

T.C.
OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

118 260

**ERİŞKİN ERKEK SIÇANLARDA ETAN 1,2 DİMETAN SÜLFONAT
(EDS) İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARI ÜZERİNE E
VİTAMİNİN ETKİSİ VE MAST HÜCRELERİNİN
DAVRANIŞINDAKİ OLASI DEĞİŞİKLİKLERİN İNCELENMESİ**

118260

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

Canan GÜÇLÜ

Danışman: Doç Dr. Varol ŞAHİNTÜRK

Eylül 2002

KABUL VE ONAY SAYFASI

Canan GÜÇLÜ'nün YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırladığı “Erişkin Erkek Sıçanlarda Etan 1, 2 Dimetan Sülfonat (EDS) İle Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine E Vitaminin Etkisi ve Mast Hücrelerinin Davranışındaki Olası Değişikliklerin İncelenmesi” başlıklı çalışma, jürimizce Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

27. 09. 2002

ÜYE

Prof. Dr. Ergin AÇIKALIN

ÜYE

Prof. Dr. Firdevs GÜRER

ÜYE

Doç. Dr. Semiha NOYAN

ÜYE

Doç. Dr. Erineç ARAL

ÜYE

Doç. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
03 / 10 / 2002 tarih ve 560 / 1560 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Yusuf ÖZYÜREK
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZGEÇMİŞ	i
TEŞEKKÜR	ii
KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ	iii
GRAFİKLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
ÖZET	x
SUMMARY	xi
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.TESTİSİN YAPISI VE İŞLEVİ	3
2.1.1.Seminifer Tübüller	5
2.1.2.Sertoli Hücreleri	5
2.1.4.İnterstisyel (Leydig) Hücreleri	7
2.2.SPERMATOGENEZ	8
2.3.SPERMİYOGENEZ	9
2.4.ATROFİ VE REJENERASYON	10
2.5.TESTİSİN HİSTOFİZYOLOJİSİ	11
2.5.1.Endokrin İşlev	11
2.5.2.Ekzokrin İşlev	12
2.6. E VİTAMİNİ	13
2.6.1.E Vitaminin Biyolojik Sistemlerdeki Rolü	13
2.6.2.E Vitaminin Biyokimyasal İşlevleri	14
2.6.3.E Vitaminin Dokular Üzerine Olan Koruyucu Etkisi	16
2.7.MAST HÜCRELERİ	17
2.7.1.Mast Hücresi Gelişim ve Dağılımı	18
2.7.2.Mast Hücresinin Etkinleşmesi ve Degranülasyonu	20
2.8.ETAN DİMETAN SÜLFONAT (EDS)	22
3.GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1.HAYVANLAR	24

3.2. EDS HAZIRLANMASI VE UYGULAMASI	25
3.3.E VİTAMİNİ	25
3.4.DOKULARIN ALINMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ	25
3.5.İSTATİSTİK	26
4.BULGULAR	27
4.1.TESTİS AĞIRLIK İNDEKSİ	27
4.2.HİSTOPATOLOJİK BULGULAR	28
4.3.MAST HÜCRESİ BULGULARI	30
4.3.1.Toplam Mast Hücreleri	30
4.3.2.Mavi Mast Hücreleri	31
4.3.3.Kırmızı Mast Hücreleri	32
5.TARTIŞMA	45
5.1.TAİ	45
5.1.1.EDS'nin Etkisi	45
5.1.2.E Vitamininin Etkisi	47
5.2.HİSTOPATOLOJİ	48
5.2.1.EDS'nin Testis Histolojisine Etkisi	48
5.2.2.E Vitamininin Etkisi	51
5.2.3.Testis Üzerinde Olumlu Etki Gösteren Diğer Maddeler	54
5.3.MAST HÜCRELERİ	55
6.SONUÇ	63
7.KAYNAKLAR	64

ÖZGEÇMİŞ

28.01.1977 tarihinde, Afyon ilinin Emirdağ ilçesinin Adayazı köyünde doğdum. İlköğrenimimi Eskişehir Vali Münir Raif Güney İlkokulunda, orta ve lise öğrenimimi Eskişehir Cumhuriyet Lisesinde tamamladım. 1994 yılında Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Biyoloji (İngilizce) bölümünde lisans eğitime başlayarak 1999 yılında mezun oldum. Aynı yıl Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitime başladım.

Canan GÜÇLÜ

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde öncelikle bana böyle bir konunun seçilmesinde yol gösterici olmasından dolayı hocam Sayın Doç. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK'e ve Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalının öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. Ergin AÇIKALIN, Prof. Dr. Cengiz BAYÇU, Prof. Dr. Firdevs GÜNER, Doç. Dr. Erinc ARAL'a her zaman destek ve ilgilerini esirgemeyen Arş. Grv. Onur UYSAL, Arş. Grv. Ayla EKER SARIBOYACI, ve Teknisyen Kaniye UYANIK'a teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Canan GÜÇLÜ

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

AB-S: Alsiyan mavisi Safranin
ABP: Androjen bağlayıcı hormon
AMH: Antimüllerian hormon
ANF: Atrial natriüretik faktör
Ca⁺⁺: Kalsiyum iyonu
cAMP: Siklik adenzin monofosfat
ATP: Adenzin trifosfat
cm: Santimetre
DEHP: Di-(2-etilheksil) fitalat
dk: Dakika
DMSO: Dimetil sülfoksit
DNA: Deoksiribo nükleik asit
EDS: Etan dimetan sülfonat
EGF: Epidermal büyüme faktörü
FSH: Folikül stimüle edici hormon
g: Gram
GnRH: Gonad Releasing Hormon
GSH: Glutasyon peksidaz
HCG: İnsan koryonik gonadotropini
HTHS: Histolojik Toplam Hasar Skoru
IgE: İmmunoglobulin E
IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IU: International unit
Kg: Kilogram
LH: Lüteinleştirici hormon
mg: Miligram
MIH: Müllerian inhibe edici hormon

Mm: Milimetre
 O_2^- : Oksijen radikali
 OH^- : Hidroksit radikali
OMHS: Ortalama Mast Hücresi Sayısı
PAS: Periyodik Asit Schiff
SOD: Süperoksit dismutaz
TAİ: Testis ağırlık indeksi
TNF: Tümör nekrozis faktörü
VIP: Vazointestinal peptid
(+): Pozitif
(-): Negatif
 μm : Mikrometre
%: Yüzde

GRAFİKLER DİZİNİ

Grafik 1: Testis ağırlık indeksleri ortalamaları	28
Grafik 2: Gruplara göre ortalama histopatolojik skor değerleri	29
Grafik 3: Toplam (mavi+kırmızı) mast hücre sayıları	31
Grafik 4: Mavi mast hücrelerinin ortalama sayıları	32
Grafik 5: Kırmızı mast hücrelerinin ortalama sayıları	33



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Deney uygulama şeması	24
Tablo 2: Gruplara göre TAI'lerinin istatistiksel karşılaştırılması	28



RESİMLER DİZİNİ

Resim 1:Tek doz EDS verildikten sonraki üçüncü günde seminifer tübüllerde şiddetli bozulmalar ve interstisyel alanda Leydig hücrelerinin azalması.

H&E, Orjinal büyültmeX33 34

Resim 2:Tek doz EDS verildikten sonraki üçüncü günde seminifer tübüllerde bozulma ve interstisyel alanda yaygın ödem.

H&E, Orjinal büyültmeX33 34

Resim 3:Tek doz EDS verildikten sonraki yedinci günde seminifer tübüllerde bozulmalar, interstisyel alanda Leydig hücrelerinin azalması ve konjesyon.

H&E, Orjinal büyültmeX33 35

Resim 4:Tek doz EDS ve üç gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta az hasarlı seminifer tübüller ve normal interstisyel alan.

H&E, Orjinal büyültmeX132 35

Resim 5:Tek doz EDS ve üç gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta az hasarlı seminifer tübüller ve kan damarlarında konjesyon.

H&E, Orjinal büyültmeX33 36

Resim 6:Tek doz EDS ve yedi gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta seminifer tübüllerde spermatogenezin devam ettiği görülmektedir.

H&E, Orjinal büyültmeX66 36

Resim 7:Tek doz EDS ve üç gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta seminifer tübüllerin ve interstisyel alanın normale yakın görüntüsü.

H&E, Orjinal büyültmeX33 37

Resim 8:Tek doz EDS ve yedi gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta seminifer tübüllerde bozulma ve Leydig hücrelerinde azalma.

H&E, Orjinal büyültmeX33 37

Resim 9:Üç gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta normal testis dokusu.

H&E, Orjinal büyültmeX33 38

Resim 10:Yedi gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta normal görüntüye sahip seminifer tübüller ve interstisyel alanda ödem.

H&E, Orjinal büyültmeX33 38

Resim 11:Yedi gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta normal interstisyel alandaki Leydig hücreleri.

H&E, Orjinal büyültmeX132 39

Resim 12:Yedi gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta normal seminifer tübüller ve interstisyel alan.

H&E, Orjinal büyültmeX132 39

Resim 13:Tek doz EDS verildikten sonraki üçüncü günde Tunika albuginea altındaki mavi boyanan mast hücreleri.

AB/S, orjinal büyültmeX132 40

Resim 14:Tek doz EDS verildikten sonraki yedinci günde Tunika albuginea altındaki mavi boyanan mast hücreleri.

AB/S, orjinal büyültmeX66 40

Resim 15: Tek doz EDS ve üç gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta mavi boyanan mast hücreleri.

AB/S, orjinal büyültmeX66 41

Resim 16:Tek doz EDS ve yedi gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta mavi boyanan mast hücreleri.

AB/S, orjinal büyültmeX132 41

Resim 17:Yedi gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta mavi boyanan mast hücreleri.

AB/S, orjinal büyültmeX66 42

Resim 18:Yedi gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta mavi boyanan mast hücreleri.

AB/S, orjinal büyültmeX66

42

Resim 19:Tek doz EDS ve üç gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta mavi ve kırmızı boyanan mast hücrelerinin birlikte görünümü.

AB/S, orjinal büyültmeX132

43

Resim 20:Tek doz EDS ve yedi gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta mavi ve kırmızı boyanan mast hücrelerinin birlikte görünümü.

AB/S, orjinal büyültmeX66

43

Resim 21:Üç gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta mavi ve kırmızı boyanan mast hücrelerinin birlikte görünümü.

AB/S, orjinal büyültmeX33

44



ÖZET

Bu çalışmada tek doz etan dimetansülfonat (EDS) uygulamasının sıçan testisinde 3. ve 7. günlerdeki etkisini, 25 ve 150 mg'lık E vitamini uygulamalarının EDS hasarını ne şekilde etkilediğini ve mast hücrelerinin kimyasal içerik ve sayısını nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladık.

Deney için 63 adet, erişkin erkek Sprague-Dawley cinsi sıçanlardan 9 grup oluşturuldu. İlgili gruplara E vitamini uygulaması EDS verilmesinden 30 dk. önce yapıldı. EDS her bir hayvana intraperitoneal (i.p.) yolla ve 75 mg/kg'lık tek dozda verildi. Daha sonra sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü ve eter anestezisi altında sol testisleri alınarak tartıldı. Elde edilen parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Hematoksilin-Eozin (H-E) ve Alsiyan mavisi-Safranin (AB-S) ile boyandı. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) hesaplaması, histopatolojik skorlama ve mast hücre sayımı yapıldı ve gruplar arasında bazı istatistiksel farklılıklar olduğu saptandı.

Sonuçta E vitamininin, doza ve süreye bağlı olarak testis ağırlığı, EDS'nin testiste oluşturduğu doku hasarı ve mast hücrelerinin granül bileşimi üzerinde olumlu etkilerinin olduğu gözlemlendi.

Anahtar Sözcükler:

Etan dimetansülfonat, testis, E vitamini, mast hücresi

SUMMARY

In the present study, we aimed to study effect of administration of a single dose of ethane dimethane sulphonate (EDS) on rat testis on 3 and 7 days afterwards, possible effects of vitamin E injection at 25 and 150 mg/animal dosage on testicular damage caused by EDS and on chemical composition and number of mast cells.

63 adult male Sprague-Dawley rats are divided into 9 groups. Administration of vitamin E to the related groups is made 30 minutes before EDS injection. Each animal in related groups received a single 75 mg/kg dose of intraperitoneal EDS injection. All animals are weighed and left testis removed under anaesthesia and then weighed. Testicular tissue is embedded in paraffin blocks and 5 µm thick serial sections are cut from the paraffin blocks and then sections are stained with Haematoxylin-Eosin (H-E) or Alcian Blue Safranin (AB-S). Testicular weight index is calculated, histopathological scoring and mast cell counting are made and significant statistical differences are detected between groups.

In conclusion, we observed that the vitamin E has a positive effect on testicular damage caused by EDS and on granule composition of mast cell, and this effect is depended on dosage and the duration of administration of vitamin E.

Key Words:

Ethane dimethane sulphonate, testis, vitamin E, mast cell

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsanın üremesine ilişkin öteden beri varolan ilgi ve merak, günümüzde daha da artmıştır. Yapılan birçok araştırmayla dişi ve erkek üreme organları ayrıntılarıyla incelenmekte, elde edilen veri sayısı gün geçtikçe çoğalmaktadır. Yine de, üreme sisteminde yer alan mekanizmalar hala tam anlamıyla çözülememiş, rapor edilen sonuçlar, açıklanmayı bekleyen yeni mekanizmalara işaret etmiştir. Bu anlamda testis, şaşırtıcı fizyolojisi, birbirinden çok farklı hücre grupları ve bu hücrelerin beraber çalışma düzenleriyle ilgiyi üzerine çekmektedir. Hala açıklanmayı bekleyen mekanizmalarıyla testis, araştırmacıların ilgi odağı olmuştur.

EDS, doğada bulunmayan, ancak laboratuvar koşullarında sentezlenebilen bir maddedir. Bu maddenin testiste bulunan Leydig hücrelerine özgül bir toksik etkisi olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (15,72,73,74). EDS'nin testislerde oluşturduğu doku hasarının zamana bağlı olarak geri dönüşümlü olduğu bilinmektedir (9,42,66,74). EDS'nin Leydig hücrelerini yıkıma uğratarak dolaylı yoldan spermatogenezi bozduğu gösterilmiştir (35).

Mast hücreleri, kemik iliği kökenli bağ dokusu hücreleri olup vücutta başlıca iki tipi bulunmaktadır: mukozal bağ dokusu içinde yer alan mukozal mast hücreleri ve bağ dokusu mast hücreleri (37,64,70). Mast hücrelerinin pek çok vücut reaksiyonunda düzenleyici rol oynadığına ilişkin bilgiler vardır (17,76,77,78). Aynı şekilde testiste EDS ile oluşturulan doku hasarında da mast hücrelerinin reaksiyon verdikleri gösterilmiştir (9,83).

E vitamini, son yıllarda özellikle antioksidan özelliği ve değişik koşullarda vücuttaki koruyucu etkileriyle gündeme gelen bir maddedir (10,40,57). E vitaminin antioksidan ve koruyucu etkilerinin doza bağlı olduğu gösterilmiştir (38,54,84). Ayrıca testiste spermatogenez üzerinde olumlu etkisinin olduğu öteden beri bilinmektedir (1,46).

Yaptığımız literatür taramasına göre testiste EDS'nin oluşturduğu hasara karşı E vitaminin ne gibi bir etkisinin olabileceğine ve mast hücrelerinin de bu uygulamaya ne şekilde tepkide bulunduğuna ilişkin herhangi bir veri saptayamadık. Biz bu çalışmamızda tek doz EDS uygulamasının sıçan testisinde 3. ve 7. günlerdeki

oluşturduğu etkiyi, 25 ve 150 mg'lık E vitamini uygulamalarının EDS hasarını ne şekilde etkilediğini ve mast hücrelerinin kimyasal içerik ve sayısını nasıl etkilediğini araştırmayı amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİSİN YAPISI VE İŞLEVİ

Testis, embriyolojik yaşamın erken dönemlerinde, karın boşluğunun arka duvarındaki peritonun yanında gelişir. Daha sonra skrotuma inerler. Tunika vaginalis testisin visseral tabakası, testis kapsülüne sıkıca yapışmış olup dar bir yarık ile iç ve dış paryetal tabakasından ayrılmıştır ve testisin arka yüzeyinde, damar ve sinirlerin testise girdiği yerde paryetal tabaka ile devam etmektedir. Bu kavitede az miktarda sıvı bulunur. Basınca duyarlı testisler sınırlı hareketlerini bu kavite içinde yaparlar ve elastik skrotum, organa zarar gelmesini önlemektedir. Gonadların skrotuma inmesiyle, zarar görme olasılığı artsa da, bu ortam karın boşluğundakinden daha düşük sıcaklığa sahip olmasına neden olur ve düşük sıcaklık, spermatogenez için önemli bir ortamdır. Yapılan çalışmalardan alınan sonuçlar, fare spermatogenezinin, normal fizyolojik ısıнын birkaç derece üstünde çevresel bir ısıya maruz bırakıldığında bozulduğunu göstermiştir (11,12,28,43,51,65).

Testisin farklılaşmasında yapısal olarak ayırt edilebilen ilk olay, allantois sapından gelen primordiyal germ hücreleri ile kolonize olacak olan seminifer kordonları oluşturmak üzere toplanan Sertoli hücrelerinin gelişimidir. 7. haftanın sonunda gonadda Sertoli hücresine özgül protein olan AMH (anti-Müllerian hormon), Sertoli hücreleri tarafından sentezlenmeye başlar. Aynı zamanda Müllerian baskılayıcı madde (MIH) olarak da bilinen AMH, dişilerde uterus ve Fallop tüplerini oluşturmak üzere farklılaşan Müller kanallarının gerilemesinden sorumludur. Fötal yaşamın geri kalan dönemi boyunca Sertoli hücrelerinde önemli bir değişim olmaz. Primordiyal germ hücreleri veya gonositler, c-kit olarak bilinen, zara bağlanan bir reseptör sergilerler. C-kit, germ hücrelerinin gonada göçü ve Sertoli hücrelerine adezyon için yaşamsal önem taşımaktadır. Gonositler, Sertoli hücreleri tarafından çevrelenerek merkezinde bulundukları cinsiyet kordonlarına ulaşp yerleşirler ve fötal yaşama kadar çoğalırlar, fakat mayoza girmezler (12,43,51,62).

Testis, kalın fibröz kapsül olan tunika albuginea ile kaplanmıştır. Testisin arka yüzünde yoğun bağ dokusu, tunika albugineadan içe doğru kısa bir uzantı gönderir

ve kan damarlarının girdiği, duktuli efferentesin ayrılacağı mediastinum testisi oluşturur. Septula testis adı verilen ince, kısa duvarlar, mediastinumdan tunika albugineaya doğru ışınal olarak yayılır ve bunlar testisi, her biri lobulus testis adı verilen 250 odacığa ayırır. Lobüller, septuladaki pencereler aracılığıyla birbirleriyle iletişimde dirler, fakat mediastinumda birbirinden tamamen ayrılırlar. Herbir lobül, 1-4 seminifer tübül bulundurur. Bunların çapı 150-250 µm'dir, 30-70 cm uzunluğundadır ve oldukça kıvrılmıştır. Her bir piramidal lobülün tepesinde seminifer tübüller kısa tübüli rektiye dönüşür. Tubuli rekti rete testisle birleşir. Buradan çıkan belli bir sayıdaki duktuli efferentes spermatozoayı duktus epididimise ulaştırır (11,20,37,58,64,70,86,90). Spermatozoa epididimisten geçiş süresince yumurtayı dölleyebilecek bir yetenek kazanır (27,29). Sıçanlarda, farelerde ve insanlarda sperm kromatinin yoğunlaşması testiste spermatogenezin olduğu zaman başlar ve epididimisle devam eder (27,68,89).

Testisler yapı ve işlev bakımından gametlerin üretildiği seminifer tübüller ve androjenlerin üretiminden sorumlu interstisyel doku olmak üzere birbirinden farklı iki bölümden oluşmaktadır. Seminifer tübüllerde iki farklı hücre topluluğu bulunur, bunlar spermatogenik hücreler ve Sertoli hücreleridir. Androjenler Sertoli hücrelerinin olgunlaşması ve spermatogenez için gereklidir. Leydig hücresinin gelişimi ile işlevi, seminifer tübülde salgılanan faktörler tarafından ayarlanmaktadır (20,37,62,64).

Seminifer tübüllerin arasındaki boşluklar oldukça damarlı gevşek bağ dokusu tarafından doldurulmuştur. Çevredeki bağ dokusunda, ince retiküler liflerin oluşturduğu ağı içinde perivasküler mezenkimal hücreler, fibroblastlar ve çok az makrofaj bulunur. Bu gevşek stroma içinde, seminifer tübüllerin arasındaki boşlukları Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) doldurur. Bu hücreler, testisin endokrin bileşenidir ve erkek cinsiyet hormonu olan testosteronu salgırlar (11,86,90). Leydig hücrelerinin, testislerdeki lökositlerin yerel düzenlenmesine aracılık ettiği düşünülmektedir. Yapılan bir çalışma, sıçanlarda testisin interstisyel dokusundaki lökositlerin çoğunluğunu yerleşik makrofajların oluşturduğunu doğrulamakta ve testislerdeki makrofaj topluluğunun heterojen olduğunu kanıtlamaktadır. Ayrıca, normal testis lökosit topluluğunun yaklaşık %10'unu T lenfositlerin oluşturduğı, B lenfositlerin ise testiste gözlenmediğı bildirilmiştir (83).

2.1.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller, spermatogenik hücreler ve destek hücrelerini bulunduran çok katlı bir epitel ile döşenmiştir. Bu epitel seminifer epitel olarak adlandırılır. Destek hücreleri tek tiptir ve Sertoli hücresi adını alır. Spermatogenik hücreler, yapısal olarak ayırt edilebilen çeşitli tipleri içerir: Spermatogonyum, birincil spermatozoon, ikincil spermatozoon, spermatid ve spermatozoon. Bunlar, ontogenik yönden birbirinden farklı hücreler değildir, fakat devam eden germ hücresi farklılaşmasının değişik aşamalarını temsil etmektedirler (20,64). Sıçanlarda spermatogenez, 14 aşamaya ayrılmıştır (63,66).

Seminifer tübüller, interstisyumun mezenkim hücrelerinden türeyen adventisyal hücreler ile kaplanmıştır. Bu yassı hücreler, laboratuvar kemirgenlerinde, her bir tübülün çevresinde devamlı bir tabaka oluştururlar ve düz kas hücrelerinin ultrastrüktür özelliklerini gösterirler. Kasılabilen bu hücreler, tipik olmayan şekilleri ve epiteli andıran hücre organizasyonu nedeniyle myoid hücreler olarak adlandırılırlar. Myoid hücreler, bu türlerin seminifer tübüllerinde gözlemlenen ritmik kasılmalardan sorumludur aynı zamanda kan-testis bariyerinin önemli bir bileşenidir. Yaşın ilerlemesiyle birlikte bu tabaka kalınlaşır (11,20,37,64,70).

İnsan testisinde peritübüler hücreler gebeliğin 14. haftasında farklılaşırlar ve seminifer tübülün çevresinde 4-5 tabaka oluştururlar. İçteki ilk iki tabakada myoid hücreler bulunurken, dıştaki iki tabakada fibroblast benzeri hücreler bulunur (61).

2.1.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücrelerinin yan sınırları ışık mikroskopunda görülemediğinden ilk histologlardan bazıları bu hücrelerin sinsisyum oluşturdıklarına inanmıştır. Artık bunların ayrı hücreler olduğu ve bazal laminadan epitelin serbest yüzüne doğru uzandıkları bilinmektedir. Aslında prizma şekilli hücrelerdir, fakat aralarındaki germ hücreleri, yan yüzlerinde derin girintiler oluşturup buraya yerleşmiştir. Seminifer epitel, çoğalmayan Sertoli hücreleri ve çoğalan, bazaldan başlayıp spermatozoa olma yönünde ilerledikçe serbest yüzeye doğru yavaş yavaş ilerleyen germ hücrelerini içerir. Sertoli

hücreleri, spermatogenik hücelere mekanik destek verir, onların besin gereksinimini karşılar ve değışen şekilleri ile farklılaşan germ hücelerinin lümene doğru olan hareketini ve epitelin serbest yüzünden spermatozoanın bırakılması işlemine etkin olarak katılırlar. Çekirdekleri, kabaca bakıldığında elipsoid şekillidir, fakat yüzeyinde 1-2 derin invaginasyon bulunabilir. Sitoplazmada normal iç yapıya sahip, bol mitokondri vardır ve hücrenin dikey eksenine paralel olan yerleşimi ve uzunluğu ile belirgindir. Golgi kompleksi geniştir, fakat ilgili salgı vezikülü veya granülleri yoktur. Granüllü endoplazma retikulumu seyrek, fakat granülsüz endoplazma retikulumu özellikle hücre bazalinde olmak üzere geniş bir alan kaplar. Spermatogenik siklusun belirli aşamalarında granülsüz endoplazma retikulumunun yoğun kümeleri Sertoli hücresi sitoplazmasında ilgili spermin, gelişen akrozomuna yakın komşulukta bulunabilir (11,20,37,70).

