

**TESTİKÜLER KONNEKSİN 43 İFADESİ
ÜZERİNE SEFTRİAKSONUN ETKİLERİ**

Hilal ŞAHİN

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nigar VARDI
Yüksek Lisans Tezi – 2015**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TESTİKÜLER KONNEKSİN 43 İFADESİ
ÜZERİNE SEFTRİAKSONUN ETKİLERİ

Hilal ŞAHİN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Nigar VARDI

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2014/15 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA

2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; Hilal ŞAHİN'in "Testiküler Konneksin 43 İfadesi Üzerine Seftriakson'un Etkileri" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

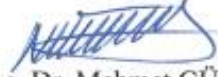
Tez Savunma Tarihi: 12/06/2015



Prof. Dr. Nigar VARDI
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU
Fırat Üniversitesi
Üye



Doç. Dr. Mehmet GÜL
İnönü Üniversitesi
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2015 tarih ve 2015/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Antibiyotikler	3
2.1.1. Beta-Laktam Antibiyotikler	3
2.1.2. Beta-Laktam Ajanların Etki Mekanizmaları.....	3
2.1.3. Sefalosporinler.....	3
2.1.3.1. Üçüncü Kuşak Sefalosporinler.....	4
2.2. Testis Embriyolojisi	4
2.3. Testis Histolojisi.....	7
2.3.1. Seminifer Tübüller.....	8
2.3.2. Sertoli Hücreleri.....	9
2.3.3. Spermatogenik Hücreler.....	12
2.3.3.1. Spermatogonyumlar.....	12
2.3.3.2. Spermatozoidler.....	13
2.3.3.3. Spermatozoidler.....	13

2.3.3.4. Spermatozoon.....	14
2.3.4. İnterstisyum.....	15
2.3.5. Leydig Hücreleri.....	16
2.3.5. Rete Testis.....	16
2.3.6. Duktuli Efferentes.....	16
2.3.7. Epididimis.....	17
2.3.8. Duktus Deferens.....	17
2.3.9. Duktus Ejakulatoryus.....	18
2.3.10. Vesikula Seminalis.....	18
2.3.11. Prostat Bezi.....	18
2.3.12. Bulböüretal Bezler (Cowper Bezleri).....	19
2.4. Testis Anatomisi.....	20
3. MATERYAL VE METOT.....	22
3.1. Deney Grupları.....	22
3.2. Histolojik Analiz.....	23
3.3. Anti-Connexin 43 / GJA1 Antibody İmmun Boyaması	24
3.4. TUNEL Metodu.....	25
3.5. Histolojik Değerlendirme.....	26
3.6. Sperm Analizi.....	26
3.7. Biyokimyasal Analiz.....	27
3.7.1. Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması.....	27

3.7.2. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	28
3.7.3. Katalaz Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	28
3.7.4. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivite Ölçümü.....	28
3.7.5. Lipid Peroksidasyonu Ürünlerinin (MDA) Ölçümü.....	29
3.7.6. Doku Süpernetantından TAS –TOS ve OSI Analizi.....	29
3.8. Eliza Testosteron Testi.....	31
3.7. Biyokimyasal Analiz.....	27
3.8. Eliza Testosteron Testi.....	31
3.9. İstatiksel Değerlendirme.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Sperm Analizi	33
4.2. Vücut Ağırlıkları.....	37
4.3. Testis Ağırlıkları.....	38
4.4. Işık Mikroskopik Bulgular.....	38
4.4.1. Seminifer Tübül Çapı ve Seminifer Epitel Kalınlığı.....	38
4.4.1.1. Kontrol Grubu.....	39
4.4.1.2. Seftriakson Grubu.....	48
4.5. Biyokimyasal Bulgular.....	59
4.6. Testosteron Seviyeleri.....	61
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69

KAYNAKLAR.....	70
EKLER.....	78
EK.1. ÖZGEÇMİŞ.....	78
EK.2. DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARI.....	79
EK.3. DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL BAŞKANLIĞI KARARI.....	80

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve yoğun tez çalışmamın bütün aşamalarında, büyük bir sabır ve anlayış göstererek, her zaman yanımda bulunan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Nigar VARDI'ya, fikirleri ile bana destek olan değerli hocalarım Doç. Dr. Mehmet GÜL, Doç. Dr. Meltem Kuruş ve Yrd. Doç. Dr. Aslı Çetin'e, mesleki bilgileriyle tezime katkısı bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Saim YOLOĞLU, Doç. Dr. Alaaddin POLAT, Kevser TANBEK ve Dr. Fatma ÖZYALIN'a çok teşekkür ederim.

Tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm Dr. Elif TAŞLIDERE, Arş. Grv. Azibe YILDIZ ve Feride KARAHAN'a, tüm çalışma arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca projenin gerçekleştirilmesi için maddi destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

ÖZET

TESTİKÜLER KONNEKSİN 43 İFADESİ ÜZERİNE SEFTRIAKSONUN ETKİLERİ

Amaç: Konneksin 43 oluklu bağlantı kanallarını oluşturan protein ailesinin bir üyesidir. Son çalışmalar; oluklu bağlantıların erkek üreme fonksiyonlarının özellikle spermatogenezin düzenlenmesinde çok önemli rolleri olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada, seftriaksonun konneksin 43 ifadesi, sperm parametreleri ve oksidatif stres üzerindeki etkilerinin; immunokimyasal ve biyokimyasal yöntemler ile değerlendirilmesi amaçlandı.

Materyal ve metot: Wistar Albino cinsi erkek sıçanlar; seftriakson (n=15) ve serum fizyolojik (n=15) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. 10 günlük deney sonunda sakrifiye edilen sıçanların testis ve epididimisleri alındı. Parafin bloklardan elde edilen seri kesitlere hemotoksilen- eozin, TUNEL ve anti-konneksin 43 immun boyama metodları uygulandı. Ayrıca sperm örnekleri yoğunluk, motilite ve morfoloji yönünden değerlendirildi.

Bulgular: Sonuçlar seftriaksonun testis ağırlıklarında, seminifer tübül çapında, germinal epitel yüksekliğinde ve plazma testesteron seviyesinde azalmaya ($p<0.05$), seminifer tübüllerde de hasara neden olduğunu gösterdi. TUNEL pozitif boyanan apoptotik hücrelerin, ölü ve amorf başlı sperm sayısının; seftriakson grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı saptandı ($p<0.05$). Ayrıca seftriaksonun, testiküler dokuda konneksin 43 boyanma yoğunluğunda azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Biyokimyasal analizlerde; seftriakson grubunda kontrol grubuna göre; malondialdehit (MDA) seviyesi, total oksidan durum (TOS) ve oksidatif stres endeksi (OSİ) değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı; KAT aktivitesinin ise azaldığı izlendi. Diğer antioksidan enzimler (SOD, GPx) ve total antioksidan durum (TAS) değerleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Çalışmamız; seftriaksonun seminifer tübül epitel hasarı, oksidatif stres, testesteron seviyesinde ve semen kalitesinde azalma gibi fertilité üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koymaktadır. Ayrıca seminifer tübül epitelinde hücrelerarası iletişimi sağlayan konneksin 43 protein ifadesinde azalmaya ve apoptozise yol açtığını göstermektedir.

Anahtar kelimeler: Sıçan, Testis hasarı, Seftriakson, Sperm analizi, İmmünohistokimya

ABSTRACT

THE EFFECT OF CEFTRIAXONE ON TESTICULAR CONNEXIN 43 EXPRESSION

Aim: Connexin 43 belongs to a family of proteins that form gap junction channels. Gap junctions are essential in the control of male reproductive functions, especially spermatogenesis. In this study, we aimed to investigate the effect of ceftriaxone, on connexin 43 expression, sperm parameters and oxidative stress by using immunochemical and biochemical methods.

Material and method: Wistar albino male rats were divided into ceftriaxone (n=15) and saline group (n=15). After 10 days, rats were sacrificed. Epididymis and testis were removed. Obtained serial section from paraffin blocks were stained with hematoxylin eosin, TUNEL and connexin 43 immunostaining method. Furthermore, sperm samples were evaluated in terms of concentration, motility and morphological aspects.

Results: Results show that there were a significant statistical decrease in testis weight, seminiferous tubule diameter, the height of the germinal epithelium and plasma testosterone levels in ceftriaxone group compared to the control group ($p < 0.05$). Also seminiferous tubules were damaged in ceftriaxone group. It was found that TUNEL positive staining apoptotic cells, and the number of dead and amorphous head sperm were statistically significantly increased in the ceftriaxone group ($p < 0.05$). Also it was observed that connexin 43 expression in tissue decreased in ceftriaxone group. Biochemical analysis showed that; MDA level, TOS and OSI values were statistically significantly increased but CAT activity was statistically significantly decreased in ceftriaxone group. There was no statistically significant difference in terms of other antioxidant enzymes (SOD, GPx) and TAS values between groups ($p > 0.05$).

Conclusion: Our study demonstrates ceftriaxone's negative impact on fertility like seminiferous tubule epithelial damage, oxidative stress, decrease in testosterone levels and semen quality. Moreover, it showed that ceftriaxone causes decreased connexin 43 protein expression which is responsible for intracellular communication in seminiferous tubule epithelium, and apoptosis.

Keywords: Rat, Testicular damage, Ceftriaxone, Sperm Analysis, Immunohistochemistry.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen Bağlayıcı Protein
AHM	: Antimüllerian Hormon
APOİ	: Apoptotik İndeks
cm	: Santimetre
DDD	: Tanımlanmış Günlük Doz
Dk.	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
g	: Gram
GSH -Px	: Glutasyon peroksidaz
hCG	: Human Koryonik Gonodotropin
HCl	: Hidroklorik asit
H-E	: Hematoksilen-Eozin
İ.p.	: İntraperitoneal
KAT	: Katalaz enzimi
kg	: Kilogram
Kons.	: Konsantrasyon
LH	: Luteinizan Hormon
MDA	: Malondialdehit
mg	: Miligram
MIS	: Müllerian İnhibitör Madde
ml	: Mililitre

mmol	: Milimol
NBT	: Nitrobluetetrazolium
OSI	: Oksidatif Stres İndeksi
PBP	: Penisilin Bağlayan Proteinler
PBS	: Phosphate Buffered Saline
RNA	: Ribonükleik Asit
SE	: Standart Error
SF	: Serum Fizyolojik
SOD	: Süperoksit dismutaz
SRY	: Sex- determining region Y
TAC	: Toplam Antioksidan Kapasitesi
TAS	: Toplam Antioksidan Durum
TDF	: Testis Belirleyici Faktör
TOS	: Toplam Oksidan Durum
TUNEL	: TdT-dUTP nick-end-labelling
X	: Objektif büyütmesi
x	: Aritmetik ortalama
µl	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Testiküler gelişim evreleri. a.5 hafatalık embriyoda farklılaşmamış gonad evresi, b.5. Haftadan sonraki evre. c. Testiküler gelişimin son evreleri.....	5
Şekil 2.2. Testisin histolojik yapısı. a. İnsan testisinin sagittal kesiti, b. İnsan testisinin H-E ile boyanmış sagittal kesiti.....	8
Şekil 2.3. Seminifer tübülde hücre bağalantı kompleksleri.....	10
Şekil 2.4. Oluklu bağlantıyı oluşturan konneksyon ve konneksin yapısı.....	11
Şekil 2.5. Seminifer tübül epiteli.....	15
Şekil 2.6. İntratestiküler ve boşaltım kanal sistemi.....	19
Şekil 2.7. Testisin anatomik yapısı.....	21
Resim 4.1. Kontrol grubu; normal sperm. Spermak; X40.....	34
Resim 4.2. Seftriakson grubu; baş kısmı normal çengelli yapısını yitirmiş, oval ve şeffaf olarak izlenen amorf baş. Spermak; X100.....	34
Resim 4.3. Seftriakson grubu; toplu iğne başı görünümlü küçük baş (pinhead). Spermak; X100.....	35
Resim 4.4. Seftriakson grubu; kuyruğun son kısmı kopmuş olarak izlenen kırık kuyruk. Spermak; X100.....	35
Resim 4.5. Seftriakson grubu; sperm kuyruğunda bükülme ve kendi üzerine kıvrılma şeklinde ayırt edilen, eğri kuyruk. Spermak; X100.....	36
Resim 4.6. Kontrol grubu; normal görünümlü, sağlam seminifer tübüller. H-E; X20.....	40
Resim 4.7. Kontrol grubu; ökromatik nükleuslu Sertoli hücreleri (oklar), koyu, oval nükleuslu spermatogonyumlar (ok uçları) ve lümene yakın lokalize olmuş spermatidler. H-E; X40.....	41
Resim 4.8. Kontrol grubu; az sayıda izlenen, TUNEL boyama ile nükleusu kahverengi boyanmış spermatogenik hücre (ok). TUNEL immün boyama; X10.....	42
Resim 4.9. Kontrol kalp; interkalar diskler kahverengi tonlarda, yoğun, kesikli çizgiler ve merdiven basamağı şeklinde görülmekte (oklar).	

Konneksin 43 immun boyama; X20.....	43
Resim 4.10. Kontrol kalp; konneksin 43 boyanmanın yoğun olarak izlendiği alanlar interkalar diskleri göstermekte (oklar). Konneksin 43 immün boyanma; X40.....	44
Resim 4.11. Kontrol grubu; 1-6. spermatogenik evrede, spermatogonyumların etrafını saran, yüzük şeklinde, kahverengi konneksin 43 boyanması görülmekte (ok başları). Konneksin 43 immun boyanma; X40.....	45
Resim 4.12. Kontrol grubu; 8. evrede, dalgalı çizgilenmeler şeklinde, kan- testis bariyeri hizasında devam eden, yaygın ve güçlü konneksin 43 boyanması izlenmekte (ok başları). Konneksin 43 immun boyanma; X40.....	46
Resim 4.13. Kontrol grubu; 9. evrede, kan testis bariyeri hizasında izlenen çizgilenme şeklinde yoğun, kahverengi boyanma. Konneksin 43 immun boyama; X40.....	47
Resim 4.14. Kontrol grubu; 10-14. evrede azalmış olarak izlenen konneksin 43 boyanması . Konneksin 43 immun boyama; X40.....	47
Resim 4.15. Seftriakson grubu; tübül lümenine dökülmüş ve gelişimini tamamlamamış spermatogenik seri hücreler izlenmekte (oklar). H-E; X20.....	48
Resim 4.16. Seftriakson grubu; epiteli sadece bazalde yer alan Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlardan oluşan seminifer tübüller. Diğer spermatogenik seri hücreler tübül lümenine dökülmüş olarak izlenmekte. H-E; X40.....	49
Resim 4.17. Seftriakson grubu; spermatogenik hücrelerin izlenmediği, yalnızca koyu boyanmış, bazale yakın spermatogonyumları içeren atrofik tübül (yıldız). H-E; X20.....	50
Resim 4.18. Seftriakson grubu; profaz ve metafaz gibi mayozun belli aşamalarında duraksamış, yoğun nukleuslu, dejenere hücreler izlenmekte (ok başları). H-E; X40.....	51
Resim 4.19. Seftriakson grubu; çok sayıda nukleus içeren, lümende ve epitele yakın olarak izlenen dev hücreler (oklar). H-E; X40.....	52
Resim 4.20. Seftriakson grubu; sitoplazmaları eozinofilik, nukleusları parçalanmış veya piknotik görünümlü, çok sayıda apoptotik hücre	

izlenmekte (oklar). H-E; X40.	53
Resim 4.21. Seftriakson grubu; seminifer tübül epiteli içerisinde, sınırları düzgün olarak izlenen vakuol yapısı (oklar). H-E; X20.....	54
Resim 4.22. Seftriakson grubu; çok sayıda nukleusu koyu kahverengi boyanan apoptotik hücreler izlenmekte (oklar). TUNEL immun boyanma; X10.....	55
Resim 4.23. Seftriakson grubu; nukleusları koyu kahverengi boyanmış, apoptotik spermatogenik seri hücreler daha yakından izlenmekte (oklar). TUNEL immun boyanma; X20.....	56
Resim 4.24. Seftriakson grubu; TUNEL pozitif olarak izlenen apoptotik Sertoli hücresi (ok başı). TUNEL immun boyanma; X40.....	56
Resim 4.25. Seftriakson grubu; germ hücreleri lümene dökülmüş tübülde konnesin 43 boyanma yoğunluğu azalmış olarak izlenmekte. Konnesin 43 immun boyanma; X40.....	57
Resim 4.26. Seftriakson grubu; konnesin 43 immün boyanma, peritübüler dokuya yakın, kesik kesik çizgilenmeler şeklinde izlenmekte (ok başları). Konnesin 43 immun boyanma; X40.....	58
Grafik 4.1. Grupların testosteron düzeyleri.....	61

TABLolar DİZİNİ

Tablo No		Sayfa No
Tablo 4.1.	Grupların sperm parametreleri yönünden karşılaştırılması.....	37
Tablo 4.2.	Grupların başlangıç- son vücut ağırlıkları.....	37
Tablo 4.3.	Grupların sağ - sol testis ve epididimis ağırlıkları.....	38
Tablo 4.4	Grupların seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıklarının (μm) karşılaştırılması.....	39
Tablo 4.5	Seminifer tübüllerin mikroskopik sınıflandırılması (%) ve P değerleri.....	40
Tablo 4.6	Apoptotik İndeks (%).....	55
Tablo 4.7	MDA, SOD, KAT, GPx, GSH, TOS, TAS, OSI yönünden grupların karşılaştırılması.....	60

1. GİRİŞ

Son yıllarda dünyada, sağlıklı erkeklerin çoğunda, semen kalitesinde bir düşüş gözlenmektedir (1). Genetik faktörlerin dışında, çevresel faktörler de sperm sayısı, morfolojisi, motilitesi ve canlılığı gibi semen kalitesini belirleyen parametreleri ve testisin germinatif epitelini etkilemektedir. Çok sayıda çalışma; semen kalitesini belirleyen spermatogenezis ile endokrin sistem bozuklukları, genito-üriner sistem enfeksiyonları, ağır metallere, pestisitlere endüstriyel kimyasallara radyasyona, kemoterapik ilaçlara maruz kalma arasında güçlü bir korrelasyon bulunduğunu göstermektedir (2-6).

Antibiyotikler (anti: karşı- biyos: yaşam), bakteriler üzerinde öldürücü (bakteriyositik) ya da üremelerini engelleyici (bakteriyostatik) etki gösteren ve bakteriyel infeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlardır (7). Ülkemizde 2003-2006 yılları ilaç tüketimine ait verileri, antibiyotiklerin ilk sırada tüketildiğini göstermektedir. Antibiyotik tüketiminin Tanımlanmış Günlük Doz (Defined Daily Doses, DDD) yöntemiyle ölçüldüğü çalışmalarda, total antibiyotik tüketimi Danimarka'da 11.3 DDD/1000 ve Hollanda'da 19.6 DDD/1000 değeri olarak saptanmıştır. Oysa, 2006 yılı için ülkemiz verilerinde aynı oran, 31.4 DDD/1000 olarak hesaplanmıştır (8) . Antibiyotiklerin vücut sistemleri ve özellikle karaciğer ve böbrek gibi organlar üzerindeki yan etkileri bir çok çalışmada araştırılmış olmasına rağmen (9,10), üreme sistemi ile ilgili çalışmalar literatürde daha sınırlı olarak kalmıştır. Antibiyotiklerin, sperm başı defektlerine, seminifer tübül epitelinde vakuolizasyona, germ hücrelerinin azalmasına, Sertoli hücrelerinde özellikle nükleuslarında morfolojik değişikliklere, sperm sayısında, motilitesinde ve erkek genital organ ağırlığında belirgin bir azalmaya neden olduğu bildirilmektedir (3-6).

Oluklu bağlantılar iyonların, ikincil mesajcıların ve küçük molüküllerin geçişini sağlayan intersellüler bir protein kanalıdır. Oluklu bağlantıların temel proteini konneksindir. Çok çeşitli konneksin proteinleri mevcut olmasına rağmen testiküler hücrelerde en fazla bulunan oluklu bağlantı proteini konneksin 43'tür. Yeni bilgiler, erkek üreme fonksiyonlarında özellikle spermatogeneziste oluklu bağlantıların önemli olduğunu göstermektedir. Konneksin 43 yoksun fare testislerinde, primordial germ hücrelerinin %50 azaldığı, diğer konneksinlerin yoksunluğunda ise spermatogenezisin etkilenmediği gösterilmiştir (11,12). Bu çalışmalara rağmen, testiküler hasara neden

olan ajanların ya da testis patolojilerinin oluklu bağlantılar üzerindeki etkileri ile ilgili araştırmalar az sayıdadır (13).

Seftriakson gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı kullanılan geniş spektrumlu etkiye sahip, bakteriolitik, sefalosporin grubu bir beta-laktam antibiyotiktir (7). Üçüncü kuşak bir sefalosporin olan seftriakson, sıklıkla pnömöni, bakteriyel menenjit, ateşli çocuklarda sepsisi önlemede, tifoid ateş ve gonore tedavisinde kullanılır (14). Seftriaksonun, erkek genital sistem üzerine etkileri birkaç araştırmacı tarafından çalışılmıştır (6, 15-17). Bu çalışmalarda; seftriaksonun uygulama süreleri ve dozlarının, testis ve epididimis ağırlıkları ile sperm sayısı ve motilitesi üzerindeki etkileri karşılaştırılmıştır. Ancak seftriaksonun spermatogenezis sürecinde önemli rolü olan konneksin 43 ifadesi üzerindeki etkileri ile ilgili herhangi bir çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Biz bu çalışmada; seftriaksonun neden olabileceği testiküler hasarda; konneksin 43'ün rolünü immunohistokimyasal yöntemle araştırmayı amaçladık .

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler (anti: karşı- biyos: yaşam), bakteriler üzerinde öldürücü (bakteriyositik) ya da üremelerini engelleyici (bakteriyostatik) etki gösteren ve bakteriyel infeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçlardır.

Antibiyotikler hedef hücreye etkilerine, etki mekanizmalarına, etki gösterdiği mikroorganizma grubuna, spektrumuna göre ve immunomodülatör etkilerine göre sınıflandırılırlar. Etki mekanizmalarından, bakteri hücre duvar sentezini engelleyenler sınıfında bulunan antibiyotiklerden biri de Beta-laktamlardır (7).

2.1.1. Beta-Laktam Antibiyotikler

Beta-laktam ajanlar, kimyasal yapılarında ortak bir beta-laktam halkası taşıyan ve hücre duvar sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubudur. Beta-laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalarına göre beş temel sınıfa ayrılırlar;

1. Penisilinler
2. Sefalosporinler
3. Karbapenemler
4. Monobaktamlar
5. Beta-laktamaz inhibitörleri

2.1.2. Beta-Laktam Ajanların Etki Mekanizmaları

Beta-laktam ajanlar, hücre duvarı sentezinin transpeptidasyon basamağında görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidazlara (Penisilin Bağlayan Proteinler; PBP) bağlanarak etki ederler. Değişik PBP'lerin farklı beta-laktam ajanlara bağlanma afiniteleri ve eklendikleri ilaç düzeyleri birbirinden farklıdır. Bu durum beta-laktam antibiyotiklerin, antibakteriyel etkinliklerinin neden birbirinden farklı olduğunu kısmen açıklayabilir (18) .

2.1.3. Sefalosporinler

İlk olarak 1940'lı yıllarda *Cephalosporicum acremonium* isimli bir mantardan elde edilen sefalosporin C'nin bulunmasından itibaren, günümüze kadar moleküler

özellikleri sürekli geliştirilerek antibakteriyel tedavide yaygın kullanılan antibiyotik türlerinden biri durumuna gelmiştir. Birbirinden farklı özellikleri ve moleküler yapıları ile günümüzde dördüncü kuşak sefalosporinlere kadar farklı grupları kullanımdadır. Birinci kuşaktakiler, gram pozitif koklara daha fazla etkili iken, üçüncü kuşaktakiler, gram-negatif çomaklar üzerine daha fazla etkilidir. İkinci kuşak sefalosporinler bu özellikleri ile diğer iki grup arasında yer alırlar. Dördüncü kuşak sefalosporinlerin gram pozitif bakterilere etkisi, birinci kuşak sefalosporinlere, gram negatiflere etkisi de üçüncü kuşak sefalosporinlere benzerlik göstermekte ve indüklenebilir beta-laktamazlara karşı da dayanıklı olmaları nedeniyle diğerlerinden ayrılmaktadır.

2.1.3.1 Üçüncü Kuşak Sefalosporinler

Etki spektrumları birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlerden daha geniş olan ve bunların etki spektrumunda bulunan bakterilere ek olarak, hastane ortamında dirençli enfeksiyonlardan sorumlu tutulan *Serratia*, *Pseudomonas*, *Citrobacter* ve *Enterobacter* gibi gram negatif bakterilere de etkili olabilen antibiyotiklerdir. Üçüncü kuşak sefalosporinler, toplum kaynaklı pnömoniler, ciddi üriner sistem enfeksiyonları, viridans streptokok kaynaklı endokarditler, gonokok enfeksiyonları ve hastane ortamında gelişen ciddi enfeksiyonların tedavisi amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında hastane kökenli pnömoniler, yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit, septik artirit, akut bakteriyel menenjit, abdominal, jinekolojik ve diyabetik ayak enfeksiyonlarında ve çeşitli gram negatif bakterilerle oluşan sepsis olgularında da kullanılmaktadır.

