

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA TRAVMATİK BEYİN HASARININ
TESTİSE OLASI ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

NERGİZ ŞEREF

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2012

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2009970071

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SIÇANLARDA TRAVMATİK BEYİN HASARININ
TESTİSE OLASI ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NERGİZ ŞEREF

Danışman Öğretim Üyesi: Doç. Dr. Ülker SÖNMEZ

Bu proje DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2011.KB.SAG.039
sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.Msc-2009970109

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Nergiz ŞEREF
**‘SIÇANLARDA TRAVMATİK BEYİN HASARININ TESTİSE OLASI
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI’** konulu Yüksek Lisans tezini 24.02.2012
tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

u

Doç. Dr. Ülker SÖNMEZ
BAŞKAN



Doç. Dr. Işıl TEKMEK
ÜYE



Prof. Dr. Halil RESMİ
ÜYE

Doç. Dr. Güven ERBİL
ÜYE(Yedek)

Doç. Dr. Mete EDİZER
ÜYE(Yedek)

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
KISALTMALAR.....	ix
ÖZET	xi
ABSTRACT	1
1.GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Testis.....	4
2.1.1. Testisin Anatomisi	4
2.1.2. Testis Histolojisi	4
2.2. Nöroendokrin Sistem.....	16
2.2.1. Hipotalamohipofiziyal sistemin ana hatları.....	16
2.2. Travmatik Beyin Hasarı.....	20
2.3. Apoptoz.....	22
2.3.1. Apoptoz'un Tanımı Ve Tarihçesi	22
2.3.2. Apoptozun Görüldüğü Olaylar	23
2.3.2.1. Morfolojik Değişiklikler	24
2.3.2.2. Biyokimyasal Değişiklikler.....	25
2.3.3. Apoptoz Mekanizması.....	25
2.3.3.1. Ekstrensek / Reseptör Aracılı Yol	25
2.3.3.2. İntrensek / Mitokondrial Yol.....	26
2.3.4. Apoptoz Regulatorleri	26

2.3.5. Spermatogeneziste Apoptozun Rolü	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. Araştırmanın Tipi	30
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	30
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	31
3.4. Çalışma Materyali.....	31
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	31
3.6. Veri Toplama Araçları	31
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler	31
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler	31
3.6.2.1. Işık Mikroskopik İncelemeler	32
3.6.2.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması	32
3.6.2.1.2. Masson-Trikrom Boyaması	33
3.6.2.1.3. Periyodik Asit Schiff Boyaması (PAS)	34
3.6.2.1.4. Cresyl Violet boyaması.....	35
3.6.2.2. Histolojik Skorlama	36
3.6.2.2.1. Johnson Testiküler Biyopsi Skoru.....	36
3.6.2.3. İmmünohistokimyasal İncelemeler.....	36
3.6.2.3.1. Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine Triphosphate DNA Nick-End Labelling (TUNEL) Boyaması.....	37
3.6.2.3.2. Aktif Kaspaz 3.....	37
3.6.2.4. İstatistiksel değerlendirme.....	38
3.6.2.5. Ultrastrüktürel İnceleme.....	38
3.6.2.5.1. Elektron Mikroskobu Doku Takibi	38
3.6.2.6. Biyokimyasal İnceleme.....	39
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	39

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	39
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	40
3.10. Etik Kurul Onayı	40
4. BULGULAR.....	41
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	41
4.1.1. Beyin Hipokampus Bölgesinin Histolojik Değerlendirilmesi	41
4.2.1. Testis'in Histolojik Değerlendirmesi	42
4.3. Histolojik Skorlama	47
4.3.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru.....	47
4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular	47
4.4.1. Apoptozun değerlendirilmesi.....	49
4.4.1.1. Spermatogonyum hücreleri Tunel Hücre Sayımı	49
4.4.1.2. Spermatogonyum hücreleri Aktif Kaspaz 3 Hücre Sayımı.....	50
4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	50
4.5. Biyokimyasal Bulgular	53
5. TARTIŞMA.....	56
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	59
7.KAYNAKÇA	60
8.EKLER	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Testis yapısı. (<i>Gray's Anatomi Atlası</i>).....	5
Şekil 2: Sertoli hücresi ve spermatogenik seri hücreleri.	9
Şekil 3: Spermin yapısı.	13
Şekil 4: Apoptoz ve nekroz (36).....	24
Şekil 5: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. H&E.	42
Şekil 6: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. H&E.	43
Şekil 7: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, beyaz ok: bazal membran, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. PAS.	43
Şekil 8: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz ok: bazal membran, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid. PAS.....	43
Şekil 9: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, beyaz ok: bazal membran, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. Masson Trikrom.	44
Şekil 10: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, beyaz ok: bazal membran, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. Masson Trikrom.	44
Şekil 11: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, beyaz ok: bazal membran, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. H&E.	45
Şekil 12: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz ok: bazal membran, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid. H&E.....	45

Şekil 13: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, beyaz ok: bazal membran, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatozoid, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. PAS.	45
Şekil 14: Travma grubuna ait testis dokusu. Kırmızı üçgen: interstisyel alandaki bağ dokusu artışı, beyaz ok: bazal membran, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatozoid, kırmızı ok: spermatid. PAS.	46
Şekil 15: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, mavi ok: spermatogonyum, sarı ok: leydig hücresi, yeşil ok: spermatozoid, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. Masson Trikrom.	46
Şekil 16: Travma grubuna ait testis dokusu. Mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatozoid, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. Masson Trikrom.	46
Şekil 17: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatozoid, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. Tunel.	47
Şekil 18: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatozoid, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel, turuncu ok: Tunel pozitif hücreler. Tunel.	48
Şekil 19: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatozoid, kırmızı ok: spermatid. Aktif Kaspaz 3.	48
Şekil 20: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatozoid, kırmızı ok: spermatid, turuncu ok: apoptoza uğrayan hücreler. Aktif Kaspaz 3.	49
Şekil 21: Kontrol grubuna ait testis dokusu. BL: bazal lamina, N: spermatogonyum nükleusu, PS: primer spermatozoid S: sitoplazma, SS: sekonder spermatozoid, ST: gelişmekte olan spermatidler.	51
Şekil 22: Travma grubuna ait testis dokusu. BL: bazal lamina, N: spermatogonyum nükleusu, PS: primer spermatozoid S: sitoplazma, SS: sekonder spermatozoid, SRT: sertoli, ST: gelişmekte olan spermatidler.	52
Şekil 23: Travma grubuna ait testis dokusu. BL: bazal lamina, N: Sertoli nükleusu, SRT: Sertoli, yıldız işareti: Sertoli-sertoli hücreleri arasındaki bağlantı kopukluğu.	52

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Doku takip protokolü.	32
Tablo 2: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.	33
Tablo 3: Masson-Trikrom boyama protokolü.	34
Tablo 4: Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü.	35
Tablo 5: Cresyl Violet boyama protokolü.	35
Tablo 6: Jonhson testiküler biyopsi skorlaması.....	36
Tablo 7: Beyin dokusu hücre sayımı istatistiksel sonuçları	41
Tablo 8: Johnsen Testiküler Biyopsi skoru sonuçları.....	47
Tablo 9: Tunel hücre sayımının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	49
Tablo 10: Aktif Kaspaz 3 hücre sayımının istatistiksel olarak değerlendirilmesi	50
Tablo 11: GnRH istatistiksel değerlendirilmesi	53
Tablo 12: Testosteron istatistiksel olarak değerlendirilmesi	53
Tablo 13: LH istatistiksel değerlendirilmesi	54
Tablo 14: FSH istatistiksel değerlendirilmesi	54
Tablo 15: GPx istatistiksel olarak değerlendirilmesi	55
Tablo 16: MDA istatistiksel değerlendirilmesi	55

KISALTMALAR

ACTH: Adrenokortikotropik Hormon

FSH: Folikül Stimulan Hormon

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon

GPx: Glutasyon Peroksidaz

H&E: Hematoksilen Eozin

LH: Luteinizan Hormon

MDA: Malondialdehit

PAS: Periyodik Asit Schiff

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

TEŞEKKÜR

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

Yüksek lisansa başvurduğum ilk gün dahi yanımda olan, tez çalışmalarımnda desteğini esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Bekir Uğur ERGUR'a,

Yüksek lisans eğitimime katkılarını sağlayan Doç.Dr. H. Alper BAĞRIYANIK'a, Doç. Dr. Işıl TEKMEK'e, Doç. Dr. Çetin PEKÇETİN'e, Doç. Dr. Güven ERBİL'e, Doç. Dr. Kazım TUĞYAN'a,

Laboratuvar çalışmalarımnda yardımlarını esirgemeyen Dr. Seda ÖZBAL'a, Serap CİLAKEK MICİLİ'ya, Sedef MENKÜ'ye ve Özcan ÜSTÜN'e,

Yüksek lisansa başladığım günden beri daima bilimsel ve manevi destekleriyle her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım Ziya DENEK ve Hande TOPEL'e,

Her konuda yanımda olduğu gibi eğitim dönemim boyunca da eksikliğini hissettirmeyen, bir telefon kadar yakınımda olan biricik dostum, dert ortağım Müjde ATA'ya,

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

SIÇANLARDA TRAVMATİK BEYİN HASARININ TESTİSE OLASI ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Nergiz ŞEREF

Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

ÖZET

Amaç:

Çalışmamızda ağırlık atışı modelini kullanarak oluşturduğumuz travmatik beyin hasarının testis üzerine etkisi olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

Yöntem:

Deney gruplarımız aşağıdaki gibi oluşturuldu:

Grup I, Kontrol grubu: Hiçbir hasara maruz bırakılmayan gruptur. (n=7)

Grup II, Travma grubu: Ağırlık atışı modeliyle travmatik beyin hasarına maruz bırakılan grup. (n=7)

Travmanın kanıtlanması amacıyla, deneyden 24 saat sonra kurban edilen deneklerden alınan beyin dokularından kesitler alınarak, cresyl violet boyaması yapıldı. Boyama yapılan kesitlerde hücre sayımı gerçekleştirildi. Alınan diğer doku olan testislere ise histokimyasal değerlendirme amacıyla H&E, PAS ve Masson Trikrom boyamaları yapıldı. İmmünohistokimyasal olarak TUNEL ve Aktif Kaspaz 3 boyaması yapılarak apoptoz değerlendirildi. Elektron mikroskopik olarak testislerin ince yapısı incelendi.

Sakrifikasyon esnasında deneklerden alınan kan örnekleriyle GnRH, testosteron, LH, FSH hormon seviyeleri ve MDA, GPx seviyeleri değerlendirildi. Sonuçlar istatistiksel olarak gruplar arasında karşılaştırıldı.

Bulgular:

Kontrol grubunun histokimyasal olarak değerlendirilmesinde testis dokusu normal gözlemlendi. Seminifer tübüller içinde tabakalanmış spermatogenik seri hücreleri, interstisyel

alandaki bulunan Leydig hücreleri ve bağ doku hücreleri; dokuyu etrafından saran düzensiz sıkı bağ dokusu tunika albuginea gözlemlendi.

Travma grubunda ise histolojik olarak değerlendirme yapıldığında spermatogenik seri hücre sayılarında azalma gözlemlendi.

TUNEL boyaması ile DNA fragmentasyonu değerlendirildiğinde kontrol grubu da dahil olmak üzere apoptoz görüldü. Grup II'de Grup I'e kıyasla daha fazla sayıda TUNEL pozitif hücrelerin bulunduğu saptandı.

Aktif Kaspaz 3 boyaması ile travma grubunda, kontrol grubuna kıyasla daha fazla apoptoza uğrayan spermatogonyumların olduğu görüldü. Hücre sayılarındaki değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Elektron mikroskopik değerlendirmelerde kontrol grubunda herhangi bir bulguya rastlanmazken, travma grubunda sertoli-sertoli hücre bağlantılarında bozulmalar meydana geldiği ve spermatogenik seri hücreler arasındaki bağlantıların düzensiz olduğu gözlemlendi. Travma grubunda bazal laminada yer yer kalınlaşmalar gözlemlendi.

Biyokimyasal incelemelerde hipofizden salgılanan GnRH, LH, FSH, Testosteron ve GPx, MDA değerleri ölçüldü. Travma grubu GnRH ve FSH değerlerinde kontrol grubuna kıyasla azalma olduğu saptandı. Diğer değerlerde ise gruplar arasında anlamlı olarak bir fark bulunmadığı gözlemlendi.

Sonuç:

Çalışmamızda travmatik beyin hasarının testis üzerine olan etkisi histokimyasal, immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal olarak incelendi. Travmatik beyin hasarının tübüllerde hasar oluşturduğu ve apoptozu artırdığı gözlemlendi.

Ancak travmatik beyin hasarının testise olası etkileriyle ilgili literatürde çalışma bulunmadığından daha farklı ağırlıklarla ve farklı zamanlarda çalışmaların artırılması ve araştırılması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler:

Testis, Travmatik beyin hasarı, Beyin, Işık mikroskobu, Sıçan

**INVESTIGATION
POSSIBLE EFFECTS OF TRAUMATIC BRAIN INJURY
ON TESTICLES IN RATS**

ABSTRACT

Purpose:

We aimed to show the effects of traumatic brain injury on the testis.

In this study, we aimed to investigate the impact of traumatic brain injury which was formed by weight drop model on testis.

Material and Method:

Animal groups were designed as showed below

Grup I, Control group: No application was performed to this animals (n=7).

Grup II, Trauma group: Traumatic brain injury which is done by weight drop model (n=7).

24 hours later trauma, animals were sacrificed. Testis tissue slides were stained with Hematoxyline&Eosine (H&E), Masson Trichrome and Periodic Acid Schiff (PAS) for light microscopy. Aktif Kaspaz 3 and Immunohistochemical TUNEL stain (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) were performed to determine apoptosis.

And GnRH, testosterone, LH, FSH hormone levels and MDA, GPx levels were observed and statistically groups were compared.

In histological evaluation, control group's testis tissue was observed normal.

Testis had an connective tissue capsule which is called tunica albuginea.

On the other hand, in traumatic group there was a diminution in serial spermatogenic cells when histologically evaluated.

In Tunel analysis, we evaluated DNA fragmentation and there was apoptosis in all the groups including control group. In group two we observed higher TUNEL positive cells when compared to group one cells

Staining with Active Caspase 3, in trauma group lots of apoptotic spermatogonium cells rather than control group.

In electron microscopical investigation we saw Sertoli-Sertoli cell junctions are demerged.

In biochemistry investigations GnRH, LH, FSH, Testosterone hormones which secreted by pituitary and Gpx, MDA values are measured. In trauma group GnRH and FSH values are decreased. Other values aren't different from groups.

In our study, we observed the impact of traumatic brain injury which is turned out by weight drop model on testis using immunohistochemistry, ultrastructural and biochemistry techniques. These results suggest that, traumatic brain injury causes damage in the tubules and increase in ratio of apoptosis.

Result:

In our study, we observed the impact of traumatic brain injury which is turned out by weight drop model on testis using immunohistochemistry, ultrastructural and biochemistry techniques. These results suggest that, traumatic brain injury causes damage in the tubules and increase in ratio of apoptosis.

In our opinion, more studies are needed to understand the mechanism of traumatic brain injury on testis damage.

Keywords:

Testis, Traumatic brain injury, Brain, Light Microscopy, Rat

1.GİRİŞ VE AMAC

Travmatik beyin hasarı, ani ve şiddetli bir darbe gelmesi sonucunda beynin kafatasıyla çarpışması sürecidir. Bu çarpışma beyni zedeleyebilir, sinir liflerini yırtabilir ve kanamaya yol açabilir. Travmatik beyin hasarı mermi gibi cisimlerle, hatta kırılmış bir kafatası parçasının beyin dokusuna girmesiyle de meydana gelebilir. Travmatik beyin hasarının ağırlığı, beynin hangi kısmının etkilendiğine ve hasarın derecesine göre büyük değişiklikler gösterir. Hafif bir travmatik beyin hasarı geçici zihin karışıklığı ve baş ağrısına neden olurken ciddi bir travmatik beyin hasarı, ölüme yol açabilir. Yüksek oranda ölüm ve hareketsizlikle sonuçlanır.

Travmatik beyin hasarı endüstriyel dünyada oldukça fazla karşılaşılan ve yüksek oranda can kaybına yol açan, maliyeti yüksek tedaviler gerektiren önemli bir hastalıktır. Travmatik beyin hasarı çeşitli kazalar sonucu öncelikli olarak beynin fiziksel olarak zarar görmesi anlamına gelmektedir. Zarar gören beyin, diğer organları da etkilemektedir. Kalbi, akciğeri, trakeayı, ince barsağı etkilediği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır.

Travmatik beyin hasarının patofizyolojisi komplekstir ve birçok alanda ve özel mekanizmalarda meydana gelir. Birçok deneysel çalışma yeni yaklaşımlar oluşturabilmek için biyomekanik ve patolojik deneylere odaklanmıştır.

Bu ön bilgiler ışığında, yaptığımız çalışmada travmatik beyin hasarının testis dokusu üzerinde etkisi olup olmadığını ışık mikroskopik, immunohistokimyasal, elektron mikroskopik ve biyokimyasal olarak incelemeleyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

2.1.1. Testisin Anatomisi

Testis, yanlardan biraz basık oval biçimde, bir çift organ olup skrotumda asılı bulunur ve birbirinden bir bölme ile (septum scroti) ayrılmıştır. Sol testis sağ testise göre biraz daha aşağı konumdadır (1).

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

Testis içerisinde yerleşik olarak bulunan tubuli rekti ve rete testis ile testis dışında yerleşik olarak bulunan duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakülatöryus kanalları genital kanal sistemini oluşturur. Bu kanal sistemi ve bununla ilişkili olan vesikula seminalis, prostat bezi, bulboüretal bezler ve cinsel birleşme organı olan penis erkek üreme sistemini oluşturur (2).

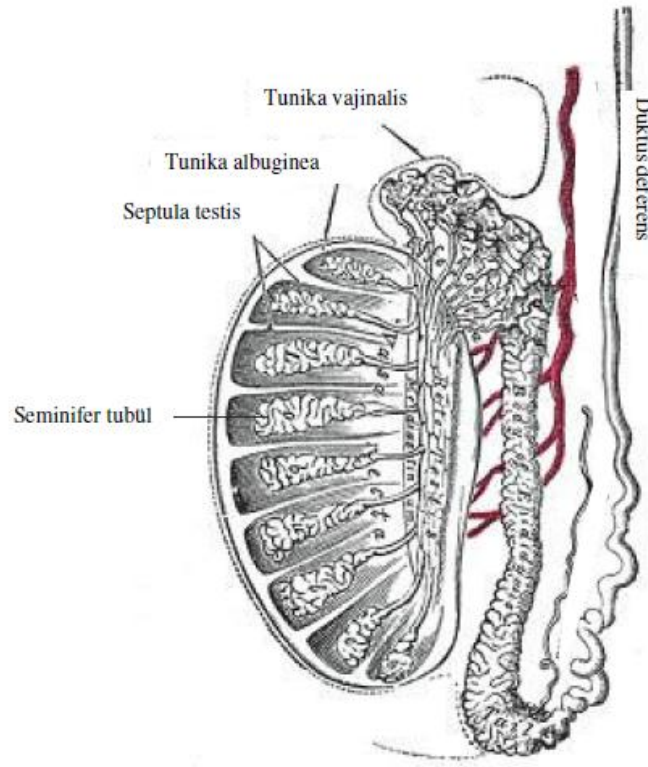
Testisin en dışında bulunan skrotum deri, fibröz kılıf ve kas liflerinden oluşur. Skrotum içten dışa doğru; peritoneumun lamina periatealisi (periorchium), fascia spermatika interna, m. Cremaster, m. Obliquus, fascia spermatika externa, tunika dartos ve en dışta cutis (deri) den oluşur. Ayrıca skrotum içerisinde testis, epididimis, duktus deferensin bir kısmı ve bu organlara gelen kan damarları ile sinirler bulunur (3).

