

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA KADMIYUM'UN TOKSİK VE
QUERCETİN'İN KORUYUCU ETKİLERİNİN MİTOFAJİ İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra KAVRAM SARIHAN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji ve Embriyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

KOCAELİ
2023

T.C.
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA KADMIYUM'UN TOKSİK VE
QUERCETİN'İN KORUYUCU ETKİLERİNİN MİTOFAJİ İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Kübra KAVRAM SARIHAN

Kocaeli Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Histoloji ve Embriyoloji Programı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ

Bu Tez Çalışması Kocaeli Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi Tarafından
Desteklenmiştir.

KOÜ BAP Proje Numarası: TDK- 2021-2506
Etik Kurul Onay Numarası: KOÜ HADYEK 1/ 2-2021

KOCAELİ

2023

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Sıçan Testis Dokusunda Kadmiyum'un Toksik ve Quercetin'in Koruyucu Etkilerinin Mitofaji ile İlişkisinin Araştırılması

Tez Yazarı: Kübra KAVRAM SARIHAN

Tez Savunma Tarihi: 19.06.2023

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		
UNVANI	ADI SOYADI	İMZA
BAŞKAN (ÜYE)		
DANIŞMAN (ÜYE)		
ÜYE		
ÜYE		
ÜYE		
ÜYE		

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

.... / /2023

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA KADMIYUM'UN TOKSİK VE QUERCETİN'İN KORUYUCU ETKİLERİNİN MİTOFAJİ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Kadmiyum'un testis dokusuna verdiği hasarın mitofaji üzerinden gerçekleşip gerçekleşmediğinin belirlenmesi ve Quercetin'in testis hasarı üzerindeki koruyucu etkisinin incelenmesidir.

Yöntem: Deneylerimizde 8 haftalık Wistar albino cinsi erkek sıçanlar kullanılmıştır. Kontrol gruplarında 6, deney gruplarında 7'şer hayvan olacak şekilde 10 grup oluşturulmuştur. Bu gruplar 0.gün kontrol, 1., 3. ve 5. hafta kontrol, kadmiyum ve kadmiyum+quercetin'dir. Kontrol grubunda ki sıçanlara her gün 1 ml %0,9'lük salin, kadmiyum grubuna 1 mg/kg kadmiyum, kadmiyum+quercetin grubuna 1 mg/kg kadmiyum+50 mg/kg quercetin intraperitoneal olarak 1 hafta, 3 hafta ve 5 hafta süreyle uygulanmıştır. Dokular toplandıktan sonra in vivo çalışmalarda uygulanmak üzere histomorfolojik yapıyı değerlendirmek için Hematoksilen&Eozin (H&E) boyaması gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte mitofaji ile ilgili PINK1, Parkin, TOM20 ve LC3 proteinlerinin miktarsal analizleri ve hücresel dağılımları Western blot ve immüno Floresan analizleri ile değerlendirilmiştir. Bunların yanında mitokondri üzerinde kadmiyumun verdiği hasar ve quercetin'in koruyucu etkilerinin ultrastrüktürel yapısı Geçirimli Elektron Mikroskopi (TEM) ile incelenmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel karşılaştırılmaları SPSS programı ile analiz edilmiştir.

Bulgular: Sıçanlardan alınan testis dokuları H&E, immünohistokimya ve geçirimli elektron mikroskopi yöntemleri için takip edilmiş ve Western blot analizi için ise protein özütleri hazırlanmıştır. Kadmiyum'un testis dokusuna verdiği hasar ve Quercetin'in koruyucu özelliği histolojik olarak ortaya konulmuştur. Ayrıca mitofajik proteinlerden olan PINK1, Parkin, LC3 ve TOM20'nin ekspresyon yoğunlukları ve protein miktarları immüno Floresan yöntemiyle belirlenerek Western blot yöntemi ile de desteklenmiştir. TEM ile testisin ultrastrüktürel yapısıyla beraber mitokondri şekli, krista yapıları gösterilmiştir.

Sonuç: Ülkemiz ve dünyada sigara başta olmak üzere kadmiyum toksisitesi kaynaklarının yol açtığı testis hasarının ve buna bağlı olarak üreme sağlığı sorunları ve infertilitenin anlaşılması ve antioksidanların kullanılarak bu sorunların giderilmeye çalışılması sosyal açıdan toplum sağlığının iyileştirilmesine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, Quercetin, Mitofaji, Testis, Mitokondri



ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN THE EFFECTS OF CADMIUM TOXICITY AND QUERCETIN PROTECTIVITY WITH MITOPHAGY IN RAT TESTIS TISSUE

Background: Aim of this study is to determine whether the damage caused by cadmium to the testicular tissue occurs through mitophagy and to examine the protective effect of Quercetin on testicular damage.

Method: 8-weeks-old male Wistar albino rats were used in our experiments. 10 groups were formed, with 6 animals in the control groups and 7 animals in each experimental group. These groups are day 0 control, 1st, 3rd and 5th week control, cadmium and cadmium+quercetin. The rats in the control group received 1 ml of 0.9% saline every day, the rats in the cadmium group 1 mg/kg cadmium, the rats in the cadmium+quercetin group 1 mg/kg cadmium+50 mg/kg quercetin intraperitoneally for 1 week, 3 weeks and 5 week during the experiment. After the tissues were collected, Hematoxylin & Eosin (H&E) staining was performed to evaluate the histomorphological structure for *in vivo* studies. In addition, quantitative analyzes and cellular distributions of PINK1, Parkin, TOM20 and LC3, which are mitophagy-related proteins, were evaluated by Western blot and immunofluorescence analyses. Besides, cadmium-induced mitochondrial damage and the protective effects of quercetin on this were investigated with the Transmission Electron Microscopy at the ultrastructural level. All data were analyzed with SPSS programme.

Result: Testicular tissues from rats were processed for H&E staining, immunohistochemistry and transmission electron microscopy methods, and protein extracts were prepared for Western blot analysis. In histological sections, the damage of cadmium to the testicular tissue and the protective effects of Quercetin have been demonstrated. Furthermore, the expression intensities and protein amounts of PINK1, Parkin, LC3 and TOM20, which are mitophagic proteins, were determined by immunofluorescence analysis and supported by Western blot technique. In addition to the ultrastructural morphology of the testis, the shape of the mitochondria and cristae structures of testicular cells were shown by TEM.

Conclusion: Understanding the testicular damage caused by cadmium toxicity sources, especially cigarette smoking, and reproductive health problems and infertility in our country and the world, and eliminating these problems by using antioxidants will contribute to the improvement of public health in social terms.

Keywords: Cadmium, Quercetin, Mitophagy, Testis, Mitochondria



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında hiçbir desteğini esirgemeyen, bugüne gelmemde büyük emeği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Melda YARDIMOĞLU YILMAZ'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aktararak, her konuda yol gösteren kıymetli hocalarım Prof. Dr. Fatma Süreyya CEYLAN'a, Prof. Dr. Serdar FİLİZ'e, Prof. Dr. Süheyla GONCA'ya,

Tezimin konfokal mikroskopik incelemesinde bilgisi ve engin deneyimi ile bana her daim yol gösteren kıymetli hocam Prof. Dr. Yusufhan YAZIR'a ve her zaman yanımda olan canım arkadaşım Araş. Gör. Dr. Selenay FURAT RENÇBER'e,

Tezimin elektron mikroskopik incelemesini sağlayan, bilgisini ve deneyimini esirgemeyen Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU'na ve Dr. Öğr. Üyesi Tuğba EKİZ YILMAZ'a,

Laboratuvarının kapılarını açarak, beni kendi öğrencilerinden ayırmayan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, desteklerini ve samimiyetlerini her zaman hissettiğim kıymetli hocalarım Prof. Dr. Murat KASAP'a ve Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a,

İlgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan Araş. Gör. Dr. Sema KURNAZ ÖZBEK'e, Araş. Gör. Dr. Özgür Doğa Özsoy'a, Araş. Gör. Dr. Sabriye KARADENİZLİ TAŞKIN'a, Dr. Öğr. Üyesi Müge SARPER KAHVECİ'ye, Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin UZUNER'e, Dr. Öğr. Üyesi Candan YILMAZ ÖZDOĞAN'a ve Mol. Bio. Elif İlknur ŞAHİN'e,

Aldığım tüm kararlarda beni destekleyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim sevgili aileme ve her koşulda yanımda olan sevgili eşim Araş. Gör. Dr. Mehmet SARIHAN'a, hayatta ki en büyük iyi'kim olan bitanecik oğlum Ömer Yiğit SARIHAN'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destek için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: TDK-2021-2506) teşekkür ederim.

ORIJİNALLIK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı / Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Sıçan Testis Dokusunda Kadmiyum’un Toksik ve Quercetin’in Koruyucu Etkilerinin Mitofaji İle İlişkisinin Araştırılması” başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

19/06/2023

Kübra KAVRAM SARIHAN

İmza

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
ORİJİNALLIK BİLDİRİMİ	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiv
ŞEKİLLER.....	xvi
TABLolar.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Testis	1
1.1.1. Testisin Embriyolojisi.....	1
1.1.1.1. Testislerin inışı	4
1.1.2. Testisin Anatomisi	5
1.1.2.1. Testis'in kan damarları, Lenf damarları ve Sinirleri	7
1.1.3. Testisin Histolojisi	9
1.1.3.1. Seminifer tübüller (Tubuli seminiferi contorti).....	10
1.1.3.1.1. Spermatogenik hücreler	11
1.1.3.1.1.1. Spermatogonyumlar	12
1.1.3.1.1.2. Primer ve sekonder spermatositler	13
1.1.3.1.1.3. Erken ve geç dönem spermatidler	14
1.1.3.1.1.4. Spermatozoonlar (Spermiumlar).....	14
1.1.3.1.2. Sertoli hücreleri	15
1.1.3.2. İnterstisyel bağ dokusu ve Leydig hücreleri	17
1.1.3.3. Spermatogenez	18
1.1.3.3.1. Spermatogonyal faz (Spermatositogenez).....	19

1.1.3.3.2. Spermatosit fazı (Mayoz)	19
1.1.3.3.3. Spermatid fazı (Spermiyogenez)	20
1.1.4. Testisin Histofizyolojisi	21
1.2. Kadmiyum	23
1.2.1. Kadmiyum'un Kaynakları ve Maruziyet Yolları	23
1.2.2. Kadmiyum'un Metabolizması	24
1.2.3. Kadmiyum'un Toksisitesi ve Testis Üzerine Etkisi	24
1.3. Mitofaji	26
1.3.1. Ubiquitin-Bağımlı Mitofaji	28
1.3.1.1. PARKIN-bağımlı (PINK1-PARKIN yolakları).....	28
1.3.1.2. PARKIN-bağımsız ama ubiquitin-bağımlı mitofaji	29
1.3.2. Ubiquitin-Bağımsız veya Reseptöre Dayalı Mitofaji Yolları	29
1.3.3. Lipid Bazlı Mitofaji	29
1.3.4. Mikromitofaji	29
1.4. Quercetin.....	30
1.4.1. Quercetin'in Kimyasal Özellikleri.....	30
1.4.2. Quercetin'in Diyet Kaynakları	31
1.4.3. Quercetin'in Emilimi, Metabolizması	31
1.4.4. Quercetin'in Biyolojik Aktiviteleri.....	32
1.4.4.1. Antioksidan aktivitesi.....	32
1.4.4.2. Anti-inflamatuar etki	32
1.4.4.3. Anti-kanser aktivitesi	33
2. AMAÇ	34
3. YÖNTEM.....	35
3.1. Deney Hayvanları	35
3.1.1. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar	35
3.1.2. Sakrifikasyon	35

3.1.3.	Vücut Ağırlıklarının Ölçümü.....	36
3.2.	Histolojik Boyama Yöntemleri ile Testis Dokusunun İncelenmesi	36
3.2.1.	Doku Takibi	36
3.2.2.	Hematoksilen&Eozin ile Morfolojik Boyama.....	37
3.2.3.	Seminifer Tübül Çapı	38
3.3.	İmmüno Floresan Yöntemi ile İnceleme.....	38
3.3.1.	Doku Takibi	38
3.3.2.	İmmüno Floresan Boyama	38
3.4.	Ultrastrüktürel Analiz	39
3.5.	Western Blot Analizi	39
3.5.1.	Dokulardan Protein İzolasyonu ve Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi.....	39
3.5.2.	Protein Örneklerinin Jel Elektroforezi (SDS-PAGE)	40
3.5.3.	Jelden Proteinlerin Membrana Aktarılması	40
3.5.4.	Membrandan İlgili Proteinlerin Gözlemlenmesi	41
3.6.	İstatistiksel Analiz.....	41
3.7.	Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar.....	41
3.7.1.	Kimyasal Malzemeler.....	42
3.7.1.1.	Antikorlar	42
3.7.2.	Cihazlar.....	43
4.	BULGULAR	44
4.1.	Vücut ve Organ Ağırlıkları	44
4.1.1.	Vücut Ağırlıkları Ölçümü.....	44
4.1.2.	Testis Organı Ağırlığı Ölçümü.....	45
4.2.	Işık Mikroskopi Bulgular.....	47
4.2.1.	Hematoksilen&Eozin Boyama Bulguları	47
4.2.2.	Morfometrik İncelemeler.....	55
4.2.2.1.	Seminifer tübül çapı ölçümü	55

4.2.2.2.	Seminifer tübül epitel kalınlığının llmesi	56
4.2.2.3.	Johnsen Skorlama Analizi	57
4.3.	Testis Dokusunda Mitofaji ile ilişkili Proteinlerin İmmünofloresan Yöntemle Gösterilmesi	58
4.3.1.	PINK1-TOM20 İmmünofloresan Analizi.....	58
4.3.2.	PARKIN-TOM20 İmmünofloresan Analiz.....	60
4.3.3.	LC3-TOM20 İmmünofloresan Analiz	62
4.4.	Testis Dokusunun TEM ile Ultrastrüktürel Analiz	64
4.5.	Western Blot Analiz Bulguları	72
5.	TARTIşMA.....	78
6.	SONUÇLAR ve ÖNERİLER	83
7.	KAYNAKLAR.....	85
8.	ZGEMİř.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER ve KISALTMALAR

17-OH-Pg: 17-hydroxyprogesterone

ABP: Androjen bağlayıcı protein

AMH: Antimüllerian hormon

BMP-4: Kemik morfogenetik protein 4

BTB: Kan-testis bariyeri

Cd: Kadmiyum

CGRP: Kalsitonin gen bağımlı peptid

CLA-1: Lipoprotein reseptörü

DHT: 5 α -dihydrotestosterone

DNA: Deoksiribonükleik asit

FSH: Folikül uyarıcı hormon

FUNDC1: FUN14 bölgesi içeren 1

GABARAP: GABA-reseptör ilişkili protein

GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon

GFN: Genitofemoral sinir

IL- α : İnterlökin- α

Ins1-3: İnsulin benzeri protein faktör-3

i.p.: İntraperitoneal

IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği

JTBS: Johnsen'in tübüler biyopsi skorlaması

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LH: Luteinize edici hormon

LIR: LC3 etkileşim bölgesi
MIS: Mülleryan inhibe edici madde
NIX: NIP3 benzeri protein X
PAS: Periyodik Asit-Schiff
PARL: Presenilin associated rhomboid-like proteini
PBS: Fosfat tamponlu salin
PINK1: PTEN-bağımlı kinaz 1
Pg: Progesterone
pSer65-Ub: Fosforlanmış ubiquitin
PV: Prosesus vaginalis
RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS: Reaktif oksijen türevleri
Que: Quercetin
TBF: Testis belirleyici faktör
TBS: Tris tamponlu salin
TBS-T: Tris tamponlu salin-tween 20
TIM: İç mitokondriyal zar
TNF- α : Tümör nekroz faktörü- α
TOM: Dış mitokondriyal zar
VCI: Vena cava inferior

ŞEKİLLER

Şekil 1.1.A. Vitellus kesesinin allantoise yakın duvarında ortaya çıkan primordial germ hücrelerinin konumunu gösteren üçüncü haftanın sonunda bir embriyo. B. Primordial germ hücrelerinin, son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle göç ederek genital kabartılara ulaşmasını gösteren bir embriyo kesiti	2
Şekil 1.2. Primitif (ilkel) cinsiyet kordonlarını gösteren altı haftalık bir embriyonun enine kesiti	2
Şekil 1.3. A. Gelişimin sekizinci haftasında testisten geçen ve tunika albuginea, testis kordonları, rete testis ve primordial germ hücrelerini gösteren enine kesit. B. Testis ve genital kanalların dördüncü aydaki görünümü	3
Şekil 1.4. Androjen-bağımlı inguinokrotal iniş evresi. A. Muhtemelen GFN ve CGRP vasıtasıyla, AMH ve androjenler tarafından gubernaküler kordun kısalması ve gubernaküler bulbusun büyümesi. B. Testislerin inguinal bölgeden skrotuma inişi	5
Şekil 1.5. Androjen-bağımlı inguinokrotal iniş evresi	5
Şekil 1.6. Testise ait tabakalar	6
Şekil 1.7. Testisin etrafını saran kılıf yapısı	7
Şekil 1.8. Testisin kan damarları olan a. testicularis, plexus pampiniformis'in gösterimi	8
Şekil 1.9. Seminifer tübüllerin histolojik görüntüsü	10
Şekil 1.10. Seminifer tübül epiteli.....	11
Şekil 1.11. Germinal epitelde yer alan spermatogonyumlar	12
Şekil 1.12. Olgun spermatozoon	15
Şekil 1.13. Sertoli hücresi ve komşu spermatojenik hücreler ile ilişkisi	16
Şekil 1.14. Spermatogenez sürecinin evreleri	19
Şekil 1.15. Mitofaji	28
Şekil 1.16. Quercetin'in Kimyasal Yapısı	30
Şekil 1.17. Quercetin metabolizmasının ve emiliminin şematik gösterimi	32
Şekil 3.1. Deney Grupları.....	36
Şekil 4.1. Haftalara göre vücut ağırlığı değişimi.....	44
Şekil 4.2. Haftalara göre yüzde vücut ağırlığı değişimi.....	45
Şekil 4.3. Haftalara göre testis ağırlıkları.....	46
Şekil 4.4. Testis ağırlığı yüzde değişimi.....	47
Şekil 4.5. Kontrol (0.gün) grubuna ait H&E boyama fotomikrografları.....	48

Şekil 4.6. Kontrol (1.hafta) grubuna ait H&E boyama fotomikrografları.....	48
Şekil 4.7. Cd (1.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografı.....	49
Şekil 4.8. Cd+Que (1.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları.....	50
Şekil 4.9. Kontrol (3.hafta) grubuna ait H&E boyama fotomikrografları.....	51
Şekil 4.10. Cd (3.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları.....	52
Şekil 4.11. Cd (3.hafta) grubuna ait H&E fotomikrografları	52
Şekil 4.12. Cd+Que (3.hafta) grubuna ait H&E fotomikrografları	52
Şekil 4.13. Kontrol (5.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları.....	53
Şekil 4.14. Cd (5. hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları.....	54
Şekil 4.15. Cd (5.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları.....	54
Şekil 4.16. Cd+Que (5.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları.....	55
Şekil 4.17. Seminifer tübül çapının ölçülmesi	56
Şekil 4.18. Seminifer tübül epitel kalınlığının ölçülmesi.....	57
Şekil 4.19. Johnsen skoru hesaplama grafiği	58
Şekil 4.20. Kontrol (0.gün), kontrol (1.hafta), Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) gruplarında PINK1+TOM20 ekspresyonları	59
Şekil 4.21. Kontrol (3. ve 5.hafta), Cd (3. ve 5.hafta) ve Cd+Que (3. ve 5.hafta) gruplarında PINK1+TOM20 ekspresyonları	60
Şekil 4.22. Kontrol (0.gün), kontrol (1.hafta), Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) gruplarında PARKİN+TOM20 ekspresyonları	61
Şekil 4.23. Kontrol (3. ve 5.hafta), Cd (3. ve 5.hafta), Cd+Que (3. ve 5.hafta) gruplarında PARKİN+TOM20 ekspresyonları	62
Şekil 4.24. Kontrol (0.gün), kontrol (1.hafta), Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) gruplarının LC3+Mitotracker red ekspresyonları	63
Şekil 4.25. Kontrol (3.ve 5.hafta), Cd (3.ve 5.hafta) ve Cd+Que (3.ve 5.hafta) gruplarında LC3+Mitotracker red ekspresyonları. Ölçü çubuğu: 10 µm	64
Şekil 4.26. Kontrol (1.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları	65
Şekil 4.27. Cd (1.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları	66
Şekil 4.28. Cd+Que (1.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları	67
Şekil 4.29. Kontrol (3.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları	67

Şekil 4.30. 3 haftalık kadmiyum grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları	68
Şekil 4.31. Cd+Que (3.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları	69
Şekil 4.32. Kontrol (5.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları	70
Şekil 4.33. Cd (5.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları	71
Şekil 4.34. Cd+Que (5.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları	72
Şekil 4.35. Haftalara göre PINK1 protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi.....	73
Şekil 4.36. Haftalara göre TOM20 protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi	74
Şekil 4.37. Haftalara göre LC3-I protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi	75
Şekil 4.38. Haftalara göre LC3-II protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi.....	76
Şekil 4.39. Haftalara göre LC3-II/LC3-I protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi....	76
Şekil 4.40. PINK1, LC3-I, LC3-II, TOM20, β -aktin protein miktarlarının gösterilmesi ve gruplara ait bandlar görülmektedir	77

TABLÖLAR

Tablo 3.1. Johnsen'in Tübüler Biyopsi Skorlaması	37
Tablo 3.2. Primer ve sekonder antikor dilüsyonları	39



1. GİRİŞ

1.1. Testis

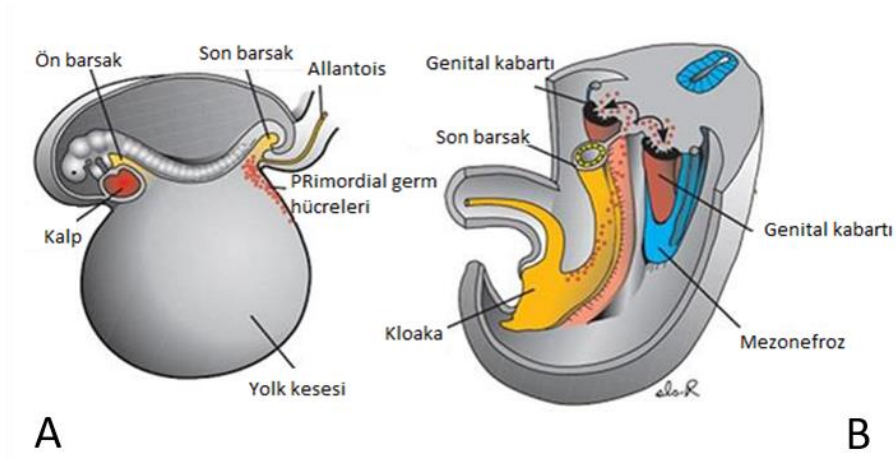
1.1.1. Testisin Embriyolojisi

Embriyonun genetik cinsiyeti fertilizasyon sırasında, ovumu dölleyen spermde Y kromozomu olup olmamasına bağlı olsa da embriyonik gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar dişi ve erkek karakteristik özelliklerini taşımazlar. Her iki cinsin de erken dönemde genital sistemleri birbirine benzediğinden dolayı, başlangıç dönemine “seksüel gelişimin farklanmamış evresi” adı verilir (Moore ve ark., 2016; Sadler, 2012).

Gonadlar, abominal duvarı döşeyen mezotelyum (mezodermal kölom epiteli), bunun altında mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken alır (Moore ve ark., 2016).

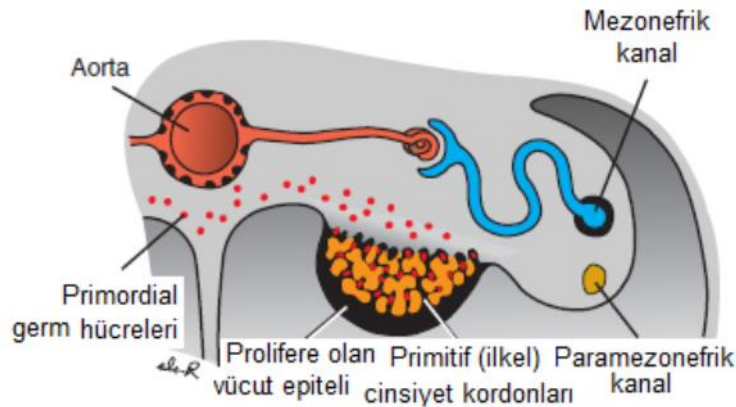
Gonadların ilk evreleri gelişimin 5. haftasında mezonefrozun medialindeki epitelde kalınlaşma ve embriyonik bağ dokusunun yoğunlaşmasıyla “genital kabartı” ya da “gonadal sırtlar” şeklinde ortaya çıkar. Gelişimin 6. haftasına kadar genital kabartılar içerisinde germ hücreleri bulunmaz. Primordiyal germ hücrelerinin, primitif gonadlara ulaşması sırasında kölom epiteli çoğalır ve epitelde bulunan hücreler mezenşim içerisine gömülür. Mezenşimin içerisine gömülen hücreler, düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. Bu kordonlar hem erkek hem de dişi embriyolarda yüzey epiteline bağlıdır. Bundan dolayı erkek ve dişi gonadların birbirinden ayırt edilmesi bu evrede mümkün olmadığı için “farklanmamış gonad” adı verilir (Moore ve ark., 2016; Piprek, 2016; Sadler, 2012). Farklanmamış gonad, dış tarafında korteks, iç tarafında ise medulla olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır.

Primordiyal germ hücreleri, 4. haftanın başında vitellüs kesesi duvarında allantoisin başlangıç yerine yakın olarak ortaya çıkar. Embriyonun katlanması sırasında, vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içine girer. Bu sırada, primordiyal germ hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca genital kabartılara göç ederek 5. haftanın başına ulaşırlar. 6. haftada ise mezenşim içerisine girerler ve genital kordonlarla birleşirler. Germ hücrelerinin göçü, Stella, Fragilis genleri, kemik morfogenetik protein 4 (BMP-4) tarafından düzenlenerek buraya gelen hücrelerin göçleri sona erer. Eğer primordiyal germ hücreleri gonadal kabartılara ulaşamazlar ise gonadlar gelişemez (Moore ve ark., 2016; Piprek, 2016; Sadler, 2012; Simon, 2007) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1.A. Vitellus kesesinin allantoise yakın duvarında ortaya çıkan primordial germ hücrelerinin konumunu gösteren üçüncü haftanın sonunda bir embriyo. B. Primordial germ hücrelerinin, son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle göç ederek genital kabartılara ulaşmasını gösteren bir embriyo kesiti (Sadler, 2012)

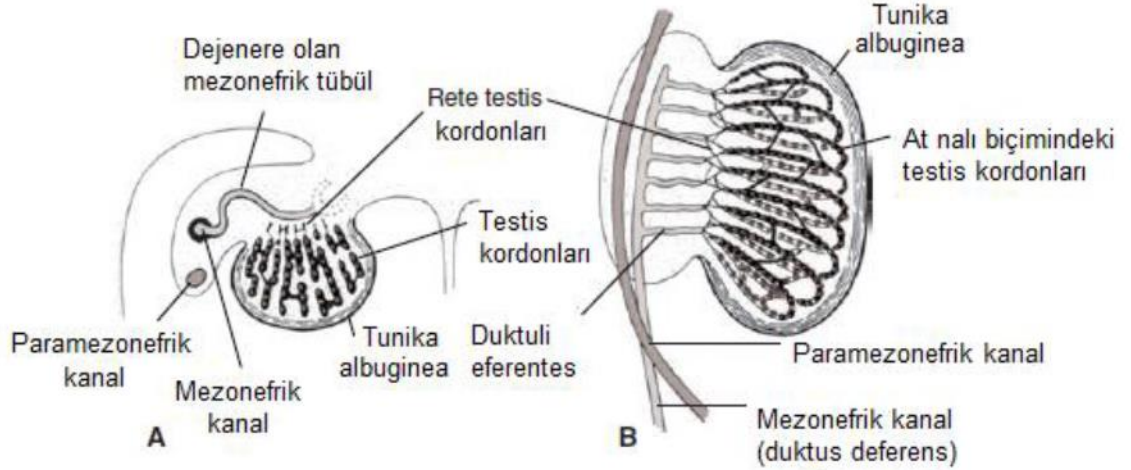
Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması esnasında gonadal kabartının epiteli proliferer olur. Epitel hücreleri altında kalan mezenşim içerisine primordiyal germ hücreleri gömülür ve primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kordonları oluştururlar (Şekil 1.2). Dişi ve erkek olmak üzere, her iki embriyo da primitif cinsiyet kordonları yüzey epiteline bağlıdır.



Şekil 1.2. Primitif (ilkel) cinsiyet kordonlarını gösteren altı haftalık bir embriyonun enine kesiti

Cinsiyet kromozomunun tipi fertilizasyon ile belirlenir. Over ya da testis yönünde gelişen gonadın tipi, daha sonraki dış genitalerde ve genital kanallarda oluşan cinsiyet farklılaşmasını belirler. Eğer embriyo genetik olarak erkek ise, primordiyal germ hücrelerin de XY cinsiyet kromozomları bulunur. Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörü (TBF) kodlayan SRY geni, primitif cinsiyet kordonları olan

testis/medullar kordonları oluşturmak üzere çoğalır ve medullanın derinliklerine kadar iner. Medullar kordonlar önce bezin hilusuna doğru, sonra da rete testis tübüllerini oluşturmak üzere ağ şeklinde dağılırlar (Şekil 1.3). Gelişimin daha ileri evrelerinde tunika albuginea adı verilen yoğun fibröz bağ dokusunun araya girmesiyle testis kordonlarının yüzey epitelleri ile olan ilişkilerini sonlandırır (Moore, 2016; Sadler, 2012; Şeftalioğlu, 1998).



Şekil 1.3. A. Gelişimin sekizinci haftasında testisten geçen ve tunika albuginea, testis kordonları, rete testis ve primordial germ hücrelerini gösteren enine kesit. B. Testis ve genitel kanalların dördüncü aydaki görünümü (Sadler, 2012)

Gelişimin dördüncü ayında, testis kordonları at nalı şeklini alır ve uçları rete testis ile devam eder. Böylece testis kordonları, primordial germ hücrelerini ve gonadın yüzey epiteli olan mezodermal kölom epitelinden köken alan Sertoli hücrelerinden meydana gelir (Moore, 2016; Ross ve Pawlina, 2006; Sadler, 2012).

Genital kabartının mezenşiminden köken alan Leydig hücreleri (İntertisyel hücreler) testis kordonlarının arasında bulunur. Testis kordonlarının farkanmaya başlamasından hemen sonra bu hücreler gelişmeye başlar. Leydig hücreleri, gestasyonun 8. haftasından itibaren androjenik hormonları (testosteron ve androstenedion) üretmeye başlar. Bu hormonlar, mezonefrik kanalların (Wolffian) ve dış genital organların erkek yönünde farklılaşmasını uyarırlar. Testosterona ek olarak, fetal testislerde yer alan Sertoli hücreleri tarafından Antimüllerian hormon (AMH) ya da Mülleryan İnhibe Edici Madde (MIS) adı verilen glikoprotein yapıda bir hormon salgılanır. Bu hormon uterus, serviks, tuba uterina ve vajinanın üst kısımlarına farklılaşan paramezonefrik (Mullerian) kanalların gelişimini baskılar. AMH hormonunun salgılanması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır (Kierszenbaum, 2006; Moore ve ark., 2016; Sadler, 2012; Şeftalioğlu, 1998).

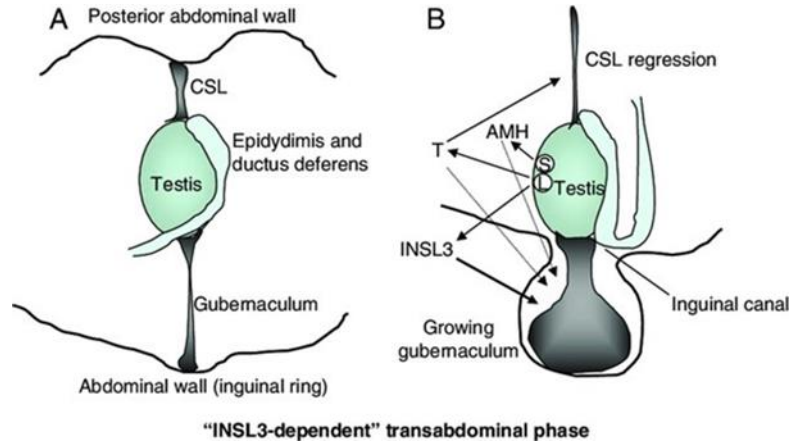
Puberteye kadar solid halde kalan testis kordonları puberte de lümenleri açılarak seminifer tübülleri oluştururlar. Seminifer tübül lümeninde Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar olmak üzere iki hücre tipi bulunur. Sertoli hücreleri, testisin yüzey epitelinden gelişen destek hücreleridir. Spermatogonyumlar, primordiyal germ hücrelerinden farklıdır ve primordiyal sperm hücreleridir. Seminifer tübüller kanalize olduğunda rete testis tübülleriyle birleşerek duktuli efferenteslere açılır. Duktuli efferentesler, duktus epididimisi oluşturan wolffian kanalı ile bağlanır. Duktus epididimisler de tek bir kanal olan duktus deferens ile birleşir (Kierszenbaum, 2006; Moore ve ark., 2016; Sadler, 2012; Şeftalioğlu, 1998).

1.1.1.1. Testislerin inişi

İkinci ayın sonunda testis ve mezonefroz karın arka duvarında bulunur ve ürogenital mezenterle bağlıdır. Bu bağlar, mezonefroz dejenere olduktan sonra gonadın mezenteri haline gelir. Mezenterin kaudal ligament şeklini alarak kaudal genital ligament olarak adlandırılır. Testisin kaudal kutbundan çıkan, ekstraselüler matriksten zengin ve yoğun mezenşimal yapı olan gubernakulum'dur. Testis aşağı inmeden önce, gubernakulum internal ve eksternal abdominal oblik kaslarının arasında inguinal bölgede sonlanır. Testisin bu bölgeye inmeye başlamasıyla gubernakulumun abdominal parçası skrotal şişliğe doğru büyümeye başlar.

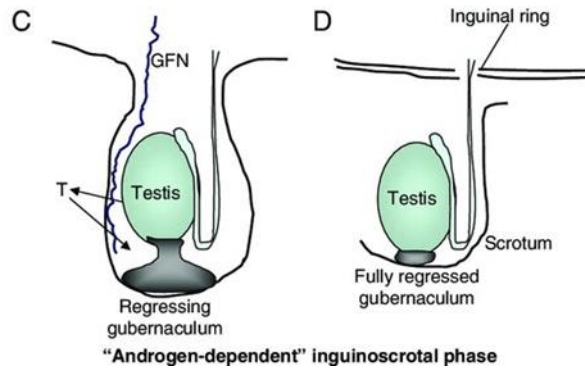
İnsanlarda testislerin inmesi, transabdominal göç evresi ve inguinokrotal iniş evresi olmak üzere iki ana evrede olur (Ağras, 2012; Sadler, 2012).

Transabdominal evre olan ilk evre intra-uterin gelişimin 10. ile 15. haftalar arasında, cinsel organların gelişiminin başlamasının hemen sonrasında gerçekleşmektedir. Testisler bu evrede abdomen içinde böbreklerin alt polünden inguinal kanal girişine doğru yer değiştirdikten sonra inguinokrotal göç başlayana kadar 28. haftanın sonuna kadar süren duraklama dönemi olur. Erkek gubernakulumunda İnsulin Benzeri Faktör-3 (Insl-3) uyarısına cevap olarak, mezenkimal proliferasyon ve hyaluronan artışı ile beraber şişme meydana gelir. Bu reaksiyon MIS salınımıyla beraber daha da artış gösterir. Şişme reaksiyonu sonucunda gubernakulum kısalır, vücudun büyümesine paralel olarak uzamaz. Testislerin inguinal kanal girişinde sabit olduğu dönemde duraklama evresinin nasıl gerçekleştiği muhtemelen genitofemoral sinire (GFN) giden L1 ve L2 duyu sinir köklerinin maskulinizasyonu ile olmaktadır. Duraklama sırasında gubernakulum ve prosesus vaginalis (PV) inguinal kanal yolu ile skrotuma doğru hareket ederek testiküler iniş için yol izler (Şekil 1.4) (Ağras, 2012).



Şekil 1.4. Androjen-bağımlı inguinokrotal iniş evresi. A. Muhtemelen GFN ve CGRP vasıtasıyla, AMH ve androjenler tarafından gubernaküler kordun kısılması ve gubernaküler bulbusun büyümesi. B. Testislerin inguinal bölgeden skrotuma inişi (Foresta ve ark., 2008)

İkinci ve son evre olan inguinokrotal evre de testisler inguinal kanaldan geçerek skrotuma yerleşirler. 35. haftanın sonunda iniş tamamlanır. Erkeklerde gubernakulumun kaudal kısmının bulböz yapısında, ekstrasellüler matriksin kaybı ile birlikte yeniden şekillenme söz konusu olabilir. Gubernakulumun ve içerisindeki PV'nin uzaması, GFN'yi etkileyerek kalsitonin gen bağımlı peptid (CGRP) salınımına yol açan androjenlerin kontrolü altında gerçekleşir (Şekil 1.5) (Ağras, 2012).



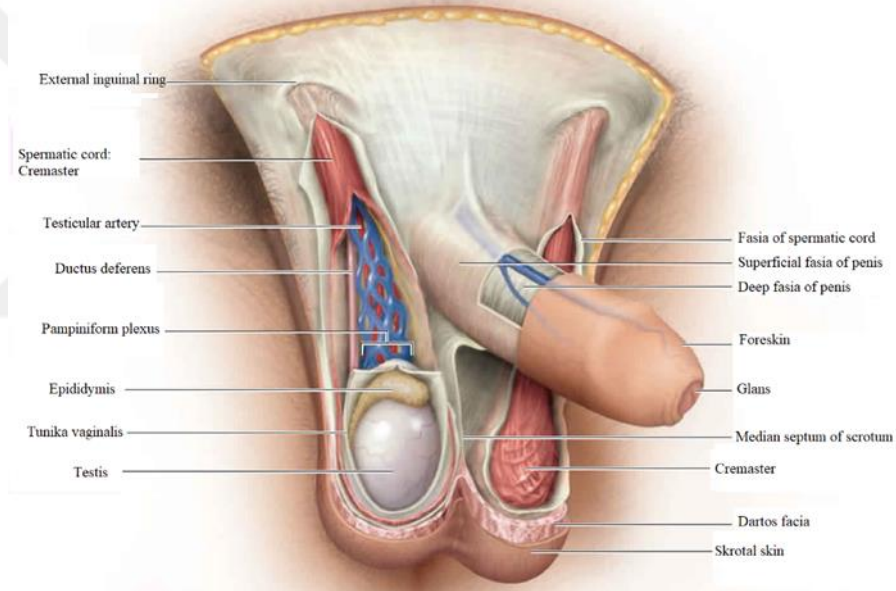
Şekil 1.5. Androjen-bağımlı inguinokrotal iniş evresi. A. Muhtemelen GFN ve CGRP vasıtasıyla, AMH ve androjenler tarafından gubernaküler kordun kısılması ve gubernaküler bulbusun büyümesi. B. Testislerin inguinal bölgeden skrotuma inişi (Foresta ve ark., 2008).

1.1.2. Testisin Anatomisi

Testisler (Orchis), üstte posterior abdominal duvarda gelişmeye başlar ve doğumdan önce aşağı doğru inerek anterior abdominal duvardaki canalis inguinalis'ten geçer, scrotum'a iner (Standring ve ark., 2016; Tiwana ve Leslie, 2021). Boyutları yetişkinlere göre yaklaşık olarak 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde; ağırlıkları 12-20 gr; hacmi ise 15-25 ml aralığında değişen bir çift organdır (Goede ve ark., 2011; Tishler, 1971).

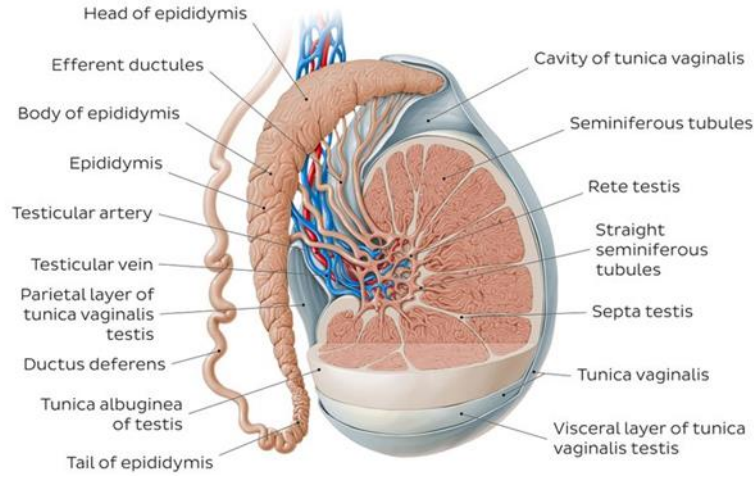
Funiculus spermaticus ile scrotum içinde asılı halde bulunurlar. Sol funiculus spermaticulus sağ funiculus spermaticulustan 1 cm daha uzundur (Ergün ve ark., 2014). Bu yüzden sol testis sağ testise göre daha aşağıdadır (Tsili ve ark., 2019). Funiculus spermaticulusu içten dışa doğru; fascia spermatica interna, fascia cremasterica ve fascia spermatica externa çevreler. Fascia spermatica interna; fascia transversalis'ten köken alır ve anulus inguinalis profundus'un kenarlarına tutunur. Fascia cremasterica, m.obliquus internus abdominis'ten köken alır. Fascia spermatica externa ise, anulus inguinalis superficialis kenarlarına tutunur, m.obliquus externus abdominis'in aponeurosis'inden köken alır (Snell, 2013).

