

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİSFENOL A UYGULANAN WİSTAR ALBİNO
SIÇANLARDA TESTİS HİSTOLOJİSİ VE
APOPTOZ ÜZERİNE LİKOPEN'İN ETKİSİ**

TUĞÇE TOPCU

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR 2016

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc- 2012970042

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BİSFENOL A UYGULANAN WİSTAR ALBİNO
SIÇANLARDA TESTİS HİSTOLOJİSİ VE
APOPTOZ ÜZERİNE LİKOPEN'İN ETKİSİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

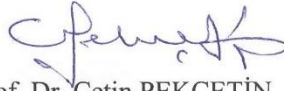
TUĞÇE TOPCU

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2015. KB. SAG.043 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc- 2012970042

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Yüksek Lisans, Histoloji ve Embriyoloji programı öğrencisi Tuğçe TOPCU, ‘ BİSFENOL A
UYGULANAN WİSTAR ALBİNO SIÇANLARDA TESTİS HİSTOLOJİSİ VE APOPTOZ
ÜZERİNE LİKOPEN’İN ETKİSİ’ konulu Yüksek Lisans tezini 10.02.2016 tarihinde başarılı
olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN

BAŞKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Güven ERBİL

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi



Prof. Dr. Müge KIRAY

ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Ülker CANKURT

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. İlkay AKSU

YEDEK ÜYE

Dokuz Eylül Üniversitesi
Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER	SAYFA
İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ	iv
GRAFİKLER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1. TESTİS ANATOMİSİ.....	8
2.1.1. Testisin Embriyolojisi.....	12
2.1.2. Testisin Histolojisi.....	12
2.1.2.1. Seminifer tübüller.....	13
2.1.2.1.1. Miyoid hücreler.....	14
2.1.2.1.2. Sertoli hücreleri.....	14
2.1.2.1.3. Spermatogonyumlar.....	16
2.1.2.1.4. Primer ve sekonder spermatositler.....	17
2.1.2.1.5. Erken ve geç dönem spermatidler.....	17
2.1.2.1.6. Spermatozoon (olgun spermatozoa).....	18
2.1.2.2. İnterstisyel alan.....	18
2.1.2.2.1. İnterstisyel bağ dokusu.....	19
2.1.2.2.2. Leydig hücreleri.....	19
2.1.3. Spermatogenez.....	21
2.1.4. Testisin Histoфизиoloji.....	22
2.1.5. Apoptozis.....	23
2.2. BİSFENOL A.....	25
2.2.1. Bisfenol A'nın Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	25
2.2.2. Bisfenol A'nın Üretimi ve Kullanım Alanları.....	25
2.2.3. Bisfenol A'nın Çevresel Durumu.....	26
2.2.4. Bisfenol A'nın Mutajenite ve Toksisitesi.....	27

2.2.5. Bisfenol A'nın Vücuda Alınması ve Fetüse Etkisi	27
2.2.6. Bisfenol A'nın Hormonal Aktivitesi.....	28
2.2. 7. Bisfenol A'nın Biyodegradasyonu.....	28
2.2. 8. Bisfenol A'nın Metabolize Edilmesi.....	29
2.3. ANTİOKSİDANLAR.....	29
2.3.1. Antioksidanların tanımı.....	29
2.3.2. Antioksidanların sınıflandırılması.....	30
2.3.3. Likopen.....	31
2.3.4. Testis, Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Sistem.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
3.1. Araştırma Tipi.....	34
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	34
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	34
3.4. Çalışma Materyali.....	35
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	35
3.6. Veri Toplama Araçları.....	36
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	36
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler.....	36
3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	36
3.6.2.2. Histokimyasal İncelemeler.....	36
3.6.2.3.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü.....	36
3.6.2.3.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) ile boyama yöntemi.....	37
3.6.2.4. Morfometrik Değerlendirmeler.....	37
3.6.2.4.1. Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması.....	37
3.6.2.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü.....	38
3.6.2.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçüm.....	38
3.6.2.4.4 Histolojik değerlendirme.....	38
3.6.2.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler.....	38
3.6.2.5.1 TUNEL Reaksiyonu.....	39
3.6.2.5.2 Aktive Kaspaz-3 İmmünreaktivitesi.....	40
3.6.2.6. Biyokimyasal Değerlendirme.....	40
3.6.2.6.1. Enzim Aktiviteleri MDA Düzeylerinin Saptanması.....	40

3.6.2.6.2.Homojenizasyon.....	41
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	42
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	42
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	42
3.10. Etik Kurul Onayı.....	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	43
4.1.1 Başlangıç Vücut Ağırlığı.....	43
4.1.2 Deney Sonu Vücut Ağırlığı.....	44
4.2. HİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	45
4.2.1. Kontrol grubu.....	45
4.2.2. SHAM Grubu.....	47
4.2.3. BPA Grubu.....	50
4.2.4. Likopen Grubu.....	51
4.2.5. BPA+Likopen Grubu.....	53
4.3. BAZAL MEMBRAN KALINLIK ÖLÇÜMÜ.....	56
4.4. MORFOMETRİK BULGULAR.....	60
4.4.1.Johnsen Skorum.....	60
4.4.2. Tübül Çapı.....	61
4.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR.....	65
4.5.1. TUNEL Bulguları.....	65
4.5.2 AKTİF KASPAZ-3 IHC (+) HÜCRE SAYIMI.....	70
4.6. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	74
4.6.1. MDA Değerleri.....	74
4.6.2. GSH Değerleri.....	74
4.6.3. GPX Enzim Aktiviteleri.....	75
5. TARTIŞMA.....	77
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
7. KAYNAKLAR DİZİNİ	84
8. EKLER.....	92

TABLÖLAR DİZİNİ

SAYFA

Tablo 3.1. Deney Grupları.....	34
Tablo 3.2. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru.....	37
Tablo 4.1. Johnsen (Jn) testis biyopsi skoru karşılaştırması (Ort.±SS).....	60

Grafik 4.1. Sıçanların deney öncesi başlangıç vücut ağırlıkları ve std sapmaları.....	43
Grafik 4.2. Kontrol, Sham, Likopen (LKP), Bisfenol A(BPA) Bisfenol A+Likopen (BPA+LKP) grupları başlangıç ve sonuç vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi.....	44
Grafik 4.3. Gruplar arası bazal membran kalınlık ölçüm değerlendirilmesi.....	57
Grafik 4.4. Gruplara ait Johnsen Skorları.....	61
Grafik 4.5. Gruplar arası Seminifer Tübül Çap Ölçüm Değerlendirilmesi.....	62
Grafik 4.6. Kontrol Grubu Hayvanlara Ait Tübül Çapları.....	63
Grafik 4.7. SHAM Grubu Hayvanlara Ait Tübül Çapları.....	63
Grafik 4.8. Likopen Grubu Hayvanlara Ait Tübül Çapları.....	64
Grafik 4.9. BPA Grubu Hayvanlara Ait Tübül Çapları.....	64
Grafik 4.10. BPA + LKP Grubu Hayvanlara Ait Tübül Çapları.....	65
Grafik 4.11. Gruplararası Tunel (+) hücre sayısı.....	67
Grafik 4.12. Gruplararası spermatogonium aktif kaspaz-3 IHC (+) hücre sayılarının değerlendirilmesi.....	71
Grafik 4.13. Gruplara ait MDA Değerleri.....	74
Grafik 4.14. Gruplara ait GSH Değerleri.....	75
Grafik 4.15. Gruplara ait GPx Enzim Aktivitesi Değerleri.....	75

Şekil 1. Erkek üreme sistemi.....	8
Şekil 2. Tunika albuginea.....	10
Şekil 3. Tunika vasküloza.....	10
Şekil 4: Seminifer Tübül ve Spermatogenik hücre serileri.....	16
Şekil 5: Leydig Hücresi.....	20
Şekil 6: Spermatogenez.....	22
Şekil 7: Serbest radikalın nötralizasyonu.....	23
Şekil 8: Bisfenol A'nın Formülüzasyonu.....	26
Şekil 9: Antioksidanlar.....	30
Şekil 10: Likopenin Formülüzasyonu.....	32
Şekil 4.1.A. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İntersitisyel alan ve seminifer tübül duvarında normal histolojik yapıdaki Sertoli ve spermatogonyum, primer spermatosit, spermatzoa hücreleri gözlemlendi (Bar= 200.0µm H&E).....	45
Şekil 4.2.B. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Normal yapıdaki seminifer tübüller, interstisyel alan ve spermatogenik hücreler görülmektedir (Bar=100 µm H&E).....	46
Şekil 4.3.C. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarında normal devam eden spermatogenez ve kan damarı gözlemlendi (Bar= 50.µm, H&E).....	46
Şekil 4.4.D. Kontrol grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarında normal spermatogenetik hücreler gözlemlendi (Bar= 50.0µm, H&E).....	47
Şekil 4.5.A.B. Sham grubunun testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler, kan damarları ve interstisyel alandaki hücre yapılarıyla birlikte testis dokusu normal histolojik yapıda gözlemlendi (Bar=200 µm, 100 µm, H&E).....	48
Şekil 4.6.C.D Sham grubunun testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler ve interstisyel alan normal histolojik yapıda gözlemlendi (Bar= 50µm, H&E).....	49

Şekil 4.7.A. BPA grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül lümeninde genişleme, kan damarı ve spermium hücrelerinde kayıp gözlemlendi (Bar= 200µm, H&E).....	50
Şekil 4.8.B. BPA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Bazal membrandan ayrılmış spermatogenik hücreler ve spermium hücrelerinde kayıp gözlemlendi (Bar=100µm, H&E).....	50
Şekil 4.9.C,D. BPA grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Bazal membranda ondülasyon, seminifer tübül epitel duvarında incelme ve lümeninde hücre dökülmesi ve spermium hücrelerinde kayıp gözlemlendi (Bar= 50µm, H&E).....	51
Şekil 4.10.A. LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler ve interstisyel alandaki hücre yapılarıyla birlikte testis dokusu normal histolojik yapıda gözlemlendi (Bar=200µm, H&E).....	52
Şekil 4.11. B. LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübüller ve interstisyel alan normal histolojik yapıda gözlemlendi (Bar= 100µm, H&E).....	52
Şekil 4.12.C,D. LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler, kan damarı ve interstisyel alandaki hücre yapılarıyla birlikte testis dokusu normal histolojik yapıda gözlemlendi (Bar=50µm, H&E).	53
Şekil 4.13. A. BPA+LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Normale yakın morfolojide seminifer tübüller gözlenmektedir. Seminifer tübüllerde hücre serisinin devam ettiği, tübüllerdeki spermatozoon sayısının arttığı, bazı tübüllerde ise spermium hücrelerinde kayıplar gözlemlendi gözlemlendi (Bar=200µm, H&E).....	54
Şekil 4.14. B. BPA+LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Normale yakın morfolojide seminifer tübüller, korunmuş spermatogenetik hücreler ve yer yer spermium hücrelerinde kayıp gözlemlendi (Bar=100µm, H&E).....	54
Şekil 4.15. C,D. BPA+LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül yapısı normale yakın gözlenmektedir. Ayrıca seminifer tübüllerde hücre serisinin devam ettiği ve tübül lümeninde spermatozoon sayısının arttığı gözlemlendi (Bar=50µm, H&E).....	55
Şekil 4.16. A; Kontrol grubuna ait sıçan testis kesiti 'PAS (+) boyama'. Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membranın normal kalınlıkta olduğu gözlemlendi (Bar=50µm, PAS).....	57

Şekil 4. 17. B; Sham grubuna ait sıçan testis kesiti ‘ PAS (+) boyama’. Sham grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membranın normal kalınlıkta olduğu gözlemlendi (Bar=50µm, PAS).....	58
Şekil 4. 18. C; LKP grubuna ait sıçan testis kesiti ‘ PAS (+) boyama’. LKP grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membranın normal kalınlıkta olduğu gözlemlendi (Bar=50µm, PAS).....	58
Şekil 4. 19. D; BPA grubuna ait sıçan testis kesiti ‘ PAS (+) boyama’. BPA grubuna ait kesitler incelendiğinde kalınlaşmış bazal membran yapısı gözlemlendi (Bar=50µm, PAS).....	59
Şekil 4. 20. E; BPA+LKP grubuna ait sıçan testis kesiti ‘PAS (+) boyama’. BPA+LKP grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membranın normale yakın kalınlıkta olduğu gözlemlendi (Bar=50µm, PAS).....	59
Şekil 4.21. A; Kontrol grubuna ait TUNEL (+) boyanan hücre gözlenmektedir (Bar=50µm, TUNEL)	67
Şekil 4.22. B; Sham grubuna ait TUNEL (+) boyanan hücreler gözlenmektedir (Bar=50µm,TUNEL).....	68
Şekil 4.23. C; BPA grubuna ait TUNEL (+) boyanan hücreler gözlenmektedir (Bar=50µm, TUNEL).....	68
Şekil 4.24. D; LKP grubuna ait TUNEL (+) boyanan hücre gözlenmektedir (Bar=50µm, TUNEL).....	69
Şekil 4.25. A; BPA+LKP grubuna ait TUNEL (+) boyanan hücreler gözlenmektedir (Bar=50µm, TUNEL).....	69
Şekil 4.26. A; Kontrol grubuna ait Aktif Kaspaz-3 immunreaktivite gösteren hücre gözlenmektedir (Bar=50µm, Aktif Kaspaz-3).....	71
Şekil.4.27. B; Sham grubu, C; BPA+ LKP grubuna ait Aktif Kaspaz-3 immunreaktivite gösteren hücreler gözlenmektedir (Bar=50µm, Aktif Kaspaz-3).....	72
Şekil.4.28. D; LKP grubu, E; BPA grubuna ait Aktif Kaspaz-3 immunreaktivite gösteren hücreler gözlenmektedir (Bar=50µm, Aktif Kaspaz-3).....	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
µm	Mikrometre
ABP	Androjen bağlayıcı protein
AMH	Antimüllerian hormon
ATP	Adenozin tri fosfat
Camp	Döngüsel adenozin monofosfat
Cm	Santimetre
CMN	Kurkumin
DHFR	Dihidrofolat redüktaz
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
FA	Folik asit
FH2	Dihidrofolat
FH4	Tetrahidrofolat
FSH	Folikül stimulan (uyarıcı) hormon
G	Gram
H	Hematoksilin
H2O2	Hidrojen peroksit
hCG	İnsan koryonik gonadotropin hormonu
H-E	Hematoksilin-Eozin
i.p.	İntraperitoneal (periton içi)
KAT	Katalaz
Kg	Kilogram
LH	Luteinizan hormon
MDA	Malondialdehit
mm	Milimetre
MTX	Metotreksat
NADPH oksidaz	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz
O2-	Süperoksit anyonu
OH	Hidroksil

SOR	Serbest oksijen radikalleri
SRV	Y kromozomunun cinsiyeti belirleyen bölgesi
TAİ	Testis ağırlık indeksi
TBF	Testis belirleyici faktör

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji alanında yetişmemde büyük emeği olan, desteğini her zaman yanımda hissettiğim, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı değerli danışman hocam Prof. Dr. Çetin PEKÇETİN'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca etkin tecrübe ve bilgilerini benden esirgemeyen değerli hocalarım; Prof. Dr. Güven ERBİL, Prof. Dr. Ülker CANKURT, Prof. Dr. Işıl TEKMEN, Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR, Prof. Dr. Alper BAĞRIYANIK, Doç. Dr. Başak BAYKARA ve Doç. Dr. Seda ÖZBAL'a,

Etkin tecrübe ve bilgisiyle tez çalışmalarımın her aşamasında yanımda olan, Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli hocam Prof. Dr. Müge KIRAY'a,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarından dolayı, Uzm. Dr. Serap Cilaker MICİLİ, Bio. Sedef MENKÜ, Bio. Özcan ÜSTEN'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan huzur duyduğum sevgili dostlarım Merve AKSOY ve Selma AYDEMİR'e,

Bana sevgi ve güvenleri ile her zaman güç veren kalplerini her zaman kalbimde hissettiğim, hayatımın her anında emeği olan biricik annem Nurşen TOPCU, biricik babam Abdurrahman TOPCU ve canım kardeşim Buse TOPCU'ya,

Sevgi ve anlayışıyla beni her zaman destekleyen, hayatımın her anında olduğu gibi yüksek lisans eğitimim boyunca ve tezimin yazımında emeği olan hayat arkadaşım, nişanlım Faruk BİTİK'e.

Sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

BİSFENOL A UYGULANAN WİSTAR ALBİNO SIÇANLARDA TESTİS HİSTOLOJİSİ VE APOPTOZ ÜZERİNE LİKOPEN'İN ETKİSİ

TUĞÇE TOPCU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

tugce_tpcu@hotmail.com

İZMİR

ÖZET

Amaç: Bisfenol A (BPA), gıda ve içecek ambalajlama materyallerinde ham madde olarak kullanılan polikarbonat plastikler ve epoksi reçinelerin monomeri olan endokrin yıkıcı bir kimyasaldır. Likopen ise sebze ve meyvelerde doğal olarak bulunan karoten ailesine ait, çeşitli etkenlere bağlı olarak gelişen oksidatif stres sonucu açığa çıkan serbest radikallerin ortadan kaldırılmasında etkili bir antioksidan bileşiktir. Yapılan araştırmalarda BPA'nın, birçok organa olumsuz etkisinin olduğu ortaya konulmuştur. Bu çalışmada BPA'nın erkek genital sistem organlarından testis üzerine olan etkilerinin histolojik olarak ortaya konulması ve olası etkilerinin Likopen ile azaltılması ve/veya ortadan kaldırılmasını amaçlamaktayız.

Yöntem: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Biriminin Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen, Wistar Albino suşu toplam (180-200 g) 35 erkek sıçan kullanıldı. Wistar Albino sıçanlar 1. *Kontrol Grubu* (14 gün hiçbir madde uygulanmadı) 2. *Sham Grubu*, (14 gün boyunca oral gavaj yöntemiyle 0,1ml etanol ile 0,1 ml/100g mısır yağı) 3. *Bisfenol A Grubu* (14. gün boyunca oral gavaj yöntemiyle 10 mg/kg Bisfenol A) 4. *Likopen Grubu* (14 gün boyunca oral gavaj yoluyla 4 mg/kg Likopen) 5. *Bisfenol A + Likopen Grubu* (14 gün boyunca oral gavaj yoluyla 10 mg/kg Bisfenol A ve 4mg/kg Likopen) olarak 5 gruba ayrıldı. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22°C oda sıcaklığında %50-60 nisbi nem bulunan standart hayvan oda ve kafeslerinde, dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslenmiştir. Çalışmada testis dokusu değerlendirilirken stereolojik yöntemle (IHSS), seminifer tübüllerin çapları ölçüldü. Ölçümler sonucu herbir gruba ait seminifer tübüllerin çaplarının ortalama değerleri bulunarak gruplar arasındaki tübül yapı farklılıkları karşılaştırıldı. Hematoksilen- Eozin ile boyanan kesitler Johnsen's skorlaması ile değerlendirildi. Tüm veriler SPSS 21 istatistik programında ortalama

± standart hata hesaplandıktan sonra gruplar arasındaki farklar Kruskal Wallis, one-way ANOVA, Post Hoc LSD testi ve Student-t testi kullanılarak yapıldı, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı.

Bulgular: Testiste yapılan histolojik ve morfolojik değerlendirmeye göre, BPA grubunun Kontrol, Sham ve LKP gruplarına göre bozuk olduğu ve BPA+LKP grubunda LKP'nin bu bozukluğu önlediği gözlemlendi. DNA hasarının değerlendirilmesinde Kontrol, Sham, LKP ve BPA+LKP grupları arasında spermatogonium ve spermatositlerde TUNEL pozitif boyanan hücrelerde anlamlı fark gözlenmezken, BPA grubunda spermatogonium ve spermatositlerde TUNEL pozitif boyanan hücreler Kontrol, Sham ve LKP gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu. BPA ve BPA+LKP grupları karşılaştırıldığında BPA+LKP grubunda TUNEL pozitif boyanan hücrelerin sayısında BPA grubuna göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi. TUNEL sonuçlarını desteklemek amacı ile yaptığımız aktif kaspaz immunohistokimyasal (IHC) değerlendirmelerine göre; Kontrol, Sham, LKP ve BPA+LKP grupları arasında spermatogoniyumlarda aktif kaspaz IHC pozitif boyanan hücrelerde anlamlı fark gözlenmezken, BPA grubunda spermatogoniyumlarda aktif kaspaz IHC pozitif boyanan hücreler Kontrol, Sham ve LKP gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu. BPA ve BPA+LKP grupları karşılaştırıldığında BPA+LKP grubunda aktif kaspaz IHC pozitif boyanan hücrelerin sayısında BPA grubuna göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi.

Gruplar arası MDA, GSH ve GPx değerleri kıyaslandığında; BPA grubunun MDA değerleri diğer deney gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, BPA grubunda GSH ve GPx değerleri diğer deney gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulundu. Ayrıca deneklerin deney başında ve deney sonundaki vücut ağırlıkları ölçülerek değerlendirmeye alınmıştır. Tüm gruplardaki deneklerin deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında sıçanların vücut ağırlıklarında artışlar görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi.

Sonuç: Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda düşük doz BPA'nın testiste oluşturduğu toksik hasara 4mg/kg LKP'nin koruyucu etkisi olduğu fakat hasarı tamamen engellemediği sonucuna vardık.

Anahtar Sözcükler: Bisfenol A (BPA), Likopen, Wistar Albino Sıçanı, Testis

EFFECT OF LYCOPENE ON APOPTOSIS AND TESTICULAR HISTOLOGY IN BISPHENOL A IS APPLIED TO WISTAR ALBINO RATS

ABSTRACT

Objective: Bisphenol A (BPA), food and beverage packaging monomer of polycarbonate plastic and epoxy resin is used as raw materials in which materials are endocrine disruptive chemicals. Lycopene belongs to carotene family is found naturally in fruits and vegetables is an effective antioxidant compounds resulting in the elimination of free radicals oxidative stress coming into the open, depending on various factors. According to the studies of BPA it has been demonstrated to have an adverse effect on many organs. In this study of BPA effects on the male testes histologically to reveal the genital organs and the possible effects of lycopene by reducing and / or eliminating we intend that.

Materials and Methods: Dokuz Eylul University Faculty of Medicine Research Unit obtained from the Laboratory of Experimental Animals, Wistar albino strain total (180-200 g) were used 35 male rats. Wistar albino rats; 1. *Control group* (14 days no substance is not implemented) 2. *Sham Group* (0,1 ml of ethanol with 0.1 ml / 100g corn oil by oral gavage method for 14 days,) 3. *Bisphenol Group* (10 mg / kg of bisphenol A by oral gavage method during 14 days) 4. *Lycopene Group* (4 mg / kg of lycopene by oral gavage for 14 days) 5. *Bisphenol A + Lycopene Group* (10 mg / kg of bisphenol A and 4 mg / kg of lycopene by oral gavage method during 14 days), they were divided into 5 groups. All animal experiments are finished 12/12 hour dark / light cycle at 20-22 ° C, 50-60% relative humidity at room temperature which standard animal rooms and cages, aged tap water and were fed standard chow. Working with testicular tissue in assessing stereological methods (IHSS), the diameter of the seminiferous tubules were measured. Measurement results for each group of seminiferous tubule structure differences between the mean values, it groups the diameter of the tubules were compared. Hematoxylin-eosin-stained sections were evaluated by Johnsen's scores. All SPSS 21 statistical software in the mean $\pm$ standard error calculated on the difference between the groups after the Kruskal-Wallis, One-Way ANOVA, POST HOC were performed using LSD test and Student's t-test, $p < 0.05$ significance level were taken into account.

Results: According to the histologic and morphologic assessment made in the testicles, BPA Control group, Sham group and is corrupt according to the LKP and the LKP group LKP+ BPA was observed to prevent this disorder. The evaluation of DNA damage Control, Sham, LKP

and the BPA + LKP group between spermatogony and spermatogenesis in significant differences were observed with TUNEL-positive staining cells and spermatogenesis in the BPA group spermatogony TUNEL positive cells stained with Control and Sham group was significantly higher than the LKP. Compared to BPA and BPA + LKP, BPA + LKP group in the TUNEL the number of positively stained cells showed a significant decrease compared to the BPA group. We did it with the purpose of supporting the active caspase result of TUNEL immunohistochemical (IHC), according to assessment; Control, Sham, LKP and BPA + LKP in spermatogonium between groups of active caspase IHC cells stained positively significant difference observed, in spermatogonium BPA group active caspase IHC positively stained cells as control, were higher in significantly according to the Sham and the LKP group. BPA and BPA + LKP group when the number of active caspase across the group IHC positively stained cells was observed a significant decrease compared to the BPA group. Between groups for MDA, GSH and GPX values compared; the experimental group is significantly higher than other groups while the MDA values of BPA, BPA group, GSH and GPX values were statistically significantly lower than the values of the other experimental groups. Also it is taken into consideration at the beginning of the end of the experiment by measuring the body weight of the subjects and experiments. Compared to all the groups in the pre-test and post-test subjects it showed increases in body weight and body weight of rats showed a statistically significant difference.

Conclusions: : Our findings are in line with low-dose BPA's toxic damage caused by testicular 4mg / kg is LKP the protective effect, but we concluded that the damage is completely blocking.

Key words: Bisphenol A (BPA), Lycopene, Wistar Albino Rats, Testis

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Organizmaya dışarıdan alınarak endokrin fonksiyonları ve dengeyi bozan, doğal ya da sentetik maddelere endokrin bozucular denir. Endokrin bozucular, hormonlara agonist ve/veya antagonist etkiler yapar. Bu etki, hormonun üretimine veya transportuna etki ederek ya da hormon reseptörüne bağlanarak metabolize olması ve atılımını değiştirmesi ile ortaya çıkabilir (1).

Bazı ilaçlar, dioksin ve dioksin benzeri bileşikler, poliklorlu bifeniller, bazı pestisitler, ftalatlar ve Bisfenol A (BPA) gibi plastizer maddeler endokrin bozucu etkiye sahip maddeler arasında sıralanmaktadır. Bu maddelerin pek çoğu besinler, kozmetikler, kişisel bakım ürünleri, deterjanlar, oyuncaklar, plastik şişeler gibi günlük hayatta yoğun olarak kullanılan ürünlerde yer almaktadır (2).

Bisfenol A, ilk kez Rus kimyager Alexander Pavloviç Dianin tarafından 1891 yılında sentezlenmiş ve östrojenik etkileri 1930’larda bulunmuş olan endüstriyel bir kimyasaldır (3). 4,4’- izopropildenedifenol; 2,2-bis(4-hidroksifenil)-propan, genel olarak Bisfenol A (BPA) adı ile bilinmektedir. BPA; 228,29 g/cm³ molekül ağırlığında, katı, fenolik kokulu, krem-beyaz renkte, kristal yapıda olan kimyasal bileşiktir. BPA dünyada yaygın olarak kullanılan kimyasallardan biridir (4). Dünyadaki yıllık üretimi 3,8 milyon tonu aşmaktadır. BPA’nın kullanım alanının fazla olması ve artan talep nedeniyle yıllık üretimde giderek artmaktadır. BPA’nın en fazla kullanıldığı alan % 70’lik oranla polikarbonat plastik üretimidir. Bunu % 25’lik oranla epoksi reçine üretimi takip etmektedir (5). Polikarbonatlar; bebek biberonları, yiyecek paketlenme malzemeleri, su şişeleri ve şişe kapakları, gözlük camları, CD, DVD, elektrik ve elektronik parçaların yapımında kullanılır (3,6,7). Epoksi reçineler ise deniz ürünleri, sebzeler, bira, alkolsüz içecekler, süt tozu gibi gıda ve içeceklerin ambalajlanmasında kullanılan metal kutuların iç yüzeyinin kaplanmasında, şarap ve su gibi sıvıların bulunduğu depolama kapları ile değişik tiplerdeki gıda taşıma kaplarının yapılmasında kullanılmaktadır (8). BPA günlük hayatta kullanılan pek çok ürünün yanı sıra diş hekimliğinde kullanılan bazı dolgu maddelerinin yapısında yer almakta ve sağlık için potansiyel tehlike oluşturabileceği düşünülmektedir (9).

Migrasyon, gıda maddesi ve ambalaj materyali arasındaki etkileşim ile meydana gelen kütle transferi olarak tanımlanmaktadır. Ambalaj materyalinden gıda maddesine monomerler, plastik katkı maddeleri ve oligomerler gibi pek çok madde migrasyonla geçebilmektedir (10).

BPA'ya mesleki nedenlerle maruz kalanlar dışında diğer bütün yaş gruplarında BPA'ya maruziyet tüketilen gıdalarla olmaktadır (11). BPA, hazır gıdalara doğrudan katıldığı gibi yağ, su, içecek, şeker, şampuan, krem gibi her tür ürün için kullanılan ambalajlardan migrasyon ile vücuda geçmektedir. Diş macunu, yiyecek ve içeceklerden ağız yoluyla, parfüm ve deterjanlardan solunum yoluyla, krem ve kozmetiklerden cilt yoluyla vücuda girerek kana geçer (10). BPA'nın büyük miktarlarda çevreye bulaşması, üretim sırasında oluşan atıkların yeterince arıtılmadan yüzey sularına verilmesi ile BPA depolarında meydana gelen kaçaklar ve taşımacılık sırasında meydana gelen kazalar ile gerçekleşmektedir (12).

BPA, oral emilimi takiben insan karaciğerinde hızla CYP2C18 ve daha az olarak CYP2C19 ve CYP2C9 enzimleri ile metabolize edilir. Karaciğerden ilk geçişte eliminasyona uğrar ve glukronik asit ile konjuge olarak major metaboliti BPA-glukronit'e (BPAG) dönüşür. Bir miktar da sülfat konjugasyonuna uğrar ve minor metabolit BPA-sülfat (BPAS) oluşur. Ortalama altı saatlik bir yarılanma ömrü vardır ve yaklaşık 42 saatte tamamına yakını idrarla atıldığı gösterilmiştir (13).

BPA ve diğer toksik maddelerin oksidatif stres oluşturarak PI3K/c-Src/FAK ve MAPK gibi sinyal yollarını etkiledikleri, bunun sonucunda da sperm sayısının azaldığı ve kalitesinin düştüğü ifade edilmektedir (14). Aynı zamanda cinsiyet hormonları, leptin, insülin ve tiroksin gibi çeşitli hormonların işlevini bozmakta ve hepatoksik, immünotoksik, mutajenik, karsinojenik gibi etkilerinin olduğu da gösterilmiştir (15).

Oksidatif stres, antioksidan savunma sistemlerinin azalması ile birlikte, serbest oksijen radikallerinin artması sonucu ortaya çıkar (16). Serbest oksijen radikalleri (ROS) organizmada dokunun yapı elemanlarını bozarak birçok zararlı etkilere yol açmaktadır (17). Testisler serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidatif hasara karşı oldukça duyarlıdır (18).

Likopen, parlak kırmızı bir karotenoid pigmenttir, en fazla domates (*Lycopersicon esculentum*)'de olmak üzere karpuz, pembe greyfurt gibi meyve ve sebzelerde bulunur. Bağırsaklardan emilebilen nadir karotenoidlerden olduğu gibi, plazmada en çok bulunan karotenoittir ve Vitamin A aktivitesinden yoksundur. LKP, düz bir zincir halinde düzenlenmiş 11 adet çift ve 2 adet tekli bağ içeren hidrokarbon zincirinin açık formundan oluşmaktadır (19; 20). Yapılan çalışmalar LKP'nin son derece etkili bir antioksidan olduğunu göstermektedir (21; 22). Domates; domates suyu, sos, salça veya ketçap şeklinde işlendiği zaman, LKP'nin kimyasal yapısı ısıya bağlı olarak değişmekte, bu da vücut tarafından daha kolay absorbe

edilmesini sağlamaktadır. Buna göre işlenmiş ya da pişirilmiş domates ürünlerindeki LKP'nin biyoyararlılığı, ham domates ürünlerinden daha fazladır (23, 24).

LKP, hücreleri serbest radikal hasarından korur, hücreler arasındaki bağları güçlendirir ve hücre metabolizmasını geliştirir. LKP yağda çözündüğünde etkinliği artmaktadır. Bu yüzden, yağ miktarı fazla olan doku ve organlarda, özellikle ciltte antioksidan koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (24).

Yapılan çalışmalar LKP'nin, oksidatif stres sonucu zarar gören testiküler doku ve sperm kalitesi, kardiyak toksisite, hepatoksisite ve nefrotoksisiteye karşı potansiyel koruyucu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (21, 25).

