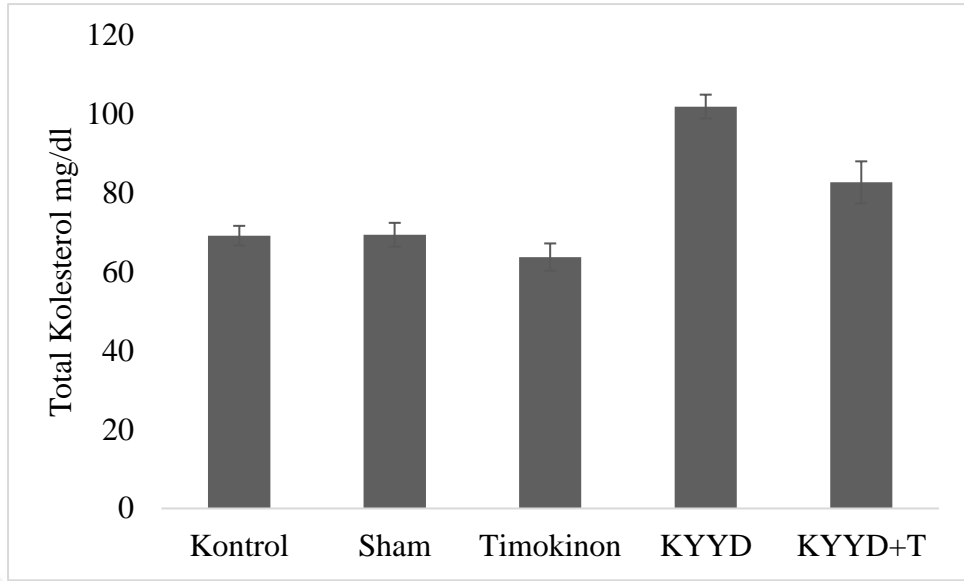
3.6. Biyokimyasal Analizlerin Gruplar Arası İstatistiği

Tablo 6. Gruplar arası biyokimyasal analiz değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi.

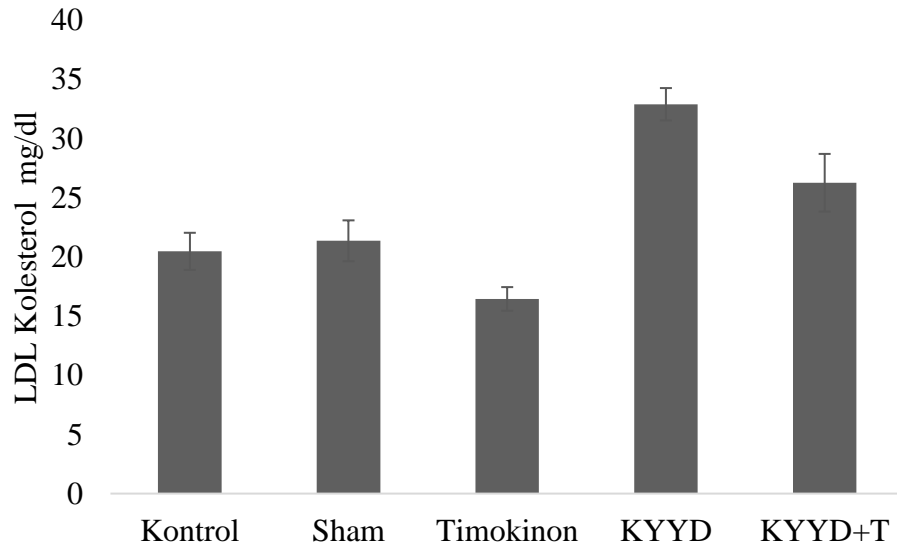
mg/dl	Kontrol	Sham	Timokinon	KYYD	KYYD+T
Total Kol.	69,17 ^c	69,38 ^c	63,72 ^d	101,89 ^a	82,66 ^b
LDL	20,47 ^c	21,36 ^c	16,45 ^d	32,90 ^a	26,27 ^b
HDL	24,05 ^a	24,28 ^a	19,67 ^b	18,51 ^b	16,64 ^c
VLDL	12,62 ^b	12,01 ^b	12,11 ^b	20,54 ^a	10,86 ^c
Trigliserid	54,01 ^a	54,16 ^a	45,43 ^c	96,25 ^a	47,26 ^c
Leptin	3,05 ^c	2,98 ^c	3,01 ^c	3,55 ^a	3,32 ^b

a,b,c: Aynı satırdaki farklı harfler istatistiksel önemliliği ifade etmektedir. $P < 0,05$

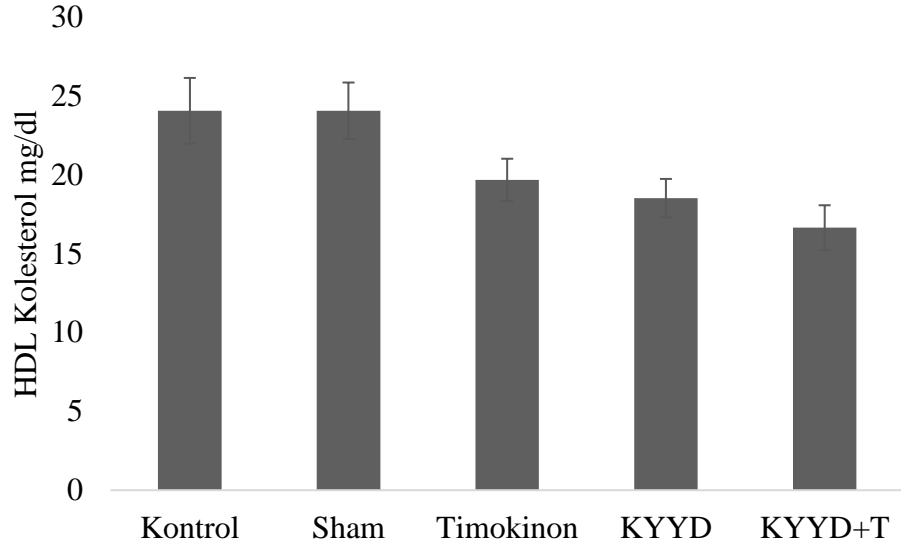
Biyokimyasal değerler bakımından, kontrol ve sham grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($P > 0,05$), ancak kontrol ve KYYD grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu görüldü. KYYD+T ile KYYD gurubundaki sıçanlar karşılaştırıldığında ise timokinon uygulamasının; total kolesterol, LDL, HDL, VLDL, trigliserid ve leptin değerlerini düşürdüğü istatistiksel olarak belirlendi ($P < 0,05$).



