T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA FORMALDEHİT MARUZİYETİYLE TESTİSLERDE OLUŞAN MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

NAZIM KUVVETLİOĞLU

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2012

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970027

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SIÇANLARDA FORMALDEHİT MARUZİYETİYLE TESTİSLERDE OLUŞAN MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

NAZIM KUVVETLİOĞLU

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Ülker SÖNMEZ

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012.KB.SAG.018 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2010970027

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Nazım KUVVETLİOĞLU' nun **'SIÇANLARDA FORMALDEHİT MARUZİYETİYLE TESTİSLERDE OLUŞAN MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ '** konulu Yüksek Lisans tezini 14/01/2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Doç. Dr. Ülker SÖNMEZ
BAŞKAN

Doç. Dr. Işıl TEKMEN
ÜYE

Prof. Dr. Gülgün OKTAY
ÜYE

Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR
(YEDEK ÜYE)

Doç. Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR
(YEDEK ÜYE)

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER i
TABLO DİZİNİ iv
ŞEKİL DİZİNİ v
KISALTMALAR vii
ÖZET 1
ABSTRACT 3
1. GİRİŞ VE AMAÇ 5
2. GENEL BİLGİLER 8
2.1. Testis 8
2.1.1. Testis Embriyolojisi 8
2.1.2. Testis Anatomisi 8
2.1.3. Testis Histolojisi 11
2.1.4. Testis Fizyolojisi 25
2.2. Formaldehit 27
2.2.1. Formaldehitin Kimyasal Özellikleri 27
2.2.2. Formaldehitin Kaynakları Ve Kullanım Alanları 27
2.2.3. Formaldehitin Organizmadaki Metabolizması 28
2.2.4. Formaldehitin Üreme Sistemi Üzerine Etkisi 28
2.3. Serbest Radikaller 29
2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri 30
2.3.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücresel Etkileri 32
2.4. Apoptozis 37
2.4.1. Apoptozisin Terminolojisi 37
2.4.2. Apoptozisin Biyolojik Süreçlerdeki Rolü 37
2.4.3. Apoptozisin Oluşumu 38
2.4.4. Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler 39
2.4.5. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar 40
2.4.6. Spermatogenezde Apoptozisin Rolü 42
2.5. Antioksidanlar 43
2.5.1. N-Asetilsistein 45

2.6. Testis Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Sistem 46
3. GEREÇ VE YÖNTEM 47
3.1. Araştırmanın Tipi 47
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı 47
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları 47
3.4. Çalışma Materyali 48
3.5. Araştırmanın Değişkenleri 48
3.6. Veri Toplama Araçları 48
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler 48
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler 49
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi 66
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi 66
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları 66
3.10. Etik Kurul Onayı 66
4. BULGULAR 67
4.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi 67
4.2. Histokimyasal Bulgular 68
4.2.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi 68
4.2.2. Masson-Trikrom Boyama Değerlendirmesi 71
4.2.3. PAS Boyama Değerlendirmesi 73
4.3. Morfometrik Bulgular 75
4.3.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması 75
4.3.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü 76
4.3.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü 77
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular 78
4.4.1.TUNEL Boyama Değerlendirmesi 78
4.4.2. Aktif Kaspaz 3 Boyama Değerlendirmesi 80
4.5. Biyokimyasal Bulgular 83
4.5.1. MDA Düzey Değerlendirmesi 83
4.5.2. GSH Düzey Değerlendirmesi 84
4.5.3. SOD Düzey Değerlendirmesi 85

5. TARTIŞMA..... 87
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 90
7. KAYNAKLAR..... 91
8. EKLER.....101

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Sertoli hücrelerinin görevleri 23
Tablo 2: Kaynaklarına göre antioksidanlar. 44
Tablo 3: Doku takip protokolü. 50
Tablo 4: Hematoksilen-Eozin boya protokolü. 51
Tablo 5: Masson Trikrom boya protokolü. 52
Tablo 6: Peryodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü. 54
Tablo 7: Jonhson testiküler biopsi skorlaması 55
Tablo 8: Aktif kaspaz 3 boya protokolü. 58
Tablo 9: MDA Standartlarının hazırlanması. 61
Tablo 10: GSH Standartlarının hazırlanması. 63
Tablo 11: SOD Standartlarının hazırlanması. 65

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Erkek üreme yolu anatomik organizasyonu 11
Şekil 2: Erkek üreme yolu anatomik organizasyonu 13
Şekil 3: İntertisyel dokuyla birlikte seminifer tübülün bir parçası 15
Şekil 4: Spermiyogenez süresince spermatidlerde ortaya çıkan başlıca değişiklikler. 19
Şekil 5: Nükleer ve mitokondriyal DNA oksidasyonu. 33
Şekil 6: Lipid peroksidasyonu. 34
Şekil 7: Lipid peroksidasyonu sonucu lipid peroksiylerinin oluşumu. 35
Şekil 8: Apoptoziste yolaklar..... 39
Şekil 9: Antioksidan sistemleri. 43
Şekil 10: N-asetilsisteinin yapısı 45
Şekil 11: Grupların deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlıkları. 67
Şekil 12: Sham grubuna ait kesit. Sınırları düzgün seminifer tübüllerde (SMT), düzenli dizilim gösteren germ hücreleri (GH) intertisyel alandaki poligonal şekilli leydig hücreleri, spermatogonyumlar ve kan damarları gözlenmektedir. H&E, X4, X10, X20 ve X40 büyütme. 68
Şekil 13: Formaldehit grubuna ait kesit. Spermatosit hücrelerinde, sertoli hücrelerinde ve sprematozoa hücrelerinde kayıp, ve lümende germinal epitel döküntüsü gözlenmektedir. H&E, X4, X10, X20 ve X40 büyütme. 69
Şekil 14: Formaldehit grubuna ait kesit. Germinal epitelde düzensizlik, lümende germinal epitel döküntüsü ve kan damarları gözlenmektedir. H&E, X4, X10, X20 ve X40 büyütme. 1
Şekil 15: N-asetilsistein grubuna ait kesit. Normale yakın morfolojiye sahip seminifer tübüllerde düzenli dizilim gösteren germ hücreleri (GH) intertisyel alandaki poligonal şekilli leydig hücreleri, spermatogonyumlar ve kan damarları gözlenmektedir. H&E, X4, X10, X20 ve X40 büyütme. 71
Şekil 16: Sham grubuna ait kesit. Normal yapıdaki intertisyel alan ve kan damarındaki bağ doku gözlenmektedir. Masson Trikrom, X10 ve X20 büyütme..... 72
Şekil 17: Formaldehit grubuna ait kesit. İntertisyel alandaki bağ doku artışı gözlenmektedir. Masson Trikrom, X10 ve X20 büyütme. 72

Şekil 18: N-asetilsistein grubuna ait kesit. Normale yakın morfolojideki intertisyel alan gözlenmektedir. Masson Trikrom, X10 ve X20 büyütme. 73
Şekil 19: Sham grubuna ait kesit. Normal kalınlıktaki bazal membran gözlenmektedir. PAS, X100 büyütme. 73
Şekil 20: Formaldehit grubuna ait kesit. Kalınlaşmış bazal membran gözlenmektedir. PAS, X100 büyütme. 74
Şekil 21: N-asetilsistein grubuna ait kesit. Normale yakın kalınlıktaki bazal membranla çevrili seminifer tübüller gözlenmektedir. PAS, X100 büyütme. 75
Şekil 22: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması. 76
Şekil 23: Grupların seminifer tübül çap ortalaması. 77
Şekil 24: Grupların seminifer tübül bazal membran kalınlığı ortalaması. 78
Şekil 25: Sham grubuna ait kesit. TUNEL (+) hücreler gözlenmektedir. TUNEL, X20 ve X40 büyütme. 78
Şekil 26: Formaldehit grubuna ait kesit. Artan TUNEL (+) hücreler gözlenmektedir. TUNEL, X20 ve X40 büyütme. 79
Şekil 27: N-asetilsistein grubuna grubuna ait kesit. Az sayıdaki TUNEL (+) hücreler gözlenmektedir. TUNEL, X20 ve X40 büyütme. 79
Şekil 28: Grupların TUNEL (+) hücre sayısı. 80
Şekil 29: Sham grubuna ait kesit. Aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücreler gözlenmektedir. Aktif kaspaz-3, X40 büyütme. 81
Şekil 30: Formaldehit grubuna ait kesit. Artan sayıdaki aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücreler gözlenmektedir. Aktif kaspaz-3, X40 büyütme. 81
Şekil 31: N-asetilsistein grubuna grubuna ait kesit. Aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücre sayısındaki azalma gözlenmektedir. Aktif kaspaz-3, X40 büyütme. . 82
Şekil 32: Grupların Kaspaz-3 immünreaktivite gösteren hücre sayısı. 83
Şekil 33: Grupların MDA düzey ortalamaları. 84
Şekil 34: Grupların GSH düzey ortalamaları. 85
Şekil 35: Grupların SOD düzey ortalamaları. 86

KISALTMALAR

FA..... Formaldehit

ml..... Mililitre

ppm..... Part Per Million

ROS..... Reaktif Oksijen Türleri

NAC..... N-Asetilsistein

GSH..... Glutatyon

cm..... Santimetre

g..... Gram

µm..... Mikrometre

m..... Metre

DNA..... Deoksiribonükleik Asit

PAS..... Periyodik Asit Schiff

ATP..... Adenozin Trifosfat

ATPaz..... Adenozin Trifosfataz

FSH..... Follikül Uyarıcı Hormon

LH..... Lüteinleştirici Hormon

RH..... Releasing Hormon

ABP..... Androjen Bağlayıcı Protein

FDH..... Formaldehit Dehitrogenaz Enzimi

MDA..... Malondialdehit

SLE..... Sistemik Lupus Eritematozusta

RA..... Romatoit Artritte

IgG..... İmmünoglobülin G

RNA..... Ribonükleik Asit

TNF..... Tümör Nekroz Faktör

hCG..... Human Chorionic Gonadotropin

NADPH..... Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat

SOD..... Süperoksit Dizmutaz

kg..... Kilogram

i.p..... İntraperitoneal

TUNEL..... Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling

SPSS..... Statistical Package For The Social Sciences

TdT..... Terminal Deoksinükleotidil Transferaz

DAB..... Diaminobenzidine

PBS..... Fosfat Buffer Salin

BHT..... Bütillenmiş Hidroksitoluen

BCA..... Biçinkoninik Asit

BSA..... Sığır serum Albumin

TOMP..... Tetramethoxypropane

mM..... Milimolar

DTNB..... 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit

TNB..... 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit

MES..... 2-(N-morfolino)etanesulfonik asit

Sn..... Saniye

nm..... Nanometre

MPA..... Metafosforik Asit

µl..... Mikrolitre

TEAM..... Trietanolamin

µM..... Mikromolar

HEPES..... 4-(2-hidroksiethil)-1-piperazineetanesulfonik Asit

EGTA..... Etilene Glikol Tetraasetik Asit

HPLC..... Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

H&E..... Hematoksilen Eozin

TEŞEKKÜRLER

Histoloji ve Embriyoloji yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabrından dolayı değerli danışman hocam Doç. Dr. Ülker SÖNMEZ'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca engin tecrübe ve bilgilerini benden esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Işıl TEKMEN'e, Doç. Dr. Kazım TUĞYAN'a, Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR'e, Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK'a, Doç. Dr. Güven ERBİL'e ve Doç. Dr. Çetin PEKÇETİN'e,

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Dr. Serap CİLAKER MICILI' ya, Dr. Seda ÖZBAL'a, Biyolog Özcan ÜSTÜN'e ve Biyolog Sedef MENKÜ' ye,

Hem eğitim hem de aile hayatımı paylaştığım, bana her konuda destek olan değerli ağabeyim Dr. Mostafa ASHRAFİ'e,

Tez çalışmaları döneminde yardımlarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Gülgün OKTAY'a ve Uzm. Biyokimyager Didem KELEŞ'e, Laboratuvar Hayvanları Anabilim Dalı üyesi Laboratuvar Hayvanları Uzm. Efsun KOLATAN'a ve yüksek lisans öğrencisi Gökmen BALTACIOĞLU'na, Moleküler Tıp Anabilim Dalı yüksek lisans öğrencisi Derya Murat ÖZGÜN'e,

Yüksek lisansa başladığım günden beri daima bilimsel ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan başta Nihan SEMERCİ olmak üzere tüm yüksek lisans arkadaşlarıma,

Tüm eğitim hayatım boyunca ve attığım her adımda beni yalnız bırakmayan, daima destekleyen aileme teşekkürü bir borç bilirim.

SIÇANLARDA FORMALDEHİT MARUZİYETİYLE TESTİSLERDE OLUŞAN MORFOLOJİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE N-ASETİLSİSTEİNİN ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Nazım KUVVETLİOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
nazimkuvvetlioglu@hotmail.com
Balçova, İZMİR

ÖZET

Amaç:

Çalışmamızda, formaldehitin testisler üzerine olan toksik etkileri ve bu toksik etkilere karşı N-asetilsistein'in koruyucu etkisi histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal düzeylerde araştırıldı.

Yöntem:

Çalışmamızda, 21 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan üç gruba ayrıldı. Grup I'deki sıçanlar sham olarak kullanıldı ve bu gruptaki sıçanlara her gün fizyolojik serum enjekte edildi. Grup II'deki sıçanlara gün aşırı olarak formaldehit enjekte edildi. Grup III'deki sıçanlara ise gün aşırı olarak formaldehit enjeksiyonu ile birlikte her gün N-asetilsistein uygulandı. Bir aylık deney süresi sonunda, bütün sıçanlar eter anestezisi altında sakrifiye edildi. Daha sonra, sıçanların testisleri çıkartılarak çevre dokulardan ayrıldı. Testis örneklerinin bir bölümü histokimyasal ve immunohistokimyasal incelemeler için kullanıldı. Testis örneklerinin diğer kısmında ise süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ile malondialdehit (MDA) ve glutatyon (GSH) seviyeleri belirlendi.

Bulgular:

Yapılan histokimyasal incelemelerde kontrol grubunda normal testis yapısı gözlendi. Formaldehit grubunda seminifer tübüllerinde düzensiz dizilmiş germ hücreleri, germ hücre kaybı, intertisyel alanda bağ doku artışı ve bazal membran

kalınlaşması gözlendi. N-asetilsistein grubunda ise normale yakın morfolojide testis yapısı gözlendi. Yapılan immunohistokimyasal incelemeler sonucu formaldehit grubu seminifer tübüllerinde sham grubuna oranla TUNEL (+) boyanan hücre sayısının ve aktif kaspaz 3 immunpozitif boyanan hücre sayısının arttığı, koruyucu olarak N-asetilsistein verilen grupta ise immunpozitif boyanan hücre sayısının azaldığı gözlendi. Biyokimyasal olarak ölçülen MDA, GSH ve SOD düzeyleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Sonuç:

Sonuç olarak, formaldehit maruziyetine bağlı olarak testisde oluşan histokimyasal hasarın ve apoptozisin N-asetilsistein uygulamasıyla baskılandığı belirlendi.

Anahtar Sözcükler:

Testis, Formaldetit, N-asetilsistein, Sıçan

EFFECTS OF N-ACETYLCYSTEINE AGAINST FORMALDEHYDE INDUCED MORPHOLOGICAL CHANGES IN RAT TESTES

ABSTRACT

Objective:

In our study, toxic effects of formaldehyde on testises and protective effects of n-acetylcysteine against these toxic effects were investigated at histolochemically, imunohistochemically and biochemically levels.

Method:

In our study, 21 male Wistar-Albino rats were divided into three groups. Rats in group I were used as sham and this rats in grup were injected with physiological saline every day. Rats in group II were injected every other day with formaldehyde. Rats in group III were administered n-acetylcysteine everyday with every other day injection of formaldehyde. At the end of one month experimental period, all rats were sacrificed under anesthesia of ether. Then the testes of rats were removed and dissected from the surrounding tissue. The some of testis specimens were used for histochemical and immunohistochemical examination. In the other part of the testis samples, superoxide dismutase (SOD) enzyme activity and malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) levels were determined.

Results:

Histochemically investigations showed that on Formaldehyde group's seminifer tubules showed irregularly arranged group of germ cells, germ cell deprivation, increase of connective tissue on interstitial area and thickening basement membrane. No significant changes were seen in N-acetylcysteine Protective Effect group. After immunohistochemical investigations apoptotic cell death was increased in Formaldehyde group compared with Sham group. N-acetylcysteine group decreased TUNEL (+) cells and Active Caspase 3 immunoreactive cells compared

with Formaldehyde group. As measured by biochemical MDA, GSH and SOD levels between all the groups were not statistically significant.

Conclusion:

In conclusion, it was determined that histochemical damage and apoptosis in testis caused by exposure of formaldehyde were suppressed by administration of N-acetylcysteine.

Key Words:

Testis, Formaldehyde, N-acetylcysteine, Rat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Formaldehit, çevreye hem doğal hem de endüstriyel kaynaklardan salınır. Doğal olarak hidrokarbonların oksidasyonu sonucu ortaya çıkar. Yerleşim bölgelerindeki konsantrasyonunun 1-20 μg/m^3 civarında olduğu Dünya Sağlık Örgütü tarafından bildirilmiştir. Sigara dumanı, kozmetik ürünler, boya, plastik, yapı malzemeleri, tekstil ve kâğıt ürünleri formaldehit içeren bazı maddelerdir (1). Glisin ve serin insanda en önemli endojen formaldehit kaynaklarıdır. Ayrıca N-metilli aminoasitler ve sarkosin de spesifik enzimler aracılığı ile oksidatif demetilasyonla formaldehite dönüşürler. Endojen doku düzeyleride formaldehit 3-12 ng/g arasında değişir ve bunun da % 40'ı serbest formdur. Yarılanma hızı çok kısadır (*t1/2 =1.5 dakika*) (2). Formaldehit antimikrobiyal özelliğinden ötürü, sterilize edici ajan ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Özellikle yüzey ve oda dezenfeksiyonu için vazgeçilmez bir maddedir (3). Endüstriyel alanlarda da formaldehit yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle, boya ve plastik yapımı, tekstil endüstrisi ve mobilya sanayisinde formaldehit kullanımı mevcuttur. Ayrıca tıp alanında ve de özellikle laboratuvarlarda formaldehit kullanımı göze çarpmaktadır. Anatomide kadavra ve organların tespiti, histoloji ve patoloji laboratuvarlarında ise dokuların fiksasyonu aşamasında kullanılır. Diş hekimliğinde, kaplamaların yapım aşamasında da formaldehit kullanımı mevcuttur. Bunun yanı sıra hemodiyaliz solüsyonlarının da formalin içerdiği bilinmektedir (4-8).

Aldehit ailesinin üyesi olan formaldehit (FA); renksiz, keskin kokulu ve suda çok iyi çözünen bir gazdır. Kimyasal formülü HCHO olup, molekül ağırlığı 30 g, erime noktası -92^oC, kaynama noktası ise -21^oC' dir. Keskin kokulu olan saf formu solunum yolları için son derece irritandır. Formaldehit güçlü elektrofilik özelliğe sahiptir ve bu nedenle reaktif bir maddedir. Bulunduğu her ortamda ve oda sıcaklığında gaz haline dönüşebilir. Metanolün oksidasyonuyla sıvı formu elde edilir. %37' lik sulu çözeltisine formalin, polimerize olmuş katı haline ise paraformaldehit adı verilir. Sıvı haldeki formu mililitre (ml) cinsinden belirlenirken, gaz hali ise part per million *(ppm)* olarak ifade edilir (4, 9).

Formaldehitin germ hücrelerine zarar verdiği ve her iki cinste de primer ve sekonder infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (10). Kadınlarda menstruel fonksiyonları bozmakta ve teratojenik potansiyele sahip olduğu için gebeliği ve

embriyonal gelişmeyi tehdit etmektedir (11). Formaldehit ihtiva eden laboratuvarlarda çalışan kişilerin germ hücrelerine ve özellikle de gebe kadınların gelişmekte olan fetuslarına karşı formaldehitin tehdit edici bir unsur olduğu ileri sürülmektedir (12). Çalıştıkları ortam gereği formaldehite maruz kalan kadınlarda, spontan abortus, anemi ve düşük doğum ağırlıklı bebek gibi bazı doğumsal ve doğumsal olmayan patolojiler bildirilmiştir (13).

Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, formaldehitin sperm sayısı ve miktarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (14). Yine deneysel olarak yapılmış olan araştırmalarda, formaldehitin testis morfolojisinde değişikliklere neden olduğu ortaya konmuştur. Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiş bu çalışmalarda, formaldehitin testis ağırlıkları ve seminifer tubül çaplarında azalmaya neden olduğu ve leydig hücrelerinde histopatolojik değişikliklerin meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca formaldehit maruziyeti sonucu, serum testosteron seviyelerinde bir düşüşün de oluştuğu tespit edilmiştir (15, 16).

Ayrıca birçok çalışmada formaldehitin testis dokusu dahil birçok dokuda reaktif oksijen türlerini (ROS) arttırdığı gösterilmiştir. ROS'un içerdiği singlet oksijen, hidrojen peroksit, süperoksit iyonları ve hidroksil radikalleri hücreye zarar veren önemli mediyatörlerdendir ve oksidatif zararda önemli rol oynarlar (17, 18, 19).

Formaldehit hasarının önlenmesi amacıyla her geçen gün yeni bir tedavi stratejisi geliştirilmekte, deneysel ve klinik çalışmalarla farklı antioksidan maddelerin, ilaçların koruyucu ve/veya tedavi edici etkinliği araştırılmaktadır. Testiste gerçekleşen formaldehit hasarının antioksidan ilaçlarla düzeltilebildiği yapılan araştırmalarda saptanmıştır (19, 20).

Ekzojen bir antioksidan olan N-asetilsistein (NAC), L-sistein aminoasidinin N-asetil türevidir. N-asetilsistein, sahip olduğu tiyol (-SH) grupları nedeniyle süperoksit radikali, hidroksil radikali, hipokloröz asit (HOC_1) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi oksidanlar ile direkt olarak etkileşerek radikal toplayıcı etki gösterir. Radikal toplayıcı etkisi in vitro olarak oldukça hızlı olmasından dolayı direkt etkili, in vivo olarak hızlı parçalandığı içinse antioksidan etkisinin indirekt etkili olduğu bildirilmektedir (4). N-asetilsistein deasetilasyona uğrayarak sistein oluşmasına yol açmaktadır. Sistein

hücresel glutatyon sentezinde kullanılmaktadır. N-asetilsisteinin antioksidan rolünün glutatyon öncülü olması, glutatyon sentezinde yer alan enzimleri stimule ederek hücresel glutatyon (GSH) azalmasını engellemesinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (10, 11). N-asetilsistein, apopitozu önleyebilmekte, çeşitli proteinlerin aktivitelerini düzenleyerek hücrenin yaşam sürecini uzatmaktadır. Ayrıca, endotelyal disfonksiyonunu azaltmakta, inflamasyon, fibroz, invazyon, kartilaj erozyonu, asetaminofen detoksifikasyonunun geciktirilmesini sağlamaktadır (12).

Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğunda, farklı patolojik durumlarda N-asetilsisteinin antioksidan etkisi üzerinde durulmuştur ancak formaldehite maruz kalmış testislere karşı koruyucu etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda sıçanlara uygulanan formaldehit maruziyeti sonucu testislerde oluşacak hasara karşı N-asetilsisteinin koruyucu etkisini histokimyasal, immunohistokimyasal, ve biyokimyasal olarak ortaya koymayı amaçladık. Yapacağımız çalışmanın literatüre ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkısı olacağı inancındayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

2.1.1. Testis Embriyolojisi

Vitellus kesesi duvarında bulunan endodermal primordial germ hücreleri üçüncü haftada allantoisi aşarak bağırsağın arka kısmında bulunan Radix mesenterii'nin sağında ve solunda mezonefrozun medialindeki Plica genitalis adını alan mezoteldeki gonadal kabartı içine girmesi ve beşinci haftanın başında buradaki hücreleri indüklemesi ile gonad taslakları gelişmeye başlar. Yedinci haftadan itibarense embriyo erkeklik veya dişilik yönünde gelişmeye devam eder.

Embriyodaki primordial hücrelerin etrafını plika içindeki mezodermal hücreler sarar. Endodermal primordial hücrelerden erkekte spermatogoniumlar, dişide ise oogoniumlar gelişirken; mezodermal hücrelerden ise erkekte sertoli hücreleri, dişide ise follikül hücreleri gelişir.

Seks kromozom kompleksinde Y kromozomu taşıyan embriyolarda testisler gelişir. Primer seks kordonları uzayarak farklılaşmamış gonad medullasına kadar iner. Kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomozlar yapar ve rete testis oluştururlar. Gonad taslakları dışında tunica albuginea geliştikten sonra seks kordonları seminifer tübüllere ve düz tübüllere (Tubuli recti) farklılaşırlar. Seminifer tübüller arasındaki mezenşimal bağ dokuda Leydig hücreleri gelişir ve bu hücreler sekizinci haftadan itibaren testosteron salgılamaya başlarlar.

Ergenlikten önce seminifer tübüllerde lümen oluşmamıştır ve sadece sertoli hücreleri ile spermatogoniumlar vardır. Bu dönemde hücrelerde mitoz bölünme gözlenirken mayoz bölünme gözlenmemektedir (21). Ergenlikten sonra ise bu hücrelere primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoonlar eklenmektedir (21, 22).

2.1.2. Testis Anatomisi

Erkekte temel üreme organı olan testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler (23). Erken fetal dönemde karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yer alan testisler fetüs geliştikçe aşağıya doğru hareket

ederek doğumdan hemen önce kanalis ingunalis aracılığıyla skrotuma inerler. Testisler temel fonksiyonlarını yapabilmeleri için karın boşluğundan skrotuma inmeleri zorunludur.

Testisler, sağlı sollu bir çift olarak skrotum denilen bir kese içinde asılı durumda bulunurlar (23). Testisler, uzun eksenleri yukarıdan aşağıya olup, yanlardan hafif basık ovoid şekilli organlardır. Kendine özgü bir sertliğe sahip olan beyaz görünümlü testislerin büyüklükleri kişiden kişiye değişmekle beraber, ortalama 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde, 2-3 cm kalınlığında ve 20-30 gr ağırlığındadır. Testisler yaklaşık aynı büyüklükte olmalarına rağmen, yapısal olarak sol testis sağdakine göre biraz daha aşağıda yer alır. Ayrıca sağ testis sola göre %10 daha ağırdır. Sıcaklıkları vücut sıcaklığından 3-4^{0}C daha düşüktür (Şekil 1) (23, 24).

Testisler temel fonksiyonlarını yapabilmek için skrotuma inişleri sırasında karın ön duvarı tabakalarını da sürüklerler. Bu nedenle şu tabakalarla kaplıdırlar;

1. Deri
2. Tunika dartos

} Skrotum

3. Fasia spermatika eksterna
4. Fasia kremasterika
5. Fasia spermatika interna

Her bir testisin fasia medialis (iç yan yüz) ve fasia lateralis (dış yan yüz) olmak üzere iki yüzü, margo anterior (ön kenar) ve margo posterior (arka kenar) olmak üzere iki kenarı, ekstremites superior (üst uç) ve ekstremite inferior (alt uç) almak üzere de iki ucu vardır (23).

İç yan yüzü konveks olup, arkada üst kenara yakın bir bölümünden başka, büyük bir parçası tunika vaginalis testisin visseral laminası ile örtülüdür. Dış yan yüz de konveks ve tunika vaginalis ile örtülü olup testisin üst kenarında olan epididim ile komşudur. Biraz konveks olan arka kenar bütün uzunluğunca epididim ile komşudur. Ön kenar serbesttir ve uzunluğunca tunika vaginalis testisin parietal laminası ile komşudur (23).

Üst uç, epididim başı ile örtülü olup burasını saran Lamina visseralis (epiorchium), doğrudan doğruya epididim üzerine atlar ve burada bir oluk meydana

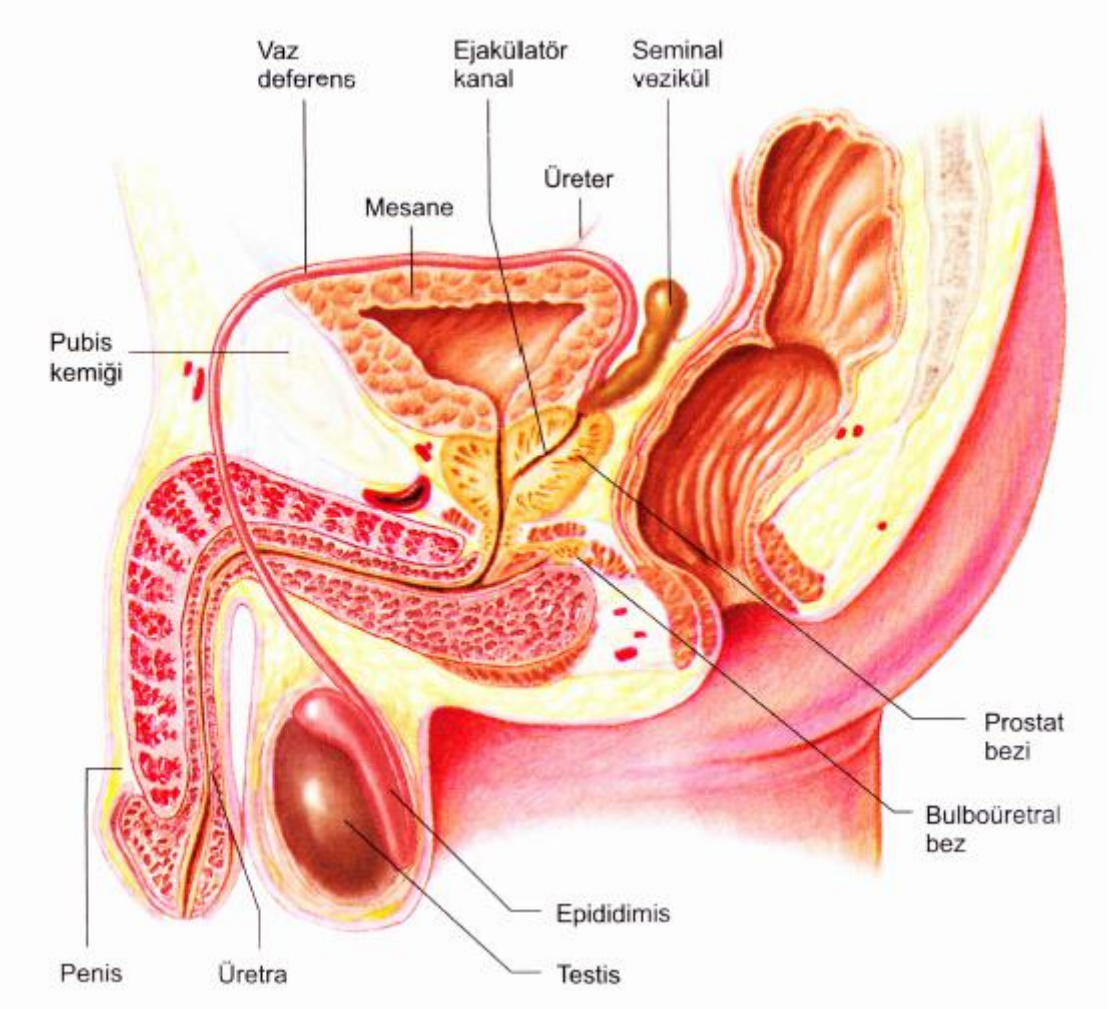
getirir. Bu şekilde oluşan kaput epididimisin hemen altında küçük oval bir cisimcik vardır. Appendiks testis denilen bu çıkıntı müller kanalı üst ucunun bir kalıntısıdır. Kaput epididimisin üstünde genellikle appendiks epididimis denilen bir çıkıntı vardır. Bu ayrılmış bir duktuli efferentestir. Alt uçta ligamentum skrotale denilen elastik ve düz kas liflerinden meydana gelmiş bir skrotal bağ ile skrotuma tutunmuştur (23).

