

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VHE-YL-2007-0001**

**RATLARDA KSILOL VE FORMALİN
İNHALASYONUNUN TESTİS DOKUSU ÜZERİNE
ETKİSİ**

Araş. Gör. ÖZAY GÜLEŞ

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Ülker EREN**

AYDIN - 2007

ÖZSÖZ

Ksilol ve formalin, histoloji ve patoloji laboratuvarlarında ve çeşitli sanayi kollarında sıklıkla kullanılan kimyasal maddelerdendir. Bu tür ortamlarda çalışan kişilerde farklı zararlı etkileri olduğu bilinmektedir. İnsanların bulunduğu ortamlarda kirliliğe ve dolayısıyla insan sağlığına direkt veya indirekt zararlı etkisi olan kimyasal maddelerin, etkileme şekilleri ve sonuçları ayrıntılı şekilde çalışılmalıdır. Bu çalışmada ksilol ve formalin koklatılan ratların testis dokusunda meydana gelen histolojik, immunohistokimyasal ve histometrik farklılıklar araştırılmıştır. Elde edilen bulgular kimyasal bulunan ortamlarda çalışanların sağlığını korumaya yönelik kullanılabileceği gibi, erkek genital sistemde yapılacak olan çalışmalarda referans olarak da kullanılabilir.

Araştırma, “Ratlarda ksilol ve formalin inhalasyonunun testis dokusu üzerine etkisi” isimli ve VTF-05007 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
GİRİŞ	1
1.1. Testis	1
1.2. Tubulus Seminiferus Kontortus	2
1.3. Sertoli Hücresi	2
1.4. İntertubuler Alanlar	3
1.4.1. Leydig Hücreleri	4
1.5. Spermatogenezis	7
1.5.1. Spermatogenezisin Kontrolü	9
1.5.2. İlk spermatogenetik Dalga	10
1.5.3. Spermatogenik Siklus Dönemleri	12
1.6. Relaksin Benzeri Faktör	15
1.6.1. RLF Reseptörü ve Etkisi	17
1.7. Testis Dokusunu Etkileyen Çevresel Faktörler	19
1.7.1. Formaldehit	19
1.7.2. Ksilol	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	24
2.1. Gereç	24
2.2. Yöntem	24
2.3. İstatistiksel Analiz	25
3. BULGULAR	26
3.1. Histolojik Bulgular	26
3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	29
3.3. Histometrik ve İstatistik Bulgular	32
3.2.1. Deneme 1 (Beş Haftalık Yaş Grubu)	32
3.2.2. Deneme 2 (Sekiz Haftalık Yaş Grubu)	35
3.2.3. Deneme 3 (Onsekiz Haftalık Yaş Grubu)	37

3.2.4. Kontrol Gruplarında Yaşın, Canlı Ağırlık, Testis Ağırlığı, Tubulus Alanı ve Epitel Yüksekliği Değerlerine Etkisi	39
3.2.5. Yaş, Canlı Ağırlık ve Kimyasal İnhalasyonunun Testis Ağırlığı, Tubulus Alanı ve Epitel Yüksekliğine Etkisi	41
4. TARTIŞMA	44
4.1. Histolojik Görünüm	44
4.2. Relaksin Benzeri Faktör	44
4.3. Yaş, Canlı Ağırlık ve Kimyasal İnhalasyonunun Testis Ağırlığı, Tubulus Alanı ve Epitel Yüksekliğine Etkisi	45
4.3.1. Testis Ağırlığı	45
4.3.2. Tubulus Alanı	46
4.3.3. Epitel Yüksekliği	46
5. SONUÇ	48
ÖZET	49
SUMMARY	51
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	59
TEŞEKKÜR	60

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP	Androgen Binding Protein (Androjen bağlayıcı protein)
ALC	Adult Leydig Cells (Erişkin Leydig hücreleri)
EDS	Ethane Dimethane Sulphonate (Ethan dimetan sülfonat)
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Folikül uyarıcı hormon)
GnRH	Gonadotropin-Releasing Hormone (Gonadotropin salınım hormonu)
hCG	Human chorionic gonadotropin (İnsan koryonik gonadotropini)
IALC	Immature Adult Leydig Cells (Genç erişkin Leydig hücreleri)
ICSH	Interstitial cell stimulating hormone
IGF-I	Insulin-like growth factor (İnsülin benzeri büyüme faktörü I)
IL-1	Interleukin 1 (İnterlökin 1)
ILC	Immature Leydig Cells (Genç Leydig hücreleri)
InsI3	Insulin Like Factor 3 (İnsülin benzeri faktör 3)
Ley- IL	Leydig- Insülin Like Peptid
LH	Luteinisation Hormone (Lüteinizasyon Hormonu)
MALC	Mature Adult Leydig Cells (Olgun erişkin Leydig hücreleri)
NBF	Neutral Buffered Formaline (Tamponlu nötr formalin)
NFALC	Newly Formed Adult Leydig Cells (Yeni şekillenmiş erişkin Leydig hücreleri)
PLC	Progenitor Leydig Cells (Progenitör Leydig hücreleri)
RLF	Relaksin Like Faktör (Relaksin benzeri faktör)
sABC	Strept avidin-biyotin kompleks
TGF α	Transforming Growth Factor α (Transforme edici büyüme faktörü α)
TGF β	Transforming Growth Factor β (Transforme edici büyüme faktörü β)
TNF	Tumör Necrosis Factor (Tümör nekroz faktörü)

ÇİZELGELER

	Sayfa
Çizelge 1 Kontrol ve deneme gruplarına ait testislerde RLF'nin boyanma yoğunluğu	30
Çizelge 2 Beş haftalık yaş grubundaki ratlarda belirlenen canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değerleri	33
Çizelge 3 Sekiz haftalık yaş grubunda, ratlarda belirlenen canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değerleri	36
Çizelge 4 Onsekiz haftalık yaş grubundaki ratlarda belirlenen canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değerleri	38
Çizelge 5 Farklı yaş grubundaki ratlardaki ratların kontrol gruplarında belirlenen canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değerleri	40
Çizelge 6 Testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliğine canlı ağırlık, kimyasal madde, yaş ve kimyasal madde-yaş interaksiyonunun etkileri	42
Çizelge 7 Tüm yaş grupları için ortalama testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliğine canlı ağırlık, kimyasal madde, yaş ve kimyasal madde-yaş interaksiyonunun etkileri	43

ŞEKİLLER

	Sayfa
Şekil 1 Beş haftalık kontrol grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi	26
Şekil 2 Sekiz haftalık kontrol grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi	27
Şekil 3 Onsekiz haftalık kontrol grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi	27
Şekil 4 Beş haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu. X: Leydig hücreleri. Üçlü boyama yöntemi	28
Şekil 5 Sekiz haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu. X: Leydig hücreleri. Üçlü boyama yöntemi	28
Şekil 6 Onsekiz haftalık haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu. X: Leydig hücreleri. Üçlü boyama yöntemi	29
Şekil 7 Beş haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu. X: RLF pozitif hücreler. sABC boyama yöntemi	30
Şekil 8 Sekiz haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu. X: RLF pozitif hücreler. sABC boyama yöntemi	31
Şekil 9 Onsekiz haftalık haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu. X: RLF pozitif hücreler. sABC boyama yöntemi	31
Şekil 10 Beş haftalık formalin koklatılan gruba ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi	34
Şekil 11 Beş haftalık ksilol+formalin koklatılan gruba ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi	34
Şekil 12 Sekiz haftalık formalin koklatılan gruba ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi	35
Şekil 13 Onsekiz haftalık ksilol+ formalin koklatılan gruba ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi	37

1. GİRİŞ

Erkek genital sistem, eşey hücrelerini yapan testisler, bu hücreleri ileten yollar olarak tubulus rektus, rete testis, epididimis, duktus deferens ile eklenik genital bezler ve dış genital organ olan penisten oluşur (Tanyolaç 1999).

1.1. Testis

Testis, skrotum içerisinde lokalize olan bir çift organdır (Krinke 2000). Testislerin ısıısını, intra-abdominal ısıının altında tutma gibi önemli görevi olan skrotum, deriden bir kılıftır. İnce ve seyrek kıllı olan bu deri kılıf altında gevşek bağ doku bulunur (Tanyolaç 1999). Organ kalın tunika albugineya ve skrotumun iç yüzeyini de örten ince tunika vaginalis ile kaplıdır (Krinke 2000). Tunika albugineya düzensiz, yoğun, sıkı bağdokudan bir kapsüldür. Yoğun olarak kollagen iplikler ve az sayıda elastik iplikleri içerir. Tunika vaginalis'in pariyetal yaprağı skrotuma yapışıktır, viseral yaprağı ise testis ve epididimisi örtmek suretiyle tunika albugineya ile temas halindedir (Dellmann ve Brown 1987). Tunika vaginalis'in iki yaprağı arasındaki boşluk, pelvis boşluğuyla ya da bir başka deyişle karın boşluğuyla ilişkidir. Gelişmenin başlangıç evresinde karın boşluğunda bulunan testislerin torbalara inmesi -desendus testis- bu yolla gerçekleşir (Tanyolaç 1999). Tunika albuginaya'dan organ içine uzanan bağdoku bölmeleri (septula testis), testis parenşimini her biri 1-4 kıvrımlı tubul içeren piramit şeklinde lopçuklara ayırır (Dellmann ve Brown 1987, Tanyolaç 1999). Yetişkin rat testisinde yaklaşık 20 adet seminifer tubul vardır. Bu tubuller 200-400 µm'luk bir çapa sahiptir. Bu kıvrımlı halkaların son uçları rete testis'e bağlanır. Rete testis, spermatozoonu tubulustan epididimise taşır (Krinke 2000). Tubuluslar kıvrımlı bir yapıya sahip olduğu için kesitlerde de bunların yuvarlak, oval ya da kıvrımlı görüntüleriyle karşılaşılır (Tanyolaç 1999).

1.2. Tubulus Seminiferus Kontortus

Tubulus seminiferus kontortuslar bazal membran ile çevrilir (Dellmann ve Brown 1987). Germ hücreleri seminifer tubul içerisinde 4-7 hücre katmanlı kalın bir epitel 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. Sekunder 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 (Tanyolaç 1999). Farklılaşmasını tamamlayan spermatozoonlar epitel katmandan ayrılarak lumene geçer (Leeson ve ark 1985).

1.3. Sertoli Hücresi

Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri desteklemektedirler. Seminifer epitelin bazal laminasına dayanır ve buradan tubulus lumenine doğru uzanırlar. Sertoli hücresi ökromatik iri bir nükleus içerir (Johnson 1991). Bol miktarda granülsüz endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda lizozom ve özellikle bazalde daha bol bulunan krista tipi mitokondriyonlar içerir. Bunların yanında glikojen, lipid damlacıkları ve albumin kristalleri gibi çeşitli sitoplazma inklüzyonlarına da sahiptir (Johnson 1991, Tanyolaç 1999).

Sertoli hücreleri spermatogenezis'te önemli görevlere sahiptir (Johnson 1991). Bunlar; spermatogenezisi düzenlemek ve kontrol etmek (Dalgaard ve ark 2002), gelişme aşamasındaki eşey hücrelerini desteklemek, korumak ve beslemek, dejenere olan eşey hücrelerini ve gelişen eşey hücrelerinden arta kalan sitoplazma parçacıklarını fagosite etmek, spermatozoon transportuna yarayan bir sekresyon yapmak (Johnson 1991, Tanyolaç 1999) olarak sayılabilir. Folikül uyarıcı hormon (Follicle Stimulating Hormone-FSH) ve testosteron, Sertoli hücrelerini uyararak bu hücrelerin androjen bağlayıcı protein

(Androgen Binding Protein/ ABP) sentezlemesini sağlar. ABP'nin, seminifer epitelde testosteron ile oluşturduğu kompleks, spermatogonyumları etkileyerek çoğalma sürecini başlatır (Johnson 1991, Hassa ve Aştı 1997). Yüksek testosteron konsantrasyonları spermatogenik siklusu desteklemek için gereklidir (Johnson 1991). Sertoli hücreleri aynı zamanda inhibin hormonu da salgırlar. İnhibin, adenohipofizden FSH üretimini inhibe eder (Johnson 1991, Krinke 2000). Bunu ya direkt olarak adenohipofiz'den gonadotropin hormon üretimini etkileyerek ya da hipotalamustan gonadotropin salınım hormonu (Gonadotropin Releasing Hormone/ GnRH) sekresyonunu etkileyerek gerçekleştirir (Johnson 1991). Sertoli hücreleri, potasyumdan zengin bol miktarda intraselüler sıvı da salgırlar. Bu özel sıvı yardımıyla spermatozoonlar, iyice gömülü oldukları Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma invaginasyonlarından kurtularak ileriye doğru sevk edilirler (Tanyolaç 1999). Sertoli hücreleri az miktarda östrojen hormonu da salgılamaktadırlar.

Yetişkinlerde spermatid sayıları kısmi olarak perinatal gelişim boyunca üretilen Sertoli hücre sayılarına bağlıdır. Sertoli hücrelerinin proliferasyon periyodu tamamlandıktan sonra yaşam boyunca sayılarının sabit kaldığı varsayılır. Sertoli hücrelerinin spermatid sayısını sabitleyici bir özelliği vardır, bu hücrelerin sayısı spermatogenezis ve günlük sperm üretimi için önemlidir (Dalgaard ve ark 2002).

Sertoli hücre proliferasyonu erkek çocuklarda perinatal olarak meydana gelir. Daha sonraki proliferasyon ve olgun hücrelere farklılaşma puberte döneminde tekrar başlar (Dalgaard ve ark 2002). Ratta Sertoli hücrelerinin proliferasyon periyodu gebeliğin 17-19. günlerinden başlar ve postnatal 15-20. günlere kadar devam eder (Orth 1982).

1.4. İntertubuler Alanlar

Tubulusların arasında gevşek bağdoku yer alır. Bu bağdoku alanları içerisinde, kan ve lenf damarları, fibrositler, kollagen iplikler, serbest mononükleer hücreler (lenfositler, makrofajlar ve mast hücreleri) ve endokrin fonksiyona sahip Leydig hücreleri bulunur (Johnson 1991).

1.4.1. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri intesitisyel dokuda küçük gruplar halinde bulunurlar. Çapları 15-20 µm olan bu hücrelerin merkezinde periferik heterokromatik, bir ya da daha fazla çekirdekçikli yuvarlak bir çekirdek vardır. Leydig hücreleri çekirdeğe yakın iyi gelişmiş bir Golgi aygıtı bulundurur. Sitoplazma ayrıca lizozomlar, peroksizomlar ve Reinke kristalleri içerir. Ancak bu kristallerin fonksiyonu bilinmemektedir. Hücreler çok sayıda krista tipi mitokondri bulundurmaktadır.

Leydig hücrelerinde lüteinizasyon hormon (Luteinisation Hormone/ LH) reseptörü bulunmaktadır (Teerds ve ark 1999). LH, Leydig hücrelerinin farklılaşması ve fonksiyonlarını devam ettirebilmesi için temel faktördür (Ge ve ark 2005).

LH Leydig hücre proliferasyonunu, direkt olarak veya indirekt olarak büyümeyi destekleyen faktörlerin üretimini düzenleyerek uyarır. Yetişkin rat testislerinde ise Leydig hücre proliferasyonu az miktardadır (Teerds ve ark 1999).

Leydig hücreleri androjenler olarak adlandırılan erkek seks steroidlerinin (testosterone, androstenedione ve dehydroepiandrosterone) sentez ve sekresyonunu sağlar (Nozu ve ark 1981, Johnson 1991). Androjenler Leydig hücrelerine yakın olan kapiller delikçiklerinden sistemik dolaşıma katılır. Testosteron sistemik dolaşıma girer girmez vücuttaki hedef organları etkiler (Johnson 1991). Üretilen testosteronun bir kısmı ise intersitisyel sıvı içerisine verilir ve spermatogeneziste parakrin ve otokrin bir etki gösterir (Krinke 2000, Ge ve ark 2005).

Puberte ile birlikte Leydig hücreleri tarafından salgılanan testosteronun (Dellmann ve Brown 1987, Johnson 1991, Krinke 2000) ana fonksiyonları arasında seksüel isteğin (libido) belirmesi, eklenik genital bezlerin fonksiyonunun sürdürülmesi, sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkması, spermatogenezisin kontrolü, hipofiz ve hipotalamusta negatif geri tepki, genel anabolik etkiler sayılabilir (Dellmann ve Brown 1987, Johnson 1991, Hassa ve Aştı 1997).

Dolaşımdaki testosteron seviyeleri, Leydig hücrelerinin hem steroidojenik kapasitesi hem de testisteki total sayıları ile ilişkilidir (Ge ve ark 2005).

Leydig hücrelerinin testosteron üretimi ilerleyen yaş ile birlikte azalır. Bu mekanizma tam olarak açıklanamamıştır. Olası nedenleri; Leydig hücre sayısında azalma, düşük LH uyarımı, Leydig hücrelerinin testosteron üretme yeteneğinin azalması ve önemli germ hücre kayıplarıdır (Chen ve ark 1994).

Ratlarda Leydig hücre gelişimi postnatal 10. günde başlar. Bu hücre gelişiminde beş hücre tipi bulunur; bunlar mezenşimal prekürsör hücreler (Mesenchymal Precursor Cells), progenitör hücreler (Progenitor Leydig Cells/ PLC), yeni şekillenmiş erişkin Leydig hücreleri (Newly Formed Adult Leydig Cells/ NFALC), genç erişkin Leydig hücreleri (Immature Adult Leydig Cells/ IALC) ve olgun erişkin Leydig hücreleri (Mature Adult Leydig Cells/ MALC)'dir. Mezenşimal prekürsör hücrelerin progenitör hücrelere farklılaşmasının başlaması LH'dan bağımsızdır. Bundan sonraki gelişme dönemlerinde LH, progenitör hücrelerin proliferasyonu ve bu hücrelerin sırasıyla yeni şekillenmiş erişkin Leydig hücreleri, genç erişkin Leydig hücreleri ve olgun erişkin Leydig hücrelerine farklılaşmasını ve farklılaşmayı takiben Leydig hücrelerinin proliferasyonunu sağlar. Mezenşimal prekürsör hücre farklılaşması ile Leydig hücrelerinde mitoz aynı zamanda meydana gelir. Gelişim boyunca mezenşimal ve Leydig hücre sayıları doğrusal olarak 1:2 oranında artar. Gelişimini tamamlamış Leydig hücrelerinin boyutu önemli derecede artmıştır. Steroid üretimi için gerekli tüm organelleri kazandığı için hücrelerin testosteron salgılama kapasitesi artar. Bu süreçte Leydig hücreleri fazla sayıda LH reseptörüne sahip olmuştur. Dolayısıyla Leydig hücresinin LH uyarımına karşı duyarlılığı artmıştır (Handagama ve Ariyaratne 2001).

Hardly ve ark (1989) postnatal rat testisinde Leydig hücrelerinin farklılaşmasında iki farklı fazın olduğunu ileri sürmüşlerdir. İlk faz mezenşimal prekürsör hücrelerin progenitör Leydig hücrelerine dönüştüğü postnatal 14. ve 28. günler arasındadır. İkinci faz ise 28. günde başlar ve Leydig hücre sayısı mitoz ile artar.

Yapılan başka bir çalışmada ise (Ge ve ark 2005), Leydig hücrelerinin postnatal gelişimi üç ayrı döneme ayrılmıştır. İlk olarak 14-21 günlük testislerde progenitör hücreler bulunur. Sonrasında 35. güne kadar hücreler steroidojenik organel yapısı ve enzim aktivitesi kazanarak genç Leydig hücreleri (Immature Leydig Cells/ ILC)'ne dönüşür. Fakat bu hücrelerin ürettikleri testosteronun çoğu metabolize olmaktadır. Son olarak bu dönemden sonra 90 günlük yaşa kadar erişkin Leydig hücreleri (Adult Leydig Cells/ ALC) oluşur. Oluşan bu hücreler aktif olarak testosteron üretir.

Leydig hücre gelişimi, insan ve diğer memeli türleri için de ratlarda tanımlandığı şekle benzerdir. Ratlarda progenitör Leydig hücreleri gelişim sırasında ilk tanımlanan oldukça yüksek proliferatif hücrelerdir. Birkaç steroidojenik enzim barındıran granülsüz endoplazmik retikulum içerir. Bundan sonraki gelişim ile ILC oluşur. Çoğunlukla postpartum 28-56. günlerde görülür. ILC, PLC'e göre daha fazla granülsüz endoplazmik

retikuluma sahiptir ve ilaveten yüksek bir steroidojenik kapasiteyi destekleyen sitoplazmik yağ damlacıkları (3 alfa-androstanediol, 5 alfa-androstanediol) içerir (Ge ve Hardly 1998). Bu hücreler ratlarda 20-40 günlük yaşlarda 3 alfa-androstanediol ve 5 alfa-androstanediol-testosteron metaboliti- üretmektedir (Chase ve Payne 1983). ILC, 56. günde ALC'e dönüşmeden önce son kez bölünmeye uğrar. ALC iri hücrelerdir ve çok miktarda granülsüz endoplazmik retikulum ile az miktarda yağ damlacığı içerir. Yüksek steroidojenik enzim aktivitesine sahiptir ve predominant olarak testosteron salgırlar (Hardly ve ark 1989).

Prepubertal rat testisinde progenitör Leydig hücreleri yaklaşık olarak doğum sonrası ikinci haftada belirlenmiştir (Handagama ve Ariyaratne 2001).

LH dışında bazı hormonlar ve kimyasal faktörler de Leydig hücre gelişimine etki etmektedirler. Testosteron ve östrojen, prekürsör hücre farklılaşmasının başlamasını inhibe eder. Progenitör hücre oluşturulduktan sonra androjenler progenitör hücrelerin olgun erişkin tip Leydig hücrelerine farklılaşması için gereklidir (Handagama ve Ariyaratne 2001). Bir grup araştırmacı (Purvis ve ark 1979, Molenaar ve ark 1986, Teeders ve ark 1989) FSH'nın bu süreçte gerekli olmadığını ileri sürmüşlerdir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü I (Insulin-like growth factor I/IGF-I), IALC proliferasyonunun indüklenmesinde ve genç erişkin Leydig hücrelerinin olgun erişkin Leydig hücrelerine farklılaşmasında görevlidir.

Transforme edici büyüme faktörü α (Transforming growth factor α / TGF α) mezenşimal prekürsör hücreler için mitojendir. Hem TGF α hem de transforme edici büyüme faktörü β (Transforming growth factor β / TGF β)-TGF α 'den daha az-, LH veya insan koryonik gonadotropini (human chorionic gonadotropin-hCG) varlığında Leydig hücrelerinde mitozu uyarır (Teerds ve ark 1999, Handagama ve Ariyaratne 2001).

Makrofajlar Leydig hücre gelişiminde önemli rol oynarlar. Leydig hücreleri makrofajdan yoksun testiste gelişimlerini tamamlayamazlar. Makrofajlar yangı durumunda ürettikleri interlökin 1 (interleukin-1/ IL-1) ve tümör nekroz faktörü (tümör necrosis factor/ TNF) ile Leydig hücre fonksiyonlarını inhibe ederler (Hales 2002).

Tiroid hormonu mezenşimal prekürsörlerin proliferasyonuna, mezenşimal prekürsör hücrelerin progenitör Leydig hücrelere farklılaşmasına, mezenşimal hücrelerin progenitör Leydig hücrelerine farklılaşmasının hızlanmasına ve neonatal dönemde yeni şekillenmiş

Leydig hücrelerinin proliferasyonunun artmasına neden olur (Handagama ve Ariyaratne 2001).

Postnatal testiste Leydig hücre sayılarında prepubertal ve pubertal artışlar ortalama iki mekanizmayla açıklanır. İlki kısa bir zaman sürecinde mezenşimal prekürsör hücrelerin Leydig hücrelerine farklılaşması, ikincisi ise yeni oluşan Leydig hücrelerinin mitotik bölünmeleridir (Handagama ve Ariyaratne 2001).

Ratlarda doğumdan sonraki 90 günlük yaşa kadar testis intersitisyumunda bir mezenşimal hücre arttığında iki Leydig hücresi oluşturmaktadır (Handagama ve Ariyaratne 2001). Deneysel olarak ethan dimetan sülfonat (Ethane Dimethane Sulphonate/ EDS) uygulaması yetişkin rat testislerinde hem mezenşimal hem de Leydig hücre sayısını artırmıştır (Teerds ve ark 1999, Handagama ve Ariyaratne 2001).

Bazı araştırmacılar da (Russel ve ark 1995, Teeders ve ark 1998, Ariyaratne ve ark 2000a,b) progenitör hücrelerin proliferasyonunu ve prepubertal rat testisinde progenitör hücrelerin farklılaşarak yeni şekillenmiş erişkin Leydig hücrelerine dönüştüğünü gözlemlemişlerdir.

Rat testisinde hem Leydig hem de mezenşimal hücre sayıları doğumdan seksüel olgunluğa kadar artar (Ariyaratne ve Handagama 2000).

Hardly ve ark (1989), 28. gündeki mezenşimal hücre sayılarını 56. gün ile karşılaştırdıklarında % 50'ye varan bir azalma tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Leydig hücreleri, insülin like faktör 3 (Insl3) ya da Leydig- insülin like peptid (Ley-IL) olarak da bilinen Relaksin like faktör (RLF)'ü salgırlar (Ivell 1997, Bamberger ve ark 1999, Adham ve ark 2000, Klonisch ve ark 2001, Ivell ve Bathgate 2002, Kumagai ve ark 2002).

1.5. Spermatogenezis

Spermatogonyumdan olgun eşey hücrelerinin (spermatozoon-spermiyum-spermatozoid) oluşması spermatogenezis olarak tanımlanır. (Dellmann ve Brown 1987, Hassa ve Aştı 1997, Krinke 2000). Bu olayda; çoğalma (goniyogenezis), büyüme, olgunlaşma (spermatozoidogenezis) ve başkalaşım (spermiyogenezis) evreleri görülür (Dellmann ve Brown 1987, Hassa ve Aştı 1997).

Ratlarda doğumdan sonraki yaklaşık 50 gün olan puberte öncesinde erkek gonositler, inaktif olarak durur. Pubertede bölünmeye başlar ve spermatogonyumlar oluşturulur (Krinke 2000). Spermatogonyumlar mitoz bölünmeyle sayıca artarlar (Hassa ve Aştı 1997). Spermatogonyumlar hayvan spermatozoa üretme yeteneğini kaybedinceye kadar bölünmeye devam ederler (Krinke 2000).

Spermatogonyumlar tip A, ara tip ve tip B olmak üzere kabaca üç tip halinde sınıflandırılırlar. Tip A spermatogonyum, A0 tip, A1 ve A4 tiplerine tekrar ayrılır. Tip A0 spermatogonyum seminifer tubulun membranında kalır ve iki kardeş hücreye bölünme yeteneğine sahiptir, Tip A1 spermatogenezis sürecine devam ederken, diğer hücre de kök hücre olarak kalır. Ratlarda A1 tip spermatogonyum 6 mitotik bölünme geçirir ve büyüme evresine girerek primer spermatosit olur. Primer spermatositler mayoz bölünmenin I. evresine girer. Hücreler bu dönem boyunca Sertoli hücresinin adluminal komponentinde sekonder spermatosit olur (Krinke 2000). Sekunder spermatositlerden de II. mayoz bölünme sonucu, haploid kromozom içeren spermatidler şekillenir (Dellmann ve Brown 1987, Hassa ve Aştı 1997). Spermiyogenezis aşamasında, spermatidler çekirdek ve sitoplazmalarında görülen bir seri değişiklikler sonucu, o türe özgü biçimlerini kazanarak, spermatozoonlara dönüşürler (Dellmann ve Brown 1987, Hassa ve Aştı 1997). Spermiyogenezis aşamasında spermatidler akrozom gelişimi için akrozomal faza girer. Daha sonra çekirdek yoğunlaşması ve uzaması meydana gelir, bunu sitoplazmik eliminasyon ve salınma takip ederek olgun spermatozoon oluşumu tamamlanır (Krinke 2000). Olgunlaşmanın ilk aşamasında Golgi aygıtı içinde birçok küçük granüller belirir. Bu granüller -proakrozom granülleri- toplanarak akrozom keseciğini oluştururlar. Akrozom keseciği, spermatid çekirdeğinin ön kutbuna gider ve çekirdek zarına yapışır. Akrozom keseciği, çekirdek dış zarına yapıştığı yerde yayılır ve çekirdeğin ön yüzünü tümüyle kaplayan bir başlık oluşturur. Kesecik içinde yerleşik olan proakrozom granülleri de başlık içinde yayılır ve ikisi birlikte akrozomu meydana getirirler. Çekirdek bu dönemde uzar ve hücre içinde eksentrik olarak yerleşir. Daha sonra baş kısmı tubulusun periferine doğru yönelirken kuyruk kısmı da lumene doğru oluşmaya başlar. Kuyruk gelişimi tamamlandıktan sonra sitoplazma yavaş yavaş çekirdeğin biçimini alarak uzar. Sitoplazmanın büyük bir kısmı parçalanıp ayrıldıktan sonra hücreler lumen içinde serbest kalır ve spermatozoonlara dönüşürler (Dellmann ve Brown 1987).

1.5.1. Spermatogenezisin Kontrolü

Spermatogenezis puberte öncesi gonadotropin sekresyonunun artışıyla puberte zamanında başlar (Krinke 2000). Spermatogenezis'te testosteron ile FSH, LH ve androjen bağlayıcı protein (ABP)'lerin rolü vardır (Hassa ve Aştı 1997). Peptid hormonlar (FSH ve LH) kan-testis bariyerini geçerek spermatosit ve spermatidlere direkt olarak ulaşamadığı için spermatogeneziste FSH etkisi muhtemelen Sertoli hücreleriyle gerçekleşir. Kan-testis bariyeri ratlarda post partum 16-19. günlerde oluşur (Krinke 2000). FSH spermatogenezisin başlaması ve seminifer tubullerin uyarılması için gerekli bir hormondur (Krinke 2000). Hipofiz ön lobundan salgılanan FSH tubulus seminiferus kontortuslardaki Sertoli hücrelerini etkileyerek bu hücrelerden ABP'nin üretilmesini uyarır (Hassa ve Aştı 1997, Krinke 2000). LH, intersitisyumdaki Leydig hücrelerinde androjenik etki oluşturmaktan dolayı erkeklerde interstitial cell stimulating hormone (ICSH) olarak adlandırılır (Krinke 2000). Cinsel olgunluğa ulaşıldığında, hipofiz ön lobundan salgılanan LH testisin intersitisyel dokusunda bulunan Leydig hücrelerini etkileyerek testosteronun salgılanmasına neden olur (Hassa ve Aştı 1997, Krinke 2000). Peptid hormonlarının tersine steroid yapıda olan testosteron difüzyonla kan-testis bariyerini kolaylıkla geçebilir. Yetişkin ratlarda intersitisyel sıvıda bulunan testosteron seviyesinin (>50 ng/ml), testiküler sıvı (~ 30 ng/ml) veya dolaşımdakinden (<10 ng/ml) daha yüksek olması testosteronun spermatogeneziste parakrin ve otokrin bir etki gösterdiğini işaret eder (Krinke 2000). Testosteron düzeyindeki yükselme, LH'nın salgılanmasını inhibe eder. Böylece testosteron miktarı belirli bir düzeyde tutulur (Hassa ve Aştı 1997). Plazma testosteron konsantrasyonları sağlıklı erkek ratlarda yaklaşık 2-3 ng/ml'dir (Krinke 2000).

Tubulus seminiferus kontortuslara gelen testosteronun androjen bağlayıcı protein ile oluşturduğu kompleks, spermatogonyumları etkileyerek çoğalma sürecini başlatır (Hassa ve Aştı 1997).

FSH spermatogenezisin başlatılması, LH ve testosteron hormonu ise sürekliliği için gereklidir (Hassa ve Aştı 1997).

Sertoli hücreleri, ABP'nin dışında, inhibin hormonu ile az miktarda da östrojen hormonu salgırlar. İnhibin, hipofiz ön lobundan FSH hormonunun salgılanmasını önler (Hassa ve Aştı 1997, Krinke 2000). Östrojen hormonu da Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronun, Sertoli hücrelerinde östrojene çevrilmesiyle elde edilir (Hassa ve Aştı 1997).

1.5.2. İlk Spermatogenetik Dalga

Memeli spermatogenezisi germ hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozis arasında hassas denge gerektiren olağanüstü gelişimsel bir süreçtir (Meehan ve ark 2001).

Bir seminifer tubulden enine seri kesitler alınıp incelenirse kolaylıkla ayırt edilebilen farklı aşamada hücreler görülür. Her bir spermatogenik düzen, seminifer epitel siklusunun bir dönemi olarak tanımlanır. Bir spermatogenik siklus, tubulün bir bölümü içindeki aynı dönemin tekrar görülmesi için geçen zaman olarak tanımlanır. Siklusun her bir dönemi tubulün uzunluğu boyunca ardışık bir düzeni takip eder. Aynı dönem arasındaki mesafe spermatogenik dalga olarak tanımlanır. Bir tubül çok sayıda tamamlanmış spermatogenetik dalga içerir (<http://www.uwyo.edu/wjm/Repro/spermat/htm> 2006).

Spermatogenezisin tamamlanması için gerekli olan, bir spermatogenik siklus içindeki dönem sayıları ve siklus sayısı türler arasında farklılık gösterir. Ratlarda 14 dönemden oluşan bir siklusun tamamlanması 12 gün sürer ve bir spermatogonyumundan spermatozoa oluşumu için 4 sıklusa (48 gün) gerek vardır (Krinke 2000). Boğalarda 12 dönemden oluşan bir siklus 14 gün sürer ve spermatogonyumun spermatozoona dönüşmeden önce 4 siklus (48 gün) meydana gelirken, insanlarda bir siklusun 6 dönemi görülür ve bir siklus 16 gün sürer. Spermatogenezisin tamamlanması için 4 sıklusa ihtiyaç vardır (64 gün) (<http://www.uwyo.edu/wjm/Repro/spermat/htm> 2006).

Memeli spermatogenezisi iki faza ayrılır. İlk faz, doğumdan sonra başlayan ilk spermatogenetik dalgayla karakterizedir. İlk spermatogenetik dalga yapılan araştırmalar sonucu erkek rat, fare, hamster, tavşan, kedi, insan vb. canlılarda gözlenmiştir (Schulze 1982, Meehan ve ark 2001, Rodriguez 2002, Moreno ve ark 2006). Spermatogenezisin 2. fazı olan olgun spermatogenezis, ilk spermatogenetik dalgadan sonra yetişkin hayvanlarda sürekli olarak meydana gelen spermatogenetik dalgalardan oluşur (Rodriguez ve ark 1997).

Erken postnatal yaşamın ilk döneminde görülen ilk spermatogenezis dalgası, ilk germ hücre apoptozisiyle aynı zamanda oluşur (Meehan ve ark 2001, Jahnukainen ve ark 2004, Moreno ve ark 2006, Zheng ve ark 2006). Ratlarda postnatal 1-6 haftalık dönemde meydana gelen ilk spermatogenezis dalgası üç haftalık yaş döneminde oldukça yüksektir (Rodriguez ve ark 1997, Jahnukainen ve ark 2004). Erkek ratlarda postnatal 18 ve 26. günler arasında apoptozis pik oluşturur (Jahnukainen ve ark 2004). Erkek farelerde ise postnatal 15 ve 16. günlerde pik tespit edilmiştir (Zheng ve ark 2006). Erken apoptozis dalgası spermatositleri spermatogonyumlardan daha çok etkiler. İlk spermatogenetik dalga

boyunca germ hücrelerinin en az % 75-80'i elimine edilir (Rodriguez ve ark 1997, Yılmaz 2005). Olgun hayvanlarda ise apoptozise uğrayan hücreler tip A ve tip B spermatogonyum, spermatosit ve spermatidlerdir (Jahnukainen ve ark 2004).

İlk spermatogenetik dalga boyunca görülen apoptozis olgun testiste gözlenen apoptozisten farklıdır:

1. Prepubertal dönem apoptozisinde sadece bir dalga meydana gelir,
2. Apoptozis spermatogonyumla sınırlı değildir tersine spermatositleri daha çok etkiler,
3. İlk spermatogenetik dalga boyunca görülen apoptozis antiapoptotik protein (Bcl-xL)-pro-apoptotik protein (Bax) dengesindeki değişimlere bağlıdır. Testis doğumdan itibaren yüksek seviyede Bcl-xL, Bax ve p53 proteinlerini içerir. Dördüncü haftadan sonra bu proteinlerin seviyeleri ani bir şekilde düşer veya tamamen ortadan kaybolur (Rodriguez ve ark 1997). Farelerde postnatal 23. günde Bcl-xL spermatosit ve yuvarlak spermatidlerde pozitif olarak görülmüştür (Meehan ve ark 2001).

İmmature rat testisinde meydana gelen fizyolojik ilk spermatogenetik dalga, spermatogenezisin başlatılmasında ve gelişiminde, seksüel olgunlaşma ve testiküler gelişim için gereklidir (Rodriguez ve ark 1997, Jahnukainen ve ark 2004). Fakat görülen apoptozisin fizyolojik önemi ayrıntılı olarak henüz açıklığa kavuşturulmamıştır (Jahnukainen ve ark 2004). Spermatogenezis oluşumu boyunca erken dönemde görülen germ hücre apoptozis dalgası, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (Rodriguez ve ark 1997).

Genetik olarak testiste apoptozisi indükleyen ve engelleyen proteinler arasındaki denge değişimleri normal fonksiyonel spermatogenezis gelişiminin bozulması için yeterlidir. Transgenik fareler erken apoptozis dalgasından yoksundur. Bu da spermatogonyum ve spermatosit yığılması ve infertiliteyle sonuçlanır (Jahnukainen ve ark 2004).

Kaspas-2 ilk spermatogenetik dalga boyunca oluşan germ hücre apoptozisinde önemli bir rol oynar. Kaspas-2 aktivasyonunun blokajı, apoptozis dalgasındaki apoptotik germ hücre sayısını azaltır (Zheng ve ark 2006).

Erkek ratlarda pubertenin başlaması ilk spermatogenik dalganın tamamlanmasıyla karakterizedir. Bu da muhtemelen spermatozoonun tubulus lumeninde görüldüğü zamandır (Aragon ve ark 2005). Sperm üretimi immatüre spermatogonyum populasyonunun kendini yenilemesiyle başlar (Meehan ve ark 2001). Erkek ratta spermatozoon ilk kez tubulus lumeninde 45-50 günlük yaşta görülür (Aragon ve ark 2005).

İlk spermatogenik dalga boyunca testisteki somatik hücreler prolife olur ve olgunlaşır. Sertoli hücreleri germ hücrelerini sarar ve destekler. Farelerde 16. günde hücrelerin proliferasyonu sona erer (Meehan ve ark 2001).

Yapılan bir çalışmada, ruminantlarda spermatogenik siklusun 6 farklı fazı boyunca tubuler çapta önemli değişiklik görülmemiştir (Wrobel ve Schimmel 1989).

Yetişkin ratlarda yapılan bir çalışmada, seminifer tubül çapları VII-VIII, IV-V ve XIII-I. spermatogenik siklus dönemlerinde ölçülmüş ve aralarında bir fark olup olmadığı değerlendirilmiştir. VII-VIII. dönemlerde tubulus çapının diğer dönemlere göre daha büyük olduğu bulunmuştur (Harris ve Nicholson 1998).

1.5.3. Spermatogenik Siklus Dönemleri

Rat seminifer epitelyum siklusu Leblond and Clermont (1952) tarafından 14 döneme ayrılır. Sınıflandırma için, hücrelerin çekirdek çapları ve hücrede mitotik figürlerin bulunması veya bulunmaması gibi özellikler göz önünde tutulur (Hess 1990). Tubul segmental bir düzene sahiptir ve her bir tubulün enine kesiti, spermatogonyum, spermatosit ve spermatidleri içeren germ hücre durumunu homojen bir şekilde gösterir (Hess 1990, Krinke 2000). Testis içinde dönemler seminifer tubullerin uzunluğu boyunca birbirini takip eden düzen içinde tekrar edilir. Rat testisinde her bir tubulus kesiti, 14 spermatogenik siklus döneminden birini göstermektedir (Hess 1990). Spermiyogenezis 19 adımda gerçekleşmektedir (Krinke 2000). Bu dönemlerin ayrımında, spermatidlerdeki morfolojik değişiklikler de temel alınmıştır (Hess 1990).

Elektron mikroskopunun kullanılmasıyla seminifer epitel siklusundaki spermatidlerin gelişimi daha net bir şekilde incelenmiştir (Hess, 1990).

Dönem I

Siklusun 1-4. dönemlerinin tanınması ilk yuvarlak spermatidlerdeki Golgi aygıtının net olarak görünmesine bağlıdır. Golgi aygıtı görüldüğünde granüllerin bulunup bulunmadığı net bir şekilde belirlenir.

İlk dönem heterokromatik nükleuslu yuvarlak spermatidlerin görülmesi ve göze çarpan bir Golgi aygıtının belirlenmesiyle karakterizedir.

Dönem II

Bu dönemin tanınması genellikle veziküllerle çevrelenmiş 0,3-0,6 µm çapta proakrozomik küçük granüllerin tanınmasına bağlıdır. İkinci adım spermatidin Golgi aygıtı iki proakrozomik granül içerir. Dorsal akrozomik yüzgeç dikkat çekici uzunlukta değildir.

Dönem III

Siklusun 3. döneminin ortasındaki üçüncü adım spermatidlerdeki akrozomik granüller 0,6-0,8 µm çapa sahiptir ve ikinci adımdaki proakrozomik granüllerden daha büyüktür. Metakrilat kesitlerde, akrozomik veziküller daha az belli ve açık olarak PAS+ boyanmıştır. Fakat çok yağın olarak PAS+ boyalı Golgi aygıtıyla çevrelenmiştir.

PAS+ boyalı, tek akrozomik granül, 3. adım spermatidlerin akrozomik vezikülleri içerisinde lokalize olmuştur. Vezikül, nükleer membranda oldukça yassılaşmış olabilir. Golgi aygıtı vezikülün biraz yanında bulunabilir.

Dönem IV

Siklusun 4. dönemi esas olarak dördüncü adım spermatidlerde bir veya daha fazla akrozomik sistem konfigürasyonunun bulunmasıyla ayırt edilir. Akrozomik granül 0,8 ve 1,1 µm arası bir çapa sahiptir. Geç dördüncü adım spermatidlerde akrozomik veziküller, nükleer membrana doğru yaslanmış. Golgi aygıtı, oluşan akrozomik sistemin biraz yanında bulunur.

Dönem V

Yuvarlak spermatidlerin akrozomik sisteminin az eğri olması ve akrozomik granülün her iki yana doğru uzamış olması 5. dönem tubulusu olarak sınıflandırılır. Uzamış spermatidlerin çekirdeği 5. dönemde epitelin derinliğine doğru hareket eder. Bu dönemde spermatidler tubulus epiteli içine maksimum penetrasyon göstermiştir. Mitotik figürler 4.

dönemde bulunur fakat 5. dönemde bulunmaz. 17. adım spermatidin başı, Sertoli hücre çekirdeğine bitişik olarak gizlenir.

Dönem VI

Mitotik figürlerin bulunması bu dönemleri ayırt etmek için kullanılır. Mitotik figürler 6. dönemde bulunur fakat 7. dönemde bulunmaz. Akrozomik sistem altıncı adım spermatid nükleusunun yaklaşık dörtte birini kaplar. Onsekizinci adım spermatidler lumene doğru göç etmiştir.

Dönem VII

Erken 7. dönem 19. adım spermatidin sitoplazmasındaki bazofilik granülün büyümesiyle geç 6. dönemden ayrılır. Akrozomik sistem 7. adım spermatid nükleusun neredeyse üçte birini kaplar. Ondokuzuncu adım geç spermatid nükleusunun eğriliği dikkat çekicidir.

Dönem VIII

Siklusun 7. döneminden 8. döneme geçişte, bazofilik granüller 19. adım spermatidin baş bölgesine doğru hareket eder ve burada birleşirler. Sekizinci adım spermatidin nükleusu ve akrozomik sistemi sitoplazmanın bazal kutbuna doğru yerleşir. Bu dönem için tipik özellik Sertoli hücresinin nükleusunun bazal membrandan uzağa yerleşmesidir. Siklusun 8. döneminde 19. adım spermatidler serbest bırakılır.

Dönem IX

Bu dönemin tanınması için önemli iki özellik, dokuzuncu adım spermatid çekirdeğinin az miktarda sıkışması ve asimetrisi ile epitel içinde artık kitlelerin bulunmasıdır. Aynı zamanda mitotik figürler 9. dönemde görülür.

Dönem X

Siklusun 10. dönemi kolaylıkla 9. dönemden ayırt edilir. Geç 10. adım spermatidin akrozomik sistemi nükleusun apeksinden kaudal bölgesine doğru uzar. Spermatid nükleusunun sagittal bir kesiti V biçimli bir yapı gösterir.

Dönem XI

Akrozomal-nükleer açıdaki sagittal kesitte nükleus çapı ayırt edici bir özelliktir. Onbirinci adım spermatidlerin nükleusunun apeksi ve akrozomu nükleus kaudal kısmına

doğru keskin bir açıda çıkıntı yapar. Onbirinci adım spermatid, akrozomik sistemin ve nükleusun caudal bölgeye doğru keskin bir açıda çıkıntısını ön plana çıkarır.

Dönem XII

Siklusun 11 ve 12. dönemleri arasında spermatid değişimi en yüksektir. Onikinci adım spermatidler kolaylıkla ayırt edilir, sivri akrozomik uçları kesit düzleminde bulunmuştur.

Dönem XIII

Erken 13. spermatidde akrozomal baş tepesi nükleusun ventral tarafında çıkıntı yapar ve nükleer apex kromatin yoğunluğundan dolayı yoğun şekilde boyanır. Dikkat çekici çekirdekçiğe sahip geniş diploten spermatositler bu dönemde tipiktir.

Dönem XIV

Siklusun 14. dönemi sadece mitotik figürler (mayoz I veya mayoz II) ve/veya sekonder spermatositler bulunduğu sınıflandırılır.

A (Mayoz I)

İlk mayotik bölünme, spermatosit sitoplazmasının merkezinde saçılmış görünümde kromatin yığınının oluşmuş büyük mitotik figürlerin bulunmasıyla tanınır.

B (Mayoz II)

Sekonder spermatositler yuvarlak spermatidlerden tipik olarak daha geniştir. Mayoz II, merkeze yerleşmiş yoğun kromatin kümelerinden oluşmuş mitotik figürlerin bulunmasıyla belirlenir (Hess 1990).

1.6. Relaksin Benzeri Faktör

Relaksin benzeri faktör [relaxin-like factor (RLF), Leydig insülin like peptid (Ley-IL), insülin like faktör 3 (Insl3)], memelilerin gonadlarında sentez edilen ve kan dolaşımına salınan bir hormondur (Bullesbach ve ark 1999, Ivell ve Bathgate 2002).

İnsanlarda kanda dolaşan ve ligand- reseptör bağlanmasının bütün özellikleriyle bir membran proteini ile bağlantı kuran RLF, bahsedilen bu özelliklerinden dolayı bir hormon olarak tanımlanmıştır (Bullesbach ve ark 1999).

Ins13 geninin ürünü olan RLF, insülin- benzeri hormon ailesinin yeni bir üyesidir (Ivell 1997, Bamberger ve ark 1999, Adham ve ark 2000, Klonisch ve ark 2001, Ivell ve Bathgate 2002, Kumagai ve ark 2002, Sadeghian ve ark 2005).

RLF ilk kez domuz testisinde tanımlanmıştır. Daha sonra insan, marmoset maymun, ruminant, fare, rat, köpek, geyik ve subprimat türlerini içeren memelilerin testis ve ovaryumlarında belirlenmiştir (Ivell ve Bathgate 2002, Sadeghian ve ark 2005).

RLF, erkeklerde olgun ve fetal testiküler Leydig hücrelerinden salgılanırken, yetişkin dişilerde teka interna, siklik ve gebelik korpus luteumunda da yapılır (Ivell ve Bathgate 2002, Paust ve ark 2002, Bogatcheva ve ark 2003).

RLF geninin açığa çıkarılması, RLF'ye karşı oluşturulan bir antikorun kullanıldığı immunohistokimyasal metotla gerçekleştirilmiştir (Bamberger ve ark 1999, Ivell ve Bathgate 2002, Sadeghian ve ark 2005). Bu metotla RLF protein olarak, testisin Leydig hücrelerinde, ovaryumun luteal hücrelerinde, foliküler teka hücrelerinde ve diğer dokularda (plasenta, hipotalamus, tiroid, meme bezi) yüksek bir seviyede açığa çıkarılmıştır (Ivell ve Bathgate 2002). Sentetik insan RLF'sine karşı oluşturulan poliklonal antikor, insülin ve relaksine yapısal olarak benzeyen diğer hormonlarla çapraz ilişki göstermez (Bullesbach ve ark 1999).

Yetişkin erkek insan ve ratta sirkülasyondaki Ins13 konsantrasyonu 0.5–2.0 ng/ml'dir. Fetal Leydig hücrelerinde Ins13 proteinin boyanmadığı görülmüştür. Bunun için olası açıklamalar vardır. İlki protein sentezlenir sentezlenmez fetal Leydig hücrelerinden salınmış olabilir. İkincisi immunohistokimya için kullanılan antikorlar rekombinant proforma karşı yükselir ve muhtemelen Ins13'ün C peptid zincirindeki epitopları tanır. Bu oldukça yüksek metabolik fetal Leydig hücre fonksiyonunun çok hızlı bir şekilde azalmasından olabilir (Sadeghian ve ark 2005). Yetişkin erkeklerin kanında en yüksek 2 ng/ml konsantrasyonda olduğu gösterilmiştir (Ivell ve Bathgate 2002). Yetişkin dişilerde sirkülasyondaki Ins13 konsantrasyonları çok düşüktür (Sadeghian ve ark 2005).

Ins13 farelerin fetal ovaryumunda gözlenmezken, testiste ilk olarak embriyonik 13,5. günde ortaya çıkarılmıştır (Adham ve ark 2000).

1.6.1. RLF Reseptörü ve Etkisi

Araştırmalar (Ivell 1997, Bamberger ve ark 1999, Adham ve ark 2000, Klonisch ve ark 2001, Kumagai ve ark 2002) RLF ve relaksinin benzer bir yapıda olduğunu göstermiştir. Ancak kalıntı maddelerin RLF reseptörüne (B zincirinin karboksil ucunda) bağlanması, relaksin ve RLF'nin farklı reseptörler içerdiğini göstermektedir. RLF için reseptör, 7-transmembran bölge reseptörü (LGR8 veya Great) iken, relaksin için LGR7 reseptördür (Ivell ve Bathgate 2002).

Fötal rodentlerde *Insl3* testiküler inişin ilk transabdominal fazından sorumludur. Yetişkin rodentlerde *Insl3* erkek germ hücrelerinde anti-apoptotik bir etkiye sahiptir. İndirekt olarak fötal Leydig hücrelerinin farklılaşmasını kontrol eder (Sadeghian ve ark 2005).

Memelilerde farklılaşmamış testis ve ovaryumlar esas olarak abdominal pozisyonda lokalize olur. Testisler gelişimi boyunca embriyonik intraabdominal pozisyondan skrotum içerisine iner. Testislerin inişi iki fazda açıklanmıştır.

(1) Transabdominal faz, insan embriyolarında gebeliğin 10-15. haftaları arasında, fare embriyolarında ise çiftleşmeden sonraki 15,5- 17,5. günler arasında meydana gelir. Kaudal genitoinguinal ligamentin doğal gelişimi ve kranial suspansor ligamentin regresyonu testislerin inguinal bölgeye doğru direkt olarak hareketini sağlar (Bogatcheva ve ark 2003). Kranial suspansor ligament ve kaudal genital ligament gubernakulum olarak adlandırılır (Adham ve ark 2000).

(2) İnguinoskrotal faz, insanlarda doğumdan önce, farelerde ise neonatal gelişimin ilk 20 günü içinde meydana gelir. Bu dönem boyunca gubernacular kordonun kısılması ve gubernacular kökün kabarması, testislerin skrotum içine geçişini sağlar (Bogatcheva ve ark 2003).

Erkek rat fötüslerinde serum RLF konsantrasyonu doğumdan iki gün önce yüksektir ($2,4 \text{ ng ml}^{-1}$) ve doğumdan hemen önce ani olarak azalır. Daha sonra erkek ve dişiler aynı düşük serum konsantrasyonuna sahiptir. Serum RLF konsantrasyon artışı doğumdan 10 gün sonra başlar ve 39. güne ($0,6 \text{ ng ml}^{-1}$) kadar devam eder (Boockfor ve ark 2001, Ivell ve Bathgate 2002) Bu bulgular RLF'nin in vivo sentez edilen bir hormon olduğunu ispat etmek için önemlidir (Ivell ve Bathgate 2002). Testisler RLF konsantrasyonunun artış fazı boyunca skrotuma iner. Bu iniş doğumdan 19-21 gün sonra tamamlanır. Yüksek prenatal

serum konsantrasyonları gubernakulum dokusundaki fazla miktarda RLF reseptörünün ortaya çıkarılması ile aynı zamana rastlamaktadır (Boockfor ve ark 2001).

Yapılan çalışmalar, prepartum gubernakulumun RLF için reseptörlere sahip olduğunu ve biçim değişikliği ve DNA senteziyle RLF'nin etkisine organ kültürlerinde cevap verdiğini gösterir. Kranial suspansör ligamentin gerilemesini içeren testiküler inişin ilk fazı androjen bağımlıdır. Bu ligament dişilerde ovaryumu perirenal pozisyonda tutar (Ivell ve Bathgate 2002).

İn vitro olarak Ins13 peptidin, GREAT/LGR8 reseptörünü aktive ettiği kanıtlanmıştır. Ins13 peptit ve GREAT/LGR8 reseptörü gubernakulumun farklılaşmasını kontrol eder (Bogatcheva ve ark 2003).

Kriptorşizm, testislerin embriyonik intraabdominal pozisyonundan skrotum içersine inmemesidir. RLF geni çıkarılmış erkek farelerde gubernakulum ligamentinin gelişimi zayıflamış ve kriptorşizm (Adham ve ark 2000, Boockfor ve ark 2001, Klonisch ve ark 2001, Ivell ve Bathgate 2002, Kumagai ve ark 2002) ve kriptorşizmin ikincil bir etkisinden dolayı spermatogenezis defektleri (Ivell ve Bathgate, 2002) ve kısırlık (Boockfor ve ark 2001) gözlenmiştir.

Kriptorşizm yeni doğan erkeklerde % 3,5 oranında gözlenirken bu oran bir yaşında % 0,5'e düşer. Testislerin abdomende alıkonulması, infertilite ve testiküler kanser risk artışıyla sonuçlanır. Cerrahi müdahale infertiliteyi önler. Testiküler gelişim, transportun sağlanmasında RLF'nin büyük bir rol oynadığı belirlenmiştir (Boockfor ve ark 2001).

Ins13 veya GREAT/LGR8 reseptörünün mutasyonları da kriptorşizme neden olur (Bogatcheva ve ark 2003).

Yapılan bir çalışmada östradiol uygulamalarının, fetal Leydig hücrelerinden RLF üretimini engelleyerek testislerin inişini olumsuz yönde etkilediği ve kriptorşizme neden olduğu bildirilmiştir (Ivell ve Bathgate 2002).

Paust ve ark (2002), yaptıkları bir çalışmada erkek ratlarda artan yaş ile kandaki serbest testosteron seviyelerinde bir azalma olduğunu belirlemişlerdir. Hybridizasyon analizi ile iki yaşlı rat testisinde RLF mRNA'nın ortaya çıkışı üç aylık ratlara göre çok daha az oranda bulunmuştur. Sirkulasyondaki testosteron konsantrasyonundaki azalmanın başlıca nedeni Leydig hücrelerinde steroidojenik kapasitenin azalmasıdır (Teerds ve ark 1999).

1.7. Testis Dokusunu Etkileyen Çevresel Faktörler

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 bireyi etkileyecek kalıtsal olmayan olumsuz etkileri meydana getiren veya olumsuz etkilerin oluşumunu hızlandıran kimyasal maddelere ise “üreme için toksik kimyasal madde” denir. Özellikle “çevresel kimyasallar” olarak adlandırabileceğimiz iş yerlerinde veya insan yaşam alanlarında kullanılan pestisitler, gıda katkı maddeleri, ağır metaller vb. kimyasalların üreme sağlığı üzerindeki etkileri belirlenmiştir (Tekbaş 2006).

Endüstriyel ve çevresel birçok kirlenici (östrojenler, ısı, çeşitli kimyasallar, elektromanyetik enerji ve radyasyon) üreme sisteminde olumsuz etkiler oluşturmaktadır (Steinberger 1992). Etkisinde kalınan maddenin cinsi yanında maruz kalma süresi ve şekli bu faktörlerin üreme sağlığına olan etkilerini belirlemektedir. Söz konusu kimyasalların cinsi, etkilenebilirlik süresi ve şiddetine göre değişmekle birlikte kimyasal maddeler dişi ve/veya erkek üreme sisteminde olumsuz etkiler oluşturabilirler (Tekbaş 2006).

Deney hayvanlarında yapılan çalışmalar (Mori ve ark 1988, Morrissey ve ark 1988, Yang ve ark 2006) çok sayıda çevresel etkenin erkek üreme fonksiyonunu etkileyebileceğini ortaya koymaktadır.

EDS, sülfür anhidrat, amonyak, kurşun asetat, ksilol, tiner, toluen, metanol, etil asetat, formaldehit gibi çevresel kimyasallar testis dokusunun fonksiyonunu ve yapısını olumsuz yönde etkilemektedir (Yamakada 1993, Teerds ve ark 1999, Handagama ve Ariyaratne 2001, Karimov ve ark 2003).

1.7.1. Formaldehit

Formaldehit ($H_2C=O$), endüstriyel kullanımı bakımından aldehit ailesinin en önemli üyesidir (Sarsılmaz ve ark 2000). Formaldehit 30,03 moleküler ağırlığında, suda kolayca eriyebilen, renksiz, kötü-keskin kokulu, yanıcı bir maddedir. Metil alkolün oksidasyonu sonucu oluşur. Memelilerde metabolizma sonucu da az miktarda formaldehit açığa çıkar ve hızla karbondioksit ve suya metabolize olur. Formalin ise formaldehitin sudaki %37’lik solusyonuna verilen isimdir. Suyla birleşen formaldehit polimerize olarak paraformaldehite

dönüşebilir. Bu dönüşümü engellemek için %10-15 oranında metanol eklenir (Yılmaz 2006). Formaldehit polimerize formda (paraformaldehit) veya solusyon olarak kullanılır. Atmosferik koşullar altında formaldehit gün ışığında ışığa bağlı olarak hızlıca karbondioksit okside olur, dolayısıyla şehir havasındaki yarılanma ömrü, gün ışığı etkisi altında kısalmaktadır. Nitrojen dioksit bulunmaması durumunda formaldehitin yarılanma ömrü gün boyunca yaklaşık olarak 50 dakikadır; nitrojen dioksitin bulunması durumunda bu 35 dakikaya düşer (WHO regional office for europe 2001). Birçok gıdada, sigara ve egsoz dumanında da formaldehit bulunur.

Formaldehit doku proteinlerini presipite etmeden koagülasyonlarına neden olduğu için biyolojik örneklerin saklanması, cesetlerin mumyalanmasında ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır (Özen ve ark 2005). Formaldehit tıpta; otopsi salonlarında, patoloji ve histoloji laboratuvarlarında dokuların tespit edilmesinde kullanılmasının yanında, tekstil, kimya, boya, kağıt, kozmetik endüstrilerinde de kullanılır. Formaldehit atmosferde 0.12-0.39 ppb seviyesinde bulunur ve herkes için temas söz konusudur (Yılmaz 2006).

Formaldehite olası maruz kalma yolları sindirim, inhalasyon ve dermal absorpsiyondur. Formaldehit suda eriyebilme yeteneğinden dolayı hızlıca respiratorik ve gastrointestinal kanallardan absorbe ve metabolize olur. Rat ve maymunlarda inhale olunan formaldehitin %90'dan fazlası üst solunum kanallarından absorbe edilir (WHO regional office for europe 2001).

Formaldehitin in vitro toksik olduğu gösterilmiştir. İnsan kültür bronşiyal epitel hücrelerinin büyüme oranı azaltmıştır. Bu etkiler hücre içi kalsiyum iyonları seviyesinin yükselmesi, glutathionu içeren düşük moleküler ağırlıklı serbest tiollerin azalmasıyla eş zamanlı olarak meydana gelmiştir (Graftstrom 1990, Cassee 1995).

Formaldehitin hayvanlarda teratojenik olduğu kanıtlanmamıştır ve izin verilen seviyelerde mesleki olarak insanlarda da teratojenik etkili değildir. Ancak formaldehitin insanlarda ve hayvanlarda kromazomal anomalilere ve kardeş kromatid değişimine yol açtığı için genotoksik özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Agency for toxic substances&disease registry 2006).

Formaldehitin reproduktif sistem üzerindeki olumsuz etkilerine ait deliller sınırlıdır. Mesleğe bağlı olarak formaldehite maruz kalan kadınlarda menstrual düzensizlikler ile deney hayvanlarında formaldehit inhalasyonu sonucunda serum testosteron seviyesini

azaltarak spermatogenezisi etkilediği belirlenmiştir (Özen ve ark 2003, Agency for toxic substances&disease registry 2006).

Deneyssel çalışmalarda oral yolla gebe halde iken formaldehit alan ratların yavrularında doğum ağırlığının düşmesi, erkek ratlarda anormal sperm insidansının artması, midenin glandüler yapısında tümör aktivasyonu gözlemlenmiştir (Sarsılmaz ve ark 2000).

Erkek ratlara %4 formaldehit solüsyonunun oral olarak uygulanması, sperm anomali (uzamış ve incelmış) insidansını önemli derecede artırmıştır (Cassidy ve ark 1983). Gebeliğin 6-15.günlerinde gavage (sonda ile besleme) yoluyla formaldehit verilen gebe albino farelerin fötuslarında teratojenik etkilerin oluşmadığı bildirilmiştir (Marks ve ark 1980). Gebeliğin 8-12. günlerinde formaldehit verilen farelerden doğan yavruların gelişimi ve yaşayabilme gücü etkilenmemiştir (Seidenberg ve ark 1986). Çiftleşmeden sonraki 4-56. günlerde diyetlerine formaldehit konularak beslenen beagle köpeklerde yavruların sağlığı, bir batında doğan yavruların boyutları, gebeliğin uzunluğu, gebe dişilerin ağırlık kazancı ve gebelik oranının etkilenmediği gözlemlenmiştir (Hurni ve Ohder 1973).

Erkek ratların sülfür anhidrat, amonyak veya bu substansların formaldehit ve kurşun asetat ile karışımlarının inhalasyonuna bir ay süreyle maruz bırakılması, seminifer epiteldeki hücrelerin etkilenecek spermatogenik siklus düzeninin bozulmasıyla sonuçlanmıştır (Karimov ve ark 2003).

Çinko ve bakır, önemli bir antioksidan enzim olan superoxide dismutase (SOD)'i içeren metalloenzimlerin prostetik gruplarıdır. Erkek ratlar formaldehite maruz bırakıldığında, bu iz elementlerin seviyesinin azaldığı ve doku gelişiminin yavaşladığı gözlenmiştir (Özen ve ark 2003).

1.7.2. Ksilol

Ksilolün (C_8H_{10} , Dimethylbenzene, Xylol, Xylene) üç kimyasal formu mevcuttur : *meta*-xylene, *ortho*-xylene, and *para*-xylene. Bu üç farklı formdan isomerler olarak söz edilir (Agency for toxic substances&disease registry 2005, Environmental health data search 2006). Daha çok endüstriyel solvent olarak kullanılan xylene *ortho*-, *meta*-, ve *para*-izomerlerin bir karışımıdır. Yaklaşık olarak %20 o-xylene, %44 m-xylene, %20 p-xylene, ve %15 ethylbenzene içerir. Xylene, toluene ve ethylbenzene gibi alkyl benzene'dir (Irwin

1997). Xylene toluene, trimethylbenzenler, benzene ve diğer hidrokarbonları içerir (Environmental health data search 2006).

Ksilol tatlı, aromatik kokulu, renksiz ve kolaylıkla yanabilen bir sıvıdır (Güler 2006). Doğal olarak petrol ve katranda bulunur (Agency for toxic substances&disease registry 2005).

Ksilol matbaacılık, plastik ve deri endüstrilerinde ve laboratuvarlarda bir solvent (eritici sıvı) olarak kullanılır. Ayrıca temizlik ajanı, boya, vernik, yapışkan ve pestisit içinde de kullanılır.

Ksilole maruz kalma yolları; boyacılar, boya endüstrisi elemanları, biyomedikal laboratuvar elemanları, benzin istasyon elemanları, otomobil garaj elemanları ve mobilyacılar gibi ksilol kullanımı gereken bir işte çalışmak; benzin, vernik, tutkal, yapışkan, gomalak, pas koruyucu ürünleri kullanmak, sigara içmek, ksilol ile kontamine besin ve suyun sindirimi olarak sayılabilir (Agency for toxic substances&disease registry 2005, Environmental health data search 2006).

Ksilol reproduktif dokularda kalıcı yapısal defektlere neden olmaz, fakat emriyo veya fötüs için toksiktir ve fertilitiyi azaltabilir (Environmental health data search 2006). Dişi ratlarda ksilolün 700 ppm toksik seviyeleri bir batında doğan yavruların boyutunu küçültür, fötusun gelişimini zayıflatır ve anomali artışına neden olur (Agency for toxic substances&disease registry 2005, Environmental health data search 2006).

Patoloji veya histoloji laboratuvarlarında ksilol ve formaline maruz kalan kadınlarda spontan abortların arttığı gözlenmiştir. Gebeliğin 7-14. günlerinde 8 gün boyunca 775 ppm ksilol karışımına maruz kalan anne ratlarda, herhangi bir toksisite görülmezken, fertilitede azalma gözlenmiştir.

İntraperitoneal xylene uygulaması ile ratların testislerinde anormal spermatozoon sayısında önemli artışlar gözlenmiştir (Washington ve ark 1983).

Organik çözücülerin (ksilol, benzene gibi) ve formalinin kullanıldığı laboratuvarlarda ve bazı sanayii kollarında bu organik maddelerin gazlarını soluyan genç ve erişkin birçok insan vardır. Ratlarda ve insanlarda yapılan çalışmalarda (Yamakada 1993, Chung ve ark 1999, Lemasters ve ark 1999, Özen ve ark 2005) ksilol, toluen, benzene ve formalinin erkek genital sistemde toksisiteye, özellikle testislerde atrofiye, testis ağırlığında ve serum testosteron seviyesinde azalmaya, spermatozoonlarda motilitede azalmaya sebep olduğu tespit edilmiştir.

Ksilol ve formalin inhalasyonunun farklı yaş gruplarında testis dokusu üzerine etkileri ile ilgili araştırmalar sınırlıdır (Yamakada 1993, Karimov ve ark 2003, Özen ve ark 2005, Zhou ve ark 2006). Kimyasal inhalasyonunu takiben Leydig hücrelerinde üretilen RLF kompozisyonunda meydana gelen değişimlerle ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanamamıştır. Araştırmada, anne gebeliğinin başlangıcından itibaren, doğumdan itibaren ve puberteden itibaren ksilol ve formalin koklatılan ratların testis dokusunda meydana gelen immunohistokimyasal ve histometrik değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

Bu çalışmada Adnan Menders Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesinden sağlanan 96 adet erkek Sprague Dawley rat kullanıldı. Ratlar araştırma süresince 14 saat aydınlık/ 10 saat karanlık ortamda, konvansiyonel koşullarda, *ad libitum* su ve yem ile beslendi. Çalışma süresince ortam sıcaklığının $24\pm 2^{\circ}\text{C}$ olması sağlandı. Materyal; anne gebeliğinin başlangıcından itibaren, doğumdan itibaren ve puberteden itibaren denemeye alınmak üzere, üç yaş grubunda düzenlendi. Her yaş grubundan sekizer hayvanın 8 hafta boyunca, bulundukları ortamda günde 8 saat süreyle ksilol (300 ppm) (Li ve ark 1986), formalin (6 ppm) (Monticello ve ark 1989) ve ksilol+formalin (150 ppm+3 ppm) solunumu gerçekleştirmeleri sağlandı. Belirtilen yaş gruplarına göre düzenlenen kontrol grupları da herhangi bir uygulama yapılmadan, eşit ortam koşullarında 8 hafta süreyle tutuldu. İnhalasyon uygulamaları 0.84 m^3 kapalı ortamda gerçekleştirildi. Söz konusu gazların deney ortamındaki seviyeleri gaz dedektörüne takılan ksilol ve formalin gaz ölçüm tüpleriyle belirlendi (Norback ve ark 1995).

2.2. Yöntem

Deney süresi sonunda beş haftalık, sekiz haftalık ve 18 haftalık olan ratlar bir gece öncesinden aç bırakıldılar. Hayvanlar tartılarak canlı ağırlıkları belirlendi. Ksilazin-ketamin ile ötenazi uygulanan ratların, testisleri çıkarılarak toplam ağırlıkları kaydedildi. Daha sonra testisler % 10'luk tamponlu nötr formalinde (neutral buffered formalin/ NBF) 24 saat tespit edildi ve rutin doku takip işlemlerinden sonra, her iki testis birarada parafinde bloklandılar.

Hazırlanmış olan bloklardan $50\text{ }\mu$ ara ile $6\text{ }\mu$ kalınlığında seri kesitler alındı. Seri alınan üç kesite histometrik değişimleri belirlemek amacıyla üçlü boyama metodu (Culling ve ark 1985), diğer bir kesite ise relaksin benzeri faktörün (relaxin-like factor-RLF) gösterilebilmesi için, strept avidin-biyotin kompleks (strept avidin-biotin complex/ sABC)

boyama metodu (Hsu ve ark 1981) uygulandı. Bu amaçla rabbit anti-Insl 3 antiserumu (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., H-035-43) kullanıldı.

Yapılan preparatlar ışık mikroskobu (Leica DMLB) ve buna bağlı görüntü analiz sistemi yardımı ile incelendi. Her hayvan için, üçlü boyama yapılan ve seri olan üç adet kesitten her birinde, yuvarlak veya yuvarlağa yakın 10 adet tubulusun alanı ve epitel yüksekliği (spermatogenetik hücrelerin oluşturduğu katmanın yüksekliği) ölçüldü. Ölçümler görüntü analiz programı (Leica Q Win Standart) yardımıyla gerçekleştirildi.

sABC boyama metodu uygulanan kesitler ise incelenerek, RLF'nin dokudaki yoğunluğu subjektif olarak değerlendirildi.

İncelenen kesitlerin gerekli görülen kısımlarının fotoğrafları çekildi.

2.3. İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin istatistiksel analizi amacıyla SPSS (for Windows 11.5) hazır paket programı kullanıldı. Her yaş grubu içinde, canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve tubulus epitel yüksekliği bakımından gruplar arası farklılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile, farkların önem kontrolü ise Duncan testi ile yapıldı.

İncelenen parametreler bakımından yaş grupları arasındaki farklılıkların aranması, canlı ağırlık kovaryans faktörü (ortak varyans faktörü) olarak kabul edilerek, Genel Doğrusal Model (General Lineer Model) ile değerlendirildi.

3. BULGULAR

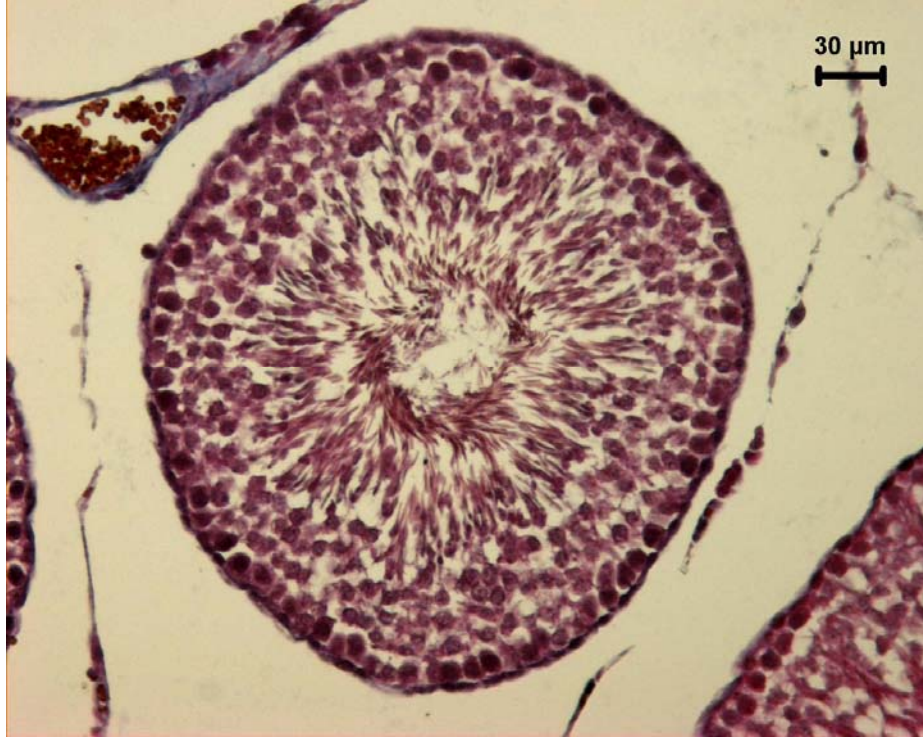
3.1. Histolojik Bulgular

Histolojik bulgular, kontrol grubunda belirlendi. Beş haftalık ratların testisinde tubulus seminiferus kontortusun lumeninin belirgin olduğu ve spermatogenetik hücrelerin kalın bir katman oluşturduğu gözlemlendi. Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları yer yer ayırt edilebildi (Şekil 1). Beş ve sekiz haftalık kontrol grubunda spermatidler gözlemlendi (Şekil 2). Onsekiz haftalık ratlarda tubulus seminiferus kontortusta epitel yüksekliğinin azaldığı, Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarının daha net ayırt edildiği görüldü (Şekil 3). Tubulus lumeninde belirgin şekilde spermatozoonlar gözlemlendi. Leydig hücreleri her üç yaş grubunda da (Şekil 4 - 6) tespit edildi.

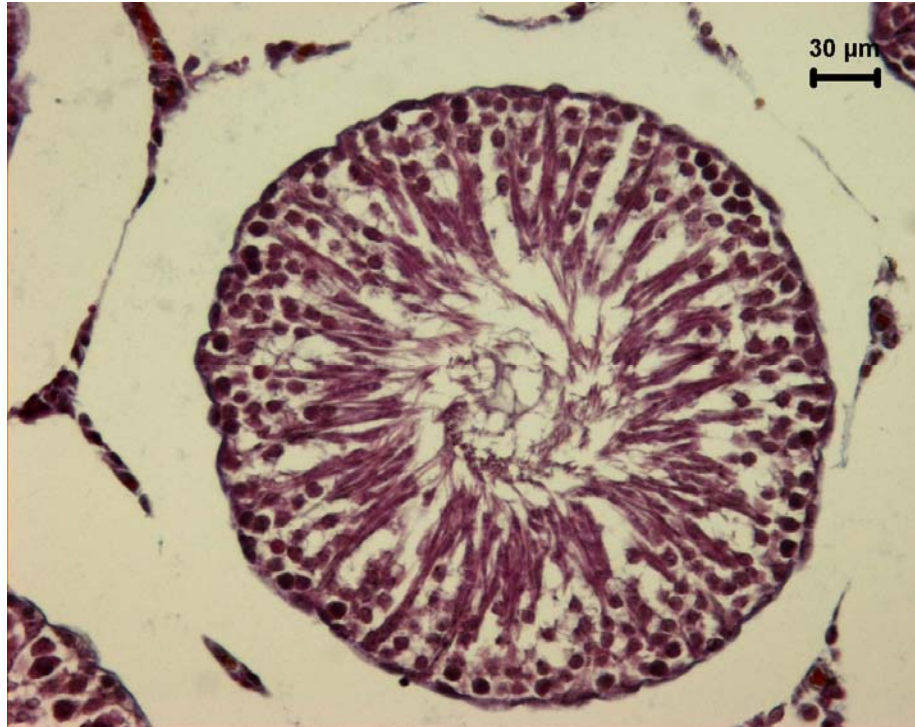


Şekil 1. Beş haftalık kontrol grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü.

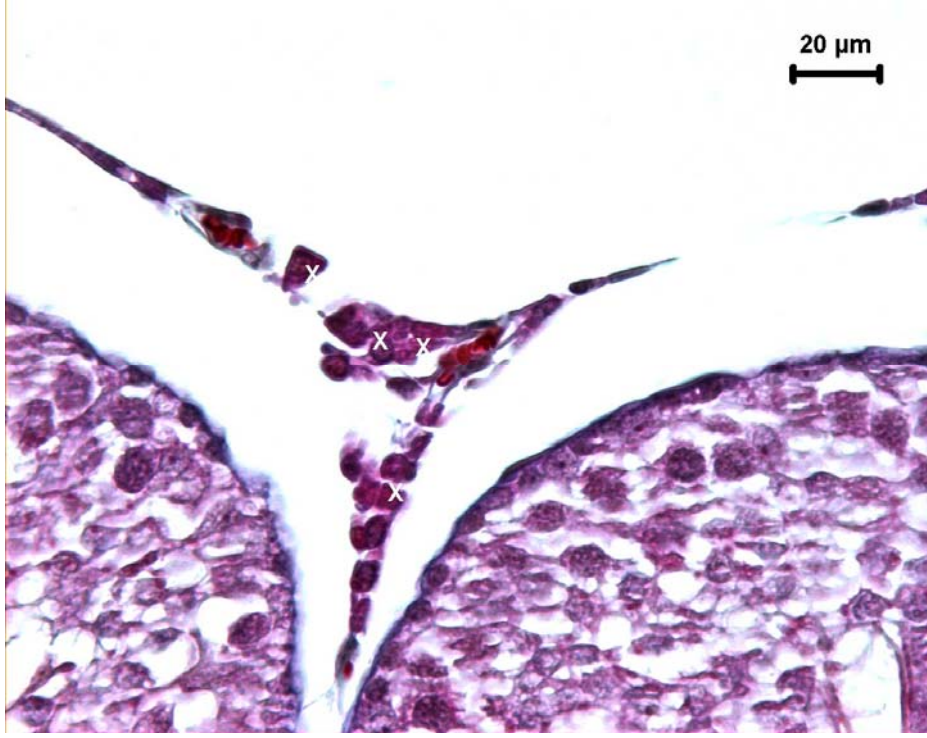
Üçlü boyama yöntemi



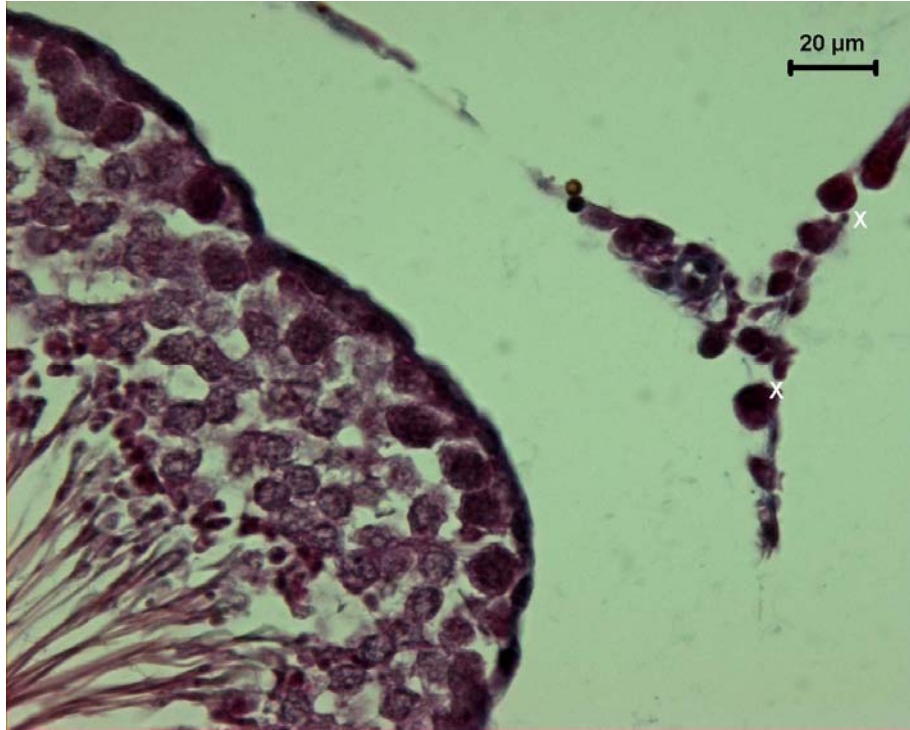
Şekil 2. Sekiz haftalık kontrol grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü.
Üçlü boyama yöntemi



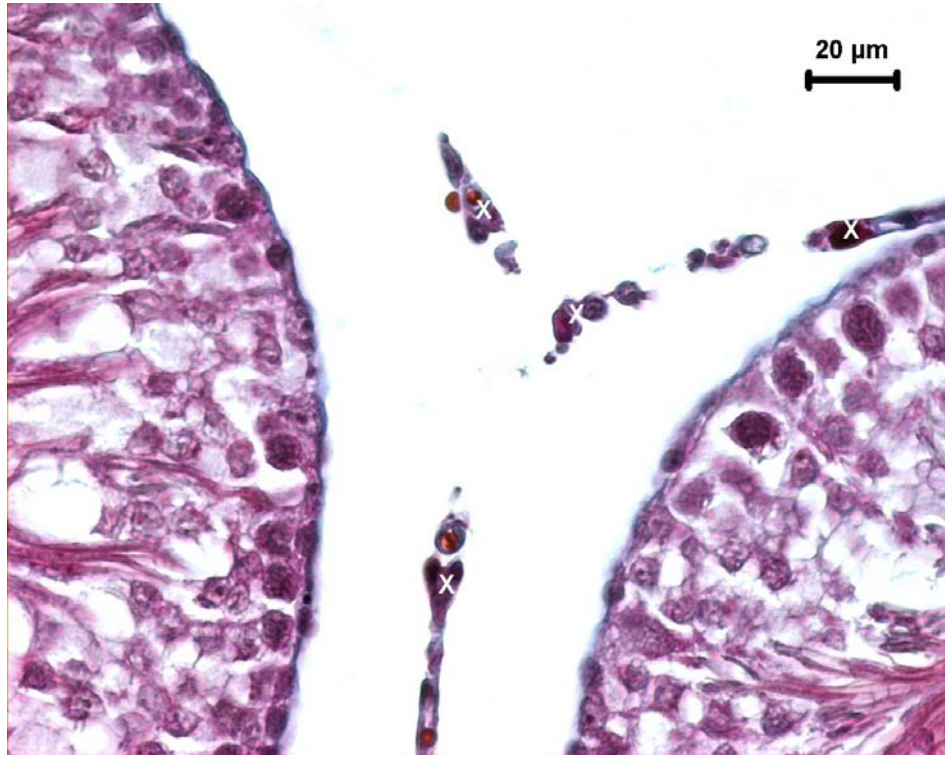
Şekil 3. Onsekiz haftalık kontrol grubuna ait testis dokusunda tubulus görüntüsü.
Üçlü boyama yöntemi



Şekil 4. Beş haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu, X: Leydig hücreleri.
Üçlü boyama yöntemi



Şekil 5. Sekiz haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu, X: Leydig hücreleri.
Üçlü boyama yöntemi



Şekil 6. Onsekiz haftalık haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu, X: Leydig hücreleri.
Üçlü boyama yöntemi

3.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

Yapılan immunohistokimyasal demonstrasyon (sABC) sonucunda belirlenen RLF yoğunluğu, her üç yaş grubu için kontrol ve deneme gruplarında subjektif olarak değerlendirildi ve elde edilen verilerin ortalaması Çizelge 1’de gösterildi.

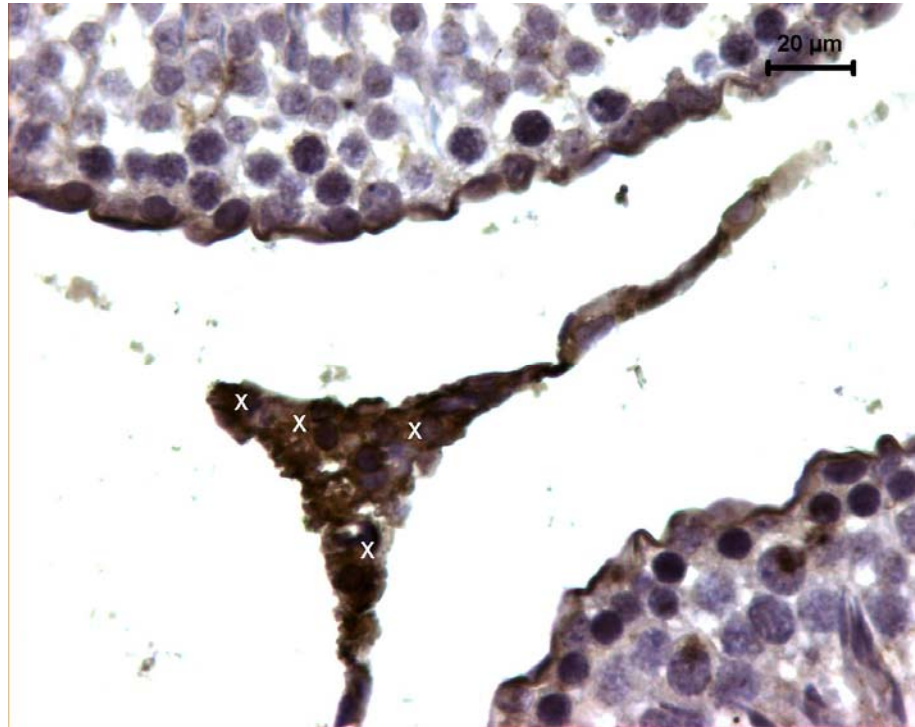
Kontrol gruplarında RLF, her üç yaş grubunda da tespit edilmekle beraber (Şekil 7 - 9), sekiz haftalık grubun boyanma yoğunluğunda azalma dikkati çekti (Çizelge 1).

Ksilol inhale ettirilen her üç yaş grubunda da RLF yoğun bir şekilde boyandı, etkilenme gözlenmedi. Formalin inhale ettirilen beş haftalık yaş grubunda RLF yoğun bir şekilde belirlenirken, sekiz haftalık ve 18 haftalık yaş gruplarında boyanma yoğunluğunun az olduğu dikkati çekti. Ksilol+formalin inhale ettirilen beş haftalık grupta RLF çok yoğun boyanırken, diğer yaş gruplarında boyanma gözlenmedi (Çizelge 1).

Çizelge 1. Kontrol ve deneme gruplarına ait testislerde RLF'nin boyanma yoğunluğu.

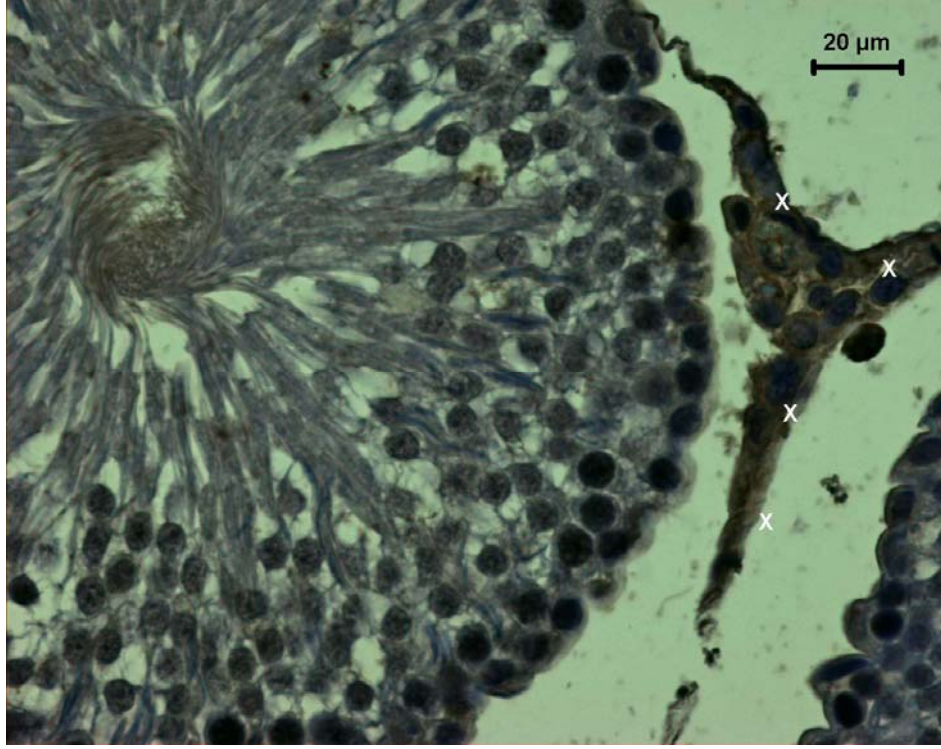
Gruplar	Yaş Grupları		
	5 Hafta	8 Hafta	18 hafta
Kontrol (n=8)	++++	+++	++++
Ksilol (n=8)	+++	++++	+++
Formalin (n=8)	+++	+	++
Ksilol+Formalin (n=8)	++++	-	-

- : Boyanma yok, + : Çok az boyanma, ++ : Az boyanma, +++ : Yoğun boyanma, ++++: Çok yoğun boyanma

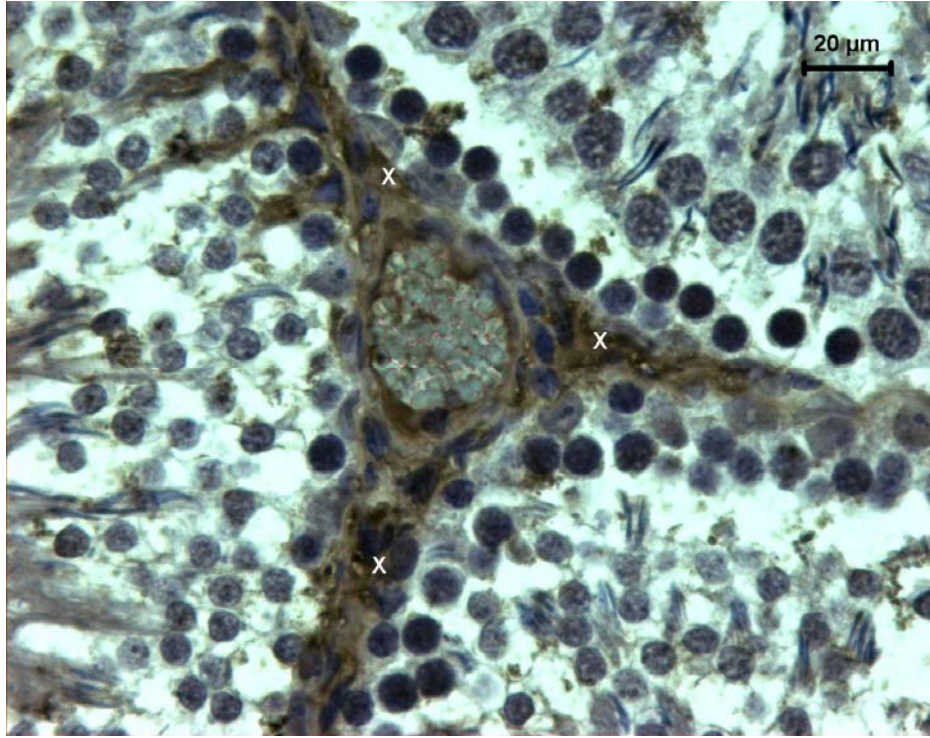


Şekil 7. Beş haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu, X: RLF pozitif hücreler.

sABC boyama yöntemi



Şekil 8. Sekiz haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu, X: RLF pozitif hücreler.
sABC boyama yöntemi



Şekil 9. Onsekiz haftalık kontrol grubuna ait testis dokusu, X: RLF pozitif hücreler. sABC boyama yöntemi

3.3. Histometrik ve İstatistik Bulgular

Kontrol grubu ratlar ile kimyasal inhale ettirilen gruplarda belirlenen canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değişkenlerine ait değerler; beş haftalık yaş gruplarındaki ratlar için Çizelge 2, sekiz haftalık yaş gruplarındaki ratlar için Çizelge 3 ve 18 haftalık yaş gruplarındaki ratlar için Çizelge 4’de verildi.

Kontrol gruplarında canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değerlerine yaşı etkisi Çizelge 5’de gösterildi.

3.3.1. Deneme 1 (Beş haftalık yaş grubu)

Kontrol grubuna ait ratların canlı ağırlıkları ve testis ağırlıklarıyla, kimyasal uygulanan gruplar karşılaştırıldığında; ksilol, formalin ve ksilol+formalin koklatılmış gruplardaki ratların canlı ağırlık ve testis ağırlıklarında gözlenen azalmanın istatistiksel olarak önemsiz olduğu belirlendi (Çizelge 2).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kimyasal koklatılan gruplarda tubulus alanında önemli oranda azalma ($P < 0,001$) tespit edildi. Ayrıca kimyasallardan ksilol ile formalin ve ksilol ile ksilol+formalin arasında gözlenen farkın da önemli olduğu dikkati çekti ($P < 0,001$) (Çizelge 2).

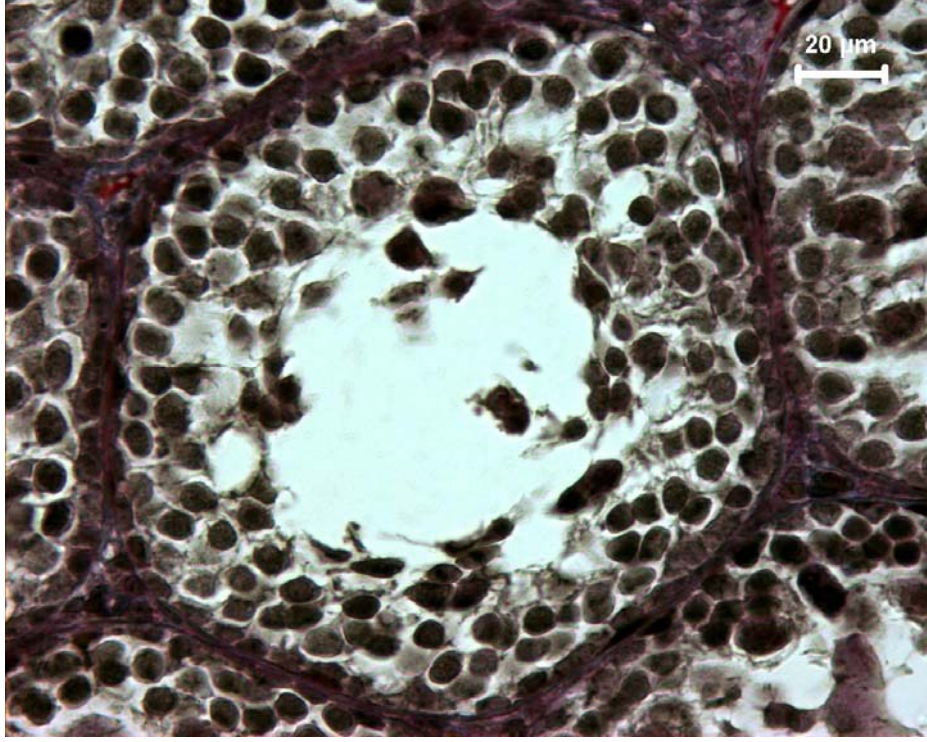
Kontrol ile karşılaştırıldığında, koklatılan kimyasalların her üçünün de epitel yüksekliğinde önemli oranda azalmaya neden olduğu belirlendi ($P < 0,001$) (Çizelge 2). Bunun yanında formalinin (Şekil 10) ksilolden daha etkili olduğu, ksilol+formalinin ise (Şekil 11) hem ksilolden hem de formalinden daha etkili olduğu saptandı ($P < 0,001$) (Çizelge 2).

Çizelge 2. Beş haftalık yaş grubundaki ratlarda belirlenen canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değerleri ($\bar{X} \pm S_x$).

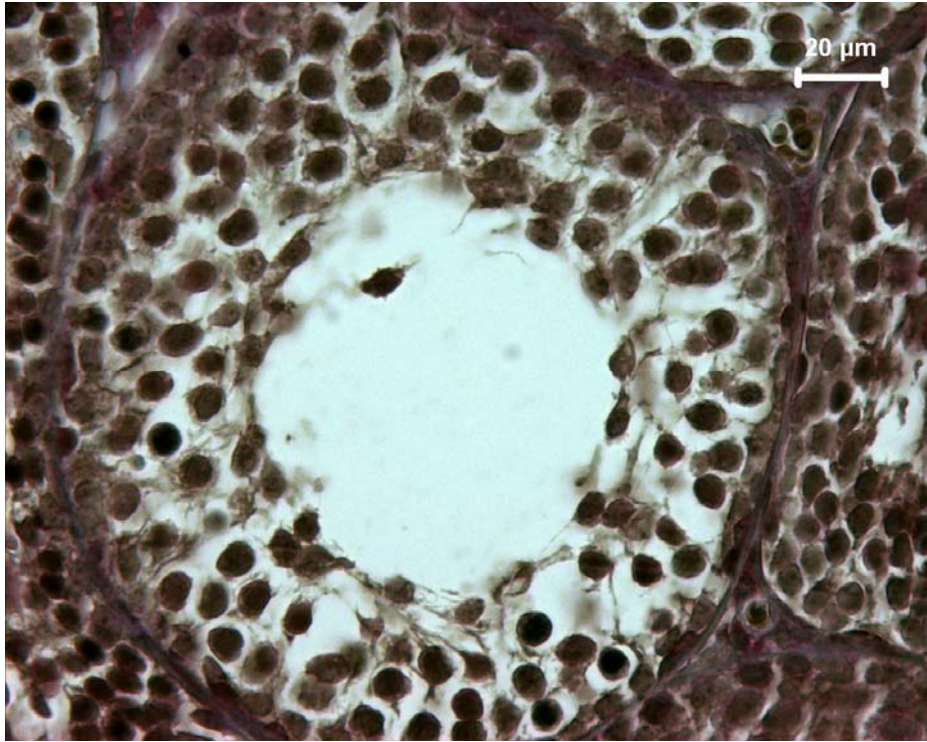
Gruplar					
	Kontrol (n=8)	Ksilol (n=8)	Formalin (n=8)	Ksilol+Formalin (n=8)	P
Canlı Ağırlık (g)	49±3	44±3	48±4	47±4	ÖD
Testis Ağırlığı (g)	0,6±0,1	0,5±0,1	0,6±0,1	0,5±0,1	ÖD
Tubulus Alanı(µm ²)	22940±334 ^a	19028±412 ^b	17997±293 ^c	17884±241 ^c	***
Epitel Yüksekliği (µm)	57±0,6 ^a	52±0,5 ^b	49±0,5 ^c	44±0,4 ^d	***

a, b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

ÖD: Önemli değil, ***: P<0,001



Şekil 10. Beş haftalık formalin koklatılan gruba ait testis dokusunda tubulus görüntüsü.
Üçlü boyama yöntemi



Şekil 11. Beş haftalık ksilol+formalin koklatılan gruba ait testis dokusunda tubulus
görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi

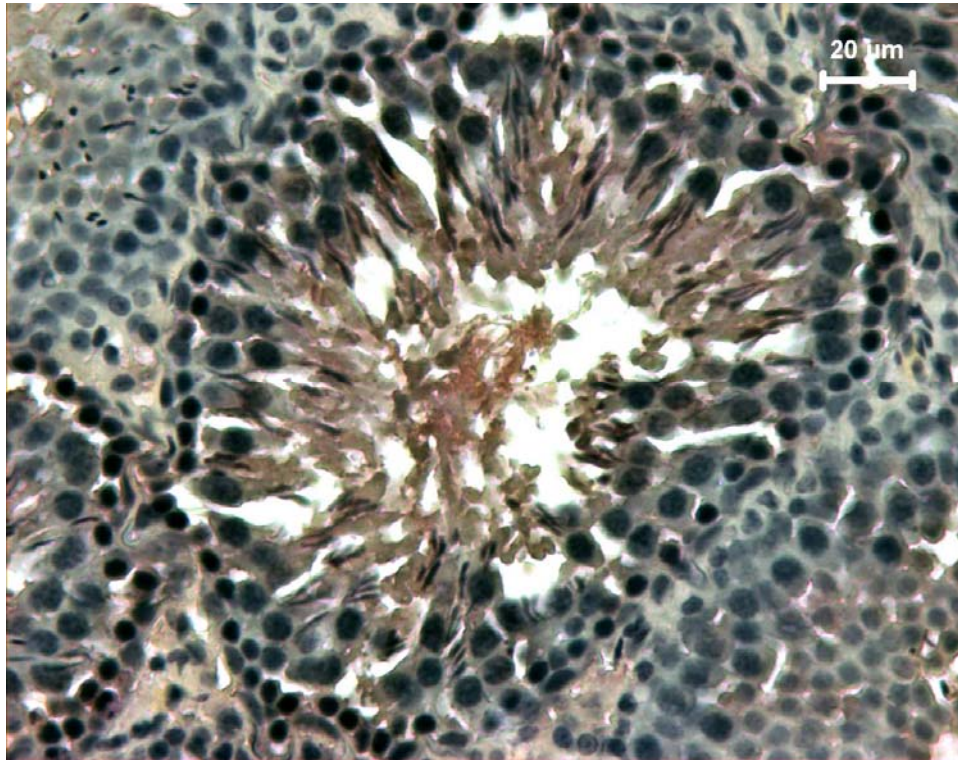
3.3.2. Deneme 2 (Sekiz Haftalık Yaş Grubu)

Sekiz haftalık kontrol grubuna ait ratların canlı ağırlıkları, kimyasal uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında; sadece ksilol+formalin koklatılmış gruptaki ratların canlı ağırlıklarının diğer gruplardan önemli oranda fazla olduğu görüldü ($P<0,01$) (Çizelge 3).

Testis ağırlığı ve tubulus alanı bakımından kimyasal uygulanan gruplar ile kontrol grubu karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmedi.

Epitel yüksekliği açısından ise sadece formalin grubunda (Şekil 12) istatistiksel düzeyde önemli azalma gözlemlendi ($P<0,001$) (Çizelge 3).

Kimyasal uygulanan gruplar arasında yapılan istatistiksel incelemede, tubulus alanı açısından anlamlılık tespit edilmedi. Epitel yüksekliği açısından, ksilol ve ksilol+formalin grupları arasında da istatistiksel anlamlılık görülmeydi. Formalin grubunda ise, ksilol ve ksilol+formalin gruplarına göre önemli oranda azalma gözlemlendi ($P<0,001$).



Şekil 12. Sekiz haftalık Formalin koklatılan gruba ait testis dokusunda tubulus görüntüsü.

Üçlü boyama yöntemi

Çizelge 3. Sekiz haftalık yaş grubunda, ratlarda belirlenen canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değerleri ($\bar{X} \pm S_x$).

Gruplar					
	Kontrol (n=8)	Ksilol (n=8)	Formalin (n=8)	Ksilol+Formalin (n=8)	P
Canlı Ağırlık (g)	77±4 ^b	85±2 ^b	87±1 ^b	111±13 ^a	**
Testis Ağırlığı (g)	1,6±0,1	1,7±0,04	1,7±0,04	1,8±0,2	ÖD
Tubulus Alanı(µm ²)	18339±295	17995±265	17991±262	17981±288	ÖD
Epitel Yüksekliği (µm)	40±0,3 ^a	39±0,5 ^a	36±0,3 ^b	39±0,4 ^a	***

ÖD: Önemli değil, **: P<0,01 , ***: P<0,001

a, b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

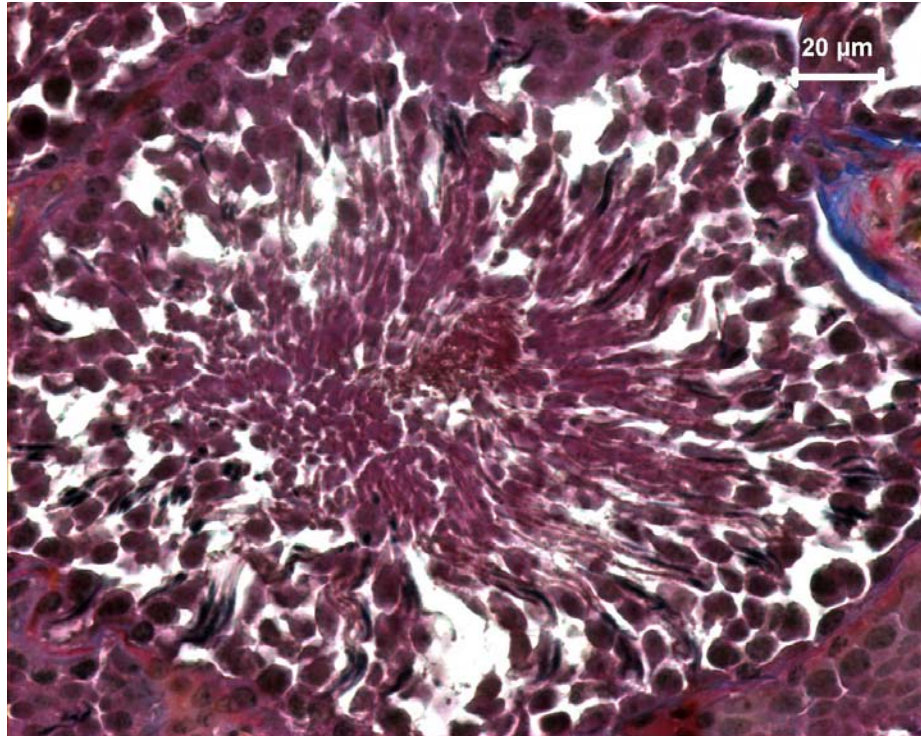
3.3.3. Deneme 3 (Onsekiz Haftalık Yaş Grubu)

Onsekiz haftalık kontrol grubuna ait ratların canlı ağırlıkları ve testis ağırlıkları kimyasal uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında; istatistiksel bir fark saptanmadı (Çizelge 4).

Tubulus alanı açısından formalin ve ksilol+formalin uygulanan grupların ortalama değerlerinin, kontrol ve ksilol uygulanan gruplardan fazla olduğu görüldü ($P<0,001$).

Tubulus epitel yüksekliğinin ise kontrole göre sadece ksilol+formalin (Şekil 13) grubunda önemli derecede arttığı ($P<0,001$) (Çizelge 4) belirlendi.

Kimyasal uygulanan gruplar arasında yapılan istatistiksel incelemede; tubulus alanı açısından, formalin ve ksilol+formalin grupları arasında istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilmedi. Ancak formalin ve ksilol+formalin gruplarında ksilol grubuna göre istatistiksel düzeyde önemli artış gözlemlendi ($P<0,001$) (Çizelge 4). Epitel yüksekliği açısından ise, sırasıyla formalin, ksilol ve ksilol+formalin gruplarında önemli oranda artış tespit edildi ($P<0,001$).



Şekil 13. Onsekiz haftalık ksilol+ formalin koklatılan gruba ait testis dokusunda tubulus görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi

Çizelge 4. Onsekiz haftalık yaş grubundaki ratlarda belirlenen canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değerleri ($\bar{X} \pm S_x$).

Gruplar					
	Kontrol (n=8)	Ksilol (n=8)	Formalin (n=8)	Ksilol+Formalin (n=8)	P
Canlı Ağırlık (g)	193±20	202±7	183±5	186±5	ÖD
Testis Ağırlığı (g)	3,8±0,2	3,9±0,1	3,6±0,1	3,7±0,1	ÖD
Tubulus Alanı(µm ²)	25523±409 ^b	25035±519 ^b	28960±1123 ^a	28083±418 ^a	***
Epitel Yüksekliği (µm)	41±0,3 ^{bc}	42±0,5 ^b	40±0,4 ^c	44±0,4 ^a	***

ÖD: Önemli değil, ***: P<0,001

a, b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

3.3.4. Kontrol Gruplarında Yaşın, Canlı Ağırlık, Testis Ağırlığı, Tubulus Alanı ve Epitel Yüksekliği Değerlerine Etkisi

Farklı yaş gruplarındaki ratların kontrol gruplarında belirlenen canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değerleri Çizelge 5’de verildi.

Canlı ağırlığın yaş ile birlikte arttığı görüldü. En yüksek ağırlık değerleri 18 haftalık hayvanlarda, en düşük ağırlık değerleri ise 5 haftalık hayvanlarda saptandı. Yaşın canlı ağırlık üzerine etkisi istatistiksel olarak önemli ($P<0,001$) bulundu. Farkların önem kontrolü sonunda beş ve sekiz haftalık yaş grupları arasındaki farkın önemsiz olduğu, ancak 18 haftalık yaş grubunun beş ve sekiz haftalık yaş gruplarının her ikisinden de farklı olduğu belirlendi.

Testis ağırlığı da yaş ile birlikte arttı. En yüksek ağırlık 18 haftalık, en düşük ağırlık beş haftalık hayvanlarda tespit edildi ($P<0,001$).

Tubulus alanları açısından en yüksek değerler 18 haftalık hayvanlarda tespit edildi. Yaşın tubulus alanı üzerine etkisi önemli ($P<0,001$) bulundu. Farkların önem kontrolünde farkın sekiz haftalık hayvanlardan kaynaklandığı gözlemlendi. Sekiz haftalık grubun ortalama tubulus alanı değeri, beş ve 18 haftalık hayvanların değerlerinden daha düşük olarak tespit edildi .

Yaşın epitel yüksekliğine etkisinin de istatistiksel olarak önemli ($p<0,001$) olduğu, farklılığın beş haftalık gruptan kaynaklandığı görüldü. Beş haftalık grubun ortalama epitel yüksekliği, sekiz ve 18 haftalık hayvanların ortalama epitel yüksekliğinden anlamlı oranda fazla bulundu ($P<0,001$).

Çizelge 5. Farklı yaş gruplarındaki ratların kontrol gruplarında belirlenen canlı ağırlık, testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliği değerleri ($\bar{X} \pm S_x$).

Kontrol Grupları				
	Beş haftalık (n=8)	Sekiz haftalık (n=8)	Onsekiz haftalık (n=8)	P
Canlı Ağırlık (g)	49±3 ^b	77±4 ^b	193±20 ^a	***
Testis Ağırlığı (g)	0,6±0,1 ^c	1,6±0,1 ^b	3,8±0,2 ^a	***
Tubulus Alanı(µm ²)	22940±334 ^b	18339±295 ^c	25523±409 ^a	***
Epitel Yüksekliği (µm)	57±0,6 ^a	40±0,4 ^c	41±0,3 ^b	***

***: P<0,001

a, b, c: Aynı satırda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

3.3.5. Yaş, Canlı Ağırlık ve Kimyasal İnhalasyonunun Testis Ağırlığı, Tubulus Alanı ve Epitel Yüksekliğine Etkisi

Testis ağırlığı, epitel yüksekliği ve tubulus alanına canlı ağırlık, yaş ve kimyasal inhalasyonunun etkileri, kimyasal madde ile yaş arasındaki etkileşimler Çizelge 6 ve 7’de gösterildi.

Testis ağırlığına yaş ve canlı ağırlığın etkisi istatistiksel anlamda önemli bulunurken ($P<0,001$), kimyasal inhalasyonu ve kimyasal madde-yaş etkileşiminin etkisi önemsiz bulundu. Testis ağırlığının, tüm gruplarda kimyasal inhalasyonundan bağımsız olarak, ilerleyen yaş ve canlı ağırlık artışı ile birlikte arttığı tespit edildi.

Tubulus alanına, yaş, canlı ağırlık ve kimyasal madde etkisinin istatistiksel olarak önemsiz olduğu görüldü. Tubulus alanı 18 haftalık yaş grubunda formalin koklatılan grupta en yüksek, sekiz haftalık yaş grubunda ise ksilol+formalin koklatılan grupta en düşük olarak bulundu. Kimyasal koklatılan gruplarda, tubulus alanları 18 haftalık yaş grubunda diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olarak tespit edildi.

Epitel yüksekliğine canlı ağırlığın etkisi önemsiz iken, yaş, kimyasal madde ve kimyasal madde-yaş etkileşiminin etkisi önemli olarak belirlendi ($P<0,001$). Epitel yüksekliği beş ve sekiz haftalık yaş dönemlerinde en yüksek olarak kontrol grubunda tespit edilirken, 18 haftalık yaş döneminde ise ksilol+formalin koklatılan grupta yüksek olarak belirlendi. Tüm kimyasal madde grupları için geçerli olmak üzere, beş haftalık yaş grubunda epitel yüksekliği diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olarak tespit edildi.

Epitel yüksekliğine kimyasal maddenin etkisi incelendiğinde ($P<0,001$), kontrol ile ksilol; formalin ile ksilol+formalin grupları arasında istatistiksel bir anlamlılık tespit edilmedi. Kontrol ve ksilol gruplarında epitel yüksekliği; formalin ve ksilol+formalin gruplarına göre istatistiksel anlamda yüksek bulundu. Onsekiz haftalık yaş grubunda, sekiz haftalığa göre epitel yüksekliğindeki artış istatistiksel olarak anlamlı görünmezken, beş haftalık yaş grubunda sekiz ve 18 haftalık yaş grubuna göre daha yüksek olarak belirlendi ($P<0,001$).

Çizelge 6. Testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliğine canlı ağırlık, kimyasal madde, yaş ve kimyasal madde-yaş interaksiyonunun etkileri

$$(\bar{X} \pm S_{\bar{x}}).$$

	Yaş	Kontrol	Ksilol	Formalin	Ksilol+ Formalin	P			
						Yaş	Canlı ağırlık	Kimyasal madde	Kimyasal madde-Yaş
Testis Ağırlığı (g)	5 hf	0,6±0,2	0,5±0,2	0,6±0,2	0,6±0,3	***	***	ÖD	ÖD
	8 hf	1,6±0,4	1,7±0,1	1,7±0,1	1,8±0,6				
	18 hf	3,8±0,4	3,9±0,3	3,6±0,1	3,7±0,3				
Tubulus Alanı (µm ²)	5 hf	22940±3002	19028±5759	17997±3751	17884±2070	ÖD	ÖD	ÖD	ÖD
	8 hf	18339±3413	17995±2635	17981±2033	17318±3823				
	18 hf	25523±3372	25035±6549	28960±14909	28083±3432				
Epitel Yüksekliği (µm)	5 hf	57±3	52±4	49±4	44,4±2	***	ÖD	***	***
	8 hf	40±2	39±4	36±1	38±2				
	18 hf	41±2	42±5	40±3	43,6±3				

ÖD: Önemli değil, ***: P<0,001

Çizelge 7. Tüm yaş grupları için ortalama testis ağırlığı, tubulus alanı ve epitel yüksekliğine canlı ağırlık, kimyasal madde, yaş ve kimyasal madde-yaş etkileşiminin etkileri ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$).

	Testis Ağırlığı (g)	Tubulus Alanı (μm^2)	Epitel Yüksekliği (μm)
Yaş	***	ÖD	***
5 hf	1,18±0,07 ^c	21392±2086	52±1,2 ^a
8 hf	1,90±0,04 ^b	18507±1193	38±0,1 ^b
18 hf	2,95±0,09 ^a	24369±2599	41±1,0 ^b
CA	***	ÖD	ÖD
Kimyasal Madde	ÖD	ÖD	***
Kontrol	2,00±0,04	22358±1168	46±0,7 ^a
Ksilol	2,04±0,04	20656±1165	45±0,7 ^a
Formalin	2,01±0,04	21751±1169	42±0,7 ^b
Ksilol+Formalin	1,98±0,04	20925±1238	42±0,7 ^b
Kimyasal Madde-Yaş	ÖD	ÖD	***

***: P<0,001

a, b, c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan ortalamalar arasındaki fark istatistiksel olarak önemlidir.

4. TARTIŞMA

4.1. Histolojik Görünüm

Yapılan çalışmada, Sertoli hücrelerinin sitoplazmaları beş, sekiz ve 18 haftalık ratların tubuluslarında gözlemlendi. Orth (1982) yaptığı çalışmada, rat testisinde Sertoli hücrelerinin proliferasyon periyodunun postnatal 15-20. günlere kadar devam ettiğini bildirmiştir. Yang ve ark (1990), Sprague-Dawley ratlarda yuvarlak spermatidlerin ilk kez 25. günde görüldüğünü, 25-40. günler arasında hızla arttığını ve 70. güne kadar artmaya devam ettiklerini bildirmektedirler. Bu çalışmada da sekiz haftalıktan itibaren daha belirgin olmakla birlikte her üç yaş grubunda da spermatidlere rastlandı. Leydig hücreleri de her üç yaş grubunda belirgin olarak gözlemlendi. Ge ve ark (2005)'nin bulguları referans alındığında, sunulan çalışmanın materyali olan beş ve sekiz haftalık yaş grubundaki ratlarda immatür Leydig hücreleri, onsekiz haftalık yaş grubunda ise olgun Leydig hücreleri görülmektedir.

4.2. Relaksin Benzeri Faktör

RLF'nin seksüel farklılaşma, gonadal fonksiyon ve germ hücre gelişiminde rol aldığı bildirilmiştir (Bogatcheva ve ark 2003). RLF ekspresyonu yetişkin memeli testisinde, tamamen farklılaşmış olgun tip Leydig hücreleri için iyi bir işaretleyicidir. Bunla birlikte prepubertal immatüre Leydig hücrelerinde veya hipertrofik veya biçimi değişmiş olan Leydig hücrelerinde sadece zayıf olarak görünür (Ivell ve Bathgate 2002). RLF rat testisinde ilk olarak 25. günden sonra progenitor Leydig hücrelerinde gözlenmiştir (Ge ve ark 2002, Sadeghian ve ark 2005). Sunulan araştırmada, kimyasal koklatılmayan her üç yaş grubunda da Leydig hücreleri RLF pozitif tespit edilmiştir. Subjektif olarak değerlendirildiğinde, formalin koklatılan sekiz ve onsekiz haftalık yaş gruplarında boyanma yoğunluğunda azalma gözlenmiş, sekiz ve onsekiz haftalık ksilol+formalin koklatılan grupta ise boyanma görülmemiştir.

Chen ve ark (1994) ile Paust ve ark (2002)'nin yapmış oldukları çalışmalarda Leydig hücrelerinin testosteron üretiminin ilerleyen yaş ile birlikte azaldığını belirlemişlerdir. Paust

ve ark (2002) ayrıca hybridizasyon analizi ile iki yaşlı rat testisinde RLF mRNA'nın ortaya çıkışı üç aylık ratlara göre çok daha az oranda bulmuşlardır. Bunun olası nedenleri; Leydig hücre sayısında azalma, düşük LH uyarımı, Leydig hücrelerinin testosteron üretme yeteneğinin azalması ve önemli germ hücre kayıpları olabilir.

Fay ve ark (1995)'nin yapmış olduğu bir çalışmada xylol inhalasyonunu takiben serum testosteron seviyesinde herhangi bir değişikliğe rastlanmazken, Yamakada ve ark (1993) serum testosteron seviyelerinin azalmış olduğunu belirlemişlerdir. Sunulan çalışmada, ksilol inhale ettirilen her üç yaş grubunda da RLF yoğun bir şekilde boyandı, ksilolden etkilenme gözlenmedi.

Beş haftalık formalin grubunda RLF yoğun bir şekilde belirlenirken, sekiz haftalık ve 4,5 aylık gruplarda boyanma yoğunluğu azalmıştır. Dolayısıyla ratlar sekiz haftalık yaştan itibaren formalin inhalasyonundan olumsuz yönde etkilenmiştir. Özen ve ark (2003, 2005) formaldehit koklatılan Wistar ratlarda serum testosteron seviyelerinin azaldığını bildirmişlerdir. Sunulan çalışmada da formalin koklatılan grupta RLF yoğunluğunun azalması, Leydig hücre fonksiyonlarındaki azalma ile bağlantılı olabilir.

Ksilol+formalin koklatılan beş haftalık grupta, RLF'nin boyanma yoğunluğu çok yoğun olarak belirlenirken, diğer yaş gruplarında boyanma olmamıştır. RLF boyanmasında ksilol inhalasyonundan etkilenme olmazken, formalin gruplarında etkilenmenin olması dolayısıyla, ksilol+formalin kombinasyonunda formalinin etkili olduğu sonucuna varılabilir.

4.3. Yaş, Canlı Ağırlık ve Kimyasal İnhalasyonunun Testis Ağırlığı, Tubulus Alanı ve Epitel Yüksekliğine Etkisi

4.3.1. Testis Ağırlığı

Cassidy ve ark (2005) ratlarda yaptıkları bir çalışmada, oral formaldehit uygulamasıyla testis ağırlığında önemli bir değişim gözlememişlerdir. Shah ve ark (1987) ise intraperitoneal formaldehit uygulamasının vücut ağırlığında önemli herhangi bir değişikliğe neden olmadığını belirlemişlerdir. Bir grup araştırmacı ise formaldehitin canlı ağırlıkta (Khan ve ark 2003) ve testis ağırlığında (Shah ve ark 1987, Khan ve ark 2003, Zhou ve ark 2006,) azalmalara neden olduğunu tespit etmişlerdir.

Ksilol inhalasyonunu takiben ise ratlarda canlı ağırlık (Nylen ve ark 1989) ve testis ağırlığında (Nylen ve ark 1989, Fay ve ark 1995) değişme olmadığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Yamakada (1993) farklı olarak ratlarda ksilol inhalasyonu sonucu canlı ağırlık ve testis ağırlığında azalma tespit etmiştir.

Sunulan çalışmada, testis ağırlığına canlı ağırlık ve yaşın etkisi istatistiksel anlamda önemli bulundu ($P<0,001$). Kimyasal inhalasyonu ve kimyasal madde-yaş etkileşiminin etkisinin önemsiz olduğu görüldü. Araştırmanın bulguları bir grup araştırmacının canlı ağırlık (Shah ve ark 1987, Nylen ve ark 1989) ve testis ağırlığı (Cassidy ve ark 2005, Nylen ve ark 1989, Fay ve ark 1995) bulgularıyla uyumluyken; yine bir grup araştırmacının canlı ağırlıkta (Yamakada 1993, Khan ve ark 2003) ve testis ağırlığında (Shah ve ark 1987, Yamakada 1993, Khan ve ark 2003, Zhou ve ark 2006) elde ettiği bulgularla uyumsuzdur. Araştırmada testis ağırlığının, tüm gruplarda kimyasal inhalasyonundan bağımsız olarak, ilerleyen yaş ve canlı ağırlık artışı ile birlikte arttığı tespit edildi.

4.3.2. Tubulus Alanı

Etanol inhalasyonunun on haftalık rat testis dokusunda tubulus çapını önemli derece azalttığı bildirilmiştir (Eid ve ark 2002). Khan ve ark (2003)'nın formaldehitin horoz testis dokusu üzerindeki etkileri üzerine yaptığı çalışmada, seminifer tubul çaplarında önemli derece azalmalar belirlenmiştir. Özen ve ark (2005) da ratlarda formalin inhalasyonu sonucu tubul çapında azalma saptamışlardır. Sunulan çalışmada ise farklı sonuçlar elde edildi. Tubulus alanı 18 haftalık yaş grubunda formalin koklatılan grupta en yüksek, sekiz haftalık yaş

grubunda ise ksilol+formalin koklatılan grupta en düşük olarak bulundu. Kimyasal koklatılan gruplarda, tubulus alanları 18 haftalık yaş grubunda diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olarak tespit edildi. Bununla beraber tubulus alanına, yaş, canlı ağırlık, kimyasal madde ve kimyasal madde-yaş interaksiyonunun etkileri incelendiğinde, istatistiksel olarak önemsiz olduğu görüldü.

4.3.3. Epitel Yüksekliği

Epitel yüksekliğine canlı ağırlığın etkisi önemsiz iken, yaş, kimyasal madde ve kimyasal madde-yaş etkileşiminin etkisi önemli olarak belirlendi ($P<0,001$). Epitel yüksekliği beş ve sekiz haftalık yaş dönemlerinde en yüksek olarak kontrol grubunda tespit edilirken, 18 haftalık yaş döneminde ise ksilol+formalin koklatılan grupta yüksek olarak belirlendi. Tüm kimyasal madde grupları için geçerli olmak üzere, beş haftalık yaş grubunda epitel yüksekliği diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olarak tespit edildi.

Epitel yüksekliğine kimyasal maddenin etkisi incelendiğinde, kontrol ile ksilol; formalin ile ksilol+formalin grupları arasında istatistiksel bir anlamlılık tespit edilmedi. Kontrol ve ksilol gruplarında epitel yüksekliği; formalin ve ksilol+formalin gruplarına göre istatistiksel anlamda yüksek bulundu ($P<0,001$). Epitel yüksekliğini ksilol etkilemezken, formalin ile ksilol+formalin inhalasyonları epitel yüksekliğini azalttı. Zhou ve ark (2006) da erişkin ratlarda (208-216 g) intraperitoneal formalin uygulamasının seminifer epitel yüksekliğinde azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Tang ve ark (2003) ise 6-14 günlük farelerde de formalin inhalasyonun seminifer epitel yüksekliğinde azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir.

Epitel yüksekliği kontrol beş haftalık yaş grubunda, sekiz ve 18 haftalık yaş grubuna göre daha yüksek olarak belirlendi ($P<0,001$). Tüm kimyasal madde grupları için geçerli olmak üzere, beş haftalık yaş grubunda epitel yüksekliği diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olarak tespit edildi.

Beş haftalık ratlarda ilk spermatogenetik dalga nedeniyle mitoz ve apoptozis aktif iken, sekiz haftalık hayvanlarda ilk spermatogenetik dalga tamamlanmış olup denge söz konusudur. Onsekiz haftalık ratlarda normal spermatogenezis devam etmektedir. Dolayısıyla epitel yüksekliğinin en fazla beş haftalık grupta tespit edilmesi, ilk spermatogenetik dalgadan kaynaklanıyor olabilir.

5. SONUÇ

Yapılan çalışmada Sertoli ve Leydig hücreleri; beş, sekiz ve 18 haftalık ratların tubuluslarında gözlemlendi. Sekiz haftalıktan itibaren daha belirgin olmakla birlikte her üç yaş grubunda da spermatidlere rastlandı. Onsekiz haftalık yaş grubunda tubulus lumeninde belirgin şekilde spermatozoonlar gözlemlendi.

Kimyasal koklatılmayan her üç yaş grubunda, immunohistokimyasal olarak Leydig hücreleri RLF pozitif tespit edildi. Kimyasal koklatılan gruplarda RLF'nin boyanmasında; ksilol inhalasyonundan etkilenme olmazken, formalin koklatılan sekiz ve onsekiz haftalık yaş gruplarında boyanma yoğunluğunda azalma tespit edildi. Sekiz ve onsekiz haftalık ksilol+formalin koklatılan grupta ise boyanma görülmedi. Ksilol+formalin kombinasyonunun olumsuz etkisinde, formalinin baskın olduğu sonucuna varılabilir. Dolayısıyla ratlar sekiz haftalık yaştan itibaren, formalin inhalasyonundan olumsuz yönde etkilenmiştir.

Testis ağırlığının, tüm gruplarda kimyasal inhalasyonundan bağımsız olarak, ilerleyen yaş ve canlı ağırlık artışı ile birlikte arttığı tespit edildi.

Tubulus alanına, yaş, canlı ağırlık, kimyasal madde ve kimyasal madde-yaş interaksiyonunun etkilerinin istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü.

Epitel yüksekliği ksilolden etkilemezken, formalin ile ksilol+formalin inhalasyonları epitel yüksekliğini azalttı. Tüm kimyasal madde grupları için geçerli olmak üzere, beş haftalık yaş grubunda epitel yüksekliği diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olarak tespit edildi.

Sonuçta, formalin ve ksilol+formalin kombinasyonu, Leydig hücreleri (RLF) ve tubulus epiteli açısından rat testis dokusunu olumsuz yönde etkilemiştir. Elde edilen bulgular, bu konuda yapılacak olan histolojik, histopatolojik ve endokrinolojik çalışmalara referans veriler olarak kullanılabilir olması ve aynı zamanda bilimsel birikime katkı oluşturmaları açısından önemlidir.

ÖZET

Araştırmada, anne gebeliğinin başlangıcından itibaren, doğumdan itibaren ve puberteden itibaren ksilol ve formalin koklatılan ratların testis dokusunda meydana gelen immunohistokimyasal ve histometrik değişimlerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla 96 adet erkek Sprague Dawley rat materyal olarak kullanıldı. Materyal; anne gebeliğinin başlangıcından itibaren, doğumdan itibaren ve puberteden itibaren denemeye alınmak üzere, üç yaş grubunda düzenlendi. Her yaş grubundan sekizer hayvanın 8 hafta boyunca, bulundukları ortamda günde 8 saat süreyle ksilol (300 ppm), formalin (6 ppm) ve ksilol+formalin (150 ppm+3 ppm) solunumu gerçekleştirmeleri sağlandı. Belirtilen yaş gruplarına göre düzenlenen kontrol grupları da herhangi bir uygulama yapılmadan, eşit ortam koşullarında 8 hafta süreyle tutuldu. Deney süresi sonunda beş haftalık, sekiz haftalık ve 18 haftalık olan hayvanların canlı ağırlıkları ve testis ağırlıkları belirlendi.

Hazırlanan bloklardan alınan kesitlere histometrik değişimleri belirlemek amacıyla üçlü boyama metodu, relaksin benzeri faktörün (relaxin like factor-RLF) gösterilebilmesi için strept avidin-biyotin kompleks (strept avidin-biotin complex/ sABC) boyama metodu uygulandı. Işık mikroskobu (Leica DMLB) ile RLF'nin dokudaki yoğunluğu; mikroskoba bağlı görüntü analiz sistemi yardımı (Leica Q Win Standart) ile tubulus alanı ve tubulus epitel yüksekliği tespit edildi.

Yapılan çalışmada Sertoli ve Leydig hücreleri; beş, sekiz ve 18 haftalık ratların testislerinde gözlemlendi. Sekiz haftalıktan itibaren daha belirgin olmakla birlikte her üç yaş grubunda da spermatidlere rastlandı. Onsekiz haftalık yaş grubunda tubulus lumeninde belirgin şekilde spermatozoonlar gözlemlendi.

Kimyasal koklatılmayan her üç yaş grubunda, immunohistokimyasal olarak Leydig hücreleri RLF pozitif tespit edildi. Kimyasal koklatılan gruplarda RLF'nin boyanmasında; ksilol inhalasyonundan etkilenme olmazken, formalin koklatılan sekiz ve onsekiz haftalık yaş gruplarında boyanma yoğunluğunda azalma tespit edildi. Sekiz ve onsekiz haftalık ksilol+formalin koklatılan grupta ise boyanma görülmedi.

Testis ağırlığının, tüm gruplarda kimyasal inhalasyonundan bağımsız olarak, ilerleyen yaş ve canlı ağırlık artışı ile birlikte arttığı tespit edildi.

Tubulus alanına, yaş, canlı ağırlık, kimyasal madde ve kimyasal madde-yaş interaksiyonunun etkilerinin istatistiksel olarak önemli olmadığı görüldü.

Epitel yüksekliği ksilolden etkilemezken, formalin ile ksilol+formalin inhalasyonları epitel yüksekliğini azalttı. Tüm kimyasal madde grupları için geçerli olmak üzere, beş haftalık yaş grubunda epitel yüksekliği diğer yaş gruplarına göre daha yüksek olarak tespit edildi.

Sonuç olarak, formalin ve ksilol+formalin kombinasyonları, Leydig hücreleri (RLF) ve tubulus epiteli açısından rat testis dokusunu olumsuz yönde etkilemiştir.

Anahtar kelimeler; Histometri, tubulus seminiferus kontortus, relaksin benzeri faktör (RLF), ksilol, formalin, rat

SUMMARY

The Effect of Xylol and Formaline Inhalation to Testicular Tissue in Rats

In this study, the immunohistochemical and histometrical changes of testicular tissues obtained from the rats which their mothers were subjected to xylol and formaline from the beginning of pregnancy, after the birth and immediately after puberty were evaluated.

Nigty six male Sprague Dawley's rats were chosen as biological material. The diverse groups were arranged in order to their ages and the duration of exposure. One group of rats' mothers exposed to xylol and formaline gases during pregnancy and then the baby rat exposed to xylol and formaline gases until they were five weeks of age. One group of rats were exposed to xylol and formaline gases from birth to eighth weeks of age, □n done group of rats were exposed to xylol and formaline gases from puberty for eighth weeks. Each group of rats exposed to diverse gas formulations such as xylol (300 ppm), formaline (6 ppm) and ksilol+formaline (150 ppm+3 ppm) combination for eight hours each day for eight weeks long. Control groups for each groups of rats, exposed to gases, were taken to compare the differences. After the tests, the groups, five weeks old, eight weeks old and 18 weeks old, respectively were weighed and their testis weights were determined.

The blocks were prepared for colorations and then two coloration methods were applied to the transversal sections; triple coloration methods to define histometric changes and strept avidin-biotine complex (sABC) to show relaxin like factor (RLF). RLF's tissue densities were defined with light microscope (Leica DMLB) and the area of tubulus and the height of epithelium of tubulus were defined with image analyze system which was linked to microscobe (Leica Q Win Standart).

In this study, Sertoli and Leydig cells were defined in each groups of rat testes. From the age of eight weeks spermatids were defined well. In the group of rats, 18 weeks old, had clear spermatozoons inside the lumen of tubules.

In control groups of those diverse ages, Leydig cells were determined to be positive in RLF when immunohistochemically checked. In the others, coloration to determine RLF showed that there was no influence in the group which were exposed to xylol gas but in the

groups which were exposed to formaline gas showed a loss in density of coloration in eighth and 18 weeks old groups.

The groups which were exposed xylol+formaline gases, whom are eight and 18 weeks old showed that there was no coloration for RLF.

The weight of testes was not affected from each chemical gases inhalation; testicular weights increased with increasing age and body weight.

Statistically, there was no influence of age, body weight, chemical substance and chemical substance-age interactions on the area of tubulus.

Epithelium height was affected by formaline and xylol+formaline inhalations, there is a clear loss of height in these groups but there was no influence of xylol. Regarding each groups of rats, five weeks old ones had higher epithelium than the others.

Consequently, formaline and xylol+formaline combinations had negative influences on Leydig cells (RLF) and those tubular epithelium of rat testises.

Key words; Histometrical, tubulus seminiferous contortus, relaxin-like factor (RLF), xylol, formaline, rat

KAYNAKLAR

Adham IM, Emmen JMA, Engel W (2000) *The role of the testicular factor INSL3 in establishing the gonadal position*, Mol. Cell. Endocrinol., 160 (1): 11-16.

Agency for toxic substances&disease registry (2005) *Xylene*, Erişim: [http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts71.pdf], Erişim Tarihi: 20.06.2006.

Agency for toxic substances&disease registry (2006) *Formaldehyde, (HCHO)* http://www.atsdr.cdc.gov/MHMI/mmg111.html#bookmark02 (20 Haziran 2006).

Aragon MA, Ayala ME, Marin M, Aviles A, Damian-Matsumura P, Dominguez R (2005) *Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development*, Reproduction, 129 (6): 717-27.

Ariyaratne HBS, Mason JI, Mendis-Handagama SMLC (2000 a) *Effects of tri-iodothyronine on testicular interstitial cells and androgen secretory capacity of the prepubertal rat*, Biol. Reprod., 63: 493-502.

Ariyaratne HBS, Mason JI, Mendis-Handagama SMLC (2000 b) *Effects of thyroid and luteinizing hormone on the onset of precursor cell differentiation into leydig progenitor cells in the prepubertal rat testis*, Biol. Reprod., 63: 898-904.

Ariyaratne HBS, Mendis-Handagama SMLC (2000) *Changes in the testis interstitium of sprague dawley rats from birth to sexual maturity*, Biol. Reprod., 62: 680-690.

Bamberger AM, Ivell R, Balvers M, Kelp B, Bamberger CM, Riethdorf L, Loning T (1999) *Relaxin-like factor (RLF): A new specific marker for leydig cells in the ovary*, Int. J. Gynecol. Pathol., 18 (2): 163-8.

Boockfor FR, Fullbright G, Bullesbach EE, Schwabe C (2001) *Relaxin-like factor (RLF) Serum concentrations and gubernaculum rlf receptor display in relation to pre- and neonatal development of rats*, Reproduction, 122: 899-906.

Bogatcheva NV, Truong A, Feng S, Engel W, Adham IM, Agoulunik AI (2003) *GREAT/LGR8 is the only receptor for insulin-like 3 peptide*, Mol. Endocrinol., 17 (12): 2639-2646.

Bullesbach EE, Rhodes R, Rembiesa B, Schwabe C (1999) *The Relaxin-like factor is a hormone*, Endocrine, 10 (2): 167-9.

Cassee FR (1995) *Upper respiratory tract toxicity of mixtures of aldehydes: in vitro and in vitro studies*, Thesis, Utrecht University, Utrecht.

Cassidy SL, Dix KM, Jenkins T (1983) *Evaluation of a testicular sperm head counting technique using rats exposed to dimethoxyethyl phthalate (DMEP), glycerol-onochlorohydrin (GMCH), epichlorohydrin (ECH), formaldehyde (FA), or methyl methanesulphonate (MMS)*, Arch. Toxicol., 53: 71-78.

Chase DJ, Payne AH (1983) *Changes in distribution and androgen production of Leydig cells of two population during sexual maturation in the rat*, Endocrinology, 112: 29-34.

Chen H, Hardy MP, Huhtaniemi I, Zirkin BR (1994) *Age-related decreased leydig cell testosterone production in the brown norway rat*, J. Androl., 15 (6): 551-557.

Chung W, Yu I, Park C, Lee K, Roh H, Cha Y (1999) *Decreased formation of ethoxyacetic acid from ethylene glycol monoethyl eter and reduced atrophy of testes in male rats upon combined administration with toluene and xylene*, Toxicol. Lett., 104: 143-150.

Culling CFA, Allison RT, Barr WT (1985) *Cellular Pathology Technique*, Butterworths and Co Ltd. London.

Dalgaard M, Pilegaard K, Ladefoged O (2002) *In utero exposure to diethylstilboestrol or 4-n-nonylphenol in rats: Number of sertoli cells, diameter and length of seminiferous tubules estimated by stereological methods*, Pharm. Toxicol., 90 (2): 59.

Dellmann HD, Brown EM (1987) *Textbook of Veterinary Histology*, 3rd Ed., Lea&Febiger, s: 286-312. Philadelphia.

Eid NAS, Shibata MA, Ito Y, Kusakabe K, Hammad H, Otsuki Y (2002) *Involvement of fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol-treated rats*, J. Androl., 25 (3): 159–167.

Environmental Health Data Search, Xylene, Erişim: [http://www.oztoxics.org/ntn/xylene.htm], Erişim Tarihi: 20.06.2006.

Fay M, Eisenmann C, Diwan S (1995) *Toxicological profile for xylene*, Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Chen H, Zirkin BR, Hardy MP (2005) *Gene expression in rat leydig cells during development from the progenitor to adult*, Biol. Reprod. 104.037499.

Ge RS, Hardly MP (1998) *Variation in the end products of androgen biosynthesis and metabolism during postnatal differentiation of rat Leydig cells*, Endocrinology, 139: 3787-3795.

Güler řG “Ksilen intoksikasyonu” Erişim: [http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/forensic_medicine/tok4.html], Erişim Tarihi: 20.06.2006.

Grafstrom RC (1990) *In vitro studies of aldehyde effects related to human respiratory carcinogenesis*, Mutation research, 238: 175-184.

Hales DB (2002) *Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis*, J. Reprod. Immunol., 57: 3-18.

Handagama C, Ariyaratne S (2001) *Differentiation of the adult leydig cell population in the postnatal testis*, Biol. Reprod., 65: 660-671.

Hardly MP, Zirkin BR, Ewing LL (1989) *Kinetic studies on the development of the adult population of leydig cells in testes of prepubertal rat*, Endocrinology, 124: 762-770.

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

Hassa O, Aştı RN (1997) *Embriyoloji*, 3. Baskı, Yorum basın yayın, s: 07-10, Ankara.

Hess RA (1990) *Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: Light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes*, Biol. Reprod., 43: 525-542.

Hsu SM, Raine L, Fanger H (1981) *Use of avidin-biotin-peroxidase complex (abc) in immunoperoxidase techniques: a comparison between abc and un labeled antibody (pap) procedures*, J. Histochem. Cytochem., 29 (4): 577-80.

<http://www.uwyo.edu/wjm/Repro/spermat/htm>, Erişim Tarihi: 23.12.2006.

Hurni H, Ohder H (1973) *Reproduction study with formaldehyde and hexamethylenetetramine in beagle dogs*, Food Cosmet. Toxicol., 11: 459-462.

Irwin RJ (1997) *Environmental contaminants encyclopedia entry on xylenes*, National Park Service.

Ivell R (1997) *Biology of the relaxin-like factor (RLF)*, Rev. Reprod., 2: 133-138.

Ivell R, Bathgate RAD (2002) *Reproductive biology of the relaxin-like factor (RLF/INSL3)*, Biol. Reprod., 67: 699-705.

Jahnukainen K, Chrysis D, Hou M, Parvinen M, Eksborg S, Söder O (2004) *Increased apoptosis occurring during the first wave of spermatogenesis is stage-specific and primarily affects midpachytene spermatocytes in the rat testis*, Biol. Reprod., 70: 290-296.

Johnson KE (1991) *Histology and Cell Biology*, 2nd Ed., Harwal Publishing Company, s: 295-304, USA.

Karimov K, Dadazhanov SHN, Gil'dieva MS (2003) *Rat reproductive cells as biological indicators of the effect of environmental factors*, Morfologia, 123 (1): 69-71.

Khan MZ, Ali Z, Muhammad G, Khan A, Mahmood F (2003) *Pathological Effects of Formalin (37% Formaldehyde) Mixed in Feed or Administered into the Crops of White Leghorn Cockerels*, J. Vet. Med. A, 50 (7): 354.

Krinke GJ (2000) *The Laboratory Rat*, 1st Ed., Academic Press, s: 150-152, 311-312, Switzerland.

Klonisch T, Kauffold J, Steger K, Bergmann M, Leiser R, Fischer B, Klonisch SH (2001) *Canine relaxin-like factor: Unique molecular structure and differential expression within reproductive tissues of the dog*, Biol. Reprod., 64: 442-450.

Kumagai J, Hsu SY, Matsumi H, Roh JS, Fu P, Wade JD, Bathgate RA, Hsueh AJ (2002) *INSL3/leydig insulin-like peptide activates the lgr8 receptor important in testis descent*, J. Biol. Chem., 277 (35): 31283-6.

Leblond CP, Clermont Y (1952) *Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat*, Ann. NY. Acad. Sci., 55: 548-573.

Leeson RC, Leeson ST, Paparo AA (1985) *Textbook of Histology*, WB Saunders Company, s: 486-489, London.

Lemasters GK, Olsen DM, Yiin JH, Lockey JE, Shukla R, Selevan SG, Schrader SM, Toth GP, Evenson DP, Huszar GB (1999) *Male reproductive effects of solvent and fuel exposure during aircraft maintenance*, Reprod. Toxicol., 13 (3): 155-156.

Li GL, Yin SN, Watanabe T, Nakatsuka H, Kasahara M, Abe H, Ikeda M (1986) *Benzene-specific increase in leukocyte alkaline phosphatase activity in rats exposed to vapors of various organic solvents*, J. Toxicol. Environ. Healt, 19 (4): 581-589.

Marks TA, Worthy WC, Staples RE (1980) *Influence of formaldehyde and Sonacide® (potentiated acid glutaraldehyde) on embryo and fetal development in mice*, Teratology, 22: 51–58.

Meehan T, Loveland KL, de Kretser D, Cory S, Print CG (2001) *Developmental regulation of the bcl-2 family during spermatogenesis: insights into the sterility of bcl-w/- male mice*, Cell Death Differ., 8 (3): 225-33.

Molenaar R, Rooij DG, Rommerts FFG, Vander Molen HJ (1986) *Repopulation of leydig cells in mature rats after selective destruction of the existent leydig cells with ethylene dimethane sulfonate is dependent on luteinizing hormone and not follicle stimulating hormone*, Endocrinology, 118: 2546-2554.

Monticello TM, Morgan KT, Everitt JI, Popp JA (1989) *Effects of formaldehyde gas on the respiratory tract of rhesus monkeys*, Am. J. Pathol., 134 (3): 515-27.

Moreno RD, Lizama C, Urzua N, Vergara SP, Reyes JG (2006) *Caspase activation throughout the first wave of spermatogenesis in the rat*, Cell Tissue Res., 533-540.

Monticello TM (1989) *Effects of formaldehyde gas on the respiratory tract of rhesus monkeys*, Pathology and cell proliferation, Am. J. Pathol., 134: 515-527.

Mori K, Inoue N, Fujishiro K, Hori H, Tanaka I (1988) *Effects of chronic inhalation of ethylene oxide on the rat testes*, J. Uoeh., 10 (4): 427-31.

Morrissey RE, Collins JJ, Lamb JC, Manus AG, Gulati DK (1988) *Reproductive effects of theophylline in mice and rats*, Fundam Appl. Toxicol., 10 (3): 525-36.

Norback D, Wieslander G, Edling C (1995) *Occupational exposure to volatile organic compounds and other air pollutants from the indoor application of water-based paints*, Ann. Occup. Hyg., 39 (6): 783-794.

Nozu K, Dufau ML, Catt KJ (1981) *Estradiol receptor-mediated regulation of steroidogenesis in gonadotropin-desensitized leydig cells*, J. Biol. Chem., 256 (4): 1915-1922.

Nylen P, Ebendal T, Eriksdotter-Nilsson M, Hansson T, Henschen A, Johnson AC, Kronevi T, Kvist U, Sjostrand NO, Hoglund G (1989) *Testicular atrophy and loss of nerve growth factor-immunoreactive germ cell line in rats exposed to n-hexane and a protective effect of simultaneous exposure to toluene or xylene*, Arch. Toxicol., 63 (4): 296-307.

Orth JM (1982) *Proliferation of Sertoli cells in fetal and postnatal rats: a quantitative autoradiographic study*, Anat. Rec., 203 (4): 485-92.

Ozen OA, Yaman M, Sarsilmaz M, Songur A, Kus I (2003) *Testicular zinc, copper and iron concentrations in male rats exposed to subacute and subchronic formaldehyde gas inhalation*, J. Trace Elem Med. Biol., 17 (1): 6.

Ozen OA, Akpolat N, Songur A, Kuş I, Zararsız I, Ozacmak VH, Sarsilmaz M (2005) *Effect of formaldehyde inhalation on hsp70 in seminiferous tubules of rat testes: An immunohistochemical study*, Toxicol. Ind. Health., 21 (10): 249-254(6).

Paust HJ, Wessels J, Ivell R, Mukhopadhyay AK (2002) *The expression of the rlf/insl3 gene is reduced in leydig cells of the aging rat testis*, Exp. Gerontol., 37 (12): 1461-1467.

Purvis K, Clausen OPF, Hansson V (1979) *LH Contamination may explain FSH effect on rat leydig cells*, J. Reprod. Fertil., 56: 657-665.

Rodriguez I, Ody C, Araki K, Garcia I, Vassalli P (1997) *An early and massive wave of germinal cell apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis*, Embo J., 16 (9): 2262–2270.

Rodriguez JB (2002) *DNA replication and germ cell apoptosis during spermatogenesis in the cat*, J. Androl., 23 (4).

Russell LD, De Franca LR, Hess R, Cooke P (1995) *Characteristics of mitotic cells in developing and adult rat testes with observations on cell lineage*, Tissue Cell., 27: 105-128.

Sadeghian H, Anand-Ivell R, Balvers M, Relan V, Ivell R (2005) *Constitutive regulation of the insl3 gene in rat leydig cells*, Mol. Cell. Endocrinol.; 241 (1-2): 10-20.

Sarsilmaz M, Ozen OA, Ozyurt H (2000) *Subakut ve subkronik formaldehit inhalasyonundan sonra sıçanlarda karaciğer enzimatik antioksidan sistemin değerlendirilmesi*, Van Tıp Dergisi, 7 (3).

Shah BM, Vachhrajani KD, Chinoy NJ, Chowdhury AR (1987) *Formaldehyde induced structural and functional changes in the testis of rats*, J. Reprod. Biol. Comp. Endocrinol., 7 (1): 42–52.

Shulze W (1982) *Evidence of a wave of spermatogenesis in human testis*, Andrologia, 14 (2): 200-7.

Seidenberg JM, Anderson DG, Becker RA (1986) *Validation of an in vivo developmental toxicity screen in the mouse*, Teratogen Carcinogen Mutagen, 6: 361–374.

Steinberger E (1992) *Disorder of the male reproductive system*, In: Environmental Medicine Ed: Tarcher AB, Plenum Medical Book Company, Newyork.

Tang M, Xie Y, Yi Y, Wang W. (2003) *Effects of formaldehyde on germ cells of male mice*, Wei Sheng Yan Jiu. , 32 (6): 544-8.

Tanyolaç A (1999) *Özel Histoloji*, 3. baskı, Yorum basın yayın, s: 132-143, Ankara.

Teerds KJ, Closset J, Rommerts FFG, De Roij DG, Stocco DM, Colenbrander B, Wensing CJG, Hennen G (1989) *Effects of pure FSH and LH preparations on the number and function of leydig cells in immature hypophysectomized rats*, J. Endocrinol., 120: 97-106.

Teerds KJ, De Rooij DG, De Jong FH, Van Haaster LH (1998) *Development of the adult type leydig cells cell population in the rat is affected by neonatal thyroid hormone levels*, Biol. Reprod., 59: 344-350.

Teerds KJ, Boer-Brouwer M, Dorrington HJ, Balvers M, Ivell R (1999) *Identification of markers for precursor and leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration*, Biol. Reprod., 60 (6): 1437-45.

Tekbaş ÖF (2006) *Kimyasallar ve üreme sağlığı*, TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni, 5 (1).

Washington WJ, Murthy RC, Doye A, Eugene K, Brown D, Bradley I. (1983) *Induction of morphologically abnormal sperm in rats exposed to o-xylene*, Arch. Androl.; 11: 233-237.

WHO Regional Office for Europe (2001) *Formaldehyde*, Erişim: [www.euro.who.int/document/aqi/5_8formaldehyde.pdf], Erişim Tarihi: 20.06.2006.

Wrobel KH, Schimmel M (1989) *Morphology of the bovine sertoli cell during the spermatogenetic cycle*, Cell Tissue Res., 257: 93-103.

Yamakada K (1993) *Influence of lacquer thinner and some organic solvents on reproductive and accessory reproductive organs in the male rat*, Biol. Pharm. Bull., 16(4): 425-7.

Yang ZW, Kong LS, Guo Y, Yin JQ, Mills N (2006) *Histological changes of the testis and epididymis in adult rats as a result of leydig cell destruction after ethane dimethane sulfonate treatment: A morphometric study*, Asian J. Androl.; 8 (3): 289-99.

Yılmaz I (2005) *Apoptozis*, Sağlık Bakanlığı-Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği.

Yılmazer D, *Formaldehit intoksikasyonu*, Erişim: [http://www.medicine.ankara.edu.tr/internal_medical/forensic_medicine/tok4.html], Erişim Tarihi:20.06.2006.

Zheng S, Turner TT, Lysiak JJ (2006) *Caspase 2 activity contributes to the initial wave of germ cell apoptosis during the first round of spermatogenesis*, Biol. Reprod., 74: 1026- 1033.

Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H, Wang HX (2006) *The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats*, Asian J. Androl., 8 (5): 584–588.

ÖZGEÇMİŞ

İzmir’de 1979 yılında doğdu. İlkokul, ortaokul ve liseyi İzmir’de tamamladı. Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesinden 2003 yılında mezun oldu. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı’nda 2003 yılında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Askerliğini 2005-2006 yılları arasında Ankara Zırhlı Birlikler Okulu ve Eğitim Tümen Komutanlığı’nda Gıda Kontrol Subayı olarak yaptı. Halen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi olarak çalışmaktadır.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmamdaki yardımlarından dolayı danışmanım Prof. Dr. Ülker EREN'e, araştırmanın yürütülmesinde yardımlarını esirgemeyen Hayvan Besleme ve Zootečni Bölümü öğretim elemanlarına teşekkür ederim.