2.1.2. Testis Histolojisi

Testislerin karın boşluğunun dışında yerleşimi vücut ısısından 2-3°C düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenez için 34- 35°C gereklidir (4).

Olgun testisin posterior yüzü epididimis ile ilişkilidir. Hem testis hem de epididimis skrotal kese içerisinde vaza deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile asılıdır (4).

Testis rete testisin yer aldığı yerde kalınlaşarak mediastinumu oluşturan tunika albuginea ile çevrelenir (Şekil 1). Mediastinumda testiküler kitleye doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250-300 lopçuğa böler. Herbir lopçuk bir ila dört seminifer tübülü içerir (4).



Şekil 1: Testis yapısı. (Gray's Anatomi Atlası).

Herbir seminifer tübül yaklaşık 150 mikrometre çapta ve 80 cm uzunluktadır; iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan tüplerdir. Rete testis, seminifer epitelin ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır (4).

Seminifer tübül iki belirgin hücre popülasyonunu içeren özelleşmiş seminifer epitel ile döşeli merkezi bir lümeninden oluşur: 1- Somatik Sertoli Hücreleri 2- Spermatogenik hücreler(spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler) (4).

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

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

Her bir testis skrotumun altında, 3 tabakalı bir kapsül ile sarılıdır. Bu yapıya testiküler kapsül denir ve tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza tabakalarından oluşur (5).

Testis en dışta mezotelyal hücrelerden oluşan, 2 yapraklı, periton kökenli seröz bir kese olan tunica vaginalis tabakası ile örtülüdür. Tunika vaginalisin visseral yaprağı testisin ön ve yan yüzlerini çevreler, pariyetal yaprağı ise skrotum üzerinde uzanmaktadır. Bu tabakanın altında tunika vaginalisin visseral yaprağı olan ve tunika vaginalisten bazal lamina ile ayrılan, tunika albuginea tabakası bulunmaktadır. En içte bulunan tunika vasküloza tabakası ise gevşek bağ dokusundan oluşur ve kan damarlarını içermektedir (6).

Tunica albuginea histolojik kesitlerde en belirgin gözlenen, sıkı, düzensiz bağ dokusundan oluşan yoğun bir tabakadır. Bu tabaka testisin posterior yüzeyi boyunca üçgen şeklinde bir kalınlaşma meydana getirir ve mediastinum testis yapısını oluşturarak organın parankiması içerisine sokulur. Mediastinum testis yapısına, tıpkı hilum yapısına olduğu gibi, genital boşaltma kanalları, kan ve lenf damarları ve sinirler bağlanır. Buradan ışınal olarak çıkan sıkı bağ dokusu yapısındaki, ince fibröz bölmeler (septula testis) testisi insanda yaklaşık olarak 250 lobüle ayırır. Piramit şeklindeki lobüllerin tavanları mediastium testise, tabanları ise testisin dış yüzüne bakar. Lobüllerin birbirleriyle ilişkide olmalarını sağlayan bölmelerin tam olmamasıdır. Her bir lobül, 1-4 arasında değişen sayıda seminifer tübül içerir. Seminifer tübüllerin arası tunika vaskülozanın testis içine uzanarak oluşturduğu interstisyel doku ile doldurulmuştur. Burada kan ve lenf damarları, makrofajlar, fibroblastlar ve androjen salgılayan Leydig hücre grupları yer almaktadır (4,7).

Testis tübülleri mediastinum bölgesi yakınında sonlanır. Sonlanan tübüllerin lümenleri daralır, düzleşir ve tubuli rekti (tubulus seminiferi rekti) denilen bir testis içi boşaltım yolunu oluşturur. Bu yapı seminifer tübülleri dar kanallardan oluşan bir ağ yapısında olan rete testise bağlar. Rete testis mediastinum testis bölgesinde anastomozlaşmıştır. Tubuli rektinin rete testis ile ilişkili bölümü ve rete testis genelde tek bir silia içeren ve kısa mikrovilluslu kübik epitelle döşelidir, tubuli rektinin seminifer tübül ile ilişkili olan bölümünde ise sadece sertoli hücreleri yer alır (8).

Kıvrımlı yapıya sahip olan duktuli efferentes kanalları birleşerek spermiyumların toplandığı ve depolandığı, en uzun, oldukça kıvrıntılı, katlantılı ve tek bir kanal olan duktus

epididimisi oluştururlar. Duktus epididimisin epitel; epitel hücrelerinin bir bazal lamina üzerine oturduğu, kısa bazal hücreler ile uzun sterostilyalı prizmatik hücrelerin yer aldığı sterostilyalı yalancı çok katlı epiteldir. Bazal laminanın altında ince bir lamina propria bulunur. Lamina propriasında altında ince düz kas katmanı yer alır (6).

Duktus epididimisin kuyruk kısmından sonra kanal duvarı birden bire kalınlaşır ve düz bir kanala dönüşür. Bu kanala duktus deferens denir ve kanal duvarında kalın bir düz kas tabakasını içerir. Duktus deferensin salgılama işlevine de sahip epitel, sterostilyalı yalancı çok katlı prizmatik epiteldir. Epitel distalde ise değişici epiteldir. Duktus deferensin prostat bezine girmeden önceki kısmının genişlemesiyle ampulla bölgesi oluşur. Vezikula seminalis kanalları duktus deferense ampulla bölgesinden sonra katılırlar. Sonra duktus deferens prostat bezine girer ve duktus ejakulatoryus kanalını oluşturur. Sonrasında ise üretraya açılır (7,9).

Tubuli Seminiferi Kontorti (Seminifer tübül) yapısı

Seminifer tübüller yoğun kapiller ağ ile çevrili, ikili-üçlü anastomozlar yapan, oldukça kıvrımlı yapıdadırlar. Testisin % 92'sini oluşturan bu tübüllerin çapları yaklaşık 150-250 mikrometre (μm), uzunlukları 30-70 (cm) dir.. Lob l n tepesine doğru kıvrımlarını kaybederek düz bir t p halini alan (tubuli rekti) ve rete testis ile devam eden tübüller her iki testiste yaklaşık olarak 1000 adettir, uzunlukları ise yaklaşık 0,5 km'dir (4,10).

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

1) Dış Hücresel Tabaka: Fibroblastlardan oluşur.

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

3) İç Hücresel Tabaka: İnce, uzun hücresel şekle ve sitoplazmalarıda lipid damlacıklarına, mikropinositotik veziküllere ve miyoflamanlara sahip, bol miktarda da granüler endoplazmik retikulum ve her iki yüzlerinde küçük invaginasyonlar içeren miyoid hücrelerden oluşmuştur. Kasılabilme özelliğine sahip olan myoid hücreler, seminifer tübülün çapını değiştirerek spermatozoonların tübül içerisindeki hareketini sağlarlar. Myoid hücre tabakası insanlarda ve bazı türlerde 3-5 tabakalı iken, kemiricilerde tek tabakalıdır.

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

Tübüller arası gevşek bağ dokusunda ise kan damarları ve sinirler, ince kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar, interstisyel hücreler olarak da adlandırılan Leydig hücre kümeleri bulunur (7-8,10).

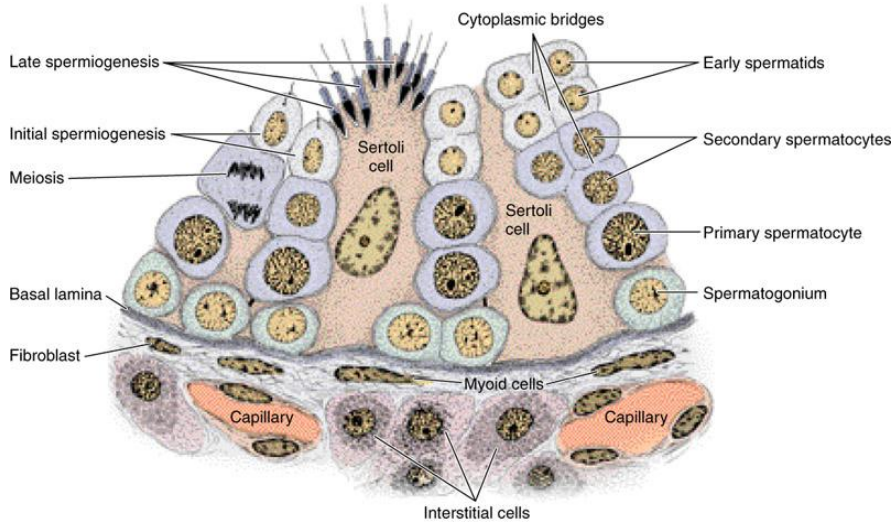
Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri, bir bazal membran üzerine oturan ve buradan seminifer tübül epiteline kadar uzanan, uzun piramidal şekilli, çevresi 7- 9 nm'lik fibröz elemanlar ile kuşatılmış, bazale yerleşmiş oluklu bir iki çentikli oval heterokromatid çekirdek ile merkezi yerleşimli bir büyük çekirdekçiğe ve apikal yan yüz farklanmalarına sahip, yan yüz zarlarının oluşturduğu karmaşık içe katlanmalar sonucunda da hücre sınırlarının ışık mikroskobu ile ayırt edilemediği hücrelerdir (Şekil 2). Sertoli hücrelerinin seminifer tübül lümene bakan apikal yüz membranları da katlanmalar ve kriptalar meydana getirerek yeni oluşan spermiyumların lümene bırakılma zamanına kadar spermatidlere yerleşebilecekleri bir alan sağlamış olurlar (6-7).

Puberteden sonra seminifer tübül epitelinin yaklaşık %10'unu sertoli hücreleri oluşturur. Buradan da anlaşılacağı gibi sertoli hücreleri spermatozoonların desteklenmesinde ve olgunlaşmasında büyük rol oynarlar (4).

Sertoli hücrelerinin sitoplazması çok iyi gelişmiş aktin filamanları ağı ile mikrotübüllerle ara filamanlardan oluşan gelişmekte olan cins hücrelerine destek görevi gören gelişkin bir hücre iskeletinin yanı sıra, iyi gelişmiş bir golgi kompleksi, bol miktarda yassı mitokondri, granülsüz (düz) endoplazmik retikulum, endolizozomların oluşturduğu lipofuskin bulunduran çok sayıdaki veziküller, lipid damlacıkları, vimentin, düşük molekül ağırlıklı sitokeratin 18 ve 19 içerirken, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum içerir.

Sitoplazmada ayrıca içeriği ve işlevi henüz tanımlanmamış Charcot-Bottcher kristaloidleri denilen inklüzyon cisimcikleri ve çekirdekçik ile birlikte çekirdek zarı altında kümelenmiş iki belirgin kromatin yoğunlaşması olan özel bir görünüme sahip üçlü görünüş bulunmaktadır (6,8).



Şekil 2: Sertoli hücresi ve spermatogenik seri hücreleri.

Sertoli hücreleri, taban ve yan yüzlerindeki sıkı bağlantı kompleksleriyle (zonula okludens) birbirlerine tutunurlar. Burada diğer sıkı bağlantılardan farklı olarak bazal membrana en yakın konumlu (seminifer epitelin 1/3 bazalinde) olarak bulunur ve seminifer tübül epitelini bazal ve adluminal kompartman olarak 2 kompartmana ayırır. Bazal kompartman daha dardır, sıkı bağlantının bazalinde yer alır ve spermatogonyumlar ile primer spermatositleri içerir. Adluminal kompartman ise daha geniştir, lümene yakındır ve sekonder spermatositler ile spermatidleri içerir. Spermatogonyumlar farklılaşırken sperme özgü proteinler ortaya çıkar ve spermatogenezis immunolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra olaylandığı için farklılaşmakta olan germ hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve onları yok edecek olan bir immün yanıtın oluşmasına neden olabilir. İşte spermatogenezis için mikro bir çevre sağlayan bu kompartmanların oluşturduğu kan-testis bariyeri, en yukarıdaki sekonder spermatositler ve spermatidleri en alttaki spermatogonyumlar ve primer spermatositlerden ayırır. Böylece sekonder spermatositler ile spermatidleri dolaşım sistemindeki antijenlerden, otoimmün bağışıklık reaksiyonlarından ve kanda bulunan maddelerden korur (4-5,10). Sertoli hücreleri ayrıca gap junction denilen bağlantılarla

hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişini sağlayarak seminifer epitel siklusunun koordinasyonunda önemli rol oynar (5). Puberteden sonra postmitotik özellik kazanması nedeniyle erişkin testisinde sertoli hücrelerinde mitotik hücre bölünmesine rastlanmaz (6,9).

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları şunlardır:

- 1) Protein ve iyonlarca zengin bir sıvının seminifer tübül lümenine salınması,
- 2) Birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanan spermatogenik hücrelerin fiziksel olarak desteklenmesi, kan-testis bariyeri nedeniyle kan desteğinden izole edilen sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiyumlara besin maddesi ve metabolitlerin sağlanması ve yine kan-testis bariyeri sayesinde gelişmekte olan spermatogenik hücrelerin immünolojik reaksiyonlardan korunması (4).
- 3) Seminifer tübül içerisinde spermatogenezin gerçekleşebilmesi için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein (ABP)'nin, Follikül Stimüle edici Hormonun (FSH) ve testosteron kontrolü altında sentezlenmesi,
- 4) Spermiyogenez sırasında rezidüel cisimcikler olarak atılan fazla spermatid sitoplazmasının fagosite edilerek sertoli hücre lizozomları tarafından yıkılması,
- 5) Olgun spermatidlerin spermiyasyon sürecinde seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak amacıyla aktin aracılı kasılmaların yapılması,
- 6) Hipofiz bezinin anterior kısmından salgılanan FSH'nin sentez ve salınmasını önleyen inhibin ve uyarıcı aktivin adı verilen peptid yapıdaki hormonların salgılanması,
- 7) Embriyonik gelişim sırasında erkek fetusta Müller (Parametonefrik) kanallarının gerilemesini ve Mezonefros kanallarının oluşmasını sağlayan glikoprotein yapıdaki Anti-Müllerian Hormon (AMH)'nin üretilmesidir (7,10-11).

Spermatogenik hücreler ve spermatogenezis

Spermatogenik hücreler seminifer tübül epitelinin büyük çoğunluğunu oluşturan çeşitli olgunlaşma aşamalarında bulunan ve düzenli olarak bölünerek olgun spermlere farklılaşan, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak şekilde 4-8 tabakalı hücrelerdir. Lümenenden bazale doğru farklılaşmanın ve olgunlaşmanın değişik evrelerindeki hücre tipleri sırası ile; spermiyumlar, spermatidler, sekonder spermatositler, primer spermatositler ve spermatogonyumlardır (10).

Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, sertoli hücreleri arasındaki okludens tipi bağlantıların altında kaldığı için bazal kompartmanda yer alırlar bazal lamina ile ilişkidirler ve kan-testis bariyerinin dışında kalırlar. 3 farklı tipi bulunur (7).

Tip A spermatogonyumlar; oval çekirdekli, yoğun bazofilik ve ince granüler kromatinli seminifer epitelin kök hücreleridir. Puberteden itibaren mitoz geçirirler ve soluk boyanan, oval çekirdekli, ince granüler kromatinli tip A açık spermatogonyumlar ile tip A koyu spermatogonyumları meydana getirirler. Tip A açık spermatogonyumlar mitoz geçirerek çekirdekçik çevresinde ve çekirdek kılıfı boyunca yoğunlaşma gösteren çekirdek kromatinine ve merkezi yerleşimli çekirdekçiğe sahip sferikal çekirdek içeren tip B spermatogonyumları oluştururlar (6).

Spermatositler

Tip B spermatogonyumlar mitoz geçirerek primer spermatositleri oluşturur. Primer spermatositler, DNA (deoksiribonükleik asit) sentezini tamamladıktan sonra mayoz bölünmenin profaz safhasının bütün fazlarını geçirirler. Profaz evresi yaklaşık 22 gün sürer ve çekirdeklerindeki sinaptonemal kompleksin varlığı ile karakterize edilen, spermatogenik serinin en büyük ve histolojik kesitlerde en çok karşılaşılan hücreler de primer spermatositlerdir. Profaz evresinden sonra kardeş kromatidler sırasıyla metafaz, anafaz ve telofaz evrelerini geçirerek $2n$ DNA ve 23 kromozom ($22+X$ veya $22+Y$) içeren sekonder spermatositleri meydana getirirler. Sekonder spermatositler kısa süren bir interfaz evresi geçirdikleri ve hızla ikinci mayoz bölünmeye girdikleri için histolojik kesitlerde çok zor görülürler (4,7).

Spermatidler

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

spermium da spermiasyon denilen olayla seminifer tübül lümenine salınır. Sonuç olarak ise bir spermatogonyumdan 4 olgun spermium oluşur (4,7).

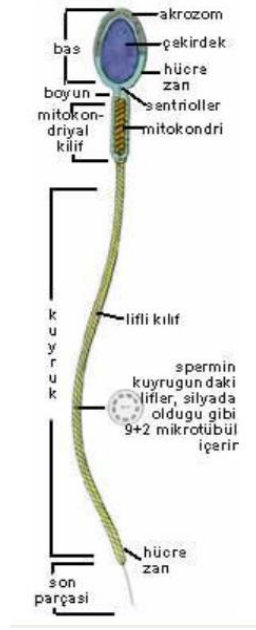
Spermiyumlar

İnsanlarda bir spermatogonyumdan olgun bir spermiyum spermatogenezis olayı ile yaklaşık olarak 64 günde meydana gelir ve olgun bir spermiyum ba , boyun ve kuyruk bölgelerinden oluşur (5). Ba  bölgesinde yassı biçimli, yoğun kromatin içeren bir çekirdek ve çekirdeğin anterior yarısını örten, özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom bulunur. Akrozom hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve en önemlisi akrozin denilen tripsin benzeri proteazlar gibi hidrolitik enzimleri içerir (6). Boyun bölgesi ba  ile kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlayan dar bir parçadır ve sperm kuyru unun merkezi parçası olan aksonemi oluşturan proksimal sentriol ile distal sentriol olmak üzere bir çift sentriol bulundurur (4). Kuyruk bölgesi ise orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç kısımdan oluşur. Kuyru un orta parçasında sarmal olarak dizilmiş mitokondriler, 9+2 mikrotübüler yapıdaki aksonem ve sperm boynundaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz adet dış yoğun fibrillerden oluşmuştur. Esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır ve spermin  ne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturan yedi adet dış yoğun fibrille sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşur. Kuyru un en kısa parçası olan son parçada ise yalnızca aksonem bulunur, dış yoğun fibriller ve fibröz kılıf bulunmaz (7,9).