Testislerin her birinin facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iç ve dış yüzü, margo anterior ve margo posterior adı verilen ön-arka kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior denilen üst ve alt ucu bulunmaktadır (Arıncı ve İlhan, 2006) (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Testise ait tabakalar (<https://healthjade.net/scrotum/>)

Testisler içten dışa doğru, tunica vaginalis (epiorchium), tunica albuginea ve tunica vasculoza olmak üzere üç kılıf tarafından sarılmıştır (Ergün ve Hayran, 2014) (Şekil 1.7). Lamina visceralis, epididimis'in tutunduğu alan dışında testisi örter. Hemen altında bulunan lamina albuginea testisleri saran sıkı bağ dokusudur. Tunica albuginea, vertikal yönde testisin içine doğru kalınlaşarak yarım bir bölme oluşturur. Mediastinum testis adı verilen bu bölmenin ön ve yan kısımlarından çıkan, septula testis olarak isimlendirilen küçük bölmelere ayrılır. Bu ayrılan küçük bölümler testisi lobuli testis denilen bölümlere ayırır (Ergün ve Hayran, 2014).



Şekil 1.7. Testisin etrafını saran kılıf yapısı (<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-testes>)

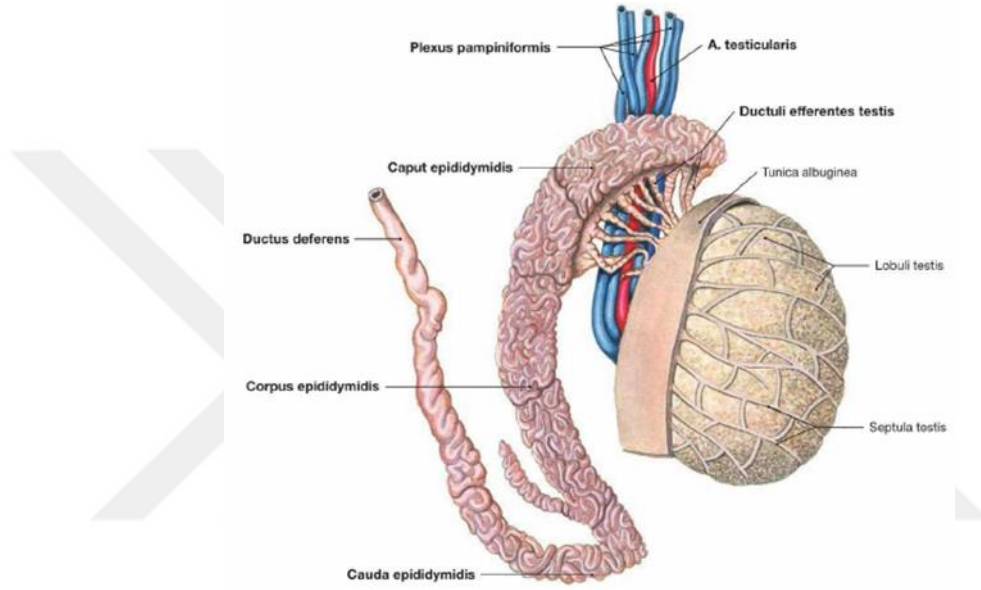
Piramit şeklinde olan lobuli testislerin tabanı perifere, tepesi mediastinum testise bakar. Taban kısımları kıvrıntılı devam eden yaklaşık 400-600 adet tubuli seminiferi contorti merkeze doğru birleşerek düzleşirler. Birleşip düzleştiklerinden dolayı sayıları 20-30 adet olan tubuli seminiferi recti'ler oluştururlar. Tubuli seminiferi recti'ler birbirleri ile birleşerek anastomozlaşarak ağ yapısı oluştururlar. Bu ağ yapısına rete testis adı verilir. 12-15 arasında değişen kanallara dönüşerek, ductuli efferentes testis adını alan kanallara dönüşür. Ductuli efferentes testis margo posterior'dan tunica albuginea'yı deler ve dışarı çıkar. Böylece epididimis'in başlangıç bölümü olan caput epididimise açılır. Testislerde üretilen spermiumlar, bu sistemi takip ederek epididimise gelerek, depo edilir ve olgunlaşmalarının son evresini tamamlarlar (Moore ve Dalley, 1999).

Tunica vasculosa, tunica albuginea'nın iç yüzünü örten damar tabakasıdır. Tunica albuginea ile birlikte septula testis'e uzanır ve lobuli testislerin de etrafını sarar (Ergün ve Hayran, 2014; Moore ve Dalley, 1999).

1.1.2.1. Testis'in kan damarları, Lenf damarları ve Sinirleri

Testisler, 2. lumbal vertebra seviyesinden çıkan aorta abdominalis'in dalı olan arteria testicularis tarafından beslenir. İnce, uzun bir arter olan arteria testicularis karın arka duvarından retroperitoneal bölgeye geçer ve ureter, n.genitofemoralis ve arteria iliaca externa'nın alt parçasını önden çaprazlar. Kanala anulus inguinalis profundus'tan geçerek ilerler. Anulus inguinalis superficialis'ler aracılığıyla kanaldan çıkarak funiculus spermaticus'a girer ve mediastinum testis'te birçok dala ayrılarak testisi kanlandırır (Arıncı ve Elhan, 2006; Snell, 2013).

Testislerde bulunan vena testicularis'i, başlangıçta funiculus spermaticus'un çevresini saran plexus pampiniformis adı verilen damar ağı oluşturur. Plexus pampiniformis, 8-12 venden oluşur ve hacmi azalarak anulus inguinalis profundus seviyesinde tek bir vena testicularise dönüşür. Plexus pampiniformis, testisi sabit ısıda tutarak ısı düzenleyici bir rol üstlenir. Sağ ve sol vena testicularis'ler plexus pampiniformis'ten çıktıktan sonra sol vena testicularis, vena renalis sinistra'ya dökülür; sağ vena testicularis ise vena cava inferior (VCI)'a açılır. Bu nedenle sol vena testicularis içinde basınç daha yüksektir (Şekil 1.8) (Arıncı ve Elhan, 2006; Ergün ve Hayran, 2014; Snell, 2013).



Şekil 1.8. Testisin kan damarları olan a. testicularis, plexus pampiniformis'in gösterimi (Paulsen ve Waschke 2010)

Testislerin lenf damarları, yüzeysel ve derin olmak üzere iki gruba ayrılır. Yüzeysel olan lenf damarları tunika vaginalis'ten, derin olan lenf damarı ise epididimis ve testis'ten başlar. Önce funiculus spermaticus içinde, sonra da arteria testicularis'lerle beraber damarlar ilerler. Arteria testicularis'in üreter ile birleştiği noktaya kadar, m.psoas major'un ön yüzü boyunca uzanır ve nodi aoritici laterales ve preaortici'ye açılırlar (Arıncı ve Elhan 2006; Ergün ve Hayran, 2014).

Testislerin sinirsel uyarımı otonom sinirleri tarafından sağlanır. Bu otonom sinirler, a. testikularis'in çevresindeki plexus testicularis'ten kaynaklanır. T10-11 medulla spinalis segmentlerinden gelen sempatik lifler ve n.vagus'tan gelen parasempatik lifler tarafından oluşturulur. Bu sinirler, testisin damarları etrafında organa taşınır (Arıncı ve Elhan 2006; Ergün ve Hayran, 2014).

1.1.3. Testisin Histolojisi

Erkek üreme sistemi, skrotum içerisinde bulunan bir çift testisten, testis içi ve dışı bulunan genital boşaltım kanallarından, aksesuar cinsiyet bezlerinden (vezikula seminalis, prostat ve bulboüretral bez) ve penisten oluşur. Testisler, birleşik tübüler yapıda bezlerdir ve hem ekzokrin hem de endokrin olarak görev yaparlar. Ekzokrin görevi, puberte dönemiyle birlikte erkek üreme hücresi olan spermatozoonların üretilmesidir. Spermatozoon üretilmesi olayına spermatogenez adı verilir. Erkek gametlerin üretimi sırasında meydana gelen hücre bölünme olayları hem mitoz hem de mayoz bölünmeyi içerir. Endokrin görevi ise, seks hormonları olarak adlandırılan androjenlerin sentezlenmesi, depolanması ve salgılanması olan steroidogenez'dir. Başlıca testosteron olmak üzere androjenler, spermatogenez için gereklidir ve erkek embriyonun fenotipik erkek fetus gelişiminde önemli rol oynarlar. Ayrıca seksüel dimorfizmden sorumludur (Gartner ve Hiatt, 2016; Junqueira ve Carneiro, 2009; Kierszenbaum, 2006; Ross ve Pawlina, 2006).

Testisler, embriyolojik gelişim sırasında karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler ve fetüsün gelişmesi sırasında göç ederek, skrotum içinde spermatik kordonları ucunda asılı olarak bulunur. Gerçekleştirdikleri bu göç sebebiyle testisler, tunika vaginalis denilen seröz bir kese şeklinde skrotum içine kendisiyle beraber peritonu da getirirler. Tunika vaginalis, lamina parietalis (periorchium) ve lamina visceralis (epiorchium) olmak üzere iki tabakadan oluşur. Lamina parietalis (periorchium) tabakası, skrotumun iç yüzünü örten mezotel ile kaplı iken, lamina visceralis (epiorchium) tabakası ise testisin ön kenar ve yan yüzlerini sarar. Bu iki tabaka arasında cavum serosun scroti adı verilen içi sıvı dolu bir boşluk bulunur (Gartner ve Hiatt, 2016; Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2006).

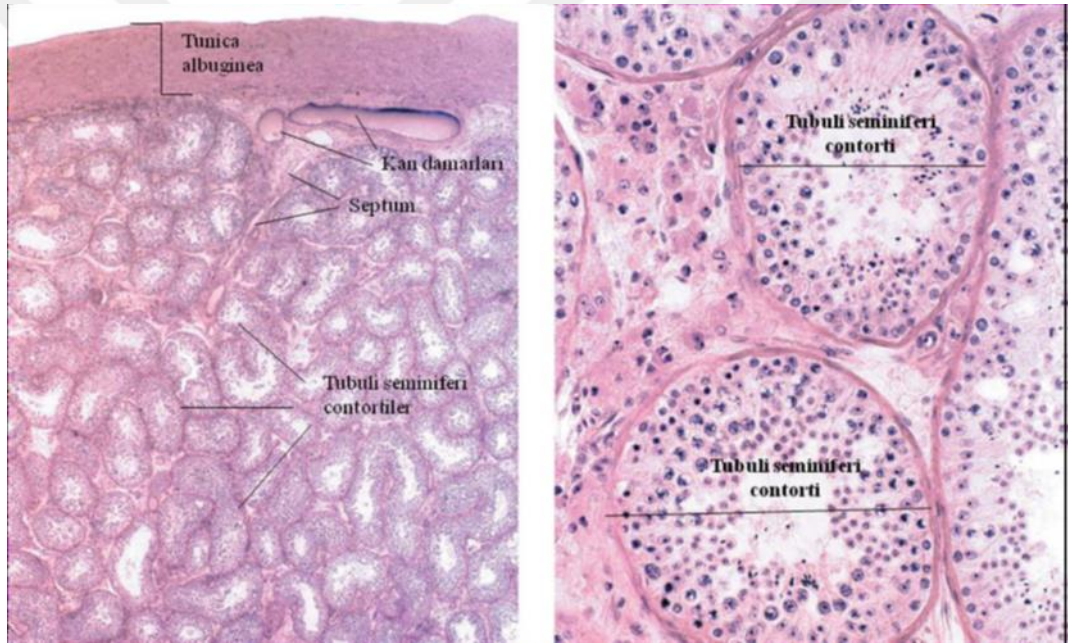
Tunika vaginalis'in lamina visceralis katmanının hemen altında kollajen liflerden zengin yoğun bağ dokusundan oluşan, sert bir kapsül şeklinde tunika albuginea yer alır. Tunika albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşarak, testise ait damar, sinir ve kanalların giriş çıkış yaptığı bölge olan mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Mediastinum testis'den bezin içine giren uzantılar bulunur. Bu uzantılara septula testis adı verilir. Bu fibröz uzantılar, tunika albuginea'nın iç yüzüne doğru ışınal olarak uzanır ve organı piramidal şekilli 250-300 adet lobuli testis adı verilen lobüllere ayırır. Her bir lobuli testis; 1-4 adet seminifer tübül ve Leydig hücrelerini (intertisyel hücreler) de içeren bağ dokusu yapısındaki stromadan meydana gelir. Lobuli testis'in içindeki her bir seminifer tübül kıvrımlı halka şeklindedir ve halkanın uçları mediastinum'a yaklaştıkça düzleşir. Seminifer tübülün bu kısmı düz tübül olarak isimlendirilir. Seminifer tübüllerde erkek üreme

hücreleri olan spermatozoonlar üretilirken, Leydig hücreleri ise androjen salgırlarlar (Gartner ve Hiatt, 2016; Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina 2006).

Testisleri saran kapsülün en iç kısmında, kan damarlarından zengin gevşek bağ dokusu yapısında tunika vasculosa tabakası bulunur. Tunika albuginea'nın iç yüzeyini ve tübüllerin arasını doldurarak tüm lobülleri sarmış olur (Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2006).

1.1.3.1.Seminifer tübüller (Tubuli seminiferi contorti)

Seminifer tübüller, testisin parankimasını oluştururlar. Tübülleri, fibroblast hücrelerini içeren fibröz bir bağ dokusu ile sarılıdır. Her bir testiste yaklaşık 250-1000 adet seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül ise, yaklaşık 30-50 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadır. Bir testiste yer alan tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Seminifer tübüllerin histolojik görüntüsü (Ross ve Pawlina 2006)

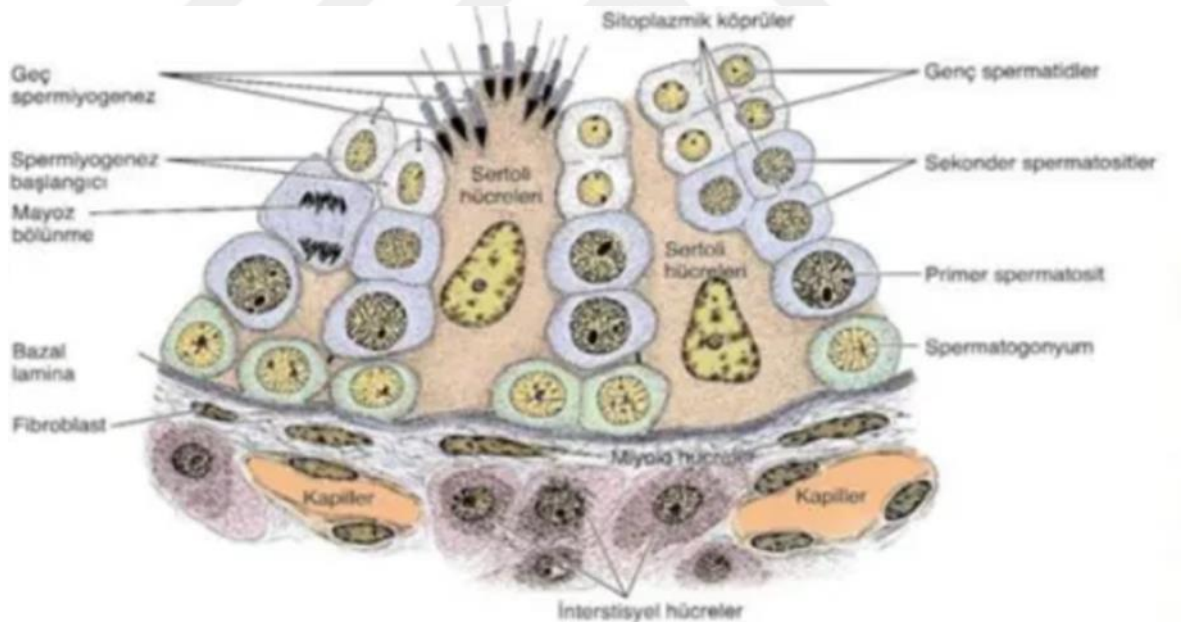
Seminifer tübüller kör bir uç ile başlayarak mediastinum testis'e bakan kısımlarında birbirlerine doğru yaklaşırlar ve kısa, dar devam eden tubuli recti olarak adlandırılan 20-30 adet kısa kanalları oluşturur. Tubuli recti'lerin çapları genişleyerek 0,5 mm olur. Mediastinum testis'e uzanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve mediastinum testisin üst kısmında bulunan rete testis adı verilen yapıyı oluştururlar. Rete testis'ler, 12-15 adet küçük kanalcıklar olan duktuli efferentes testis'e açılır. Duktuli efferentes testisler, tunika albuginea'yı delerek caput epididimis'e açılırlar ve burada genişleyip daha kıvrımlı bir şekil alarak konik yapıdaki lobülleri meydana getirirler. Duktuli efferentes testisler, duktus epididymis'e açılırlar. Duktus epididymis ilerledikçe çapı ve kalınlığı artarak duktus

deferens'e dönüşür (Gartner ve Hiatt, 2016; Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2006).

Seminifer tübüller; fibröz bir bağ dokusu kılıfı, bazal lamina ve çok katlı germinal (seminifer) epitelden oluşur. Seminifer tübülü dıştan saran fibröz bağ dokusu kılıfı olan tunica propria peritübüler doku olarak da isim alır ve 3-5 tabaka miyoid hücreden ve kollajen liflerden oluşur. Bazal membrana yapışık olarak bulunan en içteki katmanda tek tabaka şeklinde yerleşim gösteren miyoid hücreleri yer alır. Bu hücreler hem hareketsiz spermatozoonları rete testis'e iletirler ritmik kasılma hem de sekresyon yapma özelliklerine sahiptirler. Bazal membran, Sertoli hücreleri tarafından sentezlenen laminin, tip I kollajen ve tip IV kollajen içerir (Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2006).

Seminifer tübüller de bulunan germinal (seminifer) epitel, çok katlı epitel yapısı gösterir ve iki tip hücre içerir (Şekil 1.10). Epiteli oluşturan hücreler:

- 1.Spermatogenez hücreleri
- 2.Sertoli hücreleri (Sustentacular cells, Destek hücreleri)



Şekil 1.10. Seminifer tübül epiteli (Junqueira ve Carneiro, 2009)

1.1.3.1.1. Spermatogenez hücreleri

Seminifer tübüllerin duvarını 4-8 tabaka halinde döşeyen, bazal lamina ile lümen arasında yer alan, düzenli olarak çoğalan ve spermatozoona farklılaşabilen hücrelerdir. Olgunlaşmamış hücre olan spermatogonyum olarak adlandırılan spermatogenez hücreleri bazal laminanın üzerinde yerleşirken; olgun hücreler olan spermatidler ise Sertoli

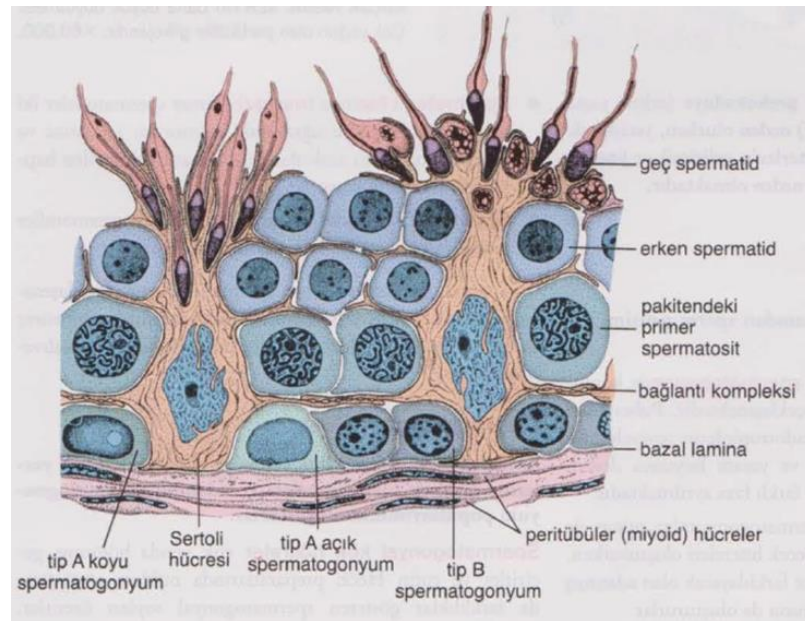
hücrelerinin apikal bölümüne tutunurlar. Spermatogonyumlardan sperm oluşumu sürecine spermatogenez adı verilir. Spermatogenez, puberteden kısa bir süre önce, pitüiter bezin gonadotropinlerin seviyelerinin artması ile birlikte başlar. Yaşam boyunca devam eder (Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2006).

Spermatogenez'in tüm evreleri spermatogenik hücre katmanlarında gerçekleşir. Hücreler olgun hale geçtikçe bazal kompartmandan lümene doğru geçerler. Bazal laminadan lümene doğru hücreler; spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoon'lar şeklinde sıralanır (Gartner ve Hiatt, 2016; Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2006).

1.1.3.1.1.Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, seminifer tübül epitelinin bazal kompartmanında, bazal membranın hemen üstünde yer alırlar. Puberte döneminde testosteron hormonunun etkisiyle beraber, spermatogonyal hücrelerin hücre bölünme siklusuna girmesine etkisi bulunur.

Spermatogonyum hücreleri, primordiyal germ hücrelerinden farklılaşırlar ve diğer spermatogenik hücrelerin öncülleridir. Diploid kromozoma sahiptir olan bu hücreler, yaklaşık 12 µm çapındadır. Serideki diğer hücrelere göre daha küçük ve soluk renkte boyanan nukleusları bulunur (Gartner ve Hiatt, 2016; Kierszenbaum, 2006). Germinal epitelde nukleusların görünümüne göre üç tip spermatogonyum tanımlanır. Bunlar; koyu boyanan tip A (Ad, Type A dark) spermatogonyumlar, açık boyanan tip A (Ap, Type A pale) spermatogonyumlar, tip B spermatogonyumlar (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Germinal epitelde yer alan spermatogonyumlar (Ross ve Pawlina, 2006)

Koyu boyanan tip A (Ad, Type A dark) spermatogonyumlar: Bu tip spermatogonyumlar seminifer epitelin kök hücreleridir. İnce granüllü kromatinli, yoğun bazofilik, oval nükleuslu hücrelerdir. Puberteden itibaren mitoz bölünme geçirerek yeni hücre tiplerini oluştururlar. Yeni oluşan hücreler ya koyu boyanan tip A (Ad) spermatogonyumlar halinde kök hücre olarak bölünme sürdürebilir ya da açık boyanan tip A (Ap) spermatogonyumlar oluşturur.

Açık boyanan tip A (Ap, Type A pale) spermatogonyumlar: Açık renk boyanan, ince granüllü kromatinli oval nükleuslara sahip olan hücreler, hormonal uyarılarla birlikte mitotik bölünme geçirerek tip B spermatogonyumlara farklılanırlar. Açık boyanan tip A spermatogonyumlar spermi üreten farklılaşma sürecine başlarlar. Bu süreçte A1, A2, A3, A4 ve daha sonra ara spermatogonyumları oluşturmak üzere birkaç mitotik bölünme geçirirler ve sayılarını artırırılar.

Tip B spermatogonyumlar: Mitotik bölünme geçirerek primer spermatositlere farklılanırlar. Merkezi nükleolusun çevresinde geniş yoğunlaşmış kromatini bulunan yuvarlak nükleusa sahiptir (Gartner ve Hiatt, 2016; Junqueira ve Carneiro, 2009; Kierszenbaum, 2006; Ross ve Pawlina, 2006).

1.1.3.1.1.2. Primer ve sekonder spermatositler

Primer spermatositler, seminifer tübülde bulunan en büyük spermatogenik hücrelerdir. Tip B spermatogonyumların mitoz bölünme geçirmeleri sonucunda oluşurlar. Primer spermatositler, mayoz başlamadan önce DNA'larını (Deoksiribonükleik asit) kopyalar. Böylece, her primer spermatosit $2n=46$ kromozom ve her kromozom iki kardeş kromatidden oluştuğu için iki katı miktarda DNA (4d) miktarı içerir. İnsan primer spermatositlerinde 22 gün süren birinci mayotik bölünmenin profazında görülebilen kromozomları oluşturacak şekilde yoğunlaşır (Junqueira ve Carneiro, 2009; Kierszenbaum, 2006; Ross ve Pawlina, 2006).

Sekonder spermatositler, birinci mayoz bölünmenin sonunda oluşur. Bu hücreler S fazına geçmeden, yeni DNA sentezlemeden ikinci mayotik bölünmenin profazına geçerler. Her sekonder spermatositin $n=23$ kromozom sayısına ($22+X$ ve $22+Y$) ve diploid DNA (2d) miktarına sahiptir. İkinci mayotik bölünmenin metafazında kromozomlar metafaz plağına dizilir. Kardeş kromatidler ayrılır ve mekiğin zıt kutuplarına hareket eder. İkinci mayotik bölünme tamamlandığında nüklear membranlar yeniden oluşur. Her bir sekonder

spermatositlerden biri 23 tek iplikli ve 1d miktarında DNA içeren iki haploid spermatid oluşur (Ross ve Pawlina, 2006).

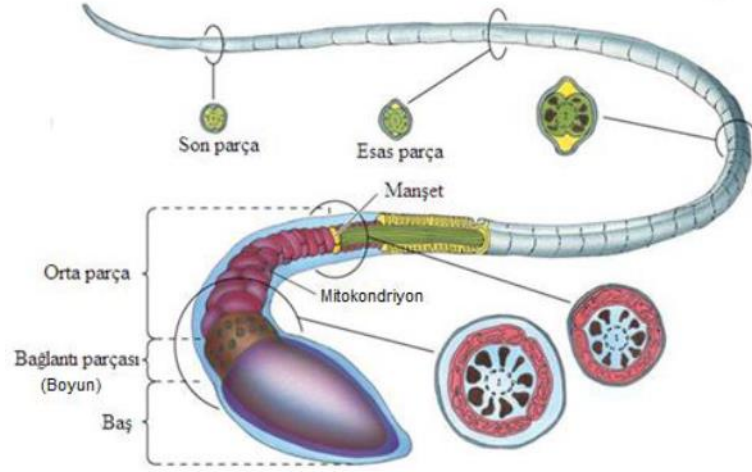
1.1.3.1.1.3. Erken ve geç dönem spermatidler

Erken dönem ya da yuvarlak spermatidler 1N kromozolu ve 1d DNA içereği olan haploid hücrelerdir. Bir n kromozom sayısı 22+X veya 22+Y kromozomu şeklinde gösterilir. Bu hücreler lümenine yakın adluminal seviyede yerleşmiş 7-8 µm boyutunda oval şekilli hücrelerdir. Nukleuslarında yoğunlaşmış kromatin bölgeleri bulunurken; sitoplazmalarında iyi gelişmiş Golgi kompleksi, mitokondriyonlar, serbest ribozomla, bir çift sentriyol ve düz endoplazmik retikulum içerir.

Spermatidler daha fazla bölünmeye uğramazlar, Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarına göç ederler ve bazı yapısal değişikliklere uğrarlar. Bu değişiklikler, Golgi fazı, kep fazı, akrozom fazı ve olgunlaşma fazıdır. Golgi fazında, sentriyoller jukstanükleer bölgeden spermatidin arka kutbuna göç ederler ve olgun sentriyol plazma membranına dik açı yaparlar. Böylece, sentriyol spermin kuyruğunu oluşturacak olan 9+2 mikrotübül çiftinin parçalarının bir araya gelmesini başlatır. Kep fazında, akrozomal vezikül nukleusun ön yarısı üzerinde yayılmasıyla akrozomal kep oluşur. Akrozomal kepin alt kısmındaki nuklear zarf parçasının porlarını kaybetmesiyle beraber kalınlaşır ve nuklear içerik yoğunlaşır. Akrozom fazında ise, spermatid kendisini hizalar, baş kısmı Sertoli hücrelerinin içine gömülür ve bazal laminaya doğru yönelir. Flagellumu, seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Spermatidin yoğunlaşan nukleusu yassılaşır ve uzar. Spermatidin yeniden şekillenmesi ile birlikte olgunlaşma fazında flagellanın etrafındaki fazla sitoplazma atılır ve olgun spermatozoon oluşur. Rezidüel cisimcik Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatidler bu yapıya değişikliklerle geçirdiği döneme, geç dönem spermatid ya da uzamış spermatid evresi olarak adlandırılır (Gartner ve Hiatt, 2016; Junqueira ve Carneiro, 2009; Kierszenbaum, 2006; Ross ve Pawlina, 2006).

1.1.3.1.1.4. Spermatozoonlar (Spermiumlar)

Yaklaşık 60 µm uzunluğunda olan olgun germ hücreleridir. Baş ve kuyruk olmak üzere iki kısımdan oluşur (Şekil 1.12).



Şekil 1.12. Olgun spermatozoon (Gartner ve Hiatt, 2007)

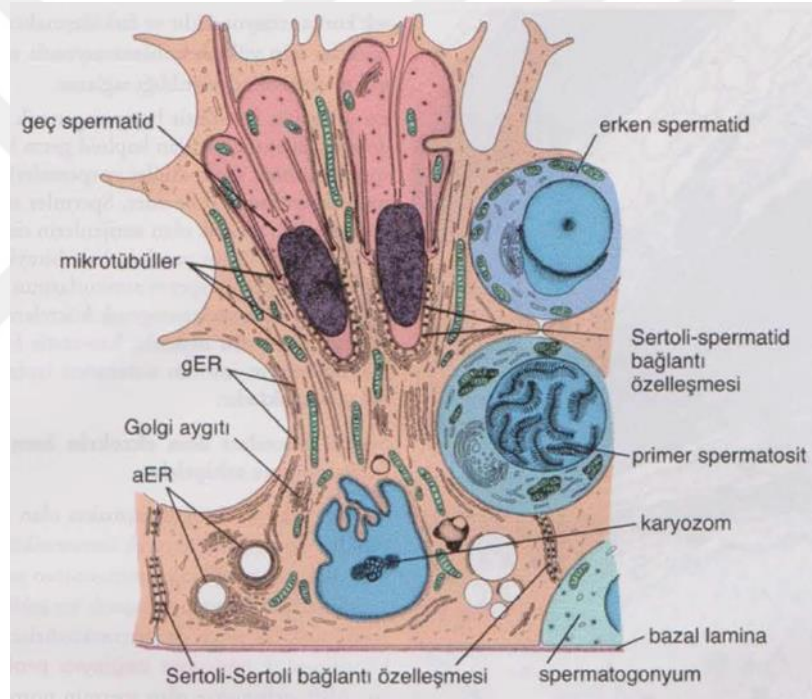
Sperm başı yaklaşık 4,5 μm uzunluğunda, 3 μm genişliğinde ve 1 μm kalınlığındadır. Spermatozoonların baş kısmı yassı ve sivridir. Nukleus, başta yoğun bir bölümü kaplar. Nukleusun anteriyorda 2/3'lük kısmını saran akrozomal kısmında tripsin benzeri proteazlar (hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin) bulunur. Akrozomal enzimler oositi saran korona radiata ve zona pellucida'ya spermatozoon girişini kolaylaştırmak için fertilizasyon sırasında salınır ve oositin zona pellusidasının delinmesi için gerekli olan enzimlerdir (Gartner ve Hiatt, 2016; Ross ve Pawlina, 2006).

Sperm kuyruğu, boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört bölüme ayrılır. Boyun kısmı kısa olan sentriyolleri ve kaba lifleri içerir. Orta parça yaklaşık 7 μm uzunlukta olup, boyun ile esas parça arasında bulunur. Bu bölüm kalın liflerin ve aksonemal kompleksin etrafında sarılmış olan mitokondriyonları içerir. Bu mitokondriyonlar kuyruğun hareketi için gerekli olan enerjiyi sağlar. Esas parça, yaklaşık 40 μm uzunluğunda olan bu bölüm kuyruk kısmının en uzun olan bölümüdür. Kalın liflerin ve aksonemal kompleksin dışındaki fibröz kılıfta bu bölgede bulunur. Dördüncü kısım ise yaklaşık 5 μm 'lık son parçadır. Bu kısım yalnızca aksonemal kompleksi içerir (Gartner ve Hiatt, 2016; Ross ve Pawlina, 2006; World Health Organization, 2010).

1.1.3.1.2. Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri, testislerin seminifer tübüllerinde bulunur ve ilk kez 1865 yılında fizyolog ve histolog olan Enrico Sertoli tarafından tanımlanmış olup onun adını almıştır (Griswold, 2018). Seminifer tübülün bazolateral kısmına yakın olarak bulunan, yaklaşık 9-12 μm boyutunda olan, uzun, piramidal şekilli destek (sustentaküler) hücreleridir (Duan ve ark., 2017). Bu hücreler de düz endoplazmik retikulumları, iyi gelişmiş granüllü

endoplazmik retikulumları, çok sayıda uzun mitokondriyonlar, iyi gelişmiş Golgi aygıtı, sayıları değişebilen mikrotübüller, lizozom, lipid damlacığı, glikojen granülleri bulunur. Ökromatik nükleuslarının şekli ve yerleşimi farklılık gösterebilmek ile beraber oval ya da üçgen şekilli olabilir. Yassı şekilde olup hücrenin bazaline paralel uzanabilir ya da üçgen şekilli olup hücrenin bazaline yakın olarak yerleşebilir. Nukleolusu çok belirgindir ve merkezi yerleşmiştir. Seyrek olarak sitoplazmanın bazalinde protein yapıda olan Charcot-Böttcher kristaloidleri adı verilen inklüzyon cisimcikleri bulunur. İnce füziform kristaloidler 10-25 μm uzunluğunda ve 1 μm genişliğindedir. Son çalışmalarda lipoprotein reseptör (CLA-1) proteinlerinin birikimi olduğunu ve bu birikimin inklüzyon cisimciklerinin lipid transportunda görevli olabileceği düşünülmektedir (Kierszenbaum, 2006; Ross ve Pawlina, 2006; Wong ve Khan, 2021).



Şekil 1.13. Sertoli hücresi ve komşu spermatojenik hücreler ile ilişkisi (Ross ve Pawlina, 2006)

Yan yana bulunan Sertoli hücreleri birbirleri ile bazolateral bölgede zonula okludensler (sıkı bağlantı) yaparak, seminifer tübül lümeninin çevresini saran kesintisiz hücre tabakası oluşturur. Sertoli hücreleri birbirleri ile zonula okludens tipi bağlantılar yaparak kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bariyer, seminifer epitelden iyon, aminoasit, protein ve karbonhidrat içeriği bakımından fizyolojik şartların oluşturulması için önemlidir. Ayrıca kan-testis bariyeri lümenin altında yer alan bölgenin bağ dokusundan gelen etkilerine karşı korur. Aynı zamanda Sertoli-Sertoli hücreleri arasında olan zonula okludens tip bağlantıları

bazal epitelyal kompartman ve luminal epitelyal kompartman olmak üzere iki epitelyal kompartman oluşturur. Bu iki farklı kompartmanın, spermatogenez için özel bir mikroçevre sağlar. Bazal kompartmanda spermatogonyumlar ve erken primer spermatositlerle sınırlıdır ve Sertoli-Sertoli hücresi ve bazal lamina arasındadır. Olgun spermatositler ve spermatidler ise Sertoli-Sertoli hücre bağlantısının luminal tarafında bulunur. Her iki kompartmanda da spermatogenik hücreler, Sertoli hücrelerinin uzantıları tarafından çevrelenir. Sertoli hücrelerinin ve farklılaşmakta olan spermatogenik hücreler arasındaki bu ilişkiden dolayı Sertoli hücrelerine destekleyici hücre de denir. (Gartner ve Hiatt, 2016; Kierszenbaum, 2006; Nishimura ve L'Hernault, 2017; Ross ve Pawlina 2006). Sertoli hücrelerinin birçok görevi vardır. Bunlar;

- 1.Spermatogenik hücrelerin beslenmesine, korunmasına ve desteklenmesine yardımcı olurlar (Ni ve ark., 2019)
- 2.Spermatogenezin parakrin ve endokrin kontrolünde görevlidir (Shi ve ark., 2018)
- 3.Spermatogenez sırasında kolesterol metabolizmasını düzenler (Titi- Lartey ve Khan, 2021)
- 4.Seminifer tübüllerin lümenine spermilerin taşınması için kullanılan, protein ve iyondan zengin yapıda bir sıvının salgılanması (Rato ve ark., 2010)
- 5.Spermiyogenez esnasında spermatidler tarafından atılan fazla sitoplazmik parçacıkların fagosite edilmesi (Arandjelovic ve Ravichandran, 2015)
- 6.Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleşen, spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlayan androjen-bağlayıcı protein (ABP) salgılanması (Titi- Lartey ve Khan, 2021)
- 7.İnhibin α ve β alt üniteleri salgılayarak hipotalamustan salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve ön hipofiz bezinden salınan FSH üzerine negatif (geri bildirim) etki gösterilmesi (Gartner ve Hiatt, 2016)
- 8.Kan–testis bariyeri ile spermatositlerin ve spermatidlerin otoimmün yanıtı ve kandaki zararlı maddelere karşı korunmasının sağlanması (Titi- Lartey ve Khan, 2021)

1.1.3.2.İnterstisyel bağ dokusu ve Leydig hücreleri

İntersisyel (ara) bağ dokusu, seminifer tübüller arasında kalan kısımdır ve testis kütesinin yaklaşık %30'unu oluşturur. Fibroblast, makrofaj, mast hücresi, lenfosit, farklılaşmamış mezenkim hücreleri gibi çeşitli hücrelerden, kan ve lenf damarları ve sinirlerden zengin gevşek bir bağ dokusudur. Kılcal damarlar pencere tiptedir ve kan proteinleri gibi büyük proteinlerin geçişine izin verir. Puberte döneminde Leydig

(intersisyel) hücreleri de bu hücre grubuna eklenir. Bu hücreler androjen üretimi açısından büyük önem taşır (Junqueira ve Carneiro, 2009; Kierszenbaum, 2006).

Leydig hücreleri, testislerde bulunan temel hücrelerdir. Kan damarları, lenfatik kanal ya da sinüzoidlerin yakınında, interstisyel bağ dokusu içerisinde bulunurlar. 15-20 µm çapındadırlar. Merkezi yerleşimli ökromatik bir nukleusları, belirgin bir nukleolusları, eozinofilik sitoplazmaya sahip poligonal şekilli hücrelerdir. Bol lipid içeriği bulunur. Bunların yanında büyük ve iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi aygıtı, çok sayıda küçük lipid damlacıkları, lizozomlar, tübüler kristal mitokondriyonlar, çok sayıda yuvarlak lipofuksin pigment granülleri ve Reinke kristaller bulunur (Mahran ve ark., 2017; Ross ve Pawlina, 2006).

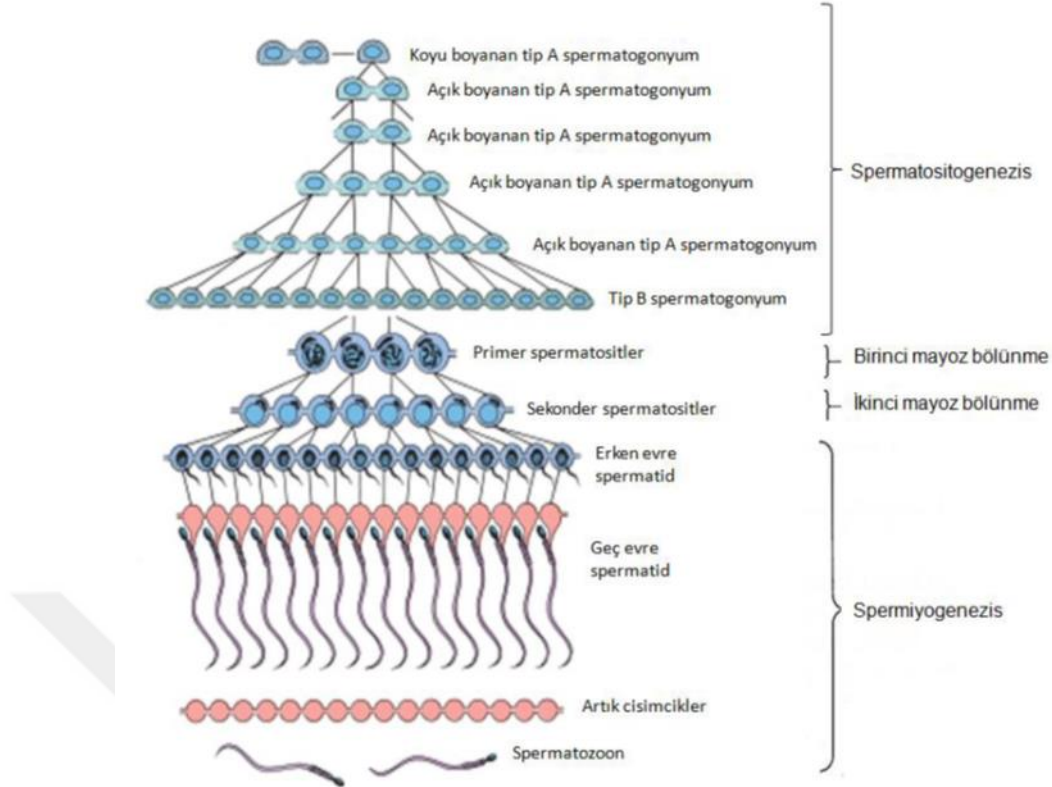
Leydig hücreleri, erkeklerde androjenlerin birincil kaynağı olan testosteronun üretilmesinden sorumludur. Testosteronun üretilmesi spermatogenez, cinsel gelişimin kontrol edilmesi, ikincil cinsel özellikler ve bu özelliklerin davranışlarının sürdürülmesi gibi önemli rolleri vardır. Bu işlevler Leydig hücrelerinde androjen üretimi ile başlar ve hipofiz bezinden üretilen lüteinizan hormon (LH) başta olmak üzere birçok faktörün kontrolü ve regülasyonu altındadır (Griswold ve Behringer, 2009; Zhou ve ark., 2019).

1.1.3.3.Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumdan olgun spermatoza oluşumunu kapsayan bir süreci ifade eder. Puberteden az bir zaman önce, pitüiter bezden salgılanan gonadotropin seviyesinin artmasıyla başlar ve hayat boyu devam eder (O'Donnell ve ark., 2017).

Spermatogenez süreci üç ana kısımdan oluşur (Şekil 1.14). Bunlar;

1. Spermatogonyal faz (Spermatositogenez)
2. Spermatosit fazı (Mayoz)
3. Spermatid fazı (Spermiyogenez) (Ross ve Pawlina, 2006)



Şekil 1.14. Spermatogenezis sürecinin evreleri (Ross ve Pawlina, 2006)

1.1.3.3.1. Spermatogonyal faz (Spermatositogenez)

Spermatogonyumların mitoz bölünme ile çoğalarak primer spermatositlere farklılaşması evresidir. Germinal epitelden bulunan farklılaşmamış kök hücreler olan tip A koyu spermatogonyumlar, mitotik bölünmeler geçirerek yeni hücre tiplerini oluşturur. Yeni hücre tiplerini oluşturabilmesi için ya tip A koyu spermatogonyumlar olarak kök hücreler bölünmeye devam edebilir ya da tip A açık spermatogonyumları oluşturabilir. Tip A açık spermatogonyumlar hormonal uyarılarla birlikte mitoz bölünme geçirirler ve tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmesi primer spermatositler oluşmadan kısa bir süre önce DNA'larını kopyalarlar. Bundan dolayı primer spermatositler normal sayıda kromozom ($2n$) ve iki katı kadar DNA'ya ($4d$) sahiptir. (Gartner ve Hiatt, 2016; Ross ve Pawlina, 2006; Suede ve ark., 2022).

