



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PROFENOFOS VE MCPA’NIN TESTİSE ETKİLERİNİN
ULTRASTRÜKTÜREL DÜZEYDE İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nejat Ünlükal

Ankara, 2011



1993
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PROFENOFOS VE MCPA’NIN TESTİSE ETKİLERİNİN
ULTRASTRÜKTÜREL DÜZEYDE İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Nejat Ünlükal

Tez Danışmanları:
Prof. Dr. Attila Dağdeviren
Prof. Dr. Gülten Karabay

Ankara, 2011

Bu çalışma Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir (Proje No: DA 09/30).

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve tezimin şekillenmesinde emeği, desteği ve içtenliği ile yanımda olan değerli hocam, danışmanım Prof. Dr. Gülten Karabay’a

Engin bilgisi, zekası ve deneyimleri ile bu süreçte katkılarını esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Attila Dağdeviren’e

Deneyimi ve Türkçe’yi güzel kullanma isteği hiç bitmeyen değerli hocam Uzm. Dr. Nejmi Zağyapan’a

Yardımları ve arkadaşlığıyla yanımda olan Uzm. Dr. Fatma Helvacıoğlu’na

Dünyaya başka bir bakış açısı getirten asistan arkadaşlarım Dr. Aleyna İskenderoğlu ve Dr. Alireza Malekpur Alamdari’ye

Tezimin istatistiksel analizlerinde ilgili yaklaşımları ile katkıda bulunan Doç. Dr. A. Canan Yazıcı ve arkadaşım Uzm. M. Agah Tekindal’a

Tez deneylerimde biyokimya analizlerinin gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Nilüfer Bayraktar’a

Uzmanlık eğitimimde ve tezimde her anlamda katkı ve destekleriyle yanımda olan arkadaşlarım Uzm. Biyolog Ece Lakşe Coşar ve teknisyenimiz Ayhan Yüksek’e

Bugünlere gelmem için beni yetiştiren, her türlü desteklerini esirgemeyen aileme ve emeği geçen herkese teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Profenofos ve MCPA' nın Testise Etkilerinin Ultrastrüktürel Düzeyde İncelenmesi

Endokrin bozucular hormonları taklit ederek veya onları bloke ederek vücuttaki normal işlevleri bozmakta, normal hormon seviyelerini değiştirmekte, hormon üretimini uyarmakta ya da üretimi duraksatmakta ya da hormonların organizmadaki yer değiştirme yollarını bozmaktadır. Endokrin bozuculardan önemli bir grup da pestisitlerdir. Pestisitler içinde en geniş kullanım alanı olan grup organofosfat grubudur. Bu bileşiklerden profenofos ve 4-kloro-2-metil fenoksi asetik asit (MCPA)'ın; erkek genital sistemine olumsuz etkilerinin bilinmesine rağmen ultrastrüktürel düzeydeki etkisi hakkındaki çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle bu çalışmada hem MCPA' nın hem de profenofosun; testis seminifer tübülleri üzerine ultrastrüktürel düzeydeki etkisini karşılaştırmalı olarak incelemek amaçlanmıştır.

Çalışmada; 14 haftalık sıçanlardan her grupta 10 adet erkek sıçan olacak şekilde 3 grup oluşturulmuştur. Grup1 kontrol grubu, Grup 2 profenofos grubu ve Grup 3 MCPA grubudur. Kontrol grubuna gavaj yoluyla yalnızca distile su uygulanmıştır. Profenofos grubuna haftada 2 kez belirlenen gün ve saatte 17 mg/kg dozunda profenofos gavaj yoluyla 1 ay süre ile uygulanmıştır. MCPA grubuna her gün belirlenen saatte 190 mg/kg dozunda MCPA gavaj yoluyla 1 ay süre ile uygulanmıştır. Çalışmadaki tüm hayvanların sakrifiye edilmesi sonucu çıkarılan testis dokularında elektron mikroskopik inceleme ve biyokimyasal inceleme yapılmıştır.

Elektron mikroskopik incelemelere göre, kontrol grubunda spermatogenez süreci sağlıklıdır. Profenofos grubunda spermatogenik hücrelerde ve Sertoli hücrelerinde yapısal bozulmalar izlenmiştir. MCPA uygulanan grupta spermatogenik seriyi oluşturan hücreler arasında boşluklar, hücrel dejenerasyon profenofosa karşı hücrelerde yapısal hasar biraz daha belirgindir. MCPA uygulanan grupta bazı Leydig hücrelerinde apoptozis belirlenmiştir. Biyokimyasal incelemelere göre, serbest ve toplam testosteron ölçümünde profenofos ve MCPA gruplarında, uygulama öncesi ve sonrasında istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır.

Testis görünümünde yapısal düzeyde gördüğümüz dejenerasyon ile biyokimyasal verilerimizin sonucu; profenofos ve MCPA' nın spermatogenez sürecinin sağlıklı olarak devam etmesini engellediğini düşündürmüştür.

Anahtar kelimeler: testis, profenofos, MCPA, elektron mikroskop

ABSTRACT

Investigation of Effects of Profenofos and MCPA on Testis on Ultrastructural Level

Endocrine disruptors disrupt normal functions of hormones in the body by imitating them or by blocking them. They change normal levels of hormones and stimulate the production of hormones or give pause to their production or disrupt the ways of translocation of hormones in the organism. A significant group of endocrine disruptors is pesticides. The most widely used is group of organophosphate among pesticides. It is known that of these compounds, profenofos and MCPA (4-chloro-2-methylphenoxy acetic acid) have negative effects on male genital system. However, studies about the effect on the ultrastructural level are limited. For this reason, in this study, investigating the effect of both MCPA and profenofos on testis seminifer tubuls on the ultrastructural level comparatively is intended.

In the study, there are three groups and in each group there are ten male rats which are fourteen weeks old. Group 1 is the group of control. Group 2 is the group of profenofos and group 3 is the group of MCPA. Only distilled water is administered to the control group by gavage. Two times per week, on determined day and time, 17 mg/kg profenofos is administered to group of profenofos by gavage for one month. Every day, on determined time 190 mg/kg MCPA is administered to group of MCPA by gavage for one month. All of the rats in the study were sacrificed and tissues of testis were excluded. Electron microscopic and biochemical investigation were made on excluded tissues of testis.

According to electron microscopic investigations, the process of spermatogenesis is healthy in the group of control. Structural degenerations were observed on spermatogenic cells and Sertoli cells in the group of profenofos. In the group of MCPA, gaps between cells which make up spermatogenic series and cellular degeneration, structural damage are more clear than profenofos. In the group of MCPA, apoptosis is determined in some Leydig cells.

According to biochemical investigations, free and total testosterone levels measured and in the groups of profenofos and MCPA, there are significant differences statistically on the levels of free and total testosterone before and after administration.

As a result of structural degeneration observed in the view of testis and biochemical data, we think that profenofos and MCPA impede the process of spermatogenesis to continue healthily.

Key Words: testis, profenofos, MCPA, electron microscopy

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa numarası

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	3
2.1.1. Erkek Genital Sistemi Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Testis anatomisi.....	5
2.1.3. Testis Histolojisi.....	8
2.1.4. Kan-Testis Bariyeri ve Sıkı Bağlantılar	14
2.1.5. Testisin Histofizyolojisi	15
2.1.6. Gonad Hormonları.....	16
2.2. Pestisitler ve Bitki Gelişim Düzenleyiciler	17
2.2.1. Tanımı	17
2.2.2. Tarihçesi	18
2.2.3. Kullanımı ve Etkileri	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma	22
3.2. Elektron Mikroskop Yöntemi	23

3.2.1. Gluteraldehit Tespit Solüsyonunun Hazırlanması ve Dokuların İlk Tespiti	23
3.2.2. Osmiyum Tetroksit Solüsyonunun Hazırlanması ve Dokuların İkinci Tespiti	23
3.2.3. Dehidrasyon ve Blok Oluşturulması	24
3.3. Biyokimyasal Analiz	24
3.4. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	26
4.1. Elektron Mikroskop Bulguları	26
4.1.1. Kontrol Grubu Bulguları	26
4.1.2. Profenofos Grubu Bulguları	32
4.1.3. Metil fenoksi kloro asetik asit (MCPA) Grubu Bulguları	37
4.2. Biyokimyasal Bulgular	48
5. TARTIŞMA	54
6. SONUÇ	61
7. KAYNAKLAR	62

KISALTMALAR ve SİMGELER DİZİNİ

ABP	: Androjen bağlayıcı protein
AMH	: Antimüllerian hormon (Mullerian inhibitory Substance)
BGD	: Bitki gelişim düzenleyiciler
CPM	: Klor-prifos metil
EPA	: Environmental Protection Agency
FSH	: Foliküler stimülan hormon
hCG	: İnsan koryonik gonodotropin
LH	: Luteinizan Hormon
MCPA	: 4-kloro-2-metil fenoksi asetik asit
MCPB	: 4-kloro-2-metil fenoksi butanoik asit
MCPP	: 4-kloro-2-metil fenoksi propiyonik asit; mecoprop
MIS	: Müllerian inhibitör madde (Antimüllerian hormon)
NIOSH	: The National Institute for Occupational Safety and Health
Profenofos	: O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl-S-propyl phosphorothioate
SHBG	: Cinsiyet hormonu bağlayıcı globülin (Testosteron-östrojen bağlayıcı globülin)
STAR	: Steroidojenik akut düzenleyici protein
TCPY	: 3,5,6-trikloro-2-pridinol
TDF	: Testis belirleyici faktör
TEBG	: Testosteron-östrojen bağlayıcı globülin (Cinsiyet hormonu bağlayıcı globülin)
TEPP	: Tetraethylpyrophosphate
2,4,5-T	: 2,4,5-trikloro fenoksi asetik asit
2,4-D	: 2,4-dikloro fenoksi asetik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Testis gelişiminin şematik görünümü	4
Şekil 2.2	Erkek genital sistemi	9
Şekil 2.3.	Seminifer tübül duvarı ile yakın çevresi.....	10
Şekil 2.4.	Germ hücrelerinin geçirdiği evreler	12
Şekil 4.1.	Kontrol grubu elektron mikrografi	27
Şekil 4.2.	Kontrol grubu elektron mikrografi.....	28
Şekil 4.3.	Kontrol grubu elektron mikrografi	29
Şekil 4.4.	Kontrol grubu elektron mikrografi	30
Şekil 4.5.	Kontrol grubu elektron mikrografi	31
Şekil 4.6.	Profenofos grubu elektron mikrografi.....	33
Şekil 4.7.	Profenofos grubu elektron mikrografi.....	34
Şekil 4.8.	Profenofos grubu elektron mikrografi	35
Şekil 4.9.	Profenofos grubu elektron mikrografi	36
Şekil 4.10.	(MCPA) grubu elektron mikrografi	38
Şekil 4.11.	MCPA grubu elektron mikrografi	39
Şekil 4.12.	MCPA grubu elektron mikrografi.....	40
Şekil 4.13.	MCPA grubu elektron mikrografi.....	41
Şekil 4.14.	MCPA grubu elektron mikrografi	42
Şekil 4.15.	MCPA grubu elektron mikrografi	43
Şekil 4.16.	MCPA grubu elektron mikrografi	44
Şekil 4.17.	MCPA grubu elektron mikrografi	45
Şekil 4.18.	MCPA grubu elektron mikrografi	46
Şekil 4.19.	MCPA grubu elektron mikrografi.....	47

Şekil 4.20. Gruplar arasında uygulama öncesi ve uygulama sonrası serbest testosteron düzeyi.....	50
Şekil 4.21. Gruplar arasında uygulama öncesi ve uygulama sonrası total (toplam) testosteron düzeyi	51



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1.	Dünyada pestisit kullanımının bölgelere göre dağılımı.....	20
Tablo 2.2.	Dünya pestisit kullanımının ürünlere göre dağılımı.....	20
Tablo 4.1.	Serbest Testosteron ve Toplam Testosteron düzeylerinin uygulama öncesi ve sonrası istatistik değerlendirmelerin özetlenmesi (Willcoxon z istatistiği)	49
Tablo 4.2.	Serbest ve Toplam Testosteron ölçümlerinin önce ve sonrasında kontrol (Grup 1), profenofos (Grup 2) ve MCPA (Grup 3) gruplarının istatistiksel olarak	52
Tablo 4.3.	Gruplar arasındaki anlamlı çıkan değişkenlerin çoklu karşılaştırma sonuçları.....	53

1. GİRİŞ

Son yıllarda endokrin sistemin işlevini bozan kimyasallara maruz kalma ile oluşan etkiler artmaktadır (endocrine disrupting chemical = endokrin bozucu kimyasal). The Natural Resources Defence Council'ın 1998 yılında yaptığı tanımlamaya göre; endokrin bozucular emildiğinde hormonları taklit ederek veya onları bloke ederek vücuttaki normal fonksiyonları bozmakta, normal hormon seviyelerini değiştirmekte, hormon üretimini stimüle etmekte veya üretimi duraksatmakta ya da hormonların organizmadaki yer değiştirme yollarını bozmaktadır (1,2). Endokrin bozucu kimyasalların üreme sistemini bozucu etkileri olabileceği hipotezi de gündemdedir. Bu anlamda, endokrin bozucu kimyasalların etkisini iyi yansıtan bir grup da pestisitlerdir (3). Pestisitler içinde en geniş kullanım alanı olan grup organofosfor grubudur. Bu kimyasalların yeni uygulama şekillerinin bulunmasıyla kullanım alanlarının daha da yaygınlaşacağı düşünülmektedir (4). ABD'de 1997'de 66 zehir kontrol merkezinin raporuna göre, organofosfor pestisitlerin diğer pestisit sınıfları içinde en fazla zehirleyici potansiyeline sahip olduğu belirtilmiştir (5). Yapılan birkaç in vitro çalışmada klor-prifos metil'in (CPM) endokrin bozucu bir kimyasal olabileceğinden şüphelenilmiştir. CPM, Hershberger deneyinde* anti-androjenik aktivite göstermiş, testosteronun stimüle edici etkisiyle gerçekleşen aksesuar cinsiyet organlarının ağırlıklarının artışıını inhibe etmiştir. Yetişkin erkeklerde, klor-prifos ve klor-prifos metil'in metabolitleri olan 3,5,6-trikloro-2-pridinol (TCPY)'un azalmış testosteron seviyesiyle ilişkili olduğu saptanmıştır (2,6). Profenofos; oral ve dermal maruziyete bağlı akut toksisite açısından orta sıralarda bulunmakta ve erkek üreme sistemi üzerinde toksik etki gösteren maddelerden biri olduğu düşünülmektedir (7).

Hızla gelişen teknoloji hayatı kolaylaştırmanın yanı sıra insan sağlığını da tehdit etmektedir. Günlük hayatta sıklıkla kullanılan ya da etkin kalınan plastiklerin, deterjanların, endüstriyel kimyasalların, tarımsal ilaçların ve böcek ilaçlarının en önemli ortak noktası endokrin çevre bozucu olmalarıdır. Özellikle ekonomik kayıpları en aza indirmek ve elde edilen ürün miktarını artırmak adına kullanılan pestisitler ve bitki gelişim düzenleyiciler (BGD) sağlık açısından zararlı bileşikler olarak sınıflandırılırlar. Bu kimyasallardan ekonomik olması nedeniyle sıklıkla tercih edilen 4-kloro-2-metil fenoksi

*Hershberger deneyi ya da testi, 5 alfa redüktaz enzimini inhibe eden, androjenik veya anti-androjenik kimyasalları saptamak amacıyla kullanılan bir kısa dönem in vivo analiz şeklidir.

asetik asit (MCPA) bitki gelişim düzenleyici bir pestisitir. MCPA'nın da endokrin sisteme etki ederek üreme işlevlerini olumsuz yönde etkilediği bildirilmiştir (8,9).

Bu bileşiklerden profenofos ve MCPA'nın; erkek genital sistemine olumsuz etkilerinin bilinmesine rağmen ultrastrüktürel düzeydeki etkisi hakkındaki çalışmalar sınırlıdır. Bu nedenle biz bu çalışmamızda hem MCPA' nın hem de profenofosun; testis seminifer tübülleri üzerine ultrastrüktürel düzeydeki etkisini karşılaştırmalı olarak incelemeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

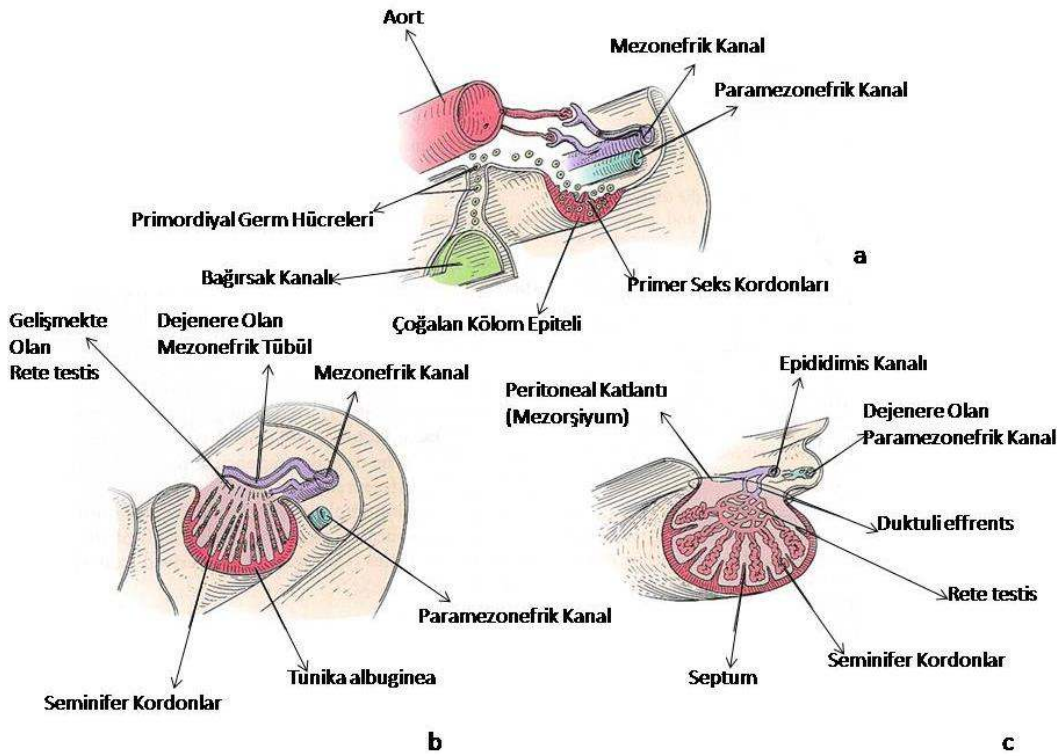
2.1.1. Erkek Genital Sistem Embriyolojisi

X kromozomuna sahip ovumun, X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile döllenmesi ile fertilizasyon gerçekleşir, böylece cinsiyet belirlenir. Gelişmekte olan gonadlar XY veya XX kromozom çiftine sahip olurlar (10,11).

Primordiyal (ilkel) germ hücreleri ilk kez gelişimin dördüncü haftasında vitellüs kesesi duvarında, allantoisin başlangıç yerine yakın endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Embriyonun katlanmaları sırasında vitellüs kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olur. Bu sırada, primordiyal germ hücreleri, arka bağırsağın dorsal mezenteriy boyunca gonadal kabartılara göç ederler. Altıncı haftada primordiyal germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve primer seks kordonlarının yapısına katılırlar (10-12).

Gonadların görünümü yedinci haftaya kadar her iki cinsten de aynıdır ve “farklanmamış gonadlar” olarak adlandırılırlar. Gonadal gelişimin ilk safhaları beşinci haftada ortaya çıkar; mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık - gonadal (genital) kabarık - oluşur. Parmak şeklindeki epitel kordonları - primer seks kordonları - altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede ilerler. Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için önemlidir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geni, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleşiktir. Farklanmamış gonadın medullası üzerinde testise farklılaşmasını sağlayan belirleyici Y kromozomudur. Y kromozomu tarafından düzenlenen TDF testiküler farklılaşmayı sağlar. Bu faktörün etkisi altında, primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşır. Farklanmamış gonad bu aşamada, dışta yer alan medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe farklılaşır, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklılaşır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenerer olur. 12. haftada gelişmekte olan gonadın kalın bir fibröz kapsül olan tunika albugineasının belirginleşmesi erkek fötüs için karakteristiktir.

Kapsülün gelişmesi sonucunda seks kordonlarının (seminifer-testiküler- kordonların), yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Bu arada genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdan ayrılır ve kendi mezenteri olan mezorşiyum ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar; seminifer tübüllere, tübülü rekti ve rete testise farklırlar. Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve androstendion) salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genital organlar erkek cinse uygun farklılaşmasını indükler. Testosteron üretimini insan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaşmıştır. Embriyoda interstisyel hücreler hamileliğin 18. haftasına kadar işlevlerini sürdürürler; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra; hipofizden salınan Luteinizan Hormon (LH) uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar. Testosterona ek olarak fetal testisler glikoprotein yapıda bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (Mullerian inhibitory Substance: MIS) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. AMH, Sertoli hücreleri tarafından salgılanır, hormonun salgılanması puberteye kadar devam eder, daha sonra seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik kanalların gelişimini baskılar (Şekil 2.1) (10-12).



Şekil 2.1. Testis gelişiminin şematik görünümü. (Ross-Pawlina'dan. Histology a text and atlas 5th ed.)

Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar, lümenleri yoktur, puberteden itibaren lümen gelişir. F tal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisinin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, duktuli efferentese farkanacak olan 15-20 adet mezonefrik tübül ile devam eder. Bu kanallar (duktuli efferentes), duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile ba lanırlar (13) .

Dişi ya da erkek embriyolar birer çift genital kanala sahiptir. Mezonefrik kanal (Wolf kanalı) erkek üreme sistemi iç organlarının önemli bir bölümüne farkanırken, paramezonefrik kanal (Müller kanalı) dişi iç genital organlarının gelişimine katılır. Beş - altıncı haftalarda genital sistem farkanmamış aşamada olduğundan genital kanalların her iki çifti de bulunur. Sekizinci haftada f tal testislerden salgılanan testosteronun etkisi altında, mezonefrik kanalların proksimal parçaları, oldukça kıvrıntılı bir hal alır ve epididimise farkanır. Mezonefrik kanalın diğer bölümlerinden duktus deferens ve duktus ejakulatorius gelişir (10,11).

Leydig hücrelerinin hem aktiviteleri hem de sayıları hormon uyarısına bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon anne kanından f tusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik farkanmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir (13,14).

2.1.2.Testis Anatomisi

Funiculus spermaticus aracılığıyla scrotum içinde asılı duran, erkek üreme hücrelerinin (spermium) yapıldığı bir çift organdır. İri bir badem b y kl  nde elips şeklinde olan testisler yaklaşık olarak 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 10-14 gr a ırlı ındadır ve sol taraftaki sa a göre genellikle 1 cm daha aşağıda bulunur.

Testislerin uzun eksenleri tam vertikal yönde değil, oblik pozisyonda durmaktadır. Üst ucu biraz  nde ve dışta, alt ucu ise biraz arkada ve i te bulunur. Konveks  n kenarı biraz da dışa-aşağı doğru, daha düzce olan arka kenarı da, biraz yukarı-i e doğru bakar. Buna göre uzun eksenini yukarıdan-aşağıya, dıştan-içe ve  nden-arkaya doğru meyilli olarak bulunur. Testislerin *facies medialis* ve *facies lateralis* adı verilen iki yüzü, *margo anterior* ve *margo posterior* adı verilen iki kenarı, *extremitas superior* ve *extremitas inferior* adı verilen iki ucu vardır.

Testisin ön kenarı, her iki yüzü ve uçları düz ve konveks olup, visseral periton (epiorchium) ile kaplıdır. Arka kenarının sadece lateral kısmı peritonla örtülüdür. Peritonsuz olan medial bölümüne, epididimis tutunur ve buradan damar-sinirleri ve kanalları geçer (15,16).

Testislerin üst ucunda *appendix testis* adı verilen küçük, yassı bir yapı görülür. Parametonefrik kanalın üst ucunun kalıntısı olan bu yapı, kadınlarda tuba uterinanın abdominal ucuna karşılık gelir. Testislerin arka kenarının dış kısmı boyunca epididimis yer alır; funiculus spermaticus da, epididimisin medialinde olmak üzere, margo posterior'da bulunur. Testislerin ön kenarı, her iki yüzü ve uçları visseral periton (epiorchium) ile örtülüdür. Periton, arka kenarın sadece lateral kısmını örter.