Erkeklerde puberteyle ba layan ve ya lılı a kadar süren bu süreçte bir testiste bir günde ortalama 50 -150 milyon spermiyum üretilirken bir spermatogonyumdan olgun bir spermiyumun üretilmesi 70 ± 4 günlük bir zaman gerektirir (9).

İnsanlarda spermatogenezisin her seminifer tübülde e  zamanlı olarak gerçekleşmemesi ve bazı lümende serbest spermiyumlara rastlanırken bazılarında yalnızca spermatidlerin gözlenmesi seminifer tübüllerde düzensiz bir görünüme yol açar. Sıçanlarda ise herbir seminifer tübülde spermatogenezis e  zamanlı olarak gerçekleşir. Ayrıca spermatogenezis evrelerinin sayısı hayvan türlerine göre farklılıklar gösterir. İnsanlarda 6, farede 12, sıçanda 14 adet spermatogenezis evresi görülür (4,9).

Spermatogenezis bir spermatogonyumdan olgun spermiyum oluşurken meydana gelen çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve ba kala ım evrelerini içeren bir süreçtir ve üç fazda gerçekleşir (5).



Şekil 3: Spermin yapısı.

- ***Spermatogonal evre (Spermatositogenez):***

Spermatogonyumların bölünerek spermatositleri oluşturdukları bu evre Spermatositogenez (Yun. Sperma; tohum + kytos; hücre + genesis; üretim) olarak adlandırılır (10).

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

Spermatositlerin ardarda iki mayoz bölünme geçirerek spermatidleri oluşturdukları ve kromozom sayıları ile DNA miktarını her hücrede eşit olarak yarıya düşürdükleri bu evre Mayoz Bölünme olarak adlandırılır (10).

- ***Spermatid evresi (Spermiyogenez)***

Spermatidlerin bir dizi hücre farklılaşması süreci geçirerek spermiyumları oluşturdukları bu evre Spermiyogenez olarak adlandırılır (7).

Spermatogenezis

Spermatogenez, bazal lamina üzerine yerleşmiş, yaklaşık olarak 12 µm çapta, çekirdeği soluk boyanan kromatin içeren, diploid, ilkel bir germ hücresi olan spermatogonyum ile başlar. Spermatogonyumlar testosteron hormonunun etkisiyle pubertede mitoz bölünmeler

geçirerek diğer spermatogonyumları ve primer spermatositleri oluştururlar. Spermatogonyumların küçük, 12 µm çapında, yuvarlak şekilli, bol heterokromatin içeren oval çekirdeğe sahip tip A koyu spermatogonyumlar, tip A açık spermatogonyumlar ve tip B spermatogonyumlar olmak üzere 3 tipi vardır. Tip A koyu spermatogonyumlar yedek hücrelerdir. Mitozla bölünerek diğer tip A koyu spermatogonyumları ve tip A açık spermatogonyumları oluştururlar. Tip A açık spermatogonyumlar da mitozla bölünerek tip B spermatogonyumları, onlar da primer spermatositlere farklılaşarak birinci mayoz bölünmenin profazına girerler ve yaklaşık 22 gün süren bu aşamadan sonra hızla birinci mayoz bölünmelerini tamamlayarak yalnızca 23 kromozom içeren, daha küçük yapıdaki ve n sayıda DNA miktarına sahip sekonder spermatositleri oluştururlar. Histolojik kesitlerde interfazda kısa süre kalan ve hızlı bir şekilde ikinci mayotik bölünmeye giren, ortalama 8 saatlik bir yaşam süresine sahip sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur. Sekonder spermatositlerin de kromozom sayısının türler için sabit bir miktarda kalmasını sağlayan mayoz bölünmeyi tamamlamasıyla 23 kromozoma sahip, yuvarlak şekilli, yaklaşık 8 µm çapında, fertilizasyonla normal diploid yapıya dönen haploid yapıdaki spermatidler oluşur (8,10).

Bir adet tip A açık spermatogonyumdan gelişen ve bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum, mitokondri, iyi gelişmiş golgi kompleksi içeren tüm spermatidler birbirlerine sitoplazmik köprücüklerle bağlıdırlar. Bunlar hidrolitik enzim depolayarak, organellerinin miktarını azaltarak, sitoplazmalarının bir kısmı dökerek, flagellum ve ilgili iskelet yapısını şekillendirerek spermiumlara dönüştürler. Bu süreç spermiyogenez olarak adlandırılır ve üç fazdan oluşur (8-9).

1) Golgi Fazı: Spermatid sitoplazmasında, düz endoplazmik retikulum, çekirdeğin yakınında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol ve serbest ribozomlar bulunur. PAS pozitif boyanan, küçük yapıdaki proakrozomal granüller golgi kompleksinde biriktikten sonra birleşerek tek bir akrozomal granülü membranla sınırlanmış bir akrozomal vezikülün içinde oluştururlar. Sentriyoller de akrozomun olduğu bölgenin karşı kutbuna göç ederek hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler ve flagellar aksonemi oluşturmaya başlarlar (10) (8).

2) Akrozomal Faz: Yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını akrozomal vezikül ile granüller kaplar ve bu aşamadan sonra da korona radiata hücrelerini tubal mukozal enzimler ile birlikte birbirinden ayıran hyaluronidaz, zona pellusidayı eriten esteraz, nöraminidaz, asit fosfataz ve

etkisi tripsine benzeyen proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içeren, lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş gören akrozom adını alırlar. Akrozomal faz evresinde hücrenin akrozom içeren ön kutbunun seminifer tübül tabanına doğru yönelmesine ek olarak nukleus uzar daha yoğun bir hal alır, sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur, mitokondriler spermiyumların hareketlerinin kaynağını aldığı yer olan orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak oluştururlar. Flagellumun hareketi ise dynein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin, ATP'nin ve mikrotübüllerin etkileşmesi sonucu oluşur (4).

3) Matürasyon Fazı: Oluşan spermiyumlar seminifer tübül lümenine doğru salınırlar ve geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir. Spermatogonyumların bölünmesiyle ve sonraki aşamalarda oluşan hücrelerin tamamen ayrılmayıp birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlı kalmaları, yaklaşık 70 gün süren, tek bir spermatogonyumdan oluşan primer ve sekonder spermatositlerle spermatidler arasındaki iletişimin devamlılığını sağlar. Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma katlantılarında spermiyogenezis aşamasını geçiren spermatid olgun spermiyuma dönüşür ve spermiyasyon olayıyla seminifer tübül lümenine salınır (4,7).

İnterstisyel Bağ Dokusu

Seminifer tübül epitelini çevreleyen ve tübüllerin arasındaki boşlukları dolduran, lamina propriya da denilen gevşek bağ doku yapısındaki interstisyel bağ dokusunda Leydig hücreleri, fibroblastlar, mast hücreleri, sitoplazmasında aktin filamentlerini içeren, düz kas hücrelerine benzetilen ve hareketsiz spermleri rete testise ilerleten ritmik kasılma hareketlerinden sorumlu olan myoid hücreler (peritübüler kontraktıl hücreleri), kollajen lifler, Leydig hücrelerine dönüşebilen farklılaşmamış mezenkimal kökenli hücreler, bağ doku elemanları, sinirler, kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine olanak sağlayan pencereci tipteki testiküler kapillerler, kan damarları ve lenfatik damarlar bulunmaktadır (4).

Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri seminifer tübüllerin arasındaki gevşek bağ dokusunda çoğunlukla pencereci tip kapiller ve küçük lenf damarlarına yakın konumda tek tek ya da küçük gruplar halinde yerleşen, yaklaşık olarak 15 µm çapında poligonal şekilli, eozinofilik, çok sayıda mikrovillus tek nukleus ve periferde yer alan 1-2 nukleolus içeren büyük hücrelerdir (8).

Leydig hücre sitoplazmasında insanlara özgü Reinke kristalleri olarak adlandırılan kristalize proteinler, steroid hormon üreten hücrelerin tipik özelliği olan tübüler kristal mitokondriler, sıkı paketlenmiş bol granülsüz endoplazmik retikulum (AGER), çekirdeğin hemen yanında büyük ve iyi gelişmiş bir golgi kompleksi ve çok sayıda yuvarlak lipid damlacıkları bulunur. Daha az sayıda ribozom, granüllü endoplazmik retikulum (GER), lizozom, peroksizom ve bol lipid damlacıkları bulunurken salgı vezikülleri bulunmaz. Leydig hücre sayısı ve aktivitesi hormonal uyarılara bağlıdır ve türlere göre değişkenlik gösterir. Gebelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçerek leydig hücrelerini uyarır. Bu hücrelerde mitokondri ve AGER'lerinde bulunan enzimlerce erkek genital organlarının farklanması ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumlu hormon olan testosteronu sentezlerler (7,10).

Kan-testis bariyeri

Kan-testis bariyeri, seminifer tübüller ile interstisyel kan damarları arasında yer alan ve seminifer tübüllere immünoglobülinlerin geçmesini önleyerek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasını sağlayan, sertoli hücrelerinin kurduğu sıkı bağlantılar ile oluşan bariyerdir (10). Seksüel olgunlaşmanın immunolojik yeteneğin gelişmesinden sonra meydana gelmesi sebebiyle spermatogenez sırasında ortaya çıkan birtakım proteinler farklılaşmakta olan sperm hücrelerinin yabancı olarak algılanmasına ve yok edilmesine sebep olabilecek bir immün yanıtı tetikledikleri için, kan-testis bariyeri gelişen spermler ve immün sistem arasında oluşabilecek her türlü etkileşimi ortadan kaldırır (4).

2.2. Nöroendokrin Sistem

2.2.1. Hipotalamohipofiziyal sistemin ana hatları

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

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

Hipotalamus diyensefalon tabanında yer alır ve 3. Ventrikül duvarının da bir kısmını oluşturur, içerisinde bazıları hormon salgılayan, nukleus adı verilen nöron topluluklarına

sahiptir. Nöroendokrin hücreler, kan-beyin bariyerinin arkasında yerleşmişlerdir ancak salgı ürünleri kan-beyin bariyerinin dışında salgılanmaktadır.

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

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

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

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

Anterior hipofizin epitelyal hücrelerinden salgılanan hormonlar, uzun bir cevap oluşturma süresine sahiptir; bu süre, bir gün hatta bir ay kadar kalıcı olabilir (4).

Hipofiz

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

Adenohipofiz üç alt bölüm oluşmuştur: 1- Pars distalis veya anterior lob, bezin esas kısmıdır 2- Pars tuberalis nöral kısım olan infundibular sapı kısmen veya bütünüyle yaka tarzında sarmaktadır. Hep beraber hipofiz sapını oluştururlar. 3- Pars intermedia veya intermediyer lob, yetişkinlerde rudimenterdir. İnce bir çizgi pars distalisi nörohipofizden ayırmaktadır.

Pars distalis histolojisi

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

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

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

Asidofiller iki esas peptid hormon salgılamaktadır: büyüme hormonu ve prolaktin. Bazofiller glikoprotein hormonları salgırlar: folikül stimulan hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH), tiroid stimulan hormon (TSH) ve adrenokortikotropik hormon (ACTH). Kromofoblar hormon içeriklerini boşaltan ve bu nedenle tipik asidofil ve bazofil boyanma afinitesini kaybeden hücrelerdir (4).

Bazofiller tarafından salgılanan hormonlar: Gonadotropinler, TSH ve ACTH

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

Gonadotropinler: FSH ve LH

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

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

FSH dişilerde folikülogenezis adı verilen süreçte ovaryan foliküllerinin gelişimini stimüle eder, erkeklerde ise testiste yer alan Sertoli hücreleri üzerine etki ederek

androjenlerden östrojenlerin aromatisasyonunu stimüle eder ve testosteronla bağlantılı olarak androjen bağlayıcı proteinin üretimini sağlar.

LH dişilerde korpus luteum ve ovaryan foliküllerde steroidogenezisi uyarırken, erkeklerde ise testiste yer alan Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron hormonunun sentezini kontrol etmektedir (4).

Tiroid uyarıcı hormon (TSH)

Anterior hipofiz hücre toplamının %5 kadarı tirotropik hücreler tarafından oluşturulur.

TSH, tiroid fonksiyonlarını ve büyümeyi düzenleyen bir hormondur.

Tirotropin -tetikleyici hormon (TRH), hipotalamusta üretilen ve üç amino asitten oluşan bir peptit olup, bazofillerde TSH'nin sentez ve salgılanmasını stimüle etmektedir. TSH aynı zamanda prolaktin salgılanmasını da uyarmaktadır.

TSH salgılanmasının inhibisyonu, tiroid hormonları olan triiyodotironin (T₃) ve tiroksin (T₄) konsantrasyonlarının artması ile olmaktadır.

TSH salgılanmasında azalma (hipofizde çok nadir gözlenen konjenital hipoplazi durumunda görülür); hücre metabolizması, ısı ve metabolik hızda düşme mental gerilik ile karakterize edilen hipotirodizim'in meydana gelmesine neden olur.

Hipotiroidizm, tiroid bezi hastalıklarında veya diyetle iyok eksikliği durumunda da görülebilir.

ACTH (Adrenokortikotropik Hormon)

ACTH veya kortikotropin, 39 amino asit uzunluğunda (4,5 kDa), kısa sirkülasyon zamanına (7-12 dakika) sahip, tek zincirli bir proteindir. Bu hormonun primer fonksiyonu, adrenal bez korteksinde yer alan zona fasikülata ve zona retikularis tabakalarının büyümelerini ve steroid sentezlemelerini stimüle etmektedir. Adrenal bez korteksinde yer alan zona glomeruloza tabakası ise anjiotensin II'nin kontrolü altındadır. ACTH'nın adrenal korteks üzerine etkisinde siklik adenosin monofosfat (cAMP) aracılık etmektedir. ACTH, adrenal bezin haricinde, ayrıca deride pigmentasyon artışı ve lipolize de neden olmaktadır

ACTH, anterior hipofizde oluşturulan pro-opiomelanokortin (POMC, 31 kDa) adı verilen, glikozillenmiş büyük bir öncül maddeden köken alır. POMC'nin oluşturduğu ürünler aşağıda belirtilmiştir.

1. Fonksiyonu bilinmeyen N-terminal peptid, ACTH ve β -lipotropik hormon (β -LPH) adı verilen bu üç POMC ürünü de, anterior hipofizden salgılanırlar.

2. Yarıklanma ürünleri olan β -LPH, γ -LPH ve β -endorfin dolaşıma verilir. β -LPH ve γ -LPH lipolitik etkiye sahipler fakat, insan yağ mobilizasyonundaki kesin etkileri bilinmemektedir.

3. γ -LPH, β -melanosit stimulan hormon amino asit dizilimini içerir (β -MSH;insanlarda salgılanmaz). β -Endorfin ise, met-enkefalin (met-enk) dizilimini içerir. β -Endorfin'in hipofizde met-enkefaline yarılandığına dair bir delil yoktur.

4.ACTH, α -MSH ve kortikotropin-benzeri intermediyer peptid (CLIP)'e yarılanır. α -MSH ve CLIP hormonları, pek çok balık türü, kurbağagiller ve sürüngenler gibi bazı türlerde, hipofiz bezinin özellikle pars intermediya bölgesinde yer alır ve derideki melanoforlarda melanin granüllerinin dağılmasına ve derinin koyu renk almasına neden olur.lar

ACTH'nın salgılanması şu şekilde kontrol edilir:

1. Hipotalamustan kortikotropin etkileyici hormon (corticotopin- releasing hormone; CRH) salgılanır. CRH paraventriküler nükleuslarda (çekirdeklerde) antidiüretik hormon(ADH) ile birlikte bulunur. ADH ve anjiotensin II'in her ikisi de, ACTH salgılanmasında, CRH'nin etkisini artırır

2. Kanda kortizolün yüksek seviyede bulunması inhibitör etkiye neden olur, bu etki CRH salgılanmasının engellenmesi veya bazofil kortikotroplar (ACTH-salgılayan hücreler) tarafından ACTH salgılanmasının durdurulması ile gerçekleştirilir.

ACTH sirkadiyen tarzda salgılanır (sabahki en yüksek seviyeyi yavaş bir düşme izler) (4).

2.2. Travmatik Beyin Hasarı

Travmatik beyin hasarı, ani ve şiddetli bir darbe gelmesi sonucunda beynin kafatasıyla çarpışması sürecidir. Bu çarpışma beyni zedeleyebilir, sinir liflerini yırtabilir ve kanamaya yol

açabilir. Travmatik beyin hasarı mermi gibi cisimlerle, hatta kırılmış bir kafatası parçasının beyin dokusuna girmesiyle bile meydana gelebilir. Travmatik beyin hasarının ağırlığı, beyin hangi kısmının etkilendiğine ve hasarın derecesine göre büyük değişiklikler gösterir. Hafif bir travmatik beyin hasarı geçici zihin karışıklığı ve baş ağrısına neden olurken ciddi bir travmatik beyin hasarı, ölüme yol açabilir (12-13).

Travmatik beyin hasarı endüstriyel dünyada oldukça fazla karşılaşılan ve yüksek oranda can kaybına yol açan, maliyeti yüksek tedaviler gerektiren önemli bir hastalıktır (14). Travmatik beyin hasarı çeşitli kazalar sonucu öncelikli olarak beyin fiziksel olarak zarar görmesi anlamına gelmektedir. Zarar gören beyin diğer dokuları da etkilemektedir. Sinir sistemini, kardiyovasküler sistemi ve akciğer dokusunu etkilediği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (15-17).

Travmatik beyin hasarı modern toplumlardaki sakatlık ve ölümle sonuçlanan en önemli sebeplerden biridir (17). Her yıl can kaybı oranı ve masraflara harcanan maddi miktar artmaktadır (14). Amerika Birleşik Devletleri'nde mortalite ve morbiditenin en önemli ortak nedenidir. Her yıl hesaplanan ekonomik yük, zihinsel işgöremezlik, üretkenlik kaybı ve sağlık masrafları dikkate alındığında 10 milyar doları bulmaktadır (18).Günümüzde hasardan sonra uzun zaman sakatlığını önlemek için hiçbir tedavi edici müdahale yoktur ve sadece akut beyin ödemi ve intrakranial basıncı azaltan tedavi seçenekleriyle sınırlandırılmıştır. Bu yüzden yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir (18-19).