1.1.3.3.2. Spermatosit fazı (Mayoz)

Primer spermatositlerde mayoz bölünmenin profaz evresinde yaklaşık 22 gün kalır ve bu evrede kromatinler görülebilen kromozomları oluşturacak şekilde yoğunlaşır. Birinci mayotik bölünmeyle birlikte oluşan hücreler sekonder spermatositlerdir. Sekonder spermatositler N kromozoma ($22+X$ ya da $22+Y$) ve $2d$ DNA'ya sahiptirler. İnterfaz evresinde çok kısa kaldıkları için, hızlı bir şekilde ikinci mayoz bölünmeye girerler. Bu

yüzden testis kesitlerinde sekonder spermatositleri görmek mümkün değildir. İkinci mayoz bölünmenin sonunda, her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner. Haploid (N) kromozoma sahip yeni hücreler olan spermatidler oluşur.

Birinci mayoz bölünmenin profazının alt evreleri, leptoten, pakiten, zigoten ve diptoten olmak üzere dört fazı geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar. Zigoten-pakiten evresinde homolog kromozomların eşleşmesini kolaylaştıran sinaptonemal kompleks oluşur. Dört evrede homolog kromozomların sinapsı ve homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri arasında genetik bilgi değişimi crossing-over adı verilen olay pakiten evresinde gerçekleşir. Daha sonra hücreler metafaz evresine ve anafaz evresinde eşleşmiş homolog kromozomlar iğ iplikleri ile zıt kutuplara çekilirler (Gartner ve Hiatt, 2007; Junqueira ve Carneiro, 2009; Kierszenbaum, 2006; Ross ve Pawlina, 2006).

Erken dönem ya da yuvarlak spermatidler, N kromozom ve 1c DNA içerirler. Mayoz bölünme sonucu meydana gelen spermatidler bölünmeye uğramazlar, Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmalarına göç ederek bir dizi yapısal değişikliğe uğrayarak spermiyogenezis adı verilen bir farklılaşma sürecini başlatırlar. Bu yapısal değişiklikler; akrozom oluşumu, flagellum şekillenmesi, kromatin kondensasyonu (yoğunlaşması) ve fazla sitoplazmanın atılmasıdır. Spermatidin bu yapısal değişikliği geçirdiği döneme, geç dönem spermatid (uzamış spermatid) evresi denir (Gartner ve Hiatt, 2016; Junqueira ve Carneiro, 2009; Kierszenbaum, 2006).

1.1.3.3.3. Spermatid fazı (Spermiyogenez)

Spermiyogenezde, spermatidler olgun sperme farklılaşırlar ve bu son aşamada yeniden şekillenmeye uğrarlar. Spermiyogenez dört faza ayrılır ve bu fazlar meydana gelirken spermatidler fiziksel olarak birbirlerine tutunmuş halde bulunur (Ross ve Pawlina, 2006).

Golgi fazı

Spermatidin, çok sayıda Golgi kompleksinin olduğu bölgede kümelenen Periyodik Asit-Schiff (PAS) pozitif küçük granüllerin bulunmasıyla karakterize bir evredir. Proakrozomal granüller, glikoprotein bakımından zengin bir içeriğe sahip olup, nukleus zarı yakınındaki membranla sınırlı olan akrozomal veziküllerle birleşirler. Akrozomal vezikül genişler ve içeriği artar. Vezikülün pozisyonu ise gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirlerken, sentriyoller jukstanükleer bölgeden spermatidin arka yönüne göç eder. Burada flagellalar aksonemi oluşturur ve sentriyoller yeniden nukleusa göç ederken hareket ettikçe aksonem birleşenleri çevresine sarılır (Junqueira ve Carneiro, 2009; O'Donnell ve ark., 2017; Ross ve Pawlina, 2006).

Kep fazı

Akrozom vezikülü nukleusun ön yarısından daha fazlasını kaplayacak şekilde genişler ve şapka gibi bu bölümü örter. Bu yapıya akrozomal kep denir. Nukleus zarının buraya bakan bölümünde porlar kaybolur, nukleustaki yoğunlaşma devam eder ve nukleus etrafını saran akrozomal kep kalınlaşır. (Gartner ve Hiatt, 2016; Ross ve Pawlina, 2006).

Akrozom fazı

Spermatid kendini yeniden hizalayarak baş kısmı Sertoli hücresinin içine gömülür ve bazal laminaya doğru yönelir. Gelişen flagellum seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Spermatidin yoğunlaşan nukleusu yassılaşır ve uzar. Akrozom, hücre zarının apikal kısmına iyice yaklaşır. Sitoplazmik mikrotübüller silindirik kılıf şeklinde organize olurlar ve nukleusu çevreleyen manşet meydana gelerek spermatidin arka kısmına doğru ilerlerler.

Sentriyoller, nukleus arka yüzüne doğru göç ederek gelişmekte olan spermatozoonun boyun parçasını oluşturmak üzere değişime uğrarlar. Nukleusa bağlı olan sentriyolden kaynaklanan dokuz kalın lif aksonemin mikrotübülünün periferinde yer alan dış yoğun lifler olarak flagellum içerisinde uzanır. Bu dış yoğun lifler, nukleus ve flagellumu birleştirdiğinden dolayı bağlayıcı parça olarak adlandırılır. Plazma zarı flagellum yüzeyini kaplamak üzere arkaya doğru uzar ve silindir yapıdaki mikrotübül kılıfı kaybolur. Mitokondriyonlar flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça denilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu kalınlaşan bölge spermatozoonların hareketlerinin kaynağı olan yerdir. Orta parçanın distalinde yer alan iki longitudinal fibröz kolon ve çok sayıda bağlayıcı halka içeren fibröz kılıf, esas parçanın dokuz adet longitudinal lifi çevreleyerek flagellumun ucuna yakın bir kısmına kadar ilerler. Fibröz kılıfın distalinde kalan, sadece aksonemi içeren bu bölüme, son parça denir (Gartner ve Hiatt, 2016; Junqueira ve Carneiro, 2009; Ross ve Pawlina, 2006).

Olgunlaşma fazı

Spermatid sitoplazmasının miktarında azalmanın görüldüğü son evredir. Spermatid sitoplazmasında artık cisimler oluşur. Bu artık cisimler spermiyasyon aşamasında bırakılarak Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilip ortadan kaldırılır. Spermatidler birbirleri ile olan bağlantılarını kaybederek, Sertoli hücrelerinden ayrılırlar ve lümene düşerler (Ross ve Pawlina, 2006).

1.1.4. Testisin Histofizyolojisi

Testis dokusu spermatozoon üretimi ve spermiyogenez ile ilgili ekzokrin fonksiyonları ve erkek cinsiyet hormonları olan androjenleri salgılaması endokrin fonksiyonlara sahiptir (Basciani ve ark., 2010; Junqueira ve Carneiro, 2009).

Testisin endokrin fonksiyonu, hipofizin adenohipofiz'in pars distalis bölgesinde bulunan gonadotrop hücrelerinin ürettiği gonadotropinler olan FSH ve LH tarafından düzenlenir. Bu gonadotropinler, testisin işlevini denetlerler ve erkeklerde yaklaşık %80'i hem LH hem de FSH içerir (Ilacqua ve ark., 2018; Junqueira ve Carneiro, 2009).

FSH, Sertoli hücrelerinden ABP'nin sentez ve salgılanmasını sağlar. ABP, testosteron ile bağlanarak testosteronu seminifer tübül lümenine taşır. Ayrıca spermatogenezis için gerekli olan FSH hormonunun yoğunlaştırılmasını sağlar ve spermatogenezisin uyarılması sağlanır. FSH'nin etkisiyle Sertoli hücrelerinden, Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ve FSH'nin salınımını aktive eden 'aktivin' ve inhibe eden 'inhibin' gibi proteinler de üretilir (Junqueira ve Carneiro, 2009).

LH, Leydig hücrelerini uyarır ve testosteron yapımını uyarır. Hipofiz bezinden FSH salgılanması negatif negatif feedback (geri bildirim) ile düzenlenir. Testosteron sentezi arttığında LH salınımı baskılanırken testosteron sentezi azaldığında LH salınımı artar (Gartner ve Hiatt, 2007; Junqueira ve Carneiro, 2009).

INSL-3, üreme ile ilgili gelişimsel süreçlerin düzenlenmesinde önemli bir faktör olarak ortaya çıkar (Foresta ve ark., 2004). INSL-3, doğum öncesi ve sonrası Leydig hücrelerinde bulunur ve endokrin işlevi ise, gubernakulum üzerindeki etkisiyle testis inişinin transabdominal evrede düzenlenmesidir (Ilacqua ve ark., 2018).

Testosteron, erkeklerde kanda bol miktarda bulunan önemli bir androjendir. Mevcut androjenlerin yaklaşık %95'i testisten gelirken, diğer kısmı ise adrenal bezlerden üretilir. Testiste androjenlerin üretimini sağlayan hormon Leydig hücreleridir. Testosteron, kolesterolden sentezlenir. Hormon sentezi, Leydig hücrelerinin uyarılmasıyla meydana gelir. Kolesterol düşük yoğunluklu lipoproteinlerden (LDL) reseptör aracılı endositoz yoluyla hücreye eklenebilir veya asetil koenzim A'dan başlayarak Leydig hücreleri içinde novo (yeniden) sentezlenebilir (Sriraman ve ark., 2005). Testosteron, 5 α -dihydrotestosterone (DHT), androsteron, androstenedion, 17-hydroxyprogesterone (17-OH-Pg), progesterone (Pg) ve pregnenolon testisin ana salgı ürünleridir. Üretilen testosteronun küçük bir kısmı testiste depolanırken, androjen olarak kanda salgılanır (Ilacqua ve ark., 2018).

Endokrin faktörlerin ve metabolitlerin taşınması ve testis sıcaklığının düzenlenmesiyle birlikte mobilizasyon testisin vaskülarizasyonun iki ana rolüdür. Seminifer tübüllerin loblara bölünmesi testiküler parankimin arteriyel beslenmesi ile olur. Her lobül, lobüllerin lateral bölgelerinde olan ve Leydig hücreleri arasında dallanan segmental arter tarafından beslenir. Erkeklerde testis sıcaklığı, vücut sıcaklığının yaklaşık 3-4°C altında ve skrotal cilt sıcaklığının ise yaklaşık 1,5-2,5°C üzerindedir. Spermatogenezis için önemli olan 35°C

sıcaklık; spermatik arteri saran venlerin oluşturduğu plexus pampiniformis ile musculus cremaster'in ve skrotum kesesinin dartos kasının ortam sıcaklığına göre kasılıp gevşemesiyle ve skrotumda yer alan ter bezleri sayesinde skrotumda sağlanır. Testisin sıcaklığının düşük tutulması, plexus pampiniformis sayesinde testislere giren sıcak arteriyel kanın testisten dönen daha düşük sıcaklıkta olan venöz kan ile soğutulması ile gerçekleşir. Ven ve arterlerin bir arada ilerlemesine Ters Akım Isı Değişim Sistemi denir (Ilacqua ve ark., 2018; Junqueira ve Carneiro, 2009).

1.2.Kadmiyum

Kadmiyum (Cd), gıdalar, su ve hava yoluyla canlı sağlığına zarar veren toksik bir maddedir. Atom numarası 48, yoğunluğu 86 cm³ 'tür. Erime ve kaynama ısıları sırasıyla 320.9°C, 765°C 'dir. Saf Cd, gümüş-beyaz renkte bir ağır metaldir (ATSDR, 2012; Raikwar ve ark., 2008).

Doğal oluşan izotopları radyoaktif değildir. Doğada bulunan mineral formları; kadmiyum oksit, kadmiyum klorür, kadmiyum sülfid ve kadmiyum sülfattır ve kadmiyum klorür ve kadmiyum sülfid su içerisinde çözünür (Mendez-Armenta ve Rios, 2007).

Yaygın olarak bulunması ile beraber, yiyecek, içecek, solunum gibi doğadaki hemen hemen her şeyde mevcuttur. Cd'nin vücuttan atılımı azdır ve vücutta birikim yaparak insan sağlığı üzerinde olumsuz etki gösterir. Ayrıca yarılanma ömrü yaklaşık 20-40 yıl gibi uzun olduğu için, konsantrasyon yaş artıka artar (Bhardwaj ve ark., 2021).

1.2.1. Kadmiyum'un Kaynakları ve Maruziyet Yolları

Cd, hem doğal hem de insan kaynaklı olarak çevreye yayılım gösterir. Doğal olarak, oksijen, klor, kükürt vb. elementlerle veya çeşitli kurşun, bakır gibi metallerle kombinasyon halinde bulunur (Chatterjee ve ark., 2017). Cd, orman yangınları ve volkanik patlamalar gibi olayların neden olduğu kayaların ve toprakların kademeli olarak erozyon ve aşınması sonucu da ekosistemde birikmektedir.

İnsan kaynaklı kaynaklar ise, kömür yakan tesislerden gelen hava, çeşitli pestisitler veya gübreler, ahşap koruyucular, metal madenciliği, atıkların/yakıtların yakılması, kaynak, boya, plastik gibi endüstriyel faaliyetleri içerir (Sahni, 2011). Bunlara ek olarak, elektronik bileşimlerin yapı ve imalatında, özellikle şarj edilebilir nikel kadmiyum piller gibi farklı alanlarda kullanılmaktadır (Genchi ve ark., 2020a). Bunun yanı sıra, Cd'nin yüksek miktarda birikim gösterdiği kabuklular, çift kabuklu yumuşakçalar, istiridyeler, kafadanbacaklılar ve yengeçler gibi deniz ürünlerinin tüketilmesi diğer canlılarda Cd toksisitesine yol açmaktadır. Karaciğer ve böbrek gibi sakatat ürünleri, yağlı tohumlar, kakao çekirdekleri ve bazı yabani

mantarlarda yüksek Cd içeriğine sahiptir. Pirinç ve buğday, yeşil yapraklı sebzeler, patates, havuç ve kereviz gibi bitkiler diğer bitkilere nazaran daha yüksek konsantrasyonlarda Cd depolar (Genchi ve ark., 2020b). Bunlara ek olarak Cd alımı ve birikiminin başka bir önemli kaynağı da tütün mamullerinin kullanımıdır (ATSDR, 2012).

1.2.2. Kadmiyum'un Metabolizması

Kadmiyum'un biyolojik yarılanma ömrü uzun olduğu için insan vücudunda birikir (ATSDR, 2012). Cd vücuda pulmoner veya gastrointestinal yollarla girdikten sonra, emilir ve albümin gibi büyük proteinlere bağlanarak plazmada taşınır. Akut Cd maruziyetinin ilk organı olan karaciğere ulaşır. Karaciğerde Cd-albümin kompleksi ayrıştırılır ve serbest bırakılan Cd, metalotiyoinin sentezini başlatır (Nordberg ve ark., 1994). Hepatositlerde nekroz/apoptoz olduktan sonra Cd-metalotiyonin birleşigi sinüzoidlere geçer. Sinüzoidlerde Cd emildikten sonra bir kısmı Cd-glutatyon konjugatları şeklinde safra yolu ile birlikte enterohepatik döngüye girer. Safra sisteminde enzimatik olarak Cd, Cd-sistein kompleksine indirgenir ve Cd yeniden ince bağırsaklardan geçer (Godt ve ark., 2006).

Cd-metallotionein birleşiginin diğer kısmı ise plazma içinde serbest hareket eder. Öncelikle böbreğe ve diğer organlara taşınır. Böbrek kronik Cd maruziyetin ana organıdır. Böbrekte glomerüler membrandan taşınarak tübüler sıvıya geçer, proksimal tübülün fırçamsı kenarlı hücreleri tarafından hücre içine alınır ve Cd-metallotionein kompleksi lizozomlarda ayrıştırılır. Böylece Cd serbest kalır (Nordberg ve ark., 1994). Sonuç olarak tübül hücrelerinde nekroz oluşur.

Dünya Sağlık Örgütü tarafından insanlar için Cd'nin tolere edilebilir tüketim miktarı; sıvı tüketiminde 3 µg/l, diyet alımlarında 25 µg/kg ve inhalasyon yolu ile alımlarda 5 ng/m³ olarak belirlenmiştir (WHO, 2010). Cd oral olarak alındıktan sonra, yaklaşık %5'inin absorbe olduğu ve karaciğerde inaktif forma dönüştüğü bildirilmektedir. Sindirim sistemi için Cd emilim oranı %1-6 arasındadır. İnhalasyon yoluyla alınan Cd'nin ise %10-30'u akciğerlerde depolanmaktadır ve depolanan Cd'nin bir kısmı solunum yollarına yerleşmektedir. Kalan kısmı ise atılmaktadır. Akciğerlerde biriken Cd'nin %50-100'ü emilmektedir. Sigara kullanımı ile Cd birikimi arasındaki ilişki incelendiğinde, sigara içmeyen yetişkinlerde kan Cd seviyesi ortalama 0,376 µg/L iken, sigara tüketenlerde bu oranın yaklaşık 5 kat fazla olduğu görülmektedir (ATSDR, 2012).

1.2.3. Kadmiyum'un Toksisitesi ve Testis Üzerine Etkisi

Vücuda alınan Cd gibi ağır metaller, çeşitli doku ve organlarda birikim gösterirler ve vücuttan atılımları zordur (Jaishankar ve ark., 2014). Çoğu ağır metalde olduğu gibi Cd

toksitesitesi için de hedef organ karaciğerdir. Ancak, karaciğerin yanında böbrek, akciğer, kemik, pankreas, duodenum ve testis dokularında da birikim gösterip doku hasarına neden olmaktadır. Doğal veya insani yollarla Cd maruziyeti sonucunda, toksik miktarda Cd'ye maruz kalma, böbrek ve karaciğer disfonksiyonu, pulmoner ödem, testis hasarı, osteomalazi, adrenal ve hemotopoietik sistemde hasar gibi çeşitli olumsuz etkilere neden olmaktadır. Dişi üreme sisteminde Cd, menarş yaşının erken olması, menstrüasyon süresinin uzaması, hormonal bozukluklar, erken doğum gibi etkilere sahiptir (Kumar ve Sharma, 2019).

Cd maruziyetinin iskelet sisteminin de demineralizasyona neden olduğunu gösteren Staessen ve arkadaşları demineralizasyonla kemik hücrelerinin Cd ile doğrudan etkileşime girdiğini, mineralizasyonu azalttığını ve prokollajen C-proteinazlarını ve kollajen üretimini inhibe ettiğini göstermiştir (Staessen ve ark., 1999). 2010 yılında Nawrot ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Cd maruziyetinde osteoporoz ile ilişkili ağrı, fiziksel bozulma, yaşam kalitesinde azalma gibi bulgulara rastlanmıştır. Menopoz sonrası kadınlarda osteoporotik kırılmalar en yaygın olanıdır (Nawrot ve ark., 2010). Yüksek Cd maruziyeti ile parathormon seviyeleri düşer ve kemik dokudan kalsiyum salınımı indüklenir. Böylece Cd, kalsiyum, D3 vitamini ve kollajen metabolizması ile etkileşir (Rafati Rahimzadeh ve ark., 2017).

Cd öncelikli olarak böbrek ve karaciğerde birikim gösterir. Cd'a çevresel veya mesleki olarak maruz kalınmasıyla beraber böbrek hasarı, proteinüri, kalsiyum kaybı ve tübüler lezyonun erken belirtileri görülebilir (Rafati Rahimzadeh ve ark., 2017). Proksimal tübüllerde oluşan hücresel hasar, idrarda kalsiyum, amino asitler, enzimler ve protein miktarının artması ile sonuçlanmaktadır (Bernard, 2004). Karaciğer ise vücuttaki biyolojik maddelerin metabolizmasında ve detoksifikasyonunda aktif rol oynar. Absorbsiyonun çoğu bağırsakta gerçekleşir fakat başlangıçta maddeler karaciğerden geçer ve birikir (Saïdi ve ark., 2013). Karaciğerde oluşan hasar, yüksek serum glutamik oksaloasetik transaminaz, glutamik piruvik transaminaz ve alkalın fosfataz seviyeleri, hepatik nekroinflamasyon, alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı olarak oluşur (Hyder ve ark., 2013; Kang ve ark., 2013). Ayrıca metalletiyonein, Cd'ye yüksek afinite göstererek ve hepatotoksik potansiyeli azaltır. Cd hepatotoksitesitesinin diğer etkenleri; Cd⁺² iyonunun mitokondrideki kritik moleküller üzerindeki sülfhidril gruplarına bağlanması, oksidatif stres, mitokondriyal geçirgenlik geçişi, mitokondriyal disfonksiyon, mitokondriyal parçalanma ve apoptoz olarak gösterilmektedir (Bucio ve ark., 1995; Casalino ve ark., 2002; Xu ve ark., 2013). Karaciğer Cd toksitesitesine maruz kaldığında, Kupffer hücrelerinin ve nötrofil infiltrasyonunun aktive olmaktadır. Buna ek olarak, proinflamatuvar sitokinler ve kemokinler de toksik süreçte yer almaktadır (Rikans ve Yamano, 2000). Lipid peroksidasyonunun artması ve/veya hücre içi glutatyon

seviyelerinin değiştirilmesinin bir sonucu olarak Cd kaynaklı oksidatif stres, metallotiyonein ve glutatyon 2'nin yukarı regölasyonu ile azaltılmaktadır.

Cd inhalasyon yolu ile vücuda girdiğinde ana hedef akciğerlerdir. Sürekli Cd maruziyetiyle birlikte akciğer tümörü, pulmoner fibröz ve amfizem gelişir (Oberdörster, 1991). Buna ek olarak, Cd inhalasyonu nötrofil akışı, alveolar makrofajlar ve epitelyal akciğer hücrelerinin büyümelerini indükleyen pulmoner inflamatuvar görölmektedir (McKenn ve ark., 1997). Bunlara ek olarak, akciğer dokusunda sıçanların Cd'ye akut olarak maruz kalmasına karşı inflamatuvar yanıtın aktive edilmesi ile sonuçlanabilir (Manca ve ark., 1994).

Erkek üreme sistemi organı olan testislere ise Cd'nin etkisi oksidatif stres, germ hücre apoptozu, testis kanaması, kan-testis bariyerinin (BTB) bozulması ve kısırlığa neden olduğu gösterilmiştir (Wang ve ark., 2011). Testislerde toksik miktarda Cd maruziyetlerinde; oksidatif stres oluşumu, lipid peroksidasyonun artması, antioksidan savunma sisteminin bozulması, sülfidril gruplarına etkilenmesi ile glutatyon depolarının tüketilmesi, kalsiyum dengesinin ve mitokondriyal fonksiyonlarının bozulması ve nekroz ile apoptoza bağlı hücreölölmlerin meydana gelmesi gözlenmiştir (Genchi ve ark., 2020b). Testislerde Cd; apikal testiküler dejenerasyona, şiddetli hemorajik nekroza ve seminifer tüböl kaybına ve Leydig hücrelerindeki testosteron üretiminin bozulmasına yol açar. Ayrıca Cd, spermatojenik hücrelere de etki eder ve bu da fertilitiyi önemli ölçüde azaltır (Wang ve ark., 2011). Seminifer tüböllerdeki atrofi sonucu olarak da sperm yapımı durur (Zhao ve ark., 2017). Cd'nin testis fonksiyonlarını bozacağından dolayı Leydig hücrelerinden sentezlenen androjen salgısını da önemli ölçüde düşürür.

1.3.Mitofaji

Hücrede bulunan mitokondri, enerji üretimi, temel biyomolekül sentezi, kalsiyum tamponlama, pro-apoptatik sinyalleşme gibi merkezi işlevleri olan bir çift zarlı organellerdir (Van der Blik ve ark., 2017; Spinelli ve Haigis, 2018). Mitokondrinin işlevsel olarak öneminin büyük olması sebebiyle, proteomundaki herhangi bir bozukluğunun hücreyi kötü etkileyeceğinden nörodejeneratif bozukluklar, kalp hastalıkları, diyabet ve kansere kadar uzanabilecek hastalıklara neden olabilmektedir (Kausar ve ark., 2018).

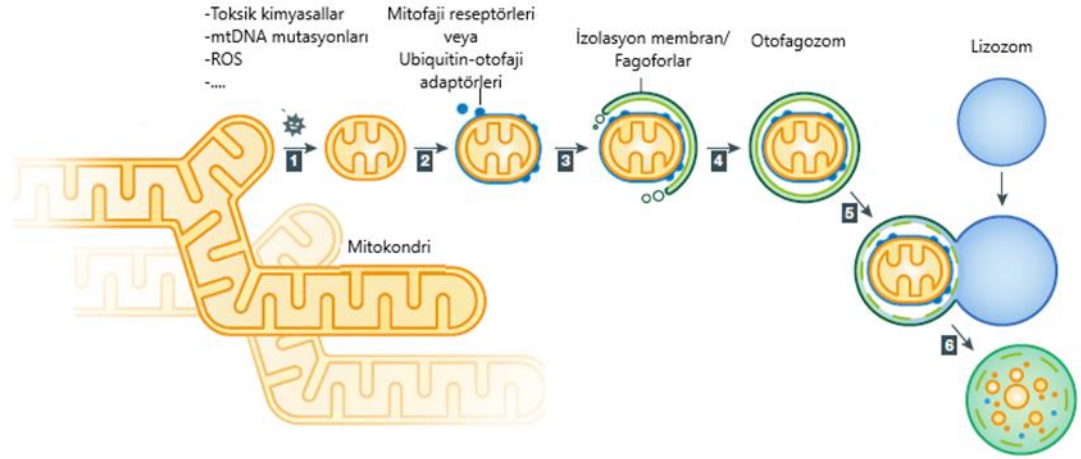
Enerji üretimi görevi sebebiyle mitokondri reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin birinci bölgesidir (Kausar ve ark., 2018). ROS üretiminin fazla olduğu zaman hücre için zararlıdır (Peoples ve ark., 2019). ROS birikiminin kontrolü için süperoksit dismutaz (SOD), tioredoksin redüktaz ve glutatyon peroksidaz gibi farklı tiplerde antioksidan sistemleri bulunur (Mailloux, 2018).

Mitokondriye verilen hasar, ROS savunma ve proteostaz gibi sistemlerin kapasitesini aşarsa, hasar gören mitokondriler lizozomal ayrıştırma yoluyla uzaklaştırmak üzere mitokondriyi seçici olarak yıkımı bir makrotofaji türü ile yapılmalıdır (Şekil 1.15) (Chen ve ark., 2020; Rodriguez-Enriquez ve diğerleri, 2006).

Memeli hücrelerinde lizozomal mitokondri, 1966 yılında ilk olarak De Duve ve Wattiaux tarafından yapılan erken elektron mikroskopi çalışmalarıyla gözlemlendi (De Duve ve Wattiaux, 1966). Ancak 2005 yılında J.J. Lemasters tarafından ilk kez seçici mitokondriyal otofaji veya mitofaji olarak adlandırıldı (Lemasters, 2005).

Hücreler için tehdit haline gelmeden önce gereksiz veya işlevsiz mitokondriler mitofaji ile ortadan kaldırılır. Oksidatif stres, hipoksi, mitokondriyal depolarizasyon ve mitokondriyal DNA (mtDNA) hasarı farklı stres türleri altında aktive olan mitofaji mekanizmaları tanımlanmıştır (Eid ve ark., 2016; Fugio ve ark., 2020). Mitofajiyi başlatan hasarlı mitokondri üzerindeki hedefleme sinyalleri göz önüne alınarak aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir:

- Ubiquitin-bağımlı mitofaji
 - o PARKIN bağlı (PTEN-bağımlı kinaz 1 (PINK1)-PARKIN yolu)
 - o PARKIN'den bağımsız ancak ubiquitin bağımlı mitofaji
- Ubiquitin'den bağımsız veya reseptör dayalı mitofaji
 - o Mitofaji reseptörleri veya inhibitörü olarak apoptoz ile ilgili proteinler
 - o Diğer mitofaji reseptörleri
- Lipid bazlı mitofaji
 - o Kardiyolipin temelli
 - o Sfingolipid temelli
- Mikromitofaji



Şekil 1.15. Mitofaji (Onishi ve ark., 2020)

1.3.1. Ubiquitin-Bağımlı Mitofaji

Ubiquitin bağımlı mitofaji, hasarlı veya gereksiz olan mitokondri yüzeyinde bulunan sinyal olan ubikuitine dayanır.

1.3.1.1. PARKIN-bağımlı (PINK1-PARKIN yolları)

PINK1-PARKIN yolağı, mitokondriyal serin/treonin protein kinaz olan PINK1'e ve sitozolik E3 ubiquitin ligaz olan PARKIN'e bağlıdır (Sekine ve Youle, 2018). Temel koşullar altında, PINK1, pozitif yüklü amino-terminal mitokondriyal hedefleme dizisinin yardımıyla iç (TIM) ve dış (TOM) zarların mitokondriyal translokazları yardımıyla mitokondriye aktarılır. PINK1'in mitokondriye aktarılmasından sonra, TIM'de iken iki kez bölünür. İlk bölünme matriks peptidazı tarafından yapılır ve mitokondriyal hedefleme dizisini ortadan kaldırır. İkinci bölünme ise TIM kompleksinin proteaz presenilin associated rhomboid-like proteini (PARL) tarafından Ala 103 ve Phe 104 arasındaki transmembran bölgesinde meydana gelir (Sekine, 2020). PARL ile bölünmüş PINK1 sitoplazmaya salınır ve proteazom tarafından N-uç kuralı ile ubiquitinasyon hızla bozulur, böylece PINK1'in bazal seviyeleri düşmüş olur (Yamano ve Youle, 2013). Mitokondriyal dış membran (MOM) üzerinde olan stabilizasyon ve otofosforilasyondan sonra PINK1, Parkin'i ilk olarak Ser65'te MOM proteinlerin konjuge edilmiş olarak bulunan ubikuitinleri fosforile eder. Parkin, fosforlanmış ubikitin (pSer65-Ub) sitozolden mitokondriye translokasyonunu sağlar (Wauer ve ark., 2015). Kısmen aktive olan pSer65-Ub bağlı Parkin, MOM proteinlerini daha da çoğaltır ve PINK1 için daha fazla substrat sağlar. Böylece sitozolden mitokondriye geçiş sağlayan ikinci bir Parkin dalgasını çeken pSer65-Ub üretilir. Bunun yanında PINK1, Ser 65'te pSer65-Ub bağlı Parkin'i fosforile etmesiyle birlikte inhibe olan E3 ubiquitin ligaz aktivitesi

çok fazla miktarda aktive olur. Bu olay MOM proteinleri üzerinde ubiquitin zincir oluşumunu daha da artırır.

Parkin'in mitokondriye alınmasıyla Mfn $\frac{1}{2}$, Miro $\frac{1}{2}$, VDAC, TOM'lar ve mitokondriyal heksokinaz gibi gibi çoklu MOM proteinlerinin yaygınlaşmasına ve proteomal bozunmasına yol açar.

1.3.1.2.PARKIN-bağımsız ama ubiquitin-bağımlı mitofaji

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalar, her yer bağımsız olan, ancak PINK1 veya Parkin'den bağımsız olan mitofaji yolları tanımlanmıştır. Bu yollar ya paralel olarak ya da klasik PINK1-PARKIN yollarına uygun olarak hareket eder.

1.3.2. Ubiquitin-Bağımsız veya Reseptöre Dayalı Mitofaji Yolları

Bu mitofaji türü, BNIP3 (BCL2/adenovirüs E1B 19 kDa protein), NIX (NIP3 benzeri protein X)/BNIP3L, FUNDC1 (FUN14 bölgesi içeren 1) gibi, tipik veya tipik olmayan LC3 etkileşim bölgesi (LIR) kısımları aracılığıyla doğrudan LC3 veya GABA-reseptör ilişkili protein (GABARAP) ile etkileşime girebilen otofaji reseptörlerine bağlıdır (Ney, 2015; Gao ve ark., 2020). Bu reseptörler çoğunlukla MOM'da bulunur ve mitokondriyal temizleme için LIR'lerine bağlıdır.

1.3.3. Lipid Bazlı Mitofaji

Mitokondriyal stres altında MOM'a yer değiştirme kabiliyetine sahip belirli lipid sınıfları LC3 ile doğrudan etkileşime girebilir. MOM'daki bu lipid-protein etkileşimi, mitofajiyi başlatmak için otofagozomların işe alınmasını kolaylaştırır (Choubey ve ark., 2021).

1.3.4. Mikromitofaji

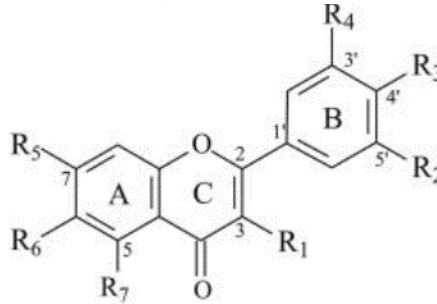
Mitokondrinin lizozoma iletim şekline bağlı olarak mitokondriyal eliminasyon, makromitofaji ve mikromitofaji olmak üzere iki yolla gerçekleşir (Lemasters, 2014). Makromitofaji, mitokondriyi bozunma füzyonu yolu ile lizozomlara aktaran ve otofagozom olarak isimlendirilen çift zarlı kesecik oluşturan seçici makrotofaji türüdür. Mikromitofaji ise, mitokondrinin otofagozom yokluğunda bozulması için, doğrudan lizozomlara ayrılmasıdır (Soubannier ve ark., 2012). Buna ek olarak, lizozomlara aktarılan mitokondri türevli veziküllerin oluşumuyla tüm organellerin yerine sadece mitokondrinin hasarlı kısmının hedefli olarak da çıkarılmasıdır. Bu mikromitofaji türünde, mitokondriyal kalite kontrol için mitokondriyi tam olarak çıkarmayı karşılayamayan nöronlar ve

kardiyomiyositler gibi bölünmeyen post-mitotik hücreler için mitokondriyal kalite kontrolünde önemli bir yer tutar (Roberts ve ark., 2016).

1.4.Quercetin

1.4.1. Quercetin'in Kimyasal Özellikleri

Quercetin (Que) (C₁₅H₁₀O₇), flavonoid bileşiklerinden olan flavonol sınıfındandır. Doğal olarak meydana gelen polar oksin taşıma inhibitörüdür (Fischer ve ark., 1997). Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (IUPAC)'ye göre Quercetin'in kimyasal formülü 3,3',4',5,7- pentahidroksilavon (3,3',4',5,7-pentahidroksi-2-fenilkromen-4-bir) ve 3,5,7,3' ve 4' bölgelerinde bir OH grubuna sahiptir (Şekil 1.16). Que, parlak sarı renkte iğne kristali yapısındadır. Moleküler ağırlığı 302,23 g/mol'dür.



Systematic name	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Quercetin	OH	OH	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnoside (quercitrin)	O-Rha	OH	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnosyl-(1→6)-glucoside (rutin)	O-RG	OH	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 3- <i>O</i> -glucoside (isoquercitrin)	O-Glu	OH	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 3- <i>O</i> -galactoside (Hyperoside)	O-Gal	OH	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 7- <i>O</i> -glucoside	OH	OH	OH	H	OH	H	O-Glu
Quercetin 3- <i>O</i> -rhamnoside-7- <i>O</i> -glucoside	O-Rha	OH	OH	O-Glu	OH	H	OH
Quercetin 6- <i>C</i> - glucoside	OH	OH	OH	H	OH	Glu	OH
Quercetin 3'- methyl ether (isohramnetin)	OH	O-Met	OH	H	OH	H	OH
Quercetin 7- methyl ether (rhamnetin)	OH	OH	OH	H	OH	H	O-Met
Quercetin 4'- methyl ether (tamarixetin)	OH	OH	O-Met	H	OH	H	OH

Gal: galactose; Glu: glucose; Rha: rhamnose; RG: rhamnosyl glucose; Met: methyl

Şekil 1.16. Quercetin'in Kimyasal Yapısı

Que, bağılı şeker içermeyen bir aglikondur. Que glikozit, OH gruplarından birinin yerine bir glikozil grubunun eklenmesi ile oluşur. Eklenen glikozil grubu, çözünürlüğü, absorpsiyonu ve in vivo etkileri değiştirebilir (Ross ve Kasum, 2022).

1.4.2. Quercetin'in Diyet Kaynakları

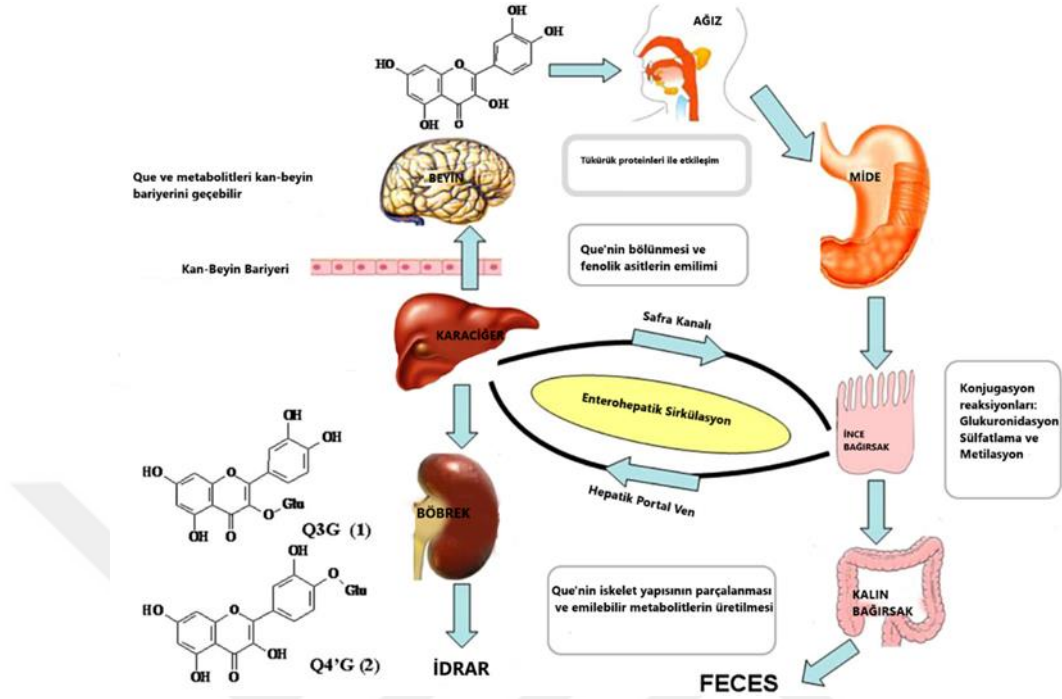
Flavonoller, flavonoid grubunun doğada en fazla bulunan formudur. Que'de flavonol grubunun bir üyesidir ve bitkilerde çok fazla bulunur. Elma, çilek, kapari, üzüm, soğan, arpacık, çay ve domates gibi sebze ve meyvelerde bulunmasına rağmen, birçok tohum, fındık, çiçek, yaprak ve ağaç kabuğunda da bulunur. Bunların yanında Ginkgo biloba, Hypericum perforatum ve Sambucus canadensis gibi tıbbi bitkilerde yer alır (Wiczowski ve ark., 2008). Araştırmalar Que'nin farklı bitki kaynaklarından elde edilen çeşitli ballarda bulunduğunu ortaya koymuştur (Petrus ve ark., 2011). En yüksek konsantrasyona sahip gıda 234 mg/100 g'ında bulunan çiğ kaparinin yenilebilir kısmıyken, en düşük konsantrasyon da olan besin ise 2 mg/100 g siyah veya yeşil çay'dır (Bhagwat ve ark., 2011).

Que'nin diyet alımı ülkeden ülkeye farklılık gösterir. Örneğin, Kuzey Çin'in Suihua bölgesinde, flavonolün ana besin kaynakları elma, patates ve portakal iken, Harbin bölgesinde ise elma, patates, kereviz ve patlıcan Que'nin ana besin kaynaklarıdır (Zhang ve ark., 2010). ABD'de ise soğan, çay ve elma yüksek miktarda Que bulunduran besinlerdir (Sampson ve ark., 2002). Japonya'da günde Que alma miktarı ortalama 16.2 mg/gün olmakla birlikte, erkeklerin Que alımı kadınlardan daha düşüktür. Alınan besinlerin başında ise, soğan, yeşil çay, kuşkonmaz, yeşil biber, domates ve kırmızı yapraklı marul gibi besinler gelmektedir (Nishimuro ve ark., 2015). Avustralya'da siyah ve yeşil çay başta olmakla beraber, soğan, brokoli, elma, üzüm ve fasulye takip etmektedir (Somerset ve Johannot, 2008).

1.4.3. Quercetin'in Emilimi, Metabolizması

Yiyeceklerden alınan Que, ağızda tükürük proteinleri ile etkileşime girerek, çözünür Que-protein ikili agregatları oluşturur (Manach ve ark., 2004). Que, mideye ulaştığı zaman güçlü bir asidik ortam ile karşılaşır ve Que'nin iskelet yapısının bozulmasına yol açan bakteriyel halka fisyonu tarafından protokateşik asit gibi emilimi midede gerçekleşen fenolik asitlere indirgenebilir (Farrell ve ark., 2012; Weldin ve ark., 2003;). İnce bağırsakta, üridin difosfat glukuronosil transferazların etkisiyle Que'nin etkin bir glukuronidasyonu ve katekol-O-metiltransferazın etkisiyle Que kapsamlı O-metilasyonu bulunur. Que'nin glikozitleri, β -glukosidazın aracılığıyla birlikte Que'ye deglikosillenir (Nemeth ve ark., 2003). Que ve Que'nin türevleri sonrasında hepatik portal ven yolu ile karaciğere taşınır.

