

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ETANOLÜN FARE TESTİSİ ÜZERİNE OLAN TOKSİSİTESİNE KARŞI
ASKORBİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİNİN MİKROSKOPİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Gültaç TIĞDAŞ

TRABZON-2006

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ETANOLÜN FARE TESTİSİ ÜZERİNE OLAN TOKSİSİTESİNE KARŞI
ASKORBİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİNİN MİKROSKOPİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

Yüksek Lisans Tezi

Gültaç TİĞDAŞ

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON-2006

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ETANOLÜN FARE TESTİSİ ÜZERİNE OLAN TOKSİSİTESİNE KARŞI
ASKORBİK ASİTİN KORUYUCU ETKİSİNİN MİKROSKOPİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

Gültaç TİĞDAŞ

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih:

Tezin Sözlü Savunma Tarihi:

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Engin YENİLMEZ

Jüri Üyesi: Prof.Dr. Yavuz ÖZORAN

Jüri Üyesi: Doç.Dr. Yavuz TEKELİOĞLU

Enstitü Müdürü: Prof.Dr. Orhan DEĞER

Trabzon-2006

TEŐEKKÖR

Tez konumun seğimi, yűrűtűlmesi ve değerlendirilmesinde desteğini ve sabrını esirgemeyen değerli danıőman hocam Doę.Dr. Engin YENİLMEZ'e, asistanlığım boyunca bilgilerini ve manevi desteğini esirgemeyen değerli hocam Doę.Dr. Yavuz TEKELİÖğLU'na, Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. Haluk ARVAS'a, yine değerli hocalarımız Doę.Dr. Sevim AYDIN ve Yrd.Doę. Esin YULUę'a, ıőık ve elektron mikroskobu takipleri sırasında yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşım Songűl ERSOY'a, Patoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof.Dr. Yavuz ÖZORAN'a, Sağlık Bilimleri Enstitűsű yűnetici ve ęalıőanlarına, Cerrahi Araőtırma Merkezi yűneticilerine, tezimin istatistiksel sonuğlarının değerlendirilmesinde katkılarını esirgemeyen Halk Sağlığı Anabilim Dalı asistanı Dr. Asuman YAVUZYILMAZ'a, değerli asistan arkadaşlarım Dr. Erkan ERDEM, Dr. Serdar YARAR ve Dr. Özlem İPCİ'ye sonsuz teőekkűrlerimi ve hayatta olmasa da, manevi olarak her zaman yanımda hissettiğim değerli babacığıma minnettarlığımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
3. MATERYAL VE METOD	10
4. BULGULAR	12
5. TARTIŞMA	22
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	25
7. ÖZET	26
8. İNGİLİZCE ÖZET	27
9. KAYNAKLAR	28

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Testisler, cinsiyet karakterleri gelişimi ile yardımcı üreme bezleri fonksiyonu için gerekli bir hormon olan testosteronu ve üreme için çok önemli olan spermatozoonları üretmektedirler (1). Bu organ dışardan verilen veya alınan toksik maddelerden kolaylıkla etkilenmektedir.

Testis için toksik olan maddelerden biri de etanoldür (2, 3, 4, 5). Etanol bazı toplumlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (6). Kronik etanol alan erkeklerde, hipotalamus-hipofiz-gonad aksı bozulmakta (7), üreme bozuklukları (5, 8, 9,), impotens, lipido kaybı (4), hipogonadizm, feminizasyon (2), seksüel, spermatogenez (10) ve fertilite (7, 11) bozuklukları, testiste oksidatif stresde artma (7), steroidojenik enzim aktivitelerinde azalma (12), testis atrofisi (2, 4, 7, 13) ve bu organ ağırlığında azalma (14) olmaktadır.

Askorbik asit (vitamin C) normal vücut fonksiyonları için gerekli olan, suda çözünen (15), antioksidan bir vitamindir (6, 15). Bu vitamin verilen erkek sıçanlarda, yüksek fertilite oranları belirlenmiştir (16). Ayrıca etanol etkisiyle oluşan oksidatif streste artma (7, 17) ve steroidogenezdeki azalmanın, askorbik asit tedavisi ile ters çevrilebileceği (17) bildirilmektedir.

Bu çalışma testiste etanol etkisiyle oluşan dejeneratif etkilerin askorbik asit sayesinde düzelebileceği fikrinden hareketle planlandı ve gerçekleştirildi. Etanolün fare testislerinde oluşturduğu dejeneratif etkiler ve askorbik asitin etanol toksisitesine karşı koruyucu etkilerinin olup olmadığı ışık ve elektron mikroskopik düzeyde araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

TESTİSLERİN EMBRİYOLOJİSİ

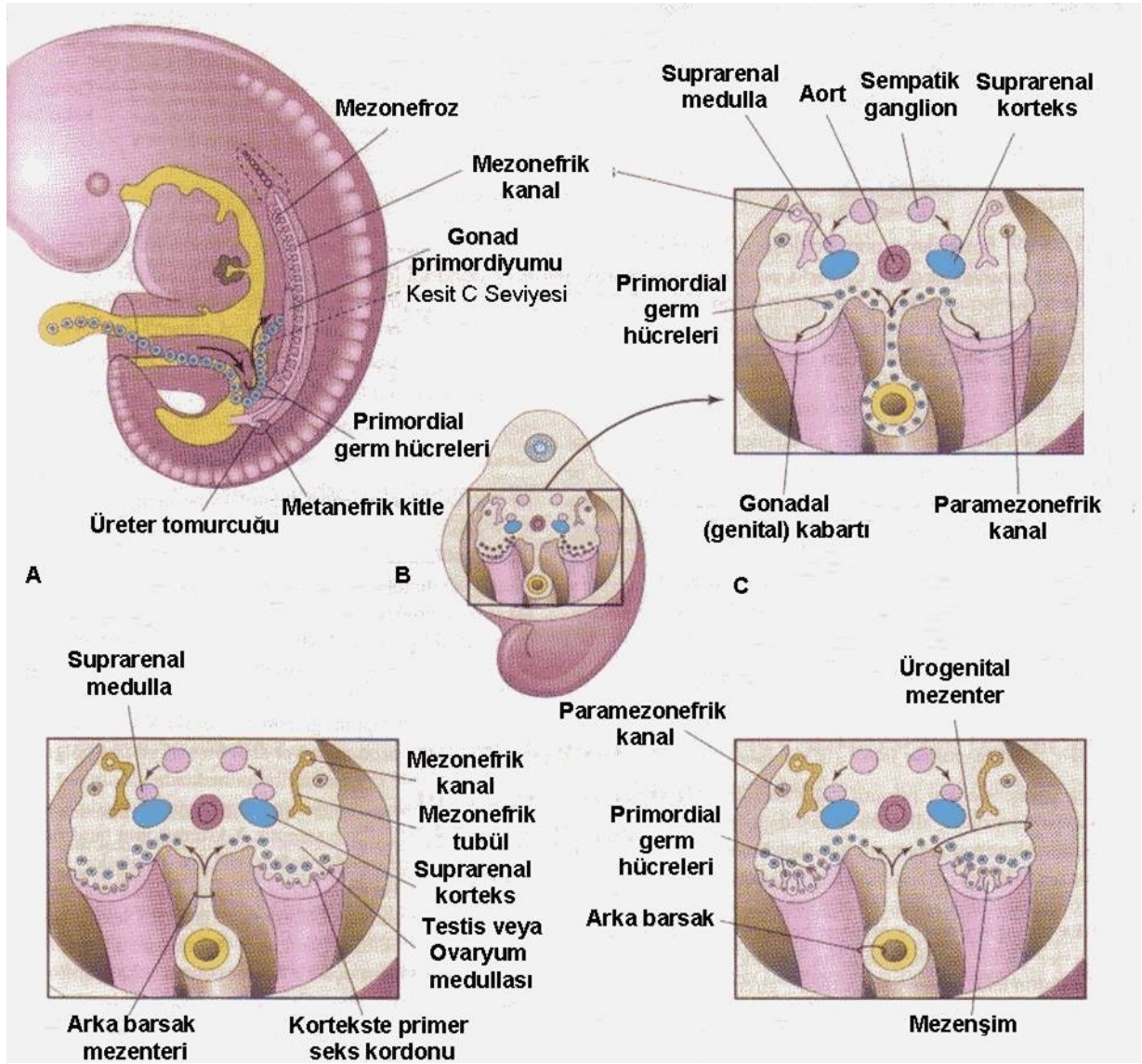
Vitellus kesesi duvarındaki endodermal **primordial germ hücrelerinin** 3. haftada allantoisi aşarak barsağın arka kısmında mezenter kökü (Radix mesenterii)'nin sağında ve solunda mezonefrozun medialindeki mezoteldeki gonadal kabartı (**Plica genitalis**) içine girmesi ve buradaki hücreleri indüklemesi (5. hafta başı) ile gonad taslakları gelişmeye başlar. Embriyonun erkeklik veya dişilik yönünde gelişmeye başlaması 7. haftadan itibaren gerçekleşir.

Erkekte veya dişide primordial hücrelerin etrafını plika içindeki mezodermal hücreler sarar. Endodermal primordial hücrelerden germinal hücreler (gonositler = erkekte **spermatogoniumlar**, dişide oogoniumlar), mezodermal hücrelerden ise destek hücreleri (erkekte **Sertoli hücreleri**, dişide ise folikül hücreleri) gelişir.

Seks kromozom kompleksinde Y kromozomu taşıyan embriyolarda testisler gelişir. Primer seks kordonları uzayarak farklılaşmamış gonad medullasına kadar iner. Kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomozlar yapar ve **rete testisi** oluştururlar. Gonad taslakları dışında Tunica albuginea geliştikten sonra seks kordonları **seminifer tubullere** ve **düz tubullere** (Tubuli recti) farklılaşırlar (Şekil 1). Seminifer tubuller arasındaki mezenşimden **Leydig hücreleri** gelişir ve bu hücreler 8. haftadan itibaren testosteron yapmaya başlarlar.

Ergenlikten önce seminifer tubuller içinde sadece Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar vardır ve tubulde lümen oluşmamıştır; mitoz bölünme izlenir, mayoz bölünme ise izlenmez (18). Ergenlikten sonra bu hücrelere primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon da eklenir (18, 19).

Kalıntı mezonefrik tubullerden efferent kanallar oluşur ve epididimi oluşturan mezonefrik kanala bağlanırlar (18).



Şekil 1. Primordial germ hücrelerinin vitellus kesesi duvarından Plica genitalise göçü (18).

TESTİSLERİN HİSTOLOJİSİ

Her bir testis **tunica albuginea** adı verilen kalın bir bağ dokusu kapsülü ile sarılmıştır. Organın arka tarafında bu bağ dokusu her iki testisin de iç kısmına doğru girerek **mediastinum testisi** yapar. Mediastinum testisten çıkan ince bağ dokusu bölmeleri olan **septumlar**, testisi **testis lobülleri** olarak isimlendirilen, sayıları 250 kadar olan, kompartmana ayırırlar. Bu kompartmanların her birinde bir ila dört adet arasında **seminifer tubul** bulunur. Her seminifer tubul çok katlı **germinal epitel** ile örtülüdür. Germinal epitel, spermatogenik (**germinal**) **hücreler** (=germ hücreleri) ve çoğalma göstermeyen **Sertoli** (sustentaküler = destek) **hücrelerinden** oluşur (Şekil 2). Burada, olgunlaşan spermatogenik hücreler spermiyumlara dönüşür (1, 20, 21). Seminifer tubuller içinde, germ ve Sertoli hücrelerinde

peroksizomlar bulunmaktadır. Tipik küçük yapılı peroksizomlar, spermatogoniada yoğunlaşmakta ve spermatogenez basamakları sırasında ortadan kaybolmaktadırlar (22). Seminifer tubuller kas-benzeri hücreler (**miyoid hücreler**), fibroblastlar, sinirler, kan damarları ve lenf damarları ile sarılıdır. Seminifer tubuller arasında testosteron üreten kümeler halinde yerleşmiş **Leydig**'in interstisyel **hücreleri** bulunur (1, 21). Farelerdeki testis interstisyumu; vaskülit, lenfanjit, spermatik granuloma ve polimorfonükleer hücre infiltrasyonuna karşı dayanıklıdır. Testis içerisinde normal olarak bir çok sabit makrofaj bulunmasına rağmen, kan-testis bariyeri dışındaki testis dokusu da inflamatuvar hücre infiltrasyonuna karşı korunur (19). Testisin interstisyel dokusunda yerleşmiş olan makrofajlar Leydig hücrelerinin fonksiyonu ve farklılaşması için önemlidir. Leydig hücrelerinin apoptozu, Leydig hücre miktarının regülasyonunda rol oynamaktadır (23).

Spermiler, **kıvrıntılı seminifer tubuller**den çıktıktan sonra **düz tubullere** (tubuli rekti) girer. Buradan da **rete testis** (testis ağı) adı verilen ve mediastinum testiste yerleşmiş olan epitelle döşeli boşluklara ulaşırlar. Rete testisten **duktuli efferentes** (getirici kanallar) aracılığı ile epididimisin baş kısmına geçen spermiler, ejakülasyon esnasında kuvvetli düz kas kasılmaları ile **duktus deferense** (götürücü kanal), oradan da üretraya boşaltılır.

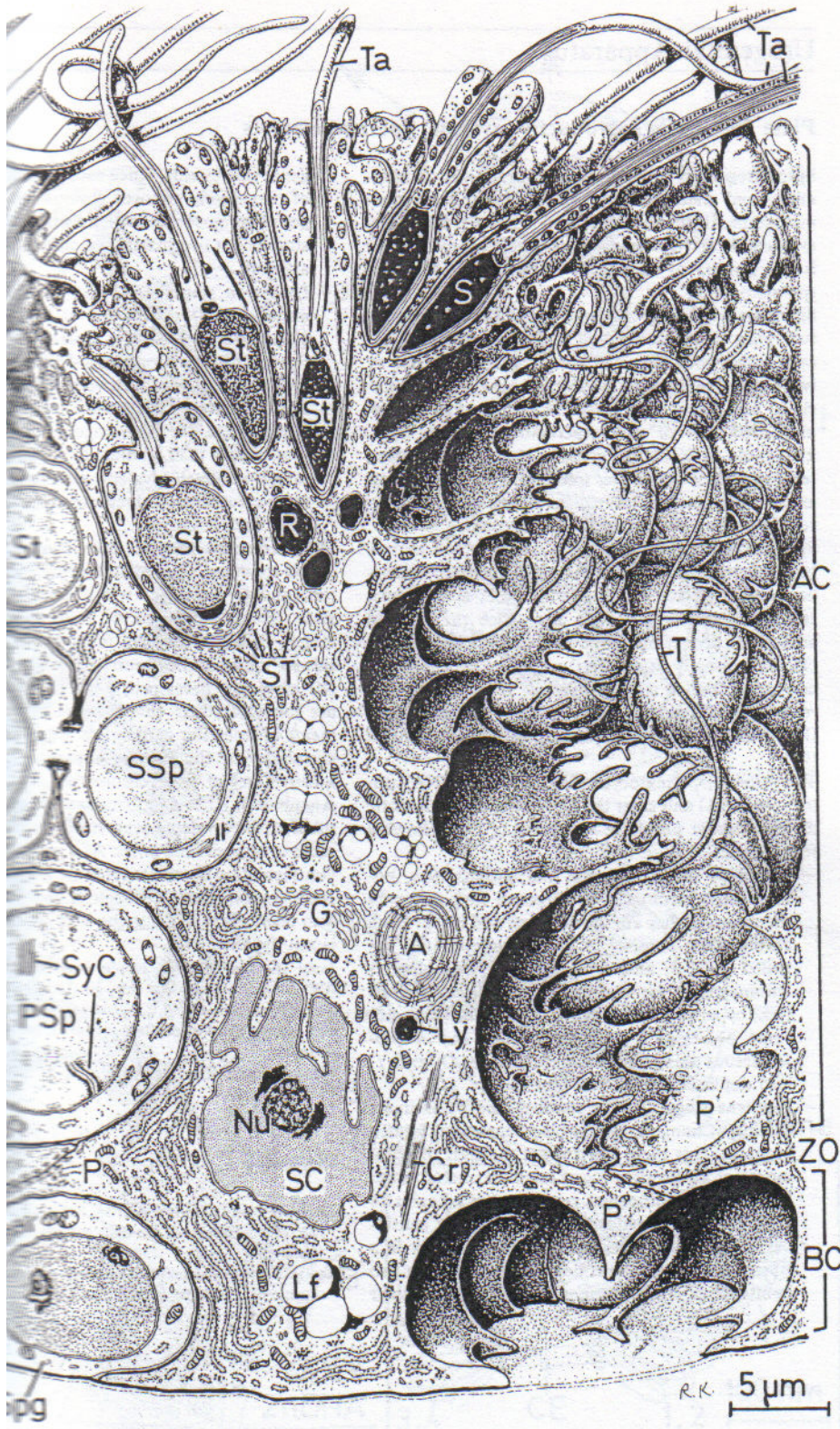
Testisler, cinsiyet karakterleri gelişimi ile yardımcı üreme bezleri fonksiyonu için elzem bir hormon olan **testosteron** ve spermatozoonları (spermatozoa) üretirler. Seminifer tubullerdeki spermatogenik hücreler **spermatogenez** yoluyla bölünüp, farklılaşarak spermileri oluştururlar (1, 21). Spermatogenez, spermatogonial kök hücrelerin mitotik proliferasyonu, spermatositlerin mayoz bölünmesi ve haploid spermatidlerin morfogenez gibi kompleks hücresel ve gelişimsel işlemleri kapsar (24). Kısacası, spermatogenez spermatozoon oluşum işlemidir (25, 26).

Spermatogenez, androjen-bağımlı kompleks bir gelişim sürecidir (27, 28). Bu süreç üç safhada gerçekleşir: 1-spermatogoniumların spermatositleri vermek üzere geçirdikleri **mitoz bölünme**, 2-spermatositlerin spermatidleri oluşturmak üzere kromozom sayısını yarıya düşüren iki **mayoz bölünme**; ve 3-spermatidlerin spermi vermek üzere geçirdikleri morfolojik değişim olan **spermiyogenez** (1, 20, 21).

Testisin seminifer tubulleri içinde bulunan, somatik tipteki Sertoli hücreleri (29) spermatogenezin düzenlenmesi ve sürdürülmesinde büyük rol oynarlar. Bu hücreler, erişkin testiste, androjen ve östrojen reseptörü taşırlar (30). Sertoli hücrelerinin fonksiyonları: 1-gelişmekte olan spermatogenik hücrelere desteklik etmek, onları korumak ve beslemek; 2-gelişmekte olan spermatidlerdeki fazlalık sitoplazmayı (artık cisim) fagosite etmek; 3-olgun spermileri seminifer tubullerin lümenine atmak, **spermiyasyon**; 4-spermin beslenme ve nakli

için gerekli testiküler sıvıyı salgılamak; **5-androjen bağlayıcı protein (ABP)** ve **inhibin** hormonlarını üretmektir (1, 21). Bu hücreler ayrıca, apoptoza giden spermatogenik hücrelerin fagositoz ile yok edilmesinden de sorumludurlar (29). Sertoli hücreleri içerisindeki androjen, kısmen seminifer epitel mikroçevresini kontrol ederek, germ hücre farklılaşmasını düzenlemektedir (31). Sertoli hücresi ektoplazmik özelleşmesi, uzamış spermatidler ile Sertoli hücreleri arasındaki etkileşimde yer alan temel bağlantı yapısıdır (32).

Sertoli hücreleri yan yüzlerindeki sıkı bağlantı kompleksleri ile birbirlerine bağlanarak **kan-testis bariyerini** yaparlar. Kan-testis bariyeri seminifer tubul duvarını **bazal** ve **lüminal** (adluminal = lümene yakın) **kompartmana** ayırır (1, 20, 21, 31). Kan-testis bariyerinin geçirgenliği, Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantıları tarafından ayarlanır ve sıkı bağlantıların organizasyonu ise Sertoli hücresi iskeleti tarafından düzenlenir (33). Bu bariyer kanda bulunan zararlı maddelerin germinal epitele geçişini engeller ve gelişen spermiyumlardaki membran antijenlerinin kana ve bağışıklık sistemine geçmesini engeller (1, 21). Bu yolla, ferden kendi spermine karşı otoimmün bir cevap geliştirmesini ve böylece otoimmün kısırlığın oluşumunu önler (1, 19).



345

Şekil 2. Seminifer (germinal) epitelin ultrastrüktürel yapısı. Spg: Spermatogonium, Psp: Primer spermatosit, Ssp: Sekonder spermatosit, St: Spermatid, SC: Sertoli hücresi (20).

Seminifer tubulde spermatogenezin farklı gelişim aşamaları görülür. Her tubul dış tarafta fibroblastlar içeren bağ dokusu tabakası ve iç tarafta da bazal membran ile çevrilidir. Bu dokuya **peritubuler doku** da denir (1). Burada bulunan **miyoid hücreler**, bazı maddelerin seminifer tubule girmesini engelleyen katabolik bir bariyer olarak görev yaparlar (34).

Tubuller arasındaki doku **interstisyel bağ dokusu** olup; fibroblastlar, kan damarları, sinirler ve lenf damarları içerir. Seminifer tubuller arasında belirgin olarak gözlenen hücreler **Leydig hücreleridir**.

Seminifer tubullerin çok katlı epiteli, **spermatogenik hücreler** ve **Sertoli** (destek) **hücrelerinden** oluşur. **Sertoli hücreleri** ince, uzun, düzensiz sınırlı hücreler olup; seminifer tubullerin bazal membranından lümenine kadar uzanır. Sertoli hücrelerinin nükleusları genellikle oval, hafif uzamıştır; çok az miktarda ve ince kromatin içerir. Bu hücrelerin çekirdekleri belirgin olup, çevrelerinde ve aralarında sıralar halinde yerleşmiş olan spermatogenik hücrelerden kolayca ayrılmasını sağlar. Farklı kesit düzlemlerinde, spermatogenik hücreler ekseriyetle Sertoli hücrelerini örtecek biçimde konumlandığı için Sertoli hücresi sınırları belirgin olarak görülemez. Olgunlaşmamış spermatogenik hücreler olan **spermatogonyumlar**, seminifer tubullerin bazal membranlarına bitişik olarak yerleşmiştir (1, 21). Spermatogonyumlar mitoz bölünme geçirerek birkaç hücre serisi üretirler. Genellikle üç tür spermatogonyum üretilir. **Soluk spermatogonyum A'**ların sitoplazmaları açık boyanır. Bunlar soluk, ince granüllü kromatin içeren yuvarlak veya oval nükleusa sahiptirler. **Koyu spermatogonyum A** soluk spermatogonyum A'ya benzer; fakat kromatini daha koyu olarak boyanır. **Spermatogonyum B'**ler farklı miktarda kromatin içeren küresel çekirdeğe sahiptir ve çekirdekçikleri merkezi olarak yerleşmiştir.

Spermatogonyum A'lar germinal epitelin kök hücreleri olarak görev üstlenmiştir ve diğer spermatogonyum A'lar ile spermatogonyum B'lere dönüşür. Spermatogonyum B'ler son mitoz bölünmelerinden sonra **primer spermatositleri** verirler. Primer spermatositler, çekirdeklerinin farklı kromatin aktiviteleri nedeniyle farklı görünüm yansıtırlar. Bu hücreler hemen birinci mayoz bölünmesine girdiklerinden seminifer tubullerde tipik mayotik görünümler çoğunluktadır.

Primer spermatositler seminifer tubullerde gözlenen en belirgin ve en büyük germinal hücrelerdir. Bu hücreler germinal epitelin orta kısmında yerleşmişlerdir. Sitoplazmalarında kaba kümeler halinde veya ince iplikler halinde kromatin içeren büyük çekirdek görülür. Primer spermatositler birinci mayoz bölünmesini geçirerek çekirdekleri daha yoğun kromatin içeren, daha küçük hücreler olan **sekonder spermatositleri** verirler. Sekonder spermatositler, oluştuktan kısa bir süre sonra ikinci mayoz bölünmesi geçirdikleri için, genellikle, seminifer

tubul kesitlerinde gözlenmezler. İkinci mayoz bölünmesinin sona ermesiyle spermatidler ortaya çıkar.

Spermatidler primer ve sekonder spermatositlerden oldukça küçüktürler. Bu hücreler Sertoli hücreleri ile sıkı ilişkide olacak şekilde, seminifer tubullerin lümenine yakın kısımlarında gruplar halinde yerleşmişlerdir. Bu bölgede spermatidler **spermiyogenez** adı verilen işlem ile spermatozoonlara farklılaşırlar. Olgunlaşmakta olan (uzamış) spermatidlerin küçük, koyu boyanan baş kısımları Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içine gömülüdür. Kuyruk kısımları ise seminifer tubul lümenine doğru serbest olarak uzanır (Şekil 2).