Travmatik beyin hasarı serebral metabolizma ve enerji üretimini etkileyen fizyolojik, biyokimyasal ve hücrel değişimlerle sonuçlanır (20). Beyin hasarı, direkt ve indirekt mekanizmalar yoluyla yapısal ve fonksiyonel hasara sebebiyet verebilir. Bazı hücreler ve aksonlar beyindeki fiziksel deformasyondan dolayı direkt etkilenirken, nöronların büyük bir kısmı ise patolojik olayların kaskadlarından dolayı kaybolur (21).

Travmatik beyin hasarının kompleks patofizyolojisi bulunur ve birçok alanda ve özel mekanizmalarda meydana gelir (22). Birçok deneysel çalışma yeni yaklaşımlar oluşturabilmek için biyomekanik ve patolojik deneylere odaklanmıştır (22). Sadece direkt hasara yol açmazken aynı zamanda sinirsel hücre kaybını geciktirmek için biyokimyasal değişiklikleri indükler. Bu biyokimyasal değişiklikler sekonder hasar olarak tanımlanır. Beyin hasarından sonra sekonder hasarın patogenezinde reaktif oksijenlerin işlevini gösteren

deneysel bilgi vardır. DNA ve oksidatif protein hasarı gibi membran lipidlerinin peroksidasyonu aracılığı ile hücresel hasara sebep olan serbest radikal türlerinin üretimini indükler (23). Oksidatif stres beyin hasarından hemen sonra başlar ve nöronal disfonksiyon ve ölümle sonuçlanan olayları başlatır (23-24).

Ayrıca travmatik beyin hasarı primer ve sekonder olarak 2 grupta sınıflandırılabilir. Primer, travmadan hemen sonra meydana gelen hasardır. Sekonder ise travmadan birkaç saat ya da birkaç gün sonra oluşabilen hasardır (15). Sekonder beyin hasarı için 2 patojenik mekanizma tanımlanır: eksitotoksisite ve apoptoz. Apoptoz proliferasyondaki hücreleri veya farklılaşan hücre popülasyonlarını elimine eden bir formdur. Beyin travması, gelişen beyinde fizyolojik apoptotik mekanizmayı aktive eder.

Travmada etkilenen önemli 2 beyin yapısı korteks ve hipokampustur. Hipokampal nöronlar hafıza ve öğrenmede ciddi rol oynar. Travmadan sonra hafıza fonksiyonu hipokampusun zedelenebilirliğinden dolayı bir risktir. Hipokampal nöron kaybı çoğu kez beyin travmasında oluşmuştur ve hafıza kayıplarıyla bağlantılıdır (25).

2.3. Apoptoz

2.3.1. Apoptoz'un Tanımı Ve Tarihçesi

Organizma yeni hücreler üretilirken, var olan hücrelerin bir kısmını hücre ölümü ile ortadan kaldırarak kendi dengesini korumaktadır. Hücre ölümü iki farklı mekanizma ile gerçekleşir: apoptoz ve nekroz. Apoptozda ve nekrozda düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucunda hücre ölümü gerçekleşir (26). Apoptoz programlı, aktif RNA ve protein sentezi ile gerçekleşen; enerji gerektiren bir ölümdür. Genetik ve biyokimyasal olaylar dizisidir (27-29). Hücrelerin normal gelişimleri sürecinde meydana gelen ölüm ilk olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terimi ilk olarak 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptoz terimi ise ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır. Yunanca bir kelime olan apoptoz; apo (ayrılan) ve ptosis (düşen) kelimelerinin birleşiminden oluşur ve “ağaçtan düşen yapraklar” olarak tarif edilmiştir. Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçaları gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu gözlemleyerek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptoz endonükleazların aktive olarak merdiven basamağı denen karakteristik DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal

kanıtı elde edilmiş ve apoptozisin genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle olan bir ölüm olduğu ortaya konulmuştur (30).

Apoptotik hücre membranı sağlamdır ve üzerinde küçük cepçikler oluşur (31-32) (Şekil 4).

Nekrotik hücre lizise uğrarken apoptotik hücre küçük cisimciklere parçalanır. Apoptotik cisimcikler membranla çevrilidir, nukleus ve diğer organellerini ve parçalarını içerir. Apoptotik cisimcikler inflamasyona neden olmazken fagositik hücreler tarafından sindirilirler (33).

2.3.2. Apoptozun Görüldüğü Olaylar

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

Apoptoz fizyolojik ve patolojik olaylar sonucunda gözlenir.

Fizyolojik Olaylar

Embriyogenez ve metamorfozda (Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi içi boşluklu organların lümen oluşumu)

- Vertebraların nöron gelişimi sırasında (barsak kriptaları gibi sürekli prolifere olan hücre gruplarının hücre sayısının dengelenmesinde)
- Uterusta endometriumun dökülmesinde (menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin gerilemesi gibi olaylarda)
- T lenfositlerin kontrolünde (T lenfositlerde doğru antijen kazanımı sağlayamayan hücrelerin ortadan kaldırılması)
- Epidermisin en üst tabakası olan stratum korneumun sürekli dökülüp yenilenmesinde görülür.

Patolojik Olaylar

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

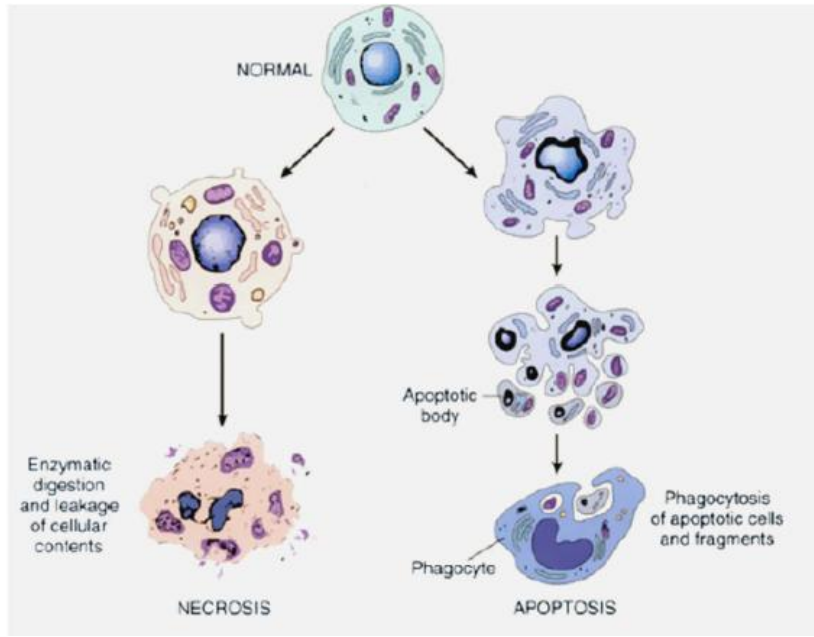
•Pankreasta ve böbrekte duktus tıkanması sonrası görülen patolojik atrofide apoptoz görülmektedir (34-35).

Şekil 4: Apoptoz ve nekroz (36).

2.3.2.1. Morfolojik Değişiklikler

Yüzey Değişimlerinin Kaybı

Apoptotik hücre komşu hücrelerle bağlantısını koparır, yüzey farklılaşmaları



(mikrovillüs gibi) yok olur ve hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (37-38).

Kromatin Yoğunlaşması

Çekirdek apoptozda odak noktadır. Hücreden hücreye değişiklik göstermekle birlikte apoptozda çekirdek genellikle büzülür. Kromatin yoğunlaşır ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porlarını kaybeder, şekil olarak düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler, granülleri kaba hal alır ve dağılır (38-39).

Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması

Hücre önce dışa doğru tomurcuklanır. Bu tomurcuklar sitoplazma parçacıkları ve sıkı paketli organeller içeren zarla sarılı apoptotik cisimciklere dönüşür (37-38).

Tüm bu morfolojik değişimler gerçekleşirken açığa fosfatidilserin çıkar. Sağlıklı hücrelerinin iç plazma membranında bulunan fosfatidilserin, apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal oluşturur (40).

2.3.2.2. Biyokimyasal Değişiklikler

DNA Fragmantasyonu

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

Hücre İskeletinin Yıkılması

Kaspazlar aktini yıkan bir proteini aktifleştirerek hücrenin normal şeklini kaybetmesine neden olur (41).

Membran Değişiklikleri

Kaspazların etkisiyle yıkılan aktin proteinleri hücrenin şeklini bozar. Yine kaspazların etkisiyle hücre zarı asimetrisi bozulur, hücre membranının iç yüzündeki fosfatidilserin yer değiştirerek zarın dışına yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre zarlarında thrombospondin adlı adhezif bir glioprotein ve bazı hücrelerin adhezyon moleküllerini (ICAM 3) içerirler. Bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositoz edilmesini sağlarken, transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar membranların parçalanıp apoptotik cisimleri oluşturmasını sağlar. Hücreler özelleşmiş yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülürler ve büzülürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organallerin birbirine yaklaştığı gözlenir (42).

Fagositoz

Apoptotik cisimler çevredeki parankima hücreleri ve fagositler tarafından fagosit edildik dokulardan uzaklaştırılır (42).

2.3.3. Apoptoz Mekanizması

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

2.3.3.1. Ekstrensek / Reseptör Aracılı Yol

Hücre dışından kaynaklanan ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas (APO-1 ve CD95) ve tümör nekroz faktör reseptörü-1 (TNFR-1) uyarılması ile düzenlenen apoptozdur (34).

TNF- α , TNF ile ilişkili apoptozis uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları, bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar. Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarında kısmen korunmuş bir ölüm bölgesi (DD- Death Domain) bulunur. Bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerine bağlanarak apoptozu başlatır. TNFR-1 ile ilişkili ölüm bölgeleri TRADD, Fas ile ilişkili ölüm bölgelerine FADD denir. Bu ölüm bölgeleri ile prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskat şeklinde gelişen aktivasyonlarını başlatır (35).

2.3.3.2. İntrensek / Mitokondrial Yol

Apoptozun yaygın yolu olan intrinsek yol hücrenin kendi içinden, sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlar. İç sinyallerle oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynar. Apoptozu başlatan yolların kavşak noktasının mitokondri olduğu görülmüştür. Dış zar geçirgenliğindeki artış sonucunda mitokondri zar potansiyelinin bozulması dış zarda hızla bir şişmeyle izlenir ve iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına neden olur. Temel olarak mitokondride solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AIF), SMAC ve ENDO G adlı DNaz enzim sitoplâzmaya salınır. Sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınması geri dönüşümsüz bir noktadır. Sitokrom c'nin salınmasında en önemli faktör Bcl-2 ailesidir. Hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailenin mitokondri üzerindeki etkileriyle hem sitokrom c'nin sitoplazmaya salınması gerçekleşir hem de bu salınım baskılanır. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar. Apoptozom kaspaz 9'u aktifleştirmek üzere keser, kaspaz 9 diğer kaspazların proteolitik bir zincir halinde aktifleşerek apoptozun gerçekleşmesini sağlar (34,43).

2.3.4. Apoptoz Regulatorleri

Apoptoz çok sayıda genler (c-myc), moleküller (seramid), iyonlar (kalsiyum), proteinler (p53) ve hatta organeller gibi mediatörlerle düzenlenir. Apoptozu düzenleyen genler cmyc, p53 ve Bcl-2'dir ve ürettikleri proteinler aynı adı alır. P53, Bcl-2 ailesi, inhibitör apoptoz proteinleri (IAP), kaspazlar gibi protein aileleri apoptoz regülatörleridir (34,44).

Bcl-2 Ailesi

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

Antiapoptotik aile üyeleri olan Bcl-2, Bcl-XL yine aynı aileden Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 adı verilen proapoptotik proteinler tarafından baskılanır. Proapoptotik üyeler normal şartlarda inaktiftir bu nedenle mitokondrial zar geçirgenliği Bcl-2 ve Bcl-x sayesinde değişmeden kalır. Ancak çeşitli uyarılar (büyüme faktörünün uzaklaştırılması Bad'ın, kalsiyum artışı Bim'in, UV ışın Bmf'nin) proapoptotik grubun aktifleşmesine yol açarlar, sonuçta Bcl-2, proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanır, Bcl-2 tarafından inaktif durumda tutulan ve yine aynı aileden olan Bak ve Bax proteinleri etkinleşerek mitokondri dış zarında geçirgenlik porların oluşumuna, zar potansiyelinin değişimine yol açar. Bu da kaspazların aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanır. Kaspazlar inhibitör apoptoz proteinleri (İAP) denen bir grup protein tarafından baskılanır.

P53 Geni

p53, DNA gardiyanı da denen ve bu güne dek üzerinde en çok çalışılan tümör süpresör proteinlerden biridir. P53 sitoplâzmada bulunan ve DNA'nın ya da hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA'da belli genlerin aktivasyonuna, böylece yapımlarının artmasına (Bax, Apaf-1, Fas) belli genlerin de baskılanmasına (Bcl-2, Bcl-X) yol açarak apoptozu tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA hasarı, hipoksi ya da onkogenlerin aktivasyonu, sürekli yapılan ama ubiquitinleyici bir protein (mdm2) tarafından belli bir hızda yıkılan p53 ün fosforillenmesine, fosforillenme ubiquitinlenmenin bozulmasına yol açar. Miktarı artan p53 çekirdeğe geçerek ilgili genlerin ifade edilmelerini değiştirerek hücreyi apoptoza sokar (45).

IAP Ailesi (inhibitör apoptoz proteinleri) Proteinleri

IAP'lar; antiapoptotik etkilerinin direkt kaspazlara bağlanarak, kaspaz inhibisyonu ile gösteren proteinlerdir. Apoptozun negatif düzenleyicileridir. Kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondrial yol ile inhibe ederler (46).

Kaspazlar

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

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

- Başlıca lenfokin yapımında bulunan Kaspazlar: Kaspaz-1 (ICE), -4, -5, -11,-12, -13, -
- Sonuçlandırıcı (effektör) Kaspazlar: Kaspaz-3 (CPP32/Yama), -6,-7

- Başlatıcı (initiator) Kaspazlar: Kaspaz-2, -8 (FLICE/MACH), -9, -10 (47-48).

Ölüm reseptörleri hücre zarı içine tutunmuş, bir ucu hücre dışına, bir ucu hücre içine bakan, hücre içi tarafında prokaspaz 8'in aktiflenmesini sağlayan bir ölüm bölgesi (death domain) bulunan reseptörlerdir. Hücre zarında bulunan kendileri için özgün reseptörlere bağlanan ligandlar reseptörün trimerik (üç bileşenden oluşan) bir yapıya dönüşmesine yol açarlar ve hücre içinde adaptör moleküller adı verilen bir dizi molekülle etkileşerek prokaspaz 8'i iki farklı büyüklükte parçaya böler. Başlatıcı kaspaz denen aktif kaspaz 8, inaktif durumdaki proenzimler olan kaspaz 3, kaspaz 6 ve kaspaz 7'nin bir zincir biçiminde aktiflenmesine yol açar. Aktiflenen tüm kaspazlar hücre makromoleküllerini parçalayarak tipik apoptoz morfolojisinin oluşumuna yol açarlar. Aktif kaspaz 8, Bcl-2 ailesi proteinlerinden biri olan Bid'in de proteolitik olarak aktifleşmesine yol açar. Bid, mitokondriden sitokrom c, bazı başka proteinlerin (SMAC) ve kalsiyumun serbestlemesine yol açar. Böylece ölüm reseptörleri yolu mitokondriyal yolu da aktiflemiş olur. Hücreye sitotoksik T reseptörleri yoluyla ulaşan Fas ligandı, ya da TNF alfa, hücre yüzeyinde bulunan kendine özgü reseptörlerine bağlanarak apoptozu uyabilir. Fas reseptörünün ligandı aktiflenmiş T lenfositlerde ayrıca dalak, testis, karaciğer ve böbrek hücrelerinin yüzeyinde ifade edilir. Çeşitli virüslerle enfekte hücrelerde ya da p53'ün aktiflenmesi sonucu Fas reseptörünün ifadesi, o hücrenin sitotoksik T lenfositler tarafından öldürülmesini sağlar. FAS ve TNF alfa dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de hücre içinde benzer yollarla ölümü yaratabilir. TRAIL reseptörlerinin FAS reseptöründen farklı olarak karaciğer, nöronlar, miyositler, kolon, bronş epiteli, Leydig hücreleri gibi dokularda yapısal biçimde ifade edildiği ve TRAIL'in de bu dokularda bulunduğu gösterilmiştir. Hücre dışından gelen sinyallerin hücre içinde apoptotik makinayı çalıştırmasına aracılık eden yollardan biri de sfingolipid yoludur. Sfingomiyelin, hücre zarının yapıtaşlarından biridir. Radyasyon ve kemoterapinin yanı sıra ölüm reseptörleri aracılığıyla da aktivelebilen bir enzim olan sfingomiyelinaz tarafından seramid'e dönüştürülür. Seramid, ayrıca serin palmitol transferaz tarafından da sentezlenebilir. Seramidaz enzimiyle seramiden oluşturulan sfingozin, Bid yapımını değişik yollarla artırarak mitokondriyal yol üzerinden apoptozu tetikler (45).

Kaspazlar için substrat olan poly ADP-Riboz polimeraz DNA zincir kırıklarına bağlanıp nuklear proteinleri modifiye etme görevini üstlenir. PARP molekülünün DNA'yı onarması kaspaz-3 ile parçalanmasını takiben önlenir (45).

2.3.5. Spermatogeneziste Apoptozun Rolü

Doku canlılığında ve devamında enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptoz, testiküler dokuda da sık saptanan bir fenomendir. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar (49-50). Apoptoz, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar (51). Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir. Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptoz gerçekleştiği bildirilmiştir. Testiste defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin %75'i apoptoza maruz kalır (49). Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (50-51). Androjen eksikliğinde, azospermi ya da oligospermi hastalarında deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir (52). Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozunun hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (53-54). Hipofizektomize immature ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde yaygın apoptoz ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da hCG tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Birimi'nden (DETFAB) temin edilen Wistar suşu toplam 14 erkek sıçan (180-250gr) 14/2011 protokol no'lu etik kurul onayı alınarak kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu suş seçilmiştir. Tüm denekler çalışma sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Denekler dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

İki çalışma grubu oluşturuldu. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlendi:

I. grup, kontrol grubu: Hiçbir uygulamaya maruz kalmayan ad libidum beslenen grup (n=7).

II. grup, travma grubu: Travmatik beyin hasarı uygulaması yapılan grup. (n=7).

Travmatik beyin hasarı uygulaması: 10 cm uzunluğunda ve 1 cm aralıklarla delinerek oluşturulmuş kontüzyon aleti parietal kemiğe dayanmış 2 mm çapında yuvarlak footplate üzerinde dik tutuldu. Beyin kontüzyonu için 40 gr ağırlığın düşürülmesi ile bir travma oluşturuldu. Parietal kemiğe ağırlığın düşürülme koordinatları 4 mm ön x 3 mm yan şeklinde uygulanmıştır. Kontüzyon gücü sağ parietal kemiğe tek taraflı uygulanmıştır.

