

**ERKEK SIÇANLARDA POLİKLORLU BİFENİLLERİN
(AROKLOR 1254) NEDEN OLDUĞU REPRODUKTİF
HASARA KARŞI TETRANDRİNİN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Feride KARAHAN

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Aslı ÇETİN
Yüksek Lisans Tezi – 2015**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ERKEK SIÇANLARDA POLİKLORLU BİFENİLLERİN (AROKLOR 1254)
NEDEN OLDUĞU REPRODUKTİF HASARA KARŞI TETRANDRİNİN
KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Feride KARAHAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Aslı ÇETİN

**Bu araştırma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2013/11 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA

2015

KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Feride KARAHAN “Erkek Sıçanlarda Poliklorlu Bifenillerin (Aroklor 1254) Neden Olduğu Reprodüktif Hasara Karşı Tetrandrinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması”** konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16/06/2015



Prof. Dr. Enver OZAN
Fırat Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Meltem KURUŞ
İnönü Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Aslı ÇETİN
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı



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.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xvi
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	2
2.1.1. Testis Anatomisi.....	2
2.1.1.1. Skrotum.....	2
2.1.1.2. Testisler.....	2
2.1.1.3. Epididimis.....	2
2.1.1.4. Duktus deferens (Vas deferens).....	6
2.1.2. Testis Embriyolojisi.....	6
2.1.2.1. Primordiyal Germ Hücreleri.....	7
2.1.2.2. Gonadlar.....	8
2.1.3. Testis Histolojisi.....	10

2.1.3.1. Seminifer Tübüller.....	10
2.1.3.2. Sertoli Hücreleri.....	11
2.1.3.3. Kan- Testis Bariyeri.....	12
2.1.3.4. Spermatogenez.....	12
2.1.3.5. Spermiyogenez.....	14
2.1.3.6. Olgun (Matür) Spermin Yapısı.....	16
2.1.3.7. İntersitisyel Doku	17
2.1.3.8. Miyoid Hücreler.....	17
2.1.3.9. Leydig Hücreleri.....	18
2.1.3.10. Rete Testis.....	19
2.1.3.11. Duktuli Efferentes.	19
2.1.3.12. Epididimis.....	20
2.1.3.13. Duktus Deferens (Vas Deferens).....	21
2.1.3.14. Duktus Ejaküatoryus.....	22
2.1.3.15. Veziküla Seminalisler	22
2.1.3.16. Prostat Bezi.....	23
2.1.3.17. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri).....	24
2.2. Poliklorlu Bifeniller (PCB).....	25
2.2.1. Poliklorlu Bifenillerin Etkileri.....	26

2.3.Tetrandrin	27
3. MATERYAL VE METOD	28
3.1. Histolojik Yöntemler	29
3.1.1. Mayer'in Hematoksilen-Eozin Metodu.....	30
3.1.2. Histolojik İnceleme İçin İstatiksel Değerlendirme.....	30
3.1.3. İmmunohistokimyasal boyama prosedürü.....	31
3.2. Biyokimyasal Yöntemler.....	32
3.2.1.Örneklerin Alınması ve Hazırlanması.....	32
3.2.2. Homojenatların Hazırlanması.....	32
3.2.3. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçümü.....	32
3.2.4. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü.....	32
3.2.5. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü.....	33
3.2.6. Doku Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü.....	33
3.2.7. Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü.....	33
3.2.8. Doku Protein Ölçümü.....	34
3.3. Organ Ağırlıkları ve Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi.....	34
3.4. Biyokimya ve Sperm Analizleri İçin İstatiksel Değerlendirme.....	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Işık Mikroskobik Bulgular.....	35

4.1.1. Kontrol Grubu Işıık Mikroskobik Bulguları.....	35
4.1.2. Aroklor 1254 Grubu Işıık Mikroskobik Bulguları.....	37
4.1.3. Aroklor 1254 + Tetrandrin Grubu Işıık Mikroskobik Bulguları.....	43
4.1.4. Tetrandrin Grubu Işıık Mikroskobik Bulguları.....	47
4.1.5. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	49
4.2. Biyokimyasal Bulgular.....	51
4.3. Spermatolojik Değerlendirme.....	52
5. TARTIŞMA.....	54
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	60
KAYNAKLAR.....	61
EKLER.....	72
Ek 1. ÖZGEÇMİŞ.....	72
Ek 2. ETİK KURUL ONAYI.....	73

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve yoğun tez dönemimde, yaptığım deneysel çalışmalar ve bu tezin hazırlanması aşamalarında bana büyük bir titizlik ve sabırla yol gösteren tez danışmanım, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Aslı ÇETİN'e, fikirleri ile bana destek olan Anabilim Dalı Başkanımız değerli hocam Prof. Dr. Nigar VARDI'ya, benden desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Mehmet GÜL'e ve Doç. Dr. Meltem KURUŞ'a, çalışmamın sperm analizlerinde büyük emeği geçen Prof. Dr. Muhterem AYDIN'a ve çalışmamızın biyokimyasal analizinde katkılarını esirgemeyen Doç. Dr. Osman ÇİFÇİ'ye ve tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm arkadaşlarım Hilal ŞAHİN'e ve Semir GÜL'e, tüm çalışma arkadaşlarıma, her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca 2013/11 no' lu projeyi maddi yönden destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Başkanlığı'na katkılarından dolayı teşekkür ederim.

ÖZET

ERKEK SIÇANLARDA POLİKLORLU BİFENİLLERİN (AROKLOR 1254) NEDEN OLDUĞU REPRODUKTİF HASARA KARŞI TETRANDRİNİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Amaç: Poliklorlu bifenillerden AR1254 immun sistem baskılayıcı, endokrin bozucu, nörotoksik, kanserojenik, teratojenik etkileri olan bir bifenil bileşiğidir. Tetrandrin ise antiinflamatuvar, anti kanser, immunsupresif ve sitoprotektif etkilere sahip bir bisbenzilisoquoline bileşiğidir. Bu çalışma, AR1254 ile oluşturulmuş reproduktif hasara karşı tetrandrinin koruyucu etkilerini göstermek amacıyla planlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda 28 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. Sıçanlar rasgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. (n=7) Gruplar sırasıyla:

1. Grup: Kontrol
2. Grup: AR1254
3. Grup: AR1254+TET
4. Grup: TET

Deney süresi sonunda sıçanlardan testis doku örnekleri alındı. Örnekler rutin doku takip işlemlerinden geçirildi, 5µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere histopatolojik incelemeler için Hematoksilen-Eozin (H-E), immunohistokimyasal incelemeler için Kaspaz-3 boyama metodları uygulandı. Hazırlanan preparatlar Leica DFC 280 ışık mikroskobu ve LeicaQWin Plus analiz sistemi kullanılarak incelendi.

Bulgular: Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi ile kontrol ve TET grubu testis örnekleri normal histolojik görünümde izlendi. AR1254 uygulanan sıçanların testis dokusunda tunikaalbuginea tabakasında konjesyon gözlemlendi. İnterstisyel alanda ise vasküler konjesyon, vakuolizasyon ve ödem tespit edildi. Seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerde azalma, lümene dökülme ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler olduğu belirlendi. AR1254+TET grubunda ise bu bulgulara belirgin derecede azalma olduğu tespit edildi. Biyokimyasal analizlerde ise AR1254 verilen sıçanlarda TBARS düzeyinin anlamlı düzeyde arttığı, TET uygulamasının bu artışı anlamlı düzeyde azalttığı izlendi. AR1254 uygulaması GSH,

SOD, GPx ve CAT düzeylerinde azalmaya neden olurken, TET uygulaması ise bu değerlerin artışına neden olmuştur. AR1254 uygulamasının sperm motilitesi ve konsantrasyonunda önemli düzeyde azalmaya neden olurken, TET uygulaması bu değerlerde artışa neden olmuştur.

Sonuç: AR1254 ile oluşturulan reproduktif hasara karşı TET'in iyileştirici etkileri olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: Aroklor1254, Testis, Tetrandrin, Sıçan, Kaspaz-3.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF POTENTIAL PROTECTIVE EFFECTS OF TETRANDRINE AGAINST REPRODUCTIVE DAMAGE INDUCED BY AROCLOR 1254 IN MALE RATS

Aim: AR1254 is a compound which from polychlorinatedbiphenyls have some effects such as immune system suppressors, endocrine disruption, neurotoxic, carcinogenic and teratogenic. Tetrandrine, a bisbenzylisoquinoline alkaloid, has anti-inflammatory, anti-cancer, immunosuppressive and cytoprotective effects. This study was planned to investigation of potential protective effects of Tetrandrine againts reproductive damage induced by AR1254 in male rats.

Material and Method: In our study 28 Sprague-Dawley rats were used. Rat were divided into 4 groups randomly selected. Groups:

1. Group: Control
2. Group: Ar1254
3. Group: AR1254+TET
4. Group:TET

At the end of the study testis tissue samples were taken from rats. The testis samples were processed by routine tissue techniques and embedded in paraffin. 5µm thick sections of tissues were cut, mounted on slides, stained with Hematoxylin-Eosin (H-E) and examined under a Leica DFC280 light microscope by Leica Qwin and Image Analysis System.

Results: In control and TET groups, testis showed a normal histological appearance with H-E procedure. Congestion in tunica albuginea layer were observed in AR1254 group, In AR1254 group, testis tissue showed some histological alterations such as : congestion in tunica albuginea layer, congestion, oedema and vacuolisation in interstitial area, reduction in germ line cells in seminiferous tubules, squamation in lümen, arrested spermatocytes in different stage in division were observed. These findings were significantly decreased in AR1254+TET group. In biochemical analysis, AR1254 lead to a significant increased in TBARS levels and significant decrease in

GSH, SOD, GPx and CAT levels in testis tissue compared with other groups. Besides, in the AR1254+TET group there was an attenuated increased in TBARS levels and an increase in GSH, SOD, GPx and CAT activities.

Conclusion: As a result of TET have protective effects against the reproductive damage which created with AR1254.

Keywords: Aroclor1254, Testis, Tetrandrine, Rat, Caspase-3

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP : Androjen bağlayıcı proteini

AEC : 3-Amino-9-Ethylcarbazole

A(CoA) : Asetilkoenzim

aER : Granülsüzendoplazmikretikulum

AH : Aril hidrokarbon

AR 1254 : Aroclor 1254

AMH : Antimüllerian hormon

BPH : Beningprostatikhiperplazia

CAT: Katalaz enzimi

DDT : Diklorodifeniltriklorethan

DHT : Dihidrotestosteron

DNA : Deoksiribonükleik asit

DTNB : 5,5'-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit]

FSH : Folikülstimülan hormon

gER : Granülerendoplazmikretikulum

GR : Glutathionereductase

GSH : Glutatyon

GSSG : OxidizedGlutathione

GST : Glutatyon-s-transferaz

GPx : Glutathioneperoxidase

H₂O₂ : Hidrojen peroksit

H-E : Hematoksilen-eosin

hCG : İnsan koryonikgonadotropin

i.p : İntraperitoneal

LH : Leydig hücreleri

MIS : Müllerian inhibitör madde

NADPH : Nicotinamideadeninedinucleotidephosphate-oxidase

NBT: Nitrobluetetrazoliumu

PAS: Periyodik asit- schiff

PAF : Prostatik Asit Fosfataz

PBS : PhosphateBufferedSaline

PCB :P oliklorlubifeniller

ROS : Serbest oksijen radikalleri

SE : Standart hata

SOD: Süper oksit dismutaz enzim

SRY: Y kromozomu üzerinde cinsiyeti belirleyen bölge

StAR : Steroidogenik akut regülatör protein

TBARs : Tiobarbitürat reaktif maddeler

TBF : Testis belirleyici faktör

TCDD : Tetrachlorodibenzo-p-dioksin

TET : Tetrandrin

cm : santimetre

kg : Kilogram

mg : Miligram

mm : Milimetre

m : Metre

μm : Mikrometre

nm : Nanometre

α-GT : α-Glutamyltranspeptidase

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Erkek Üreme Organları	3
Şekil 2.2. Testis ve Epididimis	4
Şekil 2.3. Üç haftalık embriyoda, yolk kesesi duvarında, allantois bağlantısına yakın bir yerde primordialgerm hücrelerini gösteren şema (A).Primordial germ hücrelerinin, son bağırsak ve dorsal mezenter boyunca,genital kabartıya doğru giden göç yolu (B).....	7
Şekil 2.4. Altı haftalık embriyonun lumbal bölgeden geçen transvers kesitinde, primitif cinsiyet kordonlarıyla birlikte farklanmamış gonadın görünümü. Bazı primordial germ hücreleri primitif cinsiyet kordonlarına ait hücrelerle çevrelenmiştir.....	8
Şekil 2.5. Spermiyogenez ve olgun spermatozoa	14
Şekil 2.6. Poliklorlubifenillerin genel yapısı ve klor bağlanma pozisyonları	26
Şekil 2.7. Tetrandrinin genel yapısı.....	27
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Normal yapıdaki seminifer tübüller, interstisyel alan ve spermatogenik hücreler görülmemektedir. H-E; x20.....	35
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alan, leydig hücreleri ve spermatogenik seri hücreler normal histolojik görünümde izlendi. H-E; x 40.....	36
Şekil 4.3. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda tunika albuginea tabakasında belirgin konjesyon gözlemlendi. H-E; X20.....	37
Şekil 4.4. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda vasküler konjesyon (oklar) ve seminifer tübül yapısında dejenerasyon gözlemlendi. H-E; X10	38

Şekil 4.5. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda vakuolizasyon gözlendi. H-E; X40	39
Şekil 4.6. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda interstisyel alanda ödem oluşumu (yıldız), seminifer tübül epitelinde bozulma, spermatogenez seriyi oluşturan hücrelerin düzensiz yerleşimi gözlendi. H-E; X40.....	40
Şekil 4.7. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül epitelinde dejenerasyon ve lümene dökülen hücreler (oklar) gözlendi. H-E; 40.....	41
Şekil 4.8. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler (oklar) gözlendi. H-E; X40.....	42
Şekil 4.9. AR 1254 + TET grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alanda ödem ve vasküler konjesyonda azalma, seminifer tübül hasarında azalma ve spermatozoon sayısında artış gözlendi. H-E; X20	43
Şekil 4.10. AR 1254 + TET grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Lümene dökülen hücrelerde belirgin derecede azalma (oklar) gözlendi. H-E; X40.....	44
Şekil 4.11. AR 1254 + TET grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücrelerde azalma (oklar) gözlendi. H-E; X40.....	45
Şekil 4.12. AR 1254 + TET grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alanda görülen vakuolizasyon ve ödemde azalma. H-E; X40.....	46
Şekil 4.13. TET verilen testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler ve interstisyel alandaki hücre yapılarıyla birlikte testis dokusu normal histolojik yapıda gözlendi. H-E; X20	47

- Şekil 4.14.** TET verilen testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü.
Seminifer tübüller, spermatogenik seri hücreler ve interstisyel alan normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. H-E; X40.....48
- Şekil 4.15.** Deney gruplarındaki Kaspaz-3 aktiviteleri. Kontrol (A), AR 1254 (B), AR 1254+ TET (C), TET (D). Kaspaz-3; X40.....49

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1.	Tespit maddesi ve süresi29
Tablo 3.2.	Doku takip basamakları29
Tablo 4.1.	AR 1254'ün oluşturduğu tübül çapı ve tübül epitel kalınlığındaki değişiklikler üzerine TET'in etkileri.....50
Tablo 4.2.	Tübüllerin Histolojik Skorlaması.....50
Tablo 4.3.	Tetrandrine (TET) ve AR 1254 verilmiş ratlarda TBARS, GSH, CAT, SOD ve GPx düzeyleri.....51
Tablo 4.4.	TET ve AR 1254 verilmiş ratlarda Testis ağırlıkları, Epididimis ağırlıkları, Seminal vezikül ağırlıkları, Prostat ağırlıkları.....52
Tablo 4.5.	TET ve AR 1254 verilmiş ratlarda sperm motilitesi, epididimal sperm konsantrasyonu ve anormal sperm oranı.....53

1. GİRİŞ

Poliklorlu bifeniller (PCB), endüstriyel amaçla üretilen organik klorlu bileşiklerdir. Doğada yaygın kimyasal kirlenmeye yol açtıkları ve lipofilik özellikleri nedeniyle canlı organizmada birikme eğilimi gösterdikleri bilinmektedir. PCB'ler, bir fenil yapısı üzerine değişik sayıdaki (1 ile 10 arasında) klor iyonlarının farklı konfigürasyonlarda (orto, meta ve para) bağlanmasıyla meydana gelen aromatik bileşiklerdir (1).

Kimyasal ve fiziksel yapı bakımından oldukça kalıcı (stabil) maddeler olduklarından, başlıca kapasitör, trafo, hidrolik pompa, matbaa mürekkebi, boya, pestisit ve elektrik izolasyon sıvılarının yapımında (yanmayı ve enerji kaybını önlemek için) kullanılmaktadırlar (2). PCB'ler, bilinen tüm kimyasal maddeler arasında doğada en kalıcı olanlarıdır. Lipofilik özellikleri nedeniyle yağ dokusunda birikme eğiliminde oldukları bilinmektedir (3, 4). PCBlerin kanserojenik, bağışıklık sistemini baskılayıcı, hormonal sistemin işleyişini bozucu, nörotoksik, hepatoksik ve teratojenik etkileri ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır (2, 5-11).

Poliklorlu bifenil bileşiklerinden Aroklor 1254 (AR 1254)'ün insan ve hayvanlarda erkek üreme sistemi üzerinde pek çok olumsuz etkileri olduğu gösterilmiştir. AR 1254 ve diğer poliklorlu bifenil bileşiklerin gonotropin ve steroid hormon seviyelerinde azalmaya (12), Sertoli hücrelerinde metabolik fonksiyon bozukluğuna(13), Leydig hücrelerinde LH reseptör yoğunluğunda ve steroidojenik enzim aktivitesinde azalmaya (14), testis, epididimis ve aksesuar bezlerin ağırlığında azalmaya (15-16), sperm sayısında, hareketliliğinde azalma, normal sperm sayısında artış (15, 17) ve histolojik olarak testis dokusunda dejenerasyona (18, 19) neden olduğu gösterilmiştir.

Tetrandrin (TET), Çin tıbbında kullanılan Radix Stephania tetrandra bitkisinin kökünden izole edilmiş bir bisbenzil isoquioline bileşiğidir (20, 21). TET, anti-inflamatuvar, anti kanser, immunsupresif ve sitoprotektif etkilere sahiptir (20). TET lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir. Hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve süperoksit radikalleri içeren serbest oksijen radikallerinin (ROS) üretimini etkilemektedir. TET, aritmi, hipertansiyon, inflamasyon ve bazı kardiyovasküler hastalıklarda kullanılmaktadır (22).

Bu çalışmada, TET' in AR 1254 kaynaklı reproduktif toksisitesi üzerine muhtemel olumlu etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlandı. AR 1254'ün erkek sıçanlarda neden olduğu reproduktif toksisite incelenerek TET' in bu problemin çözümünde aktif olup olmadığı tespit edilmeye çalışıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi testislerden, genital boşaltım kanallarından, aksesuar cinsiyet bezlerinden ve penisten oluşmaktadır (Şekil 2.1). Aksesuar cinsiyet bezleri vezikula seminalisler, prostat ve bulboüretral bezlerdir. Testis, spermatogenez (sperm üretimi) ve steroidogenez (seks hormonları olarak adlandırılan androjenlerin sentezlenmesi) olmak üzere başlıca iki fonksiyona sahiptir (23, 24, 25, 26). Başta testosteron olmak üzere androjenler spermatogenez için gereklidir, erkek embriyonun erkek fetüse gelişiminde önemli rol oynarlar ve seksüel dimorfizmden sorumludurlar. Erkek gametlerinin üretimi sırasında hücre bölünme olaylarında hem mitoz, hem de mayoz gerçekleşmektedir (23, 24, 25).

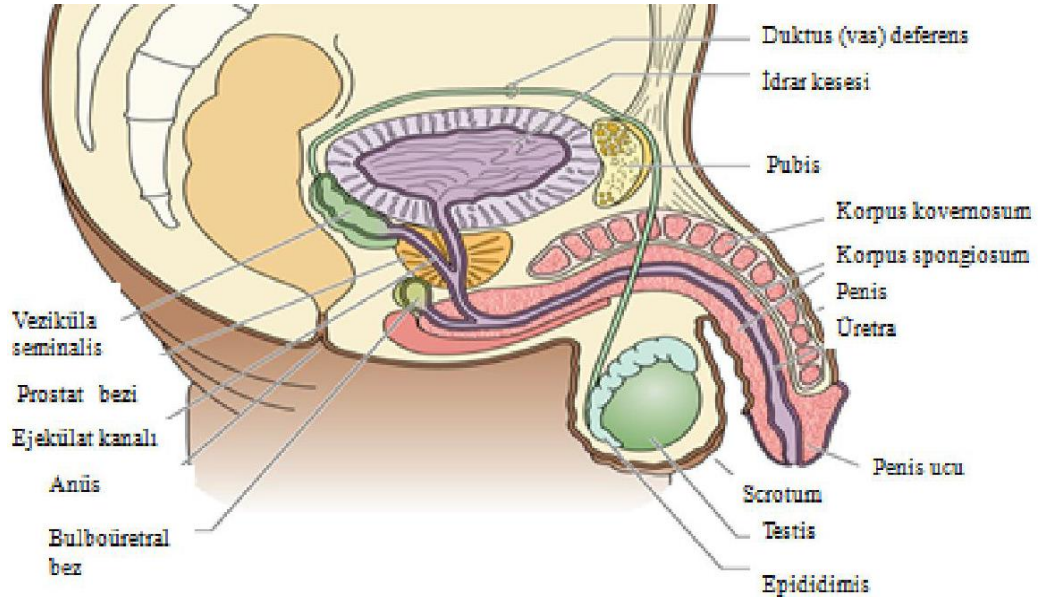
2.1.1. Testis Anotomisi

2.1.1.1. Skrotum:

Symphysis pubica'nın hemen aşağısında bulunan, deri, fibröz kılıflar ve bir miktar kas liflerinden oluşmuş bir torbadır. İçerisinde, testis ve funikulus spermaticus bulunur. Skrotumun dış yüzünün şekli bazı şartlara bağlı olarak değişir. Sıcakta ve yaşlılarda kaslar gevşer. Bu nedenle skrotumun yüzeyi genişleyip düzleşir. Soğukta ve gençlerde m. Dartos kasının kasılması sonucu, yüzeyi buruşarak küçülür ve testisi sıkıca sarar. Testislerin normal fonksiyon görebilmeleri için vücut sıcaklığından daha düşük bir sıcaklıkta bulunmaları gerekir. Skrotum, yapısındaki özellikler (derisinde bol miktarda ter bezleri, diğer katmanlarda kas lifleri, m.dartos, mkreamaster vb.) sayesinde gerekli düşük sıcaklığı (34-35 derece) sağlamaktadır (27, 28, 29).

2.1.1.2. Testisler

Testisler, yetişkin insanlarda ovoid biçimli, yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda, 2,5-3,5 cm genişliğinde ve 20-30 g ağırlığındadır. Funiculus spermaticus aracılığıyla skrotum içinde asılı durumda ve oblik pozisyonda yerleşmiş olup, erkek üreme hücrelerinin (sperm) ve seks hormonları olan androjenlerin üretildiği bir çift organdır (27, 30-38).

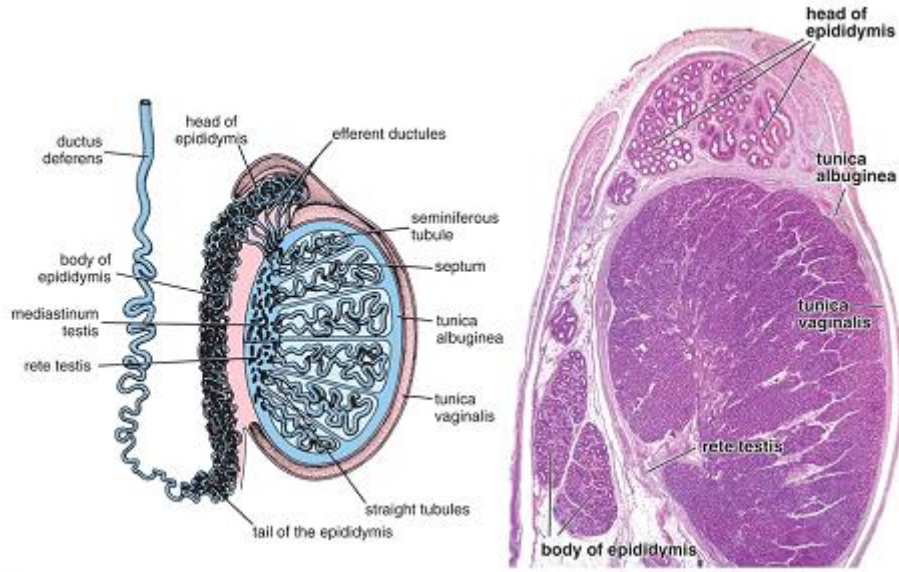


Şekil 2.1. Erkek Üreme Organları (39).