Que ve türevlerinin adsorbsiyonu, mikroorganizmaların bu bileşikleri kalın bağırsakta asimile ederler (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. Quercetin metabolizmasının ve emiliminin şematik gösterimi (Wang ve ark., 2016)

1.4.4. Quercetin'in Biyolojik Aktiviteleri

1.4.4.1. Antioksidan aktivitesi

Que, O_2^- , NO. ve ONOO- gibi reaktif oksijen türlerinin süpürücülerinden birisi olduğu için güçlü bir antioksidan özelliğine sahiptir (Kukongviriyapan ve ark., 2012; Kim ve ark., 2013). O_2^- , NO. ve ONOO- 'nun neden olduğu oksidatif hasar, hücre ve dokular üzerinde zararlı etkiler yaratabilir ve bu etkiler kardiyovasküler hastalık, diyabet ve kanser gibi pek çok hastalığa neden olabilir (Waris ve Ahsan, 2006). Bununla birlikte Que gibi antioksidanlar oluşan radikallerle tepkimeye girerek peroksidasyonu engelleyebilir (Hollman ve Katan, 1997).

1.4.4.2. Anti-inflamatuar etki

Que'nin diğer etkileri gibi antiinflamatuar etkisi de çok güçlüdür. Bureau ve ark.'nın 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada kolloid hücrelerde ipopolisakkarit kaynaklı sitokin üretimi ile indüklenen mRNA sitokin seviyelerinin, tümör nekroz faktörü- α (TNF- α) ve interlökin- α (IL- α) gibi Que'nin de inhibe edilebileceği bildirilmiştir. Ayrıca, Que'nin ilave

edilmesiyle mikrogliyal-nöronal kültürde hücre apoptozunda azaldığı gösterilmiştir (Bureau ve ark., 2008).

1.4.4.3. Anti-kanser aktivitesi

HEP2 hücreleri ve A549 akciğer kanser hücreleri gibi yapılan in vitro çalışmalarda Que'nin güçlü bir antikanser ajanı olduğu belirlenmiştir (Gibellini ve ark., 2011; Dajas, 2012). Que'nin kanser hücrelerinin büyümesi, çoğalması ve metastazında yer alan birçok kinazın baskılanması ve antioksidan aktivitesi nedeniyle oksidatif stresin yol açtığı kanser önlenabilir (Gibellini ve ark., 2011; Baghel ve ark., 2012).



2. AMAÇ

Ağır metal olan Cd, su, hava ve gıdalar yoluyla canlı sağlığına giren toksik bir maddedir. Bu toksik maddeler vücuda alındıktan sonra birikim gösterirler ve vücuttan atılımı zordur. Toksik miktarda Cd'ye maruz kalma durumunda böbrek, karaciğer disfonksiyonu, pulmoner ödem, testis hasarı, osteomalazi, hematopoietik sistemde hasar gibi çeşitli olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bunlara ek olarak üreme sağlığı ve gelişen embriyo kalitesi üzerinde geniş ölçüde zararlı etkilere sahiptir. Testislerde oluşan maruziyet sonucunda oksidatif stres oluşumu, lipid peroksidasyonunun artması, antioksidan savunma sisteminin bozulması, mitokondriyal fonksiyonların bozulması, nekroza ve apoptoza bağlı hücre ölümünün meydana gelmesi gözlenmiştir. Aynı zamanda seminifer tübül kaybı, hemorajik nekroz, spermatojenik hücreleri de etkilemesi sonucu fertilitiyi önemli ölçüde azaltır. Cd'ye bağlı hasar sonucunda mitokondride ROS oluşumu gerçekleşir. ROS oluşumu ile birlikte hem ubiquitin bağımlı hem de reseptör bağımlı mitofajiyi indükleyebilir. Bazı antioksidanların ROS'un mitofajik etkilerini engellediği ve bu PINK1 bağımlı süreçlerin başlangıçlarını regüle edebilir. Bu antioksidanlardan biri olan Que, flavonoidler içerisinde en bol bulunan önemli bir biyoflavonoiddir. Que'nin serbest radikalleri yakalama, demir ve bakır gibi metal iyonlarını şelatlama özelliği vardır. Bundan dolayı güçlü bir antioksidandır.

Cd'nin giderek artan kullanım sıklığı ve birikimine bağlı olarak meydana getirdiği olumsuz etkiler araştırılmakla birlikte halen metabolik süreçlere olumsuz etkisi ve olası etkileşimleri net bir biçimde aydınlatılamaması, bu alanda yapılacak çalışmaları değerli kılmaktadır. Cd birikiminin vücutta en çok zarar verdiği organlardan biri olan testis özellikle fertilitenin olumsuz anlamda etkilenmesi açısından geniş kitleleri etkilemektedir. Bu nedenle testis dokusunda Cd-mitofaji ilişkisi ve Que'nin bu süreçlerdeki koruyucu etkilerinin belirlenmesi Cd'ye bağlı hasarların temelinde yer alan mekanizmaların anlaşılması ve bu hasarın giderilmesi açısından önem taşımaktadır. Yapılmasını planladığımız çalışma çerçevesinde, testis dokusu hücrelerinde Cd-mitofaji ilişkisi ayrıntılı ve zaman bağımlı olarak ilk kez irdelenecek ve bu süreçlerde Que'nin koruyucuyu etkileri Cd'nin hasarına paralel olarak değerlendirmeyi hedeflemekteyiz.

3. YÖNTEM

Çalışma için Kocaeli Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan "KOU HADYEK 1/ 2-2021" sayılı karar numarası ile 28.01.2021 tarihinde onay alındı, tüm çalışmalar etik kurul ilkelerine uygun olarak gerçekleştirildi.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Kocaeli Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Birimi'nden temin edilen 66 adet, ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen, 8 haftalık Wistar albino ırkı erkek sıçan kullanıldı. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamda, 20-22°C oda sıcaklığında, uygun kafesler içerisinde barındırılarak serbestçe beslenip su içmeleri sağlandı. Tüm hayvanlar deney süresi boyunca pelet yem ve su ile beslendi.

3.1.1. Grupların Oluşturulması ve Uygulamalar

Kontrol gruplarında 6'sar, deney gruplarında 7'ser hayvan olmak üzere gruplar oluşturuldu. Deney başından sakrifiye edilinceye kadar hayvanlar vücut ağırlıkları uygulanacak madde dozlarını belirlemek üzere günlük olarak tartıldı (Wang ve ark., 2020a).

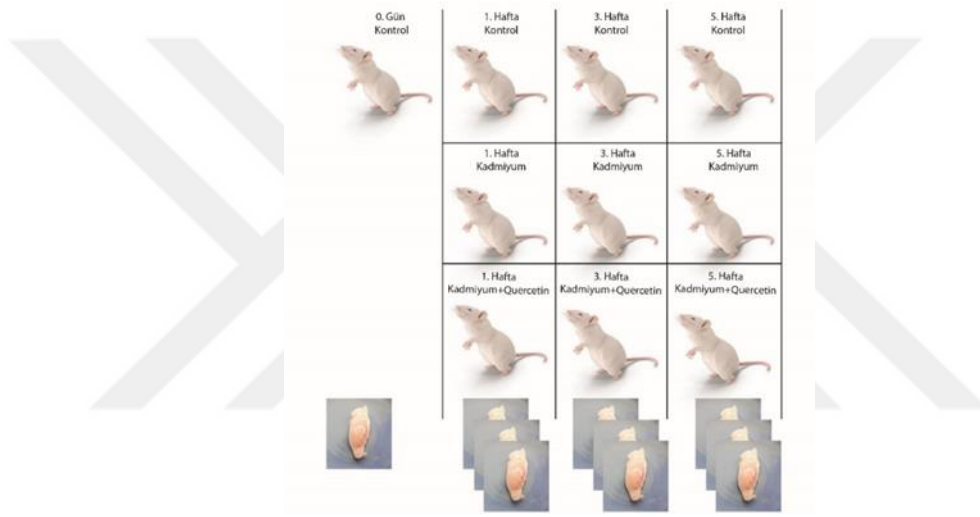
Kontrol ve deney grupları şu şekildedir;

- Kontrol grubu (n=24): 1 ml %0,9'luk salin her gün intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı.
- Kadmiyum grubu (n=21): Sıçan başına 1 mg/kg kadmiyum (Sigma-202908) her gün %0,9'luk salin içerisinde çözülerek i.p olarak uygulandı (Babaknejad ve ark., 2018).
- Kadmiyum + Quercetin grubu (n=21): Sıçan başına 1 mg/kg kadmiyum + 50 mg/kg quercetin (Sigma-Q4951) her gün %0,9'luk salin içerisinde çözülerek i.p olarak uygulandı (Babaknejad ve ark., 2018; İnce, 2020).

3.1.2. Sakrifikasyon

Deney sürelerinin (0. Gün, 1.hafta, 3.hafta ve 5. hafta) sonunda, i.p. olarak uygulanan Xylazine (10 mg/kg) ve Ketamin (90 mg/kg) anestezisi altındaki bütün hayvanlardan

intrakardiyak infüzyon ile kan örnekleri alındı. Moleküler çalışma sonuçlarının kan bileşenleri tarafından etkilenmesi için hayvanlar %0,9'luk serum fizyolojik ile intrakardiyak olarak perfüze edildi. Perfüzyon, serum setinin iğnesinin sol ventrikül içerisine sabitlenip, sağ atriyumun kesilerek serum fizyolojik solüsyonun dolaşım sistemi boyunca dolaşması ile devam etti. Perfüzyon sonrasında sıçanların karın bölgesi açılarak testisleri çıkarıldı. Sol testislerin belli bir kısmı %10'luk tamponlanmış formaldehit içerisine alınıp fikse edilerek histolojik boyamalar için belli bir kısmı ise immünfloresan çalışmalar için kullanıldı. Sağ testislerin ise belli bir kısmı elektron mikroskopi çalışmaları için %2,5'lik gluteraldehit çözeltisine alınırken, diğer kısımları ise western blot çalışmasında kullanılmak üzere %0,9'luk salin ile yıkanarak -80°C 'ye kaldırıldı.



Şekil 3.1. Deney Grupları

3.1.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Sıçanların vücut ağırlıkları, deney başından kurbanıye edilmelerine kadar, uygulanacak madde dozlarını belirlemek için günlük olarak tartılarak kaydedildi.

3.2.Histolojik Boyama Yöntemleri ile Testis Dokusunun İncelenmesi

3.2.1. Doku Takibi

Deney sonrasında sıçanlardan çıkarılan testis dokuları, histopatolojik incelemeler için %10'luk tamponlanmış formaldehit içerisinde fikse edildi. Fiksasyon sonrasında dokular kasetlere alınarak çeşme suyunda yıkandı ve artan dereceli etanol serilerinde (sırasıyla %70, %90, %96 ve %100) 24'er saat tutularak dehidrate edildi. Daha sonra %100 etanolde 2 kez 30 dk süreyle tutuldu ve toluol içerisinde 30 dk süre ile şeffaflandırma işlemi yapıldı. Devamında 56°C 'deki etüvde ilk olarak yumuşak parafinde, daha sonra sert sıvı parafin içerisinde 45'er dk bekletilen testis dokuları parafin bloklara gömüldü. Oluşan

bloklardan mikrotom aracılığıyla lamlara 4-5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her bir testisten alınan kesitlere Hematoksilen&Eozin boyaması yapılarak Olympus BH 50 ışık mikroskobu ile incelendi.

3.2.2. Hematoksilen&Eozin ile Morfolojik Boyama

Tüm grupların testis dokularına ait parafin bloklardan alınan kesitler, 1 gece boyunca 56°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra 2 saat toluol içerisinde bekletilen kesitlerin üzerinde yer alan parafin uzaklaştırıldı. Kesitler azalan dereceli etanol serilerinden (sırasıyla %100, %96, %90 ve %70) geçirilerek deparafinize edildi ve distile suda ise 10 dk tutuldu. Ardından Harris Hematoksilen'de 5 dk boyunca bekletilerek hücre nükleusları boyandı. Fazla boyanmayı gidermek için akan çeşme suyunda 10 dk yıkanan kesitler, asit-alkol solüsyonunda 10-15 saniye (sn) bekletilerek tekrar 5 dk akan çeşme suyu altına alındı. Sonrasında kesitler sitoplazmik boyanma için Eozin Y solüsyonunda 3 dk tutuldu ve sırasıyla %70, %90, %96 ve %100 etanol serilerinden geçirildikten sonra toluolde 15'er dk bekletilerek şeffaflaştırılarak entellan ile kapatıldı. Kesitler ışık mikroskobunda incelenerek testiküler-spermatogenik hasarın seviyesi değerlendirmek için Johnsen'in tübüler biyopsi skorlaması (JTBS) yapıldı. Bu skorlamaya göre aşağıdaki kriterler göz önüne alınarak değerlendirme yapıldı (Nna ve ark., 2017).

Tablo 3.1.Johnsen'in Tübüler Biyopsi Skorlaması (Nna ve ark., 2017)

Johnsen'in Tübüler Biyopsi Skorlaması	
Puan	Kriter
1	Tübüler skleroz, seminifer epitel hücresi yok
2	Sadece Sertoli hücresi, germ hücresi yok
3	Sadece spermatogonia
4	Spermatid yok, birincil spermatosit aşamasında spermatogenezin durması
5	Birçok spermatosit, ancak spermatid yok
6	Geç spermatid yok, spermatid aşamasında spermatogenezin durması
7	Birçok erken spermatid, ancak geç spermatid yok
8	Birkaç geç spermatid
9	Birçok geç spermatid içeren düzensiz tübüler epitel
10	Tam spermatogenez

3.2.3. Seminifer Tübül Çapı

Her grupta bulunan sıçanlardan rasgele 10 seminifer tübül seçildi. Seçilen tübüllerin 20X'lik objektif ile mikroskopta ölçümleri yapıldı ve ortalamaları alındı.

3.3. İmmünofloresan Yöntemi ile İnceleme

3.3.1. Doku Takibi

Perfüze edilen sıçan testis dokuları çıkarıldıktan sonra, bir gece %10'luk formaldehit içerisinde bekletildi ve %30'luk sükröz (Sigma-S0389) çözeltisi içerisinde +4°C'de dokular dibe çökünceye kadar bekletildi. Ardından metil bütan (Sigma, ABD) kullanılarak hızlı bir şekilde donduruldu. Sonraki işlemlere kadar -80°C'de derin dondurucuda saklandı. Eksi 80°C'de bulunan testis örnekleri çözöldükten sonra TissueTek (Sakura, USA) içerisine gömüldü. Kriyostat kullanılarak -20°C'de 7 µm'lik kesitler lamlara alındı.

3.3.2. İmmünofloresan Boyama

Eksi 20°C'de bulunan kesitler oda koşullarında 30 dk-1 saat aralığında bekletildi. Artan alkol serilerinden (sırasıyla %70, %80, %90, %96 ve %100) her birinde 5'er dk tutularak önce dehidrate edilen örnekler azalan alkol serilerinden (%96, %90, %80 ve %70) 5'er dk geçirilerek rehidrasyonu sağlandı. Ardından tris-tamponlu salin (TBS)'te 5 dk bekletilmiştir. %1'lik sodyum borohidrat (NaBH₄, Sigma, USA) solüsyonuyla shaker üzerinde 1 saat inkübe edildikten sonra TBS ile 2 kez yıkanan örnekler, %3'lük hidrojen peroksit solüsyonuyla 10 dk muamele edildi. Kesitler pap-penle çevrelenerek hidrofobik havuz oluşturuldu ve oda koşullarında %5'lik BSA ile 1 saat kesitler bloklandı. Protein bloklama basamağından sonra primer antikorlar (PINK1 rabbit polyclonal antibody, BC-100-494, Novus Biologicals, 1:250 dilüsyon; Parkin rabbit polyclonal antibody, NBP2-67017, Novus Biologicals, 1:250 dilüsyon; Tom20 mouse monoclonal antibody, sc17764, SantaCruz Biologicals, 1:500 dilüsyon; MAP LC3α/β mouse monoclonal antibody, sc398822, SantaCruz Biologicals, 1:500 dilüsyon) ile +4°C'de overnight inkübe edildi. Kesitler ertesi gün 3x5 dk tris tamponlu salin- tween 20 (TBS-T) ile yıkamanın ardından sekonder antikorlar (A-11001 goat anti-mouse (H+L) cross-adsorbed secondary antibody (Texas red), Invitrogen, 1:2000; ab6719 goat anti-rabbit IgG H&L (Texas red), abcam, 1:2000; ab97019 goat anti-mouse IgG H&L (FITC), Abcam, 1:2000) (Tablo 3.2) ile oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 30 dk. tutulan örnekler anti-fade mounting medium (ThermoScientific, USA) kullanılarak kapatıldı. Örnekler lazer taramalı konfokal

mikroskopta (Leica TCS SP8), LAS X (Leica Application Suite for Advanced Fluorescence) programı ile incelendi.

Tablo 3.2.Primer ve sekonder antikor dilüsyonları

PRİMER ANTİKOR	DİLÜSYON	SEKONDER ANTİKOR	DİLÜSYON
PINK1	1:250	Texas Red (rabbit)	1:2000
PARKİN	1:250	Texas Red (rabbit)	1:2000
TOM 20	1:500	Texas Red (mouse)	1:2000
LC3	1:500	FITC	1:2000

3.4.Ultrastrüktürel Analiz

Geçirimli elektron mikroskobu incelemeleri için sıçanlardan alınan testis dokuları dört parçaya ayrılarak, %2,5'lik soğuk gluteraldehit içerisinde +4°C'de 24 saat boyunca tespit edildi. Bu sürenin sonunda sertleşen dokular, steril bistüri ucu yardımıyla 1 mm³'ten küçük parçalar haline getirildi. Daha sonra fosfat tamponlu salin (PBS) ile 1 gece boyunca yıkandı. PBS ile hazırlanmış olan osmium tetraoksit (OsO₄) ile 2 saat muamele edilerek ikinci tespit yapıldı. 15 dk PBS ile yıkanan dokular dehidrasyon için sırasıyla %50, %70, %90, %96'lık alkollerden 10'ar dk %100'lük etanolden 2 kez 15'er dk geçirildi. Dehidrasyon basamağını takiben 2 kere 15'er dk propilen oksitte bekletildi. Sırasıyla 1:1 oranında propilen oksit-epon karışımında 1 gece rotarda tutuldu ve eponlara gömüldü. Kalıplar 1 gece boyunca 60°C etüvde bırakılarak blokların polimerizasyonu sağlandı. Eponlardan, önce Reichert UM2 mikrotomla 0,5 µm kalınlığında yarı ince kesitler alındı. Ardından toluidin mavisi ile boyandı. Reichert UM3 mikrotomu ile 40-50 nm kalınlığında ince kesitler alınarak bakır gridlere yapıştırıldı. İnce kesitler 45 dk %70 etanolla hazırlanmış doymuş uranil asetat solüsyonuyla ve 15 dk Reyno'un kurşun sitratı ile boyandı. Kesitler Jeol Jem-1011 model elektron mikroskobunda incelendi ve fotoğrafları Olympus Veleta TEM CCD kamera ile görüntüler çekildi.

3.5.Western Blot Analizi

3.5.1. Dokulardan Protein İzolasyonu ve Protein Konsantrasyonlarının Ölçülmesi

Eksi 80°C'de bekleyen testis doku örnekleri PBS ile yıkanarak petri kabına alındı. Steril bistüri ucu yardımıyla dokular küçültüldü ve 1,5 ml'lik axygen eppendorf tüplerin

içine alındı. Eppendorf içerisindeki dokuların üzerine 500 µl radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) ve zirkonyum bead eklenerek +4°C’de, hızı 7-8’e ayarlanmış Bullet blender içerisinde 4 dakika 4 set homojenize edildi. Homojenize edilen dokular 10000 rpm +4°C’de 10 dk santrifüj edilerek dokular toplandı. Total protein konsantrasyonunu belirlemek için örnekler hazırlandı. Eppendorfa 20 µl 2D diluent, 1 µl örnek testis dokusu, 980 µl Bradford boyası eklendi ve Bradford metodu kullanılarak Nanodrop1000 cihazında (BioRAD) okuma gerçekleştirildi. Analiz edilecek parametrelerin doku sonuçları, doku protein miktarına oranlandı. Her grup için o grupta bulunan testis örneklerinin izole edilen proteinleri birleştirilerek havuz oluşturuldu.

3.5.2. Protein Örneklerinin Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

Protein konsantrasyonlarının doğru ölçülüp ölçülmediği ve protein kalitesinin doğruluğunun belirlemek için SDS-PAGE (1D) yapıldı. Yürütme işlemine hazırlamak için iki tarafı açık dikdörtgen şeklindeki cam plaklar arasına üst taraftan 5 cm boşluk kalacak şekilde %12’lik seperating jel döküldü. Seperating jel yüzeyinin düzgün olması ve hava almaması için yaklaşık 2 cm yüksekliğinde 2-propanal eklendi. Jel polimerize olduktan sonra kurutma kağıdı yardımıyla 2-propanol uzaklaştırıldı ve stacking jel aynı şekilde dökülerek taraklar yerleştirilir ve jel polimerleşmeye bırakıldı. Jel polimerleşirken örnekler hazırlanarak 95°C’de 4 dakika kaynatıldı. Polimerize olduktan sonra jel tanka yerleştirildi ve tarak çıkartıldı. Ortaya çıkan kuyucuklar enjektör yardımıyla temizlendi ve hazırlanan örnekler her bir kuyuya yüklendi. Yürütme buffer içerisinde 180 V’da 60 dk bantlar yürütüldü. Yürütme sonrasında jel camlar arasından çıkarıldı ve yaklaşık 1 saat shaker üzerinde fiksatifte bekletildi. Distile su ile iyice yıkanan jel, taze hazırlanan Coomassie mavisi boyasına alınarak bantların net görülmesi sağlandı. Bantlar genel olarak Coomassie mavisi boyası ile değerlendirildikten sonra antikorları uygulamak için tekrardan molekül ağırlığına göre jeller hazırlandı. İlk kuyuya protein ladder yüklenip, diğer kuyulara 60 µg örnek yüklendi. Yürütme tamponunda 180 V’da 60 dk yürütüldü.

3.5.3. Jelden Proteinlerin Membrana Aktarılması

Bantlar yürütüldükten sonra proteinleri jelden nitroselüloz membrana aktarmak için Trans-Blot Turbo transfer sistemi (BioRad) kullanıldı. Transfer için transfer tamponu hazırlandı ve jelleri, Whatman kağıdı ve nitroselüloz membran bu tampon ile ıslatıldı. Transfer işleminin doğru bir şekilde gerçekleşmesi için iki Whatman kağıdı arasına jel ve nitroselüloz membran koyularak sandviç modeli yapıldı. Sistem 15 Volt’ta 20 dk boyunca

devam etti ve transfer işlemi bittikten sonra Ponceau-S boyası ile membranlar boyandı. Membranlar distile su ile Ponceau-S boyasından arındırıldı.

3.5.4. Membrandan İlgili Proteinlerin Gözlemlenmesi

Primer ve sekonder antikorların bağlanma duyarlılığının ve etkinliğinin artırılması, sinyal gücünün iyileştirilmesi, arka plan kirliliklerinin engellenmesi ve TBS kaynaklı sorunların önüne geçebilmek için ticari bir ürün olan AdvanBlock Chemi kullanıldı. Bloklama işleminden sonra membranlar bir kere 10 dk. TBS-T ile yıkandı. Membranlar PINK1 antikor (dilüsyon oranı: 1/750), Parkin antikor (dilüsyon oranı: 1/750), Tom20 antikor (dilüsyon oranı: 1/200), LC3 antikor (dilüsyon oranı: 1/200) kullanılarak +4°C'de gece boyunca (16-18 saat) roller üzerinde inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyon sonrasında primer antikor uzaklaştırmak için membranlar, üç kez 10 dk TBS-T tamponuyla yıkandı. Yıkanan membranlar, M IgG Fc BP-HRP secondary antibody (dilüsyon oranı: 1:10000; goat anti-rabbit IgG (H+L)-HRP conjugate secondary antibody (dilüsyon oranı: 1:10000; goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate secondary antibody (dilüsyon oranı: 1:10000 sekonder antikorlar ile 1 saat oda koşullarında inkübe edildi. Sekonder antikorun uzaklaştırılması için üç kez 10'ar dakika TBS-T tamponuyla yıkandı. Membran üzerine sinyal oluşumunu sağlayacak olan clarity western ECL substrate luminol/enhancer ve peroxidase solüsyonları (BioRad) eklendi. Işıyan bantların görüntüleri PDQuest Advanced 2-D Analysis (BioRad) Software ile alındı. Aynı prosedür β -aktin antikor (1:1000) için de uygulandı. Prestained protein marker olarak Thermo 26616 kullanıldı. Ortaya çıkan protein bantlarının yoğunlukları Quantity One (BioRad) programı kullanılarak hesaplandı. Bu işlemler üç kez tekrarlandı ve her bir antikor için üç ayrı sonuç elde edilerek sonuçların ortalaması alındı.

3.6.İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin değerlerinin hesaplanması IBM SPSS Statistic 25.0 paket programı ile yapıldı. Elde edilen tüm verilere Normality Test değerleri olan Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilk sonuçları kullanılarak incelendi. Normal dağılım gösteren sayısal değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma, normal dağılım göstermeyenlere ise medyan değeri olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık, normal dağılım gösteren verilere One Way ANOVA testi ile normal dağılım göstermeyen verilere ise Kruskal Wallis testi uygulandı. Çoklu karşılaştırmalar Tukey, Dunn ve Dunnett testleri kullanılarak yapıldı. $p < 0,05$ istatistiksel bakımdan anlamlılık için yeterli kabul edildi.

3.7.Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Cihazlar

3.7.1. Kimyasal Malzemeler

Quercetin (Sigma: Q4951-10 G)

Cadmium chloride (Sigma: 202908-10 G)

Ketasol (%10, 10 ml) (Richter pharma, Avusturya)

Rompun (%2, 25 ml) (Bayer)

Absolute Ethanol (%99,6) (Merck Milipore)

Etanol (%96) (Tekkim)

Toluol (Merck Milipore:108327)

Parafin (Tekkim)

Gluteraldehit (Merck Milipore: 104239)

Epoxy embedding medium kit (Fluka-45359)

Osmium tetroxide (EMS: 19134)

Propilen oksit (Merck: 8.07027.1000)

Sucrose (Sigma: S0389-500gr)

2 methybutane (Sigma: 277258-100 ml)

TissueTek (Sakura:4583)

Sodyum borahidrat (Sigma: 452882-25 g)

Hidrojen peroksit (Merck Milipore:107298)

Normal goat serum blocking solution (Vectorlabs: S1000-20)

ProLong Diamond Antifade mountant (ThermoScientific)

Triton X-100 (Merck)

Coomassie brilliant blue R-250 (BioRad: 1705060)

Clarity Western ECL substrate (BioRad: 5000006)

AdvanBlock Chemi (Advansta: R-03726-E10)

3.7.1.1.Antikorlar

PINK1 rabbit polyclonal primary antibody (BC-100-494, NOVUS)

Parkin rabbit polyclonal primary antibody (NBP2-67017, NOVUS)

MAP LC3 α/β monoclonal primary antibody (sc-398822, SantaCruz)

TOM20 mouse monoclonal primary antibody (sc-17764, SantaCruz)

M IgG Fc BP-HRP secondary antibody (sc-525409, SantaCruz)

Goat anti-rabbit IgG (H+L) -HRP conjugate secondary antibody (BioRad)

Goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP conjugate secondary antibody (BioRad)

Goat anti-mouse (H+L) cross-adsorbed secondary antibody (Texas Red)(A-11001, Invitrogen)

Goat anti-rabbit IgG H&L (Texas red) (ab6719, abcam)

Goat anti-mouse IgG H&L (FITC) (ab6785, abcam)

3.7.2. Cihazlar

Konfokal mikroskop (Leica DMI8 Laser Scanning Confocal Microscope)

Ultramikrotom (Reichert UM2- Reichert UM3)

Transmisyon elektron mikroskobu (Jeol Jem-1011) ve kamera Olympus Veleta TEM CCD

Işık mikroskobu (Leica DM 1000) ve Kamera (Leica DMC 2900)

Sıvı azot tankı (ThermoScientific)

Kriyostat (Leica CM 1520)

Santrifüj (Beckman Coulter)

NanoDrop 1000 (ThermoScientific)

Vorteks (LMS)

Buzdolabı

4. BULGULAR

4.1.Vücut ve Organ Ağırlıkları

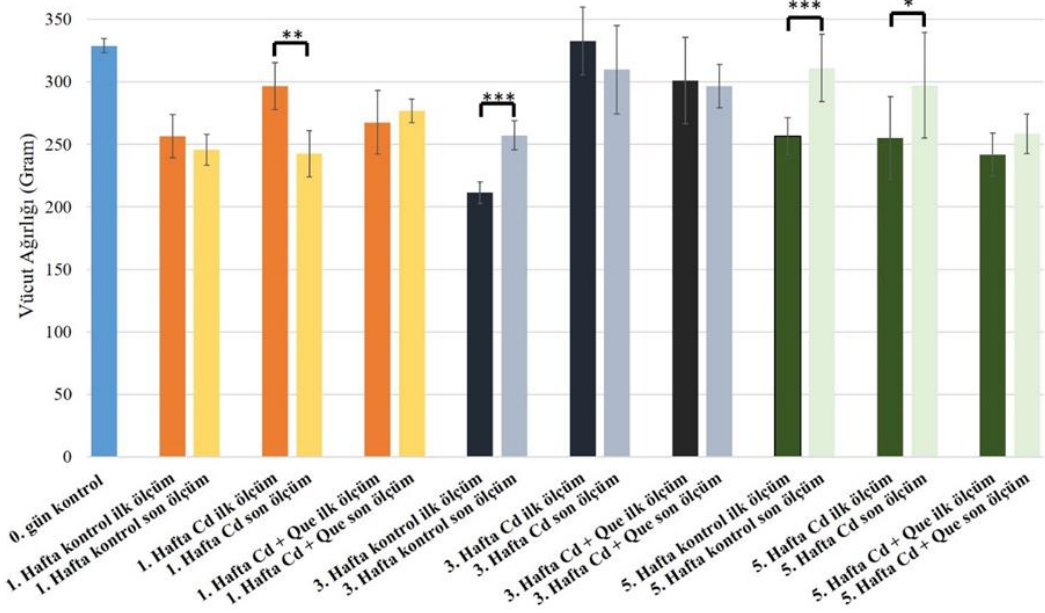
4.1.1. Vücut Ağırlıkları Ölçümü

Sıçan vücut ağırlıklarının ilk ölçüm ve sakrifiye edilmeden önceki son ölçümleri değerlendirildiğinde;

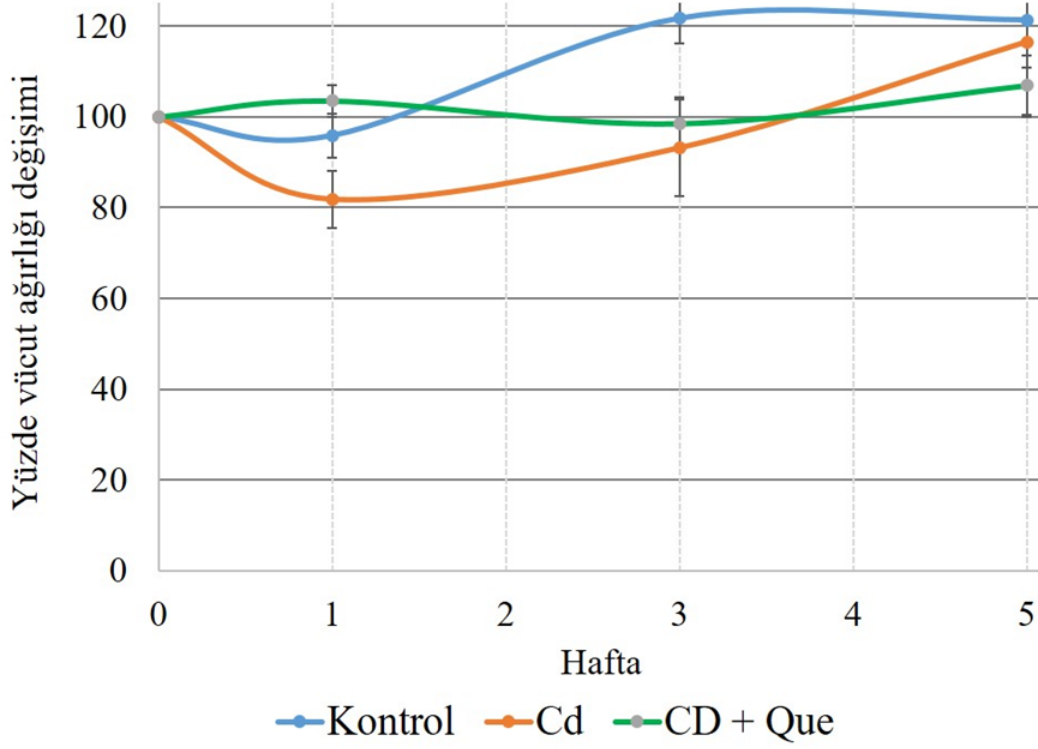
1. hafta ilk ölçüm ve son ölçüm arasında kontrol ve Cd+Que gruplarında anlamlı farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$). Cd grubunda ise iki ölçüm arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,005$).

3. hafta iki ölçüm arasında, kontrol grubunda anlamlı farklılığa rastlanmıştır ($p=0,000$). Cd ve Cd+Que gruplarında anlamlı farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$).

5. hafta da Cd ile kontrol grubu ölçümleri arasında anlamlı farklılık görülürken, Cd+Que grubunda farklılığa rastlanmamıştır ($p=0,034$, $p=0,001$ ve $p>0,005$) (Şekil 4.1 ve 4.2).



Şekil 4.1. Haftalara göre vücut ağırlığı değişimi



Şekil 4.2. Haftalara göre yüzde vücut ağırlığı değişimi

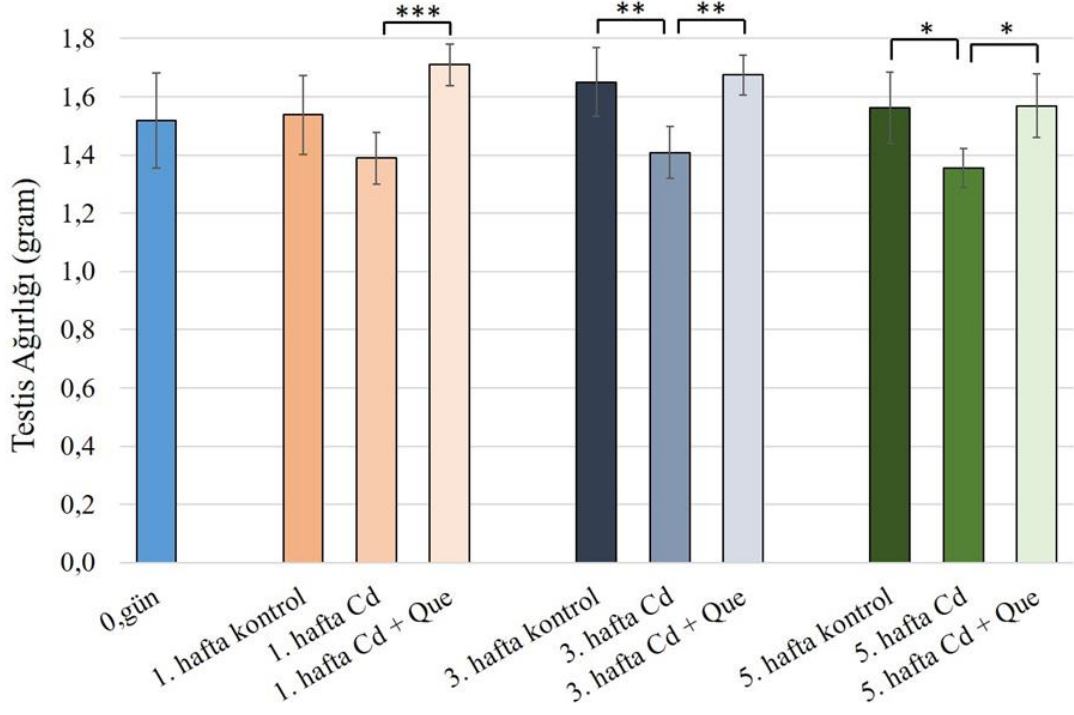
4.1.2. Testis Organı Ağırlığı Ölçümü

Testis organ ağırlıkları gruplar arasında incelendiğinde anlamlı farklılığa rastlanmıştır ($p=0,000$).

1. hafta grupları olan kontrol, Cd ve Cd+Que kendi arasında değerlendirildiğinde kontrol grubunun Cd ve Cd+Que grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmazken ($p>0,05$), Cd ve Cd+Que grupları arasında farklılık belirlenmiştir ($p=0,000$).

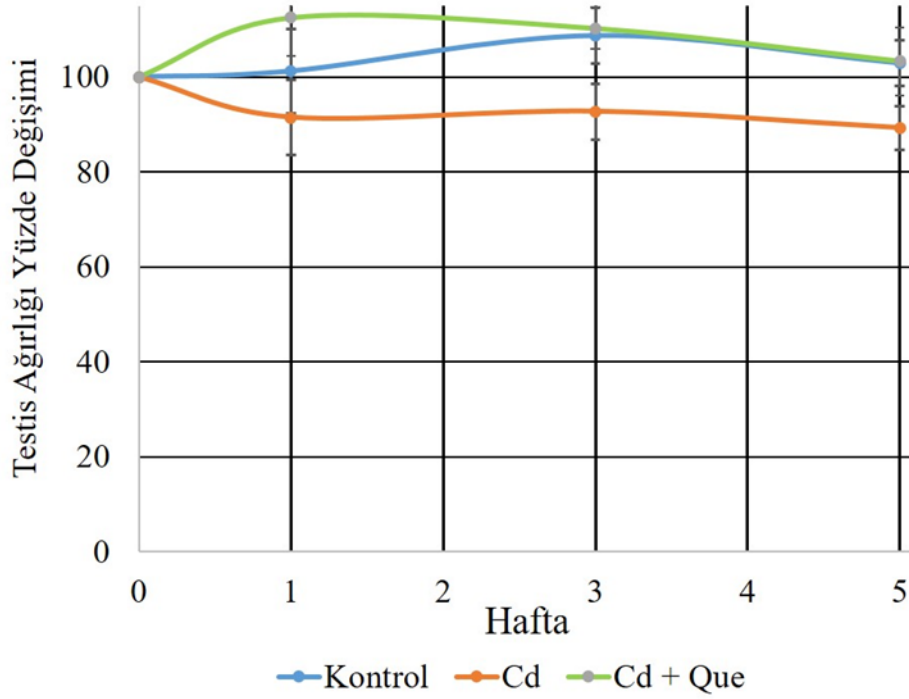
3.hafta grupları arasında, kontrol ve Cd grupları arasında anlamlı farklılık görülürken ($p=0,005$), Cd+Que arasında farklılık belirlenmemiştir ($p>0,05$). Kontrol ve Cd+Que grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$).

5.hafta gruplarından kontrol ve Cd grupları arasında anlamlı farklılık bulunurken ($p=0,029$), kontrol ve Cd+Que arasında farklılık yoktur. Cd ve Cd+Que grupları arasında anlamlı farklılık gözlemlenmiştir ($p=0,014$) (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Haftalara göre testis ağırlıkları

Gruplar arasında kıyaslama yapıldığında 1. hafta kadmiyum grubu ile 3. hafta kontrol ve Cd+Que grupları arasında anlamlı farklılığa rastlanmıştır ($p=0,002$; $p=0,000$). Buna ek olarak 1. hafta Cd+Que grubu ile 3. ve 5. hafta Cd grupları arasında da anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,000$). 3. hafta kontrol grubu 1. ve 5. hafta Cd grupları arasında anlamlı farklılık bulunurken ($p=0,002$; $p=0,000$), yine aynı haftanın Cd grubu da 1. hafta Cd+Que ile anlamlı çıkmıştır ($p=0,000$). 3. hafta Cd+Que grubu 5. hafta Cd grubu ile anlamlı bulunmuştur ($p=0,029$) (Şekil 4.4).



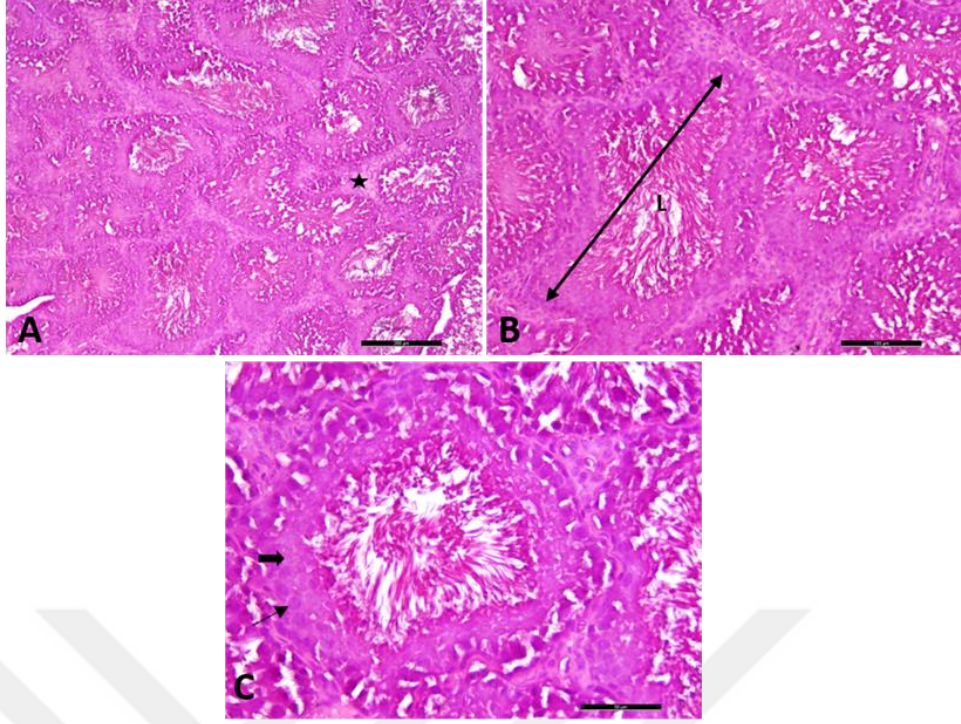
Şekil 4.4. Testis ağırlığı yüzde değişimi

4.2. Işık Mikroskopi Bulgular

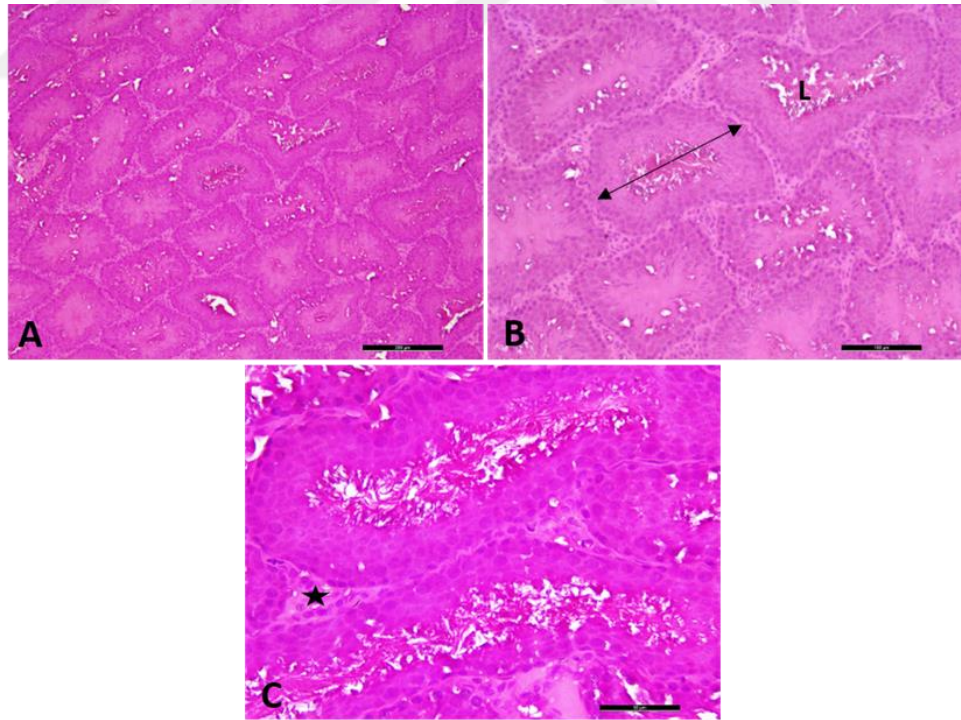
4.2.1. Hematoksilen&Eozin Boyama Bulguları

Işık mikroskopik olarak 0. gün, 1.hafta, 3.hafta ve 5.hafta kontrol, Cd ve Cd+Que gruplarına ait sıçanların testis dokusu örneklerinin genel görünümünü saptamak amacıyla H&E boyaması uygulanmıştır. Bu gruplara ait sıçanların testis dokusu örneklerinin seminifer tübül çapı ve yapısı, bazal membran yapısı, hücrelerin yapısı ve yoğunluğu, vakuol varlığı gibi parametreler açısından morfolojik olarak değerlendirilmiştir.

0.gün ve 1.hafta kontrol grubu testis kesitleri incelendiğinde, histolojik yapının ve seminifer tübül yapısının normal olduğu saptanmıştır. Tüm spermatogenik hücrelerin normal yapıda olduğu incelenmiştir. Sertoli hücre yapılarında da bir hasara rastlanmamıştır. Bu bulguların tamamı düzgün bir spermatogenezis sürecinin varlığını göstermektedir. Tunika albuginea, bazal membran ve interstisyel alanda herhangi bir dejenerasyona rastlanmamış olup, kompakt yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

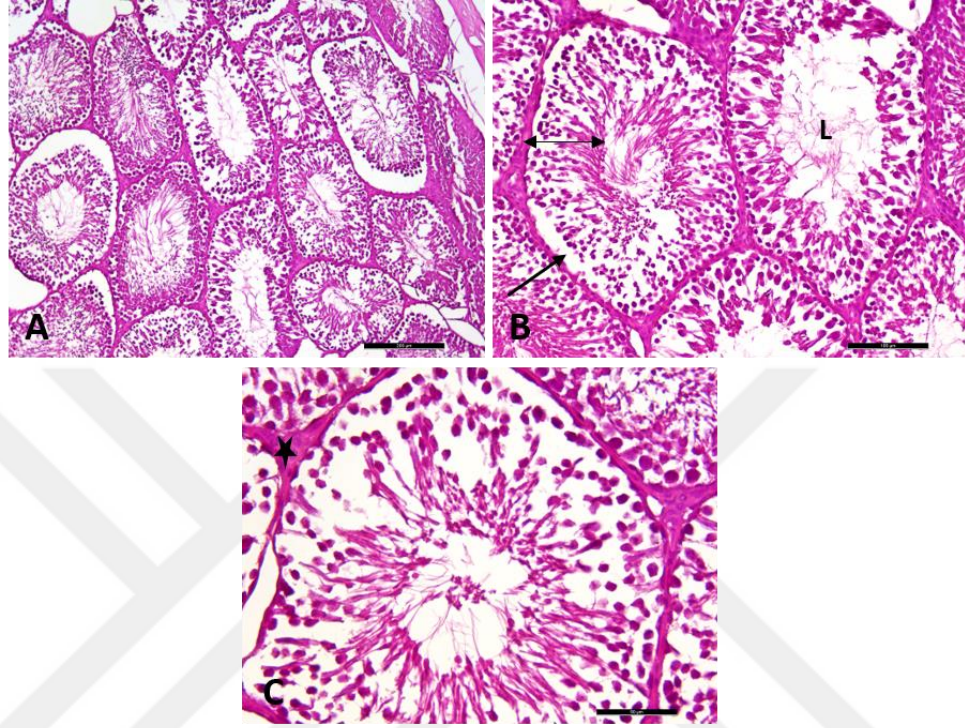


Şekil 4.5. Kontrol (0.gün) grubuna ait H&E boyama fotomikrografları. Yıldız: İnterstisyel alan, Çift başlı ok: Seminifer tübül, İnce ok: Spermatogonyum, Kalın ok: Spermatozit, L: Lümen Ölçü çubuğu: A:10X, B:20X, C: 40X



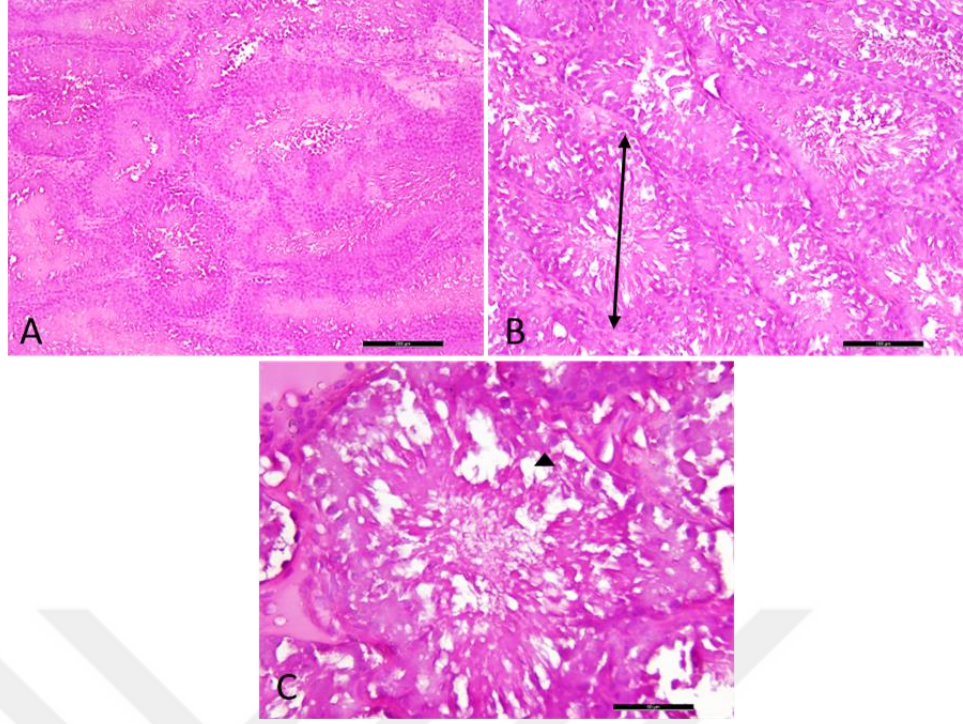
Şekil 4.6. Kontrol (1.hafta) grubuna ait H&E boyama fotomikrografları. Yıldız: İnterstisyel alan, Çift başlı ok: Seminifer tübül, L: Lümen Ölçü çubuğu: A: 10X, B: 20X, C: 40X

Cd (1.hafta) grubunda seminifer epitel kalınlığı azalmakla birlikte lümende bulunan sperm hücreleri azalmıştır. Bazal lamina ile seminifer tübüller arasında yer yer ayrılmalar görülmekle birlikte genel anlamda bütünlüğünü korumaktadır. Bazı seminifer tübüllerde dejenerasyon ve vakuolizasyona rastlanmıştır (Şekil 4.7).



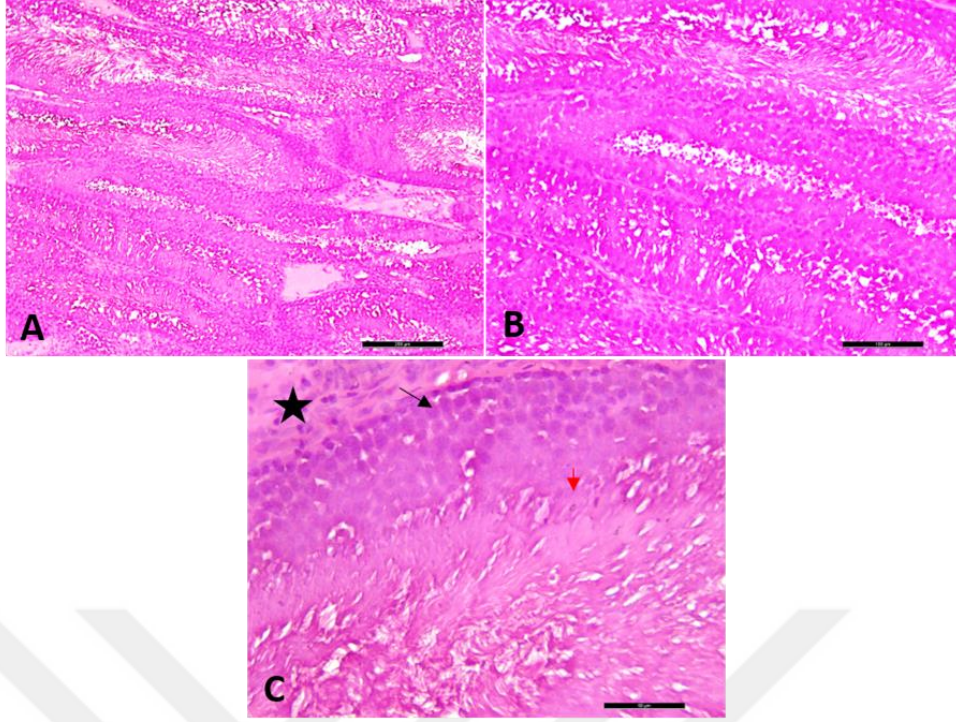
Şekil 4.7. Cd (1.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografı. Yıldız: interstisyel alan, Çift başlı ok: Seminifer tübül epitel kalınlığı, Ok: Bazal lamina ayrılması, L: Lümen, Ölçü çubuğu: A:10X, B:20X, C:40X

Cd+Que (1.hafta) grubunda seminifer tübüllerde ve spermatojenik hücre tabakaları normal histolojik yapıda olduğu gözlemlenmiştir. Yer yer vakuolizasyona rastlanmıştır. İntertisyel alan bakımından düzenli yapıya sahiptir. (Şekil 4.8).



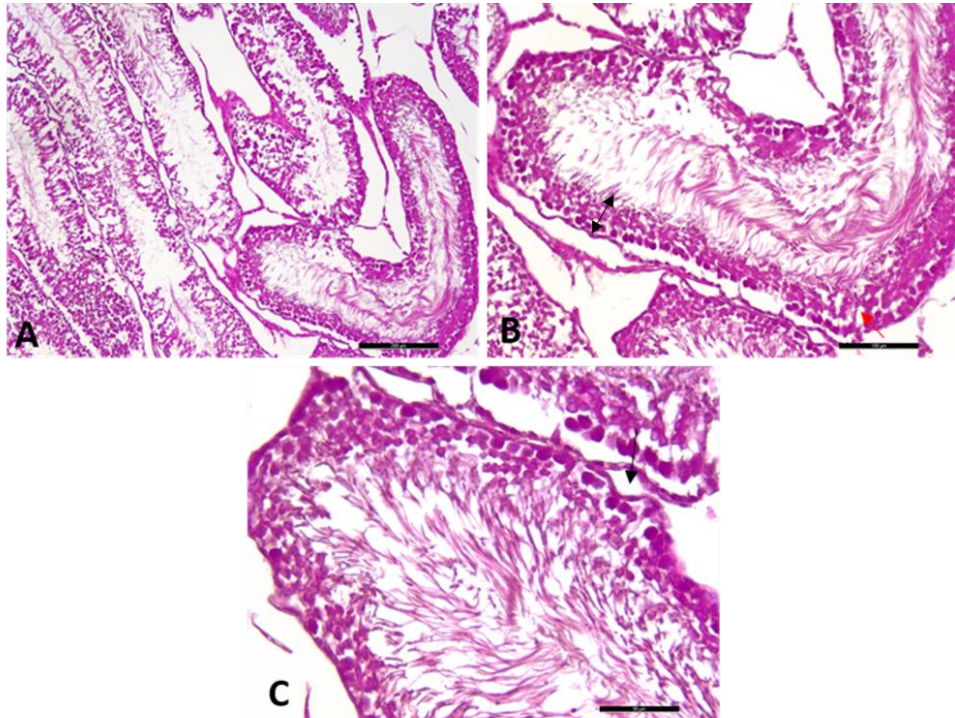
Şekil 4.8. Cd+Que (1.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları. Çift başlı ok: Seminifer tübül, Ok başı: Vakuol Ölçü çubuğu; A: 10X, B: 20X, C: 40X.

Kontrol (3.hafta) grubunda seminifer tübüller ve interstisyel alan normal histolojik yapıya sahiptir. Tüm spermatogenik hücreler normal yapıda gözlemlenmiştir. Sertoli hücre yapılarında bir hasara rastlanmamış olup spermatidlerin başları Sertoli hücre sınırına gömülü olarak gözlemlenmiştir. Bu bulguların tamamı düzgün bir spermatogenezis sürecinin varlığını göstermektedir. Tunika albuginea, bazal membran ve interstisyel alanda herhangi bir dejenerasyona rastlanmamış olup, kompakt yapıya sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9).

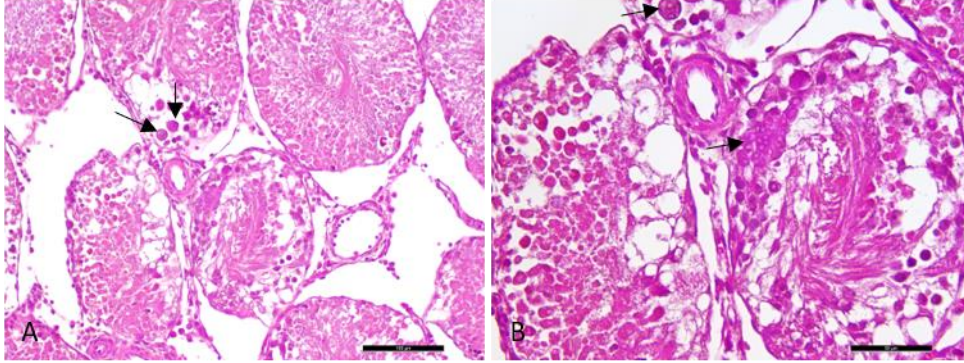


Şekil 4.9. Kontrol (3.hafta) grubuna ait H&E boyama fotomikrografları. Yıldız: İnterstisyel alan, Ok: Spermatogonyum, Kırmızı ok: Spermatid, Ölçü çubuğu: A: 10X, B:20X, C:40X

Cd (3.hafta) grubunda, seminifer tübül bazal laminadan ayrılmış ve interstisyel alanda bütünlüğe rastlanmamıştır. Seminifer epitel kalınlığı azalmış olup, Cd spermatojenik hücrelerde hasara neden olmuştur. Yer yer vakuolizasyon gözlemlenmiştir (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).

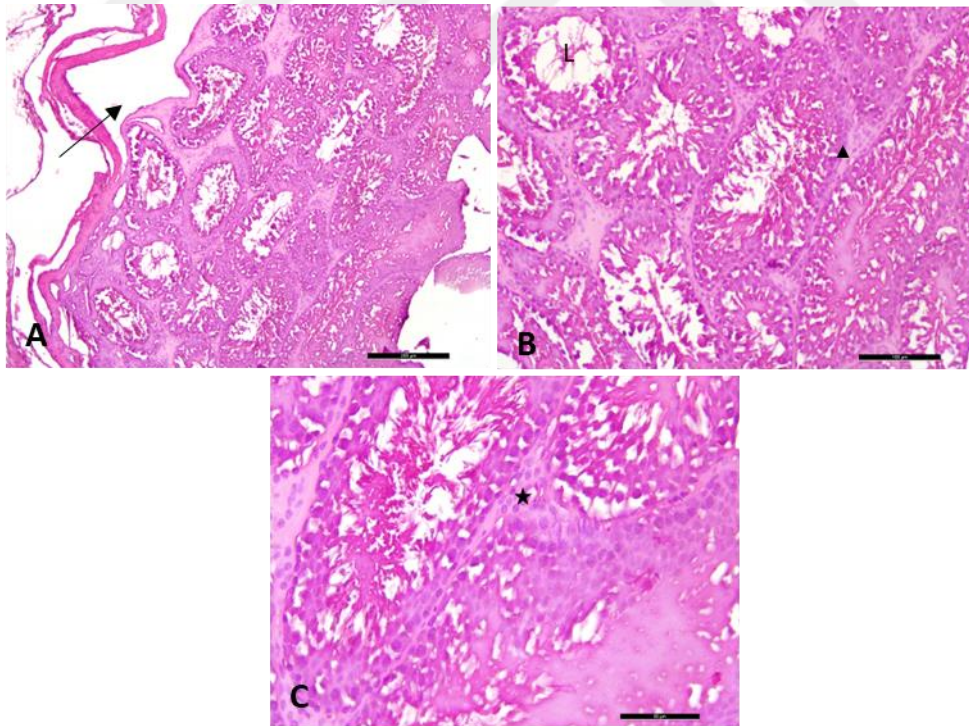


Şekil 4.10. Cd (3.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları. Kırmızı ok: Vakuol, Siyah ok: Bazal membran ayrılması, Çift başlı ok: Seminifer tübül epitel kalınlığı, Ölçü çubuğu: A:10X, B:20X, C:40X



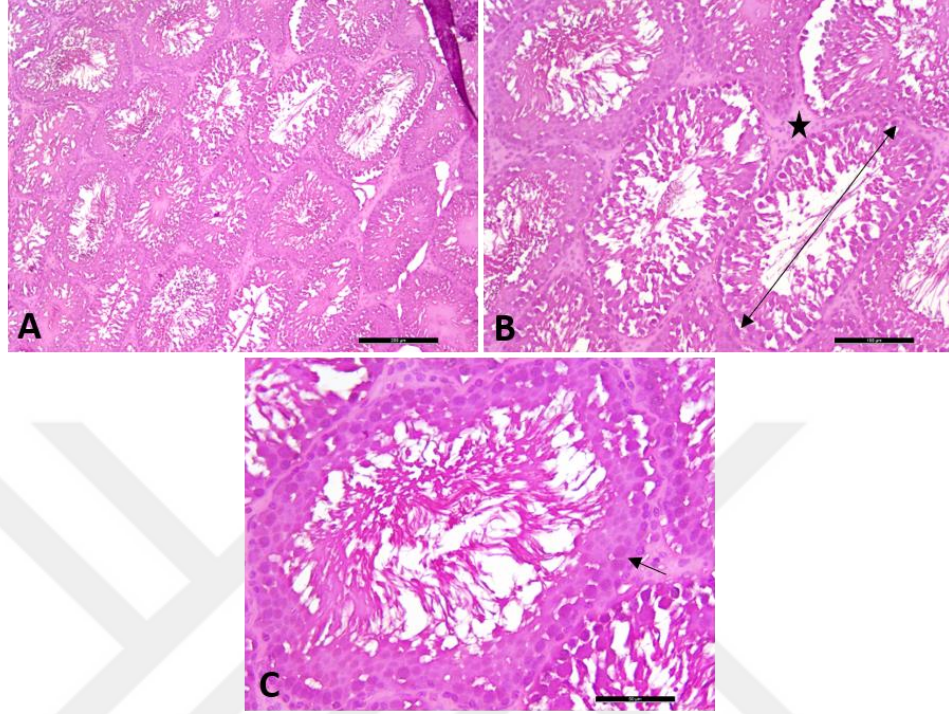
Şekil 4.11. Cd (3.hafta) grubuna ait H&E fotomikrografları. Ok: Dev hücre Ölçü çubuğu: A:20X ve B:40X

Cd+Que (3.hafta) grubunda genel olarak interstisyel alanlarda bütünlük görülmüştür. Tunika albuginea da yer yer ayrılmalar incelenmiştir. Seminifer tübülerden bazılarında dejenerasyona rastlanmıştır. Seminifer tübül çapı kalınlığı normal olarak ölçülmüştür (Şekil 4.12).



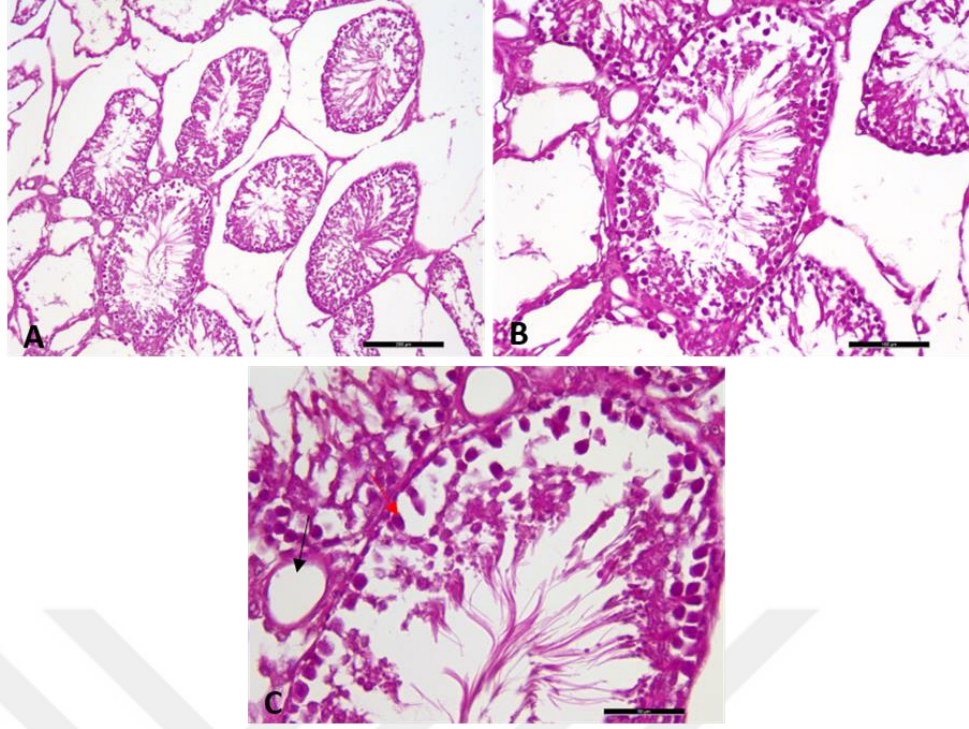
Şekil 4.12. Cd+Que (3.hafta) grubuna ait H&E fotomikrografları. Siyah ok: Tunika albuginea, Yıldız: İnterstisyel alan, Ok başı: Spermatogonyum, L: Lümen, Ölçü çubuğu: A: 10X, B:20X ve C:40X

Kontrol (5.hafta) grubunda, düzenli bir interstisyel alan görülmüş olup, seminifer epitel çapında ve spermatojenik hücrelerin oluşumlarında herhangi bir dejenerasyona rastlanmamıştır (Şekil 4.13).

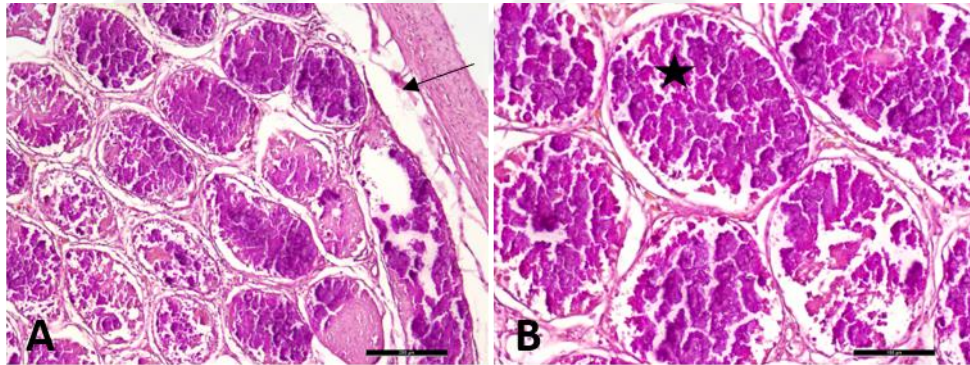


Şekil 4.13. Kontrol (5.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları. Yıldız: İnterstisyel alan, Çift başlı ok: Seminifer tübül, Ok: Spermatogonyum. Ölçü çubuğu A:10X, B:20X ve C:40X

Cd (5.hafta) grubunda ise, doku tunika albugineadan ayrılmıştır. İnterstisyel alan bütünlüğünün kalmaması ve spermatojenik hücrelerin düzenlenişlerinin hasara uğratılması ile birlikte seminifer tübüllerde sperm üretimi yok denecek kadar azalmıştır. Seminifer tübüllerin bazılarında mineralizasyon ile birlikte atrofiye rastlanmıştır (Şekil 4.14 ve Şekil 4.15).

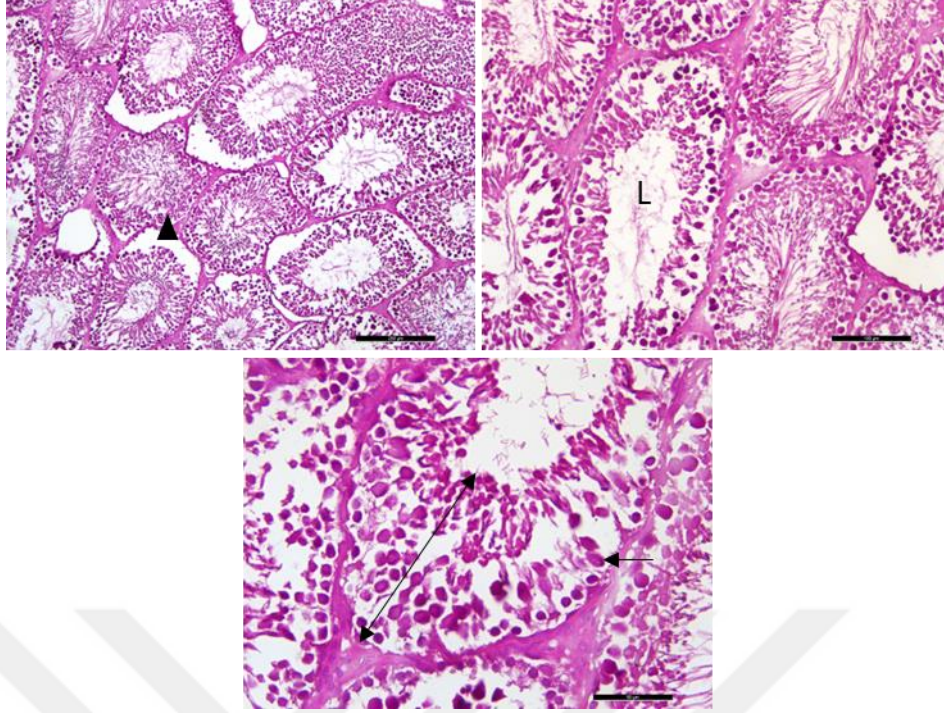


Şekil 4.14. Cd (5. hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları. Siyah ok: Kan damarları, Kırmızı ok: Spermatogonyum Ölçü çubuğu: A: 10X, B:20X ve C:40X



Şekil 4.15. Cd (5.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikrografları. Siyah ok: Tunika albugineanın ayrılması, Yıldız: Mineralizasyon, Ölçü çubuğu: A: 20X ve B: 40X

Cd+Que (5.hafta) grubu Cd (5.hafta) grubu ile karşılaştırıldığında doku bütünlüğü daha iyi olup, bazı seminifer tübüllerin yer yer bazal laminadan ayrıldığı görülmüştür. Seminifer tübül epitel kalınlığı Cd grubuna göre artmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. Cd+Que (5.hafta) grubuna ait H&E boyaması fotomikroagrafları. Çift başlı ok: Seminifer tübül epitel kalınlığı, Ok:Spermatogonyum, Ok başı: Bazal lamina ayrılması, L:Lümen, Ölçü çubuğu A: 10X, B:20X ve C:40X

4.2.2. Morfometrik İncelemeler

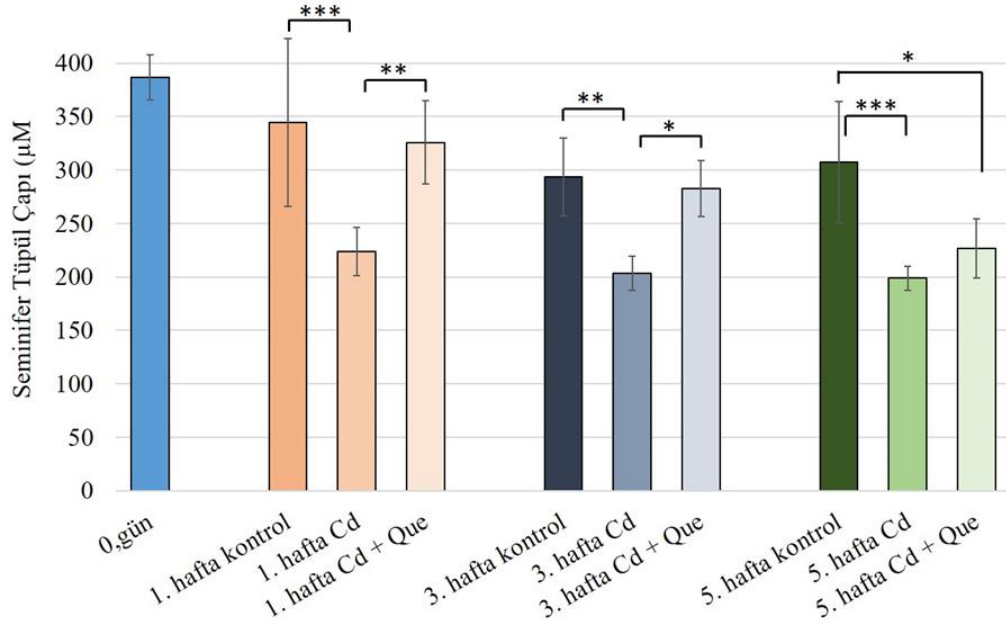
4.2.2.1.Seminifer tübül çapı ölçümü

Kontrol (0.gün) grubu diğer gruplar ile karşılaştırıldığında kontrol (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) grupları arasında anlamlı farklılık bulunmazken ($p>0,05$), diğer gruplar [kadmiyum (1.hafta), kontrol (3.hafta) ve kontrol (5.hafta), Cd (5.hafta), Cd+Que (5.hafta)] arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$).

1.hafta grupları kendi arasında incelendiğinde, kontrol ile Cd grubu arasında anlamlılık var iken ($p=0,000$), Cd+Que grubu arasında farklılık yoktur ($p>0,05$). Cd grubu ile Cd+Que grubu arasında da anlamlı farklılık gözlemlenmiştir ($p=0,001$).

3. hafta grupları kıyaslandığında, Cd grubunun sırasıyla kontrol ve Cd+Que grupları ile anlamlı farklılıkları bulunurken ($p=0,006$ ve $p=0,026$), kontrol grubu ile Cd+Que grupları arasında farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

5. hafta örneklerinde ise, kontrol grubunun hem Cd grubu ile hem de Cd+Que grupları ile anlamlı farklılıkları görülmüştür ($p=0,000$ ve $p=0,022$). Fakat Cd ve Cd+Que grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Seminifer tübül çapının ölçülmesi

4.2.2.2.Seminifer tübül epitel kalınlığının ölçülmesi

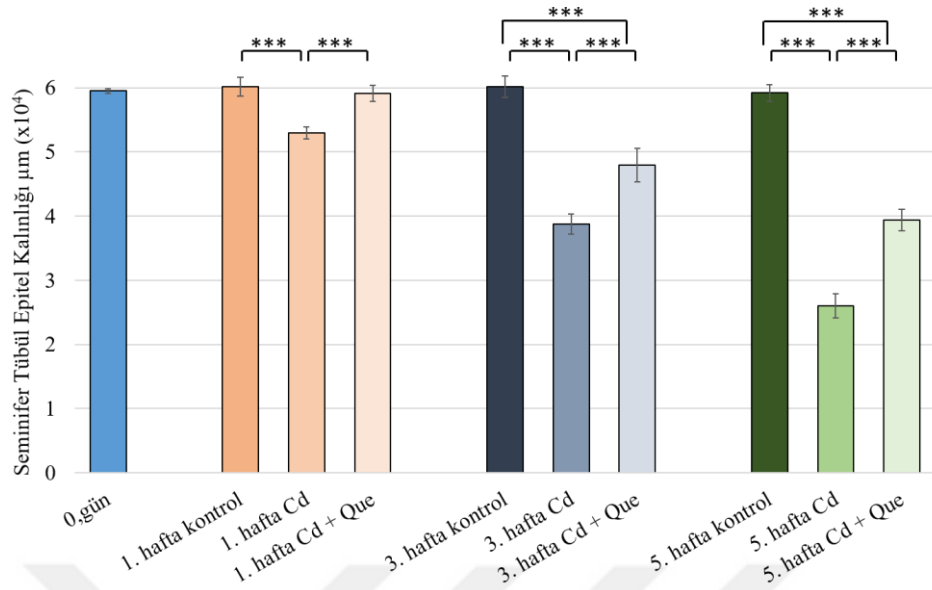
Seminifer tübülleri epitel kalınlığı bakımından incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,00$).

Kontrol (0.gün, 1.hafta, 3.hafta ve 5.hafta) grupları, Cd (1.hafta), Cd (3.hafta), Cd+Que (3.hafta), Cd (5.hafta) ve Cd+Que (5.hafta) grupları ile aralarında anlamlı farklılık görülürken ($p=0,00$); kontrol (1., 3. ve 5. haftalar) ve Cd+Que (1.hafta) arasında farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Cd (1.hafta), Cd (5.hafta) ve Cd+Que (5.hafta) grupları kendi ve diğer grupların hepsi ile arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,00$). Cd (3.hafta) grubunun diğer gruplar ile aralarında anlamlı farklılık bulunurken ($p=0,00$), Cd+Que (5.hafta) ile anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$).

Cd+Que (1.hafta) grubunun Cd (1.hafta), Cd (3.hafta), Cd+Que (3.hafta) ve Cd (5.hafta) grupları arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,00$).

Her bir grubu kendi arasında kıyaslandığında, kontrol (1.hafta) grubunun Cd (1.hafta) grubu ile arasında anlamlı farklılık görülürken ($p=0,00$), Cd+Que (1.hafta) grubu arasında farklılık görülmemiştir ($p>0,05$). Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) arasında anlamlı farklılığa rastlanmıştır ($p=0,00$). Kontrol (3.hafta) ile Cd (3.hafta) ve Cd+Que (3.hafta) arasında anlamlı farklılık görünmekle birlikte ($p=0,00$), Cd (3.hafta) ve Cd+Que (3.hafta) arasında da farklılık incelenmiştir ($p=0,00$).



Şekil 4.18. Seminiifer tübül epitel kalınlığının ölçülmesi

4.2.2.3. Johnsen Skorum Analizi

Gruplar istatistiksel olarak incelendiğinde anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,00$).

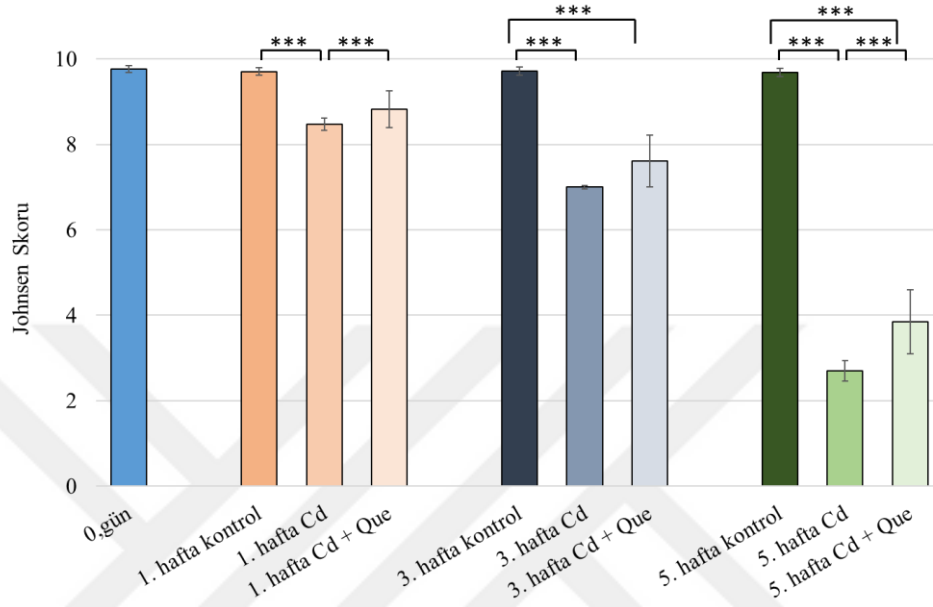
Kontrol (0.gün ve 1.hafta) grupları diğer gruplar ile karşılaştırıldığında Cd (1., 3. ve 5. hafta), Cd+Que (1., 3. ve 5. hafta) grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanırken ($p=0,00$); kontrol grupları arasında bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$). Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) grupları arasında istatistiksel anlamda bir farklılığa rastlanmamıştır ($p>0,05$). Bununla birlikte, diğer gruplar ile hem Cd (1.hafta) hem de Cd+Que (1.hafta) grupları incelendiğinde gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0,05$).

Kontrol (3. hafta ve 5. hafta) gruplarının diğer gruplar ile kıyaslaması yapıldığında diğer kontrol grupları ile anlamlı farklılığa rastlanmazken ($p>0,05$), diğer gruplar ile istatistiksel anlamda farklılık bulunmuştur ($p<0,05$). Cd (3.hafta) ve Cd+Que (3.hafta) grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmazken ($p>0,05$); diğer gruplar ile arasında farklılık vardır ($p=0,00$). Cd (5.hafta) ve Cd+Que (5.hafta) gruplarının kontrol (0.gün, 1.hafta, 3.hafta ve 5.hafta), Cd (1.hafta ve 3.hafta) ve Cd+Que (1.hafta ve 3.hafta) grupları arasında anlamlı bir farklılığa rastlanmıştır ($p=0,00$).

Grupları kendi arasında karşılaştırdığımızda, kontrol (1.hafta) grubunun Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) grupları arasında farklılık bulunmuştur ($p=0,00$ ve $p=0,001$). Bunun yanında Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) grupları arasında istatistiksel anlamda farka rastlanmamıştır ($p>0,05$).

Kontrol (3.hafta) grubunun Cd (3.hafta) ve Cd+Que (3.hafta) grupları arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,00$). Bununla birlikte Cd (3.hafta) ve Cd+Que (3.hafta) grupları arasında fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

Kontrol (5.hafta) grubunun Cd (5.hafta) ve Cd+Que (5.hafta) grupları arasında ve Cd (5.hafta) ile Cd+Que (5.hafta) grupları arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0,00$).