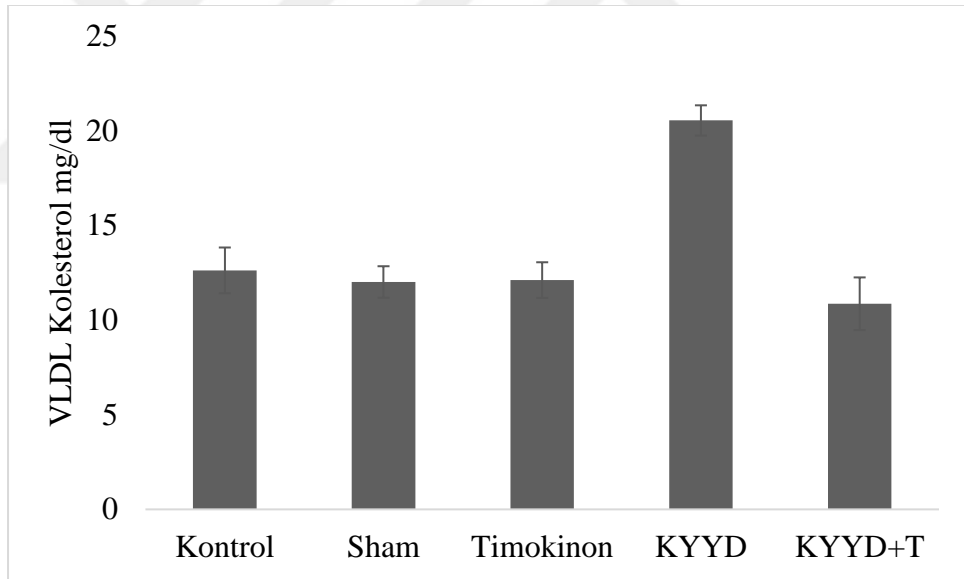
Şekil 5. Kontrol ve deney grubuna ait Total Kolesterol düzeyleri.



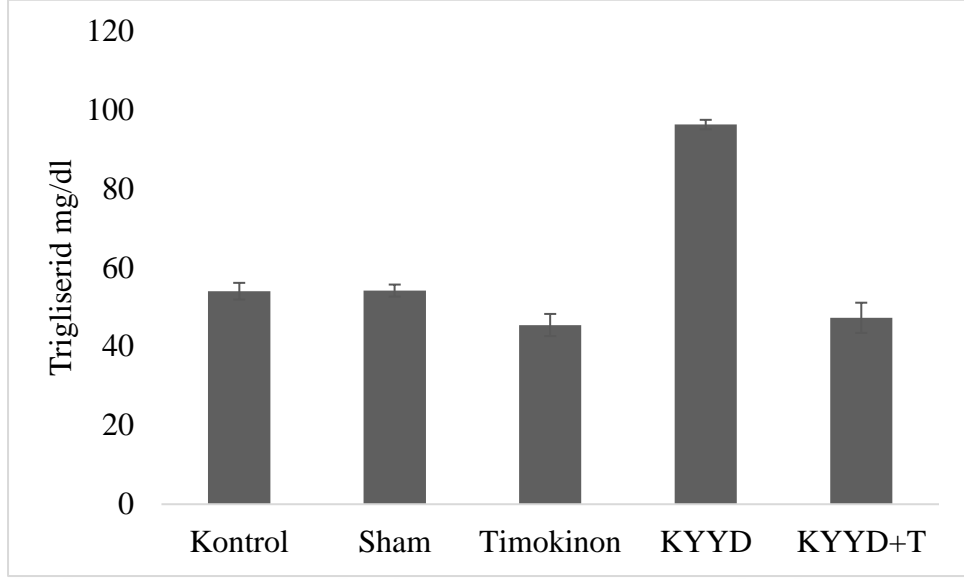
Şekil 6. Kontrol ve deney grubuna ait LDL Kolesterol düzeyleri.



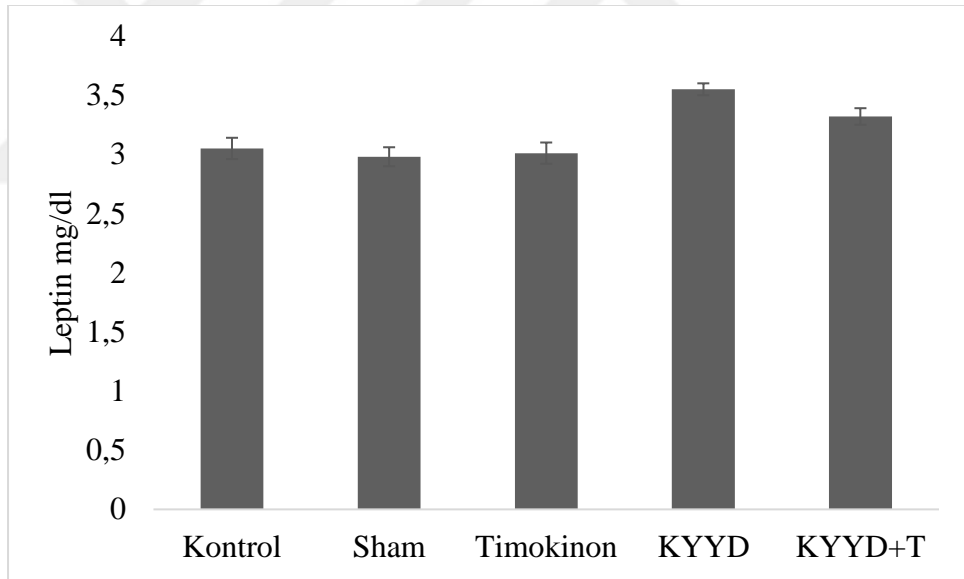
Şekil 7. Kontrol ve deney grubuna ait HDL Kolesterol düzeyleri.



Şekil 8. Kontrol ve deney grubuna ait VLDL Kolesterol düzeyleri.



Şekil 9. Kontrol ve deney grubuna ait Trigliseric düzeyleri.



Şekil 10. Kontrol ve deney grubuna ait Leptin düzeyleri.

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Vücutta aşırı miktarda yağ dokusu bulunması durumu obezite olarak adlandırılmakta ve günümüzde tedavi edilmesi gereken bir hastalık olarak kabul edilmektedir (Park ve ark. 2010, WHO 2016). VKİ oranı 25 kg/m^2 ve üzeri olanlar aşırı kilolu olarak görülmektedir (WHO 2016). Aşırı kilolu eşe sahip kadınların çocuk sahibi olma olasılığının incelenmesi bakımından 47835 kadın araştırılmış ve normal ağırlıktaki (VKİ = 18,5 – 24,5) erkek partnerlere sahip olan bireylere oranla aşırı kilolu eşe sahip bireylerin çocuk sahibi olamama olasılığının 1,49 kat fazla olduğu bildirilmiştir (Ramlau-Hansen ve ark. 2007). Ayrıca VKİ $25\text{-}30 \text{ kg/m}^2$ arasında olan erkeklerin infertilite oranının normal kilolu erkeklere oranla 1,19 kat daha fazla olduğu öne sürülmüştür (Nguyen ve ark. 2007). Özellikle de VKİ'si 30 kg/m^2 'den büyük bireylerde subfertilite riskinin 3 kat arttığı saptanmıştır (Magnusdottir ve ark. 2005). Ancak sperm sayısı ve motilitesi ile VKİ'i arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirtilmiştir (Pauli ve ark. 2008).