Testisler fetal hayatta karın boşluğu içinde, fascia transversalis ile periton arasında gelişir; ancak doğumdan önce, canalis inguinalis'ten geçerek scrotum içine iner. Karın boşluğundan scrotum içine geçiş yolu olan canalis inguinalis, fetal hayatta testisten scrotumun iç yüzüne uzanan ve *gubernaculum testis* adı verilen fibröz bir yapı ile belirlenir. Fetal gelişimin daha sonraki dönemlerinde peritonun parmak şeklinde bir çıkıntısı olan processus vaginalis, gubernaculum testis'i izleyerek karın ön duvarından geçer ve scrotum'a ulaşır. Dolayısıyla, processus vaginalis, testislerin karın boşluğundan scrotum'a inişine öncülük eder. Processus vaginalis, bu geçiş sırasında karın ön duvarı tabakalarını da birlikte sürükler. Normal durumda testisler doğumdan hemen önce bu yolu takip ederek canalis inguinalis'ten geçer ve scrotum'a iner. Processus vaginalis ise doğumdan kısa bir süre sonra kapanır. Bu nedenle testisin etrafında processus vaginalisin kalıntısı olan bir tabaka kalır. Bu tabakaya *tunica vaginalis testis* adı verilir.

Tunica vaginalis testis'in *lamina visceralis* (epiorchium) ve *lamina parietalis* (periorchium) olmak üzere iki yaprağı vardır. Lamina visceralis, sadece testis'in ön kenarını ve iki yüzünü örter; arka kenarın medial ve lateral taraflarında ise kendi üstüne kıvrılarak lamina parietalis ile devam eder. Lamina parietalis ise testis'in alt kısmından üst kısmına doğru, hatta funiculus spermaticus'un ön ve iç tarafını da kaplayacak şekilde, bir miktar yukarıya doğru uzanır. Tunica vaginalis testis'in lamina parietalis ve lamina visceralis'i arasında potansiyel bir boşluk ve bu boşluk içinde de çok az bir seröz sıvı bulunur.

Processus vaginalis, karın ön duvarından scrotum'a doğru inerken karın ön duvarı tabakalarını da birlikte sürüklediği için testis'lerin dış tarafında, karın ön duvar tabakalarının uzantıları olan tabakalar yer alır. Bunlar tunica vaginalis'ten dışa doğru; fascia spermatica interna, m. cremaster, fascia cremasterica ve fascia spermatica externa

olarak sıralanır. Bunlardan fascia spermatica interna, fascia transversalis'in; fascia cremasterica, m. obliquus internus abdominis fascia'sının; m. cremaster, m. obliquus internus abdominis'in; fascia spermatica externa ise m. obliquus externus abdominis aponörozunun uzantılarıdır.

Tunica vaginalis testis'in iç tarafında da, testisleri saran iki tabaka daha vardır. Bunlar tunica vaginalis testis'ten derine doğru tunica albuginea ve tunica vasculosa olarak sıralanır.

Tunica albuginea, testis'leri örten kalın, fibröz bir tabakadır. Elastikiyeti ve genişleme özelliği olmayan bu tabaka, arka kenardan testis içine sokulur ve vertikal bir bölme oluşturur. Bu bölmeye *mediastinum testis (corpus Highmori)* adı verilir. Mediastinum testis, testis'in extremitas superior'undan extremitas inferior yakınına kadar uzanır. Mediastinum testis'in ön ve yan kısmından çıkan uzantılara *septula testis* adı verilir. Bu uzantılar, testis parankiminden geçerek tunica albuginea'nın iç yüzüne ulaşır ve böylece testis'i koni biçiminde lobuluslara böler (*lobuli testis*). Testis parankimini, lobuli testis içinde bulunan ve kıvrımlı şeklinden dolayı *tübüli seminiferi contorti* adı verilen kanalcıklar oluşturur. Her bir testis kanalcığı, mediastinum testis yakınında *tübüli seminiferi recti* adı verilen düz bir kanalcıkla uzanır. Bütün lobulus'lardan gelen bu kanalcıklar mediastinum'a sokulur ve burada *rete testis (Haller ağı)* denilen ağı oluşturur. Lobuli testis'lerde yapılan spermium'lar rete testis'ten *ductuli efferentes testis* adı verilen kanallar aracılığıyla epididymis'e gelir.

Tunica vasculosa, testis'in damar ağından oluşan ve tunica albuginea'nın iç yüzünü örten tabakasıdır. Bu tabaka, tunica albuginea'nın uzantısı olan septula testis'lerin iç yüzünü kapladığı için lobuli testis'lerin de etrafında bir tabaka oluşturur.

Arterleri: Sağ ve sol a. testicularis'ler (aorta abdominalis'in dalı).

Venleri: Her bir testis'in arka tarafından çıkan küçük venler birleşerek *plexus pampiniformis* adı verilen venöz ağı oluştururlar. Plexus pampiniformis, funiculus spermaticus içinde yükselir ve canalis inguinalis'ten geçerek karın boşluğuna ulaşır. Plexus pampiniformis'i oluşturan venler daha yukarıda birleşerek v. testicularis'i oluşturur. V. testicularis dextra, v. cava inferior'a; v. testicularis sinistra ise v. renalis sinistra'ya dökülür.

Lenfatikleri: Yüzeyel lenf damarları tunica vaginalis testis'in altında, derin lenf damarları ise testis ve epididimis'in içinde yer alır. Bu damarlar funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna geçer, sonuçta nodi aortici laterales ve nodi preaortici'ye açılır

Sinirleri: Testis'leri inerve eden sinirler medulla spinalis'in 10-11. torakal segmentlerinden gelir. Bu sinirler plexus aorticus ve plexus renalis içinden geçer ve testis'leri besleyen damarların çevresinde organa ulaşır.

Testislerden birinin veya her ikisinin birden scrotum'a inmeyerek karın boşluğu veya canalis inguinalis içerisinde kalmasına *inmemiş testis (cryptorchidism)* adı verilir. İnmemiş testis'te kanser insidansı yüksektir. Ayrıca bu durum tedavi edilmez ise spermatogenesis'in bozulmasına neden olur.

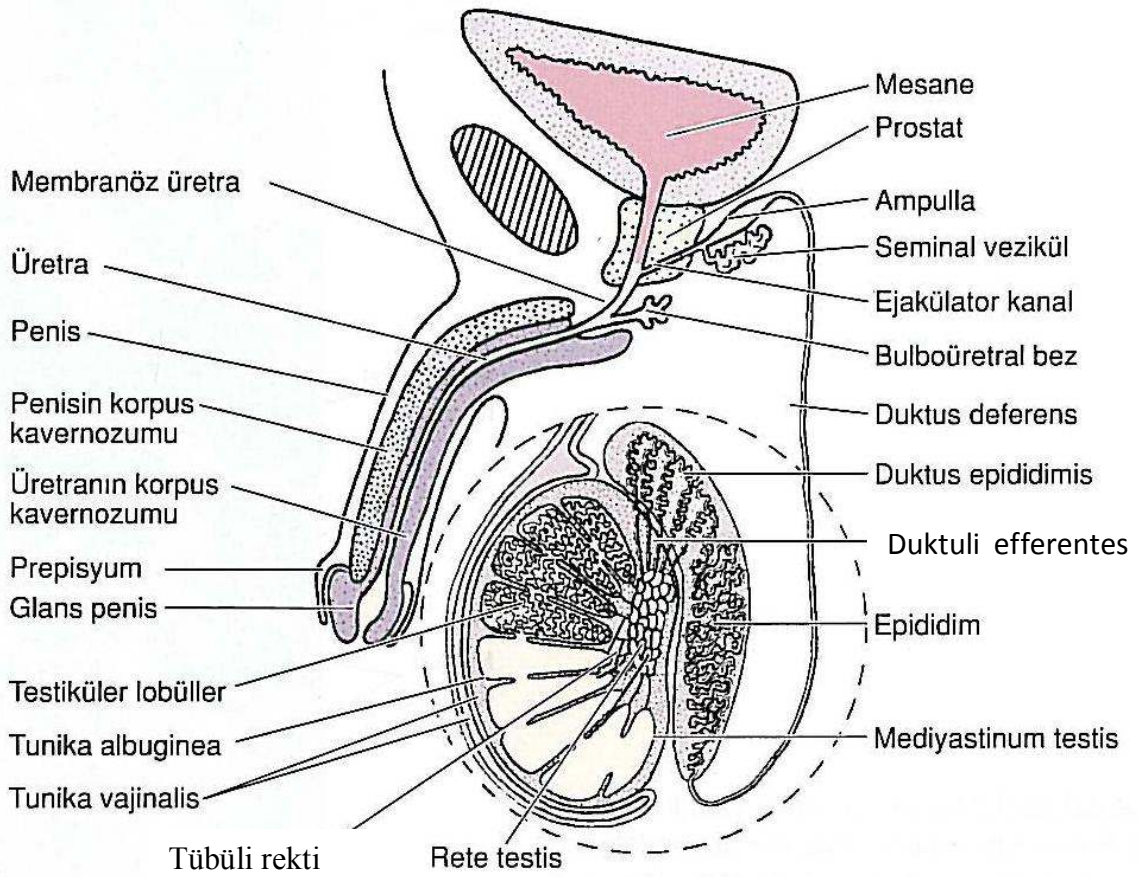
Tunica vaginalis testis'in yaprakları arasında aşırı miktarda sıvı birikmesi durumuna *hidroset (hydrocele)* adı verilir. Tümör, travma veya enfeksiyon gibi çok çeşitli nedenler, lamina parietalis ve lamina visceralis arasında bulunan sıvının artmasına veya emiliminde azalmaya sebep olarak aşırı miktarda sıvı birikmesine yol açabilir.

Nörolojik muayene sırasında, uyluğun iç yüzünün üst kısmı çizildiğinde m. cremaster kasılır ve buna bağlı olarak testis'ler yukarıya çekilir. Bu reflekse *cremaster refleksi* adı verilir. Bu refleksin afferent yolu n. genitofemoralis'in ramus femoralis'i, efferent yolu ise aynı sinirin ramus genitalis'idir (16).

2.1.3. Testis Histolojisi

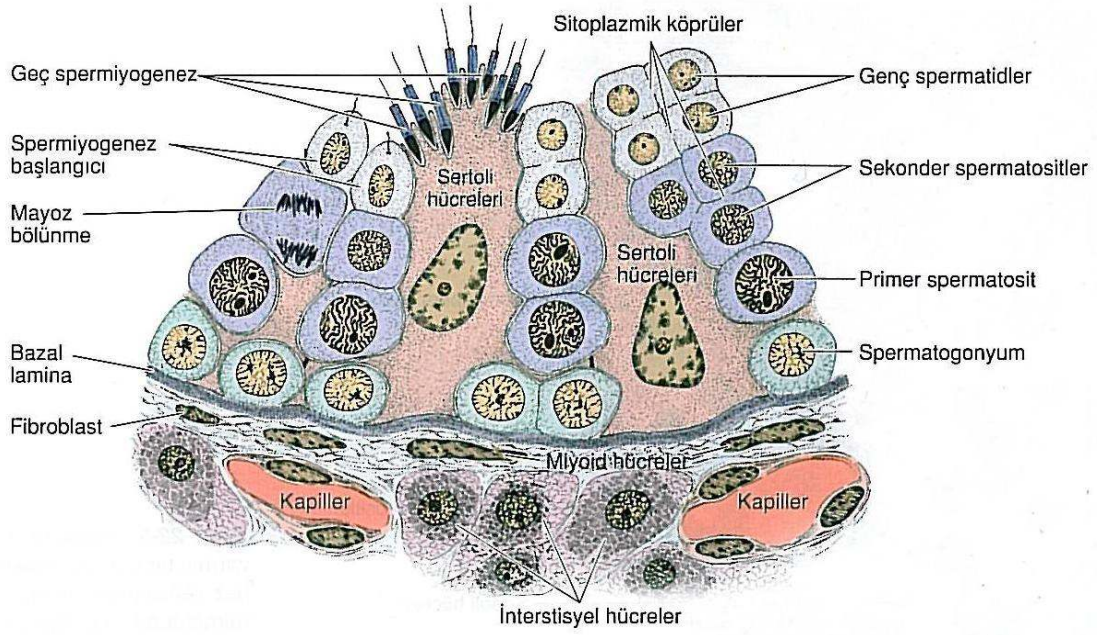
Erkek üreme sistemi, iki adet testis, genital kanallar, aksesuar bezler ve penisten oluşmaktadır (Şekil 2.2). Erkek üreme sistemi sperm (spermatozoon) yapımı, erkek seks hormonlarının üretimi ve erkek gamet hücrelerinin dışı üreme sistemine iletilmesi işlevlerini yerine getirir (17,18).

Testisler karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fötusun gelişmesi sırasında göç ederler ve skrotum içinde spermatik kordonların uçlarında asılı olarak bulunurlar. Skrotuma doğru gerçekleştirdikleri bu göç nedeniyle her bir testisi “tunika vajinalis” adı verilen ve peritondan gelişmiş seröz bir kese sarar. Tunika vajinalis dışta pariyetal, içte ise visseral bir tabakadan oluşur ve testisin ön ve yan kısımlarında tunika albugineayı örter (14). Tunika albuginea testisi çevreleyen sıkı bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsüldür. Kapsül testisin posterior yüzünde kalınlaşır, kalınlaşan bu bölgeye *mediastinum testis* adı verilir. Tunika albuginea ile bağlantılı fibröz septumlar organın derinlerine ilerleyerek bezi yaklaşık 250 piramidal parçaya böler, her bir parçaya *testis lobülü* adı verilir, lobüller arasında çoğunlukla iletişim vardır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 *seminifer tübül* yer alır. Bağ dokusunda bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) bulunur (17,18).



Şekil 2.2. Erkek genital sistemi (Junqueira- Carneiro'dan. Temel Histoloji. 10.Baskı'dan çeviri)

Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir ve tübüller kıvrımlı ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümeni daralır ve düz tübüller ya da *tübülü rekti* adıyla bilinen kısa segmentler halinde devam eder. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin *rete testis* denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 *duktuli efferentes* ile *epididimisin* baş kısmına bağlanır (13,17). Her bir seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında olup 30-80 cm uzunluktadır ve bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir *seminifer epitel*'den (*germinal epitel*) oluşur. Seminifer tübülü saran *tunika propria* birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olarak bulunan en içteki katman düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış *myoid hücre*lerden oluşur. Seminifer tübül epiteli iki tip hücreden meydana gelir. Bunlar *destek hücreleri* (*Sertoli hücreleri*) ile *spermatogenik seri hücreleri*dir (Şekil 2.3) (14).



Şekil 2.3. Seminifer tübül duvarı ile yakın çevresi (Junqueira- Carneiro'dan. Temel Histoloji. 10.Baskı'dan çeviri)

Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testiküler androjenleri salgılar (14). Testislerin karın boşluğunun dışında skrotum içinde yerleşimleri vücut ısısından 2-3 °C düşük ısıda olmalarını sağlar. Testislerin, boyu 4-5 cm, eni 2,5 cm ve ön arka çapı 3 cm olup ortalama ağırlıkları 14 gramdır (19). Testisin üst kısmında küçük, oval şekilli paramezonefrik kanalın üst ucunun kalıntısı olan *appendiks testis* bulunur. Testisler a. testicularisler tarafından beslenirler ve oldukça zengin bir kollateral ağa sahiptir (18).

Seminifer tübül duvarında bulunan spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak dört-sekiz tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşarak spermatozoonları oluştururlar (13,14,17).

Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu olay üç faza ayrılır:

- Spermatositogenez
- Mayoz
- Spermiyogenez

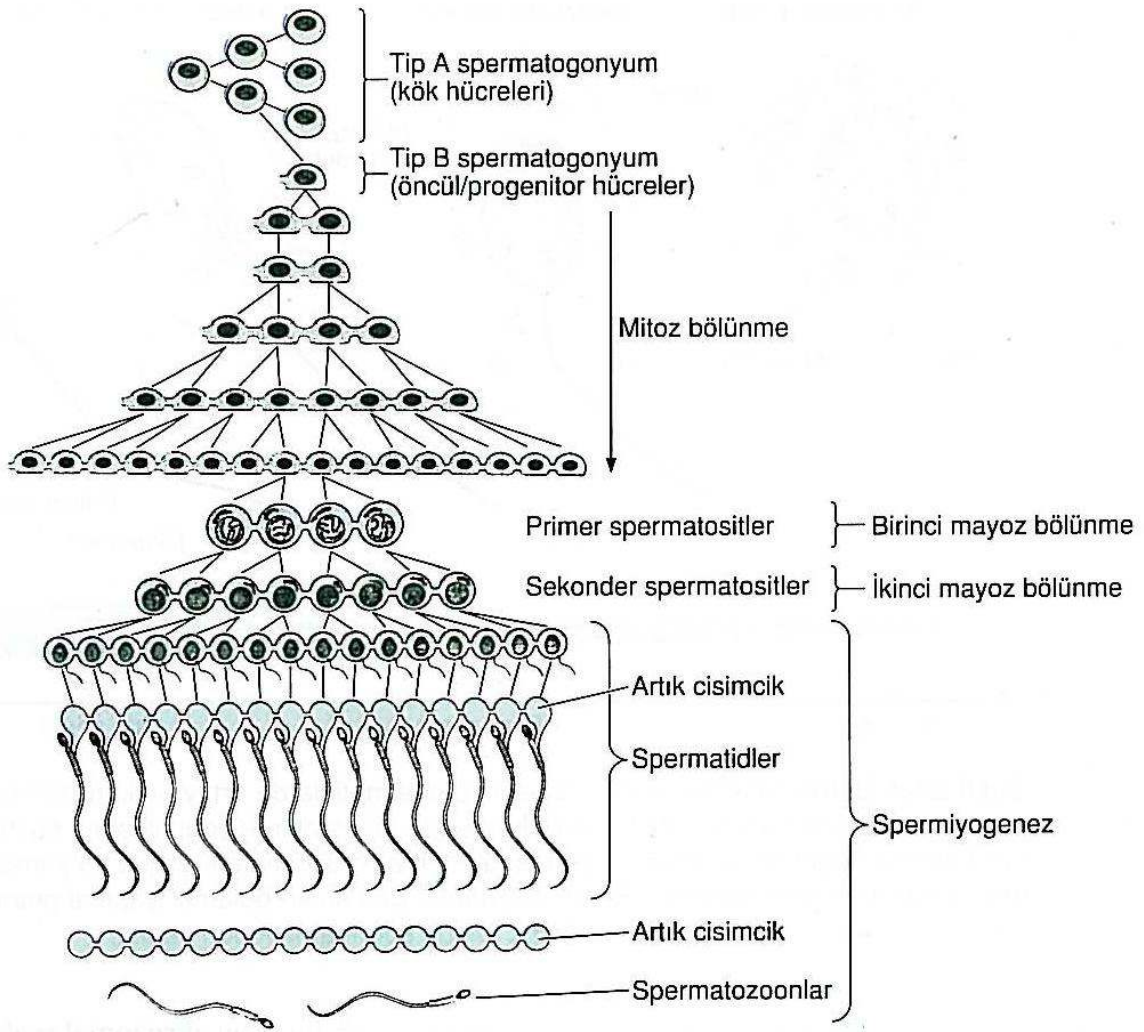
Spermatositogenez evresi: Bu evre spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden primer spermatositlerin oluşma sürecidir.

Bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş germ hücreleri olan, spermatogonyumlar ile başlar. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler. İnsanda morfolojik olarak ayrılabilen 3 tip spermatogonyum vardır: Koyu tip A spermatogonyum, soluk renkli boyanan açık tip A spermatogonyum ve tip B spermatogonyum. Koyu tip A spermatogonyum spermatogenik serinin kök hücre rezervi olarak görev yapar. Zaman zaman tip B spermatogonyuma farklılık gösteren açık tip A spermatogonyuma bölünür. Tip B spermatogonyum ise primer spermatositlere farklılık gösteren öncül hücrelerdir. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatosit ile spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynarlar (Şekil 2.4) (17).

Mayoz evresi: Primer spermatositlerin peş peşe iki mayoz bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu spermatidlerin oluştuğu evredir (17).

Spermiyogenez: Spermatidlerin farklılık gösterme süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu evredir (17).

Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak ortamdaki uzaklaşması ile spermatidler arasında birbirinden ayrılır. İnsanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki süreç yaklaşık 64 gündür (14,17). Bu süreç dalgalanmalar şeklinde oluşur, her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümünü açıklar. Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonların bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. Seminifer epitel siklusu; germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her siklus yaklaşık 16 ± 1 gün sürer ve spermatogenez dört siklustan sonra biter (13,20).



Şekil 2.4. Germ hücrelerinin geçirdiği evreleri gösteren çizim (Junqueira- Carneiro'dan. Temel Histoloji. 10.Baskı'dan çeviri)

Seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri de yer alır. Sertoli hücreleri spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzun ve piramidal biçimlidir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya oturur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopunda, Sertoli hücrelerinin sınırları belirgin değildir, çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda bu hücrelerin bol miktarda düz yüzlü endoplazma retikulumu, bir miktar granüllü endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondriyon ile lizozom içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış çekirdekte çok sayıda kıvrımlar, belirgin bir çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin görülür (14,17,20). Bitişik Sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar

seviyesinde sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu spermatogonyumlar, kanda bulunan maddelerin içine serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşmişlerdir. Spermatogenez sırasında spermatogonyumdan farklı spermatozoid serisine ait hücreler bu bağlantıları aşarak adluminal kompartmana ulaşırlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhalarındaki hücreler, kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşturulur. Spermatozoidler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatidlerin kuyrukları geliştikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki çıkıntılar halinde görülürler. Sertoli hücreleri ‘neksuslar (gap junction) ile ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır (14, 17, 20). Sertoli hücrelerinin en az dört önemli fonksiyonu vardır:

- Gelişmekte olan spermatogonik seri hücrelerinin desteklenmesi, korunması ve beslenmelerinin düzenlenmesi
- Fagositoz: Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde atılır. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve lizozomlarda sindirilir.
- Salgılama: Sertoli hücreleri Androjen bağlayıcı protein (ABP) ve inhibin adı verilen bir peptid salgırlar.
- ABP salgılanması Sertoli hücreleri tarafından foliküler stimulan hormon (FSH) kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiyol haline çevirebilirler. Bu hücreler tarafından salgılanan inhibin ise anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önler (14,17,19,20).

Sertoli hücreleri tarafından salgılanan diğer bir hormon AMH’dır. Bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fötusta Müller kanallarının (paramezonefrik kanalların) gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise Wolf kanallarından (mezonefrik kanallardan) köken alan yapıların gelişmesini sağlar. Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, X-ışını gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdır ve bu zararlı etkiler karşısında spermatogonik seri hücrelerine göre çok daha dirençlidirler. Memelilerde spermatozoonların salınımı muhtemelen hücre hareketlerinin bir sonucudur. Bu hareket Sertoli hücrelerinin apeksinde bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentler ile sağlanır (19).

Testisin seminifer tübülleri arasındaki intertisyel dokuda sinirler, kan ve lenf damarları da bulunmaktadır. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine izin verirler. İntertisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun aė, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının birleşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir. Fibroblastlar, farklanmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar başlıcalarıdır. Bağ dokusunda ayrıca steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren testisin intertisyel hücreler (Leydig hücreleri) bulunur. Bu hücreler sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Leydig hücrelerinin yuvarlak ya da poligonal şekilli ve merkezi yerleşimli ökromatinden zengin bir çekirdeği ve k  uk lipid damlacıklarından zengin sitoplazması eozinofilik boyanır (13,14).

2.1.4. Kan-Testis Bariyeri ve Sıkı Bağlantılar

Spermatogonyumların farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar. Seksüel olgunlaşmanın, immunolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması nedeniyle farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immün yanıtı uyatabilirler. Kan-testis bariyeri, gelişen spermler ve immün sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldırır. Bu bariyer seminifer tübüllere immünglobulinlerin geçmesini önler ve bu sayede serumlarında yüksek düzeyde sperm antikorları bulunan hastalarda herhangi bir fertilit  bozukluğu görülmez. Sertoli hücre bariyeri böylece seminifer epiteli bir otoimmün reaksiyondan korumuş olur. Kan ile seminifer tübüllerin i  bölgesi arasında bariyerin bulunması, sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesini açıklayan bir olgudur. Testiküler kapillerlerin pencereoli olması büyük moleküllerin serbest olarak geçişine izin verir. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar bu bariyerden sorumludurlar. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemli rol oynarlar (14).