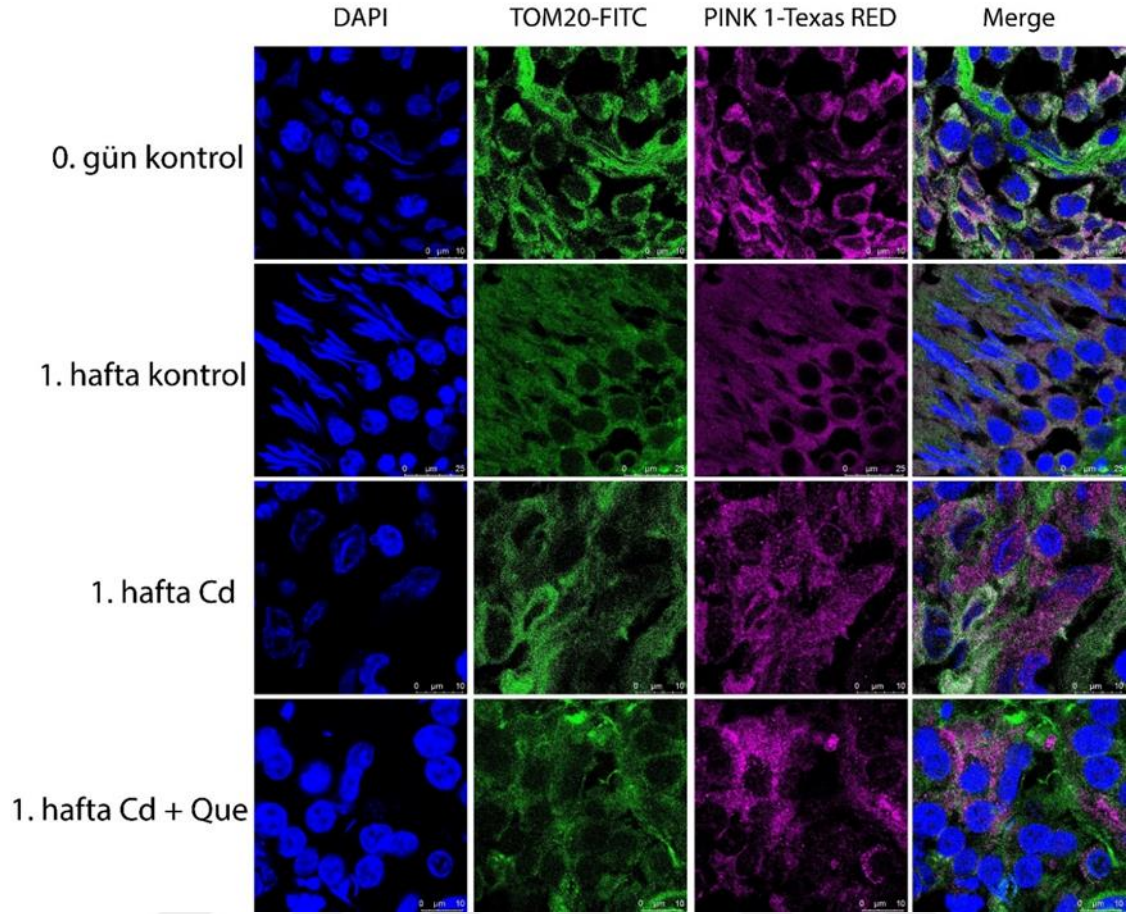


Şekil 4.19. Johnsen skoru hesaplama grafiği

4.3. Testis Dokusunda Mitofaji ile ilişkili Proteinlerin İmmünofloresan Yöntemle Gösterilmesi

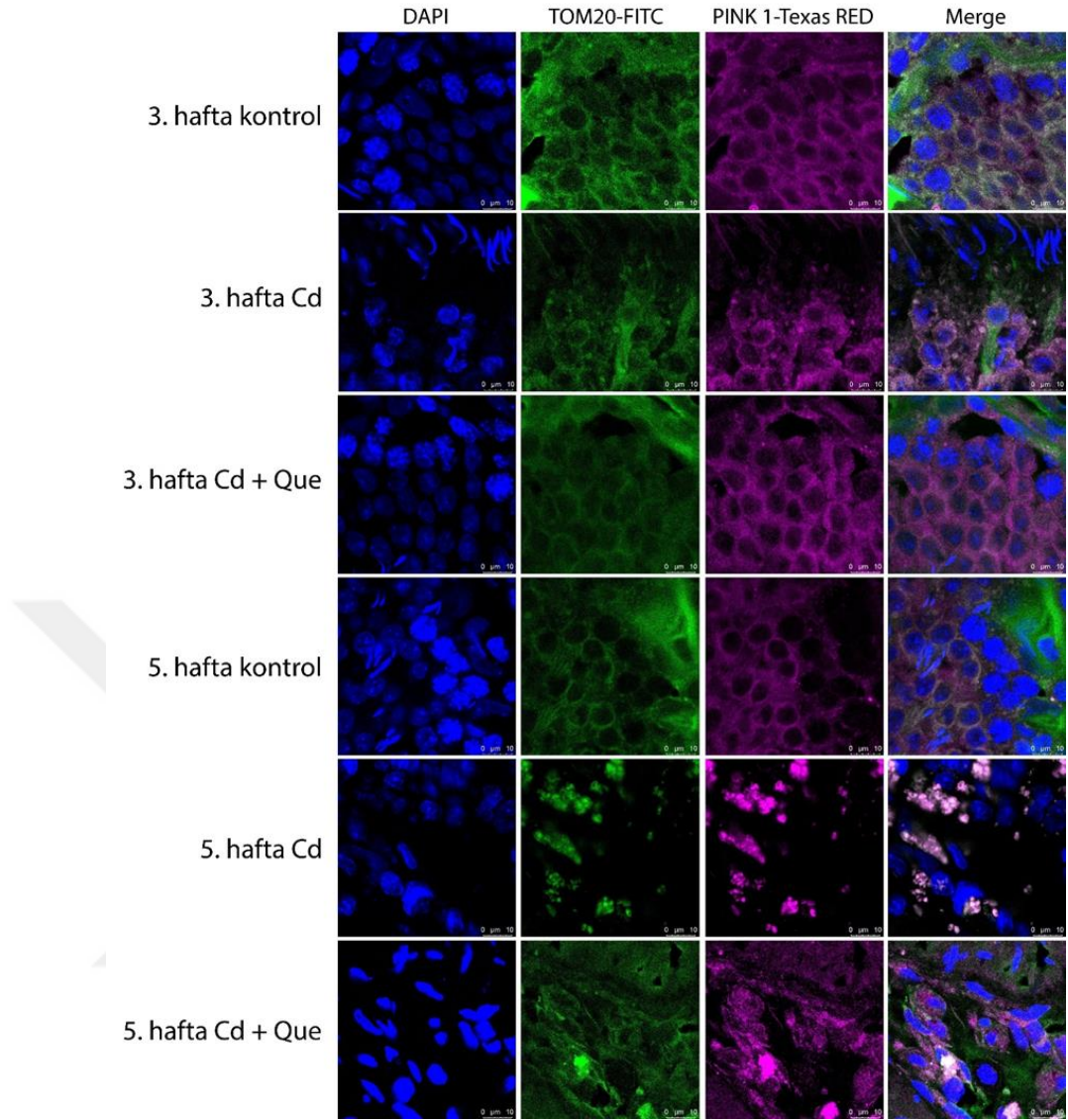
4.3.1. PINK1-TOM20 İmmünofloresan Analizi

1.haftaya ait PINK1 ekspresyonunun, 0.gün kontrol ve 1.hafta kontrol grubu arasında farklılık olmamakla birlikte, 1.hafta Cd grubunda kontrol grubuna göre artış tespit edilmiştir. Bu haftada doku bütünlüğünün bozulmaya başlaması, ekspresyonun daha çok spermatogonyumlar, spermatositler, Sertoli hücreler ve spermiyumlarda olduğunu göstermiştir. Cd grubuna kıyasla Cd+Que grubun da daha az ekspresyon bulunmuştur (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. Kontrol (0.gün), kontrol (1.hafta), Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) gruplarında PINK1+TOM20 ekspresyonları. Ölçü çubuğu: 10 µm

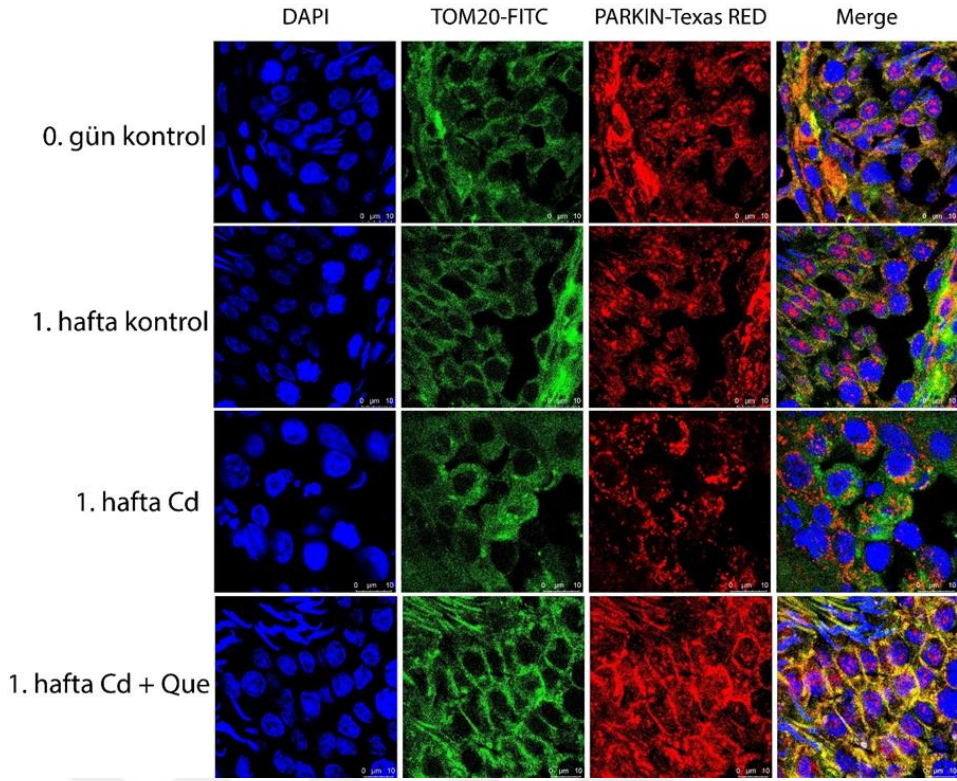
Kontrol (3.hafta) ve kontrol (5.hafta) gruplarının ekspresyon seviyeleri kontrol (0.gün) ve kontrol (1.hafta) gruplarına göre farklılık göstermemiştir. TOM20 protein seviyesi haftalara göre en fazla Cd (5.hafta) grubunda azalma göstermiş olup, PINK1 ekspresyon seviyesi artmıştır. Mitofajinin belirteçlerinden biri olan PINK1, Cd (3.hafta) grubunda mitofajinin oluştuğunu göstermiştir. Cd+Que (3.hafta) grubunun ekspresyon seviyesi göz önüne alındığında, protein yoğunluğunun Cd (3.hafta) grubundaki kadar yoğun olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Kontrol (3. ve 5.hafta), Cd (3. ve 5.hafta) ve Cd+Que (3. ve 5.hafta) gruplarında PINK1+TOM20 ekspresyonları. Ölçü çubuğu: 10 µm

4.3.2. PARKIN-TOM20 İmmüno Floresan Analiz

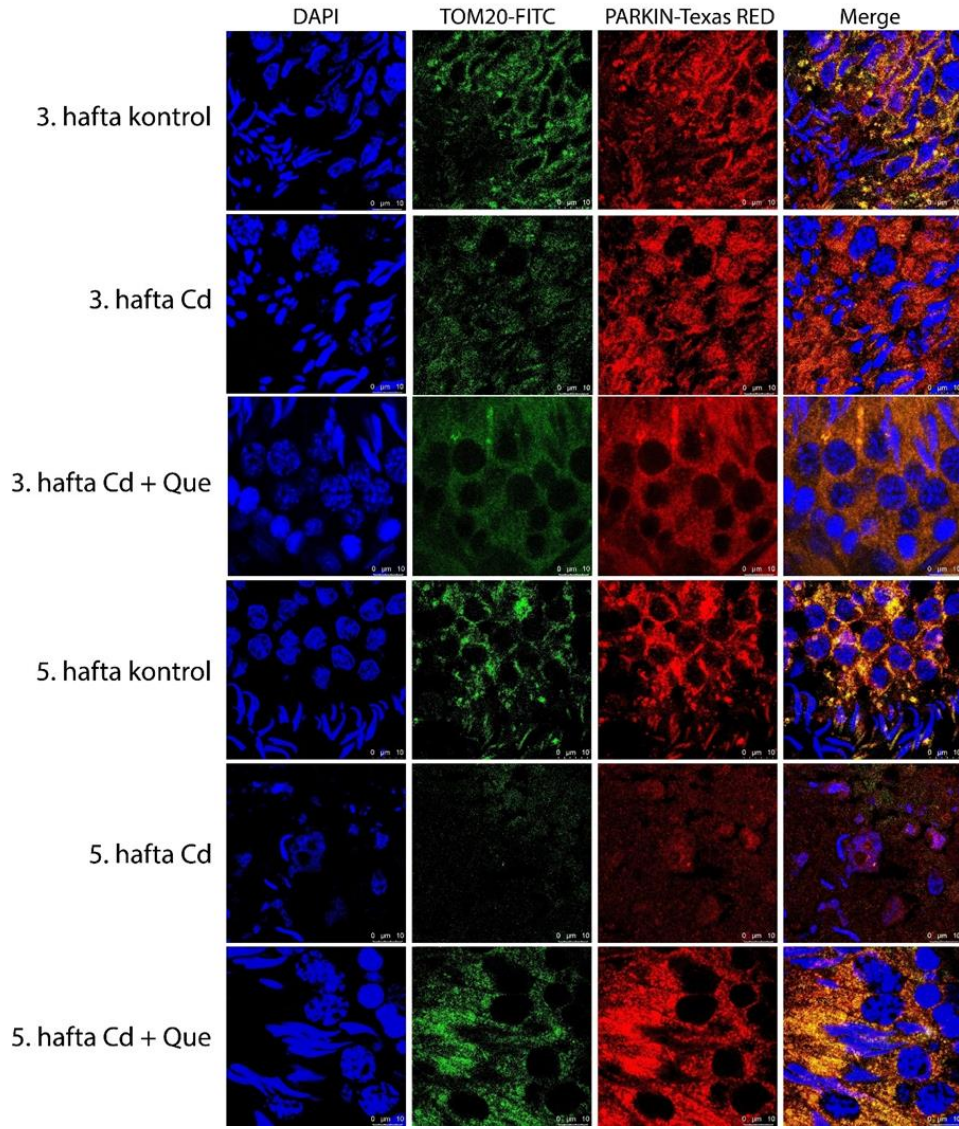
Kontrol (0.gün), kontrol (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) gruplarında Parkin ekspresyonunu nukleolus ve sitoplazmada normal seviyelerde görülmektedir. Cd (1.hafta) grubunda ki ekspresyon seviyesi azalmakla birlikte sadece sitoplazmada incelenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Kontrol (0.gün), kontrol (1.hafta), Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) gruplarında PARKİN+TOM20 ekspresyonları. Ölçü çubuğu: 10µm

Kontrol (3.hafta) grubu Parkin ekspresyon seviyesi nukleolus ve sitoplazmada normal izlendi. Cd (3.hafta) grubunda mitokondride bulunan TOM20 ekspresyonu azalmakla birlikte, Parkin ekspresyonu seviyesi azalmış ve yer yer sitoplazmada bulunmuştur (Şekil 4.23).

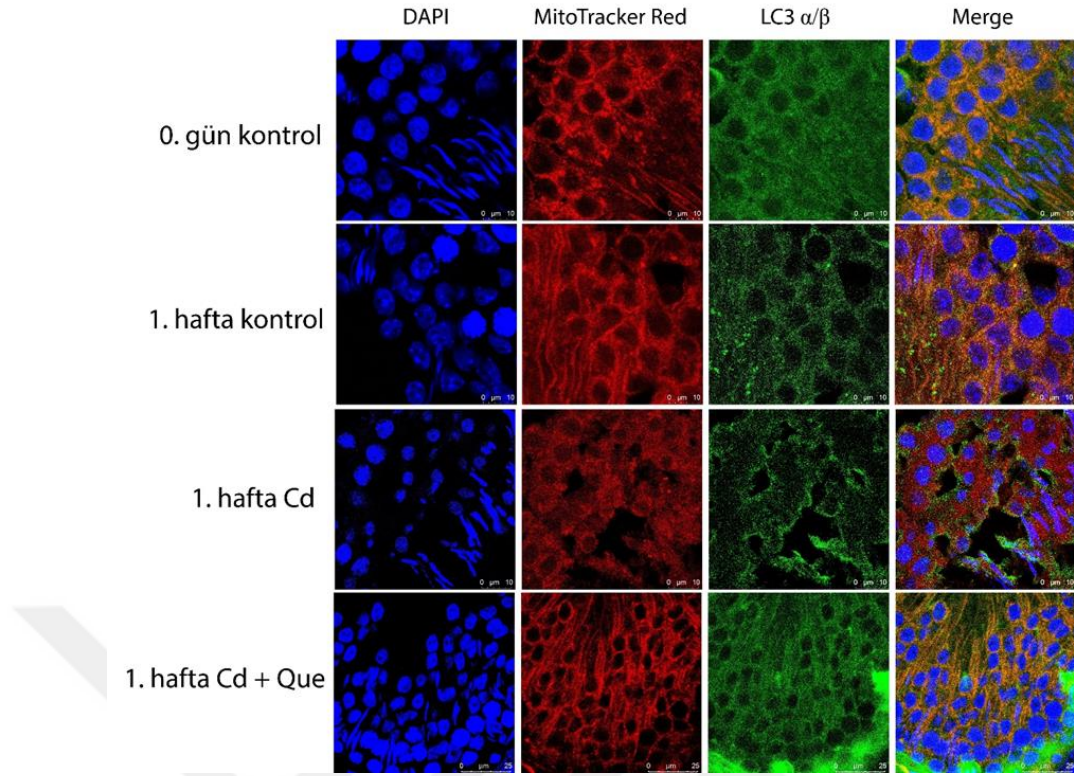
Kontrol (5.hafta) grubunda protein ekspresyon seviyeleri Cd (5.hafta) grubuna göre artmıştır. Cd gruplarından en fazla hasarın Cd (5.hafta) grubundadır. Bu grupta dokunun dejenerasyonu ile birlikte mitokondri hemen hemen hiç kalmamış olup, Parkin protein ekspresyonu çok azalmıştır. Cd+Que (5.hafta)'da dokunun düzelmeye başlaması ile birlikte mitokondri miktarının artması ve Parkin ekspresyon seviyesindeki değişiklik Cd (5.hafta) grubuna göre farklılık göstermiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Kontrol (3. ve 5.hafta), Cd (3. ve 5.hafta), Cd+Que (3. ve 5.hafta) gruplarında PARKİN+TOM20 ekspresyonları. Ölçü çubuğu:10 µm

4.3.3. LC3-Mitotracker Red İmmüno Floresan Analiz

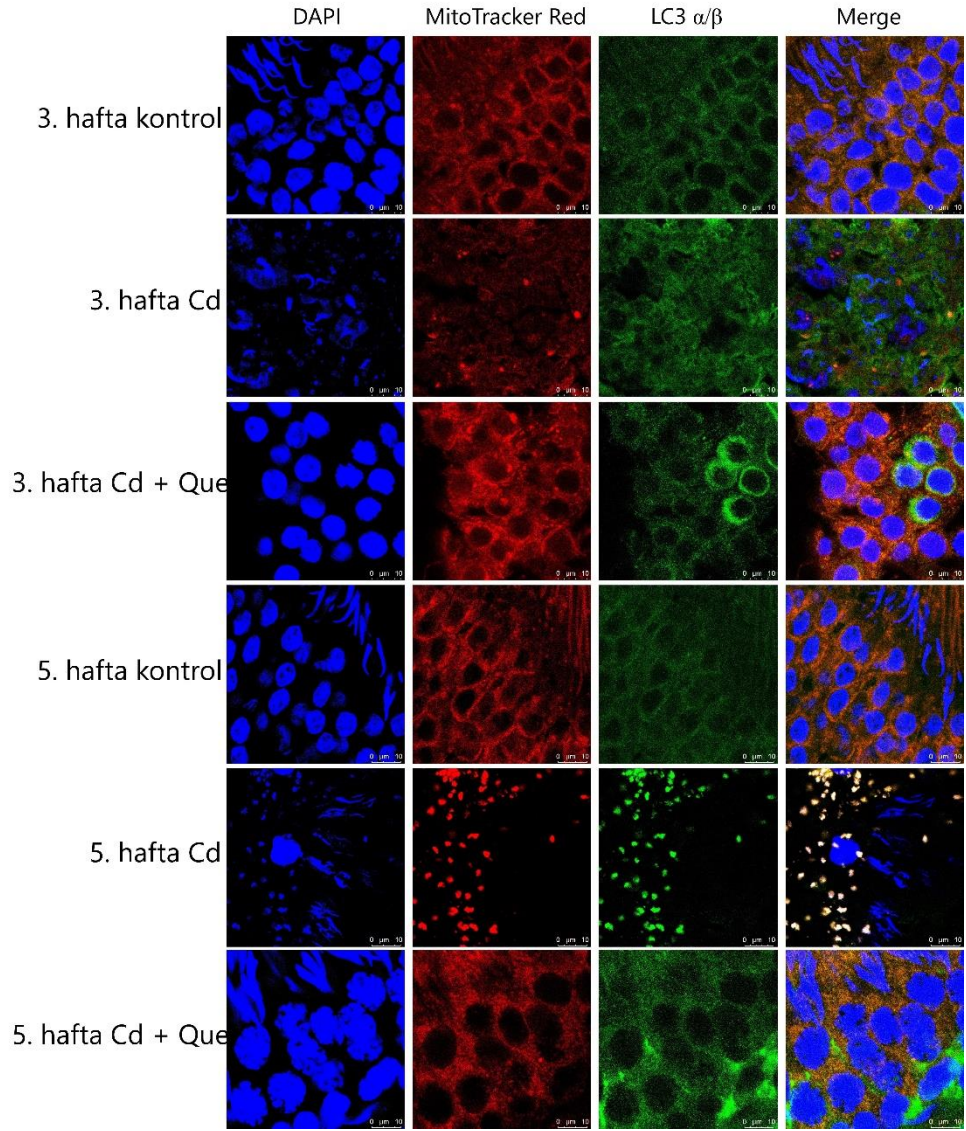
Kontrol (0.gün), kontrol (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) grupları arasında LC3 protein ekspresyon seviyelerinde bir farklılık yoktur. Cd (1.hafta) grubunda protein seviyelerinde azalma görülmüştür (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Kontrol (0.gün), kontrol (1.hafta), Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) gruplarının LC3+Mitotracker red ekspresyonları. Ölçü çubuğu: 10 μm

Kontrol (3.hafta) grubu LC3 protein ekspresyonu normal seviyede olurken, Cd (3.hafta) grubunda bu ekspresyon seviyesi dokunun dejenerasyonu ile birlikte azalmıştır. Cd+Que (3.hafta) grubunda LC3 ekspresyon seviyesi artmış ve genellikle spermatogonyumlar etrafında oluşmuştur (Şekil 4.25).

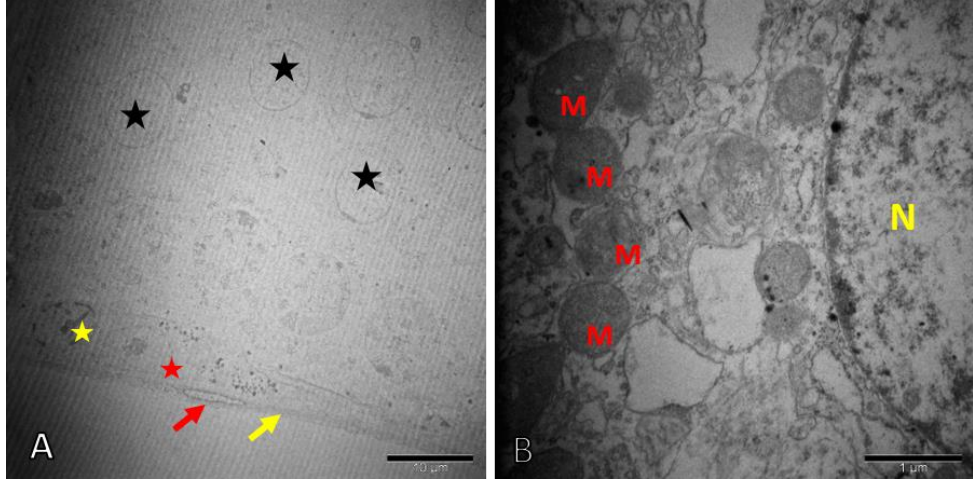
Kontrol (5.hafta) grubunun diğer kontrol grupları ile aralarında ekspresyon bir farklılık bulunmamaktadır. Cd (5.hafta) grubunda hücrelerin zarar görmesi, hatta otofajiye gitmeleri sebebiyle LC3 proteinlerinde artış gözlenmektedir. Cd+Que (5.hafta) grubu, Cd (5.hafta) grubunda olan bu hasarı azaltarak, Que ile hasarın bir miktarda olsa korunması sağlanmıştır (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Kontrol (3.ve 5.hafta), Cd (3.ve 5.hafta) ve Cd+Que (3.ve 5.hafta) gruplarında LC3+Mitotracker red ekspresyonları. Ölçü çubuğu: 10 µm

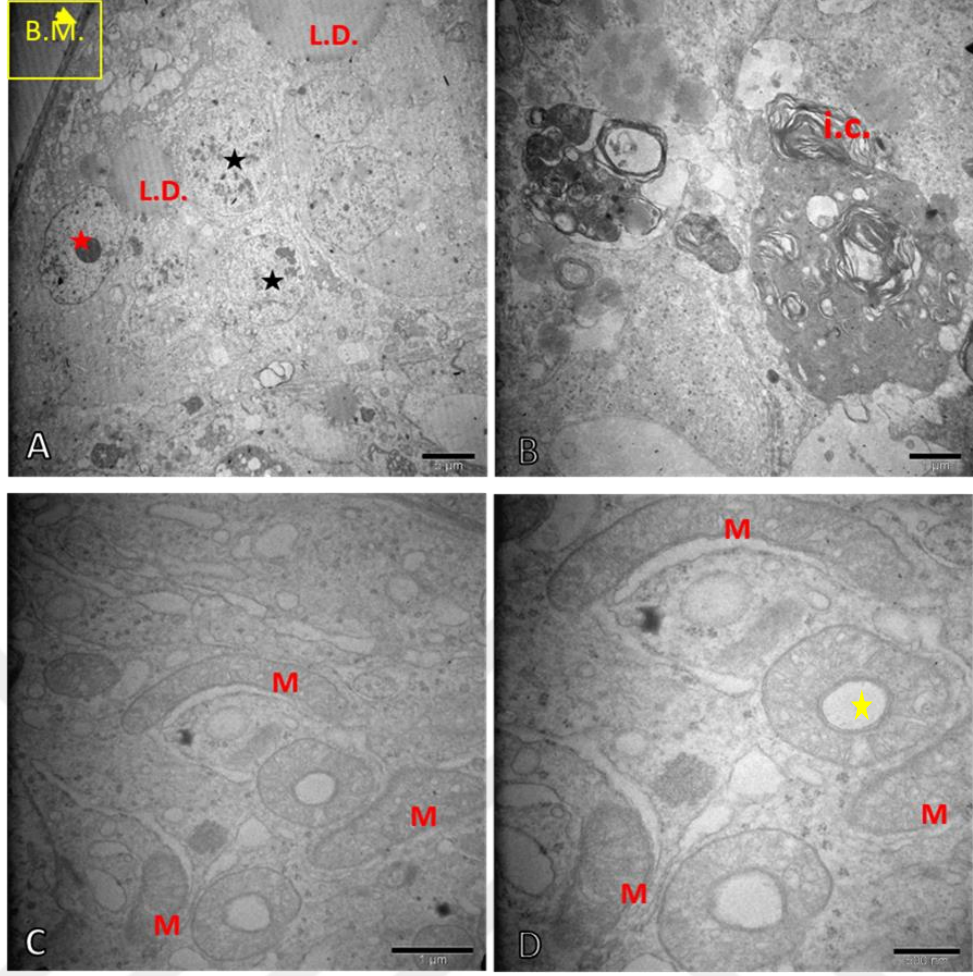
4.4. Testis Dokusunun TEM ile Ultrastrüktürel Analiz

Kontrol (1.hafta) grubuna ait sıçan testis örnekleri ultrastrüktürel olarak incelendiğinde; spermatojenik ve Sertoli hücreleri normal morfoloji sergilemişlerdir. Bununla beraber hücreler arası bağlantılar ile epitel bütünlüğünü de gösteren seminifer tübül epitelinin düzenli ultrastrüktürde olduğu gözlemlenmiştir. Seminifer epitelin bazal membranı düzgün ve normal kalınlıkta olup, tübül lümeninde çok sayıda sperm görülmüştür. Spermatojenik epitel hücrelerinin mitokondriyonları da normal morfolojik yapıya sahip olarak incelenmiştir (Şekil 4.26).



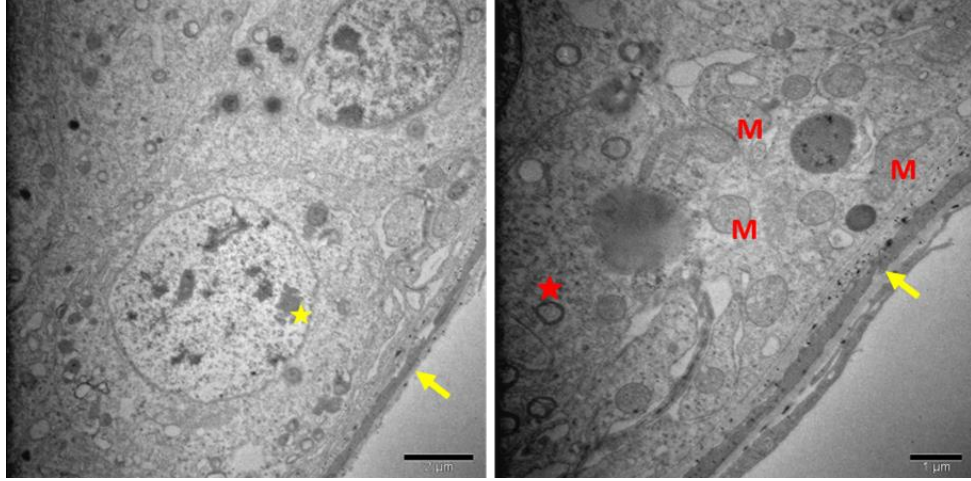
Şekil 4.26. Kontrol (1.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları. Kırmızı yıldız: Sertoli hücresi, Sarı yıldız: Spermatogonyum, Siyah yıldız: Spermatosit, Kırmızı ok: Miyoepitelyal hücre, Sarı ok: Bazal membran, M: Mitokondriyon, N: Nukleus Ölçü çubuğu; A: 10 µm ve B:1 µm

Cd (1.hafta) grubu sıçanlara ait testis örnekleri incelendiğinde; bazal membranda oturan hücrelerde ayrılmalar görülmekle birlikte hücrelerde vakuollere rastlanmıştır. Sertoli hücresindeki vakuol spermatojenik hücre sitoplazmasından daha büyük olarak gözlemlenmiştir. Büyük lipid damlaları ve düzgün mitokondrilerle beraber bazı kristalarda yer yer dilatasyonlar bulunmuştur. Bunlara ek olarak diğer Cd gruplarına oranla mitofajik görüntüler daha az görülmekle birlikte yer yer multilameller inklüzyonlara rastlanmıştır (Şekil 4.27).



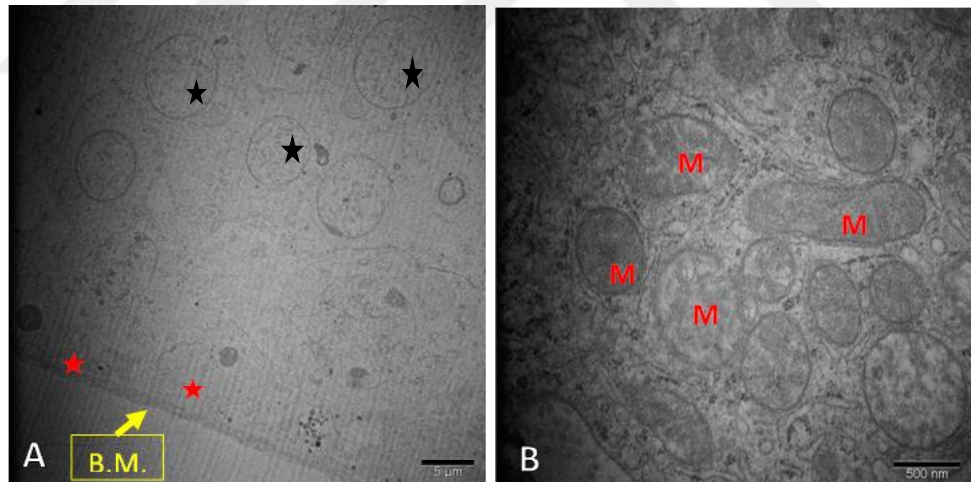
Şekil 4.27. Cd (1.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları. Kırmızı yıldız: Sertoli hücresi, Sarı yıldız: Hasarlı mitokondriyon, Siyah yıldız: Spermatosit, Sarı ok: bazal lamina, M: Mitokondriyon, L.D.: Lipid damlacığı İ.C:İnklüzyon cisimciği Ölçü çubuğu; A: 5 µm B ve C:1 µm D:500 nm

Cd+Que (1.hafta) grubu testis örnekleri incelendiğinde; epitel bütünlüğü korunmuş olarak görülmüştür. Seminifer tübül epitel hücreleri bazal lamina üzerinde oturmuştur. Sağlıklı mitokondriler görülmekle birlikte yer yer mitokondriyal genişlemeler yer almıştır (Şekil 4.28).



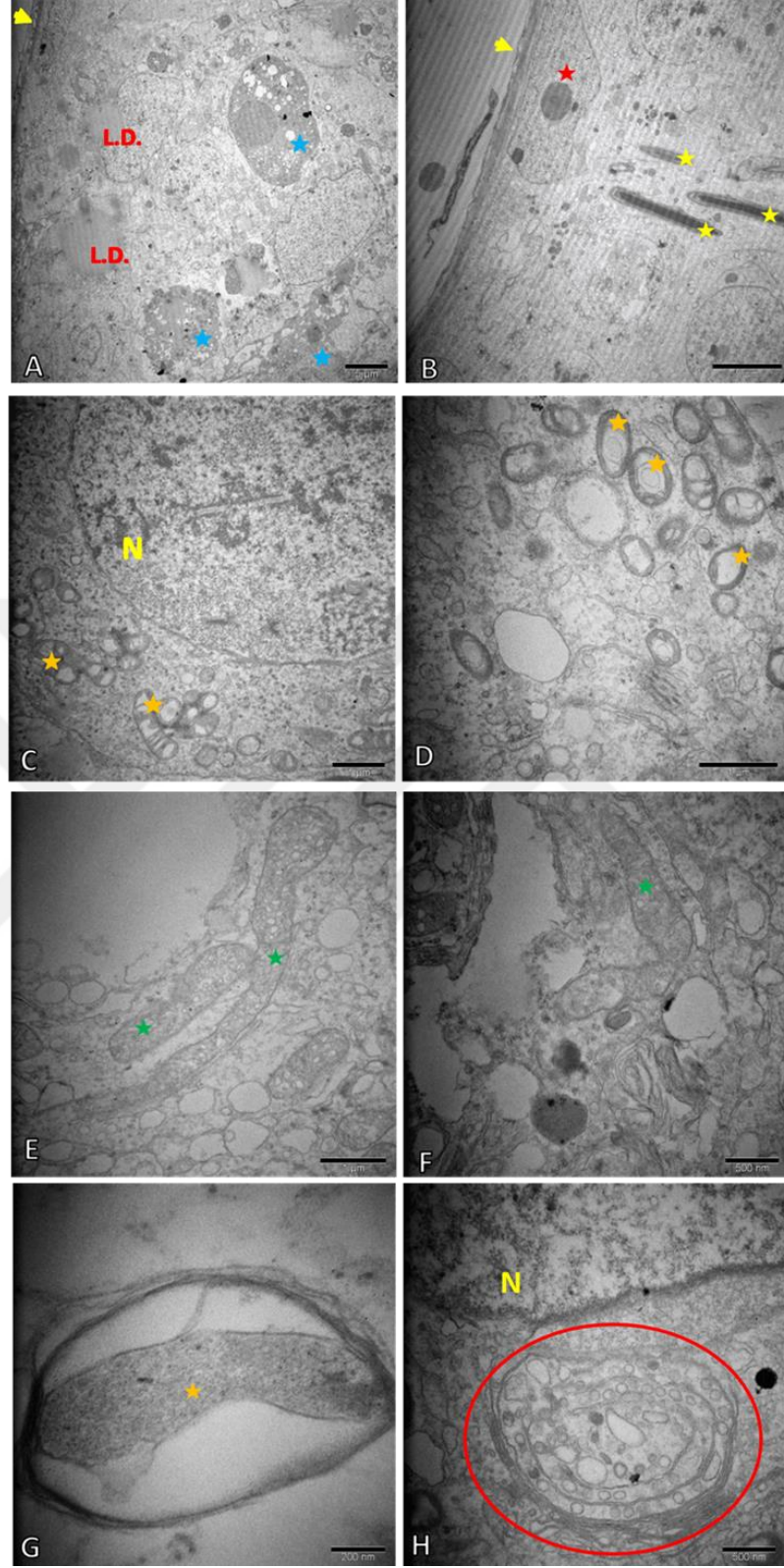
Şekil 4.28. Cd+Que (1.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları. Kırmızı yıldız: Hasarlı mitokondri, Sarı yıldız: Spermatogonyum, Sarı ok: bazal lamina, M: Mitokondriyon Ölçü çubuğu; A: 2 µm B:1 µm

Üç haftalık sıçanlara ait kontrol grubu testis örnekleri ultrastrüktürel olarak incelendiğinde; bazal membran normal kalınlıkta ölçülmüştür. Spermatojenik ve Sertoli hücreleri normal morfoloji sergilemişlerdir. Spermatojenik epitel hücrelerinin mitokondriyonları da normal morfolojik yapıya sahip olarak incelenmiştir (Şekil 4.29).



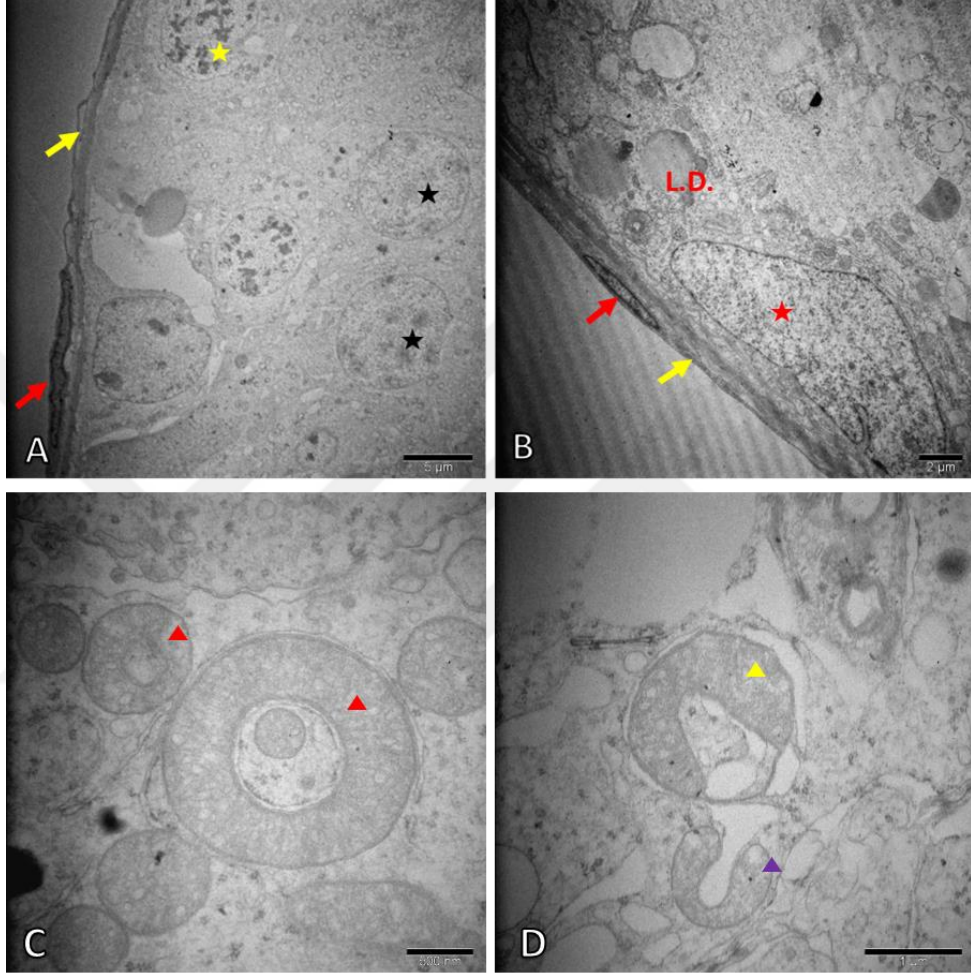
Şekil 4.29. Kontrol (3.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları. Kırmızı yıldız: Sertoli hücresi, Siyah yıldız: Spermatosit, Sarı ok: Bazal membran, M: Mitokondriyon Ölçü çubuğu; A: 5 µm ve B:500 nm

Cd (3.hafta) grubuna ait testis örnekleri ultrastrüktürel olarak incelendiğinde; hücreler arası bağlantıların bozulması sonucu bazale yakın olgun spermier görülmüştür. Hücrelerin sitoplazmalarında vakuollere rastlanmıştır. Mitokondriyal bozukluklarda ve mitofajik figürlerde artışlar görülüp, belirgin endoplazmik retikulum sisternalarında dallanmalar bulunmuştur (Şekil 4.30).



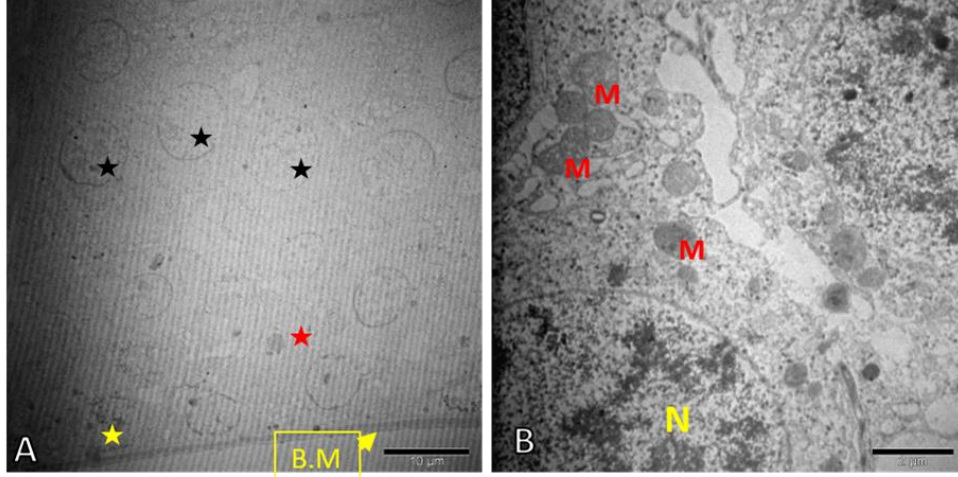
Şekil 4.30. Cd (3.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları. Mavi yıldız: Hasarlı apoptotik hücre, Turuncu yıldız: Hasarlı mitokondri, Yeşil yıldız: Mitokondriyal füzyon, Kırmızı yıldız: Sertoli hücresi, Sarı yıldız: Spermatid, Sarı ok: Bazal membran, Kırmızı halka: Multiveziküler cisim, N: Nükleus, L.D. Lipid damlacığı Ölçü çubuğu; A ve B: 5 µm, C, D ve E:1 µm, F ve H: 500 nm, G: 200 nm

Cd+Que (3.hafta) grubunda bulunan sıçanların testis örnekleri ultrastrüktürel olarak incelendiğinde; bazal membranda bütünlük sağlanmış ve miyoepitelyal hücreye rastlanmıştır. Morfolojik anlamda normal spermatogonyum, spermatosit ve Sertoli hücreleri incelenmiştir. Donut ve at nalı şeklini almış bozulmuş mitokondriler bulunmakla birlikte otofajik mitokondri de görülmüştür (Şekil 4.31).



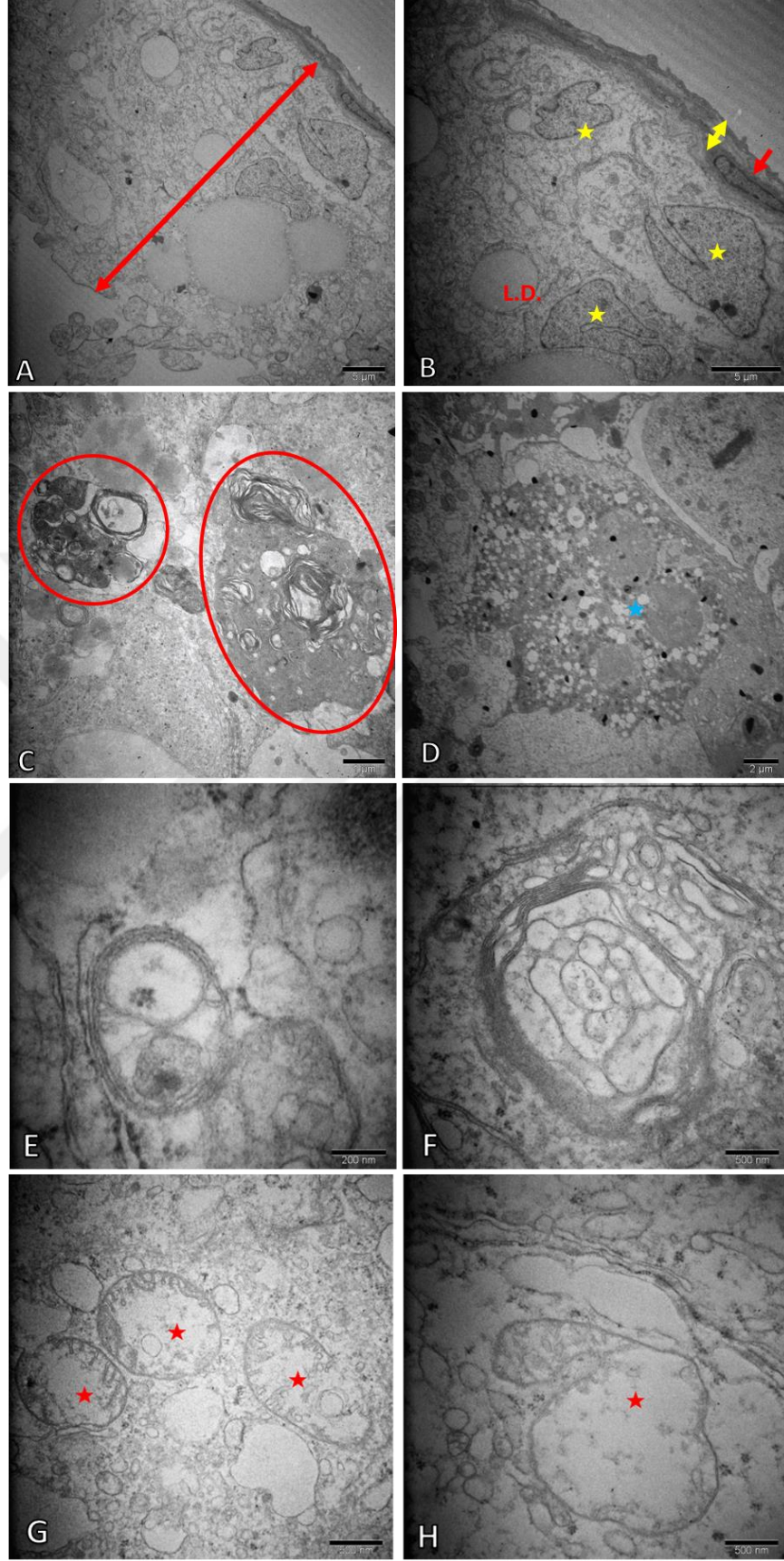
Şekil 4.31. Cd+Que (3.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları. Kırmızı yıldız: Sertoli hücresi, Sarı yıldız: Spermatogonyum, Siyah yıldız: Spermatosit, Sarı ok: Bazal membran, Sarı ok başı: Donut şekilli mitokondri, Kırmızı ok başı: Otofajik mitokondri, Mor ok başı: At nalı şeklinde mitokondri, Kırmızı ok: Miyoepitelyal hücre, L.D. Lipid damlacığı Ölçü çubuğu; A: 5 µm, B: 2 µm, C: 500 nm ve D: 1 µm

Kontrol (5.hafta) grubu testis örnekleri ultrastrüktürel olarak incelendiğinde; spermatojenik ve Sertoli hücreleri normal morfoloji sergilemişlerdir. Spermatojenik epitel hücrelerinin mitokondriyonları da normal morfolojik yapıya sahip olarak incelenmiştir (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Kontrol (5.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları. Kırmızı yıldız: Sertoli hücresi, Sarı yıldız: Spermatogonyum, Siyah yıldız: Spermatozoid, Sarı ok: Bazal membran, M: Mitokondriyon, N: Nükleus Ölçü çubuğu; A: 10 µm ve B: 1µm

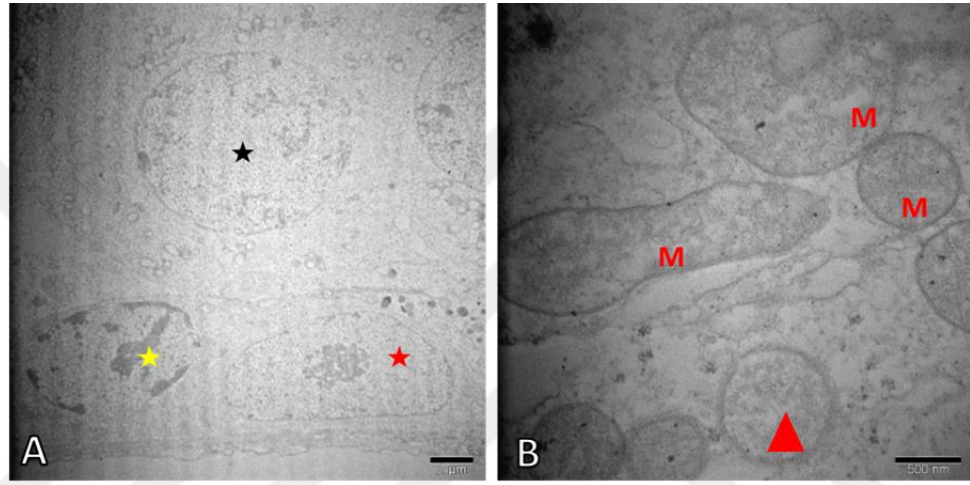
Cd (5.hafta) grubu testis örneklerine ultrastrüktürel olarak bakıldığında; seminifer tübül epiteli tamamen dejenere olmuş, kalınlığı azalmış ve bazal membran kalınlığı artmıştır. Buna karşın bazal membran yapısı ve interstisyel alan epitele nazaran korunmuş olarak görünmüştür. Hemen hemen bütün hücrelerin ultrastrüktürel yapıları yok denecek kadar azalmıştır. Hücrelerin hiçbir organeli ve nükleus yapıları izlenmemekte, yer yer lipid damlacıkları incelenmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Cd (5.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları. Kırmızı çift başlı ok: Epitel kalınlığı, Sarı çift başlı ok: Bazal membran

kalınlığı, Kırmızı ok: Miyoepitelyal hücre, Sarı yıldız: nuklear morfolojisi bozulmuş spermatogonyum, Mavi yıldız: Hasarlı/apoptotik hücre, Kırmızı halka: Multilameller cisim, Kırmızı yıldız: Hasarlı mitokondri, L.P.: Lipid damlacığı Ölçü çubuğu; A ve B: 5 µm, C: 1µm, D: 2 µm, E: 200 nm ve F, G ve H: 500 nm

Cd+Que (5.hafta) grubu testis örnekleri ultrastrüktürel olarak incelendiğinde; Cd (5.hafta) grubuna göre epitel hasarı oldukça azalmış, Sertoli ve spermatogenik hücreler ve organelleri gözlenebilmektedir. Lümeneye yakın hücrelerin organellerinde görülen kadmiyum hasarı oldukça fazladır. Mitokondri kristallerinde silinme görülmekle birlikte mitofajik bulgulara çok rastlanmamıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Cd+Que (5.hafta) grubuna ait testis dokusunun elektron mikroskopik fotomikrografları. Kırmızı yıldız: Sertoli hücresi, Sarı yıldız: Spermatogonyum, Siyah yıldız: Spermatosit, Kırmızı ok başı: Hasarlı mitokondri, M: Mitokondri Ölçü çubuğu; A: 2 µm, B: 500 nm

4.5. Western Blot Analiz Bulguları

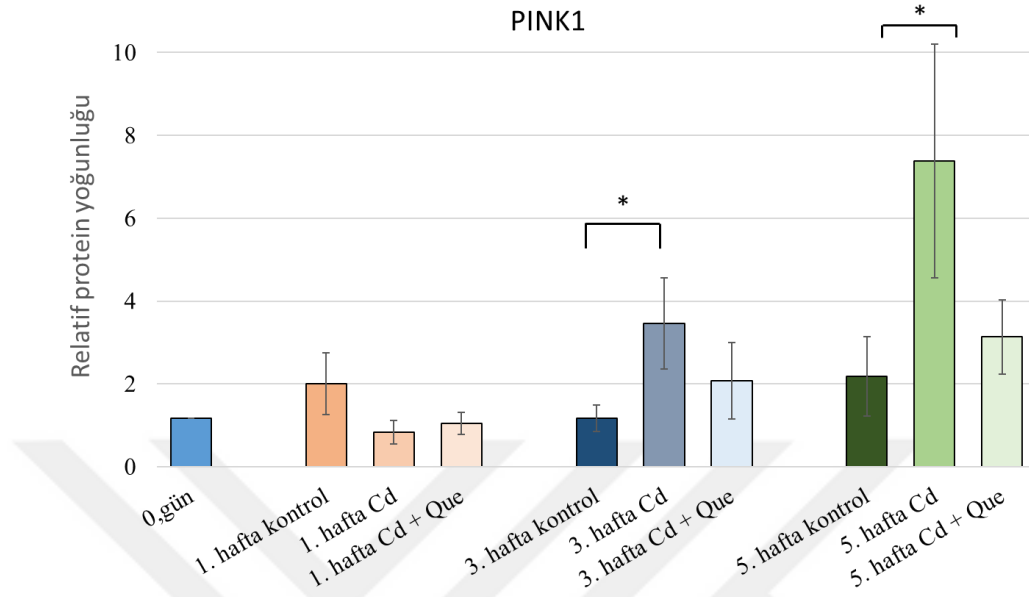
PINK1, özellikle oksidatif stres koşulları altında hücrenin hayatta kalmasını destekleyen mitokondriyal kinaz olmakla birlikte sağlıklı mitokondriyal homeostaz için önemli rol oynamaktadır (Matsuda ve ark., 2013).

PINK1 protein yoğunluğu açısından kıyaslandığında kontrol (1.hafta) grubu ile Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) grupları arasında azalma, Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) grupları arasında artış görülmekle birlikte istatistiksel anlamda farklılık bulunmamıştır.

Cd (3.hafta) ve Cd+Que (3.hafta) grupları arasında artış görülmüştür ve kontrol (3.hafta) ile Cd (3.hafta) grupları arasında istatistiksel anlamda farklılık bulunmuştur ($p=0,037$). Buna ek olarak 3.hafta Cd ve Cd+Que grupları arasında bir azalış söz konusudur.

Kontrol (5.hafta) ve Cd (5.hafta) arasındaki protein yoğunluğu açısından artış bulunmakla birlikte istatistiksel anlamda farklılık görülmüştür ($p=0,028$). 5.hafta Cd ve

Cd+Que grupları arasındaki azalma da istatistiksel anlamda farklılık söz konusu değildir (Şekil 4.35 ve Şekil 4.40).

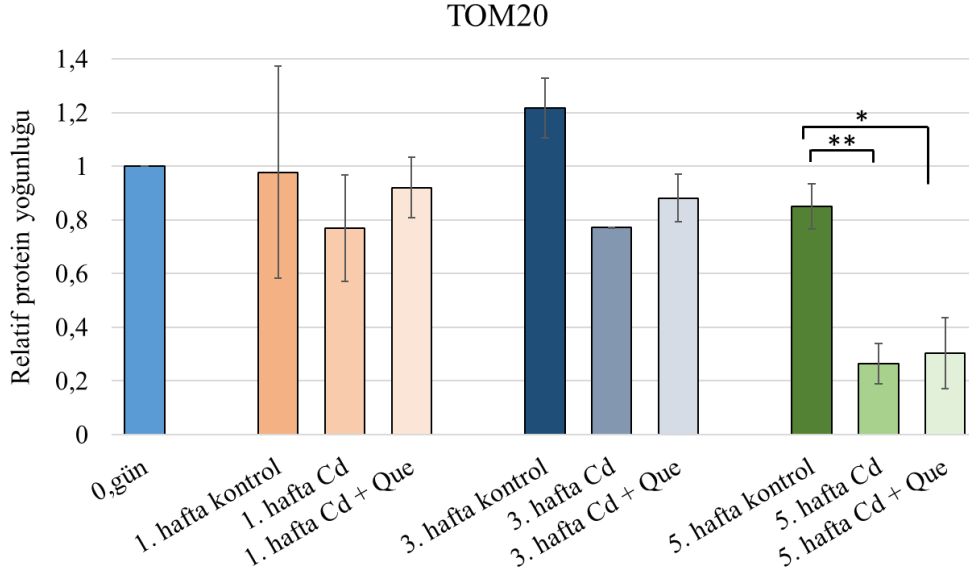


Şekil 4.35. Haftalara göre PINK1 protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi

TOM20 protein ekspresyon düzeyleri açısından kıyaslandığında, kontrol (1.hafta) ile Cd (1.hafta) arasında azalma görülürken, Cd+Que (1.hafta) arasında hemen hemen bir değişim olmamıştır. 1.hafta Cd ve Cd+Que grupları arasındaki seviye ise artmıştır. Bu bulgulara ek olarak istatistik anlamda farklılık görülmemiştir ($p>0,005$).

Kontrol (3.hafta) grubunun protein ekspresyon seviyesi Cd (3.hafta) ve Cd+Que (3.hafta) gruplarında fazla olduğu belirlenmiştir. Cd (3.hafta) ve Cd+Que (3.hafta) grupları arasındaki fark incelendiğinde Cd+Que (3.hafta) grubunda artışa rastlanmıştır, fakat istatistiksel anlamda bir farklılık göstermemiştir ($p>0,005$).

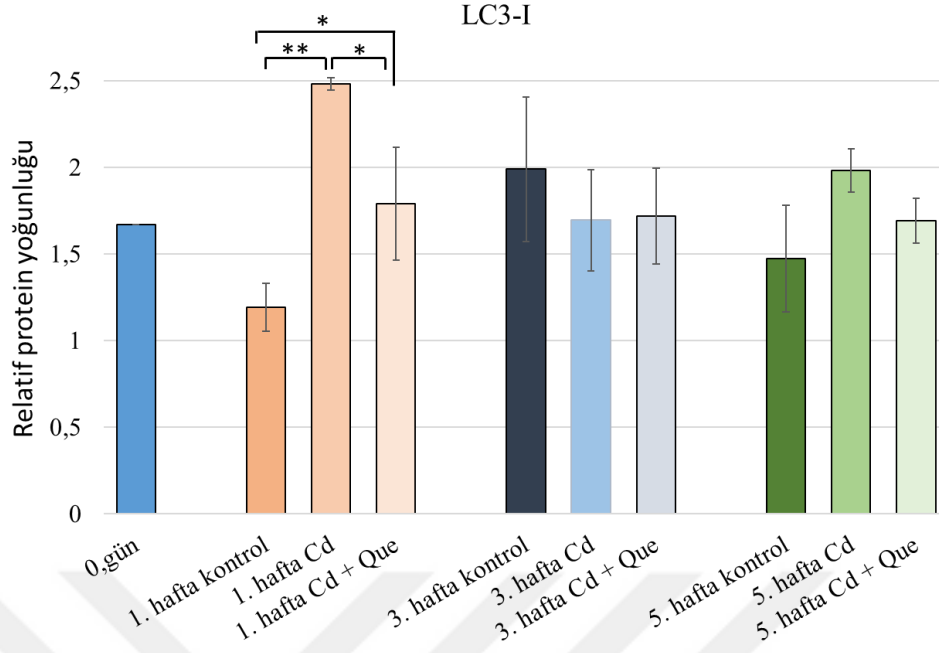
PINK1 protein yoğunluğu 5.hafta en fazla kontrol (5.hafta) grubunda görülmüş olup, kontrol (5.hafta) ile Cd (5.hafta) ve Cd+Que (5.hafta) arasında istatistiksel anlamda farklılık olduğu gösterilmiştir ($p=0,001$). Cd (5.hafta) ve Cd+Que (5.hafta) arasında fark olduğu gözlenmezken, istatistiksel anlamda farklılık belirlenmemiştir ($p>0,005$) (Şekil 4.36 ve Şekil 4.40).



Şekil 4.36. Haftalara göre TOM20 protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi

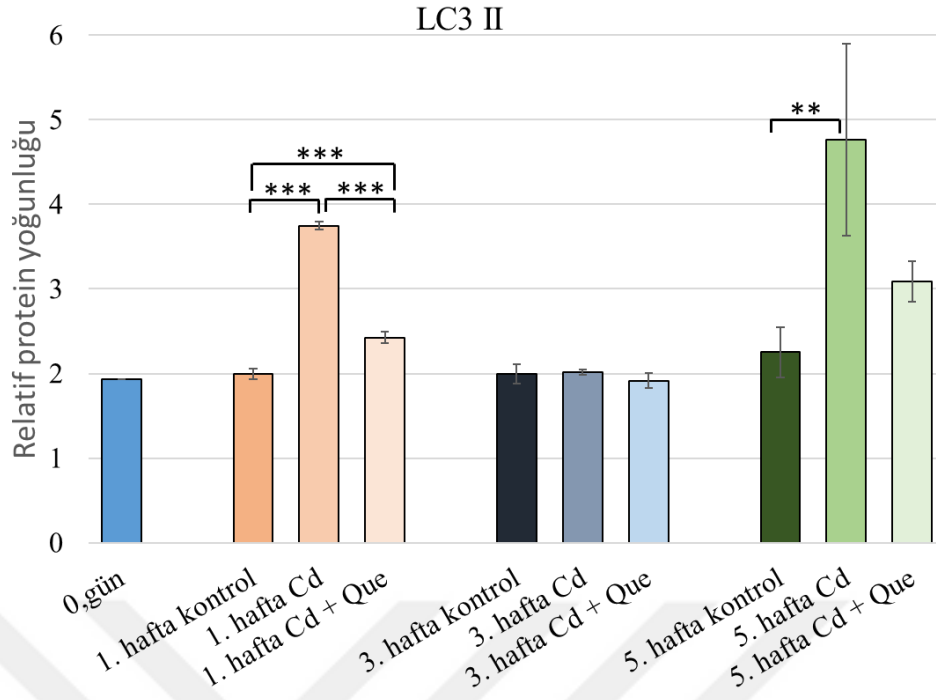
LC3, otofajinin tespit edilmesi için kullanılan önemli biyobelirteçlerdendir. LC3 a,b ve c olmak üzere farklı izoformlara sahiptir. Bununla birlikte lipidasyon durumuna göre LC3-I ve LC3-II olarak sınıflandırılmaktadır. LC3-I sitoplazmada bulunurken, LC3-II endomembran sisteminde bulunur. LC3-I'den LC3-II'ye dönüşüm, otofagozomun oluşumunun başlatılması için önemlidir.

LC3-I'in protein ekspresyonu en fazla Cd (1.hafta) grubunda görülmüştür. Cd (1.hafta) grubu ile kontrol (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) arasında azalış belirlenmiştir. Ayrıca her iki grupta istatistiksel anlamda farklılık bulunmuştur ($p=0,001$; $p=0,015$). Kontrol (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) grupları arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,036$). Kontrol (3.hafta) grubu ve diğer gruplar (Cd ve Cd+Que) arasında azalma görülmekle birlikte istatistiksel anlamda farklılık görülmemiştir. 5.haftada en yüksek değer Cd grubunda görülürken kontrol ve Cd+Que gruplarında farklılık yoktur (Şekil 4.37 ve Şekil 4.40).



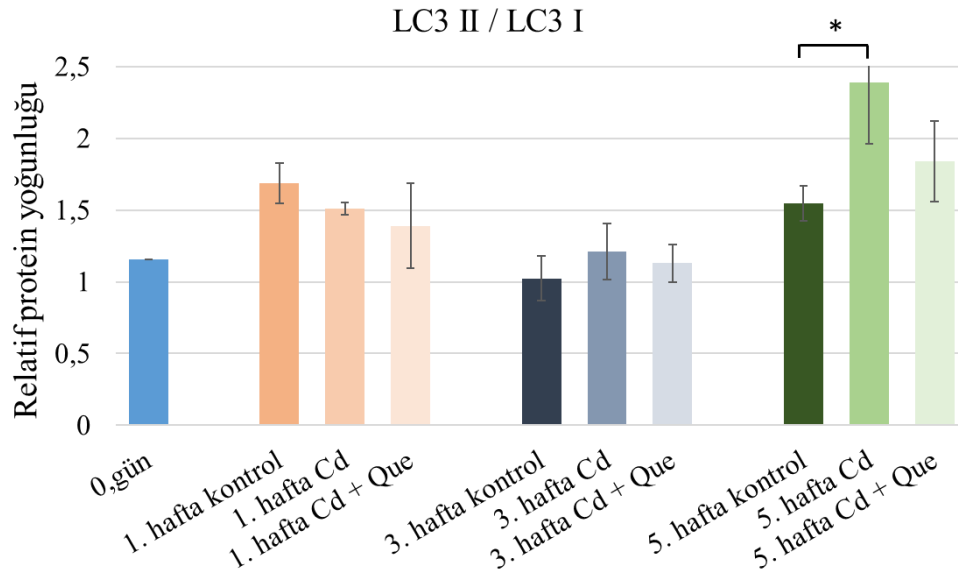
Şekil 4.37. Haftalara göre LC3-I protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi

LC3-II protein yoğunluğunun belirlenmesi için kontrol (1.hafta) ve kontrol (5.hafta) seviyeleri en yüksek düzeyde görülmüştür. 1.hafta tüm gruplar arasında anlamlı farklılık belirlenmiştir ($p=0,000$). Kontrol (1.hafta) ile Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) grupları arasında anlamlı farklılık görülmüştür ($p=0,001$; $p=0,028$). Cd (1.hafta) ve Cd+Que (1.hafta) grupları arasında istatistiksel anlamda farklılık belirlenmiştir ($p=0,015$). 3.haftada bulunan tüm grupların seviyelerinde ve istatistik olarak farklılık söz konusu değildir. Cd (5.hafta) ve kontrol (5.hafta) grupları arasında anlamlı bir farklılık vardır ($p=0,010$) (Şekil 4.38 ve Şekil 4.40).

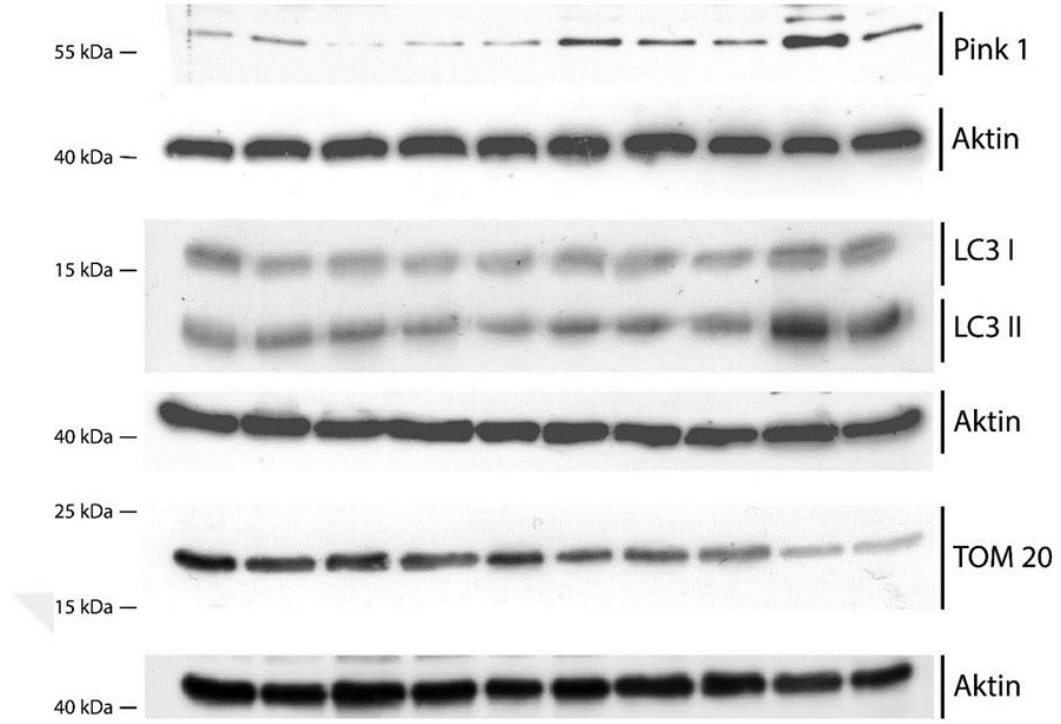


Şekil 4.38. Haftalara göre LC3-II protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi

LC3'ün iki farklı formundan ziyade otofagozom oluşumunu asıl belirleyen faktör LC3-II/LC3-I oranıdır. 1.hafta ve 3.hafta grupların da istatistiksel anlamda bir farklılığa rastlanmamıştır. Cd (5.hafta) grubu kontrol (5.hafta) grubuna göre artış göstermiş olup, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p=0,034$). Cd (5.hafta) ve Cd+Que (5.hafta) grupları arasında bir azalış olmakla birlikte istatistiksel anlamda bir farklılık bulunmamıştır ($p>0,05$) (Şekil 4.39 ve Şekil 4.40).



Şekil 4.39. Haftalara göre LC3-II/LC3-I protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi



Şekil 4.40. PINK1, LC3-I, LC3-II, TOM20, β -aktin protein miktarlarının gösterilmesi ve gruplara ait bandlar görülmektedir

5. TARTIŞMA

Bir ağır metal olan Cd; gıdalar, su ve hava yoluyla canlı sağlığına zarar veren önemli bir toksik maddedir. Cd, orman yangınları ve volkanik patlamaların neden olduğu kayaların ve toprakların kademeli olarak erozyon ve aşınması sonucu oluşan çevresel bir birikim göstermektedir. Cd'nin kullanımı sanayi ve teknolojik gelişmelerle birlikte daha da artmakla birlikte, günümüzde pigmentlerin, stabilizatörlerin, alaşımların, elektronik bileşiklerin imalatında ve özellikle şarj edilebilir nikel kadmiyum piller gibi pek çok alandan yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Böylece endüstriyel gelişmeyle birlikte atmosferdeki varlığı da artmıştır (Cannino ve ark., 2009). Bunların yanında kabuklular, çift kabuklu yumuşakçalar, istiridyeler, kafadanbacaklılar ve yengeçlerde de yüksek oranda Cd konsantrasyonları bulunmaktadır. Böbrek ve karaciğer gibi sakatat ürünlerinde, yağlı tohumlarda, kakao çekirdeklerinde ve bazı yabancı mantarlarda, pirinç, buğday, yeşil yapraklı sebzeler, patates, havuç ve kereviz Cd'nin bulunduğu gruplar arasında sayılmaktadır. Bunlara kıyasla popülasyonda Cd maruziyetinin bir başka çevresel kaynağı tütün mamüllerinin kullanımıdır (Genchi ve ark., 2020). Vücuda alınan Cd gibi ağır metaller, çeşitli doku ve organlarda birikim gösterirler ve vücuttan atılımı zordur (Manriquez ve ark., 1998; Zhou ve ark., 2001).

Henüz Cd'nin enzimatik reaksiyonlarda ve diğer biyolojik aktivitelerde herhangi bir rolü belirlenemediğinden dolayı, insan vücudu için gereksiz kabul edilmektedir (Cannino ve ark. 2009). İnsanlarda, toksik miktarda Cd'ye maruz kalma, böbrek ve karaciğer disfonksiyonu, pulmoner ödem, testis hasarı, osteomalazi, adrenal ve hemopoietik sistemde hasar gibi çeşitli olumsuz etkilere neden olabilir. Aynı zamanda Cd'nin üreme sağlığı ve gelişen embriyo kalitesi üzerinde geniş ölçüde zararlı etkileri sahip olduğu da tanımlanmıştır. Testislerde toksik miktarda Cd maruziyetlerinde; oksitidatif stres oluşumu, lipid peroksidasyonun artması, antioksidan savunma sisteminin bozulması, sülfidril gruplarına bağlanarak glutatyon depolarının tüketilmesi, kalsiyum dengesinin ve mitokondriyal fonksiyonlarının bozulması ve nekroz ile apoptoza bağlı hücresel ölümlerin meydana gelmesi gözlenmiştir (Genchi ve ark., 2020). Testislerde Cd; apikal testiküler dejenerasyona, şiddetli hemorajik nekroza ve seminifer tübül kaybına ve Leydig hücrelerinde ki testostereon üretiminin bozulmasına yol açar. Ayrıca Cd, spermatojenik hücrelere de etki eder ve bu da fertilitiyi önemli ölçüde azaltır (Fowler ve ark., 1982). Seminifer tübüllerdeki atrofi sonucu olarak da sperm yapımı durur (Cameron ve ark., 1963; Walker ve ark., 1992).

Mitofaji, otofajinin özel bir şeklidir. Zarar görmüş, yaşlanmış veya membran potansiyeli bozulmuş mitokondrilerin otofagozom aracılığıyla lizozomal olarak

parçalanması ve bir dizi hücrel mekanizmanın rol aldığı süreçler ile gerçekleşir. Yıkıma uğratılacak mitokondriler lizozomlara yönlendirilir (Kim ve ark., 2007). Memeli hücrelerinde; BINP3L/NIX, PARKIN ve PINK1 gibi bazı proteinler, mitokondrinin parçalanması ile ilişkilendirilmiştir (Deyu ve ark., 2018). PINK1, normal koşullar altında sitoplazmada öncü olarak sentezlenmektedir ve fonksiyonel mitokondrilerde iç mitokondriyal membranda lokalize olan bir serin/treonin kinazdır. Normal bir mitokondride PINK1, N-terminal ucundan kesime uğrayarak proteozomal yıkıma uğrar. Ancak mitokondriyal membran potansiyelinin bozulması, N-terminal ucun kesilememesine ve PINK1'in dış mitokondriyal membranda birikmesine neden olur. Burada biriken PINK1 proteinleri dimer oluşturarak aktifleşir ve substratlarını fosfatlamaya başlar. PINK1'in substratlarından biri de bir ubiquitin ligaz olan Parkin proteindir. Fosforile olan Parkin, mitokondri dış yüzeyine çok sayıda ubiquitin ekleyerek mitokondri yıkımı için sinyal oluşturur. Daha sonraki aşamalarda vakuolizasyon ve en son aşamada da otozom oluşumu ile birlikte mitokondriyal yıkım süreçleri tamamlanır (Yamano ve Youle, 2013; Ding ve Yin, 2012).

Que, flavonoidler içerisinde doğada en fazla bulunan önemli bir biyoflavonoiddir. Que bulunduran bitkilerin başında turpgiller, üzüm, elma, soğan, domates, çilek, yaban mersini, siyah ve yeşil çay gelmektedir (Kelly 2011; Harnly ve ark 2006). Günümüzde, ilave besin takviyesi olarak da kabul edilen fitokimyasal ilaç halinde de kullanılır (Andres ve ark. 2018). Que'nin serbest radikalleri yakalama, demir ve bakır gibi metal iyonlarını şelatlama özelliği vardır. Bundan dolayı güçlü bir antioksidandır. Bunun yanında Que antikarsinojenik, antiagregan, vazodilatör, antienflamatuar ve kardiyoprotektif etkilere de sahiptir (Harwood ve ark 2007). Bunlara ek olarak viral enfeksiyonlarda koruyucu özelliği vardır (Ristow ve ark. 2009). Ayrıca Que antioksidan etkinliği ile oksidatif strese bağlı doku hasarını azaltarak iskemi-reperfüzyonda miyokardiyal iyileşmeyi artırmaktadır. Bu koruyucu etki özellikle kronik tedavi uygulanan kalpte net bir şekilde görülmektedir (İkizler ve ark. 2007). Testis üzerinde yapılan bir çalışmada ise, testis ve epididimiste toksik etki sonucu spermatogenezis, hormon düzeyleri ve lipid yapısında oluşan bozukluklar üzerinde Que'nin koruyucu etkisinin olduğu ve zararı en aza indirdiği gösterilmiştir (Çiftçi ve ark. 2016; Bartekova ve ark. 2016). Que'nin mitokondriyal biyogenesis, mitokondriyal membran potansiyelinin regülasyonu, oksidatif solunum, ATP metabolizması ve mitokondri bağımlı apoptoz yolları ile ilişkili olduğu, son yapılan çalışmalar ile belirlenmiştir. Que aynı zamanda iç ve dış kaynaklı streslerin mitokondri üzerinde oluşturduğu oksidatif hasarın giderilmesinde koruyucu etkiye sahiptir.

Zhang ve arkadaşlarının 2019 yılında sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında Cd ve Que grupları arasında incelenen vücut ağırlıklarında değişiklik olmadığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2019; Venditti ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda, Cd'nin haftalara göre testis dokusu üzerinde toksikasyonu ve bu toksikasyonun yarattığı hasar üzerinde Que'nin koruyucu etkisini haftalara göre incelemekteyiz. Yapılan çalışmalardan farklı olarak Cd (1.hafta) ve Cd (3.hafta) gruplarda vücut ağırlığında azalma görülürken, Cd (5.hafta) grubunda ise artış görülmektedir. Bu farklılık, Cd (5.hafta) grubunda oluşan hasarın şiddetinin artmasıyla birlikte androjen hormonlarını salgılayan intertisyel alanda bulunan Leydig hücrelerinin azalmasından kaynaklanıyor olabilir (Zhu ve ark., 2020). 1.hafta, 3.hafta ve 5.hafta Cd+Que gruplarında ise ilk ölçüm kiloları ve son ölçüm kiloları arasında istatistiksel anlamda bir farklılık olmamasına rağmen artış söz konusudur. Bu artış Que'nin bir miktar da olsa Cd'nin toksik etkisini azalttığını göstermektedir.

Bu çalışmada deney hayvanlarına verilen Cd'nin farklı zaman sürelerinde testis ağırlıklarında azalmaya neden olduğu görülmektedir. Koruyucu olarak kullanılan Que antioksidanı ise toksik etkiyi azaltarak testis ağırlık kaybını önlediği saptanmıştır. Literatürde farklı antioksidanlarla yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlara rastlanmaktadır (Babaknejad ve ark., 2017; Erboga ve ark., 2015).

Zhang ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları çalışmada karaciğer dokusu histopatolojik yöntem ile incelenmiştir. Bu dokuda hasar Cd kaynaklı olmakla birlikte koruyucu olarak selenyum kullanılmıştır. Hasar sonucunda vakuollerin arttığını ve selenyumun azalttığı bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2021). Paralel sonuçlara Guan ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptıkları böbrek dokusu çalışmasında da rastlanmaktadır (Guan ve ark., 2020). Bizim yaptığımız çalışmada, Cd kaynaklı oluşan toksik etki sonucunda 1.hafta, 3.hafta ve 5.hafta gruplarında bulunan Cd gruplarında vakuol oluşumu görülmektedir. Bununla birlikte ilk haftalarda bazal laminada ayrılmalar şeklinde hasar oluşumu gözlenmiştir. Saydığımız parametrelere ek olarak, Cd (3.hafta) grubunda seminifer epitel kalınlığında incelmeye ve spermatogonyumların bozulmasıyla dev hücre oluşumu görülmektedir. Cd (5.hafta) grubunda ise morfolojileri bozulan seminifer tübüllerde dejenerasyonun oluşması ve sperm stazı ile oluşan mineralizasyon hasarın şiddetinin arttığını göstermektedir. Cd ile oluşan toksik etki üzerinde Que'nin koruyucu özelliği, Cd+Que (1.hafta) grubunda kontrole yakın bir histolojik yapı gözlenmektedir. Cd+Que (3.hafta) ve Cd+Que (5.hafta) gruplarında hasarın ilk haftaya göre daha fazla olmasından dolayı Que 1.haftaya göre koruyucu etkisi daha azdır; fakat Cd gruplarına göre interstisyel alan bütünlüğünün oluşması, seminifer epitel kalınlığının artması ve spermatogenez

sürecinin başlaması gösterilmektedir. Verilerimiz Cd'nin erkek üreme sağlığını ve gamet kalitesini etkilediğini göstermektedir, aynı zamanda insan sağlığını sürdürmek için toksik etkilerin sınırlandırılması gerekmektedir.

İn vivo olarak yaptığımız testis dokusunda Cd'ye bağlı oluşan hasarda ve Que'nin koruyucu etkilerinde mitokondrinin ince yapı, TEM ile görüntülenmiştir. Mitokondri Cd'ye maruz kaldıktan sonra, belirgin vakuolasyonlar, kristalarda bozulma ve kayıp, multiveziküler cisimcik, mitofajik figürler ve otofagozom yutulması görülmektedir. Bu etkenler Que'nin koruyucu etkisi ile en aza inmiştir. Wang ve arkadaşlarının 2010 yılında böbrek korteks mitokondrisinde yaptıkları çalışmada, Cd ve Pb metallerinin mitokondri üzerinde gösterdikleri toksik etkiler, mitokondriyal şişme ile birlikte krista kayıpları olarak gözlenmektedir. Cd'nin veya Pb'nin veya her ikisine birlikte maruz kalan böbrek korteksinde bulunan mitokondrilerinde oksidatif fosforilasyona neden olabilen geri dönüşümsüz hasara yol açtığını göstermektedir. Wen ve arkadaşlarının 2022 yılında yaptıkları çalışmada ise, Puerarin'in Cd kaynaklı mitokondriyal hasarı ve serebral korteks'te mitokondriyal kütle azalması üzerindeki nöroprotektif etkilerini incelenmektedir. Ultrastrüktürel olarak mitokondriyal yapının üzerinde Cd'nin zarar verici etkilerinin olduğunu ve hasarlanan mitokondrinin otofagozom yutulmasını teşvik ettiğini göstermektedir. Ayrıca, Cd kaynaklı mitokondriyal kayba karşı Puerarin, hem mitokondriyal hasarı hem de mitofagozom oluşumunu azalttığı bildirilmiştir. Literatürde yapılan farklı organlardaki Cd çalışmalarında bulunan sonuçlar bizim çalışmamızdaki sonuçları doğrulamaktadır (Wang ve ark., 2010; Wen ve ark., 2022). Bir başka çalışma da ise, Cd'nin PC12 hücrelerindeki mitokondriyal hasarı incelenmiş olup, 10 µM/L Cd'nin 6 saatte mitokondrilerde kristaların bozulması ve otofagozom oluşumu gösterilmektedir (Wang ve ark., 2020). Wang ve arkadaşlarının 2020 yılında Cd kaynaklı testiküler hasar üzerinde yaptıkları çalışmada, 0,2 mg, 0,4 mg ve 0,8 mg olmak üzere farklı dozlarda Cd kullanılmış olup, 5 hafta süreyle Cd maruziyetten sonra 13.haftaya kadar iyileşme sürecine bırakılmış ve apoptoz ile otofaji karşılaştırmaları yapılmıştır. 0,8 mg verilen sıçanların testis doku kesitleri TEM ile incelendiğinde erken/geç otofajik vakuoller ve otofagozomlara rastlanmaktadır (Wang ve ark., 2020).

Otofaji, memeli hücrelerinde hücresel materyali parçalanmak üzere lizozomlara ileten temel metabolik bir süreçtir. Basınç koşulları altında, mitokondri seçici olarak otofagozomların öncülleri olan izolasyon zarları olarak adlandırılan küçük zar yapılarınca algılanır, kademeli olarak genişler, daha sonra kapanır ve hapsolan mitokondriyi çıkarmak için lizozomlar ile kaynaşarak otofagozom oluşumuna yol açar (Dombi ve ark., 2018; Turco

ve Marten, 2016). Bu olayın temel özelliği LC3I ve LC3II etkileşiminin oluşması ve açıklanmasıdır. Bai ve arkadaşlarının 2021 yılında Hepa 1-6 hücrelerinde yaptıkları Cd ve molibden çalışmasında, ağır metal verilen grupların otofagozom sayısının arttığını göstermektedir (Bai ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda otofaji belirteci olan LC3 proteini Cd (5.hafta) grubunda en yüksek ekspresyon seviyesine ulaşmaktadır. Cd (5.hafta) grubunda hücrelerde dejenerasyonun artması, organellerin yıkımı ile birlikte hasarlı hücreler otofajiye gitmişlerdir. Bunun yanında Cd+Que (5.hafta) grubunda ise Que'nin koruyucu etkisinden dolayı dokuda daha az LC3 protein ekspresyonu görülmektedir. Literatürde bulunan çalışmalar, mitokondriyal fonksiyonda yer alan monogenik Parkinson hastalıkları ile ilişkili genlerin en belirgin PTEN kaynaklı serin/treonin kinaz 1 kodlayan PINK1 ve bir E3 ubiquitin ligaz Parkin'i kodlayan PRKN'dir. PINK1/Parkin yolağının mitofajinin ana mekanizması olduğunu bildirilmiştir (Allaire ve ark., 2019). Mitokondriyal hasarı tespit etme ve işlevsiz mitokondriyal bileşenleri çıkarmak için gerekli olan mekanizmalardandır (Ge ve ark., 2020). Wang ve arkadaşlarının 2020 yılında PC12 hücrelerinde Cd hasarı üzerine yaptıkları çalışmada, PINK1, Parkin, LC3 protein ekspresyon seviyeleri artmakta, TOM20 protein ekspresyon seviyesi ise azalmaktadır. Bizim çalışmamızda da ise, Cd (1.hafta) grubunda PINK1, Parkin antikor seviyeleri artmaya başlamakta olup, Cd (3.hafta) grubunda ise en yüksek seviyeye ulaşmaktadır. Bu sonuçlar Cd'nin mitofajiye neden olduğunu ve mitofajinin Cd (1.hafta) grubunda başladığını, Cd (3.hafta) grubuna kadar devam ettiğini göstermektedir. TOM20 protein ekspresyonunun azalması mitokondride oluşan hasardan dolayı oluşmaktadır. Bunlara ek olarak Cd+Que (1.hafta) ve Cd+Que (3.hafta) gruplarında, Cd (1.hafta ve 3.hafta) gruplarına göre PINK1 ve Parkin ekspresyon seviyeleri azalmıştır. Bu gruplarda protein seviyelerinin azalması Cd bağlı hasarda Que'nin koruyucu etkisini göstermektedir.

