

T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Metileugenolün

Testis Üzerindeki Etkilerinin

Işık Mikroskopik Düzeyde İncelenmesi

YELİZ ŞEN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Ana Bilim Dalı

Bu tez 05/03/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Ayşegül Çerkezkayabekir

(Danışman)

Prof. Dr. Tülin Aktaş

Yrd. Doç. Dr. Gülnur Kızılay

ÖZET

Bu çalışmada, bir besin katkı maddesi olan metileugenol'ün testis üzerine etkileri araştırıldı. Metileugenol'ün 10 mg/kg/gün ve 30 mg/kg/gün vücut ağırlığı dozları (% 0,5 metil selüloz içinde) intragastrik 10 gün süreyle hayvanlara verildi. Deney süresinin sonunda ışık mikroskobu ile metileugenol etkisiyle çeşitli dejeneratif değişikliklerin meydana geldiği tespit edildi. Seminifer tübül epitelinde düzensizlik meydana geldiği, epitelde hücrelerarası boşlukların arttığı ve bütünlük kaybının olduğu gözlemlendi. Epitel hücrelerinde yer yer membran kaybı ve özellikle nukleus etrafında sitoplazma kaybı meydana geldiği belirlendi. Seminifer tübül epitelinin bazal membranının ve interstisyel bağ doku alanlarının kontrol grubu ile kıyaslandığında korunduğu gözlemlendi. Her iki dozda da gözlenen bu nekrotik değişiklikler, metileugenol'ün 10 ve 30 mg/kg/gün dozlarında testis üzerine toksik etkisine işaret etmektedir. Bu nedenle metileugenol'ün toksik özelliklerinin ultrastrüktürel ve biyokimyasal parametrelerle daha ayrıntılı şekilde değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

ABSTRACT

In this study, the effects of methyleugenol, food additive, on the testis was investigated. 10 mg/kg/day and 30 mg/kg/day body weight doses of methyleugenol (in % 0.5 methylcellulose) were given by gavage for ten days. At the end of ten days, it was observed that several degenerative changes occurred by the effect of methyleugenol by light microscope. It was determined that disordering of epithelia of seminiferous tubules and increasing of intercellular space of epithelial cells and loosing of integrity of tubule's epithelia. Degeneration of cell membrane of epithelia and loosing of cytoplasm especially around the nucleus were detected. Basal membrane of seminiferous tubule's epithelia and connective tissue of inter seminiferous tubule area remained by comparison of control group. Necrotic changes observed in both doses indicate toxic effects of methyleugenol in testis in 10 and 30 mg/kg/day doses. Therefore, we have opinion that the toxic effects of methyleugenol have to evaluate with ultrastructural and biochemical parameters in details.

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanmasında tecrübeleriyle bana fikir veren ve yönlendiren, yüksek lisans süresi boyunca gerek ders aşamasında gerek tez aşamasında desteğini benden esirgemeyen tez danışmanım, sevgili hocam, Yrd.Doç.Dr. Ayşegül Çerkezkayabekir'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında her türlü imkânı sunan ve yararlanmamı sağlayan Biyoloji Bölüm Başkanlığına, bölümdeki tüm hocalarıma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Ayrıca maddi ve manevi her türlü desteği karşılıksız veren, sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen canım aileme ve biricik eşime, yüksek lisansım boyunca yardımlarıyla beni yüreklendiren sevgili arkadaşım Özlem Olgun Pelindağ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	III
ÖNSÖZ	IV
İÇİNDEKİLER	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAKLAR ARAŞTIRMASI	4
2.1. Testis	4
2.2. Metileugenol	14
3. MATERYAL VE METOD	16
3.1. Kimyasallar ve Doz Preparasyonu.....	16
3.2. Hayvanlar ve Doz Uygulaması.....	16
3.3. Işık Mikroskopik Takip	17
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	20
5. SONUÇLAR, TARTIŞMA VE ÖNERİLER	29
6. KAYNAKLAR	34

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1.1: Testis genel görünüm.....	5
Şekil 2.1.2: Testis anatomisi.....	6
Şekil 2.1.3: Seminifer tübül hücreleri ve leydig hücreleri.....	10
Şekil 2.1.4: Spermatogenik hücreler ve sertoli hücresi.....	12
Şekil 4.1 A: Kontrol grubuna ait testis dokusu, S: seminifer tübül, İ: intersitisyel alan, Hematoksilen-Eosin (100×) B: Kontrol grubuna ait testis dokusu, s: spermatogonyum ps: primer spermatozoid, ss: sekonder spermatozoid, sd: spermatid, Hematoksilen-Eosin(400×).....	20
Şekil 4.2 A: 10 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *: hücreler arası boşluklar ve epitelde düzensizlik, Hematoksilen-Eosin (200×) B: 10 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *: hücreler arası boşluklar, Hematoksilen-Eosin(400×).....	21
Şekil 4.3 A: 10 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *:sitoplazma kaybı, L: Seminifer tübül lümeni, Hematoksilen-Eosin(200×) B: 10 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, bazal membran (ok), *:bazal membran ayrılması, Hematoksilen-Eosin (200×).....	22
Şekil 4.4 A: Kontrol grubuna ait testis dokusu İ: İnterstisyel alan, PAS (100×) B : 10 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, İ: İnterstisyel alan, PAS (100×).....	23
Şekil 4.5 A: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, Seminifer tübül epitelinde dejenerasyon ve bütünlük kaybı (ok), İ:interstisyel alan Hematoksilen-Eosin(100×) B: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *:sitoplazma kaybı, Hematoksilen-Eosin(400×).....	24

Şekil 4.6 A: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *: epitel-bazal membran ayrılması, L: seminifer tübül lümeni, Hematoksilen-Eosin(100×)	
B: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *: epitel-bazal membran ayrılması ve epitelde bütünlük kaybı, Hematoksilen-Eosin(400×).....	25
Şekil 4.7: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *: şiddetli membran hasarı ve epitelde bütünlük kaybı,Hematoksilen-Eosin 400×).....	26
Şekil 4.8 A: Kontrol grubuna ait testis dokusu İ: İnterstisyel alan, PAS (100×)B: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, İ: İnterstisyel alan, PAS (100×).....	27

1. GİRİŞ

Esansiyel bir yağ olan metileugenol ($C_{11}H_{14}O_2$:1,2-dimetoksi-4-alilbenzen) eugenolün analogudur ve aromatik bitkilerde bulunan doğal bir bileşendir (Lahlou ve ark., 2004). Karanfil yağı, hindistan cevizi, anason, yenibahar, tarçın, ceviz kabuğu, egzotik bitki ve baharatlarda doğal olarak meydana gelen metileugenol, aromatik özelliği nedeni ile gıda sektöründe kullanılan bir katkı maddesidir. Doğal ya da sentetik orijinli metileugenol, zencefilli kek, dondurma, puding, çeşitli börek, çörek, kurabiye, turta, çeşni, ketçap, meyve özlü marmelat, alkolsüz meşrubat, sakız ve şekerleme gibi pek çok gıdada tat verici olarak kullanılmaktadır. Aynı zamanda güzel kokusu ile kozmetikte, sabun, şampuan ve parfüm gibi ürünlerde de tercih edilen bir bileşendir (Council of Europe, 2001).

Yaygın kullanımı nedeniyle insanlar metileugenol'e deri yoluyla, solunumla ve oral yolla maruz kalabilirler. Metileugenol, yaygın kullanımı ve karsinojen olarak bilinen safrol, isosafrol ve estragole yapısal benzerliğinden dolayı, Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) tarafından toksikolojik karakterizasyon ve test edilmek için aday olarak gösterilmiştir (Johnson ve ark., 2000; Lahlou ve ark., 2004). Metileugenol'ün toksikolojik ve karsinojenik özelliklerinin araştırıldığı iki yıllık besleme çalışmasında, bu bileşiğin F344/N sıçanlarında ve B6C3F1 farelerinde her iki cinsteki karsinojen olduğu ifade edilmiştir (Johnson ve ark., 2000).

Metileugenol ile ilgili çalışmalarda bu bileşiğin antibakteriyel özelliği (Franchomme ve Penoel, 1995), memelilerde hipotermik, miyorelaksant, antispazmodik ve anestetik etkileri bildirilmiştir (Sell ve Carlini, 1976; Dallmeier ve Carlini, 1981; Sousa ve ark., 1990; Magalhães ve ark., 1998; Lima ve ark., 2000; Sayyah ve ark., 2002; Yano ve ark., 2006). Ayrıca metileugenol'ün sıçan hepatositlerinde sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir (De Vincenzi ve ark., 2000; Burkey ve ark., 2000).

Abdo ve ark. (2001), metileugenol'ün toksik özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında, 10, 30, 100, 300 ve 1000 mg/kg vücut ağırlığı dozlarını, 14 haftalık bir süreyle, gavaj yoluyla F344 sıçanlarına ve B6C3F1 farelerine uygulamışlar ve metileugenol'ün karaciğer ve midede histolojik düzeyde dejeneratif etkilerini göstermişlerdir. Metileugenol'ün her iki türde serum aminotransferaz ve sorbitol dehidrogenaz aktivitelerini ve safra asit konsantrasyonunu arttırdığını, total protein ve albumin konsantrasyonunu azalttığını bildirmişlerdir.

Bundan başka metileugenol'ün doza bağlı olarak, karaciğerde kuffer hücrelerinde pigmentasyona ve safra kanalı hiperplazisine, mide mukozasında atrofiye ve kronik inflamasyona neden olduğunu ifade etmişlerdir. Yapılan çalışmada hem ışık mikroskobu hem de klinik patolojik değerlendirme sonucunda, metileugenol'ün doza bağlı olarak her iki türde de negatif etkileri gösterilmiştir.

