



**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
VHE-DR-2013-0001**

**RAT TESTİS DOKUSUNDA
POLİKLOROBİFENİL TOKSİKASYONUNA
ALFA LİPOİK ASİT KULLANIMININ ETKİSİ**

Özay GÜLEŞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ülker EREN**

AYDIN-2013

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI
VHE-DR-2013-0001**

**RAT TESTİS DOKUSUNDA
POLİKLOROBİFENİL TOKSİKASYONUNA
ALFA LİPOİK ASİT KULLANIMININ ETKİSİ**

Özay GÜLEŞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ülker EREN**

AYDIN-2013

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Histoloji-Embriyoloji (Veteriner) Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Özey GÜLEŞ tarafından hazırlanan “Rat Testis Dokusunda Poliklorobifenil Toksikasyonuna Alfa Lipoik Asit Kullanımının Etkisi” başlıklı tez, 04.01.2013 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

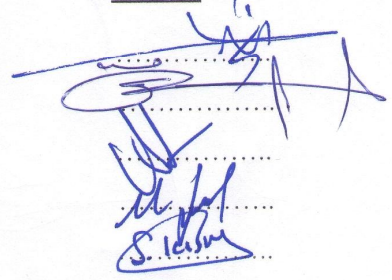
Ünvanı, Adı ve Soyadı :

(Başkan) Prof. Dr. Ülker EREN
Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY
Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK
Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI
Doç. Dr. Şadiye KUM

Üniversitesi :

ADÜ, Veteriner Fakültesi
AÜ, Veteriner Fakültesi
ADÜ, Veteriner Fakültesi
ADÜ, Veteriner Fakültesi
ADÜ, Veteriner Fakültesi

İmzası:



Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun
..... Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Sacide KARAKAŞ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Solunduğunda, ağız yoluyla alındığında, deriye nüfuz ettiğinde erkek ve dişilerin üreme fonksiyon ve kapasitelerini azaltan ve/veya doğacak bireyi etkileyecek kalıtsal olmayan olumsuz etkileri meydana getiren veya olumsuz etkilerin oluşumunu hızlandıran kimyasal maddelere “üreme için toksik kimyasal madde” denir. İnsan sağlığına toksik etkisi olan bu kimyasalların etkileri ve bu toksikasyona karşı alınabilecek önlemler ayrıntılı şekilde araştırılmalıdır.

Poliklorobifenil (PCB) bileşikler; pestisitlerin katkı maddesi olarak, matbaa mürekkebinde, boyalarda, plastik yapımında, yapıştırıcılarda, elektrik transformatörler ve kondansatörler için soğutucu ve yalıtım sıvısı olarak, vakum pompaları, yüksek gerilim kablo ve tel yapımında, trafolar, floresan lambaların balast kapasitörleri, hidrolik ve makine yağlarında, karbonsuz kopya kağıdı imalatında, macun yapımında, izolator görevi yapan maddelerde ve dolgu maddelerinde sıkça kullanılmaktadır. Bu maddeler atık maddeler ile çevreye kolayca yayıldığından akarsu ve denizleri kirleterek sularda yaşayan canlıları da etkilemektedirler. PCB’ler üretim veya kullanılmaları sırasında hava, toprak ve su sistemlerine geçerler. Yaygın şekilde kullanımları ve fiziki, kimyasal ve biyolojik yıkımlanmaya son derece dayanıklı olmaları sebebiyle, çevre ve besin kirlenmelerine yol açabilirler.

PCB bileşikler, oksidatif strese yol açıp serbest radikallerin üretimine neden olarak, hem hayvanlarda hem de insanlarda toksik etkiye neden olmaktadır. PCB bileşiklerinin toksikasyon sonucu erkek ve dişi genital sistem, endokrin sistem, üriner sistem, sinir sistemi, dolaşım sistemi, sindirim sistemine ait organlar ile enzim ve kan değerlerini etkiledikleri, aynı zamanda karsinogenik, immun sistemi baskılayıcı, doku ve organlarda apoptozisi artırıcı yönde etkili oldukları bildirilmiştir.

Bu çalışmada testislerde spermatogenezis ve testosteron üretimi üzerine etkileri olabilen PCB’nin toksikasyonuna karşı, alfa lipoik asitin (ALA) antioksidan rolünün olup olmadığı, histolojik ve biyokimyasal farklılık oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır.

Söz konusu araştırma “Testis dokusunda poliklorobifenil (PCB) toksikasyonuna karşı alfa-lipoik asit kullanımının etkisi” isimli ve VTF-10017 kodlu proje ile Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
EKLER	xvi
1. GİRİŞ	1
1.1. Erkek Genital Sistem	1
1.1.1. Testisin Yapısı	1
1.1.2. Tubulus Seminiferus Kontortus	2
1.1.3. Sertoli Hücresi	3
1.1.4. İntertubuler Alanlar	6
1.1.4.1. Leydig hücreleri	6
1.1.5. Spermatogenezis	9
1.1.5.1. Spermatogenezisin kontrolü	11
1.1.6. Spermatozoonun Yapısı	12
1.1.6.1. Baş	12
1.1.6.2. Boyun	13
1.1.6.3. Orta parça	13
1.1.6.4. Ana parça	13
1.1.6.5. Son parça	13
1.1.7. Eşey Hücrelerini İleten Yollar	14
1.1.7.1. Tubulus rektus	14
1.1.7.2. Rete testis	14
1.1.7.3. Epididimis	14
1.1.7.4. Duktus deferens	15
1.1.8. Testisin Embriyolojisi ve Germ Hücrelerinin Oluşumu	16
1.1.9. İlk Spermatogenetik Dalga	19
1.1.10. Spermatogenik Siklus Evreleri	20
1.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	25

1.2.1. Serbest Radikal Türleri	26
1.2.1.1. Süperoksit radikali (O_2^-)	27
1.2.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)	27
1.2.1.3. Hidroksil radikali (OH)	28
1.2.1.4. Hipoklorik asit (HOCl)	28
1.2.2. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları	28
1.2.3. Serbest Radikallerin Hücrelerdeki Etkileri	29
1.2.3.1. Lipidlere etkisi	29
1.2.3.2. Proteinlere etkisi	31
1.2.3.3. Karbonhidratlara etkisi	31
1.2.3.4. DNA üzerine etkisi	31
1.2.3.5. Testiste oksidatif stres	32
1.3. Antioksidan Sistem	32
1.3.1. İnfertilitede Antioksidanların Rolü	34
1.3.2. Enzimatik Antioksidanlar	35
1.3.2.1. Mitokondrial sitokrom oksidaz	35
1.3.2.2. Süperoksit dismutaz (SOD)	35
1.3.2.3. Katalaz	36
1.3.2.4. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon redüktaz (GR)	36
1.3.2.5. Glutasyon transferaz	37
1.3.2.6. Hem oksijenaz (Heme oxygenase, HO)	37
1.3.2.6.1. Hem oksijenaz-1 (Heme oxygenase-1, HO-1)	38
1.3.3. Nonenzimatik Antioksidanlar	39
1.3.3.1. Glutasyon (Glutathione, GSH)	39
1.3.3.2. E Vitamini	39
1.3.3.3. Askorbik asit (Vitamin C)	40
1.3.3.4. Beta-karoten	41
1.3.3.5. Albumin	42
1.3.3.6. Bilirubin	42
1.3.3.7. Serüloplazmin	42
1.3.3.8. Transferrin	42
1.3.3.9. Melatonin	42
1.3.3.10. Ürik asit	43

1.3.3.11. Alfa lipoik asit (ALA- 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid- 6, 8- dithiooctanoic acid- thioctic acid)	43
1.4. Testis Dokusunu Etkileyen Çevresel Faktörler	46
1.4.1. Poliklorobifeniller (PCB)	46
1.4.1.1. Kimyasal yapıları	47
1.4.1.2. Kontaminasyon yolları.....	48
1.4.1.3. Doğada ve canlılardaki metabolizması	49
1.4.1.4. Ülkemizde PCB bileşikleri ile ilgili yasal düzenlemeler	50
1.4.1.5. PCB'lerin canlılar üzerine etkileri	52
1.4.1.5.1. Erkek genital sistem üzerine etkileri	52
1.5. Apoptozis	55
1.5.1. Apoptozis Mekanizmaları	56
1.5.1.1. Mitokondri/Sitokrom c aracılı apoptozis oluşturulması	56
1.5.1.2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme ...	56
1.5.1.3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması	57
1.5.4. Apoptozisin Genetik Kontrolü	58
1.5.5. Testiste Apoptozis	58
2. GEREÇ VE YÖNTEM	62
2.1. Gereç	62
2.2. Yöntem	63
2.2.1. Histolojik Yöntem	63
2.2.1.1. Üçlü boyama metodunun uygulanması	63
2.2.1.2. Histolojik değişimlerin belirlenmesi	64
2.2.1.3. Histometrik değişimlerin belirlenmesi	64
2.2.2. Histokimyasal Yöntem (TUNEL Metodu)	65
2.2.2.1. Apoptozis yoğunluğunun değerlendirilmesi	66
2.2.3. İmmunohistokimyasal Yöntem (Strept ABC Boyama Yöntemi)	66
2.2.3.1. HO-1 yoğunluğunun değerlendirilmesi	67
2.2.4. Biyokimyasal Yöntem	68
2.2.4.1. Serum testosteron seviyelerinin belirlenmesi	68
2.2.4.1.1. Plate hazırlanması	69
2.2.4.2. Serum ve testis doku örneklerinde total oksidan ve antoksidan seviyelerinin belirlenmesi	69

2.2.4.2.1. Testis doku örneklerinden süpernatant hazırlanması	69
2.2.4.2.2. Testis dokusunda Lowry metodu (folin fenol metodu) ile protein tayini	70
2.2.4.3. Serum ve testis doku örneklerinde total oksidan seviyesi (TOS) analizi	70
2.2.4.4. Serum ve testis doku örneklerinde total antioksidan seviyesi (TAS) analizi	72
2.2.5. Moleküler Biyolojik Yöntem [SDS-PAGE (Poliakrilamit jel elektroforezis) Western Blot]	73
2.2.5.1. Western blot yöntemi için lizat hazırlanması	73
2.2.5.2. SDS-PAGE (Poliakrilamit jel elektroforezis) Western blot protokol	74
2.2.5.3. Hem oksijenaz-1 miktarının değerlendirilmesi	78
2.2.6. Sitolojik Yöntem	78
2.2.7. İstatistiksel analiz	78
3. BULGULAR	80
3.1. Vücut Ağırlığı ve Testis Ağırlığı	80
3.2. Histolojik Bulgular	80
3.2.1. Histolojik Değişimler	87
3.2.2. Histometrik Değişimler	90
3.3. Histokimyasal Bulgular	93
3.3.1. Apoptozis Yoğunluğunun Değerlendirilmesi	93
3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	95
3.4.1. Hem Oksijenaz-1 Yoğunluğunun Değerlendirilmesi	95
3.5. Biyokimyasal Bulgular	97
3.5.1. Serum Testosteron Değeri	97
3.5.2. Serum ve Testis Dokusu Total Oksidan Seviyesi (TOS)	97
3.5.3. Serum ve Testis Dokusu Total Antioksidan Seviyesi (TAS)	98
3.6. Moleküler Biyolojik Bulgular	98
3.7. Sitolojik Bulgular	101
3.7.1. Spermatozoon Morfojisinin Değerlendirilmesi	101
3.8. Korelasyon Analizi	103
4. TARTIŞMA	105
4.1. Vücut Ağırlığı ve Testis Ağırlığı	105
4.2. Histolojik Görünüm	106
4.3. Histolojik Değişimler	107
4.4. Tubulus Çapı	108

4.5. Epitel Yüksekliği	108
4.6. XIV. Dönem Tubulus % Yoğunluğu	109
4.7. Apoptozis Yoğunluğu	109
4.8. HO-1 Yoğunluğu	110
4.9. Serum Testosteron Değeri	111
4.10. Serum ve Testis Dokusu Total Oksidan Seviyesi (TOS) ve Total Antioksidan Seviyesi (TAS)	111
4.11. Spermatozoon Morfolojisinin Değerlendirilmesi	112
5. SONUÇ	114
ÖZET	117
SUMMARY	119
KAYNAKLAR	121
ÖZGEÇMİŞ	146
TEŞEKKÜR	147

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP	Androjen Bağlayıcı Protein (Androgen Binding Protein)
ADR	Adriamisin (Adriamycin)
AIF	Apoptozis-İndükleyici Faktör (Apoptosis Inducing Factor)
ALA	Alfa Lipoik Asit (Alpha lipoic acid, 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid, 6,8- dithiooctanoic acid, thiocetic acid)
AMH	Antimüllerian Hormon (Anti-Mullerian Hormone)
3 β -HSD	3 β Hidroksisteroid Dehidrogenaz (3 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase)
Blk	Blenk (Blank)
CAT	Katalaz (Catalase)
CO	Karbon Monoksit (Carbon Monoxide)
Cu-SOD	Bakır Süperoksit Dismutaz (Copper Superoxide Dismutase)
DNA	Deoksiribonükleik Asit (Deoxyribonucleic acid)
EPG	Epidermal Büyüme Faktörü (Epidermal Growth Factor)
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon (Follicle Stimulating Hormone)
GSSG	Okside Glutasyon (Oxidized Glutathione)
GnRH	Gonadotropin Salınım Hormonu (Gonadotropin Releasing Hormone)
GR	Glutasyon Redüktaz (Glutathione Reductase)
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz (Glutathione Peroxidase)
GSH	Glutasyon (Glutathione)
GsT	Glutasyon Transferaz (Glutathione-S-Transferase)
HO	Hem Oksijenaz (Heme Oxygenase)
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit (Hydrogen Peroxide)
HOCl	Hipoklorik Asit (Hypochlorous acid)
ICSH	İntersitisel Hücre Uyarıcı Hormon (Intersitisel Cell Stimulating Hormone)
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-1 (İnsulin-Like Growth Factor-1)
17-KSR	Ketosteroid Redüktaz (17-Ketosteroid Reductase)
L	Lipid Radikali (Lipid Radical)
LH	Lüteinizasyon Hormon (Luteinisation Hormone)
LOO	Lipid Peroksid Radikali (Lipid Peroxide Radical)
LOOH	Lipid Hidroperoksid (Lipid Hydroperoxide)

MDA	Malondialdehid (Malondialdehyde)
MIF	Müllerian İnhibitör Faktör (Mullerian Inhibiting Factor)
Mn-SOD	Manganez Süperoksit Dismutaz (Manganese Superoxide Dismutase)
MP	Metil Parathion (Methyl Parathion)
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)
NGF	Sinir Büyüme Faktörü (Nerve Growth Factor)
NSB	Non Spesifik Bağlanma (Non-Specific Binding)
O ₂ ⁻	Süperoksit Radikali (Superoxide radical)
OH	Hidroksil Radikali (Hydroxyl Radical)
PCB	Poliklorobifenil (Polychlorinated Biphenyl)
PCDF	Poliklorlu Dibenzofuranlara (Polychlorodibenzofurane)
PCDD	Poliklorlu Dibenzo-P-Dioksin (Polychlorodibenzodioxine)
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (Platelet-Derived Growth Factor)
PIK	Proteaz İnhibitör Kokteyli (Protease İnhibitor Coctail)
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate Buffer Saline)
PGC	Primordial Germ Hücre (Primordial Germ Cell)
p-NP	Para-Nonilfenol (Para-Nonylphenol)
PVDF	Polivinil Florid (Polyvinylidenfluorid)
ROS	Reaktif Oksijen Bileşikleri (Reactive Oxygen Species)
sABC	Strept Avidin-Biyotin Kompleks (Strept Avidin-Biotin Complex)
SDH	Sorbitol Dehidrojenaz (Sorbitol Dehydrogenase)
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat- Poliakrilamit Jel Elektroforezis (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SOD	Süper Oksit Dismütaz (Superoxide Dismutase)
TA	Total Aktivite (Total Activity)
TAS	Testis Belirleyici Faktör (Testis Determining Factor)
TBS	Tris Tampon Solüsyonu (Tris Buffer Saline)
TCDD	2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-P-Dioksin (Tetrachlorodibenzo-P-Dioxin)
TAS	Toplam Antioksidan Seviyesi (Total Antioxidant Status)
TdT	Terminal Deoksinükleotid Transferaz (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase)
TEMED	Tetra Metil Etilen Daimin (Tetramethylethylenediamine)

TGF α	Transforme Edici Büyüme Faktörü A (Transforming Growth Factor Alpha)
TGF β	Transforme Edici Büyüme Faktörü B (Transforming Growth Factor Beta)
TOS	Toplam Oksidan Seviyesi (Total Oxidant Status)



ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1.1. Reaktif oksijen bileşikleri (ROS).	26
Çizelge 1.2. Serbest oksijen radikal kaynakları.	29
Çizelge 1.3. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma.	34
Çizelge 1.4. Gıda maddelerindeki kabul edilebilir PCB seviyeleri.	51
Çizelge 3.1. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında vücut ağırlığı ve testis ağırlık değerleri.	80
Çizelge 3.2. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında subbazal vakuolizasyon.	89
Çizelge 3.3. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında epiteliyal vakuolizasyon.	89
Çizelge 3.4. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında epiteliyal dökülme.	90
Çizelge 3.5. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında tubuler lumene hücre dökülmesi.	90
Çizelge 3.6. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında kapillar hiperemi.	90
Çizelge 3.7. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait stage VII-VIII seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği değerleri.	91
Çizelge 3.8. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait stage XII-XIV seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği değerleri.	92
Çizelge 3.9. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait XIV. dönem tubulus % yoğunluk değerleri.	93
Çizelge 3.10. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında seminifer tubul başına düşen apoptotik hücre sayısı.	93
Çizelge 3.11. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında % TUNEL pozitif tubulus oranı.	95
Çizelge 3.12. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait HO-1 boyanma yoğunluğu.	95
Çizelge 3.13. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait serum testosteron değerleri.	97
Çizelge 3.14. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait serum ve testis dokusu total oksidan seviyesi.	98

Çizelge 3.15. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait serum ve testis dokusu total antioksidan seviyesi.	98
Çizelge 3.16. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait HO-1 yoğunlukları (Western blot yöntemi).	99
Çizelge 3.17. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait anormal spermatozoon oranı.	101
Çizelge 3.18. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında serum ve testis dokusu total oksidan seviyesi, serum ve testis dokusu total antioksidan seviyesi, serum testosteron değerleri, % TUNEL pozitif tubulus oranı, HO-1 yoğunluğu ve anormal spermatozoon sayısı arasında korelasyon analizi.	104

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1.1. Testosteron oluşum mekanizması.	8
Şekil 1.2. Spermatogenezis.	10
Şekil 1.3. Spermiyogenezis.	11
Şekil 1.4. Rat/fare spermatozoonu.	14
Şekil 1.5. Germ hücre gelişimi.	17
Şekil 1.6. Rat spermatogenetik siklus dönemleri.	22
Şekil 1.7. Doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu.	30
Şekil 1.8. Heme'in heme oksijenaz aracılığıyla parçalanması.	38
Şekil 1.9. PCB'lerin genel kimyasal yapısı.	48
Şekil 1.10. Hücre yüzey reseptör ve mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozisin tetiklenmesi.	57
Şekil 3.1. Kontrol grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü (L: tubulus lumeni, çizgi: tubulus epitel katmanı, X: Leydig hücreleri, a: arteriol, v: venül). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	81
Şekil 3.2. Sham kontrol grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü (T: tunika albugineya). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	81
Şekil 3.3. ALA grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	82
Şekil 3.4. PCB grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. (X: tubulus kumenine dökülen germ hücreleri, Ok: germ hücreleri arasında ayrılmalar). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	83
Şekil 3.5. ALA+PCB grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	83
Şekil 3.6. Testis dokusunda VII. dönem tubulus görüntüsü (X: 12. adım nükleusu eğri spermatid, L: lumen). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	84
Şekil 3.7. Testis dokusunda VIII. dönem tubulus görüntüsü (X: sekizinci adım spermatid, S: sertoli hücresi). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	85

Şekil 3.8.	Testis dokusunda XII. dönem tubulus görüntüsü (oklar: 12. adım spermatid). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	86
Şekil 3.9.	Testis dokusunda XIII. dönem tubulus görüntüsü (X: 13. adım spermatid). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	86
Şekil 3.10.	Testis dokusunda XIV. dönem tubulus görüntüsü (*: mitotik figürler). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	
Şekil 3.11.	PCB grubuna ait testis dokusunda gözlenen histolojik değişimler (A-D). A. Subbazal vakualizasyon (V). B. Epitelial vakuolizasyon (V). C. Epitelial dökülme (*). D. Tubulus kumenine dökülen germ hücreleri (X). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	88 89
Şekil 3.12.	PCB grubuna ait testis dokusunda kapilar hiperemi (X: kapilar hiperemi). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	91
Şekil 3.13.	Kontrol (A), Sham kontrol (B), PCB (C) ve ALA-PCB (D) grubuna ait testis dokusunda VII-VIII. dönem tubulus görüntüsü. Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	92
Şekil 3.14.	Kontrol (A), Sham kontrol (B), PCB (C) ve ALA-PCB (D) grubuna ait testis dokusunda XII-XIV. dönem tubulus görüntüsü. Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.	94
Şekil 3.15.	Kontrol grubuna (A) ve sham kontrol (B) grubuna ait tubulus seminiferus kontortusta gözlenen apoptotik hücreler (ok). TUNEL yöntemi.	94
Şekil 3.16.	PCB grubuna ait tubulus seminiferus kontortusta gözlenen apoptotik hücreler (oklar). TUNEL yöntemi.	94
Şekil 3.17.	PCB (A) ve ALA-PCB (B) grubuna ait tubulus seminiferus kontortusta HO-1 pozitif hücreler (kahverengi presipitasyonlar). sABC boyama yöntemi.	96
Şekil 3.18.	Kontrol (A) ve sham kontrol (B) grubuna ait tubulus seminiferus kontortusta HO-1 pozitif hücreler (kahverengi presipitasyonlar). sABC boyama yöntemi.	96
Şekil 3.19.	Kontrol grubuna ait HO-1 bantları (n=6).	99
Şekil 3.20.	Sham kontrol grubuna ait HO-1 bantları (n=6).	99
Şekil 3.21.	PCB grubuna ait HO-1 bantları (n=6).	100

Şekil 3.22.	ALA grubuna ait HO-1 bantları (n=6).	100
Şekil 3.23.	ALA+PCB grubuna ait HO-1 bantları (n=6).	100
Şekil 3.24.	PCB grubuna ait sperma frotinde anormal spermatozoon görüntüsü (oklar). BA: Baş anormalliği, KA: Kuyruk anormalliği. Eozin-nigrosin boyama yöntemi.	102
Şekil 3.25.	ALA-PCB grubuna ait sperma frotinde anormal spermatozoon görüntüsü (oklar). BA: Baş anormalliği, KA: Kuyruk anormalliği. Eozin-nigrosin boyama yöntemi.	102
Şekil 3.26.	Kontrol grubuna ait sperma froti görüntüsü. Eozin-nigrosin boyama yöntemi.	103



EKLER

Çizelge 1. Uluslar arası temel ölçü birimleri

Birim	Sembol
Sıcaklık	°C
Dakika	'
Gram	g
Kilogram	kg
Litre	L
Mikrogram	µg
Mikrometre	µm
Saniye	''

1. GİRİŞ

1.1. Erkek Genital Sistem

Erkek üreme sistemi; spermatozoon (spermiyum) ve erkek cinsiyet hormonlarını üreten testisler, üretilen spermatozoonların depolanması ve iletilmesinden sorumlu genital kanallar, seminal sıvı adı verilen kayganlaştırıcı salgıyı yaparak spermiyumların beslenmesini ve taşınmasını kolaylaştıran eklenik genital bezler ile dış genital organ olan penisten oluşur (Junqueira ve ark 2006, Ergün 2010).

1.1.1. Testisin Yapısı

Genital kanalların ilk bölümünü oluşturan testisler, yarım ay biçimindeki epididimisin eklenik olduğu, tunika albugineya adı verilen sıkı bağ dokudan yapılmış kalın bir kapsül ile sarılı, yumurta biçiminde bir çift organdır. Skrotum denilen bir kese içinde funikulus spermatikus ile asılı durur (Ergün 2010). Testislerin ısıısını, intra-abdominal ısıının altında tutma gibi önemli görevi olan skrotum, deriden bir kılıftır. İnce ve seyrek kıllı olan bu deri kılıf altında gevşek bağ doku bulunur. Gevşek bağ doku musculus cremasteri sarar. Bu kas tabakasının altında, peritonun evaginasyonu ile seröz bir kese şeklini alan tunika vaginalis testis'in viseral yaprağı (mezotelyum) vardır (Ergün 2010). Bu yaprak testis ve epididimisi örtmek suretiyle tunika albugineya ile temas halindedir. Tunika vaginalis'in parietal yaprağı skrotuma yapışıktır. Tunika vaginalis'in iki yaprağı arasındaki boşluk, pelvis boşluğuyla ya da bir başka deyişle karın boşluğuyla ilişkidir. Gelişmenin başlangıç evresinde karın boşluğunda bulunan testislerin skrotuma inmesi -dessensus testis- bu yolla gerçekleşir. Mezoteliyal örtünün altındaki tunika albugineya, yoğun olarak kollagen iplikler ve az sayıda elastik iplikleri içeren yoğun bağ dokudan oluşan bir kapsüldür. Tunika albugineya testisin posterior yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur (Dellmann ve Brown 1987, Junqueira ve ark 2006). Mediastinum testisten organın içerisine radier seyirli (ışınsal) septula testis olarak bilinen bağ doku bölmeleri gönderir (Ergün 2010). Bu bağ doku oluşumu köpek ve domuzda oldukça kalın iken, diğer evcil hayvanlarda fark edilmeyecek kadar incedir (Ahmed 2005). Bağ doku bölmelerinin piramit biçiminde oluşturduğu lopçukların sayısı insanda yaklaşık 250-300 kadardır ve lopçukların hacmi bulundukları yere göre değişir. Her bir lopçuk içinde sayıları dördü bulan ve kıvrımlı seyreden tubulus seminiferus kontortus adıyla bilinen kanalcıklar ve tubulusların arasını dolduran gevşek bağ dokusu

bulunur (Abraham ve ark 2002, Esfandiari ve Dehghani 2010). Tubuluslar kıvrımlı bir yapıya sahip olduğu için kesitlerde de bunların yuvarlak, oval ya da kıvrımlı görüntüleriyle karşılaşılır (Tanyolaç 1999). Yetişkin rat testisinde bu tubuller 200-400 µm'lik bir çapa sahiptir (Krinke 2000).

Kan damarları, lenf damarları ve genital kanallar mediastinumdan geçerek testise girerler ya da testisten ayrılırlar. Tubulus seminiferus rektuslar, mediastinum testis içinde rete testis adı verilen, anostomozlaşmış kanal ağına açılır (Junqueira ve ark 2006). Rete testis, spermatozoonu tubulustan epididimise taşır (Krinke 2000). Rete testisten tunika albugineyayı delerek ayrılan ve testis dışına çıkan çok sayıdaki kanalcıklar duktus eferentislerdir. Bunlar, gevşek bağ doku ile sarılı halde testisi terk ederler, kendi üzerlerine katlanarak kıvrımlar yaparlar ve kaput epididimidis oluştururlar. Bu kanala duktus epididimidis denir. Duktus epididimidis, testisin kenarı boyunca kaput ve kauda epididimidis arasında bir uçtan diğer uca kıvrılarak gidip gelmek suretiyle korpus epididimidis şekillendirir. Uzun bir kanal olduğu için çapı ve duvar kalınlığı duktus deferense yaklaştıkça artan duktus epididimidis, kuyruğun son kısmında dönüş yapar ve duktus deferens olarak devam eder (Ergün 2010).

1.1.2. Tubulus Seminiferus Kontortus

Tunika albugineyadan itibaren kör uçlarla başlayan ve testisin derinlerine doğru kıvrımlar yaparak seyreden tubulus seminiferus kontortuslar, bir bazal membran ile onun dışında kollagen ve elastik iplikler, fibroblastlar ve düz kas özelliği gösteren yassı miyoid hücreler ile sarılmıştır (Ergün 2010). Aktin ve miyozin flamanlar içeren miyoid hücreler kasılma özelliğine sahip olduklarından kanalcıklara hafif peristaltik hareketler yaptırırlar. Böylece, gelişimini tamamlayan spermatozoonların ve testiküler sıvının testis içi kanalcıklarda ilerlemesine yardımcı olurlar (Maekawa ve ark 1996). Testisin her lopçuğu içinde 1-4 adet seminifer tubulus bulunur. Tubulusun enine kesiti incelendiğinde, çeşitli gelişme aşamalarındaki erkek eşey hücreleri (germ hücreleri) ile bu hücreleri saran ve onlar arasındaki alanları dolduran piramidal şekilli Sertoli hücrelerine rastlanır. Spermatogenezis bu kanalcıklarda gerçekleşir (Ergün 2010).

Seminifer tubuluslarda çeşitli gelişme aşamalarındaki erkek eşey hücreleri (spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon) bulunur. Bu hücreler seminifer tubuluslarda kalın bir epitel katmanı oluşturur. Seminifer tubulusun bazal membranının üzerine, geniş tabanlı Sertoli hücreleri ile bunların arasında

yer alan çok sayıdaki spermatogonyumlar oturur (Leeson ve ark 1985, Tanyolaç 1999). Bazal membrandan ayrılan ve luminal yüze doğru yönelen spermatogonyumların büyümesiyle oluşan primer spermatositler en iri germ hücreleridir. Sekunder spermatositler, primer spermatositlerin yaklaşık yarısı kadardır ve bu hücreler luminal yüze doğru uzanmışlardır (Leeson ve ark 1985). Tubulusun lumenine ulaşmış olan küçük, yuvarlak spermatidler başkalaşım geçirmek üzere Sertoli hücrelerinin sitoplazma oyuntularına gömülürler ve bir süre sonra o türe özgü biçimlerini kazanarak, gelişmelerini tamamlamış spermatozoon olurlar (Tanyolaç 1999). Farklılaşmasını tamamlayan spermatozoonlar epitel katmandan ayrılarak lumene geçer (Leeson ve ark 1985).

1.1.3. Sertoli Hücresi

Sertoli hücreleri tubulus seminiferus kontortusun bazal membranından tubulusun lumenine doğru uzanan şekilde yerleşmişlerdir (Johnson 1991). Sertoli hücreleri, tubulus seminiferus kontortusun bazal membranına hemidezmozomlar yardımı ile bağlanırlar. Gelişme aşamalarındaki erkek eşey hücreleri, bu hücrelerin sitoplazmalarına yanlardan gömülmüşlerdir. Hücre bazaline yakın olarak yerleşmiş oval veya üçgen şekilli açık renkli çekirdeği ve belirgin iri çekirdekçığı ile tanınırlar. Ökromatik çekirdeğe sahip olması, hücrenin aktif olduğunu gösterir. Endoplazma retikulumundan zengindir ve iyi gelişmiş Golgi kompleksi vardır. Bol miktarda krista tipi mitokondriyonlar, lizozomlar, glikojen, lipid damlacıkları ve albumin kristalleri içeren sitoplazma inklüzyonlarına sahiptir (Johnson 1991, Abraham ve ark 2002). Organelleri arasında lizozomların çok sayıda olması fagositik aktivitesine işaret eder (Abraham ve ark 2002).

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer tubulusun dominant hücreleridir. Puberteden sonra ise seminifer tubulusu oluşturan hücrelerin yaklaşık % 10'unu oluştururlar (Abraham ve ark 2002). Sertoli hücreleri spermatogenezis'te önemli görevlere sahiptir (Johnson 1991). Bunlar; spermatogenezisi düzenlemek ve kontrol etmek (Dalgaard ve ark 2002), gelişme aşamasındaki eşey hücrelerini desteklemek, korumak ve beslemek, dejenere olan eşey hücrelerini ve gelişen eşey hücrelerinden arta kalan sitoplazma parçacıklarını fagosit etmek, spermatozoon transportuna yarayan potasyum ve bikarbonattan zengin bir sekresyon yapmak (Johnson 1991, Tanyolaç 1999) olarak sayılabilir. Sertoli hücreleri spermatogenik faaliyetlerin düzenlenmesine yardım etmek için androjen bağlayıcı protein (Androgen Binding Protein, ABP), testiküler transferin, anti-mülleriyan hormon, inhibin gibi maddeler sentezler ve salgılarlar (Ergün 2010). Hipofiz ön

lobundan gelen folikül uyarıcı hormon (follicle stimulating hormone, FSH) ve testosteron, Sertoli hücrelerini uyararak bu hücrelerin ABP sentezlemesini sağlar. Bu protein testosteron ve dehidrotestosteronu bağlayarak bu hormonların seminifer tubullere taşınmasını, yüksek yoğunlukta ve stabil olmasını sağlar. ABP'nin, seminifer epitelde testosteron ile oluşturduğu kompleks, spermatogonyumları etkileyerek çoğalma sürecini başlatır (Noyan 2008). Yüksek testosteron konsantrasyonu spermatogenik siklusu desteklemek için gereklidir. Sertoli hücreleri aynı zamanda inhibin ve aktivin hormonlarını da salgırlar. İnhibin negatif geri tepki ile FSH sentezini ve salınması önler. Bunu ya direkt olarak adenohipofizden gonadotropin hormon üretimini etkileyerek ya da hipotalamustan gonadotropin salınım hormonu (gonadotropin releasing hormone, GnRH) sekresyonunu etkileyerek gerçekleştirir. Aktivin ise FSH salınımı üzerine pozitif bir geri tepki gösterir (Krinke 2000, Abraham ve ark 2002). Sertoli hücrelerinden salgılanan bir glikoprotein olan testiküler transferin de plazma içinde bulunan demiri, gelişmekte olan spermatogenik hücrelere taşır. Bu glikoprotein germ hücrelerinin farklılaşması ve bölünmesi için gereklidir (Guitton ve ark 1999). Erkek fötusta, embriyogenezisden itibaren Sertoli hücreleri tarafından sentezlenen ve yaşam boyu salgılanan antimüllerian hormon (Anti-Mullerian Hormone, AMH) ise Müller kanallarının gerilemesine neden olmak suretiyle dişi genital sistemin gelişimini baskılar (Ergün 2010). Sertoli hücreleri, potasyum ve bikarbonattan zengin bol miktarda intraselüler sıvı da salgırlar (Weinbauer ve ark 2010). Bu özel sıvı yardımıyla spermatozoonlar, iyice gömülü oldukları Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma invaginasyonlarından kurtularak testis içi kanallara geçerler (Tanyolaç 1999).

Sertoli hücreleri alt yan yüzlerinde (bazolateral) zonula okludens adı verilen bağlantı kompleksleri sayesinde birbirlerine tutunarak kan-testis bariyerini de oluştururlar (Ergün 2010). Kan-testis bariyeri ratlarda post-partum 16-19. günlerde oluşur (Krinke 2000). Bu bariyerin bazal membranla zonula okludensler arasında kalan bölümüne bazal kompartman, zonula okludenslerden lumene kadar uzanan bölümüne ise adluminal kompartman denir. Spermatogonyumlar ve primer spermatositler bazal kompartmanda, sekonder spermatositler ve spermatidler adluminal kompartmanda yerleşmiştir. Bu nedenle tip B spermatogonyumların mitozla çoğalması ile oluşan primer spermatositler, bazal kompartmandan adluminal kompartmana ulaşmak için bağlantı kompleksini geçmek zorundadır. Bu geçiş, spermatositlerin üstündeki bağlantı kompleksinin fermuara benzer şekilde çözülmesinin ardından hücrenin altında yeniden şekillenmesiyle meydana gelir.

Böylece mayoz bölünmeler ve spermiyogenezis adluminal kompartmanda görülür. Her iki kompartmandaki erkek eşey hücreleri Sertoli hücrelerinin lateral oyuntularına yerleşirler. Erkek eşey hücreleri, kan-testis bariyeri ile kan akımından izole edildiğinden besin maddesi ve metabolit alışverişinde Sertoli hücrelerine muhtaçtır. Bu yüzden Sertoli hücreleri, spermatositler için destekleyici ve besleyici bir işleve sahiptir. Bu işlevi, dolaşım sistemi ile gelişme aşamalarındaki spermatositler arasında madde alışverişine aracılık ederek gerçekleştirirler (Ergün 2010). Sertoli hücre bariyeri aynı zamanda permeabilite bariyeri de oluşturduğundan, seminifer tubuluslardaki sıvının bileşimi ile kan plazması ve testisin lenf sıvısının bileşimi birbirinden oldukça farklıdır. Çok az miktarda protein ve glukoz içermektedir. Sıvı androjenler, östrojenler, K^+ , bikarbonat, inositol, glutamik asit ve aspartik asit bakımından ise zengindir (Setchell 1980).

Sertoli hücreleri kan-testis bariyeri sayesinde spermatozoonları immunolojik reaksiyonlara karşı korur. İmmun toleransın şekillenmesi iki şekilde olabilmektedir. Birincisi spermatozoonların mekanik olarak immunolojik etkenlerden korunmasıdır. Mekanik koruma, immunolojik reaksiyon oluşturabilecek yapıların seminifer kanalların içerisine girmesini engelleyen Sertoli hücrelerinin oluşturduğu sıkı hücre bağlantıları (tight junction) ile sağlanır (Haas ve Beer 1986). Makrofajlar, T ve B lenfositleri kan testis bariyerini geçemediği için (Iammarrone ve ark 2003) spermatosit, spermatid ve seminifer tubulusun lumeninde bulunan spermatozoonlara karşı antikor oluşumu engellenmiş olur (Mok ve ark 2011, Su ve ark 2011). Kan-testis bariyeri bu şekilde seminifer epiteli herhangi bir otoimmun reaksiyondan da korur (Junqueira ve ark 2006). İkinci yolda ise; spermatozoon yüzey antijenlerinin bir kısmı duktulus eferentis ve rete testisten geçerken sistemik olarak dışarıya sızabilirler. Bu antijenler baskılayıcı T lenfositleri aktive eder. Baskılayıcı T lenfosit aktivasyonu, B lenfositlerin antijenlere karşı duyarlılığını azaltarak spermatozoon antijenlerine karşı oluşabilecek humoral yanıtı engellemektedir (Haas ve Beer 1986).

Yetişkinlerde spermatid sayıları kısmi olarak perinatal gelişim boyunca üretilen Sertoli hücre sayılarına bağlıdır. Sertoli hücrelerinin spermatid sayısını sabitleyici bir özelliği vardır, bu hücrelerin sayısı spermatogenezis ve günlük sperm üretimi için önemlidir (Dalgaard ve ark 2002). Mezonefrik kanal epitelinden köken alan ve primordial hücrelerin etrafını saran destek hücreleri farelerde gebeliğin 11.5 gününde Sertoli hücrelerini şekillendirir (Wilhelm ve ark 2007). Ratta Sertoli hücrelerinin proliferasyon

periyodu gebeliğin 17-19. günlerinden başlar ve postnatal 15-20. günlere kadar devam eder (Orth 1982). Bu dönemden sonra Sertoli hücre proliferasyonu oldukça azalır (Walker 2003). Farelerde ise postnatal 10-12. günlerde Sertoli hücre proliferasyonu son bulur (Griswold ve McLean 2006). Erişkin rat ve fare testislerinde -Sertoli hücrelerinin proliferasyon periyodu tamamlandıktan sonra- Sertoli hücrelerinde mitoz gözlenmez (Abraham ve ark 2002, Griswold ve McLean 2006).

1.1.4. İntertubuler Alanlar

Tubulusların arasında gevşek bağdoku yer alır. Bu bağdoku alanları içerisinde, kılcal damarlar, lenf damarları, sinirler, fibrositler, kollagen iplikler, serbest mononükleer hücreler (lenfositler, makrofajlar ve mast hücreleri) ve tek tek ya da gruplar halinde yerleşmiş, endokrin fonksiyona sahip oval veya poligonal şekilli, eozinofilik bir sitoplazması olan intersitisyel hücreler bulunur. Bu hücrelere Leydig hücreleri denir. Testiküler kapılar pancerilidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin geçişine izin verirler (Junqueira ve ark 2006).

1.1.4.1. Leydig hücreleri

Eozinofilik sitoplazmalı, iri, yuvarlak veya çok köşeli (poligonal) hücrelerdir. Çapları 15-20 µm olan bu hücrelerin merkezinde periferal yerleşimli heterokromatik, bir ya da daha fazla çekirdekçikli yuvarlak bir çekirdek vardır. Hücreler çok sayıda krista tipi mitokondri ve granülsüz endoplazmik retikulum bulundurmaktadır. Bu fizyolojik özellikleri steroid hücreler için tipiktir ve adrenal bez ile ovaryumdaki steroidogenik hücrelere benzer özellik göstermektedirler. Leydig hücreleri çekirdeğe yakın iyi gelişmiş bir Golgi aygıtı bulundurur. Sitoplazma ayrıca lipofuksin granülleri, yağ damlacıkları, lizozomlar, peroksizomlar ve Reinke kristalleri içerir. Ancak bu kristallerin fonksiyonu bilinmemektedir (Teerds ve ark 1998).

Leydig hücrelerinin membranı üzerinde lüteinizasyon hormon (luteinisation hormone, LH) reseptörü bulunmaktadır (Teerds ve ark 1998). Glikoprotein yapısında olan LH, Leydig hücrelerinin farklılaşması ve fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için temel faktördür (Kofler 1982, Ge ve ark 2005).

Leydig hücreleri androjenler olarak adlandırılan erkek seks steroidlerinin (testosterone, androstenedione ve dehydroepiandrosterone) sentez ve sekresyonunu sağlar

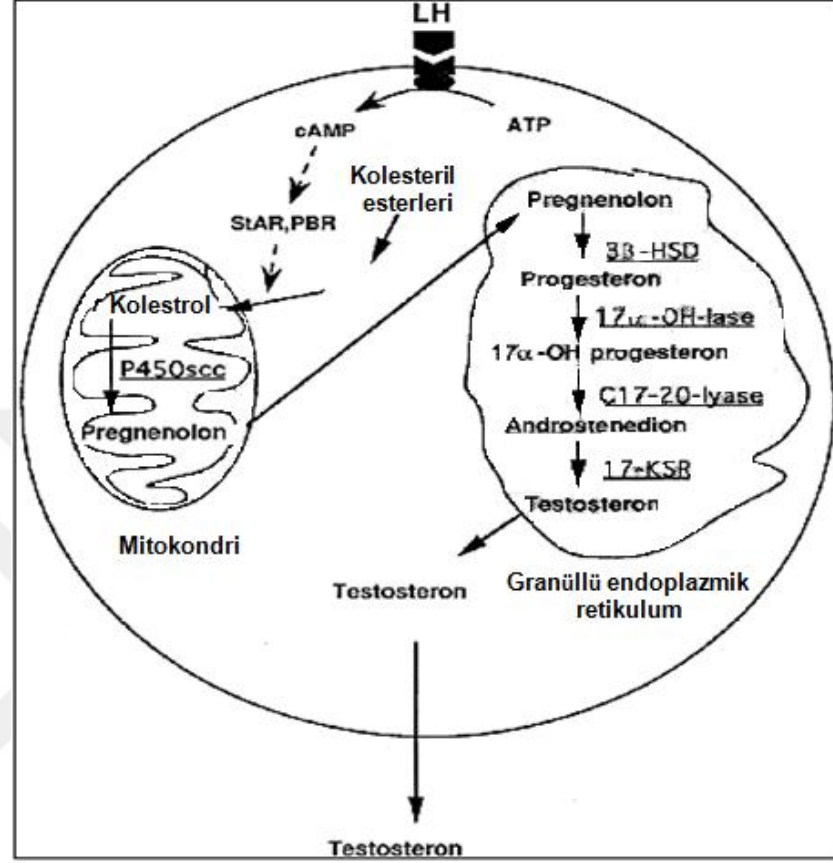
(Handagama ve Ariyaratne 2001). Testisin endokrin fonksiyonu salgıladığı bu hormonlar aracılığı ile gerçekleşir (Ergün 2010).

Hücrelerden salgılanan androjenler, gevşek bağ doku içerisindeki doku sıvısı yolu ile tubulus seminiferus kontortuslara ve kılcal damarlara geçerler. Testosteron sistemik dolaşıma girer girmez vücuttaki hedef organları etkiler (Johnson 1991). Ana fonksiyonları arasında genital organların ve eklenik genital bezlerin gelişimi, sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkması, seksüel isteğin (libido) belirmesi, spermatogenezisin kontrolü, hipofiz ve hipotalamusta negatif geri tepki, genel anabolik etkiler sayılabilir (Dellmann ve Brown 1987, Hassa ve Aştı 1997).

Hipofiz ön lobundan salgılanan LH [erkeklerde, intersitisyel hücre uyarıcı hormon (Intersitisyel Cell Stimulating Hormone, ICSH)], makrofajlar tarafından sentezlenen interlökin 1 β , transforme edici büyüme faktörü α (transforming growth factor alpha, TGF α) ve insülin benzeri büyüme faktörü-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1), prekürsör ve immatür Leydig hücre proliferasyonunu uyarmaktadırlar. Transforme edici büyüme faktörü β (transforming growth factor beta, TGF β) ise mitogenik etki gösteren faktörleri inhibe ederek etkisini göstermektedir (Teerds ve ark 1998). Rat testislerinde Leydig hücre proliferasyonu 90 günlük yaşa kadar devam etmektedir (Handagama ve Ariyaratne 2001).

Leydig hücreleri fetal dönemden itibaren testosteron salgılamaya başlar. Dişinin plasentasında üretilen gonadotropik hormon ya da LH, kan yolu ile fötusa geçerek Leydig hücrelerinin testosteron sentezlemesini ve salgılamasını uyarır. Bu hormonlar, erkek fötusta gonadların gelişimi için gereklidir. Leydig hücreleri gebelik döneminin ortalarına doğru dinlenme sürecine girerek inaktif hale geçerler. Bu dönemde Leydig hücrelerini fibroblastlardan ayırmak zordur. Dinlenme dönemi, gebeliğin ortasından ergenlik (puberte) dönemine kadar devam eden uzun bir süreçtir. Puberte döneminden itibaren Leydig hücreleri, bu sefer hipofiz ön lobundan salgılanan LH uyarımı ile tekrar testosteron sentezleyip salgılamaya başlarlar. Hücre bu işlevini yaşam boyunca sürdürür (Ergün 2010). LH'nın, Leydig hücrelerinin membranı üzerindeki özelleşmiş reseptörlere bağlanmasıyla membrandaki adenilat siklaz aktive olur. Bu durum ATP'den cAMP oluşumunu artırır. cAMP kolestril esterlerinden kolesterolü oluşturur. sSTAR protein etkisiyle kolesterol sitozolden mitokondriye taşınır. Kolesterol sitokrom P450 enzim aracılığıyla pregnenolona çevrilir. Pregnenolone mitokondriyi terk eder ve endoplazmik retikuluma taşınır. Burada enzimler aracılığıyla [3 β Hidroksisteroid Dehidrogenaz (3 β -hydroxysteroid dehydrogenase

, 3β -HSD), 17α -hydroxylase, C17-20-lyase (17α -OH-lase), ketosteroid redüktaz (17-ketosteroid reductase, 17-KSR)] sırasıyla progesteron, 17α -OH-progesteron, androstenedione ve testosteron sentezlenir (Şekil 1.1) (Zirkin ve Chen 2000).



Şekil 1.1. Testosteron oluşum mekanizması (Zirkin ve Chen 2000)

Dolaşımdaki testosteron seviyeleri, Leydig hücrelerinin hem steroidojenik kapasitesi hem de testisteki total sayıları ile ilişkilidir (Ge ve ark 2005).

LH ile testosteron arasında negatif geri bildirim vardır. LH uyarısı Leydig hücrelerinden testosteron salgılanmasına neden olurken, testosteron hormonu yeterli düzeye ulaştığında hipotalamusa etki ederek GnRH salınımını azaltır. Bu da LH ve FSH salgılanmasının azalmasına yol açar. LH'nın azalması, Leydig hücrelerinde testosteron üretimini düşürür. Testosteron düzeyi çok düştüğünde, bu sefer hipotalamustan GnRH salınımı tekrar artmakta, ön hipofizden LH ve FSH salgılanması uyarılarak testosteron düzeyinin yeniden yükselmesi sağlanmaktadır (Ergün 2010).

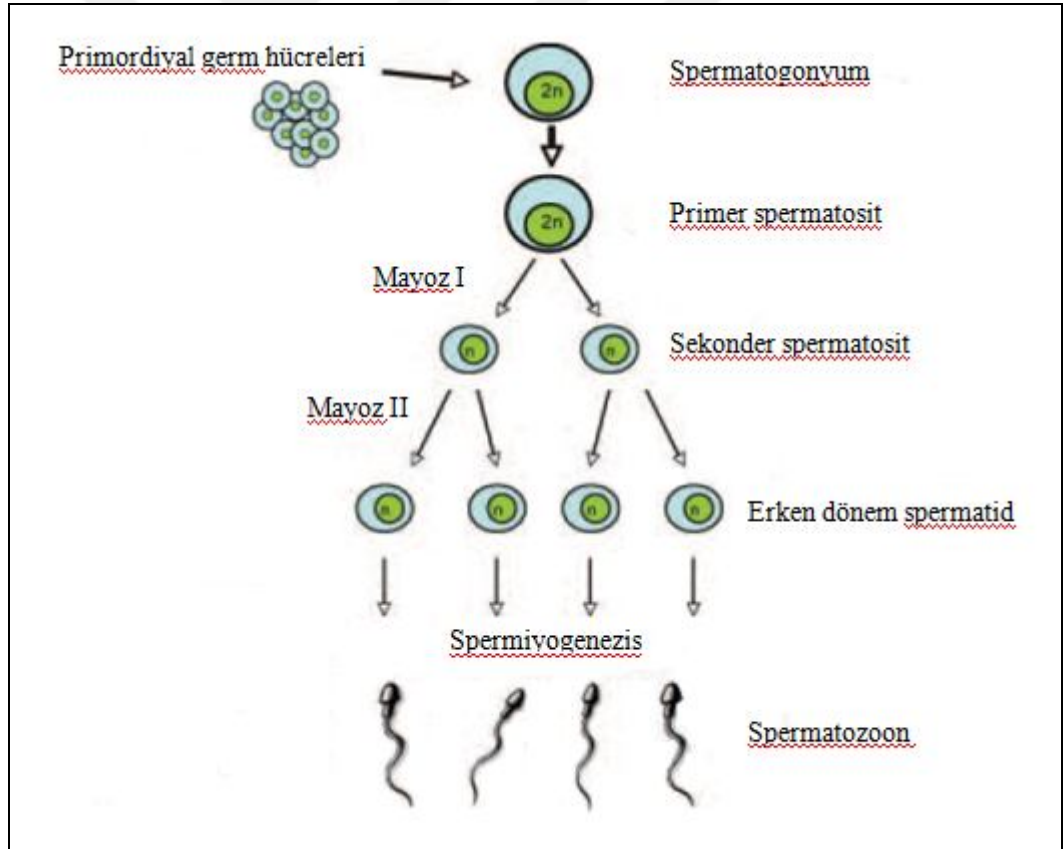
1.1.5. Spermatogenezis

Spermatogonyumdan olgun e ey hücrelerinin (spermatozoon-spermium) oluşması spermatogenezis olarak tanımlanır. Bu olayda; çoğalma (goniyogenezis), büyüme, olgunlaşma (spermatositogenezis) ve ba kala ım (spermioyogenezis) evreleri görülür (Dellmann ve Brown 1987, Hassa ve A tı 1997).

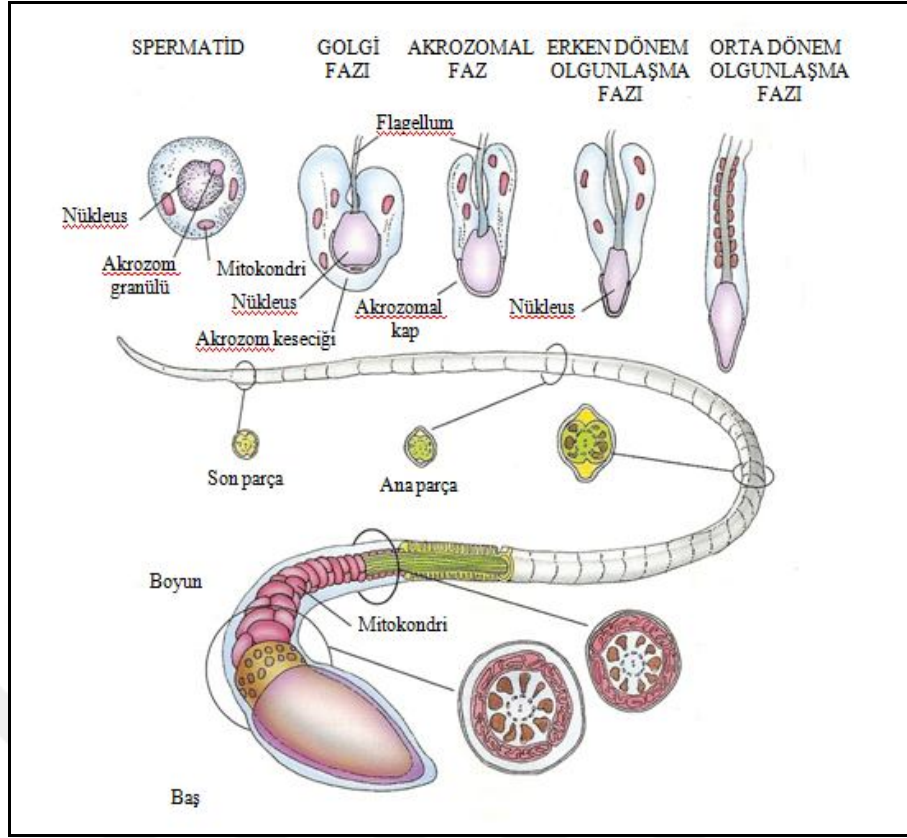
Erkek ratlarda puberte (do ımdan sonraki yaklaşık 50. gün) zamanına kadar inaktif halde bekleyen gonositler, bu yaşta bölünmeye ba lar ve spermatogonyumlar oluşturulur (Krinke 2000, Zemunik ve ark 2003). Spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle sayıca artarlar. Bu döneme goniyogenezis denir (Su ve ark 2011). Ratlarda spermatogonyumlar yedi ya ına kadar bölünmeye devam ederler (Wolf ve ark 2000).

Spermatogonyumların A ve B tipleri vardır. Tip A spermatogonyumların bir kısmı kaynak (kök) hücre olarak kalırken bir kısmı da tip B spermatogonyuma d n  rler. Tip B spermatogonyumlar altı mitotik bölünme geçirir ve büyüme evresine girerek primer spermatosit olur (Krinke 2000, Su ve ark 2011). Primer spermatositler  ekillendikten hemen sonra olgunlaşma evresine girerler. Olgunlaşma, birbirini takip eden iki mayoz bölünmeden ibarettir Birinci mayoz bölünme ba lanmadan önce primer spermatositler deoksiribonükleik asit (deoxyribonucleic acid, DNA)'lerini replike ederler (Ergün 2010). Daha sonra mayoz bölünmenin I. evresine girerler. Hücreler bu dönem sonunda Sertoli hücresinin adluminal komponentinde sekonder spermatosit olurlar (Krinke 2000). Homolog kromozomların her biri bir sekonder sparmatosite geçmiştir. Herbir sekonder spermatosit, yeni DNA sentezi olmaksızın hızla ve kısa süren ikinci mayoz bölünmeye uğrar. İkinci mayoz bölünmenin sonunda, her bir kromozomdaki iki kromatiddan birer tanesi ayrı bir hücreye yani spermatide aktarılır. Böylece, bir adet sekonder spermatositin her birinde n sayıda DNA içeren iki adet haploid spermatid meydana gelir. Haploid spermatidler artık bölünmezler. Buraya kadar süren büyüme ve olgunlaşma bölünmelerini kapsayan döneme spermatositogenezis denir. Spermioyogenezis aşamasında, spermatidler akrozom oluşumu, genetik materyalin spermatidin ba  kısmında yo unla ması ve kuyruğun uzaması gibi morfolojik değişiklikler sonucu, o t re özgü biçimlerini kazanarak, spermatozoonlara d n  rler (Dellmann ve Brown 1987, Su ve ark 2011) ( ekil 1.2) (Furnes ve Schimenti 2007). Spermioyogenezis aşamasında spermatidler akrozom gelişimi için akrozomal faza girer. Daha sonra çekirdek yo unla ması ve uzaması meydana gelir, bunu sitoplazmik eliminasyon ve salınma takip eder. Böylece olgun spermatozoon

oluşumu tamamlanır (Krinke 2000). Olgunlaşmanın ilk aşamasında Golgi aygıtı içinde glikoproteinlerden zengin birçok küçük granüller belirir. Bu granüller -proakrozom granülleri- birbirleriyle birleşerek akrozom keseciğini oluştururlar. Akrozom keseciği, spermatid çekirdeğinin ön kutbuna yönelerek çekirdek zarına tutunur. Akrozom keseciği, çekirdek dış zarına yapıştığı yerde yayılır ve çekirdeğin ön yüzünü tümüyle kaplayan bir başlık oluşturur. Kesecik içinde yerleşik olan proakrozom granülleri de başlık içinde yayılır ve ikisi birlikte akrozomu meydana getirirler. Çekirdek bu dönemde uzar ve hücre içinde eksentrik olarak yerleşir. Daha sonra baş kısmı tubulusun periferine doğru yönelirken kuyruk kısmı da lumene doğru oluşmaya başlar. Kuyruk gelişimi tamamlandıktan sonra sitoplazma yavaş yavaş çekirdeğin biçimini alarak uzar. Sitoplazmanın büyük bir kısmı parçalanıp ayrıldıktan sonra hücreler lumen içinde serbest kalır ve spermatozoonlara dönüşürler (Şekil 1.3) (Dellmann ve Brown 1987, Gartner ve Hiatt 1997).



Şekil 1.2. Spermatogenezis (Furnes ve Schimenti 2007)



Şekil 1.3. Spermiyogenezis (Gartner ve Hiatt 1997)

1.1.5.1. Spermatogenezisin kontrolü

Spermatogenezis puberte öncesi gonadotropin sekresyonunun artışıyla puberte zamanında başlar. Spermatogeneziste testosteron ile FSH, LH ve ABP'lerin rolü vardır (Yılmaz 1999, Junqueira ve ark 2006). Peptid hormonlar (FSH ve LH) kan-testis bariyerini geçerek spermatosit ve spermatidlere direkt olarak ulaşmadığı için spermatogeneziste FSH etkisi muhtemelen Sertoli hücreleriyle gerçekleşir (Krinke 2000). FSH'nın başlıca işlevi spermatozoon oluşumunu (spermatogenezis) başlatmak ve sürdürmektir. Ön hipofizden salgılanan FSH, Sertoli hücrelerini etkileyerek bu hücrelerden ABP ve östrojenlerin salınımına neden olur. ABP hem testosteron hem de östrojenlere bağlanarak bu iki hormonu seminifer tubulus sıvısı içine taşır. Böylece bu iki hormon spermatozoonların olgunlaşmasına yardım eder. Seminifer tubullerde aşırı spermatozoon üretilmesi ön hipofizden FSH salgılanmasını kısıtlar. Bu olumsuz geri etki Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibinin, ön hipofizdeki gonadotrop hücreleri etkilemesi ile gerçekleştirilir (Yılmaz 1999). Cinsel olgunluğa ulaşıldığında, hipofiz ön lobundan salgılanan LH testisin intersitisyel dokusunda bulunan Leydig hücrelerini etkileyerek testosteronun salgılanmasına neden olur (Hassa ve Aştı 1997, Yılmaz 1999). LH ve

testosteron hormonu ise spermatogenezisin sürekliliği için gereklidir (Hassa ve Aştı 1997). Peptid hormonlarının tersine steroid yapıda olan testosteron difüzyonla kan-testis bariyerini kolaylıkla geçebilir. Yetişkin ratlarda intersitisyel sıvıda bulunan testosteron seviyesi (>50 ng/ml), testiküler sıvı (~ 30 ng/ml) ve dolaşımdakinden (<10 ng/ml) daha yüksektir (Krinke 2000). Plazmadaki testosteronun belirli bir düzeye ulaşması direkt olarak hipofiz ön lobundaki gonadotrop hücrelerden LH salgılanmasını kısıtlar ya da bu etkisini dolaylı olarak hipotalamustaki nörosekretör hücrelerden GnRH salgılanmasını baskılayarak gösterir. Böylece testosteron miktarı belirli bir düzeyde tutulur (Yılmaz 1999). Plazma testosteron konsantrasyonları sağlıklı erkek ratlarda yaklaşık 2-3 ng/ml'dir (Krinke 2000).

Ortalama vücut sıcaklığının (37°C) altındaki sıcaklıkta gerçekleşen spermatogenezis için sıcaklık çok önemlidir. Testislerdeki sıcaklık yaklaşık 35°C 'dir ve çeşitli mekanizmalar aracılığıyla kontrol edilir. Testiküler arteri zengin bir venöz ağ (pampiniform pleksus) sarar. Testislerdeki sıcaklığın korunmasında önemli olan, kanın karşı yönde işleyen bir ısı değiş tokuşu ile soğutulmasıdır. Diğer etkenler terin skrotumdan buharlaşmasıyla ısı kaybı ve spermatik kordonun kremaster kaslarının kasılmasıyla testislerin daha yüksek sıcaklıklarda kalabileceği inguinal kanala çekilmesidir (Junqueira ve ark 2006).

1.1.6. Spermatozoonun Yapısı

Spermatozoon, gelişimini tamamlamış ve dölleme yeteneğine sahip erkek eşey hücresidir. Ratlarda spermatozoon uzunluğu ortalama $33\ \mu\text{m}$ 'dir (Horst ve ark 2011). Hücre ışık mikroskopta incelendiğinde sadece baş ve kuyruk bölümleri ayırt edilirken, elektron mikroskop düzeyinde incelendiğinde ise kuyruk bölümünün boyun, orta parça, ana parça ve son parça olmak üzere dört kısımdan oluştuğu görülür (Şekil 1.4) (Buffone ve ark 2012).

1.1.6.1. Baş

Hayvan türlerine göre farklı derecelerde yandan basık olan baş kısmı, fare ve ratlarda kanca şeklinde bir yapıdadır ve uzunluğu $5\ \mu\text{m}$ kadardır (Şekil 1.4). Baş kısmındaki nükleus babadan oğula geçen tüm genetik özellikleri taşır. Başın büyük bir kesimini yoğunlaşmış haploid çekirdek doldurur. Başın ön yarımı, spermatidin Golgi aygıtının başkalaşımından oluşan akrozom ile sarılmıştır. Bu oluşuma galea kapitis de

denir. Hiyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz, akrozin, proteaz gibi hidrolitik ve proteolitik enzimler içerir. Bu enzimler ovumun korona radyata ve zona pellusidasının delinmesine neden olarak spermatozoonun ovum içine girmesini kolaylaştırmaktadır (Junqueira ve ark 2006, Ergün 2010).

1.1.6.2. Boyun

Spermatozoonun hareketini sağlayan, baş ile orta parçayı birbirine bağlayan kısa ve dar bir bölümdür. Merkezinde bir adet sentriyol, periferinde uzunlamasına seyreden dokuz adet kalın fibriller ve orta parçanın dış fibrillerinden meydana gelir.

1.1.6.3. Orta parça

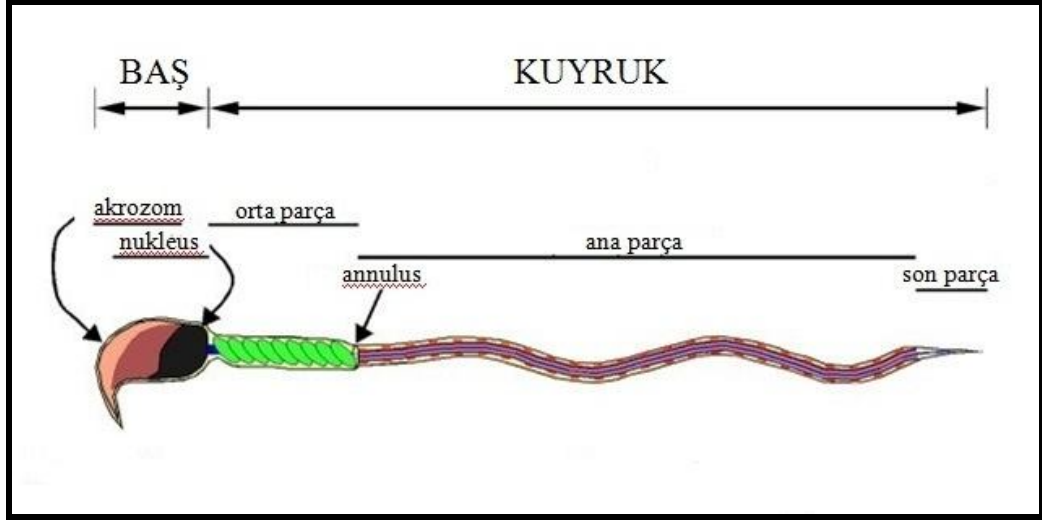
Flagellum yapısında bir oluşumdur. Yani merkezde bir çift, periferde ise dokuz çift mikrotubulus demetinin şekillendirdiği aksiyal filament kompleksinden oluşur. Bu oluşumu ayrıca, dış fibriller kuşatır. Boyun kısmından başlayan, incelerek ve sayıca da azalarak kuyruğa doğru seyreden bu kontraktıl oluşumlar aktin ve miyozin içerirler. Orta parçanın sitoplazması içinde bol miktarda mitokondriyonlar bulunur. Uç uca eklenmiş olan mitokondriyonlar spermatozoonun hareketi için enerji sağlar (Ergün 2010). Memeli spermatozoonlarında orta parça ile ana parçayı birbirine bağlayan “annulus” adı verilen halka şeklinde yoğun bir yapı vardır. Septin protein ailesinin buraya yerleştiği belirlenmiştir. Bu yapı orta parça ile son parça arasında protein diffüzyon bariyeri olarak görev yapar, ayrıca orta parçanın organizasyonunda rol oynamaktadır (Toure ve ark 2011).

1.1.6.4. Ana parça

Spermatozoonun en uzun parçasıdır. Orta parçadaki aksiyal filament kompleksi ana parçada da aynı şekildedir. Orta parçadan gelen dış fibriller bu bölümde de bulunur. Ancak boyutları ve şekillerindeki değişiklikler orta parçadakine göre daha belirgin olup ana parçanın sonuna doğru incelerek kaybolur. Ana parçayı en dıştan fibröz kılıf sarar.

1.1.6.5. Son parça

Aksiyal filament kompleksi ve etrafını saran fibröz kılıftan ibarettir. Son parçanın proksimalinde yer alan bu komplekse ait mikrotubulus çiftleri distalde değişik seviyelerde son bulur (Ergün 2010).



Şekil 1.4. Rat/fare spermatozoonu (Buffone ve ark 2012).

1.1.7. Eşey Hücrelerini İleten Yollar

1.1.7.1. Tubulus rektus

Tubulus seminiferus kontortus'un, mediastinum testise doğru uzandığı düz, kısa ve dar bir borudur. Sertoli hücreleri tek katlı prizmatik epitele dönüşerek kanalı döşer. Tubulus rektus rete testisin içine boşalır.

1.1.7.2. Rete testis

Tubulus rektuslar mediastinum testis içinde birbirleriyle anastomozlaşan kanal ağını şekillendirir. Bu kanal ağı rete testis olarak isimlendirilir. Duvarı tek katlı kübik ya da yassı hücrelidir. Rete testis sıvısı içinde oldukça yüksek konsantrasyonda, Leydig hücreleri ve germ hücreleri tarafından salgılanan östrojen bulunmaktadır. Ratlarda 250 pg/ml iken, diğer türlerde 14-900 pg/ml arasında değişmektedir (Hess 2003).

1.1.7.3. Epididimis

Yarım ay şeklinde, testise eklenik olarak bulunan epididimis, spermatozoonun olgunlaşması, hareket yeteneği kazanması ve depolanması ile Rhox 5 (Reproductive homeobox 5) gen ekspresyonunun sağlanması yönünden ileri derecede spesifikleşmiş bir dokudur. Rhox 5 geni spermatozoonun olgunlaşması ve ileriye doğru hareket yeteneği kazanmasını sağlamaktadır (MacLean ve ark 2012). Spermatozoonlar bu borucuklardan geçerken biyokimyasal, fizyolojik ve morfolojik değişimlerini tamamlayarak dölleme yeteneği kazanırlar (Junqueira ve ark 2006, Ergün 2010).

Kaput, korpus ve kauda olmak üzere üç bölümden oluşan epididimis, proksimalden distale doğru uzanmaktadır. Rete testisten tunika albugineyayı delerek çıkan 8-25 adet kanalcık duktulus eferentis'lerdir. Bunlar kıvrımlar yaparak katlanırlar ve kaput epididimidis'i meydana getirirler. Eitelin bazal laminasının dışında sirküler olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşan ince bir katman vardır (Junqueira ve ark 2006, Ergün 2010). Kaput epididimidis sperm membranına epididimis kökenli proteinleri ekler. Yine kaput epididimidis bölümü asit-baz düzenleyicileri yönünden zengindir, bu da lumen sıvısının asitliğine katkı sağlamaktadır. Kaput epididimidisteki hücreler, ayrıca spermatozoonun gelişimi ve yoğunlaşması için lumen sıvısının geri emilimini sağlarlar. Farelerde yapılan bir çalışmada, Rhox 5 geninin oldukça yüksek derecede kaput epididimidiste eksprese edildiğı belirlenmiştir (MacLean ve ark 2012).

Duktulus eferentisler birleşerek duktus epididimidis adı verilen tek bir kanal meydana getirirler. Oldukça geniş ve kıvrımlı olan bu kanalın ön bölümü korpus epididimidisi, arka bölümü de kauda epididimidisi şekillendirir. Lumeni yalancı çok katlı prizmatik epitel hücreleri döşemiştir. Yüzeyleri hareketsiz tüylerle (stereosilyum) kaplıdır. Bu hücrelerin, Sertoli hücrelerinden salgılanan ABP ve inhibini absorbe etme ve spermatozoonlara hareketlilik kazandıran bir salgı üretme özelliğı vardır. Bazal lamina altında ince bir lamina propriya ve onun etrafında sirküler seyirli düz kas hücreleri bulunur. Kanalı saran bu kaslar kontraksiyonlar yaparak spermatozoonları ileriye doğru sevkederler. Spermatozoonlar ejakulasyona kadar kauda epididimidiste depolanırlar (Ergün 2010).

1.1.7.4. Duktus deferens

Duktus deferens, kauda epididimidis bölümünden sonra dönüş yaparak düz olarak uzanan bir kanaldır. Bu kanalın tipik olarak dar bir lumeni ile tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya (tunika seroza) katmanları vardır. Tunika adventisya, ileri bölümlerinde tunika seroza adını alır. Mukozanın lamina epiteliyalis katı yalancı çok katlı prizmatiktir. Eitelin altındaki lamina propriya, kollagen ve elastik ipliklerden zengindir. Dar bir submukozayı dıştan tunika muskularis sarar. Tunika muskularis içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler seyreden güçlü düz kaslardan oluşur. En dıştan kanalı saran tunika adventisya gevşek bağ doku yapısında olup testiküler arter, pampiniform pleksus ve sinirleri içerir. Duktus deferens üretraya açılmadan önce bir genişleme yapar ki bu kısma ampulla duktus deferentis adı verilir. Ampullanın alt ucu duktus ejakulatoryus olarak

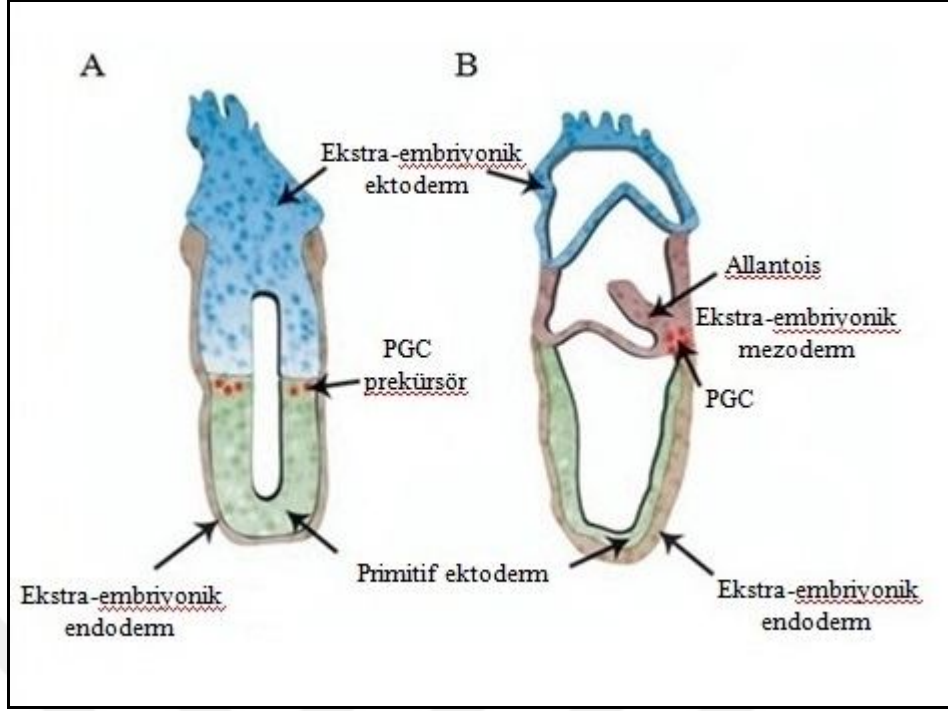
devam eder. Eklenik genital bezlerin salgı kanalları buraya ağızlanır. Bu kanal biraz ileride üretraya açılır (Junqueira ve ark 2006, Ergün 2010).

1.1.8. Testisin Embriyolojisi ve Germ Hücrelerinin Oluşumu

Embriyonun genotipi (44+XX veya 44+XY olacağı) fertilizasyon sırasında belirlenmektedir. Erkek ve dişi embriyosu bu devrede indefferent (farklanmamış) dönemdedir, fenotipik olarak ayırt edilemez. Fenotipik seksüel farklılaşma Y kromozomunun kısa kolundaki Sry geni tarafından eksprese edilen testis belirleyici faktör (testis determining factor, TDF) ile belirlenir. Gonad gelişimi dışında Leydig hücreleri testosteron, Sertoli hücreleri de müllerian inhibitör faktör (mullerian inhibiting factor, MIF) sentezlemek için farklılaşırlar. Gonadlar ve iletiler kanalları intermedier mezodermden köken alır (Dudek ve Fix 2005). Erkek sıçan gonadları embriyonik dönemin 13. gününde morfolojik olarak bipotansiyel veya farklılaşmamış gonadlar olarak tanımlanırlar (Ersoy-Çanilloğlu ve Ercan 2011).

Embriyogenezis boyunca germ hücre oluşumu türlerin devamlılığı için büyük önem taşır. Vertebrasız ve memeli dışındaki vertebralı türlerinde maternal kökenli faktörler germ hücre hattının oluşumunda rol oynar (Ying ve ark 2002). Memelilerde primordial germ hücre (primordial germ cell, PGC) hattının spesifikasyonu, farelerde embriyonik dönemin 6-6,5. gününde extraembriyonik ektodermdeki somatik hücrelerden salgılanan parakrin sinyallere (bone morfogenetik protein-BMP 4, BMP8b, BMP2 ve Smad sinyal yolunun komponentleri) bağlıdır (Tres ve ark 2004). Gastrulasyon öncesi, extraembriyonik ektoderme yakın proksimal epiblastta bulunan PGC'lerin prekürsör hücreleri (pluripotent hücreler) (Şekil 1.5) (Zwaka ve Thomson 2005) extraembriyonik ektodermde bulunan komşu hücrelerden sağlanan bone morfogenetik protein sinyallerinin fonksiyonu aracılığıyla uyarılır (Zwaka ve Thomson 2005, Matsui 2010).

Bu dönemde aynı zamanda ekstraembriyonik ektodermdeki hücreler, BMP4 varlığında epiblastta interferon ailesinin bir üyesi olan fragilis proteini ve transkripsiyon faktörü Smad1 ekspresyonunu indükler (Tres ve ark 2004). Ekstraembriyonik ektodermde eksprese edilen hem Bmp4 hemde Bmp8b'nin tek başlarına uyarım için yeterli olmadığı tespit edilmiştir. Bu yüzden birlikte uyarımları gereklidir (Ying ve ark 2002).



Şekil 1.5. Germ hücre gelişimi (Zwaka ve Thomson 2005)

Embriyonik dönemin 7. gününde PGC prekürsörleri yeni gelişen allantoisin bazaline doğru yayılır. Ekstraembriyonik mezodermde yaklaşık 45 adet olan bir hücre topluluğunu oluştururlar. Stella geni bu hücre topluluğunda eksprese edilir. Fragilis ve stella PGC farklılaşmasında önemli rol oynar (Tres ve ark 2004). Aynı zamanda bu hücre yığınınındaki prekürsör hücreler E-cadherin ile etkileşime girerek primordiyal germ hücrelerine farklılaşırlar (Matsui 2010).

Embriyonik dönemin 8,5. gününde pozitif alkalın fosfataz aktivitesi gösteren PGC'nin allantoisin bazalinden arka barsağa (hindgut/ yemek borusunun arka kısmı) doğru göçü başlar, göç sırasında bu hücreler nanos3 proteinini eksprese eder. Bu faktörün yokluğunda her iki cinsiyet hücresinin de kaybı görülmüştür. Embriyonik dönemin 9 ve 9,5. gününde hücreler arka barsaktan çıkar ve yeni oluşan her iki gonad gelişim bölgesine doğru lateral olarak göç eder. Hücrelerin arka barsaktan gonad gelişim bölgesine göçü boyunca PGC popülasyonu programlı bir hücre ölümü (apoptosis) ve proliferasyon ile dengelenir. Nanos3 geni etkisini, apoptozisin baskılanması veya proliferasyonun desteklenmesi şeklinde gerçekleştirir. Embriyonik dönemin 12,5. gününe kadar PGC genital çıkıntıya yerleşir. Embriyonik 13,5 ve 17. günlerde erkek gonadal germ hücreleri apoptoza uğrar, doğum zamanında yeni bir programlı hücre ölümü başlar (Tres ve ark 2004).

Gonad gelişiminin ilk belirtisi, her bir bağırsağın arka kısmındaki mezenter kökü (Radix mesenterii)'nin sağında ve solunda mezonefrozun medialinde genital kıvrım (Plica genitalis) olarak adlandırılan kabartının şekillenmesidir. Farklılaşmamış gonad yapısında dışta korteks, iç kısımda ise medulla bulunur. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahipse, farklılaşmamış gonadın korteksi ovaryuma differensiye olur, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içeriyorsa medulla testise farklılaşır, korteks ise dejenere olur (Moore ve Persaud 2002). Genital kıvrım embriyo 9-11 mm iken sölom epitelinin süratli hipertrofisine bağlı olarak büyür. Yaklaşık 100-300 adet primordiyal germ hücresi bölgeye ulaşır. Mezonefrik tubuller ve glomerular kapsülden gelen dejenere hücreler, primordial germ hücreleri ile birleşerek gonadal kordonları oluştururlar. Ratlarda erkek gonadların ilk morfolojik değişimi gebeliğin 13,5–14,5 günleri arasında testiküler kordonların oluşumu ile başlamaktadır. Gonadal kordonlar da primitif seks kordonlarını şekillendirirler. Genital kıvrım ve primitif seks kordonlarının olduğu bu safha gonadogenesisin indefferent safhasıdır (Ersoy-Çanilloğlu ve Ercan 2011).

Testis belirleyici faktör (TDF), postnatal gelişim döneminde primer seks kordonlarını uyararak, tubulus seminiferus kontortusları oluşturur. Bu faktör tubulusların, farklılaşmamış gonadın medullasının derinlerine doğru uzamasına sebep olur. Kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece ağsı görünümdeki rete testis oluşur (Moore ve Persaud 2002). Kıvrımlı seyreden bu tubuller rete testis aracılığı ile duktulus efferentese bağlıdır. Primitif seks kordonları sölom epitelinden mezenşimal bir tabaka olan Tunika albugineya ile ayrılmıştır. Bu tabaka gonadın kan donanımını sağlar.

Testis oluşumu belirlendikten sonra primordiyal germ hücreleri spermatogonyumları oluşturur. Spermatogonyumların çoğalması gebeliğin 17,5 gününe kadar devam eder, geç dönemde çoğalması durur ve doğuma kadar sessiz bir döneme girerler (Moore ve Persaud 2002, Ersoy-Çanilloğlu ve Ercan 2011). Mezonefrik kanal epitelinden köken alan ve primordial hücrelerin etrafını saran destek hücreleri de Y kromozomundaki Sry genin sinyaline yanıt olarak Sertoli hücrelerini şekillendirir. Sry genin yokluğunda Sertoli hücre farklılaşması meydana gelmemektedir. Sertoli hücreleri MIF hormonu salgılayarak mullerian kanalının gerilemesine neden olur (Ostrer 2000). Sertoli hücrelerinin proliferasyonu doğumdan sonra 3. haftaya kadar devam eder (Moore ve Persaud 2002, Ersoy-Çanilloğlu ve Ercan 2011). Seminifer tübüller arasında bulunan

mezenşimden Leydig hücreleri gelişir. Bu hücreler testosteron salgılayarak Wolf kanalının farklılaşmasına ve gelişimine neden olur (Ostrer 2000). Ratlarda Leydig hücre gelişimi postnatal 10. günde başlar, ortalama 90 günlük yaşta tamamlanır (Handagama ve Ariyaratte 2001, Ge ve ark 2005).

Puberteden önce seminifer tubuller içinde sadece Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar vardır ve tubulde henüz lumen oluşmamıştır; mitoz bölünme görülür, fakat mayoz bölünme görülmez (Moore ve Persaud 2002). Spermatogonyumlar, tübüllerin merkezinden ayrılıp bazal membran boyunca yerleşirler. Bazal membranda yerleştikten sonra bölünmeye başlarlar. Erkekteki germ hücrelerinin pozisyonlarındaki bu değişim testiküler gelişim için önemlidir. Seminifer tubulusta yeniden yerleşmeyen hücreler dejenere olurlar. Spermatogonyumların mitotik çoğalma dönemine girmesi spermatogonyumların alt tiplerinin ortaya çıkmasına neden olur (Ersoy-Çanılıoğlu ve Ercan 2011). Pubertenin ardından bu hücrelere primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon da eklenir ve tubulusların lumeni oluşur (Moore ve Persaud 2002, Itoh ve ark 2005).

1.1.9. İlk Spermatogenetik Dalga

Memeli hayvanlarda spermatogenezis iki faza ayrılır. İlk faz, doğumdan sonra başlayan ilk spermatogenetik dalgayla karakterizedir. İlk spermatogenetik dalga yapılan araştırmalar sonucu erkek rat (Silva ve ark 2011), fare (Cai ve ark 2011b), hamster (Golan ve ark 2000) ve insanda (Hilscher 1991) gözlenmiştir. Spermatogenezisin 2. fazı olan olgun spermatogenezis, ilk spermatogenetik dalgadan sonra puberte yaşına ulaşmış hayvanlarda sürekli olarak meydana gelen karakteristik spermatogenetik dalgalardan oluşur (Rodriguez ve ark 1997).

Rat testisinde meydana gelen fizyolojik ilk spermatogenetik dalga, spermatogenezisin başlatılmasında ve gelişiminde, seksüel olgunlaşma ve testiküler gelişimde önemli bir role sahiptir (Rodriguez ve ark 1997, Jahnukainen ve ark 2004). İlk spermatogenik dalga boyunca testisteki somatik hücreler prolifere olur ve olgunlaşır. Sertoli hücreleri germ hücrelerini sarar ve destekler (Meehan ve ark 2001).

Erken postnatal yaşamın ilk döneminde görülen ilk spermatogenezis dalgası, ilk germ hücre apoptozisiyle aynı zamanda oluşur (Meehan ve ark 2001, Jahnukainen ve ark 2004, Zheng ve ark 2006). Ratlarda postnatal 1-6 haftalık dönemde meydana gelen ilk

spermatogenezis dalgası (Jahnukainen ve ark 2004), farelerde 5. günde başlamaktadır (Meehan ve ark 2001). Erkek ratlarda postnatal 18 ve 26. günlerde (Jahnukainen ve ark 2004), erkek farelerde ise 15 ve 16. günlerde apoptozis pik yapmaktadır (Zheng ve ark 2006). İmmatür rat testislerinde görülen germ hücre apoptozisi bu dokunun gelişimi için oldukça önemlidir. Germ hücre apoptozisinin inhibisyonu yaşamın ilerleyen döneminde infertilite ile sonuçlanmaktadır. Bu dönemde meydana gelen apoptozis Bcl-2 protein ailesi (bax ve bad) ve kaspaz-3 aracılığıyla oluşmaktadır (Shaha ve ark 2010).

Memeli testislerinde FSH, LH, testosteron ve östradiol germ hücre yaşamını düzenlemektedirler. Bu hormonların aşırı miktarda üretilmesi veya eksikliği testiste germ hücrelerinde apoptozise neden olur. Zhou ve ark (2001) erkek rhesus maymunlarda yapmış oldukları bir çalışmada 20 mg/kg dozda intra muskuler testosteron enjeksiyonundan 30 gün sonra, testiste Fas/FasL ekspresyonunun ve germ hücre (özellikle spermatosit ve spermatid) apoptozisinin maksimum seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir.

Sertoli hücreleri spermatogenezisi hormonal olarak düzenleyen FSH ve testosteron reseptörlerine sahiptir. Seminifer tubulusun olgunlaşması boyunca, testosteron ve östradiol ile birlikte FSH'nın sinerjistik etkisi germ hücrelerinin yaşamasını desteklerken, östradiol tek başına pro-apoptotik bir etkiye sahiptir. FSH ve testosteron seviyelerindeki azalma germ hücrelerinde hem ekstrinsik hem de intrinsik apoptotik yolu aktive eder. Bu yüzden FSH ve testosteron germ hücreleri için ölüm sinyallerini inhibe ederek spermatogenetik hemeostazisi sağlar (Shaha ve ark 2010).

Erkek ratlarda pubertenin başlaması ilk spermatogenik dalganın tamamlanmasıyla karakterizedir. Bu da muhtemelen spermatozoonun tubulus lumeninde görüldüğü zamana denk gelmektedir (Aragon ve ark 2005). Sperm üretimi immatür spermatogonyum popülasyonunun kendini yenilemesiyle başlar (Meehan ve ark 2001). Erkek ratta spermatozoon ilk kez tubulus lumeninde 45-50 günlük yaşta görülür (Aragon ve ark 2005). Erkek farelerde ise doğumdan sonraki 35. günde tespit edilmiştir (Forand ve ark 2009).

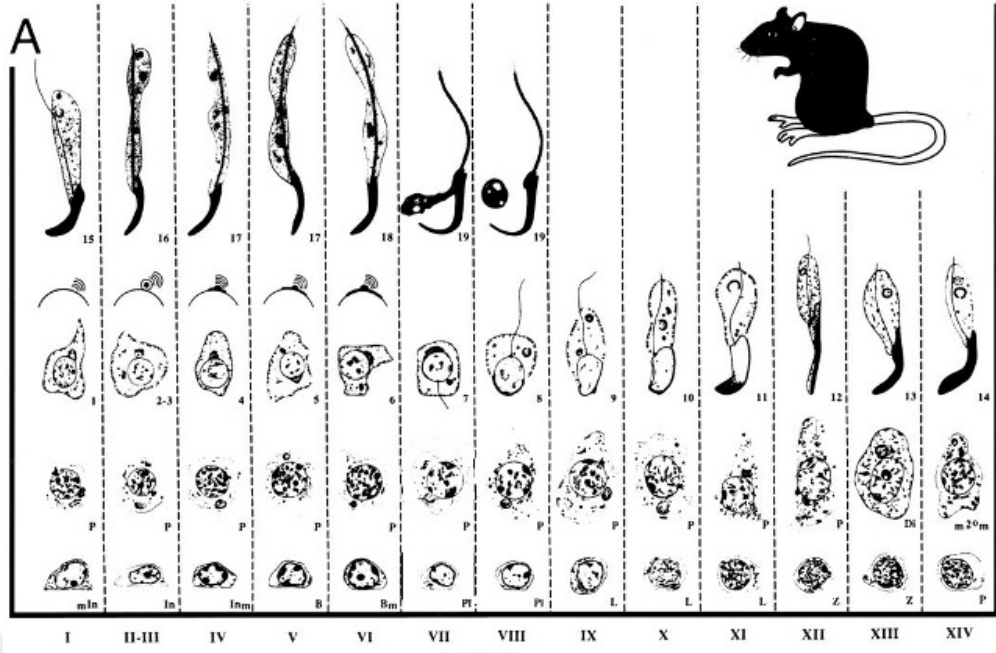
1.1.10. Spermatogenik Siklus Evreleri

Bir seminifer tubulden enine seri kesitler alınıp incelenirse birbirini takip eden, farklı gelişim aşamalarında erkek germ hücre formları görülür. Her bir spermatogenik düzen, seminifer epitel siklusunun bir evresi olarak tanımlanır. Tubulusun bir bölümü

içindeki aynı evrenin tekrar görülmesi için geçen zaman, bir spermatogenik siklus olarak tanımlanır (Yan 2000).

Spermatogenezisin tamamlanması için gerekli olan, siklus sayısı ve bir spermatogenik siklus içindeki evre sayıları türler arasında farklılık gösterir. Ratlarda bir spermatogenik siklusu 14 evreye ayrılırken (Leblond ve Clermont 1952, França ve ark 1998), farelerde 12 evreye ayrılmaktadır (Oakberg 1956). Ratlarda bir siklusun tamamlanması 12 gün sürerken, farelerde bu süre 8.45 gündür. Bir spermatogonyumundan spermatozoa oluşumu için 4 siklusa (rat: 48 gün, fare: 33 gün) gerek vardır (Leblond ve Clermont 1952, Krinke 2000, Ventela 2003). Boğalarda bir siklus 8 evreden oluşurken, spermatogenezisin tamamlanması 61 gün sürmektedir (Johnson ve ark 2000). İnsanlarda ise bir siklusun 6 evresi görülür. Spermatogenezisin tamamlanması ise 64 gün sürer (O'Donnell ve ark 2006).

Spermatogenik siklus dönemlerinin sınıflandırılması için, spermatid çekirdeğinin (çekirdek çapları) ve akrozomun morfolojik özellikleri ile hücrede mitotik figürlerin bulunması veya bulunmaması gibi özellikler göz önünde tutulur (Hess 1990, Ventela 2003). Testis içinde bu dönemler, seminifer tubullerin uzunluğu boyunca birbirini takip eden düzen içinde tekrar edilir. Rat testisinde her bir tubulus kesiti, 14 spermatogenik siklus evresinden birini göstermektedir (Hess 1990). Ratlarda spermiyogenezis 19 adımda gerçekleşirken (Şekil 1.6) (França ve ark 1998), farelerde 16 adımda meydana gelmektedir (Parvinen ve Hecht 1981). Elektron mikroskobunun kullanılmasıyla seminifer epitel siklusundaki spermatidlerin gelişimi daha net bir şekilde incelenmiştir (Hess 1990).



Şekil 1.6. Rat spermatogenetik siklus dönemleri (França ve ark 1998)

Dönem I

Siklusun 1-4. dönemleri yuvarlak spermatidlerdeki Golgi aygıtının net biçimde görünmesi ile tanınır. İlk dönem yoğun granül içermeyen birinci adım spermatidlerin görülmesi ve Golgi aygıtının belirlenmesiyle karakterizedir. Ayrıca bu dönemde 15. adım spermatidleri de belirlenmektedir.

Dönem II

Bu dönemin tanınması genellikle ikinci adım spermatidin Golgi aygıtında veziküllerle çevrelenmiş 0,3-0,6 μm çapta iki proakrozomik granülün tanınmasına bağlıdır.

Dönem III

Üçüncü adım spermatidlerde tek akrozomik granül, veziküller içinde lokalize olmuştur. Bu granüller 0,6-0,8 μm çapa sahiptir ve ikinci adımdaki proakrozomik granüllerden daha büyüktür. Vezikül, nükleer membranda biraz yassılaştırmış olabilir. Golgi aygıtı ise vezikülün biraz yanında bulunabilir.

Dönem IV

Siklusun 4. dönemi esas olarak dördüncü adım spermatidlerde bir veya daha fazla akrozomik sistem konfigürasyonunun bulunmasıyla ayırt edilir. Akrozomik granül 0,8 ve 1,1 μm arası bir çapa sahiptir. Geç dördüncü adım spermatidlerde akrozomik veziküller,

nükleer membrana doğru yaslanmışdır. Golgi aygıtı, oluşan akrozomik sistemin bir tarafında bulunur.

Dönem V

Yuvarlak spermatidlerin akrozomik sisteminin az eğri olması ve akrozomik granülün her iki yana doğru uzamış olması 5. dönem tubulusu olarak sınıflandırılır. Uzamış spermatidlerin çekirdeği 5. dönemde epitelin derinliğine doğru hareket eder. Bu dönemde spermatidler tubulus epiteli içine maksimum penetrasyon göstermiştir. On yedinci adım spermatidin başı, Sertoli hücre çekirdeğine bitişik olarak gizlenir.

Dönem VI

Akrozomik sistem altıncı adım spermatid nükleusunun yaklaşık dörtte birini kaplar. Küçük bazofilik granüllere sahip onsekizinci adım spermatidler lumene doğru göç etmiştir.

Dönem VII

Büyük bazofilik granüller lumen sınırındaki 19. adım spermatidlerin çekirdeği yanında yerleşmiştir. Akrozomik sistem 7. adım spermatid nükleusun neredeyse üçte birini kaplar. Ondokuzuncu adım geç spermatid nükleusunun eğriliği dikkat çekicidir.

Dönem VIII

Siklusun 7. döneminden 8. döneme geçişte, bazofilik granüller 19. adım spermatidin baş bölgesine doğru hareket eder ve burada birleşirler. Sekizinci adım spermatidin nükleusu ve akrozomik sistemi sitoplazmanın bazal kutbuna doğru yerleşir. Bu dönem için tipik özellik Sertoli hücresinin nükleusunun bazal membrandan uzağa yerleşmesidir. Siklusun 8. döneminde 19. adım spermatidler serbest bırakılır.

Dönem IX

Bu dönemin tanınması için önemli iki özellik, dokuzuncu adım spermatidin akrozomik sisteminin uzaması ve epitel içinde artık kitlelerin bulunmasıdır. Aynı zamanda lumen sınırında 19. adım spermatidler dizilmezler.

Dönem X

Siklusun 10. dönemi kolaylıkla 9. dönemden ayırt edilir. Geç 10. adım spermatidin akrozomik sistemi nükleusun apeksinden kaudal bölgesine doğru uzar. Spermatid nükleusunun sagittal bir kesiti V biçimli bir yapı gösterir.

Dönem XI

Akrozomal-nükleer açıdaki sagittal kesitte nükleus çapı ayırt edici bir özelliktir. Onbirinci adım spermatidlerin, akrozomik sistemi ve nükleusu kaudal bölgeye doğru keskin bir açıda çıkıntı yapar.

Dönem XII

Siklusun 11 ve 12. dönemleri arasında spermatid değişimi en yüksektir. Yoğunlaşmış çekirdeğe sahip onikinci adım spermatidlerin sivri akrozomik uçları kesit düzleminde görülmektedir.

Dönem XIII

Geç 13. adım spermatidde akrozomik sistem nükleusun ventral tarafında çıkıntı yapar ve nükleer apex kromatin yoğunluğundan dolayı yoğun şekilde boyanır. Dikkat çekici çekirdekçiğe sahip geniş diploten spermatositler bu dönemde tipiktir.

Dönem XIV

Siklusun 14. dönemi sadece mitotik figürler (mayoz I veya mayoz II) ve/veya sekonder spermatositler bulunduğu tanımlanır (Hess 1990).

A (Mayoz I)

İlk mayotik bölünme, spermatosit sitoplazmasının merkezinde saçılmış görünümde kromatin yığımından oluşmuş büyük mitotik figürlerin bulunmasıyla tanınır.

B (Mayoz II)

Sekonder spermatositler yuvarlak spermatidlerden tipik olarak daha geniştir. Mayoz II, merkeze yerleşmiş yoğun kromatin kümelerinden oluşmuş mitotik figürlerin bulunmasıyla belirlenir (Hess 1990).

Yapılan bir çalışmada, sığırlarda spermatogenik siklusun altı farklı evresi boyunca tubuler çapta önemli değişiklik görülmemiştir (Wrobel ve Schimmel 1989). Ribeiro ve ark

(2007), ratlarda siklusun VII-VIII. evrelerinde seminifer tubulus çapında istatistiksel bir fark belirlememişlerdir.

Yetişkin ratlarda yapılan bir çalışmada, tubulus boyutu ile kontraktilite arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak için spermatogenik siklusun IV-V, VII-VIII ve XIII-I. evrelerinde seminifer tubül çapları ölçülmüştür. Tubulus çapının VII-VIII. evrelerde IV-V ve XIII-I. evrelerine göre önemli oranda büyük olduğu, tubulus kontraktilitesinin ise yine aynı evrede diğer evrelere göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Harris ve Nicholson 1998).

Gaytan ve ark (1986), ratlarda 5 günlük yaştan 360 günlük yaşa kadar testis hacmi, tubulus çapı ve uzunluğunu incelemişlerdir. Bu parametrelerin artan yaş dönemiyle birlikte arttığı ve 90 günlük yaşta tubulus çapının ortalama 268 µm olduğu belirlenmiştir.

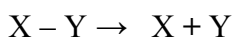
Wing ve Christensen (1982), seminifer tubulus çapının siklusun dönemleri ile ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Buna göre tubulus çapı I-V. dönemden VII-VIII. döneme kadar önemli derecede artar, sonrasında ise VIII. dönemden XI. döneme kadar azalır. VII-VIII. dönemden bir sonraki siklusun V. dönemine kadar olan tubulus çapı, siklusun VII-VIII. Dönemindeki tubulus çapından önemli oranda daha küçüktür. Tubulus çapı en yüksek VII-VIII. dönemde görülürken, en düşük XI. dönemde gözlenmektedir.

1.2. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

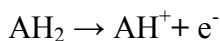
Dış yörüngelerinde en az bir adet eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküller serbest radikal denir (Del Maestro 1991, Coşkun ve ark 2005). Serbest radikaller oldukça reaktiftir, elektron çiftlemek için diğer moleküller ile reaksiyona girme eğilimindedirler (Yapar 2006).

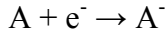
Radikaller başlıca 2 yolla oluşur;

1)Homolitik bölünme: Kovalent bağlı bir molekülün, her bir parçasındaki ortak elektronlardan birisinin homolitik bölünmesi sonucunda ortaklanmamış elektronlar taşıyan molekül veya atomlar meydana gelir:



2)Normal bir moleküle tek bir elektronun eklenmesi: Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en çok bu yolla meydana gelir (Cheeseman ve Slater 1993):





Radikaller diğer moleküller ile çeşitli şekillerde reaksiyona girerler. İki radikal karşılaştığında paylaşılmamış elektronlarını birleştirerek ortak bir elektron zinciri oluştururlar. Bu bağlantı kovalent bir bağ olarak adlandırılır.

Bir radikal; paylaşılmamış elektronunu radikal olmayan bir moleküle vererek, başka bir molekülden elektron alarak veya radikal olmayan bir moleküle bağlanarak radikal olmayan bir molekülü radikale dönüştürür (Halliwell ve Chirico 1993).

Oksidatif stres, organizmada reaktif oksijen bileşikleri (reactive oxygen species, ROS) ve reaktif nitrojen bileşikleri gibi yüksek reaktif bileşikler oluşumunun artması veya bunların ortadan kaldırılmasında azalma olarak tanımlanır (Johansen ve ark 2005). Bu bileşiklerin organizmada yararlı ve zararlı etkileri vardır. Fizyolojik olarak bu bileşiklerin düşük miktarlarında organizmayı zararlı etkilere karşı koruma ve mitojenik uyarım gibi yararlı etkileri vardır. Tam tersine bu bileşik seviyelerinin fazla miktarda yükselmesi sonucu lipid, protein, karbonhidrat ve nükleik asit gibi hücre yapılarına önemli zararlı etkileri ortaya çıkar. Reaktif oksijen bileşiklerinin zararlı etkileri enzimatik antioksidan ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile dengede tutulurlar (Valko ve ark 2006).

1.2.1. Serbest Radikal Türleri

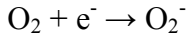
Serbest radikalleri, oksijen merkezli ve oksijen merkezli olmayan serbest radikaller olarak sınıflandırmak mümkündür. Oksijen merkezli serbest radikallerin başlıcaları O_2^- ve $OH^\cdot$ 'dir. Ayrıca H_2O_2 gibi radikal olmayan fakat etkileri ve sonuçları sebebiyle kimyasal aktiviteleri yüksek reaktif oksijen bileşikleri de vardır (Babior 2000, Johansen ve ark 2005). Çizelge 1.1'de radikal olan ve olmayan reaktif oksijen bileşikleri yer almaktadır

Çizelge 1.1. Reaktif oksijen bileşikleri (ROS) (Babior 2000, Johansen ve ark 2005)

Radikal olan ROS	Radikal olmayan ROS
Süperoksit radikali (Superoxide radical, O_2^-)	Hidrojen peroksit (Hydrogen Peroxide, H_2O_2)
Hidroksil radikali (Hydroxyl radical, $OH^\cdot$)	Lipidhidroperoksit (Lipid Hydroperoxide, LOOH)
Alkoksil radikali (RO)	Hipoklorik asit (Hypochlorous acid, HOCl)
Peroksil radikali (ROO)	Ozon (Ozone, O_3)

1.2.1.1. Süperoksit radikali (O_2^-)

Oksijen molekülüne bir elektronun eklenmesi ile süperoksit radikali oluşur (Halliwell 1989).

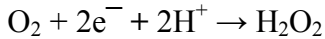


Serbest radikal olmakla beraber O_2^- 'in belirgin toksik etkisi yoktur. Normal şartlar altında O_2^- antioksidan savunma mekanizmaları tarafından hızla elimine edilir. O_2^- , NAD(P)H oksidaz, ksantin oksidaz ve siklooksigenaz aracılığıyla ve ATP üretimi için gerekli oksidatif fosforilasyon sırasında mitokondriyal elektron taşıyıcı zincir aracılığıyla oluşmaktadır. O_2^- mitokondride manganez süperoksit dismutaz (Manganese Superoxide Dismutase, Mn-SOD), sitoplazmada bakır süperoksit dismutaz (copper superoxide dismutase, Cu-SOD)'ın etkisiyle H_2O_2 'e dönüşmektedir. Özellikle geçiş metal iyonlarının (demir, bakır) varlığında O_2^- ve H_2O_2 ferrik demiri (Fe^{+3}) ferro (Fe^{+2}) hale getirerek, serbest oksijen radikallerinden en reaktif ve hasar verici özelliğe sahip olan OH radikalini oluşturmak için kolayca parçalanabilir. Bu reaksiyon "Fenton Reaksiyonu" olarak bilinir (Johansen ve ark 2005).

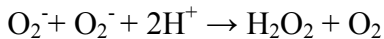
Süperoksit radikali, hidroksil radikali (OH)'den daha az reaktiftir. Bununla beraber ortaya çıktığı hücreden daha uzak yerlere rahatlıkla geçerek başka radikallerin oluşmasına ve doku hasarına neden olur (Reilly ve ark 1991).

1.2.1.2. Hidrojen peroksit (H_2O_2)

H_2O_2 zayıf bir oksidandır. Ürat oksidaz, glikoz oksidaz ve D-amino asit oksidaz gibi çoğu enzim oksijen molekülüne iki elektronun taşınmasıyla H_2O_2 oluşumuna aracılık eder (Gutteridge 1995).



Biyolojik sistemlerde H_2O_2 'in asıl kaynağı O_2^- 'in dismutasyonudur. Bu reaksiyon spontan veya süperoksit dismutaz (SOD) ile enzimatik olarak gerçekleşir

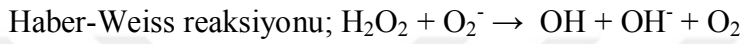
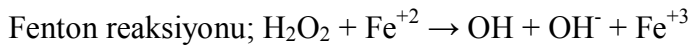


Hidrojen peroksit biyolojik membranları geçebilir ve uzun ömürlüdür. Reaktif geçiş, metal iyonlarının varlığında OH kaynağı olması nedeniyle önemlidir (Shimokawa ve Morikawa 2005).

H₂O₂ mitokondride glutasyon peroksidaz ve lizozomda katalaz aracılığıyla H₂O ve O₂'e ayrışır (Johansen ve ark 2005).

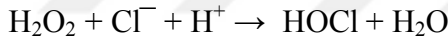
1.2.1.3. Hidroksil radikali (OH)

Süperoksit radikali ve H₂O₂'ten meydana gelen en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikalidir. Hidroksil radikalının reaktivitesi o derece yüksektir ki, yapıldığı hücre bölümünden daha uzağa difüzyonuna gerek kalmadan derhal reaksiyona girer. Yarı ömrü çok kısadır. Önemli iki kaynağı Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonudur (Kruszewski 2003, Zhang ve Huang 2003).

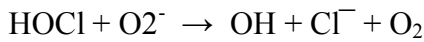
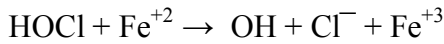


1.2.1.4. Hipoklorik asit (HOCl)

Vücutta aktif nötrofiller aracılığıyla üretilen HOCl, güçlü bir oksidandır. Nötrofil sitoplazması içinde hem içeren miyeloperoksidaz, H₂O₂ ve Cl⁻ iyonundan HOCl oluşumunu katalize eder. Biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunu başlatmak için doymamış yağ asitlerini etkiler.



Hipoklorik asit, demire bağımlı olan ve bağımlı olmayan reaksiyonlarla OH oluşumunda yer alır (Gutteridge 1995).



1.2.2. Serbest Oksijen Radikal Kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin kaynakları, endojen ve ekzojen kaynaklar olmak üzere iki başlık altında toplanır (Çizelge 1.2). Endojen kökenli oksijen radikalleri normalde organizmada oldukça az miktarlarda bulunurken, organizmada oksidatif strese neden olan ekzojen kökenli oksijen radikallerinin sayısında son yıllarda önemli ölçüde artış saptanmıştır.

Çizelge 1.2'de serbest oksijen radikallerinin endojen ve ekzojen kaynaklarından bazıları sıralanmıştır.

Çizelge 1.2. Serbest oksijen radikal kaynakları (Babior 2000, Hsu ve ark 2007)

Endojen kaynaklar	Ekzojen kaynaklar
Mitokondriler (solunum zinciri)	Hava kirliliği
Endoplazmik retikulum ve nükleer membranda elektron transport sistemi (cP450)	Radyasyon
Peroksisomlar (amino asit oksidaz, urat oksidaz)	Sigara
Plazma membranları	Alkol, Uyuşturucu
Oksidan enzimler (ksantin oksidaz)	Pestisitler
Araşidonik asit yolu	Solventler
Otooksidasyon reaksiyonları	Anestezik maddeler
(Tiyoller, hidrokinonlar, katekolaminler)	PCB toksikasyonu
Fagositik hücreler (nötrofil ve makrofajlar)	Travma
	İskemi

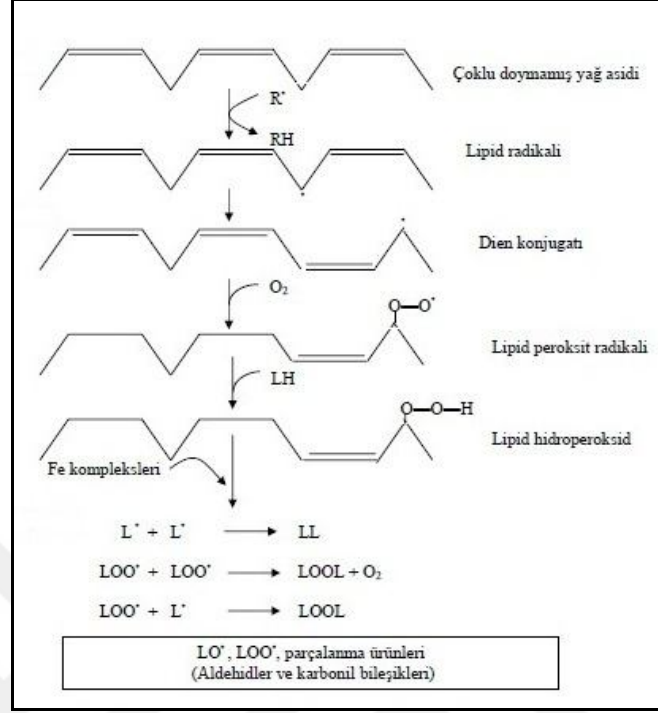
1.2.3. Serbest Radikallerin Hücrelerdeki Etkileri

Normal metabolizma sırasında ya da patolojik yolla ortaya çıkan serbest radikaller, protein, yağ, karbonhidrat ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir (Babior 2000).

1.2.3.1. Lipidlere etkisi

Lipidler, biyolojik yapılar içinde reaktif oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en duyarlı yapılardır. Serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal olay, lipid peroksidasyonu olarak tanımlanmaktadır. Bu kimyasal olay, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asiti zincirindeki α -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Serbest radikal etkisiyle yağ asiti zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asiti zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olmaktadır. Böylece oluşan lipid radikali (lipid radical, L) dayanıksız bir bileşik olup, bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Öncelikle, molekül içi çift bağ aktarılması ile oksidasyon ürünü olan dien konjugatları oluşmaktadır. Daha sonra, lipid radikalın moleküler oksijenle reaksiyona girmesi ile lipid peroksid radikali (lipid peroxide radical, LOO) meydana gelmektedir. Bu lipid peroksid radikalleri de zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine (LOOH) dönüşmektedir. Böylece reaksiyonun oto-katalitik bir biçimde yürümesi sağlanmaktadır (Yapar 2006). Lipid peroksidasyonu, LOOH'ın aldehid ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona

ermektedir. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda, malondialdehid (Malondialdehyde, MDA) oluşur (Uçgun ve ark 2005).



Şekil 1.7. Doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu (Yapar 2006)

Ortaya çıkan bu lipid peroksid ürünleri organizmada;

1. Membranların yapı ve fonksiyonlarında bozukluklara yol açarlar.
2. Triptofan ve sistein gibi amino asitleri etkileyerek protein yapısını bozar ve hasar meydana getirirler.

3. Lipid peroksidasyonu sırasında, aktiviteleri için sülfidril ve amino grubuna gereksinim duyan, özellikle hormonal uyarılara hücrenin cevap verme imkanını sağlayan yüzey reseptörleri inhibe olur.

4. Hücre membranına yakın yerleşimdeki DNA molekülleri lipid peroksidasyonundan hasar görürler ve bazen DNA'nın replikasyonu yapılamaz (Cheeseman ve Slater 1993, Halliwell ve Chirico 1993).

Lipidlerden oluşan lipid peroksil (LOO) radikalleri OH radikallerinden daha etkin olarak hasar yapabilmektedirler (Babior 2000, Burçak ve Andican 2004). Malondialdehid (MDA) miktarı, tiyobarbitürik asit testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında kullanılmaktadır (Uçgun ve ark 2005).

1.2.3.2. Proteinlere etkisi

Serbest radikaller, proteinler üzerine olan hasar yapıcı etkilerini, proteinlerde serbest radikal birikimi yaparak gösterir. Doymamış bağ ve sülfüt içeren moleküllerin serbest radikaller ile reaktivitesi yüksek olduğundan fenilalanin, sistin, sistein, tirozin, triptofan, histidin, metionin, lizin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Bunun sonucunda özellikle sülfür ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyon sonucu albümin ve immunglobulin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (Freeman ve Crapo 1982).

1.2.3.3. Karbonhidratlara etkisi

Geçiş metalleri tarafından katalizlenen bir reaksiyon ile serbest glikoz oksidasyona maruz kalır. Bunun sonucunda reaktif oksidanlar ve protein reaktif dikarbonil bileşikleri üretilir. Sinoviyal sıvının viskozitesinde önemli role sahip aminoglikan yapıdaki hyalüronik asit, serbest radikallerle etkileşerek bağ dokusunun stabilitesinin bozulmasına ve sıvının viskozitesinin kaybına neden olur (Yapar 2006).

1.2.3.4. DNA üzerine etkisi

Serbest radikaller, deoksiribonükleik asiti (DNA) etkileyerek hücrede mutasyona yol açarlar. Oksidatif hasar sonucu genetik materyalin sürekli olarak değişime uğraması mutagenesis, karsinogenesis ve yaşlanmada gözlenir. Çeşitli kanser dokularında serbest radikal aracılı DNA hasarının meydana geldiği ortaya konmuştur. DNA hasarını indükleyen reaktif oksijen bileşikleri, tek veya çift zincir DNA kırılmaları, pürin, pirimidin bazları veya deoksiriboz modifikasyonuna ve DNA-protein çapraz bağlanmasına neden olmaktadır. DNA hasarı transkripsiyonun başlaması veya durmasına yol açabilir, ayrıca sinyal iletim yollarının indüksiyonu, replikasyon hataları ve genomik dengesizliğe neden olabilir (Valko ve ark 2006).

OH radikali hem pürin ve pirimidin bazları ile hem de deoksiribozla etkileşime girerek DNA'yı hasara uğratar. Hidroksil gibi serbest radikal bileşikler DNA bazları üzerinde geri-dönüşümsüz değişikliklere neden olurlar. Bunlardan en önemlileri timin ile hidroksil radikalının oluşturduğu ürün olan timin glikol ve guanin ile hidroksil radikalının oluşturduğu ürün olan 8-hidroksi guanindir. İlk kez insan idrarında belirlenen 8-hidroksi

guanin önemli bir okside DNA ürünüdür. Bu ürün hem mutasyona hem de karsinogeneze neden olmaktadır (Valko ve ark 2006).

DNA molekülünün hasarı kronik inflamasyon, enfeksiyon, yaşlanma, karsinogenez, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıklara yol açar (Cooke ve ark 2006).

1.2.3.5. Testiste oksidatif stres

Spermatogenez saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyal oksijen tüketimini göstermektedir. Ayrıca testisteki zayıf vaskülarizasyon, bu dokuda oksijen durumunun düşük ve bu düşük oksijen miktarı için olan rekabetin oldukça şiddetli olduğunu gösterir (Chen ve ark 2005).

Hem spermatogenez hem de Leydig hücresi steroidogenezi oksidatif stresle hasar görebildiği için bu dokudaki düşük oksijen miktarı, testisin kendini serbest radikal hasarından koruyabileceği mekanizmaların önemli bir parçası olabilmektedir (Chen ve ark 2005). Ayrıca testis bu korunmayı sağlamak için çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyiciler içermektedir. Testiküler mikroçevredeki düşük oksijen miktarına rağmen yine de testis fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve reaktif oksijen radikallerini oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle oksidatif strese karşı hassas hale gelmektedir (Zangar ve ark 2004, Kaur ve ark 2006).

1.3. Antioksidan Sistem

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Serbest radikallerin ve antioksidanların düzeyleri arasındaki hassas denge korunamadığı takdirde, hücre hasarına kadar giden değişikliklerden dolayı birçok patolojik durum (Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı, ateroskleroz, kalp hastalıkları-miyokard enfarktüsü, kanser, diyabet, akut renal yetmezlik, romatoid artrit, anfiyem, bronşit ve karaciğer hastalıkları) ortaya çıkabilmektedir (Rangan ve Bulkley 1993).

Başlangıçta antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Daha sonraları ise bu tanım lipidlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde

genişletilmiştir. Antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir (Rangan ve Bulkley 1993).

Antioksidanlar;

1. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler,
2. Katalitik metal iyonlarını bağlayarak radikal oluşumunu önleyebilirler,
3. Anahtar rol oynayan süperoksit ve hidrojen peroksit gibi reaktif oksijen türlerini uzaklaştırırlar,
4. Hidroksil, alkoksil, peroksil radikallerini temizleyebilirler. Peroksitleri alkol gibi nonradikal ürünlere dönüştürerek etkilerini gösterebilirler. Örneğin; glutatyon peroksitaz, peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır,
5. Etkilerini serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek yaparlar. Hemoglobinin ve seruloplazminin bu şekilde etki gösterir.
6. Membran lipidlerini etkileyerek peroksit oluşturabilen tekil oksijeni baskılayabilir ya da temizleyebilirler (Gutteridge 1995).

Bu mekanizmalar normal biyokimyasal olaylar sırasında az miktarda oluşan radikalleri nötralize edebilirler. Ancak hiperoksi, iske mi reperfüzyon, dokularda radikal oluşturan ksenobiyotiklere maruz kalma ve dokuda radikal oluşumuna neden olan aktive olmuş nötrofiller ve diğer fagositlerin dokuda toplanması gibi durumlar, oksidan-antioksidan dengesinin bozulmasına ve bu da hücre zedelenmesi hatta hücre ölümüne yol açabilir (Yılmaz 2006).

Antioksidanlar kaynaklarına göre organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar) ve dışarıdan alınanlar (ekzojen antioksidanlar) olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılabilirdi gibi, radikal oluşumunu [metal şelatörler, süper oksit dismutaz (superoxide dismutase, SOD) katalaz (catalase, CAT), glutatyon peroksitaz (glutathione peroxidase, GSH-Px)] ve oluşan radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, ubikinon, retinoik asit, β karoten, glutatyon, ürat) antioksidanlar şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim olanlar ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler (Çizelge 1.3) (Cheeseman ve Slater 1993, Eu ve ark 2000).

Çizelge 1.3. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma.

A) Endojen Antioksidanlar
1) Enzimatik antioksidanlar Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi Süperoksit dismutaz (SOD) Katalaz (CAT) Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) Glutasyon redüktaz (Glutathione reductase, GR) Glutasyon-S-transferaz (Glutathione-S-Transferase, GST) Hem oksijenaz (Heme oxygenase, HO)
2) Nonenzimatik antioksidanlar Lipid fazda bulunanlar; α -tokoferol (E Vitamini), β -karoten, α -lipoik asit Sıvı fazda (hücre sitoplazmasında veya kan plazmasında) bulunanlar; Albumin, Askorbik asit, Bilirubin, Glutasyon (Glutathione, GSH), Melatonin, Seruloplazmin, Transferrin, Ürik asit
B) Ekzojen Antioksidanlar
1) Ksantin Oksidaz İnhibitörleri: Allopurinol, oksipürinol, folik asit, pterin aldehyd, tungsten 2) İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antienflamatuar ilaçlar, NADPH oksidaz monoklonal antikor 3) Rekombinant superoksit dismutaz 4) Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol, albumin, bilirubin, 17-Aminosteroidler (Lazoroidler), glutasyon, urat 5) Demir redoks döngüsünün inhibitörleri: Desferrioksamin

1.3.1. İnfertilitede Antioksidanların Rolü

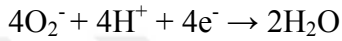
Spermatozoondaki fonksiyonel kayıplar infertilitenin en genel sebebidir. Memeli spermatozoon membranları doymamış yağ asitleri yönünden zengindir ve lipid peroksidasyon aracılı oksidatif hasarın indüklenmesi yönünden oksijene karşı oldukça duyarlıdır. Anormal spermatozoonlar ve lökosit kontaminasyonu aracılığıyla serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimi, erkeklerde infertilitenin nedenlerinden bazılarıdır. Bundan başka pestisitler, ekzojen östrojenler, ağır metaller ve yaşlanma oksidatif stresi

indükleyip, erkek sperm sayısının azalmasına neden olarak spermatogenezisi olumsuz yönde etkiler. Sınırlı endojen mekanizmalar bu hasarları tersine çevirmek için vardır. Spermatozoonu herhangi bir hasara karşı korurlar. Ancak üriner sistem enfeksiyonu bu mekanizmaların etkisini azaltır ve oksidatif stres durumunu ortaya çıkarır.

1.3.2. Enzimatik Antioksidanlar

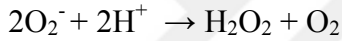
1.3.2.1. Mitokondrial sitokrom oksidaz

Mitokondrilerde solunum zincirinin en son basamağında yer alan, bakır içeren bir enzimdir. Solunum zincirindeki görevini sürdürürken, süperoksit radikalının suya dönüşümünü de sağlar (Speers-Roesch ve Ballantyne 2005):

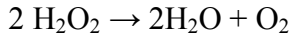


1.3.2.2. Süperoksid dismutaz (SOD)

Hücre içi enzimatik antioksidanlardan biri olan SOD, süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder.



Bu tepkime sonucunda oluşan ürünler ya lizozomlardaki katalaz (CAT) tarafından ya da mitokondrideki glutatyon peroksidaz tarafından H_2O 'ye detoksifiye edilir.



Süperoksid dismutazın üç izomeri bulunmaktadır. Bunlar sitozolik, dimerik Cu, Zn-SOD (32 kDa), mitokondrial, tetramerik Mn-SOD (96 kDa) ve ekstra sellüler SOD (EC-SOD)'dir. Cu, Zn-SOD enzim aktivitesini pH 5-9.5 de göstermektedir (Valko ve ark 2006). Bu iki enzimden Cu.Zn-SOD siyanürle inhibe olurken, Mn-SOD siyanürden etkilenmez (Hileman ve ark 2001). Enzimin fizyolojik fonksiyonu, oksijeni katabolize eden hücreleri süperoksit serbest radikalının zararlı etkilerine karşı korumaktadır. Böylece lipid peroksidasyonunu inhibe eder. Mn-SOD anti-tümöral aktiviteye de sahiptir. Bu etkisini kanser hücre sayısının artışı ve büyümesini baskılayarak göstermektedir (Valko ve ark 2006).

SOD, fagosite edilmiş bakterilerin intraselüler öldürülmesinde de rol oynar. Bu nedenle, SOD granülosit fonksiyonu için çok önemlidir. Lenfositlerde de granülositlerden daha fazla miktarda SOD bulunmaktadır (Hileman ve ark 2001).

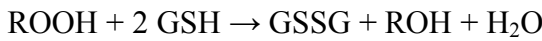
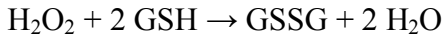
1.3.2.3. Katalaz

Katalaz (CAT) bitki, hayvan ve aerob bakterilerde bulunan bir enzimdir. Bu enzim daha çok peroksizom olarak adlandırılan hücre organeli ile mitokondri, sitoplazma ve endoplazmik retikulum içinde bulunmaktadır. Katalaz tüm enzimlerin içinde en yüksek enzim aktivitesine sahip olan enzimlerden biridir. Bir molekül katalaz altı milyon hidrojen peroksitin su ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlar. Dört adet hem grubu içeren hemoprotein yapısında olan katalazın doku aktiviteleri farklılıklar gösterir. En yüksek aktivite karaciğer ve böbrekte saptanırken, en düşük aktivite destek dokusunda izlenmektedir (Johansen ve ark 2005).

1.3.2.4. Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon redüktaz (GR)

Sitozolda yerleşik olan GSH-Px, yapısında dört selenyum atomu bulunan bir metalloenzimdir (Urso ve Carlson 2003, Drevet 2006, Valko ve ark 2006). Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve lipid hidroperoksitlerin (ROOH) yıkımını katalizleyerek membran lipidlerini ve hemoglobini oksidatif strese karşı korumaktadır (Yılmaz 2006).

GSH-Px, redükte glutasyonu okside glutatyonla dönüştürürken aynı zamanda H_2O_2 'i de suya çevirir. Hidroperoksitler enzim aktivitesi ile indirgenmekte iken glutatyon ise yükseltgenmektedir (Urso ve Carlson 2003, Drevet 2006, Valko ve ark 2006).



Okside glutatyon ise glutasyon redüktaz (GR) enzimi aracılığı ile NADPH kullanılarak yeniden redükte glutatyonla dönüştürülür (Urso ve Carlson 2003, Drevet 2006, Valko ve ark 2006).

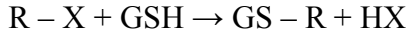


GSH-Px aktivitesindeki azalma şiddetli hücre hasarına yol açmaktadır ve bu durum özellikle selenyum eksikliği durumlarında ortaya çıkmaktadır. Çünkü selenyum bu enzimin integral bir parçasıdır. Zar yapısındaki fosfolipid hidroperoksitlerini, alkollere indirgeyerek özellikle E vitaminin yetersizliği durumlarında membranları oksidatif strese karşı korumaktadır (Drevet 2006, Valko ve ark 2006).



1.3.2.5. Glutasyon transferaz

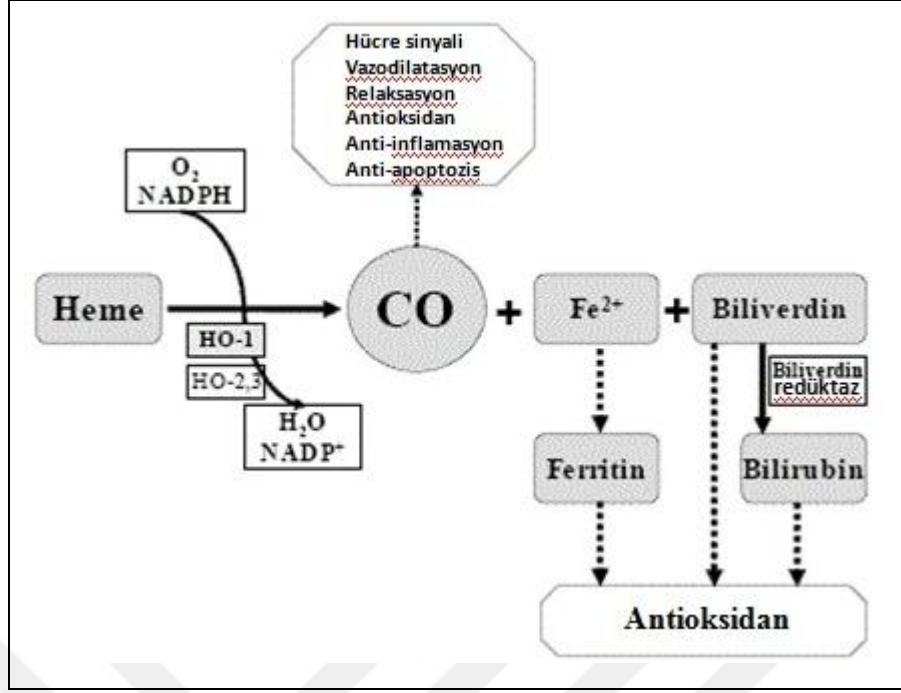
Glutasyon transferaz dimerik yapıdadır. Esas olarak sitozolde bulunur. Çok sayıda izoenzimi vardır. Yabancı maddelerin biyotransformasyonunda önemli rolleri olan GSH transferazlar çeşitli endojen ve ekzojen bileşiklerin glutasyon ile konjugasyonunu katalizler (Yapar 2006).



1.3.2.6. Hem oksijenaz (Heme oxygenase, HO)

Hem proteini, demir ve protoporfirin-IX kompleksinden oluşan ve canlı hücrelerde çok önemli fonksiyonları olan hemoproteinlerin yapısında yer almaktadır. Başlıca hemoproteinler; oksijen taşınmasında rol olan hemoglobin, oksijen metabolizmasında rol oynayan oksidaz, proksidaz, katalaz, elektron transportunda rol oynayan sitokromdur (Ozan ve ark 2011).

Endojen kaynaklı antioksidan moleküler yapılardan biri olan hem oksijenaz (HO), hücre içi hem seviyelerinin düzenlenmesinde önemli rol oynar. Bu enzim endoplazmik retikulum içinde yayılmıştır. HO, NADPH ve moleküler oksijen kullanarak hem molekülünün karbonuna bağlanarak, hem'in porfirin halkasının oksidatif olarak parçalanıp biliverdin, karbon monoksit (carbon monoxide, CO) ve serbest demire (Fe-II) ayrılmasına neden olur. Biliverdin, biliverdin redüktazın etkisiyle bilirubine dönüşür (Şekil 1.7) (Babusikova ve ark 2008). Bilirubin hücre membran lipidlerinin peroksidasyonunu engelleyerek antioksidan etki gösterir. CO de bilirubin gibi antiapoptotik etkiye sahiptir. Ayrıca guanilat siklazı aktive ederek düz kaslarda gevşeme ve damarlarda vazodilatasyona neden olur (Bıçak ve ark 2003).



Şekil 1.8. Hem'in hem oksijenaz aracılığıyla parçalanması (Babusikova ve ark 2008)

HO'nun üç izoformu vardır; HO-1, -2 ve -3. HO-1 ve -2 memeli hücrelerinde tespit edilirken, HO-3 ise sadece ratlara özgüdür (Schipper 2004). HO-1 karaciğer, dalak ve testiste (Fang ve ark 2004, Ozawa ve ark 2002), HO-2 başlıca testis ve beyinde, HO-3 ise dalak, karaciğer, timus, prostat, kalp, böbrek ve testiste yüksek derecede eksprese edilmiştir.

1.3.2.6.1. Hem oksijenaz-1 (Heme oxygenase-1, HO-1)

HO-1 ekspresyonu hipoksi, stres, ağır metaller, UV radyasyon, H_2O_2 ve NO oksit gibi serbest radikaller aracılığıyla başlar. HO-1'in biyolojik fonksiyonu oksidatif ve hücrel strese karşı hücreyi korumaktır (Fang ve ark 2004).

HO-1 apoptozisin düzenlenmesinde etkili olarak hücre büyümesinde ve ölümünde hayati bir role sahiptir (Fang ve ark 2004). Ratlarda karaciğer hücre kültüründe yapılan bir çalışmada HO-1'in antiapoptotik etki göstererek oksidatif stresin zararına karşı hücreyi koruduğu ortaya konmuştur (Tanaka ve ark 2003). HO-1'in antiapoptotik etkisi üç yolla gerçekleşir; 1) hücre içi pro-oksidan seviyelerini azaltarak 2) bilirubin seviyesini artırarak 3) CO üretimini yükselterek (Fang ve ark 2004). Endotel hücrelerinde CO'nun antiapoptotik etkisi MAPK (p38 mitogen-activated protein kinaz)'nın aktivasyonu ile (Brouard ve ark 2000), vasküler düz kas hücrelerinde ise çözünür guanilat siklazın aktivasyonu ile gerçekleştiği belirlenmiştir (Liu ve ark 2002). Aynı araştırmacılar bu etkinin mitokondriyal

sitokrom c'nin salınının bloke edilmesi ve proapoptotik p53 proteinin inhibe edilmesiyle de gerekleştiiğini ortaya koymuşlardır (Brouard ve ark 2000, Liu ve ark 2002).

Yapılan alışmalarda HO-1'in hücre koruyucu etkisinden dolayı bu enzimin aterosikleroz (Wang ve ark 1998), hipertansiyon (Ischizaka ve ark 1997), akut renal hasar (Nath ve ark 1992), toksik nefropati (Agarwal ve ark 1995), doku reddi (Tullius ve ark 2002), endotoksik çok (Lee ve Chau 2002), kronik obstruktif akciğer hastalığı (Yamada ve ark 2000), gastrointestinal hastalıklar (Guo ve ark 2001) ve Alzheimer (Ishizuka ve ark 2002) gibi hastalıklarda klinik olarak uygulanabileceği ileri sürülmüştür. Çinko-protoporfirin ve kalay-protoporfirin gibi HO inhibitörleriyle, HO-1'in inhibisyonu graft reddi (Sato ve ark 2001), iskemi (Wagner ve ark 2003), nefrotoksisite (Agarwal ve ark 1995) ve endotoksinlerin indüklediği septik şokun (Lee ve Chau 2002) daha da kötüleşmesine neden olmaktadır.

1.3.3. Nonenzimatik Antioksidanlar

1.3.3.1. Glutasyon (Glutathione, GSH)

Glutasyon, başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptittir (Yapar 2006, Yılmaz 2006). Suda öznen antioksidan ve indirgeyici bir ajandır. Glutasyonun pek çok metabolik görevi vardır. Glutasyon peroksidaz, GSH redüktaz ve GSH transferaz gibi enzimlerin substrat veya kosubstratıdır. Glutasyon, serbest radikaller ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur. Ayrıca protein yapısındaki -SH gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Amino asitlerin membrandan transportunu sağlar. Hemoglobinin methemoglobine dönüşmesini önler. İndirgenmiş glutasyon çeşitli reaksiyonlarda yükseltgenerek, okside glutatyon (oxidized glutathione, GSSG) dönüşür. Yükseltgenmiş glutasyonun tekrar indirgenmesi NADPH'ın da kullanıldığı bir reaksiyonla olur. Bu şekilde dokularda GSSG/GSH oranı düşük tutulur (Yapar 2006).

1.3.3.2. E vitamini

E vitamini tokoferol ve tokotrienol türevlerini kapsayan bir vitamindir. Doğal olarak alfa, beta, gama, delta, eta ve zeta gibi çeşitli şekilleri bulunmaktadır. Antioksidan aktivitesi en yüksek olanı alfa tokoferoldür. Yapısındaki fenolik hidroksi grubuna sahip aromatik halka kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği buradan

kaynaklanır. Bitkisel yağlar ve tohumlar, E vitamininden zengin kaynaklardır. Yer fıstığı, badem, pamuk yağı ve keten tohumunda bulunur. Diyetle alınan E vitamini yağda çözünmüş haldedir. Yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve emilir. Emilebilmesi için safra asit düzeylerinin de normal sınırlarda olması gerekir. E vitamini herhangi bir taşıyıcı protein olmadan pasif difüzyonla emilir (Gupta ve ark 2005, Hathcock ve ark 2005).

Dokularda, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. Membranların lipid tabakaları arasında yer alarak fosfolipidlerin yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerini serbest radikallerin etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini zincir kırıcı bir antioksidan olarak bilinir. Lipid peroksid radikalini (ROO) parçalayarak lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarını sonlandırır. Otoksidasyonun başlatıcısı olan peroksit ve hidroperoksit radikallerini inhibe eder. Lipid peroksidasyonunu engelleyerek, hücre zarında oluşacak olan hasarı ve düşük yoğunluklu proteinin (LDL) modifikasyonunu önler (Gupta ve ark 2005, Hathcock ve ark 2005).



Tokoferolün antioksidan etkisi, yüksek oksijen konsantrasyonlarında daha belirgindir. En yüksek oksijen kısmi basıncına maruz kalan lipid yapılarında, örneğin eritrosit membranları ve solunum sistemi membranlarında yoğunlaşma eğilimindedir. Eritrositleri de hemolize karşı korur. Prematür bebeklerde eksikliğine bağlı hemolitik anemi gösterilmiştir. Antioksidan etki ile DNA hasarını ve maling değişimleri azaltır (Hathcock ve ark 2005, Gupta ve ark 2005).

Chen ve ark (2005), Leydig hücre kültürlerinde vitamin E'nin indüklenen lipid peroksidasyonunu onardığı ve bu hücrelerin testosteron üretiminde artışa neden olduğunu belirlemişlerdir.

1.3.3.3. Askorbik asit (Vitamin C)

Askorbik asit suda çözünebilir güçlü ve önemli bir antioksidandır. Süperoksit ve hidroksil radikalleriyle kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. Hücre membranını ve DNA'yı oksidan hasara karşı korur. Başta Vitamin E ve B-karoten olmak üzere nonenzimatik antioksidanlarla birlikte çalışmaktadır. E vitamininin geri dönüşümünde görev alır, tokoferoksil radikalini alfa tokoferole indirgenmesini sağlar. Böylece E vitamini ile birlikte etkin bir şekilde LDL'yi oksidasyona karşı korur. Ayrıca,

antiproteazların oksidan maddeler ile inaktive olmasını engeller (Hathcock ve ark 2005, Valko ve ark 2006).

Vitamin C bağ dokuda kollagen üretimini sağlayarak ve kollagenin oksidatif hasardan zarar görmesini engelleyerek kan damarlarının yapısı korur (Iqbal ve ark 2004).

Vitamin C'nin akciğer, kolorektal ve mide kanserine koruyucu etkileri de ortaya konmuştur. Düşük serum vitamin C seviyeleri ise prekanser lezyonları olan gastrik metaplazi ve kronik gastritise katkı sağlamaktadır (Valko ve ark 2006).

Askorbik asit, Fe^{+3} 'i Fe^{+2} 'e indirgeyen süperoksit radikali dışındaki tek hücre içi moleküldür. Bu etkisiyle, ferrik demiri indirger, Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye uygun olan ferro-demire dönüştürür ve süperoksit radikalının üretimine neden olur. Bu özelliği C vitamininin pro-oksidan etkili olmasına neden olmaktadır (Hathcock ve ark 2005).

Yapılan bir çalışmada kadmiyumla indüklenen ROS üretimindeki artışın neden olduğu testiküler hasara karşı vitamin C'nin koruyucu etkisi ortaya konmuştur (Sen Gupta ve ark 2004).

Yapılan diğer çalışmalarda yine vitamin C ve E'nin poliklorobifenil (polychlorinated biphenyl, PCB)'e maruz kalan ratlarda Sertoli ve Leydig hücreleri ile epididimal spermatozoonlarda serbest radikallerin neden olduğu toksisiteye karşı koruyucu etkilerinin olduğu ortaya konmuştur (Kumar ve ark 2004, Murugesan ve ark 2005, Krishnamoorthy ve ark 2007). Başka bir çalışmada da, vit C'nin PCB ile hipotalamusta indüklenen oksidatif strese karşı koruyucu etkisi olduğu belirlenmiştir (Muthuvel ve ark 2006).

1.3.3.4. Beta-karoten

A vitamininin metabolik ön maddesi olan beta-keroten LDL yapısında yer alır ve LDL'yi oksidasyona karşı korurlar. Karotenoidler, hücreleri oksidan strese karşı üç farklı şekilde korurlar:

- a) Flavinler ve porfirinler gibi uyarıcıların zararlı etkilerini baskılama,
- b) Singlet (tekli) oksijeni baskılama,
- c) Peroksil radikallerini temizleme (Drisko ve ark 2003, Krinsky ve Johnson 2005)

1.3.3.5. Albumin

Yapısında bulunan çok sayıdaki sülfidril grubu aracılığıyla bakır iyonlarını bağlar ve lipid peroksidasyonunun başlamasını engeller. Bakır iyonlarının bağlanmasıyla protein yapısında hasar ortaya çıkar. Ancak albumin yarı ömrü oldukça kısa bir protein olduğundan kolaylıkla yenilenebilmektedir. Böylece bakır iyonlarının diğer proteinlerdeki sülfidril gruplarına bağlanması ve bu proteinleri hasara uğratması engellenmiş olur. Albumin kanda serbest yağ asitlerinin ve bilirubinin taşıyıcısıdır (Yapar 2006).

1.3.3.6. Bilirubin

Bilirubin lipid peroksidasyonunu inhibe edici ve süperoksit ve hidroksil radikallerinin toplayıcısı olarak antioksidan etki gösterir (Yapar 2006).

1.3.3.7. Serüloplazmin

İki değerlikli ferro demirin (Fe^{+2}) üç değerlikli ferrik demire (Fe^{+3}) yükseltgenmesini böylece fenton reaksiyonunu inhibe eder. Serbest radikal oluşumu da inhibe edilmiş olur (Crichton 2001).

1.3.3.8. Transferrin

Dolaşımdaki serbest demiri bağlayarak fenton reaksiyonunu önler (Halliwell 1989).

1.3.3.9. Melatonin

Hidroksil radikalini (OH) ortadan kaldıran çok güçlü bir antioksidandır. Melatoninin bir diğer önemli özelliği lipofilik olmasıdır. Böylece hücrenin bütün organellerine ve hücre çekirdeğine ulaşabildiği gibi kan-beyin ve kan-testis bariyerini de kolayca geçer. Bu nedenlerle çok geniş bir dağılımda antioksidan aktivite gösterir. Yaşlanma ile birlikte melatonin üretimi azalır. Bu durumun yaşlanma ve yaşlanmaya bağlı hastalıkların patogenezinde önemli olabileceği düşünülmektedir (Leon ve ark 2004). Seminal plazmadaki düşük melatonin seviyesi zayıf motilite, lökositospermia, varikosel ve non-obstrüktif azospermi gösteren infertil hastalarda gözlenmiş ve erkek genital sistemindeki oksidatif stresle ilişkilendirilmiştir (Awad ve ark 2006). Sol taraflı varikosel oluşturulmuş ratlarda melatoninin intraperitoneal enjeksiyonunun testiste oksidatif stresi hafiflettiği gösterilmiştir (Semerciöz ve ark 2003).

1.3.3.10. Ürik asit

Normal plazma konsantrasyonlarında antioksidan etki gösteren bir moleküldür. Antioksidan etkiyi çeşitli yollarla gösterir:

- a) Demir ve bakır iyonlarını bağlayarak etkisizleştirir.
- b) HOCl, OH, O²⁻ ve LOO gibi reaktif oksijen türlerini temizler (Yapar 2006).

1.3.3.11. Alfa lipoik asit (Alpha lipoic acid, 1,2-dithiolane-3-pentanoic acid, 6,8- dithiooctanoic acid, thioctic acid, ALA)

ALA, fizyolojik sistemlerde bulunan, tiyol grubu içeren ve antioksidan aktivitesi olan önemli bir moleküldür. Nispeten küçük bir moleküldür (MA: 206 g/mol) Kimyasal adı 1,2 ditiolan-3-pentanoik asit olan ALA, sekiz karbonlu bir yağ asitidir (Yapar 2006, Özkaya ve ark 2009). Bu sekiz karbon mitokondrideki oktanoik asitten sağlanmaktadır (Perham 1991). İlk kez 1950 yılında sığır karaciğerinden izole edilmiştir (Reed 2001).

Hem suda hem de yağda çözünbilme yeteneğine sahip ALA'nın iki formu vardır. R-alfa lipoik asit doğal, S-alfa lipoik asit ise sentetik formudur (Yapar 2006). R-alfa lipoik asit, mitokondride koenzim olarak bulunan bir disülfid bileşiğidir (Selvakumar ve ark 2006). Kırmızı et, brokoli, ıspanak, domates ve bezelye gibi bazı yiyeceklerde bulunan ALA aynı zamanda vücutta da sentezlenmektedir (Karaca ve Sözbilir 2007). Prokaryotik ve ökaryotik tüm hücrelerde bulunmaktadır. Mitokondride lipoik asit sentaz tarafından sentezlenmektedir (Padmalayam ve ark 2008). Plazma yarı ömrü 30 dakikadır. Esas olarak karaciğerde metabolize olur (Lombardo ve Chicco 2006). Lipoik asit proteinlere bağlı olduğundan serbest halde bulunmaz. Ancak terapötik uygulamalardan sonra serbest halde dolaşımda gözlenir (Guimaraes ve ark 2007).

Mitokondride oktanoik asitten sentezlenen ALA, yükseltgenmiş formunda intramoleküler disülfid bağı oluşturan, disülfid türevi bir moleküldür. ALA'nın okside olmuş ditiyolan halkası, çevresel şartlara bağlı olarak moleküle yüksek bir indirgeme özelliği kazandırmaktadır (Yapar 2006). ALA diyetle alındığında, sitozolik enzimler olan GSH redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz ve mitokondrial enzim E3 tarafından beyin dahil bir çok dokuda redükte formu olan dihidrolipoik asit (DHHLA)'e indirgenir (Yapar 2006, Özkaya ve ark 2009). ALA ve DHHLA'nın kimyasal reaktivitesini sağlayan da ditiyolan halkasıdır. Bu yapı ALA'yı bilinen tiyol içeren diğer biyomoleküller arasında özgün kılmaktadır.

ALA'nın antioksidan etkisi son yıllarda önem kazanmıştır ALA'nın hem okside şekli hem de indirgenmiş şekli antioksidan aktivite göstermektedir (Yapar 2006). ALA ve dihidrolipoik asitin antioksidan etkisi; sadece serbest radikal oluşumunu bastırması aracılığıyla değil, aynı zamanda indirekt olarak diğer hücrel antioksidanların yeniden kullanılması aracılığıyla da (Vitamin E, askorbik asit ve glutatyonun rejenerasyonunu sağlayarak) gerçekleşir (Guimaraes ve ark 2007, Özkaya ve ark 2009). ALA'nın güçlü antioksidan etkilerinden dolayı diyabet, arteroskleroz, nöron dejenerasyonu, multiple skleroz ve eklem hastalıkları gibi çeşitli patolojik durumlarda olumlu etkileri gözlenmiştir (Singh ve Jialal 2008).

ALA, antioksidan etkiye ilaveten bazı metabolik yollarda enzim aktivitelerini de etkileyebilir. Hepatik mikrozomal enzimlerden sitokrom P450 redüktaz ile disülfid-tiol değişimi yoluyla P450 redüktazı inhibe edebilir. Nitrik oksit sentaz ile sitokrom P450 redüktaz homologdur. Bu yüzden ALA nitrik oksit sentazı da inhibe edebilir (Yapar 2006).

Dihidrolipoik asidin antioksidan etkisi kanıtlanmış olmasına rağmen özellikle demirin varlığında prooksidan etki gösterebilir. Dihidrolipoik asit *in vitro* hem ferrik hem ferro demir ile şelat oluşturur. Bu nedenle demirin oksidatif hasarını önler. Ancak ferritinden demirin ayrılmasını ve Fe³⁺'ün Fe²⁺'ye dönüşümünü azaltarak oksidatif hasarı arttırabilir (Yapar 2006).

ALA ve DHLA'nın antioksidan ve prooksidan olarak fonksiyon gösterme yeteneği oksidatif stresin tipi ve fizyolojik şartlar tarafından belirlenmektedir (Özkaya ve ark 2009). Tiyol bileşikler tarafından oluşturulan prooksidan etkilerin çoğu O₂, H₂O₂ ve OH oluşmasına bağlanmaktadır (Yapar 2006).

Günlük diyetlerine ALA ilavesi yapılan ratların hepatositlerinde MDA seviyelerinin düştüğü, endojen antioksidan seviyelerinin arttığı ve ROS üretiminin azaldığı belirlenmiştir (Hagen ve ark 1999).

Siklofosfamid uygulaması öncesi, koruyucu amaçla ALA verilen ratların testis dokusunda, sadece siklofosfamid uygulaması ile azalan süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz ve glutatyon redüktaz seviyeleri ile artan MDA seviyesinin normale döndüğü gözlenmiştir (Selvakumar ve ark 2004).

Ratlarda adriamisin (adriamycin, ADR) ile oluşturulan testiküler hasara karşı koruyucu olarak verilen ALA'nın antioksidan seviyelerini normal düzeylerine ulaştırdığı, lipid peroksidasyonunu önemli derecede azalttığı (Prahalthan ve ark 2004) ve testiküler germ hücrelerdeki anormal değişimi normale döndürdüğü görülmüştür (Prahalthan ve ark 2006).

Aly ve ark (2009b) yapmış olduğu bir çalışmada, lipopolisakkaritle Sertoli hücrelerinde indüklenen oksidatif strese karşı ALA uygulamasının hidrojen peroksit ve lipid peroksidasyonundaki artışı ve süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon-S-transferaz, katalaz ve glutatyon redüktazdaki azalışı engelleyerek yetişkin rat Sertoli hücrelerinde hücre koruyucu etkisi olduğunu ortaya koymuşlardır.

Rat testislerinde siklofosamid ile indüklenen oksidatif hasara karşı uygulanan ALA'nın serum total antioksidan enzim kapasitesi, testis dokusu glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutatyon, malondialdehit (MDA), testis marker enzim aktiviteleri [Sorbitol Dehidrojenaz (sorbitol dehidrojenaz, SDH), gama glutamil transferaz-gamma-GT, asit ve alkalın fosfataz-ACP-ALP] ve serum testosteron seviyesindeki anormal değişimleri önlediği belirlenerek hücre koruyucu etkisi ortaya konmuştur (Motawi ve ark 2010).

Peritoneal adhesyon oluşturulan erkek ratlarda koruyucu amaçla verilen ALA'nın, MDA düzeylerini anlamlı oranda azaltırken, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktivitelerindeki artışı engellemiş olduğu görülmüştür (Özler ve ark 2011).

Sodyum arsenite maruz bırakılmadan önce ALA uygulaması, sadece bu kimyasala maruz bırakılan HepG2 hücre kültürlerinde glutatyon (GSH), hem oksijenaz ve MTA seviyelerindeki azalmayı önlemiştir (Huerta-Olvera ve ark 2008).

Farelerde yapılan bir çalışmada toksik etkili lindan (lindane/ 8-benzene hexachloride) uygulamasından sonra antioksidan etkili ALA ve vit E'nin etkisine bakılmıştır. Lindane uygulaması ile beyinde lipid peroksidasyonunun arttığı (MDA) ve GSH seviyesinin azaldığı, lindane ile birlikte ALA ve vit E uygulamasının ise artan MDA oranını azalttığı ve düşen GSH seviyesini de arttırdığı gözlenmiştir (Bist ve Bhatt 2009).

1.4. Testis Dokusunu Etkileyen Çevresel Faktörler

Solunduğunda, ağız yoluyla alındığında, deriye nüfuz ettiğinde erkek ve dişilerin üreme fonksiyon ve kapasitelerini azaltan ve/veya doğacak bireyi etkileyecek kalıtsal olmayan olumsuz etkileri meydana getiren veya olumsuz etkilerin oluşumunu hızlandıran kimyasal maddelere “üreme için toksik kimyasal madde” denir. Etkisinde kalınan maddenin cinsi yanında maruz kalma süresi ve şekli bu faktörlerin üreme sağlığına olan etkilerini belirlemektedir. Söz konusu kimyasalların cinsi, etkilenim süre ve şiddetine göre değişmekle birlikte kimyasal maddeler dişi ve/veya erkek üreme sisteminde olumsuz etkiler oluşturabilirler (Tekbaş 2006).

Doğal (bazı bitkilerde bulunan ve hormon gibi etki eden maddeler) ve yapay [2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (2,3,7,8-Tetraklorodibenzo-P-Dioksin, TCDD), PCB, pestisitler, ftalatlar, fenol türevleri-bisfenol, kimyasallar- ksilol, formaldehit] birçok endüstriyel ve çevresel kirleticiler testis dokusunun fonksiyonunu ve yapısını olumsuz yönde etkilemektedir (Handagama ve Ariyaratne 2001, Hsu ve ark 2007, Murugesan ve ark 2007, Seyran ve Erişir 2008, Gules ve Eren 2010).

1.4.1. Poliklorobifeniller (PCB)

Organik klorlu kirleticilerden olan PCB bileşikler, kimyasal olarak ilk kez 1865 yılında kömür katranında, doğada ise ilk olarak 1914 yılında bazı kuşların tüylerinde tespit edilmiştir. Çeşitli endüstriyel uygulamalarda 1930’lu yıllardan itibaren dünya çapında yaygın olarak kullanılmışlardır (Güvenç ve Aksoy 2007). Besin zincirine girerek çevresel kirlenmeye neden oldukları ve insan sağlığını tehdit etmeye başladıkları anlaşıldıktan sonra üretimleri dünyanın birçok ülkesinde (Amerika, İsveç, Danimarka, Norveç, Finlandiya, İzlanda, Türkiye) yasaklanmış, kullanımları da sınırlandırılmıştır (Lindell 2012). Ancak birçok ülkede endüstriyel teçhizat ve sanayi ürünlerinde hala kullanılmaktadır (Telli-Karakoç ve ark 2002, Çok ve ark 2004). PCB bileşikler pestisitlerin katkı maddesi olarak, matbaa mürekkebinde, boyalarda, plastik yapımında, yapıştırıcılarda, elektrik transformatörler ve kondansatörler için soğutucu ve yalıtım sıvısı olarak, vakum pompaları, yüksek gerilim kablo ve tel yapımında, trafolarda, floresan lambaların balast kapasitörleri, hidrolik ve makine yağlarında, karbonsuz kopya kağıdı imalatı, macun yapımında, izolator görevi yapan maddelerde ve dolgu maddelerinde sıkça kullanılmaktadır. Bu maddeler atık maddeler ile çevreye kolayca yayıldığından akarsu ve denizleri de kirleterek sularda yaşayan canlıları da etkilemektedirler. Bulaşmanın ana

kaynağını hayvansal orjinli besinler oluşturmaktadır. Bu canlılarda yapılan analizlerde PCB grubu maddeler tespit edilmiştir (Lindell 2012).

PCB'ler doğal çevre ortamında parçalanmaya karşı dirençlidir. Lipofilik özellikleri nedeniyle yağ dokusunda birikme eğiliminde oldukları bilinmektedir (Carpenter 2005).

PCB'lerin karsinogenik, bağışıklık sisteminini baskılayıcı, genital sistem ve hormonal sistemin işleyişini bozucu, nörotoksik, hepatotoksik ve teratojenik etkileri ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır (Robertson ve Hansen 2001, Ulbrich ve Stahlmann 2004, Kutlu ve ark 2005, Murugesan ve ark 2007, Hsu ve ark 2007).

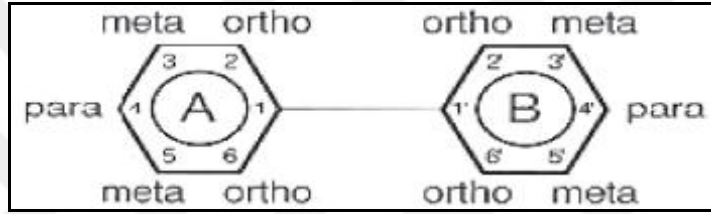
1.4.1.1. Kimyasal yapıları

PCB'lerin doğal kaynağı bulunmamaktadır ve tamamı sentetik olarak elde edilmektedir. Katı, sıvı, renksiz veya hafif sarı renktedirler. Isı (kaynama noktaları 280-415 °C), ışık gibi çevre şartlarına son derece dayanıklıdır. Yanıcı, parlayıcı, patlayıcı özellikleri olmayıp, elektriği geçirmezler (Güvenç ve Aksoy 2007). Fotokimyasal yolla değişik ürünlere dönüşebilirler. Örneğin; 300 °C'de ısıtıldıklarında son derece toksik olan poliklorlu dibenzofuranlara (polychlorodibenzofurane, PCDF) dönüşürler. Ancak 800 °C'de 10 saniyede, 1000 °C'de 3 saniyede parçalanmaktadırlar (Şişman 2007). Tüm PCB bileşikleri iki benzen halkasına bağlı 1-10 adet klor iyonu içerir. Genel kimyasal formülleri de $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ 'dir (Bruner-Tran ve Osteen 2010). PCB bileşikleri bifenil halkasının klorlanması ve 1-10 hidrojen atomunun klor ile farklı konfigürasyonlarda (orto, meta ve para) yer değiştirmesi ile oluşur (Şekil 1.8) (Ross 2004). Her bir klor iyonunun bağlanma pozisyonu ve sayısına göre, 209 farklı PCB bileşeni tanımlanmıştır. Bu bileşenlerden 130 tanesi ticari ürünlerde kullanılmaktadır (Bruner-Tran ve Osteen 2010).

PCB'ler ticari olarak daha ziyade Aroclor 1254 ve Phenoclor gibi isimlerle bilinirler. İsimlendirilmelerinde ilk iki rakam karbon atomu sayısını, son iki rakam ise klorlanma oranını gösterir. Örneğin, Araclor 1254 ismi molekülde 12 karbon atomu ve % 54 oranında (ağırlık olarak) klor içerdiğini ifade eder (Güvenç ve Aksoy 2007).

PCB bileşenleri, klor atomlarının bağlanma pozisyonuna göre iki farklı grupta sınıflandırılabilir. Planar olanlar, bifenil halkasının her iki para pozisyonunda ve meta pozisyonlarında en az iki klor atomu içeren yapılardır. Planar PCB'ler bifenil zincir yapısının orto pozisyonunda klor atomu içermedikleri ve planar yapıya sahip olduklarından

dioksin benzeri (TCDD) yapıya ve benzeri toksik etki, gösterdiklerinden “dioksin benzeri PCB Bileşikler” olarak adlandırılmaktadırlar. PCB’den kaynaklanan karsinojenite, mutajenite gibi toksik etkilerin ana sorumluları dioksin benzeri PCB’lerdir. Toksik PCB bileşenleri para- ve meta- pozisyonunda 5 ile 10 tane klor atomu içerenlerdir. PCB molekülündeki klor atomlarının sayısına bağlı olarak bileşenlerin toksisitesi değişmektedir. Buna göre klor atomu sayısı orto pozisyonunda azaldıkça PCB bileşeninin toksisitesi artmaktadır. Planar olmayan PCB izomerleri ise orto pozisyonunda birden fazla klor atomu içermektedirler ve planar olanlar kadar toksik değildirler (Şişman 2007). Aroclor 1016’nın her molekülünde 3 klor, Aroclor 1221’in yapısında 1 klor, Aroclor 1260’ın yapısında 6 klor ve Aroclor 1254’ün yapısında ise 5 klor iyonu ve 70 farklı PCB izomeri bulunmaktadır (Colciago 2006).



Şekil 1.9. PCB’lerin genel kimyasal yapısı (Ross 2004)

1.4.1.2. Kontaminasyon yolları

PCB’ler üretim veya kullanılmaları sırasında hava, toprak ve su sistemlerine girerler. Yaygın şekilde kullanımları ve fiziki, kimyasal ve biyolojik yıkımlanmaya son derece dayanıklı olmaları sebebiyle yaygın çevre ve besin kirlenmelerine yol açabilirler. Atmosfer havasında 10 gün süreyle kalabilirler (Güvenç ve Aksoy 2007). Çevrelerinde tarımsal faaliyet yapılan tüm göllerde toksik etkiye sahip olan PCB ve DDT (diklorodifeniltrikloroetan)’nin ana kimyasal kirleticiler olduğu belirlenmiştir. Organik kirleticilerin oksijen ve güneş ışığını bulamayacağı alt tabakaya geçmesi ve birikmesi söz konusudur. Düşük sıcaklıklarda yaşayan balıklar (alabalık, levrek) bu durumda göllerdeki kirliliklerden etkilenecek ilk canlılardır (Telefoncu ve Zihnioğlu 2011). Dünyada total PCB üretimi 1930-1993 yılları arasında yaklaşık 1.3 milyon tondur. Bu miktarın 1/3’ü çevreye yayılmıştır (Lindell 2012). PCB’ler uygun olmayan koşullarda yakıldıklarında tam yanma ürünleri oluşmamakta, insan, hayvan ve çevre üzerinde daha fazla zararlı etkilere sahip olan poliklorlu dibenzo-p-dioksin (polychlorodibenzodioxine, PCDD) ve PCDF türevleri ortaya çıkmaktadır (Güvenç ve Aksoy 2007).

PCB'lere maruz kalma daha çok kontamine besin maddeleri ve su ile olmaktadır. Bunun yanında hava ve dermal yolla da maruz kalınabilmektedir (Bruner-Tran ve Osteen 2010). Sindirim yoluyla maruziyet, genellikle kontamine olmuş olan balıkların tüketimiyle olmaktadır (Seyran ve Erişir 2008). Bunun dışında kontamine kabuklu deniz ürünleri, pirinç, et, yumurta ve içme sularının tüketilmesiyle de bu maddeye maruz kalınabilmektedir (Xing 2008). Bitkilerle bulaşma güçtür, çünkü lipofilik bileşiklerin bitki dokularından emilebilmeleri ve bitkilere dağılmaları mümkün değildir. Fakat normal besin hazırlama ve yıkama prosedürleri vasıtasıyla, kolayca uzaklaştırılabilecekleri kök ve gövde üzerinde emilirler (Telefoncu ve Zihnioğlu 2011). PCB'lerin plasenta yoluyla fötüse ve süt yoluyla yeni doğana transfer olduğu tespit edilmiştir (Lillienthal ve ark 2000).

Günümüze kadar insan (Masuda 1985) ve hayvanların (Şanlı 2002) PCB'ye maruz kalarak zehirlendiği çok sayıda vakayla karşılaşmıştır.

1.4.1.3. Doğada ve canlılardaki metabolizması

PCB'ler doğada ve canlılarda en kalıcı olarak bilinen kimyasal maddeler arasında yer almaktadırlar (Seyran ve Erişir 2008). Canlılarda yağ dokuda birikimini, maruz kalmanın miktarı ve süresi ile bileşiğin kimyasal yapısı etkiler (WHO 1993). Yüksek miktarda klor içerenler, düşük miktarda klor içerenlere göre daha çok birikme eğilimindedirler (Eisler ve Belisle 1996).

Memelilerde PCB'lerin toksik etkisi sitokrom p450'yi uyarma yeteneğine bağlıdır. Bu özellik PCB bileşenlerindeki klor iyonlarının sayısına ve bağlanma pozisyonuna göre değişmektedir. PCB'ler karaciğerde sitokrom p450 enzim aracılığıyla hidroksilat metabolitlerine dönüşür. Sitokrom p450 enzim aracılığıyla PCB'lerin metabolize olmaları klor iyonları sayısının artmasıyla azalmaktadır (Eisler ve Belisle 1996). Yine daha az klorlu bileşenlerin sudaki çözünürlükleri daha fazladır ve daha kolay buharlaşabilirler. Bu faktörler hem bileşenlerin taşınmasını hem de yıkımlanma şeklini etkiler. PCB'ler yavaş bir şekilde hem aerobik hem de anaerobik yollarla yıkımlanırlar. Yüksek derecede klorlu, aynı zamanda da oldukça hidrofobik ve stabil olan PCB bileşenleri anaerobik olarak (muhtemelen klor çıkarılarak), daha hafif klorlu olanlar ise aerobik yolla yıkımlanırlar. Çoğu tanımlanamamış bakteri türleri PCB'lerin klor bileşenlerini çıkararak enerji elde edebilmektedir. Ancak bu bakteri türleri sadece meta- ve para- pozisyonlardan klor sökebilmekte, bu da yalnızca bileşenlerin profillerinde değişiklik yapmakta ve böylece bileşenler daha düşük klorlu bir şekle dönüşmektedirler (örneğin, A1254 doğada anaerobik

metabolizma sonucu klor iyonları azaltılarak A1221'e dönüşebilmektedir) (Seyran ve Erişir 2008).

Hayvan türleri arasında PCB'lerin karaciğerde metabolize olma oranları farklıdır. Bu oran karaciğer bulunan sitokrom p450 enzim seviyesine göre değişir. Örneğin köpeklerde PCB bileşikleri diğer türlere göre daha hızlı metabolize olur. Çünkü sitokrom p450 enzim seviyeleri daha yüksektir (Eisler ve Belisle 1996). İnsanlarda farklı PCB bileşenlerinin yarılanma ömürleri birbirlerinden çok farklı olabilmekte, düşük klorlu bileşenler için günler ya da saatler söz konusu iken, çok daha fazla klorlu bileşenler için bu zaman on yıl ya da daha fazla olabilmektedir (Seyran ve Erişir 2008). Sinkkonen ve Paasivirta (2000) herhangi bir ayırım yapmadan insan vücudunda bulunan PCB'lerin yarı ömürlerinin 7-10 yıl arasında olabildiğini bildirmiştir. Shain ve ark (1986) düşük klorlanmış PCB bileşiklerinin büyük derecede biriktirilmediğini fakat yüksek klorlanmış PCB bileşiklerinin esas biyolojik birikime uğradığını kanıtlamışlardır. En uzun yarılanma ömürlü PCB bileşikler vücut yağ dokusunda depolanmaktadır. Bu da PCB'ye maruz kalanların sağlıklarının uzun süre risk altında olduğunu açık bir göstergesidir (Seyran ve Erişir 2008).

PCB'lerin atılımları polar bileşiklere çevrilerek sağlanmaktadır. Biyotransformasyon boyunca oluşan ürünler glutatyon ile veya doku makromolekülleri ile kovalent bağ ile birleşir. Hidroksilat ürünlerinin glukoronid ve glutatyon konjugatları önemli PCB metabolitleridir. Metabolitlerin başlıca atılım yolları safra ve dışkıdır. Düşük klorlu bileşiklerin yüksek klorlu bileşiklere göre idrarla atılım oranı daha yüksektir (Eisler ve Belisle 1996).

Yapılan bir çalışmada bir oral dozu takiben bir hafta sonra yapılan incelemede verilen dozun % 81'i rat vücudunda tespit edilmiştir. Bu miktarın % 64'ü yağ dokuda, % 11'i deride, % 5'i kas ve % 1'i karaciğerde tespit edilirken, akciğer, kan ve beyinde % 0.1 ile 0.3 arasında belirlenmiştir (Ahlborg ve ark 1992). Sipka ve ark (2008), 150µmol/kg tek dozda PCB 153'ün uygulamasından 24 saat sonra bu kimyasala karaciğerde 8.33 µg/g, akciğerde 8.56 µg/g ve beyinde 3.17 µg/g miktarda rastlamışlardır.

1.4.1.4. Ülkemizde PCB bileşikler ile ilgili yasal düzenlemeler

Yurdumuzda PCB bileşiklerinin endüstrideki kullanım boyutuna ilişkin yeterli sayıda veri bulunmamaktadır. Çevre Bakanlığı'nın 7 Ocak 1991 tarih ve 20748 sayılı

Resmi Gazete’de çıkan Atık Su Kontrol Yönetmeliği’nde, PCB bileşiklerinin deniz suyunda bulunması gereken miktarları (2-4 µg/L) belirlenerek, kontrol edilmesi gereği vurgulanmıştır. 11 Temmuz 1993 tarih ve 21634 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe giren “Zararlı Madde ve Ürünlerin Kontrolü Yönetmeliğinde” “Polihalojenli bifenil ve terpenillerin ve bunların karışımlarını ihtiva eden malzeme ve ürünler 01/01/1996 tarihinden itibaren kullanılmaz” hükmü yer almıştır.

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü’nün 16.02.2009 tarih ve 27143 sayılı Resmi Gazete’de yayımlanan Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliğinde, gıda maddelerinde PCB’nin kabul edilebilir maksimum seviyeleri Çizelge 1.4 de gösterilmiştir.

Çizelge 1.4. Gıda maddelerindeki kabul edilebilir PCB seviyeleri
(<http://www.gkgm.gov.tr>)

Gıda Maddesi	Kabul edilebilir en yüksek değer
1. Et ve et ürünleri (yenilebilir sakatatlar hariç) - Sığır türü hayvanlar ve koyun, keçi - Kanatlı hayvanlar - Domuz	4,5 pg/g yağ (*) 4,0 pg/g yağ (*) 1,5 pg/g yağ (*)
2. Karaciğer ve ürünleri (1’de belirtilen karada yaşayan hayvanların)	12,0 pg/g yağ (*)
3. Balık eti, su ürünleri ve bunlardan üretilen ürünler (yılan balığı hariç). Kabuklular (yengeç etinin kahverengi kısmı, istakoz ve benzeri büyük kabukluların (<i>Nephropidae</i> ve <i>Palinuridae</i>) baş ve göğüs etleri hariç)	8,0 (pg/g yağ ağırlık)
4. Yılan balığı eti (<i>Anguilla anguilla</i>) ve ürünleri	12,0 (pg/g yağ ağırlık)
5. Süt ve süt ürünleri (tereyağı dahil)	6,0 pg/g yağ (*)
6. Tavuk yumurtası ve yumurta ürünleri	6,0 pg/g yağ (*)
7. Aşağıdaki hayvanlardan elde edilen katı yağlar - Sığır türü hayvanlar ve koyun, keçi - Kanatlı hayvanlar - Domuz	4,5 pg/g yağ (*) 4,0 pg/g yağ (*) 1,5 pg/g yağ (*)
8. Karışık hayvansal katı yağlar	3,0 pg/g yağ
9. Bitkisel katı ve sıvı yağlar	1,5 pg/g yağ
10. Deniz ürünlerinden elde edilen yağlar (balık yağı, balık karaciğer yağı, ve insan tüketimine sunulan diğer deniz canlılarından elde edilen yağ)	10,0 pg/g yağ

*: Maksimum limit, yağ içeriği %1’den az olan gıdalar için uygulanmaz.

1.4.1.5. PCB'lerin canlılar üzerine etkileri

PCB bileşikleri serbest radikallerin üretimine neden olarak oksidatif strese yol açıp (Muthuvel ve ark 2006, Hsu ve ark 2007) hem hayvanlarda hem de insanlarda toksik etkiye neden olmaktadır (De Rosa ve ark 1998). PCB bileşiklerinin veya karışımlarının toksisitesi esas olarak klor iyonu içeriği ve bifenil halkasına bağlanma pozisyonuna bağlıdır (Dean ve ark 2002). PCB toksikasyonu sonucu erkek ve dişi genital sistem, endokrin sistem, üriner sistem, sinir sistemi, dolaşım sistemi, sindirim sistemine ait organlar ile enzim ve kan değerlerini etkiledikleri, aynı zamanda karsinogenik, immun sistemi baskılayıcı, doku ve organlarda apoptozisi artırıcı yönde etkili oldukları bildirilmiştir (Oskam ve ark 2004, Hsu ve ark 2007, Murugesan ve ark 2007).

1.4.1.5.1. Erkek genital sistem üzerine etkileri

Gelişme dönemlerinde erkeklerde PCB'lere maruz kalınması kriptorşizm, testis kanseri, prostat yangısı ve kısırlık gibi patolojik durumlara neden olmaktadır (Schrader ve Cooke 2003). Aroclor 1254 androjen reseptör antagonistidir. Androjen reseptörüne, androjen ligandının bağlanması PCB 42, 128 ve 138'in varlığında azalmaktadır (Ulbrich ve Stahlmann 2004).

Erkek ratlarda PCB'nin testis dokusunda lipid peroksidasyonunu artırdığı, enzimatik ve non-enzimatik antioksidan seviyelerini azalttığı ve spermatozoon sayısında azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir (Agletdinov 2009).

Aly ve ark (2009a), erkek ratlarda 1.5 ve 3 mg/kg/gün dozda i.p olarak uyguladıkları Aroclor 1254'ün vücut ağırlığı, testis ağırlığı ve epididimis ağırlığını azalttığı, yine sperm sayısı, sperm motilitesi ve günlük sperm üretiminde azalmaya sebep olduğu, mitokondride oksidatif stresi indükleyerek H_2O_2 seviyesini ve lipid peroksidasyonunu artırdığı, ayrıca mitokondriyal antioksidan enzim aktivasyonunu inhibe ettiği (CAT, GPx, GR) ve azalttığını (SOD) tespit etmişlerdir. Buna bağlı olarak mitokondride oksidatif stres sonucu spermatogenezisin olumsuz yönde etkilendiğini ileri sürmüşlerdir.

Murugesan ve ark (2007), yaptıkları bir çalışmada PCB (Aroclor 1254)'nin rat Leydig hücrelerinde sitokrom p450scc, 3beta-HSD ve 17beta-HSD gibi steroidogenik enzim aktivitesi ile süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon reduktaz, gamma-glutamil transpeptidaz ve glutatyon-S-transferaz gibi enzimatik antioksidan

seviyelerini azalttığını, ayrıca yine testosteron sentezinde kolesterolün mitokondriye taşınmasında görevli olan sSTAR protein seviyelerini düşürdüğü, lipid peroksidasyonunu, hidrojen peroksit ve hidrosil radikal düzeylerini artırdığını tespit etmişlerdir. Buna bağlı olarak da Leydig hücreleri tarafından testosteron üretiminin baskılandığını ileri sürmüşlerdir.

Dişi ratlara doğumdan 50 gün öncesinden farklı dozlarda (0.5, 2 ve 4 mg/kg) PCB verilmiş ve bunlardan doğan erkek ratların gruplar arası testis ağırlıklarının önemli bir değişime uğramadığı ancak tüm gruplarda serum testosteron düzeyinin önemli oranda azaldığı tespit edilmiştir (Kaya ve ark 2002).

Gray ve ark (1993), 31 günlük yaştaki ratlara farklı dozlarda (0.1, 1, 10, 25 mg/kg) Aroclor 1254'ü ağızdan 5, 10 ve 15 hafta süre ile uygulamışlardır. Deney süresi sonunda testis ağırlığı, serum testosteron seviyesi ve testiküler sperm sayısında önemli bir farklılık bulunmamıştır. Ancak 25 mg/kg dozda 10 ve 15 hafta süre ile uygulanan grupta kauda epididimidis ağırlığı azalmış, kauda epididimidis sperm sayısı ise yine aynı dozda 15 hafta süre ile uygulanan grupta azalmıştır.

Cai ve ark (2011a) farelerde yapmış olduğu bir çalışmada ise Aroclor 1254'ün (0.5, 5, 50 ve 500 µg/kg) serum testosteron seviyesinde gruplar arası bir fark oluşturmadığını, ancak doza bağlı olarak (500 µg/kg) epididimal spermatozoon sayısı ve motilitesinde azalma, anormal spermatozoon oranında artmanın gerçekleştiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca Tunel-pozitif apoptotik hücre sayısının da 500 µg/kg dozda önemli derecede yükseldiğini ileri sürmüşlerdir.

Hsu ve ark (2007) yaptıkları bir çalışmada, anne karnında PCB'ye maruz kalan yetişkin erkek ratlarda kauda epididimidis ağırlığı, epididimis total sperm sayısı ve motil sperm sayısında azalma, spermatozoonda oksidatif strese yol açarak serbest oksijen bileşikleri (ROS) üretiminde artış tespit etmişlerdir. Ayrıca düşük PCB dozuna maruz kalan grupta proapoptotik protein olan p53'ün indüklendiği, kaspaz 3'ün de inhibe olduğu belirlenmiş, yüksek doza maruz kalan hayvanlarda ise kaspaz 3 ve 9'un aktivasyonunda artış, proapoptotik proteinlerden olan Fas, bax, ve p53 gen ekspresyonunun azalmış olduğu görülmüştür.

Han ve ark (2010a) ratlarda yapmış oldukları bir çalışmada PCB uygulamasının (0,2 ve 20 mg/kg) serum FSH ve LH ile Leydig hücrelerinde P450_{17α} ve P450_{scc}

seviyelerini önemli derecede azalttığını tespit etmişlerdir. Bu da direkt olarak testosteron sentezini düşürerek testis fonksiyonlarını olumsuz yönde etkilemektedir. Yine anti-apoptotik Bcl-xL seviyesinin düştüğünü, pro-apoptotik bax seviyesinin ise değişmediğini belirlemişlerdir. Dolayısıyla PCB'nin apoptotik sinyal yolunu da etkileyerek etkisini gösterdiği ortaya konmuştur.

Yapılan başka bir çalışmada PCB'nin serum LH, FSH, testosteron, östrojen ve androjen bağlayıcı protein seviyelerini azalttığı ve antioksidan olarak kullanılan vitamin C ve E'nin testiküler Leydig hücre disfonksiyonuna karşı iyileştirici bir etkiye sahip olduğu gözlemlenmiştir (Murugesan ve ark 2005). Sridhar ve ark (2004) ile Venkataraman ve ark (2004) da benzer olarak Aroclor 1254'ün serum testosteron, östrojen ve tiroid hormon seviyelerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir.

Gao ve Wu (2011) yapmış oldukları çalışmada, PCB'nin Sertoli hücreleri arasındaki bağlantıları (zonula okludens) bozarak testis dokusunda toksik etki gösterdiğini tespit etmiştir.

Olgunlaşmamış Sertoli hücre kültüründe yapılan bir çalışmada PCB'nin Sertoli hücre morfolojisinde anormalliklere neden olduğu, ayrıca bu hücreler tarafından üretilen laktat seviyesini yükselttiği ve ölü Sertoli hücre sayısını artırdığı tespit edilerek, erkek üreme sistemini olumsuz yönde etkilediği belirlenmiştir (Raychoudhury ve ark 2000).

Kumar ve ark (2004), ratlarda 30 gün süre ile intraperitoneal olarak 2 mg/kg dozda Aroclor 1254 uygulamasının vücut ağırlığı, testis ağırlığı ve Sertoli hücrelerinden ABP sentezini önemli derecede azalttığını tespit etmişlerdir.

Anbalagan ve ark (2003), Aroclor 1254'in kaput ve kauda epididimidisin intertubuler bağ dokusunda artışa ve epididimal tubulus çapında azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir.

Gebe farelere Aroclor 1016'nın günde 0.1 mg/kg tek doz uygulamasıyla yavrularda anogenital uzaklığın ve prostat boyunun arttığı, epididimis ağırlığının azaldığı gözlenmiştir (Ulbrich ve Stahlmann 2004).

Yapılan diğer çalışmalarda da PCB'nin Leydig hücrelerinde apoptozisi artırdığı (Oskam ve ark 2004) seminifer tubullerde dejeneratif değişimlere neden olduğu (Alston ve ark 2003), sperm motilitesini (Hsu ve ark 2003, Krishnamoorthy ve ark 2007) ve üretimini

azalttığı, testis ile prostat ağırlığında ve anormal sperm sayısında artışa (Faqi ve ark 1998) neden olduğunu belirlemişlerdir.

1.5. Apoptozis

Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Öztürk 2002). Morfolojik değişiklikler ve enerji bağımlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterize olan apoptozis; kimyasallar ile indüklenen hücre ölümü, embriyolojik gelişim, hormona bağımlı atrofi, immun sistemin yapısal ve fonksiyonel gelişimi için hayati bir öneme sahiptir. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından özel bir morfoloji gösteren hücre ölümleri için kullanılmıştır (Elmore 2007). Ökaryotik organizmalardaki hücreler doğar, belirli bir süre yaşar ve sonra ölürlür. Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğin; barsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürlük, derinin epidermal hücreleri 20–25 günlük bir süre sonunda ölmektedir. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) olarak da adlandırılır (Ulukaya 2003).

Apoptozis yaşlanma ve dokularda hücre popülasyonunun korunması gibi hemostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla da meydana gelir (Park 2012). Ayrıca apoptosiz mekanizmalarındaki bozukluklar nörodejeneratif hastalıklar, iskemî, otoimmün hastalıklar ve bir çok kanser tipini içeren çeşitli hastalıklara sebep olur (Elmore 2007). Yapılan çalışmalarda PCB'ye maruz kalan ratların germ hücreleri, Sertoli ve Leydig hücrelerinde apoptozis artışı gözlenmiştir (Raychoudhury ve ark 2000, Oskam ve ark 2004, Hsu ve ark 2007).

Canlı organizmalarda farklı hücre ölüm biçimleri vardır; nekroz, apoptozis, otofaji, paraptosis, onkosis (Fink ve Cookson 2005). Bunlardan ilki yaralanmalar sonucu hücrenin zarar görerek hücre içine aşırı sıvı girmesiyle hücrenin şişip patlayarak ölmesi olarak adlandırılan nekroz, diğeri ise ısı, ışık, radyasyon, hipoksi, sitotoksik antikanser ilaçlar, xenohormonlar ve organik çevresel kirleticilerin (PCB, DDT) neden olduğu apoptozistir. Bu uyarıcıların yüksek düzeyleri nekrozla sonuçlanabilir (Elmore 2007). Apoptozis için sinyal alındıktan sonra hücrede belirgin morfolojik değişimler gözlenir. Hücrenin membranla çevrili küçük parçalara ayrılması, çekirdek küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu (180-200 baz çifti ve katları şeklinde) gözlenir. Ayrıca apoptotik

hücreler komşu fagositik hücreler tarafından fagosite edildiklerinden toksik içerikleri çevre dokuya sızmaz ve yangı oluşmaz (Han ve ark 2008b).

1.5.1. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin indüklenmesinde üç tip sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir.

1. Mitokondri/Sitokrom c aracılı apoptozis oluşturulması
2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme
3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

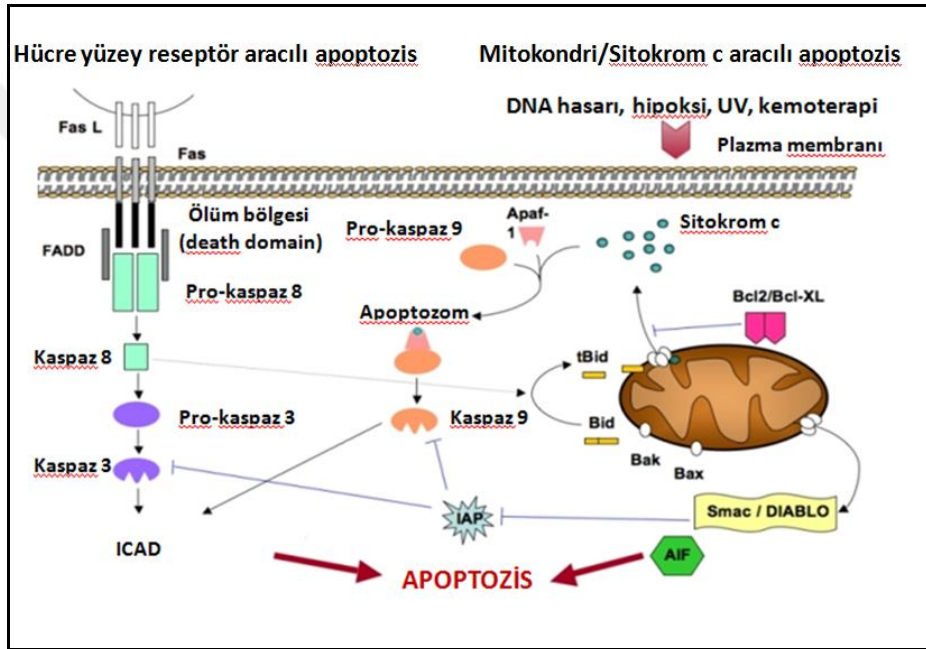
1.5.1.1. Mitokondri/Sitokrom c aracılı apoptozis oluşturulması

Bcl-2 özellikle mitokondri dışı membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax ve bad sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanırlar, burada küçük delikçikler “pore” oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom c ve apoptozis-indükleyici faktörün (apoptosis inducing factor, AIF) mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar. Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteindir. Sitokrom c’nin mitokondriden sitoplazmaya saliverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom c sitoplazmik protein olan apoptotik proteazları aktive edici faktör (Apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)’e bağlanır ve onu aktive eder, ardından ATP’nin de katılımıyla apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9’un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3’ü aktive eder (Kikuchi ve ark 2009, George ve ark 2010, Singh ve ark 2011, Park 2012). Aktif kaspaz 3, ICAD’ı inaktifleştirir, böylece ICAD’ın bağladığı CAD serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Kaufmann ve Gores 2000, Kikuchi ve ark 2009) (Şekil 1.10) (Nadege ve ark 2009).

1.5.1.2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme

Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (APO-1, CD95) ve TNFR-1 (tumour necrosis factor receptor-1-tümör nekroz faktör reseptörü-1)’in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılmaları) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunur. Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm

uyarısı almış olduklarından bir seri protein:protein interaksyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (death domain) adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain-TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi) ve FADD (Fas associated death domain-Fas ilişkili ölüm bölgesi) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktive eder (Şekil 1.10) (Nadege ve ark 2009). Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır. Kaspaz 8, FLIP (FLICE-inhibitory protein-FLICE'yi baskılayan protein)'i inhibe eder (Ulukaya 2003, George ve ark 2010, Singh ve ark 2011). Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları (kaspaz-3, -6, -7) uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar (Yılmaz 2005b, Singh ve ark 2011).



Şekil 1.10. Hücre yüzey reseptör ve mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozisin tetiklenmesi (Nadege ve ark 2009)

1.5.1.3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması

Endoplazmik retikulum (ER) protein sentezini, stres durumlarında hücresel cevabı ve hücre içi Ca^{++} düzeyini düzenler. Ca^{++} homeostazisindeki değişiklikler ve ER'de protein birikimi ER'nin stresine neden olur. Çeşitli kimyasal toksinler, oksidatif stres, Ca^{++} iyonoforu içeren toksinler ve glikosilasyon inhibitörleri ER'nin stresine neden olarak hücre ölümüne neden olur. Kaspaz-12'ye bağımlı ER aracılı apoptotik yol, mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin ER'yi etkilemesi ile prokaspaz-12 aktiflenir.

ER'nin stres durumlarında sitozolik kaspaz-7, ER membran yüzeyine göç ederek prokaspaz-12'nin aktif hale gelmesine neden olur. Aktiflenmiş kaspaz-12 sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile karşılıklı olarak etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder (Hossain ve Richardson 2011, Moserova ve Kralova 2012).

Gong ve ark (2009) ratlarda yapmış olduğu bir çalışmada, endüstriyel alanda yüzey gerilimini azaltıcı olarak kullanılan Nonilfenol'ün hem hücre içi Ca^{++} seviyelerini artırarak hem de ER'da morfolojik değişikliklere (lumenin genişlemesi) neden olarak Sertoli hücrelerinde ER'de stres oluşturduğunu buna bağlı olarakta apoptozise yol açtığını belirlemişlerdir.

1.5.4. Apoptozisin Genetik Kontrolü

Cohen (1993), yüksek dozda kullanılan steroidlerin timus hücreleri üzerine etkilerini incelemiş ve timus hücrelerinin direkt olarak apoptozisi seçmediğini, hücre ölümüne neden olacak genleri oluşturarak hücreleri apoptozise yönlendirdiğini bildirmiştir. Böylece apoptozisin genler tarafından düzenlenen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkmıştır.

Organizmada apoptozisi uyaran ve engelleyen çok sayıda gen bulunmaktadır. Bu genlerden apoptoziste görev alan en önemli grubu Bcl-2 ailesidir. Bcl-2 geni bir proto-onkogendir. Protoonkogenler normal hücre büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bcl-2 ailesinden bad, bax, bak ve bid, ayrıca p-53, p-21 ve c-myc apoptozisi indükleyen genlerdir. Bcl-2 ailesinden bcl-xl ve bcl-w, IAP (apoptozis inhibitörleri) protein ailesi üyeleri olan XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP ile c-abl, ras onkogeni, çözünebilir fas ve p-35 de antiapoptotik etkiye sahiptir (Gogada ve ark 2011, Busca ve ark 2012). Büyüme faktörleri [insülin kaynaklı büyüme faktörü (insulin growth factor-1, IGF-1)], epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EPG), fibroblast büyüme faktörü (fibroblast growth factor, FGF), sinir büyüme faktörü (nerve growth factor, NGF) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü (platelet-derived growth factor, PDGF) de apoptozu önleyici etki göstermektedir. Bad'ın fosforile olarak, Kaspaz-9'un etkisizleştirilmesini sağlarlar (Van Golen ve Feldman 2000).

1.5.5. Testiste Apoptozis

Apoptosis erken gelişim sürecinde ve erişkin testiste devamlı olarak görülen bir durumdur, farklı hücre tiplerinin homeostazisi için kesinlikle gereklidir (Shaha ve ark 2010). Testiste iki önemli apoptotik yol vardır; birincisi ekstrinsik veya hücre yüzey

reseptör aracılı apoptozis, ikincisi ise intrinsik veya mitokondri aracılı apoptozistir (Shaha ve ark 2010, Aitken ve ark 2011).

İlk germ hücre apoptozisi, fötal yaşam döneminde epiblasttan köken alan primordial germ hücrelerinin gonad taslaklarına göçü sırasında meydana gelir (Shaha ve ark 2010, Aitken ve ark 2011). Bu dönemde hücrelerin fazla sayıda apoptozise uğramasında çoğunlukla Bcl-xl ve Bax genleri aracılık eder (Shaha ve ark 2010). Apoptozisin testisin farklılaşması ve germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasındaki sayısal dengeyi sağlamada önemli bir etkisi vardır. Bu süreçte apoptozisin bozulması fenotipik bir erkek infertilitesine sebep olur (Aitken ve ark 2011). Apoptozisin spontan erkek infertilitesine sebep olmasındaki rolünün, hormonal yetersizlik, kriptorşizm, testise olan kan akımında artma, testiste lokal ısı artışı, venöz staz ve buna bağlı hipoksi gibi durumlarda testiste gözlenen aşırı sayıdaki apoptotik hücreden kaynaklandığı ileri sürülür. Buna ilaveten kaspaz aktivasyonunu ve fosfotidilserinin hücre membranının dış yüzeyine geçtiğini gösteren apoptotik belirteçler, erkek infertil hastaların spermatozoonlarında gözlenmiştir (Grunewald ve ark 2009, Aitken ve Curry 2011).

Erken apoptozis dalgası ilk spermatogenezis dalgası ile aynı dönemde oluşur (Meehan ve ark 2001, Jahnukainen ve ark 2004, Zheng ve ark 2006). Erken dönemde görülen bu germ hücre apoptozisi, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (Rodriguez ve ark 1997). Erken apoptozis dalgası spermatositleri spermatogonyumlardan daha çok etkiler (Yan ve ark 2000). Apoptozise uğrayan tip A ve B spermatogonyum, spermatositler ve spermatidler faz-kontrast mikroskop ile kolaylıkla ayırt edilebilmektedir (Henriksen ve Parvinen 1998). İlk spermatogenetik dalga boyunca germ hücrelerinin en az % 75-80'i elimine edilir (Rodriguez ve ark 1997, Yılmaz 2005a). İmmatür rat testisinde stage VII-VIII de pakiten spermatositlerde, stage IX-I de ise tip A spermatogonyumda apoptozis artışı gözlenmiştir. Bu dönemlerde görülen apoptozis erişkin testisteki apoptozisten ayrılmaktadır (Jahnukainen ve ark 2004). Erişkin rat testislerindeki apoptozis stage XIV de stage VII'den daha yoğun olarak gözlenmiştir (Kerr 1992). Sharpe ve ark (1988) da yapmış oldukları bir çalışmada stage XII-XIII ve XIV-I deki germ hücre apoptozisinin stage VII'ye göre daha fazla olduğunu belirleyerek benzer bulgulara rastlamışlardır. Allan ve ark (1992) ise erişkin rat testislerinde stage XII-XIV ve I. de tip A spermatogonyum, zigoten ve pakiten spermatositlerde apoptozis gözlemişlerdir.

Kaspas-2 ilk spermatogenetik dalga boyunca oluşan germ hücre apoptozisinde önemli bir rol oynar. Kaspas-2 aktivasyonunun blokajı, apoptozis dalgasındaki apoptotik germ hücre sayısını azaltır (Zheng ve ark 2006).

İlk spermatogenetik dalga boyunca görülen apoptozis olgun testiste gözlenen apoptozisten farklıdır:

1. Prepubertal dönem apoptozisinde sadece bir dalga meydana gelir,
2. Apoptozis spermatogonyumla sınırlı değildir tersine spermatositleri daha çok etkiler,
3. İlk spermatogenetik dalga boyunca görülen apoptozis, antiapoptotik protein (Bcl-xL)-pro-apoptotik protein (Bax) dengesindeki değişimlere bağlıdır. Testis doğumdan itibaren yüksek seviyede Bcl-xL, Bax ve p53 proteinlerini içerir. Dördüncü haftadan sonra bu proteinlerin seviyeleri ani bir şekilde düşer veya tamamen ortadan kaybolur (Rodriguez ve ark 1997). Farelerde postnatal 23. günde Bcl-xL spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde pozitif olarak görülmüştür (Meehan ve ark 2001). Jahnukainen ve ark (2004), bu dönemde midpakiten spermatositlerde görülen apoptozisin bax geninin düzenlediği caspase-3 aracılığıyla gerçekleştiğini belirlemişlerdir.

Transgenik farelerde Bcl-2 ailesinin proapoptotik bir üyesi olan Bax geni olmadığı için bu hayvanlar erken apoptozis dalgasından yoksundur. Bu da spermatogonyum ve spermatosit birikimi ve infertiliteyle sonuçlanmıştır (Knudson ve ark 1995, Russell ve ark 2002). Testiste genetik olarak indüklenerek meydana gelen apoptozisi indükleyen ve engelleyen proteinler arasındaki denge değişimleri normal fonksiyonel spermatogenezis gelişiminin bozulmasına neden olmaktadır (Russell ve ark 2002, Rodriguez ve ark 1997).

Yaşamın ilerleyen dönemlerinde çevresel toksik maddeler, kemoterapötik ajanlar ve ısı gibi etkenlere maruz kalınması sonucu hasara uğrayan germ hücrelerinin elimine edilmesinde de apoptozisin önemli rolü vardır (Wang ve ark 2007).

Sunulan araştırmanın hipotezi; PCB'nin testosteron üretimi, kullanımı, spermatogenezis ve testiste normalde varolan apoptozis ile antioksidan metabolizma üzerindeki olumsuz etkilerinin ALA kullanımı ile ortadan kaldırılabilceği şeklindedir. Dolayısıyla tez konusu, ALA'nın testislerde PCB tarafından oluşturulan toksikasyona karşı etkisinin incelenmesidir. Testislerde oluşan PCB toksikasyonuna karşı ALA'nın

antioksidan rolünün olup olmadığının, histolojik ve biyokimyasal farklılık oluşturup oluşturmadığının araştırılması amaçlanmaktadır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada, Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlanan 40 adet yetişkin erkek Wistar Albino rat (180-200 g/ 90 günlük), materyal olarak kullanıldı. Konvansiyonel koşullarda, *ad libitum* su ve yem (rat yemi, Optima) ile beslenen ratlar, 24±1°C ortam sıcaklığında, 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık olan ortamda tutuldular. Deneme süresi 30 gün olarak belirlendi. Materyal aşağıda gösterildiği şekilde ve her biri sekizer rat içerecek şekilde beş gruba ayrıldı.

1. Grup (Kontrol Grubu): Hiçbir uygulama yapılmamış olan grup.
2. Grup (Sham-Kontrol Grubu): Otuz gün boyunca 2 ml/kg/gün mısır yağı verilen grup.
3. Grup (PCB Grubu): Otuz gün boyunca 5 mg/kg/gün dozda PCB uygulanan grup.
4. Grup (ALA): Otuz gün boyunca 25 mg/kg/gün dozda ALA uygulanan grup.
5. Grup (ALA + PCB Grubu grubu): Otuz gün boyunca 25 mg/kg/gün dozda ALA ve bir saat sonra da 5 mg/kg/gün dozda PCB uygulanan grup.

PCB'ye en sık maruz kalma yolu besin zinciri aracılığıyla olduğundan Aroklor 1254 (Aroclor 1254, PCB- Sigma 48586) 5 mg/kg/gün dozda (Sitarek ve Gralewicz 2009) 2 ml/kg mısır yağı ile karıştırılarak, besleme kanülü (Feeding Needle 16GA Curved DC1 524215) ile ağızdan verildi (Sipka ve ark 2008, Sitarek ve Gralewicz 2009). Aynı şekilde ALA da (α -Lipoic Acid, Sigma T5625) mısır yağı ile karıştırılarak 2 ml/kg olacak şekilde, 25 mg/kg/gün dozda besleme kanülü ile ağızdan uygulandı (Bhatt ve Flora 2009).

Deney süresi sonunda ratlar tartılarak vücut ağırlıkları belirlendi. Uygulamalar bittikten 24 saat sonra (Muthuvel ve ark 2006, Sipka ve ark 2008) ksilazin-ketamin (20 mg/kg- 80 mg/kg, IP) ile anesteziye alınan ratların kan örnekleri, total oksidan seviyesi (total oxidant status, TOS) ve total antioksidan seviyesi (total antioxidant status, TAS) ile serum testosteron seviyelerinin belirlenmesi amacıyla, serum tüplerine alındı ve 3500 rpm de 15' santrifüje edildi. Çıkan serumlar ependorf tüplere alınarak deney aşamasına kadar – 80 °C de olan dondurucuya kaldırıldı (Song ve ark 2011).

Kan örnekleri alındıktan sonra servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanan ratların testis ve epididimisleri çıkarıldı. Epididimislerden elde edilen sperma örnekleri ile frotiler hazırlandı (Narayana ve ark 2002). Her iki testis birlikte tartılarak ağırlıkları belirlendi. Sağ

testis dokusunun yarısı TOS ve TAS, yarısı da Western blot tekniği (Sambrook ve ark 1989) ile HO-1 yoğunluğunun belirlenmesinde kullanılmak amacıyla sıvı nitrojende tespit edildikten sonra, alüminyum folyoya sarılarak, deney aşamasına kadar – 80 °C de olan dondurucuya kaldırıldı (Shiraishi ve Naito 2005, Hsu ve ark 2007). Alınan sol testis ise histolojik, histokimyasal ve immunohistokimyasal yöntemlerde kullanılmak üzere Bouin's solüsyonunda 24 saat tespit edildi (Gray ve ark 1993, Hsu ve ark 2007). Bütün olarak alınan testisin tunika albugineyası, tespit işleminin başarısını artırmak amacıyla her iki uç ve orta kısmından, paranşime zarar vermeden, insülin enjektörü iğnesi ile delindi. Testisler yaklaşık bir saat Bouin's solüsyonunda bekletildikten sonra ortadan ikiye bölündüler ve tekrar tespit solüsyonuna aktarıldılar. Bouin's solüsyonunda tespit süresini tamamlayan doku örnekleri, sırasıyla % 50'lik alkolde 48 saat ve % 70'lik alkolde 12 saat bekletildikten sonra % 80'lik alkole alınarak (Howroyd ve ark 2005) rutin doku takip işlemi uygulandı ve parafinde bloklandılar.

2.2. Yöntem

Bu çalışmada, deneme sonunda elde edilen örneklerle histolojik, histokimyasal, immunhistokimyasal, biyokimyasal, moleküler biyolojik ve sitolojik yöntemler uygulandı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

2.2.1. Histolojik Yöntem

Hazırlanmış olan parafin bloklardan 300 µm ara ile 6 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her hayvandan seri alınan sekiz kesite genel histolojik görünümün incelenmesi, histolojik ve histometrik değişimlerin belirlenmesi amacıyla Crossman'ın üçlü boyama metodu (Culling ve ark 1985) uygulandı.

2.2.1.1. Üçlü boyama metodunun uygulanması

Bu amaçla aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Parafin kesitler deparafinizasyon için iki defa 5' ksilolde tutuldu. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinde (% 100 alkol-I.'de 3', % 100 alkol-II.'de 3', % 96'lık alkolde 3', % 80'lik alkolde 3', % 70'lik alkolde 3') bekletildi.

2. Distile suda iki kez çalkalandıktan sonra 5' süreyle akan çeşme suyunda yıkandı.

3. Kesitler çekirdek boyaması için 8' Weigert's demir hemotoksilen solüsyonunda bekletildi. Daha sonra 5' süreyle akan çeşme suyunda yıkandı.

4. Metil karbonatta 1' çalkalamadan sonra 5' akan çeşme suyunda, 3' da distile su içerisinde bekletildi.

5. Kesitler bu kez sitoplazma boyaması için asit fuksin boya solüsyonuna 4 kez batırılıp çıkarıldı. Daha sonra 4 kez distile suda çalkalandı.

6. Bağ doku beyazlaşmıca kadar yaklaşık 14' fosfotungustik asitte bekletildi. Sonrasında iki kez 5' distile suda yıkandı.

7. Kesitler bağ doku boyaması için 1' anilin blue boya solüsyonunda bekletildi. Daha sonra 4 kez distile suda çalkalandı.

8. Kesitler % 2'lik asetik asitte 3' bekletildikten sonra, sırasıyla hızlıca distile sudan ve % 96 alkolden geçirildi.

9. Kesitler bu kez derecesi yükselen alkol serilerinden (% 96'lık alkolde 3', % 100 alkol-I.'de 3', % 100 alkol-II.'de 3') geçirildi.

10. İki defa 5' ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

2.2.1.2. Histolojik değişimlerin belirlenmesi

Dokuda normal histolojik görünümünden farklı olarak meydana gelen değişimler, Crossman's üçlü boyama metoduyla boyanan her hayvana ait sekiz kesitte incelendi. Bu amaçla her bir kesit, tubulus seminiferus kontortuslardaki subbazal vakuolizasyon, epitelial vakuolizasyon, epitelial dökülme, tubulus lumenine germ hücre dökülmesi ve kapılar hiperemi açısından incelendi. Belirlenen değişimler semi-kantitatif olarak değerlendirildi. Bu amaçla subjektif puanlama (0: Negatif, 1: Çok az, 2: Orta, 3: Çok) yapıldı.

2.2.1.3. Histometrik değişimlerin belirlenmesi

Gruplar için tubulus çapı, seminifer epitel yüksekliği, 14. dönem tubulus % yoğunluğu belirlendi. Bu amaçla her hayvan için seri sekiz kesitin her birinde rastgele olarak seçilen yuvarlak veya yuvarlağa yakın 20'şer adet 7-8. dönem ve 12-14. dönem tubulusun çapı ve seminifer epitel yüksekliği (spermatogenetik hücrelerin oluşturduğu katmanın yüksekliği) ölçüldü (Sharpe 1989, Spandro ve ark 1998). Ölçümler görüntü analiz programı (Leica Q Win Standart) yardımıyla interaktif olarak gerçekleştirildi. Ayrıca her kesitte 25 adet olmak üzere her hayvan için toplam 200 adet tubulus rastgele olarak incelenerek, 14. dönem tubulus % yoğunluğu belirlendi (Narayana ve ark 2006).

2.2.2. Histokimyasal Yöntem (TUNEL Metodu)

Her hayvandan 300 µm ara ile 6 µm kalınlığında organosilan (3-Aminopropyl-triethoxysilane, Sigma A3648) ile kaplanmış lamlara alınan iki kesite apoptozisin gösterilmesi için TUNEL metodu (Ozawa ve ark 2002, Vaisheva ve ark 2007, Marcon ve ark 2008) uygulandı. Bu amaçla hazır ticari kit (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Chemicon International S7101) kullanıldı.

Aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Bu tekniğe göre organosilane ile kaplı lamlara alınan parafin kesitler bir gece boyunca 37 °C lik etüvde tutuldu.

2. Ertesi gün deparafinizasyon için parafin kesitler 3 defa 5' ksilolden geçirildi. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinde (% 100 alkol-I'de 3', % 100 alkol-II'de 3', % 95'lik alkolde 3', % 70'lik alkolde 3') bekletildi. Sonrasında 5' fosfat tampon solüsyonu (phosphate buffer saline, PBS, 50 mM sodyum fosfat, pH 7.4, 200 m M NaCl) içerisinde tutuldu.

3. Kesitler 37 °C lik etüvde proteinaz K (20 µg/ml) ile nemli ortamda 15' inkübe edildikten sonra, oda sıcaklığında deiyonize su (dH₂O₂) içerisinde 2 defa 2' bekletildi.

4. Endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için kesitler hazırlanan % 3'lük hidrojen peroksit solüsyonu içinde oda sıcaklığında 5' tutulduktan sonra 2 defa 5' PBS'te bekletildi.

5. Dengeleme tamponu, 10' süreyle ve oda sıcaklığında kesitlerin üzerine uygulandı. Bu sırada endorf tüp içerisine terminal deoksinükleotid transferaz (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) enzim çalışma solüsyonu hazırlandı.

6. TdT enzim çalışma solüsyonu, kesitlerin üzerine 1 saat süreyle 37 °C lik etüvde ve nemli ortamda uygulandı. Daha sonra TdT enzimi - 20 °C de olan dondurucuya kaldırıldı. Negatif kontrol için doku kesitleri ise TdT enzim çalışma solüsyonu yerine TdT enzim reaksiyonunu durdurma tamponu ile muamele edildi.

7. Kesitler TdT enzim reaksiyonunu durdurma tamponu içerisinde 15" çalkalandıktan sonra 10' oda sıcaklığında inkübe edildi. Sonrasında 3 defa 1' PBS'te bekletildi.

8. Digoksinin-nükleotid ile işaretli DNA fragmentlerine tutunması için anti-digoksinin konjugat, kesitlerin üzerini kaplıyacak şekilde uygulandı ve 30' oda sıcaklığında, nemli ortamda inkübe edildikten sonra PBS içerisinde 4 defa 2'şer dakika tutuldu.

9. Hazırlanan peroksidaz substratı, kesitlerin üzerine uygulandı ve 3-6' (kesitlerde kahverengi renk oluşumu gözleninceye kadar) oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra kesitler deiyonize su ile 3 defa 1', 1 defa da 5' yıkandı.

10. Harris hematoksilin ile 30" zıt boyama yapıldı, sonrasında kesitler deiyonize suda 2 defa çalkalandıktan sonra üçüncü yıkamada 15' tutuldu.

11. Kesitler 3 defa % 100'lük N-butanol ile yıkandı. İlk iki yıkamada 10 kez batırılıp çıkarıldı, üçüncü yıkamada çalkalamadan 30" tutuldu. Ksilolde 3 defa 2' inkübe edildi. Daha sonra da kesitler, üzerlerine entellan damlatılıp lamelle kapatıldı.

2.2.2.1. Apoptozis yoğunluğunun değerlendirilmesi

Gruplar için tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı ve % TUNEL pozitif tubulus oranı belirlendi. Bu amaçla hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Leica DMLB) x40'lık objektif ile incelendi. Kahverengi presipitasyonun görülmesi, reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi. Her hayvan için iki kesitte, her birinde rastgele seçilen yuvarlak veya yuvarlağa yakın 100'er adet olmak üzere, toplamda 200 adet tubulusta gözlenen apoptotik hücreler sayılarak, tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı hesaplandı. Ayrıca her hayvan için sayılan 200 adet tubulusta, en az bir adet apoptotik hücre içeren tubulus sayısı belirlenerek % TUNEL pozitif tubulus oranı hesaplandı (Ozawa ve ark 2002, Vaisheva ve ark 2007, Marcon ve ark 2008).

2.2.3. İmmunohistokimyasal Yöntem (Strept ABC Boyama Yöntemi)

Her hayvandan 300 µm ara ile 6 µm kalınlığında organosilan ile kaplanmış lamlara alınan üç kesite HO-1'in belirlenmesi için strept avidin-biyotin kompleks (strept avidin-biotin complex, sABC) boyama metodu uygulandı. Bu amaçla rabbit anti-heme oxygenase 1 poliklonal primer antikoru (Rabbit anti-heme oxygenase 1 polyclonal antibody, ungonjugated, Abcam ab79854) kullanıldı (Arai-Gaun ve ark 2004, Shiraishi ve Naito 2005).

Aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Organosilane ile kaplı lamlara alınan parafin kesitler bir gece boyunca 37 °C'deki etüvde tutuldu.

2. Ertesi gün deparafinizasyon için parafin kesitler 2 defa 5' ksilolde tutuldu. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerisinden (% 100 alkol-I'de 3', % 100 alkol-II'de

3', % 96'lık alkolde 3', % 80'lik alkolde 3') geçirildi ve 5' akarsuda yıkandı. Devamında önceden 37 °C lik etüvde ısıtılmış distile su içinde yine etüvde 5' bekletildi.

3. Kesitler 37 °C lik etüvde bu kez proteinaz K (20 µg/ml) ile nemli ortamda 15' inkübe edildi.

4. Preparatlar hızlıca distile sudan geçirildikten sonra % 3'lük hidrojen peroksit solüsyonu içinde oda sıcaklığında 5' tutuldu.

5. Pipet yardımıyla kesitler distile su ile yıkanıp 5' PBS (0.01 mM, pH 7.2) içersinde tutuldu.

6. Daha sonra PBS ile hazırlanmış % 2'lik normal keçi serumunda (Normal Goat Serum, Sigma G9023) oda sıcaklığında nemli ortamda 30' bekletildi.

7. Rabbit anti-Heme Oxygenase 1 poliklonal primer antikoru, 1:400 oranında PBS ile sulandırıldıktan sonra + 4 °C de nemli ortamda bir gece bekletildi (Arai-Gaun ve ark 2004, Shiraishi ve Naito 2005).

8. Ertesi gün kesitler tris tampon solüsyonu (tris buffer saline, TBS, pH 7.6) ile yıkandıktan sonra bu solüsyonda 5' tutuldu.

9. Daha sonra 30' sekonder antikor (StreptABComplex/HRP Duet Mouse/Rabbit, DAKO K0492) ile oda sıcaklığında nemli ortamda inkübe edildi. Devamında kesitler TBS ile yıkandıktan sonra yine TBS'de 5' tutuldu.

10. Kesitler avidin-peroksidaz kompleksinde (Dako K0492, Strept ABComplex/Hrp duet mouse/rabbit) 30' oda sıcaklığında ve nemli ortamda inkübe edildi. Kesitler TBS ile yıkandıktan sonra yine TBS'de 5' tutuldu.

11. Taze hazırlanmış substrat-kromojen solüsyonu (DAB, Sigma D5905), oda sıcaklığında kesitlerin üzerine 2-3' (kesitlerde kahverengi renk oluşumu gözlenince) uygulandı. Daha sonra kesitler distile su ile 5' yıkandı.

12. Harris hematoksilen ile 30" zıt boyama yapıldı, sonrasında kesitler distile suda 2 defa çalkalandıktan sonra üçüncü yıkamada 20' distile suda tutuldu.

13. Kesitler iki defa % 100 N-butanolde 30" yıkandıktan sonra ksilolde iki defa 5' inkübe edildi ve entellan ile kapatıldı.

2.2.3.1. HO-1 yoğunluğunun değerlendirilmesi

Hazırlanan preparatlar ışık mikroskobunda (Leica DMLB) x20'lik objektif ile incelendi. Kahverengi presipitasyonun görülmesi, reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi. Her hayvan için alınan üç kesitte HO-1'in dokudaki boyanma yoğunlukları semi-kantitatif olarak belirlendi (Ozawa ve ark 2002). Bu amaçla her kesitte 20 adet, toplamda 60 adet

yuvarlak veya yuvarlağa yakın tubulus incelendi. İnceleme sonucunda pozitivitenin değerlendirilmesi amacıyla subjektif puanlama (0: Hiçbir hücrede boyanma yok, 1: Çok az sayıda boyanmış hücre, 2: Az sayıdaki hücrede boyanma, 3: Hücrelerde orta derecede boyanma, 4: Hücrelerde yoğun derece boyanma) yapıldı.

2.2.4. Biyokimyasal Yöntem

2.2.4.1. Serum testosteron seviyelerinin belirlenmesi

Serum testosteron hormon seviyesi hazır ticari kit (Testosterone EIA Kit, Cayman Chemical 582701) kullanılarak ELISA yöntemi ile tespit edildi.

Yöntemin uygulanmasında aşağıdaki işlem sırası takip edildi.

- Serumlar – 80 °C den çıkartıldı ve oda sıcaklığına gelmesi bekledi.
- EIA Solüsyonu: 10 ml konsantre EIA solüsyonunun (10X) (Cayman Chemical 582701) 90 ml distile su ile sulandırılması ile hazırlandı.
- Yıkama Solüsyonu: 5 ml konsantre yıkama solüsyonunun (400X) (Cayman Chemical 582701) 2 litre distile su ile sulandırılmasından sonra üzerine 1 ml Tween 20 (Cayman Chemical 582701) ilave edilerek hazırlandı.
- Tracer: Testosteron AChE Tracer (Cayman Chemical 582701) üzerine 6 ml EIA solüsyonu eklendi. Yeni hazırlanan 6 ml AChE tracer'a 60 µl tracer boya solüsyonu (Cayman Chemical 582701) konuldu.
- Testosteron EIA Antiserum (Cayman Chemical 582701): Üzerine 6 ml EIA solüsyonu eklendi. Yeni hazırlanan testosteron EIA antiseruma 60 µl antiserum boyası (Cayman Chemical 582701) konuldu.
- Ellman'nın Ayırıcı (Cayman Chemical 582701): Üzerine 20 ml distile su eklendi. Kullanmadan önce taze olarak hazırlandı.
- Standartların Hazırlanması: Bir tüp içerisine 900 µl distile su ve üzerine 100 µl Testosterone EIA standart konulup karıştırıldı. Daha sonra ayrı bir tüpe 900 µl EIA solüsyonu ve bunun üzerine hazırlanan ilk karışımdan 100 µl konularak standart 1 hazırlandı. Başka bir tüp içine 500 µl EIA solüsyonu ve üzerine 500 µl standart 1 den konularak standart 2 hazırlandı. Standart 3 ise 500 µl EIA buffer üzerine yine aynı miktarda 500 µl standart 2 ilave edilerek hazırlandı. Standart 4-8 de benzer şekilde hazırlandı.

2.2.4.1.1. Plate hazırlanması

Öncelikle hangi kuyucuğa hangi maddenin konulduğunun bilinmesi için haritalama işlemi yapıldı. Daha sonra aşağıda belirtildiği gibi plate hazırlandı;

- EIA solüsyonu 100 µl non spesifik bağlanma (non-specific binding, NSB) kuyucuğuna, 50 µl de B₀ (maximum binding) kuyucuğuna konuldu.
- Testosteron EIA standart, S1-S8 kuyucuklarına 50'şer µl konuldu.
- Serumlar, haritalama işleminde belirtilen kuyucuklara 50'şer µl konuldu.
- Tracer, total aktivite (total activity, TA) ve blenk (blank, Blk) kuyucuğu hariç diğer kuyucuklara 50'şer µl konuldu.
- Testosteron EIA antiserum, TA, NSB ve Blk kuyucukları hariç diğer kuyucuklara 50'şer µl konuldu.

Plate hazırlandıktan sonra analize şu şekilde devam edildi;

1. Plate üzeri koruyucu filmle kapatıldıktan sonra karıştırıcı üzerinde, oda sıcaklığında, iki saat inkübe edildi.
2. Ellman'nın ayırıcı üzerine 20 ml distile su eklenerek taze olarak hazırlandı.
3. İnkübasyon sonrasında kuyucuklar boşaltıldı ve beş kez yıkama tamponu ile yıkandı.
4. Her kuyucuğa 200 µl taze olarak hazırlanan Ellman'nın ayırıcı ilave edildi.
5. TA kuyucuğuna 5 µl işaretleyici ilave edildi.
6. Plate üzeri koruyucu filmle kapatıldıktan sonra karanlık ortamda, karıştırıcı üzerinde, oda sıcaklığında, 60-90' inkübe edildi.
7. Daha sonra plate 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda (Optic Ivymen System 2100-C, Spain) okutuldu.

2.2.4.2 Serum ve testis doku örneklerinde total oksidan ve antioksidan seviyelerinin belirlenmesi

2.2.4.2.1. Testis doku örneklerinden süpernatant hazırlanması

1. Testis doku örnekleri, bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalandı.
2. Darası alınan tüplere parçalanmış testis doku örnekleri koyularak ağırlıkları tartıldı.
3. Tüp içine testis doku ağırlığının 10 katı miktarında PBS (pH 7.4) ilave edildi.

4. Tüpler içindeki dokular buz kabı içinde homojenizatör (IKA Overhead Stirrer; Germany) yardımıyla 2000 rpm'de 3' homojenize edildi.

5. Daha sonra 6000 g'de 10' +4 °C de satrifüj (Nüve-Bench Top Centrifuge, NF 800 R, Turkey) edildi.

6. Süpernatantlar ependorf tüplere aktararak deney aşamasına kadar -80 °C'deki dondurucuda (Sanyo Ultra Low MDF U40 86S, Japan) muhafaza edildi.

2.2.4.2.2. Testis dokusunda Lowry metodu (folin fenol metodu) ile protein tayini

Yöntemin prensibi, alkali ortamda proteinler Cu^{+2} ile Cu^{+2} -protein kompleksi oluşturması ve bu kompleksin fosfo molibdat-fosfo tungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu's fenol reaktifi) indükleyerek mavi-mor renkli ürün oluşturması esasına dayanmaktadır. Rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Yöntemin uygulanmasında aşağıdaki işlem sırası takip edildi.

BSA (bovine serum albumin) (Sigma A9418): Stok çözeltiden derişimi 0, 20, 40, 60, 80, 100 mg/L olan standart çözeltiler hazırlandı.

Çözelti A: 1000 ml distile sudaki 20 g Na_2CO_3 (Sigma S2127), 4 g NaOH (Sigma S5881) ve 1.6 g Na-K tartarat çözeltisi (Sigma S6170)

Çözelti B: 100 ml distile sudaki 4 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ çözeltisi (Merck 102787)

Çözelti C: 100:1 (v/v) oranında çözelti A : çözelti B karışımı

Folin-Ciocalteu's fenol çözeltisi (Merck 1.09001)

Deney tüplerine testis dokusundan hazırlanan süpernatantlar ve standartlardan 1'er ml alındı. Üzerlerine 3 ml çözelti C eklenerek oda sıcaklığında 15' bekletildi. Bu sürenin sonunda 0.3 ml Folin-fenol çözeltisi eklenip vortekslendi ve 45' oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. UV spektrofotometrede çözeltilerin 660 nm'deki absorbans değerleri okunarak standart eğriden protein miktarları saptandı (Lowry ve ark 1951).

2.2.4.3. Serum ve testis doku örneklerinde total oksidan seviyesi (TOS) analizi

Serum ve testis doku örneklerinden hazırlanan süpernatant total oksidan seviyesi ölçümü, hazır ticari kit (Total Oxidant Status-TOS Assay Kit, Rel Assay Diagnostics, RL0024) kullanılarak spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Japan) cihazıyla belirlendi.

Analizin gerçekleştirilmesinde aşağıdaki kimyasal maddeler kullanıldı.

- Standart (Std) 2 solüsyonu: Stock Stabilized Standart Solution “SSSS” – 800 mM H₂O₂ Equiv./L
- 1. Ayıraç : Buffer
- 2. Ayıraç: Prochromogen

Numunede bulunan oksidanlar ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonla okside ederler. Mediumda bol miktarda bulunan indükleyici moleküller aracılığıyla oksidasyon reaksiyonu devam ettirilir. Ferrik iyonlar asidik mediumdaki kromojen ile renkli bir kompleks oluşturur. Buradan yola çıkılarak örnekte bulunan oksidan moleküllerin toplam miktarı ile doğru orantılı olarak, renk yoğunluğu spektrofotometrik olarak ölçülebilmektedir. Ölçüm hidrojen peroksit ile kalibre edildi ve sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L olarak belirlendi.

Analiz sırasında aşağıdaki işlem sırası izlendi.

1. İlk sulandırma için 50 μl Standart (Std) 2 solüsyonuna 10 ml distile su eklenerek vortekslendi.

2. İkinci sulandırma için, hazırlanan ilk sulandırmadan 50 μl alındı ve üzerine tekrar 10 ml distile su ilave edilerek vortekslendi.

3. Tüplere 500'er μl 1. ayıraç konulduktan sonra, bir tüpe 75 μl standart 2, diğer tüplere ise örnekler (serum / süpernatant) konuldu ve spektrofotometrede 530 nm absorbans değerinde okutuldu (Standart 2 ve örneklerin birinci absorbans değerleri).

4. Standart 2 ve örneklerin üzerine 25'er μl 2. ayıraç ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 10' inkübe edildi ve 530 nm absorbans değerinde ikinci kez okutuldu (Standart 2 ve örneklerin ikinci absorbans değerleri).

5. Sonuç değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Sonuç: $(\Delta\text{AbsÖrnek}/\Delta\text{AbsStd } 2) \times 20$ (Std 2 değeri)

$\Delta\text{AbsÖrnek}$: örneğin ikinci absorbans değeri - örneğin birinci absorbans değeri

$\Delta\text{AbsStd } 2$: Std 2 ikinci absorbans değeri – Std 2 birinci absorbans değeri

Std 2 değeri: 20 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L

2.2.4.4. Serum ve testis doku örneklerinde total antioksidan seviyesi (TAS) analizi

Serum ve testis doku örneklerinden hazırlanan süpernatant total antioksidan seviyesi ölçümü, hazır ticari kit (Total Antioxidant Status-TAS Assay Kit, Rel Assay Diagnostics, RL0017) kullanılarak spektrofotometre cihazıyla belirlendi.

Analizin gerçekleştirilmesinde aşağıdaki kimyasal maddeler kullanıldı.

- Standart 1: 0.0 mmolTrolox Equiv/L
- Standart 2: 1.0 mmolTrolox Equiv/L
- 1. Ayıraç: Buffer
- 2. Ayıraç: ABTS Radical solution

Gerçekleştirilen analiz numunede bulunan antioksidanların, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini (2,2'-Azino-di-[3-aehtylbenzthiazolinesulphonate) rengi azalmış ABTS formuna dönüştürmesi prensibine dayanmaktadır Spektrofotometrede 660 nm deki absorbans değişimi örnekteki total antioksidan seviye ile ilişkilidir. Ölçüm bir Vitamin E analogu olan Trolox Equivalent olarak adlandırılan stabil antioksidan standart solüsyon ile kalibre edilmiştir.

Analiz sırasında aşağıdaki işlem sırası izlendi.

1. Tüplere 500'er µl 1. ayıraç konulduktan sonra ilk tüpe 30 µl standart 1, ikinci tüpe standart 2 ve diğer tüplere ise örnekler (serum / süpernatant) konuldu. Daha sonra spektrofotometrede 660 nm absorbans değerinde okutuldu (Standart 1, standart 2 ve örneklerin birinci absorbans değerleri).

2. Standart 1, standart 2 ve örneklerin üzerine 75'er µl 2. ayıraç ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 10' inkübe edildi ve 660 nm absorbans değerinde ikinci kez okutuldu (Standart 1, standart 2 ve örneklerin ikinci absorbans değerleri).

3. Sonuç değeri aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Sonuç: $[(\Delta\text{AbsStd } 1 - \Delta\text{AbsÖrnek}) / (\Delta\text{AbsStd } 1 - \Delta\text{AbsStd } 2)] \times 20$ (Std 2 değeri)

$\Delta\text{AbsStd1}$: Std 1 ikinci absorbans değeri – Std 1 birinci absorbans değeri

$\Delta\text{AbsStd2}$: Std 2 ikinci absorbans değeri – Std 2 birinci absorbans değeri

$\Delta\text{AbsÖrnek}$: örneğin ikinci absorbans değeri - örneğin birinci absorbans değeri

Std 2 değeri: 20 µmol H₂O₂ Equiv./L

Süpernatantlarda yapılan TOS ve TAS analiz sonuçları protein sonucuna göre uyarlandı ve g protein cinsinden değeri verildi.

2.2.5. Moleküler Biyolojik Yöntem [SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Poliakrilamit jel elektroforezis) Western Blot]

2.2.5.1. Western blot yöntemi için lizat hazırlanması

Alüminyum folyo içine alınan ve sıvı nitrojende dondurulan testis doku örneklerinden lizatları hazırlamak için aşağıdaki işlem sırası izlendi.

1. Çalışılacak doku sayısına göre, 10 ml'lik tüplerin üzerine kontrol ve deney gruplarının isimleri yazıldı ve tüpler spor üzerine yerleştirildi.
2. Testis doku örnekleri, bir camın üzerinde bistüri yardımıyla mekanik olarak parçalandı.
3. Darası alınan tüplere parçalanmış testis doku örnekleri koyularak ağırlıkları tartıldı.
4. Ependorf tüplere 0.2 g doku başına 1800 µl lizis buffer [4 ml 40 mM Tris (pH 7.4), 84 ml distile su, 12 ml 120 mM NaCl, 100 µl % 0.1 Triton X-100] ve 200 µl proteaz inhibitör kokteyli (protease inhibitor cocktail, PIK, Rosch 1836170) olacak şekilde hesaplama yapılarak lizis buffer ve proteaz inhibitör kokteyli kondu.

Proteaz inhibitör kokteyli (PIK) (10X) hazırlanması: Bir tablet PIK'i 1 ml PBS (1X- 0.01 M, pH 7.2) içerisinde çözündürülerek hazırlanır. Her örnek için 200 µl-1X kullanılır.

PBS Hazırlanması (1X- 0.01 M, pH 7.2) amacıyla, 1.48 g Na₂HPO₄ (Sodyum fosfat dibazik, susuz, Merck 1.06585), 0.43 g KH₂PO₄ (Potasyum fosfat monobazik, susuz, Merck 1.04873) ve 7.20 g NaCl (Sodyum klorür, Sigma 13423), 1 litre distile suda çözündürüldü. Daha sonra otoklavda 2 saat süreyle sterilize edildi.

Lysis buffer hazırlanması:

Tris (40 mM, pH 7.4)

Distile su (500 ml) içinde 60.57 g Tris (Trisma Base, Sigma T1503) eritilerek 1 M Tris hazırlandı ve HCl ile pH 7.4'e ayarlandı. Bu solüsyondan 100 ml lizis buffer hazırlamak için 4 ml kullanıldı. Hazırlanan bu solüsyon otoklavda 120 °C de 15' sterilize edildi.

NaCl (120 mM)

Distile su (500 ml) içinde 29.22 g NaCl eritilerek 1 M NaCl hazırlandı. Bu solüsyondan 100 ml lizis buffer hazırlamak için 12 ml kullanıldı. Hazırlanan bu solüsyon otoklavda 120 °C de 15' sterilize edildi.

Triton X-100 (% 0.1)

Distile su (250 ml) içinde 0.25 ml Triton X-100 (Triton X-100, Sigma 9002-93-1) karıştırıldı. Bu solüsyondan 100 µl kullanılarak 100 ml lizis buffer hazırlandı.

5. Ezilmiş doku, lizis buffer ve PIK karışımı ile vortekslendi.
6. Tüpler içindeki bu dokuların, buz kabı içinde homojenizatör yardımıyla 2000 rpm'de üç kez 30" homojenize edilmesiyle lizise uğraması sağlandı (Shiraishi ve Naito 2005).

7. Daha sonra 15000 g (gravity) de 20' +4 °C de sentrifüj edildi.

Süpernatantlar ependof tüplere aktararak deney aşamasına kadar -80 °C de muhafaza edildi (Shiraishi ve Naito 2005).

2.2.5.2. SDS-PAGE (Poliakrilamit jel elektroforezis) Western blot protokol

Jel solüsyonları aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

Tris (1.5 M, pH 8.8)

Distile su (500 ml) içinde 90.85 g Tris (Trisma Base, Sigma T1503) eritilerek 1.5 M Tris hazırlandı ve HCl ile pH 8.8'e ayarlandı.

Tris (1 M, pH 6.8)

Distile su (500 ml) içinde 60.57 g Tris eritilerek 1 M Tris hazırlandı ve HCl ile pH 6.8'e ayarlandı.

SDS (% 10)

Distile su (1 ml) içinde 0.1 g SDS eritildi.

Amonyum persülfat (% 10)

Distile su (1 ml) içinde 0.1 g amonyum persülfat eritildi.

Hazırlanan bu solüsyonlardan 1.5 M Tris (pH 8.8) ve 1 M Tris (pH 6.8) otoklavda 120 °C de 15' sterilize edildi.

Jel solüsyonları hazırlandıktan sonra, SDS-PAGE (Poliakrilamit jel elektroforezis) Western blot protokolü aşağıda belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

1. Tutucular arasında sıkıştırılan dikey elektroforezis camları arasına % 12'lik 10 ml ayrıştırma jeli [3.3 ml distile su + 4 ml % 30 akrilamit-bisakrilamit (% 30 akrilamit-bisakrilamit 37.5:1, Merck 1.00639) + 2.5 ml 1.5 M Tris (pH 8.8) + 0.1 ml % 10 SDS (Sodium dodecyl sulfate, Merck S30217_030) + 0.1 ml % 10 Amonyum persülfat (Ammonium persulfate, Sigma A9164) + 0.004 ml tetra metil etilen daimin (Tetramethylethylenediamine, TEMED, Sigma T9281)] hazırlanarak döküldü.

2. Üzerindeki hava kabarcıklarını önlemek için 2-propanol (2-Propanol, Riedel-de Haen 24137) ile doldurularak polimerizasyon işlemi için 45' bekletildi.

3. Polimerizasyon işleminden sonra 2-propanol boşaltılarak jelin üstü birkaç kez distile su ile yıkandı.

4. Daha sonra 6 ml % 5 toplama jeli [4.1 ml distile su + 1 ml % 30 akrilamit-bisakrilamit + 0.75 ml 1 M Tris (pH 6.8) + 0.06 ml % 10 SDS + 0.06 ml % 10 Amonyum persülfat + 0.006 TEMED] hazırlanarak ayrıştırma jelinin üzerine döküldü ve 10'luk tarak yerleştirildi. Polimerizasyon işlemi için 15' bekletildi.

5. Polimerizasyon işlemi tamamlanan jeller elektroforez tankına yerleştirilerek üzerine 1X'lik elektroforez tamponu (100 ml stok solüsyondan (5X) alınarak üzerine 400 ml distile su eklendi) döküldü ve bu tampon içinde taraklar çıkarıldı. Sonra yükleme tarağı yerleştirildi.

Elektroforez tamponunun hazırlanması (5X) amacıyla, 15.1 g Tris ve 94.0 g glycine (Glycine, for electrophoresis, minimum % 99, Sigma G8898) 900 ml distile suda eritildi. Bu solüsyonun üzerine 50 ml % 10 SDS ilave edildi.

6. Jelin ilk kuyucuğuna molekül ağırlığı bilinen bir belirteç (Prestained Protein Marker, Broad Range, BioLabs P77085) 10 µl olarak yüklendi. Daha sonra hazırlanmış olan protein örnekleri 15 µl olacak şekilde yüklendi. Hangi kuyucuğa hangi protein örneğinin yüklendiğini anlamak için bir kağıda haritalama işlemi yapıldı.

Protein örneklerinin hazırlanması:

- Numuneler – 80 °C den çıkarılıp oda ısısına getirildi.
- Steril endorfların üzerine numunelerin isimleri yazıldı.

- İlk ependorfa sadece 20 µl marker kondu. Diğer ependorflara 20 µl numune örneği ve üzerine 20 µl laemmli buffer (Sample Buffer, Laemmli 2X Concentrate, Sigma S3401-1VL) ilave edildi.

- Ependorfların ağzı klips ile sıkıca kapatıldı.
- Protein örnekleri ve marker 100 °C de 5' kaynatıldı.
- Daha sonra marker hariç diğer numuneler santrifüj cihazında 9000 rpm'e kadar santrifüje edildi.

7. Elektroforezde numuneler ilk önce 50 voltta 30', sonra da 100 voltta jelin sonuna kadar yürütüldü.

8. Elektroforez işleminden sonra ise jeldeki proteinlerin membrana geçmesi için Western blotlama yöntemi uygulandı.

9. Elektroforez tankından çıkartılan jeller transfer solüsyonuna alınarak 15' bu solüsyon içinde bekletildi.

Transfer stok solüsyonunun hazırlanması amacıyla, 2.9 g glycine, 5.8 g tris base, 0.37 g SDS 200 ml methanolde (Methanol, Sigma 24229) eritildi. Daha sonra toplam hacim distile suyla 1000 ml'ye tamamlandı. pH 8.3 olacak şekilde ayarlandı.

10. Jel transfer solüsyonunun içinde beklerken polivinil florid (polyvinylidenfluorid, PVDF) membran (Immobilon-PSQ ISEQ00010, 26.5 x 3.75 m 1 roll) distile suda 5', 1x transfer solüsyonunda 3' yıkanırken, filtre kağıtları (Whatman 10426972, GB005, 15 x 15 cm) ise transfer solüsyonu ile ıslatılarak Western blotlama için hazır hale getirildi.

11. Bir membran için dört adet olmak üzere ıslatılmış filtre kağıtları içinde altta PVDF membran, üstte jel olacak şekilde blotlama aparatına yerleştirildi. Bir saat 70 V, 30' 100 V da Western blotlama işlemi gerçekleştirildi.

12. Proteinlerin PVDF membrana transferinden sonra, membranlar çalkalama platformu üzerinde (Labnet, Rocker 25) Ponceau S (Ponceau S Solution, Sigma P7170) boyası ile 30' muamele edildi.

13. Ponceau S membrandan uzaklaşması için 3 kez distile su ile, sonra pH'sı 7.4 olan % 0.1 Tween-20 (Merck 822184) ilaveli tris buffer solüsyonu (TBS-T) ile 2' yıkama yapıldı.

Tris Buffer Saline (TBS) solüsyonunun hazırlanması (10X) amacıyla, 12.1 g Tris ve 90.0 g NaCl 800 ml distile suda eritildi. Daha sonra pH 7.8 olacak şekilde ayarlanarak son hacim distile suyla 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan bu solüsyon otoklavda 120 °C de 15' sterilize edildi.

TBS-T hazırlanması amacıyla, 100 ml stok (10X) TBS solüsyonundan alınarak üzerine 900 ml distile su ve 1000 µl Tween-20 eklendi.

14. Yıkama işleminden sonra membran çalkalama platformu üzerinde 1 saat % 5 yağsız süt tozu solüsyonu ile bloklandı.

Yağsız Süt Tozu Solüsyonunun (% 5) hazırlanması amacıyla, 100 ml TBS-T içinde 5 g yağsız süt tozu eritilerek hazırlandı.

15. Membran bir kez TBS-T ile yıkandı.

16. Daha sonra membran % 5 yağsız süt tozuyla 1:1000 oranında (10 µl primer antikor + 10 µl % 5 yağsız süt tozu solüsyonu) dilüe edilmiş primer antikor (anti-Heme oxygenase-1, Abcam ab79854) ile çalkalama platformu üzerinde iki saat inkübe edildi.

17. Inkübasyon sonrasında membran TBS-T ile üç kez 5' çalkalama platformu üzerinde yıkandı.

18. Yıkama işleminden sonra membran, % 5 yağsız süt tozuyla 1:5000 oranında (3 µl sekonder antikor + 15 ml % 5 yağsız süt tozu solüsyonu) dilüe edilmiş sekonder antikor (StreptABComplex/HRP Duet Mouse/Rabbit, DAKO K0492) ile çalkalama platformu üzerinde bir saat inkübe edildi.

19. Inkübasyon sonrasında membran TBS-T ile üç kez 5' çalkalama platformu üzerinde yıkandı.

20. Yıkama işleminden sonra membran, 2.5 µl streptavidin-peroksidaz (Streptavidin-Peroksidaz, Sigma S5512) ve 10 ml TBS-T karışımı ile çalkalama platformu üzerinde 30' inkübe edildi.

21. Inkübasyon sonrasında membran TBS-T ile üç kez 5' çalkalama platformu üzerinde yıkandı.

22. Ardından 5' TBS-T ile muamele edilen membran, 5 ml EZ-ECL (Chemiluminescence Detection Kit for HRP, Biological Industries 20-500-120) ile 1' yıkandı.

23. Hiperkaset (Amersham Autoradiography Cassette, 24 x 30 cm, RPN11643) içine yerleştirilen membran, 3' karanlık odada inkübe edilip membrandaki protein bandları hiperfilme (Amersham Hyperfilm ECL, 50 sheets, 18 x 24 cm, 28906836) aktarıldı.

24. Film developer (Developer, ILFORD Multigrade 757855) ve fiksatiften (Rapid Fixer, ILFORD Hypam 1758285) geçirildi, distile su ile yıkandı ve ardından kurutuldu. Daha sonra bu filmler Gene Genius Bio Imaging System yardımıyla bilgisayara aktarıldı.

25. Band kalınlıkları hazır paket bilgisayar programı (UVP Life Science Software, Cambridge, UK, www.uvp.com) yardımıyla belirlendi.

2.2.5.3. Hem oksijenaz-1 miktarının değerlendirilmesi

Her gruptaki hayvana ait testis dokusunda HO-1 yoğunluğunun belirlenmesi amacıyla uygulanan SDS-PAGE (Poliakrilamit jel elektroforezis) Western blot protokol sonucu elde edilen band kalınlıkları hazır paket bilgisayar programı (UVP Life Science Software, Cambridge, UK, www.uvp.com) yardımıyla belirlendi.

2.2.6. Sitolojik Yöntem

Spermatozoonların morfolojilerinin değerlendirilmesinde eosin-nigrosin boyama tekniği kullanıldı (Hackett ve Macpherson 1965). Bu amaçla, her hayvanın epididimisi çıkarıldıktan sonra sperma örnekleri elde edildi. Temiz lam üzerine küçük bir damla sperma, iki damla % 5'lik eosin ve dört damla da % 10'luk nigrosin damlatılarak lamel aracılığıyla homojen olarak karışımı sağlandı. Daha sonra lamel ile froti çekilerek entellan ile kapatıldı.

Her hayvan için 200 adet spermatozoon morfolojik yönden incelenerek anormal spermatozoon yüzdesi belirlendi (Narayana ve ark 2002).

2.2.7. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows; version 15.0, seri no: 416a1604ed18748d3f27) paket programı kullanıldı. Ölçümle belirlenen vücut ağırlığı, testis ağırlığı, 7-8. dönem seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği, 12-14. dönem seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği, serum testosteron değeri, serum ve testis dokusu total antioksidan ile oksidan seviyeleri bakımından gruplar arası farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, farkların önem kontrolü ise *post hoc* Duncan testi ile yapıldı. Kalitatif olarak belirlenen histolojik değişimler (subbazal ve epiteliyal

vakuolizasyon, epiteliyal vakuolizasyon, lumene dökülen germ hücre yoğunluğu ve kapilar hiperemi), anormal spermatozoon oranı, tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı, % TUNEL pozitif tubulus oranı, 14. dönem yoğunluk değeri, immunohistokimyasal ve Western blot tekniği ile belirlenen heme oxygenase-1 yoğunluğu Kruskal-Wallis varyans analizi ile değerlendirildi. Farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığını belirlemek için *post hoc 97 multiple comparison testi* (Conover 1980) yapıldı.

Ayrıca kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait serum ve testis dokusu total oksidan seviyesi, serum ve testis dokusu total antioksidan seviyesi, serum testosteron değerleri, % TUNEL pozitif tubulus oranı, HO-1 yoğunluğu ve anormal spermatozoon sayısı arasında korelasyon analizi yapıldı.

Yapılan istatistiksel analizlerde farklılıkları $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**) ve $P<0.001$ (***) olan değerler önemli kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. Vücut Ağırlığı ve Testis Ağırlığı

Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında belirlenen ortalama vücut ağırlığı ve testis ağırlığı değerleri Çizelge 3.1’de verildi.

Gruplar arasındaki vücut ağırlığı farkının önemli olmadığı fakat testis ağırlığının sham kontrol grubunda daha fazla olduğu belirlendi ($P<0.001$) (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında vücut ağırlığı ve testis ağırlık değerleri.

GRUP	n	Vücut Ağırlığı (g)	P	Testis Ağırlığı (g)	P
		$(\bar{x} \pm S_x)$		$(\bar{x} \pm S_x)$	
Kontrol	8	244.88 ± 6.60	ÖD	2.54 ± 0.07^b	***
Sham kontrol	8	271.25 ± 6.95		2.96 ± 0.07^a	
PCB	8	247.00 ± 9.67		2.57 ± 0.10^b	
ALA	8	247.75 ± 9.94		2.43 ± 0.07^b	
ALA-PCB	8	238.25 ± 5.27		2.33 ± 0.09^b	

ÖD: Önemli değil, ***: $P<0.001$

3.2. Histolojik Bulgular

Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarındaki 120 günlük materyalden hazırlanan ve Crossman’ın üçlü boyama yöntemi ile boyanan, her hayvan için seri alınmış olan sekiz adet testis kesiti ışık mikroskopunda incelendi. Mikroskopik inceleme sırasında tubulus seminiferus kontortusların genel görünümü, lumenlerinin belirginliği, seminifer epitel katmanı, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve kapilar damar yapısı dikkate alındı.

Kontrol grubu ratlarda tubulus lumenlerinin belirgin olduğu ve spermatogenetik hücrelerin kalın bir katman oluşturduğu gözlemlendi. Sertoli hücrelerinin spermatogonyumlar arasında, bazal membran üzerine oturduğu görüldü. İntertubuler alandaki gevşek bağ doku içinde Leydig hücreleri tespit edildi (Şekil 3.1).

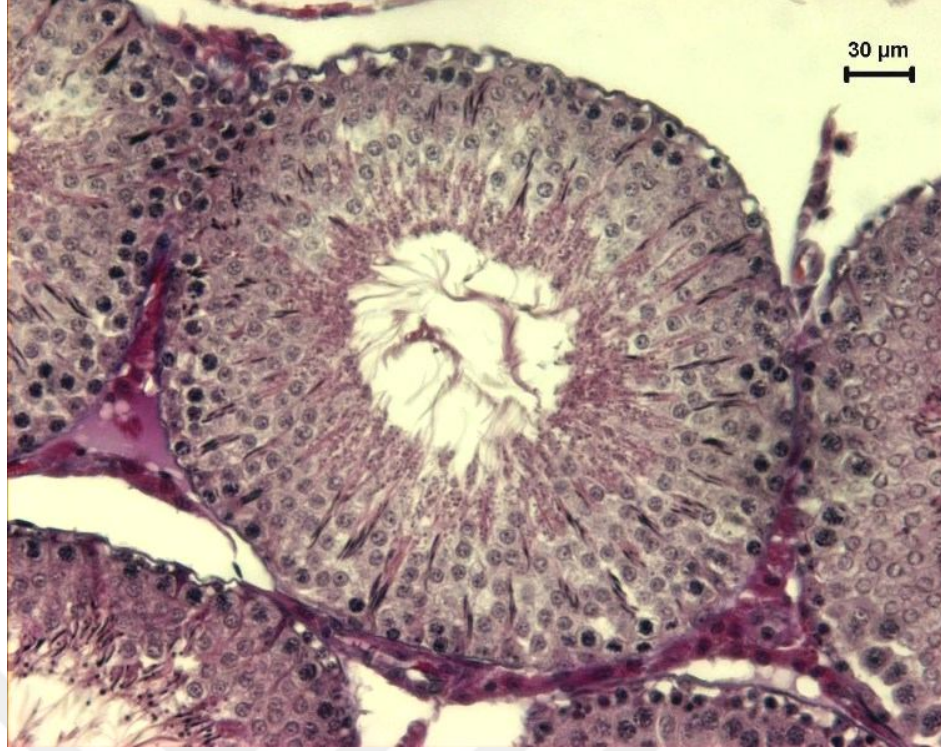
Genel histolojik görünüm açısından kontrol, sham kontrol (Şekil 3.2) ve ALA (Şekil 3.3) grupları arasında bir farklılık belirlenmedi.



Şekil 3.1. Kontrol grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü (L: tubulus lumeni, çizgi : tubulus epitel katmanı, X: Leydig hücreleri, a: arteriol, v: venül). Üçlü boyama yöntemi.



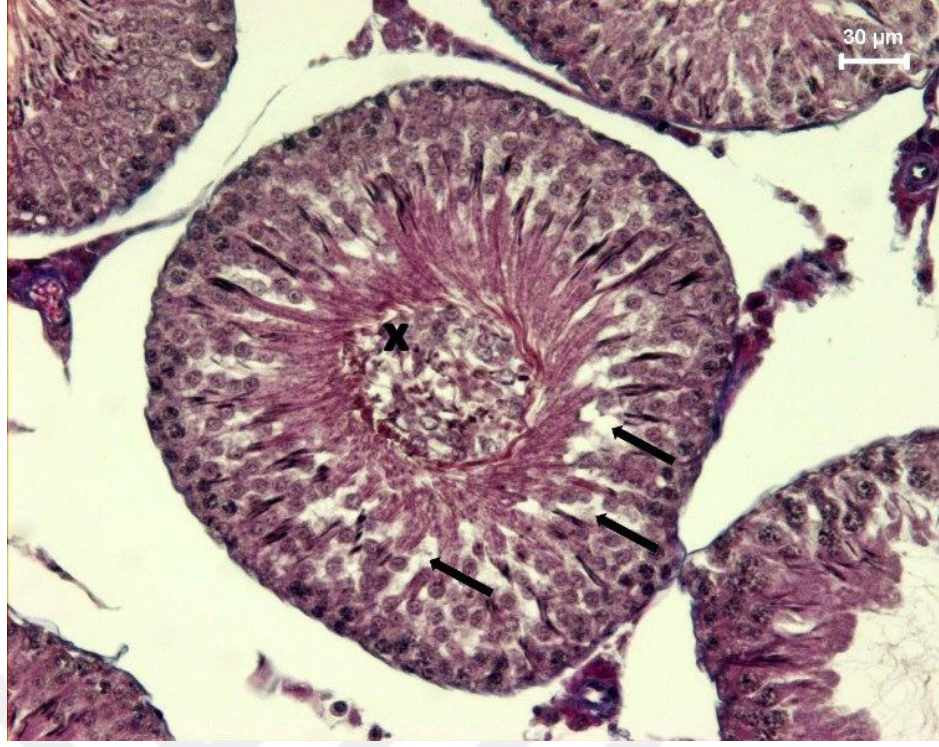
Şekil 3.2. Sham kontrol grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü (T: tunika albugineya, X: Leydig hücreleri). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.



Şekil 3.3. ALA grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü.
Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.

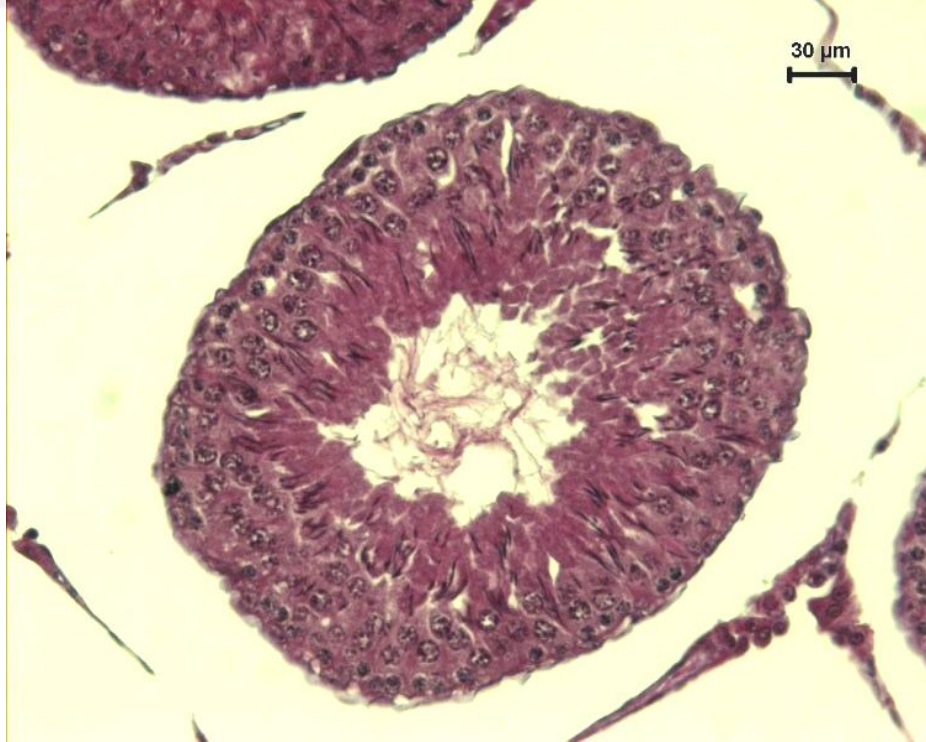
PCB grubundaki ratlarda tubulus lumenlerinin çok belirgin olmadığı ve bazı tubulus lumenlerine germ hücrelerinin döküldüğü gözlemlendi. Ayrıca tubulus çaplarında kontrol, sham kontrol ve ALA gruplarına göre küçülme, epitel katmandaki spermatogenik hücreler arasında ayrılma ve dökülmeler (Şekil 3.4) ile kapilar hiperemi tespit edildi.

ALA-PCB grubundaki genel histolojik görünüm kontrol, sham kontrol ve ALA gruplarına benzer olarak belirlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.4. PCB grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü (X: tubulus lumenine dökülen germ hücreleri, Ok : germ hücreleri arasında ayrılma ve dökülmeler).

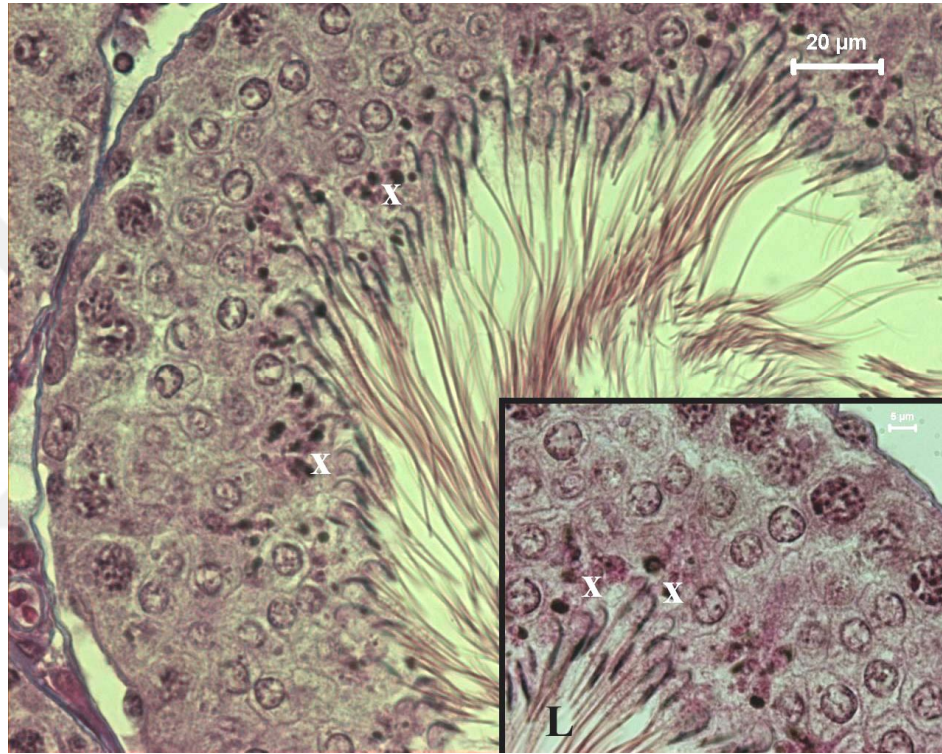
Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.



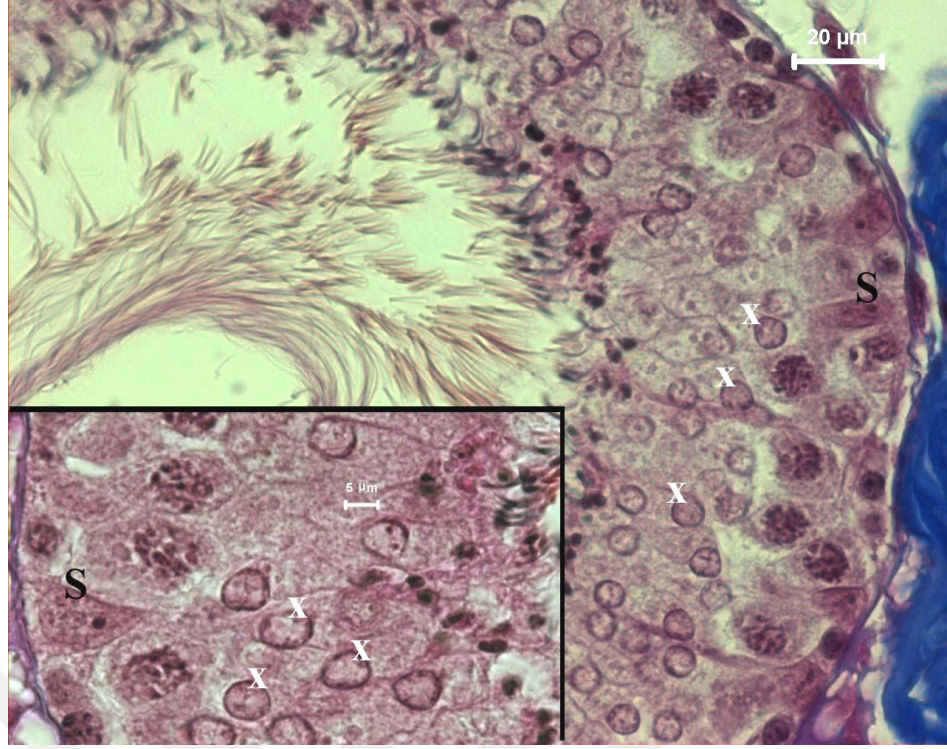
Şekil 3.5. ALA-PCB grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü.

Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.

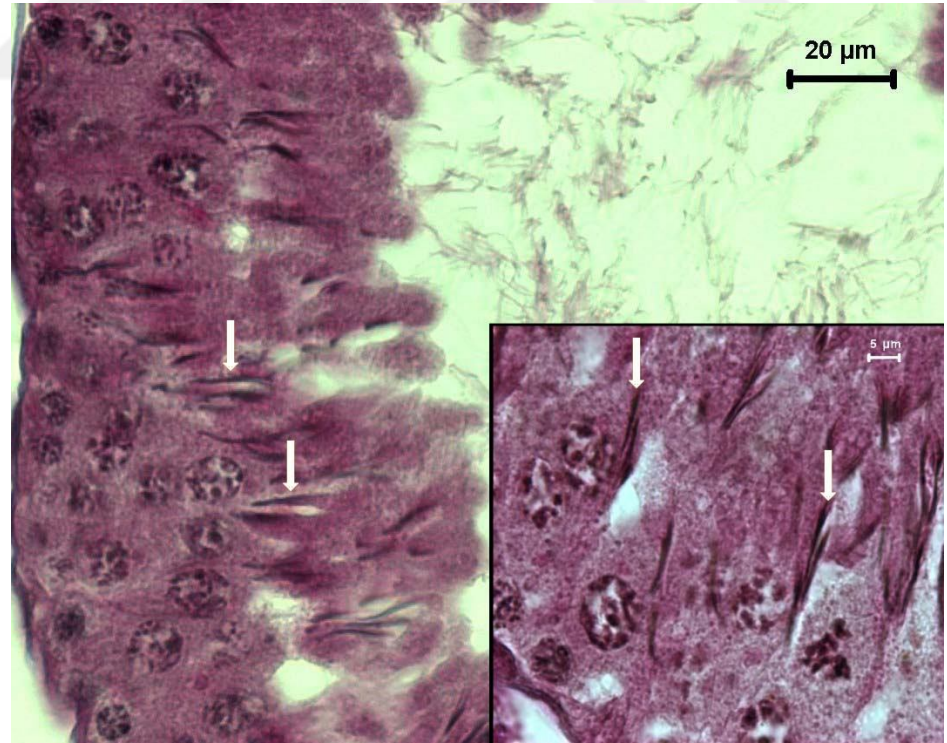
Gruplarda spermatogenik siklusun VII, VIII, XII, XIII ve XIV. dönemleri ayırt edildi. Siklusun VII. döneminde, tubulus lumeni sınırında 19. adımdaki nükleusu eğri spermatidler görüldü (Şekil 3.6). VIII. dönemde, sekizinci adım spermatidin nükleusunun sitoplazmanın bazal kutbuna doğru yerleştiği ve Sertoli hücrelerinin nükleusunun bazaldan uzaklaştığı tespit edildi (Şekil 3.7). XII. dönemde, 12. adım spermatidlerin sivri şekilde olduğu (Şekil 3.8) gözlemlendi. XIII. Dönemde, 13. adım spermatidlerin nükleusunun ventral tarafta çıkıntı yaptığı dikkati çekti (Şekil 3.9). XIV. dönemde ise mitotik figürler görüldü (Şekil 3.10).



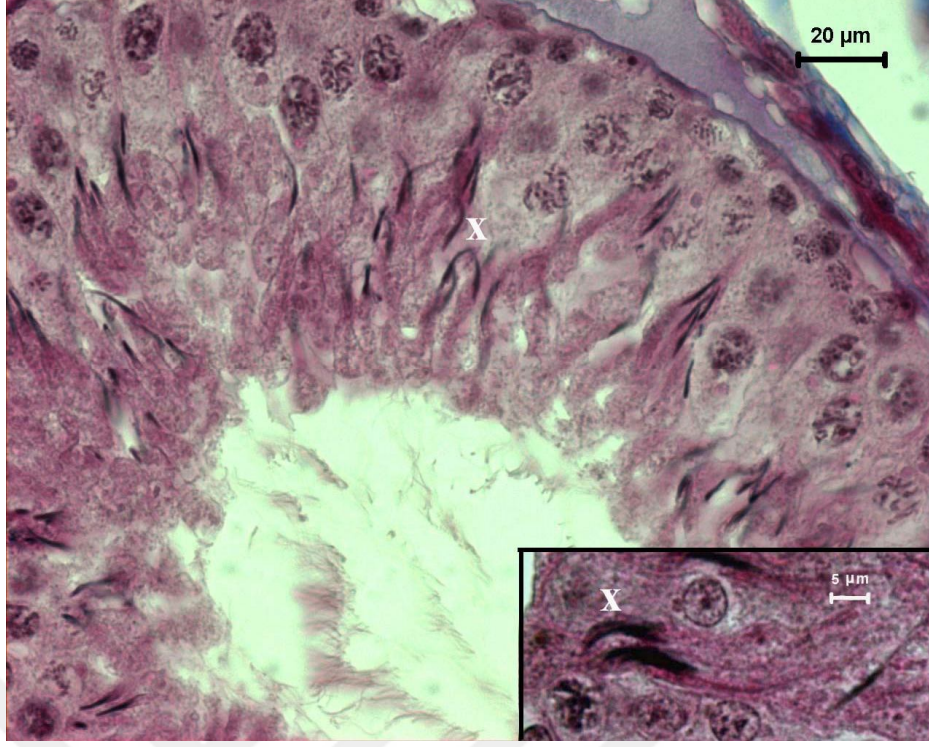
Şekil 3.6. Testis dokusunda VII. dönem tubulus görüntüsü (X: 19. adım nükleusu eğri spermatid, L: lumen). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.



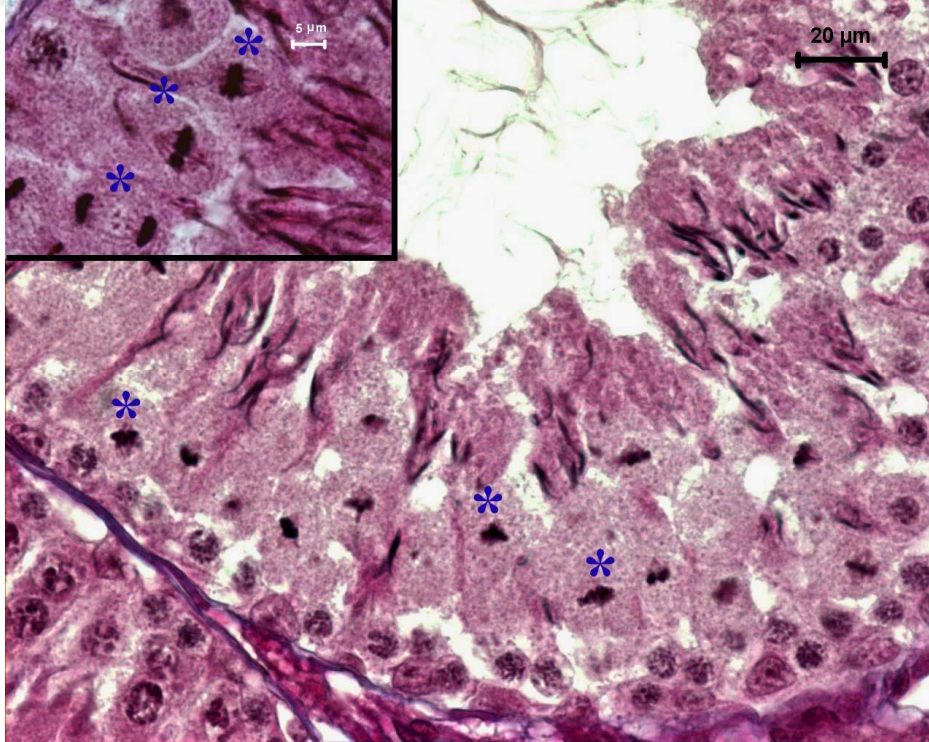
Şekil 3.7. Testis dokusunda VIII. dönem tubulus görüntüsü (X: sekizinci adım spermatid, S: Sertoli hücresi). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.



Şekil 3.8. Testis dokusunda XII. dönem tubulus görüntüsü (oklar: 12. adım spermatid). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.



Şekil 3.9. Testis dokusunda XIII. dönem tubulus görüntüsü (X: 13. adım spermatid)
Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.



Şekil 3.10. Testis dokusunda XIV. dönem tubulus görüntüsü (*: mitotik figürler).
Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.

3.2.1. Histolojik Değişimler

Gruplarda; tubulus seminiferus kontortuslarda subbazal vakuolizasyon, epitelial vakuolizasyon, epitelial dökülme, tubulus lumenine germ hücre dökülmesi ve kapilar hiperemi gibi normal histolojik görünümünden farklı görünümler dikkati çekti. Mikroskopta gözlenen bu değişimlerin subjektif olarak puanlanması ile elde edilen veriler; tubuluslarda subbazal vakuolizasyon için Çizelge 3.2, epitelial vakuolizasyon için Çizelge 3.3, epitelial dökülme için Çizelge 3.4, tubulus lumenine dökülen germ hücreleri için Çizelge 3.5 ve kapilar hiperemi için Çizelge 3.6'da verildi.

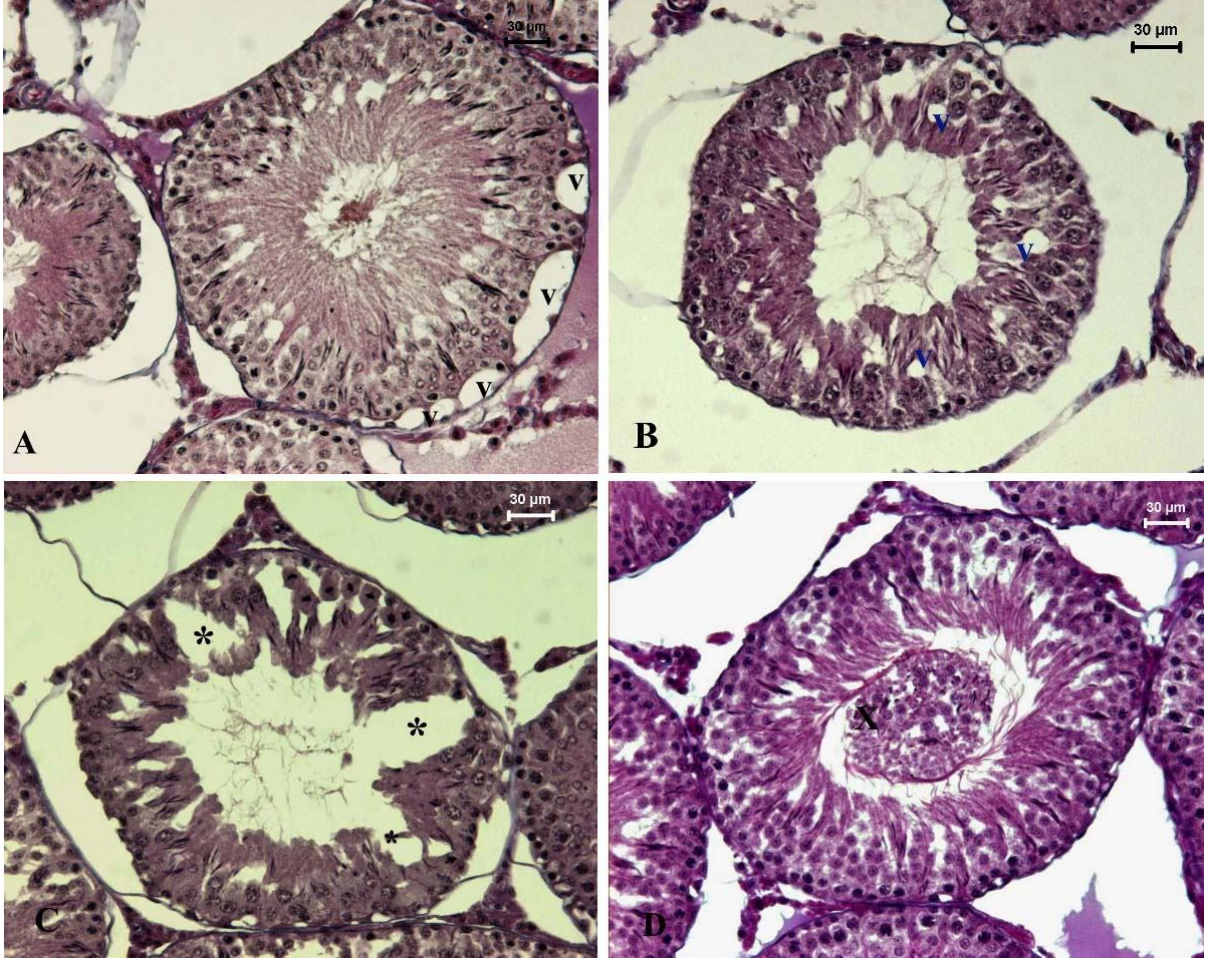
Subbazal vakuolizasyon için yapılan değerlendirilmede; PCB grubu ile kontrol, sham kontrol, ALA ve ALA-PCB grupları karşılaştırıldığında, PCB grubundaki subbazal vakuolizasyon artışının istatistiksel yönden anlamlı olduğu bulundu ($P<0.001$) (Şekil 3.11.A). Kontrol, sham kontrol, ALA ve ALA-PCB grupları arasında subbazal vakuolizasyon açısından istatistiksel olarak bir fark bulunmazken, ALA-PCB grubunda subbazal vakuolizasyonun PCB grubuna göre önemli oranda az olduğu belirlendi (Çizelge 3.2).

Epitelial vakuolizasyon (Şekil 3.11.B) açısından yapılan mikroskopik incelemede elde edilen veriler değerlendirildiğinde, gruplar arasında istatistiksel bir farklılığın olmadığı ($P>0.05$) tespit edildi (Çizelge 3.3).

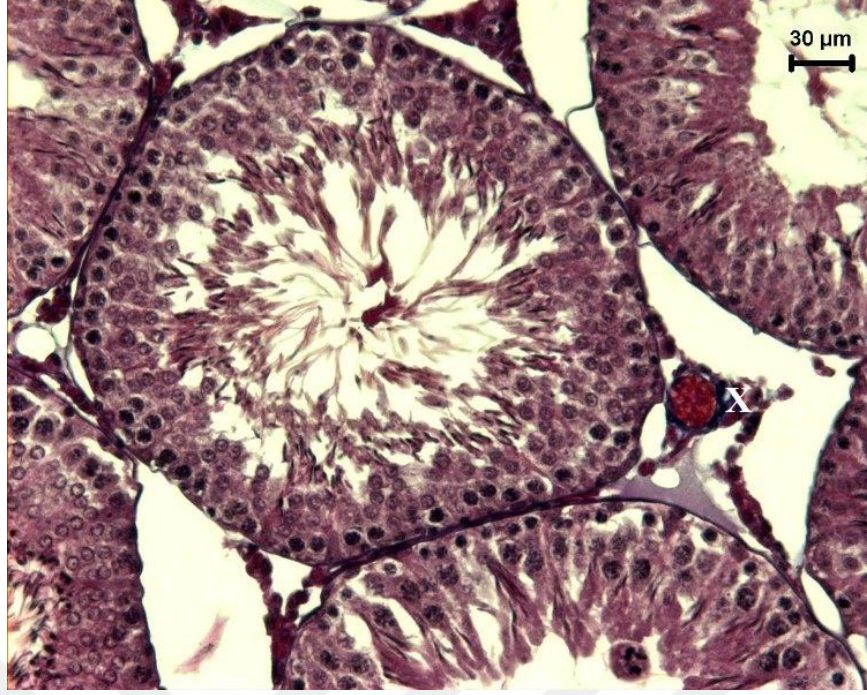
PCB grubunda gözlenen epitelial dökülmenin (Şekil 3.11.C), kontrol, sham kontrol, ALA ve ALA-PCB gruplarına göre istatistiksel olarak önemli oranda fazla olduğu ($P<0.001$) tespit edildi (Çizelge 3.4). Kontrol, ALA ve ALA-PCB grupları arasında istatistiksel yönden bir fark belirlenmezken, epitelial dökülmenin PCB grubuna göre ALA-PCB grubundaki azlığı anlamlı bulundu ($P<0.001$) (Çizelge 3.4). Sham kontrol grubunda da epitelde gözlenen ayrılma ve dökülmelerin kontrol, ALA, ALA-PCB gruplarından fazla olduğu ($P<0.001$) dikkati çekti.

Gruplar arasında tubulus lumenine dökülen germ hücreleri yönünden karşılaştırma yapıldığında kontrol, sham kontrol ve ALA grupları, arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Bunun yanında PCB grubunda diğer gruplara göre belirlenen artış anlamlı olduğu belirlendi ($P<0.001$) (Şekil 3.11.D). ALA-PCB grubunda ise diğer gruplara göre önemli derecede bir azalma belirlendi ($P<0.001$) (Çizelge 3.5).

Gruplar arasında kapilar hiperemi yönünden yapılan incelemede; PCB grubunda elde edilen verilerin (Şekil 3.12), diğer gruplara göre istatistiksel yönden yüksek olduğu tespit edildi ($P<0.05$). ALA-PCB grubu ile kontrol, sham kontrol ve ALA grupları arasında ise istatistiksel bir fark bulunmadı (Çizelge 3.6).



Şekil 3.11. PCB grubuna ait testis dokusunda gözlenen histolojik değişimler (A-D). A. Subbazal vakuolizasyon (V). B. Epiteliyal vakuolizasyon (V). C. Epiteliyal dökülme (*). D. Tubulus lumenine dökülen germ hücreleri (X). Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.



Şekil 3.12. PCB grubuna ait testis dokusunda kapilar hiperemi (X: kapilar hiperemi).
Crossman'ın üçlü boyama yöntemi

Çizelge 3.2. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında subbazal vakuolizasyon.

Grup	n	Subbazal Vakuolizasyon	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	
Kontrol	7	$0.95 (1.00) \pm 0.13^b$	***
Sham kontrol	8	$0.73 (0.50) \pm 0.11^b$	
PCB	8	$1.95 (2.00) \pm 0.14^a$	
ALA	8	$0.78 (1.00) \pm 0.08^b$	
ALA-PCB	8	$0.59 (0.00) \pm 0.09^b$	

***: $P < 0.001$

Çizelge 3.3. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında epiteliyal vakuolizasyon.

Grup	n	Epiteliyal Vakuolizasyon	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	
Kontrol	7	$0.29 (0.00) \pm 0.08$	ÖD
Sham kontrol	8	$0.31 (0.00) \pm 0.06$	
PCB	8	$0.33 (0.00) \pm 0.08$	
ALA	8	$0.44 (0.00) \pm 0.08$	
ALA-PCB	8	$0.38 (0.00) \pm 0.08$	

ÖD: Önemli değil.

Çizelge 3.4. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında epitelial dökülme.

Grup	n	Epitelial Dökülme	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	
Kontrol	7	0.98 (1.00) $\pm$ 0.14 ^c	***
Sham kontrol	8	1.39 (1.00) $\pm$ 0.09 ^b	
PCB	8	2.05 (2.00) $\pm$ 0.13 ^a	
ALA	8	0.95 (1.00) $\pm$ 0.11 ^c	
ALA-PCB	8	0.69 (0.00) $\pm$ 0.11 ^c	

***: P<0.001

Çizelge 3.5. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında tubuler lumene hücre dökülmesi.

Grup	n	Tubuler Lumene Germ Hücre Dökülmesi	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	
Kontrol	7	0.50 (0.00) $\pm$ 0.10 ^b	***
Sham kontrol	7	0.47 (0.00) $\pm$ 0.11 ^b	
PCB	8	1.34 (1.00) $\pm$ 0.14 ^a	
ALA	8	0.50 (0.00) $\pm$ 0.08 ^b	
ALA-PCB	8	0.05 (0.00) $\pm$ 0.03 ^c	

***: P<0.001

Çizelge 3.6. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında kapılar hiperemi.

Grup	n	Kapılar hiperemi	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	
Kontrol	7	0.98 (1.00) $\pm$ 0.09 ^b	*
Sham kontrol	7	0.97 (1.00) $\pm$ 0.11 ^b	
PCB	8	1.39 (1.00) $\pm$ 0.11 ^a	
ALA	8	1.00 (1.00) $\pm$ 0.09 ^b	
ALA-PCB	8	1.00 (0.00) $\pm$ 0.10 ^b	

*: P<0.05

3.2.2. Histometrik Değişimler

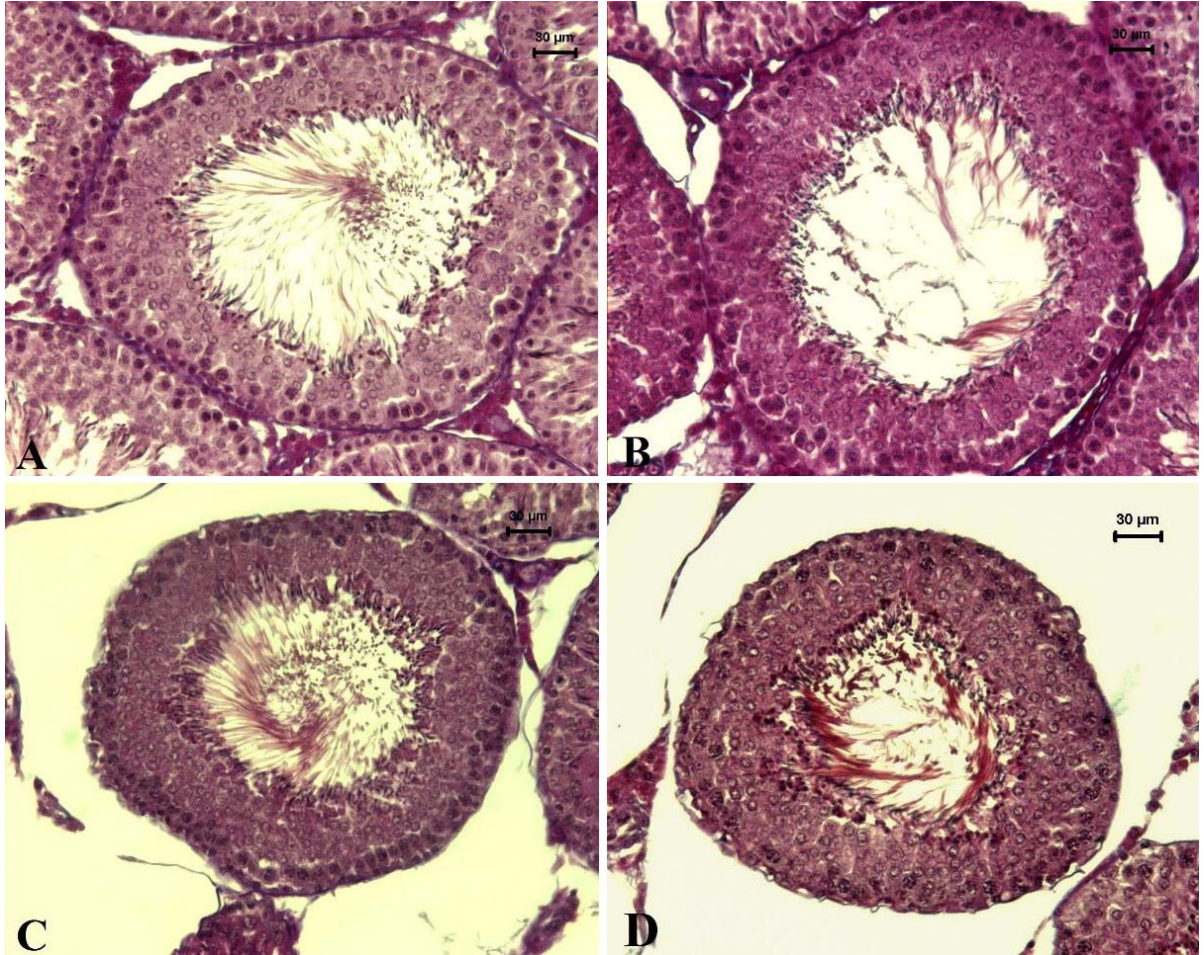
Bütün gruplarda VII-VIII. dönem ve XII-XIV. dönem seminifer tubul çapları (Çizelge 3.7, Çizelge 3.8), seminifer epitel yükseklikleri (Çizelge 3.7, Çizelge 3.8) ve XIV. dönem tubulus % yoğunluğu (Çizelge 3.9) belirlendi.

Kontrol (Şekil 3.13.A), sham kontrol (Şekil 3.13.B) ve deneme grupları arasında VII- VIII. dönem seminifer tubulus çapı karşılaştırıldığında, PCB (Şekil 3.13.C) ve ALA-PCB (Şekil 3.13.D) grubunda gözlenen azalmanın, istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi (P<0.001). Epitel yüksekliği açısından yapılan incelemede ise gruplar arası farkın önemsiz olduğu tespit edildi (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait VII-VIII. dönem seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği değerleri.

GRUP	n	VII-VIII. Dönem Seminifer Tubulus Çapı (μm) ($\bar{x} \pm S_x$)	P	VII-VIII. Dönem Seminifer Tubulus Epitel Yüksekliği (μm) ($\bar{x} \pm S_x$)	P
Kontrol	7	274.53 ± 2.57^a	***	71.21 ± 0.74	ÖD
Sham kontrol	8	277.95 ± 2.50^a		70.99 ± 0.66	
PCB	8	262.91 ± 2.53^b		71.71 ± 0.59	
ALA	8	274.43 ± 2.22^a		70.67 ± 0.71	
ALA-PCB	8	262.35 ± 2.54^b		70.98 ± 0.62	

ÖD: Önemli değil, ***: $P < 0.001$



Şekil 3.13. Kontrol (A), Sham kontrol (B), PCB (C) ve ALA-PCB (D) grubuna ait testis dokusunda VII-VIII. dönem tubulus görüntüsü. Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.

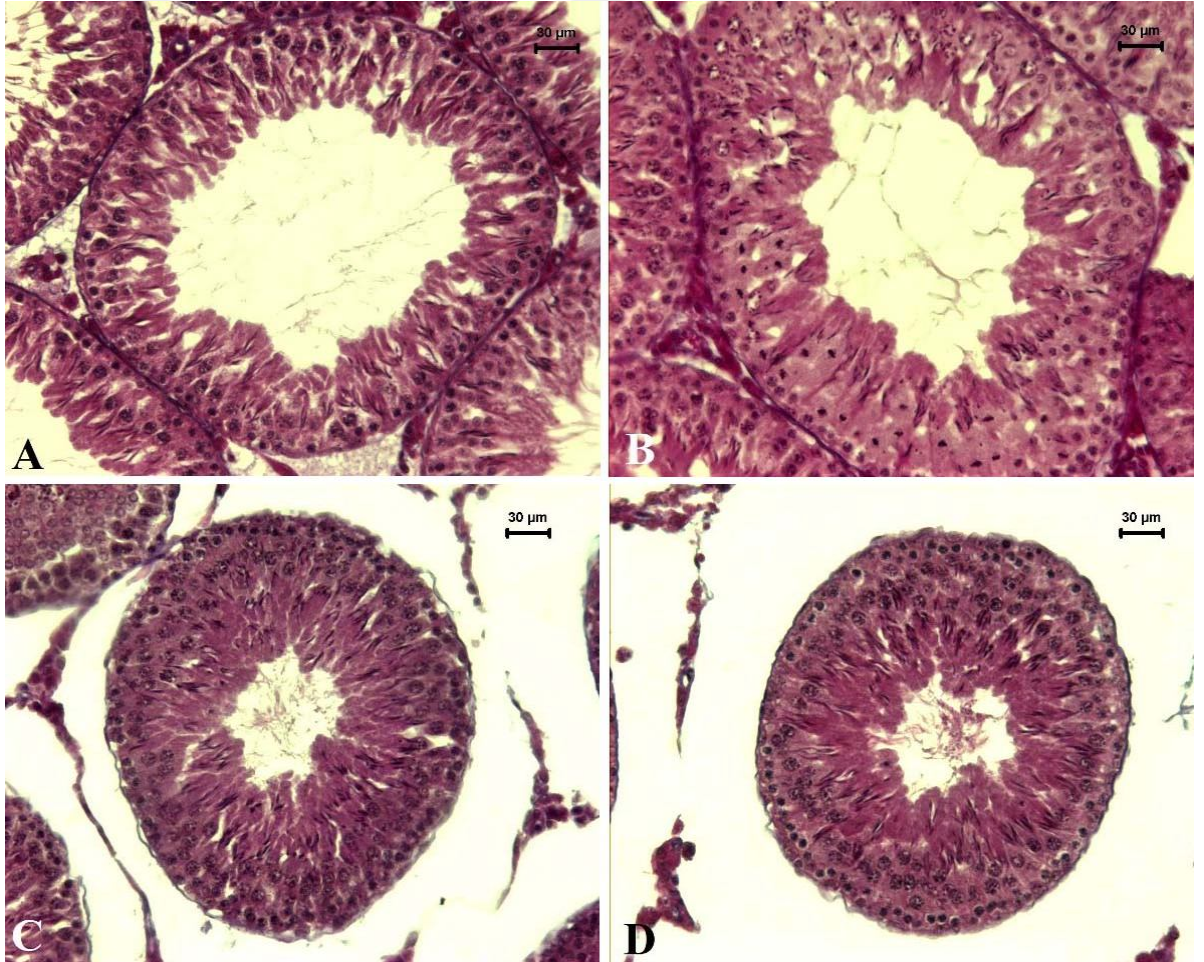
XII-XIV. dönem seminifer tubulus çapı açısından deneme grupları ile kontrol (Şekil 3.14.A) ve sham kontrol (Şekil 3.14.B) grubu karşılaştırıldığında PCB (Şekil 3.14.C) ve ALA-PCB (Şekil 3.14.D) grubunda gözlenen azalmanın önemli olduğu

($P < 0.001$), belirlendi. Epitel yüksekliği açısından ise gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmedi (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait XII-XIV. dönem seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği değerleri.

GRUP	n	XII-XIV. Dönem Seminifer Tubulus Çapı (μm) ($\bar{x} \pm S_x^-$)	P	XII-XIV. Dönem Seminifer Tubulus Epitel Yüksekliği (μm) ($\bar{x} \pm S_x^-$)	P
Kontrol	7	250.85 ± 2.56^a	***	79.76 ± 0.90	ÖD
Sham kontrol	8	251.24 ± 2.37^a		77.77 ± 0.77	
PCB	8	238.34 ± 2.17^b		77.55 ± 0.71	
ALA	8	248.59 ± 2.43^a		79.60 ± 0.85	
ALA-PCB	8	233.91 ± 2.11^b		78.07 ± 0.69	

ÖD: Önemli değil, ***: $P < 0.001$



Şekil 3.14. Kontrol (A), Sham kontrol (B), PCB (C) ve ALA-PCB (D) grubuna ait testis dokusunda XII-XIV. dönem tubulus görüntüsü. Crossman'ın üçlü boyama yöntemi.

Kontrol, sham kontrol ve deneme grupları arasında XIV. dönem tubulus % yoğunluk değerinin sayısal olarak en az PCB grubunda olduğu belirlense de, gruplar arası farkın önemsiz olduğu dikkati çekti (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait XIV. dönem tubulus % yoğunluk değerleri.

GRUP	n	XIV. Dönem Tubulus Yoğunluğu	P	XIV. Dönem Tubulus % Yoğunluğu	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	
Kontrol	7	6.57 (6.00) $\pm$ 0.61	ÖD	3.29	ÖD
Sham kontrol	8	5.63 (4.00) $\pm$ 1.43		2.80	
PCB	8	3.25 (4.00) $\pm$ 0.67		1.63	
ALA	8	5.38 (5.50) $\pm$ 0.73		2.69	
ALA-PCB	8	4.75 (5.00) $\pm$ 0.84		2.38	

ÖD: Önemli değil

3.3. Histokimyasal Bulgular

Gruplarda apoptozis yoğunluğunun gösterilmesi için TUNEL yöntemi uygulandı. Kahverengi presipitasyon, reaksiyon pozitif olarak değerlendirildi.

3.3.1. Apoptozis Yoğunluğunun Değerlendirilmesi

Bütün gruplarda, TUNEL pozitif reaksiyon veren apoptotik hücreler gözlenerek elde edilen tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı ve en az bir adet apoptotik hücre içeren tubuluslar belirlenerek hesaplanan % TUNEL pozitif tubulus değerleri sırasıyla Çizelge 3.10 ve Çizelge 3.11’de verildi.

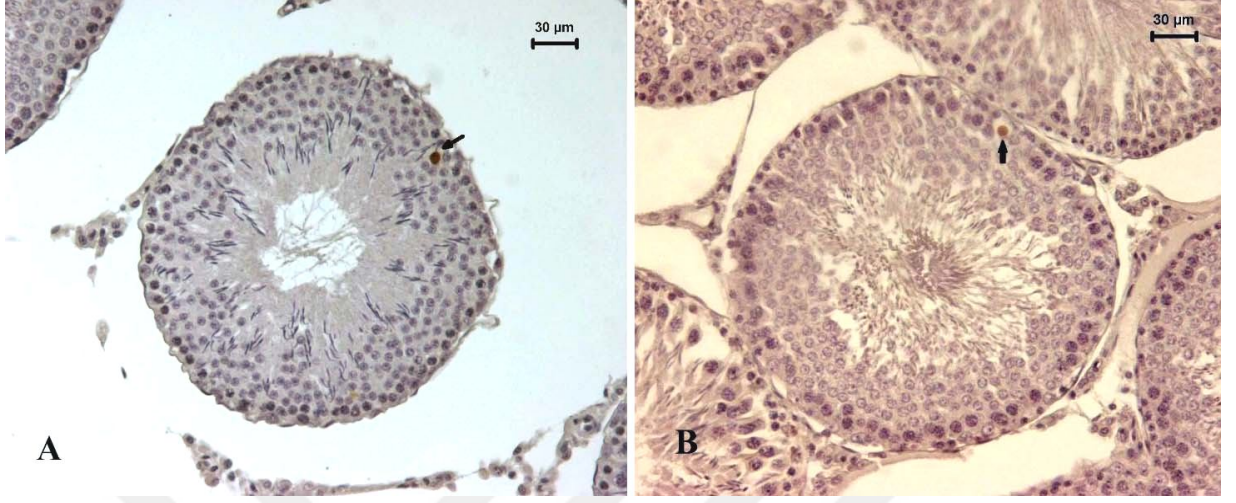
Çizelge 3.10. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında seminifer tubul başına düşen apoptotik hücre sayısı.

Grup	n	Tubulus Başına Düşen Apoptotik Hücre Sayısı	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	
Kontrol	7	0.28 (0.33) $\pm$ 0.05 ^b	*
Sham kontrol	7	0.27 (0.25) $\pm$ 0.04 ^b	
PCB	8	0.46 (0.46) $\pm$ 0.04 ^a	
ALA	8	0.26 (0.25) $\pm$ 0.05 ^b	
ALA-PCB	8	0.29 (0.31) $\pm$ 0.02 ^b	

*: P<0.05

Kontrol (Şekil 3.15.A) ve sham kontrol (Şekil 3.15.B) ve ALA gruplarında da apoptotik hücreler tespit edilmekle beraber, PCB grubunda (Şekil 3.16) seminifer tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısının diğer gruplara göre önemli derecede artış gösterdiği

belirlendi ($P<0.05$) (Çizelge 3.10). ALA-PCB grubunda belirlenen tubulus başına düşen apoptotik hücre verisinin kontrol, sham kontrol ve ALA grubuna göre istatistiksel anlamda farklı olmadığı saptandı (Çizelge 3.10).



Şekil 3.15. Kontrol grubuna (A) ve sham kontrol (B) grubuna ait tubulus seminiferus kontortusta gözlenen apoptotik hücreler (ok). TUNEL yöntemi.



Şekil 3.16. PCB grubuna ait tubulus seminiferus kontortusta gözlenen apoptotik hücreler (oklar). TUNEL yöntemi.

PCB grubunda en az bir adet apoptotik hücre içeren tubulus sayısı ve % TUNEL pozitif tubulus değerleri diğer gruplara göre anlamlı derecede ($P<0.001$) yüksek tespit edildi. Kontrol, sham kontrol, ALA ve ALA-PCB grupları arasında ise istatistiksel bir fark saptanmadı. (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında en az bir adet apoptotik hücre içeren tubulus sayısı.

Grup	n	En Az Bir Adet Apoptotik Hücre İçeren Tubulus Sayısı	% Tunel Pozitif Tubulus Değeri	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	***
Kontrol	7	14.23 (16.00) $\pm$ 1.94 ^b	7.12 ^b	
Sham kontrol	7	13.38 (13.00) $\pm$ 0.91 ^b	6.69 ^b	
PCB	8	21.56 (21.00) $\pm$ 1.13 ^a	10.78 ^a	
ALA	8	13.44 (12.50) $\pm$ 1.98 ^b	6.72 ^b	
ALA-PCB	8	13.38 (13.00) $\pm$ 1.01 ^b	6.69 ^b	

***: $P<0.001$

3.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

Bütün gruplarda hemoksigenaz-1 (HO-1) enzimi, immunohistokimyasal olarak (sABC) belirlendi.

3.4.1. Hem Oksigenaz-1 Yoğunluğunun Değerlendirilmesi

Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait kesitlerde, subjektif olarak puanlanan HO-1 boyanma yoğunluğu değerleri, Çizelge 3.12’de gösterildi.

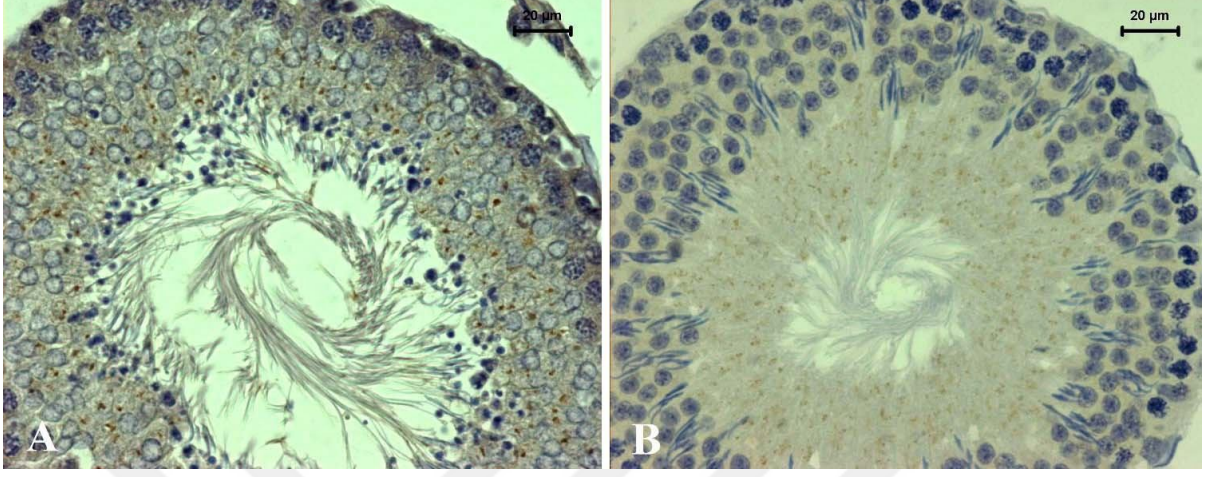
Çizelge 3.12. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait HO-1 boyanma yoğunluğu.

Grup	n	HO-1 yoğunluğu	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	***
Kontrol	7	1.76 (2.00) $\pm$ 0.08 ^b	
Sham kontrol	8	1.65 (2.00) $\pm$ 0.07 ^b	
PCB	8	2.00 (2.00) $\pm$ 0.07 ^{ac}	
ALA	7	1.83 (2.00) $\pm$ 0.09 ^{bc}	
ALA-PCB	8	2.10 (2.00) $\pm$ 0.07 ^a	

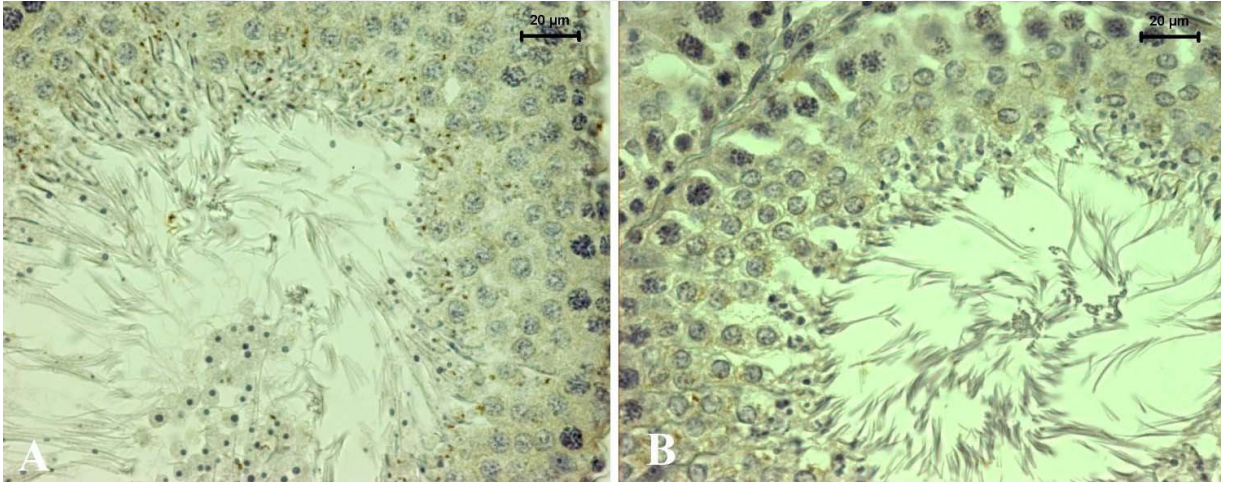
***: $P<0.001$

PCB ve ALA-PCB grubunda (Şekil 3.17) HO-1 yoğunluğunun, kontrol ve sham kontrol grubundaki hücrelerde belirlenen HO-1 boyanma yoğunluğundan (Şekil 3.18), önemli oranda yüksek olduğu ($P<0.001$) tespit edildi (Çizelge 3.12). ALA grubunda

belirlenen HO-1 boyanma yoğunluğu, hem kontrol ve sham kontrol grubuna, hem de PCB grubuna benzer olarak belirlendi(Çizelge 3.12).



Şekil 3.17. PCB (A) ve ALA-PCB (B) grubuna ait tubulus seminiferus kontortusta HO-1 pozitif hücreler (kahverengi presipitasyonlar). sABC boyama yöntemi.



Şekil 3.18. Kontrol (A) ve sham kontrol (B) grubuna ait tubulus seminiferus kontortusta HO-1 pozitif hücreler (kahverengi presipitasyonlar). sABC boyama yöntemi.

3.5. Biyokimyasal Bulgular

Kontrol ve sham kontrol grubu ratlar ile deneme gruplarında belirlenen serum testosteron değerleri, serum ve testis dokusu total oksidan ve total antioksidan seviyelerine ait değerler sırasıyla Çizelge 3.13, 3.14 ve 3.15’de verildi.

3.5.1. Serum Testosteron Değeri

Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarının serum testosteron değerleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı (Çizelge 3.13).

Çizelge 3.13. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait serum testosteron değerleri.

GRUP	n	Serum Testosteron Değeri (ng/ml) ($\bar{x} \pm S_x$)	P
Kontrol	8	2.98 $\pm$ 0.21	ÖD
Sham kontrol	8	2.86 $\pm$ 0.11	
PCB	8	3.17 $\pm$ 0.28	
ALA	8	2.94 $\pm$ 0.20	
ALA-PCB	8	3.07 $\pm$ 0.16	

ÖD: Önemli değil

3.5.2. Serum ve Testis Dokusu Total Oksidan Seviyesi (TOS)

Serum ve testis dokusunda belirlenen total oksidan seviyeleri, Çizelge 3.14’de gösterildi.

Serumda total oksidan seviyesinin PCB grubunda diğer gruplara göre önemli oranda yüksek olduğu belirlendi ($P < 0.001$) (Çizelge 3.14). ALA-PCB grubundaki serum total oksidan seviyesinin kontrol ve sham kontrol grubundan sayısal fazlalığının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi.

Kontrol ve sham kontrol grubuna ait ratların testis dokusu total oksidan seviyesi deneme grupları ile karşılaştırıldığında, PCB grubundaki fazlalığın önemli olduğu belirlendi ($P < 0.001$) (Çizelge 3.14). ALA-PCB grubundaki testis dokusu total oksidan seviyesinin PCB grubu değerinden düşük olmasının da istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($P < 0.001$) (Çizelge 3.14). Kontrol ile sham kontrol değerleri arasında, farklılığın olmadığı saptandı (Çizelge 3.14). Yine sham kontrol ile ALA ve ALA-PCB gruplarına ait değerlerin farklılıklarının önemli olmadığı dikkati çekti (Çizelge 3.14).

Çizelge 3.14. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait serum ve testis dokusu total oksidan seviyesi.

GRUP	n	Serum Total Oksidan Değeri ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./g protein) ($\bar{x} \pm S_x^-$)	P	Testis Dokusu Total Oksidan Seviyesi ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./g protein) ($\bar{x} \pm S_x^-$)	P
Kontrol	8	4.59 ± 0.44^b	***	0.42 ± 0.01^c	***
Sham kontrol	8	4.51 ± 0.47^b		$0.48 \pm 0.01^{b,c}$	
PCB	8	8.03 ± 0.75^a		0.60 ± 0.03^a	
ALA	8	4.95 ± 0.21^b		0.51 ± 0.02^b	
ALA-PCB	8	5.97 ± 0.43^b		0.53 ± 0.03^b	

***: P<0.001

3.5.3. Serum ve Testis Dokusu Total Antioksidan Seviyesi (TAS)

Serum ve testis dokusu total antioksidan seviyeleri bakımından deneme grupları ile kontrol ve sham kontrol grubu karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmedi. Bununla beraber PCB grubundaki ratların serum ve testis dokusu total antioksidan seviyelerinin, diğer gruplara göre rakamsal olarak düşük olduğu belirlendi (Çizelge 3.15).

Çizelge 3.15. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait serum ve testis dokusu total antioksidan seviyesi.

GRUP	n	Serum Total Antioksidan Seviyesi (mmol Trolox Equiv./L) ($\bar{x} \pm S_x^-$)	P	Testis Dokusu Total Antioksidan Seviyesi (mmol Trolox Equiv./L) ($\bar{x} \pm S_x^-$)	P
Kontrol	8	109.10 ± 9.90	ÖD	25.40 ± 1.64	ÖD
Sham kontrol	8	111.73 ± 12.40		29.13 ± 3.41	
PCB	8	87.63 ± 2.83		23.78 ± 3.01	
ALA	8	98.93 ± 15.46		26.28 ± 3.11	
ALA-PCB	8	98.25 ± 6.93		25.94 ± 0.84	

ÖD: Önemli değil

3.6. Moleküler Biyolojik Bulgular

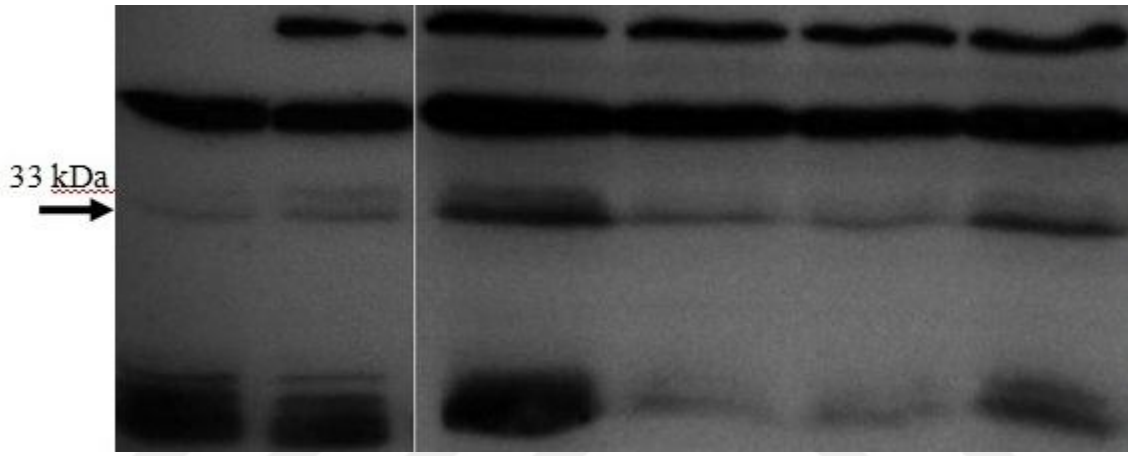
Kontrol ve sham kontrol grubu ratlar ile deneme gruplarında Western blot yöntemi ile elde edilen bant kalınlıklarına göre belirlenen HO-1 yoğunluğu Çizelge 3.16’de verildi.

Yapılan istatistiksel incelemede kontrol (Şekil 3.19), sham kontrol (Şekil 3.20), PCB (Şekil 3.21), ALA (Şekil 3.22) ve ALA-PCB (Şekil 3.23) grupları arasında anlamlı bir farklılık belirlenmedi (Çizelge 3.16).

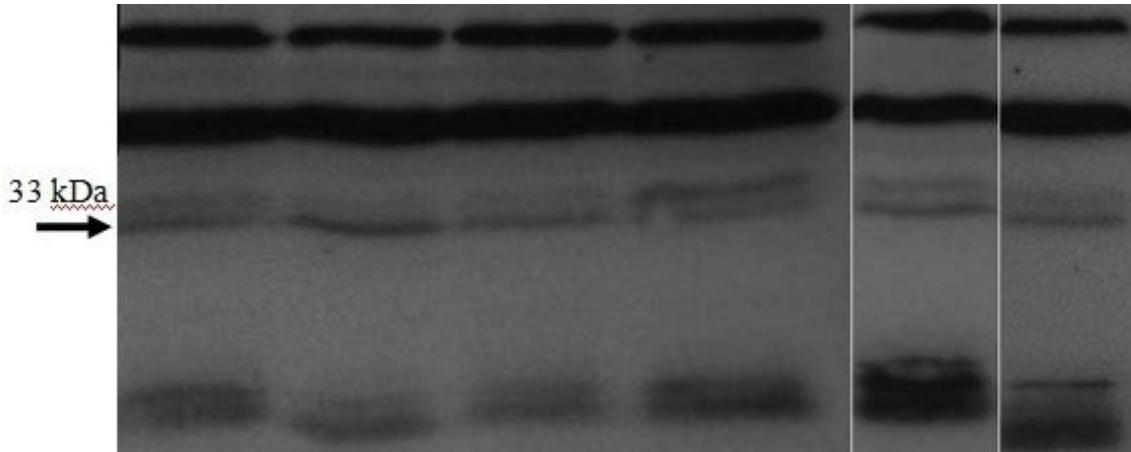
Çizelge 3.16. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait HO-1 yoğunlukları (Western blot yöntemi).

GRUP	n	HO-1 yoğunluğu (br)	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x^-)$	
Kontrol	6	6.88 (6.74) $\pm$ 0.63	ÖD
Sham kontrol	6	7.92 (7.69) $\pm$ 0.69	
PCB	6	6.89 (6.34) $\pm$ 0.43	
ALA	6	7.37 (7.37) $\pm$ 0.06	
ALA-PCB	6	7.03 (6.92) $\pm$ 0.14	

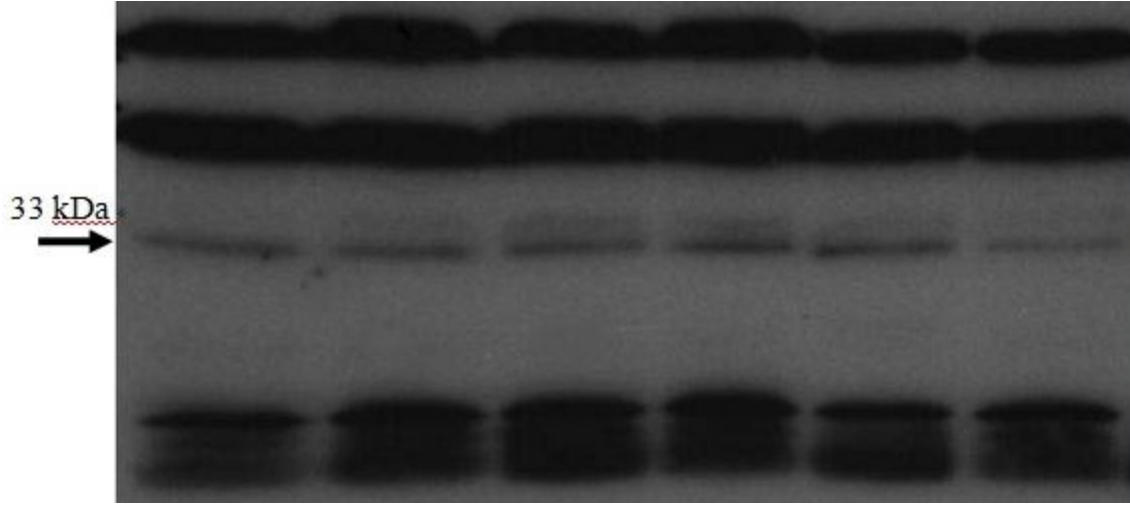
ÖD: Önemli değil



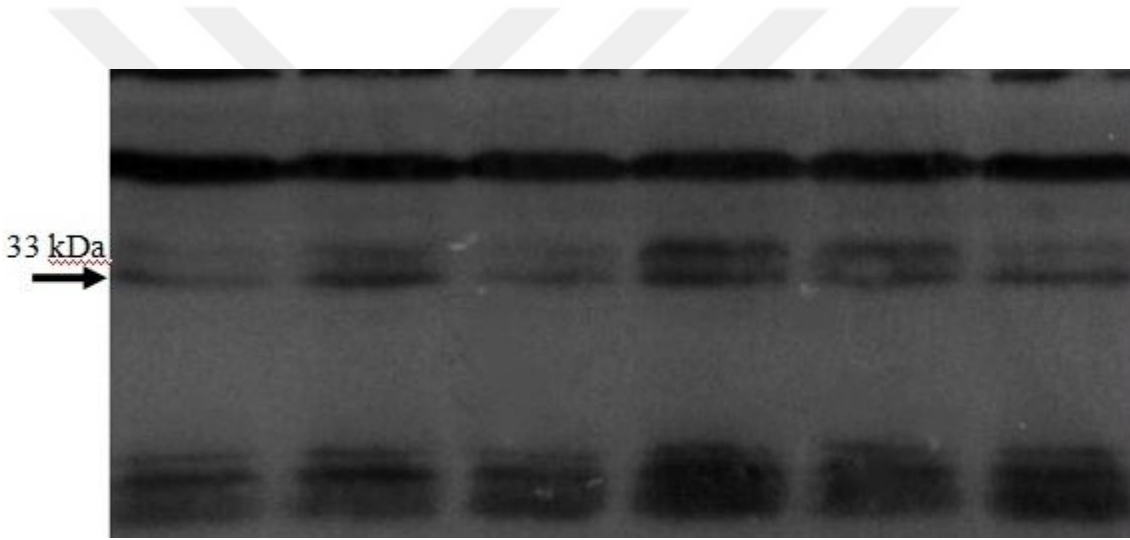
Şekil 3.19. Kontrol grubuna ait HO-1 bantları (n=6).



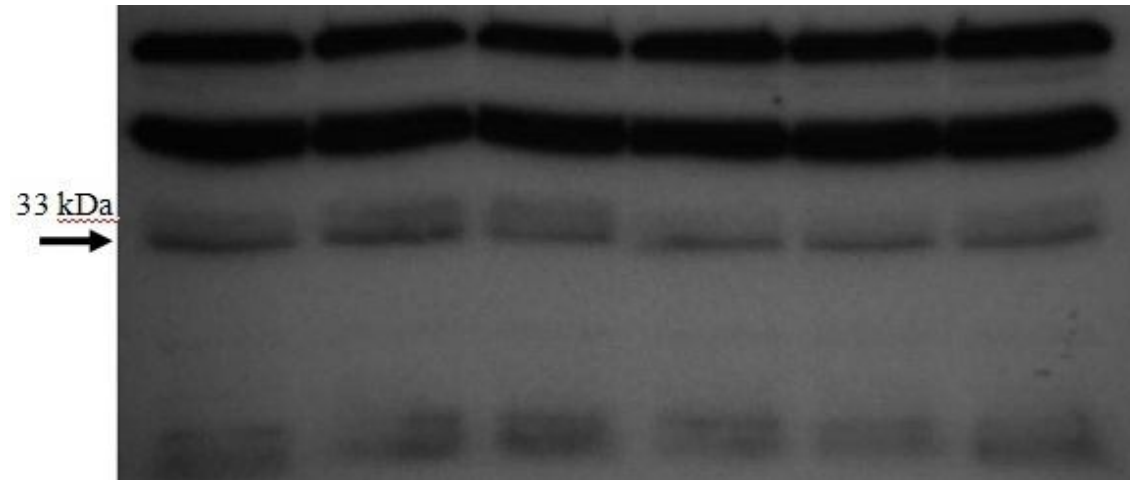
Şekil 3.20. Sham kontrol grubuna ait HO-1 bantları (n=6).



Şekil 3.21. PCB grubuna ait HO-1 bantları (n=6).



Şekil 3.22. ALA grubuna ait HO-1 bantları (n=6).



Şekil 3.23. ALA-PCB grubuna ait HO-1 bantları (n=6).

3.7. Sitolojik Bulgular

Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında epididimisten hazırlanan ve eozin-nigrosin boyama tekniği ile boyanan sperma frotileri mikroskopik olarak incelendiler.

3.7.1. Spermatozoon Morfolojisinin Değerlendirilmesi

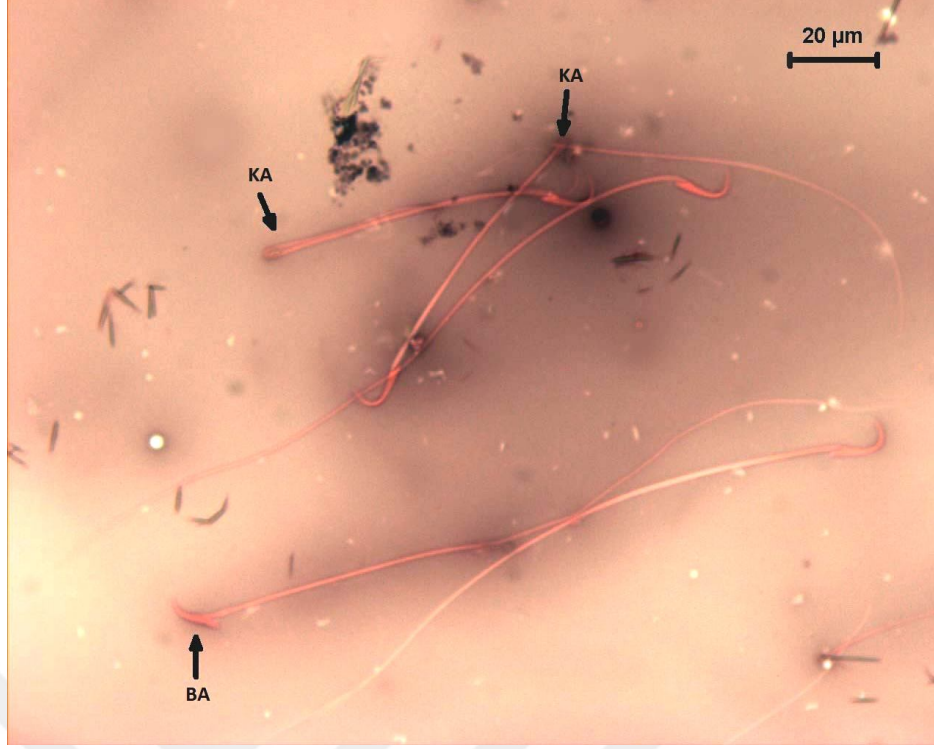
Spermatozoonların kanca şeklinde olan baş kısmı ile kuyruk kısmı morfolojik yönden değerlendirildi. Anormal spermatozoonlar baş ve kuyruk anormallikleri ile (Şekil 3.24, Şekil 3.25) normal olanlardan (Şekil 3.26) ayırt edildiler. Kontrol ve deneme gruplarında sayılan 200 adet spermatozoondaki anormal spermatozoon sayısı ve % anormalite değeri halinde Çizelge 3.17’de gösterildi.

Çizelge 3.17. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait anormal spermatozoon oranı.

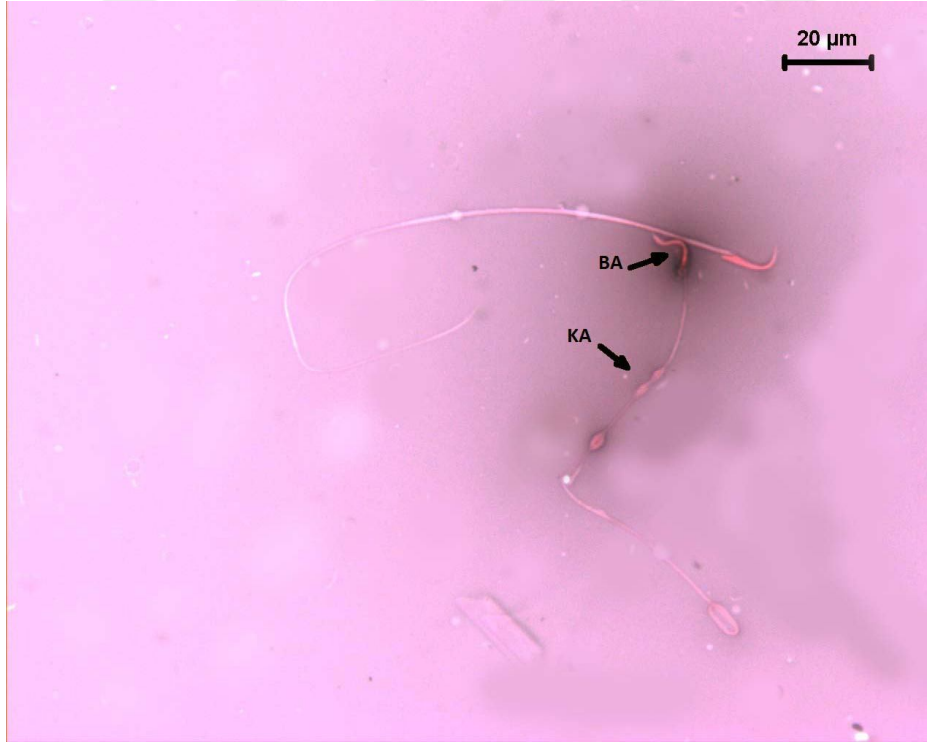
Grup	n	Anormal Spermatozoon Sayısı	% Anormalite	P
		$(\bar{x} (Md) \pm S_x)$		
Kontrol	8	6.00 (6.00) $\pm$ 1.21 ^{bc}	3.00 ^{bc}	**
Sham kontrol	8	4.00 (4.50) $\pm$ 0.85 ^c	2.00 ^c	
PCB	8	13.75 (10.00) $\pm$ 2.89 ^a	6.88 ^a	
ALA	8	8.13 (9.00) $\pm$ 1.36 ^{ba}	4.07 ^{ba}	
ALA-PCB	5	14.40 (16.00) $\pm$ 3.19 ^a	7.20 ^a	

** : P<0.01

Kontrol ve sham kontrol grupları ile deneme grupları anormal spermatozoon açısından karşılaştırıldığında PCB ve ALA-PCB gruplarında tespit edilen değerlerin anlamlı oranda yüksek olduğu bulundu (P<0.01). Kontrol grubuna göre ALA grubundaki ratların anormal spermatozoon oranında gözlenen artışın istatistiksel anlamda önemsiz olduğu belirlendi (Çizelge 3.17).

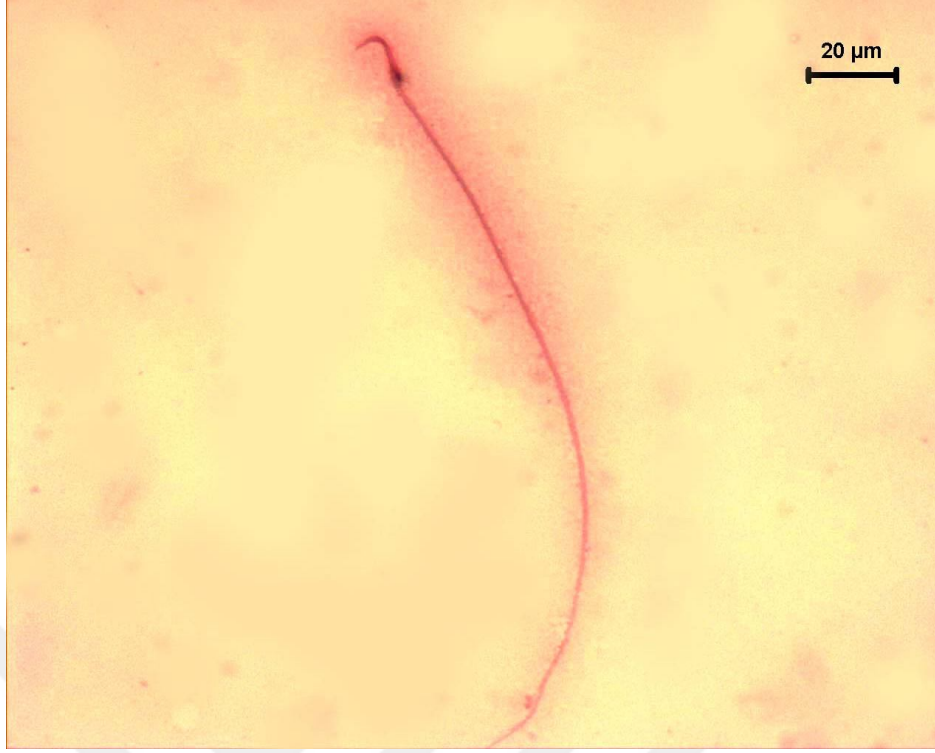


Şekil 3.24. PCB grubuna ait sperma frotisinde anormal spermatozoon görüntüsü (oklar). BA: Baş anormalliği, KA: Kuyruk anormalliği. Eozin-nigrosin boyama yöntemi.



Şekil 3.25. ALA-PCB grubuna ait sperma frotisinde anormal spermatozoon görüntüsü (oklar). BA: Baş anormalliği, KA: Kuyruk anormalliği.

Eozin-nigrosin boyama yöntemi.



Şekil 3.26. Kontrol grubuna ait sperma froti görüntüsü.
Eozin-nigrosin boyama yöntemi.

3.8. Korelasyon Analizi

Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında serum ve testis dokusu total oksidan seviyesi, serum ve testis dokusu total antioksidan seviyesi, serum testosteron değerleri, % TUNEL pozitif tubulus oranı, HO-1 yoğunluğu ve anormal spermatozoon sayısı arasında yapılan korelasyon analizi Çizelge 3.18’de gösterildi.

Serum total oksidan seviyesi ile testis dokusu total oksidan seviyesi arasında önemli derecede pozitif korelasyon belirlendi ($P<0,05$) (Çizelge 3.18).

Testis dokusu total oksidan seviyesi ile tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı arasında ve testis dokusu total oksidan seviyesi ile anormal spermatozoon sayısı arasında belirlenen pozitif korelasyon istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$) (Çizelge 3.18).

Mikroskopik düzeyde belirlenen HO-1 yoğunluğu ile anormal spermatozoon sayısı arasındaki pozitif korelasyonun da istatistiksel açıdan anlamlı olduğu görüldü ($P<0,05$) (Çizelge 3.18).

Çizelge 3.18. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında serum ve testis dokusu total oksidan seviyesi, serum ve testis dokusu total antioksidan seviyesi, serum testosteron değerleri, % TUNEL pozitif tubulus oranı, HO-1 yoğunluğu ve anormal spermatozoon sayısı arasında korelasyon analizi.

	Serum TOS	Testis Dokusu TOS	Serum TAS	Testis Dokusu TAS	Serum Testosteron Değeri	Tubulus Başına Düşen Apoptotik Hücre Sayısı	HO-1 Yoğunluğu	Anormal Spermatozoon Sayısı
Serum TOS	1	0.384*	-0.222	-0.043	-0.183	0.318	-0.124	0.232
Testis Dokusu TOS	0.384*	1	-0.193	0.057	0.064	0.348*	0.188	0.395*
Serum TAS	-0.222	-0.193	1	-0.090	-0.091	-0.217	-0.022	-0.032
Testis Dokusu TAS	-0.043	0.057	-0.090	1	0.042	0.019	-0.101	-0.120
Serum Testosteron Değeri	-0.183	0.064	-0.091	0.042	1	0.310	0.139	0.226
Tubulus Başına Düşen Apoptotik Hücre Sayısı	0.318	0.348*	-0.217	0.019	0.310	1	0.206	0.225
HO-1 Yoğunluğu	-0.124	0.188	-0.022	-0.101	0.139	0.206	1	0.411*
Anormal Spermatozoon Sayısı	0.232	0.395*	-0.032	-0.120	0.226	0.225	0.411*	1

Değerler Spearman korelasyon katsayısını ifade etmektedir. *:P<0,05.

4. TARTIŞMA

4.1. Vücut Ağırlığı ve Testis Ağırlığı

PCB'nin vücut ağırlığı ve testis ağırlığına etkisi konusunda farklı görüşler ileri sürülmüştür.

Kumar ve ark (2004), Murugesan ve ark (2005), Aly ve ark (2009a) ile Ateşşahin ve ark (2010) ratlarda intraperitoneal PCB uygulaması sonrasında vücut ağırlığında istatistiksel bir azalma belirlemişlerdir. Hsu ve ark (2007) ise tek doz PCB uygulamasının (ip) vücut ağırlığında istatistiksel olarak herhangi bir değişikliğe neden olmadığını tespit etmişlerdir.

Bir grup araştırmacı (Kumar ve ark 2004, Murugesan ve ark 2005, Aly ve ark 2009a, Ateşşahin ve ark 2010) PCB'nin intraperitoneal uygulanmasını takiben, testis ağırlığında da önemli derece azalma kaydetmişlerdir. Bunun yanında Gray ve ark (1993) ile Kaya ve ark (2002) PCB'yi ağızdan verdikleri çalışmalarında testis ağırlığında değişme olmadığını bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada ağızdan uygulanan ALA, PCB ve ALA-PCB uygulamalarının, kontrol ve sham kontrol grubuna göre vücut ağırlığında farklılık yaratmadığı tespit edilmiştir. Bu sonucun, Kumar ve ark (2004), Murugesan ve ark (2005), Aly ve ark (2009a) ile Ateşşahin ve ark (2010)'nın bulgularıyla uyumsuz olduğu görülmüştür. Bu farklılığın nedeni PCB'nin uygulanma şekli olabilir. Ağızdan alınan PCB'nin bir kısmı sindirim sistemi yoluyla atılmış olabilir. Sunulan çalışmada güncel hayatta PCB'ye maruz kalma yolunun çoğunlukla sindirim sistemi kanalıyla olduğu düşünülerek (Lindell 2012) ağızdan uygulama yapılmıştır.

Ayrıca sunulan çalışmada uygulamaların testis ağırlığına etkisi incelendiğinde, sadece sham kontrol grubunda önemli artışa neden olduğu belirlendi. Hem PCB hem de ALA lipofilik olduklarından, birlikte verildikleri PCB, ALA ve PCB/ALA gruplarında, mısır yağının emilim ve kullanımını etkilemiş olabilirler. Saf olarak verilen mısır yağı sham kontrol grubunda diyetdeki enerji veren madde düzeyini arttırdığından, testis ağırlığında artışa neden olmuş olabilir. Bu durumda sham kontrol grubunda vücut

ağırlığında da artış beklenirken -sayısal olarak artış görölse de- istatistiksel olarak anlamlı bir artış gerçekleşmemiştir.

4.2. Histolojik Görünüm

Sunulan çalışmada, PCB grubu dışındaki gruplarda (kontrol, sham kontrol, ALA ve ALA-PCB) testis dokularının histolojik görünümünün, 120 günlük ratlarda, literatürle uyumlu olarak (Junqueira ve ark 2006, Tanyolaç 1999) olması gereken histolojik görünüme sahip olduğu belirlendi.

Tubulus seminiferus kontortus lumeninin belirgin olduğu ve spermatogenetik hücrelerin kalın bir katman oluşturduğu gözlemlendi. Yang ve ark (1990) ratlarda primer spermatositlerin ilk kez postnatal 15. günde, yuvarlak spermatidlerin de ilk kez 25. günde görüldüğünü belirlemişlerdir. Khattab (2007) ratlarda yaptığı çalışmada seminifer tubulusun epitel katmanında sırasıyla spermatogonyum, primer ve sekonder spermatosit ile spermatidleri, tubulus lumeninde ise spermatozoonları gözlemlemiştir.

Orth (1982), ratta Sertoli hücrelerinin proliferasyon periyodunun gebeliğin 17-19. günlerinden başlayıp, postnatal 15-20. günlere kadar devam ettiğini bildirmektedir. Bu çalışmada Sertoli hücrelerinin sitoplazma ve çekirdeği tüm gruplardaki 120 günlük ratların tubuluslarında gözlemlendi.

Yapılan çalışmada, tüm gruplardaki ratların intertubuler alandaki gevşek bağ doku içinde Leydig hücreleri tespit edildi. Ge ve ark (2005), Leydig hücrelerinin postnatal gelişiminin 90 günlük yaşa kadar tamamlanarak erişkin hale geldiklerini ve aktif olarak testosteron ürettiklerini bildirmişlerdir.

Leblond ve Clermont (1952), Hess (1990) ile França ve ark (1998) ratlarda spermatogenik siklusun 14 dönemden oluştuğunu bildirmişlerdir. VII. dönemde tubulus lumeni sınırında 19. adımda nükleusu eğri spermatidleri, VIII. dönemde sekizinci adım spermatidin nükleusu ve akrozomunun sitoplazmanın bazal kutbuna doğru yerleştiğini, XII. dönemde 12. adım spermatidlerin akrozomunu sivri biçimde, XIII. dönemde 13. adım spermatidlerde akrozomun nükleusun ventral tarafında çıkıntı yaptığını, XIV. dönemde ise mitotik figürleri belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada da araştırmacıların (Hess 1990, Leblond and Clermont 1952, França ve ark 1998) bildirdikleri gibi bütün gruplarda spermatogenik siklusun VII-VIII, XII-XIII ve XIV. dönemleri ayırt edildi.

4.3. Histolojik Değişimler

Hsu ve ark (2007)'nin yapmış oldukları bir çalışmada, anne karnında iken tek uygulama olarak 1-10 mg/kg/gün dozda PCB 132'ye maruz kalan ratların testis dokularında herhangi bir histolojik değişime rastlanmadığı bildirilmiştir. Ateşşahin ve ark (2010) tarafından yine ratlarda yapılan bir çalışmada, sekiz hafta boyunca 2 mg/kg/gün dozda Aroclor 1254 uygulanan grupta, germ hücrelerinde dejenereasyon, epiteliyal dökülme (deskuamasyon), germ hücre sayısında azalma ve kapilar konjesyon gözlenmiştir.

Sunulan çalışmada normal histolojik görünümünden farklı olarak meydana gelen değişimler; subbazal ve epiteliyal vakuolizasyon, germ hücrelerinin tubuler lümene dökülmesi ve kapilar hiperemi olarak kaydedildi. Elde edilen veriler incelendiğinde az da olsa bütün gruplarda bu farklılıklara rastlanırken, PCB verilen grupta değişikliklerin diğer gruplara göre neredeyse iki katına ulaştığı dikkati çekti. PCB grubunda gözlenen bu farklılıkların istatistiksel olarak subbazal vakuolizasyonda ($P<0.001$), epiteliyal dökülme ($P<0.001$), germ hücrelerinin lumene dökülmesinde ($P<0.001$) ve kapilar hiperemide ($P<0.05$) anlamlı olduğu tespit edildi. Epiteliyal vakuolizasyon açısından ise gruplar arası farkın önemli olmadığı gözlemlendi. PCB grubu dışındaki gruplarda gözlenen bu değişimlerin yaşa bağlı meydana gelmiş olabileceği düşünüldü. Farelerde yapılan bir çalışmada (Takano ve Abe 1987) buna benzer değişikliklerin 6. aydan itibaren normal olarak meydana geldiği ileri sürülmektedir. Yapılan literatür taramasında ratlarda yaşa bağlı meydana gelebilecek histolojik değişimlerle ilgili bir kaynağa rastlanamamıştır.

Selvakumar ve ark (2006) siklofosfamid toksisitesine karşı ALA'nın koruyucu etkisini ratlarda araştırmışlardır. Çalışma sonucunda siklofosfamid uyguladıkları grupta histopatolojik değişimler (tubuler epitelde dökülmeler, tubulusta disorganizasyon, tubuler hiyalinizasyon) ortaya çıkarken, ALA grubu kontrol grubu ile benzerlik göstermiş, ALA+siklofosfamid grubunda ise histopatolojik değişimlerin önemli derecede azaldığını tespit etmişlerdir. Gawish (2010) ratlarda klorfiyirifos (insektisit) ve fenitrotyon (pestisit)'dan oluşan bir karışımın ağızdan verilmesi sonrasında testiste meydana gelen histolojik değişimleri incelemiş ve tubuluslarda atrofi, disorganizasyon ve hiperemi tespit etmiştir. ALA ile birlikte klorfiyirifos/fenitrotyon karışımı uygulamasıyla bu değişimlerin önemli oranda azaldığını tespit etmiştir.

Yapılan çalışmada ALA grubu subbazal ve epiteliyal vakuolizasyon, tubulus lumenine germ hücre dökülmesi ve kapilar hiperemi açısından kontrol ve sham kontrol

grubu ile benzerlik göstermiştir. Epitelial dökülme açısından ise ALA grubu ile kontrol grubu arasında önemli bir farklılık olmadığı, ALA grubunun sham kontrol grubuna göre de istatistiksel olarak daha düşük bir değere ($P<0.001$) sahip olduğu belirlenmiştir. ALA-PCB grubunda PCB grubuna göre subbazal vakuolizasyon, epitelial dökülme, tubulus lumenine germ hücre dökülmesi ve kapilar hiperemi yönünden önemli derecede azalma gözlenmiştir ($P<0.001$). Yapılan literatür taramasında, testiste PCB toksikasyonuna karşı ALA'nın etkisini araştıran herhangi bir kaynağa rastlanamamıştır.

4.4. Tubulus Çapı

Fare (Pocar ve ark 2012) ve horozlarda (Zhang ve ark 2002) PCB'nin histometrik etkisinin araştırıldığı çalışmalarda, seminifer tubulus çapının önemli derecede azaldığı tespit edilmiştir. Ayrıca Lee ve ark (2007) dioksin benzeri PCB bileşiği olan 2,3,7,8-tetraklorodibenzo-p-dioksin (TCDD)'in rat testislerinde seminifer tubulus çapını anlamlı düzeyde azalttığını belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada PCB uygulanan grupta VII-VIII. dönem ve XII-XIV. dönem seminifer tubulus çapının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($P<0.001$) küçüldüğü tespit edilmiştir.

Momeni ve ark (2012)'nin, sodyum arsenit uygulanan ratlarda antioksidan olarak verilen E vitamininin testis üzerinde koruyucu etkisini araştırdığı çalışmada, sodyum arsenit uygulanan grupta azalan seminifer tubulus çapının, E vitamini ile birlikte sodyum arsenit uygulanan grupta önemli derece arttığını belirlemişlerdir. Ratlarda yapılan başka bir çalışmada da (Mehranjani ve ark 2009) para-nonilfenol (para-nonylphenol, p-NP) uygulanan grupta tubulus çapının azaldığını, E vitamini ile birlikte p-NP verilen grupta ise tubulus çapının sadece n-NP uygulanan gruba göre önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada ise farklı sonuçlar elde edildi. Seminifer tubulus çapı açısından PCB ve ALA-PCB grupları arasında istatistiksel bir farklılık bulunmadı, her iki grupta da tubulus çapı hem VII-VIII. dönem hem de XII-XIV. dönemde, kontrol, sham kontrol ve ALA grubu verilerinden anlamlı oranda düşük bulundu.

4.5. Epitel Yüksekliği

Rat ve farelerde yapılan çalışmalarda katkı maddesinde PCB'nin kullanıldığı malathion (Bustos-Obregón ve González-Hormazabal 2003), metil parathion (methyl parathion, MP) (Narayana ve ark 2006) ve diazinonun (Sarabia ve ark 2009)

intraperitoneal uygulamasının seminifer tubulus epitel yüksekliğinde istatistiksel bir azalmaya sebep olduğu belirlenmiştir.

Sarabia ve ark (2009) farelerde intraperitoneal diazinon uygulaması ile tubulus epitel yükseliğinin anlamlı derecede azaldığını, diazinon uygulaması öncesi melatonin uygulanan grupta ise bu azalmanın önlediği tespit edilmiştir. Yapılan başka bir çalışmada da (Mehranjani ve ark 2009) para-nonilfenol (p-NP) uygulaması ile azalan tubulus epitel yüksekliği, p-NP ile birlikte E vitamini verildiğinde bu hayvanlarda tubulus epitel yüksekliğindeki azalmayı önlediği belirlenmiştir.

Sunulan çalışmada epitel yüksekliği açısından, hem VII-VIII. hem de XII-XIV. dönemler için kaydedilen veriler değerlendirildiğinde, kontrol ve deneme grupları arasında istatistiksel olarak farklılığın olmadığı belirlenmiştir. Dolayısıyla bu çalışmada PCB'nin seminifer epitel yüksekliği üzerine etkili olmadığı dikkati çekmiştir.

4.6. XIV. Dönem Tubulus % Yoğunluğu

Narayana ve ark (2006) rat testislerinde yapmış oldukları bir çalışmada, intraperitoneal olarak metil parathion (MP)'a maruz kalan grupta XIV. dönem tubulus yoğunluğunun anlamlı derecede azaldığını belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada da PCB uygulanan grupta XIV. dönem % tubulus yoğunluğunun azaldığı belirlenmiştir, fakat bu azalmanın istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir. ALA-PCB grubunda, XIV. dönem tubulus % yoğunluğunun PCB grubuna göre sayısal olarak fazla olduğu fakat bu fazlalığın bir anlamlılık göstermediği bulunmuştur.

4.7. Apoptosis Yoğunluğu

Hsu ve ark (2007)'nin yapmış oldukları bir çalışmada anne karnında iken intraperitoneal yolla tek uygulama olarak 10 mg/kg dozda PCB 132'ye maruz kalan ratların testis dokularında kaspaz 3 ve 9 ekspresyonunda artışı belirleyerek, PCB'nin apoptotik etkisini ortaya koymuşlardır. Ateşşahin ve ark (2010) da Aroclor 1254'ün, bax gen ekspresyonunu artırarak germ hücrelerinde apoptozise neden olduğunu tespit etmişlerdir. Cai ve ark (2011a)'nın farelerde yapmış olduğu bir çalışmada ise Aroclor 1254'ün TUNEL-pozitif apoptotik hücre sayısını önemli derecede yükselttiğini belirlemiştir. Yapılan bu çalışmada da tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı ($P<0.05$) ve % TUNEL pozitif tubulus sayısı ($P<0.001$), PCB (Aroclor 1254) uygulanan

gruplarda kontrol, sham kontrol ve diğer deneme gruplarına göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur. Bu bulgular ışığında Aroclor 1254'ün testiste apoptotik etkisi teyit edilmiştir.

Ratlarda yapılan bir çalışmada klorfiyirifos (insektisit) ve fenitrothion (pestisit)'dan oluşan bir karışımın ağızdan verilmesiyle artan TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısının, ALA'ya ilaveten insektisit ve pestisit'ten oluşan karışım uygulaması ile apoptozis yoğunluğunun önemli derecede düştüğü belirlenmiştir (Gawish 2010). Mohasseb ve ark (2011) streptozotosin ile indüklenmiş diyabetik ratların testis dokusunda TUNEL pozitif apoptotik hücre yoğunluğunda artış belirlerken, diyabet oluşturulmuş ratlara verilen antioksidan ALA, C vitamini ve E vitamininin apoptozis yoğunluğunu düşürdüğünü tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada da ALA-PCB uygulanan grupta tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı ($P<0.05$) ve % TUNEL pozitif tubulus sayısının ($P<0.001$) PCB uygulanan gruba göre önemli oranda düştüğü belirlenmiştir.

4.8. HO-1 Yoğunluğu

Lee ve ark (2012) ratlarda yapmış oldukları bir çalışmada PCB'ye maruz kalan grupta beyin dokusundaki nöronlarda HO-1 seviyesinin yükseldiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca Park ve ark (2010) PCB uygulanan rat feokromositoma PC12 hücre hattında HO-1 seviyesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu belirlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada da rat karaciğer hücre kültüründe nitrik oksit ile oluşturulan toksisite sonucu meydana gelen oksidatif strese karşı HO-1 seviyesinin yükseldiği ve antiapoptotik etki göstererek oksidatif stresin zararına karşı hücreyi koruduğu ortaya konmuştur (Tanaka ve ark 2003). Bu çalışmada Western blot tekniği ile HO-1 proteini belirlenmiş fakat HO-1 yoğunluğunda gruplar arasında istatistiksel bir farklılık tespit edilememiştir. Ancak immunohistokimyasal olarak HO-1 yoğunluğu PCB ve ALA-PCB gruplarında, kontrol, sham kontrol ve ALA gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek ($P<0.001$) bulunmuştur. İmmunohistokimyasal yöntemle belirlenen HO-1 yoğunluğundaki artış yapılan diğer çalışmaların (Park ve ark 2010, Lee ve ark 2012) bulguları ile uyumludur. ALA-PCB grubunda HO-1 yoğunluğunun yüksek çıkma sebebinin PCB'den kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu grupta artan HO-1 yoğunluğu ve ALA'nın birlikte apoptozis yoğunluğunu düşürdüğü ileri sürülebilir. Yapılan literatür taramasında, testiste PCB toksikasyonunda HO-1 seviyesinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

4.9. Serum Testosteron Değeri

Ratlarda yapılan bazı çalışmalarda PCB'nin (Kaya ve ark 2002, Sridhar ve ark 2004, Murugesan ve ark 2007, Han ve ark 2010a) serum testosteron seviyesini anlamlı derecede düşürdüğü tespit edilmiştir. Bazı araştırmacılar da (Gray ve ark 1993, Cai ve ark 2011a) ratlarda ağızdan PCB uygulamasının serum testosteron düzeyinde kontrol grubu ile arasında herhangi bir farklılık oluşturmadığını belirlemişlerdir. Motawi ve ark (2010) ratlarda siklofosfamid uygulaması (ip) sonucu serum testosteron düzeyinin düştüğünü, siklofosmamid ile birlikte ALA uygulamasının serum testosteron düzeyindeki azalmayı önlediğini tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise serum testosteron düzeyi açısından gruplar arası istatistiksel bir farklılık bulunmamıştır. Literatürden farklı olarak sunulan çalışmada, PCB'nin testosteron üzerinde etkili olmamasının sebebinin, PCB'nin ratlara ağız yoluyla verilmesi ve verilme süresi olabileceği ileri sürülebilir.

4.10. Serum ve Testis Dokusu Total Oksidan Seviyesi (TOS) ve Total Antioksidan Seviyesi (TAS)

Murugesan ve ark (2007), Agletdinov (2009) ile Aly ve ark (2009a) ratlarda PCB uygulamasının testis dokusunda oksidatif stresi indükleyerek H_2O_2 ve hidroksil radikal düzeyleri ile lipid peroksidasyonunu artırdığı, enzimatik antioksidan seviyelerini (SOD, CAT, GPx, GR) ise azalttığını tespit etmişlerdir. Yapılan çalışmada ise PCB uygulamasına maruz kalan ratlarda serum ve testis dokusu total oksidan seviyesinin önemli derecede arttığı ($P<0.001$), total antioksidan seviyesinin de sadece sayısal olarak azaldığı belirlenmiştir. Sunulan çalışmada elde edilen bulgular literatürle uyumlu olup, araştırmadaki PCB (Aroclor 1254) uygulama şeklinin oksidatif stresi indüklediği ortaya konmuştur.

Gawish (2010) ratlarda yapmış olduğu çalışmada klorfiyrifos (insektisit) ve fenitrothion (pestisit)'dan oluşan karışımın ağızdan uygulaması ile malondialdehit (MDA) düzeyinin arttığını, ALA+ karışım (klorfiyrifos+fenitrothion)'ın da artan MDA seviyesini düşürdüğünü tespit etmiştir. Motawi ve ark (2010) ratlarda yapmış olduğu bir çalışmada, siklofosfamid ile indüklenen oksidatif hasara karşı uygulanan ALA'nın azalan serum total antioksidan enzim seviyesini ve testis dokusu antioksidan enzim seviyesini (glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz, glutasyon) artırdığı, artan malondialdehit (MDA) düzeyini ise azalttığını belirlemişlerdir. Yine ratlarda adriamisin (ADR) ile oluşturulan testiküler hasara karşı koruyucu olarak verilen ALA'nın testis dokusu antioksidan seviyelerini

artırdığı, lipid peroksidasyonunu da önemli derecede azalttığı bulunmuştur (Pralathan ve ark 2004). Siklofosamid uygulaması öncesi, koruyucu amaçla ALA verilen ratların testis dokusunda, sadece siklofosamid uygulaması ile azalan antioksidan enzim seviyeleri (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon transferaz ve glutatyon redüktaz) ile artan MDA seviyesinin normale döndüğü gözlenmiştir (Selvakumar ve ark 2004). Sunulan çalışmada, ALA-PCB grubundaki serum ve testis dokusu total oksidan enzim seviyesinin PCB grubuna göre önemli derecede azaldığı ($P<0.001$), serum ve testis dokusu total antioksidan enzim seviyesinin de sayısal bir artış gösterdiği tespit edilerek ALA'nın PCB toksisitesinde oksidatif stresin etkilerini azaltabileceği ortaya konmuştur.

4.11. Spermatozoon Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Brown (1994) rat spermatozoon baş kısmının kanca şeklinde bir yapıya sahip olduğunu ve ışık mikroskopik olarak sadece baş ve kuyruk kısımlarının ayırt edilebildiğini belirtmiştir. Yapılan çalışmada da spermatozoonların kanca şeklinde olan baş ve kuyruk kısmı belirlendi.

Zhang (2005) horoz sperm hücre kültüründe PCB uygulamasının anormal sperm oranını önemli derecede artırdığını belirlemiştir. Yapılan diğer çalışmalarda PCB uygulaması ile sperm sayısı (Hsu ve ark 2007, Agletdinov ve ark 2009, Aly ve ark 2009a, Cai ve ark 2011a), sperm motilitesi (Hsu ve ark 2007, Aly ve ark 2009a, Cai ve ark 2011a) ve günlük sperm üretiminde (Faqi ve ark 1998, Aly ve ark 2009a) azalma ile anormal sperm oranında artış (Faqi ve ark 1998, Cai ve ark 2011a) gözlenmiştir. Sunulan çalışmada anormal spermatozoon oranı PCB ve ALA-PCB gruplarında önemli derecede yüksek bulunmuştur ($P<0.01$). Anormal spermatozoon oranındaki artışın PCB'nin toksik apoptotik etkiye sahip olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Adriamisin ile indüklenen rat testisinde oluşan toksisiteye karşı ALA'nın hücre koruyucu etkisi incelendiğinde, adriamisin grubunda sperm sayısı ile sperm motilisinde azalma ve anormal spermatozoon oranında artış görülmüştür. ALA+adriamisin grubunda ise bu değerler kontrol grubu ile benzerlik göstermiştir. Ratlarda yapılan başka bir çalışmada tiner uygulaması ile sperm sayısı, sperm motilitesi, sperm membran bütünlüğü, seminal vezikül ağırlığı ve anormal spermatozoon oranında önemli derece bir azalma belirlemişlerdir. Tiner ile birlikte ALA uygulamasının sadece tiner uygulanan grupta gözlenen bu anormal değişimleri düzelttiği ortaya konularak, ALA'nın reproduktif sistem üzerinde meydana gelen toksisiteye karşı koruyucu etkisi ortaya konmuştur (Yeni ve ark

2012). Bu çalışmada ise ALA-PCB grubunda anormal sperm oranı, kontrol ve sham kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulunmuştur ($P<0.01$). Bu sonuç ALA'nın kullanılan miktarı ve süresinin arttırılabileceğini düşündürmüştür.



5. SONUÇ

Yapılan çalışmada vücut ağırlığı açısından gruplar arasındaki farkın önemli olmadığı, fakat testis ağırlığının sham kontrol grubunda daha fazla olduğu belirlendi ($P<0.001$).

Kontrol, sham kontrol, ALA ve ALA-PCB grubu ratlarda, testislerin 120 günlük erişkin ratlarda genel olarak beklenen histolojik görünüme sahip oldukları gözlemlendi. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarında spermatogenik siklusun VII, VIII, XII, XIII ve XIV. dönemleri ayırt edildi. Deneme ve kontrol gruplarında histolojik bakıda kesitler; subbazal vakuolizasyon, epitelyal vakuolizasyon, epitelyal ayrılma ve dökülme, kapılar hiperemi açısından da incelendi. PCB grubundaki subbazal vakuolizasyon artışının istatistiksel yönden anlamlı olduğu bulundu ($P<0.001$). ALA'nın PCB'nin etkisiyle önemli oranda artış gösteren subbazal vakuolizasyonu azalttığı belirlendi. Epitelyal vakuolizasyon açısından gruplar arasında farklılık tespit edilmedi. Epitelyal dökülmenin yine PCB grubunda diğer gruplara göre fazla olduğu ($P<0.001$), ALA-PCB grubunda PCB grubuna göre epitelyal dökülmenin önemli derecede azaldığı belirlendi. PCB grubunda tubulus lümenine germ hücre dökülmesinin en fazla oranda olduğu ($P<0.001$), ALA'nın bu dökülmeyi azalttığı ($P<0.001$) saptandı. Kapılar hipereminin de PCB grubunda bir miktar fazla olduğu ($P<0.05$) tespit edildi. PCB ile birlikte ALA kullanılan grupta bu bulgunun da azaldığı dikkati çekti.

Gruplar arasında VII- VIII. dönem ve XII-XIV. dönemlerde seminifer tubulus çapları karşılaştırıldığında, PCB'nin tubulus çapını azalttığı ($P<0.001$) ve ALA'nın bu durumu düzeltmekte etkili olmadığı belirlendi.

VII- VIII. dönem ve XII-XIV. dönemlerde seminifer tubulus epitel yüksekliği ve XIV. dönem tubulus % yoğunluğunun gruplar arasında farklı olmadığı tespit edildi.

Kesitlerde tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı, en az bir apoptotik hücre içeren tubulus sayısı ve % TUNEL pozitif tubulus değerleri hesaplandığında, apoptozis oranının PCB grubunda fazla olduğu saptandı. Aynı zamanda testis dokusu total oksidan seviyesi ile tubulus başına düşen apoptotik hücre sayısı arasında pozitif korelasyon belirlenerek, apoptozisin oksidatif stresle ilişkili olduğu ortaya kondu. PCB ile birlikte ALA alan grupta ise veriler kontrol grupları ve sadece ALA alan gruptan farksızdı. Dolayısıyla ALA kullanımının PCB'nin apoptotik etkisini azalttığı tespit edildi.

İmmunohistokimyasal olarak belirlenen hemoksigenaz-1 (HO-1) enzimi yoğunluğu, PCB ve ALA-PCB grubunda kontrol ve sham kontrol grubuna göre önemli düzeyde yüksek ($P<0.001$) bulundu. ALA kullanımı HO-1 düzeyini etkilemedi. Western blot yöntemi ile HO-1 bütün gruplarda belirlendi fakat yoğunluğu açısından gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi.

Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarının serum testosteron değerleri arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı.

Serum ve testis dokusu total oksidan seviyesinin PCB grubunda diğer gruplara göre önemli oranda yüksek olduğu ve PCB ile birlikte ALA kullanılan grupta hem serum hem de testiste total oksidan seviyesinin azaldığı görüldü. Serum total oksidan seviyesi ile testis dokusu total oksidan seviyesi arasında pozitif korelasyon tespit edildi.

Serum ve testis dokusu total antioksidan seviyelerinin gruplar arasında farklı olmadığı ancak PCB grubunda serum ve testis dokusu total antioksidan seviyelerinin, diğer gruplara göre sayısal olarak düşük bir değere sahip olduğu belirlendi. ALA-PCB grubunda ise serum ve testis dokusu total antioksidan seviyelerinin PCB grubuna göre sayısal olarak bir artış gösterdiği gözlemlendi.

PCB ve ALA-PCB gruplarında, diğer gruplara göre anormal spermatozoon oranının fazla olduğu ($P<0.01$), ALA alımının anormal spermatozoon oranını değiştirmedığı tespit edildi. Yapılan korelasyon analizi ile testis dokusu total oksidan seviyesi ve anormal spermatozoon sayısı arasında pozitif korelasyon gözlemlendi.

Sonuç olarak ratlarda PCB uygulaması, histolojik değişimler açısından subbazal vakuolizasyon, epitelial dökülme, tubuler lumene germ hücre dökülmesi ve kapilar kanlanmayı artırdığı, VII-VIII ve XII-XIV. dönem tubulus çaplarında azalmaya, apoptozisin artmasına, HO-1 enzimi yoğunluğu, serum ve testis dokusu total oksidan seviyesi ile anormal spermatozoon sayısında artışa sebep olduğu tespit edildi. ALA-PCB uygulaması ile sadece PCB uygulanan grupta gözlenen bu olumsuzluklardan subbazal vakuolizasyon ($P<0.001$), epitelial dökülme ($P<0.001$), tubuler lumene germ hücre dökülmesi ($P<0.001$) ve kapilar hiperemi ($P<0.05$) ile apoptozis oranında önemli derecede azalmaya neden olduğu belirlendi. Dolayısıyla sunulan çalışma ile, PCB'nin erkek reproduktif sistem üzerinde oluşturacağı toksik etkilere karşı ALA'nın koruyucu etkisinin varlığı ortaya kondu.

Literatürden farklı olarak sunulan çalışmada, PCB'nin testosteron üzerinde etkili olmamasının sebebinin, PCB'nin ratlara sindirim sistemi yoluyla verilmesi olabileceği ileri sürülebilir. Sunulan çalışma, testiste PCB toksikasyonuna karşı ALA'nın antioksidan etkisini araştıran ilk çalışmadır. ALA'nın kullanım oranı ve vücuda veriliş yolunun değiştirilerek yapılacak çalışmaların, erkek reproduktif sistemde ALA'nın antioksidan ve anti apoptotik etkisinin ayrıntısının belirlenmesine katkı vereceği düşünülmektedir.



ÖZET

Araştırmada, testislerde oluşan poliklobifenil (PCB) toksikasyonuna karşı alfa lipoik asit (ALA)'ın antioksidan rolünün olup olmadığının, histolojik ve biyokimyasal farklılık oluşturup oluşturmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla 40 adet yetişkin erkek Wistar Albino rat (180-200 g/ 90 günlük) kullanıldı. Materyal, her biri sekizer rat içerecek şekilde beş gruba ayrıldı. Kontrol grubundaki (1. Grup) ratlara deneme süresince hiçbir uygulama yapılmadı. Sham kontrol grubuna (2. Grup) 2 ml/kg/gün mısır yağı verildi. PCB grubuna (3. Grup) Aroclor 1254 5 mg/kg/gün dozda, 2 ml/kg olacak şekilde mısır yağı ile karıştırılarak ağızdan uygulandı. ALA grubuna (4. Grup) 25 mg/kg/gün dozda ALA mısır yağı ile karıştırılarak 2 ml/kg olacak şekilde verildi. ALA-PCB grubuna (5. Grup) ise, 25 mg/kg/gün dozda ALA uygulandıktan bir saat sonra 5 mg/kg/gün dozda Aroclor 1254 aynı şekilde mısır yağı ile karıştırılarak 2 ml/kg olacak şekilde verildi. Deneme süresi 30 gün olarak belirlendi ve uygulamalar besleme kanülü ile ağızdan gerçekleştirildi.

Deney süresi sonunda 120 günlük olan ratların vücut ağırlıkları ve testis ağırlıkları belirlendi. Serum örneklerinde total oksidan seviyesi ve total antioksidan seviyesi ile serum testosteron seviyesi belirlendi. Alınan sağ testis dokusunda TOS ve TAS ile, HO-1 band yoğunluğu belirlendi. Epididimislerden elde edilen sperma örnekleri ile hazırlanan frotilere eosin-nigrosin boyama tekniği uygulanarak anormal spermatozoon sayısı belirlendi.

Parafin bloklardan alınan seri kesitlere Crossman'ın üçlü boyama metodu, TUNEL metodu ve sABC boyama yöntemi uygulandı. Işık mikroskobu ile doku kesitlerinde histolojik görünüm, histolojik değişimler, XIV. dönem tubulus yoğunluk değeri, apoptozis, HO-1 yoğunluğu ve anormal spermatozoon sayısı belirlendi. Mikroskoba bağlı görüntü analiz sistemi (Leica Q Win Standart) yardımı ile VII-VIII. dönem ve XII-XIV. dönem seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliği tespit edildi.

Ratlarda PCB uygulamasının, histolojik değişimler açısından subbazal vakuolizasyon, epitelial dökülme, tubuler lumene germ hücre dökülmesi ve kapilar kanlanmayı artırdığı belirlendi. Ayrıca VII-VIII ve XII-XIV. dönem tubulus çaplarında azalmaya, apoptozisin artmasına, HO-1 enzimi yoğunluğu, serum ve testis dokusu total oksidan seviyesi ile anormal spermatozoon sayısında artışa sebep olduğu tespit edildi.

ALA-PCB uygulaması ile sadece PCB uygulanan grupta gözlenen bu olumsuzluklardan subbazal vakuolizasyon, epitelial dökülme, tubuler lumene germ hücre dökülmesi ve kapilar hiperemi ile apoptozis oranında önemli derecede azalmaya neden olduğu belirlendi. Dolayısıyla sunulan çalışma ile, PCB'nin erkek reproduktif sistem üzerinde oluşturacağı toksik etkilere karşı ALA'nın koruyucu etkisinin varlığı ortaya kondu.

Literatürden farklı olarak sunulan çalışmada, PCB'nin testosteron üzerinde etkili olmamasının sebebinin, PCB'nin ratlara sindirim sistemi yoluyla verilmesi olabileceği ileri sürülebilir. Sunulan çalışma, testiste PCB toksikasyonuna karşı ALA'nın antioksidan etkisini araştıran ilk çalışmadır. ALA'nın kullanım oranı ve vücuda veriliş yolunun değiştirilerek yapılacak çalışmaların, erkek reproduktif sistemde ALA'nın antioksidan ve anti apoptotik etkisinin ayrıntısının belirlenmesine katkı vereceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler; Aroclor 1254, alfa lipoik asit (ALA), histometri, TUNEL, HO-1, testosteron, total oksidan seviyesi, total antioksidan seviyesi, anormal spermatozoon, rat.

SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the antioxidant, histologic and biochemical effects of alpha lipoic acid (ALA) in polychlorobiphenyl (PCB)-induced testicular toxicity.

Fourty adult male albino Wistar rats (180-200 g/ 90 days) were used. Animals were divided into 5 groups consisting of 8 rats each. Group I rats (control) did not receive any chemicals during experimental period. Group II (control sham) daily received 2 ml/kg body weight (BW) corn oil. Group III rats received Aroclor 1254 (5 mg/kg BW) dissolved in corn oil (2 ml/kg BW) by oral gavage. Group IV rats received ALA (25 mg/kg BW) dissolved in corn oil (2 ml/kg BW). Group V rats received ALA (25 mg/kg BW) by oral gavage 24 hours prior to the administration of Aroclor 1254 (5 mg/kg BW). Applications were practiced by oral gavage with feeding needle for a period of 30 days.

At the end of experimental period, all animals (120 days old) were weighted and their testis weights were determined. Total oxidant status and total antioxidant status and, serum testosterone levels were analysed in serum samples. Right testes were taken, for analysis of TOS and TAS levels and HO-1 band intensity, Sperm samples taken from epididymal ducts were prepared as slides and were stained with eosin-nigrosin, in order to determine the number of abnormal spermatozoa.

Crossman's triple staining methods, TUNEL method and strept avidin-biotine complex (sABC) were applied to the serial paraffin sections. Histological apparence, histological alterations, incidences of stage XIV tubules, apoptotic cells, HO-1 density were defined in tissue sections and the count of abnormal spermatozoa were determined with light microscope examination. Seminiferous tubule diameter and seminiferous epithelium height were measured at stage VII-VIII and stage XII-XIV tubules with image analyze system which was linked to a microscope (Leica Q Win Standart).

An increase in sub-basal vacuolization, epithelial desquamation, the presence of germ cells across to tubular lumen and capillary congestion was determined in PCB group. Besides, seminiferous tubule diameter were decreased at stage VII-VIII and stage XII-XIV tubules. Apoptosis, HO-1 density, total oxidant status in serum and testis and the count of abnormal spermatozoa were significantly increased in PCB group. In ALA-PCB groups, sub-basal vacuolization, desquamation of germinal cells in the epithelium, germ cells

across to tubular lumen, capillary congestion and apoptosis were decreased. At the end of the study, we determined the protective effect of alpha lipoic acid (ALA) in PCB-induced testicular toxicity.

In this study, in contrast to published data, serum testosterone levels were not effected in PCB groups. The reason for this discrepancy could be due to the fact that PCB was given via oral route. This study is the first research investigating the antioxidant effect of alpha lipoic acid (ALA) against PCB toxicity in the testes. Future work in the field by changing the utilization rate and the administration method of ALA, will contribute to determine the antioxidant and antiapoptotic effects of ALA in the male reproductive system.

Key words; Aroclor 1254, alpha lipoic acid (ALA), histometry, TUNEL, HO-1, testosterone, total oxidant status, total antioxidant status, abnormal spermatozoa, rat.

KAYNAKLAR

Abraham WR, Nogales B, Golyshin PN, Pieper DH, Timmis KN. Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities in soils and sediments. *Current Opinion in Microbiology* 2002;5:246-253.

Agarwal A, Balla J, Alam J, Croatt AJ, Nath KA. Induction of heme oxygenase in toxic renal injury: A protective role in cisplatin nephrotoxicity in the rat. *Kidney International* 1995;48:1298-1307.

Agletdinov EF. Mechanisms of testicular toxicity of polychlorinated biphenyls. *Antibiot Khimioter* 2009;54(9-10):33-36.

Ahlborg GU, Hanberg A, Kene K. Risk assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs). Institute of Environmental Medicine, Sweden, 1992. p.1-121.

Ahmed AE. Morphological, glycohistochemical, and immunohistochemical studies on the embryonic and adult bovine testis. Doktora Tezi. Ludwig Maximilian University of Munich, 2005.

Aitken RJ, Curry BJ. Redox regulation of human sperm function: from the physiological control of sperm capacitation to the etiology of infertility and DNA damage in the germ line. *Antioxidants & Redox Signaling* 2011;14 367–381.

Aitken RJ, Findlay JK, Hutt KJ, Kerr JB. Apoptosis in the germ line. *Reproduction*. 2011;141(2):139-150.

Allan DJ, Harmon BV, Kerr JFR. Cell death in spermatogenesis. In: Potten CS (ed.), *Perspectives on Mammalian Cell Death*. London: Oxford University Press; 1992. p. 229–258.

Alston DA, Tandler B, Gentles B, Smith EE. Testicular histopathology in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) following exposure to polychlorinated biphenyl. *Chemosphere* 2003;52(1):283-285.

Aly HAA, Domènech O, Abdel-Naim AB. Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. *Food and Chemical Toxicology* 2009a;47(8):1733-1738.

Aly HAA, Lightfoot DA, El-Shemy HA. Modulatory role of lipoic acid on lipopolysaccharide-induced oxidative stress in adult rat Sertoli cells in vitro. *Chemico-Biological Interactions* 2009b;182(2-3):112-118.

Anbalagan J, Kanagaraj P, Srinivasan N, Aruldas MM, Arunakaran J. Effect of polychlorinated biphenyl, Aroclor 1254 on rat epididymis. *Indian Journal of Medical Research* 2003;118:236-242.

Aragon MA, Ayala ME, Marin M, Aviles A, Damian-Matsumura P, Dominguez R. Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reproduction* 2005;129(6):717-727.

Arai-Gaun S, Katai N, Kikuchi T, Kurokawa T, Ohta K, Yoshimura N. Heme oxygenase-1 induced in müller cells plays a protective role in retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Investigate Ophthalmology & Visual Science* 2004;45(11):4226-4232.

Awad H, Halawa F, Mostafa T, Atta H. Melatonin hormone profile in infertile males. *International Journal of Andrology* 2006;29(3):409-413.

Atessahin A, Turk G, Yilmaz S, Sonmez M, Sakin F, Ceribasi AO. Modulatory effects of lycopene and ellagic acid on reproductive dysfunction induced by polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) in male rats. *Pharmacological Society Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 2010;106:479-489.

Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 2000;109(1):33-44.

Babusikova E, Jesenak M, Durdik P, Dobrota D, Banovcin P. Exhaled carbon monoxide as a new marker of respiratory diseases in children. *Journal of Physiology and Pharmacology* 2008;59(6):9-17.

Bhatt K, Flora SJS. Oral co-administration of α -lipoic acid, quercetin and captopril prevents gallium arsenide toxicity in rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2009;28:140-146.

Bıçak M, Özkan M, Yüksekol İ, Tozkoparan E, Balkan A, Ekiz K, Demirci N. Astım ve KOAH'ta ekspiryum havasında karbonmonoksit ölçümünün önemi. *Toraks Dergisi* 2003;4(3):231-235.

Bist R, Bhatt DK. The evaluation of effect of alpha-lipoic acid and vitamin E on the lipid peroxidation, gamma-amino butyric acid and serotonin level in the brain of mice (*Mus musculus*) acutely intoxicated with lindane. *Journal of The Neurological Sciences* 2009;276(1-2):99-102.

Brown JF. Determination of PCB metabolic, excretion and accumulation rates for use as indicators of biological response and relative risk. *Environmental Science and Technology* 1994;28:2294-2305.

Brouard S, Otterbein LE, Anrather J. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses endothelial cell apoptosis. *Journal Experimental Medicine* 2000;192:1015-1026.

Bruner-Tran KL, Osteen KG. Dioxin-like PCBs and endometriosis. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 2010;56(2):132-146.

Buffone MG, Ijiri TW, Cao W, Merdushev T, Aghajanian HK, Gerton GL. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Molecular Reproduction and Development* 2012; 79(1):4-18.

Burçak G, Andican G. Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi* 2004;35:159-169.

Busca A, Saxena M, Kumar A. Critical Role for Antiapoptotic Bcl-xL and Mcl-1 in Human Macrophage Survival and Cellular IAP1/2 (cIAP1/2) in Resistance to HIV-Vpr-induced Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287(18):15118-15133.

Bustos-Obregón E, González-Hormazabal P. Effect of a single dose of malathion on spermatogenesis in mice. *Asian Journal of Andrology* 2003;5(2):105-107.

Cai J, Wang C, Wu T, Monero JML, Zhong Y, Huang Y, Zuo Z. Distribution of spermatogenesis and differential regulation of testicular estrogen receptor expression in mice after polychlorinated biphenyl exposure. *Toxicology* 2011a;287:21-28.

Cai K, Hua G, Ahmad S, Liang A, Han L, Wu C, Yang F, Yang L. Action mechanism of inhibin α -subunit on the development of sertoli cells and first wave of spermatogenesis in mice. *Public Library of Science One* 2011b;6(10):1-9.

Carpenter DO. Environmental contaminants and human health: The health effects of persistent toxic substances. *Firat Tıp Dergisi* 2005;10:1-4.

Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. British Medical Bulletin 1993;49(3):481-493.

Chen H, Liu J, Luo L, Baig MU, Kim JM, Zirkin BR. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. Experimental Gerontology 2005;40(8-9):728-736.

Cohen JJ. Programmed cell death and apoptosis in lymphocyte development and function. American College of Physicians 1993;103:99-101.

Colciago A, Negri-Cesi P, Pravettoni A, Mornati O, Casati L, Celotti F. Prenatal Aroclor 1254 exposure and brain sexual differentiation: Effect on the expression of testosterone metabolizing enzymes and androgen receptors in the hypothalamus of male and female rats. Reproductive Toxicology 2006;22:738-745.

Conover WJ. Practical nonparametric statistics. 2nd Ed. New York: John Wiley&Sons; 1980. p. 229-239.

Cooke MS, Olinski R, Evans MD. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? Clinica Chimica Acta 2006;365(1-2):30-49.

Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Kuzey GM. Protection of endotoxin-induced oxidative renal tissue damage of rats by vitamin E or/and EGb 761 treatment. Journal of Applied Toxicology 2005;25(1):8-12.

Crichton R. Inorganic biochemistry of iron metabolism. From Molecular Mechanisms to Clinical Consequences 2nd Ed. John Wiley & Sons Ltd 2001.

Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular pathology technique. Butterworths and Co Ltd London; 1985.

Çok İ, Dönmez MK, Karakaya AE. Levels and trends of chlorinated pesticides in human breast milk from Ankara residents: comparison of concentrations in 1984 and 2002. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 2004;72:522-529.

Dalgaard M, Pilegaard K, Ladefoged O. In utero exposure to diethylstilboestrol or 4-n-nonylphenol in rats: Number of sertoli cells, diameter and length of seminiferous tubules estimated by stereological methods. Pharmacology&Toxicology 2002;90(2):59.

Dean CE Jr, Benjamin SA, Chubb LS, Tessari JD, Keefe TJ. Nonadditive hepatic tumor promoting effects by a mixture of two structurally different polychlorinated biphenyls in female rat livers. Toxicological Sciences 2002;66:54-61.

De Rosa C, Richter P, Pohl H, Jones DE. Environmental exposures that affect the endocrine system: public health implications. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 1998;1:3-26.

Dellmann HD, Brown EM. *Textbook of Veterinary Histology*. 3rd Ed. Philadelphia: Lea&Febiger; 1987. p. 286-312.

Del Maestro R. Trace elements, micronutrients and free radicals. Dreosti IE (ed). *Humano Press Inc. Cliton* 1991;25-51.

Drevet JR. The antioxidant glutathione peroxidase family and spermatozoa: a complex story. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2006;250(1-2):70-79.

Drisko JA, Chapman J, Hunter VJ. The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecologic Oncology* 2003;88:434-439.

Dudek RW, Fix JD. *Embryology*. 3rd Ed. Philadelphia: Williams&Wilkins; 2005. p. 157-166.

Eisler R, Belisle AA. Planar PCB hazards to fish, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *Patuxent Wildlife Research Center U.S. National Biological Service Laurel*, 1996.

Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 2007;35(4):495–516.

Ergün L. Erkek genital sistem. In: Özer A (Ed), *Veteriner özel histoloji*. Ankara: Nobel Yayın Dağıtım; 2010. p. 251-268.

Ersoy-Çanilloğlu Y, Ercan F. In Utero Etanol uygulamasının sıçan testis morfolojisi üzerine etkileri. *Acıbadem Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2011;2(1):10-16.

Esfandiari A, Dehghani R. Histomorphometrical study of seminiferous tubule in rats after used *Tribulus terrestris*. *Journal of Cell and Animal Biology* 2010;4(2):68-72.

Eu JP, Liu L, Zeng M, Stamler JS. An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry* 2000;39(5):1040–1047.

Fang J, Akaike T, Maeda H. Antiapoptotic role of heme oxygenase (HO) and the potential of HO as a target in anticancer treatment. *Apoptosis* 2004;9:27-35.

Faqi AS, Dalsenter PR, Mathar W, Heinrich-Hirsch B, Chahoud I. Reproductive toxicity and tissue concentrations of 3,30,4,40-tetrachlorobiphenyl (PCB 77) in male adult rats. *Human& Experimental Toxicology* 1998;17:151–156.

Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and Immunity* 2005;74(4):1907-1916.

Forand A, Messiaen S, Habert R, Bernardino-Sgherri J. Exposure of the mouse perinatal testis to radiation leads to hypospermia at sexual maturity. *Reproduction* 2009;137:487–495.

França LR, Ogawa T, Avarbock MR, Brinster RL, Russell LD. Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of Reproduction* 1998;59:1371–1377.

Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation* 1982;47(5):412-426.

Furnes B, Schimenti J. Fast forward to new genes in mammalian reproduction. *The Journal of Physiology* 2007;578(1):25-32.

Gao M, Wu NX. Male reproductive toxicity of polychlorinated biphenyls. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2011;17(5):448-452.

Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology. In: *Male Reproductive System*. USA: W.B. Saunders Company; 1997. p. 403-421.

Gawish AM. The Protective Role of Alpha Lipoic Acid Against pesticides Induced Testicular Toxicity- Histopathological and Histochemical Studies. *journal of aquaculture research & development* 2010;1:101.

Gaytan F, Lucena MC, Munoz E, Paniagua R. Morphometric aspects of rat testis development. *Journal of Anatomy* 1986;145:155-159.

Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Chen H, Zirkin BR, Hardy MP. Gene expression in rat leydig cells during development from the progenitor to adult stage: a cluster analysis. *Biology of Reproduction* 2005;72(6):1405-1415.

George J, Banik NL, Ray SK. Genistein induces receptor and mitochondrial pathways and increases apoptosis during BCL-2 knockdown in human malignant neuroblastoma SK-N-DZ cells. *Journal of Neuroscience Research* 2010;88(4):877-886.

- Gogada R, Amadori M, Zhang H, Jones A, Verone A, Pitarresi J, Jandhyam S, Prabhu V, Black JD, Chandra D. Curcumin induces Apaf-1-dependent, p21-mediated caspase activation and apoptosis. *Cell Cycle*. 2011;10(23):4128-4137.
- Golan R, Weissenberg R, Oschry Y, Shochat L, Lewin LM. Spermatogenesis in the golden hamster during the first spermatogenic wave: a flow cytometric analysis. *Molecular Reproduction and Development* 2000;55(2):205-211.
- Gong Y, Wu J, Huang Y, Shen S, Han X. Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicol Lett*. 2009;186(2):84-95.
- Gray LE, Ostby J, Marshall R, Andrews J. Reproductive and thyroid effects of low-level polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposure. *Fundamental and Applied Toxicology* 1993;20:288-294.
- Griswold MD, McLean D. The Sertoli cell. In: Neill JD (Ed.) *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 3th. Edition. USA: Elsevier Academic Press Publications; 2006. p. 949-976.
- Grunewald S, Sharma R, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Impact of caspase activation in human spermatozoa. *Microscopy Research and Technique* 2009;72 868–888.
- Guimaraes SB, Santos JMV, Aragao AA, Kimura ODS, Barbosa PHU, Vasconcelos PRL. Protective effect of α -lipoic acid in experimental spermatic cord torsion. *Nutrition* 2007;23:76-80.
- Guitton N, Brouazin-Jousseume V, Dupaix A, Jégou B, Chenal C. Radiation effect on rat Sertoli cell function in vitro and in vivo. *International of Journal Radiation Biology* 1999;75(3):327-333.
- Guo X, Shin VY, Cho CH. Modulation of heme oxygenase in tissue injury and its implication in protection against gastrointestinal diseases. *Life Sciences* 2001;69(25-26):3113-3119.
- Gules O, Eren U. The effect of xylene and formaldehyde inhalations on testicular tissue in rats. *Asian Australasian Association of Journal Animal Production Societies* 2010;23(11):1412-1420.

- Gupta S, Kumar H, Soni J. Effect of Vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology* 2005;64(6):1273-1286.
- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 1995;41(12):1819-1828.
- Güvenç D, Aksoy A. Poliklorlu Bifenillerin toksikolojisi. *Veteriner Hekimliği Dergisi* 2007;78(2):17-25.
- Haas GG Jr, Beer AE. Immunologic influences on reproductive biology: sperm gametogenesis and maturation in the male and female genital tracts. *Fertility and Sterility* 1986;46(5):753-766.
- Hackett AJ, Macpherson JW. Some staining procedures for spermatozoa. *The Canadian Veterinart Journal* 1965;6(3):55-62.
- Hagen TM, Ingersoll RT, Lykkesfeldt J, Liu J, Wehr CM, Vinarsky V..(R)- α - Lipoic acid-supplemented old rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and increased metabolic rate. *FASEB J* 1999;13(2):411-418.
- Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1989; 82: 747-752.
- Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: Its mechanism, measurement, and significance. *American Journal of Clinical Nutrition* 1993;57(7):15-25.
- Han DY, Kang SR, Park OS, Cho JH, Won CK, Park HS, Park KI. Polychlorinated biphenyls have inhibitory effect on testicular steroidogenesis by downregulation of P450_{17 α} and P450_{scc}. *Toxicology and Industrial Health* 2010a;26(5):287-296.
- Han SI, Kim YS, Kim TH. Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *Biochemistry and Molecular Biology Reports* 2008b;41(1):1-10.
- Handagama C, Ariyaratne S. Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biology of Reproduction* 2001;65:660-671.
- Harris GC, Nicholson HD. Stage-related differences in rat seminiferous tubule contractility in vitro and their response to oxytocin. *Journal of Endocrinology* 1998;157:251-257.

- Hassa O, Aştı RN. Embriyoloji. 3. Baskı. Ankara: Yorum basın yayını; 1997. s. 07-10.
- Hathcock JN, Azzi A, Blumberg J, Bray T, Dickinson A, Frei B. Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *American Journal of Clinical Nutrition* 2005;81(4):736-745.
- Henriksen K, Parvinen M. Stage-specific apoptosis of male germ cells in the rat: mechanisms of cell death studied by supravital squash preparations. *Tissue Cell* 1998;30:692-701.
- Hess RA. Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: Light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biology of Reproduction* 1990;43:525-542.
- Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2003;9:1-52.
- Hilscher W. The genetic control and germ cell kinetics of the female and male germ line in mammals including man. *Human Reproduction* 1991;6(10):1416-1425.
- Hileman EA, Achanta G, Huang P. Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2001;5(6):697-710.
- Horst GVD, Maree L, Kotzé SH, O'Riain JM. Sperm structure and motility in the eusocial naked mole-rat, *Heterocephalus glaber*: a case of degenerative orthogenesis in the absence of sperm competition? *BMC Evolutionary Biology* 2011; 11(351):1471-2148.
- Hossain MM, Richardson JR. Mechanism of pyrethroid pesticide-induced apoptosis: role of calpain and the ER stress pathway. *Journal of Toxicology Science* 2011;122(2):512-525.
- Howroyd P, Hoyle-Thacker R, Lyght O, Williams D, Kleymenova E. Morphology of the fetal rat testis preserved in different fixatives. *Toxicologic Pathology* 2005;33:300-304.
- Hsu PC, Li MH, Guo YL. Postnatal exposure of 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl and 2,2',3,4',5',6'-hexachlorobiphenyl on sperm function and hormone levels in adult rats. *Toxicology* 2003;187:117-126.

Hsu PC, Pan MH, Li LA, Chen CJ, Tsai SS, Guo YL. Exposure in utero to 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl (PCB 132) impairs sperm function and alters testicular apoptosis-related gene expression in rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2007;221:68-75.

<http://www.gkgm.gov.tr>. Erişim Tarihi: 10 Aralık 2011.

Huerta-Olvera SG, Macias-Barragan J, Bueno-Topete MR, Barriga-Martinez FD, Luz-Madrigal A, Siller-Lopez F. Lipoic acid regulates glutathione, heme oxygenase gene expression and nuclear Nrf2 activation as a mechanism of protection against exposure in HepG2 cells. *Toxicology Letters* 2008;180(1):35.

Iammarrone E, Balet R, Lower AM, Gillott C, Grudzinskas JG. Male infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* 2003;17(2):211-229.

Iqbal K, Khan A, Khatlak MA. Biological significance of ascorbic acid (Vitamin C) in human health. *Pakistan Journal of Nutrition* 2004;3(1):5-13.

Ischizaka N, Leon HD, Laursen JB. Angiotensin II-induced hypertension increases heme oxygenase-1 expression in rat aorta. *Circulation* 1997;96:1923-1929.

Ishizuka K, Kimura T, Yoshitake J. Possible assessment for antioxidant capacity in Alzheimer's disease by measuring lymphocyte heme oxygenase-1 expression with real-time RT-PCR. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2002;977:173-178.

Itoh M, Terayama H, Naito M, Ogawa Y, Tainosho S. Tissue microcircumstances for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice. *Journal of Reproductive Immunology*. 2005; 67 (1-2):57-67.

Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O. Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biology of Reproduction* 2004;70:290-296.

Johansen JS, Harris AK, Rychly DJ, Ergul A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology* 2005;4(5):1-11.

Johnson KE. *Histology and cell biology*. 2nd Ed. USA: Harwal Publishing Company; 1991. p. 295-304.

Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal Reproduction Science* 2000;60-61:471-480.

Junqueira LC, Carneiro J, Abrahamsohn PA, Dos Santos MF, Zorn TMT. Temel histoloji. In: Aytekin Y, Solakoğlu S. (Eds). İstanbul: Nobel Matbaacılık; 2006. p. 431-447.

Karaca EG, Sözbilir NB. Dietilnitrozamin verilen ratlarda alfa lipoik asidin koruyucu etkilerinin araştırılması. *Medical Journal of Kocatepe* 2007;7:11-17.

Kaufmann SH, Gores GJ. Apoptosis in cancer: cause and cure. *BioEssays* 2000;22:1007-1017.

Kaur P, Kaur G, Bansal MP. Tertiary-butyl hydroperoxide induced oxidative stress and male reproductive activity in mice: role of transcription factor NF-kappaB and testicular antioxidant enzymes. *Reproductive Toxicology* 2006;22(3):479-484.

Kaya H, Hany J, Fastabend A, Roth-Harer A, Winneke G, Lilienthal H. Effects of maternal exposure to a reconstituted mixture of polychlorinated biphenyl on sex-dependent behaviors and steroid hormone concentrations in rats: Dose-response relationship. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2002;178:71-81.

Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* 1992;95(3):825-830.

Khattab FKI. Histological and ultrastructurel studies on the testis of rat after treatment with aliminium chloride. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 2007;1(1): 63-72.

Kikuchi H, Yamashita K, Nakayama M, Toyonaga K, Tsuneyoshi I, Takasaki M, Nakayama T. Lacking of Aiolos accelerates pre-mature B cell apoptosis mediated by BCR signaling through elevation in cytochrome c release. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009;1793(7):1304-1314.

Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. *Science* 1995;270:96-99.

Kofler R. Immunofluorescence localization of glycoprotein hormones in the rat anterior pituitary gland using monoclonal antibodies and polyclonal antisera. *Journal of Histochemical Cytochemistry* 1982;30(7):645-649.

Krinke GJ. The laboratory rat. 1st Ed. Switzerland: Academic Pres; 2000. p. 150-312.

Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunkumar A, Vignesh RC, Aruldas MM, Arunakaran J. Ameliorative effect of vitamins (α -tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in rat epididymal sperm. *Reproductive Toxicology* 2007;23:239-245.

Krinsky NI, Johnson EJ. Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine* 2005;26(6):459-516.

Kruszewski M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutation Research* 2003;531(1-2):81-92.

Kumar JS, Banudevi S, Sharmila M, Murugesan P, Srinivasan N, Balasubramanian K, Aruldas MM, Arunakaran J. Effects of vitamin C and E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. *Reproductive Toxicology* 2004;19(2):201-208.

Kutlu S, Çolakoğlu N, Halifeoğlu I. Comparative evaluation of hepatotoxic and nephrotoxic effects of aroclors 1221 and 1254 in female rats. *Cell Biochemistry and Function*; 2005.

Leblond CP, Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of New York Academy of Science* 1952;55:548-573.

Lee DW, Notter SA, Thiruchelvam M, Dever DP, Fitzpatrick R, Kostyniak PJ, Cory-Slechta DA, Opanashuk LA. Subchronic polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposure produces oxidative damage and neuronal death of ventral midbrain dopaminergic systems. *Journal of Toxicological Sciences* 2012;125(2):496-508.

Lee JH, Sul D, Oh E, Jung WW, Hwang KW, Hwang TS, Lee KC, Won NH. Panax ginseng effects on DNA damage, CYP1A1 expression and histopathological changes in testes of rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Food and Chemical Toxicology* 2007;45(11):2237-2244.

Lee TS, Chau LY. Heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effect of interleukin-10 in mice. *Nature Medicine* 2002;8:240-246.

Leeson RC, Leeson ST, Paparo AA. Textbook of Histology. London: WB Saunders Company; 1985. p. 486-489.

Leon J , Acuña-Castroviejo D , Sainz, RM , Mayo JC , Tan DX , Reiter RJ . Melatonin ve mitokondriyal fonksiyon. Yaşam Bilim 2004;75(7):765-790.

Lilienthal H, Fastabend A, Hany J. Reduced levels of 1.25-Dihydroxyvitamin D3 in rat dams and offspring after exposure to a reconstituted PCB mixture. Toxicological Sciences 2000;57:292-301.

Lindell B. 146. Polychlorinated biphenyls (PCBs). Environmental Medicine at Sahlgrenska Academy 2012;46(I).

Liu XM, Chapman GB, Peyton KJ, Schafer AI, Durante W. Carbon monoxide inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells. Cardiovascular Research 2002;55:396-405.

Lombardo YB, Chicco AG. Effect of dietary polyunsaturated n-3 fatty acids on dyslipidemia and insulin resistance in rodents and humans. Journal of Nutritional Biochemistry 2006;17:1-13.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 1951; 193:265-275.

Macleane JA 2nd, Hayashi K, Turner TT, Wilkinson MF. The rhox5 homeobox gene regulates the region-specific expression of its paralogs in the rodent epididymis. Biology of Reproduction 2012;86(6):189.

Maekawa M, Kamimura K, Nagano T. Peritubular myoid cells in the testis: their structure and function. Archives of Histology and Cytology 1996;59(1):1-13.

Marcon L, Hales BF, Robaire B. Reversibility of the effects of subchronic exposure to the cancer chemotherapeutics bleomycin, etoposide, and cisplatin on spermatogenesis, fertility, and progeny outcome in the male rat. Journal of Andrology 2008;29(4):408-417.

Matsui Y. The molecular mechanisms regulating germ cell development and potential. Journal of Andrology 2010;31:61-65.

Masuda Y. Health status of Japanese and Taiwanese after exposure to contaminated rice oil. Environmental Health Perspectives 1985;60:321-325.

Meehan T, Loveland KL, de Kretser D, Cory S, Print CG. Developmental regulation of the bcl-2 family during spermatogenesis: insights into the sterility of bcl-w^{-/-} male mice. *Cell Death & Differentiation* 2001;8(3):225-33.

Mehranjani MS, Noorafshan A, Momeni HR, Abnosi MH, Mahmoodi M, Anvari M, Hoseini SM. Stereological study of the effects of vitamin E on testis structure in rats treated with para-nonylphenol. *Asian Journal of Andrology* 2009;11(4):508-516.

Mohasseb M, Ebied S, Yehia MA, Hussein N. Testicular oxidative damage and role of combined antioxidant supplementation in experimental diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry* 2011;67(2):185-94.

Mok KW, Mruk DD, Lee WM, Cheng CY. A study to assess the assembly of a functional blood-testis barrier in developing rat testes. *Spermatogenesis* 2011;1(3):270-280.

Momeni HR, Oryan S, Eskandari N. Effect of vitamin E on sperm number and testis histopathology of sodium arsenite-treated rats. *Biology of Reproduction* 2012;12(2):171-181.

Moore KL, Persaud TVN. Klinik yönleri ile insan embriyolojisi. In: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (ed.) 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evi; 2002.

Moseroova I, Kralova J. Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. *PLoS One*. 2012;7(3):e32972.

Motawi TM, Sadik NA, Refaat A. Cytoprotective effects of DL-alpha-lipoic acid or squalene on cyclophosphamide-induced oxidative injury: an experimental study on rat myocardium, testicles and urinary bladder. *Food and Chemical Toxicology* 2010; 48(8-9):2326-2336.

Murugesan P, Balaganesh M, Balasubramanian K, Arukaran J. Effects of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) on steroidogenesis and antioxidant system in cultured adult rat Leydig cells. *Journal of Endocrinology* 2007;192(2):325-338.

Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K, Arukaran J. Studies on the protective role of vitamins C and vitamin E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) induced oxidative damage in Leydig cells. *Free Radical Research* 2005;39:1259-1272.

Muthuvel R, Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Gunadharini DN, Kanagaraj P, Stanley AJ, Srinivasan N, Baasubramanian K, Aruldas MM, Aruldas J, Arunakaran J. Antioxidant effect of ascorbic acid on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress in hypothalamus of albino rats. *Clinica Chimica Acta* 2006;365:297-303.

Nadege B, Patrick L, Rodrigue R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. *Frontiers in Bioscience* 2009; 14: 4015-4034.

Narayana K, D'Souza UJA, Seetharama Rao KP. Ribavirin-induced sperm shape abnormalities in Wistar rat. *Mutation Research* 2002;513:193-196.

Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Bairy LK, D'Souza UJA. An organophosphate insecticide methyl parathion (O- O- dimethyl O-4 nitrophenyl phosphorothioate) induces cytotoxic damage and tubular atrophy in the testis despite elevated testosterone level in the rat. *Journal of Toxicological Sciences* 2006;31(3):177-189.

Nath KA, Balla G, Vercellotti GM. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *Journal of Clinical Investigation* 1992;90:267-270.

Noyan A. Yaşam ve hekimlikte fizyoloji. 17. baskı. Ankara: Mateksan yayınları; 2008.

Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *American Journal of Anatomy* 1956;99:507-516.

O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, McLachlan RI. Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: Neill JD (Ed.) *Knobil and Neill's physiology of reproduction*. 3th Edition. USA: Elsevier Academic Press Publications; 2006. p. 1017-1070.

Orth JM. Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *Anatomical Record* 1982;203(4):485-92.

Oskam IC, Ropstad E, Smith AJ, Skaare JU, Tverdal A, Berg KA, Viger R. Effects of PCB 99 and PCB 153 exposure on spermatogenesis in young adult C57BL6 mice. *Reproductive Toxicology* 2004;19:169-180.

Ostrer H. Sexual differentiation. *Seminars in Reproductive Medicine* 2000;18(1):41-49.

Ozan T, Firdolaş F, Orhan İ. Deneysel çalışmalarda priapizm: Kliniğe yansımalar. Türk Üroloji Seminerleri 2011;2:281-287.

Ozawa N, Goda N, Makino N, Yamaguchi T, Yoshimura Y, Suematsu M. Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stres. Journal of Clinical Investigation 2002;109(4):457-467.

Özkaya A, Çelik S, Yılmaz Ö. 7,12-Dimetilbenz(a)antrasen verilen kobayların beyin lipid bileşenleri üzerine α -lipoik asit'in etkisi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 2009;21(1):61-65.

Özler M, Ersöz N, Özerhan İH, Topal T, Öter Ş, Korkmaz A. The effect of alpha-lipoic acid in the prevention of peritoneal adhesions. Turkish Journal of Gastroenterology 2011;22(2):190-194.

Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2002;9(2):143-148.

Padmalayam I, Hasham S, Saxena U, Pillarisetti S. Lipoic acid synthase (LASy) a novel role in inflammation, mitochondrial function, and insulin resistance. Diabetes Journals 2008.

Park HH. Structural features of caspase-activating complexes. International Journal of Molecular Sciences 2012;13(4):4807-4818.

Park SH, Jang JH, Chen CY, Na HK, Surh YJ. A formulated red ginseng extract rescues PC12 cells from PCB-induced oxidative cell death through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1 and glutamate cysteine ligase. Toxicology 2010;278(1):131-139.

Parvinen M, Hecht NB. Identification of living spermatogenic cells of the Mouse by transillumination-phase contrast microscopic technique for 'in situ' analyses of DNA polymerase activities. Histochemistry 1981;71(4):567-579.

Perham RN. Domains, motifs and linkers in 2-oxo-acid dehydrogenase multienzyme complexes:a paradigm in the design of a multifunctional protein. Biochemistry 1991;30:8501-8512.

Pocar P, Fiandanese N, Secchi C, Berrini A, Fischer B, Schmidt JS, Schaedlich K, Rhind SM, Zhang Z, Borromeo V. Effects of polychlorinated biphenyls in CD-1 mice: reproductive toxicity and intergenerational transmission. Journal of Toxicology Sciences 2012;126(1):213-226.

- Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P. Remedial effect of DL-alpha-lipoic acid against adriamycin induced testicular lipid peroxidation. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004;267(1-2):209-14.
- Prahalathan C, Selvakumar E, Varalakshmi P. Modulatory role of lipoic acid on adriamycin-induced testicular injury. *Chemico-Biological Interactions* 2006;160(2):108-114.
- Rangan U, Bulkley GB. Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *British Medical Bulletin* 1993;49(3):700-718.
- Raychoudhury SS, Flowers AF, Millette CF, Finlay MF. Toxic effects of polychlorinated biphenyls on cultured rat Sertoli cells. *Journal of Andrology* 2000;21(6):964-973.
- Reed LJ. A trail of research from lipoic acid to alpha-keto acid dehydrogenase complexes. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:38329-38336.
- Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *American Journal of Surgery* 1991;161(4):488-503.
- Ribeiro EP, Rhoden EL, Horn MM, Rhoden C, Lima LP, Toniolo L. Effects of subchronic exposure to radio frequency from a conventional cellular telephone on testicular function in adult rats. *Journal of Urology* 2007;177:395-399.
- Robertson LW, Hansen LG. PCBs:Recent advances in environmental toxicology and health effects. Lexington KY: University Press of Kentucky; 2001.
- Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *EMBO Journal* 1997;16:2262-2270.
- Ross G. The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2004;59(3):275-291.
- Russell LD, Chiarini-Garcia H, Korsmeyer SJ, Knudson M. Bax-dependent spermatogonial apoptosis is required for testicular development and spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 2002; 66:950-958.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989. p. 18.47-18.58.

Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregón E. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on the mouse testis. *Ecotoxicology and Environmental Safety Journal* 2009;72(3):938-942.

Sato K, Balla J, Otterbein L. Carbon monoxide generated by heme oxygenase-1 suppresses the rejection of mouse-to-rat cardiac transplants. *Journal of Immunology* 2001;166:4185-4196.

Schipper HM. Heme oxygenase expression in human central nervous system disorders. *Free Radical Biology&Medicine* 2004;37(12):1995-2011.

Schrader JT, Cooke MG. Effects of Aroclors and individual PCB congeners on activation of the human androgen receptor in vitro. *Reproductive Toxicology* 2003;17:15-23.

Selvakumar E, Prahalathan C, Mythili Y, Varalakshmi P. Protective effect of DL-alpha-lipoic acid in cyclophosphamide induced oxidative injury in rat testis. *Reproductive Toxicology* 2004;19(2):163-7.

Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Protective effect of lipoic acid on cyclophosphamide-induced testicular toxicity. *Clinica Chimica Acta* 2006;367:114-119.

Semercioz A, Onur R, Ogras S, Orhan I. Effects of melatonin on testicular tissue nitric oxide level and antioxidant enzyme activities in experimentally induced left varicocele. *Neuro Endocrinology Letters* 2003;24(1-2):86-90.

Sen Gupta R, Sen Gupta E, Dhakal BK, Thakur AR, Ahnn J. Vitamin C and vitamin E protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. *Molecules and Cells* 2004;17(1):132-139.

Setchell BP. The functional significance of the blood-testis barrier. *The Journal of Andrology* 1980;1:3-10.

Seyran A, Erişir M. Poli klorlu bifeniller ve sağlık üzerine etkileri. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi* 2008;22(1):33-40.

Shaha C, Tripathi R, Mishra DP. Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 2010;365:1501-1515.

Shain W, Overmann SR, Wilson LR, Kostas J, Bush B. A congener analysis of polychlorinated biphenyls accumulating in rat pups after perinatal exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1986; 15:687-707.

Sharpe RM. Possible role of elongated spermatids in control of stage-dependent changes in the diameter of the lumen of the rat seminiferous tubule. *Journal of Andrology* 1989;10(4):304-310.

Sharpe RM, Fraser HM, Ratnasooriya WD. Assessment of the role of Leydig cell products other than testosterone in spermatogenesis and fertility in adult rats. *International Journal of Andrology* 1988;11:507-523.

Shimokawa H, Morikawa K. Hydrogen peroxide is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in animals and humans. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2005;39(5):725-732.

Shiraishi K, Naito K. Increased expression of Leydig cell haem oxygenase-1 preserves spermatogenesis in varicocele. *Human Reproduction* 2005;20(9):2608-2613.

Silva D, Lizama C, Tapia V, Moreno RD. Propylthiouracil-induced hypothyroidism delays apoptosis during the first wave of spermatogenesis. *Journal of Biological Research* 2011;44: 181-188.

Singh PK, Kumar R, Sharma A, Arora R, Chawla R, Jain SK, Tripathi RP, Sharma RK. Role of apoptotic proteins in REC-2006 mediated radiation protection in hepatoma cell lines. *Evidence-Based Complement Alternative Medicine* 2011;758326.

Singh U, Jialal I. Alpha-lipoic acid supplementation and diabetes. *Nutrition Reviews* 2008;66(11):646-657.

Sinkkonen S, Paasivirta J. Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling. *Chemosphere*. 2000;40(9-11):943-949.

Sipka S, Eum SY, Son KW, Xu S, Gavalas VG, Hennig B, Toborek M. Oral administration of PCBs induces proinflammatory and prometastatic responses. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2008;25:251-259.

Sitarek K, Gralewicz S. Early developmental effects of separate or combined perinatal exposure to combined perinatal exposure to methylmercury (MeHg) and 2,2',3,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) in the rat. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 2009;22(2):89-105.

Song C, Xie C, Zhou Z, Yu SH, Fang N. Anti-diabetic effect of an active components group from *Illex kudingcha* and its chemical composition. *Key Laboratory Of Chinese Medicine Resource and Compound Prescription* 2011;6.

Spandro RL, Collins TFX, Black T, Olejnik N, Rorie J. Testing the potential of sodium fluoride to affect spermatogenesis: a morphometric study. *Food and Chemical Toxicology* 1998;36:1117-1124.

Speers-Roesch B, Ballantyne JS. Activities of antioxidant enzymes and cytochrome c oxidase in liver of Arctic and temperate teleosts. *Comparative Biochemistry and Physiology A: Molecular&Integrative Physiology* 2005;140(4):487-494.

Sridhar M, Venkataraman P, Dhanammal S, Arunkumar A, Aruldas MM, Srinivasan N, Arunakaran J. Impact of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) and vitamin C on antioxidant system of rat ventral prostate. *Asian Journal of Andrology* 2004;6(1):19-22.

Su L, Mruk DD, Lui WY, Cheng CY. Drug transporters, the blood-testis barrier and spermatogenesis. *Journal of Endocrinology* 2011;208:207-223.

Şanlı Y. Veteriner klinik toksikoloji. Ankara: Güngör Matbaacılık; 2002. p. 808.

Şişman T. Poliklorlu bifenil bileşiklerinin *Danio rerio*'nun (Zebra balığı) gelişimi üzerine etkileri. Doktora Tezi. Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum, Türkiye. 2007.

Takano H, Abe K. Age-related histologic changes in the adult mouse testis. *Arch. Histol. Jab.* 1987;50(5):533-544.

Tanaka S, Akaike T, Fang J. Antiapoptotic effect of heme oxygenase-1 induced by nitric oxide in experimental solid tumor. *British Journal of Cancer* 2003;88:902-909.

Tanyolaç A. Özel Histoloji. 3. baskı. Ankara: Yorum Basın Yayın; 1999. p. 132-143.

Teerds KJ, De Rooij DG, De Jong FH, Van Haaster LH. Development of the adult type leydig cells cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels. *Biology of Reproduction* 1998;59:344-350.

Tekbaş ÖF. Chemicals and reproductive health. TAF Preventive Medicine Bulletin 2006;5(1):50-59.

Telefoncu A, Zihnioğlu F. Göllerdeki kimyasal kirlilik ve insan sağlığına etkisi. Ekoloji, Erişim: <http://www.ekolojidergisi.com.tr/resimler/4-9.pdf>. Erişim Tarihi: 21Aralık 2011.

Telli-Karakoç F, Tolun L, Henkelmann B. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) distributions in the Bay of Marmara sea: İzmit Bay. Environmental Pollution 2002;119:383-397.

Toure A, Rode B, Hunnicutt GR, Escalier D, Gacon G. Septins at the annulus of mammalian sperm. The Journal of Biological Chemistry 2011;392(8-9):799-803.

Tres LL, Rosselot C, Kierszenbaum AL. Primordial germ cells: What does it take to be Alive. Molecular Reproduction and development 2004;68:1-4

Tullius SG, Nieminen-Kelha M, Buelow R. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1. Transplantation 2002;74:591-598.

Uçgun Nİ, Yarısan A, Düzgünçinar Ö, Gürsel E. Diabetik retinopati ve oksidatif stres. Ret-Vit 2005;13:299-302.

Ulbrich B, Stahlmann R. Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data. Archives of Toxicology 2004;78:252-268.

Ulukaya E. Apoptosis Ders Notları. Bursa: 2003.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Toxicology 2003;189(1-2):41-54.

Vaisheva F, Delbes G, Hales BF, Robaire B. Effects of the chemotherapeutic agents for non-hodgkin lymphoma, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone (CHOP), on the male rat reproductive system and progeny outcome. Journal of Andrology 2007;28(4):578-587.

Valko M, Rhodes CJ, Moncola J, Izakovic M, Mazura M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chemico-Biological Interactions 2006;160:1-40.

Van Golen CM, Feldman EL. Insulin-like growth factor I is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis. *J Cell Physiol.* 2000;182(1):24-32.

Venkataraman P, Sridhar M, Dhanammal S, Vijayababu MR, Arunkumar A, Srinivasan N, Arunakaran J. Effects of vitamin supplementation on PCB (Aroclor 1254)-induced changes in ventral prostatic androgen and estrogen receptors. *Endocrine Research* 2004;30(3):469-480.

Ventela S. Regulation of spermatogenesis: Differentiation of GFP-labeled stemm cells and the function of cytoplasmic bridges. Turun Ylipiston Julkaisija Annales Universitatis Turkuensis, Turku, 2003.

Wagner M, Cadetg P, Ruf R, Mazzucchelli L, Ferrari P, Redaelli CA. Heme oxygenase-1 attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis and improves survival in rat renal allografts. *Kidney International* 2003;63:1564-1573.

Walker WH. Molecular mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation. *Endocrinology* 2003;144(9):3719-3721.

Wang C, Cui YG, Wang XH, Jia Y, Sinha Hikim A, Lue YH, Tong JS, Qian LX, Sha JH, Zhou ZM, Hull L, Leung A, Swerdloff RS. transient scrotal hyperthermia and levonorgestrel enhance testosterone-induced spermatogenesis suppression in men through increased germ cell apoptosis. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2007;92(8):3292-3304.

Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY. Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *American Journal of Pathology* 1998;152:711:720.

Weinbauer GF, Luetjens CM, Simoni M, Nieschlag E. Physiology of Testicular Function. In: Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S (eds.), *Andrology*. Germany: Springer; 2010. p. 11-59.

WHO (World Health Organization). Polychlorinated biphenyls and terphenyls (Second Edition). *Environmental Health Criteria* 1993, Geneva, 140.

Wilhelm D, Palmer S, Kopman P. Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiological Reviews* 2007;87:1-28.

Wing TY, Christensen AK. Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *American Journal of Anatomy* 1982;165:13-25.

- Wolf KN, Wildt DE, Vargas A, Marinari PE, Kreeger JS, Ottinger MA, Howard JG. Age-dependent changes in sperm production, semen quality, and testicular volume in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*). *Biology of Reproduction* 2000;63:179–187.
- Wrobel KH, Schimmel M. Morphology of the bovine sertoli cell during the spermatogenetic cycle. *Cell and Tissue Research* 1989;257:93-103.
- Xing G. Human Exposure and Health Risk Assessment of Polychlorinated Biphenyls at Two Major Electronic-Waste Recycling Sites in China. Doktora Tezi. Hong Kong Baptist University, 2008.
- Yamada N, Yamaya M, Okinaga S. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *American Journal of Human Genetics* 2000;66:187-195.
- Yan P. Male Reproductive Physiology. In: Zhao XX, Zhang RC (Eds.), *Recent Advances in Yak Reproduction*. USA: International Veterinary Information Service; 2000.
- Yan W, Suominen J, Samson M, Jegou B, Toppari J. Involvement of Bcl-2 family proteins in germ cell apoptosis during testicular development in the rat and pro-survival effect of stem cell factor on germ cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000;165:115-129.
- Yang ZW, Wreford NG, de Kretser DM. A quantitative study of spermatogenesis in the developing rat testis. *Biology of Reproduction* 1990;43(4):629-635.
- Yapar SB. Alfa lipoik asitin rat karaciğer homojenatlarında indüklenmiş lipid peroksidasyonuna etkisi. Uzmanlık Tezi. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Edirne, Türkiye, 2006.
- Yeni D, Fidan AF, Çiğerci IH, Konuk M, Avdatek F, Gündoğan M. Effect of α -lipoic acid on sperm quality, reproductive tract measures in thinner exposed rats. *Andrologia* 2012;44(1):74-80.
- Yılmaz B. Hormonlar ve üreme fizyolojisi. 1. baskı, Ankara: Feryal Matbaacılık, 1999. s. 340-397.
- Yılmaz İ. Apoptozis. Sağlık Bakanlığı-Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği; 2005a.

Yılmaz İ. Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi; ve yükselmiş olan apoptozisin varikozektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye. 2005b.

Yılmaz F. Desfluranın antioksidan etkinliğinin propofol ile karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta, Türkiye, 2006.

Ying Y, Qi X, Zhao GQ. Induction of primordial germ cells from pluripotent epiblast. The Scientific World Journal 2002;2:801-810.

Zangar RC, Davydov DR, Verma S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. Toxicology and Applied Pharmacology 2004;199(3):316-331.

Zemunik T, Peruzovic M, Capkun V, Zekan L, Tomic S, Milkovic K. Reproductive ability of pubertal male and female rats. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 2003;36: 871-877.

Zhang C, Fang C, Liu L, Xia G, Qiao H. Disrupting effects of polychlorinated biphenyls on gonadal development and reproductive functions in chickens. Journal of Environmental Science Health A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering 2002;37(4):509-519.

Zhang Q, Huang X. Induction of interleukin-6 by coal containing bioavailable iron is through both hydroxyl radical and ferryl species. Journal of Bioscience 2003;28(1):95–100.

Zhang YM. Protective effect of quercetin on aroclor 1254-induced oxidative damage in cultured chicken spermatogonial cells. Journal of Toxicological Sciences 2005;88(2):545-50.

Zheng S, Turner TT, Lysiak JJ. Caspase 2 activity contributes to the initial wave of germ cell apoptosis during the first round of spermatogenesis. Biology of Reproduction 2006;74:1026-1033.

Zhou XC, Wei P, Hu ZY, Gao F, Zhou RJ, Liu YX. Role of Fas/FasL genes in azoospermia or oligozoospermia induced by testosterone undecanoate in rhesus monkey. Acta Pharmacologica Sinica 2001;22(11):1028-1033.

Zirkin BR, Chen H. Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biology of Reproduction* 2000;63:977–981.

Zwaka TP, Thomson JA. A germ cell origin of embryonic stem cells? *Development* 2005;132:227-233.



ÖZGEÇMİŞ

İzmir’de 1979 yılında doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi İzmir’de tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2003 yılında mezun oldu. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı’nda 2003 yılında Yüksek Lisans Eğitimine başladı. Askerliğini 2005-2006 yılları arasında Ankara Zırhlı Birlikler Okulu ve Eğitim Tümen Komutanlığı’nda Gıda Kontrol Subayı olarak yaptı. Yüksek Lisans Eğitimini 2007 yılında tamamladı ve aynı yıl Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Doktora eğitime başladı. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı’nda 2004-2009 yılları arasında Araştırma Görevlisi olarak çalıştı. T.C. Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Aydın İl Müdürlüğü Gıda ve Yem Şube Müdürlüğüne 2009 yılında atandı. Halen Gıda ve Yem Şube Müdürlüğünde Veteriner Hekim olarak çalışmaktadır. Evli ve bir erkek çocuk babasıdır.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında her türlü bilgi birikimiyle bana yol gösteren, ilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Ülker EREN'e, araştırma sırasında dokulardaki histolojik değişimlerin belirlenmesindeki yardımlarından dolayı Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Serap BİRİNCİOĞLU'na, Western blot tekniğinin uygulanması sırasındaki yardımlarından dolayı Parazitoloji Anabilim Dalı öğretim elemanı Dr. Hüseyin Bilgin BİLGİÇ'e, biyokimyasal metotların uygulanması sırasındaki yardımlarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim elemanı Dr. Hasan AKŞİT'e teşekkür ederim. Ayrıca eğitim hayatım boyunca hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen sevgili annem ve babam ile çalışmalarım sırasında manevi desteği ile hep yanımda olan sevgili eşime ve bana neşe kaynağı olan sevgili oğlum Doruk Nebi'ye en derin sevgi ve şükranlarımı sunarım.