Kan-testis bariyeri tam olarak engelleyici (geçirimsiz) bir bariyer olmamasına karşın seçici bir kontrol oluşturur. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar kan testis bariyerini oluşturur ve seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartmanlara ayırır. Adluminal kompartmanda bu sıkı bağlantılar tarafından sürdürülen ortam başarılı bir mayoz ve spermatogenezin tamamlanabilmesi için gereklidir. Seminifer epiteldeki bağlantılar; sıkı bağlantılar, ara bağlantılar, desmozomlar ve neksuslardır. Sıkı bağlantılar bazal laminanın yanındaki seminifer epitelin bazal kompartmanındaki Sertoli hücreleri

arasında bulunur (21). Hücre iskeleti bileşenleri ise normal organizasyonlarıyla, özellikle mikrofilamanlar ve mikrotübüller, bütünlüğün sürdürülmesi ve bağlantıların tam işlev görebilmesi için gereklidir ve ayrıca spermatojenik hücrelerin normal hareketleri için de önemli olduğu bildirilmiştir (22, 23). Mikrotübüller bazal kompartmandaki spermatojenik hücrelerin adluminal kompartmana aktarılmasında görev alır (24). Kan-testis bariyerinde gösterilmiş olan sıkı bağlantılarla ilişkili periferik membran proteinleri ZO-1, ZO-2, ZO-3, cingulin, 7H6 antijen ve symplekin'dir (25-30). Son yıllarda yapılan çalışmalara göre sıkı bağlantı ipliklerini claudin-11/oligodendrosit-spesifik protein oluşturmaktadır (31). Okludin tanımlanmış tek sıkı bağlantıya spesifik integral membran proteindir (sıkı bağlantı ipliğinin bir bileşenidir) (32). Okludin, komşu hücreleri biraraya getiren sıkı bağlantıyı oluşturan 4 transmembran domaini ve 2 ekstraselüler bölgeye sahip bir proteindir (32-34).

Farede okludin Sertoli hücrelerinin dip bazal bölgelerinde bulunur ve maturasyonla yoğunluğu artar. Sıçan Sertoli hücrelerinde de benzer bulgular göstermesine rağmen, insan ve kobayda Sertoli hücresinde okludinin bulunmadığı bildirilmiştir, testis sıkı bağlantılarındaki okludin izoformları türe özgüdür (34). Testiste okludin Sertoli hücreleri arası bağlantı bölgesinde bazal olarak çok kuvvetli immunoreaktivite gösterir. Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında da yaygın bir immunoreaktivite görülebilir. Okludinin analog patterni olan ZO-1 immünoreaktivitesi Sertoli hücreleri arası bağlantı bölgelerinde, sitoplazmasında ve bazal alanda daha yoğun olarak görülmektedir (35-37).

2.1.5. Testisin Histofizyolojisi

Vücut sıcaklığının (37°C) altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin regülasyonunda ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35°C'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Zengin bir venöz pleksus (*pampiniform pleksus*) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı sağlanması ile soğuk gibi durumlarda da spermatik kordondaki kremaster kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesi de diğer mekanizmalardır.

Spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi endokrin faktörler oluşturur. Spermatogenez, hipofizin FSH ve luteinizan hormonlarının (LH) testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır. LH, intertisyel hücreler üzerine etki ederek spermatojenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder.

FSH'nin ise Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını stimüle ettiği ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açtığı ve aynı zamanda ABP'nin sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosterona bağlanarak testosteronu seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatogenezi testosteron uyarır, östrojen ve progesteronlarla inhibe edilir. Spermatozoonlar epididimise, uygun bir ortam olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içerir (14).

2.1.6. Gonad Hormonları

Gonadlar, germ hücreleri ve eşey hormonları üreten çift işlevli organlardır. Bu iki işlev, germ hücrelerinin gelişmesi için artmış yerel eşey hormon derişimi gereksiniminden ötürü, birbirleri ile sıkı ilişkidir. Ovaryumlar, ovum ile steroid hormon olan östrojen ve progesteron üretir; testisler spermatozoa ve testosteron üretir. Böbreküstü bezinde de bir grup steroid üretilmesine rağmen bunlardan sadece birkaç tanesi hormon olarak etkinlik gösterir.

Gonadların doğru işlev görmesi, üreme ve dolayısı ile türün hayatta kalması için temel önem taşır. Ayrıca gonad hormonları deri, kemik ve kas metabolizmasının sürdürülmesi gibi farklı olarak anabolik etkileri de vardır.

Kıvrıntılı seminifer tübüller arasındaki bağ doku içine saçılmış halde yerleşmiş Leydig hücreleri LH'a yanıt olarak testosteron üretir. Spermatogenez, hipofizden gelen FSH ve LH tarafından uyarılır. Bu olay, germ hücrelere farklılaşmasını yürüten bir ortama ve sistemik dolaşımdan daha yüksek bir testosteron derişimine gereksinim gösterir ve bu, Leydig hücreleri ile seminifer tübüllerin birbirine çok yakın yerleşimleriyle karşılanır.

Gonad steroidlerinin bir önceki öncülü, böbreküstü bezi steroidlerinde olduğu gibi kolesteroldür. Burada hız kısıtlayıcı basamak, tıpkı böbreküstü bezi steroidlerinde olduğu gibi, steroidojenik akut düzenleyici protein (STAR) isimli taşıyıcı protein ile kolesterolün mitokondri iç duvarına geçişinin sağlanmasıdır. Uygun bir yerleşimde bu olay, yan zincir kırıcı enzim P450scc ile gerçekleştirilir.

İnsan dahil memelilerin çoğunda, testosteronu, özgüllük, göreceli olarak yüksek afinite ve düşük kapasite ile bağlayan bir plazma β -globülini bulunur. Mutad olarak *cinsiyet hormonu bağlayıcı globülin (SHBG)* veya *testosteron-östrojen bağlayıcı globülin (TEBG)* adı verilen bu protein karaciğerde üretilir. SHBG ve albümin, dolaşımdaki testosteronun %97-99'unu bağladığı için dolaşımda hormonun sadece küçük bir payı

serbest (biyolojik olarak etkin) biçimdedir. SHBG nin birincil işlevi, testosteronun serumdaki serbest derişimini kısıtlamak olabilir. Testosteron SHBG'ye, östradiolden daha yüksek afinite ile bağlanır. Dolayısıyla, SHBG düzeyindeki bir değışiklik, serbest östradiole oranla serbest testosteron düzeyinde daha büyük bir değışiklik yapar.

Tıpkı diğier steroid hormonlar gibi, testosteron da üretilir üretilmez salgılanmaktadır (38).

2.2. Pestisitler ve Bitki Gelişim Düzenleyiciler

2.2.1. Tanımı

Doğal halde bulunan, üretilen veya herhangi bir işlem sırasında atık olarak ortaya çıkan veya kazara oluşan her türlü element, bileşik veya karışıma “kimyasal madde” denir. Solunduğunda, ağız yoluyla alındığında, deriye nüfuz ettiğinde erkek ve dişilerin üreme fonksiyon ve kapasitelerini azaltan ve/veya doğacak çocuğı etkileyecek kalıtsal olmayan olumsuz etkileri meydana getiren veya olumsuz etkilerin oluşumunu hızlandıran kimyasal maddelere ise “üreme için toksik kimyasal madde” denir (39, 40).

Toksik olduğui belirlenen 104.000’in üzerindeki kimyasal maddenin yaklaşık olarak %95’inin üreme sistemine olan etkileri incelenmemiştir, oysa NIOSH (The National Institute for Occupational Safety and Health), en sık 10 mesleki hastalık ve yaralanmaların arasında infertiliteyi de almaktadır (40, 41).

Özellikle ekonomik kayıpları en aza indirmek ve elde edilen ürün miktarını artırmak adına kullanılan pestisitler ve BGD’ler sağık açısından oldukça zararlı bileşikler olarak sınıflandırılırlar.

Pestisit terimi, insektisit (böcek öldürücü), herbisit (yabani ot öldürücü), fungusit (küf öldürücü), rodentisit (kemirgen öldürücü), akarisit (akar öldürücü) vb. şeklinde sınıflandırılan kimyasal maddelerin tümünü kapsamaktadır. Pestisitler, modern tarımın tamamlayıcı bir bileşeni halindedir ve dünyanın tüm agro-ekosistemlerinde üretim süreci bir veya daha fazla pestisit uygulamasına gereksinim duymaktadır. Hastalık, zararlı ve yabancı otların tarımsal üretimde neden olduğui kayıp ortalama olarak % 20 – 40 arasında değışmektedir. Pestisitler, hastalık, zararlı ve yabancı otların zararlarını azaltmaktadır, bunun sonucunda üretim artmakta, kalite yükselmekte, ekonomik geri dönüş artmaktadır. Pestisit kullanımı 1940’lı yıllardan beri tarımsal üretimi arttıran en önemli bileşendir.

Pestisitler, etkili maddelerinin kökenlerine göre de gruplara ayrılabilir:

1. İnorganik maddeler
2. Doğal organik maddeler
 - a) Bitkisel maddeler
 - b) Petrol yağları vb.
3. Sentetik organik maddeler
 - a) Klorlu hidrokarbonlar
 - b) Organik fosforlar
 - c) Diğer sentetik organik maddeler (azotlu bileşikler, piretroidler)

Bitki hormonları ise protein yapısında olmayan organik asit maddelerdir. Pek çok yönleriyle memeli hormonlarından farklıdır. Doğal bitki büyümesi ve gelişimi için gereklidirler. Bitki hormonlarının sentetik türevleri olan kimyasal maddelere bitki gelişim düzenleyicileri (BGD) adı verilir. Bitki hormonları altı ana grupta incelenir: oksinler, gibberellinler, sitokininler, etilen, absisik asit ve jasmonatlar. Bunların içerisinde dünyada en fazla kullanım alanına sahip olan etilendir. Bunu sırasıyla oksinler, giberellinler takip eder. Sitokininler ise daha az bir kullanım oranına sahiptir (42,43).

BGD, günümüzde yabancı ot mücadelesinde de kullanılmaktadır. Bunun için kullanılan düzenleyicilerin aktif maddeleri fenoksi yağ asitleridir: 2,4-D (dikloro fenoksi asetik asit); 2,4,5-T (trikloro fenoksi asetik asit); dichloroprop (dikloro fenoksi propiyonik asit); MCPA (4-kloro-2-metil fenoksi asetik asit); MCPB (4-kloro-2-metil fenoksi butanoik asit); MCPP (4-kloro-2-metil fenoksi propiyonik asit; mecoprop) maddeleri oksinler grubuna dahil fenoksi yağ asitleridir (44). Çalışmamızda kullandığımız MCPA eski bir pestisit olmasına rağmen ekonomik açıdan daha uygun olması nedeniyle halen tercih edilen bir maddedir. MCPA tahıllar, çayır, bakliyatlar, ağaçlar gibi bir yıllık ve çok yıllık bitkiler için sistemik bir fenoksi herbisittir. Bu herbisit hazırlanan formülasyonlarda diğer pestisitlerle de kombine edilmeye uygundur. Yabani kuşlara, tatlı su balıklarına orta derecede toksiktir. Vertebrasız tatlı su balıklarına, nehir ağzı ve deniz organizmalarına toksik değildir (45,46).

2.2.2. Tarihçesi

İnsanların pestisitleri tanımları yıllar öncesine uzanmaktadır. Kutsal sayılan tuzların, fethedilen yerlerin küllerinin ‘non-selective’ herbisit olarak M.Ö. 1200 yılında kullanıldığı, kükürdün insektisit ve fungusit özelliğinin M.Ö. 1000 yılında keşfedildiği

“Hellebore” (Helleborus niger, Helleborus orientalis ve Veratrum album) adlı bitkilerin fare, sıçan ve böceklerin kontrolü için M.Ö. 100 yılında kullanıldığı bilinmektedir. “Arsenik” M.S. 900 yılında Çinliler tarafından böceklerle karşı kullanılmıştır. Tütün ekstraktlarının M.S. 1690’da kontak insektisit olarak, dumanlarının ise M.S. 1773 yılında fumigant olarak kullanıldığı literatürde yer almıştır (47, 48). Tabii kaynaklı organik ve inorganik maddelerin bitki koruma alanında çeşitli zararlılara karşı kullanılmasına II. Dünya Savaşı öncesine kadar devam edilmiştir. Sentetik pestisitlerin devreye girişi ile bu maddelerin yoğun olarak kullanımına geçilmiştir. Kısa sürede etkili olan ve alternatifleri de bulunmayan bu sentetik pestisitlerden, ilk organik fosfatlı insektisit olan TEPP (Tetraethylpyrophosphate) Bernard Shrader tarafından 1938’de bulunmuştur. İlk organik klorlu insektisit olan DDT ise 1874’te sentezlenmiş ve Paul Müller tarafından 1939’da insektisit özelliği keşfedilmiştir (48).

İlk bitki gelişim düzenleyicilerden olan Etilen ve Asetilen 1937’de, ilk hormon etkili olan 2,4-D ise 1942’de keşfedilmiştir (47).

2.2.3. Kullanımı ve Etkileri

Dünya pestisit pazarının değeri yaklaşık 30 milyon €’ dur. Dünya pestisit kullanımı Tablo 2.1 ve 2.2’de özetlenmiştir. Herbisitler ve insektisitler en yaygın kullanılan formülasyonlardır. Kullanılan pestisitlerin %60’dan fazlası sebzeler ve hububat ekili alanlarda kullanılmaktadır. Global olarak pestisitlerin %55’i Kuzey Amerika ve Batı Avrupa’da kullanılmaktadır, ancak Doğu Avrupa’da da dikkate değer bir artış gözlenmektedir (49). Batı Avrupa’da 80 milyon hektarda tarımsal üretim yapılmaktadır. Bu alanın %50’den fazlasında hububat üretimi yapılmaktadır ve tüm alanlarda herbisit kullanılırken , %60-80’nin de fungusit, %15-98’inde ise insektisit kullanılmaktadır (50). İngiltere’de hububat ekilen alanlarda hektara 3.8 kg pestisit ve 10 farklı aktif madde kullanılmaktadır (51). Avrupa’da hektara düşen pestisit kullanım miktarı en yüksek olan ülkeler Hollanda ve Yunanistan’dır. Yıllık pestisit kullanımını iklim koşullarına bağlı olarak sürekli değişmektedir.

Tablo 2.1. Dünyada pestisit kullanımının bölgelere göre dağılımı

BÖLGELER	PAZAR PAYI
KUZEY AMERİKA	29.4
DOĞU ASYA	25.3
BATI AVRUPA	22.4
LATİN AMERİKA	15.3
DOĞU AVRUPA	2.9
DİĞER	4.7

Tablo 2.2. Dünya pestisit kullanımının ürünlere göre dağılımı

ÜRÜN	KULLANIM YÜZDESİ
HERBİSİT	49.6
İNSEKTİSİT	26.2
FUNGUSİT	19.5
DİĞER	4.7

Ülkemizdeki pestisit pazarı Avrupa ülkelerine oranla son derece küçüktür. Yıllık tüketim miktarı hektara 400 – 700 gram civarındadır. Bu pazarın parasal değeri dünya pazarının yüzde birinden azdır. Ancak ülkemizde tarımsal teknolojiyi ifade eden yoğun tarım yapılan Akdeniz, Ege gibi bölgelerde tüketim Türkiye ortalamasının çok üzerindedir. Bu bölgelerde, pestisit kaynaklı çevresel risk yüksektir. Türkiye’de tarım ilacı (pestisit) tüketimi, 1979’a göre 2002 yılında %45,29’luk bir artış göstermiştir (52).

Günümüzde kullanılan pestisitler, sadece esas hedefi artropodlara değil ayrıca omurgalılara ve memelilere de toksik olan geniş etkili biyositlerdir. Çalışmamızda kullandığımız diğer madde; bir organofosfor olan profenofos [O-4-bromo-2-chlorophenyl O-ethyl-S-propyl phosphorothioate]’ tur. Geniş etkili bir organofosfor insektisit olan profenofos; aynı zamanda hem zirai hem evsel amaçlı kullanılan bir akarisit (akarıları öldüren pestisit)’ tir (53). Göreceli olarak düşük bir plazma düzeyinde bile profenofos

toksisitesinin ölümcül olduğu görölmüştür. Bu durumla ilgili olarak ölümcül bir insan vakası zehirlenmesinde yüksek düzeylerde metabolit tesbit edilmesi profenofosun hızla metabolize olduğunu göstermektedir (54). Profenofos mikrozomal enzimler ve NADPH ile fosfooratat oksidasyonu ile aktiflenmektedir (55).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Bu çalışma, Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje Tarihi: 0.0.2009; Proje No: DA 09/30) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. Deneysel çalışmalar, Helsinki Bildirgesi ile Başkent Üniversitesi Araştırma Merkezi Kurallarına ve Başkent Üniversitesi Deneysel/Klinik Araştırma İlkeleri'ne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Sprague-Dawley türü sıçanlar Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edilmiştir. Ortama alışmalarının sağlanması için diyet uygulamasından 10 gün önce Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezi, Araştırma Ünitesine getirilen sıçanlar burada sıcaklığı ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) ve bağıl nemi ($\%32\pm 7$) sabit, vantilatör ile havalandırılan, 12 saat aydınlık / karanlık döngüsü uygulanan ortamda ve 2-3'erli olarak standart sıçan kafeslerinde barındırılmıştır. Bu süre boyunca sıçanlara standart yem verilmiş ve su kısıtlaması uygulanmamıştır (*ad libitum*).

Çalışmada; 14 haftalık sıçanlardan her grupta 10 adet erkek sıçan olacak şekilde 3 grup oluşturulmuştur. İlk gün serum testosteron düzeylerini belirlemek üzere tüm hayvanların kuyruk venlerinden 0,5 ml kan alınmıştır.

Grup 1 (Kontrol Grubu): Bu grupta deneklere gavaj yoluyla yalnızca distile su uygulanmıştır. Normal koşullar altında bir ay süre ile serbest besin ve suya ulaşmaları sağlanmıştır.

Grup 2 (Profenofos Grubu): Bu grupta deneklere haftada 2 kez belirlenen gün ve saatte 17 mg/kg dozunda profenofos (Pestanal, 45632-Fluka, İsveç) gavaj yoluyla bir ay süre ile uygulanmıştır.

Grup 3 (MCPA Grubu): Bu grupta her gün belirlenen gün ve saatte 190 mg/kg dozunda MCPA (4-Chloro- 2 Methylphenoxacetic acid, 25190, Fluka, İsveç) gavaj yoluyla bir ay süre ile uygulanmıştır.

Çalışmada yer alan tüm hayvanlar 60 mg/kg ketamin hidroklorür ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorit kullanılarak anesteziye edildikten sonra sakrifiye edildi. Sıçanlardan çıkarılan testis dokusu örnekleri küçük parçalara ayrılarak elektron mikroskopta incelenmek üzere fosfat tamponlu % 2'lik gluteraldehit tespit solüsyonuna (pH 7,4) alındı. Hayvanlardan ilk gün ve son gün alınan kanlar serum toplam ve serbest testosteron

düzeylerinin ölçülmesi için Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarı'na gönderildi.

3.2. Elektron Mikroskop Yöntemi

3.2.1. Gluteraldehit Tespit Solüsyonunun Hazırlanması ve Dokuların İlk Tespiti

Sorenson' un fosfat solüsyonunun hazırlanması

Sol. A: Sodyum fosfat dibazik ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0,946 gr

Distile su 100ml

Sol. B: Potasyum fosfat monobazik (KH_2PO_4) 0.0906 gr

Distile su 100ml

80 ml Sol. A + 20 ml Sol. B birbirine eklenerek elde edilen 100 ml solüsyon gerektiğinde bu solüsyonlardan ilave edilerek pH'sı 7.4 olacak şekilde ayarlandı.

Gluteraldehit tespit solüsyonunun hazırlanması:

92 ml Sorenson fosfat tamponuna 8 ml %25'lik Gluteraldehit eklenerek 100 ml fosfat tamponlu tespit solüsyonu elde edildi.

Dokular, bu solüsyonda 30 dakika bekletilip sertleşmeleri sağlandıktan sonra, bir mm^3 'lük parçalara bölündü ve bir saat daha gluteraldehit solüsyonunda bekletilerek ilk tespitleri sağlandı. Bunu izleyerek örnekler 5 dakika süre ile Sorenson Fosfat Tamponu ile 3-4 defa değiştirilerek yıkandı.

3.2.2. Osmiyum Tetroksit Solüsyonunun Hazırlanması ve Dokuların İkinci Tespiti:

%2'lik Osmiyum Tetroksit Solüsyonunun Hazırlanması:

Osmiyum tetroksit (OsO_4) 0.1gr

Distile su 5 ml

Bir kısım Sorenson fosfat tamponu ve bir kısım yukarıda hazırlanan %2'lik osmiyum tetroksit karıştırılarak ikinci tespit (postfiksasyon) solüsyonu elde edildi.

Dokular bu solüsyonda bir saat bekletilerek tespitleri ve boyanmaları sağlanmış oldu.

3.2.3. Dehidrasyon ve Blok Oluşturulması:

Dokular osmiyumla tespitten sonra, fazla suyun uzaklaştırılması için, artan derecelerdeki etil alkol serilerinden geçirildiler.

%25'lik alkol	10 dakika
%50'lik alkol	10 dakika
%75'lik alkol	10 dakika
%100 'lık alkol	30 dakika
%100 'lük alkol	30 dakika
%100 'lık alkol	30 dakika
%100 'lük alkol	30 dakika
Propilen oksit	5 dakika
Propilen oksit + gömme materyali	30 dakika (gömme materyalinin doku içine geçişi sağlandı).

Gömme Materyalinin Hazırlanması

Araldit CY 212	10 ml
DDSA	10 ml
BDMA	0.5 ml
Dibütil fitalat	1 ml

Bu karışıma alınan dokular 2 saat rotatorda oda ısısında karıştırıldı. Son olarak dokular aynı karışım ile gömme kapsülüne gömüldü. Süre sonunda dokular 56 derecede etüv içinde 48 saat bekletildi.

Hazırlanan bloklar da Leica ultramikrotom ile 1,5 µm'lik yarı ince kesitler alındı ve toluidin mavisi ile boyandı ve incelenecek bölgeler belirlenerek işaretlendi. Bu bölgelerden 70-90 nm'lik ince kesitler bakır gridler üzerine alındı. Alınan kesitler kontrast sağlamak için, uranil asetat ve kurşun sitrat ile boyanarak *LEO 906E EM* elektron mikroskopta değerlendirilerek fotoğraflandı.

3.3. Biyokimyasal Analiz

Deney sırasında alınan kan örnekleri 1000 x g' de 10 dakika santrifüj edildi ve ayrılan serum örnekleri çalışma yapılınca kadar -20 derecede saklandı. Çalışmada; Toplam Testosteron ölçümleri DPC Immulite® 2000; Serbest Testosteron ölçümleri ise DIASource marka kit kullanılarak RIA (Radyoaktif Immun Assay) yöntemiyle yapıldı.

