

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
VHE-2019-0003

RAT TESTİSİNDE 4-NONİLFENOL TOKSİKASYONUNA
KARŞI SELENYUMUN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Gülsüm YILMAZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ülker EREN

Sunulan tez çalışması Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17022 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2019

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	vi
TABLolar DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÖZET	xi
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Erkek Genital Sistem.....	4
2.1.1. Testisin Yapısı	4
2.1.2. Tubulus Seminiferus Kontortus.....	5
2.1.3. Sertoli Hücreleri	5
2.1.4. Testis İntersitisyumu ve Leydig Hücreleri	6
2.1.5. Spermatogenezis.....	7
2.1.6. Spermatozoonun Kapasitasyonu ve Motilite Kazanması	9
2.1.7. Kan-Testis Bariyeri	10
2.1.8. Eşey Hücrelerini İleten Yollar.....	17
2.1.9. İlk Spermatogenetik Dalga	18
2.1.9.1. Spermatogenik Siklus Evreleri	20
2.2. Erkeklerde Fertilite Problemleri	24
2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres	25
2.3.1. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Kaynakları	25
2.3.2. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Erkek Genital Sistemdeki Kaynakları	26
2.4. Oksidatif Stresin Etki Mekanizmaları	28
2.4.1. Oksidatif Stresin Hücrelerde Oluşturduğu Genel Etkiler	28
2.4.1.1. Oksidatif Stresin Lipidlere Etkisi	28
2.4.1.2. Oksidatif Stresin Proteinlere Etkisi	29
2.4.1.3. Oksidatif Stresin Karbonhidratlara Etkisi.....	30

2.4.1.4. Oksidatif Stresin DNA Üzerine Etkisi	30
2.4.1.5. Oksidatif Stresin Spermatozoonlara Etkisi.....	31
2.4.1.6. Endokrin Bozucuların Oluşturduğu Oksidatif Stresin Kan-Testis Bariyeri, Germ Hücreleri ve Leydig Hücrelerine Etkisi.....	32
2.5. Antioksidanlar	34
2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar	36
2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)	36
2.5.1.2. Katalaz (CAT)	37
2.5.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)	37
2.5.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar.....	37
2.5.2.1. Karoten	37
2.5.2.2. Arginin.....	38
2.5.2.3. Çinko	38
2.5.2.4. Folat.....	39
2.5.2.5. Koenzim Q10 (Ubiquinone)	39
2.5.2.6. Glutasyon	39
2.5.2.7. Vitamin E.....	40
2.5.2.8. Vitamin A	41
2.5.2.9. Selenyum (Se)	41
2.6. Testis Dokusunu Etkileyen Çevresel Faktörler	43
2.6.1. 4-Nonilfenol	43
2.7. Apoptozis.....	45
2.7.1. Apoptozis Mekanizmaları	46
2.7.1.1. Mitokondri/Sitokrom c aracılı apoptozis oluşturulması	46
2.7.1.2. Hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanan ölüm aktivatörleri ile tetiklenme	47
2.7.1.3. Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis oluşturulması	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
3.1. Gereç.....	50
3.2. Yöntem	51
3.2.1. Histolojik Yöntem	51
3.2.1.1. Üçlü Boyama Metodunun Uygulanması	51
3.2.1.2. Histometrik Değişimlerin Belirlenmesi.....	52
3.2.2. İmmunohistokimyasal Yöntem	52

3.2.2.1. Strept Avidin-Biotin Kompleks (Strept Avidin-Biotin Complex, sABC) Boyama Metodu.....	53
3.2.3. Biyokimyasal Yöntem	54
3.2.3.1. Karaciğer ve Böbrek Dokularında Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizi	54
3.2.3.1.1. Dokuların homojenizasyonu.....	54
3.2.3.1.2. Total protein analizi.....	55
3.2.3.1.3. Süperoksit dismutaz (SOD) analizi	55
3.2.3.1.4. Malondialdehit (MDA) analizi	57
3.2.3.2. Kanda Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizi	57
3.2.3.2.1. Hemogloblin tayini	57
3.2.3.2.2. Süperoksit dismutaz (SOD) analizi	58
3.2.3.2.3. Malondialdehit (MDA) analizi	58
3.2.4. Sitolojik Yöntem	59
3.2.4.1.Eosin-Nigrozin Boyama	59
3.2.4.2.Hancock Metodu (Sıvı Fikzasyon Yöntemi).....	60
3.2.5. İstatiksel Analiz	60
4.BULGULAR	61
4.1. Vücut ve Testis Ağırlıkları	61
4.1.1. Vücut Ağırlığı.....	61
4.1.2. Testis Ağırlığı.....	63
4.2. Histolojik Bulgular	64
4.3. Histometrik Bulgular	67
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	71
4.4.1. Kaspaz 3	71
4.4.2. Konneksin 43.....	72
4.5. Biyokimyasal Bulgular	74
4.6. Spermatozoon Morfojisinin Değerlendirilmesi	75
4.6.1. Normal-Anormal Spermatozoon Değerlendirmesi.....	75
4.6.2. Ölü-Canlı Spermatozoon Değerlendirmesi	76
5.TARTIŞMA.....	77
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	84
KAYNAKLAR.....	85
ÖZGEÇMİŞ.....	109

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein (Androgen Binding Protein)
APE	: Alkilfenol Etoksilat (Alkyl Phenol Ethoxylate)
ART	: Yardımcı Üreme Teknikleri (Assisted Reproductive Techniques)
ATP	: Adenozin Trifosfat (Adenosine Triphosphate)
BPA	: Bisfenol A (Bisphenol A)
BTB	: Kan-Testis Bariyeri (Blood-Testicular Barrier)
CAT	: Katalaz (Catalase)
CX	: Konneksin (Connexin)
DAB	: Diamino Benziolin (Diamino Benzyoline)
DDT	: Dikloro Difenil Trikloroethan (Dichloro Diphenyl Trichloroethane)
DEHP	: Di (2-Etil Hekzil) Fitalat (Diethyl Hexyl Phthalate)
DMSO	: Dimetil Sülfoksit (Dimethyl Sulfoxide)
DNA	: Deoksiribonükleik Asit (Deoxyribonucleic acid)
ED	: Endokrin Bozucu (Endocrine Disrupter)
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon (Follicle Stimulating Hormone)
GR	: Glutasyon Redüktaz (Glutathione Reductase,)
GSH	: Glutasyon (Glutathione)
GSH-Px	: Glutasyon Peroksidaz (Glutathione Peroxidase)
GST	: Glutasyon-S-Transferaz (Glutathione-S-Transferase)
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit (Hydrogen Peroxide)
HO	: Hem Oksijenaz (Heme Oxygenase)
IHC	: İmmünohistokimya (Immunohistochemistry)
JAM	: Junctional Adezyon Molekülleri (Junctional Adhesion Molecule)
L	: Lipid Radikali (Lipid Radical)
LH	: Lüteinizasyon Hormon (Luteinisation Hormone)
LOO	: Lipid Peroksid Radikali (Lipid Peroxide Radical)
LOOH	: Lipid Hidroperoksid (Lipid Hydroperoxide)
MDA	: Malondialdehid (Malondialdehyde)
MEHP	: Mono (2-Etil Hekzil) Fitalat (Monoethyl Hexyl Phthalate)

NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (Nicotinamide Adenine Dinucleotid Phosphate)
NP	: Nonilfenol (Nonylphenol)
NPE	: Nonilfenol Etoksilat (Nonylphenol Phenol Ethoxylate)
O₂⁻	: Süperoksit Radikali (Superoxide Radical)
OH	: Hidroksil Radikali (Hydroxyl Radical)
PCB	: Poliklorobifenil (Polychlorinated Biphenyl)
PBS	: Fosfat Tampon Solüsyonu (Phosphate Buffer Saline)
Rhox5	: Rhox 5 (Reproductive Homeobox 5)
RNA	: Ribonükleik Asit (Ribonucleic Acid)
ROS	: Reaktif Oksijen Bileşikleri (Reactive Oxygen Species)
sABC	: Strept Avidin-Biyotin Kompleks (Strept Avidin-Biotin Complex)
SOD	: Süperoksit Dismutaz (Superoxide Dismutase)
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
TBA	: Tiyobarbitürik Asit (Thiobarbituric Acid)
TCA	: Triklorasetik Asit (Trichloroacetic Acid)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)
ZP	: Zona pellusida (Zona pellucida)

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Serbest oksijen radikal kaynakları	26
Tablo 2. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma	35
Tablo 3. Deneme süresince kontrol ve deneme gruplarında belirlenen vücut ağırlıkları (gr).	62
Tablo 4. Grupların uygulama boyunca canlı ağırlık artış farkları (gr).	63
Tablo 5. Kontrol ve deneme gruplarında testis ağırlıkları (gr).	63
Tablo 6. Tubulus seminiferus kontortus çapı ve epitel yüksekliği (µm).	68
Tablo 7. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait XIV. dönem tubulus ortalama sayıları.	69
Tablo 8. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait XIV. dönem tubulus % yoğunluk değerleri.	70
Tablo 9. Belirgin kaspaz 3 pozitif tubulusların yoğunluğu (%)	72
Tablo 10. Serum MDA seviyesi ve SOD aktivitesi.	74
Tablo 11. Testis dokusu MDA seviyesi ve SOD aktivitesi.	74
Tablo 12. Normal-anormal spermatozoon sayım sonuçları.	75
Tablo 13. Ölü-canlı spermatozoon sayım sonuçları	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Testosteron oluşum mekanizması	7
Şekil 2. Spermatogenezis	8
Şekil 3. Rat/fare spermatozoonu	10
Şekil 4. Seminifer tübüllerde bazal kompartman ve adluminal kompartman olarak ayıran kan-testis bariyerinin şematik gösterimi	12
Şekil 5. Erişkin farelerde spermatogenezisin VIII-IX. aşamalarında germ hücre göçü sırasında kan-testis bariyerinin şematik çizimi.....	13
Şekil 6. Kan-testis bariyeri hücreler arası bağlantı kompleksleri ve hücre yapışma molekülleri	14
Şekil 7. Erişkin farelerde seminifer epitel katmanı ve kan-testis bariyeri kompozisyonu.....	15
Şekil 8. Memeli testisinde seminifer tübüller ve Leydig hücrelerinde farklı konneksin lokalizasyonu.....	16
Şekil 9. Rat spermatogenetik siklus dönemleri	21
Şekil 10. Lipid peroksidasyonu	29
Şekil 11. Memeli testisinde BPA, NP ve MEHP'in başlıca hedefleri.....	34
Şekil 12. Nonilfenolün kimyasal yapısı	44
Şekil 13. 4-Nonilfenoletoksilat, 17 β -Östradiol, 4-Nonilfenol yapılarının karşılaştırılması.....	44
Şekil 14. Hücre yüzey reseptör ve mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozisin tetiklenmesi ...	48
Şekil 15. Kontrol grubu tubulus seminiferus kontortus görüntüleri. Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.....	64
Şekil 16. A. Kontrol grubu testiste VIII. dönem spermatogenetik evrede olan tubulus seminiferus kontortus (a). B. Kontrol grubu testiste XIV. dönem spermatogenetik evrede olan tubulus seminiferus kontortus (b). Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.	65
Şekil 17. A. Selenyum grubu testiste tubulus seminiferus kontortusların görünümü. B. 4-NP+SE grubu testiste tubulus seminiferus kontortusların görünümü. Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.	65
Şekil 18. 4-NP grubu testiste tubulus seminiferus kontortus görüntüleri. Vakuol oluşumu (*). Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.	66
Şekil 19. 4-NP grubu testiste tubulus seminiferus kontortus görüntüleri. Epitel dökülmesi (*). Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.	67

Şekil 20. 4-NP grubu testiste tubulus seminiferus kontortus görüntüsü. A. Spermatogenetik epitel katmanında incelme (a), B. Tubulus seminiferus kontortusta küçülme (b). Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.....	67
Şekil 21. Kontrol grubuna ait tubulus seminiferus kontortus çapı (b) ve epitelyal yüksekliği (a). Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.....	68
Şekil 22. A. Kontrol grubunda kaspaz 3 yoğunluğu. *: Kaspaz 3 yoğunluğu daha belirgin olan tubuller. B. 4-NP grubunda kaspaz 3 yoğunluğu. *: Kaspaz 3 yoğunluğu daha belirgin olan tubuller. Strept ABC Boyama Metodu.....	71
Şekil 23. Kontrol grubunda Cx43 yoğunluğu (ok işaretleri).....	73
Şekil 24. 4-NP (A) ve 4-NP+Se (B) grubunda Cx43 yoğunluğu (ok işaretleri).....	73



ÖZET

RAT TESTİSİNDE 4-NONİLFENOL TOKSİKASYONUNA KARŞI SELENYUMUN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Yılmaz G. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Yüksek Lisans Programı (Veteriner) Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.

Çalışma, selenyumun (Se) sıçanlarda 4-NP'nin neden olduğu deneysel testis toksisitesine karşı koruyucu bir rol oynayıp oynamadığını veya sonuçta ortaya çıkan oksidatif hasarı hafifletip hafifletmediğini araştırmayı amaçlamaktadır.

Bu amaçla 30 adet yetişkin erkek Sprague Dawley rat (250-300 g / 90 günlük) kontrol, sham kontrol, Se, 4-nonilfenol (4-NP) ve 4-NP+Se olmak üzere beş eşit gruba ayrıldı. Deneme 48 gün sürdü; 4-NP 125 mg/kg/gün ve selenyum 0,5 mg/kg/gün uygulandı.Üçlü boyama yöntemiyle boyanan kesitlerde seminifer tübül çapları, epitel yükseklikleri ve XIV dönem tubul yoğunluğu incelendi. İmmunohistokimyasal olarak kaspaz 3 ve CX43 ekspresyonları gözlemlendi ve canlı-ölü, normal-anormal sperm sayıları kaydedildi. Kan serumunda ve testis dokusunda malondialdehit (MDA) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyleri belirlendi. Çalışma sonunda 4-NP'ye bağlı testis toksisitesi sitolojik, histolojik, histometrik, biyokimyasal ve immünhistokimyasal olarak ortaya konuldu. Selenyumun bu toksisiteye karşı pozitif bir etki gösterdiği, 4-NP+Se grubunda daha yüksek XIV. dönem tubul yoğunluğu, 4-NP grubuna kıyasla daha düşük kaspaz 3 seviyeleri, serumda ve testis dokusunda azalmış MDA seviyeleri, artmış SOD seviyeleri, daha yüksek canlı ve normal spermatozoa sayısı ile kanıtlanmaktadır. Se grubunda gözlenen canlı ağırlık artışındaki azalma, tüp çapı ve epitel yüksekliğindeki azalma, ve kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek kaspaz 3 seviyeleri, Se'nin doza veya kullanım süresine bağlı olarak metabolik olarak olumsuz etkilere sahip olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar kelimeler: Apoptoz, konneksin, 4-nonilfenol, selenyum, testis.

SUMMARY

INVESTIGATION OF THE PROTECTIVE EFFECT OF SELENIUM AGAINST 4-NONYLPHENOL-INDUCED TOXICITY IN RAT TESTIS

Yilmaz G. Aydin Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Histology-Embryology Master of Science Program (Veterinary) Master Thesis, Aydin, 2019.

The study aims to investigate whether selenium (Se) plays a protective role against experimental testicular toxicity induced by 4-NP in rats or alleviates resulting oxidative damage.

For this purpose, 30 adult male Sprague Dawley rats (250-300 g / 90 days old) were divided into five equal groups: control, sham control, Se, 4-nonylphenol (4-NP), and 4-NP+Se. The trial lasted 48 days, with 4-NP administered at 125 mg/kg/day and selenium at 0.5 mg/kg/day. In sections stained with the triple staining method, seminiferous tubule diameters, epithelial heights, and the density of XIV. period tubules were examined. Caspase 3 and CX43 expressions were observed immunohistochemically, and the numbers of live-dead and normal-abnormal spermatozoa were recorded. The levels of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were determined in blood serum and testicular tissue. At the end of the study, testicular toxicity due to 4-NP was demonstrated cytologically, histologically, histometrically, biochemically, and immunohistochemically. Se showed a positive effect against this toxicity, as evidenced by higher XIV. period tubule density in the 4-NP+Se group, lower caspase 3 levels compared to the 4-NP group, decreased MDA levels, increased SOD levels in serum and testicular tissue, and a higher count of live and normal spermatozoa. Based on the decrease in live weight gain observed in the SE group, along with the reduction in tubule diameter and epithelial height, and the higher level of caspase 3 compared to the control groups, suggest that Se may have metabolic adverse effects depending on the dose or duration of use.

Keywords: Apoptosis, connexin, 4-nonylphenol, selenium, testis.

1.GİRİŞ

Süpfaktan maddeler suyun yüzey gerilimini azaltırlar ve biraraya gelmeyecek iki kimyasal madde arasında köprü kurarlar (Witt, 1988). Dolayısıyla süpfaktanlar, temizleme ve çözünürleştirme özelliklerine sahip olan tasarlanmış çeşitli kimyasallar grubudur (Ying, 2006). Süpfaktanlar polar ve nonpolar hidrokarbon grubu olmak üzere iki kısımdan oluşurlar. Polar grup suda iyi çözünürken, nonpolar hidrokarbon kısmı çözünmez (Ying, 2006; Olkowska ve diğerleri, 2014). Süpfaktanlar moleküllerin hidrofobik kısmına bakılarak katyonik, noniyonik veya anyonik olarak sınıflandırılırlar (Olkowska ve diğerleri, 2014). Alkilfenol etoksilat bileşikleri (APE) gibi noniyonik süpfaktanlar en çok kullanılan grupturlar. Alkilfenoller, nonilfenol etoksilatlar (NPEO) (%80) ve okilfenol etoksilatlar (OPEO)(%20) olmak üzere iki grup bileşiğı içermektedirler (Sole ve diğerleri, 2000). Özellikle nonilfenol etoksilatlar (NPEO) ev içi, endüstriyel veya enstitüsyonel deterjan ve emülsiyonlaştırıcı olarak, deri ve tekstil işleme, lateks boya, plastik, kâğıt üretimi, temizlik deterjanlarının yapımında kullanılırlar. Ayrıca bazı örnekleri pestisit formülasyonunda da kullanılmaktadır (Chokwe ve diğerleri, 2017). Dolayısıyla hem endüstriyel hem de evsel atık sular NPEO'yu çevreye bırakmaktadırlar. Ortama bir kez bırakıldıklarında, nonilfenol etoksilatlar; nonilfenol (NP), nonilfenol monoetoksilat, nonilfenol dietoksilat ve mikrobiyal dönüşüm ile oluşan bileşikler de dahil olmak üzere metabolik ara maddelere dönüşebilmektedirler (Ahel ve diğerleri, 1994).

Alkilfenoller endokrin bozucu olup (endocrine disrupter, ED), östrojenle yarışmaktadırlar (Thibaut ve diğerleri, 1999; Bonefeld-Jorgensen ve diğerleri, 2007). Sürekli maruz kalınması halinde, dokularda biriktiğı için toksik etkilidirler (Huang ve diğerleri, 2009).

NP'nin iki farklı yapısı bulunmaktadır. Bunlar doğrusal ve dallı (branched) NP'dir. Doğrusal NP (4-NP) beyaz kristal yapıdayken, dallı NP oda sıcaklığında sıvıdır ve rengi sarıya kaymaktadır. NPE'den biyolojik bozunma ile oluşmakta olan 4-nonilfenol (4-NP), dişi cinsiyet hormonlarının etkilerini taklit etme yeteneğı ve yıkımlayıcı etkileriyle dikkat çekmektedir (Thibaut ve diğerleri, 1999). 4-NP merkezinde aromatik (veya benzen) halka, halkaya bağı dokuz karbonlu (C) yan zincir ve bu zincirin karşısında hidroksil grubu (OH) bulundurmaktadır (Cox, 2003). 4-NP, yapısındaki benzen halkasından dolayı biyolojik olarak parçalanmaya karşı dirençli ve biyobirikime müsait bir bileşiktir (Brunner ve diğerleri, 1988).

İngiltere Çevre Ajansı 4-NP'nin su içerisindeki biyolojik olarak parçalanma yarı ömrünü 150 gün olarak bildirmiştir (Warhurst, 1995). Shang ve diğerleri (1999), NP'nin sediment içerisindeki yarı ömrünün 60 yıl olduğunu rapor etmişlerdir.

Alkilfenolik bileşikler lipofilik olduklarından dolayı, balık gibi suda yaşayan canlılarda birikerek besin zinciri yoluyla biyolojik birikime uğramaktadır. 4-NP gibi kısa zincirli polietoksilat türevleri, bozulmamış öncüllerine göre sudaki organizmalar açısından daha toksiktir. Yiyeceklerle beraber su ile ya da deterjanla temas yolu ile vücuda giren bu kimyasallar, sperm oluşturma süreci olan spermatogenez olayında mitokondrilerin kristasını bozmakta ve vakuol artışına neden olmaktadır (Maruyama ve diğerleri, 2000).

Selenyum (Se), havada ve suda erimiş olarak, toprakta ve kayalarda katı halde bulunan periyodik tabloda VI A alt grubunda yer alan eser bir elementtir. Aynı grupta yer alan sülfür ile kimyasal özellikler bakımından büyük benzerlik gösterir. Doğada yer almasından dolayı buralardan bitkilere, mantarlara, bakterilere ve insanlara geçer, sonra tekrar doğaya döner ve bu döngü böylece sürer (Papp ve diğerleri, 2007).

Selenyum, bir antioksidan olup bazı metabolik hastalıkların ve kanser türlerinin önlenmesinde, aktivitelerinin azalmasında, serbest radikallerin yakalanması ve etkilerinin azaltılmasında rol oynar. Selenoproteinlerin redoks aktif bölgelerinde bulunur. Bu selenoproteinlerden en önemlisi hücre içinde hidrojen peroksite suya indirgenmesinde rol oynayan glutatyon peroksidaz (glutathione peroxidase, GPx) antioksidan enzimidir. GPx enzimi alt ünitesinde selenosistein şeklinde bir adet Se atomu içerir ve bu durum selenyumu önemli bir biyolojik element yapmaktadır. Selenyumun, E vitamini ile etkileşerek lipid metabolizması sonucu oluşan peroksitlerin neden olduğu oksidatif hasardan hücre membranını koruduğuna dair yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Gebre-Medhin ve diğerleri, 1984).

Selenyum memelilerde, karsinogen maddeleri detoksifiye eden bazı enzimlerin sentezinde rol oynayan hayati bir elementtir. Selenyumun diyetle alınmasının antikarsinogenik, antioksidan ve antitümöral etkisi olduğu bilinmektedir. Organizmada çinko miktarının en yüksek olduğu organlar testisler ve prostat dokusudur. Bu nedenle çinko, bakır ve selenyum eser elementlerinin erkek üreme sistemi üzerinde önemli fonksiyonlara sahip olduğu bilinmektedir (Amara ve diğerleri, 2008).

Alkilfenol etoksilat bileşiklerinden olan 4- NP, her yaştan insanın ve canlının bir şekilde maruz kalabileceği, endokrin bozucu etkisi olan çevresel toksik bir maddedir. Sunulan

Çalışmada, antioksidan etkili olduğu bilinen selenyumun, ratlarda 4-NP ile oluşturulacak deneysel testiküler toksisitede koruyucu veya toksisite sonucu oluşan oksidatif hasarın giderilmesinde destekleyici rolünün olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır. Yapılan literatür taramasında NP ile testiküler toksisite oluşturulmuş ratlarda selenyumun etkisi ile ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanamamıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Genital Sistem

Erkek üreme sistemi; spermatozoon (spermium) ve erkek cinsiyet hormonlarını üreten testisler, üretilen spermatozoonların depolanması ve iletilmesinden sorumlu genital kanallar, seminal sıvı adı verilen kayganlaştırıcı salgıyı yaparak spermiumların beslenmesini ve taşınmasını kolaylaştıran eklenik genital bezler ile dış genital organ olan penisten oluşur (Tanyolaç, 1999; Junqueira ve diğerleri, 2006; Ergün, 2010).

2.1.1. Testisin Yapısı

Testis, testiküler kapsül ile tamamen çevrili olup; kapsülün, mediastinum olarak bilinen kan damarları, sinirler, lenfatikler ve rete testisin mediastinal bölgesini içeren posterior kısmı ve testisi kabaca 250 kompartımana bölen fibröz bölmeleri bulunur. Testiküler kapsül üç tabakadan meydana gelmiştir: dış tabaka, seroza veya tunika vajinalis, orta tabaka, tunika albuginea; iç tabaka, tunika vaskülozadır (Ergün, 2010).

Tunika vajinalis, iyi gelişmiş bir bazal membranın üzerindeki tek katlı, yassılaştırmış mezotelyal hücrelerden oluşan bir tabakadır ve çoğunlukla histolojik preparat hazırlanırken kaybolur. Bu tabaka, peritonun aşağı doğru kese şeklinde bir uzantı göndermesi sonucu oluşur. İçteki yaprak viseral tabakadır ve testisin ön ile yan yüzünü örter. Testisin arka yüzünde ise viseral yaprak kendi üzerinden geriye doğru dönüş yapar ve tunika vajinalisin paryetal yaprağını yapar. Viseral ve paryetal yapraklar arasındaki seröz boşluk testisin serbestçe hareketine izin verir. Tunika vajinalisin viseral yaprağı bir bazal laminaya yaslanmıştır. Bu bazal lamina, tunika vajinalisi testisin orta ve en belirgin tabakası olan tunika albugineadan ayırır. Tunika albuginea, fibroblastlar ve miyofibroblastlar içeren, fibroelastik bağ dokusundan yapılmış kalın bir tabakadır. Buradaki miyofibroblastlar, özellikle testisin arka yüzünde epididimise komşu bölgede yoğunlaşır ve seminiferöz dokuda ritmik kasılmaları sağlar. Testiküler kapsülün en içteki tabakası olan tunika vasküloza ise ince, gevşek bir bağ dokusuna gömülü olan kan damarları ve lenfatik ağından oluşmuştur (Tanyolaç, 1999; Yılmaz, 2001).

2.1.2.Tubulus Seminiferus Kontortus

Mediastinumdan uzanan fibröz kapsül, testisi, lobuli testis adı verilen kompartımanlara böler. Lobüllerin tepeleri mediastinuma doğru uzanır. Her lobülde 1-4 arası oldukça kıvrıntılı tubulus seminiferus kontortuslar (seminifer tubuller) bulunur. Bu tübüller, içerisinde damarlar, sinirler ve çoğunluğu Leydig intersitisyal hücreleri olmak üzere, çeşitli hücrelerin bulunduğu gevşek bir bağ doku stroması içine gömülü haldedirler. Leydig hücreleri çoğunlukla gruplar halinde bulunan endokrin işlevleri bulunan hücrelerdir (Arıncı ve Elhan, 1997; Junqueira ve Carneiro, 2009).

Seminifer epitelde iki farklı tip hücre bulunur. Bunlar besleyici ve aynı zamanda destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ve sperm yapımından sorumlu olan germ hücreleridir (spermatogenik hücreler). Testislerde bulunan bir diğer hücre türü de erkek seks hormonu olan testosteron yapımını sağlayan Leydig hücreleridir. Seminifer tübül içinde spermatogenezin tüm aşamalarındaki hücreler bulunur. Farklılaşma fazını tamamlayan hücreler seminifer tübül içine salınırlar. Bu nedenle testisin farklı kesimlerindeki alanlarda gelişimin değişik evrelerindeki sperm üretimi devam eder (Önder, 2011).

Seminifer tübüllerin epitel duvarında Sertoli hücreleri, A ve B tipi spermatogoniumlar, primer ve sekonder spermatositler, uzamış veya yuvarlak spermatidler ile tübüllerin lümeninde spermatozoonlar bulunmaktadır. Puberteye kadar sadece seminifer tübüllerin bazal membranlarında mayoz bölünmeye girmeden bekleyen A tipi spermatogonialar bu dönemde testosteron salgılanmasında görülen artış ile uyarılarak bölünmelerine başlarlar ve B tipi spermatogonialara dönüşürler. Spermiyogenez süreci içinde mayoz bölünmelerini tamamlayarak spermatozoon haline gelirler. Epididimis içinde olgunlaşan ve fertil hale gelen spermatozoonlar oositi dölleme yeteneğine sahip olurlar. Bu süreçte tüm spermatozoonlarda çok sayıda hormonal, yapısal ve ayrıca sitoplazmik ve moleküler değişiklikler görülür (Hess ve Franca, 2008).

2.1.3.Sertoli Hücreleri

Seminifer tübüllerin duvarında, bazal membran üzerine oturmuş, lümene kadar uzanan büyük hücrelerdir (Johnson 1991).

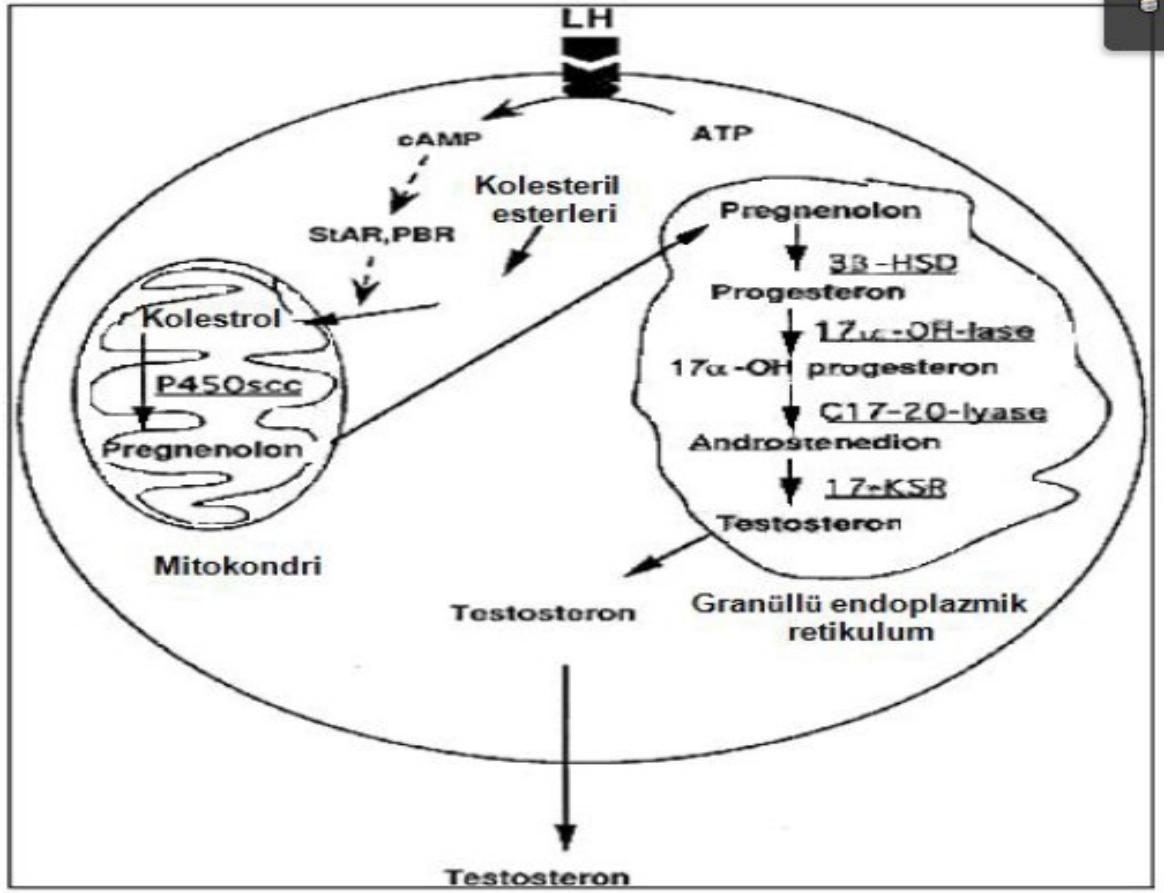
Sertoli hücrelerinin eşey hücrelerini destekleme, koruma ve besleme, dejenere olan eşey hücrelerini ve gelişen eşey hücrelerinden arta kalan sitoplazma parçalarını fagosite etme, spermatozoon transportuna yarayan bir sekresyon yapma görevleri vardır (Tanyolaç, 1999). Hipofiz ön lobundan salgılanan folikül uyarıcı hormon (FSH) tubuluslardaki Sertoli hücrelerini etkileyerek bu hücrelerden androjen bağlayan protein (ABP)'lerin salgılanmasını sağlar. Puberte döneminde luteinizan hormon (LH)'nin etkisiyle Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronun androjen bağlayan protein (androgen binding protein, ABP ile oluşturduğu kompleks spermatogoniumları etkileyerek çoğalma sürecini (mitoz) başlatır (Hassa ve Aştı, 1997).

2.1.4. Testis İntersitisiyumu ve Leydig Hücreleri

Testisin intersitisiyumunu kan damarları, lenf damarları, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve Leydig hücreleri oluşturur (Gharagozloo ve Aitken, 2011). Leydig hücreleri toplam testis volümünün yaklaşık % 5-12'sini oluşturur. Genç bir erkekte ortalama 700 milyon Leydig hücresi bulunur. Leydig hücrelerinin prekürsör hücrelerden farklılaşmasında LH ve testis içindeki parakrin faktörler etkili olurlar (Kofler, 1982; Ge ve diğerleri, 2005). Vücutta bulunan testosteronun % 95'i testislerde, Leydig hücreleri içinde kolesterolden sentezlenerek yapılır. Kolesterol ise ya dolaşımdan gelir ya da Leydig hücreleri içerisinde yeniden sentezlenerek (de novo sentez) oluşturulur veya hücre içindeki lipid damlacıklarında bulunan kolesterol esterlerinden kaynaklanır (Gharagozloo ve Aitken, 2011).

Kolesterolün hücre içinde de novo sentezi endoplazmik retikulumda gerçekleşir. Steroid öncülü asetatlar sitoplazmadan endoplazmik retikulum içine girerek bu reaksiyonu başlatırlar. Beta-hidroksi-beta-metilglutaril-CoA redüktaz (HMG-CoA) enzimi yardımıyla önce squalene çevrilir ve bundan da lanosterol yapılır. Lanosterol'den oluşan kolesterol, kolesterol bağlayıcı proteine (cholesterol binding protein, CBP) bağlanarak sitoplazmadaki kolesterol havuzuna taşınır. Her üç durumda da Leydig hücresi içinde metabolik olarak aktif kolesterol havuzunda toplanan kolesterol sonuçta mitokondriye nakledilir (Zirkin ve Chen, 2000). Burada "P-450 yan zincir klivaj enzimi" tarafından pregnenolone ve C6 isokaproaldehide dönüşür. Pregnenolone, pregnenolon bağlayan protein vasıtasıyla mitokondriden dışarı çıkarak düz endoplazmik retikulum içine taşınır, burada testosteronu oluşturur. Oluşan testosteron ise endoplazmik retikulumdan sitoplazma içine, buradan da hücre dışına taşınarak, kanda testosteron bağlayıcı proteine bağlanır (Şekil 1). Testosteronun hücre dışına çıkarılması ve

burada tutulması albumin, ABP ve testosteron-estradiol bağlayan protein gibi Leydig hücresi dışında bulunan bağlayıcı proteinler tarafından gerçekleştirilir (Hassa ve Aştı, 1997; Zirkin ve Chen, 2000).