Normal spermatogenez, hipofiz bezinin adenohipofiz kısmında yerleşmiş olan gonadotrop hücreler tarafından üretilen folikül uyarıcı hormon (**FSH**) ve lüteinleştirici hormon (**LH**)'ların uygun düzeylerinde gerçekleşir. LH interstisyel Leydig hücrelerinden testosteron üretilmesini uyarır (1). FSH testiste, Sertoli hücrelerindeki kendi reseptörlerini etkiler ve spermatogenezin sürdürülmesinde önemli bir rol oynar (35). Bu hormon Sertoli hücrelerini uyarak androjen bağlayıcı protein (**ABP**)'in üretilmesini sağlar. ABP normal spermatogenez için gerekli olan testosteronun seminifer tubullerde yoğunlaşmasını sağlar. Spermatogenezin normal devamı için seminifer tubullerde yüksek düzeyde testostereona gereksinim vardır (1). ABP'in aşırı üretimi, testis içi androjen seviyelerini düşürmekte ve sonuç olarak spermatogenezde ilerleyen bir bozukluk görülmektedir (28).

İnhibin hormonu hipofizden FSH üretimini baskılar veya önler. Erkek sekonder seks karakterlerinin gelişmesi kadar, yardımcı üreme bezlerinin yapı ve fonksiyonlarının sürdürülmesi de yeterli testosteron düzeyine bağlıdır. Hormonlardan başka testisin ısısı da spermatogenezde önemli rol oynar (1). Normal spermatogenez için, skrotum ısısı vücut ısısından daha düşük olmalıdır (1, 36). Bu ısı bazal vücut ısısından 2-3 °C daha düşük düzeydedir. Testisin skrotumda yerleşmesi bu ısı düşüklüğünü, bir dereceye kadar, sağlar. Keza, venöz pampiniform pleksus (sarmaşığa benzer ağ), testiküler arterleri sararak zıt yönde ısı değişimini gerçekleştirir. Testiküler arterlerle testise giden kan soğutulur; buna karşılık testisten venlerle vücuda dönen kan ise ısıtılır (1). Memeli sperminin, fertilizasyon için uygun hale gelebilmesi için, testisten ayrıldıktan sonra mutlaka fizyolojik değişim serilerinden geçmesi gerekmektedir (37).

ETANOL (ETİL ALKOL)

Etanol değişik toplumlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Etanol alındıktan sonra, mide ve ince bağırsaktan değişmeden emilmekte daha sonra, kan düzeyi oranında vücutun tüm dokularına ve sıvılarına geçmektedir. Emilen alkolün % 10'undan daha azı değişmeden idrar, ter ve solunumla atılmaktadır.

Etanol, akut alkolizmde, asıl etkilerini merkezi sinir sistemi üzerine yapar ve alkol alımı devam etmediğinde gerileyen hepatik ve gastrik değişiklikleri başlatabilir. Kronik alkolizmde, özellikle karaciğer ve mide olmak üzere, vücudun tüm organ ve dokularında morfolojik değişiklikler oluşur (6). Özellikle karaciğerde siroz (6, 38), midede ülser, beyinde serebellar atrofi ve dejenerasyon, gözde optik nöropati (6), kalpte kardiomiyopati (6, 38, 39), iskelet kasında miyopati (38, 39), pankreasta akut veya kronik pankreatit (6) görölmektedir. Ayrıca kronik ağır etanol alan sıçanlarda, platelet agregasyonu azalmıştır (40).

Etanol kapasitasyon süresince, kapasitasyon işlemini spesifik olarak etkileyerek spermatozoonların dölleme yeteneğini azaltmaktadır (41).

ASKORBİK ASİT (VİTAMİN C)

Askorbik asit (vitamin C) kollajen sentezi için gerekli, antioksidan bir vitamindir. Vitamin C serbest radikalleri direkt olarak temizleyebilir ve vitamin E'nin antioksidan formunu yenileyerek de indirekt yolla olumlu etki gösterebilir. Vitamin C eksikliğinde, büyüme çağındaki çocuklarda kemik hastalıkları ve kanamalar, hem çocuklarda hem de erişkinde kırık iyileşme bozuklukları gelişir. Bu vitamin diğer vitaminlerden farklı olarak endojen yolla sentez edilemez; bu nedenle bu vitaminin yiyeceklerle alınması gereklidir (6).

3. MATERYAL VE METOD

Bu araştırma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Cerrahi Araştırma Merkezi ve Patoloji Anabilim Dalında gerçekleştirildi. Fareler Cerrahi Araştırma Merkezi'nden sağlandı. 25-30 gr ağırlığındaki BALB-C türü 24 erişkin erkek fare her grupta 6 fare olacak şekilde 4 ayrı kafese kondu. Tüm fareler özel fare yemi ile beslendiler. İçecekleri sıvılar, her grup için 500 ml'lik şişelere her sabah 250 ml taze sıvı olacak şekilde kondu ve farelerin yeterince sıvı almaları sağlandı; sıvı konmadan hemen önce, günlük içtikleri sıvı miktarları ölçüldü.

Farelerin solüsyonlara alışmaları için 15 günlük bir **alıştırma peryodu** uygulaması yapıldı. Alıştırma peryodunda **Kontrol Grubu**'na ait farelere 15 gün boyunca sadece çeşme suyu verildi. **Etanol Grubu** ve **Etanol + Askorbik Asit Grubu**'na 15 gün boyunca etanole alışmaları için 1.-15. günler alkol oranı giderek artan şekilde etanol verildi. Alkol konsantrasyonları sırasıyla % 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 olarak belirlendi. **Askorbik Asit Grubu**'na çeşme suyu verildi.

Deney peryodunda, tüm gruplara 3 hafta boyunca her gün aynı saatte olacak şekilde 250 ml sıvı, içme suyu şişelerine konarak, verildi. **Kontrol Grubu**'na ait şişeye 250 ml çeşme suyu kondu. **Etanol Grubu** içme suyu şişesine çeşme suyu ile hazırlanmış %40 taze etanol kondu (150 ml çeşme suyu + 100 ml absölü etanol). **Etanol + Askorbik Asit Grubu**'na ait şişeye %40 etanol içeren içme suyu içine yaklaşık 500 mg/kg/gün olacak şekilde askorbik asit (250 ml %40 etanol + 375 mg askorbik asit) katıldı. **Askorbik Asit Grubu**'na ait şişeye askorbik asit (250 ml çeşme suyu + 375 mg askorbik asit) kondu.

Deney peryodunun sonunda toplam 24 hayvan eter anestezisi altında sakrifiye edildi ve karın bölgesinden girilerek testisleri çıkarıldı; çıkarılan testislerin bir parçası Bouin fiksatifine, diğer parçası ise %10'luk formalin fiksatifine kondu. Elektron mikroskop (EM) takibi için yaklaşık 1 mm³ büyüklüğündeki testis parçaları %4'lük glutaraldehite kondu. Işık mikroskopu için alınan parçaların yarısı Bouin fiksatifinde 18 saat, yarısı ise formalin fiksatifinde 48 saat tutuldu; rutin ışık mikroskopik doku takibinden sonra dokuların parafin blokları hazırlandı. Parafin doku blokları mikrotom aracılığı ile 4-5 mikrometre (mikron) kalınlığında kesildi. Kesitler hematoksilin-eozin ile boyanarak gerekli incelemeler yapıldı ve resimler çekildi. EM için ayrılan parçalar gluraldehitte yaklaşık 18 saat tutuldu. Parçalar rutin EM doku takibinden sonra kesildi ve kontrastlandı. Yeterli incelemelerden sonra fotoğraflar

çekildi ve gruplar arasındaki farklılıklar dikkatle incelendi. Işık mikroskopik incelemelerde her bir testis kesitinde total seminifer tubul sayısı, dejenerasyon izlenen ve izlenmeyen tubul sayıları, dejenerasyon şekli ve kaç tubulde hangi çeşit dejenerasyon görüldüğü belirlendi. Bulgular istatistiksel veriler ve resimlerle belgelendi.

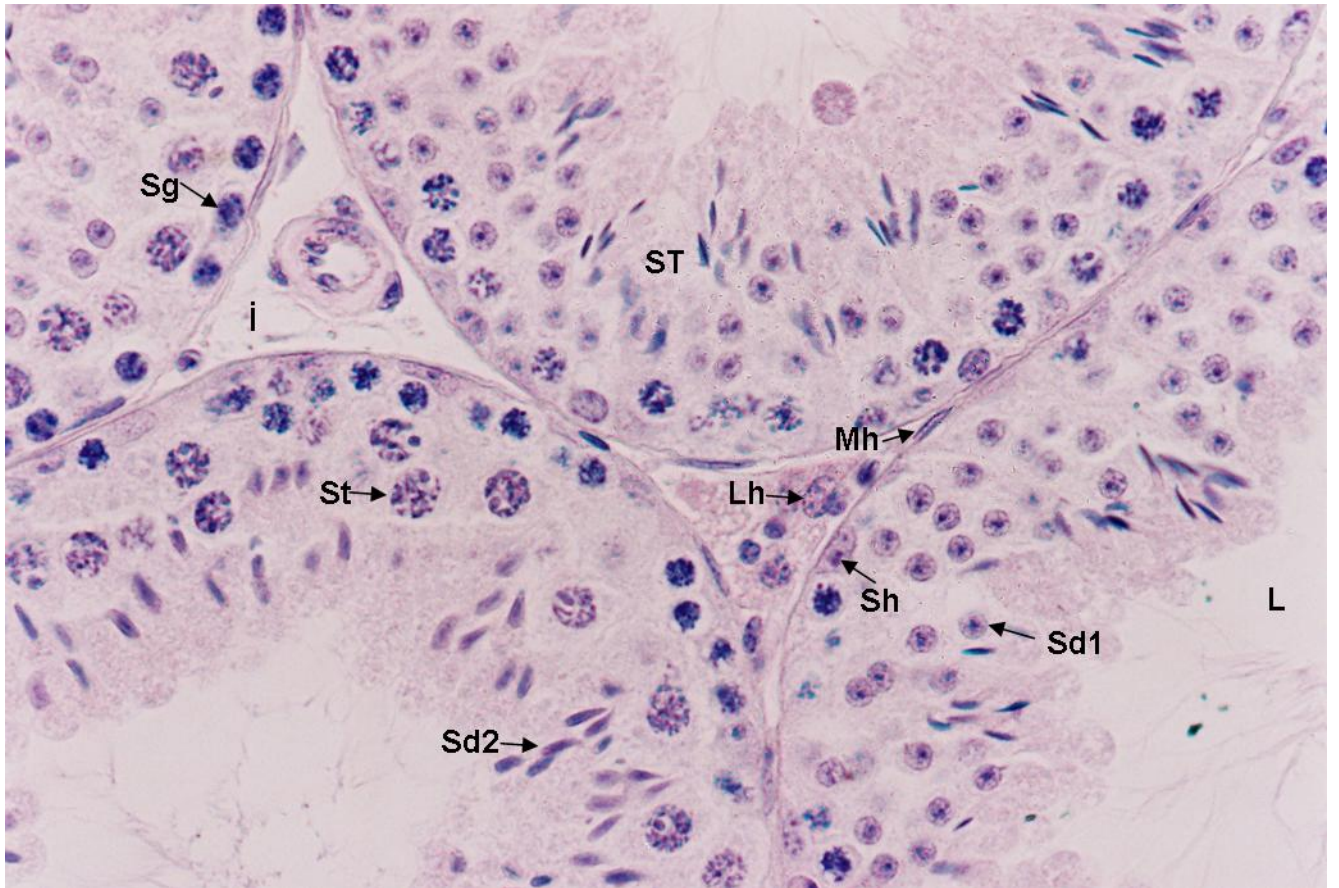
Gruplar arasındaki histolojik değişiklikleri göstermek için istatistiksel olarak Kruskal Wallis testi, farklılığı yaratan grupları göstermek için post hoc olarak, yanılma düzeyi aşağı çekilerek, Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grupların almış oldukları sıvı miktarlarının karşılaştırılması için, veriler normal dağılıma uyduğundan, tek yönlü Varyans Analizi (post hoc olarak Bonferroni testi) kullanıldı.

Elde edilen veriler aritmetik olarak $\pm$ standart sapma olarak gösterildi. Anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi; çoklu karşılaştırmalarda (post hoc) ise anlamlılık düzeyi $p<0.05$ / karşılaştırma sayısı olarak alındı.

4. BULGULAR

Kontrol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

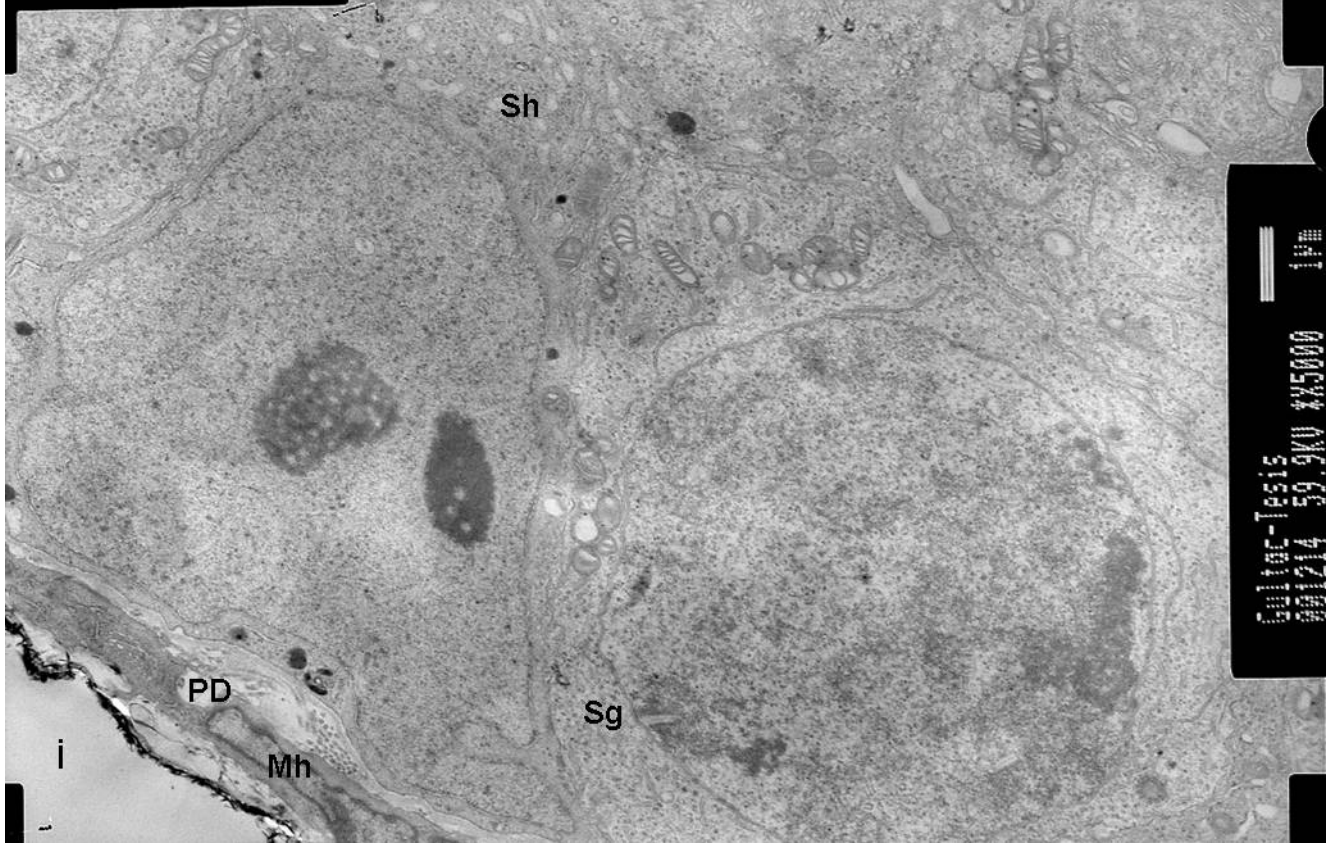
Seminifer tubuller ve bunların aralarında interstisyel bağ dokusu normal yapıda görüldü. İnterstisyel dokudaki Leydig hücreleri, seminifer tubulu saran peritubuler dokudaki miyoid hücreler, seminifer tubulun peritubuler dokuya çok yakın kısmında açık veya koyu nükleuslu spermatogoniumlar, belirgin nükleoluslu şekilsiz, ökromatik (açık) nükleuslu peritubuler dokuya yakın olan Sertoli hücreleri, spermatogoniumlara göre daha büyük ve lümene yakın spermatositler, spermatositlere göre daha küçük, açık boyanmış, yuvarlak nükleuslu lümene daha yakın yuvarlak spermatidler, uzun, koyu nükleuslu uzamış spermatidler ve tubul lümeninde uzamış spermatid kuyrukları normal yapıda izlendi (Resim 1).



Resim 1. Kontrol Grubu. Mikrofotografi X400: İnterstisyel bağ dokusu (İ), Seminifer tubul (ST), seminifer tubul lümeni (L), Leydig hücreleri (Lh), seminifer tubulu saran peritubuler dokuda miyoid hücre (Mh), spermatogonium (Sg), Sertoli hücresi nükleusu (Sh), primer spermatosit (St), yuvarlak spermatid (Sd1), uzamış spermatid (Sd2).

Kontrol Grubu Elektron Mikroskopik Bulguları

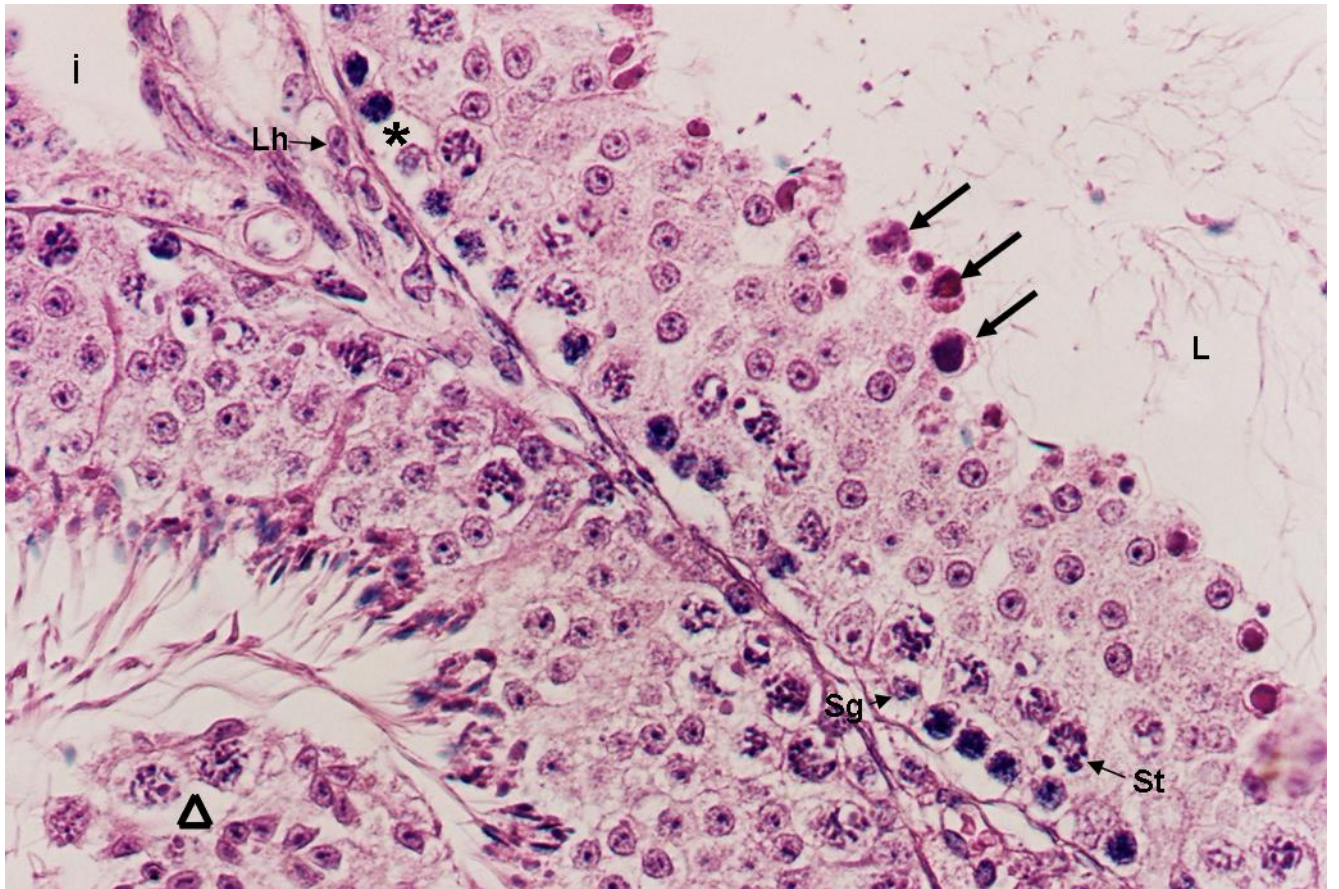
Peritubuler doku, miyoid hücre, spermatogonium, spermatosit, Sertoli hücresi (Resim 2), yuvarlak ve uzamış spermatid normal yapıda izlendi.



Resim 2. Kontrol Grubu. Elektronmikrograf X5000: İnterstisyel bağ dokusu (İ), peritubuler doku (PD), miyoid hücre (Mh), spermatogonium (Sg), Sertoli hücresi (Sh).

Etanol Grubu Işıık Mikroskopik Bulguları

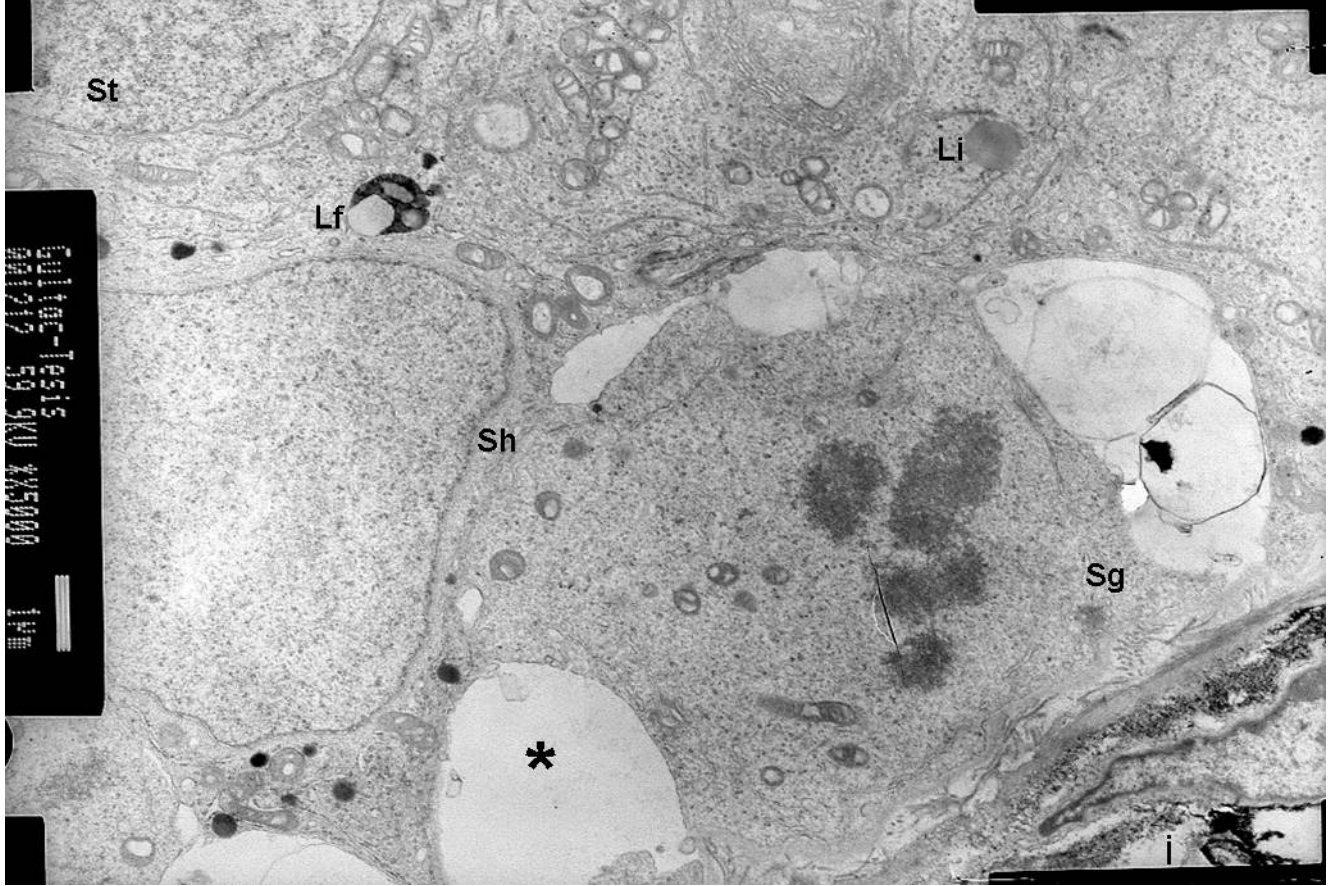
Etanol grubunda, kontrol grubuna göre, peritubuler dokuda miyoid hücrelerde bir miktar atrofi, peritubuler doku ile Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasında belirgin açılmalar, seminifer tubulde spermatogoniumlarda atrofik dejenerasyon, spermatositlerde nekrotik dejenerasyon, lümene en yakın yuvarlak germinal hücrelerde eozinofilik dejenerasyon, lümeninde olgunlaşmasını tamamlamamış döküntü germinal hücreler, interstisyel dokuda piknotik nükleuslu, atrofik Leydig hücreleri izlendi (Resim 3).