Farklı sürelerde ve farklı oranlarda yağ içeren rasyonlar kullanılarak hayvanlar üzerinde yağlı diyet ile beslenmenin etkilerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Toplam enerjinin %40'ı yağdan oluşan ve %1 oranında kolesterol içeren diyet ile 12 hafta boyunca beslenen sıçanların canlı ağırlık artışının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Sour ve ark. 2015). Toplam enerjinin %65'i eritilmiş hayvansal iç yağdan elde edilen yüksek yağlı diyet uygulamasında deney grubundaki sıçanların canlı ağırlık artışının kontrol grubuna göre daha az olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edilmiştir (Yeğın 2012). Yüksek yağlı diyet (%60) ve yüksek karbonhidrat diyeti (%69) ile 16 ve 20 hafta beslenen sıçanların canlı ağırlık artışları arasında anlamlı bir fark olmadığı öne sürülmüştür (Karaçor 2011). Toplam enerjinin %40'ının yağdan elde edildiği ve 9 hafta boyunca yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda canlı ağırlık bakımından kontrol gruplarına göre istatistiksel düzeyde anlamlı bir artış görülmesine rağmen testis ağırlığı

bakımından yağlı diyet grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir (Tüfek ve ark. 2015). Uzun vadeli yüksek yağlı diyet çalışmasında ise 24. haftaya kadar kontrol ve YYD gruplarına ait hayvanların vücut ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmediği ancak 24. haftadan itibaren devam eden YYD ile beslenmenin canlı ağırlıkta istatistiksel olarak anlamlı bir fark oluşturduğu rapor edilmiştir (Xu ve ark. 2010). İşbilen ve ark. (2007) yapmış oldukları bir çalışmada 5 ay süresince yüksek yağlı diyet ile beslemenin sıçanların canlı ağırlıklarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığını, yağlı diyet grubundaki sıçanların serum trigliserid ve total kolesterol seviyelerinin arttığı ancak i.p. olarak uygulanan dehidroepiandrosteron-sülfat (DHEAS)'ın trigliserid ve total kolesterol seviyelerini anlamlı bir biçimde azalttığı bildirilmiştir.

Toplam enerjinin %50'si yağdan karşılanacak şekilde hazırlanan farklı yağ türlerinden oluşan ve 16 hafta süren yüksek yağlı diyet çalışmasında sıçanların testis ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmediği bildirilmiştir (Campos-Silva ve ark. 2015). Yüksek yağlı diyet ile 8 hafta beslenen sıçanlarda canlı ağırlık istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterirken testis ağırlığı tersi bir durum sergileyerek istatistiksel olarak bir azalma göstermiştir (Yan ve ark. 2015). Başka bir yüksek yağlı diyet çalışmasında (enerjinin %12, %28, %44 ve %60 oranında yağ) 4 hafta boyunca beslenen sıçanlarda, düşük yağ oranı içeren (%12 ve %28) gruptaki sıçanlar ile yüksek yağ oranı (%44 ve %60) içeren grup arasında canlı ağırlıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Cha ve ark. 2000). Yemlerinde %50 oranında hayvansal yağ bulunan sıçanların 6 haftalık beslenmesi ile oluşturulan yüksek yağlı diyet araştırmasında kontrol grubuna kıyasla yağlı diyet ile beslenmenin istatistiksel olarak canlı ağırlığa etki etmediği ancak timokinonun 50 mg/kg oranında oral gavaj yolu ile verilmesinin hem kontrol hemde yüksek yağlı diyet grubunda canlı ağırlığı istatistiksel açıdan düşürdüğü görülmüştür (Bacak 2010).

Diyabet ve 12 hafta süresince yüksek yağlı diyetin testisler üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada sıçanların canlı ağırlık ve testis ağırlığında kontrol grubuna göre önemli bir artış olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark. 2016). Obezite oluşturulan sıçanlarda rezene ve kimyonun gavaj yolu ile uygulamasının leptin konsantrasyonu, canlı ağırlık ve testis yapısı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir başka çalışmada, obez grubuna ait sıçanların canlı ağırlıklarında 8 haftada %25 artış tespit edilmiştir. Rezene ve kimyon uygulamasının leptin düzeylerinde azalma ile birlikte canlı ağırlık kaybına neden olduğu bildirilmiştir (Nejatbakhsh ve ark. 2016).

Sunulan bu çalışmada toplam enerjinin %65'i yağdan elde edilen %2'lik kolesterol içeren yem ile 8 hafta boyunca beslenen sıçanlarla timokinon ilavesi yapılan sıçanların kontrol, sham ve timokinon grubuna göre canlı ağırlık ve testis ağırlık artışının istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P < 0,05$). Diğer literatürler ile karşılaştırıldığında canlı ağırlık ve testis ağırlığındaki artışın diyetin uygulama süresi ve diyet içerisindeki yağ, kolesterol ve diğer yem bileşikleri oranları ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Toplam enerjinin %40'nın yağdan karşılandığı 9 haftalık yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda seminifer tübül hacimlerinin kontrol grubuna göre daha düşük olmasına karşın timokinon uygulamasına tabi tutulan yüksek yağlı diyet grubundaki sıçanların seminifer tübül hacimlerinin kontrol grubu ile benzer olduğu belirlenmiştir (Tüfek ve ark. 2015). Bir başka çalışmada ise toplam enerjinin %50'sinin yağdan karşılandığı yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanların seminifer tübül çaplarının azaldığı belirtilmiştir (Campos-Silva ve ark. 2015). İskemi-reperfüzyon (I/R) uygulanan sıçanların testis dokusunda, seminifer tübüllerin çaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma söz konusu iken timokinon uygulaması ile seminifer tübül çaplarının normal değerlere ulaştığı bildirilmiştir (Erboga ve ark. 2016).

Çörek otu ailesinin diğer bir üyesi olan *Habbatus sauda* türüne ait uçucu yağın (6µL/100 g) ve nikotin (0,5 mg/100 g) uygulamasının sıçanlardaki etkisi

üzerine yapılan araştırmada, nikotin grubundaki sıçanların seminifer tübül çaplarında istatistiksel olarak bir değişikliğe neden olmamasına rağmen lümen çaplarında genişlemeler olduğu ve *Habbatus sauda* uygulaması ile lümen çaplarındaki genişliğin kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Cho Ping ve ark. 2014). Çörek otu tohumunun infertilite üzerine etkisini araştırmak amacıyla yapılan bir başka çalışmada ise toz halindeki çörek otu tohumlarının tuzlu suda çözdürülerek (300 mg/kg) oral gavaj yolu ile sıçanlara 60 gün boyunca uygulanması sonucunda canlı ağırlık artışında anlamlı bir fark tespit edilmemesine rağmen seminifer tübül çapları ile primer ve sekonder spermatozoid evrelerindeki spermatogenezin kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı gözlenmiştir (Mohammad ve ark. 2009).

Yüksek yağlı diyet ile 12 hafta boyunca beslenen sıçanların testis dokusunda Sertoli hücreleri ve spermatogoniumların sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma söz konusu iken astaksantin uygulaması ile Sertoli hücresi ve spermatogonium sayılarında istatistiksel olarak bir artış olduğu görülmüştür (Mortazavi ve ark. 2014). Metotrekrat'a karşı koruyucu etkilerini araştırmak için farelere yapılan 3 günlük 10 mg/kg oranındaki timokinon uygulamasının seminifer tübüllerde iyileşmeyi sağlayarak testis hasarını giderdiği gösterilmiştir (Gökçe ve ark. 2011). Kadmiyum ile testis hasarı oluşturulan bir başka çalışmada, timokinon uygulaması ile kadmiyumun oluşturduğu testis hasarının düzeltilebildiği görülmüştür (Fouad ve Jresat 2015). İskemi-reperfüzyon (I/R) uygulanan sıçanların testis dokularında oluşan hasarın timokinon uygulaması ile giderildiği tespit edilmiştir (Erboga ve ark. 2016). Vücutta aşırı demir birikiminin oksidatif strese ve tip 2 diyabete neden olabileceğinin vurgulandığı bir çalışmada yüksek yağlı diyetin canlı ağırlığını önemli ölçüde artırdığı, vücutta demir emilimini azaltarak depo edilmesinde rol oynadığı ve tip 2 diyabet oluşumuna katkı sağladığı düşünölmektedir (Yamano ve ark. 2015).