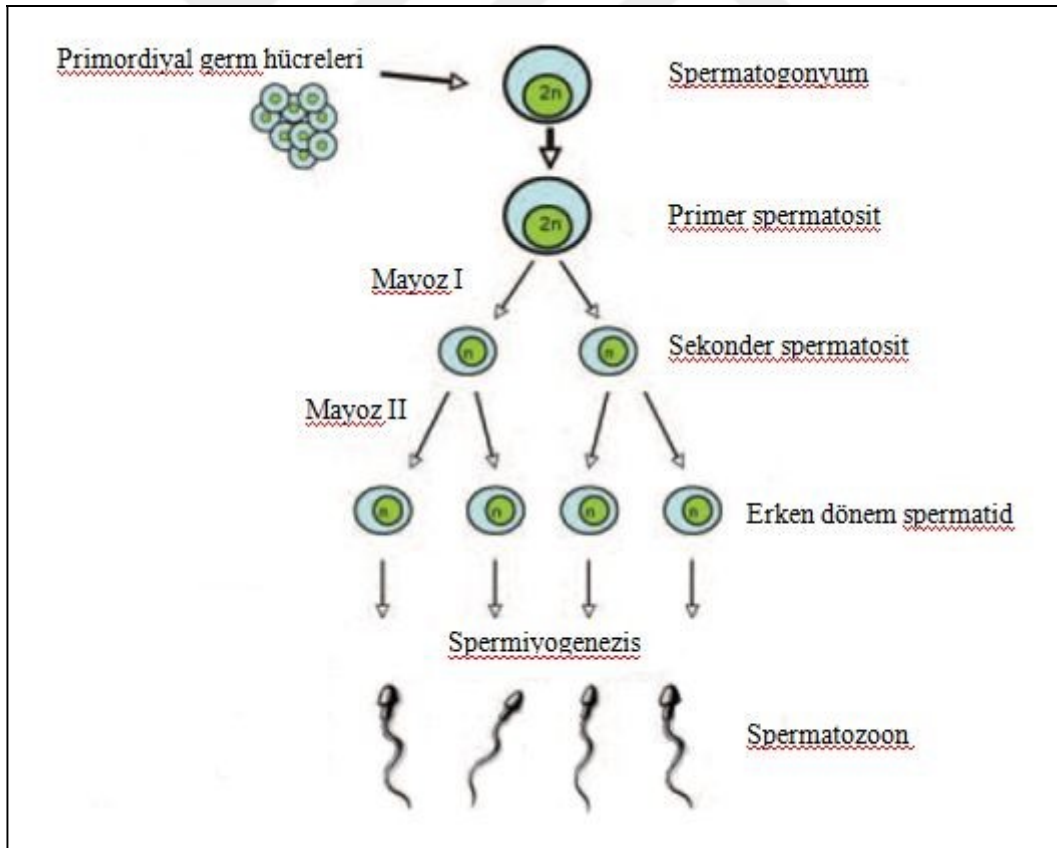
Şekil 1. Testosteron oluşum mekanizması (Zirkin ve Chen, 2000).

2.1.5. Spermatogenezis

Spermatozoon üretimi oldukça uzun ve karmaşık bir süreçtir. Olgun sperm oluşumu pubertede başlar, yaşam boyunca sürer. Germ hücrelerinin çeşitli aşamalardan geçtikten sonra spermatozoon hücresi haline gelmesi "spermatogenez" olarak adlandırılır. Spermatogenezis, çoğalma (goniyogenezis), büyüme, olgunlaşma (spermatositogenezis) ve başkalaşma (spermiyogenezis) evrelerinden oluşmaktadır. Bu evrelerin sonunda spermatogonyumlardan sırasıyla primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoonlar gelişerek spermatogenezis tamamlanır. Bu süreç içinde germ hücrelerinde gerçekleşen mayoz bölünme sonrası DNA miktarı yarıya iner, yani hücreler diploid (2n) durumundan haploid (n) duruma

geçerler. Spermatogenezisin tamamlanması insanda 72, koçta 50, ratta 48, farede 33, boğa, köpek ve aygırda 60 gün alır (Hassa ve Aştı, 1997; Krinke, 2000).

Seminifer tübüllerin epitel duvarında A ve B tipi spermatogoniumlar bulunmaktadır. Spermatogonium A'lar seminifer tubüllerin bazal kompartmanında, bazal membran üzerine oturmuş durumda bulunurlar. Üzerlerinde komşu Sertoli hücrelerinin aralarında oluşturdukları sitoplazmik uzantı bileşkeleri bulunur. Spermatogonium A'lar 16 günde bir mitoz ile bölünerek sayıca artarlar ve bir kısmı kaynak hücresi olarak kalırken, bir kısmı da spermatogonium B'leri oluşturur (Krinke, 2000; Su ve diğerleri, 2011). Spermatogonium B'ler mitotik bölünme ile sayılarını artırarak luminal yüze doğru yönlenirler ve daha da büyüyerek primer spermatositleri oluşturup mayoz bölünmeye girer (Önder, 2011). Oluşan primer spermatositlerden olgunlaşma evresi (mayoz bölünme) sonucunda sekonder spermatosit ve spermatidler, başkalaşma evresi sonucunda da spermatozoonlar meydana gelir (Şekil 2) (Krinke, 2000; Hassa ve Aştı, 1997).



Şekil 2. Spermatogenezis (Hassa ve Aştı, 1997).

2.1.6. Spermatozoonun Kapasitasyonu ve Motilite Kazanması

Spermatozoonlar ancak kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu tamamlayarak oositi dölleyebilme kapasitesine sahip olurlar (Longo, 1997; Gardner ve diğerleri, 2001). Spermatozoonlar motilite yeteneklerini eklenik genital bezlerin salgıları ile epididimiste kazanırlar. Motil spermatozoonlar vaginadan tuba uterinaya ulaşması sırasında, uterus ve ovidukt'ta bulunan salgıların etkisiyle spermatozoon'un akrozom bölgesini örten hücre membranı üzerindeki glikoproteinler ve seminal plazma proteinleri tamamen uzaklaştırılır. Böylece spermatozoonlar kapasitasyonu tamamlayarak oosit II'yi dölleyebilme kapasitesine sahip olurlar (Buffone ve diğerleri, 2012). Kapasitasyon, spermatozoonda yapısal bir değişikliğe neden olmayan ve genellikle akrozom reaksiyonunun tamamlanması için gerekli bir olgunlaşma süreci olarak kabul edilir. Spermatozoonun vaginadan tuba uterinaya ulaşması sırasında meydana gelen kapasitasyon sırasında spermatozoonun plazma membranlarında bazı değişiklikler gözlenir:

-Akrozomal kep bölgesindeki plazma membranından seminal plazma proteinleri ve glikoproteinler uzaklaştırılır.

-Spermatozoon plazma membranındaki intramembranöz partiküllerin yer değiştirdiği gözlenir.

-Hücre içi kalsiyum ve sodyum seviyesi yükselir (Schuppe ve diğerleri, 2008).

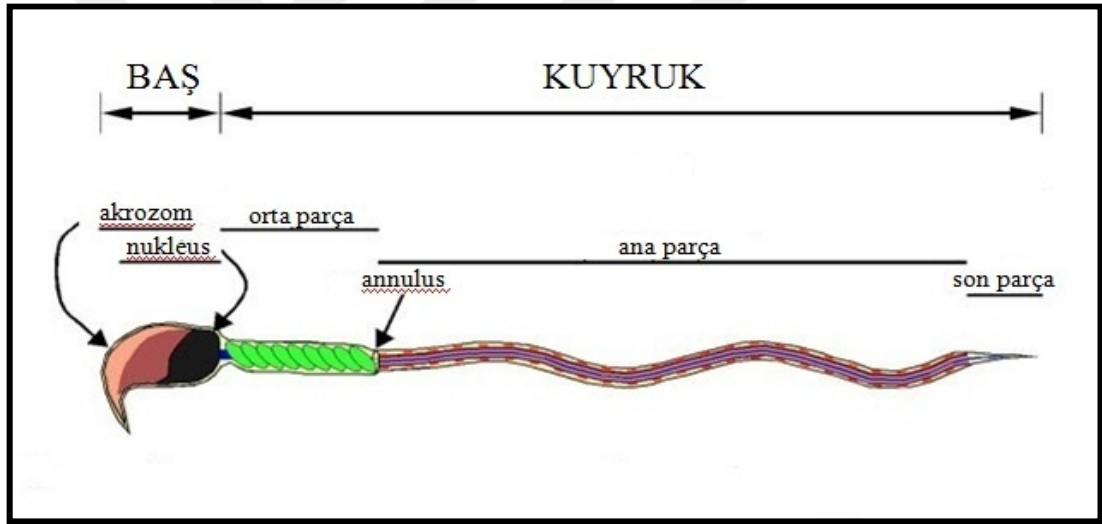
Kapasitasyon, spermatozoonların oositle karşılaşmasından önce tamamlamış olması veya bu sırada tamamlamaları gereken bir süreçtir. Her ne kadar yapısal bir değişiklik gözlenmese de kapasitasyonu tamamlamış olan spermatozoonlarda hücre içi iyonların yeniden düzenlenmesi gerçekleşir ve metabolik değişiklikler olmaktadır. Moleküler düzeyde ise adenilat siklaz/protein siklaz aktivitesi yeniden düzenlenir ve nükleus proteinlerinde değişiklikler meydana gelir (Carlson, 2004; Sadler, 2006; Gardner ve Hiatt, 2007). Kapasitasyon sürecini tamamlayan spermatozoonun motilite kinetiği değişir ve hiperaktif olur. Hiperaktivasyon, spermatozoon kuyruk hareketlerindeki açılanmanın ve ileriye doğru olan hızının artması olarak tanımlanır (Gorus ve Pipeleers, 1981; Hassa ve Aştı, 1997). Fertilizasyon sırasında üç ana olay meydana gelir. Bunlar sırasıyla;

- Akrozom reaksiyonu,
- Zona pellusida (ZP) 'nın bir proteini olan ZP3'e spermatozoonun bağlanması,

- Spermatozoon-oosit füzyonudur (Delilbaşı, 2008).

Akrozomal kese 3 ögeden oluşur: 1) dış akrozomal membran, 2) iç akrozomal membran, 3) hidrolitik enzimler (hiyalüronidaz, akrozin, esteraz, N-asetil glukozaminidaz, asit fosfotaz gibi enzimler). Spermatozoon oosite yaklaştığında ve Ca^{+2} varlığında spermatozoon plazma membranı dış akrozomal membranla kaynaşır. Bu olay “akrozom reaksiyonu” olarak adlandırılır (Eroschenco ve Fiore, 2008).

Normal bir sperm baş ve kuyruk olmak üzere iki parçadan oluşur. Baş kısmında akrozom, post akrozomal parça ve çekirdek (nükleus) bulunur. Kuyruk ise boyun, orta parça, ana parça ve son parçadan meydana gelmiştir (Şekil 3). Orta parçada spermin hareketi için enerji üreten mitokondriler yer alır. Spermin kuyruk kısmında oluşan anomaliler spermin motilitesi üzerine olumsuz etki oluşturur (Hassa ve Aştı, 1997; Buffone ve diğerleri, 2012).



Şekil 3. Rat/fare spermatozoonu (Buffone ve diğerleri, 2012).

2.1.7. Kan-Testis Bariyeri

İki Sertoli hücresi yanlara doğru yaptıkları sitoplazmik uzantılarıyla birbirlerine tutunurlar. Bu uzantıların arasında ise spermatogenetik seriye ait germ hücrelerinin etrafını kuşatarak hapsederler. Böylece germ hücrelerinin çevresindeki ortamla irtibatı kesilir. Beslenme, hormonal etkileşim gibi fonksiyonlarını Sertoli hücreleri aracılığıyla gerçekleştirir. Sertoli hücrelerinin birbirleri ile birleşerek oluşturdukları bu bariyere “kan-testis bariyeri” (BTB) adı verilir. Kan-testis bariyeri bu şekilde seminifer tubüllerin germ hücreleri ile döşeli

duvarını bazal kompartman ve adluminal kompartman olmak üzere ikiye ayırmış olur. Bazal kompartman içinde spermatogoniumlar ve genç spermatositler (leptoten, zigoten), adluminal kompartman da ise olgun spermatositler (pakiten), spermatidler ve spermatozoon bulunur (Şekil 4). Spermatositler mayoz ile bölünürlerken, mayozun ileri evrelerinde adluminal kompartman içine geçerler (Şekil 5) (Slowikowska-Hilczer, 2006).

Kan testis bariyeri ratlarda post-partum 16-19. günlerde, insanlarda ise pubertede spermatogenezis başlamadan hemen önce oluşur (Krinke, 2000). Kan-testis bariyerinin varlığını gösteren en güzel çalışma testis damarlarına verilen çoğu maddenin testisin lenf damarlarında çıkması ama rete testis sıvısına geçmemesidir (Setchell, 1980; Ergün, 2010). Bu bariyerin önemi germ hücreleri mayoz geçirirken dış etkilere çok hassas oldukları için, bunlara daha düzenli ve spesifik bir ortam sağlamasıdır (Alberts ve diğerleri, 2008; Su ve diğerleri, 2012). Ayrıca, mayoz geçirdikten sonra haploid hale gelen germ hücrelerinin vücut immun sistemi tarafından tanınmamaları nedeniyle yıkılmalarına da engel olur (Mok ve diğerleri, 2011; Su ve diğerleri, 2011).

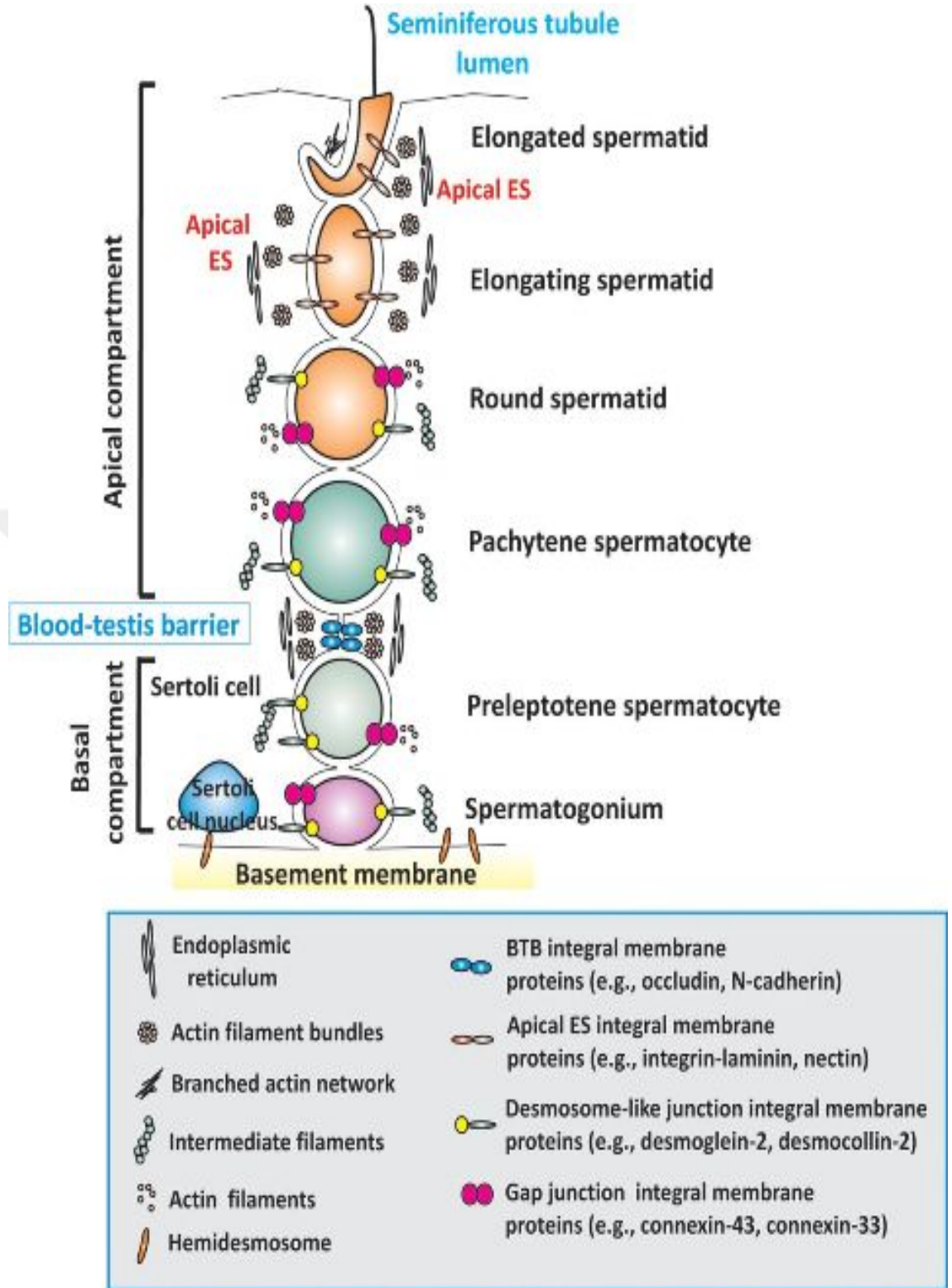
Yapılan analizler ve elektron mikroskopik incelemeler sonrası BTB'yi oluşturan komponentlerin hücreler arasında bağlantı kompleksleri ve hücre yapışma molekülleri olduğu anlaşılmıştır (Ergün, 2010). Bunlar;

-Tight junction; occludin, claudin, junctional adezyon molekülleri (junctional adhesion molecule, JAM)

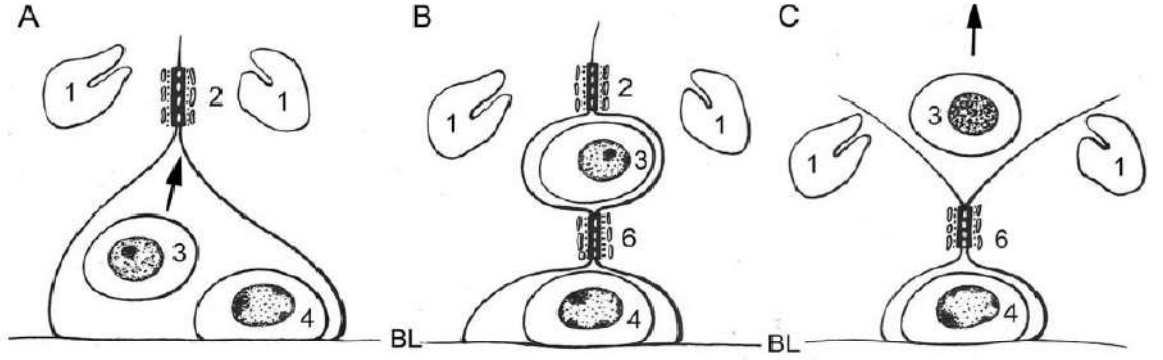
-Adherens junction; cadherin, nectin, catenin

-Gap junction; connexin, desmosom, desmocollin, desmocellin (Şekil 6)

Bu yapılar hücreleri birbirine ve bazal membrana tutundurmak için bazolateral yüzlerde bulunur. Hücre yapışma (adezyon) molekülleri Ca^{+2} bağımlı moleküller olan cadherinler ve selektinlerin dâhil olduğu proteinler, Ca^{+2} bağımsız moleküller olan immünglobulin süper ailesi ve integrinlerdir. İntegrinler temel olarak hücre-hücreler arası matriks etkileşiminde önemlidir. Cadherinler ve integrinler hücre iskeleti ile diğer hücrede yer alan cadherinlerle ya da hücre dışı matriks (integrinler) ile bağlantı kurar (Mok ve diğerleri, 2011).



Şekil 4. Seminifer tübülleri bazal kompartman ve adluminal kompartman olarak ayıran kan testis bariyerinin şematik gösterimi (Slowikowska-Hilczer, 2006).



Şekil 5. Erişkin farelerde spermatogenezisin VIII-IX. aşamalarında germ hücre göçü sırasında BTB' nin şematik çizimi (Smith ve Braun, 2012). Kan testis bariyeri bölgesinde iki komşu sertoli hücreleri ve onların çekirdekleri (1) ile birlikte Sertoli hücresi (SC) junctional kompleksi (2) gösterir. (A) preleptoten spermatosit (3) adluminal bölmeye doğru hareket eder ve bazal lamina (BL) ile temasını kaybeder, spermatogonium (4) halen bazal laminaya yapışıktır. Bu hücreler, bir ara bölme içine alınır, böylece (B) BTB bütünlüğünü güvence altına almak için, yeni bir SC açılımı (tight junction, TJ) (6) sadece preleptotene / leptoten spermatositler (3) altında oluşturulur. Eski SC TJ kaldırılır, leptoten spermatositler (3) adluminal bölmeye (C) salınır.



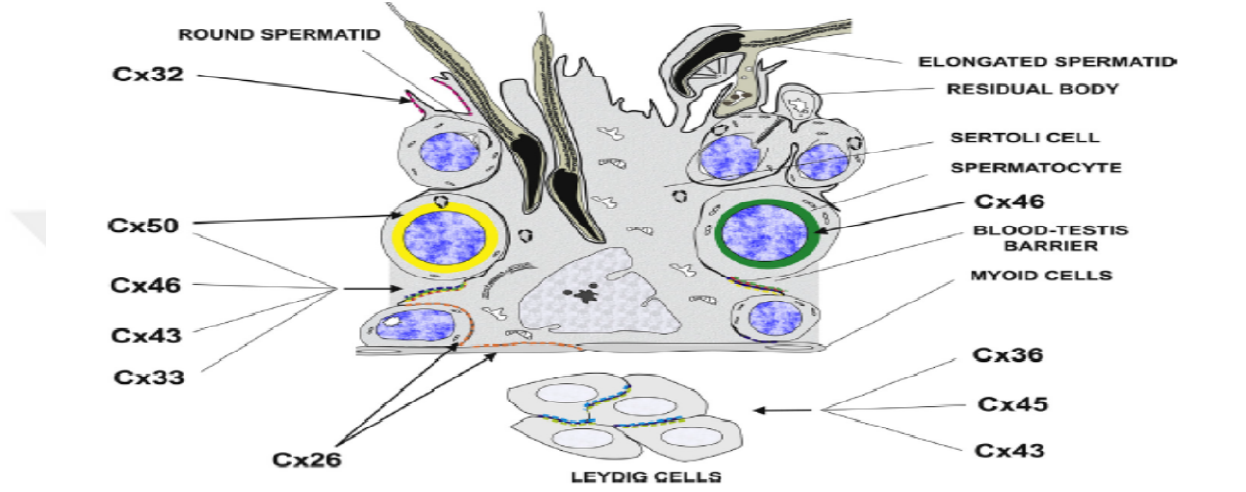
Şekil 7. Erişkin farelerde seminifer epitel katmanı ve BTB kompozisyonu. (A) Yetişkin SC ve GC (ok başları) şematik çizimi (Clermont, 1993). Sertoli hücreleri bazal lamina (BL) üzerine oturur ve seminifer tübül lümenine uzanır. Kan testis bariyeri (kutular) seminifer tübülü bazal ve adluminal bölmeye ayırır. (B) Son olarak, GC lümenin içine salınır. Kan testis bariyeri ihtiva eden bölgede de junction kompleksinde gap junction (1) zonula adherens (2) ve zonula okludens (tight junction) (3) gösterilmektedir.

Tight junction oluşumu komşu hücreler arasında geçirimsiz hücrelerarası bir bariyer sağlar. Bu tight junctionlar epitel hücrelerinde karakteristik olarak bulunurlar, apikal ve bazal tarafı ile hücrel polarite oluştururlar. Seminifer tübüllerde, bu tight junction'lar SC ve BTB arasında özellikle belirgindir (Li ve diğerleri, 2012). Tight junction'larda claudin grubu moleküller ve occludin molekülleri bulunur ve bunlar immünohistokimya (immunohistochemistry, IHC) boyama metodu, floresan boyama metodu, Western Blotting tekniği ile ekprese edilebilmektedir Günümüze dek üzerinde en çok çalışılan claudin grubu molekül claudin 11'dir (Mok ve diğerleri, 2011).

İki komşu SC arasında doğrudan iletişim için izin veren gap junction'lar, BTB altında lokalizedir. Connexon olarak adlandırılan proteinlerin oluşturduğu gap junctionlar, komşu hücreler arasındaki direkt iletişimden sorumludur. Her bir hücre, altı konneksin (Cx) proteinlerinden oluşan tek connexon içerir. Bu kanallar, küçük moleküller ve iyonlar için geçit sağlar. Farklı türlere ait testislerde yapılan çalışmalarda en baskın gap junction proteininin konneksin 43 (Cx43) olduğu belirlenmiştir (Şekil 8) (Aravindakshan ve diğerleri, 2004; Li ve diğerleri, 2013; Rode ve diğerleri, 2015).

Spermatogenezise katılan hücrelerin gelişim ve farklılaşması, hücreler arasındaki son derece düzenli ve koordineli etkileşimleri gerektirir. Özellikle Cx43 proteini, gap junctionlar

arası iletişim, fetal gelişim ve spermatogenezis sırasında germ hücrelerinin gelişiminde kritik bir rol oynamaktadır (St-pierre ve diğerleri, 2003). Çalışmalar Sertoli hücrelerinin farklılaşması ve tiroit hormonları tarafından düzenlenmesi için Sertoli hücreleri arasındaki Cx43 gap junction kurulmasını gerektirdiğini göstermiştir. Fetuste Cx43 kaybı germ hücre sayısında azalmaya neden olurken, yetişkinlerde Cx43 kaybı komple spermatogenezisin inhibe edilmesine sebep olur (Cheng ve Mruk, 2012).



Şekil 8. Memeli testisinde seminifer tübüller ve Leydig hücrelerinde farklı Cx lokalizasyonu (Kidder ve Cry, 2016). Konneksin 32 (Cx32) (eflatun) seminifer tübül içinde uzamış spermatidler yakınındaki Sertoli-Sertoli hücresi arasındaki gap junctionların apikal bölgesinde lokalize olur (St-pierre ve diğerleri, 2003). Konneksin 46 (Cx46) (yeşil) ve Cx50 (sarı), hem BTB'sinde, hem de spermatositlerin perinükleer bölgesinde yer almaktadır (Pelletier ve diğerleri, 2015). Konneksin 43 (Cx43) (mavi) ve Cx33 (kırmızı) öncelikle komşu sertoli hücreleri arasındaki kan testis bariyeri alanındaki epitelin bazaline yerleşmiştir. Konneksin 26 (Cx26) (turuncu) seminifer tubulün bazalinde lokalize olur ve perinükleer miyoid hücreleri ve spermatogonium ile ilişkilidir. İnterstisyel dokuda, Cx43 (mavi) ve Cx36 (yeşil), Leydig hücreleri arasında lokalize olmaktadır. Ayrıca, Cx45 de Leydig hücre sitoplazması içinde dağılmış olarak bulunmaktadır (Li ve diğerleri, 2013).

Sertoli hücreleri BTB sayesinde germ hücrelerini immünolojik reaksiyonlara karşı korur. İmmün tolerans iki şekilde gerçekleşmektedir. Birincisi germ hücrelerinin mekanik olarak immünolojik etkenlerden korunmasıdır. Mekanik koruma, immünolojik reaksiyon oluşturabilecek reaksiyonların seminifer kanalların içerisine girmesini engelleyen Sertoli

hücrelerinin oluşturduğu sıkı hücre bağlantıları (tight junction) ile spermatosit, spermatid ve seminifer tubulusun lümeninde bulunan spermatozoonlara karşı antikor oluşumu engellenmiş olur (Haas ve Beer, 1986). Kan testis bariyeri bu şekilde seminifer epiteli, herhangi bir otoimmün reaksiyondan da korumuş olur (Junqueira ve diğerleri, 2006). İkinci yolda ise; spermatozoon yüzey antijenlerinin duktus eferentis ve rete testisten geçerken baskılayıcı T lenfositleri aktive eder. Bu aktivasyon B lenfositlerin antijenlere karşı duyarlılığını azaltarak spermatozoon antijenlerine karşı oluşabilecek humoral yanıtı engellemektedir (Haas ve Beer, 1986; Tan ve diğerleri, 1996).

2.1.8. Eşey Hücrelerini İleten Yollar

Eşey hücrelerini ileten yollar; tubulus rektus, rete testis, epididimis ve duktus deferentis. Tubulus seminiferus kontortus'un, mediastinum testise doğru uzandığı düz, kısa ve dar bir borudur. Sertoli hücreleri tek katlı prizmatik epitele dönüşerek kanalı döşer (Odar, 1986).

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

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

Kaput, korpus ve kauda olmak üzere üç bölümden oluşan epididimis, proksimalden distale doğru uzanmaktadır. Rete testisten tunika albugineyayı delerek çıkan 8-25 adet kanalcık duktulus eferentis'lerdir. Bunlar kıvrımlar yaparak katlanırlar ve kaput epididimidis'i meydana getirirler. Epitelin bazal laminasının dışında sirküler olarak dizilmiş düz kas hücrelerinden oluşan ince bir katman vardır (Mescher, 2016). Kaput epididimidis sperm

membranına epididimis kökenli proteinleri ekler. Yine kaput epididimidis bölümü asit-baz düzenleyicileri yönünden zengindir, bu da lumen sıvısının asitliğine katkı sağlamaktadır. Kaput epididimisteki hücreler, ayrıca spermatozoonun gelişimi ve yoğunlaşması için lumen sıvısının geri emilimini sağlarlar (MacLean ve diğerleri, 2012).

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

Duktus deferens, kauda epididimidis bölümünden sonra dönüş yaparak düz olarak uzanan bir kanaldır. Bu kanalın tipik olarak dar bir lumeni ile tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya (tunika seroza) katmanları vardır. Tunika adventisya, ileri bölümlerinde tunika seroza adını alır. Mukozanın lamina epitelialis katı yalancı çok katlı prizmatiktir. Epitelin altındaki lamina propriya, kollagen ve elastik ipliklerden zengindir. Dar bir submukozayı dıştan tunika muskularis sarar. Tunika muskularis içte ve dışta longitudinal, ortada sirküler seyreden güçlü düz kaslardan oluşur. En dıştan kanalı saran tunika adventisya gevşek bağ doku yapısında olup testiküler arter, pampiniform pleksus ve sinirleri içerir (Kuran, 1983; Snell, 2004). Duktus deferens üretraya açılmadan önce bir genişleme yapar ki bu kısma ampulla duktus deferentis adı verilir. Ampullanın alt ucu duktus ejakulatoryus olarak devam eder. Eklenik genital bezlerin salgı kanalları buraya ağızlanır. Bu kanal biraz ileride üretraya açılır (Junqueira ve diğerleri, 2006; Ergün, 2010).

2.1.9. İlk Spermatogenetik Dalga

Memeli hayvanlarda spermatogenezis iki faza ayrılır. İlk faz, doğumdan sonra başlayan ilk spermatogenetik dalgayla karakterizedir. İlk spermatogenetik dalga, rat (Silva ve diğerleri, 2011), fare (Cai ve diğerleri, 2011), hamster (Golan ve diğerleri, 2000) ve insanda (Hilscher, 1991) gözlenmiştir. Spermatogenezisin ikinci fazı olan olgun spermatogenezis, ilk

spermatogenetik dalgadan sonra puberte yaşına ulaşmış hayvanlarda sürekli olarak meydana gelen karakteristik spermatogenetik dalgalarından oluşur (Rodriguez ve diğerleri, 1997).

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

Erken postnatal yaşamın ilk döneminde görülen ilk spermatogenezis dalgası, ilk germ hücre apoptozisiyle aynı zamanda oluşur (Meehan ve diğerleri, 2001; Jahnukainen ve diğerleri, 2004; Zheng ve diğerleri, 2006). Ratlarda postnatal 1-6 haftalık dönemde meydana gelen ilk spermatogenezis dalgası (Jahnukainen ve diğerleri, 2004), farelerde 5. günde başlamaktadır (Meehan ve diğerleri, 2001). Erkek ratlarda postnatal 18 ve 26. günlerde (Jahnukainen ve diğerleri, 2004), erkek farelerde ise 15 ve 16. günlerde apoptozis pik yapmaktadır (Zheng ve diğerleri, 2006). İmmatür rat testislerinde görülen germ hücre apoptozisi bu dokunun gelişimi için oldukça önemlidir. Germ hücre apoptozisinin inhibisyonu yaşamın ilerleyen döneminde infertilite ile sonuçlanmaktadır. Bu dönemde meydana gelen apoptozis Bcl-2 protein ailesi (bax ve bad) ve kaspaz-3 aracılığıyla oluşmaktadır (Shaha ve diğerleri, 2010).

Memeli testislerinde FSH, LH, testosteron ve östradiol germ hücre yaşamını düzenlemektedirler. Bu hormonların aşırı miktarda üretilmesi veya eksikliği testiste germ hücrelerinde apoptozise neden olur (Rodriguez ve diğerleri, 1997). Zhou ve diğerleri (2001) erkek rhesus maymunlarda yapmış oldukları bir çalışmada 20 mg/kg dozda intra muskuler testosteron enjeksiyonundan 30 gün sonra, testiste Fas/FasL ekspresyonunun ve germ hücre (özellikle spermatosit ve spermatid) apoptozisinin maksimum seviyeye ulaştığını tespit etmişlerdir.

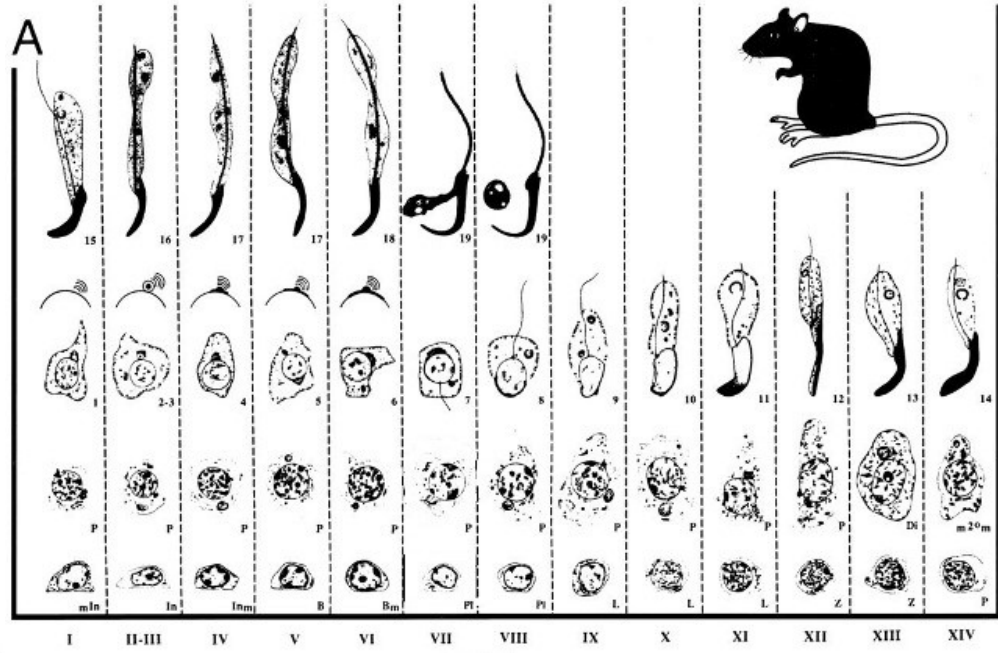
Sertoli hücreleri spermatogenezisi hormonal olarak düzenleyen FSH ve testosteron reseptörlerine sahiptir. Seminifer tubulusun olgunlaşması boyunca, testosteron ve östradiol ile birlikte FSH'nın sinerjistik etkisi germ hücrelerinin yaşamasını desteklerken, östradiol tek başına pro-apoptotik bir etkiye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

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

2.1.9.1. Spermatogenik Siklus Evreleri

Bir seminifer tubulden enine seri kesitler alınıp incelenirse birbirini takip eden, farklı gelişim aşamalarında erkek germ hücre formları görülür. Her bir spermatogenik düzen, seminifer epitel siklusunun bir evresi olarak tanımlanır. Tubulusun bir bölümü içindeki aynı evrenin tekrar görülmesi için geçen zaman, bir spermatogenik siklus olarak tanımlanır (Yan, 2000).

Spermatogenezisin tamamlanması için gerekli olan, siklus sayısı ve bir spermatogenik siklus içindeki evre sayıları türler arasında farklılık gösterir. Ratlarda bir spermatogenik siklus 14 evreye ayrılırken (Şekil 9) (Leblond ve Clermont, 1952; França ve diğerleri, 1998), farelerde 12 evre görülmektedir (Oakberg, 1956). Ratlarda bir siklusun tamamlanması 12 gün sürerken, farelerde bu süre 8.45 gündür. Bir spermatogonyumundan spermatozoa oluşumu için dört siklusa (rat: 48 gün, fare: 33 gün) gerek vardır (Leblond ve Clermont, 1952; Krinke, 2000; Ventela, 2003). Boğalarda bir siklus sekiz evreden oluşurken, spermatogenezisin tamamlanması 61 gün sürmektedir (Johnson ve diğerleri, 2000). İnsanlarda ise bir siklusun altı evresi görülür. Spermatogenezisin tamamlanması ise 64 gün sürer (O'Donnell ve diğerleri, 2006).



Şekil 9. Rat spermatogenetik siklus dönemleri (França ve diğerleri, 1998).

Dönem I

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

Dönem II

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

Dönem III

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

Dönem IV

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

µm arası bir çapa sahiptir. Geç dördüncü adım spermatidlerde akrozomik veziküller, nükleer membrana doğru yaslanmışdır. Golgi aygıtı, oluşan akrozomik sistemin bir tarafında bulunur.

Dönem V

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

Dönem VI

Akrozomik sistem altıncı adım spermatid nükleusunun yaklaşık dörtte birini kaplar.

Küçük bazofilik granüllere sahip onsekizinci adım spermatidler lumene doğru göç etmiştir.

Dönem VII

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

Dönem VIII

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

Dönem IX

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

Dönem X

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

Dönem XI

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

Dönem XII

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

Dönem XIII

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

Dönem XIV

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

A (Mayoz I)

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

B (Mayoz II)

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

Yapılan bir çalışmada, sığırlarda spermatogenik siklusun altı farklı evresi boyunca tubuler çapta önemli değişiklik görülmemiştir (Wrobel ve Schimmel, 1989). Ribeiro ve diğerleri (2007), ratlarda siklusun VII-VIII. evrelerinde seminifer tubulus çapında istatistiksel bir fark belirlememişlerdir.

Yetişkin ratlarda yapılan bir çalışmada, tubulus boyutu ile kontraktilete arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmak için spermatogenik siklusun IV-V, VII-VIII ve XIII-I. evrelerinde seminifer tubül çapları ölçülmüştür. Tubulus çapının VII-VIII. evrelerde IV-V ve

XIII-I. evrelerine göre önemli oranda büyük olduğu, tubulus kontraktilesinin ise yine aynı evrede diğer evrelere göre daha düşük olduğu gözlenmiştir (Harris ve Nicholson, 1998).

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

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

2.2. Erkeklerde Fertilite Problemleri

Fertilite, döl veriminin fizyolojik sınırlar içinde devamlılığıdır. İnfertilite, düzenli ve korunmasız cinsel ilişkide bir yıl içinde gebelik olmaması olarak tanımlanabilir. Üreme çağındaki erkek ve kadınların yaklaşık % 15-20'i eşit oranda infertildir. İnfertilite dünya çapında her 7 çiftten 1'ini etkilemektedir (Krausz ve diğerleri, 1994). Bu istatistiksel veriler infertilitenin Dünya Sağlık Örgütü'nce (world health organization, WHO) bir hastalık olarak değerlendirilmesine neden olmuştur. Bu yönde ilerleyen çalışmalar ile yardımcı üreme tekniklerinde (ART) araştırmalar giderek artmaktadır. Bu teknolojilerin ilerlemesi, erkek ve dişi üreme sistemi, gamet korunumu ve gamet kullanımı üzerindeki bilgileri arttırmıştır (Agarwal ve diğerleri, 2003).

Erkek üreme bozukluğu belli kimyasal maddelere maruz kalma, ağır metaller, böcek ilaçları ve ısı veya elektromanyetik radyasyon gibi çevresel faktörlere bağlı olarak da gelişebilir. Bunların dışında sigara, alkol kullanımı, kronik stres, şişmanlık, travma, idrar ve erkek üreme sistemi iltihabı da erkek üreme sisteminde fonksiyon kayıplarına yol açar (Tunc ve diğerleri, 2011).

2.3. Serbest Radikaller ve Oksidatif Stres

İnfertilitede bilinen sebeplerin dışında son dönemde ilgi çeken sebeplere bir yenisi eklenmiştir; oksidatif stres (Demirtaş ve Üntan, 2011). Oksidatif stres, organizmada reaktif oksijen bileşikleri (reactive oxygen species, ROS) ve reaktif nitrojen bileşikleri gibi yüksek reaktif bileşikler oluşumunun artması veya bunların ortadan kaldırılmasında azalma olarak tanımlanır. Oksidatif stres, ROS ile antioksidan olarak isimlendirilen, enzimatik olan-olmayan, koruyucuların dengesizliği neticesinde ortaya çıkar (Schuppe ve diğerleri, 2008).

ROS; radikal (hidroksil iyonu, süperoksit, NO, peroksil) ve radikal olmayan (ozon, tekli oksijen, lipid peroksit, hidrojen peroksit) molekülleri içeren geniş bir dağılım gösterir. Reaktif nitrojen metabolitleri (nitroz oksit, peroksinitrit, nitroksil iyonu) serbest nitrojen metabolitleridir ve ROS'un alt sınıfı oldukları düşünülür. Süperoksit iyonları, hidroksil radikali, peroxyland alkoksi kökleri ve radikal olmayan oksijen, hidrojen peroksit ve ozon gibi ROS türleri, normal metabolizmada oksijen kullanımı sırasında üretilir ve erkek üreme sisteminde çeşitli fizyolojik koşullar için gereklidir (Çeribaşı ve diğerleri, 2012). Reaktif oksijen bileşikleri (ROS) oksijen türevi moleküllerdir, ara ürünler olarak oluşturulmuştur ve insan vücudunda güçlü oksitleyiciler sınıfıdır. Bazı hücreler, hücre fonksiyonları için gerekli olan düşük konsantrasyonlarda ROS üretimi için özel mekanizmalara sahiptirler. Dokudaki konsantrasyonuna bağlı olarak, lipidler, proteinler ve nükleik asitler de dâhil olmak üzere, yararlı fizyolojik etkiye sahip olabilirler veya hücrel bileşenlerde patolojik hasar meydana getirebilmektedirler (Agarwal ve diğerleri, 2004).

2.3.2. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Kaynakları

Serbest oksijen radikallerinin kaynakları, endojen ve ekzojen kaynaklar olmak üzere iki başlık altında toplanır (Tablo 1). Endojen kökenli oksijen radikalleri normalde organizmada oldukça az miktarlarda bulunurken, organizmada oksidatif strese neden olan ekzojen kökenli oksijen radikallerinin sayısında son yıllarda önemli ölçüde artış saptanmıştır (Babior, 2000; Hsu ve diğerleri, 2007).

Tablo 1. Serbest oksijen radikal kaynakları (Babior, 2000; Hsu ve diğeri, 2007).

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

2.3.3. Reaktif Oksijen Bileşiklerinin Erkek Genital Sistemdeki Kaynakları

Serbest radikaller, yapıları, fiziksel ve kimyasal özellikleri, hücresel kaynakları, rol oynadıkları tepkimeler ve etkileri ile çeşitli klinik durumların patogeneğinde rol oynarlar. Erkek üreme sisteminde ROS un başlıca kaynakları; germ hücreleri, spermatozoonlar ve lökositlerdir (Valko ve diğeri, 2006).

Erkek germ hücreleri gelişimin erken aşamalarında küçük miktarlarda ROS üretir. ROS spermatozoonlarda kromatinin yoğunlaşması dahil, apoptoz indüksiyonu veya spermatogoniumların yayılması ile germ hücre sayısını ayarlama görevi vardır (Fraczek ve Kurpisz, 2005).

Olgun spermatozoonlarda ROS' lar kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve spermatozoon motilitesinde önemli bir rol oynamaktadır. ROS sinyal molekülleri (hücre içi ikincil haberciler) olarak işlev görebilir. ROS üretimi insan spermiyumunda iki ana alanda gerçekleşir. Bu alanlar mitokondri ve sperm plazma membranıdır. Mitokondrinin, solunumun

güç merkezi olması sebebiyle ROS üretiminin önemli bir bölümü, NAD bağımlı oksidoredüktaz aracılığı ile mitokondride meydana gelir. Bununla birlikte, sperm plazma membranı, ROS üretimini nikotinomid adenin dinükleotid fosfat (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/NADP) bağımlı oksidaz sistemi ile gerçekleştirir (Karadağ ve Kendirici, 2013). Olgun spermatozoonda patolojik olarak önemli düzeyde ROS üretilmese de oksidatif hasar, ROS üreten olgunlaşmamış spermatozoon ve lökositler ile yakın temas halinde olan epididimis ve seminifer tübüllerde oluşabilir (Gil-Guzman ve diğerleri, 2001).

Esas olarak rezidüel (kalıntı) sitoplazmik artıklara sahip ve infertil anormal spermatozoonlar, normal spermatozoonlardan daha yüksek düzeyde ROS üretirler. Rezidüel sitoplazma ROS üretimi ve bozuk sperm fonksiyonu ile bağlantılı glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ve kreatinfosfokinaz gibi enzimleri içerir (Fraczek ve Kurpisz, 2005).

Nötrofiller ve makrofajlar üreme sisteminde oksidanların en önemli kaynağıdır. İnflamasyon ve enfeksiyon sırasında aktif lökositler, aktif olmayan lökositlere göre daha yüksek miktarlarda (spermatozoona kıyasla 1000 kat daha fazla) ROS üretebilir. Lökositlerde ROS üretimi, NADPH oksidaz enzimi yoluyla gerçekleşir. ROS üreme sistemi için savunma mekanizmasının bir parçası olmasına rağmen, özellikle antioksidan sistemler baskılandığı zaman spermatozoonlarda hasara neden olabilir (Gil-Guzman ve diğerleri, 2001).

Geçmişte ROS'un insan spermatozoonuna toksik olduğu düşünülürken günümüzde düşük miktarda ROS'un spermatozoonun fertilizasyonu için gerekli olduğu ortaya konmuştur (Özveren, 2015). Düşük miktardaki ROS'un fertilizasyon, akrozom reaksiyonu, hiperaktivasyon, motilite ve kapasitasyon için gerekli olduğu gösterilmiştir. Süperoksit radikali (O_2^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) yüksek derecede reaktif olan, yakındaki moleküllerle etkileşime giren ve hücre organellerinde oksidatif stres hasarını başlatan oksijen metabolitleridir. Spermatozoonun düşük miktarda hidrojen peroksitte bekletilmesi; spermatozoon kapasitasyonu, hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyonunu indüklemektedir. Süperoksit anyonu da kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunu arttırmaktadır. Buna ilaveten, ROS sperm-oosit etkileşiminde de görevlidir (Agarwal ve diğerleri, 2007).

2.4. Oksidatif Stresin Etki Mekanizmaları

2.4.1. Oksidatif Stresin Hücrelerde Oluşturduğu Genel Etkiler

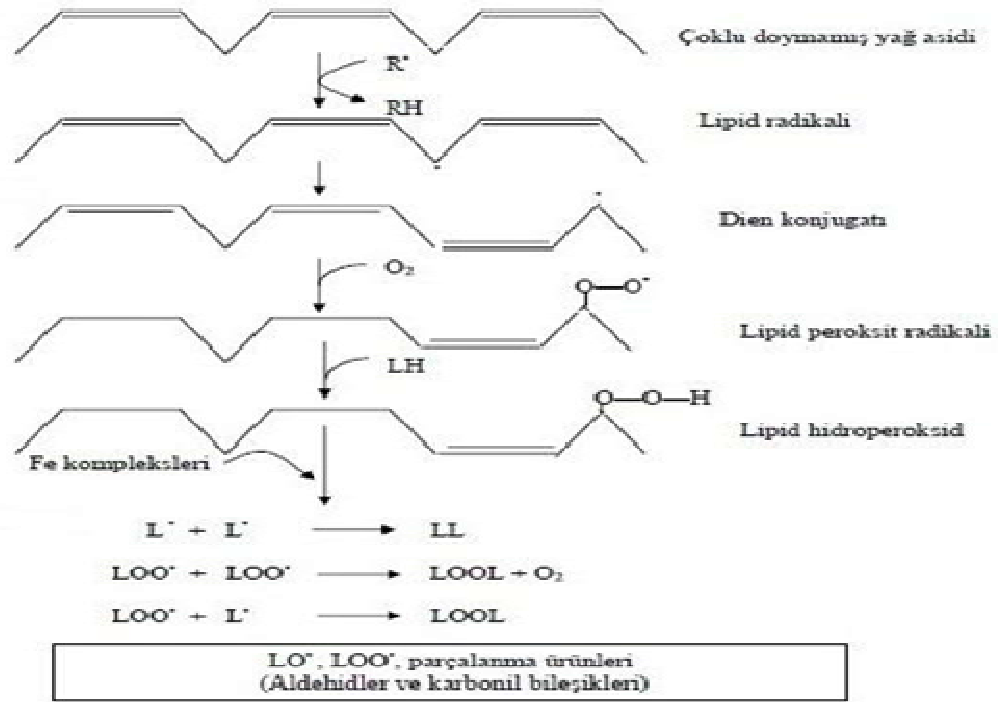
Normal metabolizma sırasında ya da patolojik yolla ortaya çıkan serbest radikaller, protein, yağ, karbonhidrat ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verir.

2.4.1.1. Oksidatif Stresin Lipidlere Etkisi

Lipidler, reaktif oksijen ürünlerinin toksik etkilerine en duyarlı yapılardır. Serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal olay, lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asiti zincirindeki α -metilen gruplarından hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Serbest radikal etkisiyle yağ asiti zincirinden hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asiti zincirinin radikal niteliği kazanmasına neden olur, oluşan lipid radikali (lipid radical, L) dayanıksız bir bileşik olup, bir dizi değişikliğe uğrar (Jones ve diğerleri, 1979).

Molekül içi çift bağ aktarılması ile oksidasyon ürünü olan dien konjugatları oluşur. Lipid radikalin moleküler oksijenle reaksiyona girmesi ile lipid peroksid radikali (lipid peroxide radical, LOO) oluşur. Bu lipid peroksid radikalleri de zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumunu sağlamakta, kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid hidroperoksidlerine (lipid hydroperoxide, LOOH) dönüşür (Şekil 10). Lipid peroksidasyonu, LOOH'ın aldehid ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesi ile sona erer (Yapar, 2014).

Lipidlerden oluşan lipid peroksil (LOO) radikalleri OH radikallerinden daha etkin olarak hasar yapabilmektedirler. Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucunda malondialdehid (Malondialdehyde, MDA) oluşur. MDA miktarı, tiyobarbitürik asit (TBA) testi ile ölçülmekte ve bu yöntem lipid peroksit düzeylerinin saptanmasında kullanılmaktadır (Uçgun ve diğerleri, 2005).



Şekil 10. Lipid peroksidasyonu (Sharma ve Agarwal, 1996).

Ortaya çıkan bu lipid peroksit ürünleri organizmada;

1.Membranların yapı ve fonksiyonlarında bozukluklara yol açarlar.

2.Triptofan ve sistein gibi amino asitleri etkileyerek protein yapısını bozar ve hasar meydana getirirler.

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

4.Hücre membranına yakın yerleşimdeki DNA molekülleri lipid peroksidasyonundan hasar görürler ve bazen DNA'nın replikasyonu yapılamaz (Sharma ve Agarwal, 1996).

2.4.1.2. Oksidatif Stresin Proteinlere Etkisi

Serbest radikaller, proteinler üzerine olan hasar yapıcı etkilerini, proteinlerde serbest radikal birikimi yaparak gösterir. Doymamış bağ ve sülfüt içeren moleküllerin serbest radikaller ile reaktivitesi yüksek olduğundan fenilalanin, sistin, sistein, tirozin, triptofan,

histidin, metionin, lizin gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir. Bunun sonucunda özellikle sülfür ve karbon merkezli radikaller meydana gelir. Bu reaksiyon sonucu albümin ve immunglobulin gibi fazla sayıda disülfid bağı bulunduran proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal fonksiyonlarını yerine getiremezler (Jones ve diğerleri, 1979).

2.4.1.3. Oksidatif Stresin Karbonhidratlara Etkisi

Geçiş metalleri tarafından katalizlenen bir reaksiyon ile serbest glikoz oksidasyona maruz kalır. Bunun sonucunda reaktif oksidanlar ve protein reaktif dikarbonil bileşikleri üretilir. Sinoviyal sıvının viskozitesinde önemli role sahip aminoglikan yapıdaki hyalüronik asit, serbest radikallerle etkileşerek bağ dokusunun stabilitesinin bozulmasına ve sıvının viskozitesinin kaybına neden olur (Yapar, 2014).

2.4.1.4. Oksidatif Stresin DNA Üzerine Etkisi

Serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona yol açarlar. Oksidatif hasar sonucu genetik materyalin sürekli olarak değişime uğraması mutagenesis, karsinogenesis ve yaşlanmada gözlenir. Çeşitli kanser dokularında serbest radikal aracılı DNA hasarının meydana geldiği ortaya konmuştur. DNA hasarını indükleyen reaktif oksijen bileşikleri, baz değişikliği, delesyon, çerçeve kayması, kromozom düzenlenmeleri tek veya çift zincir DNA kırılmaları, pürin, pirimidin bazları veya deoksiriboz modifikasyonuna ve DNA-protein çapraz bağlanmasına neden olmaktadır. DNA hasarı transkripsiyonun başlaması veya durmasına yol açabilir, ayrıca sinyal iletim yollarının indüksiyonu, replikasyon hataları ve genomik dengesizliğe neden olabilir (Tunc ve diğerleri, 2011).

OH radikali hem pürin ve pirimidin bazları ile hem de deoksiribozla etkileşime girerek DNA'yı hasara uğratar. Hidroksil gibi serbest radikal bileşikleri DNA bazları üzerinde geri-dönüşümsüz değişikliklere neden olurlar. Bunlardan en önemlileri timin ile hidroksil radikalinin oluşturduğu ürün olan timin glikol ve guanin ile hidroksil radikalinin oluşturduğu ürün olan 8-hidroksi guanindir. İlk kez insan idrarında belirlenen 8-hidroksi guanin önemli bir okside DNA ürünüdür. Bu ürün hem mutasyona hem de karsinogeneze neden olmaktadır (Schuppe ve diğerleri, 2008).

ROS, aynı zamanda sonuçta apoptoza yol açan bir reaksiyonlar zincirini başlatabilir. Apoptoz vücudun eski ve yaşlanan hücrelerini gideren doğal bir süreçtir; programlı hücre ölümü sürecidir. İnsan germ hücrelerinde apoptoz, anormal germ hücrelerini ortadan kaldırmak ve onların aşırı artışını önlemeye yardımcı olabilir. Birçok dış ve iç faktörler hücre apoptoz sürecini kontrol eder. Apoptoz süreci de ROS-bağlı DNA hasarını hızlandırılabilir ve sonuçta sperm sayısında bir azalmaya neden olabilir (Agarwal ve diğerleri, 2003).

Her spermatogenezis siklusu sırasında, germ hücrelerin yaklaşık % 75'i ölür. Sertoli hücreleri germ hücrelerinin sadece belirli bir miktarı için uygun bir ortam sağlamaktadır. Apoptoz ile Sertoli hücreleri tarafından desteklenmeyen germ hücreleri ortadan kaldırılır. Başka bir hipoteze göre apoptozisin, hücre döngüsünde kontrol noktalarını geçemeyen germ hücrelerini ortadan kaldırmak için kullanılan bir mekanizma olduğu söylenmektedir (Schuppe ve diğerleri, 2008).

2.4.1.5. Oksidatif Stresin Spermatozoonlara Etkisi

Sperma (ejakülat), spermatozoonlar ile epididimis, duktus deferens ve eklenik genital bezlere (prostat, seminal veziküller ve bulboüretal bezler) ait salgıları içeren pelte kıvamında, alkali reaksiyonda sıvı bir kitledir (Tanyolaç, 1999). Sperma kalitesi klasik olarak spermatozoonların sperma içerisindeki sayısı, motilitesi ve morfolojisine bakılarak değerlendirilir. Spermatozoon morfolojisi ile fertilizasyon potansiyeli arasındaki bağlantı birçok araştırmacı tarafından ortaya konmuştur (Ünal, 2016).

Spermatozoonlar ROS'un zararlı etkilerine duyarlıdır çünkü onların hücre zarları büyük miktarda doymamış yağ asitleri içerir. Lipidlerin esas görevi membran yapısını oluşturarak stabilizasyonunu sağlamak, kapasitasyon, akrozom reaksiyonu ve oosit-sperm füzyonunda rol almaktır. Lipit oksidasyon işlemi membran bütünlüğünün kaybı ve geçirgenliği, hücresel enzimlerin inaktivasyonu, yapısal DNA hasarı ve hücre apoptozunun artmasına yol açar. Sonuç olarak motilitesi, sayısı azalmış ve morfolojik olarak anormal spermatozoonlar oluşmaktadır (Schuppe ve diğerleri, 2008).

ROS tarafından sperm fonksiyon kaybı mekanizması çok boyutlu bir işlemdir. ROS'lar dişi genital sistemde yumurta hücresine ulaşan spermatozoonların kalitesini ve sayısını etkileyebilir. Buna ek olarak, ROS sperm-oosit füzyon olayları başlamasını engelleyerek döllenme sürecini bozar. Ayrıca, ROS'lar spermatozoonlarda DNA hasarına neden olarak

yavru sağlığını etkileyebilir ve embriyo gelişimini bozabilmektedir (Aitken ve diğerleri, 2003).

Motilite, spermatozoonların tuba uterinanın ampulla bölgesindeki yumurta hücresine (oosit II) ulaşması için çok önemli bir özelliktir. Yapılan çalışmalarda ROS seviyeleri ile spermatozoon motilitesi arasında negatif bir ilişki bulunmuştur. In vitro çalışmalarda azalan motilitenin geçici veya kalıcı olguları olabileceğini göstermiştir. Aşırı ROS geçici motilite bozukluğuna sebep olup axonemal proteinlerin fosforilasyonunda azalma ile ATP'nin hızla tükenmesine neden olur. Spermatozoon membran ve axonemal proteinler için peroksidatif hasarı sperm motilitesinde kalıcı bozulma nedeni olmaktadır (Pasqualotto ve diğerleri, 2000).

ROS'lar kaspazları aktive ederek spermatozoonların apoptozuna neden olmaktadır. Normal şartlar altında spermada bulunan anormal spermatozoonlar kendi varlıklarını en aza indirmek için apoptoza uğrarlar. Oligospermi ve azosperminin şiddeti ROS'un aşırı seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda genel olarak oksidatif hasarın şiddeti ile spermatozoon sayısı arasında pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Sikka, 2004).

Düşük miktarlardaki ROS, normal sperm-oosit füzyonu için gereklidir. Spermatozoon ve oosit, sperm-oosit füzyonu sırasında ROS'un aşırı üretimini önlemek için dahili bir mekanizmaya sahiptir, bu da süperoksit dismutaz (superoxide dismutase/SOD) salınımı ile olmaktadır. SOD üretiminde bir anormallik varsa, ROS üretimi kesintisiz devam ederek sperm ve oosite zarar verebilmektedir (Sikka, 2004; O'Flaherty ve diğerleri, 2006).

2.4.1.6. Endokrin Bozucuların Oluşturduğu Oksidatif Stresin Kan Testis Bariyeri, Germ Hücreleri ve Leydig Hücrelerine Etkisi

Endokrin bozucular olarak da isimlendirilen çevresel toksik maddeler, endokrin sistemde hormonlar gibi hareket ederler ve endojen hormonların fizyolojik işlevini bozarak infertiliteye katkıda bulunur, oksidatif stresi uyarır, BTB bütünlüğüne zarar verir, germ hücreleri, Leydig hücreleri ve Sertoli hücrelerini hedef alırlar (Sharpe, 2001).

Endokrin bozucular, insan dâhil hayvanlarda estrojenik ya da antiandrojenik tepkilerini indükleyebilen çok sayıda molekül içerir. Fenoller ve fitalatlar erkek infertilitesi ve gelişimsel anomalileri ile ilişkili diğer patolojilere neden olabilen endokrin bozucular arasındadır. Bisfenol A [2,2-bis (4-hidroksifenil) propan] (BPA), 4-nonilfenol (4-NP) ve di (2-etilheksil)

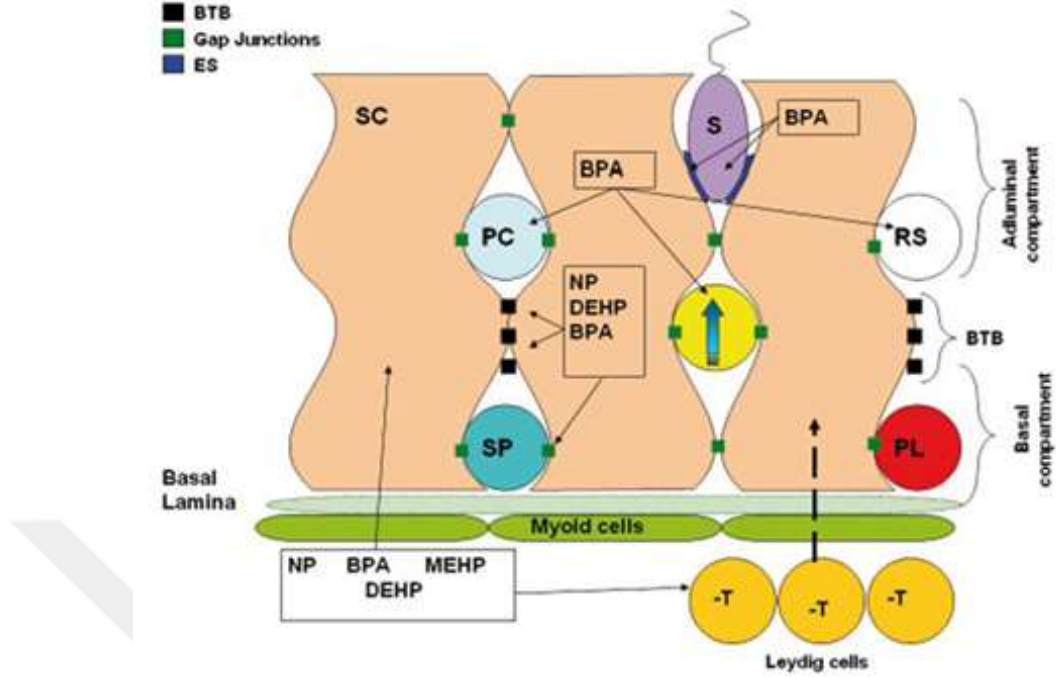
ftalat (DEHP) ve onun ana metaboliti mono (2-etilheksil) ftalat (MEHP) polikarbonat plastik, oyuncak, tıbbi cihazlar, gıda paketlenme, kozmetik sanayide ağırlıklı olarak bulunan kimyasallardır. İnsan vücudu 10 ug/gün BPA, 7.5µg/gün NP ve 30ug/gün DEHP'ye maruz kalır ve bu maddelerin serum, idrar, gebe annelerde amniyotik sıvıda, anne sütü gibi ve hatta spermaya geçtikleri tespit edilmiştir. Bu endokrin bozucular üreme sistemini olumsuz yönde etkileyerek infertiliteye neden olabilmektedir (French ve diğerleri, 2008).

Spermatozoon üretimi sırasında, apoptoz mekanizması hem içsel hem de dışsal yollar aracılığıyla seminifer tübül içinde germ hücrelerini korumak için oldukça önemlidir. Testis oksidatif stresindeki artışın, hücre apoptozunu ve daha sonra hipospermatogenezisi artırdığı bulunmuştur. EDs' lar da infertiliteye katkıda bulunur, oksidatif stresi uyarır, GJ iletişimi engeller, BTB bütünlüğüne zarar verir ve Sertoli hücresi hasarına neden olur (Safarinejad, 2009).

Hormonal değişiklikler yanı sıra, EDs' lerin aynı zamanda antioksidan enzim (örneğin, SOD, dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz) faaliyetlerinin azaltılması ve / veya lipid peroksidasyonunda bir artış yoluyla oksidatif strese neden olduğu bilinmektedir. Buna ek olarak, EDs neden olduğu oksidatif stres fosfoinositid 3-kinaz / c-Src / fokal adezyon kinaz (PI3K / c-Src / FAK) sinyal akışının fosforilasyonu ile testis hücreleri arasında hücre adezyon proteini fonksiyonunu bozabildiği tespit edilmiştir (Lenzi ve diğerleri, 2003).

Spermatogenezis sırasında, B tipi spermatogoniumlar BTB dışından bazal bölmesine ikamet eden preleptotene spermatositlere dönüşüyor. Ancak, hücrelerarası köprü üzerinden preleptotene spermatosit mayoz I / II ye hazırlanmak için adluminal bölmeye girmek için BTB geçmelidir. Bu olay bozulursa, bu da spermatogenezisde bir bozulmaya yol açar (Krinke, 2000). Örneğin kadmiyumun sıçanlarda geri dönüşü olmayan BTB bozulması ve fertilitiyi indüklediği belirlenmiştir (Siu ve diğerleri, 2009). Kadmiyumun yanı sıra, BPA'nın da kemirgenlerde BTB fonksiyonunu bozabildiği gösterilmiştir (Lenzi ve diğerleri, 2003).

Sertoli hücreleri bu bileşiklerin birincil hedefidir. Seminifer tübüller içinde kan testis bariyerinin ve gap junction yapısı bu endokrin bozucular tarafından bozulur (Şekil 11). Bu şekilde Sertoli hücrelerini etkileyerek spermatogonium (spermatogonia, SP), pakiten spermatosit (PC) ve preleptoten spermatosit (PIC) apoptozunu indükleyerek spermatozoon sayılarının azalmasına neden olur. Aynı zamanda Leydig hücrelerinin arasındaki CX43 ve CX36 protein yapılarını da bozarak Leydig hücre apoptozunu indükler, intratesticuler ve plazma testosteron (T) seviyelerini azaltır (Lagos-Cabre ve Moreno, 2012).



Şekil 11. Memeli testisinde BPA, NP ve MEHP'in başlıca hedefleri (Lagos-Cabre ve Moreno, 2012).

2.5. Antioksidanlar

Serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere organizmada antioksidan savunma sistemleri veya kısaca antioksidanlar olarak adlandırılan çeşitli savunma mekanizmaları gelişmiştir. Antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir. Sağlıklı bir vücut, pro-oksidanlar ve anti-oksidanlar oranını korumalıdır ve pro-oksidanlara karşı bu orandaki bir kayma, oksidatif strese yol açar. ROS düzeyleri patolojik olarak yüksek olduğunda, antioksidanlar oksidatif hasarı ya en aza indirgerler ya da tamamen ortadan kaldırır (Rangan ve Bulkley, 1993).

Antioksidanlar;

1. Oksijen ile reaksiyona girerek ya da onun yerini alarak lokal oksijen konsantrasyonunu azaltabilirler,
2. Katalitik metal iyonlarını bağlayarak radikal oluşumunu önleyebilirler,

3. Anahtar rol oynayan süperoksid ve hidrojen peroksid gibi reaktif oksijen türlerini uzaklaştırırlar,

4. Hidroksil, alkoksil, peroksil radikallerini temizleyebilirler. Peroksitleri alkol gibi nonradikal ürünlere dönüştürerek etkilerini gösterebilirler. Örneğin; glutatyon peroksidaz peroksitleri bu yolla temizleyen bir antioksidandır,

5. Etkilerini serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyerek yaparlar. Hemoglobin ve seruloplazmin bu şekilde etki gösterir.

6. Membran lipidlerini etkileyerek peroksit oluşturabilen tekil oksijeni baskılayabilir ya da temizleyebilirler (Gutteridge, 1995).