Resim 3. Etanol Grubu. Mikrofotografı X400: İnterstisyel doku (İ), Leydig hücresi (Lh), hücreler arası açılma (*), spermatogonium (Sg), spermatosit (St), eozinofil dejenerasyonlu germinal hücreler (→), tubul lümeninde olgunlaşmasını tamamlamamış, döküntü, germinal hücreler (Δ).

Etanol Grubu Elektron Mikroskopik Bulguları

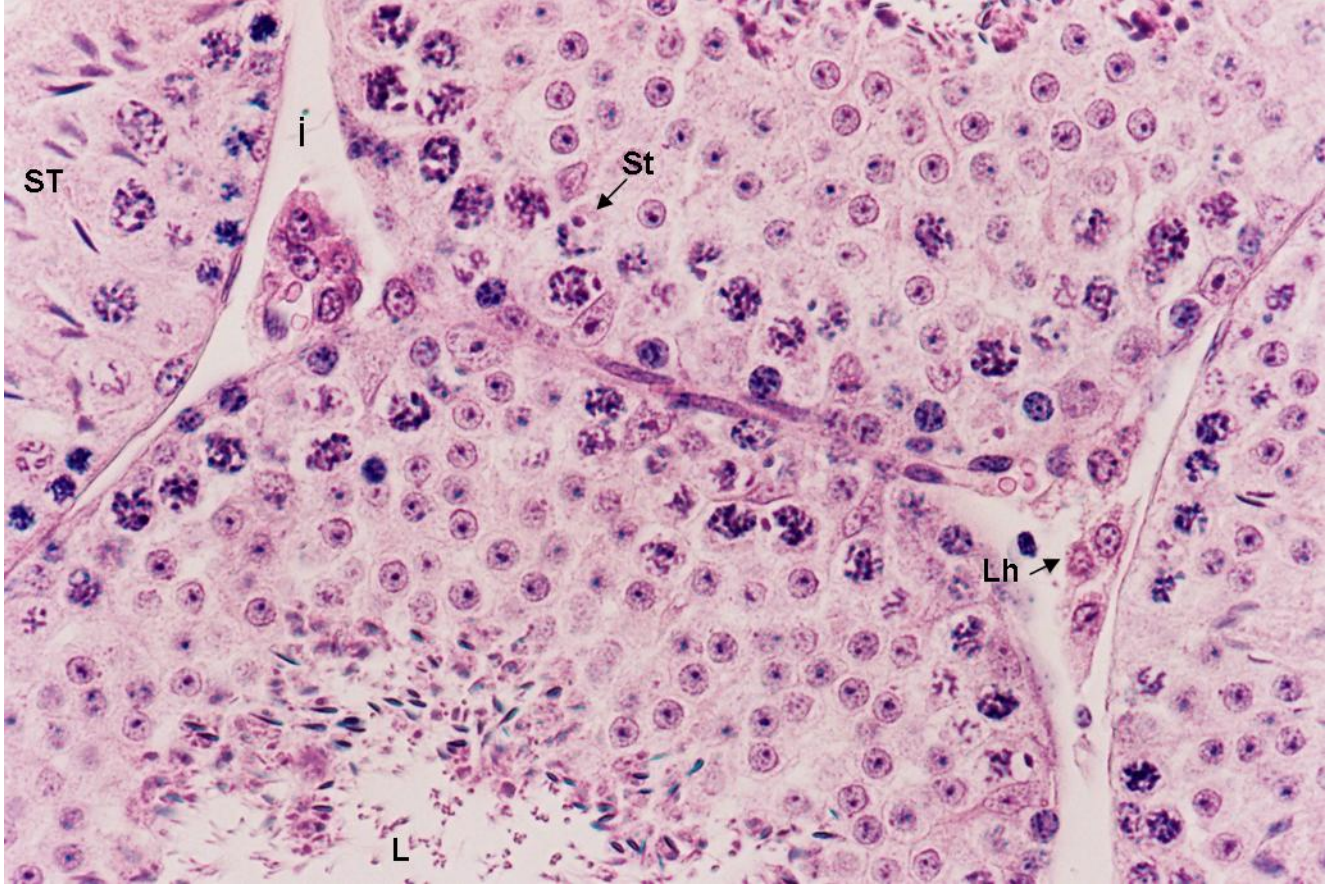
Peritubuler doku ile Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasında belirgin açılmalar, Sertoli hücresi içinde lipid ve lipofuksin inklüzyonu birikimi (Resim 4) izlendi.



Resim 4. Etanol Grubu. Elektronmikrograf X5000: İnterstisyel bağ dokusu (İ), Sertoli hücresi (Sh) ile spermatogonium (Sg) ve peritubuler doku arasında büyük vakuol şeklinde açılma (*), lipofuksin inklüzyonu (Lf), lipid (Li), spermatosit (St).

Etanol + Askorbik Asit Grubu Işıık Mikroskopik Bulguları

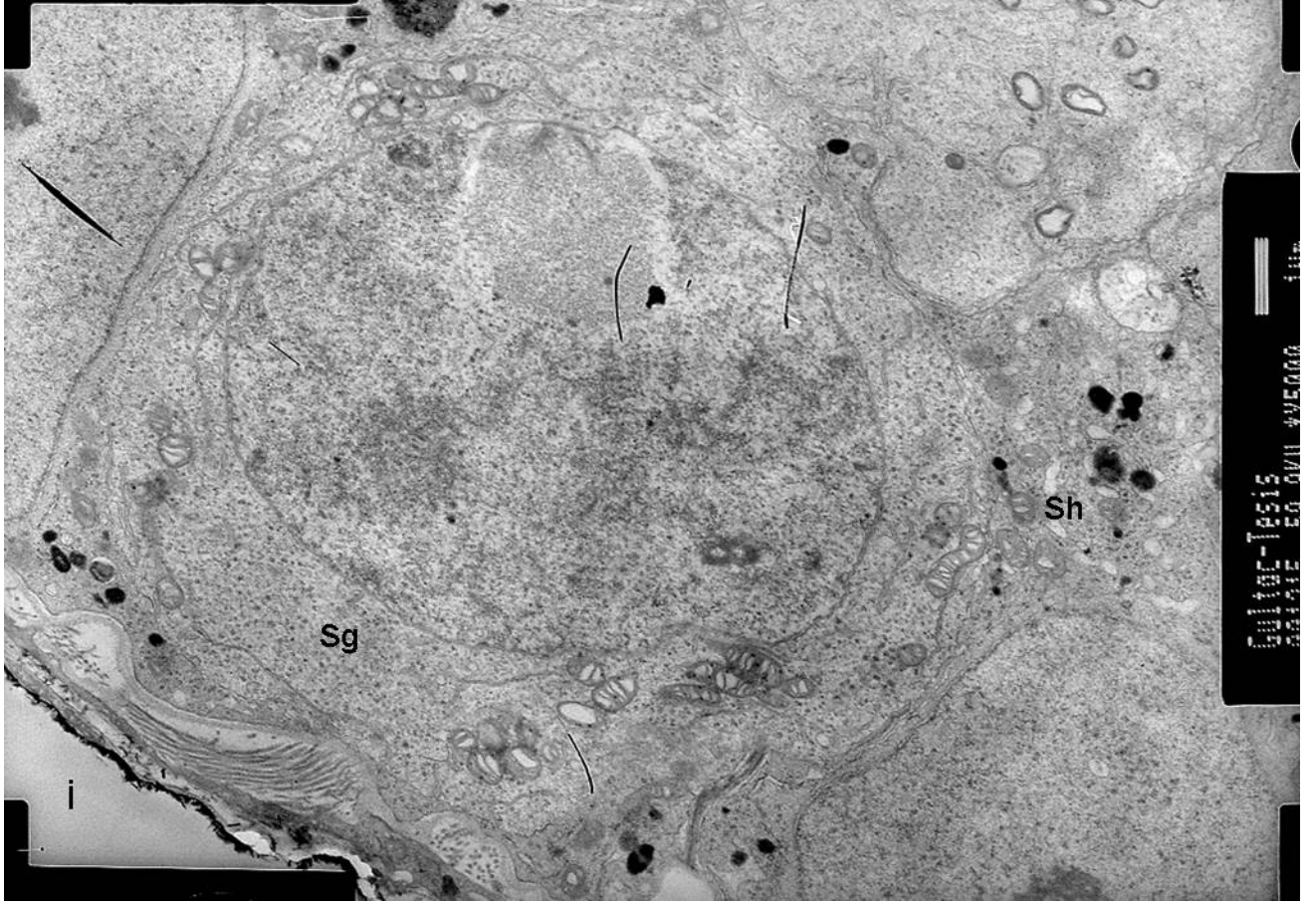
Leydig hücreleri, spermatogoniumlar, spermatidler ve Sertoli hücreleri kontrol grubundakilere benzer görünümündedir. Bazı seminifer tubullerde sadece spermatositlerde bazı apoptotik dejenerasyonlar izlenmektedir (Resim 5).



Resim 5. Etanol + Askorbik Asit Grubu. Mikrofotografı X400: Seminifer tubul (ST), interstisyel bağ dokusu (İ), Leydig hücresi (Lh), apoptotik dejenerasyonlu spermatosit (St).

Etanol + Askorbik Asit Grubu Elektron Mikroskopik Bulguları

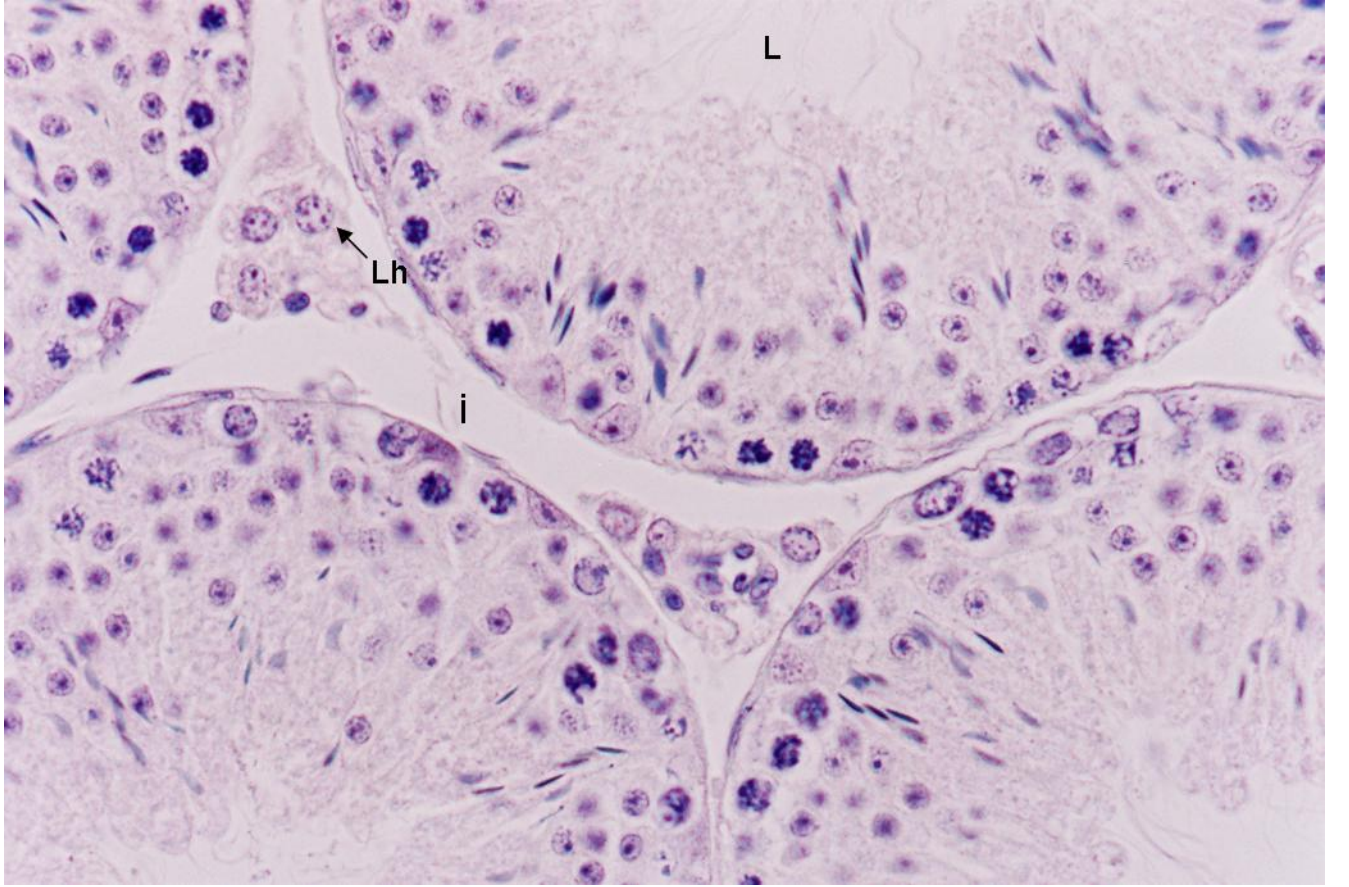
Sertoli hücreleri ve spermatositler kontrollere benzer yapıda izlendi (Resim 6).



Resim 6. Etanol + Askorbik Asit Grubu. Elektronmikrograf X5000: İnterstisyel bağ dokusu (İ), spermatogonium (Sg) ve Sertoli hücresi (Sh).

Askorbik Asit Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

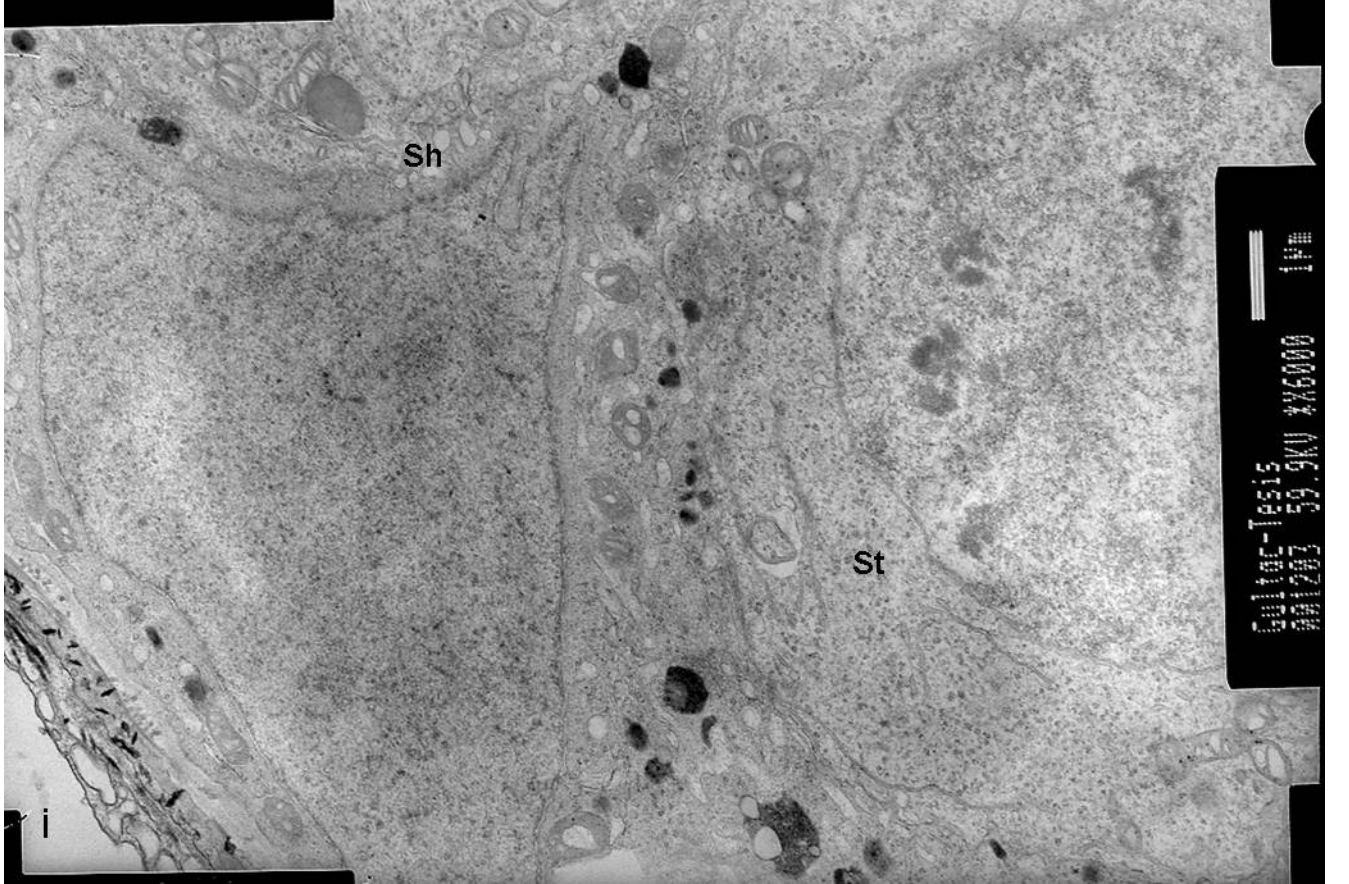
Leydig hücreleri diğer gruplardakilere göre biraz daha büyük ve daha düzgün kontürlü olarak dikkat çekmektedir. Spermatogoniumlar, spermatositler, spermatidler ve Sertoli hücreleri kontrol grubundakilere benzer olarak izlenmektedir (Resim 7).



Resim 7. Askorbik Asit Grubu. Mikrofotografi X400: İnterstisyum (İ), Leydig hücresi (Lh), seminifer tubul lümeni (L).

Askorbik Asit Grubu Elektron Mikroskopik Bulguları

Sertoli hücreleri ve spermatosit (St)'ler kontroldekilere benzer yapıda izlenmektedir (Resim 8).



Resim 8. Askorbik Asit Grubu. Elektronmikrograf X6000: İnterstisyel bağ dokusu (İ), Sertoli hücresi (Sh) ve spermatosit (St).

Tüm Gruplara Ait İstatistiksel Bulgular:

	Kontrol Grubu		Etanol Grubu		Etanol + Aa Grubu		Aa Grubu		p
	Ort	ss	Ort	ss	Ort	ss	Ort	ss	
Toplam tubul sayısı	110.2	6.2	109.2	3.7	109.8	5.7	110.0	6.3	0.995
Normal tubul sayısı	103.7	5.8	63.6	3.1	95.3	3.7	103.8	5.2	0.001
Açılma*	1.2	0.8	21.0	1.9	2.0	1.0	1.3	1.0	0.003
Dökülme**	3.8	1.0	11.6	1.3	6.3	1.8	3.8	1.0	0.001
Eozinofilik dejenerasyon	1.3	0.8	13.8	1.3	5.5	1.1	0.8	0.8	<0.0001
Sıvı alınımları (ml/6 fare)	74.5	38.7	30.5	13.4	28.8	9.0	48.3	13.3	<0.0001

Tablo 1: Gruplar arası histolojik değişiklikler ve sıvı içme miktarları.

Aa: Askorbik asit.

* Sertoli hücreleri ile peritubuler doku ve spermatogoniumlar arasındaki açılma olan tubul sayısı.

** Olgunlaşmasını tamamlamamış döküntü, germinal hücrelerin lümende bulunduğu seminifer tubul sayısı.

İstatistiksel veriler Tablo 1’de özetlenmiştir. Bu verilere göre;

Dört grup kendi arasında karşılaştırıldığında, toplam tubul sayısı ($p=0.995$) dışında normal tubul sayısında ($p=0.001$), Sertoli hücresi ile peritubuler doku ve spermatogoniumlar arasındaki açılma olan ($p=0.003$), olgunlaşmasını tamamlamamış germ hücreleri lümene dökülen ($p=0.001$), eozinofilik dejenerasyon gösteren ($p<0.0001$) tubul sayısında anlamlı bir farklılık görüldü ($p<0.05$).

Man-Whitney U testine göre etanol grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, etanol grubunda, normal tubul sayısı anlamlı olarak az, Sertoli hücreleri ile peritubuler doku ve spermatogoniumlar arasındaki açılma, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümene döküldüğü tubul sayısı ve eozinofilik dejenerasyon görülen tubul sayısı ise anlamlı olarak çok bulunmuştur ($p<0.008$).

Etanol + askorbik asit grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, etanol + askorbik asit grubunda, normal tubul sayısı, Sertoli hücreleri ile peritubuler doku ve spermatogoniumlar arasındaki açılma, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümene döküldüğü

tubul sayısı açısından anlamlı bir fark bulunmamış ($p>0.008$), eozinofilik dejenerasyon görülen tubul sayısı ise anlamlı olarak daha çok bulunmuştur ($p=0.004$).

Askorbik asit grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, askorbik asit grubundaki normal tubul sayısı, Sertoli hücreleri ile peritubuler doku ve spermatogoniumlar arasındaki açılma, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümene döküldüğü tubul sayısı, eozinofilik dejenerasyon görülen tubul sayısı açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.008$).

Etanol grubu ile etanol + askorbik asit grubu ve etanol grubu ile askorbik asit grubu karşılaştırıldığında, etanol grubunda normal tubul sayısı anlamlı olarak az, Sertoli hücreleri ile peritubuler doku ve spermatogoniumlar arasındaki açılma, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümene döküldüğü tubul sayısı, eozinofilik dejenerasyon görülen tubul sayısı anlamlı olarak çok bulunmuştur ($p<0.008$).

Etanol + askorbik asit grubu ile askorbik asit grubu karşılaştırıldığında, etanol + askorbik asit grubunda, normal tubul sayısı, Sertoli hücreleri ile peritubuler doku ve spermatogoniumlar arasındaki açılma, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümene döküldüğü tubul sayısı açısından anlamlı bir fark bulunmamış ($p>0.008$), eozinofilik dejenerasyon görülen tubul sayısı ise anlamlı olarak çok bulunmuştur ($p=0.004$).

Bonferroni testine göre farelerin sıvı tüketimleri karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre, etanol, etanol + askorbik asit ve askorbik asit gruplarının sıvı tüketiminde anlamlı derecede azalma bulunmuştur ($p<0.05$).

Etanol + askorbik asit ve askorbik asit grubu karşılaştırıldığında, etanol + askorbik asit grubunda sıvı tüketiminin daha az olduğu belirlendi ($p=0.03$).

5. TARTIŞMA

Kronik etanol kullanımı, alkolik erkeklerde hipotalamus-hipofiz-gonad aksını bozmakta (7), plazma testosteronunu ve testosteron yapım oranını düşürmekte (42), testis atrofisi ve infertiliteye neden olmaktadır. Etanol, Sertoli hücrelerinin sekretuvar fonksiyonunu olumsuz etkilemekte, testis içinde oksidatif stresi; apoptotik spermatositler ve spermatogoniumların sayısını artırmaktadır (7). Bu madde sıçanlarda, plazma FSH düzeylerinin (43) artmasına; plazma testosteron düzeyleri (2, 43, 44), testis ağırlığı (43, 44) ve germ hücreleri sayısının (43) azalmasına; testis atrofisi oluşumuna (2, 13, 43), seminifer tubuller (43) ve bunların lümen çaplarında (45) küçülmeye neden olmuştur.

Etanolün bir erkek üreme sistemi toksini (46), özellikle de bir testis toksini (2, 3, 4, 5) olduğu; testisteki toksisitesini bilhassa Leydig hücresi üzerinde gösterdiği (47, 48); bu toksisiteyi, hem doğrudan testis düzeyinde, hemde dolaylı olarak hipotalamus yada hipofiz üzerinden gerçekleştirdiği (4) bildirilmiştir. Bu maddenin Sertoli hücresi için de toksik olduğu (13, 49) ve bu hücrenin sekretuvar fonksiyonunu olumsuz etkilediği (7) bildirilmektedir. Etanolün testis gelişimini engellediği, bu engellemede Sertoli hücrelerinin Leydig hücrelerinden daha çok primer hedef olduğu belirtilmiştir. Alkolik farelerin testislerinin ışık mikroskopik değerlendirilmesinde, spermatogenezde organizasyon bozukluğu, germ hücrelerinde dejenerasyon ve Sertoli hücrelerinde vakuolizasyon izlenmiştir. Elektron mikroskopik olarak, Sertoli hücrelerinde atipik nükleer invajinasyonlar ve bazı tubullerde, bu hücreler içinde fagositoz gözlenmiştir (45). Alkolik farelerde, elektron mikroskopik olarak, Sertoli hücreleri arasındaki intersellüler bağlantılar bozulmamış, bu hücrelerin bazalinde lipid artışı belirlenmiştir (50). Bu araştırmamızda ışık mikroskopik olarak, etanol grubunda, interstisyel bağ dokusundaki Leydig hücreleri ve peritubuler dokudaki miyoid hücrelerde bir miktar atrofi, peritubuler doku ile Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasında belirgin açılmalar, spermatogoniumlarda atrofik ve eozinofilik dejenerasyon, spermatositlerde nekrotik dejenerasyon, lümene en yakın yuvarlak germinal hücrelerde eozinofilik dejenerasyon, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümeninde görülme sıklığında artış ve elektron mikroskopik olarak, Sertoli hücrelerinde atipik nükleer invajinasyonlar, bu hücrelerin bazal sitoplazmasında lipid artışı, apikal sitoplazmalarında belirgin lipofuksin inklüzyonu ve lipid birikimi ile büyük vakuol oluşumu izlendi. Etanol + askorbik asit grubunda bazı seminifer tubullerdeki birkaç spermatositte apoptotik dejenerasyonlar izlendi. Askorbik asit grubunda, spermatogoniumlar, spermatositler, spermatidler ve Sertoli hücreleri kontrol grubundakilere benzer olarak izlendi.