Yapılan bu çalışmada tüm gruplarda testis dokusunun histometrik incelemesinde KYYD grubuna ait sıçanların, seminifer tübül çaplarının diğer

gruplara göre istatistiksel olarak artış gösterdiği ancak timokinon uygulaması ile seminifer tübül çapında kontrol grubuna göre bir azalma meydana geldiği görüldü. Aynı zamanda histolojik olarak gruplar arasında bir farklılık gözlenmedi.

İnsan testisindeki peritübüler hücrelerin GDNF üreterek spermatogonial kök hücre nişinin oluşmasında katkı sağladığı bildirilmiştir (Spinnler ve ark. 2010). Aiyama ve ark. (2015), 2, 3 ve 8 haftalık hamster testisleri üzerinde yaptıkları çalışmada terminal seminifer tübüllerin sagittal kesitlerinde Sertoli hücrelerinde yüksek seviyelerde GDNF immünoaktivitesi olduğunu bildirmişlerdir. Yeni doğan farelerin testis dokularında yapılan çalışmada ise seminifer tübüllerin bazalinde kuvvetli derecede GDNF immünoaktivitesi görülürken yetişkin farelerin Sertoli hücrelerinde çok zayıf GDNF immünoaktivitesi görülmüştür. Spermatogonial kök hücre naklinden 3 ay sonra yapılan kontrollerde GDNF immünoaktivitesinin yoğun bir şekilde arttığını görmüşlerdir (Sato ve ark. 2011). GDNF immünoaktivitesinin 1 haftalık farelerde yüksek olduğu ve yaşın ilerlemesi ile birlikte GDNF immünoaktivitesinin belirgin bir biçimde azaldığı belirtilmiştir (Huleihel ve ark. 2013). Yeni doğan sıçanların testis dokularında GDNF immünoaktivitesinin Sertoli hücrelerinin sitoplazmasında yoğun bir şekilde görüldüğünü yaşın ilerlemesi ile birlikte GDNF immünoaktivitesinin testis ve böbrek dokusunda azalmasına karşın ovaryumda arttığı bildirilmiştir (Katoh-Semba ve ark. 2007).

Aşırı GDNF salınımının fare testisinde tümöre neden olduğu ve bunun sonucunda infertilitenin meydana geldiği bildirilmiştir (Meng ve ark. 2000, 2001). Chen ve ark. (2016) GDNF geninden yoksun farelerin erişkinliğe ulaştığında kısır olduklarını tespit etmişlerdir. GDNF sinyal iletiminin kesilmesi ile testis içerisinde 11 güne kadar spermatogonial kök hücrelerin gelişimini devam ettirdiği ve sonrasında gelişimin durduğu ancak yeniden GDNF sinyalinin tesis edilmesi ile spermatogonial kök hücrelerin tekrardan çoğalmaya başladığı bildirilmiştir (Savitt ve ark. 2012). GDNF'nin spermatogenez üzerine etkilerinin araştırılmasında kullanılan homozigot Ret

(V805) farelerde (C57BL/6J), GDNF uyarımı ile progenitör spermatogonial hücre sayısında artışın gözlemlendiği, GDNF'nin inhibe edilmesi ile progenitör spermatogonial hücre sayısında azalma meydana geldiği görülmüştür (Parker ve ark. 2014). Yetişkin farelerde spermatogonial kök hücrelerin endokrin düzenlenmesi üzerine yapılan bir araştırmada GDNF ekspresyonunun FSH ve androjen salınımı bölgelerinde arttığı, retinoik asit salınımının olduğu bölgelerde ise az miktarda olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçların testis içerisinde spermatogonial kök hücrelerin biyolojik aktivitelerinin düzenlenmesinde, çoğalmasında ve yenilenmesinde FSH'a yanıt olarak peritübüler miyoid hücreleri tarafından eksprese edilen GDNF'nin etkili olduğu kanaatine varılmıştır (Caires ve ark. 2012).

Yüksek yağlı diyet (enerjinin %60'ı yağdan karşılanan) ile indüklenen fareler üzerine yapılan çalışmada hipokampus, frontal korteks ve beyincikteki GDNF seviyeleri belirlenmiştir. Kontrol grubundaki GDNF seviyesinin YYD grubundaki sıçanlardan daha yüksek olduğu belirtilmiştir. YYD'in hipokampus, frontal korteks ve beyincikte GDNF salınımını engellediği ancak suda çözdürülmüş %5 ve %10'lu agapin uygulamasının hipokampus ve beyincikte GDNF salınımını arttırdığı bildirilmiştir (Franco-Robles ve López 2016). GDNF ekspresyonu artırılmış transgenetik farelerin vahşi tipteki farelere kıyasla canlı ağırlık ve vücut yağ oranlarının daha az olduğu, insülin direncine, dislipidemi, hiperlipidemi ve hepatik steatoza karşı daha dirençli oldukları ve vahşi tip farelere göre aktivite seviyelerinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir. GDNF ve reseptör agonistlerin obezitenin tedavisinde veya önlenmesinde kullanılabileceği öne sürülmektedirler (Mwangi ve ark. 2014).

Sunulan bu çalışmada, kontrol ve sham grubundaki sıçanların testis dokusunda primer spermatositler ile spermatidlerde kuvvetli, Leydig hücrelerinde orta derecede, timokinon grubundaki sıçanların testis dokularında primer spermatositlerde ve spermatidlerde zayıf, KYD grubundaki sıçanların testis dokularında primer spermatositlerde ve spermatidlerde orta derecede, KYD+T grubundaki sıçanların testis

dokularında ise primer spermatositlerde zayıf, spermatidlerde orta derecede sitoplazmik GDNF immünoaktivitesi görüldü. İmmünohistokimya ve Western blot verileri timokinonun GDNF ekspresyonunu azaltmada etkili olduğunu gösterdi.

Yüksek kolesterolle zenginleştirilmiş yem ile beslenen tavşanlarda serum kolesterol değerlerinin önemli ölçüde arttığı gösterilmiştir (Saez Lancellotti ve ark. 2010). Yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanların, normal diyet ve yüksek yağlı diyete ek olarak biyolojik bir antioksidan olan astaksantin verilen sıçanlara göre daha yüksek kolesterol, HDL, HDL/LDL ve trigliserid değerlerine sahip olduğu bildirilmiştir (Mortazavi ve ark. 2014). %5 kolesterol içeren yem ile beslenen sıçanların total kolesterol, LDL, HDL, leptin ve trigliserid değerlerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ($P<0,05$) belirtilmiştir (Altın 2013). Kolesterolü (%1) yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda LDL, total kolesterol ve leptin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu tespit edilmiştir (Sour ve ark. 2015). Yeğin (2012), yaptığı çalışmada yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanların total kolesterol, LDL, HDL ve trigliserid değerlerinin kontrol grubuna oranla istatistiksel açıdan önemli bir fark görülmediğini bildirmiştir. Timokinonun ise sıçanlarda trigliserid, HDL, LDL ve kolesterolü düşürerek hipokolesterolemik etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Bamosa ve ark. 2002).

Farklı düzeylerde yüksek yağlı diyet ile yapılan bir çalışmada deney gruplarındaki hayvanlarda, kontrol grubuna göre kan kolesterol seviyelerinin daha yüksek olduğu, hiperkolesterolemi olan tüm gruplarda ise hiperleptinemi olduğu saptanmıştır (Campos-Silva ve ark. 2015). Yemlerine %1 oranında kolesterol eklenen sıçanların 8 haftalık beslenme süreleri sonunda kontrol ve deney grubundaki sıçanlar karşılaştırıldığında total kolesterol, LDL, HDL ve trigliserid değerleri deney grubunda artış gösterdiği belirlenmiştir. Total kolesterol ve LDL değerlerinin timokinon uygulanan gruplarda istatistiksel olarak kontrol grubu ile benzer olduğu görülmüştür (Al-Naqeepa ve ark. 2009).