Antioksidanlar kaynaklarına göre organizmaya ait olanlar (endojen antioksidanlar) ve dışarıdan alınanlar (ekzojen antioksidanlar) olmak üzere başlıca iki ana gruba ayrılırlar (Tablo 2). Bunun yanı sıra radikal oluşumunu [metal şelatörler, SOD, katalaz (CAT), GSH-Px] ve oluşan radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, ubikinon, retinoik asit, β karoten, glutatyon, ürat) antioksidanlar şeklinde de ikiye ayrılabilirler. Ayrıca enzim olanlar ve enzim olmayanlar şeklinde de sınıflandırılabilirler (Cheeseman ve Slater, 1993; Eu ve diğerleri, 2000).

Tablo 2. Biyolojik sistemlerde antioksidan savunma.

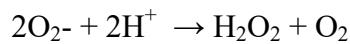
A) Endojen Antioksidanlar
1) Enzimatik antioksidanlar
Mitokondrial sitokrom oksidaz sistemi
Süperoksit dismutaz (SOD)
Katalaz (CAT)
Glutatyon peroksidaz (GSH-Px)
Glutatyon redüktaz (Glutathione reductase, GR)
Glutatyon-S-transferaz (Glutathione-S-Transferase, GST)
Hem oksijenaz (Heme oxygenase, HO)
2) Nonenzimatik antioksidanlar

Lipid fazda bulunanlar; α - tokoferol (E Vitamini), β -karoten, α -lipoik asit
Sıvı fazda (hücre sitoplazmasında veya kan plazmasında) bulunanlar; Albumin, Askorbik asit, Bilirubin, Glutasyon (Glutathione, GSH), Melatonin, Seruloplazmin, Transferrin, Ürik asit
B) Ekzojen Antioksidanlar
1) Ksantin Oksidaz İnhibitörleri: Allopurinol, oksipürinol, folik asit, pterin aldehyd, tungsten
2) İndirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) oksidaz inhibitörleri: Adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, non-steroid antienflamatuar ilaçlar, NADPH oksidaz monoklonal antikor
3) Rekombinant superoksit dismutaz
4) Diğer nonenzimatik serbest radikal toplayıcıları: Mannitol, albumin, bilirubin, 17-Aminosteroidler (Lazoroidler), glutasyon, urat
5) Demir redoks döngüsünün inhibitörleri: Desferrioksamin

2.5.1. Enzimatik Antioksidanlar

2.5.1.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

SOD süperoksit anyon dismutasyon reaksiyonlarını katalize eden metaloenzimdir. İntra- ve ekstrasellüler formları mevcuttur. Hücre içi enzimatik antioksidanlardan biri olan SOD, süperoksidin, hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize eder (Young ve Woodside, 2001)



O_2^- mitokondride mangan süperoksit dismutaz (Mn-SOD), sitoplazmada bakır süperoksit dismutaz (Cu-SOD)'ın etkisiyle H_2O_2 'e dönüşmektedir. Özellikle geçiş metal iyonlarının (demir, bakır) varlığında O_2^- ve H_2O_2 ferrik demiri (Fe^{+3}) ferro (Fe^{+2}) hale getirerek, serbest oksijen radikallerinden en reaktif ve hasar verici özelliğe sahip olan OH radikalini oluşturmak için kolayca parçalanabilir (Fraczek, 2005).

Düşük miktarlardaki ROS, normal sperm-oosit füzyonu için gereklidir. Sperm ve oosit, sperm-oosit füzyonu sırasında ROS'un aşırı üretimi SOD salınımı ile olmaktadır. SOD üretiminde bir anormallik varsa, ROS üretimi kesintisiz devam ederek sperm ve oosite zarar verebilmektedir. Sonuç olarak, spermatozoon akrozom reaksiyonu, zona pellucida bağlanması ve oosit penetrasyonu ile ilişkili gerekli biyokimyasal reaksiyonların başlaması mümkün olmamaktadır (Griveau ve Le Lannou, 1997; Fraczek, 2005).

2.5.1.2. Katalaz (CAT)

CAT moleküler oksijen ve suyun hidrojen peroksit ayrışımını hızlandırır. CAT, her bir polipeptit alt birimi yapısında tek bir ferriprotoporfirin içeren bir hemoproteindir. Bu enzim daha çok peroksizom olarak adlandırılan hücre organeli ile mitokondri, sitoplazma ve endoplazmik retikulum içinde bulunmaktadır. CAT, hidrojen peroksit kullanarak nitrik oksit tarafından uyarılan sperm hücre kapasitasyonunu aktive eden karmaşık bir mekanizmadır. CAT, hidrojen peroksit kullanarak nitrik oksit tarafından uyarılan spermatozoon kapasitasyonunu aktive eden bir mekanizmadır (Scibior ve Cieczot, 2006).

2.5.1.3. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px)

Antioksidan sistemin bir başka enzimi, hidrojen peroksit ve fosfolipidlerin peroksitler dâhil olmak üzere, organik peroksitlerin indirgenmesini katalize eden GSH-Px vardır. Sitozolde yerleşik olan GSH-Px, aktif sisteminde selenosistein şeklinde dört selenyum atomu bulunan bir metalloenzimdir. GSH-Px, redükte glutasyonu okside glutatyona dönüştürürken aynı zamanda H_2O_2 'i de suya çevirir. GSH-Px aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksit birikmesine ve hücre hasarına yol açar (Pfeifer ve diğerleri, 2001).

2.5.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar

2.5.2.1. Karoten

Karoten yağda çözünen organik bileşikler ağırlıklı olarak sarı, kırmızı, turuncu ve pembe bitkisel boyalar bulunan bir gruptur. Bu retinoidler, Vitamin A öncüleridir.

Karotenoidler hücre zarları ve epitel hücre çoğalmasını düzenleyen bütünlükten sorumlu doğal antioksidanlardır ve spermatogenez düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Onların eksikliği sperm hareketinde azalmaya yol açabilir (Hogarth ve Griswold, 2010).

Karoten yağda çözünen organik bileşikler ağırlıklı olarak sarı, kırmızı, turuncu ve pembe bitkisel boyalar bulunan bir gruptur (Yeşilayer ve diğerleri, 2008). A vitamininin metabolik ön maddesi olan beta-keroten düşük yoğunluklu lipoproteinler (low density lipoprotein, LDL) yapısında yer alır ve LDL'yi oksidasyona karşı korurlar. Karotenoidler, hücreleri oksidan strese karşı üç farklı şekilde korurlar:

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

2.5.2.2. Arginin

Pek çok hayvan ve bitki besiniyle alınabilen, vücutta glutamin, glutamat ve pralinden sentez edilebilen yarı esansiyel bir aminoasittir. Nitrik oksit sentezinin öncüsü olduğu için endotel fonksiyonunda yer alır, pek çok vasküler hastalığın patofizyolojisinde görülür. De novobiyosentezi yeterli arginin sağlamayabilir. Çocuk besin profilinde gerekliliği bildirilirken erişkin diyetindeki gereklilik belirsizdir. Çalışmalarda 1–15 gr günlük kullanımı ile sperm sayısı >10 milyon/ml olan subfertil erkeklerde sperm parametrelerinde iyileşme bildirilmektedir (NAS, 2009).

2.5.2.3. Çinko

Çoğu prostat bezinde olmak üzere vücutta 2–4 mg bulunan esansiyel mikromineraldir. DNA bağlanmasında kofaktör olan bir metalloproteindir. Bakır/çinko süperoksit dismutaz DNA hasarının onarılmasında yer alır (Ebisch ve diğerleri, 2007). Testis gelişimi ve spermiogenezde yer alır. Eksikliğinde hipogonadizm, testis-seminifer tübül atrofisi, sekonder seksüel karakterin gelişiminde gerilik görülür. Günlük 400 mg çinko ile semen parametrelerinde iyileşme görülmektedir (Colagar ve diğerleri, 2009).

2.5.2.4. Folat

Folat; DNA sentezi, RNA transferi, sistein ve metiyonin aminoasitleri için önemlidir. DNA sentezi germ hücrelerinde önemlidir, bu yüzden folat üreme için gereklidir. Ayrıca ROS'u süpürücü özelliği vardır (Joshi ve diğerleri, 2001). Kombine folat ve çinko kullanımı sonrası, fertil ve infertil erkeklerde toplam normal sperm sayısı artmıştır (Wong ve diğerleri, 2002; Colagar ve diğerleri, 2009).

2.5.2.5. Koenzim Q10 (Ubiquinone)

İç mitokondri zarında, flavoproteinler ile sitokrom arasında bağ kurarak, oksidatif fosforilasyonda rol alır. Vasküler patolojilerde, LDL peroksidasyonu damar sertleşmesine giden süreci başlatmaktadır (Bonakdar ve Guarneri, 2005). CoQ10 desteklenmiş bireylerde, plazmada ubiquinol artmakta ve LDL peroksidasyonuna direnç gelişmektedir. Sperm motilitesini sağlayan yoğun mitokondri enerjisi sağlam hücre zarı ve dengesini sağlayan CoQ10 bağımlıdır. Seminal sıvıda yoğun olan CoQ10 hücre içi ve hücre dışı hareketlilik göstermektedir. Varikozel olgularında tedaviden sonra CoQ10'un antioksidan-oraracı ihtiyacı hücre içi ve dışı transport etkinliğinin azalmasıyla ortaya çıkmaktadır. Gonadotropin (r-FSH) tedavileri sonrasında da CoQ10 artışı olmaktadır. Sperm parametrelerinde değişme görülmesi de fertilizasyonda artış bildirilmektedir (Balercia ve diğerleri, 2009). Yapılan bir çalışmada 6 ay 300 mg/gün CoQ10 kullanımı sonrasında seminal sıvıda ve spermatozoonda CoQ10 artışı ile mitokondrinin solunum zincirinde düzelme, antioksidan kapasitenin artışı ve sonuçta sperm parametrelerinde özellikle ileri hareketlilikte artış, spontan gebelik ve üremeye yardımcı tedavi yöntemleri kullanımı ile fertilizasyonda artış bildirilmiştir. Serum inhibin B seviyeleri artarken, FSH düşmesi sadece sperm fonksiyonu değil, Sertoli hücre fonksiyonunda da artış görülmesini açıklamaktadır (Safarinejad, 2009).

2.5.2.6. Glutatyon

Glutatyon (glutathione), başta karaciğer olmak üzere pek çok dokuda yüksek düzeylerde bulunan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptittir (Yapar, 2014; Yılmaz, 2006). Suda çözünen antioksidan ve indirgeyici bir ajandır. Glutatyonun pek çok metabolik

görevi vardır. Glutasyon, serbest radikaller ve peroksidlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidan hasara karşı korur (Mitchel ve Russol, 1987; Compoti, 1987). Ayrıca protein yapısındaki -SH gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller. Amino asitlerin membrandan transportunu sağlar (Ziegler, 1985). Hemoglobinin methemoglobine dönüşmesini önler. Glutasyon ayrıca lipid oksidasyonuna karşı hücre zarlarını korur ve serbest oksijen oluşumunu engeller. Glutasyon açığı motilite bozukluğu ile sonuçlanır ve spermatozoon orta parça instabilitesine yol açar. Tek taraflı sperm ya da boşaltım sistemi iltihabı ile kısır erkeklerde glutasyon takviyesi sperm parametrelerinde önemli bir iyileşme yol açar. Bir glutasyon öncüsü de sperm hareketliliğini artırır ve sperm DNA oksidatif hasar görmesini önleyen N-asetil vardır (Safarinejad ve Safarinejad, 2009). Günlük 600 mcg intramüsküler kullanımı ile sperm kinetiğinde iyileşme, morfolojide düzelme bildirilmiştir (Lenzi ve diğerleri, 1993).

2.5.2.7. Vitamin E

Yağda çözünen bir antioksidandır. Besin kaynaklı beta- gama-delta tokoferoller ise çok düşük konsantrasyonlu moleküllerdir. Vitamin E doz bağımlı bir etkisi var gibi görünen; süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerini temizleyen sperm membran antioksidanıdır (Agarwal ve diğerleri, 2007). Vitamin E antioksidan etkisini, oksidatif yağ peroksidasyonunun tekrarlayan zincir reaksiyonunu durdurarak göstermektedir (Gupta ve diğerleri, 2005; Hathcock ve diğerleri, 2005). Vitamin E' nin etkisi az miktarda selenyuma bağlıdır. Lipid peroksidasyonunu önleyen mekanizma esnasında oluşan hidrojen peroksit moleküllerinin redükte olması selenyum bağımlı glutasyon peroksidaz ile olmaktadır (Önder, 2011).

Vitamin E'nin günlük 800 mg üstü dozları karaciğer ve yağ dokusunda depolanarak toksik etki oluşturabilir. Tromboflebit, kanama-pıhtılaşma bozukluğu, gonadal disfonksiyon, prokarsinogenik etkisi çalışmalarda gösterilmiştir (Chen ve diğerleri, 2005). İnfertil erkekte tavsiye edilen günlük alınması gereken doz (recommended daily allowance, RDA) 15 mg/gün olmakla birlikte, 1000 mg/gün tolere edilebilir üst limit olarak bildirilmektedir. Yapılan bir çalışmada uzun süreli 400 mg/gün üstünde kullanımının spermatozoon mortalitesinde artışa neden olabileceği bildirilmiştir (Chen ve diğerleri, 2005). Astenospermik erkeklerde vitamin E tedavisi sonrası lipid peroksidasyonu azalmakta, motilite ve gebelik oranları artmaktadır (Suleiman ve diğerleri, 1996; Önder, 2011).

2.5.2.8. Vitamin A

Antioksidan özellikleri güçlüdür ve NADPH-gulutatyon yolları ile re-oksidize olabilir. Tavsiye edilen günlük doz RDA 75 mg/gün olarak bildirilmektedir. Günlük 1000 mg üzerinde dozların pro-oksidan ve böbrek taşı oluşumunu başlattığı, 2000 mg/gün üzerinde spermatozoonda mortaliteye neden olduğu bildirilmiştir. Günlük 200–1000 mg dozları ile 4 haftalık sürede seminal sıvıda yüksek konsantrasyona ulaşılmaktadır. Motilitede düzelme yanında morfolojide de iyileşme görülmektedir. Tedavi sonrası üremeye yardımcı tedavi yöntemleri ile gebelik oranlarında artış bildirilmektedir (Hogarth ve Griswold, 2010).

2.5.2.9. Selenyum (Se)

Selenyum toprak, bitkiler ve suda farklı bileşiklerin yapısına giren ve hayvanlar için oldukça önemli esansiyel bir iz elementtir. Başta hücre zarlarını oksidatif zararlardan koruyan glutatyon peroksidaz olmak üzere birçok enzimin ögesidir, spermatozoanın özel bir proteininin yapısında bulunur, purin ve pirimidin bazlarına bağlanabildiği için RNA'da fonksiyonu vardır, prostaglandin sentezinde, esansiyel yağ asitleri metabolizmasında rol oynar ve bağışıklık mekanizmasında önemlidir (Swain ve diğerleri, 2000).

Selenyum biyolojik bir siklusla topraktan bitkilere, hayvanlara, insanlara geçer. Organizmada eser miktarda bulunduğu için dışardan alınması gerekmektedir (Karakılçık ve Aksakal, 1993). Asıl kaynağı toprak olduğu için besin ve yemlerdeki selenyum düzeyi topraktaki miktarlarıyla doğru orantılı olarak değişir. Şayet topraktaki selenyum miktarı yeterli düzeyde ise bu toprakta yetişen bitkilerle beslenen hayvan ve insanlarda selenyum düzeyi yeterli olurken, toprakta selenyum yetersizliği olan bölgelerde ise, yetersizlik belirtileri ortaya çıkmaktadır (Burk, 1978). Selenyum, bitkilerde selenometionin, Se-metil-selenometionin, selenosistin ve selenosistein (Tietz, 1986), hayvan dokularında ise genellikle selenometiyonin ve selenosistein olarak bulunur (Ullery, 1992).

Memelilerde inorganik ve organik selenyumun her ikisi de gıda gibi değerlendirilmektedir. İnorganik selenyum (selenit ve selenat) selenide indirgenmektedir. Organik selenyum ise selenosistein ve selenometiyonin olarak bulunmaktadır. Bu aminoasitler beta-liyaz tarafından selenide metabolize olmaktadır ve daha sonra selenoproteinlerin sentezinde kullanılmaktadır. Hidrojen selenid boşaltım yoluna girebilir ve

mono- di- veya tri-metilasyona uğrar. Trimetilasyona uğramış form temel boşaltım ürünüdür ve idrarda bulunur (Vadhanavikit ve diğerleri, 1993).

Selenoproteinlerin çeşitli biyolojik proseslerde kritik rol oynadığı bilinmektedir ve bunların birkaçı antioksidan savunma ile ilgilidir. Örneğin 4 glutatyon peroksidaz arasında sitozolik glutatyon peroksidaz ilk tanımlanan selenoproteindir ve hücreleri hidrojen peroksidi, serbest yağ asit hidroperoksitleri ve fosfolipid hidroperoksitleri azaltarak hücreyi peroksidatif hasara karşı korur (Brigelius-Flohe ve Flohe, 2003).

Selenyum esansiyel bir maddedir ve besin maddeleri ile yeterli miktarda alınması gerekmektedir (Kieliszek ve Błażej, 2013) Günlük 100 µg kullanımı ile sperm motilitesinde artış bildirilmiştir. Yetişkinler için günlük alınması gereken miktar yaklaşık 90 µg'dır. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, 19 yaş ve üstü yetişkinlerde selenyum için tolere edilebilir üst alım seviyesi günde 400 mikrogram veya 5,1 mikromoldur. Bunun üstündeki seviyeler toksik olarak kabul edilir (Rayman, 2000). Glutatyon peroksidaz enziminin kofaktörü olan eser element selenyum N-asetil sistein ile kombine olarak alan infertil erkeklerde FSH düşmüş ve tüm sperm parametreleri ile birlikte testosteron ve inhibin B yükselmiştir (Çiftci ve diğerleri, 2009; Mora-Esteves ve Shin, 2013). Selenyum normal testis gelişimi, oluşumu, sperm motilitesi ve işlevi için önemli bir mikro besindir. Selenyum eksikliği seminifer epitel atrofi, sperma üretimi bozuklukları, epididimide sperm sayısında azalma ve testis hacmi azalmasına yol açar (Safarinejad ve Safarinejad, 2009). Ayrıca selenyumun yalnız başına sperm DNA oksidatif hasarı engellediği bulunmuştur (Mistry ve diğerleri, 2012). Selenyum normal testis gelişimi, sperm motilitesi ve kapasitasyonu için önemli bir mikro besindir. Selenyum eksikliği seminifer epitelde atrofi, sperma üretim bozuklukları, epididimide sperm sayısında azalma ve testis hacminde küçülmeye yol açar (Önder, 2011).

Selenyum canlılarda düşük derişimlerde antioksidan role sahipken, yüksek derişimlerde ise toksik olduğu belirtilmiştir. (Douillet ve diğerleri, 1998). Selenyumun çoğu formu toksik değildir, toksisite, selenyumun kimyasal yapısı ve alınan miktarı yanında yaş, fiziksel yapı gibi diğer faktörler ile de ilişkilidir. Ağız yolu ile doğrudan alınan asidik selenyum (selenik asit), sersemlik hissi verir, tansiyonu düşürür, solunumu yavaşlatır ve sonuçta ölüme neden olur. Selenyum sülfid, hayvanlar için kanserojenik, dimetil selenit ise insanlar için toksik etkiye sahiptir. 1000mg/kg 'a kadar alınan Se kilo kaybı, körlük, ataksia, nörolojik rahatsızlık ve solunum güçlüğüne neden olur. Son zamanlarda Se zehirlenmesinin, glutatyon ile selonotrisülfidlerin karşılıklı etkileşmesi sonucu toksik süperoksit ve hidrojenperoksit dönüşmesi ile oluşabileceği belirtilmektedir (Barceloux, 1999; Tinggi, 2003).

2.6. Testis Dokusunu Etkileyen Çevresel Faktörler

Solunduğunda, ağız yoluyla alındığında, deriye nüfuz ettiğinde erkek ve dişilerin üreme fonksiyon ve kapasitelerini azaltan ve/veya doğacak bireyi etkileyecek kalıtsal olmayan olumsuz etkileri meydana getiren veya olumsuz etkilerin oluşumunu hızlandıran kimyasal maddelere “üreme için toksik kimyasal madde” denir (Tekbaş, 2006).

2.6.1. 4-Nonilfenol

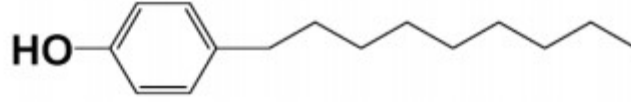
Nonilfenol etoksilatlar (NPE) ev içi, endüstriyel veya enstitüsyonel deterjan ve emülsiyonlaştırıcı olarak, deri ve tekstil işleme, lateks boya, plastik, kâğıt üretimi, temizlik deterjanlarının yapımında kullanılan endokrin bozucu bileşiklerdir (Shan ve diğerleri, 2011). Ayrıca bazı örnekleri pestisit formülasyonunda da kullanılmaktadır (Chokwe ve diğerleri, 2017). NPE, diş hekimliği, gıda ambalajlama, tekstil, zirai ilaç, deterjan, boya ve kozmetik ürünlerin üretiminde kullanılan plastik bileşimlerin yani alkilfenol etoksilatların bir bozunma ürünüdür (Urriola-Muñoz ve diğerleri, 2018). Dolayısıyla hem endüstriyel hem de evsel atık sular NPE'yi çevreye bırakmaktadır.

Ortama bir kez bırakıldıklarında, nonilfenol etoksilatlar; nonilfenol (NP), nonilfenol monoetoksilat, nonilfenol dietoksilat ve mikrobiyal dönüşüm ile oluşan bileşikler de dahil olmak üzere metabolik ara maddelere dönüşebilmektedirler (Ahel ve diğerleri, 1994).

NP'ler, nonilfenol etoksilat (NPE) üretiminde yaygın olarak (%65) kullanılmaktadır. NP'nin doğrudan veya dolaylı olarak birçok ortamda sıklıkla görülen ve en sık rastlanan kimyasallardan biri olduğu tespit edilmiştir. NP, nonilfenoletoksilatların geniş ve uzun süreli uygulanmasından dolayı, özellikle atık su artıkları ve çamurlardaki diğer kirleticilerden daha yüksek konsantrasyonlarda olduğu tespit edilmiştir (Gao ve diğerleri, 2017)

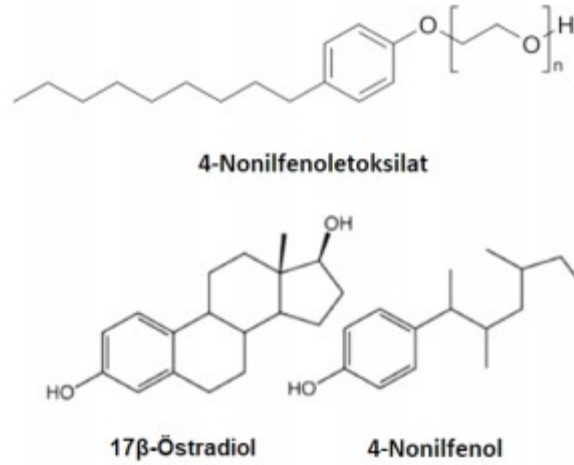
NP, alkil fenollerin alt kümesinden ve organik bileşikler ailesindendir. Sudaki çözünürlüğü 6 mg/L (pH 7)'dir. Etanol ve dimetilsülfoksit (DMSO) gibi çözücülerde iyi çözünmektedir. Alkil fenol etoksilatlar, temizlik ürünleri, boya, herbisit, pestisit gibi maddelerin yapımında kullanılan yüzey aktif bileşenleridir. Alkil fenol etoksilatların biyolojik olarak kolay parçalanma özelliği vardır ve parçalanma ürünleri biyodegradasyona karşı dirençli yapılardır (Warhurst, 1995).

NP, çeşitli alkil zincir yapısında ve ağırlıklı olarak 4-nonilfenol (>%90) (Şekil 12) formunda olan kompleks bir karışımdır (Sharma ve diğerleri, 2009). İyonik olmayan yüzey aktif maddeler için NPE ve tris (nonilfenil) fosfit formu başta olmak üzere pek çok çeşidi endüstriyel uygulamada yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu kimyasallar, daha sonra ortamı ve gıdayı kirleten NP'ye dönüşmektedir (Kawamura ve diğerleri, 2016).



Şekil 12. Nonilfenolün kimyasal yapısı (Sharma ve diğerleri, 2009).

17β-Östradiol ve 4-NP kimyasal yapıları açısından çok benzerlik göstermektedir (Şekil 13). Bu nedenle 4-NP bu dişilik hormonunun bütün fonksiyonlarını taklit etme yeteneğine sahiptir. 4-NP diğer BPA gibi östrojenik kimyasallardan daha güçlü bir östrojenik aktiviteye sahiptir (Lyons ve diğerleri, 2014). 4-NP, östrojen reseptörü ile etkileşime girip cinsel davranış ve üreme sistemini etkileyebilmektedir (Christiansen ve diğerleri, 1998).



Şekil 13. 4-Nonilfenoletoksilat, 17β-Östradiol, 4-Nonilfenol yapılarının karşılaştırılması (Lyons ve diğerleri, 2014).

Son yıllarda NPE'lar için artan talep ve üretim, 4-NP yayılımının kademeli olarak çevreye salınmasına yol açmıştır (Karci ve diğerleri, 2014). NP; su, hava, sediment ve toprakta tespit edilebilir derişimlerde bulunabilen bir kirleticidir ve çevredeki

konsantrasyonları ve yarılanma ömrü bulundukları ortamlara göre farklılık gösterebilmektedir (Zhang ve diğerleri, 1997).

4-NP, asit ve bazik çözeltilerde olduğu kadar UV ışığına maruz kalma koşullarında da kararlılığa sahip bir bileşiktir (Talsness ve diğerleri, 2009). Nonilfenoller, biyoakümülyasyon, düşük biyoyararlanım özelliği, kanserojenik, teratojenik ve mutajenik etkilerinden dolayı önem arz eden bileşiklerdir (Krupinski ve diğerleri, 2014). 4-NP, hepatik steatoz ile ilişkili olan karaciğer hepatotoksitesine ilişkin gen ekspresyonunu etkilemektedir (Kouroma ve diğerleri, 2015). Li ve diğerleri (2017), NP kaynaklı pankreas hasarının, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve oksidatif stres yoluyla meydana geldiğini, bunun da glikoz toleransının bozulmasına ve insülin sekresyonunda azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir.

2.7. Apoptozis

Canlı organizmalarda farklı hücre ölüm biçimleri vardır; nekroz, apoptozis, otofaji, paraptosis, onkozis (Fink ve Cookson, 2005). Bunlardan ilki hücrenin şişmesi, sitoplazmik vakuollerin oluşumu, şişmiş endoplazmik retikulum, zarar görmüş mitokondri, ribozomların parçalanması, bozulmuş organel zarlar sonucu oluşan şişmiş ve yırtılmış lizozomlar ve sonunda hücre zarının bozulması sonucu oluşan nekroz, diğeri ise ısı, ışık, radyasyon, hipoksi, sitotoksik antikanser ilaçlar, xenohormonlar ve organik çevresel kirleticilerin (PCB, dikloro difenil trikloroethan, DDT) neden olduğu apoptozistir (Elmore, 2007). Apoptozis için sinyal alındıktan sonra hücrede belirgin morfolojik değişimler gözlenir. Hücrenin membranla çevrili küçük parçalara ayrılması, çekirdek küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve DNA fragmentasyonu (180-200 baz çifti ve katları şeklinde) gözlenir. Ayrıca apoptotik hücreler komşu fagositik hücreler tarafından fagosite edildiklerinden toksik içerikleri çevre dokuya sızmaz ve yangı oluşmaz (Han ve diğerleri, 2008).

Apoptozis, organizmanın ihtiyaç duymadığı, biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerin zararsız bir biçimde ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Öztürk, 2002). Morfolojik değişiklikler ve enerji bağımlı biyokimyasal mekanizmalar ile karakterize olan apoptozis; kimyasallar ile indüklenen hücre ölümü, embriyolojik gelişim, hormona bağımlı atrofi, immun sistemin yapısal ve fonksiyonel gelişimi için hayati bir öneme sahiptir. Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr, Wyllie ve Currie tarafından özel bir morfoloji gösteren hücre ölümleri için kullanılmıştır

(Elmore, 2007). Ökaryotik organizmalardaki hücreler doğar, belirli bir süre yaşar ve sonra ölürlür. Yaşam süresi hücre tipine göre değişmektedir. Örneğin; barsak hücreleri 3–5 günlük bir yaşam süresini takiben ölürken, derinin epidermal hücreleri 20–25 günlük bir süre sonunda ölmektedir. Tüm bu ölümler fizyolojik şartlarda meydana geldiği için bu ölüm şekli fizyolojik hücre ölümü (physiological cell death) olarak da adlandırılır (Ulukaya, 2003).

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

2.7.1. Apoptozis Mekanizmaları

Apoptozisin indüklenmesinde üç tip sinyal yolunun rol aldığı bilinmektedir.

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

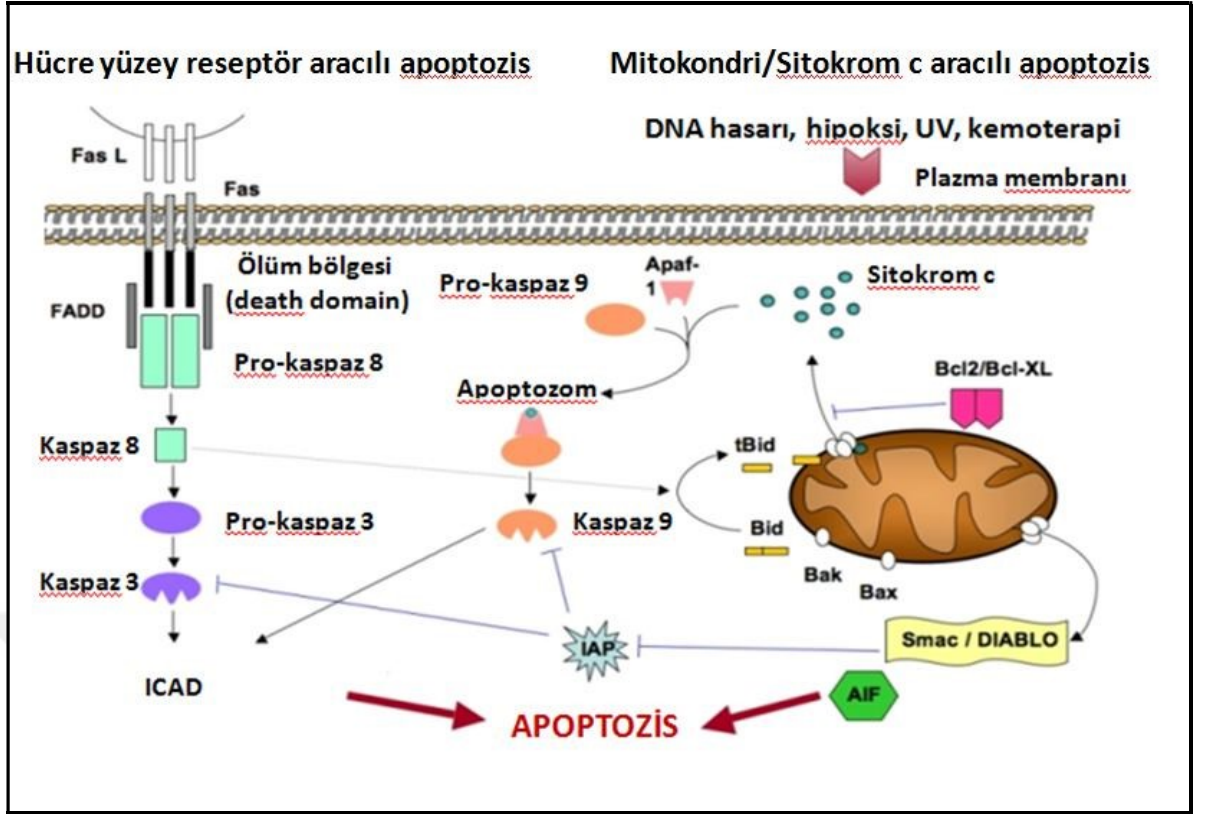
2.7.1.1. Mitokondri/Sitokrom c Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Bcl-2 özellikle mitokondri dış membranında bulunmakta ve iyon transportunu düzenlemektedir. Bax ve bad sitozolde bulunur ve apoptotik uyarı alınması halinde mitokondri membranına bağlanırlar, burada küçük delikçikler (pore) oluşumunu indükler, böylece selektif iyon permeabilitesi kaybolur, sonuçta sitokrom c ve apoptozis-indükleyici faktörün (apoptosis inducing factor, AIF) mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar (Kaneda ve diğerleri, 1999). Sitokrom c, mitokondri iç membranında bulunan elektron transport zincirinin bir proteinidir. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salıverilmesi apoptozis yoluna girmiş bir hücrede dönüşümsüz bir döneme girildiğini işaret eder. Sitokrom c sitoplazmik protein olan apoptotik proteazları aktive edici faktör (apoptotic protease activating factor1, Apaf-1)'e bağlanır ve onu aktive eder, ardından adenosin trifosfatın (ATP) da katılımıyla

apoptozom adı verilen bir kompleks oluşur. Bu kompleks inaktif olan prokaspaz-9'un aktif kaspaz-9 haline dönüşmesini sağlar. Aktif kaspaz-9 ise efektör kaspazlardan prokaspaz 3'ü aktive eder (Kikuchi ve diğerleri, 2009; George ve diğerleri, 2010; Singh ve diğerleri, 2011; Park, 2012). Aktif kaspaz 3, ICAD'ı inaktifleştirir, böylece ICAD'ın bağladığı CAD serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur (Şekil 14) (Kaufmann ve Gores, 2000; Kikuchi ve diğerleri, 2009; Nadege ve diğerleri, 2009).

2.7.1.2. Hücre Yüzeyindeki Reseptörlere Bağlanan Ölüm Aktivatörleri İle Tetiklenme

Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (APO-1, CD95) ve TNFR-1'in ilgili ligandları ile etkileşime girmesi (uyarılımaları) sonucu indüklenir. Bu hücre yüzey reseptörleri, membranda bulunur ve TNFR ailesinin üyesidirler (Essmann, 2000). Fas ve TNFR-1, ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olduklarından bir seri protein-protein interaksiyonlarından geçerler. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri (death domain) adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain-TNFR-1 ilişkili ölüm bölgesi) ve FADD (Fas associated death domain-Fas ilişkili ölüm bölgesi) ile interaksiyona girerler. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirir (Şekil 14) (Nadege ve diğerleri, 2009). Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden proteinler de bulunmaktadır. Kaspaz 8, FLIP (FLICE-inhibitory protein-FLICE'yi baskılayan protein)'i inhibe eder (Ulukaya, 2003; George ve diğerleri, 2010; Singh ve diğerleri, 2011). Kaspaz-8 (kaspaz-9 gibi) diğer kaspazları (kaspaz-3, -6, -7) uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar (Yılmaz, 2005; Singh ve diğerleri, 2011).



Şekil 14. Hücre yüzey reseptör ve mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozisin tetiklenmesi (Nadege ve diğerleri, 2009).

2.7.1.3. Endoplazmik Retikulum Aracılı Apoptozis Oluşturulması

Endoplazmik retikulum (ER) protein sentezini, stres durumlarında hücresel cevabı ve hücre içi Ca^{++} düzeyini düzenler. Ca^{++} homeostazisindeki değişiklikler ve ER'de protein birikimi ER'nin stresine neden olur. Çeşitli kimyasal toksinler, oksidatif stres, Ca^{++} iyonoforu içeren toksinler ve glikosilasyon inhibitörleri ER'nin stresine ve devamında hücre ölümüne neden olur. Kaspaz-12'ye bağımlı ER aracılı apoptotik yol, mitokondrial/sitokrom-c ve ölüm reseptör aracılı apoptozisten farklı bir yoldur. Kaspaz-12, ER membranında lokalize olan ve ER aracılı apoptozis için esas teşkil eden bir kaspazdır. Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin ER'yi etkilemesi ile prokaspaz-12 aktifleşir (Mosserova ve Kralova, 2012).

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

Gong ve diğlerleri (2009), ratlarda yapmış olduğu bir çalışmada, endüstriyel alanda yüzey gerilimini azaltıcı olarak kullanılan nonilfenolün hem hücre içi Ca^{++} seviyelerini artırarak hem de ER’de morfolojik değışiklere (lumenin genişlemesi) neden olarak Sertoli hücrelerinde ER stresi oluşturduğunu, buna bağlı olarak da apoptozise yol açtığını belirlemişlerdir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Araştırmada 30 adet yetişkin erkek Sprague Dawley rat (250-300 g/ 90 günlük), materyal olarak kullanılmıştır. Ratlar, araştırma süresince 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık ortamda, konvansiyonel koşullarda, ad libitum su ve yem ile beslendi. Çalışma süresince ortam sıcaklığının $24\pm1^{\circ}\text{C}$, nemin ise % 50-55 olarak olması sağlandı. Bütün prosedür etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi (Etik Kurul Onay Karar No:64583101/2016/107).

Materyal beş gruba ayrıldı ve her grup için altışar adet rat kullanıldı. Ratlara 4-nonilfenol (4-nonylphenol, 4-NP) (Acros-416240010) 125 mg/kg/gün dozda uygulandı (Qui ve diğerleri, 2019). Bu amaçla 4-NP, 0.5 ml mısır yağı ile karıştırılarak oral gavaj yoluyla verildi (Han ve diğerleri, 2004a). Selenyum (sodyum selenite, Na_2SeO_3) (Sigma-214485) 0,5 mg/kg/gün dozda (Hadrub ve diğerleri, 2016) 0,5 ml serum fizyolojikte eritilerek yine oral gavaj yoluyla verildi.

Deneme grupları aşağıda belirtildiği şekilde oluşturuldu.

1.Grup (Kontrol Grubu): Ratlara herhangi bir uygulama yapılmadı.

2.Grup (Sham Grubu): Bu grupta hayvanlara 48 gün boyunca 0,5 ml mısır yağı ve 0,5 ml serum fizyolojik verildi.

3.Grup (NP grubu): Ratlara 48 gün boyunca 4-NP 125 mg/kg/gün dozda uygulandı.

4.Grup (Se): Selenyum 48 gün boyunca 0,5 mg/kg/gün dozda uygulandı.

5.Grup (NP+Se grubu): Bu grupta hayvanlara 48 gün boyunca, selenyum uygulandıktan bir saat sonra 4-NP uygulandı.

Çözücü etkisini eşitlemek amacıyla; çözücü olarak mısır yağı kullanılan 4-NP grubuna Se grubunun çözücüsü olan serum fizyolojik, serum fizyolojik kullanılan Se grubuna da 4-NP çözücüsü mısır yağı aynı miktarlarda verildi. Dolayısıyla sham kontrol grubuna da hem mısır yağı, hem de serum fizyolojik uygulaması yapıldı.

Deneme başlangıcında ve deneme süresi boyunca hem kontrol hem de deney grubunun 3-4 gün arayla vücut ağırlıkları ölçüldü ve kaydedildi. Uygulama süresi sonunda, ratlar gece

boyunca aç bırakıldı ve ertesi sabah tartılarak canlı ağırlıkları belirlendi. Uygulamalar bittikten 24 saat sonra ksilazin-ketamin ile anesteziye alınan ratların kan örnekleri alındı, daha sonra servikal dislokasyon ile ötenazi uygulanan ratların testisleri çıkarıldı, her iki testisin ağırlıkları ayrı olarak tartıldı. Sağ testislerden hazırlanacak olan doku örnekleri Bouin's solüsyonunda 24 saat tespit edildi. Bouin's solüsyonunda tespit süresini tamamlayan doku örnekleri, sırasıyla % 50'lik alkolde 48 saat ve % 70'lik alkolde 12 saat bekletildikten sonra % 80'lik alkole alınarak rutin doku takip işlemi uygulandı, sonrasında parafinde bloklandı. Sol testisler ise MDA ve SOD analizleri için, alüminyum folyoya sarılarak, deney aşamasına kadar -80 °C de olan dondurucuya kaldırıldı.

Hayvanların kauda epididimisleri bistüri yardımı ile ayrıldı. Kauda epididimisler 5-6 kez makasla kesilerek 200 µl'lik PBS damlaları içinde 30 dakika 35,5 °C'de inkübe edildi. Bu sayede spermanın PBS içine difüzyonu sağlandı ve süre bitiminde kauda epididimisin doku parçaları ortamdand ayrıldı. Böylelikle sperma süspansiyonu elde edildi.

3.2. Yöntem

3.2.1.Histolojik Yöntem

Hazırlanan parafin bloklardan 6 µm kalınlığında, 200 µm aralıklı seri kesitler alındı. Her hayvandan seri olarak alınan 6 kesite genel histolojik inceleme ve histometrik değişikliklerin belirlenmesi için Crossman'ın üçlü boyama metodu uygulandı (Culling ve diğerleri, 1985).

3.2.1.1.Üçlü Boyama Metodunun Uygulanması

Bu amaçla aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

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

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

3. Kesitler çekirdeğin boyanması için 8' Weigert'in demir hemotoksilen solüsyonunda bekletildi. Daha sonra 5' süreyle akan çeşme suyunda yıkandı.

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

5. Kesitler bu kez sitoplazmanın boyanması için asit fuksin boya solüsyonuna 4 kez batırılıp çıkarıldı. Daha sonra dört kez distile suda çalkalandı.

6. Bağ doku beyazlaşmaya kadar yaklaşık 14' fosfotungstik asitte kesitler bekletildi. Sonrasında iki kez 5' distile suda yıkandı.

7. Kesitler, bağ dokunun boyanması için 1' anilin blue boya solüsyonunda bekletildi. Daha sonra dört kez distile suda çalkalandı.

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

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

10. Doku kesitleri iki defa 5' ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.2.1.2.Histometrik Değişimlerin Belirlenmesi

Gruplar için 7. ve 8. dönem tubulusların çapı ve epitelyum yüksekliği belirlendi. Bu amaçla, her hayvan için 6 adet seri kesitte rastgele seçilen yuvarlak ya da yuvarlağa yakın şekilli olan tubuluslardan 10'ar adet 7. ve 8. dönem tubulusun çapı -her tubulus için dört ölçüm- ve seminifer epitelyum yüksekliği –her tubulus için sekiz ölçüm- belirlendi.

Spermatogenezisin gerçekleşme yoğunluğunu belirlemek için, her hayvan için 6 adet kesitte olmak üzere, kesitteki 30 adet tubulustan kaç tanesinin 14. dönem tubulus olduğu belirlendi ve yüzdesi hesaplandı. Ölçümler Olympus BX43F araştırma mikroskobu ve Olympus cellSens Entry görüntü analiz programı yardımıyla interaktif olarak yapıldı.

3.2.2. İmmunohistokimyasal Yöntem

3.2.2.1. Strept Avidin-Biotin Kompleks (Strept ABC) Boyama Metodu

Dokularda apoptozis oranını ve gap junction iletişim yolu proteinlerinden konneksin 43 lokalisasyonunu belirlemek için her hayvandan altışar kesite anti-kaspaz 3 primer antikoru (Anti-caspase 3, Active antibody produced in rabbit, Sigma C8487) ve anti konneksin primer antikoru antikoru (Connexin 43, Rabbit Polyclonal, Bioss Lot 9F17V2) kullanılarak Strept ABC metodu uygulandı (Hsu ve diğerleri, 1981; Kim ve diğerleri, 2001).

Aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Organosilane ile kaplı lamlara alınan parafin kesitler bir gece boyunca 37°C'deki etüvde tutuldu.
2. Ertesi gün deparafinizasyon için parafin kesitler iki defa 5' ksilolde tutuldu. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serilerinden (% 100 alkol-I'de 3', % 100 alkol-II'de 3') geçirildi. Kesitler antijenik bölgelerin açılması için sitrat bufferda mikrodalgada 15' kaynatıldı ve 30' oda sıcaklığında soğutuldu ve fosfat tampon solüsyonunda (phosphate buffer saline, PBS, 50 mM sodyum fosfat, pH 7.4, 200 m M NaCl) iki kez 5' yıkandı.
3. Endojen peroksidazı yok etmek için hidrojen peroksid ile ön muamele yapıldı. Oda sıcaklığında 15' karanlıkta inkübe edildi.
4. Kesitler 0,1 M'lık PBS'te üç kez beşer dakika yıkandı.
5. Protein bloking solüsyonunda bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Daha sonra +4 derecede PBS ile dilüe edilmiş primer antikorda (kaspaz 3 primer antikoru 1/1000 dilüsyon, konneksin 43 primer antikoru 1/100 dilüsyon) bir gece inkübe edildi.
7. Kesitler, PBS'te iki kez beşer dakika yıkandı.
8. Sekonder antikorda 1 saat oda ısısında inkübe edildi.
9. Kesitler, PBSte iki kez beşer dakika yıkandı.
10. HRP (horseradish peroxidase) de 1 saat oda ısısında bekletildi.
11. Kesitler, PBS'te iki kez beşer dakika yıkandı.
12. DAB (3,3'-diaminobenzidine) solüsyonu eklendi ve 2' tutuldu. DAB solüsyonu ile oluşan kahverengi presipitasyonlar pozitivite olarak belirlendi.
13. Kesitler, PBS'te üç kez beşer dakika yıkandı.
14. Devamında üçer dakika artan alkol seviyelerinden geçirilerek, ksilol serilerinde beşer dakika bekletildikten sonra entellan ile kesitlerin üzeri kapatıldı.

Belirgin bir caspase 3 pozitif reaksiyon gösteren tübüllerin yüzdesi belirlendi. Bunun için her kesitte 30 adet tubul incelendi. CX 43 pozitifliği subjektif olarak değerlendirildi.

3.2.3. Biyokimyasal Yöntem

3.2.3.1. Karaciğer ve Böbrek Dokularında Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizi

Karaciğer ve böbrek dokularında oksidan ve antioksidan parametre analizlerinde ilk olarak doku homojenizasyonu yapıldı. Ardından karaciğer ve böbrek dokularında SOD, CAT, GSH ve MDA analizleri gerçekleştirildi.

3.2.3.1.1. Dokuların homojenizasyonu

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

Solüsyon 1: 1000 ml distile su içerisinde 21,29 g Na_2HPO_4 ve 8,76 g NaCl çözdürüldü.

Solüsyon 2: 1000 ml distile su içerisinde 20,42 g KH_2PO_4 ve 8,76 g NaCl çözdürüldü.

Solüsyon 1 den bir miktar alınarak solüsyon 2 yardımı ile pH 7,4'e ayarlandı ve böylece 150 mM fosfat tamponu elde edildi.

Yöntem:

Ötenazi işleminden sonra - 80 °C'ye kaldırılan karaciğer ve böbrek dokularından 0,5'er g tartıldı. Tartılan kısım 150 mM fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkandı. Kurutma işlemi sonrası doku örneği 5 ml fosfat tamponla 2000 devir ve 1 dakika süreyle buzlu su dolu kap içerisinde teflon başlıklı homojenizatörde homojenize edildi. Homojenizatlar + 4 °C'de 12 000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantlar total protein, SOD, CAT, GSH ve MDA analizinde kullanılabilecek kadar - 80 °C'de mikrosantrifüj tüpleri içerisinde saklandı.

3.2.3.1.2. Total protein analizi

Oksidan / antioksidan parametrelerin hesaplanmasında ara parametre olarak total protein analizi Biüret metoduna göre ticari total protein kiti (A2301, Archem Diagnostik Ind. Ltd., Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi.

Prensip:

Protein peptid bağları, absorbansı 520 – 560 nm’de ölçülebilen mavi – mor kompleksi oluşturmak için alkali solüsyondaki Cu(II) ile etkileşime girer. Her Cu(II) 6 peptik bağ ile kompleks oluşturabilmektedir. Tartarat tuzu stabilizasyonu sağlar, iyot molekülleri ise alkali bakır kompleksinin kendi kendine azalmasını engellemek için kullanılır.

Biüret ayırıcının içeriği:

Bakır sülfat 6 mM, sodyum potasyum tartarat 21 mM, potasyum iyodür 6 mM, NaOH 0,75 M olacak şekilde solüsyon hazırlandı.

Yöntem:

Kör, standart ve örnek için kullanılacak her bir mikrosantrifüj tüpüne total protein kiti içerisindeki biüret ayırıcından 1 ml eklendi. Süpernatantlar vorteksenerek örnek mikrosantrifüj tüplerinin içerisine 10 µl ilave edildi. Spektrofotometrede okumak üzere 2 adet kör ve 1 adet standart hazırlandı. Kör için 10 µl distile su kullanıldı. Standart için kit içerisinde bulunan standart çözeltisinden 10 µl mikrosantrifüj tüpüne ilave edildi. Tüpler vortekslendikten sonra 10 dakika süreyle 30 °C’de inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra spektrofotometrede kuartz küvetlerde köre karşı 546 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Sonuçlar g/dl olarak ifade edildi.

3.2.3.1.3. Süperoksit dismutaz (SOD) analizi

SOD aktivitesi Sun ve diğerlerinin (1988) yöntemine göre ölçüldü.

Prensip:

Reaksiyon ortamında enzimatik bir reaksiyon ile üretilen süperoksit radikallerinin, ortamda bulunan nitrotetrazolium mavi klorür (NTB) indirgemesinin, numunede bulunan SOD tarafından engellenmesi prensibine dayanır. Yöntemde süperoksit radikali üretimi

ksantin- ksantin oksidaz enzimatik reaksiyonu ile sağlanır. Ksantin, ksantin oksidaz enzimi vasıtasıyla ürik aside dönüştürülürken meydana gelen süperoksit radikalleri NTB varlığında reaksiyona girerek bu maddeyi indirgemesi sonucunda, maksimum absorbansı 560 nm’de veren formazon boyası oluştururlar. Ortama ilave edilen enzimin, üretilen radikalleri dismutasyona uğratması nisbetinde, NTB redüksiyon reaksiyonu yavaşlar ve sonuçta spektrofotometrede okunan absorbans değerleri düşer. Dolayısıyla, formazon oluşumunun inhibisyonunun tayin edilmesiyle SOD miktarı indirekt olarak saptanmaktadır.

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

Reaktif karışımı: 1225 µl × numune sayısı kadar çözelti

Ksantin oksidaz çözeltisi: 25 µl × numune sayısı kadar çözelti

CuCl₂ çözeltisi: 0,5 ml × numune sayısı kadar çözelti

Reaktif karışımı için hazırlanan çözelti içerisinde; 20 ml 10 kat sulandırılmış ksantin stok çözeltisi, 10 ml EDTA, 10 ml NTB, 6 ml Na₂CO₃, 3 ml sığır albümini bulunacak şekilde 49 ml reaktif karışımı elde edildi. Çözeltiler bu toplam miktar göz önünde bulundurulacak şekilde hazırlandı.

Ksantin stok çözeltisi hazırlanırken 23 mg ksantin üzerine 5 ml 0,1 N NaOH ve 45 ml distile su ilave edildi ve analiz günü 10 kat sulandırılarak kullanıldı. EDTA’nın 0,249 g’ı 1000 ml distile suda, NTB’nin 12,3 mg’ı 100 ml distile suda, Na₂CO₃’ün 4,2 g’ı 100 ml distile suda, sığır albüminin 100 mg’ı 100 ml distile suda, ksantin oksidaz çözeltisi 20 U olacak şekilde hazırlandı ve 2 ml 2 M amonyum sülfat içerisinde çözdürüldü. CuCl₂ ise 10,7 mg’ı 100 ml distile su içerisinde hazırlandı.

Yöntem:

Mikrosantrifüj tüplerinin içerisine vortekslenen süpernatantlardan 0,5 ml aktarıldı. Üzerine 250 µl etanol ve 150 µl kloroform eklenerek + 4 °C’de 12 000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi. Cam tüplere 1225 µl reaktif karışımı ve 250 µl örnek ilave edildi. Spektrofotometrede kör olarak kullanmak amacı ile 1225 µl reaktif karışımı üzerine 250 µl distile su ilave edildi. Numune ve kör olarak kullanılacak tüplerin üzerine 25 µl ksantin oksidaz ilave edilerek tüpler vortekslendi. Vortekslenen tüpler + 25 °C’deki su banyosunda 20 dakika bekletildi. Ardından 0,5 ml CuCl₂ ilave edilerek vortekslenen tüpler spektrofotometrede kuartz küvetlerde köre karşı 560 nm dalga boyunda okunarak hesaplama yapıldı. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.3.1.4. Malondialdehit (MDA) analizi

MDA analizi Ohkawa ve diğerlerinin (1979) metoduna göre yapıldı.

Prensip:

MDA analizi, serbest radikallerin hücre zarında oluşturduğu lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan MDA düzeyini belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Yöntemlerin çoğu MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile verdiği reaksiyonu temel alır. Bu metod MDA'nın asidik ortamda TBA ile oluşturduğu rengin 532 nm'de optik dansitesinin ölçülmesi prensibine dayanarak yapıldı.

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

Stok solüsyonu: 100 ml distile suda 2,07 ml %30'luk HCl, 0,37 g TBA, 15 g TCA çözdürüldü.

Yöntem:

Kapaklı cam tüp içerisine vortekslenen süpernatanttan 750 µl aktarıldı ve üzerine 1,5 ml stok solüsyondan eklendi. Vortekslenen cam tüpler 20 dakika + 100 °C'de kaynatıldı. Tüpler buzlu su içerisinde soğutulduktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Spektrofotometrede kuartz küvetlerde 532 nm'de havaya karşı okuma yapıldı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.3.2. Kanda Oksidan ve Antioksidan Parametre Analizi

Sıçanlardan alınan kanlarda oksidan ve antioksidan parametre analizleri gerçekleştirilirken GSH seviyesi ve CAT aktivitesi ölçülmeden önce ara parametre olarak kullanılacak olan hemoglobin miktarı hesaplandı.

3.2.3.2.1. Hemoglobin tayini

Prensip:

Drabkin solüsyonunda bulunan potasyum siyanit ve potasyum ferri siyanit ile hemoglobinin siyanomethemoglobine dönüşmesi ve oluşan rengin 540 nm'de spektrofotometrede ölçülmesi esasına dayanır.

Kullanılan çözeltilerin hazırlanması:

Drabkin çözeltisi: Balon joje içerisine koyulan 0,198 g $K_3Fe(CN)_6$, 0,052 g KCN ve 1 g $NaHCO_3$ üzerine distile su ilave edilerek 1 litreye tamamlandı.

PBS (fosfat tampon solüsyon): 200 ml distile suya 1 tablet atılarak hazırlandı.

Yöntem:

Hemolizat hazırlanması ve örneklerin muhafaza edilmesi: EDTA'lı tüplere alınan 1 ml kan örneği 3000 rpm'de 15 dakika süreyle santrifüj edildi. Tüpün dibindeki eritrositlerin başka tüpe aktarılmasının ardından pastör pipeti yardımıyla PBS ile 3 kez yıkandı. Her bir yıkama işleminden sonra tüpler 3000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Son yıkama ve santrifüj sonrasında dipte bulunan eritrositlerden 0,4 ml alınarak mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Üzerine 0,4 ml PBS ilave edilerek analizin gerçekleşeceği güne kadar - 80 °C'de muhafaza edildi.

Analiz günü içerisine 5 ml drabkin çözeltisi koyulan cam tüp içerisine vortekslenen hemolizattan 20 µl eklendi. Vortekslenen tüpler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra drabkin çözeltisi kör olarak kullanılarak spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda okuma yapıldı. Sonuçlar CAT aktivitesinin hesaplanması için g Hb/100 ml kan olarak ifade edildi. GSH seviyesinin hesaplanmasında ise aynı yöntem ile EDTA'lı tüplerdeki tam kan kullanıldı.

3.2.3.2.2. Süperoksit dismutaz (SOD) analizi

Kanda yapılan SOD analizi prensip ve yöntem olarak karaciğer ve böbrek dokularında yapılan SOD analizi ile benzer olup aralarındaki fark doku örneği yerine serum kullanılmış olmasıdır.

3.2.3.2.3. Malondialdehit (MDA) analizi

Serumda MDA analizi Ohkawa ve diğerleri (1979)'ye göre gerçekleştirildi. Serumda yapılan MDA analizinin prensibi karaciğer ve böbrek dokularında yapılan MDA analizi ile aynıdır.

Yöntem:

Kapaklı cam tüp içerisine koyulan 500 µl TBA ve 1250 µl TCA üzerine 250 µl serum aktarıldı. Cam tüpler + 95 °C'de 30 dakika boyunca kaynatıldı. Tüpler buz dolu kapta soğutuldu. Soğutma işlemi sonrası 2 ml n-butanol ilave edilerek tüpler vortekslendi ve ardından 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan kısımlar kullanılarak spektrofotometrede kuartz küvetlerde 535 nm dalga boyunda havaya karşı okuma yapıldı. Sonuçlar nmol/mg protein olarak ifade edildi.

3.2.4. Sitolojik Yöntem

Epididimislerden elde edilen sperma örnekleri sperma muayenesi yapılmak üzere iki gruba ayrıldı. Elde edilen sperma örneğinin bir bölümü eozin-nigrozin boyaması ile boyanarak (Hackett ve Macpherson, 1965), spermatozoonların ölü-canlı incelemesi ve sayımı Leica DMLB araştırma mikroskobu kullanılarak yapıldı.

Sperma örneğinin diğer yarısı Hancock solüsyonu ile tespit edilip froti hazırlandı (Hancock, 1952; Schafer ve Holzmann, 2000). Olympus CX41 Fazkontrast mikroskobu ile spermatozoon anomalileri belirlendi. Sayım yapılarak veriler kaydedildi.

3.2.4.1.Eosin-Nigrozin Boyama

1. Distile su ile %3'lük sodyum sitrat solüsyonu hazırlandı.
2. Solüsyon 63 santigrad derecede 25 dakika inkübe edildi.
3. Solüsyon 2' ye bölünerek ilk 50 ml' lik solüsyona 1 gr. eosin, diğer 50 ml.'lik solüsyona 3 gr. nigrozin eklendi.
4. Hazırlanan solüsyonlar 63 °C'de 30 dakika inkübe edildi ve süre bitiminde solüsyonlar birbirine karıştırıldı.

Eosin-nigrozin boyası (Dott ve Foster, 1972) hazır hale geldiğinde hazırlanan boya ve sperma mikropipet ile aynı oranda çekilerek lama damlatılıp karıştırıldı ve ardından froti çekilip ışık mikroskobu altında 100'lük objektifte ölü-canlı spermatozoon sayımı yapıldı (Hackett ve Macpherson, 1965). Her sperma örneğinden en az 200 tane spermatozoon olacak şekilde sayım yapıldı.

3.2.4.2.Hancock Metodu (Sıvı Fikzasyon Yöntemi)

Hazır olarak eppendorf tüpü içinde bulunan 1ml'lik Hancock solüsyonu içine 10 µl taze sperma mikropipetle alınıp ependorf tüpü içine aktarıldı ve mikropipet yardımıyla karıştırıldı. Ardından bu karışımdan mikropipet ile 5 µl çekilerek lam üzerine damlatıldı ve üzerine lamel kapatıldıktan sonra faz-kontrast mikroskobu altında normal-anormal spermatozoon sayımı yapıldı. Her sperma örneğinden en az 200 adet spermatozoon incelenerek normal-anormal yapıları belirlendi.

3.2.5. İstatiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (Statistical Packag for Social Sciences) for Windows 22 (for Windows version 15.0, seri no:416a1604ed18748d3f27) paket programı kullanıldı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen gruplar arası farklılık Kruskal Wallis testi ile incelendi. Farkın hangi grup veya gruplardan kaynaklandığını belirlemek için post hoc 97 multiple comparison testi yapıldı. Normal dağılım gösteren gruplar arası farklılık One-Way ANOVA testi ile değerlendirildi. Farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için Duncan testi yapıldı (Conover, 1980). Sayı olarak belirlenen değerler için Ki-kare metodu uygulandı. Yapılan istatistiksel analizlerden elde edilen sonuçlardan $p < 0.05$ olan değerler önemli kabul edildi. Tüm veriler ortalama ve $\pm$ standart hata olarak verildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut ve Testis Ağırlıkları

4.1.1. Vücut Ağırlığı

Ratların deneme süresi boyunca vücut ağırlıkları belirlendi. Gruplar arasında farkı belirlemek amacıyla 1.gün, 11.gün, 21.gün, 36.gün ve 48.gün ölçümleri karşılaştırıldı (Tablo 3). Vücut ağırlıkları açısından grup içinde ve gruplar arasında farklılık olmadığı tespit edildi.



Tablo 3. Deneme süresince kontrol ve deneme gruplarında belirlenen vücut ağırlıkları (gr).

Gün Grup	1. Gün (x ± S x)	11. Gün (x ± S x)	21. Gün (x ± S x)	36. Gün (x ± S x)	48. Gün (x ± S x)	
Kontrol 0	371,83±26,6	393,66±25,1	420,00±23,8	443,00±26,7	434,00±27,2	AD
Sham Kontrol 6	371,16±19,0	390,33±21,4	414,16±21,6	433,33±21,8	419,33±22,5	
4-NP 6	364,00±14,0	372,50±15,5	378,16±12,0	399,33±11,7	388,50±13,0	
Se 4	364,16±12,2	379,16±11,9	402,83±11,5	406,50±9,75	365,16±15,3	
4-NP+Se 7	370,33±12,1	377,83±10,3	378,33±8,80	387,50±9,78	388,50±13,0	
P	AD					

AD: Anlamli Değil

Gruplarda deneme süresince canlı ağırlık artışı incelendiğinde ilk 20 günde 4-NP grubunun ağırlık artışının az olduğu, Se grubunun ise yirmi günden sonra ağırlık artışının diğer gruplara göre çok az olduğu dikkati (Tablo 4) çekti. Hatta canlı ağırlık artışının 30. günden itibaren durduğu dikkati çekti. Denemenin 36-48. günleri arasında genelde canlı ağırlık kaybı izlenirken, en fazla canlı ağırlık kaybının Se grubunda olduğu

gözlendi

(Tablo

4).

Tablo 4. Grupların uygulama boyunca canlı ağırlık artış farkları (gr).

Grup (n=6)	Ağırlık Artışı 1-11. Gün Arası	Ağırlık Artışı 11-21. Gün Arası	Ağırlık Artışı 21-36. Gün Arası	Ağırlık Artışı 36-48. Gün Arası
Kontrol	21,83	26,17	23,00	-8,84
Sham Kontrol	19,17	23.83	19.17	-13.67
4-NP	8,5	5.66	21.17	-10.83
Se	15	23.67	3.67	-41.34
4-NP+Se	7,5	0.5	9.17	1.00

4.1.2. Testis Ağırlığı

Kontrol ve deneme gruplarına ait sağ ve sol testis ağırlığı ile Tablo 5’ de verildi. Testis ağırlıkları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

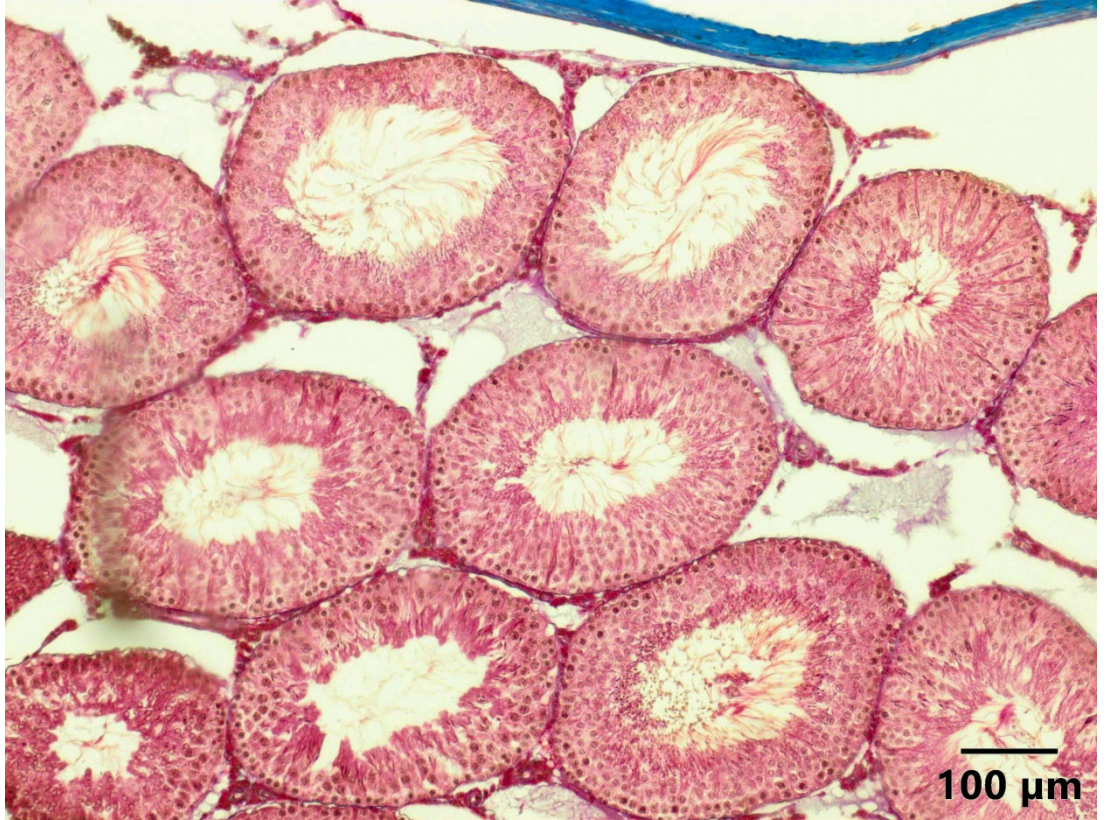
Tablo 5. Kontrol ve deneme gruplarında testis ağırlıkları (gr).

Grup (n=6)	Testis (sağ) (gr) (x ± S x)	Testis (sol) (gr) (x ± S x)
Kontrol	1,70±0,06	1,73±0,06
Sham	1,90±0,06	1,91±0,06
4-NP	1,77±0,07	1,78±0,07
Se	1,83±0,08	1,83±0,08
4-NP+Se	1,73±0,04	1,78±0,04
P	AD	AD

AD: Anlamlı Değil

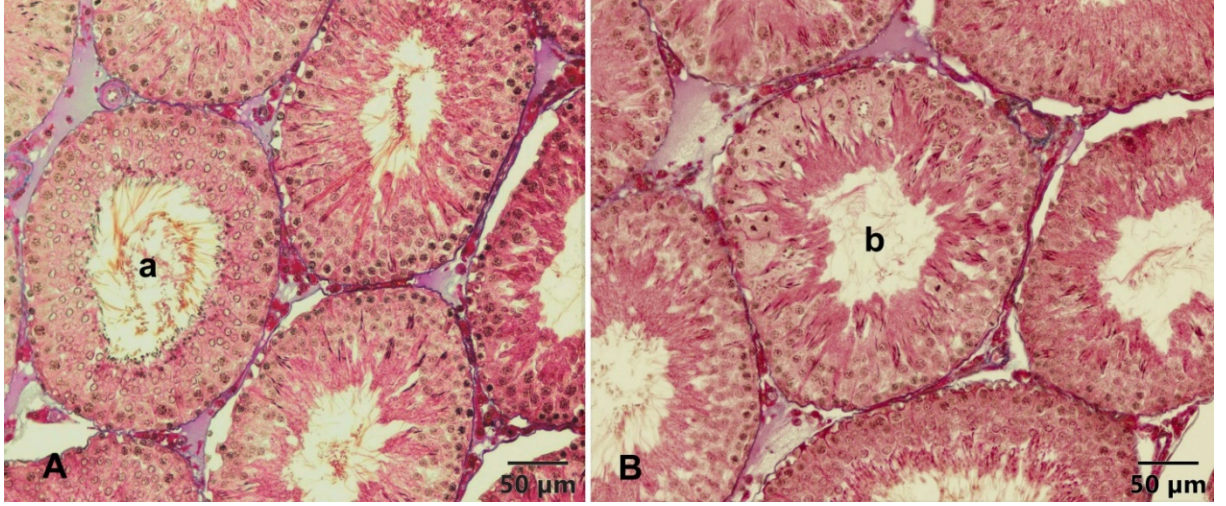
4.2. Histolojik Bulgular

Gruplarda testislerin genel histolojik görünümü için, Crossmanın üçlü boyama metodu uygulanmış kesitler (Şekil 15), ışık mikroskopunda incelendi. Tubulus seminiferus kontortusların genel görünümü, epitel hücre katmanı, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinin yapısı değerlendirildi.



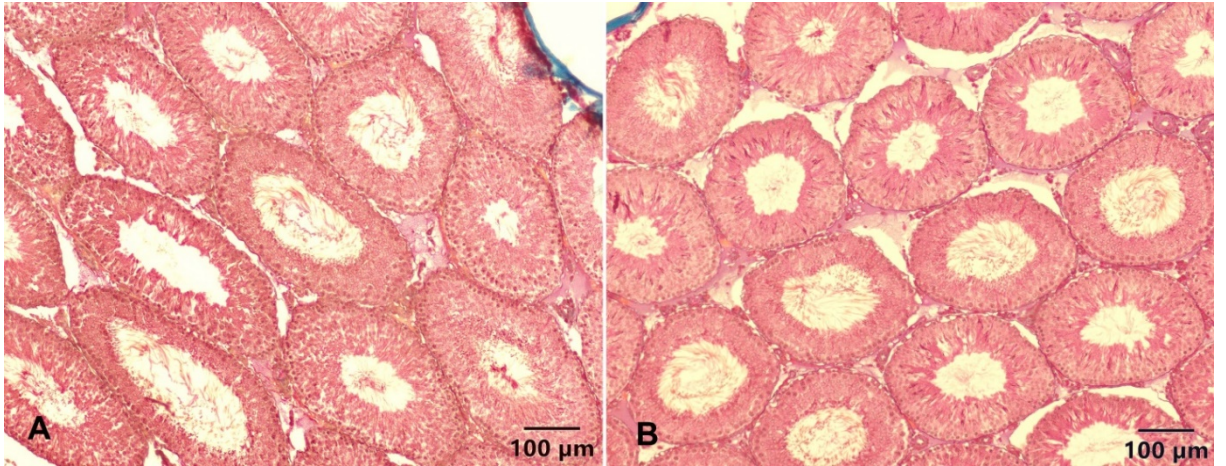
Şekil 15. Kontrol grubu tubulus seminiferus kontortus görüntüleri. Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.

Kontrol ve sham kontrol grubuna ait kesitlerde tubulus seminiferus kontortusların düzgün olduğu, Sertoli hücrelerinin ve intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinin düzenli olarak yer aldığı tespit edildi. Spermatogenetik epitel katmanının erişkin ratlarda gözlenen farklı spermatogenetik evreleri izlendi (Şekil 16).



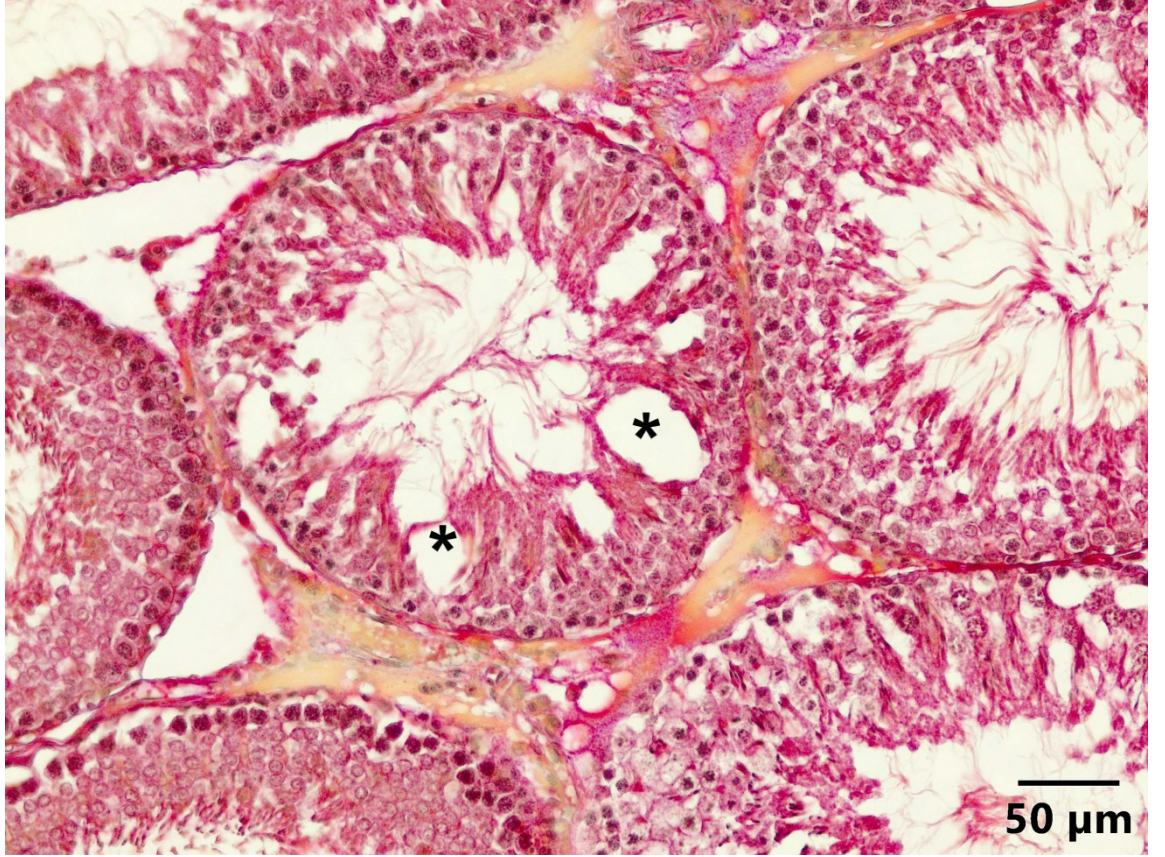
Şekil 16. A. Kontrol grubu testiste VIII. dönem spermatogenetik evrede olan tubulus seminiferus kontortus (a). B. Kontrol grubu testiste XIV. dönem spermatogenetik evrede olan tubulus seminiferus kontortus (b). Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.

Se ve 4-NF+Se gruplarına ait kesitlerde testis dokusunun genelde kontrol gruplarına benzer yakınlıkta olduğu görülmekle birlikte, epitel dökülmesi ve vakuol oluşumu gibi bazı histolojik değişiklikler de izlendi. Ayrıca 4-NF+Se grubunda tubuluslarda bir miktar küçülme dikkati çekti (Şekil 17).

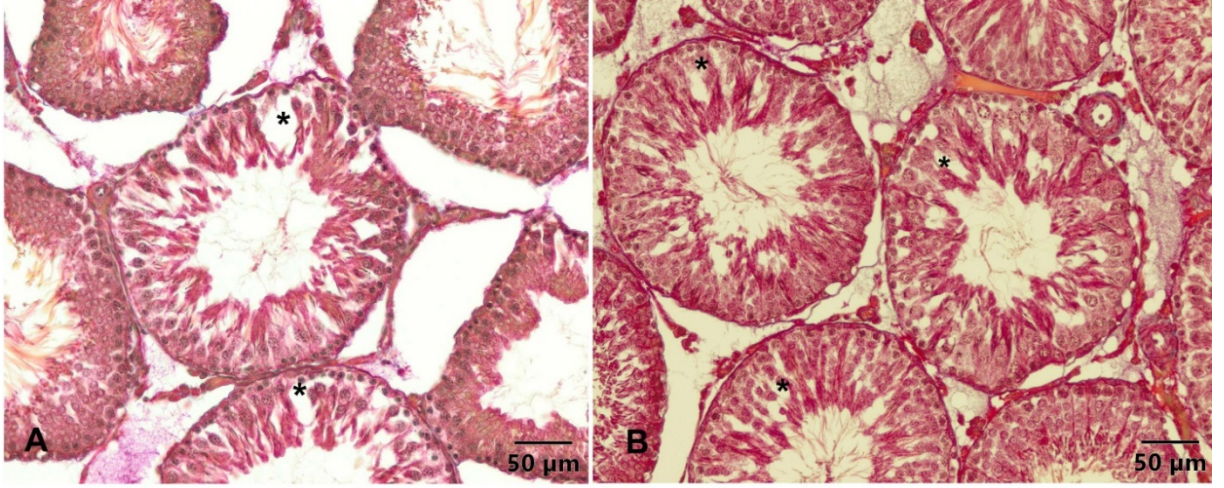


Şekil 17. A. Selenyum grubu testiste tubulus seminiferus kontortusların görünümü. B. 4-NP+Se grubu testiste tubulus seminiferus kontortusların görünümü. Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.

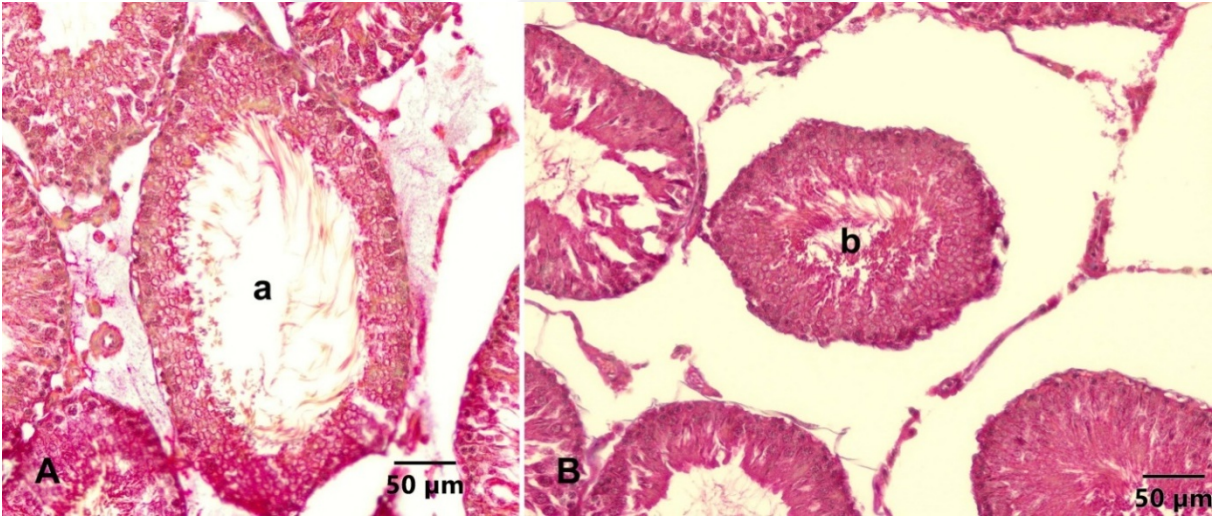
4-NP grubu ratlarında, seminifer tubullerde vakuol oluşumu (Şekil 18), germ hücrelerinin dökülmesi (Şekil 19), spermatogenik epitel katmanında incelme, tubulus çapında küçülme (Şekil 20) gibi histolojik değişikliklerin daha belirgin olduğu dikkati çekti. İnterstisyel alanda ödem oluştuğu ve interstisyel alanın genellikle genişlediği saptandı.



Şekil 18. 4-NP grubu testiste tubulus seminiferus contortus görüntüleri. Vakuol oluşumu (*). Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.



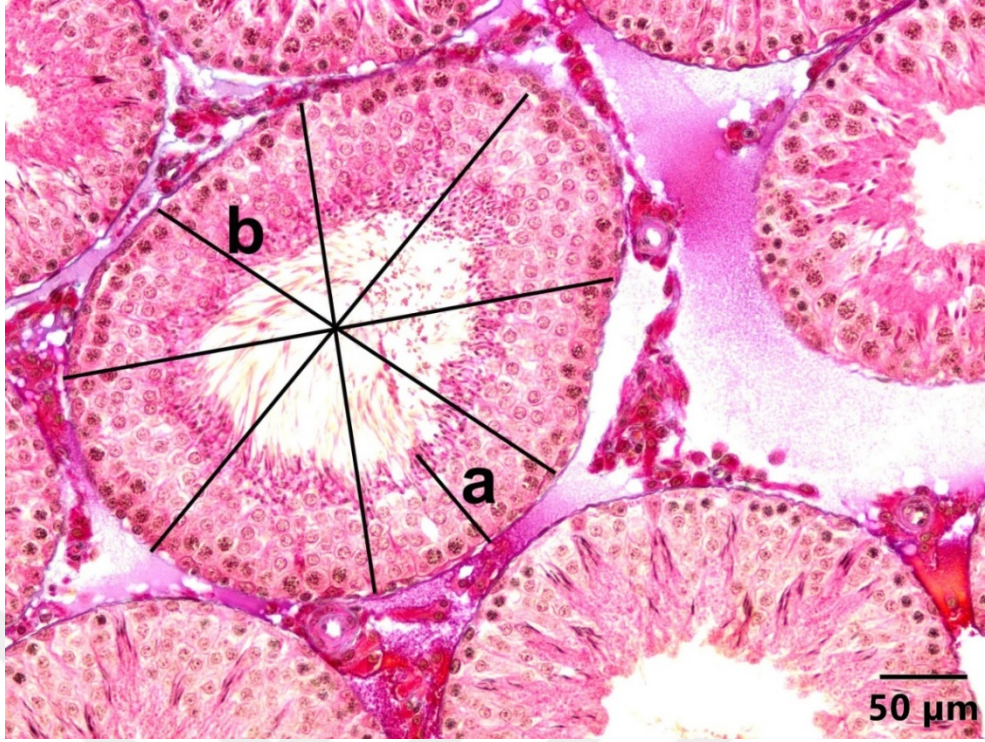
Şekil 19. 4-NP grubu testiste tubulus seminiferus contortus görüntüleri. Epitel dökülmesi (*). Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.



Şekil 20. 4-NP grubu testiste tubulus seminiferus contortus görüntüsü. A. Spermatogenetik epitel katmanında incelme (a), B. Tubulus seminiferus kontortusta küçülme (b) Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.

4.3. Histometrik Bulgular

Kontrol ve deneme gruplarında yuvarlak veya yuvarlağa yakın ait VII- VIII. dönem seminifer tubul çapları ve seminifer tubul epitel yükseklikleri belirlendi (Şekil 21). Elde edilen değerler Tablo 6'de verildi.



Şekil 21. Kontrol grubuna ait tubulus seminiferus kontortus çapı (b) ve epitel yüksekliği (a). Crossman'ın Üçlü Boyama Metodu.

Tablo 6. Tubulus seminiferus kontortus çapı ve epitel yüksekliği (μm).

Grup (n=6)	Tubul Çapı (μm) (x ± S x)	Epitel Yüksekliği (μm) (x ± S x)
Kontrol	292,68±5,09 ^a	69,10±1,44 ^a
Sham Kontrol	298,04±5,98 ^a	67,87±1,61 ^a
4-NP	270,20±2,71 ^b	52,38±0,79 ^d
Se	271,26±3,69 ^b	60,08±0,92 ^c
4-NP+Se	284,20±3,63 ^a	63,55±0,85 ^b
P	***	***

^{a,b,c,d} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki fark anlamlıdır.

***: P< 0.001

Tubulus çapı değerleri incelendiğinde (Tablo 6), 4-NP ve Se grubu seminifer tubulus çapının kontrol grubu, sham grubu ve 4-NP+Se grubu tubulus çapına oranla az olduğu ve farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($P<0.001$) bulundu. 4-NP+Se grubu tubulus çapının kontrol ve sham gruplarıyla benzer olduğu dikkati çekti.

Tubulus epitel yüksekliği incelendiğinde (Tablo 6) 4-NP grubuna ait değerlerin bütün gruplardan düşük olduğu ve farklılığın anlamlı olduğu ($P<0.001$) görüldü. Aynı şekilde Se grubunun epitel yüksekliği değerinin kontrol, sham kontrol, 4-NP+Se gruplarından düşük, 4-NP grubundan yüksek ve farklılığın anlamlı olduğu ($P<0.001$) tespit edildi. 4-NP+Se değerinin kontrol gruplarından düşük fakat 4-NP ve Se gruplarından yüksek olduğu ($P<0.001$) dikkati çekti.

Kesitlerde XIV. dönem tubulus ortalama sayıları belirlendi (Tablo 7). XIV. dönem tubulusun diğer dönemlere oranı (%) istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 8).

Tablo 7. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait XIV. dönem tubulus ortalama sayıları

Grup (n=6)	XIV. Dönem Tubulus Yoğunluğu ($\bar{x} \pm Sx$)
Kontrol	8,41±0,38
Sham Kontrol	9,44±0,26
4-NP	7,66±0,36
Se	9,38±0,32
4-NP+Se	11,30±0,33
P	AD

AD: Anlamlı Değil

Tablo 8. Kontrol, sham kontrol ve deneme gruplarına ait XIV. dönem tubulus % yoğunluk değerleri.

Grup (n=6)	XIV. Dönem % Tubulus Yoğunluğu ($\bar{x} \pm S_x$)
Kontrol	303 (%28,1) ^c
Sham Kontrol	340 (%31,5) ^b
4-NP	276 (%25,6) ^c
Se	338 (%31,3) ^b
4-NP+Se	407 (%37,7) ^a
P	***

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki fark anlamlıdır.

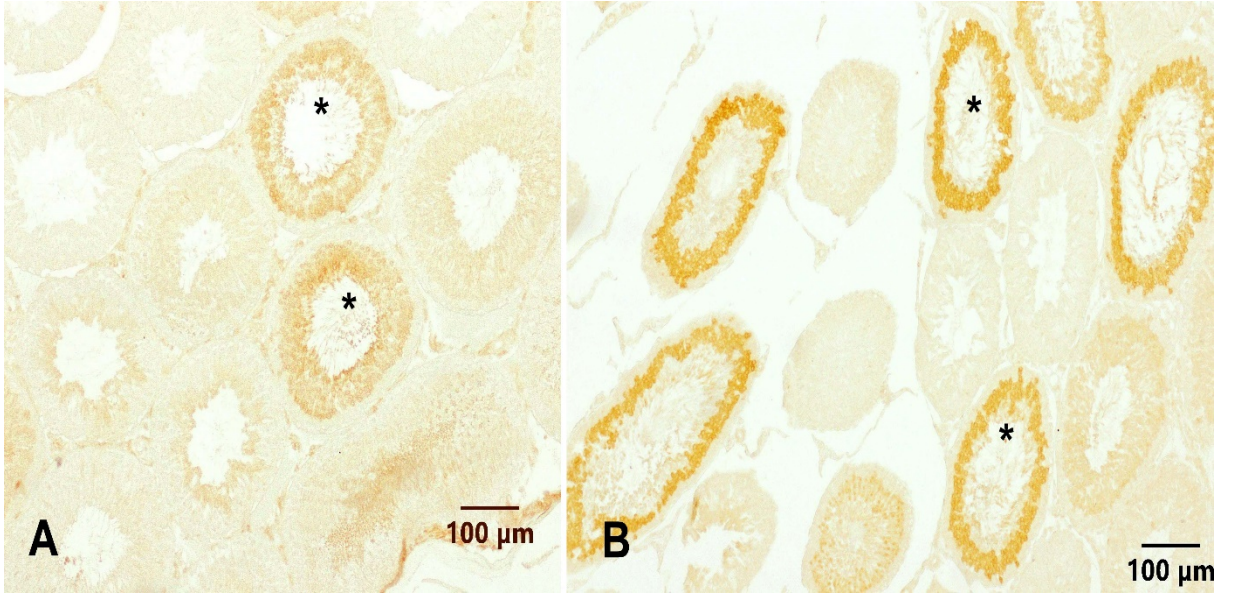
***: $P < 0.001$

Değerler incelendiğinde 4-NP grubunda XIV. dönem tubulus yoğunluğunun; sham kontrol, Se ve 4-NP+Se gruplarından anlamlı derecede düşük olduğu ($P < 0,001$) (Tablo 8) fakat kontrol grubu ile benzer ($P > 0.05$) tespit edildi. Se grubunun değerinin kontrol grubundan yüksek ($P < 0.001$) fakat sham grubuyla benzer olduğu ($P > 0.05$) görüldü. XIV. dönem tubulus yoğunluğu açısından en fazla değer 4-NP+Se grubunda olduğu ve bunun istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p < 0,001$) görüldü (Tablo 8). Bununla birlikte sham kontrol grubunun XIV. dönem tubulus yoğunluğunun kontrol grubundan fazla olduğu ($P < 0.001$) da dikkati çekti.

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.4.1. Kaspaz 3

Apoptozis oranını belirlemek için anti-kaspaz 3 primer antikoru kullanılarak dokularda kaspaz 3 yoğunluğu gösterildi (Şekil 22). Kaspaz 3'ün bazı tubullerde daha yoğun olduğu dikkati çekti.



Şekil 22. A. Kontrol grubunda kaspaz 3 yoğunluğu. *: Kaspaz 3 yoğunluğu daha belirgin olan tubuller. B. 4-NP grubunda kaspaz 3 yoğunluğu. *: Kaspaz 3 yoğunluğu daha belirgin olan tubuller. Strept ABC Boyama Metodu.

Kesitlerde belirlenen kaspaz 3 yoğunluğu belirgin olan tubullerin % oranları belirlendi (Tablo 9).

Tablo 9. Belirgin kaspaz 3 pozitif tubulusların yoğunluğu (%)

Grup (n=6)	Belirgin Kaspaz 3 Pozitif Tubulus (%)
Kontrol	837 (% 23,3) ^a
Sham Kontrol	851 (% 23,6) ^a
4-NP	1790 (% 49,7) ^b
Se	1082 (% 30,1) ^c
4-NP+Se	1207 (% 33,5) ^d
P	***

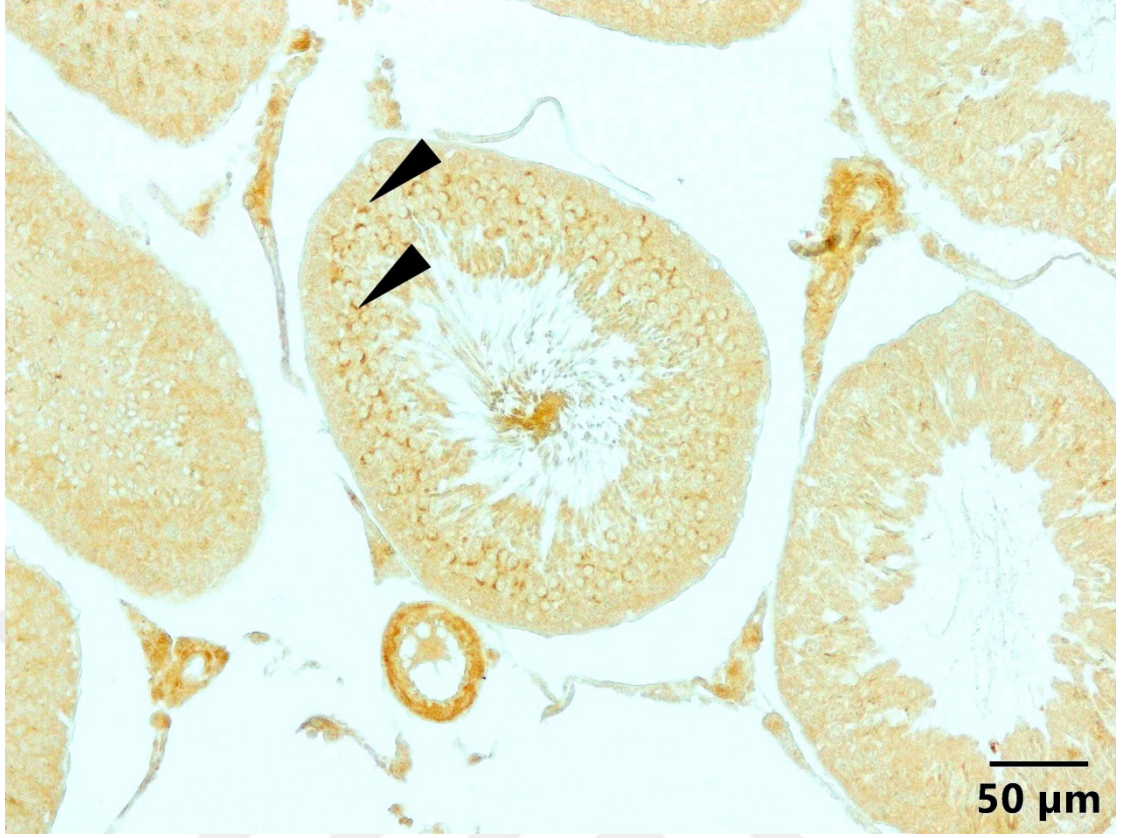
^{a,b,c,d} Aynı sütunda farklı harflerle gösterilen grup ortalamaları arasındaki fark anlamlıdır.

***: $P < 0.001$

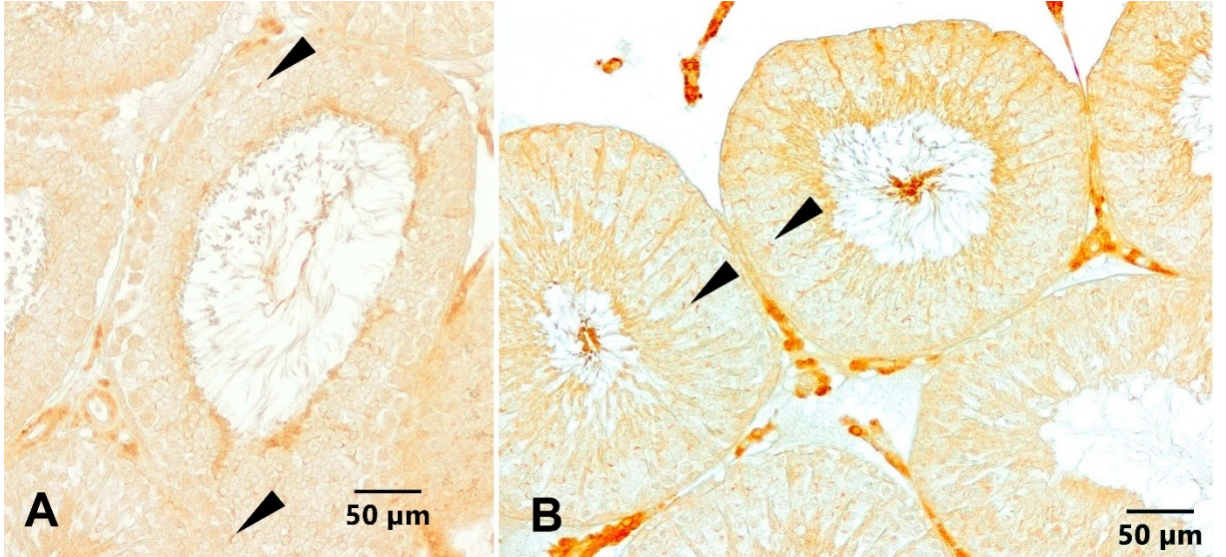
Belirgin kaspaz 3 pozitif tubulus yoğunluğu en az kontrol ve sham kontrol grubunda gözlemlendi ($P < 0.001$). En fazla belirgin kaspaz 3 pozitif tubulus yoğunluğu 4-NP grubunda tespit edildi ($P < 0.001$). Se ve 4-NP+Se gruplarında gözlenen belirgin kaspaz 3 pozitif tubulus yoğunluğunun da kontrol gruplarından fazla olduğu tespit edildi ($P < 0.001$) (Tablo 9).

4.4.2. Konneksin 43

Anti-CX43 primer antikor kullanılarak dokularda CX43 yoğunluğu belirlendi. Kontrol grubunda CX 43 pozitivitesinin 4-NP grubuna göre daha yoğun olduğu gözlemlendi (Şekil 23). 4-NP+Se grubunda da kontrol grubunda olduğu kadar olmasa da, 4-NP grubuna göre CX 43 pozitivitesinin daha yoğun olduğu belirlendi (Şekil 24). Leydig hücreleri arasındaki CX43 pozitivitesinin 4-NP'den etkilenmediği, Se alan gruplarda ekspresyonun arttığı dikkati çekti (Şekil 24).



Şekil 23. Kontrol grubunda CX 43 yoğunluğu (ok işaretleri).



Şekil 24. 4-NP (A) ve 4-NP+Se (B) grubunda CX 43 yoğunluğu (ok işaretleri).

4.5. Biyokimyasal Bulgular

MDA seviyesi ve SOD aktivitesi hem serumda (Tablo 10) hem de testis dokusunda (Tablo 11) belirlendi.

Tablo 10. Serum MDA seviyesi ve SOD aktivitesi.

Gruplar (n=6)	MDA (nmol/mg protein)	SOD (U/g protein)
Kontrol	0,81 ± 0,08 ^b	85,82 ± 1,94 ^b
Sham	0,80 ± 0,04 ^b	85,43 ± 4,12 ^b
4-NP	1,10 ± 0,05 ^a	53,25 ± 7,39 ^c
Se	0,75 ± 0,05 ^b	101,62 ± 5,94 ^a
4-NP+Se	0,81 ± 0,07 ^b	78,34 ± 5,77 ^b
P	*	**

^{a,b,c} Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasında istatistiksel açıdan önem vardır.

*: P< 0.05, **: P< 0.01, SOD; süperoksit dismutaz. MDA; malondialdehid.

Tablo 11. Testis dokusu MDA seviyesi ve SOD aktivitesi.

Gruplar (n=6)	MDA (nmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)
Kontrol	222,51 ± 8,97 ^b	5,33 ± 0,57 ^b
Sham	210,22 ± 15,80 ^b	5,12 ± 0,53 ^b
4-NP	303,72 ± 22,29 ^a	2,71 ± 0,45 ^c
Se	176,30 ± 5,03 ^c	6,26 ± 0,17 ^a
4-NP+Se	202,81 ± 16,03 ^{b,c}	5,79 ± 0,32 ^{a,b}
P	**	**

^{a,b,c}; Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasında istatistiksel açıdan önem vardır.

** : P< 0.01, SOD; süperoksit dismutaz. MDA; malondialdehid.

Sunulan çalışmada serum MDA değeri; kontrol, sham kontrol, Se ve 4-NP+Se gruplarında benzer ($P>0.05$) bulundu. En yüksek MDA değeri 4-NP grubunda kaydedildi ($P<0.05$) (Tablo 10). Testis dokusunda MDA değeri incelendiğinde yine en yüksek olarak 4-NP grubunda görüldü ($P\leq 0.001$) (Tablo 11). Ayrıca 4-NP+Se grubu MDA değerinin serumda olduğu gibi testiste de kontrol ve sham kontrol ile benzer olduğu ($P>0.05$) tespit edildi. Testis dokusunda en düşük MDA sonucunun Se ve 4-NP+Se grubunda olduğu ($P\leq 0.001$) kaydedildi (Tablo 11).

Antioksidan olarak SOD değeri incelendiğinde ise serumda en yüksek SOD değeri Se grubunda ölçüldü ($P<0.01$) (Tablo 10). 4-NP+Se ve kontrol gruplarının değerleri arasında fark gözlenmedi ($P>0.05$) (Tablo 10). Testiste ise en yüksek SOD değeri, Se ve 4-NP+Se gruplarında ($P<0.001$) kaydedildi. Kontrol grupları ve 4-NP+Se grubunun SOD verilerinin benzer olduğu dikkati çekti. En düşük SOD değerleri 4-NP grubuna ait serumda ($P<0.01$) (Tablo 10) ve testis dokusunda ($P<0.001$) kaydedildi (Tablo 11).

4.6. Spermatozoon Morfojisinin Değerlendirilmesi

4.6.1. Normal-Anormal Spermatozoon Değerlendirmesi

Anormal spermatozoonlar baş, orta parça, “S” şekilli ve kuyruk anomali olarak ayırt edildi. Gruplara ait normal-anormal spermatozoon sayım sonuçları belirlendi (Tablo 12).

Tablo 12. Normal- anormal spermatozoon sayım sonuçları.

Grup (n=6)	Anormal Spermatozoon
Kontrol	510 (%34) ^b
ShamKontrol	523 (%35) ^b
4-NP	1139 (%76) ^a
Se	489 (%33) ^b
4-NP+Se	648 (%43) ^b
P	***

^{a,b} Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasında istatistiksel açıdan önem vardır.

*** : $P< 0,001$

4-NP grubu sperma örneklerinde kuyruk anomalisi başta olmak üzere belirgin anomali izlendi. Diğer gruplar ile karşılaştırıldığında en yüksek anomali oranının 4-NP grubunda olduğu ($P<0.001$) görüldü (Tablo 12). Se ve hatta 4-NP+Se grubunda anormal spermatozoon sayısının, kontrol grupları ile benzer olduğu tespit edildi ($p>0.05$) (Tablo 12).

4.6.2. Ölü-Canlı Spermatozoon Değerlendirmesi

Hazırlanan frotilerde boyanan spermatozoonlar ölü, boyanmayanlar canlı olarak nitelerlendirildi. Gruplara ait ölü-canlı spermatozoon sayıları belirlendi (Tablo 13).

Tablo 13. Ölü-canlı spermatozoon sayım sonuçları.

Grup (n=6)	Canlı Spermatozoon Sayısı
Kontrol	1241 (% 83) ^a
ShamKontrol	1138 (% 75) ^{ab}
4-NP	513 (% 34) ^c
Se	943 (% 63) ^b
4-NP+Se	1036 (% 69) ^b
P	***

^{a,b,c,d} Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arasında istatistiksel açıdan önem vardır.

*** : $P<0,001$

Hazırlanan frotilerde 200 spermatozoonda ölü-canlı spermatozoon değerlendirilmesi yapıldığında, sayıca en az canlı spermatozoonun 4-NP grubunda ($P<0.001$) olduğu gözlemlendi. Kontrol gruplarına ait değerlerin birbirine benzediği, Se ve 4-NF+Se gruplarının canlı spermatozoon sayısının kontrol grubundan az ($P<0.001$) fakat sham kontrol grubu ile benzer olduğu kaydedildi ($P>0.05$) (Tablo 13).

5. TARTIŞMA

Sunulan çalışmada, antioksidan etkili olduğu bilinen selenyumun, ratlarda 4-NP ile oluşturulacak deneysel testiküler toksisitede koruyucu veya toksisite sonucu oluşan oksidatif hasarın giderilmesinde destekleyici rolünün olup olmadığının araştırılması amaçlanmıştır.

Yapılan araştırmada gruplar arasında vücut ağırlığı farkının oluşup oluşmadığı incelendiğinde, belirlenen vücut ağırlığı farklarının anlamlı olmadığı görüldü ($P>0.05$). Gruplarda deneme süresince canlı ağırlık artışı incelendiğinde ise ilk 20 günde NP grubunun ağırlık artışının az olduğu dikkati çekti. 4-NP'nin toksik etkisi başlangıçta etkin görünürken yirmi günden sonra hayvanlar 4-NP'ye uyum sağlamış olabilirler ya da eritici olarak kullanılan mısır yağının da besin desteği veya olası antioksidan etkisi bu sonucu doğurmuş olabilir. Mısır yağı, toksisite çalışmalarında lipofilik kimyasalların kemirgenlere uygulanmasında en yaygın araçlardan biri olarak kullanılmıştır. Rafine mısır yağı %99 triasilgliserollerden, %59 çoklu doymamış yağ asidinden (PUFA), %24 tekli doymamış yağ asidinden ve %13 doymuş yağ asidinden (SFA) oluşur (Dupond ve diğerleri, 1990).

Se grubunun ise yirmi günden sonra ağırlık artışının diğer gruplara göre çok az olduğu (Tablo 5) dikkati çekti. Nitekim denemenin 36-48. günleri arasında, genelde canlı ağırlık kaybı izlenirken, en fazla canlı ağırlık kaybının Se grubunda olduğu gözlenmiştir (Tablo 5). Raines ve Sunde (2011) yaptıkları çalışmada ratlara 5 µg Se/g diyeti verildiğinde 10. günden itibaren daha düşük vücut ağırlığına sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Jia ve diğerleri (2005) yaptıkları çalışmada, Sprague-Dawley erkek ve dişi ratlarda selenit ve yüksek selenyum proteininin, hiçbir yan etkinin gözlemlenmediği düzeyini 2 ppm Se olarak bildirmiş olup; bu miktarın erkekler için 0,14 mg/kg canlı ağırlık/gün'e ve dişiler için 0,20 mg/kg canlı ağırlık/gün'e eşdeğer olduğunu belirtmişlerdir. Bu miktarı aşan durumlarda vücut ağırlıklarında azalma gözlemiştir. Sunulan çalışmada Se, literatür doğrultusunda (Hadrub ve diğerleri, 2016), 0,5 mg/kg/gün dozda kullanılmıştır. Sonuçlardan farklı olarak, Antunes ve diğerleri (2001) erişkin Wistar ratlarda cisplatin kaynaklı (5 mg/kg) lipid peroksidasyonu ve nefrotoksisite üzerinde 1 mg/kg selenyum tedavisi uygulamışlar ve kontrol ile deneme grupları arasında vücut ağırlığı açısından fark bulamamışlardır.

Çalışmada uygulamaların testis ağırlığına etkisi incelendiğinde, anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($P>0.05$). Sunulan çalışmadan farklı olarak, Han ve diğerleri (2004a) dört

haftalık erkek ratlarda yaptıkları bir çalışmada, altı hafta boyunca oral gavaj yoluyla 125 ve 250 mg/kg NP uygulamasının artan dozla birlikte testis ve epididimis ağırlığını azalttığını tespit etmişlerdir. Bir diğer çalışmada (Chitra ve diğerleri, 2002) 45 günlük albino erkek ratlara 45 gün boyunca günlük 1, 10 ve 100 ug/kg dozda zeytinyağında çözdürülmüş 4-NP'nin oral yolla uygulamasının epididimis ve testis ağırlığını azalttığı belirlenmiştir. Sakr ve diğerleri (2011), erişkin ratlara 8 hafta boyunca her gün 1,35mg/kg dozda uyguladıkları endokrin bozucu olan karbimazolün, vücut ve testis ağırlığında azalmaya neden olduğunu, beraberinde yapılan selenyum tedavisi sonrasında ise vücut ve testis ağırlığının arttığını belirlemişlerdir. Testis ağırlığı konusunda literatürden farklı sonuçların elde edilmesi, ratların yaşı, uygulanan 4-NP çözücüsü veya uygulama sürelerinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

Sunulan çalışmada, 4-NP grubu dışındaki gruplarda (kontrol, sham kontrol, SE ve NP+Se) testis dokularının histolojik görünümünün, olması gereken histolojik görünüme sahip olduğu belirlendi. Kontrol ve sham kontrol grubuna ait kesitlerde tubulus seminiferus kontortusların düzgün olduğu, Sertoli hücrelerinin ve intersitisyel alandaki Leydig hücrelerinin düzenli olarak yer aldığı tespit edildi. Spermatogenetik epitel katmanının erişkin ratlarda gözlenen, farklı spermatogenetik evreleri izlendi. 4-NP grubu ratlarında ise seminifer tubullerde ise vakuol oluşumu, germ hücrelerinin dökülmesi, spermatogenik epitel katmanında incelme, tubulus çapında küçülme gibi histolojik değişikliklerin daha belirgin olduğu dikkati çekti. İnterstisyel alanda ödem olduğu ve interstisyel alanın genellikle genişlediği saptandı. Benzer şekilde Chen ve diğerleri (2014) yaptıkları bir çalışmada, erişkin erkek ratlara 90 gün boyunca oral gavaj yoluyla 0, 40, 100 ve 250 mg/kg NP uygulamasının artan dozlarla birlikte testis yapısını ve işlevini bozduğu belirlemişlerdir. Se ve 4-NP+Se gruplarına ait kesitlerde testis dokusunun genelde kontrol gruplarına benzer yakınlıkta olduğu görülmekle birlikte, epitel dökülmesi ve vakuol oluşumu gibi bazı histolojik değişikliklerin hafif derecede olduğu gözlemlendi. Ayrıca 4-NP+Se grubunda tubuluslarda bir miktar küçülme yine dikkati çekti. Benzer şekilde Attunes ve diğerleri (2001) erişkin erkek ratlara 7 mg/kg tek doz cisplatin (CIS) ve 2 mg/kg nano-Se intraperitoneal uyguladıklarında, CIS uygulamasıyla artan serbest radikal kaynaklı oksidatif stres düzeyinin nano-Se uygulaması ile azaldığını, anormal testis histolojik görünümünde iyileşmenin gözlemlendiğini ortaya koymuşlardır.

Tubulus çapı değerleri incelendiğinde, hem 4-NP grubu hem de Se grubu seminifer tubulus çapının kontrol grubu, sham grubu ve 4-NP+Se tubulus çapına oranla az olduğu ve

farklılığın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($P<0.001$). 4-NP+Se grubu tubulus çapının ise kontrol ve sham gruplarıyla benzer olduğu dikkati çekti.

Tubulus epitel yüksekliği incelendiğinde ise 4-NP grubuna ait değerlerin bütün gruplardan düşük olduğu ve farklılığın anlamlı olduğu ($P<0.001$) görüldü. Aynı şekilde Se uygulamasının da epitel yüksekliğini önemli oranda ($P<0.001$) düşürdüğü gözlemlendi. 4-NP ile birlikte Se uygulamasının ise epitel yüksekliğini artırmada faydalı olduğu ($P<0.001$) kaydedildi.

Elde edilen sonuçlara benzer şekilde, Urriola-Muñoz ve diğerleri (2018) NP'nin erkek üreme sisteminde seminifer tubul çap ve epitel yüksekliğinde azalmaya etki ettiğini göstermişlerdir. Sakr ve diğerleri (2011) yaptıkları çalışmada karbimazolün, seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliğini önemli ölçüde azalttığını, beraberinde yapılan selenyum tedavisi sonrasında ise seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliğinin arttığını belirlemişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada (Kara ve diğerleri, 2016) yine selenyumun iskemi–reperfüzyon hasarı üzerine olumlu etkileri olduğu gösterilmiştir. Söz konusu çalışmada (Kara ve diğerleri, 2016) testiküler torsiyondan üç saat sonra detorsiyon uygulanmış ve seminifer tubulus çapında azalma gözlenmiştir. Detorsiyondan 15 dk önce selenyum uygulamasının bu değerleri kontrol grubuna benzer düzeylere getirdiği belirlenmiştir. Sunulan çalışmada ise Se grubunda da tubulus çapının ve epitel yüksekliğinin azalmış olması dikkat çekici bulunmuştur. Literatürden (Sakr ve diğerleri, 2011; Kara ve diğerleri, 2016) farklı olan sonuç, kullanılan SE dozu ve uygulama süresinin farklılığından kaynaklanıyor olabilir.

XIV. dönem % tubulus yoğunluğu değerleri incelendiğinde sham kontrol grubunun değerinin kontrol grubu değerinden da fazla olduğu ($P<0.001$) (Tablo 8) görülmektedir. Bu durumun sham kontrol grubuna verilen mısır yağından kaynaklandığı düşünülebilir. Naji (2013) günde 2-2,5 ml olmak üzere 50 gün boyunca mısır yağı verdiği erkek tavşanlarda, testisteki sperm konsantrasyonu, 1 g testis başına düşen ortalama sperm sayısı, epididim sperm sayısı, sperm hareketliliği ve sperm canlılığının her birinde anlamlı ($P<0.05$) bir artış olduğunu göstermiştir. Araştırmacının (Naji, 2013) uyguladığı miktardan az olmakla birlikte, sunulan çalışmada sham grubu 48 gün boyunca 0.5 ml mısır yağı almıştır. Mısır yağının ana bileşenleri çoklu doymamış yağ asitleri, linoleik asit ve az miktarda linolenik asit (birlikte -%54), tekli doymamış oleik asit (-%25), doymuş palmitik asit (-%10), doymuş stearik asit (<%2), toplam trigliserit içeriği (~%95) olup, çeşitli toksisite testlerinde ve diyet çalışmalarında test kimyasallarının sondayla (zorla yutma) uygulanması için bir araç olarak olaysız bir şekilde yaygın şekilde kullanılmıştır (Kuperman ve diğerleri, 2011) Yan ve

diğerleri (2013) ratların diyetinde uygun n-3/n-6 PUFA oranının bulunmasının, sperm özelliklerini arttırarak testis ve spermin yapı bütünlüğünü güçlendirerek, üreme performansını iyileştirdiğini bildirmişlerdir.

Se verilen grupta da XIV. dönem % tubulus yoğunluğu sham kontrolle benzer ve kontrol grubundan fazla olarak kaydedilmiştir ($P<0.001$). Bu durum Se'nin de XIV. Dönem tubulus yoğunluğunu artırdığını göstermektedir. Selenyum, antioksidan savunma dahil olmak üzere çeşitli temel biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar (Kieliszek ve Blazejak, 2013) Memelilerin normal spermatogenezi için esastır ve kritik rolü genellikle fosfolipid hidroperoksit glutation peroksidazı (PHGPx/GPx4) ve Selenoprotein P ile sağlamaktadır (Boitani ve Puglisi, 2008). Taghizadeh ve diğerleri (2017) ise 60 gün boyunca günde 0.4 mg/kg sodyum selenit verdikleri ratların testisinde anlamlı değişiklikler gözlememişlerdir. Araştıracının (Taghizadeh ve diğerleri, 2017) çalışmasından farklı olarak Se, XIV. dönem tubulus yoğunluğunu artırmıştır ($P<0.001$). Burada yine çözücü etkisini eşitlemek amacıyla Se grubuna da verilen mısır yağı, Se'ü desteklemiş olabilir.

Ayrıca 4-NP+Se grubunda da XIV. dönem % tubulus yoğunluğu açısından en yüksek değere ulaşılmasının nedeninin hem 4-NP'nin eriticisi mısır yağı hem de Se'nin etkisinden kaynaklandığı söylenebilir. Bununla birlikte, XIV. Dönem % tubulus yoğunluğu sayısal olarak en az 4-NP grubunda belirlenmiş olsa da, istatistiksel olarak kontrol grubu ile arasında anlamlı fark bulunmasının nedeninin, sham kontrol grubunda görüldüğü gibi, çözücü olarak verilen mısır yağının içindeki doymamış yağ asitlerinin olası olumlu katkılarından kaynaklandığı (Naji, 2013) düşünülebilir.

Serumda en yüksek MDA değeri ($P<0.05$) ve en düşük SOD değeri ($P<0.01$) 4-NP grubunda belirlendi. Benzer şekilde testis dokusunda da en yüksek MDA seviyesi ($P<0.001$) ve en düşük SOD miktarı ($P\leq 0.001$) 4-NP grubunda tespit edildi. Bu veriler 4-NP'nin oksidan seviyesini artırıp antioksidan seviyesini azalttığını açıkça göstermektedir. Oksidatif stres, spermatogenez ve sperm fonksiyonunu bozmakta, hatta erkek infertilitesine bile neden olmaktadır (Yang ve diğerleri, 2019) Fazla miktarda ROS, mitokondriyi tahrip eder; bunun sonucunda, hasar görmüş mitokondriler ROS birikimini artırır ve nihayetinde mitokondriyal apoptotik yolları aktive eder (Wang ve diğerleri, 2019). Nitekim araştırmacılar da (Chitra ve diğerleri, 2002, Chitra ve Mathur, 2004) NP'nin ratlarda sitokrom P450 aktivitesini bozarak, ROS'un birikmesine yol açtığını, H_2O_2 üretimini ve lipid peroksidasyonunu artırırken antioksidan enzimleri azalttığını bildirmişlerdir. Shalaby ve Saleh (2011) de 100 mg/kg/gün NP verdikleri erkek albino sıçanlarda, plazma total antioksidan kapasitesinin azaldığını

bununla birlikte, testiküler MDA seviyesinde bir artış olduğunu bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada serum ve testis dokusunda belirlenen MDA ve SOD verileri araştırmacıların bulguları ile uyumludur.

Se'nin testosteron biyosentezi ve bunun sonucunda spermatozoaların oluşumu ve tipik gelişimi üzerindeki rolü nedeniyle erkek üreme sisteminde önemli olduğu bildirilmiştir (Behne ve diğerleri, 1996; Foresta ve diğerleri, 2002). Ayrıca selenyum, hidrojen peroksit ve lipit hidroperoksitlerin metabolizmasında rol oynamaktadır. Hücreleri oksidasyon işlemleri sırasında oluşan serbest radikallerin zararlı etkilerinden koruyan GPx, deiyodinaz, iyodotironin ve tioredoksin redüktaz (TRxR) gibi bazı enzimlerin ayrılmaz bir parçasını oluşturduğu kaydedilmiştir (Kieliszek ve Błażej, 2013).

Sunulan çalışmada 4-NP+Se grubuna ait hem serum örnekleri hem de testis dokusunda MDA ve SOD verileri kontrol grupları ile benzer ($P>0.05$) bulunmuştur (Tablo 10 ve 11). Elde edilen bu sonuçlar; Se uygulamasının, 4-NP'ün toksik etkisini engellediği, antioksidan oranını artırdığı sonucunu doğrulamaktadır. Taghizadeh ve diğerleri (2017) da varikosellü ratlarda belirledikleri sperm kalitesi parametreleri ile testislerdeki CAT, GPX ve SOD aktivitelerinde azalma, MDA seviyelerinde artış ve testiküler dokudaki hasarın, sodyum selenit uygulaması ile neredeyse normal seviyelere döndüğünü, ancak normal sıçanlarda bu parametreleri değiştirmedeğini bildirmişlerdir.

Sunulan çalışmada belirgin kaspaz 3 pozitif tubulus yoğunluğu en az kontrol ve sham kontrol grubunda gözlendi ($P<0.001$). En fazla belirgin kaspaz 3 pozitif tubulus yoğunluğu 4-NP grubunda tespit edildi ($P<0.001$). Bu durum da NP'nin spermatogenezise zararlı olduğunu göstermektedir. Yapılan benzer bir çalışmada da 20 günlük ratlara 42 gün boyunca 125, 250 ve 300 mg/kg/gün dozda NP uygulamasının, testislerde Fas ve FasL, mRNA upregülasyonunu ve TUNEL-pozitif hücre sayısını arttırdığı tespit edilmiştir (Han ve diğerleri, 2004b). Duan ve diğerleri (2017) yapmış oldukları bir çalışmada 7 haftalık ratlara 20 gün boyunca 2 günde bir intraperitoneal enjeksiyon yolu ile 0, 25, 50 ve 100 mg/kg dozlarda NP uygulaması sonrasında, kaspaz 1,2,9,11 mRNA ekspresyonunun arttığını göstermişlerdir. Gong ve diğerleri (2009) da ratlarda yapmış olduğu bir çalışmada, endüstriyel alanda yüzey gerilimini azaltıcı olarak kullanılan nonilfenolün hem hücre içi Ca^{++} seviyelerini artırarak hem de ER'da morfolojik değişikliklere neden olarak Sertoli hücrelerinde ER'de stres oluşturduğunu buna bağlı olarakta apoptozise yol açtığını belirlemişlerdir.

Yapılan araştırmada Se ve 4-NP+Se gruplarında gözlenen belirgin kaspaz 3 pozitif tubulus yoğunluğunun da kontrol gruplarından fazla olduğu tespit edildi ($P<0.001$) (Tablo 9).

Ranawat ve Bansal (2009) farelerde Se dengesizliğinin testiste apoptoz üzerine etkisini araştırmışlar; Se eksikliği ve fazlalığında üretilen ROS'un p38 ve kaspaz 8'in aktivasyonuna yol açtığını, bu durumun kaspaz 3'ü aktive ederek apoptozla sonuçlandığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada Se almış olan gruplardaki kaspaz 3 pozitif yoğunluğunun kontrol gruplarından fazla olması, kullanılan Se miktarının toksisitesini düşündürmektedir. Bununla birlikte aynı gruplarda serum ve testiste belirlenen MDA verileri Se toksisitesini desteklememektedir. Taghizadeh ve diğerleri (2017) de 60 gün boyunca 0,4 mg/kg sodyum selenit verdikleri normal ratlarda CAT, GPX ve SOD aktivitelerinde ve MDA seviyelerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir. Farklı olarak, sunulan çalışmada kontrol gruplarına göre Se grubundaki SOD değerinin, serumda ($P<0,01$) ve testis dokusunda ($P<0,001$) önemli oranda artmış olduğu bulundu.

Çalışmada kan testis bariyeri proteini CX43 lokalizasyonu incelendi. CX43 pozitivitesinin 4-NP alan gruplarda azaldığı gözlemlendi. 4-NP+Se grubunda Se'un bir miktar +NP etkisinden koruduğu anlaşıldı. Aravindakshan ve Cyr (2005) de yaptıkları çalışmada, 24 saat boyunca farklı konsantrasyonlarda (1- 50 mikrom) nonilfenole maruz bırakılan rat testislerinde, komşu hücreler arası kan testis bariyeri iletişim yollarının hasar gördüğünü, CX43 konsantrasyonunda azalma meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada, Leydig hücreleri arasındaki CX43 pozitivitesinin 4-NP'den etkilenmediği, hatta Se eklenen gruplarda CX43 pozitivitesinin arttığı dikkati çekti. Tanguy ve diğerleri (2011) Se'nin antioksidan etkisinin CX43 proteininin defosforilasyonunu önleyerek, CX43'ün yapısal ve işlevsel bütünlüğünü koruduğunu bildirmektedirler. Sunulan çalışmada da Se hem tubuler epitelde hem de Leydig hücrelerinde CX43 üzerinde koruyucu ve aktive edici etkisi olmuş olabilir. İlginç bir şekilde, Chojnacka ve diğerleri (2016) flutamide maruz kalan hayvanların hipertrofik Leydig hücrelerinde, muhtemelen hücrenin büyümesine bağlı olarak, CX43 ekspresyonunun arttığını, flutamidin Leydig hücreleri üzerindeki etkisinin diğer testis hücreleri üzerindeki etkilerinden farklı olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anormal spermatozoon oranının 4-NP grubunda önemli oranda artmış olduğu ($P<0.001$) görüldü. Se ve hatta 4-NP+Se grubunda anormal spermatozoon sayısının, kontrol grupları ile benzer olduğu tespit edildi ($P>0.05$). Ayrıca sayıca en az canlı spermatozoonun 4-NP grubunda ($P<0.001$) olduğu

gözlendi. Bu durum NP'nin sağlıklı spermatozoon üretimine zarar verdiğini, sayısını azalttığını, Se'nin olumlu yönde etkili olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde Han ve diğerleri (2004a) erkek ratlarda yaptıkları çalışmada, 50 gün boyunca oral gavaj yoluyla 125 ve 250 mg/kg NP uygulamasının artan dozla birlikte epididimide spermatozoon yoğunluğunun azaldığı tespit edilmiştir. Seema ve diğerleri (2007) yaptığı bir çalışmada erişkin erkek albino ratlara 60 gün süre ile 0,6 mg/kg nikotin ve 10 g/kg Se tedavisi uygulamışlardır. Çalışmalarında Se'un, nikotinin azalttığı sperm sayısı ve motilitesini iyileştirdiği, azalan testis enzim faaliyetlerini (3 *beta-hydroxysteroid dehydrogenase*-3B HSD, 17 β -*Hydroxysteroid dehydrogenase*-17B HSD) artırdığını belirlemişlerdir.

Canlı spermatozoon sayısı açısından kontrol gruplarına ait değerlerin birbirine benzediği ($P>0.05$), Se ve 4-NF+Se gruplarının canlı spermatozoon sayısının kontrol grubundan az ($P>0.001$) fakat sham kontrol grubu ile benzer olduğu kaydedildi ($P>0.05$). Se grubuna ait canlı spermatozoon sayısının kontrol grubundan az olması Se'nin kullanılan miktarı ile ilgili olabilir.

Se, 4-NF+Se ve sham gruplarının canlı spermatozoon sayısındaki benzerlik Se'un 4-NP toksisitesini engellediği sonucunu düşündürmektedir. Sham grubuna verilen mısır yağı da canlı spermatozoon sayısına olumlu katkı vermiş olabilir (Naji, 2013).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan tez çalışmasında, yaygın olarak maruz kalınan 4-NP'ye bağlı testis toksisitesi sitolojik, histolojik, histometrik, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak belirlenmiştir. Selenyumun, oluşturulan toksisiteye karşı olumlu etkili olduğu; 4-NP+Se grubunda belirlenen XIV. dönem % tubulus yoğunluğunun fazlalığı, kaspaz 3 düzeyinin 4-NP grubunda 4-NP+Se grubundan fazla olması, hem serum hem de testis dokusunda MDA düzeylerinin azalıp SOD düzeylerinin artması, canlı ve normal spermatozoon sayısının fazlalığına dayanarak söylenebilir. Bunun yanında Se grubunda belirlenen canlı ağırlık artışındaki azalma, tubulus çapı ve epitel yüksekliğindeki düşüş, kaspaz 3 düzeyinin kontrol gruplarından fazla olması sonuçlarına dayanarak, Se'nin doz veya kullanım süresine bağlı metabolik olarak olumsuz etkilerinin de olabileceği göz ardı edilmemelidir.

KAYNAKLAR

Agarwal, A., Saleh, R. A. ve Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility*, 79(4), 829–843. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)04948-8)

Agarwal, A., Shyam, S.R. ve Allamaneni, M.D. (2004). Oxidants and antioxidants in human fertility. *Middle East Fertility Society Journal*, 3(3), 184-197.

Agarwal, A., Prabhakaran, S.A. ve Sikka, S.C. (2007). Clinical relevance of oxidative stress in patients with male factor infertility: evidence-based analysis. *The American Urological Association (AUA) Update Series*, 26(1), 1-12.

Ahel, M., Hrsak, D. ve Giger, W. (1994). Aerobic transformation of short-chain alkylphenol polyethoxylates by mixed bacterial cultures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 26, 540-548.

Aitken, R. J., Baker, M. A. ve Sawyer, D. (2003). Oxidative stress in the male germ line and its role in the aetiology of male infertility and genetic disease. *Reproductive biomedicine online*, 7(1), 65–70. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61730-0](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61730-0)

Alberts, B., Johnson, A. ve Lewis, J. (2008). Germ Hücreleri ve Döllenme In: Hücrenin Moleküler Biyolojisi, (4.bs., ss. 1127-1156). Ankara.

Amara, S., Abdelmelek, H., Garrel, C., Guiraud, P., Douki, T., Ravanat, J. L., ... Ben Rhouma, K. (2008). Preventive effect of zinc against cadmium-induced oxidative stress in the rat testis. *The Journal of reproduction and development*, 54(2), 129–134. <https://doi.org/10.1262/jrd.18110>

Antunes, L. M., Darin, J. D. ve Bianchi, N.deL. (2001). Effects of the antioxidants curcumin or selenium on cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in rats. *Pharmacological research*, 43(2), 145–150. <https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0724>

Aragón, M. A., Ayala, M. E., Marín, M., Avilés, A., Damián-Matsumura, P. ve Domínguez, R. (2005). Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reproduction (Cambridge, England)*, 129(6), 717–727. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00598>

Aravindakshan, J., Gregory, M., Marcogliese, D. J., Fournier, M. ve Cyr, D. G. (2004). Consumption of xenoestrogen-contaminated fish during lactation alters adult male reproductive function. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 81(1), 179–189. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh174>

Aravindakshan, J. ve Cyr, D. G. (2005). Nonylphenol alters connexin 43 levels and connexin 43 phosphorylation via an inhibition of the p38-mitogen-activated protein kinase pathway. *Biology of reproduction*, 72(5), 1232–1240. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038596>

Arıncı K. ve Elhan A. (1997). Anatomi. (ss. 160, 417-422). Ankara: Güneş Kitabevi.

Babior B. M. (2000). Phagocytes and oxidative stress. *The American journal of medicine*, 109(1), 33–44. [https://doi.org/10.1016/s0002-9343\(00\)00481-2](https://doi.org/10.1016/s0002-9343(00)00481-2)

Balercia, G., Buldreghini, E., Vignini, A., Tiano, L., Paggi, F., Amoroso, S., ... Littarru, G. (2009). Coenzyme Q10 treatment in infertile men with idiopathic asthenozoospermia: a placebo-controlled, double-blind randomized trial. *Fertility and sterility*, 91(5), 1785–1792. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.02.119>

Barceloux D. G. (1999). Selenium. *Journal of toxicology. Clinical toxicology*, 37(2), 145–172. <https://doi.org/10.1081/clt-100102417>

Behne, D., Weiler, H. ve Kyriakopoulos, A. (1996). Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *Journal of reproduction and fertility*, 106(2), 291–297. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1060291>

Bonakdar, R. A. ve Guarneri, E. (2005). Coenzyme Q10. *American family physician*, 72(6), 1065–1070.

Bonefeld-Jørgensen, E. C., Long, M., Hofmeister, M. V. ve Vinggaard, A. M. (2007). Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol in vitro: new data and a brief review. *Environmental health perspectives*, 115 Suppl 1(Suppl 1), 69–76. <https://doi.org/10.1289/ehp.9368>

Boitani, C. ve Puglisi, R. (2008). Selenium, a key element in spermatogenesis and male fertility. *Advances in experimental medicine and biology*, 636, 65–73. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_4

Brigelius-Flohé, R. ve Flohé, L. (2003). Is there a role of glutathione peroxidases in signaling and differentiation?. *BioFactors (Oxford, England)*, 17(1-4), 93–102. <https://doi.org/10.1002/biof.5520170110>

Brunner P.H., Caplı S., Marcomini A. ve Giger W. (1988). Occurrence and behavior of line aralkylbenzene sulphonates, nonylphenol, nonylphenol mono- and nonylphenoldiethoxylates in sewage and sewagesludgetreatment. *Water Research*, 22, 1465-1472.

Buffone, M. G., Ijiri, T. W., Cao, W., Merdiushev, T., Aghajanian, H. K. ve Gerton, G. L. (2012). Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility. *Molecular reproduction and development*, 79(1), 4–18. <https://doi.org/10.1002/mrd.21393>

Burk R. F. (1978). Selenium in nutrition. *World review of nutrition and dietetics*, 30, 88–106. <https://doi.org/10.1159/000401237>

Cai, K., Hua, G., Ahmad, S., Liang, A., Han, L., Wu, C., Yang, F. ve Yang, L. (2011). Action mechanism of inhibin α -subunit on the development of Sertoli cells and first wave of spermatogenesis in mice. *PloS one*, 6(10), e25585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025585>

Conover W.J. (1980). Practical Nonparametric Statistics. (2nd ed.). New York: .John Wiley & Sons.

Carlson B.M. (2004). Transport of gametes and Fertilization. Human Embryology of in Vitro Fertilization. (3rd ed., ss. 27-41). Philadelphia: Mosby.

Çeribaşı, A. O., Sakin, F., Türk, G., Sönmez, M. ve Ateşşahin, A. (2012). Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*, 64(7-8), 717–724. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2011.01.006>

Cheeseman, K. H. ve Slater, T. F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. *British medical bulletin*, 49(3), 481–493. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072625>

Chen, H., Liu, J., Luo, L., Baig, M. U., Kim, J. M. ve Zirkin, B. R. (2005). Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Experimental gerontology*, 40(8-9), 728–736. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2005.06.004>

Cheng, C. Y. ve Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological reviews*, 64(1), 16–64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>

Chitra, K. C., Latchoumycandane, C. ve Mathur, P. P. (2002). Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. *Archives of toxicology*, 76(9), 545–551. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0372-4>

Chitra, K. C. ve Mathur, P. P. (2004). Vitamin E prevents nonylphenol-induced oxidative stress in testis of rats. *Indian journal of experimental biology*, 42(2), 220–223.

Chojnacka, K., Hejmej, A., Zarzycka, M., Tworzydło, W., Bilinski, S., Pardyak, L., ... Bilinska, B. (2016). Flutamide induces alterations in the cell-cell junction ultrastructure and reduces the expression of Cx43 at the blood-testis barrier with no disturbance in the rat seminiferous tubule morphology. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 14, 14. <https://doi.org/10.1186/s12958-016-0144-2>

Chokwe T.B., Okonkwo J.O. ve Sibali L.L. Distribution, exposure pathways, sources and toxicity of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in the environment. *Water SA* 2017, 43(4), 529-542.

Christiansen T., Korsgaard B. ve Jespersen A. (1998). Induction of Vitellogenin Synthesis by Nonylphenol and 17 β -Estradiol and Effects on the Testicular Structure in the Eelpout *Zoarces Viviparus*. *Marine Environmental Research*, 46, 141-144.

Clermont Y. (1993). Introduction to the Sertoli cell. In *The Sertoli Cell*, pp XXI–XXV. Eds LD Russell & MD Griswold. Clearwater, FL, (ss. 79-97). USA: Cache River Press.

Colagar, A. H., Marzony, E. T. ve Chaichi, M. J. (2009). Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 29(2), 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2008.11.007>

Compoti M. (1987). Glutathione depleting agents and lipid peroxidation in the aging rat. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 88, 177- 180.

Cox C. (2003). Nonylphenol and related chemicals. *Journal Of Pesticide Reform*, 16 (1), 15-20.

Ciftci, H., Verit, A., Savas, M., Yeni, E. ve Erel, O. (2009). Effects of N-acetylcysteine on semen parameters and oxidative/antioxidant status. *Urology*, 74(1), 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.02.034>

Demirtaş A. ve Üntan İ. (2011). Seminal Sıvı ve Spermde Oksidatif Stres ve Antioksidanlar Antioxidants and Oxidative Stress in Seminal Fluid and Sperm. *Türk Üroloji Seminerleri*, 2, 24-30.

Delilbaşı L. (2008). İn Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri. İstanbul: Güneş Tıp Kitapevi.

Dott, H. M. ve Foster, G. C. (1972). A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential 'life-dead' stain. *Journal of reproduction and fertility*, 29(3), 443–445. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0290443>

Douillet, C., Bost, M., Accominotti, M., Borson-Chazot, F. ve Ciavatti, M. (1998). Effect of selenium and vitamin E supplements on tissue lipids, peroxides, and fatty acid distribution in experimental diabetes. *Lipids*, 33(4), 393–399. <https://doi.org/10.1007/s11745-998-0220-z>

Drisko, J. A., Chapman, J. ve Hunter, V. J. (2003). The use of antioxidant therapies during chemotherapy. *Gynecologic oncology*, 88(3), 434–439. [https://doi.org/10.1016/s0090-8258\(02\)00067-7](https://doi.org/10.1016/s0090-8258(02)00067-7)

Duan, P., Hu, C., Butler, H. J., Quan, C., Chen, W., Huang, W., ... Yang, K. (2017). 4-Nonylphenol induces disruption of spermatogenesis associated with oxidative stress-related apoptosis by targeting p53-Bcl-2/Bax-Fas/FasL signaling. *Environmental toxicology*, 32(3), 739–753. <https://doi.org/10.1002/tox.22274>

Ebisch, I. M., Thomas, C. M., Peters, W. H., Braat, D. D. ve Steegers-Theunissen, R. P. (2007). The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility. *Human reproduction update*, 13(2), 163–174. <https://doi.org/10.1093/humupd/dml054>

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>

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

Eroschenko V.P. ve Fiore D. (2008). Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle, Demir R. (Çeviren). (10. bs.) Ankara: Palme Yayıncılık.

Essmann F. (2000). Mechanisms of apoptosis in cancer; regulatory role of caspases. Doctoral Thesis, Tecnic University of Berlin, Berlin.

Eu, J. P., Liu, L., Zeng, M. ve Stamler, J. S. (2000). An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry*, 39(5), 1040–1047. <https://doi.org/10.1021/bi992046e>

Fink, S. L. ve Cookson, B. T. (2005). Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infection and immunity*, 73(4), 1907–1916. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.4.1907-1916.2005>

Forand, A., Messiaen, S., Habert, R. ve Bernardino-Sgherri, J. (2009). Exposure of the mouse perinatal testis to radiation leads to hypospermia at sexual maturity. *Reproduction (Cambridge, England)*, 137(3), 487–495. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0358>

Foresta, C., Flohé, L., Garolla, A., Roveri, A., Ursini, F. ve Maiorino, M. (2002). Male fertility is linked to the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biology of reproduction*, 67(3), 967–971. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.003822>

Fraczek, M. ve Kurpisz, M. (2005). System redoks w nasieniu meskim i peroksydacyjne uszkodzenia plemników [The redox system in human semen and peroxidative damage of spermatozoa]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczonej (Online)*, 59, 523–534.

França, L. R., Ogawa, T., Avarbock, M. R., Brinster, R. L. ve Russell, L. D. (1998). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biology of reproduction*, 59(6), 1371–1377. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.6.1371>

French, D. B., Desai, N. R. ve Agarwal, A. (2008). Varicocele repair: does it still have a role in infertility treatment?. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 20(3), 269–274. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e3282fcc00c>

Gao Q.T., Wong Y.S. ve Tam N.F.Y. (2017). Antioxidant responses of different microalgal species to nonylphenol-induced oxidative stress. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1317–1329.

Gardner D.K., Weissman A., Howles C.M. ve Shoham Z. (2001). Textbook of Assisted Reproductive Techniques. Laboratory and Clinical Perspectives. Martin Dunitz, UK.

Gardner L.P. ve Hiatt J.L. (2007). Female Reproductive System. Color Text-book of Histology. (3rd edn., ss. 480-482). Philadelphia, Saunders.

Gaytan, F., Lucena, M. C., Munoz, E. ve Paniagua, R. (1986). Morphometric aspects of rat testis development. *Journal of anatomy*, 145, 155–159.

Ge, R. S., Dong, Q., Sottas, C. M., Chen, H., Zirkin, B. R. ve Hardy, M. P. (2005). Gene expression in rat leydig cells during development from the progenitor to adult stage: a cluster analysis. *Biology of reproduction*, 72(6), 1405–1415. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.037499>

Gebre-Medhin, M., Ewald, U., Plantin, L. O. ve Tuvemo, T. (1984). Elevated serum selenium in diabetic children. *Acta paediatrica Scandinavica*, 73(1), 109–114. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.1984.tb09907.x>

George, J., Banik, N. L. ve Ray, S. K. (2010). Genistein induces receptor and mitochondrial pathways and increases apoptosis during BCL-2 knockdown in human malignant neuroblastoma SK-N-DZ cells. *Journal of neuroscience research*, 88(4), 877–886. <https://doi.org/10.1002/jnr.22244>

Gharagozloo, P. ve Aitken, R. J. (2011). The role of sperm oxidative stress in male infertility and the significance of oral antioxidant therapy. *Human reproduction (Oxford, England)*, 26(7), 1628–1640. <https://doi.org/10.1093/humrep/der132>

Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M. C., Sharma, R. K., Alvarez, J. G., Thomas, A. J. Jr, ve Agarwal, A. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human reproduction (Oxford, England)*, 16(9), 1922–1930. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.9.1922>

Golan, R., Weissenberg, R., Oschry, Y., Shochat, L. ve Lewin, L. M. (2000). Spermatogenesis in the golden hamster during the first spermatogenic wave: a flow cytometric analysis. *Molecular reproduction and development*, 55(2), 205–211. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200002\)55:2<205::AID-MRD10>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200002)55:2<205::AID-MRD10>3.0.CO;2-P)

Gong, Y., Wu, J., Huang, Y., Shen, S. ve Han, X. (2009). Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicology letters*, 186(2), 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.01.010>

Gorus, F. K. ve Pipeleers, D. G. (1981). A rapid method for the fractionation of human spermatozoa according to their progressive motility. *Fertility and sterility*, 35(6), 662–665. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)45561-5](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)45561-5)

Griveau, J. F. ve Le Lannou, D. (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *International journal of andrology*, 20(2), 61–69. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1997.00044.x>

Gupta, S., Kumar, H. ve Soni, J. (2005). Effect of Vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology*, 64(6), 1273–1286. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.03.008>

Gutteridge J. M. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical chemistry*, 41(12 Pt 2), 1819–1828.

Haas, G. G., Jr ve Beer, A. E. (1986). Immunologic influences on reproductive biology: sperm gametogenesis and maturation in the male and female genital tracts. *Fertility and sterility*, 46(5), 753–766. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)49808-0](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)49808-0)

Hackett A.J. ve Macpherson J.W. (1965). Some staining procedures for spermatozoa. A Review. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, 6(3), 55–62.

Han, X. D., Tu, Z. G., Gong, Y., Shen, S. N., Wang, X. Y., Kang, L. N., ... Chen, J. X. (2004a). The toxic effects of nonylphenol on the reproductive system of male rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 19(2), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.06.014>

Han, X., Tu, Z., Wang, X., Shen, S. ve Hou, Y. (2004b). Nonylphenol induced apoptosis in rat testis through the Fas/FasL pathway. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 73(4), 620–627. <https://doi.org/10.1007/s00128-004-0473-2>

Han, S. I., Kim, Y. S. ve Kim, T. H. (2008). Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *BMB reports*, 41(1), 1–10. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.1.001>

Hancock, J. L. (1952). The morphology of bull spermatozoa. *Journal of Experimental Biology*, 29(3), 445–453.

Harris, G. C. ve Nicholson, H. D. (1998). Stage-related differences in rat seminiferous tubule contractility in vitro and their response to oxytocin. *The Journal of endocrinology*, 157(2), 251–257. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1570251>

Hassa O. ve Aştı R. N. (1997). Embriyoloji. (3. bs., ss. 07-10). Ankara.

Hathcock, J. N., Azzi, A., Blumberg, J., Bray, T., Dickinson, A., Frei, B., ... Traber, M. G. (2005). Vitamins E and C are safe across a broad range of intakes. *The American journal of clinical nutrition*, 81(4), 736–745. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.4.736>

Hess R. A. (1990). Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biology of reproduction*, 43(3), 525–542. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.3.525>

Hess R. A. (2003). Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 1, 52. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-52>

Hess R. A. ve Franca L. R. (2008). Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium In: *Molecular Mechanisms in Spermatogenesis* (Ed: Cheng CY). *Landes Bioscience and Springer Science+Business Medicine LLC*, 636, 1-15.

Hilscher W. (1991). The genetic control and germ cell kinetics of the female and male germ line in mammals including man. *Human reproduction (Oxford, England)*, 6(10), 1416–1425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137281>

Hogarth, C. A. ve Griswold, M. D. (2010). The key role of vitamin A in spermatogenesis. *The Journal of clinical investigation*, 120(4), 956–962. <https://doi.org/10.1172/JCI41303>

Hossain, M. M. ve Richardson, J. R. (2011). Mechanism of pyrethroid pesticide-induced apoptosis: role of calpain and the ER stress pathway. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 122(2), 512–525. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr111>

Hsu, P. C., Pan, M. H., Li, L. A., Chen, C. J., Tsai, S. S. ve Guo, Y. L. (2007). Exposure in utero to 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl (PCB 132) impairs sperm function and alters testicular apoptosis-related gene expression in rat offspring. *Toxicology and applied pharmacology*, 221(1), 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.01.027>

Hsu, S. M., Raine, L., & Fanger, H. (1981). Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*, 29(4), 577–580. <https://doi.org/10.1177/29.4.6166661>

Huang, P. C., Kuo, P. L., Chou, Y. Y., Lin, S. J. ve Lee, C. C. (2009). Association between prenatal exposure to phthalates and the health of newborns. *Environment international*, 35(1), 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.05.012>

Jahnukainen, K., Chrysis, D., Hou, M., Parvinen, M., Eksborg, S. ve Söder, O. (2004). Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis. *Biology of reproduction*, 70(2), 290–296. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018390>

Johnson K. E. (1991). Histology and cell biology. (2nd Ed., ss. 295-304). USA: Harwal Publishing Company.

Johnson, L., Varner, D. D., Roberts, M. E., Smith, T. L., Keillor, G. E. ve Scrutchfield, W. L. (2000). Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. *Animal reproduction science*, 60-61, 471–480. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(00\)00108-1](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(00)00108-1)

Jones, R., Mann, T. ve Sherins, R. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and sterility*, 31(5), 531–537. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)43999-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)43999-3)

Joshi, R., Adhikari, S., Patro, B. S., Chattopadhyay, S. ve Mukherjee, T. (2001). Free radical scavenging behavior of folic acid: evidence for possible antioxidant activity. *Free radical biology & medicine*, 30(12), 1390–1399. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00543-3](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00543-3)

Junqueira, L.C., Carneiro J., Abrahamsohn P.A., Dos Santos M.F. ve Zorn T.M.T. (2006). Temel histoloji. In: Aytekin Y, Solakoğlu S. (Eds). (ss. 431-447). İstanbul: Nobel Matbaacılık.

Junqueira, L.C. ve Carneiro J. (2009). Temel histoloji, Teks&Atlas. Solakoğlu S. Aytekin Y. (Çeviri Editörler), (ss. 379). Nobel Tıp Yayınevi.

Kaneda, K., Kashii, S., Kurosawa, T., Kaneko, S., Akaike, A., Honda, Y., ... & Satoh, M. (1999). Apoptotic DNA fragmentation and upregulation of Bax induced by transient

ischemia of the rat retina. *Brain research*, 815(1), 11–20. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)01074-9](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)01074-9)

Kara Ö., Sarı E., Akşit H., Yay B., Akşit D. ve Dönmez M. (2016). Selenyumun bir iskemi testis modelinde iskemi-reperfüzyon hasarına etkisi. *Androloji*, 48(10), 1267-1273.

Karadağ T. ve Kendirici M. (2013). Erkek infertilitesinde antioksidan tedavinin yeri. *Erkek Üreme Sağlığı*, 55, 263-264.

Karakılçık A. Z. ve Aksakal M. (1993). Selenyumun Bazı Fizyolojik işlevleri, Metabolizması ve E vitamini ile Arasındaki İlişkileri. *Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 4, 283- 291.

Karci A., Arslan-Alaton I., Bekbolet B., Ozhan M. ve Alpertunga B. (2014). H₂O₂/UV-C and Photo-Fenton Treatment Of a Nonylphenol Polyethoxylate In Synthetic Freshwater: Follow-Up of Degradation Products, Acute Toxicity And Genotoxicity. *The Chemical Engineering Journal*, 241, 43-51.

Kaufmann, S. H. ve Gores, G. J. (2000). Apoptosis in cancer: cause and cure. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 22(11), 1007–1017. [https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200011\)22:11<1007::AID-BIES7>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200011)22:11<1007::AID-BIES7>3.0.CO;2-4)

Kawamura, Y., Ogawa, Y. ve Mutsuga, M. (2016). Migration of nonylphenol and plasticizers from polyvinyl chloride stretch film into food simulants, rapeseed oil, and foods. *Food science & nutrition*, 5(3), 390–398. <https://doi.org/10.1002/fsn3.404>

Kidder, G. M. ve Cyr, D. G. (2016). Roles of connexins in testis development and spermatogenesis. *Seminars in cell & developmental biology*, 50, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.12.019>

Kieliszek, M. ve Błażej, S. (2013). Selenium: Significance, and outlook for supplementation. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 29(5), 713–718. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.11.012>

Kikuchi, H., Yamashita, K., Nakayama, M., Toyonaga, K., Tsuneyoshi, I., Takasaki, M. ve Nakayama, T. (2009). Lacking of Aiolos accelerates pre-mature B cell apoptosis mediated by BCR signaling through elevation in cytochrome c release. *Biochimica et biophysica acta*, 1793(7), 1304–1314. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2009.04.016>

Kim, J. M., Ghosh, S. R., Weil, A. C. ve Zirkin, B. R. (2001). Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonuclease are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from

reduced intratesticular testosterone. *Endocrinology*, 142(9), 3809–3816.
<https://doi.org/10.1210/endo.142.9.8375>

Kofler R. (1982). Immunofluorescence localization of glycoprotein hormones in the rat anterior pituitary gland using monoclonal antibodies and polyclonal antisera. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 30(7), 645–649. <https://doi.org/10.1177/30.7.6809810>

Krausz, C., Mills, C., Rogers, S., Tan, S. L. ve Aitken, R. J. (1994). Stimulation of oxidant generation by human sperm suspensions using phorbol esters and formyl peptides: relationships with motility and fertilization in vitro. *Fertility and sterility*, 62(3), 599–605. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)56952-0](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)56952-0)

Krinke G. J. (2000). The laboratory rat, (ss. 150-312). Switzerland: Academic Pres.

Krinsky, N. I. ve Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular aspects of medicine*, 26(6), 459–516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>

Krupiński, M., Janicki, T., Pałecz, B. ve Długoński, J. (2014). Biodegradation and utilization of 4-n-nonylphenol by *Aspergillus versicolor* as a sole carbon and energy source. *Journal of hazardous materials*, 280, 678–684. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.08.060>

Kuperman, R. G., Checkai, R. T. ve Chester, N. A. (2011). Review of Literature on Health Effects of Corn Oil and Its Oxidation Products. Edgewood Chemical Biological Center, U.S. Army Research, Development and Engineering Command.

Kuran, O. (1983). Sistematiik Anatomi, Filiz Kitabevi.

Lagos-Cabré, R. ve Moreno, R. D. (2012). Contribution of environmental pollutants to male infertility: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers. *Biological research*, 45(1), 5–14. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000100001>

Leblond, C. P. ve Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55(4), 548–573. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1952.tb26576.x>

Lenzi, A., Culasso, F., Gandini, L., Lombardo, F. ve Dondero, F. (1993). Placebo-controlled, double-blind, cross-over trial of glutathione therapy in male infertility. *Human*

reproduction (Oxford, England), 8(10), 1657–1662.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137909>

Lenzi, A., Lombardo, F., Sgrò, P., Salacone, P., Caponecchia, L., Dondero, F. ve Gandini, L. (2003). Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertility and sterility*, 79(2), 292–300.
[https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)04679-4](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)04679-4)

Li, M. W., Mruk, D. D. ve Cheng, C. Y. (2012). Gap junctions and blood-tissue barriers. *Advances in experimental medicine and biology*, 763, 260–280.
https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4711-5_13

Li, D., Sekhon, P., Barr, K. J., Márquez-Rosado, L., Lampe, P. D. ve Kidder, G. M. (2013). Connexins and steroidogenesis in mouse Leydig cells. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 91(2), 157–164. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0385>

Li, X., Zhou, L., Ni, Y., Wang, A., Hu, M., Lin, Y., ... Tian, H. (2017). Nonylphenol Induces Pancreatic Damage in Rats through Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress. *Toxicology Research*, 6, 353-360.

Longo F.J. (1997). Fertilization. Chapman and Hall, (2nd edn).

Lu, W. C., Wang, A. Q., Chen, X. L., Yang, G., Lin, Y., Chen, Y. O., ... Tian, H. L. (2014). 90d Exposure to Nonylphenol has Adverse Effects on the Spermatogenesis and Sperm Maturation of Adult Male Rats. *Biomedical and environmental sciences : BES*, 27(11), 907–911. <https://doi.org/10.3967/bes2014.128>

Lyons, R., Van de Bittner, K. ve Morgan-Jones, S. (2014). Deposition patterns and transport mechanisms for the endocrine disruptor 4-nonylphenol across the Sierra Nevada Mountains, California. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 195, 123–132.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.08.006>

MacLean, J. A., Hayashi, K., Turner, T. T. ve Wilkinson, M. F. (2012). The Rhox5 homeobox gene regulates the region-specific expression of its paralogs in the rodent epididymis. *Biology of reproduction*, 86(6), 189.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099184>

Maruyama, K., Yuan, M. ve Otsuki, A. (2000). Seasonal Changes in Ethylen Oxide Chain Length of Poly(oxyethylene)alkylphenol Ether Nonionic Surfactants in Three Main Rivers in Tokyo. *Environmental Science & Technology*, 34 (2), 343-348.

Meehan, T., Loveland, K. L., de Kretser, D., Cory, S. ve Print, C. G. (2001). Developmental regulation of the bcl-2 family during spermatogenesis: insights into the sterility of bcl-w^{-/-} male mice. *Cell death and differentiation*, 8(3), 225–233. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400799>

Mescher, A. L. (2016). Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. Fourteenth Edition ed. The male reproductive system, (ss. 573). McGraw-Hill.

Mistry, H. D., Broughton Pipkin, F., Redman, C. W. ve Poston, L. (2012). Selenium in reproductive health. *American journal of obstetrics and gynecology*, 206(1), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2011.07.034>

Mok, K. W., Mruk, D. D., Lee, W. M. ve Cheng, C. Y. (2011). A study to assess the assembly of a functional blood-testis barrier in developing rat testes. *Spermatogenesis*, 1(3), 270–280. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.3.17998>

Mora-Esteves, C. ve Shin, D. (2013). Nutrient supplementation: improving male fertility fourfold. *Seminars in reproductive medicine*, 31(4), 293–300. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1345277>

Moseroova, I. ve Kralova, J. (2012). Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways. *PloS one*, 7(3), e32972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032972>

Mruk, D. D. ve Cheng, C. Y. (2004). Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis. *Endocrine reviews*, 25(5), 747–806. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0022>

Naji, N. S. (2013). The effect of corn oil in sperm parameters and levels of some hormone, elements, and biochemical parameters in serum of white male rabbits. *Journal of Natural Sciences Research*, 3(12), 133-143.

National Academy of Sciences (NAS). (2009). Dietary guidance: DRI tables. US Department of Agriculture, National Agricultural Library and National Academy of Sciences, Institute of Medicine, Food and Nutrition Board.

Nawar, W. W. (1996). Thermal degradation of lipids. In *“Food Chemistry”*, 17(1), 18–21.

Oakberg, E. F. (1956). Duration of spermatogenesis in the mouse and timing of stages of the cycle of the seminiferous epithelium. *The American journal of anatomy*, 99(3), 507–516. <https://doi.org/10.1002/aja.1000990307>

Odar, İ. V. (1986). Anatomi ders kitabı. Hacettepe Tai Kitapçılık.

O'Donnell, L., Meachem, S. J., Stanton, P. G. ve McLachlan, R. I. (2006). Endocrine Regulation of Spermatogenesis. In: Neill JD (Ed.) Knobil and Neill's physiology of reproduction, (3th. Edn., ss. 1017-1070). USA: Elsevier Academic Press Publications.

O'Flaherty, C., de Lamirande, E. ve Gagnon, C. (2006). Positive role of reactive oxygen species in mammalian sperm capacitation: triggering and modulation of phosphorylation events. *Free radical biology & medicine*, 41(4), 528–540. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2006.04.027>

Ohkawa, H., Ohishi, N., ve Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*, 95(2), 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

Olkowska, E., Ruman, M. ve Polkowska, Z. (2014). Occurrence of surface active agents in the environment. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2014, 769708. <https://doi.org/10.1155/2014/769708>

Orth J. M. (1982). Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study. *The Anatomical record*, 203(4), 485–492. <https://doi.org/10.1002/ar.1092030408>

Oskam, I. C., Ropstad, E., Smith, A. J., Skaare, J. U., Tverdal, A., Berg, K. A. ve Wiger, R. (2004). Effects of PCB99 and PCB153 exposure on spermatogenesis in young adult C57BL6 mice. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 19(2), 169–180. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2004.07.005>

Önder, Ç. (2011). Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. İstanbul: Nobel Kitabevi.

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

Özveren, H. (2015). İdiopatik İnfertil Hastalarda Semen ve Kan Plazmasında Malondialdehit- Katalaz- Glutasyon Peroksidaz – Süperoksit Dismutaz Düzeyi ve Semen Parametleri İle İlişkisi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Üroloji Anabilim Dalı, Van.

Papp, L. V., Lu, J., Holmgren, A. ve Khanna, K. K. (2007). From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & redox signaling*, 9(7), 775–806. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1528>

Park H. H. (2012). Structural features of caspase-activating complexes. *International journal of molecular sciences*, 13(4), 4807–4818. <https://doi.org/10.3390/ijms13044807>

Pasqualotto, F. F., Sharma, R. K., Nelson, D. R., Thomas, A. J. ve Agarwal, A. (2000). Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertility and sterility*, 73(3), 459–464. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(99\)00567-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(99)00567-1)

Pelletier, R. M., Akpovi, C. D., Chen, L., Kumar, N. M. ve Vitale, M. L. (2015). Complementary expression and phosphorylation of Cx46 and Cx50 during development and following gene deletion in mouse and in normal and orchitic mink testes. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 309(3), R255–R276. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00152.2015>

Pfeifer, H., Conrad, M., Roethlein, D., Kyriakopoulos, A., Brielmeier, M., Bornkamm, G. W. ve Behne, D. (2001). Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol cross-linking during sperm maturation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(7), 1236–1238.

Qiu, Z., Wang, Y., ve Chen, J. (2019). Perinatal exposure to nonylphenol induces microglia-mediated nitric oxide and prostaglandin E2 production in offspring hippocampus. *Toxicology letters*, 301, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.11.013>.

Raines, A. M. ve Sunde, R. A. (2011). Selenium toxicity but not deficient or super-nutritional selenium status vastly alters the transcriptome in rodents. *BMC genomics*, 12, 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-26>

Ranawat, P. ve Bansal, M. P. (2009). Apoptosis induced by modulation in selenium status involves p38 MAPK and ROS: implications in spermatogenesis. *Molecular and cellular biochemistry*, 330(1-2), 83–95. <https://doi.org/10.1007/s11010-009-0103-8>

Rangan, U. ve Bulkley, G. B. (1993). Prospects for treatment of free radical-mediated tissue injury. *British medical bulletin*, 49(3), 700–718. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072641>

Raychoudhury, S. S., Flowers, A. F., Millette, C. F. ve Finlay, M. F. (2000). Toxic effects of polychlorinated biphenyls on cultured rat Sertoli cells. *Journal of andrology*, 21(6), 964–973.

Rayman, M. P. (2000). Selenyumun insan sağlığı açısından önemi. *Lancet*, 356 (9225), 233-241.

Ribeiro, E. P., Rhoden, E. L., Horn, M. M., Rhoden, C., Lima, L. P. ve Toniolo, L. (2007). Effects of subchronic exposure to radio frequency from a conventional cellular telephone on testicular function in adult rats. *The Journal of urology*, 177(1), 395–399. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2006.08.083>

Rode, K., Sieme, H., Richterich, P. ve Brehm, R. (2015). Characterization of the equine blood-testis barrier during tubular development in normal and cryptorchid stallions. *Theriogenology*, 84(5), 763–772. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.009>

Rodriguez, I., Ody, C., Araki, K., Garcia, I. ve Vassalli, P. (1997). An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *The EMBO journal*, 16(9), 2262–2270. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.9.2262>

Sadler T.W. (2006). First Week of Development: Ovulation to Gmplantation. Langsman’s Medical Embryology. 10th edn. Baltimore. *Lippincott Williams and Wilkins*, 35- 37.

Safarinejad M. R. (2009). Efficacy of coenzyme Q10 on semen parameters, sperm function and reproductive hormones in infertile men. *The Journal of urology*, 182(1), 237–248. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2009.02.121>

Safarinejad, M. R. ve Safarinejad, S. (2009). Efficacy of selenium and/or N-acetyl-cysteine for improving semen parameters in infertile men: a double-blind, placebo controlled, randomized study. *The Journal of urology*, 181(2), 741–751. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2008.10.015>

Sakr, S. A., Mahran, H. A. ve Nofal, A. E. (2011). Effect of selenium on carbimazole-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 25(1), 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2010.07.002>

Shalaby, K. ve Saleh, E. (2011). Ameliorative effect of honey bee propolis on the nonylphenol induced-reproductive toxicity in male albino rats. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 5(11), 918–927.

Schuppe, H. C., Meinhardt, A., Allam, J. P., Bergmann, M., Weidner, W. ve Haidl, G. (2008). Chronic orchitis: a neglected cause of male infertility?. *Andrologia*, 40(2), 84–91. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2008.00837.x>

Scibior, D. ve Cieczot, H. (2006). Katalaza--budowa, właściwości, funkcje [Catalase: structure, properties, functions]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej (Online)*, 60, 170–180.

Seema, P., Swathy, S. S. ve Indira, M. (2007). Protective effect of selenium on nicotine-induced testicular toxicity in rats. *Biological trace element research*, 120(1-3), 212–218. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8021-7>

Setchell, B. P. (1980). The functional significance of the blood-testis barrier. *The Journal of Andrology*, 1, 3-10.

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

Shan, J., Jiang, B., Yu, B., Li, C., Sun, Y., Guo, H., ... Ji, R. (2011). Isomer-specific degradation of branched and linear 4-nonylphenol isomers in an oxic soil. *Environmental science & technology*, 45(19), 8283–8289. <https://doi.org/10.1021/es200224c>

Shang, D. Y., Macdonald, R. W. ve Ikonomou, M. G. (1999). Persistence of nonylphenol ethoxylate surfactants and their primary degradation products in sediments from near a municipal outfall in the strait of Georgia, British Columbia. *Environmental Science & Technology*, 33, 1366-1372.

Sharma, R. K. ve Agarwal, A. (1996). Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology*, 48(6), 835–850. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(96\)00313-5](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(96)00313-5)

Sharma, V. K., Anquandah, G. A., Yngard, R. A., Kim, H., Fekete, J., Bouzek, K., ... Golovko, D. (2009). Nonylphenol, octylphenol, and bisphenol-A in the aquatic environment: a review on occurrence, fate, and treatment. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering*, 44(5), 423–442. <https://doi.org/10.1080/10934520902719704>

Sharpe R. M. (2001). Hormones and testis development and the possible adverse effects of environmental chemicals. *Toxicology letters*, 120(1-3), 221–232. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(01\)00298-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(01)00298-3)

Sikka S. C. (2004). Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *Journal of andrology*, 25(1), 5–18. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2004.tb02751.x>

Silva, D., Lizama, C., Tapia, V. ve Moreno, R. D. (2011). Propylthiouracil-induced hypothyroidism delays apoptosis during the first wave of spermatogenesis. *Biological research*, 44(2), 181–188.

Singh, P. K., Kumar, R., Sharma, A., Arora, R., Chawla, R., Jain, S. K., ... Sharma, R. K. (2011). Role of Apoptotic Proteins in REC-2006 Mediated Radiation Protection in Hepatoma Cell Lines. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2011, 758326. <https://doi.org/10.1093/ecam/neq059>

Siu, E. R., Mruk, D. D., Porto, C. S. ve Cheng, C. Y. (2009). Cadmium-induced testicular injury. *Toxicology and applied pharmacology*, 238(3), 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.01.028>

Slowikowska-Hilczer, J. (2006). Xenobiotics with estrogen or antiandrogen action – disruptors of the male reproductive system. *The Central European Journal of Management (CERM)*, 1(3), 205–227.

Smith, B. E. ve Braun, R. E. (2012). Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions. *Science (New York, N.Y.)*, 338(6108), 798–802. <https://doi.org/10.1126/science.1219969>

Snell, R. S. (2004). Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin Fonksiyonel Anatomi, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Sole, M., Lopez, D., Alda, M. J., Castillo, M., Porte, C., Pedersen, K. L., ve Barcelo, D. (2000). Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian area (NE Spain). *Environmental Science and Technology*, 34, 5076-5083.

St-Pierre, N., Dufresne, J., Rooney, A. A. ve Cyr, D. G. (2003). Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. *Biology of reproduction*, 68(4), 1232–1240. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010504>

Su, L., Mruk, D. D. ve Cheng, C. Y. (2011). Drug transporters, the blood-testis barrier, and spermatogenesis. *The Journal of endocrinology*, 208(3), 207–223. <https://doi.org/10.1677/JOE-10-0363>

Su, W., Mruk, D. D. ve Cheng, C. Y. (2012). Filamin A: A regulator of blood-testis barrier assembly during post-natal development. *Spermatogenesis*, 2(2), 73–78. <https://doi.org/10.4161/spmg.20223>

Suleiman, S. A., Ali, M. E., Zaki, Z. M., el-Malik, E. M. ve Nasr, M. A. (1996). Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *Journal of andrology*, 17(5), 530–537.

Sun, Y., Oberley, L. W., ve Li, Y. (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical chemistry*, 34(3), 497–500.

Swain, B. K., Johri, T. S. ve Majumdar, S. (2000). Effect of supplementation of vitamin E, selenium and their different combinations on the performance and immune response of broilers. *British poultry science*, 41(3), 287–292. <https://doi.org/10.1080/713654938>

Talsness, C. E., Andrade, A. J., Kuriyama, S. N., Taylor, J. A. ve vom Saal, F. S. (2009). Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 364(1526), 2079–2096. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0281>

Tan, I. P., Roy, C., Sáez, J. C., Sáez, C. G., Paul, D. L. ve Risley, M. S. (1996). Regulated assembly of connexin33 and connexin43 into rat Sertoli cell gap junctions. *Biology of reproduction*, 54(6), 1300–1310. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.6.1300>

Tanguy, S., Rakotovo, A., Jouan, M. G., Ghezzi, C., de Leiris, J. ve Boucher, F. (2011). Dietary selenium intake influences Cx43 dephosphorylation, TNF- α expression and cardiac remodeling after reperfused infarction. *Molecular nutrition & food research*, 55(4), 522–529. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201000393>

Tanyolaç, A. (1999). Özel Histoloji, (ss. 132-143). Ankara: Yorum Basın Yayın.

Taghizadeh, L., Eidi, A., Mortazavi, P. ve Rohani, A. H. (2017). Effect of selenium on testicular damage induced by varicocele in adult male Wistar rats. *Journal of trace elements in medicine and biology : organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)*, 44, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2017.08.003>

Tekbaş, Ö. F. (2006). Chemicals and reproductive health. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 5(1), 50-59.

Thibaut, R., Debrauwer, L., Rao, D. ve Cravedi, J. P. (1999). Urinary metabolites of 4-n-nonylphenol in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Science of the total environment*, 233(1-3), 193–200. [https://doi.org/10.1016/s0048-9697\(99\)00225-9](https://doi.org/10.1016/s0048-9697(99)00225-9)

Tietz N.W. (1986). Nutrition, vitamins and trace elemnts. In: textbook of clinical chemistry. Philadelphia: WB. Saunders Company.

Tinggi U. (2003). Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology letters*, 137(1-2), 103–110. [https://doi.org/10.1016/s0378-4274\(02\)00384-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4274(02)00384-3)

Tunc, O., Bakos, H. W. ve Tremellen, K. (2011). Impact of body mass index on seminal oxidative stress. *Andrologia*, 43(2), 121–128. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0272.2009.01032.x>

Uçgun, N. İ, Yarışan, A., Düzgüncinar, Ö. ve Gürsel, E. (2005). Diabetik retinopati ve oksidatif stres. *Journal of Retina and Vitreous*, 13(4), 299-302.

Ulukaya, E. (2003). Apoptozis Ders Notları. Bursa.

Urriola-Muñoz, P., Li, X., Maretzky, T., McIlwain, D. R., Mak, T. W., Reyes, J. G., ... Moreno, R. D. (2018). The xenoestrogens biphenol-A and nonylphenol differentially regulate metalloprotease-mediated shedding of EGFR ligands. *Journal of cellular physiology*, 233(3), 2247–2256. <https://doi.org/10.1002/jcp.26097>

Ünal, S. G., Take, G., Erdoğan, D., Göktas, G. ve Sahin, E. (2016). The effect of di-n-butyl phthalate on testis and the potential protective effects of resveratrol. *Toxicology and industrial health*, 32(5), 777–790. <https://doi.org/10.1177/0748233713512364>

Vadhanavikit, S., Ip, C. ve Ganther, H. E. (1993). Metabolites of sodium selenite and methylated selenium compounds administrated at cancer chemoprevention levels in the rat. *Xenobiotica*, 23, 731-745.

Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M. ve Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-biological interactions*, 160(1), 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>

Ventela, S. (2003). Regulation of spermatogenesis: Differentiation of GFP-labeled stemm cells and the function of cytoplasmic bridges. Turun Ylipiston Julkaisija Annales Universitatis Turkuensis, Turku.

Wang, H., Shao, B., Yu, H., Xu, F., Wang, P., Yu, K., ... Cao, Z. (2019). Neuroprotective role of hyperforin on aluminum maltolate-induced oxidative damage and apoptosis in PC12 cells and SH-SY5Y cells. *Chemico-biological interactions*, 299, 15–26. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2018.11.016>

Warhurst, A. M. (1995). An Environmental assessment of alkylphenol ethoxylates and alkylphenols.

Wing, T. Y. ve Christensen, A. K. (1982). Morphometric studies on rat seminiferous tubules. *The American journal of anatomy*, 165(1), 13–25. <https://doi.org/10.1002/aja.1001650103>

Witt, J. M. (1988). Chemistry, biochemistry, and toxicology of pesticides. Corvallis, OR: Oregon State University Extension Service.

Wong, W. Y., Merkus, H. M., Thomas, C. M., Menkveld, R., Zielhuis, G. A. ve Steegers-Theunissen, R. P. (2002). Effects of folic acid and zinc sulfate on male factor subfertility: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Fertility and sterility*, 77(3), 491–498. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(01\)03229-0](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(01)03229-0)

Wrobel, K. H. ve Schimmel, M. (1989). Morphology of the bovine Sertoli cell during the spermatogenetic cycle. *Cell and tissue research*, 257(1), 93–103. <https://doi.org/10.1007/BF00221638>

Xiao, X., Mruk, D. D. ve Cheng, C. Y. (2013). c-Yes regulates cell adhesion at the apical ectoplasmic specialization-blood-testis barrier axis via its effects on protein recruitment and distribution. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 304(2), E145–E159. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00422.2012>

Yan, P. (2000). Male Reproductive Physiology. In: Zhao XX, Zhang RC (Eds.), Recent Advances in Yak Reproduction. USA: International Veterinary Information Service.

Yan, L., Bai, X. L., Fang, Z. F., Che, L. Q., Xu, S. Y. ve Wu, D. (2013). Effect of different dietary omega-3/omega-6 fatty acid ratios on reproduction in male rats. *Lipids in health and disease*, 12, 33. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-12-33>

Yang, X., Zhang, X., Zhang, J., Ji, Q., Huang, W., Zhang, X. ve Li, Y. (2019). Spermatogenesis disorder caused by T-2 toxin is associated with germ cell apoptosis mediated by oxidative stress. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, 251, 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.05.023>

Yapar, S. B. (2014). Alfa lipoik asitin rat karaciğer homojenatlarında indüklenmiş lipid peroksidasyonuna etkisi. *Türk Biyokimya Dergisi*, 39(3), 317-327.

Yeşilayer, N., Doğan, G. ve Erdem, M. (2008). Balık Yemlerinde Doğal Karotenoid Kaynaklarının Kullanımı. *Journal of Fisheries Sciences* ISSN 1307.

Yılmaz, F. (2006). Desfluranın antioksidan etkinliğinin propofol ile karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi.

Yılmaz, İ. (.2005). Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi. Uzmanlık Tezi. Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul, Türkiye..

Yılmaz, Ş. N. (2001). Azoospermik İnsan Testis Biyopsi Örneklerinde Endotelial Nitrik Oksit Sentazın İmmünohistokimyasal Olarak Gösterilmesi. 15. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi.

Ying, G. G. (2006). Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. *Environment international*, 32(3), 417–431. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.07.004>

Yokosuka, M., Ohtani-Kaneko, R. ve Yamashita, K. (2008). Estrogen and Environmental estrogenic Chemical sexert developmental effects on rathypothalamicneuronsandglias. *Toxicology in Vitro*, 22 (1), 1-9.

Young, I. S. ve Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. *Journal of clinical pathology*, 54(3), 176–186. <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>

Zhang, Y., Maier, W. ve Miller, J. R. M. (1997). Effect of Rhamnolipids on the Dissolution, Bioavailability, and Biodegradation of Phenanthrene. *Environmental Science & Technology*, 31, 2211-2217.

Zheng, S., Turner, T. T. ve Lysiak, J. J. (2006). Caspase 2 activity contributes to the initial wave of germ cell apoptosis during the first round of spermatogenesis. *Biology of reproduction*, 74(6), 1026–1033. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.044610>

Zhou, X. C., Wei, P., Hu, Z. Y., Gao, F., Zhou, R. J. ve Liu, Y. X. (2001). Role of Fas/FasL genes in azoospermia or oligozoospermia induced by testosterone undecanoate in rhesus monkey. *Acta pharmacologica Sinica*, 22(11), 1028–1033.

Ziegler D. M. (1985). Role of reversible oxidation-reduction of enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. *Annual review of biochemistry*, 54, 305–329.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.001513>

Zirkin, B. R. ve Chen, H. (2000). Regulation of Leydig cell steroidogenic function during aging. *Biology of reproduction*, 63(4), 977–981.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod63.4.977>