İstatistiksel bulgularımız, etanolün Sertoli hücreleri ile peritubuler doku ve spermatogoniumlar arasında açılma, germinal hücrelerde eozinofilik dejenerasyon ve olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümene dökülmesi gibi bozukluklar izlenen seminifer tubul sayılarını artırdığını, askorbik asitin bu bozukları azalttığını göstermektedir.

Alkol etkisi sonucu bozulan ilk testis hücresinin Sertoli hücresi olabileceği bildirilmiştir (13). Bu çalışmada, etanol grubunda Sertoli hücresi içinde belirgin lipofuksin inklüzyonu birikimi, büyük vakuol oluşumu, düz endoplazmik retikulum miktarı ve küçük vakuol sayısında artış izlendi. Etanol + askorbik asit grubunda, Sertoli hücresinde izlenen bu değişikliklerin düzeldiği görüldü. Bu bulgular etanol toksisitesinde Sertoli hücresinin önemli bir hedef hücre olduğunu, askorbik asitin etanolün bu toksisitesine karşı Sertoli hücresini koruduğunu göstermektedir.

Alkol bazı kemiricilerin Leydig hücreleri çaplarında küçülmeye (51), Leydig hücrelerinde, uzamış ve kupa-şekilli mitokondrilerde ve psödopod şeklindeki sitoplazmik çıkıntılarda artışa neden olmuştur. Alkol verilenlerin Leydig hücrelerinin daha küçük ve bunların daha az sitoplazma, daha büyük mitokondri ve daha az düz endoplazmik retikuluma sahip olduğu belirlenmiştir (44). Bununla birlikte başka bir araştırmada, Leydig hücrelerinin nükleus, mitokondri ve endoplazmik retikulumu tarafından işgal edilen fraksiyonel volümünün etanolden etkilenmediği (45) bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda, etanol grubunda birçok Leydig hücresinin atrofik, bu hücre nükleuslarının da piknotik olduğu görüldü. Bu bize Leydig hücresi total volümünün azaldığını göstermektedir. Etanol + askorbik asit grubunda atrofik Leydig hücre oranının tamamen azaldığı izlendi. Askorbik asit grubunda, Leydig hücreleri ışık mikroskopik olarak, diğer gruplardakilere göre biraz daha büyük ve daha düzgün kontürlü olarak dikkat çekti. Bu sonuçlar dışardan verilen askorbik asitin bu hücre morfolojisinde düzeltme oluşturduğunu göstermektedir. Bulgular, etanolün Leydig hücrelerini olumsuz olarak etkilediğini, askorbik asitin etanol toksisitesine karşı bu hücreleri koruduğunu, hatta oluşan histolojik bozuklukları düzelttiğini göstermektedir.

Etanol farelerde, testis ağırlığı (9, 45, 50, 52, 53), testosteron düzeyi (50), spermatogonium, spermatosit, spermatid (51), epididimal sperm (45, 51) ve motil spermatozoa sayısında (45, 52, 53) azalmaya; testis ve seminifer tubul çaplarında küçülmeye (51); immatür germ hücrelerinin seminifer tubul lümenine dökülme sıklığı (9, 52) ve sperm morfoloji bozukluğunda (52) artışa neden olmuştur. Bu araştırmada etanol grubunda immatür (olgunlaşmamış) germ hücrelerinin lümene dökülme miktarında artış izlendi; etanol + askorbik asit grubunda bu miktarın kontrollere yakın olduğu belirlendi. Bu da, etanol

toksisitesiyle oluşan germ hücreslerinin olgunlaşmadan lümene dökölmesinin askorbik asit sayesinde engellendiğini, hatta bu olumsuzluğun düzelendiğini göstermektedir.

Bulgularımız testiste etanolün testiste özellikle Sertoli ve Leydig hücrelerini etkilediğini göstermektedir. Germinal hücrelerin fonksiyonlarının devamı açısından önemli olan Sertoli ve Leydig hücreleri (1, 21)'nde oluşan bozukluklar germinal hücreleri de etkileyebilir. O nedenle germinal hücrelerde oluşan bozukluklar, Sertoli ve Leydig hücrelerinde oluşan bozukluklara bağlı olarak gelişmiş olabilir.

Etanol metabolizmasının bir sonucu olarak lipid peroksidasyonu oluşmaktadır (54). Lipid peroksidasyonu, lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak bilinen MDA'nın (55) oluşumu ile ölçölmektedir (56). İçme suyu ile verilen etanol testiste lipid peroksidasyonunun artışına neden olmaktadır (5, 55). Bir antioksidan olan vitamin A, lipid peroksidasyonunu azaltarak, testiküler membranları stabilize etmekte ve alkol etkisiyle oluşan atrofiyi önlemektedir (5). Askorbik asit (vitamin C) de vitamin A gibi antioksidan bir vitamindir. Bu, serbest radikalleri direkt olarak temizleyebilir ve vitamin E'nin antioksidan formunu yenileyerek de indirekt yolla olumlu etki gösterebilir (6). Bizim araştırmamızda, etanol etkisiyle Leydig hücresi, miyoid hücre, Sertoli hücresi ve spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler olmasına rağmen, spermatogenez devam etmiş ve seminifer tubullerde spermatogenez serisi hücreleri (spermatogonium, primer spermatosit, spermatid ve spermatozoon) izlenmiştir. Etanolün fare testisinde oluşturduğu olumsuz etkiler askorbik asit takviyesiyle düzelmiştir. Bir antioksidan olan askorbik asit, bu koruyuculuk etkisini oksidatif stresi azaltarak gerçekeştirmiş olabilir. Askorbik asitin etanol toksisitesine karşı bu koruyucu etkisinin pekiştirilmesi açısından, lipid peroksidasyonunun da ölçöldüğu daha ayrıntılı çalışmaların yapılması ile bu morfolojik sonuçlar daha da anlamlı olacaktır.

Sonuçlar etanolün testiste toksik etkiler oluşturduğu, bu etkiler sonucu daha çok Sertoli ve Leydig hücrelerinde olmak üzere tüm testis hücrelerinde morfolojik bozukluklar oluşturduğu, askorbik asitin bu toksik etkilere karşı testis yapısında koruyucu ve düzeltici etki yaptığını göstermektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonuçları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

A) Sadece etanol verilen farelerin testislerinde,

- 1-Peritubuler dokuda miyoid hücrelerde bir miktar atrofi,
- 2-Peritubuler doku ile Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasında belirgin açılmalar,
- 3-Spermatogoniumlarda atrofik ve eozinofilik dejenerasyon,
- 4-Spermatositlerde nekrotik dejenerasyon,
- 5-Lümeneye en yakın yuvarlak germinal hücrelerde eozinofilik dejenerasyon,
- 6-Olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümeneye dökülmesinde artış,
- 7-İnterstisyel dokuda Leydig hücreleri nükleuslarında piknozis ve bu hücrelerde atrofi,
- 8-Sertoli hücresi içinde belirgin lipofuksin inklüzyonu ve büyük vakuol oluşumu,
- 9-Sertoli hücresi bazalinde lipid birikimi izlendi.

B) Etanol + askorbik asit verilen farelerin testislerinde,

- 1-Spermatogoniumlar, spermatositler, spermatidler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri kontrol grubundakilere benzerdi.
- 2-Bazı seminifer tubullerde, sadece bazı spermatositlerde apoptotik dejenerasyonlar izlendi.

C) Sadece askorbik asit verilen fare testislerinde,

- 1-Spermatogoniumlar, spermatositler, spermatidler ve Sertoli hücreleri kontrol grubundakilere benzer olarak izlendi.
- 2-Leydig hücreleri diğer gruplardakilere göre biraz daha büyük ve daha düzgün kontürlü olarak dikkat çekti.

Sonuçlar etanolün testiste toksik etkiler oluşturduğu, bu etkilerle daha çok Sertoli ve Leydig hücrelerinde olmak üzere tüm testis hücrelerinde morfolojik bozukluklar olduğu, askorbik asitin bu toksik etkilere karşı koruyucu ve düzeltici etki yaptığını göstermektedir.

Askorbik asitin etanol toksisitesine karşı bu koruyucu etkisinin pekiştirilmesi açısından, lipid peroksidasyonunun da ölçüldüğü daha ileri çalışmaların yapılması, bu morfolojik sonuçları daha anlamlı kılacaktır.

7. ÖZET

Etanol testis toksini olarak bilinmektedir. Onun testisteki toksisitesini oksidatif stresi artırarak yapabileceği fikrinden hareketle, bir antioksidan olan askorbik asitin fare testisinde bu toksisiteye karşı koruyucu etki yapıp yapmadığını belirlemek için bu çalışmayı gerçekleştirdik. Bu amaçla BALB-C türü 24 erişkin erkek fare kullanıldı ve 4 gruba ayrıldı: kontrol, etanol, etanol + askorbik asit, askorbik asit.

Farelerin alkole alışabilmeleri için iki haftalık alıştırma peryodu yapıldı. Bu peryoddan sonra, üç haftalık deney peryodu gerçekleştirildi. Sıvılar fare şişelerine konarak farelerin isteye bağlı olarak sıvı almaları sağlandı. Kontrol grubu, etanol grubu, etanol + askorbik asit ve askorbik asit gruplarına ait farelerin sırasıyla çeşme suyu, etanol, etanol + askorbik asit ve askorbik asit almaları sağlandı.

Deney peryodunun sonunda, farelerden alınan testis parçaları rutin doku takiplerinden sonra kesildi, boyandı; ışık ve elektron mikroskopla incelendi. Işık mikroskopik olarak, etanol grubunda, kontrol grubuna göre, Leydig hücreleri ve miyoid hücrelerde bir miktar atrofi, peritubuler doku ile Sertoli hücreleri ve spermatogoniumlar arasında belirgin açılmalar, seminifer tubulde spermatogoniumlarda atrofik dejenerasyon, primer spermatositlerde nekrotik dejenerasyon, lümene en yakın yuvarlak germinal hücrelerde eozinofilik dejenerasyon, olgunlaşmasını tamamlamamış germinal hücrelerin lümene dökülme sıklığında artış izlendi. Elektron mikroskopik olarak, Sertoli hücresi içinde belirgin lipofuksin inklüzyonu, lipid vakuelleri ve büyük boş vakuol oluşumunda artış izlendi.

Etanol + askorbik asit grubunda ve askorbik asit grubunda, ışık ve elektron mikroskopik olarak, spermatogoniumlar, spermatositler, spermatidler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri kontrol grubundakilere benzer görünümde izlendi. Etanol + askorbik asit grubunda, bazı seminifer tubullerde, sadece bazı spermatositlerde apoptotik dejenerasyonlar izlendi.

Askorbik asit grubunda, Leydig hücrelerinde, diğer gruplardakilere göre biraz büyüme ve daha düzgün kontür dikkat çekti.

Sonuç olarak bulgularımız, etanolün fare testisinde, daha çok Sertoli ve Leydig hücrelerinde, bir miktar da spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler oluşturduğunu; askorbik asitin bu bozuklukları, etanol toksisitesine karşı koruyucu etki yaparak, düzelttiğini göstermektedir.

8. SUMMARY

A Microscopic Examination About Protective Effect of Ascorbic Acid Against Ethanol Toxicity on Mouse Testis

Ethanol is known as a testicular toxin. Its toxicity may be via increase oxidative stress in the testis. Ascorbic acid is an antioxidant agent. We done this study whether ascorbic acid has a protective effect against ethanol toxicity on mouse testis. We used 24 adult male BALB-C mice and divided them into four groups: control, ethanol, ethanol + ascorbic acid and ascorbic acid.

In the first two weeks, we made mice become addictive to alcohol. After this period, three weeks experimental period was succeeded. Mice drank the fluids ad libitum in bottles. Mice in the group of control, ethanol, ethanol + ascorbic acid and ascorbic acid drank tap water, ethanol, ethanol with ascorbic acid and ascorbic acid respectively.