Yine farklı düzeylerde yüksek yağ içeren rasyonların uygulandığı bir çalışmada (%12, %28, %44 ve %60) düşük yağ oranı içeren (%12 ve %28) gruplarda leptin düzeyinin sabah, yüksek yağ oranı içeren (%44 ve %60) grupta ise öğleden sonra artış tespit edilmiştir (Cha ve ark. 2000). Yüksek yağ oranı içeren batı diyeti ile beslenen deney grubu farelerinin kontrol grubuna göre %65 daha yüksek GDNF konsantrasyonuna ve %753 daha yüksek Leptin oranına sahip oldukları, GDNF ve Leptin düzeylerinin birbiriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Baudry ve ark. 2012). Yüksek yağ oranı içeren diyet ile 8 hafta boyunca beslenen sıçanların serum leptin düzeylerinin kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış sergilediği gösterilmiştir (Yan ve ark. 2015). Yüksek yağlı diyet ile beslenmenin leptin, trigliserid, LDL ve VLDL seviyelerini önemli miktarda arttırdığı HDL seviyesini ise azalttığı, total kolesterol seviyelerinde önemli bir artışa neden olmadığı ancak timokinonun 50mg/kg oral gavaj yolu ile uygulanması ile leptin, trigliserid, LDL ve VLDL seviyelerinde önemli bir azalma söz konusu iken total kolesterol seviyesindeki düşüşün istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir (Bacak 2010).

Yüksek protein içeren peynir altı suyu konsantresinin yüksek yağlı diyet ile ilişkisinin incelenmesini amaçlayan çalışmada, peynir altı suyu verilen sıçanlarda yiyecek tüketiminin azaldığı ve buna bağlı olarak vücutta yağ birikiminin düştüğü belirlenmiştir. Yapılan biyokimyasal değerlendirmeler total kolesterol, LDL, trigliserid ve leptin seviyelerinin yüksek yağlı diyet grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldığını göstermesine rağmen serum HDL düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ortaya koymuştur (Hong ve ark. 2015). Yüksek yağlı diyet ile 10 hafta boyunca beslenen sıçanların serum trigliserid ve total kolesterollerindeki artışın kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve testiküler germ hücrelerinin apoptozis indekslerinin arttığı gösterilmiştir (Li ve ark. 2015).

Bu çalışmada total kolesterol, LDL, HDL, VLDL, trigliserid ve leptin değerlerindeki artışların Altın (2013) ile Mortazavi ve ark. (2014)'nın bulguları

ile, timokinon uygulaması sonrasında meydana gelen düşüşlerin ise Bamosa ve ark. (2002)'nin bulguları ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Bu çalışmada kolesterollü yüksek yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda i.p. yolla timokinon uygulamasının, testis ve canlı ağırlık artışı ile seminifer tübül çaplarının yanı sıra biyokimyasal değerler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ayrıca testis dokusundaki olası histolojik değişimler ile birlikte GDNF'nin ekspresyonu immünohistokimyasal ve Western blot analiz yöntemleri ile incelenmiştir.

Sonuç olarak, kolesterollü yüksek yağlı diyet ile beslenmenin, canlı ağırlık, testis ağırlığı ve seminifer tübül çapları ile serum total kolesterol, LDL, HDL, VLDL, trigliserid ve leptin değerlerini arttırmasına rağmen timokinon uygulaması ile bu değerlerin istatistiksel olarak kontrol grubuna benzer değerlere ulaşması timokinonun canlı ağırlık, testis ağırlığı ile biyokimyasal değerlerin normal sınırlara gerilemesinde tedavi edici bir ajan olarak kullanılabileceğini akla getirmektedir. Yüksek yağlı diyet ile beslenen hayvanlarda timokinon uygulamasının testis dokusunda GDNF ekspresyonunun azaltması da kolesterol, yağlı diyet ve timokinonun bu büyüme faktörünün salınımı üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

5. KAYNAKLAR

- Adam B, Kıyıcı A ve Ardıçoğlu Y: Temel ve Klinik Biyokimya (1. bs.). Konya: Nobel, 2013.
- Aiyama Y, Tsunekawa N, Kishi K, Kawasumi M, Suzuki H, Kanai-Azuma M, Kurohmaru M ve Kanai Y: A Niche for GFR α 1-positive spermatogonia in the terminal segments of the seminiferous tubules in hamster testes. stem cells, 33(9): 2811–2824, 2015.
- Al-Hader A, Aqel M ve Hasan Z: Hypoglycemic effects of the volatile oil of nigella sativa seeds. International Journal of Pharmacognosy, 31(2): 96–100, 1993.
- Al-Naqeepa G, Ismaila M ve Yazan LS: Effects of thymoquinone rich fraction and thymoquinone on plasma lipoprotein levels and hepatic low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes expression. Journal of Functional Foods, 1(3): 298–303, 2009.
- Altın M: Yüksek kolesterollü diyetle beslenen ratlarda ginsengin tnf- α , leptin ve bazı serum lipid parametreleri üzerine etkileri. Selçuk Üniversitesi, 2013.
- Aughey E ve Frye FL: Comparative veterinary histology with clinical correlates. Manson Publishing Ltd, 2001.
- Bacak E: Yağlı diyet ile beslenen sıçanlarda timokinon'un plazma leptin, karnitin, paraoksanaz, tiroid hormonları, insülin ve glikoz ile lipid profiline etkilerinin araştırılması, 2010.
- Bacha WJ ve Bacha LM: Color Atlas of Veterinary Histology (3. Baskı.). Wiley-Blackwell, 2012.
- Bamosa AO, Ali BA ve al-Hawsawi ZA: The effect of thymoquinone on blood lipids in rats. Indian Journal of Physiology and Pharmacology, 46(2): 195–201, 2002.
- Barnett R.: Obesity. The Lancet, 365(9474): 1843, 2005.

- Baudry C, Reichardt F, Marchix J, Bado A, Schemann M, des Varannes SB, Neunlist M ve Moriez R: Diet-induced obesity has neuroprotective effects in murine gastric enteric nervous system: involvement of leptin and glial cell line-derived neurotrophic factor. *The Journal of Physiology*, 590(Pt 3): 533–544, 2012.
- Baytop, T.: Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi. İ.Ü. Yayınları No:3255, 1984.
- Bliznakov EG: Lipid lowering drugs statins cholesterol and coenzyme Q10 The Baycol case a modern Pandora’s box, 56(1): 56–59, 2002.
- Brown M.S. ve Goldstein J.L.: Receptor-mediated control cholesterol metabolism, *Science*, 191(4223), 150-154, 1976.
- Buettner R, Schölmerich J ve Bollheimer LC: High-fat Diets: Modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity*, 15(4): 798–808, 2007.
- Caires KC, de Avila J ve McLean DJ: Endocrine regulation of spermatogonial stem cells in the seminiferous epithelium of adult mice. *BioResearch Open Access*, 1(5): 222–230, 2012.
- Campbell NA ve Reece JB, 2008, *Biology, Biyoloji*, 1. Baskı, 2008, Gündüz E, Demirsoy A ve Türkan İ, Palme, Ankara.
- Campos-Silva P, Furriel A, Costa WS, Sampaio FJB ve Gregório BM: Metabolic and testicular effects of the long-term administration of different high-fat diets in adult rats. *International Brazilian Journal of Urology: Official Journal Of The Brazilian Society Of Urology*, 41(3): 569–575, 2015.
- Catalano PM: Management of obesity in pregnancy. *Obstetrics and Gynecology*, 109(2 Pt 1): 419–433, 2007.
- Cha MC, Chou CJ ve Boozer CN: High-fat diet feeding reduces the diurnal variation of plasma leptin concentration in rats. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 49(4): 503–507, 2000.
- Charlton-Menys V ve Durrington PN: Human cholesterol metabolism and therapeutic molecules. *Experimental Physiology*, 93(1): 27–42, 2008.