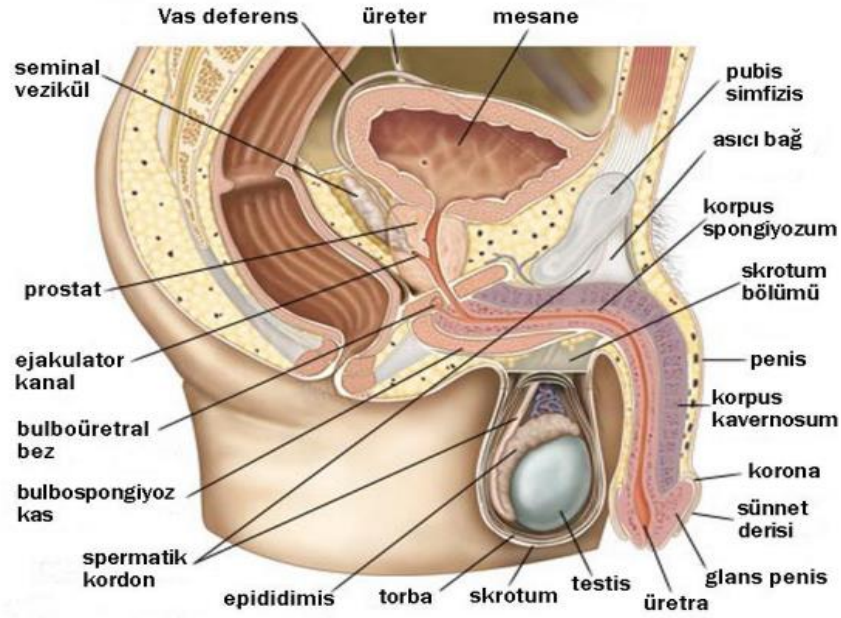
Bu çalışmada Bisfenol A'nın erkek genital sistem organlarından testis üzerine olan etkilerinin histolojik olarak ortaya konulması ve olası etkilerinin likopen ile azaltılması ve/veya ortadan kaldırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi, bir çift testis, boşaltım kanalları, yardımcı bezler ve penisten oluşur.

2.1. Testis Anatomisi

Testisler karın boşluğunun dışında skrotum içinde oblik pozisyonda yer alan ovoid şekilli bir çift organ olup funiculus spermaticus'a asılıdırlar. İnsanlarda yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm eninde ve 20-30 g ağırlığındadırlar. Büyüklükleri yaklaşık olarak aynı olsa da sola göre sağ testis %10 kadar daha ağırdır. Genellikle sol testis sağa göre 1 cm daha aşağıdadır. Sıcaklıkları vücut sıcaklığından 3-4 °C daha düşüktür. Kıvrımlı bir deri kesesi olan skrotumun iç yüzü septum scrotum ile iki ayrı bölüme ayrılır (Şekil 1). Testisler bu boşluklarda bulunurlar. Testisler, testosteron hormonu ile erkek üreme hücresi olan sperm üretiminden sorumludurlar (26, 27).



Şekil 1. Erkek üreme sistemi (28)

Testislerin facies medialis ve facies lateralis adı verilen iki yüzü, margo anterior ve margo posterior adı verilen iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior adı verilen iki ucu vardır. Testislerin arka kenarının dış kısmı boyunca epididimis yer alır; funiculus spermaticus da, epididimisin mediyalinde olmak üzere, margo posterior'da bulunur. Testislerin ön kenarı her iki yüzü ve uçları visseral periton (epiorchium) ile örtülüdür. Periton, arka kenarın sadece yan kısmını örtmektedir (26). Testisler fetal hayatta karın boşluğu içinde, fascia transversalis ile periton arasında gelişir, ancak doğumdan önce canalis inguinalis'ten geçerek skrotum içine

iner. Karın ön duvarından skrotuma doğru giderken karın ön duvarı tabakalarını da birlikte sürüklediği için testislerin dış tarafında, karın ön duvarı tabakalarına da uzantıları olan tabakalar yer alır. Bu tabakalar şunlardır:

a) Deri

b) Tunika dartos

c) Fasiaspermatika eksterna



Skrotum

d) Fasiaspermatika interna

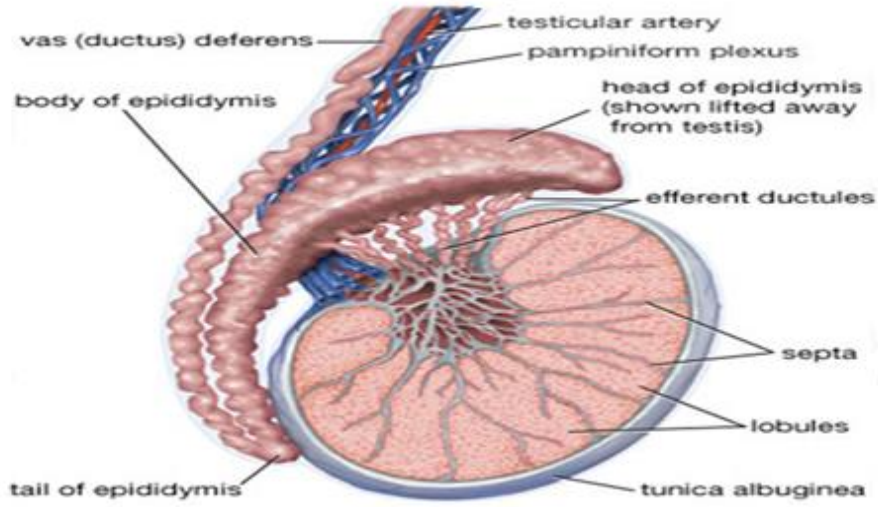
e) Fasiaspermatika interna

f) Tunika vaginalis testis

Testis dıştan içe; tunika vaginalis' in lamina visceralis' i (epiorchium), tunika albuginea ve tunika vasculosa olarak üç tabaka ile sarılıdır (26).

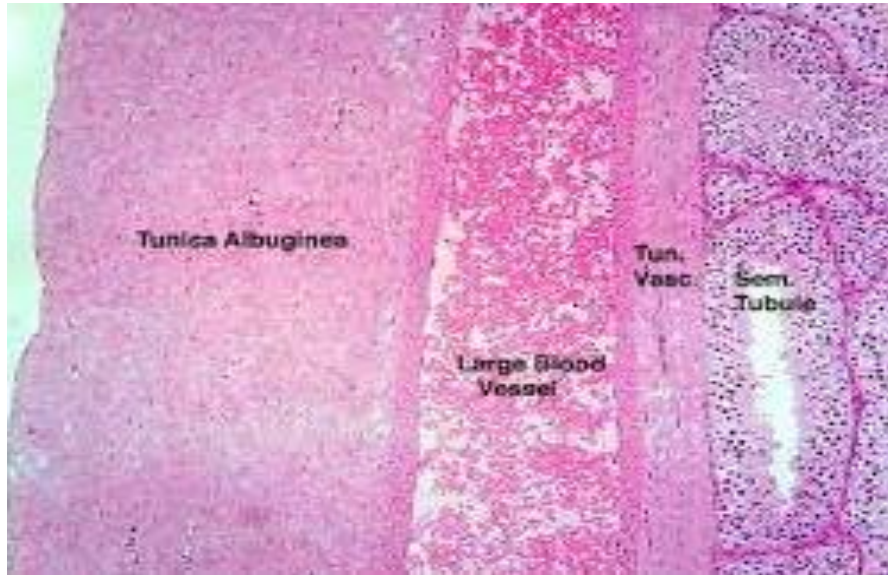
1. **Tunika vaginalis:** Mezotelyal hücrelerin oluşturduğu bu en dıştaki tabaka peritondan köken alan seröz bir kesedir. Testisin ön ve yan yüzeylerini çevreleyen visseral tabakası ve skrotum üzerine uzanan pariyetal tabakası bulunmaktadır.

2. **Tunika albuginea:** Düz kas hücreleri içeren yoğun fibroelastik düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşan en belirgin tabakadır. Bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılır. Testisin posterior tarafında kalınlaşarak mediastinum testis olarak organ içine sokulur. Elastikiyeti ve genişleme özelliği olmayan bu tabaka, arka kenardan testis içine sokulur ve vertikal bir bölme oluşturur. Bu bölmeye mediastinum testis (corpus highmori) adı verilir. Mediastinum testis'in ön ve yan kısmından çıkan uzantılara septula testis adı verilir. Bu uzantılar, testis parankiminden geçerek tunica albuginea'nın iç yüzüne ulaşır ve böylece testis'i koni biçiminde lobuluslara böler (lobuli testis). Testis parankimini, lobuli testis içinde bulunan ve kıvrımlı şeklinden dolayı tübülü seminiferi contorti adı verilen kanalcıklar oluşturur. Her bir testis kanalcığı, mediastinum testis yakınında tübülü seminiferi recti adı verilen düz bir kanalcıkla uzanır. Bütün lobulus'lardan gelen bu kanalcıklar mediastinum'a sokulur ve burada rete testis (Haller ağı) denilen ağı oluşturur. Lobuli testis'lerde yapılan spermium'lar rete testis'ten ductuli efferentes testis adı verilen kanallar aracılığıyla epididymis'e gelir (29).



Şekil 2. Tunika albuginea (30)

3. **Tunika vasküloza:** Kan damarları ağırlarını içeren, areolar bağ dokusundan oluşan en iç tabakadır. Tunica albuginea'nın iç yüzünü örten tabakasıdır. Bu tabaka, tunica albuginea'nın uzantısı olan septula testis'lerin iç yüzünü kapladığı için lobuli testis'lerin de etrafında bir tabaka oluşturur.



Şekil 3. Tunika vasküloza (31)

Tunika albuginea, rete testisin bulunduğu posterior bölgede kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinumdan testise doğru uzanan fibröz bağ dokusu septumları, testiküler dokuyu 250-300 lobüle ayırır. Her bir lobül 1-4 adet seminiferöz tübülü içermektedir. Spermiler, epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri motilite özelliklerini kazanırlar. Seminiferöz tübüller

arasındaki boşluk kan damarları, lenfatik kanallar, makrofajlar ve androjenleri salgılayan Leydig hücre grupları tarafından doldurulan interstisyel dokudan oluşmuştur.

Tunica vaginalis testis'in *lamina visceralis* (epiorchium) ve *lamina parietalis* (periorchium) olmak üzere iki yaprağı vardır. *Lamina visceralis*, sadece testis'in ön kenarını ve iki yüzünü örter; arka kenarın medial ve lateral taraflarında ise, kendi üstüne kıvrılarak *lamina parietalis* ile devam eder. *Lamina parietalis* ise testis'in alt kısmından üst kısmına doğru, hatta funiculus spermaticus'un ön ve iç tarafını da kaplayacak şekilde, bir miktar yukarıya doğru uzanır. *Tunica vaginalis* testis'in *lamina parietalis* ve *lamina visceralis*'i arasında potansiyel bir boşluk ve bu boşluk içinde de çok az bir seröz sıvı bulunur.

Arterleri: Sağ ve sol a. testicularis'ler (aorta abdominalis'in dalı).

Venleri: Her bir testis'in arka tarafından çıkan küçük venler birleşerek plexus pampiniformis adı verilen venöz ağı oluştururlar. Plexus pampiniformis, funiculus spermaticus içinde yükselir ve canalis inguinalis'ten geçerek karın boşluğuna ulaşır. Plexus pampiniformis'i oluşturan venler daha yukarıda birleşerek v. testicularis'i oluşturur. V. testicularis dextra, v. cava inferior'a; v. testicularis sinistra ise v. renalis sinistra'ya dökülür.

Lenfatikleri: Yüzeyel lenf damarları tunica vaginalis testis'in altında, derin lenf damarları ise testis ve epididimis'in içinde yer alır. Bu damarlar funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna geçer, sonuçta nodi aortici laterales ve nodi preaortici'ye açılır

Sinirleri: Testis'leri inerven eden sinirler medulla spinalis'in 10-11. torakal segmentlerinden gelir. Bu sinirler plexus aorticus ve plexus renalis içinden geçer ve testis'leri besleyen damarların çevresinde organa ulaşır. Testislerden birinin veya her ikisinin birden scrotum'a inmeyerek karın boşluğu veya *canalis inguinalis* içerisinde kalmasına 'inmemiş testis (*cryptorchidism*) ' adı verilir.

İnmemiş testis'te kanser insidansı yüksektir. Ayrıca bu durum tedavi edilmez ise spermatogenesis'in bozulmasına neden olur. *Tunica vaginalis* testis'in yaprakları arasında aşırı miktarda sıvı birikmesi durumuna hidrosel (hydrocele) adı verilir. Tümör, travma veya enfeksiyon gibi çok çeşitli nedenler, *lamina parietalis* ve *lamina visceralis* arasında bulunan sıvının artmasına veya emiliminde azalmaya sebep olarak aşırı miktarda sıvı birikmesine yol açabilir.

2.1.1. Testisin Embriyolojisi

Gonadlar, germinal epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşan bir çift gonadal kabarıklık halinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına kadar gonad içerisinde germ hücresi bulunmaz. Primordiyal germ hücreleri, 4 haftalık insan embriyosunun yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler. Ameboid hareketlerle, son barsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada genital kabarıklıkları doldururlar. Bu sırada genital kabarıklığın germinal epiteli proliferate olur ve epitel hücreleri, altındaki mezenşim içine girerler. Burada primitif seks kordonlarını oluştururlar. Düzensiz şekilli bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır. XY cinsiyet kromozomu taşıyan primordiyal germ hücrelerinin Y kromozomundaki testis belirleyici faktör etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları çoğalmaya devam ederler ve medullar kordonları oluşturmak üzere iç kesimlere doğru ilerlerler. Kordonlar, bezin hilusuna doğru rete testis tübüllerini oluşturacak bir ağ şekline dönüşürler. Gelişimin daha ileri evresinde testis kordonları, tunika albuginea adlı yoğun fibröz bağ dokusu ile yüzey epitelinden ayrılırlar. 4. ayda testis kordonları at nalı şeklini alır ve bunların uçları rete testisle devam eder. Testis kordonları, primitif germ hücreleri ve yüzey epitelinden köken alan Sertoli hücrelerinden meydana gelmiştir. Leydig hücreleri, genital kabarıklığın mezenşiminden köken alır. Testis kordonları arasında bulunurlar ve kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Gebeliğin 8. haftasında leydig hücrelerinden testosteron üretimi başlar. Puberteye kadar solid halde kalan kordonlar, pubertede lümenleri açılarak seminiferöz tübüllerini oluştururlar. Seminiferöz tübüller kanalize olduktan sonra rete testis tübüllerine katılırlar ve daha sonra duktuli efferenteslere girerler. (32).

2.1.2. Testisin Histolojisi

Testisler, epididimis ve vaza deferensin başlangıç kısmı tunika vaginalis denilen mezotelyum boşluğu içine alan deriyle kaplı bir cep olan skrotal kese içinde yer alırlar (27). Testisin başlıca iki görevi hormon ve spermatozoon üretmektir. Testiste üretilen başlıca hormon testosterondur. Testosteron spermatogenez, embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşma ve gonadotropin salgısının kontrolü için önemlidir (33). Testisler semen üreten parenşimli organlardır. Funiculus spermaticus'la asılı olarak skrotum içinde bulunurlar. Fetal hayatta testisler karın boşluğu içindedirler. Doğumdan sonra canalis inguinalis'ten geçerek (descensus testis) skrotuma inerler (32).

Testisler, lobuli testis denilen lobüllere ayrılırlar. Bu lobüller konik şekillidir. Mediastinuma doğru daralırlar, 400 tanedirler. Mediastinum, damarları ve duktusları destekler. Her lobülde bir veya birkaç kıvrılmış tubuli seminiferi contorti bulunur. Bunlar 60 cm uzunluğunda ve 150-250 mikrometre çapındadır. Bu tubuliler mediastinuma girerken birleşerek tubuli rektleri yaparlar. Sayıları 20-30 tanedir. Onlarda birleşerek rete testis denilen plexus'u yaparlar (32).

Rete testisten çıkan 10-12 duktuli efferentes tunica albugineayı delerek kaput epididimise girer. Testisin arka kenarına funikulus tutunmuştur. Arka kenarın yan kısmına bağlanmış olarak epididimis bulunur (32).

Seminifer tübül fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz lamina propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Seminifer epitelde iki tip hücre vardır. Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenetik seriyi oluşturan hücreler. Spermatogenik seri hücreler 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir; işlevleri spermatozoonları üretmektir. Spermatozoon üretimi spermatogenez olarak adlandırılır. Bu süreç, mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri içerir ve hücreler sonunda spermatozoonlara farklılaşır; bu aşama spermiyogenez olarak adlandırılır (32).

Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından önemlidir. Testisler de seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, sinirler, kan ve lenf damarlarıyla doldurulmuştur. Bağ dokusu çeşitli tipte hücre içerir, bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Ergenlikte işlevsel olarak belirgin hale gelen Leydig hücreleri interstisyel dokuda bulunur. Bu hücreler, sekonder seks karakterlerinin gerçekleşmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler (32).

2.1. 2. 1. Seminifer tübüller

Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her bir seminifer tübül; çapları yaklaşık 150-250 µm ve boyları 30-70 cm olan; iki ucu U şeklinde ve rete testise açılan tüplerdir. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir (34). Tübüller kıvrımlıdır ve uçlarına doğru lümeni daralarak düz tübüller ya da tubuli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam eden kangallar şeklinde uzanır. Bu düz tübüller, seminifer tübülleri rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlar. Rete testis,

seminifer epitelin ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes ile epididimin baş kısmına bağlanmaktadır (34).

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusunun kılıfı, belirgin bir bazal membran ve karmaşık bir terminal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz lamina propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal membrana yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Seminifer tübüllerin arasındaki boşluğu kan damarları, lenfatik kanallar veya sinüzoidler, makrofajlar ve androjen üreten hücre grupları olan interstisyel (Leydig) hücreleri doldurur (27, 29). Seminifer epitelde iki tip hücre vardır: Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenez serisini oluşturan hücreler (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler). Spermatogenez serisinin hücreleri 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir; fonksiyonları spermatozoonları üretmektir. Spermatozoonların üretimi spermatogenez olarak adlandırılır. Bu süreç, mitoz ve mayoz hücre bölünmeleri içerir ve hücreler sonunda spermatozoonlara farklılaşır; bu aşama spermiyogenez olarak adlandırılır (27, 29).

2.1.2.1.1. Miyoid hücreler

Miyoid hücreler hareketsiz spermleri rete testise ilerleten ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludurlar. Spermler epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri motilite özelliklerini kazanırlar. Peritübüler doku olarak da adlandırılan tunika propria, esas olarak fibroblast içeren çok katlı bir bağ dokusudur. Seminifer tübül etrafını çevreleyen 3-5 kat miyoid hücre ve kollajen fibril katmanından oluşmaktadır (33). Bazı hayvanlarda miyoid hücreler ultrastrüktüel olarak incelendiği zaman, sitoplazmasında çok sayıda aktin filamentleri içermesi ve bazal membrana sahip olması ile düz kas hücrelerine benzediği ortaya konmuştur. Fibroblastlarında bulunan düz endoplazmik retikulum içermeleri sayesinde kollajen sentezinde görev almaktadır (35). Spermatozoon ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden duktus epididimise ulaşması miyoid hücrelerin ritmik kasılma hareketi ile peristaltik hareketin sağlanması ile gerçekleşir (29).

2.1.2.1.2. Sertoli hücreleri

Destek hücreleri adını alan Sertoli hücreleri, bazaldan lümene kadar uzanan büyük, prizmatik hücrelerdir. Tübül boyunca düzgün aralıklarla yerleşim gösteren Sertoli hücreleri arasında bazale yakın yerde özel tip bağlantılar bulunmaktadır. Oval veya üçgen bir şekilli çekirdek büyük olup, 1-2 belirgin çekirdekcik içerir. Çekirdeğin en önemli özelliği bir ya da

daha fazla derin invaginasyonlar göstermesidir. Elektron mikroskopunda Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarının lipid damlacıkları yönünden zengin oldukları görülür. Ayrıca gelişmiş granüler endoplazmik retikulum (GER), yaygın agranüler endoplazmik retikulum (SER) sisternaları, dağınık halde serbest ribozomlar, primer ve sekonder lizozomlar, glikojen granülleri, mikrotübüller ve filamanlara sahiptir. İnsanlarda ender olarak da, çekirdek yakınında yer alan protein yapısında olduklarına inanılan kristalloid cisimcikler olan Charcot-Böttcher kristali de görülebilir. Sitoplazmada çok miktarda gözlenen elektron dens cisimciklerin, steroid senteziyle ilgili oldukları düşünülür. Mitokondriyonlar, tübüler tipte olup şekil değiştirirler. Ayrıca fincan şekilli mitokondriyonlar ve protrüzyon mitokondriyonlar diye tanımlanan özel tipteki mitokondriyonlar hücrenin bazalinde yer alırlar. Fincan şekilli mitokondriyonlar özellikle agranüler endoplazmik retikulum ile yakın ilişkilidir. Protrüzyon mitokondriyonlar ise agranüler endoplazmik retikulumun genişlemiş bir keseciğine doğru ağızlaşma gösterir. Sitoplazmada iyi gelişmiş Golgi kompleksi de yer almaktadır (29).

Sertoli hücreleri, puberteye kadar seminiferöz epitelin dominant hücre tipidir. Puberteden sonra, seminiferöz tübüleri döşeyen hücrelerin yaklaşık % 10'unu oluşturur. Daha ileri yaştaki erkeklerde spermatogenik hücre popülasyonu azaldığı zaman, Sertoli hücreleri tekrar seminiferöz epitelin ana elamanı haline gelir. Bazolateral bölgelerinde Sertoli hücreleri, komşu Sertoli hücreleri ile okludens tipi bağlantıları oluştururlar. Bazolateral okludens bağlantılar, seminiferöz epitel bazal ve adluminal kompartmana bölerler ve geliştirmekte olan spermatositleri ve spermatidleri oto-immün reaksiyonlardan koruyan kan-testis bariyerinin esas yapısını oluştururlar (29).

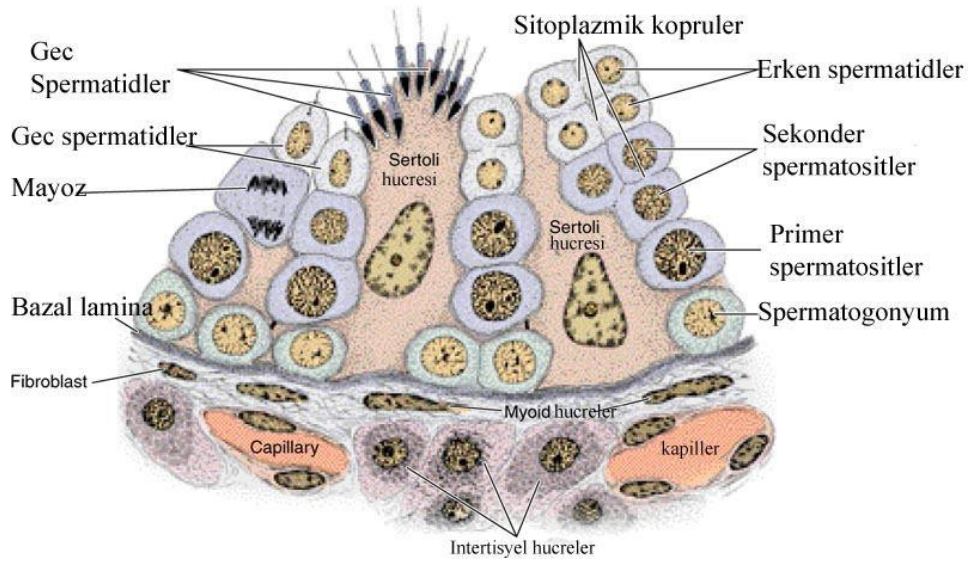
Sertoli hücrelerinin fonksiyonları:

- 1- Geliştirmekte olan spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek,
- 2- Spermiyogenezin sonunda atılan rezidüel cisimcikleri fagosite etmek,
- 3- Olgun spermatidlerin aktin aracılık asılmalarıyla, spermiyasyon sürecinde, seminiferöz tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak,
- 4- Seminiferöz tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılamak,
- 5- Follikül stimüle edici hormon (FSH) uyarımıyla, androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlemek. Bu protein, seminiferöz tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar.
- 6- Anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınımını önleyen; inhibin ve uyarıcı; aktivin adı verilen peptidleri salgılamak,

7- Anti-Müllerian (Müllerianinhibe edici) hormonu üretmek. Bu hormon embriyonik gelişim sırasında, erkek fetusta Müller (Paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlar (34).

2.1.2.1.3. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantıların altında yerleşim gösterdikleri için kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar. Üç temel morfolojik spermatogonyum tipi gözlenir: Tip A koyu spermatogonyumlar, seminifer epitelin kök (stem) hücreleridir. Yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinli oval çekirdek içerirler. Puberteden itibaren mitotik hücre bölünmeleri geçirerek ya tip A koyu spermatogonyumlarına da tip A açık spermatogonyumları oluştururlar. Tip A açık spermatogonyumlar, soluk boyanan, ince granüler kromatinli oval çekirdek içerirler. Mitotik bölünmeleri sonucunda farklı olarak tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumlar, merkezi yerleşimli çekirdeğe sahip sferikal çekirdek içerirler. Çekirdek kromatini çekirdekcik çevresinde ve çekirdek kılıfı boyunca yoğunlaşma gösterir (36, 37)



Şekil 4: Seminifer Tübül ve Spermatogenik hücre serileri (38)

2.1.2.1.4. Primer ve sekonder spermatositler

Başarılı mitotik bölünmeler geçirdikten sonra, tip B spermatogonyumlar, son S fazını (DNA sentezi) tamamladıktan sonra mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerler. Spermatogenik hücrelerin yaşam süresindeki esas DNA sentez aktivitesinin bu son turu, mayozun profaz I aşamasına başlayan bir primer spermatositin spermatogonyuma göre iki kat DNA miktarına sahip olacağını belirler. Primer spermatositler 46 kromozom ($44+XY$) ve $4N$ DNA [N haploid kromozom sayısını (insanlarda 23 kromozom) ya da bu kromozom takımındaki DNA miktarını gösterir] içerir (39). Spermatositler iki başarılı mayotik hücre bölünmesi geçirirler ve Sertoli hücreleri arasındaki tıkalı bağlantıların hemen üzerinde, seminifer tübülün adluminal kompartmanında yer alırlar. Dolayısıyla, mayoz bölünmeler kan-testis bariyeri içinde gerçekleşir (27, 33).

Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bir primer spermatosit iki adet sekonder spermatositi oluşturmak üzere birinci mayoz bölünmeye gider. Bu bölünmenin profaz aşaması yaklaşık 22 gün sürdüğünden, kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamada izlenecektir. Primer spermatositler spermatojen serinin en büyük hücreleridir ve çekirdeklerinde, sarmalanma sürecinin değişik aşamalarında kromozomların bulunması ile tanınırlar. Birinci mayoz bölünmeden sonra sekonder spermatositler olarak adlandırılan ve yalnızca 23 kromozom ($22+X$ veya $22+Y$) içeren daha küçük hücreler oluşur. Sekonder spermatositler çok hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve belirgin bir DNA sentezi olmayan ikinci mayoz bölünmeye giderler. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda çok kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir. Her bir sekonder spermatosit artık herhangi bir hücre bölünmesi göstermeden sperm şeklinde olgunlaşan iki adet haploid spermatid meydana getirir. Döllenmeyle bunlar diploid sayıya dönerler (27; 35)

2.1.2.1.5. Erken ve geç dönem spermatidler

Haploid spermatidler seminifer tübül lümenine yakın adluminal kompartmanda yerleşen, sertoli hücre sitoplazma kriptaları içinde gömülü, küçük boyutları (7-8 μm çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren çekirdekleri ile ayırt edilebilir hücrelerdir (27; 31). Spermatidin sitoplazması, çekirdeğin yakınında yer alan belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriyumlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulumu tübüllerini içerir. Proakrozomal granüller olarak adlandırılan PAS pozitif küçük granüller Golgi

kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek zarla sınırlı bir akrozom vezikülünün içinde yer alan tek bir akrozom granülü oluştururlar (34)

2.1.2.1.6. Spermatozoon (Olgun spermatozoa)

Olgun germ hücresidir. İnsanda spermatogonyumdan spermatozoon oluşumu arasında geçen süre yaklaşık 64 gündür ve bu sürece spermatogenezis adı verilir. Olgun insan spermatozoonu baş, orta parça ve kuyruktan oluşur. Spermin baş ve kuyruk kısımlarını plazma membranı sarar. Baş, akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek yassılaştırmış şekilde olup, yoğun halde kromatin içermektedir. Çekirdeğin anterior yarısını akrozom örter. Özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom; akrozom denilen tripsin benzeri proteazlar, asit fosfataz, hyalurodinaz ve nöroaminidaz gibi hidrolitik enzimler içerir. Orta parça, baş ve kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlayan bir çift sentriolün bulunduğu dar bir parçadır. Distal sentriol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonemaya kaynaklık yapar. Kuyruk yapısal yönden silyuma benzer. Kuyruk üç parçaya bölünmüştür; orta parça, esas parça ve son parça. Kuyruğun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonema ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz adet uzunlamasına seyreden filamanlardan oluşur. Esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır. Yedi dış yoğun lifle sarılı merkezi aksonema ve bir fibröz kılıftan oluşur. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturur. Son parça, dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı sadece aksonema bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır (27).

2.1.2.2. İnterstisyel alan

Testisin seminifer tübülleri arasındaki boşluklar; Leydig hücreleri, bağ dokusu elemanları, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillerler pencere tiptedir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler. İnterstisyel alanın, lenf damarlarından zengin olması, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. İnterstisyum Leydig hücreleri, fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajları içermektedir. Leydig veya testisin interstisyel hücreleri, yuvarlak ya da poligonal şekilli olup, eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptir. Merkezi yerleşimli çekirdek kaba kromatin granülleri ve belirgin çekirdekçik içerir. Steroid sentez eden hücre özellikleri taşıyan sitoplazma, yaygın agranüler endoplazmik retikulum, küçük lipid damlacıkları, tübüler kristalli mitokondriyonlar, lipofuksin granülleri ile Reinke kristali ve prekürsörlerine sahiptir. Leydig hücreleri, sekonder seks

karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondriyon ve agranüler endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilir. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda gebelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon, maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten, fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Androjenik hormonlar, gelişim sırasında, erkek genital organların farklılaşması için gereklidir (27, 29, 32; 35)

2.1.2.2.1. İnterstisyel bağ dokusu

Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından önemlidir. Testislerde seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, sinirler, kapillerler ve lenf damarları ile doludur. Bağ dokusu değişik tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Ergenlikte başka bir tip hücre daha fonksiyonel olarak belirgin hale gelir. Bu hücreler testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir (26, 27).

2.1.2.2.2. Leydig hücreleri

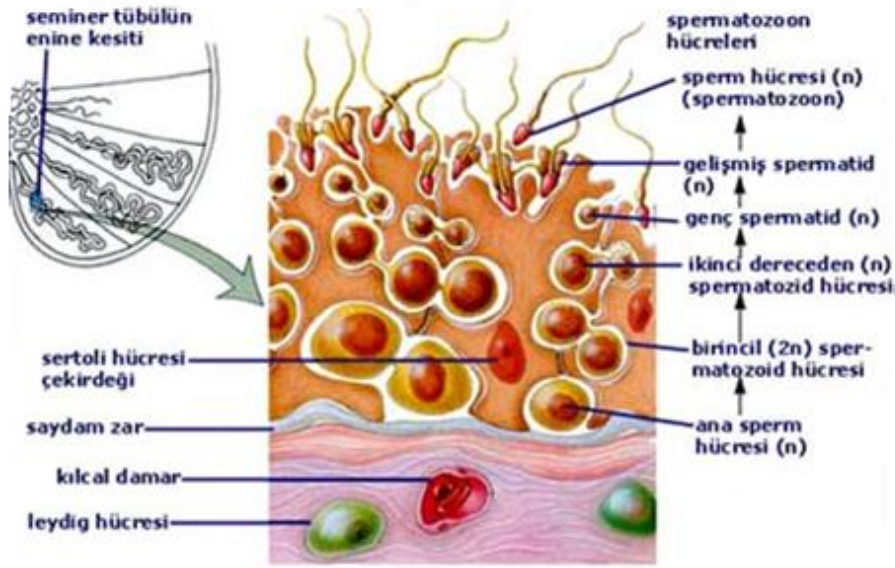
İnterstisyel Leydig hücreleri, gonadal kabarıklığın orijinal mezenşiminden köken alırlar (29). Memelilerdeki Leydig hücreleri en az iki farklı tip içerirler. Fetal tip Leydig hücreleri, fetal ve neonatal yaşam boyunca erkeğe ait primer seks karakterlerinin oluşmasından sorumludur. Bunları pubertal erkeğe ait özelliklerden sorumlu yetişkin tip Leydig hücrelerinin oluşması takip eder (35).

Fetal Leydig hücrelerinin gelişimi; ilk fetal Leydig hücreleri, testisin şekillenmesini takiben nispeten daha geç farklılaşırlar. Erkek gonadlardan ilk olarak açık bir şekilde tanımlanabilecek olan yapı histolojik kesitlerden de görülebilen seminifer tübüllerdir. İlk Leydig hücreleri fetal testisin bu gelişim basamağından sonra görülür (33).

Ratlarda seminifer tübüller 13. günde şekillenir. Aynı zamanda germ hücrelerinin etrafında ve onları çevreleyen büyük yeni tip hücreler (sertoli hücre öncülleri) ortaya çıkar (33). Bu, gonadın anterior bölgesinde başlar ve gonadın içine girinceye kadar genişleyerek devam eder ve 24 saatte sonuçlanır. Aynı zamanda bazal membran spermatik kordların etrafında kademe kademe şekillenir. Daha sonra Leydig hücreleri mezenşimal hücrelerden farklılaşarak interstisyel alanda 15.5 günde görülürler. Bu hücreler steroid üreten hücrelerin ultrastrüktürel yapısını gösteren; tübüler krsitalı büyük mitokondriler, lipid damlacıkları ve düz endoplazmik retikulum (DER) içerirler (29). Fetal rat testisleri testosteron üretmeye in vivo ve in vitro her

iki durumda da 15.5 günde başlar (40). Fetal rat testislerinin gelişebilmesi luteinizan hormonun (LH) bağlanması ile olur ve bu hormona cevap 14.5 gün ile 15.5 gün arasında olur. Aynı zamanda testosteron sekresyonunda başlar. Fetal Leydig hücreleri doğumdan sonraki ilk ve ikinci postnatal hafta boyunca azalır (41). Fetal Leydig hücrelerine postnatal 2. haftadan sonra ne olduğu net olarak bilinmemektedir. Histolojik ve ultrastrüktürel gözlemlerden bunların dejenere olarak yetişkin tip Leydig hücrelerine dönüştüğü veya postnatal yaşam boyunca özel bir grup olarak kaldığı ileri sürülmektedir (42).

Yetişkin Leydig hücrelerinin gelişimi; ratlarda, yetişkin tip Leydig hücreleri postnatal 10. gün dolaylarında görülürler ve 15. günden itibaren pubertenin sonuna kadar (56.gün) artmaya devam ederler. Leydig hücreleri mezenşimal hücrelerden şekillenirler, fakat bunlar bir önce meydana gelen Leydig hücrelerinden farklıdır. Leydig hücrelerinin sayıca artışı LH ve folikül stimulan hormon (FSH) kontrolü altındadır (43).



Şekil 5: Leydig Hücresi (44)

2.1.3. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumdan olgun sperme dönüşme aşamasındaki bir dizi olaylar sürecini kapsamaktadır. Puberteden kısa bir süre önce, hipofizden salınan gonadotropinler sayesinde başlar ve hayat boyu devam eder (45).

Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu olay üç faza ayrılır:

1. Spermatositogenez
2. Mayoz
3. Spermiyogenez

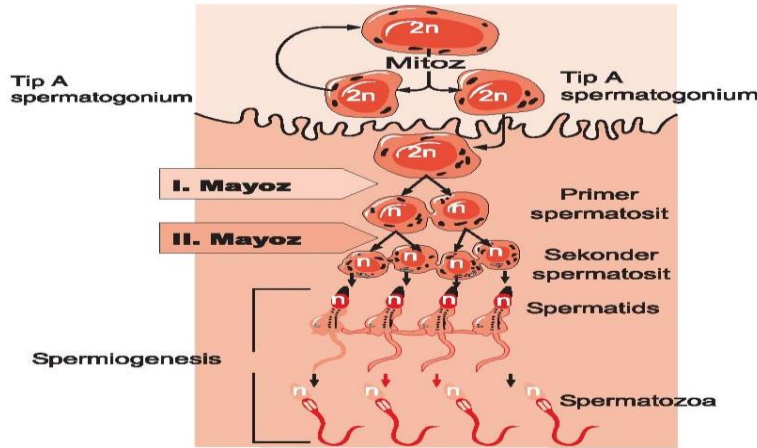
Spermatositogenez evresi: Bu evre spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden primer spermatositlerin oluşma sürecidir. Bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş germ hücreleri olan, spermatogonyumlar ile başlar. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler. İnsanda morfolojik olarak ayrılabilen 3 tip spermatogonyum vardır: koyu tip A spermatogonyum, soluk renkli boyanan açık tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum. Koyu tip A spermatogonyum spermatogenik serinin kök hücre rezervi olarak görev yapar. Zaman zaman tip B spermatogonyuma farklılık gösteren açık tip A spermatogonyuma bölünür. Tip B spermatogonyum ise primer spermatositlere farklılık gösteren öncül hücrelerdir.

Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatosit ile spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynarlar (33).

Mayoz evresi: Primer spermatositlerin peş peşe iki mayoz bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu spermatidlerin oluştuğu evredir (33).

Spermiyogenez: Spermatidlerin farklılaşma süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu evredir (33). Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak ortamdan uzaklaşması ile spermatidler arasında birbirinden ayrılır. İnsanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki süreç yaklaşık 64 gündür (33). Bu süreç dalgalanmalar şeklinde oluşur, her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümünü açıklar.

Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonların bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. Seminifer epitel siklusu; germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her siklus yaklaşık 16 ± 1 gün sürer ve spermatogenez dört siklustan sonra biter (35; 37).



Şekil 6: Spermatogenez (46)

2.1.4. Testisin Histofizyolojisi

Vücut sıcaklığının (37°C) altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin regülasyonunda ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35°C 'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Zengin bir venöz pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı sağlanması ile soğuk gibi durumlarda da spermatik kordondaki kremaster kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesi de diğer mekanizmalardır. Spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi endokrin faktörler oluşturur. Spermatogenez, hipofizin FSH ve lüteinizan hormonlarının (LH) testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH, intertisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. FSH'nin ise Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle ettiği ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açtığı ve aynı zamanda ABP'nin sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosterona bağlanarak testosteronu seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatogenez testosteron uyarır, östrojen ve progesteronlarla inhibe edilir. Spermatozoonlar epididimise, uygun bir ortam olan testiküler sıvı içinde taşınırlar.

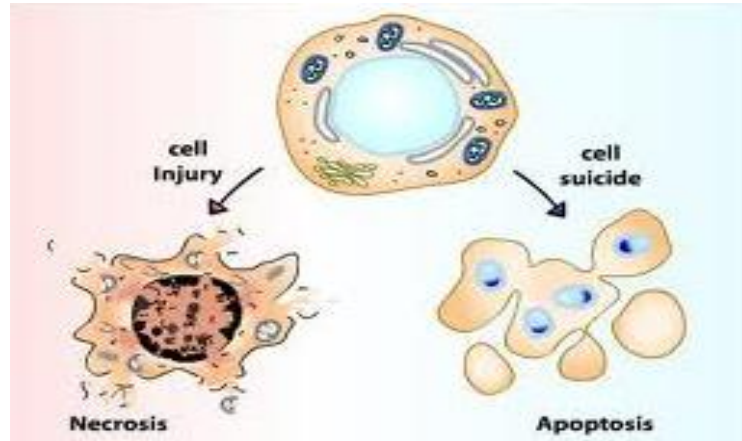
Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içerir (34).

2.1.5. Apoptozis

Apoptozis, birçok fizyolojik ve patolojik olaylarda meydana gelen programlanmış hücre ölümüdür. Kelime olarak “ayrı düşme” anlamına gelir. Embriyonal ve fötal gelişim sürecinde, yaşlılıkta, hormon azalmasına bağlı olarak meydana gelen involusyonlarda ve immün reaksiyonlarda fizyolojik olarak apoptozis görülmektedir (47).

Apoptotik süreç esnasında, hücrede birçok morfolojik değişiklikler meydana gelir. Bu değişiklikler; hücrelerin küçülmesi, büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, nüklear piknoz ve parçalanma, sitoplazmik tomurcuklanma ve apoptotik cisimciklerin oluşumu ile karakterizedir. Nükleozomlar arası DNA yıkımı görülür. Apoptotik cisimcikler fagosite olduğu için doku reaksiyonlarında inflamasyon görülmez (47). Apoptotik süreçte gözlenen aşamalar şu şekilde sıralanabilir;

1. Apoptozis’in başlatılması,
2. Hücre içi proteazların aktivasyonu,
3. Hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler,
4. Fagositoz.



Şekil 7: Apoptozis (48)

1. Apoptozis’in başlatılması: Apoptotik sürecin başlamasında hücre içi ve hücre dışı kökenli ölüm sinyalleri etkili olur. Bu uyarılara maruz kalan hücrede, ilgili genetik mekanizma harekete geçer ve apoptozis başlar (47).

Metabolizma ve siklus bozuklukları, hiperkalsemi, pH değişiklikleri gibi etkiler hücre içinden kaynaklanan sinyallerdir. Hücre dışından gelen sinyaller ise, ultraviole ışınları, hipoksi, ısı değişiklikleri, anti-kanser ilaçlar ve toksik maddelerdir. Dış kaynaklı olan sinyaller DNA hasarı meydana getirerek apoptozise yol açmaktadır (49).

2. Hücre içi proteazların aktivasyonu: Hücre içi ya da hücre dışından gelen apoptotik sinyaller, hücre içerisinde bulunan proteazları aktive eder. Bu proteazlara kaspaz adı verilir. (caspase: cysteine containing aspartate specific proteases). Şu ana kadar belirlenmiş 14 -15 kaspaz vardır (49). Bu kaspazlar; başlatıcı kaspazlar, öldürücü kaspazlar ve sitokin olgunlaşmasından sorumlu kaspazlar olarak üç sınıfa ayrılır (47). Sonuç olarak, bu kaspazların aktive olması apoptotik sürecin başlamasına yol açar (50). Bu olay şu şekilde gerçekleşir;

Mitokondri apoptozis olayında önemli rol oynar. Mitokondrial yol, sitotoksik ajanlar ve oksidatif baskı gibi çeşitli intraselüler ve extraselüler etkiler sonucu aktive olur. Apoptotik sinyaller, mitokondriye ait iç ve dış membranlar arasındaki boşluktan sitoplazmaya doğru sitokrom c salınmasına neden olur. Sitoplazmaya salınan sitokrom c, burada apaf-1'e (apoptotic protease activating factor 1) tutunur. Apaf-1'e tutunan sitokrom c sitoplazmada apoptozom oluşumuna neden olur. Meydana gelen apoptozomlar ise, kaspazları aktive eder. Sonuç olarak, kaspazların aktivasyonu da apoptozise yol açar (50).

3. Hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler: Apoptotik sürecin sonlarına doğru, kaspazlar DNA kırılmalarına yol açar. Aktin filamanının yıkımına bağlı olarak hücre normal şeklini kaybeder ve hücre membranının asimetrisi bozulur. Su kaybeden hücre büzülür. Hücre yüzeyinde kraterler oluşur. Çekirdek de büzülerek parçalanır. Son olarak hücrenin parçalanmasıyla apoptotik cisimcikler meydana gelir (47).

4. Fagositoz: Meydana gelen apoptotik cisimcikler, çevredeki parankim hücreleri ve makrofajlar tarafından fagosite edilerek dokudan temizlenir. Apoptozis esnasında inflamasyon oluşmaz (47).

Apoptozis'in Düzenlenmesi: Hücrelerdeki apoptotik sürecin kontrol edilmesinde mitokondriler önemli bir rol üstlenir. Apoptozis sürecinde Bcl-2, Bax ve Bcl-X görev alan başlıca mitokondri molekülleridir (50). Bcl-2 ailesi pro-apoptotik (Bax, Bak, Bad, Bcl-XS) ve anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL) üyeleri içerir (50). Bu üyelerin mitokondrileri etkilemesi sonucu sitokrom c ya sitoplazmaya salınır (apoptozisin başlaması) ya da salınım baskılanır (apoptozisin inhibisyonu). Pro-apoptotik ve anti-apoptotik üyeler arasındaki denge sitokrom c salınmasında önemli bir role sahiptir.

Bcl-2, Bax'ın mitokondrial membrana tutunmasını engelleyerek, sitoplazmaya olan sitokrom c salınımını inhibe eder ve apoptozis engellenir. Olayın bu şekilde gerçekleşmediği durumlarda ise, Bax mitokondrial membrana tutunarak sitoplazmaya olan sitokrom c salınmasını aktive eder ve apoptozis oluşur. Sonuç olarak, bir hücre sitoplazmasında immuno histokimyasal olarak Bax proteininin gösterilmesi o hücrede apoptozis'in meydana geldiğini ortaya koyar (51, 52).

2.2.Bisfenol A

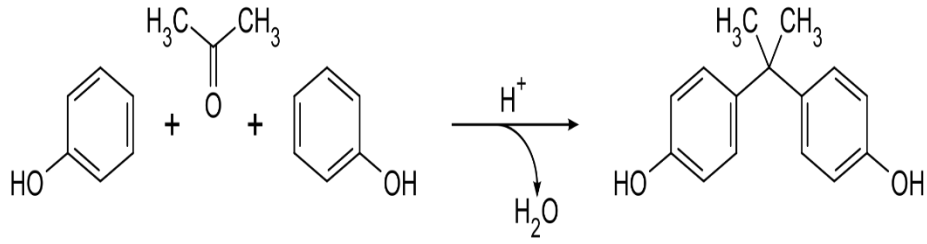
Bisfenol A (BPA) plastiklerin ve reçinelerin üretimi esnasında diğer kimyasallar ile polimerleşmesine yardımcı olarak kullanılan bir monomerdur. 2,2-bis(4-hidroksifenil) propan, genel olarak Bisfenol A (BPA) adı ile bilinmektedir. İki mol fenolün bir mol aseton ile düşük pH'da ve yüksek sıcaklıkta kondensasyonu ile elde edilmektedir. Genelde üretilen BPA %99-99.8 saflıkta olmaktadır (53).

2.2.1.Bisfenol A'nın Genel, Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

BPA katı, fenolik kokulu, krem-beyaz renkte, kristal yapıdadır. 25°C'deki yoğunluğu 1.1-1.2 gL⁻¹'dir. Etanol, aseton ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde iyi çözünmektedir. Sudaki çözünürlüğü 25°C'de 120 mgL⁻¹'dir (53).

2.2.2. Bisfenol A'nın Üretimi ve Kullanım Alanları

BPA'nın dünyadaki yıllık üretimi ortalama 1.7 milyar kg civarındadır. Almanya, Hollanda, Japonya ve Amerika gibi ülkelerde Dow, Bayer, Shell, Mitsubishi, Mitsui ve Shin Nihon gibi firmalar tarafından üretilmektedir. BPA'nın kullanım alanının fazla olması ve artan talep nedeniyle yıllık üretimi de giderek artmaktadır. Sadece Avrupa'da 1997-98 yılları arasında 40.000 ton BPA kullanılmıştır. BPA'nın en fazla kullanıldığı alan %60'lık oranla polikarbonat plastik üretimidir. Bunu %26'lık oranla epoksi reçine üretimi takip etmektedir. Genel olarak polyester üretimi, termal kağıt üretimi, PVC plastiklerde katkı maddesi olarak kullanımı, lastik ve poliamid sanayinde kullanımı % 0.2-0.3 oranlarında değişmektedir. Günlük hayatımızda kullandığımız PVC plastik pencereler, kompakt disk, iş güvenlik kaskları, kurşun geçirmez camların yüzeyine kaplanan film, otomotiv parçaları, toz boya, su ve süt şişesi, bebek biberonu, birçok elektrik ve elektronik parça yapımında BPA kullanılmaktadır (53).



Şekil 8: Bisfenol A'nın Formülüzasyonu (54)

Polikarbonat plastikler ve epoksi reçineler genel olarak gıda saklama poşetleri, su, kola ve meyve suyu şişeleri, kola ve bira kutularının iç yüzeyinin kaplandığı plastik film yapımında, bebek biberonu ve kompakt disk yapımında kullanılmaktadır. Yüksek sıcaklığa dayanıklı polikarbonat plastikler yaygın olarak otomotiv sektöründe de kullanılmaktadır. BPA'nın çok geniş kullanım alanının olması günlük hayatta kişilerin BPA ile temas etme risklerini arttırmaktadır (13).

Polikarbonat bebek biberonlarının normal kullanımı ile <0.03-5 ppb, polikarbonat şişelerin otoklav edilmesi ile 2.8 ppb ve epoksi film kaplı konserve kutusundan 80 ppb BPA'nın açığa çıkabildiği belirtilmektedir. Diş dolgu maddesi yapımında polimerik BPA bis-glisidildimetasilat ve Bisfenol A-dimetilakrilat kullanılmaktadır (55). 50 mg diş dolgu maddesinin uygulanmasından 1 saat sonra 0.05-1 ppm BPA'nın açığa çıktığını belirtmektedir (65).

2.2.3. Bisfenol A'nın Çevresel Durumu

BPA'nın çevresel konsantrasyonu hakkında yapılan çalışmalarda yüzey sularında BPA konsantrasyonlarının farklılıklar gösterdiği belirtilmektedir. Avrupa'da yapılan çalışmalarda BPA'nın yüzey sularındaki oranlarının farklı ülkelerin sınırlarından geçen aynı nehirde bile farklılık gösterdiği belirtilmiştir. Almanya, Belçika ve Hollanda'nın şehir şebekesi suları Rhine ve Meuse nehirlerinden temin edilmektedir. Yapılan çalışmalarda şehir şebekesi suyunda (<8-11 ngL⁻¹) BPA bulunduğu belirtilmektedir (56). BPA'nın büyük miktarlarda çevreye bulaşması, üretim sırasında oluşan atıkların yeterince arıtılmadan atık sularla yüzey sularına verilmesi, BPA depolarında meydana gelen kaçaklar ve taşımacılık sırasında meydana gelen kazalarla gerçekleşmektedir. 1993 yılında üretilen 640.000 ton BPA'nın yaklaşık %0.017'si çeşitli yollarla çevreye dağılmıştır.

2.2.4. Bisfenol A'nın Mutajenite ve Toksisitesi

Yapılan bakteriyel mutasyon çalışmalarında BPA'nın mutajenik olmadığı belirtilmektedir. BPA ile ön inkübasyona bırakılan *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 ve TA1537 suşları ile gerçekleştirilen mutasyon çalışmalarında 333.3 µg plak konsantrasyonu için metabolik aktivasyonlu (+S9) ve metabolik aktivasyonsuz (-S9) test edilen örneklerde revertantların sayısında artış olmadığı belirtilmektedir (57). Benzer bir diğer çalışma *S. typhimurium* TA97a, TA98, TA100 ve TA102 suşları ile 500 µg plak konsantrasyonunda metabolik aktivasyonlu ve aktivasyonsuz örneklerde revertantların sayısında artış olmadığı belirtilmiştir (58). BPA düşük akut inhalasyon toksisitesi göstermektedir. 10'ar adet dişi ve erkek Fisher F344 ratları ile gerçekleştirilmiş bir çalışmada 170 mg/m³ BPA inhalasyon yolu ile verilmiş ve çalışmada hiçbir ratın ölmediği, LC50 değerinin >170 mg/m³ olduğu belirtilmiştir (59). BPA'nın akut oral toksisitesinin belirlenmesi için yapılan çalışmada 5'er adet dişi ve erkek (Sprague-Dawley) rata oral yolla (2000–5000 mg/kg) verilen BPA'nın 2000 mg/kg konsantrasyonunda ölüme neden olmadığı, 5000 mg/kg konsantrasyonunda erkeklerden 1'inin ve dişilerin hepsinin öldüğü belirtilmiştir. Dişilerin erkeklerden daha hassas olduğu, erkek ve dişilerin hepsi değerlendirildiğinde LD50 değerinin 5000 mg/kg⁻¹ olduğu belirtilmiştir (5).

BPA ve analoglarının Suriye hamster embriyo hücre kültüründe ve V79 hücre kültüründe aneuploidiye neden olduğu, BPA'nın dietilstilbestrolden daha düşük aktiviteli olarak V79 hücre kültüründe mikro nükleus oluşumuna neden olduğu belirtilmektedir (60).

2.2.5. Bisfenol A'nın Vücuda Alınması ve Fetüse Etkisi

Oral yolla alınan BPA, gastrointestinal yolla vücuda girmektedir. Oral yolla alınan miktarın %83 kadarı 72 saat içinde dışkı ile atılmaktadır. Vücuda alınan BPA, öncelikle karaciğerde monoglukuronid formuna dönüştürülmekte ve daha sonra idrarla vücuttan atılmaktadır. BPA'nın monoglukuronid formunun anne sütüne geçebileceği belirtilmektedir. Hamile sıçanlara besinlerle verilen BPA'nın, plasentada, 0,4 ve kanda 1,6 µg/kg olarak bulunduğu ve plasenta yolu ile fetüse geçtiği belirtilmektedir. Yavruda BPA konsantrasyonunun anneye göre daha az olduğu ancak BPA'nın akümüle olabilme özelliğinden dolayı fetüsün risk altında olduğunu göstermektedir (61). İçme suyu ile verilen BPA'nın üreme, testis patolojisi ve spermatogenezis üzerine etkisi dört nesil boyunca incelenmiş (2-200 µg/kg günlük), BPA'nın sıçanlarda üreme, testis patolojisi ve özellikle spermatogenezis üzerinde olumsuzluklar meydana getirdiği belirlenmiştir.

BPA'nın düşük çevresel konsantrasyonları (2,4 µg/kg) sıçanlarda eşeyssel olgunluğun hızlanmasında postnatal gelişmelerde anormalliklere neden olmaktadır (62).

2.2.6. Bisfenol A'nın Hormonal Aktivitesi

İnsan, rat ve sıçanlarda östrojen reseptörlerinin Erα ve Erβ olmak üzere iki alt tipi bulunmaktadır. BPA'nın Erα ve Erβ reseptör bölgelere bağlanabilme özelliği 17β-estradiol'e göre 10.000 kez daha zayıftır (61). Ratlar ile yapılan çalışmalarda BPA'nın östrojen reseptörlerine bağlanabilme oranının 17β-estradiol'e göre 1/2000-8000 kez daha zayıf olduğu belirtilmiştir (54). MCF-7 hücre kültüründe BPA'nın insan serumu varlığında hücre proliferasyonunu inhibe ettiği belirtilmektedir. Östrojen antagonisti hidroksitamoksifen varlığında BPA'nın östrojenik aktivitesi 17β-estradiol gibi inhibe olmaktadır. BPA, MCF-7 hücrelerinde 17β-estradiol gibi progesteron seviyesinin artışına neden olmaktadır (63). BPA'nın progesteronik aktivite göstermediği ve anti-androjenik aktiviteli olduğu belirtilmiştir. BPA, 17β-estradiol gibi prolaktin salgılanmasını arttırmakta, konsantrasyona bağlı olarak değişen prolaktin salınması 17β-estradiole göre 1/1000-5000 kat daha zayıf olmaktadır (63).

2.2.7. Bisfenol A'nın Biyodegradasyonu

BPA'nın biyodegradasyonu çalışmaları, kültür ortamındaki organizmaların oksijen tüketimi, karbondioksit oluşurması ve analitik cihazlarla BPA'nın kalitatif ve kantitatif analizi gibi farklı yöntemlerle gerçekleştirilmektedir. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development) 301B Ready Biyodegradasyon testi ile Bisfenol A'nın şehir kanalizasyonu lağım çamurunda 28 günlük Ready Biyodegradasyon düzeyinin %83,6 olduğu, organizmaların ürettiği CO₂ miktarına göre belirlenmiştir. *West ve Goodwin* (1997), OECD 301F Manometrik Respirometri testi ile BPA'nın 28 günlük biyodegradasyon düzeyinin % 81–93,1 arasında değiştiğini belirtmektedirler (64). *Stone ve Watkinson* (1983), kapalı şişe (Closed bottle) ve Modifiye Sturm testiyle aktif çamurda BPA'nın biyolojik olarak parçalandığı belirtilmektedir (65). *Turner ve Watkinson* (1986), biyolojik atık su arıtma tesisi Modifiye SCAS (Semi Continuous Activated Sludge) testi ile BPA'nın 30 günlük aerobik biyodegradasyon düzeyinin %87–95 arasında değiştiğini belirtmektedir (66). BPA'nın nehir suyu örneklerinde parçalanmasında bakteri sayısının etkili olduğu, bakteri sayısı >10.000 CFU mL olduğu durumlarda 30°C'de 2, 20°C'de 4 ve 4°C'de 20 günde %40'nın parçalandığı belirtilmiştir. Beyaz çürükçül küf mantarı *Trametes villosa*'dan izole edilen lakkaz enzimi ile BPA'nın parçalanabildiği belirtilmiştir (67).

BPA'nın topraktaki parçalanabilirliğinin çok uzun zaman aldığı, ¹⁴C ile işaretli BPA kullanılarak yapılan çalışmada ancak 120 günlük inkübasyon sonrasında işaretli karbondioksit örneklerinin toplanabildiği belirtilmiştir (63).

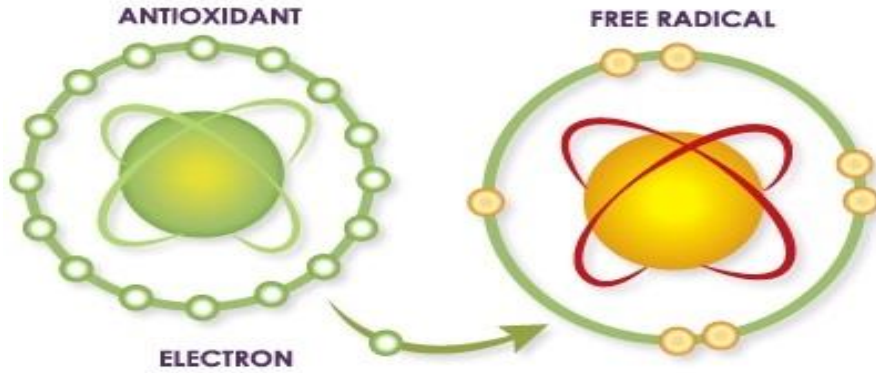
2.2.8. Bisfenol A'nın Metabolize Edilmesi

BPA'nın biyodegradasyonu sırasında minör ve majör olmak üzere iki yolla metabolizma olmaktadır. BPA'nın 4-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksiasetofenon gibi ara bileşiklere ve karbondioksite kadar parçalanmaktadır (68). BPA'nın yaklaşık %80 kadarı biyodegradasyon sonucunda p-hidroksiasetofenon ve p-hidroksibenzaldehit'e değişmektedir. Bu parçalanmış iki ürün, daha sonra p-hidroksibenzoik asit ve CO₂'ye kadar indirgenmektedir. BPA'nın kalan %20'lik kısmı biyolojik siklus içinde önce 2,2-bis-(4-hidroksifenil)-1-propanol'e daha sonra minör biyodegradasyon yolunda 2,3-bis-(4-hidroksifenil)-1,2-propandiol (Tetraol-IV)' e dönüştürülmektedir. Tetraol-IV oldukça yavaş bir şekilde p-hidroksifenaçil alkole dönüştürülmektedir. BPA'nın karışık kültürde biyodegradasyonu sonucunda oluşan parçalanma ürünleri arasında Tetraol-IV ve p-hidroksifenaçil alkol tespit edildiği belirtilmektedir (69).

2.3. ANTİOKSİDANLAR

2.3.1. Antioksidanların tanımı

Genel tanımıyla antioksidanlar, canlı organizmalarda oluşan oksidan yapıların lipid, karbonhidrat, protein, DNA gibi okside olabilecek yapılara etki etmesini engelleyen veya geciktiren yapı ve enzimlere denilmektedir (70). Antioksidan molekülleri hücrelere saldırmadan serbest radikalleri deaktif ve stabilize etme yeteneğine sahip olmaktadır. İyi bir antioksidanda olması gereken özellikler; kolayca absorbe olabilmeli, serbest radikallerin etkilerini ortadan kaldırabilmeli, hem sıvı ortamda hem zar ortamında fonksiyonel bir şekilde işlevini yerine getirebilmeli, redoks metalleriyle şelat oluşturabilmelidir. Endojen veya eksojen yollarla oluşan radikaller antioksidanlar sayesinde reaksiyonları yavaşlatılarak etkisiz hale getirilebilmekte veya olumsuz etkileri azaltabilmektedir (71).



Şekil 9: Serbest radikalin nötralizasyonu (72)

2.3.2. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar enzimatik ve enzimatik olmayan şeklinde sınıflandırılırlar. En önemlileri şunlardır;

Enzimatik Antioksidanlar:

- Süperoksit Dismutaz (SOD),
- Katalaz (CAT)
- Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px),
- Glutasyon Redüktaz (GR)
- Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)

Enzimatik Olmayan Antioksidanlar:

- | | |
|----------------|-----------------------------|
| -Glutasyon | -Flavonoidler |
| -Vitamin A | -Melatonin |
| -Vitamin C | -Selenyum |
| -Vitamin E | -Transferrin ve Laktoferrin |
| -Albumin | -Ferritin |
| -Haptoglobulin | -Ürik Asit |
| -Sistein | -Mannitol |
| -Seruloplazmin | -Lipoik Asit |
| -Bilirubin | -Hemopeksin |
| -Ubikinon | -Oksipurinol |
| -Likopen | |

2.3.3. Likopen

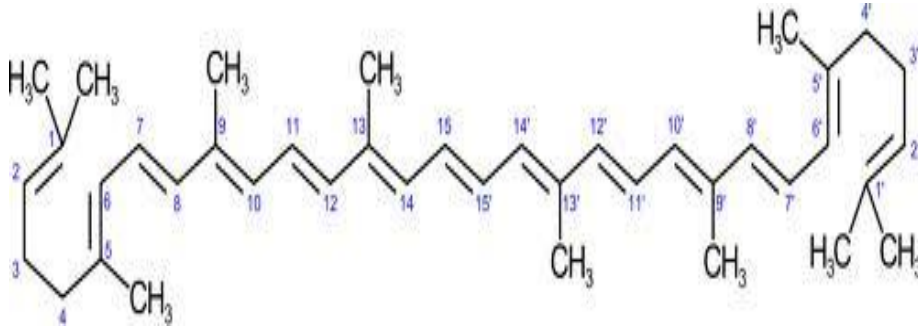
Karotenoidler, en önemli kaynağı bitkiler olan doğal olarak görülen pigmentlerin geniş oranda dağılmış bir grubudur. Genellikle kırmızı, sarı ve turuncu renklidir. Parlak renkleri, yeşil sebze ve yapraklarda olduğu gibi klorofilik pigmentlerce maskelenmiştir. Olgun bitkilerde klorofil içeriğinin azalması sonucu domates, portakal, karpuz gibi çoğu meyvenin güzel renkleri ortaya çıkar. Karotenoidler, bitkilerin fotosentezi için ışık toplama, özellikle de yıkıcı fotooksidasyona karşı koruyucu olarak gereklidir. Karotenoidler çoğu ticari gıda maddesine kimyasal sentezle üretilen saf bileşikler ya da doğal ekstraktlar şeklinde renklendirici olarak ilave edilir (73). İnsanlar tarafından bitkisel besinlerle alınan karotenoidler, A-Vitami prekursörü olarak görev yaparlar, bunların başlıcaları α -karoten, β -karoten ve β -kriptoksantindir. En fazla bulunan ve en etkili olanı β -karotendir. β -karoten A vitamin prekursörü olma özelliği yanında biyolojik önemi lipit antioksidanı olması ve özellikle singlet oksijen olmak üzere serbest radikalleri nötralize etmesidir (74). Karotenoidler insan sağlığı için önemli bileşiklerdir (23). Karotenoidlerin özellikleri ve fonksiyonları onların kimyasal yapısına bağlıdır. Fotosentezde olduğu gibi enerji transfer reaksiyonlarında en önemli faktörün özellikle tekli ve konjuge çift bağlı bir sistemle 40C ünitiinin (C=C) kuyruk kuyruğa bağlanması ile şekillenen tetraterpen yapısında uzamalarının bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Molekülün bu özelliği singlet oksijen toplamalarına izin verir. Karotenoidlerin bu radikal toplama özellikleri sayesinde, çoğu epidemiyolojik olan çalışmalarla, kanser, kalp rahatsızlıkları, dejeneratif göz hastalıkları gibi ciddi rahatsızlıklara karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir. Önemli bir karotenoid olan likopen en fazla domates (*Lycopersicon esculentum*)’de olmak üzere karpuz, pembe greyfurt gibi meyve ve sebzelerde bulunur ve onlara kırmızı rengini verir (75). LKP, β -karotene göre in-vitro sistemlerde antioksidan olarak daha büyük radikal toplama aktivitesine sahiptir (74).

Lutein, α -karoten, β -karoten, β -kriptoksantin ve likopen insan kanında en bol bulunan karotenoidler arasındadır. Epidemiyolojik çalışmalardan elde edilen verilere göre yüksek oranda karotenoidce zengin sebze ve meyve alınımı insanları en yaygın görülen, kolon, mide ve prostat kanserine karşı korumaktadır (76).

Karotenoidlerin antioksidan aktiviteleri multilamellar lipozomlarda lipit peroksidasyonun ölçülmesi ile belirlenmiştir. Etki oranları likopen> α -tokoferol> α -karoten> β -kriptoksantin> zeaksantin = β -karoten> lutein şeklinde sıralanabilir (75).

Domates; domates suyu, sos, salça veya ketçap şeklinde işlendiği zaman, LKP'nin, kimyasal yapısı ısıya bağlı olarak değişmekte, bu da vücut tarafından daha kolay absorbe edilmesini sağlamaktadır. Buna göre işlenmiş ya da pişirilmiş domates ürünlerindeki LKP'nin biyoyararlılığı, ham domates ürünlerinden daha fazladır (23).

LKP, bir alifatik hidrokarbondur ve doğal olarak bulunan yaklaşık 600 karotenoidden bir tanesidir (77). LKP, 11 konjuge ve 2 konjuge olmayan çift bağlı açık zincirli bir hidrokarbondur. LKP'nin emilimi, lipit miselleri ile birleşerek bağırsak mukoza yüzeyinden pasif difüzyonla gerçekleşmektedir. Daha sonra şilomikron yapılarına dahil edilerek karaciğere taşınmak üzere lenfatik sisteme girmekte, en çok karaciğerde çok az miktarı da dalakta depolanmaktadır. Bağırsaklardan emilebilen nadir karotenoidlerden olmasına karşılık, plazmada en çok bulunan karotenoidtir (78). LKP doğada meyve, sebze ve diğer yeşil bitkilerde bol miktarda bulunan karotenoidtir.



Şekil 10: Likopenin Formülizasyonu (79)

LKP'nin de dahil olduğu diyetle ilgili antioksidanların reaktif oksijen türlerini inaktive ettiği ve oksidatif hasara karşı koruma sağlayarak, prostat kanserinin önlenmesinde potansiyel moleküller olabilecekleri düşünülmektedir. Yine domates ve domates ürünlerinin, bazı kanser tiplerinin ve plazma lipit peroksidasyonun gelişimi ile ters bir ilişki göstermesi de LKP'nin antioksidan özelliklerine bağlanmıştır (80).

2.3.4. Testis, Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Sistem

Spermatogenez, spermatogoniumların proliferasyonu, mayoz ve spermiyogenez aşamalarından oluşan erkek germ hücre gelişiminde kompleks bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyel oksijen tüketimini göstermektedir. Testisteki zayıf vaskülarizasyondan dolayı testisteki oksijen miktarı düşüktür.

Hem spermatogenez hem de Leydig hücresi oksidatif stresle hasar görebildiği için testisteki düşük oksijen miktarı, testisi serbest radikallerin hasarından koruyabilecek mekanizmaların başında gelmektedir (81).

Testis serbest radikallerin hasarından korunabilmek için çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyicilere sahiptir. Bu antioksidan savunma sistemleri oldukça önemlidir, çünkü peroksidatif hasar testiküler torsiyondan diyabete ve ksenobiyotik maruziyeti gibi koşullarda patolojik sonuçları destekleyen bozuk testiküler fonksiyonun tek önemli sebebiymiş gibi kabul edilir (81). Testiküler mikro çevredeki düşük oksijen miktarına rağmen testis; fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle, oksidatif sitrese karşı hassas hale gelmektedir. ROS; mitokondriden ve ksantin ve NADPH oksidazları içeren çeşitli enzimlerden ve ayrıca sitokrom P450'lerden oluşabilir. Testis ROS karşı hem enzimatik hem de non-enzimatik öğelerden oluşan antioksidan sistemler içermektedir (81).

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunda bir son ürün olmakta ve oksidatif hasarın düzeyini göstermede kullanılmaktadır. Bu bileşik ya hücre düzeyinde metabolize edilir, ya da diffüze olarak diğer hücrelerde hasar yaratırlar. Aerobik bir ortamda gerek metabolizma reaksiyonları sırasında, gerekse dış etkenlere bağlı olarak meydana gelen oksijen kaynaklı radikaller, lipoproteinlerde ve hücre zarında bulunan lipitlerde (çoklu doymamış yağ asitleri) oksidasyona neden olur. Lipit hidroperoksitleri ile nihai yıkım ürünü olan düşük molekül ağırlıklı MDA lipit peroksidasyonunun indeksi olarak kabul edilir. Testis ve akciğer dokularında MDA düzeyi Mihara ve Uchiyama tarafından geliştirilen yöntem ile tayin edilmektedir (82).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız deneyseldir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Tez konusunun belirlenmesi ve literatür araştırması Nisan 2014-Haziran 2014 tarihleri arasında yapıldı. Etik kurul ve yönetim kurulu kararı Haziran 2014- Eylül 2014 tarihinde alındı. Araştırmanın deneysel ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda 2014 yılının Eylül ayında başlayıp Aralık ayında sona erdi. Histokimyasal ve immuno histokimyasal değerlendirmeler, Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, biyokimyasal değerlendirmeler ise Dokuz Eylül Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda 2014 yılının Haziran ayında başlayıp 2015 yılının Eylül ayında sona erdi. Tezin yazımı ise 2015 yılının Eylül ayında başlayıp, 2016 yılının Ocak ayında tamamlandı.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Sıçanlar rastgele seçilerek, beş çalışma grubu oluşturulmuştur. Deney grupları şu şekilde planlandı.

Tablo 3. 1. Deney Grupları

1.Grup	Kontrol grubu	n = 7
2.Grup	Sham grubu	n = 7
3.Grup	Bisfenol A grubu	n = 7
4.Grup	Likopen grubu	n = 7
5.Grup	Bisfenol A + Likopen grubu	n = 7

Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir:

1.GRUP: Kontrol Grubu (n=7), Hiçbir madde uygulanmayacak, bazal değerler için kullanılacak grup. 15. gün tüm denekler sakrifiye edilmiştir.

2.GRUP: Sham Grubu (n=7), 14 gün boyunca 0,1ml etanol ile 0,1 ml/100g mısır yağı oral gavaj yöntemiyle verilmiştir. 15. gün tüm denekler sakrifiye edilmiştir.

3.GRUP: Bisfenol A Grubu (n=7), Bisfenol A, 14 gün boyunca 10 mg/kg günlük oral gavaj yöntemiyle verilmiştir. 15. gün tüm denekler sakrifiye edilmiştir.

4.GRUP: Likopen Grubu (n=7), Likopen 14 gün boyunca 4 mg/kg günlük oral gavaj yöntemiyle verilmiştir. 15. gün tüm denekler sakrifiye edilmiştir.

5. GRUP: Bisfenol A + Likopen Grubu (n=7), 14 gün boyunca 10 mg/kg Bisfenol A ve 4mg/kg Likopen günlük oral gavaj yöntemiyle diye ekle) verilmiştir. 15.gün tüm denekler sakrifiye edilmiştir.

Likopen: Likopen, mısır yağı içinde çözüldü. 14 gün boyunca oral gavaj yoluyla 4 mg/kg dozda verildi.

Bisfenol A: Bisfenol A, etanol içinde çözüldü ve mısır yağı ile dilüe edildi. 14. gün boyunca oral gavaj yöntemiyle 10 mg/kg dozda verildi.

Bisfenol A ve Likopen BAP desteği ile sağlanan bütçe ile temin edildi.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Biriminden temin edilen, Wistar Albino suşu toplam (180-200 g) 35 erkek sıçan kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu suş seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22°C oda sıcaklığında %50-60 nisbi nem bulunan standart hayvan oda ve kafeslerinde barındırıldı. Hayvanların beslenmesi dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslenmesi yapıldı (ad libitum)

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada Grup 1'e (Kontrol Grubuna) herhangi bir işlem uygulanmadı. Grup 2'ye (Sham Grubu) oral gavaj yöntemiyle etanol ile mısır yağı, Grup 3'e (Bisfenol A grubu) oral gavaj yöntemiyle BPA, Grup 4'e (Likopen Grubu) oral gavaj yöntemiyle LKP, Grup 5'e (BPA+ LKP) oral gavaj yöntemiyle BPA+ LKP verildi.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada hayvan ağırlıklarını ölçmek için terazi; deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom, boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikropipetler, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrifüj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, homojenizatör ve buzluk kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulanmış, ince kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için Hematoksilen-Eozin, PAS (periyodik asit schiff), immünohistokimyasal olarak apoptozun belirlenebilmesi için de TUNEL ve Aktif kaspaz-3 boyamaları yapılmıştır.

3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneklerin ağırlıkları deney başlangıcında ve deney sonunda sakrifikasyon öncesi ölçüldü. Sonuçlar SPSS 21 paket programında Kruskal Walls testi kullanılarak değerlendirildi. Deneklerin ağırlıklarının başlangıç ve deney sonundaki verilerinin, grup içinde karşılaştırılmasında $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.2. Histokimyasal İncelemeler

3.6.2.3.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan parafin kesitler 2 gün 37°C de etüvde bekletildi. 2 saat 60°C de etüvde bekletilen kesitler daha sonra 20 dakikası 60°C de etüvde, 20 dakika da iki değişim halinde oda sıcaklığında olmak üzere üç değişim ksilolde bekletildi. Ardından %96'dan %70'a kadar azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Distile suda yıkandıktan sonra 15 dakika Hematoksilen boya solüsyonu içerisinde bekletilip akarsuda 15 dakika yıkama işlemi sonrası suyu süzülüp 1 dakika boyuca eozin boya solüsyonu içerisinde bekletildi. 1'er dakika içerisinde sırasıyla %70, %80, %96'ya artan etil alkol serilerinden geçirilip 3 kez 20 dakika ksilol ile şeffaflandırma yapıp entellan ile kapatıldı.

3.6.2.3.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) ile boyama yöntemi

Bazal membran kalınlığındaki değişiklikleri incelemek için PAS boyaması uygulaması yapıldı. Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 saat 60°C de etüvde bekletilip ardından bir saati 60°C de etüvde, 20 dakika da iki değişim halinde oda sıcaklığında olmak üzere üç değişim ksilolde bekletildi. Ardından %96'dan %70'e kadar azalan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edilip distile suda çalkalandıktan sonra 5 dakika periyodik asit solüsyonu içerisinde bekletildi. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 2-3 dakika distile suda bekletilen kesitler suyu süzülüp 15 dakika Schiff boya solüsyonu içerisinde karanlık odada bekletildi. Boyamadan sonra 5 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika hematoksilin boya solüsyonu içerisinde bekletildikten sonra %96'lık alkolle çalkalanıp 3 kez 20 dakika ksilol ile şeffaflandırma yapıp entellan ile kapatıldı.

3.6.2.4. Morfometrik Değerlendirmeler

3.6.2.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Çalışma sırasında testis dokusu değerlendirilirken stereolojik yöntemle, seminifer tübüllerin çapı ölçülerek elde edilen veriler, istatistiksel yöntemlerle ortalama değerleri bulunarak gruplar arasındaki tübül yapı farklılıkları karşılaştırıldı. Hematoksilin- Eozin ile boyanan kesitler Johnsen's skorlaması ile değerlendirildi.

Tablo 3. 2. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

Skor	Histolojik Bulgular
1	Tübüler kesitte hiçbir hücre yoktur.
2	Sadece Sertoli hücreleri vardır.
3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyumlar vardır.
4	Az sayıda (5/ tübül) spermatosit vardır.
5	Fazla sayıda spermatosit mevcuttur.
6	Az sayıda (5/ tübül) spermatid mevcuttur.
7	Farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır.
8	Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur.
9	Az sayıda (5/ tübül) spermatozoa vardır.
10	Fazla sayıda spermatozoanın görüldüğü tam spermatogenez mevcuttur.

3.6.2.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Seminifer tübül çap ölçümü için PAS ile boyanan kesitlerden her grup için rastgele seçilen 100 tübülde, 20X'lik büyütmeyle UTHSCA Image Tool Version 3,0 programını kullanarak çap ölçümü yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

Bazal membran kalınlığı ölçümü için PAS ile boyanan kesitlerden her gruptan rastgele seçilen 100 tübülde, 100X'lik büyütmeyle UTHSCA Image Tool Version 3,0 programı kullanılarak ölçüm yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.4.4 Histolojik değerlendirme

Hematoksilen-eozin ve PAS boyası ile boyanan kesitler ışık mikroskopunda incelenmesi yapıldı. Elde edilen görüntüler digital görüntü analiz tekniği ile değerlendirildi. Histolojik olarak hemorajik ve ödematöz değişiklikler, germ hücre dejenerasyonu, germ hücre tabakasının düzensizliği ve kaybı, seminifer tübüllerin rüptürü, interstisyel hücrelerinin dejenerasyonu değerlendirildi.

3.6.2.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi ve hücrelerdeki DNA fragmentasyonunun gösterilmesi için immünolojik yöntemler kullanıldı. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırık oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA kırıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) aracılığıyla biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinnükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine (DAB), işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Hemotoksilen ile zemin boyama yapılarak işlem sonlandırılır. İmmünohistokimyasal yöntemlerle fragmente nükleuslar veya sitoplazma koyu kahverengi boyanır.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için, dokular rutin takip işlemlerinden geçirildikten sonra TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate DNA nick-end labelling) ve Aktive-Caspase 3 immun boyamaları yapıldı.

3.6.2.5.1 TUNEL Reaksiyonu

Bu teknik için Apoptag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kiti (Millipore S7101, USA) kullanıldı. Alınan kesitler öncelikle 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra da rutin ışık mikroskopik deparafinizasyon sürecinden geçirildi. Deparafinizasyon amacıyla 15'er dakika biri etüvde olmak üzere 3 değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak distile suda çalkalandı. Distile su aşamasına getirilen kesitler öncelikle preparat tablasında fosfat tamponlu solüsyon (PBS) ile yıkandı. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizilerek alan kısıtlandı. Kurutma kağıdı ile üzerindeki PBS emdirilen dokulara Proteinaz K solüsyonu ile 15 dakika oda ısısında muamele edildi. Daha sonra dokular 3 kez PBS ile yıkandı. Taze hazırlanmış %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) ile 5 dakika oda ısısında bekletilen dokuda endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi ve tekrar PBS ile 3 defa yıkandı. Kesitlerdeki su, kurutma kağıdı ile emdirildi ve dokular kitin içerisinde mevcut kullanıma hazır bulunan dengeleme solüsyonu (Equilibration buffer) ile 5 dakika muamele edildi. Doku üzerindeki fazla sıvı kurutma kağıdı ile emdirildi ve kit içerisinde reaksiyon solüsyonu ve TdT enzim solüsyonu şeklinde ayrı ayrı bulunup kullanımdan önce ikisinin karıştırılmasıyla taze bir şekilde hazırlanan TdT enzim karışımı (%70 reaksiyon solüsyonu + %30 TdT enzim solüsyonu) ile muamele edilen kesitler 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Etüvden çıkarılan kesitler 1 ml reaksiyonu durdurma ve yıkama solüsyonunun (stop wash buffer) 34 ml distile su içerisinde dilüe edilmesiyle hazırlanan solüsyonla 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Bu işlemin ardından 3 kez PBS ile yıkama yapıldı. Kesitler Anti-Digoxigenin solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) kromojeniyle muamele edilen kesitler distile su ile iyice çalkalandı. Mayer's hematoksilen ile art alan boyaması yapıldı ve akarsuda yıkandı. Yıkamanın ardından artan alkol serilerinden geçirildikten sonra 3 değişim ksilol ile şeffaflaştırılan kesitler entellan ile kapatıldıktan sonra mikroskopta görüntülendi.

3.6.2.5.2 Aktive Kaspaz-3 İmmunreaktivitesi

İmmuno histokimyasal inceleme için deparafinizasyon sonrası kesitler 10 dk. 10 Mm sitrat buffer ile mikrodalgada ısıtıldı. Dakopen (Dako, Glostrup, Denmark) ile çevreleri sınırlandırıldı. Daha sonra kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk. %3'lük Hidrojen peroksit uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler bir saat oda ısısında bloklama solüsyonu ile enkübe edilerek ve ardından yıkama yapılmadan Anti-Kaspaz 3 aktive form 1:100 (AB3623, Millipore) antikoru ile +4°C de enkübe edildi. Ardından önce 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor daha sonra da 30 dakika enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) uygulaması yapıldı. Reaksiyonun görünür hale getirilmesi için Diamino benzidin (DAB) kullanıldı. Zemin boyaması Mayer hematoksilen ile yapıldı. Dereceli alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.2.6. Biyokimyasal Değerlendirme

Testis doku örnekleri potasyum klorid içerisinde ultrasonik homojenizatörde 1 dk süreyle homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri sırasında örnekler buz üstünde tutuldu. Homojenatlar +4°C'de ve 11000 g devirde 15 dk süreyle santrifüj edildi ve süpernatantdan enzim ve protein ölçümleri yapıldı. Tüm örnekler ölçümler yapılana kadar -80°C'de saklandı. Oksidatif stres göstergesi olan lipid peroksidasyon düzeyi (MDA) ve antioksidan savunma sisteminin göstergesi olan total glutatyon düzeyleri ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzim aktiviteleri spektrofotometrik yöntemle ölçümü yapıldı. MDA değerleri MDA ticari kiti ile spektrofotometrik yöntemle ölçümü yapıldı. Doku homojenatları kit prosedürüne göre hazırlandıktan sonra, 486 nm'de absorbansları ölçülecektir. GPx değerleri, GPx ticari kiti ile total glutatyon düzeyi GSH ticari kiti ile spektrofotometrik yöntemle ölçümü yapıldı. Doku homojenatları kit prosedürüne göre hazırlandıktan sonra ölçümü yapıldı.

3.6.2.6.1.Enzim Aktiviteleri ve MDA Düzeylerinin Saptanması

MDA değerleri The Bioxytech MDA-586 (Oxis International, USA) ticari kiti ile spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Sonuçlar µM olarak ifade edildi. Kitin çalışma yöntemi kromojenik bir reaktif ile MDA'nın 45°C'de reaksiyona girmesi temeline dayanır. 586 nm'de absorbans ölçülerek standart eğrisinden MDA değerleri belirlenir.

GSH ve GPx enzim aktiviteleri Oxis Research kitleri kullanılarak spektrofotometre (T80, PG instruments, UK) ile ölçüldü. Enzim aktiviteleri hazırlanan süpernatantlardan ölçüldü, GSH sonuçları μM , GPx sonuçları $\text{ünite/mg protein (U/mg pr)} \pm \text{Standart Hata (SH)}$ olarak gösterildi.

GSH seviyeleri Bioxytech GSH-420 (Oxis International, USA) kiti ile ölçüldü. Kitin çalışma yöntemi chromophoric thione oluşumu temeline dayanır. Tamponla karıştırılan süpernatana indirgeyici ajan eklenerek oksidize glutatyon indirgenmiş forma dönüştürülür. Daha sonra kromojen eklenip pH arttırılarak chromophoric thione oluşturulur. 420 nm'de absorbans ölçülerek GSH konsantrasyonu belirlenir.

GPx aktivitesi Bioxytech GPx-340 (Oxis International, USA) kiti ile saptanmıştır. Bu kit Paglia ve Valentine'ın tanımladığı yönteme göre hazırlanmıştır. GPx, kümen hidroperoksit ile glutatyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında, okside glutatyon (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) çevrilir, bu sırada NADPH okside olarak NADP' ye dönüşür. Spektrofotometrede 340 nm'de absorbansdaki azalma ölçülür.

Doku protein ölçümleri RANDOX'un U/CSF protein kitiyle yapıldı. Kitin çalışma prensibinde önce örnek magnezyum iyonlarını uzaklaştırmak ve proteini çöktürmek amacıyla EDTA içeren alkalın solüsyonla karıştırılır, sonra benzethonyum klorid eklenir, turbidite 3oluşturarak spektrofotometrede 600 nm' de absorbans okunur.

3.6.2.6.2.Homojenizasyon

Tüm sıçanların servikal dislokasyon ile yaşamları sonlandırıldı. 1-2 dakika içinde soğuk zemin üzerinde testis dokuları disseke edildi. Her dokudan 1x1 mm büyüklüğünde örnekler inceleme için ayrıldı. Ayrılan dokular soğuk serum fizyolojik ile hemen yıkandı ve lipid peroksidasyon ürünü olan malondialdehit (MDA), antioksidan Glutatyon (GSH) ve antioksidan enzim Glutatyon Peroksidaz (GPx) ölçümü için homojenize edildi. Doku örnekleri ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonopuls, Germany) 0.15 M KCl içinde homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri buzla soğutulmuş ortamda yapıldı. Homojenatlar +4°C'de 600 g'de 10 dk santrifüj edilerek MDA ölçümü için ependorf tüpüne ayrıldı, geri kalan homojenat +4°C'de 10000 g'de 20 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant enzim ve protein ölçümleri için ayrılarak -80 °C'de saklandı. 30 gün içinde ölçümler yapıldı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin analizi IBM Statistics 21 programında yapıldı. Başlangıç vücut ağırlığı, deney sonu vücut ağırlığı, tübül çapları, testis ağırlık indeksi değerleri ortalama $\pm$ standart sapma olarak hesaplandı. Deneklere ait verilerin öncelikle normal dağılıp dağılmadıkları ve varyanslarının homojenliği test edildi. Grupların karşılaştırılmasında veriler normal dağılıyor ise tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen çoklu grupların testinde ise Kruskal Wallis H testi, post hoc LSD testi ve Student-t testi kullanılarak yapıldı, $p < 0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, herhangi bir aksaklıkla karşılaşılmamıştır. Araştırmada herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 17 Haziran 2014 tarihinde gerçekleştirilen 03.12.2014 no'lu toplantıda, 39/2014 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur. Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

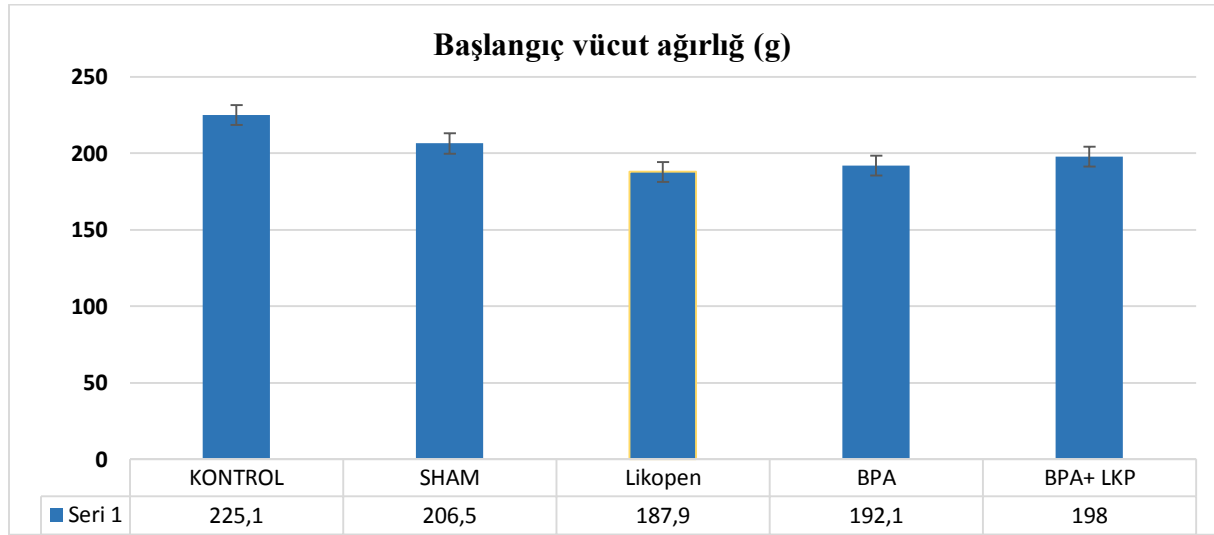
Bisfenol A uygulanan Wistar Albino sıçanlarda testis histolojisi ve apoptoz üzerine likopen'in etkisinin neler olduğunu ortaya koymak amacıyla yapılan deney sonuçlarına ait verilere istatistiki analizler uygulandı. Deney sonu vücut ağırlığı farkı, histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal bulgular olarak değerlendirildi.

4.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

4.1.1 Başlangıç Vücut Ağırlığı

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde tartılan deneklerin ağırlıkları arasındaki farklar Wilcoxon testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

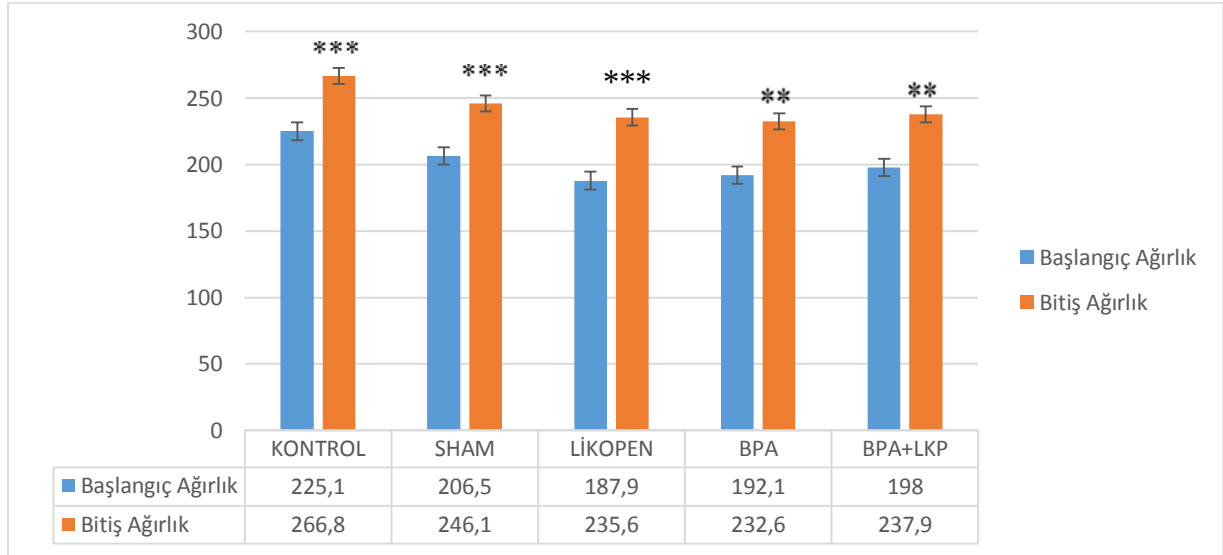
Çalışmamızda hayvanların ilk ölçülen vücut ağırlıklarına ilişkin bulguları Grafik 4. 1'de verilmiştir. Başlangıç ağırlıklarına bakıldığında grupların ağırlık düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $225,1 \pm 6,4$ gr, Sham grubunda $206,5 \pm 3,9$ gr, LKP grubunda $187,9 \pm 7$ gr, BPA grubunda $192,1 \pm 3,1$ gr ve BPA+LKP grubunda $198,0 \pm 6,4$ gr olarak saptandı. Hayvanların ilk ağırlıklarının istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda gruplar arasında önemli bir fark saptanmamıştır ($p = 0,102$).



Grafik 4. 1. Sıçanların deney öncesi başlangıç vücut ağırlıkları ve std sapmaları

4.1.2 Deney Sonu Vücut Ağırlığı

Son ağırlıklarına baktığımızda; Kontrol grubunda $266,8 \pm 11,7$ gr, Sham grubunda $246,1 \pm 6,4$ gr, LKP grubunda $235,6 \pm 13,7$ gr ve BPA grubunda $232,6 \pm 14,5$ gr BPA+LKP grubunda $237,9 \pm 16$ gr olarak saptandı. Kontrol grubunda deney öncesi ve deney sonrası sıçanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında sıçanların vücut ağırlıklarında artış görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p < 0,001^{***}$). Sham grupta deney öncesi ve deney sonrası sıçanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında sıçanların vücut ağırlıklarında artış görüldü ve istatistiksel olarak önemli fark gözlemlendi ($p < 0,004^{***}$). Likopen grubunda deney sonrası vücut ağırlığı deney öncesinden yüksek saptandı, istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p < 0,001^{***}$). BPA grubunda deney öncesi ve deney sonrası sıçanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında sıçanların vücut ağırlıklarında artış görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p = 0,003^{**}$). BPA+LKP grubunda deney öncesi ve deney sonrası sıçanların vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında sıçanların vücut ağırlıklarında artış görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlendi ($p = 0,002^{**}$) (Grafik 4.2). En çok ağırlık farkı LKP grubunda görülürken, en az ağırlık farkı BPA+LKP grubunda görüldü.



Değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir. **: $p < 0,05$ ve ***: $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

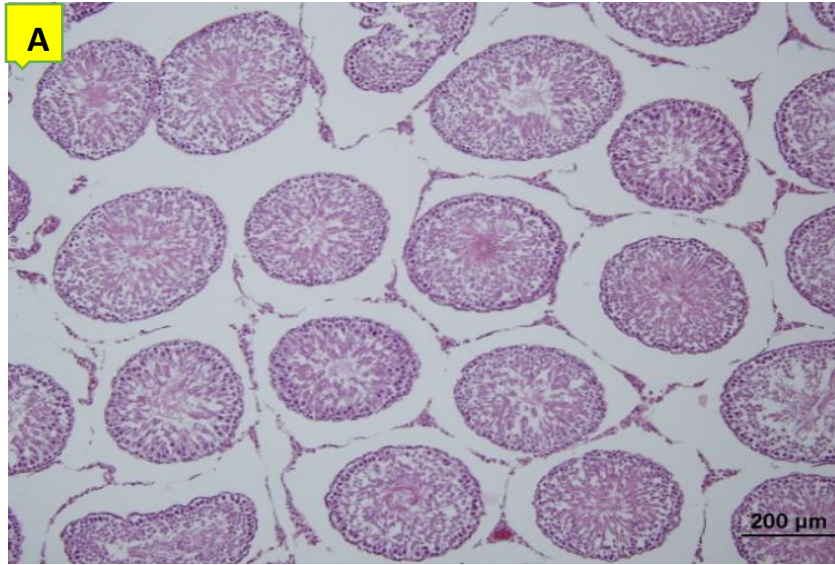
Grafik 4. 2. Kontrol, Sham, Likopen (LKP), Bisfenol A (BPA) Bisfenel A+Likopen (BPA+LKP) grupları başlangıç ve sonuç vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi

4.2. HİSTOKİMYASAL BULGULAR

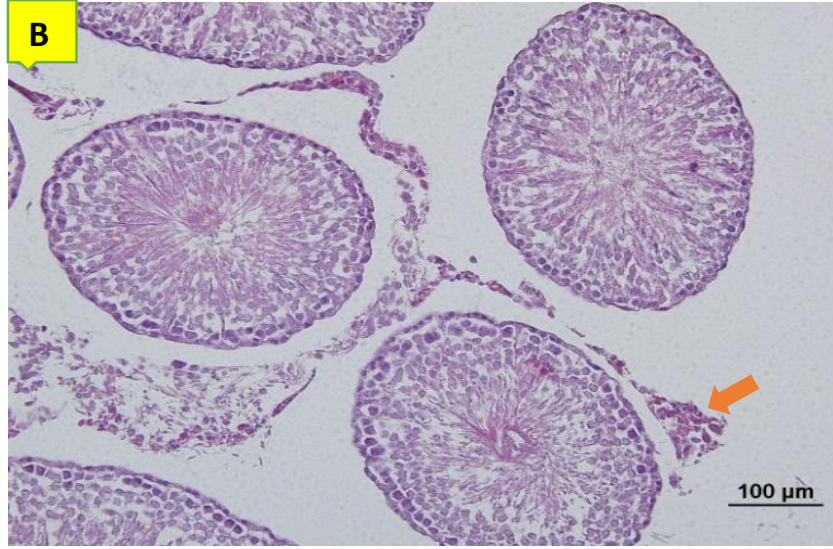
Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçan testislerinin histolojik değerlendirilmesi H&E ve PAS boyaları uygulanmıştır.