Testisler arterlerini aorta abdominalisten alırlar. Arteria testikularis testise varıncaya kadar karın boşluğunun büyük bir kısmını ve inguinal kanalı geçmek zorundadır. Arteria testikularis testisin arka kenarından bezin içine sokulur ve mediastinum testiste birçok dallar verir. Bu dallar septula testisleri izleyerek bezin her tarafına dağılırlar ve zengin kapiller ağı yaparak testis kanalcıklarını sararlar. Arteria testikularis ile arteria vesikalis süperiör'ün bir dalı olan arteria defferentialis ve arteria femoralisten gelen ve skrotumda dağılan arteria pudendae eksterna arasında anastomozlar var ise de arteria testikularis'in bağlanması veya kesilmesi, kansızlığa karşı fazla hassas olmalarına karşı testiste hasara neden olur (23).

Venler duktus deferensin etrafında pleksus pampiniformis denilen bir ven ağı meydana getirirler. Bu ağdan önce iki, sonra birer tane vena testikularis meydana gelir. Vena testikularis dekstra, vena kava inferiör'e, vena testikularis sinistra, vena renalis'e dökülür (23).

Sinirler, sempatik ve parasempatik lifler pleksus coeliakustan arteria testikularis çevresinde bulunan pleksus testikularis ile gelirler. Bu sinirler bezlerin çalışmasını idare ederler (23).

Testislerin lenf damarları funikulus spermatikus'u izler ve nodus lenfatikus ile birleşirler (23).



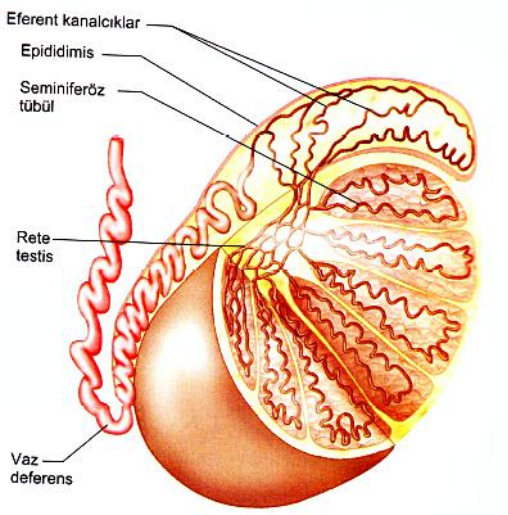
Şekil 1: Erkek üreme yolu anatomik organizasyonu (24)

2.1.3. Testis Histolojisi

Testisler karın boşluğunun dışında skrotum adı verilen bir deri içinde yer alan bir çift organdır. Aynı zamanda hem endokrin hemde ekzokrin fonksiyonu olan birleşik tübüler bir bezdir. Ekzokrin salgısı seminifer epitel tarafından salgılanan spermium isimli canlı hücre olması nedeniyle salgılama biçimi aktif holokrindir. Endokrin salgısı ise leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteron hormonudur. Olgun testisin posteriyor yüzü epididimis ile ilişkili olup, karın boşluğunun dışında skrotal kese içerisinide vaza deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile asılıdır. Bu yerleşimleri testislerin vücut ısısından 2^0C-3^0C düşük

bir ısıda olmalarını sağlar. Bu sayede normal bir spermatogenez için gerekli olan 34^0C-35^0C deki ortam şartları sağlanmış olur (25, 26).

Testis, tunika albuginea denen kalın fibröz bir kapsülle çevrilidir. Arka yüzünde sıkı bağ dokusu kısa bir mesafe boyunca tunika albugineadan içeriye doğru uzanarak mediyastinum testis denen damarların girdiği ve duktuli eferentesin organdan çıktığı yeri meydana getirir. Septula testis denen ince fibröz yapılar mediyastenden tunika albugineaya doğru ısınsal olarak yayılır, testisi ~250 piramidal kompartmana (lobuli testes) ayırır. Testisin periferi yakınında, lobüller septuladaki fenestrasyonlar aracılığıyla birbirileriyle temas halindedir. Fakat bunlar mediyastende birleştiklerinden lobüller tamamen ayrıdır. Testiste 250-350 lobül bulunur (23). Lobüllerin her biri 1-4 seminifer tübül içerir. İnsanda iki testiste toplam 800-1200 seminifer tübül bulunur ve her biri 30-80 cm uzunluğundadır. Bunların çapı 150-250 μm'dir ve oldukça kıvrıntılıdır. Etrafı zengin kapillerlerle çevrilidir. Her testiste seminifer tübülün toplam uzunlugu 300-900 m'dir. Her piramidal lobun daralmış tepesinde seminifer tübüller tubuli rekti denen düz tübüllerle birleşirler. Bu birleşme noktaları, mediyastinum testisteki bağ dokusu içerisinde bulunan ve boşlukları epitelle döşeli bir ağı, rete testisi oluştururlar. Buradan sonra duktuli efferentes testisten gelen spermatozoayı duktus epididimise iletir. Seminifer tübüllerin aralıkları oldukça vaskülarize gevşek bağ dokusuyla doludur (23). Lamina propriyanın gevşek bağ dokusu içerisinde damarlar ve bunların da çevresinde Leydig hücre kümeleri vardır (Lamina propriyanın kalınlaşarak fibröz bir karakter kazanması erkek infertilitesinin nedenlerinden biri olarak kabul edilir). Seminifer tübüller belirgin bir bazal membran ile çevrilidir ve bunun dışında lamina propriya adı verilen gevşek bağ dokusu ile devam ederler. Bazal membranın hemen dışında insanda, tübüllerin çevresinde 3-5 sıra kasılabilen (miyoid) hücre dizisi vardır (23). Bu hücrelerin ritmik kasılmasıyla seminifer tübüllerdeki sperm boşaltma kanallarına doğru ilerler. Her bir seminifer tübülü döşeyen epitelde iki tip hücre vardır (Şekil 2) (23, 24).



Şekil 2: Erkek üreme yolu anatomik organizasyonu (24)

Spermatogenetik Seriye Ait Olan Hücreler:

Spermatogenik Hücreler: Spermatogenik hücreler seminifer tübül epitelinde çeşitli olgunlaşma aşamalarında bulunan ve düzenli olarak bölünerek olgun spermlere farklanan 4-8 tabakalı hücrelerdir. Lümenden bazale doğru hücre tipleri sırası ile; spermiumlar, spermatidler, sekonder spermatositler, primer spermatositler ve spermatogonyumlardır (25).

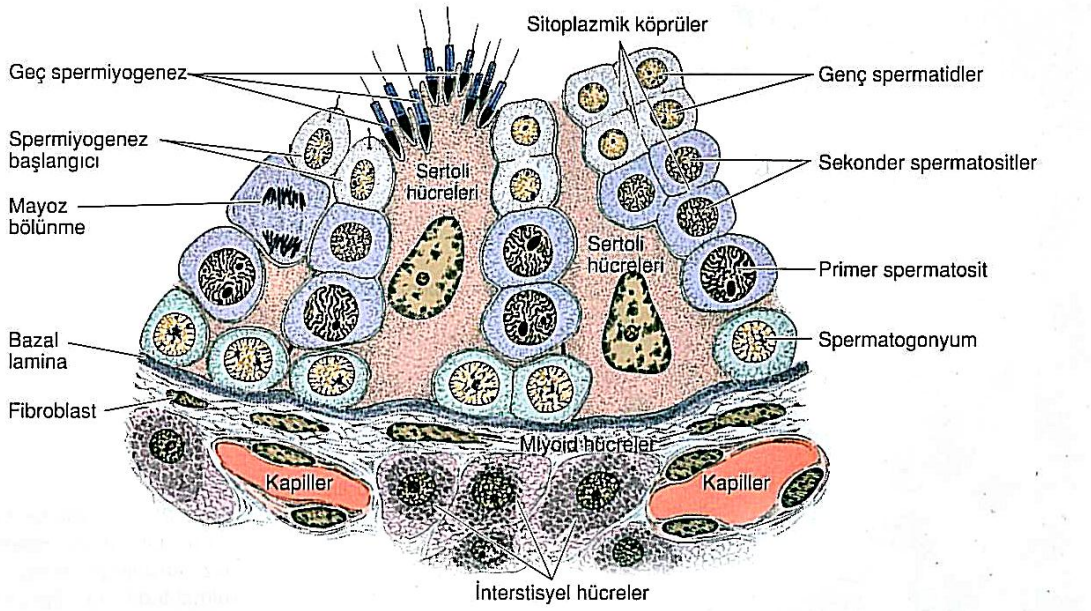
Spermatogonyumlar: Spermatogonyumlar, sertoli hücreleri arasındaki bağlantıların altında kalan bazal kompartmanda yer alırlar. Bu yüzden kan-testis bariyerinin dışında bulunurlar. Üç farklı tipi bulunur (27). Tip A spermatogonyumlar seminifer epitelin kök hücreleridir. Puberteden itibaren mitoz geçirerek soluk boyanan tip A açık spermatogonyumlar ile koyu boyanan tip A koyu spermatogonyumları meydana getirirler. Tip A açık spermatogonyumlar mitoz geçirerek tip B spermatogonyumları oluştururlar (28).

Spermatositler: Tip B spermatogonyumlar mitoz geçirerek primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositler de mayoz bölünme geçirirler. Mayoz I'in profaz evresi yaklaşık 22 gün sürdüğü için spermatogenik serinin en büyük ve histolojik kesitlerde en çok karşılaşılan hücreleri primer spermatositlerdir. Mayoz I'in sonunda oluşan sekonder spermatositler kısa süren bir interfaz evresi geçirdikleri ve hızla ikinci mayoz bölünmeye girdikleri için histolojik kesitlerde çok zor görülürler (26, 27).

Spermatidler: Sekonder spermatositler ikinci mayoz bölünmeyi tamamlayarak seminifer tübül lümeni yakınlarında sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntülerine yerleşmiş olarak bulunan spermatidleri oluştururlar. Spermatidler sertoli hücrelerinin apikal sitoplâzma katlantılarında spermiyogenez denilen bir farklılaşma sürecini geçirerek olgun spermiyumları oluştururlar. Olgun spermiumlar da spermiasyon denilen olayla seminifer tübül lümenine salınır. Sonuç olarak bir spermatogonyumdan dört olgun spermium oluşur (26, 27).

Spermiyumlar: İnsanlarda bir spermatogonyumdan olgun bir spermiyum yaklaşık olarak 64 günde meydana gelir ve bu süreç spermatogenezis olarak adlandırılır. Olgun bir spermiyum baş, boyun ve kuyruk bölgelerinden oluşur (29). Baş bölgesinde yassı biçimli çekirdeğin yarısını örten, özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom bulunur. Akrozom hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi hidrolitik enzimleri içerir (Şekil 3) (28, 30).

Boyun bölgesi baş ile kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlayan dar bir parçadır. Sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonemi oluşturan proksimal sentriolü ve distal sentriolü içerir (26). Kuyruk bölgesi ise orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç kısımdan oluşur. Kuyruğun orta parçasında sarmal olarak dizilmiş mitokondriler, 9+2 mikrotübüler yapıdaki aksonem ve dokuz adet dış yoğun fibriller bulunur. Esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır ve yedi adet dış yoğun fibrille sarılı merkezi aksonem ve fibröz kılıftan oluşur. Kuyruğun en kısa parçası olan son parçada yalnızca aksonem bulunur, dış yoğun fibriller ve fibröz kılıf bulunmaz (27, 30).



Şekil 3: İntertisyel dokuyla birlikte seminifer tübülün bir parçası. (30)

Seminifer Epitelin Siklusu:

Spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çesitli evrelerde bulunabilirler. Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu fenomen üç faza ayrılabilir: Spermatositogenez (Yun.Sperma; tohum+kytos; hücre+genesis; üretim) olarak adlandırılan evrede spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir. Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu gerçekleşen ve spermatidlerin oluştuğu evre mayoz adını alır. Spermiyogenez ise spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşması süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu safhadır. Spermatogenez, bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş bir germ hücresi olan, spermatogonyum ile başlar. Bu, yaklaşık 12 µm çapında, nispeten küçük bir hücredir ve nükleusu soluk boyanan kromatin içerir. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler ve yeni oluşan hücreler iki yol izleyebilir; bir ya da daha fazla mitotik bölünmeden sonra farklılaşmamış kök hücreler olan tip A

spermatogonyumlar (sperma+Yun, gone, nesil) olarak devam ederler ya da süregelen mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip A spermatogonyumlar spermatogenik serinin kök hücreleridir. Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatositlerden farklılaşan öncül (progenitör) hücrelerdir. Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Bu sırada primer spermatositin 46 (44+XY) kromozomu vardır ve DNA'sı da 4 n' dir. n haploid kromozom sayısını (bu insanlarda 23 adettir) ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını belirtmektedir. Bu profazda, hücreler dört faz leptoten, zigoten, pakiten ve diploten geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar ve sonuçta kromozomlar ayrılır. Genlerdeki "crossing-over" mayozun bu safhalarında oluşur. Daha sonra hücre metafaza girer ve kromozomlar takip eden anafazda her bir kutba doğru giderler. Bu bölünmede profazın yaklaşık 22 gün dolayında bir süre alması nedeniyle incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Spermatogenik seride en büyük hücreler primer spermatositlerdir, bunlar nükleuslarında kangal yapma sürecinin değişik safhalarında kromozomların bulunması ile tanınırlar. Birinci mayotik bölünmeden sonra sekonder spermatositler denilen ve yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Bu sayıca azalma (46'dan 23'e) her hücredeki DNA miktarının eksilmesi (4 n'den 2 n'e) ile birlikte olur. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayotik bölünmeye giren hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi spermatidlerin oluşmasına yol açar; bunlar 23 kromozom içerir. Birinci ve ikinci mayotik bölünmeler arasında spermatositlerde S fazı (DNA sentezi) görülmediği için ikinci bölünmeden sonra her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (1 n) hücreler meydana gelir. Böylece, mayotik sürecin sonunda haploid sayıda kromozomlara sahip hücreler oluşur. Fertilizasyonla bunlar normal diploid sayıya dönerler. Hücre bölünmesindeki indirgeyici işlev sebebiyle mayotik süreç kromozom sayısının türler için sabit, belirli bir miktarda kalmasını sağlar.

Spermiyogenez:

Spermatidler sekonder spermatositlerin bölünmesi ile oluşan hücrelerdir. Bunlar, diger hücrelerden küçük boyutları (7-8 µm çaplı), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan nükleusları ve seminifer tübüllerde lümen yakınında (jukstaluminal) yerleşmeleri ile tanınırlar. Spermatidler spermiyogenez denen karmaşık ve farklılaşma süreci geçirirler. Bu süreçte, akrozom oluşur, nükleus yoğunlaşır ve uzar, flagellum gelişir ve sitoplazmanın çoğu kaybolur. Sonuçta seminifer tübülün lümenine salınan olgun spermatozoon meydana gelir. Spermiyogenez üç faza ayrılabilir (23).

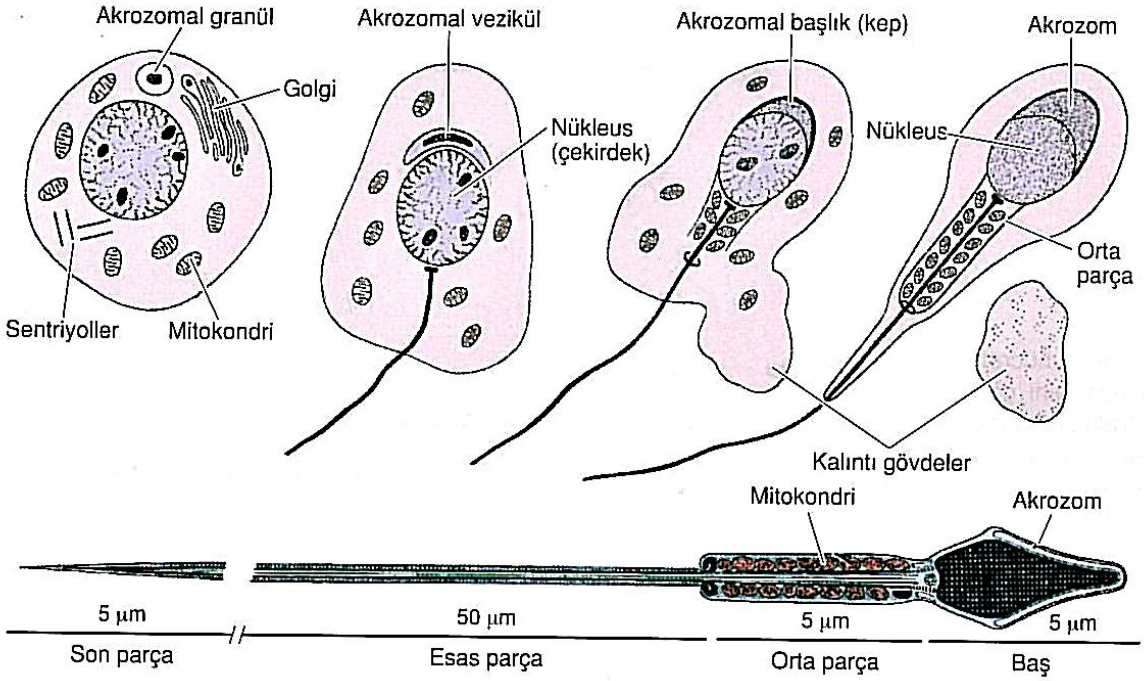
1. Golgi Fazı: Spermatidlerin sitoplazması, çekirdeğin yakınında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazma retikulumu tübülleri içerir. Küçük PAS-pozitif proakrozomal granüller Golgi kompleksinde birikirler ve bunun hemen sonrasında birleşerek membranla sınırlanmış bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal granülü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek akrozomun oluştuğu bölgenin karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar ve sentriyoller yeniden nükleusa doğru geri dönerken hareket ettikçe aksonemal komponentleri çevresine sarar.

2. Akrozomal Faz: Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş görür. Bu enzimlerin, korona radiata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Bunlar henüz ovulasyona uğramış yumurtayı çevreleyen yapılardır. Spermatozoonlar ovumla karşılaştığında akrozomun dış membranı birçok bölgede plazma membranı ile kaynaşarak akrozomal enzimlerin boşalmasına yol açar. Bu işlem akrozomal reaksiyon olarak bilinir ve fertilizasyonun ilk basamaklarından biridir. Akrozomal faz sırasında hücrenin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelir. Buna ek olarak nükleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler de flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge

spermatozoonların hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir. Mitokondrilerin bu şekilde yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ve yüksek enerji tüketimi ile ilgili olan bölgelerde toplanmasına başka bir örnek teşkil eder. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur. İmmotil silya sendromu (Kartagener sendromu), hareketsiz spermatozoonlar ve sonuçta infertilite ile karakterizedir. Bu sendrom, hastanın spermatozoonlarında dineinin ya da flagellar hareket için gerekli olan diğer proteinlerin eksikliğine bağlıdır. Bu bozukluk genellikle kronik solunum yolu enfeksiyonları ile birlikte görülür. Çünkü buna benzer bir eksiklik de solunum sisteminde epitel hücrelerinin siliyer aksonemlerinde bulunur (23).

3. Matürasyon Fazı: Geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlar tübülün lümenine doğru salınırlar. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositle spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynar. Bu ayrıntı seminifer epitel siklusunu anlamakta önemli bir rol oynayabilir. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur. Testislere deneysel ^{3}H-timidin enjeksiyonu ile gönüllüler üzerinde yapılan araştırmalarda insanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki sürenin yaklaşık 64 gün olduğu gösterilmiştir (23). Sürecinin yavaş olmasının yanısıra, spermatogenez, eş zamanlı ya da eş güdümlü olarak her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez; bu olay bir dalgalanma biçiminde olur. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümü açıklar. Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonlar bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. Seminifer epitel siklusu germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder.

İnsanda her bir siklus yaklaşık 16 ± 1 gün sürer ve spermatogenez 4 siklustan sonra biter (64 ± 4.5 gün) (Şekil 4) (30).



Şekil 4: Spermiyogenez süresince spermatidlerde ortaya çıkan başlıca değişiklikler. (30)

Sertoli Hücreleri:

Sertoli hücreleri seminifer tübül membranından lümene kadar uzanan çok yüzlü prizmatik hücrelerdir (Hemşire hücre de denilir). Yan yüzeyleri germ hücrelerine uyum sağlayacak şekilde girintili çıkıntılıdır. Enine kesitlerde zor seçilirler. Tohum hücrelerinin fazlalığı bunların %10-15 izlenmesine olanak verir. Eozinofilik sitoplazmaları, bazale yerleşmiş bir iki çentikli oval çekirdekleri vardır. Çekirdekçik belirgindir. Çekirdekçikle beraber çekirdek zarı altında kümelenmiş iki belirgin kromatin yoğunlaşması çoğu memelide özgün olan tripartide (üçlü) görünüşünü oluşturur. Sitoplazma, hücrenin dikey eksenine paralel yerleşmiş bol mitokondri içerir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazma retikulumu, bir miktar kaba endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri, yağ damlacıkları ile lizozomlar içerdiği gösterilmiştir (23). Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış çekirdekte çok sayıda kıvrımlar, belirgin bir

çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin görülür. Bazı hücrelerde fonksiyonu ve önemi bilinmeyen Charcot-Bottcher kristalloidler de gösterilmiştir (23). Bu inklüzyon bir demet vimentin filamanı yapısında uzunlamasına iğ şeklindedir. İnmemiş testis (kriptorşizm) olayında da gözlenirler. Sertoli hücreleri çok iyi bir hücre iskeletine sahiptir. Plazmalemma altında ve çekirdek çevresinde çok iyi gelişmiş aktin filamanları ağı vardır. Ara filamanlar az çok hücre eksenine paraleldir. Bu hücrelerde vimentin, düşük molekül ağırlıklı sitokeratin 18,19 pozitif gösterilmiştir. Mikrotübülüsler spermatogenez döngüsünün devresine göre çekirdek çevresi veya çekirdek üst bölgesinde yerleşmiştir. Hiç şüphesiz hücre iskeleti elemanları hücre şeklindeki değişikliğe ve germ hücrelerinin lümene doğru hareketine katılır. Spermatogenetik seri hücrelerinden farklı olarak çoğalma özelliği göstermeyen Sertoli hücreleri bu konumuyla spermatogenetik hücrelere mekanik desteklik sağlar, beslenmelerine yardımcı olur ve kan yoluyla gelen kimi zararlı maddelerden bu hücreleri korurlar. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopta Sertoli hücrelerinin sınırları belirsiz olarak görülür, çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır. Sertoli–Sertoli bağlantı kompleksi aynı zamanda seminifer epitelini 2 kompartmana böler: Alttaki dar kısım bazal bölüm (bazal kompartman), sıkı bağlantının üzerindeki lümene kadar uzanan geniş kısım ise lümen altı bölümdür. Bu sıkı bağlantı kan-testis bariyerini oluşturur ve lümen altındaki bölmeyi bağ dokusundan gelen etkilere karşı korur (23).

a) Bazal kompartman; Spermatogonyum ve genç spermatositleri içerir.

b) Adluminal kompartman; Genç spermatositleri ve spermatidleri içerir.

Bu kompartmanlar spermatogenezis için bir mikroçevre sağlar. Bitisik Sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar seviyesindeki sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu spermatogonyumlar, içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogonez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup geçerek adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhaları kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşturulur. Spermatositler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin

apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin flagellar kuyrukları gelistikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki çıkıntılar halinde görülürler. Sertoli hücreleri "gap junction" denilen birleşmelerle de ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. Bu da yukarda bahsedilen seminifer epitel siklusunun koordinasyonunda önemli olabilir. Sonuç olarak Sertoli hücrelerinin birçok önemli fonksiyonları vardır (23). Bunlar;

-Gelismekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesinde görevlidirler. Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı bağlantı kompleksleri (Tight junction=zonula okludens) vasıtasıyla irtibatlıdır. Sertoli-Sertoli bağlantı komplekslerinin kan-testis bariyer yöreleri olduğu saptanmıştır (23). Spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar kan testis bariyeri ile kan desteğinden izole edildiği için, bu spermatogenik hücreler besin maddelerinin ve metabolitlerin alıp verilmesinde Sertoli hücrelerinin aracılığına muhtaçtırlar. Kan-Testis bariyerinin immünolojik anlamda çok önemli bir işlevi vardır (23). Sertoli hücre bariyeri gelişen sperm hücrelerini immünolojik saldırıdan da korur. Söyleki; spermiyumlar immün sistem tarafından tabanca olarak tanınırlar. Çünkü, cinsel olgunlaşma immün yeteneğin gelişmesinden çok sonra pubertede olaylanır. Bu nedenle, farklanan spermatogenetik hücreler yabancı olarak tanınırlar ve immün yanıtı harekete geçirerek eşey hücrelerinin haraplanmasına neden olan antikorları oluşturabilirler. Ancak, kan-testis bariyeri, immün sistem ile eşey hücreleri arasında her türlü etkileşimi ortadan kaldırarak, antikorların seminifer tübüllere geçmesini önler ve spermatogenetik hücreleri oto-immün reaksiyonlara karşı korur.

-Spermatozoonlar testiste iken güçlü pozitiflik gösterirken epididimise geçtiklerinde MHC Class I antijenlerini kaybederler. Bu durum, epididimiste niçin otoimmün reaksiyonlara atılmadıklarını açıklar.

-Kan-testis bariyerinin immünolojik olarak önemi iki yönden iyice anlaşılmıştır;

1-) Spermatozoonlar ve spermatogenik hücreler, sadece kendi tiplerine özgü olan moleküllere sahiptir ve bunlar immün sistem tarafından "yabancı" (self olmayan) olarak tanınır (23). Spermatozoonlar, ilk olarak pubertede üretilmeye başlanır. Bu dönem, bireyin immünokompetan (yabancı molekülleri tanıyabilme ve onlara karsı

antikor sentezleyebilme yeteneği) olmalarından çok uzun süre sonradır. Bu nedenle, kan-testis bariyeri spermatogenik hücreleri immün sistemden izole tutmada önemli bir işleve sahiptir. Spermatogenik hücrelerin ve spermatozoonların immün sistemden izole edilmesindeki herhangi bir başarısızlık, sperm-spesifik antikorların üretimiyle sonuçlanır. Vazektomi (duktus deferensin cerrahi olarak çıkartılması; skrotal keseye açılan küçük bir kesiden yapılır) sonrası ve bazı infertilite (kısırlık) olgularında böyle immün yanıtlar görülmektedir. Vazektomi sonrası, immün sistem hücrelerinin hasarlı vas deferens'ten sızan spermatozoonlarla karşılaşması sonucu sperm-spesifik antikorlar üretilir. Bundan böyle, spermler genital kanaldaki immün sistemden izole kalamaz. Bazı infertilite olgularında sperm spesifik antikorlar semende gösterilmiştir. Bu antikorlar spermlerin aglütinasyonuna neden olurlar. Sonuçta, spermlerin hareketlerini ve oosit ile etkileşmesini etkileyerek infertiliteye neden olurlar (23).

Elektron mikroskop çalışmaları, farklanan spermatogenetik hücrelerin birbirlerinden ayrılmadıklarını "sitoplazma köprüleri" ile baglandıkları göstermiştir. Bu köprüler, koloni içindeki spermatogenetik hücrelerin gelişiminin aynı zamanda olaylanmasında, hücrelerin beslenmesinde ve genetik bilginin aktarılmasında işlev görürler. Fagositoz olayında görevlidirler. Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde dökülür. Bu sitoplazmik parçacıklar fagosite edilir ve Sertoli hücre lizozomları tarafından yıkılırlar. Sekresyon olayını gerçekleştirirler. Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgılarlar. Androjen-bağlayıcı protein sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından FSH ve testosteron kontrolü altında gerçeklestirilir. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronunun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiyol haline çevirebilirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgılar. Anti-müllerian hormon üretimini sağlarlar. Ayrıca Müllerianinhibe edici hormon olarak da isimlendirilen bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise, Wolf (mezonefrik) kanallarından köken alan yapıların gelismesini sağlar. Testiküler transferrinin sentezlenmesi ve salgılanmasında görev alırlar (23). Testiküler

transferrin de proteindir ve üreme hücrelerine demir taşıdığına inanılmaktadır. Kandaki demir taşıyan protein, serum transferrini, Sertoli hücresinin bazalindeki özel reseptörlere bağlanır ve sitoplazmaya alınır. Burada demir serum transferrininden testiküler transferrine aktarılır, bu da demiri seminifer epitelin adluminal kompartmanındaki gelişen üreme hücrelerine gönderir. Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ısını irradyasyonu gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdırlar ve bu zararlı etkiler karşısında spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha dayanıklıdırlar. Memelilerde spermatozoonların salınımı muhtemelen hücresel hareketlerin bir sonucudur; bu hareket Sertoli hücresinin apeksinde bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentler ile sağlanır. Sertoli hücreleri spermatogenetik hücrelerin bazal membrandan lümene doğru hareketlerinde etkin rol oynar (Tablo 1) (23).

Tablo 1: Sertoli hücrelerinin görevleri (23)

Sertoli Hücrelerinin Görevleri
1) Gelişen tohum hücrelerinin beslenmesi ve desteklenmesi.
2) Spermiyojenez sırasında ortaya çıkan sitoplazma fazlalıklarının fagositozu.
3) Gelişen tohum hücrelerinin beslenmesi ve desteklenmesi.
4) Spermiyojenez sırasında ortaya çıkan sitoplazma fazlalıklarının fagositozu.
5) Kan-testis bariyerinin oluşturulması.
6) ABP üretimi ve salgılanması.
7) İnhibin üretimi ve salgılanması.
8) Testiküler transferrin üretimi ve salgılanması.
9) Embriyojenez sırasında Müller borusunu durdurucu hormonun üretimi ve salgılanması.
10) Früktozdan zengin, spermatozoonları besleyici ve taşınmasını kolaylaştırıcı salgı salgılanması.

İnterstisyel Doku ve Leydig Hücresi:

Testis kütlesinin %25-30'unu gevşek bağ dokusu oluşturur. Bu ara doku içerisinde Leydig hücreleri, fibroblastlar, mast hücreleri, gonadotrop hormonlara cevap vermek üzere gerektiğinde Leydig hücrelerine dönüşebilen farklanmamış

mezenşim hücreleri, bol kılcallar, lenf damarları ve sinirler bulunur. Leydig hücreleri, kıvrıntılı tohum borucukları arasındaki üçgenlerde gruplanırlar. Gruplar halinde tunika albuginea, epididimis, spermatik kordon ve mediastinumda da gösterilmiştirler (23). Testosteron hormonu üretimi ve salgılanmasından sorumludurlar. Neuroendokrin fonksiyonları da vardır. Parakrin olarak oksitosin, substans-P, b-endorfin vb. salgılar endokrin fonksiyonlarından dolayı kılcal damarlarla ilişkili değişen boyutlarda topluluklar yaparlar. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteinli gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler. İnterstisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. İki çekirdekli olabilirler. İyi gelimiş Golgi kompleksi, tübüler kristali mitokondriyonlar ve asidofil sitoplazmalarında yağ damlacıkları içeririler. Çok iyi gelişmiş granülsüz endoplazma retikulumuna sahiptirler. Bu görünüşleriyle tipik steroid salgısı yapan hücrelere benzerler. Bu hücrelerde salgı granülü bulunmaz, üretilen testosteron ihtiyaca göre sentezlenir ve bekletilmeden kana verilir. Bunların sitoplazmalarında aynı zamanda peroksizom ve lizozomlar bulunur. Yaşla artan miktarlarda izlenen lipokrom pigmenti yer alır. İnsana özgü renksiz Reinke kristalleri gösterilmiştir. Bu kristaller azokarminle boyanır. Elektron mikroskobunda düzgün kristal kafesler şeklinde izlenir. Önemi bilinmemektedir. Enine kesitlerde normal bir erişken de kıvrıntılı tohum borucuğu başına beş Leydig hücresi sayılır. Olgun Leydig hücreleri normal olarak çocuk testisinde, doğumdan sonraki birkaç hafta dışında, 10 yaşına kadar bulunmaz. Herhangi bir yaştaki çocuğa saflaştırılmış LH enjekte edilirse Leydig hücrelerini geliştiren fibroblastların sayısı artar. Leydig hücrelerinin sayıları ergenlikle artarken ileri yaşta azalır. 60 yaşındaki bir erkekte 20 yaşın yarısından az sayıdadır. Puberte sırasında belirgin hale gelen, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir nükleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan ve steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, sekonder seks hareketlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Bu hücre salgıladığı testosteron hormonu (toplam testosteronun % 95'ini üretir, geri kalan %5 surrenal kortekste üretilir) ile spermatogenezisi devam ettirir. Testosteron sentezi mitokondri ve düz endoplazma retikulumunda bulunan enzimlerce gerçeklestirilerek, hücre organelleri

arası iş birliğine bir örnek oluşturur. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırsında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 4 ½ ayına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden salınan luteinizan hormon uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya basladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar (23).

2.1.4. Testis Fizyolojisi

Testis hem ekzokrin hem de endokrin fonksiyonu olan bileşik tübüler bir bezdir. Testisin endokrin işlevini Leydig hücrelerinin salgıladığı testosteron meydana getirir. Buradan salgılanan testosteron yüksek lokal etkiyle seminifer tübüllerdeki spermatogenezi etkilerken kana verilerek erkek üreme sistemine yardımcı bezlerin (prostat, vesikula seminalisler, bulboürethral bezler) işlevini de etkiler. Erkeğe özgü ikincil cinsiyet özelliklerinin (pubik kıllanma, sakal-bıyık, erkeğe özgü ses, müsküler vücut şekli) ortaya çıkmasından sorumludur. Testosteron üretimi adenohipofizden salgılanan LH (lüteinleştirici hormon) etkisiyle gerçekleşir. LH, Leydig hücrelerinde kendisine ait reseptörlere bağlanarak etki gösterir. Her ne kadar Leydig hücreleri testisin genel hacminde küçük bir yer tutsa da steroidojenik potansiyelleri çok yüksektir. Adenohipofizden LH salgısı sürekli değil esas olarak geceleri 90 dakikalık aralıklar şeklinde olur. LH dışında prolaktin ve LH-RH (LH-releasing hormon)'da doğrudan Leydig hücrelerini etkileyerek testosteron salgılanmasını etkiler. Testosteronun yükselmesi LH salgısını durdurur. LH dışında spermatogenezin başlaması ve devam etmesinde adenohipofizden salgılanan bir diğer hormon FSH (Follikül uyarıcı hormon)'da etkilidir. FSH Sertoli hücrelerini etkileyerek ABP salgılanmasını sağlar böylece spermatogenez için gerekli oranda testosteronun yerel etkisi sağlanır. Bu etki spermatogenezin başlaması için gereklidir. Germ hücrelerinin azalması FSH salgısını uyarır. FSH salgılanması Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin

hormonuyla durdurulur. Östrojenler, kadın cinsiyet hormonları ABP'i bağlayarak spermatogenezisi azaltır.

Testisin ekzokrin işlevi ise semeinfer tübülleein halokorin salgı ürünü olan spermatozoonlardır (23). İnsanda iki testisten günlük ortalama spermatozoon yapımı ortalama 200 milyondur. Bu büyük bir miktar gibi görünse de diğer türlerle karşılaştırıldığında düşük bir sayıdır. İnsanda her iki testis 800-1200 adet seminifer tübül içerir. Bunların her biri 30-70 cm uzunluğundadır. Oluşan ejakulat miktarı ise 2-5 ml dir. Bu ejakulat 40-100 milyon/ml spermatozoon içerir. Bu sayı 20 milyondan az ise infertiliteden söz edilir.

Vücut içi sıcaklığının (37^0C) altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin segülasyonunda ısı çok önemlidir. Birkaç mekanizma ile kontrol edilen testiküler ısı 35^0C' dir. Zengin bir venöz pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin etrafını sararak testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Diğer faktörler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki kramester kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir (23).

Kriptorşidizm (Yun. kryptos, gizli + orchis, testis) olarak isimlendirilen testisin inişindeki bozukluklarda, testisler 37^0C' ta kalır ve spermatogenez inhibe olur. Çok ileri olmayan vakalarda testisler cerrahi olarak skrotuma indirildikleri takdirde spermatogenez normal olarak devam edebilir. Karın içi sıcaklığında kalan testislerde germ hücrelerinin çoğalması inhibe olur fakat testosteron sentezi devam eder. Bu da kriptorşidizmli seks karakterlerinin gelişmesinin ve ereksiyon oluşmasının nedenini açıklar. Ayrıca kötü beslenme, alkolizm, toksik maddeler ve bazı ilaçların etkisi ile de spermatogonyumlarda değişiklikler ve sonuçta spermatozoon yapımında azalmalar ortaya çıkar. Formaldehit spermatogenik seri hücrelerinde oldukça toksittirle ve bu hücrelerin ölümüne sebep olarak hayvanda steriliteye yol açar (23).

Bunlarla birlikte spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi endokrin faktörler oluşturur. Spermatogenez, hipofizin folikül stimülan (FSH) ve luteinizan hormonlarının (LH) testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH interstisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. FSH'ın Sertoli hücrelerine etkiyerek adenital siklaz

yapımını stimüle ettiği ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açtığı ve aynı zamanda da androjen-bağlayıcı proteinin (ABP) sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosteron ile bağlanır ve bunu seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır ve östrojenler ve progestojenlerle inhibe edilir (23).

Spermatozoonlar epididimise, uygun bir medyum olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş androjen bağlayıcı protein içerir (23).

2.2. Formaldehit

2.2.1. Formaldehitin Kimyasal Özellikleri

Aldehit ailesinin üyesi olan formaldehit (FA); renksiz, keskin kokulu ve suda çok iyi çözünen bir gazdır. Kimyasal formülü HCHO olup, molekül ağırlığı 30 g, erime noktası -92^0C, kaynama noktası ise -21^0C'dir. Keskin kokulu olan saf formu solunum yolları için son derece irritandır. Formaldehit güçlü elektrofilik özelliğe sahiptir ve bu nedenle reaktif bir maddedir. Bulunduğu her ortamda ve oda sıcaklığında gaz haline dönüşebilir. Metanolün oksidasyonuyla sıvı formu elde edilir. % 37'lik sulu çözeltisine formalin, polimerize olmuş katı haline ise paraformaldehit adı verilir. Sıvı haldeki formu mililitre (ml) cinsinden belirlenirken, gaz hali ise part per million (ppm) olarak ifade edilir (4, 9).

2.2.2. Formaldehitin Kaynakları Ve Kullanım Alanları

Formaldehit, kimyasal özellikleri nedeniyle çok yaygın olarak kullanılan, organizmanın doğal yapısında da yer alan kimyasal bir maddedir. Bu madde, çevreye hem doğal hem de endüstriyel kaynaklardan salınır. Doğal olarak hidrokarbonların oksidasyonu sonucu ortaya çıkar. Yerleşim bölgelerindeki konsantrasyonunun 1-20 $\mu g/m^3$ civarında olduğu Dünya Sağlık Örgütü tarafından bildirilmiştir. Dizel araçların egzoz dumanında, fuel-oil, benzin ve doğal gazda, ağaç ve odun yanmasıyla ortaya çıkan formaldehit hava kirliliği sebepleri arasındadır (31). Sigara dumanı, kozmetik ürünler, boya, plastik, yapı malzemeleri, tekstil ve kağıt ürünleri formaldehit içeren bazı maddelerdir (1). Glisin ve serin insanda en önemli endojen formaldehit

kaynaklarıdır. Ayrıca N-metilli aminoasitler ve sarkosin de spesifik enzimler aracılığı ile oksidatif demetilasyonla formaldehite dönüşürler. Endojen doku düzeyleri 3-12 ng/g arasında değişir ve bunun da % 40'ı serbest formdur. Yarılanma hızı çok kısadır (*t1/2 =1.5 dakika*) (2). Formaldehit antimikrobiyal özelliğinden ötürü, sterilize edici ajan ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır. Özellikle yüzey ve oda dezenfeksiyonu için vazgeçilmez bir maddedir (3). Endüstriyel alanlarda da formaldehit yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle, boya ve plastik yapımı, tekstil endüstrisi ve mobilya sanayisinde formaldehit kullanımı mevcuttur (5). Ayrıca tıp alanında ve de özellikle laboratuvarlarda formaldehit kullanımı göze çarpmaktadır. Anatomide kadavra ve organların tespiti, histoloji ve patoloji laboratuvarlarında ise dokuların fiksasyonu aşamasında kullanılır. Diş hekimliğinde, kaplamaların yapım aşamasında da formaldehit kullanımı mevcuttur. Bunun yanı sıra hemodiyaliz solüsyonlarının da formalin içerdiği bilinmektedir (4-8).

2.2.3. Formaldehitin Organizmadaki Metabolizması

Organizmaya alınan formaldehit, karaciğerde ve eritrositlerde formaldehit dehidrogenaz enzimi (FDH) katalizörlüğünde formik aside metabolize olur. Bu reaksiyonu gerçekleştirmek için FDH enzimi kofaktör olarak glutatyona ihtiyaç duyar. Doğal olarak kan glutatyon seviyesi düştüğü zaman formaldehit konsantrasyonu artar. Bir antioksidan olan glutatyonun azalması formaldehit toksisitesini artırmaktadır. FA tetrahidrofolik asit ile bağlanarak, hücresel metabolizmanın tek karbonlu (C1) havuzuna girmektedir. Bu sayede nükleik asitler gibi makromoleküllerin yapısına katılmaktadır (4,32-34).

Formaldehit normal bir metabolit olup hücrelerde değişik seviyelerde bulunur ve vücutta depo edilmez. Formaldehitin vücuttan atılımı, ya formik asite dönüşerek idrar ve feçes yoluyla, ya da karbondioksite okside olarak solunum yoluyla gerçekleşir. Vücuttan tamamen atılımı birkaç günde gerçekleşir (35).

2.2.4. Formaldehitin Üreme Sistemi Üzerine Etkisi

Formaldehitin germ hücrelerine zarar verdiği ve her iki cinste de primer ve sekonder infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (10). Kadınlarda mensturel

fonksiyonları bozmakta ve teratojenik potansiyele sahip olduğu için gebeliği ve embriyonal gelişmeyi tehdit etmektedir (11). Formaldehit ihtiva eden laboratuvarlarda çalışan kişilerin germ hücrelerine ve özellikle de hamile kadınların gelişmekte olan fetuslarına karşı formaldehitin tehdit edici bir unsur olduğu ileri sürülmektedir (12). Çalıştıkları ortam gereği formaldehite maruz kalan kadınlarda, spontan abortus, anemi ve düşük doğum ağırlıklı bebek gibi bazı doğumsal ve doğumsal olmayan patolojiler bildirilmiştir (13).

Sıçanlar üzerinde yapılan çalışmalarda, formaldehitin sperm sayısı ve miktarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (14). Yine deneysel olarak yapılmış olan araştırmalarda, formaldehitin testis morfolojisinde değişikliklere neden olduğu ortaya konmuştur. Sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiş bu çalışmalarda, formaldehitin testis ağırlıkları ve seminifer tübül çaplarında azalmaya neden olduğu ve leydig hücrelerinde histopatolojik değişikliklerin meydana geldiği gösterilmiştir. Ayrıca formaldehit maruziyeti sonucu, serum testosteron seviyelerinde bir düşüşün de oluştuğu tespit edilmiştir (15,16).

2.3. Serbest Radikaller

İlk kez 1970'lerde Demopoulos tarafından ortaya atılan hipoteze göre serbest oksijen radikalleri ve ürünleri ilerleyici doku hasarına neden olurlar. Vücuttaki birçok reaksiyonda rol oynayan moleküler oksijen yaşam için şarttır ve aerobik organizmalar için önemli bir besindir. Oksijensiz ortamda ölüm olur. Ancak bu durum daha çok oksijenin daha iyi olacağı anlamına gelmez. Oksijen konsantrasyonu % 100 olduğunda insanların yanı sıra birçok aerobik organizma için toksik etkilerinin olduğu da bilinmektedir. Bu nedenle çeşitli hastalıkların tedavisi sırasında kullanılanımı sınırlı olmaktadır (36, 37).

Serbest oksijen radikalleri, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron bulunduran atom veya moleküllerdir. Elektronlar, dış yörüngelerinde çiftler halinde bulunduklarında o bileşik daha kararlı ve sabit bir yapıya sahip olur. Eksik elektronlu moleküller ise karalı değildirler. Kolaylıkla elektron alıp vererek, herhangi bir molekül ile reaksiyona girebilirler. Serbest oksijen radikallerinin yarı ömürleri çok kısa olmasına rağmen genel olarak çok reaktiftirler (38).

Serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonunun organ ve dokularda meydana getirdiği hasar ve hastalıkların patogenezindeki rolleri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Yaşlanma, dejeneratif hastalıklar, yanıklar, akciğer hastalıkları, karsinogenez, diabet, ateroskleroz ve katarakt oluşumundaki etkileri birçok çalışmada kanıtlanmıştır (39).

2.3.1. Reaktif Oksijen Türleri

2.3.1.1. Süperoksit Radikali (O_2^-)

Serbest oksijen radikallerinin ilk oluşanı süperoksit (O_2^-) radikalidir. Mitokondrideki yetersiz elektron transferi neticesinde süperoksit radikali oluşur. Süperoksit genellikle instabildir ve hidrojen peroksit ile oksijene dönüşür. Ancak daha ciddi hasara neden olan oksijen radikallerinin öncüsü olması nedeni ile önemlidir (36, 40).

2.3.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Süperokside bir elektron eklenmesiyle oluşur.

$$O^{\cdot} + e^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2$$

Hidrojen peroksit hücre membranlarından kolaylıkla geçebilen, endotelyal hücreleri hasar verebilen güçlü bir sitokindir. Serbest radikal olmadığı halde birçok reaktifin oluşum reaksiyonlarına katıldığı için H_2O_2 de toksik metabolitler içinde yer alır. Toksik özellik gösterebilmesi için hidroksil radikaline dönüşmek zorunda olabilir (41). Hidrojen peroksit zayıf ve yavaş bir oksidandır. Katalaz enzimi ile H_2O ve O_2'ye yıkılır. Ancak reperfüzyonda H_2O_2, süperoksit radikali ile Haber-Weiss reaksiyonuna girer (40). Haber-Weiss reaksiyonu, demirin (Fe) katalizörlüğünde gerçekleşen, süperoksit radikali ve hidrojen peroksitin Fe eşliğinde reaksiyona girip, sonuçta hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), hidroksil kökü (OH^-) ve oksijenin oluştuğu bir reaksiyondur.

$$2O_2^{\cdot} + 2H_2O_2 \longrightarrow 2O_2 + 2OH^- + 2OH^{\cdot} \text{ (Haber – Weiss reaksiyonu)}$$

Normal şartlarda bu reaksiyon fizyolojik önemi olmayacak kadar yavaştır. Ancak hemoproteinler ve metal şelatların varlığında Fenton reaksiyonu denen reaksiyonla daha hızlı olarak meydana gelir (42).

$$Fe^{+2} + 2H_2O_2 \longrightarrow Fe^{+3} + OH^- + OH^{\cdot} \text{ (Fenton reaksiyonu)}$$

2.3.1.3 Hidroksil Radikali ($OH^{\cdot}$)

Fe ile H_2O_2'nin birleşmesi ile oluşur.

$H_2O_2 + Fe^{+2} \longrightarrow OH^- + OH^{\cdot} + Fe^{+3}$

Hidroksil radikali, bilinen serbest radikaller içinde en güçlü olan ve doku hasarında sorumlu ana radikaldir (43). En önemli özelliği, hidrojen atomlarını hücre membranındaki poliansatüre yağ asitlerinden ayırmasıdır. Lipid peroksidasyonunu başlatarak hücre membranında çözülme ve buna bağlı hücre ölümü olur (44).

2.3.1.4 Hidroperoksil Radikali (HO_2^-)

Süperoksit radikalinin protonlanmasıyla oluşan ve süperoksitten daha güçlü olan bir ajandır. Biyolojik membranlardan kolay geçebilme ve yağ asitleriyle direkt olarak reaksiyona girebilme özelliği vardır (45).

2.3.1.5. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) Fe-S proteinlerinden demiri çıkararak yerine kendisi bağlanır, böylece Fenton reaksiyonunu stimüle eder ve bu mekanizma ile karsinogeneziste rol oynar.

Nitrik oksitin süperoksit dismutaz (SOD) enzimiyle yarışmaya girmesi ve süperoksit (O_2^-) radikaliyle etkileşmesi sonucu peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşur. Böylece nitrik oksitin fizyolojik etkisi inhibe edilir, oksidatif etkisi ortaya çıkar. Vasküler tonüsün düzenlenmesi için süperoksit (O_2^-) ve nitrik oksit ($NO^{\cdot}$) arasındaki fizyolojik dengenin önemli olduğu ileri sürülmektedir.

Peroksinitrit, nitrik oksit toksisitesinin başlıca sorumlusudur. Peroksinitritin proteinlere doğrudan zararlı etkileri vardır ve azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşür.

Peroksinitrit, nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) oluşturmak üzere metabolize edilir. $NO^{\cdot}$ radikalinin stabil son ürünlerin nitrit ve nitrattır. Plazma gibi çoğu vücut sıvısında nitritin çoğu nitrata dönüşmüştür (46-49).

2.3.1.6. Peroksil Radikali ($LOO^{\cdot}$)

Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller ile başlayan, membranlarda bulunan fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır (37). Lipit peroksidasyonunda zincirleme reaksiyonların başlatılması için tetikleyici faktör gereklidir. Bu faktörün $OH^{\cdot}$ radikali olduğu kabul edilmektedir. Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur ve üç aşamadan oluşur (50). Başlama safhasında $OH^{\cdot}$ radikali, bir yağ asidinin (LH) metilen molekülünden bir hidrojen atomu (H^{+}) koparark bir lipit radikali ($L^{\cdot}$) oluşturur. Bu reaksiyon hem membran lipitleri hem de besinsel yağlar için geçerlidir.

$$OH^{\cdot} + LH \rightarrow H_2O + L^{\cdot}$$

İlerleme ve yıkım safhası zincirleme reaksiyona uğrayan lipit radikaline O_2 ilavesi ile devam eder ve lipit peroksil radikali ($LOO^{\cdot}$) ile lipit peroksit oluşur.

$$L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LOO^{\cdot}$$

$$LOO^{\cdot} + LH \rightarrow LOOH + L^{\cdot}$$

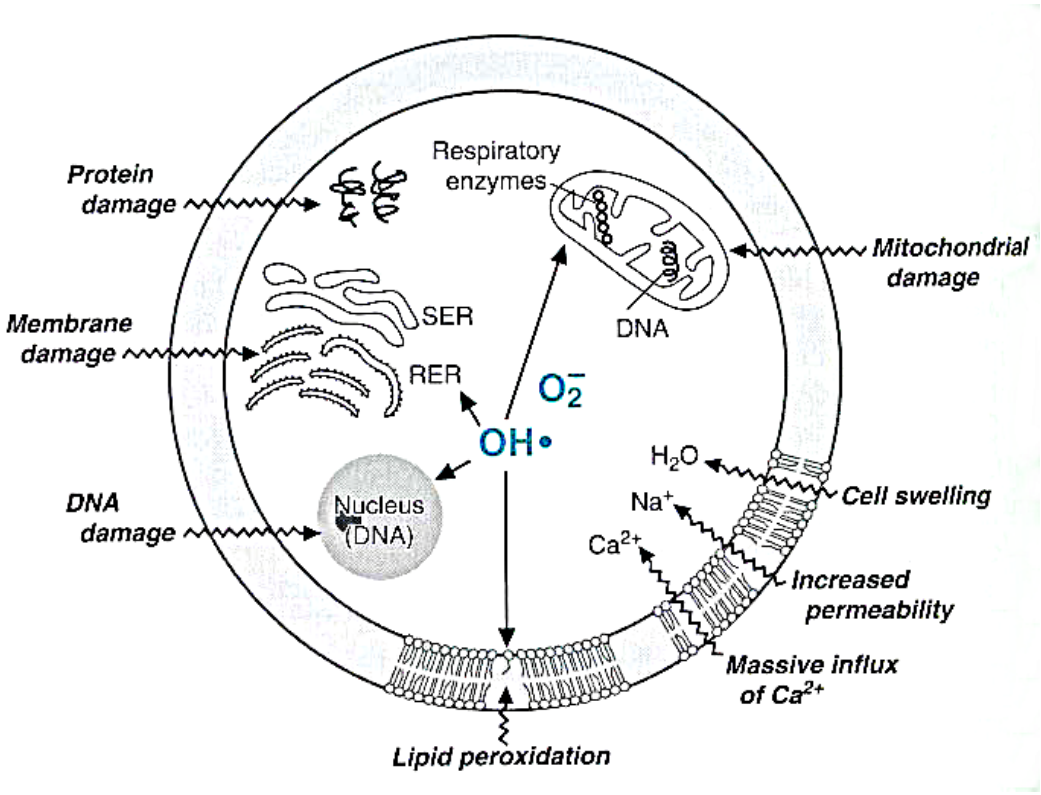
Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipidin parçalanması ile sonuçlanır. Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malondialdehit (MDA) oluşmaktadır. Oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna neden olur. Sonuç olarak deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intirensek membran özelliklerini değiştirir. Bu yıkım ürünleri mutajeniktirler. DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilirler (51, 52). Sonlanma safhası: Zincir reaksiyonu antioksidanlar tarafından sonlandırılabilir.

$$LOO^{\cdot} + L^{\cdot} + 2H^{+} \rightarrow LOOH + LH$$

2.3.2. Reaktif Oksijen Türlerinin Hücresel Etkileri

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek parsiyel oksijen basıncı (pO_2), ozon (O_3) ve azot dioksit ($NO_2^{\cdot}$), kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar. Serbest radikaller

hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali (O_2^-) ve hidroksil radikali ($OH^\cdot$) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipid peroksidasyonunu başlatır. Membranlarda lipid peroksidasyonu meydana gelmesi sonucu membran permeabilitesi artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır, nükleer ve mitokondriyal DNA okside olur (Şekil 5) (46-49).



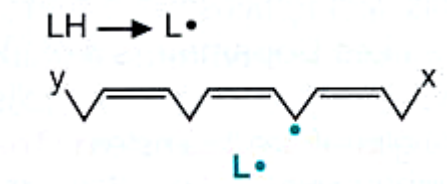
Şekil 5: Nükleer ve mitokondriyal DNA oksidasyonu (46-49).

Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir (46-49).

2.3.2.1. Membran Lipidleri ve Lipid Peroksidasyonu

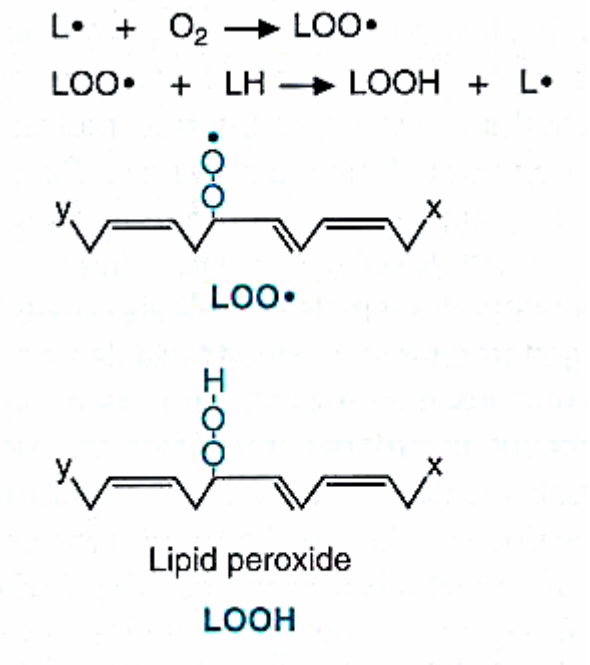
Lipidler serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar.

Poliansatüre yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve oldukça zararlıdır. Hücre membranlarında lipid serbest radikalleri (L˙) ve lipid peroksit radikallerinin (LOO˙) oluşması, reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna **"nonenzimatik lipid peroksidasyonu"** denir (Şekil 6). Hücre membranlarında lipid peroksidasyonuna uğrayan başlıca yağ asitleri poliansatüre yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu genellikle yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomlarının çıkarılması ve bunun sonucunda yağ asidi zincirinin bir lipid radikali niteliği kazanmasıyla başlar (46-49).



Şekil 6: Lipid peroksidasyonu (46-49).

Lipid radikali (L˙) dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikallerinin (L˙) moleküler oksijenle (O_2) etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikalleri (LOO˙) oluşur. Lipid peroksit radikalleri (LOO˙), membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendileri de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipidperoksitlerine (LOOH) dönüşürler ve böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder (Şekil 7) (46-49).



Şekil 7: Lipid peroksidasyonu sonucu lipid peroksiylerinin oluşumu (46-49).

Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan lipid peroksitlerinin (LOOH) yıkılımı geçiş metalleri iyon katalizini gerektirir. Plazma membranı ve subsellüler organel lipid peroksidasyonu serbest radikal kaynaklarının hepsiyle uyarılabilir ve geçiş metallerinin varlığında artar. Lokal olarak hidrojen peroksitten (H_2O_2) Fenton reaksiyonu sonucu hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) oluşması zincir reaksiyonunu başlatabilir. Lipid peroksitleri (LOOH) yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilirler veya başlangıçtaki etki alanlarından difüze olup hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar.

Üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonunda malondialdehit (MDA) meydana gelir.

Lipid peroksidasyonun en belirgin ürünü olan malondialdehit (MDA) aynı zamanda lipid peroksidasyonunu belirlemede kullanılır. MDA oluşum yerinden kolayca difüze olur. Membran yapısındaki lipid ve proteinlere çapraz bağlanarak membranın kendine özgü özelliklerin değişmesine yol açar ve permeabiliteyi bozmaktadır (53).

2.3.2.2. Nükleik Asitler ve DNA

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) deoksiriboz ve bazlarla kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçerek ve hücre çekirdeğine ulaşarak DNA hasarına, hücre disfonksiyonuna ve hatta hücre ölümüne yol açabilir. Süperokside (O_2^{-}) maruz kalan DNA molekülleri hayvanlara enjekte edildiklerinde daha fazla antijenik özellik gösterirler ki bu oldukça önemli bir etkidir, çünkü otoimmün bir hastalık olan sistemik lupus eritematozusta (SLE) ve romatoit artritte (RA) dolaşımda anti-DNA antikorlar bulunur.

2.3.2.3. Proteinler

Proteinler serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller oluşur.

Serbest radikallerin etkileri sonunda, yapılarında fazla sayıda disülfit bağı bulunan immünoglobülin G (IgG) ve albümin gibi proteinlerin tersiyer yapıları bozulur, normal fonksiyonlarını yerine getiremezler. Prolin ve lizin reaktif oksijen türleri (ROS) üreten reaksiyonlara maruz kaldıklarında nonenzimatik hidroksilasyona uğrayabilirler. Hemoglobin gibi hem proteinleri de serbest radikallerden önemli oranda zarar görürler. Özellikle oksihemoglobinin süperoksit radikali (O_2^{-}) veya hidrojen peroksitle (H_2O_2) reaksiyonu methemoglobin oluşumuna neden olur. (46-49)

2.3.2.4. Karbohidratlar

Hidroksil radikali glukoz, mannitol ve deoksi şekerlerle doğrudan reaksiyona girer. Monosakkaritlerin oksidasyonuyla peroksitler, hidrojen peroksit ve okzoaldehitler oluşur. Okzoaldehitler DNA, Ribonükleik asit (RNA) ve proteinlere

bağlanabilme ve çapraz bağlar yapma özelliğinden dolayı hücrede zararlı etkilere yol açarlar (53).

2.4. Apoptozis

2.4.1. Apoptozisin Terminolojisi

Apoptozis Yunanca kökenli bir kelime olup, apo (ayrı) ve ptozis (düşen) kelimelerinin birleşmesinden oluşmuştur. "Son baharda yaprak dökümü" anlamına gelmektedir (54, 55). Apoptozis terimi ilk kez 1972 yılında Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. adlı araştırıcılar tarafından kullanılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (56). Literatürde "programlanmış hücre ölümü, fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı" apoptozisle eş anlamlı olarak kullanılmıştır (56, 57).

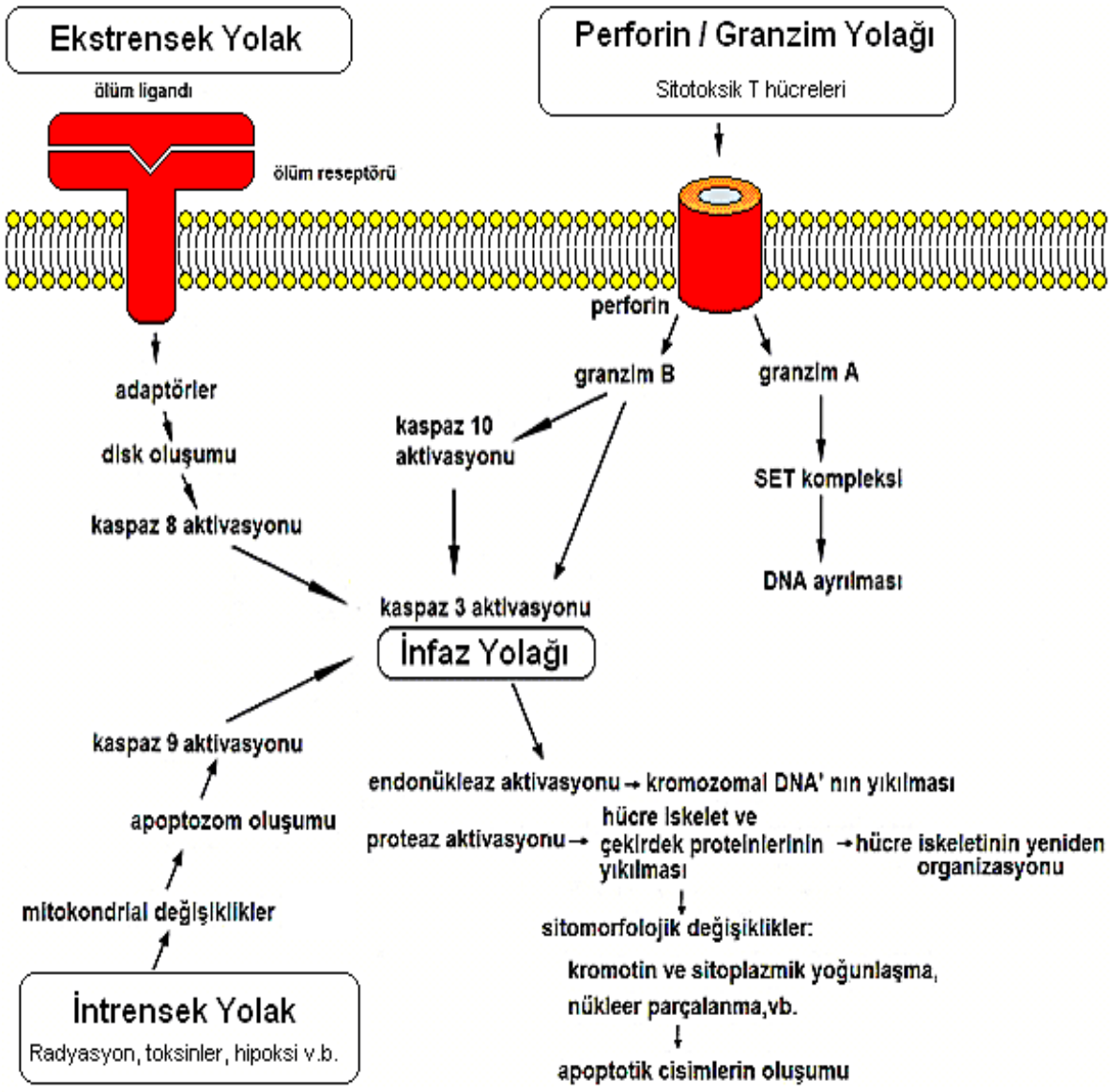
2.4.2. Apoptozisin Biyolojik Süreçlerdeki Rolü

Apoptozis birçok biyolojik süreçte etkin rol oynamaktadır. Dokuların gelişmesi, yaşlanması ve kanama kontrolünün sağlanmasında olduğu gibi, normal dokulardaki hücre topluluklarının korunması sürecinde de meydana gelmektedir (58). Deri, bağırsak epiteli, kan hücreleri gibi hücre yenilenmesinin hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozisle ortadan kaldırılırlar. Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde; fetusun implantasyonundan organogenezise kadar tüm gelişim sürecinde apoptozis rol alır. Embriyolojik süreçte; parmak aralarındaki zarın, sinir sisteminde istenmeyen nöronların ortadan kaldırılmasında apoptozis rol oynar. Erişkinde hormona bağlı involüsyonda; örneğin, menstürel siklusta endomentriyal hücre yıkımı, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin küçülmesinde apoptozis görülür. Bağışıklık sistemi hücrelerinin seçiminde de apoptozis önemli rol oynamaktadır. Apoptozisin en klasik örneği sayılan yenidoğan timusunun involüsyonu sonucunda T lenfositlerin yaklaşık %98' i seleksiyona uğramaktadır. B hücrelerinde ise apoptozisin baskılandığı belirtilmektedir. Bunun fizyolojik önemi, B lenfositlerinin duyarlı olduğu uyaranla yeniden karşılaşması durumunda hazır bulunmasını sağlamaktır (55). Ayrıca zararlı ajanların veya hastalıkların yaptığı hücre hasarlarına veya immun reaksiyonlara yanıtta da rol

almaktadır (59). Apoptozisin bir dokuda uygunsuz bir şekilde az veya yetersiz meydana gelmesiyle birçok nörodejeneratif hastalık, iskemik hasar, otoimmün hastalık ve kanser tipi meydana gelebilmektedir (58).

2.4.3. Apoptozisin Oluşumu

Birçok fizyolojik ve patolojik durum veya faktör apoptozise neden olabilir. Fakat her hücre aynı faktöre aynı şekilde yani apoptozisle cevap vermez (58). Apoptozisi etkileyen faktörler kabaca büyüme faktörlerinin geri çekilmesi, sitokinler, hücre içi kalsiyum miktarındaki artış, TNF (tümör nekroz faktör), Transforming Growth Factor I, Fas/FasL sisteminin aktive olması, DNA hasarı nedeniyle bir tümör supresör gen olan p53' ün aktive olması, viral-bakteriyel enfeksiyonlar ve glukokortikoidler şeklinde sıralanabilir. Ayrıca hipertermi, radyasyon, sitotoksik antikanser ilaçları ve hipoksi gibi nekroz oluşturabilen etkenler de hafif dozlarda apoptozis meydana getirebilirler (55). Şimdiye kadar yapılan araştırmalarda, apoptozise iki ana yolağın neden olduğu gösterilmiştir. Bunlar; ekstrensek veya ölüm reseptör yolak ve intrensek veya mitokondriyal yolak. Bununla birlikte bu iki yolun birleştiği ve birbirlerini etkileyebildiklerine dair kanıtlar vardır. T hücre aracılı sitotoksisiteyi ve perforin-granizim bağımlı hücre ölümünü içeren ek bir yolak da mevcuttur. Perforin/Granzim yolağı apoptozisi hem Granzim A hem de Granzim B vasıtasıyla indükleyebilir. Ekstrensek, intrensek ve Granzim B yolakları aynı son noktada yani infaz yolağında birleşirler. Bu yolak kaspaz-3 ayrımıyla başlatılır ve DNA parçalanması, hücre iskeletinin ve çekirdek proteinlerinin yıkılması, proteinlerin çapraz bağlanması, apoptotik cisimlerin oluşması, fagositik hücre reseptörleri için ligandların ekspresyonu ve son olarak da hücrenin fagositik hücreler tarafından fagositozu ile sonuçlanır. Granzim A paralel bir kaspaz-bağımsız yolağını aktive eder (Şekil 8) (55).



Şekil 8: Apoptoziste yolaklar (55).

2.4.4. Apoptotik Hücrede Görülen Morfolojik Değişiklikler

1. Yüzey Organellerinin Kaybı

Apoptozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovilluslar ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (60,61).

2. Hücre Büzülmesi

Apoptotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (62). Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuar reaksiyon gözlenmez (61, 63, 64).

3. Kromatin Yoğunlaşması

Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzüşür (60, 62). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (60, 61, 63).

4. Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (60, 63). Apoptozis için morfolojik değişimler hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması olurken fosfotidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfotidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (65).

2.4.5. Apoptozis ve Nekroz Arasındaki Farklar

Apoptozis, hücrede yarattığı bu değişikliklerle nekrozun bir parçasıymış gibi algılanabilir. Ancak nekrozdan farkları şunlardır.

Fiziksel Farklılıklar:

1- Nekroz bileşik hücre gruplarını etkiler, oysa apoptoziste tek tek hücreler etkilenir (66, 67).

2- Nekroz fizyolojik olmayan uyaranlarla başlar, apoptozis fizyolojik uyaranla da başlayabilir (örnek: hormonal dengenin bozulması) (61, 68).

3- Nekroza uğrayan hücre, çevreye yaydığı kemotaktik maddeler aracılığı ile çağrılan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Apoptozise uğrayan hücre ise çevreye kemotaktik madde yaymaz; yanında bulunan epitel hücreleri veya makrofajlar aracılığı ile fagositoza uğrar. Nekrozda inflamatuar cevap vardır, apoptoziste ise yoktur (66, 68, 69).

Morfolojik Farklılıklar:

1- Nekrozda zar bütünlüğü bozulur, apoptoziste zarda kabarcıklar görülür fakat asla zar bütünlüğü bozulmaz (62, 67).

2- Nekroz sitoplazma ve mitokondride şişme ile başlar, apoptoziste ise sitoplazmada büzülme ve çekirdek yoğunlaşması görülür (62, 66).

3- Nekroz total hücre parçalanması ile sonlanır, oysa apoptozis hücrenin daha ufak fragmanlara dönüşmesi ile sonlanır (apoptotik cisimler) (66).

4- Nekrozda hücre zarında vezikül formasyonu yoktur, total parçalanma olur; oysa apoptoziste zara bağlı veziküller oluşur (63).

5- Nekrozda organellerin devamlılığının bozulması mevcut iken, apoptoziste; apoptozisi başlatan bcl-2 gen ailesinin ürettiği por oluşturan proteinlerin etkisi ile organeller bütünlüğünü korur, ancak delikli bir yapıya kavuşur (62, 63) (Şekil 9).

Biyokimyasal Farklılıklar:

1- Nekrozda iyon dengesi kaybolur, apoptoziste ise sıkı bir şekilde kontrol edilen enzimatik olaylar mevcuttur (61).

2- Nekroz enerjiye ihtiyaç duymaz, pasif bir olgudur ve +4°C'de bile gerçekleşebilir. Apoptozis ise enerji gerektiren aktif bir olgudur ve +4°C' de gerçekleşemez (63).

3- Agaroz jel elektroforezi yapıldığında, nekroz sırasında DNA'nın rastgele sindirimi mevcuttur. Oysa apoptoziste rastgele olmayan, monooligonukleozomal parçalanma mevcuttur. Bu da agaroz jel elektroforezde apoptozis için karakteristik "ladder pattern" denen merdiven şeklinde kırılmalar meydana getirir (61, 70).

4- Nekroz sırasında hücre olumunun geç bulgusu; postlitik DNA parçalanması vardır (DNA, hücre bütünlüğü bozulmadan önce parçalanır). Ayrıca apoptoziste mitokondri tarafından sitoplazmaya birçok faktör salınımı mevcuttur (sitokrom-c vb.) (70, 71).

5- Nekroz sırasında nonspesifik zar parçalanması olurken, apoptoziste zar asimetrisinde değişiklikler olur (örneğin fosfotidilserin zarın sitoplazmik yüzünden ekstraselüler yüzüne doğru yer değiştirir). Bu değişiklik apoptotik hücrenin inflamatuar reaksiyon oluşturmadan lokal hücrelerce tanınıp, fagosite edilmesini sağlar (63).

2.4.6. Spermatogenezde Apoptozisin Rolü

Doku canlılığında ve devamında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptozis, testiküler dokuda da sık saptanan bir fenomendir. Spermatogenez, spermatogonyal kok hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır. Normal Spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre olumu de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar (72, 73). Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyumlarda programlı hücre ölümüne yol açar (74). Germ hücrelerindeki bu olum spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir (75). Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptozis gerçekleştiği bildirilmiştir (76). Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin % 75'i apoptozise maruz kalır (77). Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (78-81). Androjen eksikliğinde, azoospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir (75,82-86).

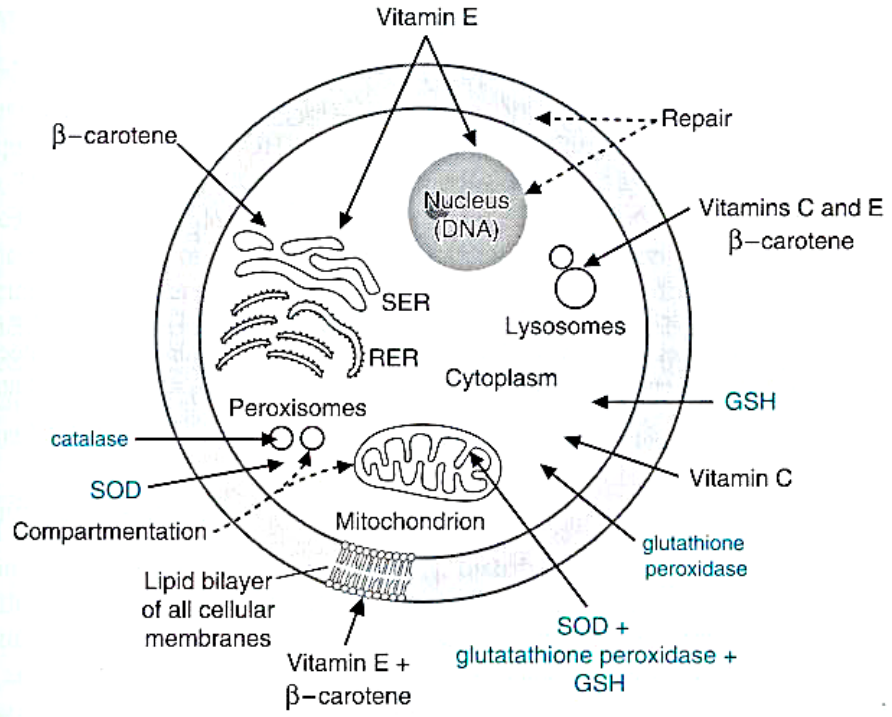
Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (85, 86). Hipofizektomize immatür sıçanlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde masif apoptozis ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da

hCG tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre olumunun engellenebildiği gösterilmiştir (83, 86).

Ayrıca, gonadotropin ya da testosteron eksikliği dışında maturasyon arresti ve hipospermatogeneze yol açan tüm klinik durumlarda da apoptozis görülebilir (87). Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan sensitivitesi de germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür (88). Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (56, 89, 90).

2.5. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Bu mekanizmalar **"antioksidan savunma sistemleri"** veya kısaca **"antioksidanlar"** olarak bilinirler (Şekil 9).



Şekil 9: Antioksidan sistemleri (46-49).

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki ederler.

1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha zayıf yeni moleküle çevirme **toplayıcı etki**dir. Antioksidan enzimler, trakeobronşiyal mukus ve küçük moleküller bu tip etki gösterirler.

2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme **bastırıcı etki**dir. Vitaminler, flavanoidler bu tarz bir etkiye sahiptirler.

3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki **zincir kırıcı etki**dir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.

4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması **onarıcı etki**dir.

Antioksidanlar, endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olabilirler (Tablo 2).

Tablo 2: Kaynaklarına göre antioksidanlar (46-49).

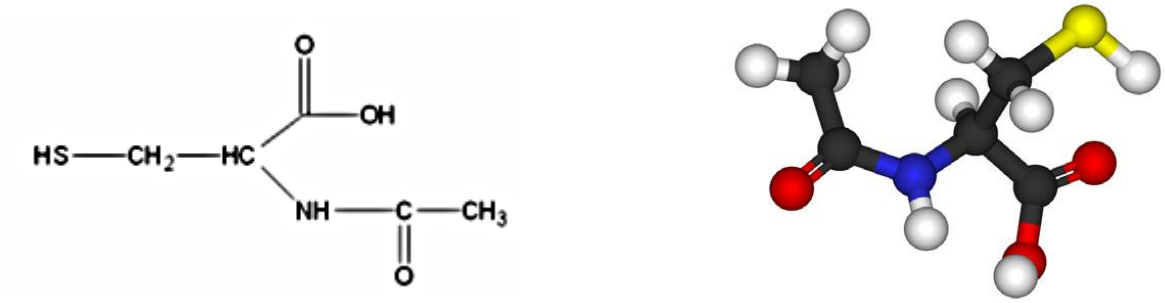
ANTİOKSİDANLAR				
ENDOJEN KAYNAKLI ANTİOKSİDANLAR		**EKSOJEN KAYNAKLI ANTİOKSİDANLAR**		
Enzim Olan Antioksidanlar	Enzim Olmayan Antioksidanlar	Vitamin Olan Antioksidanlar	İlaç Olan Antioksidanlar	Gıdadaki Antioksidanlar
1) Süperoksit dismutaz 2) Glutatyon peroksidaz 3) Glutatyon S-Transferazlar 4) Katalaz (CAT) 5) Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi. 6) Hidroperoksidaz.	1) Glutatyon 2) Sistein 3) Transferrin 4) Ferritin 5) Bilirubin 6) Melatonin 7) Seruloplazmin 8) Ürat 9) Laktoferrin 10) Albümin 11) Metiyonin 12) Miyoglobin 13) Hemoglobin	1) α-tokoferol 2) β-karoten 3) Askorbik asit 4) Folik asit (folat)	1) Ksantin oksidaz inhibitörleri 2) NADPH oksidaz inhibitörleri 3) Rekombinant süperoksit dismutaz 4) Trolox-C 5) Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar 6) Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar 7) Demir redoks döngüsü inhibitörleri 8) Nötrofil adezyon inhibitörleri 9) Sitokinler 10) Barbitüratlar 11) Demir Şelatörleri	1) N-asetilsistein 2) Butylated hydroxyanisole 3) Sodium benzoate 4) Ethoxyquin 5) Propylgalate 6) Fe-superoxyde dismutase 7) Butylated hydroxytoluene

2.5.1. N-Asetilsistein

NAC'ın bir glutatyon prekürsörü olarak bilinmesi, radikal giderici etkisinden faydalanma fikrini gündeme getirmiştir. İlk kez 1963 yılında Sheffner, mukolitik tedavi amacıyla sistein derivelerini klinikte kullanıma sunmuştur. L-sistein'in sodyum tuzu olan NAC derivasyonunun doğal sisteinden daha az irritatif olması ve göreceli olarak daha az toksik ve daha çok sülfidril grubu içermesinden dolayı klinik kullanımının daha etkili ve uygun olacağı belirtilmiştir (91).

2.5.1.1. N-Asetilsisteinin Kimyasal Özellikleri

NAC, doğal bir amino asit olan L-sisteinin N-asetillenmiş türevidir. L-sisteinin sodyum tuzu olarak hazırlanmıştır. Sistein, antioksidan etkisi olan birkaç amino asitten biridir. Asetilsistein $C_5H_9NO_3S$ şeklinde formüle edilebilir. Molekül ağırlığı 163.2 g/mol dır. %22 oranında suda erir. Alkol ve değişik sıvılarda da benzer oranda erime gösterir (Şekil 10) (91).



A. Kimayasal B. Uzaysal

Şekil 10: N-asetilsisteinin yapısı (91)

2.5.1.2. N-Asetilsisteinin Etki Mekanizması

Mukolitik etkisi balgamdaki sülfidril bağlarını kırmasından kaynaklanmaktadır (92, 93). Doğal sisteinin en az toksik ve en etkili formu L-sisteinin N-asetil formudur. Daha çok sülfidril grubu içermesi ve çözünürlüğünün daha iyi olması nedeniyle klinikte sıklıkla kullanılan formdur. N-asetilsistein, L-sisteinin N-asetil türevidir, mukoregülatör etkilidir. Vücudu zararlı etkilerden oksidanlara karşı korumada tiyol içeren bileşiklerin önemi giderek artmaktadır. En yaygın kullanılan mukolitiktir ve etkisi mukokinetiklerden daha fazladır (91, 94). Sisteine dönüşüm sonrası GSH

sentezinde rol oynar. Antioksidan etkisi iki yoldan gerçekleşir. Direkt etkisiyle, serbest oksijen radikallerini doğrudan inhibe eder. Yapısındaki sisteini artırarak, GSH sentezini artırması ise indirekt etkisidir. Oksidan strese bu mekanimazlarla karşı çıkar (95, 96). N-asetilsistein, ROS'lardan $OH^{\cdot}$, O_2^{-}, H_2O_2 radikallerini indirger (97).

2.6. Testis Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Sistem

Spermatogenez, spermatogoniumların proliferasyonu, mayoz ve spermiyogenez aşamalarından oluşan erkek germ hücre gelişiminde kompleks bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyel oksijen tüketimini göstermektedir. Testisteki zayıf vaskülarizasyondan dolayı testisteki oksijen miktarı düşüktür. Hem spermatogenez hem de Leydig hücresi oksidatif stresle hasar görebildiği için testisteki düşük oksijen miktarı, testisi serbest radikallerin hasarından koruyabilecek mekanizmaların başında gelmektedir (98, 99).

Testis serbest radikallerin hasarından korunabilmek için çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyicilere sahiptir. Bu antioksidan savunma sistemleri oldukça önemlidir, çünkü peroksidatif hasar testiküler torsiyondan diyabete ve ksenobiyotik maruziyeti gibi koşullarda patolojik sonuçları destekleyen bozuk testiküler fonksiyonun tek önemli sebebiymiş gibi kabul edilir (100, 101). Testiküler mikroçevredeki düşük oksijen miktarına rağmen testis; fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle, oksidatif sitrese karşı hassas hale gelmektedir. ROS; mitokondriden ve ksantin- ve NADPH- oksidazları içeren çeşitli enzimlerden ve ayrıca sitokrom P450'lerden oluşabilir. Testis ROS karşı hem enzimatik hem de non-enzimatik öğelerden oluşan antioksidan sistemler içermektedir (102, 103).

SOD; süperoksit anyonu hidrojen perokside ve oksijen molekülüne dönüştüren ve antioksidatif reaksiyonların tam ortasında rol oynayan önemli bir enzimdir. SOD1 (Cu/ZnSOD) sitosolik, SOD2 (MnSOD) mitokondriyal, SOD3 (ECSOD) ekstraselüler olmak üzere 3 izozimi vardır. Testiste her 3 formu da vardır (104, 105).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız deneyseldir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın deneysel ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Histokimyasal ve immunohistokimyasal değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, biyokimyasal değerlendirmeler ise Dokuz Eylül Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada toplam üç grup oluşturulmuştur. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir:

1. Grup: Sham Grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara her gün aynı saatte (11:00) 1 ml/kg steril salin solüsyonu intraperitoneal olarak verilmiştir. Bu grup oluşturularak histokimyasal, immünohistokimyasal ve biyokimyasal parametrelerin bazal değerleri toplanmıştır.

2. Grup: Formaldehit Grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara gün aşırı olarak, aynı saatte (10:00) 1/10 oranında sulandırılmış 10 mg/kg dozundaki formaldehit i.p olarak uygulanmıştır. Uygulamada, formaldehit'in % 37'lik formu kullanılmıştır.

3. Grup: Formaldehit + N-asetilsistein Grubu (n=7): Bu gruptaki sıçanlara yine gün aşırı olarak, aynı saatte (10:00) 1/10 oranında sulandırılmış 10 mg/kg dozundaki formaldehit uygulanmıştır. Bunun yanı sıra bu gruptaki deneklere her gün aynı saatte (11:00) 50 μmol/kg/gün N-asetilsistein i.p olarak formaldehitten 1 saat sonra uygulanmıştır.

Bir aylık deney süresi sonunda tüm sıçanlar eter anestezisi altında sakrifiye edilmiştir. Deneyde uygulanan formaldehitin dozu ve süresi önceden yapılan formaldehit uygulanmış literatür bilgilerine göre belirlenirken N-asetilsistein'in formaldehitteki koruyucu etkilerine ait literatür bilgisi olmadığı için kullanım

dozu ve uygulama süresi literatürdeki diğer modeller örnek alınarak belirlenmiştir (106,107).

Hayvanlara ait testisler çıkartılarak çevre dokulardan temizlenmiştir. Her sıçana ait sağ testis histolojik ve immünohistokimyasal, sol testis ise biyokimyasal incelemeler için kullanılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Birimi' nden temin edilen Wistar suşu toplam 21 erkek sıçan (230-250 g) kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçilmiştir. Tüm denekler çalışma sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 ºC oda sıcaklığında barındırılmıştır. Denekler dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslenmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada Grup I sham grubuna yalnızca fizyolojik serum, Grup II formaldehit grubuna 10 mg/kg formaldehit ve Grup III N-asetilsistein grubuna 10 mg/kg formaldehit ile 50 μmol/kg/gün N-asetilsistein uygulanmıştır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada hayvan ağırlıklarını ölçmek için terazi; deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom, boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikropipetler, biyokimyasal incelemeler için soğutmalı santrifüj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, homojenizatör, eliza cihazı ve buzluk kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulanmış, ince kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için hematoksilen & eozin, PAS (periyodik asit schiff) ve masson trikrom, immünohistokimyasal olarak apoptozun belirlenebilmesi için TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları yapılmıştır.

3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneklerin ağırlıkları deney başlangıcında ve deney sonunda sakrifikasyon öncesi ölçüldü. Sonuçlar SPSS 15,0 paket programında Wilcoxon testi kullanılarak değerlendirildi. Deneklerin ağırlıklarının başlangıç ve deney sonundaki verilerinin, grup içinde karşılaştırılmasında $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.2. Histokimyasal İncelemeler

Sağ testis histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fiske edildi. Böylece dokunun alındığı andaki yapısal nitelikleri mümkün olabildiği kadar korundu. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo 3).

Tablo 3: Doku takip protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1-2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.2.3.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60˚C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 5 değişik azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Böylece nukleusların boyanması sağlandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Böylece hücre sitoplazmasının boyanması sağlandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 4: Hematoksilen-Eozin boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Dehitratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.2. Masson Trikrom Boya Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60˚C'lik etüvde bekletilen kesitler biri etüvde olmak üzere üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçiridi. Distile suda çalkalandıktan sonra masson trikrom boyama seti (04-010802 Bio-Optica, Milano, İtalya) içerisinden dokular üzerine 6 damla weigert's iron hematoksilen A solüsyonu ile 6 damla weigert's iron hematoksilen B solüsyonu damlatılarak nukleusların boyanabilmesi için 10 dakika bekletildi. Yıkama işlemi yapılmadan preparatlar kurutulduktan sonra pikrik asit alkolik solüsyondan 10 damla damlatılarak

eritrositlerin boyanması sağlandı. Distile su ile hemen (3-4 saniye) yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 10 damla ponceau asit fuksin azofloksin solüsyonu 4 dakika bekletilerek hücre sitoplazmalarının boyanması sağlandı. Sonra preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra fosfomolibdik solüsyonundan 10 damla damlatılarak 10 dakika bekletildi. Yıkama yapılmadan masson anilin blue solüsyonundan 10 damla damlatıp 5 dakika bekletilerek bağ dokusunun boyanması sağlandı. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 5).

Tablo 5: Masson Trikrom boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda Isısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda Isısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent A + Reagent B	10 dakika
Boyama	Reagent C	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent D	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	10 dakika
Boyama	Reagent F	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkoller	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika

Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.3. Peryodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60˚C'lik etüvde bekletildi. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirildi, distile su ile çalkalandıktan sonra PAS (periodik asit schiff) boyama kiti (04-130802 Bio-Optica, Milano, İtalya) içerisinden peryodik asit solüsyonundan 10 damla damlatıp 10 dakika bekletilerek oksidasyon işlemi sonucunda aldehit gruplarının oluşması sağlandı. Ardından kesitler distile suda çalkalanarak üzerlerine 10 damla schiff reagent damlatılarak 20 dakika bekletildi. Böylece schiff reagentin içerdiği sülfür fuksin, bazik fuksine benzer çözünmeyen işaretli bileşiklerdeki 2 komşu aldehit gurubunun değişmesini sağladı. Daha sonra kesitler distile suda yıkanarak üzerlerine potasyum metabisülfit solüsyonundan 10 damla damlatılarak 2 dakika bekletildi. Kesitler yıkanmadan üzerlerine 10 damla fiksatif solüsyonundan damlatılarak 2 dakika bekletildi. Kesitler distile suda iyice çalkalandıktan sonra mayers hematoksilen solüsyonundan 10 damla damlatılarak 3 dakika bekletildi. Böylece nukleusların boyanması sağlandı. Sonrasında 5 dk akarsuda yıkandı. Daha sonra dehidratasyon işlemi için artan alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 6).

Tablo 6: Peryodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	1 saat
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (oda ısısında)	30 dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent A	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent B	20 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent C	2 dakika
Boyama	Reagent D	2 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	3 dakika
Yıkama	Akarsu	5 dakika
Dehidratasyon	%60-70-80-96-100'lük alkol serileri	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.4. Morfometrik Değerlendirmeler

3.6.2.4.1. Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması

Her grup için ayrı ayrı 100 adet tübül değerlendirilerek her bir tübüle Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo 7).

Tablo 7: Jonhson testiküler biopsi skorlaması (108).

Skor	Histolojik Bulgular
10	Birçok spermatozoa bulunan tam bir spermatogenez
9	Birçok spermatozoa var, germinal epitel bozuk ve lümen oblitere
8	Yalnız birkaç spermatozoa var (<5-10)
7	Spermatozoa yok, birçok spermatid var
6	Spermatozoa yok, yalnızca birkaç spermatid var (<5-10)
5	Spermatozoa/spermatid yok, çok sayıda spermatosit var
4	Yalnızca birkaç spermatosit var (<5), spermatid/spermatozoa yok
3	Germ hücresi olarak yalnız spermatogonia mevcut
2	Tübüller içerisinde germ hücresi yok, sertoli hücreleri mevcut
1	Tübüller içerisinde hücre yok

3.6.2.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Seminifer tübül çap ölçümü için PAS ile boyanan kesitlerden her grup için rastgele seçilen 100 tübülde, 20X'lik büyütmeyle UTHSCA Image Tool Version 3,0 programını kullanarak çap ölçümü yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

Bazal memran kalınlığı ölçümü için PAS ile boyanan kesitlerden her gruptan rastgele seçilen 100 tübülde, 100x'lik büyütmeyle UTHSCA Image Tool Version 3,0 programı kullanılarak ölçüm yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi ve hücrelerdeki DNA fragmantasyonunun gösterilmesi için immünolojik yöntemler kullanıldı. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırık oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA kırıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal

deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığıyla biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine (DAB), işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Hemotoksilen ile zemin boyama yapılarak işlem sonlandırılır. İmmunohistokimyasal yöntemlerle fragmante nukleuslar veya sitoplâzma koyu kahverengi boyanır.

3.6.2.5.1. TUNEL Boya Protokolü

Bu teknik için Apoptag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kiti (Millipore S7101, USA) kullanıldı. Alınan kesitler öncelikle 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra da rutin ışık mikroskobik deparafinizasyon sürecinden geçirildi. Deparafinizasyon amacıyla 15'er dakika biri etüvde olmak üzere 3 değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidratasyon sağlanarak distile suda çalkalandı. Distile su aşamasına getirilen kesitler öncelikle preparat tablasında fosfat tamponlu solüsyon (PBS) ile yıkandı. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizilerek alan kısıtlandı. Kurutma kağıdı ile üzerindeki PBS emdirilen dokulara Proteinaz K solüsyonu ile 15 dakika oda ısısında muamele edildi. Daha sonra dokular 3 kez PBS ile yıkandı. Taze hazırlanmış %3'lük H_2O_2 (hidrojen peroksit) ile 5 dakika oda ısısında bekletilen dokuda endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi ve tekrar PBS ile 3 defa yıkandı. Kesitlerdeki su, kurutma kağıdı ile emdirildi ve dokular kitin içerisinde mevcut kullanıma hazır bulunan dengeleme solüsyonu (Equilibration buffer) ile 5 dakika muamele edildi. Doku üzerindeki fazla sıvı kurutma kağıdı ile emdirildi ve kit içerisinde reaksiyon solüsyonu ve TdT enzim solüsyonu şeklinde ayrı ayrı bulunup kullanımdan önce ikisinin karıştırılmasıyla taze bir şekilde hazırlanan TdT enzim karışımı (%70 reaksiyon solüsyonu + %30 TdT enzim solüsyonu) ile muamele edilen kesitler 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Etüvden çıkarılan kesitler 1 ml reaksiyonu durdurma ve yıkama solüsyonunun (stop wash buffer) 34 ml distile su içerisinde dilüe edilmesiyle hazırlanan solüsyonla 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Bu işlemin ardından 3 kez PBS ile yıkama yapıldı. Kesitler Anti-Digoxigenin solüsyonu ile 30 dakika oda ısısında inkübe edildi. PBS ile 3 kez yıkama yapıldıktan sonra reaksiyonun

görünürlüğünü sağlamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) kromojeniyle muamele edilen kesitler distile su ile iyice çalkalandı. Mayer's hematoksilen ile art alan boyaması yapıldı ve akarsuda yıkandı. Yıkamanın ardından artan alkol serilerinden geçirildikten sonra 3 değişim ksilol ile şeffaflaştırılan kesitler entellan ile kapatıldıktan sonra mikroskopta görüntülendi.

3.6.2.5.2. Aktif Kaspaz 3 Boya Protokolü

Alınan kesitler 60^0C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra deparafinizasyon amacıyla 30' ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi. Dokular PBS ile yıkandı. Ardından mikrodalgada sodyum sitrat solüsyonu (Bio-Optica) içerisinde, 600 watta 6 dakika tutuldu. Soğuması için 20 dakika bekletildi. 3 kez PBS ile yıkanan kesitler 10 dk H_2O_2 ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile 3 defa yıkama yapıldı ve 1 saat bloklama solüsyonu (TA 125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile bekletildi. Primer antikor rat spesifik active caspase-3 (1:50; Millipore) ile + 4 ºC' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün kesitler oda ısısına gelene kadar bekletildikten sonra PBS ile 3 defa yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikorunda (85-9043 Zymed Histostain Kit, San Francisco, USA) 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile 3 defa yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 8).

Tablo 8: Aktif kaspaz 3 boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60˚C Etüvde	**1 Gece**
Deparafinizasyon	Ksilen 1–2–3	**30'ar Dakika**
Rehidratasyon	% 100–96–80–70'lik Alkol	**Çalkalama**
Yıkama	Distile Su	**Çalkalama**
Dokuların Etrafını Çizme	Pappen	
Yıkama	PBS	**3x5 Dakika**
	Sitrat Solüsyonu	**600 watta 6 Dakika**
Yıkama	PBS	**3x5 Dakika**
	H_2O_2	**10 Dakika**
Yıkama	PBS	**3x5 Dakika**
Bloklama	Blocking Solüsyonu	**1 Saat**
Primer Antikor	Enzim Solüsyonu	**+4˚C'de 1 Gece**
Yıkama	PBS	**3x5 Dakika**
Sekonder Antikor	Streptavidin HRP	**30 Dakika**
Yıkama	PBS	**3x5 Dakika**
Boyama	DAB Boyası	**1 Dakika**
Yıkama	Distile Su	**Çalkalama**
Zıt Boyama	Mayer Hematoksilen	**1 Dakika**
Dehidratasyon	%80–96-100'lük Alkol Serileri	**Çalkalama**
Şeffaflaştırma	Ksilen 1–2–3	**30'ar Dakika**
Kapama	**Entellan**	

3.6.2.6. Biyokimyasal İncelemeler

Sol testisin bir kısmı biyokimyasal analizler için kullanıldı. Kardiyak perfüzyon öncesi alınan sol testisin bir kısmı 3 parçaya ayrılarak PBS çözeltisinde iyice yıkandı. Böylece kan hücrelerinden iyice temizlenen dokular 3 farklı mikrosantrifüj tüpüne konarak 2 saat -20^{0}C' nin ardından -80^{0}C' de biyokimyasal incelemeler için saklandı.

3.6.2.6.1. Malondialdehit (MDA) Düzey Ölçümü

Malondialdehid (MDA) düzeyleri, *BIOXYTECH MDA-586™ Spectrophotometric Assay For Malondialdehyde* kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Yöntemin prensibi, kromojenik reaktif olan N-metil-2-fenilindol (NMPI)'un 45^{o}C'de MDA ile yaptığı reaksiyona dayanmaktadır. Burada bir molekül MDA, 2 molekül NMPI ile reaksiyon vererek 586nm'de maksimum absorbans veren stabil bir molekül olan karbosiyanin boyası oluşmaktadır.

Yöntem Basamakları:

Doku Homojenizasyonu:

1. Öncelikle tüm dokular yaklaşık olarak 150 mg olacak şekilde tartıldı. Tartılan miktarın 4 katı hacimde 10 mM pH 7,4 PBS tamponu eklendi. (600 µl PBS)

2. Homojenizasyon sırasında örnek oksidasyonunu engellemek için homojenatlara son konsantrasyıonu 5 mM olacak şekilde asetonitril içerisinde çözünmüş Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) eklendi (6 µl BHT / 600µl doku homojenatı).

3. Daha sonra her tüpe birer adet paslanmaz çelik bilye konularak Tissue Lyser II (Quiagen) cihazında 25 Hz – 45 sn'de homojenize edildi.

4. Homojenizasyon sonrası homojenatlar +4^{o}C'de ve 3000 xg 10 dakika santrifüj (Heraeus) edildi.

5. Analiz için berrak süpernatantlar ayrı tüplere alındı. Bu süpernatantın bir kısmı protein tayini için diğer kısmı ise MDA tayini için kullanıldı.

BCA Total Protein Tayini:

Örnek lizatlarının olabildiğince konsantre olması gerekir, bu nedenle öncelikle homojenattaki protein konsantrasyonu Biçinkoninik asit (BCA) tayin yöntemi ile total protein tayini belirlendi. Yöntemin prensibi, alkali koşullarda protein tarafından Cu^{2+} iyonunun Cu^{1+} iyonuna indirgenmesine ve BCA reaktifi tarafından renk değişimine dayanmaktadır. Protein tayini Pierce BCA kiti (Thermo - 23225) kullanılarak belirlendi.

1. Standart protein olarak sığır serum albumin (BSA), Kör olarak dH_2O kullanıldı.

2. Öncelikle farklı konsantrasyonlarda (2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 µg/ml) BSA standardı hazırlandı.

3. İçerisinde biçinkoninik asit bulunan BCA A Reaktifi ve % 4 bakır sülfat içeren BCA B Reaktifi 50:1 oranında karıştırılarak "Working Reagent" hazırlandı.

4. Örnekler 150 kat seyreltildi.

5. 96 kuyucuklu bir mikroplağa standart ve seyreltilmiş örneklerden 25'er µl eklendi.

6. Her kuyucuğa 200 µl "Working Reagent" eklendi.

7. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi.

8. ELISA okuyucuda (Bio-Tek) 562 nm'de örnek ve standartların absorbans değerleri okundu.

9. Elde edilen absorbans verilerine karşı standart konsantrasyonu grafiği çizildi ve bu standart grafiğinden yararlanılarak örneklerin total protein konsantrasyonu hesaplandı. Tüm örneklerin total protein konsantrasyonları 15-60 mg/ml içermesi nedeniyle lizatların MDA tayini için uygun olduğu belirlendi.

MDA Tayini:

1. Protein tayininden sonra Tablo 9'da gösterildiği gibi farklı konsantrasyonlarda seri standartlar hazırlandı. Burada 20µM Tetramethoxypropane (TOMP) stok çözeltisi (10 mM Tetramethoxypropane (TOMP) çözeltisini dilüe etmek için 1 ml 10 mM'lık TMDP stoğuna 500 ml distile su eklendi.), MDA standardı olarak kullanıldı (Tablo 9).

Tablo 9: MDA Standartlarının hazırlanması.

20µM stok TOMP standard hacmi (µl)	0	25	50	100	150	200
dH_2O hacmi (µl)	200	175	150	100	50	0
Son Konsantrasyonu (µM)	0	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0

2. Her tüpe 200 µl örnek süpernatantları ve standartlar konuldu.

3. Daha sonra her tüpe 10 µl probucol ve 640 µl R1 reaktifi (NMPI) eklendi. (R1 solüsyonunun dilüsyonu için 18 ml R1 solüsyonuna 6 ml %100'lük metanol eklendi.)

4. Tüpler vorteks ile iyice karıştırıldı.

5. Her tüpe 150 µl R2 reaktifi (Konsantre HCl) eklendi.

6. Tüplerin kapakları iyice kapatılarak vorteks ile iyice karışması sağlandı.

7. Daha sonra tüpler 45^{o}C'de 60 dakika su banyosunda inkübe edildi.

8. İnkübasyon sonrası tüpler 10000xg'de 10 dakika salınımlı santrifüj cihazında (Heraeus) santrifüj edilerek berrak süpernatant elde edilmesi sağlandı.

9. Berrak üst faz küvete aktarılarak spektrofotomere cihazında (PG – T80) 586nm'de absorbans ölçümü yapıldı.

10. Standartların absorbans değerlerinden standart grafiği çizildi ve örneklerin MDA konsantrasyonu standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.

3.6.2.6.2. Glutatyon (GSH) Düzey Ölçümü

Glutatyon (GSH) düzeyleri, *CAYMAN Glutathione Assay* kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Yöntemin prensibi, GSH'ın sülfidril grubunun 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) ile reaksiyon vermesi ve sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) oluşturmasına dayanmaktadır. Burada GSH ve TNB arasında oluşan disülfit karması glutatyon redüktaz tarafından indirgenir ve tekrar GSH ve daha fazla TNB oluşur. TNB oluşumunun oranı, örnekteki GSH konsantrasyonu ile

doğru orantılıdır. TNB'nin 405 nm'de absorbasının ölçülmesi ile örnekteki GSH değeri belirlenir.

Yöntem Basamakları:

Doku Homojenizasyonu:

1. Öncelikle tüm dokuların 50 mg olacak şekilde tartımları yapıldı ve miktarın 5 katı hacimde MES tamponu (0,2M 2-(N- morfolino) etansülfonik asit, 0,05 M fosfat ve 1mM EDTA pH 6,0) (MES tamponunun dilüsyonu için 60 ml stok MES tamponuna 60 ml HPLC-grade su eklendi) eklendi. (50 mg örnek- 250 μl MES)

2. Daha sonra her tüpe birer adet paslanmaz çelik bilye konularak Tissue Lyser II (Quiagen) cihazında 25 Hz – 45sn'de homojenize edildi.

3. Homojenizasyon sonrası homojenatlar 10.000 xg ve +4^{o}C'de 15 dakika santrifüj (Heraeus) edildi.

4. Analiz için berrak süpernatantlar ayrı tüplere alındı.

Deprotenizasyon İşlemi:

1. Süpernatantlardaki proteinlere ait sülfidril grupların girişim yapmasını engellemek amacıyla örneklerin deproteinizasyonu yapıldı. Bunun için 1:1 oranında süpernatantlara metafosforik asit (MPA) (MPA reagentin hazırlanmak için 5 g metafosforik asit 50 ml distile suda çözüldü.) eklendi ve voteks ile iyice karışması sağlandı. (200 μl örnek- 200 μl MPA)

2. Ardından 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 2.000g'de 2 dakika santrifüj (Heraeus) edildi.

3. Dikkatlice üst faz alındı ve ayrı bir tüpe konuldu ve 1 ml süpernatant başına 50 µl trietanolamin (TEAM) (TEAM hazırlanırken 4 M 531 µl trietanolamin, 469 µl distile suda çözüldü.) olacak şekilde konuldu ve hemen vortekslendi. (300 µl örnek- 15 µl TEAM)

GSH Ölçümü:

1. Deproteinizasyon işleminin ardından GSH'a ait standart grafiğini hazırlayabilmek için 50 µM GSH stok standart çözeltisi hazırlandı. Bunun için GSH

stoğu üzerine 0,2 ml dilüe edilmiş MES tamponu eklendi. Sonra bu stok çözelti kullanılarak Tablo 10.'da gösterildiği gibi farklı konsantrasyonlarda seri standartlar hazırlandı (Tablo 10).

Tablo 10: GSH Standartlarının hazırlanması.

Standartlar	**50µM Stok GSH Hacmi (µl)**	**MES Tamponu Hacmi (µl)**	**GSH Konsantrasyonu (µM)**
A	0	500	0
B	5	495	0,5
C	10	490	1,0
D	20	480	2,0
E	40	460	4,0
F	80	420	8,0
G	120	380	12,0
H	160	340	16,0

2. Her örnek ayrıca 50 kat seyreltildi.

3. 96 kuyucuklu bir mikroplağa seyreltilmiş örnek ve standartlardan 50 µl konuldu ve plağın üstü kapatıldı.

4. Daha sonra bir tüpe Assay Cocktail hazırlandı. Bunun için; 11,25 ml MES tamponu, 0,45 ml Cofactor Mixture, 2,1 ml Enzyme Mixture, 2,3 ml distile su ve 0,45 ml DTNB (DTNB kullanılmadan önce DTNB stoğu üzerine 0,5 ml distile su kondu.)çözeltileri bir tüp içerisinde karıştırıldı.

5. Hazırlanan Assay Cocktail'den tüm kuyucuklara çok kanallı pipet yardımı ile 150µl eklendi.

6. Plağın kapağı kapatılarak bir mikroplak karıştırıcıya (Labnet- Vortemp56) yerleştirildi ve mikroplak okuyucu (Elx800 – Biotek Instrument) yardımı ile her 5 dakikada bir olmak üzere 405 nm'de toplam 6 absorbans ölçümü yapıldı.

7. Alınan dört absorbans ölçümün ortalamaları alındı ve standartların ortalama absorbans değerlerinden standart grafiği çizildi ve örneklerin ortalama absorbans değerleri ile GSH konsantrasyonu standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.

3.6.2.6.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Ölçümü

Süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesi, *CAYMAN Superoxide Dismutase Assay* kiti kullanılarak spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Yöntemin prensibi, ksantin oksidaz ve hipoksantin tarafından üretilen süperoksit radikallerinin saptanması için tetrazolyum tuzlarından faydalanmaktadır. SOD'un bir ünitesi superoksit radikallerinin %50 dismutasyonu için gerekli enzim miktarındadır. Bu SOD analizi SOD'un 3 tipini de (Cu/Zn sitosolik, Mn mitokondrial ve FeSOD ekstraselüler) ölçebilmektedir. Bu çalışmada kullandığımız yöntem sitosolik SOD'u ölçmeye yöneliktir.

Yöntem Basamakları:

Doku Homojenizasyonu:

1. Öncelikle tüm dokuların 150 mg olacak şekilde tartımları yapıldı ve miktarın 5 katı (750 μl)hacimde özel olarak hazırlanmış 20 mM HEPES, 1 mM EGTA, 210 mM mannitol ve 70 mM sükroz içeren homojenizasyon tamponu eklendi. Bu tampon 50 ml distile su içerisinde 0,238 g HEPES, 0,019 g EGTA, 1,91 g mannitol ve 1,19 g sükroz çözülerek hazırlandı.

2. Daha sonra her tüpe birer adet paslanmaz çelik bilye konularak Tissue Lyser II (Quiagen) cihazında 25 Hz – 45 sn'de homojenize edildi.

3. Homojenizasyon sonrası homojenatlar 1.500 xg ve +4^{o}C'de 5 dakika santrifüj (Heraeus) edildi.

4. Analiz için berrak süpernatantlar ayrı tüplere alındı. Bu süpernatantın bir kısmı protein tayini için diğer kısmı ise SOD tayini için kullanıldı.

BCA Total Protein Tayini:

BCA total protein tayini için MDA protein tayininde kullanılan kit ve prosedürün aynısı tekrarlanmıştır.

SOD Tayini:

1. Standart grafiği için SOD stok çözeltisi hazırlandı. Bunun için 20 µl SOD standart stoğuna 1,98 ml dilüe edilmiş örnek tampon (dilüe örnek tampon hazırlanırken 2 ml stok üzerine 18 ml HPLC-grade su eklendi) eklendi.

2. Aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi kuyucuklara reaktifler eklendi (Tablo 11).

Tablo 11: SOD Standartlarının hazırlanması.

Kuyucuk	**SOD Stok (µl)**	**Örnek Tampon (µl)**	**Son SOD Aktivitesi (U/ml)**
A	0	1000	0
B	20	980	0,025
C	40	960	0,05
D	80	920	0,1
E	120	880	0,15
F	160	840	0,2
G	200	800	0,25

3. Sonra SOD standart kuyucuklarının üzerine 200 µl dilüe edilmiş radical detector (radical dedector dilüe edilirken 50 µl stok çözeltinin üzerine 19,95 ml dilüe edilmiş örnek tampon eklendi.) eklendi.

4. Örnek kuyucuklarında ise 10 µl örnek üzerine 200 µl dilüe edilmiş radical detector eklendi.

5. Reaksiyonu başlatmak için tüm kuyucuklara 20 µl dilüe edilmiş ksantin oksidaz (ksantin oksidaz dilüe edilirken 50 µl stok çözeltinin üzerine 1,95 ml dilüe edilmiş örnek tampon eklendi.) çok hızlı ve dikkatli bir şekilde eklendi.

6. Sonra 96'lı well plate dikkatlice çalkalanarak kapatıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.

7. İnkübasyondan sonra plate reader da 440-460 nm'de okundu ve sonuçlar kit prosedürüne göre hesaplandı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Deney sonunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 15,0 paket programı kullanıldı. Veriler ortalama ± standart hata olarak gösterildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, herhangi bir aksaklıkla karşılaşılmamıştır. Araştırmada herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

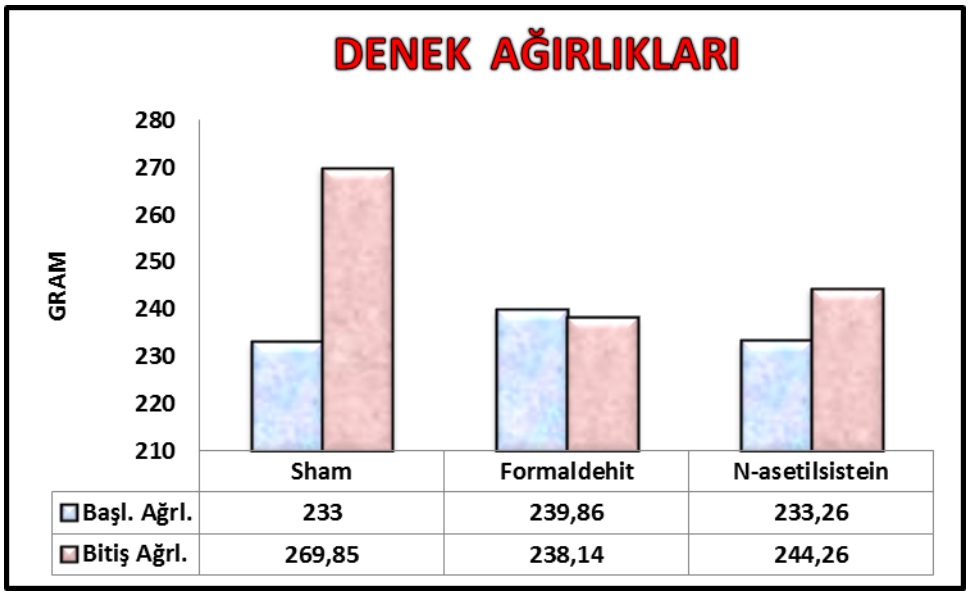
Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 28 Ekim 2011 tarihinde gerçekleştirilen 01.20.2011 no' lu toplantıda, 60/2011 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Grupların deney başlangıç ağırlık ortalamaları; sham grubunda 233±13,1 gr, formaldehit grubunda 239,86±7,29 gr, N-asetilsistein grubunda 233,29±13,1 gr olarak bulundu. Deney bitiş ağırlık ortalamaları ise; sham grubunda 269,86±36,41 gr, formaldehit grubunda 238,14±25,35 gr, N-asetilsistein grubunda 244,29±15,36 gr olarak saptandı. Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda; sham grubundaki deneklerde deney başlangıç ve bitiş ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ağırlık artışı saptanırken (p=0,028), N-asetilsistein grubundaki deneklerin başlangıç ve bitiş ağırlıkları arasında da bir artış gözlenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,498). Formaldehit grubundaki deneklerin deney başlangıç ve bitiş ağırlıkları arasında ise bir azalma gözlemiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,735). Sonuçlar SPSS 15,0 paket programında Wilcoxon Sıralı İşaretler Testi kullanılarak değerlendirildi (Şekil 11).

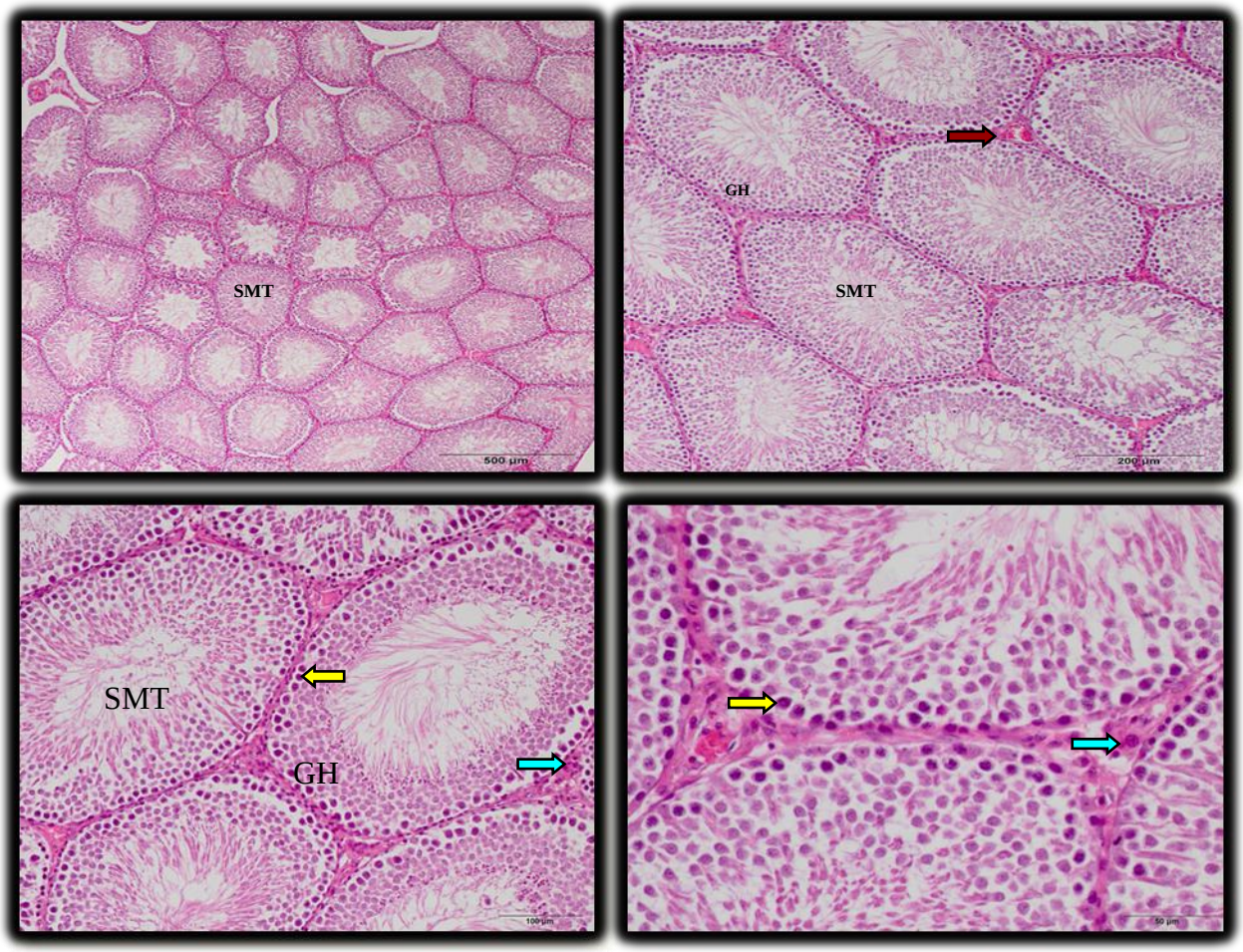


Şekil 11: Grupların deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlıkları.

4.2. Histokimyasal Bulgular

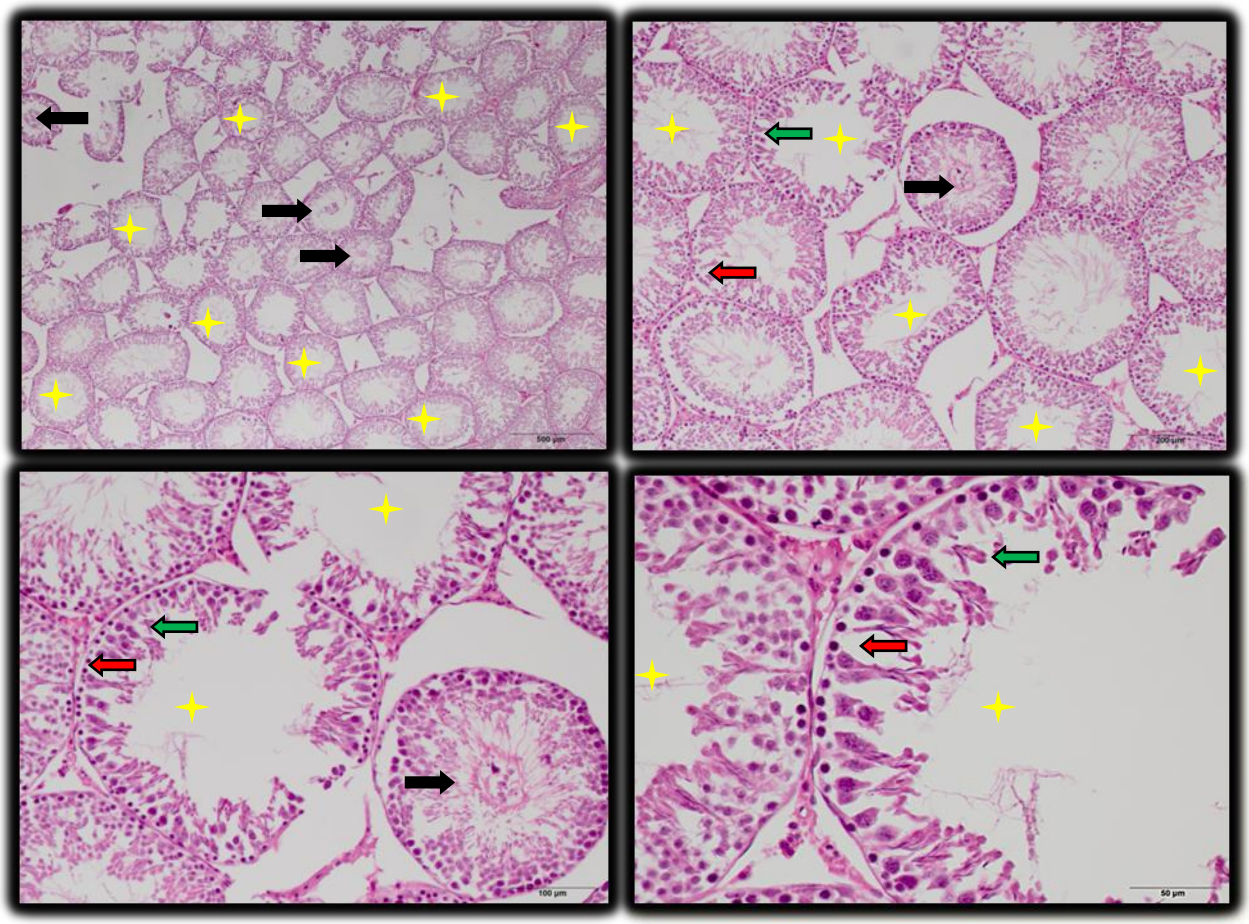
4.2.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi

Sham grubuna ait kesitler incelendiğinde normal bir morfolojiye sahip, tunika albuginea ile çevrelenmiş ve aralarını intertisyel bağ dokunun doldurduğu seminifer tübüller gözlendi. Bu tübüllerin çaplarının birbirine yakın olduğu, tübül içerisinde bulunan germinal epitel hücrelerinin düzgün bir biçimde sıralandığı görüldü. Spermatogonyumların bazal memranın hemen üzerinde düzgün sıralandığı gözlendi. Tübüllerin merkezinde ise gelişmekte olan spermatidler gözlendi. İntertisyel alanda lenf ve kan damarlar, kan damarlarına yakın yerleşmiş leydig hücreleri ile bağ doku hücreleri görüldü (Şekil 12).

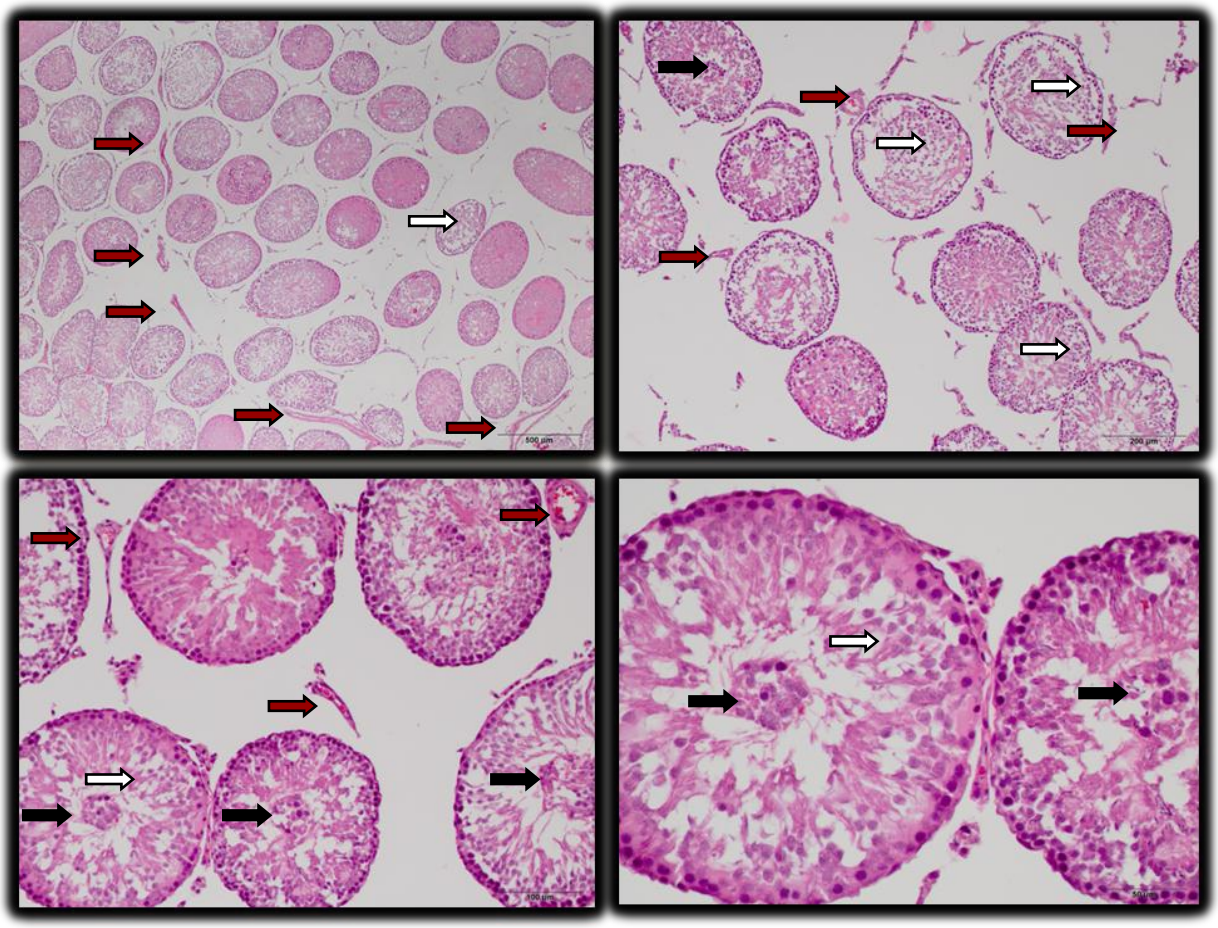


Şekil 12: Sham grubuna ait kesit. Sınırları düzgün seminifer tübüllerde (SMT), düzenli dizilim gösteren germ hücreleri (GH) intertisyel alandaki leydig hücreleri (⇨), spermatogonyumlar (⇨) ve kan damarları (⇨) gözlenmektedir (H&E, X4, X10, X20 ve X40).

Formaldehit grubuna ait kesitler incelendiğinde ise germinal epitelde düzensizlikler, spermatosit hücre kaybı, sertoli hücre kaybı ve lümende germ hücrelerinin dökülmesiyle oluşan hücre debrislerine rastlandı. Tübül lümenlerinde düzensizlik ve lümende spermium hücrelerinde kayıplar gözlendi (Şekil 13, 14)

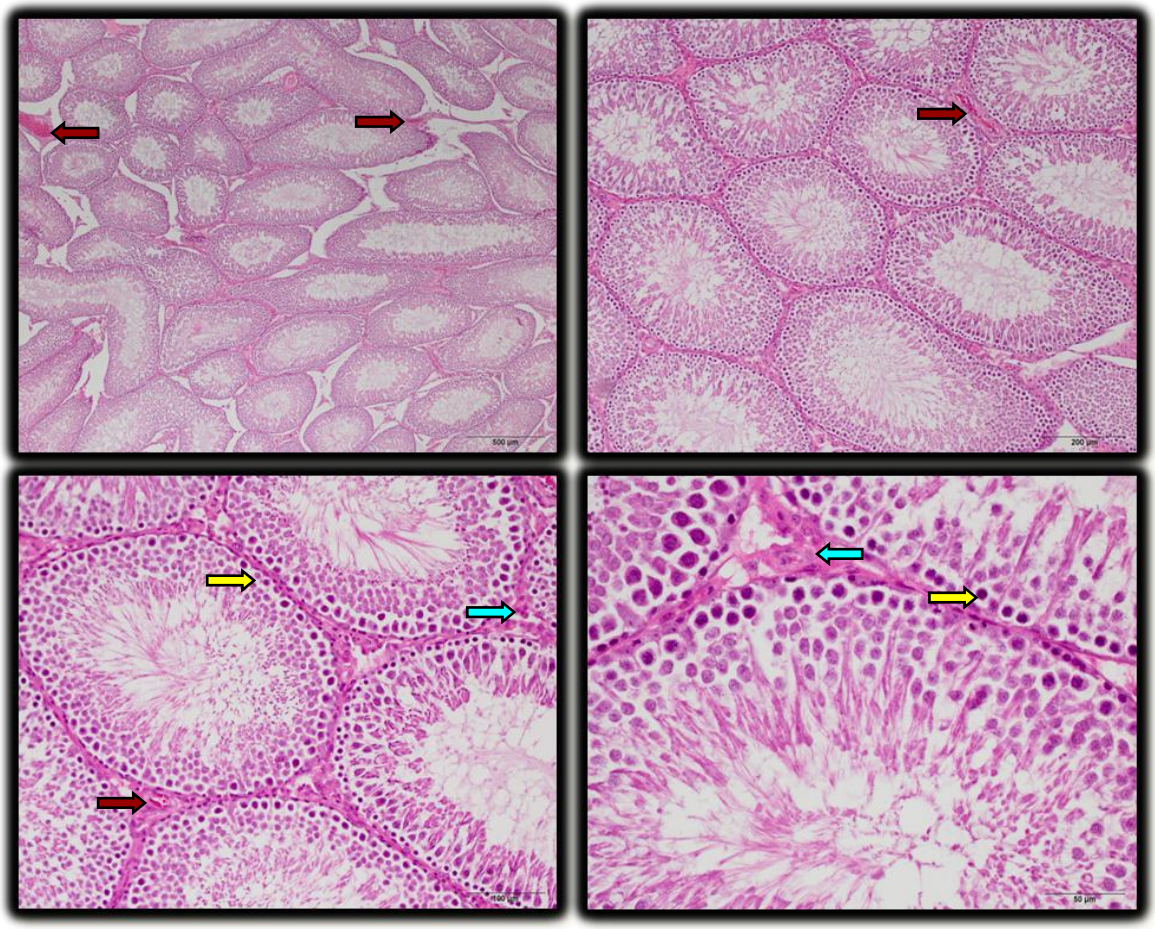


Şekil 13: Formaldehit grubuna ait kesit. Spermatosit hücrelerinde (➡), sertoli hücrelerinde (➡) ve spremium hücrelerinde (✦) kayıp, ve lümende germinal epitel döküntüsü (➡) gözlenmektedir (H&E, X4, X10, X20 ve X40).



Şekil 14: Formaldehit grubuna ait kesit. Germinal epitelde düzensizlik (⇨), lümende germ hücrelerinin dökülmesiyle oluşan hücre debrisleri (➡) ve kan damarları (➡) gözlenmektedir (H&E, X4, X10, X20 ve X40).

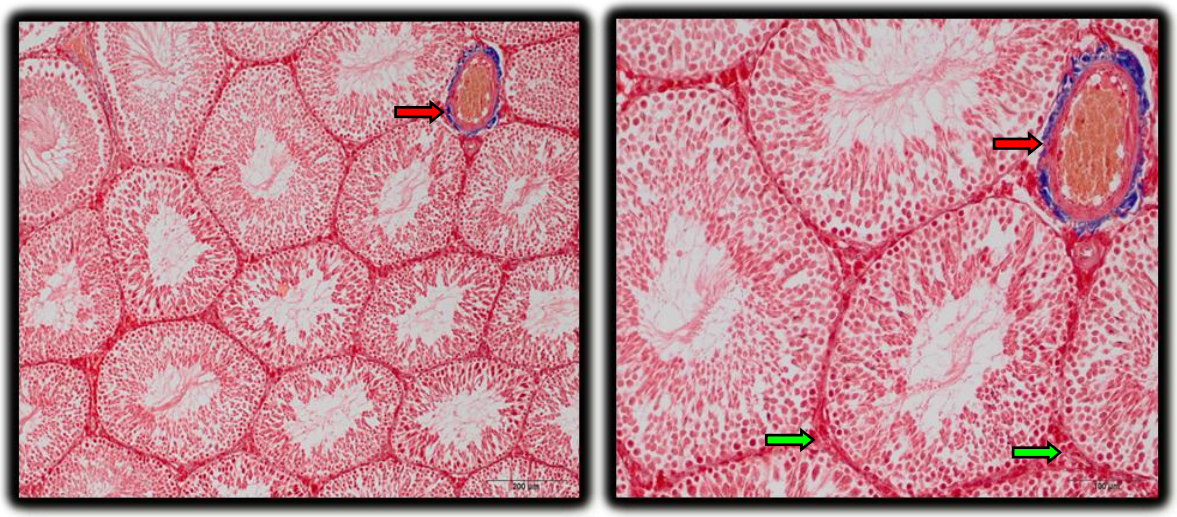
N-asetilsistein grubuna ait kesitler incelendiğinde hasarlı tübül sayısının ve hasarın şiddetinin daha az olduğu, çok sayıda tübülün normale yakın morfolojiye sahip olduğu gözlendi. Germ hücre kayıplarının azaldığı, buna bağlı olarak da morfoloji bozukluğunda düzelmeler saptandı. Tübül lümenlerindeki düzensizlik ve lümende spermium hücrelerindeki kayıpların azaldığı da gözlendi (Şekil 15).



Şekil 15: N-asetilsistein grubuna ait kesit. Normale yakın morfolojiye sahip seminifer tübüllerde düzenli dizilim gösteren germ hücreleri (GH) intertisyel alandaki poligonal şekilli leydig hücreleri (⇨), spermatogonyumlar (⇨) ve kan damarları (➡) gözlenmektedir (H&E, X4, X10, X20 ve X40).

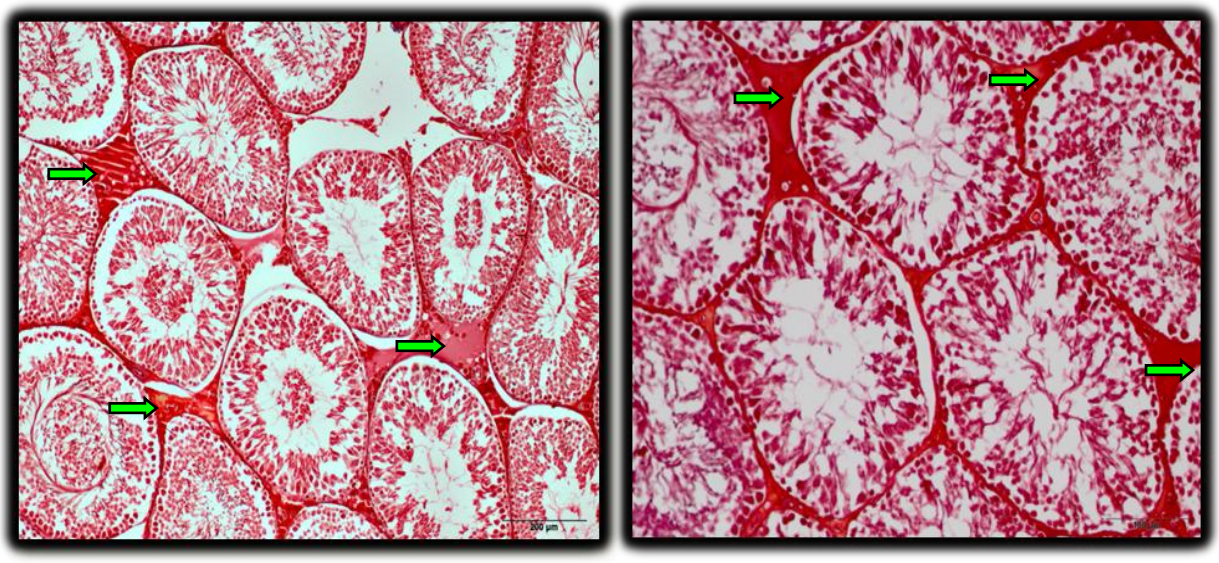
4.2.2. Masson-Trikrom Boyama Değerlendirmesi

Sham grubuna ait kesitler incelendiğinde normal yapıdaki intertisyel alan gözlendi (Şekil 16).



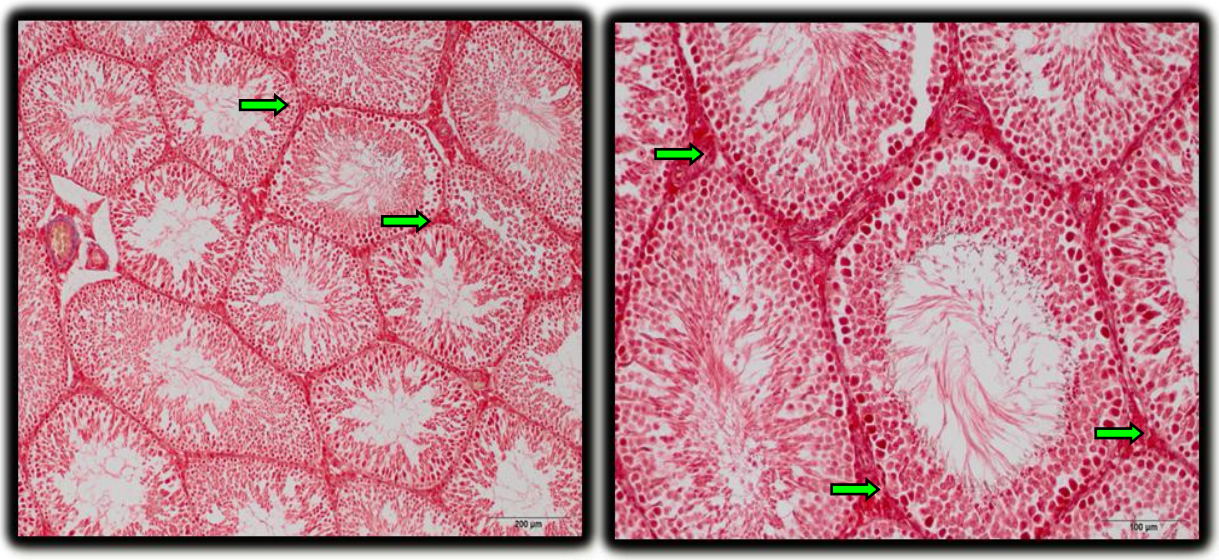
Şekil 16: Sham grubuna ait kesit. Normal yapıdaki intertisyel alan (⇨) ve kan damarındaki bağ doku fibrilleri (⇨) gözlenmektedir (Masson Trikrom, X10 ve X20).

Formaldehit grubuna ait kesitler incelendiğinde intertisyel alanda bağ doku artışı gözlendi (Şekil 17).



Şekil 17: Formaldehit grubuna ait kesit. İntertisyel alandaki bağ doku (⇨) artışı gözlenmektedir (Masson Trikrom, X10 ve X20).

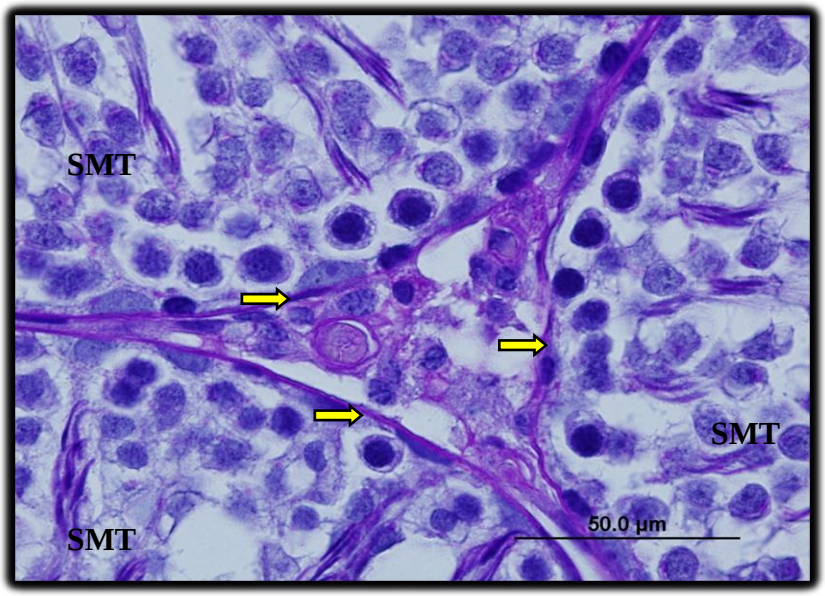
N-asetilsistein grubuna ait kesitler incelendiğinde normale yakın morfolojideki intertisyel alan gözlendi (Şekil 18).



Şekil 18: N-asetilsistein grubuna ait kesit. Normale yakın morfolojideki intertisyel alan (⟹) gözlenmektedir (Masson Trikrom, X10 ve X20).

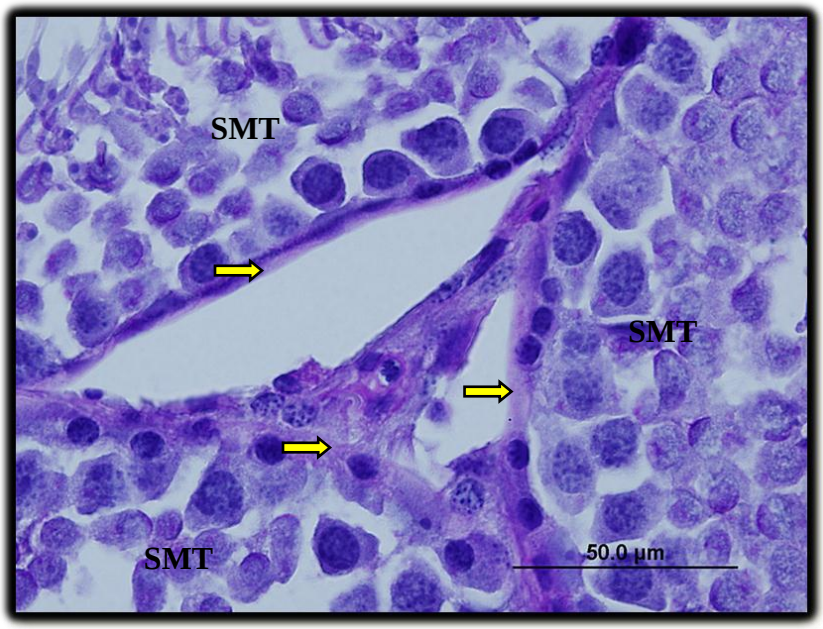
4.2.3. PAS Boyama Değerlendirmesi

Sham grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membranın normal kalınlıkta olduğu gözlendi (Şekil 19).



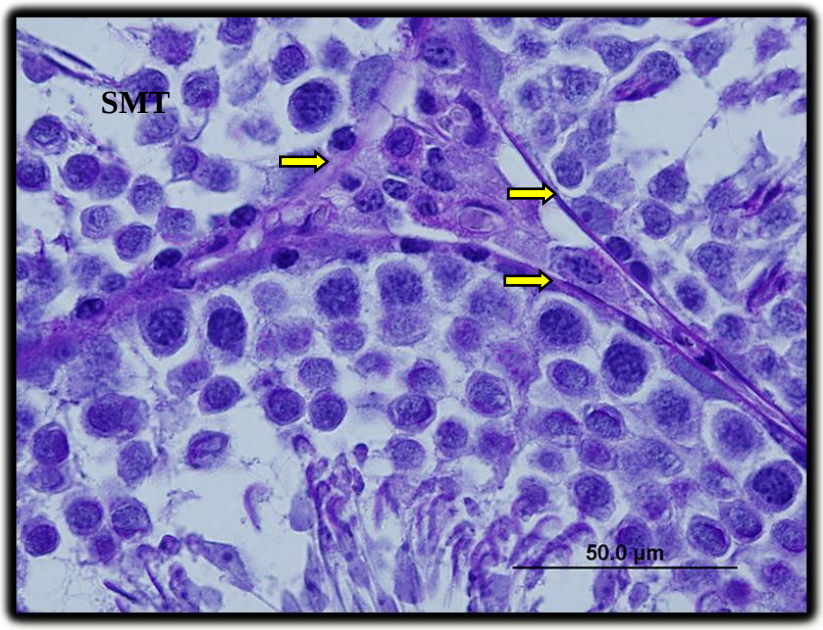
Şekil 19: Sham grubuna ait kesit. Normal kalınlıktaki bazal membran (⟹) gözlenmektedir (PAS, X100).

Formaldehit grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membran kalınlığında artış gözlendi (Şekil 20).



Şekil 20: Formaldehit grubuna ait kesit. Kalınlaşmış bazal membran (⇨) gözlenmektedir (PAS, X100).

N-asetilsistein grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membran kalınlığının sham grubuna yakın kalınlıkta olduğu saptandı (Şekil 21).



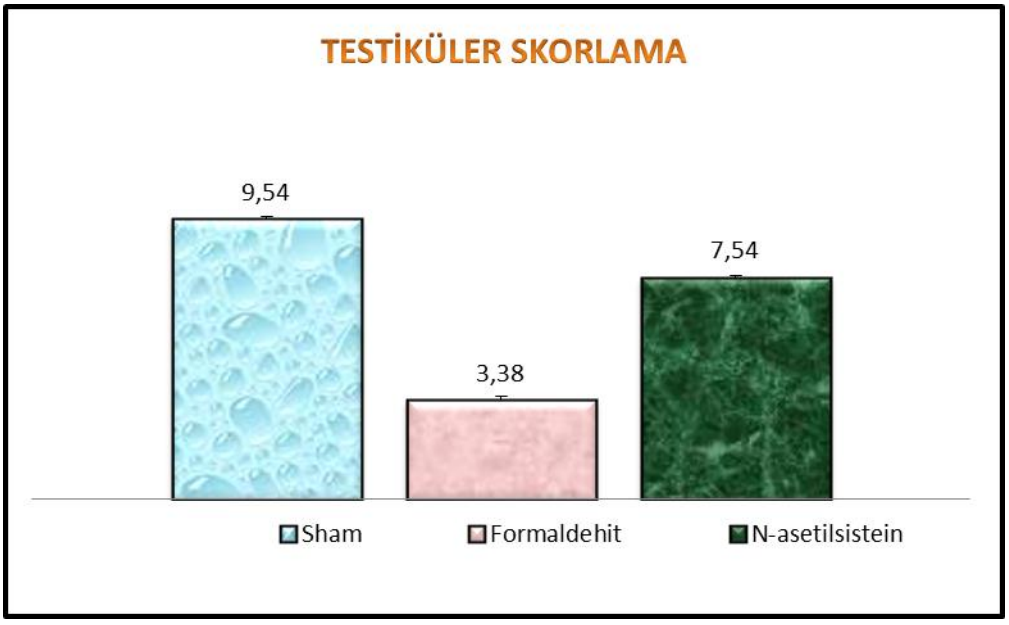
Şekil 21: N-asetilsistein grubuna ait kesit. Normale yakın kalınlıktaki bazal membranla (⇨) çevrili seminifer tübüller gözlenmektedir (PAS, X100).

4.3. Morfometrik Bulgular

4.3.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Gruplar arasındaki tübül hasarını belirlemek için morfometrik ölçümler yapıldı. Bunun için Jonhsen Testiküler Biyopsi Skorlaması yöntemi kullanıldı. Gruplar arası ortalamalar;

Sham grubu 9,54±0,16, formaldehit grubu 3,38±0,98, N-asetilsistein grubu ise 7,54±0,76 olarak bulundu. Formaldehit grubu biyopsi skor ortalamalarında sham ve N-asetilsistein gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edildi (p=0,002, p=0,002). N-asetilsistein grubunun testiküler biyopsi skor ortalamasında ise formaldehit grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı (p=0,002) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 22).

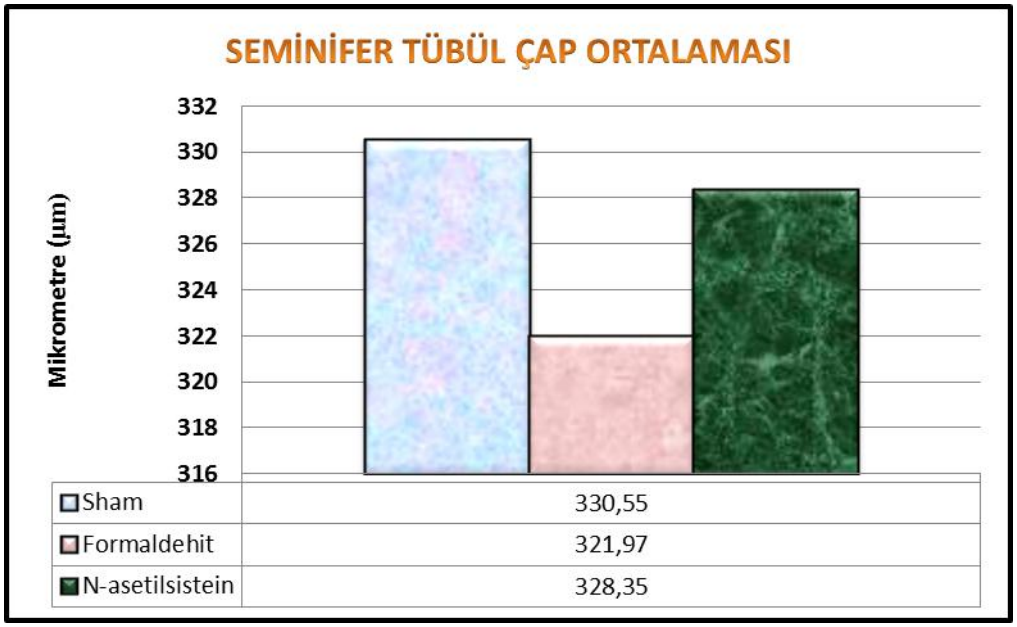


Şekil 22: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.

4.3.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Gruplar arasındaki tübül hasarını belirlemek için seminifer tübül çap ölçümleri de yapıldı. Bunun için Image Tool programı (UTHSCA, Version 3,0) kullanıldı. Gruplar arası ortalamalar;

Sham grubu 330,55±21,41 µm, formaldehit grubu 321,97±22,62 µm, N-asetilsistein grubu ise 328,35±16,88 µm olarak bulundu. Tüm gruplarda yapılan seminifer tübül çap ölçümleri sonucunda formaldehit grubundaki deneklerde ölçülen seminifer tübül çapı sham ve N-asetilsistein gruplarına kıyasla azalmış olarak tesbit edilse de istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p=0,338, p=0,482). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 23).

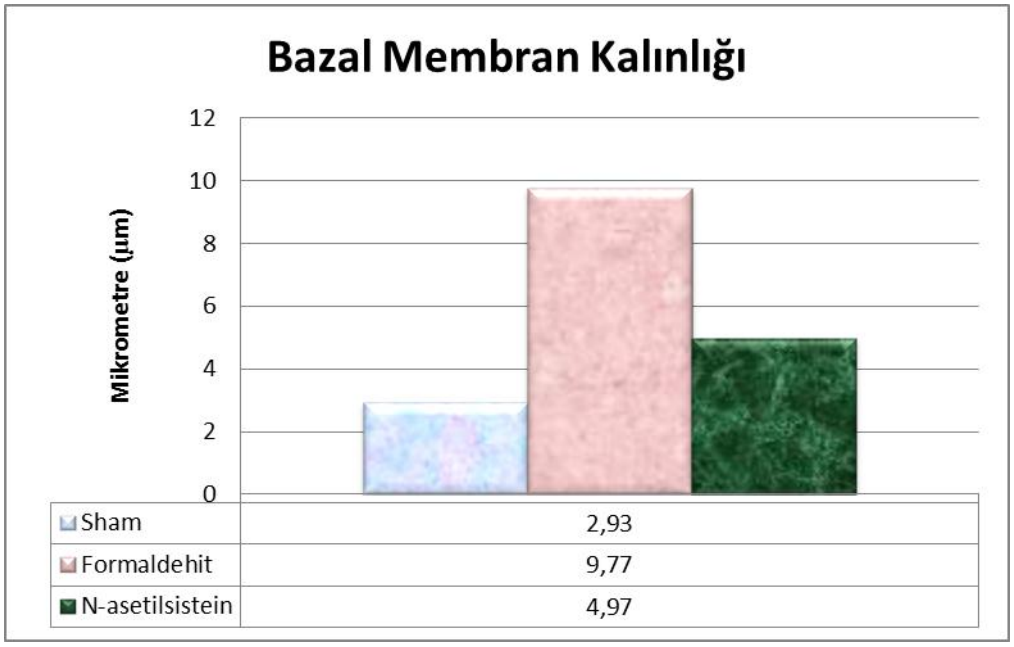


Şekil 23: Grupların seminifer tübül çap ortalaması.

4.3.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

Gruplar arasındaki tübül hasarını belirlemek için seminifer tübül bazal memran kalınlığı ölçümleri de yapıldı. Bunun için Image Tool programı (UTHSCA, Version 3,0) kullanıldı. Gruplar arası ortalamalar;

Sham grubu 2.93±0,85 µm, formaldehit grubu 9,77±0,77 µm, N-asetilsistein grubu ise 4.97±0,39 µm olarak bulundu. Tüm gruplarda yapılan seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri sonucunda formaldehit grubunda sham ve N-asetilsistein gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi (p=0,002, p=0,002). N-asetilsistein grubunda da sham grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edilmiştir (p=0,002)(Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 24).



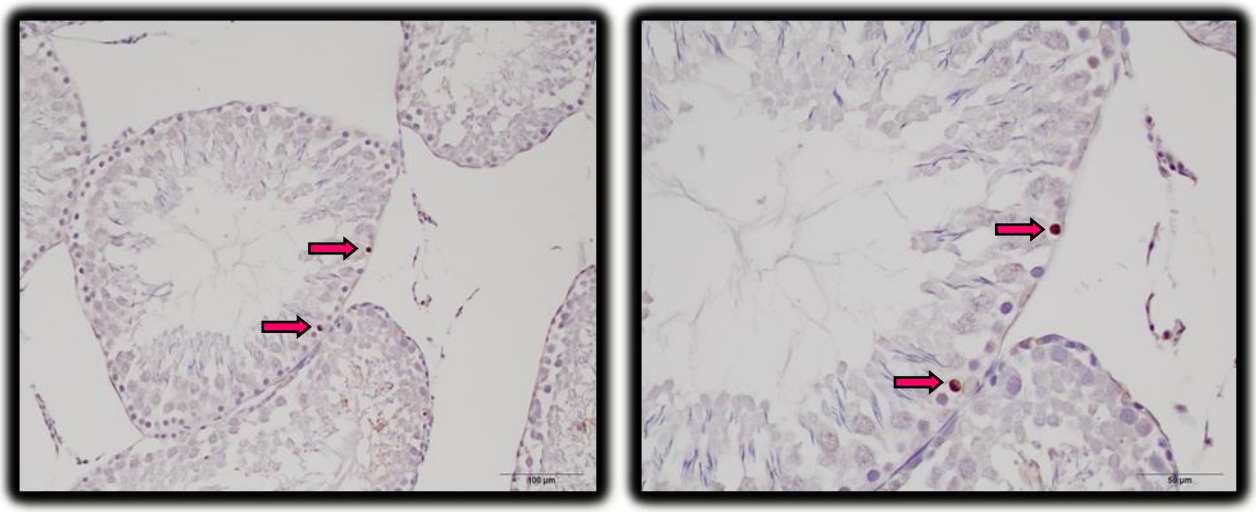
Şekil 24: Grupların seminifer tübül bazal membran kalınlığı ortalaması.

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.4.1.TUNEL Boyama Değerlendirmesi

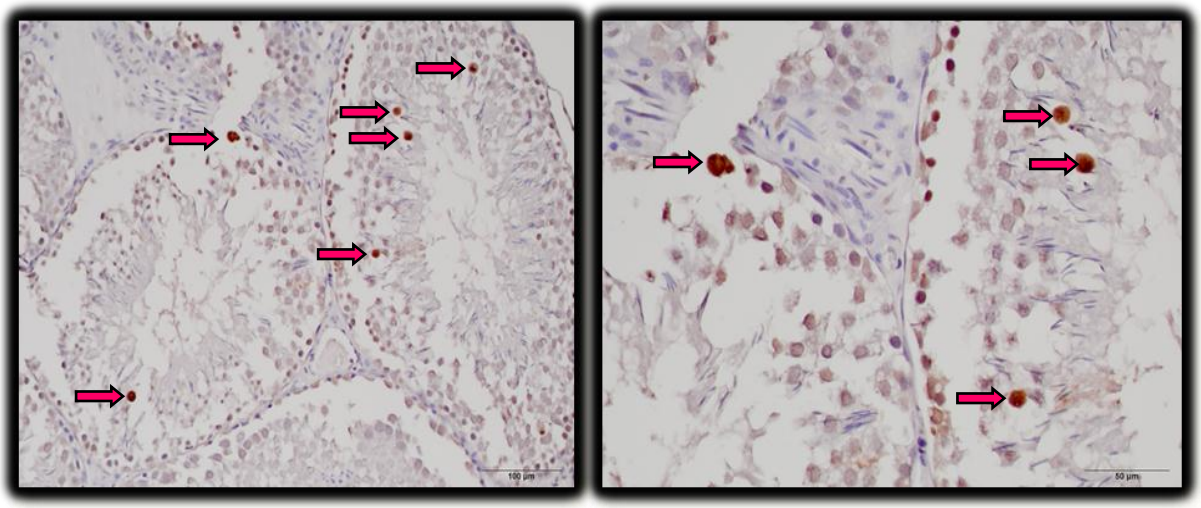
Hücrelerdeki DNA fragmantasyonunu belirlemek için TUNEL boyaması yapıldı.

Sham grubuna ait kesitler incelendiğinde birkaç hücre dışında TUNEL (+) hücreye rastlanmadı. (Şekil 25).



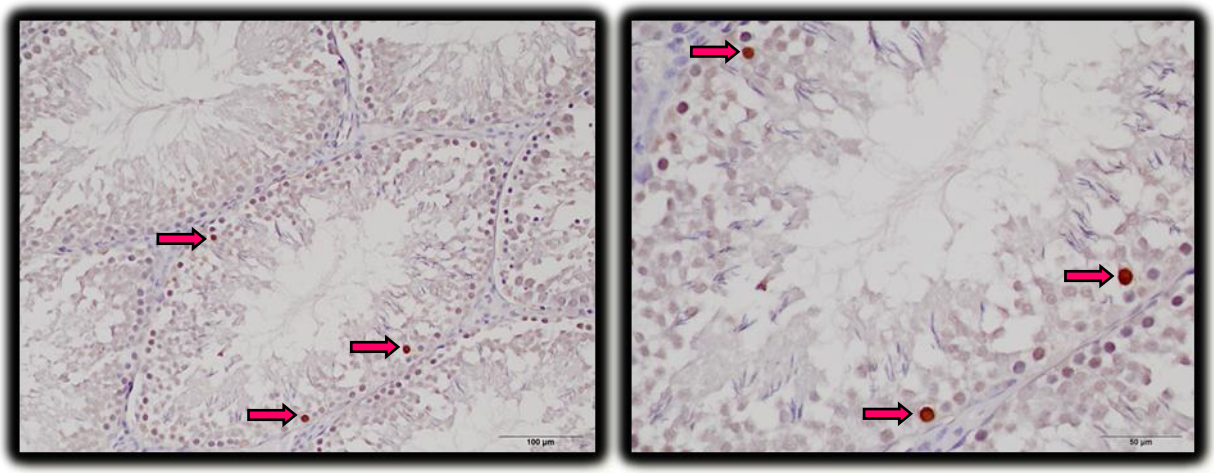
Şekil 25: Sham grubuna ait kesit. TUNEL (+) hücreler (➡) gözlenmektedir (TUNEL, X20 ve X40).

Formaldehit grubuna ait kesitler incelendiğinde TUNEL (+) hücre sayısının arttığı gözlendi (Şekil 26).



Şekil 26: Formaldehit grubuna ait kesit. Artan TUNEL (+) hücreler (➡) gözlenmektedir (TUNEL, X20 ve X40).

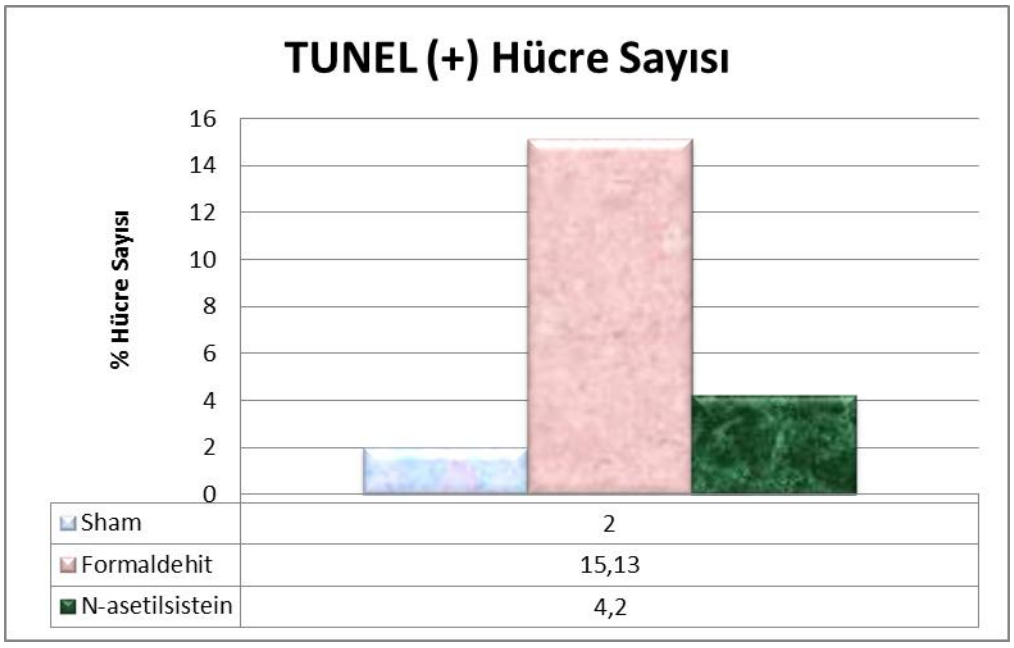
N-asetilsistein grubuna ait kesitler incelendiğinde TUNEL (+) hücre sayısında azalma olduğu gözlendi (Şekil 27)



Şekil 27: N-asetilsistein grubuna grubuna ait kesit. Az sayıdaki TUNEL (+) hücreler (➡) gözlenmektedir (TUNEL, X20 ve X40).

İstatistiksel olarak gruplar arasındaki TUNEL (+) hücre sayısı değerlendirildi. Formaldehit grubundaki hasarlı hücre sayısının sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (p=0,009). N-asetil grubundaki hasarlı hücre sayısının ise

formaldehit grubundaki hasarlı hücre sayısına göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (p=0,009). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 28).

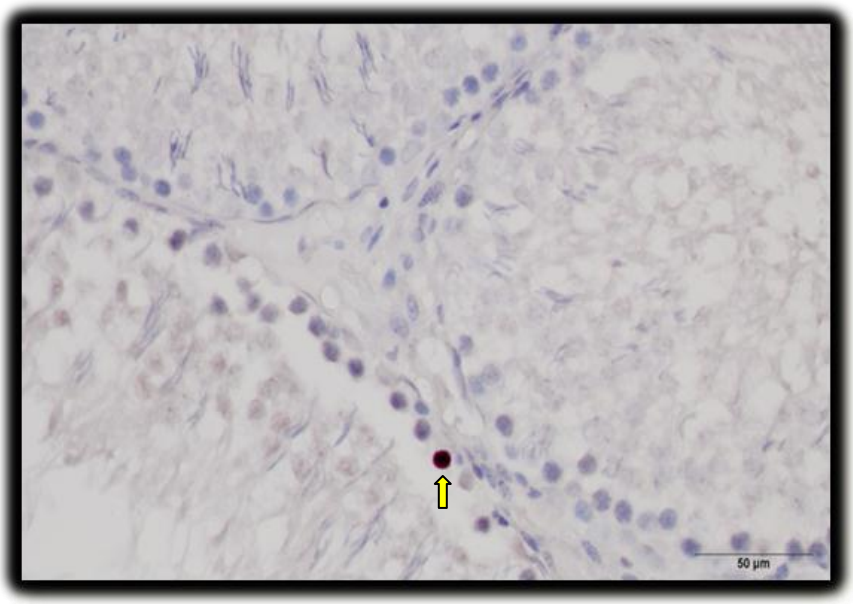


Şekil 28: Grupların TUNEL (+) hücre sayısı

4.4.2. Aktif Kaspaz 3 Boyama Değerlendirmesi

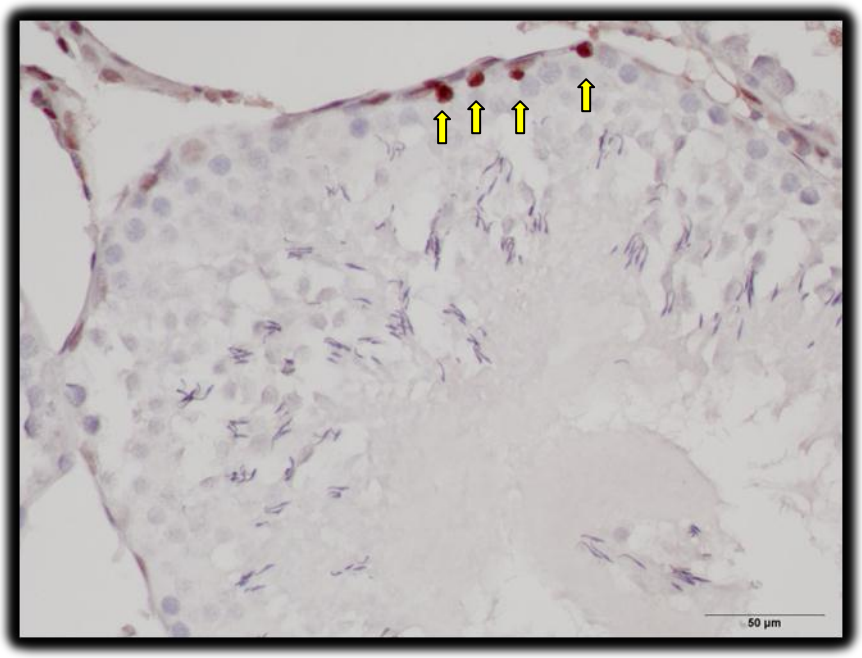
TUNEL boyamaya ek olarak apoptotik hücreleri belirlemek için aktif kaspaz-3 boyaması yapıldı.

Sham grubuna ait kesitler incelendiğinde birkaç pozitif hücre dışında aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren apoptotik hücreye rastlanmadı (Şekil 29).



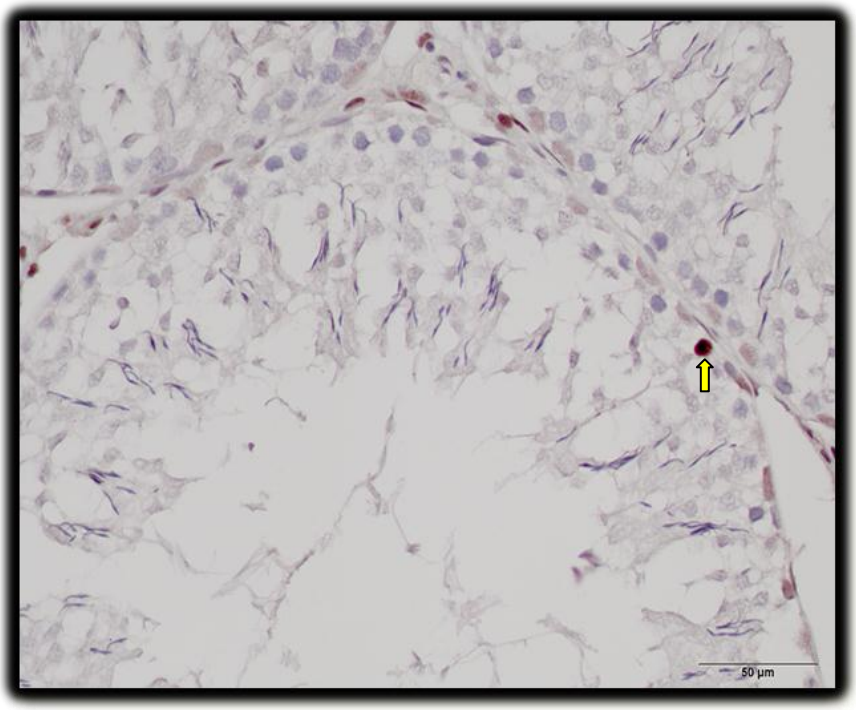
Şekil 29: Sham grubuna ait kesit. Aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücreler (⇧) gözlenmektedir (Aktif kaspaz-3, X40).

Formaldehit grubuna ait kesitler incelendiğinde apoptotik hücre sayısının artmış olduğu gözlendi (Şekil 30).



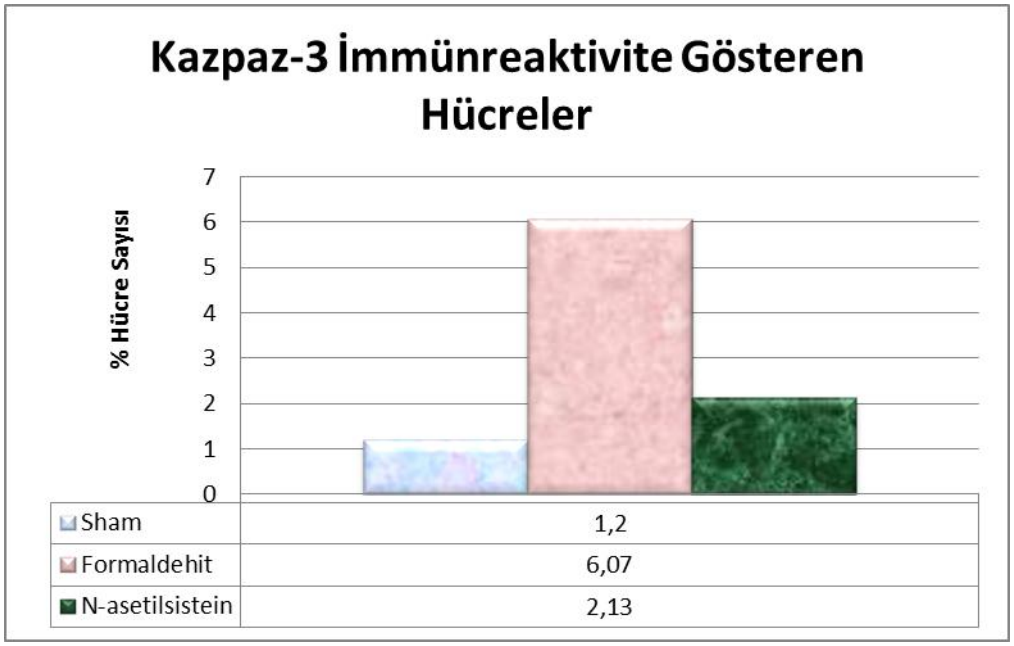
Şekil 30: Formaldehit grubuna ait kesit. Artan sayıdaki aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücreler (⇧) gözlenmektedir (Aktif kaspaz-3, X40).

N-asetilsistein grubuna ait kesitler incelendiğinde apoptotik hücre sayısının önemli ölçüde azaldığı gözlendi (Şekil 31).



Şekil 31: N-asetilsistein grubuna grubuna ait kesit. Aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücre sayısındaki azalma (⇧) gözlenmektedir (Aktif kaspaz-3, X40).

İstatistiksel olarak gruplar arasındaki kaspaz-3 immünoreaktivite gösteren hücre sayısı değerlendirildi. Formaldehit grubundaki immünoreaktivite gösteren hücre sayısının sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı (p=0,008). N-asetil grubundaki immünoreaktivite hücre sayısının ise formaldehit grubundaki immünoreaktivite gösteren hücre sayısına göre anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir (p=0,009). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 32).



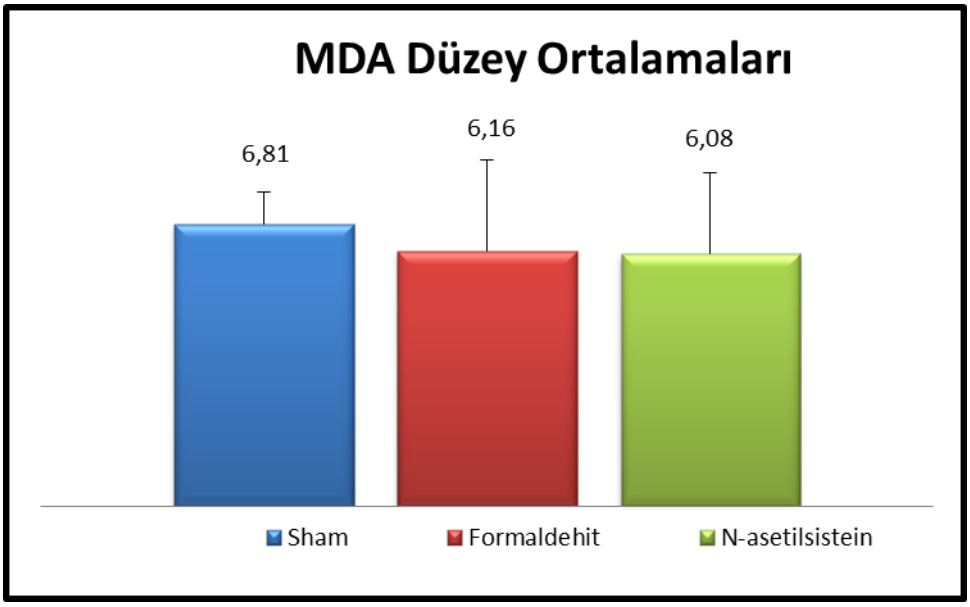
Şekil 32: Grupların Kaspaz-3 immünreaktivite gösteren hücre sayısı.

4.5. Biyokimyasal Bulgular

4.5.1. MDA Düzey Değerlendirmesi

Gruplar arasındaki hasarı belirlemek için lipid peroksidasyonu sonucu oluşan MDA düzeyi ölçümleri yapıldı. Gruplar arası ortalamalar;

Sham grubu 1,55±0,64 µM MDA, formaldehit grubu 0,88±0,4 µM MDA, N-asetilsistein grubu ise 0,62±0,37 µM MDA olarak bulundu. Tüm gruplarda yapılan MDA düzeyi ölçümü sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (p=0,054). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Şekil 33).

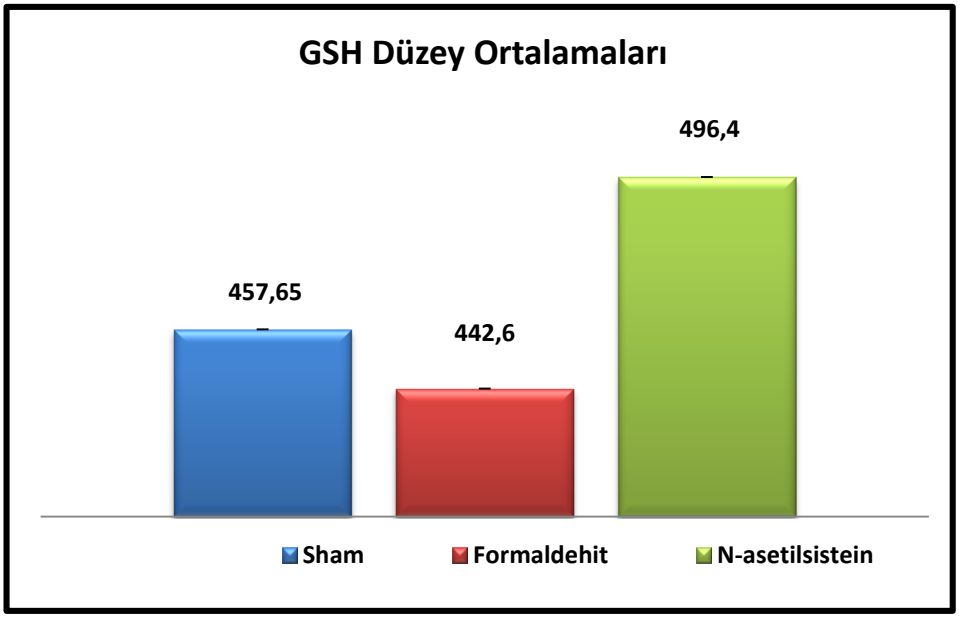


Şekil 33: Grupların MDA düzey ortalamaları.

4.5.2. GSH Düzey Değerlendirmesi

Gruplar arasındaki hasara karşı üretilen antioksidan aktiviteyi belirlemek için antioksidan olan GSH düzeyi ölçümleri de yapıldı. Gruplar arası ortalamalar;

Sham grubu 457,65±39,55 µM prot, formaldehit grubu 442,6±71,59 µM prot, N-asetilsistein grubu ise 496,4±40,7 µM prot olarak bulundu. Tüm gruplarda yapılan GSH düzeyi ölçümü sonucunda formaldehit grubunda sham grubuna kıyasla bir azalma tesbit edilmiştir. Formaldehit grubunda ölçülen GSH düzeyi ölçümü sonucuna kıyasla N-asetilsistein grubundaki GSH düzeyinde artma tespit edilmiştir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı anlaşılmıştır (p=0,224). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Şekil 34).

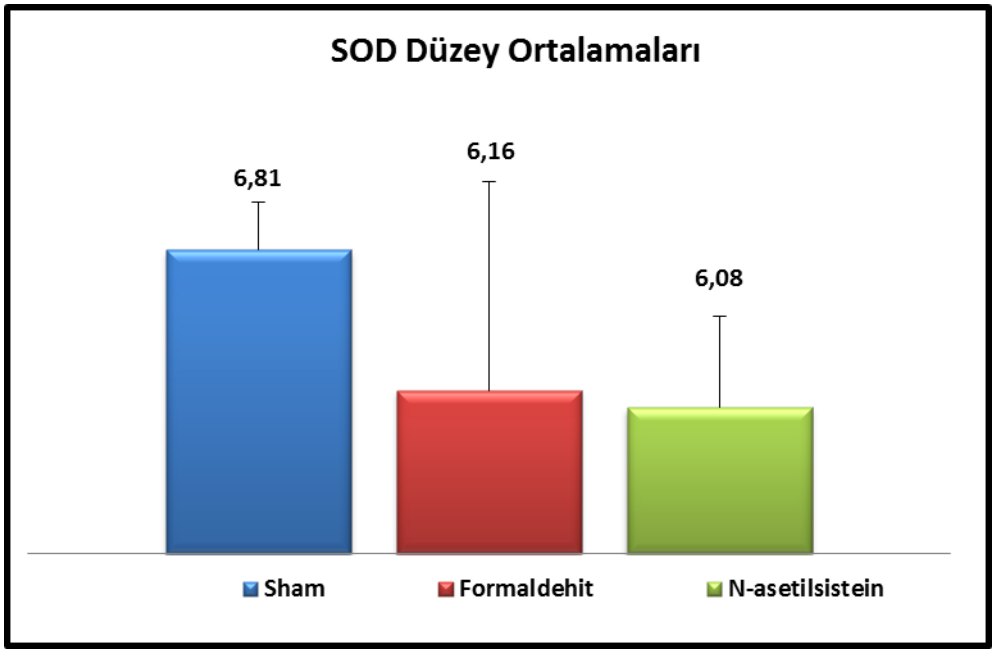


Şekil 34: Grupların GSH düzey ortalamaları.

4.5.3. SOD Düzey Değerlendirmesi

Gruplar arasındaki hasara karşı üretilen antioksidan aktiviteyi belirlemek için antioksidan enzimlerden biri olan SOD düzeyi ölçümleri de yapıldı. Gruplar arası ortalamalar;

Sham grubu 6,81±0,89 µM/ml prot, formaldehit grubu 6,16±1,05 µM/ml prot, N-asetilsistein grubu ise 6,08±1,27 µM/ml prot olarak bulundu. Tüm gruplarda yapılan SOD düzeyi ölçümü sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. (p=0,376) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Şekil 35).



Şekil 35: Grupların SOD düzey ortalamaları.

5. TARTIŞMA

Formaldehit, çeşitli sanayi ve endüstri ürünlerinin üretilmesinde ve de özellikle tıp alanında yaygın olarak kullanılan kimyasal bir maddedir. Bulunduğu her ortamda ve oda sıcaklığında gaz haline geçebildiği için sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Üretildiği ve kullanıldığı sanayi ve endüstriler ile tıp laboratuvarlarında çalışan kişiler formaldehite maruz kalmaktadır (4, 109). Hayvanlarda mutajenik ve kanserojenik olduğu belirlenen formaldehit, sinir sistemi, solunum sistemi, gastrointestinal sistem gibi birçok sistem üzerinde olumsuz etkilere sahiptir (4, 110, 111, 112, 113, 114). Alerjik ve hematolojik etkilere de sahip olan formaldehit, göz üzerinde de zararlı etkiler göstermektedir (115,116).

Genital sistem üzerinde de olumsuz etkiler gösteren formaldehitin, germ hücrelerine zarar verdiği ve her iki cinste de primer ve sekonder infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (31). Kadınlarda menstruel fonksiyonları bozmakta ve teratojenik potansiyele sahip olduğu için gebeliği ve embriyonal gelişmeyi tehdit etmektedir (11). Çalıştıkları ortam gereği formaldehite maruz kalan kadınlarda, spontan abortus, anemi ve düşük doğum ağırlıklı bebek gibi bazı doğumsal ve doğumsal olmayan patolojilerin meydana geldiği bildirilmiştir (13). Formaldehitin erkek üreme sistemi üzerindeki zararlı etkileri de deneysel olarak yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (14-16,41-43).

Daha önce deneysel olarak yapılmış olan araştırmalarda, formaldehit uygulamasının testis morfolojik yapısında da değişikliklere neden olduğu ortaya konmuştur (14-16, 19, 117). Bunun yanı sıra, yine deneysel olarak yapılan çalışmalarda, formaldehitin sperm miktarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (14, 19, 117, 118). Bizim yaptığımız çalışmada da formaldehit uygulamasının testis morfolojik yapısında bu çalışmalara paralel olarak değişikliklere neden olduğunu ve tübül lümeninde rastlanan sperm hücrelerinde gözle görülür bir azalma saptadık.

Özen ve ark. sıçanlar üzerinde gerçekleştirmiş oldukları çalışmalarında, formaldehitin testislerin seminifer tübül çaplarında azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir (15, 16). Bizim çalışmamızda da formaldehitin testis dokusunda özellikle spermatogenik seri hücrelerinde histopatolojik hasarlara rastlansa da Özen

ve arkadaşlarının yaptığı çalışmadan farklı olarak seminifer tübül çaplarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya rastlanmamıştır.

Zhou ve ark. da, iki hafta süresince formaldehit soluyan sıçanlarda seminifer tübül atrofisinin oluştuğunu göstermişlerdir (19). Majumder ve Kumar ise bir ay süresince ve de günlük olarak 10 mg/kg dozunda formaldehit uygulanan sıçanlarda, spermatogenik hücrelerde DNA miktarında azalmanın meydana geldiğini ifade etmişlerdir (118). Bizim yapmış olduğumuz çalışmada da bu çalışmalara paralel olarak seminifer tübüllerde hücre kaybına ve DNA hasarılı hücrelerde artışa rastlanılmıştır.

Yine Özen ve ark. sıçanlar üzerinde yaptığı başka bir çalışmada, bir ay boyunca ve gün aşırı olarak 10 mg/kg dozunda formaldehit uygulanan sıçanlarda formaldehitin testis dokusundaki antioksidan sistemini bozduğu, oksidatif hasara yol açtığı ve spermatogenik hücrelerde apopitozun arttığını bildirmişlerdir (106). Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya paralel olarak spermatogenik hücrelerde apopitozun arttığı gözlenmiştir.

Zhou ve ark. sıçanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında, solunum yoluyla uygulanan formaldehitin testislerde okdisatif hasara yol açtığını, formaldehit maruziyeti sonucu doku SOD ve GSH-Px değerlerinin düştüğünü, MDA değerlerinin ise arttığını tespit etmişlerdir(19). Benzer şekilde, Tang ve ark. da, 5 gün süresince intraperitoneal olarak formaldehit uygulanan farelerde, testis doku MDA değerlerinde bir artışın olduğunu göstermişlerdir (116). Ancak bizim yapmış olduğumuz bu çalışmanın biyokimyasal verileri, Zhou ve ark. ile Tang ve arkadaşlarının ortaya koydukları sonuçlar ile uyum göstermemektedir.

Gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmada, formaldehit maruziyetine bağlı olarak seminifer tübüldeki spermatogenetik hücrelerde apoptozisin oluştuğu immunohistokimyasal olarak gösterilmiştir. Spermatogenetik hücrelerde tespit ettiğimiz apoptozis, formaldehit maruziyetine bağlı olarak testis dokusunda spermatozoa üretiminin olumsuz yönde etkilendiğini ifade etmektedir. Bu yüzden, yapmış olduğumuz araştırmanın mikroskobik bulguları daha önce yapılmış olan histolojik çalışmaların sonuçları ile paralellik göstermektedir.

N-asetil sistein in vivo ve in vitro antioksidan olarak ve yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca asetaminofen intoksikasyonu, CCl_4, kloroform ve karbon

monoksit intoksikasyonunda da kullanılmıştır (119). Mukolitik etkisi ile de kronik obstrüktif akciğer hastalığında kullanılmaktadır. N-asetil sistein, iskemi-reperfüzyon hasarının engellenmesi, inflamatuar eklem hastalıklarının ve HIV ekspresyonunun önlenmesi ve erişkinin sıkıntılı solunum sendromunun tedavisinde de kullanılmaktadır (119-122). Biz de çalışmamızda N-asetilsisteinin antioksidan özelliğini kullandık.

Özen ve ark. sıçanlar üzerinde yaptığı başka bir çalışmada, bir ay boyunca ve gün aşırı olarak 10 mg/kg dozunda formaldehit uygulanan sıçanlarda formaldehitin testis dokusundaki oluşturduğu hasara karşı kullandıkları melatonin adlı antioksidan ile apopitozun azaldığını bildirmişlerdir (106). Bizim çalışmamızda da bu çalışmaya paralel olarak N-asetilsistein adlı antioksidanı kullanarak apopitozun azaldığı gözlenmiştir.

Aktaş BK. ve arkadaşlarının yapmış olduğu testiküler iskemi reperfüzyon çalışmasında N-asetilsisteinin seminifer tübül çaplarında azalmayı önlediği ve spermatogenik seri hücrelerinde kayıpların azaldığını bildirmişlerdir (123). Biz de çalışmamızda bu çalışmaya uyumlu olarak N-asetilsisteinin spermatogenik hücrelerdeki kaybı önlediğini gözlemledik.

Payabvash S. ve arkadaşlarının yapmış olduğu testiküler torsiyon çalışmasında NAC'in apoptik zarara karşı olumlu etkilerini incelemişler ve N-asetilsisteinin katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatiyon peroksidaz enzimlerinin aktivitelerini artırdığını, TUNEL (+) hücrelerin azaldığını bildirmişlerdir (124). Biz de çalışmamızda N-asetilsisteinin bu çalışmaya paralel olarak TUNEL (+) hücrelerini azalttığını gözlemledik.

Karaciğer fibrozu modelinde daha önce yapılan çalışmada Vendemiale ve ark. dimetil nitroz amin (DMN) ile geliştirilen fibroz modelinde oksidatif stresin etkinliğini ve modelde NAC uygulamalarının oksidatif stres ile karaciğer fibroz parametrelerindeki etkinliğini çalışmışlardır. Bu çalışmada DMN ile karaciğer fibrozu ve oksidatif stres tetiklenmiştir. NAC uygulaması ile fibroz markeri fibronektin düzeyi belirgin şekilde azaltılmış, hepatik glutatyon artırılmış ve MDA düzeyinin düştüğü görülmüştür (125). Bizim de yapmış olduğumuz çalışmada NAC uygulaması ile apopitozun azaldığı, testiküler glutatyonun arttığı ve MDA düzeyinin düştüğü görülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmadan elde edilen verilere göre formaldehit maruziyeti sonucunda testislerde doku hasarı oluştuğu ve apoptozu arttırdığı sonucuna varılmıştır. Formaldehitin dozu ve maruz kalma süresi, hasarın şiddeti açısından büyük önem taşımaktadır.

Literatürlerde N-asetilsistein'in formaldehit maruziyetinde testislerde koruyucu etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız literatürdeki boşluğu dolduracaktır. N-asetilsistein'in formaldehit maruziyeti sonucu oluşan testislerdeki hasara karşı koruyucu etkisi ilk defa bizim çalışmamızda histokimyasal olarak hematoksilen & eozin, masson trikrom ve PAS, immünohistokimyasal olarak TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları yapılarak ve biyokimyasal olarak MDA, SOD, GSH düzeyleri ölçülerek değerlendirildi.

Çalışmamızda N-asetilsistein'in formaldehit maruziyeti sonucunda testislerde oluşan doku hasarını histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak koruduğu sonucuna varılmıştır. Sınırlı olarak yapılan biyokimyasal çalışmada ise yeterli veriye ulaşılamaması nedeni ile daha kapsamlı biyokimyasal çalışmalar için araştırmaya açık kalmıştır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın formaldehit maruziyeti sonucunda testislerde oluşacak hasarlara karşı koruyucu önlemlerin alınması konusunda yol gösterici olacağı kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Özen OA, Sarsılmaz M. Solunan havadaki formaldehit toksisitesi ve alınması gereken önlemler. Fırat Tıp Dergisi 2000; 2: 13-19.

2. Usanmaz S. Farelerde akut ve subakut formaldehit maruziyetinin nörotoksik etkileri. Ankara Üniversitesi, Doktora Tezi, Ankara, 2000

3. Kramer A, Pitten FA, Freundt KJ, Andenmatten R. Risk-benefit evaluation of formaldehyde as a disinfectant and antiseptic. Hyg Med 1996;10: 57-536.

4. Smith AE. Formaldehyde. Occup Med 1992;42: 83-88.

5. Chia SE, Ong CN, Foo SC, Lee HP. Medical student's exposure to formaldehyde in gross anatomy dissection laboratory. J Am Coll Health 1992;41: 115-19.

6. Clark RP. Formaldehyde in patology departments. J Clin Pathol 1983;36: 46-839.

7. Cohen BI, Pagnillo MK, Musikant BL, Deutsch AS. Formaldehyde evaluation from endodontic materials. Oral Health 1998;88: 37-39.

8. Pabst R. Exposure to formaldehyde in anatomy: an occupational health hazard. Anat Rec 1987;219: 12-109.

9. Feron VJ, Till HP, de Vriger F, Woutersen RA, Cassee FR, van Bladeren PJ. Aldehides: occurance carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment. Mut Res 1991;259: 85-363.

10. Thrasher JD, Kilburn KH. Embryo toxicity and teratogenicity of formaldehyde. Archieves of Environmental Health 2001;56: 11-300.

11. Halperin WE, Goodman M, Stayner L, Elliot LJ, Keenlyside RA, Landrigan PJ. Nasal cancer in a worker exposed to formaldehyde. JAMA 1983;249: 16-510.

12. Smalky K, Schor E. Enviromental hazard, gross anatomy. N Engl J Med 1984;310: 32-531.

13. Taskinen H, Kyyronen P, Hemminki K, Hoikkala M, Lajunen K, Lindbohm ML. Laboratory work and pregnancy outcome. J Occup Med 1994;36: 19-311.

14. Chowdhury AR, Gautam AK, Patel KG, Trivedi HS. Steroidogenic inhibition in testicular tissue of formaldehyde exposed rats. Indian J Physiol Pharmacol 1992; 36: 68-162.

15. Sarsılmaz M, Özen OA, Akpolat N, Kus İ, Songur A. Subakut dönemde solunan formaldehitin sıçanların Leydig hücreleri üzerindeki histopatolojik etkileri. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi 1999;13: 37-40.

16. Ozen OA, Akpolat N, Songur A. Effect of formaldehyde inhalation on Hsp70 in seminiferous tubules of rat testes: an immunohistochemical study. Toxicology and Industrial Health 2005;21: 54-249.

17. Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Ozen OA. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. J Chem Neuroanat 2005;29: 8-173.

18. Saito Y, Nishio K, Yoshida Y, Niki E. Cytotoxic effect of formaldehyde with free radicals via increment of cellular reactive oxygen species. Toxicology 2005;210: 45-235.

19. Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H ve ark. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats. Asian J Androl 2006;8(5): 584-588

20. Özen OA, Kuş MA, Kuş İ, Alkoç OA ve ark. Protective effects of melatonin against formaldehyde-induced oxidative damage and apoptosis in rat testes: an immunohistochemical and biochemical study. Systems Biology in Reproductive Medicine 2008;54: 169-176

21. Moore KL, Persaud TVN. İnsan embriyolojisi. Six Edition, İstanbul, Nobel Tıp Kitap Evleri, 2002; 323-328.

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

23. Burukoğlu D. Kadmiyumun sıçan testisinde oluşturduğu toksisitede çinkonun koruyucu etkisinin ışık ve elektron mikroskop ile incelenmesi. Eskişehir, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2007; 27-52

24. Widmaier Ep, Raff H And Strang Kt. Vander insan fizyolojisi. Tenth Edition. İzmir, İzmir Güven Kitapevi, 2010; 658-660.

25. Paker,Ş. Histoloji. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1990. p. 448-467.

26. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara: Palme Yayıncılık; 2006. p 365-390.

27. Gartner LP, Hiatt JL. Color Atlas of Histology. China: WB Sounders Company; 2001. p. 435-458.

28. Eroschenko VP. Di Fiore's Atlas Of Histology With Functional Correlations. Ankara: Palme Yayıncılık; 2001. p. 251-265.

29. Erkoçak A. Genel Histoloji. İzmir: 1984. p. 138-160.

30. Jungueira LC, Carneiro J. Basic Histology. New York: 2003. p. 359-375.

31. Khanzadeh FA, Vaquerano MU, Khanzadeh MA, Bisesi MS. Formaldehyde exposure, acute pulmoner response and exposure control options in a gross anatomy laboratory. Am J Indust Med 1994;26: 8-61.

32. Eells JT, Mc Martin KE, Black K, Vırayotha V, Tısdell RH, Tephly TR. Formaldehyde poisoning. Rapid metabolism to formic acid. JAMA 1981;246(11): 1237-1238.

33. Heck HD, Casanova M, Starr TB. Formaldehyde toxicity: new understanding. Crit Rev Toxicol 1990;20: 397-426.

34. Heck H, Casanova M. Pharmacodynamics of formaldehyde: applications of a model for the arrest of DNA replication by DNA-protein cross- links. Toxicol Appl Pharmacol, 1999; 86-100.

35. Collins JJ, Esmen NA, Hall TA. A review and meta-analysis of formaldehyde exposure and pancreatic cancer. Am J Ind Med 2001; 336-45.

36. Kaptanoğlu E. Omurilik yaralanması ve patofizyolojisi. Temel Nöroşirürji. Ankara, Türk Nöroşirürji Derneği Yayınları 2005; 1144-55.

37. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1983; 239-57.

38. Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. Klinik Gelişim 1995; 3906-11.

39. Seven A, Candan G. Radikal ve lipid peroksid düzeyini arttıran etkenler. Biyokimya Dergisi 1995; 43-56.

40. Grace PA. Ischemia-reperfusion injury. Br J Surg, 1994; 637-47.

41. Sohal RS, Brunk UT. Mitochondrial production of pro-oxidants and cellular senescence. Mutat Res, 1992; 295-304.

42. Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury ediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Am J Surg, 1991; 488-503.

43. Kılınç K. Oksijen radikalleri: üretilmeleri, fonksiyonları ve toksik etkileri. Biyokimya Dergisi, 1985; 60-89.

44. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. J Pediatr Surg 1998; 1536-9.

45. Oostenbrug GS, Mensink RP, Hardeman MR, De Vries T, Brouns F, Hornstra G. Exercise performance, red blood cell deformability, and lipid peroxidation: effects of fish oil and vitamin E. J Appl Physiol, 1997; 746-52.

46. Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, 1996.

47. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya, Mimoza Yayınları, 1995.

48. Tietz NW. Clinical Guide to Laboratory Tests. W.B. Saunders Company. Pennsylvania, Philadelphia, 1995.

49. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company, Pennsylvania, Philadelphia, 1999.

50. Nyska A, Kohen R. Oxidation of biological systems oxidative stres phenomena antioxidants redox reactions and methods for their quantificatio. Toxicol pathol, 2002; 620-50.

51. Murrant CL, Reid MB. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. Mic Res Tec, 2001; 236-48.

52. Köse K, Doğan P. Lipid Peroksidasyonu. Erciyes Tıp Dergisi, 1992; 340-50.

53. Ayvaz S. N-asetilsisteinin intestinal iskemi- reperfüzyon hasarına etkisi. Edirne, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2005.

54. Dogan AL. Apoptozis ve ürolojik tümörler açısından önemi. Özen H, Türkeri L editörler. Üroonkoloji kitabı. Ankara, Ertem Basım Yayın, 2007; 25-32.

55. Tomatır AG. Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. T Klin Tıp Bilimleri, 2003; 499-508.

56. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer, 1972; 239-57.

57. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf 21.10.2012

58. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol, 2007; 495-516

59. Norbury CJ, Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2001; 367-401.

60. Balakumran A, Champbell GA, Maslen MT. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. Toxicol Appl Pharmacol, 1996; 122-127.

61. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature, 1980; 555-556.

62. Cohen JJ. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. Hosp Pract, 1993; 35-43.

63. Cohen JJ. Apoptosis. Immunol Today, 1993; 126-130.

64. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol, 1992; 493-501.

65. Lu J, Ashwell K, Ken WS, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. Spine, 2000; 1859-1866.

66. Cummings M C, Winterford C M, Walker N I. Apoptosis. Am J Surg Pathol, 1997; 88-101.

67. Spencer S, Cataldo NA, Jaffe RB. Apoptosis in the human female reproductive tract. Obstetrical and Gynecological Survey, 1996; 314-323.

68. Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. Cancer Biology, 1995; 3-16.

69. Majno G, Torisl A. Apoptosis oncosis and necrosis. Am J Pathol, 1995; 3-15.

70. Eastman A. Survival factors, intranuclear signal transduction and the activation of endonucleases in apoptosis. Cancer Biology, 1995;45-52.

71. Bortner CD, Odernburg NBE, Crdlowski JA. The role of fragmentation in apoptosis. Trends in Cell Biology, 1995; 21-28.

72. Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS. Spontaneous germ celi apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed celi death. J Clin Endoc and Metab, 1998; 152.

73. Sharpe RM: Regulation of spermatogenesis. in The Physiology of Reproduction. Edited by Knobil E, Neill JD. Raven Press. New York, 1994; 1364-1434.

74. Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, Lock MTW, Tycho KB, Kal HB, Rooij DG. Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. Mol Repr Development, 200; 353-359.

75. Jefferson KP, Persad RA, Holly MP. Apoptosis and Relevance to Urologists. Br J Urol, 2000; 598-606.

76. Kerr JB. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of celi types and frequency during the spermatogenetic cycle. J Reprod Fertil, 1992; 825-830.

77. Hsueh AJW, Eısenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonodal Celi Apoptosis. Recent Progress in Hormone Research, 1996; 432-457.

78. Ayaşhoğlu E. Apoptoz. T Klin Tıp Bilimleri Dergisi, 2001; 57-62.

79. Hikim S,Amiya P, Wang C, Leung A, Swerdloff R S. Involvement of Apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antogonist treatment. 2000; 136-141.

80. Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, Vassali P. An early and massive wave of germinal celi apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. Embo J, 1997; 2262-2270.

81. Wyllie AH. Apoptosis: an overview. Br Med Bull, 1997; 451-465.

82. Davis JR, Firlit CF. The germinal epithelium of cryptorchid testes, experimentally induced in prepubertal and adult rats. Fertil Steril, 1986; 187-200.

83. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic Celi Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of

Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Celi Survival. Pediatric Research, 1996; 351-356.

84. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ celi apoptosis induced by heat stress. Biol Repr, 1999; 393-399.

85. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal control of apoptotic celi death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular celi survival factors. Mol Endocrinol, 1993; 643-650.

86. Yin Y, Hawkins KL, Devvolf WC, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ celi apoptosis in adult mice. J Androl, 1997; 159-165.

87. Lin WW, Lamb DJ, Lipshultz LI, Kim ED. Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. Int UrolNephr, 1999; 361-370.

88. Blanco-Rodriguez J, Garcia MC. Apoptosis partern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. JAndrol, 1998; 487-497.

89. Cohen JJ. Overview: Mechanisms of apoptosis. Immunol Today, 1993; 126-130.

90. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. 1995; 101-105.

91. Ziment I. Acetylcysteine: a drug that is much more than a mucokinetic. Biomed Pharmacother 1988; 513-9.

92. Kayaalp OS. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10. Baskı, Hacettepe Taş. Ankara, 2002.

93. Rodenstein D, DeCoster A, Gazzaniga A. Pharmacokinetics of oral acetylcysteine: absorbtion, binding and metabolism in patients with respiratory disorders. Clin Pharmacokinet, 1978; 247-54.

94. Moldeus P, Cotgreave JA, Berggren M: Lung protection by a thiol-containing antioxidant: N-acetylcysteine. Respiration, 1986; 31-42.5.

95. Flora S, Bennicelli C, Camoirano A, Serra D, Romano M, Rossi GA, Morelli A, Flora A: İn vivo effects of N-acetylcysteine on glutathione metabolism and on the

biotransformation of carcinogenic and/or mutagenic compounds. Carcinogenesis, 1985; 1735-45.

96. Meyer A, Buhi R, Magnausen H: The effect of oral N-acetylcysteineon lung glutathione levels in idiopathic pulmonary fibrosis. J. Eur Respir, 1994; 431-6.

97. Fırat S. Kobaylarda radyasyonla oluşan akciğer hasarında doku glutatyon, glutatyon peroksidaz, glutatyon S transferaz, düzeyleri ve N-asetilsisteinin bu sistem üzerindeki etkisi. Gazi Üniversitesi Biyokimya AD, Uzmanlık tezi, Ankara, 1997.

98. Free MJ, Schluntz GA, Jaffe RA. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. Biol Reprod,1976;14: 481-88.

99. Chen H, Liu J, Luo L. Vitamin E aging and Leydig cell steroidogenesis. Exp Gerontol,2005;40: 728-36.

100. Banfi B, Molnar G, Maturana A. Ca $^{2+}$ activated NADPH oxidase in testis spleen and lymph nodes. J Biol Chem,2001;276: 594-601.

101. Kumagai A, Kodama H, Kumagai J. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. Mol Hum Reprod. 2002; 8:118-23.

102. Zini A, Schlegel PN. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. J Androl, 1996;17:473-80.

103. Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. J Androl, 1992;20-13.

104. Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY. Its function, regulation in the testis and role in male fertility. Contraception, 2002; 65:305-11.

105. Ural M, Özgüner M, Büyükvanlı B, Kuplay H ve ark. Akut diazinon toksisitesinin testis dokusunda oluşturduğu histolojik değişiklikler ve bu değişikliklere C vitamini ve E vitaminin etkisi. S.D.Ü. Tıp Fak. Derg. 2006; 13(2): 22-25

106. Ozen OA, Kus MA, Kus İ, Alkoç OA ve Songur A. 'Protective effects of melatonin against formaldehyde-induced oxidative damage and apoptosis in rat testes: An immunohistochemical and biochemical study.' Systems Biology in Reproductive Medicine, 2008; 54: 169-176.

107. Tahan G, Tarcin O, Tahan V, Eren F ve ark. 'The effects of N-asetylcysteine on bile duct-ligation induced liver fibrosis in rats' Dig Dis Sci, 2007; 52: 3348-3354

108. Johnsen SG. Testicular biopsy score count-method for registration of spermatogenesis in human testes: Normal values and results in 335 hypogonadal males. Hormones 1970;1:2-25.

109. Usanmaz SE, Akarsu ES, Vural N. Neurotoxic effects of acute and subacute formaldehyde exposures in mice. Envir Toxicol Pharmacol, 2002; 93-100.

110. Monteiro Riviere NA, Popp JA. Ultrastructural evaluation of acute nasal toxicity in the rat respiratory epitelium in response to formaldehyde gas. Fundam Appl Toxicol, 1986; 251-62.

111. Morgan KT, Patterson DL, Gross EA. Responses of the nasal mucocliary apparatus of F-344 rats to formaldehyde gas. Toxicol Appl Pharmacol, 1986; 1-13.

112. Kilburn KH, Warshaw R, Thornton JC. Formaldehyde impairs memory, equilibrium, and dexterity in histology technicians: effects which persist for days after exposure. Arch Environ Health, 1987; 20-117.

113. Zararsız I, Kus I, Akpolat N, Songur A, Ogeturk M, Sarsilmaz M. Protective effects of omega-3 essential fatty acids against formaldehydeinduced neuronal damage in prefrontal cortex of rats. Cell Biochem. Funct, 2006; 237-44.

114. Songur A, Akpolat N, Kus I, Ozen OA, Zararsiz I, Sarsilmaz M. The effects of the inhaled formaldehyde during the early postnatal period in the hippocampus of rats: a morphological and immunohistochemical study. Neurosci Res Commun, 2003; 168-78.

115. Khanzadeh FA, Vaquerano MU, Khanzadeh MA, Bisesi MS. Formaldehyde exposure, acute pulmoner response and exposure control options in a gross anatomy laboratory. Am J Indust Med, 1994; 61-8.

116. Imbus HR. Clinical evaluation of patients with complaints related to formaldehyde exposure. J Allergy Clin Immunol, 1985;76:831-40.

117. Tang M, Xie Y, Yi Y, Wang W. Effects of formaldehyde on germ cells of male mice. Wei Sheng Yan Jiu 2003;32:544-48.

118. Majumder PK, Kumar VL. Inhibitory effects of formaldehyde on the reproductive system of male rats. Indian J Physiol Pharmacol 1995;39:80-82.

119. Howard RJMW, Blake DR, Pall H, Williams A and Green ID. Allopurinol/Nacetylcysteine for carbon monoxide poisoning. Lancet 1987; 2:628-9.

120. Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Ferrari R, Albertini A, Visioli O. The role of glutathione status in the protection against ischemic and reperfusion damage: effects of N-acetylcysteine. J Mol Cell Cardiol 1988; 20:5-13.

121. Kalebic T, Kinter A, Poli G, Anderson ME, Meister A, Fauci AS. Suppression of human immunodeficiency virus expression in chronically infected monocytic cells by glutathione, glutathione ester, and N-acetylcysteine. Proc Natl Acad Sci USA 1991; 88:986-90.

122. Bernard GR. Potential of N-acetylcysteine as treatment for the adult respiratory distress syndrome. Eur Respir J 1990; 3(supp1):496-8.

123. Aktaş BK, Bulut S, Bulut S, Baykam MM ve ark. 'The effects of N-acetylcsteine on testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury.' Pediatr Surg Int, 2010; 26: 293-8

124. Payabvash S, Salmasi AH, Kiumehr S, Tavangar SM ve ark. 'Salutary effects of N-acetylcysteine on apoptotic damage in a rat model of testicular torsion' Urol Int, 2007; 79: 248-254

125. Vendemiale G, Grattagliano I, Caruso ML, Serviddio G, Valentini AM, Pirrelli M, Altomare E. Increased oxidative stress in dimethylnitrosamine-induced liver fibrosisin the rat: effect of N-acetylcysteine and interferon-alpha. Toxicol Appl Pharmacol 2001;175:130-9.

8. EKLER

Ek-1, Etik Kurul Raporu

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
35340, İnciraltı, İzmir-232 4122234
http://deu.edu.tr ldeneyetik/

Toplantı No : **01/20/2011**
Toplantı Tarihi : **28 Ekim 2011**

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na

60/2011 Protokol No'lu: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Nazım KUVVETLİOĞLU'nun yürütücüsü olduğu **"Sıçanlarda formaldehit maruziyetiyle testislerde oluşan morfolojik değişiklikler üzerine N-asetilsisteinin etkisinin incelenmesi"** isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı
(Topl.katılamadı)

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye(Topl.katılamadı)

Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye (Topl.katılamadı)

Prof.Dr.Selman SÖKMEN
Üye

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye

Prof.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye

Prof.Dr. Hüseyin BASKIN
Üye (Topl.katılamadı)

Doç.Dr.Turna İLKNUR
Üye

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye (Topl.katılamadı)

Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye (Topl.katılamadı)

Vtr.Hekim [illegible]an SERPEN
Üye

Ayşe Nur BALİN
Üye

Doç.Dr.Şermin GENÇ
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Ek 2, Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ
NAZIM KUVVETLİOĞLU

Pasaport No:	208400
Doğum Yılı:	1988
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/İZMİR
Telefon:	05055992490
Faks:	
e-posta:	nazimkuvvetlioglu@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyokimya	Lisans	2010
TR	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji (ÇAD)	Lisans	2010

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Testis, Apoptoz, Işık Mikroskobu

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/ sorumluluk/olay/üyelik vb.)	

ÖDÜLLER

	Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
	Lisans Mezuniyet Üçüncülüğü	Ege Üniversitesi Fen Fakültesi	2010

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

Düzenlenme Tarihi: 10/12/2012