Sertoli hücelerinin hücre iskeletindeki yapılar, hücre şeklindeki değışimlerde rol almaktadır, böylece germ hücelerinin tübül lümenine doğru olan hareketi gerçekleşmektedir. Hücrede birincil lizozomlar, yoğun pleomorfik ikincil lizozomlar ve düzensiz lipokrom pigmenti kümeleri bulunur.

İnsanın Sertoli hücelerine özgü bir inklüzyon ise Charchot-Bottcher kristalleridir. Bu ince füziform yapılar, 10-25 µm uzunluğundadır ve çapı yaklaşık 15 nm olup, genellikle birbirine paralel, fakat uçlarından birbirleriyle birleşen bir demet filamentten oluşmuştur. Bu yapıların kimyasal yapısı ve önemi bilinmemektedir (11,20,37,70).

Sertoli hücelerinin yetiştirildiği kültürlerin süpernatantları analiz edildiğinde, çoğu hormon stimülasyonu ile artan 10 ya da daha fazla protein ortaya çıkarılmıştır. Sertoli hücelreinin salgı ürünler, transport proteinleri, metabolitler, ekstrasellüler matriks komponentleri, regülasyon proteinleri ve proteazlar olmak üzere beş grupta toplanmaktadır (16). Günümüze kadar üstünde en çok çalışılanı ise androjen bağlayıcı protein (ABP)'dir. ABP, interstisyumdaki Leydig hüceleri tarafından salgılanan testosterona bağlanıp bunu tübüllerin lümenine ve oradan epididimise taşır. Diğer protein ise testiküler transferrindir ve bu proteinin demiri germ hücelerine taşıdığına inanılmaktadır (11).

2.1.3. İnterstisyel (Leydig) Hücreleri

Seminifer tübüllerin arasındaki açılal alanlarda, testisin temel endokrin bileşeni olan Leydig hücreleri bulunur. İnterstisyumun düzenlenmesi türden türe değışim gösterir. İnsanlarda, küçük kümeler şeklinde Leydig hücreleri, yer yer makrofaj, mast hücreleri ve fibroblast bulunduran oldukça gevşek bağ dokusu vardır. Bunun yanında, kısmen farklılaşmamış, gonadotropik hormonların uyarmasıyla Leydig hücrelerine dönüşen, mezenkim kökenli hücreler bulunur (7,11,23,30,52,62,72,74). İnsanlarda Leydig hücreleri genellikle kan damarlarıyla yakın ilişki içindedir. Burada iki çekirdekli hücrelere sık rastlanır. Leydig hücrelerinde salgı granülleri yoktur. Ürünlerini sitoplazmada depolamadan salgırlar. Mitokondri sayısı fazladır ve büyüklüğü ile şekilleri değışkendir. Asidofilik sitoplazmada, içindeki lipid damlacıklarını yitirmiş olan berrak vakuoller bulunabilir (11,73). Diğer steroid salgılayan endokrin bezlerde görüldüğü üzere, Leydig hücresinin en belirgin ultrastrüktür özelliğı; geniş, yaygın granülsüz endoplazma retikulumudur. Granüllü endoplazma retikulumu sisternaları daha az sayıdadır. Granülsüz endoplazma retikulumu zarı, androjenik steroidlerin biyosentezindeki birçok aşamada önemli olan enzimleri bulundurmaktadır. Sitoplazmada, peroksizom ile lizozomlar ve lipokrom pigmenti bulunmaktadır (11,20,64,70).

İnsan Leydig hücrelerinde Reinke kristalleri bulunur. Bunların büyüklüğü ve şekli oldukça değışken olup uçları yuvarlak veya sivridir. Ahşılmış histolojik boyalara ilgisi azdır ve olağan preparatlarda neredeyse renksiz görülrler, ancak azokarmin ile boyanabilirler. Bu kristaller puberteden önce görölmezler. İşlevleri bilinmemektedir. Ypılan bir çalışmada, androjen duyarsızlığı hastalığı olan erkeklerin Leydig hücrelerinde bu kristallerin görölmediğı bildirilmiştir (11,20,44,61).

Leydig hücreleri, gebeliğın 8. ayında, fõtal testis içinde ilk defa belirirler ve birkaç haftada sayıları artar. Sonra bilinmeyen nedenlerden õtürü doğuma çok az kalana dek azalırlar. Sayıları çocukluk ve ergenlik döneminde yavaş yavaş artar ve erişkin yaşamın ilk dönemlerinde androjenik steroid hormonları sentezler. İlerleyen yaşla birlikte sayısı yavaş yavaş azalır. 60 yaşındaki bir erkek, genellikle 20 yaşındaki

bir erkeğin sahip olduğu Leydig hücresinin yarısından daha az Leydig hücresi bulundurmaktadır (11,30,43,51,92).

Kemirgen testisindeki Leydig hücreleri, tanımlanmış iki çoğalma ve farklılaşma evresinden geçmektedir. İlki fötal yaşam boyunca ve ikincisi de puberte öncesi dönemdedir (74).

2.2. SPERMATOGENEZ

Spermatogenez kavramı, proliferatif olayları ve ilk erkek germ hücreleri spermatogonyadan erişkin spermatozoaya kadar olan hücresel değişimleri kapsamaktadır (18,62). Anlaşılır olması için, işlem üç fazda düşünülebilir (29). Bunlardan ilki, tip A spermatogonyanın bir dizi bölünme geçirerek sayısını artırması ve tip B spermatogonyayı oluşturmasıdır (28). Buna spermatositogenez denir. Spermatogonyanın bu son jenerasyonu, birincil spermatositleri üretir (11). Spermatogenezin ikinci fazı mayoz bölünmedir. Spermatositler mayoz bölünmeye girerek kromozom sayılarını yarıya indirirler ve bir grup spermatid oluştururlar (28,75). Spermiyogenez adı verilen üçüncü fazda, spermatidler hücresel dönüşüme uğrar ve spermatozoa olarak seminifer tübül lümenine bırakılırlar (11,18,71,89).

Tip A spermatogonya, kubbe şekilli hücrelerdir ve seminifer epitelin bazal laminasında bulunmaktadır. Ovoid çekirdeğinde az heterokromatin vardır ve çekirdek zarına komşu yerleşmiş iki çekirdekçik bulunur. Tip A spermatogonya, koyu renkli Tip Ad ve soluk renkli Tip Ap olmak üzere iki çeşittir. Soluk renkli hücrelerin koyu renkli hücrelerden farkı, çekirdeğinin daha açık renkte boyanmasıdır. Koyu renkli hücreler, yeni spermatogonyum oluşturmak üzere bekletilirlerken, soluk renkli hücreler mitozla devam ederler. Tip B spermatogonya, daha yuvarlak çekirdeği, daha kaba kümeler oluşturmuş kenardaki heterokromatini ve merkeze yerleşmiş olan tek bir çekirdeği ile ayrt edilebilir. Birincil spermatositler, spermatogonyanın üstündeki daha geniş, yuvarlak hücrelerdir. Tip B spermatogonyanın bölünmesiyle ortaya çıkmalarından hemen sonra, birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Mayozun bazı aşamaları, homolog kromozomların ilişkileri, şekilleri ve yoğunlaşma derecelerindeki farklılığa dayanılarak ayrt edilebilir. Birinci mayoz bölünmenin profaz

aşaması oldukça uzundur, yaklaşık 22 gün sürer. İkincil spermatositler, birinci mayoz bölünme ile ortaya çıkarlar ve interfazda çok kısa kalırlar, dolayısıyla seminifer tübül kesitlerinde pek sık rastlanılmazlar. İkinci mayoz bölünmenin profazı ise kısadır (11,12,20,37,64,70).

2.3. SPERMİYOGENEZ

Spermiyogenez kavramı, spermatidlerin spermatozoaya çevrildiği mayoz bölünme sonrası değişimleri içermektedir. Spermatidler, spermatositlerden daha küçük ve yuvarlak olup seminifer epitelde daha yukarıya yerleşmiştir. Çoğunlukla yakın paketlenme nedeniyle çok köşeli şekil alabilirler. Çekirdekte kaba heterokromatin kümeleri yoktur. Sitoplazmalarında kısa mitokondri, endoplazma retikulumunun veziküller ve tübüler yapıları ve belirgin bir Golgi kompleksi vardır.

Spermatidler farklılaştıkça, yavaş yavaş epitelin yüzeyine doğru hareket ederler. Gelişimlerinin son aşamalarında, kuyrukları lümene doğru uzanır. Bir spermatozoonun bırakılması sürecinde fazla sitoplazma atılır ve spermatozoon serbest kalır. Geride kalan sitoplazma kütesine rezidüel cisim adı verilir (11).

Spermiyogenez, 4 fazda gerçekleşir. Bunlar, Golgi fazı, Kep fazı, Akrozom fazı ve Olgunlaşma fazıdır. Golgi fazında, PAS-pozitif pre-akrozomal granüller golgi kompleksinde belirir. Bu granüller, birbiriyle birleşerek çekirdek zarına çok yakın olan, zarla çevrilmiş akrozom vezikülünü oluşturur. Akrozom vezikülü genişler ve bulunduğu bölge, oluşturulacak olan spermatozoonun ön kutbunu belirler. İki sentriol, spermatidin arka kutbuna göç ederler. Distal sentriol, hücre zarına dik olacak şekilde dizilir. Sonrasında da sperm kuyruğunun aksonom kompleksini oluşturmaya başlar. Kep fazında, akrozom vezikülü, nükleusun ön kutbunun yarısını örtmek üzere şekil değiştirir ve akrozomal kep olur. Akrozomal kepin yanındaki nükleus zarı kalınlaşır, nüklear porlarını kaybeder ve nüklear kromatin daha da yoğunlaşır (12,37,64,70). Akrozom fazında, gittikçe yoğunlaşan nükleusun boyu uzar ve yassılaşır. Akrozomal kep ile nükleusun ön yüzü, gelişen aksonomal kompleks ile arka yüzü kolaylıkla ayırt edilebilir. Nükleusun şeklinin değişmesiyle, akrozomal kep ile nükleus arasındaki sitoplazma, hücrenin arka kutbuna doğru göç eder. Bu aşamada

hücrenin ön yüzü Sertoli hücrenin sitoplazmasına gömülüdür. Spermatidin sitoplazmadan zengin olan arka yüzü tübül lümenine doğru bakmakta ve çıkıntı yapmaktadır. Aynı anda sitoplazmadaki mikrotübüller silindir bir yapı oluşturmak üzere toplanarak “manşeti” oluştururlar. Manşet, spermatidin boyunun uzamasına ve daralmasına yardım eder. Akrozomal kepin hemen arkasında bulunan manşet, gelişen kuyruğa doğru uzanır. Spermatidin arka yüzüne göç etmiş olan sentrioller, spermatidin baş (nükleus ve akrozomal kep bölgesi) ile gelişen kuyruğu birbirine bağlar. Sentriollerden biri, sperm kuyruğunun aksonomal kompleksini sentezlemeye devam ederken dokuz tane ikili mikrotübül çifti ile çevrelenen iki tane merkezi mikrotübül ile düzenli tübüler kompleks üretmiş olur. Boyun bölgesinde, aksonomal kompleksin mikrotübülleri çevresinde, kuyruğun alt kısmına doğru inen dokuz kalın fiber üretilir. Boyun bölgesinde ve altında, dokuz kalın fiberi çevreleyecek olan mitokondria biriktirmeye başlar. Mitokondria, dar bir çemberin olduğu yerde (annulus) aniden yok olur; orta parçayı temel (esas) parçadan ayırır. Olgunlaşma (Matürasyon) fazı, fazla sitoplazmanın özellikle boyun ve orta parça bölgelerinden atılmasıyla belgindir. Atılan fazla sitoplazma, Sertoli hücresi tarafından fagosit edilir. Olgunlaşmamış spermatozoa, Sertoli hücrenin yüzeyinden koparak seminifer tübül lümenine bırakılır. Artık spermiyogenez sona ermiştir. Koyu Tip A spermatogonyumdan başlayıp serbest bırakılan spermatozoona kadar olan zaman, yani spermatositogenezis, insanlarda yaklaşık 70 gün sürer (12,37,64,70).

2.4. ATROFİ VE REJENERASYON

Testis seminifer epiteli, bulaşıcı hastalıkların da içinde bulunduğu çeşitli ajanlara, alkole, besin yetersizliğine, metilmetanosülfat, oktilfenol, diepoksibütan, casodeks ve hidroksiüre gibi gonadotoksik maddelere karşı çok dayanıksızdır (3,11,18,19,32,60). Testisin X ışınlarına en az düzeyden daha fazla maruz kalması, yaygın hücre ölümüne ve hatta kısırlığa neden olabilir Normal vücut sıcaklığı, normal spermatogeneze uygun değildir. Dolayısıyla memelilerin çoğunda, testis skrotum içinde, vücut sıcaklığından birkaç derece daha az bir sıcaklıkta bulunmaktadır. Her koşulda Sertoli hücreleri, spermatogenik hücrelerden daha dayanıklıdır. Dolayısıyla zararlı ajan

uzaklaştırıldığında ya da E veya A vitamini eksikliği giderildiğinde seminifer epitelin az ya da çok tam bir rejenerasyon göstereceği beklenmelidir. Erkeklerde, yaşlılığa kadar spermatogenez devam etse de, artan yaşla beraber seminifer tübüller giderek geriler (11,37).

2.5. TESTİSİN HİSTOFİZYOLOJİSİ

2.5.1. Endokrin İşlev

Testisin endokrin işlevi, Leydig hücreleri tarafından yerine getirilmektedir. Spermatogenezin devamı için gereken testosteronun sentezi ve salgılanmasını yaparlar. Yerel etkisinin yanı sıra, kan dolaşımındaki testosteron, erkek üreme sisteminin aksesuar bezleri olan seminal vezikül, prostat ve bulboüretal bezlerin işlevinin devamı için önemlidir. Testosteron aynı zamanda, ikincil cinsiyet karakterleri olan erkeğe özgü pubis kıllanması, sakal oluşumu, düşük perdeli ses ve kas gelişiminin devamlılığından sorumludur (11,20,43,64,70).

Sertoli hücrelerinin hormonlara olan ilgisi, spermatogenik siklusun herbir aşamasında değişerek, erken aşamalarda (II-V) FSH'ya en büyük duyarlılığı gösterirken, testosterona ise VII. aşamada duyarlı olmaktadır (47,60,66,85).

Leydig hücreleri tarafından testosteron üretimi, temel olarak ön hipofizden salgılanan luteinleştirici hormona bağlıdır. Bu hormon, Leydig hücrelerinin plazma zarı üzerinde bulunan özgül reseptörlere bağlanır. Bunun sonucunda cAMP oluşur ve protein kinazlar etkinleştirilir. Kolesterol esteraz Leydig hücrelerinin sitoplazmasındaki lipid damlacıklarında bulunan kolesterol esterlerinden serbest kolesterolü serbestleştirir. Mitokondri enzimleri, kolesterolün yan zincirini pregnolon oluşturmak üzere kırar ve granülsüz endoplazma retikulumu enzimleri pregnolonu testosterona çevirmek üzere birkaç biyosentez işlemini yerine getirir (11,20,64).

Leydig hücreleri testisin toplam hacminin sadece küçük bir yüzdesini oluşturmasına rağmen, steroidogenik potansiyeli etkileyicidir. Sıçanlarda testis hacminin sadece %1'ini oluşturmakta, her 1 g testiste 22 milyon Leydig hücresi olduğu tahmin edilmektedir. Leydig hücreleri, saniyede yaklaşık 10.000 molekül testosteron

üretebilmektedir. Hormon, birçok salgı hücresinde olduğu gibi depolanmamakta, bunun yerine ihtiyaç oldukça yapıp serbest bırakılmaktadır. Hipofiz bezindeki gonadotrop hücrelerden LH salınımının sürekli olmayan bir işlem olmadığı, genellikle geceleri her 90 dk'da bir salgılandığı bilinmektedir (11). LH, Leydig hücrelerinin çoğalmasında doğrudan veya otokrin yol aracılığıyla büyüme faktörlerinin üretimini kontrol ederek, dolaylı yolla uyarmaktadır (11,23,64,74).

Testosteronun dışında diğer Leydig hücresi ürünleri, oksitosin, pro-opiomelanokortin-kökenli peptidler, örneğin α -melanosit uyarıcı hormon (α -MSH) ve β -endorfin, prostaglandinler, lökotrienler ve renin/anjiotensin gibi diğer steroidlerdir (66).

Leydig hücrelerinin insülin-benzeri büyüme faktörü-I (IGF-1), interlökin-1, vazopressin ve çeşitli tanımlanamamış Sertoli hücresi kökenli faktörler gibi intratestiküler faktörlerin hedefi olduğuna dair bulgular vardır (23,62,66). İn vitro çalışmalar, epidermal büyüme faktörü (EGF) ve IGF-I'nin gonadotropinlerle testis işlevlerini düzenlemek üzere etkileşim halinde olduğunu göstermiştir (69).

Sertoli hücreleri tarafından üretildiği düşünülen bir peptidin, Leydig hücreleri üzerinde baskılayıcı etkisi vardır. Seminifer tübüllere yerel zarar verilmesi ile bu baskılanma yıkılmakta gibi görünmekte ve komşu Leydig hücrelerinin hipertrofisini uyarmaktadır (11,44).

Çeşitli çalışmalar, ANF'nin de fare Leydig hücresindeki steroidogenez üzerinde düzenleyici rolü olduğunu göstermiştir. ANF'nin Leydig hücrelerinde testosteron üretimini etkilediğine dair artan bulgular vardır (7).

Kemirgenler üzerinde yapılan diğer çalışmalar da, mast hücresi ürünlerinin (histamin ve serotonin gibi) testisteki steroidogenezin düzenlenmesinde rol aldığını düşündürmektedir (48). Leydig hücresi etkinliğindeki bir bozukluk, sıçanların, kurbağanın ve kertenkelenin testisinde mast hücresi sayısını artırmıştır (49,66).

2.5.2. Ekzokrin İşlev

Spermatozoa, seminifer epitelin holokrin salgı ürünü olarak düşünülebilir. Spermatogenez, hipofizden salınan LH'ya cevap olarak Leydig

hücrelerinden salgılanan testosterona bağlıdır. Diğer gonadotropik hormon olan FSH, özgül olarak Sertoli hücrelerine bağlanır. FSH'nın spermatogenezin başlaması için gerekli olduğu öne sürülmüştür, ancak sürekliliği için gereksinim duyulup duyulmadığı belirgin değildir (11). Yavru sıçanlarda, spermatogenezin başlaması ve devamı için FSH'nın önemli olduğu, erişkin sıçanda ise FSH'nın mayoza girebilmeye uygun olan tip B spermatogonyanın sayısını düzenlemede rol aldığı öne sürülmüştür (31). Günümüzde elde edilen veriler, FSH'nın, Sertoli hücrelerinin testosteronun etkilerine olan duyarlılığını artırdığını ve/veya mayoza girecek olan spermatogonya sayısını düzenlediğini düşündürmektedir (85). Sertoli hücrelerinin germ hücrelerine ve seminifer tübül lümenindeki sıvıya madde taşıyan belli bir takım proteinlerin sentezini artırdığı bilinmektedir. Bu proteinlerden birisi de Sertoli hücrelerinin apikal ve yan yüzeylerinden salgılanan ve testosterona bağlanan androjen bağlayıcı protein (ABP), diğeri ise demir bağlayıcı protein olan transferrindir. Bu proteinler germ hücresi gelişimine katkıda bulunmalarının yanı sıra, lümene bırakılırlar ve testisin dış yöne giden kanallarında taşınırlar. Bu proteinlerin epididimisin normal işlevini de sağladığına inanılmaktadır (11,20,37).

Hipofiz bezinin hücreleri tarafından salınan LH'nın düzenlenmesi negatif feedback ile gerçekleşir. Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteronun yüksek düzeyde olmasıyla LH salınımı baskılanır. Aynı şekilde, dolaşımdaki testosteron düzeyindeki azalma ile LH salınımı artar. Hipofiz tarafından salınan FSH'nın feedback düzenlenmesi de buna benzer şekildedir. Erkeklerde Sertoli hücreleri ve dişilerde ovaryum foliküllerinin granuloza hücreleri tarafından yapılan inhibin de bu olaya karışmaktadır (11,14,20,37,64).

2.6. E VİTAMİNİ

2.6.1. E Vitaminin Biyolojik Sistemlerdeki Rolü

E vitaminin gerekli bir besin maddesi olduğu ilk defa 1922 yılında Evans ve Bishop tarafından bulunmuştur. Önceleri X, daha sonraları antisterilite vitamini,

1936'da buğday tohumundan elde edildikten sonra da tokoferol olarak tanımlanmıştır (38).

E vitamini yağda çözünün bir vitamindir. Bir grup tokol ve tokotrienollerden oluşup hidrofobik özelliği vardır. E vitamini, az miktarda da olsa biyolojik zarların her yerinde bulunur. Yağda çözünen bir vitamin olmasına karşın taşıdığı hidroksil grubu nedeniyle zayıf amfipatik özellik gösterir. Bu yönüyle kolestorele benzer (84).

E vitamininin bulunmasından günümüze kadar geçen sürede, hayvanlarda ve insanlarda kesin fizyolojik ve tedavi edici rolü konusundaki tartışmalar hala sürmektedir (1).

Literatürde, E vitaminin etki mekanizması üzerinde çok sayıda birbirine zıt bulgu ve iddialar söz konusudur. Bununla birlikte, E vitamininin temel biyolojik rolünü ve klinik uygulamalarını tam olarak anlamaya yönelik araştırmalar hala yapılmaktadır (4,26,33,34,79,81). Elde edilen bilgilerin çoğu, E vitamininin insanlarda birkaç klinik düzensizliği tedavi etmede etkin rol oynadığını göstermektedir (38,41).

Doğada E vitamini etkisi gösteren kimyasal yapıları farklı çeşitli bileşikler bulunmaktadır. Bu değişiklikler, moleküllerindeki yan zincirlerin durumuna ve doymuş ya da doymamış olmalarına göre tokoferoller ve tokotrienoller olmak üzere iki grupta toplanırlar. Bugün alfa, beta, delta, gamma, eta ve zeta olmak üzere altı tokofeol ve altı tokotrienol bilinmektedir (38,84).

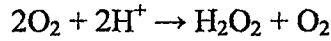
2.6.2. E Vitaminin Biyokimyasal İşlevleri

E vitaminin etkime şeklinin açıklanması konusunda en geniş desteği alan görüş antioksidan kuramıdır. Bu kuram, biyolojik sistemlerde E vitaminin bir antioksidan olarak işlev gördüğünü ileri sürer. Kontrolsüz otooksidasyonun (serbest radikal zincir tepkimesi) yol açtığı etkilerden korunan moleküller, hücresel ve alt-hücre sel zarların çoklu doymamış lipidleridir. İnsan vücunda lipid peroksidasyonu sonucunda, ateroskleroz, diyabet, retinopati ve karsinogenez gibi rahatsızlıklar ortaya çıkar (4,33,34,38,67,79).

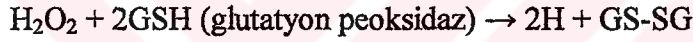
Normal hücrel metabolizma veya vücuda alınan zehirli bileşiklerin metabolizması süresince çeşitli metabolitler oluşturulur ve bunlar canlı hücrelere zarar verebilirler. Bu metabolitler: süper oksit anyon (O_2^-), hidroksil radikali ($OH^\cdot$) ve bazı serbest radikallerdir (26,38,84). Glutasyon peroksidaz (GSH), katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) birlikte, organizmaları peroksidan moleküller denen serbest radikaller ve diğer oksitleyici ara maddelerden korumayı amaçlayan bir koruyucu sistem oluştururlar (4,38,84).

Bu mekanizma şu şekilde açıklanmaktadır:

Süperoksit anyonuna (O_2^-) süperoksit dismutaz enzimi etkir:



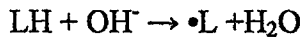
Bu şekilde elde edilen hidrojen peroksite, katalaz enzimi veya glutasyon peroksidaz etki eder.



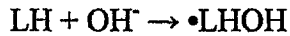
Oksijen metabolitleri, hücrede bulunan zar yapılarındaki fosfolipidlerin çoklu doymamış yağ asitlerine etki ederek zarların normal yapılarını bozar ve hücre ölümü ile sonuçlanabilecek olayları başlatırlar (34,38,67,84).

Hidroksil radikalleri ($OH^\cdot$), doğada oldukça tepkisel bir özelliğe sahiptir. Çoklu doymamış bir lipidin (LH) peroksidasyonu sonucunda yağ açili (serbest radikal) oluşur.

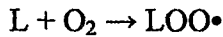
Bu serbest radikal ya hidrojen çıkarılmasıyla;



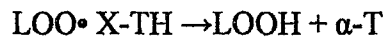
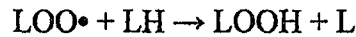
Ya da ek bir tepkimeyle oluşturulur:

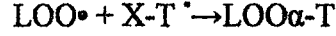


Bu yolla oluşan yağ açili radikal, peroksil radikalini oluşturmak üzere oksijen molekülünü etkileyebilir:



Bu durumda peroksil radikali, çoklu doymamış yağ asitlerine ait daha çok sayıda molekülü etkileyebilir, ya da E vitamini veya diğer antioksidanlar tarafından tüketilir. Herhangi bir durumda ürün yağ asit hidroperoksittir (LOOH):





α -TH: α -Tokoferol

Yağ asit hidroperoksiti, koruyucu mekanizmanın son aşaması olarak, glutatyon peroksidaz tarafından hidroksi asite indirgenebilir:



Böylece E vitamini, zincir dağıtıcısı peroksil radikallerini ($\text{LOO}\cdot$) tutarak zincir kırıcı bir antioksidan olarak davranır (38,39).

E vitamini, dokularda olduğu gibi, hem depolama sürecinde hem de mide-bağırsak kanalı içindeki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu süresince ortaya çıkan serbest radikal ara maddelerini temizler (38,39,55).

2.6.3. E Vitaminin Dokular Üzerine Olan Koruyucu Etkisi

Moleküler model çalışmaları, E vitamini molekülünün yan zincirlerinde bulunan 4' ve 8' nolu karbon atomlarının zarlara bağlı fosfolipidlerdeki araşidonik asit ile stabil bir kompleks oluşturabileceğini göstermiştir (38). E vitaminin daha çok zarlarda yerleşmiş olmasından ve lipidlere bağlı araşidonik asitle kompleks oluşturarak zarların yapısına girmesinden hareket ederek, E vitaminin zarlara bağlı işlevlerinin şunlar olabileceği belirtilmektedir: E vitamini;

- hücredeki zar yapılarında bulunan uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin in vivo veya in vitro bozulmalarına engel olur,
- doymamış yağ asidi, özellikle araşidonik asit içeren zarların geçirgenliklerini azaltır,
- zarlara bağlı fosfolipidlerin in vivo fosfolipazlar tarafından bozulmasını önler (38,84).

E vitaminin dokularda lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etki gösterdiğini destekleyen bir çok çalışmalar yapılmıştır (26,40,67,80,88). E vitamini alyuvarların parçalanmasını engellemekte, çeşitli toksik ajanların (karbontetraklorür, bleomisin, sülfürdioksit vb) dokulardaki zararlı etkilerine karşı antioksidan koruma göstermektedir (10,38,41). Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda deneysel kolit modelinde E vitamini verilmesiyle belirgin bir iyileşme görülmüştür (56).

E vitamini, lipid peroksidasyonuna neden olan serbest radikalleri tutarak, kuvvetli antioksidan etki gösterir. E vitamininin Down sendromu ve deneysel mikrosefalideki hasarı, ozon ve azotdioksit toksisitesini, yenidoğan bebeklerdeki hiperoksinin zararlı etkilerini, deneysel olarak oluşturulan akciğer fibrozisi, meme karsinogenezi ve kolon adenokarsinomasını, karaciğer parenkim hücrelerinde multiveziküler lizozom oluşumunu engellediği ve/veya azalttığı bildirilmiştir (54).

E vitamininden yoksun büyüyen çeşitli türdeki hayvanlarda geri dönüşü olmayan kısırlık ortaya çıkmıştır (88). Sığır Leydig hücrelerinin kültür ortamına E vitamini eklendiğinde, hücrelerin yaşam süresi ve steroidogenik etkinliğinin arttığı görülmüştür (46).

E vitaminin sıçanların hipofiz-gonad eksenine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada E vitamini eksikliğinin, gonad işlevini durduran bir etki göstererek Leydig hücrelerinde hormon sentezini azalttığını ve feedback mekanizması yoluyla hipofizden LH salınımını artırdığı saptanmıştır (1).

2.7. MAST HÜCRELERİ

Mast hücreleri 20-30µm'lik çapı ile bağ dokusunun büyük hücrelerinden birisi olup ovoid şekillidir. Yuvarlak çekirdeği tektir ve hücrenin merkezinde yerleşmiştir. Olgun mast hücresine dönüşen öncül hücreler olasılıkla kemik iliğinden türemektedir (11,20,37,45).

Sitoplazmasında bulunan sayısız granüller, hücrenin karakteristik özelliklerini oluşturmaktadır. Zarla çevrilmiş olan bu granüllerin çapı 0.3-0.8 µm arasında değişmektedir. Granüllerinde, bir sülfatlı glikozaminoglikan olan heparini bulundurmalarından dolayı toluidin mavisi ile boyandıklarında metakromazi gösterirler (20). Alsiyan mavisi-safranin boyama tekniğinde ise bağ dokusu mast hücrelerinde kırmızı boyanmış granüllerin bulunmasının matür hücreler için özgül olduğu belirtilmiştir (76). Bağ dokusu mast hücreleri, heparinin yanı sıra, yüksek histamin içeriği de bulundururlar. Elektron mikroskobu ile granüller üzerinde yapılan çalışmalar, granüllerin büyüklük ve biçimleri arasındaki farklılıkları ortaya çıkarmış ve aynı hücre içinde bile var olan ultrastrüktür çeşitlilikleri göstermiştir (11,20,36). Diğer taraftan

sitoplazma, birkaç mitokondri, seyrek granüllü endoplazma retikulumu ve kısmen küçük Golgi kompleksi bulundurduğu için belirgin değildir (20,37,90).

Mast hücresi granüllerinde, heparinin yanısıra, histamin, nötral proteazlar, aril sülfatazlar, eozinofil kemotaktik faktör, nötrofil kemotatik faktör, prostaglandin, bradikinin, nitrikoksit benzeri faktör, sitokin, kemokin ve büyüme faktörleri bulunur (2,20,45,48,76).

2.7.1. Mast Hücresi Gelişim Ve Dağılımı

Bazofiller ve mast hücreleri bazı karakteristik özellikleri paylaştıkları için, bir dönem mast hücrelerinin, bağ dokularında görevini yerine getirmek üzere kan dolaşımını terk eden bazofiller olduğuna inanılmıştır. Bu iki hücrenin farklı hücreler olduğu ve öncüllerinin de ayrı olduğu artık bilinmektedir (20). Mast hücrelerinin hematopoietik kök hücrelerinden köken aldığı ve önce kan dolaşımına, daha sonra da bağ dokusuna geçtikleri açık bir şekilde ortaya konulmuştur (21). Bağ dokusuna geçen bu öncül hücreler burada yerel faktörlerin etkisiyle mast hücrelerine farklılaşır ve karakteristik sitoplazmik granüllerini kazanırlar (11,20,21). Sıçanda mukozal mast hücrelerinin farklılaşmasının T-hücresine, insanda ise timusa bağımlı olduğu bilinmektedir (53). Yapısal karakterlerine dayanarak, az granüllü yuvarlak veya yassı görünümdeki mast hücrelerinin, ya farklılaşan mast hücreleri öncülleri ya da degranülasyona uğramış yerleşik mast hücreleri olabileceği düşünülebilir (48). Salgı granüllerinin sayısı ve homojen elektron-yoğunluğu, mast hücresi farklılaşmasının başlıca belirtileridir (21). Bu hücrelerin birkaç aydan daha az ömrü vardır ve bazen de hücre bölünmesine girerler (11,20,21,90).

Sıçan testisinde, tunika albuginea ve tunika vaskülozada, özellikle kapsül altındaki kan damarlarının çevresinde bol mast hücresi bulunur. Ancak, testis interstisyumunda hemen hemen hiç yoktur (21,66,76,77,87). Testiste mast hücreleri dokuda bulunduğu yere göre iki farklı tipte görülür: "İnterstisyel mast hücreleri" Leydig hücreleri ve diğer interstisyel hücrelerin arasında olduğu gibi kan damarlarının civarında da bulunabilir ve "Peritübüler mast hücreleri", tübüler Lamina proprianın çok yakınında veya içinde bulunurlar (36).

Testisteki mast hücrelerinin heterojenitesi, yani temel proteoglikan olarak heparin veya kondroitin sülfat bulunduran mast hücreleri, Nagai ve arkadaşları tarafından yapılan histokimyasal çalışmada tanımlanmıştır. Heparin-(+) mast hücreleri bağ dokusu mast hücrelerine, kondroitin sülfat (+) olanlar da mukozal mast hücrelerine karşılık gelmektedir (36,53). İnsan testisinde yapılan ultrastrüktür çalışmaları, interstisyel alanlardaki mast hücrelerinin (kan damarları ve/veya komşu Leydig hücreleri ve diğer hücreler arasındaki karakteristik yerleşiminden başka) çoğunlukla kafes/noktalar benzeri bir yapıda granül bulundurduğunu, yani bağ dokusu mast hücresinin eletron mikroskobik özelliklerini taşıdığını göstermiştir. Peritübüler mast hücreleri ise çok tabakalı, kıvrıntılı ya da retiküler motifte olan granülleriyle mukozal mast hücrelerinin ultrastrüktür özelliklerini göstermektedir (36).

Mast hücreleri, vücutta bağ dokusunun bulunduğu yerlere yerleşir ve burada küçük kan damarlarının çevresinde yoğunlaşır. Solunum ve sindirim sisteminin subepitelyal bağ dokusunda da bulunur. Bağ dokusundaki mast hücreleri, granüllerinde çoğunlukla heparin bulundururken, sindirim kanalı mukozasında bulunan mast hücreleri heparin yerine kondroitin sülfat içerirler. Bu hücreler, mukozal mast hücresi olarak adlandırılmaktadır (20,53). Bağ dokusu tipi mast hücreleri ise vücutta daha geniş bir dağılım göstermektedir.

Mast hücreleri, sıçan üreme sisteminin aksesuar organlarında yoğun şekilde bulunur (21). Testislerde bulunan az sayıdaki mast hücresi ise tunika albugineanın hemen altında, kan damarlarının çevresinde yer alır, interstisyumda görülmez (76,77). Mast hücrelerinin sıçan testisi interstisyumunda yoğunlaşması, yenidoğan sıçanlara östradiol verilmesi veya bir Leydig hücresi sitotoksini olan EDS'nin erişkin sıçanlara verilmesinden sonraki 14. günde gerçekleşir (9,42,76,83). Testis interstiyumunda mast hücrelerinin birikmesinin, farklılaşmış Leydig hücrelerinin burada bulunmaması ile ilgili olduğu ileri sürülmektedir (21).

2.7.2. Mast Hücresinin Etkinleşmesi Ve Degranülasyonu

Mast hücrelerinin etkinleşmesi ve degranülasyonu, içinde immün yanıtın, psikolojik ve/veya fiziksel gerilimin, alkol kullanımının ve östradiol desteğinin de bulunduğu çeşitli dış ve iç uyarıdan kaynaklanabilir (6,48,50,77).

Mast hücreleri, immünoglobulin E (IgE) için hücre yüzeyi F_c reseptörü bulundurur. Bu hücrelerin immün sistemdeki işlevi, hızlı aşırı duyarlılık tepkisi (anafilaktik reaksiyon) olarak bilinen inflamatuvar tepkiyi başlatmaktır. Genellikle bu tepki, arı zehiri, polen ve belirli ilaçlar gibi antijenler tarafından tetiklenir ve aşağıdaki olaylar zinciri gerçekleşir (20,59).

Antijenle ilk karşılaşma, IgE antikorlarının oluşumuna neden olur ve IgE mast hücrelerinin hücre zarındaki F_c reseptörlerine bağlanır, böylece bu hücre “duyarlılaştırılır”. Aynı antijen ile bir sonraki karşılaşmada, antijen mast hücresi yüzeyindeki IgE’ye bağlanarak IgE antikorlarının çapraz bağlanmasına ve reseptörlerin kümelenmesine neden olur. Çapraz bağlanma ve kümelenme, zara bağlı olan “reseptör birleştiren faktörleri” etkinleştirir; böylece en azından iki bağımsız işlemi, birincil ve ikincil mediyatörlerin serbest bırakılmasını başlatır. Birincil mediyatörlerin serbest bırakılması, ATP’nin cAMP’ye çevrilmesinden sorumlu enzim olan adenilatsiklazın etkinleşmesinden etkilenir. cAMP’deki bu artış, hücre içi depolardan Ca^{++} bırakılmasını etkinleştirir ve sitozolik Ca^{++} artar. Bunun sonucunda salgı granülleri birbirleriyle ve hücre zarıyla kaynaşır. Bu olaylar, granül içeriklerinin (histamin, heparin, proteazlar, aril sülfataz, eozinofilik kemotaktik faktör ve nötrofil kemotaktik faktör gibi) serbest bırakılmasına, yani degranülasyona neden olur. Bunlar birincil mediyatörleri oluşturur (20).

Zara bağlı IgE’nin çapraz bağlanması, aynı zamanda fosfolipaz A_2 ’yi etkinleştirir. Fosfolipaz A_2 , zardaki fosfolipidlere araşidonik asit oluşturmak üzere etki yapar. Araşidonik asit, ikincil mediyatörler olan lökotrien C_4 ile D_4 ve prostaglandin D_2 ’ye çevrilir. Bu ikincil mediyatörler mast hücresi granüllerinde depolanmaz, gereksinim anında üretilerek hızla serbest bırakılırlar.

Mast hücrelerinden bırakılan birincil ve ikincil mediyatörler, hızlı aşırı duyarlılık tepkisi boyunca inflamatuvar tepkiyi başlatır, lökositleri inflamasyonun olduğu

bölgeye çekerek vücudun savunma sistemini etkinleştirir ve inflamasyonun şiddetini ayarlar (20). Mast hücrelerinin degranülasyonu ile, astım, ve atopik dermatit durumlarında olduğu gibi hızlı aşırı duyarlılık tepkisinin (tip I allerji) tetikleyicisi olan histamin ortama bırakılır (6).

İnflamatuvar tepki boyunca aşağıdaki birbirini izleyen olaylar gerçekleşir (20):

Histamin, damar genişlemesine neden olur ve çevredeki kan damarlarının geçirgenliğini artırır. Aynı zamanda bronşların kasılmasına neden olur ve solunum yollarında mukus yapımını artırır. Eozinofil kemotaktik faktör, eozinofilleri inflamasyonun olduğu bölgeye çeker. Bu hücreler, antijen-antikor komplekslerini fagosite eder, varsa parazitleri öldürür ve inflamatuvar tepkiyi sınırlandırır. Nötrofil kemotaktik faktör, inflamasyonun olduğu bölgeye nötrofilleri çeker. Bu hücreler, ortamdaki mikroorganizmaları öldürür ve fagosite eder. Lökotrien C₄ ve D₄ damar geçirgenliğini artırır ve bronşlarda kasılmaya neden olur. Bunların vazoaktif etkileri, histaminden birkaç bin kat daha güçlüdür. Prostaglandin D₂ bronşlarda kasılmaya ve bronşiyol mukozasından bol mukus salgılanmasına neden olur.

Mast hücresi degranülasyonu, yerel bir fenomen olduğu için tipik inflamatuvar tepki genellikle hafif ve bölgeye özgüdür. Ancak aşırı duyarlı kişilerde, sistemik ve ciddi hızlı aşırı duyarlılık tepkisi gelişebilir (20). Nörotransmitterler, nöropeptidler ve sinir büyüme faktörü mast hücresi çoğalması, degranülasyonu ve sitokin salınımını uyarmaktadır (48).

Mast hücrelerinin sadece allerjik immün tepkilerde değil, aynı zamanda dokunun yeniden şekillenmesinde, fibrogenizde, anjiyogenezde ve hatta kanser invazyonunda rol oynadığı gösterilmiştir. Mast hücreleri bu olaylara, biyoaktif mediyatörleri üreterek ve salgılayarak katkıda bulunmaktadır (5,80,87).

Mast hücreleri normal insan testisinde de bulunmaktadır, ancak kesin işlevsel rolleri belirlenememiştir. Kemirgenler üzerinde yapılan çalışmalar, mast hücresi ürünlerinin (histamin ve serotonin gibi) testislerdeki steroidogenezin düzenlenmesinde rol aldığını düşündürmektedir. Genelde mast hücrelerinin biyogenik aminleri, proteoglikan, prostaglandinler, sitokinler ve kemokinler, büyüme faktörleri ve proteazların içinde bulunduğu potansiyel mediyatörleri sentezlediği ve salgıladığı

bilinmektedir. Fakat bu kokteylin bileşimi oldukça değişkendir (48). Örneğin, stres faktörü mast hücresi granüllerinde histamin sentezini artırırken vazointestinal peptid (VIP) azaltır (76,77).

Çeşitli çalışmalar, mast hücresi sayısındaki artış ve erkek infertilitesi arasında bir bağlantı olabileceğine dikkat çekmiştir (36,48). İdyopatik erkek infertilitesi olan hastaların testisindeki mast hücrelerinin heterojenitesi üzerine yapılan bir histokimyasal çalışmada, kondroitin sülfat (+) olan mast hücrelerinin sayısında artış saptanmıştır (36).

Bir çalışmada, insan mast hücrelerinin fibrojenik maddeler üreterek ve salgılayarak fibroblastları etkinleştirdiği ve kollajen sentezini hızlandığı bildirilmiştir (87). Sonradan yapılan çalışmalarda, hemen hemen tüm insan mast hücrelerinin bir ürünü olan protez triptazın bazı önemli rollerinin olduğu farkedildi. Bu roller, fibroblast için potansiyel bir mitojen olması, tip I kollajen sentezini ve fibroblast kemotaksisini uyarmasıdır (48).

2.8. ETAN DİMETAN SÜLFONAT (EDS)

Etan dimetan sülfonat (EDS), canlı hücreler üzerinde alkilleştirici ajan olarak etki gösterir. Etilnitrosoüre, tiotepa ve trietilenmelaminin (52) ve oktilfenolun (60) de içinde bulunduğu alkilleştirici ajanların, sperm kromatini yapısında, çekirdek DNA'sının denatürasyona olan eğiliminin artışına neden olduğu gösterilmiştir (19). 40 yıl kadar önce, EDS'nin fare ve sıçanlarda anti-tümör ajanı olduğu fark edilmiş ve 1966 yılında Jackson tarafından, erişkin erkek sıçanlardaki antifertilite etkisi gösterilmiştir (66). EDS'nin Leydig hücrelerini apoptozise götürdüğü mekanizma tam olarak bilinmese de, deneyler EDS'nin glutationa kovalent bağlanması ve glutationun hücrelerde tüketilmesinin, hücre toksisitesi için önemli olduğunu düşündürmektedir. Yapılan bu çalışmalar, EDS'nin Leydig hücrelerinde apoptozis yanıtını, yeni bir RNA veya protein sentezine gereksinim duymadan, DNA ve proteinleri alkilleyerek uyardığını düşündürmektedir (52).

Enjeksiyondan 8-10 hafta sonra EDS'nin sıçan testisindeki antispermatogenik etkisinin kaybolarak spermatogenez ve fertilitenin yeniden tamamen

kurulduğu fark edilmişse de, uzun yıllar boyunca EDS'nin testis üzerindeki kesin etkisi tam olarak anlaşılamamıştır (66). EDS'nin bir tek i.p. enjeksiyonu sonucunda tüm Leydig hücreleri, 36 -72 saat içinde ölür ve 2-6 hafta sonrasında rejenere olurlar (7,23,73).

Sıçanlara in vivo EDS verilmesiyle interstisyel Leydig hücrelerinin çekirdek ve sitoplazmalarında gözlenen temel değışimler, granülsüz endoplazma retikulumunda vezikülleşme, Golgi kompleksinde fokal hipertrofi ve çekirdek kromatininde kümeleşmedir. Daha sonra sitoplazma ve çekirdekte fragmantasyona giden dejeneratif değışiklikler ortaya çıkar ve bunu makrofajların fagositozu izler. Bu yapısal değışiklikler, Leydig hücrelerinin, EDS'ye yanıt olarak nekroz yerine programlı hücre ölümüne girdiklerini göstermektedir (7,22,24,52).

EDS, erişkin sıçan testisindeki Leydig hücrelerini özgül olarak yok etmekte, sonunda da yeni bir Leydig hücresi topluluğunun tam bir rejenerasyonu olmaktadır (15,23,52,66,69,72,73,74,83).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HAYVANLAR

Deney için 63 adet, 8-10 haftalık erkek Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda tutuldu. Hayvanlar, sıçan pelleti ve suyla serbestçe beslendi (13,69,83). Her grupta 7 sıçan olacak şekilde 9 ayrı deney grubu oluşturuldu ve her bir grup ayrı kafeslere konuldu.

Deney uygulamaları, Tablo 1’de görülmektedir. İlgili gruplara E vitamini uygulaması EDS uygulamasından 30 dk. önce yapıldı. E vitaminini EDS’den önce vermemizin nedeni, testise EDS’den önce ulaşmasını sağlamaktır. Benzer bir çalışmada da EDS’den önce hCG (insan koryonik gonadotropini) verilmiştir (73).

Tablo 1: Deney uygulama şeması

Gruplar	0. Gün	1. Gün	2. Gün	3. Gün	4. Gün	5. Gün	6. Gün	7. Gün
1	EDS			X				
2	EDS							X
3	EDS+25mg E vit.	25mg E vit	25mg E vit	X				
4	EDS+25mg E vit.	25mg E vit	25mg E vit	25mg E vit	25mg E vit	25mg E vit	25mg E vit	X
5	EDS+150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	X				
6	EDS+150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	X
7	25mg E vit.	25mg E vit.	25mg E vit.	X				
8	25mg E vit.	25mg E vit.	25mg E vit.	25mg E vit.	25mg E vit.	25mg E vit.	25mg E vit.	X
9	150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	150mg E vit.	X

* (X) simgesi testis dokusunun alındığı günü belirtmek için kullanılmıştır.

3.2. EDS HAZIRLANMASI VE UYGULAMASI

Ticari olarak elde edilemeyen EDS, Jackson ve Jackson'ın (1984) belirttiği şekilde Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalı'nda sentezletildi. (35). EDS, suda çözünmeyen bir tozdur, dolayısıyla solüsyon olarak hazırlanırken dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözündürüldü ve üzerine belirtildiği kadar saf su eklendi. Elde edilen solüsyondan her bir hayvana intraperitoneal (i.p.) 75 mg/kg dozunda (15,72,73,74) tek enjeksiyon yapıldı.

3.3.E VİTAMİNİ

Piyasadan ticari olarak elde edilebilen, herbir ampul içinde 300 mg E vitamini bulunduran, enjeksiyona hazır preparatlar kullanıldı (Evigen®, Aksu Farma Tıbbi Ürünler İlaç Sanayi, Türkiye). Enjeksiyonlar Tablo 1'de belirtilen dozlarda i.p. olarak uygulandı.

3.4. DOKULARIN ALINMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Tablo 1'de belirtilen günlerde sıçanlar tartılarak vücut ağırlıkları ölçülüp kaydedildikten sonra derin eter anestezisi altında sol testisleri alındı ve hemen hassas terazide testisler tartılarak ağırlıkları kaydedildi (83). Daha sonra herbir testis iki eşit parçaya bölünerek Bouin fiksatifine atıldı (7,72,73). Fiksasyon işlemi bittikten sonra dokular takibe alındı ve parafine gömme işlemi yapıldı. Elde edilen bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler herbir lam üzerine üçer kesit gelecek şekilde lamlar üzerine alındı. Lamlar kesit sırasına göre numaralandırıldı. Herbir bloktan bu şekilde hazırlanan 30 lam elde edildi. Tek numaralı lamlar Hematoksilin-Eozin ile çift numaralı lamlar Alsiyan mavisi/Safranin (AB/S) ile boyandı.

Hematoksilin ve eozin ile boyanan preparatların histopatolojik incelemesinde beş kriter dikkate alındı ve aşağıdaki şekilde skorlandı:

- a) Seminifer tübüllerde hasar varsa (1); yoksa (0)
- b) Leydig hücresi sayısında azalma varsa (1); yoksa (0)

- c) Mononükleer hücre artışı varsa (1); yoksa (0)
- d) Kan damarlarında konjesyon varsa (1); yoksa (0)
- e) İnterstisyel alanda ödem varsa (1); yoksa (0) puan verildi.

Mast hücreleri 40X objektif ile binoküler mikroskopumuzun bir okülerine takılan sayım kamerası yardımıyla (83), 1 mm²'ye düşen kırmızı veya mavi boyanan mast hücre sayıları belirlendi (2,76). Sayımlar, testisin tunika albugineası altındaki bağ dokusunda yapıldı.

Preparatlar incelendikten sonra fotomikroskop ile mikrofotograflar çekildi.

3.5. İSTATİSTİK

Testis Ağırlık İndeksi (TAİ): Testis ağırlığının hayvanın vücut ağırlığına oranlanmasıyla elde edildi ve TAİ gruplar arasında tek yönlü varyans analizi ile test edildi. Daha sonra hangi grupların birbirinden farklı oldukları Tukey HSD testi ile karşılaştırıldı. Histolojik Toplam Hasar Skoru (HTHS): Gruplar arasındaki HTHS'ları Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı.

Ortalama Mast Hücresi Sayısı (OMHS): Mavi, kırmızı, ve toplam (mavi+kırmızı) mast hücre sayıları gruplar arasında Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı.

Bütün istatistikler, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda SPSS-10.0 istatistik veri analiz programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

Bulgular, histopatolojik bulgular, mast hücrelerinin karşılaştırılması ve testis ağırlık indeksi olmak üzere üç ana grupta değerlendirildi.

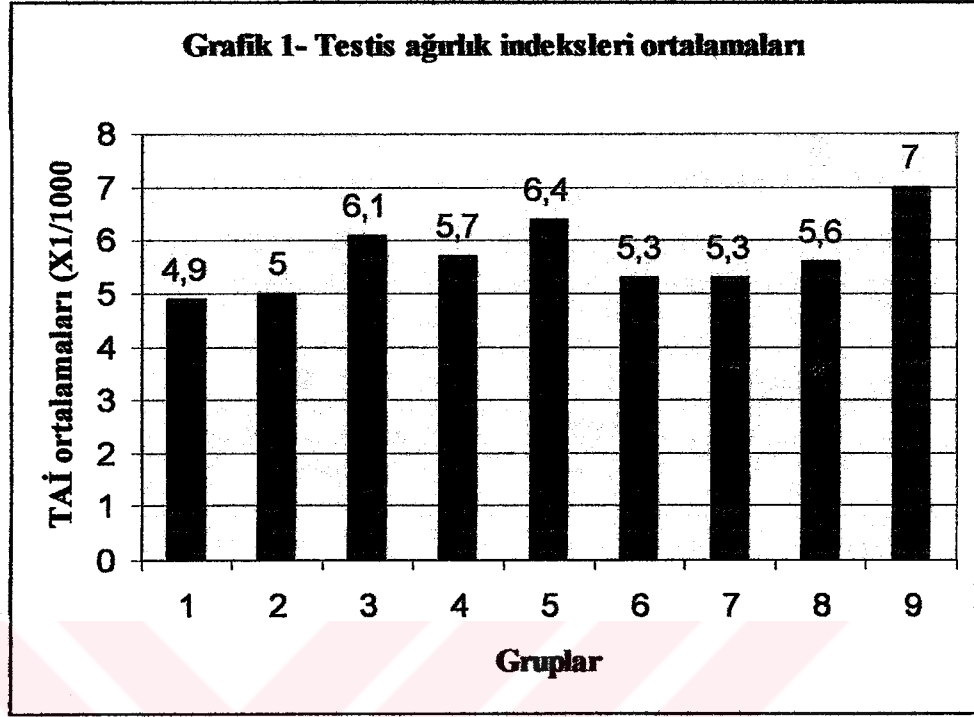
4.1. TESTİS AĞIRLIK İNDEKSİ

Tek yönlü varyans analizi kullanılarak yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında önemli farklar görüldü ($F=10,783$ $P=0.00$). Daha sonra Tukey testi ile gruplar birbirleri arasında karşılaştırıldı. Gruplara göre ortalama testis ağırlık indeksleri grafik 1’de, gruplara göre TAI’lerinin istatistiksel p değerleri de tablo 2’de görülmektedir.

Sadece EDS verilen 1. grup, tüm gruplar içinde en düşük TAI’ne sahipti. Yine sadece EDS verilen 2. grupta da ikinci en düşük TAI görüldü. En yüksek TAI, sadece yüksek doz E vitamini verilen 9. grupta görülürken, 3. ve 5. gruplarda (EDS ile birlikte düşük ve yüksek doz E vitamini verilen) da yüksek TAI ortalamaları gözlemlendi.

1. grubun TAI, EDS ile birlikte E vitamini verilen 3., 5. ve sadece yüksek doz E vitamini verilen gruplardan istatistiksel olarak önemli derecede düşüktü. Aynı şekilde, sadece EDS verilen 2. grubun TAI, E vitamini verilen 5. ve 9. gruplardan önemli derecede düşüktü. Yüksek doz E vitamini verilen 9. grubun TAI, 4, 6, 7 ve 8. gruplara göre önemli derecede yüksekti.

EDS ile birlikte yüksek doz E vitamini verilen 5. grubun TAI, 6. ve 7. gruplardan önemli derecede yüksekti.



Tablo 2- Gruplara göre TAİ'lerinin istatistiksel karşılaştırılması .

Gruplar	2	3	4	5	6	7	8	9
1	P=1,000	P=0,003	P=0,133	P=0,000	P=0,889	P=0,889	P=0,331	P=0,000
2		P=0,011	P=0,331	P=0,001	P=0,989	P=0,989	P=0,629	P=0,000
3			P=0,889	P=0,989	P=0,133	P=0,133	P=0,629	P=0,133
4				P=0,331	P=0,889	P=0,889	P=1,000	P=0,003
5					P=0,011	P=0,011	P=0,133	P=0,629
6						P=1,000	P=0,989	P=0,000
7							P=0,989	P=0,000
8								P=0,001

4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

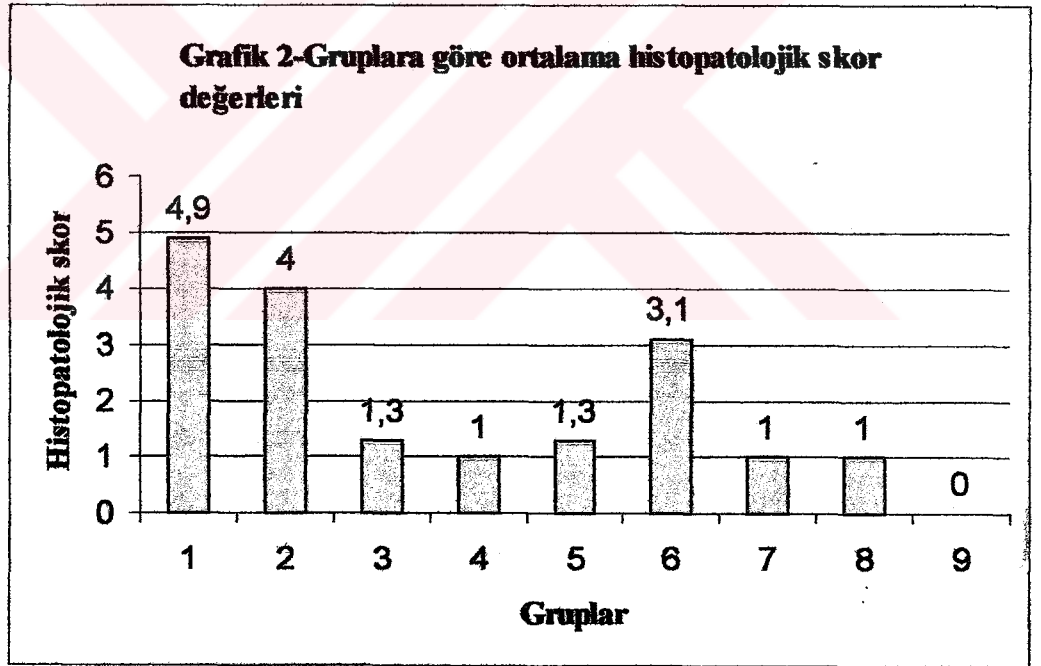
Hematoksilin-eozin ile boyanan preparatların incelenmesi sonucunda elde edilen toplam hasar skoru ortalamalarının gruplara göre dağılımı grafik 2'de

görülmektedir. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında önemli fark saptandı ($X^2=52.745$, $p=0.000$).

Tüm grupların toplam hasar skoru ortalamalarına bakıldığında en yüksek değerin sadece EDS verilen 1. ve 2. gruplarda olduğu, en düşük hasar skorunun ise 9., 4., 7. ve 8. gruplarda bulunduğu gözlemlendi.

Üç günlük gruplar kendi aralarında kıyaslandığında EDS ile birlikte verilen gerek düşük ve gerekse yüksek dozlardaki E vitamininin doku hasarını azalttığı gözlemlendi.

Yedi günlük gruplar karşılaştırıldığında ise EDS ile birlikte verilen düşük doz E vitamininin doku hasarını azalttığı ancak EDS ile birlikte yüksek doz E vitamini verildiğinde doku hasarının yeterince azalmadığı görüldü.



1. gruba ait preparatların histopatolojik incelemesi sonucunda Leydig hücrelerinin azalmaya başladığı, seminifer tübüllerin bozulmakta olduğu, makrofajların interstisyel alanda görüldüğü, interstisyel alandaki kan damarlarının konjesyone durumda ve interstisyel alanın ödemli bir görünüme sahip olduğu görüldü (Şekil 1-2).

2. gruba ait hayvanların preparatlarında saptanan histopatolojik bulgular, 1. gruptaki gibiydi (Şekil 3). Ancak, interstisyel alanda makrofajların oldukça azaldığı görüldü.

3. grupta, Leydig hücrelerine ilk iki gruba göre daha çok sayıda rastlanırken (Şekil 4), kan damarı konjesyonunun devam ettiği (Şekil 5), fakat ödemin ve makrofajların kaybolduğu ve seminifer tübüllerin daha sağlam olduğu görüldü.

4. gruba ait hayvanların bazılarının preparatlarında interstisyel alanda görülen konjesyon ve ödem dışında önemli bir histopatolojik sonuç rastlanmadı (Şekil 6).

5. gruba ait hayvanların bazılarında Leydig hücrelerinde azalmanın devam ettiği ve sadece birkaçında bozuk seminifer tübüllerin bulunduğu, genellikle seminifer tübüllerin normal görünümde olduğu gözlemlendi (Şekil 7). Makrofaj, konjesyon ve ödeme nadir olarak rastlandı.

6. grubun preparatlarında Leydig hücrelerinde azalma, seminifer tübüllerde bozulma ve makrofajlarda artış belirgindi (Şekil 8). Ancak, konjesyon ve ödem nadir olarak görüldü.

7. gruptaki hayvanların preparatlarında ödem dışında önemli bir histopatolojik bozukluk görülmedi. Testis histolojisi genel olarak normaldi (Şekil 9).

8. gruptaki hayvanların preparatlarında gözlenen bulgular, 7. gruptaki hayvanların preparatlarında gözlenen bulgularla aynıydı (Şekil 10).

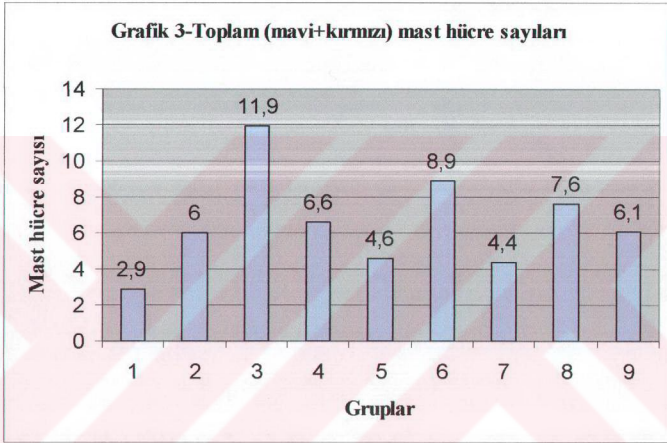
9. gruba ait preparatlarda herhangi bir histopatolojik görüntü saptanmadı ve testis dokuları normal olarak değerlendirildi (Şekil 11 ve 12).

4.3. MAST HÜCRESİ BULGULARI

4.3.1. Toplam Mast Hücreleri

Gruplara göre mm² başına düşen ortalama toplam mast hücre sayıları grafik 3’de görülmektedir. Buna göre, yapılan istatistiksel karşılaştırmada toplam mast hücre sayısı ortalamaları bakımından gruplar arasında önemli bir fark saptanmadı ($X^2=14,165$, $p=0,078$). En yüksek mast hücre sayısı, EDS ile birlikte düşük doz E

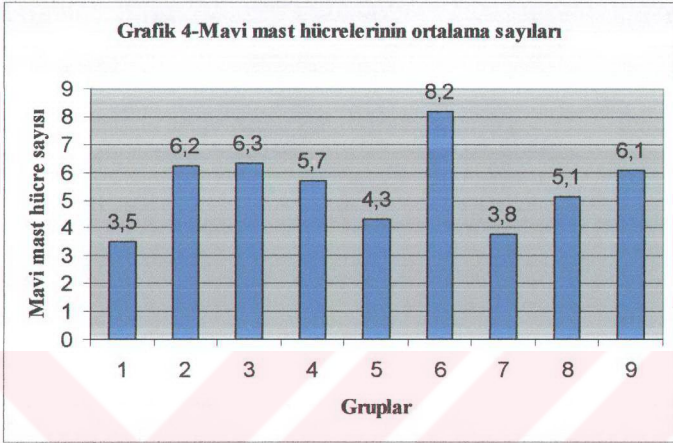
vitamini verilen 3. grupta, en düşük mast hücre sayısı ise sadece EDS verilen 1. grupta görüldü. 3 günlük gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, en fazla mast hücrelerinin EDS ile birlikte düşük doz E vitamini verilen grupta olduğu gözlenmektedir. 7 günlük grupların karşılaştırılmasında ise en fazla mast hücrelerinin EDS ile birlikte yüksek doz E vitamini verilen 6. grupta olduğu saptandı.



4.3.2. Mavi Mast Hücreleri

Alsiyan mavisi/safranin yöntemi ile mavi boyanan mast hücrelerinin mm² başına düşen ortalama mast hücre sayılarının gruplara göre dağılımı grafik 4’de görülmektedir. Yapılan analize göre, gruplar arasında istatistiksel bakımdan önemli bir fark saptanmadı ($X^2=6,648$, $p=0,575$).

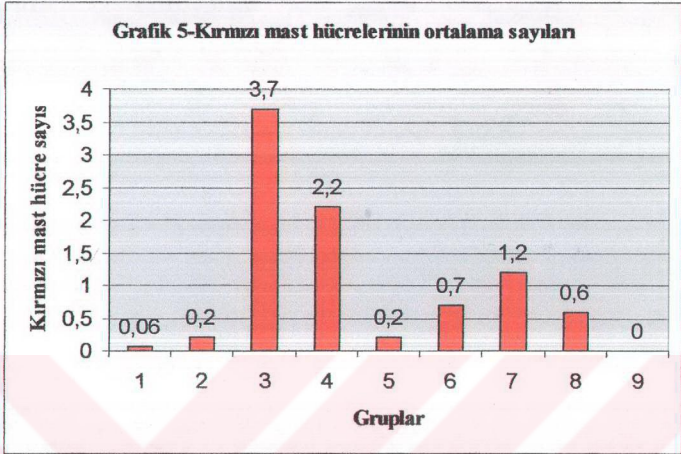
En yüksek ortalama mavi mast hücre sayısı 6. grupta görülürken, en düşük sayıya 1. grupta rastlandı. 3 günlük gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, en fazla mavi mast hücrelerinin EDS ile birlikte düşük doz E vitamini verilen 3. grupta olduğu görüldü. 7 günlük gruplar karşılaştırıldığında ise en fazla mast hücrelerine EDS ile birlikte yüksek doz E vitamini verilen 6. grupta rastlandı.



4.3.3. Kırmızı Mast Hücreleri

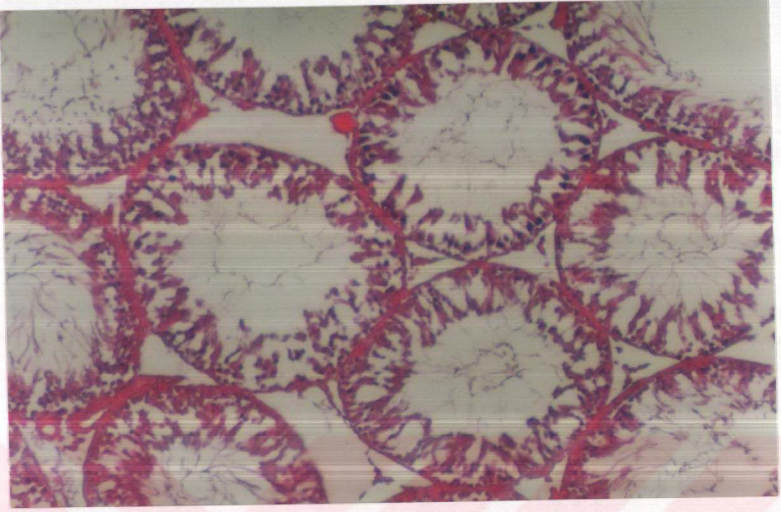
Kırmızı mast hücrelerinin gruplara göre ortalama sayıları grafik 5’de görülmektedir. Yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında önemli fark olduğu saptandı ($X^2=31.817$, $p=0.000$).

Tüm gruplar karşılaştırıldığında, en fazla mast hücrelerinin 3. grupta, en düşük mast hücre sayısının ise 9., 2. ve 5. gruplarda olduğu görülmektedir. 3 günlük gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında, yine en yüksek mast hücre sayısının EDS ile birlikte düşük doz E vitamini verilen 3. grupta olduğu; 7 günlük grupların karşılaştırmasında ise en fazla mast hücrelerinin EDS ile birlikte düşük doz E vitamini verilen 4. grupta yer aldığı gözlenmektedir.

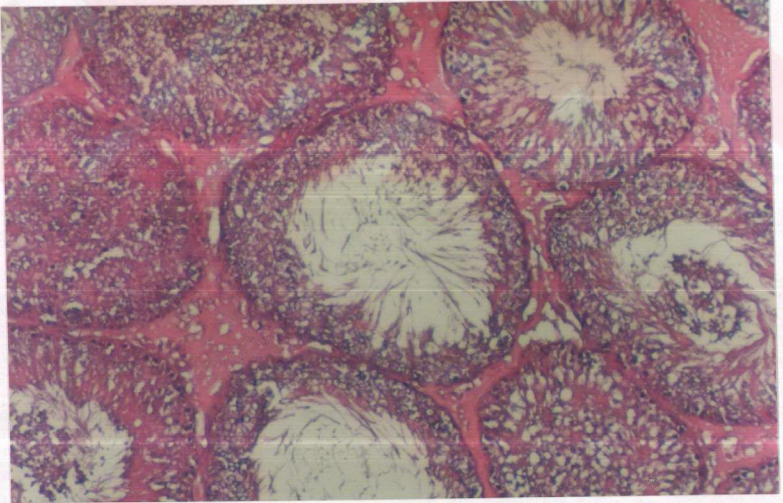


Mast hücreleri sayıları bakımından değerlendirildiğinde genel olarak EDS ile birlikte verilen düşük doz E vitamininin mast hücre sayısını diğer gruplara göre artırdığı söylenebilir.

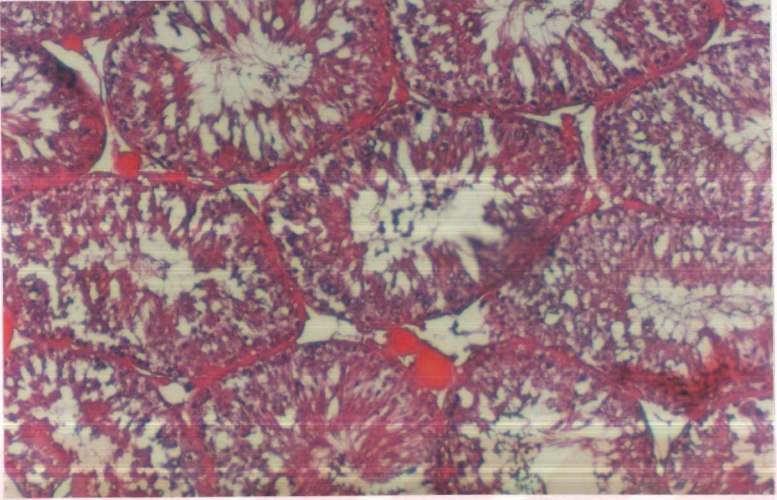
Mast hücrelerinin mavi veya kırmızı boyanmaları açısından gruplar incelendiğinde bütün gruplarda mavi boyanan mast hücrelerinin egemen olduğu (Şekil 13-18), ancak düşük doz E vitamininin gerek tek başına, gerekse EDS ile birlikte verildiği 3., 4. ve 7. gruplarda kırmızı mast hücrelerinin diğer gruplara göre daha yoğun olarak görüldüğü saptandı (Şekil 19-21).



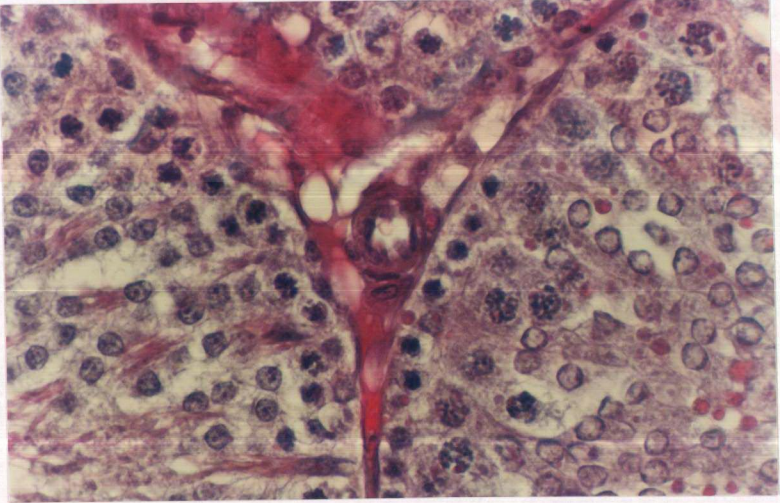
Resim 1: Tek doz EDS verildikten sonraki üçüncü günde seminifer tübüllerde şiddetli bozulmalar ve interstisyel alanda Leydig hücrelerinin azalması. H&E, Orjinal büyültmeX33



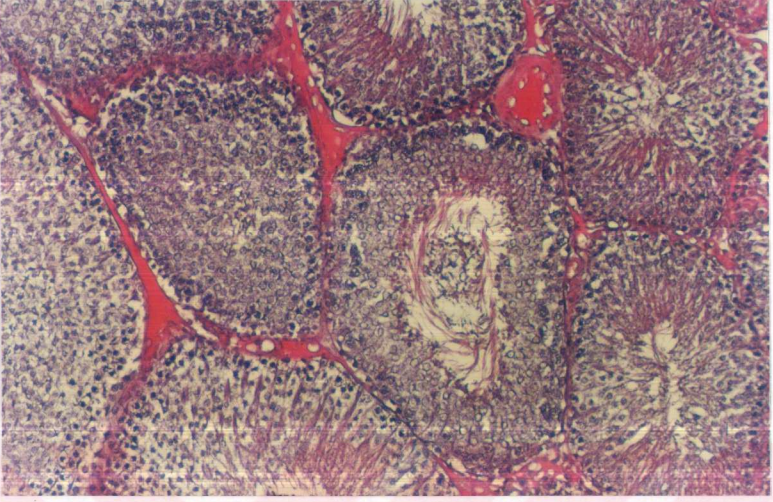
Resim 2: Tek doz EDS verildikten sonraki üçüncü günde seminifer tübüllerde bozulma ve interstisyel alanda yaygın ödem. H&E, Orjinal büyültmeX33



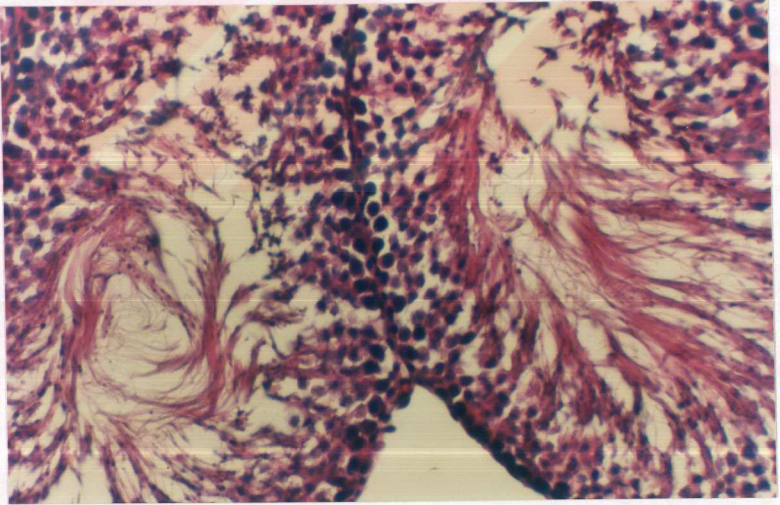
Resim 3: Tek doz EDS verildikten sonraki yedinci günde seminifer tübüllerde bozulmalar, interstisyel alanda Leydig hücrelerinin azalması ve konjesyon. H&E, Orjinal büyültmeX33



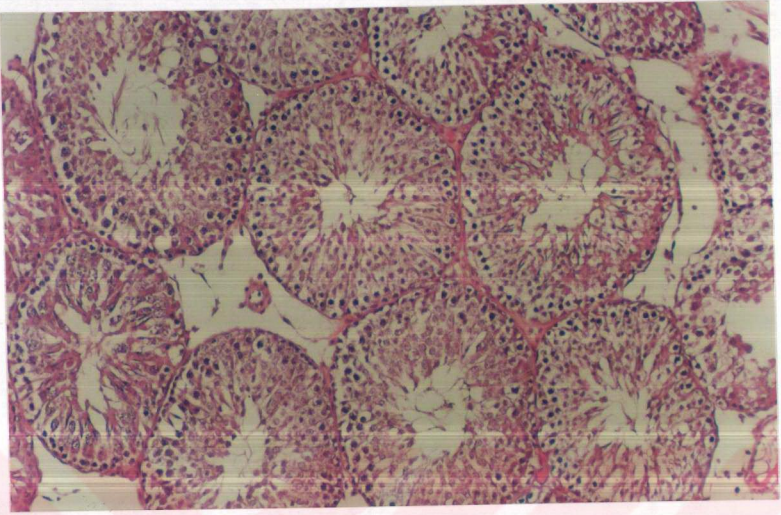
Resim 4: Tek doz EDS ve üç gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta az hasarlı seminifer tübüller ve normal interstisyel alan. H&E, Orjinal büyültmeX132



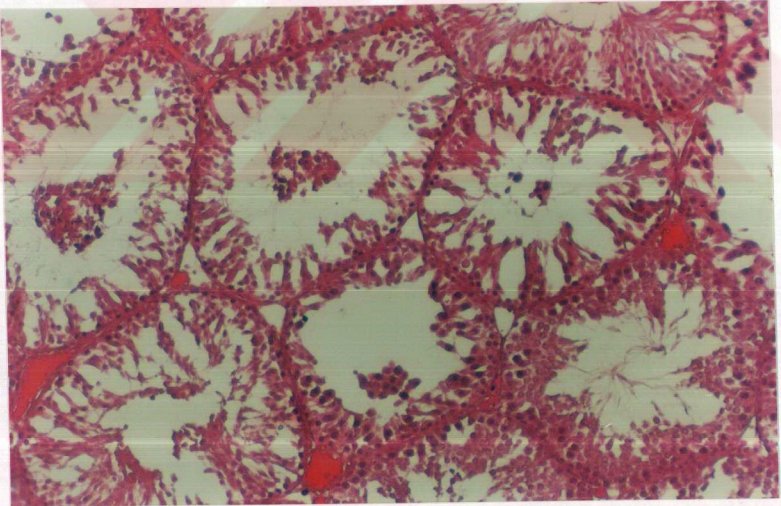
Resim 5:Tek doz EDS ve üç gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta az hasarlı seminifer tübüller ve kan damarlarında konjesyon. H&E, Orjinal büyültmeX33



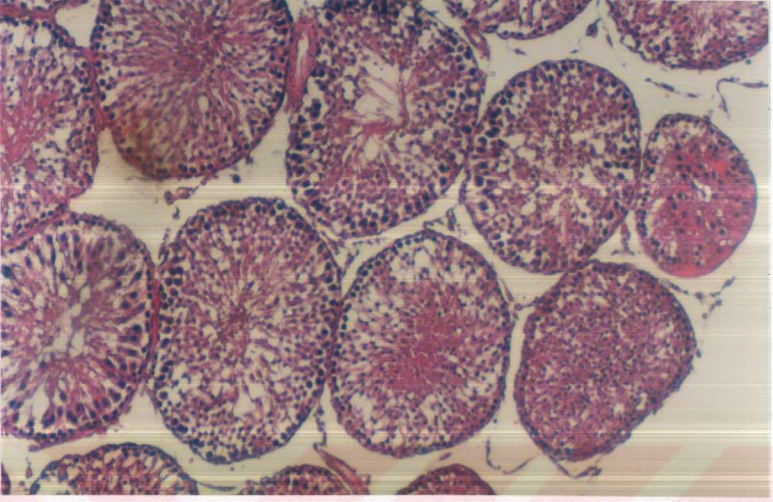
Resim 6:Tek doz EDS ve yedi gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta seminifer tübüllerde spermatogenezin devam ettiği görülmektedir. H&E, Orjinal büyültmeX66



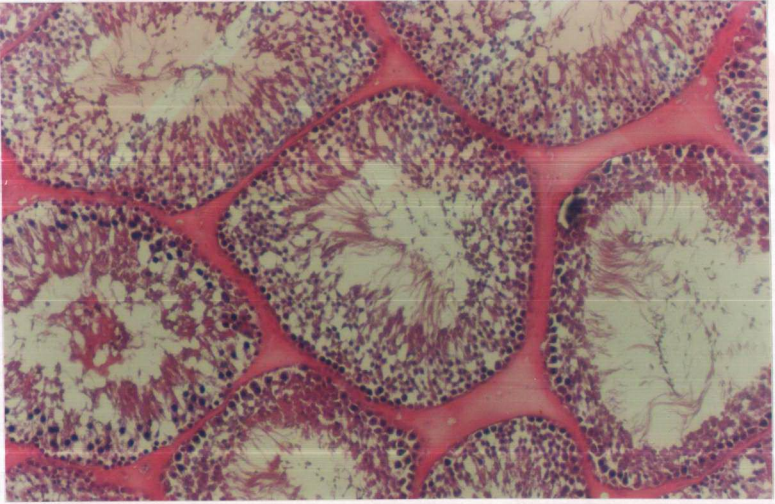
Resim 7: Tek doz EDS ve üç gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta seminifer tübüllerin ve interstisyel alanın normale yakın görüntüsü. H&E, Orjinal büyültme X33



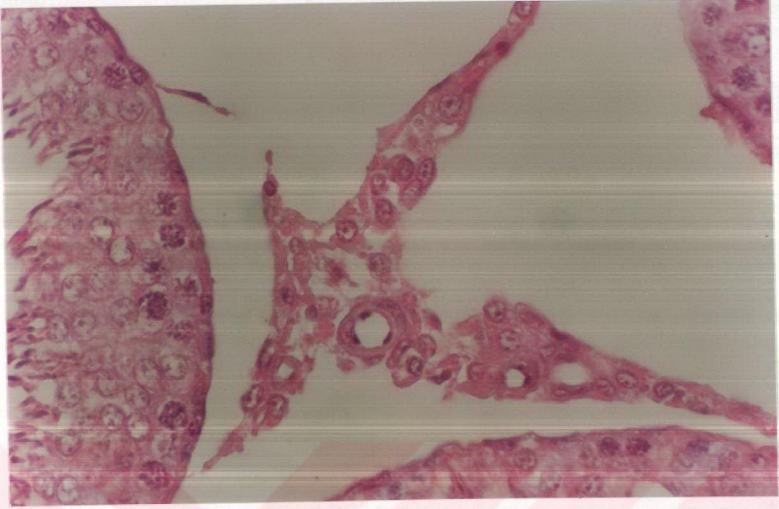
Resim 8: Tek doz EDS ve yedi gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta seminifer tübüllerde bozulma ve Leydig hücrelerinde azalma. H&E, Orjinal büyültme X33



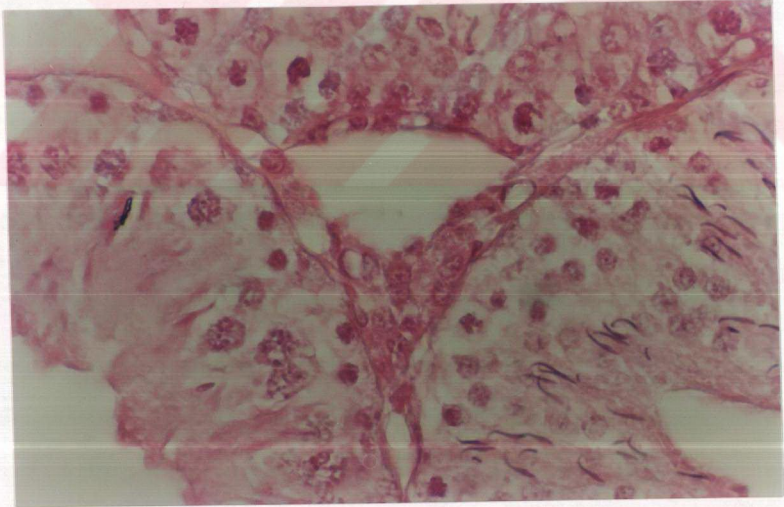
Resim 9:Üç gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta normal testis dokusu. H&E, Orjinal büyültmeX33



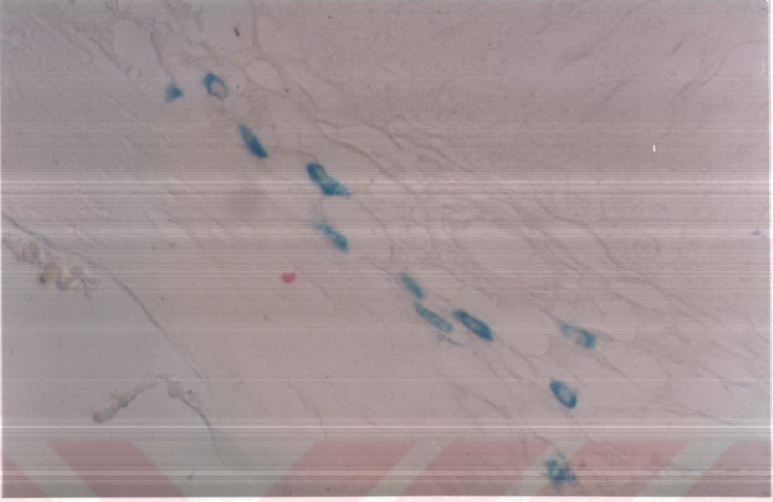
Resim 10:Yedi gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta normal görüntüye sahip seminifer tübüller ve interstisyel alanda ödem. H&E, Orjinal büyültmeX33



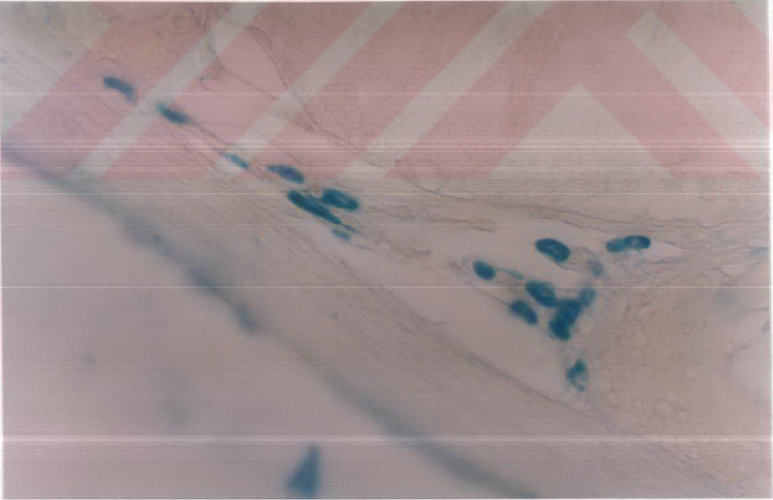
Resim 11:Yedi gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta normal interstisyel alandaki Leydig hücreleri. H&E, Orjinal büyültmeX132



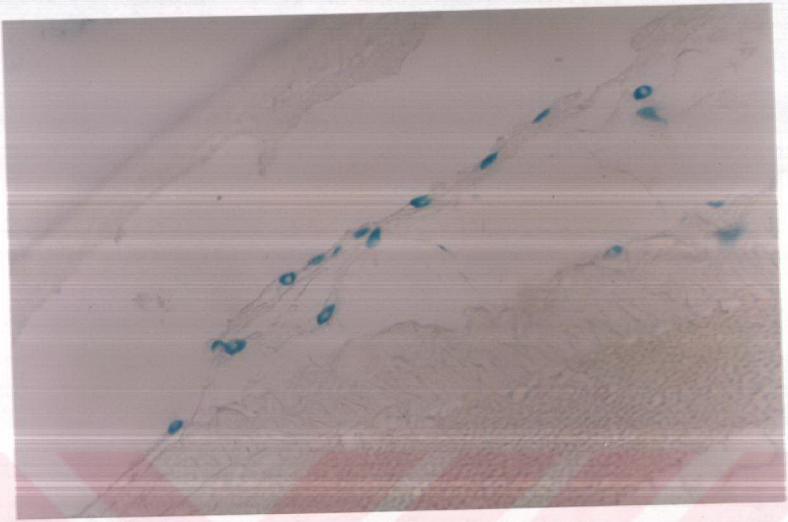
Resim 12:Yedi gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta normal seminifer tübüller ve interstisyel alan. H&E, Orjinal büyültmeX132:



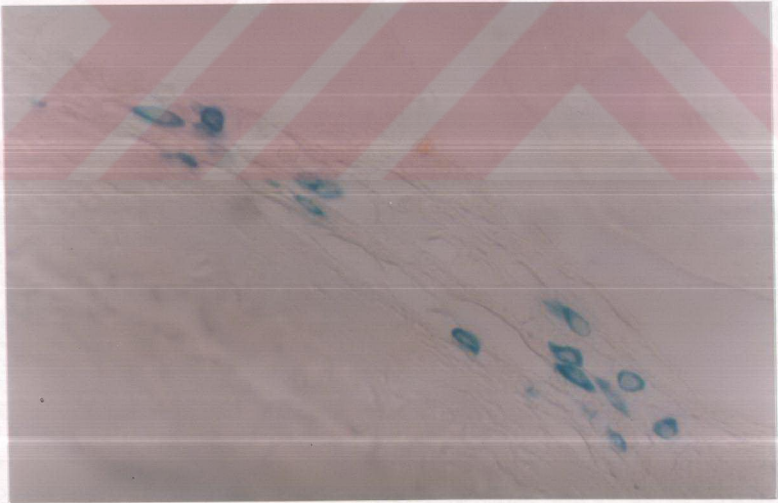
Resim 13: Tek doz EDS verildikten sonraki üçüncü günde Tunika albuginea altındaki mavi boyanan mast hücreleri. AB/S, orjinal büyültmeX132



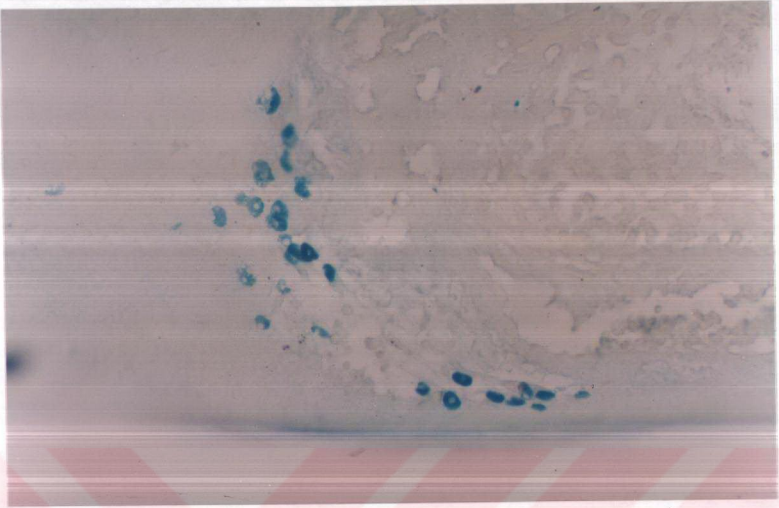
Resim 14: Tek doz EDS verildikten sonraki yedinci günde Tunika albuginea altındaki mavi boyanan mast hücreleri. AB/S, orjinal büyültmeX66



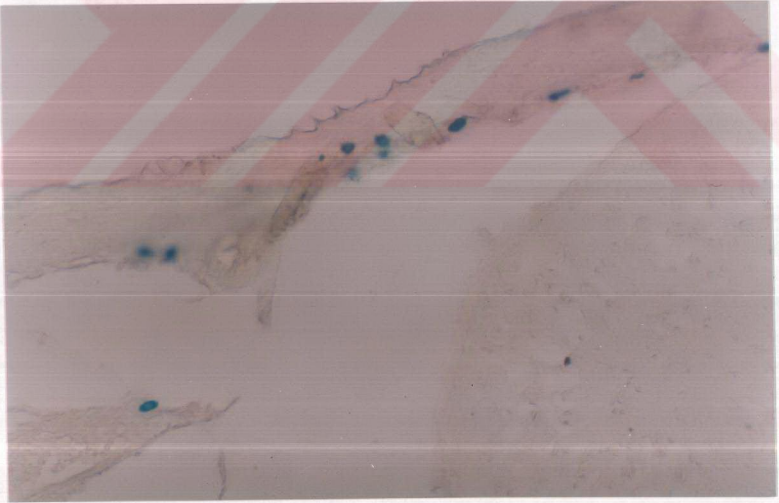
Resim 15: Tek doz EDS ve üç gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta mavi boyanan mast hücreleri. AB/S, orjinal büyültmeX66



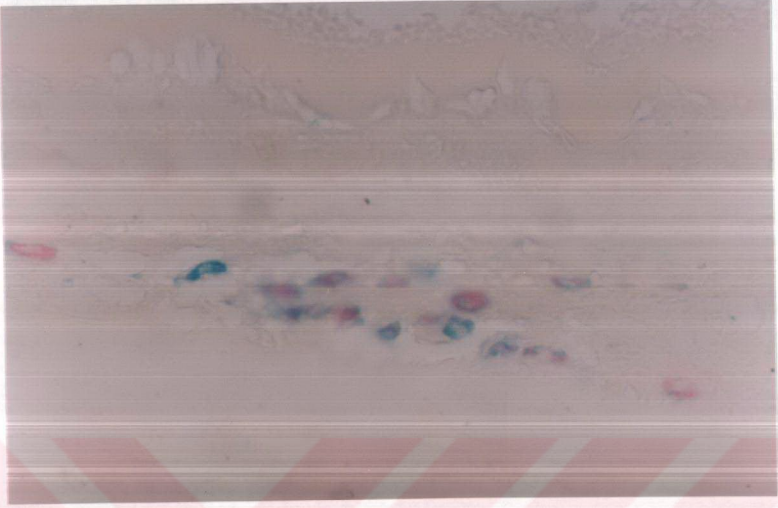
Resim 16: Tek doz EDS ve yedi gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta mavi boyanan mast hücreleri. AB/S, orjinal büyültmeX132



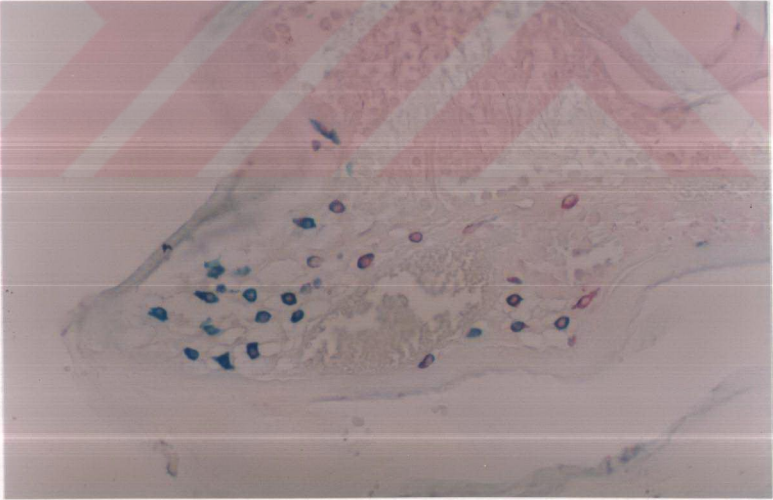
Resim 17:Yedi gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta mavi boyanan mast hücreleri. AB/S, orjinal büyültmeX66



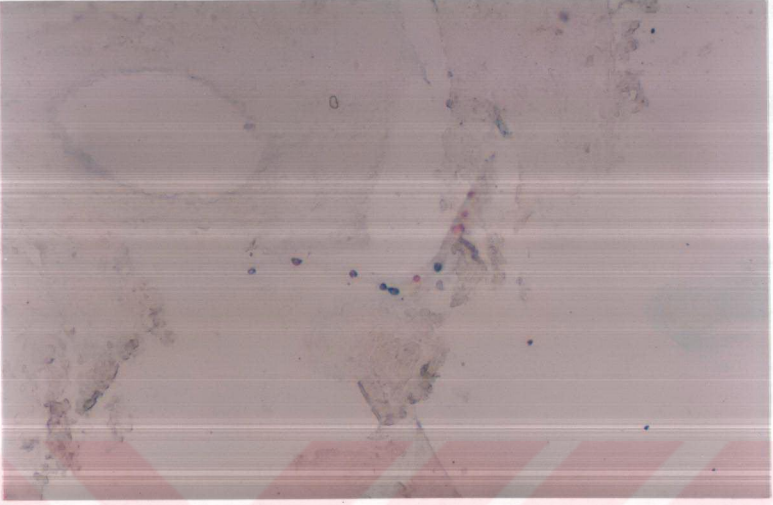
Resim 18:Yedi gün süreyle 150mg E vitamini verilen grupta mavi boyanan mast hücreleri. AB/S, orjinal büyültmeX66



Resim 19: Tek doz EDS ve üç gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta mavi ve kırmızı boyanan mast hücrelerinin birlikte görünümü. AB/S, orjinal büyültmeX132



Resim 20: Tek doz EDS ve yedi gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta mavi ve kırmızı boyanan mast hücrelerinin birlikte görünümü. AB/S, orjinal büyültmeX66



Resim 21:Üç gün süreyle 25mg E vitamini verilen grupta mavi ve kırmızı boyanan mast hücrelerinin birlikte görünümü. AB/S, orjinal büyültmeX33

5. TARTIŞMA

5.1. TAI

5.1.1. EDS'nin Etkisi

EDS'nin testis üzerindeki sitotoksik etkisi sonucunda, Leydig hücreleri ortadan kalkmakta, dolayısıyla testosteron üretimi durmakta ve böylece germ hücreleri dökülmektedir. EDS uygulamasından sonra testis ağırlığında azalma olduğu da bilinmektedir ve birçok çalışmayla ortaya konulmuştur (9,13,15,23,35,66,69,83). Chandolia ve arkadaşları, steroid yapıda olmayan anti-androjen olan casodex ile yaptıkları çalışmada, testis ağırlığının kontrol grubuna göre azalmadığını, ancak EDS uygulaması yapılan grupta belirgin bir azalmanın olduğunu rapor etmişlerdir (13). Bir başka çalışmada sadece EDS uygulaması yapılan sıçanlarda, uygulamadan sonraki 3. ve 7. günde testis ağırlığı ölçülmüş; 3. günde testis ağırlığında belirgin bir değişim görülmezken, 7. günde belirgin bir azalma saptanmış ve testis ağırlığı, hiçbir uygulama yapılmamış olan kontrol grubuna göre, uygulamadan sonraki 28. güne kadar düşük kalmıştır (9). Bizim çalışmamızda TAI sadece EDS uygulanan gruplarda en düşük değeri almasına karşın; uygulamadan sonraki 3. ve 7.günler arasında TAI bakımından belirgin bir fark görülmedi. İki çalışma arasındaki bu farklılığın nedeni, bizim TAI değerini testis ağırlığı/vücut ağırlığı formülüyle elde etmemizden veya çalışmamızda hiçbir işlem yapılmamış kontrol grubunun yer almamasından kaynaklanıyor olabilir.

Gaytan ve arkadaşları, testise enjekte edildiğinde makrofajları ortadan kaldıran Cl₂MDP-İp'nin EDS uygulamasından 4 veya 10 gün sonra enjekte edildiğinde testis ağırlığının oldukça düştüğünü (ortalama %30), 16 veya 22 gün sonra yaptıklarında ise ağırlıktaki azalmanın daha düşük (ortalama %11) olduğunu belirtmiştir (23). EDS uygulamasının sonucunda testosteronun işlevini gösteremeyecek seviyeye kadar azalması, germ hücrelerinin dökülmesine neden olmaktadır (66). Böylelikle, EDS veya benzeri sitotoksik ajanların uygulamasından sonra TAI değerinin düşmesinin büyük orandaki hücre kaybıyla ilişkili olabileceği söylenebilir.

EDS verilmesine bağlı olarak oluşan testis ağırlığındaki azalmayı ortadan kaldırmak amacıyla, çeşitli hormonlar (testosteron, LH, HCG, FSH) kullanılmıştır. Böyle bir çalışmada De Kretser ve arkadaşları, EDS uygulamasının 0. gününden başlayıp 49. güne kadar devam eden deney sürelerinde, uygulama yapılan sıçanlara değişik dozlarda testosteron implantları uygulamışlardır. 22.5 cm testosteron implantı uygulanan grubun testis ağırlığının korunduğunu, ancak 2.5 cm testosteron implantı uygulanan grupta aynı korumanın görülmediğini saptayarak testosteronun doza bağlı bir etkide bulunduğunu göstermiştir (15).

Wang ve arkadaşları, EDS uygulamasından sonra, testis ağırlığıyla beraber interstisyel sıvıda da azalma olduğunu kaydetmiştir. Otrler aynı çalışmada EDS ile birlikte testosteron implantı uygulandığında, testis ağırlığının korunduğunu ancak interstisyel sıvıda artış yerine azalma olduğunu bildirmiş ve sadece EDS uygulaması yapılan sıçanlarda, uygulamadan 21 gün sonra interstisyel sıvı hacminin yüksek olduğunu, bu durumun 41. güne kadar devam ettiğini saptamışlardır (83). İnterstisyel sıvı ile ilişkili olabileceğini düşündüğümüz konjesyon ve ödem bulgularımız, gruplar arasında anlamlı bir değişim göstermemiştir.

Buna karşın Sharpe ve arkadaşları yaptıkları derlemede, EDS+testosteron uygulaması yapılan sıçanlarda interstisyel sıvı hacminin değişmediğini, hatta uygulama yapılmamış olan kontrol gruplarına göre artış gösterdiğini bildirerek; EDS ile azalan interstisyel sıvının uygulamadan sonraki 6. güne kadar %50'den fazla azalma gösterdiğini, düşük hacmin 9. güne kadar devam ettiğini, 12. gün civarında iyileşmenin başladığını ve 21. günde interstisyel sıvı hacminin normal veya fazla olduğunu belirtmişlerdir (66).

Jackson ve Jackson, sıçanlara EDS uygulamasından sonra testis ağırlığını korumak için HCG ve LH hormonlarını kullanmıştır. Alınan sonuçlar, hem testisin hem de aksesuar organların ağırlığındaki azalmanın hormon uygulamasıyla durduğunu göstermiştir. Organ ağırlığlarındaki en iyi koruma 25 I.U. HCG uygulaması ile sağlanmıştır. 9 günlük testosteron propionat+HCG uygulamasının 5. gününde EDS enjeksiyonu yapıldığında, testisin ve aksesuar organların ağırlığlarının normal sınırlarda olduğu; sağlaştırılmış sığır LH uygulaması ile de testis ağırlığının korunduğu bu çalışmada rapor edilmiştir (35).

Başka bir çalışmada ise, hipofizektomi yapılan sıçanlarda testis ağırlığının azaldığı, hipofizektomi+EDS uygulamasının ise testis ağırlığını daha da belirgin bir şekilde düşürdüğü görülmüştür. Hipofizektomi+EDS uygulanan sıçanlara FSH ve testosteronun birlikte verilmesi veya bunların yanına GH (büyüme hormonu) eklenmesi sonrasında testis ağırlığı ölçüldüğünde, sadece hipofizektomi+EDS uygulaması yapılan gruba göre testis ağırlığının belirgin bir şekilde korunduğu saptanmıştır (69). Bütün bu çalışmalardan anlaşıldığı üzere, çeşitli hormonların testis ağırlığı üzerindeki koruyucu etkileri, germ hücreleri üzerindeki etkilerine bağlıdır.

5.1.2. E Vitamininin Etkisi

Kronik alkol uygulaması yapılan bir çalışmada verilen E vitamininin, etanolün testiste neden olduğu hasarları (testosteron seviyesinde azalma, testis dokusunda peroksidatif hasarlar, seminifer tübüllerde dejeneratif değişimler vb) büyük ölçüde engellediği görülmüştür. Ancak, bu çalışmada E vitamini her fareye haftada bir kez 5 mg ve intramusküler yolla verilmiştir. Araştırmacılar, E vitaminin testis ağırlığının azalmasını engellediğini rapor etmişlerdir (88).

EDS dışında gonadotoksik etkisi bilinen pek çok maddeye karşı E vitamininin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Plastik sanayisinde kullanılan di-(2-etilheksil) fitalatın (DEHP) gonadotoksitesine karşı C ve E vitamininin koruyucu etkisinin araştırıldığı bir çalışmada testislerde belirgin bir koruma gözlenmiştir (33). Sekonder fungal metabolit olan aflatoksinler de gonadotoksik maddelerdir. Yapılan bir çalışmada aflatoksinin testis ağırlığını düşürdüğü, seminifer tübüllerde dejeneratif değişimlere neden olduğu ve E vitamini verilmesiyle testis ağırlığının korunarak sözkonusu hasarların iyileştiği bildirilmiştir (81). Bu çalışmalarda E vitamininin koruyucu etkisinin antioksidan rolünden kaynaklandığı öne sürülmüştür. Biz de çalışmamızda, E vitamininin EDS'nin hasar verici etkisine karşı TAI değerini koruduğunu ve TAI değerinin histopatolojik bulgularımızla orantılı olduğunu saptadık. Ancak, biz E vitaminin TAI üzerindeki koruyucu etkisinin sadece antioksidan rolünden kaynaklanmadığını, bunun yanısıra başka işlevlerinin de olduğunu düşünmekteyiz.

E vitamininin, testis üzerindeki olumlu etkileri öteden beri bilinmektedir (1,77). E vitamininin Leydig hücreğine olan etkisi, Leydig hücrelerinin in vitro incelenmesiyle ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışmaya göre E vitamini, Leydig hücrelerinin HCG hormonuna olan duyarlılığını artırmaktadır (46). Bu olasılıkla iki şekilde gerçekleşmektedir: Birincisi, plazmadaki yüksek LH/HCG düzeyi nedeniyle erişkin Leydig hücreleri özgül değişimlere girmektedir; veya ikincisi, yeni Leydig hücresi topluluğu oluşturmak üzere Leydig hücresi öncüllerinin farklılaşması nedeniyle HCG koruyucu etkisini göstermektedir (73). Böylece, EDS'nin Leydig hücrelerine olan sitotoksik etkisi bir derece engellenecek, testosteron düzeyi bir miktar korunacak ve germ hücresi kaybı daha az olacağından testis ağırlığı korunabilecektir. E vitamininin bir diğer etkisi, Leydig hücrelerinin in vitro yaşam süresini uzatması ve Sertoli hücrelerinin büyüme hızını artırmasıdır (46). Leydig hücrelerinin daha dayanıklı olması ve Sertoli hücrelerinin daha hızlı büyümesi, germ hücrelerini koruyacak, hatta belki de sayısının artmasına neden olabilecektir. Bizim çalışmamızda yüksek doz E vitamini uygulamasının, en yüksek TAI değerini vermesi bu görüşü desteklemektedir.

Sonuç olarak E vitamini, bilinen antioksidan rolünün yanı sıra, bahsedilen işlevleri ile de TAI değerini koruyabilir.

5.2. HİSTOPATOLOJİ

5.2.1. EDS'nin Testis Histolojisine Etkisi

EDS, testis üzerindeki sitotoksik etkisini, Leydig hücreleri üzerinde gösterir ve kısa zaman içinde bu hücrelerin ölümüne neden olur. Yapılan çalışmalar, Leydig hücrelerinin apoptozis yoluyla öldüğünü göstermiştir (7,52). EDS uygulandıktan 12 saat sonra Leydig hücrelerinin çekirdeklerinde değişiklikler belirir (24). Çekirdek kromatininde kümelenme, granülsüz endoplazma retikulumunda vezikül oluşumu ve Golgi kompleksinde fokal hipertrofi gözlenir. Bu değişiklikleri çekirdek ve sitoplazmada fragmantasyona neden olacak dejeneratif olaylar takip eder. EDS'nin apoptozise neden olan etki mekanizması günümüzde tam olarak bilinmemektedir, ancak bu konu üzerine bazı yaklaşımlar bulunmaktadır. Bunlardan ilki, EDS'nin Leydig

hücrelerinin glutatyonla kovalent bağ kurarak bağlandığını, böylece hücrel glutatyon kaybı olacağını ve bu durum sonucunda diğer hücrelerde de gözlemlendiği gibi Leydig hücrelerinde apoptozisin tetiklendiği düşünülmektedir. Başka deneyler ise, EDS'nin apoptik reaksiyonu, DNA ve proteinleri alkileştirerek harekete geçirdiğini düşündürmektedir (52). Leydig hücrelerinin EDS'ye olan duyarlılığı, bu hücrelerin gelişimsel aşamalarıyla ilgilidir. Gelişimini tamamlamamış olan Leydig hücreleri, EDS'nin sitotoksik etkisine duyarsızdır (73).

EDS uygulamasından 24 saat sonra Leydig hücreleri ölüm sinyallerini vermeye başlar (24) ve 3 gün içinde interstisyumdan yok olurlar (74). EDS uygulamasından sonraki 4.-10. gün içinde testis interstisyumu Leydig hücresinden yoksundur. Bu durum geçici bir infertiliteye neden olur, fakat uygulamadan 14-16 gün sonra yeni Leydig hücreleri bulunur (23,72). Uygulamadan sonraki 14. günde testosteron seviyesinde hafif bir artış saptanırken, in vitro koşullardaki Leydig hücrelerinin testosteron sentezinde 16. günden itibaren artış bulunmuştur. Leydig hücreleri en az iki aşamalı bir işlemle rejenere olur. Önce, EDS uygulamasından 2-3 gün sonra mezenkimal fibroblast benzeri hücreler ve endotel hücreleri bölünerek çoğalmaya başlar (23). Bunlarda Leydig hücresi öncüllerine özel işaretleyiciler yoktur, ancak bölünen bu hücrelerden bazılarının Leydig hücresi öncülleri olduğuna dair fikir birliği sağlanmıştır (74). Farklılaşan yeni Leydig hücrelerinin peritübüler hücrelerden köken aldığı, bu hücrelerin çevresindeki interstisyel dokuya geçebilmesi için lamina propriadan ayrıldığına dair veriler vardır (7). İkinci aşamada, uygulamadan sonraki 4. günden başlayıp 14-16. günlere kadar Leydig hücresi öncüllerinin yapısal olarak ayırt edilebilen Leydig hücrelerine farklılaşması gerçekleşir. EDS uygulamasından 16-25 gün sonra, çoğunlukla yeni oluşmuş Leydig hücrelerini içeren ikinci bir çoğalma faaliyeti başlar. Bu süreç içerisinde, 21. günde testosteron seviyesi kontrol düzeyine ulaşır ve Leydig hücresi sayısı belirgin bir şekilde artar. 25. gün ve sonrasında, Leydig hücresinin yapısal ve işlevsel farklılaşması tamamlanmıştır (21,23).

Bizim çalışmamızda sadece 3 ve 7 günlük gruplar yer almaktadır. Tek başına EDS uygulaması yapılan 3 ve 7 günlük gruplarımızda, interstisyumda Leydig hücrelerinin neredeyse tümünden kaybolduğunu gördük. Bu bulgularımız, EDS verilmesinden sonraki 4-10 gün içinde Leydig hücrelerinin interstisyumdan

kaybolduğunu belirten araştırmacıların sonuçlarıyla uyumludur. Yine bizim çalışmamızın sonuçlarına göre EDS+düşük doz E vitamini verilen 3 ve 7 günlük gruplarda ve E vitamininin tek başına verildiği tüm gruplarda Leydig hücrelerinde bir azalma görülmemiştir. Ancak EDS+yüksek doz E vitamini verilen 3 ve 7 günlük grupların ikisinde de Leydig hücrelerinin azaldığını saptadık.

Leydig hücrelerinin EDS tarafından yıkımıyla testiste immünolojik yanıtın ortaya çıkarak makrofajlarla lenfositler arasında etkileşim olduğu bildirilmiştir (7). EDS uygulamasından 3 gün sonra, testisteki bağışıklık hücrelerinin üç aşamalı bir davranış sergileyebileceği belirtilmiştir. Buna göre 3.-10. günlerde makrofaj ve T lenfosit sayısında artış olmakta (inflamasyon fazı), daha sonra makrofaj sayısı azalarak Leydig hücrelerinin yenilenmesi önlenmekte (ortadan kalkma fazı) ve son olarak da olgun Leydig hücrelerinin ortamda yer almasıyla makrofaj sayısının normale döndüğü yenilenme fazı gerçekleşmektedir (83).

Leydig hücresi apoptozisi boyunca, makrofajların toplam hacmi ve sayısında artış olduğu ve makrofaj sayısının, EDS uygulandıktan 24-72 saat sonra iki kat artış gösterdiği bildirilmiştir (7,83). Bizim çalışmamızda, tek başına EDS uygulaması yapılan 3 günlük grupta ve EDS+yüksek doz E vitamini verilen 7 günlük grupta makrofajlarda artış olduğunu gözlerken, diğer gruplarımızda artış olmadığını saptadık. Testisteki makrofajların, Leydig hücresi ölümünden sonra lenfosit benzeri hücrelerin testise akın etmesini, böylece inflamatuvar reaksiyonu engellediği düşünülmektedir (7,24). Testisteki makrofaj sayısının EDS uygulanmasından önceki düzeye dönüşünün, yeni Leydig hücresi topluluğu gelişiminin olduğu zamana denk geldiği (83), bu zamanın EDS uygulamasından sonraki 10. gün olduğu gösterilmiştir (24). Bizim çalışmamızda da, tek başına EDS uygulaması yapılan 7 günlük grupta makrofaj sayısının azaldığı görülmüştür. 10 günlük grubumuz olmadığı için makrofaj sayısının normale döndüğünü göremedik, ancak bu deney grubumuzdaki makrofaj azalmasının Gaytan ve arkadaşlarının bulgularını desteklediğini söyleyebiliriz. Makrofajların azaldığı 3. ve 5. gruplarımız E vitamini verilen gruplar olduğundan ilgili bölümde tartışılacaktır.

EDS uygulamasından kısa zaman sonra Leydig hücrelerinin ölmesiyle testiste testosteron üretiminin durduğu ve uygulamadan 24 saat sonra serum androjen

seviyesinin baskılandığı ve 3-4 gün içinde testosteronun ortadan kalkmasıyla spermatogenezde bozulmaların başladığı bildirilmiştir (7). Yapılan bir çalışmada spermatogenik siklusun VII. evresinin pakiten aşamasındaki spermatositlerde, normal kontrol sıçanlardakinden farklı olarak, yer yer dejenerasyonlar ve seminifer tübülün Sertoli hücresi bariyerinin olduğu bölgelerde vakuoller görülmüştür. Bu dejenerasyon zamanla daha da artarak 5.-6. günlerde yuvarlak ve uzun spermatidleri de kapsar hale gelmiştir. Araştırmacılar spermatogenezdeki en büyük hasarın EDS uygulamasından 21 gün sonra görüldüğünü, spermatogenik siklusun birçok aşamasındaki tübüllerde germ hücrelerinin ya hiç bulunmadığını veya sayılarının oldukça azaldığını ve seminifer epitelde geniş vakoulizasyonlar görüldüğünü saptamışlardır (66). Diğer bir çalışmada, EDS uygulamasından 3 gün sonra seminifer epitelin kalınlığının biraz azalmasına karşın spermatogenezin devam ettiği, bazı spermatogonyumlarda perinükleer vakoulizasyon gözlemlendi; EDS uygulamasından 7 gün sonra ise, bazı tübüllerin epitel kalınlığında azalma, bazılarında epitel dökülmesi ve spermatogonyumlarda vakoulizasyon şeklinde dejenerasyonlar ve bazı tübüllerde de atrofi görüldüğü bildirilmiştir (42). Bizim çalışmamızda da tek başına EDS uygulaması yapılan 3 ve 7 günlük gruplarda seminifer tübüllerde benzer hasarlar görülmüştür.

Tüm bu verilerden anlaşıldığına göre, EDS uygulamasından sonra spermatogenezde görülen hasar, testosteron üretiminin durmasına bağlı olarak gelişmektedir. Yine de, testosteron kadar etkili olmasa da, Leydig hücrelerinin salgıladığı diğer parakrin faktörlerin (oksitosin vb) de etkisinin olabileceği ileri sürülmüştür (66). Ancak bazı araştırmacılar da EDS'nin Sertoli ve germ hücrelerini doğrudan etkileyebileceğini düşünmektedir (13).

5.2.2. E Vitamininin Etkisi

E vitamininin Leydig hücreleri üzerine çeşitli etkileri vardır. İn vitro ortamda Leydig hücrelerinin yaşam sürelerini uzattığı ve hücreleri daha dayanıklı bir hale getirdiği gösterilmiştir (46). Akazawa ve arkadaşları, E vitamininden yoksun beslenen hayvanların toplam Leydig hücresi sayısının, E vitamini gereksinimi karşılanmış hayvanlara göre daha az olduğunu açıklamışlardır (1). Ayrıca, E vitamini

Leydig hücrelerinde yaşlanmayı engellemektedir (92). Kronik alkol uygulamasıyla fare testisinde oluşan hasara karşı E vitamininin koruyucu etkide bulunduğu rapor edilmiştir (88). Benzer bir koruyucu etki sıçan testisinde aflatoksin hasarına karşı da saptanmıştır (82). Plastik endüstrisinde kullanılan di-(2-etilheksil)ftalat (DEHP)'nin neden olduğu spermatogenik lezyonların, E vitamini ve C vitaminin beraber uygulanmasıyla engellendiği gözlenmiştir (33). Bizim çalışmamızda, 3 günlük EDS+yüksek/düşük doz E vitamini ve 7 günlük EDS+düşük doz E vitamini gruplarında Leydig hücrelerinin korunduğunu ve seminifer tübüllerin daha sağlam olduğunu görmemiz nedeniyle E vitamininin testis üzerinde EDS hasarına karşı koruyucu etkide bulunduğu sonucuna vardık. Çalışmamızda E vitamini koruyucu etkisini, en önemli işlevi olan antioksidan görevi ile göstermiş olabilir. Yapılan çalışmalar, EDS'nin sitotoksik etki mekanizmalarından biri olarak hücrel glutatyon düzeyinde azalmayı göstermektedir. Buna göre EDS, glutatyon ile kovalent bağ kurarak hücrel glutatyon seviyesini azaltmaktadır. Böyle bir azalma ise hücrelerde apoptozisi tetikleyen bir mekanizmadır (52). Diğer taraftan E vitamini, glutatyon, süperoksit dismutaz ve peroksidaz beraber çalışan hücrel antioksidan savunma sistemleridir (41). Kronik alkol uygulaması sonucunda mitokondriyal lipid peroksidasyonunda artış ve glutatyon düzeyinde azalma olduğu ve E vitamininin, alkolün bu tip hasarlarına karşı testisi koruduğunu bildirilmiştir (82). Ancak araştırmacılar buradaki koruyucu etki mekanizmasını tam olarak açıklayamamışlardır. E vitamininin, glutatyon seviyesindeki azalma ile açığa çıkabilecek lipid peroksidasyonunu engelleyerek veya kendisi EDS'ye bağlanarak glutatyon seviyesini koruyup apoptozisi engellemiş olabileceği görüşündeyiz.

E vitamininin Leydig hücrelerine olan bir diğer etkisi ise, Leydig hücresi zarında LH/HCG reseptörü sayısını (46) veya bu reseptörlerin bağlanma eğilimini arttırmasıdır (1). Her iki durumda da Leydig hücreleri, LH/HCG'ye daha duyarlı olmaktadır. Böylece Leydig hücreleri, çoğalma/farklılaşma yönünde davranışta bulunur. EDS'nin bu davranışta bulunan Leydig hücrelerine sitotoksik etkide bulunmadığını daha önce belirtmiştik. Böylece Leydig hücreleri korunmuş olmaktadır. EDS'nin düşünülen diğer bir olası sitotoksik mekanizması, DNA ve proteinleri alkilemesi ve bunun sonucunda da Leydig hücrelerini apoptozise sürüklemesidir (52). Organizmadaki E vitamini, hücre ve organellerin zarlarına yerleşerek ve zarın daha stabil olmasını

sağlayarak geçirgenliğini azaltmaktadır (84). Bu şekilde E vitamininin, EDS'nin hücre zarından geçişini önleyerek veya geciktirerek Leydig hücrelerini korumuş olabileceğini düşünmekteyiz.

Testis interstisyumundaki makrofaj sayısı Leydig hücrelerinin ölümüyle ilişkilidir. Ölü hücrelerin hemen fagosit edilmesi amacıyla makrofaj sayısında kısa sürede artış olmaktadır (24). Bizim çalışmamızda 3 günlük EDS+düşük/yüksek doz E vitamini uygulaması yaptığımız grupların her ikisinde az sayıda makrofajın görülmesi, Leydig hücrelerinin korunduğuna dair bir başka kanıt olarak ele alınabilir. Ortamda ölmüş/ölecek hücrelerin olmaması, yeni makrofaj topluluğunun ortaya çıkmasını engellemiş olabilir. 7 günlük EDS+düşük doz E vitamini uygulaması yapılan grubumuzda da makrofaj sayısının az olduğu görülmüştür. Ancak 7 gün EDS+yüksek doz E vitamini uygulaması yapılan grupta makrofaj sayısının daha fazla ve Leydig hücrelerinin sayısının az olması; Leydig hücrelerinde beklenen korumanın olmadığını düşündürmektedir. Yine bu grupta seminifer tübüllerin de bozuk olması E vitamininin koruyucu etkisini kaybettiğinin veya doza bağımlı ters etki gösterdiğinin bir başka göstergesidir. Bu grupta testis hasarının sadece EDS uygulaması yapılmış olan gruba göre daha az olması, E vitamininin yüksek doz kullanılmasıyla koruyucu etkisinin zamanla kaybedildiğini düşündürmüştür. 7 gün boyunca sadece yüksek doz E vitamini uygulaması yapılmış olan grupta hiçbir histolojik hasarın görülmemesi bize olası iki mekanizmanın varlığını düşündürmüştür: Birincisi, yüksek doz E vitamini EDS ile birlikte uygulandığında, E vitamini tıpkı aflatoksin ile yaptığı gibi (82), EDS ile de kimyasal birleşme göstererek farklı bir sitotoksik maddeye dönüşmüş veya başka bir mekanizmayı harekete geçirmiş olabilir. İkincisi, yüksek doz E vitamini başlangıçta EDS'nin hasar oluşturmalarını engellemekte, fakat zamanla vücut metabolizması yüksek doz E vitaminini tolere edememektedir.

Sonuçta, E vitamininin yukarıda söz edilen, bilinen ve olası koruma mekanizmaları tek başına ya da birlikte çalışarak Leydig hücrelerini koruyor olabilir. Leydig hücrelerinin korunması demek, testosteron üretiminin devam etmesi, dolayısıyla da spermatogenezin devam etmesi demektir. Bunların kesin olarak ortaya konulabilmesi için daha ileri tekniklerin kullanıldığı yeni çalışmalara gereksinim vardır.

5.2.3. Testis Üzerinde Olumlu Etki Gösteren Diğer Maddeler

EDS'nin testise verdiği hasarı ortadan kaldırmak üzere çeşitli hormonların uygulandığı birçok çalışma yapılmıştır. Bunlardan en çok ilgi çeken HCG ve testosteron uygulamasını içeren çalışmalardır. Leydig hücresi farklılaşmasının LH'ya bağlı olduğu (23) ve hücre zarında LH/HCG bulunduran tek testis hücresinin Leydig hücresi olduğu saptanmıştır (22). Sıçanlarda, farklılaşmamış Leydig hücresi öncülleri LH/HCG'nin mitojenik etkisine ancak doğumdan 10 gün sonra cevap verebilmektedir (25). Jackson ve Jackson, erişkin sıçanlara 9 gün boyunca 100 IU HCG uygulamasının 4. gününde EDS enjeksiyonu yaparak sıçanların seminifer epitelinin tamamen korunduğunu; hayvanların EDS uygulamasının sadece 2-5. haftalarında steril olduğunu, ancak 5. haftadan sonra normal fertilité gösterdiğini bildirmiştir. Ayrıca, 25 veya 10 IU HCG uygulamasıyla da seminifer epitelin tamamen korunduğunu, interstisyumun normal görüldüğünü ve bu şekildeki uygulamanın hiçbir evresinde hayvanların steril olmadığını saptamışlar ve dolayısıyla, 2-5. haftalar arasında HCG dozuna bağlı fertilité olduğunu düşünmüşlerdir (35). Ancak bu çalışmada fertilité ölçütü, çiftleştirmeden sonra doğan yavru sayısı olduğu için buna bağlı sonuçların çok güvenilir olmadığını düşünmekteyiz, çünkü fertilité sorunu en azından dişi hayvanlardan da kaynaklanmış olabilir.

Yapılan bir başka çalışmada ise, bir hafta boyunca HCG enjekte edilen ve dekapitasyondan 1, 2 ve 3 gün önce HCG+tek doz EDS uygulanan sıçanların, sadece EDS enjekte edilen gruplara göre tübüler ve interstisyel yapılarının önemli ölçüde korunduğu görülmüştür (35).

EDS uygulamasından sonra Leydig hücrelerinin yaşayabilmesi için EDS'nin HCG ile beraber veya HCG'nin 3. enjeksiyonundan sonra verilmesinin gerektiği ve HCG'nin koruyucu mekanizmasının iki şekilde açıklanabileceği ileri sürülmüştür. Buna göre, LH'nın plazmada sürekli olarak yüksek düzeyde bulunması sonucunda erişkin testisinde bulunan olgun Leydig hücreleri özgül değişime girerek EDS'nin sitotoksik etkisine karşı direnç kazanmakta veya Leydig hücresi öncüllerinin farklılaşmasıyla yeni Leydig hücresi topluluğunun meydana gelmesi sağlanmaktadır (73).

Testosteron da bu konuda çalışan araştırmacıların ilgi odağı olmuştur. Jackson ve Jackson sıçanlara 27 gün androjen uygulayarak seminifer epitelin ve aksesuar organların EDS'ye karşı korunma sürecini uzatmışlar ve 9 günlük testosteron propionat+HCG uygulamasının 4. gününde EDS enjeksiyonu yapılan sıçanların testis histolojisini normal gördüklerini bildirmişlerdir (35). Testosteronun koruyucu etkisi diğer bir çalışmada da gösterilmiştir (15). Ancak 1, 5 ve 25 mg'lık testosteron esteri verilerek yapılan bir çalışmada, bu koruyucu etkinin doza bağımlı olduğu ve en iyi korumanın 25 mg'lık uygulama ile sağlandığı saptanmıştır (66).

Testosteron ve HCG/LH'dan başka, FSH'nın da Leydig hücrelerinin çoğalmasında dolaylı yoldan etkilediği rapor edilmiştir (23).

5.3. MAST HÜCRELERİ

Mast hücrelerinin sadece allerjik immün reaksiyonda değil, aynı zamanda da doku şekillenmesinde, fibroziste, enfeksiyon hastalıklarında konağın savunma mekanizmasında, anjiyogeneze ve hatta kanser invazyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (87). Mast hücrelerinin normal testisteki görevi bilinmemektedir. Yine de, diğer dokulardaki rolleri göz önüne alınarak damarlar üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir (66). Çeşitli çalışmalar sperm üretimi ve kalitesinin; prostaglandin, interferon, interlökin ve tümör nekrozis faktör (TNF) gibi mast hücresi ürünlerinden etkilenebileceğini göstermiştir (48).

Mast hücresi sayısındaki artış ve erkek infertilitesi arasındaki bağlantı birçok çalışma ile ortaya konulmuştur (36,53).

İnsan testisinde mast hücreleri, interstisyum ve lamina propria da görülmüştür. Mast hücrelerinin proteoglikanlarını belirlemek üzere yapılan bir çalışmada, idyopatik azoospermi veya oligospermi durumlarında mast hücrelerinin sayısının arttığı ve alt tiplerinin oranının değiştiği görülmüştür (87). Heparin bulunduran mast hücreleri bağ dokusu mast hücrelerine, kondroitin sülfat bulunduran mast hücreleri de mukozal mast hücrelerine denk gelmektedir. Yapılan incelemeler normal insan testisindeki mast hücrelerinin hemen hemen hepsinin heparin içerdiğini göstermiştir. İnfertil erkeklerde ise, mast hücrelerinin sayısının arttığı ve kondroitin sülfat içeren

mast hücrelerinin sayısındaki artışın, heparin bulunduran mast hücresi sayısındaki artıştan daha fazla olduğu görülmüştür (36,53). Bu durumda, mast hücrelerinin heparin içeriğindeki artış infertilitenin değil, fertilitenin bir göstergesi olarak ele alınabilir. Nitekim, bizim çalışmamızda, EDS ile birlikte verilen düşük dozdaki E vitamininin gerek 3 günlük ve gerekse 7 günlük grupta kırmızı boyanan (yüksek heparin içerikli) mast hücrelerinin sayısını artırdığı gözlenmiştir. EDS ile birlikte verilen yüksek doz E vitamini ise yeterli histolojik koruma sağlayamamış ve bu gruplardaki kırmızı mast hücrelerinin sayısı düşük kalmıştır. Tek başına düşük doz E vitamini verilen 3 ve 7 günlük gruplarda da kırmızı mast hücrelerinin belirgin olmasa da bir artış gösterdiğini, ancak tek başına yüksek dozda verilen E vitamininin kırmızı mast hücrelerini artırmadığı açıkça görülmüştür. Dolayısıyla testisteki mast hücrelerinin heparin içeriğinin belirlenmesinin o testisin fertilite potansiyeli hakkında çok kesin olmasa da bilgi vereceği görülmekte ve bu yönüyle önceden yapılmış çalışmalarla paralellik sergilemektedir.

Mast hücrelerinin belirli koşullar altında fibrozisi uyardığı bilinmektedir (53). Hem normal spermatogenezin olduğu hem de hipospermatogenez veya germ hücrelerinin hiç olmadığı testislerin interstisyel ve peritübüler mast hücrelerinde triptazın bulunduğu gözlenmiştir. Mast hücresi ürünü olan triptaz, serin proteaz işlevinin yanı sıra, fibroblastlar için potansiyel bir mitojendir, tip 1 kollajenin sentezini uyarır ve fibroblastları bulunduğu bölgeye çeker. Dolayısıyla, mast hücrelerinden bırakılan triptazın, kısır erkeklerin testisindeki fibrozis ile yani kısırlıkla ilişkili olabileceği düşünülmüştür (48). Kemirgenlerin in vitro kökenli mast hücreleri kullanılarak yapılan çalışmalar, mast hücrelerinin serin proteaz ekspresyonunu tersine değiştirebileceğini de göstermiştir (45).

Normal fertil erkeklerden alınan testislerin interstisyumunda çok az sayıda mast hücresi görülmüştür (53). Normal testiste mast hücrelerinin baskın alt tipi triptaz içeren mast hücresidir. Yapılan bir çalışmada obstrüktif azoospermi, idyopatik azoospermi ve varikoselli hastaların testisindeki baskın mast hücresi alt tipinin triptaz+kimaz içeren hücreler olduğu; hasta gruplarında triptaz+kimaz içeren mast hücrelerinin belirgin bir şekilde artarken, sadece triptaz içeren mast hücrelerinin sayısının değişmediği; bu sonuçların mast hücrelerinin alt tiplerinin oranındaki

değişimin nedeninin hücrelerin testise akını ve triptaz+kimaz içeren mast hücrelerinin gelişimindeki artış olduğunu düşündürdüğü; testiste önceden bulunan mast hücresi alt tiplerinde bir değişimin olmadığı ve testis fibrozisi ile doğru orantılı olarak da triptaz+kimaz içeren mast hücrelerinin sayısında artış olduğu bildirilmiştir (87).

Sıçanlarda, bağ dokusu mast hücreleri kimaz sentezlemektedir. Mast hücreleri kimazı heparin proteoglikanı ile beraber depolamaktadır. Mast hücrelerinin degranülasyonundan sonra da bu iki madde birbirleriyle bağlantıda kalmaya devam etmektedirler (59). İnsan mast hücrelerinin triptaz+kimaz ve triptaz içeren alt tiplerinin anjiyogenez ve doku şekillenmesi ile ilişkili olduğu için bağışıklık sistemiyle ilgili olmayabileceği ileri sürülmüştür (5). Çalışmamızda gözlediğimiz heparinli mast hücreleri ile doku iyileşmesi arasındaki bağlantı, bize insanlarda kimaz için biçilen rolün sıçanlarda da geçerli olabileceğini düşündürmektedir.

Mast hücreleri, normal sıçanların testis interstisyumunda bulunmaz. Testise girdiği yer olan ana arterlerin çevresinde ve tunika albugineanın hemen altında yerleşirler (66). Sıçan testisindeki mast hücrelerinin, testis işlevindeki hasarın giderilmesi sürecinde interstiyumda da bulunduğu belirtilmiştir (77). Heparin bulunduran ve histamin bulunduran mast hücrelerinin her ikisinin de doku tamiri ve yara iyileşmesinde rol aldığı, ancak degranülasyonun yoğunluğu ve bırakılan histamin/heparin miktarına göre yara iyileşmesinde farklı etkilerinin olduğu rapor edilmiştir (78).

AB-S tekniği ile yapılan boyamada mast hücreleri, heparin sentezini artırdığında sadece safranin ile (kırmızı) boyanırlar. Heparin sentezindeki azalma sonucunda sadece alsian mavisini ile (mavi) boyanırlar. Mukozal mast hücreleri, heparini çok az bulundurur veya hiç bulundurmaz, dolayısıyla alsian mavisini ile boyanırlar (8,20,78).

Bizim çalışmamızda gruplar arasında toplam mast hücresi (kırmızı+mavi) ortalama sayıları bakımından istatistiksel önemli bir farkın olmaması, E vitamininin toplam mast hücresi sayısını belirgin olarak etkilemediğini göstermiştir. Burada dikkat edilmesi gereken bir nokta, bizim deney gruplarımızın 3 ve 7 günlük olması ve mast hücrelerinin hasar bölgesinde yoğun şekilde birikmeye başlamasının EDS verilmesinden sonraki 2-4. haftalarda gerçekleşmesidir (9). Dolayısıyla,

çalışmamızdaki gruplarda genel olarak mast hücre sayısında artış olmaması, mast hücrelerinin bölgeye toplanmaları için 3 ve 7 günlük sürelerin yeterli olmadığı düşünülebilir. Ancak, mast hücreleri içeriklerine göre ayrı olarak ele alındığında; düşük doz E vitamininin, EDS ile birlikte veya tek başına verilmesi durumunda mast hücrelerinin içeriklerini bu süre zarfında histaminden heparine değiştirmiş olmasının önemli bir bulgu olduğunu düşünmekteyiz. Yaptığımız literatür taramasında böyle bir bulguya daha önce ulaşılmamış olduğunu gördük. Bu bulgumuz bize, E vitamininin doza ve belki de zamana bağlı olarak ve ortamın hasarlı olup olmamasına göre mast hücre içeriğini ayarladığı izlenimini vermektedir. Bize göre, tek başına EDS verilen gruplarda kırmızı boyanan mast hücrelerinin yok denecek kadar az olması, E vitamininin mast hücre içeriğini ayarlayan bir etken olduğunun kanıtı sayılabilir.

Heparin, damar gelişimi, ateroskleroz, yara iyileşmesi ve doku şekillenmesinde rol alan hücrelerin, göçünü ve çoğalmasını duruma göre hızlandırabilir veya baskılayabilir (91). Yapılan in vitro çalışmalar, heparinin fibroblast kültürüne eklenmesiyle fibroblastların kollajen substrata tutunması ve büyümesinin engellendiğini göstermiştir (5). Çalışmamızın sonuçları, doku hasarının iyileşmesi ve heparin sentezi arasında bir ilişki olabileceğine işaret etmektedir. Heparin içerikli mast hücre sayısı arttıkça EDS hasarına karşı korumanın belirgin bir şekilde arttığı çalışmamızın bulgularından gözlenmektedir. Mast hücrelerinin bu süreçte, yara iyileşmesinde rol alacak hücrelerin göçünü veya çoğalmasını hızlandırmak üzere hareket ettiği düşünülebilir. Zamanla heparin miktarındaki azalma ise akut durumun azalmasının bir işareti olabilir. Geçici korumanın olduğu durumda (5. ve 6. gruplar) ise heparin içerikli mast hücreleri 3. günde belirgin bir artış göstermemelerine karşın, 7. günde sayıları biraz daha artmıştır. Bu da bize, EDS uygulamasından sonra yüksek dozda verilen E vitamininin, mast hücre içeriğini etkin şekilde değiştiremediğini, ancak bunu yapmaya çalıştığını göstermektedir. Bunun sonucu olarak dokuda hasar ancak geçici bir süre için (3 gün) azaltılabilmiş ve 7. günde hasar artmıştır.

Sonuç olarak, heparin sentezindeki değişimin uygulanan E vitaminin dozuna bağlı olduğu görülmektedir. Düşük doz E vitamini, mast hücrelerinde heparin sentezini gerek EDS ve gerekse tek başına verilmesi durumunda arttırmakta, ancak bu durum EDS koşullarında daha belirgin olarak gözlenmektedir. Yüksek dozda verilen E

vitamini ise, heparin sentezinde belirgin bir artışa neden olmamaktadır. E vitamini, olasılıkla mast hücrelerinin histamin sentezinde azalmaya ve heparin sentezinde artışa neden olmaktadır. Toplam mast hücresi sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmaması, bu hücrelerdeki içerik değişikliğini doğrulamaktadır.

Sıçanlara soğuk immobilizasyon stresi uygulanan bir çalışmada, normalde testis interstisyumunda görülmeyen mast hücrelerinin burada çoğaldığı ve degranülasyonun uyarıldığı, stres sonucunda interstisyumda ve tunika albugineada bulunan mast hücrelerinin hemen hepsinde histamin sentezinin artarken heparin sentezinin azaldığı saptanmıştır (76). Histaminin, vücudun savunma sisteminin stres uyarılarına karşı oluşturacağı tepkide aracı bir madde olduğu kabul edilmiştir. Hem nöron hem de mast hücresi kökenli histamin, visseral ve endokrin tepkinin ortaya konulmasında kritik rol oynamaktadır (77). Bizim çalışmamızda, gruplar arasında histamin içerikli mast hücrelerinin ortalama sayıları bakımından istatistiksel bakımdan önemli bir fark gözlenmemiş olmasına karşın, düşük doz E vitamini verilen (3, 4 ve 7.) gruplarda heparin içerikli mast hücrelerinin artması ve toplam mast hücre sayılarının gruplar arasında önemli bir fark göstermediğinin de dikkate alınmasıyla 3, 4 ve 7. gruplarda mast hücrelerinde histamin sentezinde bir azalma olduğu kabul edilebilir. Bu konuda kesin bir yargıya varabilmek için daha özgül teknikler kullanılarak madde miktarlarının ölçümü ya da özgül madde işaretlemeleri yapılmalıdır.

Yapılan bir çalışmada, östradiol ile inkübe edilmiş kurbağa testis parçalarının testosteron üretiminin azaldığı ve mast hücresi sayısının arttığı rapor edilmiştir (49). Bizim çalışmamızda da, EDS'nin sitotoksik etkisini azaltmak üzere, dokuda heparin sentezinin arttığı düşünülebilir. Nitekim, diğer bir çalışmada mast hücrelerinden salınan heparinin ise çeşitli madde ve büyüme faktörlerine bağlanarak östrojenin neden olduğu testisteki bu değişiklikleri azaltabildiği belirtilmiştir (2).

10-15 günlük sıçanların testisindeki makrofajlar ortadan kaldırıldığında, testiste mast hücrelerinin kaybolduğu ve bunun nedeninin, makrofajların öldürülmesinden sonra Leydig hücrelerinin ortamdan kaybolmasının olabileceği, bu durumun da Sertoli hücrelerinden köken alan maddelere yanıt olarak geliştiği yorumu yapılmıştır (22). Sıçanlara EDS uygulamasından sonra da interstisyumda mast hücreleri belirir. Bu hücreler, zaman içinde giderek çoğalır. Sıçan testisinin interstisyumunda

mast hücrelerinin görülmesinin nedeni tam olarak bilinmemektedir, fakat Leydig hücrelerinin ortamda bulunmamasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir (2,9,66). Prepubertel sıçanlarda Leydig hücresi farklılaşmasının engellenmesiyle veya erişkin sıçanların testisinde bulunan Leydig hücrelerinin ortadan kaldırılmasıyla, interstisyumda çok sayıda mast hücresi görülmüştür (2). Testis interstisyumunda farklılaşmış Leydig hücrelerinin varlığı, hem mast hücrelerinin hem de Leydig hücresi öncüllerinin çoğalmasını engelliyor gibi görünmektedir (21). EDS uygulamasından 15 gün sonra rejenere Leydig hücrelerinin görülmesi ile aynı anda mast hücreleri de interstisyel dokuda görülmüştür (74). Yapılan başka bir çalışmada ise, EDS uygulamasından 28 gün sonra interstisyumda mast hücrelerinin bulunduğu görülmüştür (9). Bizim çalışmamızda deney grupları 3 gün ve 7 gün sürdüğü için hiçbir deney grubumuzda testis interstisyumunda mast hücresi göremedik.

Prepubertel sıçanlara GnRH antagonisti, erişkin sıçanlara da EDS uygulanması sonucunda testiste ortaya çıkan mast hücresi birikiminin, komşu dokulardan mast hücrelerinin göçü ile değil, mast hücresi öncüllerinin yerel çoğalması ve farklılaşması ile oluştuğu, homojen elektron yoğun salgı granüllerinin varlığının ve sayısının, mast hücresi farklılaşmasının işaretleri olduğu bildirilmiştir (21).

Minucci ve arkadaşları, EDS uygulanmış ve testosteron desteği yapılmış olan sıçanların testis interstisyumunda mast hücrelerinin beraberinde eozinofil lökositlerin de görülmesi nedeniyle, bu durumun interstisyel dokunun hasar görmesi sonucunda gelişen bir inflamatuvar tepki olduğunu ileri sürmüşlerdir (49). Diğer bir çalışmada da EDS'nin erişkin sıçan testisinde akut inflamatuvar tepkiye, ödem oluşumuna ve mononükleer hücrelerin göçüne neden olduğu ileri sürülmüştür (9). Gaytan ve arkadaşları, EDS uygulamasından sonra sıçan testisinde görülen mast hücresi birikiminin, çeşitli nedenlerle inflamatuvar tepkiyle ilgili olmadığını ileri sürmektedir. Bu görüşlerine destek olarak da söz konusu hayvanlarda sadece mast hücrelerinin biriktiğini, oysa inflamatuvar tepkilerde birden fazla hücre tipinin varlığının gerektiğini; EDS+hipofizektomi uygulanan sıçanlarda uygulamadan 50 gün gibi çok uzun bir zaman sonra bile mast hücrelerinin sayısında artış olmasını; hücre ölümü ve inflamatuvar tepkinin bildirilmediği östrojen veya GnRH antagonisti uygulanan yenidoğan sıçanlarda da mast hücresi birikiminin olmasını göstermektedirler (21).

Leydig hücrelerinin EDS ile yıkımı sonucunda daha önce de bahsedildiği gibi mast hücresi sayısında giderek bir artış olmaktadır. Yapılan bir çalışmada, testosteron uygulanan hayvanlarda Leydig hücrelerinin yenilenmesinin engellendiği, fakat mast hücresi sayısındaki artışın devam ettiği gözlenmiş ve böylece mast hücresi sayısındaki artışın, Leydig hücrelerinin yenilenmesi ile doğrudan ilişkili olmadığı ileri sürülmüştür (83). Bizim çalışmamızda, Leydig hücrelerinin korunduğu gruplarda (3, 4 ve 5. gruplar) mast hücrelerinin toplam sayısında istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir fark görülmesi, mast hücre sayısındaki artışın tek başına ortamda bulunan Leydig hücreleri ile bağlantılı olmadığı ve E vitamini dozu ve veriliş süresinin de etkili olduğunu düşündürmektedir. Böylece Wang ve arkadaşlarının bu görüşü bizim çalışmamızla da desteklenmektedir. Diğer yandan, yerel üretilen büyüme faktörlerinin testisteki mast hücrelerinin çoğalmasında rol oynadığını ve EDS uygulamasından sonra testisteki mast hücrelerinin EDS'den sonraki çoğalmasının birbirinden farklı olan ve farklı düzenlenen iki ayrı fazı olduğu belirtilmiştir (21).

Çeşitli işlevlerinin yanısıra bir antioksidan olarak da davrandığı düşünülen vazointestinal peptid (VIP), sıçanlara strese önce uygulandığında, mast hücrelerinin çoğalmasının ve degranülasyonunun inhibe edildiği, hücrelerin histamin içeriğinin azaldığı ve Leydig hücrelerinin korunduğu gözlenmiştir (77,78). Bu çalışmalardan alınan sonuçlar, VIP'in bağ dokusu (heparinli) mast hücrelerinden aracı maddelerin salınımını ayarladığı görüşünü desteklemektedir. Bizim çalışmamızın bulguları E vitamininin mast hücreleri üzerinde VIP'e benzer bir etki gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Çeşitli maddelerin mast hücreleri üzerindeki etkileri birçok çalışmada araştırılmıştır. Ultraviyole B ışınlarının mast hücrelerinden histamin salınımını uyardığı, bu salınımın serbest oksijen radikalleri tarafından uyarıldığı ve bir antioksidan olan askorbik asitin de histamin salınımını engellediği gösterilmiştir (50). Reaktif oksijen ürünlerinin mast hücresi degranülasyonunu ve histaminin serbest bırakılmasını uyardığı rapor edilmiştir (17). H_2O_2 'nin mast hücrelerinden çeşitli aracı maddelerin salınımını tetiklediği ve bunun olasılıkla, bir reaktif oksijen metaboliti olan H_2O_2 'nin lipid peroksidasyonu yoluyla mast hücresi zarında oluşturduğu hasardan kaynaklandığı ve E

vitamininin de membran stabilizasyonunu sağlayarak mast hücrelerinin degranülasyonunu baskıladığı düşünülmektedir (39).

E vitamini, bleomisin uygulanan sıçan ve farelerin akciğerinde kollajen birikimini azaltmıştır (10,41). Ancak araştırmacılar çalışmalarında bunun nedenlerini araştırmamışlardır. Bize göre E vitamini, mast hücrelerinin degranülasyonunu baskılayarak fibrotik ajanların ortaya çıkmasını, dolayısıyla da akciğer fibrozisini engellemiş olabilir. Çalışmamızın tüm gruplarında degranüle mast hücrelerinin sayısı ihmal edilecek kadar azdı. Olasılıkla E vitamini, antioksidan işlevinin yanı sıra, membran stabilizasyonunu sağlayarak mast hücrelerinin degranülasyonunu engelleyerek etki göstermektedir.



6. SONUÇ

- Tek başına EDS verilen gruplarda TAI değeri en düşük olmaktadır.
- Gerek tek başına E vitamini ile verilen ve gerekse EDS+E vitamini verilen grupların TAI değeri daha yüksek olmaktadır.
- En hasarlı testis dokuları tek başına EDS verilen gruplarda görülmektedir.
- EDS+düşük doz E vitamini verilen gruplarda doku hasarı azalmıştır.
- EDS+yüksek doz E vitamini verildiğinde 3. günde koruma gerçekleşirken, 7. günde hasarın tekrar artmaya başladığı görülmektedir.
- Tek başına E vitamini verilen gruplarda belirgin bir doku hasarı görülmemektedir.
- Toplam mast hücreleri bakımından gruplar arasında önemli fark bulunmamaktadır. Ancak, en az mast hücresi tek başına EDS verilen 3 günlük grupta görülürken, en çok mast hücresine EDS+düşük doz E vitamini verilen 3 günlük grupta rastlandı.
- Mavi boyanan (histaminli) mast hücrelerinin sayısı gruplar arasında fark göstermemektedir. Ancak, mavi mast hücreleri 3 günlük EDS grubunda en az görülürken, 7 günlük EDS+yüksek doz E vitamini verilen grupta en çok görülmektedir.
- Kırmızı boyanan (heparinli) mast hücrelerinin sayısı gruplar arasında önemli fark göstermektedir. En fazla kırmızı mast hücresi EDS+düşük doz E vitamini verilen gruplarda görülmektedir.