Cd gibi ağır metaller ile oluşturulan oksidatif stres PINK1-Parkin yoluyla mitofajiyi uyarabilir. PINK1 ve Parkin mitokondriyal kalite kontrolünü yönetmek için birbirlerine yakın çalışırlar. Mitokondri stres altında olduğunda, PINK1 mitokondrinin dış zarında birikir, ardından Parkin'in E3 ubiquitin ligaz aktivitesini uyarır ve Parkin'i mitokondriyal dış zara alır (Geisler ve ark, 2010). Parkin, seçici otofajiyi tetiklemek için mitokondriyal dış zar proteinlerini ubiquitinleştirir ve mitofaji oluşur. Bu mekanizmadan dolayı mitofajiyi daha iyi anlamak için mitokondri de bulunan PINK1, LC3 ve TOM20 antikorlarının protein seviyeleri western blot yöntemi ile bakılmıştır. Puerarin ile ilgili yapılan çalışmalarda Cd'ye maruz kalan cerebral kortikal örneklerin PINK1, Parkin, Nix ve LC3 protein ekspresyonlarında artışlar görülmüştür. Bu artışlar Cd'nin mitofajiye sebep olduğunu

göstermekle birlikte, puerarin'in etkisiyle birlikte mitofaji inhibe edilmiştir (Wen ve ark., 2022). Yu ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada, akut etanol tedavisi durumunda mitofaji aktivasyonu, hepatosit hasarının telafi edici bir yanıtı olarak mitofaji akışında veya lizozomal bozulmada pozitif bir artışa yol açabilir. Quercetin, lizozom biyogenezini indükleyerek ve otofagozom-lizozom füzyonunu hızlandırarak etanol aracılı mitofaji baskılamasını bloke etmiştir. Quercetini mitofajiyi etkili bir şekilde geri döndürerek mitofaji akışını yeniden açar ve karaciğer dokusunda koruma uygulamıştır (Yu ve ark., 2016). Bizim yaptığımız çalışmada, western blot sonuçlarımız immünofloresan çalışmalarına paralel olarak bulunmaktadır. Cd gruplarında TOM20 protein ekspresyon seviyeleri azalmakla birlikte, PINK1 ve LC3 protein miktarlarında ise Cd'nin etkisiyle beraber artışlar görülmektedir. Bu artış ve azalmayı Que, Cd+Que (1.hafta) ve Cd+Que (3.hafta) gruplarında inhibe ederek koruyucu etkisini göstermiştir. Bununla birlikte Cd+Que (5.hafta) grubunda ise hücrelerin dejenerasyonu ile birlikte, TOM20 protein miktarı azalmış olup, PINK1 ve LC3 protein seviyeleri artmıştır. Cd+Que (5.hafta) grubunda otofajinin aşırı artmasıyla birlikte hücre ölümleri, artan oksitadif stres nedeniyle Que dozu ve etkisi yetersiz kalmış ve koruyucu etkisi büyük oranda ortadan kalkmıştır. Bu nedenle diğer görsel bulgularla birlikte, mitokondri sayısının ciddi oranda azaldığı ve mitokondri bütünlüğünün kaybolduğu, hücre/doku canlılığının ve bütünlüğünün ciddi anlamda azaldığı görülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez kapsamında yaptığımız çalışmalarda Cd'nin özellikle 1.haftadan başlamak üzere testis spermatogenik hücrelerde toksik etki gösterdiği tüm analizlerde açıkça görülmüştür. Histomorfolojik olarak gruplarımız incelendiğinde, Cd grubunda toksik etkinin oluşması ve Cd+Que gruplarında ise 1.hafta ve 3.hafta Cd ile oluşan toksik etkinin azalması ve 5.hafta Cd+Que grubunda ise koruyucu etkinin azaldığı gösterilmiştir. TEM ile görüntülenen mitokondri, Cd'ye maruz kaldıktan sonra, belirgin vakuolasyonlar, kristalarda bozulma ve kayıp, multiveziküler cisimcik, mitofajik figürler ve otofagozom yutulması görülmektedir. Bu etkenlerin olumsuz etkisi, Que'nin koruyucu etkisi ile en aza inmiştir. Bu etkinin moleküler düzeyde incelenmesi için yapılan western blot çalışmalarında mitofaji ve otofaji markerları olarak kullanılan PINK1 ve LC3 protein ekspresyon düzeylerinin 1.haftadan başlamak üzere arttığı, ancak mitokondri seviyesini takip etmek için kullanılan TOM20 protein ekspresyonunun ise azaldığı görülmüştür. Fakat çalışma kapsamında protein ekspresyon düzeyleri western blot analizleri ile belirlenmesi planlanan Parkin proteini sonuçları yapılan tüm optimizasyon çalışmalarına rağmen elde edilememiştir. Western blot sonuçlarımız immüno Floresan çalışmalarına paralel olarak bulunmaktadır. İmmüno Floresan analizlerde PINK1 ve Parkin protein seviyelerinde Cd (1.hafta) gruplarında artış görülmesiyle beraber mitofajinin başladığını, Cd (3.hafta) mitofajinin arttığı görülmüştür. Bununla birlikte LC3 protein seviyesinde Cd (5.hafta) grubunda artış görülmüş ve otofagozom oluşumlarına rastlanmıştır. 5.hafta da toksik grup olan Cd grubunda hücre ve doku da dejenerasyonlarla beraber otofaji görülmeye başlanmıştır. Que her ne kadar ilk gruplarda görülen mitofajiyi inhibe etse de Cd+Que (5.hafta) toksik Cd'nin etkisini azaltamamıştır. Mitokondri sayısını ve kalitesini belirleyen TOM20 proteini ise, Cd (5.hafta) grubunda minimum seviyede görülmüştür.

Elde edilen sonuçlara göre mitofajinin başlangıç zamanı 1.haftadan öncesinde başlamaktadır. Bu nedenle mitofajinin başlangıç zamanı daha net belirlenmesi için Cd uygulamasından sonra ilk 1 hafta içerisindeki zaman dilimi ayrıntılı olarak incelenmeli ve böylelikle mitofajinin başlangıcı net olarak belirlenmelidir. Bunun için 0.günden itibaren 1, 3 ve 5.günlerde analizlerin tekrarlanması, daha ayrıntılı sonuçlar verecektir. Aynı zamanda analizlerde ATG6 ve Beclin1 gibi otofaji markerlarını, mitofaji markerlarına paralel olarak analiz edilmesi otofaji ve mitofaji arasındaki ilişkinin daha net kurulmasında yardımcı olacaktır.

Analizler sonucunda elde edilen veriler, Que'nin özellikle erken dönemlerde koruyucu etki gösterdiğini, ancak özellikle 5.haftada bu etkiyi belirgin bir şekilde gösteremediğini yansıtmaktadır. Bu nedenle Que'nin koruyucu etkisinin daha güçlü gösterebilmesi için Cd

uygulamasında önce başlatılarak analiz edilmesi etkinin daha doğru bir şekilde anlaşılmasına yardımcı olacaktır.



7. KAYNAKLAR

- Ağras K. (2012). Embryology of Undescended Testis and Mechanisms of Testicular Descent. *Turk Urol Sem.* 2012, 3: 17-22
- Allaire, M., Rautou, P., Codogno, P., & Lotersztajn, S. (2019). Autophagy in liver diseases: Time for translation? *Journal of Hepatology*, 70(5), 985-998. doi:10.1016/j.jhep.2019.01.026
- Andres, S., Pevny, S., Ziegenhagen, R., Bakhiya, N., Schäfer, B., Hirsch-Ernst, K. I., & Lampen, A. (2017). Safety aspects of the use of quercetin as a dietary supplement. *Molecular Nutrition & Food Research*, 62(1), 1700447. doi:10.1002/mnfr.201700447
- Arandjelovic, S., & Ravichandran, K. S. (2015). Phagocytosis of apoptotic cells in homeostasis. *Nature immunology*, 16(9), 907–917. <https://doi.org/10.1038/ni.3253>
- Arıncı, K. and A. Elhan. (2006). Anatomi. (4. Baskı). Ankara. Güneş Kitabevi
- Atsdr. 2012. “Public Health Statement for Cadmium.” Agency for Toxic Substances and Disease Registry, no. September. <http://www.atsdr.cdc.gov/PHS/PHS.asp?id=46&tid=15>
- Babaknejad, N., Bahrami, S., Moshtaghi, A. A., Nayeri, H., Rajabi, P., & Iranpour, F. G. (2018). “Cadmium Testicular Toxicity in Male Wistar Rats: Protective Roles of Zinc and Magnesium”. *Biological trace element research*, 185(1), 106–115. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-1218-5>
- Baghel, S. S., Shrivastava, N., Baghel, R. S., Agrawal, P., & Rajput, S. (2012). A review of quercetin: Antioxidant and anticancer properties. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 1, 146e160
- Bai, H., Yang, F., Jiang, W., Hu, A., Chang, H., Zhang, Y., ... Cao, H. (2021). Molybdenum and cadmium Co-induce mitophagy and mitochondrial dysfunction via ROS-mediated PINK1/Parkin pathway in hep1-6 cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 224, 112618. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112618
- Bancroft JD ve Stevens A. Theory and practice of histological techniques, (3rd ed). Churchill Livingstone, London, 1990, p. 133–134 & 188.
- Basciani, S., Mariani, S., Spera, G., & Gnassi, L. (2010). Role of platelet-derived growth factors in the testis. *Endocrine reviews*, 31(6), 916–939. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0004>
- BARTEKOVA, M., RADOSINSKA, J., PANCZA, D., BARANCIK, M., & RAVINGEROVA, T. (2016). Cardioprotective effects of quercetin against ischemia-reperfusion injury are age-dependent. *Physiological Research*, S101-S107. doi:10.33549/physiolres.933390
- Bernard A. (2004). Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 17(5), 519–523. <https://doi.org/10.1023/b:biom.0000045731.75602.b9>
- Bhagwat, S.; Haytowitz, D.B.; Holden, J.M. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3; U.S. Department of Agriculture: Beltsville, MD, USA, 2011
- Bhardwaj, J. K., Panchal, H., & Saraf, P. (2021). Cadmium as a testicular toxicant: A Review. *Journal of applied toxicology : JAT*, 41(1), 105–117. <https://doi.org/10.1002/jat.4055>
- Bucio, L., Souza, V., Albores, A., Sierra, A., Chávez, E., Cárabez, A., & Gutiérrez-Ruiz, M. C. (1995). Cadmium and mercury toxicity in a human fetal hepatic cell line (WRL-68 cells). *Toxicology*, 102(3), 285–299. [https://doi.org/10.1016/0300-483x\(95\)03095-w](https://doi.org/10.1016/0300-483x(95)03095-w)
- Bureau, G., Longpré, F., & Martinoli, M. G. (2008). Resveratrol and quercetin, two natural polyphenols, reduce apoptotic neuronal cell death induced by neuroinflammation. *Journal of neuroscience research*, 86(2), 403–410. <https://doi.org/10.1002/jnr.21503>
- Cannino, G., Ferruggia, E., Luparello, C., & Rinaldi, A. M. (2009). Cadmium and mitochondria. *Mitochondrion*, 9(6), 377-384. doi:10.1016/j.mito.2009.08.009
- Casalino, E., Calzaretti, G., Sblano, C., & Landriscina, C. (2002). Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 179(1-2), 37–50. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00245-7](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00245-7)
- Chatterjee, M., Sadhukhan, G. C., & Kundu, J. K. (2017). Indian gooseberry and Lycopodium 200c can effectively reduce cadmium induced testicular damage in 40 days exposed mice. *International Journal of Zoology Studies*, 2(6), 31–37
- Chen, G., Kroemer, G., & Kepp, O. (2020). Mitophagy: An Emerging Role in Aging and Age-Associated Diseases. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 200. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00200>
- Choubey, V., Zeb, A., & Kaasik, A. (2021). Molecular Mechanisms and Regulation of Mammalian Mitophagy. *Cells*, 11(1), 38. <https://doi.org/10.3390/cells11010038>
- Ciftci, U. (2016). Efficacy of Resveratrol and quercetin after experimental spinal cord injury. *Turkish Journal of Trauma and Emergency Surgery*. doi:10.5505/tjtes.2016.44575
- Dajas F. (2012). Life or death: neuroprotective and anticancer effects of quercetin. *Journal of ethnopharmacology*, 143(2), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.07.005>

- De Duve, C., ve Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annual review of physiology*, 28, 435–492. <https://doi.org/10.1146/annurev.ph.28.030166.002251>
- Deyu, H., Luqing, C., Xianglian, L., Pu, G., Qirong, L., Xu, W., & Zonghui, Y. (2018). Protective mechanisms involving enhanced mitochondrial functions and mitophagy against T-2 toxin-induced toxicities in GH3 cells. *Toxicology Letters*, 295, 41-53. doi:10.1016/j.toxlet.2018.05.041
- Ding, W., & Yin, X. (2012). Mitophagy: Mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *bchm*, 393(7), 547-564. doi:10.1515/hsz-2012-0119
- Dombi, E., Mortiboys, H., & Poulton, J. (2019). Modulating Mitophagy in mitochondrial disease. *Current Medicinal Chemistry*, 25(40), 5597-5612. doi:10.2174/0929867324666170616101741
- Duan, P., Hu, C., Quan, C., Yu, T., Huang, W., Chen, W., Tang, S., Shi, Y., Martin, F. L., & Yang, K. (2017). 4-Nonylphenol induces autophagy and attenuates mTOR-p70S6K/4EBP1 signaling by modulating AMPK activation in Sertoli cells. *Toxicology letters*, 267, 21–31. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.12.015>
- Eid, N., Ito, Y., Horibe, A., & Otsuki, Y. (2016). Ethanol-induced mitophagy in liver is associated with activation of the PINK1-Parkin pathway triggered by oxidative DNA damage. *Histology and histopathology*, 31(10), 1143–1159. <https://doi.org/10.14670/HH-11-747>
- Erboga, M., Kanter, M., Aktas, C., Bozdemir Donmez, Y., Fidanol Erboga, Z., Aktas, E., & Gurel, A. (2015). Anti-apoptotic and anti-oxidant effects of Caffeic acid Phenethyl ester on cadmium-induced testicular toxicity in rats. *Biological Trace Element Research*, 171(1), 176-184. doi:10.1007/s12011-015-0509-y
- Ergün M. ve Hayran M (2014). *Anatomi*. Ankara, Türkiye
- Ernst, E. (2011). Integrated medicine: Smuggling alternative practices into rational medicine? *Focus on Alternative and Complementary Therapies*, 16(1), 1-2. doi:10.1111/j.2042-7166.2011.01074.x
- Farrell, T. L., Gomez-Juaristi, M., Poquet, L., Redeuil, K., Nagy, K., Renouf, M., & Williamson, G. (2012). Absorption of dimethoxycinnamic acid derivatives in vitro and pharmacokinetic profile in human plasma following coffee consumption. *Molecular nutrition & food research*, 56(9), 1413–1423. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201200021>
- Fischer, C., Speth, V., Fleig-Eberenz, S., & Neuhaus, G. (1997). Induction of Zygotic Polyembryos in Wheat: Influence of Auxin Polar Transport. *The Plant cell*, 9(10), 1767–1780. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.10.1767>
- Foresta, C., Bettella, A., Vinanzi, C., Dabrilili, P., Meriggiola, M. C., Garolla, A., & Ferlin, A. (2004). A novel circulating hormone of testis origin in humans. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 89(12), 5952–5958. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-0575>
- Foresta, C., Zuccarello, D., Garolla, A., & Ferlin, A. (2008). Role of hormones, genes, and environment in human cryptorchidism. *Endocrine reviews*, 29(5), 560–580. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0042>
- Fowler, A. J., Singh, D. N., & Dwivedi, C. (1982). Effect of cadmium on meiosis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 29(4), 412-415. doi:10.1007/bf01605604
- Fugio, L. B., Coeli-Lacchini, F. B., & Leopoldino, A. M. (2020). Sphingolipids and Mitochondrial Dynamic. *Cells*, 9(3), 581. <https://doi.org/10.3390/cells9030581>
- Gao, A., Jiang, J., Xie, F., ve Chen, L. (2020). Bnip3 in mitophagy: Novel insights and potential therapeutic target for diseases of secondary mitochondrial dysfunction. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 506, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.02.024>
- Gartner LP ve Hiatt JL. 2016. *Color textbook of histology (7th Edition)*., Philadelphia, W.B. Saunders Company
- Ge, P., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2020). PINK1 and Parkin mitochondrial quality control: A source of regional vulnerability in Parkinson's disease. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1). doi:10.1186/s13024-020-00367-7
- Geisler, S., Holmström, K. M., Skujat, D., Fiesel, F. C., Rothfuss, O. C., Kahle, P. J., & Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature Cell Biology*, 12(2), 119-131. doi:10.1038/ncb2012
- a-Genchi, G., Carocci, A., Lauria, G., Sinicropi, M. S., & Catalano, A. 2020. “Nickel: Human Health and Environmental Toxicology”, *International journal of environmental research and public health*, 17(3), 679. <https://doi.org/10.3390/ijerph17030679>
- b-Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. 2020. “The Effects of Cadmium Toxicity”, *International journal of environmental research and public health*, 17(11), 3782. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113782>
- Gibellini, L., Pinti, M., Nasi, M., Montagna, J. P., De Biasi, S., Roat, E., Bertoncelli, L., Cooper, E. L., & Cossarizza, A. (2011). Quercetin and cancer chemoprevention. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2011, 591356. <https://doi.org/10.1093/ecam/neq053>

- Goede, J., Hack, W. W., Sijstermans, K., van der Voort-Doedens, L. M., Van der Ploeg, T., Meij-de Vries, A., & Delemarre-van de Waal, H. A. (2011). Normative values for testicular volume measured by ultrasonography in a normal population from infancy to adolescence. *Hormone research in paediatrics*, 76(1), 56–64. <https://doi.org/10.1159/000326057>
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C, Esche V, Brandenburg P, Reich A, Groneberg DA. The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J Occup Med Toxicol*. 2006 Sep 10;1:22. doi: 10.1186/1745-6673-1-22
- Griswold, S. L., & Behringer, R. R. (2009). Fetal Leydig cell origin and development. *Sexual development : genetics, molecular biology, evolution, endocrinology, embryology, and pathology of sex determination and differentiation*, 3(1), 1–15. <https://doi.org/10.1159/000200077>
- Griswold M. D. (2018). 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biology of reproduction*, 99(1), 87–100. <https://doi.org/10.1093/biolre/iov027>
- Guan, T., Xin, Y., Zheng, K., Wang, R., Zhang, X., Jia, S., ... Zhao, X. (2020). Metabolomics analysis of the effects of quercetin on renal toxicity induced by cadmium exposure in rats. *BioMetals*, 34(1), 33–48. doi:10.1007/s10534-020-00260-2
- Harnly, J. M., Doherty, R. F., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Bhagwat, S., & Gebhardt, S. (2006). Flavonoid content of U.S. fruits, vegetables, and nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9966–9977. doi:10.1021/jf061478a
- Harwood, M., Danielewska-Nikiel, B., Borzelleca, J., Flamm, G., Williams, G., & Lines, T. (2007). A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food and Chemical Toxicology*, 45(11), 2179–2205. doi:10.1016/j.fct.2007.05.015
- Hollman, P. C., & Katan, M. B. (1997). Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 51(8), 305–310. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(97\)88045-6](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(97)88045-6)
- Hyder, O., Chung, M., Cosgrove, D., Herman, J. M., Li, Z., Firoozmand, A., Gurakar, A., Koteish, A., & Pawlik, T. M. (2013). Cadmium exposure and liver disease among US adults. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*, 17(7), 1265–1273. <https://doi.org/10.1007/s11605-013-2210-9>
- Hyun, M., Kim, H., Kim, J., Lee, J., Lee, H. J., Rathor, L., Meier, J., Lerner, A., Lee, S. M., Moon, Y., Choi, J., Han, S. M., & Heo, J. D. (2023). Melatonin protects against cadmium-induced oxidative stress via mitochondrial STAT3 signaling in human prostate stromal cells. *Communications biology*, 6(1), 157. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04533-7>
- Ikizler, M., Erkasap, N., Dernek, S., Kural, T., & Kaygisiz, Z. (2007). Dietary polyphenol quercetin protects rat hearts during reperfusion: enhanced antioxidant capacity with chronic treatment. *Anadolu kardiyoloji dergisi : AKD = the Anatolian journal of cardiology*, 7(4), 404–410
- Ince E. 2020." The protective effect of quercetin in the alcohol-induced liver and lymphoid tissue injuries in newborns", *Molecular biology reports*, 47(1), 451–459. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05148-0>
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B. B., & Beeregowda, K. N. (2014). Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary toxicology*, 7(2), 60–72. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
- Junqueira LC ve Carneiro J. (2009). Temel Histoloji (10. Baskı). İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi
<https://healthjade.net/scrotum/>
<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-testes>
- Ilaqua, A., Francomano, D., Aversa, A. (2018). The Physiology of the Testis. In: Belfiore, A., LeRoith, D. (eds) *Principles of Endocrinology and Hormone Action*. Endocrinology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-44675-2_17
- Kang, M. Y., Cho, S. H., Lim, Y. H., Seo, J. C., & Hong, Y. C. (2013). Effects of environmental cadmium exposure on liver function in adults. *Occupational and environmental medicine*, 70(4), 268–273. <https://doi.org/10.1136/oemed-2012-101063>
- Kausar, S., Feng W., and Hongjuan C. (2018). "The Role of Mitochondria in Reactive Oxygen Species Generation and Its Implications for Neurodegenerative Diseases" *Cells*, 7, no. 12: 274. <https://doi.org/10.3390/cells7120274>
- Kierszenbaum AL. (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. Ankara, Palme Yayıncılık
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., & Lemasters, J. J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 462(2), 245–253. doi:10.1016/j.abb.2007.03.034
- Kim, H., Seo, E. M., Sharma, A. R., Ganbold, B., Park, J., Sharma, G., Kang, Y. H., Song, D. K., Lee, S. S., & Nam, J. S. (2013). Regulation of Wnt signaling activity for growth suppression induced by

- quercetin in 4T1 murine mammary cancer cells. *International journal of oncology*, 43(4), 1319–1325. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2036>
- Ko, G. J., Bae, S. Y., Hong, Y. A., Pyo, H. J., & Kwon, Y. J. (2016). Radiocontrast-induced nephropathy is attenuated by autophagy through regulation of apoptosis and inflammation. *Human & experimental toxicology*, 35(7), 724–736. <https://doi.org/10.1177/0960327115604198>
- Kojima, S., Sugimura, Y., Hirukawa, H., Kiyozumi, M., Shimada, H., & Funakoshi, T. (1992). Effects of dithiocarbamates on testicular toxicity in rats caused by acute exposure to cadmium. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 116(1), 24–29. doi:10.1016/0041-008x(92)90140-n
- Kukongviriyapan, U., Sompamit, K., Pannangpetch, P., Kukongviriyapan, V., & Donpunha, W. (2012). Preventive and therapeutic effects of quercetin on lipopolysaccharide-induced oxidative stress and vascular dysfunction in mice. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 90(10), 1345–1353. <https://doi.org/10.1139/y2012-101>
- Kumar, S. & Sharma, A. (2019). Cadmium toxicity: effects on human reproduction and fertility. *Reviews on Environmental Health*, 34(4), 327–338. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0016>
- Lemasters J. J. (2005). Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation research*, 8(1), 3–5. <https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.3>
- Lemasters J. J. (2014). Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox biology*, 2, 749–754. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2014.06.004>
- Mahran, A. M., Elgamal, D. A., Ghafeer, H. H., Abdel-Maksoud, S. A., & Farrag, A. A. (2017). Histological alterations in Leydig cells and macrophages in azoospermic men. *Andrologia*, 49(8), 10.1111/and.12714. <https://doi.org/10.1111/and.12714>
- Mailloux R.J. (2018). "Mitochondrial Antioxidants and the Maintenance of Cellular Hydrogen Peroxide Levels", *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, Article ID 7857251, 10 pages, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/7857251>
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>
- Manca, D., Ricard, A. C., Tra, H. V., & Chevalier, G. (1994). Relation between lipid peroxidation and inflammation in the pulmonary toxicity of cadmium. *Archives of toxicology*, 68(6), 364–369. <https://doi.org/10.1007/s002040050083>
- Matsuda, S., Kitagishi, Y., & Kobayashi, M. (2013). Function and characteristics of PINK1 in mitochondria. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, 1–6. doi:10.1155/2013/601587
- McKenna, I. M., Waalkes, M. P., Chen, L. C., & Gordon, T. (1997). Comparison of inflammatory lung responses in Wistar rats and C57 and DBA mice following acute exposure to cadmium oxide fumes. *Toxicology and applied pharmacology*, 146(2), 196–206. <https://doi.org/10.1006/taap.1997.8241>
- Méndez-Armenta, M., & Ríos, C. (2007). Cadmium neurotoxicity. *Environmental toxicology and pharmacology*, 23(3), 350–358. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.009>
- Moore KL ve Dalley AF. (1999). Clinically Oriented Anatomy. (4. Baskı). Lippicott Williams Wilkins. Baltimore, USA. 1999
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. (2016). The Developing Human: Clinically Oriented Embryology. (10. Baskı). Philadelphia Elsevier Saunders
- Nawrot, T., Geusens, P., Nulens, T. S., & Nemery, B. (2010). Occupational cadmium exposure and calcium excretion, bone density, and osteoporosis in men. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 25(6), 1441–1445. <https://doi.org/10.1002/jbmr.22>
- Németh, K., Plumb, G. W., Berrin, J. G., Juge, N., Jacob, R., Naim, H. Y., Williamson, G., Swallow, D. M., & Kroon, P. A. (2003). Deglycosylation by small intestinal epithelial cell beta-glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *European journal of nutrition*, 42(1), 29–42. <https://doi.org/10.1007/s00394-003-0397-3>
- Ney P. A. (2015). Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochimica et biophysica acta*, 1853(10 Pt B), 2775–2783. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2015.02.022>
- Ni, F. D., Hao, S. L., & Yang, W. X. (2019). Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis. *Cell death & disease*, 10(8), 541. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1782-z>
- Nishimura, H., & L'Hernault, S. W. (2017). Spermatogenesis. *Current biology : CB*, 27(18), R988–R994. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.067>
- Nishimuro, H., Ohnishi, H., Sato, M., Ohnishi-Kameyama, M., Matsunaga, I., Naito, S., Ippoushi, K., Oike, H., Nagata, T., Akasaka, H., Saitoh, S., Shimamoto, K., & Kobori, M. (2015). Estimated daily intake

- and seasonal food sources of quercetin in Japan. *Nutrients*, 7(4), 2345–2358. <https://doi.org/10.3390/nu7042345>
- Nna V.U., Ujah G.A., Mohamed M, Etim K.B., Igba B.O., Augustine E.R., Osim E.E. (2017). “Cadmium chloride-induced testicular toxicity in male wistar rats; prophylactic effect of quercetin, and assessment of testicular recovery following cadmium chloride withdrawal”. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 94, (109-123). <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.07.087>.
- Nordberg GF, Jin T, Nordberg M. (1994). “Subcellular targets of cadmium nephrotoxicity: cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or without protective metallothionein synthesis.” *Environ Health Perspect.* Sep;102 Suppl 3(Suppl 3):191-4. doi: 10.1289/ehp.94102s3191
- Oberdörster G. (1992). Pulmonary deposition, clearance and effects of inhaled soluble and insoluble cadmium compounds. *IARC scientific publications*, (118), 189–204
- O'Donnell, L., Stanton, P., & de Kretser, D. M. (2017). Endocrinology of the Male Reproductive System and Spermatogenesis. In K. R. Feingold (Eds.) et. al., *Endotext*. MDText.com, Inc.
- Onishi, M., Yamano, K., Sato, M., Matsuda, N., & Okamoto, K. (2021). Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *The EMBO journal*, 40(3), e104705. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104705>
- Paulsen F ve Waschke J. (2010). Sobotta Atlas of Human Anatomy Internal Organs. (23. Baskı) S. Hombach-Klonisch, Winnipeg, Canada
- Peoples, J. N., Saraf, A., Ghazal, N., Pham, T. T., & Kwong, J. Q. (2019). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Experimental & molecular medicine*, 51(12), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0355-7>
- Petrus, K., Schwartz, H., & Sontag, G. (2011). Analysis of flavonoids in honey by HPLC coupled with coulometric electrode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 400(8), 2555–2563. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-4614->
- Piprek RP. (2016). Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development. Vol. 58. DOI 10.1007/978-3-319-31973
- Rafati Rahimzadeh, M., Rafati Rahimzadeh, M., Kazemi, S., & Moghadamnia, A. A. (2017). Cadmium toxicity and treatment: An update. *Caspian journal of internal medicine*, 8(3), 135–145. <https://doi.org/10.22088/cjim.8.3.135>
- Raikwar, M. K., Kumar, P., Singh, M. ve Singh, A., (2008). Toxic effect of heavy metals in livestock health, *Veterinary world*, 1 (1), 28
- Rato, L., Socorro, S., Cavaco, J. E., & Oliveira, P. F. (2010). Tubular fluid secretion in the seminiferous epithelium: ion transporters and aquaporins in Sertoli cells. *The Journal of membrane biology*, 236(2), 215–224. <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9294-x>
- Rikans, L. E., & Yamano, T. (2000). Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *Journal of biochemical and molecular toxicology*, 14(2), 110–117. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-0461\(2000\)14:2<110::aid-jbt7>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-0461(2000)14:2<110::aid-jbt7>3.0.co;2-j)
- Ristow, M., Zarse, K., Oberbach, A., Klötting, N., Birringer, M., Kiehntopf, M., ... Blüher, M. (2009). Antioxidants prevent health-promoting effects of physical exercise in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(21), 8665–8670. doi:10.1073/pnas.0903485106
- Roberts, R. F., Tang, M. Y., Fon, E. A., ve Durcan, T. M. (2016). Defending the mitochondria: The pathways of mitophagy and mitochondrial-derived vesicles. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 79, 427–436. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.07.020>
- Rodriguez-Enriquez, S., Kim, I., Currin, R. T., ve Lemasters, J. J. (2006). Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy*, 2(1), 39–46. <https://doi.org/10.4161/auto.2229>
- Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition*, 22, 19–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.22.111401.144957>
- Ross MH ve Pawlina W. (2006). Histology- A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology (5th Edition). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Ruiz-Manríquez, A., Magaña, P. I., López, V., & Guzmán, R. (1998). Biosorption of CU by thiobacillus ferrooxidans. *Bioprocess Engineering*, 18(2), 113–118. doi:10.1007/pl00008978
- Sadler TW. (2010). Langman's Medical Embryology (12. Baskı). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia
- Sahni, S. K. S. (2011). Hazardous metals and minerals pollution in India: Sources, toxicity and management, A position paper. *Indian National Science Academy*, Bahadurshah Zafar Marg, New Delhi. 29
- Saïdi, S. A., Azaza, M. S., Windmolders, P., van Pelt, J., & El-Feki, A. (2013). Cytotoxicity evaluation and antioxidant enzyme expression related to heavy metals found in tuna by-products meal: An in vitro study in human and rat liver cell lines. *Experimental and toxicologic pathology*, 65(7-8), 1025–1033. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2013.03.001>

- Sampson, L., Rimm, E., Hollman, P. C., de Vries, J. H., & Katan, M. B. (2002). Flavonol and flavone intakes in US health professionals. *Journal of the American Dietetic Association*, 102(10), 1414–1420. [https://doi.org/10.1016/s0002-8223\(02\)90314-7](https://doi.org/10.1016/s0002-8223(02)90314-7)
- Sekine, S., ve Youle, R. J. (2018). PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC biology*, 16(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0470-7>
- Sekine S. (2020). PINK1 import regulation at a crossroad of mitochondrial fate: the molecular mechanisms of PINK1 import. *Journal of biochemistry*, 167(3), 217–224. <https://doi.org/10.1093/jb/mvz069>
- Shi, J. F., Li, Y. K., Ren, K., Xie, Y. J., Yin, W. D., & Mo, Z. C. (2018). Characterization of cholesterol metabolism in Sertoli cells and spermatogenesis (Review). *Molecular medicine reports*, 17(1), 705–713. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.8000>
- Simon C ve Pellicer A. (2007). Stem Cells in Human Reproduction: Basic Science and Therapeutic Potential. Informa healthcare, UK
- Snell RS. 2013. Klinik Anatomi. (6. Baskı). Ankara. Nobel Tıp Kitapevleri
- Somerset, S. M., & Johannot, L. (2008). Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutrition and cancer*, 60(4), 442–449. <https://doi.org/10.1080/01635580802143836>
- Soubannier, V., McLelland, G. L., Zunino, R., Braschi, E., Rippstein, P., Fon, E. A., & McBride, H. M. (2012). A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Current biology* : CB, 22(2), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.057>
- Standring S. (2016). Gray's Anatomy (41.Baskı). London, UK
- Staessen, J. A., Roels, H. A., Emelianov, D., Kuznetsova, T., Thijs, L., Vangronsveld, J., & Fagard, R. (1999). Environmental exposure to cadmium, forearm bone density, and risk of fractures: prospective population study. Public Health and Environmental Exposure to Cadmium (PheeCad) Study Group. *Lancet* (London, England), 353(9159), 1140–1144. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(98\)09356-8](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(98)09356-8)
- Spinelli, J.B., Haigis, M.C. (2018). The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nature Cell Biology*. 20, 745–754. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0124-1>
- Suede, S. H., Malik, A., & Sapra, A. (2022). Histology, Spermatogenesis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK553142/>
- Şeftalioglu A. 1998. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi (3. Baskı), Ankara. Ankara Üniversitesi Basımevi
- Tishler P. V. (1971). Diameter of testicles. *The New England journal of medicine*, 285(26), 1489. <https://doi.org/10.1056/NEJM197112232852622>
- Tong, X., Fu, X., Yu, G., Qu, H., Zou, H., Song, R., Ma, Y., Yuan, Y., Bian, J., Gu, J., & Liu, Z. (2023). Polystyrene exacerbates cadmium-induced mitochondrial damage to lung by blocking autophagy in mice. *Environmental toxicology*, 10.1002/tox.23804. Advance online publication. <https://doi.org/10.1002/tox.23804>
- Tsili AC, Sofikitis N, Stiliara E, Argyropoulou MI. (2019). Testis malignitelerinin MRG'si. *Abdominal Radyoloji* (NY). 44 (3):1070-1082
- Titi-Lartey, O. A., & Khan, Y. S. (2022). Embryology, Testicle. In *StatPearls*. StatPearls Publishing
- Tiwana, M. S., & Leslie, S. W. (2021). Anatomy, Abdomen and Pelvis, Testicle. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Turco, E., & Martens, S. (2016). Insights into autophagosome biogenesis from in vitro reconstitutions. *Journal of Structural Biology*, 196(1), 29-36. doi:10.1016/j.jsb.2016.04.005
- Wang, L., Li, J., Li, J., & Liu, Z. (2009). Effects of lead and/or cadmium on the oxidative damage of rat kidney cortex mitochondria. *Biological Trace Element Research*, 137(1), 69-78. doi:10.1007/s12011-009-8560-1
- Wang, L., Xu, T., Lei, W. W., Liu, D. W., Li, Y. J., Xuan, R. J., & Ma, J. J. (2011). Cadmium-induced oxidative stress and apoptotic changes in the testis of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*. *PLoS ONE*, 6(11), e27853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027853>
- Wang W., Sun C., Mao L., Ma P., Liu F., Yang J., & Gao. Y. (2016). The biological activities, chemical stability, metabolism and delivery systems of quercetin: A review. *Trends in food science & technology*, 56, 21-38. doi: 10.1016/j.tifs.2016.07.004
- a-Wang, M., Wang, X., Li, Y., Chen, N., Fan, Y., Huang, W., Hu, S., Rao, M., Zhang, Y., Su, P. (2020). “Cross-talk between autophagy and apoptosis regulates testicular injury/recovery induced by cadmium via PI3K with mTOR-independent pathway”, *Cell Death & Disease*, 11
- Wang, J., Zhu, H., Wang, K., Yang, Z., & Liu, Z. (2020). Protective effect of quercetin on rat testes against cadmium toxicity by alleviating oxidative stress and autophagy. *Environmental science and pollution research international*, 27(20), 25278–25286. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08947-2>
- Wang, W. W., Han, R., He, H. J., Li, J., Chen, S. Y., Gu, Y., & Xie, C. (2021). Administration of quercetin improves mitochondria quality control and protects the neurons in 6-OHDA-lesioned Parkinson's disease models. *Aging*, 13(8), 11738–11751. <https://doi.org/10.18632/aging.202868>

- Waris, G., & Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *Journal of carcinogenesis*, 5, 14. <https://doi.org/10.1186/1477-3163-5-14>
- Wauer, T., Simicek, M., Schubert, A., & Komander, D. (2015). Mechanism of phospho-ubiquitin-induced PARKIN activation. *Nature*, 524(7565), 370–374. <https://doi.org/10.1038/nature14879>
- WAY, J. M. (1963). The effects of sub-lethal doses of mcpa on the morphology and yield of vegetable crops. *Weed Research*, 3(2), 98-108. doi:10.1111/j.1365-3180.1963.tb00227.x
- Weldin, J., Jack, R., Dugaw, K., & Kapur, R. P. (2003). Quercetin, an over-the-counter supplement, causes neuroblastoma-like elevation of plasma homovanillic acid. *Pediatric and developmental pathology*, 6(6), 547–551. <https://doi.org/10.1007/s10024-003-5061-7>
- Wen, S., Wang, L., Wang, T., Xu, M., Zhang, W., Song, R., ... Liu, Z. (2022). Puerarin alleviates cadmium-induced mitochondrial mass decrease by inhibiting PINK1–Parkin and nix-mediated mitophagy in rat cortical neurons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 230, 113127. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.113127
- Wen, S., Xu, M., Zhang, W., Song, R., Zou, H., Gu, J., Liu, X., Bian, J., Liu, Z., & Yuan, Y. (2023). Cadmium induces mitochondrial dysfunction via SIRT1 suppression-mediated oxidative stress in neuronal cells. *Environmental toxicology*, 38(4), 743–753. <https://doi.org/10.1002/tox.23724>
- Wiczowski, W., Romaszko, J., Bucinski, A., Szawara-Nowak, D., Honke, J., Zielinski, H., & Piskula, M. K. (2008). Quercetin from shallots (*Allium cepa* L. var. *aggregatum*) is more bioavailable than its glucosides. *The Journal of nutrition*, 138(5), 885–888. <https://doi.org/10.1093/jn/138.5.885>
- World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>
- Wong, W. J., & Khan, Y. S. (2021). Histology, Sertoli Cell. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.
- Xu, S. L., Bi, C. W., Choi, R. C., Zhu, K. Y., Miernisha, A., Dong, T. T., & Tsim, K. W. (2013). Flavonoids induce the synthesis and secretion of neurotrophic factors in cultured rat astrocytes: a signaling response mediated by estrogen receptor. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*
- Van der Blik, A.M., Sedensky, M.M., Morgan, P.G. (2017). Cell Biology of the Mitochondrion, Genetics, Volume 207, Issue 3, 1 November, Pages 843–871, <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300262>
- Venditti, M., Ben Rhouma, M., Romano, M. Z., Messaoudi, I., Reiter, R. J., & Minucci, S. (2021). Evidence of melatonin ameliorative effects on the blood-testis barrier and sperm quality alterations induced by cadmium in the rat testis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 226, 112878. doi:10.1016/j.ecoenv.2021.112878
- Yamano, K., & Youle, R. J. (2013). PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy*, 9(11), 1758–1769. <https://doi.org/10.4161/auto.24633>
- Yu, X., Xu, Y., Zhang, S., Sun, J., Liu, P., Xiao, L., ... Yao, P. (2016). Quercetin attenuates chronic ethanol-induced hepatic mitochondrial damage through enhanced Mitophagy. *Nutrients*, 8(1), 27. doi:10.3390/nu8010027
- Yuan, Y., Ma, S., Qi, Y., Wei, X., Cai, H., Dong, L., Lu, Y., Zhang, Y., & Guo, Q. (2016). Quercetin inhibited cadmium-induced autophagy in the mouse kidney via inhibition of oxidative stress. *Journal of toxicologic pathology*, 29(4), 247–252. <https://doi.org/10.1293/tox.2016-0026>
- Zhang, Y., Li, Y., Cao, C., Cao, J., Chen, W., Zhang, Y., Wang, C., Wang, J., Zhang, X., & Zhao, X. (2010). Dietary flavonol and flavone intakes and their major food sources in Chinese adults. *Nutrition and cancer*, 62(8), 1120–1127. <https://doi.org/10.1080/01635581.2010.513800>
- Zhang, L., Yang, F., Li, Y., Cao, H., Huang, A., Zhuang, Y., ... Xing, C. (2021). The protection of selenium against cadmium-induced mitophagy via modulating nuclear xenobiotic receptors response and oxidative stress in the liver of rabbits. *Environmental Pollution*, 285, 117301. doi:10.1016/j.envpol.2021.117301
- Zhao, L. J., Ru, Y. F., Liu, M., Tang, J. N., Zheng, J. F., Wu, B., Shi, H. J. (2017). Reproductive effects of cadmium on sperm function and early embryonic development in vitro. *PLoS ONE*, 12(11), e0186727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186727>
- Zheng, J., Qiu, G., Zhou, Y., Ma, K., & Cui, S. (2022). Hepatoprotective effects of taurine against cadmium-induced liver injury in female mice. *Biological Trace Element Research*, 201(3), 1368-1376. doi:10.1007/s12011-022-03252-0
- Zhu, Q., Li, X., & Ge, R. (2020). Toxicological effects of cadmium on mammalian testis. *Frontiers in Genetics*, 11. doi:10.3389/fgene.2020.00527
- Zhou, J., Salvador, S., Liu, Y., & Sequeira, M. (2001). Heavy metals in the tissues of common dolphins (*Delphinus delphis*) stranded on the Portuguese coast. *Science of The Total Environment*, 273(1-3), 61-76. doi:10.1016/s0048-9697(00)00844-5

- Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q., & He, Z. (2019). The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 76(14), 2681–2695. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03101-9>
- Zou, H., Zhuo, L., Han, T., Hu, D., Yang, X., Wang, Y., Yuan, Y., Gu, J., Bian, J., Liu, X., & Liu, Z. (2015). Autophagy and gap junctional intercellular communication inhibition are involved in cadmium-induced apoptosis in rat liver cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 459(4), 713–719. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.03.027>