Kıvrımlı bir deri kesesi olan skrotumun iç yüzü, skrotal septum (septum scrotum) ile iki ayrı bölüme ayrılır. Testisler bu boşluklarda bulunur. Testislerin skrotum içindeki duruşları vertikal olmayıp, organın üst ucu öne ve dışa, alt ucu ise arkaya ve içe doğru bakmaktadır. Aynı büyüklükte olmalarına rağmen sol taraftaki testis sağ taraftakine göre genellikle 1 cm daha aşağı konumda yer almaktadır (35, 40).

Testisler skrotuma yerleştiklerinde karın içi sıcaklığından 2-3°C daha düşük sıcaklıkta bulunurlar. Karından atardamarla gelen kanın sıcaklığı toplardamar tarafından alındığından testislere düşük sıcaklıktaki kan ulaştırılır. Skrotum sıcakta gevşer, sarkar ve vücuttan uzaklaşır. Soğukta ise toplanır ve vücuda yaklaşarak testislerin optimum sıcaklıkta tutulmasını sağlar. Bu hareketleri, musculus cremaster ve musculus dartosun kasılmaları ile gerçekleşir (41, 42, 26- 29).

Testislerin facies medialis ve facies lateralis olarak adlandırılan iki yüzü; margo anterior ve margo posterior olarak adlandırılan iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior olarak adlandırılan iki ucu vardır (27, 35, 43). Testisler, dıştan içe doğru olmak üzere tunika vaginalis, tunika albugenia ve tunika vasküloza olmak üzere üç tabaka ile sarılmışlardır.



Şekil 2.2. Testis ve Epididimis (23).

a. Tunika vaginalis testis: Embriyonik processus vaginalisin distal kalıntısı olmakla birlikte testisin büyük bölümünü kaplayan periton kalıntısıdır ve mezotelyal hücrelerle döşelidir. Tunika vaginalis testisin lamina visceralis (epiorchium) ve lamina parietalis (periorchium) adı verilen iki yaprağı vardır. Lamina visceralis, yalnız testisin ön kenarı ile birlikte iki yüzünü örter; arka kenarın medial ve lateral kısımlarında ise kendi üstüne kıvrılarak lamina parietalis ile devam eder (27, 44). Lamina parietalis ise testisin alt kısmından üst kısmına doğru, funiculus spermaticus'un ön ve iç tarafını da saracak şekilde bir miktar yukarıya doğru uzanmaktadır. Lamina parietalis ve lamina visceralis arasında potansiyel bir boşluk oluşur ve bu boşluğa cavum serosum scroti denir ve boşluk içerisinde az miktarda seröz sıvı bulunmaktadır. Testislerin serbest hareketi bu kaygan özellikteki sıvıyla sağlanır (34, 35).

b. Tunika albuginea: Testisin anterolateral yüzeyinde bulunan ve düz kas hücreleri içeren yoğun fibroelastik bağ dokusundan oluşmuş (27, 45) kalın, mavimsi beyaz renkte fibröz bir tabakadır. Tunika albugineayı, arka kenarı hariç dıştan tunika vaginalis testisin lamina visceralisi örter. Peritonun bulunmadığı arka kenara epididimis tutunur, buradan testisin damar ve sinirleri girip çıkar (27, 38). Tunika albuginea testis arka yüzünde kalınlaşarak mediastnum testisi oluşturur (27, 45). Mediastnum testis, testisin üst ucundan alt ucuna kadar uzanır ve yukarı kısmı daha geniştir. Organa damar, sinir ve kanalların girip çıktığı bölgedir (27, 38, 45). Mediastnum testisin ön ve yan kısmından çıkan uzantılara 'septula testis' denir. Bu uzantılar, testis parankiminden geçerek tunica albuginea'nın iç yüzüne ışınsal uzanır ve organı piramidal şekilli 250-300

lopçuğa (lobuli testis) ayırır (35). Testis lobüllerinin taban kısımları periferde, tepe kısımları ise mediastinum testise yönelmiştir. Her lobül 1-4 adet seminifer tübül içerir. Seminifer tübüller 30- 80 cm uzunluğunda, 150-250 µm kalınlığında, spermilerin üretildiği, seminifer epitel ile döşeli kıvrımlı seyreden kanallardır. Her testiste 250-1000 adet tübül bulunmaktadır (46). Seminifer tübüller kör bir uçla başlayıp, lobçukların mediastinum testise bakan yüzlerinde düzleşip, birbirleriyle birleşerek sayıları 20-30'a iner. Tubuli seminiferi recti adı verilen bu kısa düz kanalların çapları genişleyerek 0,5 mm'ye ulaşır. Tubuli seminiferi rekti mediastinum testise uzanarak ve birbirleriyle anastomoz yaparak rete testisi oluştururlar. Rete testis, mediastinum testisin üst bölümünde sayıları 12-15 arasında değişen efferent kanalcıklara açılmaktadır. Efferent kanalcıklar, tunika albugineayı delerek testis dışına çıkarlar (27).

c. Tunika vaskulosa: Tunika albugineanın iç yüzünde yerleşmiş bir damar ağı tabakasıdır. Damarlar arasında kalan aralıkları gevşek bağ dokusu doldurur. Tunika vaskuloza, tunika albugineanın iç yüzünü ve tüm bölmelerin yüzlerini döşer ve tüm lobuli testiside sarmış olur (27, 38). Böylece testisin içindeki tüm lobuli testisi de sarmış olur (45, 47). Testis ve epididimis, aorta abdominalisin dalı olan arteria testikularislerden beslenirken, venleri ise önce funikulus spermaticus saran plexus pampiniformisi, daha sonra birbirleri ile birleşerek vena testikularisi oluştururlar. Bunlar sağ tarafta vena cava inferior, sol tarafta vena renalis sinistraya açılır (27, 28, 35). Sinirlenmesi, torakal 10.-11. medulla spinalis segmentlerinden kaynaklanan sempatik sinir lifleri ve nervus vagustan gelen parasempatik lifler ile sağlanır (38, 48).

2.1.1.3. Epididimis

Duktus efferentes ve duktus epididimisten oluşan bir organdır. Duktus epididimis ve duktus efferentes ile ilişkili düz kaslardan, damarlardan ve bağ dokusu örtülerinden oluşmaktadır. Epididimis, testisin süperiyor ve posteriyor yüzeyleri boyunca uzanan, hilal şekilli, yaklaşık 7,5 cm uzunluğunda bir yapıdır (23). Epididimis, rete testisten, duktuli efferentes testislerle aldığı spermatozoonları duktus deferense iletir. Ayrıca spermier için bir olgunlaşma ve depolama yeri olarak da görev yapar (37). Duktus epididimis yüksek düzeyde kıvrımlı, 4-6 m uzunluğunda bir tüptür. Epididimis baş, gövde ve kuyruk bölümlerine ayrılmaktadır. Duktus efferentes baş kısmını, duktus epididimis ise gövde ve kuyruk kısımlarını işgal etmektedir. Testisten epididimise giren yeni üretilmiş spermier, duktus epididimisten geçişleri sırasında motilite ve oositi fertilize etme yeteneği kazanarak olgun hale gelirler (23).

2.1.1.4. Duktus deferens(Vas deferens)

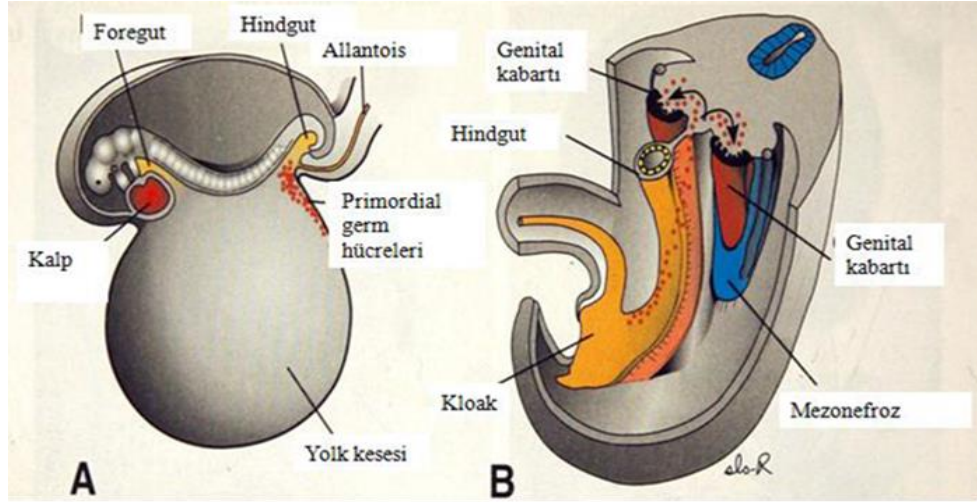
Epididimisin kuyruğunun devamı olan, kalın duvarlı müsküler bir kanaldır (49). Duktus deferens boşaltım kanalı sisteminin en uzun parçasıdır, testisin posteriyor sınırı boyunca testiküler damarlara ve sinirlere yakın olarak yükselir, spermatik kordonun bir kompanenti olarak inguinal kanalın içinden geçer ve abdomene girer (23). Mesane seviyesinde distal ucu genişleyerek duktus deferensin ampullasını oluşturur. Ampulla, seminal veziküllerin kanalları ile birleşir ve ejakülatuar kanal (duktus ejaklatoryus) olarak prostat bezinin içinde üretraya açılır (23, 49).

2.1.1. Testis Embriyolojisi

Testisler genellikle seks kromozom kompleksinde normal bir Y kromozomu taşıyan embriyolarda gelişir. Koordineli bir gen dizisi, testis gelişimini uyarır (50). İnsanlarda gonadlar, mezonefroz boyunca uzanan mezodermden gelişir (51, 52). Gonadlar (testisler ve overler), karın arka duvarını dseyen mezotel (mezodermal epitel), altında bulunan mezenşim (embriyonik baē dokusu) ve primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç kaynaktan köken alırlar (51, 53). Gonad gelişmesi, ilk kez gelişmenin 5. haftasında, mezonefrozun medialinde, saē ve solda, sölom epitelinin oēalması ve altındaki mezenşimin yoēunlařmasıyla oluşan, uzunluēuna iki adet gonadal ya da genital kabartı ile oluşmaya başlar (54).

2.1.2.1. Primordiyal Germ Hücreleri

Primordiyal germ hücreleri, epiblasttan köken alır, primitif çizgi boyunca göç eder ve üçüncü haftada yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasına yerleşir (Şekil 2.3A) (34, 54).

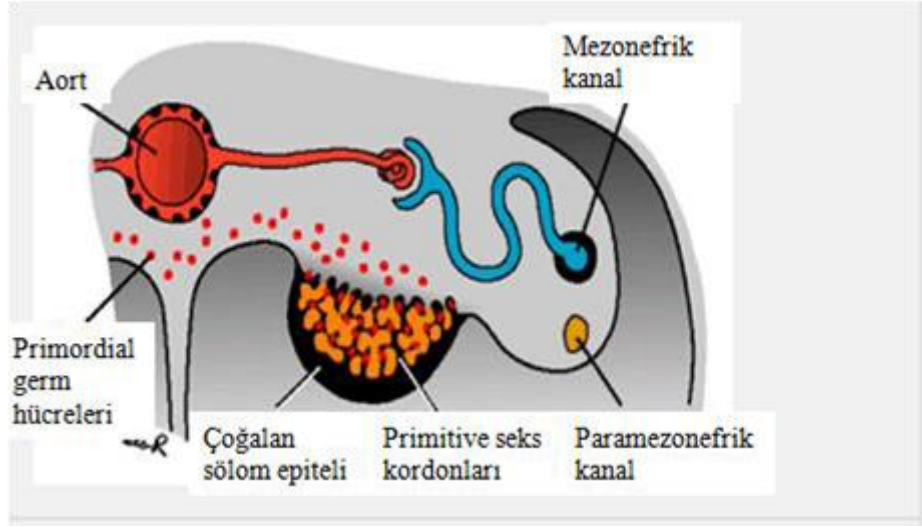


Şekil 2.3. Üç haftalık embriyoda, yolk kesesi duvarında, allantois bağlantısına yakın bir yerde primordial germ hücrelerini gösteren şema (A). Primordiyal germ hücrelerinin, son bağırsak ve dorsal mezenter boyunca, genital kabartıya doğru giden göç yolu (B) (54).

Dördüncü haftada ameboid hareketlerle sonbarsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek (Şekil 2.3B), beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşır, altıncı haftada da genital sırtları işgal ederler (51, 54). Bu hücreler genital sırtlara ulaşamadıkları takdirde gonadlar gelişemez. Primordiyal germ hücrelerinin gonadların over veya testise farklılaşmalarını üzerinde indükleyici etkileri vardır (54).

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmalarından hemen önce ve ulaştıkları sırada, genital sırttaki epitel hücreleri proliferasyon olarak alttaki mezenşimin içine gömülürler (50, 54). Bunlar burada primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz kordonları oluştururlar (Şekil 2.4) (34, 54).

Hem erkek hem de dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek ve dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir. Bu evrede gonada farklılaşmamış gonad denir (34, 53-55).



Şekil 2.4. Altı haftalık embriyonun lumbal bölgeden geçen transvers kesitinde, primitif cinsiyet kordonlarıyla birlikte farklanmamış gonadın görünümü. Bazı primordial germ hücreleri primitif cinsiyet kordonlarına ait hücrelerle çevrelenmiştir (54).

2.1.2.2. Gonadlar

Embriyonun cinsiyeti, fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin yedinci haftasına kadar erkek ve dişi morfolojik özellik göstermezler (31). Erkek ve dişi gonadların benzer özellik göstermesi ve birbirinden ayırt edilememesi durumuna farklanmamış gonad adı verilir (34, 51, 54). Farklanmamış gonad yapısında dışta korteks, iç kısımda ise medulla bulunur. Embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılaşır, medullası geriler. Embriyo genetik olarak erkek ise, primordiyal germ hücrelerinin cinsiyet kromozomları XY ise medulla testise dönüşür, korteks birkaç kalıntı dışında dejenere olur (34, 53, 54).

Cinsiyet farklanması, bazıları otozomal olan çok sayıda genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı, kısa kolu üzerinde (Yp11) SRY genini (Y kromozomu üzerindeki cinsiyeti belirleyen bölge) taşıyan Y kromozomudur (54, 56). Bu genin protein ürünü rudimenter durumdaki cinsiyet organlarının farklılaşmasını belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür. SRY proteini testis belirleyici faktördür (TBF). Fetusün cinsiyeti bu faktör varsa erkek, yoksa dişi olarak gelişir (54, 34). TBF, gonadal kordonları uyarır ve testiküler farklılaşmayı

sağlar (54, 57). TBF faktörünün etkisi altında primitif seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşır. Seminifer tübüllerin oluşumu bir dizi genin uyarılması ile meydana gelir. TBF, gonadal kordonları uyarır ve onların farklılaşmamış gonadın medullasının derinlerine doğru uzamalarına neden olur. Bu kordonlar bezin hilusuna doğru birbirleri ile anastomoz yaparlar ve rete testisi oluştururlar (23, 24, 34, 54, 57, 58). Gelişimin daha ileri evrelerinde, tunika albuginea denilen yoğun fibröz bir bağ dokusu tabakası testis kordonlarını yüzey epitelinden ayırır (34, 43). Dördüncü ayda testis kordonları at nalı şeklini alır ve bu nalın açık uçları rete testis ile devam eder. Bu durumda testis kordonları primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden gelişen Sertoli hücrelerinden meydana gelir. Gonadal sırtın mezenşiminden köken alan interstistsiyel Leydig hücreleri testis kordonlarının arasında bulunur ve bu kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Gestasyonun sekizinci haftasında, Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlarlar (34, 54). Testosteron üretimini insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık dönemde en yüksek değerine ulaşır (59). Fötal testisler, testostorona ilaveten glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) ve müllerian inhibitör madde (MIS) adı verilen bir hormonda salgılamaktadır. AMH, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır, hormonun salınması puberteye kadar devam eder, daha sonra seviyesi azalır. AMH, parametonefrik (Müller) kanalların gelişimini baskılar (34, 54). Testisler, bu dönemden sonra kendilerine ait genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini etkileyecek hale gelirler. Puberteye kadar solid halde kalan testis kordonları pubertede lümenlere açılarak seminifer tübüllere dönüşürler. Seminifer tübüller kanalize olur olmaz testis tübülleri ile birleşir ve duktus efferenteslere girerler. Bu duktuslar rete testisle, daha sonra duktus deferens adını alacak olan mezonefrik veya wolffian kanalları birbirine bağlarlar (24, 34, 54, 58). Duktus deferensin seminal vezikülden sonraki parçasına ejakulatuar kanal adı verilir (54).

Seminifer tübül duvarında Sertoli hücreleri ve spermatogonyum olmak üzere iki tip hücre bulunur. Destek hücreleri olan Sertoli hücreleri testisin yüzey epitelinden gelişirler. Spermatogonyumlar ise ilkel sperm hücreleridir ve primordiyal germ hücrelerinden farklılaşırlar (23, 50, 60). Sertoli hücreleri, fötal testiste seminifer epitelin büyük bir kısmını oluşturur (34, 50). İlerleyen dönemlerde, testis yüzey epiteli yassılaşır ve yetişkin testisinin dış yüzündeki mezoteli oluşturur. Rete testis, duktus efferentesi oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüllerle devam eder ve bu kanallar duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanır (23, 34, 50, 61). Yirmisekizinci

haftada testisler karın arka duvarından ayrılarak inguinal kanalın derinliğine doğru yer değiştirirler. Genellikle doğumdan önce skrotuma inmiş olurlar (24, 53, 58, 60, 62).

2.1.3. Testis Histolojisi

Testisler embriyonik gelişimi, seksüel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkileyen ekzokrin ve endokrin fonksiyonu olan bir çift oval şekilli organdır (49). Haploid erkek gametin (spermatozoon veya sperm) devamlı olarak üretilmesi, beslenmesi ve geçici olarak depolanması ile erkek cinsiyet hormonlarının (androjenler) sentez ve salgılanmasından sorumludur (63).

Her bir testisin etrafı tunika albuginea adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile sarılıdır. Tunika albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Testise giren ve çıkan kan damarları, lenf damarları ve kanallar bu tabaka içinde seyrederek (23, 26, 49, 64). Her bir testis kapsülünden uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar tarafından yaklaşık 250 lobüle bölünür. Her bir lobül, yüksek düzeyde kıvrımlı birkaç seminifer tübülünden oluşmaktadır. Testisin her bir lobülü içinde sperm üretilen 1-4 seminifer tübülünden ve Leydig hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki stromadan meydana gelmektedir (23, 26). Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testis androjenlerini salgılar (23, 26, 64).

2.1.3.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller, tunika propriya tarafından çevrelenmiş, seminifer epitel ile döşeli kanallardır (23). Tunika propriya, fibroblast içermeyen çok tabakalı bir bağ dokusudur. Bu tabaka insanda seminifer epiteli kuşatan ince bazal membran altında 3-5 sıra miyoid hücre ve kollajen lif tabakası içerir. Bu dokuya peritübüler doku da denir (49). Her bir seminifer tübül yaklaşık 50 cm uzunluğunda (30-50 cm arasında) ve 150-250 µm çapındadır. Seminifer tübüller, anastomoz yapan kıvrımlar şeklinde başlar, mediastinumda doğru birbirlerine yaklaşarak kısa ve düz tübüller olan tubuli rektiye oluştururlar. Bu düz tübüller ise mediastinumda bulunan rete testise açılırlar (49). Seminifer tübüller arasındaki boşluk kan damarları, lenfatik kanallar veya sinüzoidler, makrofajlar ve androjen üreten Leydig hücreleri tarafından doldurulmuştur (64, 65).

Seminifer epitelde yer alan iki ana hücre grubundan biri germ hücreleri olan spermatogenik hücreler, diğeri ise bu hücrelere destek ve besleme görevini üstlenen Sertoli hücreleridir (26, 49).

2.1.3.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelin baskın hücre tipidir. Ergenlikten sonra, tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık % 10'unu oluşturur (65). Sertoli hücreleri bazal membrandan tübül lümenine kadar uzanan prizmatik hücrelerdir (49). Hücrelerin tabanları geniştir ve bazal lamina üzerine oturur, apikal uçları ise seminifer tübülün lümenine uzanır. Tübüller arası boşluk ve seminifer tübül lümeni arasında köprü hücreler olarak görev yaparlar (23, 34, 55, 64, 65). Sertoli hücreleri, komşu spermatogenik hücreleri çevreleyen ve onların arasındaki boşlukları dolduran yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir.

Işık mikroskobunda, Hematoksilen-Eosin (H-E) boyamalarında sertoli hücrelerinin sınırları iyi belirlenemez ve soluk renkli görünürler (23). Elektron mikroskobik incelemelerinde bazal sitoplazma içerisinde yerleşmiş ökromatik bir nükleus yapısı 1-2 adet belirgin nükleolus içerir. Nükleuslarının en önemli özelliği derin invaginasyonlar göstermesidir. Sertoli hücreleri gelişmiş granüler ve agranüler endoplazmik retikulum, belirgin golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri, dağınık halde serbest ribozomlar, primer ve sekonder lizozomlar, glikojen granülleri, lipid damlacıkları, mikrotübüller ve mikrofilamentlere sahiptir (23, 24, 25, 49, 64).

Sertoli hücreleri birbirlerine özel bağlantı kompleksleriyle bağlanmıştır ve bu bağlantı bölgelerinde, komşu membranlar arasında zonula okludens (sıkı bağlantı) tipi bağlantılar oluştururlar. Bu bağlantı kompleksleri, seminifer tübül epitelini bazal ve adluminal kompartmanlara ayırır. Ayrıca, Sertoli hücreleri arasında bulunan gap junction tipi bağlantı kompleksleri, Sertoli hücreleri ile erken dönem spermatogenik hücreler arasında desmozom tipi bağlantı kompleksleri ve Sertoli hücreleriyle bazal membran arasında hemidesmozom tipi bağlantı kompleksleri yer almaktadır (23, 49, 66).

Sertoli Hücrelerinin Görevleri:

- ✓ Gelişmekte olan spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek
- ✓ Oluşturdukları bariyer ile gelişen sperm hücrelerini korumak
- ✓ Spermiyogenez sırasında ortaya çıkan sitoplazma artıklarının fagositozu

- ✓ Kan-testis bariyerinin oluşturulması
- ✓ Seminifer tübülde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı proteini (ABP) üretmek ve salgılamak
- ✓ Embriyo gelişimi sırasında erkek fetüste Müller kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoprotein olan Anti-Müllerian hormon (AMH) salgılamak
- ✓ Testiküler transferrin üretimi ve salgılanması
- ✓ Anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin ve uyarıcı aktivin adı verilen peptidleri salgılamak
- ✓ Seminifer tübül lümenine sperm taşınmasını kolaylaştıracak fruktozdan, protein ve iyonlardan zengin bir sıvı salgılamak (23, 26, 64, 65, 67).

2.1.3.3. Kan-Testis Bariyeri

İnterstisyel doku ile seminifer tübüller arasında yer alan kan- testis bariyeri, kan ve lenfatik yolla gelen maddelerin seminifer tübüller içerisine geçişini ayarlayan bir bariyer olarak görev yapar (64, 65). 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 lenfin içeriğinden oldukça farklı olmasını sağlamaktadır (26, 64).

2.1.3.4. Spermatogenez

Spermatogenez, spermatogonyumdan sperm gelişimi sürecidir. Bu süreç puberteden kısa bir süre önce, hipofizyal gonodotropin seviyelerinin artmasının etkisi altında başlar ve yaşam boyunca devam eder. Yaklaşık 64 gün süren bu süreç spermatogonyal faz, spermatosit fazı (mayoz) ve spermatid fazı (spermiyogenez) olmak üzere üç evrede gerçekleşir (23). Spermatogonyal fazda spermatogonyumlar mitoz ile bölünerek kendi yerlerine geçecek hücreleri oluştururken, sonuçta primer spermatositlere farklılaşacak olan spermatogonyumları da oluştururlar. İnsan spermatogonyumları rutin histolojik preparatlarda nükleuslarının görünümüne göre Tip A koyu, Tip A açık ve Tip B olmak üzere üç tip tanımlanmıştır. Tip A koyu spermatogonyumlar yaklaşık 12µm çapında, ince granüler kromatine sahip, yoğun bazofilik nükleuslu, kubbe şeklinde hücrelerdir. Bu hücrelerin diğer spermatogenik hücreleri oluşturan kök hücreler olduğu düşünülmektedir. Çeşitli aralıklarla bölünerek Tip A koyu ve Tip A açık spermatogonyumları oluştururlar. Tip A koyu spermatogonyum kök hücre olarak kalırken, Tip A açık spermatogonyum farklılaşıp

olgunlaşarak spermiyum haline gelir. Tip A açık spermatogonyumlar soluk boyanan, ince granüler kromatinli oval nükleus içerirler. Bu hücreler de pek çok kez mitoz geçirip sayılarını arttırlar (23, 49). Mitotik bölünmeleri sonucunda farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar (23, 68). Tip B spermatogonyumlar, merkezi yerleşimli nükleolusa sahip küre şeklinde bir nükleus içerirler. Nükleus kromatini, nükleolus çevresinde ve nükleer zar boyunca yoğunlaşma gösterir (23, 49, 68).

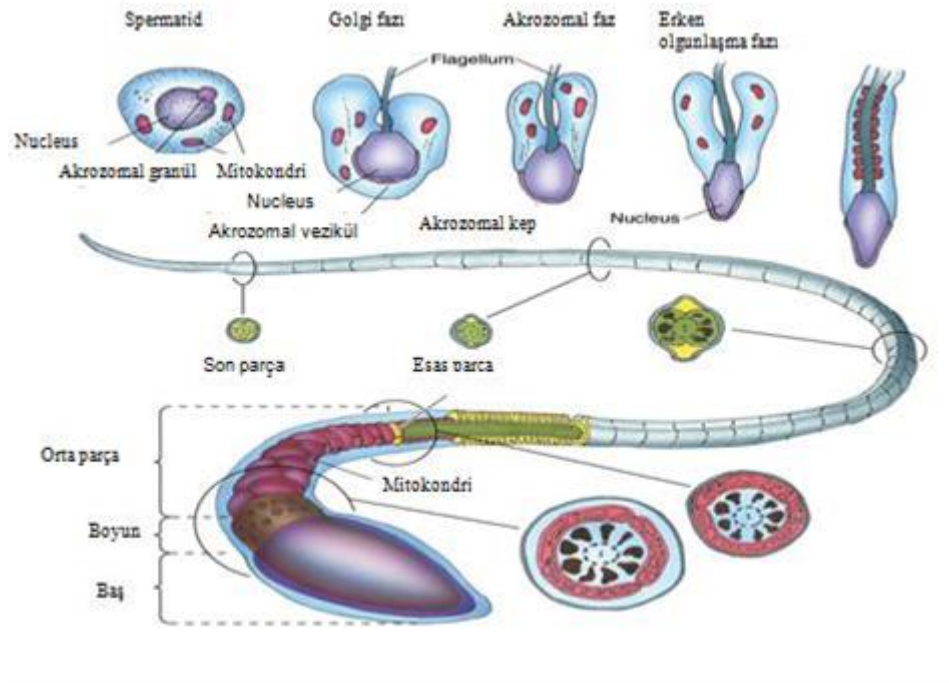
Bir seri bölünmeden sonra Tip A spermatogonyumlardan oluşan Tip B spermatogonyumlarda mitozla bölünerek primer spermatositleri oluşturur (49). Oluşan primer spermatositler DNA'larını replike ederek mayoz bölünmeye hazırlanırlar. Her bir primer spermatosit normal sayıda kromozom ($2n$) ve iki katı DNA'ya sahiptir. Primer spermatositler mayoz bölünmeye girerler (26, 49). DNA sentezini tamamladıktan sonra mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler (26). Birinci mayoz bölünmenin profazının alt evreleri; leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diyakinez evreleridir. Bu alt evrelerde görülen temel olaylar; zigoten-pakiten evresinde homolog kromozomların eşleşmesini kolaylaştıran sinaptonemal kompleks oluşumu, homolog kromozomların eşleşmesi (sinapsis), homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri arasında genetik bilgi değişimi (krossing-over) ve eşleşmiş homolog kromozomların ayrılması gibi olaylardır. Profazın yaklaşık 22 gün civarında bir süre alması nedeniyle mikroskopta incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu primer spermatosit olarak görülür. Bu uzamış profaz evresinden sonra, kardeş kromatid çiftleri metafaz, anafaz ve telofaz evreleri, kardeş kromatidleri yavru hücreler olan spermatidlere dağıtırlar (26). Spermatogenetik seride en büyük hücreler, çekirdeklerindeki sinaptonemal kompleksin varlığı ile karakterize primer spermatositlerdir (68). Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin görülmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve hızla ikinci mayotik bölünmeye giren hücrelerdir (68).

Birinci mayotik bölünme ile oluşan hücreler sekonder spermatositler olarak adlandırılır. Bu hücreler yeni DNA sentezlemeden hemen ikinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Her sekonder spermatositin kromozom sayısını azaltmıştır ($1n$); 22 otozom ve bir X ya da bir Y kromozomuna sahiptirler. Bu kromozomların her biri kardeş kromatidden oluşur. Sekonder spermatosit diploid DNA miktarına ($2d$) sahiptir. İkinci mayotik bölünmenin metafazında kromozomlar metafaz plağına dizilirler. Kardeş kromatidler ayrılır ve mekiğin zıt kutuplarına hareket eder. İkinci mayotik bölünme tamamlandığında ve nükleer membranlar yeniden oluştuğunda her bir sekonder spermatositten her biri 23 tek iplikli kromozom ($1n$) ve ($1d$) miktarında DNA içeren iki

haploid spermatid oluşur. Haploid spermatidler, daha fazla bölünmez ve olgun spermi oluşturan bir farklılaşma sürecine (spermiyogenez) uğrarlar. Sperm bir oositi fertilize ettiği zaman normal diploid durum yeniden oluşur (23, 26).

2.1.3.5. Spermiyogenez

Spermatidlerin olgun spermatozoana dönüşme sürecine 'spermiyogenez' denir ve bu dönemde hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermatidler, sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesi ile oluşan haploid kromozomlu hücrelerdir ve seminifer tübülün adluminal bölgelerinde yer alırlar (23, 26, 70). Bunlar, diğer hücrelerden küçük boyutları, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan çekirdekleri ve seminifer tübüllerde lümen yakınında Sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntüleri içine yerleşmeleri ile tanınırlar. Spermatidler, merkezi yerleşimli bir nükleus, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondriyonlara ve bir çift sentriyole sahiptir. Spermatidin olgun sperme farklılaşması (spermiyogenez) 4 fazda gerçekleşir (şekil 2.5). Bu fazlar, spermatidlerin özel bağlantılarla Sertoli hücre membranına fiziksel olarak bağlanması sonucu oluşurlar (23, 26, 67, 69).



Şekil 2. 5. Spermiyogenez ve olgun spermatozoa (65).

1) Golgi fazı: Bu faz, spermatidin çok sayıdaki Golgi kompleksinde kümelenen periyodik asit- schiff (PAS) pozitif granüllerinin bulunması ile karakterizedir. Bu proakrozomal granüller, glikoprotein bakımından zengindirler ve akrozomal vezikül denen ve nüklear zarfa komşu, membranla sınırlandırılmış bir vezikül oluşturlar. Bu fazda akrozomal vezikül genişler ve içeriği artar. Akrozomal vezikülün pozisyonu, gelişmekte olan spermin ön kutbunu belirler. Bu fazda, sentriyoller de jukstanüklear bölgeden spermatidin arka kutbuna göç ederler. Sentriyol, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturan dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki mikrotübülün parçalarının bir araya gelmesini başlatarak sperm kuyruğunun şekillenmesini destekler (23, 26, 67, 71).

2) Şapka fazı: Bu faz sırasında, akrozom vezikülü büyüyerek, nükleusun ön yarısı üzerinde yayılır. Bu, yeniden şekillenmiş yapıya akrozomal şapka denir. Bu yapının altındaki nüklear zarf parçası porlarını kaybeder ve kalınlaşır. Nüklear içerik de yoğunlaşır (23, 49, 67).

3) Akrozomal faz: Bu faz spermatidin morfolojik olarak en fazla değişim gösterdiği evredir. Nükleus yoğunlaşması, hücrenin uzaması ve mitokondrinin yer değiştirmesi bu fazda gerçekleşir. Akrozom vezikülü ve granülü, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve buna ‘akrozom’ denir (69). Bu fazda spermatid kendini yeniden hizalar ve baş, Sertoli hücrelerinin içine iyice gömülür ve bazal laminaya doğru yönelir. Gelişmekte olan flagellum seminifer tübül lümenine doğru uzanır. Spermatidin yoğunlaşan nükleusu yassılaşır ve uzar. Nükleus ve onu çevreleyen akrozom da plazma membranının ön kısmına hemen komşu bir pozisyona taşınır ve sitoplazmik kısım posteriora kalır. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna doğru uzanan silindirik bir kılıf olan manşeti oluşturmak üzere düzenlenir (23). Akrozomal faz sırasında hücrenin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelir. Buna ek olarak nükleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondri de flagellumu proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge spermatozoonların hareketlerinin kaynaklandığı yerdir (23, 64, 65).

4) Olgunlaşma fazı: Spermatidin yeniden oluşumunun bu son fazında flagellanın etrafındaki fazla sitoplazma azaltılır ve olgun (matür) spermatozoon oluşur. Daha sonra, rezidüel cisimcik olarak da adlandırılan fazla sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir. Gelişmekte olan gametleri karakterize eden interselüler köprüler rezidüel

cisimlerde kalırlar. Spermatidler artık birbirlerine bağı değildirler ve Sertoli hücrelerinden seminifer tübül lümenine salıverilirler. Bu sürece spermiyasyon denir (23, 54, 65, 67).

2.1.3.6. Olgun (Matür) Spermin Yapısı

Olgun insan spermi yaklaşık 60 µm uzunluğundadır. Sperm başı yassıdır, sivridir ve 4,5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır (23, 64). Nükleusun anteriyor üçte ikilik kısmını saran akrozomal şapka, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin olarak adlandırılan tripsin benzeri proteaz içermektedir. Bu akrozomal enzimler ovumun zona pellusidasının delinmesi için gereklidirler. Sperm yumurtaya temas ettiğinde akrozomal enzimlerin salıverilmesi akrozom reaksiyonun ilk basamağıdır (23, 69). Bu karmaşık süreç spermin penetrasyonunu ve ardından gelen fertilizasyonu kolaylaştırır ve ovuma başka spermlerin girmesini önler.

Sperm kuyruğu, boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere bölümlere ayrılır. Kısa olan boyun sentriyolleri ve kaba fiberlerin başlangıcını içerir. Orta parça yaklaşık 7 µm uzunluğunda ve mitokondriyonları içerir. Mitokondriyonlar kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin etrafında sarmal tarzda sarılmışlardır. Bu mitokondriyonlar kuyruğun hareketi için gerekli enerjiyi sağlarlar ve böylece spermin hareketinden sorumludurlar. Esas parça, 40 µm uzunluğundadır ve kalın fiberlerin aksonemal kompleksin dışındaki fibröz kılıfı içerir. Son parça, olgun sperimde flagellumun yaklaşık son 5 µm'lik kısmıdır ve yalnızca aksonemal kompleksi içermektedir (23, 26, 64, 72).

Yeni salıverilen sperm hücreleri hareketsizdirler ve Sertoli hücreleri tarafından salgılanan bir sıvının içerisinde seminifer tübüllerden taşınırlar. Sıvı ve sperm seminifer tübüllerden akar. Lamina propriyanın peritübüler kontraktıl hücrelerinin peristaltik kasılmaları bu durumu kolaylaştırır. Daha sonra seminifer tübülün kısa segmenti olan düz tübüllere girerler. Düz tübüllerde epitel sadece Sertoli hücrelerinden oluşmaktadır. Mediastinum testiste sıvı ve sperm, tek katlı kübük epitel ile döşeli bir anostomozlaşan kanal sistemi olan rete testise girer. Rete testisten boşaltım kanal sisteminin ilk parçası olan duktuli efferentesin ekstra testiküler kısmına ve daha sonra duktus epididimisin proksimal kısmına geçer sperm hücreleri duktus epididimisin oldukça kıvrımlı kanalının 4-5 m boyunca hareket ederlerken, hareket kazanırlar ve bazı olgunlaşma değişimlerine uğrarlar. Bu değişimler:

- ✓ Nükleus DNA' sının yoğunlaşması. Sperm başının boyutu azalır.

- ✓ Sitoplazmanın daha da azalması. Sperm hücreleri daha ince hale gelir.
- ✓ Plazma membranının lipidlerinde, proteinlerinde değişimler ve glikozilasyon.
- ✓ Dış akrozomal membrandaki değişimler. Sperm hücrelerinin fertilizasyon yeteneğini inhibe etmek için yüzey- ilişkili dakapasitasyon faktörü eklenir.

Distal kısmın ve daha geniş kanalların etrafını saran düz kasların kasılması, spermi epididimis kanalının distal kısmına ulaşana kadar peristaltik hareketlerle hareket ettirmeye devam eder. Burada spermler ejakülasyondan önce depolanırlar.

Sperm, erkek boşaltım kanalı sisteminde birkaç hafta canlı kalabilir, ancak dişi üreme kanalında yalnızca 2-3 gün hayatta kalabilir. Dişi kanalında bir süre sonra ovumu fertilize edebilme yeteneği kazanırlar. Sperm membranındaki glikokaliks komponentlerinin uzaklaştırıldığı ve yerine yenisinin konulduğu bu süreç kapasitasyon olarak adlandırılmaktadır (23, 26, 54).

2.1.3.7. İntersitisyel Doku

Testis kütesinin %25-30'unu gevşek bağ dokusu oluşturur. İnterstisyel doku denilen ve tübüllerin arasında bulunan bu bağ dokusu; çeşitli hücreler (Leydig hücresi, fibroblast, makrofaj, mast hücresi, lenfosit, plazmosit, undifferansiye mezenkim hücreleri), bol kılcak kan, lenf damarları ve sinirler bulunur. İnterstisyel alan androjen üretimi açısından büyük bir önem taşır (23, 64, 72, 73).

2.1.3.8. Myoid hücreler

Tunika propriya içerisinde yer alan miyoid hücreler ultrastrüktürel düzeyde bazal lamina ve bol miktarda aktin filamentleri içermeleri nedeni ile düz kas hücreleriyle ilişkili özellik gösterirler. Bu hücreler tipik fibroblastların yokluğunda kollajen sentezleme rollerinin işareti olan bir özellik olarak belirgin miktarda granüllü endoplazmik retikulum (gER) içermektedir. Myoid hücrelerin ritmik kasılmaları spermatozoanın ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden boşaltım kanal sistemine akışına yardım eden peristaltik dalgalanmaları oluşturur (23). Spermler böylelikle duktus epididimise ulaşır ve epididimisi geçtikten sonra hareket etme özelliklerini kazanırlar (26).

2.1.3.9. Leydig hücreleri

Leydig hücre toplulukları, kan damarları ve lenfatik kanal yakınında, intertübüler alanda yerleşmiştir (26). Büyük, poligonal, 15µm çapında eozinofilik hücrelerdir ve tipik olarak lipid damlacıkları içerirler (23). Merkezi yerleşimli ökromatik bir nükleus ve 1-2 nükleolus içerir. Golgi kompleksi nükleusa yakındır (23). Bu hücrelerde lipofuskin pigmenti ve çubuk şekilli ayırt edici sitoplazmik kristaller olan Reinke kristalleri sıklıkla bulunmaktadır. Rutin histolojik preparatlarda bu kristaller refraktildirler ve yaklaşık 3x20 µm boyutlarındadırlar. Bu kristallerin kesin yapıları ve fonksiyonları bilinmemekle beraber hücrenin bir protein komponentidirler (23, 34).

Leydig hücreleri bol miktarda granülsüz endoplazmik retikuluma sahiptirler. Bu özellik Leydig hücrelerinin eozinofilisinin nedenidir. Kolesterolde testosteron sentezi için gerekli enzimler granülsüz endoplazmik retikulum (aER) ile ilişkilidir. Stereoid-salgılayan hücrelerin karakteristik bir özelliği olan tübüloveziküler kristali mitokondriyonlar içermektedirler.

Leydig hücreleri erken fetal yaşam sırasında farklılaşarak testosteron salgırlar. Testosteronun salgılanması embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu için gereklidir:

- ✓ Embriyoda, testosteron ve diğer androjenlerin salgılanması erkek fetusta gonadların normal gelişimi için gereklidir.
- ✓ Pubertede, testosteron salgılanması sperm üretiminin başlatılmasından, aksesuar cinsiyet bezlerinin salgılarından ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumludur.
- ✓ Yetişkinde, testosteron salgılanması spermatogenezin ve sekonder seks karakterlerinin, genital boşaltım kanallarının ve aksesuar cinsiyet bezlerinin devamlılığının sağlanması için gereklidir (23, 26).

Serumda bulunan testosteronun yaklaşık %95'i Leydig hücreleri tarafından, geri kalan kısmı ise adrenal korteks tarafından üretilir (23, 26). Testosteron sentezi sırasında plazma kolesterolü hücreye girer, asetil koenzim (ACoA) tarafından esterleştirilir ve sitoplazmada lipid damlacıkları şeklinde depolanır. Düz endoplazmik retikulumda yağ asitleri kolesterole dönüştürülür. Kolesterol, yağ damlacıklarından mitokondriyonlara steroidogenik akut regülatör protein (StAR) aracılığı ile taşınır ve mitokondriyonlardaki sitokrom P450 enzimi olan kolesterol dezmolaz enzimi tarafından pregnenolon üretilir.

Düz endoplazmik retikulumdaki enzimler, pregnenolunu progesterona ve onu testosterona dönüştürür (26, 47, 73).

Leydig hücreleri erkek fetüsün erken farklılaşmasında aktiftir ve daha sonra fetal hayatın yaklaşık 5. ayından başlayarak inaktif oldukları bir periyoda girerler. İnaktif Leydig hücrelerini fibroblastlardan ayırt etmek güçtür. Leydig hücreleri pubertede gonodotropik stimülasyona maruz kaldıklarında, yeniden androjen salgılayan hücreler olurlar ve yaşam boyunca aktif kalırlar (23, 34).

2.1.3.10. Rete Testis

Rete testis, testisin mediastinumu içinde düzensiz biçimde anastomozlaşan kanallardan oluşur (26). Tubuli rekti adı verilen düz seminifer tübüller, mediastinum testiste yer alan bu kanal rete testise açılır (49, 67). Bu kanallar tek katlı kübik veya alçak prizmatik epitel ile döşeli düzensiz, anastomozlaşan kanallardır (26, 49). Epitel hücreleri tek bir apikal silyum ve birkaç kısa mikrovillus içerir (49). Fibroblastlar ve myoid hücreler tarafından oluşturulan duvar, büyük Leydig hücresi kümelerine eşlik eden kan damarları ve geniş lenf kanalları ile kuşatılmıştır (26, 49).

2.1.3.11. Duktuli Efferentes

Duktuli efferentes yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir (23). Kanalları döşeyen yalancı çok katlı prizmatik epitel, prizmatik ve kübik hücrelerden oluşur. Hücre boyları eşit olmadığından dolayı, epitel yüzeyi girintili çıkıntılı görülür. Uzun boylu prizmatik hücreler genellikle silyumludur. Kısa boylu hücreler ise silyum içermez, ancak yüzeylerinde çok sayıda mikrovillus bulunur (23, 26). Prizmatik hücrelerin arasına serpiştirilmiş halde epitelyal kök hücre olarak görev yapan bazal hücreler bulunmaktadır (23, 49). Silyum bulundurmayan alçak hücreler ise çok sayıda mikrovillus ve apikal yüzeyde kanaliküler invaziinasyonlar, pinositotik veziküller, membranla sınırlandırılmış yoğun cisimcikler, lizozomlar ve endositotik aktive ile ilişkili diğer sitoplazmik yapılar içermektedirler. Seminifer tübüllerde salgılanan sıvının çoğunluğu duktuli efferenteste geri emilir (23).

İnsanda yaklaşık 20 duktuli efferentes mediastinumun süperiyor ucundaki rete testisin kanalllarını duktus epididimisin proksimal parçasına bağlar. Duktuli efferentes testisten çıktıklarında yüksek düzeyde kıvrımlı hal alırlar ve 6-10 konik kütle oluşturular. Bazal kısımları epididimisin baş bölgesinin bir kısmını oluşturan bu yapıya koni vaskülozi denmektedir. Her biri yaklaşık 10 mm uzunluğundaki koni vaskülozi,

15- 20 cm uzunluğunda yüksek düzeyde kıvrımlı hal almış kanalları içermektedir. Konilerin bazalinde duktuli efferentes tek bir kanala, yani duktus epididimise açılır.

Boşaltım kanallarında düz kas tabakası ilk olarak duktuli efferentesin başlangıcında ortaya çıkar. Düz kas hücreleri duktuli efferentesin duvarında dairesel bir kılıf gibi sıralanarak birkaç hücre kalınlığında bir tabaka oluştururlar. Kas hücrelerinin arasına serpiştirilmiş halde elastik fiberler bulunur. Duktuli efferentesin içerisinde sperm transportu, hem silyumların hareketi hem de fibromüsküler tabakanın kasılması ile gerçekleşir (23, 49).

2.1.3.12. Epididimis

Epididimis, içinde spermatozoonların olgunlaştığı (döllenme yetenekleri için gerekli olan ileriye doğru hareket etme özelliğini kazandıkları) oldukça kıvrımlı bir tübüldür (26). Testisten epididimise giren yeni üretilmiş spermler, duktus epididimis boyunca geçişleri sırasında motilite ve oositi fertilize etme yeteneği kazanarak matür hale gelirler (23). Testisin süperiyor ve posteriyor yüzeyleri boyunca uzanan, hilal şekilli bir yapıdır. Yaklaşık 7,5 cm uzunluğundadır ve duktuli efferentesten, duktus epididimisten ve ilişkili düz kaslardan, damarlardan ve bağ dokusundan örtülerinden oluşmaktadır. Duktus epididimis yüksek düzeyde kıvrımlı, 4-6 m uzunluğunda bir tüptür. Epididimis baş, gövde ve kuyruk bölümlerine ayrılmaktadır. Duktuli efferentes baş kısmını, duktus epididimis ise gövde ve kuyruk kısımlarını oluşturmaktadır (23, 49). Kanalı kan damarlarından, düz kas hücrelerinden zengin sıkı bağ dokusu sarar (49). Yalancı çok katlı sterosilyalı prizmatik epiteli, bazal hücreler ve prizmatik hücrelerden (esas hücreler) oluşur:

- ✓ Esas hücreler, çok sayıda uzun sterosilyumlara sahip uzun boylu prizmatik hücrelerdir (49). Bu hücreler epididimisin baş kısmında yaklaşık 80 µm yükseklikte iken, kuyruk bölgesinde yaklaşık 40 µm yüksekliktedir. Esas hücrelerin luminal yüzeyinden sterosilyum denen çok sayıda uzun, modifiye mikrovillus uzanır. Strerosilyumların uzunluğu baş kısmında 25 µm, kuyruk kısmında ise yaklaşık 10 µm'dir (23). Sitoplazmalarında yaygın granüler endoplazma retikulumu, agranüler endoplazma retikulumu ve belirgin bir supranükleer golgi kompleksi bulunur (26, 49).
- ✓ Bazal hücreler, bazal laminanın üzerinde bulunan küçük, yuvarlak hücrelerdir. Bu hücreler kanal epitelinin kök hücreleridir (23, 26, 49).

Ek olarak, epitelin içinde Halo hücreleri olarak adlandırılan göç eden lenfositler sıklıkla bulunmaktadır. Normal koşullar altında epididimisin epiteli, boşaltım kanal sisteminde lenfositlerin bulunduğu en proksimal seviyeyi tespit etmektedir (23, 49).

Duktus epididimis 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 sıyalik asit, gliserofosfokolin ve glikoproteinleri salgılar (49).

2.1.3.13. Duktus deferens (vas deferens)

Duktus deferens, epididimisin kuyruk bölgesinin devamı olan, kalın duvarlı müsküler bir kanaldır. Duktus deferens testisin posteriyor sınırı boyunca testiküler damarlara ve sinirlere yakın olarak yükselir. Daha sonra, spermatik kordonun bir komponenti olarak inguinal kanalın içinden geçer ve abdomene girer. Spermatik kordon, testise giden ve testise gelen bütün yapıları içermektedir. Duktus deferense ek olarak, spermatik kordon testiküler arterleri, duktus deferense ve kremaster kasına giden küçük arterleri, pampiniform pleksusu, lenf damarlarını, sempatik sinir liflerini ve genitofemoral sinirin genital dalını içermektedir. Bu yapıların tamamı anteriyor abdominal duvardan köken alan fasiyal örtüler tarafından çevrelenmiştir. Spermatik kordondan ayrıldıktan sonra, duktus deferens pelviste mesane seviyesine kadar iner. Burada distal ucu genişleyerek duktus deferensin ampullasını oluşturur. Ampulla, veziküla seminalisin kanalı ile birleşir ve ejakülator kanal olarak prostat bezinin içinde üretraya doğru devam eder.

Duktus deferens, yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Uzun prizmatik hücrelerde lümene doğru uzanan uzun mikrovilluslara sahiptirler. Yuvarlak bazal hücreler, bazal laminanın üzerinde uzanırlar.

Duktus deferensin ampullası, sıklıkla glandüler divertiküller sergileyen dallanmış uzun mukozal katlantılara sahiptir. Ampullayı çevreleyen kas örtüsü, duktus deferens boyunca uzanan kas örtüsünden daha incedir ve longitudinal tabakalar ejakülatuar kanalın başlangıcının yakınlarında kaybolur. Ampullanın ve ejakülatuar kanalın epiteli salgı fonksiyonuna sahip gibi görünmektedir. Hücreler çok sayıda sarı pigment granülü içerirler. Ejakülatuar kanalın duvarı bir kas tabakasına sahip olmayıp, prostatın fibromüsküler dokusu bunun yerini alır (23, 49).

2.1.3.14. Duktus ejakulatorius

Duktus deferensin prostata giren segmentine ejakulator duktus denir (49). Yaklaşık 1 cm uzunluğunda, basit prizmatik veya yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşeli, kısa ve düz bir kanaldır. Prostat bezine girer ve prostatik üretraya açılır. Mukoza lümenine doğru katlantılar yapar. Duvarında düz kaslar bulunmaz (23, 26, 49) epiteli fibröz bağ dokusu tabakası kuşatır (49).

2.1.3.15. Vezikula seminalisler

Mesannenin posteriyor duvarının üzerinde duktus deferensin ampullasına paralel konumlanmış bir çift, uzun ve yüksek düzeyde katlantılı (23, 49), yaklaşık uzunlukları 15 cm' ye ulaşan bir çift tübüler bezdir (49). Her bir vezikula seminalisin kısa boşaltım kanalı duktus deferensin ampullası ile birleşerek ejakulator kanalı oluşturur. Vezikula seminalisler mezonefrik kanalının gelecekteki ampullayı oluşturacak olan bölgesinin evajinasyonları olarak gelişirler. Vezikula seminalislerin duvarı mukoza, ince bir düz kas tabakası ve fibröz bir kılıf içermektedir. Mukoza, salgı yüzey alanını arttırmak için çok sayıda primer, sekonder ve tersiyer katlantılar yapar. Düzensiz bölümlerin tamamı bu şekilde oluşur ve lümen ile iletişim halindedir (23, 26, 47, 49, 73, 74).

Yalancı çok katlı prizmatik epitel uzun, silyumsuz prizmatik hücreler ve bazal laminaya uzanan kısa, yuvarlak hücreler içermektedir. Kısa hücreler, boşaltım kanal sisteminin kalan kısımdakilerle özdeş görünmektedirler. Bu hücreler, prizmatik hücrelerin köken aldığı kök hücrelerdir. Prizmatik hücreler, apikal sitoplazmalarında bulunan büyük salgı vezikülleri ve iyi gelişmiş gER ile protein salgılayan hücrelerin morfolojisine sahiptirler.

Vezikula seminalislerin salgısı beyazımsı sarı renkte, visköz bir materyaldir. Bu salgı sperm için temel substrat olan fruktozu ve diğer basit şekerleri, aminoasitleri, askorbik asit ve prostoglandinleri içermektedir. Prostoglandinler ilk olarak prostat bezinden izole edilmiş olmaları ile birlikte, aslında vezikula seminalislerde büyük miktarlarda sentezlenmektedirler. Ejekülasyon sırasında vezikula seminalisin düz kas örtüsünün kasılması salgılarını ejakulator kanal içine boşaltır ve spermin üretra dışına atılmasına yardımcı olur. Vezikula seminalisin salgılama fonksiyonu ve morfolojisi testosteron kontrolü altındadır (23, 26, 49).

2.1.3.16. Prostat Bezi

Prostat, erkek üreme sisteminin en büyük aksesuar cinsiyet bezidir (23, 26, 49). Büyüklüğü ve şekli ceviz benzemektedir. Prostat bezinin temel fonksiyonu, seminal sıvının oluşumuna katkıda bulunan şeffaf, hafif alkali bir sıvı salgılamaktır. Bez pelvis içerisinde, mesanenin altında yer alır ve üretranın prostatik parçasını çevreler (23). 30-50 kadar tübüloalveolar bezden oluşmaktadır (23, 26, 49). Bezler üç konsantrik tabaka halinde düzenlenmektedir: içte bir mukozal tabaka, arada bir submukozal tabaka ve esas prostatik bezleri içeren bir periferik tabaka (23). Bezlerin lümeni, glikoproteinden zengin ve bazen kalsiyum birikme alanı olan prostatik taşlar (corpora amilasea) içerirler (26). Mukozal tabakanın bezleri direkt olarak üretraya salgılama yaparlar. Diğer iki tabaka, üretranın posteriyor duvarındaki krista üretralisin her iki yanında yer alan prostatik sinüslere açılan kanallara sahiptir. Yetişkin prostat parankimi anatomik ve klinik olarak farklı dört zona ayrılmaktadır:

Merkezi zon, prostat bezinin içinden geçen ejakülatuar kanalı çevreler. Bez dokusunun yaklaşık % 25'ini içermektedir ve hem karsinoma hem de enflamasyona karşı dirençlidir. Diğer zonlara kıyasla, merkezi zondaki hücreler daha belirgin, hafif bazofilik ve komşu hücrelerden farklı seviyedeki geniş bir nükleusa sahiptir.

Periferik zon, prostatın bez dokusunun %70'ini oluşturmaktadır. Merkezi zonun çevreler ve bezin posteriyor lateral parçasını işgal etmektedir. Prostatik karsinomaların ve inflamasyonların çoğu bu zonda gelişir.

Transizyonel zon, prostatik üretrayı çevrelemektedir. Prostatik bez dokusunun yaklaşık %5'ini oluşturur ve mukozal bezleri içermektedir. Yaşlılıkta bu bölgedeki parankim hücreleri hiperplaziye uğrar ve epitel hücrelerinde nodüller kitleler oluşur. Dolayısıyla gelişen bu nodüller prostatik üretraya baskı yaparak ürinaryonun zorlaştırır. Bu durum bening prostatik hiperplazia (BPH) olarak bilinir.

Periüretral zon, mukozal ve submukozal bezleri içermektedir. BPH' nın ileri aşamasında bu zonda patolojik büyüme gözlenir. Bu büyüme üretral basınca neden olur ve mesaneden ürün sızması gerçekleşir.

Prostat salgısı ince kıvamlı sütümsü bir sıvı olup hafifçe asidiktir. Özellikle fibrinolizin olmak üzere proteolitik enzimlerden zengindir. Fibrinolizin semenin pıhtılaşmasına engel olur. Fazla miktarda prostatik asit fosfataz (PAF) içerir. Prostatın bez epiteli testostereon ve adrenal androgenler gibi seks hormonlarından etkilenir. Bu hormonlar salgı hücrelerine girerler ve 5 α -redüktaz ile dihidrotestosterona (DHT)

dönüştürülürler. DHT, testosterondan 30 kat daha etkilidir. DHT, prostatik epitelin normal gelişimi ve proliferasyonunu stimüle eder (23, 26, 49).

2.1.3.17. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri)

Bir çift halindeki bu bezler ürogenital diyaframda yer alan, bezelye büyüklüğündeki yapılardır. Bezlerden her birinin kanalı ürogenital diyaframın inferiyor fasiyasının içinden geçer ve penil üretranın başlangıç noktası ile birleşir (23). Dış yüzünde iskelet kasları içeren bağ dokusu kapsül ile kuşatılmışlardır. Bu kapsülden ayrılan septumlar bezi lobüllere ayırır. Septumların bağ dokusu elastik liflerden, düz kas ve çizgili kas liflerinden zengindir. Sekretuar bölümü tek katlı kübik veya prizmatik epitel ile döşelidir (49). Bulboüretal bezler mukus salgılayan bir epitel ile döşelidir (26). Boyu bezin fonksiyonuna bağlı olarak değişen tek katlı prizmatik epitel testosteonun kontrolü altındadır.

Bezin berrak mukus benzeri salgısı yüksek miktarda galaktoz galaktozamin, galakturonik asit, sialik asit ve metilpentoz içermektedir. Seksüel stimülasyon, preseminal sıvının büyük kısmını oluşturan ve muhtemelen penil üretranın kayganlaştırılmasında hizmet eden bu salgının salıverilmesine neden olur (23, 26, 49).

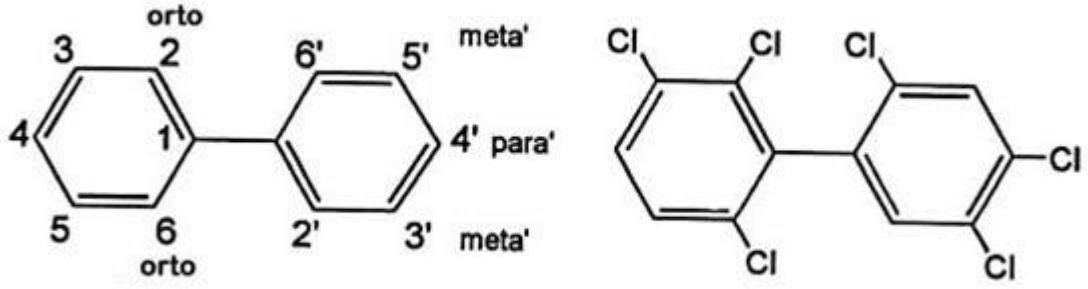
2.1. Poliklorlu Bifeniller (PCB)

Poliklorlu bifeniller (PCB'ler), her biri altı karbon atomu içeren iki benzen halkasından oluşan bir molekül olan bifenile bağlı 1 ile 10 klor atomundan oluşan organik bileşiklerdir (Şekil 2.6). Tüm PCB'lerin kimyasal formülü $C_{12}H_{10-x}Cl_x$ şeklindedir (1, 2, 75, 76). Klor iyonlarının bağlanma yeri ve sayıları nedeniyle, teorik olarak 209 farklı poliklorlu bifenil bileşeni üretilebilir (1, 77).

Poliklorlu bifeniller, 1930'lu yıllardan 1970'li yılların ortalarına kadar yaygın olarak kullanılan endüstriyel bileşiklerdir (1, 78- 80). Kimyasal ve fiziksel olarak stabil olmaları, yanıcılıklarının ve elektrik iletkenliklerinin düşük olması istenen özellikleridir (1, 81). Bu özellikleri nedeniyle en çok kapalı sistem olarak tasarlanmış kapasitörlerde ve trafolarda, akışkan olarak hidrolik pompa ve vakum pompalarında, mobilyalar, iç dekorasyon ve bina inşaatlarında, plastikleştirici olarak boyalar ve matbaa mürekkebinde, pestisit katkısı, yapıştırıcılar, astarlar, kesme yağlar, hidrolik yağlar, immersiye yağları, karbonsuz kopya kağıdı ve elektrik izolasyon sıvılarının yapımında yanmayı ve enerji kaybını önlemek amacıyla kullanılır (76, 77, 81- 84).

Poliklorlu bifeniller, bilinen tüm kimyasal maddeler arasında doğada en kalıcı olanlarıdır. Lipofilik özellikleri ve kimyasal kararlılıkları nedeniyle besin zincirinde birikerek çevresel kontaminasyona neden oldukları ve insan sağlığını tehdit ettikleri anlaşılmıştır (85). 1960'lı yılların sonunda poliklorlu bifenillerin yaygın olarak çevresel kontaminasyona sebep oldukları bulunmasına rağmen, Amerika, Japonya ve Batı Avrupa'da 1970'li yılların sonlarına kadar ve diğer bazı ülkelerde ise 1990 yılına kadar üretilmeye devam edilmiştir (1). Poliklorlu bifenil içeren endüstriyel teçhizat ve sanayi ürünleri hala kullanılmaktadır (1, 2, 86).

Genellikle poliklorlu bifeniller klorlanma yüzdelere göre piyasaya sürülmektedir. Bu maddelerde poliklorlu bifenil bileşikleri belli oranda bir karışım halinde bulunmaktadır. Bu karışımlardan bilinenlerden biri Monsanto şirketinin ürettiği AR 1254 serileridir. Bu serilerde dört rakamlı bir kod kullanılmaktadır. Bu kodlarda baştaki iki rakam karbon atom sayısını, son iki rakam ise karışımdaki klorlanma yüzdesini ifade eder. AR 1254 baştaki 12 rakamı karışımın 12 karbonlu bifenil halkasından oluştuğunu göstermektedir ve sondaki 54 karışımda %54 oranında klor bulunduğunu göstermektedir (2). Daha sonra, Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry veya IUPAC) tarafından non-orto, mono-orto ve di-orto yapılarına göre bir numaralandırma sistemi geliştirilmiştir (86).



Şekil 2.6. Poliklorlu bifenillerin genel yapısı ve klor bağlanma pozisyonları (1).

Poliklorlu bifenillerin sudaki çözünürlükleri azdır, yağ ve organik çözücülerde çözünürler, ısıya son derece dayanıklıdır ve buhar basınçları düşüktür (1, 87- 89). Oksidasyon, asit, bazve diğer kimyasal bileşiklere dayanıklı bileşiklerdir (81). Elektrikçi çok iyi yalıtırlar ve kimyasal olarak son derece inerttirler (1, 81).

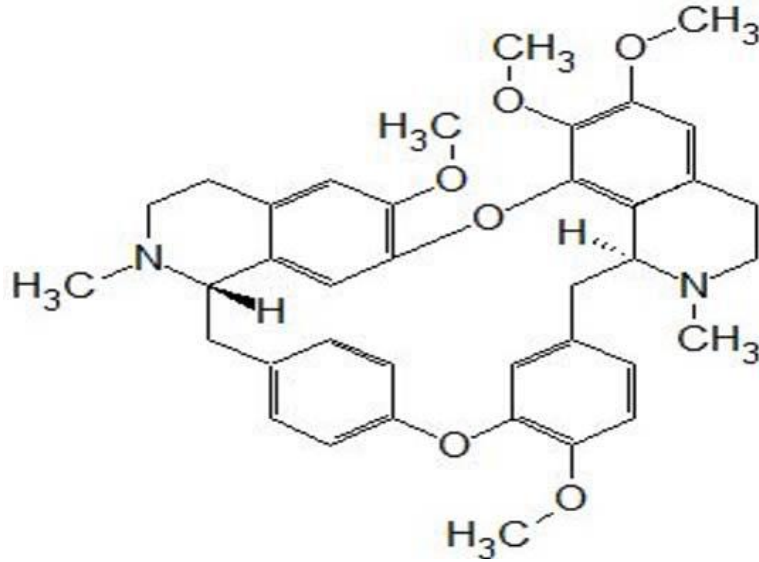
2.1.1. PCB'lerin etkileri

Poliklorlu bifeniller besin zincirine girerek, insanlar da dahil olmak üzere yeryüzündeki her canlıya taşınabilmektedir (2). 1968 yılında Japonya'da ve 1978 yılında Tayland'da meydana gelen zehirlenme vakalarından sonra poliklorlu bifenillerin çevrede ve insandaki dağılımı, birikimi ve toksik etkileri araştırılmaya başlanmıştır (2, 90). Canlılar PCB'lere solunum yoluyla, kontamine olmuş sular ve besinlerin vücuda alınmasıyla, mesleki olarak ve uzun süre kontamine olmuş suda yüzülmesiyle maruz kalırlar (2, 84). Çevrede çok kalıcı olan PCB'ler yüksek toksisiteye sahiptirler. Düşük yoğunluklarda bile hayvanlarda endokrin bozucu özellik gösterebilmektedirler (75). Ayrıca, immün sistemi baskılayıcı, nörotoksik (91), kanserojenik (92), teratojenik etkilerinin (93) olduğu ve davranış bozukluğuna sebep olduğu (94) saptanmıştır.

Poliklorlu bifenillerin androjenik ve anti-androjenik etkileri olduğu belirlenmiştir. Gelişme dönemindeki erkeklerde PCB'lere maruz kalınması kriptorşizm, testis kanseri, prostat yangısı ve kısırlık gibi patolojik durumlara neden olmaktadır (95).

2.2. Tetrandrin

Tetrandrin (TET), Çin tıbbında kullanılan *Radix Stephania tetrandra* bitkisinin kökünden izole edilmiş bir bisbenzil isoquioline bileşiğidir (20,21). İlk olarak 1932 yılında H. Kando ve K. Yano *Stephania tetrandra* bitkisinin kökünden izole edilmiş bir alkaloiddir. TET' nin yapısını oluşturan iki nitrojen atomu bu bileşiğin alkali bir özellik sergilemesine neden olmaktadır (96, 97, 98). Moleküler ağırlığı 622.76 g/mol olan ($C_{38}H_{42}O_6N_2$) bioaktif bir alkaloiddir (Şekil 2.7) (99). TET, anti- inflamatuvar, anti kanser, immunsupresif, antiaritmik, nöroprotektif ve sitoprotektif etkilere sahiptir (20, 98- 102). Son yıllarda TET' in insan hepatoselüler karsinom (HCC) otofajiyi aktive ettiği gösterilmiştir (103). TET lipid peroksidasyonunu inhibe etmektedir. Hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri ve süperoksit radikalleri içeren serbest oksijen radikallerinin (ROS) üretimini etkilemektedir (22).



Şekil 2.7. Tetrandrinin genel yapısı (22).

Tetrandrin, aritmi, hipertansiyon, inflamasyon, romatizmal artrit, sepsis, endotoksin uyarımlı üveit ve silikozis gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (22, 104-107). Deneysel çalışmalarla özellikle TET' in hayvanları iskemi reperfüzyon hasarından koruduğu, bu etkisiyle lipid peroksidasyonunda inhibisyona neden olduğu ve serbest radikallere karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (22).

3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışmada materyal olarak İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma laboratuvarından temin edilen, ağırlıkları yaklaşık 200-250 gr arasında değişen, 28 adet Sprague- Dawley cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sprague- Dawley türü sıçanlar rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. Gruplar sırası ile:

1. Grup: Kontrol grubu (7 adet)
2. Grup: AR 1254 grubu (7 adet)
3. Grup: AR 1254 + TET grubu (7 adet)
4. Grup: TET grubu (7 adet)

Kontrol grubundaki sıçanlara 30 gün boyunca 1ml mısır yağı gavaj yolu ile uygulandı. AR 1254 grubundaki sıçanlara ise AR 1254 mısır yağı içerisinde çözülerek 2 mg/kg/gün intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. AR 1254 ile birlikte TET uygulanan grupta ise sıçanlara 30 gün boyunca mısır yağı içerisinde çözünen AR 1254 2 mg/ kg/ gün (i.p) dozunda ve TET 30 mg/kg/gün olacak şekilde gavaj yolu ile uygulandı. TET ise mısır yağı içerisinde çözülerek 30 gün boyunca 30 mg/kg/gün olacak şekilde gavaj yolu ile uygulandı. Çalışmanın sonunda ketamin/ksilazin anestezisi altında sıçanlardan testis doku örnekleri histolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı. Gruplar testis ağırlıkları, epididimis ağırlıkları, seminal vezikül ağırlıkları ve prostat ağırlıkları açısından karşılaştırıldı. Histolojik olarak ışık mikroskopik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi, immunohistokimyasal değerlendirme için ise Kaspaz-3 boyama yöntemleri kullanıldı. Biyokimyasal değerlendirmeler için hücre antioksidan düzeyini değerlendirmek için TBARS ve antioksidan enzimlerin seviyeleri (GSH, CAT, SOD, GSH-Px) ölçüldü. Spermatolojik incelemelerde de sperm motilitesi, epididimal sperm konsantrasyonu ve anormal sperm oranı (baş, kuyruk, total) değerlendirildi.

3.1. Histolojik Yöntemler

Histolojik inceleme için alınan testis doku örnekleri %10'luk formaldehit içerisinde tespit edildi (Tablo3.1).

Tablo 3.1. Tespit maddesi ve süresi

FİKSATİF	MADDELER	ORANI	TESPİT SÜRESİ
FORMALDEHİT	Formaldehit	7 cc	24 saat
Solüsyonu	Distile su	93cc	

Formaldehit içerisinde tespit edilen dokulara rutin histolojik doku takip işlemleri uygulandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Doku takip basamakları.

%70 alkol	1 saat
%80 alkol	1 saat
%96 alkol	1 saat
%96 alkol	1 saat
Absolü alkol	1 saat
Absolü alkol	1 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen	1saat
Parafin I	1 saat
Parafin II	1 saat

Takip işlemlerinden sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Hazırlanan bloklardan mikrotom (Leica RM 2245) ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitlere H-E boyama metodu uygulandı ve Leica 280 ışık mikroskobu ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sistemi (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK) ile incelenerek fotoğraflandı. İmmunohistokimyasal boyama için alınan kesitler polilizin kaplı lamalar üzerine alındı. Alınan kesitlere Kaspaz-3 boyama metodu uygulandı.

3.1.1. Mayer'in Hematoxylen-Eozin Metodu:

Lamlara alınan doku örnekleri bir saat etüvde bekletildi ve doku çevresinde bulunan parafinin erimesi sağlandı. Daha sonra kesitlere sırası ile aşağıda verilen boya metodu uygulandı.

Ksilen I	5 dakika
Ksilen II	5 dakika
Ksilen III	5 dakika
%96 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
Absolü alkol	3 dakika
Absolü alkol	3 dakika
Distile suda yıkama	2 dakika
Mayer Hematoksilen	10 dakika
Çeşme suyu	20 dakika
Eozin	2 dakika
%96 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
Ksilen I	5 dakika
Ksilen II	5 dakika
Ksilen III	5 dakika

H-E ile boyanmış preparatlarda seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıkları ölçüldü (Tablo 4.1). Ölçümler, her preparattan 100 adet seminifer tübül sayılarak gerçekleştirildi. Histolojik skora, tübüllerin sağlam, dökülmüş, atrofiye ve dejenere hücrelerin varlığına göre, her bir preparattan X20 büyütmede 10 farklı alan incelenerek yapıldı (Tablo 4.2).

3.1.2. Histolojik İnceleme İçin İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analizler SPSS 13 ve MedCalc programı ile yapıldı. Tüm grupların ortalama değerleri nonparametrik Kruskal- Wallis testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklılığın önemli olup olmadığı Mann-Whitney U testi ile ikili

karşılaştırmalar yapılarak değerlendirildi. Tüm sonuçlar ortalama $\pm$ standart hata (SE) olarak ifade edildi ve $p < 0.0001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.1.3. İmmunohistokimyasal boyama prosedürü:

Testis dokularından alınan 5 μm 'lik kesitler, immunohistokimyasal boyama için polizin kaplı lamlar üzerine alındı.

Xylol I	5 dakika
Xylol II	5 dakika
Xylol III	5 dakika
%100 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
%80 alkol	3 dakika
Distile su	5 dakika
Antijen Retrieval Aşaması	15 dakika
Oda ısısında soğutma	20 dakika
Distile su	5 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	5 dakika
H ₂ O ₂ (Hidrojen Peroksit) Aşaması	10 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	5 dakika
Protein Bloke Aşaması (Süper Blok)	5 dakika
Primer Antikor Aşaması	2 saat
PBS (Phosphate Buffered Saline)	2x5 dakika
Sekonder Antikor	10 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	2x5 dakika
Streptavidin Peroksidaz (HRP) Aşaması	10 dakika
AEC Kromojen Aşaması	10 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	5 dakika
Distile su	5 dakika
Mayers Hematoksilen	40 sn
Çeşme Suyu	5 dakika
Distile Su	5 dakika
Aqueous mount ile kapatma	

3.2. Biyokimyasal Yöntemler

3.2.1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Dört hafta sonunda sıçanlar dekapite edilerek alınan doku örneklerinde (testis) malondialdehit (MDA) düzeyleri ile SOD, CAT, GSH-Px, GSH ve protein ölçümleri yapılmaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

3.2.2. Homojenatların Hazırlanması

Derin dondurucudan alınan dokular tartılarak cam tüplere konuldu. Üzerine 1/10 (g/h) oranında dilüsyon olacak şekilde %1,15’lik potasyum klorür ilave edildikten sonra soğuklukları muhafaza edilerek cam-teflon homojenizatörde 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika homojenize edildi. Hazırlanan bu homojenatlarda doku MDA tayinleri yapıldı. Geri kalan homojenat +4°C’de 45 dakika süreyle 3500 rpm’ de santrifüj edilerek süpernatant elde edildi. Bu süpernatantlarda GSH ve protein düzeyleri ile GSH-Px ve CAT enzim aktiviteleri ölçüldü. Geri kalan süpernatant kısmına kloroform/etanol (3/5, h/h) karışımından oluşan ayıraç 1/1 (h/h) oranında ilave edildi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. Daha sonra 45 dakika 3500 rpm’de santrifüj edildi. Üstte kalan kloroform/etanol fazında SOD enzim aktivitesi ve protein ölçümleri tekrar yapıldı.

3.2.3. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçümü

Doku MDA düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Ohkawa ve ark. (108) tarafından önerilen metoda göre yapıldı.

Prensip: Doku MDA tayini; aerobik şartlar altında ve pH:3,5’te, doku homojenatının kaynar su banyosunda bir saat inkubasyonu sonucu, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA’nın TBA ile oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanır.

3.2.4. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

Süperoksit dismutaz, oksidatif enerji üretimi sırasında oluşan toksik süperoksit radikallerinin (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dismutasyonunu hızlandırır. Dokulardaki SOD enzim aktivitesi Sun ve ark. (109) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı.

Prensip: Bu yöntemde SOD aktivitesi, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilen süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Oluşan süperoksit radikallerinin NBT'yi indirgemesi ile oluşan renkli formazon spektrofotometrik olarak ölçülür. Bu kompleks 560 nm'de maksimum absorbands verir. Enzimin olmadığı ortamlarda indirgenme meydana gelerek mavi-mor renk oluşmaktadır. Ortamda SOD bulunduğunda ise indirgenme olmayıp mavi-mor renk oluşmaz ve enzim aktivitesine bağlı olarak daha açık bir renk oluşur.

3.2.5. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü

Glutasyon peroksidaz, redükte glutasyonu kullanarak H_2O_2 'nin suya dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir. Dokulardaki GSH-Px aktivitelerinin tayini Beutler (110) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı.

Prensip: Glutasyon peroksidaz, H_2O_2 varlığında GSH'yi okside glutasyon (GSSG)'a dönüşmesini katalize eder. H_2O_2 'nin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımıyla tekrar GSH'a dönüştürülür. GSH-Px aktivitesi, deney ortamındaki NADPH'nin $NADP^+$ 'ya çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen absorbands farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmesi ile hesaplanır.

3.2.6. Doku Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz, katalitik aktivitesiyle H_2O_2 'yi dekompoze ederek su ve oksijene dönüştürmektedir. Dokulardaki CAT enzim aktivitelerinin tayini Aebi (111) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı.

Prensip: Hidrojen peroksit, 240 nm dalga boyunda maksimum absorbands göstermektedir. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 'nin CAT enzimi tarafından parçalanması, ultraviyole spektrumda bir absorbands azalması olarak takip edilir. Absorbanda görülen bu azalma enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

3.2.7. Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü

Dokulardaki GSH aktiviteleri Ellman (112) tarafından ditiyonitrobenzoik asit geri çevirim metodu olarak tanımlanan yöneme göre tayin edildi.

Prensip: 5,5'-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit] (DTNB), sülfhidril bileşikleri tarafından redükte edilerek bir disülfid bileşiği olan sarı renkli kompleks oluşturur. Bu

sarı renkli bileşiğin optik dansitesi 412 nm dalga boyunda ölçülerek GSH aktivitesi saptanır.

3.2.8. Doku Protein Ölçümü

Homojenat ve süpernatantlardaki protein miktarı tayinleri Lowry ve ark. (113) tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçüldü.

Prensip: Alkali bakır ayırıcındaki Cu^{++} peptid bağları ile kompleks yapmaktadır. Her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlamaktadır. Folin- Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilmiş karışıma ilave edildiğinde mor-mavi bir renk şekillenir. Oluşan bu renk 650 nm’de okunur.

3.3. Organ Ağırlıkları ve Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Testis, epididimis, seminal veziküller ve prostat gibi organların hayvanlardan alındıktan sonra ağırlıkları tartılarak değerler analiz edildi ve sperm parametreleri değerlendirildi.

Epididimal sperm konsantrasyonu; Çiftçi ve ark.(114)’ nın tarif ettiği modifiye hemosimetre yöntemi kullanılarak belirlendi. Seyreltilmiş sperm süspansiyonu yaklaşık olarak 10 µl sayım alanına damlatıldı ve 5 dakika bekletildikten sonra her iki kutucuktaki sperm hücreleri ışık mikroskobu yardımıyla 200^x büyütmede sayıldı. Sperm motilite yüzdesi Çiftçi ve ark. (114) tarafından tarif edildiği gibi bir ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi. Sperm motilite yüzdesi 400^x büyütmede değerlendirildi. Motilite tahminleri her bir örnek için üç farklı alanda yapıldı ve ardışık tahminlerin ortalaması final motilite skoru olarak kullanıldı. Morfolojik olarak anormal sperm oranını belirlemek için, eozin-nigrosin (%1,67 eozin, %10 nigrosin ve 0,1 M sodyum sitrat) ile boyanarak hazırlandı ve preparatlar ışık mikroskopunda 400^x büyütmede incelendi. Her preparat için toplam 300 spermatozoa (her grupta 210 hücre) baş, kuyruk ve toplam sperm anormallik oranları % olarak ifade edildi (114).

3.4. Biyokimya ve Sperm Analizleri İçin İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler, “SPSS for Windows 12.0” paket programı kullanılarak yapıldı. Normallik testi yapıldıktan sonra veriler non-parametrik test varsayımlarına uyduğu için grupların karşılaştırılmasında Kruskal-Wallis H varyans analizi kullanıldı. Önemlilikler, Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılarak değerlendirildi. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

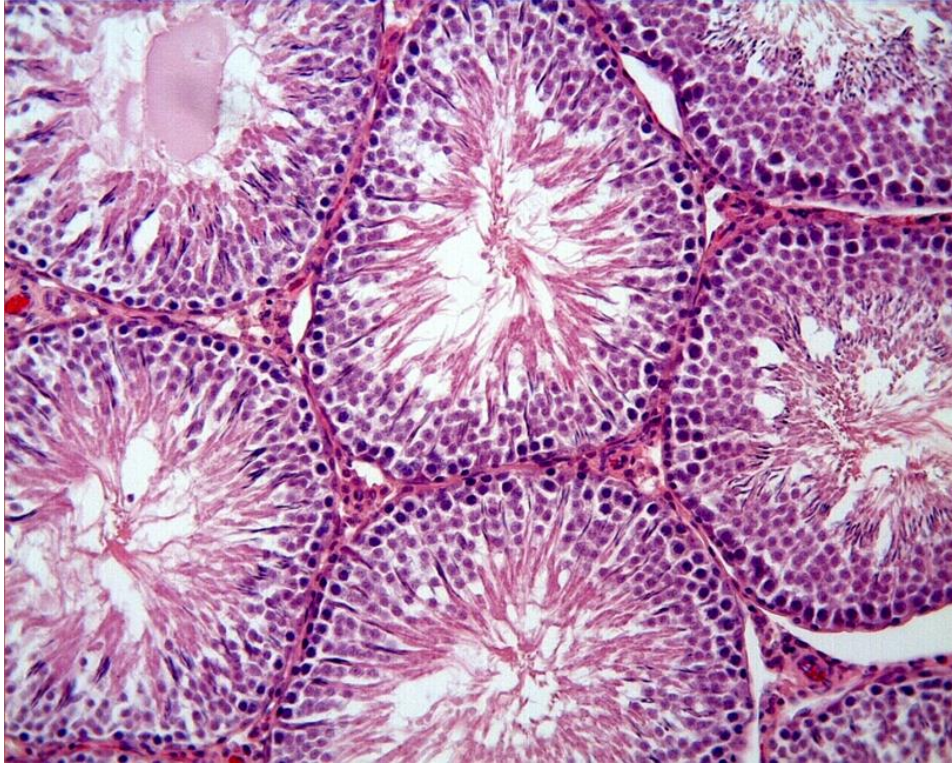
4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

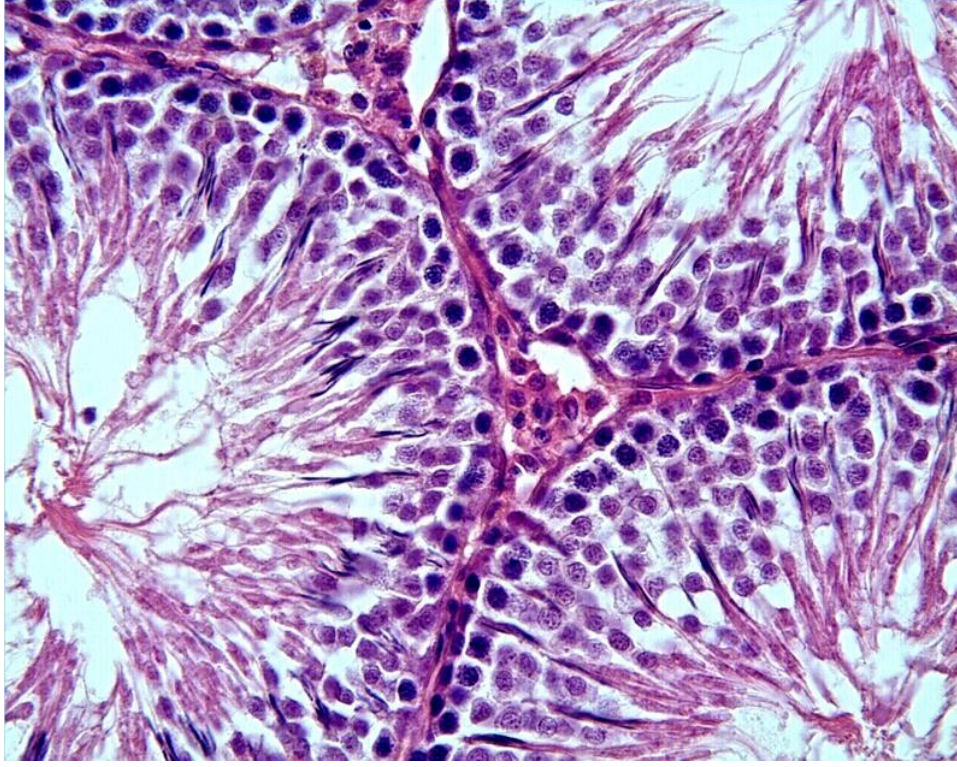
Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçanların testislerinin genel görünümünü saptamak için H-E boyaları uygulanmıştır.

4.1.1. Kontrol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

Kontrol grubunu oluşturan sıçanların testis doku örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde normal histolojik görünümde olduğu izlendi. Seminifer tübül yapıları, bazal membran ve interstisyel alan normal histolojik yapıda gözlemlendi (Şekil 4.1). Seminifer tübüllerin epitelini oluşturan spermatogenik seri hücreler, Sertoli hücreleri ve interstisyel alanda bulunan bağ dokusu normal histolojik görünümdeydi (Şekil 4.2). Gelişmekte olan spermatidler, klasik görüntülerindeki gibi kuyruk lümende, baş tübül duvarına yönelik, Sertoli hücrelerinin arasına lokalize olmuş şekilde gözlemlendi. Bu grupta; seminifer tübül çapları $303,45 \pm 2,99 \mu\text{m}$ ve germinal epitel yüksekliği ise $80,18 \pm 0,66 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü.



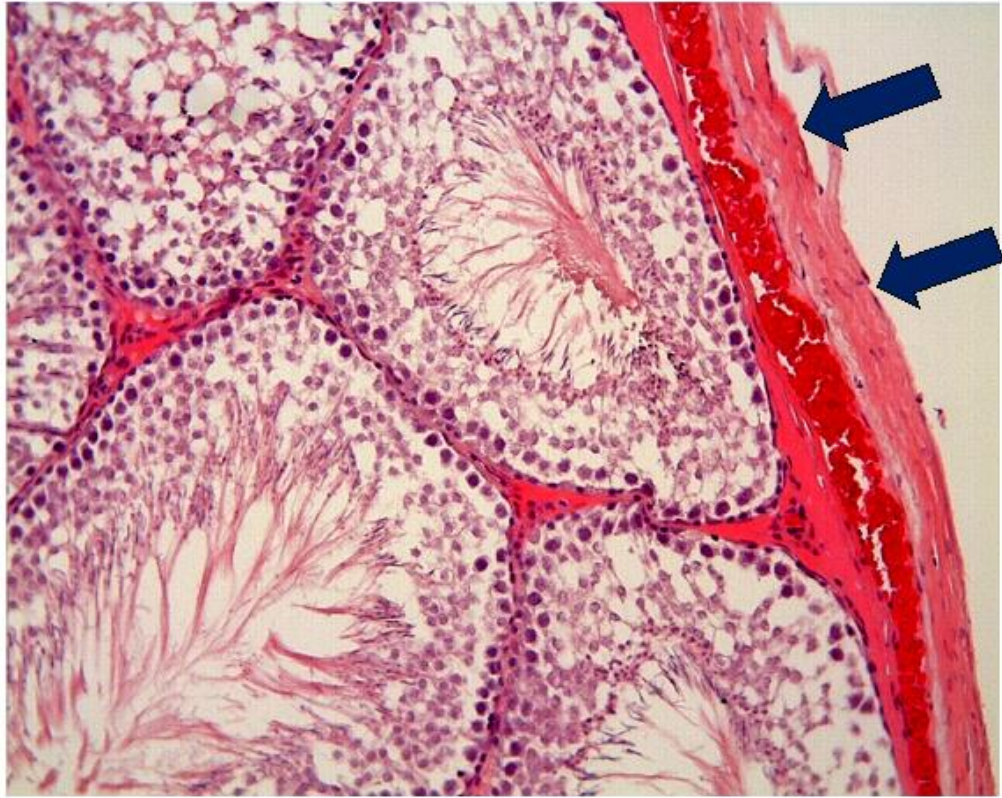
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Normal yapıdaki seminifer tübüller, interstisyel alan ve spermatogenik hücreler görülmektedir. H-E; x20.



Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alan, leydig hücreleri ve spermatogenik seri hücreler normal histolojik görünümde izlendi. H-E; x 40.

4.1.2. Aroklor 1254 Grubu Işıık Mikroskobik Bulguları

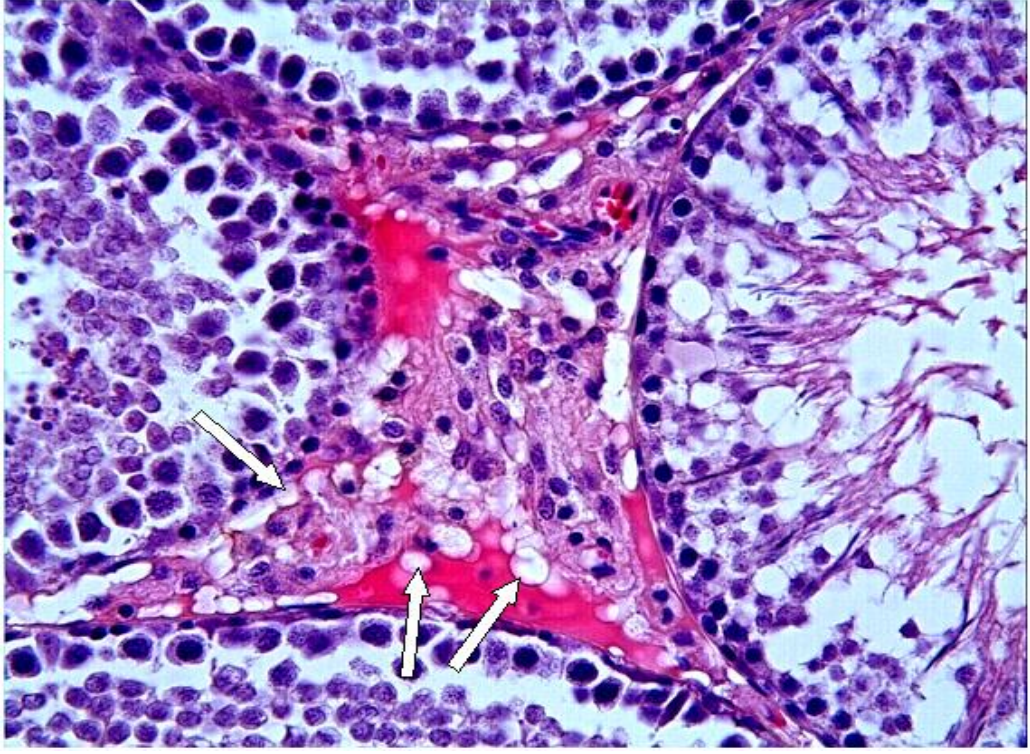
Aroklor 1254 uygulanan sıçanların testis doku örneklerinin ışık mikroskobik incelemelerinde seminifer tübüllerde hasar ve hücrel dejenerasyonlar gözlemlendi. Testis dokusunu dıştan saran tunika albuginea tabakasında (Şekil 4.3) ve interstisyel alanda (Şekil 4.4) belirgin vasküler konjesyon ayırt edildi. İnterstisyel alanda vakuolizasyon (Şekil 4.5) ve ödem oluşumu (Şekil 4.6) belirgindi. Seminifer tübül yapıları incelendiğinde bazı tübüllerde spermatogenik seri hücrelerde azalma (Şekil 4.3, 6, 7), bazılarında ise spermatogenik seri hücrelerin tübül lümenine döküldüğü (Şekil 4.7) saptandı. Buna ilaveten testis dokusunda seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler (Şekil 4.8) olduğu gözlemlendi. Bu grupta ise seminifer tübül çapları $267,56 \pm 2,44 \mu\text{m}$ ve germinal epitel yüksekliği ise $53,57 \pm 0,64 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü.



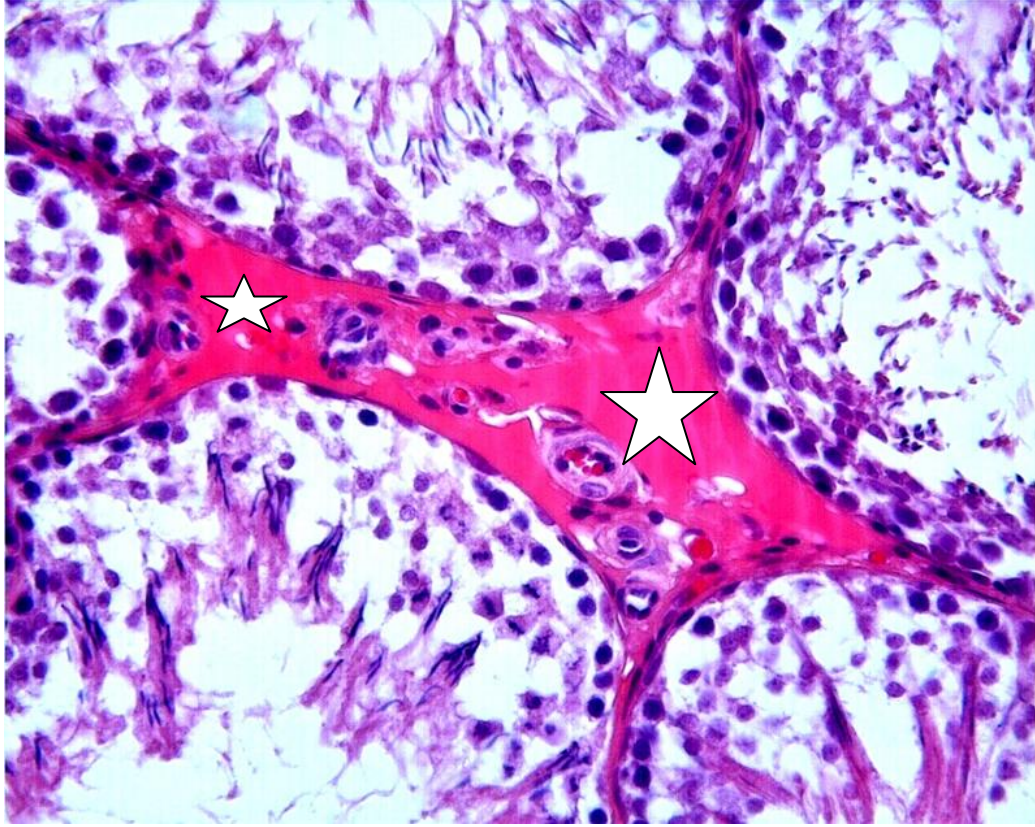
Şekil 4.3. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskobik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda tunika albuginea tabakasında belirgin konjesyon (Oklar) gözlemlendi. H-E; X20.



Şekil 4.4. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda vasküler konjesyon (Oklar) ve seminifer tübül yapısında dejenerasyon gözlemlendi. H-E; X10.

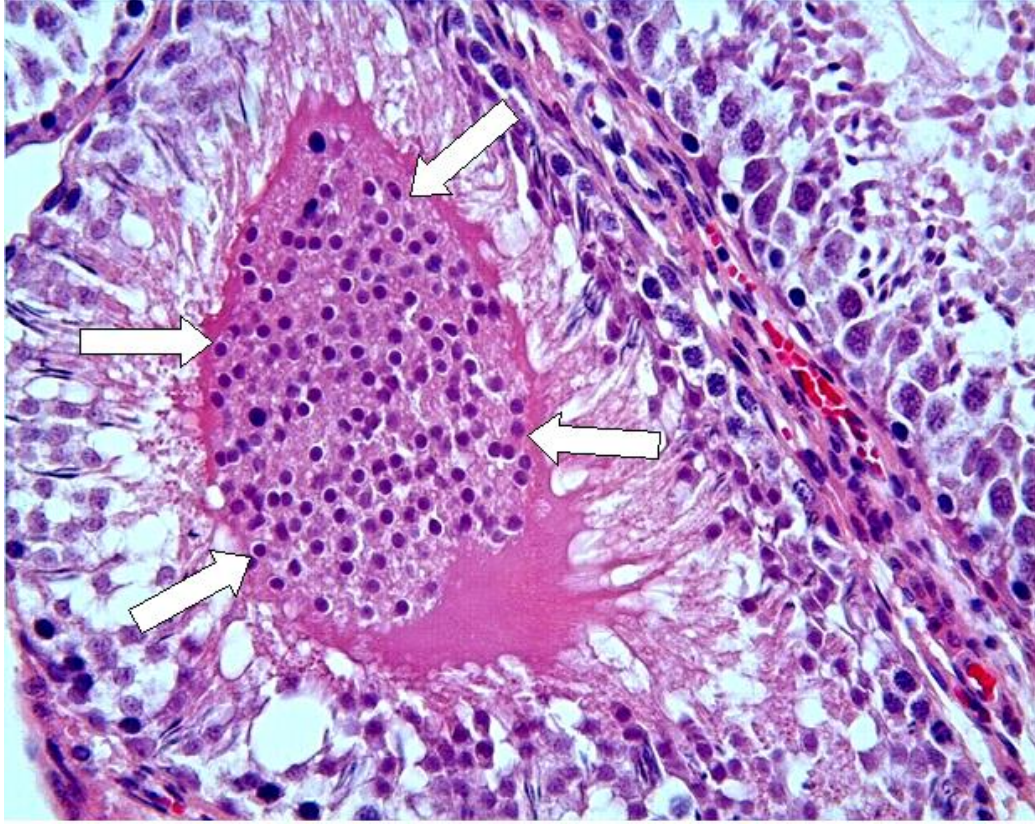


Şekil 4. 5. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda vakuolizasyon (Oklar) gözlendi. H-E; X40.

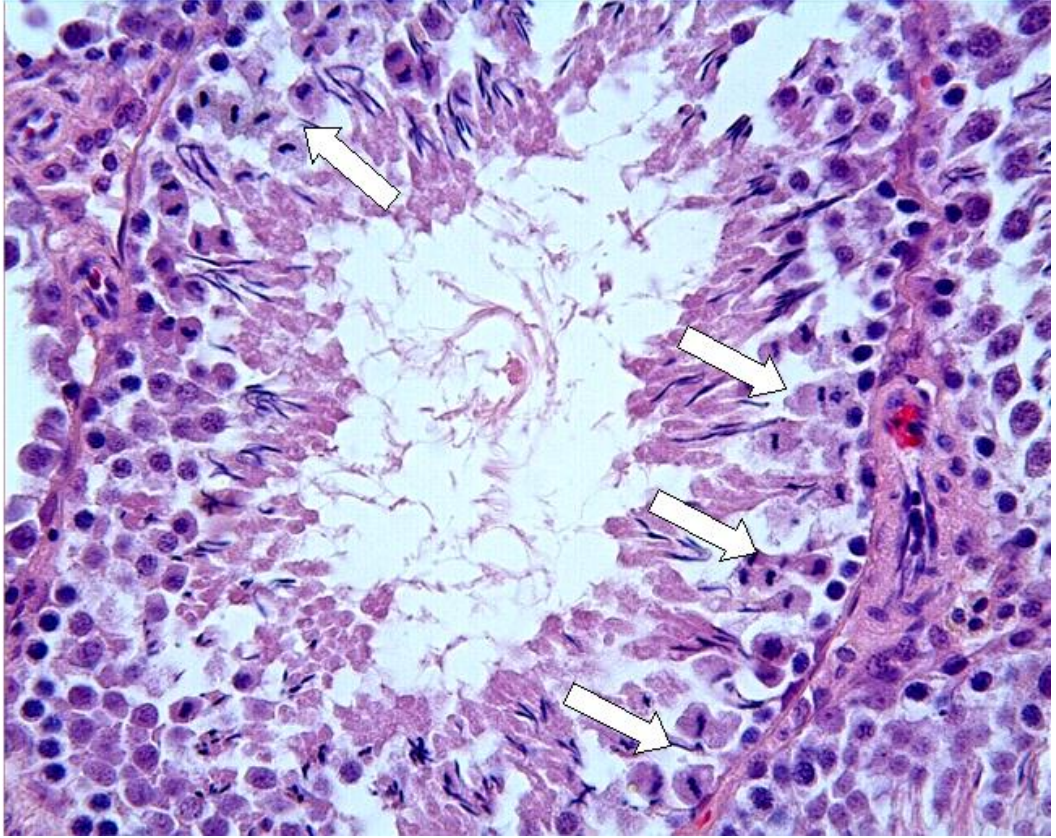


Şekil 4.6. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda interstisyel alanda ödem oluşumu (yıldız), seminifer tübül epitelinde bozulma, spermatogenetik seriyi oluşturan hücrelerin düzensiz yerleşimi gözlemlendi.

H-E; X40.



Şekil 4.7. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül epitelinde dejenerasyon ve lümene dökülen hücreler (Oklar) görüldü. H-E; X40.



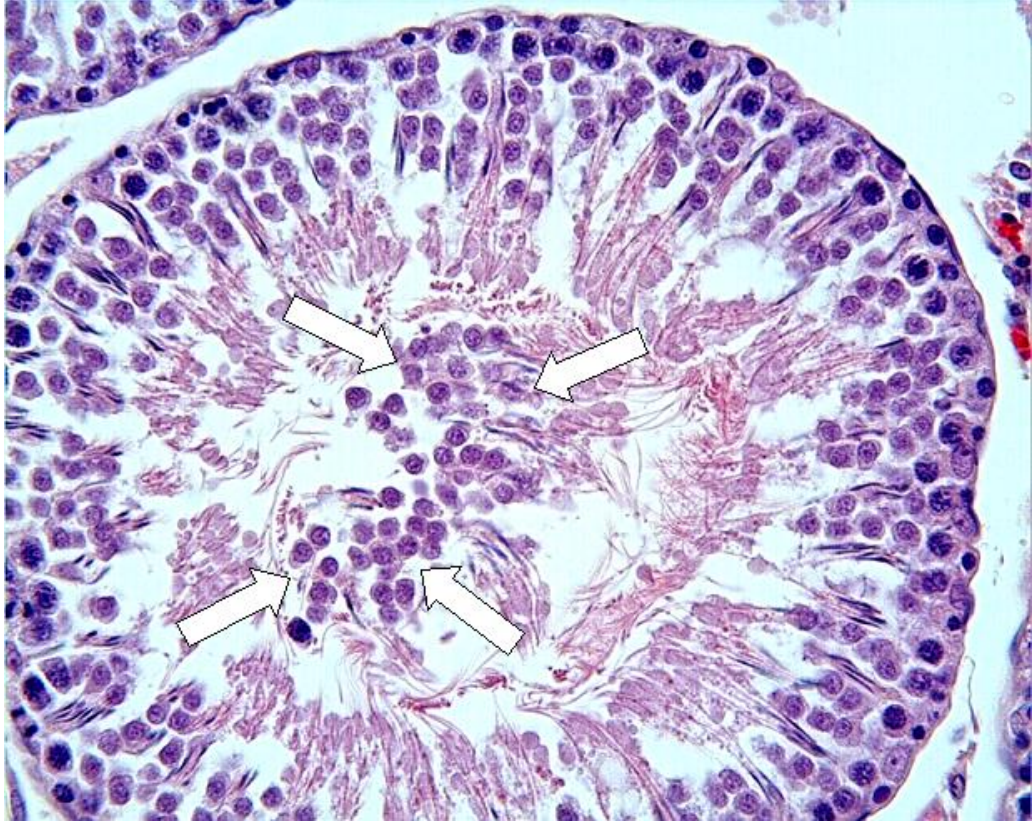
Şekil 4.8. AR 1254 grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. AR 1254 grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler (Oklar) gözlendi. H-E; X40.

4.1.3. Aroklor 1254 + Tetrandrin Grubu Işıık Mikroskopik Bulguları

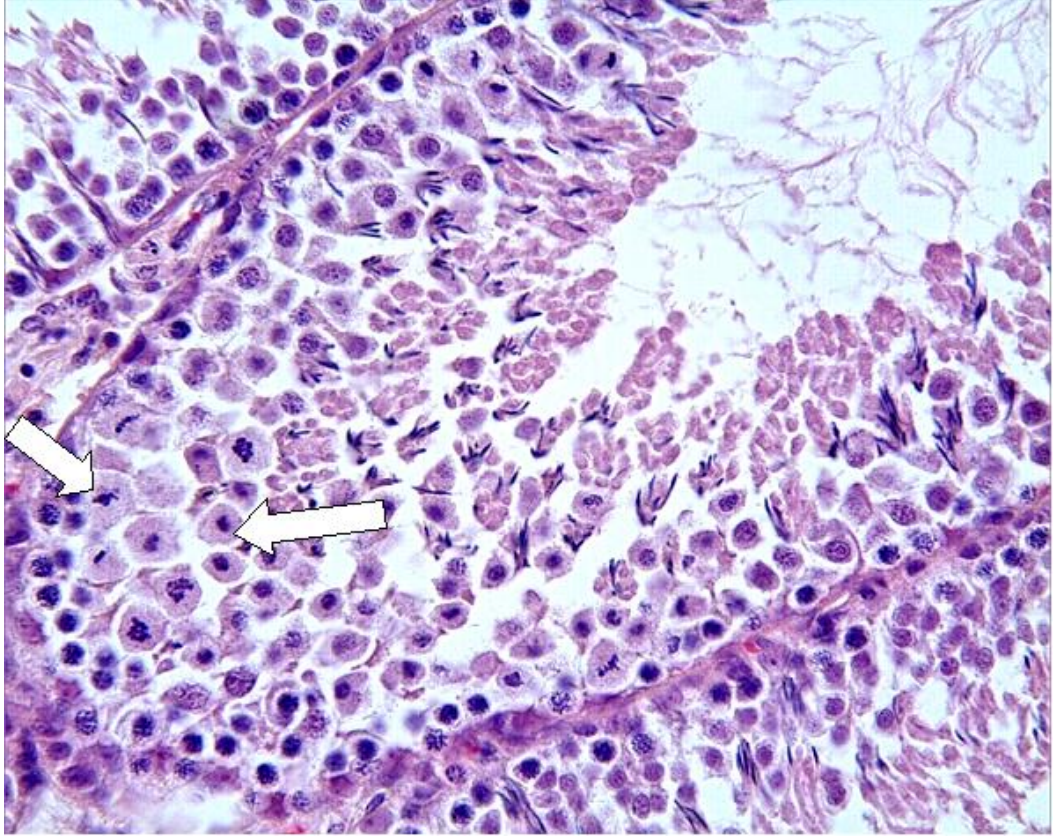
Aroklor 1254 + Tetrandrin grubunu oluşturan sııan testis örneklerinin ışıık mikroskopik incelemelerinde, az sayıda tübölde hasarın devam ettiğı görölmele birlikte, tüböl hasarın azaldığı, spermatogenik hücrelerin korunduğı gözlendi (Şekil 4.9). İnterstisyel alanda bulunan damarlarda vasküler konjesyonun azaldığı tespit edildi. Ayrıca lümene dökülen spermatogenik seri hücrelerde (Şekil 4.10) ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücrelerde (Şekil 4.11), interstisyel alanda görülen vakuolizasyon ve ödemde belirgin derecede azalma olduğı tespit edildi. Bu grupta seminifer tüböl çapları $299,62 \pm 3,39 \mu\text{m}$ ve germinal epitel yüksekliğı ise $69,37 \pm 0,62 \mu\text{m}$ olarak ölçölldü.



Şekil 4.9. AR 1254 + TET grubuna ait testis dokusunun ışıık mikroskopikgörüntüsü. İnterstisyel alanda ödem ve vasküler konjesyonda azalma, seminifer tüböl hasarında azalma ve spermatozoon sayısında artış gözlendi. H-E; X20.



Şekil 4.10. AR 1254 + TET grubuna ait testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Lümene dökülen hücrelerde belirgin derecede azalma (Oklar) gözlemlendi. H-E; X40.



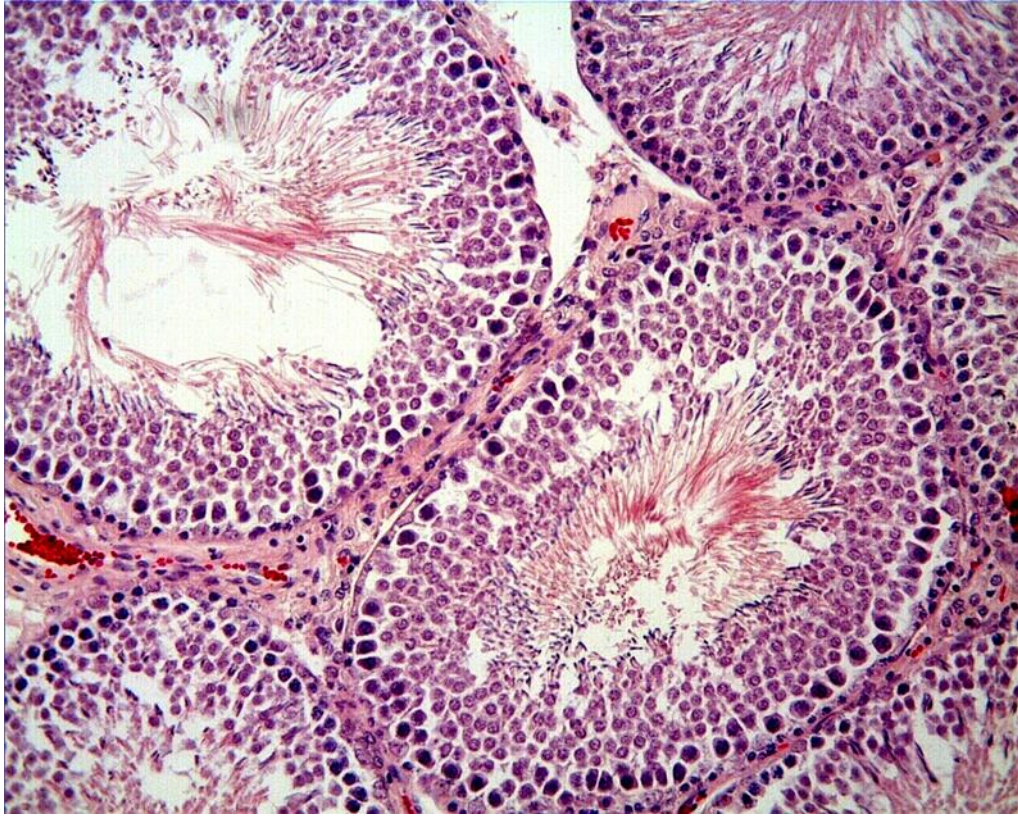
Şekil 4.11. AR 1254 + TET grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücrelerde azalma (Oklar) gözlemlendi. H-E; X40.



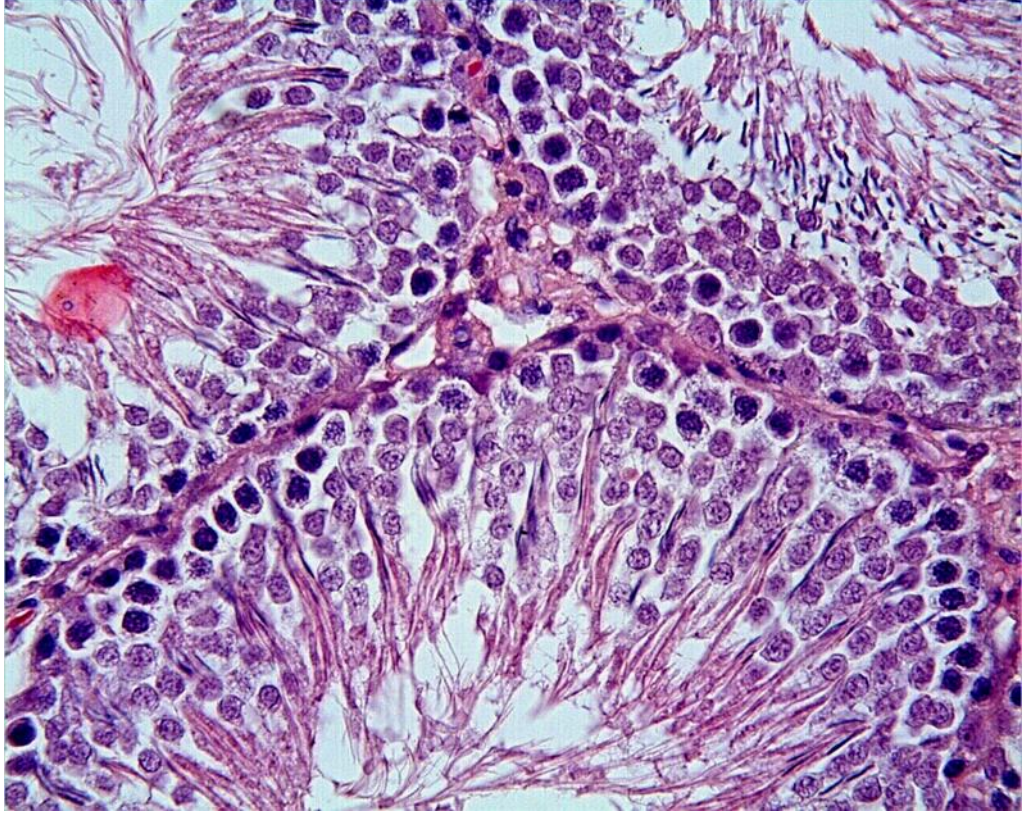
Şekil 4. 12. AR 1254 + TET grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alanda görülen vakuolizasyon ve ödemde azalma (Oklar). H-E; X40.

4.1.4. Tetrandrin Grubu Işıık Mikroskobik Bulguları

Tetrandrin grubuna ait sııan testis örneklerinin ışıık mikroskobik incelemelerinde, seminifer tübül, bazal membran ve interstisyel alan kontrol grubuna benzer bir yapı gösterdi (Şekil 4.13). Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri olan, spermatogonyum, primer spermatosit ve spermatid hücreleri ile destek hücreleri olan Sertoli hücreleri normal yapıda gözlandı. İntersitisyel alandaki bağ dokusu normal histolojik yapıda gözlandı (Şekil 4.14). Bu grupta ise seminifer tübül çapları $287,24 \pm 3,18 \mu\text{m}$ ve germinal epitel yüksekliğı ise $78,94 \pm 0,71 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü.



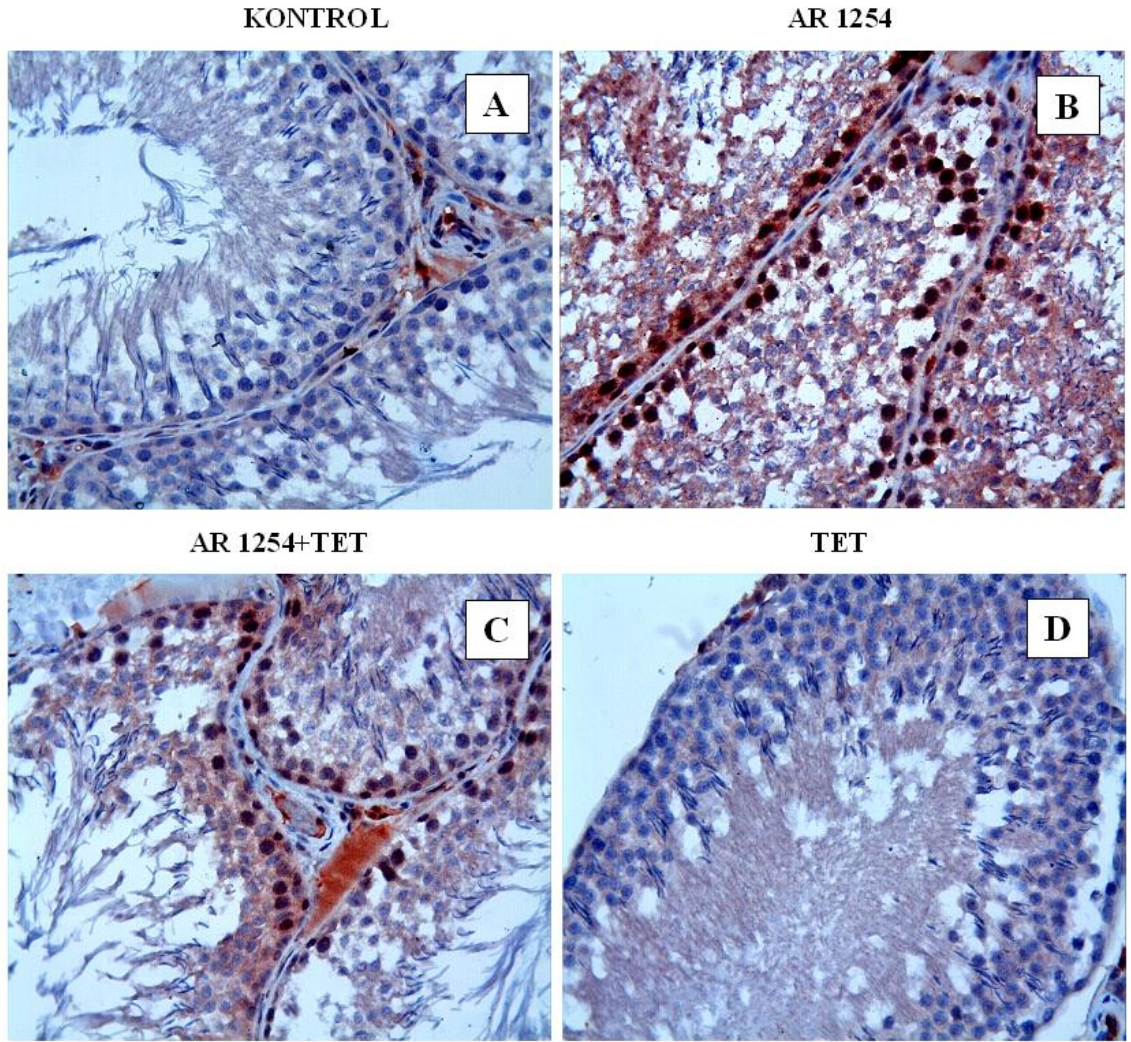
Şekil 4.13. TET verilen testis dokusunun ışıık mikroskobik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler ve interstisyel alandaki hücre yapılarıyla birlikte testis dokusu normal histolojik yapıda gözlandı. H-E; X20.



Şekil 4.14. TET verilen testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübüller, spermatogenik seri hücreler ve interstisyel alan normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. H-E; X40.

4.1.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol (Şekil 4.15A), AR 1254 (Şekil 4.15B), AR 1254 + TET (Şekil 4.15C) ve TET (Şekil 4.15 D) gruplarında spermatogenik seri hücrelerde Kaspaz- 3 immunreaktivite değerlendirilmesi yapıldı. AR 1254 grubunda belirgin derecede yoğun boyanmış Kaspaz-3 pozitif hücreler gözlemlendi. AR 1254 + TET grubunda Kaspaz-3 pozitif boyanmış hücrelerin sayısında ve boyanma yoğunluğunda belirgin derecede azalma olduğu tespit edildi. Kontrol ve TET gruplarında ise herhangi bir Kaspaz-3 immunreaktivitesi gözlenmedi.



Şekil 4.15. Deney gruplarındaki Kaspaz-3 aktiviteleri. Kontrol (A), AR 1254 (B), AR 1254+TET (C), TET (D). Kaspaz-3; X40.

Tablo 4.1. AR1254'ün oluşturduğu tübül çapı ve tübül epitel kalınlığındaki değişiklikler üzerine TET'in etkileri (ort±SEM n=7).

GRUPLAR	Tübül Çapı	Tübül Epitel Kalınlığı
Kontrol	303,45 ± 2,99 ^a	80,18 ± 0,66 ^a
AR	267,56 ± 2,44 ^b	53,57 ± 0,64 ^b
TET	299,62 ± 3,39 ^a	78,94 ± 0,71 ^a
AR + TET	287,24 ± 3,18 ^c	69,37 ± 0,62 ^c

Aynı sütundaki a,b,c küçük harfleri gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir. (P<0.0001)

Tablo 4.2. Tübüllerin Histolojik Skorlaması (ort±SEM n=7).

GRUPLAR	Normal	Dejenere	Atrofik
Kontrol	3,33 ± 0,09 ^a	0,15 ± 0,05 ^a	0,38 ± 0,06 ^a
AR	0,17 ± 0,05 ^b	0,40 ± 0,08 ^b	3,88 ± 0,14 ^b
TET	2,68 ± 0,07 ^c	0,18 ± 0,05 ^c	0,65 ± 0,08 ^c
AR + TET	1,85 ± 0,12 ^d	0,33 ± 0,07 ^d	1.13 ± 0,10 ^d

Aynı sütundaki a,b,c,d küçük harfleri gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir. (P<0.0001)

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Tablo 4.3’de TBARS, SOD, CAT, GSH ve GPx düzeylerine ait değerler verilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda AR 1254 verilen ratlarda oksidatif hasarın göstergesi olan TBARS düzeyinin kontrol ve diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi. Bununla birlikte TET uygulamasının AR 1254’ ün neden olduğu TBARS artışında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı ve AR 1254 + TET grubundaki TBARS düzeyinin kontrol grubunun değerlerine yaklaştığı tespit edildi. Sadece TET verilen grupla kontrol ve AR 1254 + TET grubu arasında rakamsal farklılıklar olsa da istatistiksel olarak anlamlı değişimlerin olmadığı saptandı. Bununla birlikte AR 1254 uygulamasının antioksidan savunma sistemi elemanları olan GSH, SOD, GPx ve CAT düzeylerinde istatistik olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Ancak TET uygulamasının GSH, GPx, CAT ve SOD düzeylerinde AR 1254’e bağlı olan azalmayı normal değerlere yaklaştırdığı belirlendi. Kontrol grubu ile TET grubu arasında tüm parametreler açısından belirgin bir farklılık gözlenmedi.

Tablo 4.3. Tetrandrine (TET)ve AR 1254 verilmiş ratlarda TBARS, GSH, CAT, SOD ve GPx düzeyleri (ort±SEM n=7)

	Kontrol	AR	TET	AR + TET
TBARS(nmol/g tissue)	5.31±0.91 ^a	8.70±1.03 ^b	4.98±0.81 ^a	6.05±0.14 ^c
GSH (nmol/ml)	130.2±4.7 ^{ac}	89.6±5.2 ^b	143.1±6.1 ^a	125.8±4.5 ^c
CAT (k/mg protein)	0.034±0.005 ^a	0.019±0.002 ^b	0.039±0.007 ^a	0.024±0.003 ^d
SOD (U/mg protein)	42.1±2.01 ^a	24.6±2.69 ^b	39.9±1.97 ^a	33.6±2.41 ^c
GPx (U/mg protein)	247.1±23.2 ^a	171.4±19.1 ^b	219± 21.7 ^c	198.7±20.3 ^d

Aynı sütundaki a,b ve c harfleri gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı (p≤0.01) göstermektedir.

4.3. Spermatolojik Bulgular

Gruplar testis ağırlıkları, epididimis ağırlıkları, seminal vezikül ağırlıkları ve prostat ağırlıkları açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Üreme sistemi organ (testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat) ağırlıklarındaki değişimler Tablo 4.4' de sunuldu. Tablodan görüleceği üzere yapılan AR 1254 uygulaması ve TET tedavisi üreme sistemi organ ağırlıklarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak herhangi bir değişime neden olmamıştır.

Tablo 4.4. TET ve AR 1254 verilmiş ratlarda Testis ağırlıkları, Epididimis ağırlıkları, Seminal vezikül ağırlıkları, Prostat ağırlıkları (ort±SEM n=7).

GRUPLAR	Testis ağırlıkları		Epididimis ağırlıkları		Seminal vezikül ağırlıkları	Prostat ağırlıkları
	SAĞ	SOL	SAĞ	SOL		
Kontrol	1.285±0.02	1.307±0.03	0.615±0.03	0.571±0.04	1.419±0.09	0.486±0.03
AR	1.330±0.05	1.348±0.043	1.348±0.043	0.547±0.03	1.365±0.09	0.498±0.02
TET	1.350±0.04	1.362±0.02	1.362±0.02	0.509±0.01	1.224±0.10	0.430±0.03
AR + TET	1.362±0.06	1.414±0.03	1.414±0.03	0.609±0.01	1.069±0.01	0.374±0.03

Tablo 4.5' de sperm karakteristikleri olan sperm motilitesi, anormal sperm miktarı ve sperm konsantrasyonları verilmiştir. AR 1254 uygulamasının sperm motilitesi ve konsantrasyonunda kontrol grubu ve TET grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu belirlendi. AR 1254 + TET grubunda ise TET kombine tedavisinin AR 1254'ün neden olduğu bu azalmayı tersine çevirdiği ve sperm motilitesi ve konsantrasyonu sadece AR 1254 verilen gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığı saptandı. Bu değerlerin kontrol grubuna yaklaştığı ve iki grup arasında istatistiksel olarak fark bulunmadığı tespit edildi. Bununla birlikte AR 1254 uygulamasının anormal sperm miktarında (Kafa, kuyruk, total) istatistiksel olarak önemli düzeyde artışa sebep olduğu ve bu artışın TET tedavisi ile azaldığı belirlendi. Azalmanın önemli düzeyde olduğu ancak kontrol grubuna göre yine de anlamlı farkın olmadığı saptandı.

Tablo 4.5. TET ve AR 1254 verilmiş ratlarda sperm motilitesi, epididimal sperm konsantrasyonu ve anormal sperm oranı (ort±SEM n=7).

GRUPLAR	Sperm motilitesi (%)	Epididimal sperm konsantrasyonu (milyon/ gram doku)	Anormal sperm oranı (%)		
			Baş	Kuyruk	Total
Kontrol	85.73±2.08 ^a	234.50±8.48 ^a	4.57±0.29 ^a	4.42±0.29 ^a	9.00±0.37
AR	58.85±1.85 ^b	139.28±6.77 ^b	9.85±0.50 ^b	8.85±0.59 ^b	18.71±0.47
TET	92.85±1.48 ^a	301.78±5.28 ^c	4.57±0.29 ^a	4.14±0.45 ^a	8.71±0.68
AR + TET	80.57±1.25 ^a	185.71±8.75 ^d	7.28±0.47 ^c	6.85±0.55 ^c	14.14±0.82

Aynı sütundaki a,b,c,d harfleri gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı ($p \leq 0.01$) göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Dünyadaki su kaynakları insanların doğayı tehdit eden davranışları ile doğru orantılı olarak insan sağlığını tehdit eder hale gelmiştir. Endüstriyel olarak ve tarımsal mücadelede kullanılan poliklorlu bifeniller DDT gibi organik klorlu bileşiklerin doğadaki kalıcılıkları, parçalanma sürelerinin uzun süre alması ve besin zincirine bulaşarak hayvanların ve insanların yağ dokularında birikmeleri bu bileşiklerin doğadaki tehlikesini artırmaktadır (115- 117). Ahlborg ve arkadaşları (117) çalışmalarında belirli bir oral dozda verdikleri poliklorlu bifenillerin bir hafta %81'inin rat vücudunda bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu miktarın % 64 'ü yağ dokuda, % 11' deride, %5' kas ve % 1' karaciğerde tespit edilirken, akciğer kan ve beyinde % 0.1 ile 0.3 arasında belirlenmiştir (117).

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarla poliklorlu bifenillerin insanlar üzerinde pek çok zararlı etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Poliklorlu bifenillerin immün sistemi baskılayıcı, nörotoksik (91), kanserojenik (92), teratojenik etkilerinin (93) olduğu yapılan deneysel çalışmalarla gösterilmiştir. Deney hayvanlarında AR 1254' ün üreme toksisitesinin olduğu gösterilmiştir (93).

PCB' lerin kanserojenik, bağışıklık sistemini baskılayıcı, hormonal sistemin işleyişini bozucu, nörotoksik, hepatotoksik ve teratojenik etkileri ile ilgili birçok araştırma yapılmıştır (2, 5, 6-10, 11, 118). Bizde çalışmamızda pek çok doku üzerinde farklı etkileri araştırılmış olan PCB' lerden AR 1254' ün üreme sistemi üzerine etkilerini araştırdık.

Poliklorlu bifeniller normal koşullar altında kimyasal olarak stabildirler. Çok sayıda oksidan ve kimyasallara karşı çok dirençlidirler. Çok yüksek sıcaklıklarda (170⁰C sıcaklığa kadar) oksijenin veya bazı aktif metallerin varlığında uzun periyotlar boyunca kimyasal olarak yapılarını değiştirmeden kalabildikleri ve suda çözünemeyen bir yapı göstermekle beraber hidrokarbonlar, yağlar ve diğer organik bileşenlerde kolaylıkla çözünebildikleri ve yağlı dokular tarafından absorbe edildikleri belirtilmiştir. Bu özelliklerinden dolayı çalışmamızda kullandığımız poliklorlu bifenillerden AR 1254 mısır yağı içerisinde çözülerek uygulandı (115, 118).

PCB' lerin oksidasyonları sonucunda ara ürün olarak reaktif aren oksidazlar oluşur. Aren oksidazlar, hem spontan hem de enzimatik olarak detoksifiye ürünlere (fenoller, dihidrodioller, glutatyon konjugatları) dönüştürülerek atılırlar. PCB' ler alternatif olarak

makromoleköl substratlarına kovalent olarak bağlanarak potansiyel toksik etki (sitotoksik, mutajenik, karsinojenik) oluşturabilirler (117).

Fare ve ratlarda anogenital uzaklık (AGD) prenatal androjenizasyonun göstergesidir. Yüksek androjen miktarı geniş AGD ile ilişkilidir. PCB' ler erkeklerde AGD' de azalmaya neden olduğu gibi çoğalmaya da neden olmaktadır. Gebe CD-1 farelere Aroklor 1016' nın günde 0,1 mg/kg tek doz uygulanmasında yavrularda AGD' de ve prostat boyutunda artma, epididimis ağırlığında azalma gözlenlenmektedir. AR 1254 zayıf androjen reseptör antagonistidir (119).

Birçok yazar (15, 17, 120, 121) AR 1254 ve diğer PCB bileşiklerinin ratlarda günlük sperm üretiminde, epididimal sperm sayısında ve motilitesinde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. İnsanlarda da PCB'lere maruz kalınmasının sperm kromatin bütünlüğünde olumsuz etkilere neden olduğu gösterilmiştir. Hsu ve ark. yaptıkları bir çalışma ile PCB'lere maruz kalan erkeklerde yüksek oranda oligospermi, anormal sperm morfolojisi ve oosite bağlanma ve penetrasyonda sperm kapasitesinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir (122). Erkekoğlu P. ve ark. (123) ise 15 gün boyunca 10mg/kg AR 1254 uygulanan erkek sıçanlarda testis ağırlığının kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir. Ayrıca bu çalışmada AR 1254 uygulanan sıçanlarda sperm sayısının (% 50) ve sperm motilitesinin (%40) kontrol grubuna göre belirgin derecede azaldığı görülmüştür. AR 1254' ün bu etkilerinin selenyum eksikliği olan sıçanlarda daha belirgin olarak görüldüğü, selenyum desteğinin ise bu etkilere karşı koruyucu olduğu belirlenmiştir. Moreno ve ark. (124) 50 ve 500 µg/kg AR 1254 uyguladıkları farelerde sperm anomalilerinde artış ve sperm sayısında belirgin bir azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Bizim sonuçlarımıza göre de yaptığımız bu çalışmada PCB'lerden AR 1254'ün ratların testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat ağırlıklarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığını gözlemledik. Moreno ve ark. (124) da yaptıkları bir çalışmada bizim bulgularımızı destekler şekilde AR 1254'ün fare testis ve epididimis ağırlıklarında herhangi bir değişikliğe neden olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca AR 1254 uygulamasının sperm motilitesi ve konsantrasyonunda, anormal sperm miktarında (Kafa, kuyruk, total) da önemli düzeyde artışa sebep olduğunu tespit ettik. Gladen ve ark. (125) ise ergenlik döneminde dioksine maruz kalanlarda testis volümlerinde değişiklik olmadığını, doğum öncesi dönemlerde maruz kalanlarda ise testis volümlerinin düştüğünü, buna bağlı olarak testis volümünün belirleyicisi olan Sertoli hücrelerinin çoğalmasının ksenoöstrojenler tarafından durdurulmasına bağlı olduğunu savunmuşlardır (126).

PCB'lerin endokrin bozucu olması, erkek üreme sistemini etkileyerek üreme kapasitesinin düşmesine, testiküler spermatozoa konsantrasyonunun azalmasına, testisin ve yardımcı üreme organlarının ağırlığının azalmasına, Leydig hücrelerinde testosteron sentezinin ve steroidogenik enzimlerin aktivitelerinin azalmasına neden olmaktadır. Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda Aroklor ve PCB'lerin testiste histopatolojik hasarlara neden olduğu rapor edilmiştir (18, 19, 124). Sangalang ve ark. (127) yaptıkları bir çalışmada histopatolojik olarak testis lobüllerinde ve spermatogenik hücrelerde organizasyon bozukluğu, spermatogenezde azalma, lobül duvarlarında fibrozis ve nekroz (127) olduğunu göstermişlerdir. Oskam ve ark. (128) ise testis dokusunda dejenere seminifer tübüller, seminifer epitel kalınlığında azalma, interselüler aralıklarda artış, spermiyogenezde bozulma ve piknotik nükleuslu hücreler olduğunu bildirmişlerdir. Ateşşahin ve ark. (19) çalışmalarında AR 1254 uygulanan sıçanlarda histolojik olarak seminifer tübüllerde dejenerasyon, dökülme, tübül yapısında bozulma, germinal hücrelerde azalma intersitisyel ödem ve konjesyon olduğunu rapor etmişlerdir. Moreno ve ark. (124) 50 ve 500µg/kg AR 1254 uygulanan farelerde kontrol grubuna göre seminifer epitelde bozulma ve spermatositlerin sayısında önemli derecede azalma olduğunu, Wakui ve ark. (129) ise 7 ve 17 haftalık sıçanlara 7, 5µg PCB uygulanmasını tüm gelişim dönemlerindeki spermatid sayılarında bir azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da yapılan diğer literatür bilgileriyle uyumlu olarak, seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerde azalma, tübül lümenine dökülme, seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler olduğu tespit edildi. Ayrıca tunika albuginea tabakasında ve interstisyel alanda vasküler konjesyon, interstisyel alanda vakuolizasyon ve ödem oluşumu da gözlemlendi. Buna ilaveten yapılan çalışmalarda seminifer tübül çaplarında ve germinal hücre tabaka kalınlıklarında azalma olduğu gösterilmiştir. Ateşşahin ve ark. (19) 2mg/kg/gün AR 1254 uyguladıkları sıçanların testis dokusunda seminifer tübül çaplarında belirgin bir azalma olduğunu belirtirken, bunun aksine Moreno ve ark. (124) da 50 ve 500µg/kg dozda AR 1254 uyguladıkları farelerin seminifer tübül çaplarında önemli derecede artış olduğunu göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda da bulgularımız Ateşşahin ve ark. (19)'nın bulgularıyla uyumlu olarak 2mg/kg/gün AR 1254 uygulamasının seminifer tübül çaplarında azalmaya neden olduğu tespit edildi.

Çalışmamızda apoptotik hücreler kaspaz-3 aktivitesi ile belirlendi. Kaspazların apoptoz sürecinde proteolitik yarıklanma kaskadını başlattığı ve böylece apoptotik olayların gelişiminde önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir. Kaspaz ailesinin 14

üyesinden biri olan kaspaz-3, apoptozisin erken basamaklarında aktive olan bir proteazdır (130).

Aroklor 1254' ün testis dokusunda oksidatif stresi ve lipid peroksidasyonunu arttırdığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir (19). Artmış oksidatif stres altında, reaktif oksijen radikalleri (ROS) DNA ve proteinlerin oksidatif hasarı ile membran lipid peroksidasyonunu içeren çeşitli mekanizmalarla hücresel hasara neden olur. Oksidatif stres güçlü bir apoptoz mediyatörü olarak bilinmektedir. Apoptotik süreçte mitokondri önemli bir rol oynar. Oksidatif stres sonucu oluşan mitokondriyal hasar sitokrom C' nin salınmasına, kaspaz aktivasyonuna ve apoptotik ölüme neden olur. Bizde AR 1254' ün testis dokusunda kaspaz-3 boyanma aktivitesini arttırdığını gözlemledik. AR 1254 uygulanan gruplarda kaspaz-3 pozitif boyanmış hücrelerin yoğunluğunda diğer gruplarla karşılaştırıldığında belirgin bir artış olduğu gözlemlendi. Hsu ve ark.'da PCB 132 uyguladıkları sıçanlarda kaspaz-3 ve kaspaz-9 aktivitelerinin arttığını gözlemlemişlerdir (120, 131). Ateşşahin ve ark.'da (19) immunohistokimyasal olarak apoptozisi gösteren diğer parametrelerden olan proapoptotik (Bax) değerlendirmelerinde, AR 1254 uyguladıkları sıçanların testis dokusunda Bax pozitif boyanmış hücrelerin yoğun olarak gözlemlendiğini, antiapoptotik (Bcl-2) değerlendirmelerinde ise kontrol grubu ile karşılaştırıldığında pozitif boyanmış hücrelerde belirgin bir farklılık olmadığını tespit etmişlerdir.

Vücutta meydana gelen fizyolojik işlevler sırasında ya da patolojik bir süreç içerisinde ortaya çıkan serbest radikaller ile antioksidan sistem arasındaki dengenin serbest radikaller tarafına kayması sonucu oksidatif hasar ortaya çıkar. Organizma oksidatif hasara karşı kendini enzimatik ve nonenzimatik antioksidan sistem ve moleküllerle korur. SOD ve GSH- Px hücre düzeyinde etkili olan antioksidan enzimlerdendir. Çalışmamızda biyokimyasal olarak TBARS, SOD, CAT, GSH ve GPx seviyeleri ölçüldü. Sonuçlarımıza göre AR 1254 uygulanan grupta oksidatif hasarın göstergesi olan TBARS düzeyinin kontrol ve diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı, bununla birlikte TET uygulamasının AR 1254' ün neden olduğu TBARS artışında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı ve AR 1254 + TET grubundaki TBARS düzeyinin kontrol grubunun değerlerine yaklaştığı tespit edildi. Antioksidan savunma sistemi elemanları olan GSH, SOD, GPx ve CAT düzeylerinde istatistik olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Ancak TET uygulamasının GSH, GPx, CAT ve SOD düzeylerinde AR 1254'e bağlı olan azalmayı normal değerlere yaklaştırdığı belirlendi. Vitamin E, vitamin C (17),

quercetin(132) ve çinko (133) gibi antioksidanlarında Aroklorun neden olduğu lipid peroksidasyonundaki artışı engellediği ve azalmış SOD, GSH, GSH-Px ve CAT aktivitelerindeki azalmayı önleyici etkieri olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Aly ve ark.'da (15) 1,5 ve 3,5 mg/kg/gün AR 1254 uygulamasının diğer bulguları destekler şekilde SOD, CAT, GR, GPx ve GSH aktivitelerinde azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir. Ateşşahin ve ark. (19) AR 1254 ile birlikte likopen ve elajik asitin birlikte uygulandığı durumda TBARS seviyelerinde önemli derecede bir azalma olduğunu ve GSH, GSH-Px ve CAT aktivitelerinde belirgin bir artış olduğunu göstermişlerdir. Murugessan ve ark.'da (14) yaptıkları bir çalışmada AR 1254 uygulanan sıçanların Leydig hücrelerinde SOD, CAT ve GPx aktivitelerinin belirgin derecede azaldığını tespit etmişlerdir. Yapılan bir diğer araştırmada ise AR 1254 uygulamasının Sertoli hücrelerinin antioksidan enzimlerinden SOD, CAT, GST, GPx, γ -GT ve GR değerlerinde azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (14, 134).

Bir kalsiyum kanal blokörü olan TET lipid peroksidasyonunu engellemekte, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu azaltmakta, sitokinlerin ve inflamatuvar mediyatörlerin oluşumunu baskılamaktadır (135- 138). TET ayrıca eritrositler ve inflamatuvar hücreleri, kalp ve karaciğer dokularını oksidatif stresten korumaktadır (135, 139-143). Li Y ve ark. (144) çalışmalarında akut pankreatikte pankreas ve karaciğer dokularında 80mg/kg TET'in i.p enjeksiyonu ile SOD ekspresyonunda azalma olduğunu göstermişlerdir. Chen ve ark. (22) ise çalışmalarında TET'in antioksidan özellikleri ile beyin iskemi reperfüzyon hasarını azalttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda TET uygulamasının AR 1254' ün neden olduğu lipid peroksidasyonunu önemli derecede düşürdüğü gözlemlendi. Ayrıca TET uygulamasının GSH, GPx, CAT ve SOD düzeylerinde AR 1254'e bağlı olan azalmayı normal değerlere yaklaştırdığı belirlendi.

Tetrandrinin terapötik etkilerini araştırmak için pek çok prelinik ve klinik çalışmalar yapılmıştır. Önceki çalışmalar, TET'in tümör hücrelerinin gelişimini inhibe ettiğini bildirmektedir. Bu sonuçlar TET'in pek çok hücre hattında antitümör etkileri olduğunu göstermiştir (145). Son yıllarda yapılan araştırmalarda TET'in lösemi, mesane kanseri, hepatom ve akciğer kanserinde mikromolar konsantrasyonlarda uygulanması antikanser etkileri olduğunu göstermiştir (146). TET'in insanlarda HCC hücrelerinde diğer kemoteropatik ajanlarla birlikte yüksek konsantrasyonlarda uygulanması apoptozisi indüklerken, düşük konsantrasyonlarda uygulanması otofajiyi stimüle ederek antitümör etkisi göstermesini sağlamaktadır (147, 148). Yapılan çalışmalarda

TET'in in vitro tümör hücrelerinde kaspaz-3 aktive ederek apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Çalışmamızda apoptozisi göstermek amacıyla kaspaz-3 boyama metodunu uyguladık. İmmünohistokimyasal olarak AR 1254 ile birlikte TET uygulanan grupta kaspaz-3 aktivitesinde ve boyanma yoğunluğunda azalma olduğunu tespit ettik. Sonuç olarak TET uygulamasının apoptotik hücrelerin azalmasında oksidatif stres inhibisyonun etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda AR 1254 uygulanan gruba göre, AR 1254 ile birlikte TET uygulanan grupta histopatolojik olarak görülen hasarın belirgin derecede azaldığı tespit edildi. AR 1254 grubunda çok yoğun olarak gözlenen tübül hasarının AR 1254 + TET grubunda devam ettiği ancak tübüler hasarın azaldığı, spermatogenik hücrelerin korunduğu gözlemlendi. İntersitisyel alanda gözlenen vasküler konjesyonun, vakuolizasyonun ve ödemin önemli derecede azaldığı tespit edildi. Bunun yanı sıra lümene dökülen spermatogenik seri hücrelerde, bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücrelerde azalma olduğu gözlemlendi. TET' in bu etkilerini antioksidan özelliğine bağlı olarak gösterdiğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda ayrıca bu bulgularımızı destekler nitelikte TET'in sperm motilitesini ve konsantrasyonunu sadece AR 1254 uygulanan gruba göre anlamlı düzeyde arttırdığı saptandı. Bununla birlikte AR 1254 uygulamasının anormal sperm miktarında (Kafa, kuyruk, total) önemli düzeyde artışa sebep olduğu ve bu artışın TET tedavisi ile azaldığı belirlendi. Literatürde TET' in üreme sisteminin üzerine etkilerini gösteren araştırmaya rastlanmamıştır ve bu konu ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmanın sonucunda erkek sıçanlarda testis dokusunda PCB'lerin (AR 1254) neden olduğu reproduktif hasara karşı TET'in koruyucu etkileri olduğu gözlemlendi. Histopatolojik olarak AR 1254 ile hasar oluşturulan grupta testiste tunika albuginea tabakasında konjesyon, interstisyel alanda ise vasküler konjesyon, vakuolizasyon ve ödem, seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerde azalma, lümene dökülme ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler olduğu gözlemlendi. AR1254+TET grubunda ise bu bulgulara belirgin derecede azalma olduğu tespit edildi. Biyokimyasal analizlerde ise AR1254 verilen sıçanlarda TBARS düzeyinin anlamlı düzeyde arttığı, TET uygulamasının bu artışı anlamlı düzeyde azalttığı izlendi. AR1254 uygulaması GSH, SOD, GPx ve CAT düzeylerinde azalmaya neden olurken, TET uygulaması ise bu değerlerin artışına neden olmuştur. AR1254 uygulamasının sperm motilitesi ve konsantrasyonunda önemli düzeyde azalmaya neden olurken, TET uygulaması bu değerlerde artışa neden olmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma TET uygulanmasının sıçanlarda AR 1254 ile oluşturulan reproduktif hasarı azalttığını göstermektedir. Çalışmamızın bu konuda ileride yapılacak benzer çalışmalara destek olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Hansen LG. The ortho side of PCBs: occurrence and disposition. *Kluwer Academic Publishers* 1999.
2. Carpenter DO. Polychlorinated biphenyls and human health. *Int J Occup Med Environ Health* 1998, 11: 291-303.
3. Kamrin MA. ve Ringer, R. K. PCB residues in mammals: A review. *Toxicol Environ Chem* 1994, 41: 63-84.
4. Carpenter DO. Environmental contaminants and human health: the health effects of persistent toxic substances. *Firat Tıp Dergisi* 2005 10: 1-4.
5. Silberhorn EM, Glauert HP ve Robertson LW. Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCBs and PBBs. *Crit Rev Toxicol* 1990, 20: 439-496.
6. James RC, Busch H, Tamburro CH. ve ark. Polychlorinated biphenyl exposure and human disease. *J Occup Med* 1993, 35: 136-48.
7. Tilson HA ve Codavanty PRS. The neurotoxicity of polychlorinated biphenyls. *Neurotoxicology* 1998, 19: 517-25.
8. Seegal RF. Epidemiological and laboratory evidence of PCB- induced neurotoxicity. *Crit Rev Toxicol* 1996, 26: 109-737.
9. Kimbrough RD ve Krouskas CA. Human exposure to polychlorinated biphenyls and health effects: a critical synopsis. *Toxicol Rev* 2003, 22: 217-33.
10. Ulbrich B, Stahlman R. Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data. *Arch Toxicol* 2004, 78: 252-68.
11. Kutlu S, Colakoğlu N, Halifeoğlu I, ve ark. Comparative evaluation of hepatotoxic and nephrotoxic effects of aroclors 1221 and 1254 in female rats. *Cell Biochem Funct* 2005; PMID: 16180246, In Press.
12. Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K, Arunakaran J. Effects of vitamins C and steroidogenic enzymes mRNA expression in polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposed adult rat Leydig cells. *Toxicology* 2007, 232: 170-82.
13. Krishnamoorthy G, Murugesan P, Muthuvel R, Gunadharini DN, Vijayababu MR, Arunkumar A et al. Effect of aroclor 1254 on Sertoli cellular antioxidant system, androgen binding protein and lactate in adult rat in vitro. *Toxicol* 2005, 20:117-26.
14. Murugesan P, Kanagaraj P, Yuvaraj S, Balasubramanian K, Aruldas MM, Arunakaran J. The inhibitory effects of polychlorinated biphenyl Aroclor 1254 on

Leydig cell LH receptors, steroidogenic enzymes and antioksidant enzymes in adult rats. *Reprod Toxicol* 2005, 20:117-26.

15. Aly HAA, Domenech O, Abdel-Naim AB. Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. *Food Chem Toxicol* 2009 (In press).

16. Ahmad SU, Tariq S, Jalali S, Ahmad MM. Enviromental pollutant Aroclor 1242 (PCB) disrupts reproduction in adult male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Environ Res* 2003, 93: 272-8.

17. Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Arunkumar A, Vignesh RC, Aruldas MM, Arunakaran J. Ameliorative effect of vitamins (a-tocopherol and ascorbic acid) on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress n rat epididymal sperm. *Reprod Toxicol* 2007, 23: 239-45.

18. Alston DA, Tandler B, Gentles B, Smith EE. Testicular histopathology in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) following exposure to polychlorinated biphenly (Aroclor 1254) in male rats. *Chemosphere* 2003, 52: 283-5.

19. Ateşşahin A, Türk G, Yılmaz S, Sönmez M, Sakin F, Çeribaşı AO. Modulatory effects of lycopene and ellagic acid on reproductive dysfunction induced by polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) in male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010 Jun; 106, 6: 479-89.

20. Ruan L, Huang HS, Jin WX, Chen HM, Li XJ, Gong QJ. Tetrandrine attenuated cerebral ischemia / reperfusion injury and induced differential proteomic changes in a MCAO Mice model using 2- D DIGE.

21. Zhang J, Yu B, Zhang XQ, Sheng ZF, Li SJ, Wang ZJ, Cui XY, Cui SY, Zhang YH. Tetrandrine, an antihypertensive alkaloid, improves the sleep state of spontaneously hypertensive rats (SHRs). *J Ethnopharmacol* 2014, 151: 729-32.

22. Chen Y, Tsai YH, Tseng SH. The potential of tetrandrine as a protective agent for ischemic stroke. *Molecules* 2011, 16: 8020-32.

23. Ross MH, Pawlina W. *Histoloji Konu Anlatımı Ve Atlas* (6.baskı) Philadelphia: Lippincott Williams –Wilkins, 2014

24. Kierszenbaum AL. *Histology and Cell Biology: An introduction To Pathology*. 3nd Edition. Elsevier, 2012.

25. Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology Text and Atlas*. 13nd Edition, 2013.

26. Kierszenbaum AL. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi* (Demir, R. Çev). Ankara: Palme Yayıncılık, 2006

27. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi* (3. Baskı). Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti, 2001.
28. Gray H, Standring S. *Gray's Anatomy- The Anatomical Basis of Clinical Practise* (39th ed.). London: Elsevier Churchill Livingstone, 2005.
29. Dere F. *Anatomi Ders Kitabı*. Adana: Okullar Pazarı Kırtasiye ve Tic. Paz. Ltd. Şti. 1994.
30. Aktümsek A. *Anatomi ve fizyoloji insan biyolojisi*, 3. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2006.
31. Cumhuriyet M, Yener N, Tuncel M. *Temel Anatomi*, Ankara, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık, 2001.
32. Dökmeci İ. *Farmakolojik ilaçlar ve etkileri*, Alfa Yayınları, 2007.
33. Moore KL, Dalley AF. *Kliniğe yönelik anatomi*, (Çev: Şahinoğlu K.), 4. Baskı, Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara, 2007.
34. Moore KL. *İnsan embriyolojisi*, (Çev: Dalkılıç H. Yıldırım M.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2009
35. Sancak B, Cumhuriyet M. *Fonksiyonel anatomi baş-boyun ve iç organlar*, 2. Baskı, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve iletişim A.Ş.-METU Press, Ankara, 2002.
36. Yousef M. Vitamin E modulates reproductive toxicity of pyrethroid lambda-cyhalothrin in male rabbits, *Food and Chemical Toxicology* 2010, 1152–59 p.
37. Yıldırım M. (1997). *İnsan Anatomisi* (3. Baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
38. Sancak B, Cumhuriyet M. *Fonksiyonel Anatomi*. 2. Baskı, Ankara: Medipress, 2012.
39. Ellis H. 2006, *Clinical Anatomy, Applied anatomy for students and junior doctors*.
40. Drake RL, Vogt IW, Mitchell AWM. (2007), *Gray's Anatomy*, (Çev: Yıldırım, M.), Güneş Kitabevi, İstanbul.
41. Aktümsek A. *Anatomi ve fizyoloji insan biyolojisi*, 3. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 2006
42. Büyükburç A., *Lityum:Gelecekte önemi artacak mı?* Metalürji ve Malzeme Mühendisi,Eti Holding A.Ş. AR-GE Dairesi Başkanlığı 2003
43. Snell RS. *Klinik anatomi*, (Çev.:Yıldırım, M.), 6.Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2004.
44. Trainer TD. Histology of the normal testis. *Am J Surg Pathol*; 11. 1987.
45. Kuran O. *Sistematik Anatomi* (3. Baskı). İstanbul: Filiz Kitabevi, 1993.
46. Eşrefoğlu M. *Renkli Resimli Genel ve Özel Histoloji*. Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık Ltd. Şti. Ankara, 2004.

47. Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. *Text/Atlas of Histology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co 1988).
48. Yıldırım M. *Resimli Sistemik Anatomi*, 1. Baskı, İstanbul: Nobel, 2013.
49. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*. Malatya: Medipres Matbaacılık Ltd. Şti. 2009.
50. Moore K.L, Persaud, T.V.N. *Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri*. (S. Müftüoğlu, P. Atilla, F. Kaymaz, Çev.). İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri, 7. Baskı. 2009.
51. Şeftalioğlu A. *Genel ve özel İnsan Embriyolojisi* (3. Baskı). Ankara: Tıp-Teknik Yayıncılık Ltd. Şti. 1998.
52. Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology* (3rd ed.). Philadelphia: Mosby-Elsevier, 2004.
53. Tamam L, Kulan E, Özpoyraz N. Lityum ve tiroid bozuklukları 2003.
54. Sadler TW. *Langman's Medikal Embriyoloji* (9. Baskı). (A.C. Başaklar Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık, 2005.
55. Hassa H. *İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları*, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, 2003.
56. Berta ve ark, Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, et al: Genetic evidence equating SRY and the testis- determining factor. *Nature* 1990: 348: 448,
57. Şahintürk V. Subfertil Erkeklerin Sperm Morfolojilerinin Işık Mikroskopik ve FloresanYöntemlerle İncelenmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2000.
58. Moore KL, Persaud TVN. *Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi*. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çev.). 8. Baskı, İstanbul: Nobel, 2009.
59. DiGeorge AM: Hermaphroditism. In Behrman RE, Kliegman RM, Arvin AM (eds): *Nelson Textbook of Pediatrics*, 15th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1996.
60. Eroschenko VP. Di Fiore *Histoloji Atlası*. Demir R. (Çev). 10. Baskı. Ankara: Palme, 2013.
61. Dar KA. Erkek Üreme Sistemi. [http://www.akademik.adu.edu.tr/fakülte/med/webfolders/ File/ Dersiçerikleri/ErkekGenital Sistemi Histo. Ppt](http://www.akademik.adu.edu.tr/fakülte/med/webfolders/File/Dersiçerikleri/ErkekGenitalSistemiHisto.Ppt).
62. Ensari E. Gebelikte Olaylanan Deneysel Hipokside Ginkgo Biloba'nın Testis Dokusunda Olası Etkisinin İncelenmesi. YüksekLisans Tezi. Ankara: Gazi Üniveritesi, Sağlık Bilimleri Ensitüsü, 2010.
63. Sarman E. Streptozotosin İle Diyabet Oluşturulmuş Sıçanların Testislerinde Kisspeptin İmmünreaktivitesinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Elazığ: Fırat Üniveritesi, Sağlık Bilimleri Ensitüsü, 2015.

64. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*, (Aytekin Y, Solakoğlu S. Çev.) 10. Baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul 2009.
65. Gartner LP, Hiatt JL, YILLLL, *Color text book of Histology*, 3.Edition.
66. Bozdoğan SERişkin Erkek Sıçanlarda Cisplatin İle Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine Sodyum Selenitin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2012.
67. Paker Ş. *Histoloji* (2.Baskı). Bursa: Uludağ Üniveristesi Basımevi,1993.
68. Young B, Heat J.W. *Wheather's Functional Histology; A Text and Colour Atlas* (4th ed.). London: Churchill Livigstone, 2000.
69. Gajera HP, Patel SV, Golakiya BA. *Fundamentals of Biochemistry – A textbook*, 2008
70. <http://www.laboratuvar.saglik.gov.tr/dosya/182928/h/laboratuvartestleri.pdf> (2013-8-23).
71. http://www.mta.gov.tr/v2.0/default.php?id=maden_kullanim (2013-9-23).
72. Cormack DH. *Essential Histology* (6th ed.). USA: Lippincott Wiilliams-Wilkins, 2001.
73. Tekelioğlu M. *Özel Histoloji*, İnce Yapı ve Gelişme. Ankara: Antıp A.Ş. 2002.
74. Ovalle WK, Nahirney PC. *Netter Temel Histoloji*. (S. Müftüoğlu Çev.) Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2009.
75. Apostoli P, Mangılı A, Carası S, Manno M. Relationship between PCBs in blood and D-glucaric acid in urine, *Toxicology Letters* 2003,144: 17-26.
76. Aydın M, Canpolat S, Seyran A.D, Bulmuş Ö, Yılmaz B. Poliklorlu bifenillerin sıçan korteks, hipokampus, striatum ve hipotalamus dokusunda katekolaminerjik nörotransmitter düzeylerine etkileri, *Fırat Tıp Dergisi* 2007,12: 88-92.
77. Safe S. Polychlorinated bipheyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses and implications for risk assessment, *Critical Reviews Toxicology* 1994, 24: 87– 149.
78. Atsdr, Toxicological Profile for Polychlorinated Biphenyls (update), Atlanta: US Department of Health and Human Services, 1997.
79. De voogt P. ve Brinkman UA.Th. Production, properties and usage of polychlorinated biphenyls, In: Kimbrough R, Jensen AA. (Eds). Halogenated Biphenyls, Terphenyls, Naphthalenes, Dibenzodioxins and Related Products. *Elsevier*, Amsterdam 1989, 3-45.

80. Hutzinger O, Safe S, Zitko V. 1974, The Chemistry of PCB's. *CRC Press*, Cleveland.
81. WHO, Polychlorinated biphenyls and terphenyls (Second Edition), Environmental Health Criteria, Geneva, 1993,140.
82. Eisler R. ve Belisle AA. Planar PCB Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates:A Synoptic Review, Contaminant Hazard Reviews, *Biological Report 31*, Denver, 1996, 1081-2911
83. De vos S, Maervoet J, Schepens P, De schrijver R. Polichlorinated biphenyls in broiler diets: their digestibility and incorporation in body tissues, *Chemosphere* 2003, 51: 7-11.
84. Seyran A. ve Erişir M. Poliklorlu bifeniller ve sağlık üzerine etkileri, *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2008, 22: 33-40.
85. Lilienthal H, Fastabend A, Hany J. Reduced levels of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 in rat dams and offspring after exposure to a reconstituted PCB mixture, *Toxicological Sciences* 2000, 57: 292–301.
86. Sandal S, Yılmaz B, Carpenter DO. Genotoxic effects of PCB 52 and PCB 77 on cultured human peripheral lymphocytes, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 2008, 654: 88-92.
87. Sawyer CN, Mccarty PL, Parkın GF. 1994, Chemistry for Environmental Engineering, McGraw-Hill, Inc.
88. Goun T GO, Thomas I, Cousins J, Barber D, Mackay KC. Jones. Air-surface exchange of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated biphenyls, *Environmental Science and Technology* 2002, 36: 426-1434
89. Yeo HG, Choi MY, Chun TW, Kim KC, Cho Y, Sunwoo. Concentration characteristics of atmospheric PCBs for urban and rural area, *Korea Science of the Total Environment*, 2004, 324, 261-70.
90. Hsu ST, Ma CI, Hsu S. Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four year follow-up, *Environmental Health Perspectives*, 59, 5-10. levels, *Toxicology Letters* 1985, 148: 29-40.
91. Rogan WJ. ve Gladen BC. Neurotoxicology of PCBs and related compounds, *Neurological Toxicology* 1992, 13: 27-36.
92. Oakley GG, Devanaboyina U, Robertson LW, Gupta RC. 1996, Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for

PCB induced oxidative stress in breast cancer, *Chemical Research in Toxicology*, 9: 1285-92.

93. Ahlborg UG, Becking GC, Birnbaum LS, Brouwer A, Derks HJGM, Feeley M, Golor G, Hanberg A, Larsen J.C, Liem AKD, Safe SH, Schlatter C, Woem F, Younes M, Yrjanheikki E. 1994, Toxic equivalency factors for dioxin-like PCB's, *Chemosphere*, 28, 1049-67.

94. Shain W, Overmann SR, Wilson LR, Kostas J, Bush B. A congener analysis of polychlorinated biphenyls accumulating in rat pups after perinatal exposure, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 1986, 15: 687–707.

95. Schrader JT. ve Cooke MG. Effects of Aroclors and individual PCB congeners on activation of the human androgen receptor in vitro, *Reproductive Toxicology* 2003, 17: 15-23.

96. Homewood CA, Warhurst DC, Peters W, Baggaley VC. Lysosomes, pH and the anti-malarial action of chloroquine. *Nature* 1972, 235: 50–2.

97. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res* 2013, 73: 3–7.

98. Ho LJ, Chang DM, Chang ML, Kuo SY, Lai J.H. Mechanism of immunosuppression of the antirheumatic herb TWHf in human T cells. *J. Rheumatol* 1999, 26: 14-22.

99. Lu JJ, Bao JL, Chen XP, Huang M, and Wang YT. “Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents,” Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, vol. 2012, Article ID485042, 12 pages, 2012. [2] L. W. Fu, Y. M. Zhang, Y. J. Liang, X. P.

100. Chen Y, Chen JC, Tseng SH. Effects of tetrandrine plus radiation on neuroblastoma cells. *Anticancer Res.* 2009, 29: 3163-71.

101. Chen Y, Chen JC, Tseng SH. Tetrandrine suppresses tumor growth and angiogenesis of gliomas in rats. *Int. J. Cancer* 2009, 124: 2260-69.

102. Chen Y, Tseng SH. The potential of tetrandrine against gliomas. *Anticancer Agents Med. Chem* 2010, 10: 534-42

103. Gong K, Chen C, Zhan Y, Chen Y, Huang Z, Li W. Autophagy-related gene 7 (ATG7) and reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase regulate tetrandrine-induced autophagy in human hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 2012, 287: 35576–88.

104. Lai JH. Immunomodulatory effects and mechanisms of plant alkaloid tetrandrine in autoimmune diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2002, 23: 1093–101.

105. Koh SB, Ban JY, Lee BY, Seong YH. Protective effects of fangchinoline and tetrandrine on hydrogen peroxide-induced oxidative neuronal cell damage in cultured rat cerebellar granule cells. *Planta Med* 2000,; 69: 506–12.
106. (Li SY, Ling LH, Teh BS, Seow WK, Thong YH. Anti-inflammatory and immunosuppressive properties of the bis-benzylisoquinolines: in vitro comparisons of tetrandrine and berbamine. *Int J Immunopharmacol* 1989, 11: 395–401.
107. Liu QY, Li B, Gang JM, Karpinski E, Pang PK. Tetrandrine, a Ca²⁺ antagonist: effects and mechanisms of action in vascular smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1995, 273: 32–9.
108. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979, 95: 351-8.
109. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxidedismutase. *Clin Chem* 1988, 34: 497-500.
110. Beutler E. Red cell metabolism. In: A Manual of Biochemical Methods. New York: Grune Strottan 1975, 67-9.
111. Aebi H. Catalase in vitro assay methods. *Methods Enzymol* 1984, 105: 121-6.
112. Ellman G. Tissue sulphydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959, 82: 70-7.
113. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with pholin. 1951.
114. Çiftçi O, Özdemir İ, Aydın M, Beytur A. Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats. *Andrologia*, 2011. doi: 10. 1111/j. 1439-0272. 2010. 01127.
115. (Anonymous 1999.) Codex Alimentarius Commission. Food and Agriculture Organization of The United Nations. World Health Organization. CX/FAC 00/26. Agenda Item 17 (d). Joint FAO/WHO Food Standards Programme Codex Committee on Food Additives and Contaminants, 1999, 12 p.
116. Çakıroğulları GÇ, Seçer S. Poliklorlu Bifeniller ve Sucul Yaşam. *Ankara Üniversitesi Çevre Bilimleri Dergisi* Haziran 2011. Cilt:3, Sayı 1, 73-87
117. Ahlborg GU, Hanberg A, Kene K. (1992). Risk assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Institute of Environmental Medicine Sweden Nord* 1992: 26 P:1-121
118. (Anonymous 1993) Polychlorinated Biphenyls and Terphenyls (Second Edition). Environmental Health Criteria 140. IPCS International Programme on Chemical Safety. 1993, 683 p. World Health Organization, GENEVA.

119. Ulbrich B, Stahlmann R. Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data. *Arch Toxicol*. 2004, 78: 252–68.
120. Hsu P-C, Li M-H, Guo YL. Postnatal exposure of 2,2',3',3',4,6'-hexachlorobiphenyl and 2,2',3',4',5',6'-hexachlorobiphenyl on sperm function and hormon levels in adult rats. *Toxicology* 2003,187:117-26.
121. Hsu P-C, Pan M-H, Li L-A, Chen C-J, Tsai S-S, Guo YL. Exposure in utero to 2,2',3',3',4,6'-hexachlorobiphenyl (PCB 132) impairs sperm function and alters testicular apoptosis-related gene expression in rat offspring. *Toxicol Appl Pharm* 2007, 221: 68-75.
122. Spano M, Toft G, Hagmar L, Eleuteri P, Rescia M, Rignell-Hydbom A et al. Exposure to PCB and p,p'-DDE in European and Inuit populations: impact on human sperm chromatin integrity. *Hum Reprod* 2005, 20: 3488-99
123. Erkekoğlu P, Zeybek ND, Aydın S, Aşçıl A, Balcıl A, Yaman Ü, Kızılgün M, Aşan E, Başaran N, Gümüşel BK. Aroclor 1254'e Maruz Kalan ve Farklı Selenyum Statüsüne Sahip Sıçanlarda Sperm Parametrelerinin ve Seks Hormonlarının Değerlendirilmesi (P 14). *Türk Toksikoloji Derneği*
124. Moreno JML. Effect of PCBs (Aroclor 1254) on Spermatogenesis in Testis of Mouse. Xiamen University China 2009.
125. Gladen BC, Ragan NB, Rogan J. Pubertal growth and development and prenatal and lactational exposure to polychlorinated biphenyls and dichlorodiphenyl dichloroethene. *J Pediatrics* 2000; 136: 490-6.
126. Çetinkaya S. Endokrin Çevre Bozucular ve Ergenlik Üzerine Etkileri. *Dicle Tıp Dergisi* 2009, 36: 59-66.
127. Sangalang GB, Freeman HC, Crowell R. Testes abnormalities in cod (*Gadus morhua*) fed aroclor 1254. *Arch Environ Con Tox* 1981, 10: 617–26.
128. Oskam IC, Lyche JL, Krogenaes A, Thomassen R, Skaare JU, Wiger R et al. Effects of long-term maternal exposure to low doses of PCB126 and PCB153 on the reproductive system and related hormones of young male goats. *Reproduction* 2005, 130:731–42.
129. Wakui S, Akagi Y, et al. Testicular toxicology of pubescent and adult rats prenatally exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *J Toxicol Pathol* 2007, 20: 133-40.
130. Yang GS, Wang W, Wang YM, Chen ZD, Wang S, Fang JJ. Effect of cocaine on germ cell apoptosis in rats at different ages. *Asian JAndrol* 2006, 8(5): 569-75.

131. Mathur PP, Huang L, Kashou A, Vaithinathan S, Agarwal A. Environmental Toxicants and Testicular Apoptosis. *The Open Reproductive Science Journal* 2011, 3: 114-24.
132. Mi Y, Zhang C. Protective effect of quercetin on aroclor 1254-induced oxidative damage in cultured chicken spermatogonial cells. *Toxicol Sci* 2005, 88: 545-50.
133. Venkataraman P, Sridhar M, Dhanammal S, Vijayababu MR, Srinivasan N, Arunakaran J. Antioxidant role of zinc in PCB (Aroclor 1254) exposed ventral prostate of albino rats. *J Nutr Biochem* 2004, 15: 608-13.
134. Kumar JS, Banudevi S, Sharmila M, Murugesan P, Srinivasan N, Balasubramanian K, Aruldas MM, Arunakaran J. Effects of Vitamin C and E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. *Reproductive Toxicology* 2004, 20: 1-8.
135. Shen YC, Chen CF, Wang SY, Sung YJ. Impediment to calcium influx and reactive oxygen production accounts for the inhibition of neutrophil Mac-1 up-regulation and adhesion by tetrandrine. *Mol. Pharmacol.* 1999, 55: 186-93.
136. Koh SB, Ban JY, Lee BY, Seong YH. Protective effects of fangchinoline and tetrandrine on hydrogen peroxide-induced oxidative neuronal cell damage in cultured rat cerebellar granule cells. *Planta Med.* 2003, 69: 506-12.
137. Hui SCG, Chan TY, Chen YY. Tetrandrine inhibits lipid peroxidation but lacks reactivity towards superoxide anion and hydrogen peroxide. *Pharmacol. Toxicol.* 1996, 78: 200-1.
138. Liu SJ, Zhou SW, Xue CS. Effect of tetrandrine on neutrophilic recruitment response to brain ischemia/reperfusion. *Acta. Pharmacol. Sin.* 2001, 22: 971-5.
139. Fernandes MA, Custodio JB, Santos MS, Moreno AJM, Vicente JAF. Tetrandrine concentrations not affecting oxidative phosphorylation protect rat liver mitochondria from oxidative stress. *Mitochondrion* 2006, 6: 176-85.
140. Castranova V. Generation of oxygen radicals and mechanisms of injury prevention. *Environ. Health Perspect.* 1994, 102: 65-8.
141. Castranova V, Kang JH, Moore MD, Pailles WH, Frazer DG, Schwegler-Berry D. Inhibition of stimulant-induced activation of phagocytic cells with tetrandrine. *J. Leukoc. Biol.* 1991, 50: 412-22.
142. Chen F, Sun S, Kuhn DC, Lu Y, Gaydos LJ, Shi X, Demers LM. Tetrandrine inhibits signal-induced NF- κ B activation in rat alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 231: 99-102.

143. Shen YC, Chou CJ, Chiou WF, Chen CF. Anti-inflammatory effects of the partially purified extract of radix stephaniae tetrandrae: Comparative studies of its active principles tetrandrine and fangchinoline on human polymorphonuclear leukocyte functions. *Mol. Pharmacol.* 2001, 60: 1083-90.
144. Li YY, Li XL, Yang CX, Zhong H, Yao H, Zhu L. Effects of tetrandrine and QYT on ICAM-1 and SOD gene expression in pancreas and liver of rats with acute pancreatitis. *World J. Gastroenterol.* 2003, 9: 155-9.
145. Qiu W, Su M, Xie F, Ai J, Ren Y, Zhang J, Guan R, He W, Gong Y, Guo Y. Tetrandrine blocks autophagic flux and induces apoptosis via energetic impairment in cancer cells. *Cell Death Dis.* 2014 , 5(3): e1123.
146. Lee J H, Kang GH, Kimet K.C. al., "Tetrandrine-induced cell cycle arrest and apoptosis in A549 human lung carcinoma cells," *International Journal of Oncolog*, 2002, 21, 1239–44.
147. Liu C, Gong K, Mao X, Li W. Tetrandrine induces apoptosis by activating reactive oxygen species and repressing Akt activity in human hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2011, 129: 1519–31.
148. Gong K, Chen C, Zhan Y, Chen Y, Huang Z, Li W. Autophagy-related gene 7 (ATG7) and reactive oxygen species/extracellular signal-regulated kinase regulate tetrandrine-induced autophagy in human hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem.* 2012, 287: 35576–88.
149. Wan J, Liu T, Mei L, Li J, Gong K, Yu C, et al. Synergistic antitumour activity of sorafenib in combination with tetrandrine is mediated by reactive oxygen species (ROS)/Akt signaling. *Br J Cancer.* 2013, 109: 342–50.

EKLER

Ek 1: Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : FerideKARAHAN

Doğum tarihi ve yeri: 16.02.1987/Gerger /Adıyaman

Uyruğu : T.C.

Medeni durumu : Bekar

İletişim adresleri : feridekarahan1@gmail.com

Eğitim Durumu

İstanbul Yenibosna Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)

İnönü Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Lisans Eğitimi

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Eğitimi

Yabancı Dil : İngilizce

Bilimsel Etkinlikler

07-18 Mayıs 2012-İnönü Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel

Etik Kurulu Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

11.06.2011-İnönü Üniversitesi Pedagojik Formasyon Sertifikası

Ek 2: Etik Kurul Onayı



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 28-01-2014
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2014/A-01
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Sıçan
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : Wistar Albino veya Sprauge- Dawley
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : ☒E ☐D ☐Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 3-4 aylık/250-300 gr

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Aslı ÇETİN'in yürütücüsü olduğu "Erkek Sıçanlarda Poliklorlu Bifenillerin (Aroklor 1254) Neden Olduğu Reprodüktif Hasara Karşı Tetrandrinin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" isimli 2014/A-01 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.

Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ
Başkan

Prof. Dr. Nigar VARDI
Üye

Doç. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ
Üye

Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ
Üye

Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN
Üye

Katlımadı
Salih AVCI
Sivil Üye

Katlımadı
Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU
Sivil Üye