Bu çalışmada, EDS'nin sıçan testisinde oluşturduğu hasara karşı E vitamini uygulaması ilk kez gerçekleştirilmiştir. E vitamininin koruyucu etkisinin yanısıra mast hücrelerini modüle ettiği de görülmüştür.

İlk kez ortaya konan bu bulguların daha ileri teknikler kullanılarak araştırılmalarının gerektiğine inanıyor ve bu sayede E vitamininin biyolojik sistemlerdeki rolünün giderek daha belirginleşeceğini düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

- 1) Akazawa, N., Mikami S.I., Kimura S.I.: Effects of Vitamin E Deficiency on the Hormone Secretion of the Pituitary-Gonadal Axis of the Rat; *Tohoku J. Exp. Med.*, 152, 221-229, (1987).
- 2) Anton, F., Morales, C., Aguilar, R., Bellido, C., Aguilar, E., Gaytan F.: A Comparative Study of Mast Cells and Eosinophil Leukocytes in the Mammalian Testis; *J. Vet. Med. A*, 45,209-218, (1998).
- 3) Anderson, D., Dobrzynka, M.M., Jackson, L.I., Yu, T.-W., Brinkworth, M.H.:Somitic and Germ Cell Effects in Rats and Mice after Treatment with 1,3-butadiene and Its Metabolites, 1,2-epoxybutene and 1,2,3,4-dieopxybutane; *Mutation Research*, 391,233-242, (1997).
- 4) Ando, K., Nagata, K., Yoshida, R., Kikugawa, K., Suzuki, M.:Effect of n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Supplementation on Lipid Peroxidation of Rat Organs; *Lipids*, 35(4), 401-407, (2000).
- 5) Armetti, L., Admon, D., Solomon, A., Levi, F.-S.:Mast Cells and Eosinophils-Their Role in Tissue Remodeling; *ACI International*, 11/1, 22-28, (1999).
- 6) Asada, M., Sugie, M., Inoue, M., Nakagomi, K., Hongo, S., Murata, K., Irie, S., Takeuchi, T., Tomizuka, N., Oka, S.: Inhibitory Effect of Alginic Acids on Hyaluronidase and on Histamine Release from Mast Cells; *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61(6), 1030-1032, (1997).
- 7) Bakalska, M., Mourdejeva, M., Russinova, A., Kyurkchiev, S., Kehayov, I.: Localization of Atrial Natriuretic Factor (ANF) in Rat Testis after Leydig Cell Destruction: Evidence for a Potatial Role in Regulating Gonadal Function; *Endocrine Regulations*, 33,183-191, (1999).
- 8) Bancroft, J. D., Stevens, A.: Theory and Practice of Histological Techniques, Third edition, Churchill Livingstone Company, Edinburgh-London, 1990.

- 9) Bayçu, C., Demirci, C., Şahintürk, V., Demirayak, Ş.: Leydig Cell Destruction and Mast Cell Accumulation in Rat Testes after Administration of Testicular Toxicant Ethane Dimethane Sulphonate; Turk. J. Med. Res., 13(6), 165-170, (1995).
- 10) Bilgin, U.Y., Karaöz, E., Bengisu, H.: Sıçanlarda Bleomisin Neden Olduğu Akciğer Fibrozisi Üzerine E Vitamininin Etkisi; Tr. J. of Medical Sciences; 15, 270-277, (1991).
- 11) Bloom, E.R., Fawcett, D.W.: A Text Book of Histology; Twelfth Edition, Chapman&Hall, London, (1994).
- 12) Carlson, B.M.: Patten's Foundations of Embryology, Sixth Edition, McGraw-Hill Companies, New York, (1996).
- 13) Chandolia, R.K., Weinbauer, G.F., Behre, H.M., Nieschlag, E.: Evaluation of a Peripherally Selective Antiandrogen (Casodex) as a Tool for Studying the Relationship between Testosterone and Spermatogenesis in the Rat; J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 38(3), 367-375, (1991).
- 14) de Kretser, D.M., Meinhard, A., Meehan, T., Phillips, D.J., O'Bryan, M.K., Loveland, K.A.: The Roles of Inhibin and Related Peptides in Gonadal Function; Molecular and Cellular Endocrinology, 161, 43-46, (2000).
- 15) de Kretser, D.M., O'Leary, P.C., Irby, D.C., Risbritger, G.P.: Inhibin Secretion is Influenced by Leydig Cells: Evidence from Studies Using the Cytotoxin Ethane Dimethane Sulphonate (EDS); International Journal of Andrology, 12, 273-280, (1989).
- 16) Demir, R.: İnsanın Gelişimi ve İmplantasyon Biyolojisi; Birinci Baskı, Ankara, (1995)

- 17) Erden, S.H., Tunçel, N., Aydın, Y., Şahintürk V., Koşar, M., Tunçel, M.:The Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) and Inhibition of Nitric Oxide on Renal Tissue Injury of Rats Exposed to Hemorrhagic Ischemia and Retransfusion: A Possible Interaction Mechanism among Mast Cells and Tissue Histamine; *Annals Newyork Academy of Sciences*, 865, 570-581, (1998).
- 18) Evenson, D.P., Jost, L.K., Baer, R.K.:Effects of Methyl Methane Sulphonate on Mouse Sperm Chromatin Structure and Testicular Cell Kinetics; *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 21, 144-153, (1993).
- 19) Evenson, D.P., Jost, L.K.:Hydroxyurea Exposure Alters Mouse Testicular Kinetics and Sper Chromatin Structure; *Cell Prolif.*, 26,147-159, (1993).
- 20) Gartner, L.P., Hiatt, J.:Colour Text Book of Histology; First Edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, (1997).
- 21) Gaytan, F., Aceitero, J., Lucena, C., Aguilar, E., Pinilla, L., Garnelo, P., Bellido, C.:Simultaneous Proliferation and Differentiation of Mast Cells and Leydig Cells in the Rat Testis. Are Common Regulatory Factors Involved?; *Journal of Andrology*, 13(5), 387-397, (1992).
- 22) Gaytan, F., Bellido, C., Aguilar, E., van Rooijen, N.:Requirement for Testicular Macrophages in Leydig Cell Proliferation and Differentiation during Prepubertal Development in Rats; *Journal of Reproduction and Fertility*, 102, 393-399, (1994).
- 23) Gaytan, F., Bellido, C., Morales, C., Reymundo, C., Aguilar, E., van Rooijen, N.:Effects oh Macrophage Depletion at Different Times after Treatment with Ethylen Dimethane Sulphonate (EDS) on the Regeneration of Leydig Cells in the Adult Rat; *Journal of Andrology*, 15(6), 558-564, (1994).

- 24) Gaytan, F., Bellido, C., Morales, C., Reymundo, C., Aguilar, E., van Rooijen, N.:Response to Leydig Cell Apoptosis in the Absence of Testicular Macrophages; *Journal of Reproductive Immunology*, 29, 81-94, (1995).
- 25) Gaytan, F., Bellido, C., Morales, C., Garcia, M., Aguilar, E.:Effects of Gonadotrophins on the Proliferative Activity of Somatic Testicular Cells in Neonatal and Prepubetal Rats; *J. Physiol. Biochem.*, 53(3), 289-300, (1997).
- 26) Giakoustidis, D., Papageorgiou, G., Iliadis, S., Kontos, N., Kostopoulou, E., Papacherestou, A., Tsantilas, D., Spyridis, C., Takoudas, D., Botsoglou, N., Dimitriadou, A., Giakoustidis, E.:Intramuscular Administration of Very High Dose of Alpha-Tocopherol Protects Liver from Severe Ischemia/Reperfusion Injury; *World Journal of Surgery*, 26(7), 872-877 (2002).
- 27) Golan, R., Cooper T.G., Oschry, Y., Weinbauer, G.F., Shochat, L., Lewin, L.M.:Epididymal Maturation of Chromatin in Spermatozoa from Control Monkeys (*Macaca fascicularis*) and Those Treated with Cetrorelix, A Gonadotropin-Releasing Hormone Antagonist; *Biology of Reproduction*, 57, 354-359, (1997).
- 28) Golan, R., Weissenberg, R., Oschry, Y., Shochat, L., Lewin, L.M.:Spermatogenesis in the Golden Hamster during the First Spermatogenic Wave:A Flow Cytometric Analysis; *Molecular Reproduction and Development*, 55, 205-211, (2000).
- 29) Golan, R., Vigodner, M., Oschry, Y., Shochat, L., Lewin, L.M.:Chromatin Condensation During Spermatogenesis in the Golden Hamster (*Mesocricetus aureus*):A Flow Cytometric Study; *Molecular Reproduction and Development*, 56, 105-112, (2000).
- 30) Gülbahçe, H.E., Lindeland, A.T., Engel, W., Lillemoe, T.J.:Metastatic Leydig Cell Tumor with Sarcomatoid Differentiation; *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 123, 1104-1107, (1999).

- 31) Henriksen, K., Kangasniemi, M., Parvinen, M., Kaipia, A., Hakovirta, H.:In vitro, Follicle-Stimulating Hormone Prevents Apoptosis and Stimulates Deoxyribonucleic Acid Synthesis in the Rat Seminiferous Epithelium in a Stage-Specific Fashion; *Endocrinology*, 137(5), 2141-2149, (1996).
- 32) Hirsch, I., Huang, B., Chancellor, M.B., Rivas, D.A., Sazman, S.K., Jost, L.K., Evenson, D.P.:Spermatogenesis in Early and Choronic Phases of Experimental Spinal Cort Injury in the Rodent Model; *Journal of Andrology*, 20(1), 63-71, (1999).
- 33) Ishihara, M., Itoh, M., Miyamoto, K., Suna, S., Takeuchi, Y., Takenaka, I., Jitsunari, F.:Spermatogenic Disturbance Induced by di-(2-ethylhexyl) Phthalate is Significantly Prevented by Treatment with Antioxidant Vitamins in the Rat; *International Journal of Andrology*, 23(2), 85-94, (1999).
- 34) Jaarin, K., Renuvathani, M., Nafeeza, M.I., Gapor, M.T.:Comparative Effect of Palm Vitamin E and Ranitidine on the Healing of Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats; *Int. J. Exp. Path.*, 80,259-263, (1999).
- 35) Jackson, C.M., Jackson, H.:Comparative Protective Actions of Gonadotrophins and Testosterone against the Antispermatogetic Action of Ethane Dimethane Sulphonate; *Journals of Reproduction and Fertility Ltd.*, 393-401, (1984).
- 36) Jezek, D., Banek, L., Hitmair, A., Pezerovic-Panijan, R., Goluza, T., Schulze, W.:Mast Cells in Testicular Biopsies of Infertile Men with 'Mixed Atrophy' of Seminiferous Tubules, *Andrologia*, 31, 203-210, (1999).
- 37) Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.:Basic Histology, Nineth Edition, Appleton&Lange, Stamford, (1998).
- 38) Karaöz, E., Karaöz, S.:E Vitamininin Biyolojik Sistemlerdeki Rolü; *J. Nutr. and Diet.*, 21(1), 101-116, (1992).

- 39) Karaöz, E., Özcan, O., Irmak, K., Sarsılmaz, M.:In Vitro Hidrojen Peroksit Uygulanmasında Kolon Mukozasında Görülen Değişiklikler ve buna E Vitamininin Etkisi; Gazi tıp Dergisi, 3,177-183, (1992).
- 40) Karaöz, E., Dalçık, H., Etlik, Ö., Irmak, M.K., Kıbrıslı, E.: Sülfürdioksit Bağı Karaciğer Toksisitesine C ve E vitamini Kombinasyonu Etkisi; Yeni Tıp Dergisi, 13(2), 96-99, (1996).
- 41) Kılınç, C., Özcan, O., Karaöz, E., Sunguroğlu, K., Kutluay, T., Karaca, L.:Vitamin E Reduces Bleomycin-Induced Lung Fibrosis in Mice:Biochemical and Morphological Studies; Journal of Basic&Clinical Physiology&Pharmacology, 4(3), 249-269, (1993).
- 42) Koyuncu, D., Açıkalm, E., Bayçu, C., Şahintürk, V.:Etan 1,2-Dimetan Sülfonat (EDS) ve İnsan Koryonik Gonadotropin (HCG)'in Erişkin Sıçan Testisindeki Hücresel Etkileşimler Üzerine Etkisi; Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 20(1-2), 1-15, (1998).
- 43) Larsen, W.J.:Human Embryology; First Edition, Churchill Livingstone Inc., Singapore, (1993).
- 44) Lejeune, H., Habert, R., Saez, J.M.:Origin, Proliferation and Differentiation of Leydig Cells; Journal of Molecular Endocrinology, 20, 1-25, (1998).
- 45) Li, L., Krilis, S.A.:Mast Cell Growth and Differentiation; Allergy, 54(4), 306-313, (1999)
- 46) Mather, J.P., Saez, J.M., Dray, F., Haour, F.:Vitamin E Prolongs Survival and Function of Porcine Leydig Cells in Culture; Acta Endocrinologica, 102, 470-475, (1983).
- 47) McLachlan, R.I., Wreford, N.G., O'Donnell, L., de Kretser, D.M, Robertson D.M. : The Endocrine Regulation of Spermatogenesis: Independent Roles for Testosterone and FSH; Journal of Endocrinology, 148,1-9,(1996).

- 48) Meineke, V., Frungieri, M., Jesberger, B., Vogt, H.J., Mayerhofer, A.: Human Testicular Mast Cells Contain Tryptase: Increased Mast Cell Number and Altered Distribution in the Testes of Infertile Men; *Fertility and Sterility*, 74(2), 239-244, (2000).
- 49) Minucci, S., Di Matteo, L., Chieffi, P., Pierantoni, R., Fasano, S.: 17β -Estradiol Effects on Mast Cell Number and Spermatogonial Mitotic Index in the Testis of the Frog *Rana esculenta*; *The Journal of Experimental Zoology*, 278, 93-100, (1997).
- 50) Mio, M., Yabuta, M., Kamei, C.: Ultraviolet (UVB) Light-Induced Histamine Release From Rat Peritoneal Mast Cells and Its Augmentation by Certain Phenothiazine Compounds; *Immunopharmacology*, 41, 55-63, (1999).
- 51) Moore, K.L., Persaud, T.V.N.: *The Developing Human-Clinically Oriented Embryology*,; Sixth Edition, W. B. Saunders Company, Philadelphia, (1998).
- 52) Morris, A.J., Taylor, M.F., Morris, I.D.: Leydig Cell Apoptosis in Response to Ethane Dimethane Sulphonate after Both In vivo and In vitro Treatment; *Journal of Andrology*, 18(3), 274-280, (1997).
- 53) Nagai, T., Takaba, H., Miyake, K., Hirabayashi, Y., Yamada, K.: Testicular Mast Cell Heterogeneity in Idiopathic Male Infertility; *Fertility and Sterility*, 57(6), 1331-1336, (1992).
- 54) Özcan, O., Karaöz, E., Sarsılmaz, M., Ozan, H., Sınav, A., Oba, G.: Sıçanlarda Karbontetraklorür Hepatotoksitesine Karşı E vitamininin Etkisi; *Tr. J. of Medical Sciences*, 16, 45-54, (1992).
- 55) Özcan, O., Karaöz, E., Dağdeviren, A., Irmak, M.K., Sarsılmaz, M.: The Effect of Vitamin E on the Colonic Mucosal Alterations Induced by Rectal Hydrogen Peroxide Administration in the Rats; *Gazi Medical Journal*, 2, 61-67, (1993).
- 56) Özcan, O., Karaöz, E., Dağdeviren, A., Sarsılmaz, M.: Sıçanlarda Rektal Yoldan Uygulanan Asetik Asitin Neden Olduğu Deneysel Kolit ve Buna E Vitamininin Etkisi; *GATA Bülteni*, 35, 29-37, (1993).

- 57) Özer, N.K., Azzi, A.:Effect of Vitamin E on the Development of Atherosclerosis; *Toxicology*, 148, 179-185, (2000).
- 58) Paker, Ş.:Histoloji; Birinci Baskı, Uludağ Üniversitesi Basımevi Bursa, (1990).
- 59) Pejler, G.:Lactoferrin Regulates the Activity of Heparin Proteoglycan-bound Mast Cell Chymase:Characterization of the Binding of Heparin to Lactoferrin; *Biochem. J.*, 320, 897-903, (1996).
- 60) Raychoudhury, S.S., Blake, C.A., Milette, C.F. : Toxic Effects of Octylphenol on Cultured Rat Spermatogenic Cells and Sertoli Cells; *Toxicology and Applied Pharmacology*, 157, 192-202, (1999).
- 61) Regadera, J., Martinez-Garcia, F., Paniagua, R., Nistal, M.:Androgen Insensitivity Syndrome; *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 123, 225-233, (1999).
- 62) Rey, R.:The Prepubertal Testis:A quiescent or a Silently Anctive Organ?; *Histol. Histopathol.*, 14, 991-1000, (1999).
- 63) Rodriguez, J.B., Garcia, C.M.:Spontaneous Germ Cell Death in the Testis of the Adult Rat Takes the Form of Apoptosis:re-Evaluation of Cell Types that Exhibit the Ability to Die during Spermatogenesis; *Cell Prolif.*, 29, 13-31, (1996).
- 64) Ross, M.H., Romrell, L.J., Kaye, G.I.:Histology-A Text and Atlas; Third Edition, Williams&Wilkins Company, Baltimore, (1995).
- 65) Sailer, B.L., Sarkar, L.J., Bjordahl, J.A., Jost, L.K., Evenson, D.P.:Effects of Heat Stress on Mouse Testicular Cells and Sperm Chromatin Structure; *Journal of Andrology*, 18(3),294-301, (1997).
- 66) Sharpe, R.M., Maddocks, S., Kerr, J.B.:Cell-Cell Interactions in the Control of Spermatogenesis as Studied Leydig Cell Destruction and Testosterone Replecement; *The American Journal Of Anatomy*, 188, 3-20, (1990).
- 67) Shvedova, A.A, Kisin, E., Murray, A., Smith, C., Castranova, V., Kommineni, C.:Enhanced Oxidative Stress in the Skin of Vitamin E Deficient Mice Exposed to Semisynthetic Metal Working Fluids; *Toxicology*, 176, 135-143, (2002).

- 68) Sivashanmugam, P., Rajalakshmi, M.:Sperm Maturation in Rhesus Monkey:Changes in Ultrstructure Chromatin Condansation, and Organisation of Lipid Bilayer; The Anatomical Record, 247, 25-32, (1997).
- 69) Spiteri-Grech, J., Barlett, J.M.S., Nieschlag, E.:Hormonal Regulation of Epidrmal Growth Factor and Insulin-like Growth Factor-I in Adult Male Hypophysectomized Rats Treated with Ethane Dimethane Sulphonate; Journal of Endocrinology, 129, 109-117, (1991).
- 70) Stevens, A., Lowe, J.S.:Human Histology; Second Edition, Times Mirror Int. Publishers Ltd. (Mosby), Barcelona, (1997).
- 71) Suter, L., Koch, E., Bechter, R., Bobadilla, M.:Three-Parameter Flow Cytometric Analysis of Rat Spermatogenesis; Cytometry, 27, 161-168, (1997).
- 72) Teerds, K.J., de Rooij, D.G., Rommerts, F.F.G., Wensing, C.J.G.:Development of a New Leydig Cell Population after the Destruction of Existing Leydig Cells by Ethane Dimethane Sulphonate in Rats:An Autoradiogrphic Study; Journal of Endocrinology, 126, 229-236, (1990).
- 73) Teerds, K.J., de Rooij, D.G., Rommerts, F.F.G., Wensing, C.J.G.:Hormone-Induced Resistance of Rat Leydig Cells to the Cytotoxic Effects of Ethane-1,2-dimethane sulphonate; Journal of Endocrinology, 134, 85-90, (1992).
- 74) Teerds, K.J., de Boer-Brouwer, M., Dorrington, J.H., Balvers, M., Ivell, R.:Identification of Markers for Precursor and Leydig Cell Differentiation in the Adult Rat Testis Following Ethane dimethyl sulphonate administration; Biology of Reproduction, 60, 1437-1445, (1999).
- 75) Tekelioğlu, M.:İnsanın Üremesi ve Gelişmesi,; Birinci Baskı, Dumat Ofset, Ankara, (1995).

- 76) Tunçel, N., Güner, F., Aral, E., Uzuner, K., Aydın, Y., Bayçu, C.:The Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on Mast Cell Invasion/Degranulation Intesticular Interstitium of Immobilized+Cold Stressed and β -Endrophin Treated Rats; *Peptides*, 17(5), 817-824, (1996).
- 77) Tunçel, N., Aydın, Y., Koşar, M., Tunçel, M.:The Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on the Testicular Tissue Histamine Level of Immobilized+Cold Stressed Rats; *Peptides*, 18(6), 913-915, (1997).
- 78) Tunçel, N., Erkasap, N., Şahintürk, V., Doğrukol-Ak, D., Tunçel, M.:The Protective Effect of Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) on Stressed Induced Gastric Ulceration in Rats; *Annals Newyork Academy of Sciences*, 865, 309-322, (1998).
- 79) van Overveld, F.W.P.C., Haenen, G.R.M.M., Rhemrev, J., Vermeiden, J.P.W., Bast, A.:Tyrosine as Important Contributor to the Antioxidant Capacity of Seminal Plasma; *Chemico-Biological Interactions*, 127, 151-161, (2000).
- 80) Verma, R.J., Nair, A.:Ameliorative Effect of Vitamin E on Aflatoxin-Induced Lipid Peroxidation in the Testis of Mice; *Asian Journal of Andrology*, 3, 217-221, (2001).
- 81) Verma, R.J., Nair, A.: Vitamin E Ameliorates Aflatoxin-Induced biochemical Changes in the Testis of Mice; *Asian Journal of Andrology*, 3, 305-309, (2001).
- 82) Verma, R.J., Nair, A.:Effect of Aflotixins on Testicular Steroidogenesis and Amelioration by Vitamin E; *Food and Chemical Toxicology*, 40, 669-672, (2002).
- 83) Wang, J., Wreford, N.G.M., Lan, H.Y., Atkins, R., Hedger, M.P.:Leukocyte Populations of the Adult Rat Testis Following Removal of the Leydig Cells by Treatment with Ethane Dimethane Sulphonate and Subcutaneous Testosterone Implants; *Biology of Reproduction*, 51, 551-561, (1994).
- 84) Wang, X., Quinn, P.J.:The Location and Function of Vitamin E in Membranes; *Molecular Membrane Biology*, 17, 143-156, (2000).

- 85) West, A.P.; Sharpe, R.M., Saunders, P.T.K.:Differential Regulation of Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate (cAMP) Response Element-Binding Protein and cAMP Response Element Modulator Messenger Ribonucleic Acid Transcripts by Follicle-Stimulating Hormone and Androgen in the Adult Rat Testis; Biology of Reproduction; 50, 869-881, (1994).
- 86) Wheater, P.R., Burkitt, H.G., Dainels, V.G.:Functional Histology; Second Edition, Churchill Livingstone, Edinburg, (1987)
- 87) Yamanaka, K., Fujisawa, M., Tanaka, H., Okada, H., Arakawa, S., Kamidono, S.:Significance of Human Testicular Mast Cells and Their Subtypes in Male Infertility; Human Reproduction, 15(7), 1543-1547, (2000).
- 88) Yardımoğlu, M., Mısırhoğlu, D.:Histological Effects of Ethanol and Protective Effects of Vitamin E on the Morphology of Seminiferous Tubules of Mice; Anadolu Tıp Dergisi, 3(3), 155-159, (2001).
- 89) Yossefi, S., Oschry, Y., Lwin, L.:Chromatin Condensation in Hamster Sperm:A Flow Cytometric Investigation; Molecular Reproduction and Development, 37, 93-98, (1994).
- 90) Young, B., Heat, J.W.:Functional Histology; Forth Edition, Churchill Livingstone, London, (2000).
- 91) Zehnder, J.L., Galli, S.J.: Cell biology: Mast-cell heparin demystified Nature, 400, 714-715, (1999).
- 92) Zirkin, B.R., Chen, H.:Regulation of Leydig Cell Steroidogenic Function During Aging; Biology of Reproduction, 63, 977-981, (2000).

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**