

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANABOLİK ANDROJENİK STEROİD
UYGULANMIŞ ERKEK SIÇANLARDA
ERİTROPOİETİNİN TESTİS DOKUSU ÜZERİNE
KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

İŞILAY SEZEN ERMİŞ

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2012

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970073

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ANABOLİK ANDROJENİK STEROİD
UYGULANMIŞ ERKEK SIÇANLARDA
ERİTROPOİETİNİN TESTİS DOKUSU ÜZERİNE
KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İŞILAY SEZEN ERMİŞ

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Kazım TUĞYAN

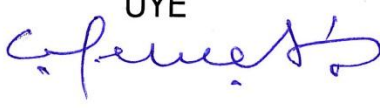
Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012.KB.SAG.014
sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc-2009970073

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Işıl Sezen ERMİŞ'in ANABOLİK ANDROJENİK STEROİD UYGULANMIŞ ERKEK SIÇANLARDA ERİTROPOİETİNİN TESTİS DOKUSU ÜZERİNE KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ konulu Yüksek Lisans tezini 11.07.2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Doç. Dr. Kazım TUĞYAN
BAŞKAN

Doç. Dr. Çetin PEKÇETİN

ÜYE


Prof. Dr.Durgül ÇELİK

ÜYE


Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK

ÜYE

Doç. Dr. Müge KIRAY

ÜYE

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
ŞEKİL LİSTESİ	iii
TABLO LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	v
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Testis	6
2.1.1. Testis Embriyolojisi	6
2.1.2. Testis Anatomisi	6
2.1.3. Testis Histolojisi	7
2.1.4. Testis Fizyolojisi	20
2.2. Nöroendokrin Sistem	23
2.2.1. Hipotalamohipofizyal Sistemin Anahatları	23
2.3. Apoptoz	26
2.3.1. Apoptoz' un Tanımı Ve Tarihçesi	26
2.3.2. Apoptoz' un Görüldüğü Olaylar	27
2.3.2.1. Morfolojik Değişiklikler	28
2.3.2.2. Biyokimyasal Değişiklikler	28
2.3.3. Apoptoz Mekanizması	29
2.3.3.1. Ekstresek / Reseptör Aracılı Yol	29
2.3.3.2. İntrensek / Mitokondrial Yol	30
2.3.4. Apoptoz Regülatörleri	30
2.3.5. Spermatogeneziste Apoptozun Rolü	33

2.4. AAS.....	34
2.5. Antioksidanlar.....	35
2.6. Epo.....	36
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40
3.1. Araştırmanın Tipi.....	41
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	41
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	41
3.4. Çalışma Materyali.....	42
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	42
3.6. Veri Toplama Araçları.....	42
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	42
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler.....	43
3.6.2.1. Işık Mikroskopik İncelemeler.....	44
3.6.2.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması.....	44
3.6.2.1.2. Peryodik Asit Schiff Boyaması.....	45
3.6.2.2. Morfometrik Değerlendirmeler.....	46
3.6.2.2.1. Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması.....	46
3.6.2.2.2. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü.....	47
3.6.2.3. İmmünohistokimyasal İncelemeler.....	47
3.6.2.3.1. TUNEL Boyama.....	47
3.6.2.3.2. Aktif kaspaz-3 Boyama.....	48
3.6.2.4. Ultrastrüktürel İncelemeler.....	49
3.6.2.4.1. Elektron Mikroskobu Doku Takibi.....	49
3.6.2.5. Biyokimyasal Analizler.....	49
3.6.2.5.1. Malondialdehit (MDA) Düzey Ölçümü.....	50

3.6.2.5.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzey Ölçümü.....	50
3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi.....	52
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	53
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	53
3.10. Etik Kurul Onayı.....	53
4. BULGULAR.....	54
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular.....	54
4.1.1. Testis'in Histolojik Değerlendirmesi	54
4.2. Morfometrik Bulgular.....	59
4.2.1. Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması.....	59
4.2.2. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü.....	60
4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	61
4.3.1. TUNEL Boyama Değerlendirmesi.....	61
4.3.2. Aktif kaspaz-3 Boyama Değerlendirmesi.....	64
4.5. Biyokimyasal Bulgular.....	67
4.5.1. MDA Düzey Değerlendirmesi.....	67
4.5.2. GPx Düzey Değerlendirmesi.....	69
4.6. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	70
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	78
7. KAYNAKLAR.....	79
8. EKLER.....	87

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Testis yapısı.

Şekil 2: Sertoli hücresi ve spermatogenik seri hücreleri.

Şekil 3: Spermin yapısı.

Şekil 4: Testisin hormonal kontrolü.

Şekil 5: Apoptoz ve nekroz.

Şekil 6: EPO ve EPO reseptörünün hücresel mekanizması.

Şekil 7: Eritropoietin ile oksijen ve eritrosit üretimi arasındaki ilişkinin mekanizması.

Şekil 8: Kontrol grubuna ait testis dokusu. H&E.

Şekil 9: Kontrol grubuna ait testis dokusu. PAS.

Şekil 10: Sham grubuna ait testis dokusu. H&E.

Şekil 11: Sham grubuna ait testis dokusu. PAS.

Şekil 12: ND grubu testis dokusu. H&E.

Şekil 13: ND grubu testis dokusu. PAS.

Şekil 14: Epo DD grubu testis dokusu H&E.

Şekil 15: Epo YD grubu testis dokusu. PAS.

Şekil 16: Epo YD grubu testis dokusu. H&E

Şekil 17: Epo DD grubu testis dokusu. PAS.

Şekil 18: Kontrol grubu testis dokusu. TUNEL.

Şekil 19: Sham grubu testis dokusu. TUNEL.

Şekil 20: ND grubu testis dokusu. TUNEL.

Şekil 21: Epo düşük doz tedavi grubu testis dokusu. TUNEL.

Şekil 22: Epo yüksek doz tedavi grubu testis dokusu. TUNEL.

Şekil 23: Kontrol grubu testis dokusu. Aktif kaspaz 3.

Şekil 24: Sham grubu testis dokusu. Aktif kaspaz 3.

Şekil 25: ND grubu testis dokusu. Aktif kaspaz 3.

Şekil 26: Epo düşük doz tedavi grubu testis dokusu. Aktif kaspaz 3.

Şekil 27: Epo yüksek doz tedavi grubu testis dokusu. Aktif kaspaz 3.

Şekil 28: Grupların MDA düzey ortalamaları.

Şekil 29: Grupların GPx düzey ortalamaları.

Şekil 30: Kontrol grubuna ait kesit.

Şekil 31: Sham grubuna ait kesit.

Şekil 32: ND grubuna ait kesit

Şekil 33: Epo düşük doz tedavi grubuna ait kesit.

Şekil 34: Epo yüksek doz tedavi grubuna ait kesit.

Şekil 35: Johnson Testiküler Biyopsi Skoruması.

Şekil 36: Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ortalaması.

Şekil 37: Aktif kaspaz 3 pozitif hücre değerlendirme tablosu.

Şekil 38: Tunel pozitif hücre değerlendirme tablosu.

TABLO DİZİNİ

Tablo 1 : Doku takip protokolü

Tablo 2 : Hematoksilen-Eozin boya protokolü

Tablo 3 : PAS boya protokolü

Tablo 4 : Johnson testiküler biopsi skorlaması

KISALTMALAR

AAS	: anabolik androgenik steroid
ND	: Nandrolone decanoate
Epo	: Eritropoietin
EM	: Elektron mikroskobu

ÖZET

ANABOLİK ANDROJENİK STERÖİD UYGULANMIŞ ERKEK SIÇANLARDA ERİTROPOİETİNİN TESTİS ÜZERİNE KORUYUCU ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

Işılay Sezen ERMİŞ

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilimdalı.

AMAÇ

Bu çalışmada; anabolik androjenik steroid hormon olan nandrolone decanoate (ND) uygulanmış erkek sıçanlarda güçlü bir antioksidan olan eritropoietinin (EPO) testis dokusu üzerine etkilerinin histolojik, ultrastrüktürel, immünohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırılması hedeflenmiştir.

YÖNTEM

Deneyisel modelimizde Wistar suşu erkek sıçanlar 5 gruba (n=7) ayrıldı. I. grup, kontrol grubu; II. grup, sham grubu; III. grup, 10 mg/kg/hafta Nandrolone decanoate (ND) verilen deney grubu, IV. grup, 10mg/kg/hafta ND ve Düşük doz (100 IU/kg) Eritropoietin (EPO) verilen deney grubu, V. grup, 10mg/kg/hafta ND ve Yüksek doz (500 IU/kg) EPO verilen deney grubu. Işık mikroskopik incelemeler için kesitler Hematoksilen&Eozin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS) ile boyandı. İmmünohistokimyasal olarak apoptoz belirlenmesi için ise terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling (TUNEL) ve Kaspaz-3 boyamaları yapıldı. Biyokimyasal incelemeler için alınan dokularda glutathion peroxidase (GPx) ve melondialdehit (MDA) düzeyleri incelendi.

BULGULAR

Yapılan çalışmalar sonucunda kontrol ve sham gruplarında normal testis yapısı gözlemlendi. ND grubunda spermatogenik seriye ait hücre diziliminde düzensizlik, germ hücre kayıpları, seminifer tübüllerde vakuolizasyon, tübül lümeninde spermiyum hücrelerinin azalması, bazılarında görülmemesi gibi bulgular gözlemlendi. Ayrıca bazal membranda kalınlaşma gözlemlendi. Epo gruplarında ise kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edildi. İmmünohistokimyasal incelemelerde ND grubu testis dokusunda kontrol grubuna göre anlamlı oranda immünopozitif hücre artışı gözlenirken Epo tedavi gruplarında kontrole yakın değerler gözlemlendi. Biyokimyasal olarak kontrol ve sham gruplarıyla ND grubu

kıyaslandığında MDA düzeylerinde anlamlı artış, GPx düzeylerinde ise anlamlı olarak azalma gözlemlendi. Tedavi gruplarında ise ND grubuna kıyasla MDA düzeylerinde anlamlı azalış, GPx düzeylerinde ise anlamlı artış saptandı.

SONUÇ

Elde ettiğimiz verilere dayanarak ND' nin testis dokusunda oksidatif stresi ve apoptozu arttırdığı, doku hasarı oluşturduğu fakat Epo' nun oluşan doku hasarını ve biyokimyasal değişiklikleri azalttığını gözlemledik.

Anahtar Kelimeler: Anabolik androjenik steroid, nandrolone decanoate, Epo, testis, apoptoz.

SUMMARY

Işıl Sezen ERMİŞ

Dokuz Eylül University Medical Sciences Institute Histology and Embryology Department.

PURPOSE

In this study, we aimed to study the protective effects of Erythropoietin, a strong antioxidant, against possible negative effects of anabolic androgenic steroid, testes of male rats histologically, ultrastructural, immunohistochemically and biochemically.

METHOD

35 Wistar albino rats were divided into 5 groups (n=7). Group I. Control; Group II. Sham; Group III. 10 mg/kg/week Nandrolone decanoate; Group IV. 10 mg/kg/week Nandrolone decanoate and low dose (100 IU/kg) EPO; Group V. 10 mg/kg/week Nandrolone decanoate and high dose (500 IU/kg) EPO were applied every Wednesday of each week for two months by intramuscular. Epo applied every day for two months by intraperitoneal. Testis tissue slides were stained with hematoxyline&eosine (H&E) and Periodic Acid Schiff (PAS) for light microscopy. Immunohistochemical TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) and active caspase-3 were performed to determine apoptosis. Glutathion peroxidase (GPx) and Malondialdehyde (MDA) levels were evaluated biochemically. Also ultrastructural observations were used.

RESULTS

Investigations of our study showed that on control and sham group's seminiferous tubules were normal. In ND group, irregular sequencing of spermatogenic cell series, lack of germ cell, vacuolization in seminiferous tubules, reduction of spermiums in lumen or lack of spermiums were observed. Also basal membrane of seminiferous tubules was thickened. No significant changes were seen in Epo groups. After immunohistochemical investigations, number of immunopositive cells were significantly increased in ND group in comparison with control group. In Epo groups immunopositive cells were found significantly decreased compared with ND group. According to biochemical results MDA and GPx levels evaluations; MDA levels were found significantly higher and GPx levels were found

significantly lower in ND group than control and sham groups. MDA levels were significantly lower; GPx levels were significantly higher in Epo groups than ND group.

CONCLUSION

According to our results; we consider that AAS increases apoptosis and oxidative stress, causes tissue damages and biochemical changes in testis. In conclusion we assume that Erythropoietin can minimize the histological damage and biochemical differences significantly.

Key Words: Anabolic Androgenic Steroid, Nandrolone decanoate, Erythropoietin, testis, apoptosis

1.GİRİŞ VE AMAC

Anabolik androjenik steroidler (AAS)' ler sporcular arasında atletik performansı arttırmak için doping amaçlı ya da kas kitlesini arttırmak için kullanılırlar (1). Anabolik-androjenik steroid (AAS) bileşenleri testosteronun sentetik analoglarıdır ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılırlar (2). Atletler tarafından kullanılan bu bileşenlerin dozları ve kombinasyonları tedavi edici dozlarından çok daha yüksek dozlardadır. Bu bileşenlerin yüksek dozları insanların ve hayvanların seksüel davranışlarında, fizyolojilerinde ve sperm kalitelerinde değişiklikler meydana getirdikleri kanıtlanmış (1,3), ancak testis dokusundaki değişikliklere daha az odaklanılmıştır (4,5). AAS'ler hipotalamik-hipofizer ekseninde gonadotropin salınmasını olumsuz geri besleme (negatif feedback) mekanizması yolu ile inhibe ederek LH ve FSH hormon kan düzeylerinde düşmeye yol açarlar (6). Sonuçta endojen testosteron ve östrodiol düzeyleri azalır. Gonadotropin baskılanması tamamlandığında spermatogenez bloke olur. Androjenler kas, kemik, prostat ve saç folikülleri gibi pek çok dokuda anabolik aktivite gösterir (7). Steroid analogları özellikle adolesan dönemdeki kişilerde bu etkileri gösterir.

Anabolik androjenik steroid olan ND' ın testis üzerine yapmış olduğu etkileri ışık mikroskopik ve biyokimyasal düzeyde inceleyen çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bu nedenle biz deneysel modelimizde ND' ın testis üzerine yapmış olduğu olumsuz etkileri histolojik, biyokimyasal ve ultrastrüktürel olarak incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

2.1.1. Testisin Embriyolojisi

Cinsiyetin farklanması bir kısmı otozomal olan çok sayıda genin rol aldığı kompleks bir süreçtir (8).

Her ne kadar embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovumu dölleyen sperm çeşidi ile fertilizasyon sırasında belirleniyorsa da; erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri embriyonik 7. haftaya kadar gelişime başlamaz. Genital sistem gelişirken dönemde her iki cinsten de birbirine benzer (9).

Cinsiyetin ikiye ayrılmasındaki anahtar, kısa kolunda “testis belirleyici faktör” (TDF) genini taşıyan Y kromozomudur. Bu faktörün varlığı veya yokluğu gonadal farklanmayı doğrudan etkiler ve Y kromozomunda yerleşmiş olan birçok genin rudimenter cinsiyet organlarının kaderini tayin etmek için harekete geçmesini sağlar (8)

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar. Mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma oluşur ve epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu sonucu mezonefrozun medialinde bir kabarıklık meydana gelir. Bu kabarıklık “gonadal kabartı (şişkinlik)” adını alır. Parmak şeklindeki epitelial kordonlar (gonadal kordonlar) altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklanmamış gonad dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşur. Eğer embriyo XX seks kromozomuna sahip ise farklanmamış gonadın korteksi overe differensiye olur, medullası geriler. Embriyo XY kromozom kompleksini içeriyorsa, medulla testise farklanır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur (9).

2.1.2. Testisin Anatomisi

Testis, yanlardan biraz basık oval biçimde, bir çift organ olup skrotum denen bir kese içinde asılı bulunan bir çift organdır ve birbirinden bir bölme ile (septum scroti) ayrılmıştır. Sol testis sağ testise göre biraz daha aşağı konumdadır (10). Erkek üreme hücreleri olan spermatozoon’lar ve erkek seks hormonları olan androjenleri üretir (11).

Testisler 3 cm kalınlığında, 10-14 gr ağırlığında, 2-3 cm genişliğinde ve yaklaşık 4 cm uzunluğundadır. Bir testisin iki yüzü (facies lateralis ve medialis), iki ucu (extremitas superior ve inferior) ve iki kenarı (margo anterior ve posterior) bulunur (12).

Testis içerisinde yerleşik olarak bulunan tubuli rekti ve rete testis ile testis dışında yerleşik olarak bulunan duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatorius kanalları genital kanal sistemini oluşturur. Bu kanal sistemi ve bununla ilişkili olan vesikula seminalis, prostat bezi, bulboüretral bezler ve cinsel birleşme organı olan penis erkek üreme sistemini oluşturur (12).

Erken fetal dönemde, karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yer alan testisler, fetüs geliştikçe aşağıya doğru hareket ederek doğumdan hemen önce inguinal kanal aracılığı ile skrotuma inerler. Testislerin normal fonksiyonlarını yapabilmeleri için karın boşluğundan skrotuma inmeleri zorunludur (11).

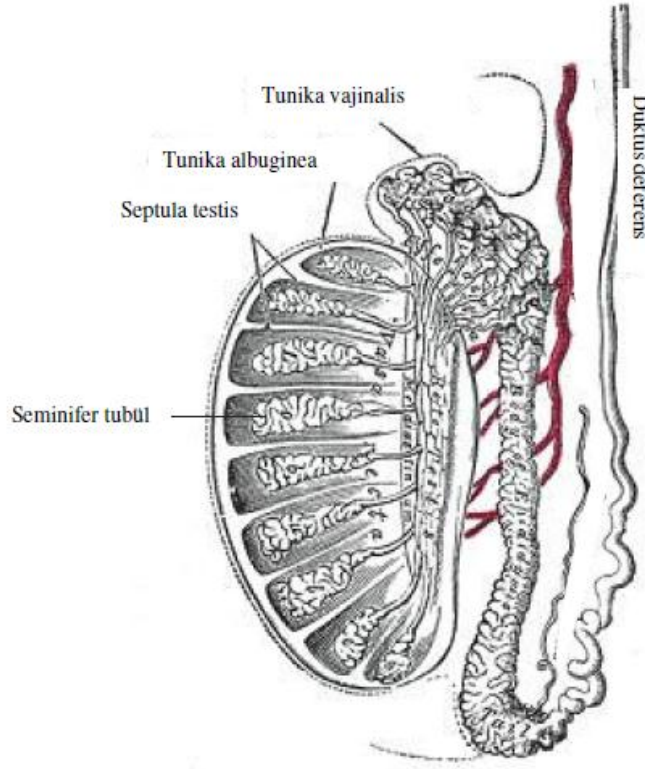
Testisin en dışında bulunan skrotum deri fibröz kılıf ve kas liflerinden oluşur. Skrotum içten dışa doğru; peritoneumun lamina periatealisi (periorchium), fascia spermatika interna, m. Cremaster, m. Obliquus, fascia spermatika externa, m. Obliquus, tunika dartos ve en dışta cutis (deri) den oluşur. Ayrıca skrotum içerisinde testis, epididimis, duktus deferensin bir kısmı ve bu organlara gelen kan damarları ile sinirler bulunur (11).

2.1.3. Testis Histolojisi

Testislerin karın boşluğunun dışında yerleşimi vücut ısısında 2-3°C düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34°C ila 35°C gereklidir (13).

Olgun testisin posteriyor yüzü epididimis ile ilişkilidir. Hem testis hem de epididimis skrotal kese içerisinde vaza deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile asılıdır (13).

Testis rete testisin yer aldığı yerde kalınlaşarak mediastinumu oluşturan tunika albuginea ile çevrelenir (Şekil 1). Mediastinumda testiküler kitleye doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250-300 lopçuğa böler. Herbir lopçuk bir ila dört seminifer tübülü içerir (13).



Şekil 1: Testis yapısı (81).

Herbir seminifer tübül yaklaşık 150 mikrometre çapta ve 80 cm uzunluktadır; iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Rete testis, seminifer epitelyumun ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır (13).

Seminifer tübül iki belirgin hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli merkezi bir lümeninden oluşur: 1- Somatik Sertoli Hücreleri 2- Spermatogenik hücreler(spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler) (13).

Seminifer epitel bir bazal membran ile kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan bir duvarla çevrelenmiştir. Miyoid hücreler hareketsiz spermleri rete testise iletirler ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur. Spermler epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri motilite özelliklerini kazanırlar.

Seminifer tübül arasındaki boşluk kan damarları, lenfatik kanallar veya sinüzoidler, makrofajlar ve androjen üreten Leydig hücre grupları tarafından doldurulmuştur.

Her bir testis skrotumun altında, 3 tabakalı bir kapsül ile sarılıdır. Bu yapıya testiküler kapsül denir ve tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza tabakalarından oluşur (14).

Testis en dışta mezotelyal hücrelerden oluşan, 2 yapraklı, periton kökenli seröz bir kese olan tunica vaginalis tabakası ile örtülüdür. Tunica vaginalisin visseral yaprağı testisin  n ve yan yüzlerini çevreler, pariyetal yaprağı ise skrotum üzerinde uzanmaktadır. Bu tabakanın altında tunica vaginalisin visseral yaprağı olan ve tunica vaginalisten bazal lamina ile ayrılan, tunica albuginea tabakası bulunmaktadır. En içte bulunan tunica vask loza tabakası ise gevşek bağ dokusundan oluşur ve kan damarlarını içermektedir (15).

Tunica albuginea histolojik kesitlerde en belirgin gözlenen, sıkı, düzensiz bağ dokusundan oluşan yoğun bir tabakadır. Bu tabaka testisin posterior yüzeyi boyunca üçgen şeklinde bir kalınlaşma meydana getirir ve mediastinum testis yapısını oluşturarak organın parankiması içerisine sokulur. Mediastinum testis yapısına, tıpkı hilum yapısına olduğu gibi, genital boşaltma kanalları, kan ve lenf damarları ve sinirler bağlanır. Buradan ışınsal olarak çıkan sıkı bağ dokusu yapısındaki, ince fibröz bölmeler (septula testis) testisi insanda yaklaşık olarak 250 lobüle ayırır. Piramit şeklindeki lobüllerin tavanları mediastinum testise, tabanları ise testisin dış y z n ne bakar. Lobüllerin birbirleriyle ilişkide olmalarını sağlayan bölmelerin tam olmamasıdır. Her bir lobül, 1-4 arasında değişen sayıda seminifer tübül içerir. Seminifer tübüllerin arası tunica vask lozanın testis içine uzanarak oluşturduğu interstisyel doku ile doldurulmuştur. Burada kan ve lenf damarları, makrofajlar, fibroblastlar ve androjen salgılayan Leydig hücre grupları yer almaktadır (13) (16).

Testis tübülleri mediastinum bölgesi yakınında sonlanır. Sonlanan tübüllerin lümenleri daralır, düzleşir ve tubuli rekti (tubulus seminiferi rekti) denilen bir testis içi boşaltım yolunu oluşturur. Bu yapı seminifer tübülleri dar kanallardan oluşan bir ağ yapısında olan rete testise bağlar. Rete testis mediastinum testis bölgesinde anastomozlaşmıştır. Tubuli rektinin rete testis ile ilişkili bölümü ve rete testis genelde tek bir silia içeren ve kısa mikrovilluslu kübik epitelle döşelidir, tubuli rektinin seminifer tübül ile ilişkili olan bölümünde ise sadece sertoli hücreleri yer alır (17).

Kıvrımlı yapıya sahip olan duktuli efferentes kanalları birleşerek spermiyumların toplandığı ve depolandığı, en uzun, oldukça kıvrıntılı, katlantılı ve tek bir kanal olan duktus epididimisi oluştururlar. Duktus epididimisin epitel; epitel hücrelerinin bir bazal lamina üzerine oturduğu, kısa bazal hücreler ile uzun sterostilyalı prizmatik hücrelerin yer aldığı sterostilyalı yalancı çok katlı epitelidir. Bazal laminanın altında ince bir lamina propria bulunur. Lamina propriasında altında ince düz kas katmanı yer alır (15).

Duktus epididimisin kuyruk kısmından sonra kanal duvarı birden bire kalınlaşır ve düz bir kanala dönüşür. Bu kanala duktus deferens denir ve kanal duvarında kalın bir düz kas tabakasını içerir. Duktus deferensin salgılama işlevine de sahip epiteli, sterosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epiteldir. Epitel distalde ise değişici epiteldir. Duktus deferensin prostat bezine girmeden önceki kısmının genişlemesiyle ampulla bölgesi oluşur. Vezikula seminalis kanalları duktus deferense ampulla bölgesinden sonra katılırlar. Sonra duktus deferens prostat bezine girer ve duktus ejakulatoryus kanalını oluşturur. Sonrasında ise üretraya açılır (13) (18).

Tubuli Seminiferi Kontorti (Seminifer tübül) yapısı

Seminifer tübüller yoğun kapiller ağ ile çevrili, ikili-üçlü anastomozlar yapan, oldukça kıvrımlı yapıdadırlar. Çapları yaklaşık 150-250 mikrometre (μm), uzunlukları 30-70 (cm) dir ve testisin % 92'sini oluştururlar. Lobülün tepesine doğru kıvrımlarını kaybederek düz tüp bir halini alan (tubuli rekti) ve rete testis ile devam eden tübüller her iki testiste yaklaşık olarak 1000 adettir, uzunlukları ise yaklaşık 0,5 km'dir (19) (13).

Seminifer tübüllerin duvarında en içte kalın bir seminifer epitel tabakası bulunur. Seminifer epitel, özelleşmiş çok katlı epiteldir, sertoli hücrelerini ve farklı olgunlaşma aşamalarındaki bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduran 4 - 8 katlı spermatogenik hücreleri içerir. Tübül duvarının orta kısmında bir bazal lamina, en dışında ise lamina propria denilen ortalama kalınlığı 8 -10 μm olan, fibroblastlarca zengin, çok katlı, silindir biçimli, tip I kollajen lif bantlarından oluşan bağ doku tabakası bulunmaktadır. Bu bölgeye peritübüler doku yada membrana propria da denilmektedir. Membrana propria ince bir bazal lamina üzerine oturan seminifer epiteli dıştan saran özelleşmiş fibröz bir dokudur ve 4 alt tabakadan oluşur. Dıştan içe doğru;

1) Dış Hücresel Tabaka: Fibroblastlardan oluşur.

2) Dış Hücresel Olmayan Tabaka: İnce bir bazal laminadır ve glikoprotein yapısındadır.

3) İç Hücresel Tabaka: İnce, uzun hücresel şekle ve sitoplazmalarında lipid damlacıklarına, mikropinositotik veziküllere ve miyoflamanlara sahip, bol miktarda da granüler endoplazmik retikulum ve her iki yüzlerinde küçük invaginasyonlar içeren miyoid hücrelerden oluşmuştur. Kasılabilme özelliğine sahip olan myoid hücreler, seminifer tübülün

çapını değiştirerek spermatozoonların tübül içerisindeki hareketini sağlarlar. Myoid hücre tabakası insanlarda ve bazı türlerde 3-5 tabakalı iken, kemiricilerde tek tabakalıdır.

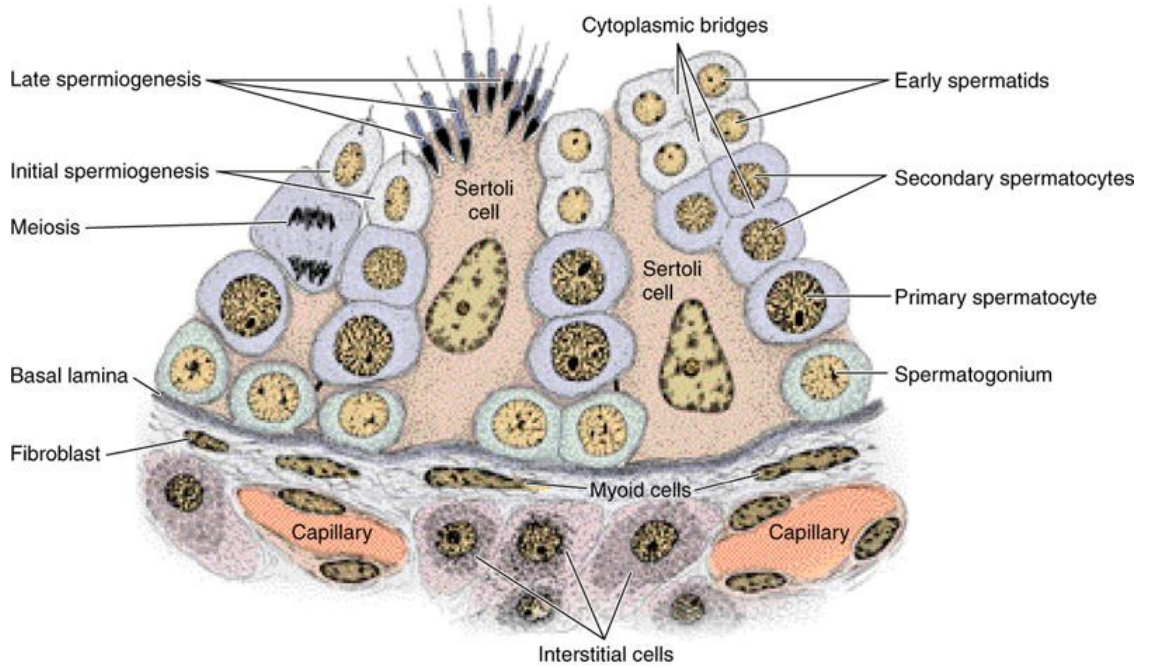
4) İç Hücresel Olmayan Tabaka: Bol miktarda glikoprotein, hyalüronik asit ve kollajen lif içeren tabakadır.