- Chen L-Y, Willis WD ve Eddy EM: Targeting the Gdnf Gene in peritubular myoid cells disrupts undifferentiated spermatogonial cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(7): 1829–1834, 2016.
- Chen Y, Wu Y, Gan X, Liu K, Lv X, Shen H, Dai G ve Xu H: Iridoid glycoside from *Cornus officinalis* ameliorated diabetes mellitus-induced testicular damage in male rats: Involvement of suppression of the AGEs/RAGE/p38 MAPK signaling pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, 194: 850–860, 2016.
- Cho Ping N, Hashim NH ve Hasan Adli DS: Effects of nigella sativa (*Habbatus sauda*) oil and nicotine chronic treatments on sperm parameters and testis histological features of rats. *Evidence-based Complementary and Alternative medicine : eCAM*, 2014, 2014.
- Collins TJ: *ImageJ for microscopy*, 2007.
- Darakhshan S, Bidmeshki Pour A, Hosseinzadeh Colagar A ve Sisakhtnezhad S: Thymoquinone and its therapeutic potentials. *Pharmacological Research*, 95–96: 138–158, 2015.
- El-Saleh SC, Al-Sagair OA ve Al-Khalaf MI: Thymoquinone and *Nigella sativa* oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *International Journal of Cardiology*, 93(1): 19–23, 2004.
- Erboga M, Aktas C, Kurt O, Uygur R, Caglar V, Turan BC, Topcu B, Fidanol Erboga Z, Gurel A ve Ozen OA: Protective effects of thymoquinone on experimental testicular ischaemia-reperfusion injury: an apoptotic, proliferative and biochemical study. *Andrologia*, 48(2): 222–230, 2016.
- Erdemir F, Fırat F ve Gençten Y: Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi ve klinik önemi. *Türk Üroloji Seminerleri*, (9): 11–17, 2011.
- Ergün L: *Histoloji Atlası Uygulama Kılavuzu* (1. bs.). Fenomen Yayınları, 2012.
- Fejes I, Koloszar S, Závaczki Z, Daru J, Szöllösi J ve Pál A: Effect of body weight on testosterone/estradiol ratio in oligozoospermic patients. *Archives of Andrology*, 52(2): 97–102, 2006.

- Fouad AA ve Jresat I: Thymoquinone therapy abrogates toxic effect of cadmium on rat testes. *Andrologia*, 47(4): 417–426, 2015.
- Franco-Robles E ve López MG: Agavins increase neurotrophic factors and decrease oxidative stress in the brains of high-fat diet-induced obese mice. *Molecules*, 21(8): 998, 2016.
- Friedman JM ve Halaas JL: Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395(6704): 763–770, 1998.
- Golden JP, DeMaro JA, Osborne PA, Milbrandt J ve Johnson EM Jr: Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature Mouse. *Exp Neurol*, 158(2): 504-528, 1999.
- Gökçe A, Oktar S, Koc A ve Yonden Z: Protective effects of thymoquinone against methotrexate-induced testicular injury. *Human & Experimental Toxicology*, 30(8): 897–903, 2011.
- Gnanapavan S, Kola B, Bustin SA, Morris DG, McGee P, Fairclough P, Bhattacharya S, Carpenter R, Grossman AB ve Korbonits M: The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(6): 2988, 2002.
- Güleç G, Hassa H, Yalçın EG ve Yenilmez Ç: Tedaviye başvuran infertil çiftlerde, infertilitenin cinsel işlev ve çift uyumuna etkisinin değerlendirilmesi. *Türk Psikiyatri Dergisi*, 3(22): 166–176, 2011.
- Halawi E: Antibacterial activity of thymoquinone and thymohydroquinone of nigella sativa l. and their interaction with some antibiotics. *Advances in Biological Research*, 3(5–6): 148–152, 2009.
- Hassa O ve Aştı RN: *Embriyoloji*. Ankara: Yorum Matbaacılık, 2010.
- Hawsawi ZA, Ali BA ve Bamosa AO: Effect of Nigella sativa (Black Seed) and thymoquinone on blood glucose in albino rats. *Annals of Saudi Medicine*, 21(3–4): 242–244, 2001.

- He Z, Jiang J, Hofmann M-C ve Dym M: Gfra1 Silencing in mouse spermatogonial stem cells results in their differentiation via the inactivation of RET tyrosine kinase. *Biology of Reproduction*, 77(4): 723–733, 2007.
- Heidargholizadeh S: Erkek İnfertilitesi Üzerinde Sertoli Hücrelerinin Etkisinin Araştırılması, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara 2015.
- Hergenç G: Kan yağları kolesterol ateroskleroz ve risk faktörleri. İstanbul: Nobel Kitap Dağıtım, 2012.
- Hickey MS, Houmard JA, Considine RV, Tyndall GL, Midgette JB, Gavigan KE, Weidner ML, McCammon MR, Israel RG ve Caro JF: Gender-dependent effects of exercise training on serum leptin levels in humans. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 272(4): E562–E566, 1997.
- Hofmann M-C: Gdnf signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Molecular and Cellular Endocrinology*, Special Issue: Stem cells and progenitors in organ maintenance, regeneration and replacement: the role of hormones and growth factors in health and disease, 288(1–2): 95–103, 2008.
- Hong S-M, Chung E-C ve Kim C-H: Anti-obesity effect of fermented whey beverage using lactic acid bacteria in diet-induced obese rats. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 35(5): 653–659, 2015.
- Houghton PJ, Zarka R, de las Heras B ve Hoult JR: Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Medica*, 61(1): 33–36, 1995.
- Huleihel M, Fadlon E, AbuElhija A, Piltcher Haber E ve Lunenfeld E: Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induced migration of spermatogonial cells in vitro via MEK and NF- κ B pathways. *Differentiation*, 86(1–2): 38–47, 2013.

- Ikonen E: Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2): 125–138, 2008.
- İşbilen B, Arı Z, Var A, Onur E ve Uyanık BS: Yüksek yağ içeren diyet ile beslenen ratlarda DHEAS'ın leptin, lipid profili ve endotel fonksiyonu üzerine etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi*, 21(3): 109–116, 2007.
- Junqueira LC ve Carneiro J, 2009, *Basic Histology, Temel Histoloji*, Solakoğlu S ve AYTEKİN Y, Nobel, İstanbul.
- Karaçor K: Yüksek Yağlı Diyetin Rat Karaciğeri Üzerine Etkileri. Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Alan Tezi, Düzce, 2011.
- Katoh-Semba R, Tsuzuki M, Miyazaki N, Yoshida A, Nakajima H, Nakagawa C, Kitajima S ve Matsuda M: Distribution and immunohistochemical localization of GDNF protein in selected neural and non-neural tissues of rats during development and changes in unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Neuroscience Research*, 59(3): 277–287, 2007.
- Keller P, Keller C, Steensberg A, Robinson LE ve Pedersen BK: Leptin gene expression and systemic levels in healthy men: effect of exercise, carbohydrate, interleukin-6, and epinephrine. *Journal of Applied Physiology*, 98(5): 1805–1812, 2005.
- Khan A, Chen H, Tania M ve Zhang D: Anticancer Activities of *Nigella sativa* (Black cumin). *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 8(5 Suppl): 226–232, 2011.
- Kierszenbaum AL: *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. (R. Demir, Çev.). Ankara: Palme, 2006.
- Klok MD, Jakobsdottir S ve Drent ML: The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: a review. *Obesity Reviews*, 8(1): 21–34, 2007.
- Kolaczynski JW, Ohannesian JP, Considine RV, Marco CC ve Caro JF: Response of leptin to short-term and prolonged overfeeding in humans.

