

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

PREPUBERTAL DÖNEMDE UYGULANAN
CYFLUTHRİNİN OLUŞTURDUĞU TESTİKÜLER
HASAR VE SPERM KARAKTERİSTİĞİ ÜZERİNE
BENFOTİAMİNİN KORUYUCU ETKİLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gözde PARLAK

2012

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Emine ÜNSALDI

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. Enver OZAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU

Danışman



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Enver OZAN

Prof. Dr. Leyla KAYIÖZ

Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU

Prof. Dr. Murat ÖZETÜRK

Doç. Dr. Oğuz ÖZCELİK



Sevgili Aileme.....

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tezimin hazırlanması aşamasında desteğini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU'na,

Anabilim dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Enver OZAN'a,

Eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım diğer değerli öğretim üyesi hocalarım sayın Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK'e, Doç. Dr. Özlem DABAK'a,

Tez çalışmama yardımcı olarak katkıda bulunan Doç. Dr. Gaffari TÜRK ve Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU ile Arş. Gör. Dr. Nevin KOCAMAN'a,

Sağladığı finansmandan ötürü Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne,

Hep yanımda olan ve her zaman desteğini aldığım sevgili eşim Öğr. Gör. Akif Evren PARLAK'a ve aileme,

teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI.....	ii
İTHAF SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	xiii
1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT	4
3. GİRİŞ	8
3.1. Cyfluthrin	15
3.2. Benfotiamin	25
3.3. Hsp 70.....	32
3.4. Testis Histolojisi.....	46
3.4.1. Seminifer Tübül	47
3.4.2. Membrana Propria	50
3.4.3. Sertoli Hücreleri.....	51
3.4.4. Kan-Testis Bariyeri.....	54
3.4.5. Spermatogenik Hücreler	54
3.4.5.1. Spermatogonyumlar	55
3.4.5.2. Spermatozitler	56
3.4.5.3. Spermatidler	57

3.4.5.4. Spermin Yapısı.....	61
3.4.6. İnterstisyel Doku.....	62
3.5. Testis Embriyolojisi	63
3.6. Testis Anatomisi.....	67
3.7. Testis İçi Genital Kanallar.....	72
3.8. Genital Boşaltım Kanalları.....	73
3.9. Yardımcı Genital Bezler.....	74
3.10. Penis	77
3.11. Testis Fizyolojisi	81
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	82
4.1. Materyal.....	82
4.2. Deneklere Uygulama Planı.....	84
4.3. İmmünohistokimya.....	85
4.4. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Ölçülmesi	86
4.5. Spermatozoalarda Morfoloji – Motilite Tayini	86
4.6. Spermatolojik Muayeneler	86
4.6.1. Sperm Yoğunluğu.....	86
4.6.2. Sperm Motilitesi	87
4.6.3. Anormal Spermatozoon Oranı	88
4.7. İstatistikî Analiz	88
5. BULGULAR.....	89
5.1. Vücut ve Üreme Organ Ağırlıkları.....	89
5.2. Spermatolojik Parametreler	91
5.2.1. Sperm Motilitesi	91

5.2.2. Epididimal Sperm Yoğunluğu	92
5.2.3. Anormal Sperm Oranı.....	92
5.3. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bulgular	98
6. TARTIŞMA	113
7. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	133
8. KAYNAKLAR	136
9. ÖZGEÇMİŞ.....	159

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Memelilerde HSP 70 ailesi.....	33
Tablo 2. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi.....	83
Tablo 3. Spermatolojik parametrelere ait ortalama $\pm$ SEM değerler.....	93

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Cyfluthrinin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2. Benfotiaminin kimyasal yapısı.	25
Şekil 3. Testis (bölgesel kesit görünümü).....	48
Şekil 4. Seminifer Tübüller, Düz Tübüller, Rete Testis ve Duktuli Eferentes	49
Şekil 5. Sertoli hücrelerinin fonksiyonları ve yerleşimi	52
Şekil 6. Seminifer epitel hücrelerin dağılımlarına ve çekirdek karakterlerine göre belirlenmesi.....	55
Şekil 7. Spermiyogenezis süresince spermatidlerde ortaya çıkan başlıca değişiklikler.....	59
Şekil 8. Testis gelişiminin şematik gösterimi	67
Şekil 9. İnsan testisinin midsagittal kesiti.....	70
Şekil 10. Epididimis yapısını gösteren bir kesitin fotomikrografı.....	75
Şekil 11. Bir duktus deferens kesitinin fotomikrografı.....	76
Şekil 12. İnsan seminal vezikülünün bir kesitine ait fotomikrograf.	78
Şekil 13. Penisin enine kesitinin çizimi	80
Şekil 14. Absolut üreme organ ağırlıkları.....	90
Şekil 15. Rölatif üreme organ ağırlıkları.	91
Şekil 16. Kontrol (Grup I.) Normal görünümlü spermiler	94
Şekil 17. Cyfluthrin (Grup II) uygulamasına bağlı olarak oluşan baş ve kuyruk anomalisi gösteren spermiler	95
Şekil 18. Cyfluthrin ve benfotiamin (Grup III.)' in birlikte uygulanmasına bağlı olarak anormal sperm görünümünde azalma	96

Şekil 19. Benfotiamin (Grup IV) uygulaması sonucunda normal sperm görüntüleri.....	97
Şekil 20. Grup I. Normal testiküler morfoloji ve spermatogenezis.	98
Şekil 21. Grup I. Seminifer tübül bazal laminasının, germinal epitelinin ve interstisyel bölgede bulunan Leydig hücrelerinin normal yapısı.....	99
Şekil 22. Grup I. Seminifer tübüllerin adluminal kompartmanlarının lümene yakın olan hücrelerinde HSP 70 immünreaktivitesi ve İnterstisyel bölgede bulunan Leydig hücrelerinin ise HSP 70 (-) olması.....	99
Şekil 23. Grup I. Seminifer tübüllerin adluminal kompartmanlarında bulunan hücrelerin HSP 70 immünreaktivitesi ve interstisyel bölgedeki Leydig hücrelerinin HSP 70 (-) olması.....	100
Şekil 24. Grup I. Adluminal kompartmanda bulunan spermatogenik seriye ait olan hücrelerin HSP 70 ekspresyonu	100
Şekil 25. Grup II. Cyfluthrin uygulamasına bağlı olarak seminifer tübül bazal laminasında invajinasyonların ve seminifer tübül germinal epitelinde yer yer dejenerasyonların oluşması.....	102
Şekil 26. Grup II. Seminifer tübül bazal laminasında belirgin invajinasyon.....	102
Şekil 27. Grup II. Cyfluthrin uygulamasına bağlı olarak seminifer tübül epitelinde dejenerasyon, bazal laminada ayrılmalar, seminifer tübül lümeninde atrofi ve germinal epitelin apikal hücrelerinde HSP 70 immünreaktivitesi ayırt edilmesi.....	103
Şekil 28. Grup II. Germinal epitelde dejenerasyon ve heterokromatik çekirdekli hücreler gözlenmesi. Epitelin apikal hücrelerinde belirgin HSP 70 immünreaktivitesi	104

Şekil 29. Grup II. Seminifer tübül lümeninde henüz olgunlaşmasını tamamlamamış spermatogenik seriye ait hücreler gözlenmesi. Kontrol grubundan farklı olarak HSP 70 immünreaktivitesinin germinal epitelin apikal hücrelerinin yanı sıra primer spermatositlerde de açığa çıkması.	104
Şekil 30. Grup II. Cyfluthrin uygulamasına bağlı olarak germinal epitelyum hücrelerinde anafaz arresti, adluminal kompartmanda yer alan germinal hücrelerde ve spermatogonialarda belirgin HSP 70 immünreaktivitesi gözlenmesi.	105
Şekil 31. Grup II. Germinal epitelde metafaz arresti , adluminal kompartmanda HSP 70 immünreaktivitesi ayırt edilmesi.	105
Şekil 32. Grup II. Spermatogonialarda, primer spermatositlerde ve germinal epitelin apikalinde bulunan hücrelerde HSP 70 immünreaktivitesi ve germinal epitelde dejenerasyon ayırt edilmesi. Leydig hücrelerinde HSP 70 (-)' liğinin gözlenmesi	106
Şekil 33. Grup II. Seminifer tübül epitelinde yaygın dejenerasyon ve epitelin apikal hücrelerinde belirgin HSP 70 immünreaktivitesi gözlenmesi....	106
Şekil 34. Grup II. Germinal epitelde yer yer anafaz arresti, spermatogonialarda ve seminifer tübülün apikal hücrelerinde belirgin HSP 70 immünreaktivitesi	107
Şekil 35. Grup III. Cyfluthrin ile birlikte benfotiamin uygulanan grupta seminifer tübül bazal laminası ve germinal epitel kontrol grubuna benzer yapı sergilemesi.	108

Şekil 36. Grup III. Bazı seminifer tübüllerin bazal laminalarında invajinasyon, germinal epitelyum hücrelerinde matürasyon arresti ve dejenerasyon ayırt edilmesi.....	109
Şekil 37. Grup III. Germinal epitelin apikal hücrelerinde ve spermatogonialarda HSP 70 immünreaktivitesi izlenirken interstisyel Leydig hücrelerinde HSP 70 (-)' liğinin ayırt edilmesi	109
Şekil 38. Grup III. Apikal seminifer tübül epitelinde yer alan germ hücrelerinde HSP 70 ekspresyonu	110
Şekil 39. Grup IV. Benfotiamin uygulanan grupta seminifer tübül bazal laminası ve germinal epiteli kontrole benzer yapıda gözlenmesi.	111
Şekil 40. Grup IV. Germinal epitelyum ve Leydig hücreleri kontrol grubuna benzer olarak izlenmesi	111
Şekil 41. Grup IV. Seminifer tübül adluminal kompartmanındaki hücrelerde belirgin HSP 70 immünreaktivitesi izlenirken, interstisyel Leydig hücrelerinde ve Sertoli hücrelerinde HSP 70 (-)' liğinin ayırt edilmesi	112
Şekil 42. Grup IV. Apikal adluminal kompartmanda yer alan germ hücrelerinin belirgin HSP 70 immünreaksiyonu ve Sertoli hücrelerinin HSP 70 (-)' liği	112

KISALTMALAR LİSTESİ

AGE	: İleri Glikasyon Son Ürünleri
AMH	: Antimüllerian Hormon
ATPaz	: Adenozin Trifosfataz
Bcl X_L , Bcl2	: Mitokondriyal protein
CD 95	: Başkalaşım Kümeleri Sistemi 95 (apoptoziste)
CK	: Sperm Kreatin Kinaz
DAG	: Diasilgliserol
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E.R.	: Endoplazmik Retikulum
EPA	: Çevre Koruma Ajansı
GSH	: Redükte glutatyon
GSSG	: Okside Glutatyon
hCG	: İnsan Koryonik Gonodotropin Hormonu
HSC	: Isı Şok Kognatı
HSE	: Isı Şok Elementi
HSF	: Isı Şok Faktörü
HSP	: Isı Şok Proteini
HSP 70	: Isı Şok Proteini 70
HSP1L	: Isı Şok Proteini 70 Benzeri Protein 1
HSPA2	: Isı Şok Proteini A2
ICSI	: İntrasitoplazmik Sperm Enjeksiyonu
IgG	: Immunoglobün G

IVF	: İnvitro fertilizasyon
LABC	: Levator ani bulboavernosus kası
LDHC24	: Düşük sperm laktat dehidrogenaz-C24
MIS	: Müllerian İnhibitör Madde
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (Yükseltgenmiş Hal)
NFkB	: Nükleer Faktör Kappab
NO	: Nitrik Oksit
p21	: Protein 21 geni
p53	: Protein 53 geni
PBS	: Fosfat tamponu
PBZ	: Periferik Benzodiyazepin Reseptörü
PFY	: Pentoz Fosfat Yolu
PKC	: Protein Kinaz C
PKC_W	: Protein Kinaz C Yolu
ROS / ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
SCO	: Sertoli Cell Only Sendrom
SGG	: Sülfogalaktilgliserolipid
SLIP1	: Sülfoglikolipid İmmobilize Edici Protein
SRE	: Serum Cevap Elementi
SRX	: Y kromozomu üzerindeki seks belirleyici bölge
STZ	: Streptozotocin
TBF	: Testis Belirleyici Faktör
ThDP	: Tiamin Di Fosfat
ThMP	: Tiamin Mono Fosfat

ThTR1	: Tiamin Taşıyıcı Protein 1
UDP	: Üridin di Fosfat
ULV	: Son Derece İnce Püskürtme Tekniği İle Oluşturulan Sis Şeklindeki Aerosol
VCAM-1	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü-1

1. ÖZET

Sentetik piretroid bir insektisit olan cyfluthrin geniş spektrumu sayesinde, genel olarak evlerde, dış çevrede ve tarımda kullanılır. Benfotiamin ise çok yönlü tedavi edici potansiyeli olan B1 vitamininin yağda eriyen türüdür. Bu çalışmada prepubertal dönemde uygulanan cyfluthrinin oluşturduğu testiküler hasar ile sperm karakteristiği üzerine benfotiaminin koruyucu etkilerini tespit etmek amaçlandı.

Çalışmada 32 adet 4 haftalık Wistar albino erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 4 gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlara (n=8) 1 ml/kg/gün zeytinyağı oral gavajla verildi. Grup II'deki sıçanlara 54 mg/kg/gün cyfluthrin 1ml zeytinyağında süspanse edilerek oral gavajla uygulandı. Grup III'deki sıçanlar 54 mg/kg/gün cyfluthrin ile birlikte 100 mg/kg/gün benfotiamin yine zeytinyağında süspanse edilerek oral gavajla verildi. Grup IV'deki sıçanlara ise 100 mg/kg/gün benfotiamin yine zeytinyağı içinde süspanse edilerek oral gavajla uygulandı. Cyfluthrin ve benfotiamin uygulamasından 5 hafta sonra sıçanların sperm motilitesi, epididimal sperm yoğunluğu ve anormal sperm oranları araştırılıp, ışık mikroskobuyla testis dokularındaki değişiklikler histokimyasal ve immunohistokimyasal olarak incelendi. Elde edilen bulgular Olympus BH 2 fotomikroskopla görüntülendi.

Deney grubu sıçanlar, sperm motilitesi bakımından karşılaştırıldığında grup II'de, grup I'e göre önemli azalmanın olduğu ($p<0.01$), grup III'te ise grup II'ye göre benfotiamin kullanımına bağlı olarak anlamlı derecede artışın olduğu ($P<0.01$), grup IV ile grup I'den elde edilen sonuçların ise birbirine paralel olduğu tespit edildi ($P>0.05$).

Epididimal sperm yoğunluğunda grup II'de, grup I'e göre ($p<0.01$) önemli azalmanın olduğu, grup III'te ise grup II'ye göre istatistikî olarak önemsiz ($P>0.05$) bir artışın olduğu, grup IV'ten elde edilen bulguların grup I'deki sonuçlarla benzer olduğu tespit edildi. ($P>0.05$).

Anormal sperm morfolojisi bakımından grup II'de, grup I'e göre toplam anormal sperm oranında önemli artışların ($p<0.01$) olduğu, grup III'te ise grup II'ye göre toplam anormal sperm oranında önemli azalmaların ($P<0.01$) meydana geldiği, grup IV ile grup I'in ise benzer sperm morfolojisine sahip olduğu gözlemlendi ($P>0.05$).

Işık mikroskobu ile yapılan incelememizde grup II'de cyfluthrinin testis dokusunda önemli dejenerasyonlara, atrofiye, maturasyon arrestine, bazal laminada bozulmalara yol açtığı ve bunların sonucunda spermatogeneziste inhibisyonun şekillendiği tespit edildi. Grup III'te cyfluthrinin toksik etkilerini önlemek amacıyla kullanılan benfotiaminin ise testis dokusunda genel anlamda koruyucu rol oynadığı söylenebilir. Bu grupta da yer yer seminifer tübül germ hücrelerinde maturasyon arresti, bazal laminada bozulmalar tespit edilmekle birlikte sadece cyfluthrin uygulanan grup II' deki bulgulara göre ihmal edilebilecek düzeyde idi. Sadece benfotiamin uygulanan grup IV ile kontrol grubu karşılaştırıldığında histolojik yapının birbirine benzer olduğu görüldü.

HSP 70 immün reaktivitesi açısından gruplar arası fark incelendiğinde, kontrol grubu ile sadece benfotiamin uygulanan grup IV'deki testis dokularında HSP 70 ekspresyonunun sadece adluminal kompartımanın apikalinde yer alan spermatid ve spermatozoalarda olduğu görüldü. Cyfluthrin uygulanan grup II ve

cyfluthrin ile birlikte benfotiamin uygulanan grup III'te ise spermatid ve spermatozoa hücrelerinin yanı sıra spermatogonia ve primer spermatositlerde de HSP 70 immün reaktivitesi ayırt edildi.

Sertoli hücreleri ve interstisyel Leydig hücreleri ise HSP 70 (-) idi. HSP 70 immün reaktivitesinin yaygınlığı en belirgin olarak grup II'de gözlemlendi.

Sonuç olarak; tarımda, evlerde ve süs çiçeklerinde istenmeyen böcekleri öldürmek amacıyla kullanılan cyfluthrine insanlar kontamine yiyeceklerle veya direkt maruz kalabilirler. Uzun süreli tekrarlayan cyfluthrin maruziyeti organizmada birçok sistemi etkileyebilir. Yapılan bu deneysel çalışmada erkek üreme sisteminin cyfluthrin uygulamasına bağlı olarak yapısal ve fonksiyonel anlamda etkilendiği gözlemlendi. Bu etkilenme, stres şartlarında arttığı bilinen HSP 70 immünreaktivitesiyle de teyit edildi.

Çalışmamızda koruyucu amaçla kullanılan benfotiaminin ise antioksidan etkiyle ve serbest oksijen türlerinin oluşumunu inhibe ederek cyfluthrinin toksik etkilerini asgari düzeyde tuttuğunu söyleyebiliriz.

Bu çalışmada elde ettiğimiz bulgular ışığında içerisinde cyfluthrinin de yer aldığı pestisitlerin kullanımı ve dozajı konusunda çok dikkatli davranılması gerektiği sonucuna varıldı. Aksi halde infertiliteyle sonuçlanabilecek ciddi halk sağlığı sorunlarıyla karşılaşmak kaçınılmaz olacaktır.

Anahtar Kelimeler : Cyfluthrin, benfotiamin, HSP 70, testis, sperm.

2. ABSTRACT

Protective effects of benfotiamine on cyfluthrin- induced testicular damage and sperm characteristics during the prepubertal period

Cyfluthrin, a synthetic pyrethroid insecticide, is generally used in houses, outdoor and agriculture thanks to its wide-spectrum. Benfotiamine is a fat-soluble kind of vitamin B1 that has a versatile therapeutic potential. This experimental study aims to establish the sperm characteristics and testicular damage induced by administration of cyfluthrin in the prepubertal period and the protective effects of benfotiamine on sperm characteristics and testicular damage.

In this study, thirty two 4-weeks old Wistar albino male rats were used. Rats were divided into 4 groups. Olive oil, 1ml/kg/day, was given to the rats (n=8) in group I by means of oral gavage. Cyfluthrin, 54mg/kg/day, was applied to the rats in group II via oral gavage by being dissolved in 1ml olive oil. Cyfluthrin (54 mg/kg/day) and benfotiamine (100 mg/kg/day) were given to the rats in group III via oral gavage by being dissolved in olive oil. Similarly, benfotiamine (100 mg/kg/day) was applied to the rats in group IV by means of oral gavage by being dissolved in olive oil. 5 weeks after treatment the sperm motility, epididymal sperm density and rates of abnormal sperm of the rats were searched, structural changes in their testicular tissues were investigated histochemically and immunohistochemically. The findings were photographed with the Olympus BH 2 photomicroscope.

When the rats in the experimental group were compared in terms of sperm motility, it was determined that there had been a significant reduction ($p<0.01$) in group II than group I, a substantial increase ($P<0.01$) in group III than group II, and the results obtained from group I and group IV were parallel to each other.

In epididymal sperm density, it was determined that there had been a significant reduction ($p<0.01$) in group II than group I, statistically insignificant increase ($P>0.05$) in group III than group II, the findings obtained from group IV were similar to the results of group I.

In terms of abnormal sperm morphology, it was observed that it caused significant increases ($p<0.01$) in total rates of abnormal sperm in group II than group I, provided significant reductions ($P<0.01$) in total rates of abnormal sperm in group III due to use of benfotiamine than group II, group IV and group I had similar sperm morphology ($P>0.05$).

In our examination conducted by means of light microscope, it was detected that cyfluthrin caused to important degenerations, atrophy, maturation arrest in the testicular tissues of the rats and degradations in the basal lamina, and as a result of these, inhibition was formed in spermatogenesis in group II. It can be said that benfotiamine used to prevent the toxic effects of cyfluthrin played a protective role on the testicular tissue in group III. In the rats of the group IV, similar structures were observed like the ones in the group I. In this group it was partly established that there were maturation arrest in the seminiferous tubules germ cells and degradations in the basal lamina; however, it was in negligible level according to the findings of group II to which cyfluthrin was applied merely.

When group IV to which benfotiamine was applied only and the control group were compared, it was observed that histological structures were similar to each other.

When the difference between the groups was examined in terms of the immunoreactivity of HSP 70, it was seen that the expression of HSP 70 in the testicular tissues of group IV, which only benfotiamine was applied to, and the control group was found only in the spermatid and spermatozoas that took place in the apical of adluminal compartment. In group II to which cyfluthrin was applied and group III to which cyfluthrin and benfotiamine were applied, the immunoreactivity of HSP 70 was differentiated in the spermatogonium and primary spermatocytes as well as the spermatid and spermatozoa cells. As for the Sertoli cells and interstitial cells of Leydig HSP 70 was (-) in them. Prevalence of HSP 70 immunoreactivity was the most prominent in the group II.

In conclusion, people may be exposed to cyfluthrin used to kill pests in agriculture, houses and ornamental flowers through contaminated foods or directly. Long-term recurrent exposure to cyfluthrin may affect many systems in the organism.

In this experimental study, male reproduction system was observed to be influenced in the structural and functional way depending on the application of the cyfluthrin. This influence was confirmed by the immunoreactivity of HSP known to increase under stress. As for benfotiamine used with the aim of protection in our study we can say that it minimized the toxic effects of the cyfluthrin with its antioxidant effect and by inhibiting the formation of reactive oxygen species.

In the light of our findings in this study it has been concluded that it should be taken care seriously about the use of pesticides, consisting of cyfluthrin as well, and about their dosage. Otherwise, it will be inevitable to be confronted with serious public health problems that might be result in infertility.

Key Words : Cyfluthrin, benfotiamine, HSP 70, testis, sperm.

3. GİRİŞ

Pestisitler tarih öncesi dönemlerden bugüne kadar kullanılan kimyasal maddelerdir. Ebers Papirüsü'nde M.Ö. 1500'lü yıllarda, evlerden pire kaçırın formüller bit, pire ve eşek arılarına karşı kullanılan insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur.

M.S. 900 yılında Çin'de bahçe haşereleri için arseniğin kullanıldığı kaydedilmiştir. Arsenik ve kükürt 1800'lü yılların başlarında insektisit ve herbisit olarak kullanılmışlardır (1).

Pestisit, EPA (Environmental Protection Agency) tarafından herhangi bir zararlıyı uzaklaştırmak, azaltmak, baskılamak ya da bozmak için kullanılan bir madde ya da madde karışımı olarak tanımlanmaktadır. Pestisit, kimyasal bir madde ya da virüs ve bakteri gibi biyolojik ajan olabilmektedir (2).

Türkiye'de pestisit tüketimi, 1979'a göre 2002 yılında % 45,29'lık bir artış göstermiştir. Bu artışa karşın ülkemizde pestisit tüketimi gelişmiş ülkelere göre oldukça düşüktür. Türkiye'de genelde az pestisit tüketilmesine karşın, en yoğun tüketilen pestisitler çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadır (3).

Pestisitler kullanıldıkları zararlı grubuna göre bazı sınıflara ayrılmışlardır. Bunlar;

- Böcekleri öldürenler (İnsektisit),
- Fungusları öldürenler (Fungusit),
- Fungusların faaliyetini durduranlar (Fungustatik),
- Yabancı otları öldürenler (Herbisit),
- Kene ve uyuz böceklerini öldürenler (Akarisit),
- Bakterileri öldürenler (Bakterisit),

- Yaprak bitlerini öldürenler (Afisit),
- Kemirgenleri öldürenler (Rodentisit),
- Nematodları öldürenler (Nematosit),
- Salyangozları öldürenler (Molluskisit),
- Algleri öldürenler (Algisit),
- Kuşları öldüren veya kaçırılar (Avensit),
- Kaçırıcılar (Repellent),
- Çekiciler (Atraktant).

Bunlardan insektisit, fungusit ve herbisitler diğerlerine oranla daha fazla miktarlarda kullanıldıklarından çevresel etkileri yönünden daha önemlidir (4).

Türkiye’de tarım ilaçları kullanımı, pestisitler yönüyle değerlendirildiğinde, en önemli grubun %45 ile insektisitler olduğu (5-7), bunu %24 ile herbisitlerin izlediği, fungusitlerin ise %16 payı olduğu görülmektedir.

Bütün insektisitler spesifik olmadıkları için sadece hedef organizmaları öldürmez, omurgalı ve omurgasız diğer organizmaları da etkilerler (8).

Halk sağlığının korunması ve özellikle de sivrisinek, karasinek gibi uçucu zararlılarla mücadele amacıyla açık alanlarda yoğun şekilde kullanılan pestisitler, hayvanların bunlara çeşitli şekillerde maruz kalmalarına ve gıda değeri taşıyan hayvansal ürünlerde kontaminasyona sebep olurlar (9). Özellikle sığır gibi süt hayvanlarında dış ve iç parazitlerin kontrolü amacı ile kullanılan pestisitler de hayvanların sütlerinde kalıntıya neden olabilmektedir (10).

Insektisitler istenmeyen böceklerin yok edilmesini sağlayarak besin üretimini artırmak için tarımda yaygın olarak kullanılmakla birlikte hastalık yapıcı vektörlerin kontrolünü de sağlamaktadır (11).

Cyfluthrin de parazit kontrolü ile hayvan sağılığı ve ürünlerinin korunmasında, uçucu haşerelerle mücadelede, halk sağılığının korunması ve ziraatta ürün korunması açısından oldukça yaygın kullanım alanına sahiptir.

İnsektisit kullanımının tartışılmaz yararlarına karşın etkin denetimden yoksun ve aşırı miktarlarda uygulanması insan dahil hedef olmayan diğere canlılarda zehirlenmelere ve ölümlere neden olmakta, ekosistemlerin ve besinlerin kirlenmesine yol açmaktadır (11, 14).

İnsektisitler kimyasal yapılarına göre;

- a) Karbamatlı insektisitler
- b) Organik fosforlu (organofosfatlı / organofosforlu) insektisitler
- c) Klorlu hidrokarbon yapısındaki insektisitler
- d) Piretroidli insektisitler olarak sınıflandırılabilir (11).

Piretrinler, insektisit aktiviteye sahip Doğu Afrika krizantem çiçeklerinden elde edilmiş doğal insektisitlerdir (12,14). Piretrinler *Chrysanthemum cinerariaefolium* bitkisinin çiçeklerinin kurutulması ile elde edilen piretrum çiçeğı adlı ilkel maddeden elde edilirler. Krizantem çiçeğinin böcek öldürücü etkisi Farslar zamanında fark edilmiştir (8, 13, 14).

Eski Yugoslavya toprakları üzerinde olan Dalmaçya'daki bir halk hikayesine göre, yaşlı bir kadın beyaz papatyalara benzeyen bir çiçeğı toplar, çiçek solduğunda bir köşeye atar, daha sonra dönüp baktığında solmuş çiçeklerin çevresinde ölü böcekleri fark eder ve krizantem ailesinden olan bu çiçek çeşidinin böcekler üzerinde öldürücü etkisi bu şekilde fark edilir. 1800'lü yıllardan başlayarak kuru çiçekler böcek öldürücü olarak Amerika Birleşik Devletleri'ne ihraç edilir. 1900'lü yıllarda piretroid olarak adlandırılan bu madde bit tedavisinde

kullanılmıştır, ancak ışıktaki bozulması bir dezavantaj olarak değerlendirilmiştir (8). Bu bileşikler kimyasal olarak kararsız olup, güneş ışığında çok çabuk yıkılıp aktivitelerini kaybederler. Piretrinler mükemmel sayılabilecek derecede insektisidal etkiye sahip olmasına karşın, memelilere yönelik toksisitesi de o ölçüde düşüktür.

Doğal piretrinlerde karşılaşılan bu sakıncaların giderilmesi amacıyla yapılan araştırmalar sonucunda güneş ışığına daha dayanıklı cyfluthrin, sipermetrin, deltametrin, permetrin gibi piretroidler sentezlenmiştir. Aktif piretrin bileşiklerine yapısal ve insektisit etkileri bakımından benzeyen sentetik maddelere piretroidler denilir. Sentetik piretroidler diye de adlandırılan bu grup, doğal piretrinlerin alkol ve asit köklerinde yapılan değişikliklerle geliştirilmiştir. Doğal piretrinlere göre kalıcılıkları daha fazladır. Bu grup insektisitler, yapılarına göre öldürücü ve bayıltıcı etkiye sahip olabilirler. Formülasyonlarda genellikle bu iki piretroid bir arada kullanılmaktadır. Ayrıca sinerjisi kullanımı da piretroidlerin etkisini arttırmaktadır. Bu grupta cyfluthrin, cyfluthrin λ -siyhalotrin, sipermetrin, deltametrin, permetrin ve fenvalerat yaygın şekilde kullanılırlar. Piretroidler insektisidal özellikler yönünden doğal piretrinlere çok benzerler.

Birden fazla piretroidi kendi aralarında veya diğer bileşiklerle kombine etmek suretiyle daha çabuk bayıltıcı ve daha güçlü öldürücü etki elde edilebilir. Piretroid insektisitler, doğal piretrinlere benzer şekilde, temas ve mide zehirleyicisi olarak etkindirler. En dikkat çekici özellikleri insektler üzerinde hızla gelişen bayıltıcı etkinliğe sahip olmalarıdır. Yağda çözünme özellikleri sayesinde insekt kutikulasından hızla emilerek toksik etkilerini gösterirler (8).

Piretroidler, geniş insektisital spektruma sahip insektisitlerdir. Etki alanları özellikle sivrisinekler, karasinekler, hamamböcekleri, tahtakuruları ve pireler gibi zararlılardır. Belirtilen üstün özellikleri nedeniyle piretroidler son yıllarda açık ve kapalı alanlarda sinek ve sivrisinekler yönüyle vektör kontrolü çalışmalarında geniş bir kullanım alanı bulmuştur (8). Sentetik piretroidler tarım alanlarında, veteriner hekimlikte, ormancılıkta, halk ve çevre sağlığı ve depolanmış ürünlerin korunmasında uçan ve yürüyen haşerelere karşı seçkin bir şekilde kullanılmaktadır.

Özellikle hayvan meskenlerinde, gübreliklerde, hayvan pazarlarında ve diğer açık ve kapalı alanlar ile gıda maddeleri imalat, depolama ve hazırlama yerlerinde bulunan kene, bit, pire, tahtakurusu, hamam böceği, güve, karasinek ve sivrisinek gibi haşerelere, veteriner hekimlik alanında da hayvanlara musallat olan ve hastalık taşıyıcı pek çok sokucu-kan emici böcekler ve sineklere karşı kullanılmaktadır (14-19). Belediyeler ve Sağlık Bakanlığının il ve ilçe teşkilatları tarafından çevre ilaçlaması ve halk sağlığını koruma ve veteriner hekimlikte dış parazitlerle mücadele amaçlarıyla yaygın bir şekilde kullanılan sentetik piretroid insektisitlere insan ve hayvanların sürekli maruz kalmaları kaçınılmazdır.

Gerek veteriner hekimlikte dış parazit ilacı olarak gerekse halk ve çevre sağlığı yönünden oldukça yaygın olarak kullanılan cyfluthrin de sentetik piretroid insektisittir (20).

Sentetik piretroidler kullanım alanı bakımından bu özelliklerinden de faydalanılarak geniş boyutta kullanım gören ve son derece etkili olmaları sebebiyle diğer insektisit gruplarına alternatif olarak gösterilen insektisitlerdir.

Sentetik piretroidler yapılarında α -cyano grubu içermeyenler tip I (permetrin, tetrametrin gibi) ve α -cyano grubu içerenler tip II (cyfluthrin, deltametrin, sipermetrin, gibi) bileşikler olarak sınıflandırılabilirler (14, 21, 22). Piretroidler absorbe edildikten sonra vücutta başlıca yağ dokusu, mide, bağırsak, karaciğer, böbrek ve sinir sistemine hızla dağılırlar. Piretroidler memelilerde karaciğerde bulunan hidrolazlar ve sitokrom-P450-bağlı monooksijenazlar tarafından çok hızlı metabolize edilerek asit ve alkole dönüştürülürler (23). Ticari piretroidler molekülün çok önemli yapısı olan ester grubuna sahiptir. Piretroid esterleri, birçok türde nonspesifik karboksilesterazlar tarafından hidrolize uğratılırlar. Daha sonra bu ayrılmayı sitokrom-P450 sisteminde hidroksilasyon reaksiyonları ve birkaç konjugasyon reaksiyonları takip eder (24,25). Memelilerde toksisitesinin düşük olması metabolitlerinin önemli derecede toksik olmadığını gösterir.

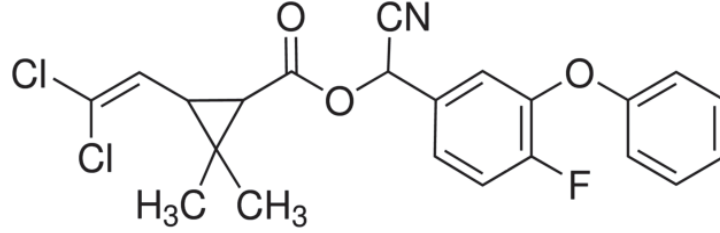
Hedef dışı canlılarda zehirliliğinin nispeten az olması, bu maddelerin fazlaca kullanılmasına neden olmaktadır. Genelde temas yolu ile etkilerini gösterirler. Sentetik piretroidler etkilerini sinir hücrelerinde voltaja bağımlı sodyum kanallarında gösterirler. Özellikle merkezi sinir sistemindeki aksonlar olmak üzere sinir hücrelerinde negatif art potansiyel artar ve süresi uzar.

Bu etki daha çok presinaptik sinir uçlarında meydana gelerek sinaptik iletimi etkiler ve nörotransmitter madde salınımı artar. Meydana gelen depolarizasyon sinir iletimini bloke eder (26). Böylece, aşırı-uyarılma, ataksi, sarsılma ve sonunda felç ile karakterize edilen sinir kaslarıyla ilgili bozukluklar meydana gelir (27).

Fakat sodyum kanallarını cyfluthrinin de bulunduğu tip II bileşikler, tip I bileşiklerden farklı bir şekilde etkilerler. Tip I bileşiklere yüksek düzeyde maruz kalan hayvanlarda dış uyarılara hassasiyet, titreme, vücut ısısında artış, ataksi (beden işlevlerinde düzensizlik), sarsılma ve sonunda felç görülür (T sendromu) ardından ölüm de gözlenebilir. Tip II grubundan olan maddeler sodyum kanallarını daha uzun süre açık tutarlar ve yüzlerce ya da binlerce tekrar eden sinir uyarılarına neden olurlar. Bazı durumlarda tekrarlı elektriksel uyarıların kanalı 30 saniyeden fazla açık tuttıkları bildirilmiştir (28). Tip II piretroidlerle zehirlenmede ise, davranışlarda bozukluk, tükürük salgısında artış, pupillada daralma, kalp hızında yavaşlama, titreme nöbetleri, seslere karşı korkuyla tepki verme ve kaslarda koordinasyon bozukluğu görülür, choreo-athetosis (istem dışı hareketler) ve felç (C sendromu) gözlenir. Cyfluthrinin de bulunduğu genellikle Tip II piretroidlerde, yapılarında bulunan α -cyano grubundan dolayı insektisit potansiyelinin daha fazla olduğu kabul edilir (29, 30). Ayrıca, cyfluthrinin de bulunduğu α -cyano grup taşıyan piretroidlerin cyano grubu olmayan piretroidlere göre vücuttan daha yavaş atıldığı bildirilmiştir (31).

3.1. Cyfluthrin

Açık Formülü:



Şekil 1. Cyfluthrinin kimyasal yapısı.

Görünüm: Soluk sarı

Kimyasal Adı : Cyano(4-fluoro-3-phenoxy-phenyl)methyl3-(2,2-dichloroethenyl) -2,2- imethylcyclopropanecarboxylate.

Moleküler ağırlığı: 434.29

Cas No : 68359-37-5

Ticari adı: Baythroid (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. A.B.D.) (32).

Cyfluthrin, kimyasal yapısı doğal olarak oluşan piretrinlerin sentetik bir analogu olduğu için sentetik piretroid olarak sınıflandırılan oldukça yeni bir böcek ilacıdır. Cyfluthrin, α -cyano grubu taşıyan Tip II sentetik piretroiddir (33). Cyfluthrin ilk kez 1987'de Amerika Birleşik Devletleri (ABD) 'de kullanım için tescil edilmiştir. Süs bitkilerinde, binaların içinde veya etrafında, tarımda istenmeyen insektlerin öldürülmesi için kullanılmıştır (34, 35). 1992'den 1997'ye kadar ABD' de cyfluthrin kullanımı % 40 oranında artmıştır (36). ABD'de pamuk arazilerinin %10'unun ve armut arazilerinin %60'ının bakımının cyfluthrin ile yapıldığı bildirilmiştir (37, 38).

ABD Çevresel Koruma Dairesi'nin yaptığı araştırmada, ABD' de cyfluthrinin böcek ilacı olarak ev içi uygulamasının yıllık olarak 33 milyondan fazla kullanıma sahip olduğu gösterilmiştir (39).

Cyfluthrin EPA (Environmental Protection Agency) tarafından ilk kez 1987 yılında kayıt altına alınmıştır. EPA tarafından cyfluthrin hem kısıtlı kullanım (RUP) hem de genel kullanım insektisitler şeklinde sınıflandırılmıştır (34).

Bir nonsistemik sentetik piretroid olarak cyfluthrin, mideyi zehirler ve sinir sistemine saldırır, böylece böceği zayıflatır ve açıklıktan öldürür. Tarımda, evlerde veya evlerin etrafında ve süs çiçeklerinde istenmeyen böcekleri öldürmek için kullanılır. Bitkilerde sistemik değildir fakat tarımda, bahçivancılıkta ve bağcılıkta kullanılır. Cyfluthrin aynı zamanda gezici çekirge ve ağustos böceklerine karşı da kullanılır (40). Birincil tarımsal kullanımı; pamuk, çim, süs bitkileri, şerbetçiotu, tahıl, mısır, mevsimsel meyve, fıstık, patates ve diğer sebze gibi ürünler üzerinde böceklerin kontrol edilmesi için ayrıca yapısal haşere kontrolü için kullanılır (41). Bunların yanında kemirici kurt, karınca, gümüşbalığı, hamamböcekleri, termitler, tohum böcekleri, buğday biti, sivrisinek, bit, sinek, mantolu böcek, tütün kurdu, elma içkurdu, avrupa mısır biti, lahana kurdu, looperler, tırtır ordusu, pamuk kurdu, yonca kurdu, Colorado patates böceği ve çok başka böcekleri kontrol etmek için de kullanılır. Öncelikle tarımda kullanılmasına rağmen, cyfluthrin halk sağlığında, hijyeninde ve ayrıca evcil hayvanlar için de kullanılır (41).

Cyfluthrin, ıslanabilir toz, aerosol, granül, sıvı, yağ içinde su emülsiyonu ve ULV (ultra low volume), oilspray konsantreleri şeklinde bazlı insektisit formülasyonlarında bulunabilir. (42).

Bütün sentetik piretroidler gibi, cyfluthrin de bir nörotoksindir. Cyfluthrin normal sinir fonksiyonlarını farklı yollarla etkiler. Sinir membranlarında değişimlere, anormal sodyum ve potasyum akımına sebep olur (43).

Bu anormal akım ise sinir sisteminin hipereksitasyonuna sebep olur ve nöronların tekrarlı boşaltımıyla sonuçlanır. Böylece aşırı derecede titremeye (ispazmoza) tutulup başka sinir dürtülerinin de engellemesine neden olarak sonunda ölüme yol açar (44, 45).

Cyfluthrin aynı zamanda sinir dokusunda kalsiyum yoğunluklarını etkiler, bunu kalsiyum taşımada etkili olan bir enzimi engelleyerek yapar. Bu ise sinirler arasındaki sinaps bağlantı bölgesine bırakılan nörotransmitter asetilokolin miktarını artırır (46). Ek olarak, sinir dokusunda bulunan iki reseptör, gamma-aminobutirik asit ve periferik benzodiyazepin reseptörleri cyfluthrin tarafından engellenir (47, 48).

Cyfluthrinin memeli hayvanlara karşı bir dereceye kadar toksik olduğu belirtilmiştir. Cyfluthrin insanlarda deri ve göz tahrişine neden olmasına rağmen, piretroid zehirlenmesi nadirdir. İnsanlarda düşük toksisitesinin temel nedeni oldukça hızlı bir şekilde elimine olduğundandır (49).

Cyfluthrin memeli hayvanlarda hızlı gerçekleşen Faz I ve daha yavaş gerçekleşen Faz II olmak üzere iki fazda metabolize olmaktadır. Cyfluthrinin birincil yıkım ürünleri karbondioksit ve ana bileşikten çok daha düşük toksisiteli bir bileşik olan 4-fluoro-3-fenil-benzaldehittir (34, 50, 51). Laboratuvar testleri cyfluthrinin intravenöz dozunun yaklaşık % 60'nın ilk 24 saat içinde idrarla atıldığını, % 6'sının sonraki 24 saat içinde elimine olduğunu göstermektedir.

Benzer şekilde, başka bir çalışmada dozun % 20'sinin ilk günde dışkı ile yok olduğu, % 3-4'ünün ise sonraki gün yok olduğu gösterilmiştir. Ayrıca tek bir oral doz cyfluthrinin % 98'inin 48 saat içinde elimine olduğu belirmiştir (52).

İnsanlar dolaylı olarak, kontamine olmuş yiyeceklerle, ev içi ya da ev dışı uygulamadan sonra kalan kalıntılarla veya direkt olarak cyfluthrin içeren ürünleri kullanarak cyfluthrine maruz kalabilirler.

Bahçeleri ya da evlerine cyfluthrin uygulayan kişiler çoğu zaman kalıntıların ne kadar uzun kalacağı konusunda endişelidirler. Bu basit bir şekilde cevaplamak için zor bir sorudur çünkü bu dayanıklılık birçok duruma bağlıdır (33).

Laboratuvar çalışmalarında, toprakta cyfluthrin kalıntılarının 120 gün kadar kaldığı, yarılanma ömrünün de tahminen 75 gün olduğu bildirilmiştir. EPA kayıtlarında ise yarılanma ömrü 56 ve 63 gündür (34, 53). Cyfluthrinin bozulmasının daha yüksek pH da hızlı olduğu bu nedenle cyfluthrinin alkali topraklara göre asidik topraklarda daha kalıcı olduğu görülmüştür (53).

Cyfluthrin uygulanan depolanmış buğdaylarda uzun bir süreden sonra cyfluthrin kalıntıları bulunmuştur. Araştırmanın uzun bir süresi boyunca (52 hafta) cyfluthrinin büyük kısmının kaldığı bulunmuştur. Cyfluthrinin tahmin edilen yarılanma ömrü sıcaklık, nem ve cyfluthrinin hangi izomerinin araştırıldığına bağlı olarak 23-114 hafta arasında değişir (54). Depolanmış buğdayda uygulanan cyfluthrin hakkında yapılan ikinci bir çalışmada da kalıntıların zamanla önemli bir derecede azalmadıkları gösterilmiştir. Ayrıca, öğütme ve pişirme boyunca azalmaların düşük olduğu bildirilmiştir (55).