Cerrahi prosedür öncesinde sıçanlar 10 mg/kg xylazine ve 60 mg/kg ketamin hidroklorür, IM olarak verilerek anestezi altına alındı. Hemen ardından travma gerçekleştirildi.

Travmatik beyin hasarından 24 saat sonra hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrasında alınan testisler Bouin solüsyonu içine alınırken beyin dokuları %10'luk tamponlanmış formaldehit içinde fikse edildi.

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneyseldir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın deneysel ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Histokimyasal ve immunohistokimyasal değerlendirmeleri Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda,

biyokimyasal parametreler ise Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'nda (ARLAB) gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

I.Grup Kontrol Grubu: Hiçbir uygulamaya maruz kalmayan gruptur (n=7).

II.Grup Travma Grubu: Travmatik beyin hasarı uygulanan deney grubudur (n=7). 40 gr ağırlık 10 cm yükseklikten hayvanın parietal kemiği üzerine atılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada Wistar suşu erkek sıçanlar (180-250 g) kullanıldı. Toplam 14 adet sıçan kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu suş seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 20-22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve pellet yem ile beslendi.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada Grup I kontrol grubuna herhangi bir işlem uygulanmamıştır. Grup II travma grubuna ise travmatik beyin hasarı uygulanmıştır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

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

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen doku örnekleri rutin doku takip prosedürüne maruz kalmış, ışık mikroskopik inceleme için takibi yapılan dokuların ince kesitleri alınmış ve çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boyamalara tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler Mayer's Hematoksilen& Eozin, Masson Trichrome boyası, PAS (Periyodik Asit Schiff Boyaması); immünohistokimyasal olarak DNA fragmentasyonunun gösterilmesi için TUNEL ve Aktif Kaspaz 3 boyaması yapılmıştır.

Elektron mikroskopik incelemeler için elektron mikroskobu doku takibi yapıldı. Yarı ince kesitler alındıktan sonra elektron mikroskobu için kesitler alınarak incelemeler gerçekleştirildi.

Biyokimyasal incelemeler için sakrifikasyon esnasında deneklerden alınan kanlar - 80°C’de saklandı. ELISA yöntemi ile GnRH, LH, FSH, testosteron gibi hormonal seviyeler değerlendirildi. Ayrıca GPx ve MDA değerleri ölçüldü.

3.6.2.1. Işık Mikroskopik İncelemeler

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

Tablo 1: Doku takip protokolü.

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

3.6.2.1.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 30 dakika 60°C’lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10’ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 5 değişim absölü alkol-%70’e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri Absölü alkolden geçirilen

kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 2).

Tablo 2: Hematoksilen-Eozin boyama protokolü.

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

3.6.2.1.2. Masson-Trikrom Boyaması

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 30 dakika (etüvde) diğer ikisi 20'şer dakikalık üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 2 değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirdi. Ve akarsuda 5 dakika bekletildikten sonra Masson Trikróm boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinden dokular üzerine 8 damla Weigert hematoksilen boyası ile 8 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 20 dakika bekletildi. 1 dk distile su ile yıkandıktan sonra 8 damla asit-alkol çözeltisi ile 1 dakika bekletilen kesitler distile suyla iyice yıkandı. Ardından 8 damla Ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı. 5 dakika sonra uzaklaştırıldı ve 1 ml stok asit çözeltisi ve 29 ml distile su ile hazırlanan asitli su ile kısaca yıkandı. 8 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 20 dakika muamele edildikten sonra asitli su ile yıkandı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından akarsu altında yıkanan kesitler artan alkol

serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflandırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Masson-Trikrom boyama protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	30 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (Oda Isısında)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (Oda Isısında)	20 Dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	No:1 + No:2 Solüsyonu	10 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	No:3	4 Dakika
Boyama	No:4	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	No:5	10 Dakika
Boyama	No:6	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük Alkoller	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.1.3. Periyodik Asit Schiff Boyaması (PAS)

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

ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı. (Tablo 4).

Tablo 4: Periyodik Asit Schiff (PAS) boyama protokolü.

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

3.6.2.1.4. Cresyl Violet boyaması

Kesitleri alınan beyinler, lama iyice yapışmaları için 3 gün süre ile 37°C'lik etüvde bekletildi. Daha sonra deparafinizasyonları yapılarak azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler distile suya getirildi. Yeni hazırlanan boya solüsyonunda 20 dk bekletildi. %96'lık alkolde çalkalanarak 3 değişim ksilolden geçirilerek entellan ile kapama yapıldı.

Tablo 5: Cresyl Violet boyama protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	37°C Etüvde	3 Gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (Etüvde)	1 Saat
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (Oda Isısında)	30 Dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	
Boyama	Cresyl Violet	20 Dakika
Dehidratasyon	96'lık Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.2. Histolojik Skorlama

3.6.2.2.1. Johnson Testiküler Biyopsi Skoru

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

Tablo 6: Johnson testiküler biyopsi skorlaması (55).

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

3.6.2.3. İmmünohistokimyasal İncelemeler

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

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

DNA fragmentasyonu Chemicon Millipore Apoptag kiti kullanılarak gösterildi. Alınan kesitler öncelikle 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra da rutin ışık mikroskopik deparafinizasyon sürecinden geçirildi. Şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak 5'er dakika iki değişim distile suda bekletildi. Distile su aşamasına getirilen kesitler öncelikle nemli çembere yerleştirilmiş ve fosfat tamponlu solüsyon (PBS) ile beş dakika muamele edildi. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizilerek alan kısıtlandı. Kurutma kağıdı ile üzerindeki PBS emdirilen dokulara Proteinaz K solüsyonu ile 15 dakika oda ısısında muamele edildi. Daha sonra dokular 2 kez PBS ile yıkandı. Taze hazırlanmış %3'lük H₂O₂ (hidrojen peroksit) ile 5 dakika oda ısısında bekletilen dokuda endojen peroksidaz aktivitesi inhibe edildi ve tekrar PBS ile 2 defa yıkandı. Kesitlerdeki su kurutma kağıdı ile emdirildi ve dokular kitin içerisinde mevcut kullanıma hazır bulunan dengeleme solüsyonu (Equilibration buffer) ile 10 dakika muamele edildi. Doku üzerindeki fazla sıvı kurutma kağıdı ile emdirildi ve kit içerisinde reaksiyon solüsyonu ve TdT enzim solüsyonu şeklinde ayrı ayrı bulunup kullanımdan önce ikisinin karıştırılmasıyla taze bir şekilde hazırlanan TdT enzim karışımı (%70 reaksiyon solüsyonu + %30 TdT enzim solüsyonu) ile muamele edilen kesitler 37°C'de 1 saat nemli çemberde inkübe edildi. Etüvden çıkarılan kesitler 1 ml Reaksiyonu durdurma ve yıkama solüsyonunun 34 ml distile su içerisinde dilüe edilmesiyle hazırlanan solüsyonla 10 dakika oda ısısında inkübe edildi. Bu işlemin ardından 3 kez PBS ile yıkama yapıldı. Kesitler Anti-Digoxigenin solüsyonu ile otuz dakika oda ısısında inkübe edildi. PBS ile 2 kez yıkama yapıldıktan sonra reaksiyonun görünürlüğünü sağlamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) kromojeniyle muamele edilen kesitler distile su ile iyice çalkalandı. Mayer's hematoksilen ile art alan boyaması yapıldı ve 3 değişim ksilol ile şeffaflaştırılan kesitler entellan ile kapatıldıktan sonra mikroskopta görüntülendi.

3.6.2.3.2. Aktif Kaspaz 3

Alınan kesitler öncelikle 60°C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra da rutin ışık mikroskopik deparafinizasyon sürecinden geçirildi. Şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak 5'er dakika iki değişim distile suda bekletildi. Distile su kurutma kağıdı yardımıyla uzaklaştırılarak dokuların etrafı PapPen ile çizildi. 3 kez 5'er dakika PBS

ile yıkanan kesitler 2 kez 5'er dk sitrat(Bio-Optica) ile kaynatıldı. İkinci kaynatmaya geçmeden önce sitratın soğuması beklenildi. 3 kez 5'er dk PBS ile yıkanan kesitler 10 dk H₂O₂ ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar 3 kez 5'er dk PBS ile yıkama yapıldı. Sekonder antikor kitin içinde bulunan "*Blocking Solüsyonu*" (A solüsyonu) ile 15 dk bekletildikten sonra yıkama yapılmadan 1/100 oranında PBS ile önceden hazırlanan primer antikor (*active Caspase 3*) koyulup 1 gece overnight'a bırakıldı. Ertesi gün PBS ile 3 kez 5'er dk yapılan yıkamadan sonra "*Sekonder Antibody*" (B Solüsyonu) ile 10 dk muamele edildi. PBS ile yıkama yapılarak "*HRP-Streptavidin*" (C solüsyonu)'nda 10 dk bekletilip PBS ile yıkama gerçekleştirildi. Sırasıyla DAB ve Mayer's Hematoksilin uygulanan kesitler 3 değişim ksilolde şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatıldı. Mikroskop altında incelemeler kaydedildi.

3.6.2.4. İstatistiksel değerlendirme

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

3.6.2.5. Ultrastrüktürel İnceleme

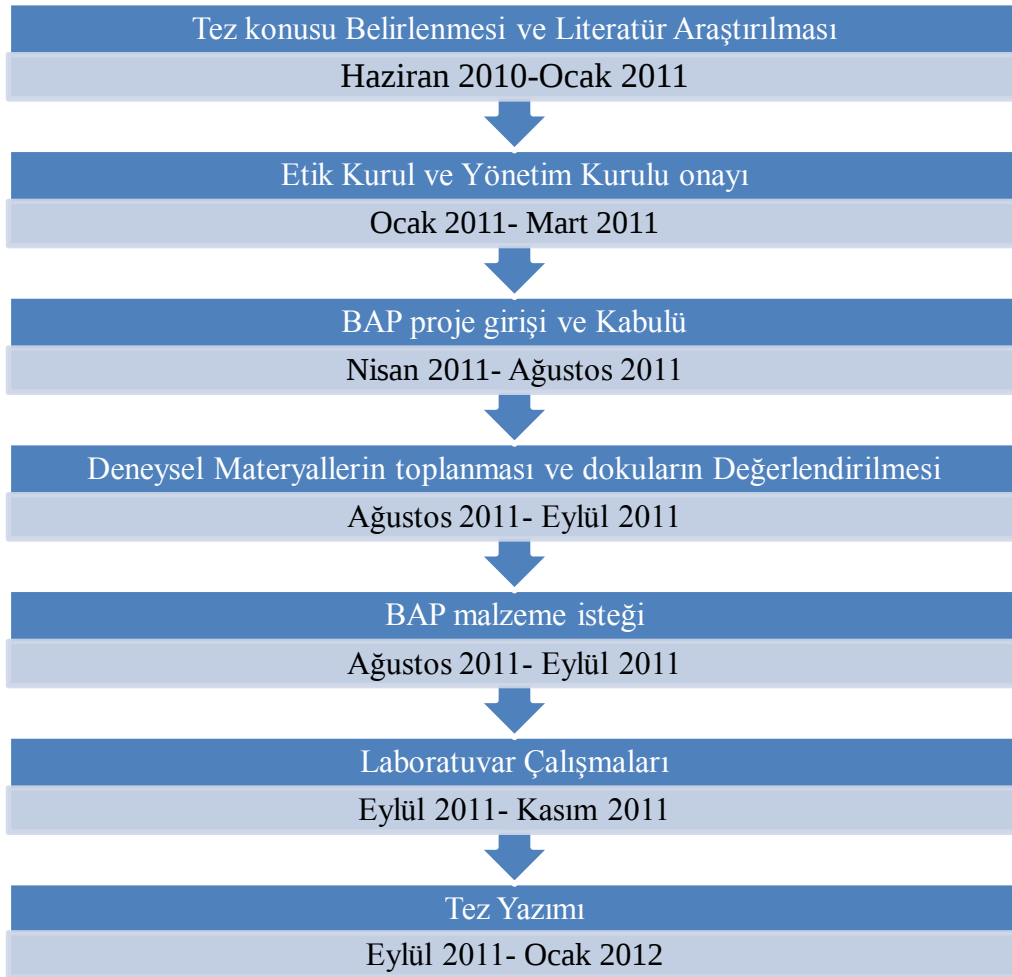
3.6.2.5.1. Elektron Mikroskobu Doku Takibi

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

3.6.2.6. Biyokimyasal İnceleme

Biyokimyasal analizler için sakrifikasyon esnasında sıçanların kalbine sol atriumdan girilerek kan alındı. Alınan kanlar direkt olarak içi boş kan tüplerine pıhtılaşmayı önlemek için yavaşça konuldu. Tüpler 30 dakikadan fazla bekletilmeyecek şekilde santrifüjlenerek serumları ayrıldı. Ayrılan serumlar, gruplandırılarak ependorf tüplerde ELISA yöntemi (CusabioElisa Kiti) uygulanana kadar -80°C’de bekletildi.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Veri analizleri Windows için SPSS’in 15.0 versiyonu ile yapıldı. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Gruplar arası karşılaştırmalar One Way Anova testi ve Mann Withney U testi kullanılarak analiz edildi. P 0,05’ten küçük olan değerler anlamlı olarak kabul edildi ($p < 0,05$).

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

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

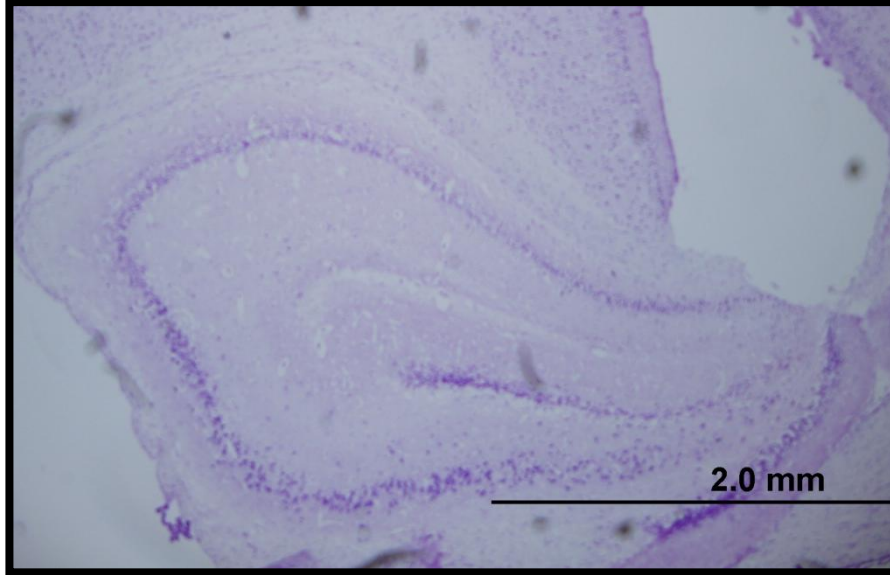
3.10. Etik Kurul Onayı

Araştırma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 05/04/2011 Toplantı no, 18 Şubat 2011 toplantı tarihinde 14/2011 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur. Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1. Beyin Hipokampus Bölgesinin Histolojik Değerlendirilmesi



Travmatik beyin hasarının oluştuğunu kanıtlamak için hipokampus bölgesinde hücre sayımı yapıldı. Mann Whitney U testi ile yapılan istatistiklere göre hasarın meydana geldiği kanıtlandı. P 0,05'ten küçük olan değerler anlamlı kabul edildi.

Paxinos ve Watson beyin kesitleri göz önünde bulundurularak 21, 23, ve 25. düzlemlerde yapılan hipokampus hücre sayımları değerlendirildi (56).

Tablo 7: Beyin dokusu hücre sayımı istatistiksel sonuçları

GRUP	N	Mean Rank	Sum of Ranks
CA1 kontrol	90	121,59	10943,00
travma	90	59,41	5347,00
Total	180		

Test Statistics^a

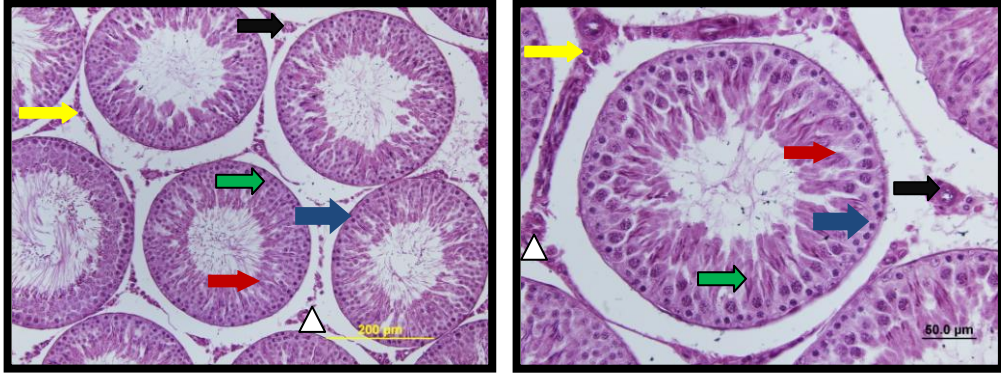
	CA1
Mann-Whitney U	1252,000
Wilcoxon W	5347,000
Z	-8,016
Asymp. Sig. (2-tailed)	,000

a. Grouping Variable: GRUP

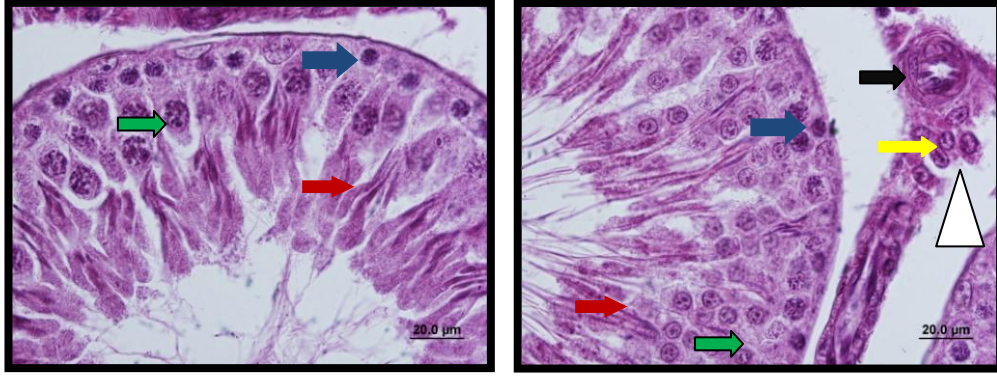
4.2.1. Testis'in Histolojik Değerlendirmesi

Testis dokusunun histokimyasal olarak değerlendirilmesi H&E, PAS ve Masson Trikrom boyamaları yapılarak değerlendirildi.