- The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 81(11): 4162–4165, 1996.
- Kort HI, Massey JB, Elsner CW, Mitchell-Leef D, Shapiro DB, Witt MA ve Roudebush WE: Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. *Journal of Andrology*, 27(3): 450–452, 2006.
- Levine JA, Eberhardt NL ve Jensen MD: Leptin responses to overfeeding: relationship with body fat and nonexercise activity thermogenesis. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84(8): 2751–2754, 1999.
- Li C, Dong Z, Lan X, Zhang X ve Li S: [Endoplasmic reticulum stress promotes the apoptosis of testicular germ cells in hyperlipidemic rats]. *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal of Andrology*, 21(5): 402–407, 2015.
- Lichtenstein AH: Effects of Diet and Exercise on Cholesterol Levels. *New England Journal of Medicine*, 339(21): 1552–1553, 1998.
- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S ve Collins F: GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 260(5111): 1130–1132, 1993.
- Magnusdottir EV, Thorsteinsson T, Thorsteinsdottir S, Heimisdottir M ve Olafsdottir K: Persistent organochlorines, sedentary occupation, obesity and human male subfertility. *Human Reproduction*, 20(1): 208–215, 2005.
- Mascarenhas MN, Flaxman SR, Boerma T, Vanderpoel S ve Stevens GA: National, regional, and global trends in infertility prevalence since 1990: A Systematic Analysis of 277 Health Surveys. *PLoS Medicine*, 9(12), 2012.
- Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, Rooij DG de, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarma M ve Sariola H: Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, 287(5457): 1489–1493, 2000.

- Meng X, Rooij DG de, Westerdahl K, Saarma M ve Sariola H: Promotion of seminomatous tumors by targeted overexpression of Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor in mouse testis. *Cancer Research*, 61(8): 3267–3271, 2001.
- Mergen BE, Mergen H, Öngel K, Tavlı T ve Tavlı V: Lipoprotein metabolizması hastalıkları ve tedavisine yaklaşım. *Türkiye Aile Hekimliği Dergisi*, 14(1): 38–45, 2010.
- Mohammad M, Mohamad MM ve Daradka HM: Effects of Black Seeds (*Nigella sativa*) on Spermatogenesis and. *Research Journal of Medicine and Medical Sciences*, 4(2): 386–390, 2009.
- Moore MW, Klein RD, Fariñas I, Sauer H, Armanini M, Phillips H, Reichardt LF, Ryan AM, Carver-Moore K ve Rosenthal A: Renal and neuronal abnormalities in mice lacking GDNF. *Nature*, 382(6586): 76–79, 1996.
- Morsi NM: Antimicrobial effect of crude extracts of *Nigella sativa* on multiple antibiotics-resistant bacteria. *Acta Microbiologica Polonica*, 49(1): 63–74, 2000.
- Mortazavi M, Salehi I, Alizadeh Z, Vahabian M ve Roushandeh AM: Protective effects of antioxidants on sperm parameters and seminiferous tubules epithelium in high fat-fed rats. *Journal of Reproduction & Infertility*, 15(1): 22–28, 2014.
- Mwangi SM, Nezami BG, Obukwelu B, Anitha M, Marri S, Fu P, Epperson MF, Le N-A, Shanmugam M, Sitaraman SV, Tseng Y-H, Anania FA ve Srinivasan S: Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against high-fat diet-induced obesity. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 306(6): G515–G525, 2014.
- Mwangi SM, Peng S, Nezami BG, Thorn N, Farris AB, Jain S, Laroui H, Merlin D, Anania F ve Srinivasan S: Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against high-fat diet-induced hepatic steatosis by suppressing hepatic PPAR- γ expression. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 310(2): G103–G116, 2016.

- Nejabatbakhsh R, Riyahi S, Farrokhi A, Rostamkhani S, Mahmazi S, Yazdinezhad A, Kazemi M ve Shokri S: Ameliorating effects of fennel and cumin extracts on sperm quality and spermatogenic cells apoptosis by inducing weight loss and reducing leptin concentration in diet-induced obese rats. *Andrologia*, 2016.
- Nguyen RHN, Wilcox AJ, Skjærven R ve Baird DD: Men's body mass index and infertility. *Human Reproduction*, 22(9): 2488–2493, 2007.
- Ovalle WK ve Nahirney PC: *Netter's Essential Histology* (2. bs.), 2013.
- Özer A: *Veteriner Özel Histoloji* (2. bs.). Nobel Kitap Dağıtım, 2010.
- Park HR, Park M, Choi J, Park K-Y, Chung HY ve Lee J: A high-fat diet impairs neurogenesis: Involvement of lipid peroxidation and brain-derived neurotrophic factor. *Neuroscience Letters*, 482(3): 235–239, 2010.
- Parker N, Falk H, Singh D, Fidaleo A, Smith B, Lopez MS, Shokat KM ve Wright WW: Responses to glial cell line-derived neurotrophic factor change in mice as spermatogonial stem cells form progenitor spermatogonia which replicate and give rise to more differentiated progeny. *Biology of Reproduction*, 91(4), 2014.
- Pauli EM, Legro RS, Demers LM, Kunselman AR, Dodson WC ve Lee PA: Diminished paternity and gonadal function with increasing obesity in males. *Fertility and sterility*, 90(2): 346–351, 2008.
- Pereira DIA ve Gibson GR: Effects of Consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 37(4): 259–281, 2002.
- Poongothai J, Gopenath TS ve Manonayaki S: Genetics of human male infertility. *Singapore Medical Journal*, 50(4): 336–347, 2009.
- Prabhakar P, Reeta KH, Maulik SK, Dinda AK ve Gupta YK: Protective effect of thymoquinone against high-fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *European Journal of Nutrition*, 54(7): 1117–1127, 2015.

- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Nohr EA, Bonde JP, Sørensen TIA ve Olsen J: Subfecundity in overweight and obese couples. *Human Reproduction*, 22(6): 1634–1637, 2007.
- Rasband W: Image J., 2016.
- Saez Lancellotti TE, Boarelli PV, Monclus MA, Cabrillana ME, Clementi MA, Espínola LS, Cid Barría JL, Vincenti AE, Santi AG ve Fornés MW: Hypercholesterolemia impaired sperm functionality in rabbits. *PLoS ONE*, 5(10), 2010.
- Sağlık Bakanlığı Sağlık Araştırmaları Genel Müdürlüğü, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Türkiye Beslenme ve Sağlık Araştırması 2010: Beslenme Durumu ve Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi Sonuç Raporu. Sağlık Bakanlığı Yayın No: 931, Ankara 2014.
- Salem ML: Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed. *International immunopharmacology*, 5(13–14): 1749–1770, 2005.
- Sallmen M, Sandler DP, Hoppin JA, Blair A ve Baird DD: Reduced fertility among overweight and obese men: *Epidemiology*, 17(5): 520–523, 2006.
- Satman I, Yılmaz T, Sengül A, Salman S, Salman F, Uygur S, Bastar I, Tütüncü Y, Sargin M, Dinççag N, Karsidag K, Kalaça S, Özcan C ve King H: Population-Based study of diabetes and risk characteristics in Turkey. *Diabetes Care*, 25(9): 1551–1556, 2002.
- Sato T, Aiyama Y, Ishii-Inagaki M, Hara K, Tsunekawa N, Harikae K, ... Kanai Y: Cyclical and patch-like GDNF distribution along the basal surface of sertoli cells in mouse and hamster testes. *PLoS ONE*, 6(12), 2011.
- Savitt J, Singh D, Zhang C, Chen L, Folmer J, Shokat KM ve Wright WW: The in vivo response of stem and other undifferentiated spermatogonia to

- the reversible inhibition of GDNF signaling in the adult. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 30(4): 732–740, 2012.
- Sayed MM, Hassanein KMA ve Senosy W: Protective effects of thymoquinone and l-cysteine on cadmium-induced reproductive toxicity in rats. *Toxicology Reports*, 1: 612–620, 2014.
- Sour S, Belarbi M, Sari N, Benammar CH, Baghdad CH ve Visioli F: Argan oil reduces, in rats, the high fat diet-induced metabolic effects of obesity. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 25(4): 382–387, 2015.
- Spinnler K, Köhn FM, Schwarzer U ve Mayerhofer A: Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Human Reproduction*, 25(9): 2181–2187, 2010.
- SPSS: SPSS for Windows, Release 18.0, Copy right (IBM Ltd. 1935-2017), Jul 30 2009.
- Suguna P, Geetha A, Aruna R ve Siva GV: Effect of thymoquinone on ethanol and high fat diet induced chronic pancreatitis a dose response study in rats. *Indian Journal of Experimental Biology*, 51(4): 292–302, 2013.
- Şahinkanat T ve Okur N: Atnalı böbreğe eşlik eden aksesuar böbrek: ender bir oluşum. *Türk Üroloji Dergisi*, 33(3): 372–374, 2007.
- Şengül Y: Doğal akut babesiosis’li koyunlarda serum lipit profili ve lipoprotein düzeylerinin incelenmesi, Yüzüncü Yıl Üniv, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2012.
- Taba Taba Vakili S, Kailar R, Rahman K, Nezami BG, Mwangi SM, Anania FA ve Srinivasan S: Glial cell line–derived neurotrophic factor–induced mice liver defatting: A novel strategy to enable transplantation of steatotic livers. *Liver Transplantation*, 22(4): 459–467, 2016.
- Tabachnick B ve Fidell L: *Using multivariate statistics* (6. Baskı.). Boston: Pearson, 2013.

- Tadokoro Y, Yomogida K, Ohta H, Tohda A ve Nishimune Y: Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mechanisms of Development*, 113(1): 29–39, 2002.
- Thabrew MI, Mitry RR, Morsy MA ve Hughes RD: Cytotoxic effects of a decoction of *Nigella sativa*, *Hemidesmus indicus* and *Smilax glabra* on human hepatoma HepG2 cells. *Life Sciences*, 77(12): 1319–1330, 2005.
- Tok E ve Aslım B: Probiyotik olarak kullanılan bazı laktik asit bakterilerinin kolesterol asimilasyonu ve safra tuzları dekonjugasyonundaki rolleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 37(1): 62–68, 2007.
- Topdemir Koçyiğit O: İnfertilite ve sosyo-kültürel etkileri. *İnsan Bilim Dergisi*, 1(1): 27–38, 2012.
- Tschöp M, Weyer C, Tataranni PA, Devanarayan V, Ravussin E ve Heiman ML: Circulating Ghrelin Levels Are Decreased in Human Obesity. *Diabetes*, 50(4): 707–709, 2001.
- Tüfek NH, Altunkaynak ME, Altunkaynak BZ ve Kaplan S: Effects of thymoquinone on testicular structure and sperm production in male obese rats. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 61(4): 194–204, 2015.
- Ueno H, Yamaguchi H, Kangawa K ve Nakazato M: Ghrelin: a gastric peptide that regulates food intake and energy homeostasis. *Regulatory Peptides, Satellite Symposium on G-Protein-Coupled Receptors (GPCRs) (held during the 6th International Symposium on VIP, PACAP and Related Peptides)*, 126(1–2): 11–19, 2005.
- Vance DE ve Van den Bosch H: Cholesterol in the year 2000. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, Cholesterol in the year 2000, 1529(1–3): 1–8, 2000.
- Vargas-Leal V: Expression and function of GDNF family ligands and their receptors by human immune cells. *Münih*, 2003.

- WHO: Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Geneva: WHO, 2000.
- WHO: World Health Report 2002. Geneva: WHO, 2002.
- WHO: WHO | Obesity and overweight. WHO, 2016.
- Woo CC, Kumar AP, Sethi G ve Tan KHB: Thymoquinone: potential cure for inflammatory disorders and cancer. *Biochemical Pharmacology*, 83(4): 443–451, 2012.
- Xu Z-J, Fan J-G, Ding X-D, Qiao L ve Wang G-L: Characterization of High-Fat, Diet-Induced, Non-alcoholic Steatohepatitis with Fibrosis in Rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(4): 931, 2010.
- Yamano N, Ikeda Y, Sakama M, Izawa-Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Miyamoto L, Tomita S, Tsuchiya K ve Tamaki T: A Long-Term High-Fat Diet Changes Iron Distribution in the Body, Increasing Iron Accumulation Specifically in the Mouse Spleen. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61(1): 20–27, 2015.
- Yan W, Mu Y, Yu N, Yi T, Zhang Y, Pang X, Cheng D ve Yang J: Protective effects of metformin on reproductive function in obese male rats induced by high-fat diet. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 32(7): 1097–1104, 2015.
- Yeğin B: Erken Gelişim dönemlerinden itibaren yüksek yağ içerikli diyetle beslenen yavrularda hippocampus morfolojisinin stereolojik yöntemlerle incelenmesi ve davranış parametreleriyle karşılaştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, 2012.
- Yılmaz FÇ ve Yardımcı H: Beden kütle indeksinin infertilite üzerine etkisi. *Hacettepe University Faculty of Health Sciences Journal*, 1(0), 2015.
- Yomogida K, Yagura Y, Tadokoro Y ve Nishimune Y: Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse sertoli cells. *Biology of Reproduction*, 69(4): 1303–1307, 2003.

Zaoui A, Cherrah Y, Alaoui K, Mahassine N, Amarouch H ve Hassar M: Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(1): 23–26, 2002.

Zeng Q, Cheng Y, Zhu Q, Yu Z, Wu X, Huang K, Zhou M, Han S ve Zhang Q: The relationship between over-expression of glial cell-derived neurotrophic factor and its ret receptor with progression and prognosis of human pancreatic cancer. *Journal of International Medical Research*, 36(4): 656–664, 2008.



6. ÖZGEÇMİŞ

05.01.1984 yılı ANKARA/Çubuk doğumluyum. İlk okul öğrenimimi Tekirdağ-Saray, Orta ve Lise öğrenimimi Bursa-İnegöl'de tamamladım. 2001-2006 yılları arasında Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde Lisans eğitimimi tamamladım. 2010 yılında Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Anabilim Dalında Tezsiz Yüksek Lisansımı, 2012 yılında ise Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Tezli Yüksek lisans eğitimimi tamamladım. 2012 yılında Kafkas Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Doktora eğitimine başladım.