Çileklerde cyfluthrin hakkında yapılan bir araştırmada, kalıntıların araştırma süresi (uygulamadan 21 gün sonra) boyunca kaldıklarını gösterilmiştir (56). Topraktaki dayanıklılığı gibi, ev içindeki dayanıklılığı da şartlara bağlı olarak değişir. Bir dairenin içinde aerosol uygulamasından sonra, cyfluthrin kalıntılarını ölçen bir araştırmada cyfluthrinin bütün araştırma süresi boyunca (60 saat) kaldığı gösterilmiştir. Cyfluthrin kalıntılarındaki azalmalar araştırma boyunca sabit olduğundan, azalmalara göre ömrü ölçülememiş böylece dayanıklılığı hakkında bir tahmin yapılamamıştır. (57). Başka bir araştırmada ise cyfluthrin uygulanmış yatakhane yerlerinde uygulamadan sonra 3 gün boyunca kalıntıların bulunduğu gösterilmiştir (58).

EPA düzenli olarak cyfluthrini kullanan uygulayıcılar için endişesini belirtmiştir. 1987'de cyfluthrin kaydından hemen önce, EPA böcek ilacı uygulayıcıları için risk oranlarını tahmin etmiş ve cyfluthrini 3 ay boyunca kullanan uygulayıcılar için uygun bir güvence olmadığı sonucuna ulaşmıştır. EPA'nın maruz kalma değerlendirme bölümü, uygulayıcıların cyfluthrin kullanırken respiratör giymeleri ile maruz kalmanın azaldığını ileri sürmüştür. Fakat bu koruyucu giyisiler zorunlu tutulmamıştır (59). EPA bir uygulayıcının uygun bir koruma almak için kullanabileceği cyfluthrin miktarını düzeltmiştir (uygulanan daireler ve her daire için kullanılan cyfluthrin miktarı) ve risk değerlendirmesinin yapıldığı cyfluthrin aynı zamanda hastanelerde, kreşlerde, okullarda, lokantalarda ve yiyecek ticaret kurumlarındaki kullanımı için kayıt edilmiştir (60).

Mesleki maruz kalma ile ilgili başka bir endişe de cyfluthrinin yıkama ile kumaştan ne kadar içe geçtiği hakkında yapılan araştırmalardan sağlanır.

Deterjana, kumaş türüne ve kullanılan cyfluthrin ürününe bağlı olarak cyfluthrin kalıntılarının % 5-100 arasında makina yıkaması ile çıkmadığı belirtilmiştir. Araştırma cyfluthrin içeren bütün ürünlerde yıkamadan sonra böcek ilacının % 90 kaldığını göstermiştir. Yıkamanın piretroid kalıntılarında bir fark yaratsa da sonuçta yıkamanın kalıntıyı gidermesi açısından çok başarılı olmadığı görülmüştür. Bu sonuç cyfluthrin kullanan böcek ilacı uygulayıcılarının cyfluthrini iş elbiselerinden çıkartmakta zorluk çekebilecekleri anlamına gelmektedir (61). İkinci bir araştırma ise yıkama işleminin cyfluthrin kalıntılarını çıkartma konusunda daha başarılı olduğunu göstermiştir ancak yinede cyfluthrin kalıntılarının % 20- 30 oranında çıkmadığı belirtilmiştir (62).

Cyfluthrin öldürülmesi gereken istenmeyen böceklerin yanında bir dizi başka organizmaları da etkiler. Bu tür etkilerin arı, örümcek, balık, kuş, ve sucul omurgasızlarda görüldüğü belirtilmiştir.

Ayrıca, örnek sucul ekosistemler hakkında çalışmalar cyfluthrinin normal ekosistem işlevlerini bozma yeteneğine sahip olduğunu göstermiştir (33). Cyfluthrin içeren böcek ilacı ürünleri cyfluthrinden başka içeriklerde sahiptir, bunlara imalathaneler tarafından gizlidir denilir ve EPA tarafından "inert" içerik olarak sınıflandırılır. Bu içeriklerin bazıları hakkında yapılan araştırmalar ve testler bunların bazı kanserlerin oluşumunda etkili olduklarını göstermiştir (63-65).

İnsektisitlerin subletal dozları böcek popülasyonlarını temelde 3 yolla etkiler. Bunlar;

- a) Hayatta kalma sürelerini etkileyerek,
- b) Üreme kabiliyetlerini etkileyerek,
- c) Gelecek nesillerin genetik yapılarını etkileyerek (66).

Bunlara bağlı olarak enzimlerin aktivitelerini değiştirirler, üremeyle ilgili anormalliklere sebep olurlar (67). Böceklerle bu şekilde bir etki yapan insektisitlerin kullanım dozları, yöntemleri ve süreleri, dolaylı ya da doğrudan temas eden insan ve diğer canlılara da değişik şiddetlerde etki yapabilir.

Pestisitlerin genel olarak üreme sistemine etki mekanizmalarını sınıflandıracak olursak;

- Üreme hücrelerinin kalitesinde azalma ve sayısında düşüş olarak etki gösterebilirler,
- Hormon sentezinde değişimler,
- Hormon depolanması ve salınmasındaki değişimler,
- Hormon transport ve kleransındaki değişimler,
- Hormon-reseptör tanınması ve bağlanmasındaki değişimler,
- Hormon post reseptör aktivasyonundaki değişimler,
- Oksidatif stresin indüklenmesi (68).

Araştırma konumuzla ilgili piretroid grubundan olmayan pestisitlerle yapılmış birçok sayıda çalışma vardır (69-81).

Cyfluthrinin de içerisinde yer aldığı piretroid grubu pestisitlerde ise araştırma konumuzun dışında daha çok çoğunun genotoksik, sitotoksik, mutajenik ve teratojenik etkileri üzerine daha çok çalışmalar yapılmıştır (82- 100).

Son yıllarda konumuzla ilgili yayınlar giderek artmaya başlamıştır. Yapılan araştırmalar altı sentetik piretroidin, androjen reseptörlere bağlanarak (erkek cinsellik hormonu) normal androjenik fonksiyonları bozduklarını göstermiştir. Bu tür etkilere, geniş olarak endokrin bozulma adı verilir ve göğüs kanseri, testiküler kanser ve azalmış sperm sayıları gibi bir dizi sağlık sorunlarıyla ilişkilendirilmiştir. Araştırmacılar, insan üreme sistemine olan istenmeyen etkileri önlemek için piretroidlerle temasdan kaçınmayı önerir (101).

Cyfluthrinin periferik benzodiyazepin (PBZ) reseptörlerle bağlandığını gösteren araştırmalar da mevcuttur. PBZ reseptörler testislerde yüksek yoğunluklarda bulunur ve hormon duyarlılığında önemli rol oynar (102).

Piretroidlerin, hayvanlar ve insanlarda yapılan çalışmalarda sperm konsantrasyonu, motilitesi ve morfolojisi üzerine olumsuz etkilerinin olduğu gösterilmiştir (103-124).

Cyfluthrin ile çeşitli alanlarda ve farklı denekler kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Uzun süre cyfluthrine maruz kalmanın kilo kaybına ve yüksek doz cyfluthrin verilen gruplarda ise vücut ağırlığında ve bazı organ ağırlıklarında değişikliklere yol açtığı bildirilmiştir (52). 450 ppm kadar Baytroid ile beslenen sıçanlarda iki yıllık bir beslenme sonucunda, erkeklerde vücut ağırlığı azalması gözlenmiş ve bazı dişilerde böbrek iltihabı görülmüştür (125). Memeli organizmalarda cyfluthrin kısa ve uzun vadede çalışmalar siyatik sinirde düzeltilebilir hasara ve dişilerde böbrek iltihabına yol açtığı belirtilmiştir (52).

Ciddi şekilde cyfluthrine maruz kalmanın en yaygın semptomu paresteziya (kaşıntı, yanma, ve sızlayan özellikle yüzde oluşan cilt rahatsızlığı) olduğu, bunun da uyuşukluk ile sonuçlandığı belirtilmiştir.

Yüksek cyfluthrin dozlarının aşırı salivasyona, iritabiliteye, tremor, koordinasyon bozukluğuna, ıspazmoza (aşırı derece titreme) ve kan basıncı düşüşüne neden olduğu bildirilmiştir (52, 126).

Birçok piretroid gibi, cyfluthrinin ciddi toksisitesi sıcaklık ile olumsuz bir şekilde ilişkilidir yani düşük sıcaklıkta daha yüksek toksisite görüldüğü bildirilmiştir (127). Cyfluthrin solunum yoluyla alındığı zaman da zehirlidir (43,128). Cyfluthrinin, hafif göz iritasyonuna yol açtığı (43,129,130), bir süre maruz kalmayla diyareye, düşük vücut sıcaklığına ve kilo kaybına neden olduğu belirtilmiş uzun süreli cyfluthrin inhalasyonunun da vücut sıcaklık düşüşüne, kilo kaybına, ve karaciğer ağırlığında değişikliklere ve huysuzluğa neden olduğu gösterilmiştir (131). Yüksek dozda cyfluthrine maruz kalma sonucunda sinir sisteminde kronik fonksiyonel bozulmalara neden olduğu, düşük dozlarda kronik maruz kalmada ise sinir sistemi bozukluklarının kronik semptomlarına yol açabildiği belirtilmiştir (43, 53, 131).

Cyfluthrinin aynı zamanda antiandrojenik, mitostatik, genotoksik, sitotoksik, mutajenik, teratojenik ve immunotoksik etkileri hakkında çalışma ve araştırmalar yapılmış ve etkisi incelenmiştir. (12, 20, 33, 82, 96, 125, 131, 133-136). Cyfluthrin ile ilgili geniş kullanım alanına bağlı olarak birçok alanda çeşitli çalışmaların olduğu görülmektedir. Ancak yaptığımız literatür taramasında kendi araştırma konumuzla ilgili yapılan çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir.

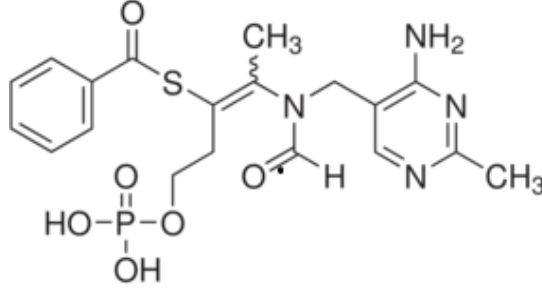
Özellikle erkeklerin kullanım alanı olarak daha fazla insektisit ya da pestisitlere maruz kaldığı aşıkardır. Çünkü bitkisel ürünleri muhafaza ve verim elde etmede gerek tarımda ve ziraatta, gerek hayvan sağlığı ve hayvansal ürünlerin korunmasında, hayvancılıkta ya da halk sağlığını korumada, ilaçlama sektöründe çalışanlarda erkeklerin oranı kadınlara göre daha fazladır.

Bu sektörlerde çalışan ya da kullanımı gittikçe yaygınlaşan tek ya da bileşik solüsyonlarda bulunan cyfluthrine dolaylı olarak maruz kalan kişilerde ortaya çıkabilecek ve kişileri aile hayatında, toplum hayatında sosyal ve psikolojik olarak da etkileyebilen infertilite için cyfluthrinin erkek üreme sistemi hücrelerine etkisini araştırılması son derece önemlidir. Bu kadar geniş kullanım alanına sahip bir insektisit ile insanların doğrudan ya da dolaylı olarak maruz kalmaması düşünülemez.

Bu nedenle böyle bir etkileşimde özellikle erkeklerde üreme sistemine ve buna ait parametrelere olabilecek bir etkinin ne ölçüde olduğunu araştırma konusu yaparak bu alandaki yetersiz çalışmalara bir katkı sağlamak amacıyla bu çalışmayı planladık.

3.2. Benfotiamin

Açık Formülü:



Şekil 2. Benfotiaminin kimyasal yapısı.

Görünüm : Beyaz

Kimyasal Adı : S-[(Z)-2-[(4-amino-2-methylpyrimidin-5-yl)
methylformylamino]-5-phosphonooxypent-2-en-3-yl]
benzenecarbothioate.

Moleküler ağırlığı : 466,45 g/mol

Cas No : 22457-89-2

Ticari adları : S-Benzoylthiamine O-monophosphate (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. A.B.D.) (137).

Tiamin suda çözülebilen bir vitamin olup hububatta, bakliyat, kuru fasulyede, soyada, fındıkta, ekmekte, yağsız ette ve balıkta bulunur. Tiamin, hücresel enerji metabolizmasında karbonhidratların enerjiye dönüştürülme sürecine yardımcı olarak önemli bir rol oynar. Tiamin; kalbin, kasların ve sinirlerin normal durumda çalışması için gereklidir ve farklı metabolik bozuklukların tedavisi için faydalıdır. (138, 139).

Tiaminden türemiş bileşimler Allium genusedaki soğan, taze soğan ve pırasa gibi bitkilerde bulunmuştur ve Allitiamin olarak isimlendirilmiştir (140).

Benfotiamin, allitiamin olarak isimlendirilen, kızarmış veya ezilmiş sarımsakta, soğan, taze soğan ve pırasa gibi sebzelerde eser miktarda bulunan, tiamin-kökenli birleşimlerin eşsiz kaynaklarından biridir (141).

Benfotiamin yağda-çözülebilir bir tiamin türdeşidir ve S-Benzoylthiamine-0-mono fosfat olarak tanınan eşsiz açık tiyazol-halkalı bir yapıya sahiptir ki bu yapı onun doğrudan bağırsak duvarını geçebilmesini ve kolaylıkla hücre membranına ve hücre içine geçmesini sağlar. Bu yapı nedeniyle Benfotiamin, S-acyl tiamin grubunun türevi olarak da tanımlanmıştır (142, 143). Başka bir tanıma göre benfotiamin , B1 vitamininin yağda eriyen türüdür. Normal suda çözülebilir B1 vitaminine tiamin, özel yağda çözülebilir B1 vitaminine ise benfotiamin denilir (141).

Benfotiamin yapısı nedeniyle hakiki tiamine göre çok daha yüksek bir biyoelverişliliğe sahiptir. Bu özelliğiyle benfotiaminin, suda-çözülebilir tiamine göre vücutta daha kolay absorbe edildiği ve oral uygulamada eşdeğer bir tiamin dozuna göre en az beş kat daha yüksek tiamin-plazma konsantrasyonuna yani suda çözülebilir tiamine göre beş kat daha yüksek plazma düzeylerine ulaşabilme etkinliğine sahip olduğu bildirilmiştir (144 ,147, 148, 150). Bundan ötürü diğer yağda çözülebilir ya da allitiamin ailesindeki lipid tiamin türevlerine göre daha iyi olduğu ve lipitte çözülebilir türdeşleri içerisinde en güçlü olduğu belirtilmiştir (144).

Benfotiaminin oral uygulamasıyla tiamin, tiamin mono fosfat ve tiamin difosfat düzeylerinin kanda ve karaciğerde önemli bir ölçüde arttığı fakat beyinde oluşmadığı görülmüştür. Benfotiaminin daha iyi bir absorpsiyon kapasitesinin olması, tiamin eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan akut periferik sendromunun tedavisi için faydalı olabileceği bildirilmiştir (145, 146).

Benfotiaminin reaktif oksijen türleri üzerine de inhibe edici etkisinin olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (151, 152).

Benfotiaminin insan endotel hücrelerinde ilerlemiş glikasyon son ürünlerin (Advanced Glycation Endproduct, AGE) artışını engellediği görülmüştür (154). Benfotiamin yüksek glikoz hasarlarında koruyucu etkiye sahiptir (155). Redükte glutatyon (GSH), hücrede çevresel oksidan ajanların etkisini kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerini okside olmaktan korur, antioksidan gibi davranır. Bu arada glutatyonun kendisi oksitlenir (GSSG). Bu okside glutatyonun fonksiyonunu yapabilmesi tekrar redükte hale gelmesi ile mümkündür. Bunun için NADPH'lar kullanılır. Pentoz fosfat yolu NADPH için önemli bir kaynaktır ve tiamin de bu yolu aktive edici olduğundan (156) dolaylı bir antioksidan olarak kabul edilmiştir (154, 155).

Endotel hücrelerde ve perisitlerde yüksek glikoz maruziyetinden dolayı meydana gelen apoptozisin iki göstergesi olan deoksiribonükleik asit (DNA) fragmantasyonu artışı ve Caspase 3 aktivitesi benfotiamin tarafından engellenebilir (157).

Ayrıca diyabetik nöropatiye bağılı ağrıların giderilmesinde ve diyabetik nefropati ve diyabetik kardiyomiyopati üzerine etkileri olduğu gösterilmiştir (149, 150). Benfotiaminin Tip 2 diyabetik sıçan böbreklerinde fosfodiesteraz 5 ve izoformlarının ekspresyonu üzerine etkisi incelenmiştir (153).

Bir başka çalışmada da benfotiaminin diyabetli sıçanlardaki endotel hücrelerde fazla sayıda üretilmiş reaktif oksijen türlerini normalleştirdiğı gösterilmişken (158), bir diğerk çalışmada streptozotocin (STZ) indüklemeli diyabetik farelerde de oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir (159).

Benfotiamin diyabette gliseraldehit-3-fosfat ve fruktoz-6-fosfatı, ksiloz-5-fosfata ve eritroz 4-fosfata dönüştürür. Bunu diyabetik komplikasyonun ilerlediğini gösteren bir işaret olan tiamin di fosfatın dokuda artmasıyla ilerlemeyi durdurmak için yapar. Bunu yaparken transketolaz enzimini aktifleştirerek yapar. Böylece gliseraldehit-3-fosfat ve fruktoz-6-fosfat gibi glikolitik metabolitlerin yüksek oranda bulunmasıyla aktifleşen diaçilgliserol (DAG) - protein kinase C (PKC_W) yolunu ve heksosamin yolunu, AGE (ilerlemiş glikasyon son ürünleri) oluşum yolunu bloke eder. Özellikle AGE oluşumunu inhibe eder (145, 146, 158).

Benfotiamin bir transketolaz aktifleştiricisi olarak göz önüne alınmıştır (132). Benfotiamin, gliseraldehit 3-fosfat ve fruktoz 6- fosfatı, pentoz fosfat yolunun enzimi olan transketolazı aktifleştirilmesi ile uzaklaştırılır (146). Deneysel diyabetik nöropatide, heksoz ve trioz fosfatı pentoz fosfat yoluna yönlendirerek dokudaki AGE'lerin azaltılmasını da sağlar (160, 161). Deneysel diyabetik nöropatide, lipitte çözülebilen benfotiaminin suda çözülebilen tiamine göre fonksiyonel sinir bozukluğu engellenmesinde ve AGE formasyonlarının azaltılmasında üstün olduğı gösterilmiştir (162, 163).

Proteinler yüksek glikoz konsantrasyonları ile karşılaştıklarında, glikoz bir enzimin aracılığına gereksinim duymadan proteine bağlanarak kontrolsüz glikasyon reaksiyonlarına neden olur. Glikasyona uğramış protein, moleküler oksijene bir elektron vererek serbest oksijen radikali oluşumuna neden olur. Glikoz ve proteinlerin amino grupları arasında kendiliğinden gelişen enzimatik olmayan glikasyon reaksiyonları yoluyla önce Schiff bazları, sonrasında daha stabil olan Amadori ürünleri oluşur. Amadori ürünlerinin oluşumundan sonra ileri glikasyon son ürünleri (AGE) meydana gelir (138, 164 - 167)

Araştırmalar, AGE'lerin reseptör aracılı mekanizma ile serbest radikal üretimini uyarmasının yanı sıra, artmış serbest radikallerin de hücre içi AGE oluşumunu arttırdığını göstermektedir (168).

Yapılan çalışmalarda AGE ve serbest radikallerin, protein kinaz C (PKC)'yi aktive ettiği gösterilmiştir. Aktive olan PKC'nin, vasküler kan akımını, damar permeabilitesini, hücre dışı matriks bileşenlerini ve hücre büyümesini etkileyerek vasküler komplikasyonların patogenezinde rol aldığı öne sürülmektedir (169-171).

Benfotiamin transketolazı aktifleştirir, pentoz fosfat yolunu çalıştırır, protein kinaz C (PKC) hareketini azaltır ve buna bağlı olarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS) üreten NADPH oksidaz enzimini inaktif yapar böylece oksidatif stresi azaltarak ve önleyerek antioksidan gibi davranır (172-174). Yüksek glukoz konsantrasyonu, poliol yolu ile sorbitol üretimine neden olur. Bu yoldaki aldoz redüktaz enzim aktivitesi için NADPH kullanıldığından hücre içi NADPH tüketilir. Okside glutatyonun redükte forma çevrilebilmesi ve nitrik oksit (NO) sentezi için NADPH gereklidir.

Bu nedenle sorbitol yolunun aktif olması ve sonuçta NADPH'ın yokluğu hücrenin antioksidan kapasitesinin sınırlanması anlamına gelmektedir (175). Benfotiamin , poliol metabolik yolu regüle edilen aldoz redüktaz hareketini engelleyerek NADPH tüketilmesini engeller (176).

Birkaç çalışmada sperm hareketliliği ile glikoliz, pentoz fosfat yolu ve oksidatif fosforilasyon arasındaki ilişki incelenmiştir (195-197).

Benfotiamin enzimatik olmayan glikolizlenmeyle, glikolizlenemeyen son-ürün formasyonu ile sonuçlanan üridin di fosfat (UDP)-N-asetilglukozaminin artmasını engeller. Bunların yanı sıra ileri glikasyon son ürünlerini (AGE) azaltır (212,230), böbrekteki endotelial hücrelerde AGE oluşumlarını engeller (155,177).

AGE'lerin toksik etkileri arasında; proteinlerin yapılarını ve fonksiyonlarını değiştirebilmeleri, kendi reseptörleri ile oksidatif stresi indükleyebilmeleri ve sonuçta nükleer faktör kappaB (NFkB) gibi redoks duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive etmeleri ve ilgili genlerin (prokoagülant doku faktörü endotelin -1, adhezyon molekülü, VCAM- 1 gibi) ekspresyonlarının artışı bulunmaktadır (178, 179).

Benfotiamin nükleer faktör kappaB proteinleri (NF-KB) aktifleşmesinin engellenmesi ile diyabetik retinopati, nöropati, mikroangiopati ve nefropati gibi diyabetik komplikasyonlarının tedavisinde kullanılır (151, 180-183). Ek olarak periferik nöropati, mortalite ve morbiditede kullanılmasının (184, 185), hipergliseminin vasküler hücrelere olumsuz etkilerinin yok edilmesinde faydalı olduğu gösterilmiştir (186).

Benfotiaminin insan perisit apoptozisinin engellenmesinde, faredeki anjiyogenesis ve sonraki apoptozisin engellenmesinde, streptozotosin-bağlı deneysel şeker hastalığı olan kardiyomyosit kontraktıl disfonksiyonun engellenmesinde, ilerlemiş titreşim persepsiyonda, motor fonksiyon ve alkolik polinöropatinin tüm sebeplerinin azaltılmasında, iskemik diabetik kol ve bacakların iyileşmesinin hızlandırılmasında, endotoksine bağlı üveitin, makro/mikrovasküler endotelial disfonksiyon gibi patolojik durumların gelişmesinin önlenmesinde çok yönlü terapötik potansiyele sahip olduğu bildirilmiştir (143, 145, 151, 187 - 190) .

Spermde tiaminin varlığına ve erkeğe özgü infertilite, spermatogenezis, sıçan testisleri, Sertoli ve Leydig hücreleri üzerine etkilerine yönelik çalışmalar yapılmıştır (191 - 194).

Sonuç olarak araştırma konumuzla ilgili benfotiaminin koruyucu etkisine hiç bakılmamıştır. Tiaminin bir türevi olan ve daha etkin olduğu düşünölen benfotiamini bu alandaki etkisini araştırmak amacıyla kullandık.

3.3. HSP 70

HSP 70 (mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, sc-32239, California, USA)

Hücreler ısı şoku gibi ya da farklı stres yaratıcı durumlarla karşılaştıklarında ısı şok ya da stres proteinleri adı verilen sentezi artan bir grup proteinler, heat shock protein (HSP) olarak tanımlanmıştır ve moleküler ağırlıklarına göre gruplandırılmışlardır. HSP 70 insan vücudunda iyi tanımlanmış tiplerden biri olup 70-kDa'luk bir proteindir (198).

Ökaryotik hücrelerdeki ısı şok proteinleri, molekül ağırlıklarına bağımlı olarak beş aile içerisinde sınıflandırılmaktadırlar (HSP 110, HSP 90, HSP 70, HSP 60, küçük ısı şok proteinleri ve ubikuitin). HSP 70, üzerinde en çok çalışılmış ve tanımlanmış ısı şok proteindir (199).

Lindquist ve Craig (200) yapılan ilk çalışmalarda hücrede aynı kökenden gelen (kognat) HSC 70 ve ısı şoku uyarımlı HSP 70 olmak üzere iki çeşit HSP 70 protein ailesi üyesinin saptandığını bildirmişlerdir. HSC 70, normal koşullarda sitoplazma ve çekirdekte dağılmış durumda bulunmakta ve memeliler arasında yüksek oranda korunmuş bir genetik diziyi paylaşmaktadır.

HSP 70 geninin Boorstein ve ark., (201) yaptıkları çalışmada DNA dizi analizleri sonucunda yirmi dört ökaryotik ve prokaryotik türde söz konusu proteinin türler arasında yüksek benzerlik gösterdiğini saptamışlardır.

HSP 70 protein ailesi, hücrede bulundukları yer ve görevlerine göre, ısı şok kognatı 70 (HSC 70/ HSP 73), stres uyarımlı HSP 72, mitokondrial HSP 75 (HSP 75/ grp 75) ve endoplazmik retikulumda (E.R) bulunan HSP 78 (HSP 78/ grp 78) olarak dört alt grupta toplanmaktadırlar (202).

Yedi farklı HSP 70 geni tablo 1.'de gösterildiği gibi fare, sıçan ve insanlarda bulunmuştur. Farelerde tüm hücrelerde Grp 78 ve Grp 75'inde bulunduğu ve HSC70-2' nin de salındığı görülmüştür. Farelerde strese bağlı olarak HSP70-1 ve HSP70-3 geni vardır.

Bu indüklenebilen HSP 70'lerin, hücreleri stres kaynaklı hasarlardan korumaya yönelik olarak ortaya çıktığına inanılır. İki HSP 70 ailesi üyesi de spermatogenezis sırasında salınır. HSP70-2 mayotik faz sırasında HSC70-t ise post-mayotik faz sırasında salınır. Bundan dolayı HSP 70'lerin salınımı gametogenez esnasında yapısal, indüklenebilir ve gelişimsel mekanizmalarla kontrol edilir. HSP 70'lerin gametogenez boyunca çeşitli fonksiyonları vardır (203).

Tablo 1. Memelilerde HSP 70 ailesi (203)

Fare Genler	Sıçan Homoloğu	İnsan Homoloğu
hsp70-1	hsp70-1	hsp70-2
hsp70-3	hsp70ib	hsp70-1
hsc70	hsc70	hsc70
hsp70-2	hst70	hspA2
hsc73t		hsp70-hom
grp75		grp75
grp78		grp78

32 santigrat derece sıcaklığında HSC 70, GRP 75, GRP 78, HSP70-2 ve HSC70T germ hücrelerinde tanımlanmışlardır (204-206). Ancak indüklenebilir HSP70-1 veya HSP70-3 42-43 °C’ deki testislerde tanımlanmamışlardır (207). Son çalışmalar HSF1 aktivasyonu ve ısı-indüklemeli HSP70-1 veya HSP70-3 salınımının 38 °C’de ısı şokunda olduğu buna karşın 42 °C’de testisin somatik hücrelerindeki HSP70-1 veya HSP70-3’ün indüklendiği görülmüştür (208). Bu verilerin indüklenebilir HSP 70’lerin spermatogenik hücreleri orta termal stresten koruduğu, yaklaşık normal değerin 10 °C üstünde ise bunu yapamadığını gösterir. Ancak spermatogenik işlemler uzun süreli 37 °C’ye maruz kalırsa kriptorşid testis olarak adlandırılan duruma dönüşebilirler (203).

Isı şok proteinleri olarak adlandırılmalarına karşılık söz konusu proteinlerin sentezleri, hücrelerin radyasyon, kimyasal maddeler, oksijen yetersizliği, ağır metaller, alkol, yem kısıtlanması gibi diğer stres faktörlerine maruz kaldıklarında da artmaktadır (209-212).

HSP yapımı ısı, ultraviyole ışık ve sitotoksik ajanlar tarafından uyarılır. HSP yapımını uyaran faktörler proteinlere toksik olan yapılardır. Denatüre proteinlerin düzeyinde artma görülür (213).

HSP 70 oluştuktan sonra yeni sentezlenmiş immatür proteinlere bağlanır. Bu proteinler de oluşabilecek erken ve düzensiz bağlanmaları önler. Yeni polipeptid zincirinin amino asitleri en son ürünü oluşturmak için gerekli bütün bilgileri sağlarlar. Fizikokimyasal güçlerle üç boyutlu proteinin katlanması oluşur. Daha önceleri bu olayların kendiliğinden olduğuna inanılırdı. HSP tespiti ile bu kavram değişmiştir.

HSP 70 molekülü immatür polipeptit zincirlerine bağlanmaktadır ve bu yapıların yetersiz bağlanmasını ve katlanmasını önlemektedir. HSP'ler bu fonksiyonlarıyla “moleküler koruyucular” olarak bilinirler. Moleküler koruyucular, proteinlerin kendi yapılarını değiştirmeden taşınmasını ve katlanmasını sağlarlar.

HSP 70 moleküler koruyucuların prototipidir. İmmatür ve bozulmuş proteinlerin gizlenmiş hidrofobik zincirlerine bağlanırlar. Hasar görmüş proteinlerin bir araya gelmesini önlerler ve bu proteinleri çözünür hale getirirler. HSP 70'e ek olarak diğer HSP'ler de protein bozulması ve hücre sinyal mekanizmasında yer alırlar. HSP'ler “homeostasis”i sağlayarak hücrenin devamlılığını sürdürebilmesi için pozitif etkide bulunurlar (214).

Diğer bir ifadeyle HSP'ler, protein katlanması ve translokasyonuna yardım eden moleküler şaperonlardır (215). Moleküler şaperon terimi; hücrel proteinlerin transport veya migrasyonuna yardım eden stres proteinlerinin bağlanma yeteneği olarak tanımlanır (216).

Hücrel stres altında proteinler denatüre olur ve sarmal yapı bozulur bunun sonucunda rastgele oluşan sarmal yapılar birbirlerine dolaşarak veya çapraz bağlanarak protein yığınlarını (agregatlar) oluşturabilirler, bu olay nihayetinde hücre ölümüyle sonuçlanacaktır.

HSP 70, sıcaklık veya oksidatif stres gibi protein yapısına zarar verebilecek koşullarda yeni oluşmuş polipeptid zincirlerinin yanlış katlanmalarını veya yapışarak çökelmelerini önlemektedir.

Stres esnasında proteinlerin hidrofobik rezidülerine bağlanmakta, ortaya çıkabilecek denatürasyon ve çökelmeleri engelleyerek yeniden katlanmalarını yönlendirmektedir. Böylece hücrelerin iyileşmesine yardım eder (215 - 217). Ek olarak şaperonlar, matür proteinler oluştuktan sonra fonksiyonlarının olgunlaşmasında rol alırlar (218).

Ayrıca HSP 70 proteinleri, organel membranları arasında protein translokasyonuna rehberlik ederek, unstabil veya anormal proteinlerin proteolitik indirgenmesini kolaylaştırarak ve regülatuar proteinlerin biyolojik aktivitelerinin kontrolünü sağlayarak, ATP bağımlı moleküler şaperonlar olarak görev yaparlar (219, 220).

Bugün bilinmektedir ki proteinlere toksik olan ve koruyan durum arasında süreklilik gösteren bir denge vardır. Protein denatürasyonu sonucu protein bütünlüğü kaybolmakta bunun sonucu olarak HSP gibi proteinlerin yapısını korumaya yönelik olan moleküllerin üretimi artmaktadır (214).

Tipik olarak bir HSP 70 proteini, 613–635 aminoasit uzunluğundadır. HSP 70, hücre içerisinde düzenleyici proteinlerle etkileşimde anahtar rol oynar (221). Isı şok proteinlerinin pek çoğu, oldukça korunmuş bir amino (N)-terminal adenosine trifosfataz (ATPaz) ucu ve bir karboksi (C) terminal substrat-bağlayıcı ucundan oluşurlar.

HSP 70'in moleküler yapısı 44 kilodaltonluk (kDa), 18kDa, 10kDa olmak üzere 3 ana bileşenden oluşur. HSP 70'deki tekrarlayan katlanmamış polipeptidlerin bağlanması ve serbest bırakılması siklusu, HSP 40 ailesi üyeleri gibi çeşitli şaperonlar tarafından modüle edilir (217).

Isı şok ya da stres proteinleri olarak adlandırılmalarına rağmen söz konusu proteinler normal, stres faktörlerinin etkili olmadığı koşullarda da hücre içinde bulunmakta ve bu durumda “ısı şok kognatları (heat shock cognates)” olarak tanımlanmaktadırlar ve sürekli eksprese edilmektedirler (222).

Isı şok cevabının transkripsiyonu ısı şok faktörü (HSF) ile kontrol edilir. Normal şartlar altında HSF’ler HSP’lere bağlıdır ve inaktiftir. Isı şok faktörleri ısı şok elementi (HSE) olarak bilinen hedef sırasının tanınmasından sorumludur.

Isı şoku gibi stres mevcudiyetinde, HSF’ler HSP’lerden ayrılır, protein kinaz veya diğer serin/treonin kinazlar HSF’leri fosforile eder, sitosolde HSF’lerin trimer formları oluşur. Bu HSF trimerleri nükleusa girer ve HSP 70 genindeki HSE’ye bağlanır. Bağlanmayı takiben HSF’ler fosforile olur ve HSP mRNA transkripsiyonu olur, HSP mRNA nükleustan sitoplazmaya çıkar. Sitoplazma içinde yeni HSP’ler sentez edilir (translasyon).

Multipl HSE’ler, HSP geninde promotor bölgede bulunur. Isı şok elementine ek olarak promotor bölgede serum cevap elementi (SRE) vardır. Serum cevap elementi, serum stimülasyonuna cevap verir ve hücrelerde HSP ekspresyonunun bazal seviyesinin mevcudiyetinden sorumludur (223).

HSP 70 ailesi, hücre herhangi bir stres altında değil iken ATP bağımlı moleküler şaperon olarak yeni sentezlenen proteinlerin doğru katlanmalarında ve hedef bölgelere taşınımında görev alır (219).

HSP 70 seviyeleri zararlı etki altında olmayan hücrelerde düşüktür. Stresin çeşitli formlarının uygulandığı hücrelerde aniden seviyesi artar. Kimyasal toksisite bu strese neden olabilir. Stresten etkilenen HSP 70'in hızla yükseldiği hücrelerde hasarlı proteinlerin onarımı bunu izler. Böylece hücrelerde daha fazla hasar önlenir ve hücre fonksiyonlarının devamlılığı sağlanır (224, 225) .

Birçok HSP ailesine ait üye, memelilerin testis ve sperminde tanımlanmıştır. Testise özgü HSP 70 formları HSP 70-2 ve HSC 70t ilk kez sıçanlarda tanımlanmıştır (205). Bunlar özellikle spermatogenik hücrelerde görülmüştür.

HSC 70t post mayotik faz esnasında salınır (226). Bu proteinlerin homologları daha sonra sıçan ve insan testislerinde de keşfedilmiştir (226, 227). HSP 70-2 'nin fare germ hücrelerinde mayozun ilerlemesinde (progresyonunda) gerekli olduğu ortaya konmuştur (226). İnsanlarda HSP 70-2'nin homoloğu HSPA 2 olarak ifade edilir ki bu da faredeki HSP70-2'den dört farklı amino asit ile ayrılır. Ayrıca ek olarak sıçanlarda olmayan karboksil ucunun yanında altı amino asit dizisi de içerir (228). HSPA2' nin dışında insanlarda HSPA1L ve HSPH3 olmak üzere testiste tanımlanan HSP proteinleri de vardır (229). HSP'ler fare, sıçan, sığır, domuz ve insan sperm yüzeyinde tespit edilmiştir.

HSP 70 ailesi üyeleri sperm yüzeyinde çok bulunan bileşenler olarak görülmüştür (230, 231, 232). HSP 70 antijenlerinin insan sperm yüzeyinin tümünde lokalize olduğu immunofloresans ile tespit edilmiştir (231). Bir başka çalışmada HSP 70 ailesinin iki üyesinden HSPA2 ve HSPA1L'nin insan sperm membran antijenlerinden olduğu belirtilmiştir.

Bu tespit, infertil erkeklerin seminal plazma örneklerinde anti-sperm antibodyler tarafından belirlenmiştir. HSPA2 ve HSPA1L büyük ölçüde daha çok insan sperm plazma membranında spermatogenezis sırasında görülmüştür. (233). Ancak Mitchel ve ark., tarafından yapılan yeni bir araştırma, hem immünobead testi (IBT) hem de floresanla aktive edilmiş hücre ayrışması (FACS) analizi ile insan sperm yüzeylerinde HSP şaperonunu algılamayı başaramamıştır (234).

Başka bir çalışmada insan sperm yüzeyinde yedi farklı HSP ailesi üyesi ve HYOU1 ve HSPD1 olarak adlandırılan ve yeni tespit edilen HSP şaperonları insan sperm yüzeyinde tanımlanmıştır (232). HSP 70 antijenleri tüm insan spermi boyunca tespit edilmiştir (230,231).

Bunlardan HSPA2'nin tüm kuyruk bölgesi boyunca plazma membranında lokalize olduğu gösterilmiştir (235). Başka bir çalışmada HSP 70 üyelerinden HSPA1L, HSPA8, HSPA5, HSPD1 ve HSPC1 hücre yüzeyinde tanımlanmışlardır (236 - 240). HSP ailesi kapasitasyon ve akrozom reaksiyonlarına giden spermde yeniden dağılım gösterir (232, 238, 241, 242).

Sığırlarda yapılan bir çalışmada HSP 70' in profaz spermatositlerin sitoplazmasında ve uzamış spermatidlerde, kaput epididimal spermatozoaların sitoplazmik dropletlerinde, kauda epididimal ve korpus epididimal spermatozoaların orta kısmında ve post akrozomal bölgede lokalize olduğu bulunmuştur. Taze ejakule edilmiş spermatozoalarda HSP 70 ' in dağılımında değişiklik olduğu, kapasitasyon ve akrozom reaksiyonları esnasında HSP 70'in yeniden dağılım gösterdiği bildirilmiştir. Bu değişim, fertilizasyonda HSP 70' in muhtemelen bir rol aldığı fikrini doğurmuştur (241).

HSP 70' in insanlarda, boğa ve domuzda sperm fonksiyonları için önemli rolü olduğu ayrıca kemirgenlerde, sığırlarda ve insanlarda fertilizasyon ve embriyo gelişimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (231, 241, 243 - 247).

Spermin yüzey şaperonlarını salmasının, zona pellusidaya bağlanma ve etkileşim yeteneği ile bağlantılı olacağı düşünülmüştür. HSP şaperonları da sperm yüzeyinde bulunur. Anti HSP 70 antibodylerinin sperm-zona pellusida etkileşimini bozduğu, inhibe ettiği sığır, domuz, insan sperm çalışmalarında gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, kaydedeğer şekilde anti HSP 70 antibodylerinin zona pellusida ile spermatozoanın sıkı bağlanmasını azalttığı, pronüklear yapı ve mayoz II' nin tamamlanmasını kestiği şeklinde sonuçlar ortaya konmuştur (241, 242, 247 - 250).

Bu sonuçlar sperm yüzeyindeki HSP şaperonlarının fertilizasyon ve embriyo gelişimi ile bağlantılı olduğu fikrini güçlendirir.

Sülfogalaktilgliserolipid (SGG), spermde bulunan major glikolipiddir. Yüzey proteinlerinden bir diğeri sperm yüzey sülfoglikolipid immobilize edici protein (SLIP1)'dir . Sperm-zona etkileşiminde rol alır. Sperm membranının SGG'ye spesifik bağlanma özelliği vardır. SGG'nin SLIP1'in migrasyonunda önemli rolü vardır. SGG sağlam akrozomda apikal akrozomal bölgede bulunurken, spermin kapasitasyonu sırasında ekvatorial bölgeye doğru yer değiştirir (251).

HSP 70'in in vitro olarak sülfogalaktilgliserolipid (SGG) içeren sülfatlı glikolipidleri bağladığı bildirilmiştir. Bundan dolayı sperm yüzey HSP'lerinin adhezin gibi fonksiyonlarının olabileceğini düşünülmüştür. Adhezin germ hücre bağlanması sırasında sülfoglikolipitin tanınmasına aracılık yapar (252 - 254).

Araştırmacılar SGG' li ve HSP şaperonlu sperm yüzey komplekslerinin oluşumunu ve zona bağlanma proteinlerini muhtemelen bir lipid raf şeklinde zona pellusida-sperm yapışması için temel oluşturduğunu düşünmüşlerdir. Bundan ötürü bu HSP şaperonların aktivitesinin, sperm kapasitasyonunu tetikleyiciliği ile ilişkili olduğu kanaatine varılmıştır (255).

Memelilerde embriyonik gelişim için birçok HSP'lerin salınımı zorunludur. HSP 47' nin fetal gelişimde, HSP 70-2 spermatogenezis sırasında, HSP 90' nın ise ekstra embriyonik gelişimde etkili olduğu bildirilmiştir (256).

Spermiyogenezisin son evrelerinde gerçekleşmesi gereken fazla sitoplazmanın atılımının doğru şekilde gerçekleşmediği durumlara sitoplazmik tutulum denir.

Son yıllarda, insanlarda HSPA2 (farelerde HSP 72, sıçan HST 70) olarak tanımlanan (70 kDa testis spesifik şaperon protein, HSP 70 ailesinin bir üyesi) olarak tanımlanan bir proteinin, sitoplazmik atılım ile eş zamanlı olarak sentezlendiği ve regüle edildiği gösterilmiştir (257).

Farelerde, sıçanlarda ve insanlarda mayotik faz spermatositleri somatik dokularda bulunmayan HSP 70'i sentezlerler (228, 258, 259). HSP70-2 fare ve hamsterların pakiten spermatositlerinde sinaptonemal komplekslerin lateral elementlerinin bir bileşeni olarak tanımlanmıştır, fakat oositler için tanımlanmamıştır (206, 235). HSP70-2, sinaptomal komplekslerde zigotenden diploten boyunca yer alır ve sinaptonemal kompleks formasyonunda kayda değer şekilde bulunabilir. DNA tamir ve rekombinasyon işlemlerinde yer alır (203).

Hücrede temel olarak HSC70 sentezlenir. HSC70 spermatogenik hücrelerin nükleuslarında lokalize olmuştur ve sinaptomal komplekste kesinlikle lokalize değildir (206). HSP70-2 cyclin-B1-CDC kinaz aktivitesi için dolayısıyla mayotik hücre döngüsünün regülasyonu için gereklidir (260, 261). Düşük HSPA2 proteini oranına ve sitoplazmik tutulumlu sperme sahip erkeklerin yaklaşık %40'ının düşük sperm laktat dehidrogenaz-C24 (LDHC24) konsantrasyonları gösterdiği de ortaya konulmuştur (261). Dolayısıyla HSPA2 salınımindaki bozukluk ile spermatogenezis gelişimi durur ve spermatositler apoptozise uğrar. Gecikmiş profazdan dolayı yapısal anomaliler oluşur ve çok az hücre mayotik bölünmeye ilerler. Mayozdaki bu başarısızlık, spermatosit apoptozisinin artışı ile bağlantılıdır (262).