Kaboğlu ve ark. (2009), metileugenol etkisi ile vücut ağırlığında anlamlı bir değişikliğin olmadığı, karaciğerde sinüzoidlerde genişleme, hepatositlerde; hipertrofi, sitoplazmik vakuolizasyon ve piknotik nukleuslar, endotelde membran hasarı ve bağ dokuda mononükleer hücre infiltrasyonu gözlemlendiğini bildirmişlerdir. Ayrıca böbrekte glomerulus kaybı, tübül epitelinde dejenerasyon, hipertrofik epitel hücreleri, proksimal tübüllerin lümeninde materyal birikimi meydana geldiğini tespit etmişlerdir. İnce bağırsakta ise villusların bazal kısımlarında mitotik figürlerde artış, bağ dokuda ödem, lamina propriada bağ doku-epitel doku ayrılması, bağ dokuda köpüksü görünüm ve lökosit infiltrasyonu gözlemiştir. Bununla beraber böbrek ve ince bağırsakta SOD (süperoksit dismutaz) ve katalaz aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik gözlenmezken, Gpx (glutasyon peroksidaz) aktivitesinde yüksek dozda (30 mg/kg/gün) anlamlı bir artış meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca LDH (laktat dehidrogenaz) ve ALP (alkalin fosfataz) aktiviteleri her iki doz grubunda (10 ve 30 mg/kg/gün) fakat AST (aspartat aminotransferaz) aktivitesi sadece 30 mg/kg/gün metileugenol grubunda anlamlı şekilde azaldığını ifade etmişlerdir. ALT (alanin aminotransferaz) aktivitesinde her iki doz grubunda (10 ve 30 mg/kg/gün) da anlamlı değişiklik gözlenmemiştir. Karaciğerde total glukoz miktarı değişmeden kalırken, glikojen miktarı 30 mg/kg/gün metileugenol grubunda anlamlı şekilde azalmıştır.

Ultrastrüktürel düzeyde ise akut metileugenol etkisi ile karaciğerde hepatositlerde, düz yüzlü endoplazmik retikulum keselerinde şişme, artış ve elektron yoğun birikimler, sitoplazmik vakuolizasyon, mitokondri ve lizozom sayısında hafif bir artış, nukleus zarında invaginasyon meydana geldiği ayrıca, safra kanaliküllerinde genişleme ve kanalikül mikrovilluslarında artış gözlenmiştir (Çerkezkayabekir ve ark., 2009).

Bu çalışmada ise yaygın olarak kullanımına rağmen Ulusal Toksikoloji Programı (NTP, 2000) tarafından toksikolojik karakterizasyon ve test edilmek için aday gösterilen metileugenol'ün, erkek sıçanlarda testis üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

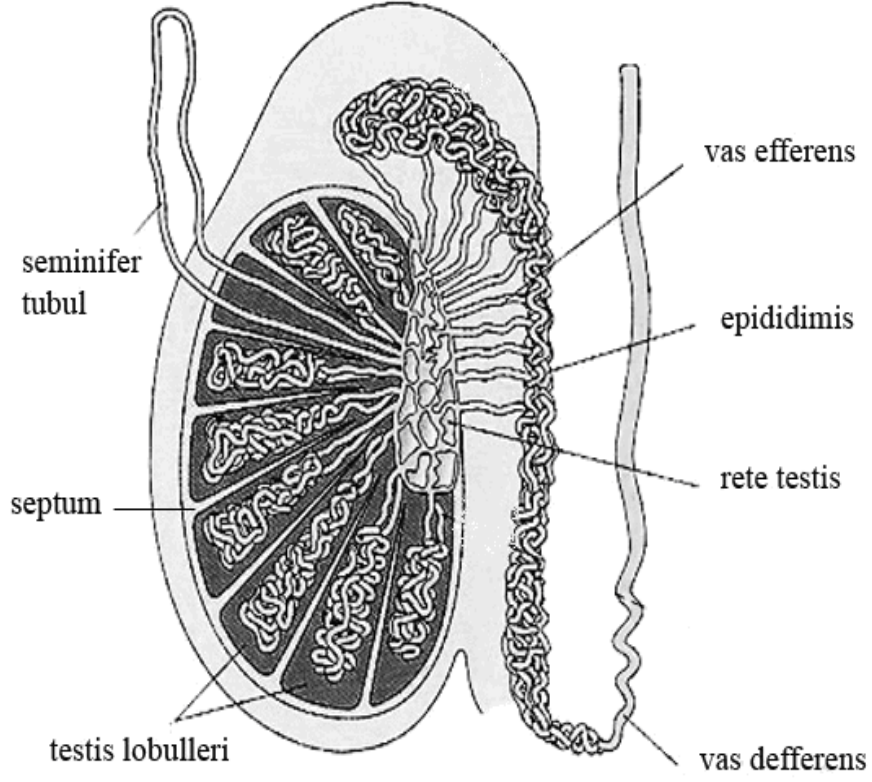
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAKLAR ARAŞTIRMASI

2.1. Testis

Testisler, gametlerin (sperm, spermatozoa) meydana getirilmesi (gametogenezis, spermatogenezis) ve steroid yapıdaki hormonların üretilip salgılanmasından sorumlu bezlerdir. Testisler skrotum içinde spermatik kord ile asılı dururlar ve birbirlerinden septum skroti ile ayrılırlar. Erişkin insan testisi oval şekilli, 4-5 cm uzunlukta, 2,5-3,5 cm genişlikte ve 20-30 gr ağırlığındadır. Olgun testisin posterior yüzü epididimis ile ilişkidir (şekil 2.1.1). Hem testis hem de epididimis, skrotal kese içerisinde vaz deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kord ile asılıdır.

Testisler üç tabakadan meydana gelen testiküler kapsül ile sarılıdır. En dışta mezotelyal hücrelerin oluşturduğu *tunika vaginalis* bulunur. Tunika vaginalis peritondan köken alan seröz bir kesedir. Testisin ön ve yan yüzeylerini çevreleyen visseral tabaka ve skrotum üzerine uzanan pariyetal tabaka bulunmaktadır. Orta kısımda bulunan *tunika albuginea* düz kas hücreleri içeren fibroelastik bağ dokusundan oluşan bir tabakadır ve bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılır. *Tunika vasküloza* ise kan damarları ağlarını içeren, areolar bağ dokusundan oluşan en iç tabakadır (şekil 2.1.2).

Tunika albuginea, rete testisin bulunduğu posterior bölgede kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Mediastinumdan testise doğru uzanan fibröz bağ dokusu septumları, testiküler dokuyu 250-300 lobüle ayırır. Her bir lobül 1-4 adet seminifer tübülü içerir.



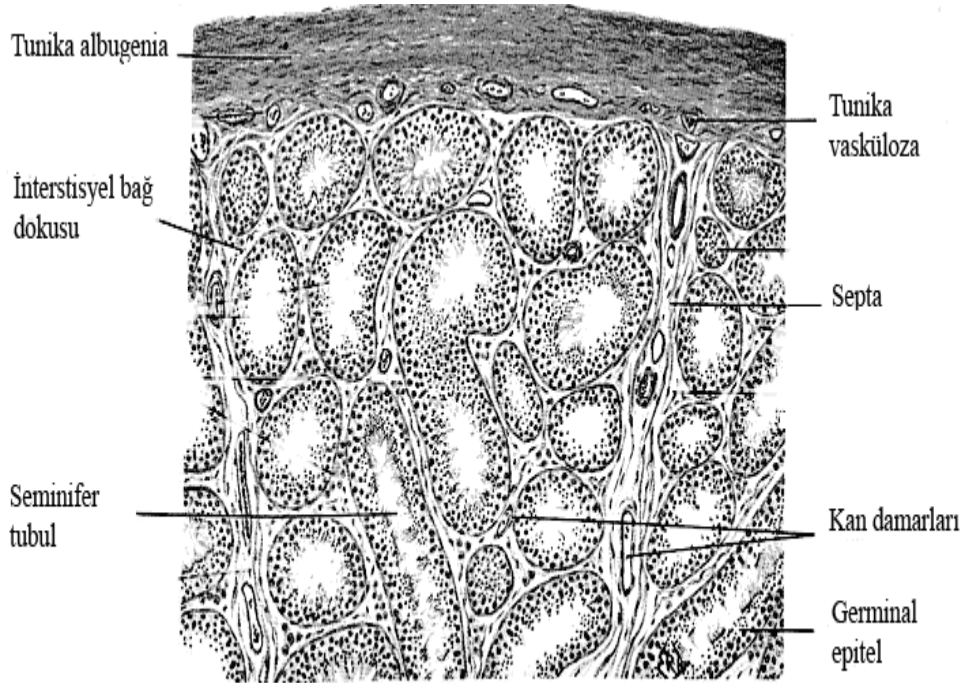
Şekil 2.1.1: Testis genel görünüm

Seminifer tübüllerin çapı 150-250 μm arasında, uzunlukları da 30-80 cm kadardır. Her bir lobüldeki seminifer tübüller lobülün mediastinumuna bakan kısmında birleşerek, tubuli rekti'ye açılırlar. Tubuli rekti ile başlayan erkek genital boşaltım yolları önce testis içinde ve daha sonra da testis dokusunun dışında farklı yapısal özelliklerle ve farklı isimlerle devam ederler.

Seminifer túbülleri astarlayan epitel, dıştan bazal lamina ile kollajen lifler ve miyoid hücrelerden oluşan özelleşmiş bir fibröz doku tarafından sarılmıştır. Bu fibröz dokuya peritúbüler doku denir. Miyoid hücreler, hareketsiz spermleri rete testise iletirler ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur. Seminifer túbül epiteli ince bir bazal lamina üzerine oturmuştur.

Miyoid hücrelerin organizasyonu türlere göre değişiklikler gösterir. Kemiricilerde tek tabaka halinde düzenlenme gösterirken, insanlarda ve bazı türlerde 3-5 tabakalıdır. Miyoid hücreler, kasılarak seminifer túbülün çapını değiştirebilir ve spermatozoonların túbül içerisinde hareketine yardım ederler (Abraham, L., 2006).

Seminifer túbüller arasındaki alan kan damarları, lenfatik kanallar, makrofajlar ve androjenleri salgılayan Leydig hücre grupları tarafından doldurulan interstisyel dokudan oluşmuştur (şekil 2.1.2).



şekil 2.1.2: Testisten ışık mikroskopik görünüm

Her bir seminifer túbülü döşeyen epitelde iki tip hücre vardır;

1-Spermatogenik seriye ait olan hücreler: Düzenli olarak bölünerek farklılaşan hücreler olup, 4-8 tabaka hücre içerirler. Bazalden lümene doğru çok sayıda farklı gelişim sürecinde hücre tipleri bulunur;

Spermatogonyumlar:

Bazal kompartmanda, bazal lamina ile direkt ilişkide olan hücrelerdir (şekil 2.1.3). Sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantıların altında yerleşim gösterdikleri için, kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar

Üç temel morfolojik spermatogonyum tipi gözlenir: Tip A koyu spermatogonyumlar, seminifer epitelin kök hücreleridirler. Yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinli oval çekirdek içerirler. Puberteden itibaren mitotik hücre bölünmeleri geçirerek ya tip A koyu spermatogonyumları ya da tip A açık spermatogonyumları oluştururlar. Tip A açık spermatogonyumlar, soluk boyanan, ince granüler kromatinli oval çekirdek içerirler. Mitotik bölünmeleri sonucunda farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumlar, merkezi yerleşimli çekirdekçiğe sahip küresel çekirdek içerirler. Nukleus kromatini nukleolus çevresinde ve nukleus kılıfı boyunca yoğunlaşma gösterir (Ross M.H., Pawlina W., 2006).

Primer spermatositler:

Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmeleri sonucu primer spermatositler oluşur. Son S fazını (DNA sentezi) tamamladıktan hemen sonra mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Bu safhada leptoten, zigoten, pakiten ve diploten fazlarını geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar. Bu bölünmede profazın yaklaşık 22 gün sürmesi nedeniyle mikroskopta incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Spermatogenik seride en büyük hücreler primer spermatositlerdir. Uzun süren profaz evresinin ardından meydana gelen metafaz, anafaz ve telofaz evreleri sonucu sekonder spermatositler oluşur (Ross M.H., Pawlina W., 2006).

Sekonder spermatositler:

Birinci mayoz bölünmeden sonra oluşan sekonder spermatositler 23 kromozom içerir. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin görülmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve hızla ikinci mayotik bölünmeye giren hücrelerdir (Ross M.H., Pawlina W., 2006).

Spermatidler:

Sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesi ile oluşan spermatidlerin boyutları diğer hücrelerden küçüktür (7-8 μm). Bu hücreler yoğunlaşmış kromatin materyali içeren çekirdekleri ve seminifer tübüllerde sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntülerinde yerleşmeleri ile tanınırlar (şekil 2.1.3).

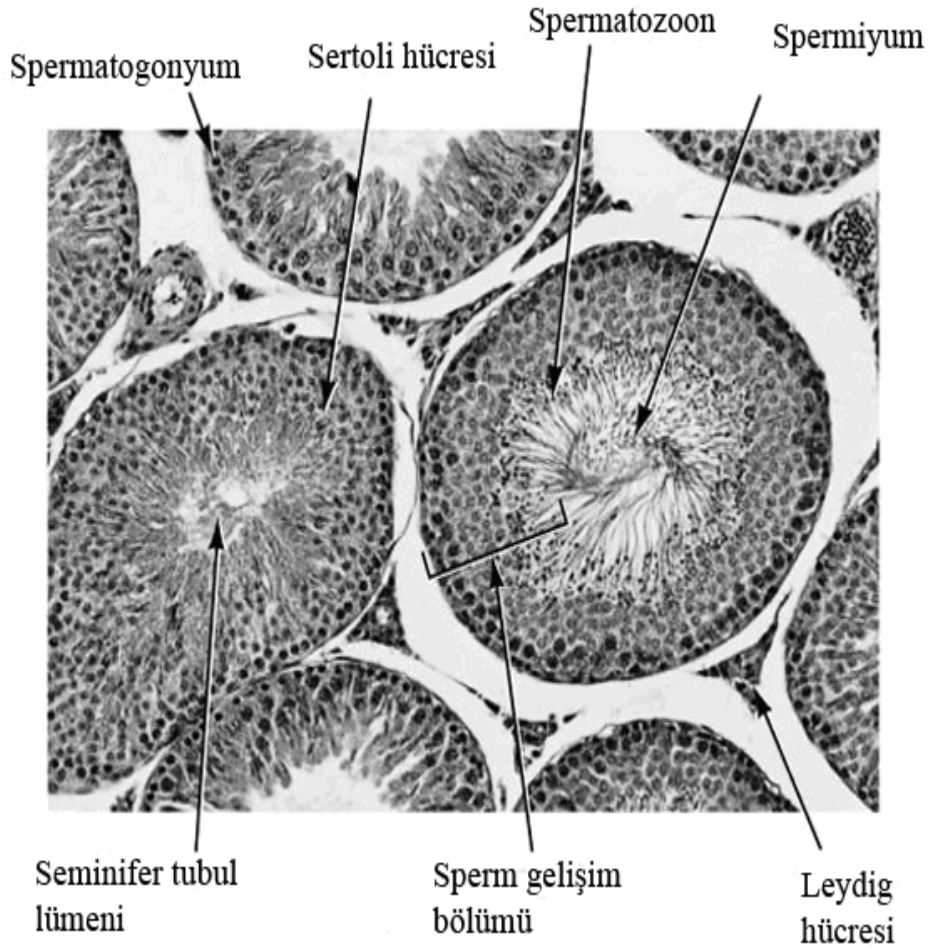
Spermatidler, spermiyogenez adı verilen farklılaşma süreci geçirerek metamorfoza uğrarlar. Spermiyogenezde ilk olarak kamçı gelişir. Kamçı distal sentriyolden gelişir. Keratin içeren dış yoğun lifler ve fibroz kılıf ile çevrili bir aksoneme sahiptir. Mitokondriler kuyruğun orta parçasının çevresinde sarılmış şekilde bir kılıf oluşturur. Bunu akrozom gelişimi izler. Akrozom gelişimi golgi evresi, kep/şapka evresi, akrozomal evre ve olgunlaşma evresi olmak üzere dört evrede gerçekleşir. Golgi evresinde hidrolitik enzimler golgi aygıtından akrozomal vesiküle aktarılır. Sentriyol çifti akrozomal vesikülün zıt kutbuna göç eder. Kep evresinde akrozom kesesi yassılaşır, çekirdek zarına tutunmuş bir kep oluşturur ve çekirdek çevresini sarmaya başlar. Spermatid, akrozomal bölge bazal kompartmana bakacak şekilde döner. Akrozomal evrede akrozom, nukleusun üst kısmını örter ve sarmaya devam eder. Bu sırada manşet (nukleus çevresinde bir halka ve tutunmuş mikrotübüller) oluşur. Distal sentriyol de aksonemi oluşturur.

Olgunlaşma evresinde manşet kuyruğa ilerler. Keratin içeren dış yoğun lifler gelişir ve aksonem boyunca dizilirler. Mitokondriler, orta parçada dış yoğun liflerin çevresinde dizilir ve manşet dağılır. Son olarak da nüklear yoğunlaşma gerçekleşir. Somatik histonlar protaminlerle yer değiştirdiğinde nüklear yoğunlaşma oluşur. Artık cisimler spermleşme aşamasında bırakılır ve sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir (Ross M.H., Pawlina W., 2006; Abraham, L., 2006).

Spermatozoonlar:

Olgun germ hücreleridir (şekil 2.1.3). İnsanda spermatogonyumdan spermatozoon oluşumu arasında geçen süre yaklaşık 64 gündür ve bu sürece *spermatogenezis* adı verilir. Olgun insan spermatozoonu baş, orta parça ve kuyruktan oluşur. Spermin baş ve kuyruk kısımlarını plazma membranı sarar. Baş, akrozomla sarılmış nukleustan oluşur. Nukleus yassılaştırmış şekilde olup, yoğun halde kromatin içerir. Nukleusun anterior yarısını akrozom örter. Özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom; akrozin denilen tripsin benzeri proteazlar, asit fosfataz, hiyaluronidaz ve nöroaminidaz gibi hidrolitik enzimler içerir. Orta parça, baş ve kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlayan bir çift sentriolün bulunduğu dar bir parçadır. Distal sentriol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapar.

Kuyruk yapısal yönden silyuma benzer. Kuyruk üç parçaya bölünmüştür; orta parça, esas parça ve son parça. Kuyruğun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondrilerin oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonem ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz adet uzunlamasına seyreden filamandan oluşur. Esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır. Yedi dış yoğun lifle sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturur. Son parça, dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı sadece aksonem bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır (Ross M.H., Pawlina W., 2006).



Şekil 2.1.3: Seminifer tübül hücreleri ve interstisyel alan

2- Sertoli hücreleri:

Sertoli hücreleri, puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücre tipidir. Puberteden sonra, seminifer tübüleri döşeyen hücrelerin yaklaşık % 10'unu oluşturur. Daha ileri yaştaki erkeklerde spermatogenik hücre popülasyonu azaldığı zaman, Sertoli hücreleri tekrar seminifer epitelin ana elamanı haline gelir. Sertoli hücreleri seminifer tübül membranından lümeneye kadar uzanan prizmatik hücrelerdir ve birbirleriyle oluşturdukları bağlantı birimleri arasındaki alanlarda spermatogenik serinin farklı olgunlaşma evrelerindeki hücreler bulunur (şekil 2.1.4).

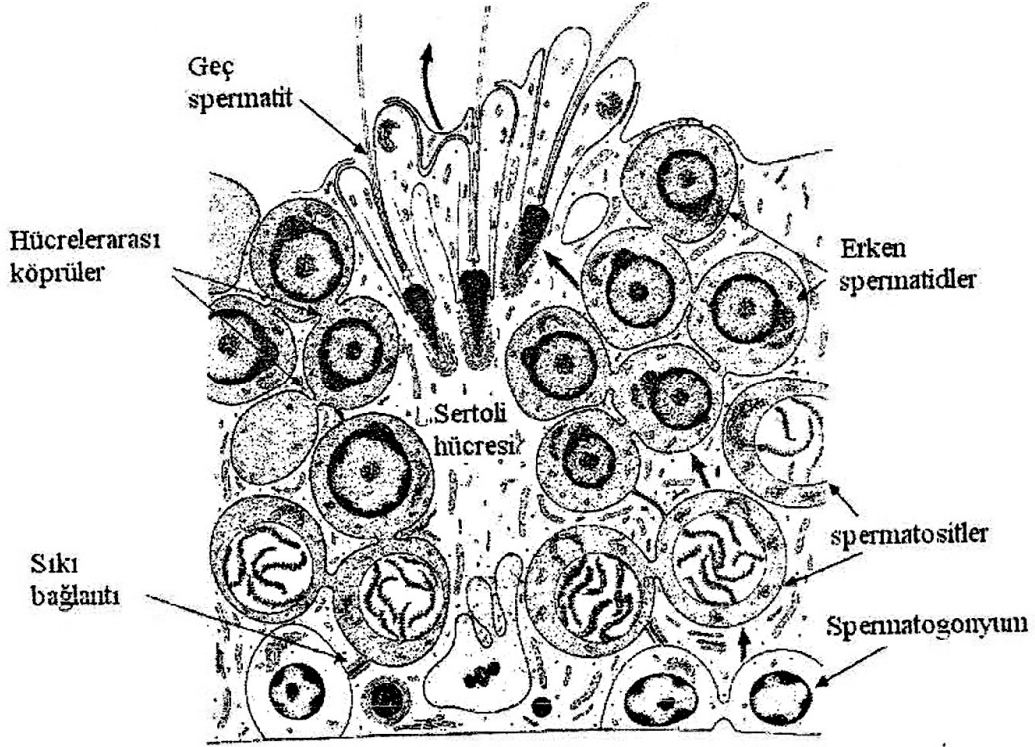
Büyük bir çekirdek ve heterokromatin kitleleri ile ilişkili geniş bir çekirdekçik içerir. Sitoplazmasında düz yüzlü ve granüllü endoplazmik retikulum, mitokondriler, lizozomlar lipid damlacıkları, golgi aygıtı ve zengin bir hücre iskeleti bulunur (Ross M.H., Pawlina W., 2006; Abraham, L., 2006).