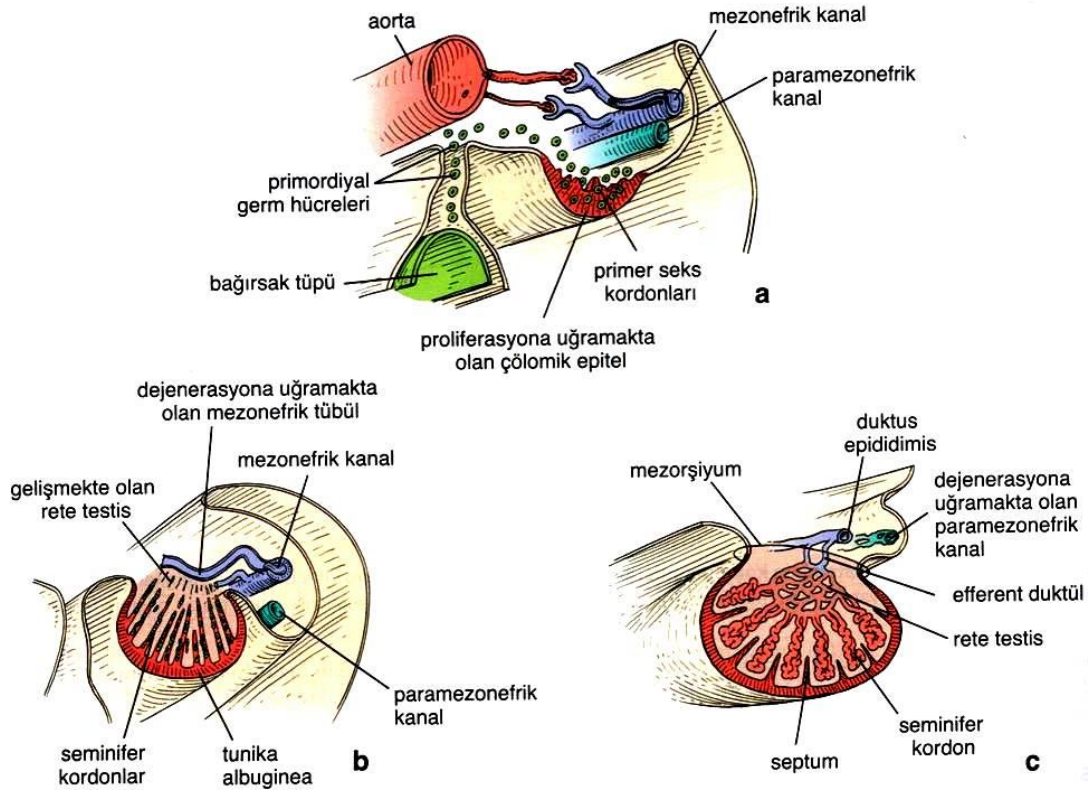
Seftriaksonun BOS'a geçişi iyi olduğu için akut pürülan menenjit tedavisinde başarıyla kullanılmaktadır. Sefalosporinlerin çoğu 1 g'lık uygulamayı takiben 42-150 mg/ml serum pik seviyeleri sağlar. Serum yarılanma ömürleri 1-2 saattir, ancak seftriaksonda bu süre 5-10 saate kadar artar. Doz aralığının uzun olması nedeni ile ayakta tedavi gören hastalar için seçilebilecek uygun bir antibiyotiktir. Kan, idrar, safra, akciğer, periton sıvısı ve büllöz sıvı gibi birçok vücut sıvısına terapötik düzeyde geçer. Gastrointestinal sisteme ait yan etkilerden ishal, özellikle seftriakson kullanımında sık görülür (19).

2.2. Testis Embriyolojisi

Primordiyal germ hücreleri, epiblasttan köken alır, pirimitif çizgi boyunca göç eder ve üçüncü haftada yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm

hücrelerinin arasına yerleşirler. Embriyonun katlanmaları sırasında, vitellus kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur (20). Bu sırada, primordiyal germ hücreleri, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal kabartılara göç ederler. Altıncı haftada primordiyal germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve primer seks kordonlarının yapısına katılırlar (21).

Gonadların görünümü yedinci haftaya kadar her iki cinstede aynıdır ve “farklanmamış gonadlar” olarak adlandırılırlar. Gonadal gelişimin ilk safhaları beşinci haftada ortaya çıkar; mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık - gonadal (genital) kabartı - oluşur. Parmak şeklindeki epitel kordonları - primer seks kordonları - altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede ilerler (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Testiküler gelişim evreleri. a. 5 haftalık embriyoda farklılaşmamış gonad evresi. b. 5. Haftadan sonraki evre. c. Testiküler gelişimin son evreleri (22).

Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için önemlidir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geni, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleşiktir. Farklanmamış gonadın medullası üzerinde

testise farklanmasını sağlayan belirleyici Y kromozomudur. Y kromozomu tarafından dzenlenen TDF testiküler farklılaşmayı sağlar. Bu faktörün etkisi altında, primer seks kordonları seminifer tübüllere farklanırlar. Farklanmamış gonad bu aşamada, dışta yer alan medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe farklanır, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklanır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur. Onikinci haftada gelişmekte olan gonadın kalın bir fibröz kapsül olan tunika albugineasının belirginleşmesi, erkek fetus için karakteristiktir.

Kapsülün gelişmesi sonucunda seks kordonlarının (seminifer-testiküler-kordonların), yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Bu arada genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdan ayrılır ve kendi mezenteri ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar; seminifer tübüllere, tübüli rekti ve rete testise farklanırlar. Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve androstendion) salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genital organlar erkek cinse uygun farklanmasını indükler. Testosteron üretimini insan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaşmıştır. Embriyoda interstisyel hücreler hamileliğin 18. haftasına kadar işlevlerini sürdürürler; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra; hipofizden salınan Luteinizan Hormon (LH) uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar. Testosterona ek olarak fetal testisler, glikoprotein yapıda bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (Müllerian inhibitory Substance: MIS) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. AMH, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır, hormonun salgılanması puberteye kadar devam eder, daha sonra seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik kanalların gelişimini baskılar.

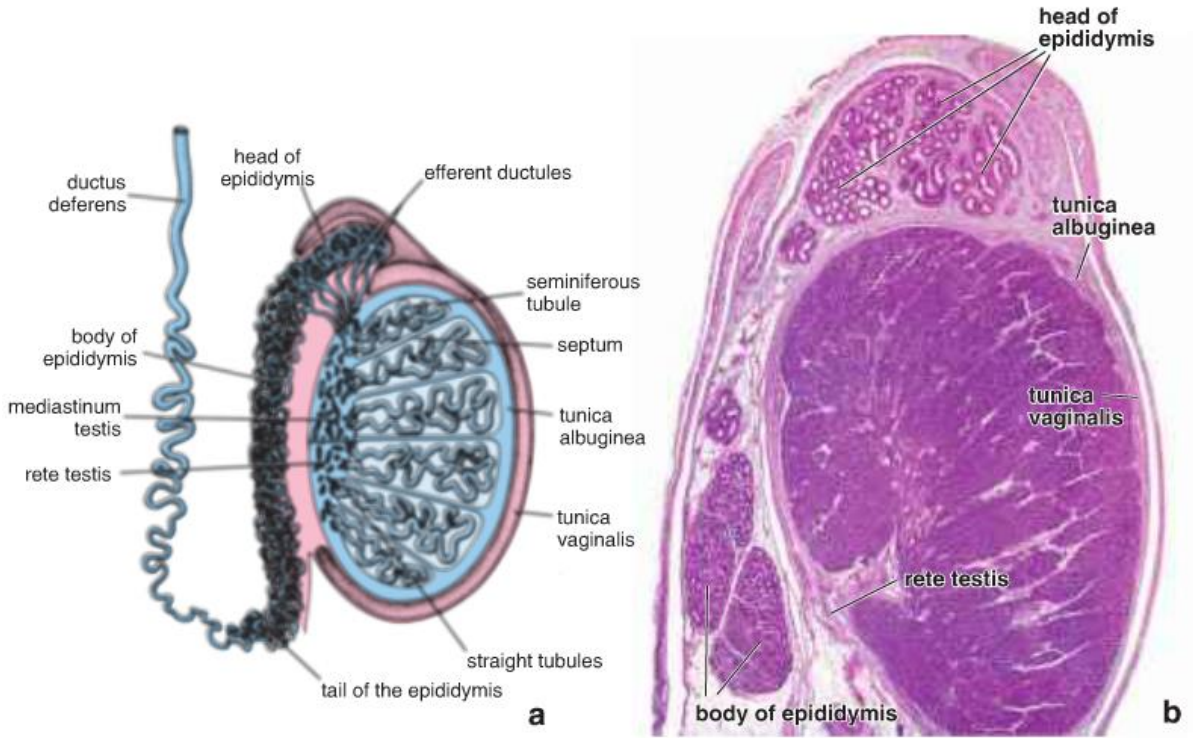
Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar, lümenleri yoktur, puberteden itibaren lümen gelişir. Fetal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisinin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, duktuli efferentes farklanacak olan 15-20 adet mezonefrik tübül ile devam eder. Bu kanallar (duktuli efferentes), duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar (23).

Dişi ya da erkek embriyolar birer çift genital kanala sahiptir. Mezonefrik kanal (Wolf kanalı) erkek üreme sistemi iç organlarının önemli bir bölümüne farklanırken, paramezonefrik kanal (Müller kanalı) dişi iç genital organlarının gelişimine katılır. Beşinci ve altıncı haftalarda genital sistem farklanmamış aşamada olduğundan genital kanalların her iki çifti de bulunur. Sekizinci haftada fetal testislerden salgılanan testosteronun etkisi altında, mezonefrik kanalların proksimal parçaları, oldukça kıvrıntılı bir hal alır ve epididimise farklanır. Mezonefrik kanalın diğer bölümlerinden, duktus deferens ve duktus ejakulatorius gelişir (20, 21).

Leydig hücrelerinin hem aktiviteleri hem de sayıları hormon uyarısına bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon anne kanından fötusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik farklanmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir (22, 24).

2.3. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi, testisler, yardımcı bezler, testis dışı ve içi genital kanallar ve penisten oluşur. Testisler, embriyonik gelişim, seksüel olgunlaşma ve üreme fonksiyonlarını etkileyen, puberteyle birlikte spermatozoonların üretimi ve beslenmesi ile erkek seks hormonu olan testosteronun sentezinden sorumlu, ekzokrin ve endokrin fonksiyonu olan bir çift organdır. Yanlardan basık, oval şekilli, iri badem büyüklüğünde, herbiri 10-25 gr ağırlığında ve 2,5x3,5 cm boyutlarında bir çift organ olan testislerin posterior yüzü, epididimisle bağlantılıdır. Testisi dıştan saran **tunica albuginea** tabakası, testisin posterior yüzünde kalınlaşarak **mediastinum testisi** oluşturur ve fibröz uzantılar halinde organın içine doğru sokulur. Testise giren ve çıkan lenf ve kan damarları ile kanallar bu tabaka içinde seyreder. Mediastinum testis içine doğru uzanan ince bağ dokusu septumları, testisi yaklaşık 250 lobüle ayırır. Herbir lobülün içinde, spermilerin üretildiği, sayıları 1-4 arasında değişen seminifer tübüller bulunur (Şekil 2.2). Seminifer tübüllerin arasında kalan boşluk, lenf damarlarını, kan damarlarını, sinirleri, Leydig hücre gruplarını ve makrofajları çevreleyen interstisyel doku ile doldurulmuştur (22, 25, 26).



Şekil 2.3. Testisin histolojik yapısı. a. İnsan testisinin sagital kesiti, b. İnsan testisinin Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanmış sagital kesiti (22).

2.3.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller, 30-80 cm uzunluğunda ve yaklaşık 150-200 µm çapında oldukça kıvrıntılı kanallardır. Her bir testiste 250- 1000 adet bulunan seminifer tübüller, anastomoz gösteren kıvrımlar şeklinde başlar, mediastinuma doğru yaklaşırken düz ve kısa tübüller olan *tubuli rekti*' yi oluştururlar. Bu düz tübüller ise medastinumda bulunan ve anastomozlaşan kanallar olan rete testise açılırlar. Seminifer tübüller, seminifer epitel ve germinal epitel olarak adlandırılan çok katlı bir epitel ile döşelidir. Seminifer epitel, dışta bazal lamina, kollajen lifler ve kasılabilen miyoid hücrelerden oluşan özelleşmiş, peritübüler doku veya *tunika propria* olarak adlandırılan çok tabakalı bir bağ doku ile çevrelenmiştir. Miyoid hücrelerin organizasyonu türlere göre değişiklik gösterir. Kemiricilerde tek tabaka halinde düzenlenme gösterirken, insanlarda ve bazı türlerde 3-5 tabakalıdır. Miyoid hücreler, elektron mikroskopik düzeyde düz kas hücrelerine benzeyen, bazal lamina ile sarılı, aktin filamentlerinden zengin hücrelerdir ve kotraksiyon yetenekleri sayesinde seminifer tübüllerin çapını değiştirerek, hareketsiz spermilerin *rete testise* doğru ilerleyen ritmik hareketini sağlarlar. Seminifer epitelde

spermatogenik hücreler ve Sertoli hücreleri olmak üzere iki ana hücre grubu mevcuttur (25).

2.3.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, bazalden lümene kadar uzanan uzun, prizmatik ve büyük hücrelerdir. Destek hücreleri olarak da bilinen bu hücreler, gelişmekte olan sperm hücrelerinin beslenmesini, korunmasını ve desteklenmesini sağlar. Ayrıca, tam olarak farklılaşamayan ve olgunlaşamayan spermatogenik hücreleri fagosite ederek ortadan kaldırma yeteneğine sahiptirler. Spermatogenik hücreler gibi bölünme yetenekleri yoktur. Puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücre tipi iken puberteden sonra sayıları azalır. Sertoli hücreleri, daha ileri yaştaki erkeklerde spermatogenik hücre popülasyonu azaldığında tekrar seminifer epitelin ana elemanı haline gelirler (22).

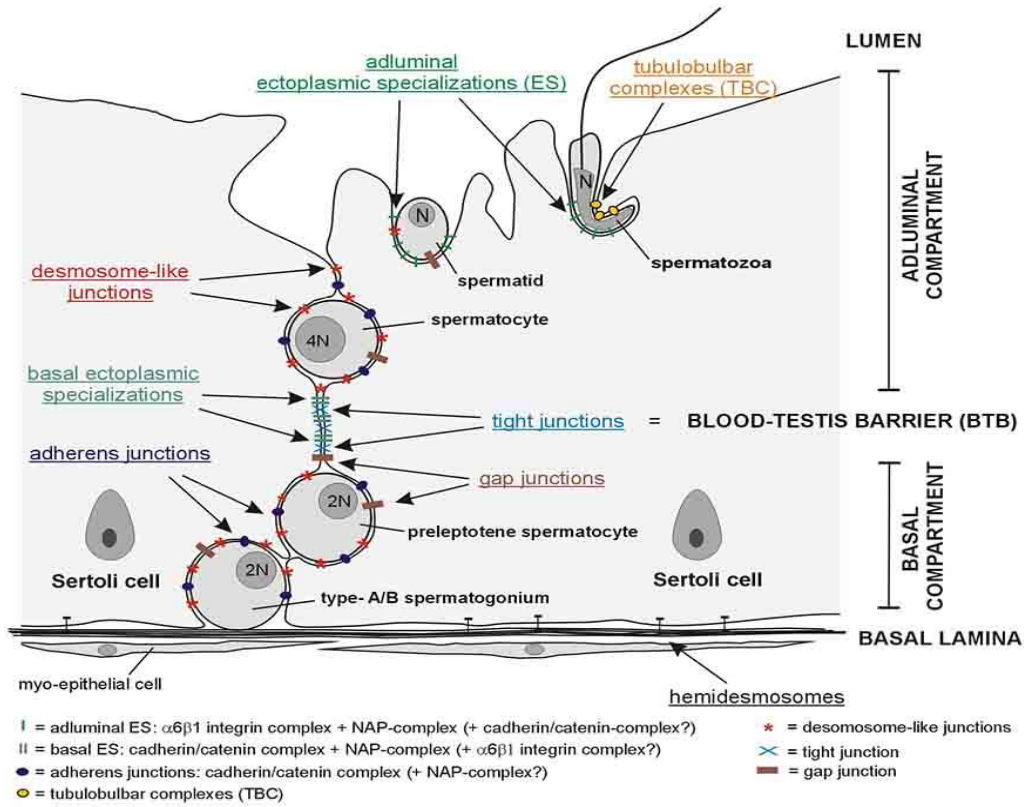
Sertoli hücrelerinin ökromatik nükleusu büyük, oval veya üçgen şeklindedir ve bazal sitoplazmada konumlanmıştır. Nükleusları bir veya daha fazla iç katlantılara sahiptir. Bazı türlerde **karyozom** adı verilen kendine has 3 parçalı yapıda RNA ve DNA içeren cisimcik çifti tarafından kuşatılan 1-2 adet belirgin nükleolus içerir (27). Elektron mikroskopik düzeyde Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında bol miktarda lipid damlacıkları görülür. Ayrıca belirgin Golgi kompleksi, bol ve tübüler tipte mitokondriyonlar, gelişmiş granüler ve agranüler endoplazmik retikulum, primer ve sekonder lizozomlar, serbest ribozomlar, glikojen granülleri, mikrotübüller ve mikrofilamentlere sahiptir(24, 25).

İnsanlardaki Sertoli hücrelerinde bazal sitoplazmada, çekirdek yakınında yer alan ve **Charcot- Böttcher** adı verilen inklüzyon cisimcikleri de görülebilir. Bu hücrelerin sınırları ışık mikroskopik düzeyde zor seçilir. Hücrelerin apikalinde gelişmekte olan spermatozoonların baş kısımları bulunur.

Birbirlerine komşu olan Sertoli hücreleri arasında çok sayıda bağlantı kompleksi yer almaktadır. Komşu membranlar arasında 50'den fazla paralel kaynaşma bölgeleri bulunan zonula okludens türü bağlantılar bulunmaktadır (22, 25). Bu sıkı bağlantı kompleksleri sayesinde interstisyel dokudaki kan damarları ile seminifer tübüller arasında **kan-testis bariyeri** oluşturulur. Kan- testis bariyeri ile seminifer epitel; bazal ve adluminal kompartmanlara ayrılır. Bu bariyer, germ hücrelerinin kandan gelen ilaçlar, toksik kimyasallar ve mutajenler gibi zararlı ajanlara karşı korunmasını ve seminifer tübüllerin iyon, aminoasit, karbonhidrat ve protein içeriğinin, kan ve lenf içeriğinden

daha farklı olmasını sağlamaktadır (27). Spermatogonyumların farklılaşması, sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına neden olur. Seksüel olgunlaşmanın, immünolojik yeteneğin gelişmesinden daha sonra meydana gelmesi sonucu, farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanmaktadır. Bu durum, germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immün yanıtı teşvik etmektedir. Kan-testis bariyeri sayesinde, seminifer tübüllere immünooglobulinlerin geçişi önlenerek, haploid germ hücreleri; sekonder spermatosit, spermatid ve spermler ile immün sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşim ortadan kaldırılmış olur (22, 28).

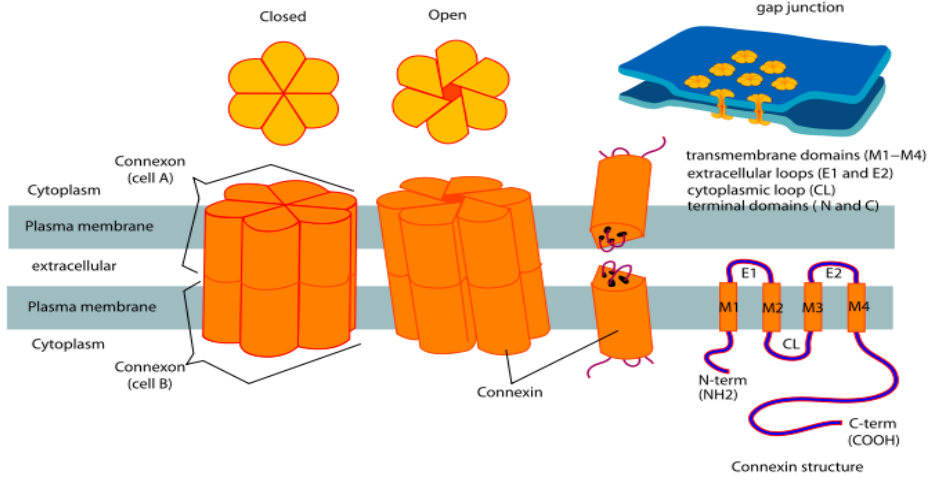
Sertoli hücreleri membranlarında sıkı bağlantılardan başka, oluklu bağlantı (gap junction) tipi bağlantı kompleksleri, tubulobulbar kompleksler, ektoplazmik özelleşmeler, fokal bağlantılar, desmozom tipi bağlantılar ve hemidesmozom tipi bağlantılar da yer almaktadır (Şekil 2.3.2) (29).



Şekil 2.3. Seminifer tübülde hücre bağlantı kompleksleri (30).

Bağlantı komplekslerinden oluklu bağlantılar, konneksinler denen iç zar proteinlerinden meydana gelmiştir. Altı konneksin, hücre zarını kateden içi boş silindirik bir yapı olan ‘konneksonu’ oluşturur. Komşu hücrelerdeki konneksonların

ucuca düzenlenmesi iki hücrenin sitosolü arasında iletişim için doğrudan bir kanal oluşumu sağlar. Bu bağlantı birimleri komşu hücreler arasında kimyasal ve elektriksel uyarımdan sorumludur (Şekil 2.4) (31).



Şekil 2.4. Oluklu bağlantıyı oluşturan konnekson ve konneksin yapısı (32).

Konneksinin bir izotipi olan konneksin 43' ün spermatogenezis sürecinde çok önemli rolü olduğu kanıtlanmıştır. Özellikle son yıllarda azospermi ile ortaya çıkan spermatogenetik problemlerde, konneksin 43' ün patogenezisdeki etkileri ortaya konulmuş ve normal spermatogenez basamaklarının devamı için mutlak gerekliliği bildirilmiştir (33). Konneksin 43' ün diğer bağlantı komplekslerinin spermatogenik süreçteki fonksiyonlarını da düzenlediği düşünülmektedir. Ayrıca konneksin 43 spesifik erkek infertilite tipleri ve testiküler kanserin tedavisinde potansiyel iyileştirici hedefler olarak görülmektedir (31).

Spermatogenik hücreler, Sertoli hücrelerinin lateral uzantılarıyla oluşturulan bölmelerde yerleşmişlerdir. Seminifer tübüllerin bazal kısmına yakın bölgelerde Sertoli hücreleri arasında spermatogonyumlar ve erken dönem primer spermatositler yerleşirken, luminal bölgelere doğru, daha olgun spermatositler ve spermatidler yerleşir. Spermatogenik hücreler büyüyüp olgunlaştıkça, lümene doğru ilerlerken, Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı komplekslerinin oluşturduğu bariyeri aşmak zorundadır (25).

Sertoli hücreleri, testosteron ve dihidrotestosterona yüksek bağlanma afinitesine sahip androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlerler. ABP sayesinde luminal bölgede testosteron hormonu yüksek konsantrasyonlarda tutularak, gelişim ve farklılaşma

evrelerinde olan sperm hücrelerinin olgunlaşmaları sağlanır. Bu hücrelerde ayrıca folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını baskılayan inhibin, plazminojen aktivatör ve transferrin sentezlenir (34).

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları:

- Kan-testis bariyerini oluşturmak.
- Gelişmekte olan spermatogenik hücreleri desteklemek.
- Seminifer tübül lümenine, sperm transportunu kolaylaştıracak, protein ve iyonlardan zengin sıvı salgılamak.
- Spermiyogenez sonunda atılan rezidüel cisimcikleri veya gelişimini tamamlayamamış spermatogenik hücreleri fagosite etmek.
- Anti-Müllerian (Müllerian inhibe edici) hormonu üretmek, (Bu hormon embriyonik gelişim esnasında, erkek fetusta Müller (Paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlamaktadır.)
- Plazminojen aktivatör ve transferrin gibi molekülleri sentezlemek ve ayrıca FSH uyarımıyla, androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezlemek. (Bu protein seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar.)
- Anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin ve uyarıcı aktivin adı verilen peptidleri salgılamak (22, 27, 28).

2.3.3. Spermatogenik Hücreler

Düzenli olarak bölünerek matur spermata farklanan hücreler olup, 4-8 tabaka hücre içerirler. Bazaldan lümeneye doğru hücre tipleri :

2.3.3.1. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, bazal kompartmanda bazal lamina ile direkt ilişkide olan hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantıların altında yerleşim gösterdikleri için kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar. Üç temel morfolojik spermatogonyum tipi gözlenir : Tip A koyu spermatogonyumlar, seminiferöz epitelin kök (stem) hücreleridirler. Yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinli oval çekirdek içerirler. Puberteden itibaren mitotik hücre bölünmeleri geçirerek ya tip A koyu spermatogonyumları ya da tip A açık spermatogonyumları oluştururlar. Tip A açık spermatogonyumlar, soluk boyanan, ince granüler kromatinli oval çekirdek içerirler.

Mitotik bölünmeleri sonucunda farklanarak tip B spermatogonyumları oluştururlar. Tip B spermatogonyumlar, merkezi yerleşimli çekirdekçiğe sahip sferikal çekirdek içerirler. Çekirdek kromatini çekirdekcik çevresinde ve çekirdek kılıfı boyunca yoğunlaşma gösterir (22). (Şekil 2.5)

2.3.3.2. Spermatisitler

Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmeleri sonucu oluşan primer spermatisitler, sentez fazını (DNA sentezi) tamamladıktan hemen sonra mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Bu safhada leptoten, zigoten, pakiten ve diploten fazlarını geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar ve krossing-over'den sonra kromozomlar ayrılır. Daha sonra hücreler, metafaza girer ve kromozomlar takip eden anafazda her bir kutba doğru giderler. Bu bölünmede profazın yaklaşık 22 gün dolayında bir süre alması nedeniyle mikroskopta incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Spermatojenik seride en büyük hücreler, çekirdeklerindeki sinaptonemal kompleksin varlığıyla karakterize primer spermatisitlerdir. Birinci mayoz bölünmeden sonra oluşan sekonder spermatisitler $2n$ DNA ve 23 kromozom ($22+X$ veya $22+Y$) içerir. Testis kesitlerinde sekonder spermatisitlerin görülmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve hızla ikinci mayotik bölünmeye giren hücrelerdir (22, 35).

2.3.3.3. Spermatisidler

Spermatisidler, sekonder spermatisitlerin ikinci mayoz bölünmesi ile oluşan hücrelerdir. Bunlar, diğer hücrelerden küçük boyutları (7-8 μm çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan çekirdekleri ve seminiferöz tübüllerde lümen yakınında Sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntülerinde yerleşmeleri ile tanınırlar. Spermatisidler, **spermiyogenez** adı verilen farklılaşma süreci geçirerek metamorfoza uğrarlar. Bu süreçte; akrozom oluşur, çekirdek yoğunlaşır ve uzar, kuyruk gelişir ve sitoplazmanın çoğu kaybedilir. Yeni oluşmuş spermatisid, merkezi yerleşimli bir çekirdek, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondriyonlara ve bir çift sentriyole sahiptir. Spermatisidin matür sperme farklılaşma süreci 4 faz içerir. Bu fazlar, spermatisidlerin özel bağlantılarla Sertoli hücre membranına fiziksel olarak bağlandığında oluşurlar.

a) Golgi fazı: Çekirdeğin bir kutbuna yerleşen Golgi kompleksi, PAS (+) granüller olan proakrozomal granülleri salgılamaya başlar. Bu granüller çekirdek kılıfına yakın

yerleşim gösteren akrozomal vezikül içinde yoğunlaşır. Sentriyoller, akrozomal vezikülün şekillendiği çekirdek bölgesinin zıt kutbuna göç ederek sperm kuyruğunun şekillenmesini başlatır.

b) Şapka fazı: Akrozomal vezikülün yerleştiği çekirdek yüzeyinde, yarıya kadar yayılmasıyla karakterizedir. Akrozomal şapkanın altında yer alan çekirdek kılıfı porlarını kaybederek kalınlaşır. Çekirdek içeriği yoğunlaşır.