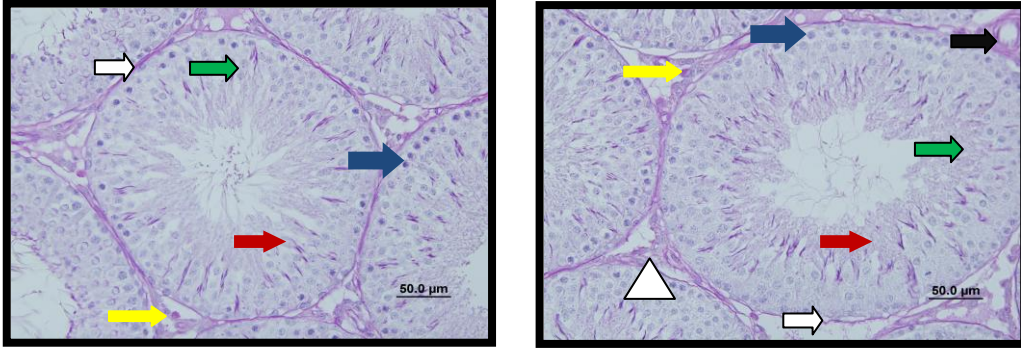
Testise ait ışık mikroskopik kesitler H&E ve Masson Trikrom boyamalarıyla incelendiğinde Kontrol grubunda; testis dokusu en dışta Tunika vaginalis altında tunika albuginea ile sarılıydı. Seminifer tübüller, interstisyel alanda Leydig hücreleri ve interstisyel bağ dokusundan oluşmaktaydı. İnterstisyel bağ dokusunda kan ve lenf damarları bulunuyordu. Leydig hücreleri arasında yassı çekirdekli bağ dokusu hücreleri de izlenmekteydi. Seminifer tübüller geniş interstisyel doku içinde heterojen bir yapı göstermekteydi. Tübülleri çevreleyen miyoid hücreler yassı ve uzun çekirdekleri ile ayırt ediliyordu. Seminifer tübüllerin duvarında bazal membran üzerine oturmuş spermatogoniyumlar, spermatositler ve spermatidler izlendi. Bunların arasında yer yer Sertoli hücreleri bulunmaktaydı. Tübüllerin merkezinde gelişmiş ve gelişmekte olan spermatidler mevcuttu. PAS boyamasında bazal laminanın korunduğu gözlemlendi.



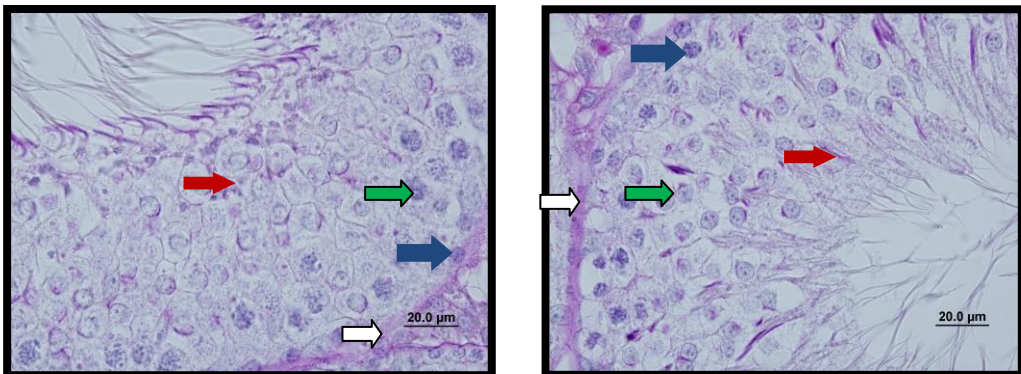
Şekil 5: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. H&E.



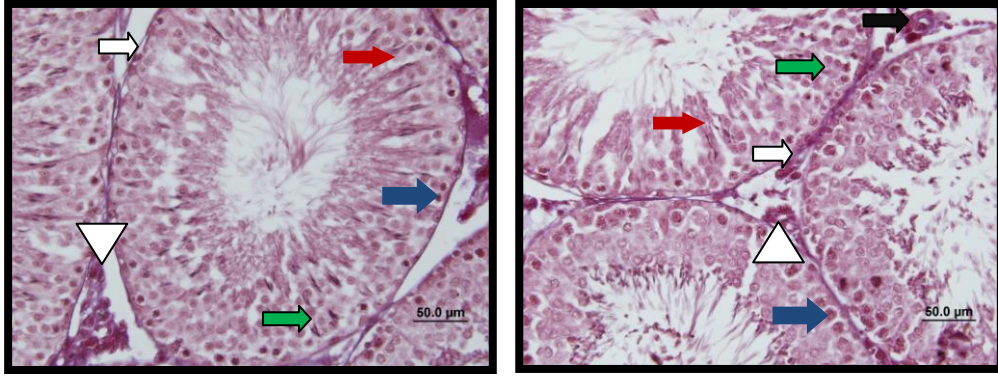
Şekil 6: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. H&E.



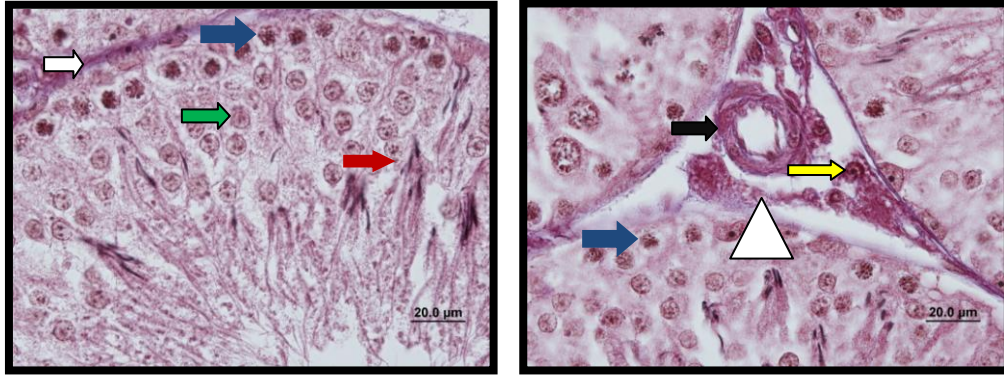
Şekil 7: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, beyaz ok: bazal membran, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. PAS.



Şekil 8: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz ok: bazal membran, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid. PAS.

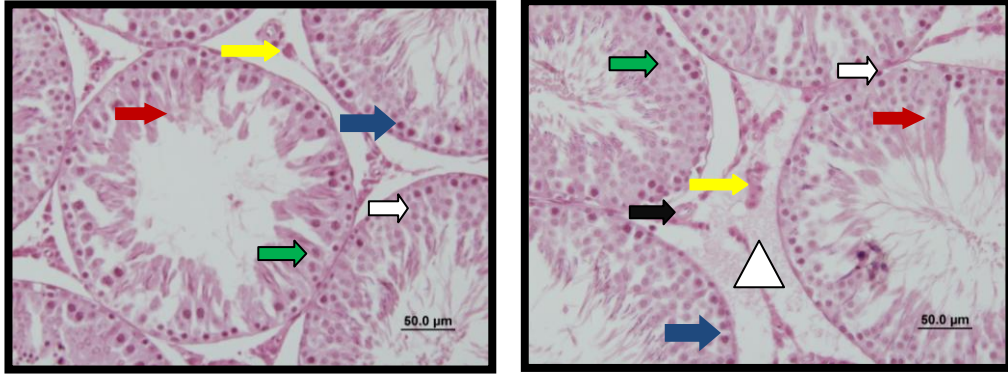


Şekil 9: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, beyaz ok: bazal membran, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. Masson Trikrom.

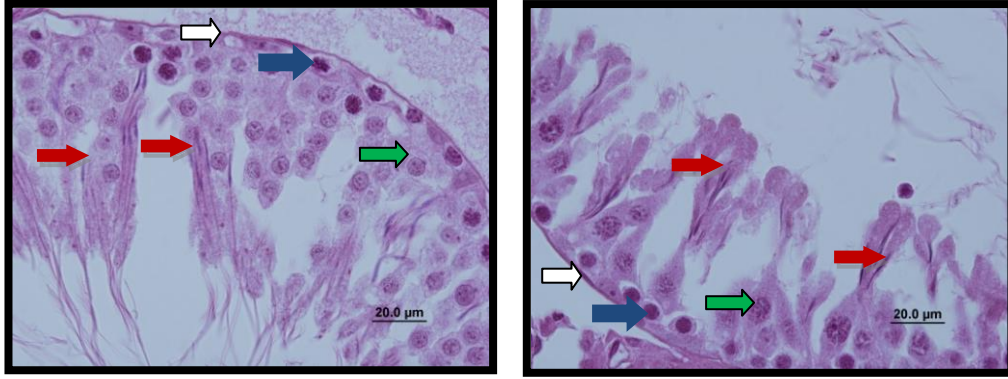


Şekil 10: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, beyaz ok: bazal membran, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. Masson Trikrom.

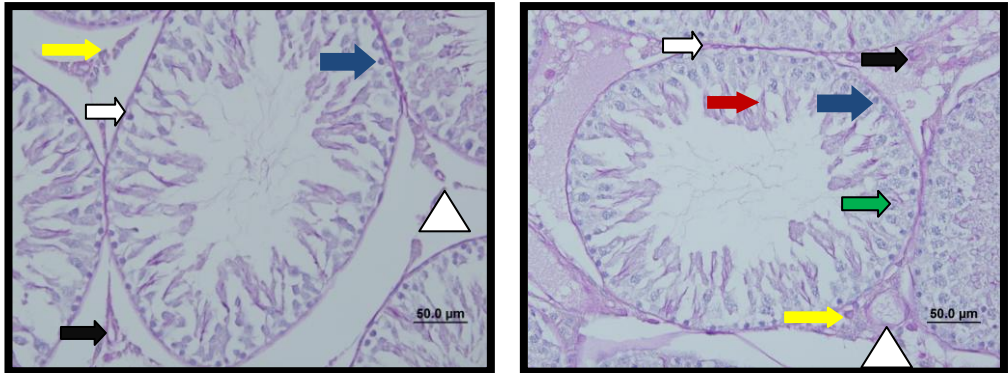
Travma grubu incelendiğinde H&E ve Masson Trikrom boyamalarında testis en dışta tunika vaginalis ve altında tunika albuginea tabakası ile sarılı olarak görülmekteydi. Bazı seminifer tübül yapılarında şekil bozukluğu saptanırken, tübüller arasındaki interstisyel bağ dokusunda artışa rastlandı. İnterstisyel alanda yer alan Leydig hücreleri etrafında bağ doku hücreleri ve kapillerler gözlemlendi. Seminifer tübül içindeki spermatogenik seri hücrelerinden spermatogonyumların sayı ve şekillerini koruduğu gözlenirken, spermatosit sayısında azalma olduğu gözlemlendi. Seminifer tübüllerin bir kısmında lümende spermiyumlara rastlanmadı. Seminifer tübüllerin etrafını saran bazal membran PAS boyamasıyla incelendiğinde kontrol grubundaki gibi izlendi.



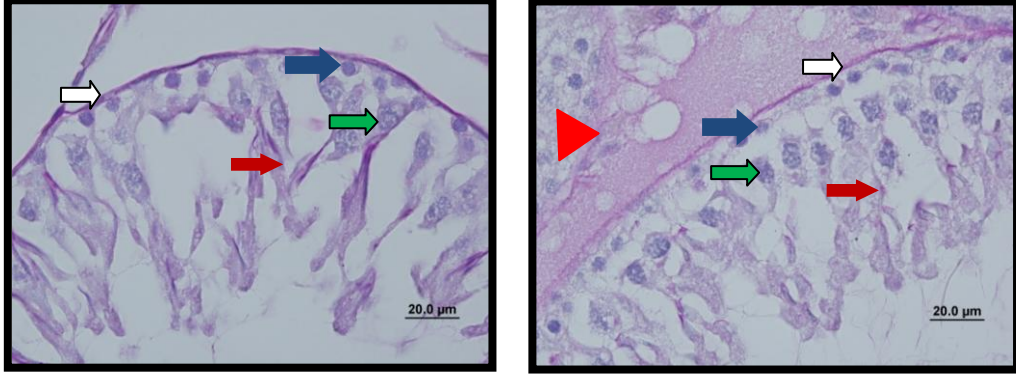
Şekil 11: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, beyaz ok: bazal membran, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatozot, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. H&E.



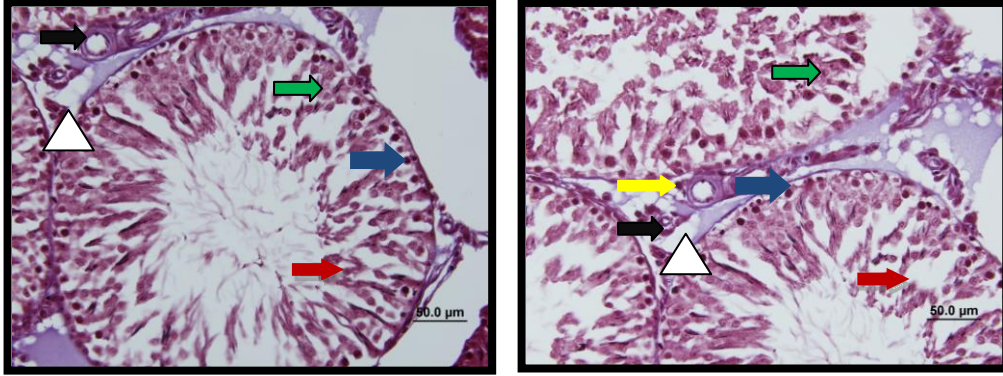
Şekil 12: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz ok: bazal membran, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatozot, kırmızı ok: spermatid. H&E.



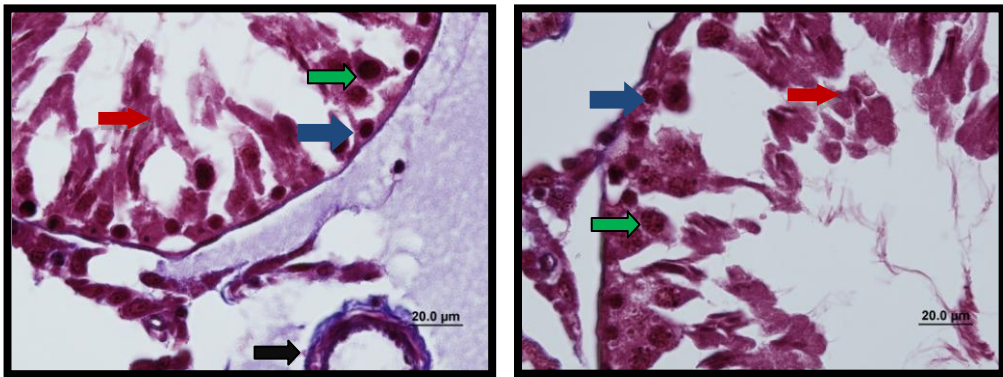
Şekil 13: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, beyaz ok: bazal membran, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatozot, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. PAS.



Şekil 14: Travma grubuna ait testis dokusu. Kırmızı üçgen: interstisyel alandaki bağ dokusu artışı, beyaz ok: bazal membran, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid. PAS.



Şekil 15: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, mavi ok: spermatogonyum, sarı ok: leydig hücresi, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. Masson Trikröm.

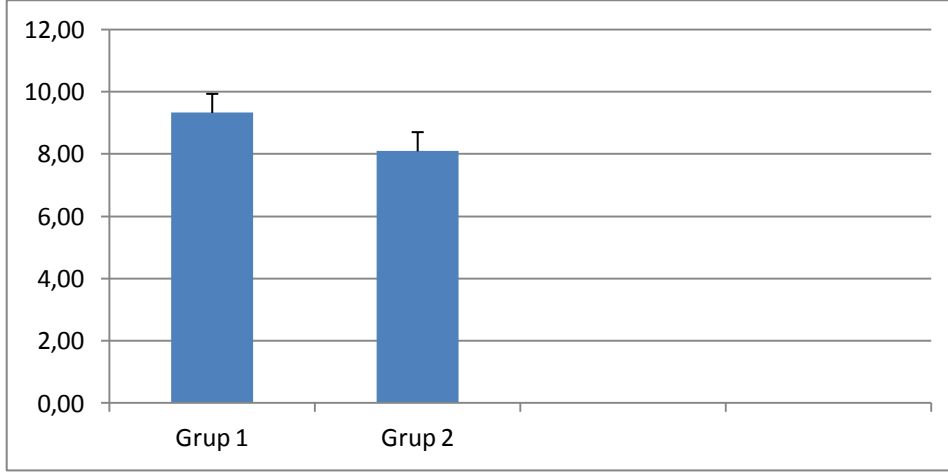


Şekil 16: Travma grubuna ait testis dokusu. Mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. Masson Trikröm.

4.3. Histolojik Skorlama

4.3.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

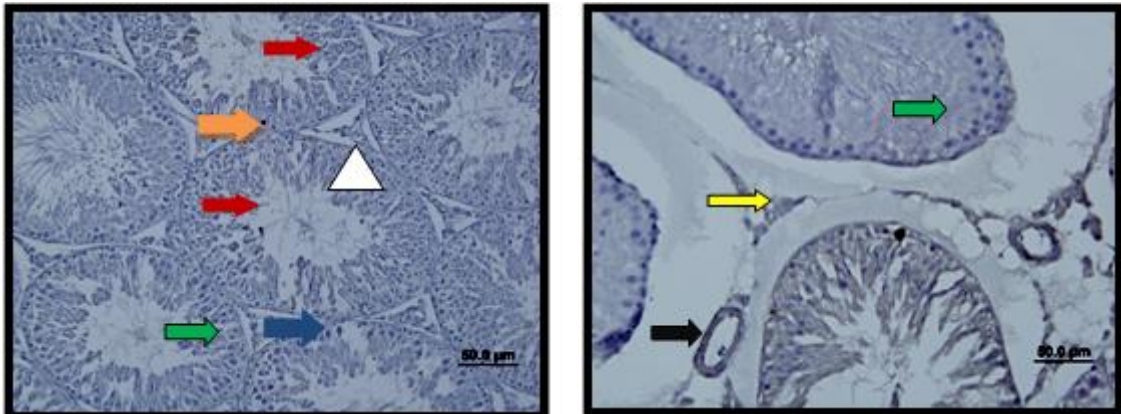
Tablo 8: Johnsen Testiküler Biyopsi skoru sonuçları



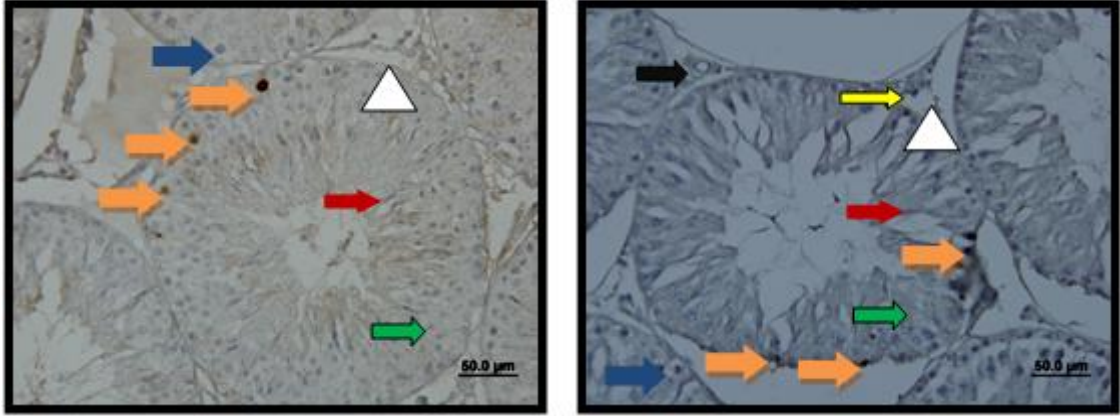
Johnsen Testiküler biyopsi sonuçlarına göre travma grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı sonuçlar elde edilmiştir. Travma grubunda değeri 8,00 olarak saptanırken, kontrol grubu 10,00'a yakın olarak saptandı. Travma grubunda hasar meydana geldiği gözlemlendi.