3.4. İstatistiksel Analiz

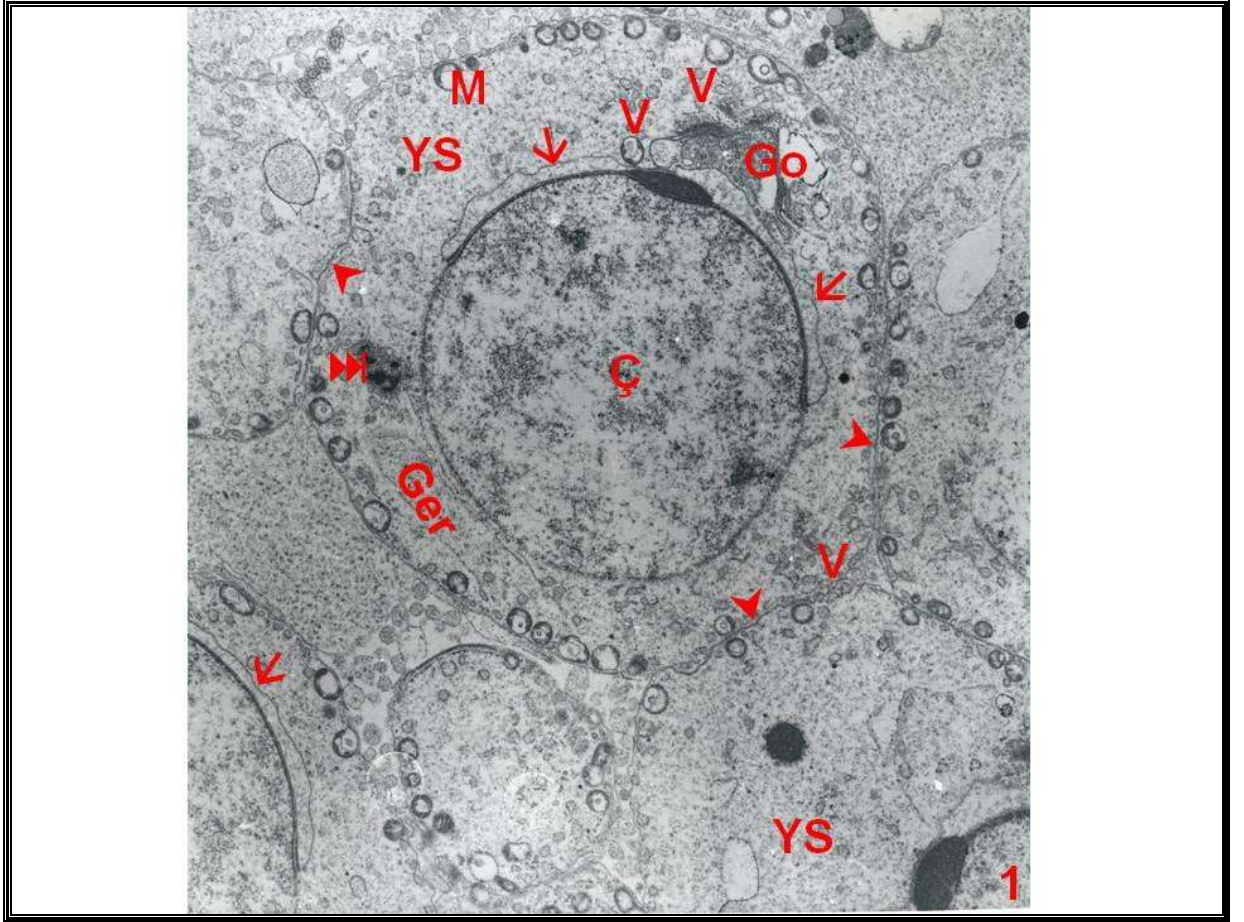
Veriler öncelikle tanıtıcı istatistikleri alınarak değerlendirilmiştir, daha sonra veriler parametrik test uygulanabilmesi için gerekli ön şartlardan normallik varsayımı kontrol edilmiştir. Shapiro-Wilk normallik testi sonuçlarına göre verilerin normal dağılmadığı tespit edilmiştir. Böylece parametrik olmayan istatistiki yöntemlerin kullanılmasına karar verilmiştir. Hayvanların ilk gün ve son gün serum toplam ve serbest testosteron düzeyleri ölçümü bağımlı iki grup medyanları arasındaki farklılığa Wilcoxon Z (bağımlı iki grup) istatistiği kullanılarak değerlendirilmiştir. Serbest ve toplam testosteron ölçümlerinin önce ve sonrasında kontrol, profenofos ve MCPA'nın meydanlarının karşılaştırılması Kruskal Wallis (bağımsız üç grup) testi uygulanarak, istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

4. BULGULAR

4.1. Elektron Mikroskop Bulguları

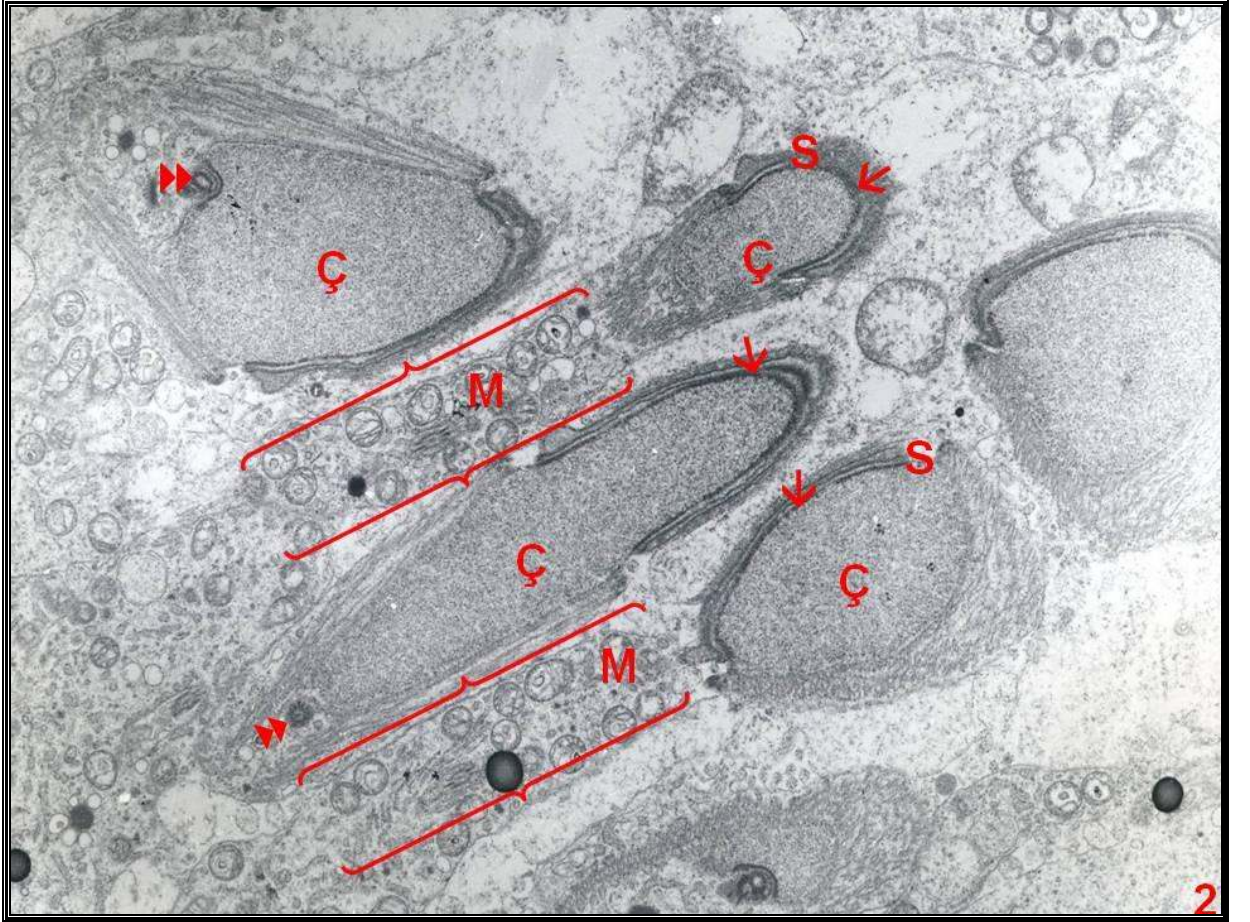
4.1.1. Kontrol Grubu Bulguları

İnce yapı düzeyinde testis değerlendirmelerimizde kontrol grubunda farklı gelişim evrelerinde spermatidler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinin normal yapı sergiledikleri görüldü. Spermatogenez sürecinin sürekliliğini koruduğu seminifer tübüllerde, yuvarlak spermatidlerde akrozomal vezikülün şekillendiği ayırt edildi. Golgi birleşiminin altında oluşan akrozomal vezikülün heterokromatinden zengin hale gelen spermatid çekirdeğini ön kutbundan sardığı ve sitoplazmada dağınık yerleşen irili ufaklı veziküllerin akrozomal kesenin olduğu kutupta gruplar oluşturduğu ayırt edildi. Yuvarlak spermatidin çevredeki gelişmekte olan hücrelerle oluklu bağlantılarla (gap junctionlarla) bağlantısını koruduğu izlendi (Şekil 4.1). İleri gelişim aşamasında olan spermatidlerde (geç spermatidlerde) çekirdek kromatininin yoğunlaştığı, gelişmekte olan akrozomal vezikülün zıt kutbunda sentriyolün yerleşim gösterdiği izlenirken spermiyogenez sürecine yaklaşan spermatidlerde orta parçanın tam olarak şekillendiği ve mitokondriyonların düzenli konumlandıkları ayırt edildi (Şekil 4.2). Küçük büyütme resiminde seminifer tübülün bazal laminası üzerinde yerleşim gösteren Sertoli hücresi ve interstisiyel alandaki Leydig hücresi çekirdek, çekirdekçik ve organel dağılımları bakımından alışlagelmiş normal yapı özelliklerini gösteriyordu (Şekil 4.3). Büyük büyütmelerde bazal lamina üzerinde yerleşik Sertoli hücresi ökromatinden zengin çekirdeği belirgin çekirdekçigiyle ayırt edilirken sitoplazmada mitokondriyonlar ve birkaç elektron yoğun granülün varlığı izlendi (Şekil 4.4). İnterstisiyel bağ dokusunda Leydig hücrelerinin büyük büyütme resminde çekirdek ve çekirdekçiklerinin kromatin dağılımının ve organellerinin doğal yapıda ve kapillerlere yakın yerleşimli olduğu görüldü (Şekil 4.5). Bu bulgular spermatogenez sürecinin sağlıklı olarak süregeldiğini düşündürdü.



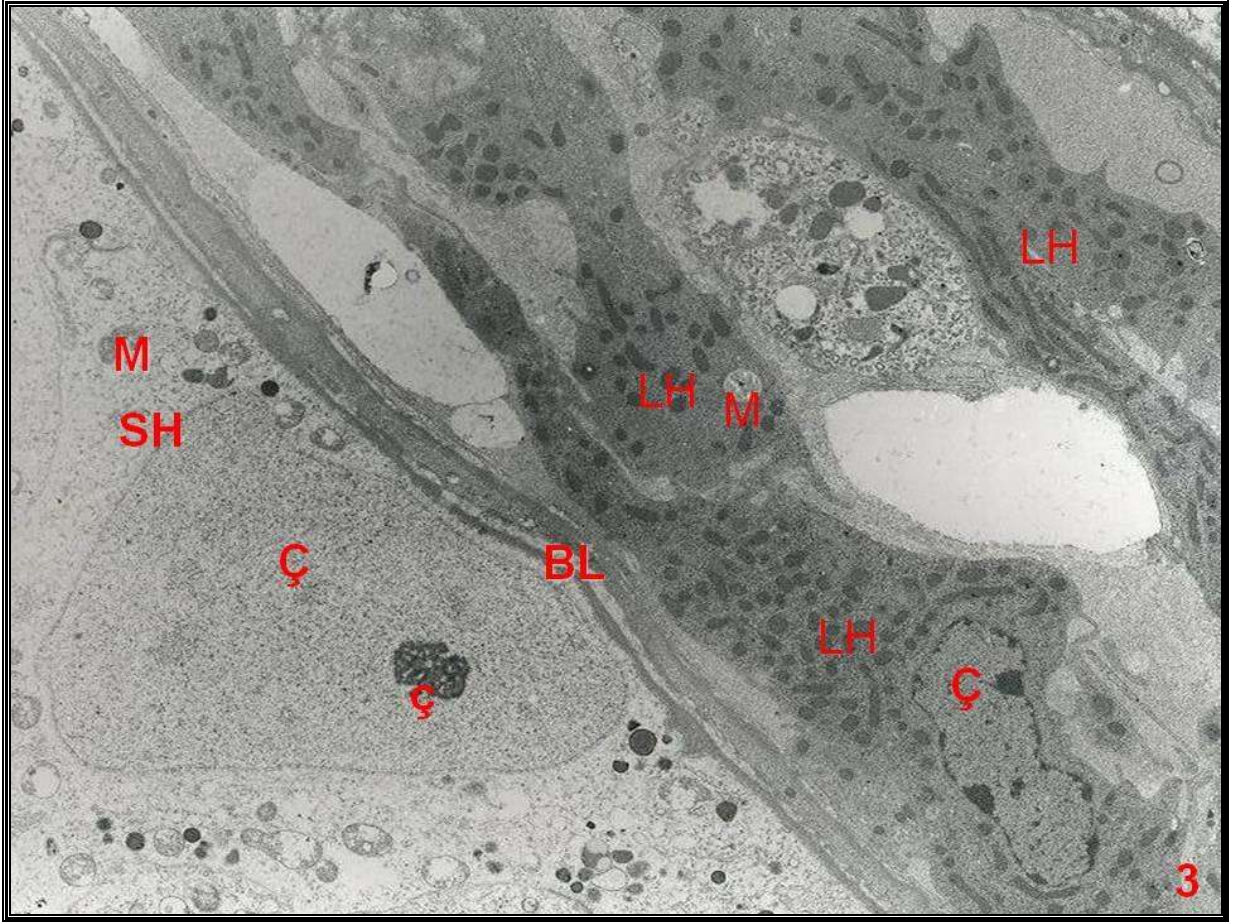
Şekil 4.1. Kontrol grubu elektron mikrografi

Seminifer tübül duvarındaki yuvarlak spermatidde (YS), çekirdek (Ç) ön kutbunda gelişmekte olan akrozomal vezikül (→), Golgi birleşği (Go), sitoplazmada içersine dağılmış veziküller (V), mitokondiyonlar (M), otofajik vakuol (▶▶), granüllü endoplazma retikulumu (GER) ve diğer hücrelerle olan oluklu bağlantı (▶) görülüyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X3597).



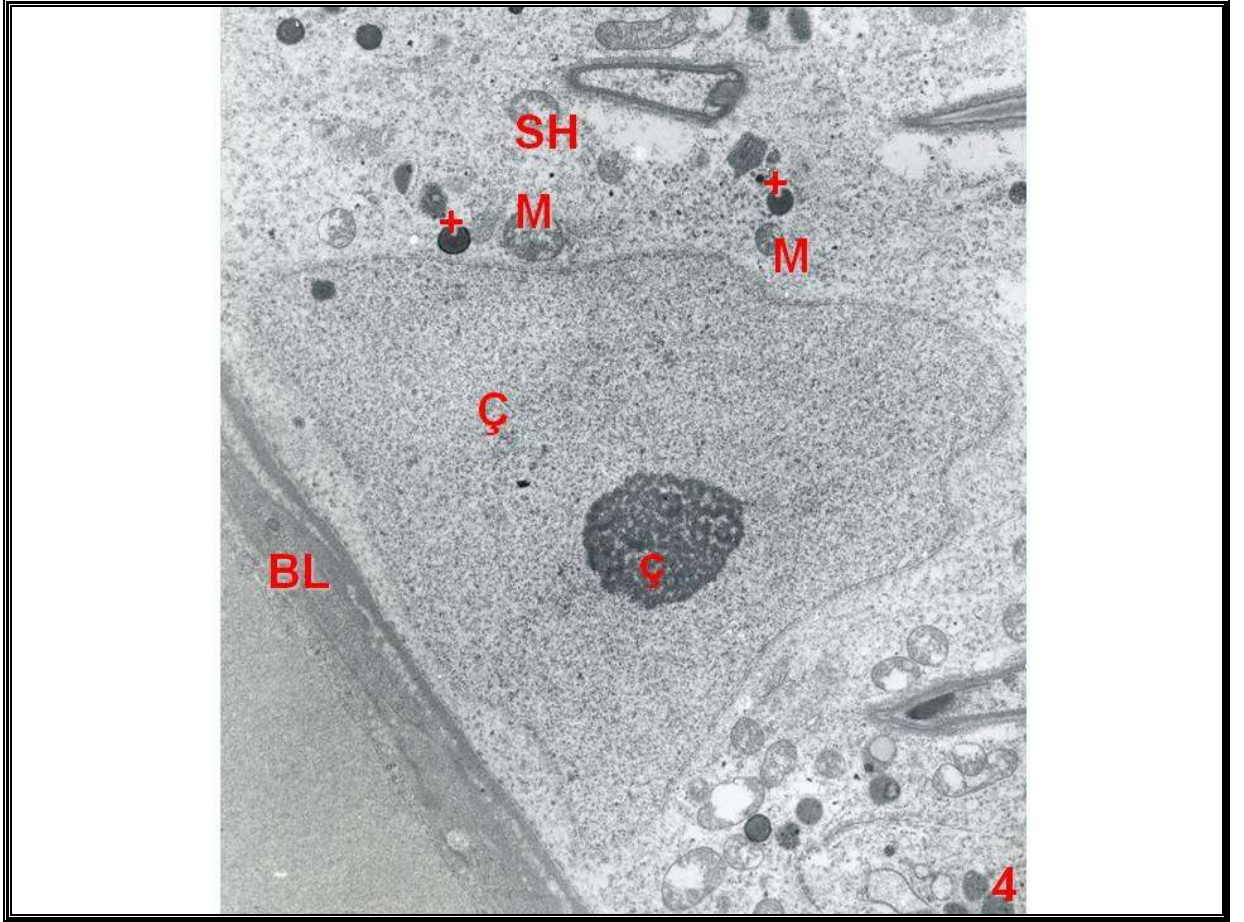
Şekil 4.2. Kontrol Grubu elektron mikrografi

İleri gelişim aşamasında olan spermatidlerde (S) yoğunlaşan çekirdek (Ç) kromatini, akrozomal vezikülün (→) zıt kutbunda sentriyol (►►), spermiyogenez sürecine yaklaşan spermatidlerde kuyruk orta parçasında ({}) düzenli yerleşim gösteren mitokondriyonlar (M) ayırt ediliyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X3597).



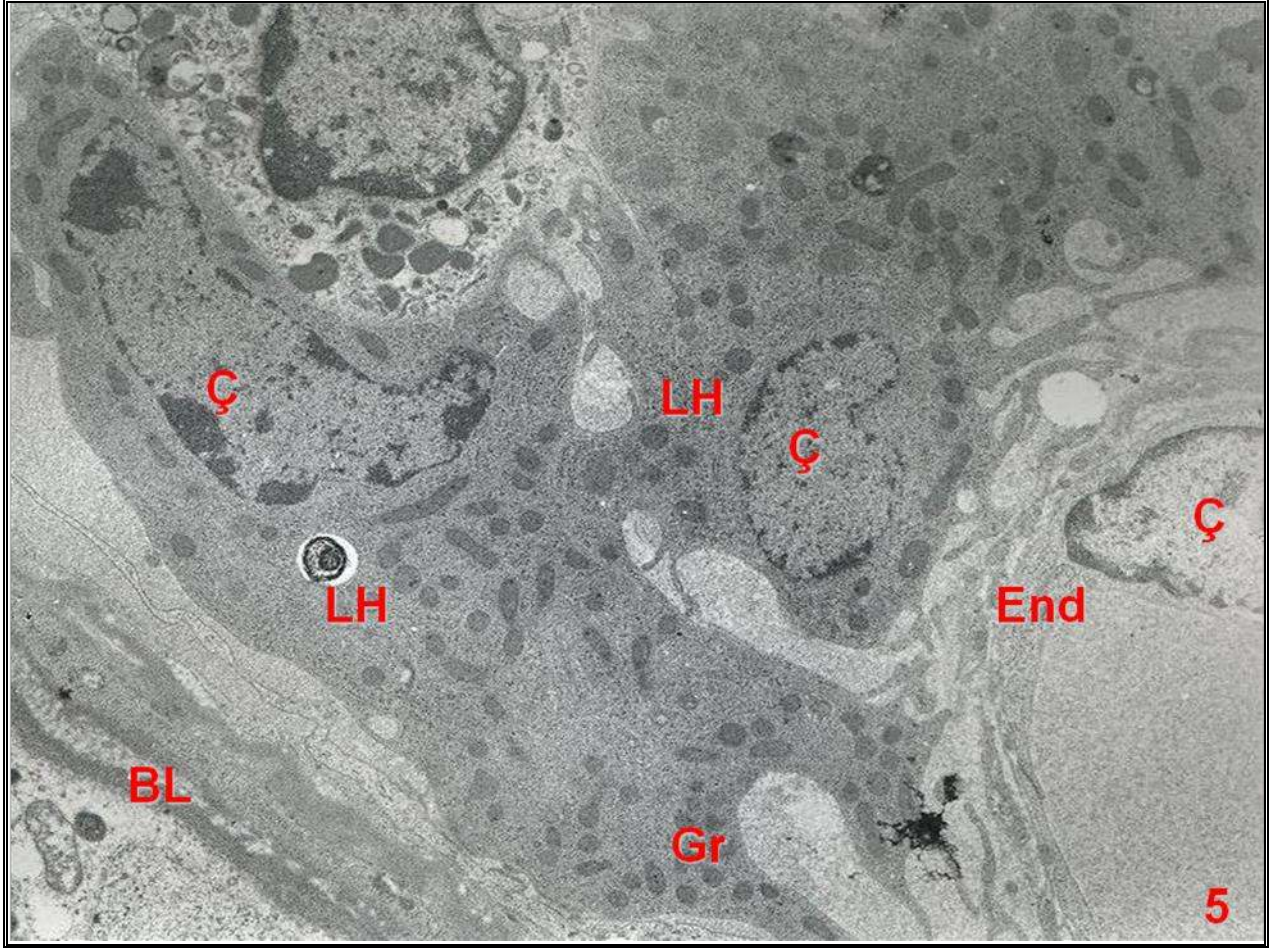
Şekil 4.3. Kontrol Grubu elektron mikrografi

Seminifer tübül bazal laminası (BL) üzerinde yerleşim gösteren Sertoli hücresi ökromatinden zengin çekirdeği (Ç), belirgin çekirdekçığı (ç), sitoplazmaya dağılan mitokondriyonları (M) ile ayırt ediliyor. İnterstisyel bağ dokusunda Leydig hücreleri (LH) belirgin çekirdek (Ç) ve çekirdekçikleri (ç) izleniyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X2784).



Şekil 4.4. Kontrol Grubu elektron mikrografi

Büyük büyütmede seminifer tübülün bazal laminası (BL) üzerindeki Sertoli hücresi (SH) ökromatinden zengin çekirdeği (Ç), belirgin çekirdekçisiyle (ç) izlenirken sitoplazmada mitokondriyonlar (M) ve elektron yoğun granüller (+) görülüyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X2784).



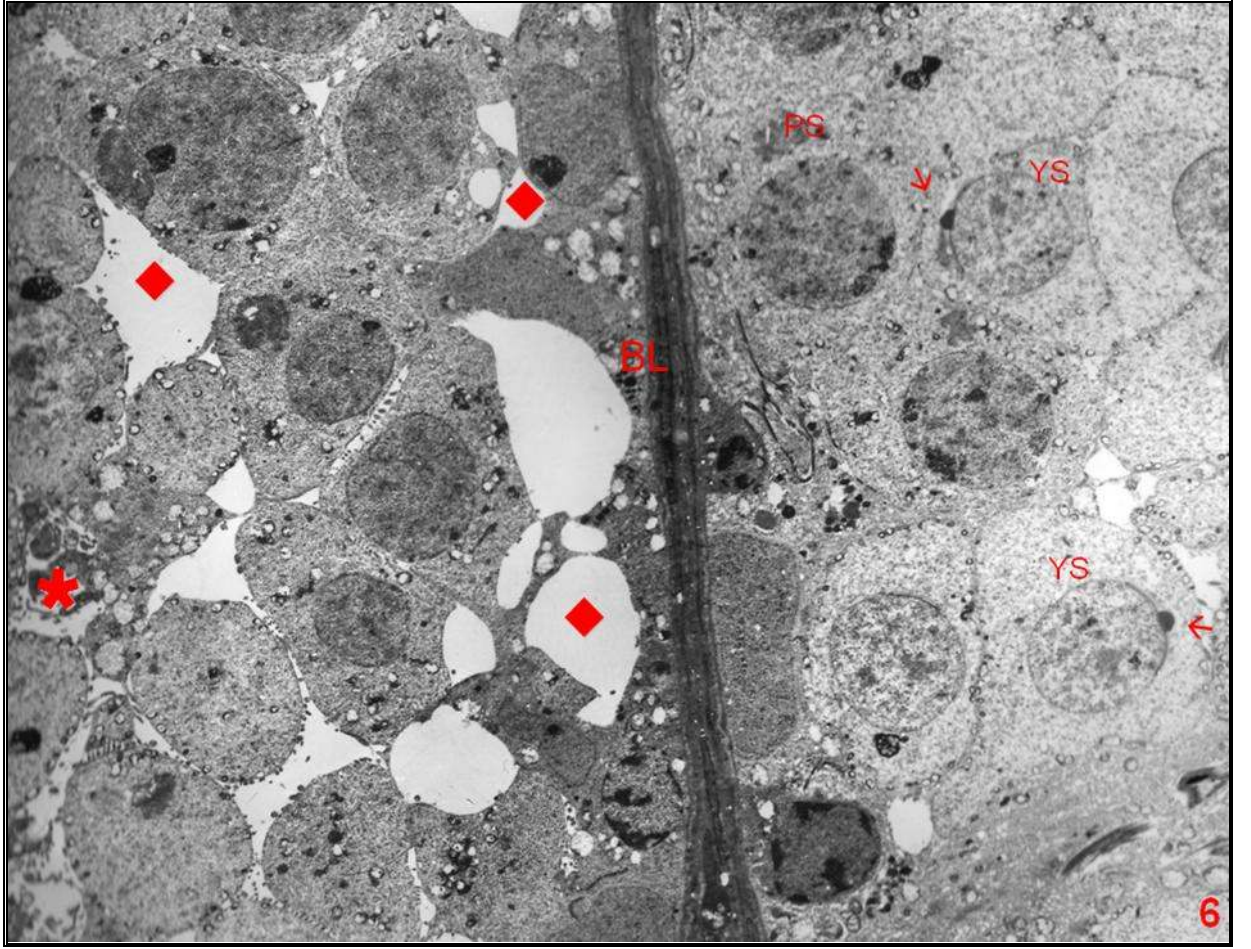
Şekil 4.5. Kontrol Grubu elektron mikrofrafı

Büyük büyütmede interstisiyel bağ dokusunda Leydig hücrelerinin (LH) çekirdek (Ç) ve çekirdekçiklerinin (ç) kromatin dağılımı, sitoplazmadaki mitokondriyonlar (M), yoğun matriksli granüller (Gr) ve hücrelerin yakınında yerleşim gösteren kapiller endotel hücresi (End) normal görünümlü çekirdeği (Ç) ile gösteriliyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X4646).

