

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RATLARDA DAİDZEİN' İN TESTİS
HİSTOLOJİSİNE ETKİSİ

Ayşe ÇETİNKAYA

DANIŞMAN
Prof. Dr. Mustafa SANDIKÇI

AYDIN-2012

ÖNSÖZ

Daidzein ve genistein bitkilerde yaygın olarak bulunan izoflovan grubu fitoöstrojenlerdendir. İzoflavonların bilinen en iyi kaynağı Leguminosae ailesine ait bitkilerden kurubaklagiller (bezelye, fasulye, mercimek vb.) özellikle de soya fasulyesidir.

Son yıllarda, fitoöstrojenler hormon tedavisine etkili alternatifler bulma girişimi içinde ilaç endüstrisinde ilgi görmektedir. Yapılan çalışmalar fitoöstrojenlerin göğüs, prostat, endometrium gibi hormona bağlı kanser türleri ile kolon, rektum ve pankreas gibi diğer kanser türlerine karşı koruyucu olabileceğini göstermiştir. Fakat fitoöstrojenlerin çok miktarda tüketilirse hayvanlarda infertiliteye yol açtığı bildirilmiştir. Sunulan çalışmada daidzein'in rat testislerindeki etkileri incelenmiştir.

Araştırma, "Ratlarda daidze'in testis histolojisine etkisi" isimli ve VTF-11026 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER.	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR	iV
ÇİZELGELER DİZİNİ	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	Vi
GİRİŞ	1
1.1. Genel Bilgiler	1
1.1.1. Testislerin embriyonal gelişimi	1
1.1.2. Testis histolojisi	2
1.1.2.1. Sertoli hücreleri	4
1.1.2.2. İnterstisyel doku ve leydig hücreleri	5
1.1.3. Spermatogenezis	6
1.1.4. Spermatogonial kök hücreler	7
1.1.5. Spermatogenetik dalga	8
1.2. Fitoöstrojenler	10
1.2.1. Doğadaki fitoöstrojen kaynakları	11
1.2.2. Fitoöstrojenlerin etki mekanizması	11
1.2.3. Fitoöstrojenlerin tedavide kullanım alanları	12
1.2.4. Fitoöstrojenlerin yan etkileri	13
2. GEREÇ VE YÖNTEM	14
2.1. Gereç	14
2.2. Yöntem	14
2.3. İstatistiksel Analiz	15
3. BULGULAR	16
3.1. Histolojik ve Morfometrik Bulgular	16
3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	18
4. TARTIŞMA	25
5. SONUÇ	28
ÖZET	29
SUMMARY	30

KAYNAKLAR

31

TEŞEKKÜR

40

SİMGELER VE KISALTMALAR

µm :	Micrometer (Mikrometre)
ABP:	Androgen-binding protein (Androjen- bağlayıcı protein)
DNA:	Deoxyribonucleic acid (Deoksiribonükleik asit)
FSH:	Follicle-stimulating hormone (Folikül-stimüle edici hormon)
LH :	Luteinisation hormone (Lüteinizasyon hormonu)
PAS:	Periodic acid shift (Peryodik asit shift)
PBS:	Phosphate-buffered saline (Fosfat-tamponlu salin)
UTF-1:	Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (Farklılaşmamış embriyonik hücre transkripsiyon faktor-1)

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1. Yirmi gün boyunca Daidzein uygulanmış ratlarda seminifer tubul çapları ve tubulus epitel yükseklikleri	17
Çizelge 2. Yirmi gün boyunca Daidzein uygulanmış ratların seminifer tubullerinde germ hücre yoğunlukları	17
Çizelge 3. Yirmi gün boyunca Daidzein uygulanmış ratların seminifer tubullerinde spermatogonial kök hücre yoğunlukları	18

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1. Kontrol grubu erişkin bir ratın testis kesiti. Üçlü boyama yöntemi	19
Şekil 2. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. Üçlü boyama yöntemi	19
Şekil 3. Kontrol grubu erişkin bir ratın testis kesiti. Hematoksilen eozin boyama	20
Şekil 4. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. Hematoksilen eozin boyama	20
Şekil 5. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. V: Vakuol. Üçlü boyama yöntemi	21
Şekil 6. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. V: Vakuol. Üçlü boyama yöntemi	21
Şekil 7. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. →: Germ hücreleri. Üçlü boyama yöntemi	22
Şekil 8. Kontrol grubu erişkin bir ratın testis kesiti. →: Spermatogonial kök hücreler. İşaretli streptavidin biotin yöntemi	23
Şekil 9. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. →: Spermatogonial kök hücreler. İşaretli streptavidin biotin yöntemi	23
Şekil 10. Kontrol grubu erişkin bir ratın testis kesiti. → : Spermatogonial kök hücreler. İşaretli streptavidin biotin yöntemi	24

1. GİRİŞ

1.1. Genel Bilgiler

1.1.1. Testislerin embriyonal gelişimi

Kromozomal cinsiyet: Kromozomal cinsiyet döllenme ile belirlenir. Haploid spermin yeni organizmaya Y kromozomu mu, yoksa X kromozomu mu aktaracağına bağlıdır. Cinsiyetin ikiye ayrılmasındaki anahtar, cinsiyeti belirleyen bölgesinde cinsiyet belirleyen faktör genini taşıyan Y kromozomudur. Y kromozomundaki düzenleyici Sry geni bir transkripsiyon faktörünü kodlar. Germinal kordonlar somatik hücrelerde kısa bir süre boyunca aktive olur ve bunlar Sertoli hücrelerine farklılaşarak antimüllerien hormon salgılamalarını sağlar (Drews 2000, Moore ve Persaud 2002).

Gonadal cinsiyet: Gonad Y kromozomu varlığında farklılaşıp testise dönüşmeye başlar. Y kromozomu yoksa ovaryumoluşur (Drews 2000).

Testisler, embriyonun bel bölgesindeki intermedier mezodermin ürogenital plak' ından meydana gelirler. Bu bölgedeki coelom epitelinde sağlı-sollu iki kabartı meydana gelir. Crista genitilis (gonadlar) adını alan bu kabartılar testisin çatısını oluştururlar. Cinsiyet hücrelerinden yoksundurlar. Cinsiyet hücreleri allontois orjinine yakın vitellus kesesinin kaudal duvarındaki endodermal hücrelerden gelişir. Bu hücreler arka bağırsağın dorsal mezenterii boyunca embriyonun lumbar bölgesindeki gonadal kabartıya göç eder ve oraya yerleşirler. Bu dönemde crista genitilisler ve buraya gelen primitif cinsiyet hücreleri henüz farklılaşmamıştır (Moore ve Persaud 2001, Hassa ve Aştı 2003).

Crista genitilis' lerde germinatif epitelyum hücreleri mezenşimine doğru kordonlar şeklinde çöker. İlkel cinsiyet kordonları kalınlaşır ve gonadın medullasına uzanırlar. Oluşan bu kordonlara "Medulla kordonları" denir. Testis kordonları, gonadın hilusunda ince hücre kordonlarına parçalanarak rete testisler oluşur. Daha ileri gelişimde, kalın fibröz bir kapsül olan tunica albuginea oluştuğunda, testis kordonları yüzey epiteli ile bağlantılarını keserler. Kalın fibröz tunica albuginea insanlarda 12. haftada oluşur.

Onaltıncı haftada testis kordonları at nalı biçimini alır ve uç noktaları birleşerek tubuli rekti'leri oluştururlar. Testis kordonları bu evrede, ilkel cinsiyet hücrelerini ve sölom epitelinden köken alan Sertoli hücrelerini içermektedir. Testis kordonları arasındaki mezenşimde ise Leydig hücreleri bulunur (Moore ve Persaud 2001). Memelilerdeki Leydig hücreleri en az iki farklı tip içerirler. Fötal tip Leydig hücreleri, fötal ve neonatal yaşam boyunca erkeğe ait primer cinsiyet karakterlerinin oluşmasından sorumludur. Daha sonra pubertal erkeğe ait özelliklerden sorumlu yetişkin tip Leydig hücreleri oluşur (Christensen 1975).

Puberteden önce testis kordonlarının içi doludur. Püpertede lümen kazanmakta ve seminifer tubul adını almaktadır. Daha sonra kanalize olan diğer genital boşaltma yollarına açılırlar. Testis gelişmesinin son aşamasında yüzey epiteli yassılaşmakta ve ergin testisin dış yüzeyini döşeyen tek katlı mezotelyumu oluşturmaktadır (Sadler 1996).

Prenatal süreçte abdomende gelişimini sürdüren testisler, doğuma yakın bir zamanda inguinal kanaldan geçerek skrotuma inerler ve burada funikulus spermaticus ile asılı halde tutulurlar (Stevens ve Lowe 1997).

1.1.2. Testis histolojisi

Testis, gametlerin (sperm, spermatozoa) meydana getirilmesi (gametogenezis, spermatogenezis) ve steroid yapıdaki hormonların üretilip salgılanmasını (steroidogenezis) sağlayan hem ekzokrin hem endokrin işlevi olan bir organdır (Erbengi 1990, Sriraman ve ark 2003).

Testisler üç tabakadan meydana gelen testiküler kapsül ile sarılıdır (Artan 1988, Young ve Heath 2000).

1. Tunika vaginalis : Mezotelyal hücrelerin oluşturduğu bu en dıştaki tabaka peritondan köken alan seröz bir kesedir. Testisin ön ve yan yüzeylerini çevreleyen visseral tabakası ve skrotum üzerine uzanan pariyetal tabakası vardır.

2. Tunika albuginea : Düz kas hücreleri içeren, fibroelastik bağ dokusundan oluşan en belirgin tabakadır. Bazal lamina ile tunika vaginalisten ayrılır. Testisin posterior tarafında kalınlaşarak mediastinum testis olarak organ içine sokulur.
3. Tunika vasküloza : Kan damarları ağlarını içeren, bağ dokusundan oluşan en iç tabakadır.

Mediastinumdan testiküler kitleye doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250-300 lobçuğa böler. Spermatogenezis seminifer tubul bölümlerinde gerçekleşir. Herbir lobçuk 1-4 seminifer tubülü içerir (Junqueira ve Carneiro 2006). Her bir seminifer tubul yaklaşık 150 µm. çaptadır ve 80 cm. uzunlukta kıvrıntılı bir yapıdadır (Abraham 2006). Etrafi zengin kılcallarla çevrilidir. Her testiste seminifer tubulün toplam uzunluğu 300-900 m. dir. Seminifer tubul iki belirgin hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitelyum ile döşeli merkezi bir lümeninden oluşur. Bu hücreler spermatogenetik hücreler ve Sertoli hücreleridir. Seminifer tubuller, tubuli rekti denen düz tubullerle birleşirler. Bu birleşme noktaları, mediastinum testisteki bağ dokusu içerisinde bulunan ve boşlukları epitelle döşeli bir ağı, rete testisi oluştururlar (Angelova ve ark 1996).

Tubulus seminiferus bazal membran ile çevrilir (Dellmann ve Brown 1987). İnterstisiyel alanda Leydig hücrelerinin yanı sıra kan damarları, sinirler, lenfatik damarlar ve diğer bağ dokusu elemanları vardır. Germ hücreleri seminifer tubul içerisinde 4-7 hücre katmanlı kalın bir epitelyum oluşturur. Germ hücreleri tubulusun bazalinden lumenine doğru farklılaşır. Proliferasyonla hücreler lumene doğru itilir (Leeson ve ark 1985). Bazal membran üzerine oturan, geniş tabanlı Sertoli hücreleri ile bunların arasında yer alan çok sayıdaki spermatogonyumlar ilk sıradaki hücrelerdir (Tanyolaç 1999). Sertoli hücreleri bazal laminadan tubulusun lumenine doğru uzanır (Johnson 1991, Krinke 2000). Bazal membrandan ayrılan ve luminal yüze doğru yönelen spermatogonyumların büyümesiyle oluşan primer spermatositler en iri germ hücreleridir. Sekonder spermatositler, primer spermatositlerin yaklaşık yarısı kadardır ve bu hücreler luminal yüze doğru uzanmışlardır (Leeson ve ark 1985). Tubulusun lumenine ulaşmış olan küçük, yuvarlak spermatidler başkalaşım geçirmek üzere Sertoli hücrelerinin sitoplazma oyuntularına gömülürler ve bir süre sonra o türe özgü biçimlerini kazanarak, gelişmelerini tamamlamış spermatozoon olurlar. Farklılaşmasını tamamlayan spermatozoonlar epitel katmandan ayrılarak lümeneye geçer (Tanyolaç 1999).

Seminifer tubullerin enine kesitinde spermatogenetik hücreler bazı özellikleriyle birbirlerinden ayırt edilebilirler. Nükleus özelliklerine göre 2 tip spermatogonyum tanımlanmıştır. Tip A spermatogonyumlar, ince granüler kromatine sahip yoğun bazofilik nükleuslu hücrelerdir. Bu hücreler diğer spermatogenetik hücreleri oluşturan kök hücrelerdir. Belli aralıklarla bölünerek bir hücre Tip A spermatogonyum olarak kalırken diğer hücre Tip B spermatogonyumlara farklılaşır. Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatositlere farklılaşan öncül (progenitor) hücrelerdir (Abraham 2006). Spermatogenik seride en büyük hücreler primer spermatositlerdir ve bunlar nükleuslarında kromozomların kısalıp kalınlaşması sürecinin değişik safhalarının bulunması ile tanınırlar (Eşrefoğlu 2009). Birinci mayoz bölünmeden sonra oluşan sekonder spermatositler primer spermatositlere oranla daha küçük hücrelerdir. Spermatidlerin çoğu ise tubulusta lümene yakın, baş ve kuyruk oluşmaya başlamış hücreler halinde görülürler (Abraham 2006).

1.1.2.1. Sertoli hücreleri

Puberteye kadar seminifer epitelin dominant hücre tipi Sertoli hücreleridir. Puberteden sonra, seminifer tubulleri döşeyen epitelin yaklaşık %10'unu oluşturur. Sertoli hücreleri spermatogenetik serideki hücreleri kısmi olarak saran piramidal hücrelerdir (Abraham 2006). Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminada tutunur. Apikal uçları ise seminifer tubul lümenine doğru uzanan bu hücrelerin sınırları düzensizdir ve sitoplazmada derin çöküntüler içerir. Büyük olan çekirdek, oldukça belirgin olan karakteristik bir çekirdekçiğe sahiptir (Kalaycı 1986). Sertoli hücrelerinin bazolateral okludens bağlantıları seminifer epiteli bir bazal ve bir adluminal kompartmana böler ve geliştirmekte olan spermatositleri ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan koruyan kan – testis bariyerini oluştururlar (Russell ve ark 1990).

Sertoli hücreleri spermatogeneziste önemli görevleri vardır. Gelişmekte olan spermatozoonları destekler, korur ve beslenmesini sağlar. Gelişen eşey hücrelerinden arta kalan sitoplazma parçalarını fagozite eder. Spermin yaşaması için gerekli olan androjen bağlayıcı protein gibi pek çok maddeyi ve sıvıyı salgılar (Tanyolaç 1999).

Sertoli hücreleri folikül stimüle edici hormon (Follicle-stimulating hormone/ FSH) uyarımına cevap verir ve androjen bağlayıcı protein (Androgen-binding protein/ ABP) sentezini ve sekresyonunu düzenler. Androjen- bağlayıcı protein testosteron ve dehidrotestesteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesinde olan bir salgısal proteindir. Spermatogenezin gerçekleşmesi, diğer bir deyişle spermatozoon oluşumu için ABP testosteron kompleksi oluşur. Sonra seminifer tubul içinde, testosteronun yüksek düzeyde salınımını sağlar. Seminifer tubul sıvısı olarak seminifer tubullerin lümenine salınır ve buradan da eşeyssel boşaltım kanallarına doğru akar. Ayrıca Sertoli hücreleri inhibin ve aktivin alt ünitelerini (alfa ve beta alt üniteleri) salgırlar. Sertoli hücreleri tarafından üretilen glikoprotein yapıda bir hormondur. Folikül stimüle edici hormon, Lüteinizasyon hormon (Luteinisation hormone/ LH) ve spermatozoon oluşumunu büyük ölçüde denetler. Seminifer tubullerde spermatozoonların üretimi yetersiz kaldığında ön hipofizden FSH salınır ve Sertoli hücreleri uyarılarak inhibin salınımı ile spermatozoonların gelişmesi için gerekli olan besin sağlanır (Junqueira ve ark. 1993, Yılmaz 1999).

1.1.2.2. İnterstisyel doku ve Leydig hücreleri

Seminifer tubuller arasındaki boşluklar sinirlerden, kan ve lenf damarlarından zengin gevşek bağ dokusudur. Bu bağ dokuda çeşitli hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve endokrin göreve sahip leydig hücreleridir. Yuvarlak veya poligonal şekilli, yuvarlak nükleuslu, asidofil sitoplazmalı Leydig hücreleri bağ dokusu içinde tek tek veya gruplar şeklinde görülürler (Junqueira ve Carneiro 2006). Leydig hücrelerinin sitoplazmalarının en tipik özelliği çok sayıda lipid damlaları, yaygın bir şekilde düz endoplazmik retikulumu ve iyi gelişmiş golgi aygıtı bulundurmalarıdır. Puberteden sonra, bir siklik adenoazin monofosfat aracılı mekanizma tarafından LH ile uyarılmanın ardından, Leydig hücreleri, 5 α -redüktaz enzimi testosteron üretirler. Bu hücreler sentezledikleri testosteron hormonunu, birlikte bulundukları kan kılcallarına boşaltarak endokrin sekresyon yaparlar (Eşrefoğlu 2009).

Leydig hücreleri androjenler olarak adlandırılan erkek seks steroidlerinin (Testosterone, androstenedione, dehydroepiandrosteron) sentezlenmesini ve sekresyonunu sağlar. Testosteron Leydig hücrelerinin sitoplazmalarında bulunan lipid damlacıklarındaki kolesterolden sentezlenir. Puberte döneminde ise spermatogenez ve erkek aksesuar

bezlerinin (prostat ve seminal vezikül) fonksiyonlarını sürdürür ve sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişmesi için gereklidir (Russel ve ark 1990, Ross ve ark 2003).

İlk testesteron salınımı embriyonik dönemde başlar. Gebelik döneminde anneden geçen plesantadan salınan korionik gonadotropin anne kanından fötüse geçer. Testisteki Leydig hücrelerini uyarır ve testesteronun sentezlenmesine ve salınımına neden olur. Testesteron diğer androjenlerle birlikte gonadların gelişiminde görevlidir. Ergenliğin başlamasıyla hipofizin anterior lobundan salgılanan LH interstisyel hücreler üzerine etki ederek normal spermatojenik hücrelerin gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. Bu nedenle LH, interstisyel hücre stimüle edici hormon olarak da adlandırılır. Leydig hücrelerinin farklılaşması, fonksiyonlarını devam ettirmesi ve testosteron üretimi için LH gereklidir (Kierszenbaum 2006). Lüteinizasyon hormonu Leydig hücrelerinin zarındaki özel reseptörlere bağlanarak Leydig hücrelerinin yağ damlacıklarındaki kolesterol oluşumunu artırır. Kolesterol mitokondride pregnenola dönüşür. Daha sonra mikrozom enzimleri aracılığıyla hidroksiprojesterona çevrilir. Projesteron endoplazmik retikulumda önce androstenediona, sonra testosterona dönüşür. Ayrıca androstenediol yoluyla da testesteron üretilebilir. Leydig hücrelerinden salınan testesteron kan ve lenf damarları yada peritubuler doku sıvısı yoluyla seminifer tubullere geçerler. Spermatozoonların seminifer tubullerde oluşması için testosteronun seminifer tubullerde bulunması gereklidir. Spermatogeneziste hem otokrin hem de parakrin bir etki gösterir (Krinke 2000). Dolaşımdaki testosteron ise iskelet ve kas sisteminin gelişim ve işlevi, eşeyssel organ, eşeyssel iletim yolları ve eklenti bezlerinin büyüme ve işlev görmesi, yağ dokusunun dağılımı, cinsel istek ve eşeyssel davranışlar için gereklidir (Yılmaz 1999).

1.1.3. Spermatogenezis

Puberteden sonra spermatogonyumların bölünüp farklılaşarak sperm oluşturmasıdır. Goniogenezis spermatogonyumların mitozla bölünerek çoğaldığı evredir. Bu hücreler irileşerek primer spermatositleri oluştururlar (Dellmann ve Brown 1987, Krinke 2000). Spermatositlerin ardarda iki bölünme geçirerek kromozom sayılarını ve Deoksiribonükleik asit (Deoxyribonucleic acid/ DNA) miktarlarını yarıya düşürmesini kapsayan evre mayoz evresidir. Primer spermatosit birinci mayoz bölünmesi ile iki adet sekonder spermatosite bölünür. Sekonder spermatositler ikinci mayoz bölünme sonucunda haploid kromozom

sayısına iner. Yani büyüme ve olgunlaşma aşamalarını kapsayan dönem spermatositogenezis adını alır. Bu hücreler başkalaşım evresiyle spermatidleri oluşturur. Spermatidlerin farklılaşarak hareketli spermatozoonlara dönüşmesine spermiyogenezis denir. İnsanlarda spermatogenez yaklaşık 9 haftalık bir sürede tamamlanır (Junqueira ve ark. 1993).

1.1.4. Spermatogonial kök hücreler

Vücudumuzda pek çok organ ve dokuda kök hücre bulunmakta ve gerektiğinde fonksiyonel hale geçerek yenileyici (regenerative) ya da tamir edici (repair) roller üstlenirler. İnsanda embriyonal gelişimin ikinci haftasının başında epiblast tabakasından köken alan ve ilk kez dördüncü haftanın başında vitellus kesesi duvarında gözlenen kök hücrelere ‘Primordiyal Germ Hücreleri’ denir. Bu hücreler dişilerde ovositlerin öncüsü olan ovogonyumları, erkekte spermatozoonların öncüsü olan spermatogonyumları oluştururlar. ‘Embriyonik Germ Hücreleri’ ise primordiyal germ hücrelerinden köken alan pluripotent kök hücrelerdir. Fetusun 5-9 haftalık iken gonadal kıvrım ve mezenter bölgesindeki primordiyal germ hücrelerinin kültürü ile elde edilebilirler. İlk olarak farede tanımlanan bu hücreler insanlarda da gösterilmiştir (Moore ve Persaud 2001).

Spermatogonial kök hücreleri seminifer tubullerin alt tabakasında bulunur ve puberta öncesinde spermatogonia olarak isimlendirilir. Spermatogonial kök hücreleri bir yandan kendi popülasyonlarını korumak için yenileme, öte yandan aşırı kök hücre yoğunluğunu önlemek için farklılaşma davranışı gösterir, böylece tümör oluşumu önlenir (De Rooij 1998, Ehmcke ve ark 2006). Bu yüzden de spermatogonial kök hücrelerinin yenileme/farklılaşma oranının 1/1 oranında olması gerekmektedir. Bu yüzden testiste spermatogonial kök hücre popülasyonu sınırlı yoğunluktadır. Örneğin, fare ve rat testislerinde toplam kök hücre popülasyonu sırasıyla 35 000 ve 350 000 olarak saptanmıştır. Bu popülasyon yoğunluğu, spermatogonial kök hücre çalışmaları için bir engeldir. Ancak buna ilişkin araştırmalar devam etmekte ve deneysel olarak seprmatogonial kök hücre zenginleştirme yöntemleri geliştirilmektedir. Özellikle vitamin-A bakımından yetersiz beslenme, testisleri aşırı sıcaklığa maruz bırakma ve kriptorşid uygulamaları spermatogonial kök hücre zenginleştirmede önemli uygulamalardır. Vitamin-A bakımından yetersiz beslenme spermatogenesisi spermatogonia A evresinde

durdurmakta ve böylece spermatogoninin mayoza girmesi engellenmektedir. Diğer iki uygulama ise testis sıcaklığının vücut sıcaklığında tutularak spermatogenesisin, spermatogonia A evresinde mayoza girmesinin engellenmesiyle karakterizedir (Van Pelt ve ark 1995, Shinohara ve ark 2000).

Kök hücreleri içerisinde de spermatogonial kök hücreleri ayırt edici özelliklere sahiptir. Farklaşmamış embriyonik hücre transkripsiyon faktörü (Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1/ UTF-1) fare ve insan embriyonik dönem boyunca hem dişi hemde erkek primordial germ hücrelerinde bulunur. Erişkinlerde germ hücresi içeren dokulardaki kök hücrelerde bulunan transkripsiyon faktörüdür (Vatansever 2008). Embriyonik kök hücrelerde UTF-1 kromatin komponentidir. Testiste UTF-1 ekspresyonu sadece kök hücrede sınırlıdır (Kooistra ve ark. 2010). Seminifer tubullerin bazalindeki hücrelerde UTF-1 eksprese edilir ve hücrenin çekirdeğinde bulunur (Van Bragt ve ark. 2008). Testis tümörlerinde testiküler karsinomada ve testiküler germ hücreli tümörler ekspresyonun olduğu bilinmektedir. Embriyonal karsinom ve seminom tanısı için UTF-1 kullanılabilceği bildirilmiştir (Wang ve ark. 2010).

1.1.5. Spermatogenetik dalga

Son yıllarda spermatogonial kök hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar spermatogenesisin temel mekanizmasının anlaşılması noktasında önemli gelişmeler sağlamıştır. Bu araştırmalar aynı zamanda spermatogeneze yeni yaklaşımlar ve açılımlar getirmektedir. Seminifer tubulde enine kesit alınıp incelendiğinde tubullerde farklı tipte hücrelerin olduğu görülür. Her bir spermatogenetik düzen seminifer epitelyum siklusunun bir dönemi olarak tanımlanır. Siklusun her bir dönemi tubul boyunca ardışık bir düzeni takip eder aynı dönem arasındaki mesafe spermatogenetik dalga olarak tanımlanır. Ratlarda toplam 14 evre vardır ve 12 gün sürer. Evreler türlere göre değişiklik arzeder (Li ve ark 1997, Yılmaz 2009).

Erkek ratlarda pubertenin ilk spermatogenetik dalganın tamamlanmasıyla ilk spermatozoonun tubulus lümeninde görülmesi ile başlar. İlk spermatogenetik dalga boyunca testisteki somatik hücreler prolife olur ve olgunlaşır. Sertoli hücreleri germ hücrelerini sarar ve destekler (Meehan ve ark 2000).

Sınıflandırma için hücrelerin çekirdek çapları, hücrede mitotik figürlerin bulunması veya bulunmaması veya spermatidlerdeki morfolojik değişiklikler göz önünde tutulur (Hess 1990).

Dönem I de hücreler heterokromatik nükleuslu yuvarlak spermatidlerin görülmesi ve belirgin golgi aygıtının bulunması ile karakterizedir.

Dönem II de veziküllerle çevrelenmiş 0,3-0,6 μm . çapta proakrozomik küçük granüllerin bulunması ile karakterizedir. Spermatitde golgi aygıtı iki proakrozomik granül içerir.

Dönem III de akrozomik granüller 0,6-0,8 μm . çaptadır. Metilkrilat kesitlerde, akrozomik veziküller az boyanmış PAS pozitif boyanmıştır. Golgi aygıtı PAS pozitifliği yoğun olarak karakterizedir.

Dönem IV de Spermatidler de bir veya daha fazla akrozomik sistem konfigirasyonunun bulunması ile ayırt edilir. Akrozomik granül 0,8-1,1 μm . arası bir çapa sahiptir. Mitotik figürler görünür.

Dönem V de yuvarlak spermatidlerin akrozomik sisteminin az eğri olması ve akrozomik granülün her iki yana doğru uzamış olması ile karakterizedir. Bu dönemde spermatidler tubulus epiteli içine tamamen penetrasyon göstermiştir.

Dönem VI da akrozomik spermatid nükleusun yaklaşık dörtte birini kaplar. Spermatidler lümene doğru göç etmiştir.

Dönem VII de spermatidin sitoplazmasındaki büyük bazofilik granül mevcuttur. Spermatid nükleusu eğridir.

Dönem VIII de bazofilik granüller spermatidin baş bölgesine doğru hareket eder ve burada birleşirler. Sertoli hücresinin nükleusunun bazal membrandan uzağa yerleşmektedir. Bir kısım spermatidler serbest bırakılır.

Dönem IX da spematid çekirdeğinin az miktarda sıkışması ve asimetrisi ile epitelin içinde artık madde bulunması karakterizedir. Mitotik figürler görülür.

Dönem X da spermatidin nükleusu apeksinden kaudal bölgesine doğru uzar. Spermatid nükleusunun sagital bir kesiti V biçimli bir yapıdır.

Dönem XI de spermatid akrozomik sisteminin ve nükleusun caudal bölgeye doğru keskin bir açıda çıkıntısını ön plana çıkarır.

Dönem XII de spermatidler kolay ayırt edilir. Sivri akrozomik uçları bulunur.

Dönem XIII de spermatositlerin çekirdekçiği diploten yapıdadır.

Dönem XIV de mitotik yapılı sekonder spermatidler ile karakterizedir (Hess 1990, Harris ve Nicholson 1998).

1.2. Fitoöstrojenler

Geniş çaplı mera hayvancılığı yapılan Avustralya’da ıslah çalışmalarını takiben koyunlarda kısırlık oranının artması, araştırmacıların dikkatlerini meradaki bitkiler üzerine yoğunlaştırmıştır (Chamley ve ark 1985, Coskun ve İmir 1991). Bitkilerin östrojenik aktiviteye sahip oldukları ilk olarak 1941 yılında Emmens tarafından bildirilmiştir. Bu araştırmacı “Proöstrojen” olarak tanımladığı bir kısım bileşiklerin hayvanlar tarafından alındıktan sonra metabolize edilerek aktif hale geçtiklerini ve östrojen benzeri etki gösterdiklerini belirtmiştir (Emmens 1965). Daha sonra bu bileşiklere kısaca “fitoöstrojenler” adı verilmiştir (Andersan ve ark 1999).

Flavonoidler polifenolik bileşikler olup bitki orjinli yapılardır. Günümüze kadar 4000 farklı flavonoid tanımlanmıştır. Flavonoidler; izoflavonlar, lignanlar, kumestanlar ve stilbenler olmak üzere dört sınıfta toplanabilir (Hollmann ve Batan 1997). Flavonoidler, hücre sistemi içerisinde çeşitli biyolojik etkilere sahiptir. Flavonoidlerin antimikrobiyal, antiviral, antiülserojenik, sitotoksik, antineoplastik, mutajenik, anti-inflammatuar, antioksidan, antiplatelet etkisi vardır (Formica ve Regelson 1995). Bitkilerde yaygın olarak bulunan izoflovan grubundaki fitoöstrojenler daidzein (7,4’-dihidroksi izoflavon), genistein, formonentin, biochanin A, pratensein ve prunetindir (Muller ve ark 1989).

1.2.1. Doğadaki fitoöstrojen kaynakları

İzoflavonların bilinen en iyi kaynağı Leguminosae ailesine ait bitkilerden kurubaklagiller (bezelye, fasulye, mercimek vb.), özellikle de soya fasulyesidir. Ancak Graminae, Rosaceae (Prunus sp.), Iridaceae (Iris sp) ve Solanaceae (Nicotiana tabacum) türlerinde de görülmektedir. Bugün en çok kullanılan izoflavon kaynakları soya fasulyesinin işlenmesi ile elde edilen çeşitli ürünlerdir. Bunlar soya unu, soya protein izolatları, tofu, soya sütü, soya yoğurdu ve soya şehriyesidir. Soya ürünleri dışındaki kaynaklar diğer kurubaklagiller, tam-tahıl ürünleri ve kırmızı yonca otlarıdır (Cassidy ve ark 2000, Bingham ve ark 1998). Uzakdoğuda sıklıkla tüketilen fermente soya ürünlerinin izoflavon içeriği zengindir. Çünkü fermentasyon süresince mikroorganizmalar izoflavonların glikozit bağı kırarak glikozit yapılarının aglikonlara dönüşmesini sağlar. Bu durum serbest formdaki bileşiklerin konsantrasyonunu ve biyoyararlılığını artırabilmektedir (Liggins ve ark 1998).

1.2.2. Fitoöstrojenlerin etki mekanizması

Doğal östrojenlere benzerlik gösteren fitoöstrojenler organizmada bulunan doğal östrojenlerle yarışarak reseptörlere bağlanıp direkt etki oluşturabilirler. Ayrıca östrojen metabolizmasında rol oynayan bazı enzimlerin etkinliğini değiştirdiği bildirilmiştir. Bu etkisi ile üreme sistemi hücrelerinin östrojen metabolizmasını bozabildiği ve östrojenlerin hücreler üzerindeki etkisini değiştirebildiği belirtilmiştir (Haris ve ark 2000, Singh ve ark 1996). Bu yönde yapılan araştırmalarda farelerdeki östrojen reseptörlerinin işlevini sürdürmemesinin infertilite problemine yol açtığı ve bu etkiden sadece östrojen reseptörlerinin sorumlu olduğu ileri sürülmüştür (Atanassova ve ark 1999).

Steroidler yağda çözünmelerine karşın, vücudun bütün hücrelerine geçebilirler. Östrojenler steroid yapıdadır ve özellikle mukoza, hipotalamus ve önhipofize geçer. Serbest östrojen fraksiyonu hücre içine girerek nükleus üzerindeki özel reseptörlerine bağlanır. Oluşan hormon-reseptör kompleksi nükleus içine girerek DNA kromatini üzerindeki cevap elementi bölgesine bağlanır ve m-RNA sentezlenerek özgül proteinlerin üretimini sağlar ve hedef organ veya hücreyi etkiler (Nilsson ve ark 2001).

Dışarıdan verilen östrojen ve androjen hormonları da ön hipofiz üzerine kısıtlayıcı etki yapar ve LH hormon salınımını azaltır ve LH azalması Leydig hücrelerini etkileyerek testesteron salınımını azaltır (Yılmaz 1999). Ancak daidzeinin doğrudan östrojen reseptörlerine bağlanarak direk testis üzerinden mi yoksa hipotalamus ve hipofiz bezini etkileyerek testesteron üretimini etkilediği bilinmemektedir. Zhang ve Cui (2009) yaptıkları çalışmalarda fare Leydig hücre kültürlerine daidzein uygulandığı araştırmada, düşük doz daidzein testesteron salınımı artırmaktadır. Yüksek dozda daidzein ise testesteron üretimini azaltmaktadır (Weber ve ark 2001).

1.2.3. Fitoöstrojenlerin tedavide kullanım alanları

Son yıllarda fitoöstrojenler, birçok insanın yan etkileri nedeniyle östrojenik ilaç kullanmaya isteksiz oluşu yüzünden hormon tedavisine etkili alternatifler bulma girişimi içinde ilaç endüstrisinde bir hayli ilgi yaratmıştır. Yapılan çalışmalar fitoöstrojenlerin göğüs, prostat, endometrium gibi hormona bağlı kanser türleri ile kolon, rektum ve pankreas gibi diğer kanser türlerine karşı koruyucu olabileceğini göstermiştir (Fitzpatrick 1999, Cassidy ve ark 2000). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar bitkisel östrojenlerin tüketiminin özellikle hormona bağlı oluşan hastalıklardan bir ölçüde koruma sağladığını göstermektedir. Göğüs kanseri, prostat kanseri ve koroner kalp hastalığı riski düşük toplumlarda (ör: Japonlar) idrarla isoflavonoid atılımı yüksek, bu hastalıkların riskinin yüksek olduğu toplumlarda (Batı Ülkeleri) ise idrarla isoflavonoid atılımı düşüktür. Daha açık bir ifade ile fitoöstrojen alımının fazla olduğu ülkelerde prostat kanseri görülme sıklığının düşük olduğuna işaret edilmektedir. Fakat bu koruyucu etkilerin mekanizması açık değildir (Adlercreutz ve ark 1991). Fitoöstrojenlerin, steroid metabolizmasında yer alan aromataz ve 17- hidroksi steroid dehidrogenaz gibi enzimleri baskılayabilme yeteneklerinin ve diğer antikarsinojenik etkilerinin prostat kanserine karşı koruyucu olabileceği iddia edilmiştir (Hempstock ve ark 1998).

Östrojenik özelliklerinden başka, fitoöstrojenlerin özellikle izoflavonların polifenolik yapılarına bağlı olarak antioksidan etkileri vardır. İzoflavonlar, serbest radikalleri doğrudan veya antioksidan enzimleri etkileyerek, oksidatif DNA hasarını önleyebilirler. Fitoöstrojenlerin tümör oluşumunda önemli rol oynayan bazı enzimlerin

etkinliklerini baskılayabildiklerini gösteren çalışmalardan sonra, bu bileşiklerin potansiyel antikarsinogenik etkilerine dikkat çekilmiştir (Davis ve ark. 1999, Burke ve ark 2000, Umland ve ark 2000). Fitoöstrojenler antiproliferatif özellikleri ile hücrelerin bölünerek çoğalmasını önlediği, antianjiogenetik etkileriyle de anjiogenezi baskılayarak tümör hücrelerinin metastaz yapmalarını azalttıkları bildirilmiştir (Knight ve Eden 1996, Cassidy ve ark. 2000). Yapılan çalışmalarda izoflavonoidlerin veya soya/soya ürünlerinin ve keten tohumunun toplam kolesterolü ve düşük dansiteli lipoprotein seviyelerini düşürücü, yüksek dansiteli lipoproteini yükseltici etkileri gösterilmiştir (Umland ve ark 2000). Testiküler hücre kültürü ile yapılan bir çalışmada poliklorlu bifeniller verilen hücrelerde toksik etkiyi daidzeinin azalttığı gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2008)

1.2.4. Fitoöstrojenlerin yan etkileri

Fitoöstrojenlerin alımı ile ilgili kaygıların olduğu bazı noktalar da vardır. Bunların başında bu bileşiklerin kısırlığa neden olabileceği ve göğüs kanserini uyarabileceği düşünceleri gelir. Ayrıca izoflavonların aşırı miktarlarda alımına neden olabilecek olan soya bazlı yenidoğan mamalarının kullanımı da kaygı duyulan durumlardan biridir (Davis ve ark 1999, Setchell 2001). İzoflavonların tiroid hormonlarının üretiminde anahtar rol oynayan tiroid peroksidaz enzimini inhibe ederek, tiroid hastalıklarına neden olabileceği düşünülmüştür. Ancak bu kaygıların haklı kaygılar olduğunu gösteren kanıtlar olmadığı gibi, bu bileşiklerin düzenli olarak ve yüksek konsantrasyonlarda tüketildiği toplumlarda bu tip rahatsızlıkların görülme sıklığında farklılık olmadığı belirtilmiştir (Davis ve ark 1999).

Araştırmada, 20 gün süreyle Daidzein yedirilen erişkin erkek ratların testis dokusunda meydana gelen morfolojik, morfometrik değişimlerin ve spermatogonial kök hücre yoğunluklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışma Adnan Menderes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (ADÜ-HADYEK, sayı: 2010/072) izniyle gerçekleştirildi. Çalışmada Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlanan 30 adet 3 aylık erkek Sprague Dawley rat kullanıldı. Hayvanlar bir kontrol (n=10) ve iki deney (n=20) olmak üzere toplam 3 gruba ayrıldı. Hayvanlar araştırma süresince 12 saat aydınlık/ karanlık ortamda, konvansiyonel koşullarda ve *ad libitum* su ve yem ile beslendi.

2.2. Yöntem

Hayvanlardan 10 tanesine 20 mg/kg, diğer 10 tanesine de 100 mg/kg günlük dozlarda daidzein (Cayman, Katolog No: 10005161) gavaj yoluyla uygulandı (Pan ve ark. 2008). Diğer 10 hayvan ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Son Daidzein uygulanmasından bir gün sonra, ratlar intraperitoneal yolla xylazine + ketamin (ksilazin hidroklorür 40 mg/kg + ketamin hidroklorür 50 mg/kg Bayer) ile anestezi edildikten sonra servikal dislokasyon ile öldürüldüler. Alınan testis örnekleri Bouin's tespit sıvısında 24 saat tespit edildi. Rutin doku takibinden sonra parafinde bloklandı. Bloklardan 200 mikrometre arayla 5 mikrometre kalınlığında seri olarak kesitler alındı. Kesitler Crosman 'ın üçlü boyama yöntemi, hematoksilin eozin ve periodic acid schiff (Periodic acid shift / PAS) reaksiyonu yöntemleri ile boyandı (Demir 2001).

Bloklardan seri olarak alınan 6 kesitin her birinde rastgele 10'ar adet enine kesilmiş seminifer tubulde tubulus çapı ve epitel yüksekliği (bazalden lümene) ışık mikroskobu (Leica DMLB) ve buna bağlı Görüntü Analiz Sistemi (Leica Q Win Standart) ile ölçüldü. Tubulus çapı ve epitel yükseklikleri seminifer tubullerdeki spermatogenetik dalgaya bağlı olarak değişeceği için, verilerin güvenilirliği açısından bu dalgalanmanın IX ve X. aşamadaki tubuller seçilerek ölçümler bu tubullerde gerçekleştirildi. Dalgalanmanın IX ve X. dönemi diğer dönemlerden kolay ayrılabilmesinden dolayı tercih edildi. Seminifer tubullerde germ hücre yoğunluğu bloklardan seri olarak alınan 6 kesitin her birinde

rastgele 6'şar adet enine kesilmiş tubulde subjektif puanlama yöntemi ile değerlendirildi (1: Çok az, 2: Az, 3: Orta, 4: Yoğun).

Ayrıca alınan testis dokusu kesitlerinde immunohistokimyasal olarak (İşaretli streptavidin- biyotin Yöntemi) spermatogonial kök hücreler işaretlendi (Van Bragt ve ark. 2008). Bu amaçla doku kesitleri deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemlerinden sonra antijen retrieval için 98 °C'de 0.01 M sodyum sitrat içinde mikrodalga fırında 10 dakika kaynatıldı. Kesitlerdeki endojen peroksidaz aktivitesi ise Fosfat-tamponlu salinde hazırlanmış % 3 lük H₂O₂ de 5 dakika kalarak bloke edildi. Kesitler % 5'lik normal tavşan serumunda 30 dakika bekletilen kesitler 4 °C'de bir gece primer antikorda (anti-UTF-1, Chemicon International, AB3383, poliklonal, Fosfat-tamponlu salin ile 1/100 sulandırma) inkube edildi (Kristensen ve ark. 2008). Daha sonra sekonder antikora (Dako, K-0690) bulunan biotinli sekonder antikorda (Dako Cytomation LSAB+system-HRP) oda ısısında 1 saat ve streptavidin HRP'de (Dako Cytomation LSAB+system-HRP) oda ısısında 1 saat inkube edildi. Antikora bağlanma gösteren hücrelerin boyanması DAB kullanılarak gerçekleştirildi. Eş zamanlı olarak ilgili primer antikora ilave edilmeksizin aynı yöntem uygulanan doku kesitleri negatif kontrolleri oluşturdu. Hematosilen ile zıt boyamaları yapılan kesitler dehidre edilerek lamelle kapatıldı. İncelenen kesitlerin gerekli görülen bölgelerinden kamera (Leica DC-200) ile fotoğraflar çekildi. Seminifer tubullerde kök hücre yoğunluğunu belirlemek için her kesitten rastgele 10'ar adet enine kesilmiş tubulde subjektif puanlama yöntemi ile değerlendirildi (1: Çok az, 2: Az, 3: Orta, 4: Yoğun).

2.3. İstatistiksel Analiz

Yapılan ölçümlerin istatistiksel analizi için SPSS (for Windows 11.5) hazır paket programı kullanıldı. Tubulus çapı ve tubulus epitel yüksekliği bakımından gruplar arası farklılığın olup olmadığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldı. Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Duncan testi ile belirlendi. Seminifer tubullerde germ hücre yoğunluğu ve spermatogonial kök hücre yoğunluğu bakımından gruplar arası farklılığın olup olmadığını belirlemek için Kruskal-Wallis testi yapıldı. Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Post Hock LSD testi ile belirlendi.

3. BULGULAR

3.1. Histolojik ve Morfometrik Bulgular

Kontrol grubu hayvanlarda, seminifer tubullerde germ hücreleri ile Sertoli hücrelerinin ve interstisyel alanda Leydig hücrelerinin düzenli olarak yer aldığı testislerin normal testiküler görünüme sahip oldukları görüldü (Şekil 1).

Daidzein yedirilen deney gruplarında ise özellikle seminifer tubullerde büzüşme olduğu (Şekil 2), tubulus lümenlerinin ise kontrollere (Şekil 3) göre daha geniş olduğu (Şekil 4) dikkati çekti. Ayrıca daidzein verilen ratların seminifer tubul kesitlerinde yaygın olarak irili ufaklı vakuollerin varlığı dikkati çekti (Şekil 5 ve 6). Fakat kontrol grubunda vakuoler yapılara rastlanmadı (Şekil 1 ve 3). Daidzein uygulanan gruplarda seminifer tubullerde bulunan germ hücrelerinin yoğunlunun kontrol grubuna (Şekil 1 ve 3) göre azaldığı, germ hücrelerinde dökülmeler olduğu görüldü (Şekil 7).

Daidzein uygulamasından 20 gün sonra kontrol ve deney grubu hayvanlardan alınan testis örneklerinde seminifer tubulus çapı ve epitel yüksekliğine ait ortalama değerler Çizelge 1’de, seminifer tubullerdeki germ hücre yoğunluğu ise Çizelge 2’ de verildi. Daidzein uygulanan gruplarda tubulus çapı ve epitelyum yüksekliklerinin kontrollere göre azaldığı ($p<0,001$) görüldü. Fakat farklı dozlarda daidzein uygulanan gruplar arasında hem seminifer tubulus çapı hem de epitel yüksekliği açısından istatistiksel bir farklılık görülmedi. Seminifer tubullerde 20 mg/kg ve 100 mg/kg daidzein alan gruplardaki germ hücre yoğunluklarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı ($p<0,01$) görüldü.

Çizelge 1. Ratlara 20 gün Daidzein uygulamadan sonra testislerinde seminifer tubul çapları ve tubulus epitel yükseklikleri ($\bar{X} \pm S_{-\bar{x}}$).

Gruplar	Tubul çapı	Epitel Yüksekliği
Kontrol (n=10)	261 $\pm$ 2,62 ^a	66,0 $\pm$ 1,08 ^a
Grup1 (n=10) 20 mg/kg.	226 $\pm$ 5,16 ^b	52,4 $\pm$ 0,90 ^b
Grup2 (n=10) 100 mg/kg	233 $\pm$ 4,11 ^b	58,0 $\pm$ 1,70 ^b
P	***	***

a, b: her sütündeki farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksek olarak önemlidir.

*** p<0,001

Çizelge 2. Ratlara 20 gün Daidzein uygulamadan sonra testis seminifer tubullerinde germ hücre yoğunlukları ($\bar{X} \pm S_{-\bar{x}}$).

	Kontrol (n=10)	Grup1 (n=10) 20 mg/kg.	Grup2 (n=10) 100 mg/kg	P
Germ hücre yoğunluğu	3,90 $\pm$ 0,20 ^a	2,73 $\pm$ 0,20 ^b	2,25 $\pm$ 0,27 ^c	**

a, b, c: her satırdaki farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksek olarak önemlidir.

** p<0,01

3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

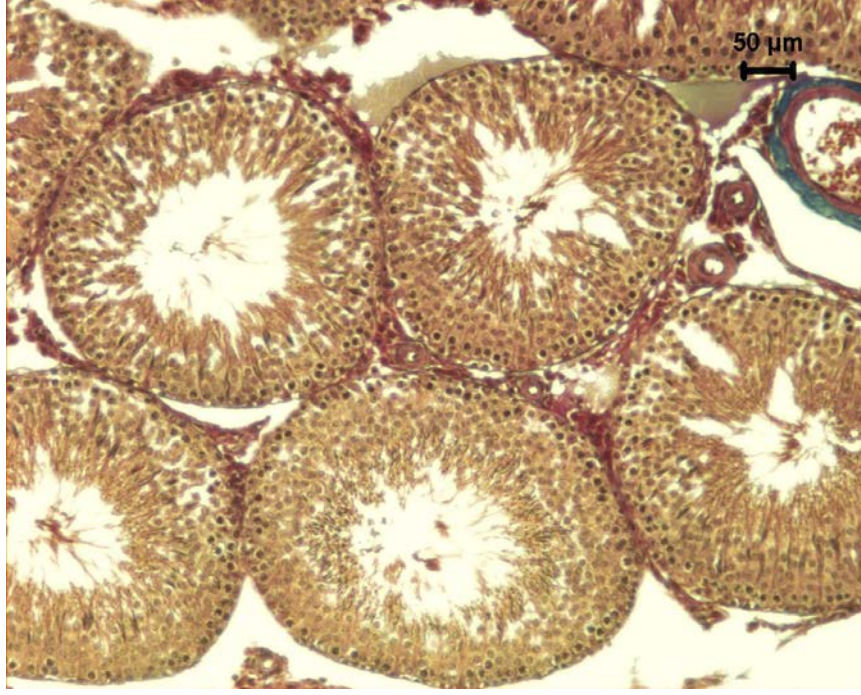
Yapılan immunohistokimyasal demonstrasyonlar sonucunda spermatogonial kök hücrelerin kontrol ve deney gruplarında seminifer tubullerin bazalinde lokalize oldukları gözlemlendi (Şekil 8 ve 9). İmmun reaktivitenin spermatogonial hücrelerin çekirdeklerinin periferinde geliştiği görüldü (Şekil 8 ve 9). Fakat immün reaktif hücrelerin hem kontrol hem de deney gruplarında bütün seminifer tubullerde değil, bazı tubuluslarda görüldüğü dikkati çekti (Şekil 10). Yapılan incelemelerde, farklı dozlarda (20 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün) daidzein verilen gruplarda kontrollere (Şekil 8) göre spermatogonial kök hücrelerin daha yoğun olduğu görüldü (Şekil 9). Daidzein uygulamasından 20 gün sonra kontrol ve deney grubu hayvanlardan alınan testis örneklerinde spermatogonial kök hücre yoğunluklarına ait ortalama değerler Çizelge' 3'de verildi. Seminifer tubullerde 20 mg/kg ve 100 mg/kg daidzein alan gruplardaki kök hücre yoğunluklarının kontrol grubuna göre istatistiksel olarak arttığı ($p<0,05$) tespit edildi. Ayrıca yüksek doz daidzein uygulanan grupta immün pozitif hücrelerin düşük doz grubuna göre daha yoğun olduğu ($p<0,05$) görüldü.

Çizelge 3. Yirmi gün boyunca Daidzein uygulanmış ratların seminifer tubullerinde spermatogonial kök hücre yoğunlukları ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

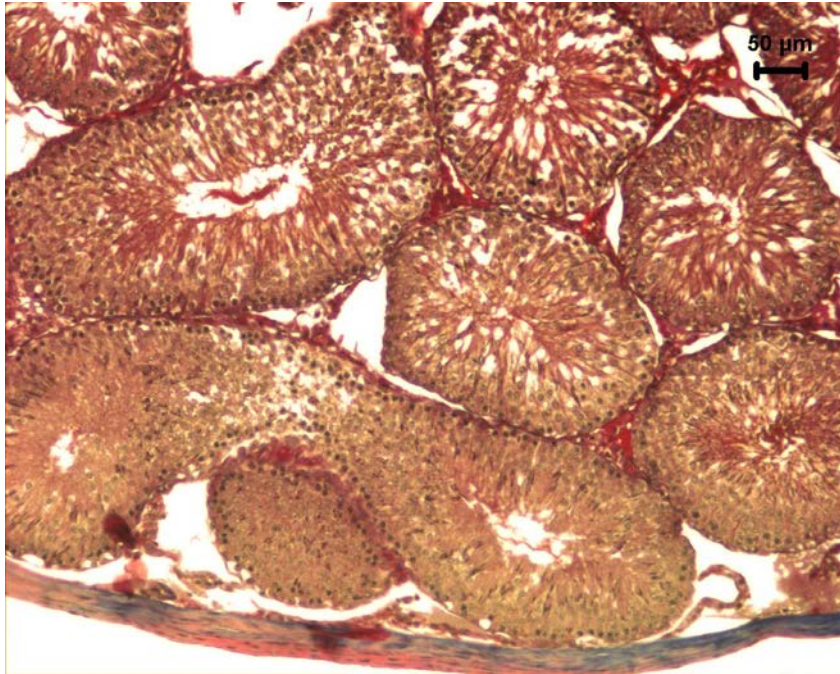
	Kontrol (n=10)	Grup1 (n=10) 20 mg/kg.	Grup2 (n=10) 100 mg/kg	P
spermatogonial kök hücre yoğunlukları	$2,22 \pm 0,038^a$	$3,08 \pm 0,041^b$	$3,84 \pm 0,045^c$	*

a, b, c: her satırdaki farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksek olarak önemlidir.

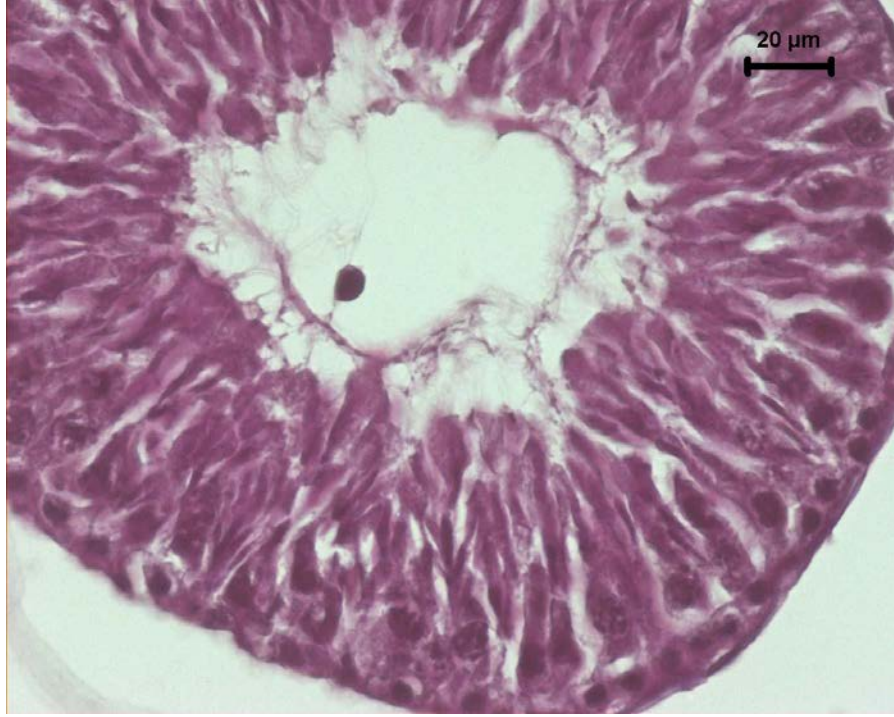
* $p<0,05$



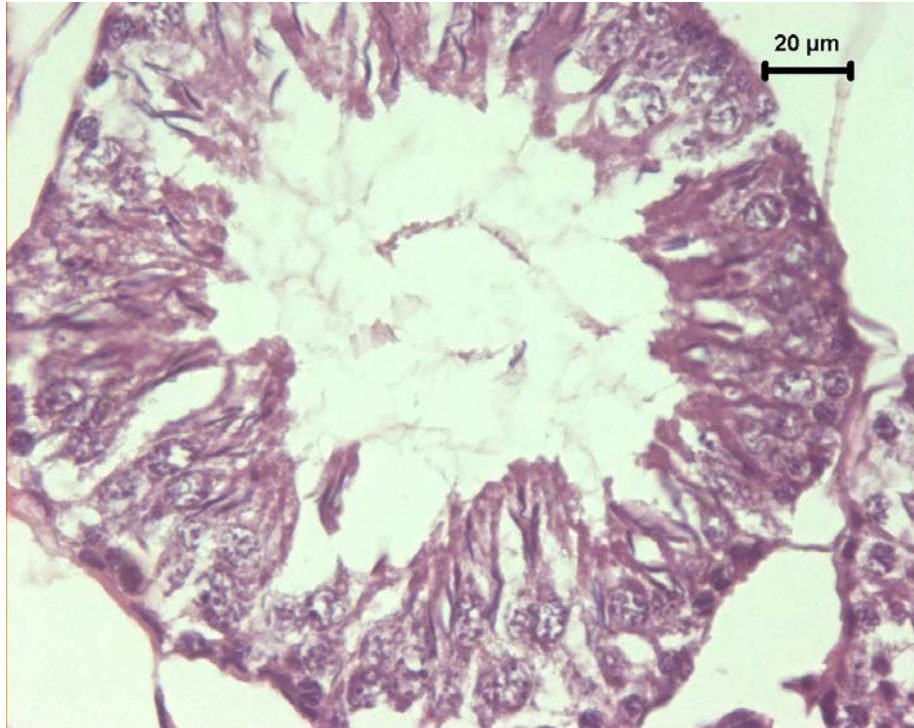
Şekil 1. Kontrol grubu erişkin bir ratın testis kesiti. Normal testiküler yapı gözlemlendi. Üçlü boyama. Bar: 50 µm.



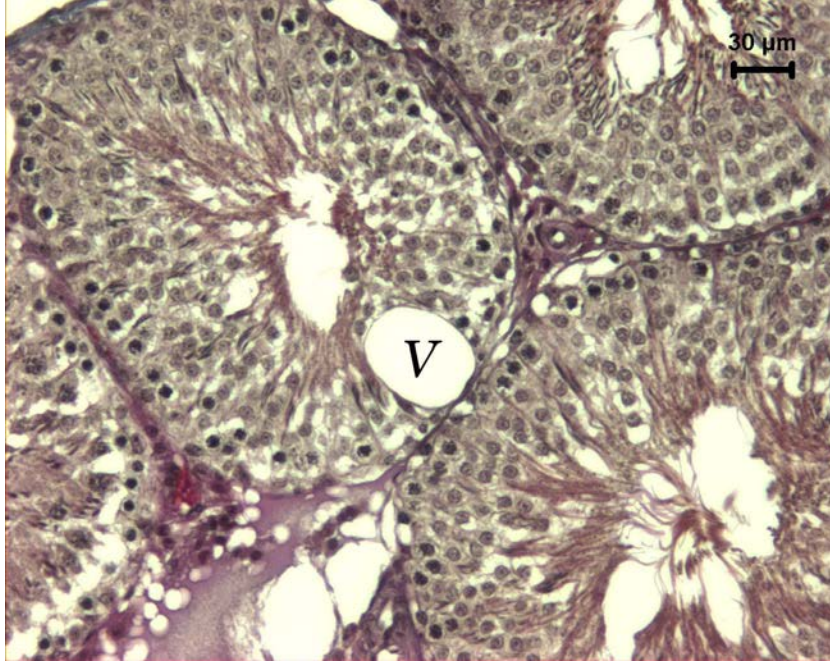
Şekil 2. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. Büzüşme olan seminifer tubuller. Üçlü boyama. Bar: 50 µm



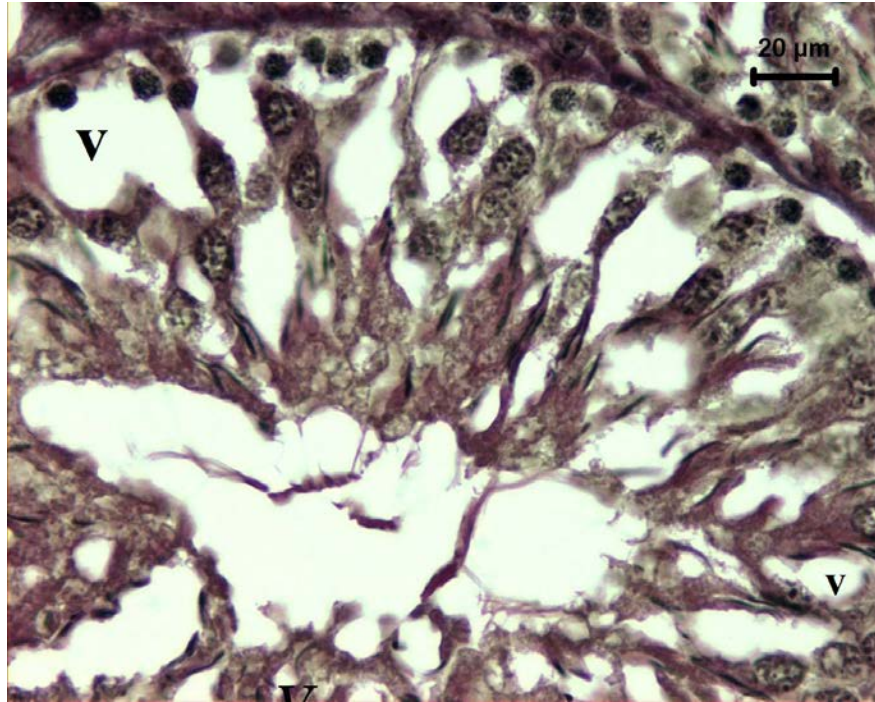
Şekil 3. Kontrol grubu erişkin bir ratın testis kesiti. H & E Bar: 20 µm.



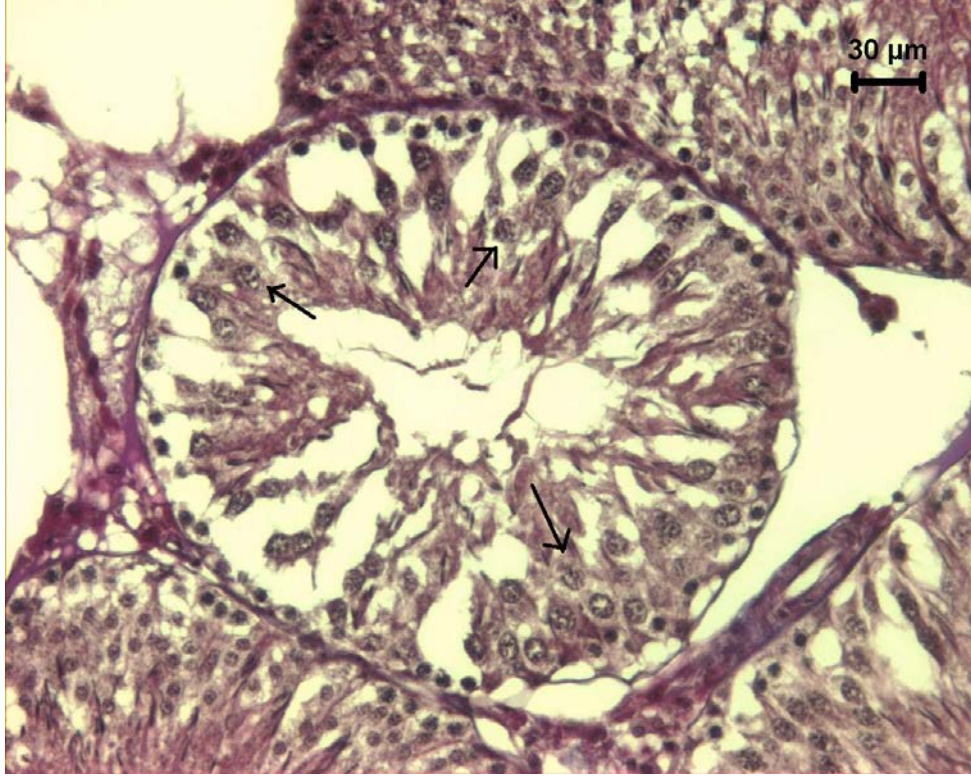
Şekil 4. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti Seminifer tubul lümeni kontrol grubuna göre geniş. H & E. Bar: 20 µm.



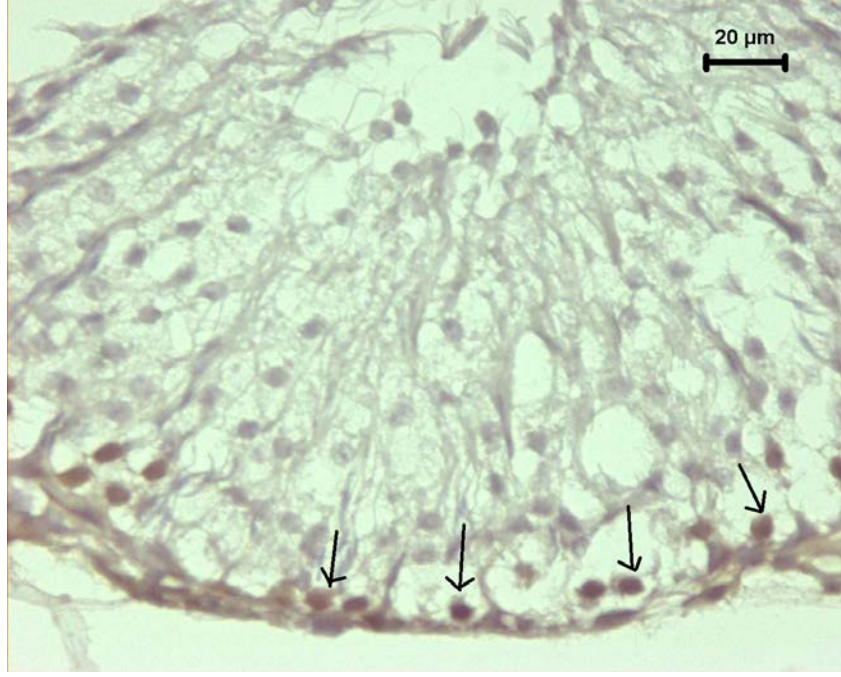
Şekil 5. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. Semifer tubul kesitlerinde vakuol (V). Üçlü boyama. Bar: 30 µm.



Şekil 6. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. Semifer tubul kesitlerinde irili ufaklı vakuoller (V) Üçlü boyama. Bar: 20 µm.



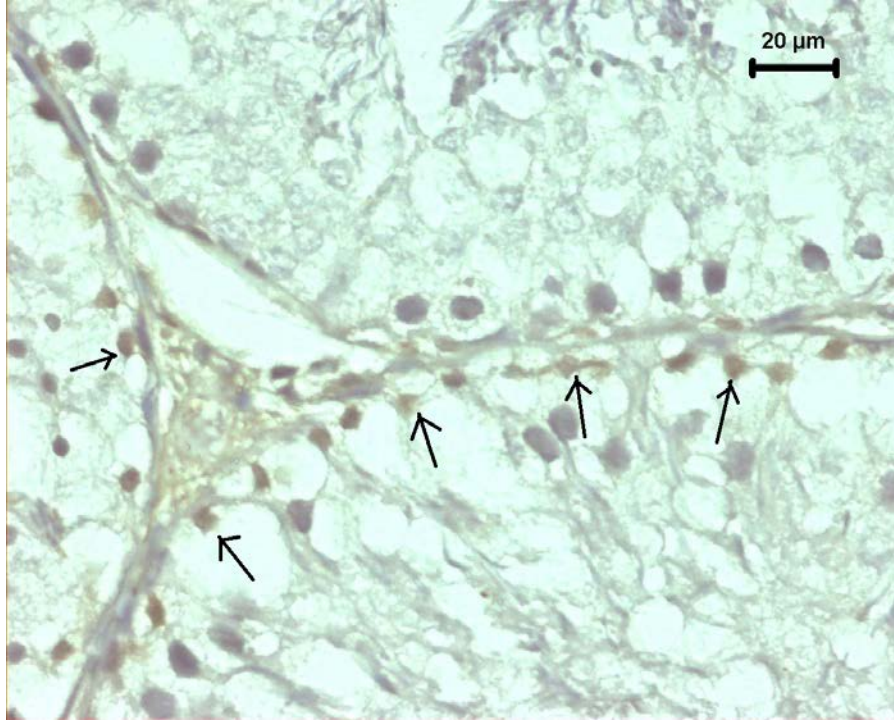
Şekil 7. 100 mg/kg. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. Seminifer tubullerde azalmış germ hücreleri (→), germ hücrelerinde dökülmeler meydana geldi. Üçlü boyama. Bar: 30 µm.



Şekil 8. Kontrol grubu erişkin bir ratın testis kesiti. seminifer tubullerin bazalinde lokalize olan spermatogonial kök hücreleri (→). İşaretli streptavidin- biyotin Yöntemi. Bar: 20 µm.



Şekil 9. Daidzein uygulanmış erişkin bir ratın testis kesiti. Kontrol grubuna göre daha yoğun spermatogonial kök hücreleri. (→).İşaretli streptavidin- biyotin Yöntemi. Bar: 20 µm.



Şekil 10. Kontrol grubu erişkin bir ratın testis kesiti. Spermatogonial kök hücreler (→).İmmun reaktif hücreler herseminifer tubul kesitinde değil bazı tubullerde görülmektedir. İşaretli streptavidin- biyotin Yöntemi. Bar: 20 µm.

4. TARTIŞMA

Son 50 yıl içerisinde erkeklerde sperm sayısının giderek azaldığı ve bunun başlıca çevresel etkenlere bağlı olduğu ileri sürülmektedir (Sharpe ve Shakkebaek 1993). Bu çevresel etkenlerden biri de hayvan ve insan gıdalarında bulunan fitoöstrojenlerdir. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar bitkisel östrojenlerin tüketiminin özellikle hormona bağlı oluşan hastalıklardan bir ölçüde koruma sağladığını göstermektedir (Adlercreutz ve ark 1991). Diğer taraftan fitoöstrojenlerin alımı ile ilgili kaygıların olduğu bazı noktalar da vardır. Bunların başında bu bileşiklerin kısırlığa neden olabileceği ve kanseri uyurabileceği düşünceleri gelir (Davis ve ark 1999, Setchell 2001). Bu nedenlerden dolayı, bu çalışmada, erişkin erkek ratlara oral olarak 20 gün süreyle fitoösrojen (daidzein) verilerek testis histolojisinde ne gibi değişiklikler yaptığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sunulan çalışmada daidzein yedirilen hayvanların seminifer tubullerinde büzüşme olduğu, tubulus lümenlerinin ise kontrollere göre daha geniş olduğu ve seminifer tubullerde bulunan germ hücrelerinin yoğunlunun kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. Ayrıca daidzein uygulanan gruplarda tubulus çapı ve epitelyum yüksekliklerinin kontrollere göre azaldığı dikkati çekti. Yapılan literatür incelemelerinde daidzein yedirilerek tubulusların histometrik parametrelerini inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Jiang ve ark (2008) 2 mg/kg, 20 mg/kg ve 100 mg/kg şeklinde 3 farklı dozda daidzein verilen ratlarda sadece 100 mg/kg daidzein alan ratların testislerinde testiküler atrofi ve spermatogenezisin zarar gördüğünü bildirilmişlerdir. Han ve ark (2003) yaptığı çalışmada ise sperm kalitesi 100 mg/kg daidzein dozunda değişmezken, 1000 mg/kg dozda azaldığı bildirilmişlerdir.

Öte yandan başka fitoösrojen veya bunların kombimasyonlarını yem katkısı olarak kullanan çalışmalara bakacak olursak; Robertson ve ark (2002) izoflavon içeren dietle (soya katılmış yem) beslenen farelerde spermatogenezis'in aksadığını (germ hücre sayısının azaldığını), tubulus lümen volümünün arttığını bildirmiştir. Germ hücre yoğunluğunun azalması ve tubulus lümeninin genişlemesi bu çalışmadaki verilerle uyumludur. Bakırel ve ark.'nın (2002) yaptığı çalışmada, yemlerine fitoöstrojen (*Trifolium pratense*) katılan ratların seminifer tubul çaplarında ve primer spermatositlerin sayısında

herhangi bir değişme görölmezken, epididimisten alınan spermatozoonların motilite ve morfolojisinin bozulduğu belirtilmiştir. Vicdan ve ark (2007) yaptığı çalışmada ise yemlerine 500 mg/g ve 1000 mg/g fitoöstrojen (daidzein + genistein kombinasyonu) verilen farelerin seminifer tubullerinin germ hücrelerinde apoptozisin arttığını belirlemişlerdir. Serum sex steroid ve gonodotrofin seviyelerinin bakıldığı çalışmalarda; Mitchell ve ark (2001) 2 ay süreyle insanlara fitoöstrojen (40 mg, genistein, daidzein ve glycitein) katkılı beslemenin sonunda serum sex steroid ve gonodotropin seviyelerini etkilemediğine dikkati çekerken, Robertson ve ark (2002) izoflavon içeren dietle beslenen farelerde FSH' nin bloke olduğunu bildirmişlerdir.

Erişkin erkek ratlara östrojen (ethinyl estradiol, diethylstilbestrol gibi) verilerek testiküler yapı ve hormonların incelendiği çalışmalarda (Sharpe ve ark 1998, Atanassova ve ark 1999, Hossaini ve ark 2003), seminifer tubul çapının azaldığı, seminifer tübül germ hücre dökülmeleri, seminifer epitelyum katının atrofik olduğu, germ hücrelerde apoptozisin arttığı, seminifer tubul lümeninin genişlediği, gonodotropin ve Gn Rh seviyesinin azaldığı bildirilmiştir. Bu çalışmalardaki veriler fitoöstrojen vererek elde ettiğimiz verileri destekler niteliktedir.

Ayrıca daidzein verilen ratların semifer tubul kesitlerinde yaygın olarak irili ufaklı vakuollerin varlığı dikkati çekti. Fakat kontrol grubunda vakuoler yapılara rastlanmadı. Fitoöstrojen verilerek testiküler yapıdaki vakuoler değişikliklerle ilgili herhangi bir bulguya rastlanmamıştır. Fakat Hossaini ve ark (2003) ratlara 40 µg/kg estrodiol benzoat gavaj yöntemi ile verdikleri çalışmalarında testislerin seminifer tubul kesitlerinde sıklıkla vakuoller yapılara rastladıklarını belirtmişlerdir. Bu bulgu çalışmamızın sonucu ile uyuşmaktadır.

Spermatogenezisin devamlılığı seminifer tubullerde bulunan spermatogonial kök hücrelerle sağlanmaktadır. Spermatogonyum A'lar pluripotent kök hücre özelliklerine sahiptir. Bir pluripotency geni olan UTF-1 (undifferentiated embryonic cell transcription factor-1) erişkin farelerde sadece ovaryum ve testiste tanımlanmıştır (Okuda ve ark 1998, Van Bragt ve ark 2008). Ayrıca Kristenson ve ark (2008) UTF-1 geninin pluripotenside transkripsiyon faktörleri olarak rol aldığını ve spermatogonial yenilenmede görev aldığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, UTF-1'in testiküler germ hücre tümörlerinde eksprese edildiği vurgulanarak, bu tümörlerde UTF-1'in yoğun olarak eksprese edilmesinden dolayı

bu tümörlerin spermatogonium'dan köken aldığını ileri sürmüşlerdir. Sunulan çalışmada, farklı dozlarda (20 mg/kg/gün ve 100 mg/kg/gün) daidzein verilen ratların testis kesitlerinde UTF-1 demonstrasyonu gerçekleştirilerek işaretlenen spermatogonial kök hücrelerin seminifer tubullerde kontrollere göre daha yoğun olduğu tespit edildi. Fitoöstrojenlerin UTF-1 pozitif spermatogonial kök hücrelerin yoğunluğunu nasıl etkilediği konusunda herhangi bir çalışmaya rastlanmadı. Bu bulgu ilk kez bu çalışmayla ortaya konmuştur.

Bilindiği üzere, germ hücrelerinin gelişim süreci FSH ve testosteronun Sertoli hücreleri üzerindeki etkilerine bağlı olup, her iki hormon da germ hücrelerinde hücre bölünmesi ve farklılaşmasını potansiyalize eder (McLaghlán ve ark 1996). Ancak Saunders ve ark (2001), gelişimin değişik aşamalarındaki germ hücrelerinde östrojen reseptörlerinin varlığı nedeniyle, germ hücreleri üzerinde östrojenin direkt etkisinin olduğunu ve östrojenin Leydig hücreleri ve Sertoli hücrelerinde inhibitör, germ hücrelerinde ise stimülatör etki gösterdiklerini bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar eksojen olarak uygulanan östrojenin sıçanlarda prespermatogonial hücrelerde (gonositler) ve spermatogonial hücrelerde proliferasyonu uyardığını ve bunu da bu hücrelerde bulunan östrojen reseptör- β aracılığı ile gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir. Bu bilgiler ışığında, sunulan çalışmada daidzein yedirilen sıçanların testislerinde UTF-1 pozitif spermatogonial kök hücre yoğunluğunun kontrollere göre artmasının mekanizması; bu hücrelerde bulunan östrojen reseptörlerinin uyarılması aracılığı ile proliferere oldukları, şeklinde açıklanabilir.

5. SONUÇ

Sunulan çalışmada daidzein yedirilen hayvanların seminifer tubullerde b     me olduğu, tubulus lümenlerinin ise kontrollere göre daha geniş olduğu, seminifer tubul kesitlerinde yaygın olarak irili ufaklı vakuollerin olduğu ve seminifer tubullerde bulunan germ hücrelerinin yoğunlunun kontrol grubuna göre azaldığı, germ hücrelerinde d  k  meler olduğu görülmüştür. Ayrıca daidzein uygulanan gruplarda tubulus çapı ve epitelyum y  ksekl  klerinin kontrollere göre azaldığı dikkati çekmiştir. Yapılan immunohistokimyasal demonstrasyonlar sonucunda daidzein verilen gruplarda kontrollere göre spermatogonial kök hücrelerin daha yoğun olduğu tespit edilmiştir. Histometrik ve immunhistokimyasal veriler ilk kez bu çalışma ile ortaya konmuştur. Bu   alı  ma ile insanlar ve hayvanların yedikleri besinlerle fito  strojenleri de aldıkları d    n  ld  ğ nde, bu konunun aydınlatılması açısından ülkemizde geniş çaplı epidemiyolojik çalışmaların yapılmasına gereksinim bulunmaktadır.

ÖZET

Bu çalışmada oral olarak 20 gün süreyle daidzein verilen ratların testislerinde meydana gelen histolojik ve histometrik farklılıkların incelenmesi amaçlandı. Materyal olarak 30 adet 3 aylık erkek Sprague-Dawley rat kullanıldı. Hayvanlar her grupta 10 rat olacak şekilde üç gruba ayrıldı. Hayvanlardan 10 tanesine 20 mg/kg, diğer 10 tanesine de 100 mg/kg günlük dozlarda daidzein gavaj yoluyla uygulandı. Diğer 10 hayvan ise kontrol grubu olarak kullanıldı. Sunulan çalışmada daidzein yedirilen hayvanların seminifer tubullerde büzüşme olduğu, tubulus lümenlerinin ise kontrollere göre daha geniş olduğu, seminifer tubul kesitlerinde yaygın olarak irili ufaklı vakuollerin olduğu, hücre dökülmesinin gerçekleştiği ve seminifer tubullerde bulunan germ hücrelerinin yoğunluğunun kontrol grubuna göre azaldığı görüldü. Ayrıca daidzein uygulanan gruplarda tubulus çapı ve epitelyum yüksekliklerinin kontrollere göre azaldığı dikkati çekti. Yapılan immunohistokimyasal demonstrasyonlar sonucunda daidzein verilen gruplarda kontrollere göre spermatogonial kök hücrelerin daha yoğun olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar, diyet ile alınan fitoöstrojenlerin erkeklerde fertilitayı olumsuz etkileyebileceğini akla getirmektedir.

Anahtar Kelimeler; Daidzein, Spermatogonial kök hücre, Testis, Rat

SUMMARY

In this study, we aimed to examine the histological and histometrical changes in the testes of rats produced by orally administration of daidzein for 20 days. A total of 30 male Sprague-Dawley rats in 90 days of age were used. Rats were randomly divided in three groups of 10. One group was administered with 20 mg/kg and the other group was administered with 100 mg/kg daidzein daily with gavage. Other 10 rats were used as control group. In this study, we observed that, the testes of the daidzein administered rats represented seminiferous tubules contraction, enlargement of tubular lumens, diffuse vacuolization in sections of seminiferous tubules, cell loss occurred and the reduction of the germ cells frequency in the seminiferous tubules compared with the control rats. Also, tubular diameter and the epithelial height decreased in daidzein administered rats' compared with the controls. Immunohistochemical analyzes revealed that, the spermatogonial stem cells were found to more intense in daidzein administered rats when compared to control. These results suggested that, dietary phytoestrogens may negativ affect on male fertility.

Keywords: Daidzein, Spermatogonial stem cell, Testes, Rat

KAYNAKLAR

Abraham LK. Histology and Cell Biology. 2006, p. 531-553.

Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T, Okada H. *Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet.* American Journal of Clinical Nutrition, 1991, 54: 1093-1100.

Anderson JJB, Anthony, MS, Cline, JM, Washburn, SA, Garner SC. *Health potential of soy isoflavones for menopausal women,* Public Health Nutrition, 1999, 2(4): 489-504.

Angelova P, Davidoff M, Bakalska M, Kanchev L. *In vitro effects of substance P and arginin zasopression on testosterone production in Leydig cells of short and long photoperiodic hamsters,* Andrologia, 1996, 28: 321-326.

Artan E. Histoloji, 1.baskı, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Basımevi, 1988. p. 357-375.

Atanassova N, McKinnell C, Walker M, Turner KJ, Fisher JS, Morley M, Millar MR, Groome NP, Sharpe. *Permanent effects of neonatal oestrogen exposure in rats on reproductive hormone levels, Sertoli cell number and the efficiency of spermatogenesis in adulthood,* Endocrinology, 1999, 140(1): 5364-5373.

Bakirel T, Keleş O, Bozkurt H, Ak K. *Farelerde Trifolium pratensenin spermatogenezis üzerine etkisi ve akut toksisitesi,* Turkish Journal of Veterinary and Animal Science, 2002; 555-559.

Bingham SA, Atkinson C, Liggins J, Bluck L, Coward A. *Phyto-oestrogens,* British Journal Nutrition, 1998, 79: 393-406.

Burke GL, Vitolins MZ, Bland D. *Soybean isoflavones as an alternative to traditional hormone replacement therapy*, Journal Nutrition, 2000, 130: 664-665.

Cassidy A, Hanley B, Raventos R. *Isoflavones, lignans and stilbens-origins, metabolism and potential importance to human health*, Journal of The Science of Food and Agriculture, 2000, 80: 1044-1062.

Chamley WA, Clarke IJ, Moran AR. *Seasonal changes in LH secretion in normal ewes and ewes grazed oestrogenic clover*, Australian Journal of Biological Sciences, 1985, 38: 109-113.

Christensen AK. *Leydig cells*, In: Greep RO, Astwood EB, Hahninton DW, Geiger S (Eds). Handbook of Physiology. American Physiological Society, 1975, p.57-94.

Coskun B, İmir M. *Yem maddelerindeki östrojenik etkili maddeler ve hayvanlar üzerindeki etkileri*, Türk Veteriner Hekimliği Dergisi, 1991, 11: 21-24.

Davis S, Dalais F, Simpson E, Murkies A. *Phytoestrogens in health and disease*, Recent Progress In Hormone Research, 1999, 54: 185-211.

De Rooij DG. *Stem cells in the testis*, International Journal of Experimental Pathology, 1998, 79: 67–80.

Dellmann HD, Brown EM. Textbook of Veterinary Histology. 1987; p. 286-312.

Demir R. Histolojik Boyama Teknikleri. Ankara: Palme yayıncılık; 2001. 73-184.

Drews U. Gonadlar. Renkli Embriyoloji Atlası. İn: Aytekin Y, Gürsoy E. (eds). Yüce reklam, Nobel Tıp kitabevi İstanbul 2000; 336-337

Ehmcke J, Wistuba J, Schlatt S. *Spermatogonial stem cells*, Human Reproduction Update, 2006, 12(3): p. 275–282.

Emmens CW. *Oestrogenic, anti- oestrogenic and anti-fertility activities of various compounds*, Journal of Reproduction Fertility, 1965, 9: 277-283.

Erbengi T. Temel Histoloji. 2. Baskı 2. Cilt. Ankara: Güneş Kitabevi; 1990.

Eşrefoğlu M. Özel Histoloji. Malatya: Medipres yayıncılık; 2009. p. 260-261.

Fitzpatrick LA. *Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens*, Mayo Clinic Proceedings, 1999, 74: 601-607.

Formica JV, Regelson W. *Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids*, Food Chemistry, 1995, 33: 1061-1080.

Jiang CX, Pan LJ, Feng Y, Xia XY, Huang YF. *High-dose daidzein affects growth and development of reproductive organs in male rats*, Source College of Life Science, 2008, 14(4): 351-5.

Johnson KE. Histology and Cell Biology. Harwal Publishing Company 1991; p.295-304.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji. İn: Aytekin Y. (Eds), 6. baskı, Barış Kitabevi, İstanbul, 1993. p. 495-516.

Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. İn: Aytekin Y, Solakoğlu S (Eds), Nobel Tıp Kitabevi; 2006. p. 431-47.

Han ZY, Wang GL, Chen W, Zhang LJ. *Effects of daidzein on sperm quality, testis gain and testosterone in mice*, College of Animal Science Technology, 2003,9(8):566-8.

Harris GC, Nicholson HD. *Stage-related differences in rat seminiferous tubule contractility in vitro and their response to oxytocin*, Journal of Endocrinology, 1998, 157: 251–257.

Haris R.M, Waring RH, Kirk, CJ, Hughes, PJ. Sulphation of oestrogenic alkylphenols and 17- β -estradiol by human platelet phenol sulphotransferases. *J.Biol.Chem.* 2000; 275, 159-166.

Hassa O, Aşti RN. Embriyoloji. Ankara: Yorum basın yayın; 2003. p. 133-137.

Hempstock J, Kavanagh JP, George NJR. *Growth inhibition of prostate cell lines in vitro by phyto-oestrogens*, *British Journal Of Urology*, 1998, 82: 560-563.

Hess RA. *Quantitative and qualitative characteristic of the stage and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: Light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes*, *Biology of Reproduction*, 1990, 43: 525-542.

Hollmann PCH, Batan MB. *Absorption, metabolism and health effect of dietary flavonoids in man*, *Biomedicine Pharmacotherapy*, 1997, 51: 305-310.

Hossaini A, Dalgaard M, Vinggaard AM, Pakarinen P. *Male reproductive effects of octylphenol and estradiol in Fischer and Wistar rats*, *Reproductive Toxicology*, 2003, 17: 607-615

Kalaycı Ş. Histoloji. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1986. 374-377.

Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. In: Demir R (eds). Ankara: Palme Yayıncılık; 2006. 547-548.

Knight DC, Eden JA. *A Review of the clinical effects of phytoestrogens*, *Obstetrics and Gynecology*, 1996, 87: 897-904.

Kooistra SM, van den Boom V, Thummer RP, Johannes F, Wardenaar R, Tesson BM, Veenhoff LM, Fusetti F, O'Neill LP, Turner BM, de Haan G, Eggen BJ. *Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 regulates ESC chromatin organization and gene expression*, *Stem Cells*, 2010, 28(10): 1703-1714.

Krinke GJ. *The Laboratory Rat*, Academic Press, 2000, p. 150-152, 311-312.

Kristensen DM, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Graem N, Jacobsen GK, De Meyts ER, Leffers HV. Presumed pluripotency markers UTF-1 and REX-1 are expressed in human adult testes and germ cell neoplasms, *Human Reproduction*, 2008, 23(4): 775-782.

Leeson RC, Leeson ST, Paparo AA. Textbook of Histology. London: WB Saunders Company; 1985. p. 486-489.

Li H, Papadopoulos V, Vidic B, Dym M, Culty M. Regulation of rat testis gonocyte proliferation by platelet-derived growth factor and estradiol, *Endocrinology*, 1997, 138: 1289–1298.

Liggins J, Bluck LJC, Coward A. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food, *Analytical Biochemistry*, 1998, 264: 1-7.

Meehan T, Schlatt S, O'Bryan MK, de Kretser DM, Loveland KL. Regulation of Germ Cell and Sertoli Cell Development by Activin, Follistatin, and FSH, *Developmental Biology*, 2000, 220(2): 225-237.

McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, de Kretser DM, Robertson DM. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *Journal Endocrinology* January 1, 1996 148:1-9

Mitchell JH, Cawood E, Kinniburgh D, Provan A, Collins AR, Irvine DS. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males, *Clinical Science*, 2001, 100: 613–618.

Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi Klinik Yönleri ile. In: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Eds) Nobel Kitapevi; 6. Baskı: 2001.

Muller HM, Hoffman J, Mayr U. Stoffwechsel und wirkung von phytoöstrogenen beim tier, *Übersichten zur Tierernaehrung*, 1989, 17: 47-84.

Nilsson S, Kela S, Treuter E, Tujague M, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J. *Mechanisms of estrogen action*, Physiological Reviews, 2001, 81: 4

Okuda A, Fukushima A, Nishimoto M, Orimo A, Yamagishi T, Nabeshima Y, Kuro-o M, Nabeshima Y, Boon K, Keaveney M. *UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells*, Embo Journal, 1998, 17: 2019-2032.

Pan L, Xia X, Feng Y, Jiang C, Cui Y, Huang Y. *Exposure of juvenile rats to the phytoestrogen daidzein impairs erectile function in a dose-related manner in adulthood*, Journal of Andrology, 2008, 29: 55-62.

Robertson KM, O'donnel LI, Simpson ER, Jones MEE. *The Phenotype of the Aromatase Knockout Mouse Reveals Dietary Phytoestrogens Impact Significantly on Testis Function*, Endocrinology, 2002, 143: 2913–2921.

Ross MH, Kaye IG, Pawlina W. *Histology a text and atlas*. 4th edition. USA: Lippincott Williams Wilkins Press; 2003; p. 690–694.

Russell LD, Ettlin RA, Hixson APS, Clegg ED. *Histological and Histopathological Evaluation of The Testis*. Florida: Cache River Press; 1990. p. 119-160.

Sadler TW. Çeviri: Başaklar C. *Longman's Medikal Embriyoloji*. Palme Yayıncılık; 1996; p. 273-274.

Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquhart H, Irvine DS, Millar MR. *Differential expression of oestrogen receptor alpha and beta proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates*, Molecular Human Reproduction, 2001, 7(3): 227-236.

Setchell K. *Soy Isoflavones-Benefits And Risks From Nature's Selective Estrogen Receptor Modulators*, Journal of the American College of Nutrition, 2001, 20(5): 354-362.

Sharpe RM, Shakkebaek NE. *Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract*, The Lancet, 1993, 341: 1392-1395.

Sharpe, RM, Atanassova N, McKinnell C, Parte P, Turner KJ, Fisher JS, Kersr JB, Groome NP, Macpherson S, Millar MR, Saunders PTK. *Abnormalities in functional development of the Sertoli cells in rats treated neonatally with diethylstilbestrol: A possible role for oestrogens in Sertoli cell development*, Biology of Reproduction, 1998, 59: 1084-1094.

Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. *Functional analysis of spermatogonial stem cells in Steel and cryptorchid infertile Mouse models*, Developmental Biology, 2000, 220: 401–411.

Singh J, Hunt P, Eggo MC, Sheppard MC, Kirk CJ, Michell RH. *Thyroid-stimulating hormone rapidly stimulates inositol polyphosphate formation in FRTL-5 thyrocytes without activating phosphoinositidase*, Biochemical Journal, 1996, 175-182.

Sriraman V, Sairam MR, Rao AJ. *Evaluation of relative roles of LH and FSH in regulation of differentiation of leydig cells using an ethane 1,2 dimethyl sulfonate treated adult rat model*, Journal of Endocrinology, 2003, 176: 151–161.

Stevens A, Lowe J. Human Histology. 2nd edition. London: Mosby Press; 1997. p. 309-325.

Tanyolaç A. Özel Histoloji, 3. Baskı. Ankara: Yorum basın yayın; 1999. p. 132-143.

Umland EM, Pharm D, Cauffield JS. *Phytoestrogens as therapeutic alternatives to traditional hormone replacement in postmenopausal women*, Pharmacotherapy, 2000, 20 (8): 981-990.

Van Bragt MP, Roepers-Gajadien HL, Korver CM, Bogerd J, Okuda A, Eggen BJ, de Rooij DG, van Pelt AM. *Expression of the pluripotency marker UTF1 is restricted to a subpopulation of early A spermatogonia in rat testis*, Reproduction, 2008, 136(1): 33-40.

Van Pelt AMM, van Dissel-Emiliani FMF, Gaemers IC, van der Burg MJ, Tanke HJ, de Rooij DG. *Characteristics of A spermatogonia and preleptotene spermatocytes in the vitamin A-deficient rat testis*, Biology of Reproduction, 1995, 53: 570–578.

Vatansever HS. Embriyonik kök hücreler. Sağlıkta Birikim 2008; 1: 25-44.

Vicdan K, Erdoğan D, Elmas Ç, Özoğul C. *Effects of dietary phytoestrogens on mouse testis: evaluation by electron microscopy and caspase-3 immunostaining*, Journal of the Turkish German Gynecological Association, 2007, 8(3): 290-296.

Wang P, Li J, Allan R W, Guo CC, Peng Y, Cao D. *Expression of UTF1 in primary and metastatic testicular germ cell tumors*, Anatomic Pathology, 2010, 134: 604-612.

Weber KS, Setchell KDR, Stocco DM, Lephart ED. *Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5[alpha]-reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rat.*, Journal of Endocrinology, 2001, 170: 591-599.

Yılmaz A. *Spermatogonial kök hücreleri ve transplantasyonu*, Ege Üniversitesini Ziraat Fakültesi Dergisi, 2009, 46 (2): 145-154.

Yılmaz B. Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi. Ankara: Feryal matbaacılık; 1999. p.342-359.

Young B, Heath JW. Wheater's Functional Histology- A text and colour atlas. Fourth Edition. Churchill Livingstone. 2000. p. 328-340.

Zhang D, Mi Y, Wang K, Zeng W, Zhang C. *Attenuating effect of daidzein on polychlorinated biphenyls-induced oxidative toxicity in mouse testicular cells*, Journal of Zhejiang University Science, 2008, 9(7): 567-571.

Zhang L, Cui S. *Effects of daidzein on testosterone synthesis and secretion in cultured mouse leydig cells*, Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2009, 22(5): 618 – 625.

TEŞEKKÜR

Tez bulgularımda ki değerlendirmelerde bilgilerini bizden esirgemeyen Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji Anabilimdalından Doç Dr. Recai TUNCA ve çalışmamdaki yardımlarından dolayı Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi sorumlusu Veteriner Hekim Barbaros ŞAHİN'e Teşekkür Ederim.