HSP 70'ler post-mayotik spermatidler ve spermatozolda bulunur (203). Farelerde HSC70t (insanda HSP70-hom) uzamış fare spermatidlerinde ve ayrıca spermatozoalarda saptanmıştır (263, 264). HSPA2 ilk olarak primer ve sekonder spermatositte, daha sonra da plazma membranının yeniden şekillenmesi (remodelizasyon) ve sitoplazmik artıklı uzamış spermatidde görülmüştür. İnsan ejakulatında düşük seviyede HSPA2 tespit edilmiştir (235).

Fare HSP70-2 şaperon proteininin insandaki homologu olan HSPA2'nin tanımlanması oldukça önemlidir çünkü insan erkek germ hücrelerindeki HSPA2, spermatositlerde ve terminal spermiyogenezisde (daha çok uzamış spermatidlerde ve spermelerde) olmak üzere iki önemli noktada ifade edilmektedir (265).

HSPA2'nin varlığı, olgun spermin bir karakteristiğidir ve spermin fertilizasyon kapasitesi hakkında bilgi verir (265). Bu bilgi, Huszar ve arkadaşlarının “sitoplazmik tutulumu sahip olgun olmayan sperm, zona pellusidaya yetersiz bağlanma göstermiştir” şeklindeki bulguları ile desteklenmektedir. Olgun olmayan spermde sitoplazmik tutulum, sperm şeklinin değişmesine de neden olur (266). Bu proteinin yokluğunun, hem sitoplazmik atılımın başarısızlığına hem de mayotik sürecin kusurlarına bağlı olabileceği düşünülmektedir (206, 226, 267). Sperm oluşum sürecinde, mayoz boyunca sinaptik anomaliler, kromozomal anomaliler ve erkek infertilitesi birbirleri ile ilişkilidir. Bu kromozomal anomalilerde temel faktör, büyük bir olasılıkla, HSPA2'nin düşük ekspresyonu ve mayotik kusurlarla ilgilidir (268).

Son yıllarda yapılan pek çok çalışmada, sitoplazmik atılım ve HSPA2 şaperon protein ekspresyonu gibi sperm maturasyonunda anahtar rol oynayan moleküler belirteçler üzerinde yoğunlaşmıştır (235, 261, 269 - 272).

Semende bulunan HSPA2 oranının %10'nun altında olması, erkeklerde azalmış fertilitenin bir belirtecidir (265). Erkekler normospermik ya da oligospermik değil de, HSPA2 oranlarına bakılarak çok ya da az matür sperm içermelerine göre sınıflandırıldıklarında; sitoplazmik tutulum derecesi, sperm immatüritesi oranı ve kromozomal anöploidiler arasında istatistiksel olarak belirgin bir korelasyon ($r=0.70-0.78$) olduğu ortaya konmuştur (273).

Spermiyogenezisde sitoplazmik atılım ile eş zamanlı olarak sperm plazma membranında da yeniden düzenlenmeler olur.

Sperm matüritesi ve fonksiyonu hakkında bilgi veren, sperm kreatin kinaz (CK) ve HSPA2 gibi çeşitli objektif biyokimyasal belirteçler kullanılarak erkek fertilitésinin değeriendirilmesi yeni bir yaklaşımdır (265, 272, 274). 70 kDa moleküler ağırlığındaki HSPA2 şaperon proteini ise sperm gelişimi ve matürasyonunu gösteren bağımsız bir ölçüt olarak kabul edilmektedir. Diğer şaperon proteinler gibi HSPA2 de spermin yeniden şekillenmesi için gerekli olan yapısal proteinler ile DNA tamir enzimleri ve protaminler gibi çok çeşitli proteinlerin taşınmasında rol oynamaktadır (267, 272, 275). Gerçekte, HSPA2 mayoz bölünme sırasında oluşan sinaptonemal kompleksin bir parçası olduğundan, HSPA2'nin yetersiz ekspresyonu anöploidiler gibi mayotik defektlere de neden olmaktadır (272). Ayrıca, HSPA2'nin terminal spermiyogenezisle aynı zamanda yani sitoplazmik atılım sırasında ikinci kez temel bir ekspresyon göstermesi önemlidir (272). Böylece, HSPA2 sitoplazmik atılımın doğru bir şekilde gerçekleşmesini sağlayarak anormal sperm morfolojisinin ortaya çıkmasını engellemektedir (272).

Spermatozoon apoptozisi ve spermatozoon DNA'sında hasar erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicileri olarak kabul edilir. Apoptozis ile ortaya çıkan germ hücre kaybı, spermatogenezis sırasında oluşur. p53, p21, CD 95 (276), Caspase-3 (277, 278), Caspase 1-8 (278), Bcl-2 , Bcl XL (279, 280) ve Fas düzeyleriyle, değişik yollarla saptanabilmektedir. Caspase 1-3-8 postakrozomal bölgede, Caspase 9 ise orta parça (midpiece) bölgesinde gösterilmiştir (278).

HSP 70'in apoptoziste çalışma mekanizması, apoptotik enzimler olan Caspase 3 ve 9'un salınmasıyla gerçekleşir. Böylece HSPA2, apoptotik sürecin olası inhibitörüdür (235).

Özetleyecek olursak; HSP 70 gen ailesi proteini (HSPA2/HSP70-2) sentezi sinaptonemal kompleksin sürdürülmesi, spermatosit gelişimi için gerekli mayotik bölünmede önemli rol oynamaktadır. HSPA2 ekspresyonu sinaptonemal kompleks içindeki mayotik bölünmede ve terminal spermiyogenezisdeki elonge spermatid aşamasında olmak üzere iki aşamada oluşmaktadır.

Spermatogenezisin spermatid aşaması, normal gelişim veya düşük matüriteli sperm gelişimi için temel aşamadır. Elonge spermatidde aşamalı HSPA2 regülasyonu ile normal sperm matürasyonu oluşur. Bu aşamalar ile sitoplazmik artıkların atılması ve plazma membranının yeniden şekillenmesi (remodelizasyon) ile normal baş morfolojisi oluşur. Böylece normal zona-pellusida ve hyaluronik asit bağlanma alanı şekillenir. HSPA2 ekspresyon düzeyi sperm hücresel matüritesi ve fertilizasyon potansiyeli ile ilişkilidir. Sitoplazmik retansiyonu olan ve HSPA2 konsantrasyonu düşük olan immatür spermlerin zona bağlanması düşüktür. HSPA2 defekti sinaptonemal kompleksde defektlere ve immatür spermatozoa oluşumuna neden olabilmektedir (281).

Sonuç olarak; insan sperminde de varlığı bilinen HSP 70 ailesi (HSPA2/HSP70-2)'nin cyfluthrin gibi bir pestisitinin etkisine göre nasıl bir yönelime sahip olduğu hakkında veriler elde etmek için çalışmamızda HSP 70'in immünoreaksiyonunu incelemeyi amaçladık.

3.4. Testis Histolojisi

Erkek üreme sisteminin bir parçası olan testisler, puberteyle birlikte spermatozoonların üretimi ve beslenmesi ile başlıca erkek seks hormonu olan testosteronun sentezinden sorumlu olan bir çift organdır (282, 283)

Erişkin insan testisi oval şekilli, 4-5 cm uzunluğunda, 2,5-3,5 cm genişliğinde, anteroposterior 3 cm çapında ve 20-30 gr ağırlığındadır. Olgun testisin posterior yüzü epididimis ile ilişkidir. Hem testis hem de epididimis skrotal kese içerisinde vaz deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kord ile asılıdır. Testisler dıştan üç tabakadan meydana gelen testiküler kapsül ile sarılıdır.

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 kalın fibröz bağ dokusundan oluşan en belirgin tabakadır. Bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılır. Testisin posterior tarafında kalınlaşarak mediastinum testis olarak organ içine sokulur.
3. Tunika vasküloza: Kan damarı ağlarını içeren, areolar bağ dokusundan oluşan en iç tabakadır (284).

Tunika albuginea, rete testisin bulunduğu posterior bölgede kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinumdan testise doğru uzanan fibröz bağ

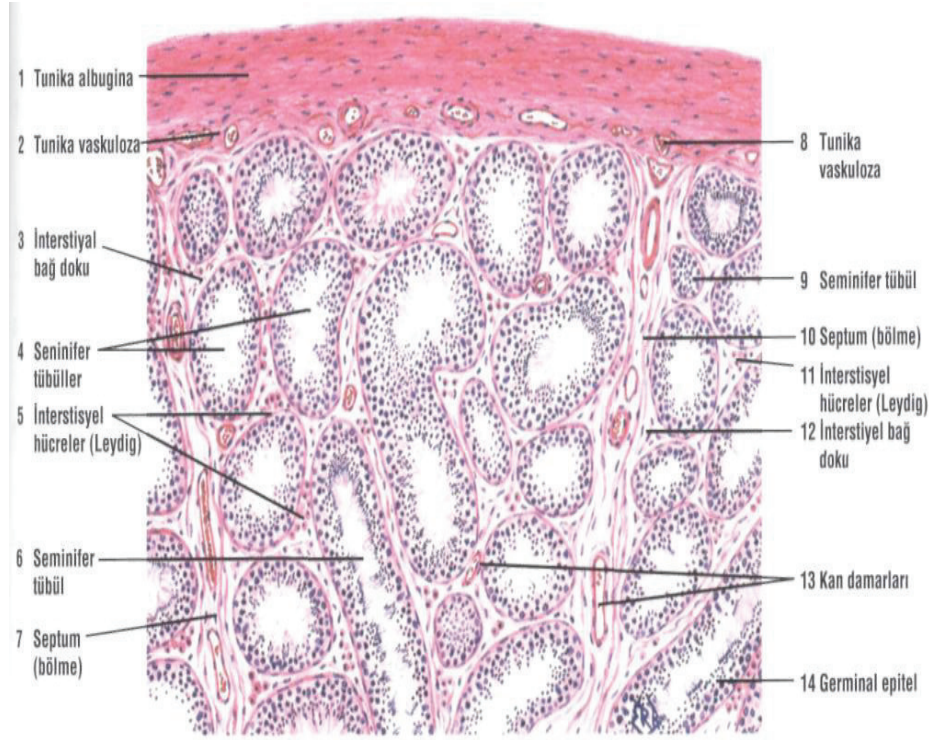
dokusu septumları, testiküler dokuyu 250-300 lobüle ayırır. Her bir lobül 1-4 adet seminiferöz tübülü içermektedir (284).

Seminifer tübüller etrafındaki interstisyel bağ dokusu, kan damarları , gevşek bağ dokusu hücreleri ve kümeler halinde yerleşmiş epiteliyal interstisyel leydig hücrelerini içerir. İnterstisyel hücreler testisin endokrin hücreleridir ve kan dolaşımına erkek seks hormonu olan testosteronu salgılar (285, 286).

3.4.1. Seminifer Tübül

Seminifer tübül, yaklaşık 150-200 µm çapta ve 20-80 cm uzunlukta oldukça kıvrıntılı kanalcıklardır. Seminiferöz tübüller, anastomoz gösteren kıvrımlar şeklinde başlar, mediastinuma doğru birbirlerine yaklaşıp kısa boşaltma kanalı olan tubuli rektiye yaparlar. İki ucu U şeklinde olan bu tübüller de, rete testise açılırlar (287).

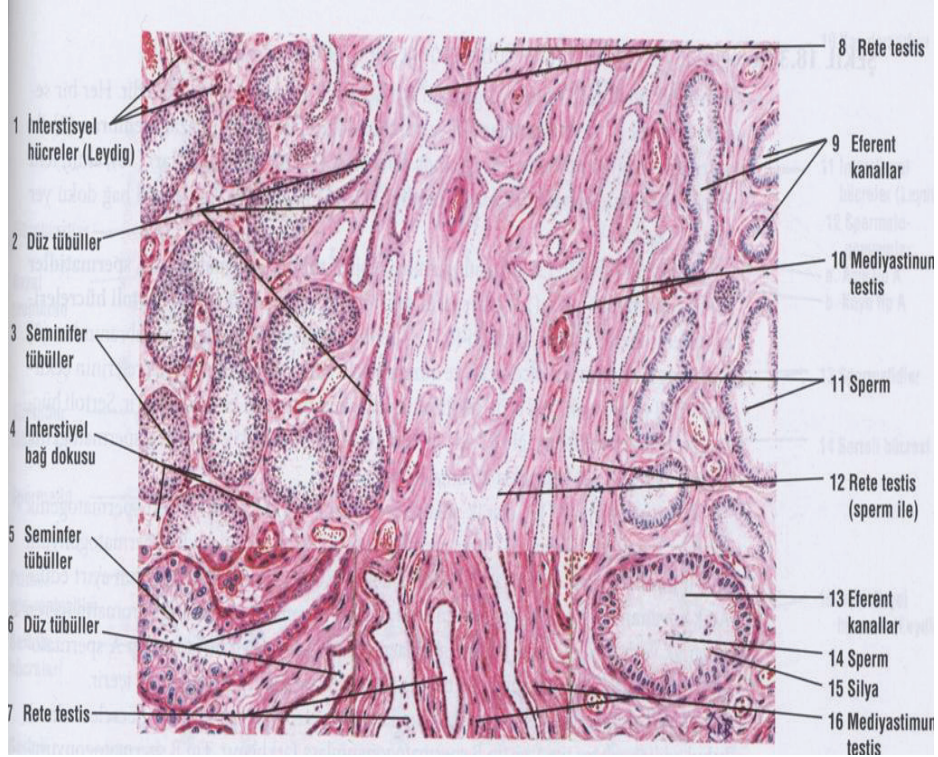
Seminifer tübüller testis kesitlerinde enine, uzunlamasına ve oblik olarak gözlenen uzun ve kıvrıntılı tübüllerdir. Seminifer tübüller germinal epitel adı verilen çok katlı epitel ile döşelidir. Germinal epitel seminifer tübülün bazal membran üzerinde yerleşmiştir (285).



Şekil 3. Testis (bölgesel kesit görünümü). Boya: Hematoksilen ve Eozin (285).

Altta ki resimde birkaç seminifer tübül görülmektedir. Seminifer tübüller spermatogenik hücreleri ve destek (Sertoli) hücrelerini içeren germinal epitel ile döşelidir. İnterstiysel bağ dokusu steroid (testosteron) üreten interstisiyel hücreleri (Leydig) içerir. Mediastinum testiste, seminifer tübüller , düz tübüllere dönüşür. Düz tübüller kısa ve dar olup, spermatogenik hücrelerden yoksun kübik veya prizmatik epitel ile döşelidir. Düz tübüller rete testis olarak devam eder. Rete testis tek katlı yassı, alçak kübik veya alçak prizmatik epitel ile döşeli geniş lümenli düzensiz anastomozlar yapan tübüler ağıdır. Rete testis bağlandığı duktuli eferentes yakınlarında genişler. Duktuli eferentes genellikle düz olup duktus epididimisin baş kısımlarına yaklaştıkça kıvrıntılı hale gelir. Duktuli eferentes rete testisi epididimise bağlar. Rete testiste bulunan bazı tübüller ve duktuli eferentes

sperm kümeleri içerirler. Duktuli eferentes (Eferent kanallar) epiteli alçak kübik hücre grupları içinde alternatif olarak uzun prizmatik hücre grupları içerir. Farklı uzunlukta hücre bulunmasından dolayı, duktuli eferentes lümeni değişkendir. Duktuli eferentesin-uzun hücreleri silya, kübik hücreler ise mikrovillus içerir (285).



Şekil 4. Seminifer Tübüller, Düz Tiibüller, Rete Testis ve Duktuli Eferentes (Eferent Kanallar) (285).

Seminiferöz tübül kompleks, çok katlı epitel ile döşelidir ve iki tip hücre içerir :

1. Sertoli hücreleri
- 2.Spermatogenik hücreler (spermatogonyumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatozoalar)

Seminifer epitel, dıştan, bazal lamina ile kollajen lifler ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan özelleşmiş bir fibröz doku tarafından sarılmıştır. Bu fibröz dokuya peritübüler doku ya da membrana propria denir. Miyoid hücreler, hareketsiz spermleri rete testise iletirler. Ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur.

3.4.2. Membrana Propria

İnce bir bazal lamina üzerine oturmuş olan seminifer epitel dıştan özelleşmiş fibröz doku ile sarılmıştır. Bu sınırlayıcı tabakaya, membrana propria ya da peritübüler doku adı verilir. Membrana propria 4 alt tabakadan oluşmuştur :

1. İç hücresel olmayan tabaka : Kollajen lifler, glikoproteinler ve hyaluronik asid içeren bir tabakadır.

2. İç hücresel tabaka : İnce, uzun şekilli miyoid hücrelerden oluşmuştur. Miyoid hücreler, oldukça ince ve uzun hücreler olup her iki yüzlerinde küçük invaginasyonlar içerirler. Çekirdekleri de ince ve uzundur. Bol miktarda granüler endoplazmik retikulum içeren sitoplazmaları lipid damlacıklarına, mikropinositotik veziküllere ve miyofilamanlara sahiptir.

3. Dış hücresel olmayan tabaka : Glikoprotein tabiatında, dışta yer alan ince bir bazal laminadır.

4. Dış hücresel tabaka : Fibroblastlardan meydana gelmiştir.

Miyoid hücrelerin organizasyonu türlere göre değişiklikler gösterir. Kemiricilerde tek tabaka halinde düzenlenme gösterirken, insanlarda ve bazı

türlerde 3-5 tabakalıdır. Miyoid hücreler, kasılarak seminifer tübülün çapını değiştirebilir ve spermatozoonların tübül içerisinde hareketine yardım ederler.

Membrana proprianın kalınlığı, yaşlılık ve özellikle Klinefelter sendromu gibi, kromozom anomalisi ile ilişkili klinik olgularda artar (284).

3.4.3. Sertoli Hücreleri

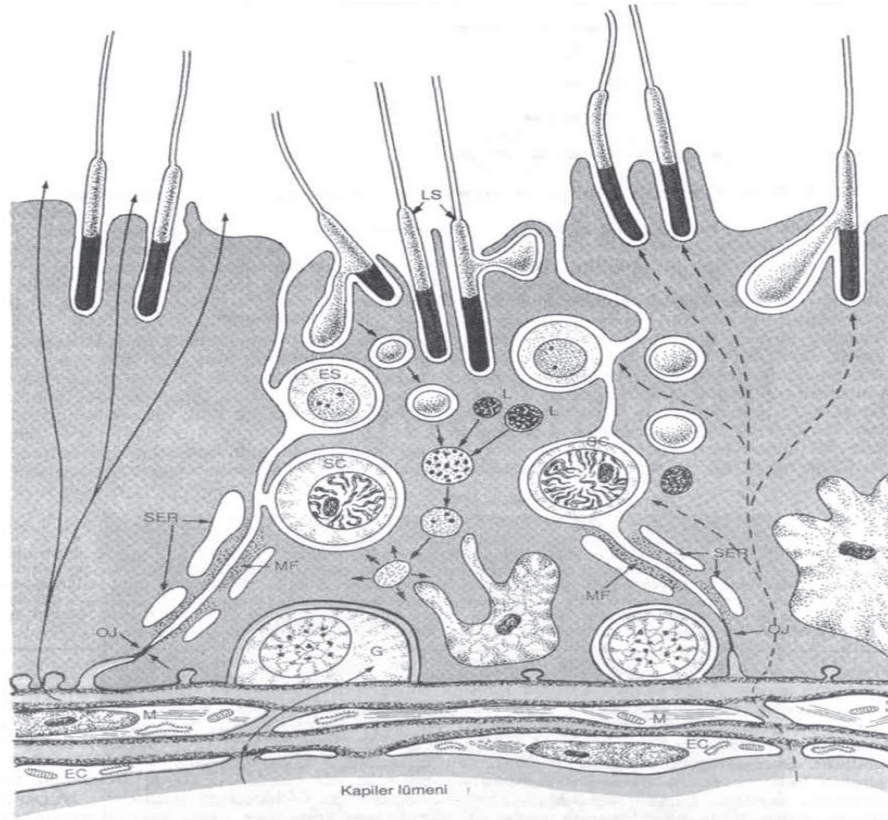
Spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskobunda, Sertoli hücresinin sınırları belirsiz olarak görülür, çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazmik retikulumu, bir miktar granüllü endoplazmik retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozomlar içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış nükleusta çok sayıda kıvrımlar, belirgin bir nükleolus ve az miktarda heterokromatin görülür.

Bitişik sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu spermatogonyumlar, içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogenezis sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup geçerek adluminal kompartmana çıkarlar.

Burada spermatogenezisin daha ileri safhaları kandan gelen ürünlerden bir kan testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı

bağlantılar ile oluşturulur. Spermatositler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin flagellar kuyrukları geliştikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki çıkıntılar halinde görülürler.

Sertoli hücreleri "gap junction" denilen birleşmelerle de ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. Bu da yukarıda bahsedilen seminifer epitel siklusunun koordinasyonunda önemli olabilir (288).



Şekil 5. Sertoli hücrelerinin fonksiyonları ve yerleşimi (288).

Bu hücreler yan yüzleriyle birbirine bağlanarak seminifer tübülleri iki kompartımana ayırırlar. Alt kısım, bazal kompartmandır ve kan damarlarının lümenini, interstisyel boşlukları ve spermatogonyumlar (G) tarafından işgal edilen bölgeleri kapsamaktadır. İkinci (üst) kısım, aşağıdaki tıkaçıcı bağlantılar (OJ)

seviyesine kadar seminifer tübüllerin adluminal kompartımanı olarak tanımlanır. Tıkayıcı bağlantıya yönelik oklar, membranların birleştiği ve maddelerin birinci kompartımandan ikinci kompartımana geçişinin engellediği noktaları göstermektedir.

Membran bağlantısının üzerindeki özelleşmiş bölgeler, sirküler düzenlenme gösteren mikrofilamentler (MF) ve düz endoplazma retikulumu (SER) sisternaları bulunmasıyla tanınırlar. Sertoli hücrelerinin bazı fonksiyonları da gösterilmiştir. Yukarıdaki resimde soldaki hücrede oklar testiküler sıvının salgılanmasını göstermektedir. Ortadaki hücrede oluşmakta olan spermatidlerin sitoplazmik artık cisimcikleri fagositte edilmekte ve lizozomlar (L) tarafından sindirilmektedir. Sağdaki hücrede noktalı oklar metabolitlerin ekstraselüler alandan spermatositlere (SC), erken (ES) ve geç (LS) spermatidlere ve spermatozoonlara taşınmasını göstermektedir. Materyalin bazal kompartımandan lümene aktarılmasına ve spermatogenik hücrelerin Sertoli hücreleri içinden geçişi ayırt edilmektedir (288).

Sertoli hücreleri testis içerisinde birçok önemli fonksiyonlara sahiptir:

- Gelişmekte olan germ hücrelerinin fiziksel destek, korunma ve beslenmesini sağlamak,
- Spermatid gelişimi sırasında oluşan sitoplazma artıklarını (residual cisimcikler) fagositte etmek,
- Seminifer lümen içerisine spermiasyon sonrası olgun spermin atılmasını sağlamak,
- Spermin boşaltım kanalları içerisinde taşınması ve beslenmesi için gerekli fruktozdan zengin testiküler sıvıyı salgılamak.

- Seminifer tübül lümeninde testosterona bağlanarak konsantrasyonunu arttıran androjen-bağlayıcı proteini (ABP)  retmek ve salgılamak.
- Hipofizden (Pituitar Bez) follikül-uyarıcı hormon (FSH) salınımını önleyen inhibin hormonunu salgılamak.
- Diő  ve erkek üreme organlarının gelişimi sırasındaki M ller kanallarının gerilemesini sağlayan glikoprotein yapısındaki Müllerian inhibe edici hormon veya anti Müllerian hormonu üretmek ve salgılamak (285).

3.4.4. Kan-Testis Bariyeri

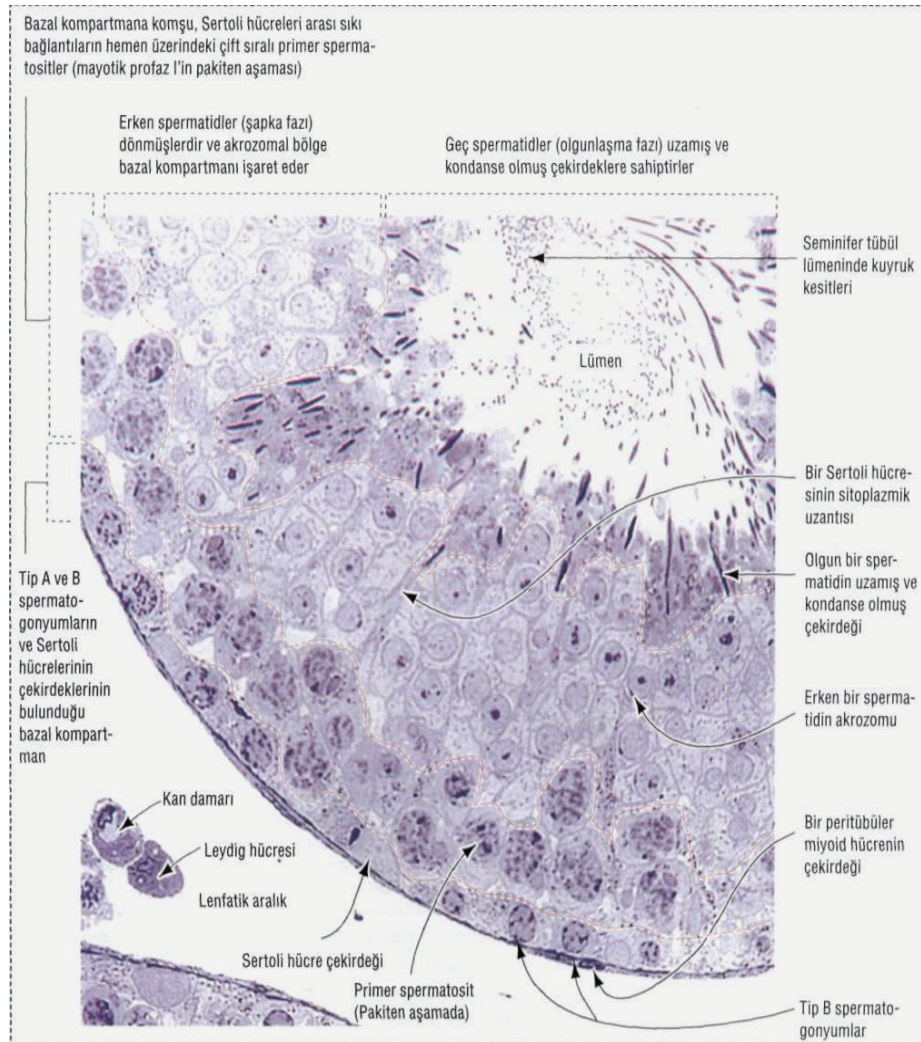
Komőu Sertoli hücreleri sıkı bağlantı kompleksi (tight junctions) aracılığı ile birbirleri ile bağlanarak kan-testis bariyerini oluştururlar. Böylece seminifer tübül bazal ve adluminal (lümene yakın bölge) olmak üzere iki kompartmana ayrılır. Bu bariyer kan dolaőımından antijenlerin geçiőini önler ve germ hücrelerini immun sistemin etkilerinden korur. Böylece kan-testis bariyeri kiőinin kendi spermine karşı otoimmun cevap oluşumunu, antikor oluşumunu ve sonuç olarak sterilit yi önler. Kan-testis bariyeri ayrıca germinal epitele kandan zararlı maddelerin geçiőini de engeller (285).

3.4.5. Spermatogenik Hücreler

Düzenli olarak bölünerek matür spermlere farklanan hücreler olup, 4-8 tabakadan oluşurlar. Bazalden lümene doğru hücre tipleri aşağıdaki gibi sıralanır (283).

3.4.5.1. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan diploid spermatogenik hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki tıkalıcı bağlantıların altında yer alırlar ve bu nedenle kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar



Şekil 6. Seminifer epitel hücrelerin dağılımlarına ve çekirdek karakterlerine göre belirlenmesi (287).

Spermatogonyumlar spermatogonyal kök hücreden köken alırlar ve pubertede başlayan başarılı mitotik hücre bölünmeleri geçirirler.

İki temel morfolojik spermatogonyal hücre tipi gözlenebilir: (1) tip A spermatogonyum (insan testislerinde A koyu ve A açık spermatogonyumlar olarak gözlenir); (2) tip B spermatogonyumdur.

Spermatogonyal kök hücrelerin erkek fertilitesinde önemli etkileri vardır. Bu hücreler kısmen sessiz hücrelerdir ve bu nedenle radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidirler.

Mitotik olarak bölünen spermatogonyumlar, mayotik bölünen spermatositler ve farklılaşmakta olan spermatidler kanser kemoterapisine ve radyasyona duyarlıdır. Radyoterapi veya antikanser kemoterapisinin sonlandırılmasından sonra, spermatogonyal kök hücreleri spermatogenik süreci yeniden oluşturabilirler (287).

3.4.5.2. Spermatositler

Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmeleri sonucu oluşan primer spermatositler, sentez fazını (DNA sentezi) tamamladıktan hemen sonra mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Bu safhada leptoten, zigoten, pakiten ve diploten fazlarını geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar ve crossing-over'den sonra kromozomlar ayrılır. Daha sonra hücreler, metafaza girer ve kromozomlar takip eden anafazda her bir kutba doğru giderler. Bu bölünmede profazın yaklaşık 22 gün dolayında bir süre alması nedeniyle mikroskopta incelenen hücrelerin

büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Seride en büyük hücreler çekirdeklerindeki sinaptonemal kompleksin varlığıyla karakterize primer spermatositlerdir.

Birinci mayoz bölünmeden sonra oluşan sekonder spermatositler $2n$ DNA ve 23 kromozom ($22+X$ veya $22+Y$) içerir. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin görülmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve hızla ikinci mayotik bölünmeye giren hücrelerdir (282 - 284).

3.4.5.3. Spermatidler

Spermatidler, sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesi ile oluşan hücrelerdir. Bunlar, diğer hücrelerden küçük boyutları (7-8 μm çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan çekirdekleri ve seminifer tübüllerde lümen yakınında Sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntülerinde yerleşmeleri ile tanınırlar. Spermatidler, spermiyogenez adı verilen farklılaşma süreci geçirerek metamorfoza uğrarlar. Bu süreçte ; akrozom oluşur, çekirdek yoğunlaşır ve uzar, kuyruk gelişir ve sitoplazmanın çoğu kaybedilir.

Yeni oluşmuş spermatid, merkezi yerleşimli bir çekirdek, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondriyonlara ve bir çift sentriyole sahiptir. Spermatidin matür sperme farklılaşma süreci dört faz içerir. Bu fazlar, spermatidlerin özel bağlantılarla Sertoli hücre membranına fiziksel olarak bağlandığında oluşurlar.

A) Golgi Fazı: Spermatidlerin sitoplazması, nükleusun yakınında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazma retikulumu tübülleri içerir. Küçük PAS-pozitif proakrozomal

granüller Golgi kompleksinde birikirler ve bunun hemen sonrasında birleşerek membranla sınırlanmış bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal granülü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek akrozomun olduğu bölgenin karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler.

Flagellar aksonem oluşmaya başlar ve sentriyoller yeniden nükleusa doğru geri dönerken hareket ettikçe aksonemal komponentleri çevresine sarar.

B) Şapka fazı : Akrozomal vezikülün yerleştiği çekirdek yüzeyinde, yarıya kadar yayılmasıyla karakterizedir. Akrozomal şapkanın altında yer alan çekirdek kılıfı porlarını kaybederek kalınlaşır. Çekirdek içeriği yoğunlaşır (282 - 284, 287)

C) Akrozomal Faz: Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş görür. Bu enzimlerin, korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Bunlar henüz ovulasyona uğramış yumurtayı çevreleyen yapılardır.

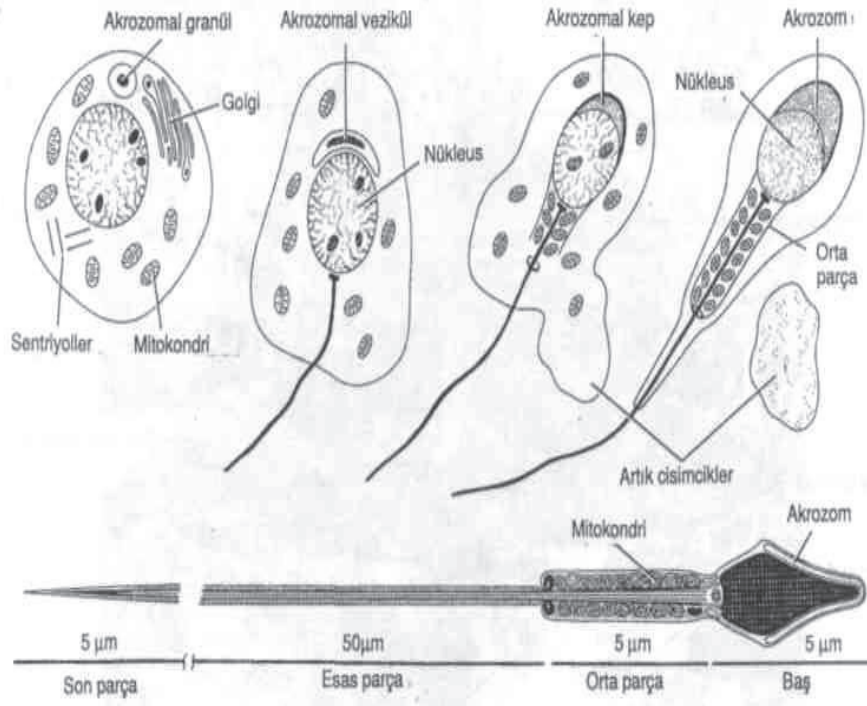
Spermatozoonlar ovumla karşılaştığında akrozomun dış membranı birçok bölgede plazma membranı ile kaynaşarak akrozomal enzimlerin boşalmasına yol açar. Bu işlem akrozomal reaksiyon olarak bilinir ve fertilizasyonun ilk basamaklarından biridir.

Akrozomal faz sırasında hücrenin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelir. Buna ek olarak nükleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler de flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça

adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge spermatozoonların hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir.

Mitokondrilerin bu şekilde yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ve yüksek enerji tüketimi ile ilgili olan bölgelerde toplanmasına başka bir örnek teşkil eder. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur.

D) Matürasyon Fazı: Geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir ve spermatozoonlar tübülün lümenine doğru salınırlar (288).



Şekil 7. Spermiyogenezis süresince spermatidlerde ortaya çıkan başlıca değişiklikler (288).

Spermatozoonun esas yapısal özelliği olan baş kısmı, başlıca yoğunlaşmış nükleer kromatinden oluşur. Nükleus hacminin azalması, spermin daha çok

hareket etmesine yarar ve yumurtaya girerken genomun haraplanmasını önler. Spermatozoonun geri kalan bölümünün yapısı hareket edebilmeyi sağlayacak şekilde düzenlenmiştir (288).

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 spermatogenezisdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynarlar. Bu ayrıntı aşağıda açıklanan seminifer epitel siklusunu anlamakta önemli bir rol oynayabilir. Spermatogenezis süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur (288).

Testislere deneysel ^3H -timidin injeksiyonu ile gönüllüler üzerinde yapılan araştırmalarda insanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki sürenin yaklaşık 64 gün olduğu gösterilmiştir.

Sürecinin yavaş olmasının yanı sıra, spermatogenezis, eş zamanlı ya da eş güdümlü olarak her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez; bu olay bir dalgalanma biçiminde olur. Bu durum her bölgesinde spermatogenezisin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümü açıklar. Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonlar 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 bir siklus yaklaşık 16 ± 1 gün sürer ve spermatogenezis 4 siklustan sonra biter (64 ± 4.5 gün) (288).

3.4.5.4. Spermin Yapısı

Olgun sperm iki elemandan oluşur : baş ve kuyruk. Bir bağlantı parçası ile baş kuyruğa bağlanmıştır.Kuyruk üç parçaya bölünmüştür: Orta parça, esas parça, ve son parça. Spermin baş ve kuyruk kısımlarını bir plazma membranı sarar.

Baş, akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek yassılaşmış yoğun bir yapıdır. Çekirdeğin anterior (ön) yarısını akrozom örter ve lizozomlarda sıkça bulunan hidrolitik enzimler (proteazlar, asit fosfatazlar, hiyaluronidaz, ve yanı sıra nöraminidaz) içerir. Genellikle akrozom, özel bir tip lizozom olarak kabul edilir.

Akrozomal enzimler, ovositi saran korona radyata ve zona pellusidayı sindirerek sperm girişini kolaylaştırmak için döllenme anında salınır.

Bağlantı parçası, bir çift sentriyolün bulunduğu dar bir parçadır. Distal sentriyol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapar.

Kuyruğun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz uzamına seyreden kolonlardan oluşur. Orta parçanın alt sınırı mitokondriyel sarmalın annulusta sonlanmasıyla belirgindir.Esas parça, kuyruğun en uzun parçasıdır. Yedi dış yoğun lifçe sarılı (orta parçadaki dokuz liften farklı) merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur.Fibröz kılıf, eş uzaklıktaki uzamına kolonlardan çıkan dairesel iskelet tarafından oluşturulur. Hem dış yoğun lifler, hem de fibröz kılıf,

spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan proteinler olan keratin içerir. Son parça, dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı, sadece aksonem bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır (287).

3.4.6. İnterstisyel Doku

Testisin seminifer tübülleri arasındaki boşluklar bağ dokusu birikintileri, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler. İnterstisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur.

Puberte sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir nükleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan bir hücredir. Steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir. Bu hücreler, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondri ve düz endoplazma retikulumunda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası işbirliğine bir örnek oluşturur.

İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir.

Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 4 1/2 ayına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden salınan luteinizan hormon uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar (288).

3.5. Testis Embriyolojisi

Her ne kadar embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, oositi döleyen sperm çeşidi ile fertilizasyon sırasında belirleniyorsa da, erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri, embriyonik dönemin 7. haftasına kadar gelişime başlamamaktadır (289). Cinsiyetin farklanması, çok sayıda otozomal genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Seksüel farklanmanın anahtarı kısa kolunda (Yp 11) SRY geni (Y kromozomu üzerindeki seks belirleyici bölge) taşıyan Y kromozomudur. Bu genin protein ürünü cinsiyet organlarının gelişimini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür.

SRY proteini testis belirleyici faktördür (TBF). Bu faktörün varlığıyla fetusun cinsiyeti erkek tipinde, yokluğu ya da hatalı olmasında ise kadın tipinde gelişir (290, 291).

Genital sistem erken dönemde, her iki cinste de birbirine benzemekte ve bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıç periyodu “seksüel gelişimin farklılaşmamış safhası” olarak adlandırılmaktadır (289). Gonadların erkek ve dişiliğe farklılaşmaları, yani gonadal cinsiyet 7. haftada olur ve XX, XY kromozom kompleksine bağlıdır. Fenotipik farklılaşma 20.haftada tamamlanır (291- 294).

Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar

- Posterior karın duvarını döşeyen sölom epiteli.
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri (291).

Gonadlar başlangıçta bir çift uzunlamasına, kölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş genital veya gonadal kabartılar halinde belirirler. Gelişimin 6. haftasına kadar bu genital kabartılar içinde germ hücreleri yoktur.

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartının epiteli proliferasyon olur ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülürler. Bunlar burada primitif cinsiyet kordonları denilen irregüler şekilli kordonları oluştururlar. Hem erkek hem de dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir, işte bu devredeki gonad farklılaşmamış gonad olarak bilinir (290).

Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için önemlidir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geni, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleşiktir. Farklılaşmamış gonadın

medullası üzerinde testis belirleyici Y kromozomudur. Y kromozomu tarafından düzenlenen, TDF, testiküler farklılaşmayı sağlar bu faktörün etkisi altında, primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşırlar. Farklanmamış gonad dışta yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe diferensiye olur, medullası geriler.

Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklanır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur (289).

Gelişimin 4. haftasında, büyük yuvarlak şekilli ilkel cins hücreleri, allantois kesesine yakın vitellus kesesi endoderm hücreleri arasında görülmeye başlar. Embriyonun kıvrılması sırasında, vitellus kesesinin dorsal kısmı embriyon içine alınır.

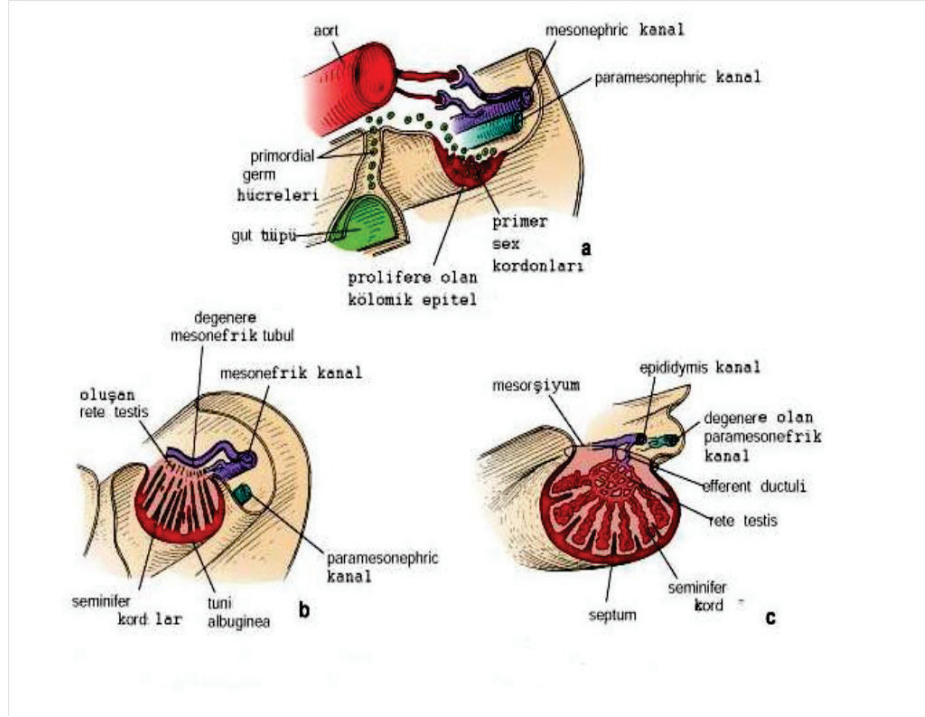
Bu kıvrılma olayları sırasında, ilkel cins hücreleri, son bağırsağın dorsali boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşırlar. 6.haftada da genital kabartıları işgal ederler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşmadıklarında gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum veya testise farklanmasında ilkel cins hücrelerinin indükleyici etkisi vardır.

Primordiyal germ hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve o sırada, genital kabartı epitelini çoğaltır ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülürler. Bunlar ilkel cins (seks) kordonları denilen düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. Erkek ve dişi embriyonlarda bu kordonlar, yüzey epitelini ile ilişkilidir. Bu evrede dişi ve erkek gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi olası değildir (289 - 291, 294).

Seks kordonlarının (seminifer-testiküler- kordonların) kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Yoğun tunika albuginea gelişimi fötusta testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefroza ayrılır ve kendi mezenteri olan mezorsiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklılırlar.

Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve andosteron) salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalerin maskulin olarak farklılaşmasını indüklerler. Testosteron üretimini insan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaşmıştır. Testosterona ilaveten fetal testisler glikoprotein yapıda bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır.

Antimüllerian hormon, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır, hormonun salgılanması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik duktusların gelişimini baskılar (289).



Şekil 8. Testis gelişiminin şematik gösterimi (296).

Yaklaşık 26. haftada testisler karın arka duvarından skrotuma inerler. Konumdaki bu değişme, pelvis genişlemesi ve embriyo bedeninin uzaması ile birlikte olur. Ayrıca testislerin alt kutuplarını gelişen skrotuma bağlayan, testosterona duyarlı ligamentum gubernakulumun, testosteron salınımıyla kısılması da etkilidir. Testisler, abdominal kavite ve skrotum arasında dar bir geçit olan inguinal kanaldan geçerek skrotuma inerler (282, 289).

3.6. Testis Anatomisi

Testis, skrotum içinde yer alan ve erkek üreme hücrelerinin yapıldığı organdır. Testisler bir çift olup yumurta şeklindedir. Her bir testisin facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, margo anterior ve margo

posterior olmak üzere iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu vardır . Testisler, funiculus spermaticus aracılığı ile skrotum içinde asılı durumdadır. Sol testis sağ testise göre genellikle 1 cm daha aşağıda bulunmaktadır (296).

İri bir badem büyüklüğünde olan testisler yaklaşık olarak 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 10-14 gr ağırlığındadır. Testisler elips şeklinde olup skrotum içinde oblik pozisyonda durmaktadır (297).

Testislerin üst ucunda appendiks testis adı verilen küçük, yassı bir yapı görülmektedir. Bu yapı para mezonefrik kanalın üst ucunun kalıntısıdır. Testislerin arka kenarlarının dış kısmı boyunca epididimis yer alır; funiculus spermaticus da, epididimisin medialinde olmak üzere, margo posteriorda bulunur.

Testislerin ön kenarı, her iki yüzü ve uçları visseral periton (epiorchium) ile örtülüdür. Periton arka kenarı sadece lateral kısmını örtmektedir (298).

Intrauterin hayatta karın boşluğunda yer alan testis doğumdan hemen önce kanalis inguinalisten geçerek skrotuma inmektedir. Bu geçiş sırasında karın boşluğunda kendisini saran periton kesesini (processus vaginalis) de beraberinde taşımaktadır. Doğumdan sonra procesus vaginalis periton boşluğuyla ilişkisini keserek tunica vaginalis ismini alır. Tunica vaginalisin skrotumun iç yüzünü döşeyen lamina parietalis (periorchium) ve testisin üzerini örten lamina visceralis (epiorchium) olmak üzere iki tabakası vardır. Bu iki tabaka arasında, çok az miktarda seröz sıvı bulunmaktadır. Testise gelen ve testisten çıkan damar ve sinirler de testisin skrotuma inişi sırasında onu takip ederler. Bu oluşumlar bir araya gelerek funiculus spermaticus adı verilen bir kordon meydana getirmektedirler. Funiculus spermaticus içerisinde, ductus deferens, a.v.

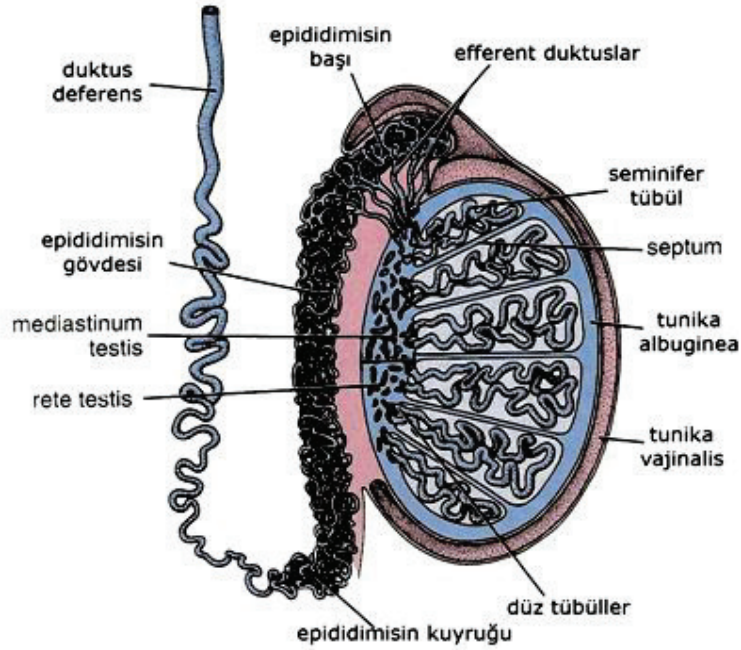
testicularis, a. ductus deferentis, a. cremasterica, n. genitofemoralis'in genital dalı, otonomik sinirler ve lenf damarları yer almaktadır (296). Tunica vaginalis testisin iç tarafında da, testisleri saran iki tabaka daha vardır. Bunlar tunica vaginalis testisten derine doğru tunica albuginea ve tunica vasculosa olarak sıralanırlar (298).

Tunica albuginea, testisi saran mavimsi beyaz renkli, sıkı yapılı fibröz bir tabakadır. Arka kenarda testisin içine doğru kalın ve vertikal yarım bir bölme şeklinde uzantı gönderir. Bu bölmeye mediastinum testis denir. Mediastinum testisin ön ve yan kısımlarından çıkan septula testis denilen bölmeler testisi piramit şeklinde boşluklara ayırır. Mediastinum testisten damarlar ve kanallar girip çıkarlar.

Tunica vasculosa, tunica albuginea'nın iç yüzünde bulunan damar ağı tabakasıdır. Tunica albuginea'nın iç yüzünü ve tüm bölmelerin yüzeylerini döşer. Böylece testisin içindeki tüm lobuli testisi de sarmış olur. Piramit şeklinde olan lobuli testislerin taban kısımları periferde, tepe kısımları ise mediastinum testise yönelmiştir. Her bir lobçuk 1-3 veya daha fazla küçük tüplerden oluşur. Kıvrıntılı seyirinden dolayı bu tüplere tubuli seminiferi kontorti denir. Bu tüpler kör bir ucla başlar ve tüpler arasında gevşek bağ dokusu bulunur. Bu tüplerin yaklaşık olarak sayısı her bir testiste 400-600, uzunlukları 70-80 cm, çapları da 0,1-0,3 mm kadardır. Lobçukların mediastinum testise bakan tepe kısımlarında bu boruların seyri gittikçe düzleşir ve birbirleriyle birleşerek sayıları 20-30'a iner. Tubuli seminiferi recti denilen bu tüplerin, çapları da genişleyerek 0,5 mm olur.

Tubuli seminiferi rektiler mediastinum testisin fibröz dokusu içine girerek arkaya ve yukarı doğru uzanır. Bu kanallar seyri esnasında birbirleriyle anastomoz

yaparak rete testis denilen ağı oluştururlar. Rete testis, mediastinum testisin üst bölümünde sayıları 12-15 arasında değişen kanallar şekline dönüşür. Duktuli efferentes testis denilen bu kanallar testisin arka kenarının üst kısmında tunika albuginea'yı delerek dışarı çıkarlar. Duktuli efferentes testisler kaput epididimide duktus epididimis denilen kanala açılır. Epididimide spermiyumlar depo edilir ve olgunlaşmasının son safhasını tamamlar (297).



şekil 9. İnsan testisinin midsagittal kesiti . (Histology. A Text and Atlas, 5th ed.'dan modifiye edilmiştir, 299).

Testis ve epididimis aortanın dalı olan a. testicularisten beslenirler. a.testicularis, a.renalislerin biraz aşağısında aortanın ön yüzünden ayrılan bir çift arterdir. a.testicularis birçok dala ayrılır.

Bu dallardan 2 veya 4 tanesi duktus deferens boyunca uzanarak epididimisi besler. Diğer dalları tunika albugineanın arka kısmını delerek testise girer ve bu organı besler.

Testis ve epididimisin venleri önce plexus pampiniformis denilen kıvrıntılı bir ven plexusunu, daha sonra da birbirleriyle birleşerek v. testicularisi oluştururlar. Bunların da sağ taraftaki v. cava inferior'a, sol taraftaki v. renalis sinistra'ya açılır. V.testicularislerde kapakçık bulunur.

Lenfatik drenaj yüzeysel ve derin olmak üzere iki şekilde olur. Yüzeysel tunika vaginalisin yüzeyselinde, derindeki ise epididimis ve testisin içinde bulunur. Bunlar 4-8 damar şeklinde funniculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna girerler. V. testicularisi takip ederek aortanın ön ve yan tarafındaki lenf nodüllerine açılırlar.

T₁₀ - 11. medulla spinalis segmentlerinden kaynaklanan sempatik lifler, damarların çevresindeki plexuslar aracılığı ile gelir. Plexus testicularis erkeklerde a. testicularis etrafında testise uzanır, dalları da epididimis ve duktus deferense gider. Üst bölümü plexus aorticus abdominalis ve plexus renalisden, alt bölümü ise plexus hypogastricus superior ve inferior'dan lifler alır (298).

3.7. Testis İçi Genital Kanallar

Testis içi genital kanallar tubuli rekti (düz tübüller), rete testis ve duktuli efferentestir. Seminifer tübüllerin çoğu kangal biçimindedir, bunların her iki ucu rete testise tubuli rekti olarak bilinen yapılarla bağlanır. Spermatogenik hücrelerin giderek ortadan kaybolduğu bu tübüllerin başlangıç bölümünde duvarı, sadece kalan Sertoli hücreleri oluşturur. Bu başlangıç bölümü tıkHz bağ dokusu kılıfı ile desteklenen ve kübik epitel içeren ana segmentle devam eder (288).

Tubuli rekti rete testisin içine boşalır. Rete testis tunika albugineanın kalınlaşması ile oluşmuş mediastinum içinde bulunur. Rete testis kübik epitel ile döşeli ve oldukça fazla anastomozları olan bir kanallar şebekesidir.

Rete testisten 10-20 adet duktuli efferentes çıkar. Bunlar epididimis yönüne doğru hareket sağlayan silyalı hücrelerle değışimli olarak silyasız kübik hücre gruplarından oluşan bir epitele sahiptir. Bu, epitele tarak şeklindeki karakteristik görünümünü verir. Silyasız hücreler seminifer tübüllerden salgılanan sıvının çoğunu absorbe ederler. Silyalı hücre aktivitesi ve sıvı absorbsiyonu spermatozoonların epididimise doğru süpürölmesini sağlayan bir sıvı akımı sağlar.

Epitelin bazal laminasının dışında sirküler olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşan ince bir tabaka vardır. Duktuli efferentes giderek birleşip epididimisin duktus epididimisini oluşturur (288).

3.8. Genital Boşaltım Kanalları

Testiste üretilen spermatozoonları penil yollara doğru taşıyan kanallar duktus epididimis, duktus deferens (vas deferens) ve üretradır.

Duktus epididimis yaklaşık 4-6 m uzunluğunda, tek ve oldukça kıvrıntılı bir tüptür. Bu uzun kanal, çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları ile birlikte epididimisin kuyruk ve gövdesini oluşturur. Yuvarlak bazal hücreler ve prizmatik hücrelerden oluşmuş yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Bu hücreler, düz kas hücreleri ve kan kapillerlerinden zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş bir bazal lamina üzerine oturur. Bu düz kasların peristaltik kasılmaları spermin kanallar boyunca ilerlemesine yardım eder. Epitel hücrelerinin yüzeyleri ise stereosilya adını alan uzun ve dallanmış düzensiz mikrovilluslar ile kaplanmıştır (288).

Duktus epididimis epiteli spermatogenezis süresince atılan artık cisimciklerin ortadan kaldırılması ve sindirilmesine katılır.

Epididimisten duktus (vas) deferens denilen kalın müsküler duvarlı düz bir tüp devam ederek prostatik üretraya açılır. Bu kanalın tipik olarak dar bir lümeni ve kalın bir düz kas tabakası vardır. Mukozası uzamına kıvrımlar oluşturur; yüzeyi boyunca çoğunlukla stereosilyalara sahip yalancı çok katlı prizmatik epitel ile kaplıdır. Lamina propria elastik liflerden zengin bir bağ dokusu katmanıdır. Kalın müsküler tabaka, içte ve dışta longitudinal ortada sirküler tabakalardan oluşmuştur. Duktus deferens spermatik kordonun bir parçasını oluşturur. Bu kordon testiküler arter, pampiniform pleksus ve sinirleri içerir. Prostata girmeden önce duktus deferens genişler ve ampulla denilen bölümü oluşturur. Bu alanda epitel kalınlaşır ve oldukça fazla kıvrımlar yapar.

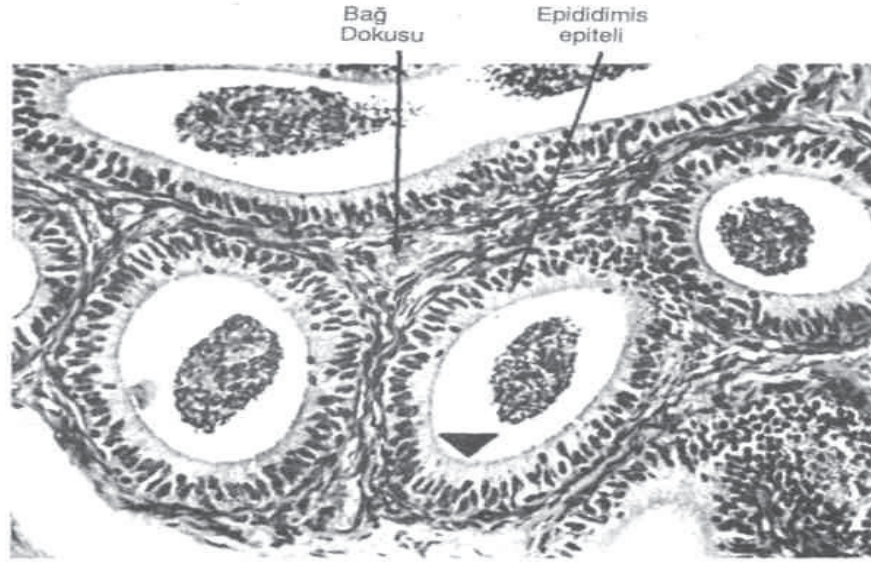
Ampullanın son kısmında seminal veziküller duktusa katılırlar. Bundan sonra duktus deferens prostata girer ve prostatik üretraya açılır. Prostata giren segmente ejakülatuvar duktus denir. Duktus deferensin mukoza tabakası ampulla boyunca ejakülatuvar duktusun içine kadar devam ederken, kas tabakası ampulladan sonra bitmektedir (288).

3.9. Yardımcı Genital Bezler

Bu bezler seminal veziküller, prostat bezi ve bulboüretral bezlerdir. Seminal veziküller, uzunlukları 15 cm olan iki adet oldukça dolambaçlı tüplerdir; bu tüpler spermatozoonlar için depolanma yeri değildir. Organdan kesitler alındığında aynı tüp farklı yönlerde gözlenebilir. Salgı granüllerinden zengin yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşeli mukoza kıvrımları vardır. Bunların ultrastrüktürel özellikleri protein sentezleyen hücrelere benzer. Lamina propria elastik liflerden zengindir ve ince bir düz kas tabakası ile çevrilidir. Seminal veziküllerin viskoz sarımsı sekresyonu, spermatozoonları aktive eden fruktoz, sitrat, inositol, prostaglandinler ve çeşitli proteinlerden zengindir. Erkek üreme sistemi ile ilişkili bu bezler tarafından üretilen karbonhidratlar seminal sıvıya salgılanırlar ve sperm motilitesi için enerji kaynağını oluştururlar. Fruktoz, bu karbonhidratlar içerisinde en fazla bulunan monosakkariddir. İnsan ejakülatının % 70'i seminal veziküllerden kaynaklanır. Epitel hücrelerinin boyutları ve salgılama sürecinin aktivitesinin derecesi testosterona bağlıdır.

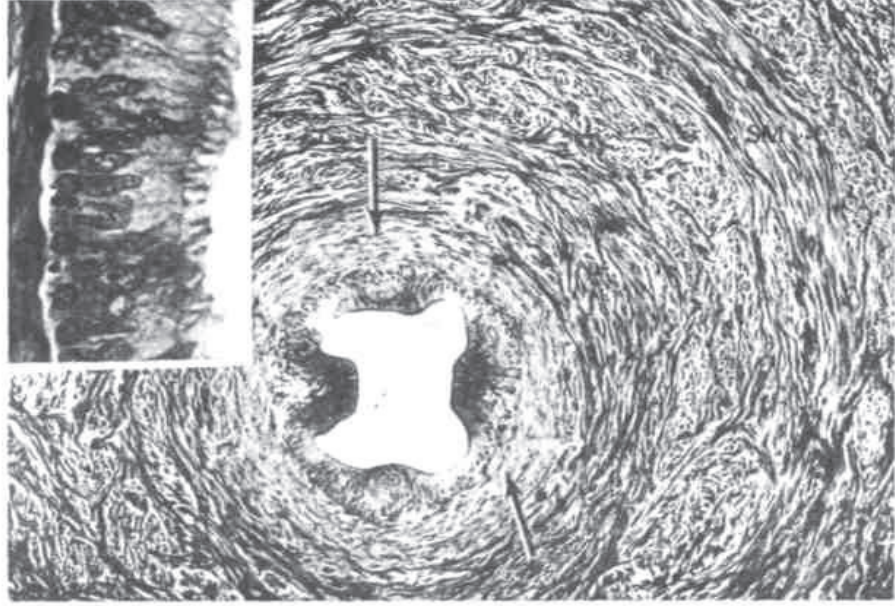
Prostat 30-50 adet dallanmış tübülo alveoler bezin oluşturduğu bir topluluktur; bu bezlerin kanalları prostatik üretraya boşalır. Prostat prostatik sıvıyı

retir ve bunu iç kısmında biriktirir; bu sıvı ejakülasyon sırasında itme gücü için gereklidir. Prostat düz kaslardan zengin bir fibroelastik kapsül ile çevrilmiştir. Kapslden çıkan septumlar bezin içine doğru uzanırlar ve bezi loblara ayırırlar; bu loblar erişkin erkekte kolayca seçilemez. Bezleri ayrıca zengin bir fibromuskuler stroma çevreler (288).



şekil 10. Epididimis yapısını gösteren bir kesitin fotomikroğrafı (288).

Duktus epididimis epiteli, bağ dokusu ve stereosilya (ok başı) ayırt edilmektedir. H&E boyası, x 200 (288).



Şekil 11. Bir duktus deferens kesitinin fotomikrografı (288).

Kanalın düz kas hücreleri (SM) tarafından oluşturulan kalın bir duvarı vardır. Oklar ince lamina propriayı göstermektedir. x 16. Kümelenmiş stereosilyalı, yalancı çok katlı prizmatik epitelin ayrıntıları monte edilmiş küçük kesitte büyütülmüş olarak gösterilmiştir. x 320 (288).

Prostatta üç belirgin bölge bulunur: Birincisi merkezi bölgedir (central zone). Yalancı çok katlı bir epitel vardır ve bezin hacminin % 25'ini oluşturur. Bezin % 70'ini periferik bölge (peripheral zone) oluşturur. Bu bölgenin epiteli daha düzgündür ve burası prostat kanserinin geliştiği başlıca bölgedir. Üçüncü bölge olan geçiş bölgesi (transition zone), tıpta oldukça önemlidir çünkü burası selim prostat hiperplazilerinin büyük bir bölümünün kaynaklandığı bölgedir (288).

50 yaşın üstündeki erkeklerin % 50'sinde bulunan selim prostat hipertrofinin görülme oranı giderek artarak 70 yaşın üstündekilerde % 95'lere kadar çıkar.

Selim (benin) prostat hipertrofisi, vakaların sadece % 5-10'unda üretra obstrüksiyonuna yol açarak klinik semptomlar verir. Malign prostat tümörü erkeklerde ikinci en sık görülen kanser türüdür ve kansere bağlı ölümlerin üçüncü en sık nedenidir.

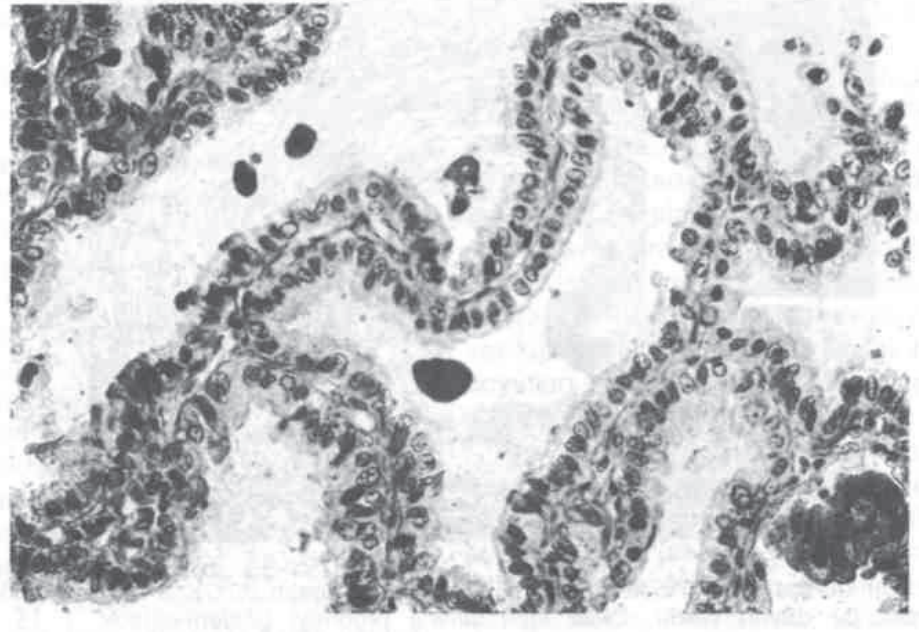
Prostatik bezlerin lümeninde sıklıkla 0.2-2 mm çapında glikoprotein yapısında küçük küresel cisimcikler bulunur. Bunlar prostat taşları ya da korpora amilasea olarak isimlendirilir. Bu cisimcikler çoğunlukla kalsifiye olmuştur. Önemleri anlaşılamamıştır fakat sayıları yaşla birlikte artmaktadır.

Bulboüretal bezler (Cowper bezleri), çapları 3-5 mm olan ve üretranın membranöz kısmının proksimalinde yerleşerek buraya açılan bezlerdir. Mukus salgılayan tek katlı kübik epitele sahip tübülo alveoler bezlerdir. İskelet ve düz kas hücreleri her bir bezi loblara ayıran septumlarda bulunurlar. Sekresyonu, kayganlaştırıcı olarak görev yapan berrak bir mukustur (288).

3.10. Penis

Penis başlıca üç silindirik erektile doku kitlesi ile üretrayı içermekte olup, dıştan deri ile sarılmıştır. Bu silindirlerden ikisi, penisin korpus kavernozumları dorsal olarak yerleşmiştir. Ventral olarak yerleşmiş olan diğeri ise üretranın korpus kavernozumunu ya da korpus spongiyozum adını alır ve üretrayı çevreler. Bu yapı en sonda genişleyerek glans penisi oluşturur. Korpus kavernozumlar, tunika albuginea denilen ve tıkkız bağ dokusundan oluşan dirençli bir tabaka ile sarılıdır. Penisin ve üretranın korpus kavernozumları erektile dokudan oluşmuştur (288).

Eretil doku, penceresiz endotel hücreleri ile döşeli ve bağ dokusu ile düz kas hücrelerinden oluşan trabekülalarla ayrılan venöz boşluklardır.



Şekil 12. İnsan seminal vezikülünün bir kesitine ait fotomikrograf. Masson trikrom boyası x 300 (288).

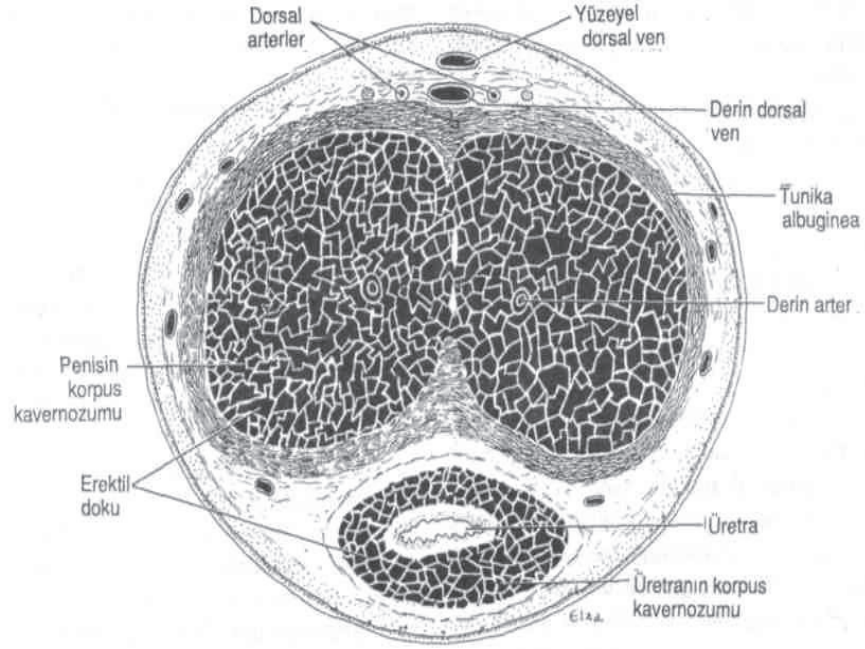
Prepusyum (sünnet derisi), içinde düz kaslar ile bağ dokusu içeren retraktil bir deri katlamasıdır. Yağ bezleri, glansı çevreleyen deride ve katlantı içinde bulunurlar.

Penil üretranın büyük bölümü yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir; glans peniste bu, çok katlı yassı epitele dönüşür. Mukus salgılayan Littre bezleri penil üretra boyunca bulunurlar.

Penisin arteriyel desteği internal pudental arterlerden gelir, bunlardan da penisin derin arterleri ve dorsal arterleri çıkar. Derin arterler besleyici ve helisin arterleri oluşturmak üzere dallara ayrılırlar (288).

Bunlardan ilki yani besleyici olanlar trabekülalara gerekli oksijen ve besin maddelerini sağlarken ikincisi yani helisin arterler doğrudan kavernöz boşluklara (erektile dokular) açılırlar. Helisin arterler ve derin dorsal venler arasında arteriyovenöz şantiar vardır.

Penil ereksiyon hemodinamik bir olaydır ve penisteki vasküler boşlukların duvarlarındaki düz kaslar ile arteriyel kasların aldıkları nöral uyarılarla kontrol edilir. Yumuşak durumda iken peniste minimal kan akımı vardır. Erektile olmayan durum hem penil düz kasın intrinsek tonusu, hem de sürekli sempatik uyarılar tarafından indüklenen tonusla sağlanır. Ereksiyon parasempatik kaynaklı vazodilatatör uyarılarla oluşur; bu uyarılar penil damarların ve kavernöz düz kasın gevşemesini sağlar. Vazodilatasyon, aynı zamanda penil dokuya gelen sempatik vazokonstriktör uyarıların baskılanmasını sağlamaktadır. Penil arterlerde ve kavernöz boşluklardaki açılma, kan akımında artışa yol açarak bu boşlukların kanla dolmasını ve sonuçta penisin sertleşmesini sağlar.



Şekil 13. Penisin enine kesitinin çizimi (288).

Ejakülasyon ve orgazmdan sonra parasempatik aktivite azalır ve penis önceki yumuşak durumuna döner.

Testiküler tümörler, başlıca germ hücreleri, Leydig (interstisyel) hücreleri ya da Sertoli hücrelerinden köken alırlar. İnterstisyel hücre tümörleri, steroid hormonlar (androjenler ve östrojenler) salgılayarak karakteristik endokrin semptomlar oluşur.

3.11. Testis Fizyolojisi

Çeşitli dokuların aktiviteleri ve birbirleri ile olan ilişkileri, endokrin sistemin hücreleri tarafından salgılanan ve sentezlenen hormonlar olan kimyasal habercilerin kontrolü altındadır (300).

Erkeklerde esas üreme işlevi spermiyumun (spermatozoon) oluşturulmasıdır ki bu da testislerde olur. Testis ayrıca erkek cinsiyet hormonu olan testosteronu yapar. Spermatogenezis için testosteron hormonuna gereksinim vardır. Testosteron intersitisiyel dokuda bulunan Leydig hücrelerince salgınır (300).

Testislerdeki Leydig hücre sayısı çocuklarda azdır. Ancak yeni doğanda ve puberteden sonra erkeklerde son derece fazladır. Bu dönemlerde testisler büyük miktarda testosteron salgırlar. Bu hormon Leydig hücrelerinde kolesterolden sentezlenir (300).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Materyal

Çalışmamız, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Başkanlığı'nın onayı ve Fırat Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi (FUBAP) (Proje No:2057) desteği alındıktan sonra başlatıldı. Bu çalışmada materyal olarak kullanılan Wistar Albino cinsi sıçanlar F.Ü Deney Hayvanları Merkezi (FÜDAM) biriminden temin edilmiştir. Araştırma Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (FÜDAM) gerçekleştirildi. Deney için Wistar-Albino cinsi 32 adet 4 haftalık Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. 21°C oda ısısında 12 saat ışık (7:00-19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00- 07:00) tutulan sıçanlar, özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda (normal çeşme suyu) verildi. Hayvan yemleri Yem Sanayi T.A.Ş. Elazığ Yem Fabrikasında hazırlandı (Tablo 2).

Tablo 2 . Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi.

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29,4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0,6
Kavimix VM 23-Z (%) [*]	0,2
Methionin (%)	0,2
DCP (%) ^{**}	1,6
[*] 1 gramında : 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0,006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth., 0,32 mg Mn, 16 mgFe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca bulunur. ^{**} % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur.	

4.2. Deneklere Uygulama Planı

Çalışmada 32 adet 4 haftalık, 85-105 gr ağırlığında Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Çalışma her grupta 8 adet sıçan içeren toplam 4 grup halinde planlandı.

Grup I: Kontrol grubu olarak kullanılan sıçanlardan oluşturuldu (n=8). Her bir sıçana günlük 1 ml/kg/gün dozda zeytinyağı oral gavaj yolu ile verildi.

Grup II: 5 hafta süresince günde tek doz 54 mg/kg/gün cyfluthrin (133) (Cas no: 68359-37-5, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. A.B.D.) 1 ml zeytinyağında süspanse edilerek oral gavaj yoluyla uygulandı (n=8).

Grup III: 5 hafta süresince 54 mg/kg/gün cyfluthrinle birlikte 100 mg/kg/gün benfotiamin (Cas No : 22457-89-2, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. A.B.D.) zeytinyağında çözülerek oral gavaj yoluyla uygulandı (n=8).

Grup IV: 5 hafta süresince 100 mg/kg/gün benfotiamin 1ml zeytinyağında çözülerek oral olarak uygulandı (n=8).

5 haftalık deney sonucunda epididimisten spermatozoa toplanması yapıldı. Hızlıca testis dokuları alınıp Bouin Solüsyonunda 5- 6 saat süreyle tespit edildi. Tespit aşamasından sonra dokular % 50'lik, % 60'lık, % 70'lik alkollerde 12'şer saat yıkandı. Yıkanan dokular dereceli alkol serilerinden (% 80, % 90, % 96, % 100) geçirildi. Ksilolde parlatılıp ısı 56 °C olan etüvde parafin infiltrasyonu yapıldı. Takiben parafin bloklar (Sigma-paraplast embedding media, Stenheim, Germany) hazırlandı. Bu parafin bloklardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin bir kısmına Hemotoksilen & Eosin ve Periodic Acid Schiff teknikleri

kullanılarak histokimyasal boyama yapıldı. Geri kalan doku kesitleri ise immünohistokimya için kullanıldı.

4.3. İmmünohistokimya

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildikten sonra, distile suya alındı. Dokular antigen retrieval için sitrat tampon solüsyonunda pH:6'da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika kaynatıldı. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için H₂O₂ ile muamele edildi. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block (Ultra V Block, TA-125-UB, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) solüsyonu ile muameleden sonra primer antikor (HSP 70 mouse monoclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, sc-32239, California, USA) ile 60 dakika inkübe edildi. Primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor 30 dakika (biyotinli anti-mouse IgG, Diagnostic BioSystems, KP 50A, Pleasanton, USA), streptavidin horseradish peroksidaz 30 dakika ve DAB kromojeni uygulandıktan sonra Harris hematoksilinle zıt boyama yapıldı. Negatif kontrol için hazırlanan dokularda primer antikor yerine phosphate buffered saline (PBS) kullanıldı, diğer basamaklar aynı şekilde uygulandı. PBS ve distile sudan geçirilen dokular uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

4.4. Vücut ve Organ Ağırlıklarının Ölçülmesi

Çalışma sonunda sıçanlar dekapite edilip testis ve epididimisleri yağ dokularından arındırıldıktan sonra tartıldı. Eklenti bezlerinden v. seminalis ile prostat çıkarılarak tartıldı. Tüm üreme organlarının absolut ve rölatif ağırlıkları tespit edilerek kaydedildi. Rölatif organ ağırlıkları aşağıdaki formül yardımıyla hesaplandı.

$$\text{Rölatif organ ağırlığı} = \frac{\text{Absolut üreme organ ağırlığı (g)}}{\text{Vücut ağırlığı (g)}} \times 100$$

4.5. Spermatozoalarda Morfoloji – Motilite Tayini

Deney sonunda sıçanlar dekapite edilip epididimisten spermatozoalar toplanarak motilite, morfoji açısından değerlendirildi.

4.6. Spermatolojik Muayeneler

4.6.1. Sperm Yoğunluğu

Sağ epididimis petri kutusu içerisindeki 1 ml fizyolojik tuzlu suda (%0.9'luk NaCl) bistüri ve makas yardımıyla iyice parçalanarak 2 dakika boyunca bir pensle parçacıklar iyice ezildi. Sonra epididimal dokudaki bütün spermatozoonların sıvıya geçmesi için oda sıcaklığında 4 saat inkübasyona bırakıldı.

Bekleme süresini takiben spermatozoon ihtiva eden süpernatant alyuvar pipetinin 0.5 çizgisine kadar, 5g sodyum bikarbonat, 1 ml formalin, 25 mg eozin ve 100 ml distile su içeren solüsyon da 101 çizgisine kadar çekildi. Dolayısıyla süpernatant 1:200 oranında sulandırılmış oldu. Yaklaşık 10 µl sulandırılmış süpernatant önceden lamel yapıştırılmış Neubauer lamının her iki sayım (toplam 400 küçük kare, 0.1 mm³ hacim) alanına lamelin kenarına pipetin ucu değdirilerek yerleştirildi. Neubauer lamı ışık mikroskobuna yerleştirilip 5 dakika beklenerek solüsyon içerisindeki spermatozoonların tüm alana homojen bir şekilde dağılması sağlandı. Her iki sayım alanındaki tüm karelere düşen spermatozoonlar ışık mikroskobunun 200'lük büyütmesinde sayıldı ve hesaplandı (301).

4.6.2. Sperm Motilitesi

Bunun için bir lam mikroskobun ısıtma tablasına yerleştirilerek sıcaklığının 37 °C'ye ulaşması sağlandı. Birkaç damla Tris buffer solüsyonu (Tris (hidroksimetil) aminometan 3.63 g, glukoz 0.50 g, sitrik asit 1.99 g ve distile su 100 ml) ısıtma tablası üzerindeki lama damlatıldıktan sonra sol kauda epididimisten kesit yapılarak alınan ve spermatozoon ihtiva eden küçük bir damla süspansiyon bu solüsyon üzerine yerleştirilip lamel yardımıyla karıştırılarak homojen bir hal alması sağlandı. Daha sonra 400'lük büyütmede gözle motilite yüzdesi belirlendi. Motilite tahminleri sol kauda epididimisten alınan bir damla süspansiyon için 3 farklı saha incelenerek yapıldı. Bu 3 farklı sahanın ortalama değerleri yüzde motilite oranı olarak hesaplandı (302).

4.6.3. Anormal Spermatozoon Oranı

Anormal spermatozoon oranını tayin etmek için birkaç damla Tris buffer solüsyonu temiz, kuru ve önceden ısıtılmış (37 °C) bir lama damlatıldıktan sonra üzerine sol kauda epididimisten alınan küçük bir damla süspansiyon damlatılarak bir lamel yardımıyla karıştırılıp homojen hale getirildi (301). Daha sonra bu karışımdan ince frotiler çekilip Spermac (Stain Interprise, Willington) boyası ile boyandı ve kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminden sonra frotiler LCD ekranlı ışık mikroskopunda (400x) incelendi. Bir frotide toplam 300 spermatozoon incelenip baş, kuyruk ve toplam anormal spermatozoon oranı yüzde olarak ifade edildi ve fotoğraflandı.

4.7. İstatistikî Analiz

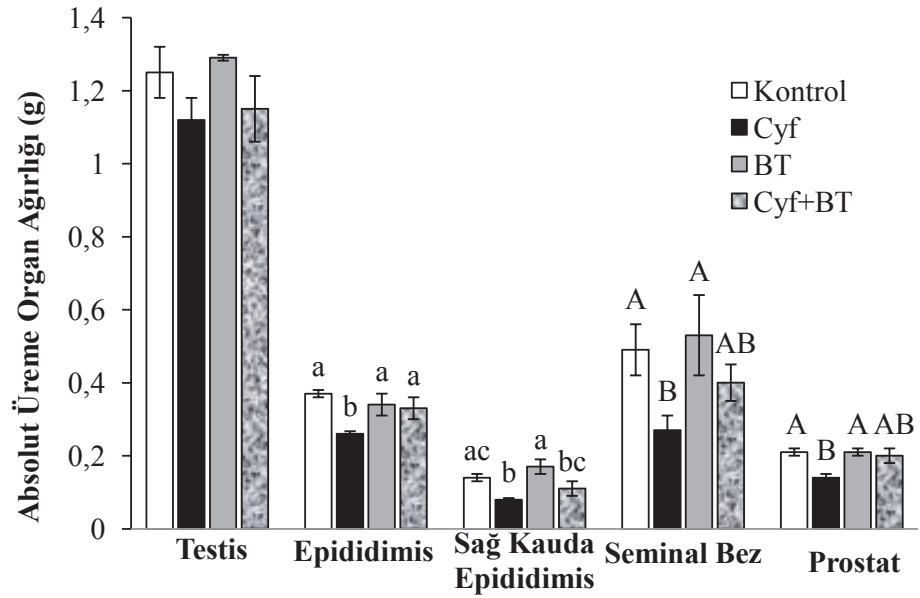
Veriler ortalama $\pm$ SEM değerleri olarak sunuldu. $P<0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Verilerin normal dağılım varsayımına uygun olup olmadığı Shapiro Wilk testi uygulanarak incelendi ve test sonucunda verilerin normal bir dağılım gösterdiği tespit edildi. Buna istinaden normal dağılım gösteren grupları karşılaştırarak aralarındaki farklılıkları tespit etmek amacıyla Tek Yönlü Varyans (ANOVA) Analizi uygulandı ve ikili karşılaştırmalar için de post-hoc Duncan testi kullanıldı. Tüm istatistikî analizler SPSS (Versiyon 10.0) paket programı kullanılarak yapıldı.

5. BULGULAR

5.1. Vücut ve Üreme Organ Ağırlıkları

Kontrol, cyfluthrin, cyfluthrin + benfotiamin ve benfotiamin gruplarına ait dekapitasyon öncesi vücut ağırlıkları sırasıyla 170.67 ± 17.07 , 165.75 ± 8.44 , 177.25 ± 5.27 ve 163.00 ± 12.12 olarak tespit edildi. Vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi ($P > 0.05$).

Absolut organ ağırlıkları Şekil 14’de sunulmuştur. Testis ağırlığı açısından gruplar arasında önemli bir farklılık bulunamadı ($P > 0.05$). Buna rağmen cyfluthrin uygulaması epididimis ($P < 0.01$), sağ kauda epididimis ($P < 0.01$), seminal bez ($P < 0.05$) ve prostat ($P < 0.05$) ağırlığında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azalmalara neden oldu. Cyfluthrin uygulanan sıçanlara eşzamanlı benfotiamin verilmesi cyfluthrin grubu ile karşılaştırıldığında epididimis ağırlığında önemli ($P < 0.01$), sağ kauda epididimis, seminal bez ve prostat ağırlığında ise önemsiz ($P > 0.05$) artışlara neden oldu. Bununla birlikte cyfluthrin ile birlikte benfotiamin uygulaması sonucu artan üreme organ ağırlıkları kontrol grubuna yakın değerlere ulaştı.

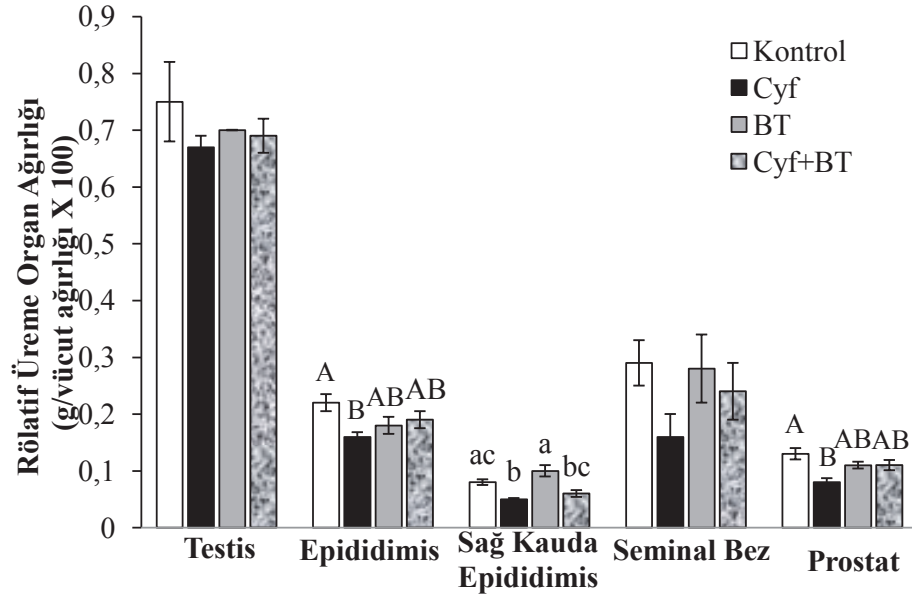


Şekil 14. Absolut üreme organ ağırlıkları.

Değişik küçük (a, b ve c: $P<0.01$) ve büyük harf (A ve B: $P<0.05$) taşıyan sütunlar arasındaki farklılıklar istatistikî açıdan anlamlıdır.

Rölatif organ ağırlıkları şekil 15’de sunulmuştur. Testis ve seminal bez ağırlığı açısından gruplar arasında önemli bir farklılık bulunamadı ($P>0.05$). Buna rağmen cyfluthrin uygulaması epididimis ($P<0.05$), sağ kauda epididimis ($P<0.01$) ve prostat ($P<0.05$) ağırlığında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azalmalara neden oldu.

Cyfluthrin uygulanan sıçanlara eşzamanlı benfotiamin verilmesi cyfluthrin grubu ile karşılaştırıldığında epididimis, sağ kauda epididimis ve prostat ağırlığında sayısal fakat istatistikî olarak önemsiz ($P>0.05$) artışlara neden oldu. Bununla birlikte cyfluthrin uygulaması ile birlikte benfotiamin uygulaması sonucu artan epididimis ve prostat ağırlıkları kontrol grubuna yakın değerlere ulaştı.



Şekil 15. Rölatif üreme organ ağırlıkları.

Değişik küçük (a, b ve c: $P<0.01$) ve büyük harf (A ve B: $P<0.05$) taşıyan sütunlar arasındaki farklılıklar istatistikî açıdan anlamlıdır.

5.2. Spermatolojik Parametreler

Spermatolojik parametrelere ait değerler Tablo 3’de sunulmuştur.

5.2.1. Sperm Motilitesi

Cyfluthrin uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sperm motilitesinde önemli ($p<0.01$) azalmalara neden olurken, cyfluthrin ile birlikte eşzamanlı benfotiamin uygulaması cyfluthrin grubu ile karşılaştırıldığında cyfluthrinin azalttığı sperm motilitesini anlamlı derecede ($P<0.01$) arttırmış ve kontrol grubundaki değere yakın bir değere getirmiştir. Bununla birlikte tek başına benfotiamin uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sperm motilitesinde anlamlı bir artış sağlayamamıştır ($P>0.05$).

5.2.2. Epididimal Sperm Yoğunluğu

Cyfluthrin uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında epididimal sperm yoğunluğunda önemli ($p<0.01$) azalmalara neden olduğu tespit edildi. Cyfluthrin ile birlikte eşzamanlı benfotiamin uygulaması cyfluthrin grubu ile karşılaştırıldığında cyfluthrinin azalttığı sperm motilitesini sayısal olarak arttırmasına rağmen bu artış istatistikî olarak önemsiz ($P>0.05$) bulunmuştur. Öte yandan cyfluthrin - benfotiamin grubundaki bu artışla epididimal sperm yoğunluğu değeri kontrol grubundaki değere yakın olarak bulunmuştur. Tek başına benfotiamin uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında epididimal sperm yoğunluğunda anlamlı bir artış sağlayamadı ($P>0.05$).

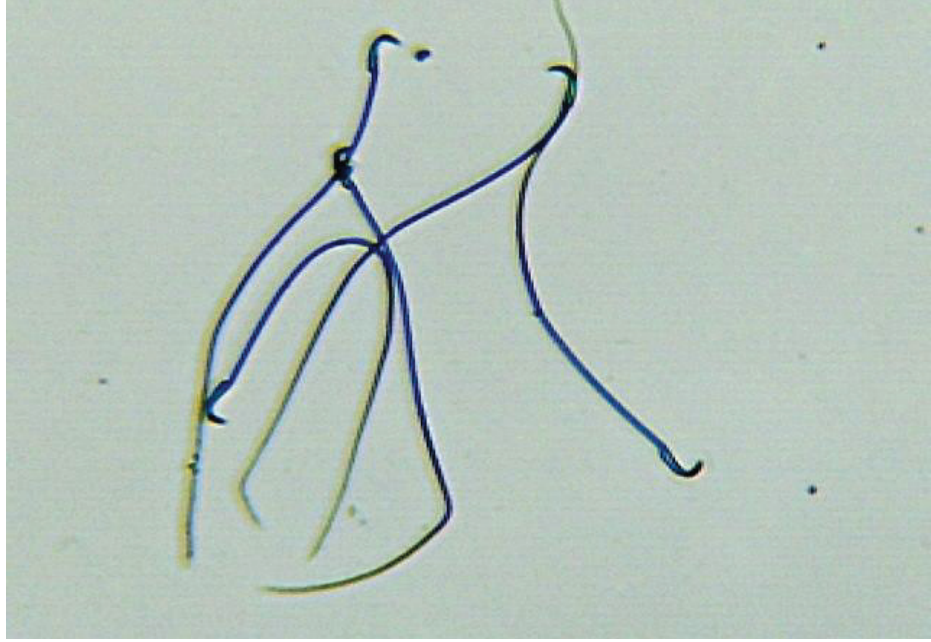
5.2.3. Anormal Sperm Oranı

Cyfluthrin uygulaması kontrol grubu ile karşılaştırıldığında baş ($P<0.05$), kuyruk ($P<0.01$) ve toplam ($p<0.01$) anormal sperm oranında önemli artışlara neden oldu. Cyfluthrin ile birlikte eşzamanlı benfotiamin uygulamasının cyfluthrin grubu ile karşılaştırıldığında cyfluthrinin arttırdığı baş anomalilerinde istatistiki açıdan önemsiz ($P>0.05$), kuyruk ($P<0.01$) ve toplam ($P<0.01$) anormal sperm oranında ise önemli azalmalar sağladığı ve ayrıca tüm anormal sperm tiplerinde elde edilen değerlerin kontrol grubundaki değerlere yakın bir değere getirildiği gözlemlendi. Bununla birlikte tek başına benfotiamin uygulamasının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anormal sperm oranında anlamlı bir artışa neden olmadığı görüldü ($P>0.05$).

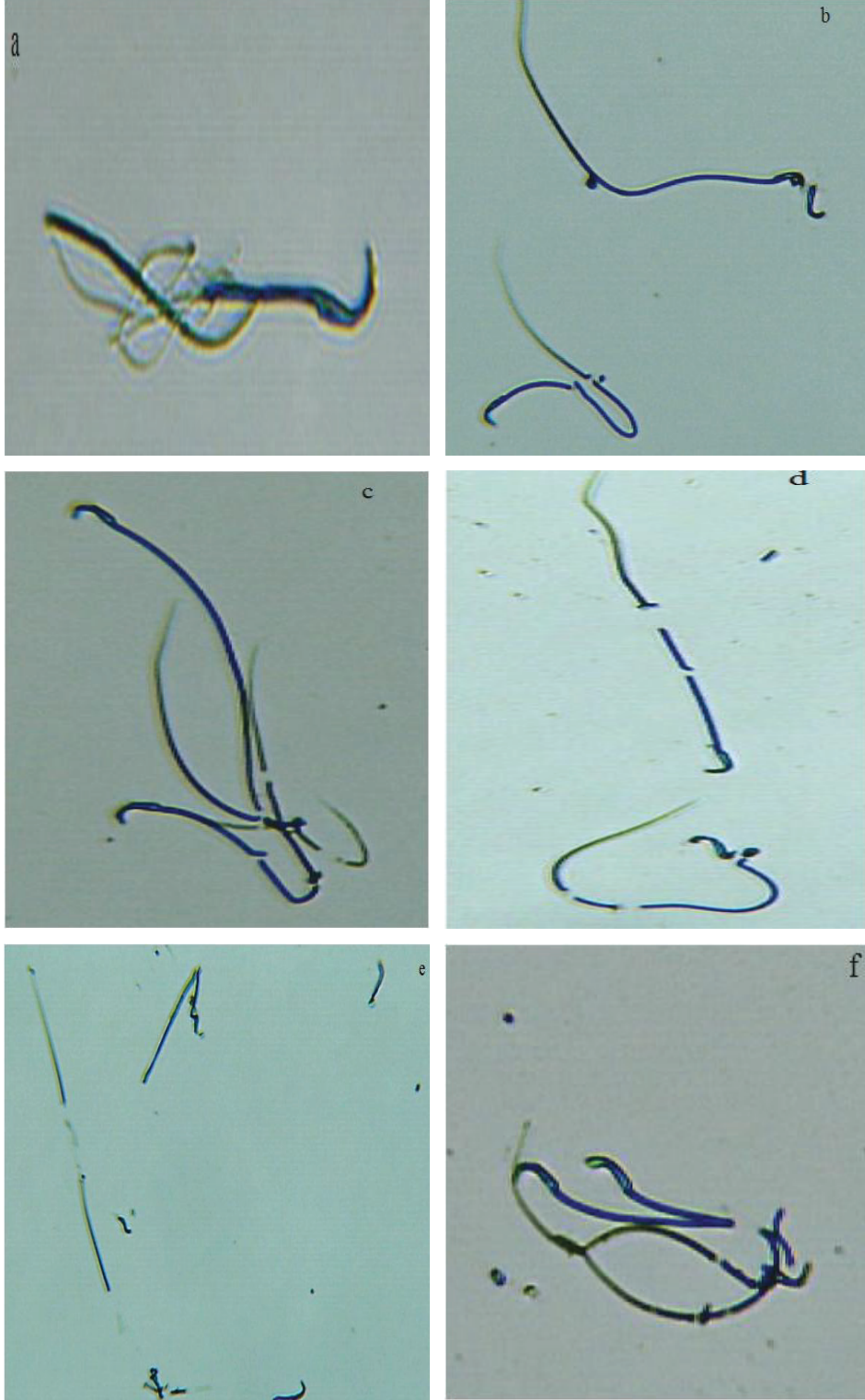
Tablo 3. Spermatolojik parametrelere ait ortalama $\pm$ SEM değerler.

Gruplar	Parametreler				
	Sperm motilitesi (%)	Epididimal sperm yoğunluğu (milyon/kauda epididimis)	Anormal sperm oranı (%)		
			Baş	Kuyruk	Toplam
Kontrol	75.5 $\pm$ 2.9 ^a	105.3 $\pm$ 17.1 ^{ac}	6.7 $\pm$ 2.0 ^A	8.5 $\pm$ 1.5 ^a	15.2 $\pm$ 2.1 ^a
Cyfluthrin	47.3 $\pm$ 6.4 ^b	40.8 $\pm$ 5.8 ^b	19.6 $\pm$ 4.2 ^B	23.8 $\pm$ 2.8 ^b	43.4 $\pm$ 5.1 ^b
Benfotiamin	79.1 $\pm$ 4.9 ^a	116.0 $\pm$ 28.0 ^c	7.5 $\pm$ 1.8 ^A	10.0 $\pm$ 1.6 ^a	17.5 $\pm$ 2.3 ^a
Cyfluthrin+Benfotiamin	69.9 $\pm$ 5.1 ^a	69.3 $\pm$ 4.4 ^{ab}	9.5 $\pm$ 1.5 ^{AB}	15.0 $\pm$ 2.1 ^a	24.5 $\pm$ 3.7 ^a

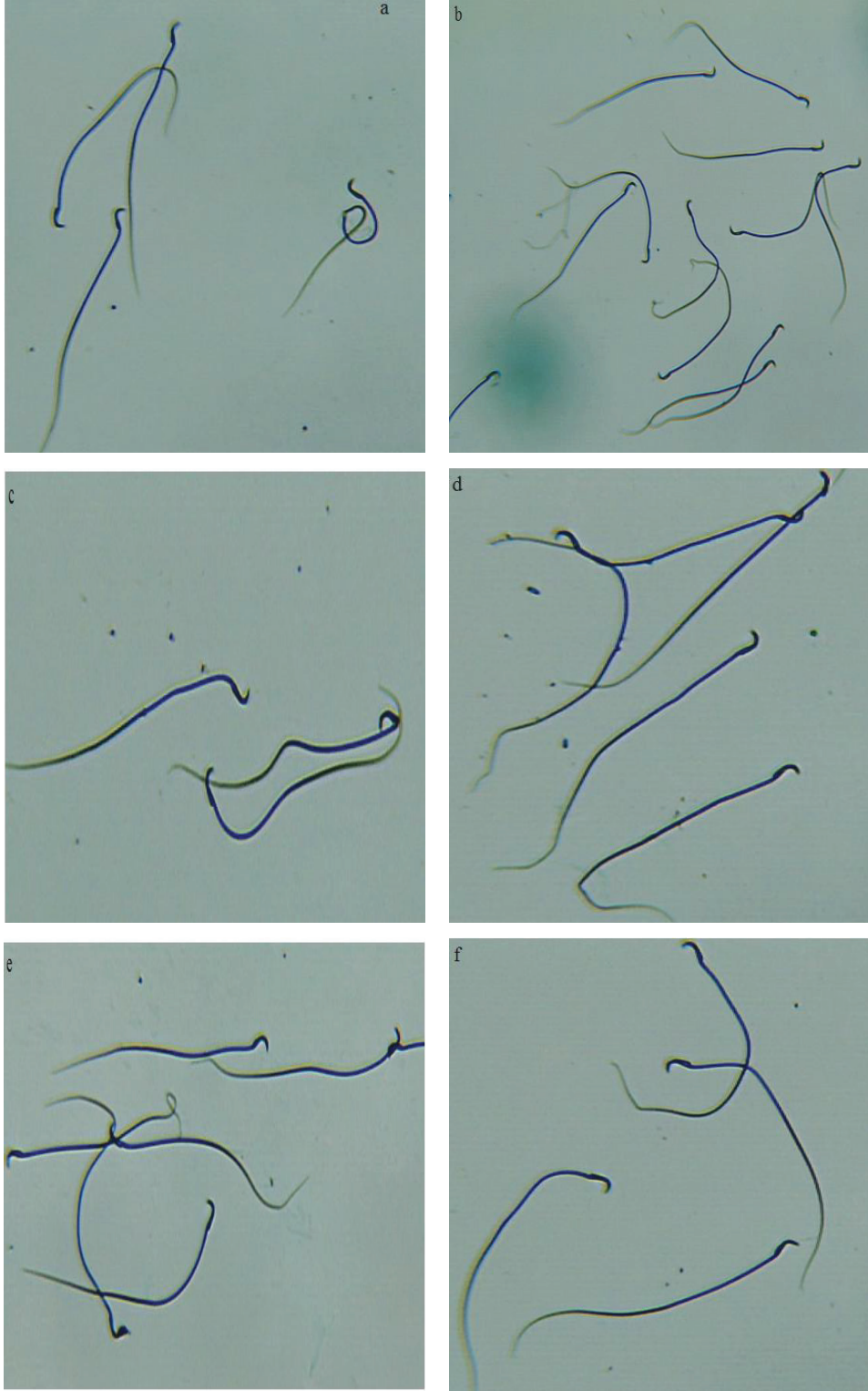
Değişik küçük (a, b ve c: $P < 0.01$) ve büyük (A ve B: $P < 0.05$) harf taşıyan değerler arasındaki farklılıklar istatistikî açıdan anlamlıdır.



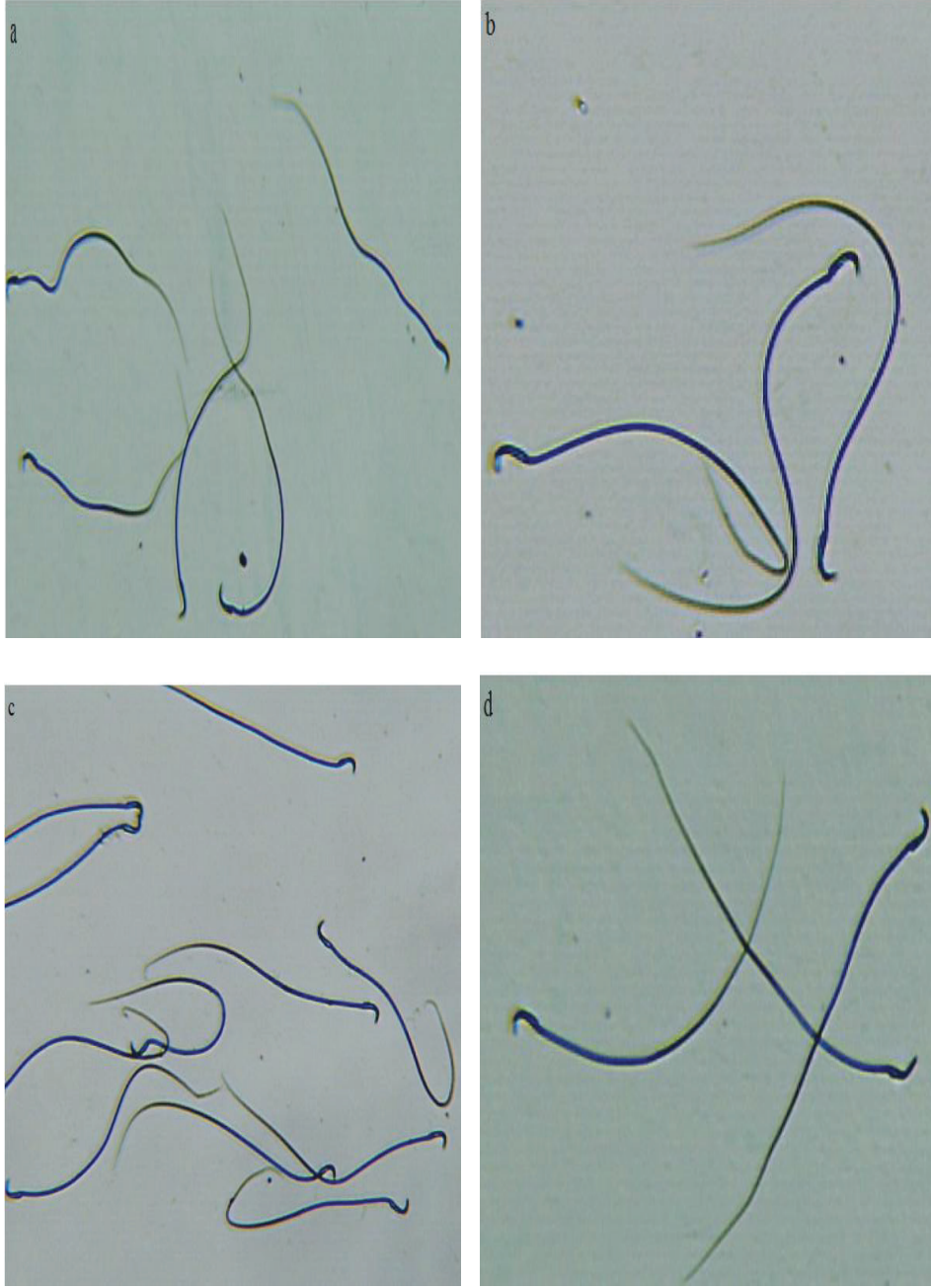
Şekil 16. Kontrol (Grup I.) Normal görünümlü spermiler. Spermac (Stain Enterprise, Willington) boyası 400X.



Şekil 17. Cyfluthrin (Grup II) uygulamasına bağlı olarak oluşan baş ve kuyruk anomali gösteren spermler (a,b,c,d,e,f). Baş ve kuyruk kısmında kopmalar mevcut Spermac boyası 400X.



Şekil 18. Cyfluthrin ve benfotiamin (Grup III.)' in birlikte uygulanmasına bağlı olarak anormal sperm görünümünde azalma (a,b,c,d,e,f). Baş ve kuyruk kısmında iyileşmeler mevcut. Spermac (Stain Interprise, Willington) boyası 400X.

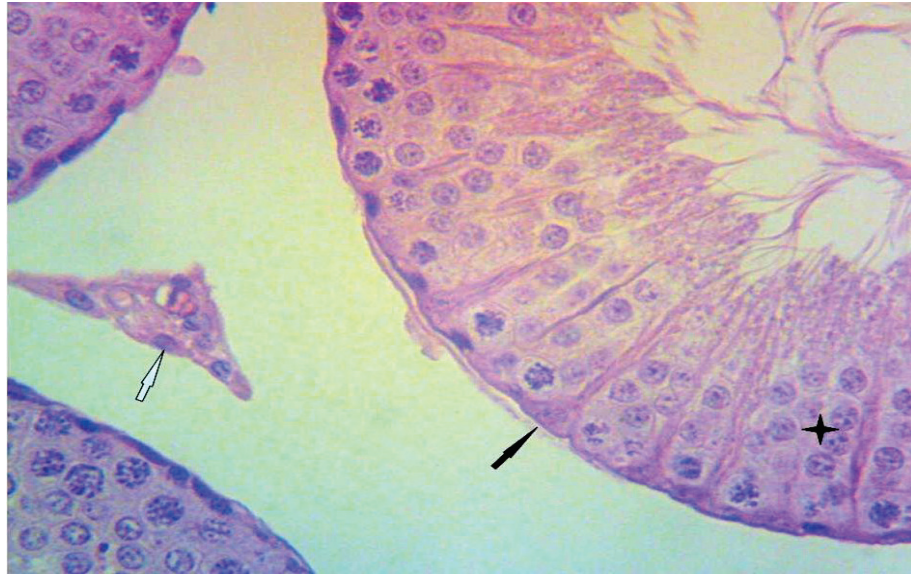


Şekil 19. Benfotiamin (Grup IV) uygulaması sonucunda normal sperm görüntüleri. Kontrol grubundakine benzer normal görünümlü sperm (a,b,c,d). Spermac (Stain Interprise, Willington) boyası 400X.

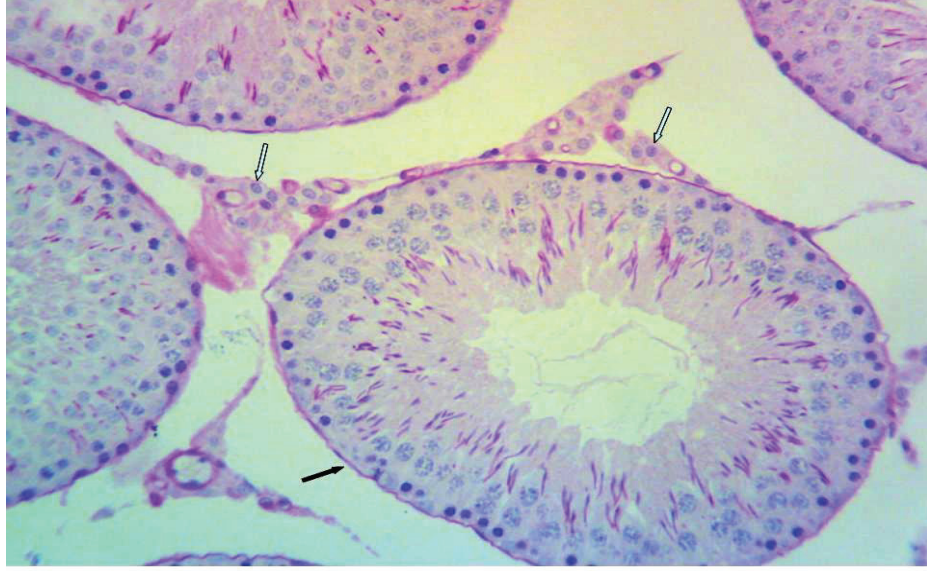
5.3. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol grubuna ait sıçanların testis dokuları incelendiğinde seminifer tübüller, seminifer tübüllerin bazal laminası tübüller içinde yer alan spermatogenik seriye ait hücreler ve Sertoli hücreleri, seminifer tübüller arasında yer alan Leydig hücreleri normal yapıda gözlemlendi Şekil (20,21).

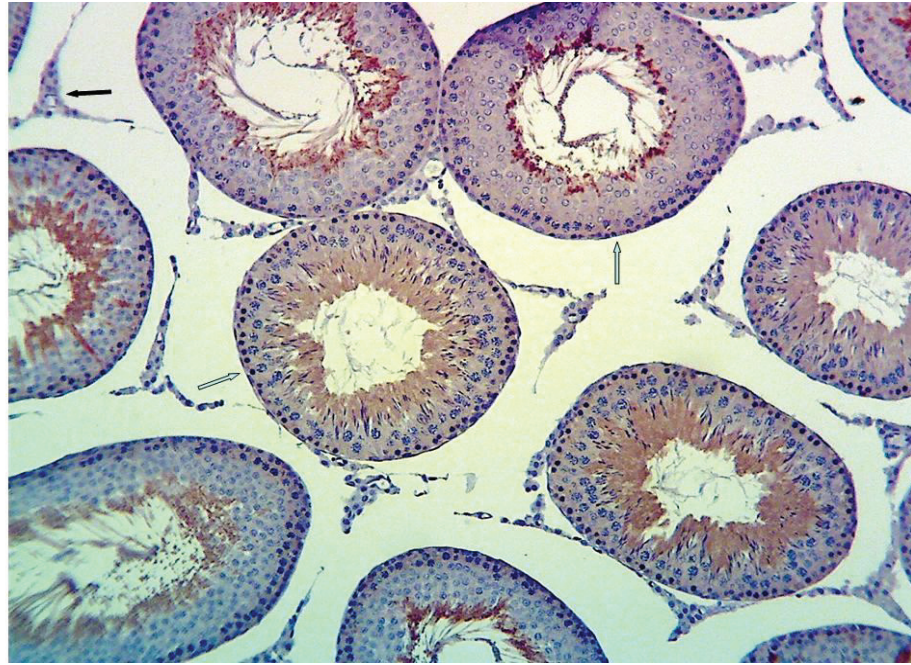
Bu grupta HSP 70 immün reaktivitesi , sadece adluminal kompartımanın apikalinde yer alan spermatid ve spermiyumlarda ayırt edildi. İnterstiyeel Leydig hücrelerinde, spermatogonia, primer spermatosit ve Sertoli hücrelerinde HSP 70 immün reaktivitesi gözlenmedi Şekil (22- 24).



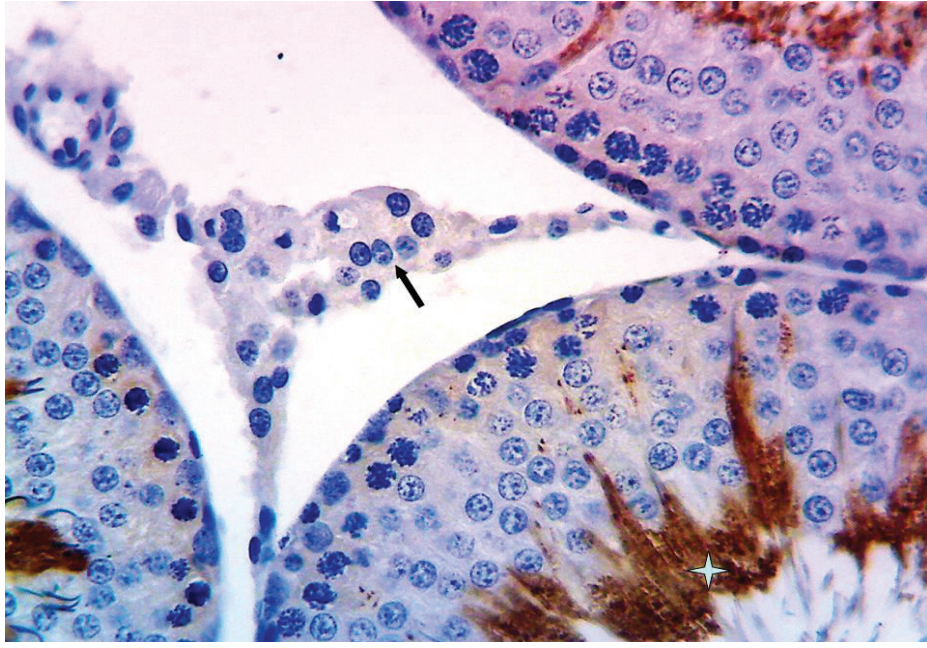
Şekil 20. Grup I. Normal testiküler morfoloji ve spermatogenezis. Seminifer tübül bazal laminası (➡), seminifer tübül epitelinin oluşturan germ hücreleri (★) ve interstisyel Leydig hücreleri (⇨) normal yapıda ayırt edilmekte H&E X 40.



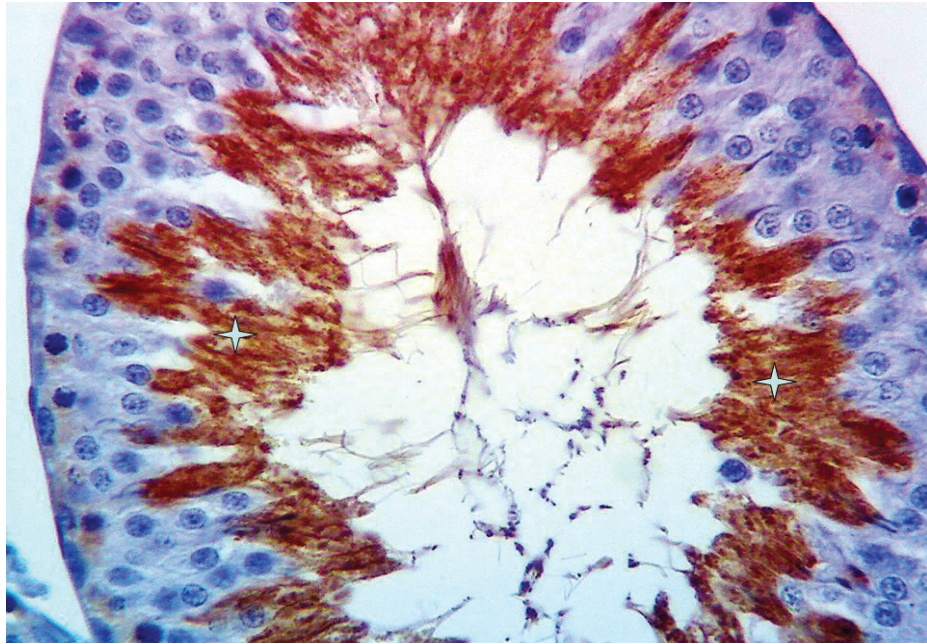
Şekil 21. Grup I. Seminifer tübül bazal laminasının (—→), germinal epitelinin ve interstisyel bölgede bulunan Leydig hücrelerinin (⇨) normal yapıda olduğu ayırt edilmekte. PAS X 20.



Şekil 22. Grup I. Seminifer tübüllerin (⇨) adluminal kompartmanlarının lümene yakın olan hücrelerinde HSP 70 immünreaktivitesi ayırt edilmektedir. İnterstisyel bölgede bulunan Leydig hücrelerinin (—→) ise HSP 70 (-) olduğu gözlenmektedir. X 10.



Şekil 23. Grup I. Seminifer tübüllerin adluminal kompartmanlarında bulunan hücrelerin HSP 70 immünreaktivitesi (✧) ve interstisyel bölgedeki Leydig hücrelerinin HSP 70 (-)' liği (—→) gözlenmektedir. X 40.



Şekil 24. Grup I. Adluminal kompartmanda bulunan spermatogenik seriye ait olan hücrelerin HSP 70 ekspresyonu (✧) X 40.

Beş hafta süresince cyfluthrin uygulanan grup II' ye ait olan kesitlerde seminifer tübül epitelinde yer yer önemli sayılabilecek derecede dejenerasyon, atrofi, seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücrelerin bazılarının metafaz, bazılarının anafaz arrestinde olduğu ve spermatogenezisin inhibe olduğu gözlemlendi. Bazı seminifer tübüllerin epitelinin bazal laminalarından ayrıldığı, bazı tübüllerin bazal laminalarında belirgin invaginasyonların olduğu tespit edildi (Şekil 25- 28).

Bazı seminifer tübüllerin lümeninde henüz olgunlaşmalarını tamamlamamış olan spermatogenik hücrelerin döküldüğü gözlemlendi (Şekil 29).

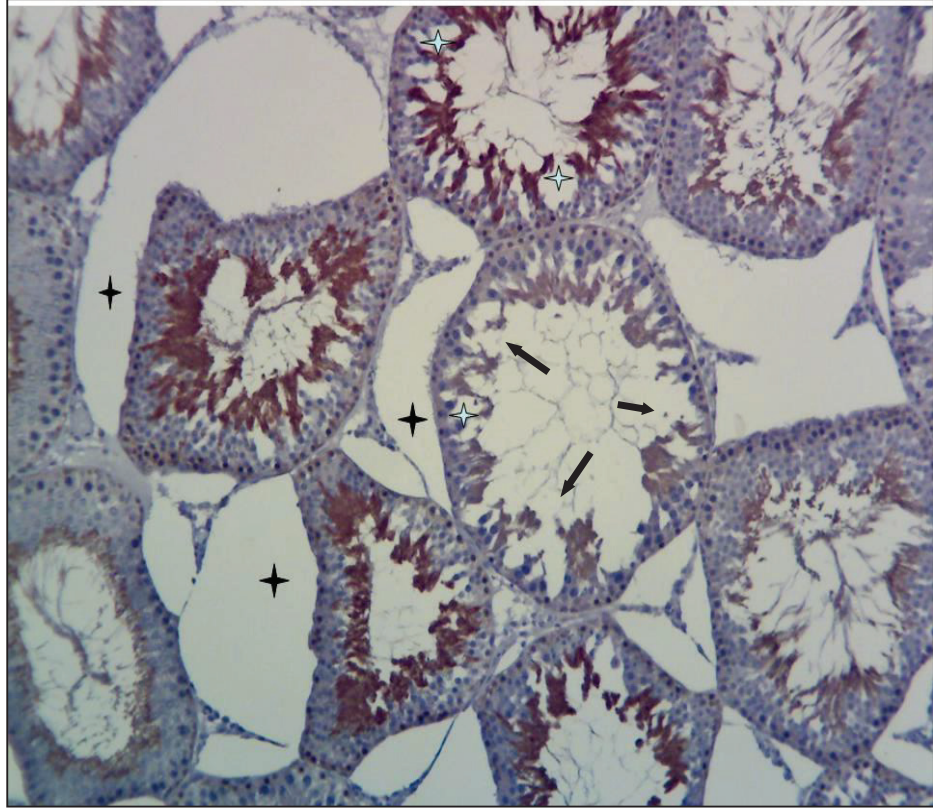
Bu gruba ait kesitlerde, HSP 70 immünreaksiyonu spermatid ve spermatozoaların yanı sıra kontrol grubundan farklı olarak spermatogonialarda ve primer spermatositlerde de gözlemlendi. İnterstiye Leydig hücreleri ve Sertoli hücreleri bu grupta da HSP 70 (-) olarak tespit edildi (Şekil 30-34).



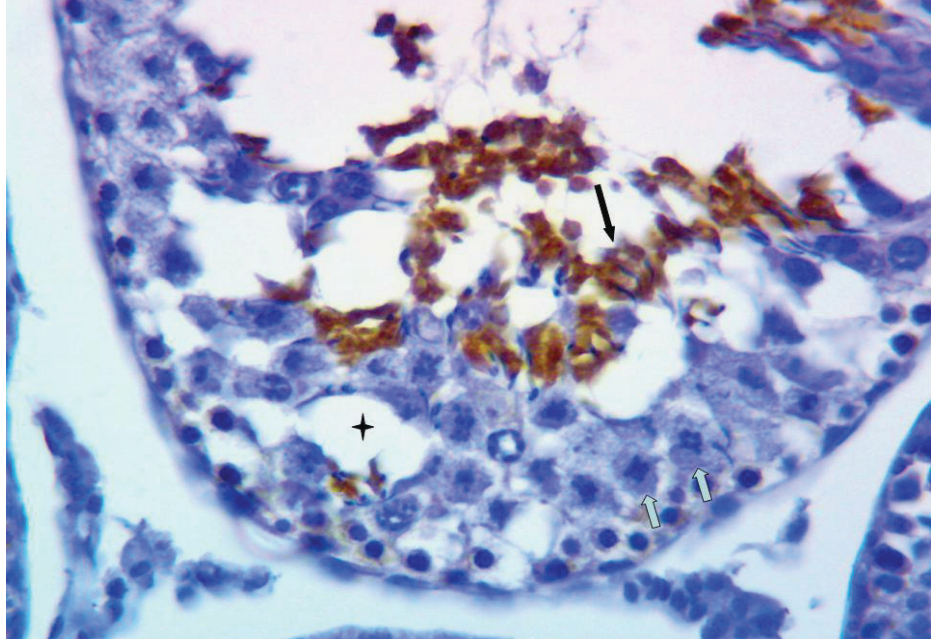
Şekil 25. Grup II. Cyfluthrin uygulamasına bağlı olarak seminifer tübül bazal laminasında invaginasyonların ($\Rightarrow$) ve seminifer tübül germinal epitelinde yer yer dejenerasyonların olduğu ($+$) ayırt edilmekte PAS x 20 .



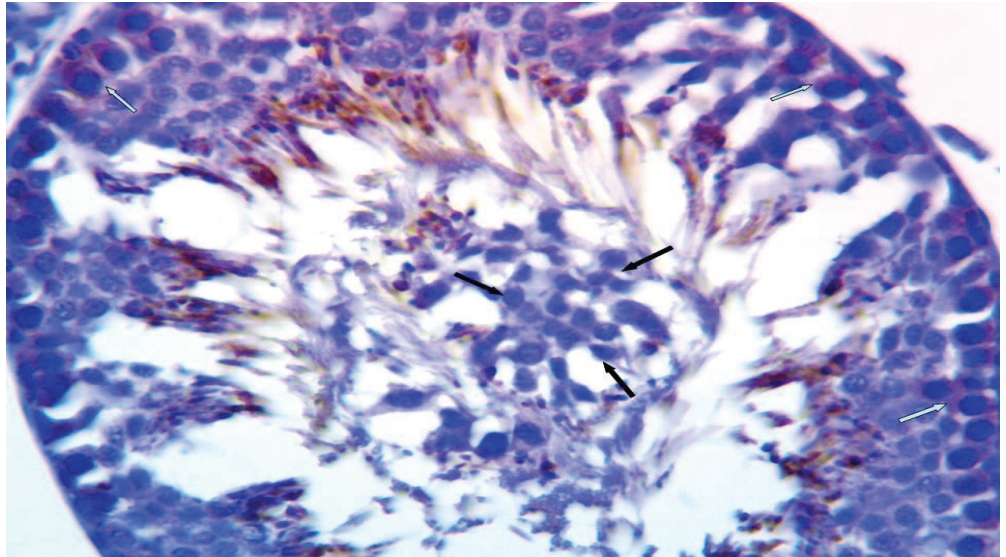
Şekil 26. Grup II. Seminifer tübül bazal laminasında belirgin invaginasyon ($\Rightarrow$) PAS X 40.



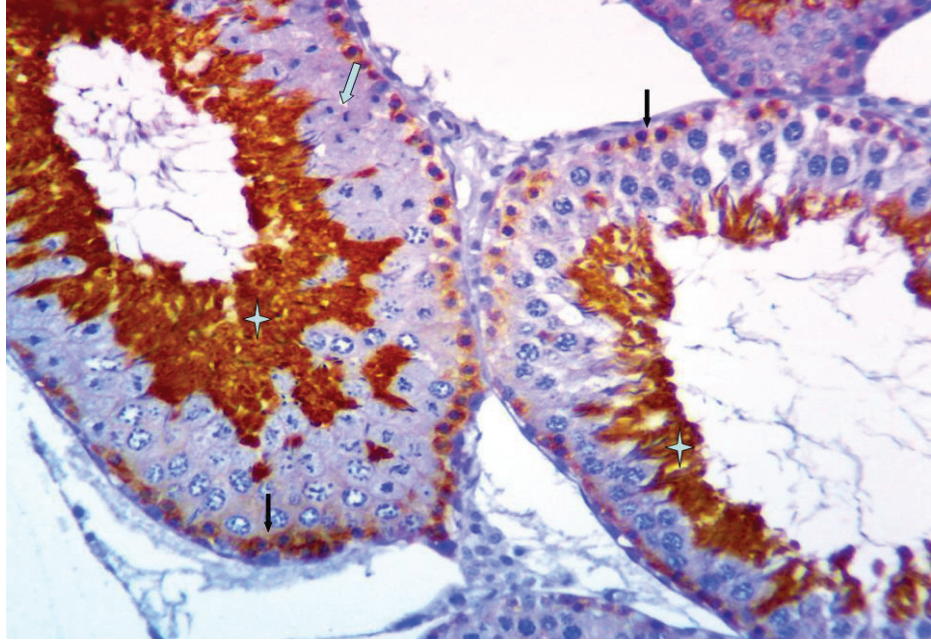
Şekil 27. Grup II. Cyfluthrin uygulamasına bağlı olarak seminifer tübül epitelinde dejenerasyon (✧) , bazal laminada ayrılmalar (✦), seminifer tübül epitelinde atrofi (➔) ve germinal epitelin apikal hücrelerinde HSP 70 immünreaktivitesi ayırt edilmekte X 10.



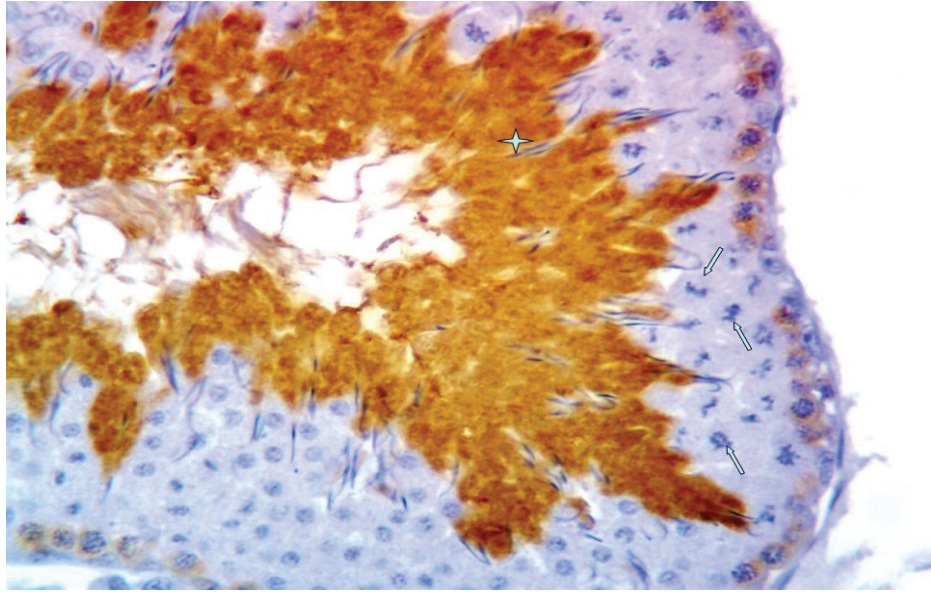
Şekil 28. Grup II. Germinal epitelde dejenerasyon (✚) ve heterokromatik çekirdekli ve kontürleri düzensiz hücreler (⇔) gözlenmekte. Epitelin apikal hücrelerinde belirgin HSP 70 immünreaktivitesi (➡) X 40.



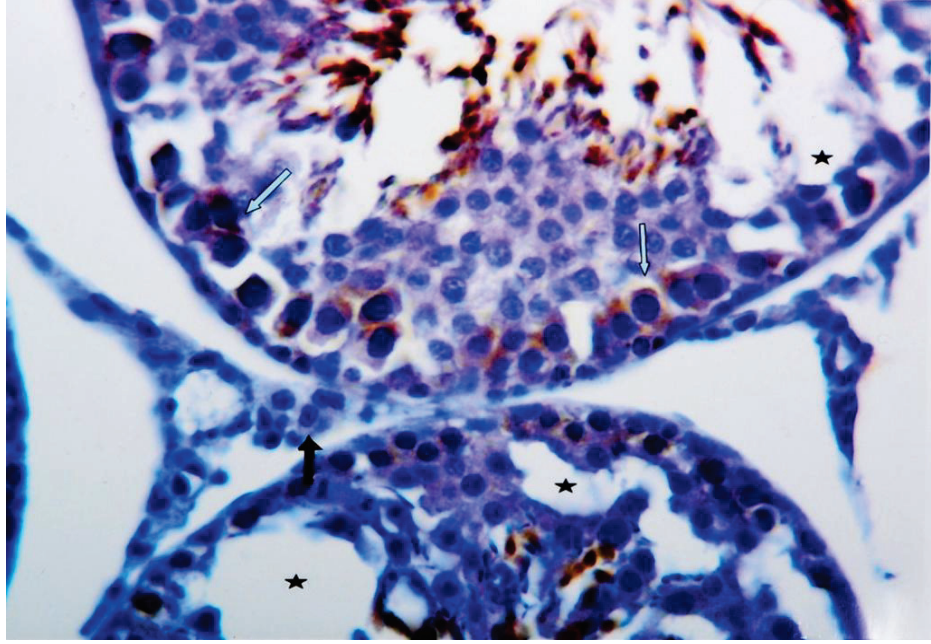
Şekil 29. Grup II. Seminifer tübül lümeninde henüz olgunlaşmasını tamamlamamış spermatogenik seriye ait hücreler gözlenmekte (➡). Kontrol grubundan farklı olarak HSP 70 immünreaktivitesinin germinal epitelin apikal hücrelerinin yanı sıra primer spermatositlerde de açıkça çıktığı (⇔) izlendi X 40.



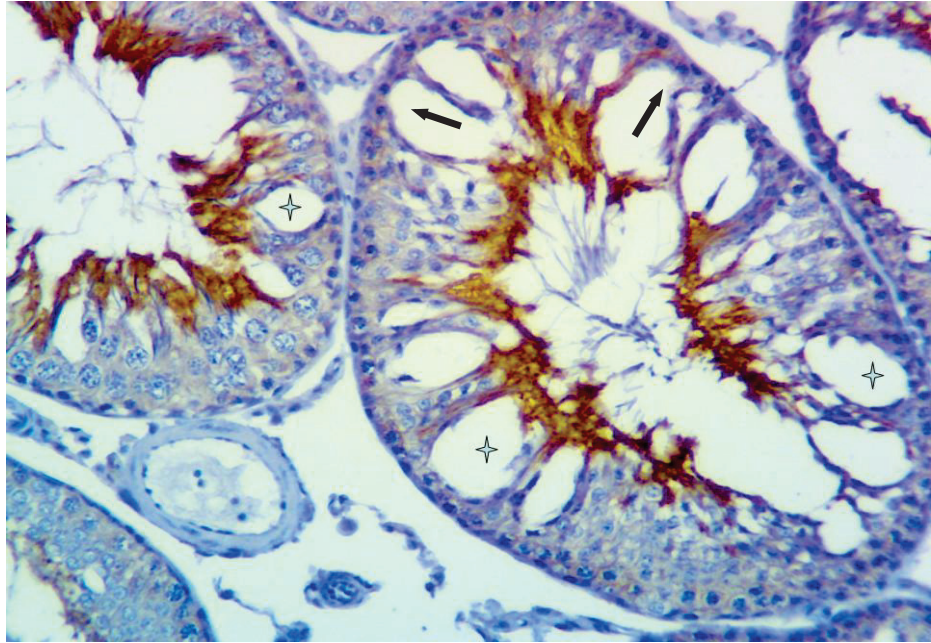
Şekil 30. Grup II. Cyfluthrin uygulamasına bağlı olarak germinal epitelyum hücrelerinde anafaz arresti ($\Rightarrow$), adluminal kompartmanda yer alan germinal hücrelerde ($\star$) ve spermatogonialarda ($\blackrightarrow$) belirgin HSP 70 immünreaktivitesi gözlenmekte X 20.



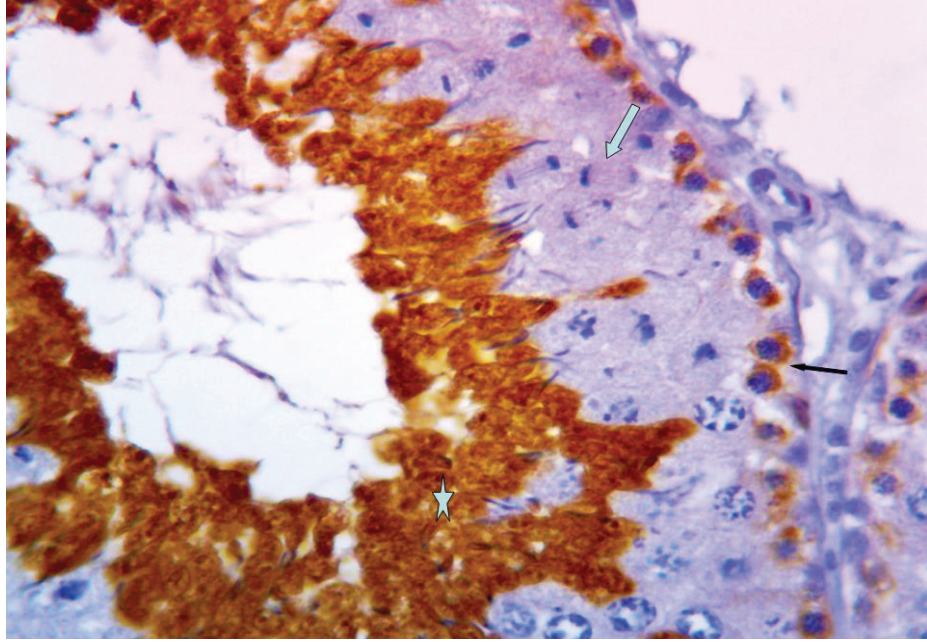
Şekil 31. Grup II. Germinal epitelde metafaz arresti ($\Rightarrow$), adluminal kompartmanda ($\star$) HSP 70 immünreaktivitesi ayırt edilmekte X 40.



Şekil 32. Grup II. Primer spermatositlerde (⇒) ve germinal epitelin apikalinde bulunan hücrelerde HSP 70 immünreaktivitesi ve germinal epitelde dejenerasyon ayırt edilmekte (★). Leydig hücrelerinde HSP 70 (-)' liği gözlenmekte (→) X 40.



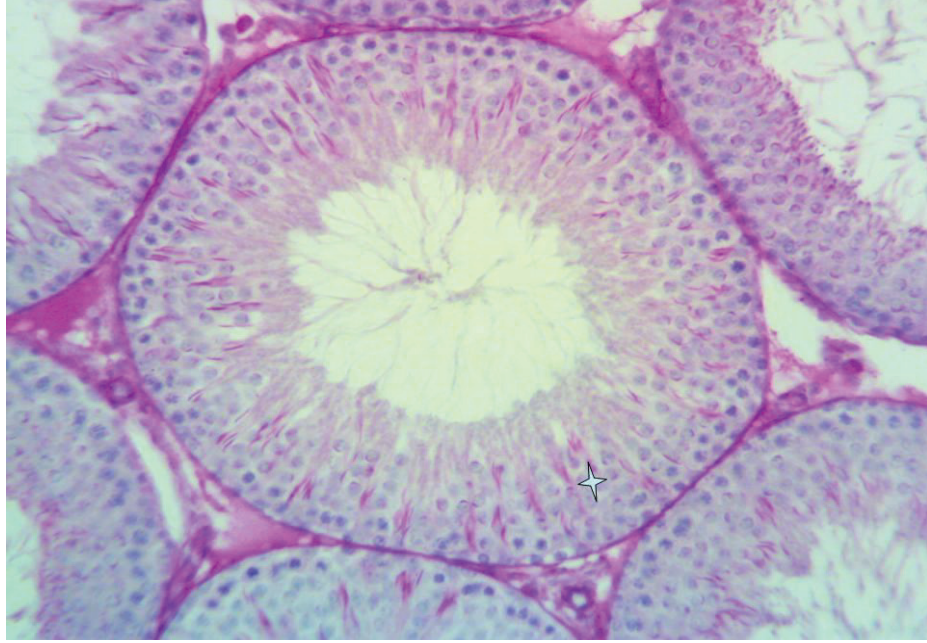
Şekil 33. Grup II. Seminifer tübül epitelinde yaygın dejenerasyon (☆) ve atrofi (→) ve epitelin apikal hücrelerinde belirgin HSP 70 ekspresyonu gözlenmekte X 20.



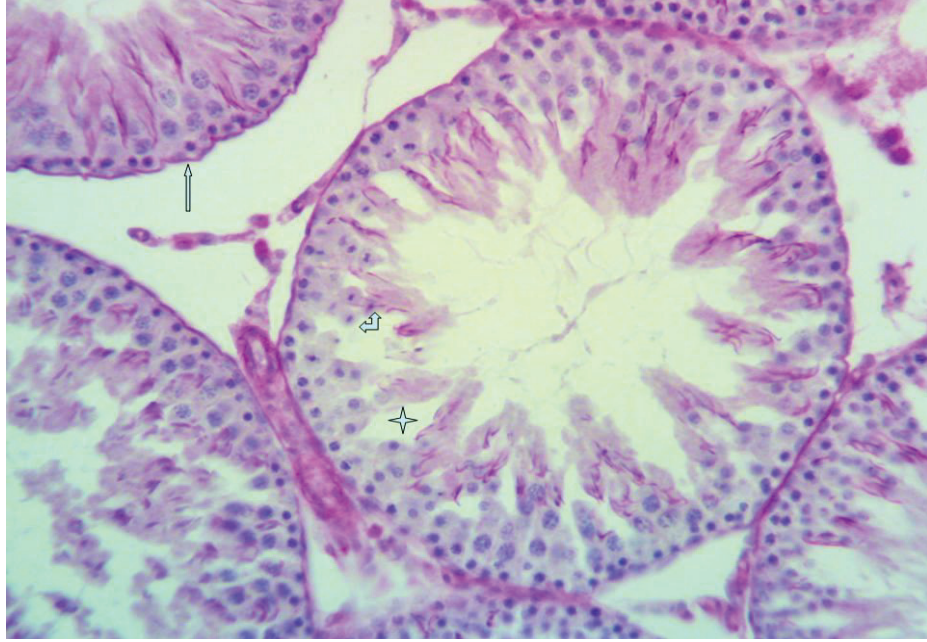
Şekil 34. Grup II. Germinal epitelde yer yer anafaz arresti ($\Rightarrow$), spermatogonialarda ($\rightarrow$) ve seminifer tübülün apikal hücrelerinde (☆) belirgin HSP 70 immünreaktivitesi X 40.

Cyfluthrin ile birlikte benfotiamin uygulanan deneklerin testis dokularında seminifer tübül epitelinin sadece cyfluthrin uygulanan gruba göre belirgin şekilde korunduğu tespit edildi. Bu grupta yer yer germinal epitelde hasar olan tübüllere rastlanmakla birlikte bu sayı cyfluthrin grubuyla kıyaslandığında ihmal edilebilecek düzeyde azdı. Birkaç seminifer tübülde gelişmekte olan spermatogenik hücrelerin metafaz arresti ve seminifer epitelin bazal laminasında invaginasyonlar ayırt edildi. Fakat genel anlamda seminifer tübül epiteli ve bazal lamina normal yapısını korumuş olarak gözlemlendi. İnterstisyel bölgedeki Leydig hücreleri de normal yapıda ayırt edildi (Şekil 35, 36).

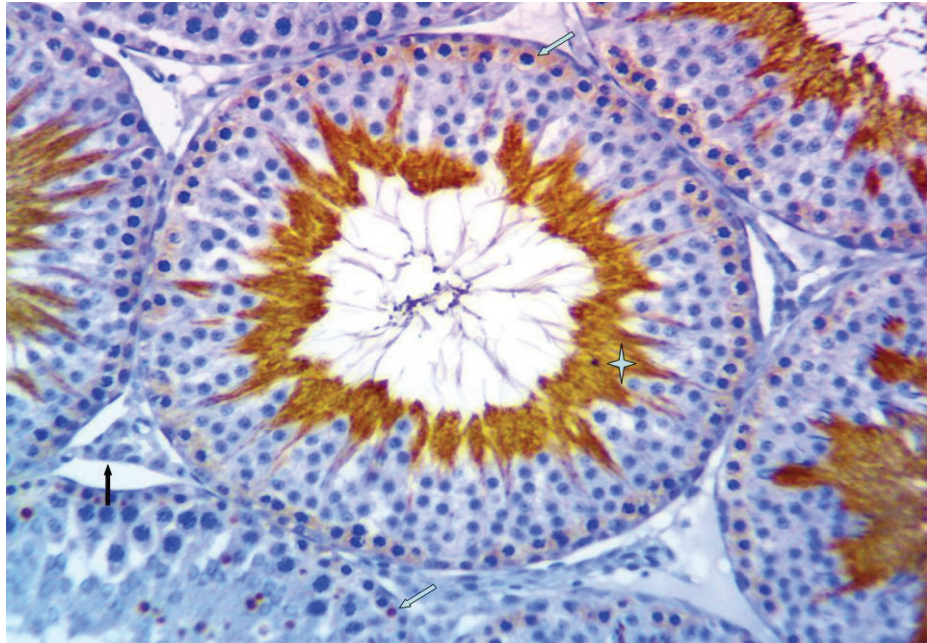
Bu grupta HSP 70 immün reaktivitesi çoğunlukla adluminal kompartımda yer alan spermatid ve spermatozoalarda gözlendi. Fakat yer yer HSP 70 (+) spermatogonia ve primer spermatositlere de rastlandı. Leydig ve Sertoli hücreleri bu grupta da HSP 70 (-) olarak tespit edildi (Şekil 37, 38).



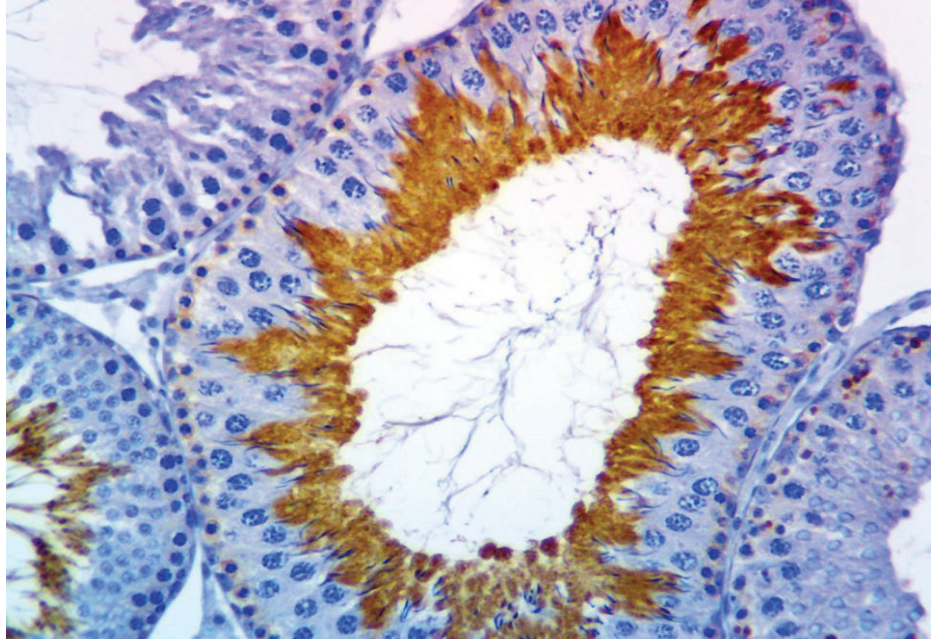
Şekil 35. Grup III. Cyfluthrin ile birlikte benfotiamin uygulanan grupta seminifer tübül bazal laminası ve germinal epitel (↖) kontrol grubuna benzer yapı sergilemektedir. PAS X 20.



Şekil 36. Grup III. Bazı seminifer tübüllerin bazal laminalarında invaginasyon (⇐), germinal epitelyum hücrelerinde matürasyon arresti (⇐) ve dejenerasyon (✦) ayırt edilmekte PAS X 20.



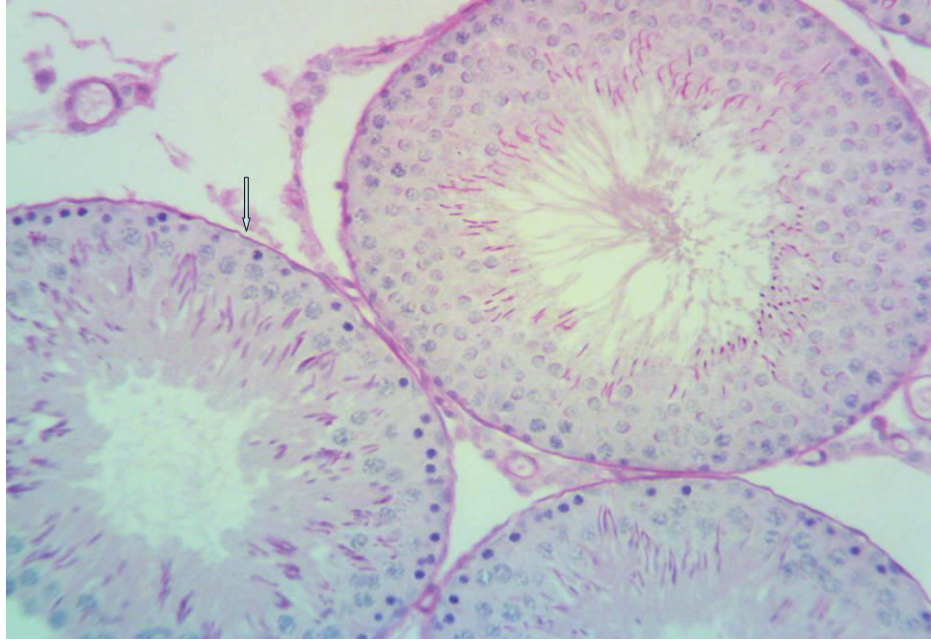
Şekil 37. Grup III. Germinal epitelin apikal hücrelerinde (✦) ve spermatogonialarda (⇐) HSP 70 immünreaktivitesi izlenirken interstisyel Leydig hücrelerinde HSP 70 (-)' liği ayırt edilmekte (➡) X 20.



Şekil 38. Grup III. Apikal seminifer tübül epitelinde yer alan germ hücrelerinde HSP 70 ekspresyonu X 20.

Benfotiamin uygulanan gruba ait kesitler kontrol grubuna benzer yapıda izlendi. Seminifer tübül epiteli, bazal lamina, spermatogenezis ve interstiyel Leydig hücreleri normal yapıda izlendi (Şekil 39,40).

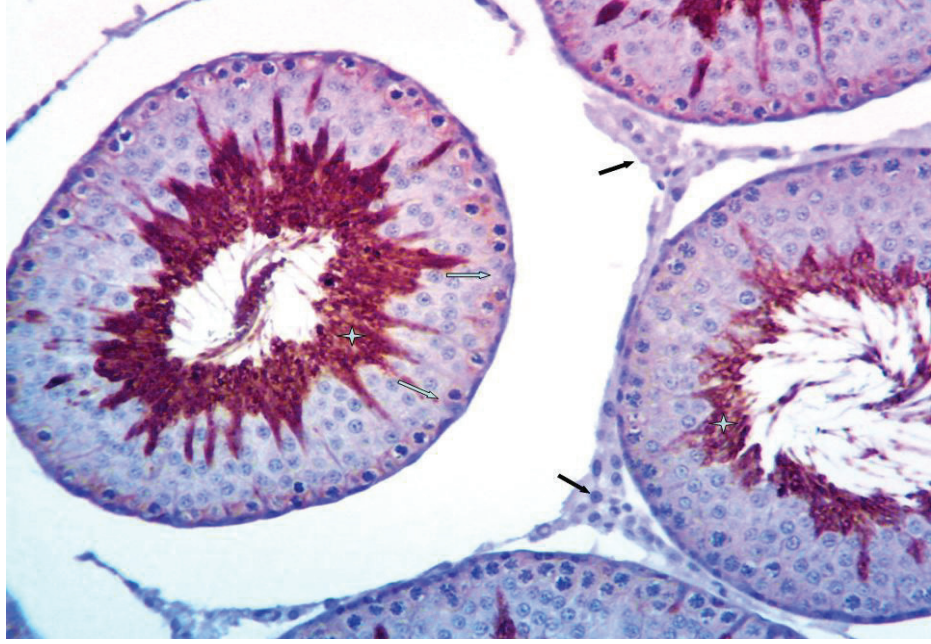
HSP 70 immün reaktivitesi de kontrol grubunda olduğu gibi adluminal kompartmanın apikalinde yoğunlaşmıştı. Leydig ve Sertoli hücreleri bu grupta da diğer gruplarda olduğu gibi HSP 70 (-) idi. Bu gruba ait kesitlerde spermatogenenezisin inhibisyonunu düşündürecek bir bulguya rastlanmadı (Şekil 41, 42).



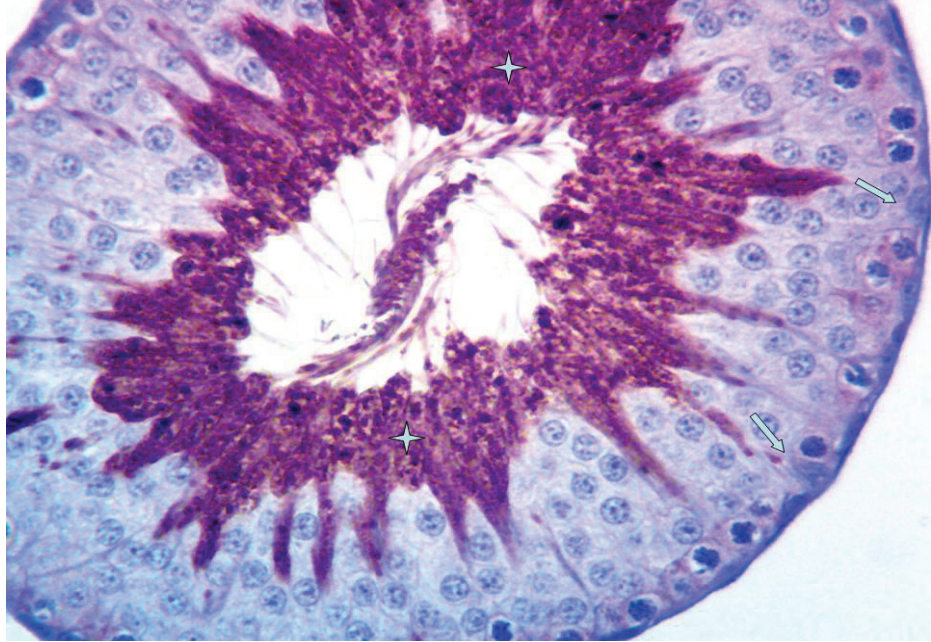
Şekil 39. Grup IV. Benfotiamin uygulanan grupta seminifer tübül bazal laminası ($\Rightarrow$) ve germinal epiteli kontrolle benzer yapıda gözlenmekte PAS X 20.



Şekil 40. Grup IV. Germinal epitelyum ($\Rightarrow$) ve Leydig hücreleri ($\Rightarrow$) kontrol grubuna benzer olarak izlenmekte. H&E X 20.



Şekil 41. Grup IV. Seminifer tübül adluminal kompartmanındaki hücrelerde belirgin HSP 70 immünreaktivitesi izlenirken (✦), interstisyel Leydig hücrelerinde (➡) ve Sertoli hücrelerinde (⇒) HSP 70 (-)' liği ayırt edilmekte X20.



Şekil 42. Grup IV. Apikal adluminal kompartmanda yer alan germ hücrelerinin belirgin HSP 70 immünreaksiyonu (✦ ve Sertoli hücrelerinin HSP 70 (-)' liği (⇒) X 40.

6. TARTIŞMA

Erkek infertilitesinin insanoğlunun son derece önemli sorunlarından biri olması nedeniyle, pestisitlerin muhtemel etkisi pek çok araştırmacının yakın ilgisini çekmiştir. Günümüze kadar testis gerek ışık ve gerekse elektron mikroskobu düzeyinde pek çok araştırmacıya konu olmuş, bu konuda oldukça fazla çalışma yapılmıştır. Yapılan ilk çalışmalar ışık mikroskobu düzeyinde olmakla beraber daha sonra elektron mikroskobu çalışmaları da ön plana çıkmıştır. Bugüne kadar iskemi, bazı vitaminlerin eksikliği, ısı, testiküler hastalıklar ve çeşitli kimyasal maddeler gibi pek çok toksik ajanın testise olan etkileri incelenmiş, önemli sonuçlara ulaşılmıştır (303 - 317).

Pestisitler, erkek infertilitesinin önemli nedenlerinden birini oluşturan gonadotoksinler grubunda yer alırlar. Bu toksinler etkilerini ya direkt germ hücrelerini etkileyerek ya da Sertoli hücre fonksiyonlarını baskılayarak yaparlar. Maruz kalma süresine göre sperm dansitesinde azalma veya ileri safhada ise kalıcı azospermiye neden olabilmektedirler (286, 318). Dünya pestisit pazarında herbisitler ve insektisitler en yaygın kullanılan formülasyonlardır. Türkiye’de birinci sırayı insektisitler alır. Deneysel çalışmamızda kullandığımız cyfluthrin de bu insektisitler arasında yer almaktadır (319, 320).

Cyfluthrinin de ait olduğu piretroid insektisitlerle ilgili yapılan araştırma çalışmaları az sayıdadır. Bu durum sentetik grubun diğerlerine göre çok daha güvenilir olduğu düşüncesinden kaynaklanmış olabilir.

Piretroid grubu dışında daha fazla araştırmaya konu olan insektisit ve pestisitleri sperm parametrelerinde meydana getirdiği değişimler açısından

incelediğimizde; etilen dibromidinin sperm sayısında, sperm motilitesi ve canlılığında önemli derecede azalmaya, anormal sperm sayısında artışa neden olduğu bildirilmiştir (335). Carbarylının (336) spermatogonyumların yapısal kromozomal aberasyon oranlarında artışa, spermiyogenezisin özellikle erken safhasında akrozom gelişiminde anormal bulguların ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir. Karbendazim (332), curacon (73), methamidophos (75) ve metil parathionun (81) sperm yapısal anormalliklerinin oranının artışına ve fertilitede azalmaya yol açtığı bulunmuştur. Quianlphos (74), phosphorothionate (71), phoxim (105), dimethoatin (72) sperm konsantrasyonunun düşmesine, dichlorvosın sperm anormalliklerinin görülme sıklığında artışa yol açtığı ortaya konmuştur (11).

Malathionun sperm baş morfolojisinde anormalliklere ve sperm hücrelerinin boyutlarında artışa (77), diazinonun spermatid hücrelerinin boyutlarında azalmaya ve spermatogenik hücre sıralarında bozulmaya sebep olduğu (79), dimethoate (329) ve dimethyl methylphosphate'ın (330) ise germ hücrelerinde dejenerasyon ve morfolojik olarak kamçıda kıvrılma, baş kısmında ayrılma olması gibi anormalliklere yol açtığı bildirilmiştir. Sperm parametrelerindeki bu değişimler deney hayvanlarına verilen doza ve zamana bağlı olarak değişiklik göstermiştir (77, 79, 329, 330).

Çalışma konumuzla ilgili piretroid grubuna ait araştırmalar diğer grup insektisitlere göre daha az olmasına rağmen, yapılan toksikolojik araştırmalar piretroid grubu insektisitlerin de erkek genital sistemi üzerinde zararlı etkilerinin olduğunu göstermektedir (12, 15, 18, 31, 34 ,36, 43, 52).

Kumar ve arkadaşları piretroid olan cypermethrin ile yaptıkları çalışmada anormal sperm başı içeren bulgulara rastlamışlardır (110).

Bir başka çalışmada piretroid gruba ait pestisitlerin progressif sperm hareketi üzerine olan etkileri çalışılmıştır. Ayrıca Çin’de Tan ve arkadaşları pestisit fabrikasında çalışan kişiler üzerinde pestisitlerin sperm motilitesini ve konsantrasyonunu azalttığını gösteren bir çalışma yapmışlardır (118). Yine cypermethrinin de sperm motilitesini azalttığını, anormal sperm oranını arttırdığını ve normal sperm sayısını düşürdüğünü gösteren çalışmalar da mevcuttur (97, 112 - 114).

Mani ve arkadaşları, fenvalerate piretroidinin epididimal sperm konsantrasyonuna ve sperm motilitesine olumsuz etkilerinin olduğunu göstermişlerdir (104).

Elbetieha ve arkadaşları cypermethrinin sperm üretimini, epididimal ve testiküler sperm konsantrasyonunu ve fertilitiyi azalttığını tespit etmişlerdir (111).

Piretroid grubuna ait insektisitlerden bifenthrin, permethrin ve cypermethrinin antiandrojenik etki gösterdiği in vivo ve in vitro çalışmalarda saptanmıştır (114, 120, 122). Buna karşın Kunimatsu ve ark. (124) permethrinin antiandrojenik etkilerinin in vivo şartlarda olmadığını Wu ve ark. ise cypermethrinin aksine β -cypermethrinin de antiandrojenik etkisinin olmadığını göstermişlerdir (114). β -cypermethrinin sperm sayısını, hareketliliğini, canlılığını azalttığı da gösterilmiştir (115).

Test materyalimiz olan cyfluthrinin in vivo ve in vitro şartlarda genotoksisite gösterdiğini belirten çalışmalar (12, 82) ayrıca androjen reseptörünün etkisini azaltan anti androjenik etki gösterdiğini (133) bildiren

alışmalar yapılmıştır. Sentetik piretroidlerin bir grubunun androjenik fonksiyonları etkiledikleri görölmüştür. Piretroid grupların anti androjenik etki gösterme derecesi küçükten büyüğe doğru; betacypermethrin, permethrin, beta cyfluthrin, cypermethrin, cyfluthrin, bifenthrin, flutamide olarak sıralanmıştır (133).

Sperm morfolojisi ile sperm fonksiyonları arasında anlamlı ilişki bulunduğu, bazı çalışmalarda da gösterilmiştir. % 4'ün üzerinde normal morfoloji gösteren spermelerde zona pellusida ile akrozom reaksiyonu geçirebilme potansiyelinin yüksek olduğu ortaya konmuştur (321). Diğer çalışmalarda da spermin zona pellusidaya bağlanmasında sperm morfolojisinin önemli bir gösterge olduğu savunulmaktadır (322).

Anormal morfolojili spermelerde DNA hasarı daha yüksek oranda bulunmaktadır. ICSI işlemi yapıldığında DNA hasarı yüzdesi ile fertilizasyon oranları arasında negatif ilişki olduğu gösterilmiştir. Motilitesi düşük spermlele ICSI yapılırken normal görünömlü sperm kullanılsa da bu hücrelerde DNA hasarı bulunma olasılığı oldukça yüksek olmaktadır (323). Ayrıca sperm morfolojisinin çeşitli otozomal ve spesifik Y genleri tarafından kontrol edildiği bildirilmiş (324, 325) ve pestisitlerin testiküler DNA hasarı yapabileceği (326) ve bazı mutajenlerin Y kromozomunda kırıklara sebep olabileceği belirtilmiştir (326, 327).

Sperm parametrelerinde bildirilen değışikliklerin kendi çalışmamızdaki cyfluthrin uygulanan grupta da ortaya çıktığını gördük. Cyfluthrin uygulanan sıçanların spermlelerinde baş ve kuyruk anomalilerinde artış olduğu ve bunun sonucunda toplam anomali oranında da önemli bir artışa neden olduğu göröldü.

Çalışmamızda, kontrol grubuna göre cyfluthrin grubunda sperm motilitesinde önemli derecede azalma olduğu görüldü. Cyfluthrine maruz bırakılan sıçanlarda sperm motilitesindeki azalma bir ya da daha fazla mekanizmayla bağlantılı olabilir. Bunlar ;

Testise doğrudan inhibitör etki yapabilirler, hipofiz bezine etki ederek gonadotropin konsantrasyonlarını azaltabilir ve dolayısıyla bozulmuş spermatogeneze neden olabilirler, nörotransmitterlerin konsantrasyonlarını değiştirebilirler, yardımcı bezler tarafından fruktoz sentezi ve salgılanması testosteronun testisler tarafından salgılanmasına bağlıdır. Bundan ötürü eğer cyfluthrin antiandrojenik etki gösterip serum testosteron seviyesini azaltırsa, fruktoz sentezini ve salgılanmasını etkileyeceğinden sperm motilitesindeki azalmaya katkıda bulunabilir ve yine cyfluthrin spermilerin mitokondriyal enzim aktivitesini azaltabilir veya kan-testis bariyerini geçerek spermatogenik hücrelerde patolojik değişikliklere sebep olabilir. Sperm motilitesi, sperm mikrotübül yapısının bozulmasının bir sonucu olarak azalabilir. Cyfluthrinin ortaya çıkardığı anormal sperm sayısının artışı sperm motilitesindeki azalma ile sonuçlanabilir. Böylesi mekanizmalarla cyfluthrinin doğrudan veya dolaylı olarak testis dokusuna etkisi ile çalışmamızda elde ettiğimiz patolojik bulguların ortaya çıktığını söyleyebiliriz.

Yaptığımız deneysel çalışmada cyfluthrinin epididimal sperm yoğunluğunda önemli bir azalmaya, spermatogeneziste inhibisyona neden olduğu görüldü. Bazı seminiifer tübüllerdeki spermatogenik hücrelerin metafaz bazılarının ise anafaz arrestinde olduğu tespit edildi.

Bazı seminifer tübüllerin lümenine henüz olgunlaşmasını tamamlamamış spermatogenik hücrelerin döküldüğü gözlemlendi.

Laboratuvar incelemelerimizde cyfluthrine ait elde ettiğimiz bulgular ile cyfluthrinin sperm yapısını bozduğunu özellikle spermdeki morfolojik anomalileri arttırdığını ve motiliteyi azalttığını gördük. Bunun sonucunda cyfluthrinin hem sperm- zona pellusida bağlanmasına zarar verebileceğini hem de DNA hasarına yol açabileceğini düşünebiliriz. Bu nedenle cyfluthrinin erkeğe özgü infertiliteyi arttırıcı yönde etki göstereceğini söyleyebiliriz.

Erkeğe özgü infertilitenin yanı sıra tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada gebelik boyunca cyfluthrine maruz kalan tavşanların, maruz kalmayanlara göre daha çok düşük yaptığı gösterilerek cyfluthrinin kadın fertilitesine de olumsuz etkisinin olduğu ortaya konmuştur (33).

Piretroid grubu dışındaki insektisit ve pestisitlerin testis dokusunda meydana getirdiği değişiklikler de araştırılmıştır. Metomilinin seminifer tübüllerde dejeneratif değişikliklere yol açtığı (69), methyl parathionun seminifer tübüllerde nekroz ve interstisyel dokuda ödem oluşturduğu bildirilmiştir (78). Organofosfatlı insektisitlerin seminifer tübüllerin bazal membranında bozulmalara yol açtığı ortaya konmuştur (76, 313).

Karbendazimin, duktuli efferenteslerde tıkanma meydana getirdiğine, tübüler epitelde dökülmeye ve atrofiye, bazal laminanın düzgün yapısını kaybederek kalınlaşmasına ve kıvrıntılı bir hal almasına neden olduğu gösterilmiştir (332). Quianlphosun germinal epitelde dejenerasyona, methamidophosun seminifer epitelin kollabe olmasına, hücre hasarında artış ve hatta germinal epitelin ortadan kalkmasına ve interstisiyel bölgede granüler

birikimler ve vakuoller oluşmasına neden olduğu bildirilmiştir (74). Danimarka’da yaygın olarak kullanılmakta olan 24 adet pestisit üzerine yapılan geniş kapsamlı bir araştırmada bu pestisitlerin germinal epiteli gevşettiği ve düzensizleştirdiği bildirilmiştir (333). Diazinonun (79) seminifer tübül lümenlerinde dilatasyonlara, metil parathionun seminifer tübül hasarına ve bazı seminifer tübüleri döşeyen epitelde incelmeye, seminifer tübül epitelinde dökülmelere yol açtığı görülmüştür (78, 334).

Piretroid grubu insektisitlerden β -cypermethrinin, Leydig hücrelerinin mitokondri ve endoplazmik retikulum (E.R) organellerinde şişmeye, çekirdek membranında hasara yol açtığı, Leydig hücre sayısında ve seminifer tübül germ hücrelerinde azalmaya neden olduğu gözlenmiştir (115).

Yaptığımız çalışmada cyfluthrin uygulamasına bağlı olarak seminifer tübül epitelinde dejenerasyon, seminifer tübül bazal laminasında invaginasyonlar ve bazı tübüllerin epitelinin bazal laminalarından ayrıldığı gözlemlendi.

Piretroid grubu dışındaki insektisit ve pestisitlerin vücut ve organ ağırlıkları üzerine olan etkileri incelendiğinde dichlorvosun 1, 2 ve 4 mg/kg dozlarının üreme organlarının absolut ağırlıklarında önemli değişikliklere neden olmadığı, rölatif testis ve epididimisin ağırlıklarının ise sadece 4 mg/kg uygulanan grupta önemli ölçüde arttığı ortaya konmuştur (70). Başka bir çalışmada ise dichlorvos uygulamasından 4 ve 7 hafta sonra sıçanların vücut ve organ ağırlıklarında azalma meydana geldiği gözlenmiştir (11).

Organofosfatlı insektisitlerin deney hayvanlarında vücut ve organ ağırlıklarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. (78, 337, 338). Fenitrothionun genital organ ağırlıklarına etkisi olmadığı (80), metil parathionun testis

ağırlıklarında (339) ve vücut ağırlığında azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (81). Dimethyl methylphosphatın da doz değişimine bağlı olarak testis ağırlığını azalttığı tespit edilmiştir (329, 330).

Piretroid grubu insektisitlerden ise fenvalerate piretroidinin testis ağırlığına azaltıcı etkisi olduğu (104), Cypermethrinin seminal bez epitelyum yüksekliğini arttırdığı, testesterona duyarlı organların ağırlığını azalttığı saptanmıştır (112 - 114). Bir başka çalışmada ise β -cypermethrinin prostat, testis ve seminal vezikül ağırlıklarını azalttığı tespit edilmiştir (115).

Ratnasooriya ve arkadaşları piretroid olan lambda-cyhalothrin ile erkek sıçanlarda üreme davranışları üzerine yaptıkları çalışmada, sıçanlarda seksüel fonksiyon kayıplarının olduğunu bildirmişlerdir. Vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilememiş ancak kontrol grubuna göre cyhalothrinli grubun daha düşük düzeyde olduğu görülmüştür (116).

Cyfluthrinin ise belirgin bir şekilde seminal vezikülde, ventral prostatta, dorso lateral prostatta, levator ani bulbocavernosus kasında (LABC) ve Cowper bezlerinin ağırlığında azalmaya yol açtığı saptanmıştır (133).

β -Cyfluthrin için ise sadece üreme bezlerinin ağırlığını önemli bir ölçüde azalttığı saptanmıştır (133).

Bir başka çalışmada, sıçanlara cyfluthrin uygulaması sonucunda yavruların viabilitesinde azalma ve kilo kaybının olduğu bildirilmiştir. Bunun besin alımına bağlı olarak meydana geldiği tahmin edilmektedir. Çünkü besin alımının bu gruptaki deney hayvanlarında kontrole göre daha az olduğu gözlenmiştir (125, 131).

Biz yaptığımız bu çalışmada testis ağırlığı açısından gruplar arasında önemli bir farklılık bulamamamıza rağmen, cyfluthrin uygulamasının epididimis, sağ kauda epididimis, seminal bez ve prostat ağırlığında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı azalmalara neden olduğunu saptadık. Epididimisteki azalmalara hücrelerin sayısındaki azalmanın yol açtığını düşünebiliriz.

Cyfluthrin maruziyetine bağlı olarak gelişen testiküler hasar bulguları, daha önce cyfluthrinle ve piretroid gruba ait diğer pestisitlerle yapılmış çalışmalarda elde edilen bulgularla paralellik göstermektedir.

Ayrıca cyfluthrine ait spermatogenik ve testiküler bulgularımızın diğer farklı grup insektisitlerle ve pestisitlerin etkileriyle paralellik göstermesi cyfluthrinin ait olduğu piretroid grubun etkilerinin diğer gruplarla benzer olduğunu ortaya koydu. Bu da ait oldukları grupların da kıyaslanması ve değerlendirilmesi açısından bir veri oluşturmaktadır.

Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda piretroid gruba ait olan pestisitlerin daha güvenli kullanabileceği konusunda genel bir kanı vardır. Oysa piretroid grubunda yer alan cyfluthrin ile yaptığımız bu çalışmada infertiliteye neden olabilecek ciddi bulguların elde edilmesi piretroidlerin de diğer organofosforlu ve organoklorlu pestisitler kadar toksik olabileceği fikrini doğurdu.

Benfotiaminin araştırma konumuzla ilgili koruyucu etkilerine yönelik bir çalışma bulunmamaktadır. Fakat tiaminin spermatogenezisde rol oynadığına ve spermde bulunduğuna yönelik bulgular vardır. Tiamin eksikliğinde ya da yetersiz alımında spermatogenezis ve sperm parametrelerinde olumsuz sonuçların ortaya çıktığını belirten çalışmalar mevcuttur (191 - 194).

Spermatogenezis tiamine ihtiyaç duyar, spermatogenezisin tiamine duyduğu yüksek-ilgi tiamin taşıyıcı protein 1 (ThTR1) eksikliği gösteren transgenik farelerde kanıtlanmıştır (191). Yüksek doz tiamin verilen sıçanlarda tiaminin, spermatogenezisde verimsizliğe yol açtığı bunun da muhtemelen yüksek doza karşılık yetersiz kalan tiamin taşıyıcısı eksikliğinden olabileceği düşünülmüştür (192). Bu sonuç, araştırmacıların spermatogenezisde tiamin taşıyıcılarının ve metabolizmasının etkili olduğunu ortaya koymuştur. Araştırmacılar erkeğe özgü infertiliteyi yüksek tiamin duyarlı tiamin taşıyıcılarının yetersiz oluşuna bağlamışlardır. Ayrıca buna karşın Sertoli ve Leydig hücrelerinin ise tiamin eksikliğine dayanıklı olduğunu bildirmişlerdir (191). Bununla birlikte diyetle alınan yetersiz tiaminin spermatosit sayısını azalttığını ve aspermiye neden olduğunu belirten çalışmalar da vardır (192).

Bir başka çalışmada, spermin tamamının tiamin, tiamin mono fosfat (ThMP) ve tiamin di fosfat (ThDP) 'ı değişen oranlarda içerdiği gösterilmiştir. Bu alışmada ThDP içeriği ile semendeki ml'ye düşen spermatozoa sayısı arasında pozitif bağlantı (azoospermik olgular bu bağlılığa dahil edilmemiştir. Azospermik vakalarda ThDP kontrol grubuna göre düşük bulunmuştur) görülmüştür. ThDP dışında tiamin ile ThMP için önemli bir bağlantı bulunmamıştır. ThDP içeriği ile semendeki ml'ye düşen spermatozoa sayısı arasında pozitif bağlantı bulunmasına karşın spermatozoa ThDP içeriği ile hareketlilik oranı arasında önemli bir ilişki tespit edilememiştir. Bu sonuçlar ThDP' ın temel olarak spermatozoa içinde lokalize olduğunu göstermektedir (193). Bu sonuç, aynı zamanda semenden hazırlanan seminal sıvıda ThDP konsantrasyonunun düşük olduğunu gösteren sonuçlar tarafından da desteklenmektedir (193).

ThDP, pentoz fosfat yolundaki transketolaz için bir kofaktördür ve yolun oksidatif bölümünün kesintisiz akışının sürmesi için önemlidir. Deneysel olarak pentoz fosfat yolunun inhibisyonunun insan spermatozoasında progressif hareketliliği azalttığı gösterilmiştir (195, 196). Bu yüzden yüksek düzeyde hareketli spermatozoaların yüksek bir ThDP içeriğine sahip olma yatkınlığı ile pentoz fosfat yollarının işlevlerinin bağlantılı olduğu düşünülmüştür. Pentoz fosfat yolu Nikotinamid adenin di nükleotid fosfat (NADPH) için temel kaynaktır. NADPH glutatyon redüktaz tarafından glutatyonun azaltımı için gereklidir. Redükte glutatyon, küçük sitoplazmik hacimleri yüzünden sınırlı olarak antioksidan kapasitesi gösteren spermatozoalarda antioksidan savunması için önemlidir (196).

Yapılan çalışmalarda çoğu nedenle testiküler kanser ya da farklı kaynaklı azospermi ve vazoktemi uygulanan hastalardaki azospermi olgularında ThDP miktarının az olduğu da saptanmıştır (193).

Yüksek doz tiaminin, vücut tarafından taşınımının yetersiz olduğu bunun nedeninin ise tiamin taşıyıcı mekanizmasının sınırlı olmasından kaynaklandığı ve buna bağlı olarak da spermatogeneziste verimliliğin azaldığı bildirilmiştir (191). Ayrıca diyetle alınan yetersiz tiaminin infertiliteye yol açabilecek şekilde spermatogenezisi olumsuz etkilediği de bildirilmiştir (192). Yapılan çalışmalarda tiaminin türevi olmasına rağmen benfotiaminin, tiamine göre daha etkin olduğu gösterilmiştir (144). Ayrıca benfotiaminin ThDP'nin miktarının artmasını ve aktifleşmesini sağladığını gösteren çalışmalar da yapılmıştır (145, 146).

Benfotiaminin, tiamine göre farmakolojik olarak çok daha küçük miktarlarının yaklaşık beş katı kadar daha hızlı bir emilime ve daha etkili biyo

elverişliliğe sahip olduğu için bazı hastalıkların tedavisinde tiaminin yerine tercih edilmesi gerektiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (144 - 147) .

Bu verilere göre tiamin için doz ayarlamasının önemli olduğunu söyleyebiliriz. Çünkü tiamin yüksek veya yetersiz dozlarda spermatogenezisde olumsuz etkiye yol açabilmektedir. Bundan dolayı tiamin ile kıyaslandığında düşük dozda daha etkili olan benfotiaminin, tiaminin yerine kullanılabileceğini düşünebiliriz.

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda da benfotiaminin sperm motilite, yoğunluk gibi parametreleri arttırdığını düşünürsek daha düşük dozda daha çok emilime sahip benfotiamin kullanımının erkeğe özgü infertilitede olumlu etki yapabileceğini söyleyebiliriz.

ThDP insan semeninde bulunmuş bir tiamin bileşiğidir. ThDP miktarının sperm hareketine ve spermatozoalardaki antioksidan savunmaya etkisinin olabildiği düşünülebilir (193).

Benfotiaminin ThDP' nin miktarının artmasını ve aktifleşmesinin sağladığını göz önünde tutarsak benfotiaminin pentoz fosfat yolunu (PFY) aktifleştireceğini, ayrıca semendeki ThDP'yi artıracakını düşünerek sperm motilitesindeki olumsuz etkileri iyileştirebilme ihtimalinin olabileceği iddiasını ortaya koyabiliriz. Çalışmamızın sonucunda, benfotiamin uygulamasının gruplarda, sperm motilitesini ve epididimal sperm yoğunluğunu artırması, cyfluthrine bağlı olarak oluşan toplam anormal sperm oranında ise azalmalar sağlaması bu iddayı destekler niteliktedir.

Benfotiaminin bir pestisit oluşturabileceği kimyasal bir strese karşı testiküler hasar ve sperm parametrelerine yönelik nasıl bir etkisinin olduğuna dair

bir çalışmaya rastlamadık. Genellikle bu yöndeki çalışmalar özellikle A, E ve C vitamini üzerine yoğunlaşmıştır. Bu vitaminlerin bazı çalışmalarda koruyucu bir etkiye sahip olduğu bazılarında ise etkisiz olduğu bildirilmiştir (11, 334, 339 - 350).

Vitaminlerin koruyuculuğunun, yapılan çalışmanın amacına ve vitaminin yapısına göre farklılık gösterdiği görülmektedir. Çalışmamız sonucunda cyfluthrinin sperm parametreleri üzerine (motilite, epididimal yoğunluk ve toplam anomaliler) oluşturduğu hasarı benfotiaminin kontrol grubu değerlerine yakın olacak kadar iyileştirdiğini gördük. Ayrıca cyfluthrinin oluşturduğu testiküler hasarı azalttığı, genel olarak normal yapıyı koruduğu görüldü. Yine benfotiamin cyfluthrin uygulamasıyla azalan epididimis ağırlığında, sağ kauda epididimis, seminal bez ve prostat ağırlığında sayısal artışlara neden oldu.

Bu uygulama sonucunda artan üreme organ ağırlıkları, epididimis ve prostat ağırlıkları kontrol grubuna yakın değerlere ulaştı. Bu sonuçlara göre benfotiaminin üreme sisteminde iyi bir koruyuculuğa sahip olduğunu söyleyebiliriz. Ayrıca cyfluthrin ile yapılan çalışmada meydana gelen testis hasarının serbest radikal oluşumundan da kaynaklanabileceği düşünülürse benfotiaminin serbest radikal oluşumunu önlediğine yönelik çalışmaların da olması bu yönde iyileştirmede bulunmasını açıklayabilir. Çünkü bu vitamin pentoz fosfat yolunu etkinleştirerek, reaktif oksijen türlerinin (ROT) oluşmasını engellemektedir. Diyabetin cinsel fonksiyon bozukluklarına neden olduğunu ve glikolizisin sperm canlılığı ve hareketi için temel enerji kaynağı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (119, 311).

Benfotiaminin de diyabet tedavisinde kullanıldığı ve etkili olduğunu gösteren çalışmalar yapılmıştır (149, 150). Bu açıdan da benfotiaminin diyabetin neden olabileceği olumsuz sperm parametrelerine ve cinsel fonksiyon başarısızlıklarına faydalı olabileceğini yeni bir yaklaşım olarak ortaya koyabiliriz.

Üreme toksikolojisi alanında stres ve HSP'nin etkileşimine yönelik çalışmalar önem kazanmaktadır. Çünkü intrinsik ve ekstrinsik faktörlerin geniş çeşitliliği; deoksiribonükleik asit (DNA) bozulmasına, protein sentez arrestine, hücre döngüsünün bozulmasına ya da uygunsuz apoptosize neden olabilir. Bunların tümü anormal spermatogenezisle sonuçlanabilir (359).

HSP 70 seviyeleri zararlı etki altında olmayan hücrelerde düşüktür. Stresin çeşitli şekillerinin uygulandığı hücrelerde aniden seviyesi artar. Kimyasal toksisite bu strese neden olabilir.

Stresten etkilenen HSP 70'in ekspresyonu hızla artar ve bunu takiben hücrelerde hasarlı proteinlerin onarımı başlar. Böylece intraselüler hasar önlenir, entegre hücre fonksiyonlarının devamlılığı sağlanır (224, 225).

Bazı araştırmalar ise HSP 70 proteininin artan sentezi ile kazanılmış stres toleransı arasında bir ilişki bulunduğunu göstermiştir (351, 352). Yapılan deneysel bir çalışmada HSP 'nin apoptozise karşı hücre koruyucu etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Hücrelere olan bu katkılarından dolayı stres durumlarında tüm organizmanın korunmasına yönelik faydaları vardır (353). İndüklenebilir HSP 70 apoptozisi, sinyal kaskadına müdahale ederek ve efektör kaspazların aktivasyonunu bozarak engeller (354). Özellikle HSP 70'in apoptozisi inhibe ettiği ve böylece öldürücü uyarılara maruz kalan hücrelerde yaşamı artırdığı gösterilmiştir (217, 355 - 358). Özen ve ark. yaptıkları çalışma sonucunda, kontrol

grubunda testiküler dokunun spermatogenetik hücrelerinin mayoz 1' in profaz safhasında HSP 70 sentezlediğini öne sürmüşlerdir. Buna göre strese maruz kalmayan spermatogenetik hücrelerde de HSP 70 immunoreaksiyonu tespit edilebilir görüşü ortaya çıkmıştır (359).

Subkronik (13 hafta) formaldehit uygulamasından sonra testiküler dokuda HSP 70 ekspresyonundaki değişiklikler immunohistokimyasal açıdan incelenmiş ve formaldehit inhalasyonu ile oluşturulan kimyasal stresin germ hücrelerinde HSP 70 immunreaksiyonunda artışa yol açtığı tespit edilmiştir (359). Bu çalışmada seminifer tübül çapları formaldehit maruziyeti ile önemli derecede azalmıştır. Spermatogenezis olumsuz olarak etkilenmiştir ve olumsuz etkilenen spermatogenezisten dolayı tübül çaplarının aşırı azaldığı vurgulanmıştır.

Tübül çaplarındaki azalma testosteron seviyesinin düşmesiyle azalan spermatogenezis ile sonuçlanmış olabilir şeklinde yorumlanmıştır. Seminifer epitelyumun adluminal bölgesinde yer alan spermatid ve spermatositlerdeki HSP 70 sentezini arttıran mekanizma spermatogoniaları da etkilemiştir. HSP 70 immunreaksiyonu mitotik karaktere sahip hücreler olan spermatogonialarda da belirlenmiştir (359).

Bu immunreaksiyon formaldehitin artan dozlarıyla orantılı olarak artmıştır. HSP 70 sentezinin artışı, formaldehitin neden olduğu kimyasal stresten kaynaklanan DNA hasarını tamir etmeye yardımcı olabilir. Sonuç olarak formaldehit gazının spermatogenik hücrelere zarar verebileceği ve HSP 70 sentezini arttırabileceği gösterilmiştir (359).

Bu çalışmadan farklı olarak biz yaptığımız çalışmada kontrol grubuna ait olan testis dokularında adluminal kompartımanın apikalinde yer alan spermatid ve

spermatozoalarda belirgin HSP 70 immunreaksiyonu tespit etmekle birlikte spermatogonia ve primer spermatositlerde HSP 70 immunreaksiyonu tespit edemedik.

Fakat cyfluthrin ile oluşturduğumuz kimyasal stres ile birlikte spermatogonia ve primer spermatositlerde de belirgin HSP 70 immunreaksiyonu gözlemledik.

Başka bir çalışmada oligoazospermi ve varikoselli erkeklerin spermalarında HSP A4, HSF 1 ve HSF 2' nin arttığı, hem oligoazospermi hem de varikoselli durumlarda ise bu değerlerin maksimuma çıktığı görülmüştür. Ayrıca oligoazospermide artan HSP 9 tespit edilmiştir.

Bu sonuçlar, heat shock proteinlerinin spermatogeneziste varikosel vb. durumlarda meydana gelebilecek bozuklukların şiddetini tespit etmede kullanılabilecek belirleyici moleküllerin olabileceği fikrini ortaya koymuştur (360).

HSP 70 ailesi üyelerinin, memeli erkek germ hücrelerinin farklılaşmasında, akrozom ve kamçı gibi normal morfolojik gelişimlerinde belirgin bir rol oynadığı gösterilmiştir. Azospermi durumlarında HSP 70 tespit edilememiştir. Bununla birlikte HSP 70 düzeyleri fertil gruplarla karşılaştırıldığında infertil gruplarda (asthenospermik ve oligoasthenospermik) kayda değer bir şekilde artmıştır. Sonuçta HSP 70 salınımının infertil erkeklerin spermatozalarındaki apoptozise karşı koruyucu bir mekanizma olarak artmış olabileceği bildirilmiştir (361).

Sığırlarda yapılan bir çalışmada ise anti HSP 70' in bulunduğu 3-9 günlük kültür medyumlarında apoptozisin arttığı ve blastosist safhasına ulaşan embriyo

sayısının azaldığı görülmüştür. Daha sonra bu kültür medyumlarına sıcaklık artışı uygulandıktan sonra ısıнын artmasıyla apoptozise uğramış hücre sayısının öncekine oranla daha düşük olduğu görülmüştür. Sıcaklığın artmasıyla artan HSP 70' in apoptozisi düşürebileceği kanısına varılmıştır. Bunun için HSP 70' in fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim açısından kritik bir rol oynayabileceği düşünülmüştür (247).

Yapılan çalışmalarda normal insanların testiküler dokusunda, spermatogenik hücrelerde HSP 70' in güçlü bir şekilde salındığı, spermatogenezin durdurulmuş olduğu dokularda ise spermatid evresinde ve spermatositte normal insan testis dokusuna göre daha az HSP 70 salınımı görülmüştür. “Sertoli cell only sendrom” lu hastalarda HSP 70 ekspresyonu tespit edilememiştir. Bu sonuçlar HSP 70' in maturasyon bozukluğuyla ilişkili olduğunu göstermektedir (362). Biz de yapmış olduğumuz çalışmada Sertoli hücrelerinin kontrol ve deney gruplarında HSP 70 (-) olduğunu tespit ettik.

Normal dokularda güçlü, maturasyonu durdurulmuş testiküler dokularda ise daha az HSP 70-2 ekspresyonunun görülmesi ayrıca “Sertoli cell only (SCO) sendrom” lu vakalarda hiç görülmemesi HSP 70-2' in salınımindaki azalmanın, erkek infertilitesinin patogenezi ile bağlantılı olduğu sonucunu doğurmuştur (363). Yapılan bir çalışmada HSP 70-2 geni hasarlı farelerde mayotik hasarlı spermatogenezis görülmüştür. Bunun nedeni olarak araştırmacılar spermatosit gelişiminin mayotik bölünmelerden ve sinaptonemal kompleksin desinapsisinden önce geç pakiten evresinde durduğunu dolayısıyla gelişimin de olmadığını söylemişlerdir (206, 226, 262, 267). Sonuç olarak bu genin salınımindaki bozukluk gecikmiş pakiten ve diplotenli spermatositlerde apoptozise ve gelişimsel

bozukluklara yol açmasıyla ilk mayozun profazı esnasında pakiten evresinde spermatogenezis durduğundan dolayı infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (262, 267).

HSPA 2 ekspresyon düzeyinin sperm maturasyonu ve fertilizasyon potansiyeli ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur.

Sitoplazmik retansiyonu olan ve HSPA 2 konsantrasyonu düşük olan immatür spermilerin zona bağlanması düşük olduğu bildirilmiştir (281). İn vitro fertilizasyon (IVF) sikluslarında sperm HSPA 2 (%10'dan büyük) konsantrasyonu yüksek ise gebelik oranlarının da yüksek olduğu görülmüş, fakat %10' un altı sınır alındığında ise başarısız gebelik sonucu için prediktivite değeri %100 görülmüştür (281). Bir başka çalışmada immunoglobulin G (IgG) 'nin HSP 70 antijenine zıt etki yaptığı, infertil kadın hastalardan alınan IgG serumunun invitro fertilizasyonu (IVF)' i inhibe ettiği ortaya konmuştur (232, 236, 237, 249, 346 - 348).

Ayrıca domuz ve sığırlarla yapılan çalışmalarda anti HSP 70 antikollarının sperm-zona pellusida interaksiyonunu inhibe ettiği belirtilmiştir (241, 243) .

Daha önce yapılan çalışmalarla HSP'lerin (HSP 70 / HSP 70-2, HSPA 2) genler tarafından üretiminin olmayışının veya az oluşunun infertiliteye yol açabileceği gösterilmiştir (206, 226, 262, 265, 267, 272, 281). Diğer taraftan herhangi bir faktör veya patojen sonucu duran spermatogenezis vakalarında da HSP'nin çok az bulunduğu ya da hiç bulunmadığı ortaya konmuştur (360 - 363).

Bulgularımızda kontrol grubu ve sadece benfotiamin uygulanan gruba göre cyfluthrin grubunda spermatid ve spermatozoalarda ek olarak spermatogonialarda

ve primer spermatositlerde de HSP 70 immünreaktivitesi belirlendi. HSP 70 immünreaktivitesindeki bu artış daha koyu yaygın boyanma ile tespit edildi. Bu sonuç HSP 70'in strese bağlı olarak arttığını belirten çalışmalarla paralellik arz etmektedir.

Cyfluthrine bağlı olarak HSP 70 immünreaksiyonunda artış görülmesi cyfluthrin maruziyetinin organizmada önemli derecede kimyasal bir stres oluşturduğu şeklinde yorumlanabilir. Ayrıca, HSP 70'in cyfluthrinin olumsuz etkisini göstermede kullanılabilecek bir molekül olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmamızda cyfluthrinli grupta sperm motilitesinde azalma, kuyruk, baş ve toplam anomali oranlarında artış gösteren spermatozoaların ortaya çıktığı görüldü. Spermatid ve spermatozolar da HSP 70 ekspresyonunun artışı belirlendi. Ayrıca kontrol grubuyla kıyaslandığında spermatogonia ve primer spermatositlerde de HSP 70 immünreaksiyonu ayırt edildi. HSP 70 ekspresyonundaki artışın sebebi normal morfolojiye sahip spermilerin oluşmasını sağlama ya da normal morfolojiyi korumaya yönelik olabilir. Sadece benfotiamin uygulanan gruptaki HSP 70 immünreaktivitesi kontrol grubu ile benzerlik göstermektedir. Cyfluthrin ile birlikte benfotiamin uygulanan deneklerde ise cyfluthrinin oluşturduğu strese bağlı oluşan anomalilerin, cyfluthrin grubuna göre azalmış olduğu görüldü. Bu grupta HSP 70 immünreaktivitesi, cyfluthrinin indüklediği kimyasal stresten dokuyu korumaya yönelik olarak hem bazal kompartımanda hem de adluminal kompartımanda yer alan hücrelerde tespit edildi. Buna göre, benfotiaminin cyfluthrinin olumsuz etkilerini azaltarak, cyfluthrinin oluşturduğu stresle artan HSP 70 ekspresyonunu regüle ettiği gözlemlendi.

Cyfluthrinin neden olduğu testiküler hasar, spermelerde motilitenin azalmasına ve morfolojik bozukluklara yol açmış bununla birlikte HSP 70 ekspresyonunu artırmıştır. Cyfluthrinin indüklediği bu artışın, HSP 70'in germ hücrelerinde koruyucu, apoptozisi önleyici bir rol üstlenmek üzere meydana gelmiş olabileceği fikrini uyandırmaktadır.

Yaptığımız bu çalışmanın sonucunda prepubertal dönemde cyfluthrin ile oluşturulan kimyasal stresin puberteye geçiş döneminde testiküler morfolojiyi ve fizyolojiyi hasara uğrattığı gözlemlendi. Artan HSP 70 ekspresyonunun bu hasarı önlemede yetersiz kaldığı saptandı. Cyfluthrin ile birlikte koruyucu amaçla kullanılan benfotiaminin HSP 70 ile birlikte fonksiyon göstererek testiküler morfolojiyi ve fizyolojiyi daha etkin şekilde koruduğu tespit edildi. Bu durumda gerek tarım endüstrisinde gerekse evlerde haşerelere karşı olan mücadele esnasında kullanılan piretroidlerin doz ayarlamasının oldukça dikkatli bir şekilde yapılması gerektiği sonucuna varıldı. Aksi halde organizmada üreme sisteminin de içinde bulunduğu bir çok sistem piretroid toksikasyonundan irreversible hasarlar oluşabilecek şekilde etkilenebilir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsanlar cyfluthrine, kontamine besin alımı, çevresel kalıntılarla temas, ilaçlama alanlarında bulunma yoluyla maruz kalabilirler. Mesleki açıdan ya da kazara bu bileşiklerle sürekli temas edilmesi sonucunda oluşan komplikasyonlar, testiküler hasar, sperm motilitesinin ve yoğunluğunun azalması, sperm anomalilerinin artması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Oluşacak testiküler hasar ve olumsuz spermatogenik etkilerden dolayı gerek zirai mücadelede gerekse halk sağlığı için kene, sinek, böcek gibi insektisit mücadelesinde kullanılan cyfluthrinin dozajının dikkatli bir şekilde hazırlanması, uygulama sürelerine dikkat edilmesi, uygulamaları esnasında inhalasyondan kaçınmaya yönelik önlemler alınması gerekir.

Çalışmamız sonucunda cyfluthrinin etkilerinin testiküler hasara ve buna bağlı olarak spermatogenezisde bozulmaya yol açtığı tespit edildi. Buna bağlı olarak sperm anomalilerinin artması, morfolojik yapısı bozulan spermilerin fonksiyonel açıdan yetersizliğine sebep olarak, sperm - zona pellusida bağlanmasında başarısızlığa yol açabilir. Bu fikirden yola çıkarak yüksek doz cyfluthrinin infertiliteye neden olabileceği kanaatine varılmıştır. Anormal morfoloji gösteren spermelerde DNA hasarı yüksek oranda bulunabilmektedir. Bundan dolayı cyfluthrinin neden olduğu anormal morfolojili spermelerde DNA hasarı bulunabileceğini söyleyebiliriz. Tüm bunlar fertilizasyon için istenmeyen durumlardır.

İnfertilite durumlarında başvuru alan yardımcı üreme teknikleri uygulamalarında, spermiyogramlarında morfoloji ve motilite bozukluğu gösteren kişilerin spermeleriyle intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) yapılırken normal görünümlü sperm kullanılsa da bu hücrelerde DNA hasarı bulunma olasılığının oldukça yüksek olduğu başka çalışmalarda gösterilmiştir. Buna bağlı olarak sperm anomalilerinin artması, morfolojik yapısı bozulan spermelerin fonksiyonel açıdan yetersiz hale gelmesi, sperm – zona pellusida bağlanmasında başarısızlığa yol açabilir.

Cyfluthrinin sebep olduğu böyle infertilite vakalarında yardımcı üreme teknikleri kullanılsa bile bu DNA hasarı risklerinin olabileceği düşüncesindeyiz. Bundan dolayı piretroid insektisit olan cyfluthrinin daha kontrollü dozajlarda ve bilinçli kullanılması, doğal dengenin bozulmaması ve gelecek nesillerde üreme sorunlarının yaşanmaması için büyük önem taşımaktadır.

Prepubertal dönemde cyfluthrine maruz kalan sıçanların puberteye girdikten sonra sperm parametrelerini ve testiküler dokularını inceledik. Bundan ötürü insektisitlerin veya piretroidlerin özellikle prepubertal döneme ait bulgularını ortaya koymuş olmamızla temel bir yaklaşım olabilecek verileri elde ettik. Bunun sonucu olarak aynı alanda yapılacak diğer araştırmalarla karşılaştırma olanağı sağlayabilecek tamamlayıcı bir çalışmayı sonuçlandırdık.

Çalışmamızda HSP 70 açısından elde ettiğimiz bulgulara dayanarak, HSP 70' in testis ve sperm yüzeyinde koruyucu etkisine bağlı olarak immunreaksiyon göstermesi ve artması patolojik durumlar için HSP 70 tespitinin önemli bir parametre olabileceğini göstermektedir.

Sperm membran yapısı fertilizasyonun oluşmasında önemli bir role sahiptir. Sperm membran yüzey proteinlerinden olan HSP 70 ile ilgili verilerin değerlendirmesinin, infertilite araştırmalarında yani hem vakanın patolojisinin aydınlatılmasında hem de tedavi planlamasında son derece önemli ve kullanılabilecek alternatif bir marker olduğunu söyleyebiliriz.

Çalışmamızda kullandığımız benfotiaminin bu konuda nasıl etki yaptığını ortaya koymamız bu alanda çok yeni ve yararlı veriler elde etmemizi sağladı. Çünkü daha önce benfotiaminin testiküler hasar ve sperm parametreleri üzerine etkilerini içeren bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çalışmamız sonucunda benfotiaminin bu yönde oldukça etkili olduğunu, cyfluthrinin hasarını tamamen bertaraf etmese bile kontrol grubuna yakın düzeylere getirebildiğini gördük. Bu da bize cyfluthrinin toksisitesini tam olarak önlemese bile benfotiaminin bu tür patolojilerde tedavide kullanılabilecek etkiye sahip olduğunu gösterdi. Ayrıca kullanımının daha yaygın olması ve daha popüler olan E ve C vitaminlerinin dışında benfotiaminin de güçlü bir alternatif olarak düşünülmesi gerektiği fikrini ortaya çıkardı.

Sonuç olarak, bu tez çalışmamızda elde edilen bulguların üreme tıbbı, infertilite ve yardımcı üreme teknikleri alanlarında testiküler hasar ve sperm parametreleri konularında yapılacak olan embriyolojik, histolojik, histopatolojik ve endokrinolojik çalışmalara referans veriler olarak kullanılabilir olması ve aynı zamanda bilimsel birikime katkı oluşturmaları açısından önem arz etmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Costa, L.G. Toxic effects of pesticides. In: Casarett&Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, Seventh ed., Ed, Klaassen, C.D. The McGraw-Hill Co. Inc., USA, 2008 ;883-930.
2. EPA. What is a Pesticide? (US EPA definitions) retrieved June 24, 2006.
3. Delen N, Durmuşoğlu E, Güncan A, ve ark.“Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalısı Sorunları”, Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, Ankara, 2005:1-21.
4. Dökmeci İ. Toksikoloji. Nobel Tıp Kitapevi. İstanbul 1988.
5. Kaya S. Dış Parazitleri Etkileyen İlaçlar. Veteriner Uygulamalı Farmakoloji. 4. Baskı, Ankara 2007; 65: 575-655.
6. Balkaya N, Arslan A. Sulu Çözeltilerdeki Pestisidlerin Güneş Işığı Etkisiyle Bozunumu. Ekoloji Der 2004; 14(53): 18-24.
7. Topbaş MT, Brohi AR, Karaman MR. Çevre Kirliliği, T.C. Çevre Bakanlığı Yayınları Ankara, 1998.
8. Çakır S. Çukurova Yöresinden Toplanan Sütlerde Sentetik Piretroid İnsektisid Varlığının Araştırılması. Doktora Tezi , Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.
9. WHO. Guidelines on stiation analysis for public health pesticide management. World Health Organization. Genava 2005.
10. Ciscato CHP, Gebara AB, Spinosa HS. Pesticide residues in cow milk consumed in Sao Paulo city (Brazil). Journal of Environmental Science and Health, 2002; B37 (4), 323-330.
11. Dirican EK. Dichlorvos’un Sıçan Testisleri Üzerine Toksik Etkisi ve Vitamin C ve E’nin Koruyucu Rolü. Doktora Tezi , Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
12. İla HB, Topaktaş M, Rencüzoğulları E, et al. Genotoxic potential of cyfluthrin. Mutation Research. 2008; 656: 49–54.
13. Barr DB, Needham LL. Analytical Methods for Biological Monitoring of Exposure to Pesticides. Journal of Chromatography B. 2002; 777: 5-29.
14. Chen S, Luo J, Hu M, Geng P, Zhang Y. Microbial Detoxification of Bifenthrin by a Novel Yeast and Its Potential for Contaminated Soils Treatment. PLoS One 2012; 7 (2) : 1-12.
15. Bradhury SP, Coats IR. Comparative toxicology of the pyrethroid insecticides. Rev Environ Toxicol. 1989; 108: 133-177.
16. Dikshith TSS. Toxicology of Pesticides in Animals. CRC press. 1990: 1-39.
17. Şanlı Y. Türkiye’de pestisid kullanımından kaynaklanan çevre ve besin kirlenmesi sorunları. Türkiye’de Veteriner ilaçları üretimi, Pazarlanması, Güvenli Kullanımı ve Kalıntı Sorunları Sempozyumu. 13-14 Ekim, Ankara. 1994.
18. Valantine, W.M. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1990; 20(2): 375-382.

19. Casida JE, Gammon DW, Glickman AH, et al. Mechanism of selective action of pyrethroid insecticides. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 1983; 23: 413-438.
20. Yavuz H, Filazi A, Bilgili A, ve ark. Siflutrin'in immunotoksikolojik etkilerinin araştırılması. *Ankara Univ Vet Fak Der* 1996; 43: 209-213.
21. Maroni M, Colosio C, Ferioli A, et al. Biological monitoring of pesticide exposure: A review. *Introduction. Toxicology.* 2000; 7,143 (1): 1-118.
22. Kaya S, Bilgili A. Pestisidler. *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji. İkinci Baskı, Ankara : Medisan Yayınevi , 2002 ; 385-535.*
23. Crawford MJ. The Metabolism of Pyrethroids Insecticides in Rats: Excreted Metabolites. *Pestic Sci* 1981; 12: 399-411.
24. Heder AF, Hirsch-Ernst KI, Baurer D, et al. Induction of Cytochrome P450 2B1 by Pyrethroids in Primary Rat Hepatocyte Cultures. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 71-79.
25. Kaneko H, Ohkawa H, Miyamoto J. Comparative Metabolism of Fenvalerate and the (2S, alfaS)-isomer in Rats and Mice. *J Pestic Sci* 1981; 6: 317-326.
26. Vijverberg HP, Van den bercken J. Neurotoxicological Effects and the Mode of Action of Pyrethroid Insecticides. *Toxicology* 1990; 21: 105-126.
27. Narahashi T. Neuroreceptors Ion Channels as the Basis For Drug action: Past, Present, and Future. *J. Pharmacol Exp Ther* 2000; 294: 1-26.
28. Williams PL, James RC, Roberts SM. Principles of Toxicology Environmental and Industrial Applications. Second edition, U.S.A : A Wiley- Interscience Publication, 2000; 345-366.
29. Vijverberg HP, Van der zalm JM, Van den bercken J. Similar Mode of Action of Pyrethroids and DDT on Sodium Channel Gating in Myelinated Nerves. *Nature* 1982; 295: 601-603.
30. Tabarean IV, Narahashi T. Potent Modulation of Tetrodotoxin-sensitive and Tetrodotoxin-resistant Sodium Channels by the Type II Pyrethroid Deltamethrin. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 284: 958-965.
31. Kakko I. Toxic Mechanisms of Pyrethroids Studied In Vitro. Academic Dissertation. Finland. *Acta Universitatis Tamperensis* 2004: 1018.
32. Anonymous. "Cyfluthrin" http://www.sigmaaldrich.com/catalog/productdetail.do?lang=en&n4=33738|fluka&n5=search_concat_pno|brand_key&f=spec/11.03.2010
33. "Cyfluthrin" Insecticide fact sheet. Cox C (Editor). *Journal of Pesticide Reform* 1994; 14 (2) : 28 – 34.
34. U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances. Office of Pesticide Programs. Washington, D.C. Pesticide fact sheet: Cyfluthrin. 30 1987: 164.
35. Anonymous. Farm Chemicals '92. Meister Publishing Company. Willoughby OH. 1992.
36. US Department of Health and Human Services. Trends of National Pyrethroid Use. Draft Toxicological Profile for Pyrethrins and Pyrethroids. Public Health Service Agency for Toxic Substances and Disease Registry 2001.

37. U.S. Dept. of Agriculture. National Agricultural Statistics Service. Agricultural Statistics Board. 1994. Agricultural chemical usage: Field crops summary. Washington, D.C, Marc 1993.
38. U.S. Dept. of Agriculture. National Agricultural Statistics Service. Agricultural Statistics Board. 1992. Agricultural chemical usage: fruit and nuts summary. Washington, D.C, June 1991.
39. Whitmore RW, Kelly JE, Reading PL. National home and garden pesticide use survey: Final report, Executive summary, results, and recommendations. Research Triangle Park, NC: Research Triangle Institute 1992; 1.
40. FAO Specifications and Evaluations for Plant Protection Products Beta-Cyfluthrin, Food and Agriculture Organization of the United Nations 1999.
41. Thomson WT. Agricultural Chemicals Handbook, Book 1. Thomson Publications. Fresno, CA. 1992.
42. Meister RT. Farm Chemicals Handbook '95. Meister Publishing Company. Willoughby, OH. 1995.
43. U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances, The review of toxicology data in support of the registration of Baythroid 240 ornamental pyrethroid insecticide Tempo 2. Memo from J.E. Whalan, Hazard Evaluation Division, to George LaRocca, Registration Division, Washington, D.C, 1986.
44. Corbett JR, Wright KW, Baillie AC. The biochemical mode of action of pesticides. Second edition. London, U.K, 1984 :151.
45. Cremlyn RJ. Agrochemicals: Preparation and mode of action. Chichester, U.K.: John Wiley & Sons 1991 : 68-69.
46. Al-Rajhi DH. Properties of $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ - ATPase from rat brain and its inhibition by pyrethroids. Pest Biochem Physiol 1990 ; 37: 116-120.
47. Ramadan AA, et al. Action of pyrethroids on GABA receptor function. Pest Biochem Physiol 1988; 32: 97-105.
48. Ramadan AA, et al. Actions of pyrethroids on the peripheral benzodiazepine receptor. Pest Biochem Physiol 1988; 32: 106-113.
49. Moran DP. Recognition and Management of Pesticide Poisonings. Health Effects Division, Office of Pesticide Programs, U.S. EPA. Fourth edition. Washington, DC, 1989.
50. Shaw HR, Ayers JE, McCann SA. Metabolism of Baythroid in a dairy cow. Unpublished report No. 86043 from Bayer Institute of Toxicology. Submitted to WHO by Bayer CropScience AG, Monheim, Germany, 1983.
51. Ecker W. Biotransformation of (F-phenyl-UL-14C)-cyfluthrin; characterization and preliminary identification of metabolites. Unpublished report No. 1632 from Bayer Institute of Pharmacokinetics. Submitted to WHO by Bayer CropScience AG, Monheim, Germany, 1982.
52. Pesticide Residues in Food. Evaluations Part II Toxicology. Cyfluthrin. JMPR 1987; 53-78.

53. Shehata AF, et al. Some factors influencing persistence, hydrolysis, downward movement and leachability of cyfluthrin in Egyptian soils. *Annals Agric. Sci. (Fac. Agric., Ain Shams Univ., Cairo, Egypt)* 1987; 32(3):1677-1687.
54. Noble RM, Hamilton DJ. Stability of cypermethrin and cyfluthrin on wheat and storage. *Pestic Sci* 1985; 16:179-185.
55. Dicke W, Ocker HD, Thier HP. Rückstandsanalyse von pyrethroid-insecticiden in getreide, mahlerzeugnissen und brot. *Z. Lebensm. Unters Forsch* 1988 ; 186:125-129.
56. McEwen FL, Braun HE, Richey GM, et al. Residues of Synthetic Pyrethroid Insecticides on Horticultural Crops *Pestic Sci* 1986; 17:150-154.
57. Class TJ, Kintrup J. Pyrethroids as household insecticides: analysis, indoor exposure and persistence. *Fresenius J Anal Chem* 1991; 340:446-453.
58. Stout DM, Wright CG, Leidy RB. The determination of cyfluthrin in air and on surfaces.
59. U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances. Registration of Tempo™ 2 (containing cyfluthrin) and risk assessment of pest control officer (PCO) use in buildings. Memo from J.E. Whalan, Hazard Evaluation Division, to G. LaRocca, Registration Division. Washington, D.C, August 27 1987.
60. U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances. Revised risk assessment of pest control officer (PCO) use of Tempo™ 2 insecticide in buildings. Memo from J.E. Whalan, Hazard Evaluation Division, to G. LaRocca, Registration Division. Washington, D.C, November 10 1987.
61. Laughlin J, Newburn K, Gold R.E. Pyrethroid insecticides and formulations as factors in residues remaining in apparel fabrics after laundering. *Bull. Environ Cont Toxicol* 1991; 47: 355-361.
62. Nelson C. et al. Laundering as decontamination of apparel fabrics: Residues of pesticides from six chemical classes. *Arch Environ Contam Toxicol* 1992; 23:85-90.
63. U.S. Dept. of Health and Human Services. Public Health Service. Sixth annual report on carcinogens. Summary. Research Triangle Park: National Institute of Environmental Health Sciences 1991.
64. U.S. Dept. of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.. Toxicological profile for xylenes. October 1993.
65. U.S. Dept. of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for ethylbenzene. November 1990.
66. Moriarty F. The Sublethal Effects of Synthetic Insecticides on Insects. *Biol Rev* 1969; 44: 321-357.
67. Haynes KF. Sublethal Effects of Neurotoxic Insecticides on Insect Behavior. *Ann Rev Entomol* 1988; 33: 149-168.
68. Naz R. "Endocrine Disruptors, Effects on male and Female Reproductive Systems". CRC Press, Florida: 1999; 8-27.

69. Mangoub AA, El-Medany AH. Evaluation of chronic exposure of the male rat reproductive system to the insecticide methomyl. *Pharmacological Research* 2001; 44(2): 73-80.
70. Okamura A, Kamijima M, Shibata E, et al. A comprehensive evaluation of the testicular toxicity of dichlorovose in Wistar rats. *Toxicology* 2005; 213: 129-137.
71. Berger CW, Sultatos LG. The effects of the phosphorothionate insecticide fenitrothion on mammalian cytochrome P450 dependent metabolism of estradiol. *Fundamental and Applied Toxicology* 1997; 37: 150-157.
72. Salem MH, Abo-Elezz Z, Abd-Allah GA, Hassan GA, Shaker N. Effect of organophosphorus (dimethoate) and pyrethroid (deltamethrin) pesticides on semen characteristics in rabbits. *J Environ Sci Health B* 1988; 23(3): 279-290.
73. Nahas S, Hondt HA, Abdou HA. Chromosome aberrations in spermatogonia and sperm abnormalities in Curacron-treated mice. *Mutation Research* 1989; 222: 409-414.
74. Ray A, Chatterjee S, Ghosh S, et al. Quinalphos induced suppression of spermatogenesis, plasma gonadotropins, testicular testosterone production and secretion in adult rats. *Environ Res* 1992; 57(2): 181-189.
75. Burrue VR, Raabe OG, Overstreet JW, Wilson BW, Wiley LM. Paternal effects from methamidophos administration in mice. *Toxicol Appl Pharm* 2000; 165: 148-157.
76. Sarkar R, Mohanakumar KP, Chowdhury M. Effects of an organophosphate pesticide, quinalphos, on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in adult male rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000; 118: 29-38.
77. Giri S, Prasad SB, Giri A, Sharma GD. Genotoxic effects of malathion: an organophosphorus insecticide, using three mammalian bioassays in vivo. *Mutation Research* 2002; 514: 223-231.
78. Joshi SC, Mathur R, Gajraj A, Sharma, T. Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 2003; 14: 91-98.
79. Dutta HM, Meijer HJ. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. *Environ Pollut* 2003; 125(3): 355-360.
80. Okahashi N, Sano M, Miyata K, et al. Lack of evidence for endocrine disrupting effects in rats exposed to fenitrothion in utero and from weaning to maturation. *Toxicology* 2005; 206(1/5): 17-31.
81. Mathew G, Vijayalaxmi KK, Abdul Rahiman M. Methyl parathion- induced sperm shape abnormalities in Mouse. *Mutat Res* 1992; 280: 169-173.
82. Tisch M, Faulde MK, Maier H. Genotoxic Effects of Pentachlorophenol, Lindane, Transfluthrin, Cyfluthrin, and Natural Pyrethrum on Human Mucosal Cells of the Inferior and Middle Nasal Conchae. *American J of Rhinology* 2005; 19: 141-151.
83. Institoris I, Undeğer U, Sirok O, Nehez M, Desi I. Comparison of Detection Sensivity of Immuno-and Genotoxicological Effects of Subacute Cypermethrin and Permethrin Exposure in Rats. *Toxicology* 1999; 137: 47-55.

84. Çelik A, Mazmancı B, Çamlıca Y, Aşkın A, Çömelekoğlu Ü. Cytogenetic Effects of Lambda-Cyhalothrin in Wistar Rat Bone Marrow. *Mutat Res* 2003; 539: 91-97.
85. Çelik A, Mazmancı B, Çamlıca Y, Çömelekoğlu Ü, Aşkın A. Evaluation of Cytogenetic Effects of Lambda-Cyhalothrin in Wistar Rat Bone Marrow by Gavage Administration. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2005; 61: 128-133.
86. Çelik A, Mazmancı B, Çamlıca Y, Aşkın A, Çömelekoğlu Ü. Induction of Micronuclei by Lambda-Cyhalothrin in Wistar Rat Bone Marrow and Gut Epithelial Cells. *Mutagenesis* 2005; 20 (2): 125-129.
87. Çavaş T, Ergene-gözükara S. Evaluation of The Genotoxic Potential of Lambda-Cyhalothrin Using Nuclear and Nucleolar Biomarkers on Fish Cells. *Mutat Res* 2003; 534: 93-99.
88. Campana MA, Panzeri AM, Moreno VJ, Dulout FN. Genotoxic Evaluation of the Pyrethroid Lambda-cyhalothrin Using the Micronucleus Test in Erythrocytes of the Fish *Cheiroden interruptus interruptus*. *Mutat Res* 1999; 483: 155-161.
89. Chauhan LKS, Agarwal DK, Sundararaman V. In Vivo Induction of Sister Chromatid Exchange in Mouse Bone Marrow Following Oral Exposure to Commercial Formulations of Alpha-Cyano Pyrethroids. *Toxicology Letters* 1997; 93: 153-157.
90. Chauhan LKS, Saxena PN, Gupta SK. Cytogenetic Effects of Cypermethrin and Fenvalerate on the Root Meristem Cells of *Allium cepa*. *Environ and Exp Botany* 1999; 42: 181-189.
91. Saxena PN, Chauhan LKS, Gupta SK. Cytogenetic Effects of Commercial Formulation of Cypermethrin in Root Meristem Cells of *Allium sativum*: Spectroscopic Basis of Chromosome Damage. *Toxicology* 2005; 216: 244-252.
92. Villarini M, Moretti M, Pasquini R, et al. In vitro Genotoxic Effects of the Insecticide Deltamethrin in Human Peripheral Blood Leukocytes: DNA Damage ('comet' assay) in Relation to the Induction of Sister-Chromatid Exchanges and Micronuclei. *Toxicology* 1998; 130: 129-139.
93. Suman G, Naravaneni R, Jamil K. In Vitro Cytogenetic Studies of Cypermethrin on Human Lymphocytes. *Indian J Exp Biol* 2006; 44 (3): 233-239.
94. Patel S, Pandey AK, Bajpayee M, Parmar D, Dhawan A. Cypermethrin-Induced DNA Damage in Organs and Tissues of the Mouse: Evidence from the Comet Assay *Mutat Res* 2006; 607 (2): 176-183.
95. Kakko I. Toxic Mechanisms of Pyrethroids Studied In Vitro. Academic Dissertation. Finland. *Acta Universitatis Tamperensis* 2004: 1018.
96. Hadnagy W, Seemayer NH, Kühn KH, Leng G, Idel H. Induction of Mitotic Cell Division Disturbances and Mitotic Arrest by Pyrethroids in V79 Cell Cultures. *Toxicol Lett* 1999; 107: 81-87.
97. Bhunya SP, Pati PC. Genotoxic Effects of a Synthetic Pyrethroid Insecticide, Cypermethrin, in Mice In Vivo. *Toxicol Lett* 1988; 41 (3): 223 - 230.

98. Mukhopadhyay I, Chowdhuri DK, Bajpayee M, Dhawan A. Evaluation of In Vivo Genotoxicity of Cypermethrin in *Drosophila melanogaster* Using the Alkaline Comet Assay. *Mutagenesis* 2004; 19 (2): 85-90.
99. Nehez M, Lorenz R, Desi I. Simultaneous action of cypermethrin and two environmental pollutant metals, cadmium and lead, on bone marrowcell chromosomes of rats in subchronic administration. *Ecotoxicol Environ Saf* 2000 ; 45 (1): 55–60.
100. Giri S, Sharma GD, Giri A, Prasad SB. Fenvalerate-induced chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in the bone marrowcells of mice in vivo. *Mutat Res* 2002; 520 (1–2): 125–132
101. Ramadan AA, et al. Actions of pyrethroids on the peripheral benzodiazepine receptor. *Pest Biochem Physiol* 1988; 32: 106-113.
102. Eil C, Nisula BC. The binding properties of pyrethroids to human skin fibroblast androgen receptors and to sex hormone binding globulin. *J Steroid Biochem* 1990; 35(3/4): 409-414.
103. Lifeng T, Shoulin W, Junmin J, et al. Effects of fenvalerate exposure on semen quality among occupational workers. *Contraception* 2006; 73: 92–96
104. Mani U, Islam F, Prasad AK, et al. Steroidogenic alterations in testes and sera of rats exposed to formulated fenvalerate by inhalation. *Hum Exp Toxicol* 2002; 21(11): 593–597.
105. Xu LC, Zhan NY, Liu R, Song L, Wang XR. Joint action of phoxim and fenvalerate on reproduction in male rats. *Asian Journal of Andrology* 2004; 6: 337– 341.
106. Ahmad M, Hussain I, Khan A, Najib-ur-Rehman. Deleterious effects of cypermethrin on semen characteristics and testes of dwarf goats (*Capra hircus*). *Experimental and Toxicologic Pathology* 2008; 61: 339–346.
107. Bigelow PL, Jarrell J, Young MR, Keefe TJ, Love EJ. Association of semen quality and occupational factors: comparison of case-control analysis and analysis of continuous variables. *Fertility and Sterility* 1998; 69: 11–18.
108. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal* 1992; 305: 609–613.
109. Schettgen T, Koch HM, Drexler H, Angerer J. New gas chromatographic– mass spectrometric method for the determination of urinary pyrethroid metabolites in environmental medicine. *Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 2002; 778: 121– 130.
110. Kumar S, Gautam AK, Agarwal KR, Shah BA, Saiyad HN. Demonstration of sperm head shape abnormality and clastogenic potential of cypermethrin *J Environ Biol* 2004; 25(2): 187–90.
111. Elbetieha A, Da’as SI, Khamas W, Darmani H. Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001;41(4):522–528.
112. Rodriguez H, Tamayo C, Inostroza J, et al. Cypermethrin effects on the adult mice seminal glands. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009; 72: 658–62.

113. Yuan C, Wang C, Gao S, et al. Effects of permethrin, cypermethrin and 3 phenoxybenzoic acid on rat sperm motility in vitro evaluated with computer-assisted sperm analysis *Toxicol In Vitro* 2009; doi:10.1016/j.tiv.2009.11.001
114. Wu W, Zhang J, Zhu W, et al. [Antiandrogenic effects of cypermethrin and beta-cypermethrin] (in Chinese, with English abstract). *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi* 2008;26:193–197.
115. Wang XZ, Liu S.S, Sun Y, et al. Beta-cypermethrin impairs reproductive function in male mice by inducing oxidative stress. *Theriogenology* 2009; 72: 599–611
116. Ratnasooriya WD, Ratnayake SS, Jayatunga YN. Effects of pyrethroid insecticide ICON (lambda cyhalothrin) on reproductive competence of male rats. *Asian J Androl* 2002;4(1):35-41.
117. Kamijima M, Hibi H, Gotoh M, et al. A survey of semen indices in insecticide sprayers. *J Occup Health* 2004;46(2):109–18.
118. Tan LF, Wang SL, Sun XZ, et al. Effects of fenvalerate exposure on the semen quality of occupational workers. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2002;8(4):273–6
119. Bajpai M, Gupta G, Setty BS. Changes in carbohydrate metabolism of testicular germ cells during meiosis in the rat. *Eur J Endocrinol* 1998 138:322-327.
120. Zhu W, Zheng YF, Zhu HJ, Zhu XQ. The antiandrogenic effect and mechanism of bifenthrin. *J Toxicol* 2006;20:305–7 (in Chinese).
121. Sun H, Xu XL, Xu LC, et al. Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. *Chemosphere* 2007;66:474–9.
122. Kim SS, Lee RD, Lim KJ, et al. Potential estrogenic and antiandrogenic effects of permethrin in rats. *J Reprod Dev* 2005;51:201–10.
123. Xu LC, Liu L, Ren XM, et al. Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of some pesticides in vitro. *Toxicology* 2008;243:59–65.
124. Kunitatsu T, Yamada T, Ose K, et al. Lack of anti-androgenic or estrogenic effects of three pyrethroids (esfenvalerate, fenvalerate, and permethrin) in the Hershberger and uterotrophic assays. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002;35:227–37.
125. IRIS Accession number 132. October 1993. Baythroid.
126. Morgan DP. Recognition and management of pesticide poisonings. Washington, D.C.: U.S. EPA. Office of Pesticide Programs. Health Effects Division 1989.
127. Wadleigh RW, et al. Effect of temperature on the toxicities of ten pyrethroids to German cockroach. (Dictyoptera: Blattellidae). *J Econ Entomol* 1991; 84(5):1433-1436.
128. Pauluhn J, et al. Methodological aspects of the determination of the acute inhalation toxicity of spray-can ingredients. *J Appl Toxicol* 1988; 8(6):431-437.
129. U.S. EPA. Office of Pesticides and Toxic Substances. Review of acute toxicology data in support of the registration of Tempo 20% Wettable Powder for use in food handling establishments. Memo from J.E. Whalan, Hazard Evaluation Division, to George LaRocca, Registration Division. Washington, D.C: February 24 1987.