After the experimental period, pieces of testis were taken and rutin tissue following procedure was carried out and cut, stained, and examined by light and electron microscope.

In ethanol group, light microscopically, we found atrophy in myoid and Leydig cells, widening between Sertoli cell, spermatogonium and peritubular tissue, atrophic degeneration in spermatogonium, necrotic degeneration in primary spermatocyte, eosinophilic degeneration in germinal cells near to lumen, increase in sloughing of immature germinal cells to the lumen. Electron microscopically, an increase in lipofuscin pigment, lipid vacoules and large empty vacoules were seen in Sertoli cell.

In ethanol + ascorbic acid group, spermatogonia, spermatocytes, spermatids, Sertoli and Leydig cells were similar to control group in both light and electron microscope. In some tubules of this group, apoptotic degeneration were seen in a few spermatocytes.

In ascorbic acid group, Leydig cells became larger and their contours were more regular.

As a result of the study, the data showed that ethanol cause more degenerative changes in Sertoli and Leydig cells than spermatogenic cells, and ascorbic acid repairs these degenerations and has a protective effect against ethanol toxicity.

9. KAYNAKLAR

- 1-Eroschenco VP, Di Fiore. Histoloji Atlası (Atlas of Normal Histology, Çev. Ed. Demir R). s. 283-289, Palme Yayıncılık, Ankara, 2001.
- 2-Van Thiel DH, Gavalier JS, Lester R, Goodman MD. Alcohol-induced testicular atrophy. An experimental model for hypogonadism occurring in chronic alcoholic men. Gastroenterology. 1975 Aug;69(2):326-32.
- 3-Van Thiel DH, Cobb CF, Herman GB, Perez HA, Estes L, Gavalier JS. An examination of various mechanisms for ethanol-induced testicular injury: studies utilizing the isolated perfused rat testes. Endocrinology. 1981 Dec;109(6):2009-15.
- 4-Van Thiel DH. Ethanol: its adverse effects upon the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. J Lab Clin Med. 1983 Jan;101(1):21-33.
- 5-Rosenblum ER, Gavalier JS, Van Thiel DH. Lipid peroxidation: a mechanism for alcohol-induced testicular injury. Free Radic Biol Med. 1989;7(5):569-77.
- 6-Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Temel Patoloji (Basic Pathology, Çev. Ed. Çevikbaş U) 6. Baskı, s. 234-235, 256-257, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti., İstanbul, 2000.
- 7-Zhu Q, Meisinger J, Emanuele NV, Emanuele MA, LaPaglia N, Van Thiel DH. Ethanol exposure enhances apoptosis within the testes. Alcohol Clin Exp Res. 2000 Oct;24(10):1550-6.
- 8-Anderson RA Jr, Willis BR, Oswald C. Spontaneous recovery from ethanol-induced male infertility. Alcohol. 1985 May-Jun;2(3):479-84.
- 9-Willis BR, Anderson RA Jr, Oswald C, Zaneveld LJ. Ethanol-induced male reproductive tract pathology as a function of ethanol dose and duration of exposure. J Pharmacol Exp Ther. 1983 May;225(2):470-8.

10-Grattagliano I, Vendemiale G, Errico F, Bolognino AE, Lillo F, Salerno MT, Altomare E: Chronic ethanol intake induces oxidative alterations in rat testis. *J Appl Toxicol.* 1997; 17(5):307-11.

11-Berryman SH, Anderson RA Jr, Weis J, Bartke A. Evaluation of the co-mutagenicity of ethanol and delta 9-tetrahydrocannabinol with Trenimon. *Mutat Res.* 1992 Jan;278(1):47-60.

12-Maneesh M, Jayalekshmi H, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM: Effect of chronic ethanol administration on testicular antioxidant system and steroidogenic enzyme activity in rats. *Indian J Exp Biol.* 2005; 43(5):445-9.

13-Zhu Q, Van Thiel DH, Gavalier JS. Effects of ethanol on rat Sertoli cell function: studies in vitro and in vivo. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997 Nov;21(8):1409-17.

14-Martinez FE, Martinez M, Padovani CR, Bustos-Obregon E: Morphology of testis and epididymis in an ethanol-drinking rat strain (UChA and UChB). *J Submicrosc Cytol Pathol.* 2000; 32(2):175-84.

15-Benjamin CL, Garman GR, Funston JH. *Human Biology.* p. 199-2001, 449-455, The MacGraw-Hill Companies, New York, 1997.

16-Sonmez M, Turk G, Yuce A: The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male wistar rats. *Theriogenology* 2005; 63(7): 2063-2072.

17-Maneesh M, Jayalakshmi H, Dutta S, Chakrabarti A, Vasudevan DM: Experimental therapeutic intervention with ascorbic acid in ethanol induced testicular injuries in rats. *Indian J Exp Biol.* 2005; 43(2):172-6.

18-Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi. Klinik Yönleriyle (The Developing Human 6. baskıdan çeviri. Çev. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H). s. 323-328, Nobel Tıp Kitap Evleri, İstanbul, 2002.

19-Itoh M, Terayama H, Naito M, Ogawa Y, Tainosho S. Tissue microcircumstances for leukocytic infiltration into the testis and epididymis in mice. *J Reprod Immunol.* 2005 Oct;67(1-2):57-67.

20-Krstic RV. *Human Microscopic Anatomy.* p. 342-361. Springer-Verlag, Berlin, 1991.

21-Young B, Heath JW, Stevens A, Lowe JS, Deakin PJ. *Wheater's Functional Histology. A Text and Color Atlas.* p. 328-336. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000.

22-Luers GH, Thiele S, Schad A, Volkl A, Yokota S, Seitz J. Peroxisomes are present in murine spermatogonia and disappear during the course of spermatogenesis. *Histochem Cell Biol.* 2005 Nov 30;111.

23-Haider SG. Cell biology of Leydig cells in the testis. *Int Rev Cytol.* 2004;233:181-241.

24-Shoji M, Chuma S, Yoshida K, Morita T, Nakatsuji N. RNA interference during spermatogenesis in mice. *Dev Biol.* 2005 Jun 15;282(2):524-34.

25-Dettin L, Ravindranath N, Hofmann MC, Dym M. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. *Biol Reprod.* 2003 Nov;69(5):1565-71.

26-Bastos H, Lassalle B, Chicheportiche A, Riou L, Testart J, Allemand I, Fouchet P. Flow cytometric characterization of viable meiotic and postmeiotic cells by Hoechst 33342 in mouse spermatogenesis. *Cytometry A.* 2005 May;65(1):40-9.

27-Maclean JA 2nd, Wilkinson MF. Gene regulation in spermatogenesis. *Curr Top Dev Biol.* 2005;71:131-97.

28-Petrusz P, Jeyaraj AD, Grossman G. Microarray analysis of androgen-regulated gene expression in testis: the use of the androgen-binding protein (ABP)-transgenic mouse as a model. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005 Dec 9;3(1):70.

29-Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. *Mol Reprod Dev.* 2005 Jun;71(2):166-77.

30-Sneddon SF, Walther N, Saunders PT. Expression of androgen and estrogen receptors in sertoli cells: studies using the mouse SK11 cell line. *Endocrinology*. 2005 Dec;146(12):5304-12.

31-Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Nov 15;102(46):16696-700.

32-O'Donnell L, Stanton PG, Bartles JR, Robertson DM. Sertoli cell ectoplasmic specializations in the seminiferous epithelium of the testosterone-suppressed adult rat. *Biol Reprod*. 2000 Jul;63(1):99-108.

33-Wiebe JP, Kowalik A, Gallardi RL, Egeler O, Clubb BH. Glycerol disrupts tight junction-associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. *J Androl*. 2000 Sep-Oct;21(5):625-35.

34-Vernet N, Dennefeld C, Rochette-Egly C, Oulad-Abdelghani M, Chambon P, Ghyselinck NB, Mark M. Retinoic Acid Metabolism and Signaling Pathways in the Adult and Developing Mouse Testis. *Endocrinology*. 2006 Jan;147(1):96-110.

35-Grover A, Smith CE, Gregory M, Cyr DG, Sairam MR, Hermo L. Effects of FSH receptor deletion on epididymal tubules and sperm morphology, numbers, and motility. *Mol Reprod Dev*. 2005 Oct;72(2):135-44.

36-Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, Fujii J. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic Res*. 2005 Jul;39(7):697-705.

37-Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, de la Vega-Beltran JL, Trevino CL, Felix R, Darszon A. K(ATP) channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. *Dev Biol*. 2006 Jan 15;289(2):395-405.

- 38-**Diamond I, Van Thiel DH, Lester R. Alcoholic myopathy and cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1989 Feb 16;320(7):458-60.
- 39-**Urbano-Marquez A, Estruch R, Navarro-Lopez F, Grau JM, Mont L, Rubin E. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med.* 1989 Feb 16;320(7):409-15.
- 40-**Baysan O, Kaptan K, Erinc K, Oztas Y, Coskun T, Kayir H, Uzun M, Uzbay T, Beyan C, Isik E. Chronic heavy ethanol consumption is associated with decreased platelet aggregation in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2005 Jun;206(2):85-90.
- 41-**Salonen I. Exposure to ethanol during capacitation impairs the fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Int J Androl.* 1986 Aug;9(4):259-70.
- 42-**Gordon GG, Altman K, Southren AL, Rubin E, Lieber CS. Effect of alcohol (ethanol) administration on sex-hormone metabolism in normal men. *N Engl J Med.* 1976 Oct 7;295(15):793-7.
- 43-**Van Thiel DH, Gavalier JS, Cobb CF, Sherins RJ, Lester R. Alcohol-induced testicular atrophy in the adult male rat. *Endocrinology.* 1979 Oct;105(4):888-95.
- 44-**Gavalier JS, Perez HA, Estes L, Van Thiel DH. Morphologic alterations of rat Leydig cells induced by ethanol. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;18 Suppl 1:341-7.
- 45-**Anderson RA Jr, Berryman SH, Phillips JF, Feathergill KA, Zaneveld LJ, Russell LD. Biochemical and structural evidence for ethanol-induced impairment of testicular development: apparent lack of Leydig cell involvement. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989 Aug;100(1):62-85.
- 46-**Anderson RA Jr, Willis BR, Oswald C, Zaneveld LJ. Male reproductive tract sensitivity to ethanol: a critical overview. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;18 Suppl 1:305-10.
- 47-**Van Thiel DH, Gavalier JS, Cobb CF, Santucci L, Graham TO. Ethanol, a Leydig cell toxin: evidence obtained in vivo and in vitro. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;18 Suppl 1:317-23.

48-Chiao YB, Van Thiel DH. Biochemical mechanisms that contribute to alcohol-induced hypogonadism in the male. *Alcohol Clin Exp Res*. 1983 Spring;7(2):131-4.

49-Farghali H, Williams DS, Caraceni P, Borle AB, Gasbarrini A, Gavalier J, Rilo HL, Ho C, Van Thiel DH. Effect of ethanol on energy status and intracellular calcium of Sertoli cells: a study using immobilized perfused cells. *Endocrinology*. 1993 Dec;133(6):2749-55.

50-Weinberg J, Vogl AW. Effects of ethanol consumption on the morphology of the rat seminiferous epithelium. *J Androl*. 1988 Jul-Aug;9(4):261-9.

51-Seetharam YN, Sujeeth H, Jyothishwaran G, Barad A, Sharanabasappa G, Umareddy B, Vijaykumar MB, Patil SB. Antifertility effect of ethanolic extract of Amalakyadi churna in male albino mice. *Asian J Androl*. 2003 Sep;5(3):247-50.

52-Anderson RA Jr, Willis BR, Oswald C, Zaneveld LJ. Partial reversal of ethanol-induced male reproductive pathology following abstinence. *Alcohol Alcohol*. 1985;20(3):273-86.

53-Anderson RA Jr, Phillips JF, Zaneveld LJ. Chronic ethanol ingestion during puberty alters the transient increase in testicular 5 alpha-reductase in the Swiss-Webster mouse. *J Androl*. 1989 Jan-Feb;10(1):28-36.

54-Rosenblum ER, Gavalier JS, Van Thiel DH. Vitamin A at pharmacologic doses ameliorates the membrane lipid peroxidation injury and testicular atrophy that occurs with chronic alcohol feeding in rats. *Alcohol Alcohol*. 1987;22(3):241-9.

55-Schlorff EC, Husain K, Somani SM. Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol*. 1999 Jun-Jul;18(2-3):203-14.

56-Rosenblum E, Gavalier JS, Van Thiel DH. Lipid peroxidation: a mechanism for ethanol-associated testicular injury in rats. *Endocrinology*. 1985 Jan;116(1):311-8.