4.2.1. Kontrol grubu

Kontrol grubunu oluşturan sıçan testis örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde, seminifer tübüller, intersisyal alanı intertisyal bağ dokusu oluştuyordu. Bu grupta bazal membran, seminifer tübül yapıları ve intertisyal alan normal yapıda gözlemlendi. İnterstitisyal alanda yer alan Leydig hücreleri eozinofilik sitoplazmaları ve eksantrik yerleşimli çekirdekleri normal olarak gözlemlendi. İnterstitisyal alanda bulunan damarlar normal yapıda gözlemlendi. İnterstitisyal dokuda makrofaj veya mast hücresi saptanmadı. Düzgün bir spermatogenezin olduğu tübül duvarı, Sertoli hücreleri, oldukça belirgin spermatogonyumları ve spermatogenik seri hücreleri ile normal yapıda gözlemlendi. Gelişmekte olan spermatidler, klasik görüntülerindeki gibi kuyruk lümende, baş tübül duvarına yönelik, Sertoli hücrelerinin arasına lokalize olmuş şekilde gözlemlendi.



Şekil 4.1.A. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstitisyal alan ve seminifer tübül duvarında normal histolojik yapıdaki Sertoli ve spermatogonyum, interstitisyal aralık, primer spermatosit, spermatazoa hücreleri gözlemlendi (Bar= 200 µm H&E)



Şekil 4.2.B. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Normal yapıdaki seminifer tübüller, interstisyel alan () ve spermatogenik hücreler görülmektedir (Bar=100 μm H&E).



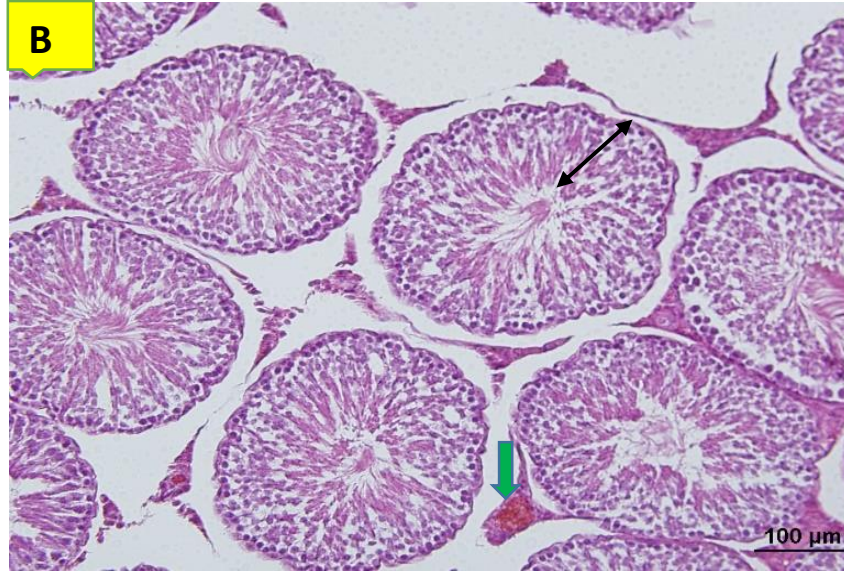
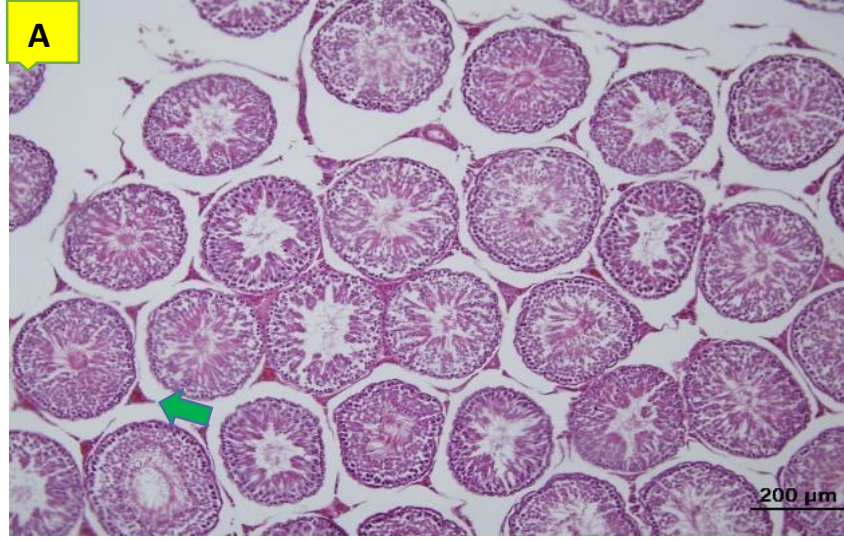
Şekil 4.3.C. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarında normal devam eden spermatogenez () ve kan damarı () gözlemlendi (Bar= 50.μm, H&E).



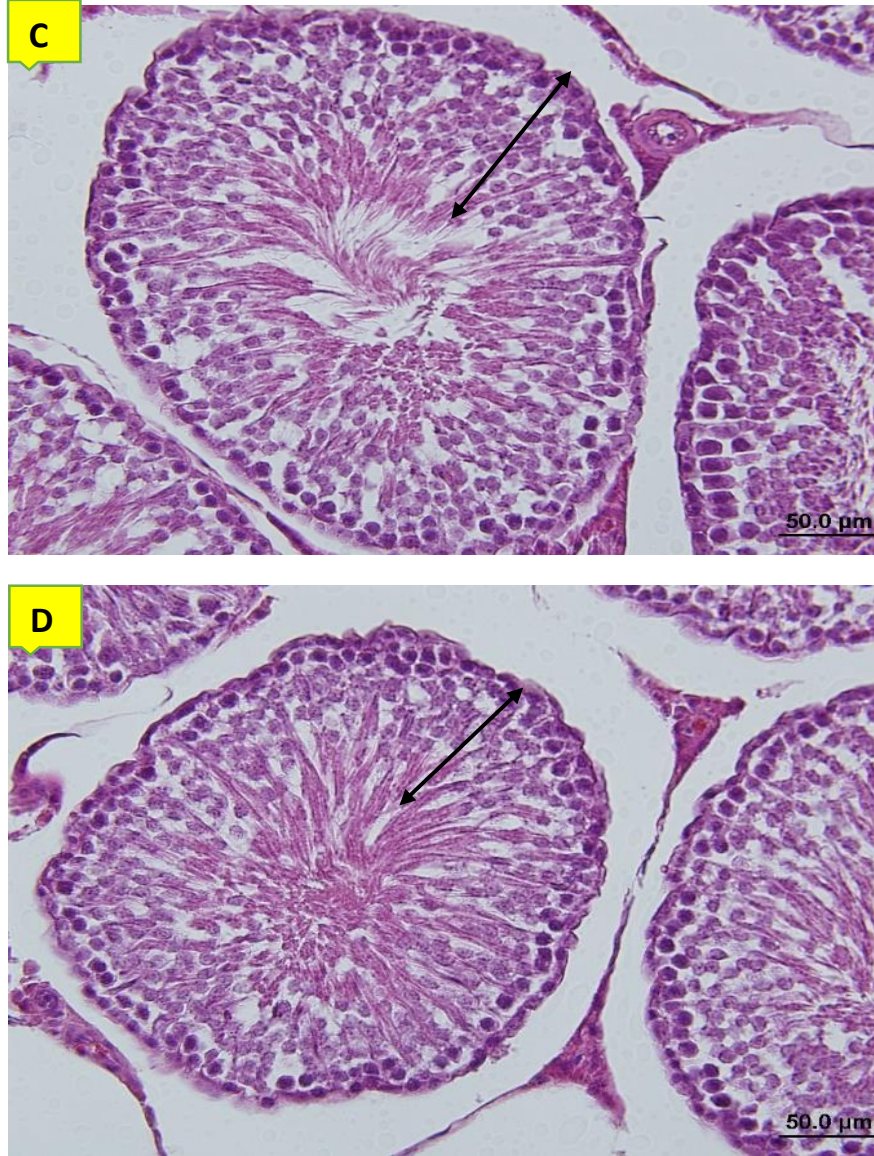
Şekil 4. 4.D. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarında normal spermatogenetik hücreler (↔) ve (↓) kan damarı gözlemlendi (Bar= 50.0 μ m, H&E).

4.2.2. SHAM Grubu

Bu gruba ait sıçan testis örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde, seminifer tübül, bazal membran ve interstisyel alan kontrol grubuna benzer bir yapı gösterdi. Spermatogenezin normal devam ettiği gözlemlendi. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri olan, spermatogonyum, primer spermatosit ve spermatid hücreleri ile destek hücreleri olan Sertoli hücreleri normal yapıda gözlemlendi.



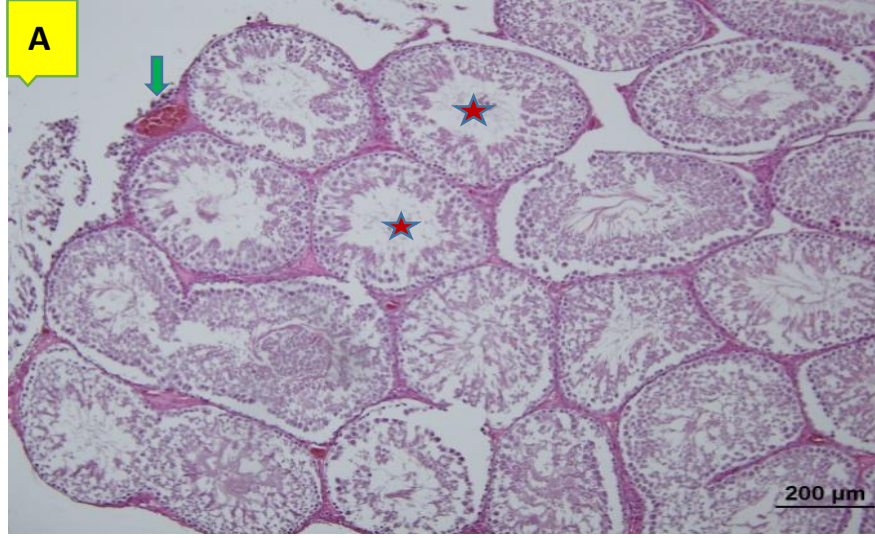
Şekil 4. 5.A. B. Sham grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler ($\longleftrightarrow$), kan damarları ($\downarrow$) ve interstisyel alandaki hücre yapılarıyla birlikte testis dokusu normal histolojik yapıda gözlemlendi (Bar=200μm,100 μm, H&E)



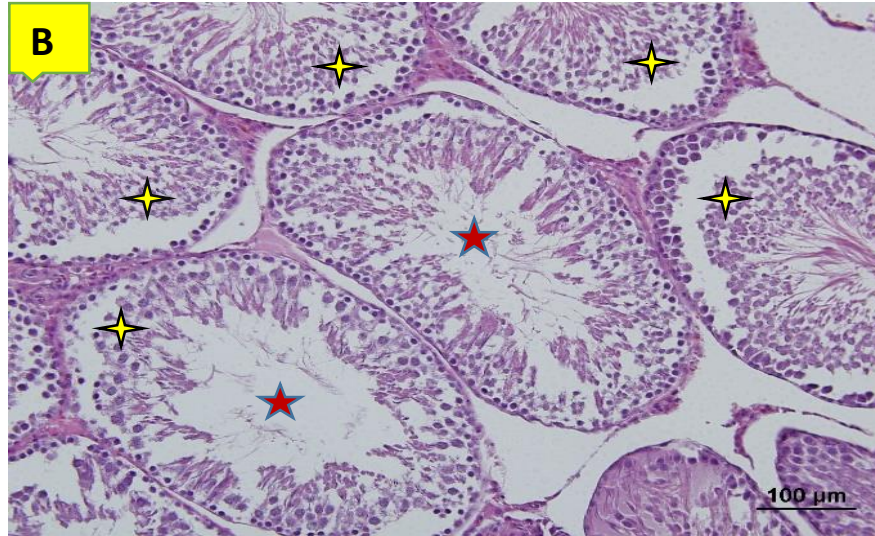
Şekil 4.6.C.D Sham grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler (↔), interstisyel alan normal histolojik yapıda gözlemlendi (Bar= 50μm, H&E).

4.2.3. BPA Grubu

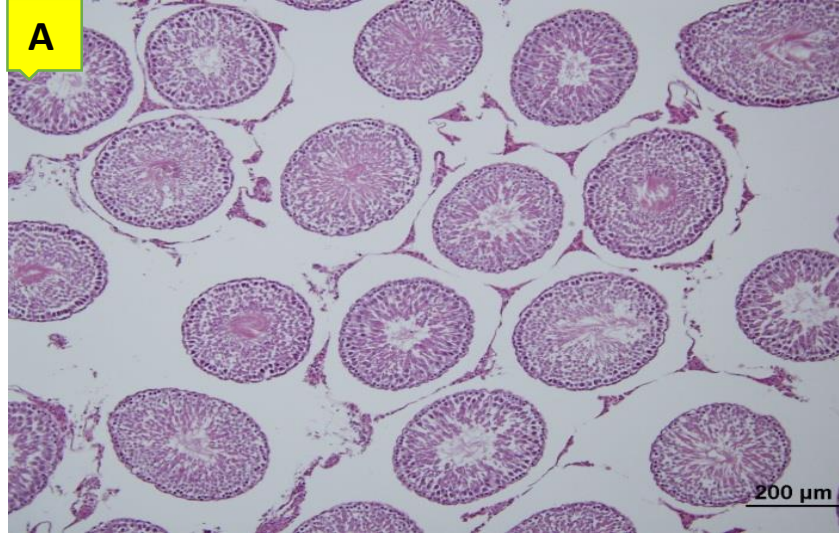
BPA grubunu oluşturan sıçan testis örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde seminifer tübüllerde hasar ve hücrel dejenerasyonlar gözlemlendi. Spermatogenetik hücrelerin bazal membrandan ayrıldığı ve interstisyel alanda yer yer ödem oluşumu gözlemlenmiştir. Spermatogenik serisinde dejenerasyonlar belirlendi.



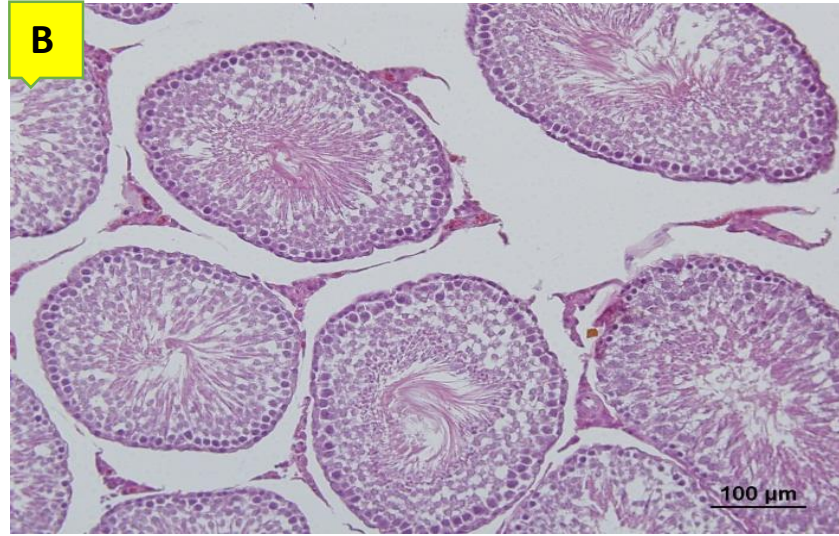
Şekil 4.7.A. BPA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül lümeninde genişleme, kan damarı (↓) ve spermium hücrelerinde (★) kayıp gözlemlendi. (Bar= 200µm, H&E).



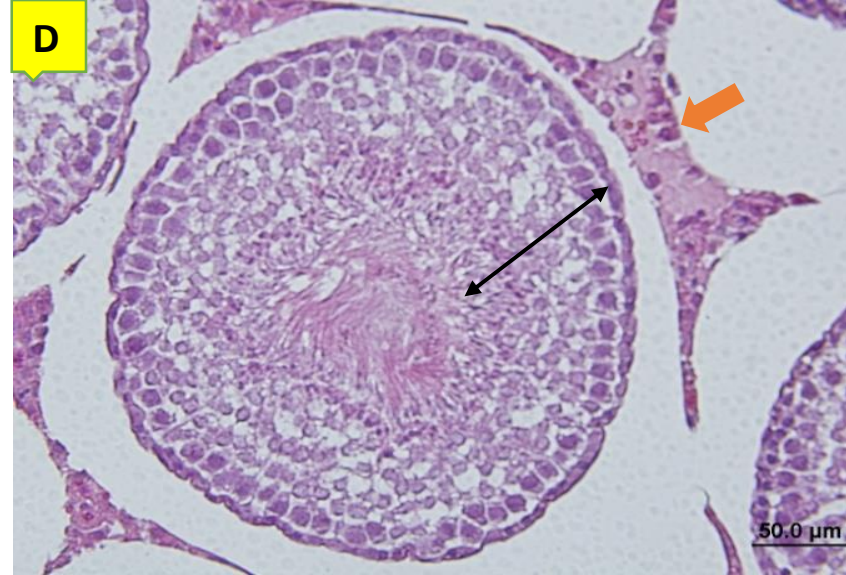
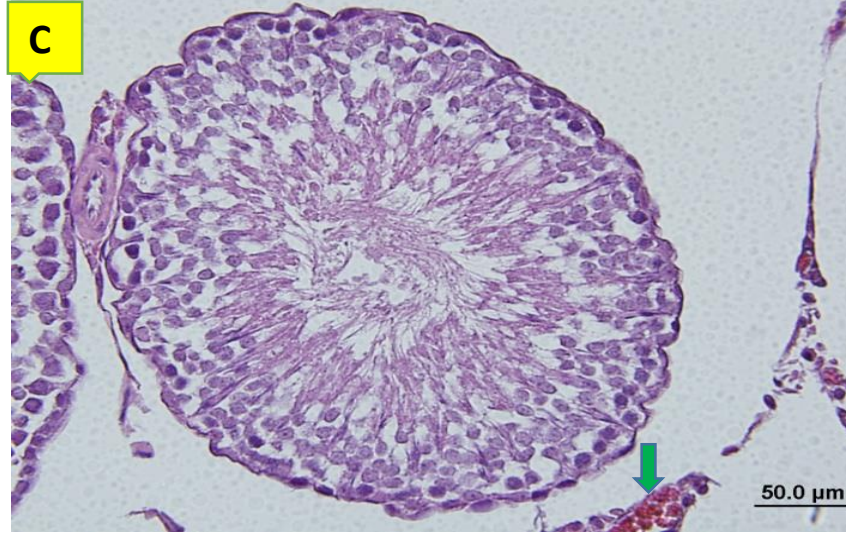
Şekil 4.8.B. BPA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Bazal membrandan ayrılmış spermatogenik hücreler (★) ve spermium hücrelerinde kayıp (★) gözlemlendi. (Bar=100µm, H&E)



Şekil 4.10.A. LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler ve interstisyel alandaki hücre yapılarıyla birlikte testis dokusu normal histolojik yapıda gözlemlendi (Bar=200μm, H&E).



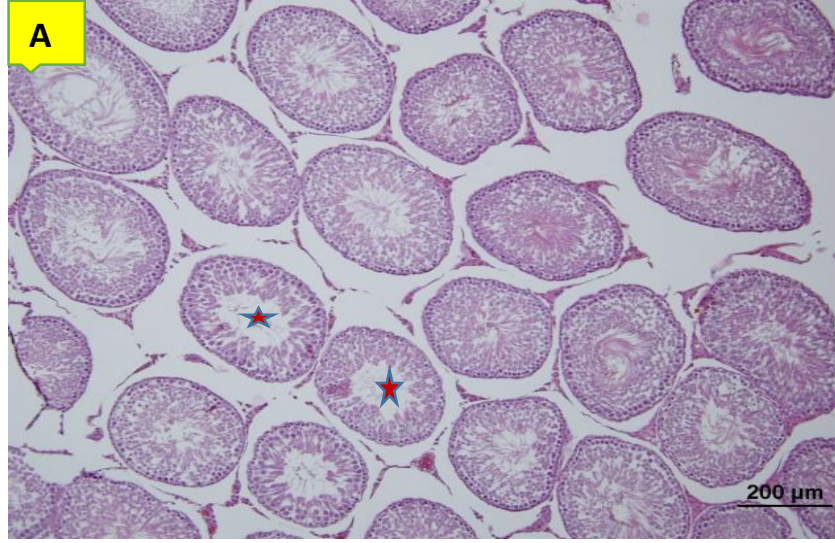
Şekil 4.11. B. LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübüller ve interstisyel alan normal histolojik yapıda gözlemlendi (Bar= 100μm, H&E).



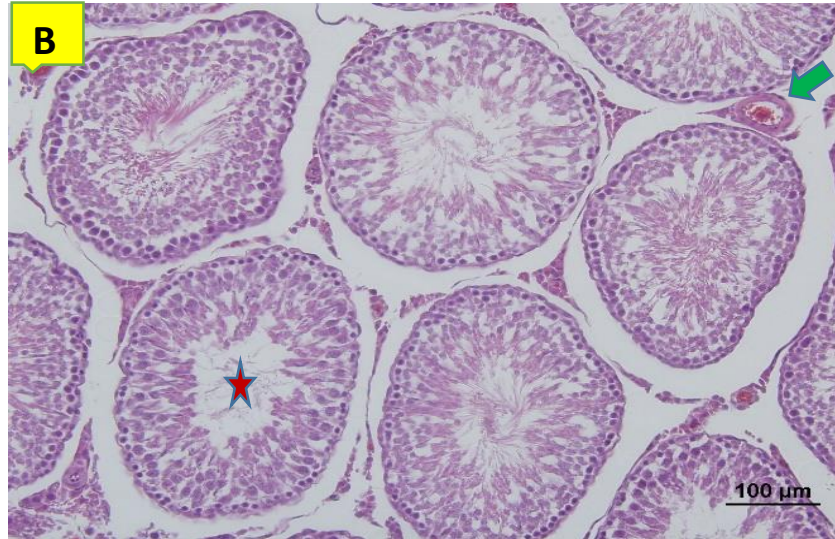
Şekil 4.12.C.D. LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler (), kan damarı () ve interstisyel alandaki hücre () yapılarıyla birlikte testis dokusu normal histolojik yapıda gözlemlendi (Bar=50μm, H&E).

4.2.5. BPA+LKP Grubu

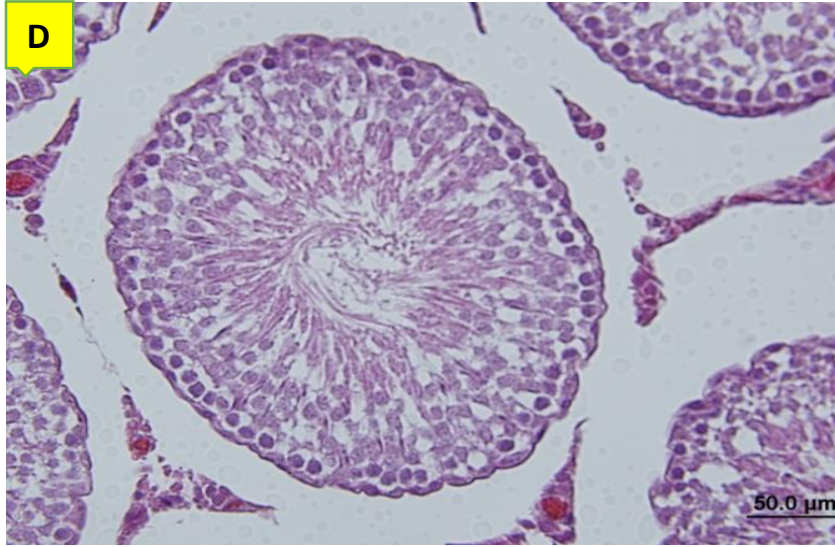
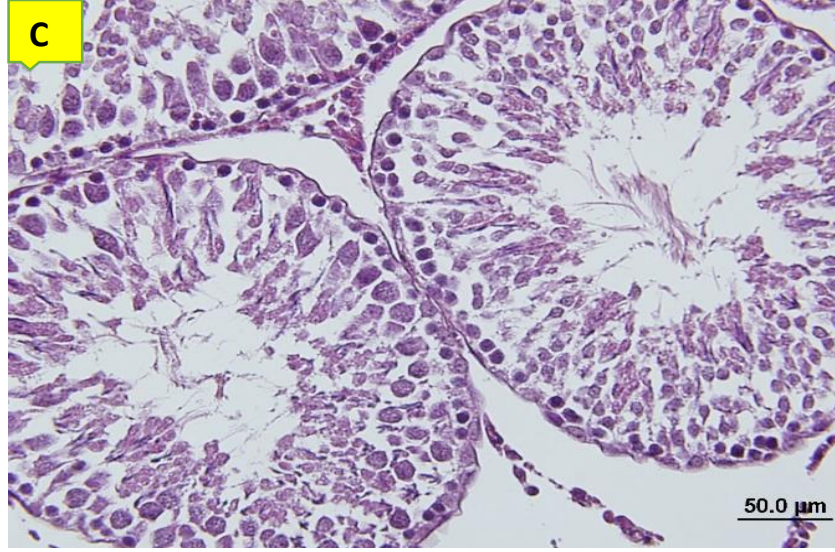
BPA+LKP grubunu oluşturan sıçan testis örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde, az sayıda tübülde hasarın devam ettiği görülmekle birlikte, tübüler hasarın azaldığı, spermatogenik hücrelerin korunduğu ve spermatogenezin devam ettiği gözlemlendi (Şekil 13). Tübül lümeninde bulunan kuyruklu sperm sayısı normale yakındı. Tübül lümeninde belirgin bir daralma bu grupta gözlenmedi ve genelde normale yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13, Şekil 4.14)



Şekil 4.13. A. BPA+LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Normale yakın morfolojide seminifer tübüller gözlenmektedir. Seminifer tübüllerde hücre serisinin devam ettiği, tübüllerdeki spermatozoon sayısının arttığı, bazı tübüllerde ise spermium hücrelerinde (★) kayıplar gözlemlendi (Bar=200µm, H&E).



Şekil 4.14. B. BPA+LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Normale yakın morfolojide seminifer tübüller, kan damarı (➡), korunmuş spermatogenetik hücreler ve yer yer spermium hücrelerinde (★) kayıp gözlemlendi (Bar=100µm, H&E).



Şekil 4.15. C.D. BPA+LKP grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül yapısı normale yakın gözlenmektedir. Ayrıca seminifer tübüllerde hücre serisinin devam ettiği ve tübül lümeninde spermatozoon sayısının arttığı gözlemlendi (Bar=50μm, H&E)

4.3. BAZAL MEMBRAN KALINLIK ÖLÇÜMÜ

Çalışmamızda gruplar arası bazal membran kalınlıklarının karşılaştırılmasında One Way ANOVA testi uygulanmıştır. $P < 0.05$ ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kontrol grubu bazal membran kalınlık ölçümü ortalama $3,04 \pm 0,2 \mu\text{m}$ olarak saptandı. Sham grubu bazal membran kalınlık ölçümü ortalama $2,93 \pm 0,2 \mu\text{m}$ saptandı. LKP grubu bazal membran kalınlığı ölçümü ortalama $3,03 \pm 0,5 \mu\text{m}$ olarak saptandı. BPA grubu bazal membran kalınlık ölçümü ortalama $6,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ olarak saptandı. BPA +LKP bazal membran kalınlık ölçümü ortalama $5,6 \pm 7,3 \mu\text{m}$ olarak saptandı. PAS ile boyadığımız testis örneklerinde PAS pozitif boyanmış bazal membran ve tunika albuginea yapısı normal yapıda gözlemlendi.

Kontrol, Sham, LKP grupları arasında bazal membran kalınlığı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı (Kontrol-Sham $p=1,000$, Kontrol-LKP $p=1,000$, Sham-LKP $p=1,000$).

Kontrol grubu, BPA grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda daha kalın bulundu (Kontrol- BPA $p=0,0001$).

Sham grubu, BPA grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda daha kalın bulundu (Sham- BPA $p= 0,0001$).

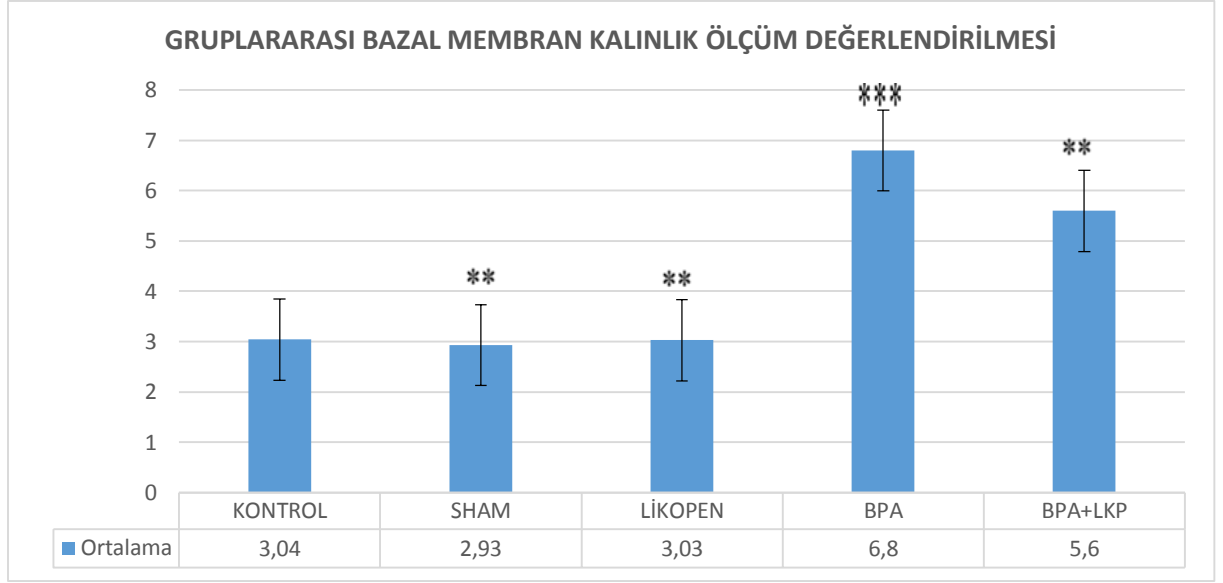
LKP grubu, BPA grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda daha kalın bulundu (LKP- BPA $p=0,0001$).

Kontrol grubu BPA +LKP grubu ile karşılaştırıldıklarında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (Kontrol- BPA +LKP $p=0,51$).

Sham grubu BPA +LKP grubu ile karşılaştırıldıklarında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunamadı (Sham- BPA +LKP $p= 0,08$).

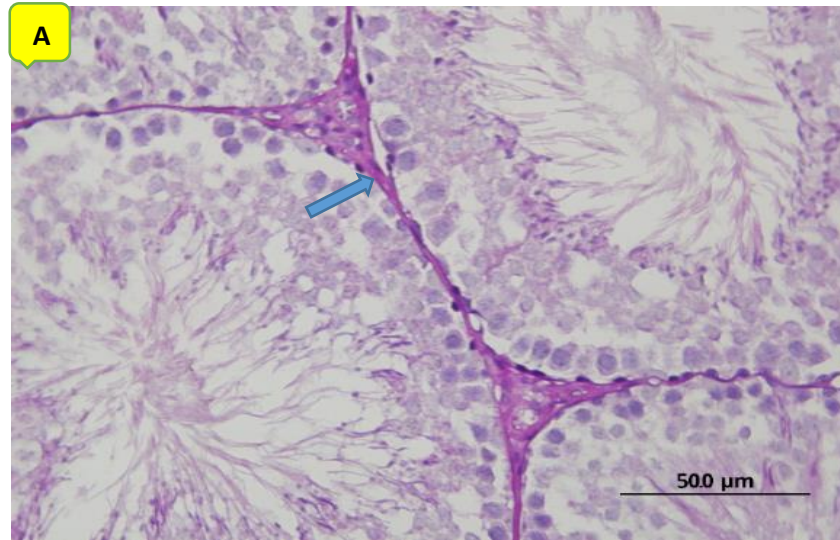
LKP grubu BPA +LKP grubu ile karşılaştırıldıklarında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (LKP- BPA +LKP $p=0,58$)

BPA grubu ve BPA+LKP gruplarının bazal membran kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA+LKP grubunda daha incedir ($p=0,0001$).