130. Miles Inc. Agriculture Division. Material Safety Data Sheet: Tempo 2EC. Kansas City, MO: January 30 1991.
131. U.S. EPA. Office of Pesticide Programs. "Tox one-liners": Cyfluthrin. Washington, D.C : June 28 1989.
132. Katare R, Caporalli A, Emanuelli C, Maddeddu P. Benfotiamine improves functional recovery of the infarcted heart via activation of pro-survival G6PD/Akt signaling pathway and modulation of neurohormonal response. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2010; 49 : 625-638.
133. Zhang J, Zhu W, Zheng Y, Yang J, Zhu X. The antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides cyfluthrin and beta-cyfluthrin. *Reproductive Toxicology* 2008; 25: 491–496.
134. Eraslan GA, Saygı ŞB, Essiz DC, et al. Evaluation of Aspect of Some Oxidative Stress Parameters Using Vitamin E, Proanthocyanidin and N-Acetylcysteine Against Exposure to Cyxuthrin in Mice. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2007; 88 : 43–49.
135. Sepici-dincel A, Benli AC, Selvi M, et al. Sublethal Cyfluthrin Toxicity to Carp(Cyprinus Carpio L.) Fingerlings: Biochemical, Hematological, Histopathological Alterations. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009; 72 : 1433–1439.
136. Yavuz H, Hazıroğlu R, Daşkın Ali, ve ark. Tavşanlarda Siflutrin'in Teratojenik Etkilerinin Araştırılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 1996; 43: 421-427.
137. Anonymous. "Benfotiamine" http://www.sigmaaldrich.com/catalog/productdetail.do?d7=0&n5=search_concat_pno|brand_key&n4=b9636|sigma&n25=0&q=on&f=spec/ 11.03.2010.
138. Thornalley PJ. The potential role of thiamine (vitamin B(1)) in diabetic complications. *Curr Diab Rev* 2005;1: 287–98.
139. Malecka SA, Poprawski K, Bilski B. Prophylactic and therapeutic application of thiamine (vitamin B1)—a new point of view. *Wiad Lek* 2006;59:383–7.
140. Fujiwara M, Watanabe H, Matsui K. Allithiamine, a newly found derivative of vitamin B1. *J Biochem* 1954;41:29–39.
141. Anonymous <http://www.mwt.net/~drbrewer/benfotiamine.htm/> 21.05.2010
142. Bitsch R, Wolf M, Moller J, Heuzeroth L, Gruneklee D. Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamine derivative. *Ann Nutr Metab* 1991;35:292–296.
143. Yadav UCS, Subramanyam S, Ramana KV. Prevention of endotoxin-induced uveitis in rats by benfotiamine, a lipophilic analogue of vitamin B1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2276–2282.
144. Loew D. Pharmacokinetics of thiamine derivatives especially of benfotiamine *Int J Clin Pharmacol Ther* 1996; 34(2): 47-50.
145. Balakumar P, Rohilla A, Krishan P, Solairaj P, Thangathirupathi A. The multifaceted therapeutic potential of benfotiamine *Pharmacological Research* 2010; 61: 482–488.

146. Volvert ML, Seyen S, Piette M, et al. Benfotiamine, a synthetic S-acyl thiamine derivative, has different mechanisms of action and a different pharmacological profile than lipid-soluble thiamine disulfide derivatives. *BMC Pharmacol* 2008;8:10.
147. Hilbig R, Rahmann H. Comparative autoradiographic investigations on the tissue distribution of Benfotiamine versus thiamin in mice. *Arzneimittelforschung* 1998;48:461–468.
148. Shoeb M, Ramana KT. Anti-inflammatory effects of benfotiamine are mediated through the regulation of the arachidonic acid pathway in macrophages. *Free Radical Biology & Medicine* 2012;52:182-190.
149. Winkler G, Pal B, Nagybeganyi E, et al. Effectiveness of different benfotiamine dosage regimens in the treatment of painful diabetic neuropathy, *Arzneimittelforschung* 1999; 49: 220–224.
150. Sánchez-Ramírez GM, Caram-Salas NL, Rocha-González HI, et al. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* 2006;530:48–53.
151. Gadau S, Emanuelli C, Linthout SV, et al. Benfotiamine accelerate the healing of ischaemic diabetic limbs in mice through protein kinase B/Akt-mediated potentiation of angiogenesis and inhibition of apoptosis. *Diabetologia* 2006;49:405–20.
152. Marchetti V, Menghinini R, Rizza S, et al. Benfotiamine counteracts glucose toxicity effects on endothelial progenitor cell differentiation via Akt/FOXO signaling. *Diabetes* 2006;55:2231–7.
153. Shim JB, Yang DY, Han YK, et al. Effect of Benfotiamine in Expression of Phosphodiesterase 5 and Isoforms in Type 2 Diabetic Rat Kidney. *Korean J Androl* 2010; 28(2):93-99.
154. Pomeroy F, Molinar Min A, La Selva M, et al. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. *Acta Diabetol* 2001;38:135-138
155. Bakker SJ, Heine RJ, Gans RO. Thiamine may indirectly act as an antioxidant. *Diabetologia* 1997; 40:741-742
156. Hsu GM, Chow BF. Effect of thiamine deficiency on glutathione contents of erythrocytes and tissues in rat. *Proc Soc Exp Bio Med* 1960; 104: 178-180
157. Beltramo E, Berrone E, Buttiglieri S, Porta M. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20:330-336
158. Hammes HP, Du X, Edelstein D, et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. *Nat Med* 2003; 9:294-299
159. Wu S, Ren J. Benfotiamine alleviates diabetes-induced cerebral oxidative damage independent of advanced glycation end-product, tissue factor and TNF- α . *Neurosci Lett* 2006; 394: 158-162

160. Haupt E, Ledermann H, Kopcke W. Benfotiamine in the treatment of diabetic polyneuropathy-a three-week randomized, controlled pilot study (Bedip study). *Int J Clin Pharmacol Ther* 2005;43:71–7.
161. Cameron NE, Gibson TM, Nangle MR, Cotter MA. Inhibitors of advanced glycation end product formation and neurovascular dysfunction in experimental diabetes. *Ann NY Acad Sci* 2005;1043:784–92.
162. Stracke H, Hammes HP, Werkmann D, et al. Efficacy of benfotiamine versus thiamin on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. *Exp Clin Endocrinol Diab* 2001;109:330–336.
163. Kathleen A, Head ND. Peripheral neuropathy: pathogenic mechanisms and alternative therapies. *Alt Med Rev* 2006;11:4.
164. Hatfield J. Advanced glycation end-products (AGEs) in hyperglycemic patients. *J Young Invest* 2005;13:1.
165. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001;414:813–820.
166. Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP Glycation of proteins as a source of superoxide. *Diabetes* 1988;14(1): 1114- 1120.
167. Dinçer Y, Akçay T, Alademir Z, İlkova H. Effect of oxidative stress on glutathione pathway in red blood cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 2002; 51(10): 1360-1362.
168. Giardino I, Edelstein D, Brownlee M. Bcl-2 expression or antioxidants prevent hyperglycemia-induced formation of intracellular advanced glycation end products in bovine endothelial cells. *The Journal of Clinical Investigation* 1996; 97(6): 1422-1428.
169. Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *European Journal of Clinical Investigation*. 1997; 27(2): 97-108.
170. Koya D, King GL. Protein kinase C activation and the development of diabetic complications. *Diabetes* 1998; 47(6), 859-866.
171. Way KJ, Katai N, King GL Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabetic Medicine* 2001; 18 (12): 945-959.
172. Babaei-Jadidi R, Karachalias N, Ahmed N, Battah S, Thornalley PJ. Prevention of incipient diabetic nephropathy by high-dose thiamine and benfotiamine. *Diabetes* 2003;52:2110–2120.
173. Inoguchi T, Li P, Umeda F, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes* 2000; 49:1939–1945.
174. Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, et al. Protein kinase C-dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P)H oxidase. *J Am Soc Nephrol* 2003 14: 227–232.
175. Maritim AC, Sanders RA, Watkins III JB. Diabetes, oxidative stress and antioxidants: Review. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 2003; 17(1): 4-38.

176. Berrone E, Beltramo E, Solimine C, Ape AU, Porta M. Regulation of intracellular glucose and polyol pathway by thiamine and benfotiamine in vascular cells cultured in high glucose. *J Biol Chem* 2006; 281: 9307–9313.
177. Thornalley PJ, Babaei-Jadidi R, Al Ali H, et al. High prevalence of low plasma thiamine concentration in diabetes linked to a marker of vascular disease. *Diabetologia* 2007;50:2164–2170.
178. Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, et al. Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997; 46(9): 1481-1490.
179. Eidland A, Sebekova K, Schinzel R. Advanced glycation end products and the progressive course of renal disease. *American Journal of Kidney Diseases* 2001; 38 (4): 100-106.
180. Goh SY, Cooper ME. The role of advanced glycation end products in progression and complications of diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1143–1152.
181. Kislinger T, Tanji N, Wendt T, et al. Receptor for advanced glycation end products mediates inflammation and enhanced expression of tissue factor in vasculature of diabetic apolipoprotein E-null mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:905.
182. Wautier MP, Chappey O, Corda S, et al. Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280:685–694.
183. Li SY, Sigmon VK, Babcock SA, Ren J. Advanced glycation endproduct induces ROS accumulation, apoptosis, MAP kinase activation and nuclear O-GlcNAcylation in human cardiac myocytes. *Life Sci* 2007;80:1051–1056.
184. Ang CD, Alviar MJ, Dans AL, et al. Vitamin B for treating peripheral neuropathy. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;3. CD004573.
185. Head KA. Peripheral neuropathy: pathogenic mechanisms and alternative therapies. *Altern Med Rev* 2006;11:294–329.
186. Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. *Acta Diabetol* 2008;45:131–141.
187. Ceylan-Isik AF, Wu S, Li Q, Li SY, Ren J. High-dose benfotiamine rescues cardiomyocyte contractile dysfunction in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Appl Physiol* 2006;100:150–156.
188. Woelk H, Lehl S, Bitsch R, Kopcke W. Benfotiamine in treatment of alcoholic polyneuropathy: an 8-week randomized controlled study (BAP I study). *Alc Alc* 1998;33:631–638.
189. Balakumar P, Kaur T, Singh M. Potential target sites to modulate vascular endothelial dysfunction: current perspectives and future directions. *Toxicology* 2008;245:49–64.

190. Beltramo E, Berrone E, Tarallo S, Porta M. Different apoptotic responses of human and bovine pericytes to fluctuating glucose levels and protective role of thiamine. *Diab Metab Res Rev* 2009;25:566–76.
191. Oishi K, Barchi M, Au AC, Gelb BD, Diaz GA. Male infertility due to germ cell apoptosis in mice lacking the thiamin carrier, *Tht1*. A new insight into the critical role of thiamin in spermatogenesis. *Dev Biol* 2004; 266: 299–309.
192. Onodera K, Kisara K, Okabe H, Ogura Y. Studies on the effects of thiamine deficiency on rat testes. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 1980; 76: 143– 152.
193. Gangolf M, Czerniecki J, Radermecker M, et al. Thiamine Status in Humans and Content of Phosphorylated Thiamine Derivatives in Biopsies and Cultured Cells. *Plos One* 2010; 5(10): e13616. doi:10.1371/journal.pone.0013616
194. Lonsdale D. A Review of the Biochemistry, Metabolism and Clinical Benefits of Thiamin(e) and Its Derivatives Advance Access Publication 2006;3(1): 49–59
195. Auger J, Ronot X, Dadoune JP. Human sperm mitochondrial function related to motility: a flow and image cytometric assessment. *J Androl* 1989; 10: 439–448.
196. Williams AC, Ford WC. Functional significance of the pentose phosphate pathway and glutathione reductase in the antioxidant defenses of human sperm. *Biol Reprod* 2004; 71: 1309–1316.
197. Nascimento JM, Shi LZ, Tam J, et al. Comparison of glycolysis and oxidative phosphorylation as energy sources for mammalian sperm motility, using the combination of fluorescence imaging, laser tweezers, and real-time automated tracking and trapping. *J Cell Physiol* 2008; 217: 745–751.
198. Aufricht C. Heat-shock protein 70: molecular supertool? *Pediatr Nephrol* 2005; 20:707-713.
199. Yeğenoğlu ED. Etlik Piliçlerde Sıcak Stresine Alıştırma Uygulamalarının Beyin HSP 70 Düzeyine Etkisinin Araştırılması. Doktora Tezi, İzmir : Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2007.
200. Lindquist S, Craig EA. The heat shock proteins. *Annu Rev Genet* 1988; 22:631–677.
201. Boorstein WR, Ziegelhoffer T, Craig EA. Molecular evolution of the HSP 70 multigene family, *J. Mol. Evol* 1994; 38: 1–17.
202. Green JM, Gu L, Ifkovits J, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies specific for members of the mammalian 70kda heat shock protein family. *Hybridoma* 1995; 14 (4): 347.
203. Dix D. HSP 70 expression and function during gametogenesis *Cell Stress Chaperones*. 1997; 2(2): 73–77.
204. Allen RL, O'Brien DA, Eddy EM. A novel hsp70-like protein (P70) is present in mouse spermatogenic cells. *Molec Cell Biol* 1988;8:828-832.
205. Allen RL, O'Brien DA, Jones CC, Rocket DL, Eddy EM. Expression of heat shock proteins by isolated mouse spermatogenic cells. *Molec Cell Biol* 1988;8: 3260-3266.

206. Allen JW, Collins BW, Merrick BA, et al. HSP70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma* 1996;104: 414–421
207. Zakeri EZ, Welch WJ, Wolgemuth DJ. Characterization and Inducibility of HSP 70 Proteins in the Male Mouse Germ Line *J Cell Biol*, 1990; 111: 1785-1792
208. Sarge KD, Male Germ Cell-specific Alteration in Temperature Set Point of the Cellular Stress Response *The Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 18745-18748.
209. Saydam N, Steiner F, Georgiev O, Schaffner W., Heat and heavy metal stress synergize to mediate transcriptional hyperactivation by metal-responsive transcription factor mtf-1. *J Biol Chem* 2003; 278 (34): 31879-31883.
210. Zulkifli I C, Norma MT, Israf DA, Omar AR. The effect of early-age food restriction on heat shock protein 70 in heat stress broilers. *Bri Poult Sci* 2002; 43: 141-145.
211. Özer EA, Yılmaz O, Akhisaroglu M, Tuna et al. Heat shock protein 70 expression in neonatal rats after hypoxic stress. *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med* 2002; 12 (2): 112-117.
212. Hahn GM, Shiu EC, Auger EA. Mammalian stress proteins Hsp70 and Hsp28 coinduced by nicotine and either ethanol or heat. *Mol Cell Biol* 1991; 11 (12): 6034-6040.
213. Hightower LE. Heat shock stress proteins, chaperons and proteotoxicity. *Cell* 1991; 66:191-197.
214. Pelham HRB. HSP-70 accelerates the recovery of nuclear morphology after heat shock. *Embo J* 1984; 3:3095-3100.
215. Milani V, Noessner E, Ghose S, et al. Heat shock protein 70: role in antigen presentation and immune stimulation. *Int J Hyperthermia* 2002;18:563-575.
216. Ostberg JR, Kaplan KC, Repasky EA. Induction of stress proteins in a panel of mouse tissues by fever-range whole body hyperthermia. *Int J Hyperthermia* 2002;18:552-562.
217. Rylander MN, Feng Y, Bass J, Diller KR. Thermally induced injury and heat-shock protein expression in cells and tissues. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1066: 222-242.
218. Glover JR, Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* 1998;94:73-82.
219. Bukau B, Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 1998;92:351-366
220. Kasar T. Demir Eksikliği Anemisi Ve Tedavisinin Ghrelin Obestatin Ve Isı Şok Proteini 70 Üzerine Etkisi. *Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, 2009.
221. Morimoto RI, Kroeger PE, Cotto JJ. The transcriptional regulation of heat shock genes: a plethora of heat shock factors and regulatory conditions. *EXS* 1996; 77:139–163.
222. Martin J , Hartl FU. Chaperone-assisted protein folding. *Curr Opin Struct Biol* 1997; 7:41 - 52.
223. Pirkkala L, Nykanen P, Sistonen L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. *Faseb J* 2001;15:1118-1131.
224. Craig EA. The heat shock response. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 1985; 18: 239-280.

225. Tytell M, Barbe MF. Synthesis and axonal transport of heat shock proteins. In Smith, R.S. and Bisby, M.A., editors, Axonal transport . New York, NY: Alan R. Liss 1987; 473_ 492.
226. Eddy EM. Role of heat shock protein HSP70-2 in spermatogenesis. *Rev Reprod* 1999; 4: 23–30.
227. Son WY, Hwang SH, Han CT, et al. Specific expression of heat shock protein HspA2 in human male germ cells. *Mol Hum Reprod* 1999; 5: 1122–1126.
228. Bonnycastle LL, Yu CE, Hunt CR. et al. Cloning, sequencing, and mapping of the human chromosome 14 heat shock protein gene (HSPA2). *Genomics* 1994; 23: 85–93.
229. Vos MJ, Hageman J, Carra S, Kampinga HH. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry* 2008; 47: 7001–7011.
230. Boulanger J, Faulds D, Eddy EM, Lingwood CA. Members of the 70Da heat shock protein family specifically recognize sulfoglycolipids: role in gamete recognition and mycoplasma-related infertility. *J Cell Physiol* 1995; 165: 7–17.
231. Miller D, Brough S, Al-Harbi O. Characterization and cellular distribution of human spermatozoal heat shock proteins. *Hum Reprod* 1992; 7: 637–645
232. Naaby-Hansen S, Herr JC. Heat shock proteins on the human sperm surface. *J Reprod Immunol* 2009; doi:10.1016/j.jri.09.006
233. Bohring C, Krause W. Characterization of spermatozoa surface antigens by antisperm antibodies and its influence on acrosomal exocytosis. *Am J Reprod Immunol* 2003;50: 411–419.
234. Mitchell LA, Nixon B, Aitken RJ. Analysis of chaperone proteins associated with human spermatozoa during capacitation. *Mol Hum Reprod* 2007; 13: 605–613.
235. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase Misoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod* 2000; 63: 925–932.
236. Clarke GN, Hyne RV, Du Plessis Y, Johnston WI. Sperm antibodies and human in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1988; 49: 1018–1025.
237. Clarke GN, Liu DY, Baker HW. Immunoinfertility: a case study with implications for immunocontraception. *Arch Androl* 1995; 35: 21–27.
238. Asquith KL, Baleato RM, McLaughlin EA, Nixon B, Aitken RJ. Tyrosine phosphorylation activates surface chaperones facilitating sperm–zona recognition. *J Cell Sci* 2004; 117: 3645–3657.
239. Lachance C, Bailey JL, Leclerc P. Expression of Hsp60 and Grp78 in the human endometrium and oviduct, and their effect on sperm functions. *Hum Reprod* 2007; 22: 2606–2614
240. Pilch B, Mann M. Large-scale and high-confidence proteomic analysis of human seminal plasma. *Genome Biol* 2006;7: 40.
241. Kamaruddin M, Kroetsch T, Basrur PK, Hansen PJ, King WA. Immunolocalization of heat shock protein 70 in bovine spermatozoa. *Andrologia* 2004; 36: 327–334.

242. Spinaci M, Volpe S, Bernardini C, et al. Immunolocalization of heat shock protein 70 (Hsp70) in boar spermatozoa and its role during fertilization. *Mol Reprod Dev* 2005; 72: 534–541.
243. Kamaruddin M, Kroetsch T, Basrur PK, King WA . Heat shock protein 70 in bovine semen. *Biol Reprod* 1996; 54 (Suppl. 1):222
244. Huang SY, Kuo YH, Lee YP, et al. Association of heat shock protein 70 with semen quality in boars. *Anim Reprod Sci* 2000; 63:231–240.
245. Eggert-Kruse W, Neuer A, Clusmann C, et al. Seminal antibodies to human 60 kd heat shock protein (HSP 60) in male partners of subfertile couples. *Hum Reprod* 2002; 17: 726–735.
246. Neuer A, Spandorfer SD, Giraldo P, et al. The role of heat shock proteins in reproduction. *Hum Reprod Update* 2000; 6: 149–159.
247. Matwee CN, Kamaruddin M, Betts DH, Basrur PK, King WA. The effects of antibodies to heat shock protein 70 in fertilization and embryo development. *Mol Hum Reprod* 2001; 9: 829–837.
248. Huang SY, Chen MY, Lin EC, et al. Effects of single nucleotide polymorphisms in the 5'-flanking region of heat shock protein 70.2 gene on semen quality in boars. *Anim Reprod Sci* 2002; 70: 99–109.
249. Shetty J, Naaby-Hansen S, Shibahara H, et al. Human sperm proteome: immunodominant sperm surface antigens identified with sera from infertile men and women. *Biol Reprod* 1999; 61: 61–69.
250. Shibahara H, Sato I, Shetty J, et al. Two-dimensional electrophoretic analysis of sperm antigens recognized by sperm immobilizing antibodies detected in infertile women. *J Reprod Immunol* 2002; 53: 1–12.
251. Tanphaichitr N, Smith J, Mongkolsiriekieart S, Gradil C, Lingwood CA. Role of a gamete-specific sulfoglycolipid immobilizing protein on mouse sperm-egg binding. *Dev Biol* 1993;156(1):164-75.
252. Mamelak D, Lingwood C. The ATPase domain of hsp70 possesses a unique binding specificity for 3'-sulfogalactolipids. *J Biol Chem* 2001; 276: 449–456.
253. Boulanger J, Faulds D, Eddy EM, Lingwood CA. Members of the 70 Da heat shock protein family specifically recognize sulfoglycolipids: role in gamete recognition and mycoplasma-related infertility. *J Cell Physiol* 1995; 165: 7–17.
254. Mamelak D, Mylvaganam M, Whetstone H, et al. Hsp70s contain a specific sulfogalactolipid binding site. Differential aglycone influence on sulfogalactosyl ceramide binding by recombinant prokaryotic and eukaryotic Hsp70 family members. *Biochemistry* 2001; 40: 3572–3582.
255. Nixon B , Asquith KL, Aitken RJ. The role of molecular chaperones in mouse sperm–egg interactions *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005; 240: 1–10.

256. Christians ES, Zhou Q, Renard JP, Benjamin IJ. Heat shock proteins in mammalian development *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2003; 14: 283–290.
257. Huszar G, Ozenci CC, Cayli S, et al. Hyaluronic acid binding by human sperm indicates cellular maturity, viability, and unreacted acrosomal status. *Fertil Steril*, 2003; 79 (Suppl 3) : 1616-24.
258. Zakeri ZF, Wolgemuth DJ, Clayton R. Hunt Identification and Sequence Analysis of a New Member of the Mouse HSP70 Gene Family and Characterization of Its Unique Cellular and Developmental Pattern of Expression in the Male Germ Line *Molecular And Cellular Biology* 1988; 2925-2932.
259. Wiśniewski J, Kordula T, Krawczyk Z., Isolation and nucleotide sequence analysis of the rat testis-specific major heat-shock protein (HSP70)-related gene *Biochimica et Biophysica Acta* 1990; 1048(1):93
260. Zhu D, Dix DJ, Eddy EM. HSP70–2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development* 1997;124: 3007–3014.
261. Lalwani S, Sayme N, Vigue L, et al. Biochemical markers of early and late spermatogenesis: relationship between the lactate dehydrogenase-X and creatine kinase-M isoform concentrations in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1996; 43(4): 495-502.
262. Mori C, Nakamura N, Dix DJ, et al. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp70-2 knockout mice. *Dev Dyn* 1997; 208:125–136.
263. Midori Matsumoto, Shun-ichi Kurata, Hirokazu Fujimoto, Motonori Hoshi Haploid specific activations of protamine 1 and hsc70t genes in mouse spermatogenesis *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1993; 1174 (3 ,23): 274-278
264. Maekawa M, O'Brien DA, Allen RL, Eddy EM. Heat-shock cognate protein (hsc71) and related proteins in mouse spermatogenic cells *Biol Reprod.* 1989;40(4):843-852.
265. Ergur AR, Dokras A, Giraldo JR, et al. Sperm maturity and treatment choice of in vitro fertilization (IVF) or intracytoplasmic sperm injection: diminished sperm HspA2 chaperone levels predict IVF failure. *Fertil Steril* 2002; 77(5): 910-918.
266. Huszar G, Jakap A, Ozenci CC, et al. Sperm Testing by Hyaluronic acid binding: Andrologic Laboratory assesment and sperm selection., in *Biotechnology of Human Reproduction*. Parthenon Publishing Group: NY. 2002; 149-157.
267. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, et al. Targeted gene disruption of Hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93(8): 3264-3268.
268. Satı GL. İnsan Sperminde Kromozomal Yapı Anomalileri İle Hücresel Olgunlaşmanın İlişkisi. Yüksek Lisans Tezi, Antalya : Akdeniz Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005.

269. Huszar G, Vigue L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentration and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev*, 1993; 34(3): 292-298.
270. Huszar G, Corrales M, Vigue L. Correlation between sperm creatine phosphokinase activity and sperm concentrations in normospermic and oligospermic men. *Gamete Res* 1988; 19(1): 67-75.
271. Huszar G, Vigue L, Corrales M. Sperm creatine kinase activity in fertile and infertile oligospermic men. *J Androl* 1990; 11(1): 40-46.
272. Huszar G, Vigue L, Morshedi M. Sperm creatine phosphokinase isoform ratios and fertilizing potential of men: a blinded study of 84 couples treated with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1992; 57(4): 882-888.
273. Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, et al. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod* 2001; 16(6): 1209-17.
274. Huszar G, Vigue L. Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev* 1990; 25(3): 258-262.
275. Tsunekawa N, Matsumoto M, Tone S, Nishida T, Fujimoto H. The Hsp70 homolog gene, Hsc70t, is expressed under translational control during mouse spermiogenesis. *Mol Reprod Dev* 1999; 52(4): 383-391.
276. Sakkas D, Mariethoz E., Manicardi G, et al. Origin of dna damage in ejaculated human spermatozoa.; *Rev Reprod*.1999; 4:31-37.
277. Weng SH, Taylor SL, Morshedi M, et al. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm.; *Mol Hum Reprod*. 2002;8(10):984-91.
278. Paasch U, Grunewald S., Agarwal A., Glandera H.J. Activation pattern of caspases in human spermatozoa.; *Fertil Steril*. 2003;81:802-809.
279. Seli E, Sakkas D. Spermatozoal Nuclear Determinants of Reproductive Outcome: Implications For ART.; *Hum. Reprod Update*. 2005;11(4):337-349.
280. Cayli S, Sakkas D, Vigue L, ve ark. Cellular maturity and apoptosis in human sperm: creatine kinase, caspase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm.; *Mol Hum Reprod*. 2004;10(5):365-72.
281. Gunalp S. İcisi'de Matur Sperm Seciminde Yeni Bir Yontem. 2. Güncel Üreme Endokrinolojisi, Yardımcı Üreme Teknikleri Kongresi Bildiri Kitabı. Çeşme , İzmir : 2008; 104-106.
282. Ross MH, Pawlina W. *Histology A Text And Atlas*. 5th Ed., Baltimore, Philadelphia: Lippincott, 2006.
283. Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO. Erkek Üreme Sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S. (Çeviren) *Temel Histoloji*. 1. Baskı, İstanbul : Nobel Tıp Kitapevleri, 2005.
284. Kaya M, Polat S, Mete UÖ, Tap Ö, Özgür H. *Özel Histoloji Ders Notları*. Adana : Ç.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları, 2006.

285. Eroschenko P.V. diFiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle, Demir R (Çeviren). 10.baskı, Boston: Palme Yayıncılık, 2008.
286. Gubari S. Karbosulfanla kontamine besin alımının sıçan testisi üzerine kronik etkilerinin ince yapı düzeyinde araştırılması. Uzmanlık tezi, Adana : Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2008.
287. Abraham L. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R (Çeviren). 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık 2006.
288. Junquera LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S., Ahışalı B. (Çeviri Editörleri), İstanbul : Barış Kitapevi, 1998.
289. Moore-Persaud. İnsan Embriyolojisi Klinik Yonleri İle. Yıldırım M, Okar İ, Dalcık H (Çeviri Editorleri) 6. Baskı, Nobel kitabeveleri, 2002.
290. Sadler TW. Langman' s Medikal Embriyoloji Başaklar AC (Çeviren). 9. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2005.
291. Şeftalioğlu A, Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, 3. Baskı, Ankara: Feryal Matbaası, 1998.
292. Maskar Ü, Embriyoloji . 6. Baskı, İstanbul: AR Yayın Dağıtım; 1982.
293. Petorak İ, Medikal Embriyoloji, 1. Baskı, İstanbul: Beta Basım Yayım;1984.
294. Rethenburger A. Gay R. Renkli Embriyoloji Atlası, İstanbul: Nobel Tıp Kitabeveleri, 2000.
295. Sağlam B, Kronk Stres Etkisinde Sıçan Testis Sertoli Hücrelerindeki Yapısal Değişiklikler: Vimentin İmmunohistokimyası, Dna Fragmentasyonu, Serbest Oksijen Radikal Biyokimyası. Uzmanlık Tezi, İstanbul: Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü , 2009.
296. Cumhuriyet M. Temel Anatomi. Ankara : Metu Press, 2001.
297. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. Ankara: Güneş Kitabevi, 1997.
298. Sancak B, Cumhuriyet M. Fonksiyonel Anatomi. Ankara : Metu Press, 1999.
299. Özel HB, Tek Taraflı Testis Torsiyonunda KARŞI Testiste Testiküler Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Aktivitesindeki Değişimlerin Histolojik ve Histoşimik Olarak Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü , 2009.
300. Guyton AC. Textbook of medical physiology. Sixth edition, Philadelphia, Toronto : Saunders Company, 1981.
301. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Yüce A, Çeribaşı AO. Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats. Theriogenology 2007; 67: 778-785.
302. Sönmez M, Türk G, Yüce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels in male wistar rats. Theriogenology 2005; 63: 2063-2072.
303. Yasılıgöz E. Karbosulfan İnhalasyonunun Fare Testisine Ultrastrüktürel Etkisi. Yüksek Lisans Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
304. Kaya M, Türkyılmaz R. An ultrastructural study on the presence of various types of crystals in the infertile human testis. Anat Embryol 1985; 172: 217 – 225.
305. Narbaitz R, Tolnai G, Jolly EE, Barwin N, Mckay DE. Ultrastructural studies on testicular biopsies from eighteen cases of hypospermatogenesis. Fertil Steril 1978; 30 (6) : 679 – 86.

306. Sigg C, Hedinger C. Quantitative and ultrastructural study of germinal epithelium in testicular biopsies with ‘mixed atrophy’. *Androl* 1981; 13 (5): 412 – 424.
307. Ghowdhury AK, Steinberger E. Selective damage induced by heat to the testicular germinal epithelium of rats. *Anat Rec* 1963; 145 – 217.
308. Kanwar KC, Bawa SR, Pawan KS. Mode of formation of giant cells in testicular hyperthermia. *Fertil Steril* 1971; 22: 778 – 783.
309. Kaya M, Harrison RG. An analysis of the effect of ischaemia on testicular ultrastructure. *J Pathol* 1975; 117: 105-115.
310. Steinberger E, Tjioe DY. Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. *Fertil Steril*, 1969; 20 (3) : 640- 648.
311. Cooper TG. 1984. The onset and maintenance of hyperactivated motility of spermatozoa from the mouse. *Gamete Res* 9:55-74,
312. Francavilla S, Santiemma V, Francavilla F, et al. Ultrastructural changes in the seminiferous tubule wall and intertubular blood vessels in human cryptorchidism. *Arc Androl* 1979; 2 : 21 – 30.
313. Powers JM, Schaumburg HH. The testis adreno-leukodystrophy. *Am J Pathol* 1981 ; 102 : 90–98.
314. Nistal M, Paniagua R, Picazo ML. Testicular and epididymal involvement in Fabry’s disease. *J Pathol* 1983 ; 141 : 113–124.
315. Özgür H, Kaya M, Doran Ş, Solmaz S. Ultrastructure of the seminiferous tubules in human testes before and after varicocelelectomy. *Anat Embryol* 2003 ; 207 : 343–353.
316. Makita Y, Omura M. Effects of perinatal combined exposure to 1,1-dichloro-2,2 bis (p-chlorophenyl) ethylene and tributyltin on male reproductive system. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006 ; 99(2) : 128-32.
317. Bustos – Obregon E, Gonzales – Hormazabal P. Effect of a single dose of malathion on spermatogenesis in mice. *Asian J Androl* 2003 ; 5(2) : 105-7.
318. Ambrus A, Hamilton DJ, Kuiper HA, Racke KD. Significance of impurities in the safety evaluation of crop protection products. (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2003 ; 75 (7) : 937 – 973.
319. Steiss J.E, Braund K.G , Clark E.G. Neuromuscular effects of acute 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4- D) exposure in dogs. *J. Neurol Sci* 1987; 78: 295- 301.
320. Squibb R.E, Tilson H.A, Mitchell CL. Neurobehavioral assessment of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4- D) in rats. *Neurobehav. Toxicol Teratol* 1983; 5: 331- 335.
321. Franken DR, Bastiaan HS, Kidson A, Wranz P, Habenicht UF. Zona pellucida mediated acrosome reaction and sperm morphology. *Andrologia* 1997 ;29(6):311-317.
322. Franken DR, Kruger TF, Oehninger S, et al. The ability of the hemizona assay to predict human fertilization in different and consecutive in-vitro fertilization cycles. *Hum Reprod* 1993;8(8):1240-4.

323. Lopes S, Sun JG, Jurisicova A, Meriano J, Casper RF. Sperm deoxyribonucleic acid fragmentation is increased in poor-quality semen samples and correlates with failed fertilization in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1998 ;69(3):528-32.
324. Forejt J. Spermatogenic failure of translocation heterozygotes affected by H- 2 inbreed gene in mouse. *Nature* 1976; 260: 143–145.
325. Krazanowska H. Inheritance of sperm head abnormalities types in mice and the role of Y-chromosomes. *Genet Res* 1976; 28: 189–198.
326. Styrna J, Imai HT, Moriwaki K. An increased level of sperm abnormalities in mice with a partial deletion of the Y chromosome. *Genet Res* 1991; 57: 195–199.
327. Styrna J, Klag J, Moriwaki K. Influence of partial deletion of the Y chromosome on mouse sperm phenotype. *J Reprod Fertil* 1991; 92: 187–195.
328. Topham JC. Do induced sperm-head abnormalities in mice specifically identify mammalian mutagens rather than carcinogens? 1980; 74(5) : 379-387.
329. Afifi NA, Ramadan A, Abd-El-Aziz MI, Saki EE. Influence of dimethoate on testicular and epididymal organs, testosterone plasma level and their tissue residues in rats. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 1991; 98 :419- 423.
330. Dunnick JK, Gupta BN, Harris MW, Lamb JC. Reproductive toxicity of dimethyl methylphosphate in the male fisher 344 rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol* 1984; 72: 379- 387.
331. Farag AT, Ewediah MH, El-Okazy AM. “Reproductive toxicology of acephate in male mice”, *Reprod. Toxicol* 2000; 14: 457-462
332. Lim J, Miller MG. Role of testis exposure levels in the insensitivity of prepubertal rats to carbendazim – induced testicular toxicity. *Fundam Appl Toxicol* 1997; 37:158-167.
333. Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermansen IM, Bonefeld Jorgensen EC. “Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity and aromatase activity in vitro” *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002; 179: 1-12
334. Uzunhisarcıklı M, Kalender Y, Dirican K, et al. Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and the protective role of vitamins C and E. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2007; 87(2): 115-122
335. Schrader SM, Turne TW, Ratcliffe JM. The effects of ethylene bromide on semen quality: a comparison of short term and chronic exposure. *Reproductive Toxicology* 1988; 2: 191-198
336. Xia Y, Cheng S, Bian Q, et al. Genotoxic effects of spermatozoa of carbaryl-exposed workers. *Toxicol Sci* 2005; 85:615-623.
337. Chung MK, Kim JC, Han SS. Developmental toxicity of flupyrzofos, a new organophosphate insecticide, in rats. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 723-729.
338. Breckenridge C, Pesant M, Durham HD, Ecobichon DJ. A 30-day toxicity study of inhaled fenitrothion in the albino rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1982; 62: 32-43.
339. Büyükkömürcü F. Ratların Testisleri Üzerine Metil Parathionun Etkisi ve Vitamin C ve E’nin Koruyucu Rolü. Yüksek Lisans Tezi, Ankara :Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü , 2006.

340. Kodentsova VM, Vrzhesinskaya OA, Spirichev VB. Male fertility: a possible role of vitamins. *Ukr Biokhim Z* 1994; 66: 17– 22.
341. Kim KH, Wang ZQ. Action of vitamin A on the testis: role of the Sertoli cell. In: Russel, L.D., Grisworld, M.D. (Eds.), *The Sertoli Cell*. Cache River Press Clearwater FL 1993; 517– 535.
342. Vezina D, Mauffette F, Roberts KD, Bleau G. Selenium-vitamin E supplementation in infertile men. Effects on semen parameters and micronutrient levels and distribution. *Biol Trace Elem Res* 1996; 53: 65– 83
343. Ciereszko A, Dabrowski K. Sperm quality and ascorbic acid concentration in rainbow trout semen are affected by dietary vitamin C: an across-season study. *Biol Reprod* 1995; 52: 982– 988.
344. Ural M, Özgüner M, Büyükvanlı B, Kuplay H, Köylü H. Akut diazinon toksisitesinin testis dokusunda oluşturduğu histolojik değişiklikler ve bu değişikliklere C vitamini ve E vitaminin etkisi *SD Üniv Tıp Fak Derg* 2006;13(2)/ 22-25.
345. Yousef MI, Abdallah GA, Kamel KI. Effect of ascorbic acid and Vitamin E supplementation on semen quality and biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science* 2003; 76(1): 99-111.
346. Sobhon P, Mitranond V, Tosukhowong P, Chindaduangrat W. Cytological changes in the testes of Vitamin – A deficient rats. *Acta Anat* , 1979; 103:169 – 183.
347. Rajeswary S, Mathew N, Akbarsha MA, Kalyanasundram M, Kumaran B. Protective effect of vitamin E against carbendazim – induced testicular toxicity – histopathological evidences and reduced residue levels in testis and serum. *Arch Toxicol*. 2007 ; 81 (11) : 813-21.
348. Wu SH, Oldfield JE, Whanger PD, Weswig PH. Effect of Selenium, Vitamin E, and Antioxidants on Testicular Function in Rats *Biology of Reproduction* 1973; 8: 625-629.
349. Mclean J, Russell D, Griswold D. Biological Activity and Enrichment of Spermatogonial Stem Cells in Vitamine A- Deficient and Hyperthermia – Exposed Testis from Mice Based on Colonization Following Germ Cell Transplantation. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 1374-1379.
350. Griswold M, Bioshop P, Kim K, Ping R, et al. Function of Vitamine A in Normal and Synchronized Seminiferous tubules. *Ann NY Acad Sci*, 1989; 564: 154-172.
351. Lazlo A. The relationship of heat shock proteins, thermotolerance and protein synthesis. *Exp. Cell Res* 1988; 178: 401-414
352. Lee YJ, Dewey W. Effect of cycloheximide or puromycin on induction of thermotolerance by heat in Chinese Hamster ovary cells: dose fractionation at 45.5 °C. *Cancer Res* 1987; 47: 5960-5966.
353. Garrido C, Gurbuxani S, Ravagnan L, Kroemer G. Heat shock proteins: Endogenous modulators of apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 286:433-442.
354. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Experimental Cell Research* 1999; 248: 30–43.

355. Ellis RJ, Van Der Vies SM. Molecular chaperones. *Ann Rev Biochem* 1991; 60: 321- 347.
356. Nıkfarjam M, Muralıdharan V, Su K. Patterns of heat shock protein (HSP 70) expression and kupffer cell activity foollowing thermal ablation of liver and colorectal liver metastases. *İnt J Hyperthermia* 2005; 21(4): 319-332.
357. Mosser DD, Caron AW, Bourget L. Role of the human heat shock protein HSP 70 in protection against stres-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17(9): 5317-5327.
358. Mosser DD, Caron AW., Bourget L, Meriin AB. The chaperone of HSP 70 is required for protection against stres-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 2000; 20(19): 7146 - 7159.
359. Özen OA , Akpolat N, ve ark. Effect of formaldehyde inhalation on Hsp70 in seminiferous tubules of rat testes: an immunohistochemical study *Toxicology and Industrial Health* 2005; 21: 249 - 254
360. Ferlin A, Speltra E, Patassini C. Heat Shock Protein and Heat Shock Factor Expression in Sperm Relation to Oligozoospermia and Varicocele. *The Journal of Urology* 2010; 183 (3): 1248-1252.
361. Özdemirler EG, Toker NK , Durlanık Ö, et al. The role of heat shock protein 70 (HSP 70) in male infertility: is it a line of defense against sperm DNA fragmentation? *Fertility and Sterility* 2008; 90(2): 322-327.
362. Feng HL, Tan EQ, Zheng LJ, et al. Expression Of Hsp-70, Estrogen And Progesterone Receptors In Normal And Subfertile Human Testicular Tissue *Theriogenology* 1998; 49 (1): 370.
363. Feng HL, Sandlow JI, Sparks AE. Decreased expression of the heat shock protein hsp70-2 is associated with the pathogenesis of male infertility. *Fertility & sterility* 2001; 76(6):1136-1139
364. Idahl A, Boman J, Kumlin U. Demonstration of Chlamydia trachomatis IgG antibodies in the male partner of the infertile couple is correlated with a reduced likelihood of achieving pregnancy. *Hum. Reprod.* 2004; 19: 1121–1126.
365. Idahl A, Abramsson L, Kumlin U, Liljeqvist JA, Olofsson JI. Maleserum Chlamydia trachomatis IgA and IgG, but not heat shock protein 60 IgG, correlates with negatively affected semen characteristics and lower pregnancy rates in the infertile couple. *Int J Androl* 2007; 30: 99–107.
366. Dieterle S, Wollenhaupt J. Humoral immune response to the chlamydial heat shock proteins hsp60 and hsp70 in Chlamydiaassociated chronic salpingitis with tubal occlusion. *Hum Reprod* 1996; 11: 1352–1356.

9. ÖZGEÇMİŞ

17.09.1980 tarihinde İstanbul’ da doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Malatya’da tamamladım. Daha sonra Fırat Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazanarak yüksek öğretime başladım. 2004 yılında Biyolog ünvanıyla mezun oldum. 2010 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Programı Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans eğitimime başladım. Fırat Üniversitesi Hastanesi Tüp Bebek Ünitesinde Biyolog göreviyle çalışmaktayım.