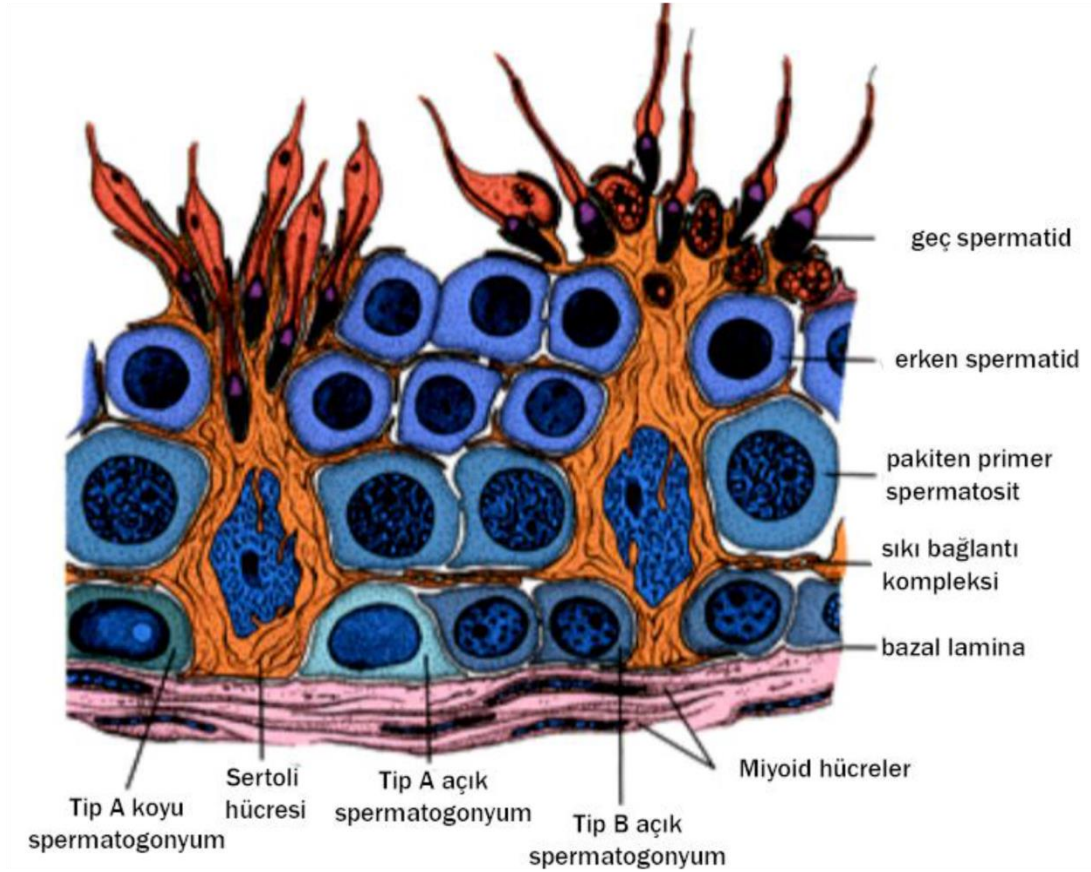
c) Akrozomal faz: Kromatini yoğunlaşan çekirdek yassılaştır. Sitoplazmik kısım posteriorda kalır. Sitoplazmik mikrotübüller silindirik bir kılıf olan manşet şeklinde düzenlenir. Akrozomal yüzeyin zıt kutbuna göç eden ve kuyruğun erken gelişimini başlatan sentrioller, modifiye olarak spermin boyun bölgesini şekillendirir. Manşetin kaybolması ve sitoplazma derininden boyun bölgesi ve uzantısına mitokondriyon göçü olur. Böylece orta parça şekillenir.

d) Maturasyon fazı: Sitoplazmik artığın (rezidüel cisimcik) spermden atıldığı fazdır. Bu yapılar, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Sonuçta seminiferöz tübülün lümenine salınan olgun spermatozoonlar oluşur (22, 34).

2.3.3.4. Spermatozoon

Olgun germ hücresidir. İnsanda spermatogonyumdan spermatozoon oluşumu arasında geçen süre yaklaşık 64 gündür ve bu sürece **spermatogenezis** adı verilir. Olgun insan spermatozoonu baş, orta parça ve kuyruktan oluşur. Spermin baş ve kuyruk kısımlarını plazma membranı sarar. Baş, akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek yassılaştırmış şekilde olup, yoğun halde kromatin içermektedir. Çekirdeğin anterior yarısını akrozom örter. Özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom; akrozom denilen tripsin benzeri proteazlar, asit fosfataz, hyalurodinaz ve nöroaminidaz gibi hidrolitik enzimler içerir. Orta parça, baş ve kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlayan bir çift sentriolün bulunduğu dar bir parçadır. Distal sentriol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonemaya kaynaklık yapar. Kuyruk yapısal yönden silyuma benzer. Kuyruk üç parçaya bölünmüştür ; **orta parça**, **esas parça** ve **son parça**. Kuyruğun orta parçası, sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüler aksonema ve dış yoğun lifler adı verilen sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz adet uzunlamasına seyreden filamanlardan

oluşur. Esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır. Yedi dış yoğun lifle sarılı merkezi aksonema ve bir fibröz kılıftan oluşur. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturur. Son parça, dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanmasından dolayı sadece aksonema bulunan kuyruğun çok kısa bir parçasıdır (22, 35).



Şekil 2.5. Seminifer tübül epiteli (22).

2.3.4. İnterstisyum

Testisin serminiferöz tübülleri arasındaki boşluklar ; Leydig hücreleri, bağ dokusu elemanları, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillerler, pencereli tiptedir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler. İnterstisyel alanın, lenf damarlarından zengin olması, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. İnterstisyum; Leydig hücreleri, fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajları içermektedir.

2.3.5. Leydig Hücreleri

Leydig veya testisin interstisyel hücreleri, yuvarlak ya da poligonal şekilli olup, eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptir. Merkezi yerleşimli çekirdek kaba kromatin granülleri ve belirgin çekirdekcik içerir. Steroid sentez eden hücre özellikleri taşıyan sitoplazma, yaygın agranüler endoplazmik retikulum, küçük lipid damlacıkları, tübüler kristal mitokondriyonlar, lipofuksin granülleri ile Reinke kristali ve prekürsörlerine sahiptir. Leydig hücreleri, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondriyon ve agranüler endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce gerçekleştirilir. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda gebelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon, maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten, fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Androjenik hormonlar, gelişim sırasında, erkek genital organların farklılaşması için gereklidir (22, 34).

2.3.5. Rete Testis

Damardan çok zengin olan mediastinum içine yerleşmiş, birbirleriyle anastomozlaşan tübüler yapılardır ve bir tubulus ağı oluştururlar. *Tubuli rekti* adı verilen düz seminifer tübüller, mediastinum testiste yer alan bu kanal ağına açılır. Tek katlı kübik veya alçak prizmatik epitelle döşeli, düzensiz bu kanalların epitel hücreleri, tek bir apikal silyum ve birkaç kısa mikrovillus içerir, nükleusları çok koyu boyanır ve bu hücrelerin yaslandığı bazal membran, mediastinumun bol kan damarlı bağ dokusu ile sarılmıştır. Spermiler, tubuli rekti ve rete testisten hızla geçtiğinden, kesitlerde lümende spermilere nadiren rastlanır (25, 26).

2.3.6. Duktuli Efferentes

Rete testisi epididimise bağlayan ve sayıları yaklaşık 20 adet olan bu kıvrımlı kanallar, yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Bu kanallar, testisten çıkarken çok kıvrımlı bir şekil alarak konik yapıları oluşturur. Bu konilerin bazal kısımlarında efferent kanallar, epididimis kanalına açılır (22).

Efferent kanalların epitelindeki hücreler prizmatik ve kübik hücrelerdir. Uzun boylu hücrelerinde silyum bulunurken, kısa boylu hücrelerinde çok sayıda mikrovillus, apikal sitoplazmalarında bol miktarda lizozom, mikropinositotik vezikül ve membranla sınırlı yoğun cisimler bulunur. Seminifer tübüllerden salgılanan sıvının büyük bir

bölümü, bu hücreler tarafından geri emilir. Bazal membrana komşu yerleşen kübik şekilli bazal hücreler ise , diğer hücelere dönüşebilen kök hücrelerdir. Ayrıca elastik lif içeren sirküler ince bir kas tabakası bu kanalı kuşatmaktadır. Bu kas tabakası ve silyumların hareketi, spermlerin bu kanallar boyunca ilerlemesini sağlar (25, 26).

2.3.7. Epididimis

Bu organ duktus efferentes ve duktus epididimisten oluşur. Testislerin arka yüzü boyunca uzanan bu yapı, **baş, gövde** ve **kuyruk** olmak üzere üç bölümden oluşur. Baş kısmında efferent duktus bulunur. Duktus epididimis ise, son derece kıvrımlı, uzun bir kanal olup, epididimisin gövde ve kuyruk kısmında bulunmaktadır. Bu kanalı saran sıkı bağ dokusu, kan damarları ve düz kas hücreleri bakımından zengindir. Yalancı çok katlı sterosilyalı prizmatik epitel, **bazal hücreler** ve **esas hücrelerden** oluşur. Esas hücreler, çok sayıda uzun sterosilyalara sahip, uzun boylu prizmatik hücrelerdir. Sitoplazmalarında yaygın granüller ve agranüler endoplazmik retikulum ağı ve belirgin bir Golgi kompleksi bulunur. Bazal hücreleri, kök hücre özelliğindedir. Epitel içinde, **Halo hücreleri** adı verilen lenfositlere rastlanabilir. Baş ve gövde bölümlerinde bağ dokusu dışında sirküler düz kas tabakası bulunur (22, 25).

Duktus epididimis, spermlerin, bu bölümden geçerken hareket ve fertilitate yeteneği kazandıkları özel bir kanaldır. Ayrıca, duktuli efferentesten geriye kalan absorbe edilmemiş sıvının geri emilimi ve Sertoli hücreleri tarafından ortadan kaldırılmamış artık cisimlerin ve dejenere spermlerin fagosite edilmesi gibi olaylar burada gerçekleşir. Esas hücreler, sperm olgunlaşmasını sağlayan siyalik asit, gliserofosfokolin ve glikoproteinleri salgılar (25).

2.3.8. Duktus Deferens

Epididimis kuyruğunun devamı olup, kalın duvarlı müsküler bir borudur. Testisin arka yüzünden aşağı doğru uzanıp, spermatik kordonun bir elemanı olarak inguinal kanaldan geçip karın boşluğuna ulaşır. Mesane seviyesinde genişleyerek ampulla kısmını oluşturur ve bu yapının son kısmında seminal vezikülün kanalları da katılır. Duktus deferens daha sonra prostata girer ve üretraya açılır. Prostata giren segmente **ejekulatuvar duktus** adı verilir. Epiteli, yalancı çok katlı prizmatik epitelidir ve hücrelerinin çoğunun yüzeyinde sterosilyum bulunur. Epitel altında elastik liflerden zengin lamina propria bulunur. Mukoza, lümeneye doğru katlantılar yaptığı için lümen

düzensiz görülür. Kas tabakası, içte ve dışta longitudinal, orta sirküler seyreden kas liflerinden oluşmuş kalın bir tabakadır (25).

2.3.9. Duktus Ejakulatoryus

Yaklaşık 1 cm uzunluğunda, basit prizmatik epitelle döşeli, kısa ve düz bir kanaldır. Prostat bezine girer ve prostatik üretraya açılır. Mukoza lümenine doğru katlantılar yapar. Duvarında düz kaslar bulunmaz (27).

2.3.10. Vesikula Seminalis

Yaklaşık 15 cm uzunluğunda, kıvrımlı ve tübüloalveolar yapıya sahip bir çift olan bu bezlerin iç kısmında, lümenine doğru uzanan salgı epitelinin döşediği bağ dokusu girinti ve çıkıntıları bulunur. Çok ince katlar oluşturan mukozaya, dallı ve birbirine bağlantılar oluşturan petekli bir görünüme sahiptir. Labirent şeklinde izlenen lümeni yalancı çok katlı epitelle döşelidir. Kısa, bazal hücreler ve prizmatik hücreler içerir. Epitelin yüksekliği testosteron hormonuna bağlı olarak değişir. Bazı hücreler mikrovillus içerirken, bazılarında tek bir flagellum vardır. Hücreler bol silindirik mitokondriyon, granüllü endoplazmik retikulum ve Golgi kompleksi içerir. Yoğun salgı granülleri vardır. Epitelin altında fibroelastik bağ dokusu ve bu dokunun altında, içte sirküler dışta longitudinal kaslar bulunur. En dış kısımda ise bağ dokusundan bir kapsül yer almaktadır (27, 36, 37).

İnsanda ejakülataın %70'lik bölümü bu bezin salgısıdır. Bu bezler, visköz, sarımsı renkte, spermatozoonları aktive eden sitrat, inozitol, prostoglandinler ve çeşitli proteinler gibi maddeleri içeren bir salgı üretir. Bu salgıda ayrıca bol miktarda fruktoz bulunur ve spermatozoonlar bu monosakkarid sayesinde, hareketleri için gerekli enerjiyi elde ederler (36).

2.3.11. Prostat Bezi

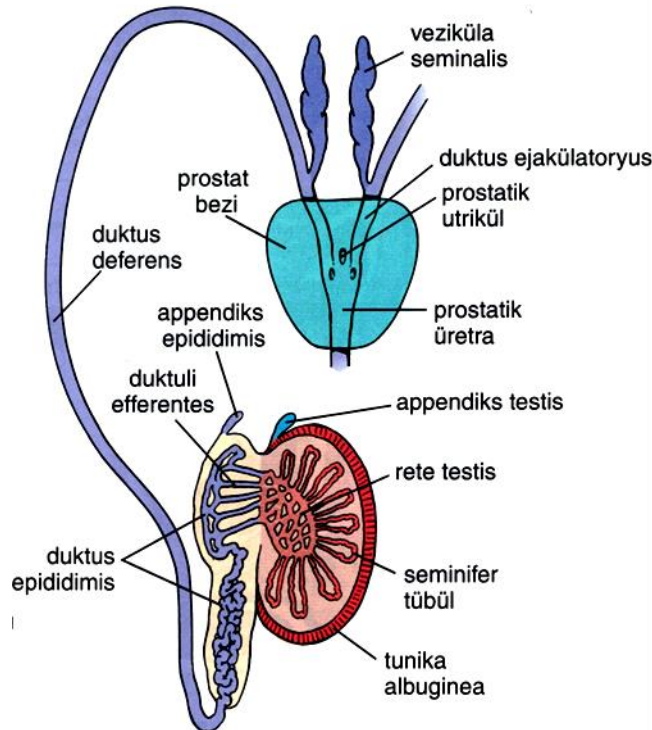
Normal erişkin prostatı kestane boyutunda ve yaklaşık 20 gr ağırlığındadır. Retroperitoneal yerleşim gösteren bu organ, mesane boynu ve üretranın çevresini sarar. Çeperinde ince, belli belirsiz bir fibroelastik bağ dokusu kapsülle karışık düz kas ve arka tarafında ise ejakülator kanalların girişi bulunur. 30-50 adet dallanmış tübüloalveoler bezden oluşur ve bu bezlerin kanalları prostatik üretraya boşalır. Prostatta bulunan üç ayrı bölgeden **birincisi**, bez hacminin %25 ' ini kaplayan merkezi bölgedir (santral kuşak). Bu bölgenin epiteli yalancı çok katlı epitelidir. Bezin %70'ini

kaplayan **ikinci bölge** periferik bölgedir (perifer kuşak) ve prostat kanseri bu bölgede gelişir. **Üçüncü bölge** geçiş bölgesidir (geçiş kuşağı) ve bu bölge, iyi huylu prostat hiperplazilerinin büyük bir bölümünün kaynaklandığı bölgedir (36, 37).

Prostat bezlerinin lümeninde sıklıkla çapı 0.2-2 mm olan, glikoprotein yapılı, küçük küresel cisimcikler bulunur. Bunlar **prostat taşları** veya korpora amilasea olarak adlandırılır. Önemi anlaşılmamış olmakla birlikte, sayıları ilerleyen yaşla birlikte artmaktadır. Prostat bezi epiteli yalancı çok katlı epiteldir ve bazal hücreler ile salgı yapan hücrelerden oluşur. Prostat salgısı, ejakülat sıvının yaklaşık %15'ini oluşturur ve asit fosfataz, amilaz ve fibrinolizinden çok zengindir (36, 38).

2.3.12. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri)

Çapları 3-5 mm olan ve üretranın membranöz kısmının proksimalinde yerleşerek buraya boşalan bezlerdir. Bu bezler, mukus salgılayan tek katlı silindirik epitelle döşeli tübüloalveolar bezlerdir. Fibroblast, düz kas ve çizgili kas içeren bir kapsülü vardır. Ve kapsülden ayrılan bölmeler bezi loblara ayırır. Bezin salgısı, kayganlaştırıcı işlevi gören berrak bir mukustur (Şekil 2.6) (27, 36).



Şekil 2.6. İntratestiküler ve boşaltım kanal sistemi (22).

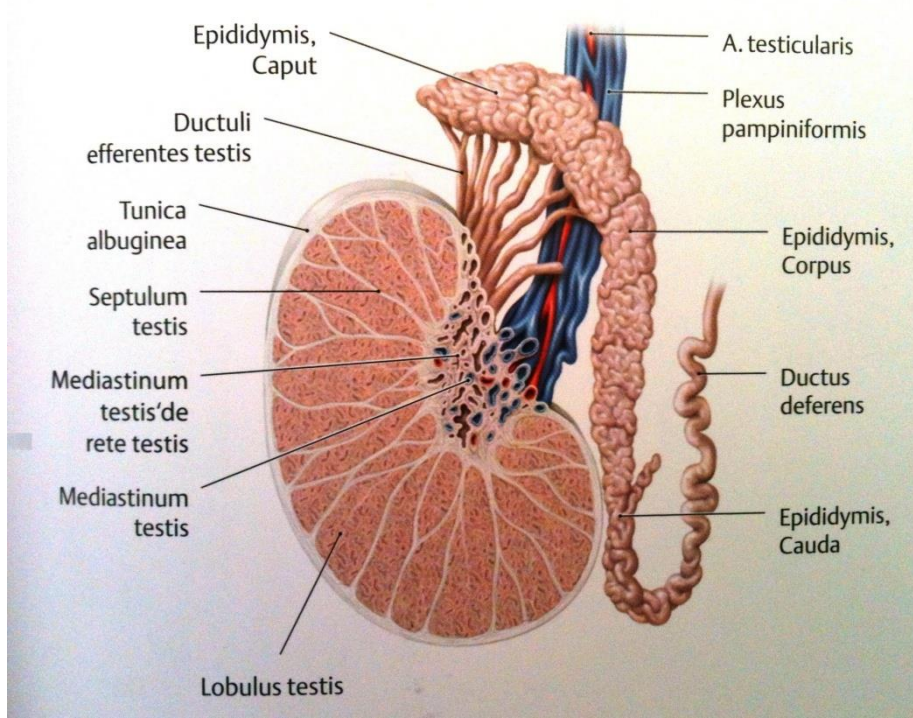
2.4. Testis Anatomisi

Erişkin bir erkeğin testisi 4x3, 5x3 cm boyutlarındadır. Testisler ovoid şekilli gonadlardır. Her birinin hacmi 30 ml kadardır. Testisin anterolateral 2/3 bölümü serbest iken, posterolateral yüzü epididim, bağ dokusu ve damarlarla örtülüdür. “**Mediastinum testis**” olarak isimlendirilen kranioposterior kısmından, seminal taşıyıcılar çıkar (39).

Testis, **tunika albuginea** adı verilen kompakt bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bu tabaka; fibroblastlar ve kollajenden yoğun bir yapıdadır. Tunika albuginea'nın altında nispeten daha gevşek bağ dokusu yapısında, **tunika vaskulosa** adı verilen damarsal bir tabaka yer alır. Tunika albuginea testisin arkasında kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Burada tunika albugineanın iç yüzünden çıkan fibröz septalar testisi yaklaşık 250 adet, piramit biçimli lobüllere ayırır. Herbir lobülün içinde bir ile dört arasında değişen sayıda kıvrımlı seminifer tübül bulunur. Seminifer tübüller ise **rete testis** diye isimlendirilen kanal ağına açılırlar. Tunika albuginea'nın üzerinde peritonun uzantısı olan **tunika vaginalis** yer almaktadır. Tunika vaginalis iki yapraklıdır. Anteriorda, testise yakın olan ve epididimi çevreleyen kısmına **viseral tabaka**, daha dışta yer alan kısmına ise **paryetal tabaka** adı verilir. Bunların da dışında sırasıyla, **fascia spermatica interna, musculus cremaster, fascia spermatica externa, tunika dartos** ve **cilt** yer alır. Spermatic kord; duktus deferens, duktus deferensin arter ve veni, testiküler arter, plexus pampiniformis, plexus deferentialis, processus vaginalis peritonei, musculus cremaster, arteria cremasterica, vena cremasterica, lenf damarları, ilioinguinal sinir ve genitofemoral sinirin genital dallarından oluşur. Tüm bu oluşumlar birbirine gevşek bir bağ dokusuyla bağlanmış ve dıştan kas lifleri ile **fascia spermatica externa, fascia cremasterica, fascia spermatica interna** adı verilen zarlarla sarılmıştır (40). Testisin ana damarı aortanın ön yüzünden ve böbrek arterinin yaklaşık iki-üç cm altından çıkan testiküler arterdir. Bu damar iç kasık halkasına kadar retroperitoneumda ilerleyip spermatic kord yapıları arasına katılır. Tek veya dallara ayrılan testiküler arter, testis arka yüzüne ulaşarak oblik biçimde tunika albugineayı geçer. Sonra ana dallar bölünerek ilerler ve seminifer tübüller arasında yer alan interlobüler arteriollerini oluşturur. Ana damar testiküler arter olmasına karşın, kremasterik, vazal ve epididimal arterlerle testiküler arter arasında birçok anastomoz görülebilmektedir.

Testisin venöz drenajı kapiler ile başlar ve testis dışında **plexus pampiniformis**'i meydana getirirler. Çoğunlukla iç kasık halkası seviyesinde bu venler birleşerek

testiküler veni oluştururlar. Sağ testiküler ven, sağ böbrek veninin dört-beş cm kadar altından vena kava inferiora, sol testiküler ven ise sol böbrek venine açılır. Testisin innervasyonu asıl olarak sempatik postganglionik ve viseral afferent sinirlerle olmaktadır. Sinirler genelde damarları takip ederek testise ulaşırlar. Tunika albuginea dışında dallara ayrılan sinirler interstisyuma kan damarları ile birlikte ulaşırlar. Testis lenfatikleri, seminifer tübüller etrafında görülmeyen lenfatik kapillerlerle interlobüler septadan başlar. Daha sonra spermatik kordu takip ederek paraaortik, interaortokaval ve perikaval lenf düğümlerine açılırlar (Şekil 7) (39, 40).



Şekil 2.7. Testisin anatomik yapısı (41).

3. MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada; İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilen, canlı ağırlığı ortalama 200-250 g olan, 9 haftalık 30 adet erkek Wistar albino sıçan kullanıldı. Sıçanlar sıcaklığın 21°C ve nemin %55-60 olduğu, havalandırması olan bir ortamda, 12 saat aydınlık (08:00–20:00) 12 saat karanlık, gün ışığı ritmindeki odada bırakıldılar. Kafesler içinde standart pellet yem ile beslendiler ve çeşme suyu aldılar. Çalışmamız için İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi etik kurulundan (Etik kurul no: 2014/A-06) onay alındı. Rastgele seçilen denekler 2 gruba ayrıldı. Deney süresince ilaç gurubundan iki hayvan telef oldu.

3.1. Deney Grupları

1. Kontrol grubu: Bu gruptaki hayvanlara 0,2 ml serum fizyolojik (SF) insülin enjektörü ile intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. (n=15)

2. Seftriakson grubu: Bu gruptaki hayvanlara 1000 mg toz seftriakson, 200 mg/kg değerine göre 4 ml enjeksiyonluk su ile çözdürülüp 0,2 ml ilaç insülin enjektörü ile intraperitoneal (i.p.) olarak uygulandı. (n=15).

Tüm uygulamalar her gün 11:00-12:00 saatleri arasında 10 gün süreyle yapıldı. Deney başlangıcında ve sonunda, hayvanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Ketamin ve ksilazin (1.2-1.4 g/kg) anestezisi altında sakrifiye edildi. Her sıçanın kalbinden Eliza testi için ortalama 5 ml kan alındı. Alınan kanlar deney tüpüne aktarıldıktan sonra 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar testesteron seviyesi ölçümü için eppendorflara alındıktan sonra soğutucuya konuldu. Hayvanların testis ve epididimisleri alınıp, ağırlıkları ölçüldü. Sol testislerin yarısı alınarak Bouin solüsyonuna konulurken, testislerin diğer yarısı biyokimyasal çalışmalar için derin dondurucuya alındı. Sağ testisler histolojik çalışmalar için % 10 formalin solüsyonuna konuldu.

3.2. Histolojik Analiz

Bouin solüsyonu içerisinde 24 saat kalan dokuların fiksasyon işleminin bitmesini takiben yükselen dereceli alkollerde (%80, %96, %96, %100) 1 saat dehidrate edilerek, ksilende 2 saat şeffaflaştırılıp, sıvı parafinde 3 saat (1.5+1.5) bekletildikten sonra parafine gömüldüler. Fikse olması için %10'luk nötral tamponlanmış formaline (NTF) konulan örnekler fiksasyon işleminin bitmesini takiben 24 saat boyunca akan çeşme suyunda yıkandılar. Daha sonra yükselen dereceli alkollerde (%70, %80, %96, %100) dehidrate edilerek, ksilende şeffaflaştırılıp parafine gömüldüler. Parafin bloklardan Leica RM 2145 marka mikrotom yardımıyla 5 µm'lik kesitler, ışık mikroskopik ve immunohistokimyasal yöntemler için polilizinli lamlara alındı. Hazırlanan bu lamalar dokunun lama adezyonunu artırmak için 37°C'lik etüvde 2 saat bekletildi. Kesitlere genel histolojik yapıyı gözlemek amacıyla Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi uygulandı. Ayrıca oluklu bağlantı bileşenlerinden konneksin 43' ün gösterilmesi için anti-konneksin 43 / GJA1 antikoru, apoptotik hücreleri belirlemek için ise TUNEL immünohistokimyasal boyama yöntemleri olarak kullanıldı. Preparatlar Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win görüntü analiz sistemi (Leica Microscope Imaging Solution Ltd, Cambridge, UK) ile incelenerek skorlandı, fotoğrafları çekildi.