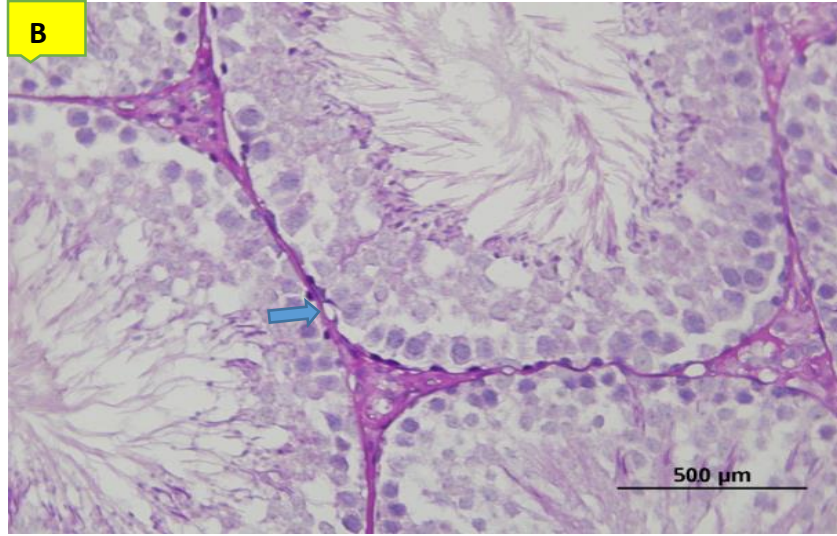


Değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir. **: $p < 0,05$ (BPA grubu ile karşılaştırıldığında) ve ***: $p < 0,05$ (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında) olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

Grafik 4. 3. Gruplararası bazal membran kalınlık ölçüm değerlendirilmesi



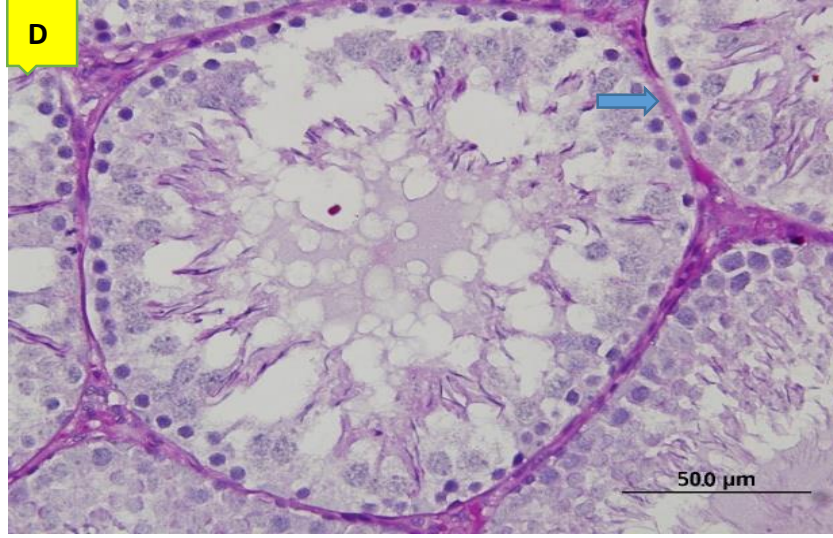
Şekil 4.16. A; Kontrol grubuna ait sıçan testis kesiti 'PAS (+) boyama'. Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membranın normal kalınlıkta () olduğu gözlemlendi (Bar 50μm, PAS).



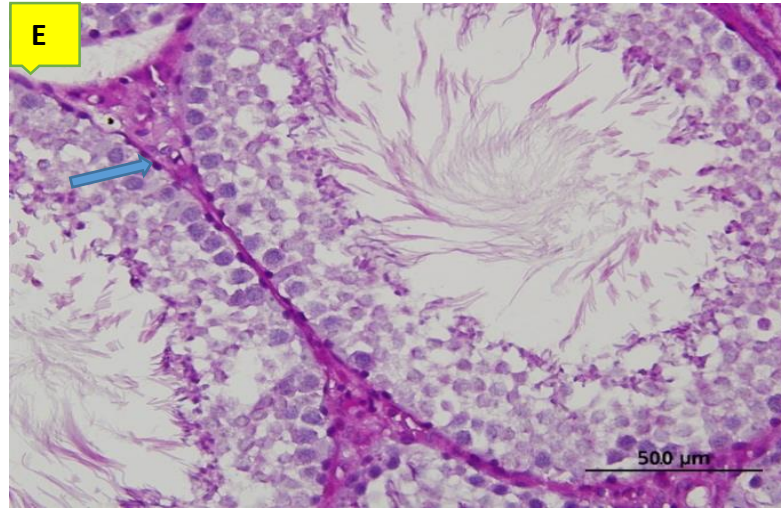
Şekil 4.17 B; Sham grubuna ait sıçan testis kesiti 'PAS (+) boyama'. Sham grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membranın normal kalınlıkta (→) olduğu gözlemlendi (Bar 50µm, PAS).



Şekil 4. 18. C; LKP grubuna ait sıçan testis kesiti 'PAS (+) boyama'. LKP grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membranın normal kalınlıkta (↓) olduğu gözlemlendi (Bar 50µm, PAS).



Şekil 4. 19. D; BPA grubuna ait sıçan testis kesiti 'PAS (+) boyama'. BPA grubuna ait kesitler incelendiğinde kalınlaşmış bazal membranın yapısı (➡) gözlendi (Bar 50µm, PAS).



Şekil 4. 20. E; BPA+LKP grubuna ait sıçan testis kesiti 'PAS (+) boyama'. BPA+LKP grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membranın normale yakın kalınlıkta (➡) olduğu gözlendi (Bar 50µm, PAS).

4.4. MORFOMETRİK BULGULAR

4.4.1. Johnsen Skorlama

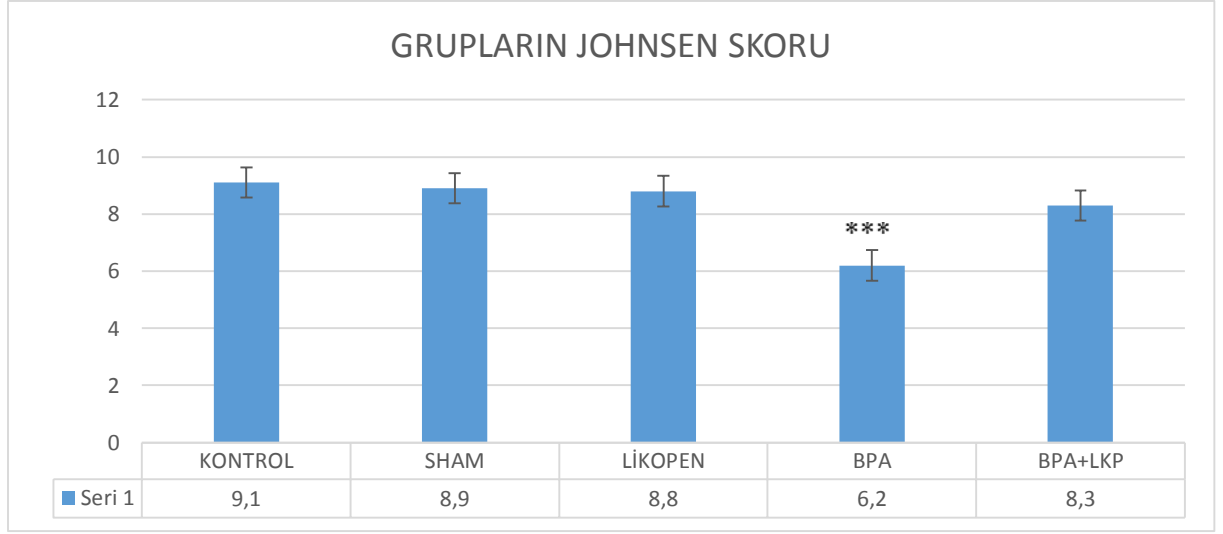
Çalışmamızda gruplar arası Johnsen Skorlama karşılaştırılmasında One Way ANOVA testi uygulandı. Ayrıca Kruskal Wallis Multiple Comparison Z Value Testi ile Kontrol grubuna göre karşılaştırmalar yapıldı. $p < 0.05$ ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmamızda her bir testis örneğinin histolojik kesitlerinde Johnsen skorlamasına göre saptanan değerler toplanarak bir sıçan için toplam Johnsen skoru saptandı. Kontrol grubu $9,1 \pm 0,4$, sham grubu $8,9 \pm 0,6$, Likopen grubu $8,8 \pm 0,1$, BPA grubu $6,2 \pm 0,2$, BPA+LKP grubu ise $8,3 \pm 0,1$ olarak bulundu.

Toplam Johnsen skoru açısından tüm gruplar incelendiğinde; sadece BPA grubu istatistiksel açıdan anlamlı bulunurken diğer gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunamadı ($p < 0,05$). (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Jonhnsen (Jn) testis biopsi skoru karşılaştırması (Ort.±SS)

	N	Ort ±std	p
KONTROL	7	$9,1 \pm 0,4$	0,062
SHAM	7	$8,9 \pm 0,6$	0,145
LİKOPEN	7	$8,8 \pm 0,1$	0,324
BPA	7	$6,2 \pm 0,2$	0,001
BPA+LKP	7	$8,3 \pm 0,1$	0,051



Değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir. ***: $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Grafik 4. 4. Gruplara ait Johnsen Skorları

4.4.2. Tübül Çapı

Çalışmamızda gruplar arası seminifer tübül çap ölçümü karşılaştırılmasında One Way ANOVA testi kullanıldı. $p < 0.05$ ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Çalışmamızda hayvanların Kontrol, Sham, LKP grupları arasında seminifer ölçülen tübül çaplarına ilişkin bulguları Grafik 4.5’de verilmiştir. Hayvanların tübül çaplarının istatistiksel olarak karşılaştırılması sonucunda gruplar arasında önemli bir fark saptandı (Kontrol-Sham $p = 0,145$, Kontrol-LKP $p = 0,324$, Sham-LKP $p = 0,542$).

Kontrol grubu, BPA grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda kontrol gruba göre daha dar bulundu. (Kontrol-BPA $p = 0,0001$).

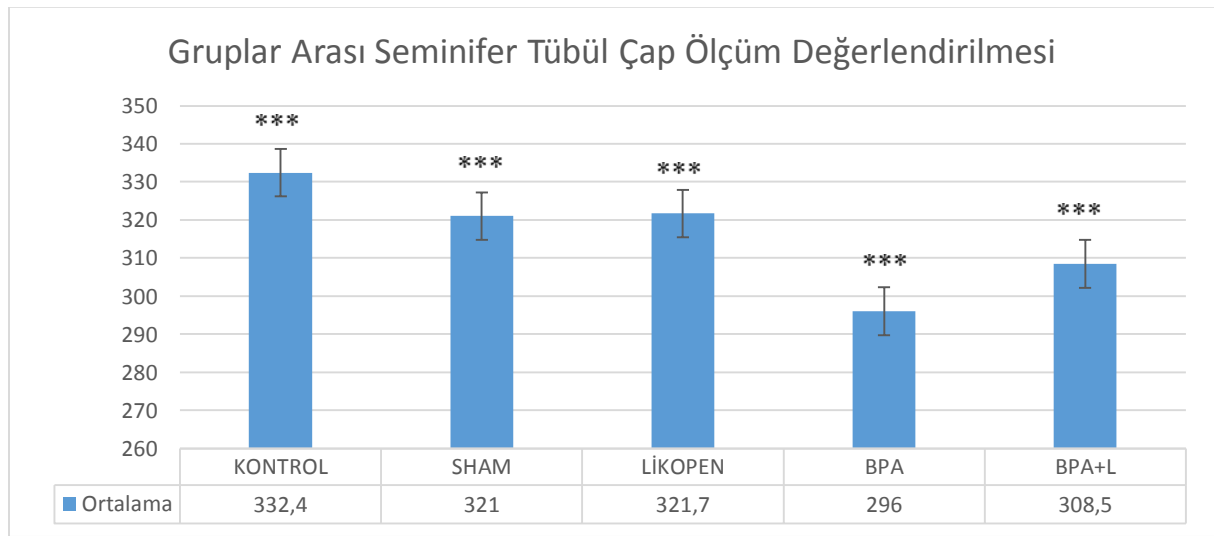
Sham grubu, BPA grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda Sham grubuna göre daha dar bulunmuştur. (Sham-BPA $p = 0,0001$).

LKP grubu, BPA grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda LKP gruba göre daha dar bulundu. (LKP-BPA $p = 0,0001$).

Kontrol grubu, BPA +LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Kontrol grubunda BPA+LKP grubuna göre daha geniş bulundu (Kontrol-BPA+LKP $p=0,001$).

Sham grubu, BPA+LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Sham grubunda BPA+LKP grubuna göre daha geniş bulundu (Sham-BPA+LKP $p=0,001$).

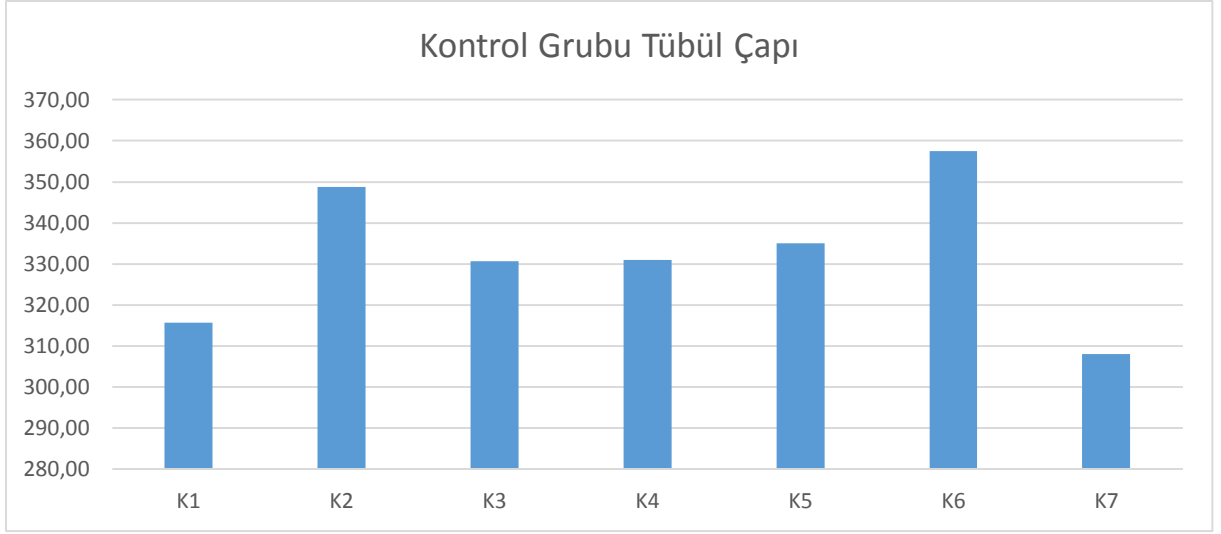
BPA grubu ve BPA+LKP gruplarının seminifer tübül çap ölçümü arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA +LKP grubundan daha dardır. ($p=0,0001$). (Grafik 4.5)



Değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir. ***: $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

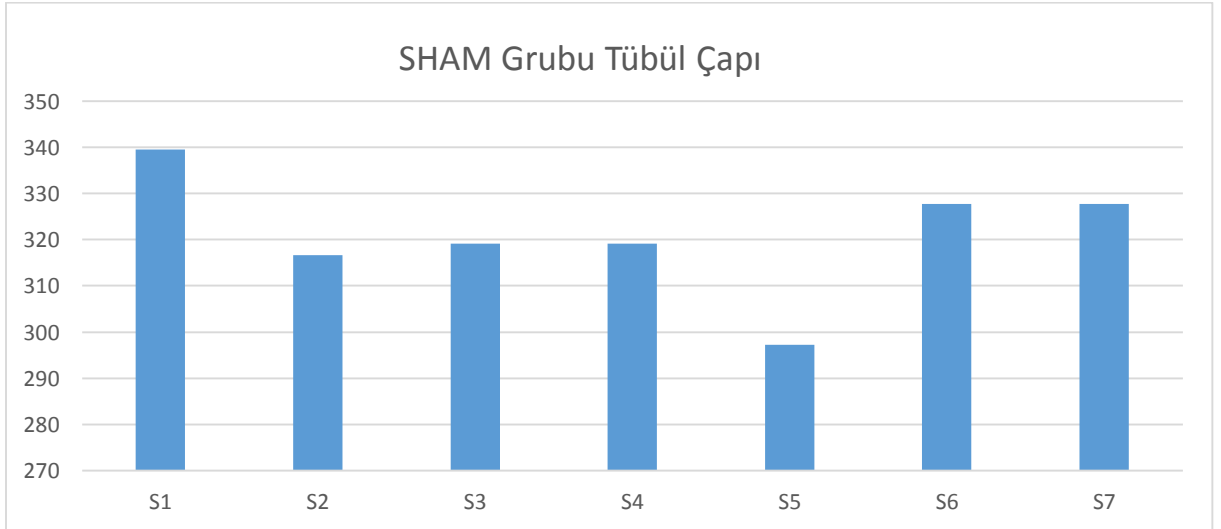
Grafik 4. 5. Gruplar arası Seminifer Tübül Çap Ölçüm Değerlendirilmesi

Araştırmamızda kontrol grubu 7 sıçana ait tübül çapları incelendiğinde, en yüksek tübül çapı 358 mikron ile 6 numaralı sıçanda görülürken, en düşük tübül çapı 309 mikron ile 7 numaralı sıçanda görülmüştür.



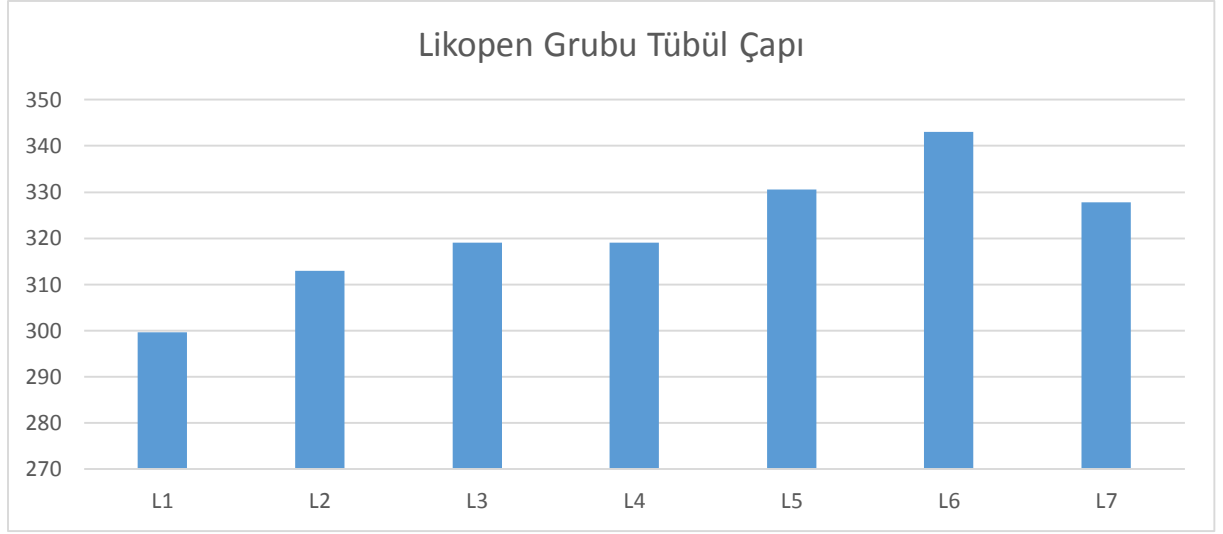
Grafik 4. 6. Kontrol Grubu Hayvanlara Ait Tübül Çapları

Araştırmamızda SHAM grubu 7 sıçana ait tübül çapları incelendiğinde, en yüksek tübül çapı 338 mikron ile 1 numaralı sıçanda görülürken, en düşük tübül çapı 295 mikron ile 5 numaralı sıçanda görülmüştür.



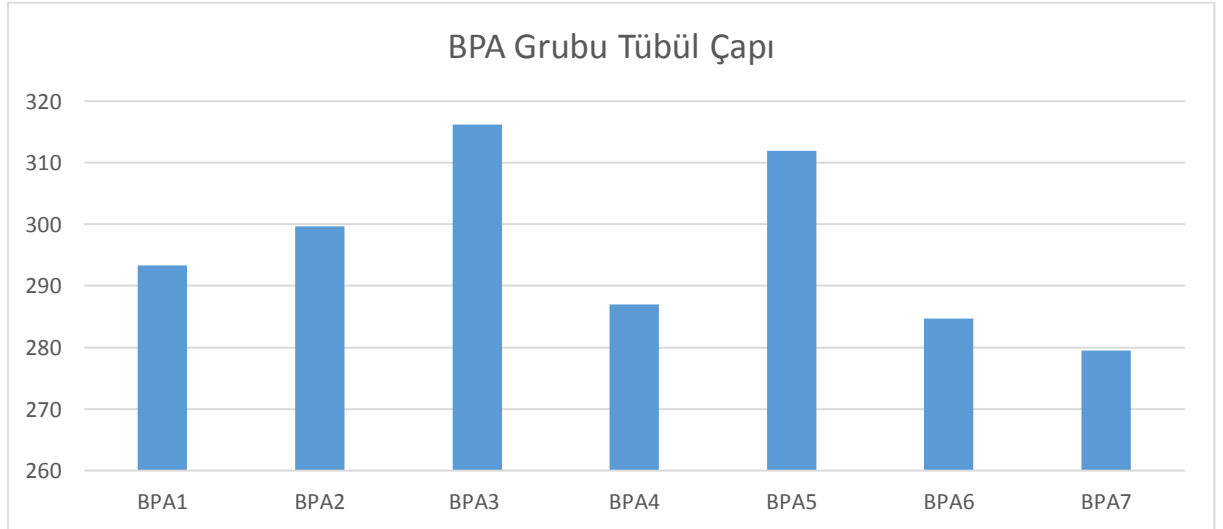
Grafik 4. 7. SHAM Grubu Hayvanlara Ait Tübül Çapları

Araştırmamızda LİKOPEN grubu 7 sıçana ait tübül çapları incelendiğinde, en yüksek tübül çapı 344 mikron ile 6 numaralı sıçanda görülürken, en düşük tübül çapı 298 mikron ile 1 numaralı sıçanda görülmüştür.



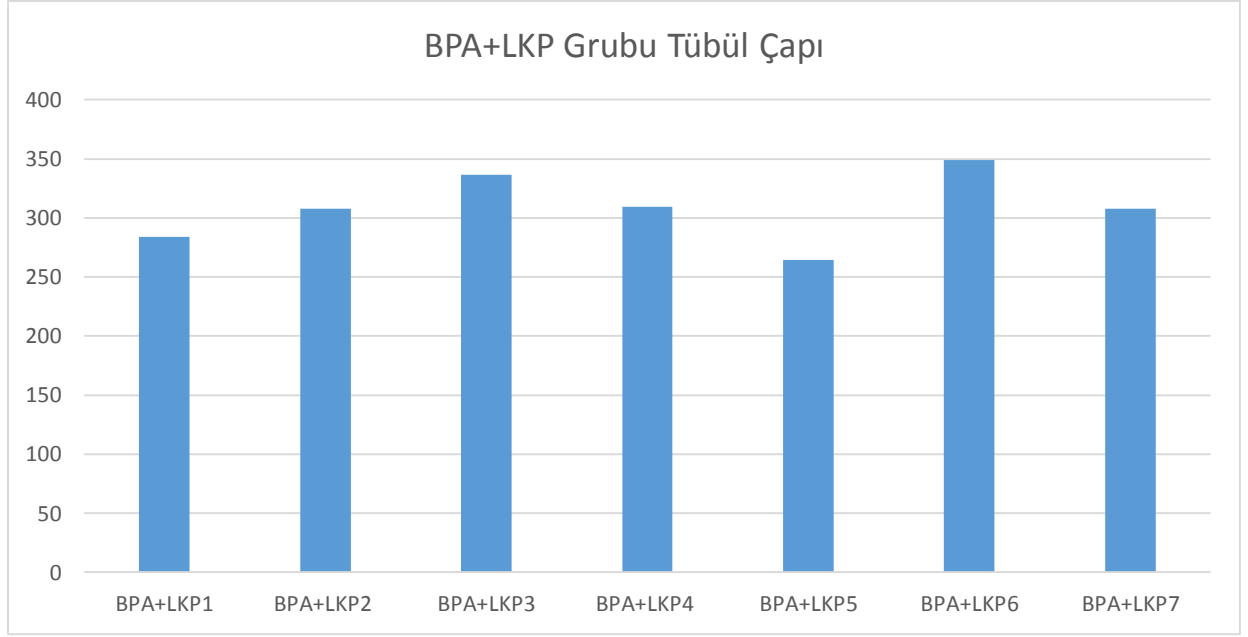
Grafik 4. 8. Likopen Grubu Hayvanlara Ait Tübül Çapları

Araştırmamızda BPA grubu 7 sıçana ait tübül çapları incelendiğinde, en yüksek tübül çapı ortalama 315 mikron ile 3 numaralı sıçanda görülürken, en düşük tübül çapı ortalama 278 mikron ile 7 numaralı sıçanda görüldü.



Grafik 4.9. BPA Grubu Hayvanlara Ait Tübül Çapları

Araştırmamızda BPA+LKP grubu 7 sıçana ait tübül çapları incelendiğinde, en yüksek tübül çapı 350 mikron ile 6 numaralı sıçanda görülürken, en düşük tübül çapı 252 mikron ile 5 numaralı sıçanda görülmüştür.



Grafik 4.10. BPA + LKP Grubu Denekler Ait Tübül Çapları

4.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

4.5.1. TUNEL Bulguları

TUNEL boyama yöntemi ile seminifer tübülde bulunan spermatogenik hücreler incelendi. Seminifer tübüllerde bulunan spermatogenik hücrelerin DNA fragmentasyonlarının değerlendirilmesi için TUNEL pozitif boyama yapıldı.

Çalışmamızda testis dokusunda, TUNEL pozitif boyanan hücrelerin karşılaştırılmasında One Way ANOVA testini kullandı. $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

TUNEL yöntemi ile boyama sonucu, nukleusları boyanmış olan hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Kontrol grubundaki sıçanların seminifer tübüllerinde gözlenen spontan apoptoz ağırlıklı olarak spermatogonyumlarda ve çok az olarak da spermatositlerde gözlemlendi ve APOİ'i $28,3 \pm 0,85$ olarak hesaplandı. Sham grubunda seminifer tübüldeki hemen hemen bütün spermatogenetik seride az sayıda apoptotik nukleuslara rastlandı ve APOİ'i $26,6 \pm 0,23$ bulundu. Likopen grubunda da kontrol grubuna benzer bir görüntü vardı ve APOİ'i $18,5 \pm 0,72$ olarak hesaplandı. BPA grubunda ise seminifer tübüldeki spermatogenetik seride apoptotik nukleuslara rastlandı fakat; Sham grubundakinden çok fazlaydı ve APOİ'i $49,6 \pm 0,65$ olarak bulundu.

BPA+LKP grubunda ise seminifer tübüldeki spermatogenetik seride apoptotik nukleuslara rastlandı APOİ'i $38,3 \pm 0.27$ olarak bulundu.

Kontrol, Sham, LKP grupları arasında seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatogonium hücre sayısı karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (Kontrol-Sham $p=0,86$, Kontrol-LKP $p=0,75$ Sham-LKP $p=0,62$)

Kontrol grubu, BPA grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda yüksek bulundu. (Kontrol-BPA $p=0,0001$)

Sham grubu, BPA grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda yüksek bulundu. (Sham-BPA $p= 0,0001$)

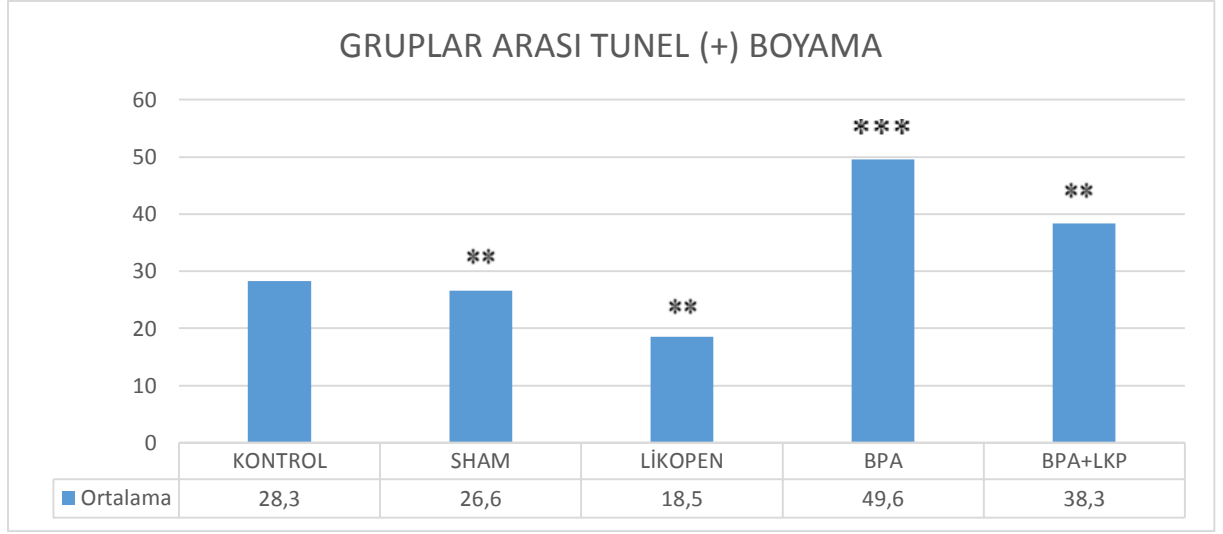
LKP grubu, BPA grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda yüksek bulundu. (LKP-BPA $p=0,0001$)

Kontrol grubu, BPA+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerdeki TUNEL pozitif spermatosit hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (Kontrol-BPA+LKP $p=0,42$)

Sham grubu, BPA+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerdeki TUNEL pozitif spermatosit hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (Sham-BPA+LKP $p= 0,32$)

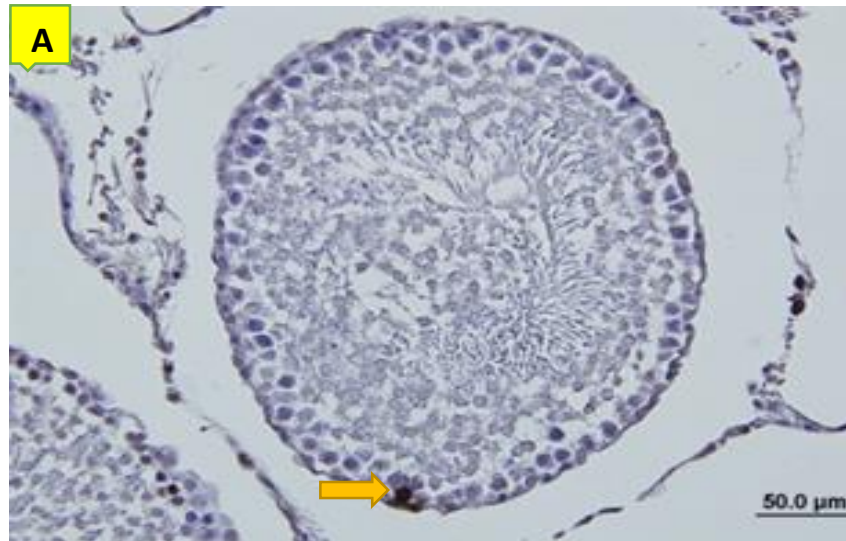
LKP grubu, BPA+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerdeki TUNEL pozitif spermatosit hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (LKP- BPA+LKP $p=0,73$)

BPA grubu ile BPA+LKP karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda yüksek bulundu. (BPA -BPA +LKP $p=0,0001$)

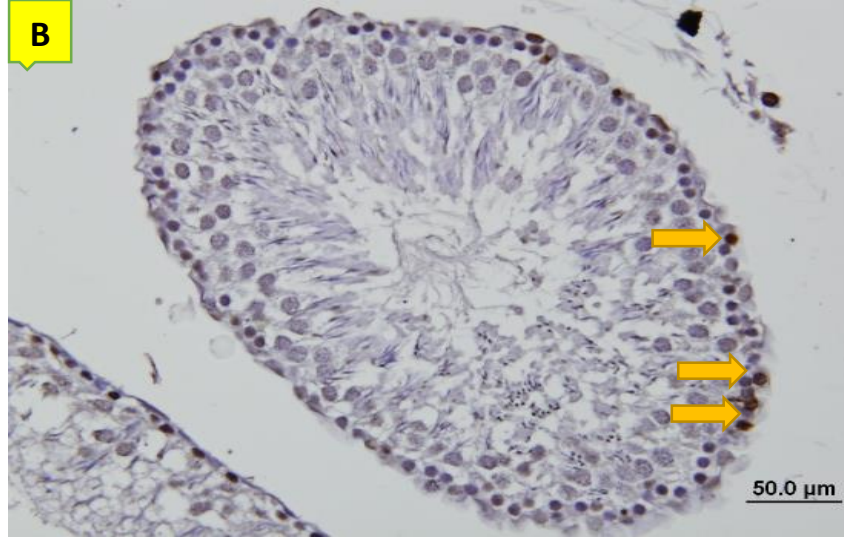


Değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir. **: $p < 0,05$ (BPA grubu ile karşılaştırıldığında) ve ***: $p < 0,05$ (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında) olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

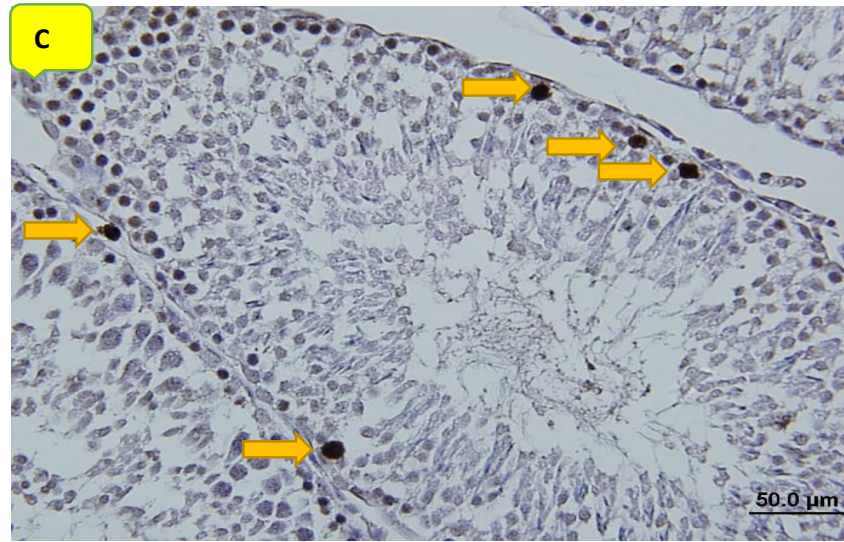
Grafik 4.11. Gruplar arası Tunel (+) hücre sayısı



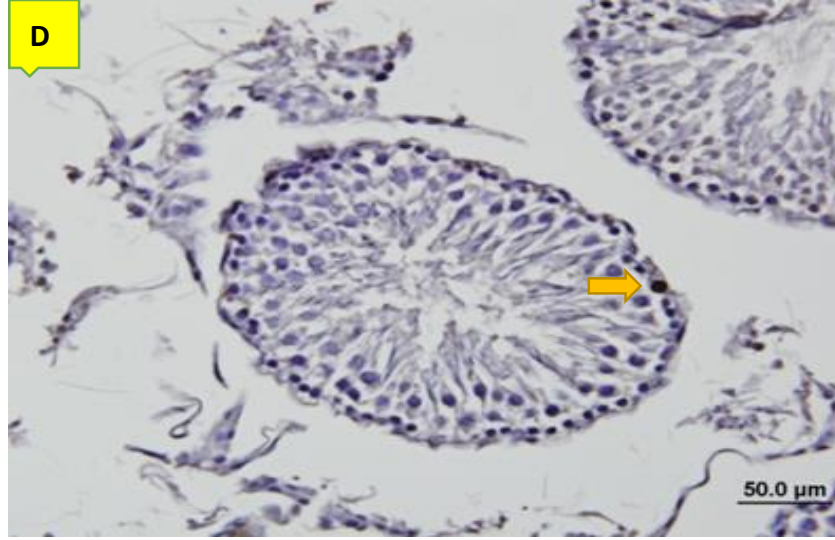
Şekil 4.21. A; Kontrol grubuna ait TUNEL (+) hücre (→) gözlenmektedir (Bar 50μm, TUNEL).



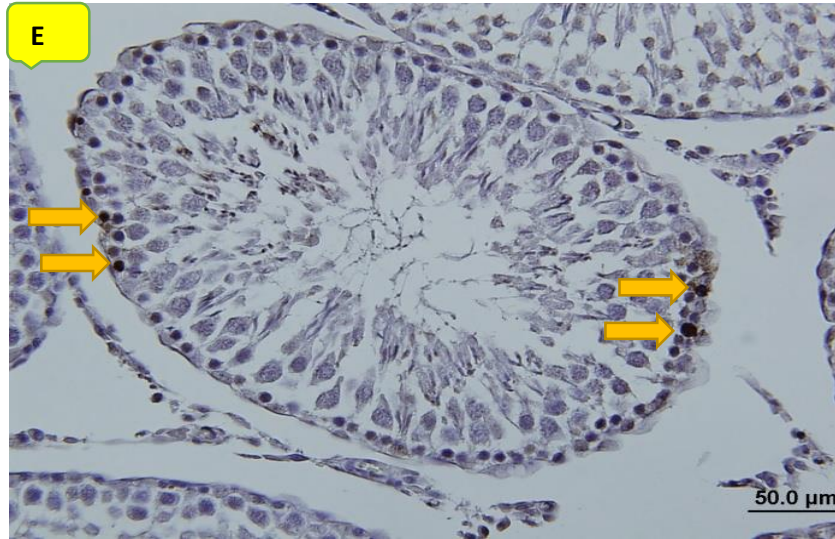
Şekil 4.22. B; Sham grubuna ait TUNEL (+) boyanan hücreler (→) gözlenmektedir (Bar 50μm, TUNEL).



Şekil 4. 23. C; BPA grubuna ait TUNEL (+) boyanan hücreler (→) gözlenmektedir (Bar 50μm, TUNEL).



Şekil 4.24. D; LKP grubuna ait TUNEL (+) boyanan hücre (➡) gözlenmektedir (Bar 50µm, TUNEL).



Şekil 4.25. E; BPA+LKP grubuna ait TUNEL (+) boyanan hücreler (➡) gözlenmektedir (Bar 50µm, TUNEL).

4.5.2 AKTİF KASPAZ-3 IHC (+) HÜCRE SAYIMI

Kontrol grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium sayımı ortalama $7,7 \pm 0,81$ olarak saptandı. Sham grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı ortalama $8,15 \pm 0,65$ olarak saptandı. LKP grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı ortalama $6,02 \pm 0,11$ olarak saptandı. BPA grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatosit hücre sayımı ortalama $26,25 \pm 2,12$ olarak saptandı. BPA+LKP grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı ortalama $10,22 \pm 1,02$ olarak saptandı.

Kontrol, Sham, LKP grupları arasında seminifer tübüllerdeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayısı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı (Kontrol-Sham $p=0,73$, Kontrol-LKP $p=0,96$, Sham-LKP $p=0,88$)

Kontrol grubu BPA grubu ile karşılaştırıldığında aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayısı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda yüksek bulundu (Kontrol-BPA $p=0,0001$).

Sham grubu BPA grubu ile karşılaştırıldığında aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayısı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda yüksek bulundu (Sham-BPA $p=0,0001$).

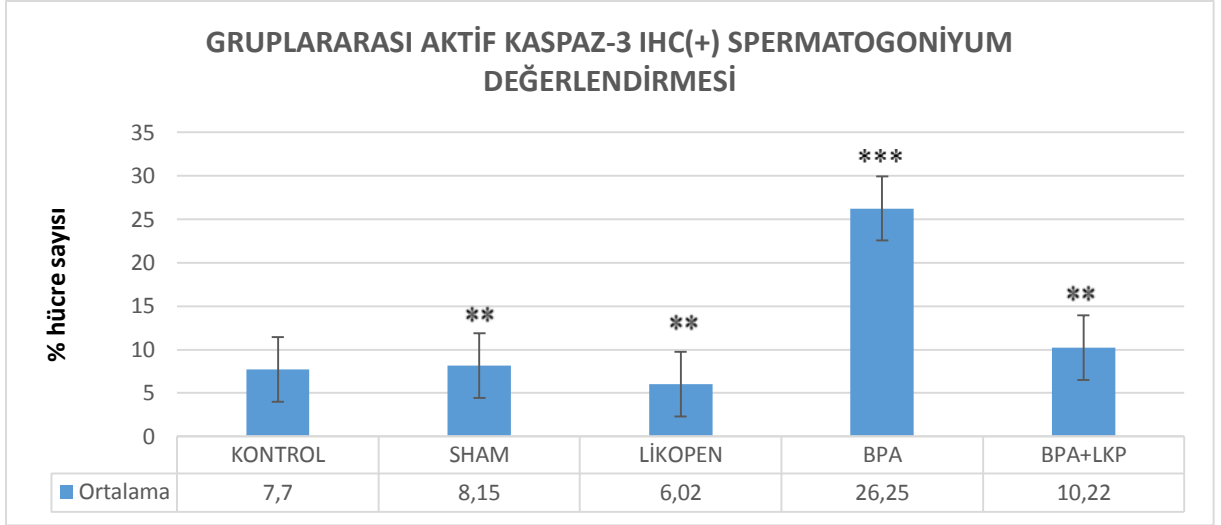
LKP grubu BPA grubu ile karşılaştırıldığında aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayısı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda fazla bulundu (LKP-BPA $p=0,0001$).

Kontrol grubu, BPA+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (Kontrol-BPA+LKP $p=0,43$)

Sham grubu, BPA+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (Sham-BPA+LKP $p=0,15$)

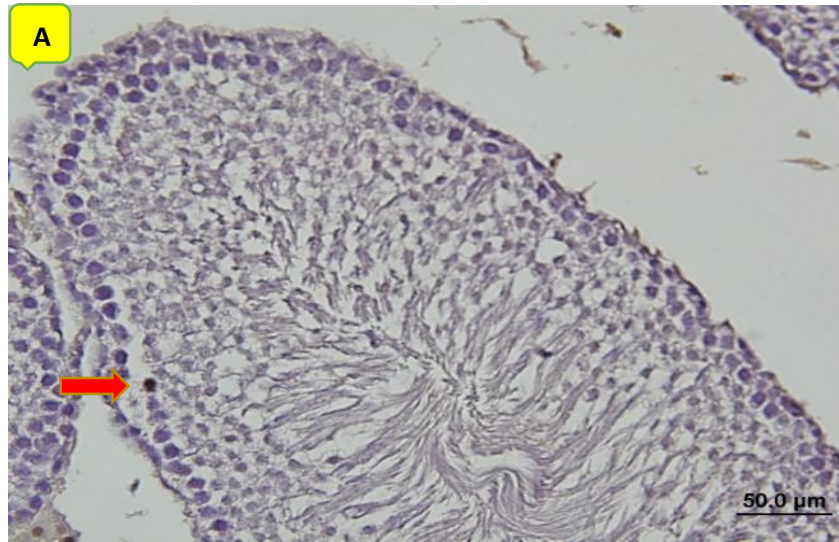
LKP grubu, BPA+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (LKP-BPA+LKP $p=0,42$)

BPA grubu ile BPA+LKP karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda yüksek bulundu. (BPA-BPA+LKP $p=0,0001$)

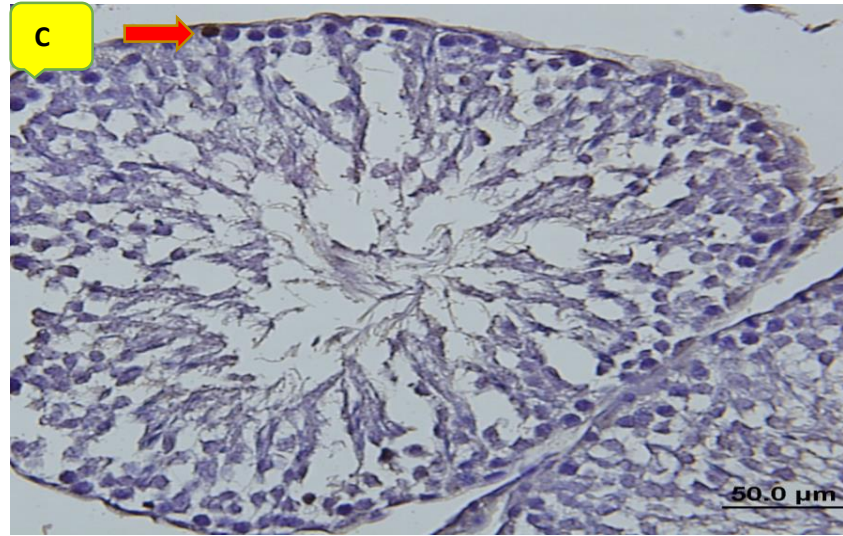


Değerler ortalama $\pm$ SS şeklinde verilmiştir. **: $p < 0,05$ (BPA grubu ile karşılaştırıldığında) ve ***: $p < 0,05$ (kontrol grubu ile karşılaştırıldığında) olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

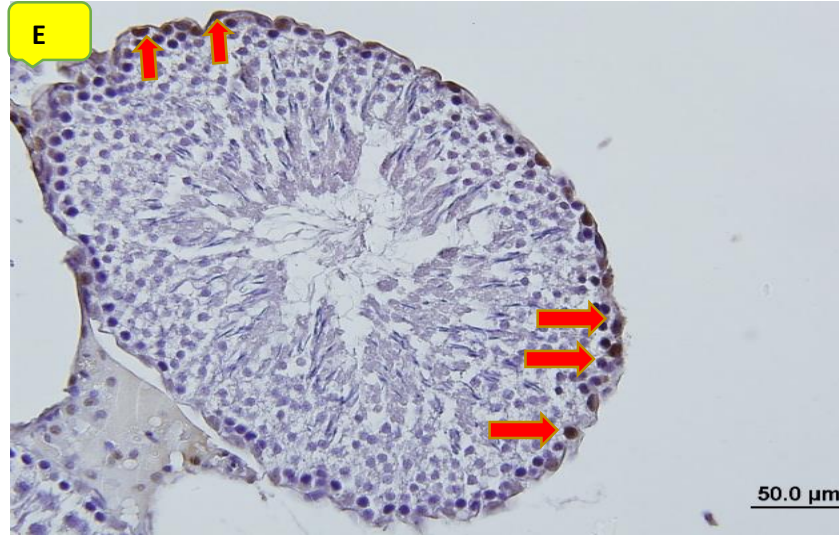
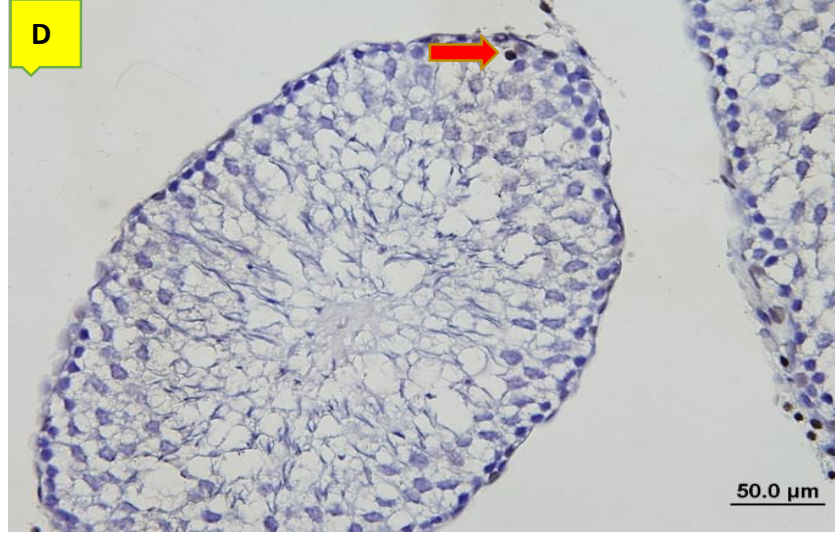
Grafik 4.12. Gruplararası spermatogonium aktif kaspaz-3 IHC (+) hücre sayılarının değerlendirilmesi



Şekil 4.26. A; Kontrol grubu Aktif Kaspaz-3 immunreaktivite gösteren hücre () gözlenmektedir. (Bar 50μm, Aktif Kaspaz-3)



Şekil 4.27 . B; Sham grubu, C; BPA+LKP grubuna ait Aktif Caspaz-3 immunreaktivite gösteren hücreler () gözlenmektedir. (Bar 50µm, Aktif Caspaz-3)

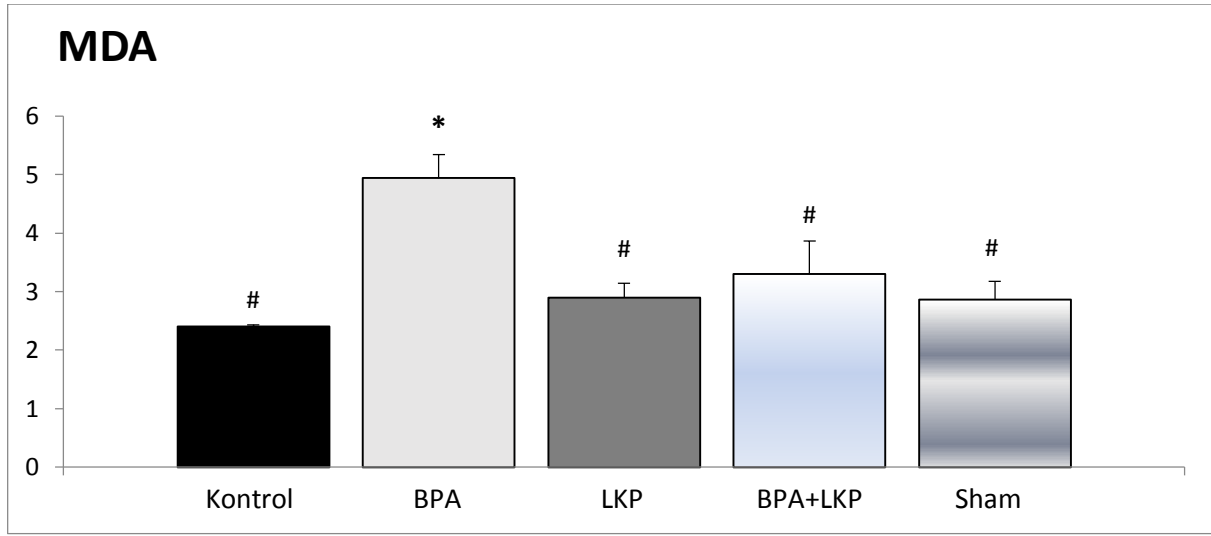


Şekil.4.28. D; LKP grubu, E; BPA grubu, Aktif Caspaz-3 immunreaktivite gösteren hücreler () gözlenmektedir. (Bar 50μm, Aktif Caspaz-3)

4.6. BİYOKİMYASAL BULGULAR

4.6.1. MDA Değerleri

Tüm grupların MDA değerleri Tablo 4. 2’de, ortalama MDA sonuçları Grafik 4. 13’de gösterildi. BPA grubunun MDA değerleri diğer deney gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). BPA+LKP grubunda MDA değerleri BPA grubuna göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). LKP ve BPA+LKP grupları arasında anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0.05$).



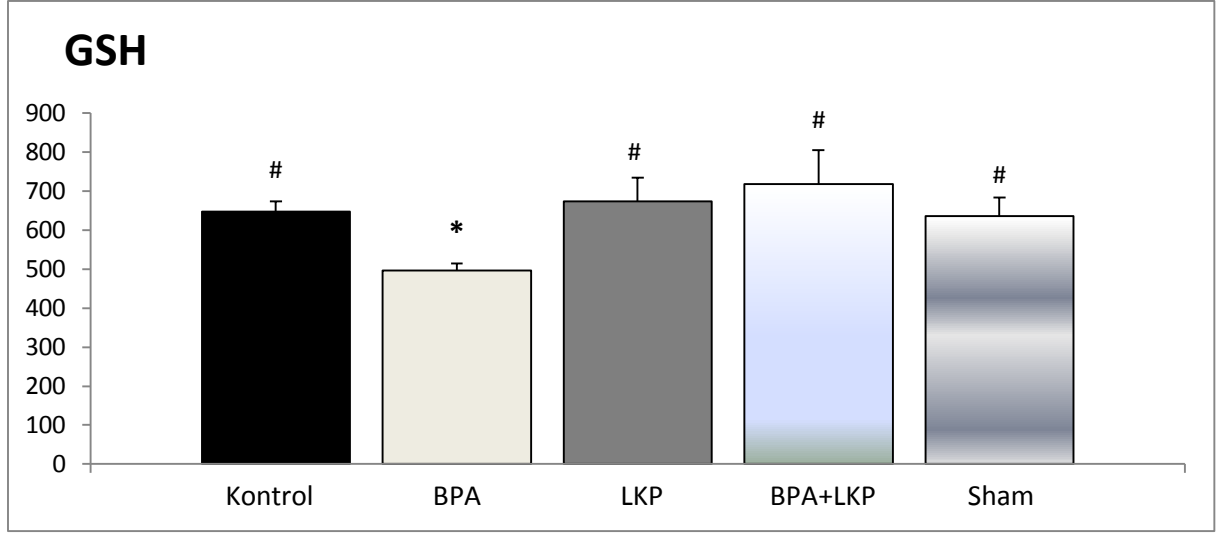
Grafik 4.13. Gruplara ait MDA Değerleri

*Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı

BPA grubuna göre anlamlı olarak farklı

4.6.2. GSH DEĞERLERİ

Tüm grupların GSH değerleri Tablo 4.2’de, ortalama GSH sonuçları Grafik 4.14’de gösterilmektedir. BPA grubunda GSH değerleri diğer deney gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). BPA+LKP grubunda GSH değerleri BPA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). LKP ve BPA+LKP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$).



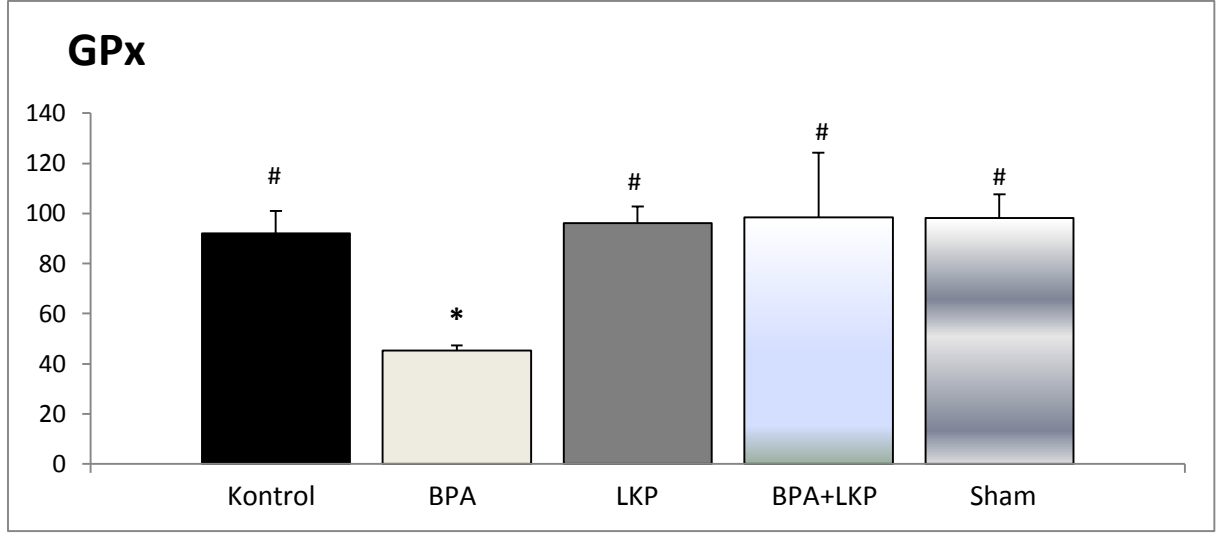
Grafik 4.14. Gruplara ait GSH Değerleri

*Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı

BPA grubuna göre anlamlı olarak farklı

4.6.3. GPX ENZİM AKTİVİTELERİ

Tüm grupların GPx Enzim Aktivitesi değerleri Tablo 4.2’de, ortalama GPx enzim aktivitesi sonuçları Grafik 4.15’de gösterilmektedir. BPA grubunda GSH değerleri diğer deney gruplarına göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0.05$). BPA+LKP grubunda GSH değerleri BPA grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$). LKP ve BPA+LKP grupları arasında anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$).



Grafik 4.15. Gruplara ait GPx Enzim Aktivitesi Değerleri

*Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı

BPA grubuna göre anlamlı olarak farklı

Tablo 4. 2. Grupların MDA, GSH ve GPx enzim değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları

Grup	n	MDA (μM)	GSH (μM)	GPx U/mg pr
KONTROL	7	2.39 ± 0.02 [#]	647.06 ± 26.56 [#]	92.10 ± 8.89 [#]
BPA	7	4.94 ± 0.40 [*]	497.14 ± 17.69 [*]	45.30 ± 1.91 [*]
LKP	6	2.89 ± 0.25 [#]	673.99 ± 60.86 [#]	96.09 ± 6.76 [#]
BPA+LKP	6	3.30 ± 0.55 [#]	718.87 ± 85.46 [#]	98.39 ± 25.76 [#]
SHAM	7	2.86 ± 0.31 [#]	635.32 ± 48.19 [#]	98.04 ± 9.53 [#]

*Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı

BPA grubuna göre anlamlı olarak farklı

5. TARTIŞMA

Bisfenol A (BPA), plastiklerin ve reçinelerin üretimi esnasında diğer kimyasallar ile polimerleşmeye yardımcı olarak kullanılan bir monomerdur. BPA'nın endokrin bozucu bir etkisi bulunmakta ve bu etkisine serbest BPA neden olmaktadır. BPA'ya maruz kalınmasında hem dişilerde, hem de erkeklerde üreme hormonları ve tiroid hormonlarının reseptörlerini, sentezlerini ve/veya atılımlarını etkilemektedir. BPA'nın erkek üreme sistemi üzerine etkilerini değerlendiren çalışmaların çoğu deney hayvanlarında, özellikle sıçanlarda yapılmıştır. Birçok çalışmada BPA'nın erkek üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkisi, spermde oksidatif stresin indüksiyonu ile açıklanmaktadır. Sıçanların oral yoldan artan dozlarda BPA'ya maruziyetinin, antioksidan savunma sisteminin azalmasına ve epididimal spermelerde oksidatif stresin artışına yol açabileceği bildirilmektedir. Birçok yapılan araştırmada BPA'ya maruz kalan sıçanlarda süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon redüktaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri azalırken, reaktif oksijen bileşiklerinin (ROS) ve lipid peroksidasyonun anlamlı ölçüde arttığı belirtilmiştir.

Bizim çalışmamızdaki amacımız, düşük dozda BPA'nın erkek genital sistem organlarından testis üzerine olan etkilerinin histolojik olarak ortaya konulması ve olası etkilerinin Likopen ile azaltılması ve/veya ortadan kaldırılmasının ışık mikroskopik, immunohistokimyasal, biyokimyasal düzeyde incelenmesidir.

United States Department of Health and Human Services'nin 2008 yılında yapmış olduğu araştırmada erkek sıçanlarda düşük doz BPA'ya maruz kalmanın sperm üretiminde azalmaya neden olduğu saptanmıştır (83). *Takahashi ve ark* 2003 yılında yapmış oldukları çalışmada, erişkin farelerin 4 hafta süreyle (intraperitoneal) günde 20 mg/kg BPA'ya maruziyeti sonucu, sperm üretiminde değişiklikler meydana geldiğini bildirilmiştir (84). *Ho ve ark.* 2013 yılında yapmış oldukları çalışmada, BPA ile karşılaşmış olan sıçanların yaşamının ilerleyen zamanlarında testis dokularında dejenerasyon görülme riskinin artabileceğini savunmuşlardır. Bu etkinin doğrudan DNA modifikasyonu ile değil, diğer bazı kanser yapıcı bileşikler gibi, BPA'nın da DNA'nın hücre fonksiyonlarını kontrol eden proteinlerde tranlasyon aşamasında değişikliklere neden olması sonucu oluştuğunu ileri sürmüşlerdir (85). *Sakaue ve ark.*'nin 2001 yılında yaptıkları çalışmada, yüksek dozda BPA'ya oral maruziyetin günlük sperm üretiminde ve fertilitede azalmaya neden olduğu gösterilmiştir; ancak 20 µg/kg/gün dozunun altında sperm üretimi önemli ölçüde farklı bulunmamıştır (86). *Feldman ve ark.* 1995 yılında yaptıkları çalışmada, içme suyu ile verilen BPA'nın üreme, testis patolojisi ve spermatogenezis üzerine

etkisi sıçanlarda dört nesil boyunca incelenmiş (2-200 µg/kg gün), BPA'nın sıçanlarda üreme, testis patolojisi ve özellikle spermatogenezis üzerinde olumsuzluklar meydana getirdiğini saptamışlardır. BPA'nın düşük çevresel konsantrasyonları (2.4 µg/kg) sıçanlarda eşeyssel olgunluğun hızlanması ve postnatal gelişmelerde anormalliklere neden olabileceği sonucuna varmışlardır (62). *Kuiper ve ark.* 1996 yılındaki çalışmalarında ise, gebe sıçanlara besinlerle verilen BPA'nın, plasentada, 0,4 ve kanda 1,6 µg/kg ağırlık olarak bulunduğu ve plasenta yolu ile fetüse geçtiği belirtilmektedir. Yavruda BPA konsantrasyonunun anneye göre daha az olduğu ancak BPA'nın birikme olabilme özelliğinden dolayı fetüsün risk altında olabileceğini belirtmişlerdir (61).

Bizim çalışmamızda erkek sıçanlara 14. gün boyunca oral gavaj yöntemiyle 10 mg/kg BPA uygulandı ve sonuçta BPA'ya maruz kalmanın sperm üretiminde azalmaya neden olduğu saptanmıştır. *Domoradzki ve ark.* 2004 yılında, 21 rat üzerinde yapmış oldukları çalışmada oral yoldan verilen 10 mg/kg BPA konsantrasyonunun post natal dönemde (Tmax) (1,5-3 saat) en üst seviyeye ulaştığını saptamışlardır (87). *Pottenger ve ark.* 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada sıçanlara oral yoldan 10 mg/kg BPA uygulamışlardır. Sonuçta BPA'ya maruz kalmanın sperm üretiminde azalmaya neden olduğu saptanmıştır (88).

Biz de çalışmamızda yapmış olduğumuz lipid peroksidasyonun değerlendirilmesinde BPA verilen grupta MDA düzeylerinde kontrol, sham, LKP gruplarına göre anlamlı bir artış olduğunu gördük. Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunan GPx ve GSH enzimleri serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı en önemli defans mekanizmalarını oluştururlar. Normal koşullarda hücrelerde bulunan hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin yıkımını katalize eden GPx, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyen önemli bir enzimdir. Çalışmamızda BPA uygulanmış testis dokusundaki GPx değerlerinin düştüğünü gözlemledik.

LKP, bir alifatik hidrokarbondur ve doğal olarak bulunan yaklaşık 600 karotenoidten bir tanesidir (78). LKP' nin başlıca domates ve bu sebzeden elde edilen ketçap, sos ve domates suyu gibi ürünlerde bulunur (89). Ayrıca karpuz, pembe greyfurt ve pembe kavunda LKP içeren diğer besin kaynaklarıdır. LKP göğüs kanseri, prostat kanseri gibi kanser türlerinde koruyucu etkiye sahiptir.