4.1.2 Profenofos Grubu Bulguları

Profenofos'un testis ince yapısına etkilerini değerlendirdiğimiz grupta bir grup seminifer tübül normal yapısını korurken diğer bazı tübüllerde belirgin yapısal değişiklikler dikkati çekti. Bütünlüğünü koruyan tübüllerde bazı yuvarlak spermatidlerde akrozom vezikülünün gelişmekte olduğu izlendi. Bu grupta bazal laminanın homojen yapısını kaybettiği ve yer yer elektron yoğun görünüm sergilediği ayırt edildi. Yapısal hasarın izlendiği tübüllerde spermatogenik seriyi oluşturan hücreler arasında belirgin boşlukların şekillendiği ve seminifer epitelin bütünlüğünü koruyamadığı dikkati çekti (Şekil 4.6). Özellikle spermatogenez aşamasındaki spermatidlerin mitokondriyonlarında belirgin şişme ve kristalizis izlenirken ayrıca hücre sitoplazmalarında rezidüel cisimlerin varlığı belirlendi (Şekil 4.7). Büyük büyütmede Sertoli hücre çekirdeğinin normal yapısını yitirdiği yer yer heterokromatinden zengin olduğu görülürken sitoplazmasında şişmiş (dev) kristalizisli mitokondriyonlar ve rezidüel cisimler izlendi (Şekil 4.8). Seminifer tübül bazal laminasının bazı alanlarda kontrol grubundan farklı olarak dalgalı (ondülal) görünüm sergilediği ve yer yer ayrılmaların olduğu gözlemlendi. Bu tübüllerin duvarını oluşturan hücrelerde rezidüel cisim oluşumu, iri lipid damlacıkları, yaygın vakuolizasyon izlenirken, mitokondriyonların şişme ve kristalizis ile birlikte simit ya da çentikli gibi anormal biçimlerde oldukları dikkati çekti. Ara bağ dokusundaki Leydig hücrelerinin sitoplazmalarının az yoğun boyandığı (elektron geçirgen olduğu), kristalizisli mitokondriyonlara ve otofajik vakuollere sahip olduğu görüldü (Şekil 4. 9).

Profenofos uygulamasının spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerde oluşturduğu yapısal hasarın yanı sıra Sertoli hücrelerindeki belirgin yapısal bozunmalara neden olduğu izlendi. Bu bulgu kan-testis bariyerinin bozulmasının göstergesi olarak düşünüldü ve profenofos'un spermatogenez sürecini olumsuz etkilediğini gösteren bir ince yapı bulgusu olduğu belirlendi.



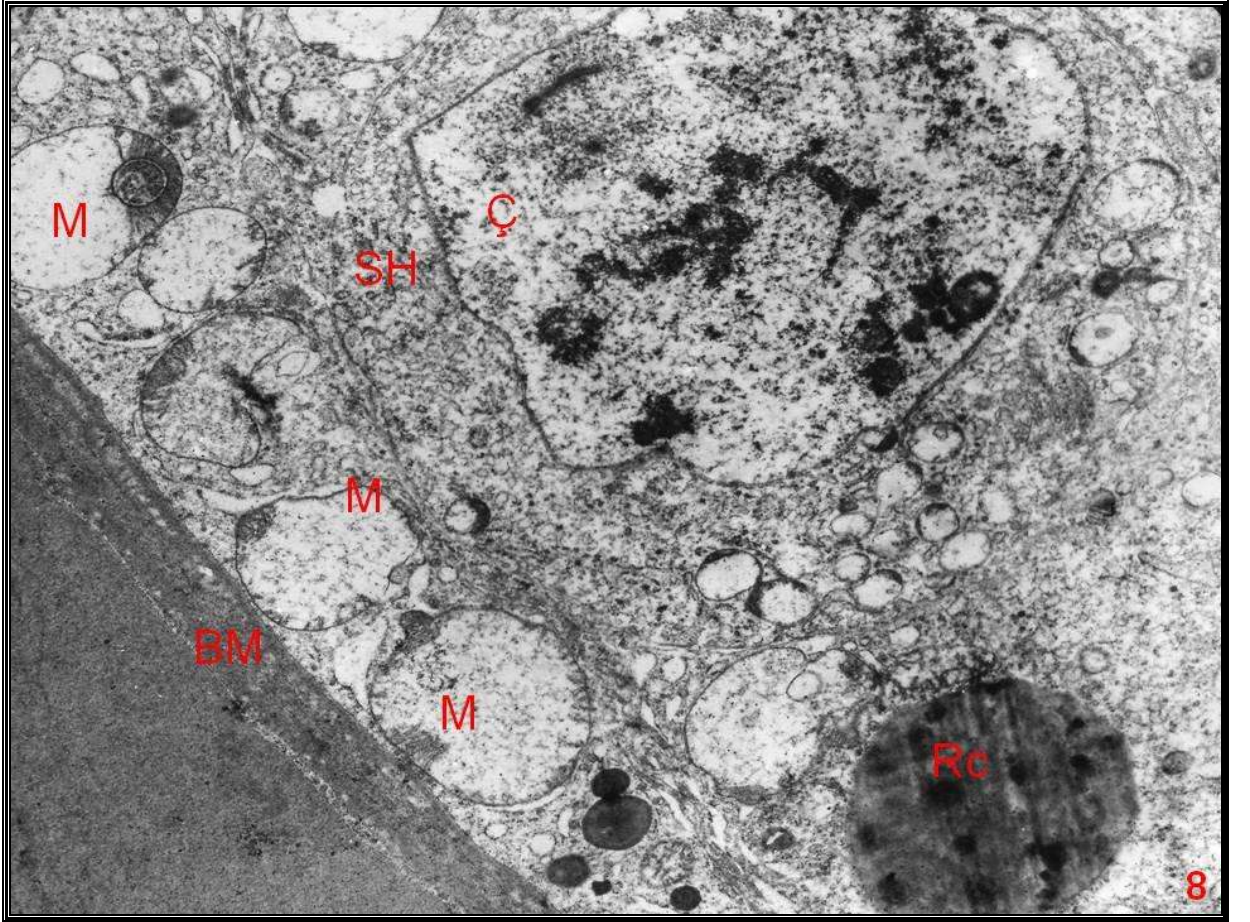
Şekil 4.6. Profenofos Grubu elektron mikrografı

Resmin sağ tarafında bütünlüğünü koruyan seminifer tübülde primer spermatosit (PS) ve yuvarlak spermatidlerde (YS) akrozomal vezikül (→) görülüyor. İki tübülün sınırını oluşturan bazal laminanın (BL) elektron yoğun boyandığı ayırt ediliyor. Resmin sol yarısındaki seminifer tübül duvarını oluşturan hücreler arasında belirgin boşluklar (◆) ve lümene yakın alanda apoptotik oluşum (*) izleniyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X1293).



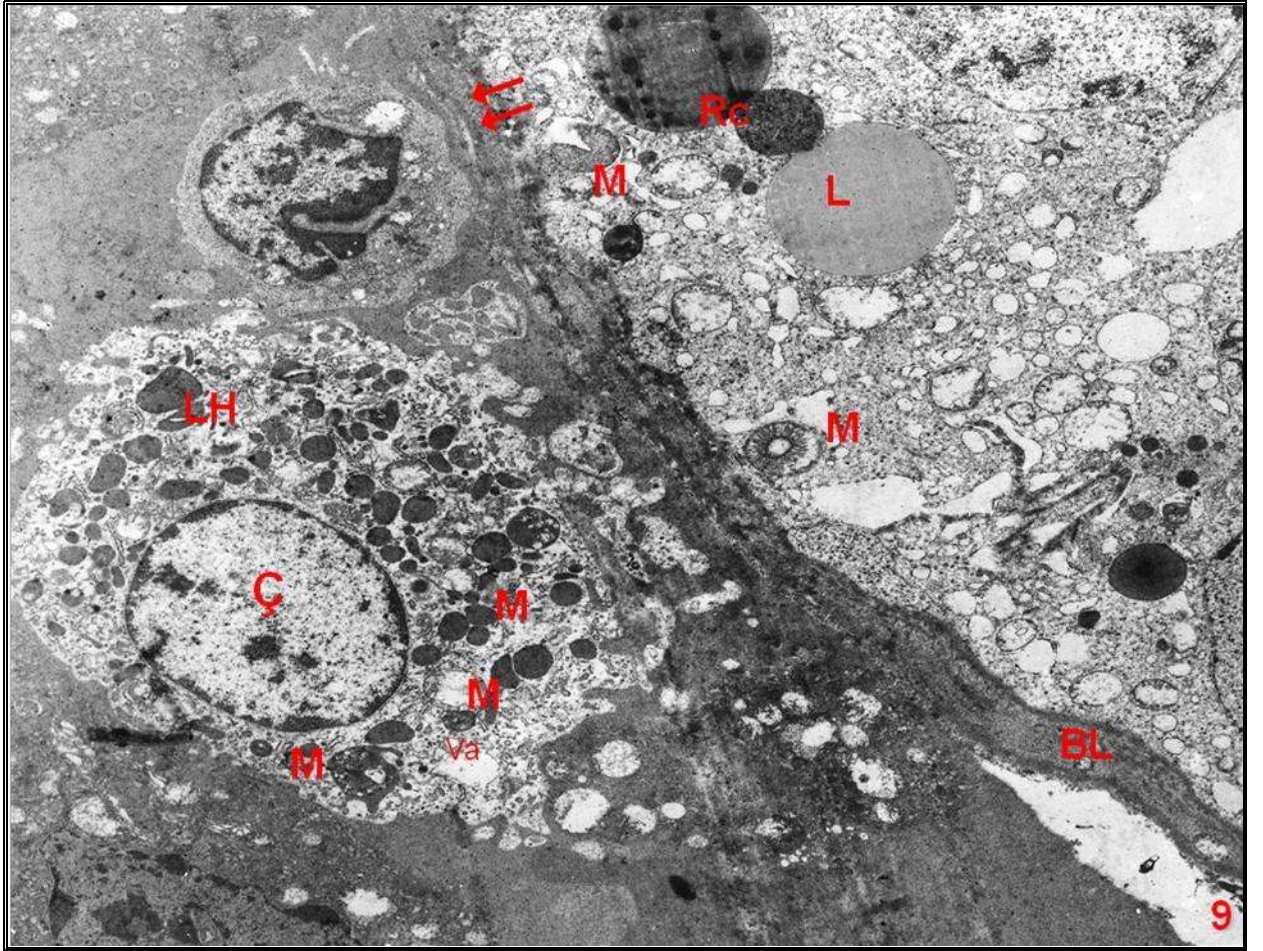
Şekil 4.7. Profenofos Grubu elektron mikrografı

Spermatogenez aşamasındaki spermatidlerin çevre hücrelerinde şişmiş kristalizisli mitokondriyonlar (M) ile birlikte hücre sitoplazmalarında rezidüel cisimlerin (Rc) varlığı belirlendi (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X1293).



Şekil 4.8. Profenofos Grubu elektron mikrosafı

Büyük büyütmede bazal membran (BM) üzerindeki anormal Sertoli hücre (SH) çekirdeği (Ç), sitoplazmada anormal şekilli, iri ve kristalizisli mitokondriyonlar (M), residüel cisim (Rc) gösteriliyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X4646).



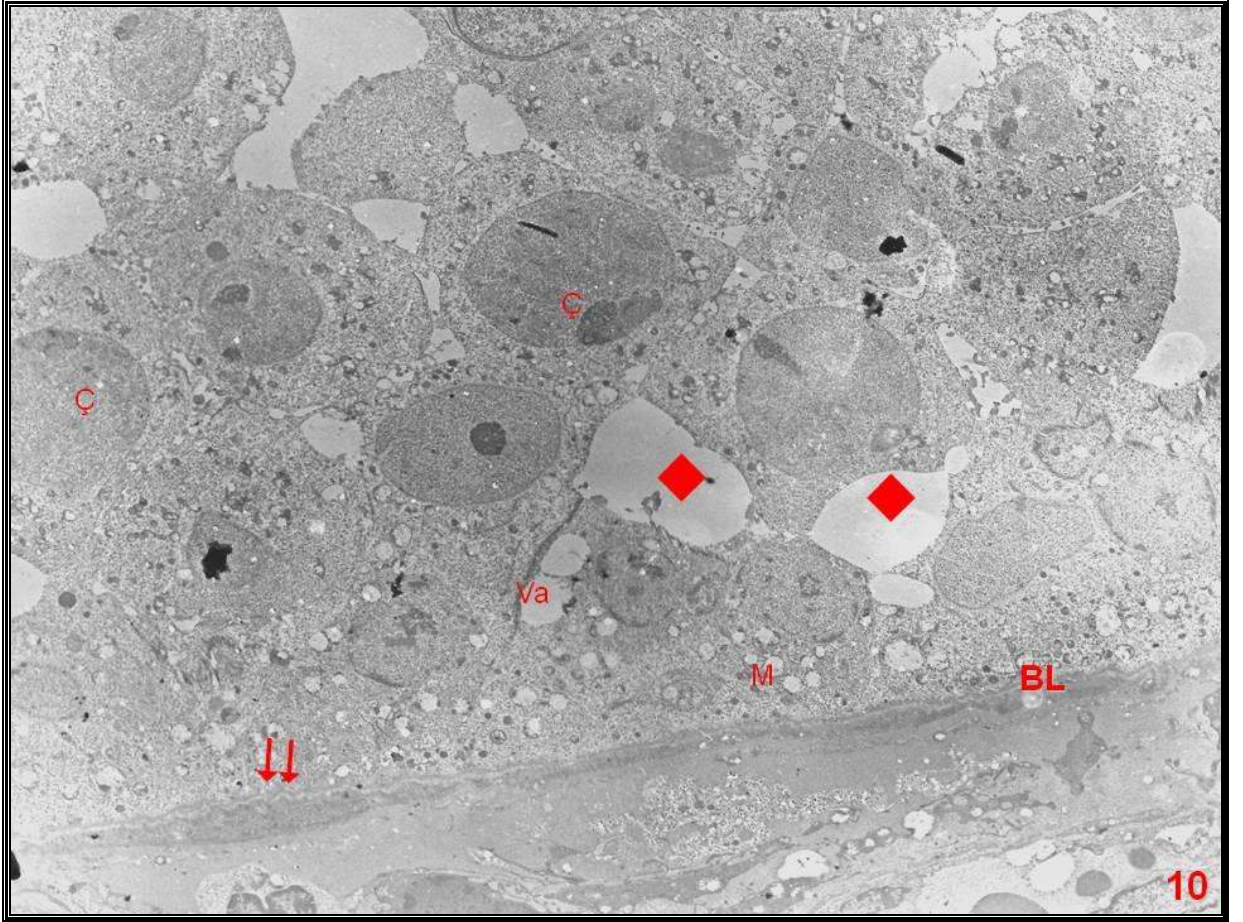
Şekil 4.9. Profenofos Grubu elektron mikrografı

Seminifer tübül bazal laminasının (BL) düzensiz seyirli ($\rightleftharpoons$) olduğu ve yer yer ayrılımların olduğu gözlemlendi. Bu tübüllerin duvarını oluşturan hücrelerde rezidüel cisim (Rc) oluşumu, iri lipid damlacıkları (L), yaygın vakuolizasyon (Va) izlenirken, mitokondriyonların (M) şişme ve kristalizis ile birlikte simit şekilli ya da çentikli anormal şekilli oldukları dikkati çekti. Ara bağ dokudaki az yoğun boyanan Leydig hücresi (LH) kristalizisli mitokondriyonlar (M) ve otofajik vakuol ($\blacktriangleright$) oluşumu izleniyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X 2784).

4.1.3. Metil fenoksi kloro asetik asit (MCPA) Grubu Bulguları

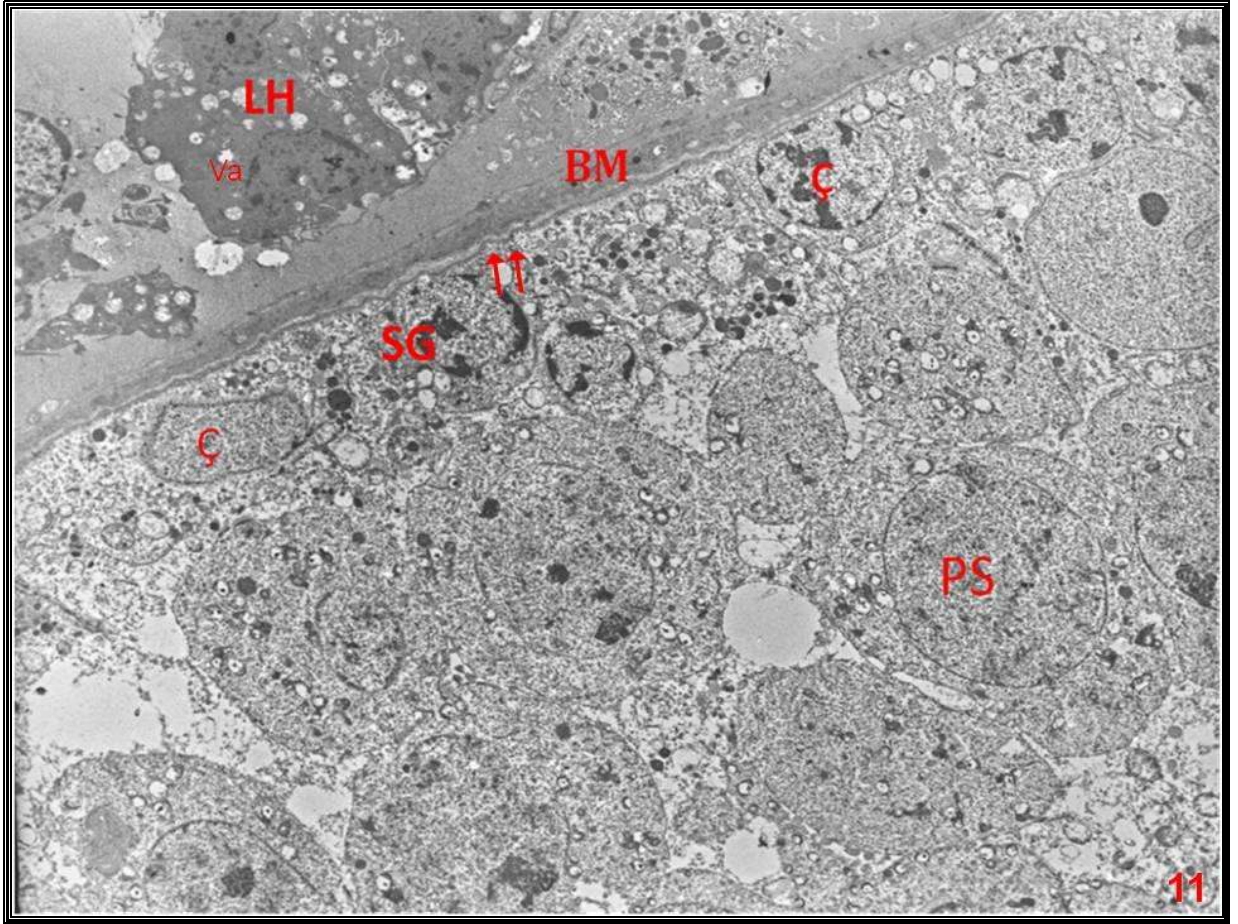
MCPA uygulanan deney grubunun testis ince kesitlerinde; seminifer tübül epitelini oluşturan hücreler arasında bir önceki gruba benzer olarak boşlukların varlığı görüldü. Farklı gelişim evresindeki spermatogenik hücrelerin bazılarında kromatinin çekirdek zarı altında yoğunlaştığı belirlendi. Seminifer tübülün bazal laminasında dalgalı görünüm ve bölgesel kalınlaşma dikkati çekti (Şekil 4.10). Farklı alan değerlendirmelerinde yer yer seminifer tübül duvarında daha az yapısal hasar izlendi. Ancak bazal lamina seyrinde düzensizlik bu tübüllerde de ayırt edildi. Spermatogonyumların ve spermatositlerin mitokondriyonlarında kristalizis, hücreler arasında açılmalar izlendi. Bu grupta interstisyel alandaki Leydig hücrelerinin elektron yoğun sitoplazmalarında vakuolizasyon görüldü (Şekil 4.11). Yapısal hasarın belirgin olduğu tübüllerde büyük büyütmelelerde primer spermatositler arasında boşluklar, sitoplazmalarında vakuoller, hücre sınırlarındaki düzensizlik saptandı (Şekil 4.12-13). Geç spermatidlerin normalde Sertoli hücreleri ile ilişkili olması gerekirken bazı tübüllerde ayrık yerleşim gösterdikleri izlendi (Şekil 4.14). Diğer gruplardan ayrıcalı olarak geç spermatidlerin bazılarında sitoplazmada lipid damlacıklarının birikimi dikkati çekti (Şekil 4.15). Tunika propriya üzerinde yerleşik spermatogonyumlarda dejenerasyonun yanı sıra mitokondriyonlarda kristalizis, şişme ve vakuolizasyon gözlemlendi. Hücreler arası boşlukların genişlediği, spermatositler arası bağlantı birimlerinde açılmaların olduğu belirlendi (Şekil 4. 16). Küçük ve büyük büyütmedeki incelemelerde ara bağ dokuda kollajen lif artışı dikkati çekti. Tunika propriya ve bazal membranın normal yapıda olduğu belirlendi (Şekil 4.17-18). İnterstisiyel alandaki Leydig hücrelerinin sitoplazmasının az yoğun boyandığı, mitokondriyonlarda dejenerasyonun yanı sıra çok sayıda lizozomun varlığı ilgiyi çekti. Profenofosdan ayrıcalı olarak bazı Leydig hücrelerinde apoptozis belirlendi (Şekil 4. 19).

MCPA uygulanan grupta spermatogenik seriyi oluşturan hücreler arasında boşluklar, hücresel dejenerasyon profenofosa karşın hücrelerde yapısal hasar biraz daha belirgindi.



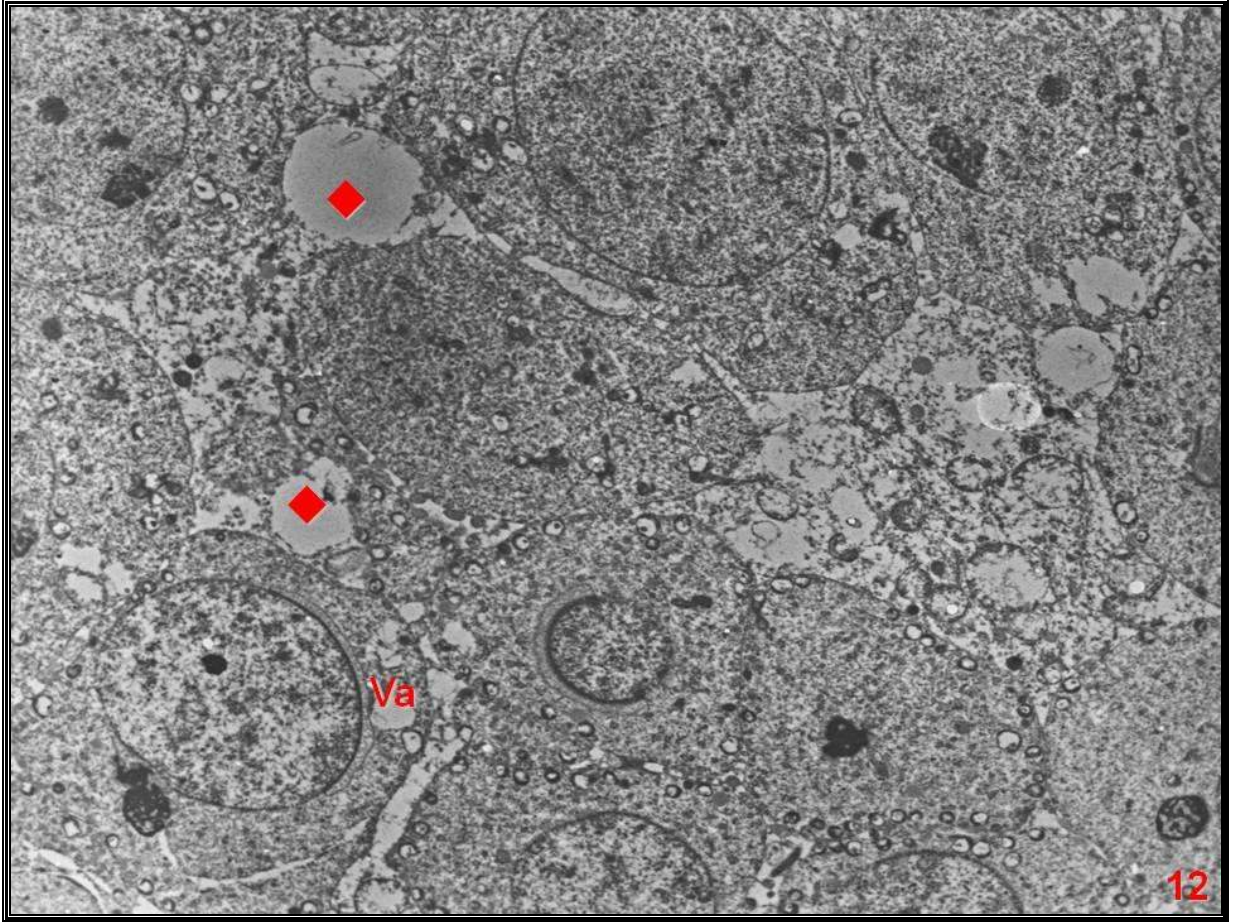
Şekil 4.10. MCPA Grubu elektron mikrografi

Testiste seminifer tübül bazal laminasında (BL) düzensiz seyir ($\Rightarrow$), tübül duvarındaki hücreler arası boşluk (◆) Farklı gelişim evresindeki spermatogenik hücrelerinin bazılarında kromatinin çekirdek (Ç) zarı altında yoğunlaştığı, yer yer bazı hücrelerin sitoplazmasında vakuolizasyon (Va) ve kristalizisli mitokondriyonlar (M) görülüyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X1293).