Tübüller arası gevşek bağ dokusunda ise kan damarları ve sinirler, ince kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar, intertisyel hücreler olarak da adlandırılan Leydig hücre kümeleri, bulunur (17) (16) (19).

Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri, bir bazal membran üzerine oturan ve buradan seminifer tübül epiteline kadar uzanan, uzun piramidal şekilli, çevresi 7- 9 nm'lik fibröz elemanlar ile kuşatılmış, bazale yerleşmiş oluklu bir iki çentikli oval heterokromatid çekirdek ile merkezi yerleşimli bir büyük çekirdekçiğe ve apikal yan yüz farklanmalarına sahip, yan yüz zarlarının oluşturduğu karmaşık içe katlanmalar sonucunda da hücre sınırlarının ışık mikroskobu ile ayırt edilemediği hücrelerdir (Şekil 2). Sertoli hücrelerinin seminifer tübül lümene bakan apikal yüz membranları da katlanmalar ve kriptalar meydana getirerek yeni oluşan spermiyumların lümene bırakılma zamanına kadar spermatidlere yerleşebilecekleri bir alan sağlamış olurlar (16) (15).

Puberteden sonra seminifer tübül epitelinin yaklaşık %10'unu sertoli hücreleri oluşturur. Buradan da anlaşılacağı gibi sertoli hücreleri spermatozoonların desteklenmesinde ve olgunlaşmasında büyük rol oynarlar (13).



Şekil 2: Sertoli hücresi ve spermatogenik seri hücreleri (82).

Sertoli hücrelerinin sitoplazması çok iyi gelişmiş aktin filamanları ağı ile mikrotübüllerle ara filamanlardan oluşan gelişmekte olan cins hücrelerine destek görevi gören gelişkin bir hücre iskeletinin yanı sıra, iyi gelişmiş bir golgi kompleksi, bol miktarda yassı mitokondri, granülsüz (düz) endoplazmik retikulum, endolizozomların oluşturduğu lipofuskin bulunduran çok sayıdaki veziküller, lipid damlacıkları, vimentin, düşük molekül ağırlıklı sitokeratin 18 ve 19 içerirken, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum içerir. Sitoplâzmada ayrıca içeriği ve işlevi henüz tanımlanmamış Charcot-Bottcher kristaloidleri denilen inklüzyon cisimcikleri ve çekirdekçik ile birlikte çekirdek zarı altında kümelenmiş iki belirgin kromatin yoğunlaşması olan özel bir görünüme sahip üçlü görünüş bulunmaktadır (15) (17).

Sertoli hücreleri, taban ve yan yüzlerindeki sıkı bağlantı kompleksleriyle (zonula okludens) birbirlerine tutunurlar. Burada diğer sıkı bağlantılardan farklı olarak bazal membrana en yakın konumlu (seminifer epitelin 1/3 bazalinde) olarak bulunur ve seminifer tübül epitelinin bazal ve adluminal kompartman olarak 2 kompartmana ayırır. Bazal kompartman daha dardır, sıkı bağlantının bazalinde yer alır adluminal kompartmanı çevreler ve spermatogonyumlar ile primer spermatositleri içerir. Adluminal kompartman ise daha geniştir, lümene yakındır ve sekonder spermatositler ile spermatidleri içerir. Spermatogonyumlar farklılaşırken sperme özgü proteinler ortaya çıkar ve spermatogenezis

immunolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra olaylandığı için farklılaşmakta olan germ hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve onları yok edecek olan bir immün yanıtın oluşmasına neden olabilir. İşte spermatogenezis için mikro bir çevre sağlayan bu kompartmanların oluşturduğu kan-testis bariyeri, en yukarıdaki sekonder spermatositler ve spermatidleri en alttaki spermatogonyumlar ve primer spermatositlerden ayırır ve sekonder spermatositler ile spermatidleri dolaşım sistemindeki antijenlerden, otoimmün bağışıklık reaksiyonlarından ve kanda bulunan maddelerden korur (13) (19) (14). Sertoli hücreleri ayrıca gap junction denilen bağlantılarla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişini sağlayarak seminifer epitel siklusunun koordinasyonunda önemli rol oynar (38). Sertoli hücrelerinin puberteden sonra postmitotik özellik kazanması nedeniyle erişkin testisinde sertoli hücrelerinde mitotik hücre bölünmesine rastlanmaz (15) (18).

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları şunlardır:

- 1) Protein ve iyonlarca zengin bir sıvının seminifer tübül lümenine salınması,
- 2) Birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanan spermatogenik hücrelerin fiziksel olarak desteklenmesi, kan-testis bariyeri nedeniyle kan desteğinden izole edilen sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiyumlara besin maddesi ve metabolitlerin sağlanması ve yine kan-testis bariyeri sayesinde gelişmekte olan spermatogenik hücrelerin immünolojik reaksiyonlardan korunması (13),
- 3) Seminifer tübül içerisinde spermatogenezin gerçekleşebilmesi için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein (ABP)'nin Folikül stimüle edici hormonun (FSH) ve testosteron kontrolü altında sentezlenmesi,
- 4) Spermiyogenez sırasında rezidüel cisimcikler olarak atılan fazla spermatid sitoplazmasının fagosite edilerek sertoli hücre lizozomları tarafından yıkılması,
- 5) Olgun spermatidlerin spermiyasyon sürecinde seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak amacıyla aktin aracılı kasılmaların yapılması,
- 6) Hipofiz bezinin anterior kısmından salgılanan FSH'nin sentez ve salınmasını önleyen inhibin ve uyaran aktivin adı verilen peptid yapıdaki hormonların salgılanması,
- 7) Embriyonik gelişim sırasında erkek fetusta Müller (Paramezonefrik) kanalların gerilemesini ve Mezonefroz kanallarının oluşmasını sağlayan glikoprotein yapıdaki Anti-Müllerian Hormon (AMH)'nin üretilmesidir (16) (20) (19).

Spermatogenik hücreler ve spermatogenezis

Spermatogenik hücreler seminifer tübül epitelinin büyük çoğunluğunu oluşturan çeşitli olgunlaşma aşamalarında bulunan ve düzenli olarak bölünerek olgun spermlere farklılaşan, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak şekilde 4-8 tabakalı hücrelerdir. Lümenenden bazale doğru farklılaşmanın ve olgunlaşmanın değişik evrelerindeki hücre tipleri sırası ile; spermiumlar, spermatidler, sekonder spermatositler, primer spermatositler ve spermatogonyumlardır (19).

Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantıların altında kaldığı için bazal kompartmanda yer alırlar bazal lamina ile ilişkidirler ve kan-testis bariyerinin dışında kalırlar. 3 farklı tipi bulunur (16).

Tip A spermatogonyumlar; oval çekirdekli, yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinli seminifer epitelin kök hücreleridir. Puberteden itibaren mitoz geçirirler ve soluk boyanan, oval çekirdekli, ince granüler kromatinli tip A açık spermatogonyumlar ile tip A koyu spermatogonyumları meydana getirirler. Tip A açık spermatogonyumlar mitoz geçirerek çekirdekçik çevresinde ve çekirdek kılıfı boyunca yoğunlaşma gösteren çekirdek kromatinine ve merkezi yerleşimli çekirdekçiğe sahip sferikal çekirdek içeren tip B spermatogonyumları oluştururlar (15).

Spermatositler

Tip B spermatogonyumlar mitoz geçirerek primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositler, DNA (deoksiribonükleik asit) sentezini tamamladıktan sonra mayoz bölünmenin profaz safhasının bütün fazlarını geçirirler. Profaz evresi yaklaşık 22 gün sürer ve çekirdeklerindeki sinaptonemal kompleksin varlığı ile karakterize edilen, spermatogenik serinin en büyük ve histolojik kesitlerde en çok karşılaşılan hücreler de primer spermatositlerdir. Profaz evresinden sonra kardeş kromatidler sırasıyla metafaz, anafaz ve telofaz evrelerini geçirerek $2n$ DNA ve 23 kromozom ($22+X$ veya $22+Y$) içeren sekonder spermatositleri meydana getirirler. Sekonder spermatositler Kısa süren bir interfaz evresi geçirdikleri ve hızla ikinci mayoz bölünmeye girdikleri için histolojik kesitlerde çok zor görülürler (16) (13).

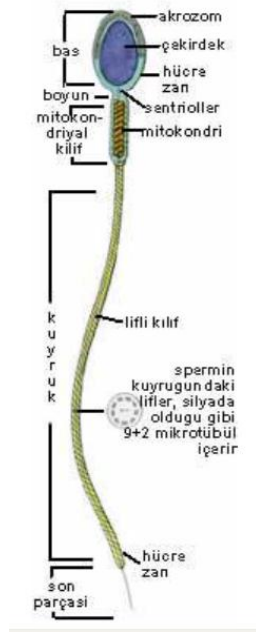
Spermatidler

Sekonder spermatositler; ikinci mayoz bölünmeyi tamamlayarak seminifer tübül lümeni yakınlarında sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntülerine yerleşmiş, 7-8 µm çapa, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan merkezi yerleşimli çekirdeğe, iyi gelişmiş bir Golgi kompleksine, çok sayıda mitokondri ve bir çift sentriyole sahip olan spermatidleri oluştururlar. Spermatidler sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma katlantılarında spermiyogenez denilen ve sırasıyla golgi fazı, akrozomal faz ve maturasyon fazı olmak üzere 3 aşamadan oluşan bir farklılaşma süreci geçirerek olgun spermiyum oluştururlar. Olgun spermiyum da spermiyasyon denilen olayla seminifer tübül lümenine salınır. Sonuç olarak ise bir spermatogonyumdan 4 olgun spermiyum oluşur (13) (16).

Spermiyumlar

İnsanlarda bir spermatogonyumdan olgun bir spermiyum spermatogenezis olayı ile yaklaşık olarak 64 günde meydana gelir ve olgun bir spermiyum baş, boyun ve kuyruk bölgelerinden oluşur (14). Baş bölgesinde yassı biçimli, yoğun kromatin içeren bir çekirdek ve çekirdeğin anterior yarısını örten, özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom bulunur. Akrozom hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve en önemlisi akrozin denilen tripsin benzeri proteazlar gibi hidrolitik enzimleri içerir (15). Boyun bölgesi baş ile kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlayan dar bir parçadır ve sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonemi oluşturan proksimal sentriol ile distal sentriol olmak üzere bir çift sentriol bulundurur (13). Kuyruk bölgesi ise orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç kısımdan oluşur. Kuyruğun orta parçasında sarmal olarak dizilmiş mitokondriler, 9+2 mikrotübüler yapıdaki aksonem ve sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz adet dış yoğun fibrillerden oluşmuştur. Esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır ve spermin öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan yedi adet dış yoğun fibrille sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Kuyruğun en kısa parçası olan son parçada ise yalnızca aksonem bulunur, dış yoğun fibriller ve fibröz kılıf bulunmaz (18) (16).

İnsanlarda spermatogenezisin her seminifer tübülde eş zamanlı olarak gerçekleşmemesi ve bazı lümende serbest spermiyumlara rastlanırken bazılarında yalnızca spermatidlerin gözlenmesi seminifer tübüllerde düzensiz bir görünüme yol açar. Sıçanlarda ise her seminifer tübülde spermatogenezis eş zamanlı olarak gerçekleşir. Ayrıca spermatogenezis evrelerinin sayısı hayvan türlerine göre farklılıklar gösterir. İnsanlarda 6, farede 12, sıçanda 14 adet spermatogenezis evresi görülür (18) (13).



Şekil 3: Spermin yapısı (83).

Spermatogenezis bir spermatogonyumdan olgun spermiyum oluşurken meydana gelen çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve başkalaşım evrelerini içeren bir süreçtir ve üç fazda gerçekleşir (14).

- **Spermatogonal evre (Spermatositogenez):**

Spermatogonyumların bölünerek spermatositleri oluşturdukları bu evre Spermatositogenez (Yun. Sperma; tohum + kytos; hücre + genesis; üretim) olarak adlandırılır (19).

- ***Spermatosit evresi (mayoz bölünme):***

Spermatositlerin ardarda iki mayoz bölünme geçirerek spermatidleri oluşturdıkları ve kromozom sayıları ile DNA miktarını her hücrede eşit olarak yarıya düşürdükleri bu evre Mayoz Bölünme olarak adlandırılır (19).

- ***Spermatid evresi (Spermiyogenesis)***

Spermatidlerin bir dizi hücre farklılaşması süreci geçirerek spermiyumları oluşturdıkları bu evre Spermiyogenesis olarak adlandırılır (16).

Spermatogenesis

Spermatogenez, bazal lamina üzerine yerleşmiş, yaklaşık olarak 12 µm çapta, çekirdeği soluk boyanan kromatin içeren, diploid, ilkel bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Spermatogonyumlar testosteron hormonunun etkisiyle pubertede mitoz bölünmeler geçirerek diğer spermatogonyumları ve primer spermatositleri oluştururlar. Spermatogonyumların küçük, 12 µm çapında, yuvarlak şekilli, bol heterokromatin içeren oval çekirdeğe sahip Tip A Koyu Spermatogonyumlar, Tip A Açık Spermatogonyumlar ve Tip B Spermatogonyumlar olmak üzere 3 tipi vardır. Tip A Koyu Spermatogonyumlar yedek hücrelerdir ve mitozla bölünerek diğer Tip A Koyu Spermatogonyumları ve Tip A Açık Spermatogonyumları oluştururlar. Tip A Açık Spermatogonyumlar da mitozla bölünerek Tip B Spermatogonyumları, onlarda primer spermatositlere farklılaşarak birinci mayoz bölünmenin profazına girerler ve yaklaşık 22 gün süren bu aşamadan sonra hızla birinci mayoz bölünmelerini tamamlayarak yalnızca 23 kromozom içeren, daha küçük yapıdaki ve eksik DNA miktarına sahip daha az sayıdaki sekonder spermatositleri oluştururlar. Histolojik kesitlerde interfazda kısa süre kalan ve hızlı bir şekilde ikinci mayotik bölünmeye giren, ortalama 8 saatlik bir yaşam süresine sahip sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur. Sekonder spermatositlerin de kromozom sayısının türler için sabit bir miktarda kalmasını sağlayan mayoz bölünmeyi tamamlamasıyla 23 kromozoma sahip, yuvarlak şekilli, yaklaşık 8 µm çapında, fertilizasyonla normal diploid yapıya dönen haploid yapıdaki spermatidler oluşur (17)(19). Bir adet Tip A Açık Spermatogonyumdan gelişen ve bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum, mitokondri, iyi gelişmiş golgi kompleksi içeren tüm spermatidler birbirlerine sitoplazmik köprücüklerle bağlıdırlar ve bunlar hidrolitik enzim depolayarak, organellerinin miktarını azaltarak, sitoplazmalarının bir kısmı dökerek, filagellum ve ilgili

iskelet yapısını şekillendirerek spermiumlara dönüşürler. Bu süreç Spermiyogenezis olarak adlandırılır ve üç fazdan oluşur (18) (17).

1) Golgi Fazı: Spermatid sitoplazmasında, düz endoplazmik retikulum, çekirdeğin yakınında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol ve serbest ribozomlar bulunur. PAS pozitif boyanan, küçük yapıdaki proakrozomal granüller golgi kompleksinde biriktikten sonra birleşerek tek bir akrozomal granülü membranla sınırlanmış bir akrozomal vezikülün içinde oluştururlar. Sentriyoller de akrozomun olduğu bölgenin karşı kutbuna göç ederek hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler ve flagellar aksonemi oluşturmaya başlarlar. Sonrasında nükleusa doğru geri dönerken hareket etmelerinin sonucunda aksonem komponentlerini çevrelerine sararlar (19) (17).

2) Akrozomal Faz: Yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını akrozomal vezikül ile granüller kaplar ve bu aşamadan sonra da korona radiata hücrelerini tubal mukozal enzimler ile birlikte birbirinden ayıran hyaluronidaz, zona pellusidayı eriten esteraz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzeyen proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içeren, lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş gören akrozom adını alırlar. Akrozomal faz evresinde hücrenin akrozom içeren ön kutbunun seminifer tübül tabanına doğru yönelmesine ek olarak nükleus uzar daha yoğun bir hal alır, sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur, mitokondriler spermiumların hareketlerinin kaynağını aldığı yer olan orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak oluştururlar. Flagellumun hareketi ise dynein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin, ATP'nin ve mikrotübüllerin etkileşmesi sonucu oluşur (13).

3) Matürasyon Fazı: Oluşan spermiumlar seminifer tübül lümenine doğru salınırlar ve geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir. Spermatogonyumların bölünmesiyle ve sonraki aşamalarda oluşan hücrelerin tamamen ayrılmayıp birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlı kalmaları, yaklaşık 70 gün süren, tek bir spermatogonyumdan oluşan primer ve sekonder spermatositlerle spermatidler arasındaki iletişimin devamlılığını sağlar. Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma katlantılarında spermiyogenezis aşamasını geçiren spermatid olgun spermiuma dönüşür ve spermiyasyon olayıyla seminifer tübül lümenine salınır (16) (13).

İnterstisyel Bağ Dokusu

Seminifer tübül epitelini çevreleyen ve tübüllerin arasındaki boşlukları dolduran, lamina propriya da denilen gevşek bağ doku yapısındaki interstisyel bağ dokusunda Leydig hücreleri, fibroblastlar, mast hücreleri, sitoplazmasında aktin filamentlerini içeren, düz kas hücrelerine benzetilen ve hareketsiz spermleri rete testise ilerleten ritmik kasılma hareketlerinden sorumlu olan myoid hücreler (peritübüler kontraktıl hücreleri), kollajen lifler, Leydig hücrelerine dönüşebilen farklılaşmamış mezenkimal kökenli hücreler, bağ doku elemanları, sinirler, kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine olanak sağlayan pencerele tipteki testiküler kapillerler, kan damarları ve lenfatik damarlar bulunmaktadır (13).

Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri seminifer tübüllerin arasındaki gevşek bağ dokusunda çoğunlukla pencerele tip kapiller ve küçük lenf damarlarına yakın konumda tek tek ya da küçük gruplar halinde yerleşen, yaklaşık olarak 15 µm çapında poligonal şekilli, eozinofilik, çok sayıda mikrovillus tek nukleus ve periferde yer alan 1-2 nukleolus içeren büyük hücrelerdir (17). Leydig hücre sitoplazmasında insanlara özgü Reinke kristalleri olarak adlandırılan kristalize proteinler, steroid hormon üreten hücrelerin tipik özelliği olan tübüler kristal mitokondriler, sıkı paketlenmiş bol granülsüz endoplazmik retikulum (AGER), çekirdeğin hemen yanında büyük ve iyi gelişmiş bir golgi kompleksi ve çok sayıda yuvarlak lipid damlacıkları bulunur. Daha az sayıda ribozom, granüllü endoplazmik retikulum (GER), lizozom, peroksizom ve bol lipid damlacıkları bulunurken salgı vezikülleri bulunmaz. Leydig hücre sayısı ve aktivitesi hormonal uyarılara bağlıdır ve türlere göre değişkenlik gösterir. Gebelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçerek leydig hücrelerini uyarır. Bu hücrelerde mitokondri ve AGER'lerinde bulunan enzimlerce erkek genital organlarının farklılanması ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumlu hormon olan testosteronu sentezlerler (16) (19).

Kan-testis bariyeri

Kan-testis bariyeri, seminifer tübüller ile interstisyel kan damarları arasında yer alan ve seminifer tübüllere immünoglobülinlerin geçmesini önleyerek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasını sağlayan, sertoli hücrelerinin kurduğı sıkı bağlantılar ile oluşan bariyerdir (19). Seksüel olgunlaşmanın immunolojik yeteneğın gelişmesinden sonra

meydana gelmesi sebebiyle spermatogenez sırasında ortaya çıkan birtakım proteinler farklılaşmakta olan sperm hücrelerinin yabancı olarak algılanmasına ve yok edilmesine sebep olabilecek bir immün yanıtı tetikledikleri için, kan-testis bariyeri gelişen sperm ve immün sistem arasında oluşabilecek her türlü etkileşimi ortadan kaldırır (13).

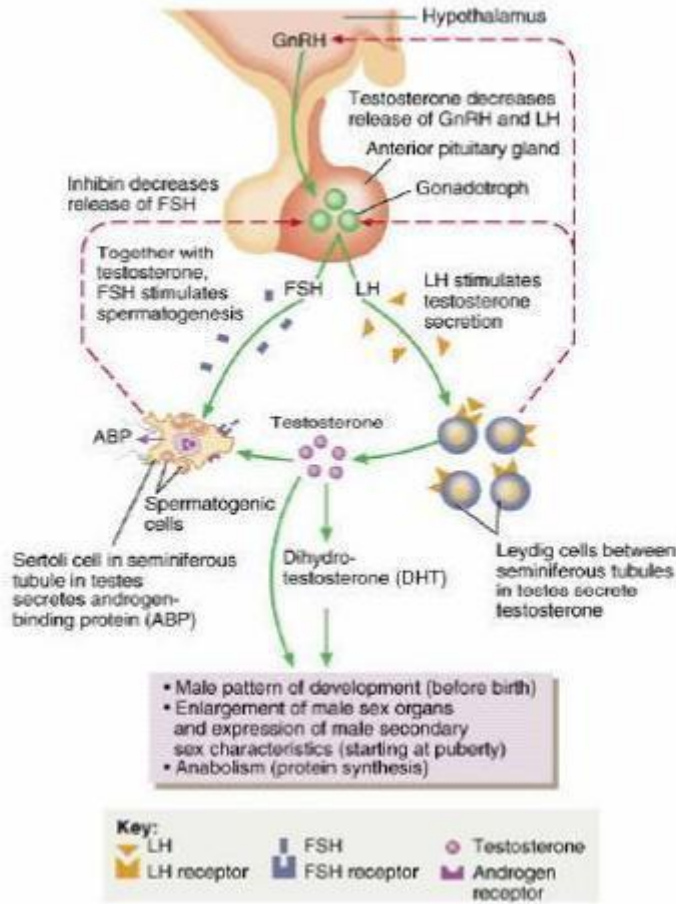
2.1.4. Testis Fizyolojisi

Testisler iki temel işleve sahiptir. Bunlar erkek germ hücresi olan spermiumların üretilmesi ve seks hormonu testosteronun sentezlenmesi, depolanması ve salgılanmasıdır. Testisin bu işlevi puberte döneminde başlar ve hipotalamo-hipofizer sistemin kontrolü altındadır. Hipotalamustan salgılanan gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH) hipofiz bezinin ön lobundan luteinize edici (LH) hormonun salgılanmasını uyarır. LH ise Leydig hücrelerinde bulunan reseptörlere bağlanarak bu hücrelerde kolesterolden başlıca testosteron olmak üzere östrojen dahil diğer hormonların sentezlenmesini sağlar. Diğer bir hipofiz ön lobu hormonu olan follikül uyarıcı hormon (FSH) ise yine hipotalamustan GnRH hormonu aracılığı ile salgılanır ve Sertoli hücrelerinde androjen bağlayıcı proteinin (ABP) sentezini ve salınımını uyarır. ABP testosteronu bağlayarak onun seminifer tübüllerde yüksek yoğunlukta kalmasını sağlar. Bu şekilde bölgesel olarak ortamda yüksek yoğunlukta bulunan testosteron FSH' nin etkisiyle spermatogenezin normal olarak gerçekleşmesine olanak tanır. Testisler günde holokrin tip salgılama ile yaklaşık 200.000.000 spermiumun oluşumunu sağlar (21).

Hormonal Kontrol

Beyinden salgılanan nöropeptitler ve nörotransmitterler (dopamin, norepinefrin, asetil kolin, serotonin) hipotalamusta gonadotropin salgılayıcı hormonun (GnRH) salgılanmasını uyarır. GnRH hipofizden glikoprotein yapısında folikül stimüle edici hormon (FSH) ve luteinize edici hormon (LH) salgılanmasını sağlar. LH spermatogenezisi dolaylı olarak uyarırken, endojen testosteron üretimini de aktive eder. FSH'nin hedefi ise spesifik reseptörleri olan Sertoli hücreleridir. Bu nedenle testosteron ve FSH, seminifer tübül epiteline etki eder. Androjen bağlayan protein (ABP) bir Sertoli hücresi ürünüdür. Testosteron LH'nin birincil inhibitörüdür ve potent etkili dihidrotestosterona ya da potent etkili östradiol (E2) dönüşebilir. Testosteron hipotalamik, östrojen ise hipofizer yolla inhibitör etki yapar. FSH'nin inhibisyonu sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin adlı nonsteroid bir maddeyle olmaktadır (22; 21).

Hormonal Control of Testicular Function



Şekil 4: Testisin hormonal kontrolü (84).

İnhibin

Sertoli hücrelerinde üretilen ve hipofiz bezinden FSH salınımını inhibe eden protein yapıdaki bir hormon olan inhibinin sürekli salgılanması durumuna FSH üretimi baskılanırken spermium sayısı azaldığında FSH miktarı artar (23).

Spermatogenez

Spermatogenez, 46 kromozomlu spermatogonyanın 23 kromozomlu spermatozoalara dönüşüm sürecidir. Testis kitlesinin %85-90'ını oluşturan seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri ve değişik evrelerde germ hücreleri bulunur. Sertoli hücreleri sabit sayıda, çoğalmayan hücrelerdir. Seminifer tübül bazal membranında birbirlerine sıkı şekilde bağlanarak kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bariyer, germ hücrelerinin immün sistemle karşılaşmasını ve infertilite oluşmasını engeller. Sertoli hücreleri bir taraftan gelişen germ hücrelerini beslerken, bozulanları ve diğer yabancı artıkları fagosit eder. Ayrıca ABP, FSH

reseptörleri ve inhibin üretimiyle androjen ve östrojen yıkılımını sağlar. Spermatogonya ve genç spermatositler seminifer tubulusların bazal tabakasında bulunurken, olgun spermatositler ve spermatidler adlüminal tabakada yer alırlar. Bazal tabakadan adlüminal tabakaya geçişte kan-testis bariyeri bozulmaz. Germinal hücreler bazal membrandan lümene doğru farklılaşma sırasına göre dizilirler. Primitif spermatogonyadan ya yeni spermatogonya ya da spermatosite dönüşecek hücreler oluşur. Primer spermatositten sekonder spermatosit oluşurken kromozom sayısı yarıya, yani 23'e iner. Bunlar spermiogeneze uğrayarak spermatid ve olgun spermatozoa şeklini alır. Tüm bu aşamalar için gerekli süre 64-74 gündür. Spermatogenezin başlaması için FSH, sürdürülmesi için ise testosteron gereklidir. Testiküler sperm hareketlidir; ovumu fertilize edemez. Spermatozoa bu yeteneği ancak epididimden geçerken kazanır. Spermilerin epididimden geçiş süresi yaklaşık iki gündür. Rete testis sıvısıyla duktus deferense gelen sperm, bu hücrelerin su reabsorbe etmesiyle oluşan basınç farkı, epitel hücrelerinin siliyer hareketleri ve en önemlisi de miyoid hücrelerin kasılması ile taşınır. Sperm, epididim içinde ilerledikçe motilite kazanır ve ovumu dölleyebilme özelliği kazanır. Epididim fonksiyonu, androjene özellikle dihidrotestosterona bağlıdır. Epididim kanalındaki epitel hücrelerinden salgılanan maddelerin tümü sperm olgunlaşmasında etkilidir. Duktus deferens spontan motiliteye sahip bir organdır. Düzensiz küçük kasılmalarla sürekli sperm taşır. Cinsel uyarılarla bu taşıma hızlanır. Ejakulat ortalama 3-3,5 ml'dir, seminal plazma ve spermatozoadan oluşur. Total volümün %1'inden azı spermatozoadır. Ortalama 3,5 ml ejakülatın 1,5-2 ml'si veziküloseminalisten, 0,5 ml'si prostattan, 0,1-0,2 ml'si Cowper ve Littre bezlerinden gelir. Ejakülatın ilk bölümü duktus deferensin ampullasındaki sperm ve prostat salgısını içermediğinden spermden zengindir. Daha sonraki kısımlar çoğunlukla veziküloseminalis salgısından oluşur. Normalde ejakülatın her mililitresinde 60-120 milyon spermatozoa bulunur. Ovumu aşılabilmesi için bu sayının en az 20 milyon olması ve ayrıca spermilerin en az yarıdan fazlasının hareketli, yine %60'nın morfolojik açıdan normal olması gerekir. Spermatozoa, 50-60 mikron uzunluğunda küçük, hareketli ve atipik bir hücredir. Kadın üreme organlarında yaşama süresi ortalama 48-72 saattir. Cinsel uyarının çok yüksek olduğu, ejakülasyona yakın zamanda duktus deferensin ampullasındaki sperm, prostat ve vezikülo seminalis salgıları arka üretrada toplanır. Mesane boynu ve iç sfinkter kapanır, çizgili dış sfinkter açılır. Perineal ve bulbokavernöz kasların kasılması ile ejakulat ritmik hareketler şeklinde dışarı atılır (21; 24).

2.2. Nöroendokrin Sistem

2.2.1. Hipotalamohipofiziyal sistemin ana hatları

Hipotalamus ve hipofiz bezi (pituitar bez), hipotalamohipofiziyal sistem olarak adlandırılan, birbiri ile bütünleşmiş nöroendokrin bir ağ oluştururlar.

Hipotalamohipofiziyal sistem iki ana kısımdan oluşur; 1- hipotalamik adenohipofiziyal sistem, hipotalamusu anterior hipofize bağlar, 2- hipotalamik nörohipofiziyal sistem, hipotalamusu posterior hipofize bağlanmaktadır.

Hipotalamus diyensefalon tabanında yer alır ve 3. Ventrikül duvarının da bir kısmını oluşturur, içerisinde bazıları hormon salgılayan, nukleus adı verilen nöron topluluklarına sahiptir. Nöroendokrin hücreler, kan-beyin bariyerinin arkasında yerleşmişlerdir ancak salgı ürünleri kan-beyin bariyerinin dışında salgılanmaktadır.

Hipotalamusun nöroendokrin hücreleri, peptid yapısında, tetikleyici(releasing) ve inhibitör hormonlar veya faktörler ile hipofiz bezi üzerinde pozitif veya negatif etkiler gösterirler; tetikleyici ve inhibitör hormonlar, aksonlar ile nörohipofize iletilen nörotransmitter maddelere göre, çok kısa bir süre cevap oluştururlar.

Nöroendokrin hücrelerin nörohipofiz içerisinde yer alan akson terminallerinde nörofizin adı verilen taşıyıcı proteinlere bağlı peptid hormonlar içeren bol miktarda depo salgı granülü bulunur. Nöral uyarıların kontrolünde, hormon ve taşıyıcı proteinlerin her ikisi de, eksositoz ile, hemen yakın çevredeki pencereli tip kapillerler içerisinde salgılanırlar.

Anterior hipofiz kan damarlarından zengindir. Hipotalamusun alt kısmında veya hipofiz sapında, pencereli tip kapiller pleksusa (primer pleksus adı verilir) sahiptir. Primer pleksus, portal venlerle, hipofiz bezi anterior lobunda bulunan sekonder pleksusa bağlanarak hipotalamohipofiziyal portal sirkülasyon oluşturulur.

Anterior hipofizdeki epitelyal hücreler tarafından salgılanan hormonlar, granüllerde depo edilirler ve taşıyıcı bir proteine sahip değildirler, endokrin uyarılar sonucu, sekonder kapiller pleksus içerisine, siklik, ritmik veya pulsatil(nabız şeklinde) olarak salgılanırlar.

Anterior hipofizin epitelyal hücrelerinden salgılanan hormonlar, uzun bir cevap oluşturma süresine sahiptir; bu süre, bir gün hatta bir ay kadar kalıcı olabilir.

Hipofiz

Hipofiz embriyolojik olarak iki farklı kökene sahip iki dokudan oluşmuştur: 1- adenohipofiz, epitelial bez kısmı 2- nörohipofiz, nöral kısım.

Adenohipofiz üç alt bölüm oluşmuştur: 1- Pars distalis veya anterior lob, bezin esas kısmıdır 2- Pars tuberalis nöral kısım olan infundibular sapı kısmen veya bütünüyle yaka tarzında sarmaktadır. Hep beraber hipofiz sapını oluştururlar.

Pars distalis histolojisi

Pars distalis üç elemandan oluşur: 1-epitelial hücre kordonları, 2-az miktardaki bağ dokusu stroması ve 3- pencere tip kapillerler.

Kordonlar şeklinde düzenlenen epitel hücreleri, hipotalamustan kan getiren pencere tip kapiller ile sarılmıştır. Salgılanan hormonlar kapiller ağ içerisine geçer, buradan da venöz sinüslara açılan hipofiziyal venlere boşalır.

Anterior hipofizde üç ayrı tipte endokrin hücre bulunur : asidofiller, bezin yan taraflarında yaygındır; bazofiller, bezin orta kısmında çoğunluktadırlar ve kromofoblar.

Asidofiller iki esas peptid hormon salgılamaktadır: büyüme hormonu ve prolaktin. Bazofiller glikoprotein hormonları salgırlar: gonadotropin folikül stimulan hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH), tiroid stimulan hormon (TSH) ve adrenokortikotropik hormon (ACTH). Kromofoblar hormon içeriklerini boşaltan ve bu nedenle tipik asidofil ve bazofil boyanma afinitesini kaybeden hücrelerdir.

Bazofiller tarafından salgılanan hormonlar: Gonadotropinler, TSH ve ACTH

Gonadotropinler (FSH ve LH) ve TSH ortak özelliklere sahiptir: 1) Glikoprotein yapıdadırlar ve 2) iki zincir içerirler. α zinciri, bir glikoproteindir ve FSH, LH ve TSH için ortaktır ancak β zinciri her bir hormon için özgündür. Bundan dolayı β zinciri her bir hormona ayrı bir özellik kazandırmaktadır.

Gonadotropinler: FSH ve LH

Gonadotropinler, FSH ve LH hormonlarının her ikisini de salgılamaktadırlar. Gonadotropinler, anterior hipofiz hücrelerinin yaklaşık %10'unu oluştururlar.

Gonadotropinlerin salgılanması, hipotalamusun arkuat ve preoptik alanlarında üretilen bir dekaeptid olan gonadotropin tetikleyici hormon (GnRH) tarafından stimüle edilir. GnRH, anterior hipofizdeki diğer hormonlar gibi nabız tarzında salgılanır. FSH ve LH'nin her ikisinin sentez ve salgılanması tek bir bazofil hücre tarafından yapılmaktadır.

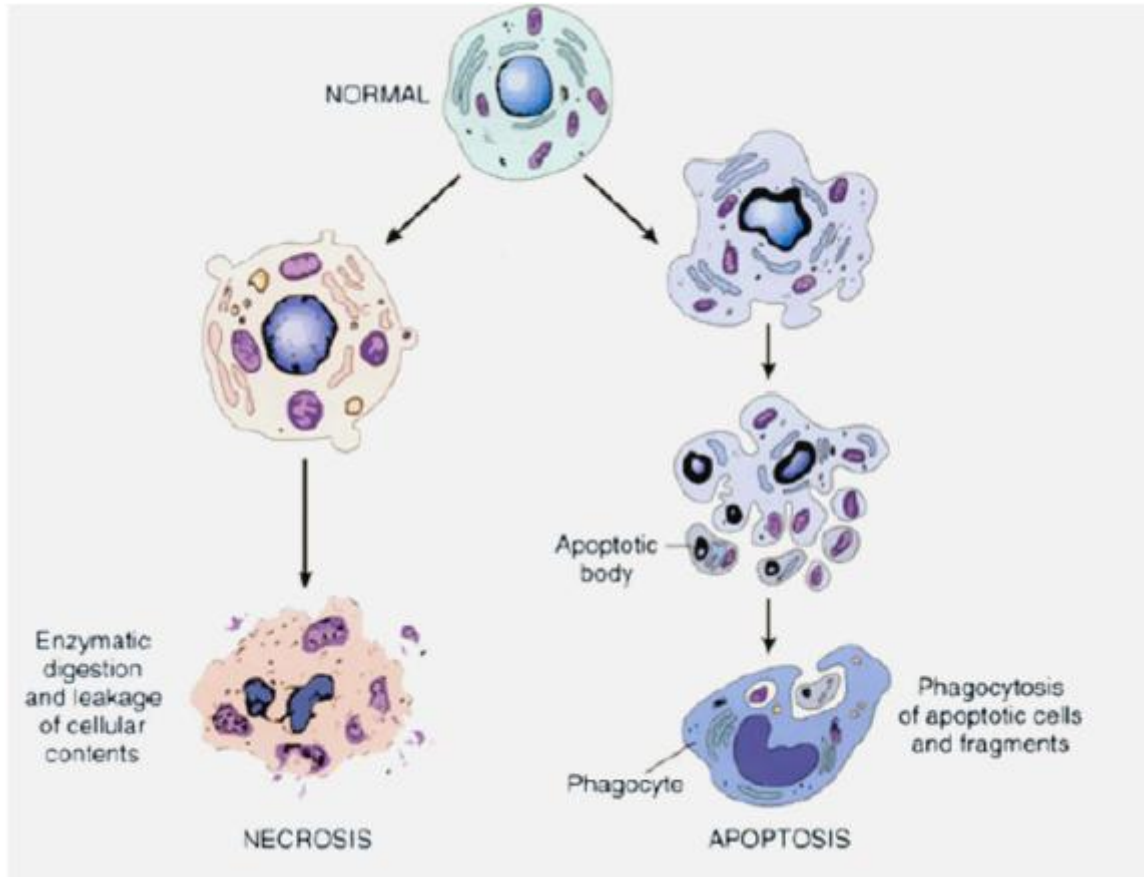
FSH dişilerde folikülogenezis adı verilen süreçte ovaryan foliküllerinin gelişimini stimüle eder, erkeklerde ise testiste yer alan Sertoli hücreleri üzerine etki ederek androjenlerden östrojenlerin aromatisasyonunu stimüle eder ve testosteronla bağlantılı olarak androjen bağlayıcı proteinin üretimini sağlar.

LH dişilerde korpus luteum ve ovaryan foliküllerde steroidogenezisi uyarırken, erkeklerde ise testiste yer alan Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron hormonunun sentezini kontrol etmektedir (31).

2.3. Apoptoz

2.3.1. Apoptoz'un Tanımı Ve Tarihçesi

Organizma yeni hücreler sentezlerken, var olan hücrelerin bir kısmını hücre ölümü ile ortadan kaldırarak kendi dengesini korumaktadır. Hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir: apoptoz ve nekroz. Apoptozda ve nekrozda düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucunda hücre ölümü gerçekleşir (41). Apoptoz programlı, aktif RNA ve protein sentezi ile gerçekleşen; enerji gerektiren bir ölümdür. Genetik ve biyokimyasal olaylar dizisidir (42), (43), (44).



Şekil 5: Apoptoz ve nekroz (48).

Hücrelerin normal gelişimleri sürecinde meydana gelen ölüm ilk olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terimi ilk olarak 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptoz terimi ise ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Yunanca bir kelime olan apoptoz; apo (ayrılan) ve ptosis (düşen) kelimelerinin birleşiminden oluşur ve “ağaçtan düşen yapraklar “ olarak tarif edilmiştir. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçaları gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu gözlemleyerek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır.

1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptoz endonükleazların aktive olarak merdiven basamağı denen karakteristik DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiş ve apoptozisin genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle olan bir ölüm olduğu ortaya konulmuştur (45).

Apoptotik hücre membranı sağlamdır ve üzerinde küçük cepçikler oluşur (46), (47).

Nekrotik hücre lizise uğrarken apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla çevrilidir, nukleus ve diğer organellerini ve parçalarını içerir. Apoptotik cisimcikler inflamasyona neden olmazken fagosititik hücreler tarafından sindirilirler (49).

2.3.2. Apoptozun Görüldüğü Olaylar

Apoptotik hücreler organizmanın bazı dokularında sürekli olarak oluşmaktadır ve bu yaşam boyunca devamlıdır. Böylece ölüm (apoptoz) ve yeniden yapım (mitoz) bu dokularda doku homeostazisini oluşturan dinamik bir denge halindedir. Günde yaklaşık bir milyon hücre apoptoza uğrarken yerine yeni hücrelerin yapımı devam etmektedir.

Apoptoz fizyolojik ve patolojik olaylar sonucunda gözlenir.

Fizyolojik Olaylar

- Embriyogenez ve metamorfozda (Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi içi boşluklu organların lümen oluşumu)
- Vertebraların nöron gelişimi sırasında (barsak kriptaları gibi sürekli proliferen olan hücre gruplarının hücre sayısının dengelenmesinde)
- Uterusta endometriumun dökülmesinde (menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin gerilemesi gibi olaylarda)
- T lenfositlerin kontrolünde (T lenfositlerde doğru antijen kazanımı sağlayamayan hücrelerin ortadan kaldırılması)
- Epidermisin en üst tabakası olan stratum korneumun sürekli dökülüp yenilenmesinde görülür.

Patolojik Olaylar

- Her türlü neoplazide (sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hipoksi gibi fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda)
- Hormon bağımlı dokuların patolojik atrofisinde, otoimmün hastalıklarda sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümünde

- Pankreasta ve böbrekte duktus tıkanması sonrası görülen patolojik atrofide apoptoz görülmektedir. (50), (51).

2.3.2.1. Morfolojik Değişiklikler

Yüzey Organellerinin Kaybı

Apoptotik hücre komşu hücrelerle bağlantısını koparır, yüzey farklılaşmaları (mikrovillüs gibi) yok olur ve hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (52), (53).

Kromatin Yoğunlaşması

Çekirdek apoptozda odak noktadır. Hücreden hücreye değişiklik göstermekle birlikte apoptozda çekirdek genellikle büzülür. Kromatin yoğunlaşır ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porlarını kaybeder, şekil olarak düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler, granülleri kaba hal alır ve dağılır (53), (54).

Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması

Hücre önce dışa doğru tomurcuklanır. Bu tomurcuklar sitoplazma parçacıkları içeren, sıkı paketli organeller içeren zarla sarılı apoptotik cisimciklere dönüşür (52), (53).

Tüm bu morfolojik değişimler gerçekleşirken açığa fosfatidilserin çıkar. Sağlıklı hücrelerinin plazma membranında bulunan fosfatidilserin, apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal oluşturur (55).

2.3.2.2. Biyokimyasal Değişiklikler

DNA Fragmantasyonu

Hedef proteinlerden olan DNA, endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirir. Çekirdek içine giren Ca^{+2} Mg^{+2} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırıklar oluşur ve merdiven basamağı adıyla karakterizedir.

Hücre İskeletinin Yıkılması

Kaspazlar aktini yıkan bir proteini aktifleştirerek hücrenin normal şeklini kaybetmesine neden olur (56).

Membran Değişiklikleri

Kaspazların etkisiyle yıkılan aktin proteinleri hücrenin şeklini bozar. Yine kaspazların etkisiyle hücre zarı asimetrisi bozulur, hücre membranının iç yüzündeki fosfatidilserin yer değiştirerek zarın dışına yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre zarlarında thrombospondin adlı adhezif bir glioprotein ve bazı hücrelerin adhezyon moleküllerini (ICAM 3) içerirler. Bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositoz edilmesini sağlarken, transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar membranların parçalanıp apoptotik cisimleri oluşturmalarını sağlar. Hücreler özelleşmiş yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler ve büzülürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı gözlenir (57).

Fagositoz

Apoptotik cisimler çevredeki parankima hücreleri ve fagositler tarafından fagosit edildik dokulardan uzaklaştırılır (57).

2.3.3. Apoptoz Mekanizması

Apoptoz ekstrensek yolla hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınmasıyla, genlerin DNA hasarına intrinsek yanıtıyla veya proteolitik enzimlerin doğrudan hücreye girişiyle (Perforin- Granzim) ile gelişebilir.

2.3.3.1. Ekstrensek / Reseptör Aracılı Yol

Hücre dışından kaynaklanan ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (APO-1 ve CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) uyarılması ile düzenlenen apoptozdur (50).

TNF- α , TNF ile ilişkili apoptozis uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları, bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar. Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarında kısmen korunmuş bir ölüm bölgesi (DD- Death Domain) bulunur. Bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerine bağlanarak apoptozu başlatır. TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgeleri TRADD, Fas ile ilişkili ölüm bölgelerine FADD denir. Bu ölüm bölgeleri ile prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskat şeklinde gelişen aktivasyonlarını başlatır (51).

2.3.3.2. İntrensek / Mitokondrial Yol

Apoptozun yaygın yolu olan intrensek yol hücrenin kendi içinden, sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlar. İç sinyallerle oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynar. Apoptozu başlatan yolların kavşak noktasının mitokondri olduğu görülmüştür. Dış zar geçirgenliğindeki artış sonucunda mitokondri zar potansiyelinin bozulması dış zarda hızla bir şişmeyle izlenir ve iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına neden olur. Temel olarak mitokondride solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF), SMAC ve ENDO G adlı DNaz enzim sitoplâzmaya salınır. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması geri dönüşümsüz bir noktadır. Sitokrom c'nin salınmasında en önemli faktör Bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin mitokondri üzerindeki etkileriyle hem sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması gerçekleşir hem de bu salınım baskılanır. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar. Apoptozom kaspaz 9'u aktive etmek üzere keser, kaspaz 9 diğer kaspazların proteolitik bir zincir halinde aktiveleşerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar (50), (58).

2.3.4. Apoptoz Regülatörleri

Apoptoz çok sayıda genler (c-myc), moleküller (seramid), iyonlar (kalsiyum), proteinler (p53) ve hatta organeller gibi mediatörlerle düzenlenir. Apoptozu düzenleyen genler cmc, p53 ve Bcl-2'dir ve ürettikleri proteinler aynı adı alır. P53, Bcl-2 ailesi, inhibitör apoptoz proteinleri (IAP), kaspazlar gibi protein aileleri apoptoz regülatörleridir (50), (59).

Bcl-2 Ailesi

Mitokondride dış zar potansiyelinin değişmesinden Bcl-2 ailesi adı verilen protein grubu sorumludur.

Antiapoptotik aile üyeleri olan Bcl-2, Bcl-XL yine aynı aileden Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 only adı verilen proapoptotik proteinler tarafından baskılanır. Proapoptotik üyeler normal Çartlarda inaktiftir bu nedenle mitokondrial zar geçirgenliği Bcl-2 ve Bcl-x sayesinde değişmeden kalır. Ancak çeşitli uyarılar (büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ın, kalsiyum artışı Bim'in, UV ışın Bmf'nin) proapoptotik grubun aktiveleşmesine yol açarlar, sonuçta Bcl-2, proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanır, Bcl-2 tarafından inaktif

durumda tutulan ve yine aynı aileden olan Bak ve Bax proteinleri etkinleşerek mitokondri dış zarında permeability transition porların oluşumuna, zar potansiyelinin değişimine yol açar. Bu da uygulamacı kaspazların aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanır. Kaspazlar inhibitör apoptoz proteinleri (İAP) denen bir grup protein tarafından baskılanır.

P53 Geni

p53, DNA gardiyanı da denen ve bu güne dek üzerinde en çok çalışılan tümör süpresör proteinlerden biridir. P53 sitoplâzmada bulunan ve DNA'nın ya da hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA da belli genlerin aktivasyonuna, böylece yapımlarının artmasına (Bax, Apaf-1, Fas) belli genlerin de baskılanmasına (Bcl-2, Bcl-X) yol açarak apoptozu tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA hasarı, hipoksi ya da onkogenlerin aktivasyonu, sürekli yapılan ama ubiquitinleyici bir protein (mdm2) tarafından belli bir hızda yıkılan p53 ün fosforillenmesine, fosforillenme ubiquitinlenmenin bozulmasına yol açar. Miktarı artan p53 çekirdeğe geçerek ilgili genlerin ifade edilmelerini değiştirerek hücreyi apoptoza sokar (60).

IAP Ailesi Proteinleri

IAP'lar; antiapoptotik etkilerinin direkt kaspazlara bağlanarak, kaspaz inhibisyonu ile gösteren proteinlerdir. Apoptozun negatif düzenleyicileridir. Kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler (61).

Kaspazlar

Kaspazlar sistein aspartatik asit proteazlar olarak bilinir ve birbirleriyle homolog büyük bir protein ailesidir. Kaspazlar proteolitik yarıklanmayla aktifleşen negatif granüller olarak üretilir. Bu güne dek yaklaşık 100 kaspaz substratı rapor edilmiştir.

İnsanda yapı ve fonksiyonlarına göre on bir değişik kaspaz tarif edilmiştir:

- Başlıca lenfokin yapımında bulunan Kaspazlar: Kaspaz-1 (ICE), -4, -5, -11,-12, -13, -14
- Sonuçlandırıcı (effektör) Kaspazlar: Kaspaz-3 (CPP32/Yama), -6,-7
- Başlatıcı (initiator) Kaspazlar: Kaspaz-2, -8 (FLICE/MACH),-9,-10 (62), (63).

Ölüm reseptörleri hücre zarı içine tutunmuş, bir ucu hücre dışına, bir ucu hücre içine bakan, hücre içi tarafında prokaspaz 8'in aktiflenmesini sağlayan bir ölüm bölgesi (death

domain) bulunan reseptörlerdir. Hücre zarında bulunan kendileri için özgün reseptörlere bağlanan ligandlar reseptörün trimerik (üç bileşenden oluşan) bir yapıya dönüşmesine yol açarlar ve hücre içinde adaptör moleküller adı verilen bir dizi molekülle etkileşerek prokaspaz 8'i iki farklı büyüklükte parçaya böler. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz 8, inaktif durumdaki proenzimler olan kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7'nin bir zincir biçiminde aktiflenmesine yol açar. Aktiflenen tüm kaspazlar hücre makromoleküllerini parçalayarak tipik apoptoz morfolojisinin oluşumuna yol açarlar. Aktif kaspaz 8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid'in de proteolitik olarak aktifleşmesine yol açar. Bid, mitokondriden sitokrom c, bazı başka proteinlerin (SMAC) ve kalsiyumun serbestlemesine yol açar. Böylece ölüm reseptörleri yolu mitokondriyal yolu da aktiflemiş olur. Hücreye sitotoksik T reseptörleri yoluyla ulaşan Fas ligandı, ya da TNF alfa, hücre yüzeyinde bulunan kendine özgü reseptörlerine bağlanarak apoptozu uyarabilir. Fas reseptörünün ligandı aktiflenmiş T lenfositlerde ayrıca dalak, testis, karaciğer ve böbrek hücrelerinin yüzeyinde ifade edilir. Çeşitli virüslerle enfekte hücrelerde ya da p53 ün aktiflenmesi sonucu Fas reseptörünün ifadesi, o hücrenin sitotoksik T lenfositler tarafından öldürülmesini sağlar. FAS ve TNF alfa dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de hücre içinde benzer yollarla ölümü yaratabilir. TRAIL reseptörlerinin FAS reseptöründen farklı olarak karaciğer, nöronlar, miyositler, kolon, bronş epitel, Leydig hücreleri gibi dokularda yapısal biçimde ifade edildiği ve TRAIL'in de bu dokularda bulunduğu gösterilmiştir. Hücre dışından gelen sinyallerin hücre içinde apoptotik makinayı çalıştırmasına aracılık eden yollardan biri de sfingolipid yoludur. Sfingomiyelin, hücre zarının yapıtaşlarından biridir. Radyasyon ve kemoterapinin yanı sıra ölüm reseptörleri aracılığıyla da aktiflenebilen bir enzim olan sfingomiyelinaz tarafından seramid'e dönüştürülür. Seramid, ayrıca serin palmitol transferaz tarafından da sentezlenebilir. Seramidaz enzimiyle seramiden oluşturulan sfingozin, Bid yapımını değişik yollarla artırarak mitokondriyal yol üzerinden apoptozu tetikler (60).

Kaspazlar için substrat olan poly ADP-Riboz polimeraz DNA zincir kırıklarına bağlanıp nuklear proteinleri modifiye etme görevini üstlenir. PARP molekülünün DNA'yı onarması kaspaz-3 ile parçalanmasını takiben önlenir (60).

2.3.5. Spermatogeneziste Apoptozun Rolü

Doku canlılığında ve devamında enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptoz, testiküler dokuda da sık saptanan bir fenomendir. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar (32,33). Apoptoz, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar (34). Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir (35). Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptoz gerçekleştiği bildirilmiştir (36). Testiste defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin %75'i apoptoza maruz kalır (32). Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (33,34). Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir (37,38). Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozunun hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (39,40). Hipofizektomize immature ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde yaygın apoptoz ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da hCG tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir.

2.4. Anabolik Androjenik Steroidler (AAS)

Anabolik androjenik steroidler kısaca anabolik ajanlar sınıfına ait olan doping maddeleridir. Anabolik ajanlar sınıfı içerisine Beta-2 Agonistler, İdrar Söktürücüler (Diüretikler), Peptid Hormon Ve Analogları, Anti-Östrojenik Aktivite Gösteren Maddeler ve Siliciler de dahildir. (25).

Kelime anlamı itibariyle "yapıcı", "inşaa edici" hormon anlamına gelen anabolik steroidler, doğal erkeklik hormonu olan testosteronun kimyasal modifikasyonu sonucu sentez edilmiş maddelerdir. Hem anabolik, hem de androjenik etkileri vardır. Bu nedenle sporcular tarafından en çok kullanılan doping maddelerindendir. Vücut kas kitlesini artırıcı özelliklerinden dolayı, en fazla vücut geliştiriciler, halterciler ve diğer kas gücünün ön plana çıktığı (kuvvet ve sürat sporları) spor dallarında kullanılırlar. Gerek testosteron, gerekse sentetik androjenik-anabolik steroidler vücutta enzim sistemlerini etkileme, primer cinsiyet karakterleri olan cinsiyet organların büyümesini uyarma (testislerde, peniste, skrotumda gelişme, sperm yapımını uyarma), sekonder cinsiyet karakterleri olan ses tellerinin kalınlaşması, vücut kıllanmasında artış, kas kitlesinde artış, deri yağ bezlerinden salgı artışı, boy uzaması, protein yapımını artırma ve protein yıkımını azaltma, cinsel istek ve saldırganlıkta artış, kan yapımında artış gibi etkilerde bulunur. Anabolik steroid kullanan sporcularda sportif performansta yarar yerine zarara neden olabilmektedir. Kas kitlesini artırıcı etkileri normal tedavi dozlarının çok üzerindeki dozlarla mümkündür. Doğal ya da sentetik tüm anabolik steroidlerin sporcular tarafından kullanımı yasaklanmıştır (26).

Anabolik - androjenik steroidler hemen hemen vücuttaki tüm organlarda yan etkiler oluşturabilir. Ödem, kalbin iş yükünde, kan basıncında, kolesterol düzeyinde, kalp damar hastalıkları riskinde, kalp krizi riskinde ve yağ bezleri salgısında artış, kas krampları, tendon zedelenmeleri ya da kopmaları, karaciğer fonksiyon bozuklukları, kan glukoz seviyesinde artış, tümör oluşumu riski, tümör büyümesini uyarma, böbrek fonksiyon bozuklukları, kan pıhtılaşma faktörlerinde bozukluk, tiroid fonksiyonları bozukluğu ve psikolojik bozukluklar gibi yan etkileri vardır (27).

Anabolik steroidlerin puberte öncesi kullanılması kıkırdakların erken kemikleşmesine ve boy kısalığına neden olur. Anabolik steroidler erkeklerde; Saç dökülmesi, meme dokusunda büyüme, Hipofizde LH ve FSH salınımını baskı altında tutarak, testis dokusunda küçülme, doğal erkeklik hormonlarının üretiminin azalmasına dolayısıyla, sperm üretiminde azalma, kısırılık, cinsel istekte azalma, prostat büyümesi ve prostat kanseri riskinde artış gibi

yan etkilere neden olurlar. Bayanlarda; erkek tipi kıllanma, saç dökülmesi, meme dokusunda küçülme, ses kalınlaşması, cinsel isteğin aşırı artması, klitoris büyümesi, adet düzensizliği veya adetinin tamamen durması gibi yan etkileri vardır (28).

Androstendiol, androstendion, dehidroepiandrosteron (DHEA), dihidrotestosteron, testosteron, fluoksimesteron, klostebol, metandienon, metenolon, nandrolon, 19 norandrostendiol, 19-norandrostendion, oksandrolon, stanozolol ve benzer bileşikler bu grupta yer almaktadır (29).

İdrar analizlerinde Testesteron (T)/Epitesteron (E) oranı önemlidir. Testosteron salınımı gün boyunca vücutta farklılıklar gösterir. Dışarıdan alınan testosteronun belirlenebilmesi için vücuttaki miktarı değişmeyen epitesteron ile oranı dikkate alınır. Bu oranın 6'nın üzerinde olması doping olarak kabul edilmektedir (düşük epitesteron endojen üretimi, androjen üreten tümör, enzim eksikliği gibi fizyolojik ve patolojik koşullar ispat edilmediği sürece, sporcunun idrarında T/E oranının 6'dan büyük bulunması doping sayılır). T/E' nin 6'dan büyük bulunduğu durumlarda, ilgili tıbbi kurulların, sonucun pozitif olarak ilan edilmesinden önce bir araştırma yapması zorunludur (Ketakanazol testi uygulanır. Ketakanazol antifungal olmasına rağmen doğal testosteronun salınımını inhibe ettiğinden vücuttan atılan sadece eksojen testosterondur. Teste rağmen oran yine 6'dan yüksekse, testosteron dışarıdan alınmıştır (30).