Kesitlere uygulanan boyaların prosedürleri (42):

Hematoksilen-Eozin Boyama

Ksilen-----5 dk.+ 5 dk. + 5 dk.
Absolü Alkol-----3 dk.
Alkol 96 °-----3 dk.
Alkol 80 °-----3 dk.
Alkol 70 ° -----3 dk.
Distile su -----5-10 sn çalkalanır
Hematoksilen -----12-13dk.
Çeşme suyu -----25 dk.
Eozin -----2 dk.
Alkol 96 ° -----3 dk. + 3 dk.
Absolü Alkol -----3 dk. + 3 dk. + 3 dk
Ksilen -----5 dk. + 5 dk. + 5 dk.
Kesitler Kanada balsamı ile kapatıldı.

3.3. Anti-konnexin 43 / GJA1 İmmun Boyaması

İmmünohistokimya Boyama Prosedürü:

Anti-konnexin 43 / GJA1, parafin kesitlere her bir antikor için ayrı uygulanan Streptavidin-Biotin-Peroksidaz yöntemi boyama işlem sırası:

1. Kesitler 60°C'de 1 saat etüvde deparafinize edildi. Kesilende 15 dakika bekletilen kesitler daha sonra inen alkol serilerinden (%100 - %70) geçirilip, distile suya alındı.
2. Distile suda 5-10 dakika bekletilen kesitler, antijen retrieval aşaması için hazırlandı.
3. Kaynayan sitrat tamponu içine alınan kesitler, 7 dakika sitrat ile muamele edildi. Kesitler tampon içinden çıkarılmadan soğumaya bırakıldı.
4. Soğuyan kesitler önce distile su ile, daha sonra fosfat buffer solusyon (PBS) ile 1-2 dakika yıkandı.
5. Yıkama işleminden sonra doku kesitlerinin sınırları hidrofobik kalem (pappen) ile çizildi ve kesitler platforma dizildi.
6. Kesitlere hidrojen peroksit (peroxide block) damlatılarak 10 dakika beklendi. Ortamın sıcak olması için kaynamış su platforma kondu ve kapağı kapatıldı. Ardından hidrojen peroksit silkelenerek kesitler PBS ile 3 kez, 5 dakika yıkandı.
7. Kesitlerin yüzeyine protein block damlatıldı ve 5 dakika bekletildi. Ardından kesitler çok iyi silkelenerek protein blok uzaklaştırıldı. Kesitler yıkanmadan diğer aşamaya geçildi.
8. Kesitlere primer antikor damlatılarak 2 saat bekletildi. Daha sonra PBS ile 3 kez, 5 dakika yıkandı.
9. Sekonder antikor ile 10 dakika muamele edildikten sonra, PBS ile 3 kez, 5 dakika yıkandı.
10. Streptavidin-Peroksidaz kompleksinde 10 dakika muamele edildi. Daha sonra PBS ile 3 kez, 5 dakika yıkandı.
11. Substrat-kromojen (AEC; 3, aminoetil 9, karbazol) solüsyonu ile 3-5 dakika inkübe edildi (*Renk reaksiyonu gözlenene kadar*).
12. PBS ile 3 kez, 5 dakika yıkandı.
13. Distile suda çalkalandı.
14. Kesitlere Mayer's hematoksilen boyası yapıldı (1 dakika).
15. Çeşme suyunda yıkandı.
16. Distile suda yıkandı.
17. Kesitler yıkama işleminden sonra su bazlı kapatma maddesi ile kapatıldı.

3.4. Tunel Metodu

Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi. Boyama metodu aşağıda ayrıntılı olarak verilmiştir. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Leica DM500- DFC 295) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı.

Pozitif kontrol için sıçan meme dokusu kullanıldı. Negatif boyamada çalışma solüsyonu yerine Reaksiyon Buffer uygulandı.

TUNEL boyama prosedürü:

İşlem	Süre
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15 dakika
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.
6 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7 PBS	3X5 dakika
8 Endojen peroksidaz blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9 PBS	3X5 dakika
10 Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11 Çalışma solüsyonu (%70 Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12 Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3X5 dakika
15 DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3X5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Hematoksilen	1-5 dakika
19 Distile su	5 dakika
20 %80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21 Xylol	2X5 dakika
22 Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.

3.5. Histolojik Değerlendirme

H-E ile boyanmış preparatlarda seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıkları ölçüldü. Ölçümler, H-E boyama metodu ile boyanmış her preparattan 100 adet seminifer tübül incelenerek gerçekleştirildi. Histolojik skorlama; sağlam, dökülmüş (farklı gelişim aşamalarındaki spermatogenik hücrelerin lümende izlenmesi), atrofiye (seminifer tübül epitelinde birkaç tane spermatogenik hücrenin bulunması ya da hiç bulunmaması), çok çekirdekli dev hücreli (seminifer tübül lümeninde ya da lümene yakın epitel içerisinde çok çekirdek içeren büyük hücrelerin izlenmesi), duraksamış ve dejenere hücreli (spermatogenik gelişim evrelerinin erken dönemlerinde, bölünme sırasında duraksamış veya dejenere spermatositler içeren) tübüller olarak sınıflandırıldı.

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler ise apoptotik olarak değerlendirildi. Kesitlerde X10'luk büyütmede rastgele seçilen alanlarda, normal ve apoptotik en az 500 hücre sayıldı. Apoptotik hücrelerin, toplam (normal + apoptotik) hücrelere oranlanması ile apoptotik indeks (AI)'i hesaplandı. [Apoptotik indeks (APOİ)=Apoptotik nükleus sayısı/Toplam hücre sayısı x 100]. Konneksin 43 boyanma aktivitesi, tübüllerin boyanma yoğunluğu ve lokalizasyonuna göre X20 objektif büyütmesi kullanılarak değerlendirildi ve gruplar karşılaştırıldı.

3.6. Sperm Analizi

Sağ ve sol epididimis, 10 ml'lik petri kabında 1 ml Earle's Balanced Salt Solution dış ortam mediumunda diseksiye edildi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildikten sonra merkezinde herbiri 0.1x0.1 mm'lik 100 kareye bölünmüş 1mm² ince klavuzlar bulunan makler kamarası üzerine bir damla sperm süspansiyonu damlatıldı, X20 büyütme altında 10 küçük kare sayılarak bir milyon ile çarpıldı ve spermlerin canlı, ölü sayıları ve motilitesi hesaplandı. Sperm morfolojisi için Spermak boya prosedürü uygulandı (43-45).

Spermak boyama prosedürü:

Spermak boyama kiti 3 boyama solüsyonu ve bir fiksatiften oluşmaktadır.

1. Likefiye olmuş semenden bir damla alınıp bir lam üzerine ince bir film tabakası şeklinde dilüe edilmeden yayılıp en fazla 5 dakika hava ile teması sağlanır.

2. Preperat en az 5 dakika şale içerisinde bulunan fiksatif içerisinde bekletilir. (Bu süre uzatılabilir.)
3. Bir kap içerisinde bulunan distile suya 5-6 kez daldırılarak yıkanır. Suyun fazlası kurutma kağıdı kullanılarak alınır ve bir miktar kuruması beklenir. Fazla kurutulmamalıdır.
4. A boyası 1-2 dakika boyanır. Yıkama yapılır.
5. B boyası 1-2 dakika boyanır. Yıkama yapılır.
6. C boyası 1-2 dakika boyanır. Yıkama yapılır.
7. Preperat havada kurumaya bırakılır.
8. Immersiyon yağı kullanılarak X100 büyütme mikroskopta preperat incelenir.

Tüm preparatlar, Viggiano ve arkadaşları (45) tarafından 1996 'da, Saether ve arkadaşları (46) tarafından 2007 'de yapılan çalışmaya uygun olarak sperm yoğunluğu, sperm motilitesi, sperm morfolojisi yönünden değerlendirildi. Sperm anomalileri baş ve kuyruk anomalileri olmak üzere iki grupta analiz edildi. Sperm başının normal çengelli yapısının bozulması, şeffaf ve oval görünümü 'amorfs baş' olarak, baş yapısının küçük ve toplu iğne başı şeklinde olması 'küçük baş (pinhead)' olarak değerlendirildi. Sperm kuyruk yapısında ise kuyruğun uç kısmı kopmuş olanlar 'kırık kuyruk', kuyruğun kendi etrafında bükülmesi ise 'eğri kuyruk' olarak değerlendirildi.

3.7. Biyokimyasal Analizler

MDA seviyeleri homojenatta; KAT ve GSH-Px aktiviteleri süpernatanda; SOD aktivitesi etanol/kloroform ekstraktında ölçüldü. Enzim aktivitelerinin ölçüldüğü süpernatandan veya ekstraktlarda protein miktarı belirlendi.

3.7.1. Dokuların Biyokimyasal Analizlere Hazırlanması

Derin dondurucuda saklanan dokular analiz günü çıkarılarak tartıldı. Soğuk SF ile dokular yıkandı. Makas ile küçük parçalara ayrılarak homojenize edilmek üzere cam tüplere konulan mide dokularına 2 ml Tris-HCl (pH=7.4) tamponu eklendi. Buz doldurulmuş plastik kap içerisine yerleştirilen cam tüpteki doku 16.000 devir/dk hızda 3 dakika homojenize edildi (IKA, Germany). Son hacim Tris-HCl tamponuyla 5 ml'ye tamamlandı. Karıştırıldıktan sonra homojenatın bir kısmı MDA ölçümü için ependorf tüplerine aktarıldı. Homojenatın bir kısmı GSH-Px aktivitesi için 3220 rpm'de +4°C'de 30 dakika santrifüj edildi. Geriye kalan kısmı da KAT aktivitesi için 10 sn süreyle 3 kez santrifüj edildikten sonra aynı şekilde santrifüj edildi. Elde edilen süpernatantların

bir kısmı GSH-Px ve KAT enzim aktiviteleri ölçümü için, bir kısmı da SOD enzim aktivite ölçümü için ekstraksiyona tabi tutuldu. Etanol fazında SOD enzim aktivitesi ölçüldü.

3.7.2. Süperoksit Dismutaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

Süperoksit dismutaz (SOD, EC 1.15.1.1) aktivitesi Sun ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edildi (47). Bu metotta SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksidin nitrobluetetrazolium'u (NBT) indirgemesi esasına dayanır. Oluşan süperoksit radikalleri NBT'yi indirgeyerek renkli formasyon oluşturur. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbanı verir. Ortamda SOD enzimi bulunması halinde NBT indirgenmesi gerçekleşmeyip, enzim miktarı ve aktivitesine bağlı olarak açık renk oluşmaktadır. Enzimin bulunmadığı ortamda ise bu indirgeme meydana gelip mavi-mor renk oluşmaktadır.

1 U SOD, NBT redüksiyonunu %50 inhibe eden enzim aktivitesidir. Sonuçlar U/mg protein olarak ifade edildi.

3.7.3. Katalaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

Katalaz (KAT, EC 1.11.1.6) aktivitesi Aebi'nin yöntemine göre yapıldı (48). Deneyin prensibi hidrojen peroksidin (H_2O_2) parçalanma hız sabitinin (s^{-1} , K) tayinine dayanmaktadır. Deney ortamına eklenen H_2O_2 , KAT enzimi tarafından su ve oksijene parçalanmaktadır. Bu reaksiyon UV spektrofotometrede absorbanı azalması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Absorbansdaki bu azalma KAT enzim aktivitesiyle doğru orantılıdır. H_2O_2 'in UV spektro analizinde maksimum absorbanı verdiği dalga boyu 240 nm olduğundan ölçümler bu dalga boyunda yapıldı.

Aktiviteler K/g protein olarak ifade edildi.

3.7.4. Glutasyon Peroksidaz Enzim Aktivite Ölçümü

Glutasyon peroksidaz (GSH-Px, EC 1.11.1.9) aktivitesi Paglia ve arkadaşlarının metoduna göre ölçüldü (49). Metodun temeli, ortamda bulunan NADPH'ın enzim aktivitesiyle ortamdan uzaklaştırılması sonucu 340 nm'de absorbanı azalmasına dayanmaktadır. Deney ortamında redükte glutasyon (GSH), sodyum azid (NaN_3), glutasyon redüktaz, NADPH en son ilave edilmek üzere substrat H_2O_2 vardı. Enzim tarafından ortamdan uzaklaştırılan H_2O_2 başına $NADPH \rightarrow NADP^+$ döngüsü gerçekleşmektedir. Bu nedenle birbir etkileşim söz konusudur. O halde enzim

aktivitesi ile birim zamanda oluşan NADP+ miktarını gösteren absorbans azalması doğru orantılıdır.

$$\text{Hesaplama: } U/L = [(\Delta A/t)/6.22 \times 10^{-6}] \times (1/0.02)$$

GSH-Px enzim aktivitesi U/mg protein olarak ifade edildi.

3.7.5. Lipid Peroksidasyonu Ürünlerinin (MDA) Ölçümü

Uchiyama ve arkadaşlarının metoduna göre yapıldı (50). Metodun prensibi; MDA'nın tiyobarbitürik asit ile 95°C'de reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli ürünün tespitine dayanmaktadır. N-butanol fazından ekstrakte edilerek oluşan rengin şiddeti, spektrofotometre ile 535 ve 520 nm'de ölçüldü. 1,1,3,3 Tetrametoksipropan ile hazırlanan değişik konsantrasyonlardaki standartlar ve bunlardan çizilen standart grafiği ile sonuçlar değerlendirildi. Sonuçlar nmol/g yaş doku olarak ifade edildi.

3.7.6. Doku Süpernetantından TAS –TOS ve OSI Analizi

TAS (toplam antioksidan durum) ölçümü Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader ve TAS kit seti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit ile asidik bir ortamda (asetat buffer 30 mmol/L; pH 3.6) sadece hidrojen peroksidi kullanarak redükte ABTS (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) molekülü, ABTS^{•+} okside forma dönüşür. Asetat buffer solüsyonundaki konsantre (koyu yeşil) ABTS^{•+} molekülleri uzun bir süre daha kararlı kalır. Yüksek pH daha yoğun bir asetat buffer (asetat buffer 0,4 mol/L; pH 5,8) ile dilüe edildiği zaman, rengi yavaş yavaş kendiliğinden daha açık hale dönüşür. Analiz yapılan örnekteki mevcut antioksidanlar konsantrasyonlarıyla orantılı olarak bu renkteki azalmayı bir dereceye kadar arttırır. Bu reaksiyon spektrofotometrik olarak izlenebilir ve renkteki açılma oranı örnekteki toplam antioksidan kapasitesi ile (TAC) orantılıdır. Mikroplate reader da 660 nm'de okunan absorbans değişimindeki deney sonuçları TAC ölçüm testleri için kullanılan standart antioksidan ve bir vitamin E analogu olan trolox solüsyonuyla kalibre edilir . Sonuçlar mmol Trolox Equivalent /M biriminde ifade edilir (51).

TOS (toplam oksidan durum) ölçümü Biotek HT Snynergy Gen 5 yazılımlı immuno plate reader ve TOS kit seti (Rel Assay Diagnostics, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu kit ile örnek mevcut oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksi ferrik iyon oksitler. Oksidasyon reaksiyonu reaksiyon mediumunda bulunan gliserol

moleküller tarafından gerçekleştirilir. Asidik ortamda ferrik iyonlar xyleneol orange ile renkli bir kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen, renk yoğunluğu örnekteki toplam oksidan molekül miktarı ile orantılıdır. Deney, hidrojen peroksit ile kalibre edilir ve sonuçlar, litre başına mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri cinsinden ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ equivalent/L) ifade edilir (52).

Oksidatif stres indeksi (OSI), oksidatif stres derecesinin bir indikator parametresi olup, hesaplanması formüldeki gibidir. Total Antioxidant Status ve Total Oxidant Status Kitlerini kullanarak OSI hesaplanabilmektedir.

$$\text{OSI} = \frac{\text{TOS, } \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}}{\text{TAS, } \mu\text{mol Trolox Equivalent/L}}$$

Doku homojenat ve süpernatant ekstraktlarında protein tayini:

Kullanılan reaktifler: A reaktifi: 20 mmol CuSO_4 , 34 mmol Na_3Sitrat , B reaktifi: 0.19 mmol Na_2CO_3 , 0,1 mol NaOH ve Folin-Ciocalteu-Fenol (FCF) reaktifleri kullanıldı.

Deneyin prensibi: Protein miktarı Lowry metoduna göre tayin edildi (53). Bu yöntemde, alkali çözeltide bakır-protein kompleksi oluşarak fosfomolibdat-fosfotungstat reaktifini (Folin-Ciocalteu-Fenol reaktifi) redükler ve koyu mavi bir renk oluşur. Burada rengin koyuluğu ortamdaki protein konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Folin reaktifinin ilavesinde şunlara dikkat edilmesi gerekmektedir: Bu reaktif sadece asit ortamda dayanıklıdır. Fakat ifade edilen bu redükleme ise pH 10'da oluşmaktadır. Bu yüzden folin reaktifi süratle alkali bakır-protein çözeltisine ilave edilmeli ve vortekslenmelidir. Bu uygulama ile fosfomolibdat-fosfotungstat (folin) reaktifi parçalanmadan önce redüklenme olayı gerçekleşir.

Deneyin yapılışı: Standart grafiği çizmek için konsantrasyonu bilinen sığır serum albümininden hazırlanmış çözeltiler kullanıldı. “OD – mg/mL protein konsantrasyonu” grafiği çizilerek protein değerleri bu grafikten okundu. Standart ve numuneler köre karşı 700 nm’de okundu.

	Numune	Kör
Numune	10 µL	-
Deiyonize su	490 µL	500 µL
C Reaktifi (5/1:B/A)	2.5 Ml	2.5 Ml

Karıştırılır, 5-10 dakika beklenir.

D Reaktifi (1/1:FCF/d.s.)	0.25 mL	0.25 Ml
---------------------------	---------	---------

30 dakika oda ısısında bekletilir ve 700 nm’de köre karşı OD okunur.

$$\text{Hesabı: Protein (mg/mL)} = (K_{st}/A_{st}) \times A_N$$

K_{st} : Standardın konsantrasyonu

A_{st} : Standardın absorpsiyonu

A_N : Numunenin absorpsiyonu

3.8. Eliza Testosteron Testi

Testosteron (rat) Eliza, DRG’nin ölçümünde sandiviç ELİZA yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde Testosteron (rat)’a spesifik monoklonal antibody ile kaplı 96 kuyucuklu plak kullanıldı. Kitin içeriğindeki konjüгат hariç, tüm solüsyonlar oda ısısına getirilerek çalışıldı.

Kit içerisinde mevcut olan standarta 1 ml standart dilüsyon tamponu eklenerek 1µg/ml stok standart solüsyonu hazırlandı. Daha sonra dilüsyon tamponuyla bu stok standarttan seri sulandırma yapılarak 0.39; 0.78; 1.56; 3.13; 6.25; 12.5; 25 ng/ml’ lik konsantrasyonlarda standartlar hazırlandı. Numuneler dilüsyon tamponu ile 30 kat dilüe edildi. İlk olarak 300 µl inkübasyon tamponu tüm kuyucuklara eklendi, 5 dk oda ısısında inkübe edildi. Plak daha sonra 2 kez yıkama tamponu ile yıkandı. Blank olarak belirlenen kuyucuklara 100 µl standart/ numune dilüsyon tamponu eklendi. Plak 2 saat oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 3 kez yıkama solüsyonu ile plak yıkandı. 100 µl antibody solüsyonu eklenip 1 saat oda ısısında inkübe edildi. Ardından plak 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı. 100 µl HRP solüsyonu eklendi. 30 dk tekrar oda ısısında inkübe edildi. Plak inkübasyon sonunda 3 kez yıkama solüsyonu yıkandı. Yıkamanın ardından 100 µl kromojen solüsyonu kuyucuklara eklenip 10dk inkübe

edildi. İnkübasyonun sonunda 100 µl stop solüsyonu kuyucuklara eklenerek reaksiyon durduruldu. Çalışma sonunda plak okuyucu yardımıyla 450 nm de okuması yapıldı. Kitin sensitivitesi 0.39 ng/ml' dir.

3.9. İstatiksel Değerlendirme

Araştırmalarımızın istatiksel olarak değerlendirilmesinde SPSS for Windows Version 17.0 yazılımı kullanıldı. Ölçülebilir değişkenlere ilişkin veriler, aritmetik ortalama ± standart hata (SE) ve median (Med)- (Min-Max) olarak sunuldu. Ölçülebilir değişken verilerinin normal dağılım gösterip göstermediği Shapiro Wilk normallik testi ile test edildi. Grupların karşılaştırılmasında Unpaired t test ve Mann-Whitney U testi, grupların kendi içindeki değişimlerinin test edilmesinde Paired t testi ve Wilcoxon testi kullanıldı. $P < 0.05$ istatiksel olarak anlamlı kabul edildi.

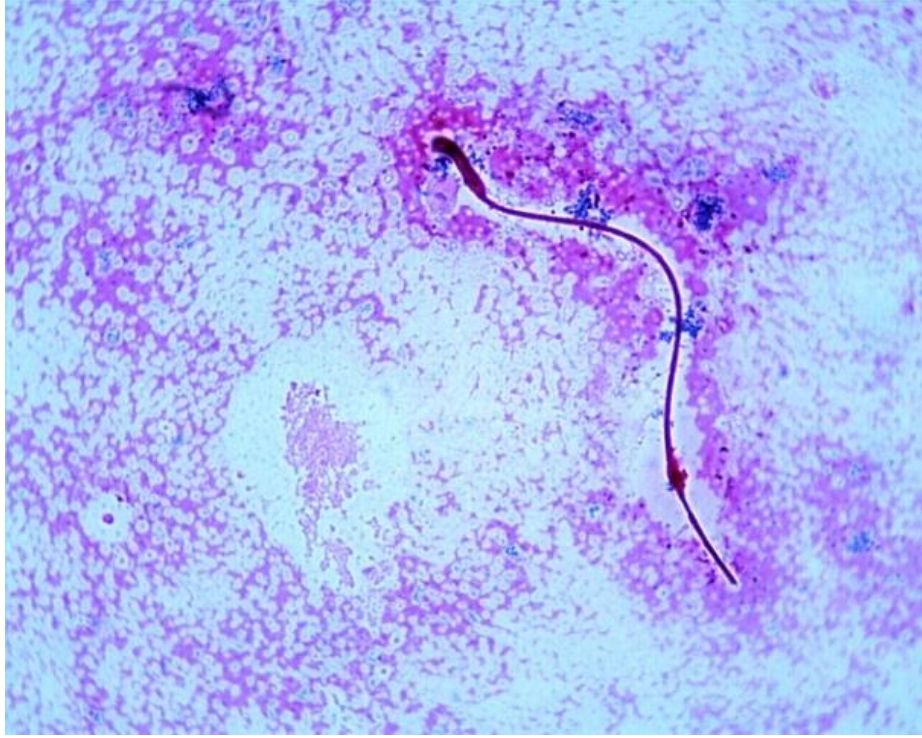
4. BULGULAR

4.1. Sperm Analizi

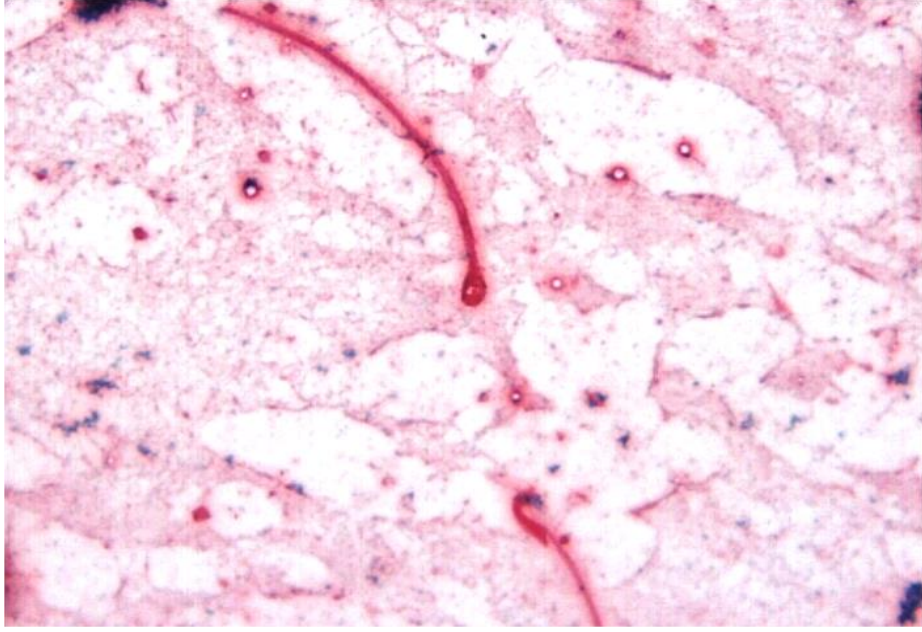
Kontrol grubunda 1 ml'deki sperm konsantrasyonu 56 ± 2.0 milyon, seftriakson grubunda ise 50 ± 2.2 milyon olarak hesaplandı. Seftriakson grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. Her kesitte incelenen 10 alandan, kontrol grubunda 78.6 ± 2.4 canlı, 21.4 ± 2.4 ölü sperm bulunurken, seftriakson grubunda 66 ± 2.9 canlı, 34 ± 2.8 ölü sperm sayıldı. Seftriakson grubunda ölü sperm sayısı, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede artmıştı ($p= 0.01$). Canlı ve ölü sperm sayısı belirlendikten sonra yüzde olarak motilite hesaplandı. Sperm motilitesi her iki grupta birbirine benzer olarak bulundu (kontrol; 70.2 ± 1.5 , seftriakson; 67 ± 2.2) ($p> 0.05$). Kontrol grubunda spermler; çengel şeklinde bir baş ve düzgün bir kuyruk yapısına sahip olarak izlendi (Resim 4.1). Histolojik görünümü normal olan spermlerin sayısı, seftriakson grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede azalmıştı ($p= 0.001$). Sperm başı anomalileri sınıfında incelenen amorf başlı spermlerin sayısı seftriakson grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttı ($p= 0.01$) (Resim 4.2). Diğer sperm anomalileri (pinhead, eğri kuyruk ve kırık kuyruk) seftriakson grubunda artmış olmasına rağmen, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p> 0.05$) (Resim 4.3, 4.4, 4.5). Sperm parametreleri Tablo 4.1 'de verilmiştir.



Resim 4.1. Kontrol grubu; normal sperm. Spermak; X40



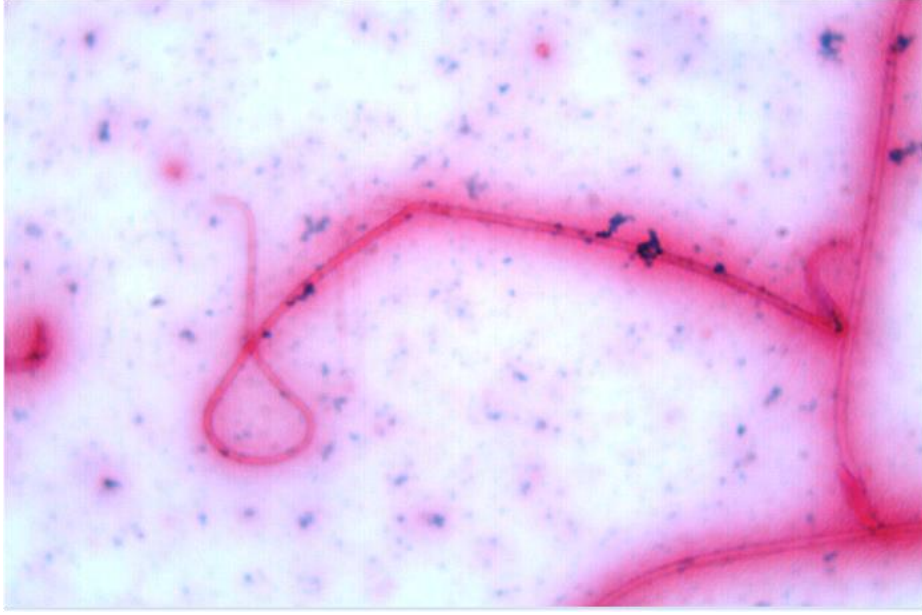
Resim 4.2. Seftriakson grubu; baş kısmı normal çengelli yapısını yitirmiş, oval ve şeffaf olarak izlenen amorf baş. Spermak; X100.



Resim 4.3. Seftriakson grubu; toplu iğne başı görünümlü küçük baş (pinhead). Spermak; X100.



Resim 4.4. Seftriakson grubu; kuyruğun son kısmı kopmuş olarak izlenen, kırık kuyruk. Spermak; X100.



Resim 4.5. Seftriakson grubu; sperm kuyruğunda bükülme ve kendi üzerine kıvrılma şeklinde ayırt edilen, eğri kuyruk. Spermak; X100.

Tablo 4.1. Grupların sperm parametreleri yönünden karşılaştırılması.

Gruplar		Konsantrasyon (milyon)	Canlı	Ölü	Oran	Motilite
Kontrol	X ± SE	56±2.0	78.7±2.4	21.4±2.4	4.2±0.6	70.3±1.5
	Med. (Min – Max)	5.7(47-67)	82(66-88)	18(12-34)	4.5(1.9-7.3)	69.5(64-80)
Seftriakson	X ± SE	50 ± 2.2	66±2.9	34±2.8	2.1±0.3	67±2.2
	Med. (Min – Max)	4.9 (39 -62)	69(50-74)	31(26-50)	2.3(1.0-2.8)	68.4(54-77)
P değerleri	P=	0.058	0.011	0.011	0.011	0.36

Gruplar		MorN	MorA	MorP	MorE	MorK
Kontrol	X ± SE	94.3±0.5	3.6±0.5	0.7±0.3	0.2±0.2	1.2±0.4
	Med. (Min – Max)	94(92-97)	4(1-5)	0(0-2)	0(0-2)	1.5(0-3)
Seftriakson	X ± SE	91.5± 0.35	5.5±0.5	0.9±0.5	0.3±0.2	1.8±0.4
	Med. (Min – Max)	91.5(90 -93)	5.5(4-8)	0 (0-4)	0(0-2)	2(0-3)
P değerleri	P=	0.01	0.016	0.96	0.58	0.24

Not: MorN: Morfoloji normal, **MorA:** Morfoloji amorf baş, **MorP:** Morfoloji pinhead(küçük baş), **MorE:** Morfoloji eğri kuyruk, **MorK:** Morfoloji kırık kuyruk.

4.2. Vücut Ağırlıkları

Deney başlangıcı ve deney sonu vücut ağırlık kazanımları bakımından; seftriakson grubu kontrol grubuna göre daha az ağırlık kazandı. Deney gruplarının, deney başlangıcı ve sonundaki kilo ağırlıkları ile kilo farkları **Tablo 4.2'** de verilmiştir.

Tablo 4.2. Grupların başlangıç- son vücut ağırlıkları.

Gruplar	Başlangıç kilo	Son kilo	Kilo farkı	P
Kontrol	162.3±3.79	188.9±4.62	26.5±1.18	0.17
Seftriakson	187.4±4.66	209.3±5.14	21.9±1.32	

4.3. Testis Ağırlıkları

Sıçanların deney sonu ortalama testis ve epididimis ağırlıkları sağ ve sol olarak ölçüldü. Seftriakson grubundaki sıçanların testis ağırlıklarında (sağ; 1 ± 0.1 g, sol; 1 ± 0.1 g) kontrol grubuna göre (sağ; 1.2 ± 0.1 g, sol; 1.2 ± 0.1 g) istatistiksel olarak önemli bir azalma gözlemlendi ($P=0.001$). Deney gruplarının testis ve epididimis ağırlıkları ve bu ağırlıkların gruplar arasındaki farkların istatistiksel değerlendirmeleri Tablo 4.3 'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Grupların sağ - sol testis ve epididimis ağırlıkları.

Gruplar		Sag testis	Sol testis	Sag epididimis	Sol epididimis
Kontrol	X \pm SE	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
	Med. (Min – Max)	1.2 (1 -1.7)	1.2(1-1.6)	0.4(0.3-0.5)	0.4(0.3-0.5)
Seftriakson	X \pm SE	1 ± 0.1	1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0.1
	Med. (Min – Max)	1(0.1-1.3)	1.1(0.7-1.2)	0.3(0.2-0.4)	0.4(0.2-0.6)
P değerleri		0.002	0.002	0.009	0.66

4.4. Işık Mikroskopik Bulgular

4.4.1. Seminifer Tübül Çapı ve Seminifer Epitel Kalınlığı

Kontrol grubunda, seminifer tübül çapları 300 ± 1.3 μm , germinal epitel yüksekliği ise 300 ± 0.5 μm olarak ölçülürken, seftriakson grubunda seminifer tübül çapı 260 ± 1.83 μm ; germinal epitel yüksekliği ise 260 ± 0.6 μm olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, seftriakson grubunda seminifer tubul çapı ve germinal epitel yüksekliği istatistiksel olarak anlamlı derece azalmış olarak bulundu ($p>0.05$). Seminifer tübül çapı ve germinal epitel yüksekliği Tablo 4.4' de verildi.

Tablo 4.4. Grupların seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıklarının (μm) karşılaştırılması.

Gruplar		Seminifer tübül çapı	Seminifer epitel kalınlığı
Kontrol	X \pm SE	300 \pm 1.3	300 \pm 0.5
	Mean(min-max)	315(252-389)	75(55-97)
Seftriakson	X \pm SE	260 \pm 1.83	260 \pm 0.6
	Mean(min-max)	307(233-412)	78(48-98)
P değerleri		0.006	0.002

4.4.1.1. Kontrol Grubu

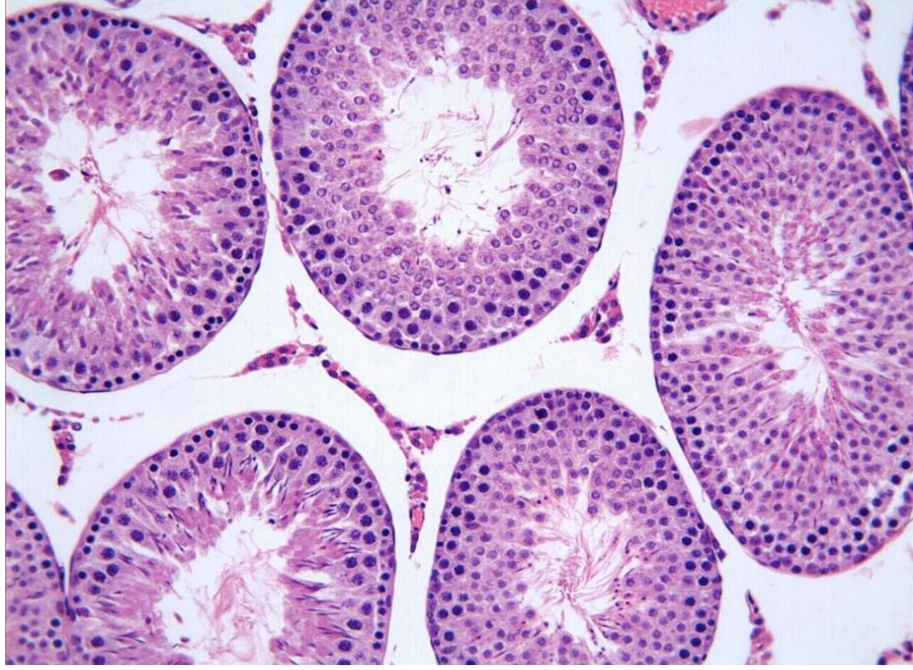
Seminifer tübüller gevşek bağ dokusu ile birbirinden ayrılmış, yuvarlak oval şekilli ve çok katlı epitel ile döşeli olarak gözlemlendi (Resim 4.6). Epitel belirgin bir bazal lamina üzerine oturmuş spermatogenetik hücreler ve Sertoli hücrelerinden oluşmaktaydı. Seminifer tübül epitelinde, ökromatik nukleuslu Sertoli hücreleri spermatogenik hücrelerden belirgin olarak ayırt edilmekteydi. Koyu yuvarlak ve oval şekilli nukleusları ile tanınan spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri ile birlikte bazal membranın hemen üzerinde yerleşmişlerdi. Primer spermatositler, büyük ve profaza özgülük nukleus görünümü ile diğer spermatogenik hücrelerden ayrılırken, spermatidler lümene yakın olarak izlendi (Resim 4.7).

Yüzde 93.3 \pm 1.4 tübül sağlam olarak izlenirken, sadece 6.6 \pm 1.4 tübül atrofik olarak olarak belirlendi. Kontrol grubunda atrofik, dev hücreli ya da dejenere hücreli tübüllere rastlanmadı. Seminifer tübüllerin mikroskopik sınıflandırılması Tablo 4.5 'de verildi.

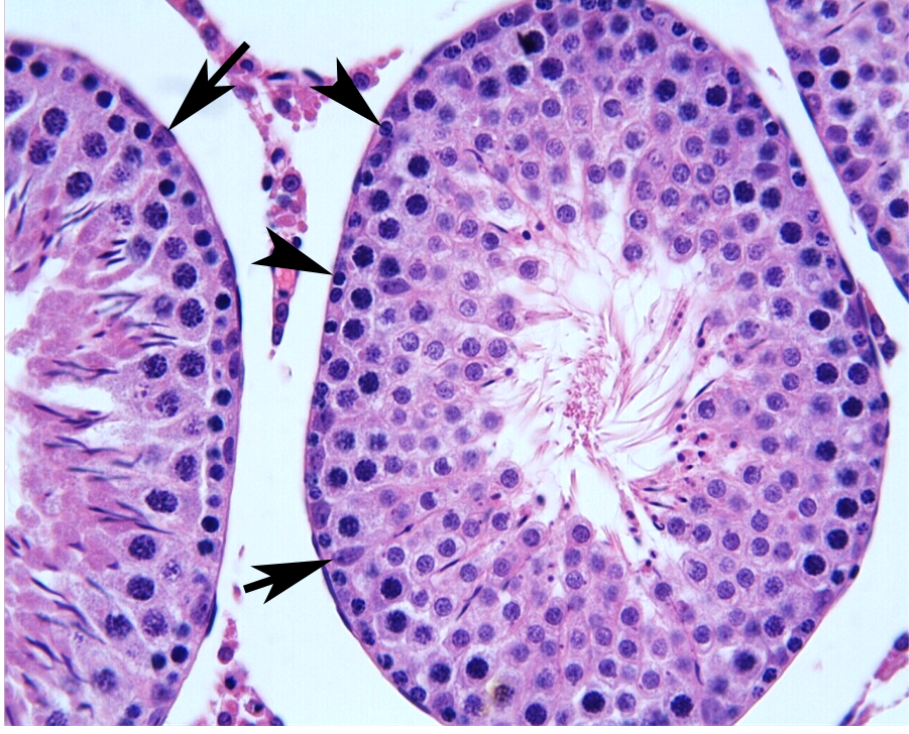
Kontrol grubunda; TUNEL metodu uygulanmış kesitlerde nukleusu kahverengi boyanan hücrelere seyrek olarak rastlandı. Bu gruptaki apoptotik indeks; spermatogenik hücreler için 1.85 \pm 0.69, Sertoli hücreler için ise 0.14 \pm 0.37 olarak hesaplandı (Resim 4.8).

Tablo 4.5. Seminifer tübüllerin mikroskopik sınıflandırılması (%) ve P değerleri.

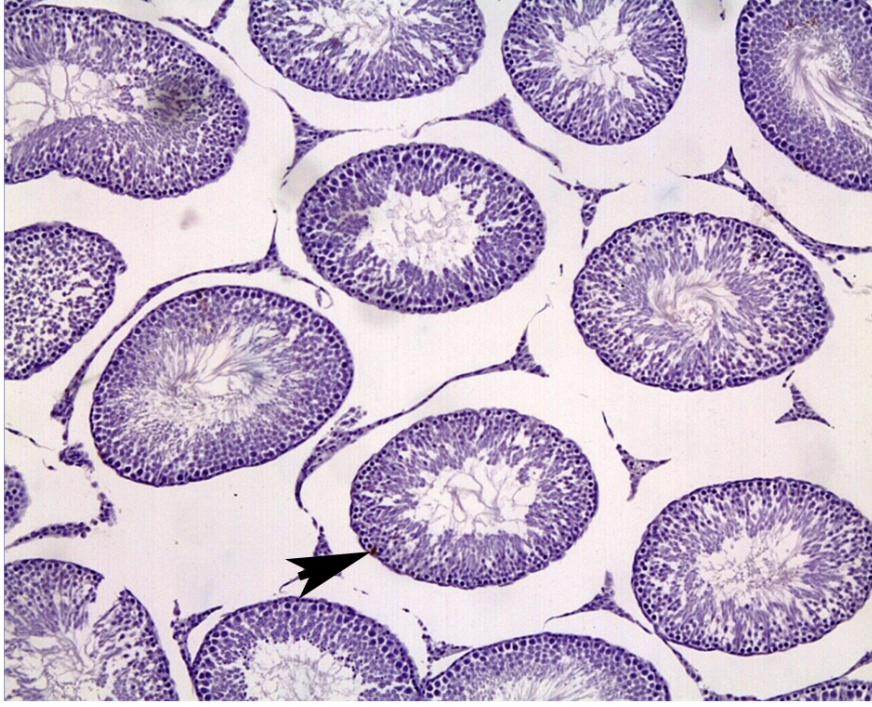
Gruplar	Testis Tübül Yapısı					
		Sağlam	Dökülmüş	Atrofiye	Dev nukleuslu	Duraksamış
Kontrol	X ± SE	93±1.4	6.7±1.4	0±0	0±0	0±0
	Med. (Min – Max)	94(79-100)	0(0-21)	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)
Seftriakson	X ± SE	56.5±3.2	35.7±2.5	4.6±1.6	0.3±0.2	2.4±0.7
	Med. (Min – Max)	54(41-77)	36.5(20-47)	1.5(0-15)	0(0-2)	2(0-8)
P değerleri		0.000	0.000	0.001	0.148	0.000



Resim 4.6. Kontrol grubu; normal görünümlü, sağlam seminifer tübüller.
H-E; X20.

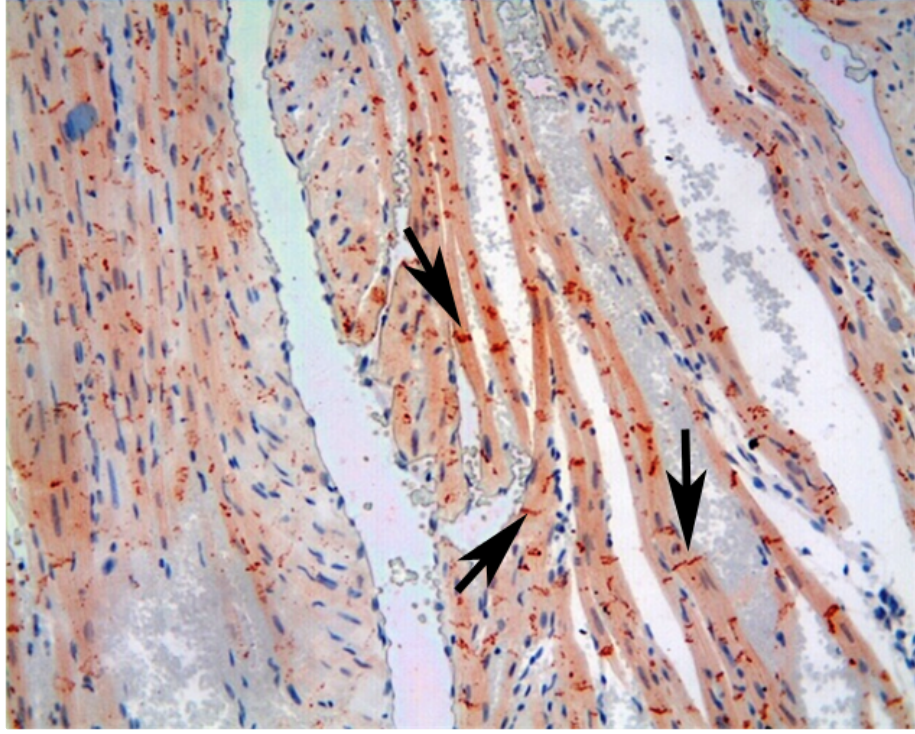


Resim 4.7. Kontrol grubu; ökmromatik nükleuslu Sertoli hücreleri (oklar), koyu, oval nükleuslu spermatogonyumlar (ok uçları) ve lümene yakın lokalize olmuş spermatidler. H-E; X40.

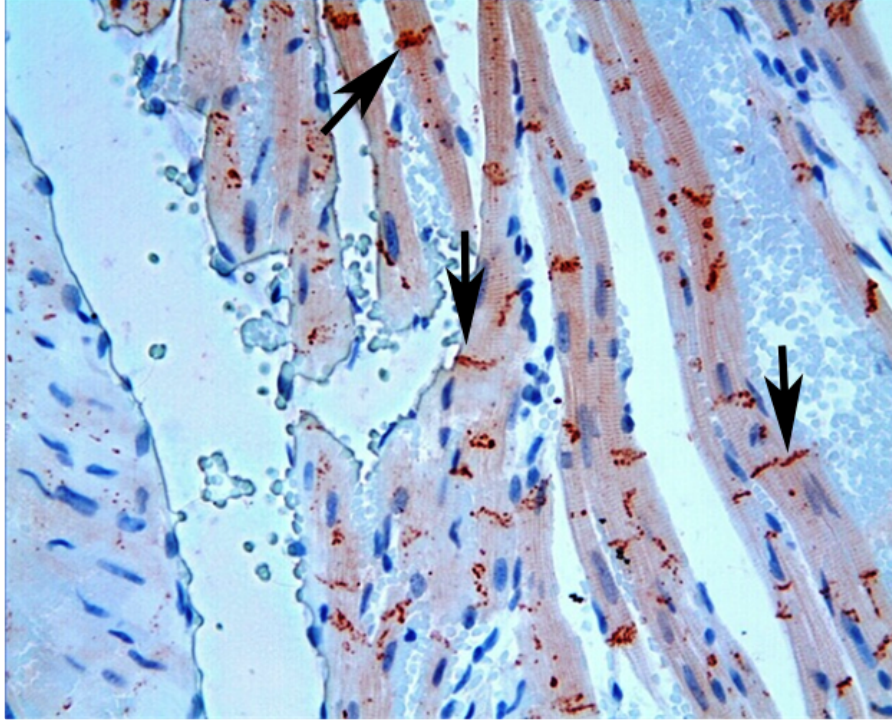


Resim 4.8. Kontrol grubu; az sayıda izlenen, nukleusu kahverengi boyanmış spermatogenik hücre (ok). TUNEL immun boyanma; X10.

Konneksin 43 immun boyama yönteminde, pozitif kontrol olarak kalp kası kullanıldı. Konneksin 43, kalp kası tellerinin birbirleriyle bağlantı yaptığı interkalar diskler hizasında, çizgilenmeler ve merdiven basamağı şeklinde kahverengi tonlarda, yoğun olarak boyandı (Resim 4.9 ve 4.10).



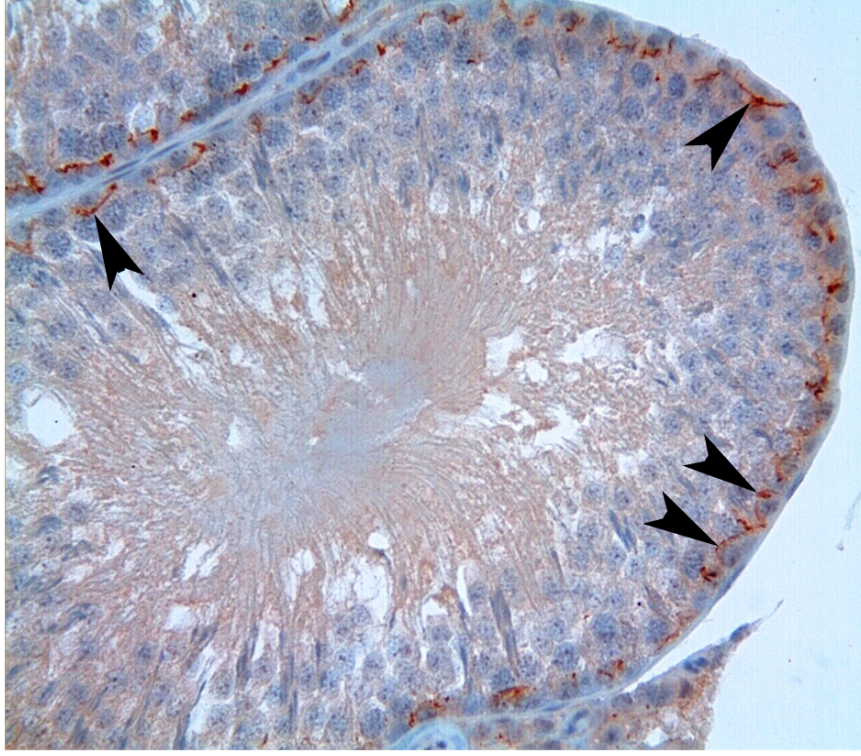
Resim 4.9. Kontrol kalp; interkalar diskler kahverengi tonlarda, yoğun, kesikli çizgiler ve merdiven basamağı şeklinde görülmekte (oklar).
Konneksin 43 immün boyama; X20.



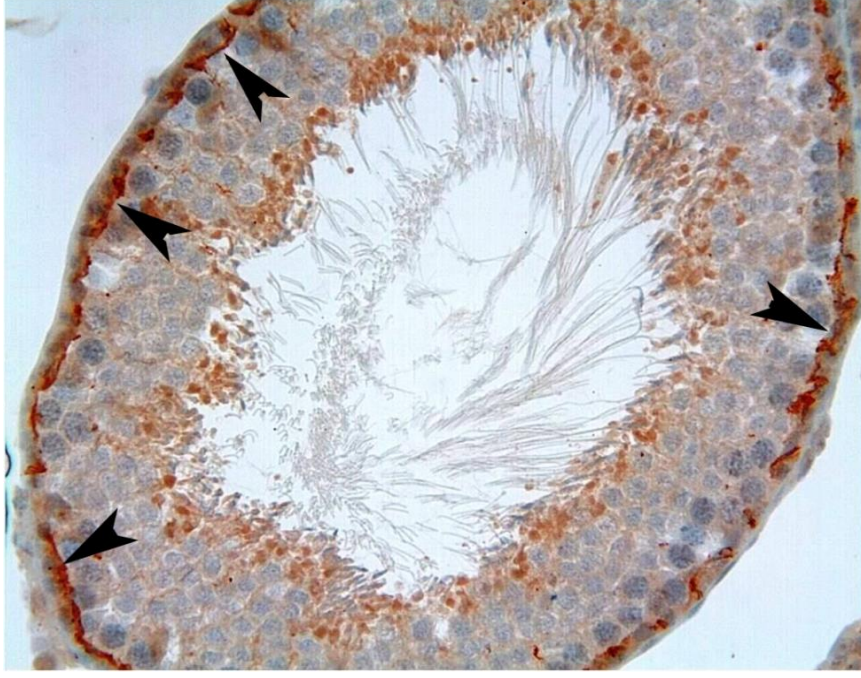
Resim 4.10. Kontrol kalp; konneksin 43 boyanmanın yoğun olarak izlendiği alanlar interkalar diskleri göstermekte (oklar). Konneksin 43 immün boyanma; X40.

Kontrol grubunda spermatogonyumların apikali ile primer spermatositlerin bazali arasında yer alan, Sertoli hücre bağlantılarının oluşturduğu kan-testis bariyeri bölgesinde güçlü bir konneksin 43 boyanma yoğunluğu izlendi. Seminifer tübüller arasında, konneksin 43 boyanma yoğunluğunun, seminifer tübül epitelinin evrelerine göre değişiklik gösterdiği tespit edildi. Germ hücrelerinin gelişim evrelerine göre, sıçanlarda 14 periyodik seminifer epitel siklusu tanımlanmıştır (55).

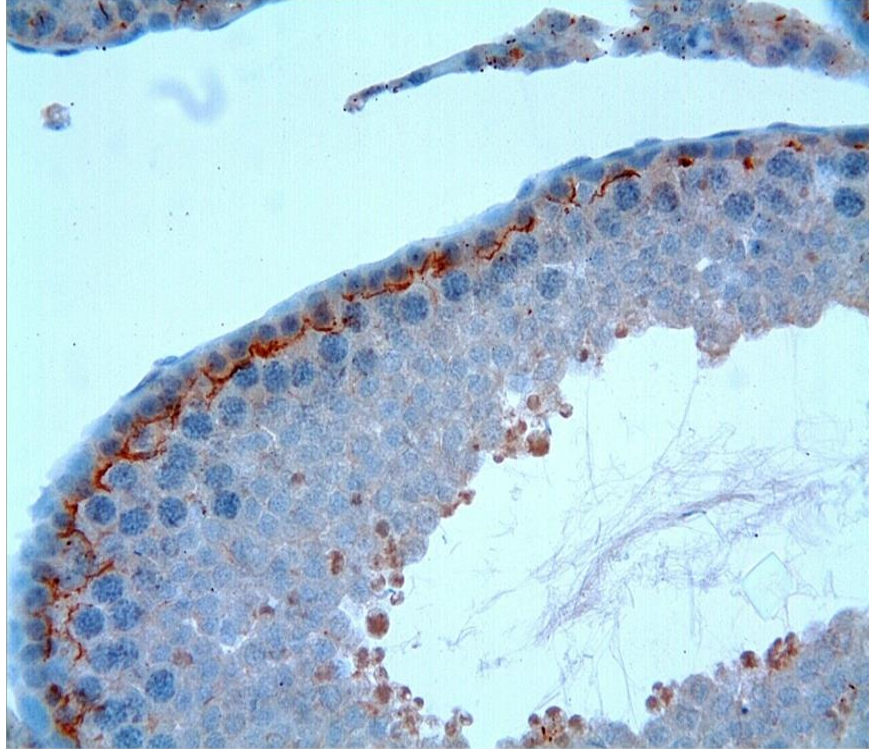
Seminifer tübül epitelindeki ardışık 14 evre içerisinde en yoğun boyanma 8 ve 9. evrede, en zayıf boyanma ise 10-14. evrelerde gözlemlendi. Seminifer epitel evrelerinin erken dönemlerinde (1-6) konneksin 43, yuvarlak şekilde spermatogonyumların etrafını sarar tarzda boyanırken, kan-testis bariyeri ayırt edilemedi (Resim 4.11). Sekizinci ve dokuzuncu evrelerde ise konneksin 43, kan-testis bariyeri hizasında devam eden dalgali çizgilenmeler şeklinde, yaygın ve güçlü olarak boyandı (Resim 4.12 ve 4.13). Onuncu ve onördüncü evrelerde ise boyanma yoğunluğu azalmış olarak gözlemlendi (Resim 4.14).