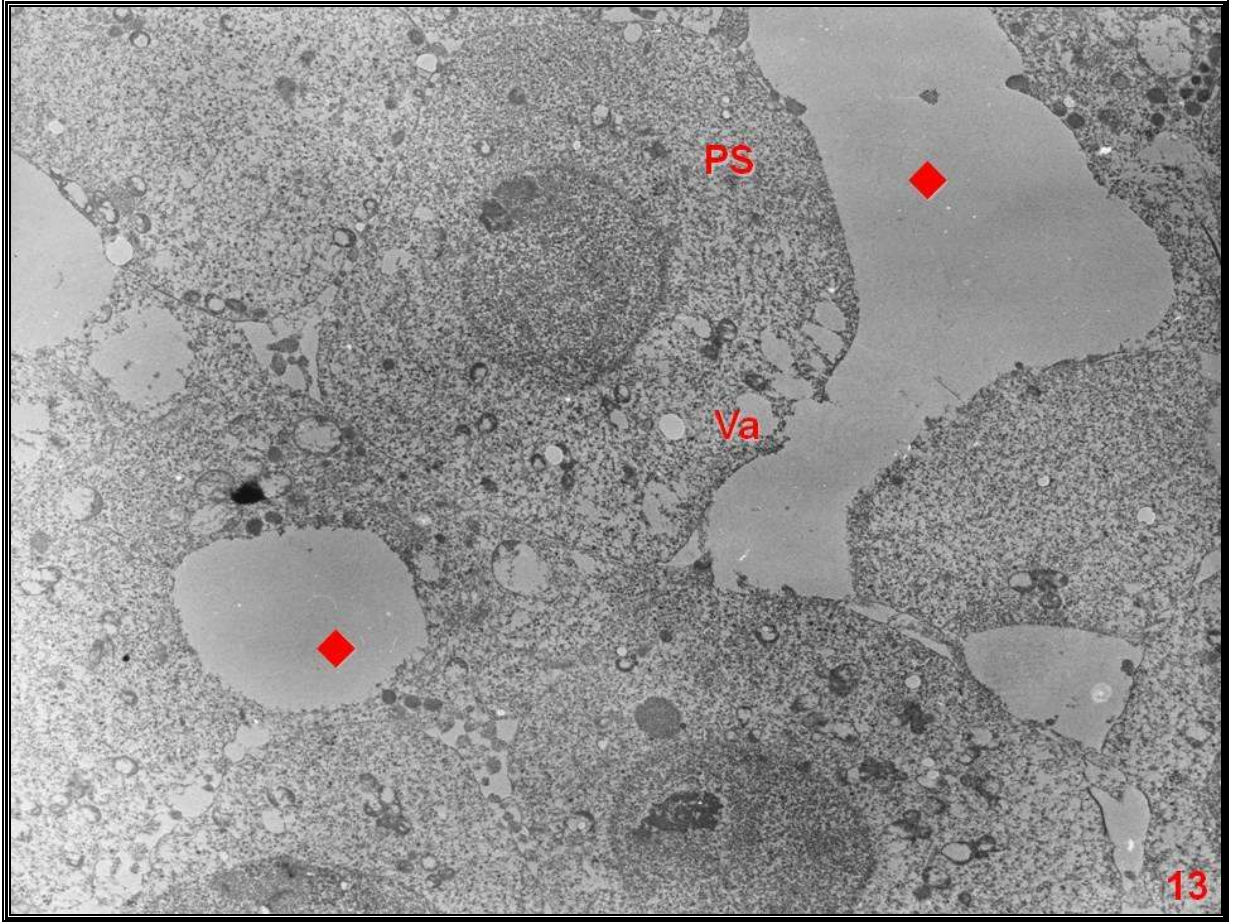
Şekil 4.11. MCPA Grubu elektron mikrografı

Seminifer tübülde bazal membran (BM) seyrinde düzensizlik ($\Rightarrow$), hücreler arasında açılmalar ($\blacklozenge$), spermatogonyumların (SG) ve spermatositlerin (S) mitokondriyonlarında (M) kristalizis, interstisiyel alandaki koyu sitoplazmalı Leydig hücrelerinde (LH) vakuolizasyon (Va) ayırt ediliyor (Uranil asetat&Kurşun sitrat X1670).



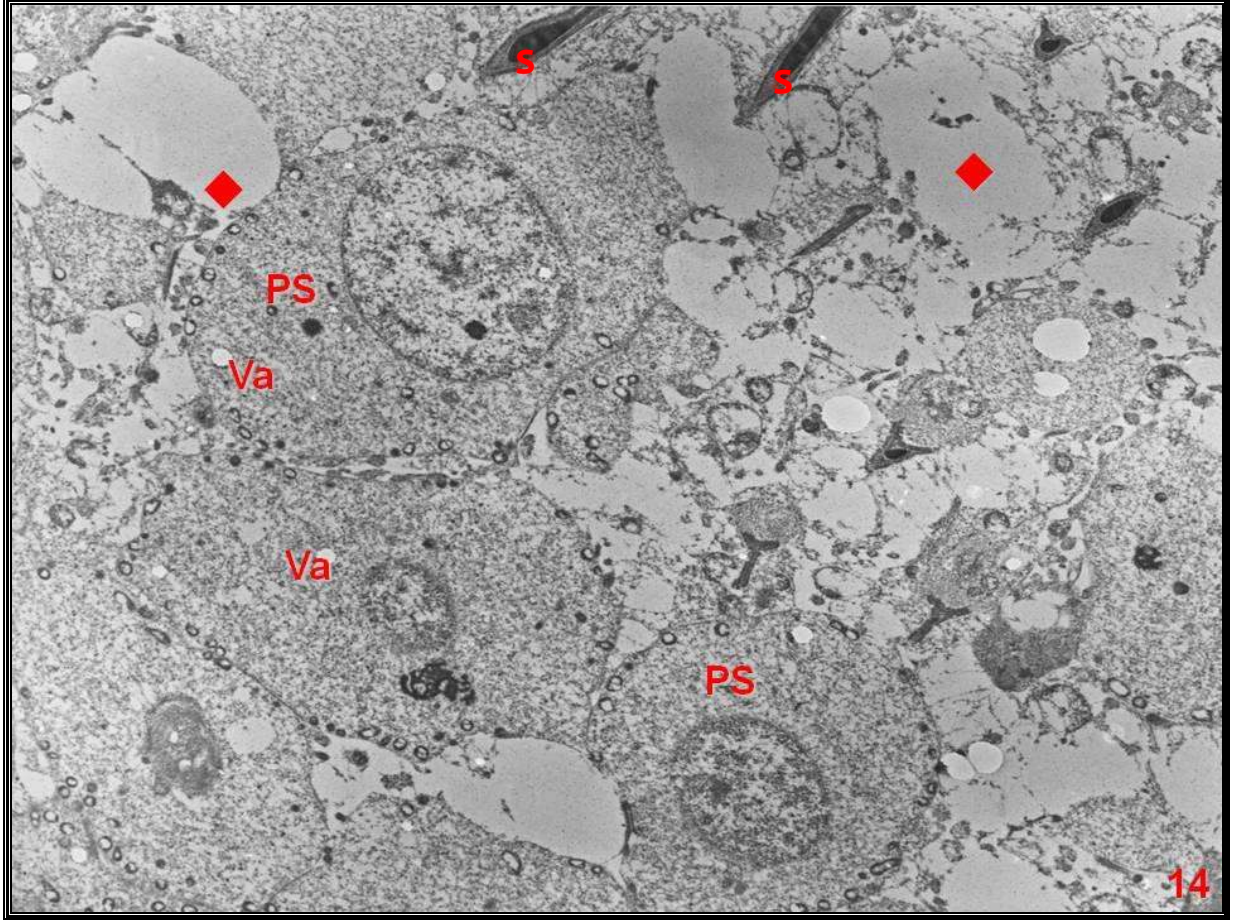
Şekil 4.12. MCPA Grubu elektron mikrosrafı

Yapısal hasarın belirgin olduğu tübüller de büyük büyütme de gelişmekte olan hücreler arasında boşluklar (◆), sitoplazmalarında vakuoller (Va) gösteriliyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X2156).



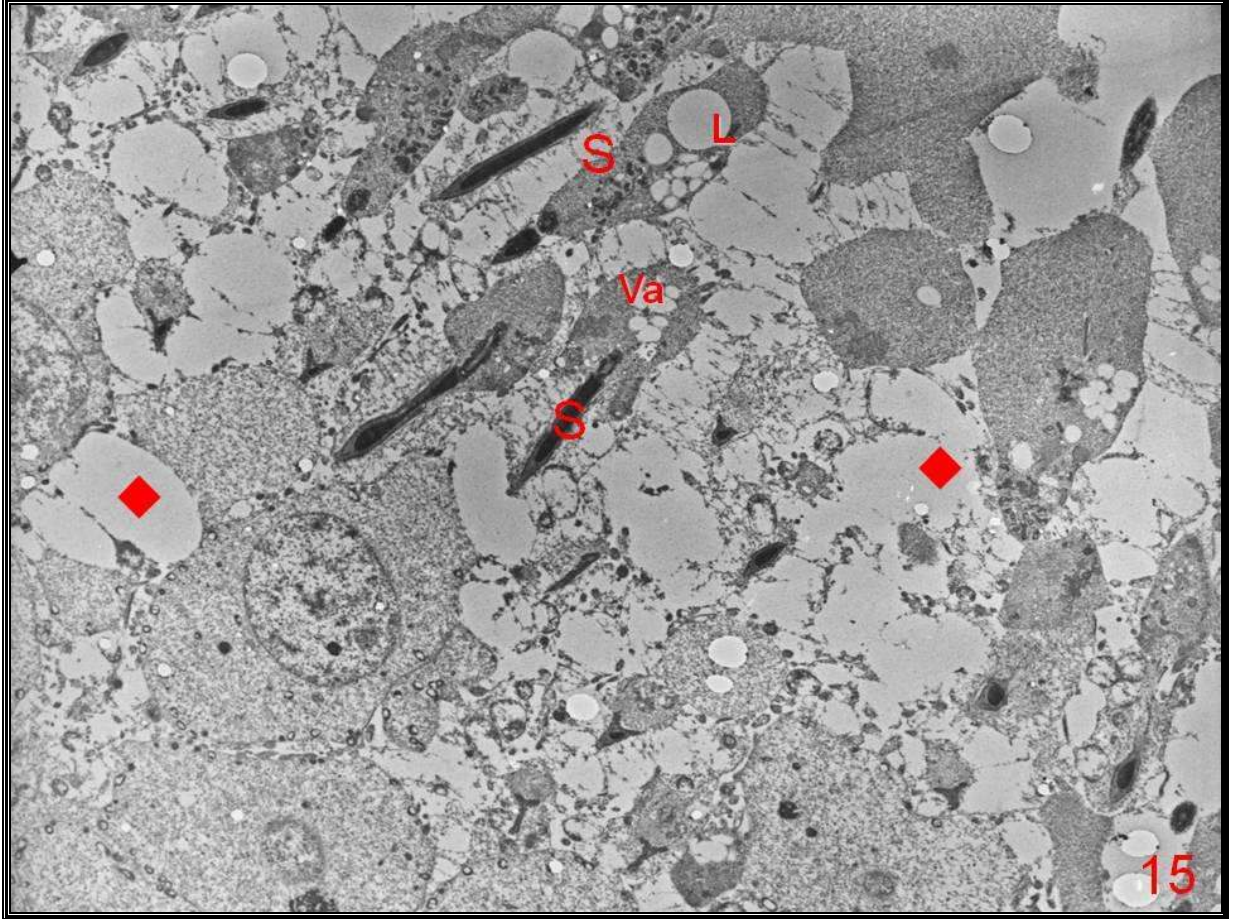
Şekil 4.13. MCPA Grubu elektron mikrografi

Büyük büyütmede primer spermatosit (PS) sitoplazmasında vakuoller (Va) hücreler arasında boşluklar (◆) gösteriliyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X2784).



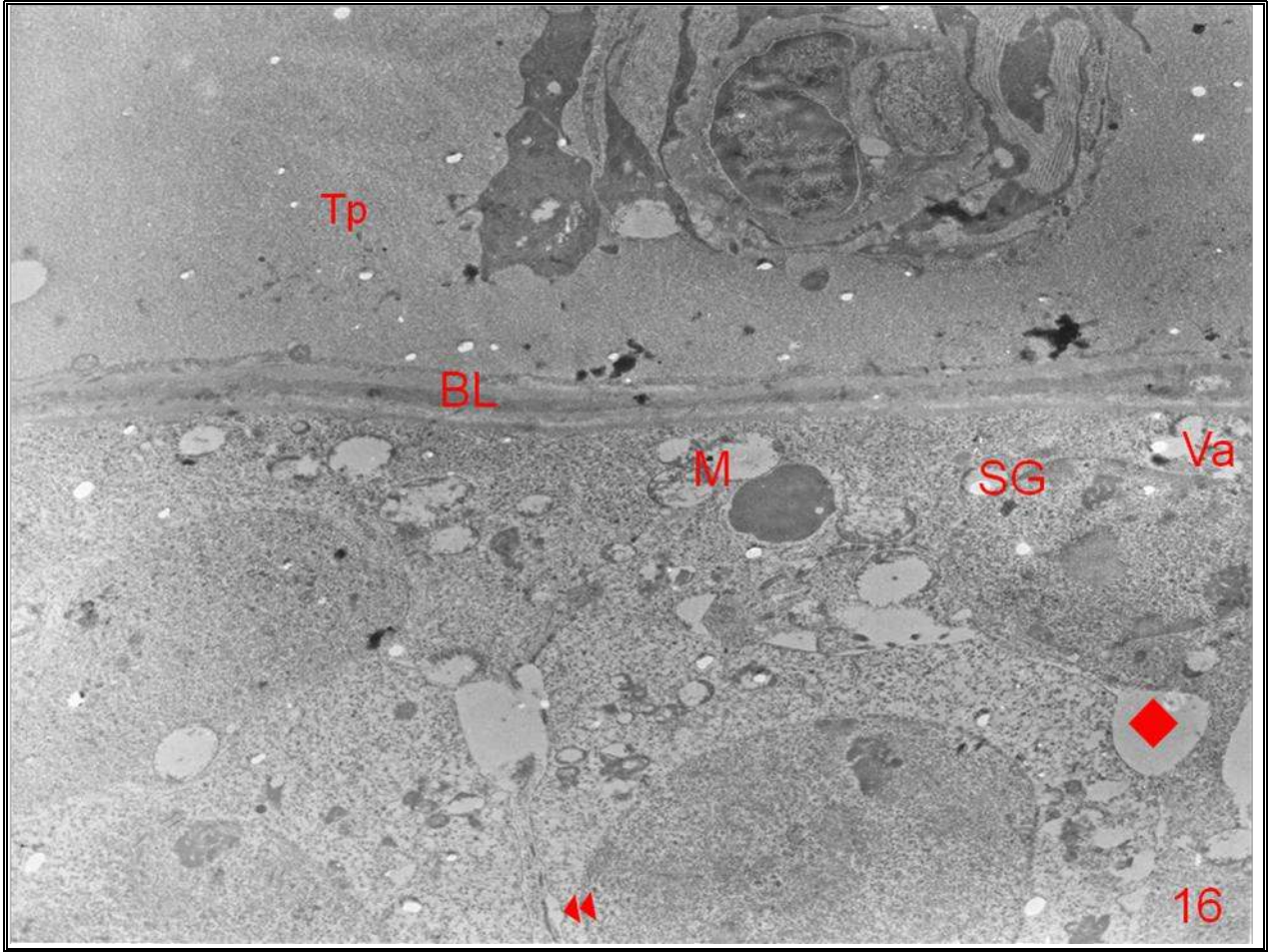
Şekil 4.14. MCPA Grubu elektron mikrografı

Yapısal hasarın ileri derecede izlendiği tübüllerde primer spermatositler (PS) arasında boşluklar (◆) geç spermatidlerin (S), Sertoli hücreleri ile olan bağlantılarını yitirdikleri ayırt ediliyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X2156).



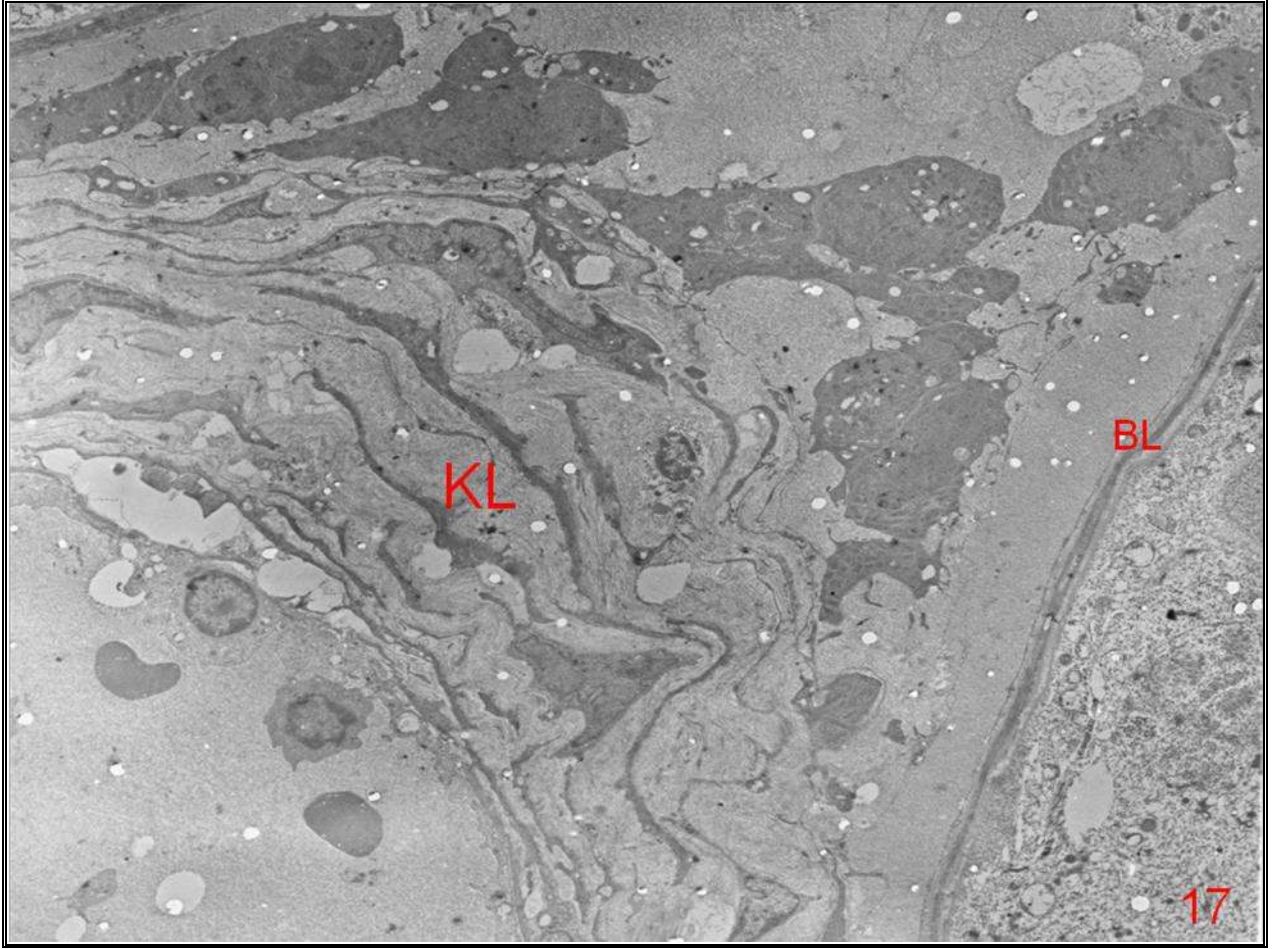
Şekil 4.15. MCPA Grubu elektron mikrografı

Seminifer tübül duvarındaki geç spermatidlerin (S) bazılarında sitoplazmada lipid damlacıkları (L), vakuoller (Va) birikimi, hücreler arası açılmalar (◆) izleniyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X1670).



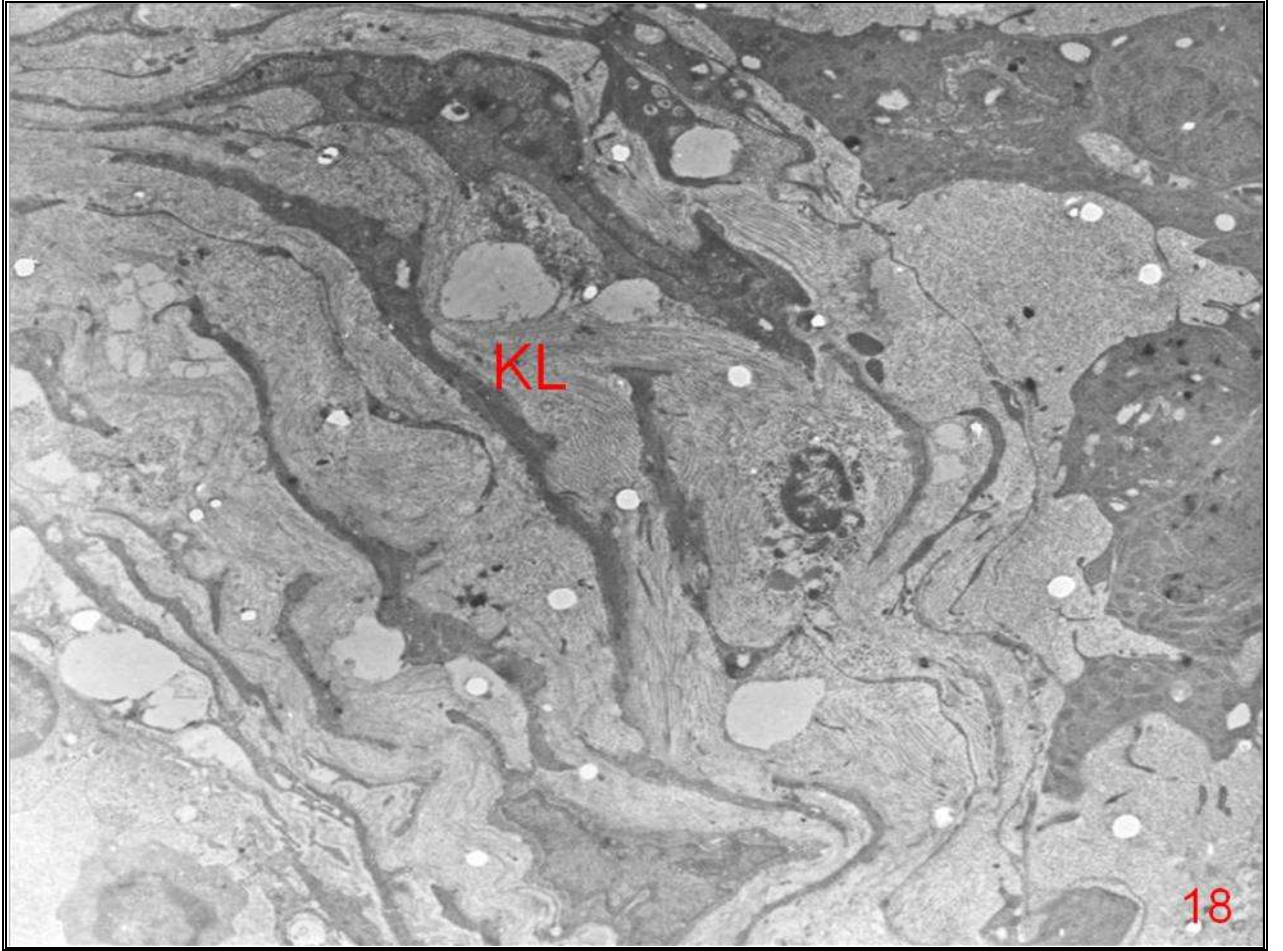
Şekil 4.16. MCPA Grubu elektron mikrografı

Tunica propriya (Tp) üzerinde yerleşik spermatogonyumlarda (SG) vakuolizasyon (Va), mitokondriyonlarda (M) kristalizis, hücreler arası boşlukların (◆), spermatositler arası bağlantı birimlerinde dilatasyonun (↗) olduğu görülüyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X2784).



Şekil 4.17. MCPA Grubu elektron mikrografi

Testiste tunika propriya (Tp), kollajen lif (KL) artışı ve bazal lamina (BL) görülüyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X1670).



Şekil 4.18. MCPA Grubu elektron mikrografı

Büyük büyütmede kollagen lif (KL) dağılımı izleniyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X2784).



Şekil 4.19. MCPA Grubu elektron mikrografı

İnterstisyel alandaki açık sitoplazmalı Leydig hücreleri (LH), çekirdekleri (Ç), kirtalizisli mitokondriyonlar (M), lizozomlar (Lz) izlenirken apoptotik Leydig hücreleri (*) varlığı ayırt ediliyor (Uranil asetat - Kurşun sitrat, orijinal büyütme X3597).

4.2. Biyokimyasal Bulgular

Serbest testosteron ölçümünde testosteron değeri kontrol grubu ilk ölçümleri için 3.4600 ± 1.73 pg/ml, kontrol grubu son ölçümleri için 2.0700 ± 2.80 pg/ml 'dir. Profenofos grubu serbest testosteronun ilk ölçümleri için 6.3300 ± 3.64 pg/ml ve son ölçümleri 1.85 ± 1.40 pg/ml olarak tespit edilmiştir. MCPA ilk ölçümleri için 3.59 ± 1.98 pg/ml aralığında iken uygulama sonrası serbest testosteron değeri 2.49 ± 2.16 pg/ml'dır (Tablo 4.1).

Toplam testosteron ölçümünde testosteron değeri kontrol grubu ilk ölçümleri 223.91 ± 112.44 ng/dl, kontrol grubu son ölçümleri 109.11 ± 77.79 ng/dl olarak ölçülmüştür. Kontrol grubu serbest ve toplam testosteron ölçümleri arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 4.1) (Şekil 4.20).

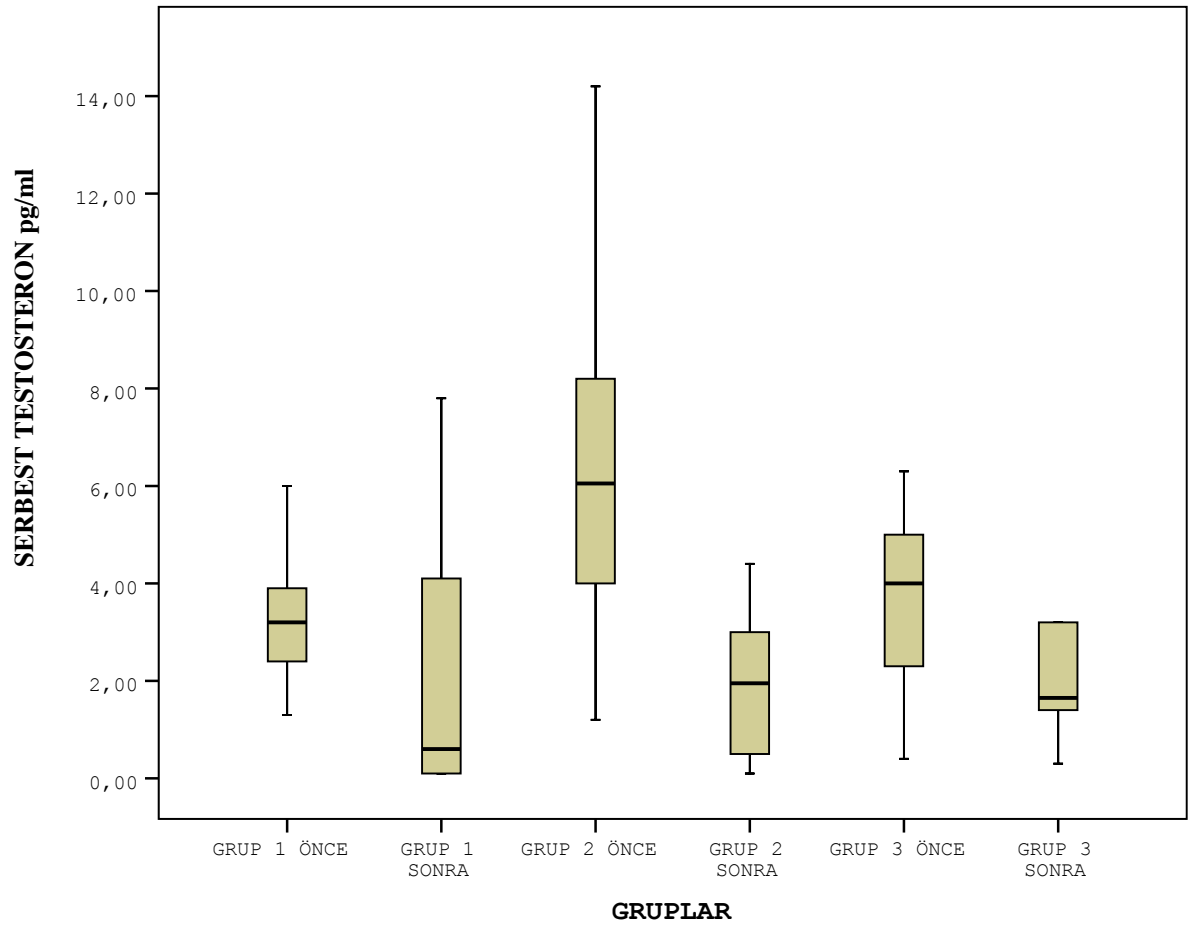
Profenofos grubunun toplam testosteron ilk ölçümleri 369.10 ± 234.62 ng/dl aralığındayken uygulama sonrası toplam testosteron düzeyi 108.18 ± 53.88 ng/dl olarak belirlenmiştir. Serbest ve toplam testosteron ölçümünde testosteron değeri profenofos grubu önce ve sonrasında ($p < 0,05$ olduğundan) istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır (Tablo 4.1).

MCPA grubunda toplam testosteron değeri 222.85 ± 102.01 ng/dl ve uygulama sonrası MCPA 201.62 ± 164.79 ng/dl'dur. Serbest ve toplam testosteron ölçümünde testosteron değeri MCPA grubu önce ve sonrasında ($p < 0,05$ olduğundan) istatistiki olarak anlamlı bir farklılık vardır (Tablo 4.1) (Şekil 4.21).

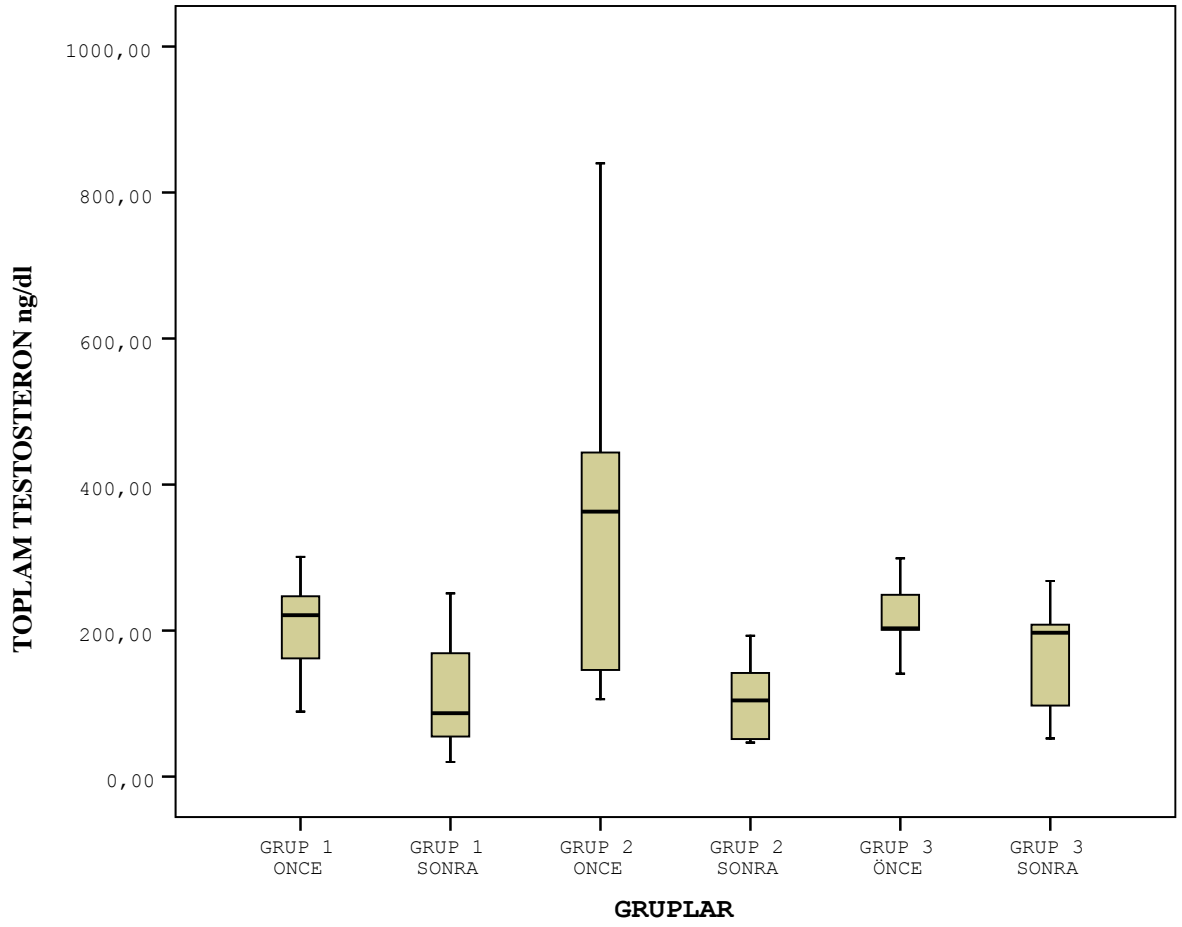
Tablo 4.1. Serbest Testosteron ve Toplam Testosteron düzeylerinin uygulama öncesi ve uygulama sonrası istatistik değerlendirmelerin özetlenmesi (Willcoxon z istatistiği)

	Ortalama	Örnek genişliği	Standart sapma	Standart hata	Medyan	Min-maks	WILLCOXON Z	Anlamlılık (p)
SERBEST TESTOSTERON GRUP 1 ÖNCE	4.2600	10	0.80028	0.25307	4.1500	3.2 – 5.80	-1.071	0.309
SERBEST TESTOSTERON GRUP 1 SONRA	4.5860	10	0.57371	0.18142	4.4550	3.87 – 5.80		
SERBEST TESTOSTERON GRUP 2 ÖNCE	6.3300	10	3.64022	1.15114	3.6300	1.06- 8.40	-2.547	0.011*
SERBEST TESTOSTERON GRUP 2 SONRA	1.8500	10	1.40337	.44378	1.0435	0.4660- 19.300		
SERBEST TESTOSTERON GRUP 3 ÖNCE	3.5900	10	1.98520	.62777	0.203	0.5550- 4.4800	1.274	0.020*
SERBEST TESTOSTERON GRUP 3 SONRA	2.4900	10	2.16562	.68483	0.1970	0.52 – 6.25		
TOPLAM TESTOSTERON GRUP 1 ÖNCE	244.910	10	26,50367	8,38120	242	213- 301	-1.071	0.720
TOPLAM TESTOSTERON GRUP 1 SONRA	238.900	10	35,48536	11,2215	240.5	169- 312		
TOPLAM TESTOSTERON GRUP 2 ÖNCE	369.1000	10	234.62710	74.19560	363	106- 840	-2.497	0.013*
TOPLAM TESTOSTERON GRUP 2 SONRA	108.1800	10	53.88953	17.04137	104.35	46- 193		
TOPLAM TESTOSTERON GRUP 3 ÖNCE	222.8500	10	102.01200	32.25903	203	55- 448	-0.764	0.045*
TOPLAM TESTOSTERON GRUP 3 SONRA	201.6200	10	164.79365	52.11233	197	52- 625		

* p<0.05



Şekil 4.20. Gruplar arasında uygulama öncesi ve uygulama sonrası serbest testosteron düzeyi



Şekil 4.21. Gruplar arasında uygulama öncesi ve uygulama sonrası toplam testosteron düzeyi.

Tablo 4.2. Serbest ve Toplam Testosteron ölçümlerinin önce ve sonrasında kontrol (Grup 1), profenofos (Grup 2) ve MCPA (Grup 3) gruplarının istatistiksel olarak değerlendirilmesi.

	GRUPLAR	N	Ortalama rank değerleri	Ortalama	Medyan	Standart Hata	Kruskal Wallis	p
Serbest Testosteron önce	Grup 1	10	12.65	3.46	3.25	0.55	5.161	0.076
	Grup 2	10	20.65	6.33	6.05	1.15		
	Grup 3	10	13.20	3.59	4.00	0.62		
Serbest Testosteron sonra	Grup 1	10	5.50	2.07	0.60	0.88	21.123	0.000*
	Grup 2	10	17.90	108.18	104.35	17.04		
	Grup 3	10	23.10	261.62	197.00	52.11		
Toplam Testosteron sonra	Grup 1	10	13.80	223.91	221	35.55	2.658	0.265
	Grup 2	10	19.20	369.10	363.00	74.19		
	Grup 3	10	13.50	203.00	203.00	32.25		
Toplam Testosteron sonra	Grup 1	10	13.30	109.11	86.75	24.60	3.92	0.141
	Grup 2	10	13.20	108.12	104.35	17.04		
	Grup 3	10	20.00	201.62	197.00	52.11		

* p<0.01

Kruskal Wallis tablosu sonuçlarına göre Serbest Testosteron için ilk hallerinde ($\chi^2=5.161$, $p=0.076$) $p>0,05$ olarak bulunmuştur (H_0 kabul). Buna göre, gruplara göre testosteron ortalamaları bakımından en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu söylenemez (Tablo 4.2).

Kruskal Wallis tablosu sonuçlarına göre Serbest Testosteron için son hallerinde ($\chi^2=21.123$, $p=0.000$) $p<0,05$ olarak bulunmuştur (H_0 red). Buna göre, gruplara göre testosteron ortalamaları bakımından en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu söylenir (Tablo 4.2). Hangi gruplar arasında farklılık olduğu tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.3. Gruplar arası ndaki anlamlı çıkan değişkenlerin çoklu karşılaştırma sonuçları

Grup1 – Grup 2	<0.05*
Grup1 – Grup 3	<0.05*
Grup2 – Grup 3	<0.05*

Kruskal Wallis tablosu sonuçlarına göre Toplam Testosteron için ilk hallerinde ($\chi^2=2.658$, $p=0.265$) $p>0,05$ olarak bulunmuştur (H_0 Kabul). Buna göre, gruplara göre testosteron ortalamaları bakımından en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu söylenemez.

Kruskal Wallis tablosu sonuçlarına göre Toplam Testosteron için son hallerinde ($\chi^2=3.920$, $p=0.141$) $p>0,05$ olarak bulunmuştur (H_0 Kabul). Buna göre, gruplara göre testosteron ortalamaları bakımından en az bir grubun diğerlerinden farklı olduğu söylenemez.

5. TARTIŞMA

Pestisit, EPA (Environmental Protection Agency) tarafından herhangi bir zararlıyı uzaklaştırmak, azaltmak, baskılamak ya da bozmak için kullanılan bir madde ya da madde karışımı olarak tanımlanmaktadır. Pestisit; kimyasal bir maddenin yanı sıra, virüs ya da bakteri gibi biyolojik ajan da olabilmektedir (56). Pestisitler, doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi sentetik olarak da üretilmektedir.

Profenofos, iyi bilinen bir organofosforlu pestisid olup 20 yıldan fazla bir süredir pamuk ve tütün Lepidopteron böceklerini kontrol amacıyla tarımda kullanılmaktadır. Profenofosun akut toksik etkisi asetilkolin esterase aktivitesinin inhibisyonudur, bu da insanlarda toksisite ile sonuçlanmaktadır (57).

Bu organofosforlu pestisitler bazı ülkelerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunların yalnızca genotoksik ajanlar olmayıp pek çok biyokimyasal yolağı da olumsuz etkilediği bildirilmiştir. 2006 yılında yayınlanan bir çalışmada in vitro koşullarda insan periferik kanında apoptoz ve nekroz araştırılmıştır. İmmün hücrelerin istatistiksel olarak anlamlı ölçüde organofosforlu pestisitlerden olumsuz etkilendiği bildirilmiştir (58).

Somatik ve germ hücre kromozomları üzerinde farklı organofosforlu pestisitlerin etkilerini değerlendirmek için yapılan çalışmada sıklıkla buprofezin, petrol yağı ve profenofos bileşikleri seçilmiştir. Bu kimyasallar letal dozlarının 1/4 'i, 1/8'i ve 1/16'i oranında kemik iliği hücre kültürüne uygulandığında 24 saat sonra dozdan bağımsız olarak somatik kromozomal sapmanın profenofos uygulanan gruplarda arttığı bildirilmiştir. Araştırmacılar profenofos uygulanan grupta germ hücrelerinde de profenofosun kromozomal sapmalarda daha etkin olduğunu bildirmişlerdir (59).

Organofosfor grubu maddelerin erkek genital sistemine özellikle de spermatogeneze etkisi bilinmektedir. Profenofosun, spermatogeneze etkisini yapısal düzeyde belirlemek amacıyla sıçanlar üzerinde bir çalışma yapılmış ve testiküler epitel ile Leydig hücrelerinde dejeneratif değişiklikler saptanmıştır (7).

Sıçan testisi üzerinde yapılan histomorfolojik çalışmada organofosfor insektisit kirleticilerden kinlfos testis germinal epitelinde dejeneratif değişikliklerle birlikte seminifer tübüllerinin çapında da daralmaya neden olmuş ve testiküler atrofi oluşturmuştur (60).

Üreme bazındaki toksisitesini göstermek amacıyla profenofos farelere verilmiş ve spermatogon hücrelerde kromozomal anomaliler ve sperm anormallikleri tespit

edilmiştir. Kromozomal anomalide anlamlı artış, spermatogonal hücrelerde; sperm anormalliklerinde anlamlı artış ve sperm sayı ve hareketinde anlamlı düşüş ile spermlerde yapısal hasar gösterilmiştir (61).

Organofosfor insektisitlerin (klorprifos metil, diazinon, profenofos) erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerini araştırmak üzere sıçanlar üzerinde bir çalışma yapılmıştır. Çalışmada, erkek üreme organlarının ağırlıkları ölçülmüş, cinsiyet steroid hormonların seviyesine bakılmış, spermatozoaların morfolojileri değerlendirilmiş ve histopatolojik değerlendirme yapılmıştır (2). Sonuç olarak organofosfor pestisitlerin testis ve vezikula seminalis ağırlıkları üzerine etkilerinin doza bağımlı olduğu ve 50 ppm dozda iken testis ve vesicula seminalis'in ağırlıkları üzerinde belirgin derecede azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca yüzde olarak en fazla etkiye neden olan organofosfor bileşiğin diazinon olduğu ve testis ağırlığında %62.2 ; vezikula seminalis ağırlığında %64.5 oranında azalmaya neden olduğu saptanmıştır. Diğer taraftan, epididimis ve prostat bezlerinin ağırlıklarında belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir. Aynı çalışmada serum asetilkolin esteraz düzeylerine de bakılmıştır ve bütün organofosfor pestisitlerin serum kolinesteraz düzeyinde belirgin azalmaya neden olduğu görülmüştür. Serum kolinesteraz üzerindeki inhibitör etkisi yüzde olarak en fazla olan yüksek konsantrasyonlardaki diazinondur; bunu sırasıyla CPM ve profenofos takip eder (62).

Bizim çalışmamızda da profenofos grubunun elektron mikroskopik incelemelerinde seminifer tübül epitelinde dejeneratif değişiklikler saptanmıştır. Seminifer tübül hücrelerinde çok sayıda iri rezidüel cisim oluşumu, iri lipid damlacıkları, yaygın vakuolizasyonla birlikte mitokondriyonlarda anormal şekil, şişme ve kristalizis görülmüştür. Ayrıca interstisiyel dokudaki Leydig hücrelerinde mitokondriyal dejenerasyon ve otofajik vakuollerin varlığı belirlenmiştir. Profenofos spermatogenezi olumsuz etkilemiş, spermatogenik seriyi oluşturan hücrelerin arasında büyük boşlukların şekillendiği görülmüştür. Sertoli hücrelerinde de çok sayıda rezidüel cisim oluşumu ve mitokondriyonlarında ileri derecede kristalizis belirlenmiştir. Seminifer tübül bazal laminasında da dejeneratif değişiklikler gözlenmiş olup bazı tübüllerde bazal lamina şeklinin düzensizleştiği ve yer yer ayrılmalara olduğu saptanmıştır. Ara bağ dokudaki Leydig hücrelerinde yer yer mitokondriyonlarda matriks kondensasyonundaki artışın yanı sıra şişme ve vakuol oluşumu dikkati çekmektedir. Bu yapısal dejeneratif olguların yanı sıra testosteronun biyokimyasal ve istatistiksel olarak anlamlı derecede azalması spermatogenezi olumsuz yönde etkileyerek spermin sağlıklı gelişimini engellediğini ve pestisit aracılı infertiliteye neden olabileceğini düşündürmektedir.

2000'de Sarkar ve arkadaşlarının, 2001'de Gore'nin çalışmalarında da üreme işlevlerini bozan pek çok çevresel kimyasalın aynı zamanda merkezi sinir sistemi üzerinde de olumsuz etkileri olduğunu bildirmişlerdir. Bu maddelerin nöroendokrin bozucular olarak hipotalamo-pituiter-gonadal yolakta etkili olduğunu bildirmişlerdir (62,63).

1953'te Herken ve Neubert'in çalışmalarına göre organofosforlar; asetilkolin esterase inhibisyonu yoluyla nöroendokrin bozucu olarak işlev görürler ve beyinde asetilkolin seviyelerinin artmasına neden olurlar (63). 2003'te Karanth ve Pope, 2004'te McDaniel ve Moser, 2007'de Farag ve arkadaşlarının çalışmalarının sonucunda organofosfora etkin bırakılan sıçanlarda kolinesteraz aktivitesinin belirgin şekilde azaldığı görülmüştür (64-67).

Lyons'un 1999 yılında yaptığı çalışmada, organofosfor pestisitlerin asetilkolinesteraz aktivitesini azaltıcı ve sinir uyarılarını engelleyici etkisi ile gonadotropik hormonları uyaran hormon salınımının azalması ile bağlantılı olduğunu bildirmiştir (68). Bu veriler biyokimyasal analizlerimizde plazma testosteron seviyesinin anlamlı ölçüde düşük olmasının bir nedeninin de gonadotropin uyaran hormonların serumda azalmasından kaynaklandığını düşündürmüştür.

Yüksek konsantrasyonda organofosfor pestisit uygulanan sıçanlarda sperm motilite yüzdeleri belirgin şekilde azalmıştır ve en az insidans diazinon'da saptanmıştır (2). Fertil ve infertil erkekler arasındaki ayrımının yapılmasında; sperm konsantrasyonundan çok; sperm morfolojisine bakmanın daha anlamlı olduğu çalışmalarda belirtilmiştir. Bu nedenle profenofosun sperm morfolojisi etkisine yoğunlaşan araştırmacılar incelemelerinde spermelerde kıvrık kuyruk, helozonik kuyruk ve protoplazmik damlacıkların varlığını saptamışlardır. Bütün yapısal bozukluklar arasından yüzde olarak en fazla görüleni kıvrık kuyruk olgusudur (bent tail) (69).

Bizim çalışmamızda da profenofosun spermatogenik seri hücrelerine ince yapı düzeyinde dejeneratif etkisi; özellikle mitokondriyonlar üzerinde olmuştur. Anormal şekilli farklı büyüklüklerdeki mitokondriyonların varlığı yanında vakuolizasyon ve kristalizisin görülmesi sağlıklı bir spermatogenezin gerçekleşmesini engellediğini düşündürmüştür.

Nour El-Hoda A.Zidan, 2009 yılında yaptıkları çalışmalarında organofosforlu pestisit uyguladıkları sıçanlarda testosteron seviyelerinde belirgin derecede azalma saptamışlardır. Bu etkinin yüksek konsantrasyonda (50 ppm) fazla; düşük konsantrasyonda az olmak üzere testosteron seviyelerinde düşme gördüklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar serum LH ve FSH seviyelerindeki belirgin azalmanın ise yalnızca yüksek konsantrasyonda organofosforlu pestisit uygulanan sıçanlarda gözlemlendiğini bildirmişlerdir

(2). Testosteron temel olarak testislerdeki interstisyel Leydig hücrelerinden, daha az olarak da adrenal bezlerden ve ovaryumlardan sentezlenen 288.4 dalton ağırlığında bir hormondur. Bu nedenle, testisler erkek cinsiyet hormonlarının, androjenlerin üretiminden ve spermatozoa üretiminden sorumludur. Hem cinsel güç (potens) açısından, hem de salgılama miktarı açısından en önemli androjen olan testosteron kuvvetli bir anabolik hormondur. Testosteron ikincil erkek cinsiyet karakterlerinin gelişmesi ve spermatogenez için mutlaka olmalıdır. Testosteron testislerdeki interstisyel Leydig hücrelerinden LH etkisiyle salgılanır (70,71). Krause'e göre azalmış testosteron seviyeleri, Leydig hücrelerinin doğrudan hasarına veya bu hücrelerin LH tarafından azalmış stimülasyonuna bağlı olarak görülebilir (72). Literatürde farklı dozlarda organofosforlu pestisit uygulanan sıçanlarda testosteron seviyelerinde azalma olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Bu çalışmalarda LH ve FSH seviyelerindeki azalmaya ve gonadlarda oluşan defektlerin eşlik ettiği bildirilmiştir. Abd-el Aziz ve arkadaşları 1994'te, diazinon'un; genital organların ağırlıklarının azalmasına, anormal ve ölü spermatozoonların artışına bağlı motilite azalmasına ve plazma testosteron seviyelerinin düşmesine neden olduğunu belirtmiştir (72-76). Diğer çalışmalarda da, klorprifos, fenthion, fenitrition ve dimethoate gibi organofosforlu pestisitlerin androjen reseptör antagonisti gibi davrandıklarını veya gonadotropin sentezi veya steroidogenesis ile bağlantılı gen ekspresyonunu engelledikleri gösterilmiştir (73,77,78). 1995'te Sinha ve arkadaşları gonadotropinlerdeki azalmanın testislerdeki sperm yoğunluğundaki azalmayla bağlantılı olabileceğini öne sürmüşlerdir (79).

Moustafa ve arkadaşları (2007) profenofosu, erkek sıçanlara 65 gün boyunca haftada iki defa 17.8 mg/kg dozunda oral olarak uygulamışlardır. Profenofos'un sıçan testisinde erkek cinse özgü gen ekspresyonu üzerine etkilerini inceleyen araştırmacılar testislerdeki gen ekspresyonu DNA mikroarray analizi ve RT-PCR ile; sitokrom P450 17A1'i de kapsayan steroidogenesis genleri, StAR ve CYP 11A1'de anlamlı bir artış belirlemişlerdir. Testislerde seminifer tübüller arasında belirgin ödem, Leydig hücrelerinde yapısal hasarların yanı sıra spermatogenik seri hücrelerinde de vakuol oluşumu saptamışlardır (7).

Bizim çalışmamızda da Moustafa ve arkadaşlarının bulgularına benzer olarak profenofos ve MCPA uygulamaları sonucu seminifer epiteli oluşturan hücreler arasında boşlukların şekillendiği belirlenmiştir.

2008 yılında Moustafa ve arkadaşlarının benzer bir diğer çalışmasında Wistar sıçanlar üzerinde profenofos'un erkeklere özgü sitokrom P450 (CYP) enzimleri üzerine

etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla 65 gün boyunca haftada iki kez 17.8 mg/ kg oral yoldan profenofos uygulanmıştır. Profenofos, hepatik ve testiküler CYP2C11 seviyelerini ve CYP3A2 mRNA ve protein ekspresyonunu downregüle etmiştir. Kontrol gruplarıyla kıyaslandığında profenofos uygulanan sıçanlarda testiküler aromataz (CYP19A) mRNA'sı azalmıştır. Ayrıca çalışmada organofosforlu pestisit olan profenofos'un erkeğe özgü CYP enzimleri üzerine bir endokrin bozucu olduğu ve testostere seviyelerinde de azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (80).

Bizim çalışmamızda da serbest testostere ve toplam testostere seviyelerinin ölçümünde; testostere değerinin profenofos grubunda anlamlı olarak azaldığı belirlenmiştir ($p<0,05$).

Histolojik yapı açısından değerlendirildiğinde, organofosfor pestisitler uygulanan sıçanların testislerinde normal testiküler yapı vardır ancak seminifer tübüllerde konjesyon belirlenmiştir (2). Çalışmamızda da profenofos grubunda yer yer bazı seminifer tübüllerinin doğal yapısını koruduğu izlenirken bazı seminifer tübüllerde ise spermatogenik seri hücrelerin ileri derecede dejenere olduğu belirlenmiştir.

Organofosforlu pestisitlerin yanı sıra tarım alanında organoklorlu herbisitler de sıklıkla kullanılmaktadır. Literatürde, BGD olarak da işlev gören bu kimyasalların fertilitte üzerinde olumsuz etkilerinin sözü edilmektedir.

Klorofenoksi bileşenleri selektif (özümlü) herbisitler olup, tüm dünyada istenmeyen otların kontrolünde yaygın bir şekilde kullanılmaktadırlar. Bu ailenin farklı üyelerinin Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da kullanımları bazı açılardan farklılıklar göstermektedir. Örneğin; 2,4-D Amerika'da yabancı otlara karşı kullanılan esas herbisit olmasına rağmen, Batı Avrupa'da kullanımı daha azdır ve Batı Avrupa'da 2,4-D değil, MCPP major herbisit olarak kullanılmaktadır. MCPA'nın Avrupa'daki market payı Amerika'dan daha fazladır. Son on yıl boyunca klorofenoksi herbisitlerin insanlarda belli kanser çeşitlerine neden olabilme potansiyelleri hakkında araştırmalar yapılmıştır. Laboratuvar hayvanları ya da hücre kültürleri ile yapılan toksikolojik çalışmalarda elde edilen kanıtlar, gözlemsel epidemiyoloji ile saptanan biyolojik olasılıklarla ilgili bulguların değerlendirilmesinde kullanışlı olmuştur. Kronik toksisite ve karsinojenite ilgili olarak 24 ay boyunca erkek ve dişi Wistar sıçanlardan oluşan gruplara 0, 20, 80 ve 320 ppm MCPA uygulanmıştır. 80 ppm ve üzeri dozlarda toksisite saptanmıştır. Hedef organlar ise, böbrekler, karaciğer ve kırmızı kan hücreleridir. 20 ppm ile uygulanan grupta MCPA bağımlı etkiler gözlenmemiştir. Bu dozların hiçbirinde toplam veya spesifik neoplazm insidansında bir artış söz konusu olmamıştır. Benzer şekilde, 2 yıl boyunca B6C3F1 farelere 20, 100 ve 500

ppm dozlarında MCPA verilmiş ve en yüksek doz ile uygulanan grupta böbrek toksisitesi gelişmiş; ancak karsinojenik bir yanıt oluşmamıştır.

Elo ve Parvinen 'in Organoklorlu bir herbisit olan MCPA'nın testis üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmada; 9 haftalık Sprague-Dawley sıçanlara 190 mg/kg MCPA verilmesi sonucu istatistiksel olarak anlamlı ölçüde değişen seminifer tübül epitelinde bozulma ve piknotik çekirdek saptamışlardır. (6).

2006 yılında Sadlonova ve arkadaşlarının çalışmasında 90 gün 0,1 ve 1,5 mg/kg MCPA uygulaması yapılan köpeklerde biyokimyasal ve histolojik değişimler gözlenmiştir. Araştırmacılar testis ağırlıklarında azalma ile birlikte ışık mikroskopik değerlendirmelerinde bazı alanlarda testiküler atrofi, spermatogenik hücrelerde azalma belirlerken Sertoli hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde herhangi bir yapısal hasar olmadığını vurgulamışlardır (46).

2002 yılında yayınlanan deneysel çalışmada dünyada en çok kullanılan ikinci herbisit olan Tordon'un etkileri değerlendirilmiştir. Tordon 2,4-diklorofenoksasetik asit (2,4-D) ve 4-amino-3,5,6-trikloropikolinik asit olmak üzere iki aktif bileşeni olan ticari bir üründür. Çalışmada sıçanlara 9 hafta boyunca oral yolla 0.125 ml/kg (düşük doz), 0.25 ml/kg (normal doz) ve 0.5 ml/kg (yüksek doz) dozunda Tordon 75D® uygulanmış ve kontrol grubu deneklerde su verilmiştir. Uygulamanın 1., 2. ve 4. haftasında kan örnekleri alınmış ve 9 haftanın sonunda da testis dokuları incelenmiştir. Özellikle yüksek doz uygulaması yapılan deney grubunda testis 4 hafta yüksek doz Tordon 75D® uyguladıkları deney grubunda seminifer tübüllerde, hücreler arasında geniş boşluklar izlenirken, 9 hafta yüksek doz Tordon 75D® uygulanan grupta, tübüllerin daraldığı ve germ hücrelerinin tükendiğini belirten araştırmacılar uzun süre yüksek doz uygulamasının sonucunda, nekrotik hücreler ve multinükleer dev hücrelerin şekillendiğini saptamışlardır. 1 haftalık iyileşme periyodundan sonra da uzun süre yüksek doz uygulanan deney grubunda yer yer bazı seminifer tübüllerin yalnızca Sertoli hücreleri ve tükenmekte olan germ hücreleri içerdiği görülürken bazı tübüllerin doğal yapısını koruduğu görülmüştür. Araştırmacılar ayrıca 4 hafta yüksek doz Tordon 75D® uygulanan grupta, bir testis normal ağırlık ve boyutlarda olduğunu diğer testisin normal ağırlık ve boyutunun iki katına çıktığını görmüşlerdir. Büyük olan testiste germ hücreleri içermeyen tübüller ve Leydig hücre hipoplazisi saptamışlardır (81).

Çalışmamızda MCPA uyguladığımız deney grubunda yukarıda sözü edilen çalışmaları destekler tarzda seminifer tübül epitelinde dejeneratif değişiklikler gözlemlenmiştir. Bunlar seminifer tübül bazal membran seyrinde düzensizlik ile birlikte

spermatogonyumların ve spermatositlerin mitokondriyonlarında kristalizisti. Bu hücrelerde spermatogonyum ve spermatositlerin arasında açılmalar mevcuttur. Spermatidler yer yer Sertoli hücresi ile olan bağlantısını yitirmiştir. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinde de bol miktarda vakuolizasyon izlenmiştir. Ayrıca bazı seminifer tübüller dejenere yapıdayken bazıları normal yapısını koruduğu gözlenmiştir.



6. SONUÇ

Çalışmamızda akut etkisini değerlendirdiğimiz profenofos ve MCPA' nın testis dokusunda, seminifer tübüllerin bazal membran seyrinde düzensizliğe, seminifer epitel hücreleri arasında boşluk oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Profenofos grubunda germinal epitel hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde anormal şekilli mitokondriyonların varlığı izlenmiştir. Ayrıca profenofos grubunda Sertoli hücrelerinde rezidüel cisim oluşumu görülürken, MCPA uygulanan grupta germinal epitelin yer yer Sertoli hücresi ile bağlantılarını yitirdikleri belirlenmiştir. Ara bağ dokuda Leydig hücrelerinin mitokondriyonlarında kristalizis belirlenmiştir. Serbest ve toplam testosteron üzerinde yaptığımız biyokimyasal ve istatistiksel değerlendirmede testosteron değerlerinin uygulama sonrası anlamlı ölçüde azaldığı saptanmıştır. Testis görünümünde yapısal düzeyde gördüğümüz dejenerasyon ile biyokimyasal verilerimizin sonucu; profenofos ve MCPA'nın spermatogenez sürecinin sağlıklı olarak devam etmesini engellediğini düşündürmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. National Resources Defense Council. Endocrine Disruptors. Erişim: (<http://www.nrdc.org/health/effects/qendoc.asp>). Erişim tarihi: 12/1/2010
2. El-Hoda N, Zidan A. Evaluation of the reproductive toxicity of chlorpyrifos methyl, diazinon and profenofos pesticides in male rats. *International Journal of Pharmacology* 5 (1): 51- 57, 2009.
3. Johnson RA, Harris RE, Wilke RA. Are pesticides really endocrine disruptors. *Wisc. Med. J.* 99: 34- 38, 2000.
4. Gupta RK, Miller KP, Babus JK, Flaws JA. Methoxychlor inhibits growth and induces atresia of antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol Sci.* 93: 382– 389, 2006.
5. Litovitz TL, Kein-Schwartz W, Dyer KS, Shannon M, Lee S, Powers M. Annual report of the American association of poison control centers toxic exposure surveillance system. *Am. J. Emerg. Med.* 16: 443-497, 1998.
6. Kamijima M, Hibi H, Gotoh M, Taki K, Saito I. A survey of semen indices in insecticide sprayers. *J. Occup. Health* 46: 109- 118, 2004.
7. Moustafa GG, Ibrahim ZS, Hashimoto Y, Alkelch AM, Sakamoto KQ, Ishizuka M, Fujita S. Testicular toxicity of profenofos in matured male rats. *Arch. Toxicol.* 81: 875- 881, 2007.
8. Çetinkaya S. Endokrin çevre bozucular ve ergenlik üzerine etkileri. *Dicle Tıp Dergisi* 36: 59- 66, 2009.
9. Tabb MM, Blumberg B. New models of action for endocrine disrupting chemicals. *Mol Endocrinol* 20: 475- 482, 2006.
10. Sadler TW. *Langman medical embryology*. Başaklar AC (Çev). 9. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2007.
11. Moore KL, Persaud TVN. *The Developing Human*. 8th. Ed. China, Saunders, 2007.
12. Carlson MB. *Human Embryology and Developmental Biology*. 4rd. Ed. China, Mossby, 2009.
13. Ross MH, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas*. 5th ed. Philadelphia, Saunders, 2006.

14. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. 10. Baskı, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2006.
15. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. baskı. 1. cilt. Ankara, Güneş Kitabevi, 2001.
16. Sancak B, Cumhuri M. Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar. 4. baskı. Ankara, ODTÜ Yayıncılık, 2008.
17. Gartner PG, Hiatt JL. Color Text Book of Histology. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 2006.
18. Gray H. Anatomy of the Human Body. Philadelphia, Lea & Febiger, 2000.
19. Kierszenbaum AL, Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. 1. Baskı,. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006.
20. Fawcett DW, A Textbook of Histology. 12 th ed. New York, Chapman&Hall, 1994.
21. Lui W, Dolores M, Lee WM, Cheng CY. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. Biology of Reproduction 68: 1087- 1097, 2003.
22. Hirsch M, Noske W. The tight junction: structure and function. Micron. 24: 325–352, 1993.
23. Russell LD, Peterson RN. Sertoli cell junctions: morphological and functional correlates. Int Rev Cytol. 94: 177–211, 1985.
24. Russell LD. Movement of spermatocytes from basal to the adluminal compartment of rat testis. Am J Anat. 148:313–328, 1977.
25. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. J Cell Biol. 103:755–766, 1986.
26. Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D. Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO -1. Proc Natl acad Sci USA. 88: 3460- 64, 1991.
27. Haskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR. ZO - 3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO- 1 and occludin. J Cell Biol. 141:199–208, 1998.
28. Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones J. Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. Nature. 333:272–276, 1988.
29. Zhong Y, Saitoh T, Minase T, Sawada N, Enomoto K, Mori M. Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO- 1, cingulin, and ZO- 2. J Cell Biol. 120: 477–483, 1993.
30. Keon BH, Schäfer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW. Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. J Cell Biol. 134:1003–1018, 1996.

31. Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S. Claudin- 11/OSP based tight junctions of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol.* 145:579–588, 1999.
32. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S. Occludin: a novel integral membrane protein localized at tight junctions. *J Cell Biol.* 123:1777–1788, 1993.
33. Mitic LL, Anderson JM. Molecular architecture of tight junctions. *Ann Rev Physiol.* 60: 121–142, 1998.
34. Moroi S, Saitou M, Fujimoto K, Sakakibara A, Furuse M, Yoshida O, Tsukita S. Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol.* 274: 1708–1717, 1998.
35. Feldman GJ, Mullin JM, Ryan MP. Occludin: structure, function and regulation. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57:883- 917, 2005.
36. Pelletier RM, Okawara Y, Vitale ML, Anderson JM. Differential distribution of the tight junction associated protein ZO-1 isoforms alpha+ and alpha – in Guinea pig Sertoli cells: a possible association with F-actin and G-actin. *Biology of Reproduction* 57: 367- 376, 1997.
37. Siu MKY, Cheng CY. Extracellüler matrix: Recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous during spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 71: 375-391, 2004.
38. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry.* 25th edition. New York, USA, Appleton & Lange, 2000
39. Yücel Ü. Pestisitlerin İnsan Ve Çevre Üzerine Etkileri. Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Nükleer Kimya Bölümü Kimyasal Maddelerle Çalışmalarda Sağlık ve Güvenlik Önlemleri Hakkında Yönetmelik. 26 Aralık 2003 Tarihli Resmi Gazete, Sayı: 25328.
40. Tekbaş ÖF. Kimyasallar ve Üreme Sağlığı. TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni 5(1): 50-58, 2006.
41. Steinberger E. Disorder of the Male Reproductive System In: *Environmental Medicine* (Tarcher AB, ed). Newyork, Plenum Medical Book Company, 1992.
42. Yücel Ü. Pestisitlerin İnsan Ve Çevre Üzerine Etkileri Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Nükleer Kimya Bölümü, Ankara, 2007.
43. Çetinkaya MA, Baydan E. Bitki Gelişim Düzenleyicilerin Zehirliliğine Genel Bir Bakış. Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre, Ankara, 2005.
44. Westwood MN. Hormones and Growth Regulators, Temperate Zone Pomology: Physiology and Culture. 3rd ed., Inc. 9999 S.W. Wilshire, Suite 124, Portland, Oregon 97225, Timber Press, 1993.
45. Ravenzwaay BV, Mellert W, Deckardt K, Küttler K. The comparative toxicology of 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid and its plant metabolite 4-chloro-2-

carboxyphenoxyacetic acid in rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 42: 47-54, 2005.

46. Sadlonová I, Hózová R, Flaskárová E. Adverse effects of herbicide MCPA on dogs in a 90 day toxicological study. *Neuro Endocrinol Lett. Suppl* 2: 108-11, 2006.
47. Öztürk S, Özge N. *Bitki Koruma İlaçları*, Ankara, Eser Matbaası, 1978.
48. Ware GW, Estes B, Cahill WP. Dislodgeable insecticide residues on cotton. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 20: 17-19, 1978.
49. Worthing CR, Walker SB. *The pesticide manual: A world compendium*. Croydon, British Crop Protection Council, s. 4720-4721, 1987.
50. CPA. *Crop Protection Association Handbook*, Peterborough, Crop Protection Association, 2000.
51. Hassan SA, Albert R, Bigler F, Blaisinger P, Bogenschutz H, Boller E, Brun J, Chiverton P, Edwards P, Englert WD, Huang P, Inglesfield C, Naton E, Oomen PA, Overmeer WPJ, Rieckmann W, Samsoe-Petersen L, Staubli A, Tuset JJ, Viggiani G, Vanwetswinkel G. Results of the Third Joint Pesticide Testing Programme by the IOBC/WPRS-Working Group "Pesticides and Beneficial Organisms" *J. Appl. Entomol.* 103: 92-107, 1987.
52. Yıldız M, Gürkan MO, Turgut C, Kaya Ü, Ünal G. Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre*, Ankara, 2005.
53. Delen N, Durmuşoğlu E, Güncan A, Güngör N, Turgut C, Burçak A. Türkiye’de pestisit kullanımı, kalıntı ve organizmalarda duyarlılık azalışı sorunları. *Türkiye Ziraat Mühendisliği 6. Teknik Kongre*, Ankara, 2005.
54. Gotoh M, Sakata M, Endo T, Hayashi H, Seno H, Suzuki O. Profenofos metabolites in human poisoning. *Forensic Sci Int* 116: 221–226, 2001.
55. Glickman AH, Wing KD, Casida JE. Profenofos insecticide bioactivation in relation to antidote action and the stereospecificity of acetylcholinesterase inhibition, reactivation, and aging. *Toxicology and Applied Pharmacology* 73: 16-22, 1984.
56. EPA (Environmental Protection Agency). Antimicrobial pesticide products. Erişim: (<http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/antimic.htm>). Erişim tarihi: 27.08.2010
57. Malghani S, Chatterjee N, Yu HX, Luo Z. Isolation and identification of profenofos degrading bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 893- 900, 2009.
58. Das GP, Shaik AP, Jamil K. Estimation of apoptosis and necrosis caused by pesticides in vitro on human lymphocytes using DNA diffusion assay. *Drug Chem Toxicology* 29 (2): 147-156, 2006.
59. Fahmy FA, Abdalla EF. Genotoxicity evaluation of buprofezin petroleum oil and profenofos in somatic and germ cells of male mice. *Journal of Applied Toxicology* 18: 301- 305, 1998.

60. Debnath D, Mandal TK. Study of quinalphos (an environmental oestrogenic insecticide) formulation (Ekalux 25 E.C.) - induced damage of the testicular tissues and antioxidant defence systems in Sprague – Dawley albino rats. *J Appl Toxicol* 20: 197 –204, 2000.
61. El Nahas SM, De Hondt HA, Abdou HE. Chromosome aberrations in spermatogonia and sperm abnormalities in Curacrontreated mice. *Mutat Res* 222: 409–414, 1989.
62. Sarkar R, Mohanakumar KP, Chowdhury M. Effects of an organophosphate pesticide, quinalphos, on the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in adult male rats. *J. Reprod. Fertil.* 118: 29-38, 2000.
63. Gore AC. Environmental toxicant effects on neuroendocrine function. *Endocrine* 14: 235- 246, 2001.
64. Herken H, Neubert D. Content of acetylcholine in the brain under various functional conditions. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 219: 222-233, 1953.
65. Karanth S, Pope C. In vitro inhibition of blood cholinesterase activities from horse, cow and rat by tetrachlorvinphos. *Int. J. Toxicol.* 22: 429-433, 2003.
66. McDaniel KL, Moser VC. Differential profiles of cholinesterase inhibition and neurobehavioral effects in rats exposed to fenamiphos or profenofos. *Neurotoxicol. Teratol.* 26: 407-415, 2004.
67. Farag AT, El-Aswad AF, Shaaban NA. Assessment of reproductive toxicity of orally administered technical dimethoate in male mice. *Reprod. Toxicol.* 23: 232-238, 2007.
68. Lyons G. Pesticides Posing Hazards to Reproduction. UK, WWF. Godalming, 1999.
69. Guzick D, Overstreet J, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N. Engl. J. Med.* 345: 1388-1393, 2001.
70. Guyton AC. Textbook of Medical Physiology. 8th Ed., Philadelphia, WB. Saunders, 1991.
71. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC. Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology. 2nd Ed. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1997.
72. Krause W. Influence of DDT, DDVP and malathion on FSH, LH and testosterone serum levels and testosterone concentration in testis. *Environ. Contam. Toxicol.* 18: 231-242, 1977.
73. Ray A, Chatterjee S, Ghosh S, Kabir SN, Pakrashi A, Deb C. Suppressive effect of quinalphos on the activity of accessory sex glands and plasma concentrations of gonadotrophins and testosterone in rats. *Arch. Environ. Con. Toxicol.* 21: 383-387, 1991.

74. Ray A, Chatterjee S, Ghosh S, Bhattacharya K, Pakrashi A, Deb C. Quinalphos-induced suppression of spermatogenesis, plasma gonadotrophins, testicular testosterone production, and secretion in adult rats. *Environ. Res.* 57: 181-189, 1992.
75. Abd El-Aziz MI, Sahlab AM, Abd El-Khalik M. Influence of diazinon and deltamethrin on reproductive organs and fertility of male rats. *Dtsch Tierarztl Wochenschr* 101: 230- 232, 1994.
76. Kang HG, Jeong SH, Cho JH, Kim DG, Park JM, Cho MH. Chlorpyrifos-methyl shows anti-androgenic activity without estrogenic activity in rats. *Toxicology* 199: 219- 230, 2004.
77. Walsh LP, McCormick C, Martin C, Stocco DM. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ. Health Perspect.* 108: 769-776, 2000.
78. Kitamura S, Suzuki T, Otha S, Fujimoto N. Antiandrogenic activity and metabolism of the organophosphorus pesticide fenthion and related compound. *Environ. Health Perspect.* 111: 503-508, 2003.
79. Sinha N, Narayan R, Shanker R, Saxena DK. Endosulfan-induced biochemical changes in the testis of rats. *Vet. Hum. Toxicol.* 37: 547-549, 1995.
80. Moustafa GG, Ibrahim ZS, Ahmed MM, Ghoneim MH, Sakamoto KQ, Ishizuka M, Fujita S. Downregulation of male-specific cytochrome P450 by profenofos. *Japanese Journal of Veterinary Research* 56: 109-118, 2008.
81. Oakes DJ, Webster WS, Brown - Woodman PDC, Ritchie HE. Testicular changes induced by chronic exposure to the herbicide formulation, Tordon 75D® (2,4 dichlorophenoxyacetic acid and picloram) in rats. *Reproductive Toxicology* 16: 281–289, 2002.