Ateşşahin ve ark. 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada sisplatinle oluşturulmuş testiküler hasara LKP'in koruyucu etkisini araştırmışlar ve 4mg/kg LKP'in sisplatinin neden olduğu seminifer tübül çapında azalma, germinal epitel kalınlığında artma gibi testiküler hasarlara LKP'nin koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca sisplatinin neden

olduğu MDA artışını LKP anlamlı derecede düşürdüğü yine yapılan çalışmada gösterilmiştir. Antioksidan kapasiteyi göstermek amacıyla testis dokusunda GPx düzeylerine bakılmış ve sispaltine bağı azalan GPx miktarını LKP'in anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştirlerdir (90). *Ateşşahin ve ark.* 2006 yılında yapmış olduğı başka bir çalışmada adriamisin kullanımında testiste oluşabilecek toksik hasara LKP'in koruyucu etkisini araştırmışlar ve 4 mg/ kg LKP' nin testis dokusundam sperm motilitisinde artışa, adriamisinin neden olduğı seminifer tübül çapındaki azalmayı önleyip, seminifer tübül çapında artışa neden olduğı, germinal epitel kalınlığında artışı sağladığı ve yüksek MDA düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğı gösterilmiştir (91). Yapılan bazı çalışmalarda da, testiste oksidatif hasar sonucu meydana gelen bozulmaların, uygulanan çeşitli antioksidanlar ile düzeldiğı ifade edilmiştir. *Zhou ve ark.*'nın 2006 yılındaki çalışmalarında LKP'nin, formaldehit maruziyeti sonucu testiste oluşan oksidatif hasarı ve histopatolojik bozulmaları engellediğı gözlenmiştir. (92). *Türk ve ark.*'nın 2007 yılında testisler üzerinde yaptıkları çalışmada da, siklosporin A'nın neden olduğı oksidatif hasar ve histolojik bozulmanın likopen tarafından önlendiğı bildirilmiştir (21). *Kurt ve ark.* (2005), sıçanlarda oluşturulan oksidatif hasarın rasyona ilave edilen likopen ile önlenebileceğini ve likopenin serbest radikalleri uzaklaştıran katalaz ve glutatyon peroksidazın aktivitelerini arttırdığını belirtmişlerdir (93). *Rafi ve ark.* 2007 yılında farelerde bağırsak iltihabının likopenin, serbest olan oksijeni yakalayabilme yeteneğı sayesinde antioksidan etki gösterdiğini ortaya koymuşlardır (94). *Bhuvaneswari ve ark.*, 2001 yılında yapmış oldukları çalışmada sıçanlarda geliştirilen buccal (ağız içi) kese kanserinin likopenin lipit peroksidasyonunu düşürerek ve kan dolaşımındaki anti oksidan dolaşımını artırarak önlediğı gözlenmiştir (95). *Karahan ve ark.* (2006), sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmada likopen ilavesi yapılan rasyonlarda plazma MDA düzeylerinin kontrol değerlerine yaklaştığını saptamışlardır (96). Benzer şekilde *Kurt ve ark.* (2005), oksidatif hasar sonucu artan MDA düzeyinin likopen ile düşürülebileceğini belirlemişlerdir (93). *Taş ve ark.* 2009 yılında likopen uygulamasının aflatoksin B1 (AFB1) uygulanmış ratların üreme sistemi, sperm kalitesi ve oksidatif stres üzerine olan önleyici etkilerini saptamak amacıyla yürüttükleri çalışmalarında, AFB1 uygulanan hayvanların motilitesinde önemli düzeyde azalma ve toplam anormal spermatozoon sayısında ise artış saptanmıştır. AFB1 uygulanan hayvanların testis malondialdehyde (MDA) seviyesi Kontrol grubu hayvanlarınkinden daha yüksek bulunmuştur. AFB1 uygulanan hayvanların germinatif hücrelerin kalınlığı, Kontrol grubu hayvanlarınkinden daha küçük tespit edilmiştir. Çalışmada LKP uygulamasının spermatozoa

motilitesini önemli düzeyde artırdığı ve AFB1'in spermatozoa özellikleri ve testis üzerindeki olumsuz etkilerini giderdiği saptanmıştır (97). *Durairajanayagam ve ark* 2014 yılında yaptıkları çalışmada erkek infertilitesi üzerine likopenin etkilerini inceledikleri çalışmada aşırı miktarda Reaktif oksijen türlerinin (ROS) sperm canlılığı ve hareketliliği azalttığı, oksidatif stresin sperm membran lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve apoptoz neden olduğu burada tedavi etmenin en iyi yolunun iyi bir antioksidan olan likopen ile olabileceğini savunmuşlardır (98).

Bizde yapmış olduğumuz çalışmada BPA maruziyeti sonucu oluşan seminifer tübül çapında azalma, bazal membran kalınlaşmasının görülmesi gibi testiküler hasara 4 mg/kg LKP'in anlamlı derecede koruyucu olduğunu gözlemledik. Ayrıca yapmış olduğumuz çalışmada BPA grubunda MDA düzeyleri artmış ve BPA+ LKP gruplarında LKP etkisi ile MDA seviyelerinde anlamlı bir azalma tesbit edilmiştir. Çalışmamızda baktığımız parametrelerden biri de GPx seviyeleridir. BPA gruplarında düşmüş olan GPx miktarı BPA+LKP gruplarında anlamlı derecede artmıştır. Yine GSH değerleri ise BPA grubuna göre büyük oranda yükselmiştir. *Zhou ve ark.*, 2006 yılındaki sıçanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında, solunum yoluyla uygulanan formaldehitin testislerde oksidatif hasara yol açtığını, formaldehit maruziyeti sonucu doku GSH-Px değerlerinin düştüğünü, MDA değerlerinin ise arttığını tespit etmişlerdir (92). *Tang ve ark.* 2003 yılında, 5 gün süresince intraperitoneal olarak BPA uygulanan farelerde, testis doku MDA değerlerinde bir artışın olduğunu göstermişlerdir (99).

Apoptozis, birçok fizyolojik ve patolojik olaylarda meydana gelen programlanmış hücre ölümüdür. Apoptotik sürecin başlamasında hücre içi ve hücre dışı kökenli ölüm sinyalleri etkili olur. Bu uyarılara maruz kalan hücrede, ilgili genetik mekanizma harekete geçer ve apoptozis başlar. Metabolizma ve siklus bozuklukları, hiperkalsemi, pH değişiklikleri gibi etkiler hücre içinden kaynaklanan sinyallerdir. Hücre dışından gelen sinyaller ise, ultraviyole ışınları, hipoksi, ısı değişiklikleri, anti-kanser ilaçlar ve toksik maddelerdir. *Kuş ve ark.* 2008 yılında yapmış oldukları çalışmada, hem seminifer tübül duvarındaki spermatogenetik hücrelerde hem de Leydig hücrelerinde apoptozisin meydana geldiği immunohistokimyasal değerlendirme ile ortaya koymuşlardır. Ayrıca spermatogenetik hücrelerde belirlenmiş olan apoptozis, formaldehit toksisitesine bağlı olarak testislerde sperm üretiminin olumsuz yönde etkilendiğini ve Leydig hücrelerinde gözlenen apoptotik değişiklikler ise testosteron üretiminin azalmış olabileceği sonucuna varmışlardır (100). *Wang ve ark.* (2003), erkek ratlarda, Nonilfenol ve

BPA'ya maruz kalan Sertoli hücrelerinde, Nonilfenol (NF) ve BPA'nın konsantrasyonu arttıkça apoptozun arttığını rapor etmişlerdir (101). *Gong ve ark. (2009)* , Nonilfenol ve BPA'nın Sertoli hücreleri üzerinde, apoptosizde önemli bir rol oynayan ER stresi oluşturabileceğini de belirtmişlerdir (102).

Bu çalışmada, TUNEL değerlendirmelerinde; BPA+LKP grubunda LKP etkisi ile TUNEL pozitif spermatogonium ve spermatosit sayısında BPA grubuna göre anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. *Can 2010* yılında yapmış (81) olduğu metil parationun testiste oluşturduğu toksik hasara likopenin koruyucu etkisinin biyokimyasal, ışık mikroskopik ve ultrastrüktürel düzeyde incelendiği tez çalışmasında, TUNEL değerlendirmesinde; metil paration grubunda spermatogonium ve spermatositlerdeki apoptozun kontrol, sham ve LKP gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttırdığını tespit etmişlerdir (81). *Han ve ark. (2004)*, Sprague–Dawley erkek ratlara 50 gün boyunca 0, 125 ve 250 mg/kg/gün NF uygulamış ve Tunel sonucuna göre, testis hücrelerinde NF'nin doza bağlı apoptozu arttırdığını belirtmiştir (103). *Weber ve ark., 2002; Gong ve Han, 2006* yaptıkları çalışmalarda da Nonilfenol ve BPA'nın testis hücrelerinde apoptoza neden olduğu belirtilmiştir (94,102). Hücre içi ya da hücre dışından gelen apoptotik sinyaller, hücre içerisinde bulunan proteazları aktive eder. Bu proteazlara KASPAZ adı verilir. *Gültekin 2013* yılında yapmış olduğu testis dokusunda seminifer tübüldeki apoptozis hem immünohistokimyasal olarak TUNEL yöntemi ile göstermiştir. Sisplatin grubunda artmış apoptozisle beraber belirgin bir boyanma olduğu (Aktif KASPAZ-3) buna karşın Kontrol ve Zn grubunda boyanmanın olmadığı, Sisplatin (CP) +Zn grubunda ise apoptozisin devam ettiği fakat, boyanma şiddetinin CP'deki kadar fazla olmadığını tespit etmişlerdir (105). *Yıldırım ve ark. 2012* yılında yapmış oldukları çalışmada apoptozisin değerlendirmesinde standart yöntem kabul edilen TUNEL yöntemini kullandı. Kontrol grubu ile diğer grupların apoptozis oranları karşılaştırıldığında sadece birinci ve ikinci gün grubu ile anlamlı fark bulunurken diğer gruplarla anlamlı fark bulunamadı (106). *Göncü ve ark. 2014* yılında yaptıkları çalışmada apoptotik DNA kırıklarını göstermek için TUNEL işaretleme ve Aktif kaspaz 3'ün ve sitokrom C belirlenmesi için primer antikorları ile SDS-PAGE ve blotlama sonrasında inkübe etti. Sonuçta TUNEL'de pozitif reaksiyon belirlenirken, Kaspaz aktivitesi ise larval evrenin son günü olan 10. Günü ile pupal evrenin 12. saatleri arasında gözlemlendi (107). *Özçelik ve ark. 2014* yılında Wistar albino sıçanları üzerinde yapmış oldukları çalışmada hayvanları 5 gruba ayırmış ve hayvanları dekapite edilerek kanda TNF- α ve adiponektin (ADP), böbrek ve mesane örneklerinde histolojik değerlendirme,

malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), ADP ve KASPAZ-3 değerlerini ölçmüştür. Metabolik sendrom geçiren grupta kaspaz-3 aktivitesinin arttığını, diğer gruplarda azaldığını tespit etmişlerdir (108). Çalışmamızda Kontrol, Sham ve LKP grupları, BPA grubu ile karşılaştırıldığında aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayısı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve BPA grubunda yüksek bulundu. Kontrol, Sham ve LKP grupları grubu, BPA+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmadan elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda düşük doz BPA 'nın testiste oluşturduğu toksik hasara 4mg/kg LKP'nin koruyucu etkisi olduğu, ancak hasarı tamamen engellemediği sonucuna vardık. Bisfenol A dozu ve maruz kalma süresi, hasarın şiddeti açısından büyük önem taşımaktadır.

BPA'nın testiste oluşturduğu toksik hasara LKP'nin koruyucu etkisi ilk defa bizim çalışmamızda; histokimyasal olarak H&E ve PAS boyamaları, immünohistokimyasal olarak TUNEL, Aktif Kaspaz-3 boyamaları ve biyokimyasal olarak MDA, GSH ve GPX enzim aktivite düzeyleri ölçülerek değerlendirildi.

Literatürlerde BPA 'nın testiste oluşturduğu toksik hasara LKP'nin koruyucu etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamızın, literatüre katkı sağlayacağını düşünüyoruz.

7.KAYNAKLAR

1. Durmaz E, Giray BK. Çevresel bir endokrin bozucu: Bisfenol A ve toksik etkilerinin Değerlendirilmesi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2013; 56: 192-199
2. Gülnaz O. Bisfenol A'nın Biyolojik Parçalanması, Biyokonsantrasyon Faktörleri ve Östrojenik Aktivite Düzeylerinin Belirlenmesi. 2003 <http://library.cu.edu.tr/tezler/5852.pdf>
3. Wolstenholme JT, Rissman EF, Connelly JJ., 2011. The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. Horm Behav. 59(3):296-305.
4. Ballesteros-Gomez A, Rubio S, Perez-Bendito D (2009): Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. J Chromatogr A, 1216(3), 449-469.
5. ECB, 2003, European Chemicals Bureau, European Union Risk Assessment Report 4,4' Isopropylidenediphenol(Bisphenol-A). EINECS No: 201-245-8 Office for Official Publications of the European Communities,
6. Tsai WT (2006): Human health risk on environmental exposure to bisphenol-A: A Review. J Environ Sci Heal C. 24, 225-55.
7. Fleisch AF, Sheffield PE, Chinn C, Edelstein BL, Landrigan PJ. Bisphenol A and related compounds in dental materials. Pediatrics. 2010;126(4):760-768.
8. Matsumoto A, Kunugita N, Kitagawa K, Isse T, Oyama T, Foureman GL, Morita M, Kawamoto T (2003): Bisphenol A levels in human urine. Environ Health Persp, 111(1), 101-104.
9. Garcia RS, Losada PP (2004): Determination of bisphenol A diglycidyl ether and its hydrolysis and chlorohydroxy derivatives by liquid chromatography–mass spectrometry. J Chromatogr A, 1032, 37–43.
10. Akyüz S, Yarat A, Egil E. Bisfenol-A İçerikli Dental Materyallere Güncel Yaklaşım. MUSBED 2011;1(3):190-195
11. Lau OW, Wong SK (2000): Contamination in food from packaging material. J Chromatogr A, 882, 255-270.
12. Dekant W, Völkel W (2008): Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures. Toxicol Appl Pharm, 228,114–134.
13. Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'block, S.T., Harris, L.R., 1998. A Review of the Environmental Fate, Effects and Exposures of Bisphenol A. Chemosphere, 36: 2149-2173.

14. Ye X, Kuklenyik Z, Needham LL, Calafat AM., 2005. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2, 5-dichlorophenol ,and 2 -hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatographytandem mass spectrometry. Anal Bioanal Chem 383: 638-644.
15. Wong EW, Cheng CY., 2011. Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. Trends Pharmacol Sci. 32(5):290-299.
16. Michalowicz J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. Environmental toxicology and pharmacology 37 (2014) 738-758
17. Eken A. Rat Kan ve Doku Oksidatif Stres Parametreleri. Journal of Clinical and Analytical Medicine, 2001
18. Prillaman HM, Turner TT. Rescue of testicular function after acute experimental torsion. J Urol 1997; 157:340-5.
19. Agarwal S, Rao AV. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. CMAJ 2000;163(6):739-44.
20. Sabbağı Ç, Sürücüoğlu M.S. Likopen: İnsan Sağlığında Vazgeçilmez Bir Bileşen. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi Cilt: 6, No: 3, 2011 (27-41)
21. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Yüce A, Çeribaşı A.O., 2007, Lycopene protects against cyclosporine A- induced testicular toxicity in rats. Theriogenology 67;778–785
22. Salem E.A, Salem N.A, Maarouf A.M, Şerefoğlu E.C, Hellstrom W.J.G. Selenium and lycopene attenuate cisplatin-induced testicular toxicity associated with oxidative stress in wistar rats. UROLOGY 79: 1184.e1–1184.e6, 2012
23. Canene-Adams, K., Campbell, J.K., Zaripheh, S., Jeffery, E.H. and Erdman, J.W. 2005.The tomato as a functional food, Journal of Nutrition 135, 1226–1230
24. Cooper, D.A., Webb, D.R, Peters, J.C. 1997. Evaluation Of The Potential For Olestra To Affect The Availability Of Dietary Phytochemicals. J Nutr 127;1699-709.
25. Hekimoğlu A, Kurçer Z, Aral F, Baba F, Sahna E, Ateşşahin A. Lycopene, an antioxidant carotenoid, attenuates testicular injury caused by ischemia/reperfusion in rats. Tohoku J. Exp. Med., 2009, 218, 141-147
26. Ünlükal N., 2011. Profenofos Ve Mcpa’nın Testise Etkilerinin Ultrastrüktürel Düzeyde İncelenmesi. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı
27. Abraham L. Üreme Sistemi. Demir R. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006:531-564.

28. Marieb EN. (2001). Human Anatomy and Physiology, 5th edition, Benjamin Cummings, San Francisco. s.567-588
29. Gubari S . Karbosulfanla Kontamine Besin Alımının Sıçan Testisi Üzerine Kronik Etkilerinin İnce Yapı Düzeyinde Araştırılması, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji–Embriyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2008
30. Utiger R. D. Testis anatomy. Encyclopaedia Britannica, Inc. 2016.
<http://www.britannica.com/science/testis>
31. <http://www.dicle.edu.tr/Contents/01baef8f-7b2e-4395-afc0-3132c45538c9.pdf>
32. Gray J.A. McNaughton N. (2000). The Neuropsychology of Anxiety: An Enquiry into the Functions Of The Septo-Hippocampal System, Second Edition Oxford University Press.
33. Gartner PG, Hiatt JL. Color Text Book of Histology. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 2006.
34. Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2009, Temel Histoloji, (Çeviri: Aytekin, Y., Solakoğlu, S.,) 10. Baskıdan Çeviri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 135.
35. Ross, M.H., Pawlina, W., 2006, Histology- a text and atlas with correlated cell and molecular biology, 5. Edition, Lippincott W&W, Philadelphia. : Lippincott W&W, 784-829 p.
36. Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO. Erkek Üreme Sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S. Temel Histoloji.1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2005: 431-448.
37. Kierszenbaum AL, Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. 1. Baskı,. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
38. Jangueria LC, Carnerio J, Kelley OR. Temel histoloji. Barış Kitapevi 1998; 431-33.
39. Işık, A., Işılay, L., Atabenli, Erdemli, E., Akbay, C., Anafarta, K., 1997, Sıçan testisinde metotreksatin ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri, Ankara Üniversitesi Tıp fakültesi Mecmuası cilt 50, sayı 3, 125-129 p.
40. Bozdoğan, S., 2012, Erişkin Erkek Sıçanlarda Cisplatin İle Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine Sodyum Selenitin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir
41. Sadler TW. 2005. Ürogenital Sistem. Başaklar AC. Langman’s Medikal Embriyoloji. 9. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 313-354.
42. Kaya M, Polat S, Mete UÖ, Tap Ö, Özgür H.2006. Özel Histoloji Ders Notları. Adana, Ç.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları, s: 156-161.

43. Özgür H, Kaya M, Doran Ş, Solmaz S. (2003). Ultrastructure of the seminiferous tubules in human testes before and after varicocelelectomy. *Anat Embryol.* 207: 343–353.
44. <http://www.suleymanyusuf.com/insaninolusumu/insaninolusumu03.html>
45. Sternberg, S.S., 1997, *Histology for pathologist*, Lippincott-Raven, New York.
46. <http://www.oytunerbas.com.tr/kadin-genital-sistem-onkolojisi/17/>
47. Öztürk F. (2002). Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 9, 143-48.
48. <http://www.kozanbilgi.net/apoptozis.html>
49. Strasser A., O'Connor L., Dixit V.M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-45.
50. Ergin M. Apoptosis. *Arşiv* 2002; 11: 495-504.
51. Deveraux Q.L., Schendel S.L., Reed J.C. (2001). Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol Clin* 19, 57-74.
52. Gross A., McDonnell J.M., Korsmeyer S.J. (1999). Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.
53. Kosky, P.E., Guggenheim, E.K., 1991. The Aqueous Phase in the Interfacial Synthesis of Polycarbonates. 1. Ionic Equilibria and Experimental Solubilities in the BPA-NaOH-H₂O System. *Ind. Eng. Chem. Res.* 30 (3): 462–467.
54. <http://pslc.ws/macrog/pc.htm>
55. Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, V.P., Olea, N., 1995. Xenoestrogens Released From Lacquer Coatings in Food Cans. *Environ Health Persp.* 103: 608-612
56. Ike, M., Jin, C.S., Fujita, M., 2000. Biodegradation of Bisphenol A in the Aquatic Environ. *Water Sci. Technol.*, 42: 31-38.
57. Haworth, S., Lawlor, T., Mortelmans, K., Speck, W., Zeiger, E., 1983. Salmonella mutagenicity Test Results For 250 Chemicals. *Environ. Mutagen.*, 1: 3-142.
58. Schweikl, H., Schmalz, G., Rackebrandt, K., 1998. The Mutagenic Activity of Unpolymerized Resin Monomers in Salmonella Typhimurium And V79 Cells. *Muta. Research*, 415: 119-130.
59. Nitschenke, K.D., Quast, J.F., Wolfe, E.L., 1985. Bisphenol A: Acute Aerosol Toxicity Study With Fischer 344 Rats. Dow Chemical Company Report.
60. Metzler, M., Kulling, S.E., Pfeiffer, E., Jacobs, E., 1998. Genotoxicity Of Estrogens. *Z Lebensm Unters Forsch A*, 206: 367-373.

61. Kuiper, G.G.J.M. Enmark, E. Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. And Gustafsson J.A., 1996. Cloning Of A Novel Estrogen Receptor Expressed In Rat Prostate And Ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa*, 93:
62. Feldman D., Krishnan, A., 1995. Estrogens In Unexpected Places: Possible Implications for Researchers and Consumers. *Environ. Health Perspect.* 103, 129-133.
63. Fent, G., Hein, W.J., Moendel, M.J., Kubiak, R., 2003. Fate Of 14 Bisphenol A In Soils. *Chemosphere*, 51: 735-746.
64. West, R.J., Goodwin, P.A., 1997. Evaluation of the Ready Biodegradability of Bisphenol-A Using the OECD Method 301F: Manometric Respirometry Test Dow Company report. Study ID 971108A (in UK, 2000)
65. Stone, C.M., Watkinson, R.J., 1983. Diphenylol propane: an Assessment of Ready Biodegradability, Sittingbourne Research Centre, Kent, England. Report SBGR.83.425
66. Turner, S.J., Watkinson, R.J., 1986. Diphenylol Propane: An Assessment of Inherent Biodegradability. Sittingbourne Research Centre, Kent, England, Shell Group Research Report. SBGR86.161.
67. Fukuda, T., Uchida, H., Takashima, Y., Uwajima, T., Kawabata, T., Suzuki, M., 2001. Degradation Of Bisphenol A By Purified Laccase From *Trametes Villosa*. *Biochem. And Biophys. Res. Com.* 284: 704-706.
68. Lobos, J.H., Leib, T.K., Su, T.M., 1992. Biodegradation of Bisphenol A and Other Bisphenols by A Gram-Negative Aerobic Bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1823-1831.
69. Ike, M., Jin, C.S., Fujita, M., 1995. Isolation And Characterization Of A Novel Bisphenol A-Degrading Bacterium *Pseudomonas Paucimobilis* Strain Fj-4. *Jap. J. Water Treatment Biol.*, 31: 203-212.
70. Ertürk B. (2006). Akciğer Kanserli Hastalarda Malondialdehit (MDA) ve Total antioksidan kapasite (TAOK) düzeyi ölçümü ile Oksidan-antioksidan dengenin araştırılması. Süreypaşa Göğüs ve Kalp Damar Hastalıkları Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık tezi, İstanbul.
71. Derviş E., (2011). Oral Antioksidanlar, S.B. Haseki Eğitim Hastanesi, Dermatoloji Kliniği, Derleme, *Dermato*; 2(1) : 263-267.
72. <http://healthyorganicmealdelivery.com/7-day-analysis-healthsavor-meals-antioxidants/>

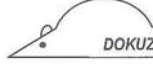
73. Young AJ., Lowe GM., 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys.* 1;385(1):20-7,
74. Kucuk O., Sarkar FH., Djuric Z., Sakr W., Pollak MN., Khachik F., Banerjee M., Bertram JS., Wood DP. Jr.2002. Effects of lycopene supplementation in patients with localized prostate cancer. *Exp Biol Med (Maywood).* 227(10):881-5.
75. Stahl W, Sies H . Lycopene: a biologically important carotenoid for humans. *Arch Biochem Biophys.* 1;336(1):1-9. 1996.
76. Dorgan JF., Sowell A., Swanson CA., Potischman N., Miller R., Schussler N., Stephenson HE. Jr., 2000. Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett.* 30;154(2):201-10.
77. Gupta SK, Trivedi D, Srivastava S, Joshi S, Halder N, Verma SD. 2003. Lycopene attenuates oxidative stress induced experimental cataract development: an in vitro and in vivo study. *Nutr*,19: 794-799
78. Yaping Z., Suping Q., Wenli Y., Zheng X., Hong S., Side Y., Dapu W., 2002. Antioxidant activity of lycopene extracted from tomato paste towards trichloromethyl peroxy radical CCl₃O₂. *Food Chemistry*, 77, 209-212,
79. <http://lycolife.pl/index.php/likopen/?lang=en>
80. Pellegrini N., Riso P., Porrini M.2000. Tomato consumption does not affect the total antioxidant capacity of plasma. *Nutrition.* 16(4):268-71.
81. Can N. (2010). Metil Parationun Testiste Oluşturduğu Toksik Hasara Likopen'in Koruyucu Etkisinin Biyokimyasal, Işık Mikroskopik ve Ultrastrüktürel Düzeyde İncelenmesi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji, Yüksek Lisans Tezi, İzmir.
82. Mihara M, Uchiyama M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86:271-8.
83. United States Department of Health and Human Services. NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A. September 2008 NIH Publication No. 08-5994
84. Takahashi O, Oishi S. (2003). Testicular toxicity of dietarily or parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food Chem Toxicol* 41: 1035-1044.
85. Ho SM, Tang WY, Belmonte de Frausto J, Prins GS. (2013) Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 66: 5624-5632.

86. Sakaue, M. et al. 2001. Bisphenol A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *J Occup Health*. 43: 185-90,
87. Domoradzki, J.Y., Thornton, D.M., Pottenger, J.H., Hansen, S.C., Card, T.L. et al. (2004) Age and Dose Dependency of the Pharmacokinetics and Metabolism of Bisphenol A in Neonatal Sprague-Dawley Rats Following Oral Administration.. *Toxicological Sciences* 77, 230–242
88. Pottenger, L. H., Domoradzki, J. Y., Markham, D. A., Hansen, S. C., Cagen, S. Z., and Waechter, J. M., Jr. (2000). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol. Sci.* 54, 3–18
89. Ateşşahin A, Gaffari T, İzzet K. 1998. Lycopene prevents adriamycin induced testicular toxicity in rats. *Nutr Rev*, 56: 35-51
90. Ateşşahin A, Yılmaz S, Karahan İ, Çeribaşı AO, Karaoğlu A, 2005; Effects of lycopene against cisplatin induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats. *Toxicology*, 212: 116-23.
91. Ateşşahin A, Türk G, Karahan İ, Yılmaz S, Çeribaşı AO, Bulmuş O. 2006; Lycopene prevents adriamycin induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril*, 1: 1216-22.
92. Zhou DX, Qui SD, Zhang J, et al. 2006. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. *Asian J Androl* 8: 584-8.
93. Kurt, H., Başaran, A., Aral, Erinc., 2005. Sıçanlarda Karbon Tetraklorit'in Oluşturduğu Oksidatif Stresin Likopen ile Önlenmesi. *Tıp Bilimleri Dergisi*, 25:2
94. Rafi, M., M., Yadav, P., N., Reyes, M., 2007. Lycopene Inhibits LPS-induced Proinflammatory Mediator Inducible Nitric Oxide Synthase in Mouse Macrophage Cells. *Journal of Food Science*, 72(1):69-74.
95. Bhuvaneshwari, V., Velmurugan, B., Nagini, S., 2001. Lycopene Modulates Circulatory Antioxidants During Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis. *Nutrition Research*, 21(11):1447-1453.
96. Karahan, İ., Yılmaz, S., Ateşşahin, A., 2006. Ratlarda Cisplatin ve Gentamisin Kan ile Karaciğerde Oluşturdukları Oksidatif Stres Üzerine Likopenin Etkileri. *Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi (Veteriner)*. Cilt:20, Sayı:1, Sayfalar:39-43.
97. Taş M, Saruhan B., Kurt D., Yokuş B., Denli M. 2009. Protective Role of Lycopene on Aflatoxin B1 Induced Changes Sperm Characteristics and Testicular Damages in Rats. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 16 (4): 597-604, 2010

- 98.** Durairajanayagam D, Agarwal A, Ong C, Prashast P. Lycopene and male infertility. *Asian J Androl* 2014;16: 420-5
- 99.** Tang M., Xie Y., Yi Y., Wang W. (2003). Effects of Bisfenol A on germ cells of male mice. *Wei Sheng Yan Jiu* 32, 544-48
- 100.** Kuş İ., Zararsız İ., Akpolat N., Ögetürk M., Kuş M., Özen O.A., Sarsılmaz M. 2008. Deneysel Formaldehit Zehirlenmesinde Omega-3 Yağ Asitlerinin Testislerdeki Antiapoptotik Etkileri: İmmuno histokimyasal Bir Çalışma. *Fırat Tıp Dergisi* 13(3): 162-166
- 101.** Wang, X., Han, X., Hou, Y., Yao, G. (2003). Effect Of Nonylphenol On Apoptosis Of Sertoli Cells İn Vitro. *Environmental Contamination And Toxicology*, 70 (5): 898-904
- 102.** Gong, Y., Han, X.D. (2006). Nonylphenol-İnduced Oxidative Stress And Cytotoxicity İn Testicular Sertoli Cells. *Reproductive Toxicology*, 22: 623–630.
- 103.** Han, X.D., Tu, Z.G., Gong, Y., Shen, S.N., Wang, X.Y., Kang, L.N., Hou, Y.Y., Chen, J.X. (2004). The Toxic Effects Of Nonylphenol On The Reproductive System Of Male Rats. *Reprod Toxicol.*, 19(2): 215-221.
- 104.** Weber, L.P., Kıparıssıs, Y., Hwang, G.S., Nıımı, A.J., Janz, D.M., Metcalfe, C.D. (2002). Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 131: 51-59
- 105.** Gültekin, B.(2013). Sisplatin Toksisitesinin Sıçan Testisinde Yarattığı Histolojik Değişimlere Çinkonun Etkisinin Araştırılması (Deneysel Çalışma). Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi.
- 106.** Yıldırım A.B. Özdamar S.(2012) Diazinon'un Sıçan Testisi Üzerine Etkilerinin Histokimyasal Olarak İncelenmesi. *Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences)* 21(1) 1-8.
- 107.** Göncü, E. Uranlı, R., Selek, G., Dertli, D., Parlak O.(2014) İpek Böceği, *Bombyx mori* Orta Barsağında Larval-Pupal Metamorfozda Meydana Gelen Yeniden Şekillenme Sürecinde Apoptotik Belirteçler. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Eskişehir, Türkiye
- 108.** Özçelik R., Çevik, Ö., Çetinel, Ş., Yeğen, B.Ç. Şener G.(2014). Metabolik Sendromun Böbrek Ve Mesane Dokularında Neden Olduğu Oksidan Hasarın İncelenmesi: Kalori Kısıtlaması Ve Egzersizin Koruyucu Etkileri. 40. Ulusal Fizyoloji Kongresi Poster No: P06 Poster No: P062 222

8. EKLER

Ek-1, Etik Kurul Raporu



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234

Gündem No/ Toplantı No/Yıl : 03/12/2014

Toplantı Tarihi : 17 Haziran 2014

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na

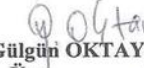
39/2014 Protokol No'lu; Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Prof.Dr.Çetin PEKÇETİN'in yürütücüsü olduğu "Bisfenol A Uygulanan Wistar Albino Sıçanlarda Testis Histolojisi ve Apoptoz Üzerine Likopen'in Etkisi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
Başkanı


Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye

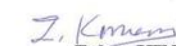
Prof.Dr.Tolga Fikri KÖROĞLU
Üye(Topl.Katılmadı)


Prof.Dr.Gülgün OKTAY
Üye


Prof.Dr.Safiye AKTAŞ
Üye


Doç.Dr.Türkan ZERTAY
Üye

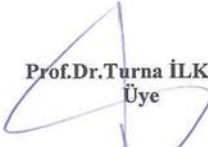
Doç.Dr.Nermin Nüket GÖÇMEN MAS
Üye(Topl.katılmadı)


Zehra KINAM
Üye


Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı


Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye


Prof.Dr.Hüseyin BASKIN
Üye


Prof.Dr.Turna İLKNUR
Üye

Prof.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye (Topl.Katılmadı)


Doç.Dr.Pembe UYGUN KESKİNOĞLU
Üye

Yard.Doç.Dr.Orhan KALEMCI
Üye


Vet.Hekim Adnan SERPEN
Üye

Ek-2, Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ TUĞÇE TOPCU

TC Kimlik No / Pasaport No:	28747409214
Doğum Yılı:	04.09.1990
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/ İZMİR
Telefon :	
Faks :	
e-posta :	tugce_tpcu@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Karadeniz Teknik	Sağlık Bilimleri	Biyoloji	Lisans	2012

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Testis, Işık Mikroskobu, Apoptoz

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--