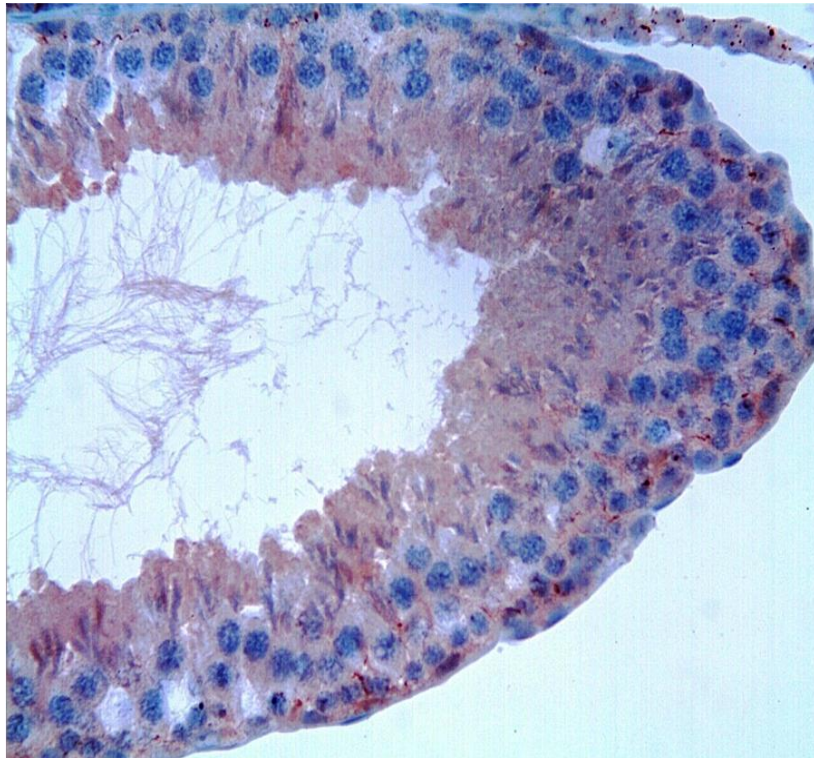
Resim 4.11. Kontrol grubu; 1-6. spermatogenik evrede, spermatogonyumlar etrafını saran, yüzük şeklinde, kahverengi konneksin 43 boyanması görülmekte (ok başları). Konneksin 43 immün boyanma; X40.



Resim 4.12. Kontrol grubu; 8. evrede, dalgalı çizgilenmeler şeklinde, kan- testis bariyeri hizasında devam eden, yaygın ve güçlü konneksin 43 boyanması izlenmekte (ok başları). Konneksin 43 immun boyanma; X40.



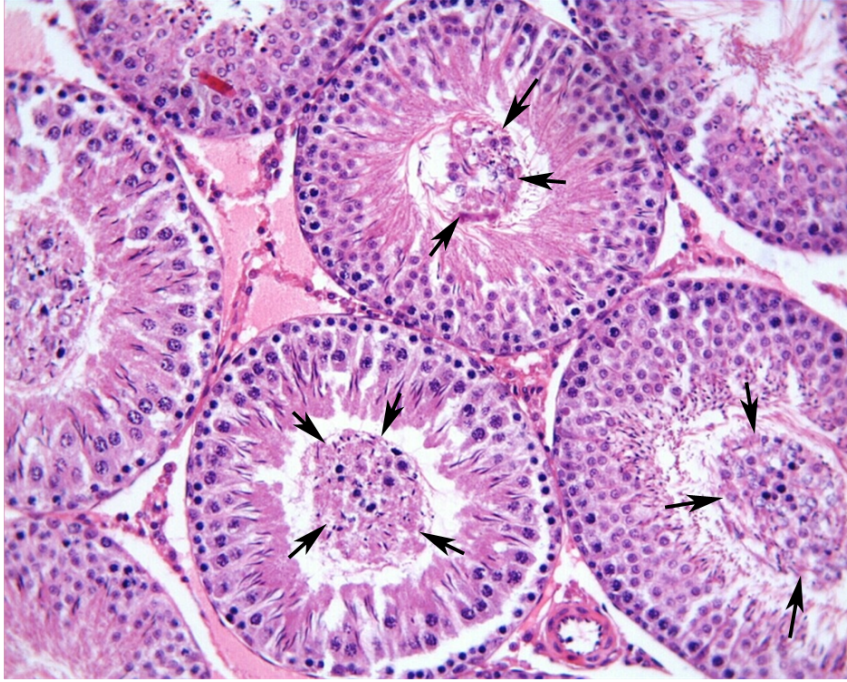
Resim 4.13. Kontrol grubu; 9. evrede, kan testis bariyeri hizasında izlenen çizgilenme şeklinde yoğun, kahverengi boyanma. Konneksin 43 immun boyama; X40.



Resim 4.14. Kontrol grubu; 10-14. evrede azalmış olarak izlenen konneksin 43 boyanması . Konneksin 43 immun boyama; X40.

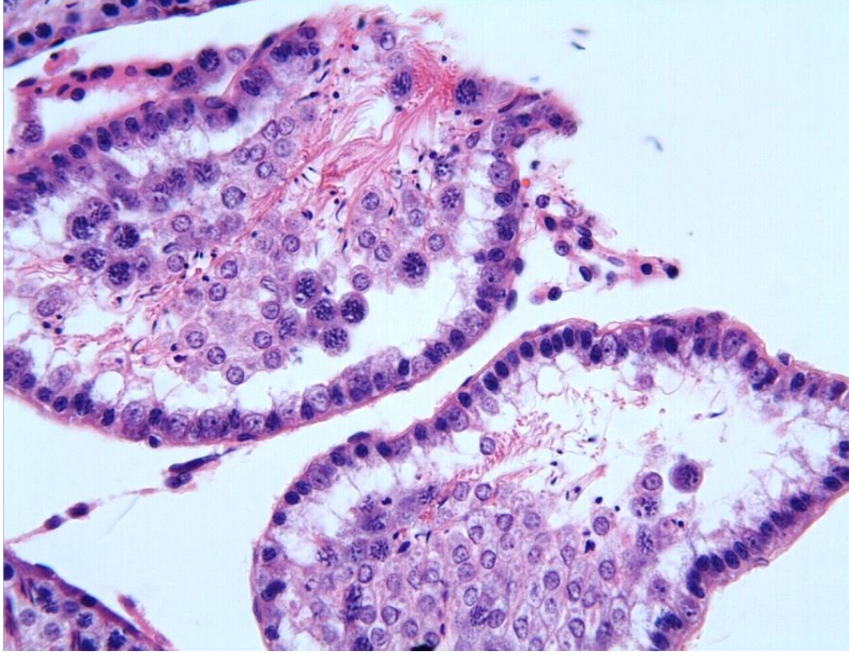
4.4.1.2. Seftriakson Grubu

Her kesitte değerlendirilen 100 seminifer tübülün, ortalama 35.7 ± 2.5 'i dökülmüş, 4.6 ± 1.6 'nın atrofiye, 0.3 ± 0.2 'nin dev hücreli, 2.4 ± 0.7 dejenere ve 56.5 ± 3.2 tübülün de sağlam olduğu tespit edildi. Dökülmüş tübüllerde, germinatif epitelden ayrılan ve gelişimini tamamlamamış spermatojenik seriye ait hücrelerin, lümen içerisinde biriktiği tespit edildi (Resim 4.15).



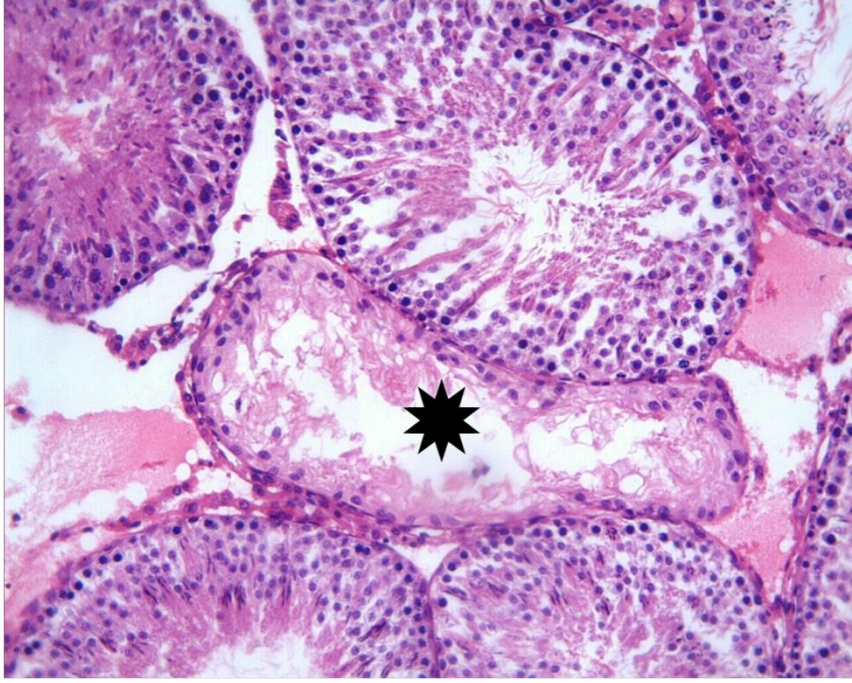
Resim 4.15. Seftriakson grubu; tübül lümenine dökülmüş ve gelişimini tamamlamamış spermatojenik seri hücreler izlenmekte (oklar). H-E; X20.

Bazı seminifer tübüllerde, epitel sadece Sertoli hücreleri ve spermatogonyumları içermektedir. Diğer spermatogenik seri hücrelerin tümü lümene dökülmüş olarak gözlemlenir (Resim 4.16).



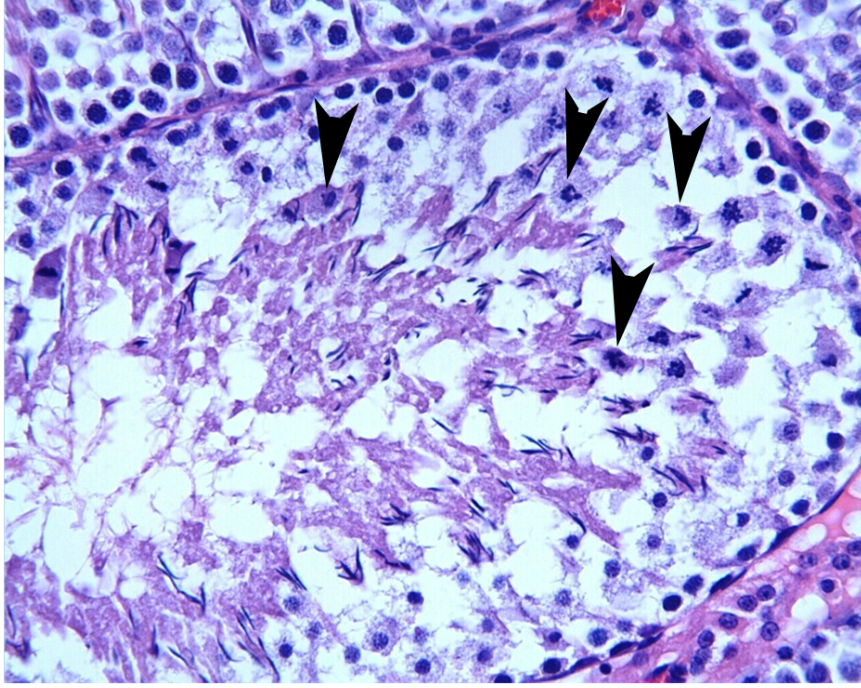
Resim 4.16. Seftriakson grubu; epiteli sadece bazalde yer alan Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlardan oluşan seminifer tübüller. Diğer spermatogenik seri hücreler tübül lümenine dökülmüş olarak izlenmektedir. H-E; X40.

Atrofik seminifer túbüllerde ise spermatogenik hücreler sayıca azalmış olarak gözlemlendi (Resim 4.17). Bazı atrofik túbüllerde ise, spermatogonyum dışında hiçbir seminifer túbül epitel hücresine rastlanmadı.

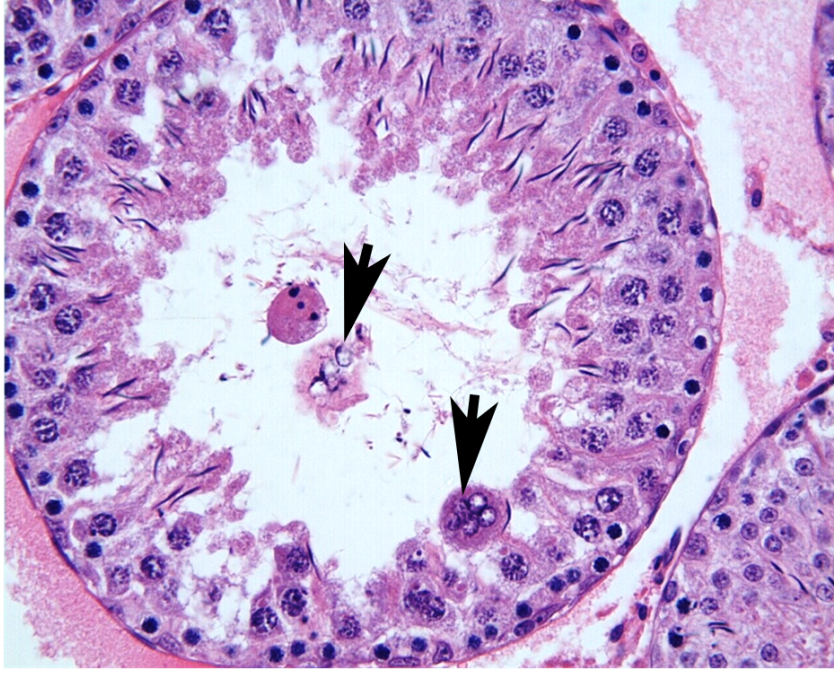


Resim 4.17. Seftriakson grubu; spermatogenik hücrelerin izlenmediği, Yalnızca koyu boyanmış, bazale yakın spermatogonyumları içeren atrofik túbül (yıldız). H-E; X20.

Bazı túbüllerde de nukleusu yoğun, mayozun belli aşamalarında duraksamış ve farklı şekillerde izlenen dejenere hücreslere rastlandı (Resim 4.18). Az sayıda túbülde de, seminifer túbül epitelinin lümenine yakın bölümünde, birden fazla sayıda nukleus içeren dev hücreler gözlandı (Resim 4.19).

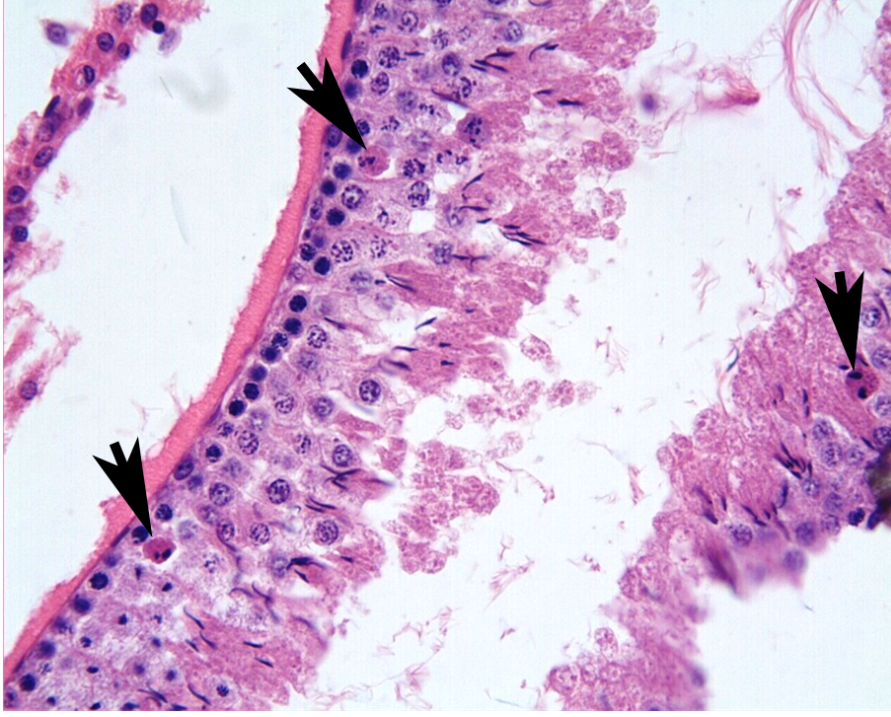


Resim 4.18. Seftriakson grubu; profaz ve metafaz gibi mayozun belli aşamalarında duraksamış, yoğun nukleuslu, dejenere hücreler izlenmekte (ok başları). H-E; X40.



Resim 4.19. Seftriakson grubu; çok sayıda nukleus içeren, lümende ve epitele yakın olarak izlenen dev hücreler (oklar).
H-E; X40.

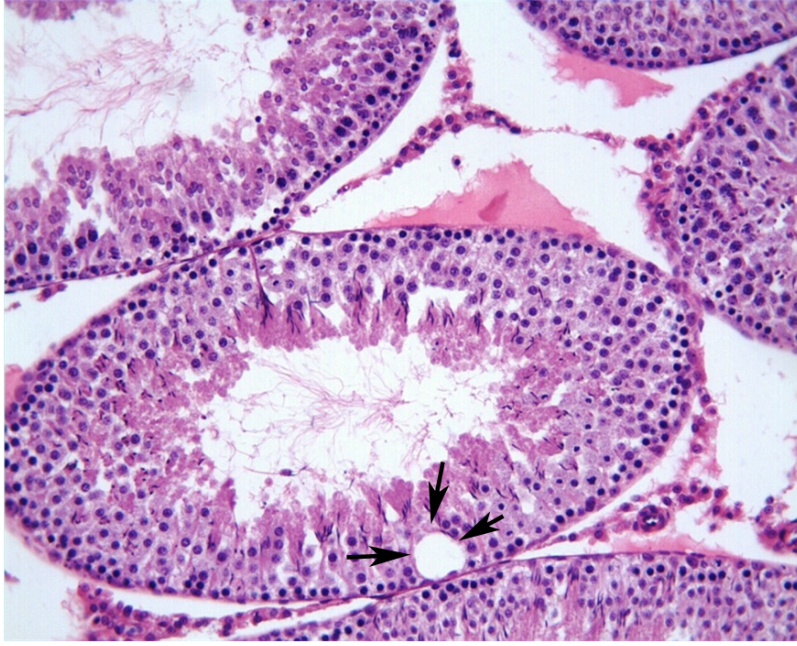
Ayrıca hematoxilen eozin boyama yöntemi uygulmuş kesitlerde, eozinofilik sitoplazmaları, piknotik ya da parçalanmış nükleusları ile ayırt edilen çok sayıda apoptotik hücre izlendi (Resim 4.20).



Resim 4.20. Seftriakson grubu; sitoplazmaları eozinofilik, nükleusları parçalanmış veya piknotik görümlü, çok sayıda apoptotik hücre izlenmekte (oklar). H-E; X40.

Bazı túbüllerde dikkat çeken diğer bir bulgu da; seminifer túbül epiteli içerisinde sınırları düzgün olarak izlenen büyük vakuollerdi. Bu vakuollar epitelin bazaline yakın olarak izlendi (Resim 4.21).

Seftriakson grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, spermatogenetik seri hücrelerinde (Resim 4.22 ve 4.23) ve Sertoli hücrelerinde (Resim 4.24) TUNEL pozitif boyanan hücreler bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p<0.05$). Grupların apoptotik indeks sonuçları Tablo 4.6' da verildi.



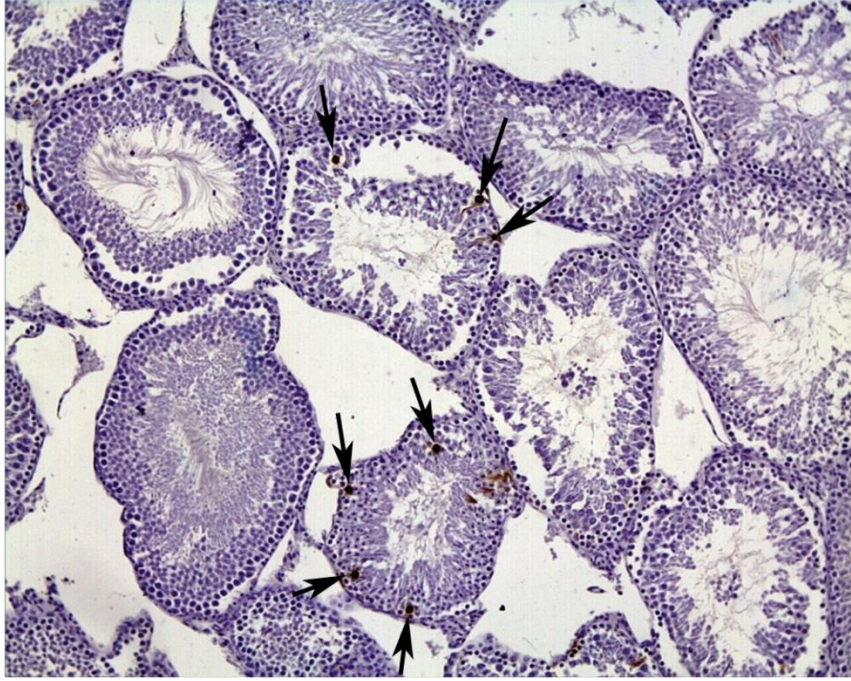
Resim 4.21. Seftriakson grubu; seminifer túbül epiteli içerisinde, sınırları düzgün olarak izlenen vakuol yapısı (oklar). H-E; X20.

Tablo 4.6. Apoptotik İndeks (%)

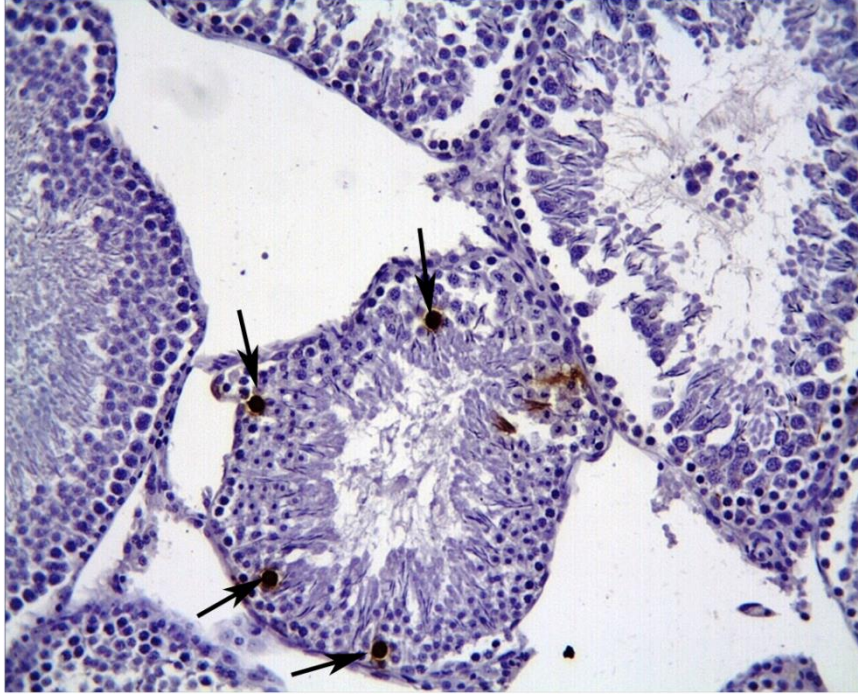
Gruplar	Apoptotik İndeks (%)	
	Spermatogenetik seri hücreleri	Sertoli hücreleri
Kontrol	1.85 ± 0.69	0.14 ± 0.37
Seftriakson	7.42 ± 0.78 ^a	2.57 ± 0.53 ^a

Değerler ortalama ± standart sapma olarak verilmiştir.

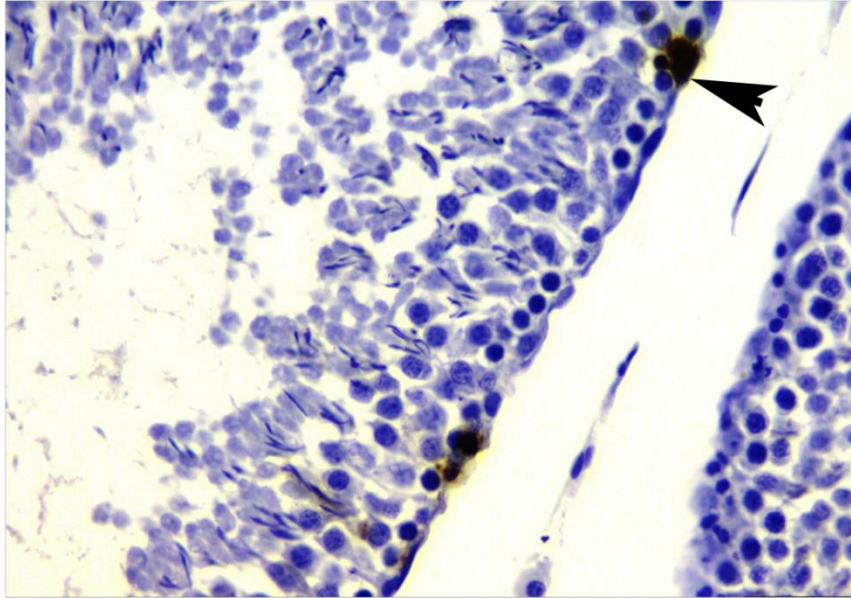
^a Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, p<0.05.



Resim 4.22. Seftriakson grubu; çok sayıda nükleusu koyu kahverengi boyanan apoptotik hücreler izlenmekte (oklar). TUNEL immün boyanma; X10.

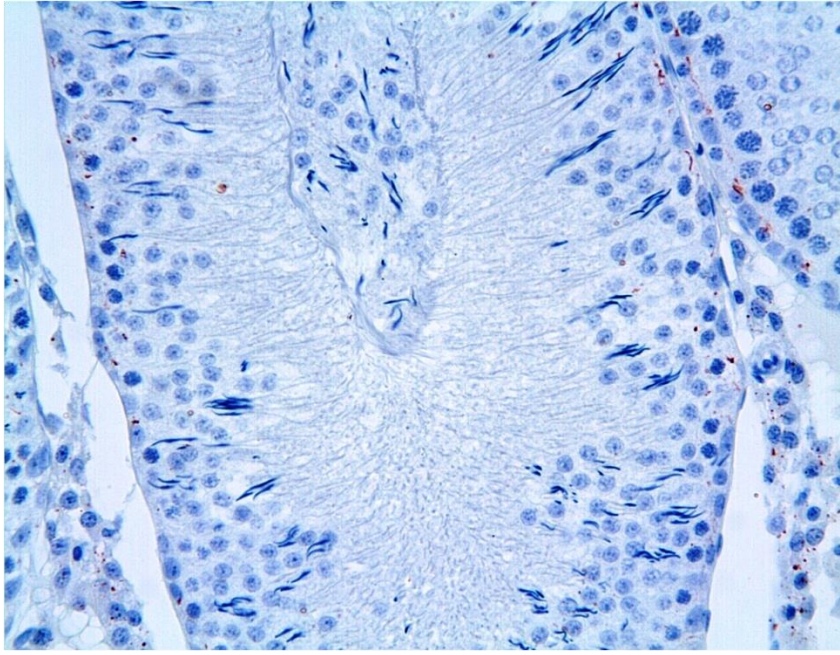


Resim 4.23. Seftriakson grubu; nukleusları koyu kahverengi boyanmış, apoptotik spermatogenik seri hücreler daha yakından izlenmekte (oklar). TUNEL immun boyanma; X20.

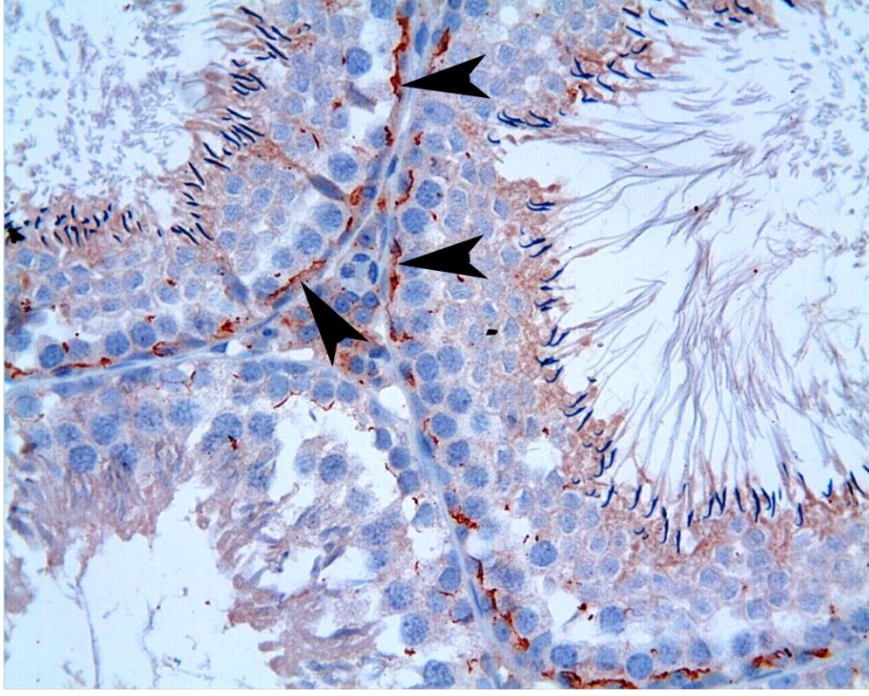


Resim 4.24. Seftriakson grubu; TUNEL pozitif olarak izlenen apoptotik Sertoli hücresi (ok başı). TUNEL immun boyanma; X40.

Seftriakson grubu sıçanların kesitlerinde; seminifer epitel tübül evresine göre konneksin 43'n dağılımlı ve boyanma özellikleri kontrol grubuna benzerdi. Ancak germ hücreleri lümene dökülen tübüllerde konneksin 43 boyanma yoğunluğu belirgin olarak azalmıştı (Resim 4.25). Ayrıca kontrol grubunda yoğun olarak boyanan kan testis bariyeri, bu grupta peritübüler dokuya yakın kesik kesik çizgilenmeler şeklinde izlendi (Resim 4.26).



Resim 4.25. Seftriakson grubu; germ hücreleri lümene dökülmüş tübülde konneksin 43 boyanma yoğunluğu azalmış olarak izlenmekte. Konneksin 43 immün boyanma; X40.



Resim 4.26. Seftriakson grubu; konneksin 43 immün boyanma, peritübüler dokuya yakın, kesik kesik çizgilenmeler şeklinde izlenmekte (ok başları). Konneksin 43 immun boyanma; X40.

4.5. Biyokimyasal Bulgular

MDA seviyesi, kontrol grubunda 12.8 ± 1 nmol/mg iken, seftriakson grubunda 13.5 ± 1.1 nmol/mg olarak ölçüldü. MDA seviyesi seftriakson grubunda, kontrol grubuna oranla istatikselsel olarak anlamlı derecede artmış olarak bulundu ($p=0.04$).

Kontrol grubunun doku SOD aktivitesi 1 ± 0.05 U/mg iken, seftriakson grubunun aktivitesi 0.9 ± 0.03 U/mg olarak ölçüldü. Gruplar arasında doku SOD aktivitesi yönünden istatikselsel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.07$).

Kontrol grubunun ortalama doku KAT aktivitesi 2.6 ± 0.2 U/mg iken, seftriakson grubunun aktivitesi 2 ± 0.2 U/mg olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, seftriakson grubunun KAT aktivitesinin istatikselsel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p=0.047$).

GPx seviyesi kontrol grubunda 68.1 ± 2.6 U/mg, seftriakson grubunda ise 75.7 ± 6.2 U/mg olarak tespit edildi. Kontrol grubu ile seftriakson grubu karşılaştırıldığında doku GPx seviyeleri açısından istatikselsel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.35$).

Kontrol grubunun ortalama doku GSH seviyesi 3.1 ± 0.5 nmol/mg iken, seftriakson grubunda 2.4 ± 0.5 nmol/mg olarak ölçüldü. Gruplar arasında doku GSH seviyeleri açısından istatikselsel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p=0.35$).

Kontrol grubunun ortalama TOS değerleri 5 ± 0.6 μ mol H₂O₂ equivalent/L iken, seftriakson grubunun değerleri 7.6 ± 0.4 μ mol H₂O₂ equivalent/L olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, seftriakson grubunun TOS değerlerinin istatikselsel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü ($p=0.012$).

Kontrol grubunun ortalama TAS değerleri 0.8 ± 0.01 mmol Trolox Equivalent /M, seftriakson grubunun değerleri 0.8 ± 0.05 mmol Trolox Equivalent /M olarak ölçüldü. Gruplar arasında doku TAS değerleri açısından istatikselsel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.76$).

Kontrol grubunun ortalama OSİ değeri 6.5 ± 1.08 , seftriakson grubunun ise 9.7 ± 1 olarak ölçüldü. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, seftriakson grubunun OSİ değerlerinin istatikselsel olarak anlamlı derecede arttığı görüldü ($p=0.04$). Grupların MDA, SOD, KAT, GPx, GSH, TOS, TAS, OSI değerleri Tablo 4.7' de verildi.

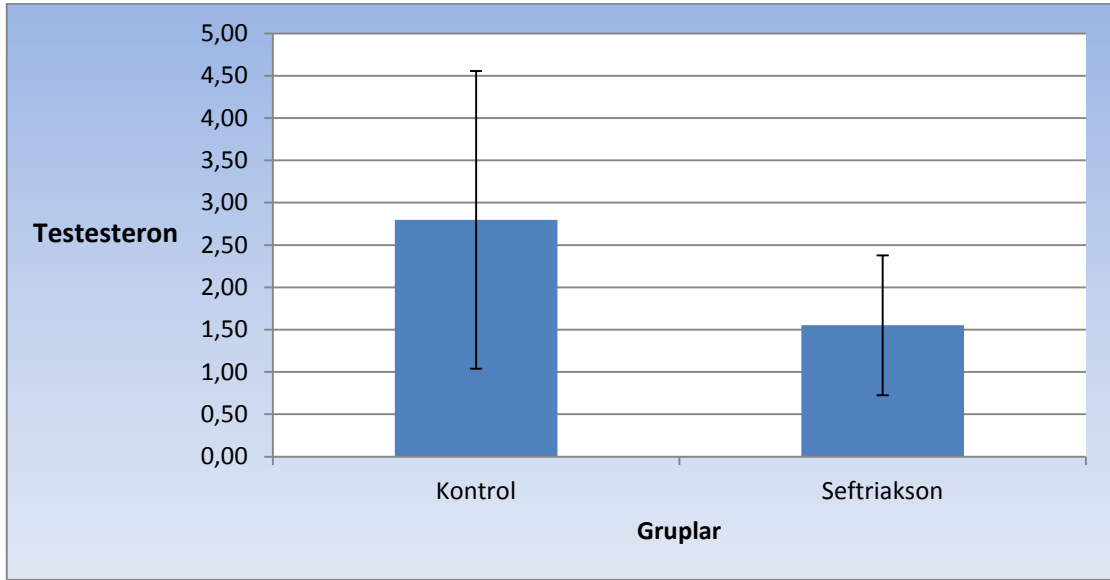
Tablo 4.7. MDA, SOD, KAT, GPx, GSH, TOS, TAS, OSI yönünden grupların karşılaştırılması.

Grup		MDA	SOD	KAT	GPx	GSH	TOS	TAS	OSI
Kontrol	X ± SE	12.8±1	1±0.05	2.6±0.2	68.1±2.6	3.1±0.5	5±0.6	0.8±0.01	6.5±1.08
	Med. (Min – Max)	12.9(5.1-19)	1(0.8-1)	2.8(2-4)	67(62-76)	3.2(2-4)	5.4(4-7)	0.8(0.7-1)	7.9(4-9)
Seftriakson	X ± SE	13.5± 1.1	0.9±0.03	2±0.2	75.7±6.2	2.4±0.5	7.6±0.4	0.8±0.05	9.7±1
	Med. (Min – Max)	13.2(11. -17)	0.9(0.8-1)	2(2-3)	73 (61-97)	2.4(2-4)	7.4(7-9)	0.8(0.7-1)	9.2(7-13)
P=		0.04	0.076	0.047	0.347	0.347	0.012	0.76	0.04

4.6. Testesteron Seviyeleri

Kontrol grubunda testesteron düzeyi 2.8 (ng/ml) olarak ölçülürken, seftriakson grubunda 1.5 (ng/ml) olarak tespit edildi. Seftriakson verilmesi, kontrol grubuna göre testesteron düzeyini istatistiksel olarak anlamlı derecede düşürdü ($p=0.04$). Testesteron düzeyleri Grafik 4.1’de verildi.

Grafik 4.1. Grupların testosteron düzeyleri (ng/ml).



5. TARTIŞMA

Sefalosporinler; pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları, endokarditler, yumuşak doku enfeksiyonları, septik artirit, akut bakteriyel menenjit, diyabetik ayak, gonokok enfeksiyonlarında ve çeşitli gram negatif bakterilerle oluşan sepsis olgularında yaygın olarak kullanılmaktadır (19). Ülkemizde son zamanlarda en yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin, üçüncü kuşak sefalosporinlerden sefoperason, sefotaksim ve seftriakson olduğu dikkat çekmektedir (55). Seftriakson, yüksek etki potansiyeli ve geniş spektrumlu aktivitesinden dolayı gram negatiflere karşı son derece kuvvetli bir antibiyotiktir (15-17). Antibiyotiklerin vücut sistemleri, karaciğer, böbrek gibi organlar üzerindeki olumsuz etkileri yanında insanda ve hayvan modellerinde semen parametreleri üzerine önemli etkileri olduğu bilinmektedir (4, 5).

Erkek fertilitesi, spermatogonyumların çoğalmasına ve devamlı olarak spermatogenik hücrelere farklılaşmasına bağlıdır. Bu yüksek mitotik aktivite özelliğinden dolayı testiküler germinatif epitel; kimyasal ajanlara ve ilaçlara karşı son derece hassastır (56). Yapılan deneysel çalışmalar; antibiyotiklerin erkek genital organ ağırlıklarında (5), germ hücre sayısında (4), seminifer tübül çapında ve germinal hücre kalınlığında azalmaya neden olduğunu göstermektedir (56, 57). Testiküler hacmin % 90'nını seminifer tübüller oluşturmaktadır. Seminifer tübüllerdeki hasar testis ağırlığını da etkilemektedir. Birçok araştırmacı, seftriaksonun da dahil olduğu pek çok antibiyotiğin testis, aksesuar cinsiyet organları ve epididimis ağırlığında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (5, 58-60). Biz de çalışmamızda da seftriakson uygulanan sıçanlarda, seminifer tübüllerde dökülme ile karakterize testiküler hasar, atrofi, dejenerasyon ile testis ağırlıklarında kontrol grubuna göre önemli bir azalma gözlemledik. Hess ve ark. (61), kimyasal ajanların Sertoli hücrelerindeki mikrotübüllerin ve ara filamanların yapısını bozarak, spermatogenik hücrelerin lümene dökülmesine yol açtığını bildirmiştir. Dökülmelerin, Sertoli hücrelerindeki adezyon proteinlerinin (kadherin vb.) ekspresyonundaki düzenlemenin azalmasından da kaynaklandığı düşünülmektedir (62).

Seminifer epitelde, 3 tip hücrelerarası bağlantı bulunmaktadır. Kadherin merkezli adherens bağlantı, okludin merkezli sıkı bağlantı ve konneksin merkezli oluklu bağlantı. Bütün bu bağlantılar, seminifer epiteli bazal ve apikal kompartmanlara ayıran kan testis bariyerini oluşturacak şekilde etkileşim halindedirler (63, 64). Oluklu bağlantı; hücreler

arasında iyonlar ve moleküller (<1-1.5 kDa) için geçit görevi yapmasıyla, diğerk bağlantı komplekslerinden ayrılır. Spermatogenezin endokrin ve parakrin mekanizmalarla düzenlendiği bilinmesine rağmen, germ hücre farklılaşması boyunca meydana gelen hücresel değişikliklerin koordinasyonu için, oluklu kanallar üzerinden direk bir bağlantıya ihtiyaç duyulmaktadır (65). Oluklu bağlantı kanalları, konneksin proteinleri tarafından oluşturulur. Testiste en çok bulunan konneksin tipi olan konneksin 43'n (66), Sertoli hücreleri arasında ve Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki oluklu bağlantılarda yer aldığı bilinmektedir (67). GJA1 olarak da bilinen, predominant, testiküler bir oluklu kanal proteini olan konneksin 43'n Sertoli hücrelerinde spermatogenezin pubertal başlangıcıyla birlikte ortaya çıktığı ve intrasellüler iletişime katılarak spermatozoonların gelişiminde, olgunlaşmasında ve spermatogenezin düzenlenmesinde hayati rol oynadığı bildirilmiştir (68). Özellikle son yıllarda azospermi ile ortaya çıkan spermatogenetik problemlerde, konneksin 43'n patogenezindeki etkileri ortaya konulmuş ve normal spermatogenez basamaklarının devamı için mutlak gerekli olduğu bildirilmiştir. Konneksin 43'n diğerk bağlantı komplekslerinin, spermatogenik süreçteki fonksiyonlarını da düzenlediği düşünülmektedir (31). Chevallier ve arkadaşlarına (33) göre, konneksin 43, spesifik erkek infertilite tipleri ve testiküler kanserin de dahil olduğu pek çok kanser türünün tedavisinde üzerinde çalışılması gereken potansiyel bir protein olarak görülmektedir. Risley ve ark. (68) da, Sertoli hücreleri veya Sertoli ile germ hücreleri arasındaki oluklu bağlantıların, Sertoli hücre metabolizmasının düzenlenmesini kolaylaştırdığı ve ayrıca Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasındaki sinyal iletimini desteklediğini belirtmişlerdir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar; spermatogenezin sürdürülebilmesinin konneksin 43 proteine bağlı olduğunu göstermektedir (69). Östrojen benzeri ajanlar, genetik veya çevresel faktörlerin etkisiyle testiküler konneksin 43 ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin, Sertoli hücrelerinin farklılaşma sürecinin bozulmasına yol açtığı, böylece Sertoli hücrelerinin germ hücreleri üzerindeki kontrolünün azaldığı düşünülmektedir (70). Sonuç olarak hipospermatogenez ve hipofertilite durumlarının ortaya çıktığı bildirilmiştir (33). Patolojik hastalıklarda semifer tübüllerde konneksin 43 ifadesindeki azalma veya yokluk; ilk kez Batias ve ark. (71) tarafından retinoid X reseptör beta eksik olan farelerde gösterilmiştir. Steger ve arkadaşlarının (72) yapmış olduğu diğerk bir çalışmada, konneksin 43 'n insan spermatogenezinin düzenlenmesine katıldığı, konneksin 43 yokluğunun ise spermatogenez, spermatogonyum düzeyinde

durdurduğu ve Sertoli Cell Only sendromuna neden olabileceği bildirilmiştir. Kopera ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise, ilaçlara erken dönemde maruz kalan deneklerde, konneksin 43 ifadesinde azalma buna bağlı olarak spermatogenik duraklama ve hipospermatogenez gibi ciddi değişiklikler olduğu görülmüştür (65). Oluklu kanallardaki konneksin 43'ün boyanma yoğunluğunun, seminifer epitelyal döngünün hangi safhada olduğuna bağlı olarak değişkenlik gösterdiği bilinmektedir (68, 14). Çalışmamızda; Clermont ve arkadaşlarının (54) belirlediği seminifer tübül epitelindeki ardışık 14 evre içerisinde en yoğun boyanma 8 ve 9. evrede, en zayıf boyanma ise 10-14. evrelerde gözlemlendi. Sefriakson grubu sıçanların kesitlerinde; germ hücreleri lümene dökülen tübüllerde, konneksin 43 boyanma yoğunluğu belirgin olarak azalmıştı. Ayrıca kontrol grubunda yoğun olarak boyanan kan testis bariyeri, bu grupta peritübüler dokuya yakın kesik kesik çizgilenmeler şeklinde izlendi. Kopera ve arkadaşları (65) bizim çalışmamıza benzer olarak; normal seminifer epiteline, kan testis bariyerindeki en yoğun boyanma evresinin 8. evrede, devam eden dalgalı bir çizgi şeklinde izlendiğini, erken evrelerde ise (1-5) yüzük şeklinde bir boyanmanın tespit edildiğini bildirmektedir. Aynı araştırmacılar; flutamid verilen sıçanların, sağlam epitele sahip seminifer tübüllerinde konneksin 43 dağılımının kontrollere benzer olduğunu gözlemlerken, germ hücrelerinin lümene döküldüğü ya da spermatogenik duraksama izlenen tübüllerde ise konneksin 43 boyanma yoğunluğunun azaldığı ve sınırlarının belirgin şekilde bozulduğunu rapor etmişlerdir (65). Yapılan in vitro çalışmalarda da; kültüre edilen Sertoli hücre hatlarına uygulanan toksik ajanların, konneksin 43 mRNA ve protein seviyelerini düşürdüğü tespit edilmiştir (73, 74). Benzer şekilde Bisfenol A'ya maruz kalan sıçanlarda da konneksin 43 ifadesinin azaldığı ve oluklu bağlantı yapılarının bozulduğu rapor edilmiştir (75). Bütün bu bulgular; toksik ajanlara karşı konneksin 43 ifadesindeki değişikliklerin, spermatogenezin bozulmasına neden olan faktörlerden biri olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda dikkat çeken diğer bir bulgu; bazı tübüllerde, nükleusu yoğun, mayozun belli aşamalarında duraksamış spermatogenik hücrelerin izlenmesiydi. Timmermanns (76), aminoglikozid grubu antibiyotik olan gentamisin; spermatogonyal bölünmeyi ve primer spermatosit evresinde spermatogenik mayotik bölünmeyi duraksatarak, spermatogenik arreste neden olduğunu bildirmiştir. Tedavi dozunda verilmesi de, aminoglikozidlerin spermatogenez üzerindeki bu etkisini doğrulamıştır (77). Enzimatik çalışmalar spermatogenik duraksamanın; spermatogonyum ve spermatositlerin nükleuslarında RNA transkripsiyonun dolayısıyla

protein sentezinin azalmasına, ikinci basamakta da spermatozoid serilerinde glikoz metabolizmasının yavaşlamasına bağlı olabileceğini göstermiştir (76).

Çalışmamızda seftriakson uygulanan sıçanlarda, túbül lümenine yakın konumda, birden fazla nükleus içeren dev hücreler gözlemlendi. Aruldas ve arkadaşları (78), kromiyuma maruziyet sonrasında, primatlarda bu şekilde multinükleer dev hücreleri tanımlamışlardır. Toksik ajanlara maruz kalan sıçanlarda multinükleer germ hücrelerinin oluştuğu bir çok çalışmada da gösterilmiştir (65, 78, 79). Faridha ve arkadaşlarına göre bu tür hücrelerin oluşumu, germ hücre klonlarını bağlayan hücrelerarası köprülerin açılması sonucunda meydana gelmektedir (80). Yin ve arkadaşları ise dev hücrelerin varlığının germ hücre dejenerasyonuna işaret ettiğini bildirmişlerdir (81).

Çalışmamızda, bazı túbüllerde seminifer túbül epiteli içerisinde sınırları düzgün, epitelin bazaline yakın olarak konumlanmış büyük vakuoller izlendi. Öner ve arkadaşları, sefalosporin grubu antibiyotiklerin 14 gün süre ile uygulandığı sıçanlarda, spermatogonyumlar ile Sertoli hücreleri arasında büyük vakuollü yapıların ortaya çıktığını rapor etmiştir. Elektron mikroskopik incelemelerde; büyük vakuollü yapıların spermatogonyumlar ile Sertoli hücreleri arasındaki membran komşuluklarında oluştuğu gösterilmiştir (55).

Çalışmamızda önemli bir bulgu, seftriakson grubunda apoptotik germ hücre sayısının, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede artmasıydı. Biz apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarının in situ saptanmasında, en duyarlı ve en hızlı metod olan ve "TdT-dUTP nick-end-labelling" sözcüklerinin kısaltılması ile ifade edilen "TUNEL" yöntemini kullandık. Bu yöntem; apoptotik hücrelerdeki DNA sarmal kırıklarını serbest 3'-OH uçlarında enzimatik bir reaksiyon ile tespit ederek, apoptoza giden hücrelerin görüntülenmesini sağlamaktadır (82). Ayrıca testiküler dokudaki apoptotik hücreler; literatür bilgileriyle uyumlu olarak hematoksil-eozin boyama yöntemi uygulamış kesitlerde, eozinofilik sitoplazmaları, piknotik ya da karyolizise uğramış, parçalanmış nükleusları ile ayırt edildiler. Khaki ve ark. (5) ile Kopera ve ark. (65) çalışmalarında; antibiyotik uygulanan gruplarda, apoptotik hücrelerin arttığını saptamış, antibiyotiklerin de diğer kimyasal ajanlar gibi spermatogenez sürecine etki ettiğini belirtmişlerdir. Bozec ve ark., ilaçlara maruziyet sonrası, sıçan germ hücrelerinde izlenen apoptozisin, mitokondri bağımlı yoldaki pro ve anti apoptotik moleküller arasındaki dengenin bozulması sonucu olduğunu bildirmişlerdir (83). Benbrahim-Talla ve arkadaşlarına göre ise, germ hücre apoptozisi, androjen azalmasına

bağlı olarak Sertoli hücre matürasyonunun bozulması sonucu oluşmaktadır (84). Hasarlı, fonksiyonsuz ya da aşırı üretilen germ hücrelerinin ortadan kaldırılması ve normal spermatogenik hücre gelişiminin sağlanması, sürdürülmesi için gerekli ortam ve besin Sertoli hücreleri tarafından sağlanır. Germ hücre apoptozisi, fosfotidilserinin plazmalemmmanın eksternal yüzüne çıkması ile başlar ve Sertoli hücre yüzeyinde bulunan klas B reseptör tip I tarafından tanınması ile Sertoli hücreleri tarafından apoptotik hücrelerin fagositozu gerçekleşir. Konneksin 43 inhibisyonunun testiste germ hücre apoptozisine yol açan bir uyarıcı olduğu düşünülmüş ve ilk olarak Lee Nikki ve ark. (85) Sertoli hücreleri ve spermatogonyumlar arasındaki konneksin merkezli oluklu bağlantıların bozulmasının veya fonksiyonunun inhibe edilmesinin spermatogenezisin regülasyonunun bozulmasına ve germ hücre apoptozisinin başlamasına neden olduğunu bildirmiştir. Genotoksisite çalışmaları ise; antibiyotik uygulaması sonrasında germ hücre apoptozisindeki bu artışın, testiste oluşan peroksit radikallerinin (86), in vitro ortamda DNA tek zincirinde kırılmaya neden olduğu ve kromozomal yapının bozulması sonucu olabileceğini göstermektedir (87).

Çalışmamızda; yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşan ve lipid peroksidasyonunun belirteci olarak kullanılan MDA seviyesinin seftriakson grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı, hidrojen peroksitin moleküler oksijen ve suya çevrilmesini katalizleyen KAT aktivitesinin ise istatistiksel olarak anlamlı derecede azaldığı görüldü. Diğer antioksidan enzimler olan SOD ve GPx aktiviteleri ile GSH seviyesi yönünden iki grup arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Saalu ve ark. (88) çalışmalarında, antibiyotiklerin testiküler dokuda, SOD, KAT ve GPx aktivitelerinde azalmaya yol açtığını, MDA seviyesini de artırdığını göstermiştir. Akondi ve ark. (89) da, aminoglikozid grubu antibiyotik olan gentamisin uygulamasının, MDA seviyesini önemli derece arttırıp, SOD ve KAT gibi antioksidan enzim seviyelerini düşürerek oksidatif strese neden olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca çalışmamızda oksidatif stres parametreleri olan total oksidant durumu (TOS) ve oksidant durum endeksinde (OSI) artış tespit edilirken, total antioksidant durumu (TAS) değerlerinde herhangi bir değişiklik saptanmadı. Aksoy ve arkadaşlarına göre, toplam antioksidan durumunun ölçümü (TAS) yani tüm antioksidanların birleştirilmiş aktivitesi, tüm antioksidanların genel olarak değerlendirilmesini sağlamaktadır. Toplam oksidan durumu (TOS), genel oksidan durumunun bir belirtecidir. Oksidan durum indeksi (OSI), TOS/TAS oranıdır ve vücuttaki oksidatif stresin hesaplanmasını sağlar. TAS ve TOS' un karşılaştırılmasının genel oksidatif stresin iyi bir belirteci olduğu

düşünülmektedir (90). Reaktif oksijen radikalleri, sperm dahil bütün hücrelerde normal metabolik süreç içerisinde sentezlenmektedir Antioksidan aktivite ile reaktif oksijen radikalleri arasındaki dengenin bozulması, semende hücrel hasara neden olmaktadır. Oksijen radikalleri yüksek derecede reaktif olduklarından, özellikle doymamış yağ asitleri gibi intrasellüler bir çok molekülle reaksiyona girebilirler. Sperm membranları polisatüre yağ asitlerinden zengin olduğundan, peroksidatif hasara yüksek derecede hassasiyet gösterirler (91). Sanocka ve ark. (92) sperm lipidlerinin peroksidasyonunun, membran yapısındaki fosfolipidleri bozarak, aksonemal hasara yol açan intrasellüler ATP kaybına, sperm canlılığının azalmasına ve morfolojik defektlere neden olduğunu bildirmişlerdir. Sperm hücresi sayısı, motilitesi, canlı/ölü oranı, morfoloji ve seminal volüm gibi parametreler genellikle erkek deneklerin fertilitelerini belirlemek için değerlendirilmektedir (93). Literatürde seftriaksonun da dahil olduğu pek çok antibiyotik, sperm motilitesi, konsantrasyonu ve volümünde belirgin bir azalmaya yol açtığı belirtilmiştir (3- 6, 58, 59, 94-96). Kumar ve ark., sperm sayısındaki düşüşün, erkek infertilitesinin önemli bir göstergesi olduğunu bildirmişlerdir (97). Khajavi ve ark., sperm baş ve kuyruk anomalilerinin, germ hücrelerinde yapısal değişiklikleri tetikleyen nokta mutasyonları sonucu olduğunu açıklamışlardır (98). Ayrıca anormal sperm sayısında artışın, testosteron konsantrasyonunun azalmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir (99). Timmermans; antibiyotiklerin, sperm konsantrasyonu ve semen volümünün azalmasında, seminal hücrelerdeki mayoz ve mitozu engelleyici etki yaparak rol oynadığını saptamıştır (76). Ayrıca Masuda ve ark. da, antibiyotiklerin, Sertoli hücrelerinde fagositozu etkilediği böylece anormal sperm sayısının arttığını rapor etmişlerdir (94). Yapmış olduğumuz çalışmada, seftriaksonun ölü sperm sayısını arttırdığı, histolojik görünümü normal olan sperm sayısını da azalttığı gözlemlendi. Ayrıca amorf başlı sperm sayısının seftriakson grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı tespit edildi. Diğer yandan seftriakson sperm motilitesinde istatistiksel olarak bir değişikliğe neden olmadığı saptandı. Khaki ve arkadaşları (5) da fluoroquinolon grubundan bir antibiyotik olan ofloxocinin, fizyolojik ve yüksek doz uygulamasının, sperm motilitesini etkilemediğini açıklamışlardır.

Testesteron; normal testiküler gelişimin, spermatogenezisin ve erkek fertilitelerinin sürdürülmesi için gereklidir. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalar; kemoterapik ajanların ve antibiyotiklerin plazma testosteron seviyesini önemli derecede düşürdüğünü göstermektedir (5, 100-102). Biz de çalışmamızda; seftriakson uygulamasının, testesteron düzeyini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede

düşürdüğünü gözlemledik ($p=0.04$). He ve ark. (58), memelilerde ve çoğu kemirgenlerde Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteronun, seviyesindeki herhangi bir azalmanın, hipotalamus-hipofiz-gonadal eksenin geri besleme mekanizmasıyla gonadotropin (LH ve FSH) artışına neden olduğunu belirtmişlerdir. Testesteron/ LH oranındaki azalmanın, bastırılmış testiküler fonksiyonun en önemli belirleyicisi olduğu ve sonrasında testesteron değerinde azalmaya yol açtığını bildirmişlerdir. Antibiyotiklerin; testesteron, testesteron/LH değerlerini baskıladıklarını, LH ve FSH düzeylerini artırdığını ve bu durumun antibiyotiklerin Leydig hücrelerine olan direk etkilerinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. He ve ark. antibiyotiklerin; Leydig hücrelerinde, endoplazmik retikulum membranlarında genişleme ve mitokondrilerde şişme gibi yapısal değişikliklere neden olduğunu, gelişen hücresel hasar sonucu testosteron seviyelerinin de azaldığını rapor etmişlerdir (58).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak bu çalışma; gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı kullanılan geniş spektrumlu etkiye sahip bir antibiyotik olan seftriaksonun, spermatogenezis üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koymaktadır. Seftriaksonun; spermatogenezisin bozulması anlamına gelen spermatogenik duraksamaya, sperm motilitesinde, canlılığında ve plazma testosteron seviyesinde azalmaya, spermin morfolojik bozukluklarına ve germ hücrelerinde apoptozise neden olduğu gözlemlendi. Ayrıca seftriaksonun oksidatif stres parametrelerinde artışa ve konneksin 43 ifadesinde azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Seftriaksonun konneksin 43 ifadesindeki azalmaya neden olması, spermatogenik hücrelerin farklanması için seminifer tübül içerisinde, Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan mikroçevrenin korunmasını sağlayan kan-testis bariyerinin de bozulması anlamına gelmektedir. Oluklu kanalın proteini olan konneksin 43'ün spermatogenezis sürecinin desteklenmesi ve düzenlenmesinde önemli rolü olduğu, spermatogenik hücre gelişimindeki bozulma, azalma ya da apoptozisin konneksin 43 yoluyla sağlanan iletişimin bozulmasıyla ilişkili olabileceği düşüncesindeyiz.

Diğer yandan bu çalışmanın bilinçli ve uygun antibiyotik kullanımının yaygınlaştırılmasına, gereksiz ve uygunsuz kullanımının önlenmesine, aynı zamanda reçetesiz antibiyotik kullanımının kısıtlanması için önlemlerin alınmasına katkı sağlayabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Fisch H, Braun SR. Trends in global semen parameter values. *Asian J Androl* 2013, 15: 169-73.
2. Bonde JP, Giwercman A. Enviromental xenobiotics and male reprodective health. *Asian J Androl* 2014, 16: 3-4.
3. Alp H, Cirit U, Tas M, Rifaioğlu MM, Hatipoğlu NK, Aytekin I, Yucel M, Fırat U. Effects of sildenafil citrate, isoniazid and streptomycin on testicular tissue and epididymal semen quality in rats. *Urology* 2012, 80(4): 953.e9-14.
4. Brillhante O, Okada FK, Sasso-Cerri E, Stumpp T, Miraglia SM. Late morfofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. *Reprod Biol Endocrinol* 2012, 10: 79. doi: 10.1186/1477-7827-10-79.
5. Khaki A, Novin MG, Khaki AA, Nouri M. Comparative Study of the Effects of Gentamicin, Neomycin, Streptomycin and Ofloxacin Antibiotics on Sperm Parameters and Testis Apoptosis in Rats. *Pakistan Journal of Biological Science* 2008, Volume: 11, Issue: 13, 1683-9.
6. Antohi E, Gales C, Nechifor M. Pharmacological agents that affect sperm motility. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 2011, 115(4): 1183-8.
- 7 . Kayaalp O. *Tıbbi Farmakoloji 1.cilt, 13. Baskı*. Ankara: Pelikan Yayıncılık 2012, Sf.157-211.
8. Karabay O. Türkiye’de Antibiyotik Kullanımı Ve Direnç Nereye Gidiyor ?. *Ankem Derg* 2009, 23(Ek 2): 116-120.
9. Elsayed MG, Elkomy AA, Aboubakr MH. Evaluation of ceftriaxone nephrotoxicity in albino rats. *IJAVMS* 2011, Vol.5, Issue 2: 153-63.
10. Malomo SO. Toxicological Implications of Ceftriaxone Administration in Rats. *Nigerian Journal Of Biochemistry And Molecular Biology* 2000, Vol. 15, No. 1. 33-8.
11. Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. *Biol Reprod* 1999, 60: 1263-70.
12. Roscoe WA, Barr KJ, Mhawi AA, Pomerantz DK, Kidder GM. Failure of spermatogenesis in mice lacking connexin 43. *Biol Reprod* 2001, 65:829-38.
13. Balak MK, Hejmej A, Sadowska J, Bilinska B. Connexin 43 expression in human and mouse testes with impaired spermatogenesis. *European Journal of Histochemistry* 2007, Vol. 51 Issue 4:261-8.

14. Shiffman ML, Keith FB, Moore EW. Pathogenesis of ceftriaxone-associated biliary sludge. In vitro studies of calcium-ceftriaxone binding and solubility. *Gastroenterology* 1990, 99 (6): 1772–8.
15. Hall MJ, Westmacott D, Wong-Kqi-In P. Comparative in-vitro activity and mode of action of ceftriaxone; a new highly potent cephalosporin, *J Antimicrob Chemother* 1981, 8: 193.
16. Mitsuhashi S, Sekine Y, Arisawa M. Ceftriaxone. A long-lasting cephalosporin: Further studies on the mode of antibacterial action. *Curer Chemother Immunother* 1981, Jul 19-24: 445.
17. Wiser R, Gillett AP, Andrews JM, Bedford KA. A cephalosporine: with a high degree of activity and broad antibacterial activity: an in vitro comperative study. *J Antimicrob Chemother* 1980, 6: 595.
18. Gülay Z. Hücre Duvarı Sentezini Engelleyen Antibakteriyeller. *Ankem Derg* 2003, 17 (No.3): 192-204.
19. Öncül O. *Antibiyotikler I*. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi: 31 Kasım 2002- İstanbul: (s.23-38).
20. Sadler TW. Çeviri: Başaklar AC. *Langman's Medikal Embriyoloji*, 11. Baskı. Ankara, 2011: Palme Yayıncılık.
21. Moore KL, Persaud TVN. Çeviri: Dalçık H, Yıldırım M. *İnsan Embriyolojisi*, 8. Baskı. İstanbul, 2009: Nobel Tıp Kitabevleri.
22. Ross MH, Pawlina W. *Histology: A Text And Atlas*, 6th ed. Philadelphia, 2011: Lippincott Williams & Wilkins.
23. Carlson MB. *Human Embryology and Developmental Biology*, 4th ed. China, 2009: Mossby.
24. Junquera LC, Corneiro J, Kelley RO. Çeviri: Solakoğlu S . *Temel Histoloji Test ve Atlas*. İstanbul, 2009: Nobel Tıp Kitabevleri.
25. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*. Malatya, 2009: Medipres Yayıncılık.
26. Parker Ş. *Histoloji*, 2. Baskı. Bursa, 1993: Uludağ Üniversitesi Basımevi.
27. Skinner M, Griswold M. *Sertoli Cell Biology* .USA, 2005: Elsevier Academic Press.
28. Cormack DH. *Essential Histology*, 6th ed. USA, 2001: Lippincott Williams & Wilkins.
29. Kopera I, Bilinska BC, Cheng Y, Mruk D. Sertoli–germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Phil. Trans. R. Soc. B.*, 2010, 365, 1593–605.

30. Goosens S, Roy F. Cadherin-Mediated Cell- Cell Adhesion In The Testis. *Frontiers in Bioscience*, 2005, 10, 398- 419.
31. Weider K, Bergmann M, Brehm R. Connexin 43: its regulatory role in testicular junction dynamics and spermatogenesis. *Histol Histopathol*, 2011, 26: 1343-52.
32. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Connexon_and_connexin_structure.svg.
33. Chevallier D, Carette D, Segretain D, Gilleron J, Pointis G. Connexin 43 a check-point component of cell proliferation implicated in a wide range of human testis diseases. *Cellular and Molecular Life Science*, 2013, 70: 1207- 20.
34. Kierszenbaum AL. Çeviri: Demir R. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi- Patolojiye Giriş*. Ankara, 2006: Palme Yayıncılık.
35. Kaya M, Polat S, Mete UÖ, Tap Ö, Özgür H. *Özel Histoloji Ders Notları*. Adana, 2006: Ç.Ü. Tıp Fakültesi Yayınları.
36. Tekelioğlu M. *Özel Histoloji, İnce Yapı ve Gelişme*. Ankara, 2002: Antıp A.Ş.
37. Ovalle WK, Nahirney PC. Çeviri: Müftüoğlu S. *Netter Temel Histoloji*. Ankara, 2009: Güneş Tıp Kitabevleri.
38. Gartner LP, Hiatt JL. Çeviri: Dağdeviren A. *Renkli Histoloji Atlası*, 4. Baskı. Ankara, 2009: Güneş Tıp Kitabevleri.
39. Snell RS. *Clinical anatomy*, 3rd ed. Boston, 1986: Brown and Company.
40. Kuran O. *Sistemik anatomi*. İstanbul, 1983: Filiz Kitabevi.
41. Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. Çeviri: Yıldırım M. *Prometheus Anatomi Atlası*. İstanbul, 2009: Nobel Tıp Kitabevleri.
42. Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques (4th ed.)*. Churchill, Livingstone, 1996: Medical Division of Pearson Professional Limited.
43. <http://www.tanimed.eu>.
44. Seed J, Chapin R, Clegg ED, Dostal LA, Foote RH, Hurtt ME, Klinefelter GR, Markris SL, Perreault SD, Schrader S, Seyler D, Sprando R, Treinen AK, Veeramachaneni RDN, Wise LD. Methods For Assessing Sperm Motility, Morphology And Counts In The Rat, Rabbit And Dog: A Consensus Report. *Reproductive Toxicology*, 1996, Vol. 10, No.3: 237-244
45. Viggiano JM, Herrero MB, Martinez SP, Gimeno M. Analysis of the Effect of Nitric Oxide Synthase Inhibition on Mouse Sperm Employing a Modified Staining Method for Assessment of the Acrosome Reaction. *Journal of Anthology*, 1996, Vol. 17. No. 6: 692-8.

46. Saether T, Tran TN, Rootwelt H, Grav HJ, Christophersen BO, Haugn TB. Essential Fatty Acid Deficiency Induces Fatty Acid Desaturase Expression In Rat Epididymis, But Not In Testis. *Reproduction*, 2007, 133(2): 467-77.
47. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem*, 1988, 34: 497-500.
48. Aebi H. *Catalase*. In Bergmeyer HU (ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. New York and London, 1974: Academic Press. 673-7.
49. Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med*, 1967, 70:158-70.
50. Uchiyama M, Mihara M. Determination of MDA precursor in tissue by TBA test. *Anal Biochem*, 1978, 36: 271-8.
51. Erel O. A Novel Automated Direct Measurement Method For Total Antioxidant Capacity Using A New Generation, More Stable ABTS Radical Cation. *Clinical Biochemistry*, 2004, 37: 277-85.
52. Erel O. A New Automated Colorimetric Method For Measuring Total Oxidant Status. *Clinical Biochemistry*, 2005, 38: 1103-11.
53. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 1951, 193, 265-75.
54. <http://www-personal.umich.edu/~akc/cycleSE.htm>.
55. Öner A, Turan O, Aytekin Y, Sağduyu H, Altuğ T, Kural AR. The effect of cefoperazone, ceftriaxone and cefotaxime on spermatogenesis. *Türk Üroloji Dergisi*, 1994, Cilt: 20, Sayı: 4, 456-61.
56. Kim JC, Kim KH, Chung MK. Testicular cytotoxicity of DA-125, a new anthracycline anticancer agent, in rats. *Reproductive Toxicology*, 1999, 13, 391-7.
57. Ateşşahin A, Şahna E, Türk G, Çeribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A, Bulmuş Ö. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J. Pineal Res*, 2006, 41, 21-7.
58. He Z, Qiu J, Li J, Zhao D, Chen G, Chen L. Long-Term Effects of Conversion From Cyclosporine to Rapamycin on Testicular Function and Morphology in a Rat Transplantation Model. *Elsevier Inc. Transplantation Proceedings*, 2013, 45, 763–9.
59. Nashwa AM, El-Sawy ASF, El-Ashmawy IM. Effects of ceftriaxone on reproductive and biochemical aspects of male rats. *Alex. J. Vet. Science*, 2011, Vol. 33 No.1: (43-50).

60. Manson JM, Zolna NE, Kang YJ, Johnson CM. Effects of cefonicid and other cephalosporin antibiotics on male sexual development in rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 1987, 31: 991–7.
61. Hess RA, Nakai M. Histopathology of male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histol Histopathol*, 2000, 15:207–24.
62. Kim JM, Ghosh SR, Weil ACP, Zirkin BR. Caspase-3 and caspase-activated deoxyribonucleases are associated with testicular germ cell apoptosis resulting from reduced intra testicular testosterone. *Endocrinology*, 2001, 142:3809–16.
63. Pointis G, Segretain D. Role of connexin-based gap junction channels in testis. *Trends Endocrinol. Metab*, 2005, 16: 300–6.
64. Wong CH, Cheng CY. The blood-testis barrier: its biology, regulation, and physiological role in spermatogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol*, 2005, 71: 263–96.
65. Kopera I, Durlej M, Hejmej A, Knapczyk-Stwora K, Duda M, Slomczynska M, Bilinska B. Differential Expression of Connexin 43 in Adult Pig Testes During Normal Spermatogenic Cycle and After Flutamide Treatment. *Reprod Dom Anim*, 2011, 46, 1050–60.
66. Pointis G. Gap junctional communication in the male reproductive system. *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, 1719: 102–16.
67. Sridharan S, Simon L, Meling DD, Cyr DG, Gutstein DE, Fishman GI, Guillou F, Cooke PS. Proliferation of adult sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol Reprod*, 2007, 76, 804–12.
68. Riskey MS, Tan IP, Roy C, Saez JC. Cell-, age- and stage dependent distribution of connexin 43 gap junctions in testes. *J Cell Sci*, 1992, 103: 81–96.
69. Izzo G, d'Istria M, Ferrara D, Serino I, Aniello F, Minucci S. Connexin 43 expression in the testis of the frog *Rana esculenta*. *Zygote*, 2006, 14: 349-57.
70. Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Reprod Toxicol*, 2004, 18: 413-21.
71. Batias C, Defamie N, Lablack A, Thepot D, Fenichel P, Segretain D. Modified expression of testicular gap-junction connexin 43 during normal spermatogenic cycle and in altered spermatogenesis. *Cell Tissue Res*, 1999, 298:113-21.
72. Steger K, Tetens F, Bergmann M. Expression of connexin 43 in human testis. *Histochem Cell Biol*, 1999, 112:215–20.

73. Defamie N, Mograbi B, Roger C, Cronier L, Malassine A, Brucker-Davis F, Fenichel P, Segretain D, Pointis G. Disruption of gap junctional intercellular communication by lindane is associated with aberrant localization of connexin43 and zonula occludens-1 in 42GPA9 Sertoli cells. *Carcinogenesis* 22, 2001, 1537–42.
74. Zhou DR, Zhou YC, Cui GH, Guo X, Qin J, Gui YT, Cai ZM. Gossypol repressed the gap junctional intercellular communication between Sertoli cells by decreasing the expression of connexin 43. *Toxicol In Vitro* 22, 2008, 1719–25.
75. Salian S, Doshi T, Vanage G. Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of Sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*, 2009, 265, 56–67.
76. Timmermans LM. Modifications in spermatogenesis following antibiotic therapy. *Acta Urol Belg*, 1989, 57: 35–46.
77. Narayana K. An aminoglycoside antibiotic gentamycin induces oxidative stress, reduces antioxidant reserve and impairs spermatogenesis in rats. *J. Toxicol. Sci*, 2008, 33: 85-96.
78. Aruldas MM, Subramanian S, Sekar P, Vengatesh G, Chandrahasan G, Govindarajulu P, Akbarsha MA. Chronic chromium exposure-induced changes in testicular histoarchitecture are associated with oxidative stress: study in a nonhuman primate (*Macaca radiata* Geoffroy). *Hum Reprod* 20, 2005, 2801-13.
79. Vardi N, Parlakpınar H, Ates B, Cetin A, Otlu A. Antiapoptotic and antioxidant effects of β -carotene against methotrexate-induced testicular injury. *Fertility and Sterility*, 2009, Vol. 92, No. 6, doi:10.1016.
80. Faridha A, Faisal K, Akbarsha MA. Aflatoxin treatment brings about generation of multinucleate giant spermatids (symplasts) through opening of cytoplasmic bridges: light and transmission electron microscopic study in Swiss mouse. *Reprod Toxicol*, 2007, 24, 403–8.
81. Yin Y, Dewolf WC, Morgentaler A. Experimental cryptorchidism induces testicular germ cell apoptosis by p53-dependent and independent pathway in mice. *Biol Reprod*, 1998, 58: 492–6.
82. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol*, 2007, 35(4): 495–516).
83. Bozec A, Chuzel F, Chater S, Paulin C, Bars R, Benahmed M, Mauduit C. The mitochondrial-dependent pathway is chronically affected in testicular germ cell death in adult rats exposed in utero to anti-androgens. *J Endocrinol*, 2004, 183, 79–90.

84. Benbrahim-Tallaa L, Siddeek B, Bozec A, Tronchon V, Florin A, Friry C, Tabone E, Mauduit C, Benahmed M. Alterations of Sertoli cell activity in the longterm testicular germ cell death process induced by fetal androgen disruption. *J Endocrinol*, 2008, 196, 21–31.
85. Lee Nikki PY, Lrung KW, Wo JY. Blockage of testicular connexins induced apoptosis in rat seminiferous epithelium. *Apoptosis 11*, 2006, 1215-29.
86. Weyers AI, Ugnia LI, Ovando HG, Gorla NB. Ciprofloxacin increases hepatic and renal lipid hydroperoides levels in mice. *Biocell*, 2002, 26: 225-8.
87. Sanchez G, Hidalgo ME, Vivanco JM, Escobar J. Induced and photoinduced DNA damage by quinolones: Ciprofloxacin, ofloxacin and nalidixic acid determined by comet assay. *Photochem. Photobiol.*, 2005, 81: 819-22.
88. Saalu LC, Osinubi AA, Olagunju JA. Early and Delayed Effects of Doxorubicin on Testicular Oxidative Status and Spermatogenesis in Rats. *International Journal of Cancer Research*, 2009, 1811- 9727.
89. Akondi RB, Akula A, Challa SR. Protective Effects of Rutin and Naringin on Gentamycin Induced Testicular Oxidative Stress. *Eur J Gen Med*, 2011, 8(1): 57-64.
90. Aksoy F, Dogan R, Ozturan O, Yıldırım YZ, Yenigün A, Veyseller B, Öztürk B. Betahistine Exacerbates Amikacin Ototoxicity .*Annals of Otolaryngology & Rhinology & Laryngology*, 2014, 10.1177/0003489414557020.
91. Parra Cid T, Coneja JR. Antioxidant nutrients protect against cyclosporine A nephrotoxicity. *Toxicology*, 2003, 189, 99-111.
92. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004, 212, 1-7.
93. Garner DL, Hafez ESE. *Spermatozoa and seminal plasma*. In Hafez ESE (eds.) *Reproduction in Farm animals*, 6th ed. Philadelphia, USA, 1993: Lea and Febiger. 165-87.
94. Masuda H, Fujihira S, Ueno H. Ultrastructural study on cytotoxic effects of cyclosporine A in spermiogenesis in rats. *Med Electron Microsc*, 2003, 36(3): 183–91.
95. Tanyildizi S, Türk G. The effects of diminazene aceturate and ceftriaxone on ram sperm. *Theriogenology*, 2004, 15;61(2-3): 529-35.
96. Akaike M, Inazu M, Ohno H, Takayama K, Omosu M, Kobayashi T. Effects of cefpirome sulfate on male sexual development in rats. *J Toxicol Sci*, 1990, 15: 109–27.
97. Kumar SG, Narayana K, Bairy KL, D'souza UJ, Samuel VP, Gopalakrishna K. Dacarbazine induces genotoxic and cytotoxic germ cell damage with concomitant

decrease in testosterone and increase in lactate dehydrogenase concentration in the testis. *Mutat Res*, 2006, 607(2): 240-52.

98. Khajavi NA, Razavi S, Mardani M, Tavalae M, Deemeh MR, Nasr-Esfahani M. Can Zeta sperm selection method, recover sperm with higher DNA integrity compare to density gradient centrifugation? *IJRM*, 2009, 7(2): 73-7.

99. Movahed E, Sadrkhanlou RAR, Ahmadi A, Nejati V, Zamani Z. Effect of purine nucleoside analogue-acyclovir on the sperm parameters and testosterone production in rats. *Int J Fertil Steril*, 2013, 7(1): 49-56.

100. Çeribaşı AO, Sakin F, Türk G, Sönmez M, Ateşşahin A. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2012, Vol: 64, Issues 7–8, 717–24.

101. Fritsche L, Budde K, Dragun D. Testosterone concentrations and sirolimus in male renal transplant patients. *Am J Transplant.*, 2004, 4(1): 130 –1.

102. Tondolo V, Citterio F, Panocchia N. Gonadal function and immunosuppressive therapy after renal transplantation. *Transplant Proc.*, 2005, 37(4): 1915–7.

EKLER

Ek 1. Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

Adı: Hilal

Soyadı: Şahin

Doğum Yeri: İslahiye/Gaziantep

Doğum Tarihi: 01.12.1985

Eğitim Bilgileri

Kırıkhan Naim Atakaş Anadolu Lisesi-Hatay (1996-2003).

Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Lisans Eğitimi-Diyarbakır (2006-2011).

İnönü Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabim Dalı, Yüksek Lisans Eğitimi-Malatya (2013-2015).

İletişim Bilgileri

hilalsahin112@gmail.com

Ek 2. Etik Kurul Onayı



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI


Toplantı Tarihi : 31-01-2014
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2014/A-06
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Sıçan
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : Wistar Albino
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 30 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 8-10 Haftalık

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Prof.Dr Nigar VARDI'nın yürütücüsü olduğu "Sıçanlarda Seftriaksonun Testis Histolojisi ve Sperm Parametreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" isimli 2014/A-06 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

<p>Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Başkan</p>	<p><i>Araştırmacı</i> Prof. Dr. Nigar VARDI Üye</p>	<p>Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye</p>
<p>Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye</p>	<p>Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye</p>	<p>Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye</p>
<p><i>Katılmadı</i> Salih AVCI Sivil Üye</p>	<p><i>Katılmadı</i> Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye</p>	

EK.3. Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı Kararı



T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi
Deney Hayvanları Etik Kurulu Başkanlığı

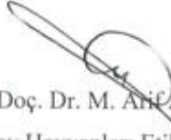
Sayı : 60161673-01/35
Konu : 2014/A-06 nolu çalışma

MALATYA
21 / 05 / 2015

Sayın: Prof.Dr Nigar VARDI
Tıp Fakültesi Histoloji AD

2014/A-06 protokol nolu "Sıçanlarda Seftriaksonun Testis Histolojisi ve Sperm Parametreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi" isimli çalışmanın başlığının "Testiküler Konneksin 43 İfadesi Üzerine Seftriakson'un Etkileri." şeklinde değiştirilmesi Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı tarafınca uygun görülmüştür.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


Doç. Dr. M. Arif ALADAĞ
Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanı

Inönü Üniversitesi Merkez Kampüsü 44280 MALATYA
Telefon: (0 422) 341 00 45 Faks: (0 422) 341 00 36
e-posta: tıp@inonu.edu.tr Elektronik Ağ : <http://cms.inonu.edu.tr/tr/tip>

Bilgi için: