



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

ACETAMİPRİDİN TESTİS TOKSİSİTESİNE KARŞI MELATONİN VE VİTAMİN E’NİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tıpta Uzmanlık Tezi

Emrah ZAYMAN

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE

MALATYA - 2019



**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

ACETAMİPRİDİN TESTİS TOKSİSİTESİNE KARŞI MELATONİN VE VİTAMİN E’NİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tıpta Uzmanlık Tezi

Emrah ZAYMAN

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE

**Bu tez, T.C. İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP) tarafından
2017/944 proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA - 2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis Embriyolojisi	3
2.2. Testis Anatomisi	6
2.3. Testis Histolojisi	9
2.3.1. Seminifer Tübül	10
2.3.2. İnterstisyel doku.....	22
2.4. Testis Fizyolojisi.....	23
2.5. Pestisitler.....	25
2.5.1. İnsektisitler.....	28
2.5.2. Neonikotinoidler	30
2.5.3. Acetamiprid	31
2.6. Melatonin	32
2.6.1. Melatonin sentezi ve düzenlenmesi	33
2.6.2. Melatonin metabolizması.....	35
2.6.3. Melatoninin etkileri.....	36
2.7. Vitamin E	37
2.8. Apoptozis	39
2.8.1. Kaspazlar	40
2.8.2. Apoptozis ve Testis.....	41
3. MATERYAL VE METOT	42
3.1. Araştırma Türü ve Yapıldığı Yer.....	42
3.2. Deney Grupları ve Uygulamalar.....	42
3.2.1. Deneyin Sonlandırılması ve Anestezi.....	43
3.2.2. Histolojik Teknikler ve Analizler	43

3.2.3.	Işık Mikroskopik Teknikler	43
3.2.4.	Mayer's Hematoxylen-Eozin Metodu	44
3.2.5.	Periodic Acid Schiff (PAS) Boyama Metodu	45
3.2.6.	İmmünohistokimya Boyama Metodu	46
3.2.7.	Transmission Elektron Mikroskopi	47
3.3.	Biyokimyasal Analizler	49
3.3.1.	Doku Homojenat Analizi	49
3.3.2.	Kan Serum Hormon Düzeylerinin Analizi	50
3.4.	İstatistiksel Analiz.....	52
4.	BULGULAR.....	53
4.1.	Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	53
4.2.	Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	53
4.3.	Histolojik Bulgular	54
4.3.1.	Işık Mikroskopik Bulgular	54
4.3.2.	Elektron Mikroskopik Bulgular	76
4.4.	İmmünohistokimyasal Boyama H-Skoru.....	92
4.5.	Morfometrik Bulgular.....	93
4.5.1.	Johnsen Testiküler Biyopsi Skoruması	93
4.5.2.	Seminifer Tübül Çap Ölçümü.....	93
4.5.3.	Seminifer Epitel Kalınlığı.....	94
4.6.	Biyokimyasal Bulgular	94
4.6.1.	Doku Homojenat Düzeyleri	94
4.6.2.	Kan Serum Hormon Düzeyleri	95
5.	TARTIŞMA	96
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	103
	KAYNAKLAR	105
	EKLER.....	115

TEŞEKKÜR

Yoğun tez dönemimde yaptığım deneysel çalışmalarında ve bu tezin hazırlanış aşamalarında bana büyük bir titizlikle ve sabırla yol gösteren, yardımını esirgemiyen değerli hocam Prof. Dr. Mehmet GÜL'e, Asistanlık dönemimde bilgi ve tecrübelerinden her zaman faydalandığım, iyi niyeti ve güleryüzüyle desteğini her zaman hissettiğim Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Nigâr VARDI'ya, değerli hocalarım Doç.Dr. Aslı TAŞLIDERE ve Doç.Dr. Elif TAŞLIDERE'ye, tezimin biyokimyasal ve istatistiksel analizlerine yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi M. Erman ERDEMLİ ve Dr. Öğr. Üyesi Harika G. GÖZÜKARA BAĞ'a teşekkür ederim.

Tez sürecimin her aşamasında bana yardımcı olan Arş. Gör. Semir GÜL başta olmak üzere, mezun arkadaşlarım Uzm. Dr. Salih Yahya AKSANYAR'a ve Uzm. Dr. Mehmet Mustafa ERDOĞAN'a; tezimin deney aşamasında yardımcı olan Arş. Gör. Cemile Ceren GÜL'e, Bio. Leyla YURTSEVEN'e ve İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama merkezi çalışanlarına, ayrıca mesai arkadaşlarım Arş. Gör. Birgül YİĞİTCAN, Arş. Gör. Azibe YILDIZ ve Arş. Gör. Dr. Rümeyza Hilal CIRIK'a da ayrıca teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip anne ve babama, kardeşlerime, sevgili eşim Esra'ya ve asistanlığımın son dönminde ailemize katılan oğlum Erdem'e sonsuz teşekkürler. İyi ki varsınız...

ÖZET

Acetamipridin Testis Toksisitesine Karşı

Melatonin ve Vitamin E'nin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Çalışmamızda, acetamipridin testiste neden olduğu histopatolojik hasar ve erkek üreme sistemi hormonları ve oksidatif stres parametreleri üzerinde yaptığı değişikliklere karşı melatonin ve vitamin E'nin koruyucu etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

50 adet *Balb-c* erkek fare kontrol gruplarında 6, diğer gruplarda 8 adet olmak üzere 7 gruba ayrıldı. 21 gün süren deney sonrası alınan testis dokularında H&E, PAS ve kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama yapıldı. Ayrıca ultrastrüktürel inceleme için alınan doku örnekleri TEM ile analiz edildi.

Acmp grubunda seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığında azalma, epitelde dejenerasyon, lümende azalmış spermatozoonlar, seminifer epitel bazal membranında PAS+ likte azalma, interstisyel alanda ödem ve Leydig hücrelerinde hidropik dejenerasyon görüldü. Kaspaz 3 boyamada diğer gruplardan daha fazla immün reaktivite pozitifliği vardı. TEM incelemesinde tübül hücrelerinde dejenerasyon, spermatogenik seri hücrelerinde lizozomal birikim, miyelin figür içeren vakuolizasyonlar ve nekroz; Leydig hücrelerinde stoplazmada hidropik dejenerasyon, stoplazmada elektron yoğun lipid vakuelleri ve kromatolizis belirlendi. Sertoli hücrelerinde primer ve sekonder elektron yoğun lizozomal birikimler dikkati çekti. Yine Acmp grubunda Biyokimyasal olarak doku; GSH ve TAS da azalma, MDA ve TOS da artış gözlemlendi. Plazma LH, FSH ve testosteron düzeylerinde azalma izlendi. Melatonin, vitamin E ve ikisinin birlikte uygulandığı gruplarda histolojik hasarı, apoptotik hücre ölümünü hem ışık mikroskopik hem de ultrastrüktürel düzeyde azaldığı, biyokimyasal olarak ise oksidatif parametrelerde azalma ve hormonal parametrelerde artış izlendi. Vitamin E'nin, melatonine göre oksidatif parametreleri azaltıp, antioksidatif parametreleri arttırmada daha etkili olduğu gözlemlendi. Tek başına vitamin E'nin tüm gruplardan daha yüksek düzeyde hormonal parametreleri arttırdığı görüldü.

Sonuç olarak, çalışmamızda acetamiprid maruziyetinin testis dokusunda hasar oluşturduğu ve üreme yeterliliğini azalttığı, testiste oksidatif stresi indüklediği, üreme hormonlarının düzeylerine ve oksidan-antioksidan denge üzerine olumsuz etkisinin olduğunu gördük. Bu hasarın tedavisinde Vitamin E'nin birçok parametrede melatoninden daha etkili olduğunu tespit ettik.

Anahtar kelimeler: Acetamiprid, Melatonin, Testis, Vitamin E.

ABSTRACT

Investigation of the Protective Effects of Melatonin and Vitamin E against Acetamiprid Testicular Toxicity

The aim of this study was to investigate the protective effects of melatonin and vitamin E against the acetamiprid caused histopathological damage and reproductive system hormones and oxidative stress parameters changes in male mouse testis.

50 Balb-c male mice were divided into 7 groups as 6 in control group and 8 in other groups. H&E, PAS and kaspaz-3 staining were performed in the testis tissues obtained after 21 days of experiment. Tissue samples taken for ultrastructural examination were also analyzed by TEM.

In the Acmp group, seminiferous tubule diameter and epithelial thickness decreased. Epithelium degeneration, decreased spermatozoa in the lumen, PAS+ decrease in the seminiferous epithelial basement membrane, edema in the interstitial area and hydropic degeneration in Leydig cells were detected. Caspase-3 had more immune positivity than the other groups. In TEM examination, degeneration of tubule cells, lysosomal accumulation, vacuoliations containing myelin and necrosis in spermatogenic series cells were detected. In the Leydig cells, hydropic degeneration in the cytoplasm, electron dense lipid vacuoles in the cytoplasm and chromatolysis were prominent. Primary and secondary electron dense lysosomal accumulations were noted in Sertoli cells. Biochemically, in the Acmp group, there was a decrease in GSH and TAS, an increase in MDA and TOS levels. Plasma LH, FSH and testosterone levels were decreased. It was seen that histological damage, apoptotic cell death ratio decreased in both light microscopic and ultrastructural levels in groups that were administered melatonin, vitamin E and two together. Also, oxidative parameters were decreased and hormonal parameters increased in both group. Vitamin E was found to be more effective in decreasing the oxidative parameters and increasing the antioxidative parameters than melatonin. Vitamin E alone increased hormonal parameters higher than all groups.

In conclusion, in our study, it was observed that acetamiprid exposure caused damage to testis tissue and decreased reproductive ability, induced oxidative stress in testis, and had negative effects on levels of reproductive hormones and oxidant-antioxidant balance. Vitamin E was found to be more effective to protect the testis tissue against acetamiprid toxicity than melatonin in many parameters.

Key words: Acetamiprid, Melatonin, Testis, Vitamin E.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
ACh	Asetil Kolin
Acmp	Acetamidrid
ADI	Acceptable Daily İntake (Kabul edilebilir günlük alım)
AMH	Anti-Müllerian Hormon
aER	Agranüler (Düz) Endoplazmik Retikulum
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
DDT	Dikloro Difenil Trikloroethan
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EPA	ABD Çevre Koruma Ajansı
FSH	Folikül Stümulan Hormon
g	Gram
gER	Granüllü Endoplazmik Retikulum
GSH	Total Glutatyon
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
H ₂ O	Su
H&E	Hematoksilen – Eosin
i.p.	İntraperitonal
kg	Kilogram
LDL	Düşük Dansiteli Lipoproteinler
LH	Luteinizan Hormon
m	Metre
MDA	Malondialdehit
Mel	Melatonin
ml	Mililitre
mg	Miligram

ng	Nanogram
nAChRs	Nikotinik Asetil Kolin Reseptörü
NADPH	Nikotinamid-Adenosin Dinükleotid Fosfat
O ²⁻	Superoksit Radikali
OSİ	Oksidatif Stres İndeksi
PAS	Periyodik Asit-Schiff
PBS	Phosphate Buffered Saline
RNA	Ribonükleik Asit
SD	Standart Sapma
SF	Serum Fizyolojik
sn	Saniye
SRY	Sex-determining Region on Y
TAS	Total Antioksidan Seviye
TBF	Testis Belirleyici Faktör
TOS	Total Oksidan Seviye
TEM	Transmission Elektron Mikroskobu
v.a.	Vücut Ağırlığı
Vit E	Vitamin E
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. Üç haftalık embriyoda germ hücrelerinin göçü	3
Şekil 2.2. Beş haftalık embriyoda germ hücrelerinin göçü.....	5
Şekil 2.3. Skrotum ve içindeki yapıların şematik çizimi	8
Şekil 2.4 Testis anatomisi	9
Şekil 2.5. Testis histolojik kesiti.....	10
Şekil 2.6. Seminifer tübül yapısı.....	11
Şekil 2.7. Seminifer tübül ve çevresindeki dokunun şematize görünümü.....	12
Şekil 2.8. Sertoli hücresinde “Charcot-Böttcher” cisimciği EM görüntüsü.	13
Şekil 2.9. Spermatogonyumların şematik çizimi	16
Şekil 2.10. Spermatogenezis şeması	18
Şekil 2.11. Bir insan spermatozoonunun diyagramı	20
Şekil 2.12. Spermiyogenez süreci.....	21
Şekil 2.13. Matür spermin yapısı	21
Şekil 2.14. Testisin interstisyel (Leydig) hücreleri.....	23
Şekil 2.15. Testiküler fonksiyonun hormonal düzenlenmesi.....	25
Şekil 2.16. Acmp’nin kimyasal yapısı	31
Şekil 2.17. Melatonin’in kimyasal yapısı	33
Şekil 2.18. Melatoninin biyosentetik yolları.....	34
Şekil 2.19. Viamin E’nin kimyasal yapısı	38
Şekil 2.20. İntrensek ve Ekstrensek Apoptozis mekanizması	41
Şekil 4.1. Distile su. Seminifer tübül lümeni. H-E, 10X.....	55
Şekil 4.2. Distile su. Seminifer epitel, Sertoli h., spermatogonyum. H-E, 20X	55
Şekil 4.3. Distile su. Seminifer tübül lümeni, Sertoli h., Leydig hücresi. H-E, 40X.....	56
Şekil 4.4. Distile su. Seminifer tübül bazal membranı. PAS, 20X	56
Şekil 4.5. Distile su. Kaspaz 3 immünreaktivesi. İHK, 20X	57
Şekil 4.6. Etanol. Seminifer tübül lümeni. H-E, 10X	57
Şekil 4.7. Etanol. Seminifer epitel, Sertoli h., spermatogonyum. H-E, 20X	58
Şekil 4.8. Etanol. Sertoli h., spermatogonyum, Leydig h. H-E, 40X	58

Şekil 4.9. Etanol. Seminifer tübül bazal membranı. PAS, 20X.....	59
Şekil 4.10. Etanol. Kaspaz 3 immunreaktivitesi. İHK, 20X.....	59
Şekil 4.11. Mısır yağı. Seminifer tübül lümeni. H-E, 10X.....	60
Şekil 4.12. Mısır yağı. Seminifer epitel, Sertoli h, spermatogonyum. H-E, 20X.....	60
Şekil 4.13. Mısır yağı. Sertoli h., spermatogonyum, Leydig h.. H-E, 40X	61
Şekil 4.14. Mısır yağı. Seminifer tübül bazal membranı. PAS, 20X.....	61
Şekil 4.15. Mısır yağı. Kaspaz 3 immun reaktivesi. İHK, 20X.....	62
Şekil 4.16. Acmp. Seminifer tübül lümeni, seminifer epitelde ayrılma. H-E, 10X.....	63
Şekil 4.17. Acmp. Seminifer tübül dejenerasyonu. H-E, 20X.....	64
Şekil 4.18. Acmp. Sertoli h., spermatogonyum, Leydig h. H-E, 40X	64
Şekil 4.19. Acmp. Seminifer tübül bazal membranı. PAS, 20X.....	65
Şekil 4.20. Acmp. Kaspaz 3 immunreaktivitesi. İHK, 20X.....	65
Şekil 4.21. Acmp+Mel. Seminifer tübül lümeni. H-E, 10X.....	67
Şekil 4.22. Acmp+Mel. Seminifer epitel, spermatogonyum. H-E, 20X.....	67
Şekil 4.23. Acmp+Mel. Sertoli hücresi, Leydig hücresi H-E, 40X	68
Şekil 4.24. Acmp+Mel. Seminifer tübül bazal membranı. PAS, 20X.....	68
Şekil 4.25. Acmp+Mel. Kaspaz 3 immunreaktivitesi. İHK, 20X	69
Şekil 4.26. Acmp+Vit E. Seminifer tübül lümeni. H-E, 10X.....	70
Şekil 4.27. Acmp+Vit E. Seminifer epitel, spermatogonyum. H-E, 20X.....	71
Şekil 4.28. Acmp+Vit E. Sertoli h., spermatogonyum, Leydig h. H-E, 40X	71
Şekil 4.29. Acmp+Vit E. Seminifer tübül bazal membranı. PAS, 20X.....	72
Şekil 4.30. Acmp+Vit E. Kaspaz 3 immunreaktivitesi. İHK, 20X.....	72
Şekil 4.31. Acmp+Vit E+Mel. Seminifer tübül lümeni. H-E, 10X	73
Şekil 4.32. Acmp+Vit E+Mel. Seminifer epitel, Sertoli h. H-E, 20X.....	73
Şekil 4.33. Acmp+Vit E+Mel. Leydig h., spermatogonyum. H-E, 40X	74
Şekil 4.34. Acmp+Vit E+Mel. Seminifer tübül bazal membran. PAS, 20X	74
Şekil 4.35. Acmp+Vit E+Mel. Kaspaz 3 immunreaktivitesi. İHK, 20X	75
Şekil 4.36. Distile su. Spermatogonyumlar. Skala: 2 µm.....	76
Şekil 4.37. Distile su. Farklı gelişim aşamalarında, spermatidler. Skala: 2 µm	76
Şekil 4.38. Distile su. Normal ultrastrüktürde spermatozoon. Skala: 1 µm	77
Şekil 4.39. Distile su. Normal ultrastrüktürde Leydig h., Skala: 2 µm	77

Şekil 4.40. Etanol. Spermatogonyumlar. Skala: 2 µm.....	78
Şekil 4.41. Etanol. Farklı gelişim aşamalarında. spermatidler Skala: 2µm.....	78
Şekil 4.42. Etanol. Normal ultrastrüktürde spermatozoon ve Sertoli h., Skala: 2 µm.....	79
Şekil 4.43. Etanol. Normal ultrastrüktürde Leydig h., Skala: 2 µm	79
Şekil 4.44. Mısır yağı. Sertoli h., spermatogonyum. Skala: 2 µm.....	80
Şekil 4.45. Mısır yağı. Erken spermatid.. Skala: 2 µm.....	80
Şekil 4.46. Mısır yağı. Normal ultrastrüktürde spermatozoon. Skala: 2 µm	81
Şekil 4.47. Mısır yağı. Leydig hücresi nükleusu. Skala: 2 µm	81
Şekil 4.48. Acmp. Sertoli h., Dejenere primer spermatosit. Skala: 5 µm.....	82
Şekil 4.49. Acmp. Dejenere geç spermatid , spermatosit stoplazması. Skala: 2 µm	83
Şekil 4.50. Acmp. Spermatozoon akrozomları, Sertoli h. stoplazması. Skala: 2 µm	83
Şekil 4.51. Acmp. Leydig h. nükleusunda kromatolizis ve dejenerasyonlar. Skala: 2 µm ..	84
Şekil 4.52. Acmp+Mel. Sertoli h. stoplazması, spermatogonyum. Skala: 2 µm	85
Şekil 4.53. Acmp+Mel. Normal ultrastrüktürde erken spermatidler. Skala: 2 µm.....	85
Şekil 4.54. Acmp+Mel. Normal ve hasarlı spermatozoonlar. Skala: 2 µm	86
Şekil 4.55. Acmp+Mel. Leydig h. nükleusu ve lizozomları. Skala: 2 µm.....	87
Şekil 4.56. Acmp+Vit E. Sertoli h., spermatogonyum. Skala: 2 µm.....	87
Şekil 4.57. Acmp+Vit E. Normal ultrastrüktürde spermatidler. Skala: 2 µm	88
Şekil 4.58. Acmp+Vit E. Normal ultrastrüktürel yapıda spermatozoon. Skala: 2 µm	88
Şekil 4.59. Acmp+Vit E. Leydig hücresi nükleusu, lizozom, Skala: 2 µm	89
Şekil 4.60. Acmp+Vit E+Mel. Sertoli h., spermatogonyum. Skala: 2 µm	90
Şekil 4.61. Acmp+Vit E+Mel. Farklı gelişim aşamalarında spermatidler. Skala: 2 µm	90
Şekil 4.62. Acmp+Vit E+Mel. Normal ultrastrüktürde spermatozoon. Skala: 2 µm	91
Şekil 4.63. Acmp+Vit E+Mel. Leydig h. nükleusu, lipid vakuolleri, Skala: 2 µm	91

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 4.1. Deney başlangıcı ve deney sonu denek ağırlıklarının karşılaştırılması.....	53
Tablo 4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	53
Tablo 4.3. H-skoru	92
Tablo 4.4. Johnsen skoru	92
Tablo 4.5. Seminifer Tübül Çapı	93
Tablo 4.6. Seminifer Epitel Kalınlığı.....	93
Tablo 4.7. GSH ve MDA düzeyleri	94
Tablo 4.8. TAS, TOS ve OSI düzeyleri	94
Tablo 4.9. Plazma hormon düzeyleri	95

1. GİRİŞ

Acetamiprid (Acmp), (E)-N-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-N-cyano-N methylacetamidine, tarımsal üretimin birçok alanında yaprak bitleri, arılar, sivrisinekler ve emici böceklerle mücadele için yaygın olarak kullanılan neonikotinoid sınıfı bir insektisittir (1). Kokusuz, beyaz renkte ve toz formunda bir maddedir (2). Acmp insanlar için potansiyel toksisitesi nedeniyle tarım ürünlerindeki seviyesi kontrol edilmektedir (2-4). Neonikotinoidler, sinaptik aralıkta asetil kolinin (ACh) agonisti olarak hareket eder ve böceklerin merkezi sinir sistemindeki nikotinik asetil kolin reseptörlerine (nAChRs) bağlanarak sinaptik uyarıyı engeller (5, 6).

Acmp öncelikli olarak idrarda elimine edilir ve atılır. Dışkı eliminasyonu ise özellikle safra yoluyla olur. Acmp'in eliminasyon hızı idrarda dışkıdakinin yaklaşık iki katı kadardır (7). İnsan testislerinde ($\alpha 5$, $\beta 4$) ve prostatta ($\alpha 5$) memeli sinir sisteminde ($\alpha 4$, $\beta 2$), fare testislerinde ve spermatozonda ($\alpha 7$) farklı nAChRs alt türleri eksprese edildiğinden, bu organlar neonikotinoidlerin ve dolayısı ile de acetamipridin ana hedeflerini oluşturmaktadır (8-10). Üreme sistemi, çevre kirliliğine, özellikle pestisitlere karşı daha savunmasızdır. Bu nedenle insektisitlerin testiste oksidatif stres oluşturarak spermatogenetik hücrelerde, Sertoli ve Leydig hücrelerinde yapısal ve fonksiyonel hasara neden olduğu, hormonal regülasyonun herhangi bir aşamasında endokrin fonksiyonu kesintiye uğrattığı bildirilmiştir (11, 12).

Melatonin, N-asetil-5-metoksitriptamin, vücutta başlıca pineal bez tarafından salgılanan bir hormondur (13). Melatonin, çeşitli endokrin, nöronal ve immün fonksiyonların düzenlenmesinde görev alır (13, 14). Melatonin, LH'nin pulsatil salınımı da dahil olmak üzere üreme işlevinin düzenlenmesinde etkilidir (15). Ayrıca melatonin, hücrelerde sitoprotektif etkiye sahip olup, serbest radikal süpürücü ve güçlü bir antioksidan etkinliği vardır (16).

Vitamin E, antioksidan özelliği olan ve serbest radikallerin zararlı etkilerine karşı hücre ve dokuların korunmasında rolü olan ve biyolojik membranlarda bulunan yağda çözünür bir vitamindir (17). Vitamin E'nin memeli spermatogenezisinin korunması için hayati önem taşıyan güçlü bir lipofilik antioksidan olduğu ve Sertoli hücrelerinde ve pakiten spermatositlerde, özellikle de yuvarlak spermatidlerde yüksek miktarda bulunduğu bildirilmiştir (18, 19).

Çalışmanın amacı, son yıllarda tarımsal üretim alanlarında oldukça yaygın kullanılan acetamiprid maruziyetinin testis dokusuna ve üreme fonksiyonları üzerine verdiği hasara karşı melatonin ve vitamin E'nin koruyucu etkilerinin histolojik ve biyokimyasal yöntemlerle araştırılmasıdır.



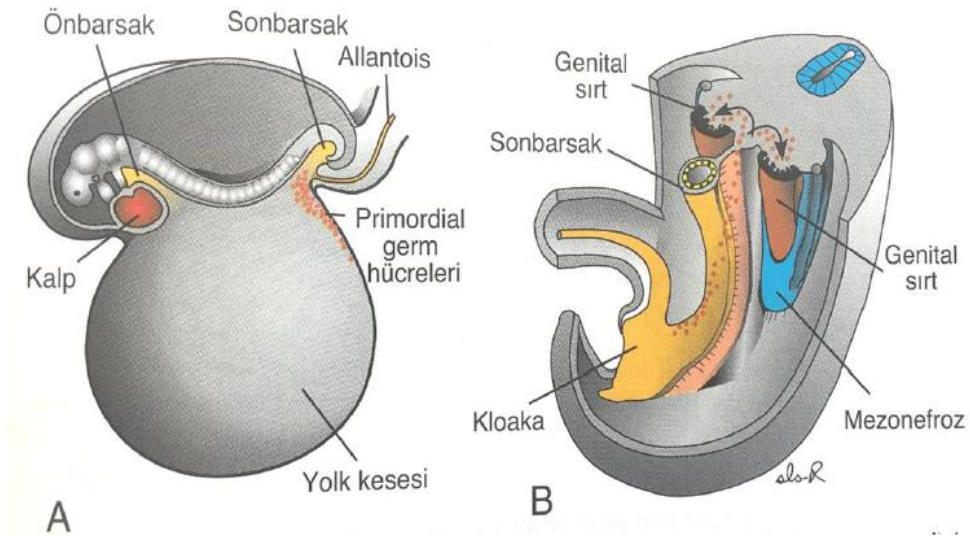
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Embriyolojisi

Embriyoda genetik olarak cinsiyetin belirlenmesi fertilizasyonda oositi dölleyen spermin kromozomal özelliğiyle belirlenir. Embriyonik dönemin yedinci haftasına kadar morfolojik cinsiyet özellikleri henüz gelişmez. Gonadlar her iki cinste de yedinci haftaya kadar benzer görünümündedir. Bunlara farkanmamış gonadlar denir.(20)

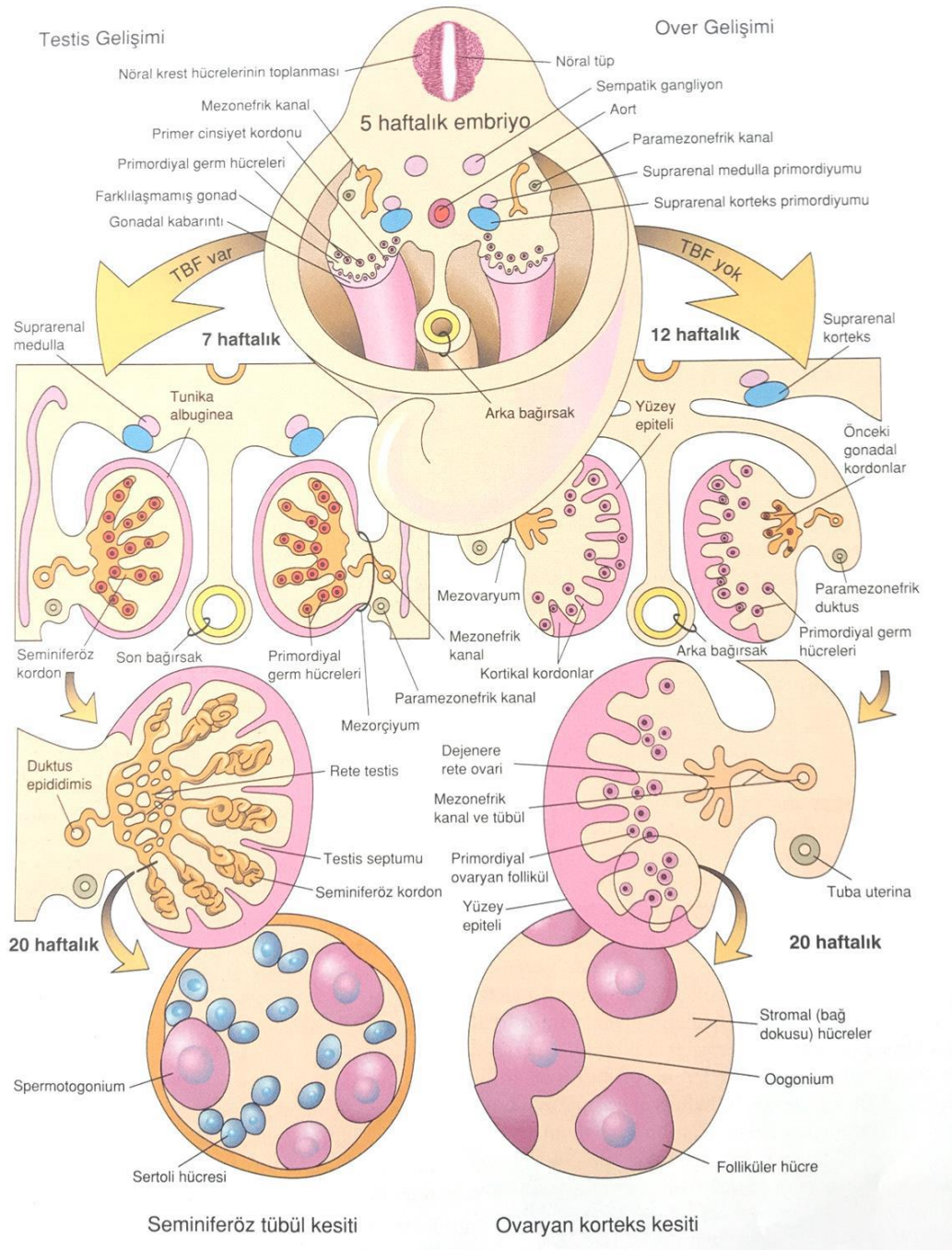
Gonadların köken aldığı üç kaynak primordiyal germ hücreleri, posterior abdominal duvarın mezoteli ve altındaki mezenşimdir. Mezonefrozun medialindeki mezotel ve altındaki mezenşim beşinci haftada proliferere olarak bir genital kabarıntı meydana getirir. Epitelyal kordonların hemen altındaki mezenşime doğru hareketiyle farkanmamış gonadda dışta korteks ve içte medulla meydana gelir. XY kromozumlu embriyolarda medulla testise farkanır, korteks geriler. XX kromozoma sahip embriyolarda ise korteks overe farkanır ve medulla geriler (21).

Dördüncü haftanın başında primordial germ hücreleri yolk kesesinin allantoysine yakın duvarında endoderm hücreleri arasında oluşurlar. Son barsağın dorsal mezenteri boyunca hareket ederek beşinci haftada gonadal kabarıntılara ulaşmış olurlar (Şekil 2.1). Altıncı haftanın sonunda mezenşim içerisine ilerleyen primordiyal germ hücreleri primer cinsiyet kordonlarına katılırlar (20).



Şekil 2.1. 3 haftalık embriyoda germ hücrelerinin göçü (21).

Cinsiyet farklanması, birçok genin etkili olduğu multifaktöriyel bir süreçtir. 1923'ten sonra bilim insanları cinsiyet farklanmasında kilit rol alan ve testis belirleyici gen olarak isimlendirilen SRY (Sex-determining Region on Y) genini içeren Y kromozomunun sorumlu olduğunu tesbit etmişler. Bu genin protein son ürünü bir transkripsiyon faktörü olan Testis Belirleyici Faktördür (TBF). Bu genin varlığıyla erkek, yokluğuyla dişi cinsiyet oluşur (21, 22) (Şekil 2.2). TBF etkisiyle primer cinsiyet kordonları seminifer tübüllere dönüşür. Farklanmamış gonadın medullasına doğru büyür, dallanır ve anastomozlaşarak rete testisi meydana getirir. Sıkı fibröz bir bağ dokudan oluşan tunika albugineanın gelişimiyle seminifer tübüllerin yüzey epiteliyle bağlantısı kaybolur. Mezonefroz dejenere olurken testis kendi mezenteri olan mezorşiyum ile asılır (20).



Şekil 2.2. Beş haftalık embriyoda germ hücrelerinin göçü (23).

Dördüncü ayda atnalı şeklinde olan testis kordonları rete testis ile devam eder. Puberteye kadar testis kordonları spermatogonyumlar ve Sertoli hücrelerinden oluşan solid yapılar şeklinde bulunur. Puberte döneminde testis kordonlarında lümen oluşumuyla

seminifer tübüller gelişir (21). Bu dönemde testosteron hormonunun artışıyla birlikte spermatogenez başlar (24).

Gonadal kabartının mezenşiminden Leydig hücreleri meydana gelir. Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron ve androstenodion hormonları, sekizinci haftadan itibaren dış genitallerin ve mezonefrik duktusların erkek olarak farklanmasını sağlar. İnsan koryonik gonadotropin hormonu 8 -12 haftalık dönemde pik yaparak testosteron üretimini uyarır. Fetal dönemde testislerdeki Sertoli hücrelerinden salgılanan Anti-Müllerian Hormon (AMH) ise paramezonefrik duktusların gelişimini inhibe eder.

26. haftada pelvisdeki büyüme ve embriyodaki boyut artışı ile birlikte testisler inguinal kanalda ilerler ve skrotuma inmeye başlar (20). Testislerin büyümesi, b tin içinde büyüyen organların oluşturduğu intraabdominal basınçta artışı ve gerileyen mezonefroz testislerin karın arka duvarı boyunca hareketine yardımcı olur. Bu süreç fibröz bir yapı olan testisten skrotuma uzanan gubernakulum testis eşliğinde ve androjen hormonların kontrolünde gelişir. Peritonun parmaksı uzantısı olan processus vaginalis fetal gelişim sürecinde karın ön duvarı tabakaları ile birlikte gubernakulum testisin seyri boyunca skrotuma ulaşır (25). Testisler 2-3 gün içinde skrotuma iner. Term doğmuş bebeklerin %97'sinden fazlasında testisler skrotum içerisindedir. Genellikle doğumda inmemiş testis tespit edilen bebeklerin çoğunda testisler bir yaşına kadar skrotuma iner (26).

2.2. Testis Anatomisi

Erkek  reme organı olan testis, skrotum denilen deri bir kese içinde, sağ ve sol bir çift olarak asılı haldedir. Oval şekilli, yanlardan basık ve yaklaşık aynı b y kl ktedirler. Farklılık olabilmekle birlikte, testislerin boyutları ortalama 4-5 santimetre (cm) uzunluğunda, 2-3 cm kalınlığında ve 2-3 cm genişliğindedir. Ortalama ağırlığı 10-14 gram (g)'dır. Aynı büyüklükte olmalarına rağmen sol testis sağ testise göre daha aşağıda yer alırken, sağ testis ise sol testise göre %10 daha ağırdır ve ısıları vücut ısısından 3-4  C daha düşüktür (şekil 2.3).

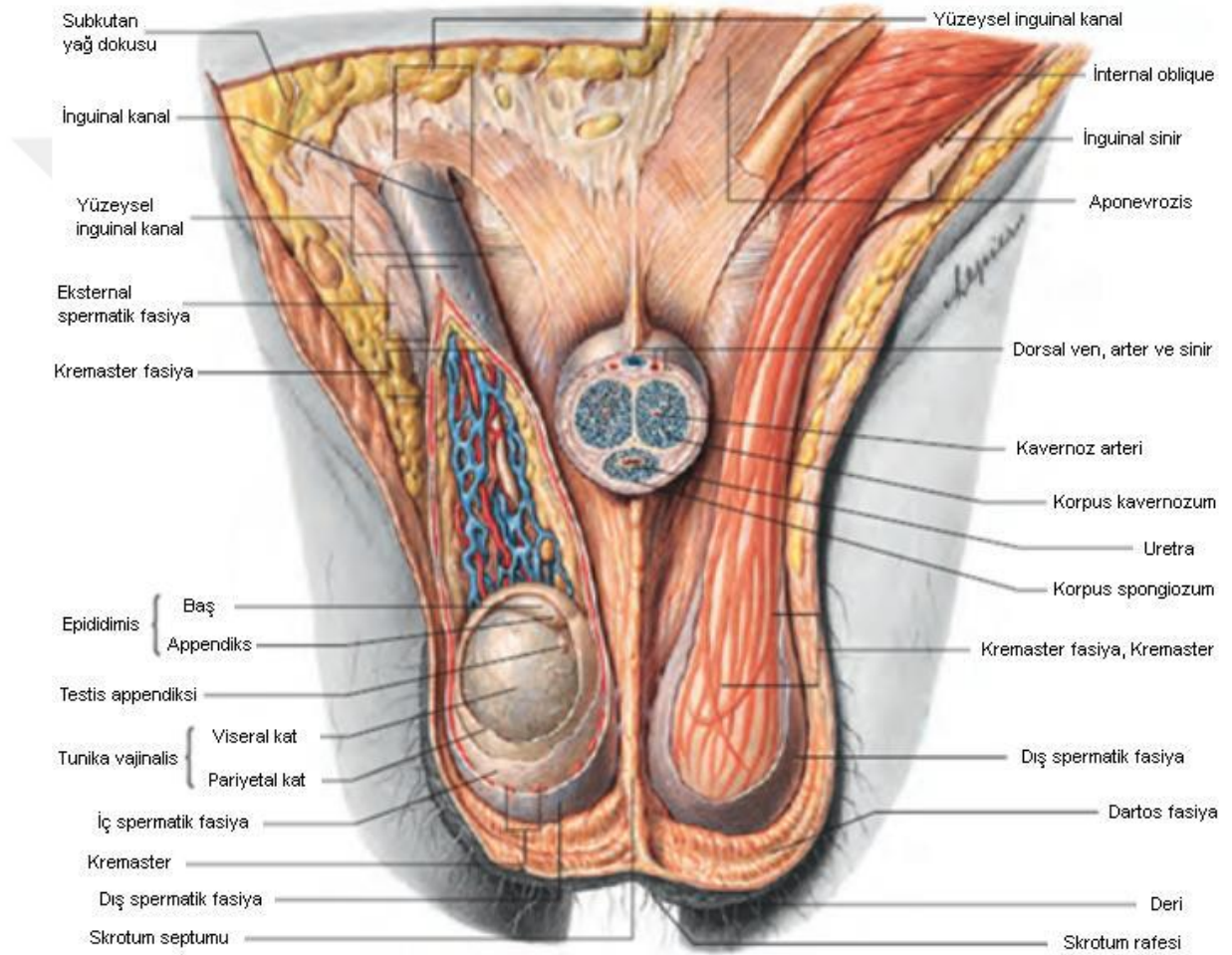
Fetal dönemin başlangıcında karın boşluğunda böbreklere yakın olan testisler, fetüs büyüdükçe aşağıya iner. Doğum  ncesi inguinal kanaldan skrotum içerisine inişini tamamlar. Testisler bu yolla skrotuma inerken karın ön duvarını da kendisiyle beraber sürükler (27).

Testisi dıştan saran 3 tabaka vardır. Bunlar dıştan içe tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa'dır. Tunica vaginalis de dışta paryetal i te visceral olmak üzere

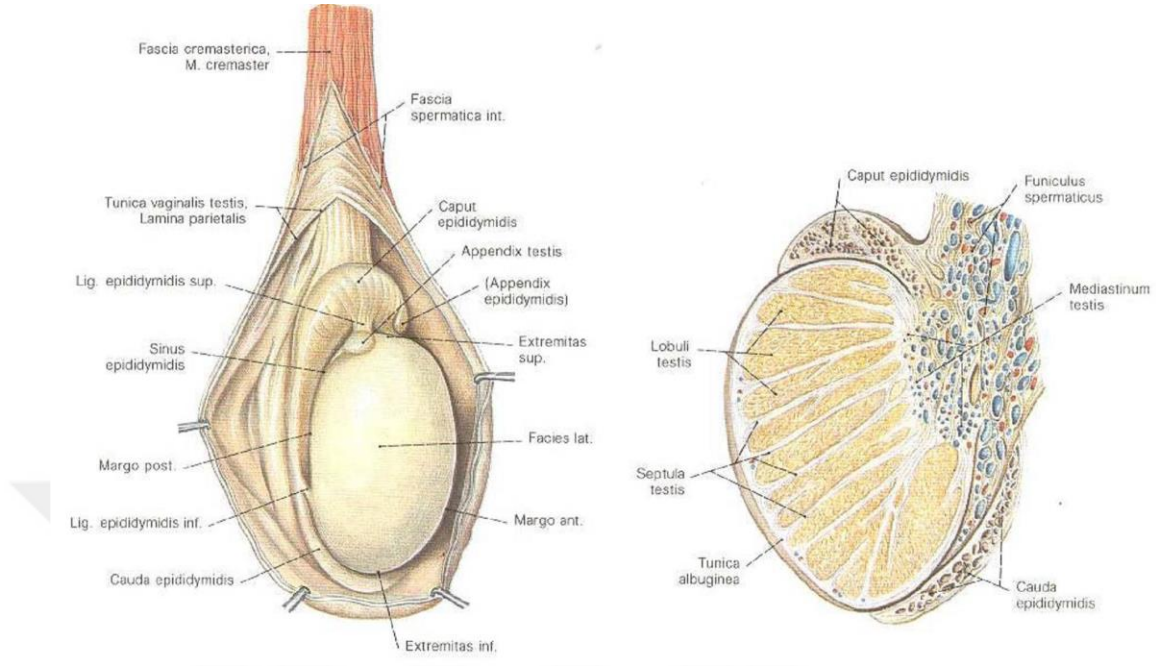
iki tabakalıdır. Bu iki tabaka arasında seröz bir sıvı vardır, bu seröz sıvının artmasına “hidrozel” denir. Ekstravaginal testis torsiyonu da bu boşlukta gerçekleşir (28, 29). Testisleri dıştan saran Tunika albuginea kalın, sıkı fibröz bağ dokusu yapısındadır ve arada düz kas hücreleri bulunur. Bu düz kas hücreleri kasılarak spermin efferent duktuslara doğru ilerleterek ejakülasyona yardımcı olur. Tunika albuginea, testisin arka bölgesinde içe doğru kalınlaşarak mediastinum testisi meydana getirir. Mediastinum testisten çıkan uzantılara septula testis denir ve testisi 200’den fazla lobuluslere ayırır (lobuli testis). Lobuli testis içinde tübülü seminiferi kontorti adı verilen kanalcıklar vardır ve bunların tamamı testis parankimini oluşturur. Seminiferi kontortiler mediastinum testise yakın bir yerde tübülü rekti olarak adlandırılan düz bir kanalcıkla devam eder. Tübülü rekti mediastinum testise girdikten sonra burada rete testis adı verilen bir ağ oluşturur. (Şekil 2.4). Rete testisler 6-12 adet efferent kanalın birleşmesi ile oluşur, testiküler sıvının ve spermatazoanın epididim baş kısmına ilerlemesini sağlar (30-32).

Skrotumda asılı duran testisler, septum scroti denen bir parça ile birbirinden ayrılırlar. Testislerden başka skrotumda funiculus spermaticusun alt ucu ve epididimis bulunur. Skrotumun duvarı dıştan içe doğru; deri, yüzeysel fascia, m. dartos, m. obliquus externus abdominis’ten gelişen fascia spermatica externa, m. obliquus internus abdominis’ten gelişen fascia cremastarica, fascia transversalis’ten gelişen fascia spermatica interna ve en içte de peritoneumun lamina parietalis (periorchium) tabakalarından meydana gelir. Skrotum derisi, buruşuk, pigmentli ve incedir. Her iki yan labioskrotal şişkinlikler orta hatta birleşerek Skrotumda belli belirsiz bir çizgi oluştururlar. Skrotumun arterleri; skrotumun ön tarafını a. pudenda externa, arka tarafını ise a. pudenda interna besler. Ayrıca a. testicularis ve a. cremastericadan da besleyici dallar alır. Skrotumun venleri olan v. scrotalisler arterlere eşlik eder ve v. pudenda externa ile birleşir. Skrotumun inervasyonu ön kısmını, n. ilioinguinalis’ten köken alan nn. scrotales anteriores ve n. genitofemoralis’in genital dalı inerve ederken; arka kısmını ise, n. perinealis superficialis’in dalları olan nn. scrotales posteriores ve n. cutaneus femoris posterior’un perineal dalı inerve eder. Testislerin kanlanması abdominal aortadan çıkan arteria testikularisler ile olur. Testisin arka kısmından çıkan küçük venlerle birleşerek plexus pampiniformis denilen venöz bir ağ oluşturur. Plexus pampiniformis spermatik kordun içinde inguinal kanaldan geçerek sağda vena cava inferiora, solda ise vena renalis dökülür. Testiste 4-8 adet lenfatik damar, spermatik kord

içinde ilerler ve paraaortik lenf nodlarına drene olur. Testisin innervasyonu medulla spinalisin torakal 10-12 segmentlerinden gelen sempatik lifler ve nervus vagustan gelen parasempatik liflerden oluşan pleksus testikularis ile olur. Pleksus testikularis, testicüler arter ve deferential arter etrafında testise gelir. Testiste 4-8 lenfatik damar, spermatik kord içinden geçerek paraaortik lenf nodlarına dökülür ve lenfatik drenaj sağlanır (30, 33-35).



Şekil 2.3. Skrotum ve içindeki yapıların şematik çizimi (36).

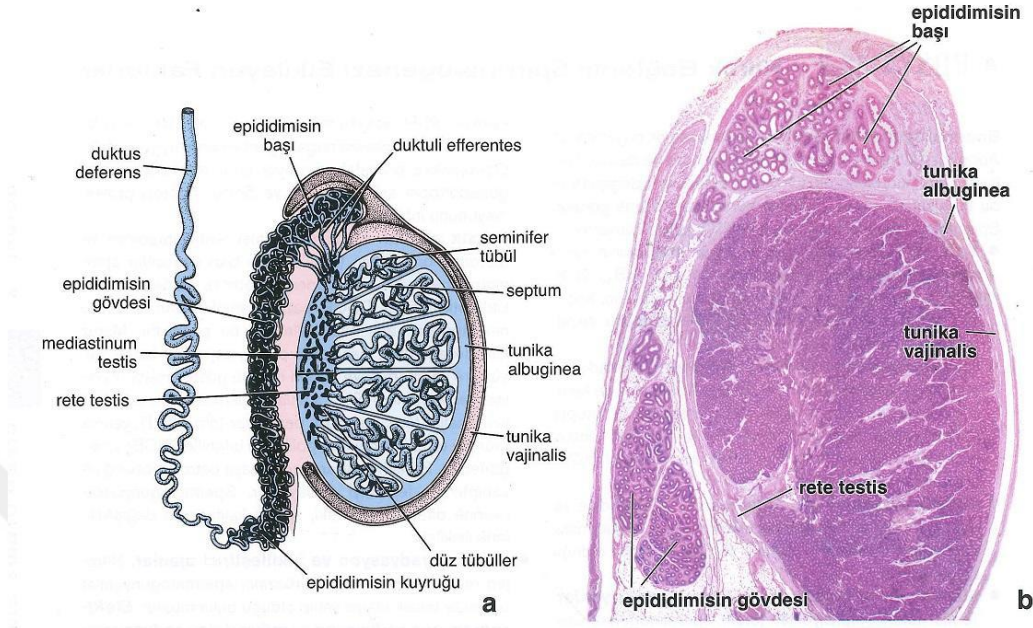


Şekil 2.4 Testis anatomisi (37)

2.3. Testis Histolojisi

Testis, endokrin ve ekzokrin özellikleri olan birleşik tübüler bir bezdir. Endokrin özelliği Leydig hücrelerinden salgılanan androjenik hormonlarla olur. Ekzokrin özelliği ise aktif olarak holokrin biçimde spermium salgılamasıyla olur (38).

Testisler, tunika albuginea denilen sıkı bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidir. Bu bağ doku testisin posterior kısmında yoğunlaşarak mediastinum testisi oluşturur. Testise giren çıkan kan ve lenf damarları, sinirler ve sperm kanalları mediastinum testisten geçer. Tunika albugineadan testis içine doğru uzanan sıkı bağ dokusu uzantıları (septum) testisi yaklaşık 250 lobüle ayırır. Bu uzantılar kesintisiz değildir ve genellikle birbiriyle bağlantılıdır. Her bir testis lobülü, içerisinde lenf ve kan damarları, sinirler ve testosteron salgılayan Leydig hücrelerini içeren gevşek bir bağ dokusu ve sperm ürettiği 1-4 adet seminifer tübülünden oluşur (39-42). Lobül içindeki seminifer tübüller oldukça kıvrıntılıdır. Genellikle kendi üzerinde katlanarak halka şeklini alırlar. Mediastinuma yaklaştıkça kısalır ve düzleşirler. Burada tübülü rekti adını alırlar. Mediastinuma girdikten sonra ise anastomozlaşarak rete testisi oluştururlar (24) (Şekil 2.5).

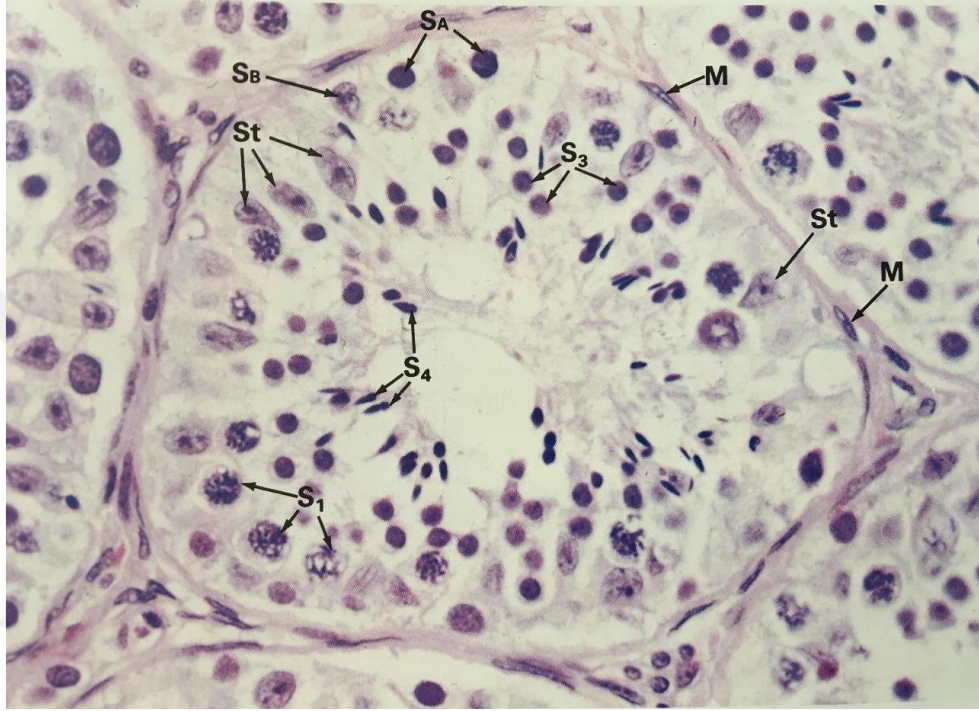


Şekil 2.5. Testis histolojik kesiti (24)

2.3.1. Seminifer Tübül

Testiste yapısal ve fonksiyonel bir birim olan seminifer tübüller, testisin büyük bir kısmını oluşturur. Yaklaşık olarak 30-80 cm uzunluğunda ve 150-250 mikrometre (μm) kalınlığında, kıvrımlı olarak seyreden kanallardır. Bir testiste bulunan tübüller uç uca eklendiğinde yaklaşık 250 metre (m) uzunluğundadır. Tübüller uca doğru daralarak düzleşir. Bu düz tübüllere tübülü rekti denir. Tübülü rekti seminifer tübülleri epitel ile döşeli ince labirent şeklinde kanal sisteminden oluşan rete testise bağlar. Birbiri ile anastomozlaşan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 adet duktuli deferentes ile epididimisin baş bölgesine bağlanır. Seminifer tübüller, seminifer epitel ya da germinatif epitel adı verilen bir epitel ile döşelidir. Epitel, bazal laminaya oturur ve altında fibroblast, kollajen lifler ve myoid hücrelerden oluşan lamina propria vardır. Lamina proprianın ortalama kalınlığı 8-10 μm kadardır ve en iç katmanında Bazal laminaya yapışık olan miyoid hücreler elektron mikroskopik olarak, düz kas hücrelerine benzer ve aktin filamentlerden zengindir, bazal lamina ile sarılı (3-5 kat) hücreler olarak görünür. Myoid hücrelerin kontraksiyonu sonucu tübül lümenindeki olgun spermiyumlar kanallara iletilir. Bağ dokusunun kollajen lifleri myoid hücrelerce sentezlenir. İnterstisyel alanın çoğunluğunu Leydig hücreleri oluşturmakla birlikte, ince kollajen ve retiküler lifler, fibroblast hücreleri, makrofajlar, sinirler, kan ve lenf

damarları bulunur (40, 43, 44). Seminifer epitel, bazal lamina ve tübül lümeni arasında spermatogenik seri hücreleri ve Sertoli hücreleri olarak iki farklı hücre grubu içeren 4 - 8 kattan oluşan çok katlı bir epitelidir (39, 45) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. Seminifer tübül yapısı (46).

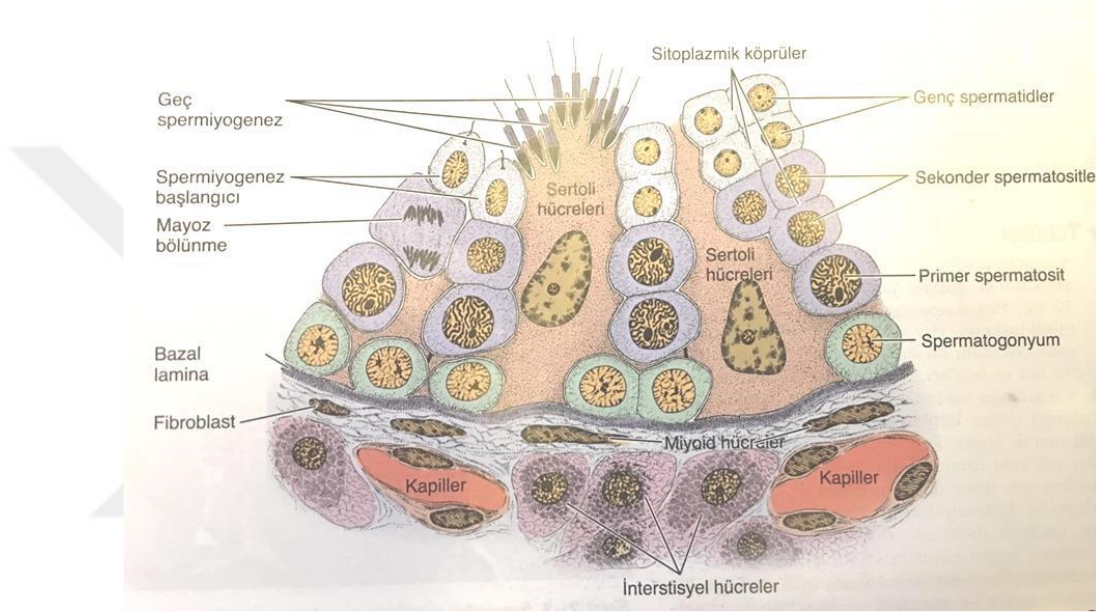
Seminifer tübül. H&E x640. SA: Tip A spermatogonyum, SB: Tip B spermatogonyum, S1: Primer spermatosit, S3: Spermatid, S4: Spermatozoa, St: Sertoli hücresi, M: miyoid hücre (46).

Seminifer epitel siklusu

Farklılaşma sürecindeki spermatogenik hücrelerin gelişimi rastgele değildir. Birbirine özgü hücre tipleri bir arada gruplanmıştır. Bu gruplaşma, her tip A spermatogonyum arasındaki intersellüler bağlantılar ve olgunlaşmanın her evresinde zaman geçirmeleri nedeniyle oluşmaktadır. Bir seminifer tübülün herhangi bir bölümünde farklılaşmanın bütün fazları ardışıktır ve kök hücrelerin soyları sitoplazmik bağlantılarla birbirine bağlıyken senkronize şekilde mitotik ve mayotik bölünmelere ve olgunlaşmaya uğrarlar (24) (Şekil 2.7).

Spermatogenez İnsanda yaklaşık 74 gün sürmektedir. Spermatogenetik seri hücreleri seminifer epitelin kalınlığı boyunca birkaç nesil halinde gelişir. Hücrelerde karakteristik olarak bir birlik vardır. Seminifer epitel siklusunun süresinin sabit olduğu ve insanda yaklaşık 16 gün sürdüğü kanıtlanmıştır. İnsanda bir kök hücrenin spermatogenez sürecini

tamamlaması için yaklaşık 4-6 siklus gerekir. Daha sonra, spermatozoonun epidimisten geçmesi ise yaklaşık 12 gün sürer. Testiste yaklaşık günde 300 milyon sperm hücresi üretimi olur. Siklus uzunluğu ve spermatogenez için gerekli süre sabittir ve farklı türler için ayrıdır. Bundan dolayı erkek infertilitesi için herhangi bir tedavi sürecinde spermatogenezin ilk fazlarını etkileyen bir ilaç verildiyse, o bileşiğin sperm üretimindeki etkisini görmek için yaklaşık 86 güne ihtiyaç vardır (24).



Şekil 2.7. Seminifer tübül ve çevresindeki dokunun şematize görünümü(40).

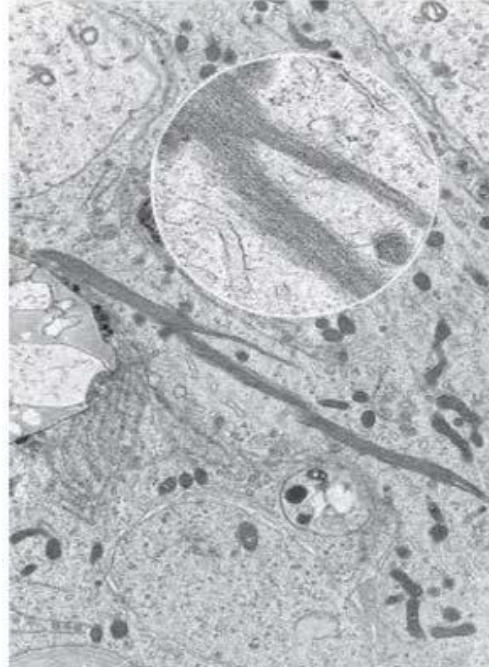
Sertoli hücreleri

Puberteye kadar seminifer epitelin baskın hücresi olan Sertoli hücrelerinin fizyolojik önemi ilk olarak İtalyan bilim adamı Enrico Sertoli tarafından 1865’de (47) keşfedilmiştir. Sertoli hücreleri puberteden sonra, seminifer tübül hücrelerinin yaklaşık %10’unu oluşturur. Yaş ilerledikçe spermatogenik hücre popülasyonu azalır ve Sertoli hücreleri tekrar epitelin ana hücresi haline gelir (39).

Puberteden sonra çoğalmayan ve testis fonksiyonları için çok önemli olan Sertoli hücreleri, spermatozoonların desteklenmesinde ve olgunlaşmasında önemli rolü vardır. Seminifer epitelin bazal laminasından lümene kadar uzanan Sertoli hücreleri, prizmatik şekillidir. Lümene uzanırken etrafındaki spermatogenik hücreleri çevreler ve çok sayıda lateral ve apikal uzantıları ile aralarındaki boşlukları doldurur. Bu uzantılardan dolayı hücre

sınırları net değildir. Sertoli hücrelerinin seminifer epiteldeki bu yerleşimi ayrıca tübüllere yapısal destek de verir (40, 42, 48).

Sertoli hücrelerinin çekirdekleri ökromatik, girintili-çıkıntılı, oval veya üçgen şekillidir ve belirgin bir nükleolusa sahiptir. Çekirdeğin bu özellikleri Sertoli hücrelerinin aktif olduğunu gösterir. Stoplazması organallerden zengindir. Bolca granülsüz endoplazmik retikulum (aER), az sayıda granüllü endoplazmik (gER) retikulum, oldukça gelişmiş golgi kompleksi, bolca mitokondri ve lizozom, lipid damlacığı, lipofuksin pigmenti, glikojen granülleri ve zengin hücre iskeleti (vimentin, aktin, mikrotübül) vardır. İnsanlarda Sertoli hücre stoplazmasının bazalinde “Charcot-Böttcher” denilen inklüzyon cisimcikleri vardır (Şekil 2.8). Işık mikroskopik olarak görülebildiği gibi elektron mikroskopik olarak da yoğun, 10-15 μm uzunluğunda 1 μm genişliğinde, paralel seyirli filamentlerdir. Bu cisimciklerin kimyasal içeriği ve işlevi henüz bilinmemekle birlikte son çalışmalar lipoprotein reseptör (CLA-1) proteinlerinin birikimi olduğunu rapor eden çalışmalar vardır. Bu da, Charcot-Böttcher cisimciklerinin Sertoli hücreleri tarafından lipidlerin kullanımında ve taşınmasında bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (24, 39, 42, 44, 48).



Şekil 2.8. Sertoli hücresinde “Charcot-Böttcher” cisimciği EM görüntüsü (24).

Tübül epiteli boyunca yan yana dizilen Sertoli hücreleri, hücrenin bazolateral yüzünde birbirleriyle zonula okludens (sıkı bağlantı) bağlantılarıyla kan-testis bariyerinin oluşuma katılır. Sertoli hücresi-Sertoli hücresi bağlantısı, yapısal olarak son derece eşsiz bir membran ve sitoplazmik özelleşmeler kombinasyonundan oluşur. Bu bağlantı kompleksleri seminifer tübül epitelinin bazal ve adluminal kompartman olmak üzere ikiye böler. Spermatogonyumlar ve erken primer spermatositler bazal kompartmanda yer alırken (Sertoli hücresi-Sertoli hücresi bağlantıları bazal lamina arasında), daha olgun spermatositler ve spermatidler ise adluminal kompartmanda (Sertoli hücresi-Sertoli hücresi bağlantıları lümen arasında) bulunur. seminifer tübül lümeni içerisindeki yapıların dolaşımdaki antijenlerle temasını engelleyen kan testis bariyeri, kanda bulunan maddelere ve otoimmün reaksiyonlara karşı gelişmekte olan spermatositleri ve spermatidleri korur. Spermatogenez sırasında tübülün adluminal bölgesine geçmek için, spermatogonyumların bölünmesi ile oluşan hücreler bu bariyeri bir şekilde aşar. Ayrıca iki Sertoli hücresi arasında gap junctionlar, Sertoli hücresi ile erken dönem spermatogenik hücreler arasında desmozom benzeri bağlantılar ve Sertoli hücreleri ile bazal lamina arasında hemidesmozom bağlantıları bulunur (24, 39, 40, 42, 43).

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları;

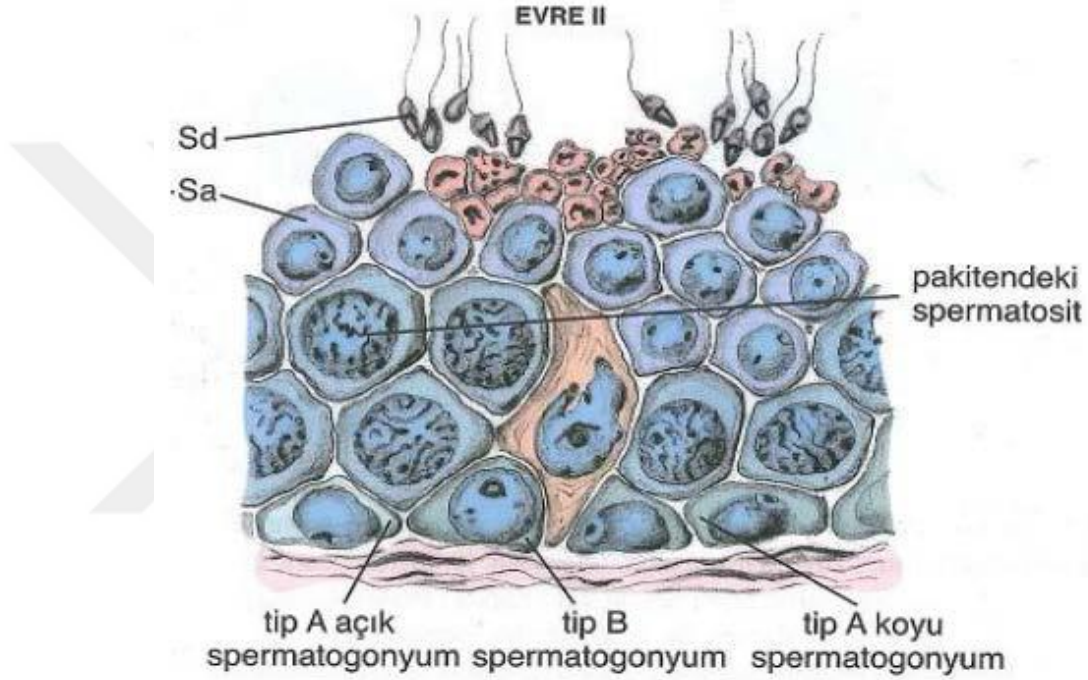
1. Birbirine sitoplazmik köprülerle bağlı olan spermatogenik hücrelere sitoplazmik dallarıyla destek olur. Kan-testis bariyeri ile kan dolaşımından izole edilen spermatositler, spermatidler ve spermatozoonların, besin ve metabolit alışverişini sağlar (40).
2. Gelişimini tamamlayamamış ve dejenere olmuş spermatogenik hücreleri ve spermiyogenez sürecinde artık spermatid stoplazmasını (rezidüel cisimcik) fagosit eder (40, 43).
3. Erkek fetusta embriyonik gelişim sürecinde müller (paramezonefrik) kanalllarının gerilemesini sağlayan hormon olan AMH'ü salgılar. Bu da erkek cinsiyet gelişimi için önemlidir (44).
4. Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllerden genital kanallara doğru akan ve spermelerin taşınmasını kolaylaştıran bir sıvı salgılar (40).
5. Testosteron ve Follükül stimüle edici hormon (FSH) kontrolünde Androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezler (40).
6. Hipofizden FSH salınımını engelleyen inhibin B ve FSH üretimini uyarıcı aktivin isimli hormonları üretir (40, 43).

Spermatogenez

Gametlerde gametogenez olarak adlandırılan mayoz bölünme ile Haploid kromozomlu germ hücrelerinin oluşma sürecidir. Gametler (sperm, oosit) primordiyal germ hücrelerinden köken alırlar. Prenatal dönemin 2. haftasında epiblast tabakasında beliren primordiyal germ hücreleri, buradan Vit Ellüs kesesine göç ederler. Prenatal dönemde gelişmekte olan gonadlara ise 4-5. haftada göç ederler ve mitoz bölünmeyle sayılarını arttıırırlar. Daha sonra mayoz bölünmeden oluşan gametogenez sürecini geçirirler. Yenidoğan döneminde testislerde az sayıdaki primordiyal germ hücreleri, destek hücreleri ile sarılmış, geniş, soluk hücreler olarak görülürler. Pubertenin başlaması ile destek hücreleri olgunlaşarak Sertoli hücrelerini meydana getirir. Spermatogonyumlar öncü hücrelerdir ve bölünüp farklılaşarak spermatidlerin oluştuğu bu sürece spermatogenez denir. Spermatogenez puberte ile birlikte başlar. Spermatidlerin arka arkaya iki bölünme geçirmesiyle kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını yarıya indirerek spermatidlerin oluşması mayoz bölünme ile gerçekleşir. Birinci mayoz bölünme sonrası primer spermatositten iki adet sekonder spermatosit oluşur. Böylece diploid kromozoma sahip primer spermatositin kromozom sayısı haploid olur. Sekonder spermatositler ikinci mayoza girer. Sonuçta haploid kromozom ve DNA içeriğine sahip spermatidler oluşur. Spermatidlerin farklılaşarak hareketli spermatozoonlara (spermiumlara) dönüşmesine ise spermiyogenez denir. Bütün bu süreçler testis tübüllerinde meydana gelir. Ancak her ne kadar spermiumlar seminifer tübüllerde farklılaşmasını tamamlamış olsa da erkek genital kanallarında devam eden yolculuk sürecinde çeşitli bezlerin salgı ürünlerinin etkisi ile daha da olgunlaşır (40, 44)

Spermatogenez ve spermiyogenez yaklaşık olarak insanda 9 haftada tamamlanır. Bir tübülde bu dönemde yaşanan bütün aşamaları görmek genellikle mümkün değildir. Seminifer tübüllerden enine yapılacak bir kesitte spermatogenik hücreler bazı özellikleri ile birbirlerinden ayırdedilebilirler. Spermatogonyumlar bazal membranın hemen üzerinde yer alır ve mitozla bölünerek diğer spermatogenik hücreleri oluşturan ana hücrelerdir. Nükleus özelliklerine göre tanımlanan spermatogonyumlar üç tiptir. Tip A koyu spermatogonyumlar oval şekilli, ince granüler kromatine ve yoğun bazofilik nükleusa sahiptir ve kök hücre görevi görürler. Bölünerek ya tekrar bir Tip A koyu spermatogonyum ya da bir Tip A açık spermatogonyumu meydana getirirler. Tip A açık spermatogonyumlar açık boyanan

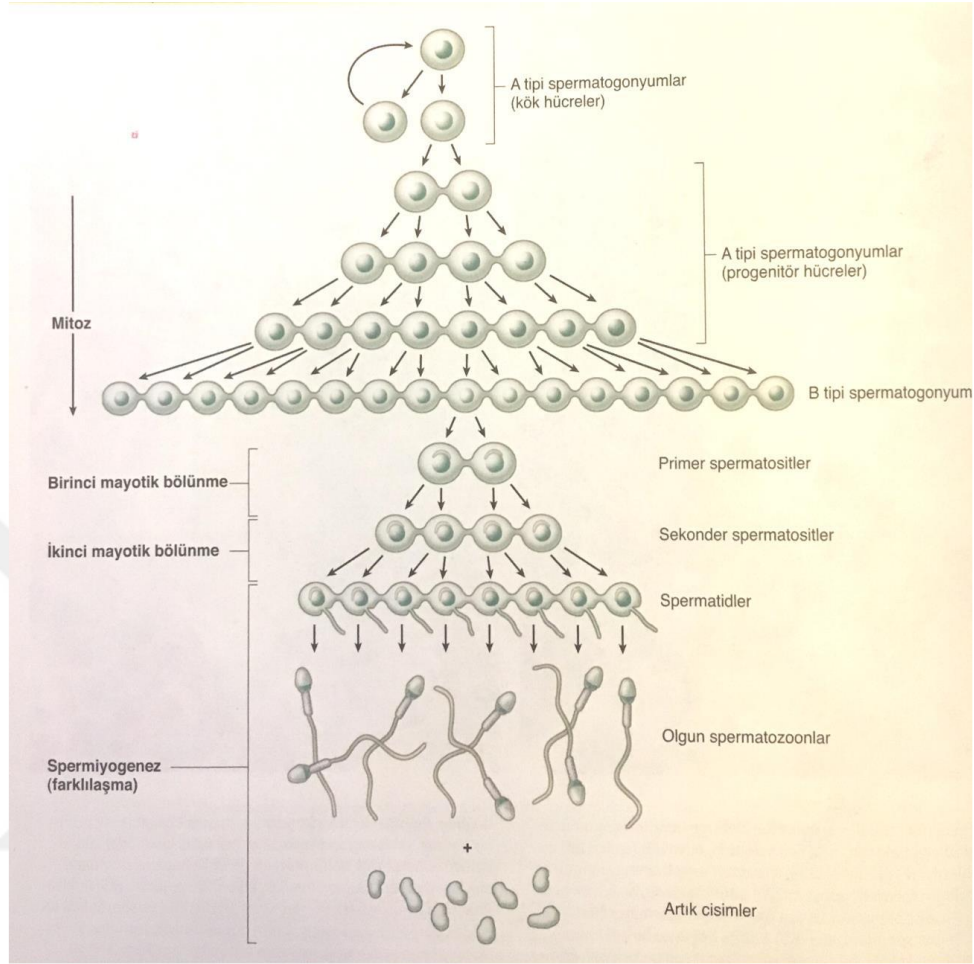
nukleusları ile koyu Tip A spermatogonyumlardan ayrılır. Tip A açık spermatogonyumlar da mitoz geçirerek sayılarını artırır. Bu bölünmelerden sonra Tip A spermatogonyumlar Tip B spermatogonyumlara dönüşürler. Tip B spermatogonyumlar nükleer kılıf boyunca ve nükleolusun çevresinde yoğun kümeler yapan kromatine ve yuvarlak nükleusa sahip hücrelerdir. Mitoz bölünme ile primer spermatositleri oluşturan öncü (progenitör) hücrelerdir (Şekil 2.9).



Şekil 2.9. Spermatogonyumların şematik çizimi (24).

Primer spermatositler oluşunca hemen DNA larını replike ederek mayoz bölünmeye hazırlanırlar. primer spermatositler normalin iki katı kromozom sayısına ($4n$) ve iki katı DNA ya ($2d$)'ya sahiptir. Mayoz bölünmeye giren primer spermatositlerin profaz safhasında kromatin yoğunlaşması sonucu nukleuslarında kromatin iplikçikleri görülür. Bu nukleusları ve geniş stoplazmaları ile primer spermatositler kolayca tanınırlar. İnsanda profaz yaklaşık 22 gün sürdüğü için kesitlerde spermatogenik serinin en iri hücreleri olan primer spermatositlere çokça rastlanır. Profaz sonunda 44 otozomal, bir çift de seks kromozomu oluşur. Homolog kromozomlar eşlenerek metafaz plağına dizilirler. Krossing-over ile tetradlar arasında genetik materyal değişimi olur. Böylece tek bir spermatositten gelişen dört spermatidin de genetik özellikleri farklı olur. Homolog kromozomlar birbirinden ayrılarak zıt kutuplara çekilir. Tetradlar birbirinden ayrılarak diad haline geri gelir. Bu süreçte

kromozomların iki kromatidi de birbirine bağlıdır. Homolog kromozomların kutuplara çekilişi rastgeledir. Anneden ve babadan gelen kromozomların da rastgele dizilimi ile genetik çeşitlilik oluşur. Birinci mayoz bölünme sonunda primer spermatositlerden sekonder spermatositler meydana gelir. Sekonder spermatositler kısa süre içinde ikinci mayoz bölünmeye girdiklerinden kesitlerde bu hücrelere çok az rastlanır. Primer spermatositlere oranla sekonder spermatositler daha küçük hücrelerdir. Sekonder spermatositler DNA sentezi yapmadan ikinci mayozun profazına girerler. 22 otozomal ve bir seks kromozomu (Y veya X) içerirler, diploid sayıda DNA ya ($2n$) sahiptirler. Kromozomların her birinde iki kardeş kromatid vardır. Metafazda bu kromatidler birbirlerinden ayrılarak ve zıt kutuplara doğru çekilirler. Spermatidler sekonder spermatositlerden ikinci mayoz bölünme sonunda oluşur. Spermatidler 23 kromozoma (n) normalin yarısı DNA ya ($1n$) sahiptirler. Yuvarlak veya poligonal şekilli, yoğun nükleuslu olan spermatidler, spermiyogenez olarak adlandırılan bir değişim sürecine girerler. Böylece nükleusları küçülür ve yoğunlaşır. Hücreler kuyruk oluşturarak spermatozoonlara dönüşürler (40, 43, 44) (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Spermatogenezis şeması (24).

Spermiyogenez

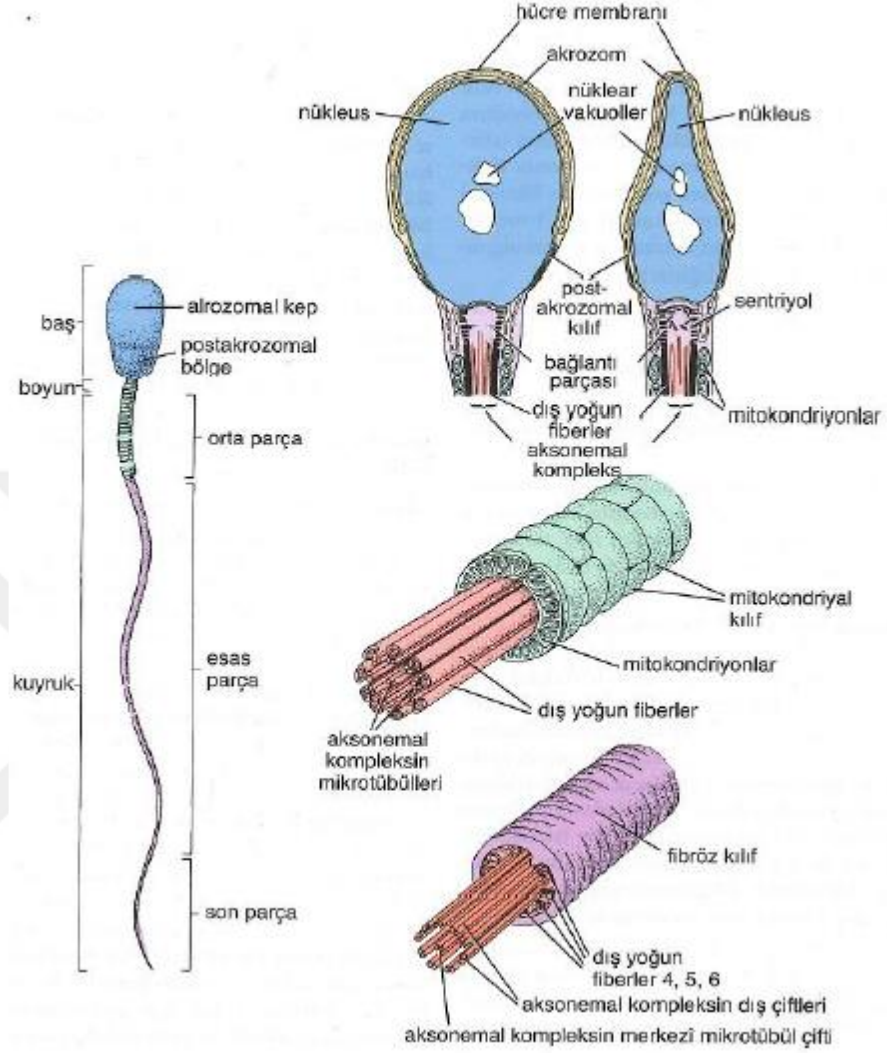
İkinci mayoz ile oluşan spermatidlerin farklılaşarak spermiuma dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücrelerde bölünme olmaz ve kromozom sayısı sabit kalır. Haploid kromozomlu spermiumun döllenmesi sonucunda diploid hücre oluşur. Spermiyogenez: Golgi, kep, akrozom ve olgunlaşma fazları olmak üzere dört fazdan oluşur (24) (Şekil 2.11, 2.12).

1. Golgi dönemi: Spermatidde golgi komplekslerinin bulunduğu alanlarda PAS+ granül birikiminin olduğu bir dönemdir. Glikoprotein içeriğin yoğun olduğu bu yapılara proakrozomal granül denir. Bunlar nükleus membranının çevresindeki akrozomal vezikülle birleşir. Akrozomal vezikül gelişen spermiumun ön kutbunu belirler. Bu süreçte sentriyoller de spermiumun arka kutbuna doğru göç eder. Bu bölgede bulunan mikrotübüller de sentriyollerden başlayarak spermium kuyruğunun aksonemini oluşturacaktır (24, 40).

2. Kep dönemi (Şapka dönemi): Akrozomal vezikülün nükleusun ön bölümünü kaplayacak şekilde genişleyerek şapka gibi bu bölümü kuşattığı dönemdir. Nükleus

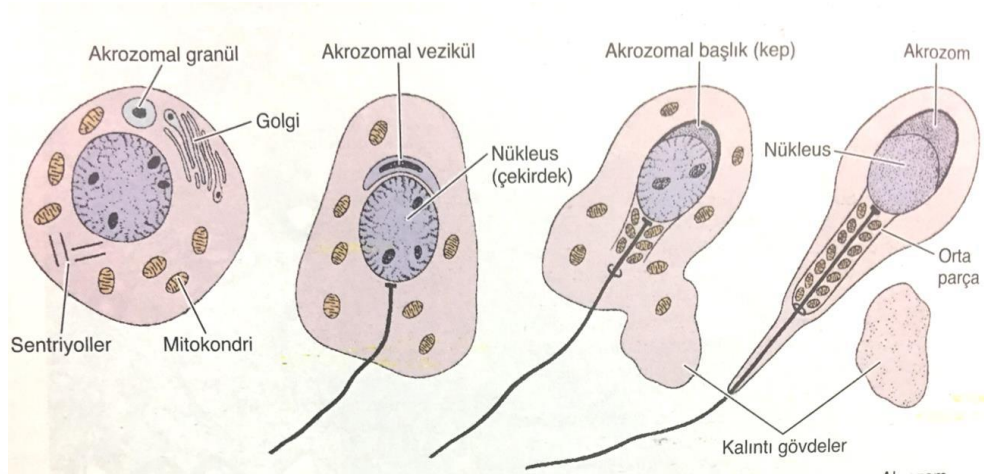
membranının buraya bakan bölümünün porları kaybolur ve membran kalınlaşır. Nükleus içeriği yoğunlaşır. Akrozom, aslında başlıca hiyaluronidaz, tripsin benzeri proteaz olan akrozin gibi hidrolitik enzimleri içeren özelleşmiş bir lizozom tipidir. Bu enzimler spermatozoon bir oosit ile karşılaştığında salınır ve akrozomun dış zarı spermatozoonun hücre zarı ile birleşir. Bu enzimler oositleri çevreleyen korona radiata hücreleri arasındaki bağlantıları kopararak zona pellusidayı sindirir. Bu olaya “akrozomal reaksiyon” denir (24, 44).

3. Akrozom dönemi: Belirgin değişikliklerin gerçekleştiği dönemdir. Spermiyumun akrozom ve yoğunlaşmış çekirdeğini içeren baş kısmı Sertoli hücrelerinin stoplazması içine gömülür. Kuyruk flagellumu uzayarak lümende belirginleşmeye başlar. Çekirdek yoğunlaşır ve uzar, nükleozomları çevreleyen histon proteinleri, küçük bazik peptid yapıdaki protaminler ile yer değiştirir. Stoplazmada bulunan mikrotübüller akrozomdan başlayarak spermatidin arka kutbuna doğru uzanarak silindirik kılıfı (manşet de denir) oluşturur. Flagellumun oluşmasında ana rolü olan sentriollerden oluşan 9 adet kalın lif aksonemin mikrotübül çiftlerinin çevresindeki kalın lifleri meydana getirir. Bu liflerin başlangıcı boyun (bağlayıcı parça) bölgesi olarak isimlendirilir. Plazma membranı uzayan flagellum yüzeyini kaplamak üzere arkaya doğru uzarken, manşet kaybolur. Mitokondriyonlar boyun bölgesinden başlayarak distale uzanan bölgede dış kalın liflerin etrafını bir kılıf gibi sararlar. Mitokondriyon kılıfı ile çevrili bu kısım kuyruğun orta parçasını oluşturur. Burası flagellumun hareketi için gerekli ATP nin üretildiği yerdir. Orta parçanın distalinde bulunan iki longitudinal fibröz bant ve etrafındaki fibröz kılıf esas parçanın dış yoğun liflerini sarmalayarak flagellumun ucuna kadar ilerler. Bu bölge esas parça olarak adlandırılır. Esas parçanın distalinde kalan ve sadece aksonemin mikrotübüllerini ihtiva eden kısa son bölüm ise son parça olarak adlandırılır (24, 40).



Şekil 2.11. Bir insan spermatozoonunun diyagramı (24)

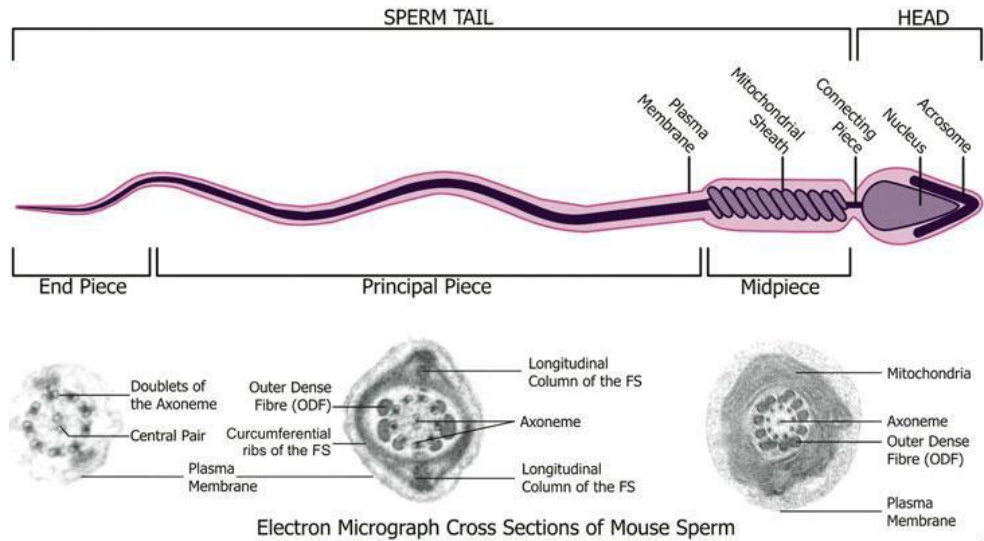
4. Olgunlaşma dönemi: Spermiyogenezin son dönemidir. Bu dönemde stoplazma miktarı azalır. Fazla stoplazmayı içeren kısım boğumlanarak ayrılır ve Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatidlerin birbirleri ile olan bağlantıları kaybolur, Sertoli hücrelerinden ayrılarak lümene düşerler (24, 40, 44).



Şekil 2.12. Spermiyogenez süreci (40).

Olgun (Matür) Spermin Yapısı

Olgun insan sperminin uzunluğu ortalama 60 μm kadardır. Baş kısmının uzunluğu yaklaşık 4,5 μm , genişliği 3 μm ve kalınlığı 1 μm kadardır. Şekli yassı ve sivridir. Nükleusun ön kısmının üçte ikisini hyalüronidaz, asit fosfataz, akrozin, nöraminidaz gibi enzimler ihtiva eden akrozomal kep ile örtülüdür. Bu akrozomal enzimler spermin zona pellucidayı geçebilmesi için gereklidir. Sperm ovuma temas edince bu enzimler salınır ve akrozom reaksiyonu başlamış olur. Daha sonra meydana gelen karışık olaylar zinciri ovumun tek bir sperm tarafından geçilmesine ve fertilizasyona yardımcı olur (Şekil 2.13).

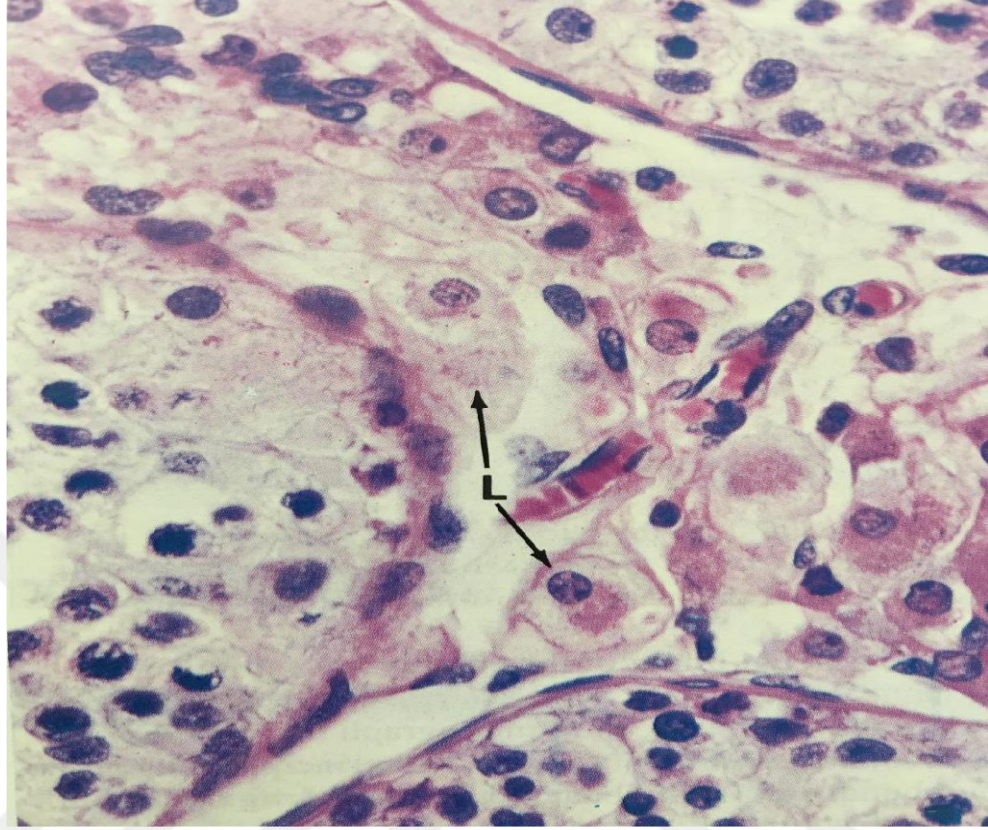


Şekil 2.13. Matür spermin yapısı (49).

2.3.2. İnterstisyel doku

Seminifer tübüllerin arasında bulunan çok sayıda kan ve lenf damarlarını, sinir liflerini içeren gevşek bağ dokusu özelliğindeki alandır. İnterstisyel dokuda normal bağ dokusu hücreleri olan fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajlar gibi hücrelerin dışında Leydig hücreleri (interstisyel hücreler) denilen, testosteron hormonu üreten hücreler de vardır. İnterstisyel alanda tek tek ya da gruplar halinde bulunan Leydig hücreleri yuvarlak ya da poligonal şekilli, asidofil stoplazmalı ve yuvarlak ökromatik nükleuslu hücrelerdir (Şekil 2.14). Steroid sentezleyen Leydig hücrelerinin stoplazmalarında tipik olarak çok sayıda lipid damlası vardır (44). Leydig hücrelerinin stoplazmalarında da steroid sentezleyen diğer tüm hücrelerde olduğu gibi agranüler endoplazmik retikulum fazlaca bulunur. Ayrıca stoplazmalarında tübüloveziküler kristalleri olan çok sayıda mitokondriyon, lipofuksin pigmenti ve çubuk şeklinde fonksiyonu bilinmeyen bir protein ürünü inklüzyon olan “Reinke kristalleri” görülür. Leydig hücre tümörlerinin yaklaşık %50’sinde bu yapılara rastlandığından dolayı tanısal amaçlı olarak da kullanılabilirler (24, 44).

Sentezledikleri testosteron hormonunu etrafındaki kan kapillerlerine boşaltan Leydig hücreleri böylece endokrin sekresyon yapmış olurlar. Embriyonik dönemde testis gelişimi için testosteron ve diğer androjenlerin olması gerekir. Pubertede ise bu hormonlar sperm üretimi ve aksesuar bezlerin sekresyonunun başlaması, ayrıca sekonder seks karakterlerinin gelişimi için şarttır. Erişkin dönemde ise spermatogenezin, aksesuar bezlerin sekretuar aktiVit Elerinin ve sekonder seks karakterlerinin devamı için gereklidir (24, 40, 44).



Şekil 2.14. Testisin interstisyel (Leydig) hücreleri (46).

2.4. Testis Fizyolojisi

Testisler vücudun dışında skrotum denilen torba şeklindeki yapının içindedirler. Ağırlığı 35-45 g, uzunluğu 4-6 cm ve hacmi 20-25 ml dir. Yaşlandıkça hacmi azalır.

Embriyonal dönemin başlangıcında vücut boşluğunda bulunan testisler, doğumdan önce yaklaşık 7-8. aylarda skrotuma inerler. Skrotum sıcaklığı vücut sıcaklığının yaklaşık 2 °C altındadır. Testislerin karın boşluğunun dışında bulunmasının sebebi spermatogenez için daha düşük sıcaklığın (32-35°C) gerekliliğidir. Bu düşük sıcaklığı sağlayan spermatik arterler ve venler arasındaki zıt akımdır. Sağlanması gereken bu sıcaklık çok önemlidir çünkü testislerdeki sıcaklık artışı, seminifer tübül hücrelerine hasar verecek spermatogenez engelleyebilir.

Spermilerin üretiminden, depolanmasından, salgılanmasından ve testosteron üretiminden testisler sorumludur. Sertoli hücreleri germ hücrelerinin etrafındaki destek dokusunu oluşturur. Seminifer tübüller bazal membran ve peritübüler hücre tabakası ile çevrilidirler. Peritübüler hücreler, peristaltik hareketten sorumlu hücrelerdir. Bu hücreler kasılarak spermilerin epididime doğru iter(50).

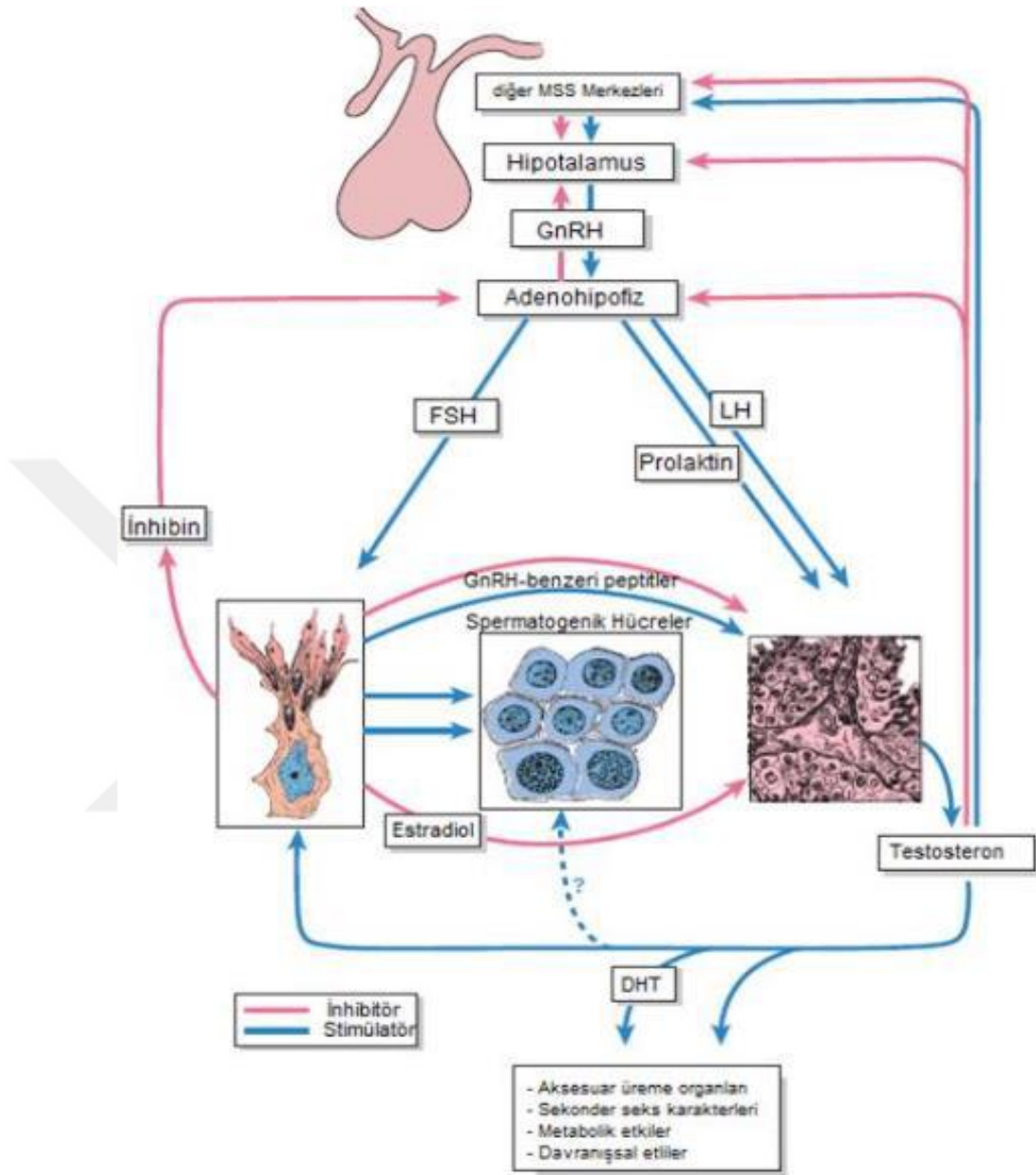
FSH: Hipotalamustan salgılanan gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH) hipofizin ön lobundan follikül uyarıcı hormonu (FSH) salınımını stümüle eder. FSH Sertoli hücrelerinden inhibin ve aktivin salgılanmasını uyarır. Ayrıca Androjen bağlayıcı protein (ABP)'in salgılanmasında stimüle eder. ABP, androjenleri bağlayarak oluşturduğu kompleks ile spermatogenik hücreler için gerekli olan yüksek androjenik çevreyi oluşturur. Spermatogenez östrojen ve progesteronlarla inhibe edilirken testosteron ile uyarılır. Spermatozoonlar epididimise, testiküler sıvı içinde taşınırlar. Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilen Testiküler sıvı; proteinler, steroidler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içerir.(50)

Inhibin: Bu hormon Sertoli hücrelerinde sentezlenen bir proteindir ve hipofizden FSH salınımını inhibe eder. İnhibin devamlı salınırsa FSH ı baskılar. Üreme hücresi sayısı azalınca da FSH artar (24).

LH: Hipotalamustan salgılanan gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH) hipofizin ön lobundan luteinize edici hormon (LH) un salgılanmasını uyarır. LH da Leydig hücrelerinde testosteronun sentez ve salınımını uyarır. LH, prolaktin ile birlikte Leydig hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde görev alır. Prolaktin, LH reseptörünün gen ekspresyonunu düzenler. Prolaktin artışı, Leydig hücrelerinden androjenlerin sentezini azaltarak spermatogenezi zayıflatabilir ve bu da infertiliteye neden olur. Hipotalamo-hipofizer kontrol ile testosteron, negatif geri bildirimde bulunarak LH sekresyonu 2 yolla baskılar;

1. Ön hipofize direk etki ederek, gonadotropik hücrelerin GnRH'a cevap olarak daha az salgı yapmaları sağlanır.

2. Hipotalamusu etkileyerek GnRH nöronlarının salgı şiddetini azaltır ve bu da gonadotropinlerin sekresyonunu azaltır (24, 50) (Şekil 2.15)



Şekil 2.15. Testiküler fonksiyonun hormonal düzenlenmesi (24).

2.5. Pestisitler

İnsanların gıdalarını, sağlıklarını ve yaşam konforlarını tehlikeye atan böcek, kemirici, yabani ot, mantar, parazit gibi canlılara “pest” denir. Bu zararlı canlılarla mücadelede onların üremesini önleyen, uzaklaştıran veya popülasyonlarını azaltan ürünlere ise “pestisit” denir (51). Pestisitler tarım alanlarında kullanıldığı gibi ayrıca evlerde, açık arazilerde ve kamusal alanlarda da kullanılmakta. Pestisitler sıvı, granül, pellet, çözünabilir toz, gaz gibi farklı formlarda üretilmektedir (52). Dünyadaki İnsan nüfusu her geçen gün artmakta

ve bu artışla paralel olarak yiyecek üretimi ve tüketimi de aynı oranda artmaktadır. Bu talebe karşılık vermek, üretimi artırmak ve ürünlerin yetismesi veya depolanması esnasında ortaya çıkacak zararlılardan korumak için tarımsal alanda modern teknoloji ve bu teknolojinin bir parçası olan pestisitler kullanılmak durumundadır.

Pestisitlerin Kullanım alanlarına göre sınıflandırılması:

Herbisitler: Yabani bitkiler ile mücadelede,

Akarisitler: Kene, uyuz gibi akarlarla mücadelede,

Mollusisitler: Salyangoz gibi yumuşakçalarla mücadelede,

Nematisitler: Nematodlarla mücadelede,

Ovisitler: Akarların ya da böceklerin yumurtalarıyla mücadelede,

Rodentisitler: Fare gibi kemirgenlerle mücadelede,

İnsektisitler: Böceklerle mücadelede,

Fungisitler: Küf, pas ve mantarları öldürmede,

Algisitler: Yüzme havuzu, göl, kanal, su tankları ve diğer alanlardaki alglerle mücadelede kullanılan pestisitlerdir.

Pestisit kullanımı çok eski tarihlere dayanır (51, 53). M.Ö. 1500’lerde yazılmış olan Ebers papirüslerinde pirelerden korunmak amacıyla hazırlanan preparat formülleri bulunmaktadır. M.Ö. 1000 li yıllarda Aristoteles, Homer ve Kato’nun eserlerinde çeşitli yağ spreyleri, sülfür merhemleri, tuz ve fumigantların tarımda kullanıldığına dair ibareler vardır (51, 53). Yunan hekim Dioscorides tarafından kükürt ve arseniğin toksik özellikleri olduğu bildirilmiştir (54). 17. Yüzyıldaki tarım devrimiyle kullanılan kimyasalların sayısı ve çeşidi 1940’lı yıllara kadar her geçen gün artmıştır. 1600’lerde karıncalara karşı bal ve arsenikten yapılan bir karışım, bitki bitine karşı da tütün kullanılmıştır (52, 54). 1890’lı yıllardan sonra civa türevleri fungusit olarak kullanılmıştır (54). 19. Yüzyılın sonlarına doğru bakır arsetoarsenit, kalsiyum arsenat, nikotin sülfat ve sülfür gibi kimyasallar Amerikalı çiftçiler tarafından tarlalarda kullanılmış, ancak ilkel kimya ve uygulama metodları yüzünden tatmin edici sonuçlar alınamamıştır (55). Pestisitlerin kullanımı tarımsal üretimin artmasına paralel olarak II. Dünya Savaşından sonra artış göstermiştir (56) ve özellikle dikloro difenil trikloroethan (DDT), zararlılara karşı olağanüstü geniş spektruma sahip olması sayesinde, piyasada geniş bir yer bulmuştur. Ancak, DDT’in kontrolsüz ve sürekli kullanımı zararlıların direnç kazanmasına, hedef dışı bitki ve hayvanların zarar görmesine, pestisit kalıntılarının

risk oluşturmasına neden olmuştur (51, 57). Bazı bilim insanlarına göre; dünya nüfusunun 2025'e kadar sekiz milyarı aşacağı tahmin edilmekte ve bu nüfusla gıda ve tekstil ihtiyaçlarının karşılanması için daha fazla tarımsal ürüne gereksinim olacaktır. Bu da pestisit kullanımının zamanla artacağına işaret etmektedir (57). Pestisitlerin zararları, kimyasal özelliğine ve derişimine göre değişim gösterir. Bununla birlikte, maruziyetin miktarı, süresi ve yolu toksik etkiyi belirleyen ana etmenlerdir. Pestisitlere maruziyet yolları; oral, inhalasyon ve dermal yolla olur (52). Oral maruziyet genelde siusid amaçlı ya da yanlış ve dikkatsiz saklama koşulları sebebiyle kaza sonucu oluşmaktadır (58). Bununla birlikte solunum ve deri yoluyla da pestisit uygulayıcıları, tarım işçileri yüksek risk altındadır (52).

Amerika Birleşik Devletleri'nde pestisitlerle ilgili denetimler Amerika Birleşik Devletleri evre Koruma Ajansı (US Environmental Protection Agency, EPA) tarafından yapılır (51). Ülkemizde ise Gıda Tarım ve Orman Bakanlığı tarafından yapılır. Avrupa Birliğinde pestisitlerin ruhsatlandırılması için öncelikle etken maddelerin Avrupa Komisyonuna bağlı Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (European Food Safety Authority, EFSA) tarafından onaylanması gerekmektedir (59). EFSA veritabanında pestisit olarak onaylanmış 491 etken madde bulunmaktadır (European Commission 2016). Kabul edilebilir günlük alım (Acceptable daily intake, ADI) değeri pestisitler için Dünya Sağlık rgt (DSÖ, World Health Organisation, WHO) tarafından ilan edilmiştir (58, 60).

Türkiye'de pestisit kullanımı Tablo 2.1'de görüldüğü üzere en yüksek kullanım fungusitlerdedir. İnsektisitler genellikle 2. Sırada yer almaktadır. (TK 2018) (Tablo 2.1.).

Tablo 2.1. Türkiye'de pestisit kullanımı verileri (TÜİK 2018)

(Ton)

	İnsektisitler	Fungusitler	Herbisitler	Akarisitler	Rodentisitler	Diğer	Toplam
2006	7 628	19 900	6 956	902	3	9 987	45 376
2007	21 046	16 707	6 669	966	51	3 277	48 716
2008	9 251	16 707	6 177	737	351	5 613	38 836
2009	9 914	17 863	5 961	1 533	78	2 302	37 651
2010	7 176	17 396	7 452	1 040	147	5 344	38 555
2011	6 120	17 546	7 407	1 062	421	6 978	39 534
2012	7 264	18 124	7 351	859	247	8 766	42 611
2013	7 741	16 248	7 336	858	129	7 128	39 440
2014	7 586	16 674	7 794	1 513	149	6 007	39 723
2015	8 117	15 984	7 825	1 576	197	5 327	39 026
2016	10 425	20 485	10 025	2 025	259	6 835	50 054
2017	11 436	22 006	11 759	2 452	236	6 209	54 098

2.5.1. İnsektisitler

İnsektisitler, başta tarımsal bitkilerin üretimini tehdit eden ve taşıdığı bulaşıcı hastalıklar nedeniyle böceklerin kontrolünde kullanılan, biyolojik veya sentetik olarak üretilmiş pestisitlerdir (61).

Başlıca insektisit grupları;

Organoklorlu insektisitler: Genellikle sinir sistemindeki uyarının blokajına neden olarak etkilerini gösterirler. En çok bilineni DDT'dir ve modern ilk insektisittir (57). Alman kimyacı Othmar Zeidler tarafından 1874'de keşfedilen DDT'nin 1939'da insektisit özelliğini bulan Dr. Paul Muller; sıtma, tifüs, sarıhumma ve diğer böceklerce taşınan birçok hastalığın kontrolünde etkili bir şekilde DDT'nin kullanılması nedeniyle 1948'de Nobel'in tıp ödülünü almıştır (37, 55, 62, 63). Ancak çözünürlüğünün fazla olması ve buhar basıncı ile güneş ışığına dayanıklı olması nedeniyle çevre kalıcılığı, yüksek lipofilik özelliği, metabolik stabilitesi sonucu hedef olmayan organizmalardaki biyobirikimi sebebiyle kullanımı yasaklanmıştır (62, 64).

Organofosfatlı insektisitler: Asetil kolin esteraz enzimini irreverzible inhibe eder. 2. Dünya Savaşı'nda Almanya'nın, zehirli olması sebebiyle üzerinde çalıştığı sarin, soman ve tabun gibi gazlar kimyasal silah amaçlı kullanılmıştır ve yapılan çalışmalar sırasında insektisit özelliklerinin de olduğu farkedilmiştir (63). Genel olarak omurgalılar için en toksik sınıftır ve stabil değildirler (62, 63).

Karbamatlar: Karbamik asit esteridirler. Memeliler üzerinde çok düşük oral ve dermal toksisiteleri vardır. Ancak böceklerle karşı geniş bir spektruma sahiptirler. Kolinesteraz enzim inhibisyonu yapar. Organofosfatlı insektisitlerin aksine bu durum geri dönüşümlüdür. Karbaril, metiokarb, primikarb bu gruptadırlar (57, 63).

Piretroitler: Piretrum analogu sentetik piretroitler; güneş ışığına dayanıklıdır ve birçok tarım zararlısı böceğe karşı da etkilidir. Tıpkı DDT benzeri etkileri vardır. Nöron membranında sodyum kanallarının sürekli açık kalmasına neden olurlar. Bu etkileri böceklerin hem periferik hem de merkezi sinir sistemi üzerinedir. Tekrarlayan impulslar üreterek sinir hücresinde paralyze neden olur. Alletrin (1. kuşak), tetrametrin (2. kuşak), permetrin (3. kuşak), sipermetrin, teflutrin (4. kuşak) bu gruba örnek verilebilir (55, 63).

Diğer grup insektisitler: Amitraz, foretanat gibi formamidin grubu insektisitlerdir. Norepinefrin ve serotoninin yıkımında görevli monoaminoksidaz enzimini inhibe ederek biyogen aminlerin birikimine, dolayısıyla da böceklerin hareketsiz kalarak ölmesine sebep olurlar. Özellikle organofosfat ve karbamat grubu insektisitlere dirençli zararlıların kontrolünde tercih edilirler. Dinokap gibi dinitrofenol grubu insektisitler Oksidatif fosforilasyonu inhibe ederek ATP oluşumunu önlerler. Tebufenpirad gibi pirazol grubu insektisitler mitokondriyal elektron transportunu inhibe ederek ATP yapımını bozarlar. Rotenon solunumla ilgili enzimleri inhibe ederek solunum fonksiyonlarında kayba, turuncgillerin kabuğundan elde edilen limonen periferik sinir sisteminin duyu sinirlerini etkiler (63).

Biorasyonel insektisitler: Doğal kaynaklı ve EPA tarafından biopestisit olarak isimlendirilen insektisitler de bulunmaktadır. Örneğin; mikrobiyal pestisitler (*Bacillus thuringiensis*, *Hirsutella thompsonii*, *Nosema locustae*, *Neoplectana carpocapsae*), biyokimyasallar ve bitkiye birleştirilmiş koruyucular. Zararlıya karşı direnç sağlayacak genin bitkiye aktarılması ilkesine dayanan transgenik pestisitler de diğer bir grup biorasyonel insektisittir (63).

Nikotinoid/Neonikotinoidler: Neonikotinoidlerin keşfi böceklerle modern mücadele tarihinde önemli bir dönüm noktasıdır. Doğal nikotin temel alınarak üretilmiştir. Tütünden elde edilen nikotin alkaloidi uzun yıllardan beri birçok böcek zararlısı ile mücadelede kullanılmakla birlikte özellikle yumuşak vücutlu tırtıl ve yaprak bitine karşı sıklıkla

kullanılmıştır. Ancak, günümüzde yüksek olan memeli toksisitesi nedeniyle yerini neonikotinoidler gibi yeni sentetik insektisitlere bırakmıştır.

2.5.2. Neonikotinoidler

Total insektisit piyasasının %15'inin üzerinde bir hacme sahiptirler. Dünyada ve ülkemizde sık kullanılan organofosfat ve karbamat grubu pestisitlerin yerini ışığa dayanıklı olmaları ve böceklerde, memelilere oranla yüksek toksisite göstermelerinden dolayı alan bu grup insektisitler, dünyada hayvan sağlığı ve ürün korunmasında sıklıkla kullanılan en yeni insektisit sınıfı olup EPA tarafından 2. ve 3. sınıf toksinler grubunda sınıflandırılmıştır (65).

Neonikotinoidler yapısal ve etkinlik olarak nikotine benzerler. Nikotin böcek nAChR'lerine bağlanarak insektisit etki gösterdiği raporlanmıştır. Fakat neonikotinoid insektisitlerle karşılaşıldığında nikotin, hedef olmayan canlılara ve özellikle memelilere yüksek toksisite gösterir (66). Nikotinler sadece böcek nAChR'lerine değil; aynı zamanda diğer hayvanların nAChR'lerine de etki ederek seçicilik göstermezler (67). Neonikotinoidler ise memelilerdeki nikotinik asetil kolin reseptörlerine ilgisi böceklerdekine göre daha düşük olduğundan böcekler karşı yüksek toksisiteye, memelilere ve sucul organizmalara karşı düşük toksisiteye sahiptir (68, 69).

Neonikotinoid grubu insektisitlerin özellikle DNA hasarı (70), kardeş kromatid değişimi mikroçekirdek oluşumu, kromozal anomalilere neden olabildiği düşünülmektedir (71).

Neonikotinoid grubu insektisitler; N-nitroguanidinler (imidakloprid, tiyametoksam, dinotefuran ve klotianidin) ve N-siyano-aminidler (acetamiprid ve tiakloprid) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır (55).

Neonikotinoid insektisitlerle zehirlenme vakaları rapor edilmiştir. Mesleki maruziyet sonucu oluşan vakalar kısıtlı olsa da imidakloprid ile siusid amaçlı 13 vaka (72), acetamiprid ile 2 akut zehirlenme vakası (73) rapor edilmiştir. Bu olguların hepsinde serumda yüksek acetamiprid seviyesi ölçülmüştür. Bulantı, kusma, kas güçsüzlüğü, hipotermi, konvülsiyon gibi klinik belirtilerle beraber; taşikardi, hipotansiyon, elektrokardiyogram değişiklikleri, hipoksi ve susuzluk gibi akut organofosfat zehirlenmesi benzeri semptomlar gözlenmiştir. Görülen bu semptomlar için septomatik tedavi uygulanmış olup her iki olgu da herhangi bir komplikasyon gelişmeden 2 gün sonra hastalar taburcu edilmiştir (73).

2.5.3. Acetamiprid

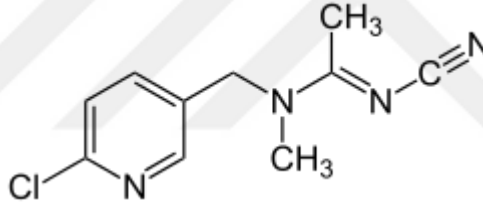
Acetamiprid, zararlı böceklerle karşı sıkça tercih edilen bir neonikotinoid insektisittir. İmidakloprid sonrası ikinci üretilen neonikotinoiddir. İlk kez “Mospilan” ticari ismi ile Japonya’da satılmaya başlanmıştır (74, 75). Yapraklı sebzelerde, lahana türlerinde, taneli meyvelerde, üzümelerde, pamuk, tütün, patates, domates, biber, fındık, turunçgil, süs bitkileri ve çiçekler gibi ürünleri olumsuz etkileyen zararlıları yok etmede kullanılır. Örneğin: pamuk tarlalarında, yaprak biti (*Aphis gossypii*), yaprak piresi (*Empoasca spp.*), beyazsinek (*Bemisia tabaci*) vb böceklerin bertarafında kullanılmaktadır. Acetamiprid nörotoksik etkiye sahip olup, canlıların sinir sisteminde tahribata yol açmaktadır (76).

Ticari Adı: Mosetam, mospilan, malcon, hekplan, akira, neoplan, mostar

Kimyasal Adı: (*E*)-*N*¹-[(6-chloro-3-pyridyl)methyl]-*N*²-cyano-*N*¹-methylacetamidine

Kapalı Formülü: C₁₀H₁₁ClN₄

Açık Formülü:



Şekil 2.16. Acmp’in kimyasal yapısı

Erime Noktası: 98.9 °C

Molekül Ağırlığı: 222.68 g/mol

Cas NO: 135410-20-7

Pestisit Tipi: İnsektisit

Kimyasal Sınıf: Neonikotinoid insektisit

Fiziksel Görünüm: Beyaz kristal

Koku: Kokusuz

Fotokararlılık: Günes ışığında kararlı.

Çözünürlük: Distile suda 4250mg/L (25 °C)

pH:5 3480mg/L (25 °C)

pH:7 2950mg/L (25 °C)

pH:9 3960mg/L (25 °C)

Aseton, metanol, etanol, diklormetan, kloroform, asetonitril, tetrahidrofuran içinde çözünür.

Atmosferde fotokimyasal olarak üretilen hidroksil radikalleriyle buhar haldeki acetamiprid reaksiyona girerek bozunur; havada gerçekleşen reaksiyonla yarılanma ömrünün 5 saat olduğu düşünülmektedir. Acetamipridin 34 gün olarak rapor edilen sudaki fotoliz yarılanma ömrü temel alındığında atmosferde doğrudan fotolize uğrayabileceği bildirilmektedir. Aerobik toprak metabolizması çalışmalarından rapor edilen acetamipridin yarılanma ömrü; <1 günden 8,2 güne kadar değişir. Buna dayanılarak acetamipridin suda biyodegrede olması beklenir (77).

Yapılan çalışmalarda acetamipridin 18 günden az yarılanma ömrü ile kalıcı olmadığı, yeraltı sularına geçme potansiyelinin düşük olduğu, düşük derinliklere süzülümünün anlamlı olmadığı sonuçlarına ulaşılmıştır. Bozunma ürünlerinin yeraltı sularına geçme potansiyeli acetamipriden daha fazladır. Acetamipridin oksijenli toprak metabolizması ile meydana gelen ana bozunma ürününün çevredeki dayanıklılığı ve hareketliliği yeraltı sularının kirlenmesine neden olabilir ancak tüm kanıtlar bu tür bir kirlenmenin toksikolojik açıdan anlamlı olmadığını göstermektedir (78-80).

Acetamiprid ile yapılan çalışmalarda tek doz 1-50 mg/kg vücut ağırlığı (v.a.) (yaklaşık %96 saflık) ve tekrarlayan 1 mg/kg v.a. (minimum %60 saflık) dozlarda oral uygulama sonrası hızlı ve geniş çapta absorbe olduğu tespit edilmiştir. Acetamiprid özellikle karaciğer, böbrek, adrenal ve tiroid bezlerinde yüksek konsantrasyonlara ulaşarak tüm vücuda dağılım gösterir. Uygulama sonrası 24 saat içinde idrarla hızlı bir şekilde atılır ve 96 saat içinde %90'ından fazlası elimine olur. Kemirgenlerde tek doz (1 veya 50 mg/kg v.a.) oral uygulama sonrası acetamipridin geniş çapta metabolize olduğu tespit edilmiştir. Uygulanan dozun %50-70'i metabolitleri halinde idrar ve feçes ile atılırken tekrarlayan uygulamalarda dozun %90'dan fazlası metabolitleri halinde atılır (81).

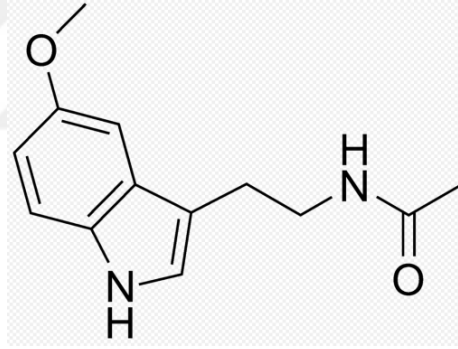
Acetamipridin atık çevresel seviyeleri hakkında çok az rapor vardır. Bir çalışma, Pekin ve Shandong İllerinde karpuz ve topraktaki maksimum acetamiprid kalıntılarının sırasıyla 0,01 ve 0,3 mg / kg olduğunu bildirmiştir. Bu, acetamiprid kalıntılarının çevrede ve yiyeceklerde kalabileceğini ve bu kalıntıların insan vücudunda birikme ve insan sağlığını etkileme potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir (81).

2.6. Melatonin

Fransız düşünür Rene Descartes'ın pineal bezi "ruhun tahtı" olarak tanımlamasından yaklaşık üç yüzyıl sonra 1954'de Kitay ve Altschule'nin "The Pineal Gland" isimli kitabı ve

1958'de Aaron Lerner tarafından pineal bezden salgılanan melatoninin yapısının ortaya konulması modern anlamda pineal bez araştırmalarının öncüsü olmuştur (82). Melatonin (N-asetil-5-metoksi triptamin) başlıca epifiz bezinin pineolasit denilen hücrelerinde üretilir. Melatonin diğerk birçok dokuda da üretilen, uyku, üreme, sirkadiyen ritim ve immunité gibi birçok biyolojik işlevin düzenlenmesinde rol oynayan bir hormondur. Doğal bir nörotransmitter olan melatonin, memelilerin yanı sıra bitkiler tarafından da kullanılmaktadır (82, 83).

Melatonin, uyku ritminin düzenlenmesi, kan basıncının regülasyonu, mevsimsel üreme gibi daha birçok fizyolojik olayların sirkadiyan ritimlerinin düzenlenmesinde rol alır (84). Melatonin seviyesi geceleri, gündüze oranla daha fazladır. Melatonin bu özelliğı ile çevresel fotoperiyodik değışimler ile ilgili iç organlara bilgi vermesi hususunda iyi bir sinyal molekülüdür (64).



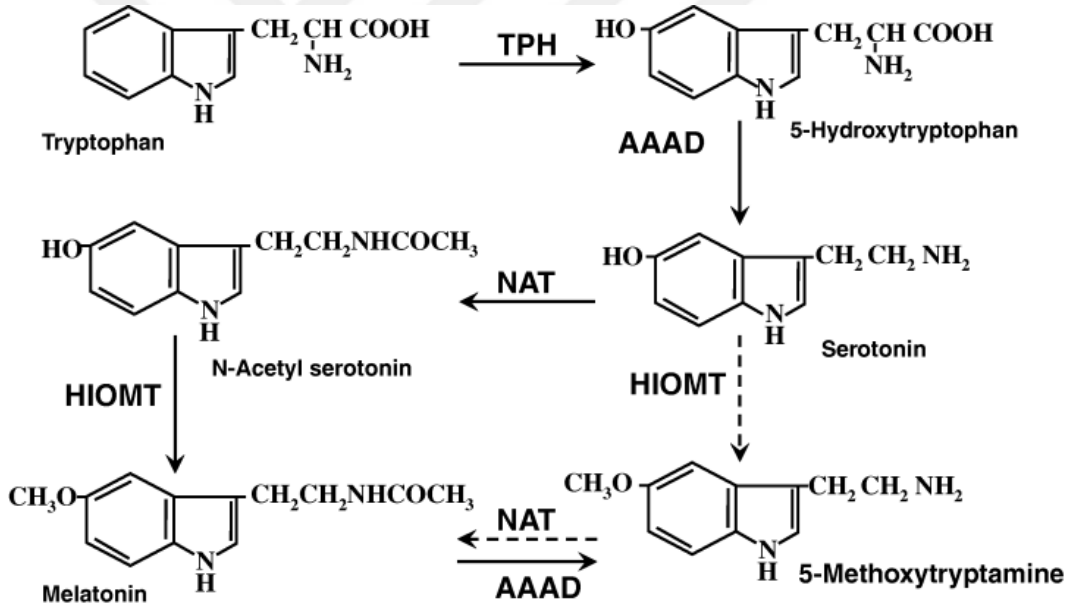
Şekil 2.17. Melatoninin kimyasal yapısı (84).

2.6.1. Melatonin sentezi ve düzenlenmesi

Başlangıçta, melatoninin omurgalıların yalnızca epifiz bezlerinde sentezlendiğıne inanılıyordu. Çalışmalar birçok ekstrapineal doku ve organın melatonin sentezleme kapasitesine sahip olduğunu göstermiştir. Bunlar retina (85), siliyer cisim (86), lens (87), beyin (88), timus (89), solunum yolu epiteli (90), kemik iliğı (91), bağırsak (92), over (93), testis (94), plasenta (95), lenfositler (96) ve cilt (97). Bağırsaktan üretilen melatoninin, pineal bez tarafından üretilenlerden iki kat daha büyük olduğu tahmin edilmektedir (98). Serumdakilere kıyasla yüksek oranda melatonin seviyeleri kemik iliğinde, safrada ve sıçan ve koyunlarda üçüncü ventriküler sıvıda tespit edilmiştir (91, 99).

Melatonin, esansiyel bir aminoasit olan triptofandan sentezlenen bir indol bileşiğidir. Triptofan büyük bir kısmı (%80) pineal bez tarafından kullanılır. Gece boyunca yaklaşık 30 mg melatonin sentezlenir (100).

Dolaşımdan hücre içine alınan triptofan, ilk olarak triptofan 5-hidroksilaz enzimi tarafından 5-hidroksitriptofan'a, 5-hidroksitriptofan ise L-aromatik aminoasit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) ile 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) dönüştürülür. Serotonin de N-asetiltransferaz (NAT) ile N-asetilserotonin'e ve son olarak N-asetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enziminin melatonin'e dönüştürülür (Şekil 2.19) (101-103). NAT genellikle melatonin biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim olarak belirtilir (104) (Şekil 2.18).



Şekil 2.18. Melatonin'in biyosentetik yolları

TPH, triptofan hidroksilazı; AAAD, aromatik amino asit dekarboksilaz; NAT, N-asetiltransferaz; HIOMT, hidroksiindol O-metiltransferaz (105).

Pinealositlerin ışığa duyarlı olması nedeniyle engellenen melatonin üretimi karanlıkta artmaktadır. Melatonin üretimi gece saat 20:00-21:00 saatleri arasında artmaya başlar ve 01:00-03:00 saatleri arasında maksimum seviyeye ulaşır. Sabah saat 05:00-07:00 arasında üretimi giderek azalarak bazal seviyeye düşer (106, 107). Melatonin üretiminin biyolojik saate bağlı gerçekleştiği ve nokturnal bir döngü izlediği bilinmektedir. Beyinde biyolojik ritmin düzenlenmesinden sorumlu merkez olan suprakiazmatik nükleus (SKN) pineal bezden

melatonin salınımını da kontrol etmektedir (108). SKN'dan gelen ve pineal bezde sonlanan postganglionik sinir uçlarından salınan norepinefrin ile pinealosit membranındaki $\alpha 1$ ve $\beta 1$ adrenerjik reseptörler uyarılarak hücre içi cAMP artışı olur. Bu da melatonin yapım hızını düzenleyen N-asetiltransferaz enzim etkisini artırır, sonuçta serotoninden melatonin sentezi ve salgılanması artar (109).

Melatonin seviyelerinin ışık, ısı, gel-git gibi fotoperiyodik çevrenin etkisi altında olduğu gibi β -bloker gibi ilaçlardan da etkilendiği düşünülmektedir. β -bloker kullananlarda nokturnal melatonin seviyesinin azaldığı ve uyku uyanıklık bozuklukları olduğu görülebilmektedir. β -bloker dışında noradrenalin ve serotonin metabolizması üzerinden etki eden birçok ilaca bağlı olarak da seviyelerinde değişme görülebilmektedir. Bunlardan NSAI, SSRI, SNRI, nöroleptikler, kalsiyum kanal blokerleri, benzodiazepinler, steroidler gibi ilaçlar, alkol ve sigara pineal fonksiyonları stimüle ya da inhibe ederek melatonin plazma düzeylerini etkilerler (110).

Melatoninin, üç aydan küçük çocuklarda salınımı çok azdır. Yaşla birlikte salınımı artar ve sirkadiyen ritim kazanır. Serum düzeyi 1-3 yaşlarında gece en yüksek iken (325 pg/ml veya 1400 pmol/L) yaş ilerledikçe yavaş bir şekilde düşer. Genç erişkinlerde gündüz ve gece doruk değerleri 10 ve 60 pg/ml (40-260 pmol/L) dir. Yaşlanma ile melatonin sentezinde azalma görülür (111). Cinsiyetin melatonin salınımı üzerine etkisi yoktur (112). Yoğun oksidatif stres, dolaşımdaki melatonin seviyelerinin hızlı bir şekilde düşmesine neden olur (113).

2.6.2. Melatonin metabolizması

Melatonin üretildikten sonra depolanmaz. Doğrudan kan dolaşımına ulaşır ve vücutta tüm biyolojik sıvılara ve dokulara dağılır. Melatonin, hem hidrofilik hemde lipofilik olduğu için, birçok vücut sıvısı ve dokuda (beyin omurilik sıvısı, tükürük, lenf, amniotik sıvı, idrar, sperma, retina ve siyatik sinir) varlığı gösterilmiştir. Ayrıca melatonin anneden fötüse plasenta yoluyla yeni doğanlarda ise sütle geçmektedir (114, 115). Melatoninin yarılanma ömrü 30 ile 60 dakika arasındadır. Ekzojen alınan melatoninin yarılanma ömrü ise 12 ile 48 dakika arasında değişir. Ekzojen olarak verilen melatonin de endojen melatonin gibi aynı yolları kullanarak metabolize olur (116).

Melatonin % 90'ı karaciğerde hidroksilasyona (6-hidroksimelatonin) uğrayarak hızla metabolize olur ve sülfürik ya da glukuronik asit ile konjuge olduktan sonra idrarla atılır.

Melatoninin idrardaki başlıca metaboliti 6-sülfatoksimelatonin'dir ve idrardaki düzeyi serum melatonin düzeyi ile yakın ilişkilidir (115). Ayrıca melatonin böbreklerde de metabolize olur. ise idrarda bulunan melatonin hormon metabolitidir(103, 114). 6-sulfatoksimelatonin, özellikle çocuklarda epifiz bezi fonksiyonun değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (117). Son yıllarda tükürük melatonin düzeyi de pineal fonksiyonların bir göstergesi olarak kabul görmektedir (118).

2.6.3. Melatoninin etkileri

Melatoninin insan ve memelilerde G proteinine bağlı 2 farklı reseptörü bulunmuştur. (MT 1 ve MT2). MT1, hipofizin pars tuberalisinde ve suprakiazmatik nukleusta bulunmuş, MT2 ise retinada bulunmuştur (119). Melatoninin ritmik özelliğe sahip termoregülasyon, enerji metabolizması, sirkadiyen ritm, üreme ve uyku kontrolü gibi birçok biyolojik fonksiyon üzerine etkilidir (112, 120, 121). Melatonin hücre zarları ve vücuttaki birçok bariyeri kolayca geçebilen güçlü bir serbest radikal süpürücü ve geniş spektrumlu bir antioksidandır (122, 123). OH, O₂⁻, ve NO içeren radiakal oksijen ve nitrojen türlerinin doğrudan temizleyicisidir. Melatonin diğer antioksidanlarla beraber onların etkilerini de artırarak etki gösterir (124). Melatoninin antioksidan özelliği vitamin E'nin iki katı kadar olduğu ve en etkili lipofilik antioksidan olduğu ispatlanmıştır (125). Melatonin'in diğer antioksidanlardan bir farkı da, metabolitlerinin de radikal süpürücü ve uzaklaştırıcı olmasıdır (105). Melatoninin hücre içerisinde seviyelerini arttırdığı antioksidan enzimler arasında mitokondriyal ve sitozolik süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz bulunmaktadır. Bunların yanında melatonin nöronal ve indüklenebilir nitrik oksit sentetaz enzimleri gibi hücre ölümü mekanizmalarında rolü olan enzimlerin miktarlarını da düşürdüğü yapılan araştırmalarla gösterilmiştir (126, 127).

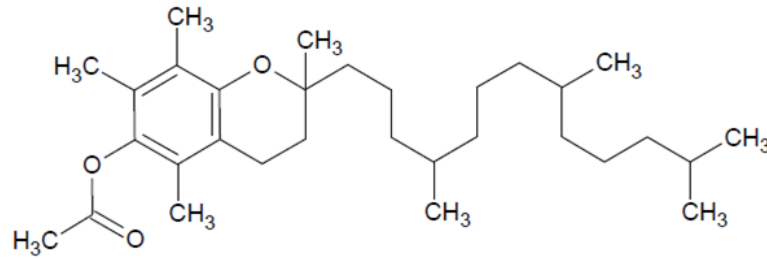
Melatoninin Anti-inflamatuar etkinliği vardır (14). Preklinik çalışmalarda, melatonin sitokin üretimini arttırdığı ve bu etkiyle kazanılmış immun yetmezlikleri etkisizleştirdiği düşünülmektedir. Yapılan bazı çalışmalarda melatoninin, viral (HIV gibi), ve bakteriyel enfeksiyonlarla mücadelede ve kanserle mücadelede kullanılabileceği ileri sürülmektedir (128).

Ek olarak, melatonin üretimi, sıçanlarda diyet kısıtlaması ve insanlarda egzersiz gibi düşük yoğunluklu stres tarafından düzenlenebilir. Yoğun oksidatif stres, dolaşımdaki melatonin seviyelerinin hızlı bir şekilde düşmesine neden olur (129).

Melatoninin, hipotalamus-hipofiz-gonad aksında baskılayıcı bir etkisi vardır. Doğrudan hipotalamustan GnRH ve hipofizden de LH salınımını baskılar. Leydig hücrelerinde melatonin' in bağlandığı reseptörler vardır ve Leydig hücrelerinde testosteron sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir. Melatonin ayrıca endorfin gibi GnRH salgılanmasını azaltan opioid maddelerin salgılanmasını da arttırmaktadır (13, 103, 130).

2.7. Vitamin E

1922 yılında Bishop ve Evans yaptıkları bir çalışmada ratları ekşimiş yağ eklenmiş yemle beslemişler ve ratlarda fetal reabsorbsiyon gelişmiş ve bu olumsuz etkinin sebzelerde bulunan bir madde tarafından önlenebildiğini tespit etmişler. Sebzelerde bulunan bu bilinmeyen bileşiğe 1924 yılında Sure tarafından E vitamini adı verilmiştir. Evans ise bu bileşiği ratların diyetine eklediği bir çalışmasında ratların üreme performanslarında belirgin bir artış gözlemlemiş ve bu bileşiği (tokos = doğurmak, phero = taşımak ve bileşiğin bir alkol olması nedeniyle “tokoferol” olarak isimlendirmiştir (Şekil 2.20) (131). 1937 ve 1938 yıllarında alfa tokoferolün yapısı Erhard Fernholz tarafından keşfedilmiş; α -tokoferolün kimyasal olarak sentezlenmesi ise 1938'de Karrer ve ark. tarafından başarılmıştır (132). Daha sonra gama ve delta tokoferol adları verilen iki grup daha bulunmuştur. Plazmadaki E vitamininin %80-90' ını α -tokoferol oluşturur ve dokudaki esas E vitaminidir. Bunun nedeni α -tokoferol'ün LDL içinde öncelikle tekrar vücut içine alınmasına tokoferol bağlayıcı protein (TBP) yoluyla ve γ -tokoferolün karaciğerde çabuk yıkılmasına bağlıdır (133). α -tokoferol diyetle bulunan temel E vitaminidir ve kandaki miktarı γ -tokoferolden 4-10 kat fazladır. Tokoferoller yağda ve organik çözücülerin birçoğunda kolayca çözünür, suda çözünmez, yapışkan kıvamlıdır, açık sarı renktedir, ısıya, alkalilere, asitlere ve görünür ışığa dayanıklıdır. Ancak ultraviyole ışıkta kolaylıkla bozulmaktadır (134).



Şekil 2.19. Vitamin E'nin kimyasal yapısı

Süpürme, baskılama, onarma ve endojen savunmayı artırma mekanizmalarının hepsini kullanabilen son derece güçlü antioksidan olduğunu ortaya konulmuştur (135).

Yüksek antioksidan kapasitesi sahip olan E vitamini lipofilik özelliğinden dolayı kan-beyin bariyerini rahatlıkla geçerek santral sinir sisteminde güçlü nöroprotektif etki gösterir (136). Plasentayı kolaylıkla geçen E vitamininin büyük bir kısmı fetal beyin dokusu tarafından alınır (137). Deney hayvanları üzerinde yapılan bir çalışmada, düşük E vitamini seviyelerinin; glial hücre fonksiyonlarını, nörogenezi, miyelinizasyonu ve sinaptogenezi bozduğu tespit edilmiştir (138).

Oral yoldan alınan tokoferollerin birkaç saat içinde absorpsiyonu maksimum düzeydedir. intestinal sistemde safra ile emülsifiye edildikten sonra reabsorbe edilir (139). E vitamininin Plazmada taşınması β -lipoproteinlere bağlanarak olur. Tokoferolun safra ile atılım oranı çok düşük düzeydedir. Oral yoldan yüksek dozda tokoferol verildikten sonra insan idrarında metabolitleri tespit edilmiştir (140). E vitamini yaş ve cinsiyete göre farklı miktarlarda karaciğer ve yağ dokularında depo edilir. E vitamini düzeyi, dişi hayvanlarda erkek hayvanlardan daha yüksektir hipofiz bezi, adrenal bezlerde, uterus ve plasentada da yüksek miktarda depo edilmektedir (141). Antioksidan özelliği en yüksek olan tokoferol çeşiti α -tokoferoldur. α -Tokoferol lipofilik özellik göstermesinden dolayı membran spesifik bir antioksidan olup, plazma membranı, mitokondri ve mikrozom gibi membrandan zengin hücre kısımlarında bulunmaktadır (142). Hücresel hasarın oluşumunda önemli etken oksidatif strestir (143). E vitamini serbest radikalleri süpürücü etkiyle toplayarak membran fosfolipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonunu erken dönemde baskılar ve oksidatif strese karşı ilk savunma hattını oluşturur (135, 144) Ayrıca E vitamininin lipid peroksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırarak ve singlet oksijen, süperoksit ve hidroksil radikallerini indirgeyerek antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (145).

Rota ve ark., E vitamininden yoksun diyetle beslenen ratların hipokampal nöronlarında gen transkripsiyonunun, nörotransmisyon, beta amiloid metabolizmasının, apoptosiz ve hormon metabolizmasının önemli ölçüde bozulduğunu ortaya koymuşlardır (146). Deney hayvanlarındaki E Vit Eksikliği sonucu üreme sistemlerinde bozukluklar oluşur. Erkeklerde testis atrofisi, testiküler dejenerasyon ve sterilit (seminifer tübüllerin dejenerasyonu ve spermatogenezis yetersizliği) dişilerde ise; ovaryum fonksiyonunun

bozulmamasına rağmen uterus fizyolojisinin bozulması sonucu fetal rezorbsiyon ya da ölü doğumlar meydana gelir (134, 147). İnsanlarda uzun süren E vit yetersizliği, eritrositlerde hemoliz, pulmoner hipertansiyon, immun cevapta ve fagositik fonksiyonlarda azalma (148), düşük doğum ağırlıklı bebekler, irritabilite, hemolitik anemi, yeni doğanların kalbinde intraventriküler kanamaya neden olmaktadır (149, 150). Besinlerde bulunan selenyum, E vitamininin emilmesinde etkili bir maddedir (149). E vitamininden yoksun büyüyen çeşitli türdeki hayvanlarda geri dönüşümsüz infertilite ortaya çıkmıştır (151). Sığır Leydig hücrelerine kültür ortamında E vitamini eklendiğinde, hücrelerin yaşam süresi ve steroidojenik etkinliğinin arttığı gösterilmiştir (152).

Vitamin E insanlarda ve hayvanlarda fazla olması toksik etkiye neden olmamaktadır. E vitamini fazla alındığında birkaç gün içerisinde dışkı ve idrarla vücuttan uzaklaştırılır. Diğer yağda eriyen vitaminler gibi depolanmaz. Çok yüksek dozları bulantı ve ishal yapabilir. Yapılan hayvan deneylerinde yüksek dozda verilen E vitamininin büyümeyi durdurduğu, kasları zayıflattığı, alyuvar sayısını azalttığı ve kemikleşmeyi yavaşlattığı görülmüştür (142, 153).

2.8. Apoptozis

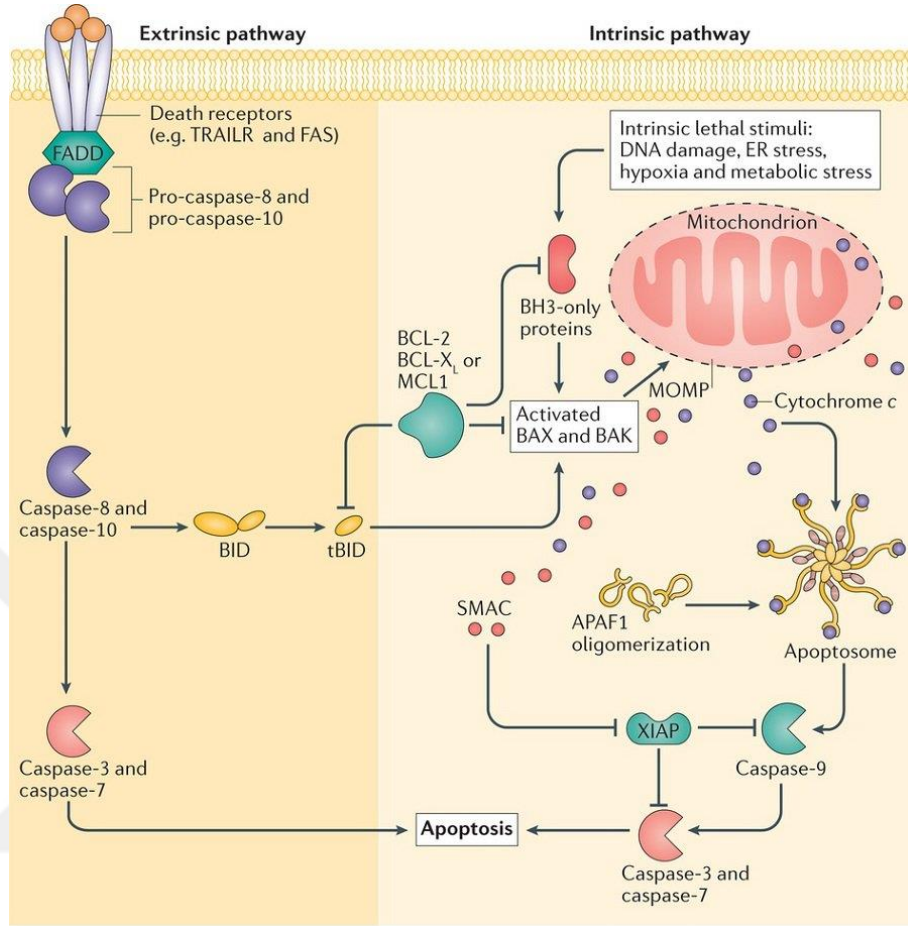
Kelime anlamı olarak Yunanca'da apo=ayrı ve ptosis=düşen kelimelerinin birleştirilmesi ile ağaç yapraklarının ayrılması "yaprak dökümü" anlamına gelir. Çok hücreli canlılarda görülen programlı hücre ölümü "Programmed cell death (PCD)" şeklindedir (154). Apoptozis ilk olarak, gelişen embriyoda keşfedilmiştir. Embriyonun şekillenmesi (morfogenez) için programlı hücre ölümü temel bir olaydır (155). Apoptozis olayı embriyonik aşamada kalmayıp ergin aşamasında da devam etmektedir (156). Apoptozisin moleküler mekanizması tam olarak çözülememiştir. Ancak, hücrelerin genetik olarak hafızalarında var olan intihar programının çeşitli sinyallerle, patofizyolojik koşullarla ve oksidatif stres gibi olaylar ile aktive olmasıyla başladığı düşünülmektedir (157). Apoptozis, hücrenin yaşam süresince yapım-yıkım dengesinin devamlılığında organizmada hasar görmüş veya organizma için tehlikeli olabilecek hücrelerin yok edilmesinde, hücre DNA'sında meydana gelebilecek mutasyonların kanser hücrelerinin oluşumuna neden olabileceği için bu hasarlı hücrelerin programlı olarak öldürülmesinde rol alır (156). Son yıllarda, bu dengenin bozulması bazı hastalıkların patogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir (158). Apoptozisde, hücre ölümü çevre dokulara hasar vermeksizin gelişse de, bazı

durumlarda dolaylı olarak çevre dokuda nekrozu başlatabilir ya da tam tersine nekroz apoptozis gelişmesine neden olabilir (159). Apoptozis, birçok fizyolojik ve patolojik durumda ortaya çıkabilir ve nekrozdan farklı olarak genellikle inflamasyon görülmez (160). Apoptozda, hücre ve çekirdeği, hacmini küçültürken yoğunlaşmaya başlar, hücre büzülür, hücre yüzeyinde kabarcıklar oluşur ve DNA' da kırılmalar meydana gelir (156).

Apoptozis, hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınmasıyla ekstrensek (Reseptör Aracılı Yol) , DNA hasarına genlerin yanıtıyla intrinsek (mitokondrial), veya proteolitik enzimlerin doğrudan hücreye girişiyle (Perforin – Granzim) olmak üzere 3 farklı şekilde gelişebilir (161). Apoptozun kontrolü Bcl-2 / Bax gen ailesi ile sağlanır. Bu gen ailesinin yirmi farklı üyesi belirlenmiştir ve bazıları apoptoz inhibitörüdür (antiapoptotik), bazıları da apoptozu uyarır ve proapoptotik genler olarak bilinir (162).

2.8.1. Kaspazlar

İntrinsek ve ekstrensek sinyallerle programlı hücre ölümünü uyararak hücre içi proteazlara kaspaz (Caspase: Cysteine-Containing Aspartate Specific Proteases) denir (106). Kaspazlar, proteolitik etki gösteren moleküllerden meydana gelen apoptozisde oluşan morfolojik değişiklikleri uyararak bir gruptur ve insan hücrelerinde bir düzineden fazla kaspaz olduğu bilinmektedir (163). Bu proteinler, inaktif yani zimogen (prokaspaz) formunda hücrenin stoplazmasındadırlar. Aktif merkezlerinde bulunan sisteinden dolayı sistein proteazlar olarak isimlendirilen enzim grubudurlar. Prokaspazların aktif kaspazlara dönüşümü hücreye ölüm uyarısının gelmesini takiben olur. Kaspazlar birbirlerini aktifleştirerek kaspaz aktivasyon serisinin oluşumunu başlatırlar. Kaspaz 2, 8, 9, 10 başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, Kaspaz 3, 6, 7 de efektör kaspazlar olarak bilinirler. Hücreye apoptotik sinyalin gelmesiyle aktive olan başlatıcı kaspazlar takiben efektör kaspazları aktif hale getirirler. Aktive olmuş efektör kaspazlar ise kendisi ile ilişkili proteinleri parçalarlar ve karakteristik apoptotik hücre morfolojisi şekillenmeye başlar. Bu morfolojik bozulmanın ana nedeni hücre iskeletinin ana bileşeni olan aktin filamanlarının yıkımıdır ki bu yıkım sonucu hücre normal morfolojisini kaybeder. Kaspazlara ihtiyaç duyulduğunda yeniden sentezlenmesine gerek yoktur. Apoptozisi tetikleyen başlangıç sinyalinin ardından, stoplazmadaki proenzimler aktif kaspaz formuna geçerler ve yaklaşık bir saat içinde hücre ölümü meydana gelir (164) (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. İntrensek ve Ekstrensek Apoptozis mekanizması

2.8.2. Apoptozis ve Testis

Testiste, hasarlı germ hücrelerinin toplam germ hücrelerine oranı yaklaşık %75 olup bu dejenere hücreler apoptoz mekanizması ile ortamdan uzaklaştırılırlar (165). Kerry ve ark. yaptıkları bir çalışmada Testiste sürekli olarak apoptozis gerçekleştiğini bildirmişlerdir (166). Spermatozaların gelişimi sürecinde germ hücrelerinde meydana gelen apoptozis çok önemlidir. Hormonal yetersizlik, kriptorşidizm, testiste artan kan akış hızı ve lokal ısı artışı, venöz staz ve buna bağlı hipoksi, testiküler hipotermi, gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH) antagonisti ile yapılan tedaviler ve stres gibi durumlar testiste apoptozu artıran etkenlerdir (167, 168). Seminifer tübül epitelinde meydana gelen çevresel faktörler de (ısı, radyasyon veya soğutma gibi) germ hücrelerinde apoptozisi tetikleyebilir (169).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Araştırma Türü ve Yapıldığı Yer

Bu çalışma, *Balb-c* fareler üzerinde yapılan deneysel bir çalışmadır. İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulundan alınan onay (Etik kurul protokol no: 2017/A-48) ile İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Çalışmada, bu merkezden temin edilen, ortalama yaşları 32 haftalık ve ortalama ağırlıkları 35-45 gr 50 adet *Balb-c* erkek fare kullanıldı. Fareler deney hayvanları merkezinde, havalandırması olan, 22 ± 2 °C'lik ısı ve mevsimsel gün ışığı ritmindeki aydınlatmalı odalarda özel kafeslerde üçerli veya dörderli gruplar halinde kafeslere konuldu. Bütün fareler standart pellet fare yemi ve çeşme suyu ile beslendi.

3.2. Deney Grupları ve Uygulamalar

Çalışmada %95 güven düzeyinde ve %80 güç ile 7 grubun karşılaştırılması için etki genişliği 0,6397 olarak alındığında grup başına gereken minimum örneklem genişliği 6 olarak hesaplanmıştır. Çalışma sürecinde hayvanların ölüm riski gözetildiğinden kontrol grubundaki hayvan sayısı 6, diğer gruplardaki hayvan sayısı 8 olarak belirlenmiştir. Denekler aşağıdaki şekilde 7 gruba ayrıldı ve tartılarak deney başlangıcındaki ağırlıkları kaydedildi. Acmp (Mosetam 20SP) distile su, Viamin E (α -Tocopherol; Sigma T3251) mısır yağı, Melatonin ise etanol içerisinde çözöldü. Tüm deneklerin çalışma öncesi vücut ağırlıkları tartıldı ve kaydedildi.

1. Grup: Distile su (0,5 ml/gün, gastrik gavaj) verildi.
2. Grup: Mısır yağı (0,3 ml/gün, gastrik gavaj) verildi.
3. Grup: Etanol (%5) (0,5 ml/gün, i.p.) verildi.
4. Grup: Acmp (0,5 ml 25 mg/kg/gün, gastrik gavaj) verildi.
5. Grup: Acmp (0,5 ml distile su içinde 25 mg/kg/gün, gastrik gavaj) + Melatonin (0,5 ml %5'lik etanol içinde 20 mg/kg/gün, i.p.) verildi.
6. Grup: Acmp (25 mg/kg/gün, gastrik gavaj) + Vitamin E (0,3 ml mısır yağı içinde 100 mg/kg/gün, gastrik gavaj) verildi.
7. Grup: Acmp (25 mg/kg/gün, gastrik gavaj) + Vitamin E (100 mg/kg/gün, gastrik gavaj) + Melatonin (20 mg/kg/gün, i.p.) verildi.

Tüm gruplardaki deneklere uygulamalar her gün, günde bir defa olmak üzere sabah 08:00-10:00 saatleri arasında yapıldı. Deneyin 3. ve 5. günleri arasında Acmp grubundan 1, Acmp+Melatonin grubundan 2 ve Acmp + Melatonin + Vtamin E grubundan 1 denek çalışma dışı bırakıldı.

3.2.1. Deneyin Sonlandırılması ve Anestezi

Denekler, 21 gün süren uygulamanın ardından 22. Gün vücut ağırlıkları tartıldıktan sonra 50 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar® Eczacıbaşı Warner-Lambert ilaç sanayi, Levent, İstanbul) ve 10 mg/kg xylazine hidrokloritin (Rompun® Bayer, Şişli, İstanbul) ile aseptik şartlarda intraperitoneal yolla verilerek anestezi sağlandı. Anestezi altındaki deneklerin povidon iyot ile cilt antisepsisi sağlandıktan sonra, ameliyat düzeneğine ön ve arka bacakları tesbit edildi. Deneklere laparotomi yapıldıktan sonra testisleri total olarak çıkarıldı, kan örnekleri alındıktan sonra yüksek doz anestezik verilerek ötenazi uygulandı. her bir denekten alınan sağ testis histomorfometrik analizler için %10'luk formaldehite konulurken; sol testis dokusu da biyokimyasal analizler yapılmak üzere -80°C de muhafaza edildi.

3.2.2. Histolojik Teknikler ve Analizler

3.2.3. Işık Mikroskopik Teknikler

Histolojik değerlendirme için alınan doku örnekleri 24 saat içerisinde 2-3 mm'lik küçük parçalara ayrılıp (trimlenerek) plastik doku takip kasetlerine alındı ve Formaldehiti yenilendi. Bu halde dokular 24 saat daha beklenerek fikse edildi. Fiksasyon işleminin ardından çeşme suyunda yıkanan dokular Tissue-Tek VIP/SAKURA marka doku takip cihazında aşağıdaki protokole göre doku takip basamaklarından geçirildi.

1. Musluk suyu	40 dk
2. Musluk suyu	40 dk
3. %80 alkol	1 saat
4. %96 alkol	1 saat
5. %96 alkol	1 saat
6. Absölü alkol	1 saat
7. Absölü alkol	1 saat
8. Ksilen	1 saat

9. Ksilen	1 saat
10. Ksilen	1 saat
11. Parafin I	1 saat
12. Parafin II	1 saat
13. Parafin III	1 saat
14. Parafin IV	1 saat

Doku takip işlemleri tamamlanan doku örnekleri parafin bloklara gömüldü. Hazırlanan parafin bloklardan mikrotomla 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Hazırlanan kesitlere Hematoksilen-eozin (H&E) ile periodic acid schiff (PAS) boyama ve kaspaz-3 immunohistokimyasal boyama yapıldı.

3.2.4. Mayer's Hematoxylen-Eozin Metodu

Doku örneklerinden alınan kesitlere otomatik boya cihazı (Leica Autostainer XL) ile aşağıdaki prosedure göre H&E boyaması uygulandı.

1. İnkübasyon	(60°C, 1 saat)
2. Ksilen	5 dakika x 3 defa
3. %96 alkol	3 dakika
4. %96 alkol	3 dakika x 2 defa
5. Absolü alkol	3 dakika x 2 defa
6. Çeşme suyunda yıkama	5 dakika
7. Mayer's Hematoxylen	10 dakika
8.Çeşme suyunda yıkama	5 dakika x 3 defa
9. Eosin	2 dakika
10. %96 alkol	3 dakika x 2 defa
11. Absolü alkol	3 dakika x 2 defa
12. Ksilen	5 dakika x 3 defa

Uygulanan işlemlerin ardından lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Yapılan tüm boyamalarda testis kesitleri Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, Nikon DS-Fi2 kamera ve Nikon NIS-Elements Documentation görüntü analiz programı (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) ile incelenerek histopatolojik değerlendirmeler yapıldı.

fotoğraflar alındı. Hematoksilen Eozin boyama yapılarak incelenen dokuların değerlendirilmesinde, seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı ölçümü ve Johnsen's testiküler histolojik hasar skoru (170) metodu kullanıldı.

Johnsen's testiküler histolojik hasar skoru için aşağıdaki parametreler kullanıldı

10=Çok sayıda spermatozoa, düzgün yükseklikte germinal epitel, normal çaplı tübüler lümen

9 = Çok sayıda spermatozoa, düzensiz germinal epitel, oblitere tübüler lümen

8 = Tübüler kesit başına 5 ± 10 'dan daha az spermatozoa

7 = Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid, spermatosit ve spermatogonia

6 = Spermatozoa yok, 5 ± 20 spermatid, çok sayıda spermatosit ve spermatogonia

5 = Spermatozoa ve spermatid yok, çok sayıda spermatosit ve spermatogonia

4= Spermatozoa ve spermatid yok, spermatosit 5'den az, fakat çok sayıda spermatogonia

3 = Sadece spermatogonia

2 = Germinal hücreler yok, sadece Sertoli hücreleri var (Sertolicell-only sendromu)

1 = Tübüllerde hiç hücre yok

Seminifer tübül çapları ölçümünde her gruptan 6 adet deneğe ait preparatta, her preperattan 100 tübül ölçüldü. Ölçümler, x10 luk büyütmede testis periferinin 2 sıra iç kısmında kalan alan 4 e bölünerek bir testisin her iki yarı kesitinden yapıldı. Her bir tübülün bir uzun ekseni bir de kısa ekseni olmak üzere 2 farklı çapı ile epitelin en kalın ve en ince yerinden iki farklı epitel kalınlığı ölçüldü ve herbir tübül için ortalamaları alındı.

3.2.5. Periodic Acid Schiff (PAS) Boyama Metodu

Periyodik asit (0.5 g + 100 ml distile su)	5 dk
Disitle su	3 dk
Schiff	20 dk
Çeşme suyu	15-20 dk
Disitle su	3 dk
Hematoksilen	10 dk
Çeşme suyu	3 dk
Alkol %100	3 dk x 3 defa

Ksilen	3 dk x 3 defa
--------	---------------

Uygulanan bu işlemlerin ardından lamalar entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı.

3.2.6. İmmünohistokimya Boyama Metodu

Kaspaz 3 (P42574, CASP3 Polyclonal Antibody, ABclonal®) immünohistokimya boyama için polilizinli lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki kesitlere deparafinizasyon aşamasını takiben sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı.

Antijen Retrieval (Sitrata tamponu içinde, pH=6.0)	121°C, 15 dk
Distile Su	1 kez yıkama
PBS	1 kez yıkama
Peroksit Blok (Hidrojen Peroksit)	10 dk
PBS	1 kez yıkama
Protein Blok (Süper Blok)	5 dk
Primer Antikor (IL-10 & Kaspaz 3)	30 dk
PBS	1 kez yıkama
Sekonder Antikor (Biotinylated Goat Anti-polyvalent)	20 dk
PBS	1 kez yıkama
Streptevadin Peroksidaz (HRP)	10 dk
PBS	1 kez yıkama
Kromojen (1 damla kromojen + 1 ml tampon)	10 dk
PBS	1 kez yıkama
Distile Su	1 kez yıkama
Hematoksilen	60 sn
Musluk Suyu	3 kez yıkama
Distile Su	1 kez yıkama

IHC uygulanan kesitler su bazlı kapatıcı kullanılarak lamel ile kapatıldı. Kesitler Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, Nikon DS-Fi2 kamera ve Nikon NIS-Elements Documentation görüntü analiz programı (Nikon Corporation, Tokyo, Japan) ile incelenerek fotoğraflar alındı.

Testis dokusunda Caspaz-3 pozitif immünoreaktivitesini ölçmek için pozitif boyanmış hücrelerin yüzdesi ve boyama yoğunluğu çarpımı ile elde edilen H-Skoru kullanıldı.

$$H \text{ Score} = \sum P_i (i+1)$$

P_i, her yoğunluk kategorisindeki boyanmış alanın yüzdesidir (0–100%). İntensity (i), Spesific boyanmanın yoğunluğu (0-3) (0: Boyanma yok, 1: Zayıf, 2: Orta, 3: Şiddetli boyanma)

3.2.7. Transmission Elektron Mikroskopi

Farelerin testislerinden alınan yaklaşık 1 mm³ hacmindeki doku örnekleri %2,5'luk glutaraldehit (Glutardialdehyde solution 25% for electron microscopy 250 ml, MERCK, Germany) içerisine konuldu. İkincil fiksatif olarak doku takibi esnasında %1 Osmium tetraoksit (Osmium (VIII) oxide for microscopy 500 mg, MERCK, Germany) (OsO₄) kullanıldı. Glutaraldehit fiksasyonundan sonra aşağıdaki doku takip prosedürü uygulandı.

1. Fosfat tampon 0.1 M	5 dk x 4 defa
2. Osmium tetroksit	1,5 saat (+4°C)
3. Fosfat tampon 0.1 M	5 dk x 4 defa
4. Aseton % 30	20 dk
5. Aseton % 50	20 dk
6. Aseton % 70	20 dk
7. Aseton % 90	20 dk
8. Aseton % 100	20 dk x 2 defa
9. Araldit %50	30 dk
10. Araldit % 75	1 s
11. Araldit % 100	1 s

Doku takibinin ardından dokular araldit (CY212, TAAB, E006, England) içine gömülerek, 45°C'de 4 saat, 70°C'de 24 saat polimerizasyon için inkübe edildi.

Elektron mikroskopik doku fiksasyonu ve takibinde kullanılan solüsyonlar:

% 2,5 Gluteraldehit Solüsyonu

- 0,2 M fosfat tamponu 50 ml
- %25 Gluteraldehit 12 ml
- Distile su 38 ml

% 1 Osmium Tetroksit solüsyonu

- 5 ml %4'lük Osmium tetraoksit solüsyonu ışık almaması için koyu cam şişe içerisine alındı. Üzerine 5ml distile su ve 0.2 M fosfat tamponu eklendi.

Fosfat tamponu (0,1 M)

- Na_2HPO_4 (0,2 M) 38 ml (0,2 M Na_2HPO_4 için: 3,56 g Na_2HPO_4 100 ml deiyonize su içinde çözöldü.)
- NaH_2PO_4 (0,2 M) 12 ml (0,2 M NaH_2PO_4 için: 3,56 g NaH_2PO_4 100 ml deiyonize su içinde çözöldü.)
- Deiyonize Su 50 ml

Araldit

- DDSA 20 ml
- Araldit CY212 20 ml
- BDMA 0,8 ml

Hazırlanan araldit bloklar trimer (Leica EM trim) cihazında trimlendikten sonra ultramikrotom (Leica Ultracut R) ile 80 nm kalınlığında testis kesitleri bakır gridler üzerine alındı. Kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlandıktan sonra Zeiss Libra 120 TEM ile incelenerek fotoğraflar alındı.

Uranil Asetat Boyası

- Metil Alkol 80 ml
- Uranil Asetat 2 g
- Distile Su 20 ml

Gridler hazırlanan karışımında 10 dakika boyandı.

Kurşun Sitrat Boyası

- Kurşun sitrat 0,266 g
- Trisotyum sitrat 0,352 g

- Sodyum hidroksit (1 M) 1,6 ml
- Distile su 8,4 ml

Gridler hazırlanan karışımda 5 dakika boyandı.

3.3. Biyokimyasal Analizler

Çalışma sonunda sıvı azot tankına alınan ve daha sonra -80 °C derin dondurucuda bekletilen testis dokularında MDA, GSH, TAK ve TOK düzeyleri, serumda ise LH, FSH ve Testosteron düzeyleri ölçüldü.

3.3.1. Doku Homojenat Analizi

Dokuların Biyokimyasal analizlere hazırlanması

Derin dondurucuda muhafaza edilen testis dokuları çalışma günü çıkarılarak tartıldı. %10'luk homojenat oluşacak şekilde fosfat tamponu ilave edilerek buz içinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize edildi (IKA, Germany). Doku homojenatları 5000 rpm'de, +4 derecede, 30 dakika santrifüj edilerek süpernatant elde edildi.

Redükte Glutasyon (GSH) düzeyinin ölçümü

GSH analizi, Ellman'ın tarif ettiği yöntemle göre yapıldı (171). Analiz tüpünde bulunan GSH'nın 5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit ile reaksiyona girerek sarı-yeşilimsi renk vermesi ve oluşan bu rengin ışık şiddetinin 410 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunarak GSH konsantrasyonunun tayin edilmesi şeklinde yapıldı.

Malondialdehid (MDA) düzeyinin ölçümü

MDA analizi Uchiyama ve ark. (172) yöntemine göre yapıldı. MDA konsantrasyonu, süpernatandaki MDA'nın 95 °C'de tiyobarbitürik asit ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan pembe renkli ürünün n-butanol fazından ekstrakte edilen süpernatanın spektrofotometre ile 535 ve 520 nm de ölçülmesiyle belirlendi.

Total Oksidan Seviye (TOS) ölçümü

Total oksidan kapasitenin ölçümünde, ticari TOS ölçüm kiti (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensipi, örnekteki oksidanların ferröz iyon-şelatör kompleksini ferrik iyonlara okside etmesine ve oluşan ferrik iyonların asidik ortamda kromojen madde ile renk oluşturması esasına dayanır (173). TOS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, ELİZA 25 °C'ye ayarlanarak, 500 µL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 75 µL serum karıştırılıp 530 nm'de absorbansı ölçüldü. Karışıma 25 µL reaktif

2 (pro-kromojen solüsyon) eklenerek 10 dk. inkübasyondan sonra tekrar 530 nm’de absorbans ölçülmesiyle TOK düzeyleri belirlendi.

Total Antioksidan Seviye (TAS) ölçümü

Ticari TAS ölçüm kiti (RelAssay Diagnostic, Türkiye) kullanıldı. Yöntemin prensipi, örnekteki antioksidanların, koyu mavi-yeşil renkli ABTS radikalini, renksiz ABTS formuna indirgemesine dayanır (174). TAS ölçümü için, kitin prosedüründe belirtildiği şekilde, ELİZA cihazı 25 °C’ye ayarlanarak, 500 µL reaktif 1 (ölçüm tamponu) ve 30 µL serum karıştırılıp 660 nm’de absorbansı ölçüldü. Karışıma 75 µL reaktif 2 (renkli ABTS solüsyonu) eklenerek 10 dk. inkübasyondan sonra tekrar 660 nm’de absorbans ölçülmesiyle TAK düzeyleri belirlendi.

Oksidatif stres indeksi (OSİ)

TOS seviyelerinin TAS seviyelerine oranının yüzdesi olarak ifade edilen OSİ hesaplanırken, TAS testinin birimindeki mmol değeri TOS testindeki gibi µmol birimine çevrilir (175). Sonuçlar “arbitrary unit” (AU) olarak ifade edildi ve aşağıdaki formüle göre hesaplanır. Sonuçlar “arbitrary unit” (AU) olarak ifade edildi ve aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$OSİ = \frac{TOS, \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ equivalent/L}}{TAS, \mu\text{mol Trolox Equivalent/L}} \times 100$$

3.3.2. Kan Serum Hormon Düzeylerinin Analizi

Kesim sırasında kalp dokusundan alınan kan örnekleri 1000 x g de 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazma şeklinde ayrıldı. Serumlar çalışma gününe kadar –80 °C de derin dondurucuda muhafaza edildi. Çalışma günü serumlarda ELİSA ölçüm yöntemi ile Sunred marka (Shanghai Sunred Biological Technology Co., Ltd. No.128 Lane 628, Jufengyuan Road, Baoshan District, 200444 Shangai, China) Rat spesifik ELİSA kitleri ile LH, Testosteron ve FSH parametreleri çalışıldı.

LH

SunRed marka Rat spesifik 201-11-0180 katalog no’lu LH ELİSA kiti ile LH parametresi bakıldı. 32 mIU/mL, 16 mIU/mL, 8 mIU/mL, 4 mIU/mL ve 2 mIU/mL ‘lik standart solüsyonlarından 50µL ve numunelerden 40 µL ve blank 50 µL olmak üzere her bir plate kuyucuğuna pipetlendi. Ardından sadece numunelerin bulunduğu kuyucuklara 10 µL

LH-antibody solüsyonundan eklendi. Ardından Standart ve numunelerin bulunduğu her bir kuyucuğa 50 µL Streptavidin-HRP solüsyonundan eklenirken blank'ın bulunduğu kuyucuğa eklenmedi. Üzeri kapatılan plate 37°C'de 1 saatlik inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından 350 µL'lik yıkama hacmi olacak şekilde 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından blank kuyucukları da dahil her bir kuyucuğa 50 µL Chromogen A Solüsyonu eklendi ve ardından Chromogen B Solüsyonu eklenerek plate in üzeri kapatılıp 37°C'de 10 dk inkübasyon yapıldı. 10 dk'lık inkübasyonun ardından stop solüsyonu 50 µL her bir kuyucuğa ilave edilip 450 nm'de nm'de Synergy H1 Microplate Reader'da okuma yapıldı.

Testosteron

SunRed marka Rat spesifik 201-11-5126 katalog no'lu Testosteron ELİSA kiti ile Testosteron parametresi bakıldı. 100 pg/mL, 200 pg/mL, 400 pg /mL, 800 pg/mL ve 1600 pg/mL'lik standart solüsyonlarından 50µL ve numunelerden 40 µL ve blank 50 µL olmak üzere her bir plate kuyucuğuna pipetlendi. Ardından sadece numunelerin bulunduğu kuyucuklara 10 µL T-antibody solüsyonundan eklendi. Ardından Standart ve numunelerin bulunduğu her bir kuyucuğa 50 µL Streptavidin-HRP solüsyonundan eklenirken blank'ın bulunduğu kuyucuğa eklenmedi. Üzeri kapatılan plate 37°C'de 1 saatlik inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik inkübasyonun ardından 350 µL'lik yıkama hacmi olacak şekilde 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından blank kuyucukları da dahil her bir kuyucuğa 50 µL Chromogen A Solüsyonu eklendi ve ardından Chromogen B Solüsyonu eklenerek plate in üzeri kapatılıp 37°C'de 10 dk inkübasyon yapıldı. 10 dk'lık inkübasyonun ardından stop solüsyonu 50 µL her bir kuyucuğa ilave edilip 450 nm'de nm'de Synergy H1 Microplate Reader'da okuma yapıldı.

FSH

SunRed marka Rat spesifik 201-12-1002 katalog no' lu FSH ELİSA kiti ile FSH parametresi bakıldı. 50 mIU/mL, 25 mIU/mL, 10 mIU/mL, 5 mIU/mL ve 2,5 mIU/mL' lik standart solüsyonlarından 50µL ve numunelerden 40 µL ve blank 50 µL olmak üzere her bir plate kuyucuğuna pipetlendi. Ardından sadece numunelerin bulunduğu kuyucuklara 10 µL FSH-antibody solüsyonundan eklendi. Ardından Standart ve numunelerin bulunduğu her bir kuyucuğa 50 µL Streptavidin-HRP solüsyonundan eklenirken blank'ın bulunduğu kuyucuğa eklenmedi. Üzeri kapatılan plate 37°C'de 1 saatlik inkübasyona bırakıldı. 1 saatlik

inkübasyonun ardından 350 µL'lik yıkama hacmi olacak şekilde 5 kez yıkama işlemi yapıldı. Yıkamanın ardından blank kuyucukları da dâhil her bir kuyucuğa 50 µL Chromogen A Solüsyonu eklendi ve ardından Chromogen B Solüsyonu eklenerek plate in üzeri kapatılıp 37°C'de 10 dk inkübasyon yapıldı. 10 dk'lık inkübasyonun ardından stop solüsyonu 50 µL her bir kuyucuğa ilave edilip 450 nm'de Synergy H1 Microplate Reader'da okuma yapıldı.

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi, varyansların homojenliği ise Levene testi ile incelendi. Normal dağılıma uyan veriler ortalama ve standart sapma ile özetlendi ve varyanslar homojen olduğunda grup karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi ve Tukey HSD ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Grupların varyansı homojen olmadığında Welch testi ve Tamhane's T2 ikili karşılaştırma yöntemi uygulandı. Normal dağılıma uymayan veriler ise medyan, minimum ve maksimum değerler ile özetlendi ve grup karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis testi ve sonrasında Conover ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Tüm testlerde anlamlılık düzeyi 0,05 olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneklerin, deney öncesi ve deney sonrası ağırlıkları tartılarak aşağıdaki veriler elde edildi.

Tablo 4.1. Deney başlangıcı ve deney sonu denek ağırlıklarının karşılaştırılması

	Deney başlangıcı			Deney sonu			p
	vücut ağırlığı (g)			vücut ağırlığı (g)			
	N	Ortalama	S. Sapma	N	Ortalama	S. Sapma	
Distile su	6	42,17	1,47	6	42,00	2,00	0,771
Mısır yağı	6	39,00	2,00	6	38,50	2,35	0,762
Etanol	6	39,33	3,61	6	38,83	4,92	0,791
ACMP	7	38,57	0,79	7	40,14	1,46	0,062
ACMP+Mel	6	42,33	2,34	6	40,33	2,58	0,310
ACMP+Vit E	8	38,75	2,38	8	39,38	2,92	0,672
ACMP+Vit E+Mel	7	37,57	2,44	7	36,86	2,54	0,618

Tüm gruplar için $p>0,05$ olduğu için gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneklerin deney sonu testis ağırlık ortalamaları ölçüldü ve aşağıdaki veriler elde edildi.

Tablo 4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

	N	Ortalama	S. Sapma	p
Testis ağırlık ortalamaları (g)	6	0,190	0,175	0,869
Distile su	6	0,111	0,012	
Mısır yağı	6	0,110	0,005	
Etanol	7	0,113	0,014	
ACMP	6	0,110	0,019	
ACMP+Mel	8	0,108	0,011	
ACMP+Vit E	7	0,107	0,007	

Tüm gruplar için $p>0,05$ olduğu için gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu.

4.3. Histolojik Bulgular

4.3.1. Işık Mikroskopik Bulgular

Distile Su, Etanol ve Mısır Yağı grupları

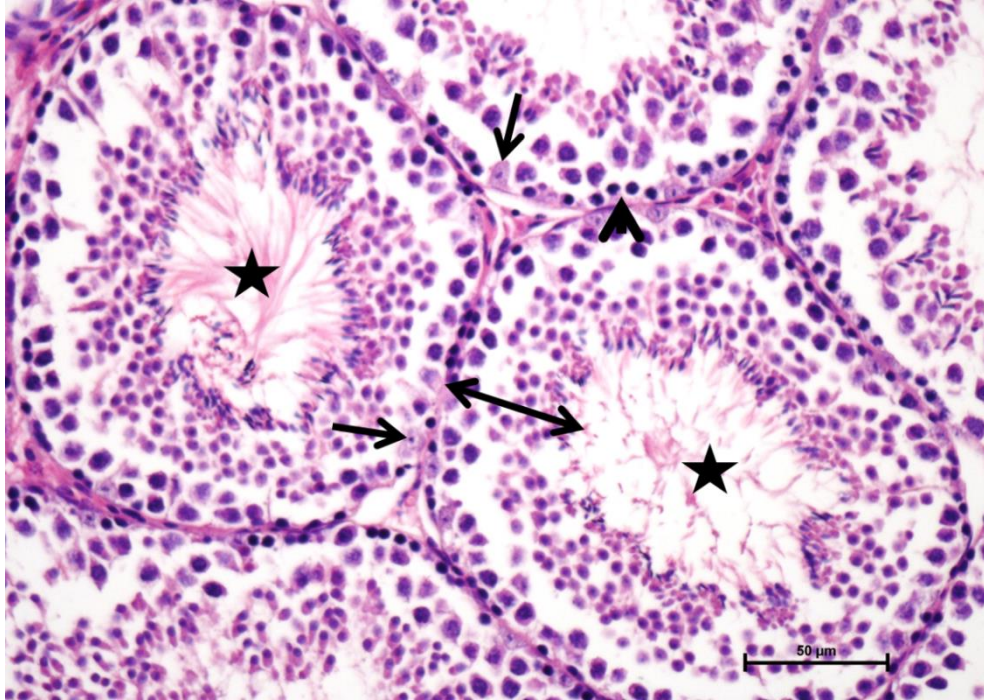
Histolojik görünüm benzer olup, bu gruplara ait hematoksilen eozin boyanmış kesitlerde, testis dokusu dıştan fibröz bağ dokusu kapsül ile çevrili olup, düzgün görümlü seminifer tübüller ve seminifer tübüller arasında ince interstisyel bağ dokusu izlendi (Şekil 4.1, 4.6, 4.11). Seminifer tübüllerin çoğunluğu normal histolojik yapıda seminifer epitel içeriyordu. Seminifer epitel bazal bölgesinde heterokromatik nükleuslu spermatogonyumlar ve Sertoli hücre nükleusları izlenmekte olup, normal histolojik görünümde değerlendirildi (Şekil 4.2, 4.7, 4.12). Semibifer epitelin adluminal tabakasından ise primer spermatositler ve farklı gelişim aşamalarında süpematitler izlendi. Seminifer epitelin luminal yüzünde, çok sayıda spermatozoonun baş bölgelerinden seminifer epitele tutunmuş olduğu görüldü. Ayrıca seminifer tübül lümenlerinde farklı yoğunluklarda spermatozoon mevcuttu. Seminifer tübül etrafında çok az interstisyel bağ dokusu tübülleri düzgün şekilde çevrelemişti. Bu interstisyel bağ dokunun seminifer tübüller arasındaki genişlemiş bölgelerinde kan damarları ve Leydig hücrelerini içerdiği görüldü. İnterstisyel bağ dokusundaki Leydig hücreleri ve vasküler yapılar normal histolojik görünümde değerlendirildi. Seminifer tübüller rasındaki şeffaf gözükken genişlemiş alanların histolojik tekniğe bağlı ayrılmalar sonucu oluştuğu değerlendirildi (Şekil 4.3, 4.8, 4.13). Bu gruplara ait Johnsen skoru ortalamaları: Distile Su grubu için $9,908 \pm 0,042$, Etanol grubu için $9,827 \pm 0,070$, Mısır Yağı grubu için $9,852 \pm 0,082$ olarak tespit edildi (Tablo 4.4).

PAS boyanan kesitlerde, seminifer tübüllerin bazal membranları PAS+ boyanmış, ince ve düzgün olarak izlendi ve normal histolojik yapıda değerlendirildi (Şekil 4.4, 4.9, 4.14)

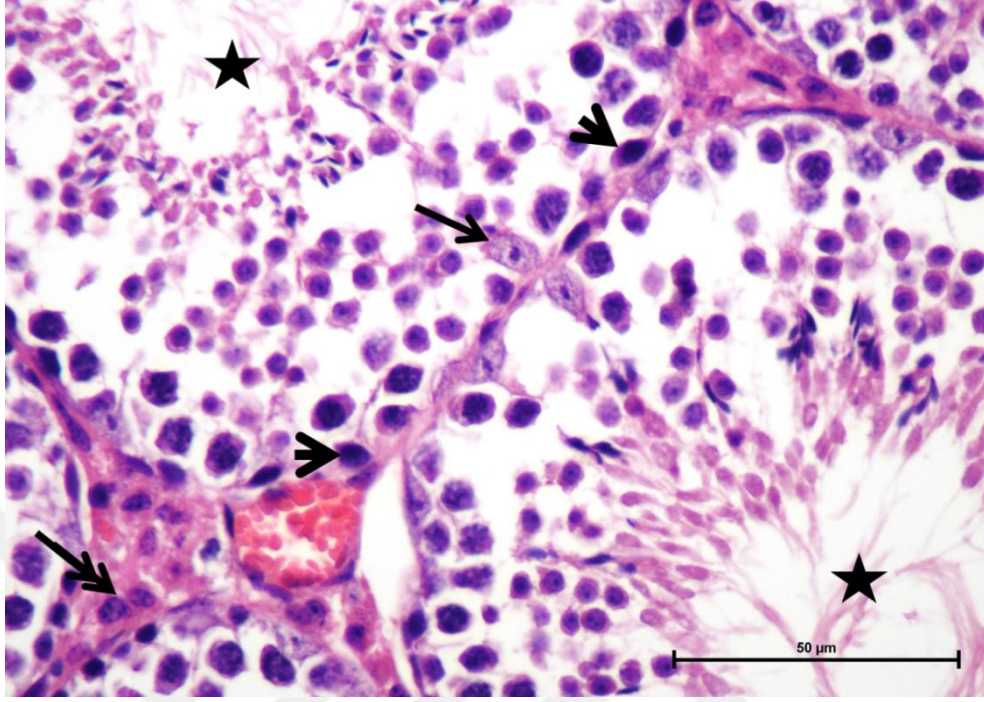
İmmünohistokimyasal olarak kaspaz 3 boyanan kesitlerde, seminifer tübüllerde ve interstisyel bağ dokusu alanlarda diffüz, zayıf kaspaz 3 immün reaktivitesi saptandı (Şekil 4.5, 4.10, 4.15). Bu gruplara ait; seminifer tübül kaspaz 3 immün reaktivitesi H-skoru ortalamaları: Distile Su grubu için 10,5 (1-20), Etanol grubu için 20 (1-40), Mısır Yağı grubu için 10,5 (1-40) olarak tespit edildi. İnterstisyel alan kaspaz 3 immün reaktivitesi H-skoru ortalamaları: Distile su grubu için 10,5 (1-20), Etanol grubu için 20 (1-40), Mısır yağı grubu için 10,5 (1-20) olarak tespit edildi (Tablo 4.3).



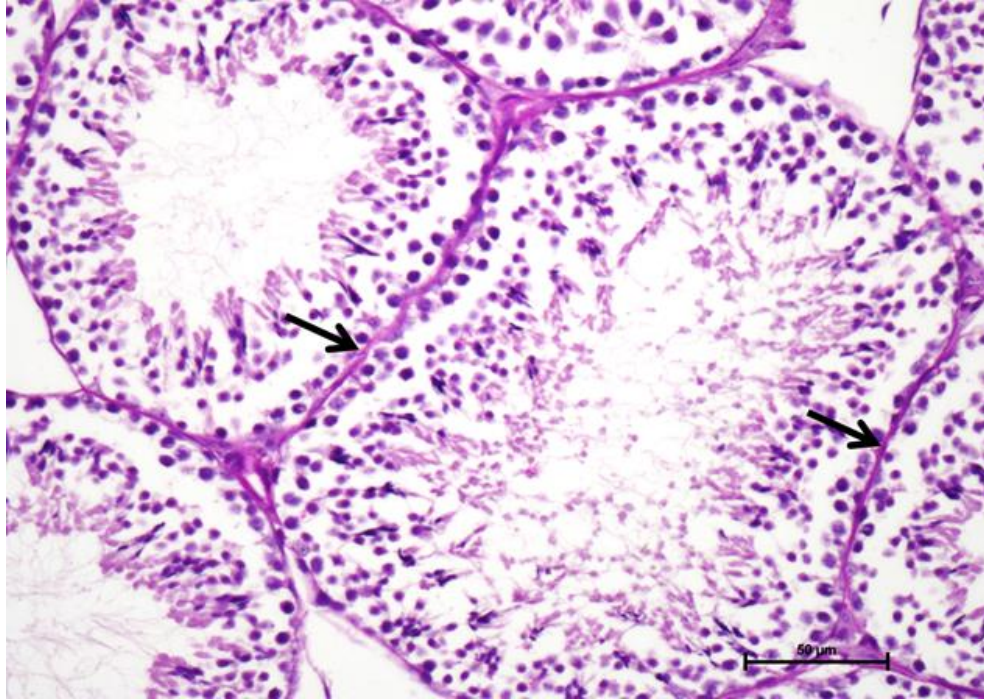
Şekil 4.1. Distile su grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız). H-E, 10X



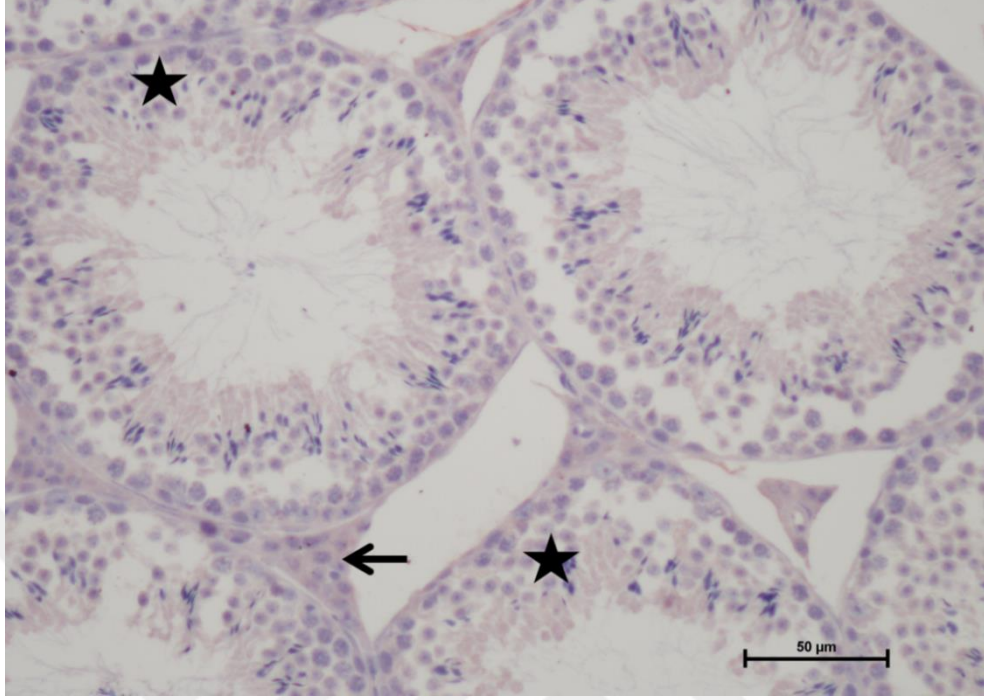
Şekil 4.2. Distile su grubu. Seminifer epitel (çift yönlü ok), Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı). H-E, 20X



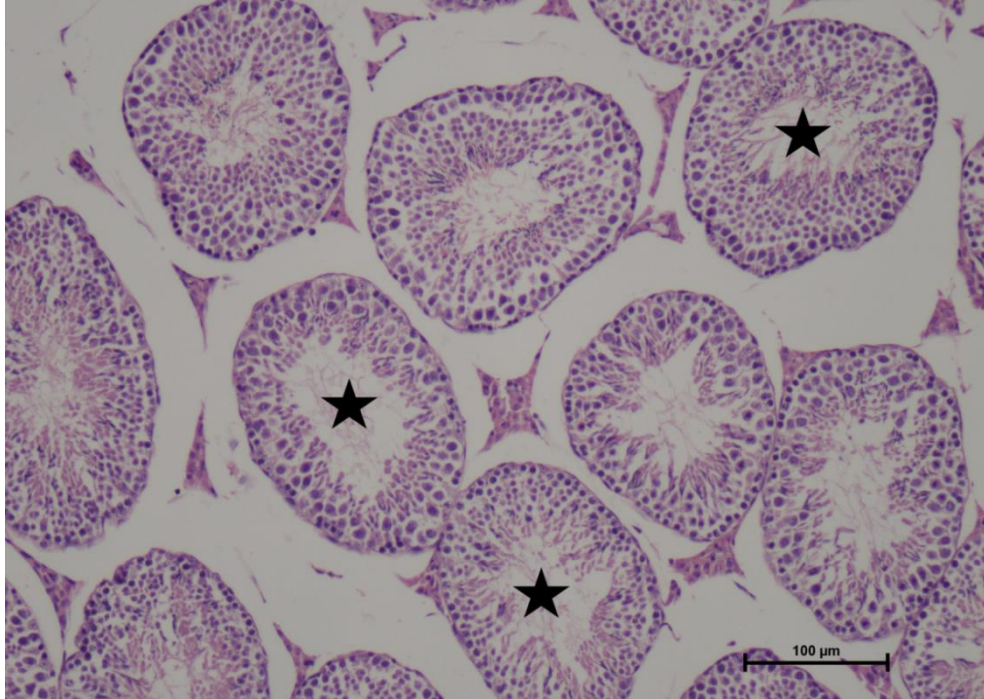
Şekil 4.3. Distile su grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı), Leydig hücresi (çift başlı ok). H-E, 40X



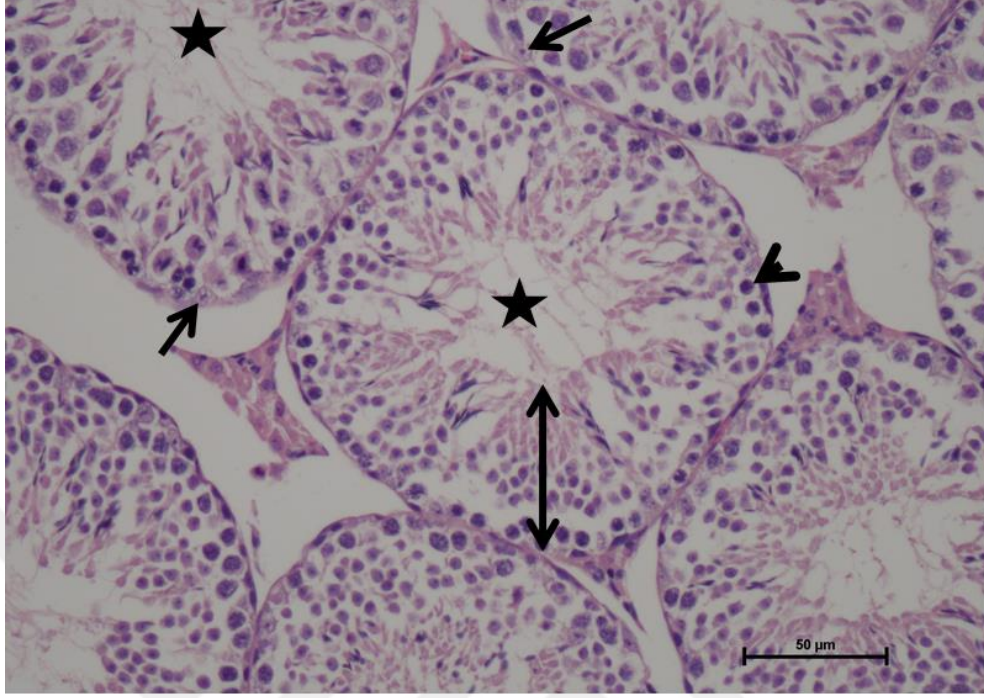
Şekil 4.4. Distile su grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, 20X



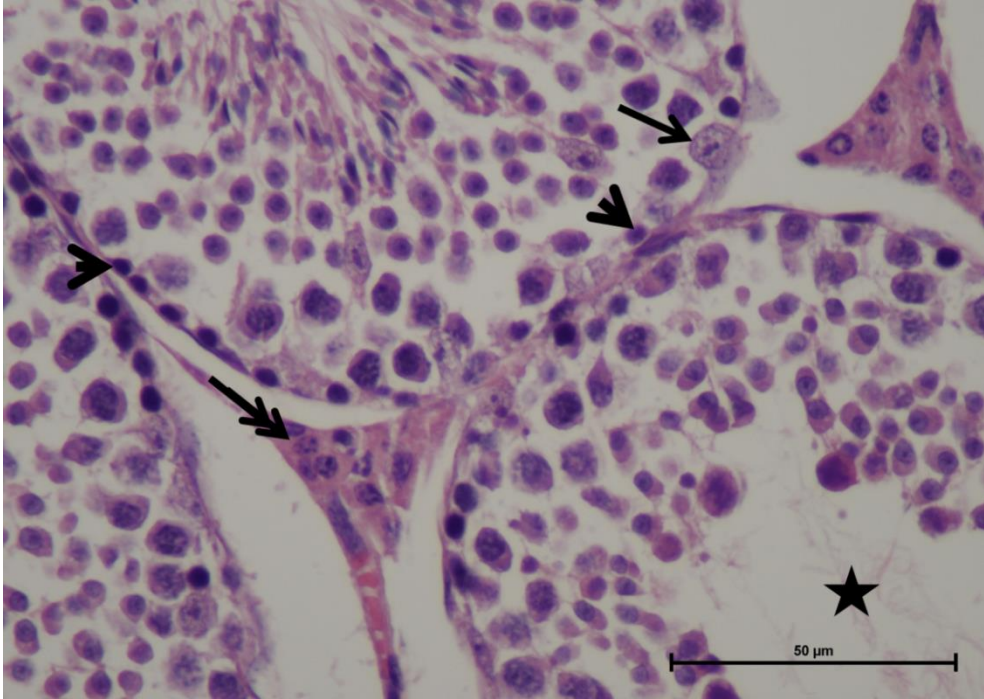
Şekil 4.5. Distile su grubu. Seminifer epitelde (yıldız) ve interstisyel alanda (ok) zayıf caspaz immunreaktivesi. İHK, 20X



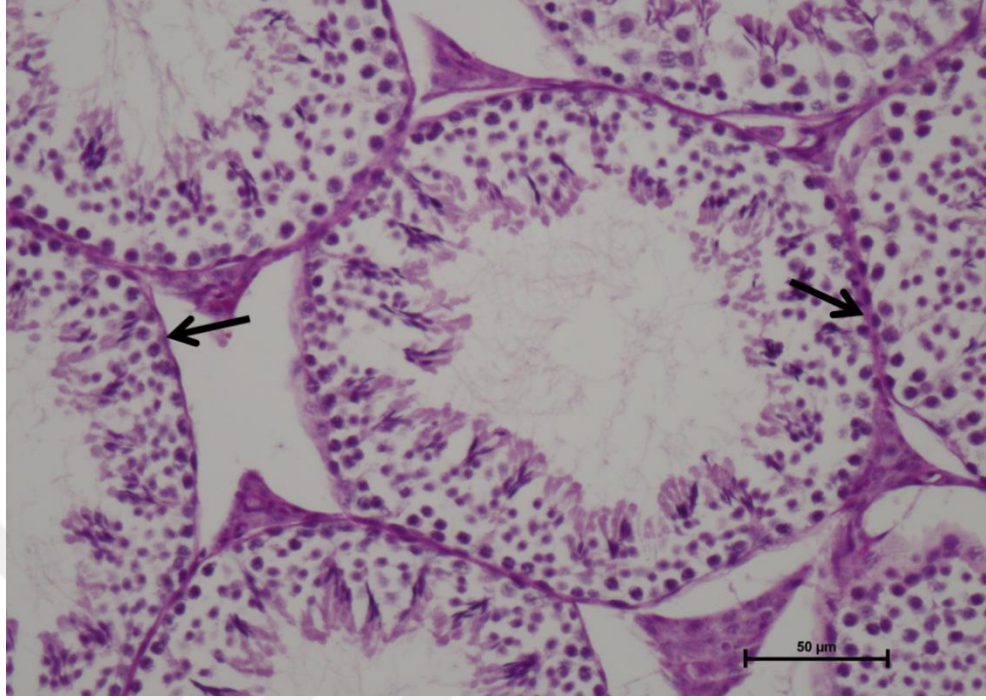
Şekil 4.6. Etanol grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız). H-E, 10X



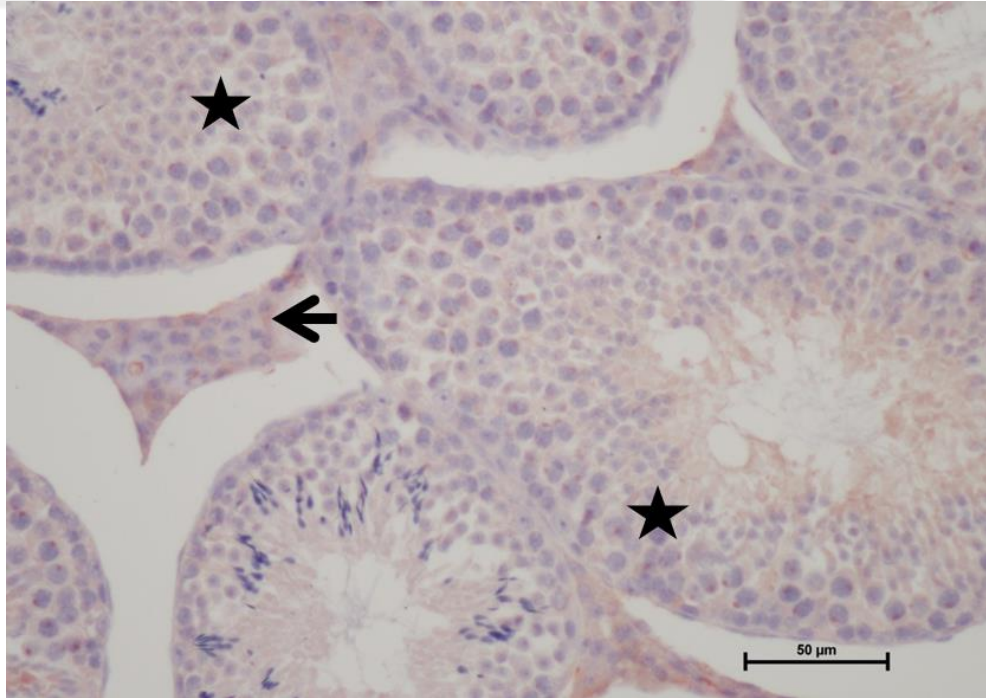
Şekil 4.7. Etanol grubu. Seminifer epitel (çift yönlü ok), Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı). H-E, 20X



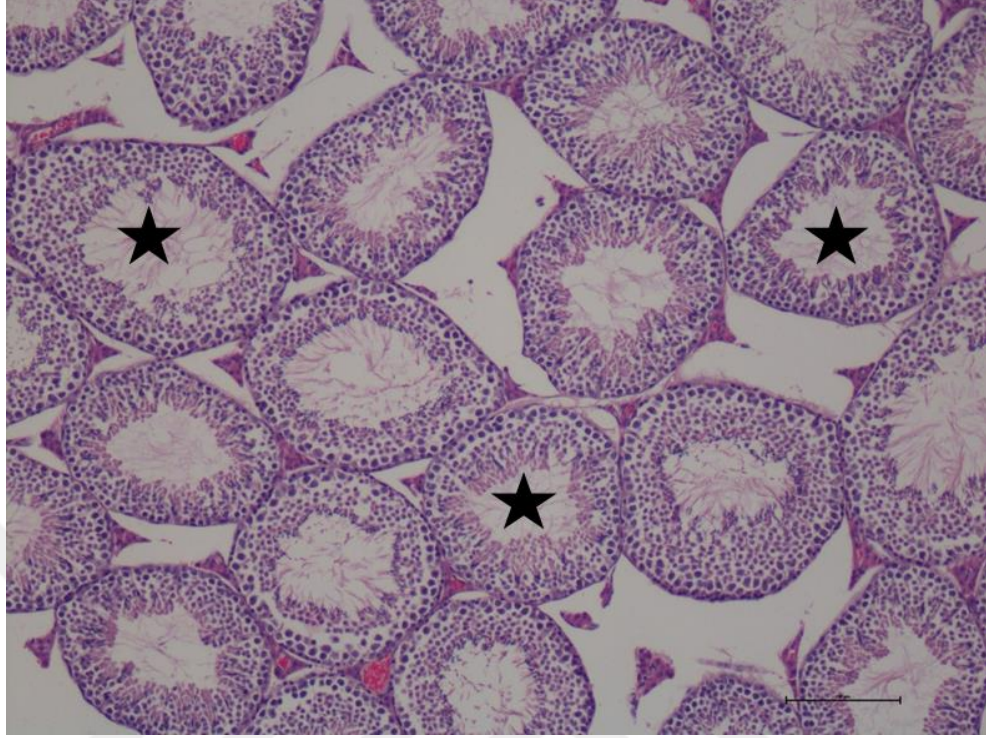
Şekil 4.8. Etanol grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı), Leydig hücresi (çift başlı ok). H-E, 40X



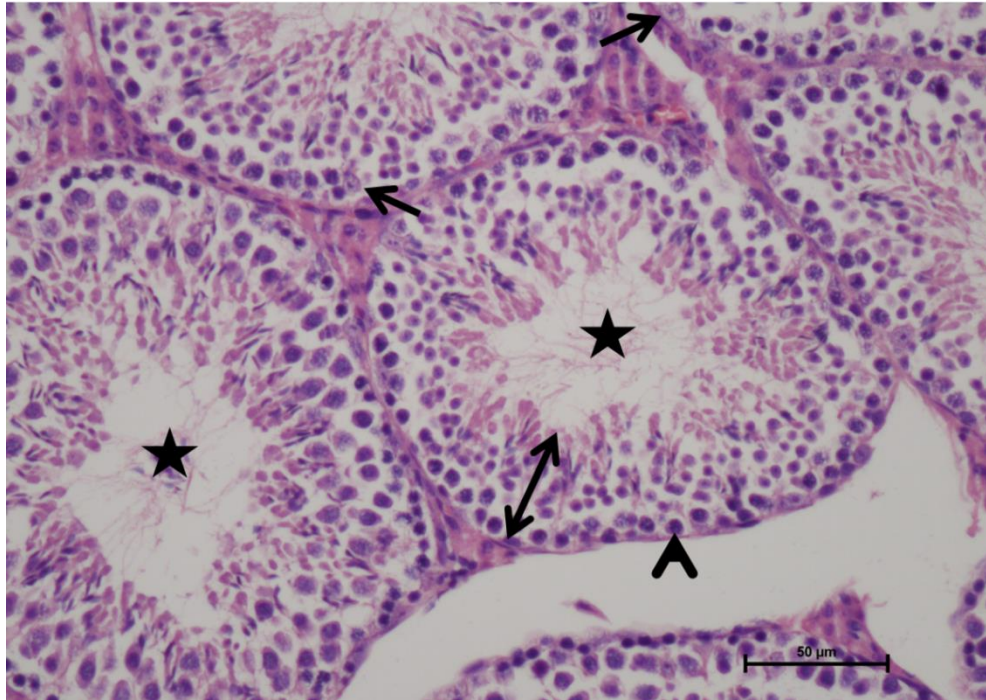
Şekil 4.9. Etanol grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, 20X



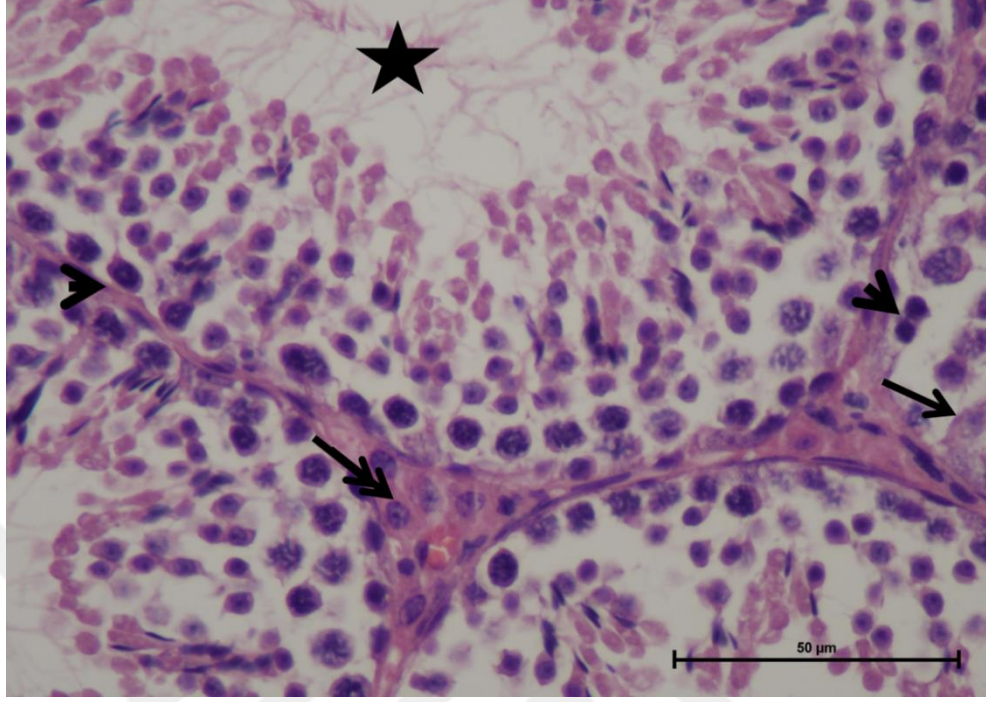
Şekil 4.10. Etanol grubu. Seminifer epitelde (yıldız) ve interstisyel alanda (ok) zayıf kaspaz 3 immunreaktivesi. İHK, 20X



Şekil 4.11. Mısır yağı grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız). H-E, 10X



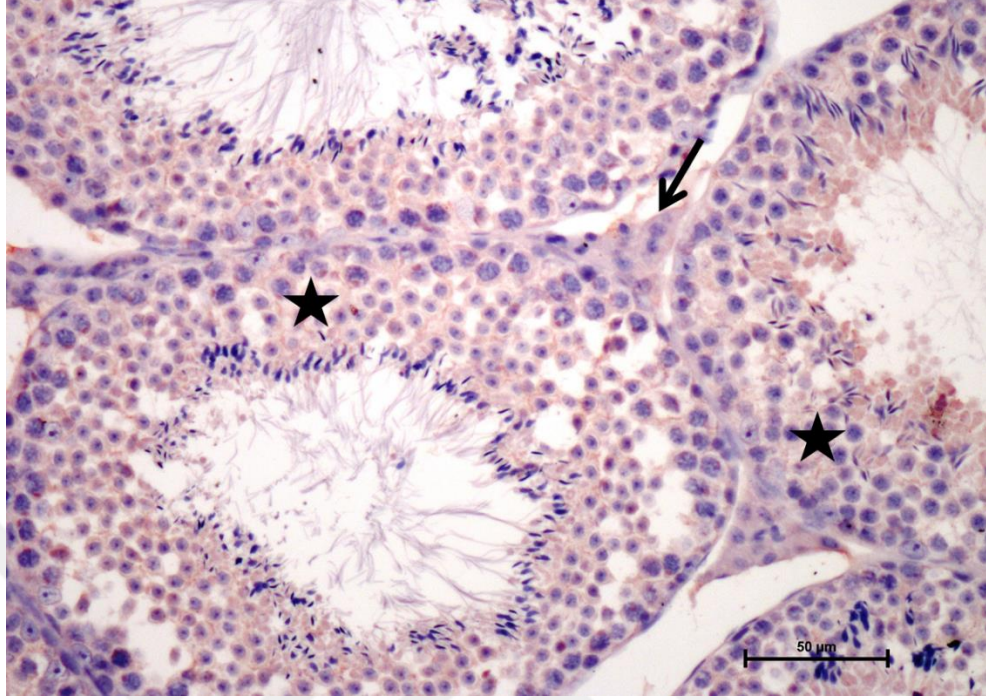
Şekil 4.12. Mısır yağı grubu. Seminifer epitel (çift yönlü ok), Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı). H-E, 20X



Şekil 4.13. Mısır yağı grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı), Leydig hücresi (çift başlı ok). H-E, 40X



Şekil 4.14. Mısır yağı grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, 20X



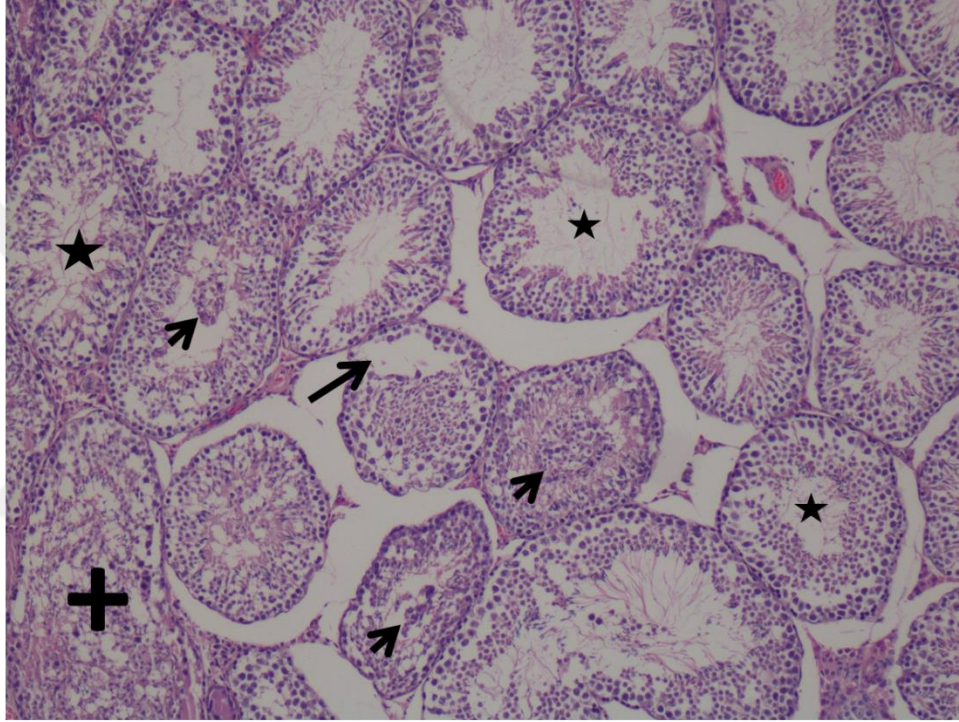
Şekil 4.15. Mısır yağı grubu. Seminifer epitelde (yıldız) ve interstisyel alanda (ok) zayıf kaspaz 3 immunreaktivesi. İHK, 20X

Acmp grubu

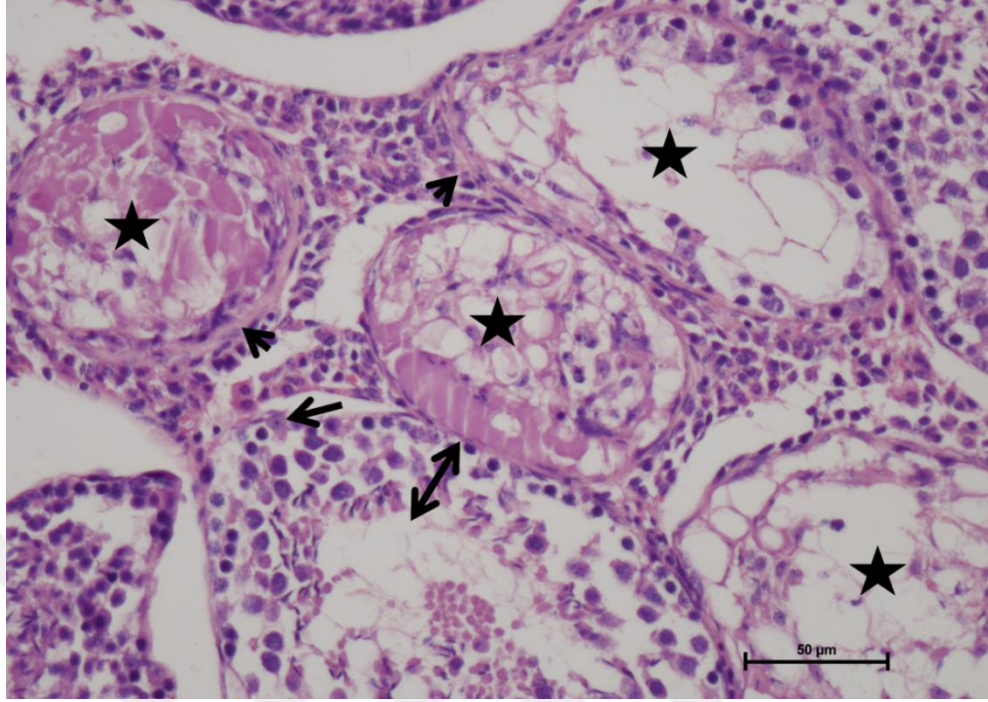
Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerde, bazı tübüllerin seminifer epitellerinde farklı derecelerde hasar, dejenerasyon ve hücre tabakalanmasında organizasyon bozukluğu, seminifer tübül lümenlerinde dejenere hücre artıkları izlendi. Ayrıca bazı tübüllerde seminifer epitel bazal kompartman ile adluminal kompartman arasında ayrılma bölgeleri tespit edildi. Total seminifer epitel dejenerasyonu olan tübüllerin periferel bağ dokusunda kalınlaşma dikkati çekti, bu tübüllerde intratübüler eozinofilik materyal birikimi izlendi. (Şekil 4.16). Bazı tübüllerde seminifer epitel hücrelerinin büyük vakuoller oluşturacak şekilde organizasyonunda bozulmalar olduğu görüldü (Şekil 4.17). İnterstisyel alanda Leydig hücrelerinde hidropik dejenerasyon ve nükleus konturlarında düzensizlik izlendi. (Şekil 4.18). Ayrıca bazı interstisyel alanlarda ödematöz aselüler eozinofilik boyanan materyal birikimi görüldü. Bu gruba ait Johnsen skoru ortalaması $7,743 \pm 0,096$ olarak tespit edildi (Tablo 4.4).

PAS boyanan kesitlerde, seminifer tübül bazal membranlarında PAS pozitifliğinin zayıf olduğu ve yer yer kesintiye uğradığı görüldü. Bazı alanlarda interstisyel bağ dokusunda ödem tespit edildi (Şekil 4.19).

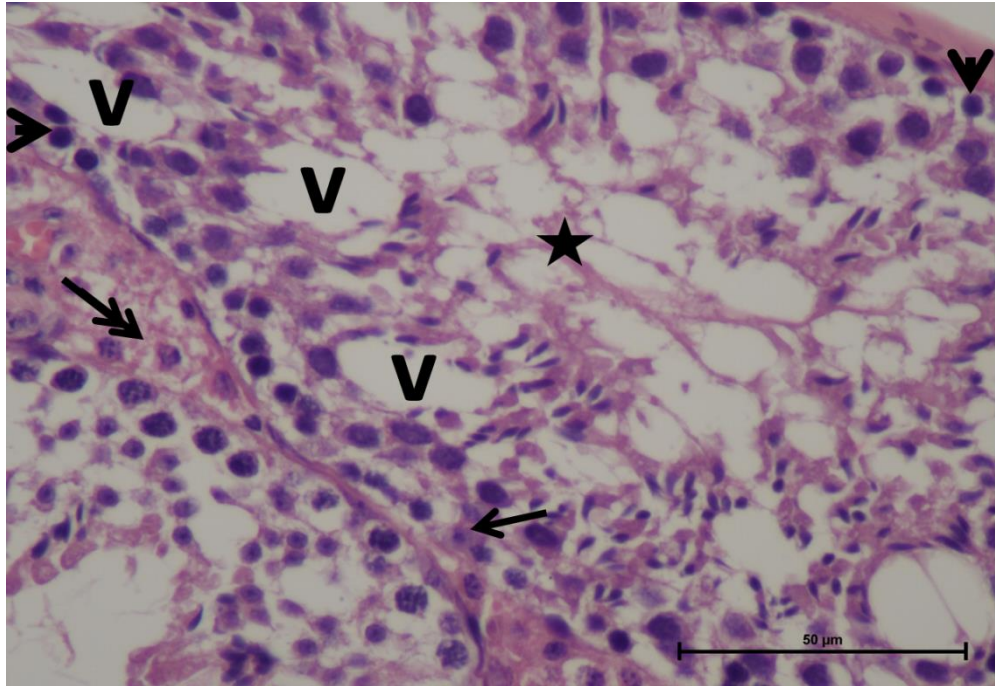
İmmünohistokimyasal olarak kaspaz 3 boyanın kesitlerde, seminifer tübüllerde ve interstisyel bağ dokusu alanlarda genel olarak diffüz, orta düzeyde kaspaz 3 immün reaktivitesi saptandı (Şekil 4.20). Seminifer tübül kaspaz 3 immün reaktivitesi H-skoru ortalaması 210 (150-240), interstisyel alan kaspaz 3 immün reaktivitesi H-skoru ortalaması 50 (20-60) olarak tespit edildi (Tablo 4.3).



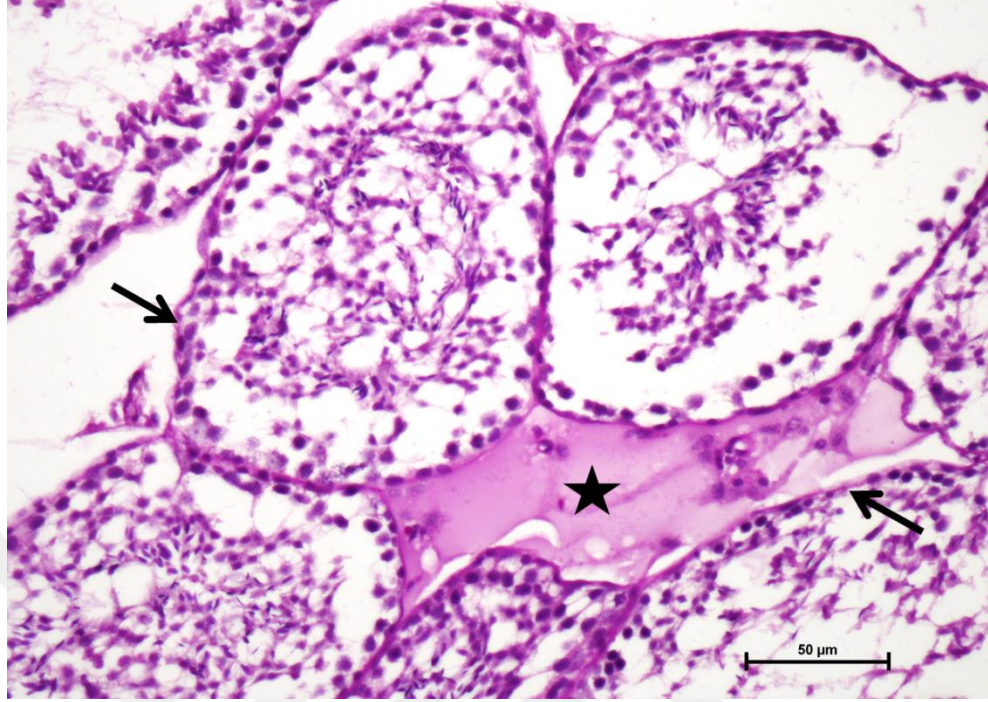
Şekil 4.16. Acmp grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız), seminifer epitelde ayrılma bölgesi(ok), seminifer tübül epiteli dejenerasyonu (+). H-E, 10X



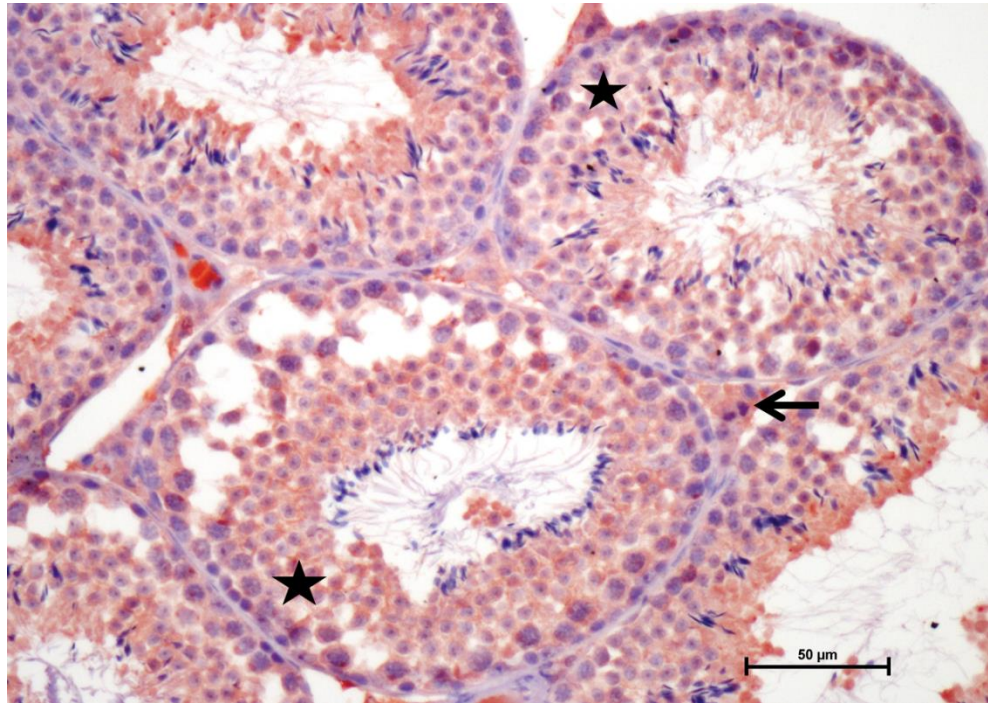
Şekil 4.17. Acamp grubu. Seminifer epitel (çift yönlü ok), Seminifer tübül dejenerasyonu (yıldız), seminifer tübül duvarında kalınlaşma (ok başı) Sertoli hücresi (ok). H-E, 20X



Şekil 4.18. Acamp grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı), Leydig hücresi stoplazmasında hidropik değişiklik (çift başlı ok). H-E, 40X



Şekil 4.19. Acmp grubu. Seminifer tübül bazal membranında zayıf PAS+ boyanma (ok), interstisyel alanda ödem (yıldız). PAS, 20X



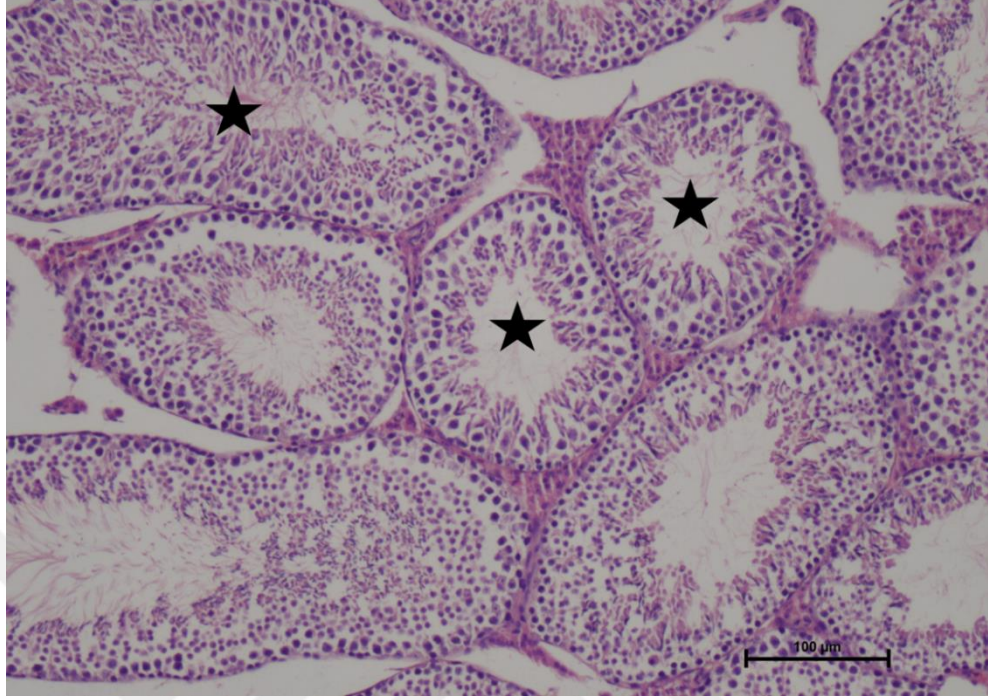
Şekil 4.20. Acmp grubu. Seminifer epitelde (yıldız) ve interstisyel alanda (ok) orta düzeyde kaspaz 3 immunreaktivesi. İHK, 20X

Acmp+Melatonin grubu

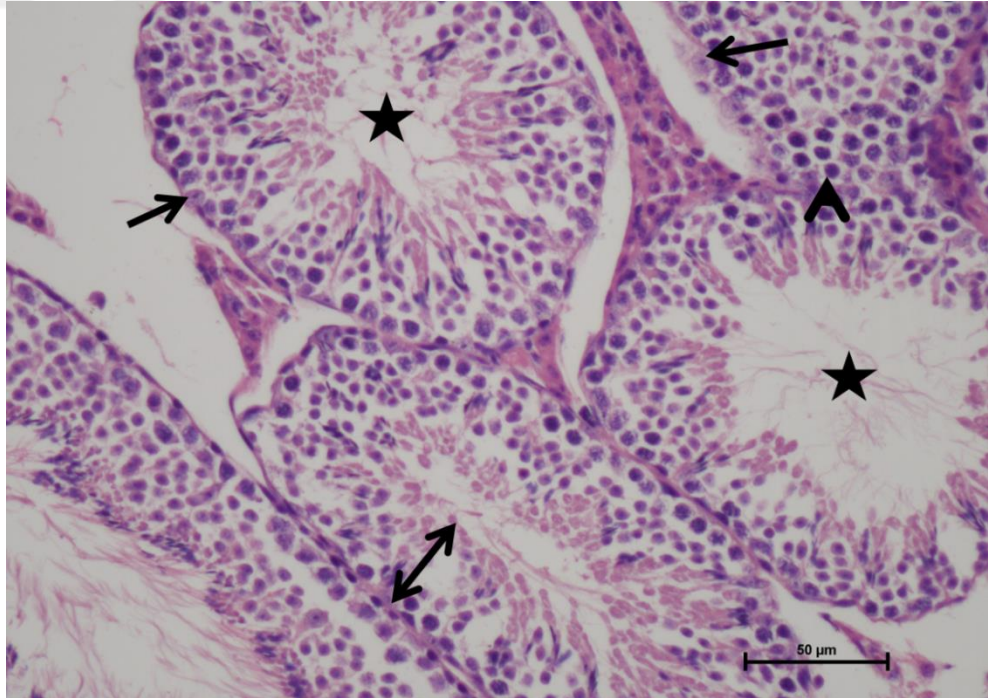
Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerde, seminifer tübüllerin genel olarak normal histolojik görünümde olduğu izlendi. Yer yer bazı tübüllerde seminifer epitelde bazal ve adluminal kompartmanlar arasında ayrılma bölgeleri görüldü. Nadir olarak, bazı tübüllerin lümeninde küçük gruplar halinde seminifer epitele ait dökülmüş hücreler mevcuttu (Şekil 4.21). Tübüllerde seminifer epitel organizasyonu ve dizilimi normal yapıda tespit edildi (Şekil 4.22). Tübül sınırları ince interstisyel bağ dokusu ile çevrili olup bağ dokusunun genişlediği alanlarda eozinofilik stoplazmalı ökromatik nükleuslu Leydig Hücre grupları izlendi ve normal histolojik yapıda değerlendirildi (Şekil 4.23). Bu gruba ait Johnsen skoru ortalaması $9,585 \pm 0,062$ olarak tespit edildi (Tablo 4.4).

PAS boyanan kesitlerde, seminifer tübül bazal membranları ince ve düzgün şekilde PAS pozitif boyanmış olarak izlendi. İnterstisyel alanda Leydig hücreleri sitoplazmik PAS pozitiflik gösteriyordu (Şekil 4.24).

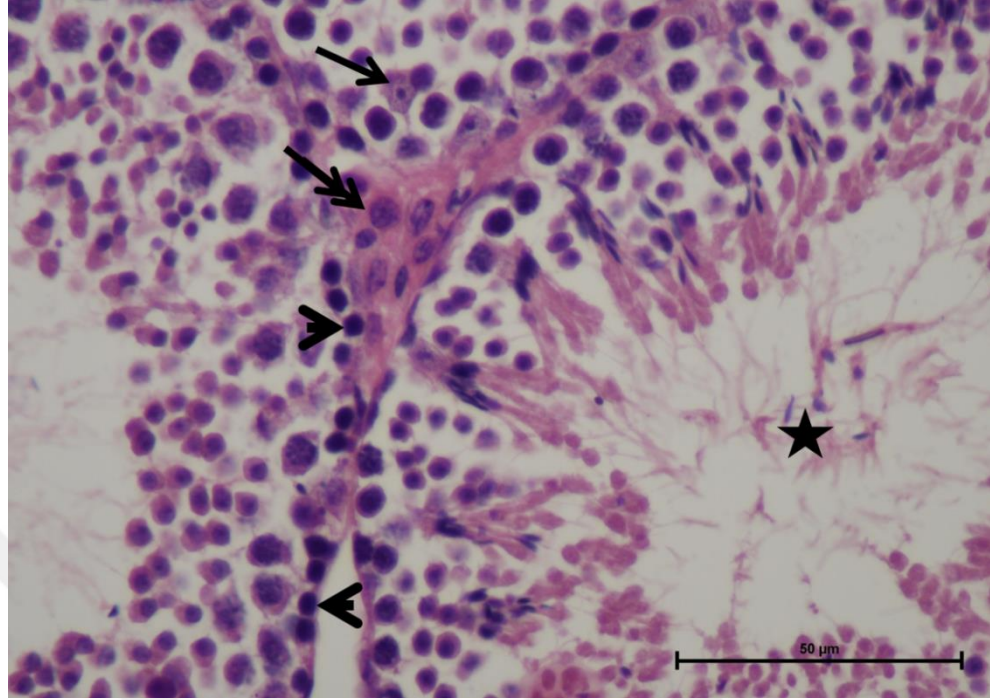
İmmünohistokimyasal olarak kaspaz 3 boyanın kesitlerde, seminifer tübüllerde zayıf ve yer yer orta düzeyde kaspaz 3 immün reaktivitesi görülürken, interstisyel alanda zayıf kaspaz 3 immün reaktivitesi izleniyordu (Şekil 4.25). Seminifer tübül kaspaz 3 immün reaktivitesi h skoru ortalaması 40 (20-40), İnterstisyel alan kaspaz 3 immün reaktivitesi h skoru ortalaması 20 (20-40) olarak tespit edildi (Tablo 4.3).



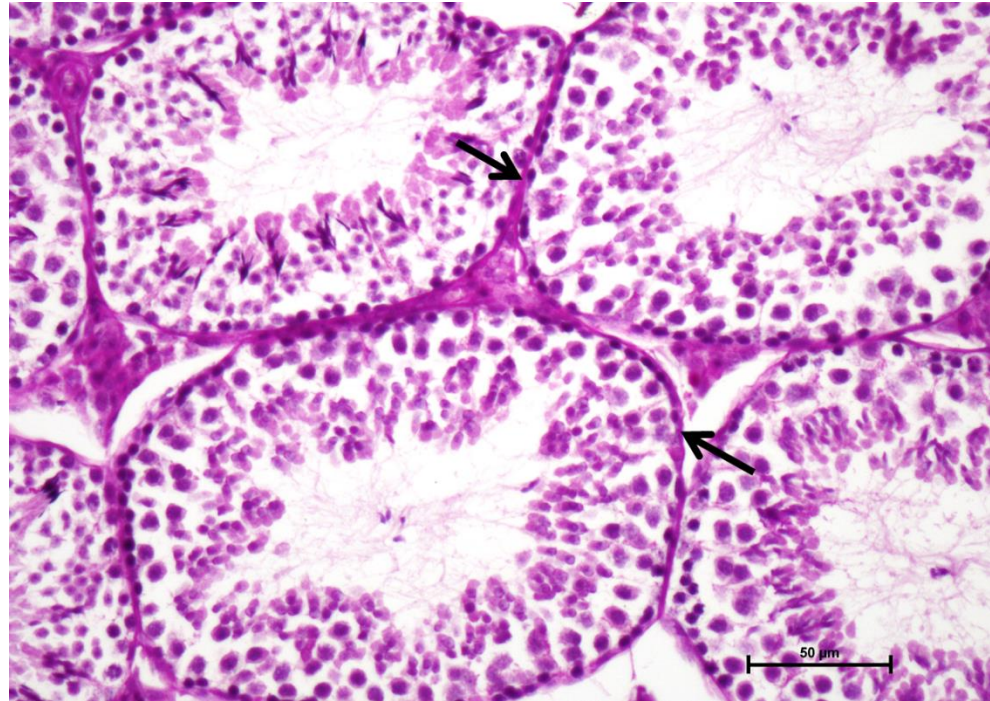
Şekil 4.21. Acmp+Mel grubu; Seminifer tübül lümeni (yıldız). H-E, 10X



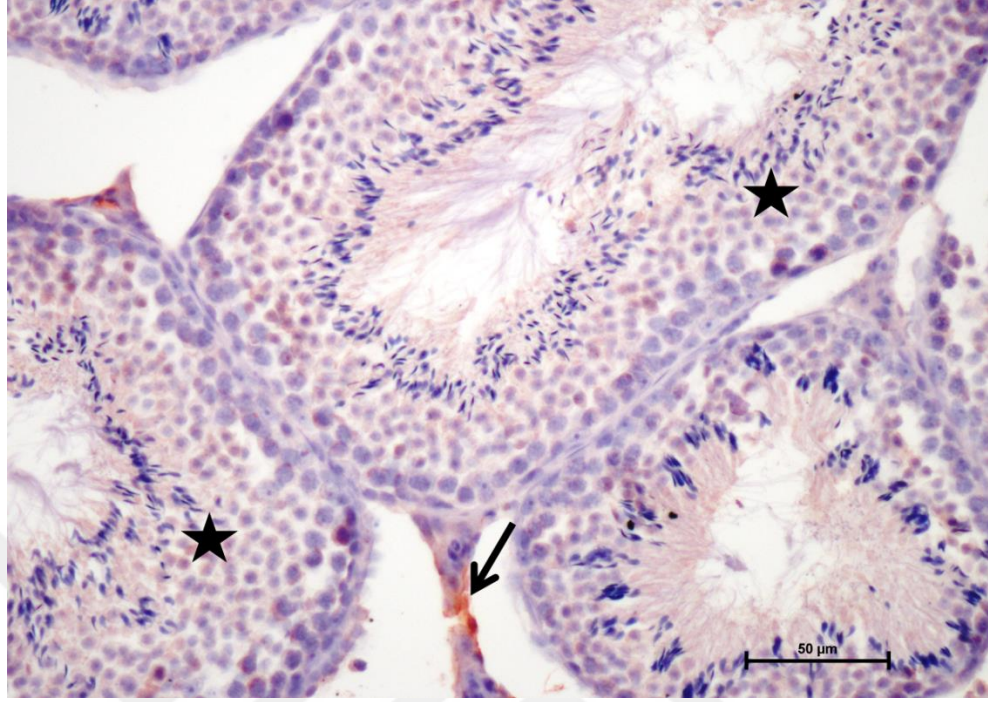
Şekil 4.22. Acmp+Mel grubu; Seminifer epitel (çift yönlü ok), Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı). H-E, 20X



Şekil 4.23. Acmp+Mel grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı), Leydig hücresi (çift başlı ok). H-E, 40X



Şekil 4.24. Acmp+Mel grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, 20X



Şekil 4.25. Acmp+Mel grubu. Seminifer epitelde (yıldız) bazı alanlarda orta ve interstisyel alanda (ok) zayıf kaspaz 3 immunreaktivesi. İHK, 20X

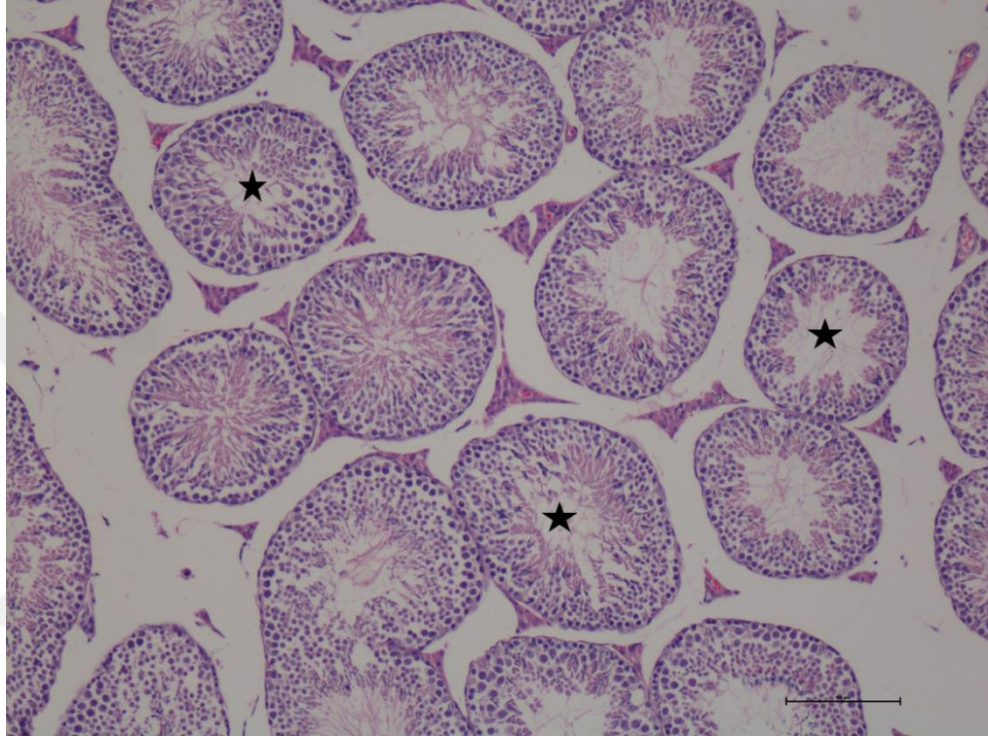
Acmp+Vitamin E grubu

Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerde, dıştan bağ dokusu kapsül ile çevrilmiş olan normal histolojik görünümde, düzgün sınırlı seminifer tübülleri izleniyordu. Seminifer tübül hücreleri normal histolojik yapıda tabakalanma gösteriyordu. Bazı seminifer tübül epitelinde bazal ve adluminal kompartmanlar arasında ince ayrılma alanları tespit edildi (Şekil 4.26). Tübüllerin büyük çoğunluğunda lümende spermatozoonlar yoğun olarak mevcuttu (Şekil 4.27). Spermatogenik seri hücreleri olağan yapıda izlendi. İnterstisyel bağ dokusu alanlarında tekniğe bağlı ayrılmalar mevcut olmakla birlikte interstisyel bağ dokunun geniş olduğu alanlarda Leydig hücre grupları saptandı. Leydig hücreleri eozinofilik stoplazmalı ve ökromatik nükleuslu olup normal histolojik yapıda değerlendirildi (Şekil 4.28). Bu gruba ait Johnsen skoru ortalaması $9,680 \pm 0,081$ olarak tespit edildi (Tablo 4.4).

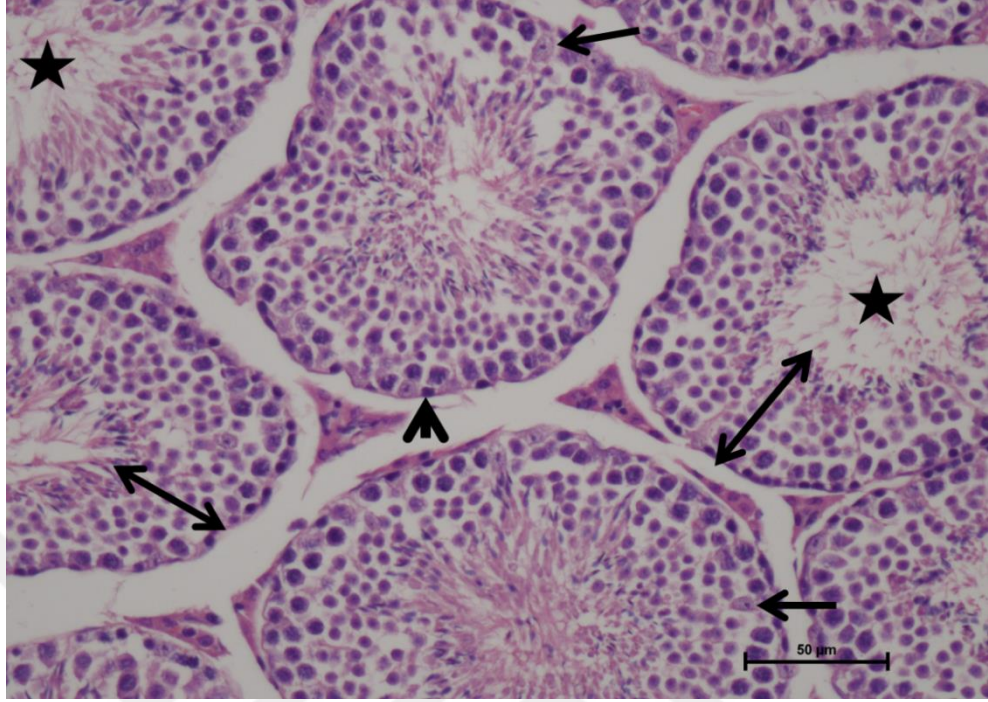
PAS boyanan kesitlerde, seminifer tübül bazal membranları ince, düzgün ve kesintisiz olarak normal histolojik yapıda ve PAS pozitif boyanma gösteriyordu (Şekil 4.29).

İmmünohistokimyasal olarak kaspaz 3 boyanan kesitlerde, seminifer tübüllerde ve interstisyel bağ dokusu alanlarda genel olarak diffüz, zayıf düzeyde kaspaz 3 immün reaktivitesi saptandı (Şekil 4.30). Seminifer tübül kaspaz 3 immün reaktivitesi h skoru

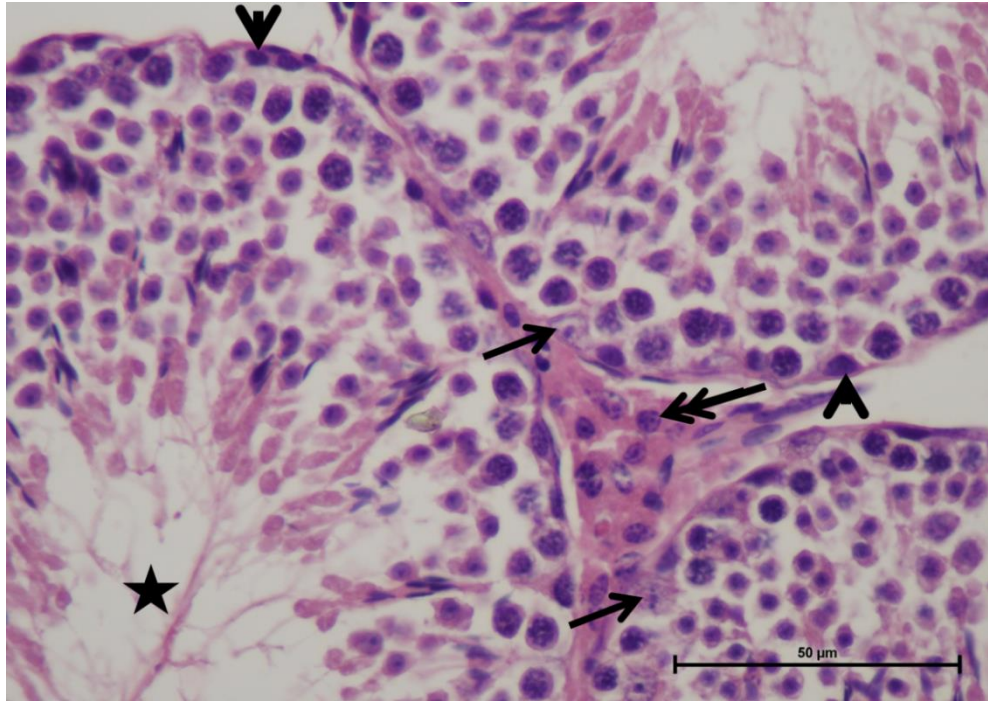
ortalaması 40 (20-60), interstisyel alan kaspaz 3 immün reaktivitesi h skoru ortalaması 20 (0-40) olarak tespit edildi (Tablo 4.3).



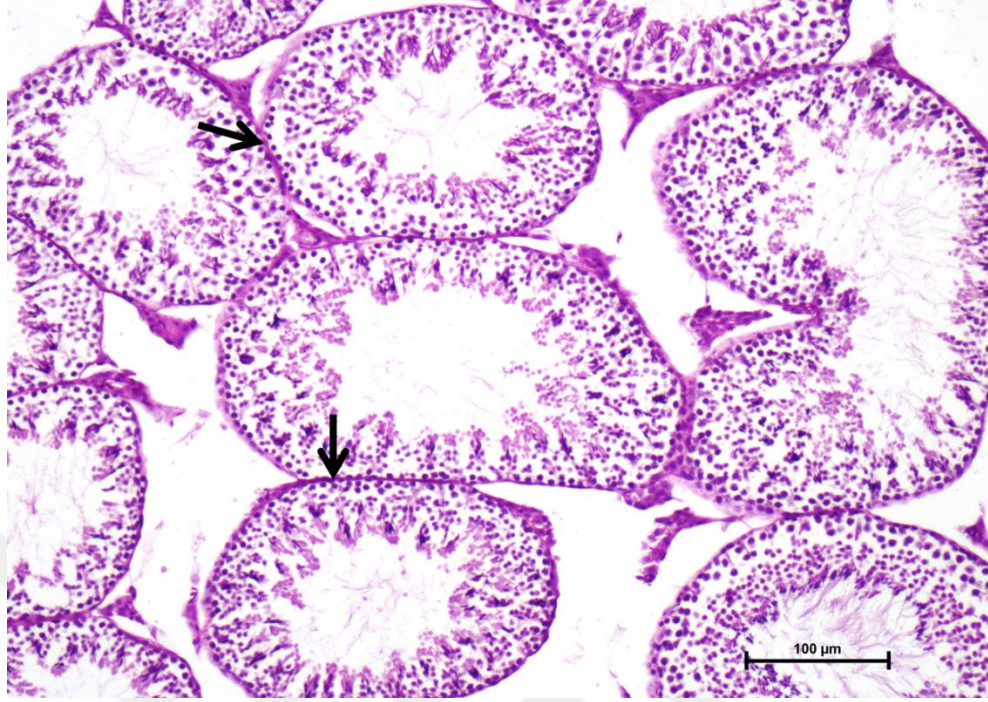
Şekil 4.26. Acmp+Vitamin E grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız). H-E, 10X



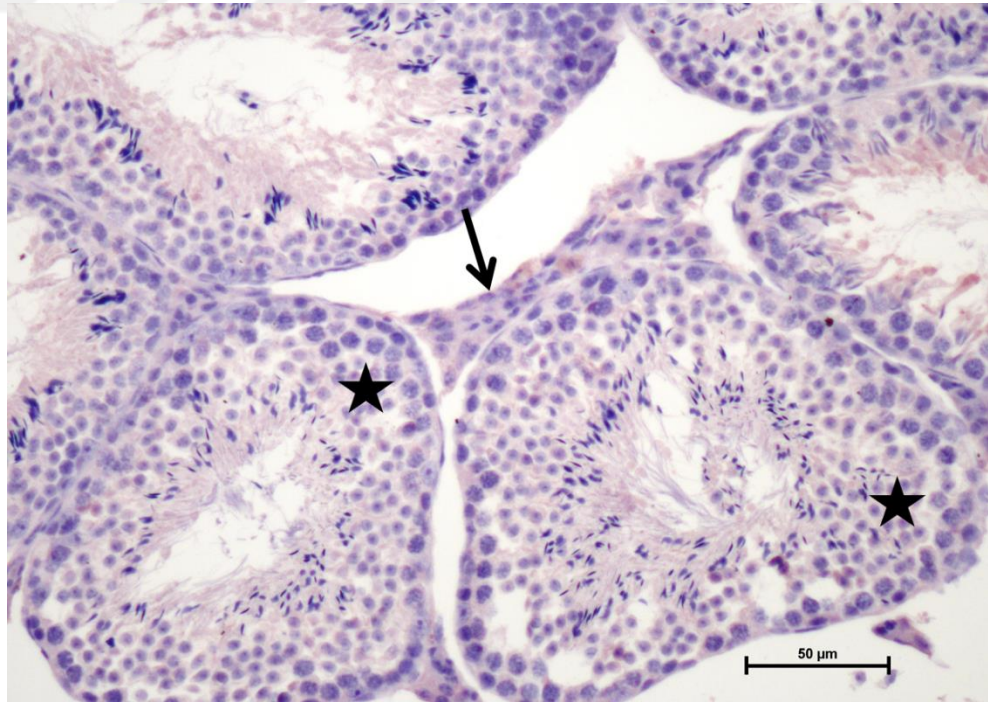
Şekil 4.27. Acmp+Vit E grubu. Seminifer epitel (çiftyönlü ok), Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı). H-E, 20X



Şekil 4.28. Acmp+Vit E grubu Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı), Leydig hücresi (çift başlı ok). H-E, 40X



Şekil 4.29. Acmp+Vit E grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, 20X



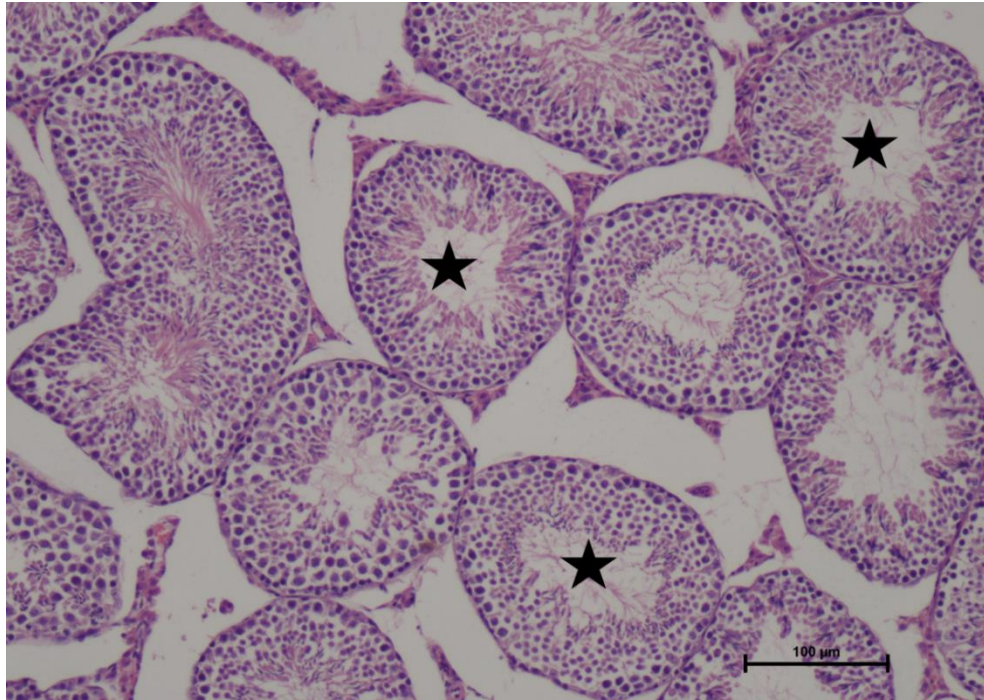
Şekil 4.30. Acmp+Vit E grubu. Seminifer epitelde (yıldız) ve interstisyel alanda (ok) zayıf kaspaz 3 immunreaktivesi. İHK, 20X

Acmp+Vitamin E+Melatonin grubu

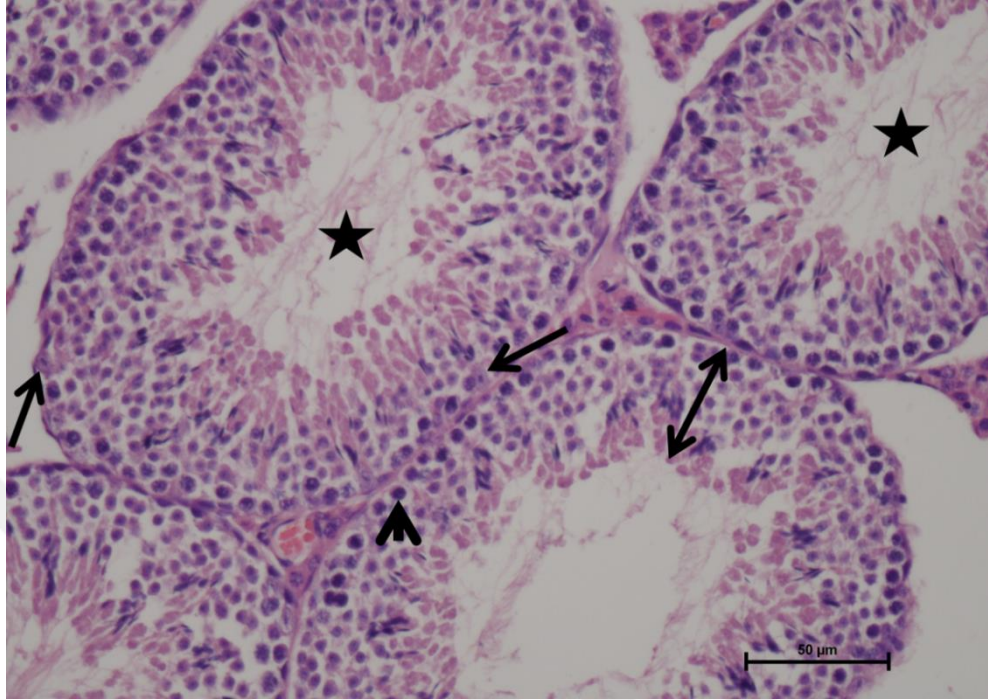
Hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerde, seminifer tübüller ve interstisyel bağ dokusu alanlarının genel olarak normal histolojik görünümde olduğu izlendi (Şekil 4.31). Seminifer tübül epiteli içerisindeki hücre dizilimi ve tabakalanması olağan yapıda olup tübüllerin büyük kısmında, lümende farklı yoğunluklarda spermatozoonlar mevcuttu (Şekil 4.32). İnterstisyel bağ dokusu normal yoğunluk ve yapıda olup, kalınlaştığı bölgelerde Leydig hücre grupları içeriyordu. Leydig hücreleri eozinofilik stoplazmalı ve ökromatik nükleuslu olup normal histolojik yapıda değerlendirildi (Şekil 4.33). Bu gruba ait Johnsen skoru ortalaması $9,767 \pm 0,035$ olarak tespit edildi (Tablo 4.4).

PAS boyanan kesitlerde, seminifer tübül bazal membranları PAS pozitif boyanmış olarak normal histolojik yapıda izlendi (Şekil 4.34).

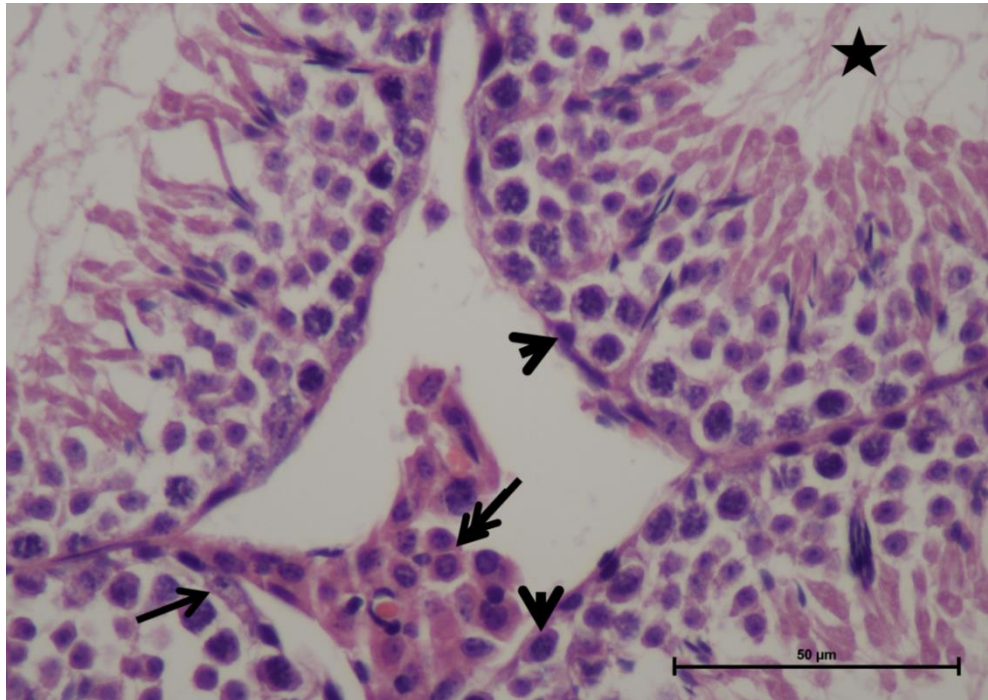
İmmünohistokimyasal kaspaz 3 boyanan kesitlerde, seminifer tübüllerde ve interstisyel bağ dokusu alanlarda diffüz, zayıf düzeyde kaspaz 3 immün reaktivitesi saptandı (Şekil 4.35). Seminifer tübül kaspaz 3 immün reaktivitesi h skoru ortalaması 20 (20-40), interstisyel alan kaspaz 3 immün reaktivitesi h skoru ortalaması 20 (20-40) olarak tespit edildi (Tablo 4.3).



Şekil 4.31. Acmp+Vit E+Mel grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız). H-E, 10X



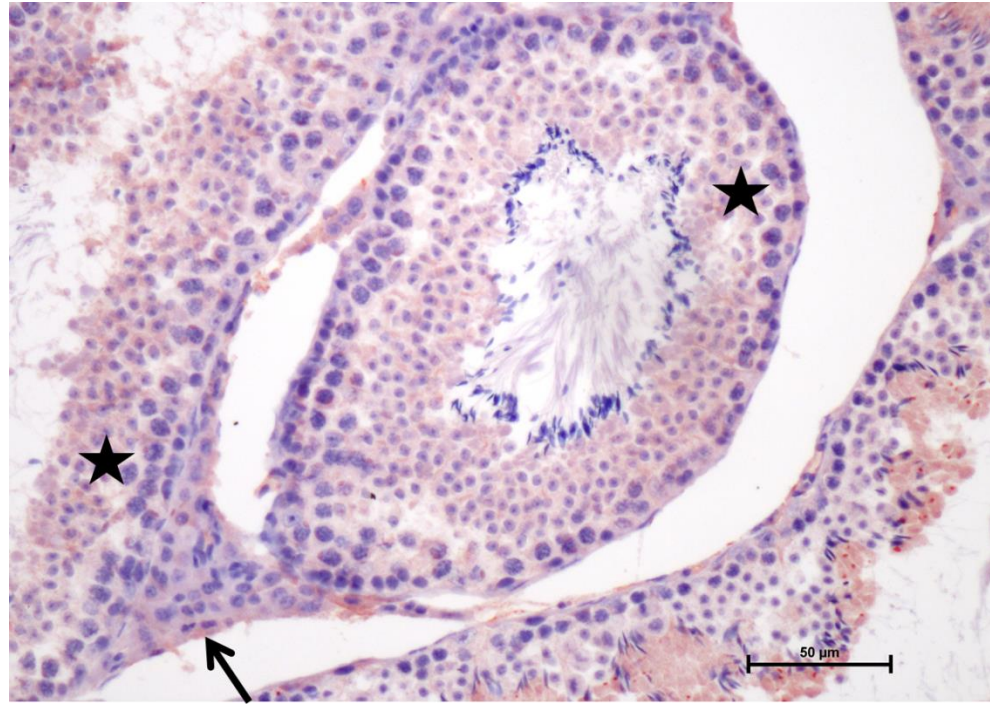
Şekil 4.32. Acmp+Vita E+Mel grubu. Seminifer epitel (çift yönlü ok), Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı). H-E, 20X



Şekil 4.33. Acmp+Vit E+Mel grubu. Seminifer tübül lümeni (yıldız), Sertoli hücresi (ok), spermatogonyum (ok başı), Leydig hücresi (çift başlı ok). H-E, 40X



Şekil 4.34. Acm+Vit E+Mel grubu. Seminifer tübül bazal membranı (ok). PAS, 20X

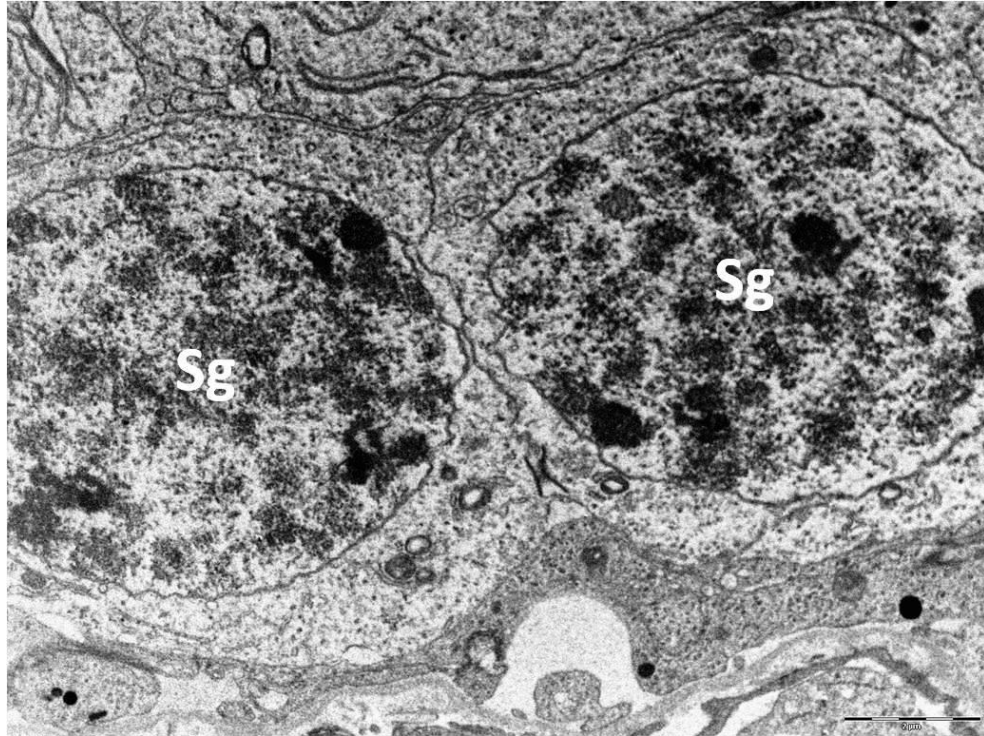


Şekil 4.35. Acm+Vit E+Mel grubu. Seminifer epitelde (yıldız) ve interstisyel alanda (ok) zayıf kaspaz 3 immunreaktivesi. İHK, 20X

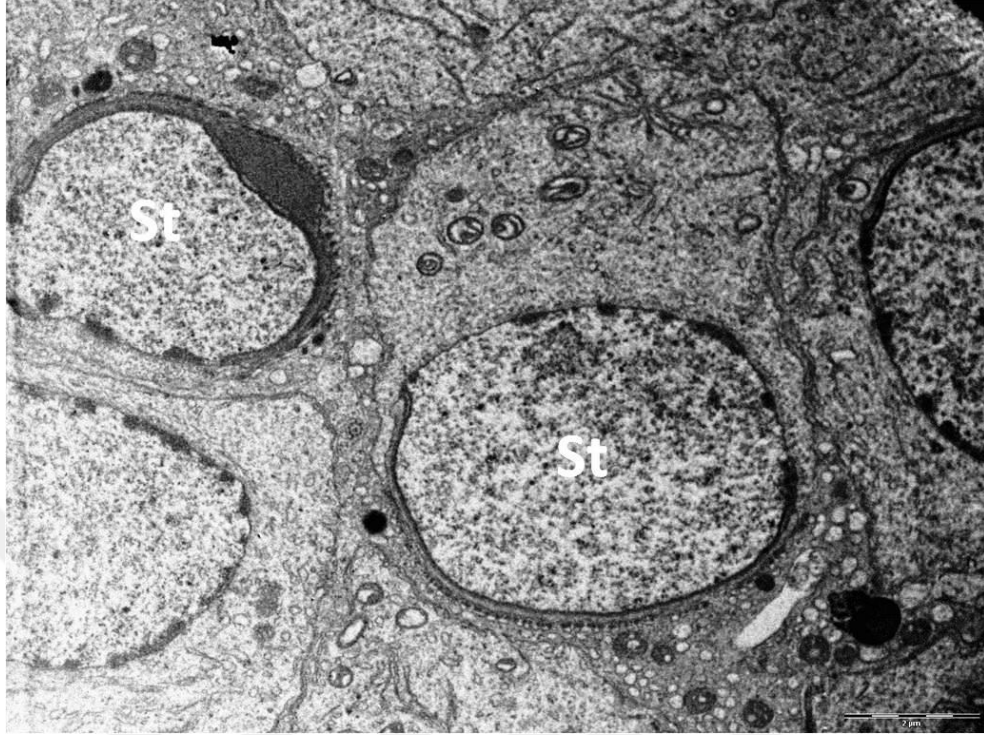
4.3.2. Elektron Mikroskopik Bulgular

Distile Su, Etanol ve Mısır Yağı grupları

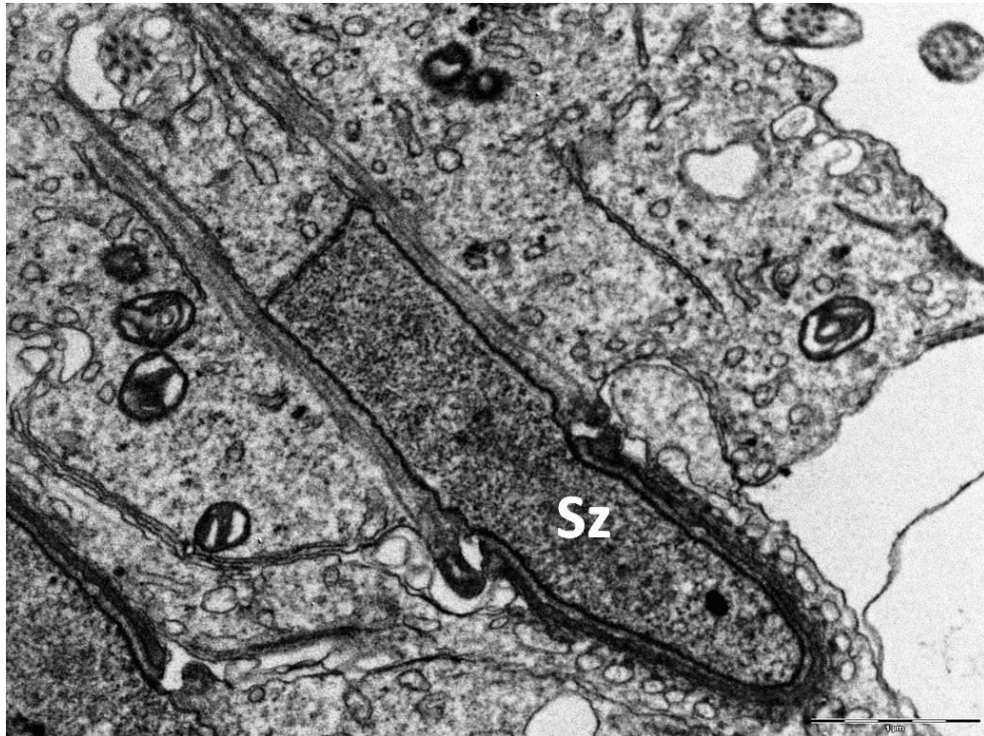
Alınan İncelenen ultra ince kesitlerde, sminifer tübül epitelinde spermatogenik seri hücreleri normal yapıda ve düzende görüldü. Bazal membran üzerinde ökromatik ve heterokromatik alanlar içeren spermatogonyum nükleusları normal ultrastriktürel yapıda izlendi (Şekil 4.36, 4.40). Spermatogonyumların dar stoplazma alanları olağan yapıda değerlendirildi. Spermatogonyum bazal mebran, spermatogonyum-Sertoli hücresi ve spermatogonyumlar arası bağlantı bölgeleri düzenli ve normal yapıda izlendi (Şekil 4.44). Seminifer epiteldeki farklı gelişim aşamalarında spermatositler ve spermatitler normal nükleus ve stoplazma görünümüne sahip olup gelişim aşamaları ile uyumlu preakrozomal ve akrozomal yapılar tespit edildi (Şekil 4.37, 4.41, 4.45). Seminifer epitel lümene yakın bölgesinde baş kısımları Sertoli Hücresi stoplazmasına gömülü spermatozoonlar normal ultrastriktürel yapıda izlendi. Tübüller arası interstisyel bağ dokusu içerisinde genellikle gruplar halinde Leydig Hücreleri izlendi. Leydig Hücre nükleuslarında ökromatik vr heterokromatik alanlar ve stoplazma içeriği normal ultrastriktürel yapıda değerlendirildi (Şekil 4.39, 4.43, 4.47).



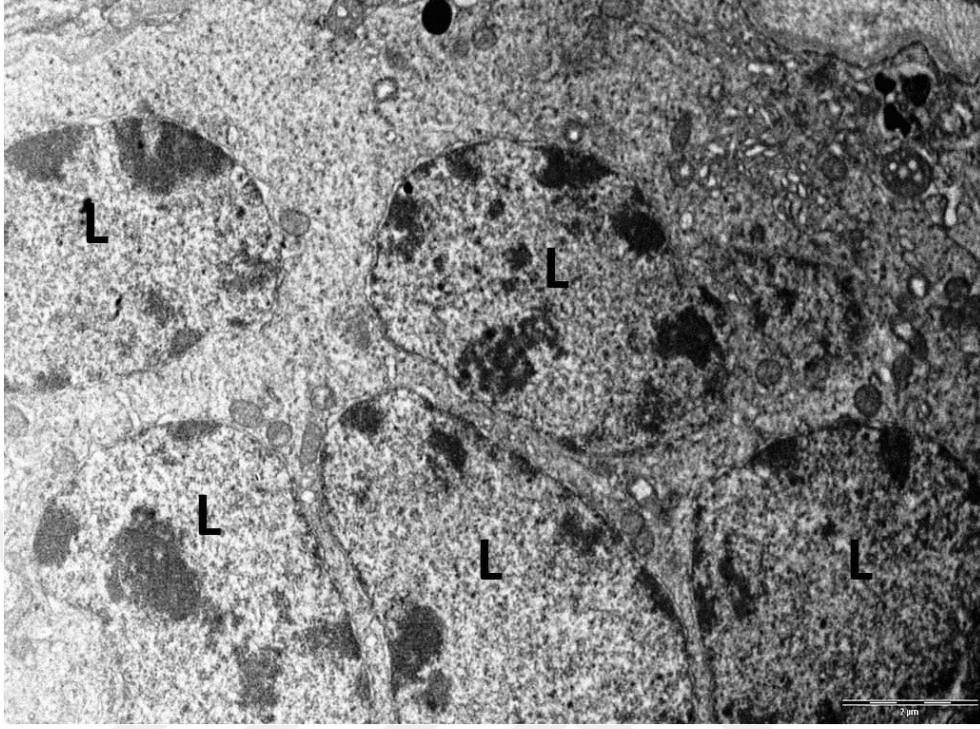
Şekil 4.36. Distile su. Spermatogonyumlar (Sg). Skala=2 µm



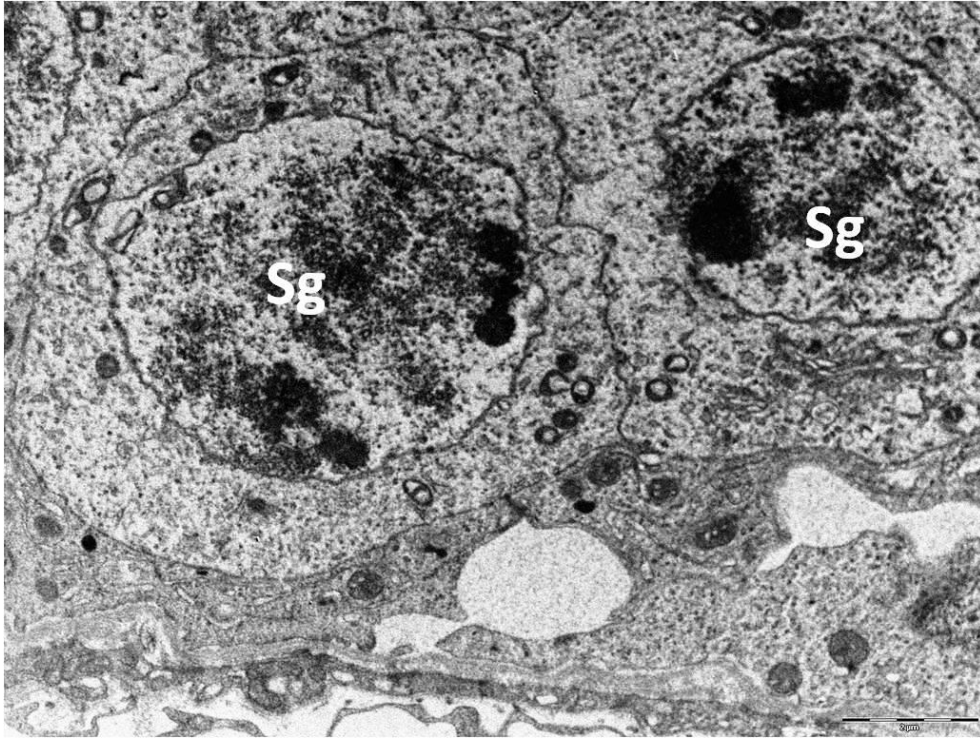
Şekil 4.37. Distile su. Farklı gelişim aşamalarında, normal ultrastrüktürde spermatidler (St). Skala=2 µm



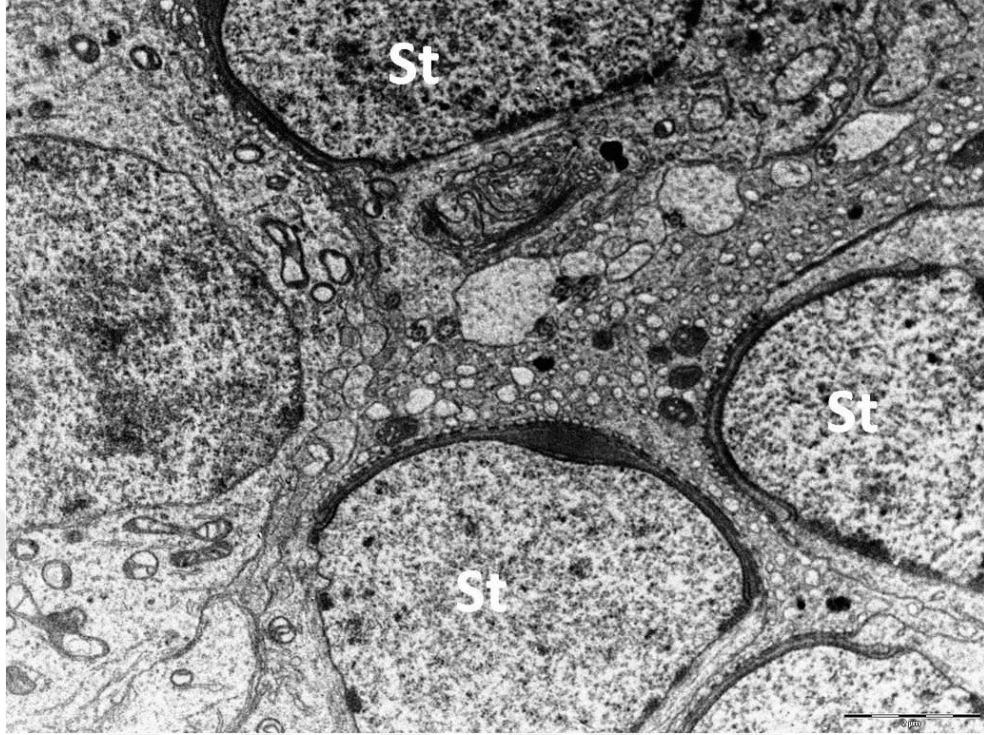
Şekil 4.38. Distile su. Normal ultrastrüktürde spermatozoon (Sz). Skala=1 µm



Şekil 4.39. Distile su. Normal ultrastrüktürde Leydig hücreleri (L), Skala=2 µm



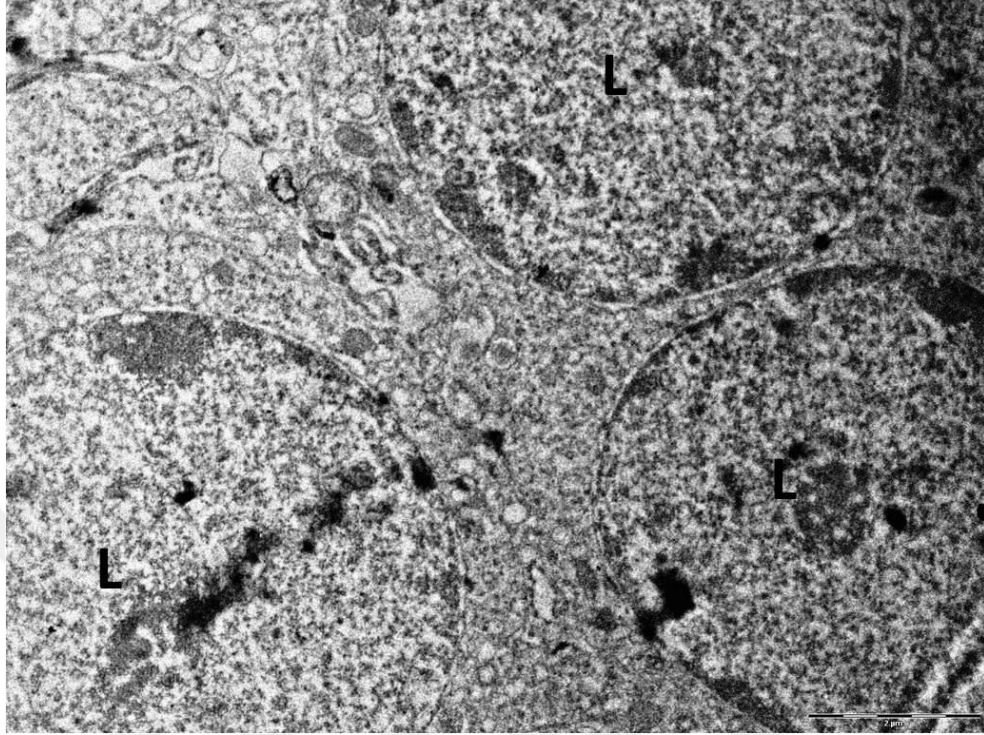
Şekil 4.40. Etanol. Spermatogonyumlar (Sg). Skala=2 µm



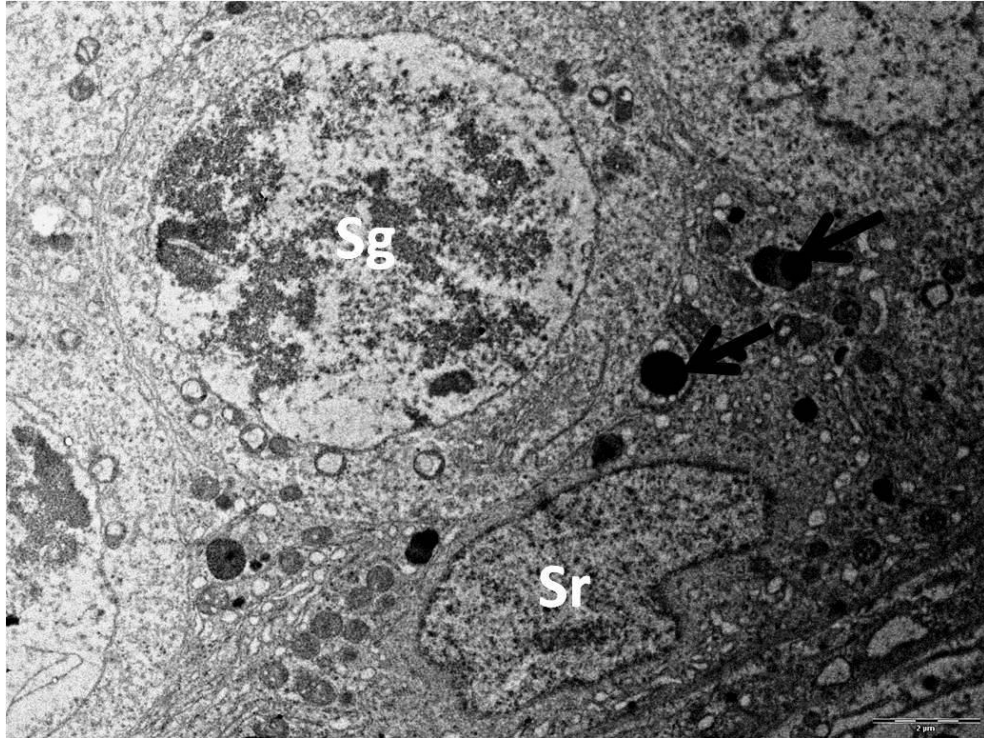
Şekil 4.41. Etanol. Farklı gelişim aşamalarında, normal ultrastrüktürde spermatidler (St).
Skala=2µm



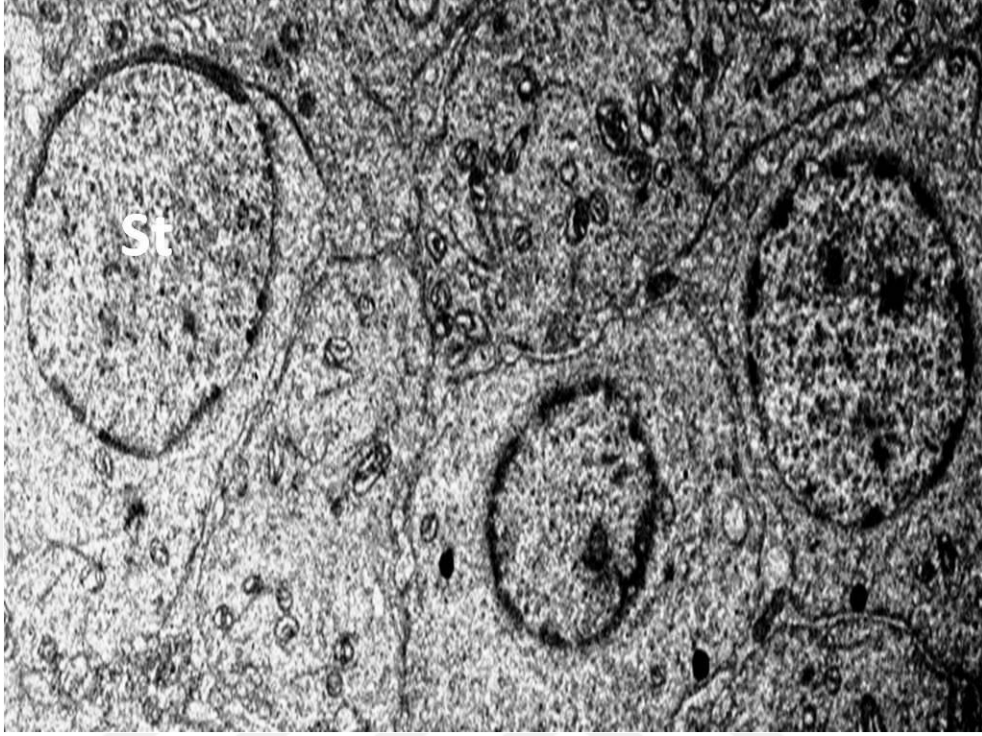
Şekil 4.42. Etanol. Normal ultrastrüktürde spermatozoon (Sz) ve Sertoli hücresi (sr).
Skala=2 µm



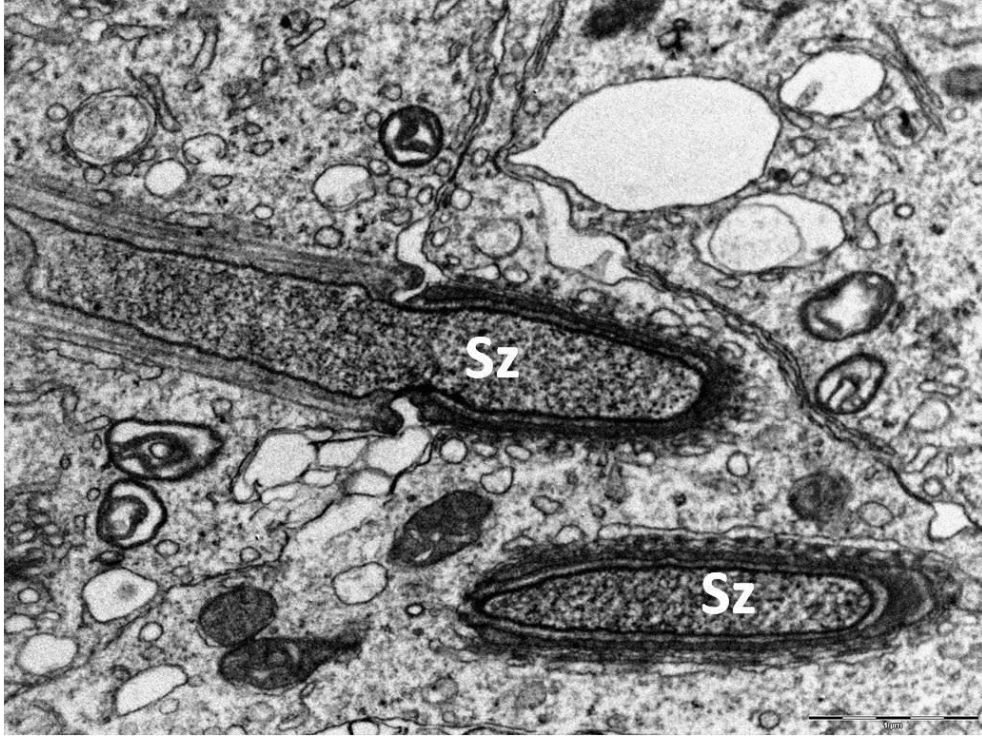
Şekil 4.43. Etanol. Normal ultrastrüktürde Leydig hücreleri (L), Skala=2 µm



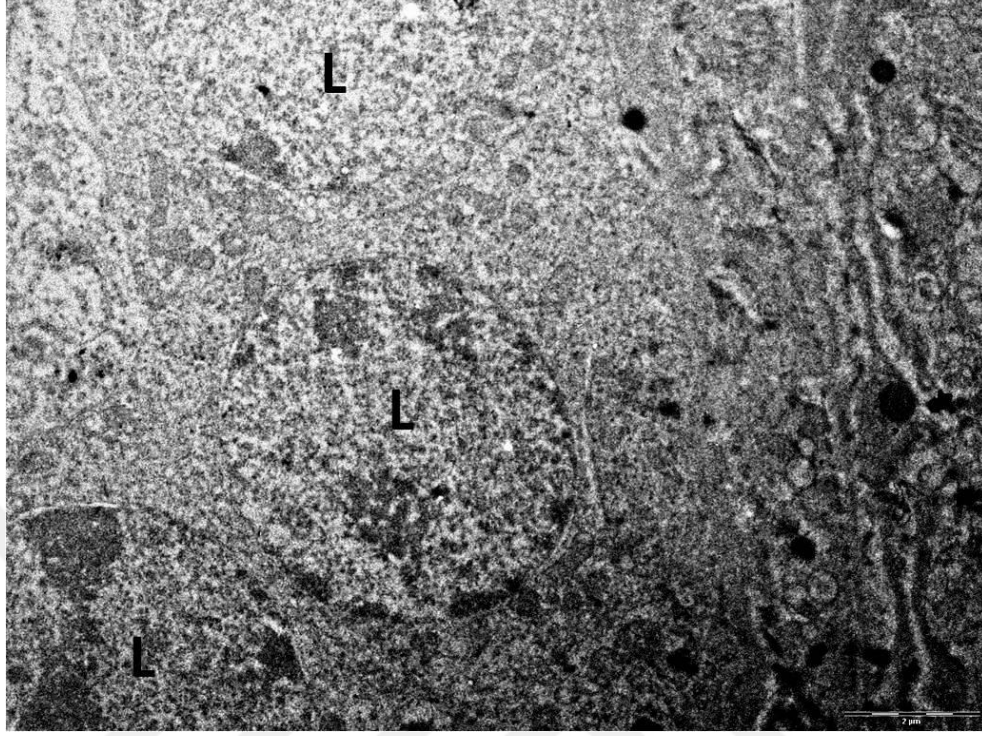
Şekil 4.44. Mısır yağı. Sertoli hücresi (Sr), Sertoli hücresi stoplazmasında küçük lizozomlar (ok), spermatogonyum (Sg). Skala=2 µm



Şekil 4.45. Mısır yağı. Normal ultrastrüktürde erken spermatid (St). Skala=2 μ m



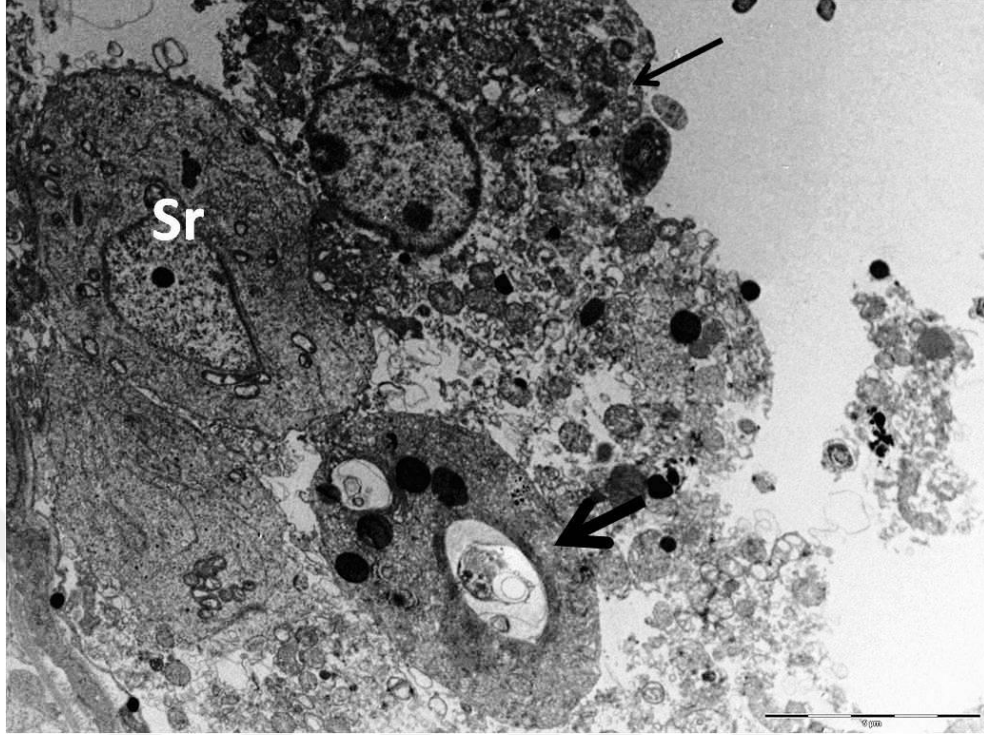
Şekil 4.46. Mısır yağı. Normal ultrastrüktürde spermatozoon (Sz). Skala=2 μ m



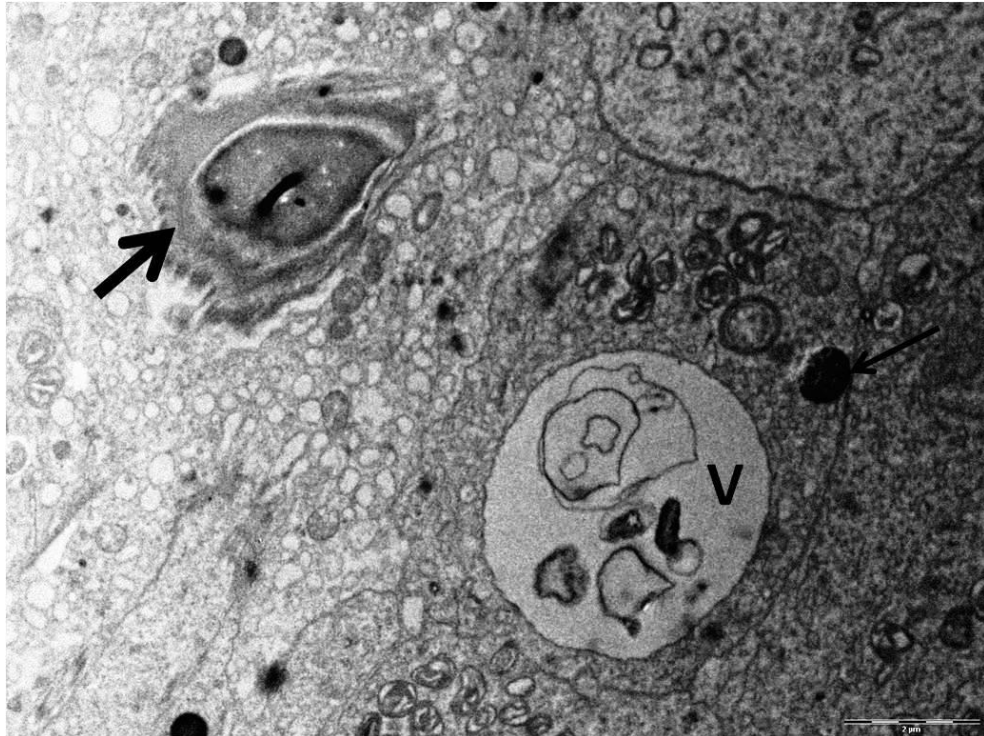
Şekil 4.47. Mısır yağı. Leydig hücresi nukleusu (L). Skala=2 μ m

Acmp grubu

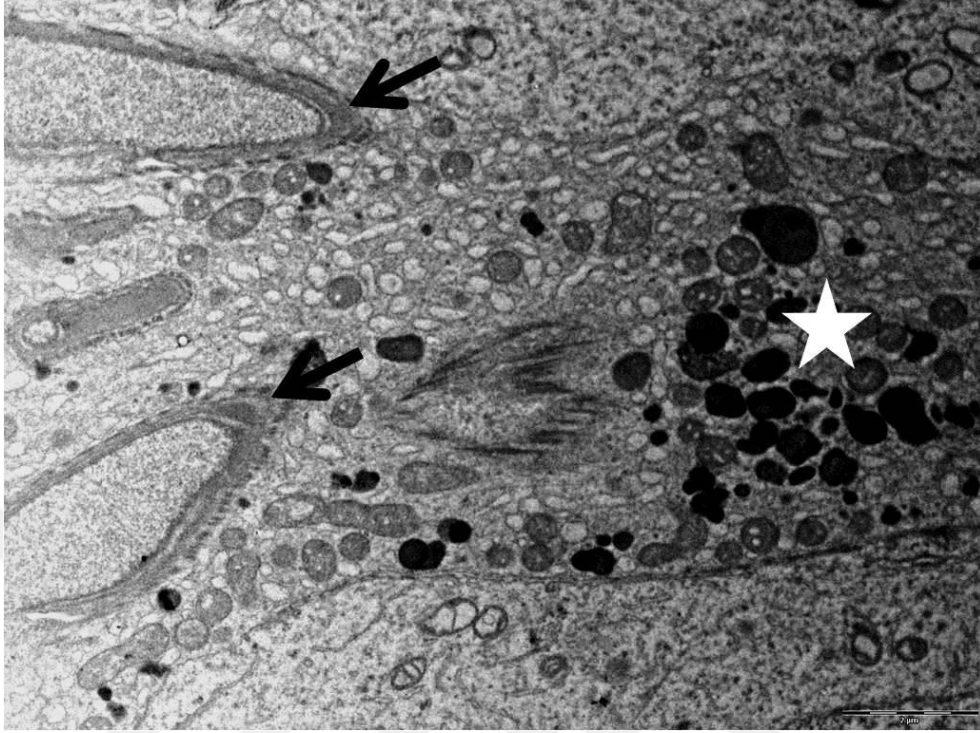
İncelenen ultra-ince kesitlerde, seminifer tübül epitelinde yer yer farklı derecelerde hasar ve dejenerasyon izlendi. Bazı tübül epitellerinde spermatogonyum seviyesine kadar tüm spermatogenik hücre serilerinde; lizozomal birikim, farklı boyutlarda miyelin figür içeren vakuolizasyon ve hücre nekrozu izleniyordu (Şekil 4.48, 4.49). Geç spermatit ve spermatozoonlarda baş bölgesinde düzensiz nükleus ve akrozom yapısı, nükleus yoğunluğunda artış ve akrozomlarda heterojenite tespit edildi. Sertoli hücrelerinde yoğun primer ve sekonder elektron yoğun lizozomal birikim dikkati çekti (Şekil 4.50). İnterstisyel alanda bazı Leydig Hücre stoplazmalarında ileri derecede hidropik dejenerasyon ve yer yer stoplazma bütünlüğü kaybolmuştu, mitokondriyonlar ve endoplazmik retikulum dejenere yapıda olup zorlukla seçilebiliyordu ve stoplazma alanları içerisinde elektron yoğun lipid vakuolleri saptandı. Bu özelliklerdeki Leydig Hücrelerinde nükleer kramatolizis belirgindi (Şekil 4.51).



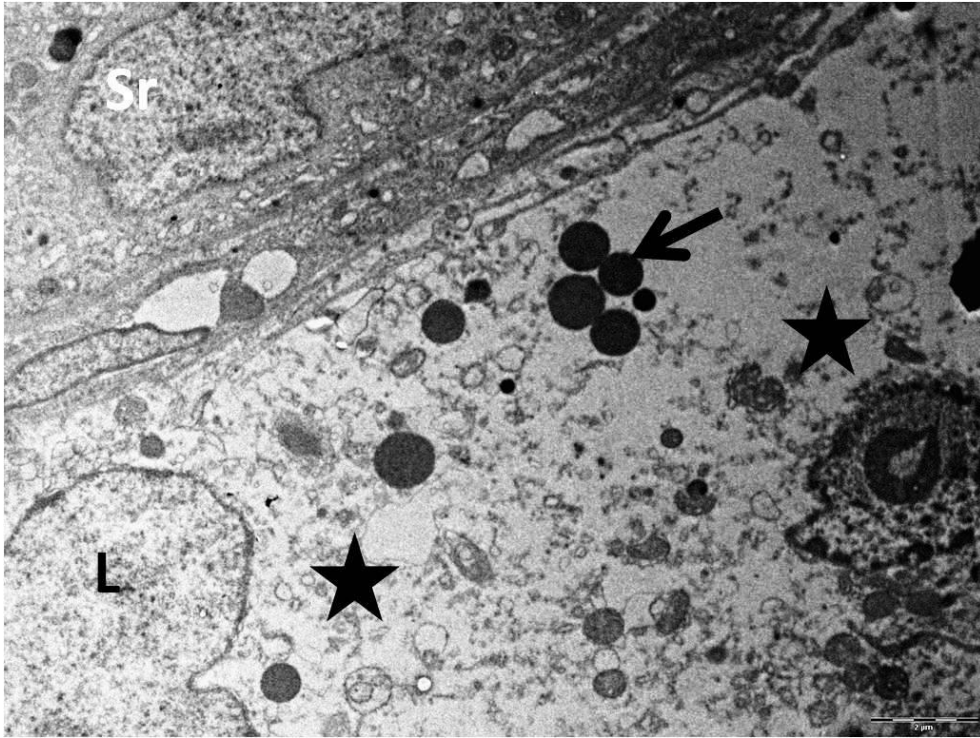
Şekil 4.48. Acmp. Sertoli hücresi (sr), Dejenere primer spermatosit (ince ok), seminifer tubül duvarında vakuoller içinde miyelin figürler ve lizozomlar içeren stoplazma parçası. Skala=5 µm



Şekil 4.49. Acmp. Dejenere geç spermatid, spermatosit stoplazmasında miyelin figürler içeren büyük vakuol (kalın ok), ve lizozom (ince ok). Skala=2 µm



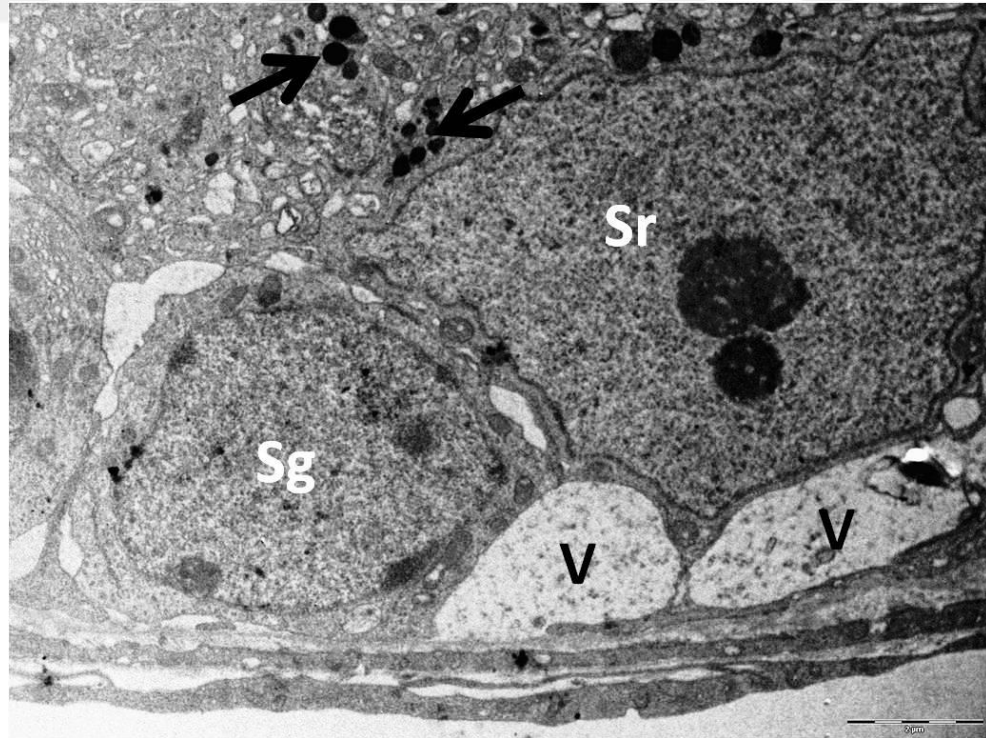
Şekil 4.50. Acmp. Spermatozoon akrozomları elektron yoğunluğunda azalma (ok), Sertoli hücresi stoplazmasında yoğun sekonder lizozom birikimi (yıldız). Skala=2 μ m



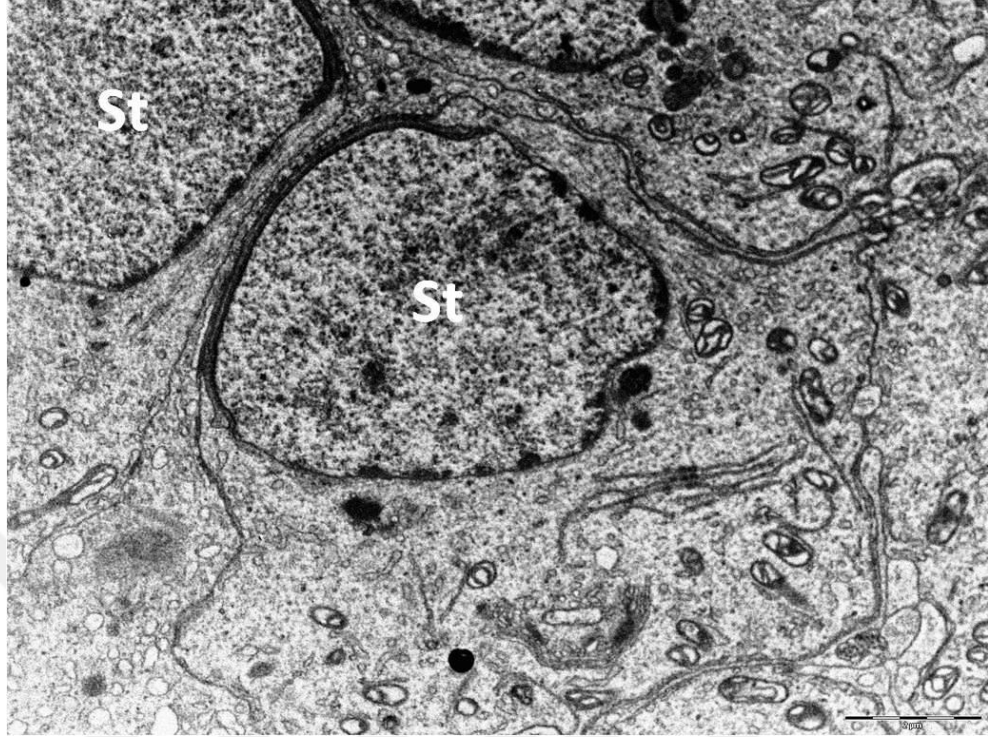
Şekil 4.51. Acmp. Sertoli hücresi (sr), Leydig hücre nukleusunda kromatolizis (L), Leydig hücrelerinde hidropik dejenerasyon (yıldız), lipid vakuolleri (ok). Skala=2 μ m

Acmp+Melatonin grubu

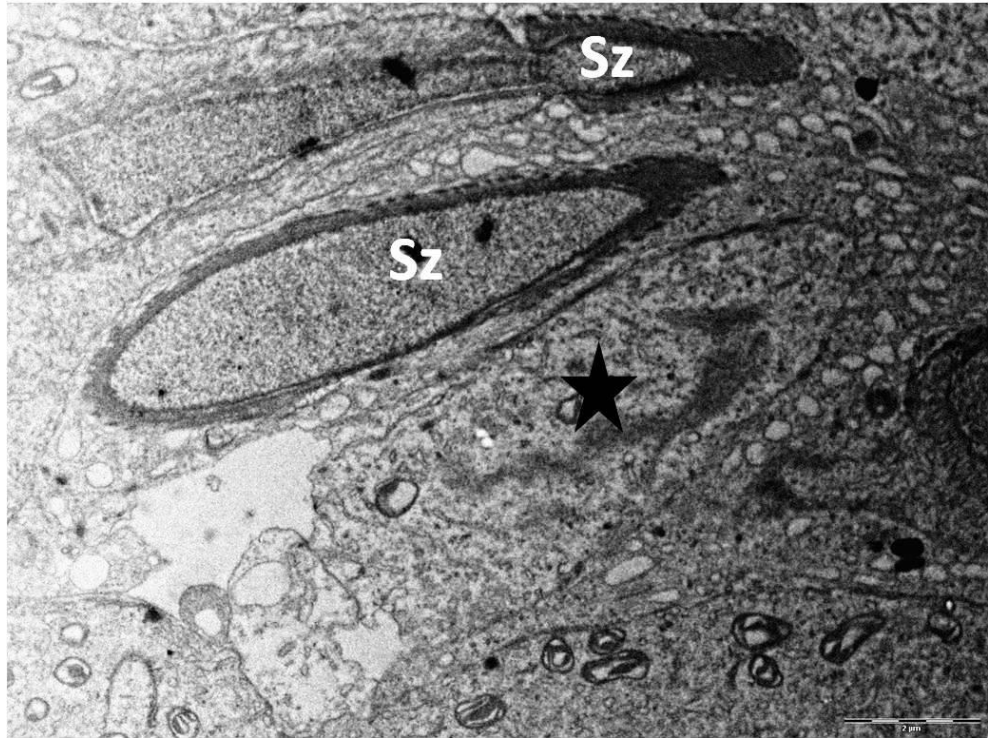
İncelenen ultra ince kesitlerde, spermatogonyumlar normal ultrastrüktürel görünümde değerlendirildi. Spermatogonyum bazal mebran, spermatogonyum-Sertoli hücresi ve spermatogonyumlar arası bağlantı bölgelerinde yer yer farklı genişliklerde ayrılmalar ve vakuol yapıları dikkati çekti. Sertoli Hücre stoplazmalarında lizozomal birikimler izlendi (Şekil 4.52). Seminifer epitel içerisinde farklı gelişim aşamalarında spermatositler ve spermatitler normal nükleus ve stoplazma yapısına sahipti (Şekil 4.53). Seminifer epitel lümene yakın bölgesinde baş kısımları Sertoli Hücresi stoplazmasına gömülü spermatozoonlar normal ultrastrüktürel yapıda izlendi (Şekil 4.54). Yer yer akrozomal kep içermeyen, boyun segmentinde elektron yoğun bölgeler içeren anormal yapılı spermatozoonlara rastlandı. İnterstisyel alanda izlenen Leydig Hücreleri genel olarak normal ultrastrüktürel yapıda olmakla birlikte; bazılarında lizozomal birikimlerde artış ve minimal düzeyde nükleer kromatolizis dikkati çekti. Ayrıca bazı alanlarda interstisyel bağ dokusu içerisinde ödem tespit edildi (Şekil 4.55).



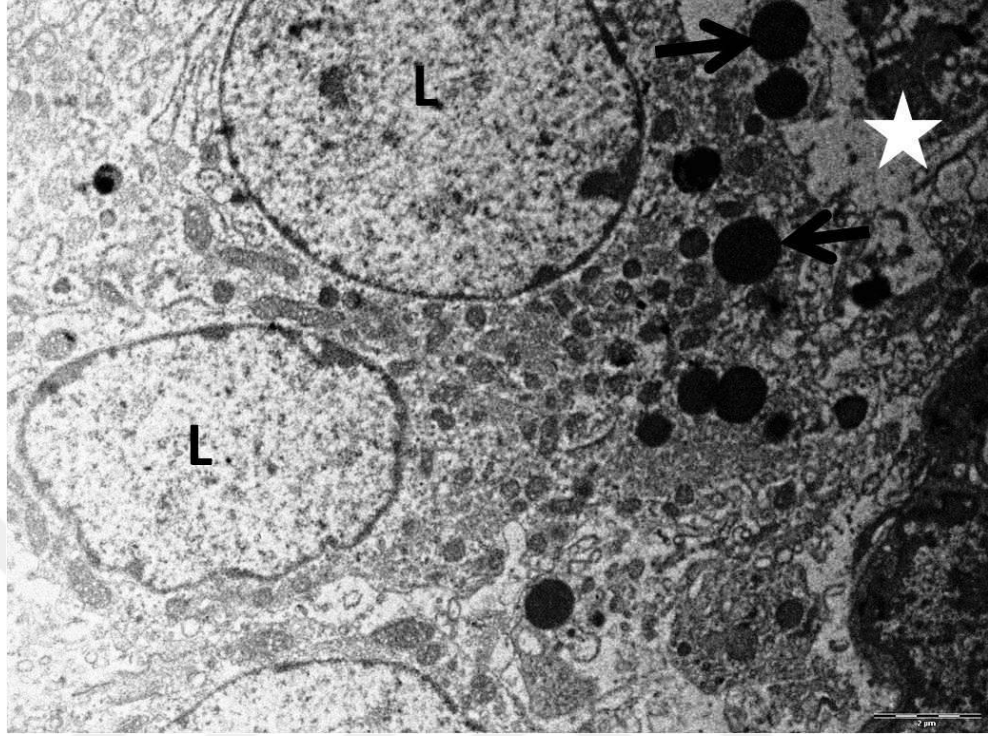
Şekil 4.52. Acmp+Mel. Sertoli hücresi (Sr), Sertoli hücresi stoplazmasında lizozomlar (ok), spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi ve spermatogonyum ile bazal membran arasında vakuoller (v). Skala=2 μ m



Şekil 4.53. Acmp+Mel. Normal ultrastrüktürde erken spermatidler (St). Skala=2 μ m



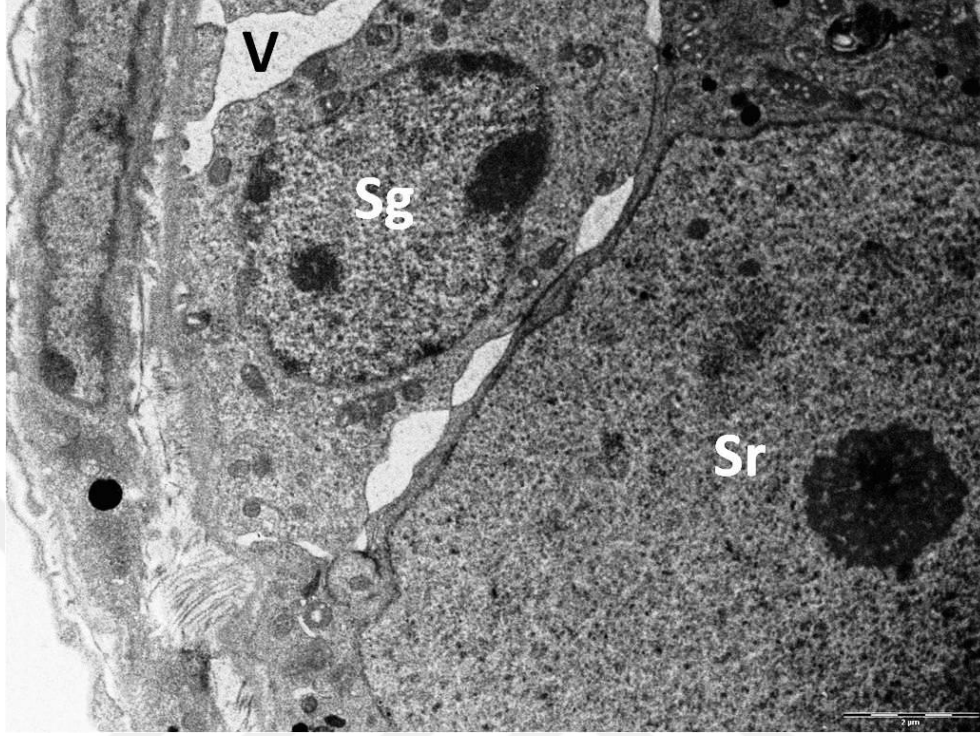
Şekil 4.54. Acmp+Mel. Normal ultrastrüktürde spermatozoon (Sz), Nuklear kromatolizis, akrozom kaybı ve sitoplazmik hidropik değişiklikli içeren spermatozoon (yıldız). Skala=2 μ m



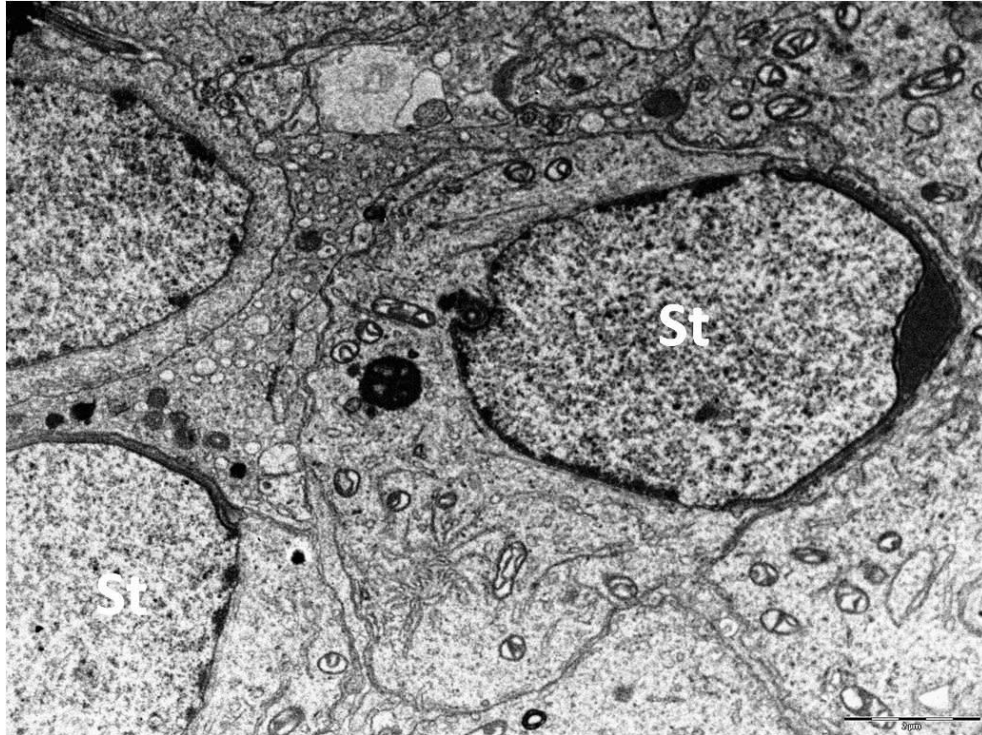
Şekil 4.55. Acmp+Mel. Leydig hücresi nukleusu (L), Leydig hücre stoplazmasında lizozomlar (ok), interstisyel dokuda minimal ödem (yıldız). Skala=2 μ m

Acmp+Vitamin E grubu

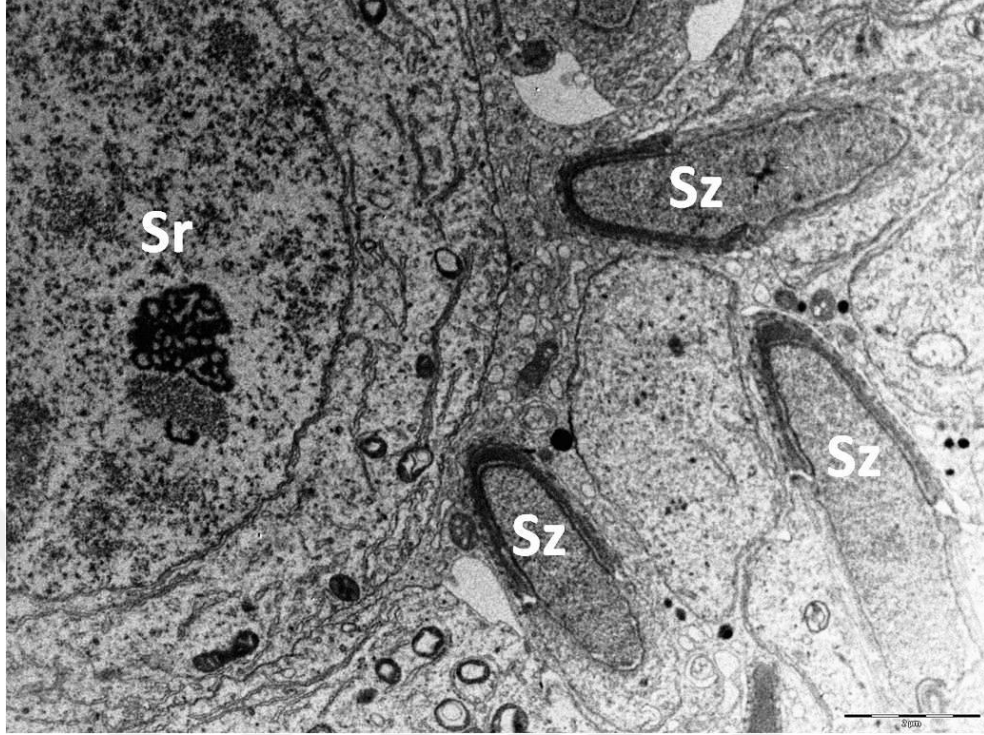
Acmp+Melatonin grubunda görülen intertisyel alanda ödem ve anormal yapılı spermatozoon dışındaki tüm ultrastriktürel bulgular Acmp+Mel grubu ile aynıydı.



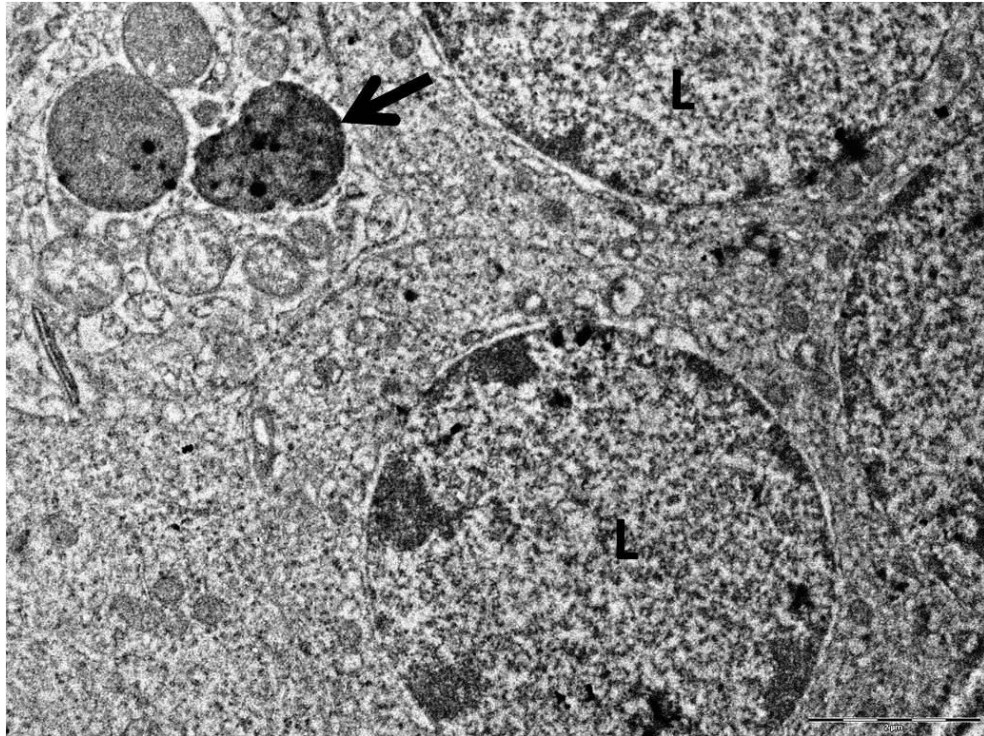
Şekil 4.56. Acmp+Vit E. Sertoli hücresi (Sr), spermatogonyum (Sg), Sertoli hücresi ve spermatogonyum ile bazal membran arasında vakuoller tarzda ayrılma alanları (V).Skala=2μm



Şekil 4.57. Acmp+Vit E. Farklı gelişim aşamalarında, normal ultrastrüktürde spermatidler (St). Skala=2 μm



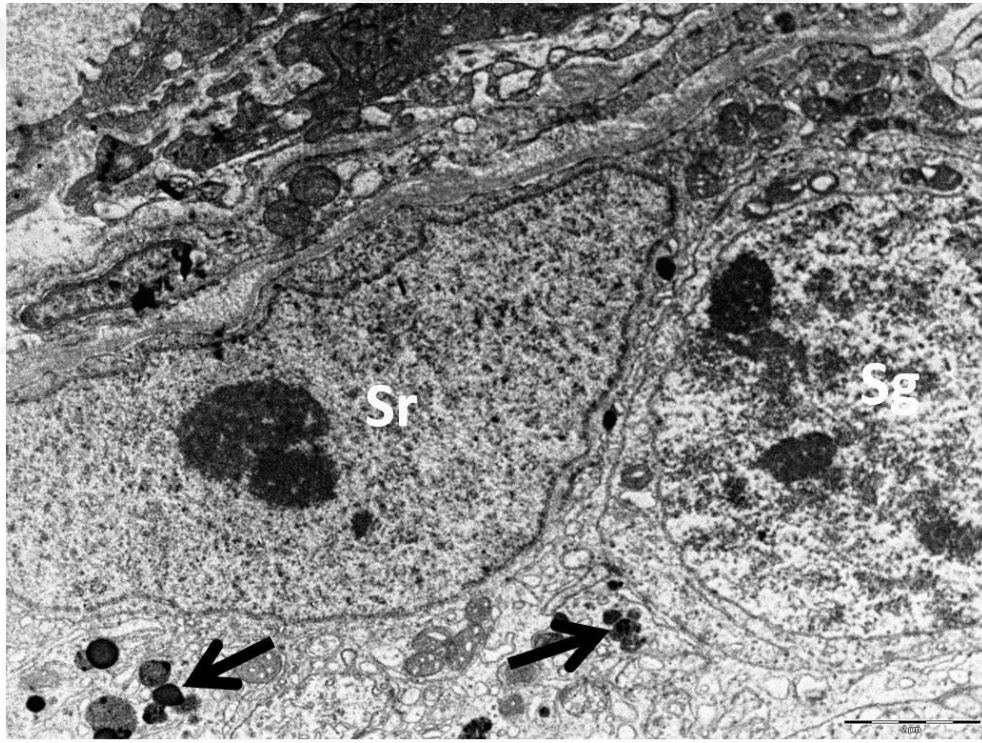
Şekil 4.58. Acmp+Vit E. Normal ultrastrüktürel yapıda spermatozoon (Sz) ve Sertoli hücresi (Sr). Skala=2 μ m



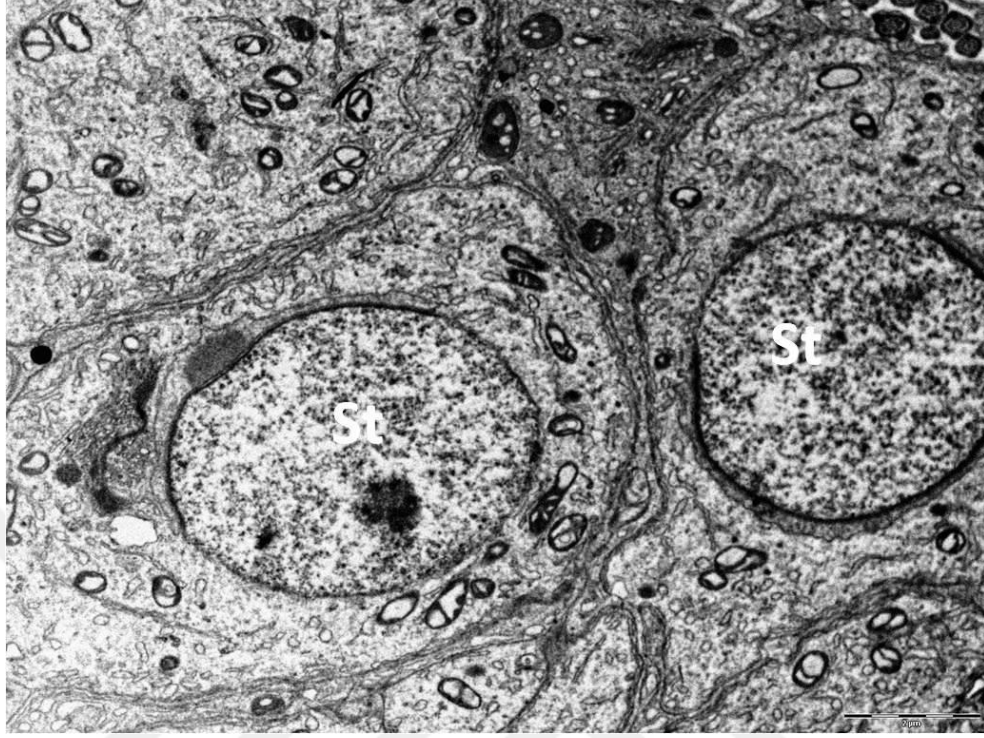
Şekil 4.59. Acmp+Vit E. Leydig hücresi nukleusu (L), lizozom (ok), Skala=2 μ m

Acmp+VitaminE+Melatonin gubu

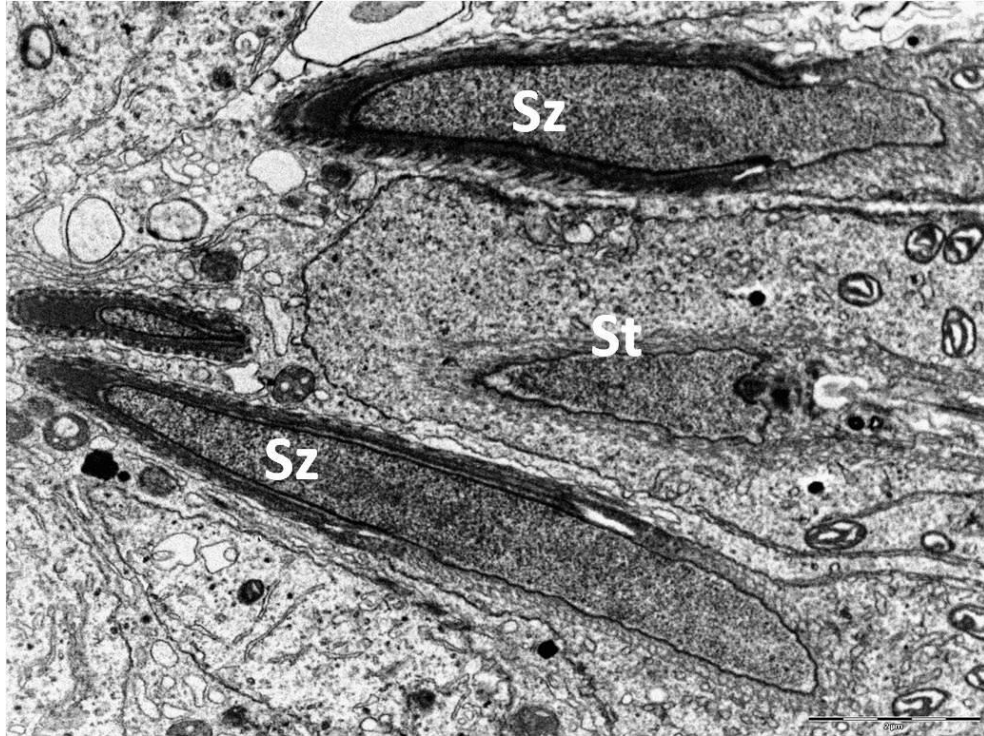
Acmp+VitaminE+Melatonin gubunda İncelenen ultra ince kesitlerde spermatogonyumlar ve Sertoli Hücreleri normal ultrastritürel yapıda izlendi. Sertoli hücre stoplazmalarında küçük lizozomal birikimler mevcuttu. Farklı gelişim aşamalarındaki spermatogenik hücreler normal yapıda değerlendirildi. Luminal yüzde baş kısımları seminifer epitele dönük spermatogonyumlar ve geç spermatitler normal ultrastriktürel yapıda izlendi. İnterstisyel alanlarda Leydig hücreleri gruplar halinde görüldü. Normal nükleus ve stoplazmaya sahip olup, bazılarının stoplazmalarında primer ve sekonder lizozomlar görüldü.



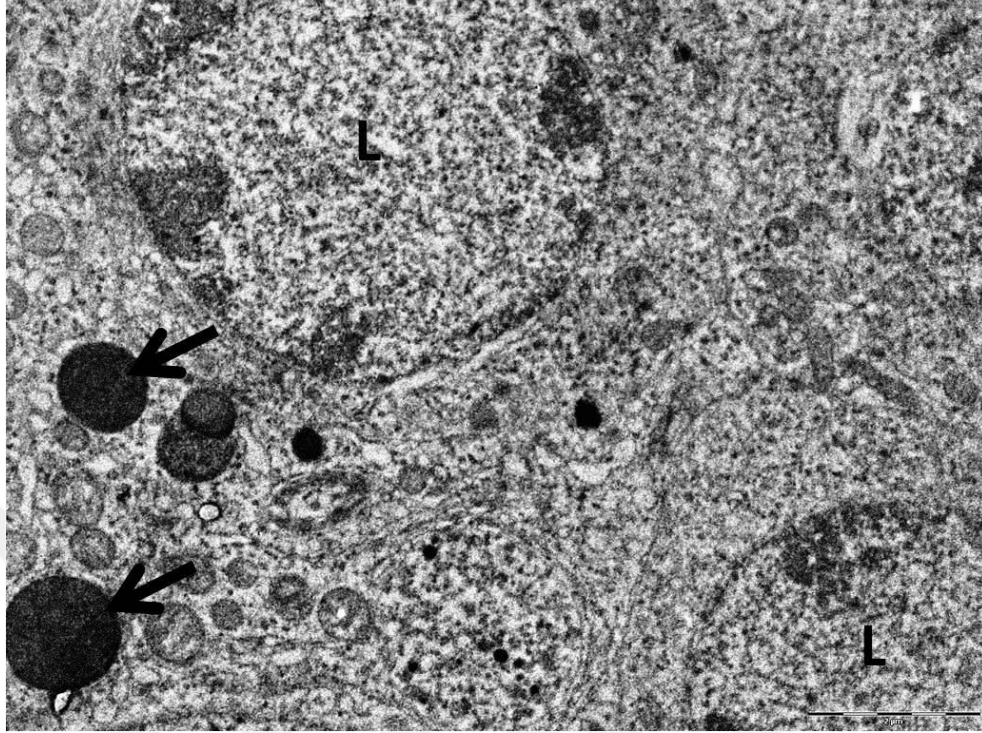
Şekil 4.60. Acmp+Vit E+Mel. Sertoli hücresi (Sr), Sertoli hücresi stoplazmasında küçük lizozomlar (ok), spermatogonyum (St). Skala=2 µm



Şekil 4.61. Acmp+Vit E+Mel. Farklı gelişim aşamalarında, normal ultrastrüktürde spermatidler (St). Skala=2 µm



Şekil 4.62. Acmp+Vit E+Mel. Normal ultrastrüktürde spermatozoon (Sz), geç spermatid (st). Skala=2 µm



Şekil 4.63. Acmp+Vit E+Mel. Leydig hücresi nukleusu (L), lipid vakuolleri (ok), Skala=2 μm

4.4. İmmünohistokimyasal Boyama H-Skoru

Tablo 4.3. İmmünohistokimya H-skoru

	Kaspaz 3 Seminifer Tübül H Skoru	Kaspaz 3 İnterstisyel Alan H Skoru
Distile su	10.5 (1-20) ^a	10.5 (1-20) ^a
Mısır yağı	10.5 (1-40) ^a	10.5 (1-20) ^a
Etanol	20 (1-40) ^a	20 (1-40) ^{a,c}
ACMP	210 (150-240) ^b	50 (20-60) ^b
ACMP+Mel	40 (20-40) ^{c,d}	20 (20-40) ^c
ACMP+Vit E	40 (20-60) ^d	20 (0-40) ^{a,c}
ACMP+Vit E+Mel	20 (20-40) ^{a,c}	20 (20-40) ^{a,c}
p	<0,001	0,0051

Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

4.5. Morfometrik Bulgular

4.5.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Tablo 4.4. Johnsen skoru

	N	Ortalama	S. Sapma
Distile su ^a	6	9,908	0,041
Mısır yağı ^{a,b}	6	9,852	0,082
Etanol ^{a,b}	6	9,827	0,070
ACMP ^e	7	7,743	0,096
ACMP+Mel ^d	6	9,585	0,062
ACMP+Vit E ^{c,d}	8	9,680	0,081
ACMP+Vit E+Mel ^{b,c}	7	9,767	0,035
p		<0,001	

Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

4.5.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Tablo 4.5.Seminifer Tübül Çapı [μm]

	N	Ortalama	S. Sapma
Distile su ^a	6	190,60	4,66
Mısır yağı ^{a,b}	6	182,05	6,86
Etanol ^{b,c}	6	178,84	2,33
ACMP ^c	6	163,53	7,24
ACMP+Mel ^{a,b,c}	6	177,90	8,43
ACMP+Vit E ^{b,c}	6	177,83	1,36
ACMP+Vit E+Mel ^{a,b,c}	6	181,35	8,06
P		<0,001	

Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

4.5.3. Seminifer Epitel Kalınlığı

Tablo 4.6. Seminifer Epitel Kalınlığı [μm]

	N	Ortalama	S. Sapma
Distile su ^a	6	47,02	2,34
Mısır yağı ^b	6	38,71	1,72
Etanol ^b	6	38,76	2,21
ACMP ^c	6	27,40	2,43
ACMP+Mel ^d	6	32,26	2,10
ACMP+Vit E ^{b,d}	6	35,15	1,02
ACMP+Vit E+Mel ^b	6	36,62	2,26
p		<0,001	

Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

4.6. Biyokimyasal Bulgular

4.6.1. Doku Homojenat Düzeyleri

Tablo 4.7. GSH ve MDA düzeyleri

	N	GSH (nmol/g wet tissue)	MDA (nmol/g wet tissue)
Distile su	6	656,80±11,03 ^a	846,50±9,54 ^a
Mısır yağı	6	665,51±32,97 ^a	846,17±14,55 ^a
Etanol	6	641,18±22,19 ^a	848,50±21,30 ^a
ACMP	6	527,29±15,74 ^b	1240,17±18,09 ^b
ACMP+Melatonin	6	857,41±21,75 ^c	954,67±7,92 ^c
ACMP+Vit E	6	911,03±17,64 ^d	760,33±10,91 ^d
ACMP+Vit E+Melatonin	6	967,51±21,09 ^e	731,32±7,82 ^e
p value		<0,001	<0,001

Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

Tablo 4.8. TAS, TOS düzeyleri ve OSI değeri

	N	TAS (mmol/L)	TOS (μ mol/L)	OSİ
Distile su	6	3,59 $\pm$ 0,14 ^a	8,59 $\pm$ 0,22 ^a	0,24 $\pm$ 0,01 ^a
Mısır yağı	6	3,60 $\pm$ 0,10 ^a	8,49 $\pm$ 0,51 ^a	0,24 $\pm$ 0,02 ^a
Etanol	6	3,41 $\pm$ 0,07 ^a	8,55 $\pm$ 0,26 ^a	0,25 $\pm$ 0,01 ^a
ACMP	6	2,67 $\pm$ 0,19 ^b	11,22 $\pm$ 0,28 ^b	0,42 $\pm$ 0,04 ^b
ACMP+Melatonin	6	5,53 $\pm$ 0,23 ^c	7,57 $\pm$ 0,35 ^c	0,14 $\pm$ 0,01 ^c
ACMP+Vit E	6	7,24 $\pm$ 0,21 ^d	5,53 $\pm$ 0,36 ^d	0,08 $\pm$ 0,00 ^d
ACMP+Vit E+Melatonin	6	8,42 $\pm$ 0,26 ^e	6,72 $\pm$ 0,24 ^e	0,08 $\pm$ 0,00 ^d
p		<0,001	<0,001	<0,001

Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

4.6.2. Kan Serum Hormon Düzeyleri

Tablo 4.9. Kan serum hormon düzeyleri

	N	LH (mIU/mL)	Testosteron (pg/mL)	FSH (mIU/mL)
Distile su	6	1,98 $\pm$ 0,11 ^a	55,53 $\pm$ 1,77 ^a	2,36 $\pm$ 0,05 ^a
Mısır yağı	6	1,97 $\pm$ 0,14 ^a	55,10 $\pm$ 1,81 ^a	2,38 $\pm$ 0,14 ^a
Etanol	6	1,99 $\pm$ 0,06 ^a	55,83 $\pm$ 1,46 ^a	2,37 $\pm$ 0,09 ^a
ACMP	7	1,05 $\pm$ 0,04 ^b	41,46 $\pm$ 1,09 ^b	1,55 $\pm$ 0,02 ^b
ACMP+Melatonin	6	2,22 $\pm$ 0,09 ^c	76,96 $\pm$ 1,14 ^c	2,87 $\pm$ 0,07 ^c
ACMP+Vit E	8	2,80 $\pm$ 0,11 ^d	88,28 $\pm$ 1,37 ^d	3,34 $\pm$ 0,06 ^d
ACMP+Melatonin+Vit E	7	2,50 $\pm$ 0,09 ^e	83,51 $\pm$ 2,05 ^e	3,10 $\pm$ 0,04 ^e
p value		<0,001	<0,001	<0,001

Farklı harfler gruplar arasındaki farkların istatistiki olarak anlamlılığını ifade eder.

5. TARTIŞMA

Sanayileşmenin artmasıyla birlikte erkeklerin üreme kapasiteleri giderek azalmaktadır. Kısırlık, çiftlerin %13 ile %18'ini etkilemektedir ve hem epidemiyolojik hem de klinik çalışmalardan elde edilen kanıtların artması, erkek üreme sorunlarının görülme sıklığının arttığını göstermektedir (176). Erkek kısırlığı ciddi bir androloji mücadelesi haline geldi. Pestisitlerin yaygın kullanımı bu bozulmadan sorumlu önemli faktörlerden biridir (58). Neonikotinoid grubundan bir insektisit olan acetamiprid, nispeten yenidir. Meyveler, sebzeler ve çay gibi mahsullerdeki; yaprak bitleri gibi lepidoptera ve hemipteraları öldürmek amaçlı kullanılmaktadır. Bununla birlikte, kalıcılığı, suda çözünürlüğü ve çok büyük kullanım hacimleri nedeniyle, çok küçük miktarlarda kullanılsalar bile çevrede birikme eğilimindedirler. Acetamiprid ve metabolitleri, insan sağlığına ve çevreye tehdit oluşturabilecek miktarlarda su sistemine ulaşabilirler (177-179). Her ne kadar memelilere karşı bugüne kadar diğer böcek öldürücülerden daha düşük toksisite gösterdikleri gösterilmiş olsa da, bazı çalışmalar neonikotinoidlere maruz kalmanın insanlar dahil memeliler için sağlık riskini tehdit edebileceğini göstermiştir (180, 181). Diğer taraftan, nispeten küçük moleküler ağırlığı ve yüksek suda çözünürlüğü nedeniyle, neonikotinoidler bitki dokularına girebilir ve bitkide uzun süre kalabilirler (182). Örneğin, uygulamadan iki hafta sonra kiraz yapraklarının ve meyvelerin iç dokularında tiametoksam ve acetamiprid tespit edilmiştir (183). Bununla birlikte, bu özellikler ayrıca çevresel kirlenme ve hedef dışı organizmalara maruz kalma olasılığını da artırır. Örneğin, aerobik topraklarda, neonikotinoidlerin birkaç ay, hatta yıl yarı ömrü vardır ve tekrar tekrar kullanıldığında birikebilirler (184). İnsektisitlere maruz kalmak erkek üreme sisteminde zararlı etkiler yaratabilir (185). Pestisitlerin neden olduğu erkek üreme bozuklukları, testislerde aşırı reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretilmesi, Leydig hücre hasarı ve plazma testosteron seviyesinin düşüşü ile ilişkilidir (186). Acetamiprid de benzer mekanizmalar yoluyla erkek üreme toksisitesine neden olabilir (187).

Şimdiye kadar, birçok in vitro ve in vivo laboratuvar çalışma, neonikotinoidlerin üreme toksikolojisi üzerine potansiyel toksik etkilerini göstermiştir (185). Bizim çalışmamız da neonikotinoidlere karşı insan maruziyetini gözden geçirmekte ve neonikotinoidlerin erkek üreme sistemi üzerindeki toksik etkileri üzerine gelecekteki çalışmalara ışık tutmak ve potansiyel toksisitelerinin değerlendirmesini özetlemektedir.

Etkili bir peroksil radikal temizleyici olan alfa-tokoferol (Vitamin E), membranlarda serbest radikal çoğalmasını önleyen ve membran lipidlerini oksidatif hasardan koruyan zincir kırıcı bir antioksidandır (kırıcı lipid peroksidasyon zincir reaksiyonu) (188, 189). Oksidatif stresin çeşitli hastalıklarda anahtar rol oynadığı bilinmektedir. Son bulgular, bazı pestisitlerin neden olduğu toksik belirtilerin, hücrenin çeşitli membran bileşenlerine verdiği zarar sonucu oluşan lipid peroksidasyon ürünlerinin özellikle karaciğer başta olmak üzere böbrek, beyin, testis ve fetüste birikmesinin nedeninin artan reaktif oksijen türlerinin artışı ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (190-193).

Melatoninin temel ve birincil işlevi, reseptörden bağımsız bir serbest radikal temizleyici ve geniş spektrumlu bir antioksidan görevi görmesidir. Melatonin'in reaktif oksijen türleriyle (ROS) ve reaktif azot türleriyle (RNS) ile etkileşiminin, türevlerinin çoğunu içeren uzun bir süreç olduğu anlaşılmaktadır. Melatonin ve metabolitlerinin art arda ROS ve RNS'ni temizlediği bu sürece serbest radikal süpürücü kaskad adı verilir. Çalışmamızda antioksidan özellikleri ortak olan bu iki maddeyi olası testis hasarındaki histolojik, ultrastrüktürel ve biyokimyasal etkinliklerini karşılaştırmalı olarak incelemeyi hedefledik.

Zhang ve ark. farelere 35 gün boyunca oral gavaj yolu ile 30 mg/kg/gün Acmp uygulaması sonrası deney öncesi ve deney sonrası deneklerin vücut ağırlığı ve testis ağırlıkları ortalamalarında kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma ($p<0,05$) olduğunu göstermişler. Aynı çalışmada 20 mg/kg/gün vitamin E uygulaması ile deneklerin vücut ağırlıkları ve testis ağırlıklarında anlamlı bir artış olduğunu gözlemlemişler (194). Mosbah ve ark. sıçanlara 45 gün boyunca oral gavaj yolu ile 27 mg/kg/gün Acmp uygulaması sonrası deney öncesi ve deney sonrası deneklerin vücut ağırlığı ve testis ağırlıkları ortalamalarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma ($p<0,05$) olduğunu göstermişler (195). Arıcan ve ark. sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada 90 gün boyunca oral yolla düşük, orta ve yüksek doz Acmp grubu oluşturarak sırasıyla 12,5, 25 ve 30 mg/kg/gün Acmp uygulaması sonrası deney öncesi ve deney sonrası deneklerin vücut ağırlığı ve testis ağırlıkları ortalamalarını karşılaştırmışlar. Düşük ve orta doz Acmp grubunda vücut ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artmış ($p<0,05$), yüksek doz Acmp grubunda da artış olmuş ancak bu artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ($p>0,05$). Yine aynı çalışmada deney öncesi ve deney sonrası testis ağırlık ortalamaları karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (196). Bizim çalışmamızda ise bu çalışmalara

benzer doz ve uygulama süresinde deneklerin deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları ve testis ağırlık ortalamaları tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (Tablo 4.1, 4.2) Görüldüğü gibi deney başlangıcı ve deney sonu deneklerin vücut ağırlıkları ve testis ağırlık ortalamaları, bazı çalışmalardaki vücut ağırlığı istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalırken; bazı çalışmalarda bizim çalışmamızda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir.

Gruplar arası seminifer tübül çapları ve seminifer epitel kalınlık ortalamaları karşılaştırıldığında çalışmamızdaki seminifer tübül çapı ortalamaları; Acmp grubunda ($163,53\pm7,24\ \mu\text{m}$), distile su ($190,60\pm4,66\ \mu\text{m}$) ve mısır yağı ($182,05\pm6,86\ \mu\text{m}$) grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde ($p<0,05$) azalmıştı. Ancak, Acmp grubu ile Acmp+Mel ($177,90\pm8,43\ \mu\text{m}$), Acmp+Vit E ($177,83\pm1,36\ \mu\text{m}$) ve Acmp+Mel+Vit E ($181,35\pm8,06\ \mu\text{m}$) grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$) (Tablo 4.5). Seminifer epitel kalınlık ortalamaları ise Acmp grubunda diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azalmıştı ($p<0,05$). Acmp+Mel grubu ile Acmp+Vit E grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fark yokken ($p>0,05$), Acmp+Vit E+Mel grubunda Acmp+Mel grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde artış vardı ($p<0,05$). Acmp uygulanmış deneklere melatonin ve vitamin E uygulamasının seminifer epitel kalınlığını artırdığı; bununla birlikte, vitamin E ve melatoninin birlikte uygulanması tek başlarına uygulanmalarından daha fazla bir etki ile hasarı azaltarak, seminifer epitel kalınlığını daha da arttırmıştır (Tablo 4.6). Acmp'in seminifer tübül çapı ve seminifer epitel kalınlığına etkisi ile ilgili benzer literatür çalışmasına rastlanmamıştır.

Johnsen SG. tarafından ilk kez tanımlanan bir yöntem olan “testis biyopsi skoru” ortalama sayısı ile sperm sayısı arasında yüksek bir korelasyon bulundu ve bu yöntemle insanda ilk kez endokrin koşulları, testis dokusunun fonksiyonel durumu ile ilişkilendirmenin mümkün olduğu sonucuna varıldı (170). Biz de, çalışmamızda hemotoksilen eozin boyanmış kesitlerde bu skora yöntemi kullandık ve Acmp grubunda skor ortalaması diğer gruplara göre anlamlı ölçüde düşük ($p<0,05$) çıktı. Acmp+Mel ve Acmp+Vit E gruplarında, Acmp grubuna göre skor daha yüksekti fakat gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Acmp+Vit E+Mel grubunda ise skoru daha da yükselerek Acmp ve Acmp+Mel gruplarından istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığını gözlemledik (Tablo 4.4). Histolojik incelemelerde Acmp grubunda, seminifer tübül lümenlerinde dejenere hücre artıkları,

seminifer epitelde dejenerasyon ve vakuolizasyon, Leydig hücrelerinde hidropik dejenerasyon ve nükleus konturlarında düzensizlik izlendi. Ayrıca bazı alanlarında interstisyumda ödematöz, aselüler eozinofilik boyanan materyal birikimi, lümendeki spermatozoon sayısında azalma izlendi. PAS boyanmış kesitlerde; Acmp grubunda, diğer gruplara göre PAS+ boyanmada azalma ve interstisyel alanda ödem görüldü. Ayrıca, seminifer tübüllerde atrofiye hücreler, olgunlaşmasını henüz tamamlamamış ve birbirinden koparak lümene dökülmüş spermatogenik seri hücreleri ve apoptotik hücreler gözlemledik. Çalışmamızdaki verilere benzer şekilde Zhang ve ark. 35 gün boyunca oral gavaj yolu ile 30 mg/kg/gün Acmp uyguladıkları çalışmada da benzer histolojik sonuçlar elde etmişler (194).

Acmp'in apoptotik süreçteki etkinliğini anlamak için, hem intrinsik hem de extrinsik yolağın efektör bir kaspazı olan "Kaspaz 3" pozitifliğine bakıldı. İmmünohistokimyasal olarak kaspaz 3 boyanan kesitlerin analizinde H skoru uygulandı. Acmp grubunda kaspaz 3 immünreaktivitesinin orta düzeyde boyandığı görüldü. Acmp+Mel ve Acmp+Vit E grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmayıp ($p>0,05$), zayıf düzeyde boyanma görüldü. Acmp+Vit E+Mel grubu kontrol grupları ile benzer yoğunlukta boyanma gözlemlendi (Tablo 4.3). Literatürde Acmp uygulaması ile kaspaz yolları değerlendirilerek apoptotik sürecin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamış olup, Arıcan ve ark. yaptıkları çalışmada artan dozlarda (12,5, 25 ve 30 mg/kg/gün oral) Acmp uygulaması sonrası apoptotik sürecin bir göstergesi olarak kullanılan TUNEL boyama yönteminin kullanıldığı ve doza bağlı olarak TUNEL+ hücre sayısında artış olduğunu göstermişler (196). Benzer şekilde Bal ve ark. da artan (2, 8, 24 mg/kg/gün) Acmp dozlarında TUNEL + hücre sayısında artış olduğunu göstermişler (197).

Çalışmamızda alınan ultra-ince kesitlerin TEM incelemesinde, Acmp grubunda; Bazı spermatogenik seri hücrelerinde; lizozomal birikim, farklı boyutlarda miyelin figür içeren vakuolizasyon ve hücre nekrozu izlendi. Geç spermatit ve spermatozoonlarda baş bölgesinde düzensiz nükleus ve akrozom yapısı, nükleus yoğunluğunda artış ve akrozomlarda heterojenite tespit edildi. Sertoli hücrelerinde yoğun primer ve sekonder elektron yoğun lizozomal birikim dikkati çekti. İnterstisyel alanda bazı Leydig Hücre stoplazmalarında ileri derecede hidropik dejenerasyon ve yer yer stoplazma bütünlüğü kaybolmuştu, mitokondriyonlar ve endoplazmik retikulum dejenere yapıda olup zorlukla seçilebiliyordu ve stoplazma alanları içerisinde elektron yoğun lipid vakuolleri saptandı. Bu özelliklerdeki

Leydig hücrelerinde nükleer kramatolizis belirgindi. Zhang ve ark. tarafından yapılan çalışmada Acmp grubunda Leydig hücrelerinde mitokondriyal dejenerasyon tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Acmp ve Vitamin E' nin birlikte uygulandığı grupta, Acmp grubunda görülen ultrastrüktürel bozuklukların belirli düzeyde iyileştiği ve Leydig hücrelerinde bol organel varlığı ve normal görünümde mitokondrilerin gözlendiği rapor edilmiştir (194). Benzer şekilde Kong ve ark. tarafından sıçanlarda yapılan oral yolla düşük ve yüksek dozlarda (10 ve 30 mg/kg/gün) 35 gün Acmp uyguladıkları çalışmada, Acmp gruplarında doz artışı ile doğru orantılı olarak mitokondriyal hasarda artış olduğu, bununla birlikte Vit E uygulamasının bu hasarı önlediği tespit edilmiştir (198). Bizim çalışmamızda da Acmp grubunda bazı Leydig hücrelerinin mitokondrilerinde yoğun dejenerasyon tespit edilmiş olup, hem Vit E hem de Mel uygulanan gruplarda bu dejenerasyonun azaldığı görüldü. Acmp+Mel grubunda Acmp+Vit E grubundan farklı olarak bazı alanlarda anormal spermatozoon ve interstisyel ödem gözlendi. Acmp+Vit E+Mel grubunda ise spermatogenik seri hücreleri, Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri kontrol gruplarına benzer şekilde normal ultrastrüktürel yapıda izlendi.

Çalışmamızda yapılan biyokimyasal analizlerde testis dokusunda Acmp grubunda GSH düzeyi diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Acmp toksisitesine karşı Vit E uygulanan grupta, Mel uygulanan gruba göre GSH düzeyinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$). Acmp+Vit E+Mel grubunda ise GSH düzeyi tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$) (Tablo 4.7). Arıcan ve ark. yaptıkları çalışmada düşük, orta ve yüksek doz gruplarının tamamında kontrol grubuna kıyasla GSH düzeylerinin anlamlı derecede azaldığını göstermiştir ($p<0,05$) (196). Benzer şekilde Devan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada GSH düzeyinin tüm doz gruplarında kontrole göre Acmp grubunda düştüğü belirtilmiştir (199). Bal ve ark. nenikotinoid insektisit grubunun bir diğer üyesi clothainidin ile erkek ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada artan dozlarda (2, 8, 24 mg/kg bw) uygulanan clothainidin sonrası alınan testis dokusunda GSH düzeylerinin dozla ters orantılı değiştiğini göstermişlerdir (197).

Zhang ve ark. (194) ile Kong ve ark. (198) tarafından yapılan çalışmalarda Acmp'in testis dokusunda MDA seviyesini anlamlı derecede arttırdığı rapor edilmiştir. Benzer şekilde Arıcan ve ark.'nın yaptığı çalışmada da Acmp doza bağımlı olarak kontrol grubuna göre

MDA düzeyinin anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir. Çalışmamızda Acmp grubunda MDA seviyesi tüm gruplardan anlamlı derecede yüksek olarak ölçüldü. Acmp+Vit E+Mel grubunda ise MDA seviyesi tüm gruplara göre anlamlı ölçüde daha düşük çıktı. Vit E uygulanan grupta, melatonin uygulanan gruba göre MDA seviyesi anlamlı ölçüde daha düşük ($p<0,05$) olarak kaydedildi (Tablo 4.7).

Arıcan ve ark.'nın (196) yaptığı çalışmada Acmp grubunda artan dozlarda Acmp uygulaması ile ters orantılı olarak TAS seviyesinde azalma görülürken, TOS seviyesinde doğru orantılı olarak artış gözlenmiştir. Benzer olarak bizim çalışmamızda da Acmp grubunda TAS değeri diğer gruplara göre anlamlı ölçüde en düşük seviyedeydi ($p<0,05$). Acmp+Vit E+Mel grubunda ise diğer gruplara göre anlamlı ölçüde en yüksek seviyedeydi ($p<0,05$). Vit E uygulanan grupta, melatonin uygulanan gruba göre TAS seviyesi anlamlı ölçüde daha düşük ($p<0,05$) olarak kaydedildi (Tablo 4.8). Acmp grubunda TOS değeri diğer gruplara göre anlamlı ölçüde en yüksek seviyedeydi ($p<0,05$). Acmp+Vit E+Mel grubunda ise diğer gruplara göre anlamlı ölçüde en düşük seviyedeydi ($p<0,05$). Vit E uygulanan grupta, melatonin uygulanan gruba göre TAS seviyesi anlamlı ölçüde daha düşük ($p<0,05$) olarak kaydedildi (Tablo 4.8). Oksidatif Stres İndeksi, Acmp grubunda diğer gruplara göre anlamlı ölçüde en yüksekti ($p<0,05$). Acmp+Vit E+Mel grubu ile Acmp+Vit E grupları arasında anlamlı fark olamayıp ($p>0,05$) bu iki grupta diğer gruplardan anlamlı ölçüde en düşüktü ($p<0,05$) (Tablo 4.8).

Çalışmamızda, vitamin E uygulanan grupta, melatonin uygulanan gruba göre antioksidatif parametreler daha yüksek iken oksidatif parametreler daha düşüktü. Antioksidan özelliği vitamin E den daha yüksek olduğu bilinen melatoninin en etkili lipofilik antioksidan olduğu ispatlanmıştır (125). Melatoninin bu etkinliğinin Acmp tarafından, reseptör düzeyinde ya da henüz bilemediğimiz bir mekanizma ile etkinliğini azalttığını düşünmekteyiz.

Kong ve ark.'nın (198) yaptığı çalışmada yüksek doz (30 mg/kg/gün) acetamiprid uyguladıkları grupta plazma testosteron konsantrasyonları, kontrol grubundan anlamlı olarak düşük ($p<0.01$) ve plazma LH düzeyleri ise kontrol grubundan anlamlı ölçüde yüksek ($p<0.01$) bulunmuştur. Aynı çalışmada, Acmp uygulanan gruba yüksek doz E vitamini uygulandığında testosteron düzeyinin anlamlı olarak arttığı ($p<0.05$) ve LH düzeylerinde anlamlı ölçüde azalma ($p<0.05$) olduğu görülmüş. Arıcan ve ark.'nın (196) yaptığı çalışmada

ölçülen testosteron seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla maruziyet gruplarında gözlenen düşüşün istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiş ($P>0.05$). Ayrıca bu çalışmada LH düzeylerinde tüm Acmp gruplarında artış olduğu ancak düşük ve orta doz grubu için tespit edilen bu artışın kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlılık düzeyinde olduğu gözlenmiştir ($P<0.05$). FSH düzeylerinde ise tüm Acmp gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde bir artış gözlenmiştir. Mosbah ve ark.'nın (195) yaptığı çalışmada 27 mg/kg/gün Acmp uyguladıkları grubun testosteron seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde azaldığı görülmüş ($p<0.05$). Zhang ve ark. nin yaptığı çalışmada Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, sadece acetamiprid grubunda serum testosteron düzeyi azalmış ($P<0.05$). Acetamiprid grubu ile acetamiprid ve vitamin E'nin birlikte uygulandığı grupta ise anlamlı bir fark olmadığı görülmüş ($P>0.05$). Bizim çalışmamızda ise LH, FSH ve testosteron düzeyleri; Acmp grubunda tüm gruplara göre anlamlı ölçüde düşüktü ($p<0.05$). Acmp+Vit E grubunda tüm gruplardan anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p<0.05$). Acmp+Vit E+Mel grubunda ise Acmp+Mel grubundan anlamlı ölçüde daha yüksekti ($p<0.001$) (Tablo 4.9).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Acmp uygulaması sonrası testis dokusunda ışık mikroskopik olarak seminifer tübül çapı ve seminifer epitel kalınlığında azalma, tübül epitelinde dejenerasyon, spermatogenik hücrelerde dökülme, lümende azalmış spermatozoonlar, seminifer epitel bazal membranında PAS+ likte azalma, interstisyel alanda ödem ve Leydig hücrelerinde hidropik dejenerasyon meydana geldi. Apoptozisi göstermek için yapılan immünohistokimyasal caspaz 3 boyamada diğer gruplardan daha fazla ve orta düzeyde immün reaktivite pozitifliği vardı. TEM’nda yapılan incelemede ise tübül hücrelerinde dejenerasyon, spermatogenik seri hücrelerinde lizozomal birikim, miyelin figür içeren vakuolizasyonlar ve nekroz; Leydig hücrelerinde stoplazmada ileri derecede hidropik dejenerasyon, stoplazma bütünlüğünde kayıp, mitokondri ve endoplazmik retikulumlarda dejenerasyon, stoplazma alanları içerisinde elektron yoğun lipid vakuolleri ve kramatolizis belirlendi. Biyokimyasal olarak GSH ve TAS da azalma, MDA, TOS ve OSI de artış; hormonal olarak ise LH, FSH ve testosteron düzeylerinde azalma gözlemlendi.

Melatonin, vitamin E ve ikisinin birlikte uygulandığı gruplarda histolojik hasarın ve apoptotik hücre ölümünün hem ışık mikroskopik hem de ultrastrüktürel düzeyde azaldığı görüldü. Biyokimyasal olarak ise oksidatif parametrelerde azalma ve hormonal parametrelerde artış meydana geldiği gözlemlendi. Vitamin E’ nin, melatonine göre oksidatif parametreleri azaltıp antioksidatif parametreleri artırmada daha etkili olduğu görülürken, özellikle hormonal parametreleri iyileştirmede tek başına tüm gruplardan daha iyi olduğu görüldü.

Sonuç olarak çalışmamızda acetamipridin subakut maruziyetinin testis dokusunda yaptığı hasar ve üreme yeterliliği üzerine zarar verdiği, testiste oksidatif stresi indüklediği, üreme hormonlarının düzeylerini, oksidan ve antioksidan parametreler üzerine etkisini inceledik. Acetamipridin testisteki bu etkilerini özellikle Leydig hücreleri olmak üzere spermatogenik seri ve Sertoli hücrelerinde mitokondri ve endoplazmik retikulumlarında oluşturduğu hasar ve lizozomal birikimlerin artışı sonucu başlayan patolojik bir sürecin etkili olabileceğini düşünüyoruz. Leydig hücrelerindeki mitokondri hasarının steroid sentezini bozduğu başka çalışmalarda raporlanmıştı. Ancak testosteron seviyelerinin azalması negatif feed-back etki ile LH ve FSH salınımında artışa neden olmadı. Bu etkide, dozun ve uygulama süresinin de etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Yüksek dozlarda ya da uzun süreli maruziyetlerde Acmp’in sistemik olarak hipotalamo-hipofizal aksı etkilediğini

düşünüyoruz. Acmf'in Leydig hücrelerinde endoplazmik retikulum hasarı ve lizozomlardaki artışın nedenleri için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca çalışmamızda Acmf'in oksidan parametreleri daha önceki çalışmalarda olduğu gibi arttırdığı görüldü. Acmf'in testis hasarına karşı Vitamin E'nin, özellikle biyokimyasal parametrelerde daha olumlu etkilerinin olduğunu gözlemledik.

Tarımsal alanda kullanımı gittikçe artan Acmf'in sebze ve meyvelerde kontrol düzeyleri açısından denetimlerinin artırılması ve kullanımının profesyonel ve eğitimli kişilerin denetiminde uygulanması ve düzenli aralıklarla yiyeceklerdeki maruziet düzeylerinin tespiti gerektiğini düşünüyoruz. İnfertiliteye neden olabileceğini düşündüğümüz Acmf'in testis hasarında vitamin E'nin, melatoninden etkili olabileceğini ve tedavide kullanılabileceğini, bunun için klinik çalışmalarla desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB. Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. Trends in pharmacological sciences. 2001;22(11):573-80.
2. [cited 2018]. Available from: www.epa.gov/acetamiprid.
3. Pramanik S, Bhattacharyya J, Dutta S, Dey P, Bhattacharyya A. Persistence of Acetamiprid in/on Mustard (*Brassica juncea* L.). Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology. 2006;76(2).
4. Sanyal D, Chakma D, Alam S. Persistence of a neonicotinoid insecticide, acetamiprid on chili (*Capsicum annum* L.). Bulletin of environmental contamination and toxicology. 2008;81(4):365-8.
5. Shimomura M, Yokota M, Ihara M, Akamatsu M, Sattelle DB, Matsuda K. Role in the selectivity of neonicotinoids of insect-specific basic residues in loop D of the nicotinic acetylcholine receptor agonist binding site. Molecular pharmacology. 2006.
6. Tomizawa M, Casida JE. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2005;45:247-68.
7. Council NR. California Environmental Protection Agency Department of Toxic Substances Control (DTSC) Letter of Introduction, Overview, Concept Paper, and Appendices 1–4 from DTSC Report. 1999.
8. Flora A, Schulz R, Benfante R, Battaglioli E, Terzano S, Clementi F, et al. Transcriptional regulation of the human $\alpha 5$ nicotinic receptor subunit gene in neuronal and non-neuronal tissues. European journal of pharmacology. 2000;393(1-3):85-95.
9. Bray C, Son J-H, Kumar P, Meizel S. Mice deficient in CHRNA7, a subunit of the nicotinic acetylcholine receptor, produce sperm with impaired motility. Biology of reproduction. 2005;73(4):807-14.
10. Chen M, Tao L, McLean J, Lu C. Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures. Journal of agricultural and food chemistry. 2014;62(26):6082-90.
11. Turner TT, Lysiak JJ. Oxidative stress: a common factor in testicular dysfunction. Journal of andrology. 2008;29(5):488-98.
12. Mahat RK, Kumar S, Arora M, Bhale DV, Mehta R, Batra J. Role of oxidative stress and antioxidants in male infertility. Int J Health Sci Res (IJHSR). 2015;5(3):324-33.
13. Reiter RJ. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. Endocrine reviews. 1991;12(2):151-80.
14. Carrillo-Vico A, Reiter RJ, Lardone PJ, Herrera JL, Fernández-Montesinos R, Guerrero JM, et al. The modulatory role of melatonin on immune responsiveness. Current opinion in investigational drugs. 2006;7(5):423-31.
15. Dullo P, Chaudhary R. Short review of reproductive physiology of melatonin. Pakistan Journal of Physiology. 2009;5(2):46-8.
16. Mayo JC, Sainz RM, Tan D-X, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. Journal of neuroimmunology. 2005;165(1-2):139-49.

17. Kodama H, Yamaguchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T. Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertility and sterility*. 1997;68(3):519-24.
18. Johnson FC. The antioxidant vitamins. *CRC critical reviews in food science and nutrition*. 1979;11(3):217-309.
19. Yoganathan T, Eskild W, Hansson V. Investigation of detoxification capacity of rat testicular germ cells and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 1989;7(4):355-9.
20. Torchia KMTVNPM. *The Developing Human*. 9th Edition ed2013.
21. Sadler TTW, Langman JMe. *Langman's medical embryology*. 11th ed. / T.W. Sadler ; original illustrations by Jill Leland ; computer illustrations by Susan L. Sadler-Redmond ; scanning electron micrographs by Kathy Tosney ; ultrasound images by Nancy Chescheir and Hytham Imseis. ed2010.
22. Schoenwolf G B, S, Brauer P, Francis-West P. *Larsen's Human Embryology*. 4th ed. ed: Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2009.
23. Moore KL PT. *İnsan Embriyolojisi*. 8. Baskıdan çeviri ed. Nobel tıp yayınları2008. 263-4 p.
24. Ross M PWÇBB. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. 6. baskı ed. Palme yayıncılık2014.
25. Sancak B CM. *Fonksiyonel Anatomi*. 9. baskı ed. ODTÜ yayıncılık2015.
26. Arıncı K EA. *Anatomi*. Güneş tıp kitabevleri2014. 291-3 p.
27. Tortora GJ DB. *Principles Anatomy and Physiology*. 12. ed. John Wiley & Sons2009. 1082-93 p.
28. In Walsh PC RA, Vaughan ED, Jr, Wein AJ (Eds): *Brooks JD. Anatomy Of The Lower Urinary Tract And Male Genitalia*. Campbells Urology. 8 ed. Philadephia: WB Saunders2002. 41-80 p.
29. RS. S. *Clinical Anatomy*. 3 ed. Boston: Brown And Company1986. 168-75 p.
30. Sancak B CM. *Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar*. 5 ed. ODTÜ yayıncılık, Ankara1999.
31. Vannini V DU, Rosa E. *Anatomi atlası*. 7 ed. Birol Basın Yayın Dağıtım ve Ticaret Ltd. Sti, İstanbul1999. 160,1 p.
32. AM G. *Anatomi Temel Ders Kitabı*. 1 ed. Ankara, Palme Yayıncılık,2015. 118-20 p.
33. MacLennan GT. *Hinman's Atlas of UroSurgical Anatomy*. 2 ed. Phidelpphia: W.B Saunders Co1993. p. 472-83.
34. KL M. *Clinical Oriented Anatomy* 3ed. Baltimore: Williams And Wilkins Co1992. 144-52 p.
35. Toprak M AM. *Anatomi Ders Kitabı*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul1996. 844-61 p.
36. Standring S. *Gray's Anatomy (The Anatomical Basis of Clinical Practice)*. Forty-first ed. British Library & Library of Congress2016.
37. Putz R, Pabst R. *Sobotta-Atlas of Human Anatomy: Head, Neck, Upper Limb, Thorax, Abdomen, Pelvis, Lower Limb; Two-volume set*2006.
38. Ş. P. *Histoloji*. 2 ed. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi1993.
39. AL K. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Çeviri editörü: Ramazan DEMİR. Palme Yayıncılık2006. 531-64 p.
40. Junqueira LC CJ. *Temel Histoloji*. Çeviri Editörü: Seyhun Solakoğlu YA, editor. Nobel Tıp Kitabevleri2009. 418-34 p.
41. Ross MH PW. *Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas*. 6 ed. Palme Yayınları2014.

42. AL M. Junqueira's Temel Histoloji, Çeviri Editörü: Seyhun Solakoğlu: Nobel Tıp Kitapevleri; 2015. 60-448 p.
43. John F. Ash DAM, Sheryl A. Scott. Histology: McGraw-Hill; 2013. 252-61 p.
44. M E. Özel Histoloji. 2 ed: İstanbul Medikal Yayıncılık 2016. 335-49 p.
45. Gartner L.P. HJL. Color Textbook Of Histology. 2 ed: W.B Saunders Company, Philadelphia,; 2001. 487-508 p.
46. Young B HJ, Stevens A, Lowe JS, Deakin PJ. Wheater's Functional Histology. 4 ed: Churchill Livingstone; 2000. 328-40 p.
47. Redi C. Sertoli Cells - Methods and Protocols. European journal of histochemistry : EJH. 2019;63(1).
48. Ovalle WK NP. Netter Temel Histoloji. 2009.
49. Spermatozoa Development.
50. Widmaier E RH. Vander insan fizyolojisi. 10 ed: Güven Kitabevi; 2010. 657-78 p.
51. Delaplane K. Pesticide usage in the United States: History, benefits, risks, and trends. 1996.
52. Schwartz A, Stanbury, M., ve Granger, J. . What You Need To Know About Pesticides And Your Health 2019. Available from: https://www.michigan.gov/documents/mdch_Pesticide_Booklet_97200_7.pdf.
53. Costa LG. Toxic effects of pesticides. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 2008;8:883-930.
54. Klaassen CD, Amdur MO. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons: McGraw-Hill New York; 2013.
55. Simon JY. The toxicology and biochemistry of insecticides: CRC press; 2011. 25-85 p.
56. Tomlin C. British crop protection council, surrey. MacBean C The Pesticide Manual. 2003;12.
57. Simon JY. The toxicology and biochemistry of insecticides: CRC press; 2011. 1-6 p.
58. Costa NO, Vieira ML, Sgarioni V, Pereira MRF, Montagnini BG, Mesquita SdFP, et al. Evaluation of the reproductive toxicity of fungicide propiconazole in male rats. Toxicology. 2015;335:55-61.
59. Erbach G. Pesticide legislation in the EU: Towards sustainable use of plant protection products. Library briefing. Library of the European Parliament 120291REV1. 2012:1-6.
60. Shah PV, Ray D. Pesticide Residues in Food: Toxicological Evaluations: Azoxystrobin. World Health Organization, Rome, Italy. 2008:3-34.
61. Kumargal D. ÇÜ, Aşkın A. İyon kanallarını hedef alan insektisitler. Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg. 2012;5(2):7-13.
62. Ford KA. Metabolism, Pharmacokinetics and Toxicology of the Neonicotinoid Insecticides in Mice.: Berkeley, ABD: University of California, Molecular Toxicology.; 2008. 1-7 p.
63. David M. Whitacre GWW. An Introduction to Insecticides (4th edition) 01.01.2019. Available from: <https://ipmworld.umn.edu/ware-intro-insecticides>.
64. TAN DX ML, ESTEBAN-ZUBERO E, ZHOU Z, REITER RJ. Melatonin as a potent and inducible endogenous antioxidant: synthesis and metabolism. Molecules. 2015;20:18886-906.
65. Casida JE, Quistad GB. Why insecticides are more toxic to insects than people: the unique toxicology of insects. Journal of Pesticide Science. 2004;29(2):81-6.

66. Gepner J, Hall L, Sattelle D. Insect acetylcholine receptors as a site of insecticide action. *Nature*. 1978;276(5684):188.
67. Millar NS, Denholm I. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invertebrate Neuroscience*. 2007;7(1):53-66.
68. Kiriya K, Itazu Y, Kagabu S, Nishimura K. Insecticidal and neuroblocking activities of acetamiprid and related compounds. *Journal of Pesticide Science*. 2003;28(1):8-17.
69. Tomizawa M, Casida JE. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual review of entomology*. 2003;48(1):339-64.
70. Bull S, Fletcher K, Boobis A, Battershill J. Evidence for genotoxicity of pesticides in pesticide applicators: a review. *Mutagenesis*. 2006;21(2):93-103.
71. Rupa D, Rita P, Reddy P, Reddi O. Screening of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in peripheral lymphocytes of vegetable garden workers. *Human toxicology*. 1988;7(4):333-6.
72. Mohamed F, Gawarammana I, Robertson TA, Roberts MS, Palangasinghe C, Zawahir S, et al. Acute human self-poisoning with imidacloprid compound: a neonicotinoid insecticide. *PloS one*. 2009;4(4):e5127.
73. Imamura T, Yanagawa Y, Nishikawa K, Matsumoto N, Sakamoto T. Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans. *Clinical toxicology*. 2010;48(8):851-3.
74. Yamamoto I, Casida JE. Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor. 1999.
75. Ünver S, Uysal H. Neonikotinoid İnsektisitlere Bağlı Olarak *Drosophila melanogaster*'in AChE Aktivitesinde Meydana Gelen Değişikliklerin Bitkisel Ekstraktlar ile Giderilmesi Üzerine Araştırmalar. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi*. 2014;35(4):107-16.
76. Farooqui T. A potential link among biogenic amines-based pesticides, learning and memory, and colony collapse disorder: a unique hypothesis. *Neurochemistry international*. 2013;62(1):122-36.
77. Joint F. EVALUATIONS.
78. Tokieda M, Ozawa M, Kobayashi S, Gomyo T. Method to determination of total residues of the insecticide acetamiprid and its metabolites in crops by gas chromatography. *JOURNAL OF PESTICIDE SCIENCE-PESTICIDE SCIENCE SOCIETY OF JAPAN-JAPANESE EDITION*-. 1997;22:77-83.
79. 時枝正則, 田中哲也, 小澤道弘, 五明健. High performance liquid chromatographic determination of acetamiprid and its degradation products in soil. *Journal of Pesticide Science*. 1998;23(3):296-9.
80. 時枝正則, 小澤道弘, 五明健. Methods of determination of acetamiprid and its degradation products in soil by gas chromatography. *Journal of Pesticide Science*. 1999;24(2):181-5.
81. Wu J, Wang K, Zhang H. Dissipation and residue of acetamiprid in watermelon and soil in the open field. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 2012;89(3):644-8.
82. Brzezinski A. Melatonin in humans. *New England Journal of Medicine*. 1997;336:186-95.

83. Reiter R, Coto-Montes, A, Boga, JA, Fuentes-Broto, L, Rosales-Corral, S, and Tan, DX. Melatonin: new applications in clinical and veterinary medicine, plant physiology and industry. *Neuro endocrinology letters*. 2011;32:575-87.
84. Melatonin and Sleep 2019 [updated APRIL 5, 2017]. Available from: <https://www.tuck.com/melatonin/>.
85. Iuvone P, Besharse JC. Regulation of indoleamine N-acetyltransferase activity in the retina: effects of light and dark, protein synthesis inhibitors and cyclic nucleotide analogs. *Brain research*. 1983;273(1):111-9.
86. Martin X, Malina H, Brennan M, Hendrickson PH, Lichter P. The ciliary body-the third organ found to synthesize indoleamines in humans. *European journal of ophthalmology*. 1992;2(2):67-72.
87. ABE M, ITOH MT, MIYATA M, ISHIKAWA S, SUMI Y. Detection of melatonin, its precursors and related enzyme activities in rabbit lens. *Experimental eye research*. 1999;68(2):255-62.
88. Stefulj J, Hörtnner M, Ghosh M, Schauenstein K, Rinner I, Wölfler A, et al. Gene expression of the key enzymes of melatonin synthesis in extrapineal tissues of the rat. *Journal of pineal research*. 2001;30(4):243-7.
89. Jimenez-Jorge S, Jimenez-Caliani AJ, Guerrero JM, Naranjo MC, Lardone PJ, Carrillo-Vico A, et al. Melatonin synthesis and melatonin-membrane receptor (MT1) expression during rat thymus development: role of the pineal gland. *Journal of pineal research*. 2005;39(1):77-83.
90. Kvetnoy IM. Extrapineal melatonin: location and role within diffuse neuroendocrine system. *The Histochemical Journal*. 1999;31(1):1-12.
91. Tan D-x, Manchester LC, Reiter RJ, Qi W-b, Zhang M, Weintraub ST, et al. Identification of highly elevated levels of melatonin in bone marrow: its origin and significance. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1999;1472(1-2):206-14.
92. Huether G, Poeggeler B, Reimer A, George A. Effect of tryptophan administration on circulating melatonin levels in chicks and rats: evidence for stimulation of melatonin synthesis and release in the gastrointestinal tract. *Life sciences*. 1992;51(12):945-53.
93. Itoh MT, Ishizuka B, Kuribayashi Y, Amemiya A, Sumi Y. Melatonin, its precursors, and synthesizing enzyme activities in the human ovary. *Molecular human reproduction*. 1999;5(5):402-8.
94. Tijmes M, Pedraza R, Valladares L. Melatonin in the rat testis: evidence for local synthesis. *Steroids*. 1996;61(2):65-8.
95. Iwasaki S, Nakazawa K, Sakai J, Kometani K, Iwashita M, Yoshimura Y, et al. Melatonin as a local regulator of human placental function. *Journal of pineal research*. 2005;39(3):261-5.
96. Abreu C-VACJ, P Lardone PJ, García-Mauriño S, Reiter RJ, Guerrero JM. 2004 Evidence of melatonin synthesis by human lymphocytes and its physiological significance: possible role as intracrine, autocrine, and/or paracrine substance. *FASEB Journal*. 18:537-9.
97. Fischer TW, Sweatman TW, Semak I, Sayre RM, Wortsman J, Slominski A, et al. Constitutive and UV-induced metabolism of melatonin in keratinocytes and cell-free systems. *The FASEB journal*. 2006;20(9):1564-6.
98. Huether G. The contribution of extrapineal sites of melatonin synthesis to circulating melatonin levels in higher vertebrates. *Experientia*. 1993;49(8):665-70.

99. Skinner DC, Malpoux B. High melatonin concentrations in third ventricular cerebrospinal fluid are not due to Galen vein blood recirculating through the choroid plexus. *Endocrinology*. 1999;140(10):4399-405.
100. G. Ş. Karanlığın hormonu melatonin, derleme. *Marmara Eczacılar Derg*. 2010;14:112-20.
101. Kus İ, Sarsılmaz, M. Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2002;22:221-6.
102. Ayar A, Kutlu, S., Yilmaz, B., Kelestimur, H. Melatonin inhibits spontaneous and oxytocin-induced contractions of rat myometrium in vitro. *Neuroendocrinology Letter*. 2001;22:301-6.
103. Kelestimur H. İnsanda pineal bezin fonksiyonları. *Fırat Üniv Sağlık Bilimleri Dergisi*. 1996;10:141-7.
104. Karolczak M, Korf H-W, Stehle JH. The rhythm and blues of gene expression in the rodent pineal gland. *Endocrine*. 2005;27(2):89-100.
105. Tan DX ML, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res*. 2007;42(1):28-42.
106. Hardeland R. Melatonin and the pathologies of weakened or dysregulated circadian oscillators. *Journal of pineal research*. 2016;62(1).
107. Scholtens R, van Munster, BC, van Kempen, MF, and de Rooij, SE. Physiological melatonin levels in healthy older people: A systematic review. *Journal of psychosomatic research*. 2016;86:20-7.
108. Tricoire H, Moller, M, Chemineau, P, and Malpoux, B. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reproduction*. 2003;61:311-21.
109. Boutin JA, Delagrang, P., Rettori, M.C. Melatonin: molecular pharmacology and therapeutic applications. *Medicographia*. 2000;22:72-80.
110. Fourtillan JB BA, Fourtillan M ve ark. Melatonin secretion occurs at a constant rate in both young and older men and women. *Physiol-Endocrinology Metab*. 2001;280:e11-e2.
111. Horne JA, Ostberg, O. Individual differences in human circadian rhythms. *Biological psychology*. 1977;5:179-90.
112. Altun A VA, Altun BU. Melatonin ve Kardiyovasküler Sistem. *Ana Kar Der*. 2001;1:283-8.
113. Wu W, Reiter RJ, Troiani ME, Vaughan GM. Elevated daytime rat pineal and serum melatonin levels induced by isoproterenol are depressed by swimming. *Life sciences*. 1987;41(12):1473-9.
114. Erlich SS, Apuzzo, MLJ. The Pineal Gland: Anatomy, Physiology and Clinical Significance. *Journal of Neurosurgery*. 1985;63:321-41.
115. Cagnacci A. Melatonin in Relation to Physiology in Adult Humans. *Journal of Pineal Research*. 1996;21:200-13.
116. ÇAM A, ERDOĞAN, M.F. Melatonin. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 2003;56:103-12.
117. Webb S.M. DMP. Role of melatonin in health and disease. *Clin Endocrinol*. 1995;42:221-34.
118. Touitou Y AA, Camus F ve ark. Daily profiles of salivary and urinary melatonin and steroids in healthy prepubertal boys. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2009;22:1009-15.

119. Reppert SM WD, Godson C. Melatonin receptors step in to the light: Cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17:100-2.
120. S. N. Metabolic Effects of Melatonin on Oxidative Stress and Diabetes Mellitus. *Endocrine.* 2005;27(2):131-5.
121. Srinivasan V P-PS, Maestroni GJM, Esquifino AI, Hardeland R, Cardinali DP. Role of Melatonin in Neurodegenerative Diseases. *Neurotoxicity Research.* 2005;7(4):293-318.
122. Tan DX CL, Poeggeler B, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin: a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. *Endocrine J.* 1993;1:57-60.
123. M. P. Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders: implication and counteracting of melatonin. *Journal of Applied Biomedicine.* 2011;9:185-96.
124. Arnao MB H-RJ. The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signal Behav.* 2006;1(3):89-95.
125. Lowes DA WN, Murphy MP, Galley HF. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin-6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br J Anaesth.* 2013;110(3):472-80.
126. Shi H, Wang, X, Tan, DX, Reiter, RJ, and Chan, Z. Comparative physiological and proteomic analyses reveal the actions of melatonin in the reduction of oxidative stress in Bermuda grass (*Cynodon dactylon* (L). Pers.). *Journal of pineal research.* 2015;59:120-31.
127. Reiter RJ TD, Osuna C, and Gitto E. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *Journal of biomedical science.* 2000;7:444-58.
128. GJ. M. The immunotherapeutic potential of melatonin. 2001;10(3):467-76.
129. Stokkan K-A, Reiter RJ, Nonaka KO, Lerchl A, Yu BP, Vaughan MK. Food restriction retards aging of the pineal gland. *Brain research.* 1991;545(1-2):66-72.
130. Yilmaz B, Kutlu S, Mogulkoc R, Canpolat S, Sandal S, Tarakci B, et al. Melatonin inhibits testosterone secretion by acting at hypothalamo-pituitary-gonadal axis in the rat. *Neuro Endocrinol Lett.* 2000;21(4):301-6.
131. HM. E. The Pioneer history of vitamin E. *Vitam Horm.* 1976;20.
132. MK. H. Vitamin E:A reexamination. *Am J Clin Nutr.* 1976;29.
133. Champe PC HR. *Biyokimya.* 2 ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 1997. 438 p.
134. Aras K EG, Karahan S. *Tıbbi Biyokimya.* Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1976. 169-75 p.
135. Stratton SP LD. Determination of singlet oxygen-specific versus radical-mediated lipid peroxidation in photosensitized oxidation of lipid bilayers: Effect of beta-carotene and alpha-tocopherol. *Biochem.* 1997;36:12911-20.
136. Behl C DJ, Cole GM, Schubert D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;186:944-50.
137. Hidiroglu N MR, McDowell LR. Maternal transfer of vitamin E to fetal and Neonatal guinea pigs utilizing a stable isotopic technique. *Nutr Res.* 2001;21:771-83.
138. Gohil K SB, Chakraborty AA, Terasawa Y, Raber J, Farese RV, Packer L, Cross CE, Traber MG. Gene expression profile of oxidant stress and neurodegeneration in transgenicmicedeficient in alpha-tocopherol transfer protein. *Free Radi Biol Med.* 2003;35:1343-54.
139. PB. H. Hawk's Physiological chemistry. 14 ed: Mc Graw-Hill; 1965.
140. Korner FW VJ. *Vitamins.* Basel: La Roche; 1978.
141. Combs GF NT, Scott ML. Mechanisms of action of selenium and vitamin E in protection of biological membranes. *Federation Proc.* 1975;34.

142. Kanter M, Topçu, Y., Uygun, M. Cisplatin nefrotoksitesinde E vitamini'nin koruyucu etkileri: ışık ve elektron mikroskopik çalışma. 2007;5(3):83-90.
143. Jialal I FC. Oxidized LDL and antioxidants. Clin Cardiol. 1993;16:16-9.
144. Van-Der-Meulen JH MA, Jackson MJ, Faulkner JA. Contraction– induced injury to the extensor digitorum longus muscles of rats: The role of vitamin E. J Appl Physiol. 1997;83:917-23.
145. L. P. Protective role of vitamin E in biological systems. Am J Clin Nutr. 1991;53:1050-5.
146. Rota C RG, Minihane AM, Stoecklin E, Barella L. Dietary vitamin E modulates differential gene expression in the rat hippocampus: potential implications for its neuroprotective properties. Nutr Neurosci. 2005;8:21-9.
147. Chow q CK. Vitamin E and Blood Wld. Rev. Nutr Diet. 1985;45:133-66.
148. Fritsma GA, George, A., Fritsma, M.S.,. Vitamin E and autoxidation. American Journal of Medical Technology. 1983;49(6):453-6.
149. Rice D, Kendy, S. Vitamin E: Function and Effects of Deficiency. Br Vet J. 1988;144:483-96.
150. Turner RJaF, J.M. Selenium and the Immune Response. Proceed Nutr Soc. 1991;50:275-85.
151. Yardımoğlu M, Mısırlıoğlu D. Histological effects of ethanol and protective effects of vitamin e on the morphology of seminiferous tubules of mice. Anadolu Tıp Dergisi.3(3):155-9.
152. Mather JP, Saez, J.M., Dray, F. Vitamin E prolongs survival and function of porcine leydig cells in culture. Acta Endocrinologica. 1983;102:470-5.
153. Gajera HP, Patel, S.V., Golakiya, B.A. Fundamentals of Biochemistry – A textbook2008.
154. Curtin JF CT. Live and let die: Regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. Cell Signal. 2003;15:983-92.
155. Junqueira LC CJ. Temel Histoloji Text & Atlas. 10 ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2006. 66-447 p.
156. Demirbağ Z SK. Hücre Biyolojisi. Trabzon: Gündüz Ofset Matbaacılık; 2009. 235-40 p.
157. Hampton MB OS. Redox regulation of apoptotic cell death. Biofactors. 1998;8:1-5.
158. Mcphie D L CR, Peralta A H, Chen Y, Ivins K J, Manly S P, Kozlowski M R, Neve K A, Neve RL. DNA synthesis and neuronal apoptosis caused by familial alzheimer disease mutants of the amyloid precursor protein are mediated by the p21 activated kinase PAK3. The Journal of Neuroscience. 2003;23(17):6914-27.
159. Büyükgebiz O CJ. Apoptoz. Sendrom. 2001;13:102-7.
160. F. Ö. Apopitoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002;9(2):143-8.
161. Roshal M ZY, Planelles V. Apoptosis in AIDS. Apoptosis. 2001;6:103-16.
162. S N. Apoptosis by death factor. Cell 1997;88:355-65.
163. SJ. R. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. NatRev Mol Cell Biol. 2004;5:897-907.
164. Shibue T TT. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. int J Cancer 2006;119:2036-43.
165. Hsueh A EK, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonadal Celi Apoptosis. Recent Progress in Hormone Research. 1996;51:432-57.

166. B. KJ. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil.* 1992;95:825-30.
167. Jefferson K P PRA, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol.* 2000;86:598-606.
168. Kadioğlu A ÇS, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman MÖ, Usta MF, Kendirci M. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi.* 1 ed. İstanbul: Türk Androloji Derneği Yayını; 2004. 91-8 p.
169. Blanco-Rodriguez J GMC. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl.* 1998;19:487-97.
170. SG J. Testicular Biopsy Score Count- A Method For Registration Of Spermatogenesis In Human Normal Values And Results In 335 Hypogonadal Males. *Hormones.* 1970;1:2-25.
171. L EG. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1979;95:351-8.
172. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical biochemistry.* 1978;86(1):271-8.
173. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clinical biochemistry.* 2005;38(12):1103-11.
174. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical biochemistry.* 2004;37(4):277-85.
175. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38(12):1103-11.
176. Iammarrone E, Balet R, Lower A, Gillott C, Grudzinskas J. Male infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology.* 2003;17(2):211-29.
177. Zhou Q, Ding Y, Xiao J. Sensitive determination of thiamethoxam, imidacloprid and acetamiprid in environmental water samples with solid-phase extraction packed with multiwalled carbon nanotubes prior to high-performance liquid chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry.* 2006;385(8):1520-5.
178. Mohammadi A, Yamini Y, Alizadeh N. Dodecylsulfate-doped polypyrrole film prepared by electrochemical fiber coating technique for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A.* 2005;1063(1-2):1-8.
179. Ding T-H, Lin H-H, Whang C-W. Determination of chromium (III) in water by solid-phase microextraction with a polyimide-coated fiber and gas chromatography-flame photometric detection. *Journal of Chromatography A.* 2005;1062(1):49-55.
180. Terayama H, Endo H, Tsukamoto H, Matsumoto K, Umezu M, Kanazawa T, et al. Acetamiprid accumulates in different amounts in murine brain regions. *International journal of environmental research and public health.* 2016;13(10):937.
181. Han W, Tian Y, Shen X. Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere.* 2018;192:59-65.
182. Magalhaes LC, Hunt TE, Siegfried BD. Efficacy of neonicotinoid seed treatments to reduce soybean aphid populations under field and controlled conditions in Nebraska. *Journal of economic entomology.* 2009;102(1):187-95.
183. Hoffmann EJ, Vandervoort C, Wise JC. Plum curculio (Coleoptera: Curculionidae) adult mortality and associated fruit injury after exposure to field-aged insecticides on tart cherry branches. *Journal of economic entomology.* 2010;103(4):1196-205.
184. Goulson D. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology.* 2013;50(4):977-87.

185. Mostafalou S, Abdollahi M. Pesticides and human chronic diseases: evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicology and applied pharmacology*. 2013;268(2):157-77.
186. Bal R, Nazıroğlu M, Türk G, Yılmaz Ö, Kuloğlu T, Etem E, et al. Insecticide imidacloprid induces morphological and DNA damage through oxidative toxicity on the reproductive organs of developing male rats. *Cell biochemistry and function*. 2012;30(6):492-9.
187. Abarikwu SO, Pant AB, Farombi EO. Quercetin decreases steroidogenic enzyme activity, NF- κ B expression, and oxidative stress in cultured Leydig cells exposed to atrazine. *Molecular and cellular biochemistry*. 2013;373(1-2):19-28.
188. Traber MG, Stevens JF. Vitamins C and E: beneficial effects from a mechanistic perspective. *Free Radical Biology and Medicine*. 2011;51(5):1000-13.
189. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free radical biology and medicine*. 2007;43(1):4-15.
190. Verma RS, Srivastava N. Effect of chlorpyrifos on thiobarbituric acid reactive substances, scavenging enzymes and glutathione in rat tissues. 2003.
191. Yousef M, El-Demerdash F, Al-Salhen K. Protective role of isoflavones against the toxic effect of cypermethrin on semen quality and testosterone levels of rabbits. *Journal of environmental science and health, part B*. 2003;38(4):463-78.
192. Yousef MI. Vitamin E modulates reproductive toxicity of pyrethroid lambda-cyhalothrin in male rabbits. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(5):1152-9.
193. Mosbah R, Yousef MI, Maranghi F, Mantovani A. Protective role of *Nigella sativa* oil against reproductive toxicity, hormonal alterations, and oxidative damage induced by chlorpyrifos in male rats. *Toxicology and industrial health*. 2016;32(7):1266-77.
194. Zhang J-j, Yi W, Xiang H-y, Li M-X, Li W-H, WANG X-z, et al. Oxidative stress: role in acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system. *Agricultural sciences in China*. 2011;10(5):786-96.
195. Mosbah R, Djerrou Z, Mantovani A. Protective effect of *Nigella sativa* oil against acetamiprid induced reproductive toxicity in male rats. *Drug and chemical toxicology*. 2018;41(2):206-12.
196. YE. A. neonikotinoid grubu insektisitlerden asetamiprid'in erkek üreme sistemi üzerine etkisinin araştırılması. istanbul: İstanbul üniversitesi sağlık bilimleri enstitüsü farmasötlük toksikoloji anabilim dalı 2017.
197. Bal R, Türk G, Tuzcu M, Yılmaz Ö, Kuloğlu T, Baydaş G, et al. Effects of the neonicotinoid insecticide, clothianidin, on the reproductive organ system in adult male rats. *Drug and chemical toxicology*. 2013;36(4):421-9.
198. Kong D, Zhang J, Hou X, Zhang S, Tan J, Chen Y, et al. Acetamiprid inhibits testosterone synthesis by affecting the mitochondrial function and cytoplasmic adenosine triphosphate production in rat Leydig cells. *Biology of reproduction*. 2016;96(1):254-65.
199. Devan RS, Mishra A, Prabu P, Mandal T, Panchapakesan S. Sub-chronic oral toxicity of acetamiprid in Wistar rats. *Toxicological & Environmental Chemistry*. 2015;97(9):1236-52.

EKLER

EK 1:

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Emrah ZAYMAN
Doğum tarihi ve yeri : 30/08/1984 –MALATYA
Uyruğu : T.C.
İletişim adresleri : emrahzayman@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Malatya Lisesi (1999-2001)
Lisans : Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2002-2008, Elazığ
Yabancı Dil : İngilizce

Çalıştığı Kurumlar

2008 - Doğanşehir Mehmet KÜÇÜK Sağlık Ocağı
2010 - 2014 Malatya 112 Acil Sağlık Hizmetleri
2014 - 2015 Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD
2016 - İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD