

TC.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PERFLORODODEKANOİK ASİDİN TESTİSTE
OLUŞTURDUĞU HASARA KARŞI
RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

BURÇİN TUNA

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc- 2010970028

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PERFLORODODEKANOİK ASİDİN TESTİSTE
OLUŞTURDUĞU HASARA KARŞI
RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

BURÇİN TUNA

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Işıl TEKMEK

Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2012. KB. SAG.017
sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU. HSI. MSc- 2010970028

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı,
Yüksek Lisans programı öğrencisi Burçin TUNA' nın '**Perflorododekanoik Asidin Testiste
Oluşturduğu Hasara Karşı Resveratrolün Koruyucu Etkisinin Araştırılması**' konulu
Yüksek Lisans tezini 05/03/2013 tarihinde başarılı bulunmuştur.



Doç. Dr. Işıl TEKMEK

BAŞKAN



Prof. Dr. Gülgün OKTAY

ÜYE



Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR

ÜYE

Doç. Dr. Ülker SÖNMEZ

ÜYE (YEDEK)

Yard. Doç. Dr. Nilgün YENER

ÜYE (YEDEK)

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
TABLO DİZİNİ.....	viii
KISALTMA	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. TESTİS	7
2.1.1. Testisin Anatomisi	7
2.1.2. Testis Histolojisi	9
2.1.2.1. Skrotum	9
2.1.2.2. Testiküler Kapsül.....	10
2.1.2.3. Testisin Histolojik Yapısı	10
2.1.2.3.1. Tubulus Seminiferus Kontortus.....	11
2.1.2.3.2. Sertoli Hücreleri.....	12
2.1.2.3.3. Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenezis	14
2.1.2.3.3.1. Spermatogonyum.....	15
2.1.2.3.3.2. Primer Spermatositler	16
2.1.2.3.3.3. Sekonder Spermatositler	17
2.1.2.3.3.4. Spermatid.....	18
2.1.2.3.3.5. Olgun Spermium-Spermatozoon	20
2.1.3. Testis Fizyolojisi.....	22
2.2. APOPİTOZ VE NEKROZ	25
2.2.1. Elektron Mikroskopik Morfolojik Özellikler	26
2.2.2. Işık Mikroskopik Morfolojik Özellikler	27
2.2.3. Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri	28
2.2.4. Kaspaz Ailesi ve Apoptozdaki Rollerini	29
2.2.5. Spermatogenezis ve Apoptoz	31
2.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS).....	32
2.3.1. Ros'un hücreSEL substratları.....	33

2.3.1.1.	Lipitler	33
2.3.1.2.	Protein.....	34
2.3.1.3.	Karbonhidratlar.....	34
2.3.1.4.	Nükleik Asitler Ve DNA	34
2.3.2.	Antioksidanlar.....	34
2.3.3.	İnsan Semeninde Ros'un Kaynağı.....	35
2.3.3.1.	Lökosit	35
2.3.3.2.	Spermatozoon	35
2.3.4.	Spermatozoon Antioksidan Sistemi.....	36
2.3.5.	Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi	36
2.4.	RESVERATROL.....	38
2.4.1.	Resveratrolün Farmakolojisi.....	38
2.4.1.1.	Biyosentezi	38
2.4.1.2.	Resveratrolün biyotransformasyonu :	40
2.4.2.	Resveratrolün Vazodilatör Etkisi.....	41
2.4.3.	Resveratrolün Trombosit Agregasyon İnhibisyonu.....	41
2.4.4.	Resveratrolün Antiinflamatuvar Aktivitesi.....	41
2.4.5.	Resveratrolün Antioksidan Aktivitesi.....	42
2.4.6.	Resveratrolün Testis Üzerine Etkilerini Gösteren Çalışmalar	43
2.5.	PERFLORLU BİLEŞİKLER	43
2.5.1.	Genel Özellikleri.....	43
2.5.1.1.	Perflorlu Bileşiklerin Kullanım Alanları:	44
2.5.1.2.	Perflorlu Bileşiklerin Çevreye ve Besin Zincirine Katılma Yolları	44
2.5.1.3.	Perflorlu Bileşiklerin İnsanlara Sağlık Açısından Etkileri	44
2.5.2.	Perflorlu Bileşiklerin Türleri	45
2.5.2.1.	Perflorododekanoik asit (PFDoA,C12)	46
3.	GEREÇ VE YÖNTEMLER	48
3.1.	ARAŞTIRMANIN TİPİ	48
3.2.	ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI	48
3.3.	ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ / ÇALIŞMA GRUPLARI	49
3.4.	ÇALIŞMA MATERYALİ.....	49
3.5.	ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ.....	49

3.6.	VERİ TOPLAMA ARAÇLARI	49
3.6.1.	Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler	49
3.6.2.	Araştırmada kullanılan yöntemler	49
3.6.2.1.	Perflorododekanoik Asidin Hazırlanması.....	49
3.6.2.2.	Resveratrolün Hazırlanması.....	50
3.6.2.3.	Doku Örneklerinin Hazırlanması.....	50
3.6.2.4.	Rutin Doku Takibi	50
3.6.2.5.	Işık mikroskopik incelemeler	51
3.6.2.5.1.	Hematoksilen& Eozin Boya Protokolü	51
3.6.2.5.2.	Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü	51
3.6.2.5.3.	Masson Trichome Boya Protokolü	52
3.6.2.6.	Histolojik skrolama.....	52
3.6.2.6.1.	Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru	52
3.6.2.6.2.	Seminifer Tübül Çap Ölçümü.....	53
3.6.2.6.3.	Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü	53
3.6.2.7.	İmmunohistokimyasal incelemeler	53
3.6.2.7.1.	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling (TUNEL) Boyaması	54
3.6.2.7.2.	Active Caspase-3 Boya Protokolü	55
3.6.2.8.	Ultrastrüktürel İncelemeler	55
3.6.2.8.1.	Elektron Mikroskobu Doku Takibi.....	55
3.6.2.9.	Biyokimyasal incelemeler	56
3.6.2.9.1.	Malondialdehit Düzeylerinin İncelenmesi.....	56
3.6.2.9.2.	GSH (indirgenmiş glutatyon) Düzeylerinin Belirlenmesi	57
3.6.2.9.3.	Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzeylerinin Belirlenmesi	58
3.6.2.9.4.	Testosteron Düzeylerinin Belirlenmesi	58
3.7.	ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ	60
3.8.	VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	60
3.9.	ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI	60
3.10.	ETİK KURUL ONAYI.....	60
4.	BULGULAR.....	61
4.1.	HAYVAN AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	61

4.2.	IŞIK MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME	61
4.2.1.	Hematoksilen- Eosin Boyama	61
4.2.2.	PAS Boyama.....	66
4.2.3.	Masson Trichrome Boyama.....	73
4.3.	MORFOMETRİK BULGULAR.....	76
4.3.1.	Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru	76
4.3.2.	Seminifer Tübül Çap Ölçümü.....	77
4.3.3.	Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü	78
4.4.	İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR	79
4.4.1.	TUNEL Boyama.....	79
4.4.2.	Active Caspase-3 Boyama	84
4.5.	Elektron Mikroskopik Bulgular	87
4.6.	Biyokimyasal Bulgular	89
4.6.1.	MDA Değerleri.....	89
4.6.2.	GSH değerleri	90
4.6.3.	SOD Değerleri	91
4.6.4.	Testosteron Değerleri.....	91
5.	TARTIŞMA.....	93
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	99
7.	KAYNAKLAR.....	100
8.	EKLER.....	115

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 1. SPERMATOGENİK HÜCRELER VE SERTOLİ HÜCRELERİ	15
ŞEKİL 2. SPERMATOGENEZİSİN ŞEMATİK GÖRÜNÜMÜ	17
ŞEKİL 3. TESTOSTERONUN SENTEZİNİN BİYOSENTEZ AŞAMALARI	23
ŞEKİL 4. APOPTOZ / KASPAZ YOLU.....	31
ŞEKİL 5. REAKTİF NİTROJEN /OKSİJEN TÜRLERİ.....	33
ŞEKİL 6. OKSİDATİF STRES VE ERKEK İNFERTİLİTESİ	37
ŞEKİL 7. RESVERATROLÜN KİMYASAL YAPISI	38
ŞEKİL 8. FİNAL ÜRÜNDEKİ KARBONLARIN NERDEN GELDİĞİ RENKLENDİRME İLE GÖSTERİLMEKTEDİR	39
ŞEKİL 9. RESVERATROLÜN KANDA TAŞINMASI VE HÜCRE İÇİNE GEÇİŞ HİPOTEZİ	40
ŞEKİL 10. PERFLORODODECANÖİK ASİDİN KİMYASAL FORMÜLÜ	47
ŞEKİL 11. JONHSEN BİYOPSİ SKOR TABLOSU	53
ŞEKİL 12. TESTOSTERON STANDARTLARININ HAZIRLANMASI.....	59
ŞEKİL 13. BAŞLANGIÇ VE SON VÜCUT AĞIRLIKLARI.....	61
ŞEKİL 14. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS DOKUSU 10X H&E.	62
ŞEKİL 15. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS DOKUSU 20X H&E.	63
ŞEKİL 16. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X H&E.	63
ŞEKİL 17. SHAM GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X H&E.....	64
ŞEKİL 18. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X H&E	64
ŞEKİL 19. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X H&E.	65
ŞEKİL 20. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X H&E.	65
ŞEKİL 21. RESVERATROL+ASİT GRUBU 20X H&E.....	66
ŞEKİL 22. RESVERATROL+ ASİT GRUBU 40X H&E.....	66
ŞEKİL 23. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X (PAS).....	67
ŞEKİL 24. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X (PAS).....	67
ŞEKİL 25. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 100X (PAS).....	68
ŞEKİL 26. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 100X (PAS).....	68
ŞEKİL 27. SHAM GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X (PAS)..	69
ŞEKİL 28. SHAM GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X (PAS)..	69

ŞEKİL 29. SHAM GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 100X (PAS).	70
ŞEKİL 30. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X (PAS)..	70
ŞEKİL 31. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X (PAS)..	71
ŞEKİL 32. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 100X (PAS).	71
ŞEKİL 33. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X (PAS)..	72
ŞEKİL 34. RESVERATROL+ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X (PAS)..	72
ŞEKİL 35. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X (MASSON TRİCHROME).73	
ŞEKİL 36. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS KESİTLERİ 40X (MASSON TRİCHROME)..	74
ŞEKİL 37. SHAM GRUBUNA AİT TESTİS KESİTLERİ 20X (MASSON TRİCHROME) 74	
ŞEKİL 38. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X (MASSON TRİCHROME).	75
ŞEKİL 39. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X (MASSON TRİCHROME).	75
ŞEKİL 40. RESVERATROL+ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTLERİ 20X (MASSON TRİCHROME)..	76
ŞEKİL 41. TÜM GRUPLARIN JOHNSEN TESTİKÜLER BİYOPSİ SKORU ORTALAMASI.	77
ŞEKİL 42. TÜM GRUPLARIN SEMİNİFER TÜBÜL ÇAP ORTALAMASI.....	78
ŞEKİL 43. TÜM GRUPLARIN SEMİNİFER TÜBÜL BAZAL MEMBRAN ÇAP ORTALAMASI.....	79
ŞEKİL 44. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS KESİTLERİ 20 X (TUNNEL).	80
ŞEKİL 45. SHAM GRUBUNA AİT TESTİS KESİTLERİ 20X (TUNNEL).	80
ŞEKİL 46. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X (TUNNEL).	81
ŞEKİL 47. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X (TUNNEL).	81
ŞEKİL 48. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X (TUNNEL)..	82
ŞEKİL 49. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X (TUNNEL).	82
ŞEKİL 50. RESVERATROL+ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 20X (TUNNEL).. ..	83
ŞEKİL 51. RESVERATROL+ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X (TUNNEL).. ..	83
ŞEKİL 52. TÜM GRUPLARIN TUNNEL+ HÜCRE SAYILARI YÜZDESİ	84
ŞEKİL 53. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X. AKTİF KASPAZ-3.....	85
ŞEKİL 54. SHAM GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X. AKTİF KASPAZ-3.....	85
ŞEKİL 55. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS KESİTİ 40X. AKTİF KASPAZ-3.	86
ŞEKİL 56. RESVERATROL+ASİT AİT TESTİS KESİTİ 40X. AKTİF KASPAZ-3.	86

ŞEKİL 57. KONTROL GRUBUNA AİT TESTİS DOKUSUNUN İNCE KESİTİ.....	88
ŞEKİL 58. SHAM GRUBUNA AİT TESTİS İNCE KESİTİ.....	88
ŞEKİL 59. ASİT GRUBUNA AİT TESTİS İNCE KESİTİ.	89
ŞEKİL 60. RESVERATROL +ASİT GRUBUNA AİT TESTİS İNCE KESİTİ	89
ŞEKİL 61. TÜM GRUPLARIN ORTALAMA MDA DEĞERLERİ.	90
ŞEKİL 62. TÜM GRUPLARIN ORTALAMA GSH DEĞERLERİ.	90
ŞEKİL 63. TÜM GRUPLARIN ORTALAMA SOD DEĞERLERİ	91
ŞEKİL 64. TÜM GRUPLARIN ORTALAMA TESTOSTERON SEVİYELERİ	92

TABLO DİZİNİ

TABLO 1. FLOROKİMYASAL LİSTESİ	46
TABLO 2. SOD STOCK VE SAMPLE BUFFER	58

KISALTMA

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein

ICSH: İnterstisyel Hücre Stimule Edici Hormon

CAMP: Siklik Adenozin Monofosfat

SEM : Tarayıcı Elektron Mikroskop

Na⁺ : Sodyum

K⁺ : Potasyum

Cl⁻ : Klorür

Ca⁺² : Kalsiyum

tTG: Transglutaminaz

ICE: İnterlökin 1- β Dönüştürücü Enzim

AIF: Apoptoz İndükleyici Faktör

APAF-1: Apoptatik Proteaz Aktive Edici Faktör

Fas-1: Fas Ligand

TNF: Tümör Nekroz Faktör

ICAD: Kaspazla Aktifleşen Deoksiribonükleaz İnhibitörü

hCG: İnsan Karyonik Gonodotropin hormonu

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

DNA: Deoksiribonükleik Asit

NADH: Nikotinamid Adenin Dinukleotid

NADPH: Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat

FSH: Folikül Stimulan Hormon

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon

GPx: Glutasyon Peroksidaz

GRD: Glutasyon Reduktaz

GST: Glutasyon S- Transferaz

GSH: Glutasyon

CAT: Katalaz

TAK: Total Antioksidan Kapasitesi

ATP: Adenozin Trifosfat

RES: Resveratrol

H&E: Hematoksilen Eozin

LH: Luteinizan Hormon

MDA: Malondialdehit

SOD: Superoksitdismutaz

PAS: Periyodik Asit Schiff

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

DES: Dietilstilbesterol

HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

PFAAs: Perfluoroalkil asitler

PFOA: Perfluorooktanoik asit

PFOS: Perfluorooktane sülfat

PFDA: Perfluorodekanoik asit

PFDoA: Perflorododekanoik asit

TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji eğitimim boyunca daima yol gösterici olan, tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen, her konuda desteğini hissettiğim değerli danışman hocam Doç. Dr. Işıl TEKMEYEN'e,

Yüksek lisansa başvurduğum ilk gün dahi yanımda olan, tez çalışmalarımda desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR, Prof. Dr. Gülgün OKTAY'a

Yüksek lisans eğitimime katkılarını sağlayan Doç.Dr. H. Alper BAĞRIYANIK, Doç. Dr. Ülker SÖNMEZ, Doç. Dr. Çetin PEKÇETİN, Doç. Dr. Güven ERBİL, Prof. Dr. Kazım TUĞYAN'a

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen Dr. Seda ÖZBAL, Serap CİLAKER MICİLİ, biolog Sedef MENKÜ, Özcan ÜSTÜN ve Kerim GÜNDÜZ'e

Yüksek lisansa başladığım günden beri daima bilimsel ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım, Merve TÜTÜNCÜ, Nihan SEMERCİ, Nazım KUVVETLİOĞLU, Pınar AKOKAY, Nevin ERSOY, Gülşah BİTGÜL, Nergiz ŞEREF'e

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

PERFLORODODEKANOİK ASİDİN TESTİSTE OLUŞTURDUĞU HASARA KARŞI RESVERATROLÜN KORUYUCU ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

Burçin TUNA

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı,
Narlıdere, İzmir.**

ÖZET

Amaç:

Perflorododekanoik asit (PFDoA) geniş endüstriyel uygulamaları olan, insan ve hayvan serumunda tespit edilen ve erkek üreme sistemi üzerine olumsuz etkileri olan 12 karbonlu sentetik kimyasaldır.

Çalışmamızda PFDoA' nın, testiste oluşturduğu hasara karşı resveratrolün koruyucu etkisini histokimyasal, immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal olarak incelemeyi amaçladık.

Metot:

28 Sprague-Dawley suşu erkek sıçanlar (230-240g) dört gruba ayrıldı (n=7). Kontrol Grubu: Hiçbir müdahale yapılmayan grup (n=7). Sham Grubu: 14 gün boyunca 4ml/kg hacimde %5'lik alkol verilen grup (n=7). Asit Grubu: 14 gün boyunca oral gavaj ile 10mg PFDoA/kg /gün uygulanan grup (n=7). Resveratrol+ Asit Grubu: 14 gün boyunca oral gavaj ile 40 mg/kg resveratrol ve 10 mg PFDoA/kg /gün uygulanan grup (n=7). Deney başlangıcında ve bitiminde bütün deneklerin ağırlıkları ölçüldü ve 14. Günde kurban edildi. Histokimyasal incelemeler için hematoksilin & eozin (H&E), masson trikrom ve periyodik asit schiff (PAS), immünohistokimyasal olarak da apoptozun belirlenmesi için TUNEL ve Aktif Kaspaz- 3 boyamaları yapıldı. Biyokimyasal incelemeler için doku homojenatlarında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH) malondialdehit (MDA) ve serum testosteron düzeyleri incelendi. Ayrıca testis ince yapısı ultrastrüktürel düzeyde incelendi.

Bulgular:

Histolojik değerlendirmede kontrol ve sham gruplarına ait testis dokuları normal yapıda olduğu gözlenmiştir. Asit grubuna ait histokimyasal ve ultrastruktural incelemelerde seminifer tübülde vakuolizasyon, spermatogenik hücrelerde azalma, interstisyel alanda bağ doku artışı ve kalınlaşmış bazal membran gözlenmiştir. Resveratrolün koruyucu etkisine bakıldığında

resveratrol + asit grubunda normale yakın morfolojide testis yapısı gözlemlendi. İmmunohistokimyasal değerlendirmede, asit grubunda apoptatik hücre sayısında kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlemlenmiştir. Resveratrol + asit grubunda ise apoptatik hücre sayısında asit grubuna göre anlamlı azalma gözlemlenmiştir.

Biyokimyasal sonuçlarda, asit grubuna ait MDA seviyelerinde kontrol ve resveratrol+asit grubuna göre anlamlı artış gözlemlenmiştir.

Asit grubuna ait SOD seviyelerinde kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gözlemlenmemiştir. Resveratrol+asit grubunda ise kontrol, sham ve asit grubuna göre anlamlı artış gözlemlenmiştir.

Asit grubuna ait GSH seviyelerinde kontrol ve sham grubuna göre anlamlı azalma gözlemlenmiştir. Resveratrol+asit grubuna ait GSH seviyeleri asit, kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak artmıştır. Sham grubunda ise kontrol grubuna göre anlamlı artış gözlemlenmiştir.

Asit grubuna ait serum testosteron seviyeleri kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Resveratrol+asit ve sham grubundaki testosteron seviyeleri ise asit ve kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır.

Sonuç:

Elde ettiğimiz verilere dayanarak perflorododekanoik asidin (PFDoA) testiste doku hasarı oluşturduğu, oksidatif stresi ve apoptozu arttırdığı, koruyucu ajan olarak kullanılan resveratrolün oluşan doku hasarını ve biyokimyasal değişiklikleri azalttığını gözlemledik.

Anahtar kelimeler: PFDoA, Testis, Resveratrol

PROTECTIVE EFFECTS OF RESVERATROL AGAINST THE DAMAGE CAUSED BY PERFLUORODODECANOIC ACID ON MALE RATS.

ABSTRACT

Objective:

Perfluorododecanoic acid (PFDoA, C12), a synthetic perfluorinated chemical containing 12 carbons, has broad industrial applications and has been detected in sera from humans and other animals and has been shown to produce adverse effects on the male reproductive system.

In this study we aimed to investigate protective effects of resveratrol, against the damage Perfluorododecanoic acid (PFDoA) on male rat histologically, immunohistochemically, ultrastructural and biochemically.

Method:

28 Sprague-Dawley rats (230-240 g) were divided into four groups (n=7). Control Group: No application was performed to this animals (n=7). Sham Group: Orally dosed for 14 days 5% ethanol (4 v/w) (n=7). Acid Group: Orally dosed for 14 days with 10 mg PFDoA/kg/day (n=7). Resveratrol+ acid Group: Orally dosed for 14 days with 40 mg/kg resveratrol and 10 mg PFDoA/kg/day (n=7). Before the experiment and at the end of experiment, all rats were weighed and sacrificed on 14. Days. Testes tissue slides were stained with hematoxyline&eosine (H&E), Masson Trichrome and Periodic Acid Schiff (PAS) for histochemically. TUNEL and Active Caspase- 3 stains was performed to determine apoptosis immunohistochemically. Superoxide Dismutase (SOD), Glutathion (GSH), Malondialdehyde (MDA) levels and serum testosterone were evaluated biochemically. Also ultrastructural alterations were observed.

Result:

In histological evaluation, control group and sham group's testis tissues were observed normal. On acid group's histochemically and ultrastructural investigations showed that seminifer tubules showed vacuolization, deprivation of spermatogenesis cells and increase of connective tissue on interstitial area and thickened basale membran. No significant changes were seen in resveratrol+acid group which is protective effect of resveratrol. After immunohistochemical investigations apoptotic cell death was increased significantly in acid group compared with control group. In resveratrol+acid group, apoptotic cells decreased significantly compared with acid group.

According to biochemically results MDA levels in acid group showed a significant increase compare with control and resveratrol+acid groups.

SOD levels in acid group is compared with control group increased but not significant. SOD levels increased significantly in resveratrol+acid group compare with the control, sham, acid group.

Acid group's GSH levels decreased significantly compare with the control and sham group. Resveratrol+acid group's GSH levels increased significantly compare with the acid, control, sham group. Sham group's GSH levels decreased significantly compare with the control group. Acid group's serum testosterone levels decreased significantly compare with the control and sham group. Resveratrol+acid group's testosterone levels increased significantly compare with the acid and control group. Sham group's testosterone levels increased significantly compare with the control group.

Conclusion:

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

Key words: PFDoA, Testis, Resveratrol

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Perflorlu bileşikler, karbon zincirinde tüm hidrojenlerin flor ile değiştirildiği organo-flor bileşiklerdir. Perflorlu bileşikler büyük moleküler ağırlığa sahiptir ve molekülleri farklı en az bir atom ya da fonksiyonel grup içermektedir (1, 2, 3).

Dayanıklı, biyo-birikimli ve zehirli olan bu bileşiklerin birçok alanda etkin biçimde yararlanılmasının sebebi de uzun ömürlü olmalarıdır (2, 3, 4).

Tüketiciler tarafından kullanılıp atılan PFC içerikli ürünler, çöp sahalarından sızarak çevreye karışabilirler. Ayrıca, perflorlu bileşiklerin yağmur suyunda oluşan çökeltileri bu bileşiklerin toprağa karışmalarına sebep olmaktadır. Bu yüzden toprağın perflorlu bileşikler açısından önemli bir çevresel atık deposu olduğu düşünülmektedir (5). Kullanılan yangın söndürücü köpükler de bu kimyasalların çevreye sızmalarına neden olmaktadır. Ayrıca yüzeyi temizlenen ürünlerin (elbise, halı vs) ve bu kimyasalların endüstriyel süreçlerde kullanımı perflorlu bileşiklerin kentsel atık su arıtma sistemlerine karışmasına neden olmaktadır (6). Bu şekilde perflorlu bileşikler sudaki beslenme ağına karışırlar (7, 8).

Perflorlu bileşiklerin sağlık açısından oluşturduğu etkilerden bazıları; endokrin bozuklukları, öğrenme bozuklukları, infertilite gibi üreme sorunları, bağışıklık sistemi değişimleri, endometriosis, şeker hastalığı sıklığında artış şeklinde sıralanabilir (9). Hayvanlar ve gelişme çağındaki gençler, bu kimyasalların toksik etkilerinden en fazla zarar gören gruplardır. Bazı araştırmalar, bu kimyasalların pankreas, karaciğer, testis ve meme kanseri riskini arttırabileceğini işaret etmiştir. Hamilelikte düşük riski, kilo kaybı, tiroid problemleri, bağışıklık sisteminde zayıflık gibi farklı sorunlarda bu bileşiklerle ilişkilendirilmiştir (10).

Perflualkil asitlerden (PFCAs, $F(CF_2)_nCO_2$, $n \geq 7$) biri olan perflorododekanoik asit(PFDoA, $F(CF_2)_{11}CO_2$), 50 yıldan fazla, gıda paketlenme, yangın söndürme köpüğü, kozmetik, döşeme, surfaktan ve yüzey koruyucu gibi tüketici ve endüstriyel üretimde kullanılmaktadır (11).

Akut (14 gün) ve kronik (110 gün) çalışmalarda, PFDoA tarafından oluşan testosteron inhibisyonunun, kolesterol taşıma ve steroidogeneze sorumlu genlerin ekspresyonunda değişiklik ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (12, 13).

Fakat PFDoA' nın erkek hayvanlarda üreme toksisitesi ve ilgili mekanizmaları çok az bilinmektedir.

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma

sistemleri" veya kısaca "antioksidanlar" olarak bilinirler. Antioksidan savunma mekanizmaları hem intraselüler (superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, peroksidaz, ferritin) hem de ekstraselülerdir (transferrin, laktoferrin, seroloptazmin, haemopexin, haptoglobin ve albumin). Bazı serbest radikaller bu antioksidanlardan kurtulup, hasara yol açma yeteneğindedir (14, 15).

Antioksidan sistemde enzimatik (süperoksitdismutaz: SOD, Glutatyon peroksidaz/ Glutatyon reduktaz: GPX / GRD, Katalaz: CAT) ve enzimatik olmayan (Askorbat, Ürat, Vitamin E, pirüvat, taurin, hipotaurin) antioksidanlar mevcuttur. Bu antioksidanlar üç savunma mekanizması içerir. Bunlar; önleme, durdurma ve tamir etmedir (16, 17).

Resveratrol, 5-[(E)-2-(4-hydroxyphenyl)-ethenyl]benzene-1,3-diol veya trans-3, 5, 4'-trihydroxystilbene olarak da adlandırılan bir moleküldür. Mol ağırlığı 228. 25 g/mol olup kırmızı üzüm kabuğu, yerfıstığı, bazı bitkilerin sap ve köklerinde ve kırmızı şarapta bulunan resveratrol doğal bir polifenolik fitoaleksindir (18).

Resveratrolün değişik doz ve uygulama süreleriyle yapılan biyoyararlanım çalışmalarına göre; RES oral yolla alındıktan sonra hızla bağırsaklardan emilir ve bir saat gibi kısa sürede kana geçer ve karaciğer, böbrek, kalp ve beyin basta olmak üzere çeşitli organlara dağılır. Oral yolla 25 mg verildiğinde en az % 70' inin emildiği bildirilmiştir. Biyotransformasyonu asıl olarak karaciğer mikrozomlarında ve az miktarda da bağırsaklarda olur.

Resveratrolün emiliminin hızlı olduğu, dokulara kolay tasındığı ve büyük oranda idrar yolu ile atıldığı gösterilmiştir (19).

Resveratrolün sayılan etkilerinin yanında çeşitli hücrel ve moleküler etkileri de vardır. Çalışmalarda trans-resveratrol, dietilstilbesterol (DES) ve östradiolün yapısal benzerliklerinden ve resveratrolün fitoöstrojen olarak sınıflanmasını sağlayan östrojen yanıt sisteminini düzenlemesinden bahsedilmektedir (20, 21).

Bu bilgiler ışığında çalışmanın amacı; perflorododekanoik asidin (PFDoA) testiste oluşturduğu hasara karşı resveratrolün koruyucu etkisinin araştırmaktır. Resveratrolün doku düzeyindeki etkilerini gösterebilmek amacıyla testis dokusu, ışık mikroskopik, elektron mikroskopik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla SOD, GSH ve MDA değerleri ve biyokimyasal parametrelere ek olarak serum testosteron seviyeleri de incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS

2.1.1. Testisin Anatomisi

Testisler, erkekte temel üreme organı olup, sağlı sollu bir çift halde testis torbası (skrotum) denilen deri bir kese içinde funiculus spermaticus aracılığı ile asılı durumda bulunurlar. Testisler, uzun eksenleri yukarıdan aşağıya olup, yanlardan hafif basık ovoid organlardır. Beyaz görünümlü ve kendine özgü bir sertliğe sahip olan testislerin büyüklükleri kişiden kişiye değişmekle beraber, ortalama 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm genişliğinde, 2-3 cm kalınlığında ve 20-30 g ağırlığındadır. Sıcaklıkları vücut sıcaklığından 3-4 °C daha düşüktür. Testisler yaklaşık aynı büyüklükte olmalarına karşın, sağ testis sola göre % 10 daha ağırdır. (22, 23, 24, 25, 26). Sol funiculus spermaticus daha uzundur bu nedenle sol testis, sağ testisten biraz daha aşağı yerleşimlidir (26). Funiculus spermaticus içten dışa doğru fascia spermatica interna, m.cremaster ile fascia cremasterica ve fascia spermatica externa sarar (12). Testislerin skrotum içindeki duruşları boyuna koşut olmayıp, organın uzun eksenini yukarıdan aşağı ve önden arkaya eğik durumdadır (27).

Testisin spermatik arterleri kıvrıntılı olup buradaki kan spermatik venlerin pampiniform pleksusunda bulunan kana paralel fakat zıt yönde akmaktadır. Bu anatomik yapı, ısı ve testosteronun zıt akım değiş tokuşuna izin verebilir (28).

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler (22, 24, 25, 29, 30). Erken fetal dönemde karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yer alan testisler, fetus geliştikçe aşağıya doğru hareket ederek doğumdan hemen önce kanalis inguinalis yoluyla skrotuma inerler. Testislerin temel fonksiyonlarını yapabilmeleri için karın boşluğundan skrotuma inmeleri zorunludur. Testisler bu inişleri sırasında karın ön duvarı tabakalarını da sürüklerler. Bu yüzden şu tabakalar ile kaplıdır.

- a) Deri Skrotum
- b) Tunika dartos
- c) Fasia spermatika eksterna
- d) Fasia kremasterika
- e) Fasia spermatika interna
- f) Tunika vaginalis testis

Testisin fasia medialis (iç yan yüz) ve fasia lateralis (dış yan yüz) olmak üzere iki yüzü, margo anterior (ön kenar) ve margo posterior (arka kenar) olmak üzere iki kenarı, ekstremities

superior (üst uç) ve ekstremitas inferior (alt uç) olmak üzere de iki ucu vardır. İç yan yüzü konveks olup, arkada üst kenara yakın bir bölümünden başka, büyük bir parçası tunika vaginalisin visseral laminası ile örtülüdür. Dış yan yüz de konveks ve tunika vaginalis ile örtülü olup testisin üst kenarında olan epididim ile komşudur. Biraz konveks olan arka kenar boydan boya epididim ile komşudur. Ön kenar serbesttir ve tunika vaginalis testisin parietal laminası ile komşudur.

Üst uç epididim başı ile örtülü olup burasını saran Lamina visseralis (epiorchium), doğrudan doğruya epididim üzerine atlar ve burada bir oluk meydana getirir. Bu şekilde oluşan kaput epididimisin hemen altında küçük oval bir cisimcik vardır. Appendiks testis denilen bu çıkıntı müller kanalı üst ucunun bir kalıntısıdır. Kaput epididimisin üstünde genellikle appendiks epididimis denilen bir çıkıntı vardır. Bu ayrılmış bir duktuli efferentestir. Alt uca ligamentum skrotale denilen elastik ve düz kas liflerinden meydana gelmiş bir skrotal bağ ile skrotuma tutunmuştur (22, 24, 25, 31, 32).

Epididimis, testisin posterolateral yüzeyinde bulunan, yaklaşık 5-6 metre uzunluğunda ve tek tübülü kontortiden oluşan bir dokudur. Vas deferens, epididimal içeriği üretraya taşır ve 30-35 cm uzunluğunda, müsküler bir kanaldır. Testiküler arterler, aortadan çıkar ve iç inguinal halkaya ulaşabilmek için retroperitoneal bölgede bulunur. Testise girdiğinde internal arter, inferior testiküler arter ve epididimisin baş kısmına giden kapiller arter olmak üzere dallara ayrılır. Testiküler venler ise testiküler arterin çevresinde pampiniform pleksusu oluşturmaktadırlar (33).

Testis ve epididimis innervasyonu iki yolla olmaktadır. Bazı bir kısım sinirler renal ve aortik pleksuslardan çıkmakta ve gonadal damarlarla birlikte bulunmakta, diğer gonadal afferent ve efferent sinirler ise vas deferens ile birlikte pelvik pleksustan çıkmaktadırlar. Genitofemoral sinirin genital dalları da, parietal ve visseral tunika vaginalis ve skrotum duyarlılığını sağlamaktadırlar (33).

Testisler, arterlerini aorta abdominalisten alırlar. Arteria testikularis, testise varıncaya kadar karın boşluğunun büyük bir kısmını ve inguinal kanalı geçmek zorundadır. Testisin arka kenarından bezin içine sokulmakta ve mediastinum testiste birçok dallar vermektedirler. Bu dallar septula testisleri izleyerek bezin her tarafına dağılır ve zengin kapiller ağı yaparak testis kanalcıklarını sararlar. Venler duktus deferensin etrafında pleksus pampiniformis olarak adlandırılan bir ven ağı oluştururlar. Bu ağdan önce iki, sonra birer tane vena testikularis meydana gelir. Vena testikularis dekstra vena kava inferior'e, vena testikularis sinistra vena

renalis'e dökülür. Sempatik ve parasempatik lifleri; plexus cöliakustan arteria testicularis çevresinde bulunan plexus testikularis ile gelirler. Bu sinirler bezlerin çalışmasını kontrol etmektedirler.

Testislerin lenf damarlarına bakıldığında ise funikulus spermatikus'u izledikleri ve nodus lenfatikus ile birleştikleri görülür (22, 24, 30, 32).

2.1.2. Testis Histolojisi

Erkek üreme sistemi; üreme hücrelerini (spermatozoon) yaratan, temel üreme organı olan ve skrotum içinde bulunan bir çift testis ile bu hücreleri kadın cinsel üreme organına ulaştıran iletici yollar ve eklenti bezlerden oluşur.

İletici yollar(genital yollar); duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatorus ve üretra masculinadan oluşur. İletici yolların son bölümü erkeğin cinsel birleşme organı olan penis içinde yer alır. Eklenti genital bezler; salgılarını genital yollara boşaltan, ejakulat oluşumuna katkı sağlayan ve işlevsel olarak testisin ürettiği testosterona bağımlı bezlerdir.

Bunlar bir çift seminal vezikül, prostat ve iki bulboüretral bezden oluşan salgı bezleridir. (25, 34, 35). Testisler ekzokrin ve endokrin fonksiyonlu birleşik tübüler bezlerdir (6). Ekzokrin salgısı, spermium ve testis sıvısı, endokrin salgısı ise steroid yapılı olan testosteron hormonudur. Dolayısıyla testisler; üreme ve hormon salgılama gibi iki önemli işleve sahiptirler (36) .

Testisler karın boşluğunun dışında skrotum içinde yer alırlar. Bu yerleşimleri, testislerin vücut ısısından 2-3°C derece düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenezis 34°C-35°C'de olaylanır (37, 38).

2.1.2.1. Skrotum

Derisi; çok ince, melanin pigmenti içerdiğinden kahverengi renkte olan, ince kıllar, yağ bezleri (salgısı özel kokuda) ve çok bol ter bezleri bulunan, sinir sonlanmalarından zengin (kılın mekanik uyarılması ve ısı değişimlerine duyarlı) bir yapıdır. Deri altında yağ dokusu yoktur (ısı kaybı için uygun bir yapı), deri ile altında yer alan ince düz kas tabakası (dartos kası) arasında ince bir bağ dokusu vardır.

Skrotum, testis ısısının ayarlanmasında önemli rol oynar. Yapısal özellikleri (deri altında yağ dokusu olmayışı, damardan ve ter bezinden zengin oluşu) bu işlevine uygundur (29).

2.1.2.2. *Testiküler Kapsül*

Her bir testis, tunika albuginea denilen, düz kas hücreleri içeren düzensiz sıkı bağ dokudan bir kılıf ile çevrilidir (39). Bu kılıfı, testisin ön ve yan yüzlerinde peritondan köken alan, seröz bir kese olan, iki yapraklı tunika vaginalis örter (40). Tunika vaginalisin dış yaprağı skrotum duvarı, iç yaprağı tunika albuginea ile komşudur (41). Tunika albuginea, testisi koruyan bir kılıf olması yanında, içerdiği lifler ve düz kas hücrelerinin kasılmaları sonucu oluşturdukları basınçla seminifer tübüllerde oluşan spermiyumların, taşıyıcı kanallara yönelmesini sağlar (42). Tunika albuginea; dinamik bir kapsül olup, periyodik kasılma erkindedir. Bu kapsülün iç kısmı tunika vaskuloza adı verilen kan damarlarından zengin gevşek bağ dokusu katmanıdır. Tunika albuginea'nın testis içine doğru olan uzantılarının (septum) iç yüzünü de örter, dolayısıyla Tunika vasküloza bütün lobülleri dıştan sarar ve testisin intersitisyel dokusunu oluşturur (29, 38). Tunika albuginea, testisin arka yüzeyi boyunca organın parankiması içine sokularak üçgen biçimli bir kalınlaşma yapar. Buna mediastinum testis denir (43). Kan ve lenf damarları ve genital boşaltım kanalları mediastinumdan testise girer ve çıkar (41).

Testiküler kapsülün görevi; periyodik kontraksiyonlar yaparak testisin hacmini düzenlemek ve duktus sistemine masaj etkisi yaparak, spermiumların dışı doğru hareketinde yardımcı olmaktır (27, 29).

2.1.2.3. *Testisin Histolojik Yapısı*

Her bir testis, kapsülden ışınal olarak çıkan sıkı bağ doku bölmeleri (septula testis) ile yaklaşık 250 lopçuğa (lobuli testis) bölünmüştür. Lopçukların tabanları testisin dış yüzüne, tepeleri ise mediastinum testis'e bakar (44). Septalar tam olmadığından, piramit şekilli lopçuklar birbirleriyle ilişkilidir. Her bir lopçuk, seminifer tübül (tubulus seminiferi convolutus, tubulus seminiferus contortus) denilen; kör bir uçla başlayıp sayıları 1-4 arasında değişen kıvrımlı tübüller içerir (36). Tübüller, mediastinum yakınında sonlanırken lümenleri daralır ve düzleşirler. Bu bölüme düz tübül ya da tubuli rekti (tubulus seminiferi recti) denir (45). Testis içi boşaltım yollarından olan tubuli rekti; seminifer tübüller, mediastinumda anastomozlaşan kanallar sistemi olan rete testis'e bağlar (39). Buradan duktuli efferentes denilen, yaklaşık 10-12 adet kanal tunika albugineayı geçerek testis dışına çıkar. Kıvrıntılı olan bu kanallar birbiriyle birleşirler ve tek bir kanal olan duktus epididimis'i oluştururlar (42).

2.1.2.3.1. *Tubulus Seminiferus Kontortus*

Spermatogenezisin olaylandığı yapılar olan tubulus seminiferus kontortuslar; her biri yaklaşık 30-80 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapında iki ucu U biçiminde olan, rete testise açılan tüplerdir (46, 47). Tübüller; komşu tübülle birleşen, ikili-üçlü anastomatik lup biçiminde başlarlar. Tübülün iki kolu her zaman aynı lobül içinde bulunmaz ve septumun kesikli olduğu yerlerden 2 lobül arası bağlantı kurulur (29). Her iki testiste ortalama 1000 adet bulunur. Tübüllerin toplam uzunlukları yaklaşık 0,5 km kadardır ve testisin % 92' sini oluşturular (43).

Tubulus seminiferus kontortuslar bazal membran ile çevrilir (48). Germ hücreleri seminifer tubul içerisinde 4-7 hücre katmanlı kalın bir epitel oluşturur. Seminifer tübül epiteli; modifiye çok katlı kübiktir. Epitelin üzerinde yerleşik olduğu bazal lamina, elastik fibrillerden zengin olup yaşlandıkça yoğunluğu artar ve kalınlaşır (29). Bazal lamina üzerine oturmuş seminifer epitelde iki grup hücre bulunur.

1. Sertoli hücreleri
2. Spermatogenik hücreler (29)

Germ hücreleri tubulusun bazalinden lumenine doğru farklılaşır. Proliferasyonla hücreler lumene doğru itilir (49). Bazal membran üzerine oturan, geniş tabanlı Sertoli hücreleri ile bunların arasında yer alan çok sayıdaki spermatogonyumlar ilk sıradaki hücrelerdir (50). Sertoli hücreleri bazal laminadan tubulusun lümenine doğru uzanır (51, 52). Bazal membrandan ayrılan ve luminal yüze doğru yönelen spermatogonyumların büyümesiyle oluşan primer spermatositler en iri germ hücreleridir. Sekonder spermatositler, primer spermatositlerin yaklaşık yarısı kadardır ve bu hücreler luminal yüze doğru uzanmışlardır (49). Tubulusun lumenine ulaşmış olan küçük, yuvarlak spermatidler başkalaşım geçirmek üzere Sertoli hücrelerinin sitoplazma oyuntularına gömülürler ve bir süre sonra o türe özgü biçimlerini kazanarak, gelişmelerini tamamlamış spermatozoon olurlar (50). Farklılaşmasını tamamlayan spermatozoonlar epitel katmandan ayrılarak lumene geçer (49).

Bazal laminanın dışında peritübüler doku bulunur. Peritübüler doku tabakalar halinde yerleşmiş bağ dokusu fibrilleri ve fibroblastlardan oluşur. En iç kısımda (bazal laminaya yakın) yassı epitele benzer miyoid hücreler bulunur.

Miyoid hücre; kendi içinde doğan impulslarla kontraksiyonlar yapabilen, fakat gerçek düz kas hücresi olmayan hücrelerdir. Birbirlerine membranlarıyla tutunur, ancak makromoleküllerin seminifer tübüle geçişini tamamen engellemezler.

Peritübüler dokunun dışında geniş lenfatik kapillerler bulunur. Bu sebeple peritübüler doku ve lenf kapillerinin, seminifer tübül ve kan arasında madde değişimine bir engel oluşturduğu ileri sürülmüştür (29).

Tübüller arasındaki gevşek bağ dokuda, testosteron hormonu sentezleyen Leydig hücreleri, ince kollagen ve retiküler lifler, fibroblastlar, mast hücreleri, az sayıda makrofaj, lenfatik kapillerler, kan damarları ve sinirler bulunur. Testis lopçuklarını dolduran seminifer tübüller ile Leydig hücreleri testisin parankimasını oluştururlar (39, 45).

2.1.2.3.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücrelerdir (47). Bazal lamina üzerine oturan seminifer epitelin bütün kalınlığınca uzanan, yüksek boylu, piramidal şekildedirler (27, 29). Spermatogenetik hücrelere kıyasla az sayıda bulunurlar (47). Puberteden sonra, seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluştururlar (47). Germ hücreleri arasına, oldukça düzenli aralıklarla yerleşmişlerdir (29). Işık mikroskopunda incelendiğinde; oldukça düzensiz olan hücre sınırlarına sahip oldukları görülür. Sitoplazmaları saydam, nukleusları ince uzun, oluklu, hücrenin uzun eksenine paralel konumlu ve kromatince fakirdir. Bu nedenle nukleolus belirgin olarak seçilir (29, 47).

Elektron mikroskopunda incelendiğinde ise, apikal sitoplazmasında (tübül lümenine bakan) spermiumların yerleşimine uygun girintileri vardır. Sitoplazmasının yan uzantıları spermatogonyum ve spermatositler arasına uzanır. Böylece seminifer epiteldeki değişik tipteki hücreleri bir arada tutar (29).

Nukleus; düzensiz, kromatinden fakir, 1-2 adet özel yapıda belirgin nukleolus taşır. Organelleri çoktur; çok sayıda mitokondri, endoplazmik retikulum (bol agranüler, az miktarda granüler tip) ve salgı granülleri içerir. Ayrıca golgi kompleksi, ribozomlar, mikrofibriller ve zengin bir hücre iskeleti (vimentin, aktin, mikrotübüller) içerir (29, 47). Granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları, mikrotübülüs ve mikrofilamanları aracılığı ile farklılaşmasını tamamlayan spermiumların lümenine atılmasında rol oynarlar (44). Organellerin arasında lizozomların çok sayıda olması fagositik aktivitesine işaret eder. Spermatosit artıkları sertoli hücrelerince temizlenir. Sertoli hücreleri bazolateral bölgelerinde

birbirleriyle zonula okludenslerle bağlanarak, seminifer tübül lümenini (intratübüler aralık) çepeçevre kuşatan kesintisiz bir hücre tabakası oluştururlar (29, 47).

Sertoli hücreleri arasında bulunan zonula okludensler sayesinde; ekstratübüler aralıktan intratübüler aralığa (lümen) makromoleküllerin geçişi engellenir. Bu sebeple ekstratübüler aralıkta yer alan spermatogonyumlar dışındaki germ hücrelerinin proteinleri kana ulaşamaz ve bunlara karşı antikor yapılmaz. Peritübüler doku ve sertoli hücreleri; kan testis engelinin morfolojik temelidir (29). Bazolateral okludens bağlantıları seminifer epiteli bir bazal ve bir adluminal kompartmana bölerler ve gelişmekte olan spermatositleri otoimmün reaksiyondan koruyan kan-testis bariyeri olarak adlandırılan elemanları belirlerler (47). Kan-testis bariyeri; spermatogenezin daha ileri safhalarında oluşur ve germinal hücreleri kandan gelen zararlı ürünlere karşı korur. Spermatogonyumlar bu bariyerin alt kısmında (bazal kompartmanda) yerleşmiş olup kandaki maddelerden serbestçe yararlanabilmektedirler. Bu bariyer seminifer tübüllere immünoglobulinlerin de geçmesini önler, bu sayede serumlarında yüksek düzeylerde sperm antikorları bulunan hastalarda, herhangi bir fertilité bozukluğu görülmez. Kan-testis bariyeri bu şekilde seminifer epiteli herhangi bir otoimmün reaksiyondan da korur (46). Ek olarak, gelişmekte olan germ hücreleri lümene doğru hareket ederken bu engeli geçmelidirler. Bu durum olasılıkla engelde bozulma olmaksızın germ hücrelerinin yukarıdaki sıkı kavşakların ilerleyici yıkımına eşlik eden germ hücrelerinin aşağıdaki sürekli yeni sıkı kavşak oluşumu ile gerçekleşir. Seminifer tübül lümenindeki sıvı plazmadan tamamen farklı olup, çok az miktarda protein ve glukoz içermektedir; sıvı androjenler, östrojenler, K⁺, inositol, glutamik asit ve aspartik asit bakımından ise zengindir. Sıvının bu yapısının korunması muhtemelen kan-testis bariyerine bağlıdır (28).

Sertoli hücrelerinin seminifer tübüle sürekli boşalan salgısı sperm ilerleyişini kolaylaştırır ve androjen bağlayıcı protein testosteronu bağlayarak, seminifer tübül içinde testosteron birikimini sağlar (testosteron spermatogeneziste etkindir) (29).

Germ hücreleri, Sertoli hücreleri tarafından oluşturulan çevrede yaşadıkları için, sertoli hücreleriyle germ hücreleri arasında gerçekleşen parakrin uyarılar, germ hücre ölüm işlemini de düzenler. Germ hücre apoptozu; ya Sertoli hücre ön-yaşam faktörlerinde azalma ya da Sertoli hücre pro-apoptotik faktörlerinde artış veya her ikisi tarafından uyarılabilir (53).

Olgun testiste bölünme göstermeyen sertoli hücreleri, tüm seminifer epitel boyunca uzandığından tübülün yapısal düzenlemesinin korunmasında da etkilidir ve birçok etkenlere

karşı oldukça dayanıklıdır (ısı, radyasyon, toksik madde, infeksiyon, beslenme yetersizliği gibi) (29, 42).

Folikül uyarıcı hormon (FSH), sertoli hücrelerini etkileyerek spermatid olgunlaşmasındaki son evreleri kolaylaştırır ve ek olarak androjen bağlayıcı protein (ABP) yapımını da destekler (28). Bu protein testosteron ve dehidrotestosteron bağlayarak hormonların taşınmasını, seminifer tübüllerde yüksek yoğunlukta ve stabil olmasını sağlar (54).

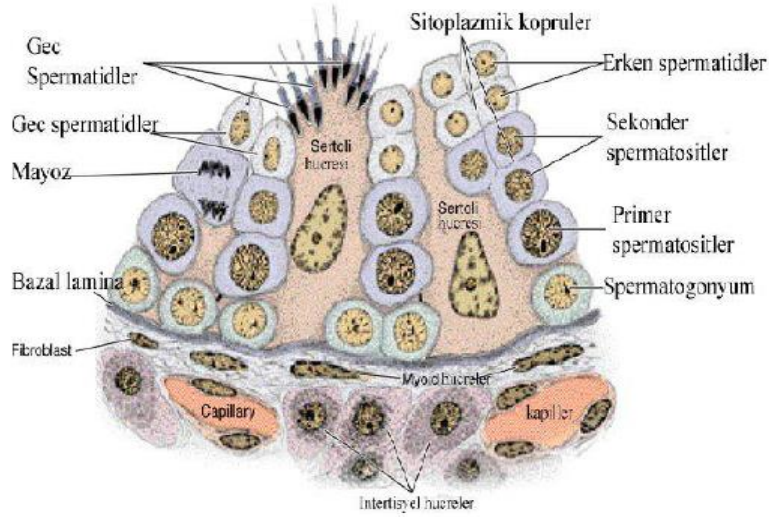
Sertoli hücreleri inhibin ve aktivin altünitelerini salgırlar. İnhibin hipotalamustan ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve FSH üzerine negatif feedback bir etki gösterir. Aktivin ise FSH salınımı üzerine pozitif feedback bir etki gösterir. Sertoli hücreleri puberteden sonra postmitotiktir. Erişkin testisinde mitotik hücre bölünmesi gözlenmez (47).

Sertoli hücreleri testiküler transferrin'i sentezler ve salgırlar. Demir bu madde sayesinde dış ortamdan alınarak üreme hücrelerine iletilir (55).

Özetle; androjenler (testosteron) ve FSH, gametogenezis (spermatogenezis) fonksiyonunun devamını sağlar. Adenohipofizden salınan luteinize edici hormon (LH) ya da interstisyel hücre stimüle edici hormon (ICSH) Leydig hücrelerinin testosteron salgılamalarını uyarır (54).

2.1.2.3.3. *Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenezis*

Spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasında dört ile sekiz katman olarak düzenlenmiştir. Üreme hücreleri ya da spermatogenik hücreler; sertoli hücreleri ile birlikte seminifer tübül epitelini oluşturan, düzenli olarak çoğalan ve olgun spermiyumlara farklılıklar gösteren hücrelerdir (38). Olgunlaşma aşamalarındaki bu hücreler; bazaldan lümene doğru spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatit ve spermiyum olarak sıralanır (şekil 1) (46).



Şekil 1. Spermatogenik hücreler ve Sertoli hücreleri (26)

Spermatogenezis, spermatogonyumdan olgun spermiyum oluşmasına değin geçen çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve başkalaşım evrelerini içeren bir süreçtir (39). Testiste spermatogenezis hormonal denetim altındadır. Spermatogenezis hipofizden salgılanan FSH (Folikül uyaran hormon) tarafından düzenlenirken, spermatogenezisin sürekliliği için gerekli olan ve Leydig hücrelerince salgılanan testosteron düzeyi de yine hipofizden salgılanan LH (Luteinize eden hormon) tarafından denetlenmektedir (42).

Spermiyum üretimi puberte ile başlar ve bir testiste günlük ortalama 50-150 milyon spermiyum üretilir. Olgunlaşma süreci 64 günde tamamlanır (55).

Spermatogenezis üç evreye ayrılır.

1) Spermatogonyal evre (Spermatositogenezis):

Spermatogonyumlar, mitoz bölünmelerle sayılarını arttıırırlar ve primer spermatositlere farklanırlar.

2) Spermatosit evresi (Mayoz bölünme):

Primer spermatositler ardı ardına iki mayoz bölünme geçirerek kromozom sayılarını ve DNA'larını indirgerler. Sonuçta haploid kromozoma sahip hücreler olan spermatidler oluşur.

3) Spermatid evresi (Spermiyogenezis):

Spermatidler olgun spermiyumlara farklanırlar (38, 45).

2.1.2.3.3.1. Spermatogonyum

Bazal bölgede bazal membran ile doğrudan ilişkide olan, 12 μ m çapında, diğer spermatogenik seri hücreleri içerisinde küçük, diploid spermatogenik hücrelerdir. Kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar (38). Spermatogonyal kök hücreden köken alırlar. Puberteye

değin dinlenmede kalıp, bu evrede testosteron hormonunun etkisiyle uyarılarak hücre döngüsüne girerler (46). Spermatogonyumlar çok sayıda bölünmeler geçirerek spermatogonyum serilerini oluştururlar. İnsanda yapısal olarak ayırt edilebilen üç tip spermatogonyum vardır.

Bunlar:

Koyu A Tipi (Ad) spermatogonyumlar

Açık A Tipi (Ap) spermatogonyumlar

B Tipi spermatogonyumlar

Açık A tipi spermatogonyumlar; B tiplerinden daha azdır. Oval veya yuvarlak şekillidirler. Bazal membran üzerine otururlar. Hücre şekliyle uyumlu yuvarlak ya da oval çekirdek ökromatiktir. Genelde tek bir çekirdekçik görülür. A tipi spermatogonyumlarda organeller sitoplazmada dağılmıştır; yuvarlak mitokondriyonlar çekirdek yakınında bulunur, belirgin Golgi kompleksi ve ribozomlar izlenir. Açık A tipi spermatogonyumlar depo hücrelerdir. Gerekğinde spermatogenezi başlatmak için devreye girerler (38, 42).

Koyu A tipi spermatogonyumlar; bazal membran ile bağlantıları daha fazla olan küçük, uzamış spermatogonyumlardır. Koyu bazofilik boyanan, oval heterokromatik çekirdek içerirler. Seminifer epitelin kök hücreleridir. Düzensiz aralıklarla bölünerek, yeni koyu ve açık A tipi spermatogonyumları oluştururlar (38, 42, 45).

Spermatogonyumların en yaygın bulunan tipi, B tipidir. Bunlar da bazal membrana otururlar. Ancak bazal membran ile bağlantıları daha azdır. Hücre çekirdeği yuvarlaktır ve merkezde yerleşmiştir. Çekirdekte bir ya da iki koyu boyanan çekirdekçik bulunur. Sitoplazmada A tiplerine karşın daha çok ribozom bulunur. Mitoz bölünme ile primer spermatositleri oluştururlar (38, 43).

Koyu ya da açık A tipi spermatogonyumlar kök hücrelerdir. Bölünerek yeni açık ve koyu A tipi spermatogonyumları yaparlar. Koyu A tipi spermatogonyumlar da B tipi hücreleri oluşturmak için bölünürler. B tipi spermatogonyumlar son mitoz bölünmelerinden sonra primer spermatositlere farklılaşırlar. Böylece spermatositogenezis tamamlanır ve mayoz bölünme evresi başlar (38, 45, 56).

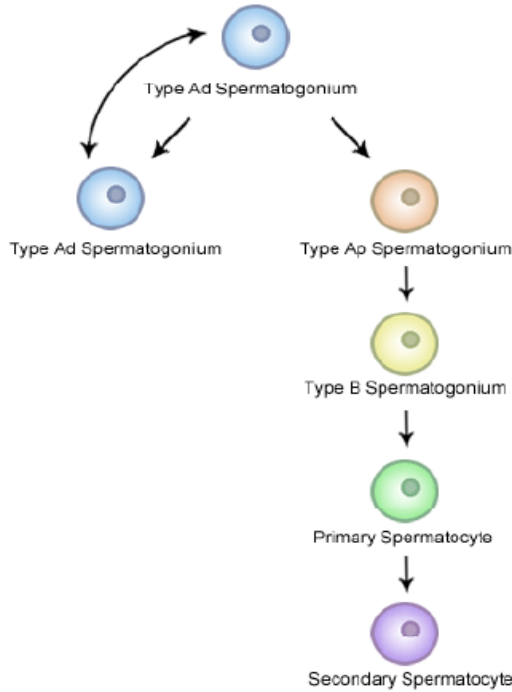
2.1.2.3.3.2. Primer Spermatositler

Primer spermatositler; spermatogenik serinin en sık görünen ve en iri hücreleridir. 18 µm büyüklüğündedirler, veziküler görünümlü belirgin bir çekirdek içerirler. Primer spermatositler başlangıçta 46 kromozom sayısına ve 2n DNA'ya sahiptirler. Kısa sürede

Mayoz I'in profaz evresine girerler ve DNA' larını $4n$ 'e çıkartırlar. Profaz evresi yaklaşık üç hafta (22 gün) sürer. Leptoten evresinde, kromozomlar uzun silindirik iplikçikler olarak izlenirler. Zigoten'de homolog kromozomlar yan yana gelirler. Pakiten evresinde, kısa kalın ve belirgin hale gelen kromozomlar dört kromatidden oluşan tetratları yaparlar. Diploten'de, homolog kromozomlar arasında crossing over denilen gen alışverişi gerçekleşir. Pakiten evresi insanlarda yaklaşık 16 gün sürer. Profaz aşamasından sonra çekirdek zarı ortadan kalkar ve homolog kromozomlar Metafaz I'de ekvatoryal düzlemde dizilirler. Anafaz I'de kutuplara çekilen ve birbirinden ayrılan iki kromatidli kromozomlar, Telofaz I'de haploid sayıda kromozom içeren iki adet sekonder spermatositi oluşturur. Sekonder spermatositler hızla komşu Sertoli hücrelerinin arasından geçerek adluminal bölgeye doğru yer değiştirmeye başlarlar (38, 42, 43, 45, 46).

2.1.2.3.3.3. Sekonder Spermatositler

Oluşan sekonder spermatositler küçük hücrelerdir ve yeniden DNA eşleşmesi yapmadan (interfaz evresine girmeden) doğrudan mayoz II' nin profaz evresine girdiklerinden, seminifer epitelde sık izlenemezler. Ortalama sekiz saatlik bir yaşam süreleri vardır. Sekonder spermatositteki kromatidler, bölünme sonunda ayrılarak her biri bir spermatide gider. Sonuçta n kromozom sayısına sahip 4 adet spermatid oluşur (şekil 2) (40, 43, 46).



Şekil 2. Spermatogenezisin şematik görünümü (26).

2.1.2.3.3.4. Spermatid

23 kromozom taşır. Spermatozit-2'nin yarısı büyüklüğe sahiptir. Birbirleriyle sitoplazmik bağlantı yapan sınırsız hücre kümesi oluştururlar. Primer spermatozit, sekonder spermatozit ve spermatidlerin arasında bulunan sitoplazmik köprüler spermatogenezin düzenlenişinde rol oynar, hücreden hücreye bilgi aktarılmasına olanak verir. Spermatogenez (spermatidin oluşumu) tamamlanınca bu köprüler kaybolur ve hücreler serbest hale gelir. Spermatid bölünmez, şekil değişikliği ile spermiuma dönüşür. Böylece spermatogonyumdan spermium oluşana kadar iki evre bulunur. Spermatogonyumdan spermatid oluşması spermatozitoz; spermatidin şekil değiştirerek spermiumu oluşturması; spermiogenezdir (29).

Spermiogenez; Küre ya da poligonal şekilde olan spermatidin sferik nükleusunun kromatini yoğun olup, merkezi yerleşimlidir. Çekirdeğe yakın iyi gelişmiş golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri ve bir çift sentriol bulunur.

Spermiogenezde yukarıda sayılan organellerin hepsinde değişim olmaktadır. Bu olay dizisi şu şekilde özetlenebilir;

1- Golgi Evresi: Golgi bölgesindeki küçük veziküllerde karbonhidrattan zengin granüller birikir (proakrozomal granül). Sonra granüllerin birleşmesiyle tek büyük bir granül oluşur, çevresel membranla kuşatılmış olan bu granüle akrozomal granül (akrozomal vezikül) denir. Golgi kompleksinden türeyen akrozomal vezikül çekirdeğe doğru ilerleyerek çekirdek dış zarına yapışır. Çekirdek yüzeyinde giderek büyüyerek, çekirdeği yarıya kadar örter. Akrozomal vezikülün içerdiği sıvı rezorbe olunca, büzülür ve çekirdeği kep gibi saran iki yapraklı kese durumuna geçer. Akrozomal maddelerin kep içinde dağılması ile yapısını tamamlar ve akrozomal kep (akrozom) adını alır. Akrozomda birçok hidrolitik enzim bulunur. Bu sebeple akrozom özel tip lizozom olarak yorumlanabilir. Bu enzimler korona radiata hücrelerinin ovumdan ayrılmasında ve zona pellusida'nın sindirilmesinde rol oynarlar.

2- Sentriollerin Yer Değiştirmesi ve Flagellumun Oluşması: Çekirdeğin bir kutbunda akrozom gelişirken karşı kutbunda sentrioller yerleşir. Çekirdeğe yakın olan sentriolden (bazal sentriol) silindirik bir flagellum uzanır. Flagellum uzadıkça çevresinde ince, fibriler bir kılıf oluşur. Flagellum spermiumun kuyruk kısmını yapar. Diğer sentriol (distal sentriol) kuyruğun başlangıç kısmına yakın bir yere göç ederek flagellumu bir halka gibi kuşatır (annulus).

3- Sitoplazmik Kayıp: Sitoplazmanın bir kısmı kuyruk ucuna doğru kayarak flagellumu kuşatır, geri kalanıda rezidual cisim şeklinde dışarıya atılır. Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir. Farklılaşma ilerledikçe sitoplazma fazlası atılmakta, sadece çekirdeği, orta parçayı ve flagellumu saran ince bir tabaka halindeki sitoplazması geride kalmaktadır. Sertoli hücrelerinin lizozomdan zengin oluşu, atılan sitoplazmanın sindirilmesini sağlar. Sertoli sitoplazması içinde sindirilemeyen lipid damlacıkları artık olarak birikir.

4- Mitokondrilerin Göçü: Mitokondriler bazal sentriol ve annulus arasına spiral olarak yerleşir. Böylece flagellumun ilk bölümü mitokondrial bir kılıf ile kuşatılır. Flagellumun fonksiyonu için, gerekli enerjiyi mitokondriler sağlar. Flagellum hareketi mikrotübüller arasındaki karşılıklı ilişki, ATP ve dynein denen proteinle ilgilidir. Spermium ayrıca erkek genital bezlerden seminal sıvıya verilen salgı içindeki karbonhidratları da enerji kaynağı olarak kullanmaktadır.

5- Nukleus Değişimi: Nukleus kromatini yoğunlaşmaya ve yassılaşmaya başlar. Hücre membranına doğru yer değiştirir. Nukleus akrozom ve çevresindeki az miktardaki sitoplazmayla birlikte spermiumun baş kısmını yapar. Akrozomal kepin arka kenarında nukleus çevresinde mikrotübüller silindirik bir bant oluşturur. Bu bant nukleusun ince uzun bir şekil alması ve yassılaşmasında rol oynar. Olgun spermatidlerde kuyruklar tübül lümenine doğru uzanır. Sertoli hücreleri tarafından lümen serbest bırakılan olgun hücrelere spermium (spermatozoon) denir. Bu sırada morfolojik olarak matur, fakat fonksiyonel olarak immatürdür. Hareketsizdir ve ovumu dölleme yeteneği sınırlıdır.

6- Olgunlaşmanın Son Adımı Olarak Kapasitasyon: Ejakülasyondan sonra (seminal sıvının boşalması) kadın organizması içinde fertilizasyondan az zaman önce spermde görülen enzimatik değişiktir. Kapasitasyon yaklaşık yedi saat sürer, morfolojik bir değişim olmaz (29).

Meydana geldiği düşünülen değişimlerin bazıları şöyledir;

- Uterus ve fallop kanallarında bulunan sıvılar, erkek genital kanalındaki sperm aktivitesini baskılayan ve ortadan kaldıran farklı inhibitör faktörleri yok eder.
- Spermatozoa erkek genital kanal sıvısında bulunduğu zaman sürekli olarak, seminifer tübüllerden gelen ve yüksek oranda kolesterol içeren birçok vesikülle karşılaşır. Vesiküllerdeki kolesterol devamlı şekildedir. Sperm akrozomunu çevreleyen membranının sağlamlaşması sağlanırken, enzimlerin serbestleşmesi engellenir. Ejakülasyon sonrası, vajinada depolanan sperm ve kolesterol vesikülleri uterus sıvısına katılır. Ardından birkaç

saat içinde kolesterolün büyük miktarda kaybolduğu görülür. Bu durumda spermin baş bölgesinde membran zayıflar.

- Aynı zamanda spermin baş bölgesindeki membranın kalsiyum iyonlarına karşı geçirgenliği artar. Kalsiyumun sperme büyük miktarlarda girişi flagellum aktivitesini değiştirir. Böylece eski güçsüz dalgalı hareketi yerine güçlü hareketlere başladığı görülür. Buna ek olarak kalsiyum iyonları akrozomun, baş bölümünde membranın intraselüler yapısında değişmelere neden olur. Akrozomun enzimlerini hızlı ve kolay olarak serbestleştirecek hale getirir. Bu değişim sayesinde doğru hareket eder, hatta ovumun zona pellusida bölgesine girmeye çalışır. Böylece kapasitasyon döneminde birçok değişiklik ortaya çıkar. Onlar olmadan, sperm fertilizasyon için ovuma gideceği yolu bulamaz (57).

Spermiumlar; seminifer tübül ve boşaltıcı duktus sistemi içindeyken hareketli değildir. Yani ilerlemesi sırasında flagellum hareketi yoktur. Spermium epididimise sertoli ve rete testis hücreleri tarafından salgılanan testiküler sıvı içinde taşınır. Seminifer tübül duvarında bulunan myoid hücrelerin, efferent tübüllerden itibaren duktus duvarlarında bulunan düz kas tabakasının kontraksiyonu, spermin ilerleyişinde yardımcıdır (29).

Spermatogenezi Uyarıcı Hormonal Faktörler

1- Testosteron: Testislerde interstisyumda yerleşim gösteren Leydig hücreleri tarafından salgılanır. Sperm oluşumunda germinal hücrelerin bölünmeleri ve gelişmeleri için gereklidir.

2- Luteinizan Hormon: Ön hipofiz bezinden salgılanır, Leydig hücrelerini uyararak testosteron salgılanmasını sağlar

3- Folikül Stimulan Hormon: Ön hipofiz bezinden salgılanır, Sertoli hücrelerini uyarır. Bu stimülasyon olmadan spermatidlerin spermilere dönüşümü (spermiogenez olayı) olanaksızdır.

4- Östrojen: Folikül stimulan hormon ile uyarılan sertoli hücrelerinde testosteron ile birlikte yapılır.

5- Büyüme Hormonu (ve diğer birçok hormon): Testislerin temel metabolik fonksiyonlarının kontrolü için gereklidir. Büyüme hormonu, özellikle spermatogonyumların erken bölünmesini hızlandırır (57).

2.1.2.3.3.5. Olgun Spermium-Spermatozoon

Silindirik biçimli, total uzunluğu 55-65 µm olan, hareketli hücrelerdir. Dört kısımdan oluşur:

1- BAŞ: 4-5 µm uzunluğunda, 2,5-3 µm genişliğinde ve 1µm kalınlığındadır (39).Yassı armut şeklindedir. Fusiform şekilli, kromatinden zengin çekirdeği ve akrozomal kepi (galea kapitis) taşıyan bölümdür (29). Çekirdeğin 2/3 ön kısmını akrozom örter (57). Hepsini dıştan hücre zarı kuşatır. Çekirdeğin yoğun olması hacmini küçültür, böylece hareketliliği artar (29).

Akrozomal membran çekirdek zarına yapışıktır (29). Özel tip bir lizozom olarak kabul edilen akrozom; akrozin denilen tripsin benzeri proteazlar, asit fosfataz, hyaluronidaz ve nöroaminidaz gibi hidrolitik enzimler içerir (42, 46, 50). Lizozomal enzimlerin akrozomda bulunuşu (hyaluronidaz dahil) fertilizasyonda yardımcıdır. Ovumu kuşatan zona pellusida; glikoprotein bir tabakadır ve hyaluronik asidi içerir (29).

2- BOYUN: Spermiyumun hareket merkezi olarak kabul edilen boyun parçası kısadır. Bir çift sentriyol içerir. Proksimal sentriyolden çıkan mikrotubuluslar 9+2 (kinosilyum) düzenlenimi ile aksonemi yaparlar. Aksonemin çevresi yoğun fibröz yapıda halkalarla çevrilidir. Bu bölgede sitoplazma artıkları gözlenir (42, 45).

3- ORTA PARÇA: Tipik flagellum ve mitokondrial kılıf bulunur (29).

4- KUYRUK: İnsanda 55 µm uzunluğundadır. Aksonem boyundan başlayıp kuyruğun son kısmına değin uzanır. Kuyruk üç parçadan oluşur; orta parça, esas parça ve son parça (38 42, 46)

Orta Parça (Pars intermedia): Aksonemin (9+2) çevresinde dokuz adet dış lifler, onun da çevresinde kuyruğa enerji sağlayan spiral olarak yerleşmiş mitokondriyonlar bulunur. Ortalama uzunluğu 5-7 µm' dir (45).

Esas Parça (Pars principalis) : Kuyruğun en uzun bölümüdür. Yedi dış yoğun fibril ile sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf spermiyumun öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için gerekli sağlam bir iskelet oluşturur (42).

Son Parça (Pars terminalis) : Kuyruğun son kısmında fibröz kılıf kaybolur (29). Aksonemi kapsar. Kısa bir sonlanma bölümüdür (38).

Olgun spermatozoon üretimi insanda 70 ± 4 günlük bir zamanda tamamlanır. Sıçanlarda izlenen süreçte benzer şekilde gelişir; ancak yaklaşık 50 ± 4 gün sürer. Seminifer epitel siklusu; epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan maturasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. Bu evreler; sıçanda 14, fare ve maymunda 12, insanda 6 basamaklıdır (38).

Seminifer tübüller arasındaki boşluklar; kollajen lifler, kan ve lenf damarları, sinir lifleri ve çeşitli hücrelerce doldurulmuştur. Bu hücreler; fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve testisin Leydig hücreleridir (38, 43, 46).

Leydig hücreleri endokrin işlevleri nedeniyle kılcal damarlarla ilişkili yerleşim gösterirler ve değişen sayılar içeren topluluklar yaparlar. Bu hücreler steroid hormon sentezleyen hücrelere özgü organel ve enzimlerden zengindir. Leydig hücreleri çok köşeli, yaklaşık 15  m çapında ve genelde tek çekirdekli hücrelerdir. Çekirdek çoğunlukla ekzantrik duruşlu olup, bir ya da iki çekirdekçik bulunur. Çekirdek kromatinden yoksundur, bu nedenle soluk boyanır. Sitoplazma asidofiliktir. Sitoplazmalarında iyi gelişmiş Golgi kompleksi, mitokondriyonlar ve lipid damlacıkları içerir. Çok iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulumları vardır. Sitoplazmada peroksizom, lizozomlar ve yaş ilerledikçe artan oranda da lipokrom pigmenti bulunur. Leydig hücrelerinde işlevleri bilinmeyen, insana özgü olan renksiz, azokarmin ile boyanan ve büyüklükleri değişebilen Reinke kristalleri bulunmaktadır (38, 39, 40, 42, 43, 44, 46, 55).

Leydig hücreleri, ikincil cinsiyet özelliklerinin gelimesinden sorumlu olan testosteron hormonunu üreterek spermatogenezisin sürekliliğini sağlar. Testosteron, mitokondriyon ve granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce sentezlenir (40, 41).

Embriyonik gelişim sırasında, plasental gonadotropik hormon anne kanından fetusa geçerek, androjenik hormonları üreten f tal testiküler intersitisyel hücreleri uyarır. Hormonlar, embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik intersitisyel hücreler gebeliğin dördüncü ayına değin farklılaşmiş olarak kalırlar. Daha sonra ise testosteron sentezindeki azalmaya koşut gerilerler. Hücreler, gebelik süresince ve hipofizden salınan LH uyarımı altında, testosteron sentezine yeniden başladıkları ergenlik öncesi döneme değin dinlenmede kalırlar (40, 41, 53).

Olgun Leydig hücreleri, doğumdan sonraki birkaç hafta dışında, 10 yaşına değin erkek  ocuk testisinde bulunmaz. Leydig hücrelerinin sayıları, ergenlikle birlikte artar, ileri yaşlarda azalır. Leydig hücre sayısı 60 yaşındaki bir erkekte, 20 yaşındaki bir erkekteki sayının yarısından da azdır (58).

2.1.3. Testis Fizyolojisi

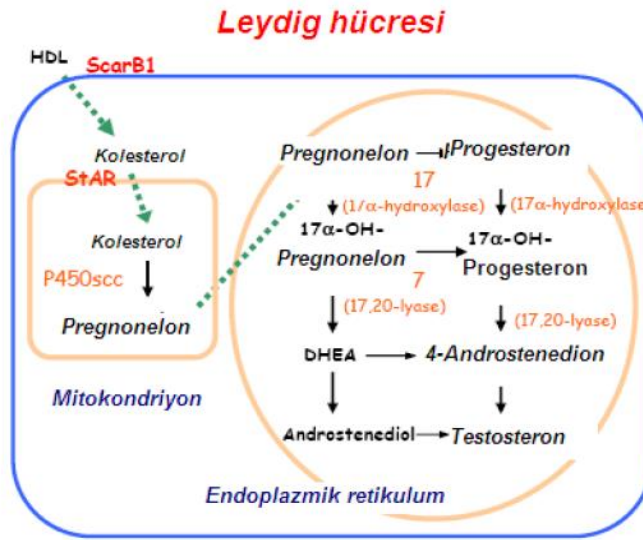
Testis ekzokrin ve endokrin işleve sahip bileşik tübüler bir bezdir. Testislerin iki önemli işlevi vardır (47, 53, 57).

- 1) Cinsiyet hormonları ya da androjenlerin sentezlenmesi (steroidogenezis)

2) Erkek üreme hücreleri olan spermiyumların üretilmesi (spermatogenezis, gametogenezis)

Testisin endokrin işlevi; Leydig hücrelerinin testosteron, dihidrotestosteron, androstenedion gibi androjenler olarak tanımlanan erkek cinsiyet hormonlarının salgılanmasıdır (59). Testosteron en önemli testis hormonudur. Testislerde ve böbrek üstü bezlerinde kolesterolden ya da doğrudan asetil koenzim A' dan sentezlenir. Testosteronun büyük bir kısmı hedef dokularda daha aktif olan dihidrotestosterona dönüşür (60).

Testosteron sentezinin biyosentetik aşamaları şu şekilde gerçekleşir (61).



Şekil 3. Testosteronun sentezinin biyosentez aşamaları

Testosteron testislerden salgılandıktan sonra, yaklaşık %97' si zayıf bağlarla plazma albumini ya da güçlü bir şekilde cinsiyet hormonu bağlayan globulin olarak adlandırılan 1β globulinle bağlanır. Bağlı hormonun dolaşım sisteminde kalış süresi 30 dakika–1 saat olabilir. Bu süre sonunda testosteron ya dokularda tutulur ya da inaktif ürünlere dönüşerek vücuttan atılır. Dokularda tutulmayan testosteron, karaciğerde başlıca androsteron ve dehidroepiandrosterona dönüşür. Aynı anda her iki yapı glukuronoidlerle ya da sülfatlarla birleşerek bağlı hale getirilir. Bunlar da ya safra içinde sindirim kanalına verilirler ya da idrarla böbreklerden atılırlar (60, 61).

Testosteron protein sentezini artırır, yıkımını azaltır; böylece büyüme hızını etkiler. Kemik büyümesini durdurur. Testosteron esas etki yeri olan prostat ve diğer birkaç dokuda 5-α redüktaz enzimi aracılığı ile dihidrotestosterona dönüşür ve sitoplazmik reseptör proteinine bağlanır.

Reseptör-hormon kompleksi daha sonra çekirdeğe gider, burada bir çekirdek proteiniyle bağlanarak DNA-RNA kayıt işlemini uyarır. RNA polimeraz aktifleşir ve prostat hücrelerinde RNA içeriği artar, bunu hücresel protein artışı izler. Böylece testosteron vücudun her yerindeki protein sentezini arttırmakla birlikte bu artış daha özgün olarak ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesinden sorumlu olan hedef organ ve dokularda görülmektedir (56, 59).

Testosteron yüksek yerel etkiyle seminifer tübüllerde spermatogenezisi etkilerken, kana verilerek (endokrin etkiyle) hedef organları (iskelet kası vb.) ve erkek üreme sistemi yardımcı bezlerinin (prostat, vesikula seminalisler, bulboüretal bezler) işlevini düzenler (56, 62).

Erkek üreme organlarının tümünün yapısı ve işlevleri testosteron varlığına bağlıdır. Testosteron, erkeğe özgü ikincil cinsiyet özelliklerinin (pubik kıllanma, sakal-bıyık, erkeğe özgü ses, kaslı vücut şekli) ortaya çıkmasından sorumludur (40, 41).

Fötal yaşam süresince testisler, plasentada oluşturulan koryonik gonadotropinlerle uyarılarak orta düzeyde testosteron salgılar. Bu hormon, fetal gelişim sürecinde ve doğumdan sonra 10. haftaya değin vücutta bulunur. Yaklaşık 10-13 yaşına kadar testosteron üretilmez. Puberte evresinde testosteron yapımı hızla artar. 50 yaşından sonra ise hızı düşüşe geçer, 80 yaşında en üst düzeyin % 20-50' sine iner (59).

Her iki cinste de cinsel işlevler hipotalamo-hipofizer sistemin denetimi altında olaylanır. Hipotalamik nöronların arkuat çekirdeklerinde yüksek yoğunlukta sentezlenen gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH), hipotalamik hipofizer portal kan yoluyla, hipofiz bezinin ön lobuna taşınır, LH ve FSH salgılanmasını uyarır. GnRH, 1-3 saatte birkaç dakika süreyle salgılanır. LH ve FSH testislerdeki hedef dokular üzerinde siklik adenzin monofosfat ikinci haberci sistemini uyarır. Bu sistem daha sonra hedef hücrelerdeki özgül enzim sistemlerinin aktive olmasını sağlar. LH, Leydig hücrelerinde özgün reseptörlere bağlanarak etki gösterir. Adenohipofizden LH salgısı sürekli değildir, geceleri 90 dakikalık aralıklarla olur. LH dışında, prolaktin ve LHRH' da doğrudan Leydig hücrelerini etkileyerek testosteron salgılanmasını etkiler. Salgılanan testosteron düzeyi, uyarıcı LH miktarlarıyla doğru orantılıdır. Yüksek düzey testosteron varlığı, negatif geri bildirim etkisi ile hipotalamus ve hipofiz ön lobu salgısını azaltarak, testosteron sentezininin baskılanmasına neden olur ve hormon düzeyi normale gelir. Buna karşıt olarak, testosteron düzeyinin çok az olması koşulunda hipotalamustan yüksek düzeyde GnRH salgılanır, hipofiz ön lobundan LH ve FSH salgılanması artar ve testiküler testosteron salgısı yükselir (40, 56, 59).

LH dışında, spermatogenezisin başlaması ve sürmesinde adenohipofizden salgılanan bir diğer hormon olan FSH da etkilidir. FSH, Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını uyarır ve sonuçta cAMP artışına neden olur. Aynı zamanda androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılanmasını sağlar. ABP, testosteron ile bağlanır ve bunu seminifer tübül lümenine taşır. Böylece spermatogenezis için gerekli oranda testosteron yerel etkisi sağlanmış olur. Bu etki spermatogenezisin başlaması için gereklidir. Spermiyumların azalması FSH salgısını uyarır. FSH salgılanması, Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hormonuyla baskılanır. Östrojenler, kadın üreme hormonları, ABP' yi bağlayarak spermatogenezisi azaltır (40, 41, 59).

Testilerin dış salgısı, holokrin bir salgı ürünü olan spermiyumlardır. İnsanda günlük ortalama spermiyum üretimi iki testisten toplam 200 milyondur (40, 41, 45, 47, 59).

Testosteron üretimi normal vücut sıcaklığında olaylandığı halde, normal spermiyum üretimi yaklaşık 35°C' de gerçekleşir. Spermatogenezisin düzenlenmesinde ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35°C' dir. Zengin venöz bir pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin çevresini sarar. Bu anatomik düzenlenim, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan karşı bir ısı akımı sağlar. Diğer etkenler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki kremaster kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir (33, 40, 60).

2.2. APOPİTOZ VE NEKROZ

Apoptozis ve nekroz, hücre ölümünde rol oynayan mekanizmalardır. Hücrenin intiharı olarak adlandırılan apoptozis, organizmanın biyolojik görevini tamamlamış veya hasarlanmış hücrelerinin, çevredeki komşu hücrelere zarar vermeden ortadan kaldırılmasını sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen, programlı, biyokimyasal ve morfolojik değişikliklerin olduğu bir hücre ölümü şeklidir. İlk kez 1972 yılında İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr ve arkadaşları tarafından 'ayrı düşmek' anlamına gelen bu terim kullanılmış, canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (63). Genetik olarak programlanmış olan apoptozis, intrinsik faktörler ile kontrol edilmekle birlikte dışarıdan gelen ekstrinsik sinyaller de hücre zarındaki reseptörler aracılığıyla bu intihar yolunu uyatabilmektedir (64, 65).

Nekroz ise; hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, ultraviyole ışık gibi zararlı hücre dışı uyaranlar sonucu oluşan, istenmeyen bir süreçtir. Hücre plazma membran lipidlerinin peroksidasyonu sonucu, hücre içeriği ortama dökülerek inflamatuvar yanıt

oluşturmakta ve komşu hücreler de bu durumdan etkilenmektedir. Nekroz patolojik bir olaydır. Apoptozis ise fizyolojik veya patolojik uyaranlarla oluşabilir (66).

2.2.1. Elektron Mikroskopik Morfolojik Özellikler;

Apoptozis; hücreleri asenkron ve tipik olarak inflamatuvar değişiklik olmaksızın etkiler. En erken gözlenen olay; keskin sınırlı, yoğun, ince granüler hilal şeklinde çekirdek zarına bitişik kütle oluşturmak üzere kromatinin kondensasyonudur. Kondanse kromatinin nükleusa oranı hücre tipine göre değişir. Örneğin lenfoid hücrelerde yüksek, az heterokromatinli hücrelerde düşüktür. Nükleer porlar; kondanse kitlelerin yakınında nadiren gözlenirken, nükleer zarın geri kalan kısımlarında belirgin bir şekilde gözlenirler. Nukleolar değişiklikler de oluşur, ancak bunlar sadece kesitlerin bazı seviyelerinde görülmektedir (67, 68).

Bu nükleer değişimlerle apoptotik hücreler, komşu hücrelerden ayrılır. Hücre yüzey özelleşmeleri (mikrovilluslar gibi) kaybolur. Hücre hacmi azalır, yoğunluğu artar, sitoplazmik organeller kompakt hale geçer, hücrenin ve nükleus taslağının kıvrımları görünür. Nükleus, çoğu çift membranla sınırlı birçok ayrı fragmana parçalanabilir ve hala kromatin ayrımı yapılabilir. Bunlar, kondanse kromatin içerir ve yüzey kabarıntılarının oluşması (blebing) esnasında ayrılırlar. Her fragmanda kromatin içeriği ve ebatı değişir; kondanse kromatin tüm enine kesiti kaplayabilir veya periferde hilal şeklinde kalabilir. Nükleer kıvrımlanma ve fragmantasyon, timositler gibi yüksek nükleer/sitoplazma oranına sahip hücrelerde sınırlanır. Bu esnada, sitoplazmada, hücre yüzeyine paralel ışınlar halinde sitoskeletal filamanlar toplanır; ribozomal partiküller semikristalin yapılar şeklinde kümelenir; kaba endoplazmik retikulumlar, konsantrik sarmallar oluşturacak şekilde tekrar düzenlenir; düz endoplazmik retikulumdan gelişen ve plazmalemmanın altında yerleşen sayısız vakuoller, plazma membranı ile birleşip tarayıcı elektron mikroskop (SEM) ile gözlenebilen krater tarzında yapılar oluşur. Bol sitoplazmalı hücreler, geniş yüzey kabarıntıları (bleb) ve çıkıntılar oluştururlar ve en iyi SEM ile demonstre edilebilirler (67, 68, 69, 70, 71).

İn vivo apoptotik cisimler; komşu epitel hücrelerince, mononükleer fagositlerce veya tümör hücrelerince oluştuktan hemen sonra fagosite edilirler. İntraepitelyal makrofajlar; glanduler epitelde oluşan apoptotik cisimlerin uzaklaştırılmasında önemli bir rol oynar ve sayıları glandular atrofi ve involüsyonda, mononükleer fagosit göçü ve mitoz ile artar (69, 70).

2.2.2. Işık Mikroskopik Morfolojik Özellikler;

En erken ışık mikroskopik belirti olan ani hücre büzüşmesi, nükleer değişimlere bağlı simultane oluşur. Bu arada, kültüre hücrelerde komşu hücreler arası bağlantı kaybı da bunun delilidir. Büzüşme; muhtemelen sodyum (Na^+)-potasyum (K^+)- klorür (Cl^-) kotransporter sistemin inhibisyonundan dolayı net bir dışa sıvı akışından oluşur (67, 72).

Histolojik olarak apoptotik cisimler; bazofilik nükleer materyalli veya materyalsiz, yuvarlak - oval sitoplazmik kitleler halinde görünürler. Çoğu apoptotik cisimler eozinofilik olsa da, pankreatik asiner hücreler gibi fazla ribozom içeren hücrelerden türeyenler bazofilik olabilir. Tomurcuklanmanın sınırlandığı hücrelerden oluşan apoptotik cisimler, orijinal hücre boyutundan hafif küçüktürler. Yaygın tomurcuklanmanın mümkün olduğu hücrelerde, ebat olarak apoptotik cisimler epeyce değişiktir, en küçüğü bile en az bir bazofilik nükleer fragman içerdiği takdirde ışık mikroskobu ile görülebilir. Yüksek nükleus/sitoplazma oranlı hücrelerden köken alanlarda, dar bir sitoplazma ile çevrelenen piknotik kromatin kitlesi şeklinde görülür. Diğer apoptotik cisimler ise, daha çok değişik miktarda daha küçük nükleer fragmanların bulunduğu sitoplazma içerirler. Ultrastrüktürel olarak karakteristik hilal şekilli görülen kromatin kümeleri, 5µm'lik parafin kesitlerde nadiren görünür; bunun yerine kromatin, yoğun bazofilik kitleler olarak görülür. Kesitlerde apoptotik cisimler, sıkça belirgin açık boşluklarda yer alırlar. Bunların bir kısmı, soluk boyalı makrofajlardaki cisimleri gösterir; diğerleri ekstrasellüler, doku hazırlanması esnasında büzüşme artefaktı sonucunda oluşan boşluk olabilir. Daha büyük, normal ve patolojik durumlarda uzun süredir bilinen ayrı apoptotik cisimler, farklı isimler alabilir. Bunlar; karaciğerdeki Councilman cisimleri, barsak kriptalarındaki karyolitik cisimler, lenf nodlarının germinal merkezindeki makrofajların tingible cisimleri, liken planusta Civatte cisimleri, ultraviyole radyasyon sonrası güneş yanığı hücrelerini kapsar (67).

Apoptotik cisimler, dokuda dağınık kümeler halinde olabilir. Bunlar, tek tek hücrelerin fragmentasyonu sonucu oluşabilir veya tek bir fagositte, tipik olarak makrofajda birkaç hücreden oluşan apoptotik cisimlerin toplanıp oluşturduğu daha büyük agregatlar şeklinde olabilir. Apoptotik cisimlerin sayıları yüksekse, makrofajlarda degradasyon lipofuskin pigment oluşumuyla sonuçlanır. İlgi çekici şekilde, apoptotik cisimlerin fagositozunda makrofajlar, inflamatuvar mediatör salınımıyla cevap vermezler (67, 73).

Apoptotik cisimlerin küçük ebatları ve kısa yarı ömürleri, inflamasyonun yokluğu, apoptotik hücreler uzaklaştırıldığında kalan hücrelerin, hücre sıralarını kapatması, apoptozisi

hücre delesyon oranının yüksek olduğu zamanda bile göreceli olarak histolojik açıdan az göze çarpar hale getirir. Apoptozis oranında küçük artışlar bile epeyce artmış hücre kaybıyla ortaya çıkar (74).

2.2.3. Apoptozun Biyokimyasal Özellikleri;

Apoptozis işlemi, enerji gereksinimi olan bir süreçtir. Fizyolojik hücre ölümünü, belli fazlara bölmek uygun olur. En erken faz, apoptotik cevabı başlatan stimulus fazıdır. Bu, yüzey reseptörleri aracılığıyla yayılan bir eksternal sinyal olabilir veya bir ilaç, toksin veya radyasyon etkisiyle hücre içinden orijin alabilir. İkinci faz, sinyalin veya metabolik durumun saptanması ve sinyal iletimini içerir. Sinyal iletim yolları, bu mesajı hücre ölümü efektör mekanizmasına iletir. Effektör faz ise, hücre ölüm mekanizmasının üçüncü kısmıdır ve pozitif ve negatif regülatörleri ile beraber proteazların aktivasyonunu içerir. Dördüncü faz, hücre kromatininin kondanse olduğu ve DNA'sının degrade edildiği postmortem fazdır (75).

Hızlı nükleer DNA yarıklanmasına, uzun zamandır apoptozisin en önemli biyokimyasal göstergesi olarak bakılmıştır (76). Bu DNA degradasyonu, iki aşamada oluşur. İlki, 200-300 kilobaz çiftlik fragmanlara ve/veya 50 kilobaz çiftlik fragmanlara yarıklanır. (77). Nükleer zarfa doğru kromatin marjinasyonu, muhtemel morfolojik görünümüdür (78). İkincisi, apoptoza giden hücrelerin tamamını olmasa da çoğunu etkileyen, internukleozomal (nukleozomlar arası bağlayıcı bölgelerden) çift iplikli DNA yarıklanmasıdır, böylece oligonukleozomal ebatlı fragmanlar oluşur (79).

Apoptotik hücre debrisleri, in vivo hemen fagositte edilirler. Bu yüzden hücre rüptüre olmadan önce, apoptotik hücrelerin fagositlerce tanınabilmeleri için plazma membran değişimlerini tamamlamaları gerekir. Gerçekten plazma membran değişimlerinin, programlanmış hücre ölümünde çok erken oluştukları gösterilmiş (80, 81). Apoptozise giden hücrelerde oluşan dramatik morfolojik değişikliklerden, sitoskeletal elemanlardaki değişimler ve yaygın sitoplazmik proteinaz aktiviteleri sorumludur. İn vivo, apoptotik cisimlerin lizis olmaması ve böylece inflamasyona yol açmadığı gerçeği apoptotik hücrelerde üç önemli olayı vurgular; membran integrasyonunun korunması, ani tanınma ve fagositoz. Sitoplazmik proteinlerle, geniş çapraz bağlar kuran doku transglutaminazının (tTG) aktivasyonu, yüzey kabarıntılarının (bleb) oluşumunda ve intrasellüler içeriğin hücrede tutulmasında anahtar bir rol oynamaktadır (82). tTG, apoptotik cisimlerde en yüksek konsantrasyondadır (83).

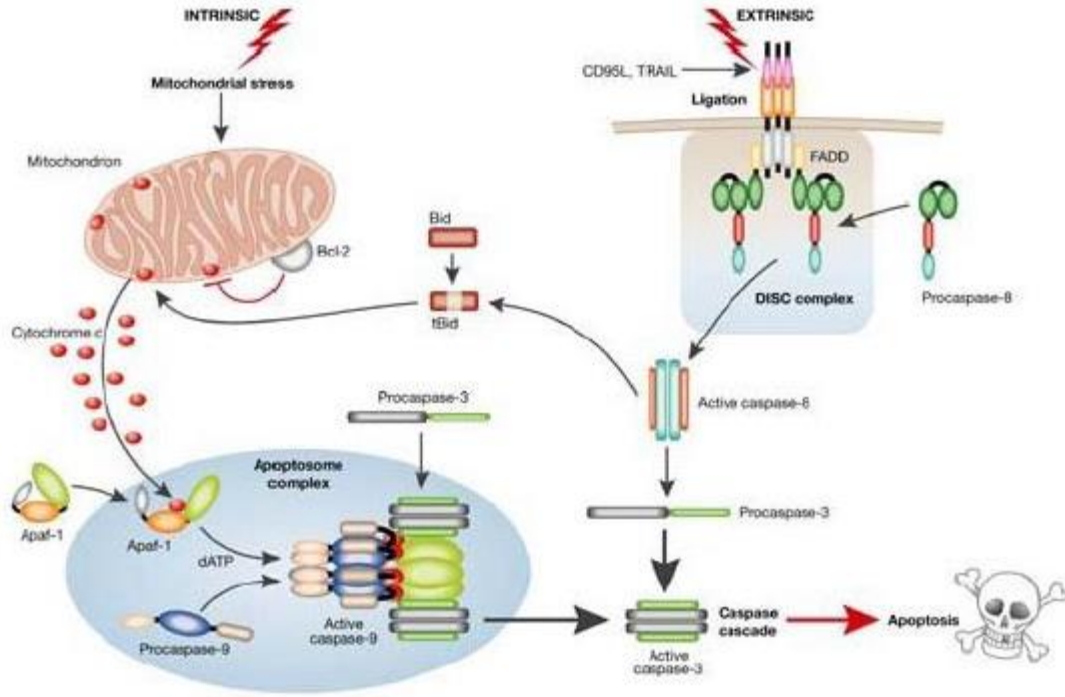
2.2.4. Kaspaz Ailesi ve Apoptozdaki Roller;

Kaspazlar (caspase-cysteine aspartate spesifik proteases); zimojen (inaktif prekürsör) olarak sitoplazmada bulunan ve aktif merkezlerinde sistein yer aldığından, sistein proteazlar olarak adlandırılan bir enzim grubudur ve çok az rastlanan bir substrat alanı olan aspartik asitten sonraki peptid bağı kırarlar (84, 85). Hücrede inaktif (zimojen) olarak bulunurlar ve birbirlerini aktifleştirerek proteolitik bir kaskata (şelale tarzı reaksiyon dizisi) neden olurlar. Bazıları (Kaspaz 2, 8, 9, 10) başlatıcı kaspazlar olarak bilinirken, bazıları da (3, 6, 7) efektör kaspazlar olarak bilinir. Başlatıcı kaspazlar, apoptotik uyarıyla başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara naklederler. Efektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (örneğin, hücre iskeleti proteinleri aktin veya fodrin, nükleer membran proteini lamin A, DNA tamirinde rol alan PARP'ı) parçalayarak apoptotik hücre morfolojisinin meydana gelmesine neden olurlar. İlk tanımlanan enzim interlökin 1- β dönüştürücü enzimdir (ICE) ve prokaspaz 1 olarak bilinir (86). Kaspaz kaskadı, mitokondri aracılı intrinsik yolla sitokrom c'nin sitoplazmaya saliverilmesi sayesinde prokaspaz 9'un aktivasyonu yoluyla aktifleştirildiği gibi, kaspazlar da sitokrom c'nin saliverilmesine neden olabilirler. Sitokrom c ile birlikte apoptoz indükleyici faktör (AIF) de sitoplazmaya salınır. Bu yolda, apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) de görev almaktadır. Sitokrom c ve Apaf-1 birleşerek, prokaspaz-9'u aktive ederler. Aktif kaspaz 9 da kaspaz-3'ü aktive eder. Proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır. Ya da ekstrinsik yolla ölüm aktivatörlerinin (fas ligand-FasL- ve Tümör nekroz faktör-TNF-) hücre yüzeyindeki reseptörlerine [Fas (diğer isimleriyle APO-1, CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1)] bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır. Bu bağlanmalar, ölüm domain proteinleri aracılığıyla olur. Kaspaz 8 de diğer kaspazları uyararak hücrenin fagositozuna yol açar (Şekil 4). Son mekanizma ise endoplazmik retikulum aracılı apoptozdur. Kaspaz-12, endoplazmik retikulum membranında lokalizedir. Hücre içi Ca^{++} seviyelerinin yükselmesi ve kalpainin etkisiyle prokaspaz 12 aktifleşir ve sitoplazmaya yönelir. Kaspaz-9 ile etkileşerek sitozolik kaspaz kaskadını aktive eder. Terminal uç olan aktif kaspaz 3, kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz inhibitörünü (ICAD, inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease) inaktifleştirir, böylece ICAD'ın bağladığı kaspazla-aktifleşen deoksiribonükleaz (CAD, caspase-activated deoxyribonuclease) serbestleşir ve bu da apoptozisin karakteristik bulgularından biri olan kromatin kondensasyonuna ve oligonükleozomal DNA fragmentasyonuna neden olur. Buraya kadarki mekanizma kaspaz-

bağımlı apoptozisi gösterir; oysa kaspaz-bağımsız apoptozisin varlığı da bilinmektedir. Kaspaz-bağımsız apoptozis, yine mitokondriden salıverilen bir faktör olan AIF'ün etkisiyle gerçekleştirilir. Fakat AIF'ün etkilediği nükleazın ne olduğu henüz bilinmemektedir. Bir kaspaz inhibitörleri ailesi olan apoptozun inhibitörleri (IAPs), kaspazları selektif olarak inhibe ederler, böylece apoptotik mekanizmayı durdururlar. IAP'ler tarafından caspase -3, -7, ve -9'un inhibisyonunun yapısal temeli, son zamanlarda rapor edilmiştir (84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91). Bu inhibitörler birçok malign hücreler tarafından aşırı eksprese edilmektedirler. IAP'ler, ayrıca hücre siklusunu da etkileyerek apoptozisi durdurabilirler.

Kaspazların sınıflandırılması (92)

- Kaspaz-1 (ICE)
- Kaspaz-2 (ICH-1, Nedd-2)
- Kaspaz-3 (CPP32, Apopain, Yama)
- Kaspaz-4 (ICH-2, TX, ICE_{rel1})
- Kaspaz-5 (ICE_{rel11}, TY)
- Kaspaz-6 (Mch2)
- Kaspaz-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)
- Kaspaz-8 (FLICE, Mch5, MACH)
- Kaspaz-9 (Mch6, ICE-LAP6)
- Kaspaz-10 (Mch4)
- Kaspaz-11 (ICH-3)
- Kaspaz-12
- Kaspaz-13 (ERICE)
- Kaspaz-14 (MICE)



Şekil 4. Apoptoz / Kaspaz yolu

Kaspazların çoğu sitoplazmada bulunuyorsa da bazı üyeleri, örneğin kaspaz 12, Golgi apparatusunda; kaspaz 2, kaspaz 3 ve kaspaz 9 mitokondri ile ilişkide bulunabilir (93). En önemli başlatıcı kaspazlar; tip I apoptoz (mitokondri aracılı, intrinsik) için kaspaz 8, tip II apoptoz (ekstrinsik) için kaspaz 9, tip III apoptoz (endoplazmik retikulum aracılı) için kaspaz 12’ dir. Kaspaz 3 aktivasyonu programlanmış hücre ölümünde geri dönüşümsüz noktanın en önemli göstergesidir (94).

2.2.5. Spermatogenezis ve Apoptoz

Dişi ve erkek gonadların normal gelişimi esnasında hücre ölümü olmaktadır. Ovarian foliküllerin % 90’ı hayatın erken döneminde apoptoza uğrar ve bu foliküllerin atrezisi kadınların üreme döneminde de önemlidir. Erkeklerde ise testisteki germ hücrelerinin % 75’i apoptoza uğrar ve bu mekanizma ile bozuk germ hücreleri yok edilmiş olur.

Normal spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklanmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar. Sinka ve arkadaşları tarafından normal spermatogenez sırasında olan spontan hücre ölümü ve gonadotropik desteğin kesilmesi ile skrotumda sıcaklık artışına bağlı hızlanmış germ hücre ölümünün apoptoz yoluyla olduğu gösterilmiştir (95). Apoptoz, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar (96). Germ hücrelerindeki bu ölüm,

spermin normal gelişimi için mutlaka gereklidir (97). Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin % 75'i apoptoza maruz kalır (98). Sperm apoptozu ve sperm DNA'sında hasar; erkek infertilitesinin potansiyel belirleyicileri olarak kabul edilir. Apoptoz ile ortaya çıkan germ hücre kaybı, spermatogenez sırasında oluşur ve p53, p21, Kaspaz, Bcl-2 ve Fas düzeyleriyle değişik yollarla saptanabilmektedir (99, 100, 101).

Testislerde sperm yapımı ve matürasyonu, sertoli hücrelerinin desteği altında gerçekleşir. Ancak bu olayın sağlıklı sürebilmesi, Sertoli hücrelerinin sayısı ile spermatogonyum sayısı arasındaki belirli orana bağlıdır. Çünkü zaten çoğalma kapasitesi olmayan Sertoli hücreleri, sadece belirli sayıdaki spermatogonyumları destekleyebilir. Yani, mayoz bölünmeye girecek spermatogonyum sayısı sınırlıdır. Eğer spermatogonyum sayısı, Sertoli hücrelerinin destek kapasitesini aşarsa, fazla hücreler apoptoz ile parçalanır (102).

Bazı çalışmalarda germ hücrelerinin apoptozunda testosteronun da etkili olduğu bildirilmiştir (103). Spermatogenez sırasında apoptozun başlatılmasında etken bir başka faktör ise germ hücreleri ve lökositlerden kaynaklanan ROS yapımı ve miktarıdır (104, 105). İnsan spermi ile yapılan çok sayıdaki çalışmada, hücre ölümü ile ROS üretimi arasında sıkı ilişki bulunduğu vurgulanmıştır (106, 107).

Spermatogenezde, testiküler germ hücre apoptozun hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (108, 109). Hipofizektomize immatür ratlarda, hem germinal hem de somatik hücrelerde apoptozun ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da insan karyonik gonadotropin hormonu (Human Chorionic Gonadotropine Hormone, hCG) tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir (109, 110).

Seminifer tübül epitelinin ısı, toksik madde, radyasyon veya soğuk gibi faktörlere olan duyarlılığı da germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran diğer bir faktördür (111). Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptoz gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (112, 113, 114).

2.3. REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ (ROS)

Serbest radikal; bir ya da daha fazla çiftlenmemiş elektronu bulunan atom ya da molekül olarak tanımlanmıştır. ROS, yüksek derecede reaktif oksijenlenmiş ajanlara sahip serbest radikaller sınıfıdır (115). Organizmada, geçiş metallerini (Fe^{2+} ve Cu^{+} gibi metaller) içeren enzimler vasıtasıyla, moleküler oksijene tek elektronların transferi ile oksidasyon

reaksiyonları meydana gelmektedir (14). Sonuç olarak; NADH ve NADPH, oksijenden reaktif oksijen ara ürünlerinin meydana gelmesine yol açmaktadır. Bu bileşikler; aerobik metabolizmanın, ilaçlar ve çevresel toksinlerle oluşan reaksiyonların yan ürünleri olarak sürekli meydana gelmektedir. İleri derecede reaktifler ve DNA, proteinler ve doymamış yağlarda ciddi kimyasal değişikliklere neden olurlar. ROS' lar; reperfüzyon hasarı, kanser, inflamatuvar hastalıklar ve yaslanma gibi çok sayıda patolojiden sorumlu tutulmuşlardır (116). Moleküler oksijen, biradikal doğasının bir sonucu olarak yüksek derecede reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturma eğilimindedir. Reaktif oksijen türleri (ROS); normal oksijen metabolizması sırasında az miktarda oluşan süper oksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) dir. Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin olduğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller (R), peroksit radikalleri (ROO), alkoksi radikalleri (RO), tiyil radikalleri (RS), sülfenil radikalleri (RSO), tiyil peroksit radikalleri (RSO_2) gibi çeşitli serbest radikaller oluştururlar (117).

RNS		Reaksiyon	ROS		Reaksiyon
Nitrik Oksit (NO [•])	NO[•] L-arginine + O₂ + 2 NADPH → Citrulline + NO[•] + 2 NADP⁺ + H₂O		Süperoksit Radikali (O ₂ ^{•-}) t _{1/2} = 1 x 10 ⁻⁶ s	O₂ + 1e⁻ → O₂^{•-} NADPH oksidaz NADPH + 2O₂ → NADP⁺ + H⁺ + 2 O₂^{•-}	
Nitrogen Dioksit (NO ₂ [•])	NO [•] + O ₂ → NO ₂ [•] 2 NO ₂ [•] + H ₂ O → HNO ₃ + HNO ₂ (nitrik ve nitrus asit üretimi) RH + NO ₂ [•] → R [•] + HNO ₂ (lipit peroksidasyon başlatma)		Hidroperoksil radikali (HO ₂ [•])	O ₂ + H ₂ O → HO ₂ [•] + OH ⁻	
Reaktif olmayan oksijen türleri			Reaksiyon		
Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	SO₂ 2 O₂^{•-} + 2 H⁺ → H₂O₂ + O₂ HO₂[•] + e⁻ + H⁺ → H₂O₂		Hidroksil radikali (OH [•]) t _{1/2} = 1 x 10 ⁻⁹ s	Fenton reaction: H ₂ O ₂ + 1e ⁻ (Fe ²⁺ /Cu ⁺) → Fe ³⁺ /Cu ²⁺ + OH [•] + OH ⁻ Haber-Weiss: O ₂ ^{•-} + H ₂ O ₂ → O ₂ + H ₂ O + OH [•]	
Hipoklorit asit (HOCl)	HPO₂ H₂O₂ + Cl⁻ → HOCl + OH⁻ (hypochlorous acid formation) HOCl + O₂^{•-} → O₂ + Cl⁻ + OH⁻ or HOCl + Fe²⁺ → Fe³⁺ + Cl⁻ + OH⁻ (hydroxyl formation) HOCl = H⁺ + OCl⁻ (hypochlorite formation) HOCl + H⁺ + Cl⁻ = Cl₂ + H₂O (chlorine gas formation) R-NH₂ + HOCl → RNHCl + H₂O (aurine chloramines)		Sülfür radikali (RS [•])	RSH + $\cdot C \rightarrow \cdot CH + RS^{\cdot}$ RSH + OH [•] → RS [•] + H ₂ O RSH + ROO [•] → RS [•] + ROOH RSH + Fe ³⁺ → RS [•] + Fe ²⁺ + H ⁺ or RSH + Cu ²⁺ → RS [•] + Cu ⁺ + H ⁺	
Peroksinitrit (ONOO [•]) t _{1/2} = 3-5 x 10 ⁻³ s	O ₂ ^{•-} + NO [•] → ONOO [•] ONOO [•] + H ⁺ → ONOOH		Singlet oksijen (¹ O ₂) t _{1/2} = 1 x 10 ⁻⁶ s		
Ozon (O ₃)	Cl ⁻ + O ₃ → O ₃ ⁻ + ClO		Alkoksil (RO [•]) Peroksil (ROO [•]) t _{1/2} = 1 x 10 ⁻⁶ s and t _{1/2} = 1 x 10 ⁻⁴ s		
Silve 2006'dan uyarlanmıştır			Silve 2006'dan uyarlanmıştır		

Şekil 5. Reaktif Nitrojen /Oksijen Türleri

2.3.1. Ros'un hücresel substratları

2.3.1.1. Lipitler;

Lipitler, serbest radikallerin etkilerine karşı en hassas olan biyomoleküllerdir. Hücre membranlarındaki kolesterol ve poliansatüre (doymamış) yağ asitleri (PUFA) serbest radikallerle kolayca reaksiyona girer, lipit peroksidasyonu oluşturur (16). Hücre membranlarında lipit serbest radikalleri (L) ve lipit peroksit radikallerinin (LOO) oluşması,

reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu hücre hasarının önemli bir özelliği olarak kabul edilir. Serbest radikallerin sebep olduğu lipid peroksidasyonuna ‘nonenzimatik lipid peroksidasyonu’ denir. Fagositik hücrelerin uyarılması, fosfolipaz ve protein kinazın aktivasyonuna neden olur. Böylece plazma membranından arasidonik asidin serbestleşmesi sonucu serbest radikal üretimine ‘enzimatik lipid peroksidasyonu’ denir (14). Malondialdehit (MDA) lipid peroksidasyon son ürünüdür ve MDA ölçülmesi lipid peroksit seviyelerinin indikatörü olarak kullanılır (117).

2.3.1.2. Protein;

Proteinler, serbest radikallere karşı poliansatüre yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi amino asitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler.

2.3.1.3. Karbonhidratlar;

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkisiyle çeşitli ürünler meydana gelir ve çeşitli patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar.

2.3.1.4. Nükleik Asitler Ve DNA;

İyonize edici radyasyonla oluşan serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyona ve ölüme yol açarlar. Hidroksil radikali (OH•) deoksiriboz ve bazlar ile kolayca reaksiyona girer ve değişikliklere yol açar. Aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit (H_2O_2) membranlardan kolayca geçer ve hücre çekirdeğine ulaşır. Sonunda DNA kalıcı ‘oksidatif hasara’ uğrar. Eğer hidroksil radikalleri DNA'ya yakın olursa, purin ve pirimidin bazlarına saldırarak mutasyonlara ve hatta hücre ölümüne sebep olabilirler (117).

2.3.2. Antioksidanlar

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması vardır. Bu mekanizmalar "antioksidan savunma sistemleri" veya kısaca ‘antioksidanlar’ olarak bilinirler. Antioksidan savunma mekanizmaları, hem intraselüler (superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon, peroksidaz, ferritin) hem de ekstraselülerdir (transferrin, laktoferrin, seroloptazmin, haemopexin, haptoglobin ve albumin). Bazı serbest radikaller bu antioksidanlardan kurtulup, hasara yol açma yeteneğindedir (14, 15).

Antioksidan sistemde enzimatik (süperoksitdismutaz: SOD, Glutatyon peroksidaz / Glutatyon reduktaz: GPX / GRD, Katalaz: CAT) ve enzimatik olmayan (Askorbat, Ürat,

Vitamin E, pirüvat, taurin, hipotaurin) antioksidanlar mevcuttur. Bu antioksidanlar üç savunma mekanizması içerir. Bunlar: önleme, durdurma ve tamir etmedir (16, 17).

Endojen Antioksidanlar:

Endojen antioksidanlar, enzim ve enzim olmayanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Enzim olan endojen antioksidanlar şunlardır: Süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-GPx), glutatyon S-transferazlar (GST), katalaz (CAT), mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi, hidroperoksidaz (117).

Enzim olmayan endojen antioksidanlar şunlardır: Melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyogloblin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin, albümin.

Eksojen Antioksidanlar:

Dışarıdan alınan antioksidanlar şunlardır: a-tokoferol (vitamin E), b-karoten, askorbik asit (vitamin C), folik asit (folat), ksantin oksidaz, mannitol, albümin, barbitüratlar, demir selatörleri (14).

2.3.3. İnsan Semeninde Ros'un Kaynağı

Semende ROS kaynağı; lökositler ve spermatozoondur (84).

2.3.3.1. Lökosit

Erkek genital sisteminde sürmekte olan enfeksiyon için bir gösterge olarak kabul edilir. Bütün infertil erkeklerin %10-20'sinde bulunur. Semendeki lökositlerin kaynağı epididim ve prostattır (118). Lökositler; hem normal hem de infertil erkeklerin semenlerinde bulunabilir. %60-70'ini polimorf nükleuslu nötrofiller oluşturur. Mikroorganizmalara karşı mücadele verirken ortama süperoksit anyonu (O_2^-) salarlar ki bu da diğer ROS ve iyonlarla reaksiyona girerek ya da dismutasyon ile hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^\bullet$) veya hipoklorid gibi diğer toksik maddelerin oluşmasına neden olur (14). Lökosit, spermatozoona göre 100 kat daha fazla ROS üretebilir (17). Serbest oksijen radikallerinin üretimi lökositospermik (semen lökosit kontaminasyonu) örneklerde anlamlı olarak daha fazladır. Lökositospermik bireylerde, sağlıklı donörler ve lökosit olmayan hastalarla karşılaştırıldığında DNA hasarı anlamlı derecede artış gösterir (119). Eğer semende lökosit konsantrasyonu 3 milyon/ml'yi geçerse fertilizasyonda anlamlı bozulma gözlenir (118).

2.3.3.2. Spermatozoon

ROS'un ikinci kaynağı spermatozoonun kendisidir. İnsan spermatozoonu endojen ROS'un az bir kısmını kontrollü bir şekilde oluşturma yeteneğine sahiptir (16,120). Aslında

spermatozoon kapasitesini için, sinyal iletim mekanizması sırasında faydalanılmak üzere az miktarda süperoksit anyonu ve hidrojen peroksit üretmektedir (120). Spermatozoonun H_2O_2 'nin düşük konsantrasyonu ile inkübe edildiğinde kapasitesini (121), hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyon yeteneği kazanması ile fertilizasyon yeteneğinin stimüle edilebildiği gösterilmiştir (16). Erken evre spermatositler, yuvarlak ve uzamış spermatidlerin hepsi aynı düzeyde ROS yaparlar. Epididimisteki henüz maturasyonunu tamamlamamış spermatozoon, bunlardan daha fazla ROS üretmektedirler (17, 121). Matürasyonu bozulan spermatozoon, spermiyogenezin son evresinde fazla sitoplazma artığını atamaz. Sonuçta spermatozoon normalden daha fazla ROS yapar ve oksidatif stres belirtileri verir. Zaten ROS düzeyi yüksek olan semenlerde glukoz-6-fosfat dehidrogenaz aktivitesi de artmıştır. Bu enzim sitoplazmik artığın fazla olduğu semen örneklerinde yükselmektedir (16, 121).

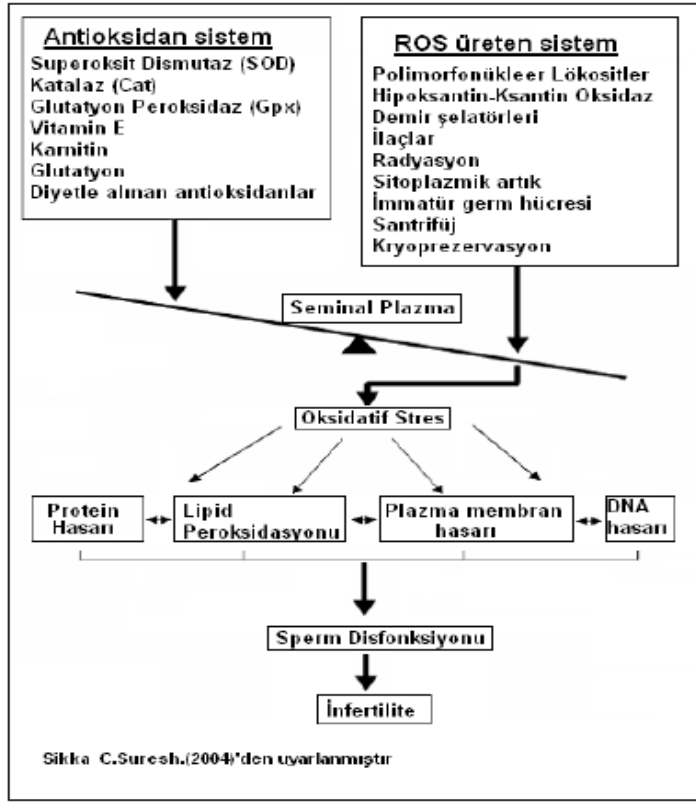
2.3.4. Spermatozoon Antioksidan Sistemi

Seminal plazma; antioksidan enzimler olan SOD, GPX/ GRD, katalaz, ve enzimatik olmayan askorbat, ürat, E vitamini, piruvat, glutatyon, taurin, hipotaurin gibi antioksidanlar içerir (14). Seminal plazmadaki düşük antioksidan kapasite, özellikle katalaz aktivitesi ve TAK (total antioksidan kapasitesi) anormal spermatozoon etiolojisinde önemli olabileceği belirtilmiştir (122). İn-vitro, oksidatif stresin aktive lökositlerle gerçekleştirilen çalışmalar dahil olmak üzere; hipotaurin, indirgenmiş glutatyon ve N-asetil sisteinin de dahil olduğu çok geniş bir aralıkta antioksidanların, insan spermatozoonu ekzojen kaynaklı toksik oksijen metabolitlerinden korumada potansiyel klinik değerleri olduğu gösterilmiştir (16). Spermatozoonları ekzojen kaynaklı ROS'dan koruyan SOD, katalaz, hipotaurin, pentoksifilin veya vitamin E gibi ajanların hiçbirinin NADPH' nin indüklediği oksidatif strese karşı etkin olmadığı gösterilmiş olup, bunun nedeni ROS' in intraselüler kaynaklı olması olarak düşünülmüştür. Ne yazık ki bugüne kadar antioksidanların, insan spermatozoonunu endojen kaynaklı ROS' dan koruma kabiliyetlerini gösterecek bir model geliştirilmemiştir (123).

2.3.5. Oksidatif Stres ve Erkek İnfertilitesi

Spermatozoon, ROS' a normal hücrelerden daha hassastır. Çünkü plazma membranları büyük oranda poliunsatüre (doymamış) yağ asitleri ve sitoplazmaları da düşük konsantrasyonlarda antioksidan sistem enzimleri içerir (15, 16, 117). Normalde serbest oksijen radikallerinin üretiminde ve antioksidan sistem arasında bir denge vardır.

Spermatozoon, oksidatif ajanlardan DNA'sını iki savunma mekanizması ile korur. Bunlardan ilki; DNA'nın paketlenerek düzenlenmesi, diğeri ise seminal plazmadır (15).



Şekil 6. Oksidatif Stres ve Erkek infertilitesi

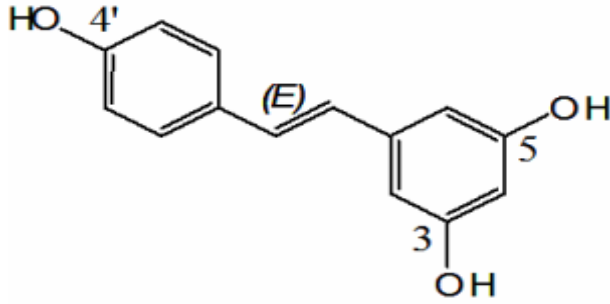
Oksidatif stresin erkek infertilitesindeki önemi, 1943'te iskoç androlog John MacLeod'un aerobik şartlarda enkübe edilen insan spermazoonların hareketliliğinin katalaz eklenmesi ile arttığını göstermesinden beri bilinmektedir (121). Erkek faktörlü infertilitede, oksidatif stres süresince temel değişiklikler sonucunda spermatozoon DNA'sında bütünlük hasarı, DNA fragmentasyonu ve kromatin çapraz bağlanmaları olduğu, bunun da germ hücre apoptozisini hızlandırabileceği ileri sürülmüştür (17). İmmatür spermatozoonlar tarafından üretilen ROS' un matür spermatozoonlar üzerinde oksidatif hasar yapabileceği ve bunun infertilite nedeni olabileceği düşünülmüştür (12, 17, 119). Spermatozoonda ROS toksisite mekanizması lipit peroksidasyonu ile başlar, motilitenin bozulmasıyla devam eder ve nükleer DNA hasarı oluşturur (15, 17) .

Spermatozoonda ROS' un etkisinin ilk göstergesi flagellar salınım sıklığında progressif bir azalma olmasıdır. Bu etki hücre içi ATP (Adenozin trifosfat) konsantrasyonunun düşmesine bağlıdır ve aksonem proteinlerinin cAMP-protein kinaz A-bağımlı yolla fosforilasyonunda bozulmaya yol açan bir takım olaylar zinciri tarafından tetiklenir. ROS;

spermatozoon DNA'sını baz modifikasyonu, DNA zincir kırığı, kromatin karşılıklı bağlanması şeklinde etkiler (17).

2.4. RESVERATROL

5-[(E)-2-(4-hydroxyphenyl)-ethenyl]benzene-1,3-diol veya trans-3, 5, 4'-trihydroxystilbene olarak da adlandırılan bir moleküldür. Mol ağırlığı 228. 25 g/mol olup kırmızı üzüm kabuğu, yerfıstığı, bazı bitkilerin sap ve köklerinde ve kırmızı şarapta bulunan resveratrol doğal bir polifenolik fitoaleksine' dir (Şekil 7). Kırmızı üzüm kabuğu ile birlikte fermentasyona uğratıldığı için kırmızı şarapta yaklaşık 5 g/l bulunmasına rağmen beyaz şarapta çok daha az miktarda bulunur. Bunun sebebi olarak beyaz şarap yapımında kabukların ayrılarak üzümün fermentasyona bırakılması gösterilir (18).



Şekil 7. Resveratrolün kimyasal yapısı

Ultraviyole spektral özelliklerine göre resveratrolün cis- ve trans- izomerleri bulunur. Trans –resveratrol ısıktan korunduğu sürece sabit kalır ve üzüm ekstirelerinde de bu formu bulunur (124).

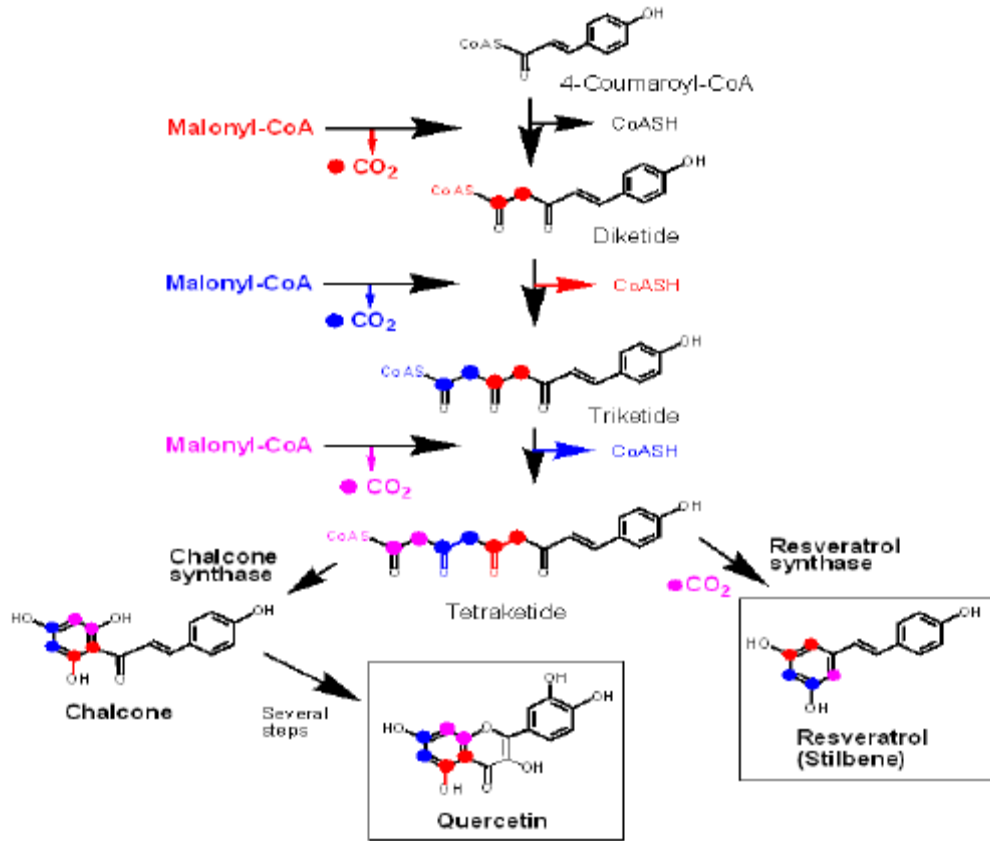
Üzümdeki resveratrolün oda sıcaklığı, mikrobiyal enfeksiyon, ultraviyole radyasyon, ozona maruziyet gibi çevresel koşullardan etkilendiği ve oranının değiştiği gösterilmiştir (125). Resveratrolün emiliminin hızlı olduğu, dokulara kolay taşındığı ve büyük oranda idrar yolu ile atıldığı gösterilmiştir (126).

2.4.1. Resveratrolün Farmakolojisi

2.4.1.1. Biyosentezi

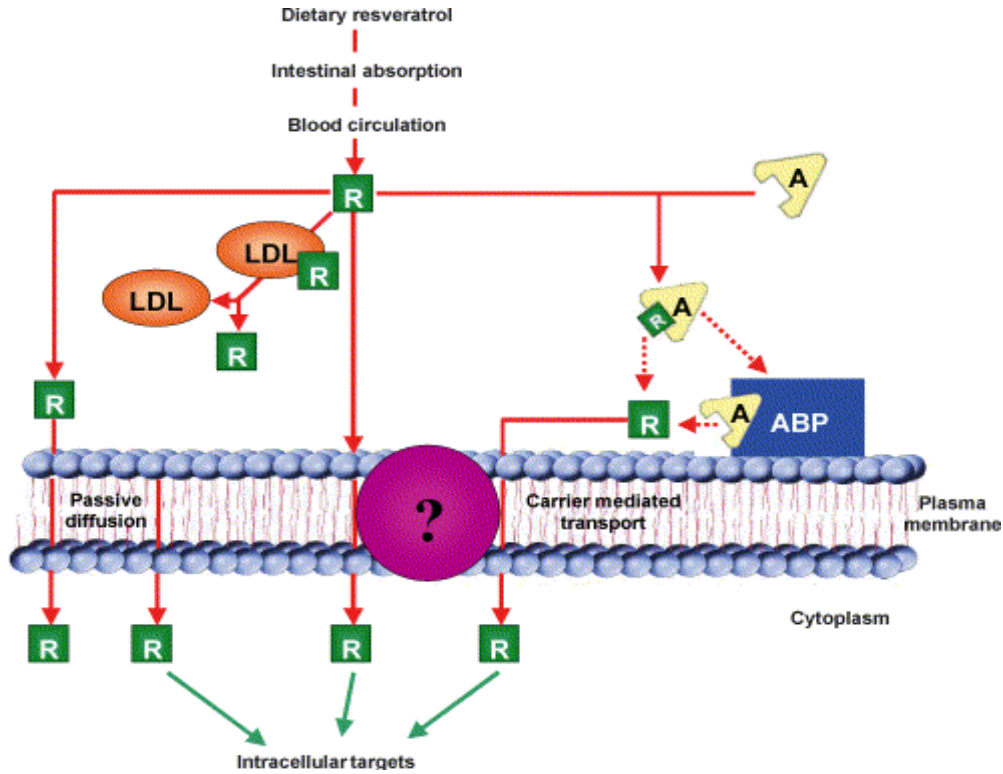
Resveratrol kısaca; stres, travma, enfeksiyon ya da uv ısıgı maruziyetinde 4-kumarol koenzim A (4-kumarol-CoA) ve malonil koenzim A (malonil-CoA)'dan sentezlenir, yani sentezi yapısal değil indüklenebilir. 4-kumarol-CoA ve malonil-CoA bütün bitkilerde bulunan enzimlerdir. 3 molekül malonil-CoA ve 1 molekül 4-kumarol28 CoA tetraketid yapısını oluşturur. Bu aşamaya kadar sentez basamakları aynı iken bundan sonra ki basamakta

oluşan ürünün RES mi yoksa flavonoit mi olduğu uzun yıllar sır olarak kalmıs. Daha sonra ise ortamda Resveratrol sentaz varsa ürünün RES ve kalkan sentaz varsa ürünün flavonoit olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 8. Final ürünlerdeki karbonların nerden geldiği renklendirme ile gösterilmektedir (127, 128).

Resveratrol, esas olarak albumine bağlanarak kanda taşınır. Lipoproteinlere de bağlandığı bildirilmiştir. Hepatoblastoma hücreleri üzerinde resveratrolün kinetik karakteriyle ilgili yapılan çalışmaya göre; RES hücre içine asıl olarak taşıyıcı aracılı geçiş ve pasif difüzyonla alınmaktadır. RES albumine bağlanıp kompleks oluşturduktan sonra, albumin membran reseptörlerince bu kompleksin tutulduğu ve daha sonra da bu reseptörler tarafından serbest RES'ün hücre membranına doğru salıverildiği düşünülmektedir. Ancak bu aşamadan sonra geçişle ilgili bir bilgi bulunmamaktadır (129).



Şekil 9. Resveratrolün kanda taşınması ve hücre içine geçiş hipotezi (129).

2.4.1.2. Resveratrolün biyotransformasyonu :

Resveratrolün değişik doz ve uygulama süreleriyle yapılan biyoyararlanım çalışmalarına göre; RES oral yolla alındıktan sonra hızla bağırsaklardan emilir ve bir saat gibi kısa sürede kana geçer ve karaciğer, böbrek, kalp ve beyin basta olmak üzere çeşitli organlara dağılır. Oral yolla 25 mg verildiğinde en az % 70'inin emildiği bildirilmiştir. Saf RES ile doğal kırmızı şarap içimiyle alınan RES emiliminin karşılaştırıldığı çalışmalarda RES' in alkoldeki formunun daha fazla emildiği bildirilmiştir. Üzüm suyunun içilmesiyle emilen RES miktarı, saf RES emiliminden daha düşüktür. RES üzüm suyu içinde glikozit formundadır ve bu formunun RES emilimini güçleştirdiği düşünülmektedir. Biyotransformasyonu asıl olarak karaciğer mikrozomlarında ve az miktarda da bağırsaklarda olur.

Resveratrolün emiliminin hızlı olduğu, dokulara kolay tasındığı ve büyük oranda idrar yolu ile atıldığı gösterilmiştir (19). Resveratrolün farklı dokularda farklı etkinliği vardır. Bu etkiler 4 ana başlık altında toplanabilir.

1. Vazodilatör etki
2. Trombosit agregasyonu inhibisyonu
3. Antiinflamatuvar aktivite
4. Antioksidan aktivite

2.4.2. Resveratrolün Vazodilatatör Etkisi

Bu etkinin mekanizması tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Damar endotel hücrelerinden salınan NO' in, damar düz kasında kasılma-gevşeme yanıtları üzerine etkisi olduğu bilinmektedir. Resveratrolün vazodilatatör etkisi nitrik oksit antagonizması yolu ile ortaya çıkıyor olabilir. Resveratrolün ve kırmızı şarabın potansiyel kardiyoprotektif özelliklerinin yanında, damar tonusunu düzenleme, endotel fonksiyonunu sürdürme gibi etkileri de tespit edilmiştir (127). Kırmızı şaraptaki polifenollerin endoteli sağlam aorta halkalarında oluşturduğu vazodilatatör etkiden, endotel hücrelerinin varlığı ve endotel hücrelerindeki Ca^{+2} düzeyinin artışının sorumlu olduğu belirtilmiştir. Üzümde bulunan ekstirenin endoteli sağlam olan sıçan aorta halkalarında fenilefrin ile oluşturulan kasılma yanıtlarında anlamlı gevşeme cevabı oluşturduğu, endoteli çıkarılmış halkalarda ise etkisinin olmadığı gösterilmiştir (130). Resveratrolün kimyasal yapısı ve biyolojik etkileri östrojene benzemesi onun fitoöstrojen olduğunu düşündürmüştü de bu etkilerin östrojen reseptör blokerleri ile geri döndürülemediği gösterilmiştir (131).

2.4.3. Resveratrolün Trombosit Agregasyon İnhibisyonu

Trombositler damar endotelinde oluşan bir hasarda; kanın akışkanlığı değiştirmeksizin hızla hemostazı sağlamaya yarayan kan hücreleridir. Yaralanan damarda, hasarlı damarın subendotelyal alanlarına yapışırlar. Yaralanma yüzeyine yayılarak, agregasyonu ve trombus oluşumu için yeni trombositlerin toplanmasına katkıda bulunur. Bu hasarlanan endotelin normal iyileşme sürecidir. Kanama-pıhtılaşma fonksiyonunun temel hücresi olan trombosit fonksiyonlarının yetersizliği kanamaya, fazlalığı ise tromboza yol açabilir. Trombosit aktivasyon ve agregasyonunun artışı tromboz ve ateroskleroz patogeneğinde önemli risk faktörleridir (132). Araşidonik asitten siklooksijenaz enzimi ile oluşan TxA_2 trombositlerde agregasyonu tetikler, PGI_2 ise inhibe eder. Endotel kaynaklı NO'de agregasyon ve adezyonu inhibe eder (133). Agregasyonu tetikleyen ajanların trombositlerde hücre içi Ca^{+2} artırdıkları, inhibe edicilerin ise azalttıkları görülmüştür. Resveratrolün trans formu hücre içi kalsiyum miktarını düşürerek agregasyonu engeller (127). Resveratrolünün cis izomerinin daha fazla antiagregan olduğunu bildiren bir çalışma da mevcuttur (134).

2.4.4. Resveratrolün Antiinflatuar Aktivitesi

Resveratrolün bu aktivitesinin proteazlar, kompleman sistemi, bradikininler, NO, sitokinler, adezyon molekülleri ve prostaglandinler gibi inflamasyondan sorumlu tutulan maddelerin oluşumunu engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir (127, 135, 136). Trans-

resveratrolün antioksidan ve antiinflamatuvar etkisinin, immün sistem hücrelerinde inflamatuvar sitokinleri düzenleyerek ortaya koyduğu bilinmektedir (127).

İnvitro bir çalışmada trans-resveratrolün naturel killer hücrelerinin sitotoksitesini azalttığı, CD4 ve CD8 T henfositlerinde de sitokin üretimini düşürdüğü gösterilmiştir (137). Bir başka çalışmada resveratrolün hücrel toksisiteyi azalttığı, lenfosit proliferasyonunu baskıladığı, lenfosit kaynaklı interlökinlerin ve tümör nekroz faktörün (TNF- α) üretimini azalttığını gösterilmiştir (138).

2.4.5. Resveratrolün Antioksidan Aktivitesi

Resveratrolün antioksidan özelliği ve peroksi radikal süpürücü etkisi ile kalbi koruduğu düşünülmektedir. İskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarı, dokuda lipid peroksidasyonunu artırmakta ve peroksi radikaller oluşturmaktadır. Koroner oklüzyonla iskemi ve iskemi-reperfüzyon hasarının oluşturulduğu bir çalışmada, resveratrol koroner perfüzatta lipid peroksidasyonu göstergesi kabul edilen Melondialdehit düzeylerini anlamlı olarak azaltmıştır (139). Peroksi radikal süpürücü olarak bilinen ‘trolox’ ile karşılaştırılan bir çalışmada resveratrolün bu açıdan daha güçlü olduğu gösterilmiştir. Düşük dansiteli lipoprotein peroksidasyonlarının demir ve bakır iyonları ile artırıldığı bilinmektedir. Serbest radikal süpürücü etkinin araştırıldığı bir çalışmada resveratrolün demir ve bakır iyonları düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir (140). Resveratrolün bakır selasyon kapasitesinin yüksek olduğu bilinmektedir. Cis izomerinin selasyon kapasitesi trans izomerinin kapasitesinin yarısı kadardır. Bunun nedeni olarak OH gruplarının konumu gösterilmiştir. Resveratrolün bakır selasyon kapasitesinin yüksekliği, antioksidan özelliği ve radikal süpürücü özelliği birbirleri ile uyumaktadır (141). Resveratrolün lipid peroksidasyonunu azaltıcı etkisinin ‘epicatecin’, ‘catechin’ ve ‘quercetin’ gibi diğer fenollerden güçlü olduğu gösterilmiştir (142). Serbest radikallerin DNA hasarı yaptığı bilinmektedir.

Resveratrolün potent hidroksil radikal süpürücü etkisi ile DNA kırılmalarını azalttığı ortaya konmuştur (143). Düşük dansiteli lipoproteinlerin peroksidasyonunun resveratrol tarafından belirgin olarak azaltıldığı gösterilmiştir. Resveratrolün koroner damar hastalıklarına karşı koruyucu etkisinin anlaşılmasında, düşük dansiteli lipoproteinlerin oksidasyonunu önleyici etkisinin bulunması, çok önemli bir dönüm noktası olmuştur. Bunun yanı sıra resveratrolün lipid peroksidasyonunu azalttığı fakat hidroksil radikal süpürücü etkisinin anlamlı olmadığı bildirilen çalışmalar da mevcuttur (144).

Östrojenler klasik olarak kadın hormonu olarak bilinir. Ancak östrojen sentezi, erkek üreme sisteminde androjen hormonları kontrolünde bir miktar gerçekleşmektedir. Östrojen; erkek üreme döngüsünde nöroendokrin feedback ile kontrol edilerek, testisten ve androjenlerden lokal aromatzasyonla üretilir. Bu üretim testisin parakrin fonksiyonu dahilinde gerçekleşir (145). Bu bilgilere dayanılarak yapılmış bir çalışmada, yapısal olarak östrojenlere benzeyen trans-resveratrolün yetişkin sıçanlarda spermatogenez ve testis üzerine tedavi edici etkisi araştırılmış ve oral resveratrol tedavisi ile sıçanlarda spermatozoa üretiminde artış görölmüş ve herhangi bir yan etkiye rastlanmamıştır (146).

2.4.6. Resveratrolün Testis Üzerine Etkilerini Gösteren Çalışmalar

Normal dokuda resveratrol etkisini araştıran bir çalışmada, testislerin makroskopik görünüm ve ağırlık açısından farklılık göstermediği, ancak resveratrol verilen grupta seminifer grup dansitesinin ve spermatozoa sayısının daha yüksek bulunduğı gösterilmiştir. Aynı çalışmada anomali spermatozoa oranının daha düşük; serum LH, FSH ve testosteron düzeylerinin daha yüksek olduğı gösterilmiştir. Bu değışikliklerin nedeninin hipotalamus-hipofiz-gonad aksının resveratrol tarafından uyarılması olduğı bildirilmektedir (146). Testiste torsiyonla gerçekleştirilen iskemi- reperfüzyon hasarı sonrası resveratrol verilen sıçanlarda, germ hücre apoptozisinin anlamlı olarak azaldığı gösterilmiştir (147). Benzer bir çalışmada resveratrol verilen grupta torsiyon sonrası doku MDA düzeylerinin anlamlı olarak düşük; GSH seviyesinin ise anlamlı olarak yüksek bulunduğı gösterilmiştir (145). Sigaradaki toksik maddelerden Benzopirenin kullanılarak DNA hasarı ve apoptozis oluşturulan testis modelinde, resveratrol verilmesinin spermatozoa parametrelerindeki bozulmayı anlamlı miktarda azalttığı gösterilmiştir (148).

2.5. PERFLORLU BİLEŞİKLER

2.5.1. Genel Özellikleri

Perflorlu bileşikler, karbon zincirinde tüm hidrojenlerin flor ile değıştirildiğı organo-flor bileşiklerdir. Perflorlu bileşikler büyük moleküler ağırlığa sahiptir ve molekülleri farklı en az bir atom ya da fonksiyonel grup içermektedir. (1, 2, 3).

Dayanıklı, biyo-birikimli ve zehirli olan bu bileşiklerin birçok alanda etkin biçimde yararlanılmasının sebebi de uzun ömürlü olmalarıdır (2, 3, 4). Fotoliz, hidroliz ve biyolojik bozulmalara karşı dayanıklı olduklarından doğada çok uzun süre (yıllarca, on yıllarca) ve belki de sonsuza kadar kalabilirler (149).

Perflorlu bileşikler göl, okyanus, sediment, kanalizasyon, toprak, yağmur suyu, kapalı ve açık havada, ev tozunda bulunur ve çeşitli toksik etkilere yol açarak biyolojik sistemleri sekteye uğrattırır (150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157).

2.5.1.1. Perflorlu Bileşiklerin Kullanım Alanları:

Perflorokarbonlar çoğunlukla sanayide yüzey aktif madde ve karışımlarının kararlılığını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Leke ve su geçirmez özellikleri sayesinde ayakkabı, giysi, çanta gibi tüketici ürünlerde kullanılır. Ayrıca mutfak eşyaları, halı, mobilya, böcek ilaçları, yangın söndürme köpükleri, fotoğraf filmleri, temizlik maddeleri, yer cilaları, kağıt ürünleri, şampuan ve gıda ambalajı yapımında kullanılmaktadır (9).

2.5.1.2. Perflorlu Bileşiklerin Çevreye ve Besin Zincirine Katılma Yolları

Perflorlu bileşiklerin doğaya karışımının nedeni bu bileşiklerin doğrudan emisyonu ve kazara sızıntı şeklinde olabildiği gibi, PFC içerikli ürünlerin üretimi ve bunların kullanımıyla da olabilir (4, 8). Tüketiciler tarafından kullanılıp atılan PFC içerikli ürünler, çöp sahalarından sızarak çevreye karışabilirler. Ayrıca perflorlu bileşiklerin yağmur suyunda oluşan çökeltileri, bu bileşiklerin toprağa karışmalarına sebep olmaktadır. Bu yüzden toprağın perflorlu bileşikler açısından önemli bir çevresel atık deposu olduğu düşünülmektedir (5). Kullanılan yangın söndürücü köpükler de bu kimyasalların çevreye sızmalarına neden olmaktadır. Ayrıca yüzeyi temizlenen ürünlerin (elbise, halı vs) ve bu kimyasalların endüstriyel süreçlerde kullanımı perflorlu bileşiklerin kentsel atık su arıtma sistemlerine karışmasına neden olmaktadır (6). Bu şekilde perflorlu bileşikler sudaki beslenme ağına karışırlar (7, 8).

Perflorlu bileşikler küresel kirleticilerdir ve yayıldıkları yakın çevreyi kirlettikleri gibi, nehirlerle, hava akımlarıyla ve okyanus akıntılarıyla binlerce kilometre yolculuk yapabilmektedirler. Gezegenin sıcak bölgelerinden soğuk bölgelerine yayılırlar ve buralarda büyük oranda yoğunlaşarak yeniden dünya yüzeyine inerler. Bugün, kuzey kutbu gibi çok az endüstriyel etkinlik olan uzak bölgeleri bile kirletmiş durumdadırlar (4).

2.5.1.3. Perflorlu Bileşiklerin İnsanlara Sağlık Açısından Etkileri

Perflorlu bileşiklerin kağıt ve ambalajlı ürünlerde, ev ve iş yerlerindeki halılarda, lekelerle karşı dayanıklı kumaşlarda, temizliyicilerde kullanılması; insanların sürekli bu bileşiklere maruz kalma sebeplerinden biridir (158). Ayrıca PFC içeren kapalı ortam havasının ve tozunun, yetişkinler ve çocuklar tarafından solunumu, kullanılan teflon tavalar ve pizza kutuları gibi fast-food paketlenmesinde bu bileşiklerin kullanımı insanların bu kimyasallara maruz kalmasına neden olmaktadır (155, 159, 160). Perflorlu bileşiklerin

dünyadaki tüm canlıları ve doğal yaşamı tehdit ettiğine ilişkin birçok bilimsel kanıt vardır. İnsanların bu kimyasallara maruz kalmasına yol açan en önemli sebep özellikle et, balık ve çiftlik ürünleri gibi yağlı besinlerdir. Besin olarak tüketilen sıvı yağ, süt, tereyağı, et ve insan dokuları gibi yağlı maddelerde birikerek yoğunlaşmaktadır. Haziran 2000’de ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA), çok yağlı besin tüketen insanların dioksine maruz kaldıklarını ve binde bir oranında kanser riskiyle karşı karşıya olduklarını saptamıştır. Perflorlu bileşiklerin plasenta yoluyla anne rahmindeki fetusa, anne sütü yoluyla da bebeğe geçtiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda anne sütü emen bebekler için, Dünya sağlık örgütü’nün kalıcı organik kirletici dioksinler için belirlemiş olduğu günlük üst sınırının 144 katına kadar çıktığı saptanmıştır (9).

Perflorlu bileşiklerin sağlık açısından oluşturduğu etkilerden bazıları; endokrin bozuklukları, öğrenme bozuklukları, infertilite gibi üreme sorunları, bağışıklık sistemi değişimleri, endometriosis şeker hastalığı sıklığında artış şeklinde sıralanabilir (9). Hayvanlar ve gelişme çağındaki gençler, bu kimyasalların toksik etkilerinden en fazla zarar gören gruplardır. Bazı araştırmalar bu kimyasalların pankreas, karaciğer, testis ve meme kanseri riskini arttırabileceğini işaret etmiştir. Hamilelikte düşük riski, kilo kaybı, tiroid problemleri, bağışıklık sisteminde zayıflık gibi farklı sorunlarda bu bileşiklerle ilişkilendirilmiştir (10).

2.5.2. Perflorlu Bileşiklerin Türleri

Perfluoroalkil asitler (PFAAs), karbon omurgası genellikle 4-14 karbon uzunluğundan oluşan perflorlu kimyasallar ailesindendir ve perfluorooktanoik asit (PFOA), perfluorooktane sulfat(PFOS),perfluorodekanoik asit (PFDA) ve perfluorododekanoik asit (PFDoA) içermektedir (178). Bunların dışında çok sayıda perflorlu bileşik türü mevcuttur (tablo 1) .

Tablo 1. Florokimyasal listesi (179).

İSMİ	TİCARİ İSMİ
PFDoA	Perflorododekanoik asit
POSF	Perflorooktan sülfonil florit
PFOA	Perflorooktanoik asit
PFOS.NH ₄ tuzu	Amonyum perflorooktan sülfonat
PFOS.DEA tuzu	Perflorooktan sülfonat, diethanolamin tuzu
PFOS.K tuzu	Potasyum Perflorooktan sülfonat
PFOS.Li tuzu	Lityum Perflorooktan sülfonat
FOSA	Perflorooktan sülfonamid
PFOSH	Perflorooktan sülfonik asit
N-EtFOSA	N-Etil perflorooktan sülfonamid
N-MeFOSA	N-Metil perflorooktan sülfonamid
N-EtFOSE	N-Etil perflorooktan sülfonamid etanol
N-MeFOSE	N-Metil perflorooktan sülfonamid etanol
N-EtFOSEA	N-Etil perflorooktan sülfonamid etilakrilat
N-EtFOSEMA	N-Etil perflorooktan sülfonamid metakrilat
N-MeFOSEA	N-Metil perflorooktan sülfonamid etil akrilat
N-EtFOSGE	N-Perflorooktilsüfonil-N-Etilglisinat

2.5.2.1. Perflorododekanoik asit (PFDoA,C12)

Perflualkil asitlerden (PFCAs, $F(CF_2)_nCO_2$, $n \geq 7$) biri olan perflorododekanoik asit(PFDoA, $F(CF_2)_{11}CO_2$), 50 yıldan fazla, gıda paketlenme, yangın söndürme köpüğü, kozmetik, döşeme, surfaktan ve yüzey koruyucu gibi pek çok alanda kullanılmaktadır (11). PFDoA gibi omurgasında yediden fazla karbon içeren perflorlu kimyasalların vücutta metabolize olmaları ve vücuttan atılımı kolay olmamaktadır. Ayrıca kısa karbon zincirli perflorlu kimyasallara göre yüksek biyobirikim kapasitesine sahip ve fizyolojik olarak daha kalıcı olduğu görülmektedir (161). Fakat PFDoA'nın erkek hayvanlarda üreme toksisitesi ve ilgili mekanizmaları çok az bilinmektedir.

Akut (14 gün) ve kronik (110 gün) çalışmalarda, PFDoA tarafından oluşan testosteron inhibisyonunun, kolesterol taşıma ve steroidogeneze sorumlu genlerin ekspresyonunda değişiklik ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (12, 13).

O=C(O)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)C(F)(F)

PFC'lerin insanda ve küresel ortamda bulunması, toksisitesi, çevresel akıbeti ve insan maruziyet kaynakları önemli bir araştırma konusu olmuştur (167, 168). Bilimsel ve düzenleyici topluluklar tarafından yapılan araştırma faaliyetleri ve PFC'lerin toksikolojik çalışmaları son 10 yılda artmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma da Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Birimi'nden (DETFAB) temin edilen, Sprague Dawley suşu toplam 28 erkek sıçan (230- 240 gr) kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Sprague Dawley suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçilmiştir. Tüm denekler deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarları'nda 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20-26°C oda sıcaklığında %30-70 bağıl nemde barındırıldı. Denekler dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile ad libitum beslendi.

4 çalışma grubu oluşturuldu. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlendi.

Kontrol Grubu: Hiçbir müdahale yapılmayan grup (n=7).

Sham Grubu: Resveratrol ve PFDaA alkol ile çözüleceğinden alkolün etkilerini görebilmek için 14 gün boyunca 4ml/kg hacimde %5'lik alkol verilen grup (n=7).

Asit Grubu: 14 gün boyunca oral gavaj ile 10mg/kg PFDaA verilen grup (n=7).

Resveratrol + Asit Grubu: 14 gün boyunca oral gavaj ile 40 mg/kg resveratrol uygulamasından sonra ve 10 mg/kg PFDaA verilen grup (n=7).

Tüm gruplar için deney süresi 14 gün olarak belirlendi. PFDaA'nın toksik etkilerine karşı araştırmacı ve personel için maske ve eldiven kullanıldı. Toksik maddelerin hazırlanması, inhalasyonla zehirlenme riskine karşı çeker ocakta yapıldı. 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. ARAŞTIRMANIN TİPİ

Araştırma deneyseldir.

3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Araştırmanın deneysel ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Histokimyasal, immunohistokimyasal ve ultrastrüktürel değerlendirmeleri Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, biyokimyasal parametreler ise Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) gerçekleştirilmiştir.

3.3. ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ / ÇALIŞMA GRUPLARI

Kontrol Grubu: Hiç bir müdahale yapılmayan grup (n=7).

Sham Grubu: Resveratrol ve PFDoA alkol ile çözüleceğinden alkolün etkilerini görebilmek için 14 gün boyunca 4ml/kg hacimde %5' lik alkol verilen grup (n=7).

Asit Grubu: 14 gün boyunca oral gavaj ile 10 mg/kg PFDoA verilen grup (n=7).

Resveratrol+ Asit Grubu: 14 gün boyunca oral gavaj ile 40 mg/kg resveratrol uygulamasından sonra ve 10 mg/kg PFDoA verilen grup (n=7).

3.4. ÇALIŞMA MATERYALİ

Bu çalışmada Spraque Dawley suşu toplam 28 erkek sıçan (230- 240 gr) kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Spraque Dawley suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçilmiştir. Tüm denekler deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarları'nda 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20-26°C oda sıcaklığında %30-70 bağıl nemde barındırıldı. Denekler dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile ad libitum beslendi.

3.5. ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ

Çalışmada kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Sham grubuna, resveratrol ve PFDoA alkol ile çözüleceğinden alkolün etkilerini görebilmek için 14 gün boyunca 4ml/kg hacimde %5'lik alkol verilmiştir. Asit Grubuna, 14 gün boyunca oral gavaj ile 10mg/kg PFDoA verilmiştir. Resveratol + asit grubuna ise 14 gün boyunca oral gavaj ile 40 mg/kg resveratrol verildikten sonra 10 mg/kg PFDoA uygulanmıştır.

3.6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada deneklerin ağırlıklarını ölçmek için 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 çember ve otomatik mikropipetler kullanılmıştır. Biyokimyasal incelemeler için HPLC, soğutmalı santrifüj, santrifüj, terazi, pH metre, vorteks, manyetik karıştırıcı, derin dondurucu, plak okuyucu (Abs/Flu/Lum) kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada kullanılan yöntemler

3.6.2.1. Perflorododekanoik Asidin Hazırlanması

PFDoA, %96 saflıkta Alfa Aesar' dan temin edildi. PFDoA ve koruyucu gruplar için belirlenen 10 mg/kg asit (PFDoA) dozu için sıçanların ortalama kiloları hesaplandı. Ortalama

250 gr gelen sıçanlar için, her bir sıçanın günlük alması gereken PFDoA miktarı 2. 5 mg olarak belirlendi (12). PFDoA, literatürle uyumlu olarak alkolde çözüldü (169). %96'lık alkolden 5 µl alınarak yaklaşık 2. 5 mg PFDoA ependorf tüp içinde çözülerek üzeri 1 ml'ye kadar distile su ile tamamlandı. Belirlenen doz 1 ml' lik insülin enjektörü ile oral gavaj yöntemi ile verildi. PFDoA tazeliğini koruması için günlük hazırlandı.

3.6.2.2. Resveratrolün Hazırlanması

Resveratrol, $\geq 98,0$ % saflıkta Cayman Chemicals (USA) ' dan temin edildi. Koruyucu grubuna verilecek resveratrol dozunu belirlemek için sıçanların ortalama kiloları hesaplandı. Seçilen 40 mg/ kg resveratrol dozu için ortalama 250 gr gelen bir sıçanın günlük alması gereken miktar 10 mg olarak belirlendi (170). Resveratrolün tazeliğini korumak için haftalık solüsyonlar hazırlandı. Bir haftalık resveratrol dozu, sıçan ağırlıkları göz önünde bulundurularak 490 mg olarak belirlendi ve tartılarak falcon tüpe aktarıldı. Hazırlanan solüsyon vortekslendikten sonra aliminyum folyo ile sarılarak buzdolabında saklandı.

3.6.2.3. Doku Örneklerinin Hazırlanması

Deney süresi biten sıçanların ağırlıkları, sakrifikasyondan önce terazi ile tartıldı. Sıçanlar sakrifikasyon için eter anestezisi altına alındı. Ardından testis dokuları çıkarıldı. Sol testis ışık mikroskopik inceleme için, sağ testis ise elektron mikroskobu ve biyokimyasal inceleme için ayrıldı. Işık mikroskopik incelemeler için sol testis, % 10' luk formaldehite alındı. Sağ testisin bir kısmı elektron mikroskopik inceleme için % 2,5' luk gluteraldehite, diğer kısmı ise biyokimyasal inceleme için ependorf tüplere alındı. Biyokimyasal inceleme için alınan örnekler -80°C ' ye kaldırıldı.

3.6.2.4. Rutin Doku Takibi

%10'luk formaldehitte üç gün bekletilen testis dokuları, rutin histolojik takip işlemlerinden geçirildi.

Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi.

- %70' lik alkol (20 dk)
- %80' lik alkol (20 dk)
- %96' lık alkol (20 dk)
- Aseton 1 (20 dk)
- Aseton 2 (20 dk)
- Aseton 3 (20 dk)
- Aseton 4 (20 dk)

- Ksilol 1 (30 dk)
- Ksilol 2 (30dk)
- Parafin 1 (1 saat)
- Parafin 2 (1 saat)

Dokular parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla dokulardan lizinli lamlara 5 μ m kalınlığında kesitler alındı. Kesitlerin bir kısmı ışık mikroskopunda incelenmek üzere Hematoksilen Eosin (H&E), Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Masson Trichrome boyası ile, diğer kısmı ise immunohistokimyasal incelemeler için Tunel ve Aktif Caspase- 3 yöntemiyle boyandı.

3.6.2.5. Işık mikroskopik incelemeler

3.6.2.5.1. Hematoksilen& Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C' lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk (etüvde), diğer ikisi 10' ar dakikalık üç farklı ksilende bekletildi. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 kere absolü alkol ve %96' dan % 70' e azalan alkol serilerinden geçirildi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 5 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dk akarsuda yıkanan kesitler, 45 sn Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler, şeffaflandırma amacıyla 20' şer dk 3 değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

3.6.2.5.2. Periyodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dk 60 ° C 'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk (etüvde) diğer ikisi 10' ar dakikalık üç farklı ksilende bekletildi. Rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96' dan %70' e azalan alkol serilerinden geçirildi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 3-5 dk periyodik asit ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 1-2 dk akarsuda yıkanan kesitler, 20-23 dk schiff boyası ile boyandı. Boyamadan sonra kesitler 5 dk akarsuda tutuldu ve 1 dakika Mayer's hematoxylen ile boyandı. Daha sonra rehidratasyon işlemi için sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflandırma amacıyla 20'şer dk 3 değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

3.6.2.5.3. *Masson Trichome Boya Protokolü*

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dk 60 ° C 'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dk (etüvde) diğer ikisi 10' ar dakikalık üç farklı ksilende bekletildi. Rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96' dan %70' e azalan alkol serilerinden geçirildi. Kesitler distile su ile çalkalandıktan Masson Trichrome boyama seti (Bio- Optica, 20134, Milano, İtalya) içerisinden dokular üzerine 6 damla reaktif A ve 6 damla reaktif B damlatılarak 10 dakika bekletildi. Yıkama yapılmadan kesitlerden reaktifler süzdürülerek 10 damla reaktif C damlatıldı ve 4 dakika bekletildi. Distile su ile yıkama yapıldıktan sonra 10 damla reaktif E damlatılarak 10 dakika bekletildi. Yıkama yapılmadan kesitlerden reaktifler süzdürüldü ve 10 damla reaktif F damlatılarak 5 dakika bekletildi. Distile su ile yıkama yapıldıktan sonra kesitler hızlıca artan alkol serilerinden geçirildi ve 1 dakika absolü alkolde bekletildi. Ksilolde şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.2.6. *Histolojik skrolama*

3.6.2.6.1. *Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru*

Rutin doku takip işlemlerinin ardından 5 µm kalınlığında alınan kesitler PAS ile boyandı. Her grup için ayrı ayrı 100 tübül değerlendirilerek, her bir tübüle Johnsen testiküler biyopsi skrolaması yapıldı. Yöntemin skor tablosu şekil 11'de gösterilmiştir. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. P <0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

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

Şekil 11. Jonhsen Biyopsi Skor Tablosu

3.6.2.6.2. *Seminifer Tübül Çap Ölçümü*

Rutin doku takip işlemlerinin ardından 5µm kalınlığında alınan kesitler PAS ile boyandı. Seminifer tübül çap ölçümü için oval ya da ovale yakın tübüller tercih edildi. Her grup için 100 tübül olacak şekilde rastgele seçilen toplamda 500 tübülde, 20 X'lik objektifte UTHSCA Image Tool Version 3.0 programı kullanılarak çap ölçümü yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. P <0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.6.3. *Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü*

Rutin doku takip işlemlerinden geçirildikten sonra 5µm kalınlığında alınan kesitler PAS ile boyandı. Bazal membran ölçümü, her bir gruptan rastgele seçilen 100 tübülde 100X' lik objektif altında UTHSCA Image Tool Version 3. 0 programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. P <0,05 olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.7. *İmmunohistokimyasal incelemeler*

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için DNA fragmentasyonu immunolojik yöntemle 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 deoksiniükleotidler 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.

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

Bu teknik için Apoptag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kiti (Millipore S7101, USA) kullanıldı.

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 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 (TA-015-HP, Lab vision, Fremont, CA) 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 hematoksilin ile art alan boyaması yapıldı ve 3

değişim ksilol ile şeffaflaştırılan kesitler entellan ile kapatıldıktan sonra mikroskopta görüntülendi.

3.6.2.7.2. *Active Caspase-3 Boya Protokolü*

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 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 'Sekonder 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.

3.6.2.8. *Ultrastrüktürel İncelemeler*

3.6.2.8.1. *Elektron Mikroskobu Doku Takibi*

Karnovski solüsyonuna (pH 7. 4) konulan dokular 4°C'de bir gece bırakıldı. 0,1 M sodiumphosphate buffer ve 0,1 M sucrose karışımında 3 kez 15 dk bekletildi. %2 sodiumphosphate buffered osmium tetraoxide (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 uranylasetat ve %1 phosphotungstic acid karışımı ile 4°C'de kontrast amaçlı overnight'a bırakıldı. Sırasıyla %80,90 ve 96'luk 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.

3.6.2.9. Biyokimyasal incelemeler

3.6.2.9.1. Malondialdehit Düzeylerinin İncelenmesi

MDA düzeyleri, sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan HPLC yöntemi ile belirlendi. HPLC çalışma prensibi, bir kolon içerisindeki karışımdan 2 veya fazlasıyla çok bileşenin, hareketli (taşıyan) bir faz yardımıyla, durağan (sabit) bir faz arasından farklı hızlarda kinetik etmeleri esasına dayanır.

Analiz Koşulları

- Kolon özellikleri: 250x 4,6mm 5µM tanecik çapında C18 kolon
- Mobil faz bileşimi: KH_2PO_4 (0,01M) %30 metanol içerecek şekilde hazırlanır. K_2HPO_4 (0,01M) %30 metanol içerecek şekilde hazırlanır (pH 7)'ye ayarlanır. Mobil faz 0. 2 µM çapında filtreden geçirilerek süzülür.

- Mobil faz akış hızı: 0,8mL/dakika
- Gradient program: İzokratik
- Fırın sıcaklığı: 30 °C
- Dedektör: Floresans (eksitasyon 515 nm, emisyon 553 nm)
- Enjeksiyon hacmi: 10 µL
- Standart/ standart için çözgen: Standartlar saf su ile çözülür ve dilue edilir.

Uygulama basamakları

1. 40 µL, örnek (veya standart) kapaklı cam tüplere konur.
 2. 100 µL saf su ilave edilir.
 3. 20 µL, 2. 8 mmol/L BHT (etanolde) ilave edilir. 40 µL, %81 SDS, 600 µL, 8 g/L TBA+Asetik asit karışımı ilave edilir.(TBA, 200 mL/L asetik asid ile 1: 1 dilue edilir, 2 M NaOH pH NaOH ile 3. 5'a ayarlanır.)
 4. 95 °C'de su banyosunda 1 saat bekletilir.
 5. Su banyosundan çıkarıldıktan sonra buz üzerinde soğutulur.
 6. 200 µL saf su, 1000 µL, butanol: piridin (15: 1) ilave edilir ve tam 1 dakika vorteksenerek karıştırılır. 2-3 dakika tüpler bekletilir.
 7. Renkli üst (organik) fazın kendiliğinden ayrıldığı gözlenir.
 8. Üst fazlar eppendorf tüplerine alınır.
 9. 10,000 rpm'de 5-10 dakika santrifüj edilir.
- HPLC cihazına 10 mikrolitre enjeksiyon yapılır

3.6.2.9.2. GSH (indirgenmiş glutatyon) Düzeylerinin Belirlenmesi

GSH düzeyleri, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlendi.

Analiz Koşulları

- Kolon özellikleri: 250/4,6 mm, 5µM C18 kolonu (ACE/121-254)
- Mobil faz bileşimi: Mobil faz; 50 mM CH₃COONa ve asetonitril 70:30 oranında karışımı hazırlanır. Karışımın pH'sı 50 mM asetik asit ile 6.20 ye ayarlanır. Mobil faz 0. 2 µM çapında filtreden geçirilerek süzülür.

- Mobil faz akış hızı: 0,7 mL/dakika
- Gradient programı: İzokratik
- Fırın sıcaklığı: Oda ısısı
- Dedektör: Floresans (eksitasyon 340 nm, emisyon 420 nm)
- Enjeksiyon hacmi: 10 µL
- Standart/ standart için çözgen: GSH standart 0.01 N HCl içinde çözünür.

Uygulama basamakları

A-İndirgenmiş glutatyon ölçümü için örneklerinin hazırlanması

100 µL örnek veya standarda, 150 µL Tris tamponu eklenir ve vortekslenir.

- Karışımdan 100 µL alınarak 800 µL % 6 MPA eklenir ve vortekslenir.
- 10,000 rpm, +4°C'de 7 dakika santrüfjü edilir.
- 100 µL süpernatanta, 400 µL fosfat tampon eklenir (nötralizasyon)
- 100 µL nötralize edilmiş örnek/standarta, 100 µL OPA eklenir.
- 5 dakika bekletilir.
- 800 µL fosfat tamponu eklenir.
- Hazırlanan örnekten 5 µL HPLC cihazına enjekte edilir.

B-Total glutatyon ölçümü için örneklerinin hazırlanması

1. 100 µL paket eritrosit veya standarda, 100 µL DTT ve 50 µL Tris tampon eklenir ve vortekslenir.

2. 30 dakika +4°C'de bekletilir.
3. Karışımdan 100 µL'ye 800 µL % 6 MPA eklenir ve vortekslenir.
4. 10,000 rpm ve +4°C'de 7 dakika santrüfjü edilir.
5. 100 µL süpernatanta, 400 µL fosfat tampon eklenir (nötralizasyon).
6. 100 µL nötralize edilmiş örnek/standarta, 100 µL OPA eklenir.

7. 5 dakika beklenir.

8. 800 µL fosfat tampon

9. Hazırlanan örnekten 5 µL HPLC cihazına enjekte edilir.

3.6.2.9.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzeylerinin Belirlenmesi

SOD düzeyleri, Superoxide Dismutase Assay Kit (Cayman Chemical Item No. 706002) kullanılarak belirlendi.

Standart grafiği için SOD stock solüsyonu hazırlandı. Bunun için;

20µl SOD standart, 1,98 ml sample buffer ile dilüe edildi. 7 temiz cam test tüpü A'dan G' ye işaretlendi. Her bir tübe tablo 2' de belirtildiği gibi SOD stock ve sample buffer eklendi

Tablo 2. SOD stock ve sample buffer

Tube	SOD stock (µl)	Sample Buffer (µl)	Final SOD Activity (U/ml)
A	0	1,000	0
B	20	980	0.025
C	40	960	0.05
D	80	920	0.1
E	120	880	0.15
F	160	840	0.2
G	200	800	0.25

SOD Standart kuyucuklarına, 200 µl dilüe edilmiş radical detector ve 10µl standart (A-G tüpler) eklendi.

Örnek kuyucuklarına, 200 µl dilüe edilmiş radical detector ve 10µl standart eklendi.

Reaksiyonu başlatmak için kuyucuklara 20µl dilüe edilmiş xanthine oxidase eklendi.

96 kuyucuklu plak, kapağı kapatılarak yavaşça karıştırıldı.

Oda sıcaklığında 20 dk inküe edildi ve plak okuyucuda 450 nm dalga boyunda plak okundu.

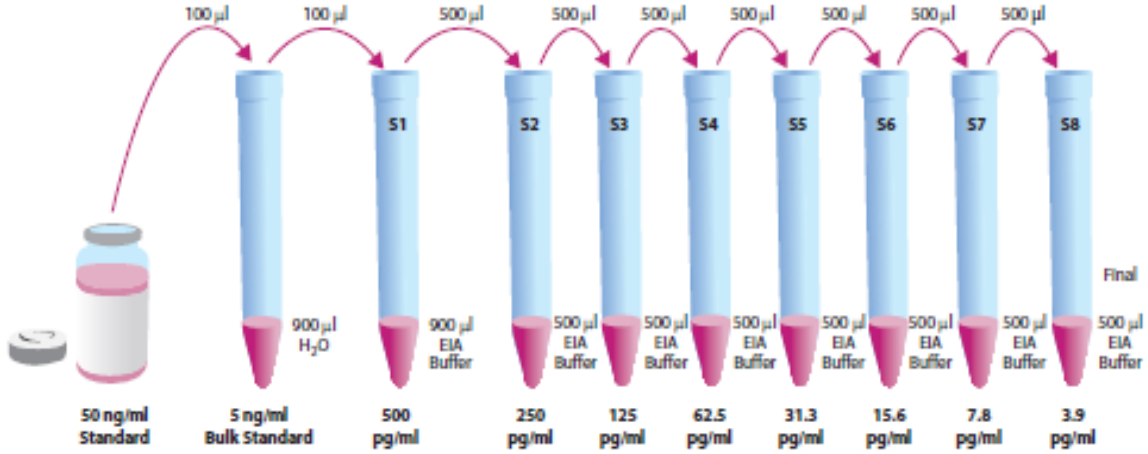
3.6.2.9.4. Testosteron Düzeylerinin Belirlenmesi

Testosteron düzeyleri, Testosterone EIA Kit (Cayman Chemical Item No. 582701) ile belirlendi.

Testosteron EIA standart hazırlamak için, pipet ucu art arda birkaç kez ethanol ile doldurulup boşaltılarak ethanolde dengelendi. Dengelenmiş pipet ucu kullanılarak 100 µl testosteron EIA standart (Item No. 482704) temiz test tüpüne aktarıldı. Sonra 900 µl ultrasaf su ile dilue edildi. Bu solüsyonun konsantrasyonu 5 ng/ ml dir.

8 test tüpleri 1'den 8'e kadar numaralandırıldı. 900 µl EIA buffer 1. Tübe, 500 µl EIA buffer 2'den 8'e kadar numaralandırılmış tüplere alikotlandı. Toplam standarttan (5 ng/ml)

100µl 1.tübe transfer edildi ve hızla karıştırıldı. Seri olarak standart, 1.tüpten 500 µl alınıp 2.tüpe aktarılırak dilüe edildi. Sonra 2.tüpten 500µl alınıp 3.tübe aktarıldı. Bu süreç 4'ten 8'e kadar numaralandırılmış tüplerde de devam etti.



Şekil 12. Testosteron standartlarının hazırlanması

Plakanın gelişimi; boş kuyucuklar wash buffer ile 5 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 200 µl Ellman's Reagent eklendi. Total aktivite kuyucuklarına 5µl tracer eklendi. Plaka plastik film ile kaplandı. Orbital karıştırıcı ile büyük düz kapak kullanılarak plağın karanlıkta gelişimi sağlandı. Bu testin gelişim süresi 60-90 dakikadır. 405- 420 dalga boyunda plak okuyucuda plak okundu.

3.7. ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ



3.8. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Veri analizleri Windows için SPSS'in 15. 0 versiyonu ile yapıldı. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $P < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI

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

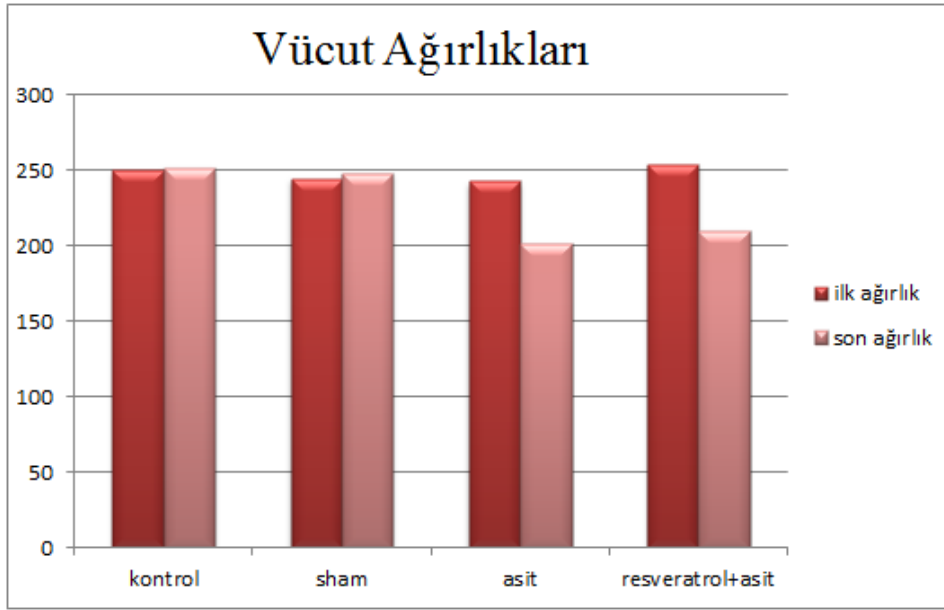
3.10. ETİK KURUL ONAYI

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu tarafından 04/19/2011 Toplantı no, 07 Ekim 2011 toplantı tarihinde 61/2011 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur. Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. HAYVAN AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Deney başlangıcında ve deney bitiminde (sakrifikasyondan önce) hayvanların ağırlıkları ölçülmüştür. Başlangıç ve son ağırlıklar şekil 13’da gösterilmiştir. Deney sonunda kontrol ve sham grupları hayvan ağırlıklarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0.05$). Asit ve resveratrol + asit grubundaki hayvanların ağırlıklarında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p < 0.05$). Sonuçlar SPSS 15,0 paket programında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 13. Başlangıç ve son vücut ağırlıkları

4.2. IŞIK MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRME

4.2.1. Hematoksilen- Eosin Boyama

Kontrol gruplarına ait testis dokularında, seminifer tübüller interstisyel doku içinde normal morfolojide görülmekteydi ve tübül epitelindeki spermatogonyum, spermatosit, spermatid ve sertoli hücreleri, bazal laminaya komşu myoid hücreler ile interstisyum ve bu alandaki leydig hücrelerinin normal yapıda olduğu gözlenmiştir. Spermatozoonların kuyrukları lümene ve baş kısımları ise sertoli hücrelerinin tepesindeki oyuklara girmiş durumdaydı. İnterstisyel alandaki leydig hücreleri, tipik eksantrik yerleşimli ve 1 yada 2 çekirdekçik içeren çekirdekleriyle normal görünümdeydi ayrıca interstisyel bağ dokusunda kan ve lenf damarları bulunuyordu. Seminifer tübülün bazal laminasına yakın yerleşen myoid hücrelerin de düzgün duruşları ve mekik tarzındaki çekirdekleri oldukça tipik görünümdeydi (şekil 14, 15, 16).

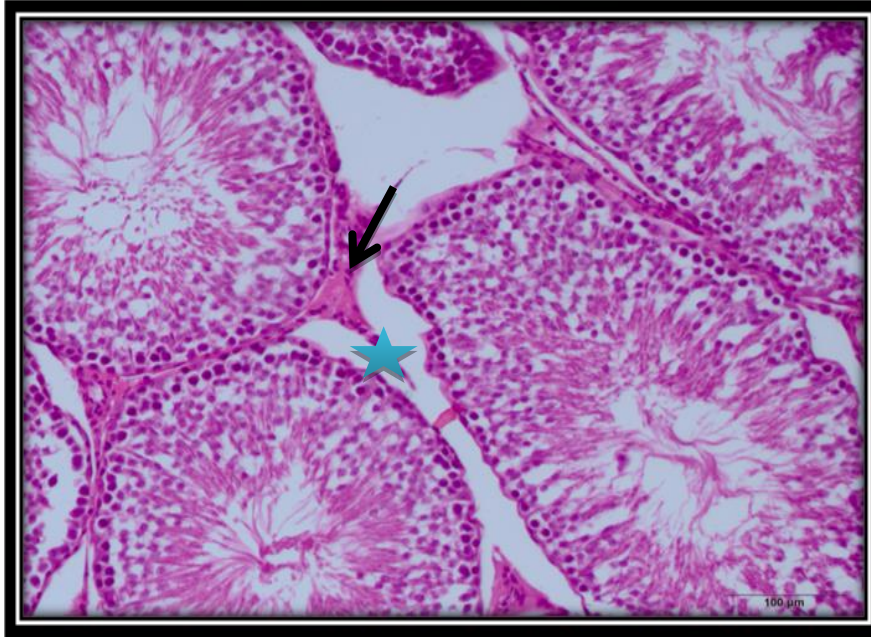
Sham grubuna ait testis kesitleri incelendiğinde birkaç vakuolize olmuş tübül dışında kontrol grubuna yakın testiküler morfoloji gözlenmiştir (şekil 17).

Asit grubu testis kesitleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; atrofik değişiklikler, tübüller arasındaki şekil ve boyut farklılıkları en göze çarpan özelliklerdi. Atrofik tübüllerin boyutlarındaki küçülme yanı sıra normal yapının bozulduğu, hücrelerin bazal membrandan ayrılarak lümene döküldüğü dikkat çekiciydi. Büyük büyültmelerde hücrelerin lümene dökülmüşü ile hücre debrisleri gözlendi. Sınırları bozulmuş tübül epitelinde vakuolizasyon alanları mevcuttu. Bu tübüllerde genelde germ hücre diziliminin bozulduğu ve spermiyogenezin duraksadığı gözlendi. Atrofik tübüllerde sertoli hücreleri dışında spermatogenetik seri hücrelerinden primer spermatosit ve spermatidler izlendi, ancak spermatozoa görülmedi. İnterstisyel alan testis dokusunun genelinde genişlemiş, leydig hücrelerinde azalma görülmekte idi (şekil 18, 19, 20).

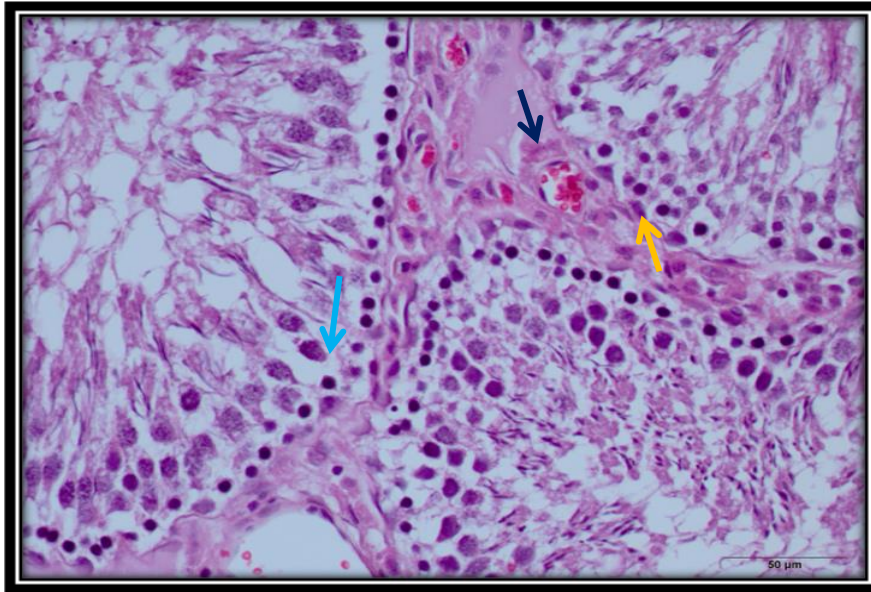
Koruyucu grup olan resveratrol + asit grubuna ait testis kesitleri incelendiğinde, gerek bazal lamina ve gerekse seminifer tübül yapıları kontrol grubuna benzer bir yapı gösteriyordu. Asit grubunda gözlenen dejenerasyonun neredeyse tamamen engellendiği dolayısıyla korunmuş spermatogenik hücreler, düzgün seminifer tübül yapısı, interstisyel alanda normale yakın görünümlü ve sayıda leydig hücreleri gözlendi. Spermatogenezin de normal olduğu ve spermium üretiminin devam ettiği görüldü. Bazı tübüllerde epitel hücreleri arasında az da olsa vakuollü görünüme rastlandı (şekil 21).



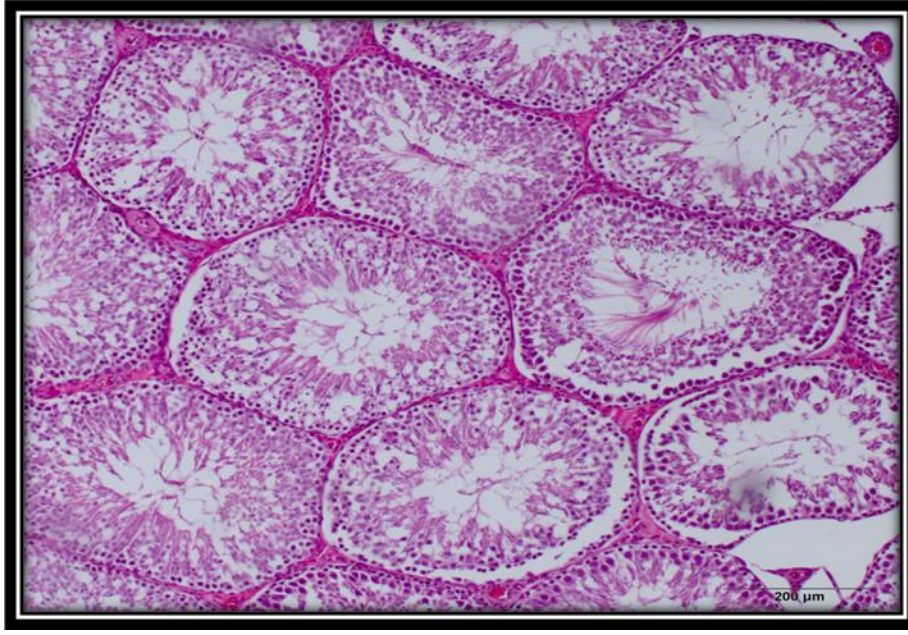
Şekil 14. Kontrol grubuna ait testis dokusu 10X H&E. Normal testis morfolojisi görünmektedir. **Mavi ok** interstisyel bağ doku. **Turuncu ok** seminifer tübül. **G.E** germinal epitel. **S.T.L.** seminifer tübül lümeni.



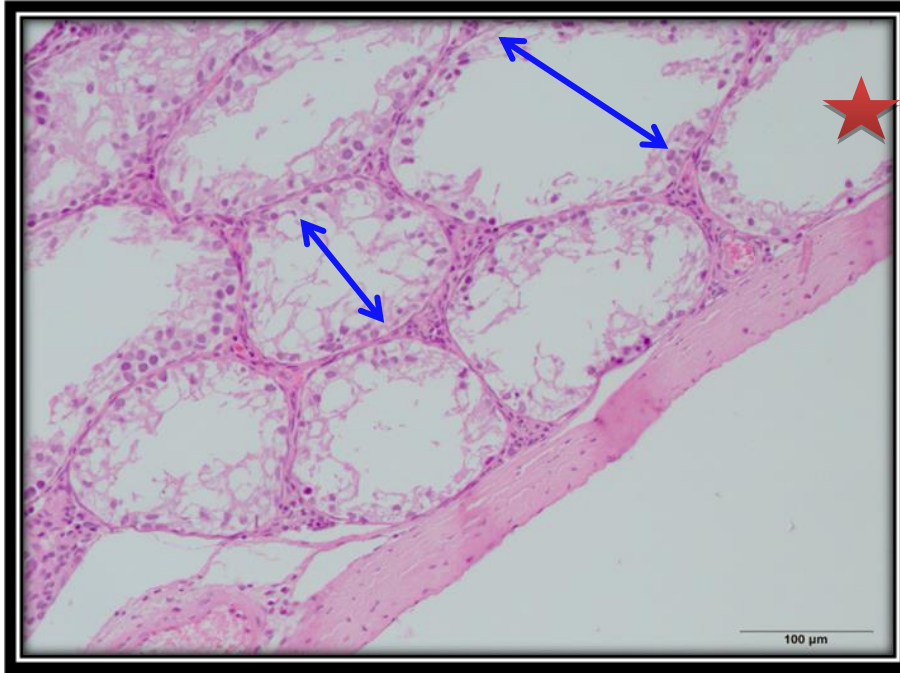
Şekil 15. Kontrol grubuna ait testis dokusu 20X H&E. Normal testis morfolojisi görünmektedir. **Yıldız** interstisyel bağ doku. **Siyah ok** Leydig hücreleri.



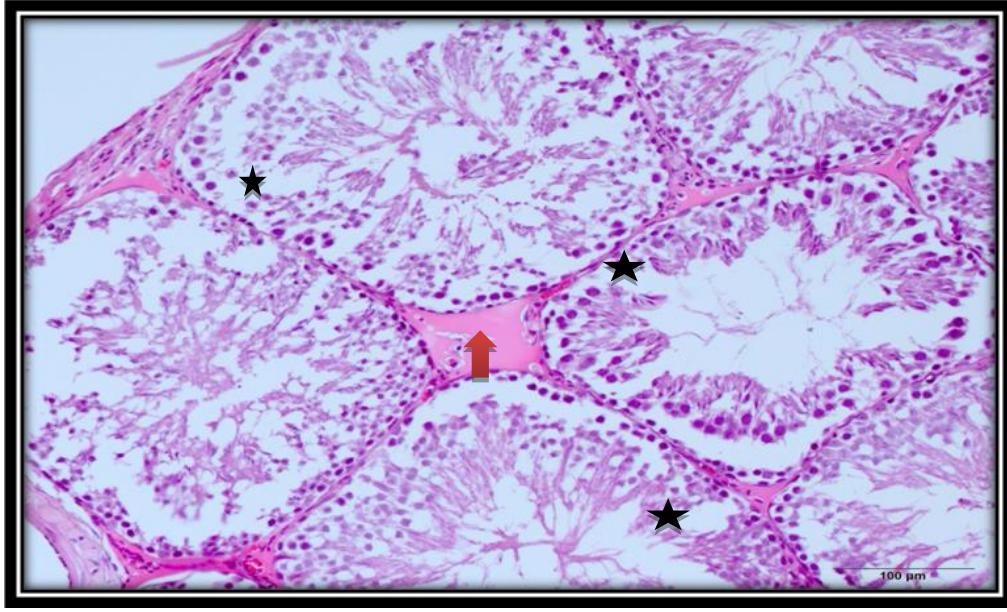
Şekil 16. Kontrol grubuna ait testis kesiti 40X H&E. **Lacivert ok** kan damarı. **Sarı ok** myoid hücreler. **Mavi ok** spermatogonium.



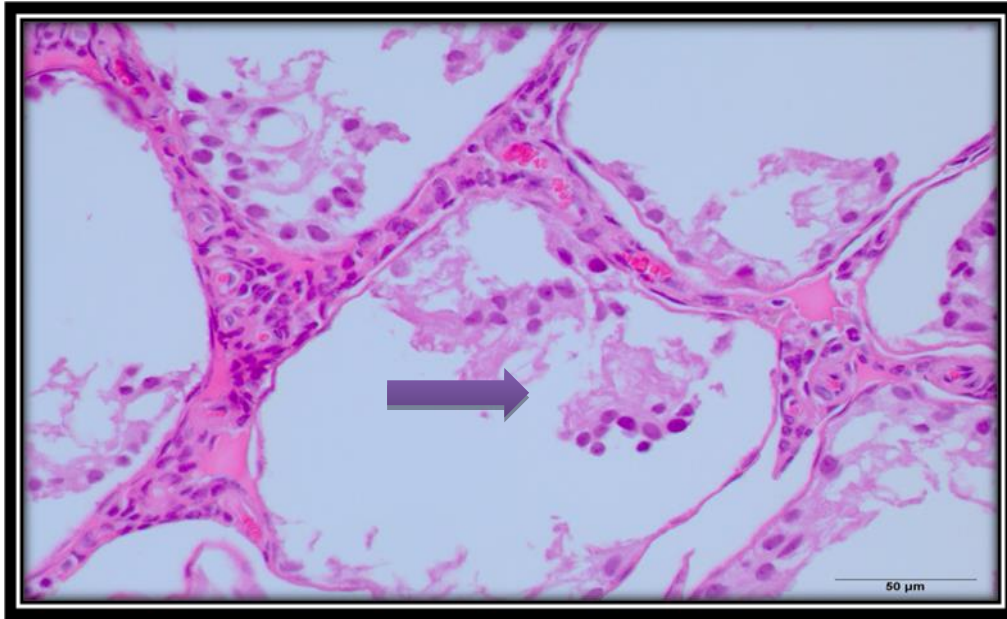
Şekil 17. Sham grubuna ait testis kesiti 20X H&E. Kontrol grubuna yakın morfolojik görünüm.



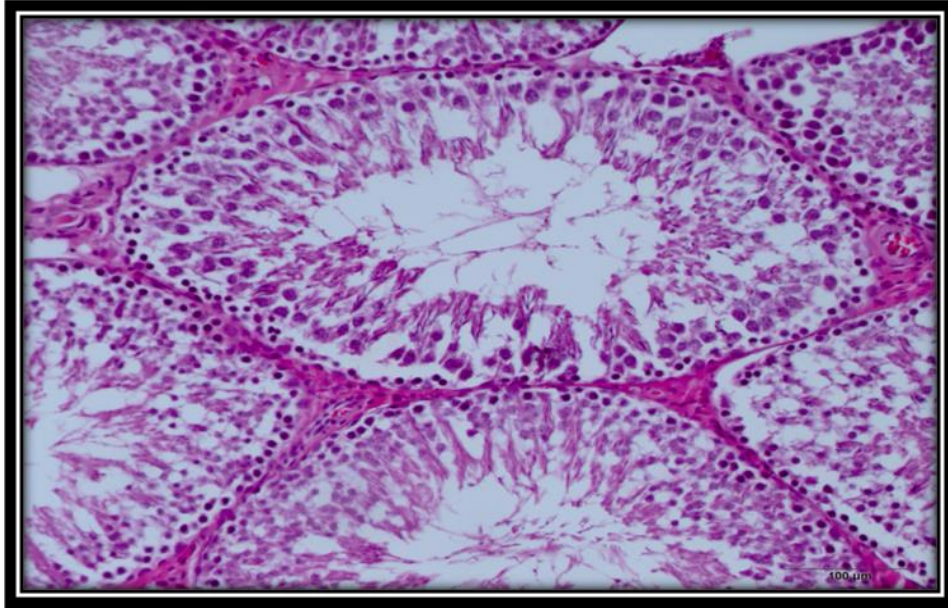
Şekil 18. Asit grubuna ait testis kesiti 20X H&E. **Mavi ok** Seminifer tübül çapında azalma seminifer epitel lümeninde genişleme ve seminifer epitel kalınlığında azalma. **Yıldız** seminifer tübüllerde atrofi görülmektedir



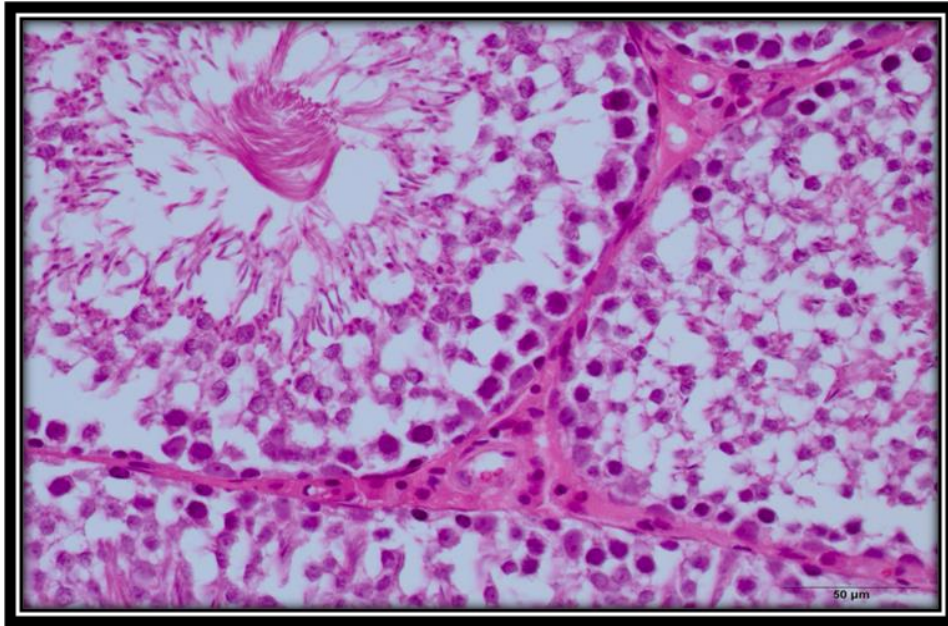
Şekil 19. Asit grubuna ait testis kesiti 20X H&E. Sınırları bozulmuş seminifer tübül. **Yıldız** seminifer epitelinde vakuolizasyon alanları. **Ok** genişlemiş interstisyel alan.



Şekil 20. Asit grubuna ait testis kesiti 40X H&E. Sınırları ve germ hücre dizilimi bozuk tübüller. **Ok** hücre debrisleri. İnterstisyel alanda bağ doku artışı görülmektedir. Seminifer tübüllerde spermatozoa görülmemektedir.



Şekil 21. Resveratrol+asit grubu 20X H&E. Kontrol grubuna yakın morfoloji görülmektedir.



Şekil 22. Resveratrol+ asit grubu 40X H&E

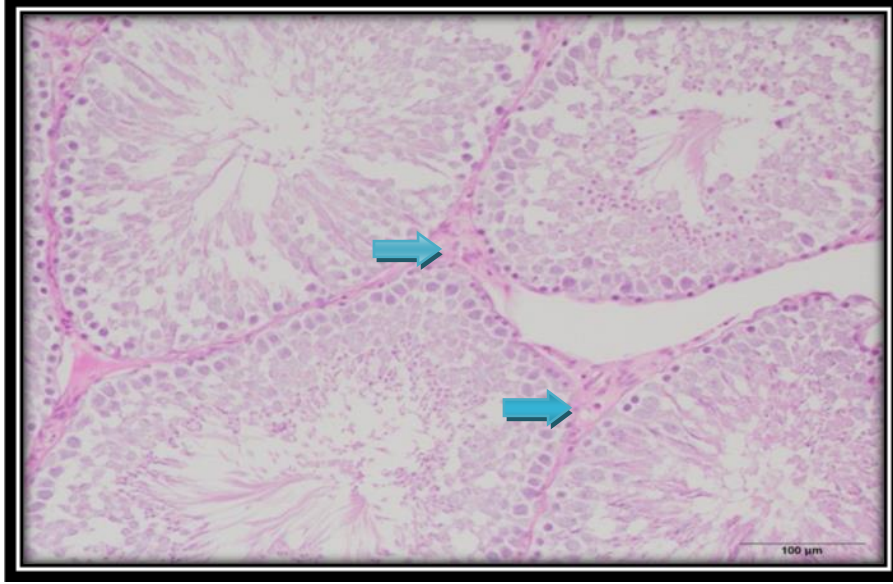
4.2.2. PAS Boyama

Kontrol grubu ait kesitlerin PAS boyamaları incelendiğinde, seminifer tübüllerin bazal membranları normal olarak izlenmektedir.

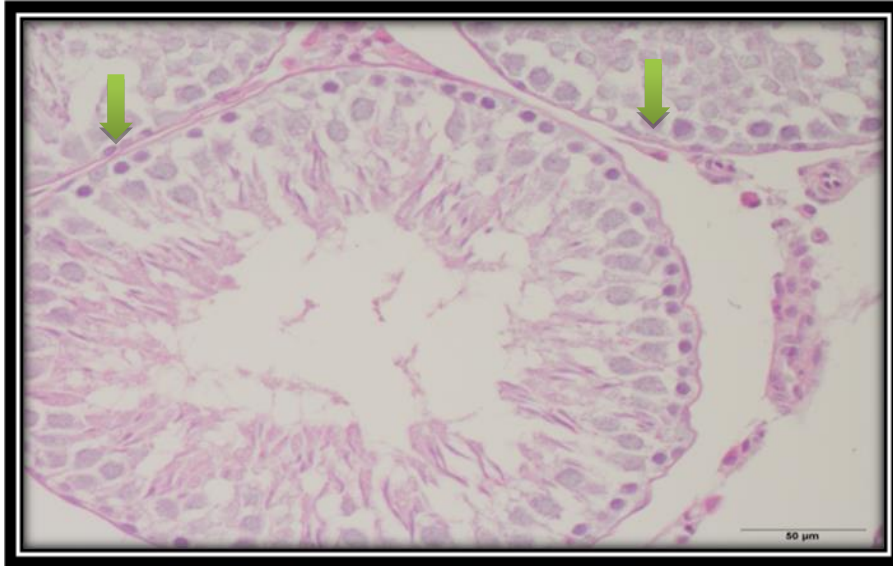
Sham grubuna ait PAS boyamaları incelendiğinde kontrol grubuna yakın morfoloji gözlemlendi.

Asit grubuna ait kesitlerin PAS boyamasında tübül çevresindeki bazal membranda bozulmalar mevcuttu. Ayrıca bazal membran kalınlığında ve intersitisyel bağ dokuda artış gözlenmiştir.

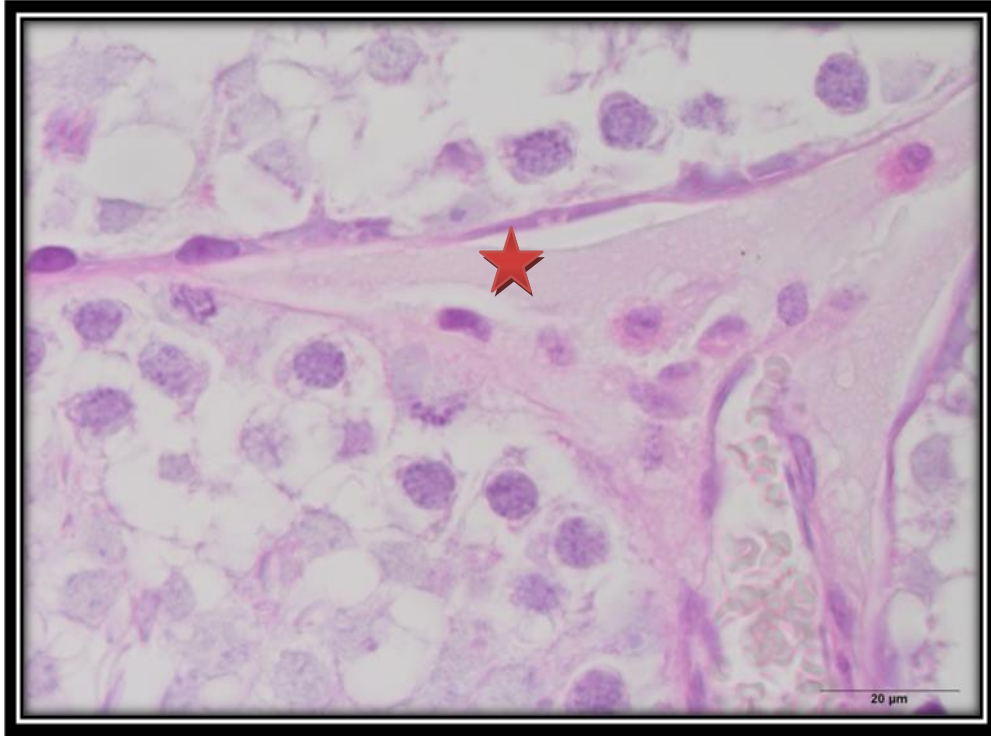
Resveratrol+asit grubunda ise seminifer tübüllerde normal testiküler morfoloji ve bazal membran kalınlığının kontrol grubuna yakın olduğu gözlenmiştir.



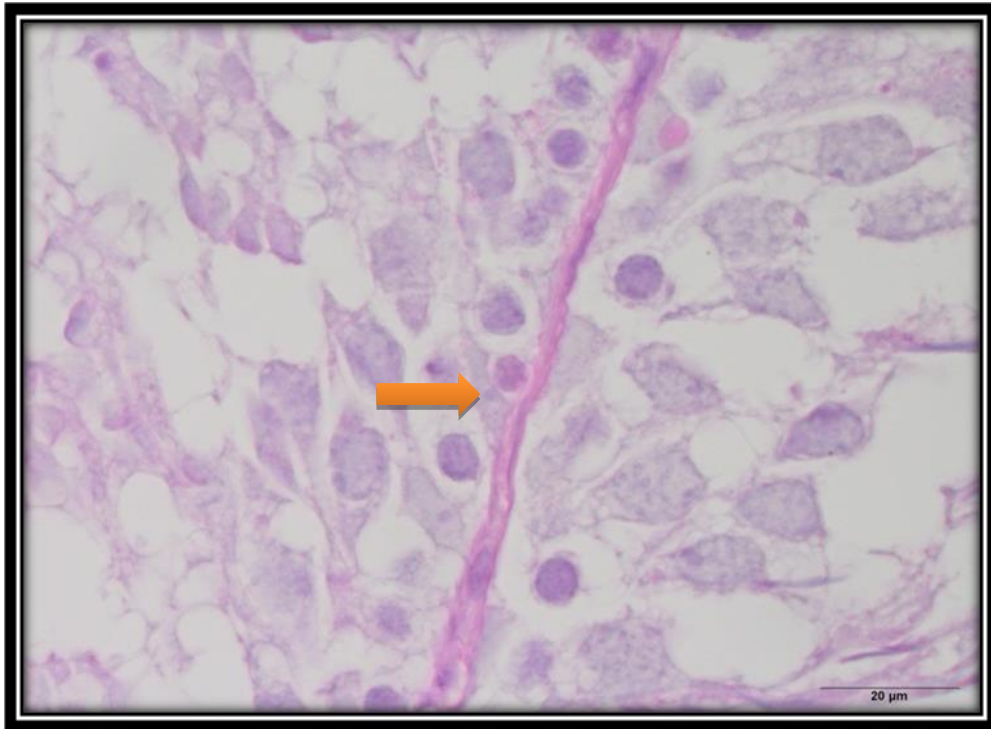
Şekil 23. Kontrol grubuna ait testis kesiti 20X (PAS). Ok intersitisyel alanda bağ doku normal görünümde



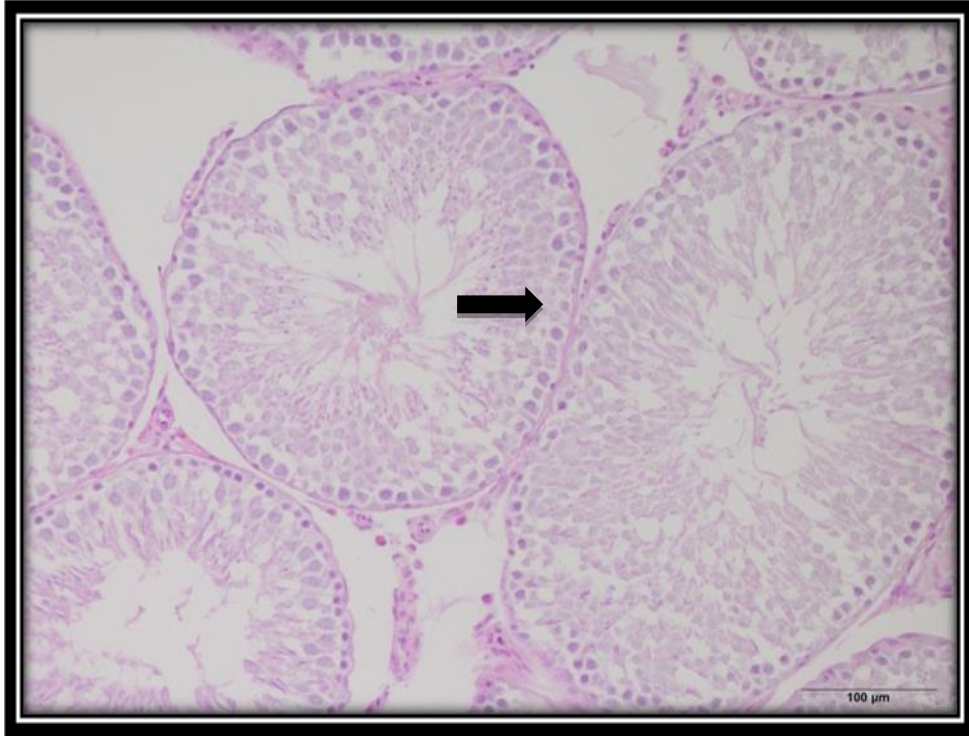
Şekil 24. Kontrol grubuna ait testis kesiti 40X (PAS). Ok seminifer tübül bazal membran normal kalınlıkta



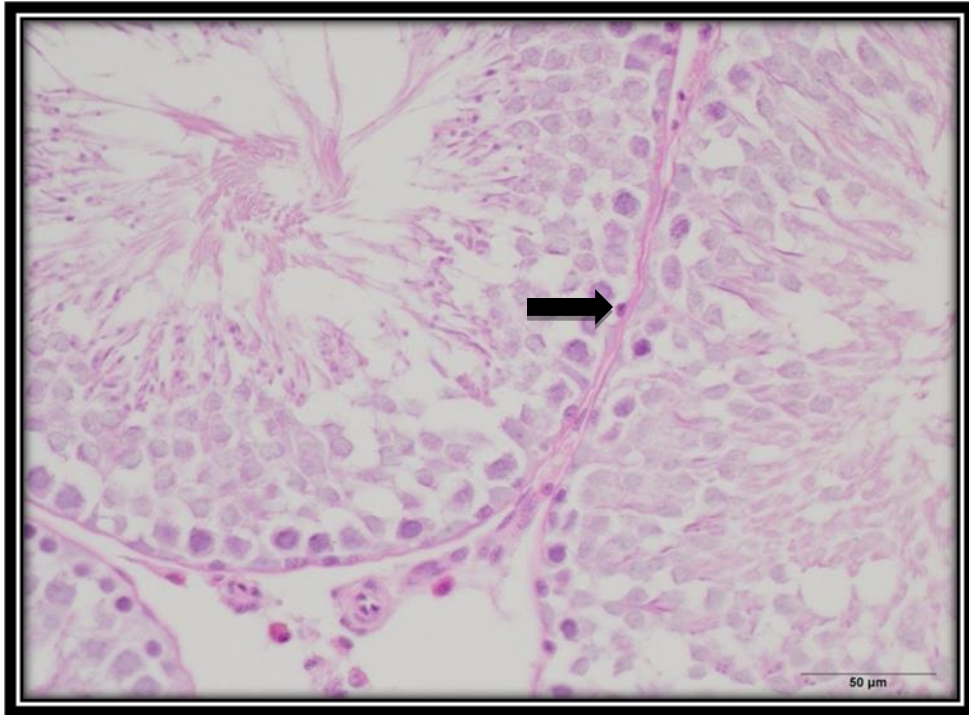
Şekil 25. Kontrol grubuna ait testis kesiti 100X (PAS). **Yıldız** intersitisyel alanda bağ doku normal görülmektedir.



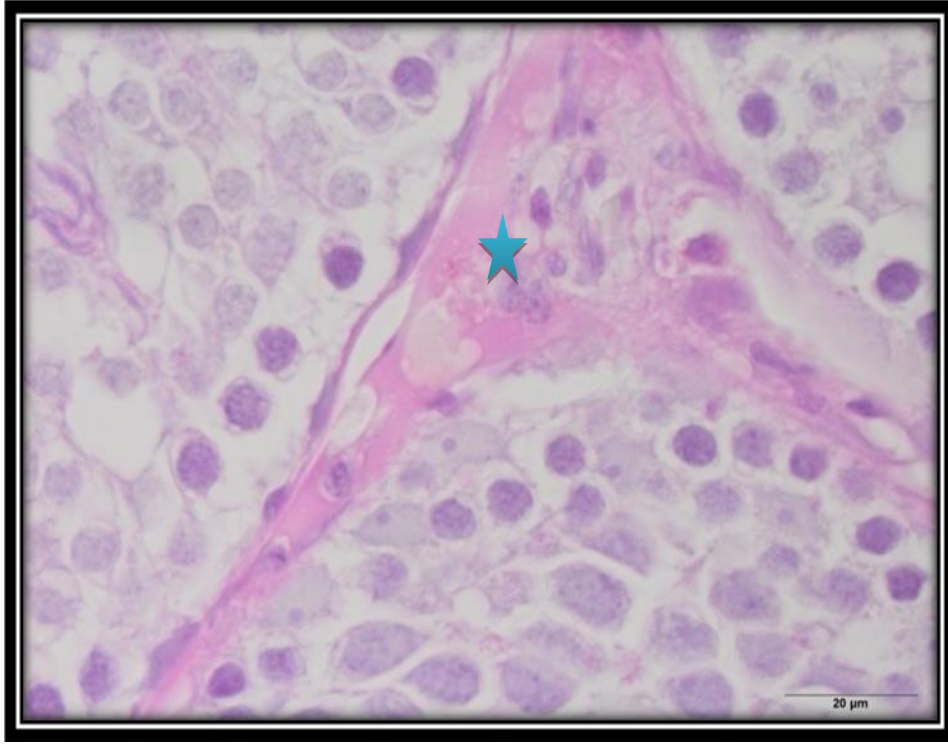
Şekil 26. Kontrol grubuna ait testis kesiti 100X (PAS). **Ok** bazal membran normal kalınlıkta görülmektedir.



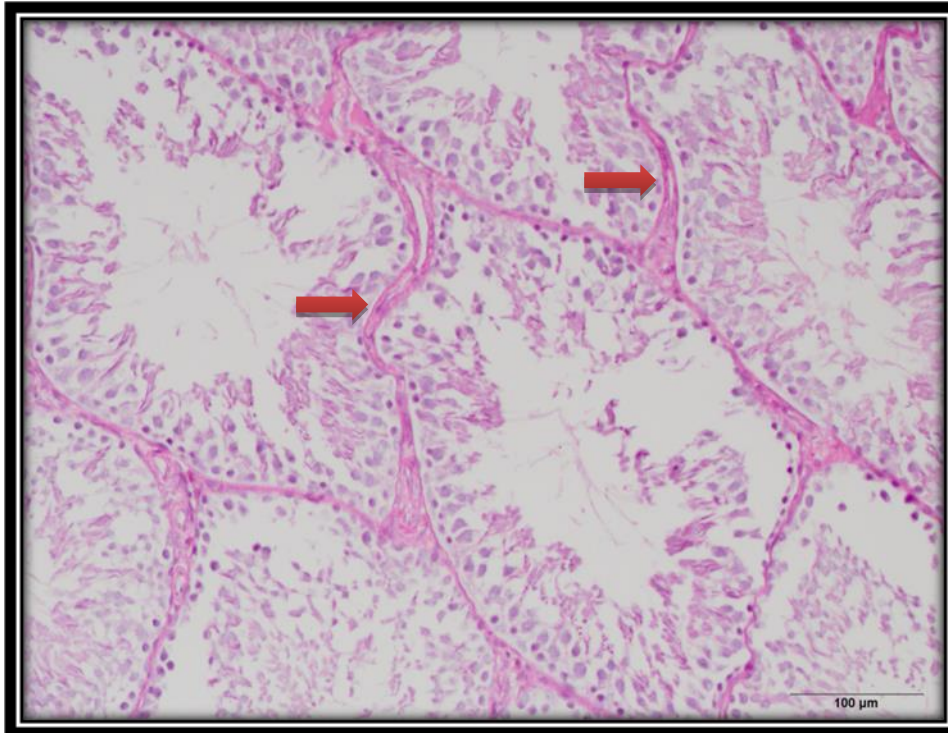
Şekil 27. Sham grubuna ait testis kesiti 20X (PAS). **Ok** bazal membran kalınlığı kontrol grubuna yakın görünümündedir.



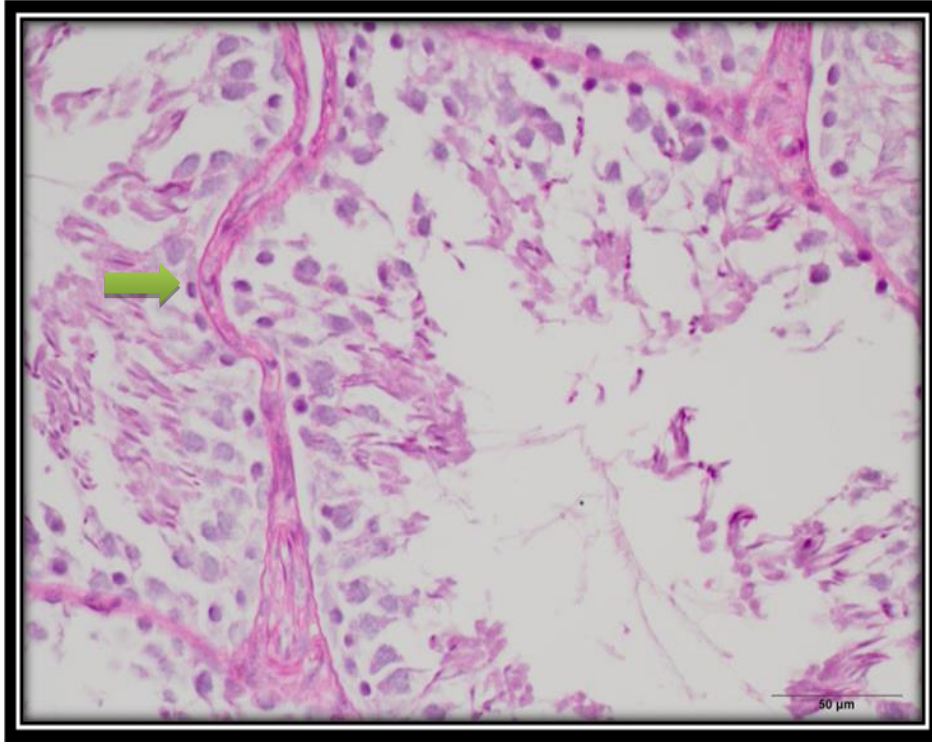
Şekil 28. Sham grubuna ait testis kesiti 40X (PAS). **Ok** bazal membran kalınlığı kontrol grubuna yakın görünümündedir.



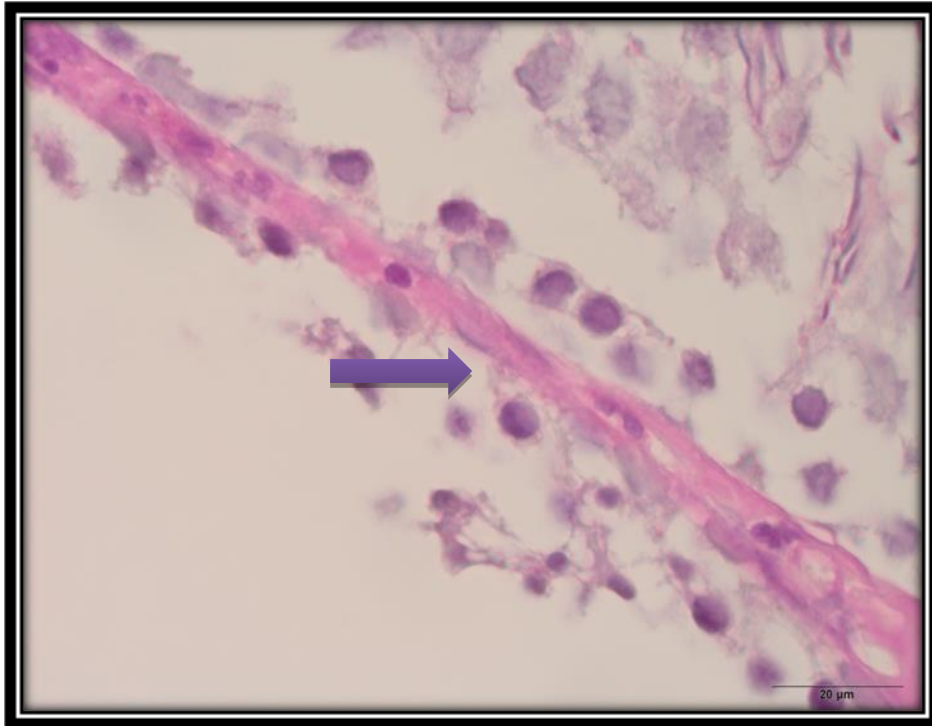
Şekil 29. Sham grubuna ait testis kesiti 100X (PAS). **Yıldız** interstisyel alanda bağ doku normal görünümündedir.



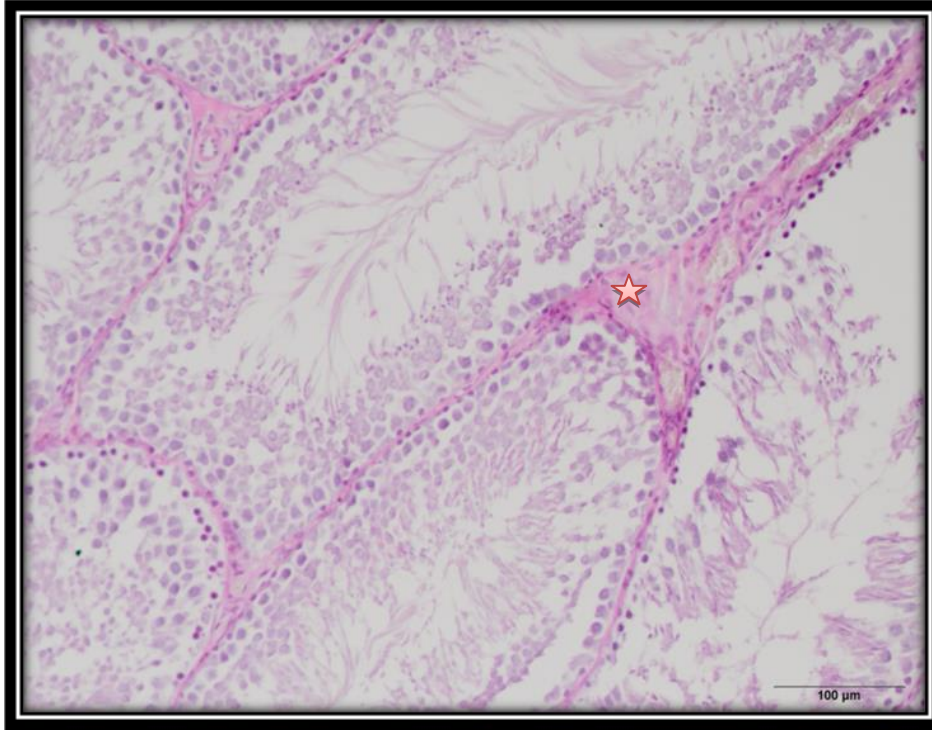
Şekil 30. Asit grubuna ait testis kesiti 20X (PAS). **Ok** seminifer tübüllerin bazal membran kalınlığında artış gözlenmektedir.



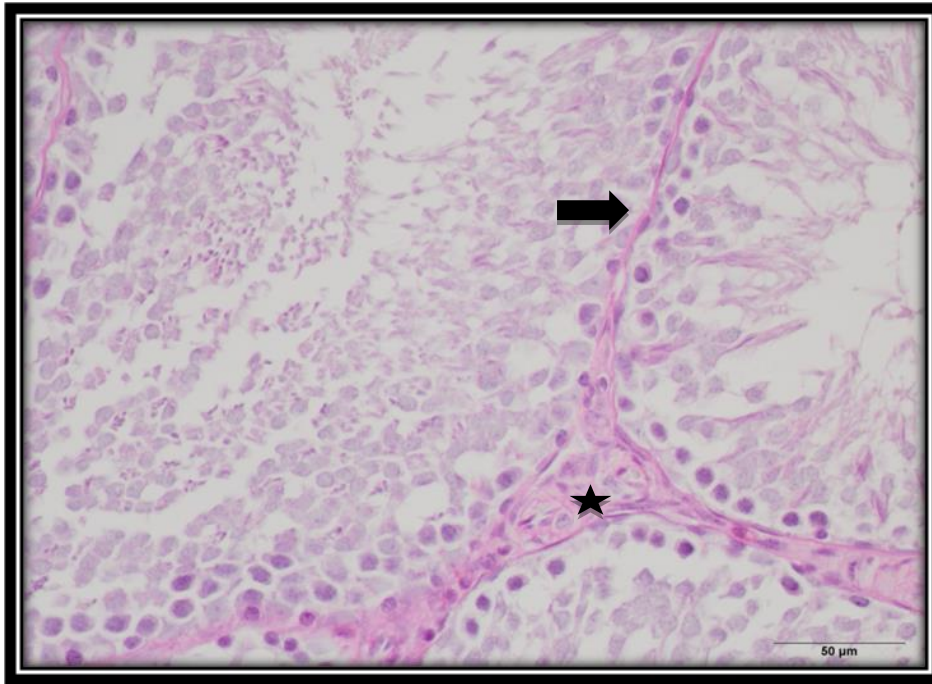
Şekil 31. Asit grubuna ait testis kesiti (PAS) 40X. **Ok** seminifer tübüllerin bazal membran kalınlığında artış görülmektedir.



Şekil 32. Asit grubuna ait testis kesiti 100X (PAS). **Ok** Kalınlaşmış bazal membran.



Şekil 33. Asit grubuna ait testis kesiti 20X (PAS). **Yıldız** interstisyel alanda bağ doku artışı görülmektedir.



Şekil 34. Resveratrol+asit grubuna ait testis kesiti 40X (PAS). **Ok** bazal membran kalınlığı. **Yıldız** interstisyel alan kontrol grubuna yakın görülmektedir.

4.2.3. Masson Trichrome Boyama

Tüm gruplarda bağ doku artışını görebilmek amacı ile PAS boyamasına ek olarak üçlü boyama metodu (Masson Trichrome) kullanıldı.

Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde, interstisyel alandaki bağ dokunun normal olduğu gözlenmiştir.

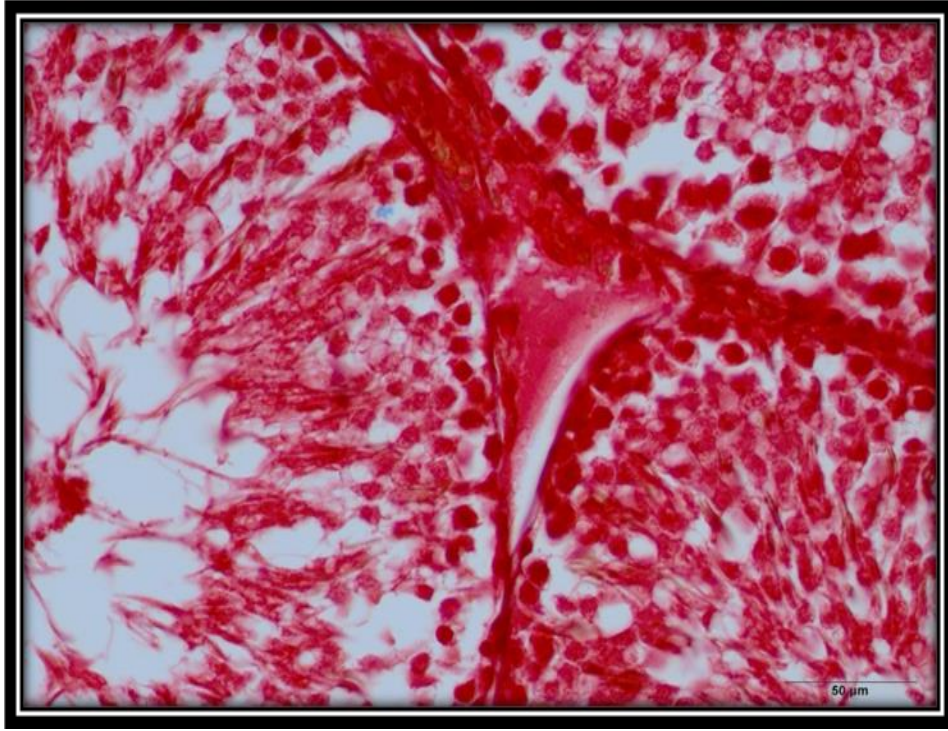
Sham grubuna ait kesitler incelendiğinde benzer şekilde istersitisyel alanda bağ doku artışına rastlanmamıştır.

Asit grubuna ait kesitler incelendiğinde ise interstisyumun genişlediği ve bağ dokusu içeriğinin arttığı ve giderek kalınlaştığı dikkati çekmektedir.

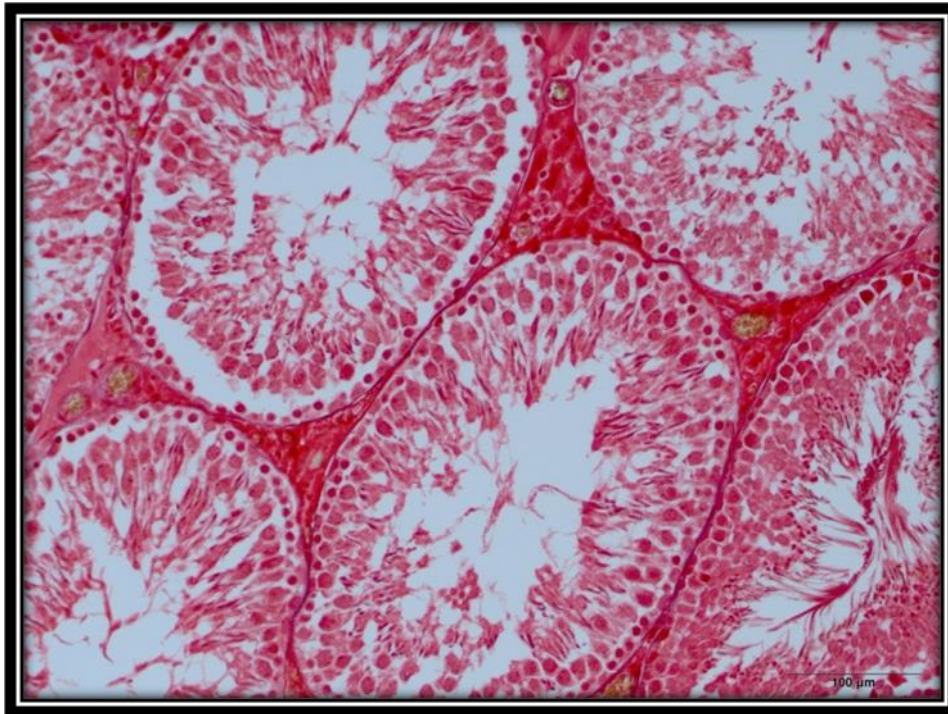
Resveratrol+asit grubuna ait kesitler incelendiğinde kontrol grubuna yakın testiküler morfoloji gözlenmiştir.



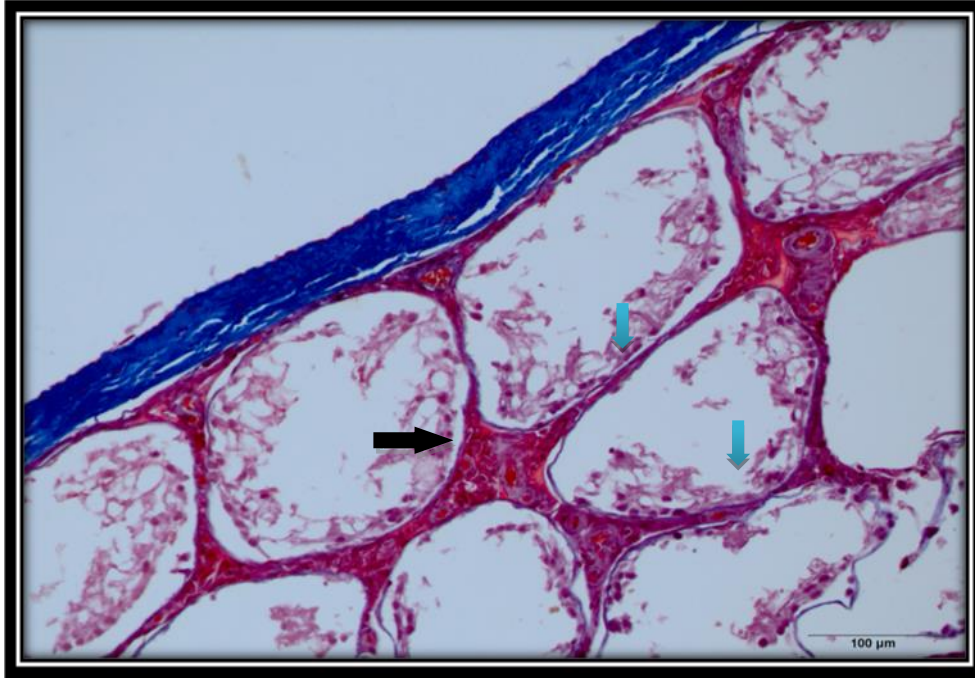
Şekil 35. Kontrol grubuna ait testis kesiti 20X (Masson Trichrome). **Yıldız** normal görünümlü interstisyel alan.



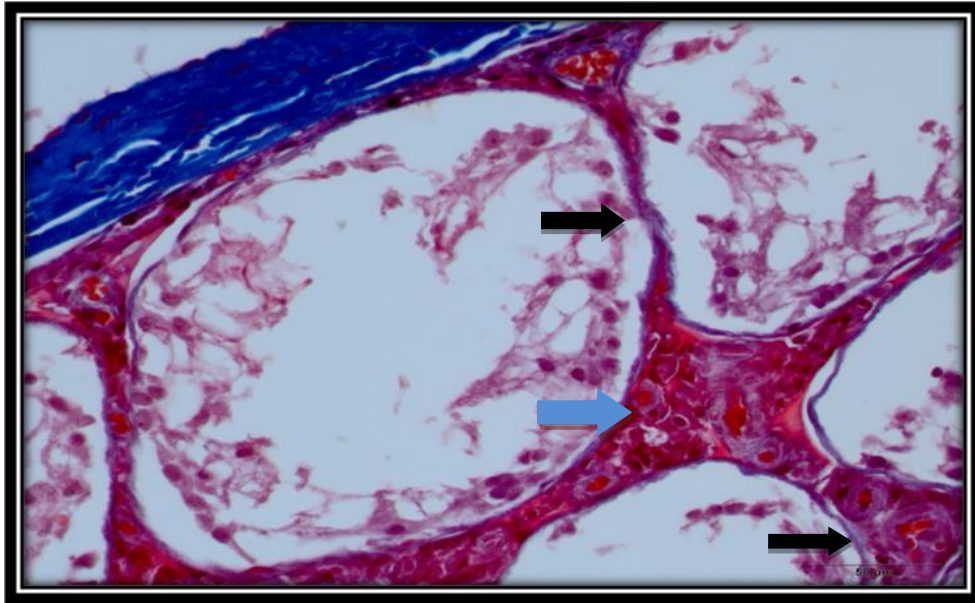
Şekil 36. Kontrol grubuna ait testis kesitleri 40X (Masson Trichrome). Normal görünümlü interstisyel alan.



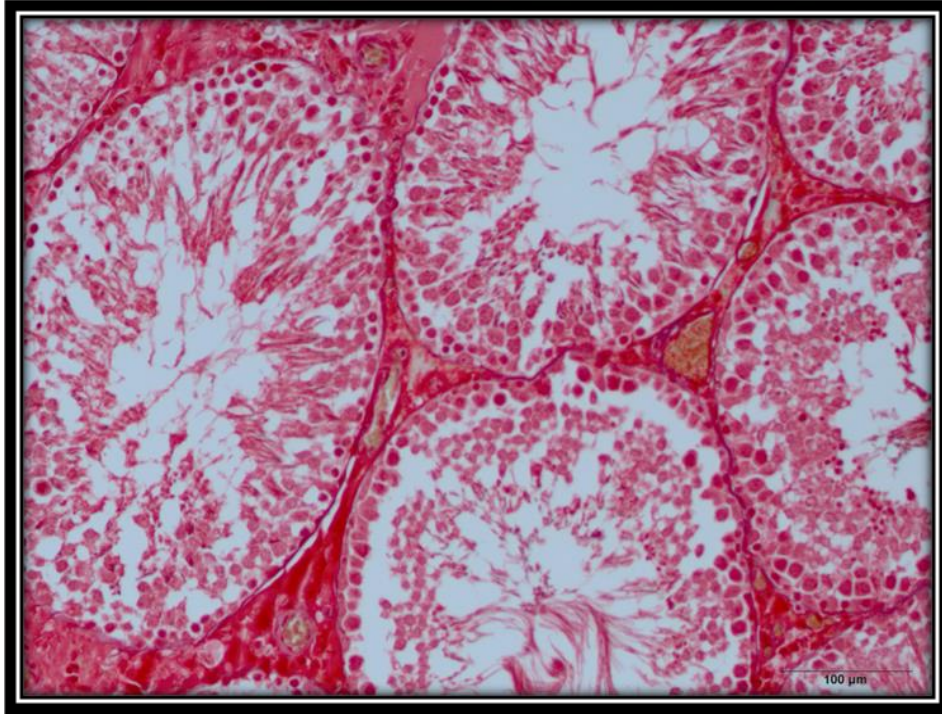
Şekil 37. Sham grubuna ait testis kesitleri 20X (Masson Trichrome)



Şekil 38. Asit grubuna ait testis kesiti 20X (Masson Trichrome). **Siyah ok** interstisyumun genişlediğini ve bağ doku içeriğinin arttığını göstermektedir. **Mavi ok** ise seminifer tübüllerin bazal membranlarındaki artan kollajen fibrilleri göstermektedir.



Şekil 39. Asit grubuna ait testis kesiti 40X (Masson Trichrome). **Mavi ok** interstisyumda bağ doku artışını ve **siyah ok** bazal membrandaki kollajen fibril artışını göstermektedir.



Şekil 40. Resveratrol+asit grubuna ait testis kesitleri 20X (Masson Trichrome). Kontrol grubuna yakın görüntüler elde edilmiştir.

4.3. MORFOMETRİK BULGULAR

4.3.1. *Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru*

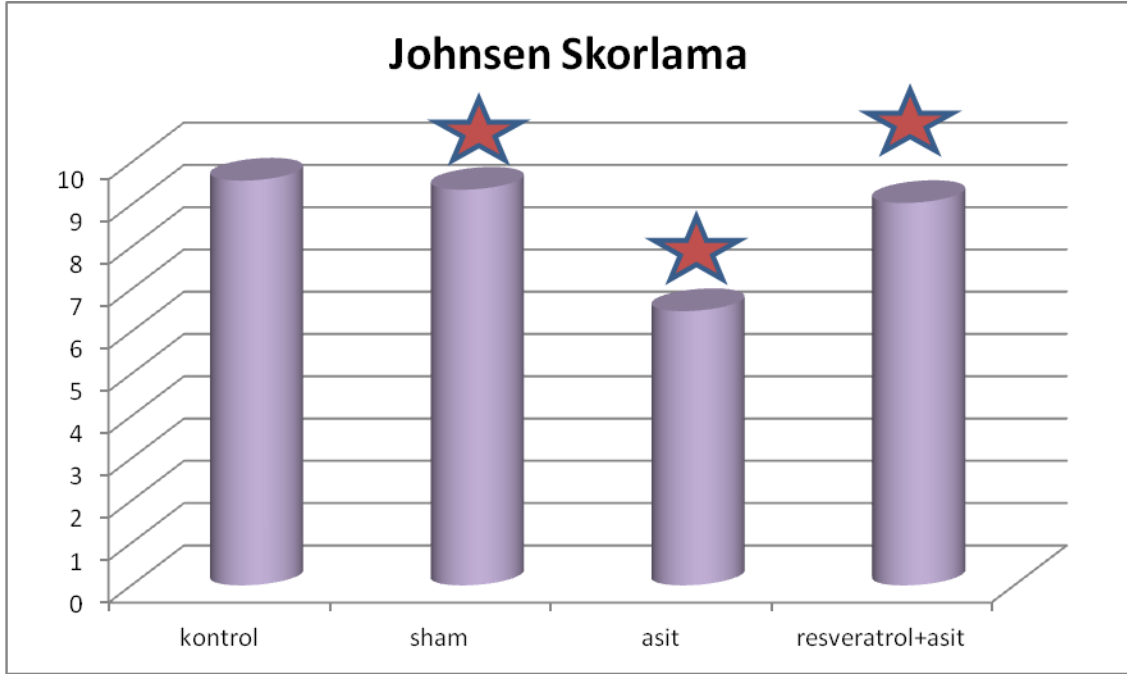
PAS ile boyanan testis kesitlerinde yapılan incelemeler sonucu, tüm grupların johnsen testiküler biyopsi skorları şekil 41’ de gösterilmiştir.

Sham grubu ile kontrol grubu testiküler biyopsi skorları karşılaştırıldığında, sham grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p < 0.05$).

Asit grubuna ait testiküler biyopsi skorlamasında, kontrol ve sham grubuna oranla anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p < 0.05$).

Koruyucu grup olan resveratrol+asit grubunda, asit grubuna göre anlamlı artış ($p > 0.05$) ve kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuçlar SPSS 15,0 paket programında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 41. Tüm grupların Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru ortalaması.

4.3.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

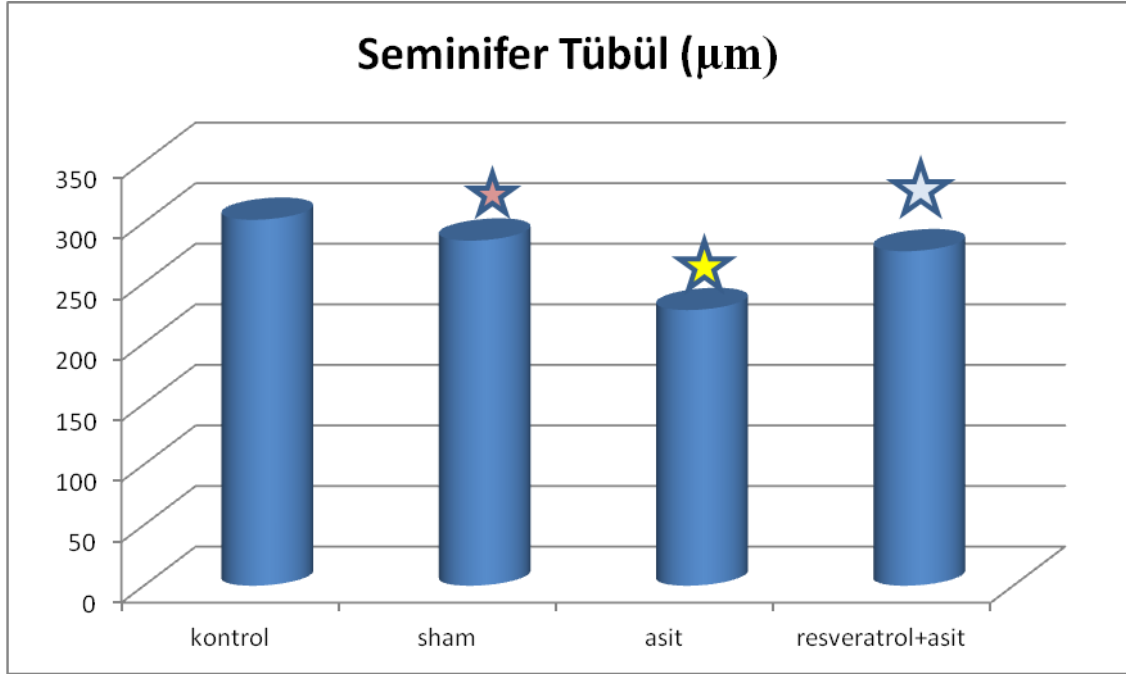
PAS ile boyanan testis kesitlerinde çap ölçümü, 20X' li objektifte UTHSCA Image Tool Version 3.0 programı kullanılarak yapıldı. Tüm grupların seminifer tübül çap ölçümleri şekil 42' de gösterilmiştir. Yapılan ölçümler sonucunda;

Sham grubundaki Seminifer tübül çapları kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır.

Asit grubundaki Seminifer tübül çapları, kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0.05$).

Resveratrol+ asit grubundaki Seminifer tübül çapları asit grubuna göre anlamlı artmış ($p<0.05$) fakat kontrol grubuna göre yakın değerler bulunmamıştır.

Sonuçlar SPSS 15,0 paket programında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 42. Tüm grupların seminifer tübül çap ortalaması

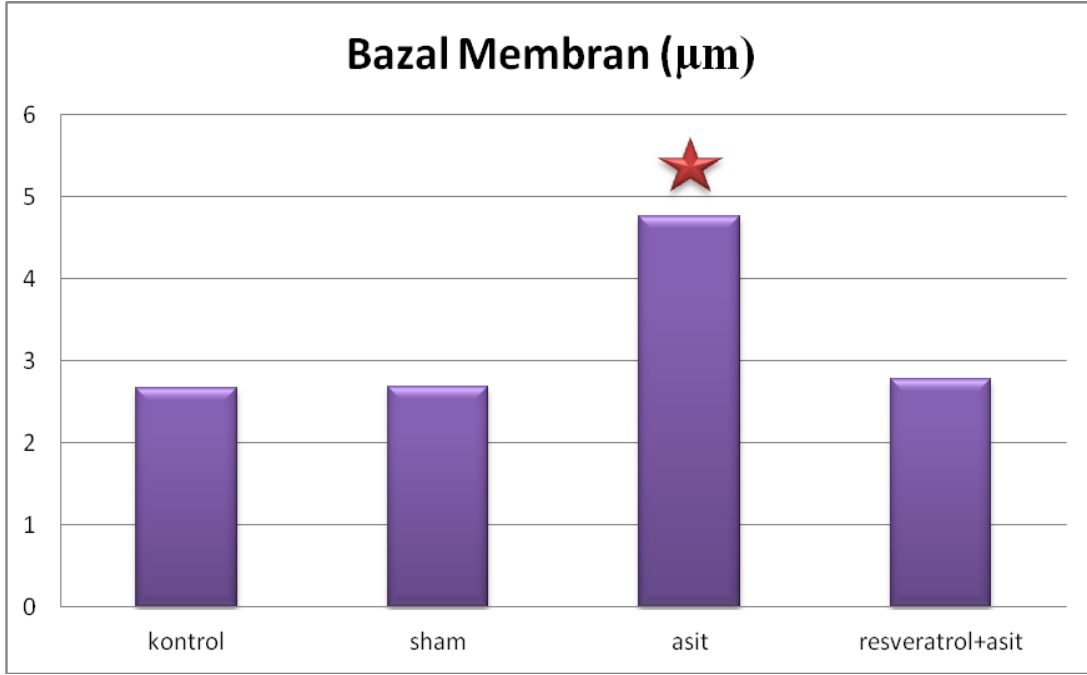
4.3.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

PAS ile boyanan testis kesitlerinde 100X'lik objektifte UTHSCA Image Tool Version 3.0 programı kullanılarak bazal membran kalınlığı ölçümü yapıldı. Tüm grupların seminifer tübül bazal membran kalınlık ölçümleri şekil 43' de gösterilmiştir.

Asit grubundaki bazal membran kalınlığı kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0.05$).

Resveratrol grubunda ise bazal membran kalınlığı asit grubuna göre anlamlı azalmıştır ($p<0.05$) ve kontrol grubuna yakın sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuçlar SPSS 15,0 paket programında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak değerlendirilmiştir.



Şekil 43. Tüm grupların seminifer tübül bazal membran çap ortalaması

4.4. İMMUNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

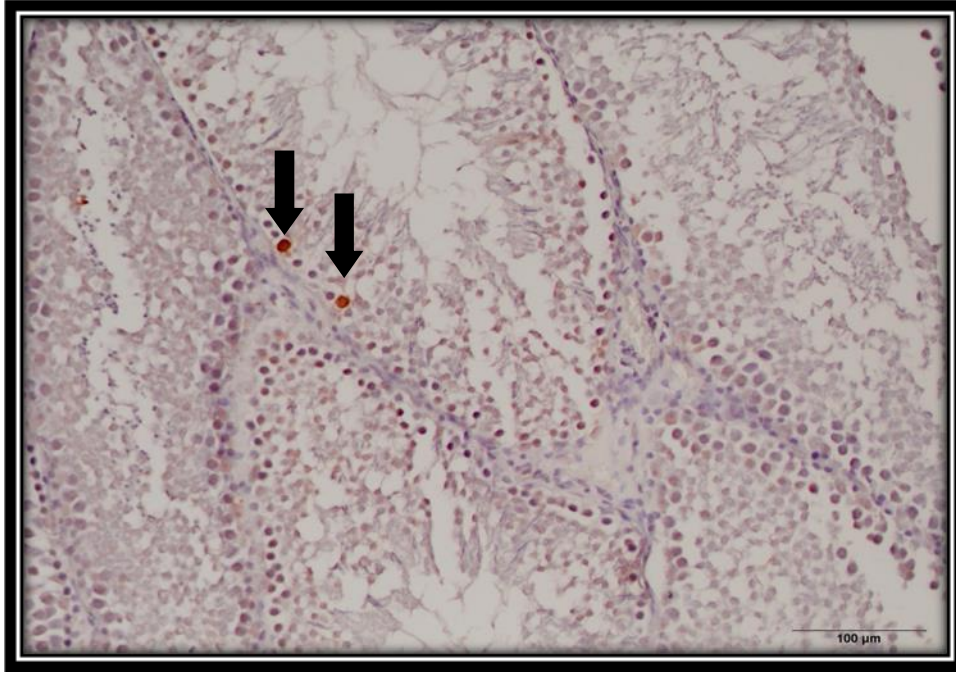
4.4.1. TUNEL Boyama

Kontrol grubu testis kesitlerinde; seminifer tübüller, ara bağ dokusu ve bağ dokusunda yer alan damar ve Leydig hücre toplulukları normal yapıda gözlemleniyordu. Kontrol grubunda seminifer tübüllerde bulunan primer spermatositlerde birkaç TUNEL pozitif hücreye rastlanmıştır.

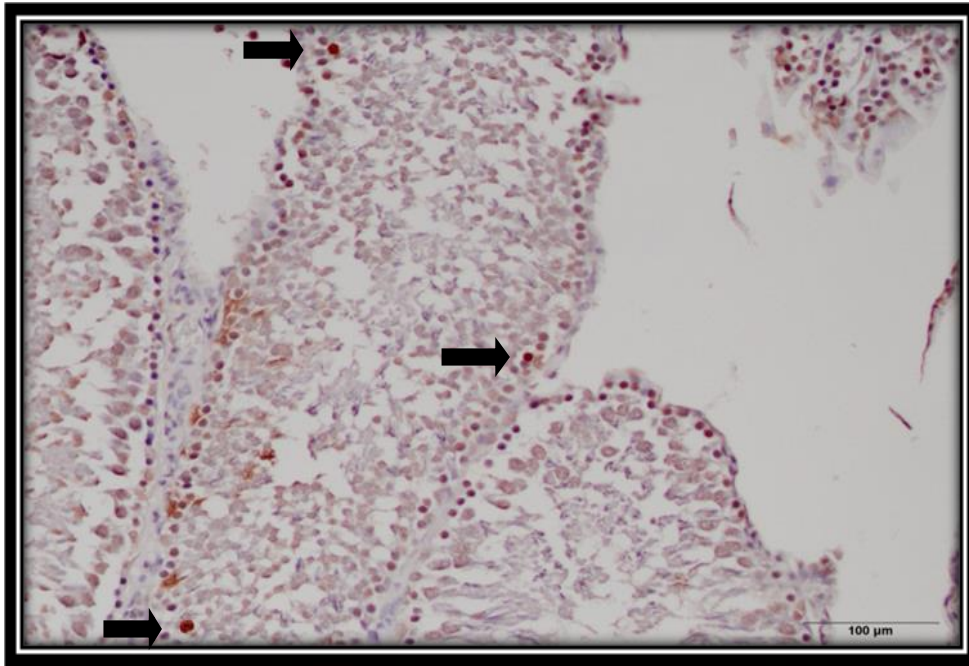
Sham grubu testis kesitlerinde kontrol grubuna yakın sayıda tunel pozitif hücreye rastlanmıştır.

Asit grubunda seminifer epitelde ve leydig hücrelerinde küçük, orta ve büyük büyülmelerde TUNEL pozitif hücrelerin son derece arttığı gözlemlendi. TUNEL pozitif hücrelerin genellikle primer spermatositler olduğu belirgindi.

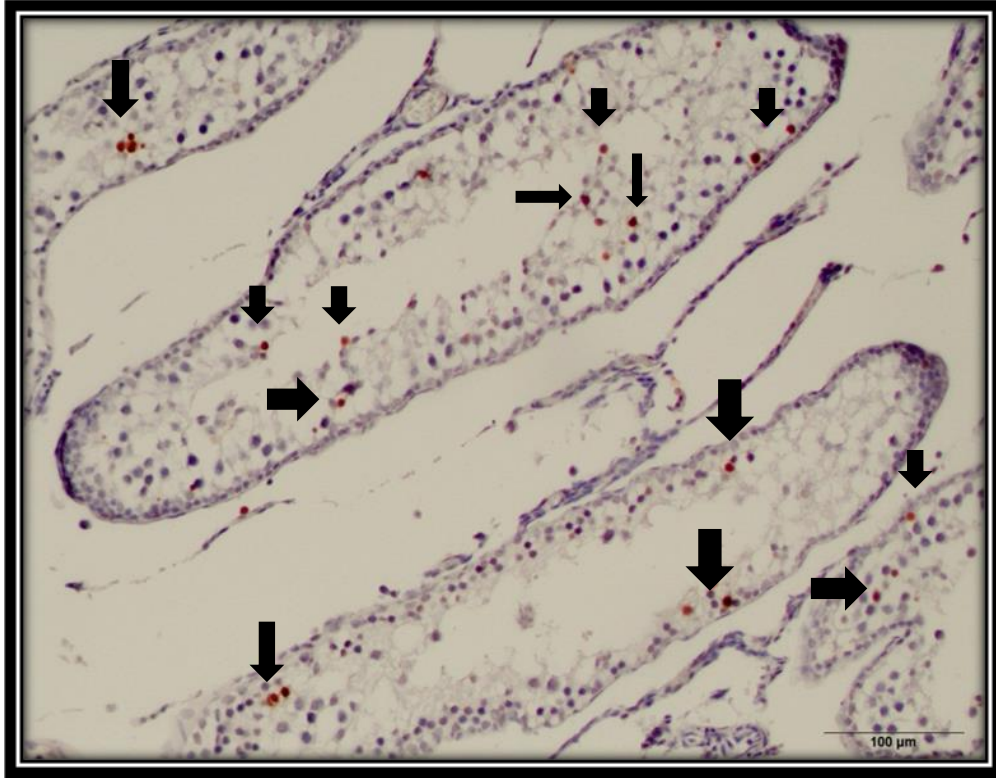
Resveratrol uygulanan grupta TUNEL pozitif hücrelerin bir önceki asit grubuna göre anlamlı olarak azaldığı gözlemlenmiştir.



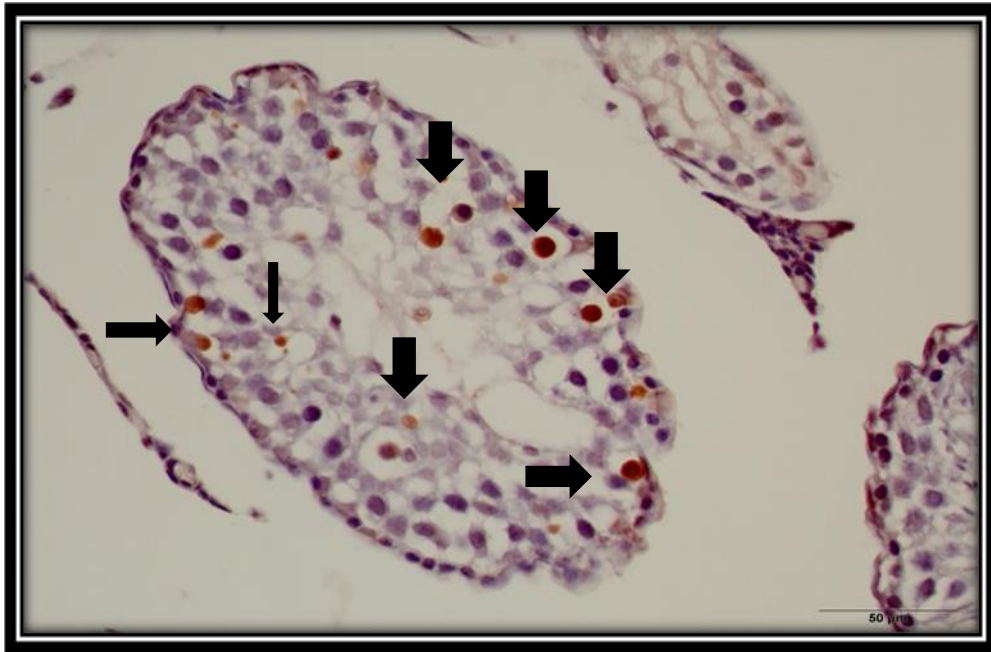
Şekil 44. Kontrol grubuna ait testis kesitleri 20 X (TUNNEL). **Ok** ile TUNNEL+ hücreler gösterilmiştir.



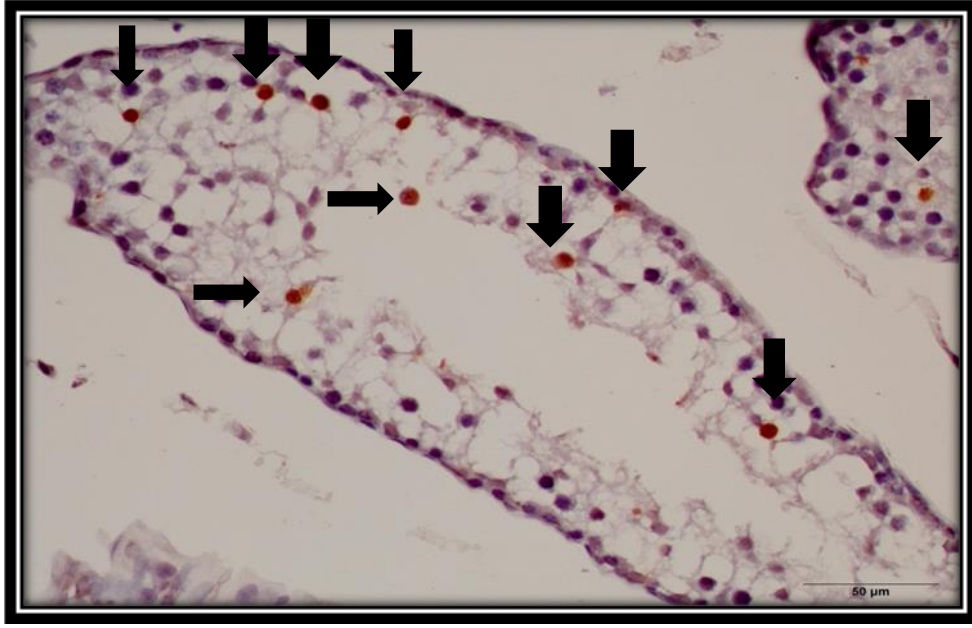
Şekil 45. Sham grubuna ait testis kesitleri 20X (TUNNEL). **Ok** ile TUNNEL+ hücreler gösterilmiştir.



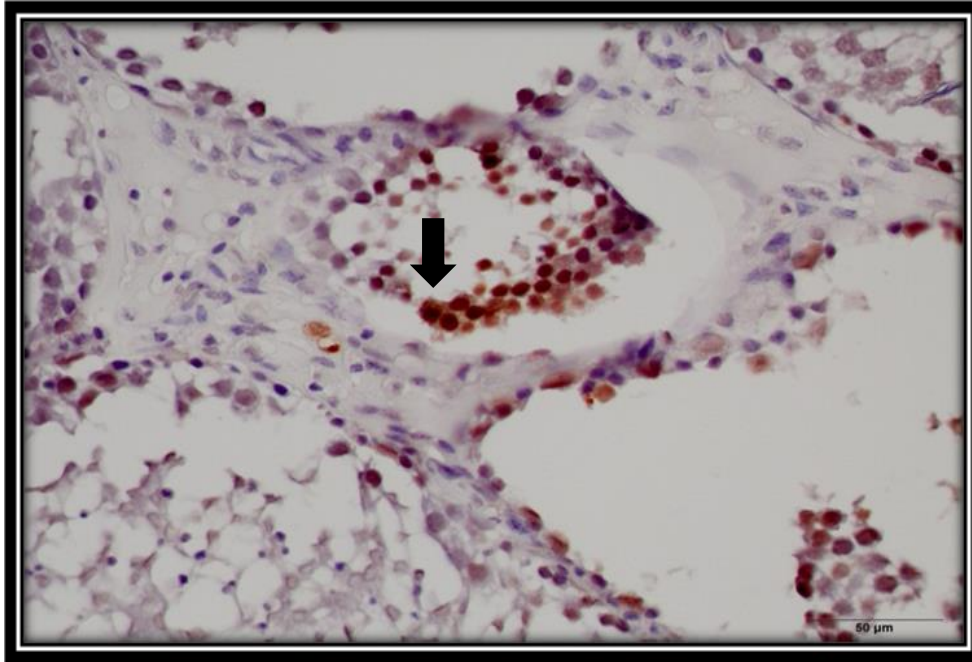
Şekil 46. Asit grubuna ait testis kesiti 20X (TUNNEL). **Ok** ile TUNNEL+ hücreler gösterilmiştir.



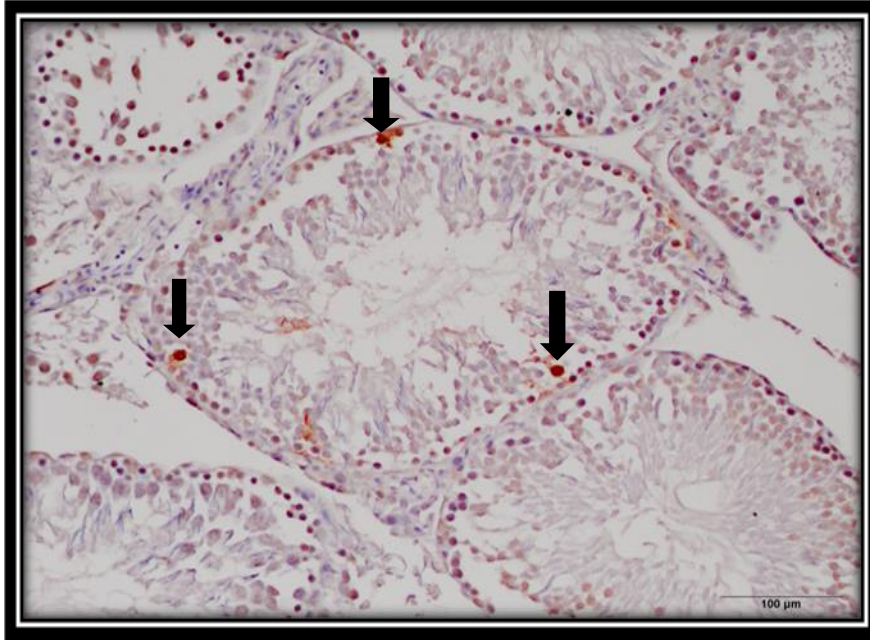
Şekil 47. Asit grubuna ait testis kesiti 40X (TUNNEL). **Ok** ile TUNNEL+ hücreler gösterilmiştir.



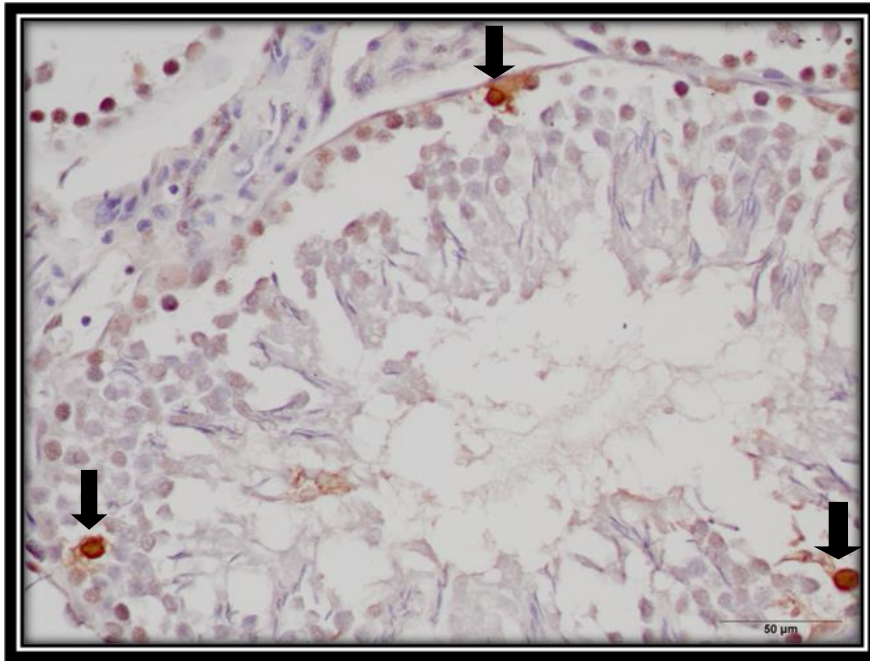
Şekil 48. Asit grubuna ait testis kesiti 40X (TUNNEL). **Ok** ile TUNNEL+ hücreler gösterilmiştir.



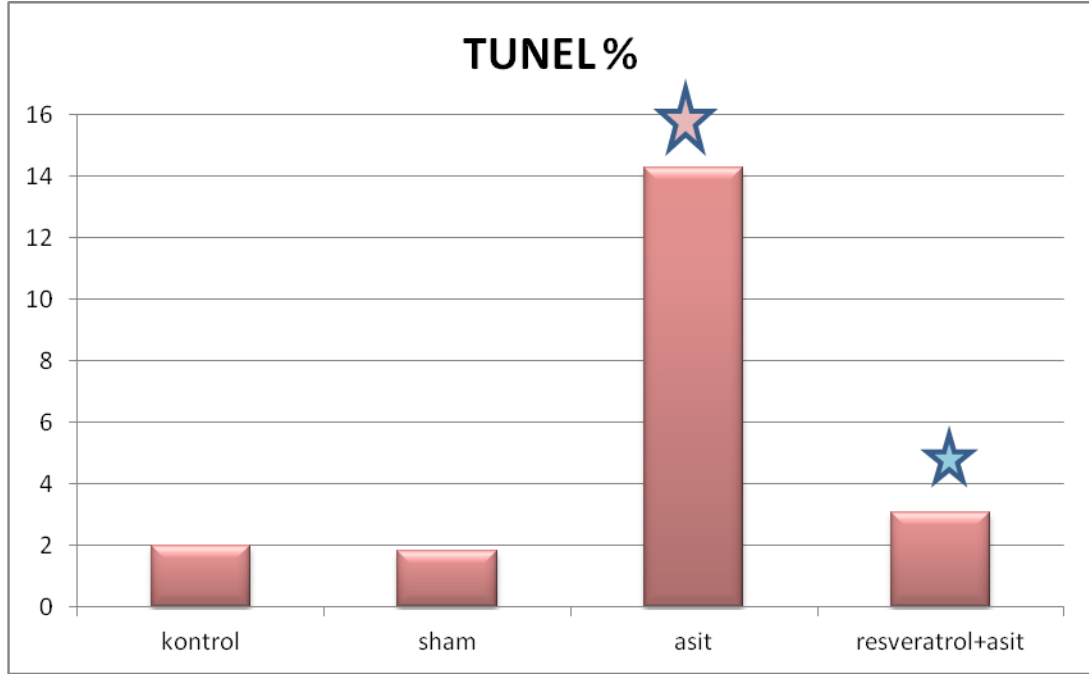
Şekil 49. Asit grubuna ait testis kesiti 40X (TUNNEL). **Ok** ile interstisyel alanda bulunan leydig hücrelerindeki TUNNEL+ hücreler gösterilmiştir.



Şekil 50. Resveratrol+asit grubuna ait testis kesiti 20X (TUNNEL). **Ok** ile TUNNEL+ hücreler gösterilmiştir.



Şekil 51. Resveratrol+asit grubuna ait testis kesiti 40X (TUNNEL). **Ok** ile TUNNEL+ hücreler gösterilmiştir.



Şekil 52. Tüm grupların TUNNEL+ hücre sayıları yüzdesi

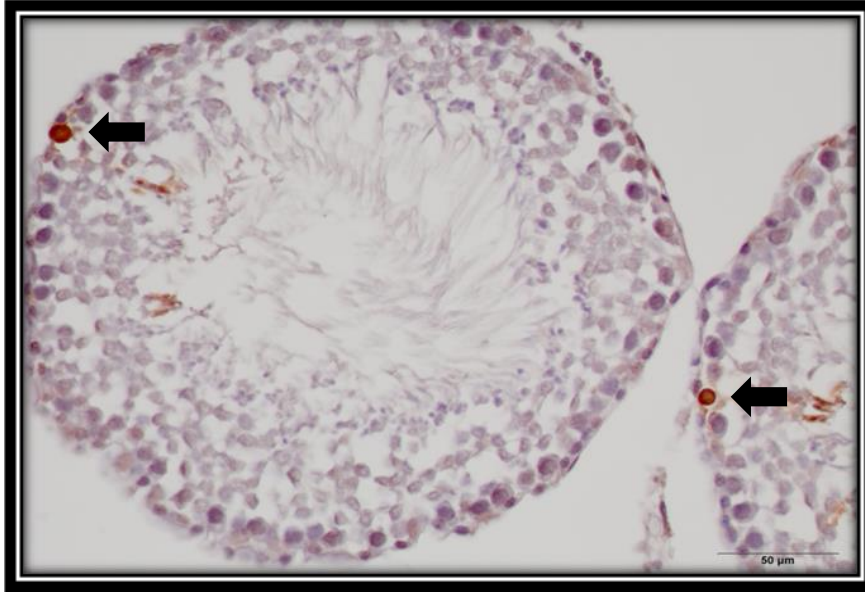
4.4.2. Active Caspase-3 Boyama

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

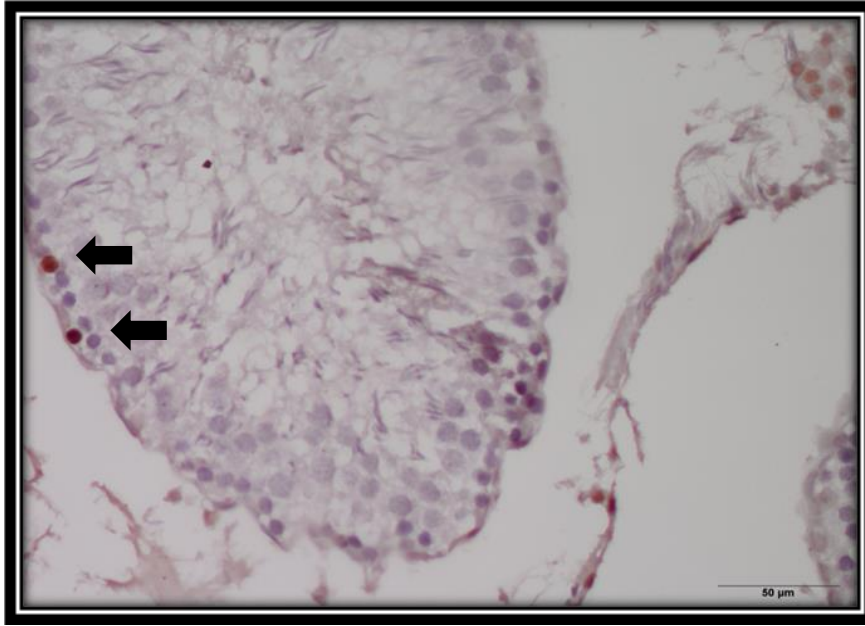
Kontrol ve sham grubuna ait kesitler incelendiğinde birkaç pozitif hücre dışında aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren apoptotik hücreye rastlanmamıştır (Şekil 53, 54).

Asit grubuna ait kesitler incelendiğinde apoptotik hücre sayısının artmış olduğu gözlenmiştir (Şekil 55).

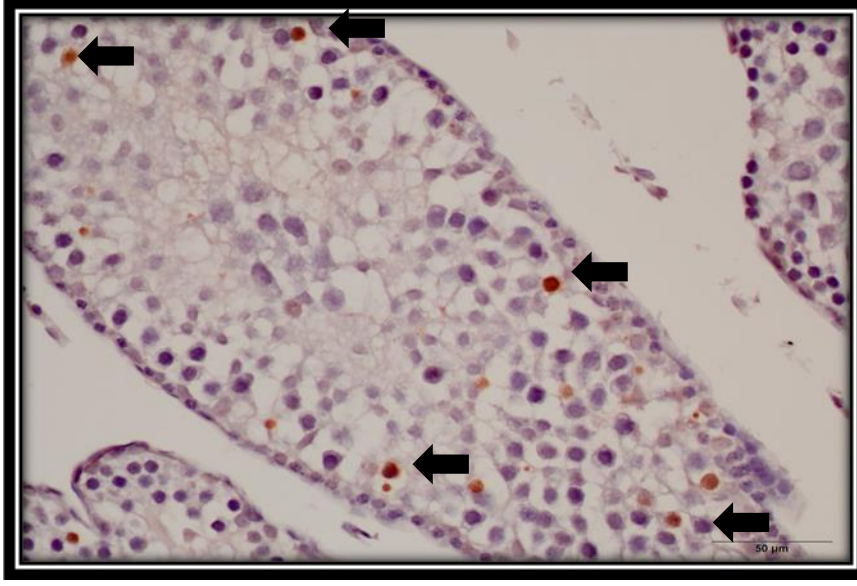
Resveratrol+asit grubuna ait kesitler incelendiğinde apoptotik hücre sayısının önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir (Şekil 56).



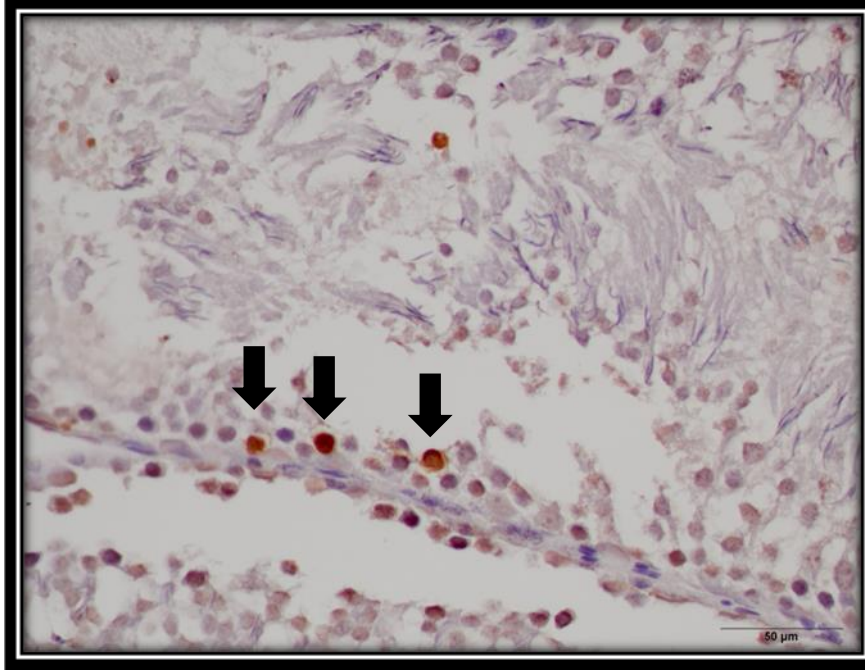
Şekil 53. Kontrol grubuna ait testis kesiti 40X. **Ok** Aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücreler gösterilmiştir.



Şekil 54. Sham grubuna ait testis kesiti 40X. **Ok** ile Aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücreler gösterilmiştir.



Şekil 55. Asit grubuna ait testis kesiti 40X. **Ok** ile Aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücreleri gösterilmiştir.



Şekil 56. Resveratrol+asit ait testis kesiti 40X. **Ok** ile Aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücreler gösterilmiştir.

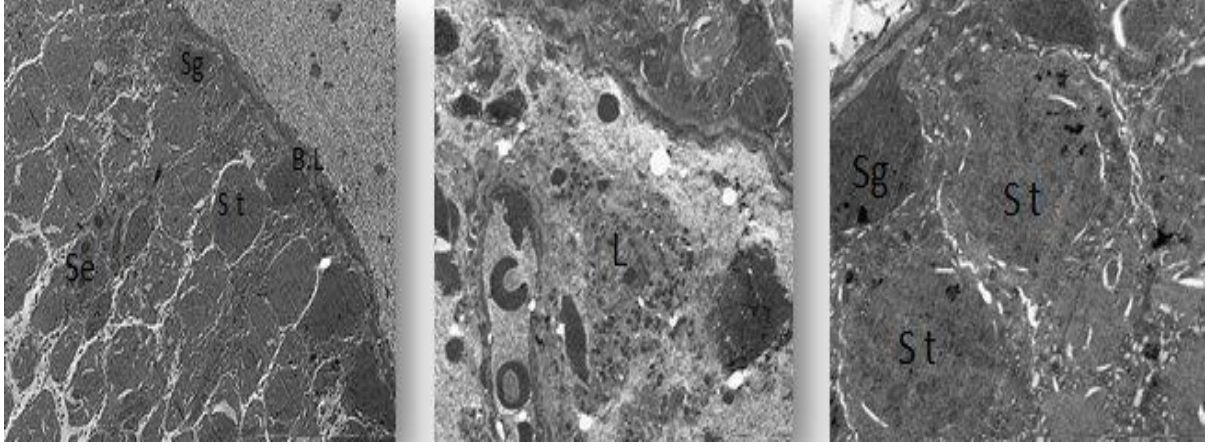
4.5. Elekrn Mikroskobik Bulgular

Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde; seminifer tübülleri çevreleyen membrana propria tabakası incelendiğinde düzenli bir bazal lamina yapısı gözlenmekteydi. Bazal laminanın altında bulunan myoid hücre ve spermatogonyumların çekirdek ve sitoplazmasının normal yapıda olduğu dikkat çekmektedir. Çentikli, ovoid  ekle sahip, ökromatik nükleus, belirgin nükleolusa sahip sertoli hücreleri ile seminifer tübül içinde yerleşmiş olan farklı gelişim aşamalarındaki spermatositler, hücre-hücre bağlantıları ve sertoli-sertoli hücre bağlantıları da düzgün morfolojide olduğu görülmektedir ( ekil 57).

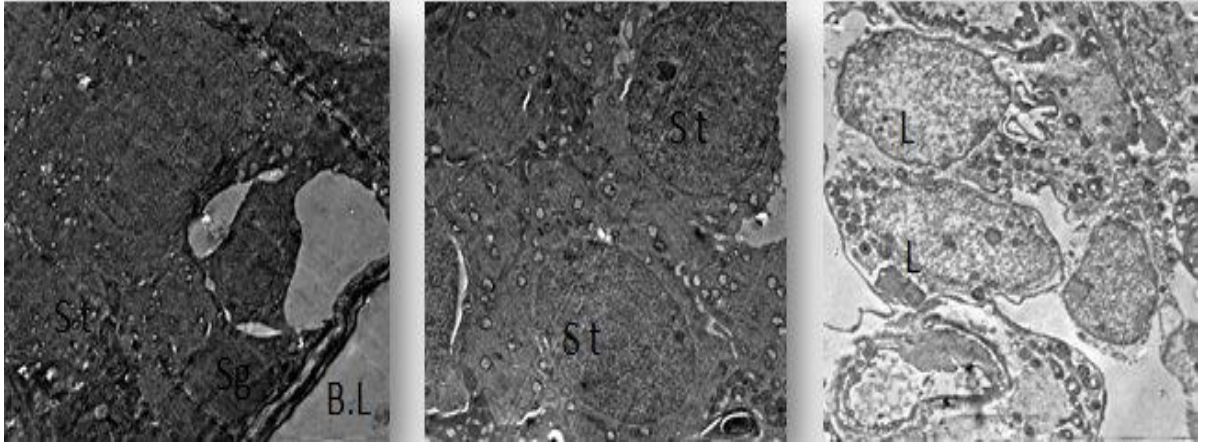
Sham grubuna ait kesitler incelendiğinde kontrol grubuna benzer bulgular elde edilmiştir. Bazal lamina üzerine oturan düzgün ve yuvarlak spermatogonyumlar gözlendi. Sertoli hücreler ve primer spermatositlerde ise dikkat edilecek bir farklılaşma gözlenmemektedir ( ekil 58).

Asit grubu, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bazal membranda kalınlaşma olduğu ve yapısının bozulduğu saptandı. Spermatositler arasında hücresel bozulmalar ve spermatogenik seri hücreleri arasında ayrılmalar gözlenmekteydi. Spermatogonyumların aralarında sertoli hücreleri görülmekteydi. Sertoli-sertoli hücreleri arasındaki bağlantı  ezeliklerinde bozulmalar gözlemlendi ve hücreler arasında oldukça fazla miktarda boşluklar bulundu. Primer ve sekonder spermatositlerin üzerinde gelişmekte olan spermatidlerin dizilimler bozulmuş ve dağınık olarak gözlemlendi. Leydig hücrelerinde ise yoğun düzensiz çekirdekler, kötü tanımlanmış nükleer membran ve kondanse kromatin gözlendi ( ekil 59).

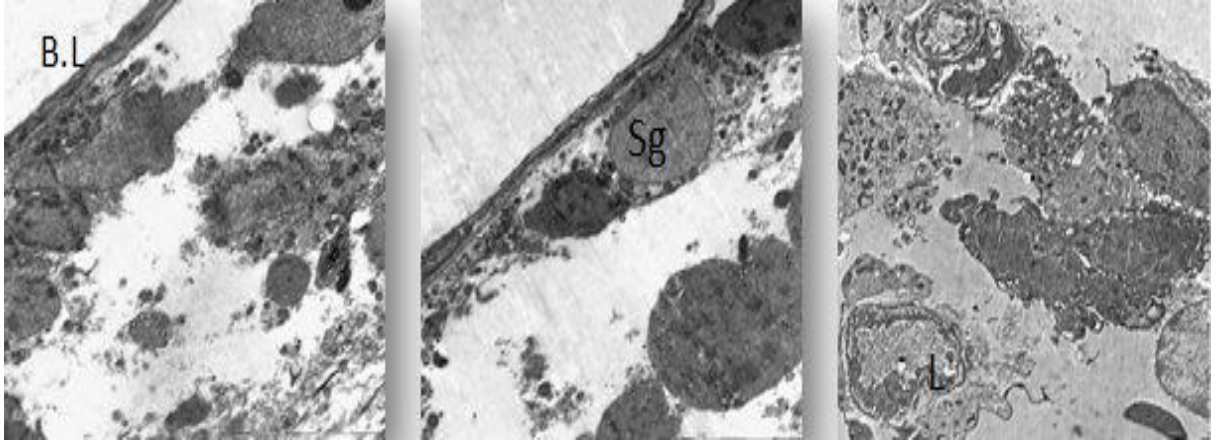
Resveratrol+asit grubuna ait kesitler incelendiğinde; bazal lamina, leydig, sertoli ve spermatogenik hücrelerde kontrol grubuna yakın bulgular elde edildi. Bazal lamina normal kalınlıkta, sertoli, leydig ve spermatogenik hücrelerde hücresel bütünlük korunmaktaydı. Bu sonuçlar resveratrolün, PFD A tarafında oluşan ultrastrüktürel hasarı önlediğini göstermiştir ( ekil 60).



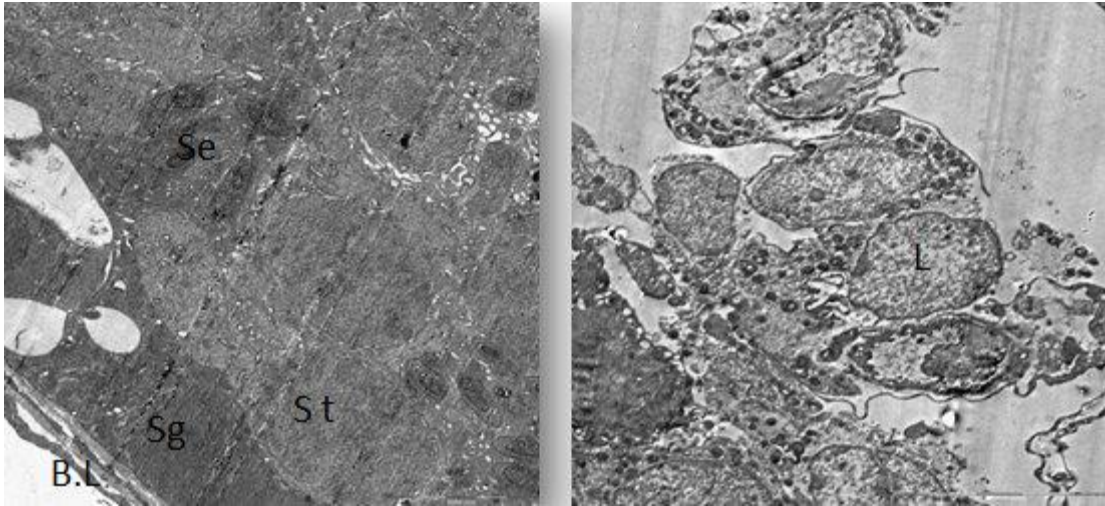
Şekil 57. Kontrol grubuna ait testis dokusunun ince kesiti. Bazal membran (**Bl**), spermatogonyum (**Sg**), primer spermatosit (**St**), sertoli hücresi (**Se**) gözlenmektedir ve interstisyel alanda leydig hücreleri (**L**) görülmektedir. Uranil Asetat-Kurşun Sitrat, X630, X800, X2000 büyütme.



Şekil 58. Sham grubuna ait testis ince kesiti. Spermatogonyum (**Sg**), primer spermatosit (**St**) ve interstisyel alanda leydig hücreleri (**L**) görülmektedir. Uranil Asetat-Kurşun Sitrat X1600, X2000 büyütme.



Şekil 59. Asit grubuna ait testis ince kesiti. Kalınlaşan bazal membran (**B.L**) ve hücreler arasında oluşan boşluklar gözlenmektedir. (**L**) leydig hücresi. Uranil Asetat-Kurşun Sitrat X1000, X1250, X1000 büyütme



Şekil 60. Resveratrol +asit grubuna ait testis ince kesiti X1600. Normal kalınlıkta bazal membran (**B.L**), hücresel bütünlüğü bozulmamış ve birbirine yakın hücreler gözlenmektedir. (**Sg**) Spermatogonyum, (**St**) primer spermatosit, (**L**) leydig hücreleri. Uranil Asetat-Kurşun Sitrat X1600, X1250 büyütme.

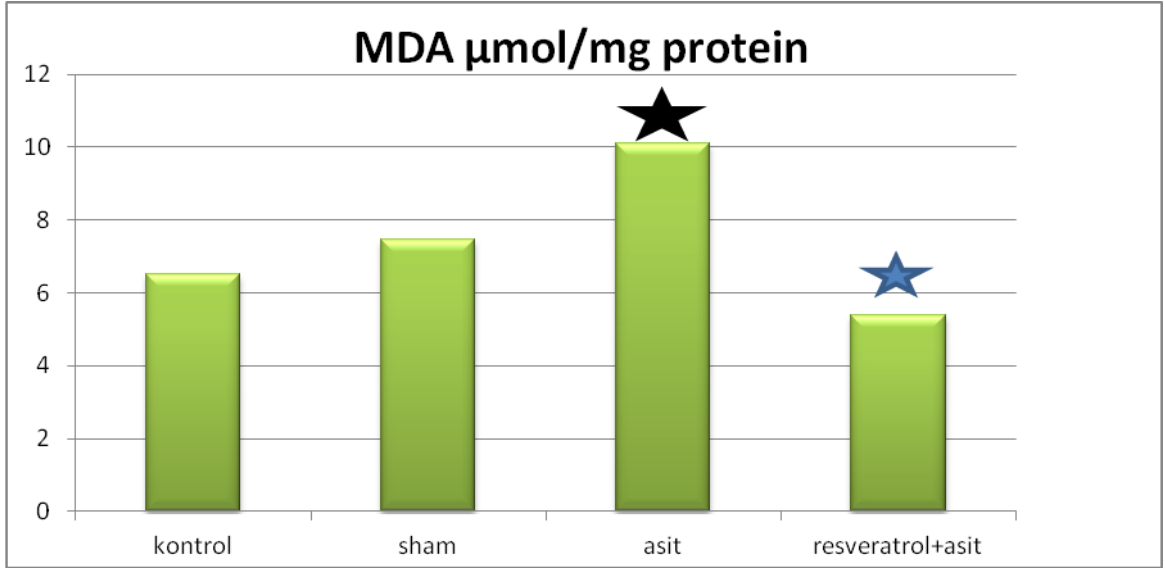
4.6. Biyokimyasal Bulgular

4.6.1. MDA Değerleri

Tüm grupların ortalama MDA değerleri şekil 61’ de gösterilmiştir.

Asit grubundaki MDA, kontrol ve sham grubuna göre anlamlı artmıştır ($p<0,05$).

Resveratrol+asit grubundaki MDA, asit ve kontrol grubuna göre anlamlı azalmıştır ($p<0,05$).



Şekil 61. Tüm grupların ortalama MDA değerleri.

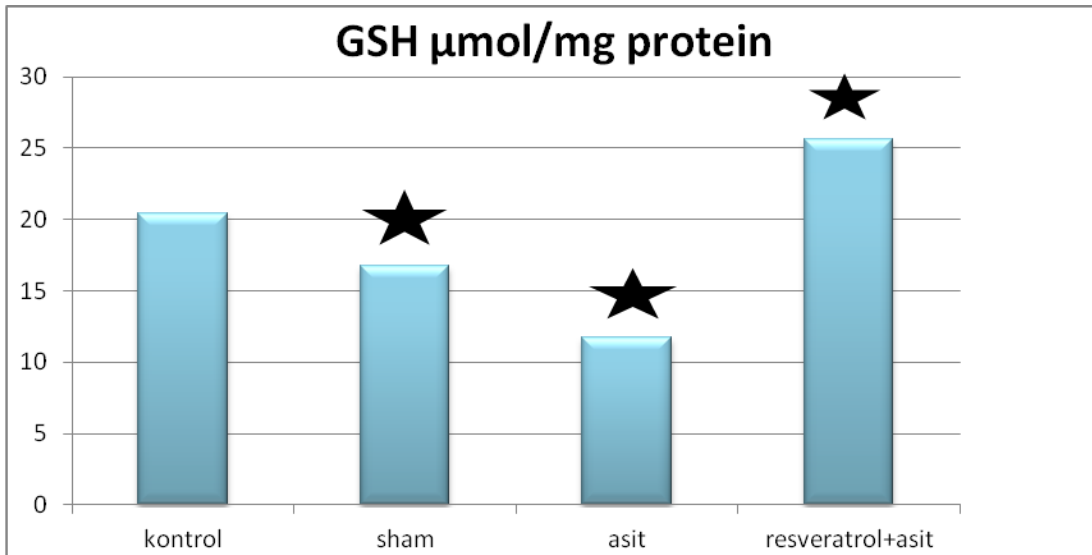
4.6.2. GSH değerleri

Tüm grupların ortalama GSH değerleri şekil 62’ de gösterilmiştir.

Asit grubundaki GSH değerleri, kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p < 0,05$).

Resveratrol+asit grubundaki GSH değerleri, kontrol, asit ve sham grubuna göre anlamlı artmıştır ($p < 0,05$).

Sham grubundaki GSH değerleri, kontrol grubuna göre anlamlı düşmüştür ($p < 0,05$).



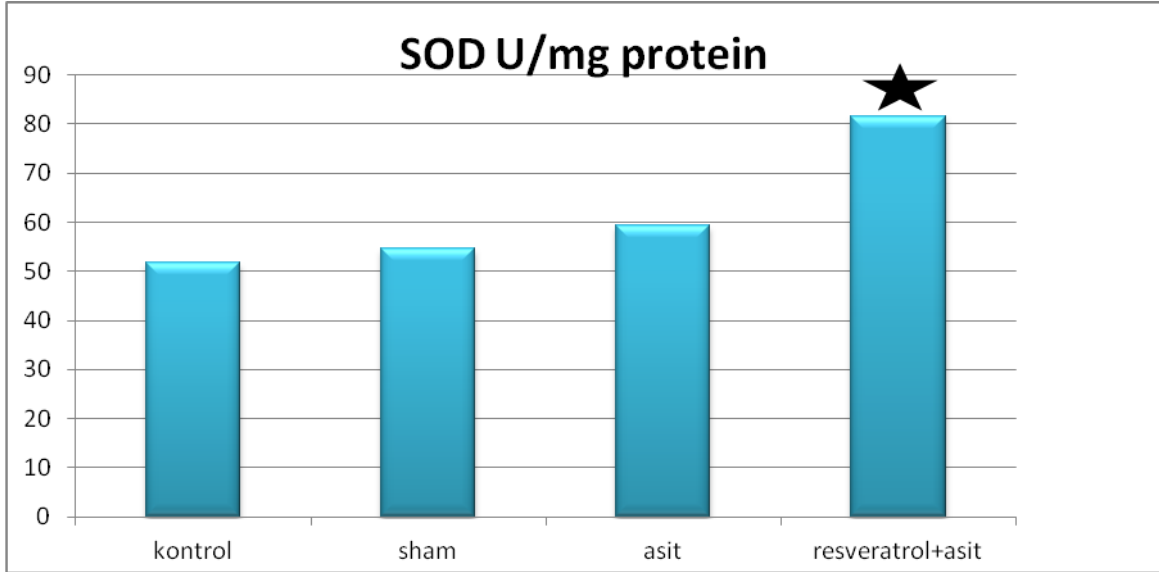
Şekil 62. Tüm grupların ortalama GSH değerleri.

4.6.3. SOD Değerleri

Tüm grupların ortalama SOD değerleri şekil 63’de gösterilmiştir.

Asit grubundaki SOD değerleri kontrol grubuna göre artmıştır fakat anlamlı değildir ($p>0,05$).

Resveratrol+asit grubundaki SOD değerleri, kontrol, sham ve asit grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).



Şekil 63. Tüm grupların ortalama SOD değerleri

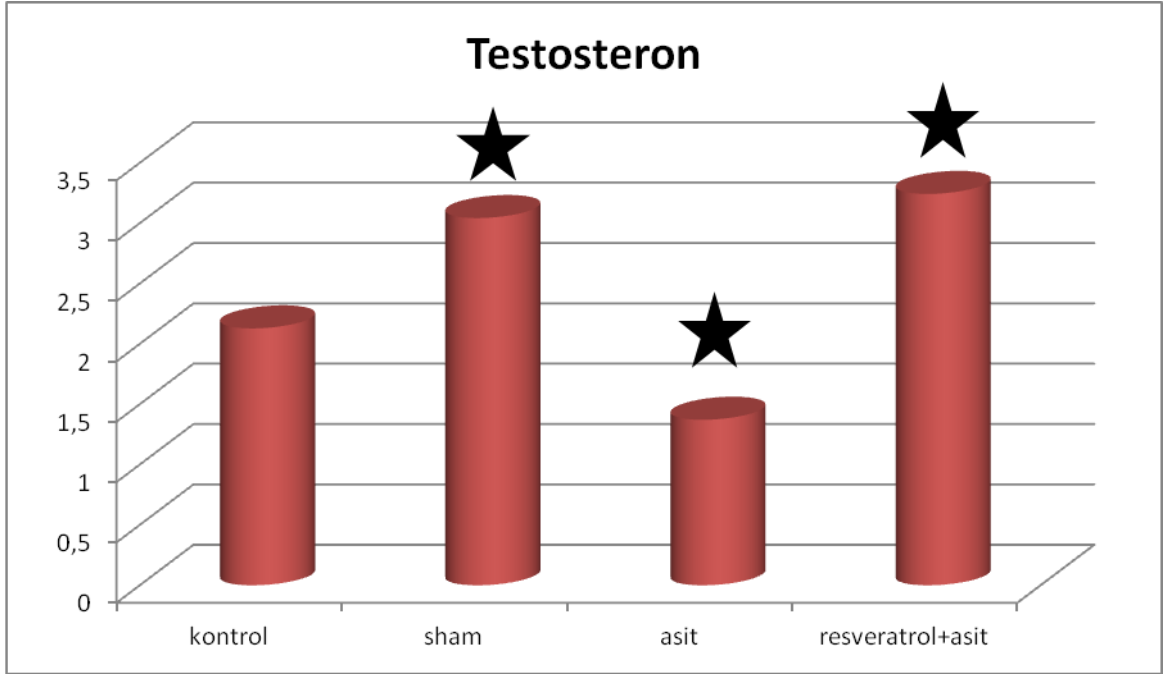
4.6.4. Testosteron Değerleri

Tüm grupların ortalama testosteron seviyesi şekil 64’de gösterilmiştir.

Asit grubundaki testosteron seviyeleri kontrol ve sham grubuna göre anlamlı azalmıştır ($p<0,05$).

Sham grubundaki testosteron seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).

Resveratrol+asit grubundaki testosteron seviyesi kontrol ve asit grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).



Şekil 64. Tüm grupların ortalama testosteron seviyeleri

5. TARTIŞMA

İnsan sağlığı ve doğa için zararlı, biyo birikimli ve doğada kolay çözünmeyen perflorlu bileşiklerin dünyadaki tüm canlıları ve doğal yaşamı tehdit ettiğine ilişkin birçok bilimsel kanıt bulunmaktadır.

Oksidatif stres, serbest radikallerin dokularda fiziksel hasara yol açtığı bir süreçtir. Bu hasar antioksidan maddelerle giderilmeye çalışılır (171, 172). Testiste çeşitli nedenlerle oksidatif stres geliştiği ve oluşan serbest radikallerin antioksidanlarla giderildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (147, 173).

Son dönemlerde, antioksidan özelliğe sahip doğal maddelerin ve besinlerin serbest radikallerin neden olduğu hücresel hasar üzerine olan olası faydaları birçok araştırmacı tarafından çalışılmaktadır. Bu doğal bileşiklerden biri de viniferinler ailesinden olan RES'dir (174). En çok bilinen antioksidanlar olan E vitamini ve C vitamininden daha güçlü olan RES; OH. ve O₂ .- radikallerini süpürür, OH. radikalının neden olduğu lipid peroksidasyonu inhibe eder, OH. ile H₂O₂'in neden olduğu DNA hasarını önler. Protein oksidasyonunu engeller. Serum antioksidan kapasitesini artırır. Düşük dansiteli lipoproteinlere bağlanarak lipoprotein peroksidasyonunu inhibe eder. RES'ün ayrıca, antikanser, östrojenik, antiplatelet, vazorelaksan, iskemireperfüzyon hasarından koruyucu, antienflamatuvar, hepatoprotektif, antimikrobiyal aktiviteli olduğu tespit edilmiştir (175, 176).

Bu çalışmada ise perflorododekonoik (PFDoA) asidin testiste oluşturduğu hasara karşı resveratrolün koruyucu etkisi ultrastrüktürel, immunohistokimyasal ve biyokimyasal olarak araştırılmıştır.

PFDoA' nın testiste oluşturduğu hasara karşı resveratrolün koruyucu etkisi ilk kez çalışılmıştır.

Çalışmamızda oksidatif stres belirteçlerinden biri olarak doku MDA düzeyleri değerlendirilmiştir. Çünkü artmış MDA konsantrasyonu lipid peroksidasyonu ve doku hasarına işaret etmektedir (177).

H.zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, rat karaciğerlerinde PFDoA ile indüklenen oksidatif stres sonucunda MDA seviyelerinde anlamlı artış gösterilmiştir (178). Bizim çalışmamızda da, PFDoA verilen asit grubundaki sıçanların testislerinde MDA seviyelerinin diğer gruplara göre anlamlı olarak yüksek bulunduğu gösterilmiştir (p<0,05). Aynı şekilde resveratrolün oksidatif stres üzerine olumlu etkisinin dokularda MDA düzeylerini azaltarak gösterdiği de bilinmektedir (173, 179). Ancak PFDoA ile birlikte resveratrol verilerek doku

MDA düzeylerinin bakıldığı bir çalışma literatürde yoktur. Bu bilgilerden hareketle resveratrol, PFDaA'nın oluşturduğu oksidatif stres, lipid peroksidasyonu ve doku hasarını olumlu olarak etkilediği gösterilmiştir.

Bir diğer biyokimyasal parametre olarak testis GSH düzeyleri incelenmiştir. GSH süperoksit radikale karşı hücrel savunma sisteminin kilit bileşenidir. GSH konsantrasyonu ve hücrel GSH-GSGG⁻ turnover hızı oksidatif stresin bir göstergesidir. GSH seviyelerinin süperoksit radikali ile süperoksid kökenli diğer bileşenlerin yarattığı lipid peroksidasyon miktarı ile ters orantılı olduğu gösterilmiştir (180). Çeşitli sebeplerle oksidatif stres oluşturulan çalışmalarda doku GSH düzeylerinin oksidatif sürecin takibi için iyi bir parametre olduğu gösterilmiştir (173, 181). Ancak PFDaA ile birlikte resveratrol verilerek doku GSH düzeylerinin bakıldığı bir çalışma yoktur. Yaptığımız çalışmada PFDaA' ya maruz kalan grupta GSH düzeylerinin anlamlı olarak düşmesi, oksidatif stres halinde dokuda GSH tüketiminin artması ile açıklanabilir. PFDaA ve resveratrolün beraber verildiği grupta GSH seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı artması ($p<0,05$) resveratrolün oksidatif stresi azaltarak GSH tüketimini düşürmesine bağlı olduğu düşünülmüştür. Bizim çalışmamızda ise resveratrolün koruyucu etkisi görebilmek için PFDaA' dan önce resveratrol oral gavaj ile uygulanmıştır. Sonuçlarımıza göre RES, PFDaA'nın neden olduğu artan radikal üretimini azaltarak GSH düzeylerinin artmasına neden olmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise resveratrol grubundaki GSH düzeyi, kontrol grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).

Bir metalloenzim olan SOD, O₂ .-'i detoksifiye ederek, hücreleri serbest radikallerin neden olduğu oksidatif hasara karşı korur.

Levi ve Arasia'nın yaptığı çalışmada ise 0,2 ve 0,5 mg/kg/ PFDaA verilen gruplarda SOD aktivitesindeki anlamlı düşüş, SOD protein seviyesindeki azalma ve SOD'un antioksidan yeteneğinin inhibe olduğunu göstermişlerdir (182). Böylece testis hücrelerinin süperoksit radikallerini temizleme yeteneği azalmış olur. Bizim çalışmamızda ise asit grubuna 10 mg/kg/gün PFDaA verilmiş, kontrol grubuna göre artış görülmüştür fakat anlamlı değildir ($p>0,05$). Kontrol ve sham grupları arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Sıçanlarda oluşturulan kronik alkol tüketiminin karaciğer dokusunda neden olduğu oksidatif hasara bağlı olarak azalan SOD aktivitesinin RES uygulamasıyla kontrole yakın bir düzeye yükseldiği bildirilmiştir (183). Bizim çalışmamızda ise RES uygulaması ile testis dokusundaki SOD aktivitesi, asit grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).

Üreme fonksiyonları üzerinde önemli bir görevi olan serum testosteron seviyeleri de PFDoA 'dan olumsuz bir şekilde etkilenmektedir. Shi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 5 ve 10 mg/kg/gün PFDoA verilen grupta serum testosteron seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı olarak düşmüştür ($p<0,05$) (12). Shi ve arkadaşlarının yaptıkları benzer çalışmada ise 0,2 mg/kg/gün veya 0,5 mg/kg/gün PFDoA 'ya kronik (110 gün) maruz kalan ratların serum testosteron seviyesinde de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda da asit grubuna ait deneklerin serum testosteron seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,05$) (161). Bu sonuçlarla birlikte leydig hücrelerinde görülen apoptoz, PFDoA'nın leydig hücreleri üzerine direkt etkisi olduğunu ve steroid sentezini inhibe ettiğini düşündürmektedir.

Shin ve arkadaşları trans-resveratrolün erkek üreme sistemi işlevlerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada ex vivo olarak penis ereksiyonu, in vivo olarak da sperm sayısı ve kalitesi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda trans-resveratrolün kan testosteron düzeylerini, sperm sayılarını ve epididimal sperm hareketliliğini arttırmanın yanında, penis ereksiyonunu da tetikleyerek üreme işlevinde olumlu bir etkiye neden olduğu belirlenmiştir (184).

Forgacs ve arkadaşları fare primer Leydig hücre kültürünün testosteron üretimine resveratrolün etkisini incelemişlerdir. Primer Leydig hücre kültürleri, 48 saat süresince 1,56-200 μ M konsantrasyonda resveratrole verilmiştir. Sonuçta 12,5-50 μ M resveratrolün testosteron üretimini arttırdığı belirlenmiştir (185).

Bizim çalışmamızda ise 40 mg/kg/gün resveratrol ile birlikte 10 mg/kg/gün PFDoA uygulanan grupta resveratrolün, serum testosteron seviyesi üzerindeki olumlu etkisi gösterilmiştir. Resveratrol uygulanan gruptaki serum testosteron seviyesi asit grubuna göre anlamlı olarak artmıştır ($p<0,05$).

Shi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 110 gün (kronik) 0.5 mg PFDoA/kg/gün maruz kalan sıçanların testislerinde morfolojik değişikliklerin gözlemlendiğini ve spermatogenezde önemli rol oynayan seminifer tübüllerin olumsuz yönde etkilendiği gösterilmiştir (161). Literatür taramasında 14 gün (akut) PFDoA'ya maruz kalan sıçanların testislerin histolojik ve immunohistokimyasal değerlendirilmesi bulunmamaktadır. Bizim çalışmamızda elde edilen ışık mikroskopik bulgularda ise; 14 gün (akut) 10 mg/kg/PFDoA' ya maruz kalan asit grubunun seminifer tübül çapları, kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Bazal membran kalınlığı ise kontrol ve sham grubuna göre anlamlı artmıştır ($p<0,05$).

Yong-guang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 2,5-hexanedione (HD) ile oluşturulan testiküler hasarda resveratrolün spermatogenez sürecindeki olumlu etki gösterilmiştir. Bu çalışmada 5 grup oluşturulmuştur. 5 hafta boyunca grup A kontrol, grup B,C,D,E'ye 1% 2,5-HD, 9 hafta boyunca grup C,D,E' ye intragastrik uygulama ile farklı konsantrasyonlarda resveratrol ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ve $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) verilmiştir. Çalışmanın bitiminde, resveratrolün artan dozunda seminifer tübül çapları kontrol grubuna yakın olduğu ancak kontrol grubundan daha düşük olduğu gösterilmiştir (170).

Bizim çalışmamızda ise PFDoA' ya maruz kalan grupta, epitel boyunun ve seminifer tübül çapının diğer gruplara karşın azaldığı, PFDoA ile birlikte resveratrol uygulanan grupta, seminifer tübül çapında, kontrol grubuna göre hala anlamlı azalmanın görülmesi, resveratrolün dozunun seminifer tübül çapında tam yeterli olmadığını, etki süresinin kısa ya da dozun yetersiz olduğunu düşündürmektedir.

Resveratrol+PFDoA grubundaki bazal membran kalınlığının ise asit grubuna göre anlamlı olarak azalması, resveratrolün yeterli olduğu gösterilmiştir ($p < 0,05$).

Akut ve kronik, oral ya da intraperitoneal etanol uygulanan çalışmalarda serbest radikallerin ve lipid peroksidasyonun arttığı gösterilmiştir (186, 187, 188, 189, 190, 191). Husain ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada etanol ile indüklenen oksidatif stres sonucunda GSH-Px, SOD ve CAT aktivitesinde düşüş gözlenmiştir (192). Kuruş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 3 ay boyunca 6% etanol ve standart diyet ile ad libitum beslenen deneklerin GSH-Px, SOD ve CAT değerlerinde anlamlı düşüş gözlenmiştir (193). Grattagliano ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 8 hafta 3% lük etanol uygulanarak GSH değerlerinde anlamlı azalma gözlenmiştir (194). Bizim çalışmamızda ise 14 gün oral yolla 5% lik alkol uygulanan deneklerde GSH değerlerinde anlamlı olarak azalma gözlenirken, MDA ve SOD değerlerinde anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir.

Akut alkol tüketiminin testiküler hasara yol açtığını gösteren çalışmalar vardır (195, 196). Kuruş ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 3 ay boyunca 6% etanol ve standart diyet ile ad libitum beslenen deneklerin testislerindeki seminifer tübül çaplarında azalma, seminifer tübüllerde dejenerasyon ve atrofi, epitel boyunca kısalma ile dökülmeler gözlenmiştir (193). Bizim çalışmamızda ise sham grubunda 14 gün boyunca 5% lik etanol uygulanarak seminifer tübül çaplarında azalma, az da olsa seminifer tübüllerde atrofi ve spermatogenezde bozulmalar gözlenmiştir. Bu sonuçlar diğer gruplar ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; sham grubundaki seminifer tübül çapı kontrol grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Johnsen

skorlama sistemi göre elde edilen sonuçlarda ise sham grubunda kontrol grubuna göre anlamlı azalma gözlenmiştir. Fakat asit grubundaki azalma kontrol ve sham grubuna göre anlamlı bulunmuştur. Bazal membran kalınlığında ise sham grubunda anlamlı değişiklikler gözlenmemiştir. Bu sonuçlar 14 gün 5% lik alkol tüketiminin seminifer tübül çapında anlamlı azalmaya, spermatogenezde az da olsa bozulmalara yol açtığını, oksidatif stres belirteçlerinden biri olan GSH değerlerinde anlamlı azalmaya yol açarken diğer değerleri etkilemediği gözlenmiştir.

Etanolün hipotalamus-hipozif gonadal aks üzerine etkileri kapsamlı olarak çalışılmaktadır (197, 198). Akut Yüksek doz etanolün genel olarak ratlarda testosteron seviyesini düşürdüğü bilinmektedir (199, 200). Düşük dozlarda ise testosteron seviyesini düşürdüğü, arttırdığı ya da değiştirmediğini gösteren çalışmalar da rapor edilmiştir (199, 200, 201, 202). Fernández-Mateos ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 35 gün boyunca (6. 2 % w/v) etanol diyeti uygulanmıştır. 5 hafta boyunca haftanın 3 günü alkol diyeti, 4 günü ise sıvı diyeti uygulanmıştır. Deney bitiminde kesintili alkol tüketiminin kronik alkol tüketimine göre testosteron seviyesini arttırdığı gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda ise sham grubunda 14 gün boyunca yaklaşık 5%’ lik alkol uygulanarak testosteron seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı arttığı görülmüştür (203).

Bu çalışmada histolojik parametrelerden biri olan Johnsen skoru da kullanıldı. Çünkü Johnsen skoru seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenezin yeterliliğini ve olgun spermatozoa sayısını verir. Antioksidanların oksidatif stres sonucu bozulan spermatogenez üzerine olumlu etkilerinden yola çıkarak, PFDoA ve resveratrolün testiste ortaya çıkaracağı etkilerini Johnsen kriterleri ile değerlendirdik.

Dört grubun testis seminifer tubulleri histolojik olarak incelendiğinde Johnsen skoru PFDoA’ya maruz kalan grupta diğerlerine göre anlamlı olarak düşük bulundu ($p<0,05$). Bulgularımız ışığında PFDoA maruziyetin tübüler spermatozoa maturasyonunu bozduğu görülmüştür. PFDoA alımıyla birlikte resveratrol verilmesinin sperm maturasyon süreci üzerindeki olumsuz etkiyi değiştirdiğini düşünmekteyiz.

Revel ve arkadaşları, Benzo(a)piren’e (Bap) etkin kalmanın sperm DNA’ sında hasar ve apoptoza etkisi ile doğal aril hidrokarbon reseptör (AhR) antagonisti olan resveratrolün olası hasarlara koruyucu özelliğini değerlendirdikleri çalışmalarında 2 deney düzeneği oluşturmuşlardır. Çalışmanın sonucunda, farelerin Bap’a etkin kalmasının spermatogenezde toksik bir etki oluşturduğu ve sperm yoğunluğunda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir.

Bununla birlikte, resveratrolün, üreme işlevinde, toksik maddenin etkilerinin önlenmesinde iyileştirici işlev gösterdiği, sperm DNA hasar ürünlerinin oluşumunu ve apoptozu önemli ölçüde azaltabildiği saptanmıştır (204).

Uğuralp ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, deneysel testis torsiyonu sonrası resveratrol uygulamasının, testiküler üreme hücrelerinin apoptozu üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Sonuçta resveratrolün testislerde üreme hücre apoptozunu azaltabileceği gösterilmiştir (147).

Shi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 5 ve 10 mg PFDoA/kg/gün' ya maruz kalan ratların testislerinde bulunan leydig, sertoli ve spermatogenik hücrelerde apoptozun karakteristik özellikleri gözlenmiştir. Bu özellikler; yoğun düzensiz nükleus, kondanse kromatin ve iyi tanımlanmamış nükleer membrandır (12).

Bizim çalışmamızda da bazal membranda kalınlaşma olduğu ve yapısının bozulduğu, spermatogonyumlardan türevlenen spermatositler arasında hücresel bozulmalar ve spermatogenik seri hücreleri arasında ayrılmalar gözlenmekteydi. Sertoli-sertoli hücreleri arasındaki bağlantı özelliklerinde bozulmalar ve hücreler arasında oldukça fazla miktarda boşluklar bulundu. Primer ve sekonder spermatositlerin üzerinde gelişmekte olan spermatidlerin dizilimleri bozulmuş ve dağınık olarak gözlemlendi. Leydig hücrelerinde ise yoğun düzensiz çekirdekler, kötü tanımlanmış nükleer membran ve kondanse kromatin gözlemlendi.

PFDoA'nın neden olduğu olumsuz etkiye resveratrolün koruyucu özelliği araştırıldığında asit uygulanan gruptaki tunel pozitif hücrelerin ve aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren apoptotik hücre sayısının anlamlı olarak arttığı görülmüştür.

Revel ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, resveratrolün, üreme işlevinde, toksik maddenin etkilerinin önlenmesinde iyileştirici işlev gösterdiği, sperm DNA hasar ürünlerinin oluşumunu ve apoptozu önemli ölçüde azaltabildiği saptanmıştır.

Bizim çalışmamızda da resveratrol+asit grubunda apoptotik hücre sayısının asit grubuna göre anlamlı olarak azaldığı Revel ve Uğuralp' in bulgularına benzer sonuçlar elde edilerek apoptozis ve apoptotik değişikliklerin resveratrolün antioksidan etkisi ile anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamız endüstriyel alanda yaygın kullanımı olan PFDoA' nın erkek üreme sistemi üzerine neden olabileceği olumsuz etkilerin belirlenmesi ve bu etkilere antioksidanların koruyucu etkilerin araştırılması açısından önem kazanmaktadır.

Literatürde resveratrolün, perflorlu kimyasallardan PFDoA toksisitesine karşı koruyucu etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız literatürdeki boşluğu dolduracaktır. Resveratrolün, PFDoA sonucu oluşan testiküler hasara karşı koruyucu etkisi ilk defa bizim çalışmamızda histokimyasal olarak hematoksilen & eozin, masson trikrom ve PAS, immünohistokimyasal olarak TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları yapılarak, testis ince yapısı ultrastrüktürel düzeyde incelenerek ve biyokimyasal olarak SOD, MDA, GSH ve testosteron düzeyleri ölçülerek değerlendirilmiştir.

Çalışmamızdan elde edilen verilere göre perflorlu kimyasallara maruz kalan sıçanların testislerinde doku hasarı oluşturduğu, oksidatif strese yol açtığı, apoptozu arttırdığı, biyokimyasal parametrelerde de önemli değişikliklere yol açtığı sonucuna varılmıştır. Resveratrolün, PFDoA'nın ile oluşturulan oksidatif stres, lipid peroksidasyonu, doku hasarını, apoptozu önlediği ve serum testosteron seviyelerini olumlu olarak etkilediği görülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Dinglasan, M.J., Ye, Y., Edwards, E.A. and Mabury, S.A., 2004, Fluorotelomer alcohol biodegradation yields poly- and perfluorinated acids, *Environ Sci Technol.*, 38:57-64p.
2. Lehmler, H.J., 2005, Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants - a review (*Chemosphere*), 58: 71-96p.
3. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development), 2002a. Co-operation on Existing Chemicals Hazard assessment of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and its salts, Environment irectorate, Joint meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, Pesticides and Biotechnology.
4. Prevedouros, K., Cousins, I.T., Buck, R.C. and Korzeniowski, S.H., 2006. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates, *Environ Sci Technol.*, 40: 32-44p.
5. Renner, R., 2006, Is Arctic PFOA contamination a “blast from the past”, *Environmental Science and Technology online*, Science News – January 4, 2006.
6. Anonim, 2006, <http://www.tuketicidergisi.com/default.aspx?pid=9187&nid=10496> (Erişim tarihi: 16.11.2010).
7. Boulanger, B., Vargo, J.D., Schnoor, J.L. and Hornbuckle, K.C., 2005b, Evaluation of perfluorooctane surfactants in a waste water treatment system and in a commercial surface protection product, *Environ Sci Technol.*, 39: 24-30p.
8. Stock, N.L., Lau, F.K., Ellis, D.A., Martin, J.W., Muir, D.C.G and Mabury, S.G., 2004, Polyfluorinated telomer alcohols and sulfonamides in the North American troposphere. *Environ. Sci. Technol.*, 38: 991-996p.
9. Anonim, 2010a, „A Newly Discovered Reason to Avoid Fast Food and Popcorn“, http://www.foodconsumer.org/newsite/Opinion/Comments/fast_food_and_popcorn_0112100718.html (Erişim tarihi: 25.11.2010).
10. Anonim, 2010c, <http://www.0diyet.com/blog/> (Erişim tarihi: 02.12.2010).1. (1) Prevedouros, K.; Cousins, I. T.; Buck, R. C.; Korzeniowski, S. H.*Environ. Sci. Technol.* 2006, 40, 32–44.
11. Ohmori, L., Kudo, N., Katayama, K., Kawahima, Y., 2003, Comparison of the toxicokinetics between perfluorocarboxylic acids with different carbon chain length, *toxicology* 184, 135-140.

12. Shi, Z., Zhang, H., Liu, Y., Xu, M., and Dai, J. (2007). Alterations in gene expression and testosterone synthesis in the testes of male rats exposed to perfluorododecanoic acid. *Toxicol. Sci.* 98, 206–215.
13. Monroe, R. K., and Halvorsen, S. W. (2009). Environmental toxicants inhibit neuronal Jak tyrosine kinase by mitochondrial disruption. *Neurotoxicology* 30, 589–598.
14. Halliwell B.& Gutteridge J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Third Edition. Oxford University Press. ISBN 1999;1-29.
15. Sikka CS. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted.
16. Baker MA, Aitken RJ. Reactive oxygen species in spermatozoa: methods for monitoring and significance for the origins of genetic disease and infertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005;3:67.
17. Agarwal A:Significance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male.
18. <http://en.wikipedia.org/wiki/Resveratrol>.
19. Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis- resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int J Tissue React.* 1996;18:67-71.
20. Bhat KPL, Kosmeder JW, & Pezzuto JM. Biological effects of resveratrol. *Antioxid. Redox Signal.* 2001;3:1041–1064.
21. Aziz MH, Kumar R, & Ahmad N. Cancer chemoprevention by resveratrol: in vitro and in vivo studies and the underlying mechanisms. *Int. J. Oncol.* 2003;23:17–28.
22. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. Cilt 1-2. Ankara:Güneş Kitabevi. İsn 975- 7467-28-6 ve 1999.
23. Ariyaratne S, Kim I, Mills N, Mason I, Mendis-Handagama C. Effects of ethane dimethane sulfonate on the functional structure of the adult rat testis. *Archives of Andrology*. 2003 ve 49:313–326.
24. Odar İV. *Anatomi*: Hacettepe Kitapçılık Ltd. Şti; 1986.
25. Yıldırım M. *İnsan anatomisi*. 4. Baskı. İstanbul: Tayf Ofset; 1999.
26. Leonhardt H, Kahle W, Platzer W. *Anatomi Atlası Karın ve İç Organlar*. Kazancıgil A, Atay T, (Çev.), Cilt 2, 4. Basım, İstanbul, Arkadaş Tıp Kitapları, 1986. .
27. Snell RS. *Klinik Anatomi*. Yıldırım M (Çev.) . 6. Baskı. İstanbul. Nobel Kitabevi. 2004.

28. William F.G. A Lange Medical Book. In: Doğan A. 16. baskı. Cerrah Paşa İstanbul. Barış Kitabevi. 1995.
29. Kalaycı Ş.Histoloji.Bursa:Uludağ Üniversitesi Basımevi;1986.7. Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli G.İnsan embriyolojisi.7.Baskı.İstanbul:Alfa Basım Yayım Dağıtım;1992.
30. Şeftalioğlu A.Genel ve özel insan embriyolojisi.Üçüncü Baskı.Ankara:Tıp Ve Teknik Yayıncılık Ltd. Şti;1998.
31. Dere F.Anatomi ders kitabı.Cilt 1-2.Adana;1988.
32. Karataş S.Sıçanlarda kadmiyum klorür'ün (CdCl₂) testis dokusuna etkisi.Yüksek Lisans Tezi.Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı,Eskişehir,Şubat,1998.
33. Campbell Üroloji. 8. Baskı, Güneş Kitabevi, 2005: 76-78.
34. Erkek üreme sistemi. <http://www.medibul.com/files.php?p=pp&cid=32>. [Çevrimiçi]
35. İnsan üreme sistemi. Tübitak
<http://www.biltek.tubitak.gov.tr/bilgipaket/ureme/01.swf>. [Çevrimiçi]
36. Kaloğlu C, Gürsoy E. Sıçanlarda gonadların gelişimi ve testiküler farklılaşma. İstanbul Cerrahpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 1997; 18: 243-251.
37. Khosrowbeygi A, Zarghami N., Deldar Y. Correlation between sperm quality parameters and seminal plasma antioxidants status. Iranian J Reprod Med. 2004; 2(2):58-64.
38. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology A Text and Atlas with Cell and Molecular Biology. 4. Basım. Baltimore, Philadelphia, 2003.
39. Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. Özel Histoloji.2.Basım, Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2007.
40. Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. Genel Histoloji. 3.Basım, Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2008.
41. Eroschenko VP. Di Fiore Histoloji Atlası. Demir R. (Çev.). 10.Baskı. Palme Yayıncılık, 2008.
42. Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R (Çev.), Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
43. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook Of Histology. 3. Basım,Philadelphia: WB Saunders Company; 2007.
44. Akay MT. Genel Histoloji. 5. Baskı. Ankara:Palme Yayınevi; 2001.

45. Ilgaz C. Genital Sistem Histolojisi Ders Notu. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı; 2009.
46. Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S. (Çev.). 10.Baskı. İstanbul. Nobel Kitabevi 2006.
47. Abraham L. Kierszenbaum, MD, PhD. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Patolojiye Giriş. In: Demir R. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
48. Dellmann HD, Brown EM (1987) Textbook of Veterinary Histology, 3rd Ed.,
49. Leeson RC, Leeson ST, Paparo AA (1985) Textbook of Histology, WB Saunders.
50. Tanyolaç A (1999) Özel Histoloji, 3. baskı, Yorum basın yayın, s: 132-143, Ankara.
51. Johnson KE (1991) Histology and Cell Biology, 2nd Ed., Harwal Publishing Company, s: 295-304, USA.
52. Krinke GJ (2000) The Laboratory Rat, 1st Ed., Academic Press, s: 150-152, 311-312, Switzerland.
53. Boekelheide K, Fleming SL, Johnson KJ, Patel SR, Schoenfeld HA. Role of Sertoli cells in injury-associated testicular germ cell apoptosis. Proc Soc Exp Biol Med, 2000; 225 (2): 105-15.
54. Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji. 17. baskı. Ankara, Meteksan Kağıt-Karton Üretim Tesisleri. 2008.
55. Netter FH, Ovalle WK, Nahirney PC. Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çev.), Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009.
56. Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Baçaklar A.C. (Çev.), 9. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2005.
57. Guyton AC. Resting membrane potential. John E hall eds. Textbook of medical physiology. 11st ed, Saunders, Missouri, 2005.
58. Assuncao Guimaraes C, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur J Biochem, 2004; 271(9): 1638-50.
59. Oberhammer F, Wilson JW, Dive C et al. Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. EMBO J 1993; 12: 3679-3684. .
60. Öktem S, Özhan MH, Özol D. Apoptozisin önemi. Toraks Dergisi 2001; 2:91-95.
61. Akdeniz E. Testiste Spermatogenik Hücrelerde $\beta 1$ İntegrinler ve Fibronektin Dağılımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi ; 2004.

62. Wyllie AH, Duvall E. Cell death. In: McGee JO'D, Issacson PGR, Wright N (eds). Oxford Textbook of Patology, vol 1. USA: Oxford University pres; 1992; 142-147.
63. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide spread implications in tissue kinetics. Br J Cancer,1972; 26: 239-57.
64. Assuncao Guimaraes C, Linden R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. Eur J Biochem, 2004; 271(9): 1638–50.
65. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. J Pathol, 1984; 142(1):67-77.
66. Thompson CB. Apoptosis. In: Paul WE, ed. Fundamental Immunology. Lippincott-Raven Publishers, 1999; 342-346.
67. Cummings MC, Winterford MC, Walker NI. Apoptosis. In Sternberg SS. Histology for Pathologists. Lipincott-Raven Publishers Second Edition. 1997: pp 3-21.
68. Wyllie AH. Cell Death. Int Rev Cytol 1987; Suppl 17: 755-785.
69. Walker NI. Ultrastructure of rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. Am J Pathol 1987; 126: 439-451.
70. Walker NI, Gobe GC. Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland induced by duct obstruction. J Pathol 1987; 153: 333-344.
71. Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). Immunology. 1985; 56(2): 351-8.
72. Wilcock C, Hickman JA. Characterisation of a Na⁺/K⁺/Cl⁻ cotransporter in alkylating agent-sensitive L1210 murine leukemia cells. Biochim Biophys Acta 1988; 22: 946(2): 359-67.
73. Meagher LC, Savill JS, Baker A, Fuller RW, Haslet C. Phagocytosis of apoptotic neutrophils does not induce macrophage relsease of tromboxane B2. J Leukoc Biol 1992; 52:269-273.
74. Howie SE, Sommerfield AJ, Gray E, Harrison DJ. Peripheral T lymphocyte depletion by apoptosis after CD4 ligation in vivo. Selective loss of CD44 and activating memory T cells. Clin Exp Immunol 1994; 95: 195-200.
75. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD 2003; 1-19.

76. Wyllie AH. Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-556.
77. Oberhammer F, Wilson JW, Dive C et al. Apoptotic death in epithelial cells: Cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. *EMBO J* 1993; 12: 3679-3684.
78. Earnshaw WC. Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 337-343.
79. Collins RJ, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JFR. Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. *Int J Radiat Biol* 1992; 61: 451-453.
80. Fadok VA, Savill JS, Haslett C et al. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol.* 1992; Dec 15: 149(12): 4029-35.
81. Creutz CE. The annexins and exocytosis. *Science* 1992; Nov 6; 258(5084): 924-31. .
82. Fesus L, Davies PJ, Piacentini M. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol.* 1991; 56(2): 170-7.
83. Piacentini M, Autuori F, Dini L. "Tissue" transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor-stimulation. *Cell Tissue Res.* 1991; 263(2): 227-35.
84. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *J Biochem* 1997; 326: 1-16. .
85. Earnshaw WC, Martins LM and Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 383-424.
86. Yuan J, Shaham S, Ledoux S, Ellis HM and Horvitz HR. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993; 75: 641-652.
87. Thornberry NA and Lazebnik Y. Caspases: Enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-1316.
88. Slee EA, Adrain C and Martin SJ. Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ.* 1999; 6: 1067-1074.
89. Chai J, Shiozaki E, Srinivasula SM et al. Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP. *Cell* 2001; 104: 769-780.
90. Riedl SJ, Renatus M, Schwarzenbacher R et al. Structural basis for the inhibition of caspase-3 by XIAP. *Cell* 2001; 104:791-800.

91. Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 276: 869-874, 2001.
92. Creagh EM and Martin SJ. Caspases: cellular demolition experts. *Biochemical Society Transactions* 2001; 29 (6) :pp 696-702.
93. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996;87,171.
94. Arama E, Agapite J and Steller H. Caspase activity and a specific cytochrome C are require.
95. Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, ve ark., 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*, 1998;83: 152.
96. Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, Lock MTW, ve ark., Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development*, 2000; 56: 353-359.
97. Jefferson KP, Persad RA, Holly MP, Apoptosis and Relevance to Urologists.
98. Hsueh AJW, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, ve ark., Gonadal cell apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research* 1996;51: 432-457.
99. Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis, *Bioessays*. 2000;22: 423 -430.
100. Martincic DS, Klun IV, Zorn B, Vrtovec HM. Germ cell apoptosis in the human testis.; *Pflugers Arch*. 2001; 442 : 159 -160.
101. Said TM, Paasch U, Glander HJ, Agarwal A. Role of caspases in male infertility, *Hum Reprod*. 2004;10: 39 -51.
102. Host E, Lindenberg S, Smidt-Jensen S. The role of DNA strand breaks in human spermatozoa used for IVF and ICSI. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000;79(7): 559-63.
103. Billig H, Chun SY, Eisenhauer K, Hsueh AJ. Gonadal cell apoptosis: hormoneregulated.
104. Vinatier D, Dufour P, Subtil D. Apoptosis: a programmed cell death involved in ovarian and uterine physiology. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1996;67(2): 85- 102.
105. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, ve ark., Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod* 1998;59(5):1037-46 .

106. De Lamirande E, Gagnon C, Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod* 1995;10(1): 15-21.
107. Shen HM, Chia SE, Ong CN, Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J Androl* 1999;20(6): 718-23.
108. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*, 1993;7: 643-650.
109. Yin Y, Hawkins KL, Devvolf WC, Morgantaler A, Heat stress causes testicular germ cell apoptosis in adult mice. *J Androl*. 1997;18: 159- 165.
110. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, et al., Apoptotic cell death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research*. 1996; 40: 351-356.
111. Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis pattern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl*, 1998;19: 487-497.
112. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today*,1993; 14: 126-130 .
113. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide spread implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*,1972; 26: 239-57.
114. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Reviews*, 1995;11: 101-105.
115. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl*. 1988;9(6):367-76.
116. Lenzi A, Gandini L, Picardo M. A rationale for glutathione therapy. *Hum Reprod*.
117. Silva PFN. Physiology of peroxidation processes in mammalian sperm. <http://igiturarchive.library.uu.nl/dissertations/2006-0710-200029/full.pdf>. 2006. Utrecht University.
118. WHO : World Health Organization Laboratory Manual For The Examination Of Human Semen And Sperm-Cervical Mucus _traction. 4th Ed. New York: Cambridge University Press: Cambridge.1999.
119. Alvarez J.G., Sharma R.K.,Ollero M.,Saleh R.A., Lopez et al. Increased DNA damage in sperm from leukocytospermic semen samples as determined by the sperm chromatin structure assay. *Fertil Steril* 2002;78(2):319-29.

120. De Lamirande E, Gagnon C. A Positive role for the superoxide anion in triggering hyperactivation and capacitation of human Spermatozoa. *Inter J Androl*. 1993;16(1):21-5. 88.
121. Aitken R.J., Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome Reproduction, 2001;122:497–506.
122. Khosrowbeygi A, Zarghami N., Deldar Y. Correlation between sperm quality parameters and seminal plasma antioxidants status. *Iranian J Reprod Med*. 2004; 2(2):58-64.
123. Twigg J., Fulton N., Gomez E., Irvine D.S., ve ark. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod* 1998;13(6):1429–36.
124. Das DK, Sato M, Ray PS, Maulik G, Engelman RM, Bertelli AA, Bertelli A, Cardioprotection of red wine: role of polyphenolic antioxidants. *Drugs Exp. Clin. Res*. 1999;25:115-120.
125. Hain R, Bieseler B, Kindl H, Schroder G, Stocker R. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol, *Plant Mol. Biol*. 1990;15:325-335.
126. Bertelli AA, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP. Plasma, urine and tissue levels of trans- and cis- resveratrol (3,4',5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *Int J Tissue React*. 1996;18:67-71.
127. Soleas, G.J., Diamandis, E.P. and Goldberg, D.M.: Resveratrol: A Molecule Whose Time Has Come? And Gone?. *Clin Biochem* 30, (2), 91-113.
128. <http://www.biologie.uni-freiburg.de/data/bio2/schroeder/Resveratrol.html>. Erisim tarihi:11.05.2007.
129. Jannin, B., Menzel, M., Berlot, J-P., Delmas, D., Lançon, A., Latruffe, N.: Transport of resveratrol, a cancer chemopreventive agent, to cellular targets: plasmatic protein binding and cell uptake. *Biochem Pharmacol* 68, (6), 1113-1118, 2004.
130. Fitzpatrick DF, Hirschfield SL, Ricci T, Jantzen F, Coffey RG, Endothelium, dependent vasorelaxation caused by various plant extracts. *Cardiovasc. Pharmacol*. 1995;26:90-95.
131. Andriambeloson E, Kleschyov AL, Muller B, Beretz A, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br. J. Pharmacol*. 1997;120:1053-1058.

132. Bertelli AAE, Giovannini De Caterina RL. Antiplatelet activity. 1996.
133. Yamaguchi M, Jie Z. Effect of polyphenols on calcium content and alkaline phosphatase activity in rat femoral tissues in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* 2001;24:1437- 1439.
134. Mihara M, Uchiyama M. Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium- reduction method. *Clin. Chem.* 1990;36:1440-1443.
135. Kimura, Y, Okuda H, Arichi S. *Biochim. Biophys. Acta* 1985; 834: 275–278.
136. Jang DS, Kang BS, Ryu SY, Chang IM, Min KR, and Kim Y. *Biochem.*
137. Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci* 2001;70:81–96.
138. Gao X, Xu YX, Janakiraman N, Chapman RA, Gautam SC. Immunomodulatory activity of resveratrol: Suppression of lymphocyte proliferation, development of cellmediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochem Pharmacol* 2001;2:1299– 1308.
139. Li-Man H, Ming-Jai S, Wing-Keung C, Chin-Wei C, Wan-Fen C, & Jan-Kan Chen. The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *British Journal of Pharmacology* 2002;135:1627-1633.
140. Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci.* 1997;61(21):2103-2110.
141. Fulgenzi A, Bertelli AA, Magni E, Ferrero E, Ferrero ME. *En vivo* inhibition of TNF alpha- induced vascular permeability by resveratrol. *Transplant Proc.* 2001;33:2341-2343.
142. Ferrero ME, Bertelli AA, Pellegatta F, Fulgenzi A, Corsi MM, Bertelli A. Phloalexin resveratrol (3-4-5- Trihydroxystilbene) modulates granulocyte and monocyte endothelial adhesion. *Transplant Pro.* 1998;30:4191-4193.
143. Nigdikar SV, Williams Nr, Griffin BA, Howard AN. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low- density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Ntr.* Aug 1998;68(2):258-265.
144. Andriambeloson E, Stoclet JC, Andriantsitohaina R. Mechanism of endothelial nitric oxide- dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat thoracic aorta. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1999;33:248-254.
145. Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS, & Lubahn DB. A role for estrogens in the male reproductive system. *Nature (Lond.)* 1997;390:509–511.

146. M Emilia J, Eulalia G-P, Thais M, Joan M, Joan E, Rodriguez G, Joana MP. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *Nutrient Metab.* 2005;757-760.
147. Uguralp S, Usta U, Mizrak B. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg.* 2005 Oct;15(5):333-6.
148. Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF, Casper RF. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol.* 2001 Sep- Oct;15(5):479-86.
149. EWG (Environmental Working Group), 2006, PFCs A Group of Chemicals that Contaminate the Planet, 38:16-2p.
150. Boulanger, B., Vargo, J., Schnoor, J.L. and Hornbuckle, K.C., 2004, Detection of perfluorooctane surfactants in Great Lakes water, *Environ Sci Technol.*, 38: 64-70 p.
151. Higgins, C.P., Field, J.A., Criddle, C.S. and Luthy, R.G., 2005, Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge, *Environ Sci Technol.*, 39:46-56p.
152. Boulanger, B., Peck, A.M., Schnoor, J.L. and Hornbuckle, K.C., 2005a, Mass budget of perfluorooctane surfactants in Lake Ontario, *Environ Sci Technol.*, 39: 74-79.
153. Loewen, M., Halldorson, T., Wang, F. And Tomy, G., 2005, Fluorotelomer carboxylic acids and PFOS in rainwater from an urban center in Canada, *Environ Sci Technol.*, 39: 44-51p.
154. Shoeib, M., Harner, T., Ikononou, M. and Kannan, K., 2004, Indoor and outdoor air concentrations and phase partitioning of perfluoroalkyl sulfonamides and polybrominated diphenyl ethers, *Environ Sci Technol.*, 38: 13-20p.
155. Shoeib, M., Harner, T., Wilford, B.H., Jones, K.C. and Zhu, J., 2005, Perfluorinated sulfonamides in indoor and outdoor air and indoor dust: occurrence, partitioning, and human exposure, *Environ Sci Technol.*, 39: 599-606p.
156. Kubwabo, C., Stewart, B., Zhu, J. and Marro, L., 2005, Occurrence of perfluorosulfonates and other perfluorochemicals in dust from selected homes in the city of Ottawa, Canada., 11: 8 p.

157. Moriwaki, H., Takatah, Y. and Arakawa, R., 2003, Concentrations of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) in vacuum cleaner dust collected in Japanese homes, *Environ. Monit.*, 5: 7p.
158. Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K.S., Loganathan, B.G., Mohd, M.A., Olivero, J., Wouwe, V.N., Yang, J.H. and Aldous, K.M., 2004. Perfluorooctanesulfonate and Related Fluorochemicals in Human Blood from Several Countries, *Environmental Science and Technology*, 40: 715–720p.
159. Begley, T.H., White, K., Honigfort, P., Twaroski, M.L., Neches, R. and Walker, R.A., 2005, Perfluorochemicals: potential sources of and migration from food packaging, *Food Addit Contam.*, 22: 23-31p.
160. Anonim, 2010b, "Perfluorinated Compounds". <http://watoxics.org/chemicals-of-concern/perfluorinated-compounds-pfcs> (EriGim tarihi: 19.11.2010).
161. Shi, Z., Ding, L., Zhang, H., Feng, Y., Xu, M., and Dai, J. (2009). Chronic exposure to perfluorododecanoic acid disrupts testicular steroidogenesis and the expression of related genes in male rats. *Toxicol. Lett.* 188, 192–200.
162. Diemer, T., Allen, J. A., Hales, K. H., and Hales, D. B. (2003). Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits.
163. Turner, T. T., Tung, K. S., Tomomasa, H., and Wilson, L. W. (1997). Acutetesticular ischemia results in germ cell-specific apoptosis in the rat. *Biol. Reprod.* 57, 1267–1274.
164. Zini, A., and Schlegel, P. N. (1997). Cu/Zn superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase mRNA expression in the rat testis after surgical cryptorchidism and efferent duct ligation. *J. Urol.* 158, 659–663.
165. Differential expression profiling of the hepatic proteome in a rat model of dioxin resistance correlation with genomic and transcriptomic analyses. *Mol. Cell Proteomics* 5, 882-89Emilim.
166. Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., and Seed, J. (2007) Perfluoroalkyl acids: a review of monitoring and toxicological findings. *Toxicol. Sci.* 99, 366–394.
167. Kennedy, G. L., Jr., Butenhoff, J. L., Olsen, G.W., O'Connor, J. C., Seacat, A.M., Perkins, R. G., Biegel, L. B., Murphy, S. R., and Farrar, D. G. (2004) The toxicology of perfluorooctanoate. *Crit. Rev. Toxicol.* 34, 351–384.

168. Andersen, M. E., Butenhoff, J. L., Chang, S. C., Farrar, D. G., Kennedy, G. L., Jr., Lau, C., Olsen, G. W., Seed, J., and Wallace, K. B. (2008) Perfluoroalkyl acids and related chemistries: toxicokinetics and modes of action. *Toxicol. Sci.* 102, 3–14.
169. Shi Z.,Feng Y.,Wang J.,Zhang H.,Ding L.,Dai J.Perfluorododecanoic acid-induced steroidogenic inhibition is associated with steroidogenic acute regulatory protein and reactive oxygen species in cAMP-stimulated Leydig cells.
170. Guang J., Tao P.,Yong L.,Chuan L.,Hua L. Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2,5-hexanedione.
171. Elsayed NM, Bendich A. Dietary antioxidants: potential effects on oxidative products in cigarette smoke. *Nutr Res* 2001;21:551–67.
172. Karla J, Chaudhary AK, Prasad K. Increased production of oxygen free radicals in cigarette smokers. *Int J Exp Pathol* 1991;72:1–7.
173. Uguralp S, Usta U, Baykarbulut A. Resveratrol reduces ischemia reperfusion injury after experimental testicular torsion. *Eur J Pediatr Surg.* Apr 2005;15(2):114-9.
174. Berger, M.M.: Can oxidative damage be treated nutritionally?. *Clin Nutr* 24, 172–183,2005.
175. Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.-H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Haris, G.K., Shi, X.:Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses.*Biochem Bioph Res Co* 309, (4), 1017-102, 2003.
176. Docherty, J.J., Fu, M.M., Hah, J.M., Sweet, T.J., Faith, S.A., Booth, T.: Effect of resveratrol on herpes simplex virus vaginal infection in the Mouse. *Antivir Res* 67, (3), 155-162, 2005.
177. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990;186:421-31.
178. Zhang H., Shi Z., Liu Y., Wei Y., Dai J. Lipid homeostasis and oxidative stress in the liver of male rats exposed to perfluorododecanoic acid *Toxicology and Applied Pharmacology* 227 (2008) 16–25.
179. Li-Man H, Ming-Jai S, Wing-Keung C, Chin-Wei C, Wan-Fen C, & Jan-Kan Chen. The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *British Journal of Pharmacology* 2002;135:1627-1633.
180. Meister A. Transport and metabolism of glutathione and gamma-glutamyl amino acids. *Biochem Soc Trans.* 1983;11:793-4.

181. Özyurt H, Pekmez H, Parlaktas BS ve ark. Oxidative stress in testicular tissues of rats exposed to cigarette smoke and protective effects of caffeic acid phenethyl ester Assian J Androl. 2006;8(2):189-193.
182. Levi, S., Arosio, P., 2004. Mitochondrial ferritin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1887-1889.
183. Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., May, M.E., Gharbi, N., Kamoun, A., El-Fazaâ, S.: Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver. *Life Sci* 80, (11), 1033-1039, 2007.
184. Shin S, Jeon J, Park D, Jang MJ, Choi JH, Choi BH, Joo SS, Nahm SS, Kim JC, Kim YB, et al. Trans-resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. *Archives of Pharmacal Research* 2008; 31(1): 83-87.
185. Forgacs Zs, Somosy Z, Telbisz A, Massanyi P, Lukac N, et al. Effect of resveratrol on the testosterone production of mouse primary leydig cell culture. 2004.
186. Lecomte, E., Grolier, P., Herbeth, B., Pirollet, P., Musse, N., Paille, F., Braesco, V., Siest, G., Artur, Y., 1994. The relation of alcohol consumption to serum carotenoid and retinol levels. Effects of withdrawal. *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 64, 170–175.
187. Schlorff, E.C., Husain, K., Somani, S.M., 1999. Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol* 18, 203–214.
188. Oner-Iyidogan, Y., Gurdol, F., Oner, P., 2001. The effects of acute melatonin and ethanol treatment on antioxidant enzyme activities in rat testes. *Pharmacol Res.* 44, 44–49.
189. Genc, S., Gurdol, F., Oner-Iyidogan, Y., Onaran, I., 1998. The effect of melatonin administration on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Pharmacol. Res.* 37, 37–40.
190. Bekpinar, S., Tugrul, Y., 1995. Influence of selenium supplementation in non-toxic doses on testis lipid peroxide and antioxidant levels in chronic alcohol-fed rats *Alcohol* 30, 645–650.
191. Lieber, C.S., 2005. Metabolism of alcohol. *Clin. Liver Dis.* 9, 673–702.
192. Husain, K., Scott, B.R., Reddy, S.K., Somani, S.M., 2001. Chronic ethanol and nicotine interaction on rat tissue antioxidant defense system. *Alcohol* 25, 89–97.
193. Kurus M., Ugras M., Ates B., Otlu A. Apricot ameliorates alcohol induced testicular damage in rat model. *Food and Chemical Toxicology* (2009) 47 2666–2672.

194. Grattagliano I., Vendemiale G., Errico F., Bolognino A. E., Lillo F., Salerno M. T., Altomare E. Chronic ethanol intake induces oxidative alterations in rat testis. *JOURNAL OF APPLIED TOXICOLOGY*, VOL.(1997) 17(5), 307–311.
195. I.L., Friksen, C.J., Gustafsson, B., Harthorn, C., Hard, E., Larsson, K., 1989. Effects of chronic and acute ethanol treatment during prenatal and early postnatal ages on testosterone levels and sexual behaviors in rats. *Pharmacol Biochem. Behav.* 33, 867–87.
196. Kelce, W.R., Ganjam, V.K., Rudeen, P.K., 1990. Inhibition of testicular steroidogenesis in the neonatal rat following acute ethanol exposure. *Alcohol* 7, 75–80.
197. Emanuele MA, Emanuele N: Alcohol and the male reproductive system. *Alcohol Res Health* 2001; 25: 282–287.
198. Devaud LL, Risinger FO, Selva D: Impact of the hormonal milieu on the neurobiology of alcohol dependence and withdrawal. *J Gen Psychol* 2006; 133: 337–356.
199. Apter SJ, Eriksson CJ: The effect of alcohol on testosterone concentrations in alcohol preferring and non-preferring rat lines. *Alcohol Clin Exp Res* 2003; 27: 1190–1193.
200. Eriksson CJ, Widenius TV, Ylikahri RH, Harkonen M, Leinonen P: Inhibition of testosterone hepatic and testicular acetaldehyde, ketone bodies and cytosolic redox state in rats. *Biochem J* 1983; 210: 29–36.
201. Jimenez V, Cardinali DP, Cano P, Alvarez MP, Reyes Toso CF, Esquifino AI: Effect of ethanol on 24-hour hormonal changes in peripubertal male rats. *Alcohol* 2004; 34: 127–132.
202. Cicero TJ, Badger TM: Effects of alcohol on the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the male rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1977; 201:427–433.
203. Fernández-Mateos P., Jiménez-Ortega V., Cano Barquilla P., P. Cardinali D., I. Esquifino A. Discontinuous versus continuous drinking of ethanol in peripubertal rats: effect on 24-hour pattern of hypophyseal-gonadal axis activity and anterior pituitary oxidative stress. *Neuroendocrinology* 2012 DOI: 10.1159/000334963.
204. Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF, Casper RF, et al. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reproductive Toxicology* 2001; 15: 479–486.

8.EKLER

Ek-1, Etik Kurul Onayı



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

35340, Inciraltı, İzmir-232 412234
http://deu.edu.tr/denevetik/

Toplantı No : 04/19/2011
Toplantı Tarihi : 07 Ekim 2011

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na

61/2011 Protokol No'lu: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Burçin TUNA'nın yürütücüsü olduğu "**Perfluorododeknoik asitin testiste oluşturduğu hasara karşı resveratrolün koruyucu etkisinin araştırılması**" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

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

Prof.Dr.Alper SOYLU
Üye

Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Ayşe GELAL
Üye

Prof.Dr.Selman SÖKMEN
Üye (Topl.katılamadı)

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

Doç.Dr.Turna İLKNUR
Üye

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

Ayşe Nur BALİN
Üye (Topl.katılamadı)

Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye

Prof.Dr. Hüseyin BASKIN
Üye

Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK
Üye

Vtr.Hekim Adnan SERPEN
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, Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ

BURÇİN TUNA

TC Kimlik No / Pasaport No:	22669389746
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/İZMİR
Telefon :	0232 412 45 95
Faks :	
e-posta :	tnburcin@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2009

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

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

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Testisler, apoptozis

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
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