2.5. Antioksidanlar

Serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerini ortadan kaldırmak için antioksidanlar adı verilen çeşitli savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki hassas denge korunmadığında hücre hasarı ve ölümüyle sonuçlanan pek çok patolojik durum gözlenir (67,64). Yüksek oksijen tüketimine sahip karaciğer, beyin, böbrek gibi organlar yüksek antioksidan enzim aktivitesine sahiptir (68). Serbest radikaller ve reaksiyon ürünleri biyomoleküller, fagositler ve myofibroblastların aktivitelerini artırır. Membran yapısındaki lipitleri peroksidasyona karşı korudukları için lipit peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Antioksidanlar lipid peroksidasyonunu engellemeleri yanında protein, nükleik asitler ve karbonhidratların korunmasını sağlarlar (68,64). Lipid peroksidasyonu ve lipid peroksidasyon ürünleri ile oluşturulan fibrozun, bazı hayvan modellerinde antioksidanların kullanımı ile azaldığı gösterilmiştir (65). Satelit hücrelerin aktivasyonlarının antioksidan etkisiyle bloke edildiği gösterilmiştir. Hücre kültürü ortamında, sıçan stellat ve kupffer hücreleri fonksiyonlarına antioksidanların etkileri

araştırılmış ve bu iki hücrenin düzenleyici fonksiyonları aynı zamanda karaciğer hasarından da sorumlu tutulmaktadır (66).

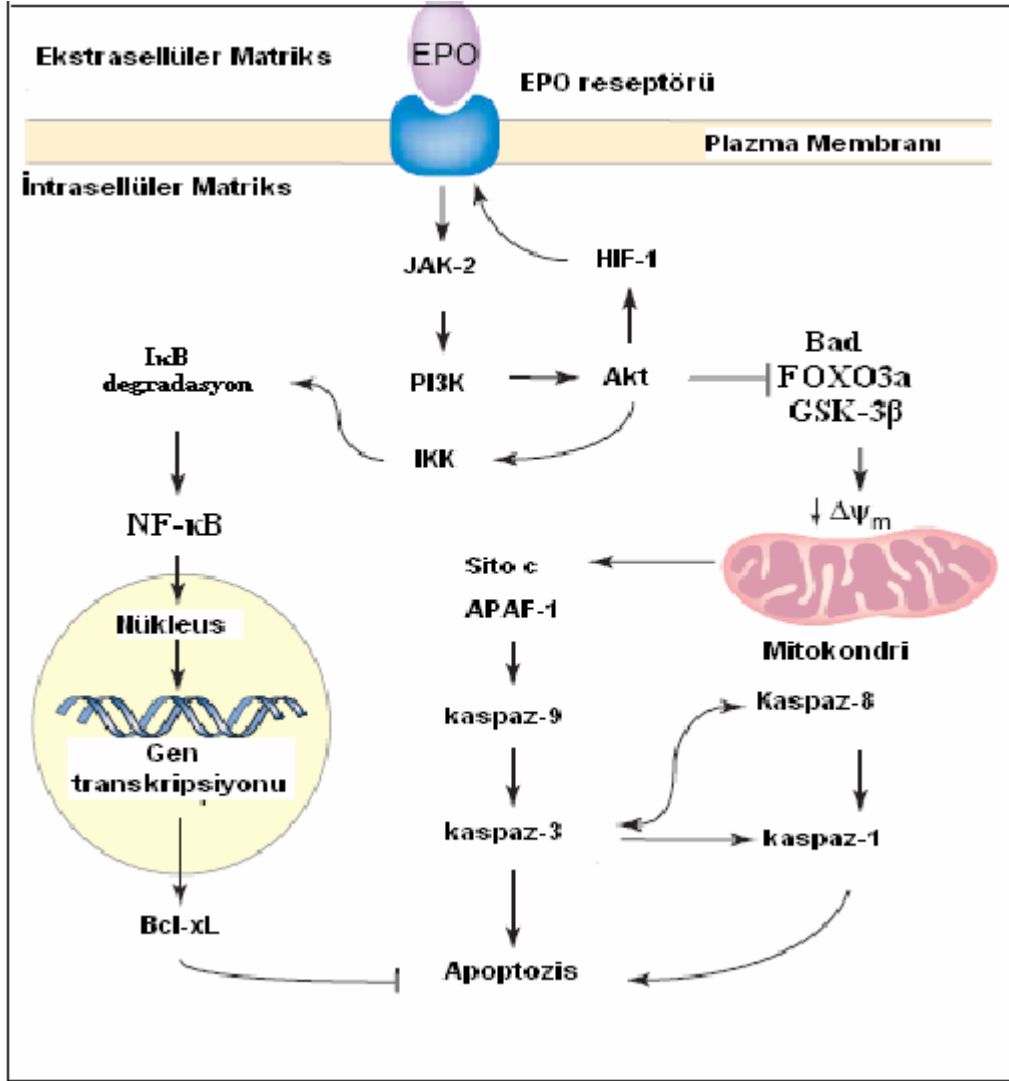
2.6. Eritropoietin

İlk kez 1906 yılında Carnot ve Deflandre (69) arteriyel hipoksinin bir hümoral faktörle kırmızı hücre üretimini arttırdığını bildirmişler ve adını hematopoietin olarak belirlemişlerdir. 1952 yılında, Stohlman ve arkadaşları (70) vücudun siyanotik alanlarındaki kemik iliğinden yapılan örneklemelerinde, normal bölgelerle karşılaştırıldığında eritroid hiperplazi gözlemlemişlerdir. 1953 yılında da bu hormonun ismi eritropoietin (EPO) olarak değıştirilmiştir. 1957 yılında EPO üretiminin böbreklerde olduğu, bilateral nefrektomili deney hayvanlarında anemi gelişmesiyle saptanmıştır. Fetal eritropoezisinde EPO aracılığıyla düzenlendiğı ilk olarak 1963 yılında tanımlanmıştır. 1977 yılında saf EPO insan idrarından izole edilerek aminoasit yapısı kısmen tespit edilmiş, 1985 yılında da EPO geninin izolasyonu ve klonlanması gerçekleşmiştir (rhEPO). En son 2005 yılında Fisher tarafından yapısı incelenmiştir (70,71).

EPO, esas olarak erişkin böbreklerindeki interstisiel fibroblastlarda fetusta ise hepatositlerde üretilen bir glikoproteindir. Yapısı ısıya dayanıklı alfa globulindir. Yedinci kromozomda bulunan tek kopya gen olan insan EPO geni beş ekzon ve dört introndan oluşmaktadır. Son ürünü yaklaşık 30 kDal molekül ağırlığında, 165 aminoasitli bir peptiddir ve yaklaşık % 40'lık bölümü karbonhidrattan meydana gelmektedir. Dört tane glikolize olmuş zincire sahiptir, bunlardan 3 tanesi N-bağlı, bir tanesi de O-bağlı asidik oligosakkarit yan zincirlerdir. Glikolize bu zincirler EPO' nun biyolojik aktivitesi açısından önemlidir ve EPO'nun protein yapısını oksijen radikallerinden korumaktadır. Ayrıca, N ve O bağlı zincirler olgun EPO  retilimi ve salgılanması için gereklidir. EPO'nun biyolojik aktivitesi, pozisyon 7 ve 160 ile pozisyon 29 ve 33'de bulunan sistein bağları arasında kurulan iki disülfid bağına bağlıdır. EPO Neuraminidaz tarafından da yıkılmaktadır ve sağlıklı insanlarda ortalama serum değeri 8.1 mIU/ml (3.7-15.2) olarak ölçülmektedir (71,73,74).

Temel işlevini gerçekleştirmek için EPO hücrelerdeki bir yüzey reseptörüne (EPO reseptör) bağlanır ve reseptöre EPO' nun bağlanması ile reseptör homodimerize olarak aktifleşir. EPO-R ile ilişkili Janus tirozin kinaz -2 (JAK-2) otofosforile olur. JAK-2, protein kinaz B (Akt) ve diğer alt basamaklarını aktive etmektedir. Bu alt basamaklar, FOXO3a, GSK-3  (glikojen sentetaz kinaz), Bad, PI3K (Fosfoinozitol 3-fosfat), Bcl-xL, NF- B (Nükleer faktör  B), APAF-1 (Apopitotik proteazı aktive eden faktör-1), mitokondrial

membran geçirgenliği ve kaspazlardır. Sonuçta hedef dokudaki EPO-R uyarımının net etkisi; proliferasyon, apoptozun inhibisyonu ve hücrelerin farklılaşmasıdır (74).

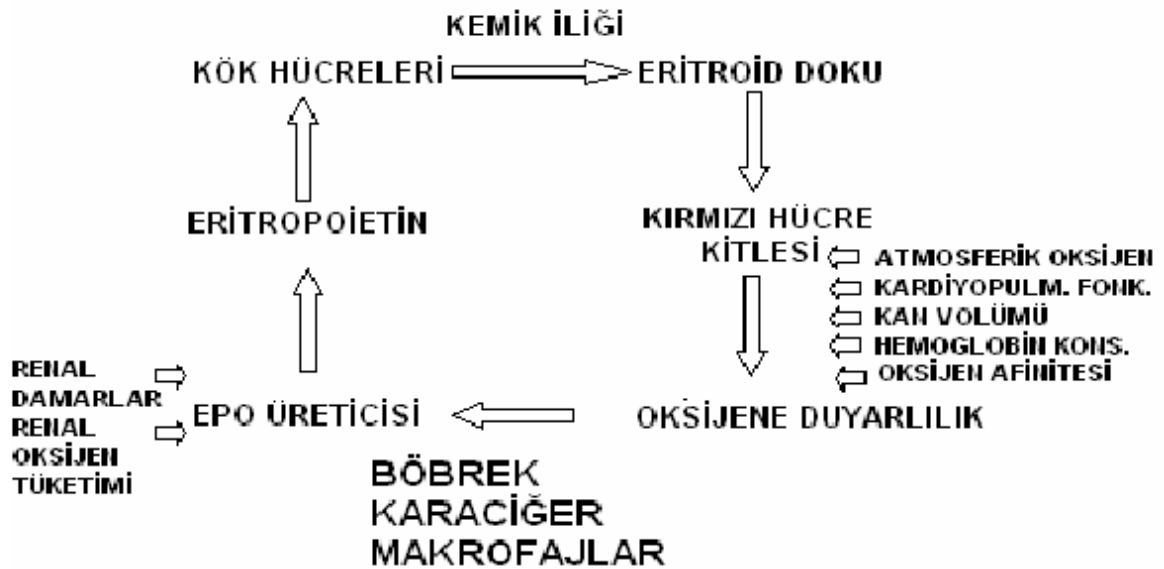


Şekil 6: EPO ve EPO reseptörünün hücresel mekanizması (74).

EPO reseptörü aracılığıyla, apoptozu sağlayan bad, bcl, kaspazlar gibi moleküllerin aktivitesini azaltarak ve Bcl-2, NF-κB gibi antiapoptotik moleküllerin aktivitesini arttırarak apoptozu önlemeye çalışır (74) (Şekil 6).

Oksijen taşıma kapasitesi veya oksijen saturasyonunda azalma, doku hipoksisine neden olmakta ve EPO gen ekspresyonu meydana gelmektedir. Kandaki EPO konsantrasyonunun artması, kemik iligindeki eritropoezi uyarır ve sonunda oksijen temininde artış meydana gelir. Oksijen düzeyindeki artışın sonucunda, negatif bir etki ile aktif olan EPO geninin aktivasyonu azalmaktadır. EPO oksijen bağımlı yolla düzenlenen genlere önemli bir örnek olmaktadır.

Çevre dokularda oksijen gereksinimine göre eritrosit üretimini dengede tutan feedback mekanizma Şekil 7’de açıklanmaktadır (72,73).



Şekil 7: Eritropoietin ile oksijen ve eritrosit üretimi arasındaki ilişkinin mekanizması (73).

Derin anemi ve hipokside EPO'nun plazma düzeyi, normalin 10000 katına kadar yükselebilir. Düzeyinin azalmasının en önemli nedeni kronik böbrek yetmezliğidir. Ayrıca kemik iliginin toksinlerle inhibisyonu, kanama, eritrosit ömrünün kısalması ve malnütrisyon da EPO düzeyinin azaldığı görülmektedir. Adrenerjik agonistler, IGF-1, tiroid hormonları, androjenler henüz tam açıklanamamış mekanizmalarla EPO salınımını artırırlar. Hipokside ve bazı tümörlerde (böbrek tümörü, karaciğer tümörü, serebellar hemanjioblastom) de arttığı gözlemlenmiştir (73).

İnsan fetal plazma EPO düzeyleri doğumda kordosentez ile alınan umbilikal kord kanında ve amniotik sıvıda ölçülebilir. Eritropoietin, insan fetusunda 19.gebelik haftasından itibaren saptanmaktadır. Bazı araştırmacılar 18-37. gebelik haftaları arasındaki sağlıklı fetuslardan kordosentez ile EPO düzeylerini ölçmüşler ve değerlerin gebelik boyunca düşük düzeylerde olduğunu tesbit etmişlerdir. Ancak zıt olarak bazı araştırmacılar 19. haftadan itibaren doğuma kadar düzeylerin, 2-4 katına kadar arttığını bulmuşlardır. Son çalışmalarda EPO'nun transplasental geçişinin olmadığı ve gebelik boyunca, fetal gelişim sırasında majör

olarak böbrek dışı organlarda üretilmekte olduğu tespit edilmiştir. Hepatik yoğunluklu olan EPO üretimi, doğum sonrası dönemde hemen azalmaktadır (75,76,77).

Umbilikal kordonda saptanan EPO düzeylerinin fetusun doğum eylemi esnasında, oksijenasyonunu yansıttığı tesbit edilmiştir (77).

İnsan eritropoietini ilk defa 1985’de Lin ve arkadaşları (79) tarafından klonlanmış ve üretilmiştir. Kullanım için FDA (Food and Drug Administration) tarafından konulan ilk endikasyon, son dönem böbrek yetmezliği hastalarında transfüzyon ihtiyacını azaltmak için verilmiştir. FDA’nin önerdiği mevcut endikasyonlar ise ;

1-Kronik böbrek yetmezliğine bağlı anemi,

2-AIDS hastalarındaki zidovudin kullanımına bağlı gelişen anemi,

3-Non-myeloid lösemili hastalarda kemoterapiye bağlı gelişen anemi,

4-Kan transfüzyonu ihtiyacını azaltmak için kardiyak nedenler dışında elektif cerrahiye alınan ve perioperatif ciddi kan kaybı beklenen hastaların tedavisinde kullanılmasıdır (78).

Eritropoietin bu sayılan klinik durumların dışında kanserle veya kemoterapi ile ilişkili anemide, kemik iliği transplantasyonunda, kronik hastalık anemisi, orak hücre anemisi gibi durumlarda da kullanım alanı bulmuştur (78).

EPO aneminin düzeltilmesinde etkili ve iyi tolere edilebilir bir ilaç olsada bazı yan etkilere neden olmaktadır. Klinik olarak anlamlı en yaygın yan etki hipertansiyondur. Özellikle son dönem böbrek hastalarında hipertansif ensefalopati, epileptik nöbetler ve tromboembolik hadiseler nadirde olsa bildirilmiştir (78). Olumlu birçok etkilerinden dolayı yeni kullanım alanları açısından çalışmalar devam etmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Biriminden (DETFAB) temin edilen Wistar suşu toplam 35 erkek sıçan (170-200g) 19/2011 protokol no'lu etik kurul onayı alınarak kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçilmiştir. Tüm denekler çalışma sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Denekler dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile ad-libitum beslendi.

Beş çalışma grubu oluşturuldu. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlendi:

I. grup: Kontrol grubu: Normal ad-libitum beslenen grup (n=7)

II. grup: Sham grubu: Yer fıstığı yağı ve serum fizyolojik verilen grup (n=7). Yer fıstığı yağı intramuskular enjeksiyonla 8 hafta boyunca haftada 1 kez uygulanmıştır. Serum fizyolojik ise 8 hafta boyunca hergün intraperitoneal enjeksiyon yardımı ile uygulanmıştır.

III. grup: 10 mg/kg/hafta Nandrolone decanoate (ND) verilen deney grubu (n=7). ND 8 hafta boyunca haftada 1 kez intramuskular enjeksiyonla uygulanmıştır. 4 ml. ND ; 6 ml. yer fıstığı yağı içerisinde çözündürülerek kullanılmıştır.

IV. grup: 10mg/kg/hafta ND ve Düşük doz (100 IU/kg) Eritropoietin (EPO) verilen deney grubu (n=7). 100 IU/kg EPO 8 hafta boyunca hergün serum fizyolojik içerisinde çözündürülerek intraperitoneal enjeksiyon yardımıyla uygulanmıştır.

V. grup: 10mg/kg/hafta ND ve Yüksek doz (500 IU/kg) EPO verilen deney grubu (n=7). 500 IU/kg EPO 8 hafta boyunca hergün serum fizyolojik içerisinde çözündürülerek intraperitoneal enjeksiyon yardımıyla uygulanmıştır.

Nandrolone Decanoate (ND) (25mg/ml) , İran hormon şirketi (Tahran,İran)'dan elde edilmiştir. Nandrolone Deecanoate uygulaması yaklaşık 8 hafta süre ile yer fıstığı yağı içinde çözündürülerek intramuskular enjeksiyon yöntemiyle verildi. Eritropoietin (EPO) Neurocormon, Roche 2000 IU/kg elde edildi. EPO serum fizyolojik içinde çözündürülerek yüksek ve düşük dozlar elde edildi. EPO uygulaması yine 8 hafta süre ile hergün intraperitoneal enjeksiyon yöntemi ile verildi.

Bu süre içinde herhangi bir nedenle deneye devam edemeyen ya da deney bitmeden yaşamı sonlanan denekler, grup sayıları korunarak deney ve istatistik kapsamından çıkarıldı. Deney sonunda eter anestezisi uygulanarak hayvanlar sakrifiye edildi. Sakrifiye işleminden sonra testis dokusu çıkarıldı. Dokuların bir kısmı biyokimyasal analiz için ayrıldı. Histolojik incelemeler için alınan dokular %10'luk tamponlanmış formaldehit içinde fiksede edildi. Elektron mikroskobu içinse 1mm³'lük dokular Karnovsky fiksatifine alındı.

Sakrifikasyondan sonra hayvanlar ve ortaya çıkan atıklar, tıbbi atık torbalarına alınarak deney hayvanları multidisiplin laboratuvarı tarafından hastanenin imha bölümüne gönderilerek kurallara uygun koşullarda yok edildi.

3.1 Araştırmanın Tipi

Araştırma deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın deneysel ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Araştırmanın histoloji ve immünohistokimyasal değerlendirmeleri ise Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'nda gerçekleştirilmiştir. Araştırma 29 Eylül 2011 tarihinde başlamış ve 18 Mayıs 2012 tarihinde sonlanmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

I. grup: Kontrol grubu: Normal ad-libitum beslenen grup (n=7)

II. grup: Sham grubu: Yer fıstığı yağı ve serum fizyolojik verilen grup (n=7). Yer fıstığı yağı intramuskular enjeksiyonla 8 hafta boyunca haftada 1 kez uygulanmıştır. Serum fizyolojik ise 8 hafta boyunca hergün intraperitoneal enjeksiyon yardımı ile uygulanmıştır.

III. grup: 10 mg/kg/hafta Nandrolone decanoate (ND) verilen deney grubu (n=7). ND 8 hafta boyunca haftada 1 kez intramuskular enjeksiyonla uygulanmıştır. 4 ml. ND ; 6 ml. yer fıstığı yağı içerisinde çözündürülerek kullanılmıştır.

IV. grup: 10mg/kg/hafta ND ve Düşük doz (100 IU/kg) Eritropoietin (EPO) verilen deney grubu (n=7). 100 IU/kg EPO 8 hafta boyunca hergün serum fizyolojik içerisinde çözündürülerek intraperitoneal enjeksiyon yardımıyla uygulanmıştır.

V. grup: 10mg/kg/hafta ND ve Yüksek doz (500 IU/kg) EPO verilen deney grubu (n=7). 500 IU/kg EPO 8 hafta boyunca hergün serum fizyolojik içerisinde çözündürülerek intraperitoneal enjeksiyon yardımıyla uygulanmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada Wistar suşu toplam 35 erkek sıçan (170-200g) kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçilmiştir. Tüm denekler çalışma sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Denekler dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile ad-libitum beslendi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Diğer deney grupları ise Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5' dir. Grup 3 , Grup 4 ve Grup 5'e aynı doz ND intramuskular enjeksiyon yardımıyla uygulanmıştır. Grup 4 ve Grup 5'e serum fizyolojik içerisinde çözündürülmüş EPO intraperitoneal enjeksiyon yardımıyla uygulanmıştır. Grup 2 serum fizyolojik ve yer fıstığı yağı uygulanmıştır. Grup 3 ise sadece ND' ye maruz kalmıştır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada deneklerin ağırlıklarını ölçmek için hassas terazi; deneklerden elde edilen dokuların doku takibinde etüv, incelenmesinde kesit almak için mikrotom, boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için nemli chamber ve otomatik mikropipetler kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Araştırmada öncelikle kontrol ve sham grupları dışındaki gruplara ND uygulanmıştır.

Deney sonunda elde edilen doku örnekleri rutin doku takip prosedürüne maruz kalmış, histolojik inceleme için takibi yapılan dokuların ince kesitleri alınmış ve çeşitli histolojik ve immünohistokimyasal boyamalara tabi tutulmuştur.

Araştırmada histolojik değişiklikler Mayer's Hematoksilen&Eozin, PAS boyası, immünohistokimyasal olarak apoptozun gösterilmesi aktif kaspaz 3 ve DNA fragmentasyonunun gösterilmesi TUNEL ile yapılmıştır.

Modelin Oluşturulması

Nandrolone decanoate hazırlanışı

Ticari olarak 1 ml'lik ampuller satın alınmıştır. Her ampul 25 mg/ml Nandrolone decanoate içermektedir. Kg başına 10 mg olarak uygulayabilmek için 4 ml. Nandrolone decanoate ticari ampülü 6 ml. yer fıstığı yağı içinde çözündürülmüştür. İntramuscular olarak uygulanmıştır.

EPO'nun hazırlanışı

ROCHE neurocormonun 2000 IU/kg 6 adet hazır şırınga şeklinde satın alınan EPO düşük doz için 21 µl alınıp 7 ml. serum fizyolojik içinde çözündürülmüştür. 100 IU/kg olarak intraperitoneal uygulanmıştır. Yüksek doz içinse 105 µl alınıp 7 ml. serum fizyolojik içinde çözündürülmüştür. 500 IU/kg olarak intraperitoneal uygulanmıştır.

Doku Örneklerinin Hazırlanması

Deney süresi biten sıçanların ağırlıkları sakrifiye edilmeden önce hassas terazi ile tartıldı. Eter anestezisi altında sakrifiye edilen sıçanların sol testisleri çıkarıldı, ikiye bölünerek yarısı elektron mikroskopik takip için Karnovsky fiksatifine alındı, diğer yarısı biyokimyasal analizler için alınarak homojenatları hazırlanıp -80'e kaldırıldı. Daha sonra sağ testis dokuları rutin doku takibi için %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonuna alındı. İki gün %10'luk tamponlu formaldehitte bekleyen testis dokuları rutin histolojik doku takibi prosedürüne göre takip edildi.

3.6.2.1. Işık Mikroskopik İncelemeler

Alınan testisler %10'luk formaldehit solüsyonunda 24–48 saat fikse edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'şar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 1). Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ'luk parafin kesitler alındı.

Tablo 1: Doku takip protokolü.

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

3.6.2.1.1.Hematoksilen-Eozin Boyaması

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dakika 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 5 değişim absolü alkol %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 2).

Tablo 2: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (Oda ısısında)	10 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (Oda ısısında)	10 Dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	10 Dakika
Boyama	Eozin	2 Dakika
Yıkama	%70-80-96-100-100'lük Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.1.2. Peryodik Asit Schiff Boyaması (PAS)

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absölü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 3-5 dakika peryodik asit ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 1-2 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 20-23 dakika schiff boyası ile boyandı. Boyamadan sonra 5 dk akarsuda tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absölü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. (Tablo 3).

Tablo 3: Peryodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	1 Saat
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (Oda Isısında)	30 Dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	10 Dakika
Boyama	Peryodik Asit	3-5 Dakika
Yıkama	Akarsu	1 Dakika
Boyama	Schiff	20-23 Dakika
Yıkama	Akarsu	1-2 Dakika
Boyama	Hematoksilen	1-2 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Dehidratasyon	%60-70-80-96-100'lük Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.2. Morfometrik Değerlendirmeler

3.6.2.2.1. Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması

Deney gruplarındaki her bir hayvan için ayrı ayrı 20 adet tübül değerlendirilerek her bir tübüle Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar için One Way ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p>0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

Tablo 4: Johnson testiküler biyopsi skorlaması (80).

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

3.6.2.2.2. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

PAS ile boyanan kesitlerden deney gruplarındaki her bir hayvan için ayrı ayrı 20 adet tübül değerlendirilerek 100x'lik büyütmeyle her bir tübülde Image Tool (UTHSCA Image Tool Version 3,0 USA) görüntü analiz programı kullanılarak ölçüm yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar için One Way ANOVA testi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p>0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

3.6.2.3. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için DNA fragmentasyonu immünojenik yöntemlerle gösterildi. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırıklar oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'-OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığı ile biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili veya hematoksilin ile ters boyama yapılarak işlem sonlandırılır.

3.6.2.3.1. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling (TUNEL) Boyaması

DNA fragmentasyonu ROCHE Apoptag kiti kullanılarak gösterildi. Alınan kesitler öncelikle 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra da rutin ışık mikroskopik deparafinizasyon sürecinden geçirildi. Şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak 5'er dakika iki değişim distile suda bekletildi. Distile su aşamasına getirilen kesitler öncelikle nemli çembere yerleştirilmiş ve fosfat tamponlu solüsyon (PBS) ile beş dakika muamele edildi. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizilerek alan kısıtlandı. Kurutma kağıdı ile üzerindeki PBS emdirilen dokulara Proteinaz K solüsyonu ile 15 dakika oda ısısında muamele edildi. Daha sonra dokular 2 kez PBS ile yıkandı. Taze hazırlanmış %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) ile 5 dakika oda ısısında bekletilen dokuda endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi ve tekrar PBS ile 2 defa yıkandı. Kesitlerdeki su kurutma kağıdı ile emdirildi ve dokular kitin içerisinde mevcut kullanıma hazır bulunan dengeleme solüsyonu

(Equilibration buffer) ile 10 dakika muamele edildi. Doku üzerindeki fazla sıvı kurutma kağıdı ile emdirildi ve kit içerisinde reaksiyon solüsyonu ve TdT enzim solüsyonu şeklinde ayrı ayrı bulunup kullanımdan önce ikisinin karıştırılmasıyla taze bir şekilde hazırlanan TdT enzim karışımı (%70 reaksiyon solüsyonu + %30 TdT enzim solüsyonu) ile muamele edilen kesitler 37 °C'de 1 saat nemli çemberde inkübe edildi. Etüvden çıkarılan kesitler 1 ml Reaksiyonu durdurma ve yıkama solüsyonunun 34 ml distile su içerisinde dilüe edilmesiyle hazırlanan solüsyonla 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Bu işlemin ardından 3 kez PBS ile yıkama yapıldı. Kesitler Anti-Digoxigenin solüsyonu ile otuz dakika oda ısısında inkübe edildi. PBS ile 2 kez yıkama yapıldıktan sonra reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) kromojeniyle muamele edilen kesitler distile su ile iyice çalkalandı. Mayer's hematoksilen ile art alan boyaması yapıldı ve 3 değişim ksilol ile şeffaflaştırılan kesitler entellan ile kapatıldıktan sonra mikroskopta görüntülendi.

3.6.2.3.2. Active Caspase-3

Alınan kesitler öncelikle 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra da rutin ışık mikroskopik deparafinizasyon sürecinden geçirildi. Şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak 5'er dakika iki değişim distile suda bekletildi. Distile su kurutma kağıdı yardımıyla uzaklaştırılarak dokuların etrafı PapPen ile çizildi. 3 kez 5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler 2 kez 5'er dk sitrat (Bio-Optica) ile kaynatıldı. İkinci kaynatmaya geçmeden önce sitratin soğuması beklenildi. 3 kez 5'er dk PBS ile yıkanan kesitler 10 dk H₂O₂ ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama yapıldı. Sekonder antikor kitin içinde bulunan "*Blocking Solüsyonu*" (A solüsyonu) ile 15 dk bekletildikten sonra yıkama yapılmadan 1/100 oranında PBS ile önceden hazırlanan primer antikor (*active Caspase 3*) koyulup 1 gece overnight'a bırakıldı. Ertesi gün PBS ile 3 kez 5'er dk yapılan yıkamadan sonra "*Sekond Antibody*" (B Solüsyonu) ile 10 dk muamele edildi. PBS ile yıkama yapılarak "*HRP-Streptavidin*" (C solüsyonu)'nda 10 dk bekletilip PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Sırasıyla DAB ve Mayer's Hematoksilen uygulanan kesitler 3 değişim ksilolde şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatıldı. Mikroskop altında incelemeler kaydedildi.

3.6.2.4. Ultrastrüktürel İncelemeler

3.6.2.4.1. Elektron Mikroskobu Doku Takibi

Karnovsky solüsyonuna (pH 7.4) konulan dokular 4°C’de bir gece bırakılır.. 0,1 M sodiumphosphate buffer ve 0,1 M sucrose karışımında 3 kez 15 dk bekletildi. %2 sodiumphosphate buffered osmium tetroxide (pH 7.4) solüsyonu ile 90 dk post fiksasyon için muamele edildi. 0,1M sodiumphosphate buffer (pH 7.4) ile 3 kez 15 dk. yıkandı. %50 oranında hazırlanmış aseton ile 2 kez 15 dk. dehidratasyonu yapıldı. Dokular %70 aseton, %0,5 uranylasetate ve %1 phosphotungstic acid karışımı ile 4°C’de kontrast amaçlı overnight’a bırakıldı. Sırasıyla %80,90 ve 96’lık aseton ile 2 kez 15 dk muamele edilen dokular %100’lük asetonunda 2 kez 20 dk tutuldu. Propilen oksitte 2 kez 15 dk bekletilen dokular sırasıyla 30 dk 2:1, 1:1 ve 1:2 oranında hazırlanan propilen oksit:epon karışımlarında bekletildi. Epon solüsyonunda 4°C’de bir gece bırakıldı. 3.gün hazırlanan yeni epon solüsyonunda 48 saat 65°C’ye polimerizasyon için bırakıldı.

3.6.2.5. Biyokimyasal Analizler

Sağ testisin bir kısmı alınarak biyokimyasal analizler için kullanıldı. Doku örnekleri 2 ml soğuk distile su içinde ultrasonik homojenizatörde 1 dk süreyle homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri sırasında örnekler buz üstünde tutuldu. Homojenat +4°C’de ve 10 000 g devirde 15 dk santrifüj edildi ve süpernatantdan enzim ve protein ölçümü yapıldı. Örnekler ölçüm yapılana kadar - 70°C’de saklandı.

Oksidatif stres göstergesi olan lipid peroksidasyon düzeyi (MDA) saptandı. Spektrofotometrik yöntemle antioksidan savunma sisteminin göstergesi olan GPx enzim aktiviteleri ölçüldü.

Homojenat Hazırlanması

Testis dokusunun bir kısmı alınarak biyokimyasal analizler için kullanıldı. Doku örnekleri 2 ml soğuk distile su içinde ultrasonik homojenizatörde 1 dk süreyle homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri sırasında örnekler buz üstünde tutuldu. Homojenat +4°C’de ve 10 000 g devirde 15 dk santrifüj edildi ve süpernatanttan enzim ve protein ölçümü yapıldı. Örnekler ölçüm yapılana kadar - 70°C’de saklandı.

3.6.2.5.1. Malondialdehit (MDA) Düzey Ölçümü

MDA değerleri MDA ticari kiti ile (Bioxytech, MDA-586, Oxis international, Inc.) spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Doku homojenatları kit prosedürüne göre hazırlandıktan sonra, 486 nm'de absorbanları ölçüldü.

MDA değerlerinin saptanması:

- Daha önceden –80 °C'deki doku homojenatları 10 dakika oda ısısında çözüldü.
- 200 µl'lik örnekler tüplere konuldu.
- Her tüpe 10'ar µl probukol eklendi. (Bioxytech, Oxis Research, MDA 586®)
- Her tüpe 640 µl R1 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice vortekslendi.
- Her tüpe 150 µl R2 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice vortekslendi.
- 45°C de 60 dakika inkübe edildi.
- Temiz bir süpernatant için örnekler santrifüj edildi (ör. 10,000 X g 10 dakika),
- Temiz süpernatant kısım ölçüm küvetine konularak spektrofotometre ile 586 nm'de absorban ölçüldü (HACH-LANGE DR 5000®).
- Kit prosedürüne göre hesaplama yapıldı.

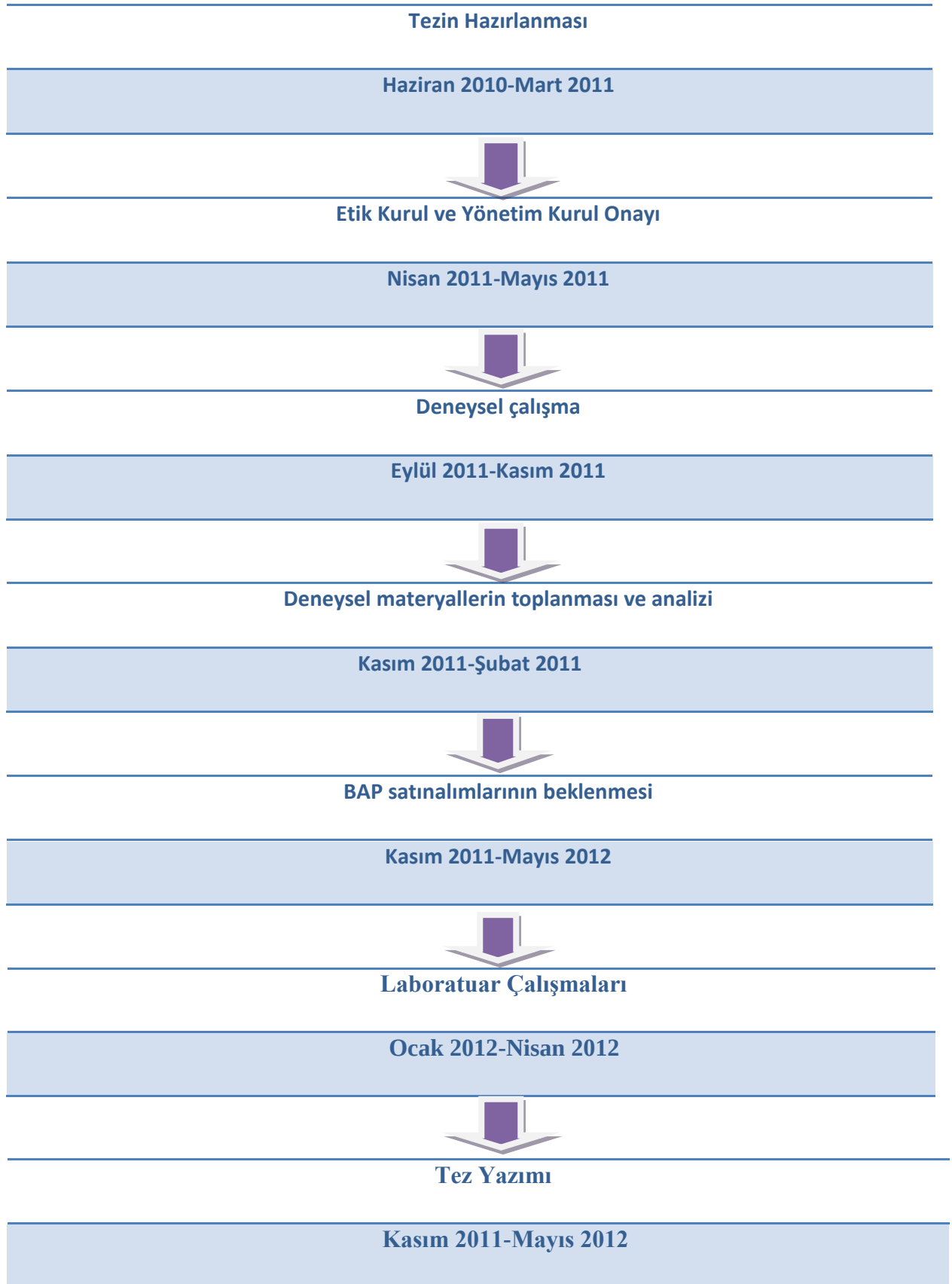
3.6.2.5.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzey Ölçümü

GPx değerleri, GPx ticari kiti ile (Bioxytech, GPx-340, Oxis international, Inc.), spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Doku Homojenatları kit prosedürüne göre hazırlandıktan sonra HACH-LANGE DR 5000 cihazıyla spektrofotometrik olarak ölçüldü. Ölçüm yöntemi:

- Distile su ile cihaz 340 nm'de sıfırlandı.
- 350 µL buffer, 350 µLNADPH ve 70 µL örnek ölçüm küvetine konuldu.
- Karışım spektrofotometre içerisine konuldu.
- Karışıma 350 µL tert-butil hidroperoksit eklenerek pipetle karıştırıldı.

- 3 dakika boyunca absorbans değışikliği kaydedildi.
- Kit prosedürüne göre hesaplama yapıldı.

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirmesi

Deneyden elde edilen değerler Windows için SPSS 15,0 istatistik programı kullanılarak analiz edildi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi. Gruplar arasındaki farklar one-way ANOVA posthoc LSD testi ile değerlendirildi. $P<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, malzeme satın alımlarındaki aksaklıklar dışında herhangi bir aksaklıkla karşılaşılmamıştır.

Araştırmada herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından 05/08/2011 toplantı no, 15 Nisan 2011 toplantı tarihinde 19/2011 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

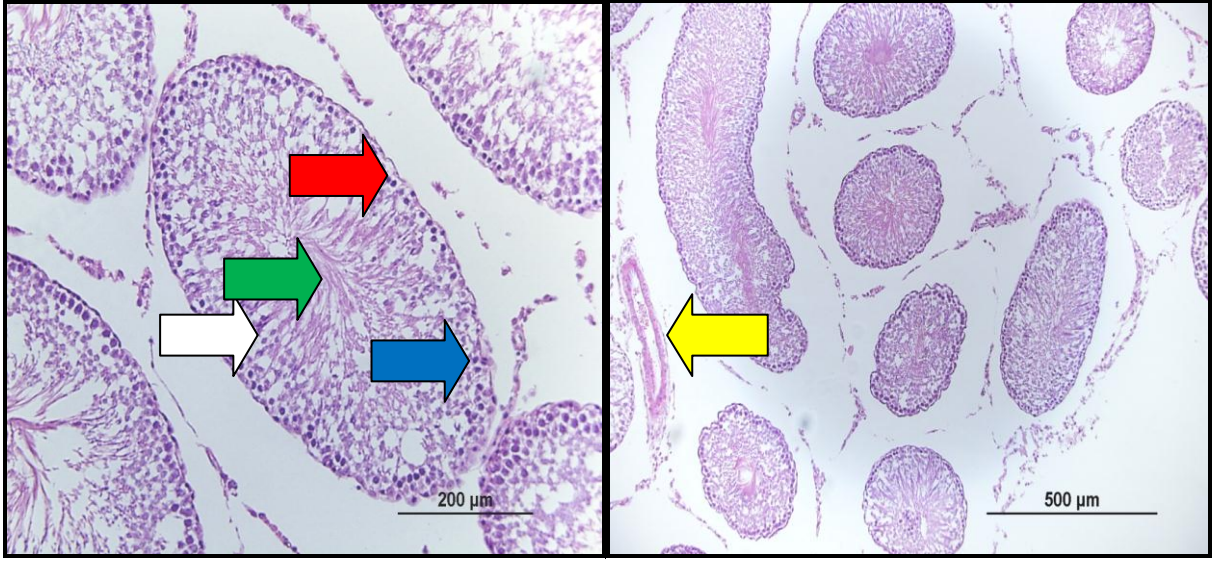
4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

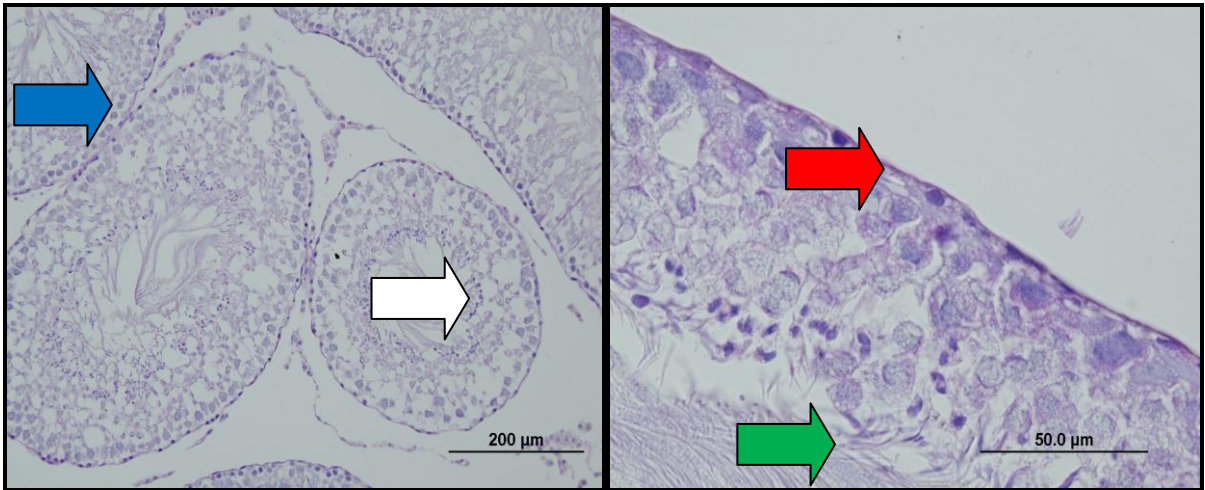
4.1.1. Testis'in Histolojik Değerlendirmesi

Testis dokusunun histolojik açıdan değerlendirilmesi için H&E, PAS boyamaları yapılarak değerlendirildi.

Testis'e ait histolojik kesitleri incelendiğinde Kontrol grubunda; seminifer tübüller, intersisyal alanda Leydig hücreleri ve intertisyal bağ dokusundan oluşmaktaydı. İntertisyal bağ dokusunda kan ve lenf damarları bulunuyordu. Kapillerler etrafında toplanmış Leydig hücreleri düzensiz poligonal biçimli, eozinofilik sitoplazmalı, büyük eksantrik yerleşim gösteren çekirdeğe sahipti. Leydig hücreleri arasında yassı çekirdekli bağ dokusu hücreleri de izlenmekteydi. Seminifer tübüller geniş intertisyal doku içinde heterojen bir yapı göstermekteydi. Tübülleri çevreleyen miyoid hücreler yassı ve uzun çekirdekleri ile ayırt ediliyordu. Seminifer tübüllerin duvarında bazal membran üzerine oturmuş spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler izlendi. Bunların arasında yer yer Sertoli hücreleri bulunmaktaydı. Tübüllerin merkezinde gelişmiş ve gelişmekte olan spermatidler mevcuttu. Bazı tübüllerde ise spermatogonyumlar, spermatositler, spermatidler ve Sertoli hücreleri izlenirken gelişmekte olan spermiyuma rastlanmadı. İntertisyal dokuda makrofaj veya mast hücresi saptanmadı. Tunika mukozada lamina epitelyalisin transizyonel epitelden meydana geldiği ve lamina proprianın gevsek bağ dokusundan oluştuğu görüldü. PAS boyamasında bazal laminanın korunduğu gözlemlendi.

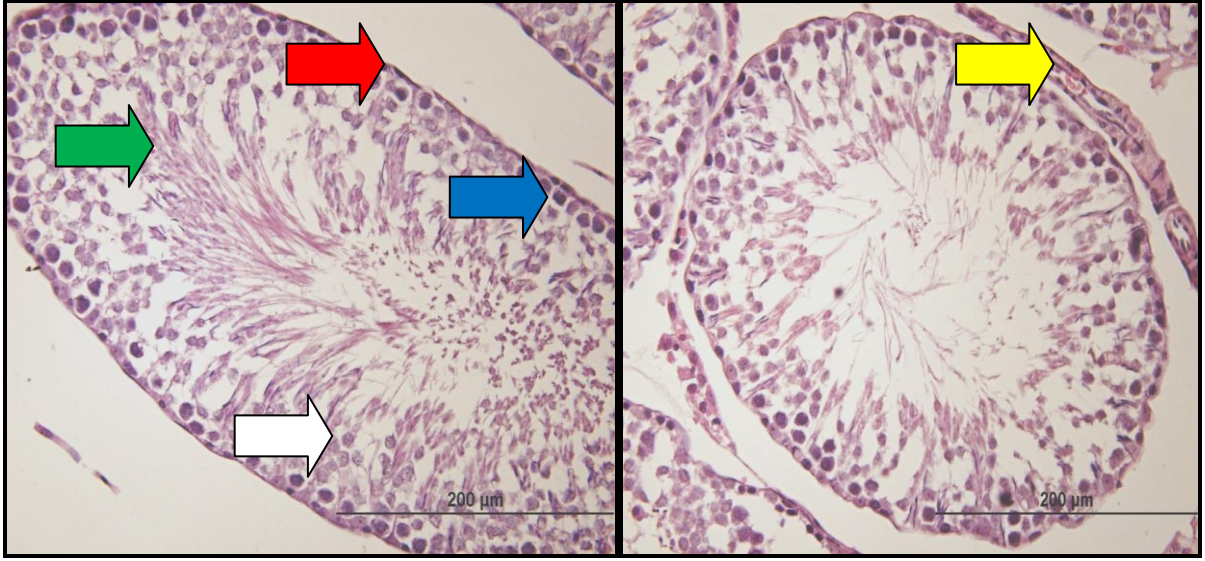


Şekil 8: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Kırmızı ok: bazal membran, mavi ok: spermatogonia, beyaz ok: spermatosit, yeşil ok: spermium, sarı ok: kan damarı, H&E.

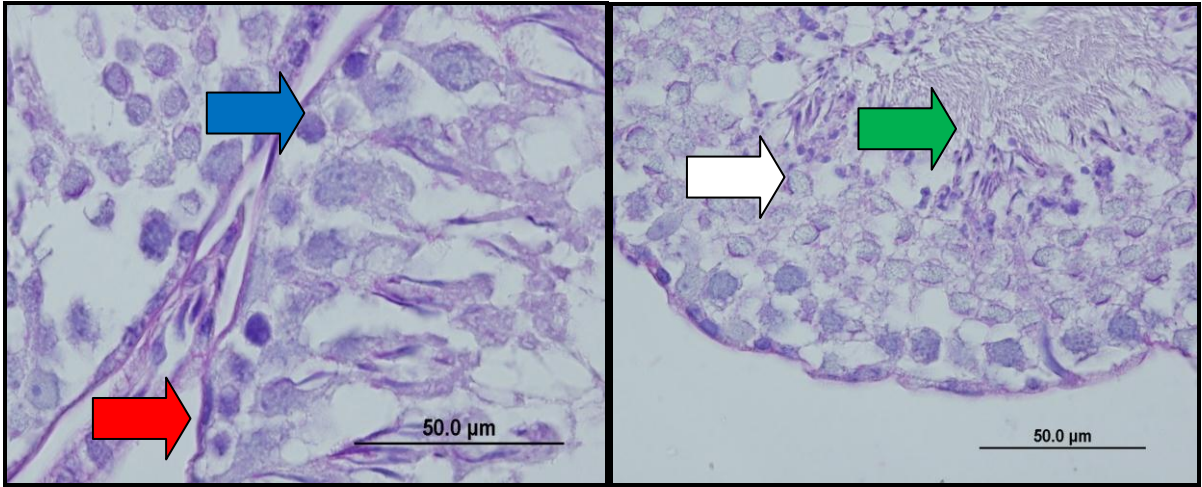


Şekil 9: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Kırmızı ok: bazal membran, mavi ok: spermatogonia, beyaz ok: spermatosit, yeşil ok: spermium, PAS.

Sham grubu incelendiğinde kontrolle benzer bulgular gözlendi.



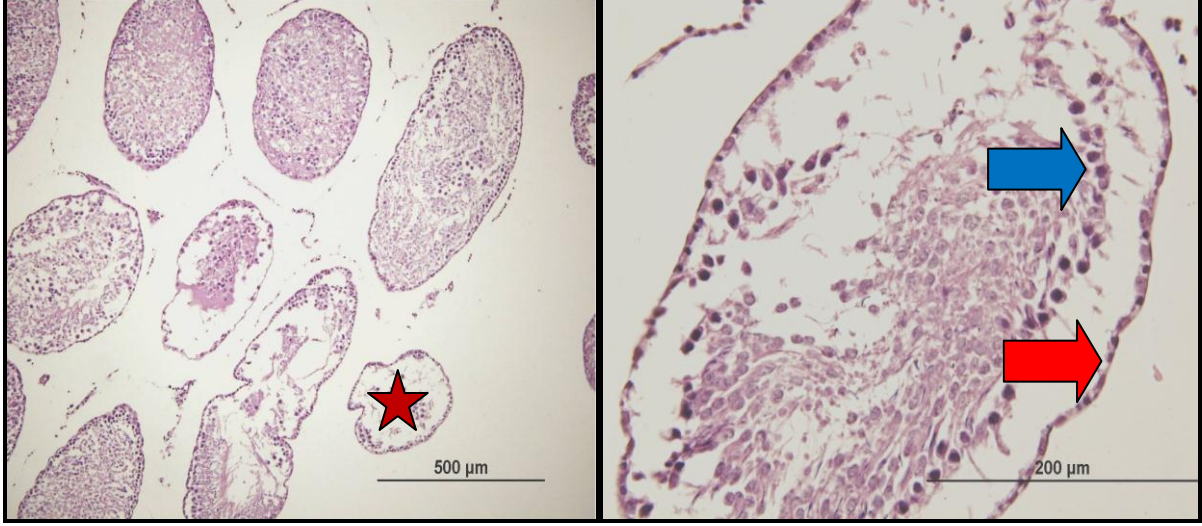
Şekil 10: Sham grubuna ait testis dokusu. Mavi ok: spermatogonia, kırmızı ok: bazal membran, beyaz ok: spermatosit, yeşil ok: spermium, sarı ok: kan damarı, H&E.



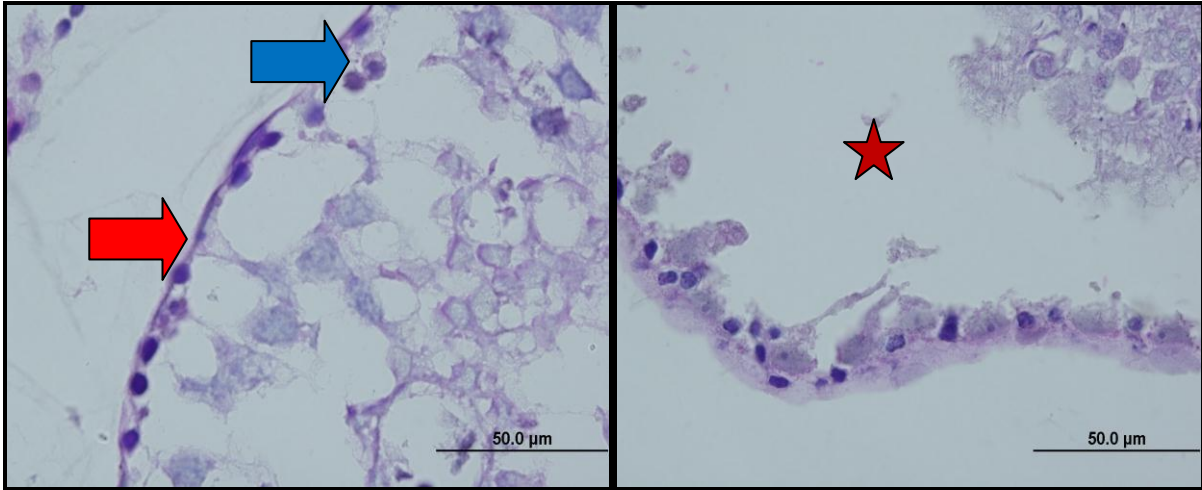
Şekil 11: Sham grubuna ait testis dokusu. mavi ok: spermatogonia, kırmızı ok: bazal membran, beyaz ok: spermatosit, yeşil ok: spermium, PAS.

Nandrolone Decanoate (ND) grubu incelendiğinde seminifer tübüllerde yoğun dejenerasyonlar gözlemlendi. Birkaç tübülde atrofi, tübül lümeninde düzensizlik, lümeninde spermium hücrelerinin olmaması, seminifer tübül duvarındaki epitelde bozulma, spermatogenik seriye ait hücrelerde düzensizlikler, sayılarında belirgin azalmalar ve yine bu hücrelerde bazal

laminadan ayrılmalar, tübülün karakteristik yuvarlak yapısında bozulmalar ve tübül lümeninde tıkanıklıklar saptanmıştır.

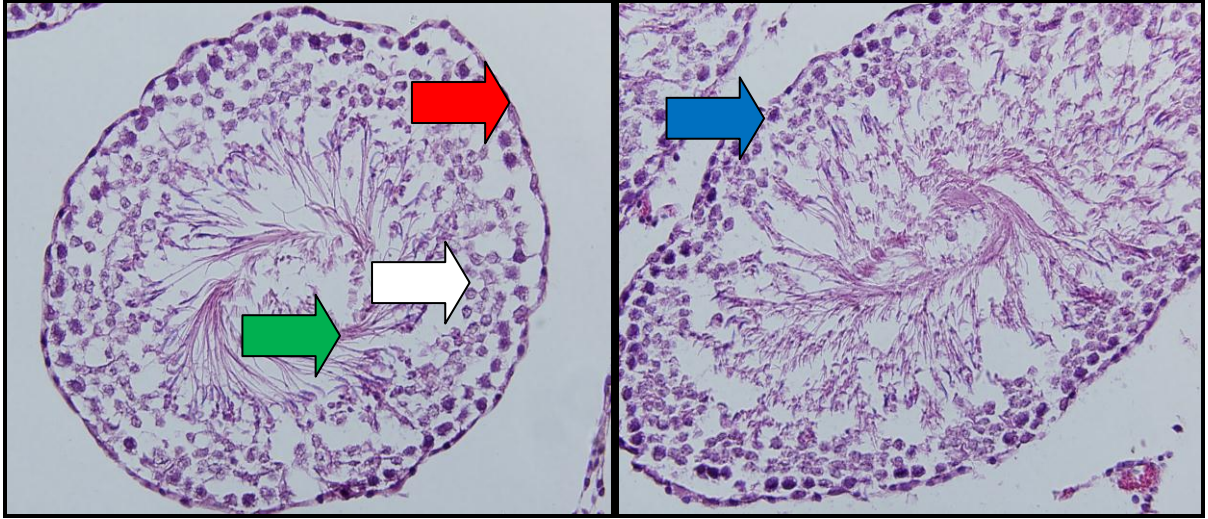


Şekil 12: ND grubu testis dokusu. Kırmızı Yıldız(*): atrofiye seminifer tübül, mavi ok: spermatogonia, kırmızı ok: bazal membran, H&E.

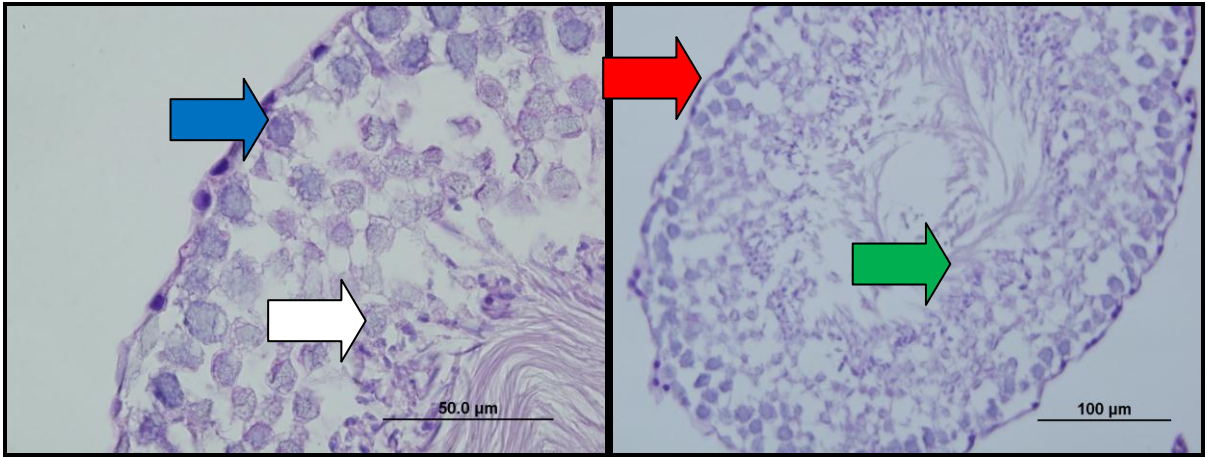


Şekil 13: ND grubu testis dokusu. Kırmızı Yıldız(*): atrofiye seminifer tübül, mavi ok: spermatogonia, kırmızı ok: bazal membran, PAS.

Epo düşük doz grubu incelendiğinde çok sayıda tübülün normale yakın morfolojiye sahip olduğu, spermatogenik seri hücrelerinin sayılarında artış olduğu gözlemlenmiştir.

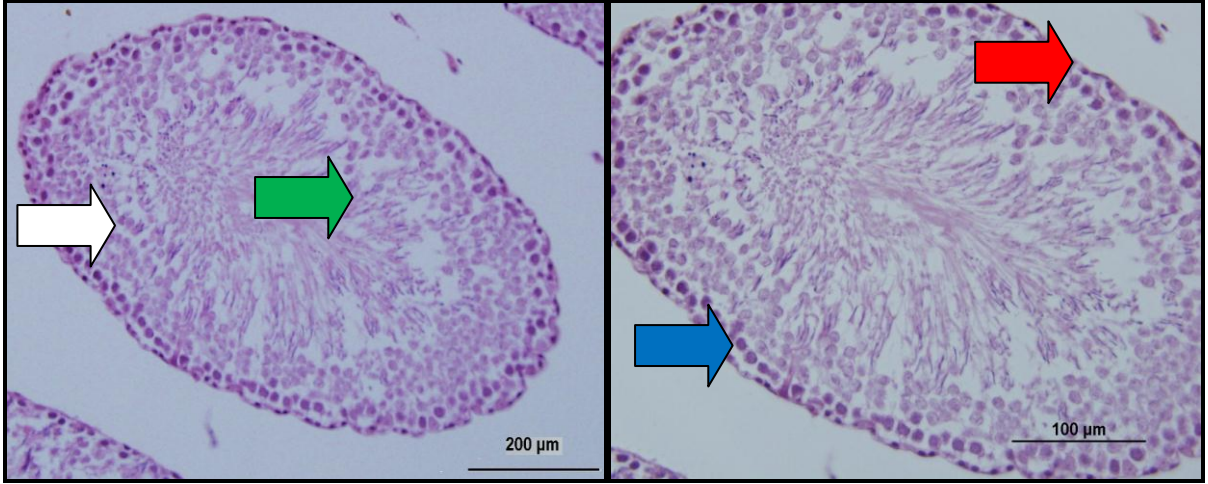


Şekil 14: Epo DD grubu testis dokusu. Mavi ok: spermatogonia, kırmızı ok: bazal membran, beyaz ok: spermatosit, yeşil ok: spermium, H&E.

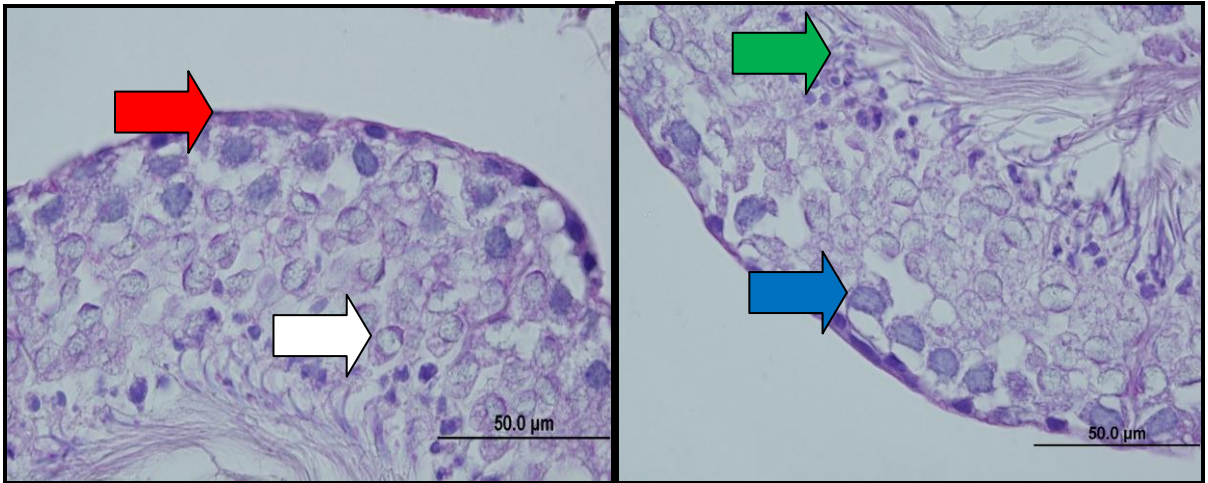


Şekil 15: Epo DD grubu testis dokusu. Mavi ok: spermatogonia, kırmızı ok: bazal membran, beyaz ok: spermatosit, yeşil ok: spermium, PAS.

Epo yüksek doz grubu incelendiğinde kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 16: Epo YD grubu testis dokusu. Mavi ok: spermatogonia, kırmızı ok: bazal membran, beyaz ok: spermatosit, yeşil ok: spermium, H&E.



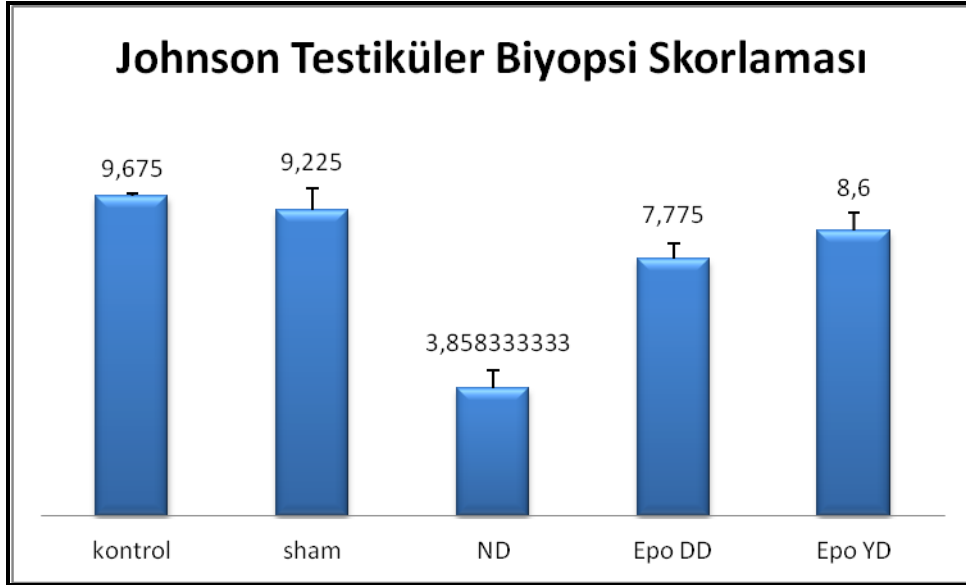
Şekil 17: Epo YD grubu testis dokusu. Mavi ok: spermatogonia, kırmızı ok: bazal membran, beyaz ok: spermatosit, yeşil ok: spermium, PAS.

4.2. Morfometrik Bulgular

4.2.1. Johnson Testiküler Biyopsi Skoruması

Testis dokusunda gruplar arasındaki tübül hasarını belirlemek için morfometrik ölçümler yapıldı. Bunun için jonhson testiküler biyopsi skoruması yöntemi kullanıldı. Gruplar arasında jonhson testiküler biopsi skoruması düzeyleri ortalamaları; kontrol grubu $9,675 \pm 0,06$, sham grubu $9,225 \pm 0,66$, ND grubu $3,858 \pm 0,54$, Epo DD grubu $7,775 \pm 0,45$, Epo YD grubu $8,6 \pm 0,57$ olarak bulundu. Kontrol grubu ile sham grubu kıyaslandığında

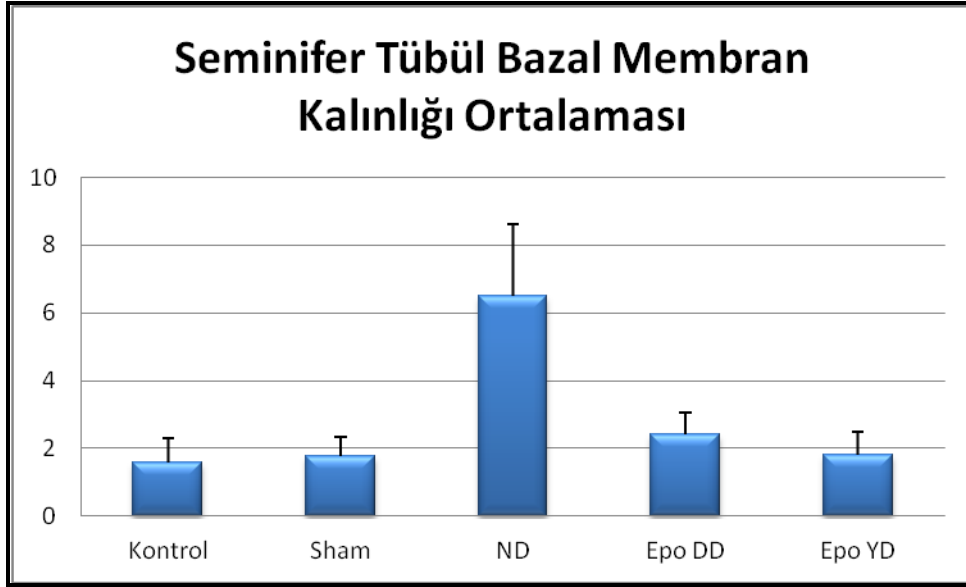
istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ($p=0,75$). Kontrol grubu ile ND grubu, Epo DD grubu, Epo YD grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,004$). ND grubu ile Epo DD grubu ve Epo YD grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,004$).



Şekil 35: Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması.

4.2.2. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

Testis dokusunda gruplar arasındaki tübül hasarını belirlemek için germinal epitel kalınlıkları Image Tool programı (UTHSCA Image Tool Version 3,0 USA) kullanılarak ölçüldü. Gruplar arasında bazal membran kalınlığı ortalamaları; kontrol grubu $1,595 \pm 0,68$, sham grubu $1,758 \pm 0,57$, ND grubu $6,495 \pm 2,13$, Epo DD grubu $2,399 \pm 0,66$, Epo YD grubu $1,812 \pm 0,66$ olarak bulundu. Kontrol grubu ile sham grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ($p=0,49$). Kontrol grubu ile ND grubu, Epo DD grubu, Epo YD grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,000$, $p=0,000$, $p=0,057$). ND grubu ile Epo DD grubu ve Epo YD grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,000$).



Şekil 36: Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ortalaması.

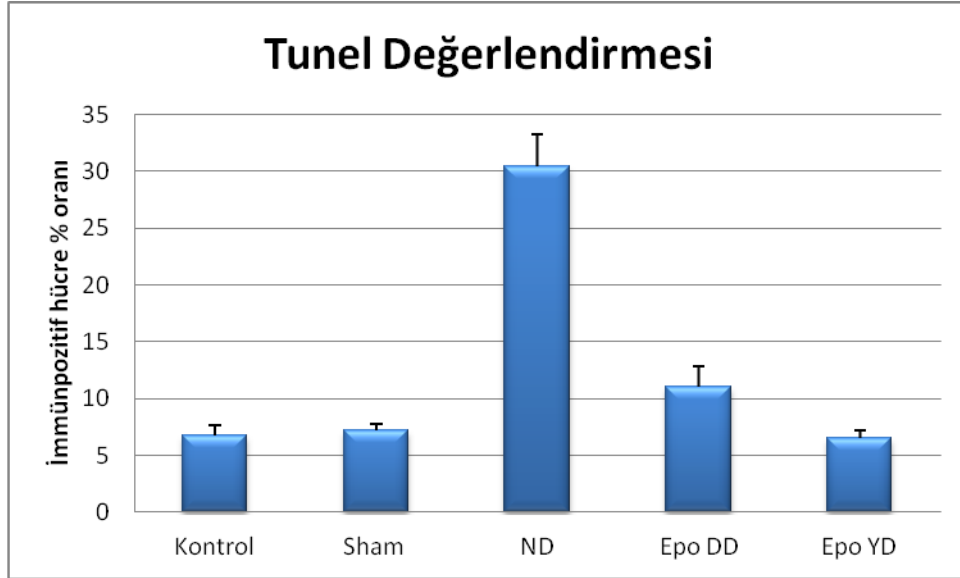
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular

4.3.1. TUNEL Boyama Değerlendirmesi

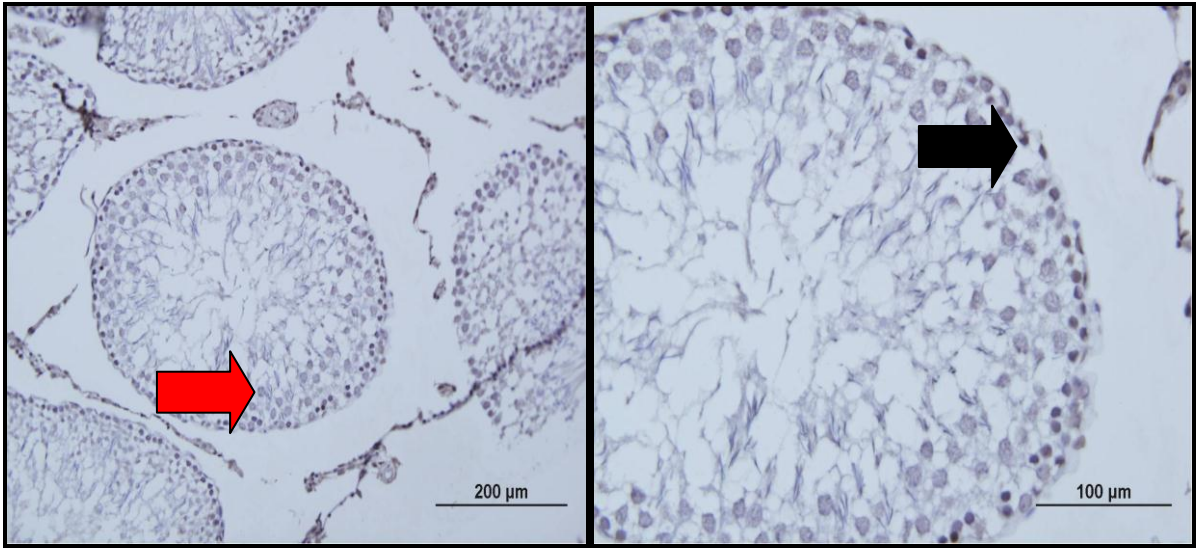
Spermatogenik seriye ait hücrelerin DNA fragmantasyonlarının değerlendirilmesi için TUNEL boyaması yapıldı. Her gruptaki deneklerin testis doku kesitlerinde X20 objektif büyütmesi ile 10 ayrı alanda her alandan 100 hücrenin TUNEL pozitif boyananları sayılarak ortalamaları alındı.

Testis dokusuna ait histolojik kesitlerde ortalama TUNEL pozitif boyanan hücre sayıları, Kontrol grubu $6,75 \pm 0,85$; Sham grubunda $7,25 \pm 0,48$; ND grubunda $30,5 \pm 2,75$; Epo DD grubunda $12 \pm 1,87$; Epo YD grubunda $11 \pm 0,65$ olarak bulundu.

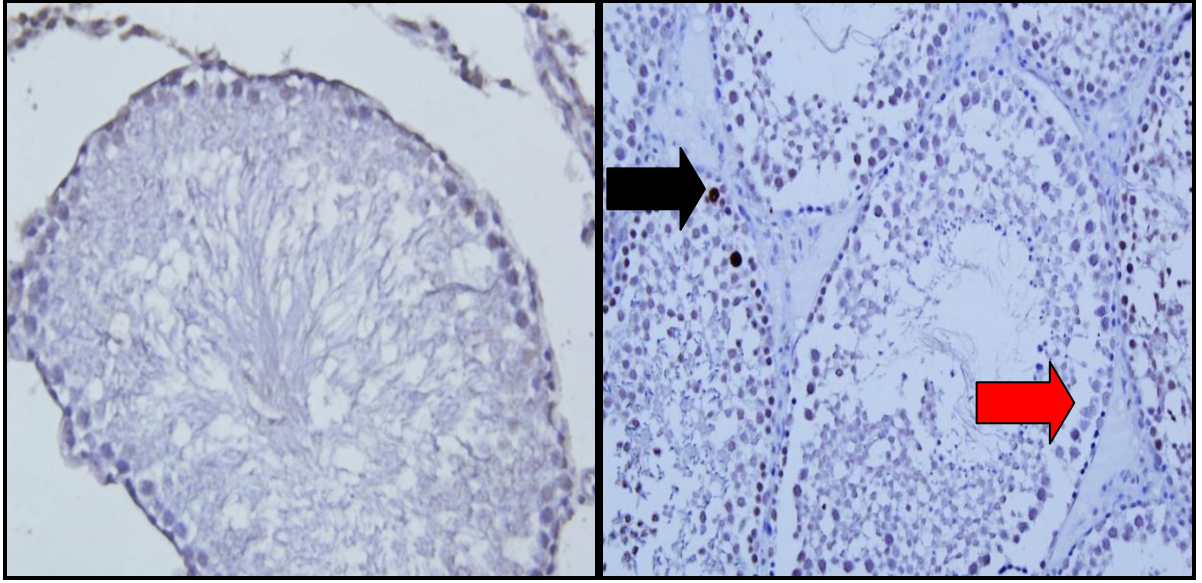
İstatistiksel olarak kıyaslandığında; kontrol ve sham grupları ile ND grubu arasında anlamlı fark saptandı. ND grubunda anlamlı olarak artış saptandı. ($p=0,0001$, $p=0,0001$). ND grubu ile Epo DD ve Epo YD grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır. ND grubunda Epo DD ve Epo YD grubuna kıyasla anlamlı artış saptanmıştır. ($p=0,0001$, $p=0,0001$).



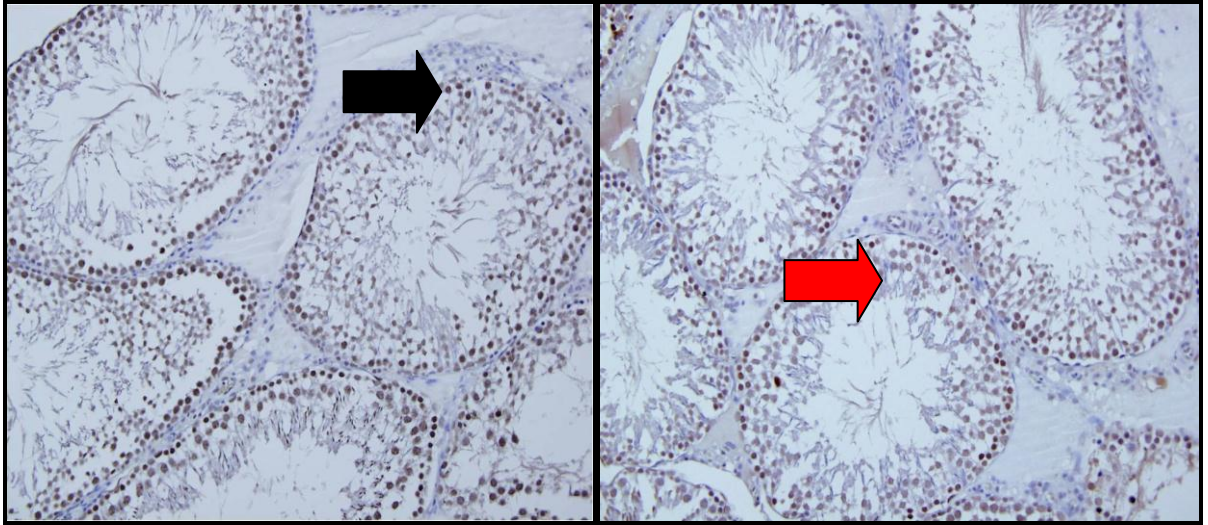
Şekil 38: Tunel pozitif hücre değerlendirme tablosu.



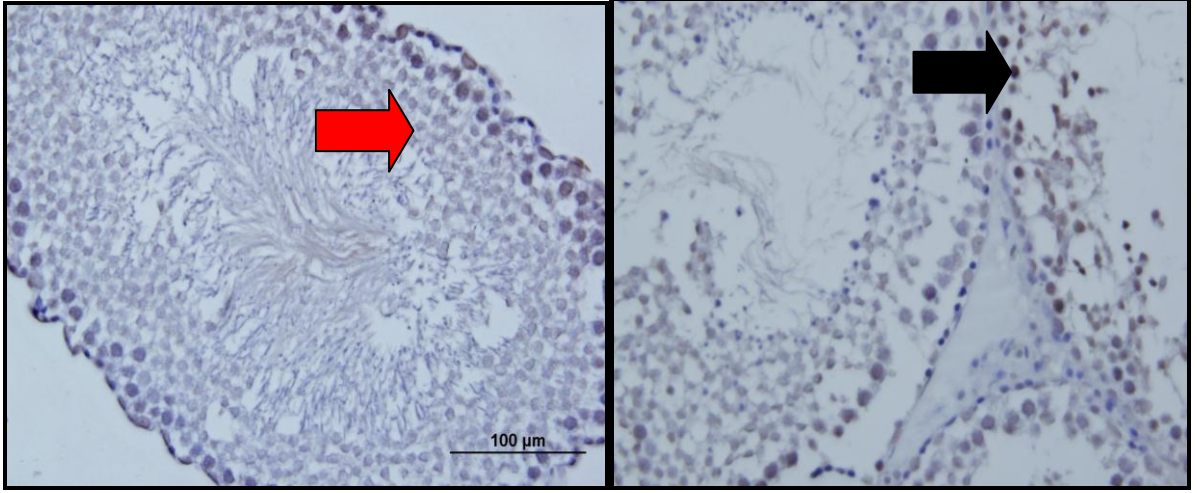
Şekil 18: Kontrol grubu testis dokusu. Siyah ok: TUNEL pozitif hücreler, kırmızı ok: TUNEL negatif hücreler, TUNEL.



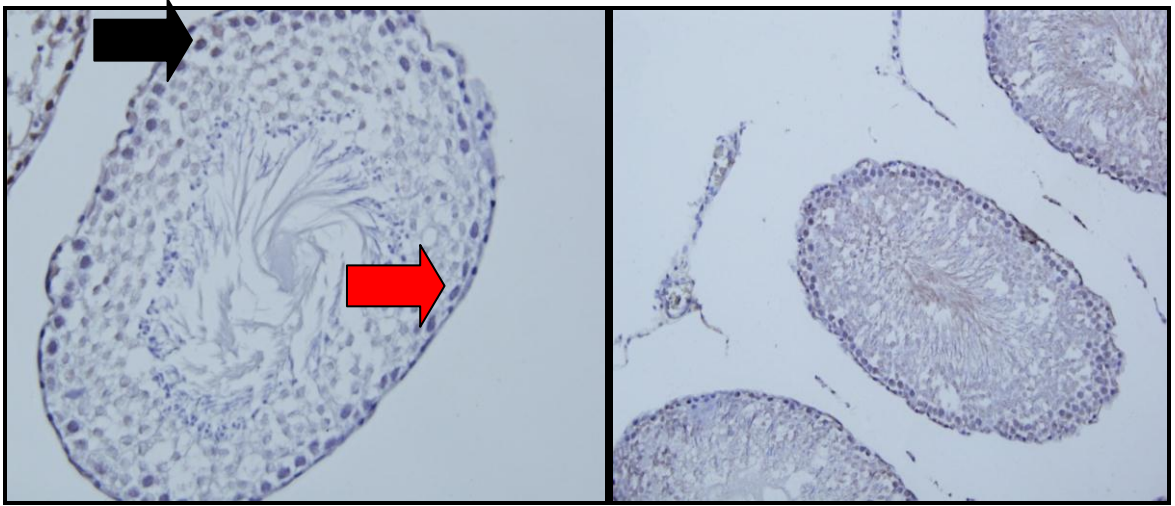
Şekil 19: Sham grubu testis dokusu. Siyah ok: TUNEL pozitif hücreler, kırmızı ok: TUNEL negatif hücreler, TUNEL.



Şekil 20: ND grubu testis dokusu. Siyah ok: TUNEL pozitif hücreler, kırmızı ok: TUNEL negatif hücreler, TUNEL.



Şekil 21: Epo düşük doz tedavi grubu testis dokusu. Siyah ok: TUNEL pozitif hücreler, kırmızı ok: TUNEL negatif hücreler, TUNEL.



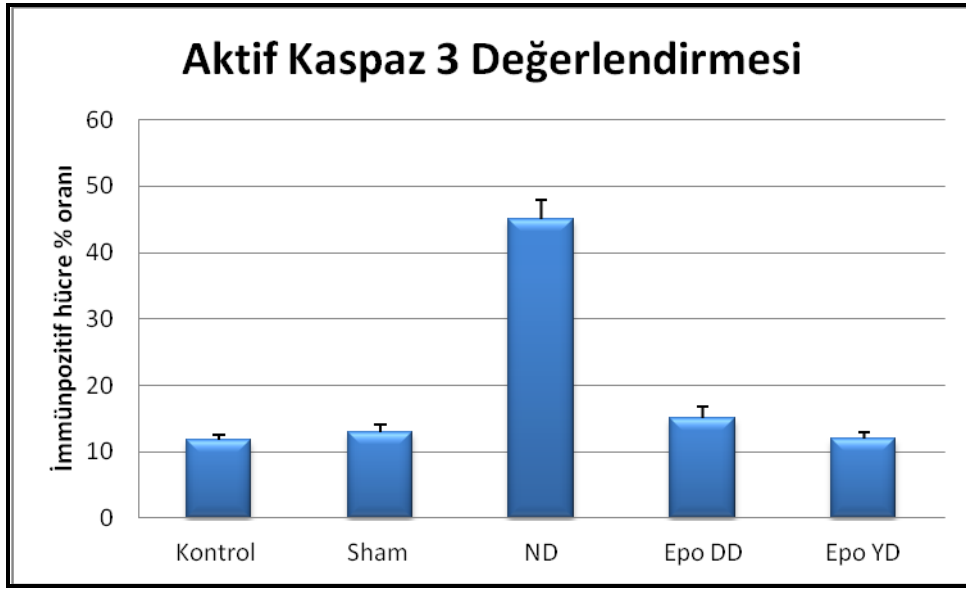
Şekil 22: Epo yüksek doz tedavi grubu testis dokusu. Siyah ok: TUNEL pozitif hücreler, kırmızı ok: TUNEL negatif hücreler, TUNEL.

4.3.2. Aktif Kaspaz 3 boyama değerlendirmesi

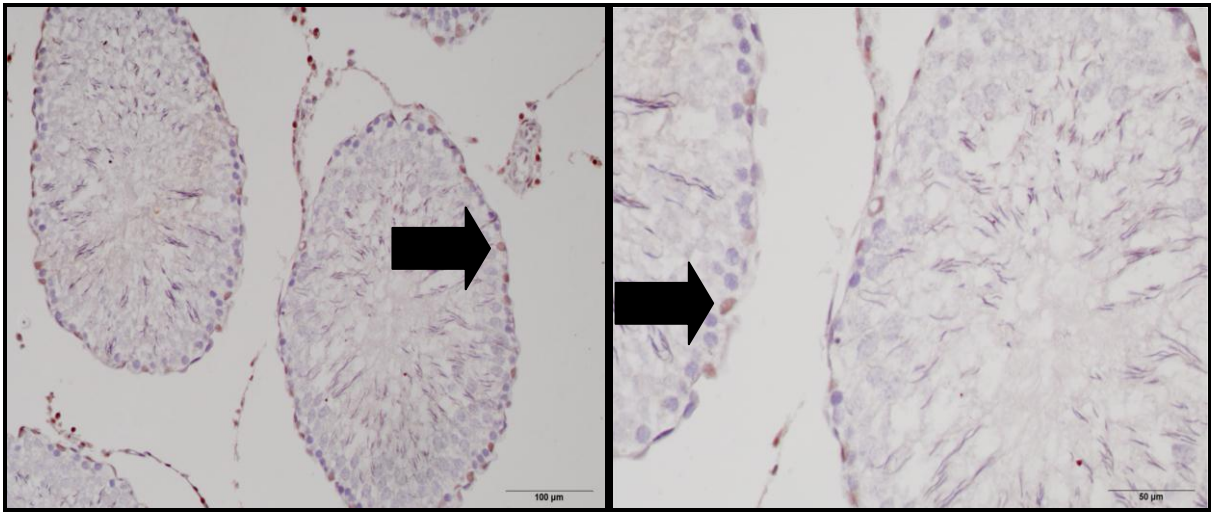
Spermatogenik seriye ait hücrelerde apoptozu belirlemek için aktif kaspaz 3 boyaması yapıldı. Her gruptaki deneklerin testis doku kesitlerinde X20 objektif büyütmesi ile 10 ayrı alanda her alandan 100 hücrenin immünopozitif boyananları sayılarak ortalamaları alındı.

Testis dokusuna ait histolojik kesitlerde ortalama pozitif boyanan hücre sayıları, Kontrol grubuna ait kesitlerde $11,75 \pm 0,85$; Sham grubunda $13 \pm 1,08$; ND grubunda $45 \pm 2,95$; Epo DD grubunda $15 \pm 1,82$; Epo YD grubunda $14,0 \pm 0,91$ olarak bulundu.

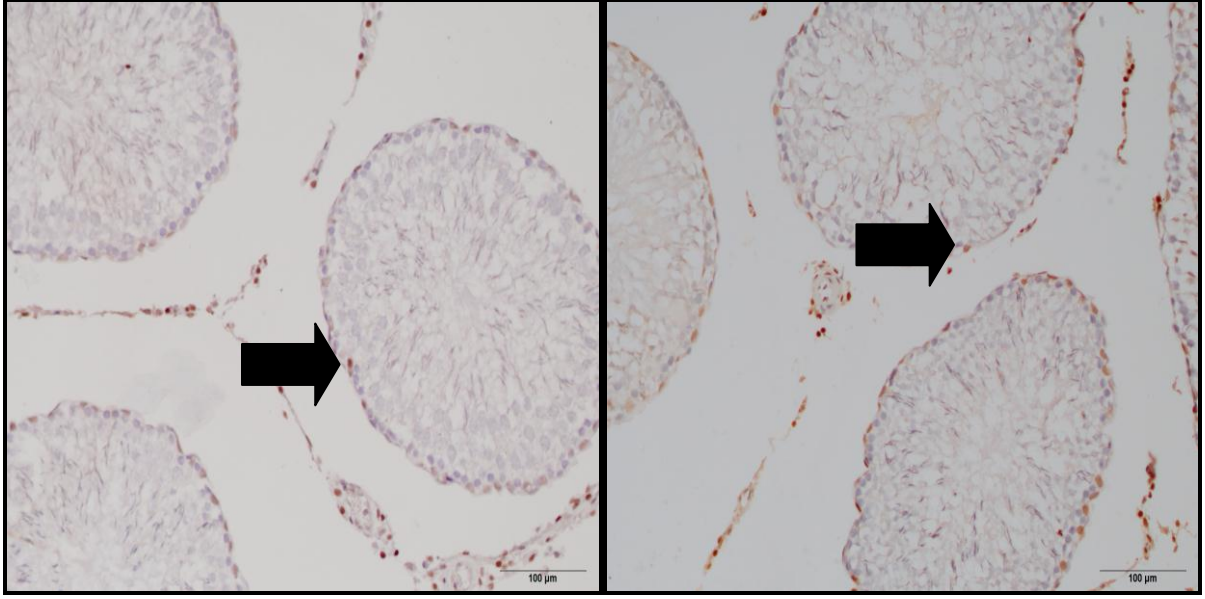
İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında, kontrol ve sham grupları ile ND grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır. ($p=0,0001$, $p=0,0001$). ND grubu ile Epo DD ve Epo YD grupları kıyaslandığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve ND grubunda anlamlı olarak artış saptandı. ($p=0,0001$, $p=0,0001$).



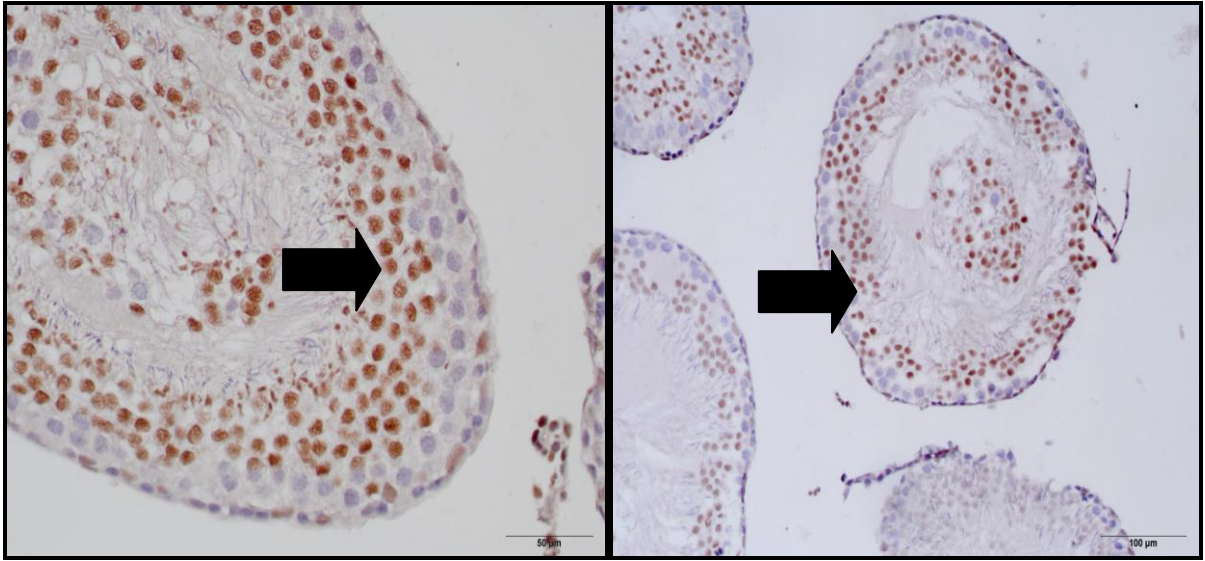
Şekil 37: Aktif kaspaz 3 pozitif hücre değerlendirme tablosu.



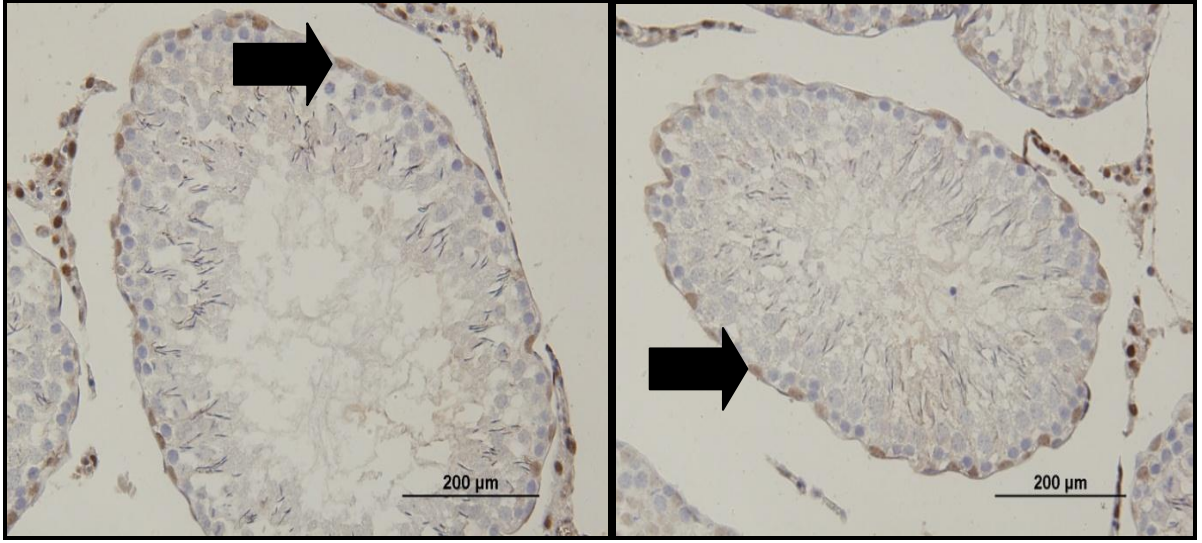
Şekil 23: Kontrol grubu testis dokusu. Siyah ok: Aktif kaspaz 3 immünoreaktivite gösteren hücreler.



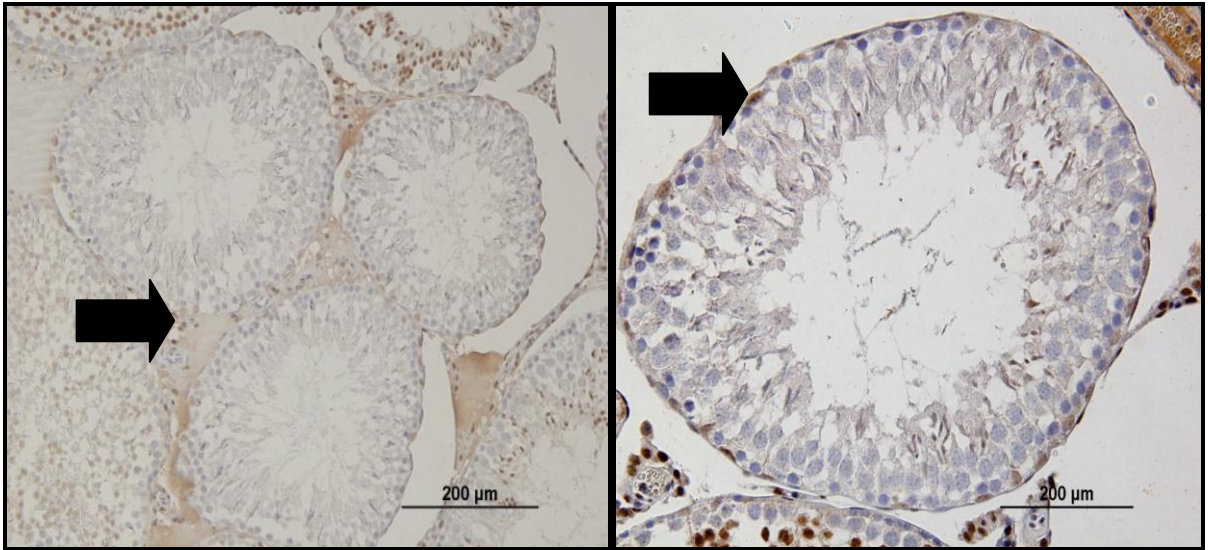
Şekil 24: Sham grubu testis dokusu. Siyah ok: Aktif kaspaz 3 immünoreaktivite gösteren hücreler.



Şekil 25: ND grubu testis dokusu. Siyah ok: Aktif kaspaz 3 immünoreaktivite gösteren hücreler.



Şekil 26: Epo düşük doz tedavi grubu testis dokusu. Siyah ok: Aktif kaspaz 3 immünoreaktivite gösteren hücreler



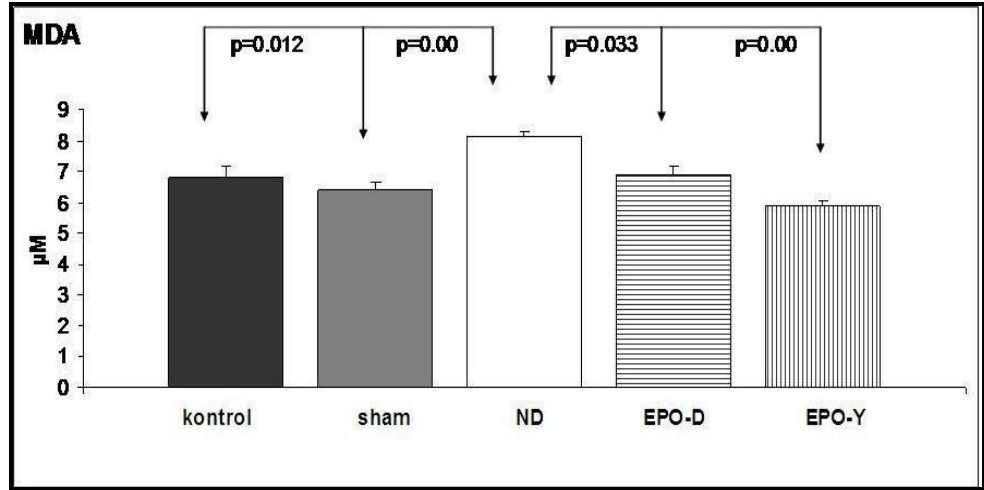
Şekil 27: Epo yüksek doz tedavi grubu testis dokusu. Siyah ok: Aktif kaspaz 3 immünoreaktivite gösteren hücreler

4.5. Biyokimyasal Bulgular

4.5.1. MDA Düzey Değerlendirmesi

MDA düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $6,82 \pm 0,33 \mu\text{M}$, Sham grubunda $6,36 \pm 0,27 \mu\text{M}$, ND grubunda $8,11 \pm 0,17 \mu\text{M}$, Epo DD grubunda $6,92 \pm 0,21 \mu\text{M}$ ve Epo YD

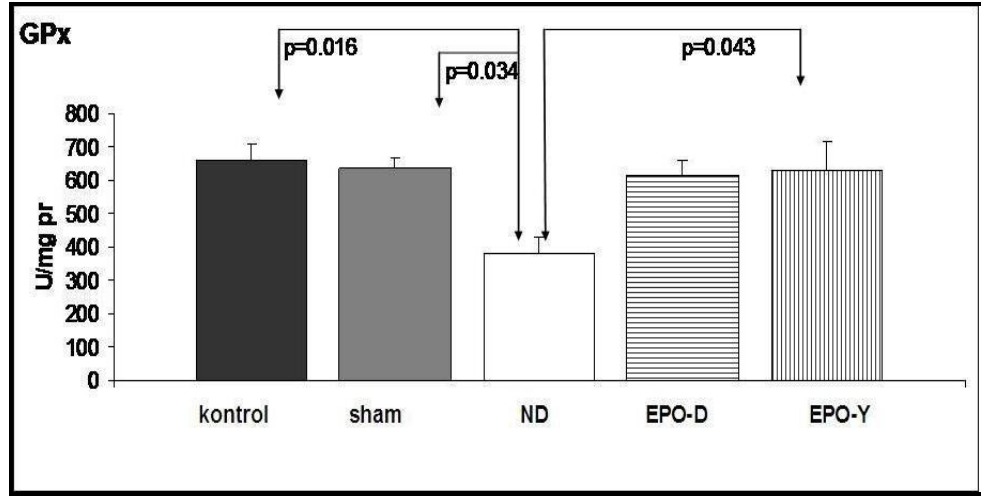
tedavi grubunda $5,87 \pm 0,18 \mu\text{M}$ olarak saptandı. Kontrol grubu ile sham grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=1,00$). Kontrol grubu ile ND grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,012$). ND grubu ile Epo DD grubu ve Epo YD grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,033$, $p=0,00$).



Şekil 28: Grupların MDA düzey ortalamaları.

4.5.2. GPx Düzey Değerlendirmesi

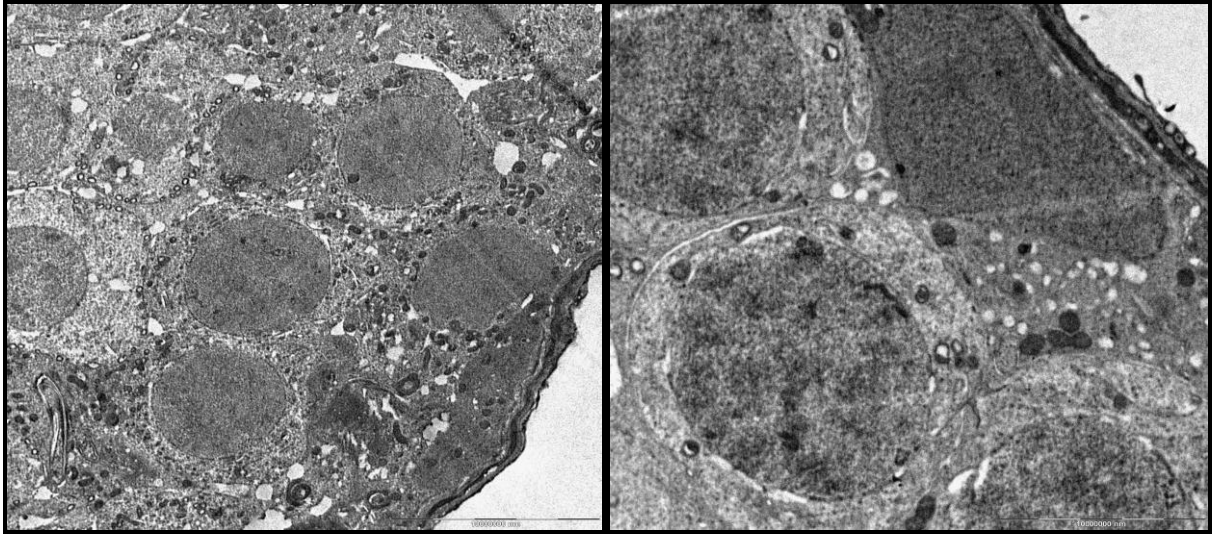
GPx düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $660,59 \pm 48,64$ U/mg protein, Sham grubunda $636,82 \pm 29,12$ U/mg protein, ND grubunda $378,55 \pm 53,65$ U/mg protein, Epo DD grubunda $613,37 \pm 45,04$ U/mg protein ve Epo YD tedavi grubunda $629,23 \pm 85,20$ olarak saptandı. Kontrol grubu ile sham grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ($p=1,00$). Kontrol grubu ile ND grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,016$). ND grubu ile Epo DD grubu kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ($p=0,090$). ND grubu ile Epo YD grupları kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi ($p=0,043$).



Şekil 29: Grupların GPx düzey ortalamaları.

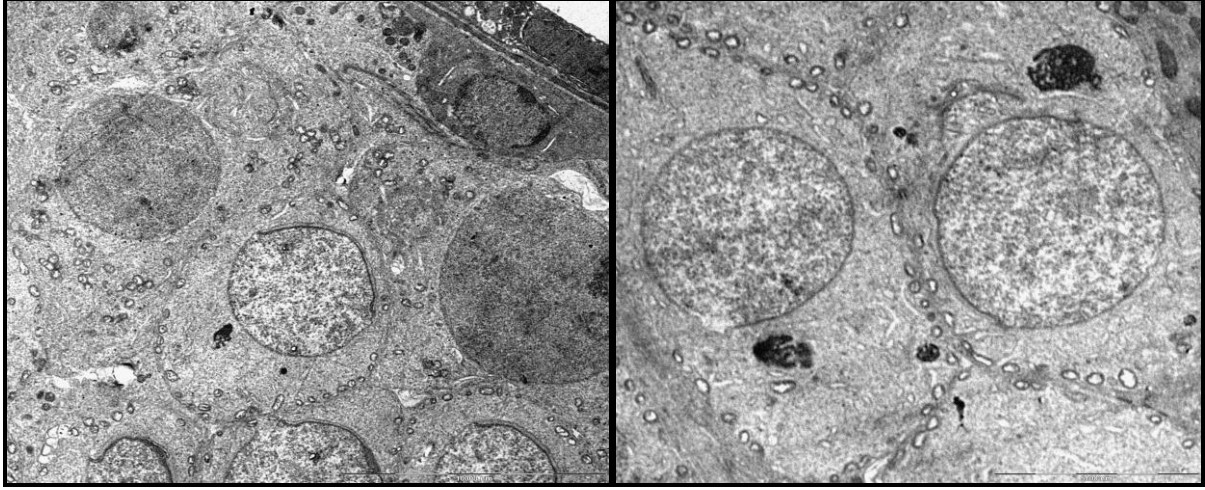
4.6. Elektron Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubunda bazal lamina üzerinde spermatogonyumlar ve sertoli hücreleri bulunmaktaydı. Bazal membranda epitelyum ve myoid hücreler bulunmaktaydı. Sertoli hücreleri stoplazmasında bazale yakın çekirdek görülmekteydi. Golgi kompleksi, lizozomlar, AGER, GER ve mitokondriler düzgün yapıdaydı. Sertoli hücrelerinde lipit damlacıkları görülmekteydi. Normal morfolojideki spermatogenik seri hücreleri, hücreler arasındaki sıkı bağlantılar düzgün yapıda görülmekteydi. Normal bazal membran ve normal yapıdaki leydig hücreleri görülmekteydi.



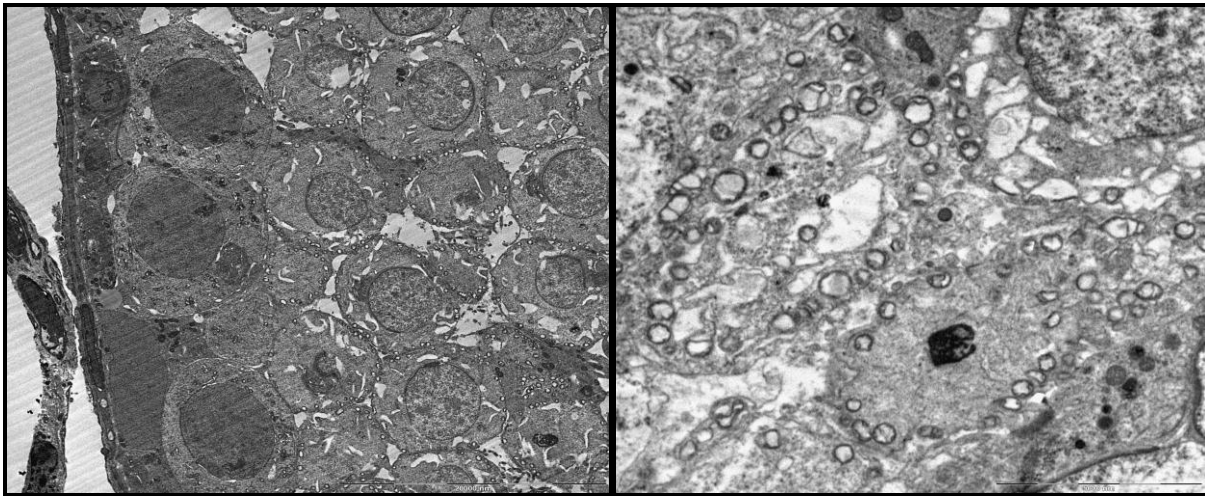
Şekil 30: Kontrol grubuna ait kesit

Sham grubunda kontrol grubu ile uyumlu sonuçlar gözlenmiştir. Bazal membranın normal kalınlıkta olduğu, sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreleri içeren germinal epitel hücrelerinin normal stoplazmik yapıda oldukları gözlenmiştir.



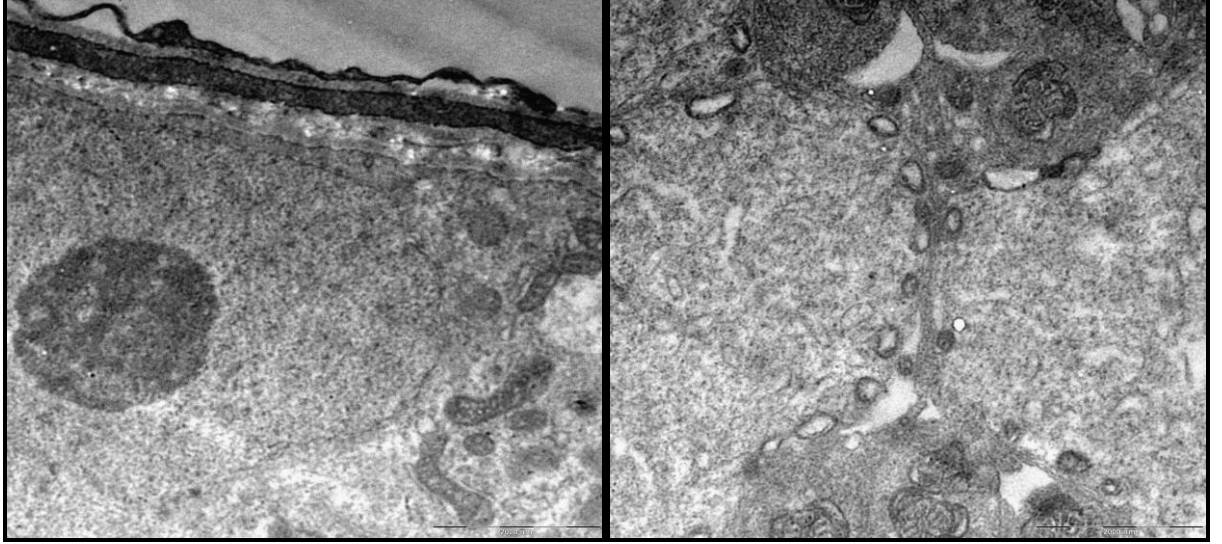
Şekil 31: Sham grubuna ait kesit.

ND grubunda spermatogenik hücre yapılarında bozulma, hücre bağlantılarında dejenerasyon, sitoplazmada lipid damlacıkları ve veziküller gözlemlendi. Spermatid hücrelerinin stoplazmasında yoğun cisimcikler görülmüştür. Sertoli hücrelerinde boş vakuolar alanlar, lipid damlacıkları ve mitokondrilerde vakuolizasyon görülmüştür. Düzensiz ve kalınlaşmış bazal lamina, ayrıca leydig hücrelerinde stoplazmik vakuolizasyon görülmüştür.



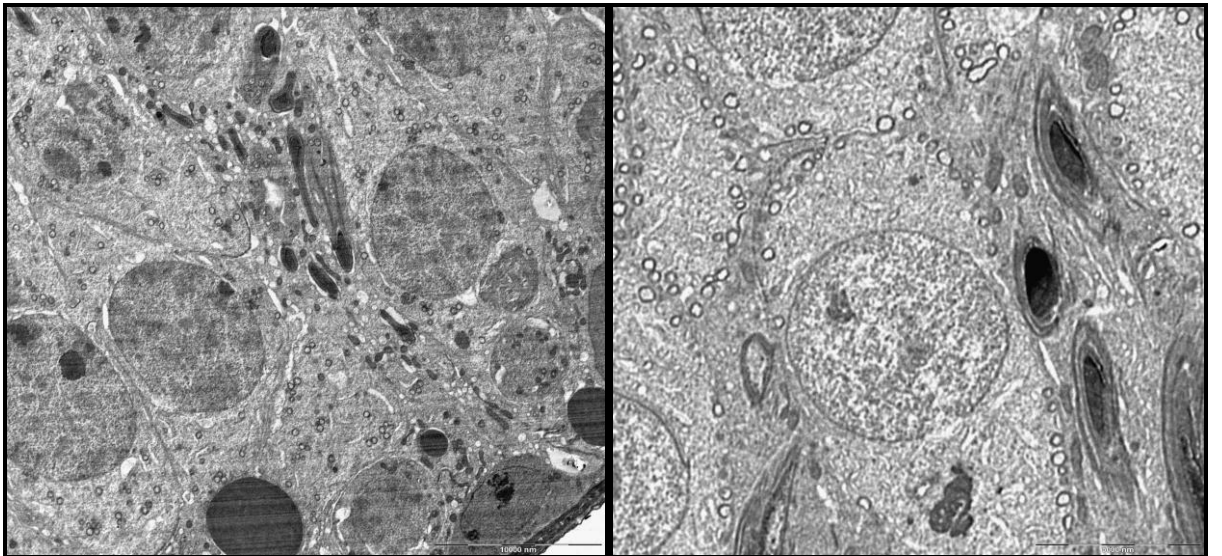
Şekil 32: ND grubuna ait kesit

Epo düşük doz tedavi grubunda bazal membranın normal kalınlıkta olduğu, hücreler arasındaki boşlukların azaldığı görüldü. Sertoli hücrelerinde vakuolar alanların azaldığı gözlenmiştir.



Şekil 33: Epo düşük doz tedavi grubuna ait kesit.

Epo yüksek doz tedavi grubunda kontrol ve sham gruplarıyla benzer sonuçlar görülmüştür. Normal bazal membran ve normal yapıdaki leydig hücreleri görülmekteydi. Normal morfolojideki spermatogenik seri hücreleri, hücreler arasındaki sıkı bağlantılar düzgün yapıdaydı.



Şekil 34: Epo yüksek doz tedavi grubuna ait kesit.

5. TARTIŞMA

İnsanoğlu yeryüzünde var olmaya başladığı zamanlardan günümüze kadar hiçbir zaman akıl ve fiziki sınırlarını kabullenmemiş, ruhsal ve bedensel sınırlarını aşmaya çalışmış, bazen de gücünü üst düzeylere çıkarabilmek, beceri ve yeteneklerini geliştirmek için bazı maddeler kullanmışlardır (85). Bütün bunları gerçekleştirirken her zaman bir takım takviye edici maddeler kullanmışlardır. Örneğin MÖ 300 yılında Yunanistan'da sporcuların mantar yedikleri Güney Amerika yerlilerinin koka yaprağı çiğnedikleri, kendir ve kava (karabiberden elde edilen bir madde) gibi maddeler kullandıkları kaynaklarda belirtilmektedir (86). Günümüzde de sporcularda rekabet ve fiziksel performansı arttırmak için doping amaçlı ergojenik madde kullanılma oranı da artmaktadır (87).

Dünyada spor tarihi boyunca özellikle atletizm, halter ve vücut geliştirme sporu ile uğraşan genç yaştaki bir çok sporcunun doping amacıyla “Anabolik Androjenik Steroid” (AAS)’leri yoğun olarak kullandığı bilinmektedir. Günümüzde çözüm bekleyen bu durum maalesef halen bir problemdir. Bu maddeler atletik performansı arttırmak için doping amaçlı ya da kas kitlesini arttırmak için kullanılırlar (1).

Daha önce yapılan bir araştırmada sporcuları doping kullanımlarındaki birincil amaç performansı arttırmak ve fiziksel görünümü güzelleştirmek olduğu belirtilmiştir (88).

Bir araştırmada, steroid kullananların en az kokain kullananlar kadar yaygın olduğunu, hatta steroidlerin halüsinojenik haplardan daha çok kullanıldığını ortaya çıkartmıştır. Araştırmalar, steroidlerin tedavi dışı kullanım hızının gün geçtikçe arttığını göstermektedir (89).

Sporcular, anabolik steroid grubu maddeleri almakta ısrar etmektedirler. Gençler ise anabolik steroidleri, sportif performanslarının çoğaltılmasının dışında fiziksel görünüşlerinin de daha iyi olması amacıyla kullanmaktadır. Ayrıca bu olay yetişkinlerde de görülmektedir (88).

Anabolik-androjenik steroid (AAS) bileşenleri testosteronun sentetik analoglarıdır ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılırlar (2). Atletler tarafından kullanılan bu bileşenlerin dozları ve kombinasyonları tedavi edici dozlarından çok daha yüksek dozlardadır. Bu bileşenlerin yüksek dozları insanların ve hayvanların seksüel davranışlarında, fizyolojilerinde ve sperm kalitelerinde değişiklikler meydana getirdikleri kanıtlanmış (1,3), ancak testis dokusundaki değişikliklere daha az odaklanılmıştır (4,5).

Biz de çalışmamızda bir anabolik androjenik steroid olan Nandrolone decanoate'nin testis dokusuna verdiği zararı ışık mikroskopik, ultrastrüktürel ve biyokimyasal olarak çalışmayı amaçladık.

Takahashi ve ark. AAS kombinasyonları ile yaptıkları çalışmada seminifer tübül lümeninde skar dokusu, sertoli hücresi ve leydig hücrelerinin sayısında azalma ayrıca leydig hücrelerini atrofik olarak gözlemlemişlerdir. Spermatogenik seri hücrelerinin bazal tabakadan ayrıldığı da gözlenmiştir (90). Bizim çalışmamızda da AAS grubunda seminifer tübüllerde yoğun dejenerasyonlar, birkaç tübülde atrofi, tübül lümeninde düzensizlik, lümende spermium hücresinin olmaması, seminifer tübül duvarındaki epitelde bozulma, spermatogenik seriye ait hücrelerde düzensizlikler, sayılarında belirgin azalmalar ve yine bu hücrelerde bazal laminadan ayrılmalar, tübülün karakteristik yuvarlak yapısında bozulmalar ve tübül lümeninde tıkanıklıklar saptadık.

Shokri ve ark. 2009 yılında yaptıkları çalışmada 170-200 gr. ağırlığında Wistar albino cinsi ratları kontrol, sham, ND, egzersiz ve ND+egzersiz grubu olmak üzere 5 gruba ayırmışlardır. ND grubuna 8 hafta boyunca 10 mg/kg/hafta ND uygulanmış, egzersiz grubuna ise günde 1 saat haftanın 5 günü egzersiz yaptırılmıştır. Çalışmanın amacı testis dokusunda egzersizle birlikte ND uygulanan grupta immünpozitif hücrelerin artış gösterip göstermediğini gözlemlemektir. Apoptozu belirlemek için TUNEL ve aktif kaspaz 3 boyamaları yapılmış ayrıca elektron mikroskopik olarak da çalışılmıştır. Sonuçta ND+egzersiz grubu, kontrol, sham ve ND gruplarıyla kıyaslandığında; ND+egzersiz grubunda germ hücrelerinde immünpozitif hücrelerin artış gösterdiği gözlemlenmiştir. ND grubuyla kontrol ve sham grupları kıyaslandığında; ND grubunda immünpozitif hücre sayılarında anlamlı artış saptanmıştır. (91). Bizde çalışmamızda TUNEL ve aktif kaspaz 3 boyamalarında kontrol, sham ve epo gruplarıyla kıyaslandığında ND grubunda immünpozitif hücre sayılarında anlamlı artış saptadık.

Mesbah ve ark. yaptığı çalışmada sprague-dawley ratlara 3 mg/kg/hafta ve 10 mg/kg/hafta olmak üzere iki farklı doz ND 14 hafta boyunca uygulanmış ve testis dokusu üzerine etkileri ultrastrüktürel olarak çalışılmıştır. İnterisyal alandaki hücrelerin dejenere olduğu, bazal membranın kalınlaştığı ve seminifer tübül çapının azaldığı görülmüştür. Ayrıca sertoli hücrelerinde dejenerasyon ve apoptotik germ hücreleri gözlenmiştir (92). Bizde çalışmamızda bu çalışmayla benzer olarak ND grubunda spermatogenik hücre yapılarında

bozulma, hücre bağlantılarında dejenerasyon, sitoplazmada lipid damlacıkları ve veziküller, spermatid hücrelerinin stoplazmasında yoğun cisimcikler, sertoli hücrelerinde boş vakuolar alanlar, lipid damlacıkları ve mitokondrilerde vakuolizasyon gözledik. Ayrıca düzensiz ve kalınlaşmış bazal lamina, leydig hücrelerinde stoplazmik vakuolizasyon görülmüştür.

Michele ve ark. daha önce yaptıkları çalışmada yine bir anabolik androjenik steroid olan Testosterone propionate uygulanan ratlarda sadece leydig hücrelerindeki apoptozu göstermeyi başarmışlardır (93).

Chaves ve ark. yaptıkları çalışmada ND' nin antioksidan enzim sistemlerini de etkilediğini göstermişlerdir. 8 hafta boyunca 10 mg/kg/hafta ND uygulanan ratların kalp dokularında SOD ve GPx düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı sonuçlar bulunmuştur. (94). Bizde yaptığımız çalışmada bu çalışmayla paralel sonuçlar elde ettik. Çalışmamızda epo uygulanan grupların uygulanmayan gruplara kıyasla MDA düzeylerinin anlamlı derecede düşük , GPx düzeylerinin ise anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemledik.

Naraghi ve ark. yaptıkları elektron mikroskopik bir çalışmada intertisyel alanda bulunan leydig hücrelerinin sayısında azalma ve stoplazmik vakuolizasyonlar, seminifer tübül bazal membranında kalınlaşma ve düzensiz dalgalanmalar görülmüştür. Sertoli hücrelerinin sroplazmasında vakuolizasyon, lipid damlacıkları ve mitokondrilerde vakuolizasyon görülmüştür. Ayrıca birkaç apoptotik germ hücresi gözlenmiştir (95).

Son dönemlerde antioksidan özelliğe sahip maddelerin serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarına karşı gösterdikleri antiapoptotik etkileri pek çok araştırmacı tarafından çalışılmaktadır. Bu maddelerden biri de epo' dur.

EPO, esas olarak erişkin böbreklerindeki interstisiyel fibroblastlarda fetusta ise hepatositlerde üretilen bir glikoproteindir. Yapısı ısıya dayanıklı alfa globulindir. Yedinci kromozomda bulunan tek kopya gen olan insan EPO geni beş ekzon ve dört introndan oluşmaktadır. Son ürünü yaklaşık 30 kDal molekül ağırlığında, 165 aminoasitli bir peptiddir ve yaklaşık % 40'lık bölümü karbonhidrattan meydana gelmektedir. Dört tane glikolize olmuş zincire sahiptir, bunlardan 3 tanesi N-bağlı, bir tanesi de O-bağlı asidik oligosakkarit yan zincirlerdir. Glikolize bu zincirler EPO' nun biyolojik aktivitesi açısından önemlidir ve EPO'nun protein yapısını oksijen radikallerinden korumaktadır. Ayrıca, N ve O bağli zincirler olgun EPO üretimi ve salgılanması için gereklidir.

EPO reseptörü aracılığıyla, apoptozu sağlayan bad, bcl, kaspazlar gibi moleküllerin aktivitesini azaltarak apoptozu önlemeye çalışır.

Oksijen taşıma kapasitesi veya oksijen saturasyonunda azalma, doku hipoksisine neden olmakta ve EPO gen ekspresyonu meydana gelmektedir. Kandaki EPO konsantrasyonunun artması, kemik iligindeki eritropoezi uyarır ve sonunda oksijen temininde artış meydana gelir. Oksijen düzeyindeki artışın sonucunda, negatif bir etki ile aktif olan EPO geninin aktivasyonu azalmaktadır. EPO oksijen bağımlı yolla düzenlenen genlere önemli bir örnek olmaktadır. Bu durum da ROS temizlenmesi için önemli bir adımdır. Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre EPO sıçan dokularındaki MDA seviyelerindeki artışı inhibe ettiği ve antioksidan savunma mekanizmasını arttırmak suretiyle hücreleri hasara karşı korumaktadır (96). Bizde çalışmamızda EPO uygulanan grupların uygulanmayan gruplara kıyasla MDA düzeylerinin düşük, GPx düzeylerinin yüksek olduğunu gözlemledik.

Spermatozoa testis içerisindeyken immobil ve infertildir. Postgonadal değişim epididim içerisinde olur yani burada hareketlilik kazanır ve fertil hale gelir. Kobayashi ve ark. 2002 yılında yapmış oldukları çalışmada kültürü yapılan fare epididimisinin epo ürettiğini bulmuşlardır (97). Yamamoto ve ark. yaptığı çalışmada epo' nun leydig hücre fonksiyonunu iyileştirdiğini, epididimal sperm maturasyonunu ve sperm fertilizasyon kapasitesini arttırdığını belirtmişlerdir. (98).

Köseoğlu ve ark. 2008 yılında yaptıkları çalışmada 720' testis torsiyonundan sonra haftada 3 kez enjekte edilen 1000 IU/kg epo'nun testis torsiyonundan sonra olması gereken histopatolojik değişiklikleri engellediğini görmüşlerdir (99).

Ergür ve ark. daha önce yapmış oldukları çalışmalarında testiste 2 saat torsiyondan sonra intraperitoneal olarak 500 IU/kg EPO' nun olması gereken histopatolojik değişiklikleri engellediğini belirtmişlerdir. Testis spermatogenik seri hücrelerinde apoptozu belirlemek için TUNEL ve aktif kaspaz 3 yöntemini kullanmışlardır. Ayrıca SOD ve GPx düzeylerine bakılmıştır. Morfometrik olarak germinal epitelyum kalınlıkları ölçülmüş ve testiküler biyopsi skorlaması yapılmıştır. Sonuçlar bizim çalışmamızla uyumludur. TUNEL ve aktif kaspaz 3 boyamada torsiyon grubuyla epo tedavi grubu arasındaki immünpozitif hücreler kıyaslandığında hücre sayılarında anlamlı azalış bulunmuştur. Bizde çalışmamızda epo tedavi gruplarında ND grubuna kıyasla immünpozitif hücre sayılarında anlamlı derecede azalma gözlemledik. SOD ve GPx düzeylerinde de yine aynı şekilde torsiyon grubuyla epo tedavi grubu kıyaslandığında epo tedavi grubunun SOD ve GPx düzeylerinin anlamlı derecede

yüksek olduğu gözlenmiştir. Biz de çalışmamızda GPx düzeylerinin epo uygulanan tedavi gruplarında ND grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğunu gözlemledik. Morfometrik olarak ölçülen germinal epitelyum kalınlıklarında epo tedavi grubu torsiyon grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulgular elde edilmiştir. Bizde çalışmamızda germinal epitelyum kalınlık ölçümünde ND grubunda anlamlı derecede artış olduğunu saptadık. (100).

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmadan elde edilen verilere göre kas kitlesini arttırmak için kullanılan AAS'lerin testisde doku hasarı oluşturduğu, apoptozu ve oksidatif stresi arttırdığı sonucuna varılmıştır.

Literatürde Epo'nun ND' nin yarattığı hasara karşı koruyucu etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız literatürdeki boşluğu dolduracaktır.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın AAS hasarına karşı koruyucu önlemlerin alınması konusunda yol gösterici olacağı kanısındayız.

Kaynaklar

- 1- Clark AS, Harrold EV, Fast AS. Anabolic-androgenic steroid effects on the sexual behavior of intact male rats. *Horm Behav* 1997;31:35–46.
- 2- Vardar E., Vardar S. A., Tuğlu C., Anabolik androjenik steroidlerin kötüye kullanımı *Anadolu Psikiyatri Dergisi* 2002; 3:104-107
- 3- Wroblewska AM., Androgenic-anabolic steroids and body dysmorphia in young men. *J Psychosomatic Res* 1997;3:225–34.
- 4- Pope HG Jr, Katz D L. Psychiatric and medical effects of anabolic-androgenic steroid use. A controlled study of 160 athletes. *Arch Gen Psychiatry* 1994;51:375–8.
- 5- Koskinen E, Andersson M, Katila T. Effect of 19-norandrostenediolylaurate on testicular growth in colts. *Acta Vet Scand* 1997;38:51–7.
- 6- Pope HG, Brower KJ: Anabolic-androgenic steroid abuse. Sadock BJ, VA Sadock (eds.): *Kaplan and Sadock's Comprehensive Textbook of Psychiatry*'de, yedinci baskı, Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2000, s.1085-1095.
- 7- Barbara J. Attardi, Stephanie T. Page, Sheri A. Hild, Christopher C. Coss, and Alvin M. Matsumoto Mechanism of Action of Bolandiol (19-Nortestosterone-3 β ,17 β -Diol), a Unique Anabolic Steroid with Androgenic, Estrogenic, and Progestational Activities *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010 February 15; 118(3): 151–161. doi:10.1016/j.jsbmb.2009.11.008.
- 8- Sadler, T.W. Langman's Medikal Embriyoloji. Çev. Can Başaklar. 6. Basım. Ankara: Palme Yayıncılık, 1993.
- 9- Moore, K ve TVN Persaud. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Çev. EMİN ÖZTAŞ ve HAKKI DALÇIK. 6. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.
- 10- Odar, Prof.Dr.İbrahim. *Anatomi Ders Kitabı*. Ankara : Elif Matbaacılık, 1979.
- 11- Yıldırım, M. *İnsan Anatomisi*. İstanbul : Nobel Tıp Kitabevi, 2003. s. 210-214.
- 12- Gökmen G., N İçten. *Sistematik Anatomi*. İzmir : İzmir Güven Kitabevi, 2003. s. 531-546.
- 13- AL.Kierszenbaum. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Ankara : Palme Yayıncılık, 2006. s. 531-564.
- 14- A.Erkoçak. *Genel Histoloji*. İzmir : s.n., 1984. s. 138-160.

- 15- **Eroschenko, VP.** *Di Fiore's Atlas of Histology With Functional Correlations.* Ankara: Palme Yayıncılık, 2001. s. 251-265.
- 16- **LP Gartner, JL. Hiatt.** *Color Atlas of Histology.* China : WB Saunders Company, 2001. s. 435-458.
- 17- **Ross HM, Pawlina W.** *Histology A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology.* Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001. s. 647-789.
- 18- **Jungueira, LC ve Carneiro, J.** *Basic Histology.* New York : s.n., 2003. s. 359-375.
- 19- **Paker, Ş.** *Histoloji.* Bursa : Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1990. s. 448-467.
- 20- **Young B, Heath JW.** *Wheather's Functional Histology A Text and Colour Atlas.* New York : Williams & Wilkins, 2000. s. 286-432.
- 21- Guyton AC, Hall JE. *Tıbbi Fizyoloji.* Ankara : Nobel Kitap evi, 2005: 200-456.
- 22- Anafarta, K ve Bedük, Y. *Temel Üroloji-Ürogenital Sistemin Fizyolojisi.* 1. Baskı. İstanbul : Güneş Tıp Kitabevleri, 1998: 36-69.
- 23- Dere, F. *Anatomi Ders Kitabı.* Adana : Okullar Pazarı Kitabevi, 1989. s. 655-668. Cilt 2. Cilt.
- 24- <http://www.saglik.gov.tr/extras/aileplanreh/bolum7.pdf>. 05 04 2010.
- 25- Ikara S: Doping amacıyla kullanılan ilaçlar ve etkileri, Anti doping eğitimi, editors: Hincal A, Dalkara S. Sayfa: 49-55 Hacettepe Üniv. Ankara (1991).
- 26- Ergen E: Sporda ilaç kullanımının medikal ve etik yönleri. Anti doping eğitimi, editors: Hincal A, Dalkara S. Sayfa: 41-49 Hacettepe Üniv. Ankara (1991).
- 27- Ghaphery NA: Performance Enhancing Drugs. *Orthop Clin North Am*, 26: 433 (1995).
- 28- Norris, J.A., "FDA Warns: Steroids May Be Hazardous to Your Health," *Schools Without Drugs: The Challenge*, U.S.Department of Education, November 1987.
- 29- J.A., "Anabolic/Androgenic Steroids," *NIDA Research Monograph* 102,1990.
- 30- National Institute on Drug Abuse, "anabolic Steroids: Is Bigger Better or Just Big Trouble?," *NIDA Notes*, Spring /Summer 1989.
- 31- **AL.Kierszenbaum.** *Histoloji ve Hücre Biyolojisi.* Ankara : Palme Yayıncılık, 2006. s. 477-486.

- 32- Sinha Hikim A P, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X-H, Swerdloff R S. Spontaneous germ cell apoptosis in humans : evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endoc and Metab*, 83:152, 1998.
- 33- Sharpe R M: Regulation of spermatogenesis. In *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E, Neill J D. Raven Press. New York, pp: 1364-1434, 1994.
- 34- Beumer T L, Roepers L H, Gademan S U, Lock M T W, Tycho K B, Kal H B, Rooij D G. Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development*. 56:353-359, 2000.
- 35- Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol*. 86:598-606, 2000.
- 36- Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil*, 95: 825-830, 1992.
- 37- Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic Cell Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research*. 40: 351-356, 1996.
- 38- Davis J R, Firlit C F. The germinal epithelium of cryptorchid testes, experimentally induced in prepubertal and adult rats. *Fertil Steril*. 17: 187-200, 1986.
- 39- Tapanainen J S, Tilly J L, Vihko K K, Hsueh A J W. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis : gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*, 7:643-650, 1993.
- 40- Mehmet Guneya, Baha Orala, Hilmi Demirin: Fallopian damage induced by organophosphate insecticide methyl parathion, and protective effect of vitamins E and C on ultrastructural changes in rats. *Toxicol Ind Health*. 2007 Aug;23 (7): 429-38.
- 41- Kiess, W ve B Gallaher. «Hormonal control of programmed cell death apoptosis.» *Eur J Endocrine* 18 (1998): 482-491.
- 42- Majno, G ve I Joris. «Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death.» *Am J Pathol* 146 (1995): 3-15.

- 43- Thompson, C. B. «Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.» Science 267 (1995): 456-1462.
- 44- Ameisen, J S. «The origin of programmed cell death.» Science 272 (1996): 1278.
- 45- Kerr, JFR, AH Wyllie ve AR Currie. «Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics.» Br J Cancer 26 (1972): 239-245.
- 46- Brouckaert, G, et al. «Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production.» Molecular Biology of the Cell 15 (2004): 1089-1100.
- 47- Willingham, MC. «Cytochemical methods for the detection of apoptosis.» The Journal of Histochemistry & Cytochemistry 47 (9) (1999): 1101-1109.
- 48- KUMAR, VINAY, ABUL K. ABBAS ve NELSON FAUSTO. ROBBINS AND COTRAN PATHOLOGIC BASIS OF DISEASE. 7. Baskı. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005.
- 49- Barisic, K, J Petrik ve L Rumora. «iochemistry of apoptotic cell death.» Acta Pharm. 53 (2003): 151-164.
- 50- Ulukaya, E. «Apoptozis Ders Notları.» 11 4 2003. 19 8 2010 <http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf>.
- 51- Elmore, S. «Apoptosis: A review of programmed cell death.» Toxicol Pathol 35 (4) (2007): 495-516.
- 52- Balakumran, A, GA Champbell ve MT Maslen. «Calcium channel bloklers induce thymic apoptosis in vivo rats.» Toxicol Appl Pharmacol 139 (1996): 122-127.
- 53- Cohen, JJ. «Apoptosis.» Immunol Today 14 (1993): 126-130.
- 54- Wyllie, AH. «Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.» Nature 284 (1980): 555-556.
- 55- Lu, J, et al. «Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis.» Spine 25 (2000): 1859-1866.
- 56- Sheikh, MS ve Aj-Jr Fornace. «Role of p53 family members in apoptosis.» J Cell Physiol 182 (2000): 171-181.
- 57- Mountz, JD ve T Zhou. «Apoptosis and autoimmunity.» Kopman, WJ. A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions. Lippincott-William&Wilkins, 2001.

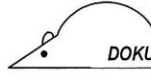
- 58- Ow, YP, et al. «Cytochrome c: functions beyond respiration.» *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol 9 (2008): 532-542.
- 59- Öktem, S, MH Özlem ve D Özdol. «Apoptozisin önemi.» *Toraks Dergisi* 2.1 (2001): 91-95.
- 60- Solakoğlu, Z. «Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni.» *Klinik Gelişim* 22.3 (2009): 20-25.
- 61- Donoghue, S, et al. «Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma.» *Cancer Research* 59 (1999): 5386-5391.
- 62- Donepudi, M ve MG Grutter. «Structure and zymogen activation of caspases.» *Biophysical Chemistry* 101 (2002): 145-153.
- 63- Hengartner, MO. «The Biochemistry of Apoptosis.» *Nature* (2000): 407.
- 64- Krahenbuhl S, Talos C, Lauterburg BH, Reichen J. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. *Hepatology* 1995;22: 607-12.
- 65- Tahan V, Ozaras R, Canbakan B, Uzun H, ve ark. Melatonin reduces dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. *J Pineal Res* 2004;37: 78-84.
- 66- Kawada N, Seki S, Inoue M, Kuroki T. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupffer cells. *Hepatology* 1998;27: 1265-1274.
- 67- Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998; 11: 342-346.
- 68- Mercan U. Toksikolojide serbest radikallerin önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 2004; 15: 91-96.
- 69- Jelkman W. Erythropoietin research 80 years after the initial studies by Carnot and Deflandre. *Respir Physiol.* 1986; 63: 257-66.
- 70- Moritz K.M., Lim G.B., Wintour E.M.: Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis, *Am. J. Physiol.* 1997;273: 1829-1844.
- 71- Krantz S.B.: Erythropoietin, *Blood*. 1991; 77: 419-34.
- 72- Bauer C, Koch KM, Scigala P., Wiecezorec _: Erythropoietin; *Molecular Physiology and Clinical Application.* 1994; pp: 365-375.
- 73- Erslev AJ: *Hematology*, McGraw-Hill Book Company, 3.ed. 1986: 365-76; 1634-1636.

- 74- Olsen NV. Central nervous system frontiers for the use of erythropoietin. Clin. Infect. Dis. 2003;37: S323-S330.
- 75- Eckadt K.U., Boutellier U., Kurtz A., et al: Rate of eritropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. J. Appl Physiol 1989; 66: 1785-8.
- 76- Malek A., Sager R., Eckardt K.U., Bauer C., Schneider H.: Lack of transport of erythropoietin across the human placenta as studied by an in vitro perfusion system, Pflugers Arch.1994;427: 157-61.
- 77- Thomas R.M., Canning C.E., Cotes P.M., Linch D.C., Rodeck C.H., Rossiter C.E., Huens E.R.: Erythropoietin and cord blood hemoglobin in regulation of human fetal erythropoiesis, Br J Obstet Gynaecol.1983; 90:795-800.
- 78- Rizzo DJ., Seidenfeld J., Piper M., Aronson N., Lichtin A., Littlewood T. Erythropoietin: A Paradigm for the development of practice guidelines, American Society of Hematology, 2001.
- 79- Lin F-K, Suggs S., Lin C-H., Cloning and expression of the human erythropoietin gene proc. Natl. Acad Sci USA, 1985; 82: 7580-7584.
- 80- <http://www.androloji.org.tr/images/File/28.Say%C4%B1%20pdf/11.pdf>. 09.09.2009.
- 81- Glass J, Mundy AR. Male reproductive system, In: Standring S, editors. Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice. 39. baskı, İspanya, Elsevier churchill livingstone, 2005, 1305.
- 82- Jungueira, LC ve Carneiro, J. Basic Histology. New York 2003: 359-375.
- 83- http://www.harunyahya.org/bilim/hy_insanin_yar_mucizesi/insaninyaratilisi3.html. 12.09.2010.
- 84- <http://kcampbell.bio.umb.edu/lectureI.htm> 05.01.2010.
- 85- Baysaling Ö. *Sporda Her Yönüyle Doping*. Birinci Basım, İlpress Basım & Yayın. 2000; 89-107.
- 86- Atasü T, Yücesir İ. *Doping'in Tarihçesi*. In: Atasü T., Yücesir İ. ed. Doping ve Futbolda Performans Artırma Yöntemleri. Türkiye Futbol Federasyonu Yayınları. İstanbul. 2004; 25-38.
- 87- Jenkins P. Doping in sport. *The Lancet*, 2002; 360: 99- 100.
- 88- Baysaling. Ö., *Sporda Her Yönüyle Doping*. 2000. s:53

- 89- Perry, Paul, J PhD; Lund, Brian C Pharm D, MS; Deninger, Michael J PhD; Kutscher, Eric C PharmD; Schneider, Justin PharmD Anabolic Steroid Use in Weightlifters and Bodybuilders: An Internet survey of Drug Utilization. *Clinical Journal of sport Medicine*. 15(5): 326-330, September 2005.
- 90- Takahashi M., Tatsugi Y., Kohno T. Endocrinological and pathological effects of anabolic androgenic steroid in male rats. *Endocrine Journal* 2004, 51 (4), 425-434.
- 91- S. Shokri, R. J. Aitken, M. Abdolvahhabi, F. Abolhasani, F. M. Ghasemi, I. Kashani, S. Ejtemaeimehr, S. Ahmadian, B. Minaei, M. A. Naraghi and M. Barbarestani. Exercise and Supraphysiological Dose of Nandrolone Decanoate Increase Apoptosis in Spermatogenic Cells. *Nordic Pharmacological Society. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2009, 106, 324–330.
- 92- S.F. Mesbah, S. Shokri, S. Karbalay-Doust, H. Mirkhani. Effects of Nandrolone Decanoate on Ultrastructure of Testis in Male Adult Rats. *Iran J Med Sci* 2008; 33(2): 94-100.
- 93- Feinberg MJ, Lumia AR, McGinnis MY. The effect of anabolic- androgenic steroids on sexual behavior and reproductive tissues in male rats. *Physiol Behav* 1997; 62:23-30.
- 94- Elen Aguiar Chaves, Pedro Paulo Pereira-Junior, Rodrigo Soares Fortunato, Masako Oya Masuda, Antonio Carlos Campos de Carvalho, Denise Pires de Carvalho, Marcus F. Oliveira, Jos'e Hamilton Matheus Nascimento. Nandrolone decanoate impairs exercise-induced cardioprotection: Role of antioxidant enzymes. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 99 (2006) 223–230.
- 95- M.A. Naraghi, F. Abolhasani, I. Kashani, I.J. Anarkooli, M. Hemadi, A. Azami, M. Barbarestani, R.J. Aitken, S. Shokri. The effects of swimming exercise and supraphysiological doses of nandrolone decanoate on the testis in adult male rats: a transmission electron microscope study. *Folia Morphol.*, 2010, Vol. 69, No. 3.
- 96- Bruno Sepodes, Rui Maio, Rui Pinto, Edward Sharples, Pedro Oliveira, Michelle McDonald, Muhammad Yaqoob, Christoph Thiemermann and Helder Mota-Filipe. Recombinant human erythropoietin protects the liver from hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *European Society for Organ Transplantation* 19 (2006) 919–926.

- 97- Toshihiro Kobayashi, Haruko Yanase, Toshihiko Iwanaga, Ryuzo Sasaki, Masaya Nagao. Epididymis is a novel site of erythropoietin production in mouse reproductive organs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296 (2002) 145–151.
- 98- Y. Yamamoto, N. Sofikitis, I. Miyagawa, Effects of erythropoietin bromocryptine and hydralazine on testicular function in rats with chronic renal failure, *Andrologia* 29 (1997) 141–144.
- 99- Köseoğlu B., Yılmaz E., Ceylan Y., Uzun E., Bayram İ., Hızlı F., The protective effect of erythropoietin infusion on testicular torsion/detorsion: an experimental study. *Int Urol Nephrol* (2009) 41:85–91.
- 100- Ergur B., Kiray M., Pekcetin C., Bagriyanik A., Erbil G. Protective effect of erythropoietin pretreatment in testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Journal of Pediatric Surgery* (2008) 43, 722–728.

EK-1



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234
http://deu.edu.tr/idenyetik/

Toplantı No : 05/08/2011
Toplantı Tarihi : 15 Nisan 2011

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na

19/2011 Protokol No'lu; Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Doç.Dr.Kazım TUĞYAN'ın yürütücüsü olduğu "**Anabolik androjenik steroid uygulanmış erkek sıçanlarda eritropoietinin testis dokusu üzerine koruyucu etkilerinin incelenmesi**" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


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


Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı


Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye

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


Prof.Dr.Selman SÖKMEN
Üye

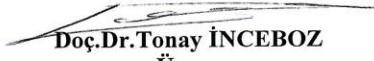
Prof.Dr.G.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye

Prof.Dr.Abdullah KUMRAL
Üye(topl.katılamadı)

Prof.Dr.A.Hüseyin BASKIN
Üye(topl.katılamadı)

Doç.Dr.Turna İLKNUR
Üye(topl.katılamadı)

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye


Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ
Üye

Vtr.Hekim Adnan SERPEN
Üye

Ayşe Nur BALIN
Üye

Doç.Dr.Şermin GENÇ
Üye (topl.katılamadı)

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

EK-2

ÖZGEÇMİŞ

IŞILAY SEZEN ERMİŞ

TC Kimlik No / Pasaport No:	
Doğum Yılı:	1987
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Inciraltı/İZMİR
Telefon :	0232- 412 45 66
e-posta :	sezenermis@msn.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	EGE ÜNİVERSİTESİ	FEN FAKÜLTESİ	Biyoloji	Lisans	2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

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

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Testis, Skrotum, Anabolik Androjenik Steroidler

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

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

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
------------	------------------	------

☐			
--------------------------	--	--	--

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--