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları:

- 1- Gelişmekte olan spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek,
- 2- Spermiyogenezin sonunda atılan rezidüel cisimcikleri fagosite etmek,
- 3- Olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla (spermiasyon süreci) seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak,
- 4- Seminifer tübül lümenine protein ve iyon bakımından zengin bir sıvı salgılamak,
- 5- Folikül stimüle edici hormon (FSH) uyarımıyla, androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlemek. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar.
- 6- Anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen ve uyarıcı peptidleri salgılamak,
- 7- Müller inhibe edici (MIH) hormon salgılamak. (Ross M.H., Pawlina W., 2006; Junquera L.C. ve ark., 2005)

Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı bağlantı kompleksleri (zonula okludens) ile bağlıdır. Sertoli-sertoli bağlantı komplekslerinin kan-testis bariyer bölgeleri olduğu saptanmıştır. Spermatogonyuların farklılaşması spermatozoona özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar. Seksüel olgunlaşmanın, immünolojik yeteneğin gelişmesinden daha sonra meydana gelmesi sonucu, farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanmaktadır. Bu durum, germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immün yanıtı tetiklemektedir. Kan-testis bariyeri, gelişen spermler ve immün sistem arasında oluşabilecek etkileşimi ortadan kaldırır. Bu bariyer, seminifer tübüllere immünooglobulinlerin geçmesini önler ve bu nedenle serumlarında çok yüksek düzeylerde sperm antikorları bulunan hastalarda herhangi bir fertilitte bozukluğu görülmemektedir (Ross M.H., Pawlina W., 2006).

Sertoli-sertoli bağlantı kompleksi aynı zamanda seminifer epitelinin bazal ve adluminal kısım olmak üzere iki bölüme ayırır. Bazal kısım spermatogonyumları, adluminal kısım ise geç spermatidleri, erken spermatidleri ve spermatozoidleri içerir (şekil 2.1.4).



Şekil 2.1.4: Spermatogenik hücreler ve sertoli hücresi

Leydig (İnterstisyum) hücreleri:

Testisin seminifer tübülleri arasındaki alan Leydig hücreleri, bağ dokusu elemanları, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur (şekil 2.1.3). Testiküler kapillerler pencere tiptedir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler. İnterstisyel alanın, lenf damarlarından zengin olması, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Seminifer tübüller arası alan, aynı zamanda Leydig hücreleri, fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajları içermektedir.

Leydig hücreleri (testisin interstisyel hücreleri) yuvarlak ya da poligonal şekilli olup, eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptir. Merkezi yerleşimli nukleus kaba kromatin granülleri ve belirgin nukleolus içerir. Steroid sentez eden hücre özellikleri taşıyan sitoplazma, yaygın granülsüz endoplazmik retikulum, küçük lipid damlacıkları, tübüler kristal mitokondriler, lipofuksin granülleri ile Reinke kristali ve öncülerine sahiptir.

Leydig hücreleri, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondri ve granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilir. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda gebelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon, maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten, fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Androjenik hormonlar, gelişim sırasında, erkek genital organların farklılaşması için gereklidir (Ross M.H., Pawlina W., 2006; Abraham, L., 2006).

Leydig hücrelerinin salgıladığı testosteronun etkisiyle gelişip olgunlaşan spermatozoonlar, seminifer tübüllerden sırasıyla şu kanalları izleyerek uzaklaşır.

Testis içi genital kanallar:

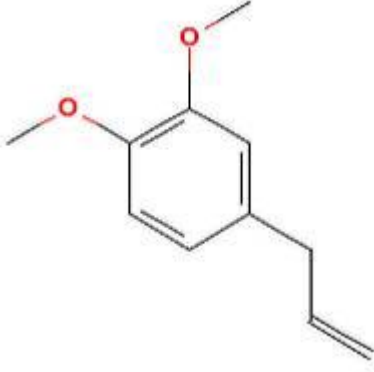
- Tubuli rekti
- Rete testis
- Duktuli efferent

Dış genital kanallar:

- Ductus epididimis
- Ductus deferens
- Ductus ejakulatorius
- Üretra

2.2. Metileugenol

Kimyasal formülü: C₁₁H₁₄O₂



Kimyasal ismi: 1,2-dimetoksi-4-alilbenzen, 1,2-dimetoksi 4-(2-propenil) benzen, 1,3,4-eugenol metil eter, eugenil metil eter.

Molekül Ağırlığı: 178.23

Kullanım alanları: Dondurma, puding, bÖrek, çÖrek, meşrubat, sakız, şekerleme gibi yiyeceklerde tat verici, sabun, şampuan, parfüm gibi ürünlerde de koku verici olarak kullanılmaktadır. Karanfil yağı, hindistan cevizi, anason, yenibahar, tarçın, ceviz kabuğı, egzotik bitki ve baharatlarda doğal olarak meydana gelen metileugenol, aromatik özelliğı nedeni ile gıda sektöründe kullanılan bir katkı maddesidir.

Metileugenol, alilalkoksibenzen olarak isimlendirilen kimyasal bileşik ailesinin bir üyesidir. İsoeugenol, eugenol, astragol ve safrol da bu ailenin diğeri önemli üyeleri olarak sayılabilir (Robison ve Barr, 2006). Metileugenol'ün toksikokinetik özelliklerinin araştırıldığı çalışmalarda insanda serum yarı ömrünün 90 dakika olduğu bildirilmiştir (Schechter ve ark., 2004). Hayvanlarda metileugenolün ince bağırsaktan çabuk ve tam bir şekilde absorbe edildiğı ve metabolizmasının doza bağılı olarak regüle edildiğı ifade edilmiştir. Düşük dozlarda metileugenol'ün *O*-demetilasyonla metabolize edildiğı, yüksek dozlarda ise epoksidasyon yada 1-hidroksilasyon ile detoksifiye edildiğı bildirilmiştir (Robison ve Barr, 2006).

Metileugenol ile ilgili çalışmalarda bu bileşimin antibakteriyel özelliği (Franchomme ve Penoel, 1995), memelilerde hipotermik, myorelaksant, antispazmodik ve anestetik etkileri bildirilmiştir (Sell ve Carlini, 1976; Dallmeier ve Carlini, 1981; Sousa ve ark., 1990; Magalhães ve ark., 1998; Lima ve ark., 2000; Sayyah ve ark., 2002; Yano ve ark., 2006). Ayrıca metileugenol'ün sıçan hepatositlerinde sitotoksik ve genotoksik etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir (De Vincenzi ve ark., 2000; Burkey ve ark., 2000).

Çeşitli baharatların, mikroorganizmalar üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada yüksek oranda metileugenol, eugenol içeren karanfil, yenibahar gibi baharatların antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir (Üner ve ark., 2000).

Öksürük, solunum güçlüğü, baş ağrısı, diş ağrısı, eklem iltihabı ve sinüzitin tedavisinde kullanılan bir ilacın içerdiği *Asari radix* bitkisinde yüksek oranda safrol ve metileugenol bulunduğu tespit edilmiştir. Yapılan toksikolojik çalışmalarda safrol ve metileugenol'ün hepatokarsinogen ve genotoksik olduğu belirlenmiştir. Bu sebeple bu maddelerin miktarları kaynatılarak azaltılmış ve ilaç analjezik olarak kullanılmıştır. (Chen ve ark., 2009)

3. MATERYAL VE METOD

Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığına Bağlı Etik kurulun 15.12.2005 tarihli ve 17 sayılı oturumunda çalışmamız değerlendirilmiştir. Toplantıda alınan 2 nolu karar üzerine çalışmamız için deney hayvanı kullanımı uygun görülmüş ve deney, T.Ü.Deney Hayvanları biriminde gerçekleştirilmiştir. (Sayı No: B.30.2.TRK.0.01.00.00/102-15742)

3.1. Kimyasallar ve Doz Preparasyonu

Metileugenol (CAS # 93-15-2; 99% saf; Merck, Hohenbrunn, Germany) ve metilselüloz (CAS # 9004-67-5; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) firmasından temin edildi. Metileugenol, %0,5 metilselüloz (suda çözünür) içinde süspansiyon edilerek 10 ve 30 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozları hazırlanarak hayvanlara verildi. Diğer tüm kimyasalların analitik preparatları kullanıldı.

3.2. Hayvanlar ve Doz Uygulaması

Çalışmada Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nden temin edilen 235±35 gr ağırlığında Wistar albino erkek sıçanlar kullanıldı. Hayvanlar bir kontrol ve iki doz grubu olacak şekilde üç gruba ayrıldı (n=10). Metileugenol uygulanan gruplardan birincisine 10 mg/kg vücut ağırlığı/gün, ikincisine ise 30 mg/kg vücut ağırlığı/gün dozları, 10 gün süreyle, gavaj yoluyla uygulanırken kontrol grubuna eş zamanlı olarak %0,5 metilselüloz verildi. Deney süresi boyunca hayvanlar standart pellet yem ile beslendi ve serbest şekilde çeşme suyu almaları sağlandı. Hayvanlar deney öncesi adaptasyonları ve deney süresi boyunca optimum laboratuvar koşullarında (21 °C sıcaklık, %40-60 nem ve 12 saat aydınlık-karanlık periyodu) Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde muhafaza edildi.

3.3. Işık Mikroskopik Takip

Deney süresinin sonunda hayvanlar 5-10 mg/kg Xylazin ve 50-70 mg/kg Ketalar anestezi altında disekte edildi. Işık mikroskopik değerlendirme için alınan parçalar (testis) Bouin solusyonu ile 24 saat süreyle fikse edildi. Fiksasyon süresinin sonunda % 70 alkol ile yıkanarak fiksatif uzaklaştırıldı. Yükselen alkol serileri ile parçaların dehidratasyonları yapıldı, ksilol ile şeffaflaştırıldı ve parafin bloklara gömüldü. Bu bloklardan Microm HM 355 S marka mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen-Eosin ve Periodik Asit Schiff (PAS) ile boyandı ve bulgular değerlendirildi. Olympus BH-2 marka fotomikroskop ile bulgular fotoğraflandı.

PAS boyama yöntemi:

Glikojen, müköz salgı ve glikoproteinlerde bulunan 1,2-glikol veya 1,2-aminoalkol gruplarının ve dolayısıyla aldehit gruplarının gösterilmesinde kullanılır. Önce, periyodik asit ile dokular okside edilir ve aldehit grupları açığa çıkarılır. Bu aldehit grupları, daha sonra sodyum metabisülfid ile renksizleştirilen bazik fuksin (ağartılmış fuksin) ile yapılan Schiff ayırıcı ile reaksiyona girer. Böylece, söz konusu aldehit grupları renkli fuksine dönüşür. Bu kısım, koyu pembe-mor (leylak renginde) görülür.

PAS boyamada yıkama solusyonlarının hazırlanışı:

a- %10'luk $K_2S_2O_5$

b- %10 N HCl

Yıkama solusyonları hazırlanırken a ve b çözeltilerinden 10'ar ml alındı. Üzerine 180 ml musluk suyu ilave edildi. Yıkama solusyonu I, II ve III olmak üzere üçe bölündü.

Hematoksilen-eosin boyama yöntemi:

Hematoksilen, bazik (katyonik) bir boyadır ve dokularda negatif yüklü, asidik kısımlar tarafından tutulurlar. Eosin ise, asidik (anyonik) bir boyadır ve dokularda pozitif yüklü, bazik kısımlar tarafından tutulurlar. Hematoksilen ile çekirdek mavi-mor, eosin ile sitoplazma pembe renk boyanır.

Eosin Y'nin hazırlanışı:

1 gr Eosin Y 100 ml distile su içinde çözüldü, çözelti filtre kâğıdından süzülerek kullanıldı

Harris Hematoksilen; Merck firmasından (Katalog numarası: 1092530500) temin edilen boya solüsyonu kullanıldı.

Hematoksilen-Eosin Akış Planı

Ksilol I	1 gece
Ksilol II	15"
% 96 Alkol	10"
% 90 Alkol	10"
% 80 Alkol	10"
% 70 Alkol	10"
% 50 Alkol	10"
Saf su	10"
Hematoksilen	10"
Çeşme suyu ile çalkalama	
% 70 Alkol ile çalkalama	
Eosin Y	10"
% 70 Alkol ile çalkalama	
% 90 Alkol	5"
% 96 Alkol	5"
% 96 Alkol	5"
Aseton I	10"
Aseton II	10"
Saf ksilol	10"
Entellan ile kapama	

Periyodik Asit Schiff (PAS) Akış Planı

Ksilol I	1 gece
Ksilol II	15"
% 96 Alkol	10"
% 90 Alkol	10"
% 80 Alkol	10"
% 70 Alkol	10"
% 50 Alkol	10"
Saf su	10"
%1'lik periyodik asit	5"
Schiff solusyonu	30"
Akarsu ile çalkalama	
Distile su ile çalkalama	
I. Yıkama solüsyonu	5"
II. Yıkama solüsyonu	5"
III. Yıkama solüsyonu	5"
Akarsuda yıkama	5"
Hematoksilin	7"
Akarsuda yıkama	5"
% 96 Alkol	5"
% 96 Alkol	5"
Aseton I	10"
Aseton II	10"
Saf ksilol	10"
Entellan ile kapama	

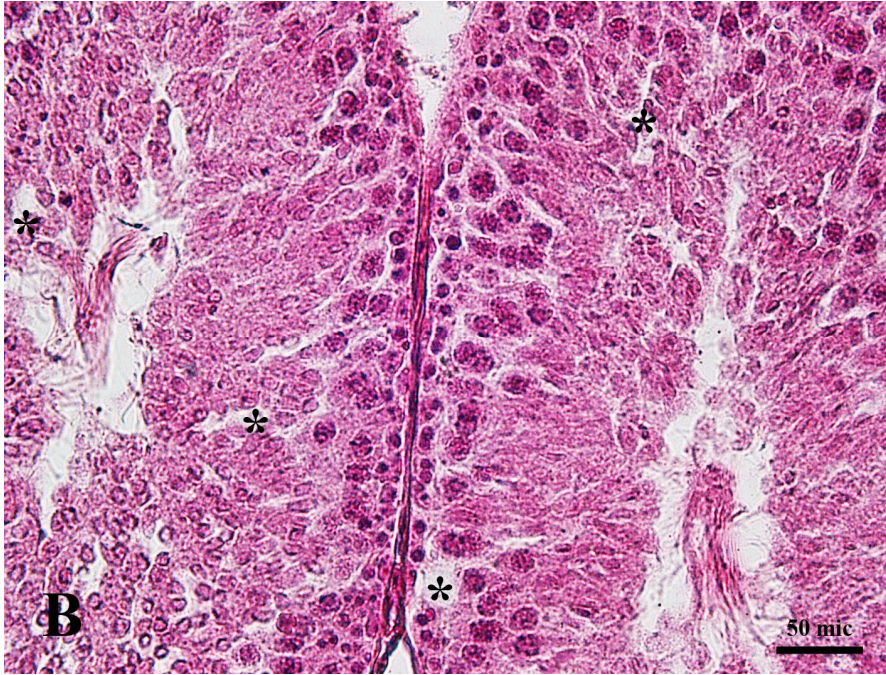
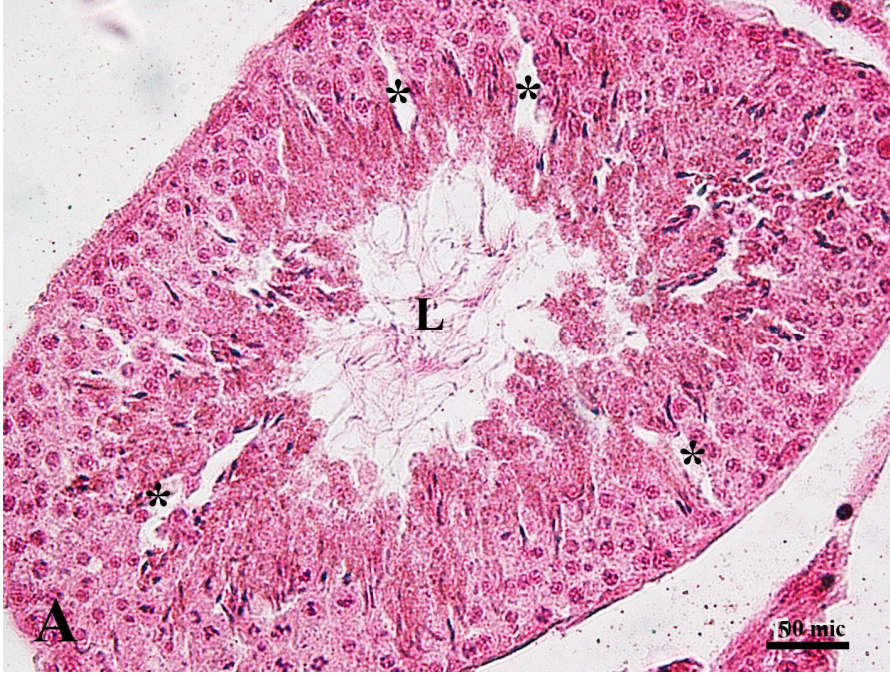
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Deney süresinin sonunda kontrol grubunun normal morfolojik görünümünü koruduğu (Şekil 4.1 A-B), ancak doz gruplarında metileugenol etkisiyle çeşitli nekrotik değişikliklerin meydana geldiği ışık mikroskobu ile tespit edildi. 10 mg/kg/gün grubunda seminifer tübül epitelinde düzensizlik meydana geldiği, epitelde hücreler arası boşlukların arttığı ve bütünlük kaybının oluştuğu belirlendi (Şekil 4.2 A-B). Epitel hücrelerinde membran kaybı ve özellikle nukleus etrafında sitoplazma kaybı meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4.3 A). Seminifer tübül epitelinin bazal membranında ayrılmalar olduğu gözlemlendi (Şekil 4.3 B). İnterstisyel alanların kontrol grubu ile kıyaslandığında değişmediği görüldü (Şekil 4.4 A-B). 30 mg/kg/gün grubunda benzer şekilde nekrotik değişikliklerin meydana geldiği gözlemlendi. Seminifer tübül epitel hücrelerinde artmış hücreler arası boşlukların daha fazla bütünlük kaybına neden olduğu (Şekil 4.5 A-B), bazal membrandan ayrılma ve kopmaların daha fazla sayıda seminifer tübülde meydana geldiği (Şekil 4.6 A-B), daha şiddetli bir membran hasarı ve sitoplazma kaybının gerçekleştiği belirlendi (Şekil 4.7). Tübüller arası alanlardaki bağ dokunun ise kontrol grubu ile kıyaslandığında değişmediği gözlemlendi (Şekil 4.8 A-B).



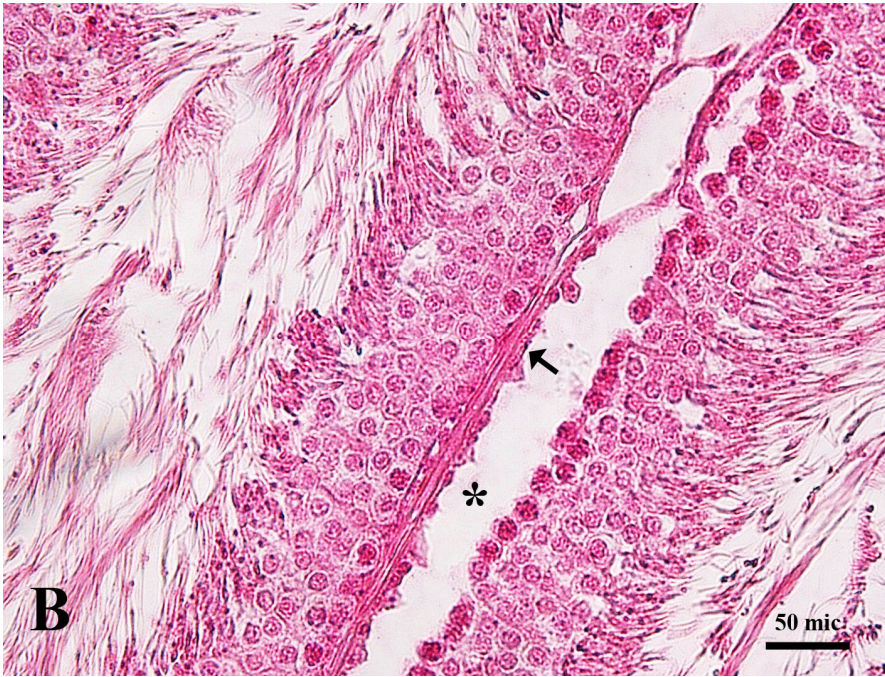
Şekil 4.1 A: Kontrol grubuna ait testis dokusu, S: seminifer tübül, İ: intersitsiyel alan, Hematoksilen-Eosin (100×)

B: Kontrol grubuna ait testis dokusu, s: spermatogonyum
ps: primer spermatozoid, ss: sekonder spermatozoid, sd: spermatozoid,
sertoli hücresi (ok), Hematoksilen-Eosin(400×)

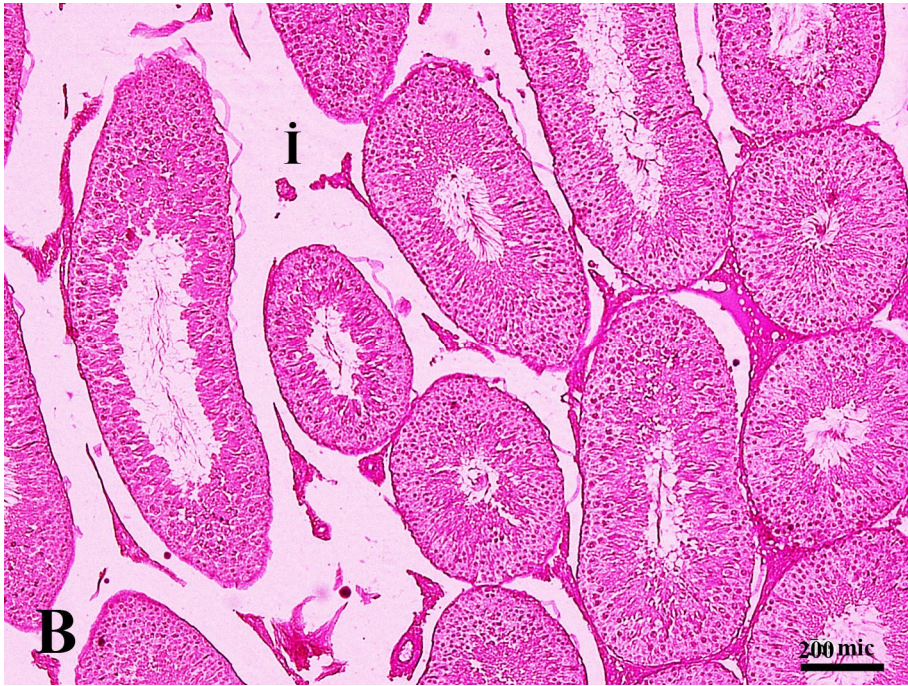


Şekil 4.2 A: 10 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *: hücrelerarası boşluklar ve epitelde düzensizlik, Hematoksilen-Eosin (400×)

B: 10 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *: hücreler arası boşluklar, Hematoksilen-Eosin(400×)

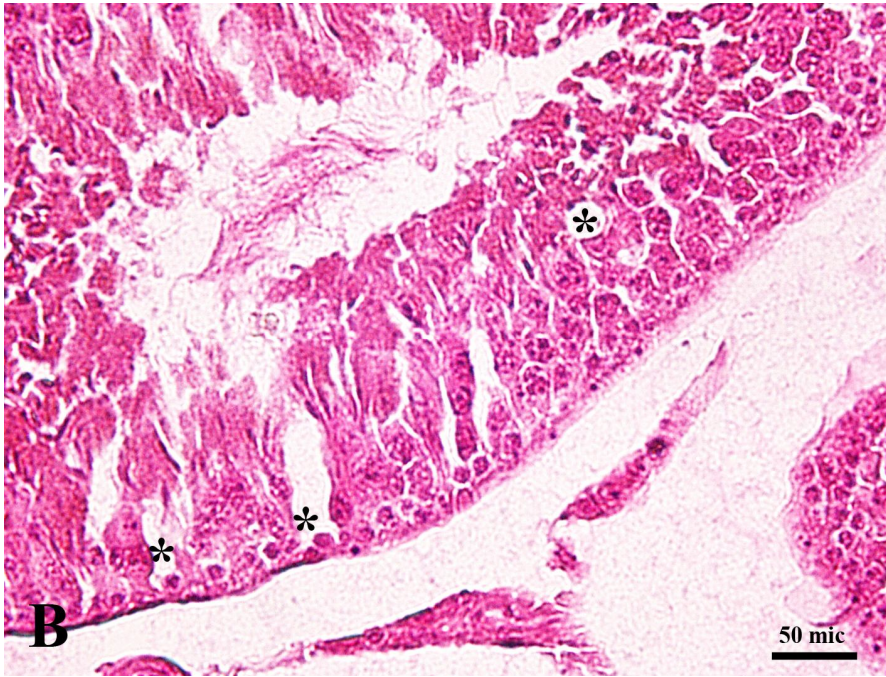
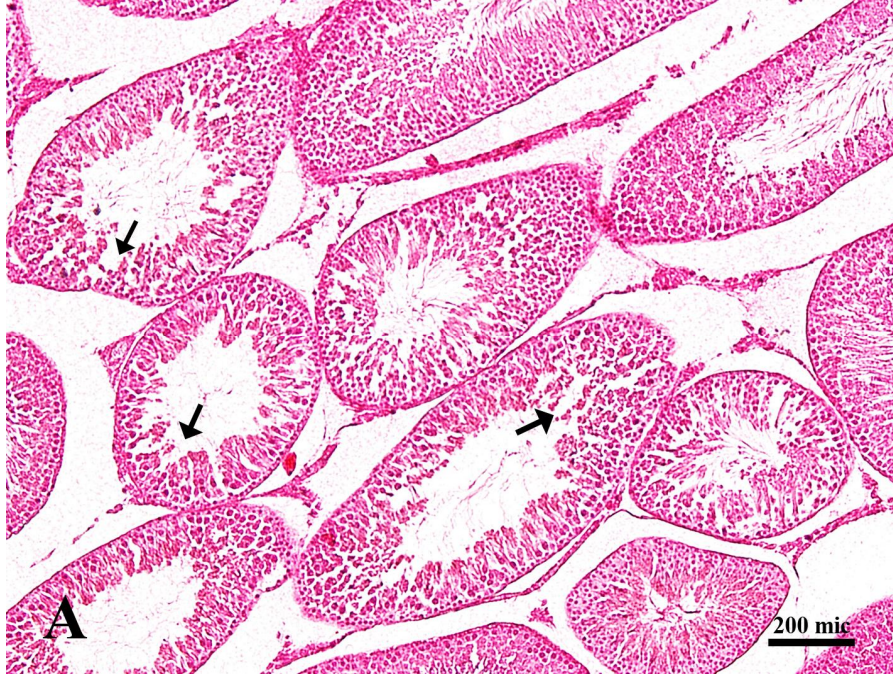


Şekil 4.3 A: 10 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *:sitoplazma kaybı, L: Seminifer tübül lümeni, Hematoksilen-Eosin(400×)
 B: 10 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, bazal membran (ok), *:bazal membran ayrılması, Hematoksilen-Eosin (400×)



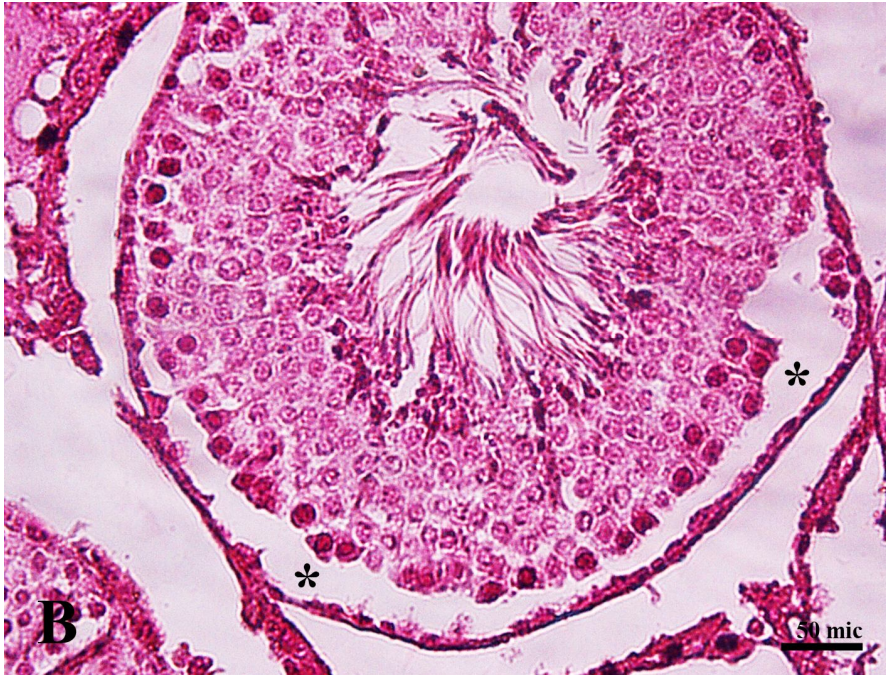
Şekil 4.4 A: Kontrol grubuna ait testis dokusu İ: İnterstisyel alan, PAS (100×)

B: 10 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, İ: İnterstisyel alanı, PAS (100×)



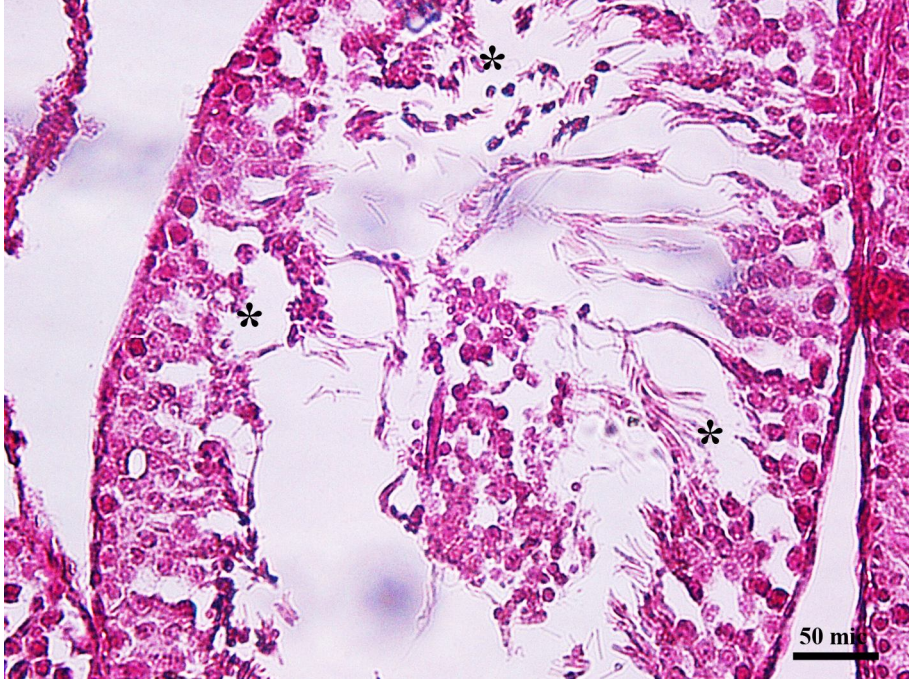
Şekil 4.5 A: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, Seminifer tübül epitelinde dejenerasyon ve bütünlük kaybı (ok), İ:interstisyel alan Hematoksilen-Eosin(100×)

B: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *:sitoplazma kaybı, Hematoksilen-Eosin(400×)



Şekil 4.6 A: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *: epitel-bazal membran ayrılması, L: seminifer tübül lümeni, Hematoksilen-Eosin(100×)

B: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, *: epitel-bazal membran ayrılması ve epitelde bütünlük kaybı, Hematoksilen-Eosin(400×)



Şekil 4.7: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu,
*: şiddetli membran hasarı ve epitelde bütünlük kaybı, Hematoksilin-Eosin
(400×)



Şekil 4.8 A: Kontrol grubuna ait testis dokusu İ: İnterstisyel alan, PAS (100×)

B: 30 mg/kg/gün metileugenol grubuna ait testis dokusu, İ: İnterstisyel alanı, PAS (100×)

5. SONUÇLAR, TARTIŞMA ve ÖNERİLER

Metileugenol aromatik özelliği nedeniyle gıda sektöründe ve kozmetikte çok geniş bir kullanım alanına sahiptir (Council of Europe, 2001). Bu nedenle insanlar çeşitli yollarla metileugenol'e maruz kalabilirler. Yaygın kullanımı ve karsinojen olarak bilinen safrol, isosafrol ve estragole yapısal benzerliğinden dolayı metileugenol, Ulusal Toksikoloji Programı (NTP) tarafından toksikolojik karakterizasyon için aday olarak gösterilmiş bir bileşiktir (Johnson ve ark., 2000; Lahlou ve ark., 2004). Bu çalışmada, %5 metilselüloz içinde süspanse edilen metileugenol'ün 10 ve 30 mg/kg vücut ağırlığı dozları, 10 gün süreyle gavaj yoluyla Wistar albino erkek sıçanlara verilerek testis dokusundaki akut histopatolojik etkileri araştırıldı.

Deney süresinin sonunda, ışık mikroskobu düzeyinde kontrol grubunun morfolojisi korunurken (şekil 4.1.A-B), doz gruplarında metileugenol etkisiyle çeşitli nekrotik değişikliklerin meydana geldiği tespit edildi. Seminifer tübül epitelinde düzensizlik meydana geldiği, epitelde hücrelerarası boşlukların arttığı ve bütünlük kaybının olduğu belirlendi (Şekil 4.2 A-B, 4.5 A). Epitel hücrelerinde membran kaybı ve özellikle nukleus etrafında sitoplazma kaybı meydana geldiği tespit edildi (Şekil 4.3 A ve 4.5 B). Testis dokusunda seminifer tübülün epitel hücrelerinde dejeneratif sürecin etkisi ile hücre içindeki lizozomal enzimler serbestleşmiş, hatta hasar görmüş hücre membranını da aşarak hücrelerarası alana dâhil olmuş olabilir. Bu durum dokudaki nekrotik değişimi açıklayabilir. Bu değişimler hücre içinde bir bütünlük kaybının gerçekleştiğini ve buna bağlı olarak hücre metabolizmasının negatif yönde etkilendiğini göstermektedir.

Metileugenol'ün yüksek derecede lipofilik özelliğe sahip olduğu daha önce ifade edilmiştir (Abdo ve ark., 2001). Böylece hücre membranını kolaylıkla geçerek hücre içi alana dâhil olabilir. Membrandan seçici olmayan bu geçiş metileugenol'ün membrana ve sitoplazmaya verdiği hasarı açıklayabilir.

Konuyla ilgili bir uzun dönem besleme çalışmasında 10 ve 30 mg/kg metileugenol dozlarına maruz kalan erkek sıçanlarda testis ağırlığında ve 100 mg/kg dozunda ise spermatozoal konsantrasyonda anlamlı şekilde azalma meydana geldiği bildirilmiştir (NTP 2000). Abdo ve ark. (2001), 100 mg/kg metileugenol doz grubunda testis ağırlığında anlamlı şekilde artış meydana geldiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada bu dozda seminifer tübüllerde orta düzeyde bir genişleme ile birlikte spermatogenik hücrelerin seminifer tübüllerin lümenine doğru difüzyonu ile karakterize edilen testiküler dejenerasyon tanımlanmıştır. Ayrıca spermatogoniumların ise morfolojik olarak normal oldukları ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda Abdo ve ark. (2001)'nın gözlediği gibi lümenine doğru bir difüzyon görülmemiştir. Epitelde bütünlük kaybı ve hücrelerarası boşlukların artmış olması, daha önce Abdo ve ark. (2001), tarafından tarif edilen testiküler dejenerasyonun henüz başlangıç aşamasında olduğunu düşündürmektedir.

Kaboğlu ve ark. (2009) alışmalarında karaciğer, böbrek ve ince bağırsak dokularında benzer şekilde nekrotik değişiklikler gözlemişlerdir. Karaciğerde sinüzoidal alanlarda genişleme, hipertrofi ve sitoplazmik vakuolizasyon, endotel hasarı, mononklear hücre infiltrasyonu ve piknotik nukleuslar meydana geldiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde böbrek dokusunda tübül epitelinde membran dejenerasyonu hipertrofik hücreler ve proksimal tübül lümeninde dejeneratif hücre kalıntıları gözlemişlerdir. İnce bağırsakta ise mitotik figürlerde artış, bağ dokuda dem, bağ doku epitel doku ayrılması ve lökosit infiltrasyonu meydana geldiğini ifade etmişlerdir (Kaboğlu ve ark., 2009). Abdo ve ark. (2001), çalışmalarında metileugenol etkisi ile 100 mg/kg doz grubunda, karaciğerde Kuffer hücrelerinde pigmentasyon, safra kanalı hiperplazisi, mide mukozasında atrofi ve kronik inflamasyon meydana geldiğini bildirmişlerdir. Bizim alışmamızda ise testiste mononklear hücre infiltrasyonuna rastlanmadı ve inflamasyon bölgeleri görülmedi. Ancak benzer şekilde çalışmamızda seminifer tübülleri astarlayan epitel ile bu epitelin bağlandığı basal membran arasında yer yer ayrılmalar meydana geldi (şekil 4.3 B). Yüksek doz grubunda (30 mg/kg) bu ayrılmalar daha fazla sayıda seminifer tübülde gözlendi (şekil 4.6 A-B). Dejeneratif süreçten bazal membranın etkilenmiş ve bunun sonucu, epitel-bazal membran bütünlüğü bozulmuştur. Bu durum, dokuda meydana gelen nekrotik dejenerasyonun bir başka işareti olarak kabul edilebilir ve epitelin spermatogenik hücre serisinde de bir düzensizlik yaratmış olabilir. Genel mnda epitel bütünlüğünün kaybolması, epitelin de kısmi fonksiyon kaybı olarak düşünülebilir. Yapılan toksikokinetik çalışmalar, sıçan ve farelerde metileugenol'un oral dozlarının absorpsiyonunun çok hızlı ve tam olduğunu göstermiştir (NTP 2000). Böylece metileugenol hızlı bir şekilde dokulara ulaşır ve önemli bir kısmı idrarla dışarı atılır.

Kan dolaşımı düşünüldüğünde ince barsak, karaciğer ve böbrekler metileugenol etkisine birincil düzeyde maruz kalan detoksifikasyon organlarıdır. Metileugenol'ün sitokrom p450 enzim sistemi ile detoksifiye edildiği (Borchert ve ark., 1973, Smith ve ark., 2002), *o*-demetilasyon ile detoksifikasyonun gerçekleştiği (Solheim ve Scheline, 1976), sürecin sonunda 1-hidroksimetileugenol ve epoksi diol olmak üzere iki temel metabolitin meydana geldiği ve bu bileşiklerin de toksik etkiye sahip olabileceği bildirilmiştir (Abdo ve ark., 2001). Testisler ise karaciğer böbrek ve ince bağırsaklara göre periferal konumdadır ve muhtemelen bu nedenle gözlenen toksik etki şiddeti daha düşüktür.

Her iki doz grubunda da testisin interstisiyel alanlarında kapillerler çevresinde gruplar yapmış olarak Leydig hücreleri ve aralarında az sayıda fibroblast ve makrofajlara rastlandı. Bağ doku alanlarında kapillerlerin lümenleri düzenli ve endotel hücreleri belirgin normal morfolojilerini koruduğu tespit edildi. Kontrol grubuyla kıyaslandığında bağ doku alanlarında, hücresel ve hücrelerarası matris açısından bir fark gözlenmedi. Bağ dokunun genel anlamda korunduğu belirlendi (şekil 4.4 A-B ve 4.8 A-B).

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular; seminifer tübülleri astarlayan epitelde düzensizlik, epitelde hücrelerarası boşluğun artması, bütünlük kaybı, epitel hücrelerinde membran ve sitoplazma kaybı, bazal membranda ayrılma, geri dönüşümlü nekrotik değişikliklerdir. Periferal organlar olmaları itibarıyla testislerde gözlediğimiz bu değişiklikler nispeten karaciğer, böbrek ve ince bağırsaklarda gözlenenlerden daha az şiddetli hasarlardır.

Kaboğlu ve ark. (2009), çalışmalarında antioksidan enzimlerden süperoksit dismutaz (SOD), glutasyon peoksidaz (GPX) ve katalaz (CAT) aktivitesi üzerine metileugenol'n etkisini araştırmışlardır. Buna göre SOD ve CAT aktivitesinde anlamlı bir değişiklik gzlemezken, GPX aktivitesinin böbrek ve ince bağırsakta 30 mg/kg doz grubunda anlamlı şekilde arttığını bildirmişlerdir. Diğer morfolojik değişikliklerle birlikte metileugenol'n toksik etkisine karşı verilen adaptif bir cevap olarak değerlendirmişlerdir. Metileugenol'n karaciğer dokusu üzerine etkilerinin araştırıldığı bir diğer çalışmada ise hepatositlerde düz yüzlü endoplazmik retikulum keselerinde şişme, artış ve elektron yoğun birikimler, sitoplazmik vakuolizasyon, mitokondri ve lizozom sayısında artış, nukleus zarında invaginyasyon, safra kanalikllerinde genişleme ve mikrovilluslarda artış meydana geldiğini bildirmişlerdir (erkezkayabekir ve ark., 2009). Ultrastrüktürel düzeyde ifade edilen bu bulgular, dokuda geri dönüşümlü nekrotik değişimin göstergeleridir. Bizim alışmamızda da ışık mikroskopik düzeyde nekrotik değişim işaretleri meydana gelmiştir. Ancak periferal organ olmaları nedeni ile nekroz şiddeti daha düşüktür ve spermatogenik serideki hücrelerde meydana gelen hafif dejenerasyon kısmi olarak epitelde fonksiyon kaybını düşündürmektedir.

Çalışmamızda gözlenen bu nekrotik değişiklikler metileugenol'n 10 ve 30 mg/kg/gün dozlarında testis üzerine toksik etkisine işaret etmektedir. Bu nedenle metileugenol'n toksik özelliklerinin testiste ultrastrüktürel ve biyokimyasal parametrelerle daha ayrıntılı şekilde değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

Abdo, K.M., Cunningham, M.L., Snell, M.L., Herbert, R.A., Travlos, G.S., Eldridge, S.R., 2001, "14-Week toxicity and cell proliferation of methyleugenol administered by gavage to F344 rats and B6C3F1 mice" *Food Chem Toxicol*, 39,4,303-316.

Abraham, L., 2006, *Üreme Sistemi*, Demir R., *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, Palme Yayıncılık, 1,531-564.

Borchert, P., Wislocki, P.G., Miller, J.A., Miller, E.C., 1973, "The metabolism of the naturally occurring hepatocarcinogen safrole to 1'-hydroxysafrole and the electrophilic reactivity of 1'-acetoxysafrole." *Cancer Res.*, 33, 575-589.

Burkey, J.L., Sauer, J.M., McQueen, C.A., Sipes, I.G., 2000, "Cytotoxicity and genotoxicity of methyleugenol and related congeners a mechanism of activation for methyleugenol" *Mutat Res*, 453,1,25-33.

NTP, 2000, "NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Methyleugenol (CAS NO. 93-15-2) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies)" *Natl Toxicol Program Tech*, 491,1-412.

Chen, C., Spriano, D., Lehmann, T., Meier, B., 2009, "Reduction of Safrole and Methyleugenol in *Asari radix et rhizoma* by Decoction" *Forsch Komplementmed*, 16,3,162-166.

Council of Europe, Committee of Experts on Flavouring Substances, 2001 "Opinion of the Scientific Committee on Food on Methyleugenol (4-Allyl-1,-dimethoxybenzene)" *Document SCF/CS/Flavour/4 ADD1*, 1,10.

Kaboglu, A., Ertan, F., Kızılay, G., 2009, "The effects of methyleugenol on the liver, kidney and small intestine and on the antioxidant enzymes in rats" *Fresenius Environmental Bulletin*, 18, 481-490.

Çerkezkayabekir, A., Kızılay, G., Ertan, F., 2009, "Ultrastructural Changes In Rat Liver by Methyleugenol and Evaluation of Some Biochemical Parameters" *Turkish Journal of Biology*.

Dallmeier, K., Carlini, E.A., 1981 "Anesthetic, hypothermic, myorelaxant and anticonvulsant effects of synthetic eugenol derivatives and natural analogues" *Pharmacology*, 22,2,113-127.

De Vincenzi, M., Silano, M., Stacchini, P., Scazzocchio, B., 2000, "Constituents of aromatic plants: I. Methyleugenol" *Fitoterapia*, 71,2,216-221.

Franchomme, P., Penoel, D., 1995, "Phenols methyl-esters et ether-oxydes" *L'aromathérapie exactement. Encyclopédie de l'utilisation Thérapeutique des Huilles Essentielles*, 170-176.

Johnson J.D., Ryan M.J., Toft II J.D, Graves S.W., Hejtmancik M.R., Cunningham M.L., Herbert R., Abdo K.M., 2000 "Two-Year Toxicity and Carcinogenicity Study of Methyleugenol in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice" *J. Agric. Food Chem.*, 48,8, 3620-3632.

Junquera L.C., Carneiro J., Kelley R.O.,2005, *Erkek Üreme Sistemi*, Aytekin Y., Solakoğlu S., *Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitapevleri*, 1,431-448.

Sayyah, M., Valizadeh, J., Kamalinejad, M., 2002, "Anticonvulsant activity of the leaf essential oil of *Laurus nobilis* against pentylenetetrazole- and maximal electroshock-induced seizures" *Phytomedicine*, 9,3,212-216.

Lahlou, S., Figueiredo, A.F., Magalhaes, P.J., Leal-Cardoso, J.H., Gloria, P.D., 2004, "Cardiovascular effects of methyleugenol, a natural constituent of many plant essential oils, in normotensive rats" *Life Sci*, 74,19,2401-2412.

Lima C.C., Criddle D.N., Coelho-de-Souza A.N., Monte F.J.Q., Jaffar M., Leal-Cardoso J.H., 2000 "Relaxant and Antispasmodic Actions of Methyleugenol on Guinea-Pig Isolated Ileum" *Planta Med*, 66,5,408-411.

Magalhães, P.J.C., Criddle, D.N., Tavares, R.A., Melo, E.M., Mota, T.L., Leal-Cordoso, J.H., 1988, "Intestinal myorelaxant and antispazmodic effects of the essential oil of *Croton nepetaefolius* and its constituents cineole, methyleugenol and terpineol." *Phytotherapy Research*, 12, 8, 172-177.

Robison, S.H., Barr, D.B., 2006 "Use of biomonitoring data to evaluate methyleugenol exposure and its relationship to the environmental public health continuum." *Environ Health Perspect*, 114,11,1797-1801.

Ross M.H., Pawlina W., 2006, *Histology: A Text and atlas with correlated cell and molecular biology*, Lippincott Williams & Wilkins, 5,728-748.

Schechter, A., Lucier, G.W., Cunningham, M.L., Abdo, K.M., Blumenthal, G., Silver, A.G., Melnick, R., Portier, C., Barr, D.B., Barr, J.B., Stanfill, S.B., Patterson, D.G., Needham, L.L., Stopford, W., Masten, S., Mignogna, J., Tung, K.C., 2004, "Human consumption of methyleugenol and its elimination from serum." *Environ Health Perspect*, 112, 6, 678-680.

Sell, A.B., Carlini, E.A., 1976, "Anesthetic action of methyleugenol and other eugenol derivatives" *Pharmacology*, 14,4, 367-377.

Smith R.L., Adams T.B., Doull J., Feron V.j., Goodman J.I., Marnett L.J., Portoghese P.S., Waddell W.J., Wagner B.M., Rogers A.E., Caldwell J., Sipes I.G., 2002, "Safety assessment of allylalkoxybenzene derivatives used as flavouring substances-methyl eougenol and estragole." *Food and Chemical Toxicology*, 40, 851-870.

Solheim, E., Scheline, R.R., 1976, "Metabolism of alkenebenzene derivatives in the rat. II. Eugenol and isoeugenol methyl ethers." *Xenobiotica*, 6, 137-150.

Sousa, M.B., Ximenes, M.F., Mota, M.T., Moreira, L.F., Menezes, A.A., 1990, "Circadian variation of methyleugenol anesthesia in albino rats" *Braz J Med Biol Res*, 23,5,423-425.

Üner, Y., Aksu, H., Ergün, Ö., 2000 "Effects of Spices on Some Microorganisms" *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Fakülte Dergisi*, 26,1,1-10.

Yano S., Suzuki Y., Yuzurihara M., Kase Y., Takeda S., Watanabe S., Aburada M., Miyamoto K., 2006, "Antinociceptive effect of methyleugenol on formalin-induced hyperalgesia in mice" *European Journal of Pharmacology*, 533,99-103.

<http://openlearn.open.ac.uk/mod/resource/view.php?id=193032>

http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/Labs.f04/male%20reproduction%20lab/Male%20Reproduction%20Lab.html

<http://tehjuggernauts.blogspot.com/2008/06/amazing-pictures.html>