4.4. İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol grubunda yapılan Tunel boyamasında spermatogonyumlarda çok az sayıda Tunel pozitif hücreler gözlenmiştir. Travma grubunda ise kontrol grubuyla kıyaslandığında daha fazla sayıda Tunel pozitif hücre görülmektedir. Fakat hücre sayımları yapılarak istatistiksel sonuçlar incelendiğinde anlamlı sonuç vermemiştir.

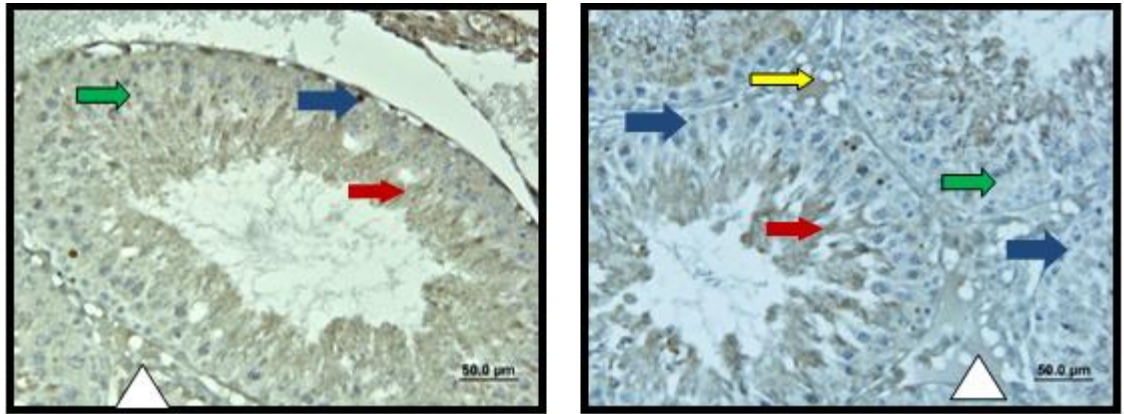


Şekil 17: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel. Tunel.



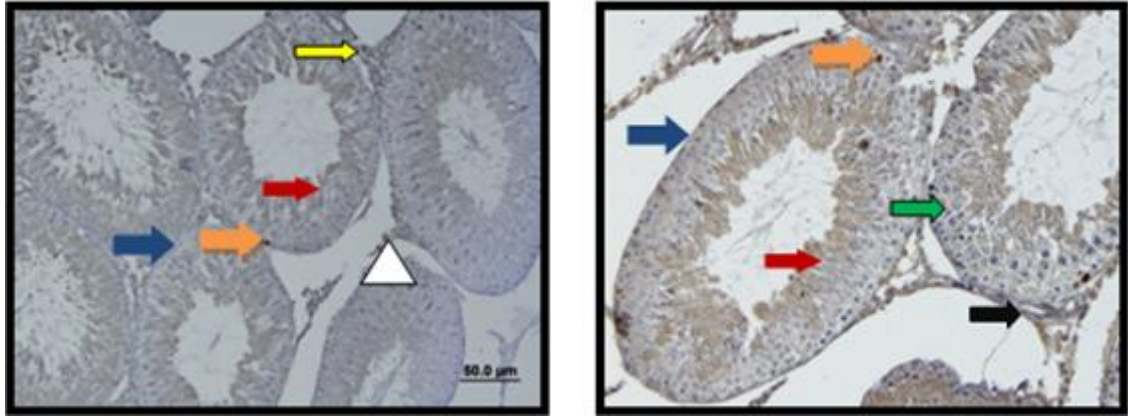
Şekil 18: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, siyah ok: endotel, turuncu ok: Tunel pozitif hücreler. Tunel.

Kontrol grubunda yapılan Aktif Kaspaz 3 immün boyamasında spermatogonik seri hücrelerinin spermatogonium hücrelerinde çok az miktarda apoptotik hücreye rastlandı. Spermatogonik seri hücrelerinden spermatosit ve spermiyumlarda apoptoza rastlanmadı.



Şekil 19: Kontrol grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid. Aktif Kaspaz 3.

Travma grubunda yapılan Aktif Kaspaz 3 immün boyamasında spermatogonik seri hücrelerinin spermatogonium hücrelerinde apoptoz artışı gözlemlendi. Spermatosit hücrelerinin bir kısmında da apoptoza rastlanırken lümene yakın olarak konumlanan spermiyumlarda ise apoptoza rastlanmadı.



Şekil 20: Travma grubuna ait testis dokusu. Beyaz üçgen: interstisyel bağ dokusu, sarı ok: leydig hücresi, mavi ok: spermatogonyum, yeşil ok: spermatosit, kırmızı ok: spermatid, turuncu ok: apoptoza uğrayan hücreler. Aktif Kaspaz 3.

4.4.1. Apoptozun değerlendirilmesi

4.4.1.1. Spermatogonyum hücreleri Tünel Hücre Sayımı

Testisin Tünel pozitif boyanmış spermatogonyum hücreleri ile yapılan sayımlar One Way Anova programı ile değerlendirilmiştir. P 0,05'ten küçük olan değerler anlamlı olarak kabul edildi.

Tablo 9: Tünel hücre sayımının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

TUNEL								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	7	4,7143	,48795	,18443	4,2630	5,1656	4,00	5,00
travma	7	5,5714	3,64496	1,37766	2,2004	8,9425	2,00	12,00
Total	14	5,1429	2,53763	,67821	3,6777	6,6080	2,00	12,00

ANOVA

TUNEL					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,571	1	2,571	,380	,549
Within Groups	81,143	12	6,762		
Total	83,714	13			

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler anlamlı sonuç vermemiştir.

4.4.1.2. Spermatogonyum hücreleri Aktif Kaspaz 3 Hücre Sayımı

Testisin Aktif Kaspaz 3 ile pozitif boyanmış spermatogonyum hücreleri ile yapılan sayımlar One Way Anova programı ile değerlendirilmiştir. P 0,05'ten küçük olan değerler anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Tablo 10: Aktif Kaspaz 3 hücre sayımının istatistiksel olarak değerlendirilmesi

CASPASE								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	7	1,5714	,53452	,20203	1,0771	2,0658	1,00	2,00
travma	7	3,1429	,89974	,34007	2,3107	3,9750	2,00	4,00
Total	14	2,3571	1,08182	,28913	1,7325	2,9818	1,00	4,00

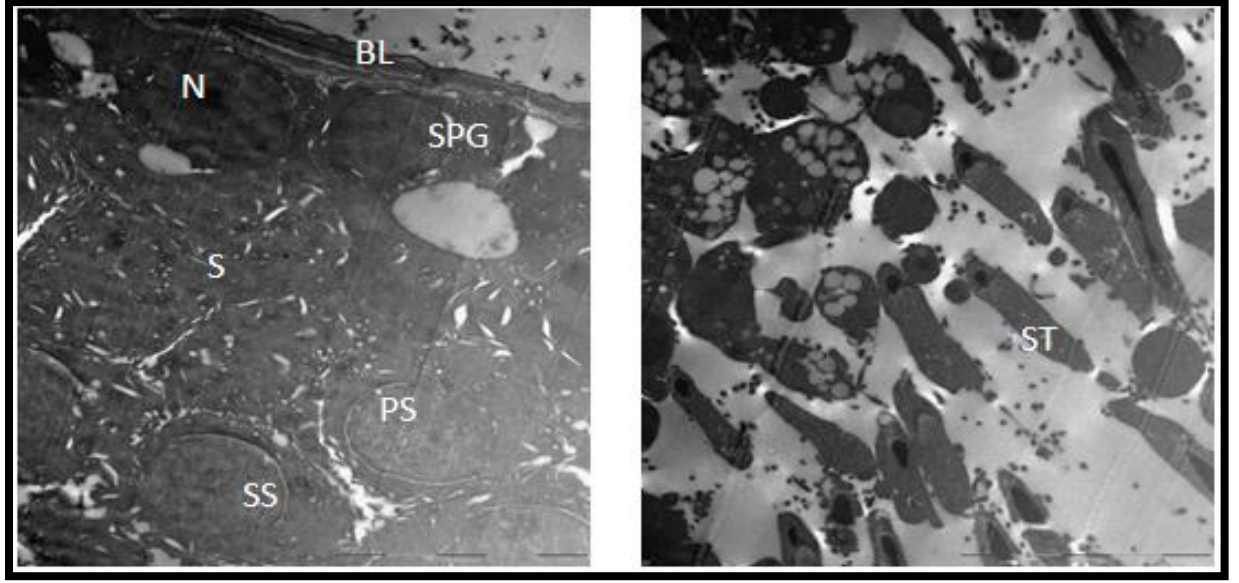
ANOVA

CASPASE					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8,643	1	8,643	15,783	,002
Within Groups	6,571	12	,548		
Total	15,214	13			

Yapılan istatistiksel değerlendirmeler anlamlı sonuç vermiştir. Travma grubunda kontrol grubuna göre daha fazla sayıda apoptotik hücreye rastlanmıştır.

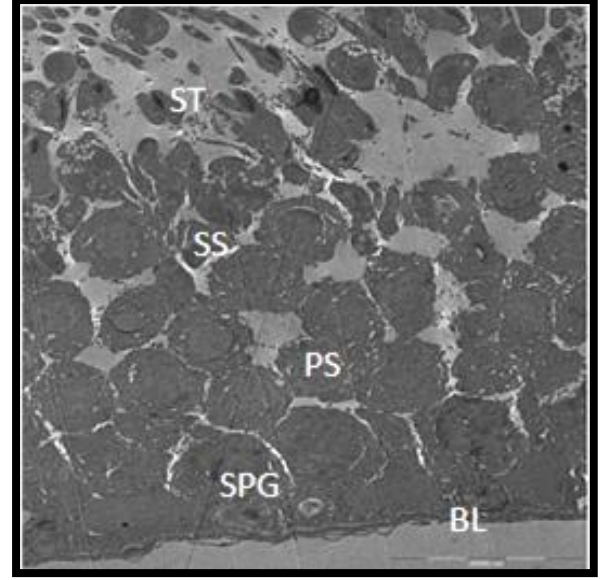
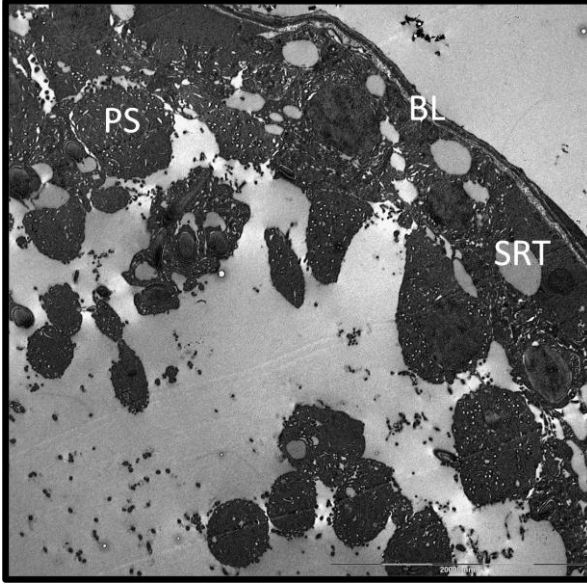
4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubunda seminifer tübülleri saran bazal membranın iç kısmı, bazal lamina üzerindeki spermatogonyumlar ve sertoli hücreleri bulunmaktaydı. Bazal membranda epitel ve düz kas özelliği gösteren miyoid hücreler bulunmaktaydı. Miyoid hücrelerin üst ve alt taraflarında kollajen demetleri görülmekteydi. Sertoli hücrelerinde küçük lipid damlacıkları yaygın şekilde gözlenmekteydi. Sertoli-sertoli bağlantılarının altında spermatogonyumlar bulunmaktaydı. Spermatogonyumların çekirdekleri elipsoid şeklinde ve merkezi yerleşimliydi. Sertoli hücre sitoplazmaları ile sarılmış olarak gözlenen primer spermatositler gelişigüzel dağılmış mitokondrilere sahipti. Primer ve sekonder spermatositlerin üzerinde tipik bir şekilde oldukça gelişmiş golgi kompleksine sahip spermatidler yer almaktaydı. Seminifer tübüllerin lümeninde farklı gelişim evrelerinde gözlenen spermiyumlar bulunmaktaydı.

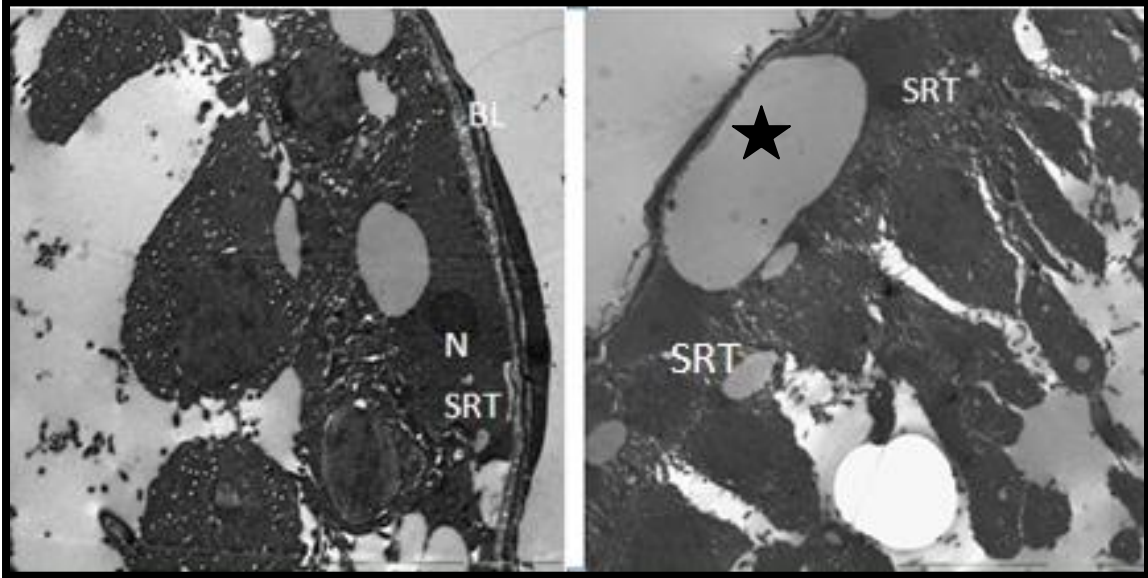


Şekil 21: Kontrol grubuna ait testis dokusu. BL: bazal lamina, N: spermatogonyum nukleusu, PS: primer spermatosit S: sitoplazma, SS: sekonder spermatosit, ST: gelişmekte olan spermatidler.

Travma grubunda ise spermatogonyumlar bazal membranın üstünde gözlenmekteydi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında bazal membranda kalınlaşma olduğu ve yapısının bozulduğu saptandı. Kontrol grubuyla aynı özelliklerde epitelyum ve düz kas özelliği taşıyan miyoid hücreler bulunmaktaydı. Spermatogonyumların çekirdekleri elipsoid şeklinde ve merkezi yerleşimliydi. Spermatogonyumlardan türevlenen spermatositler arasında hücreler bozulmalar ve spermatogenik seri hücreleri arasında ayrılmalar gözlenmekteydi. Spermatogonyumların aralarında sertoli hücreleri görülmekteydi. Sertoli-sertoli hücreleri arasındaki bağlantı özelliklerinde bozulmalar gözlemlendi ve hücreler arasında oldukça fazla miktarda boşluklar bulundu. Primer ve sekonder spermatositlerin üzerinde gelişmekte olan spermatidlerin dizilimleri bozulmuş ve dağınık olarak gözlemlendi. Seminifer tübüllerde spermiyumlar bulunmaktaydı.



Şekil 22: Travma grubuna ait testis dokusu. BL: bazal lamina, N: spermatogonyum nukleusu, PS: primery spermatosit S: sitoplazma, SS: sekonder spermatosit, SRT: sertoli, ST: gelişmekte olan spermatidler.



Şekil 23: Travma grubuna ait testis dokusu. BL: bazal lamina, N: Sertoli nukleusu, SRT: Sertoli, yıldız işareti: Sertoli-sertoli hücreleri arasındaki bağlantı kopukluğu.

4.5. Biyokimyasal Bulgular

GnRH

One Way Anova testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede Kontrol grubu ve Travma grubu arasında anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir. Travma grubunda kontrol gurubuna göre salgılanan GnRH seviyesinde azalma saptanmıştır.

Tablo 11: GnRH istatistiksel değerlendirilmesi

GNRH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	7	164,9914	43,56897	16,46752	124,6969	205,2860	92,33	234,24
travma	7	78,6886	25,39275	9,59756	55,2042	102,1729	37,60	109,97
Total	14	121,8400	56,38257	15,06888	89,2857	154,3943	37,60	234,24

ANOVA

GNRH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	26068,641	1	26068,641	20,502	,001
Within Groups	15258,281	12	1271,523		
Total	41326,922	13			

Testosteron

One Way Anova testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede Kontrol grubu ve Travma grubu arasında anlamlı farkın bulunmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 12: Testosteron istatistiksel olarak değerlendirilmesi

TESTOSTE

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	7	3,4100	2,55473	,96560	1,0473	5,7727	,76	6,78
travma	7	3,6271	2,23475	,84465	1,5603	5,6939	1,43	6,47
Total	14	3,5186	2,30867	,61702	2,1856	4,8516	,76	6,78

ANOVA

TESTOSTE

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,165	1	,165	,029	,868
Within Groups	69,125	12	5,760		
Total	69,290	13			

LH

One Way Anova testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede Kontrol grubu ve Travma grubu arasında anlamlı farkın bulunmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 13: LH istatistiksel değerlendirilmesi

LH								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	6	10,1967	5,95444	2,43089	3,9479	16,4455	2,18	16,74
travma	6	11,3067	6,20877	2,53472	4,7910	17,8224	5,48	19,41
Total	12	10,7517	5,82875	1,68262	7,0483	14,4551	2,18	19,41

ANOVA

LH					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3,696	1	3,696	,100	,758
Within Groups	370,021	10	37,002		
Total	373,718	11			

FSH

One Way Anova testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede Kontrol grubu ve Travma grubu arasında anlamlı farkın bulunduğu tespit edilmiştir. Travma grubunda kontrol grubuna göre salgılanan FSH seviyesinde azalma saptanmıştır.

Tablo 14: FSH istatistiksel değerlendirilmesi

FSH								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	6	31,2750	11,03839	4,50640	19,6909	42,8591	14,10	43,02
travma	6	12,3233	8,05896	3,29006	3,8660	20,7807	3,48	24,86
Total	12	21,7992	13,52258	3,90363	13,2073	30,3910	3,48	43,02

ANOVA

FSH					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1077,497	1	1077,497	11,537	,007
Within Groups	933,964	10	93,396		
Total	2011,461	11			

GPx

One Way Anova testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede Kontrol grubu ve Travma grubu arasında anlamlı farkın bulunmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 15: GPx istatistiksel olarak değerlendirilmesi

GPx								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
kontrol	7	12,9957	1,72812	,65317	11,3975	14,5940	10,78	15,40
travma	7	13,8871	3,01904	1,14109	11,0950	16,6793	10,20	18,37
Total	14	13,4414	2,40812	,64360	12,0510	14,8318	10,20	18,37

ANOVA

GPx					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2,781	1	2,781	,460	,511
Within Groups	72,606	12	6,051		
Total	75,387	13			

MDA

One Way Anova testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede Kontrol grubu ve Travma grubu arasında anlamlı farkın bulunmadığı tespit edilmiştir.

Tablo 16: MDA istatistiksel değerlendirilmesi

MDA								
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1,00	7	2,9100	,73048	,27610	2,2344	3,5856	2,03	3,96
2,00	7	2,7700	,72277	,27318	2,1015	3,4385	1,39	3,73
Total	14	2,8400	,70190	,18759	2,4347	3,2453	1,39	3,96

ANOVA

MDA					
	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,069	1	,069	,130	,725
Within Groups	6,336	12	,528		
Total	6,405	13			

5. TARTIŞMA

Travmatik beyin hasarı endüstriyel dünyada oldukça fazla karşılaşılan ve yüksek oranda can kaybına yol açan, maliyeti yüksek tedaviler gerektiren önemli bir hastalıktır. Travmatik beyin hasarı çeşitli kazalar sonucu öncelikli olarak beynin fiziksel olarak zarar görmesi anlamına gelmektedir. Zarar gören beyin, diğer organları da etkilemektedir. Kalbi, akciğeri, trakeayı, ince barsağı etkilediği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. (15-17).

Biz de çalışmamızda daha önce literatürde rastlamadığımız, deneysel travmatik beyin hasarını uygulayarak testis üzerindeki olası etkilerini inceledik. Histolojik kimyasal, immunohistokimyasal, elektron mikroskopik ve biyokimyasal yaptığımız çeşitli incelemelerde testiste hasarın meydana geldiğini gözlemledik.

Özışık ve ark. 170-200 gr Wistar albino sıçanlarda ağırlık atışı modelini kullanmışlar. Travma modeli Allen metodu kullanılarak 10 mg/kg ksilazin ve 60 mg/kg ketamin anestezisi altında 140 gr ağırlık 10 cm yükseklikten atılarak oluşturulmuş ve travmadan 2, 8, 24 saat sonraki kardiyak miyositleri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Travmadan 2 saat sonra kardiyak miyositlerde ödem oluşumuna ek olarak dilate sarkoplazmik retikulum ve şişkin mitokondriler gözlenmiştir. Travmadan 8 saat sonra sakrifiye edilen dokularda ventrikül duvarının kas dokusunda belirgin perinuklear ödem olduğu belirtilmiştir. En fazla hasarın görüldüğü travmadan 24 saat sonra yapılan sakrifikasyonlarda ise kardiyak miyositlerin sitoplazmasında büyük oranda ödem bulunmuş ve dilate sarkoplazmik retikulum gözlenmiştir. Şişkin mitokondri bulunması diğer bir ultrastrüktürel bulgu olarak kabul edilmiştir. İlginç biçimde kardiyak miyositlerin bazı nukleuslarında heterokromatin artışı görülmüştür. İstatistiksel sonuçlara göre travmadan 24 saat sonra önemli düzeyde nuklear hasarın meydana geldiği saptanmıştır. Sonuç olarak travma modelinin kalp dokusunda lipid peroksidasyon seviyesini zamana bağımlı olarak önemli miktarda artırdığı gözlenmiştir. Miyositlerde meydana gelen bu hasarın birden fazla mekanizmadan kaynaklandığını ve katekolaminlerin bu hasara yol açabileceğini vurgulamışlardır (16,57).

Emir ve ark. yaptıkları çalışmada ağırlık atışı modelinde 200-300 gr ağırlık kullanmışlar ve deney grubu lipid peroksidasyon seviyelerinde kontrol grubuna göre artış olduğu saptanmıştır (58).

Emir ve ark. yaptıkları diğer bir çalışmada ağırlık atışı modelini 30 gr ağırlık ile oluşturarak yarattıkları travma sonucunda miyositlerde oluşan hasara karşı metilprednisolon'un yararlı etkisini araştırılmıştır. Önceki çalışmalarında olduğu gibi travma

oluşturulan gruplarda kontrol grubuna göre lipid peroksidasyon seviyesinde artış olduğunu gözlenmiştir (59).

Biz de yaptığımız çalışmada literatür bilgilerini göz önünde bulundurarak 40 gr ağırlık atışı ile oluşturduğumuz travmadan 24 saat sonra sakrifikasyon gerçekleştirerek testis üzerine olan hasarı Emir ve ark. yaptığı çalışmaya paralel olarak gözlemledik.

Hang ve ark. 220-250 gr Wistar suşu sıçanlar kullanarak 40 gr ağırlığın 25 cm yükseklikten atılmasıyla travma modelini oluşturmuştur. Travmadan 3, 12, 24, 72 saat ve 7 gün sonra incelenen ince barsak dokusunda zamana bağlı olarak gittikçe artan hasar meydana geldiği saptanmıştır. Villus boyu ve derinliği, kripta derinliği, yüzey alanı ölçümleri incelenmiş; istatistiksel olarak değerlendirme yapıldığında en fazla hasarın 7 gün sonraki grupta olduğu belirlenmiştir (60).

Biz de çalışmamızda Hang ve ark. yapmış olduğu çalışmaya paralel olarak travma modelinde kullandığımız hayvanların suşlarına ve ağırlık miktarlarına uyum gösterdiğinden 40 gr ağırlık kullandık ve 24 saat sonra sakrifikasyonu gerçekleştirdik.

Yıldırım ve ark. yaptıkları çalışmada travmatik beyin hasarı sonucunda trakea epitelinde; AGER'de vakuol formasyonu ve mitokondrial artış gözlediler ayrıca bağ dokusunda intersellüler ödem gözlemişlerdir (61).

Biz de yaptığımız çalışmada elektron mikroskopik incelemede leydig hücrelerinde yoğun olarak vakuolizasyon gözlemledik.

Sarkar ve ark. 200-250 gr Sprague Dawley cinsi sıçanlarda yaptıkları çalışmada organofosfatların hipotalamo-hipofiziyal aksı etkilediğini ve etkilenen aksın gonadlar üzerinde değişimlere yol açarak gonadotropin konsantrasyonlarını değiştirebileceğini, buna bağlı olarak spermatogenik hasara yol açabileceğini vurgulamışlardır (62).

Yaptığımız çalışmada literatüre paralel olarak travmadan sonra salgılanan hormon seviyelerinde meydana gelen değişimleri gözlemledik. GnRH ve FSH seviyelerinde anlamlı olarak azalma meydana gelmiştir.

Wagner ve ark. yaptıkları çalışmada, geçirdikleri kazalar sonucu beyin hasarı gören hastalardan, 10 gün sonra aldıkları kanlarla yaptıkları analizlerde gonadotropin ve somatotropinlerin baskılandığını belirtmişlerdir. Yapılan ölçümler sonucunda erkeklerde LH, FSH, GH, testosteron ve dişilerde ise östradiol miktarında azalma olduğunu gözlemlemişlerdir (63).

Yaptığımız çalışmada travmatik beyin hasarı sonrasında biyokimyasal incelemelerle gonadotropinlerin bir kısmında (GnRH, FSH) anlamlı olarak azalma meydana geldiğini belirledik.

Akazawa ve ark. yaptıkları çalışmada 22 günlük Wistar suşu sıçan kullanmışlardır. Vitamin E eksikliğinden kaynaklanan hipofiz-gonad sistemini incelemişler ve testiste direkt hasara yol açtığı gözlenmiştir. FSH ve LH seviyelerinin vitamin E eksikliği olan grupta kontrol grubuna göre daha düşük seviyede bulundukları belirtilmiştir. Vitamin eksikliğinin serum testosteron seviyesinde azalmaya ve feed back mekanizmasıyla da LH seviyesinde artmaya neden olduğunu vurgulamışlardır (64).

Kasturi ve ark. yaptıkları çalışmada travmatik beyin hasarının insanlarda hipotalamusta ve hipofizde patolojik değişikliklere neden olduğunu sonucun hipopituitarizme sebep olarak anterior hipofizden salgılanan hormonları etkilediğini belirtmişlerdir (65).

Biz de çalışmamızda beyin hasarından dolayı etkilenen hipotalamo-hipofiziyal aksın hormonları etkilediğini ve etkilenen hormonların testis üzerinde olumsuz etki yaratacağını düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneyimizde daha önce literatürde rastlamadığımız travmatik beyin hasarının testise olası etkilerini ortaya çıkarmayı amaçladık. Bu amaçla travmatik beyin hasarı uyguladığımız deneklerden alınan testis dokusu Hematoksilen-Eozin, Masson Trikrom, PAS gibi histolojik boyamalarla morfolojik olarak değerlendirildi. DNA fragmentasyonunun değerlendirilmesi amacıyla TUNEL ve apoptoz belirlenmesi için Aktif Kaspaz 3 boyaması ile işaretleme yapıldı. Biyokimyasal olarak GnRH, LH, testosteron, FSH hormon seviyeleri değerlendirildi. Ayrıca MDA ve GPx seviyeleri ölçüldü.

Işık mikroskopik incelemelerde yapılan Johnsen testiküler biyopsi sonuçlarına göre travma grubunda kontrol grubuna kıyasla hasar meydana geldiği sonucuna ulaşıldı.

İmmünohistokimyasal olarak yapılan incelemeler sonucunda travmatik beyin hasarı uyguladığımız grupta yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, kontrol grubuna kıyasla apoptoz oranında artış olduğu gözlemlendi.

Elektron mikroskopik incelemelerde travma grubunda spermatogenik hücre serileri aralarında bağlantı bozuklukları ve sertoli-sertoli hücrelerinin bağlantılarında ayrılmalar gözlenmiştir.

Biyokimyasal olarak yapılan değerlendirmeler sonucunda hipofizden salgılanan GnRH ve FSH gibi hormon seviyelerinde anlamlı olarak azalma görülürken, LH, testosteron hormonları ve GPx, MDA seviyelerinde anlamlı olarak değişme gözlemlenmemiştir.

Bu çalışmada daha önce literatürde rastlamadığımız travmatik beyin hasarının testise olası etkileri histokimyasal, immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal olarak araştırılmıştır.

Gelecek çalışmalarda travmatik beyin hasarı modelinin farklı ağırlık atışlarıyla denenmesi ve etkinliği en yüksek ağırlığın belirlenmesi gerekmektedir. Ayrıca testis üzerinde en etkili zamanın bulunması için farklı zaman aralıklarında deneyler yapılmalıdır. Böylelikle literatürde bulunan bu boşluğun doldurulabileceği kanısındayız.

7.KAYNAKÇA

1. **Odar İ.** Anatomi Ders Kitabı. Ankara : Elif Matbaacılık, 1979.
2. **Gökmen G, İçten N.** Sistematik Anatomi. İzmir Güven Kitabevi, 2003.
3. **Yıldırım M.** İnsan Anatomisi. İstanbul : Nobel Tıp Kitabevi, 2003: 210-214.
4. **Kierszenbaum AL.** Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara. Palme Yayıncılık, 2006: 531-564.
5. **Erkoçak A.** Genel Histoloji. İzmir. 1984: 138-160.
6. **Eroschenko VP.** Di Fiore's Atlas of Histology With Functional Correlations. : Palme Yayıncılık, Ankara 2001; 251-265.
7. **LP Gartner, Hiatt JL.** Color Atlas of Histology. China : WB Saunders Company, 2001: 435-458.
8. **Ross HM, Pawlina W.** Histology A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 647-789.
9. **Jungueira LC, Carneiro J.** Basic Histology. New York. 2003: 359-375.
10. **Paker Ş.** Histoloji. Uludağ Üniversitesi Basımevi, Bursa. 1990: 448-467.
11. **Young B, Heath JW.** Wheather's Functional Histology A Text and Colour Atlas. New York : Williams & Wilkins, 2000: 286-432.
12. **Marmarou A, Montasser A, Foda E, Brink W.** A new model of diffuse brain injury rats. J Neurosurg, 1994; 80: 291-300.
13. **Oncel S.** <http://www.kocaelide.com/article.php?id=169> .
14. **Lindh C, Wennersten A, Arnberg F.** Differences in cell death between high and low energy brain. Acta Neurochir, 2008; 150: 1269-1275.

15. **Sonmez U, Sonmez A, Erbil G, Tekmen I, Baykara B.** Neuroprotective effects of resveratrol against traumatic brain injury in immature rats. *Neurosci. Lett.*, 2007; 420: 133-137.
16. **Ozisik K, Yildirim E, Kaplan S, Solaroglu I, Sarson MF, Kilinc K.** Ultrastructural changes of rat cardiac myocytes in a time-dependent manner after traumatic brain injury. *American Journal of Transplantation*, 2004; 4: 900-904.
17. **Yildirim E, Kaptanoglu E, Ozisik K, Beskonakli E, Okutan O, Sargon MFl.** Ultrastructural changes in pneumocyte type II cells following traumatic brain injury in rats. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004; 25: 523–9.
18. **Davis L, Pauly J, Readnower R.** Fasting is Neuroprotective Following Traumatic Brain Injury. *Journal of Neuroscience Research*, 2008; 86: 1812-1822.
19. **Sharma H, Meinzingen S, Johanson C.** Cerebrolysin reduces blood-cerebrospinal fluid barrier permeability change, brain pathology, and functional deficits traumatic brain injury in rats. *Ann.N.Y.Acad.Sci*, 2010; 1199: 125-137.
20. **Fukushima M, Lee S, Moro N.** Metabolic and Histologic Effects of Sodium Pyruvate Treatment in the Rat after Cortical Contusion Injury. *Journal of Neurotrauma*, 2009; 26: 1095-1100.
21. **Ozisik P, Oruckaptan H, Geyik P.** Effect of erythropoietin on brain tissue after experimental head trauma in rats. 2007; 68: 547-555.
22. **Silva D, Brito J, Ibiapina J.** Traumatic brain injury. Clinical and pathological parameters in an experimental weight drop model. *Acta Cirurgia Brasileira*, 2011; 26: 94-100.
23. **Ates O, Cayli S.** Neuroprotection by resveratrol against traumatic birain injury in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2007; 294: 134-144.
24. **Turkoglu O, Eroglu H, Okutan O.** Atorvastatin efficiency after traumatic brain injury in rats. *Surgical Neurology*, 2009; 72: 146-152.

25. **Ozdemir D, Tugyan K, Uysal N, Sonmez U.** Protective effect of melatonin against head trauma-induced hippocampal damage and spatial memory deficits in immature rats. *Neuroscience Letters*, 2005; 385: 234–239.
26. **Kiess W, B Gallaher.** Hormonal control of programmed cell death apoptosis. *Eur J Endocrine*, 1998; 18: 482-491.
27. **Majno G, Joris I.** Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. *Am J Pathol*, 1995; 146: 3-15.
28. **Thompson C. B.** Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 1995; 267: 456-1462.
29. **Ameisen J S.** The origin of programmed cell death. *Science*, 1996; 272: 1278.
30. **Kerr JFR, Wyllie AH, AR Currie.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972; 26: 239-245.
31. **Brouckaert G.** Phagocytosis of necrotic cells by macrophages is phosphatidylserine dependent and does not induce inflammatory cytokine production. *Molecular Biology of the Cell*, 2004; 15: 1089-1100.
32. **Willingham MC.** Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 1999; 47: 1101-1109.
33. **Barisic K, Petrik J, Rumora L.** Biochemistry of apoptotic cell death. *Acta Pharm*, 2003; 53: 151-164.
34. **Ulukaya E.** http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf. 19.8.2010.
35. **Elmore S.** Apoptosis: A review of programmed cell death. 2007; 35: 495-516.
36. **Kumar, Vinay, Abul K. Abbas, Nelson Fausto.** Robbins And Cotran Pathologic Basis Of Disease. Philadelphia : Elsevier Saunders, 2005.
37. **Balakumran A, Campbell G.A, Maslen MT.** Calcium channel bloklers induce thymic apoptosis in vivo rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996; 139: 122-127.
38. **Cohen JJ.** Apoptosis. 1993;14: 126-130.

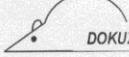
39. **Wyllie AH.** Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 1980; 284: 555-556.
40. **Lu J.** Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine*, 2000; 25: 1859-1866.
41. **Sheikh MS, Fornace Aj-Jr.** Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol*, 2000; 182: 171-181.
42. **Mountz JD, Zhou T.** Apoptosis and autoimmunity. WJ Kopman. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions.*: Lippincott-William&Wilkins, 2001.
43. **YP Ow.** Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2008; 9: 532-542.
44. **Öktem S, Özlem MH, Özdol D.** Apoptozisin önemi. *Toraks Dergisi*, 2001: 91-95.
45. **Solakoğlu Z.** Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni. *Klinik Gelişim*. 2009: 20-25.
46. **Donoghue S.** Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. *Cancer Research*, 1999; 59: 5386-5391.
47. **Donepudi M, Grutter MG.** Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry*, 2002; 101: 145-153.
48. **Hengartner M.O.** The Biochemistry of Apoptosis. *Nature*, 2000: 407.
49. **Sinha Hikim A P, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X-H, Swerdloff R S.** Spontaneous germ cell apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed cell death. *J Clin Endoc and Metab*, 1998; 83: 152.
50. **Sharpe R M.** Regulation of spermatogenesis in the *Physiology of Reproduction*. Neill J D. Raven Knobil E. New York : Press, 1994: 1364-1434.
51. **Beumer T L, Roepers L H, Gademan S U, Lock M T W, Tycho K B, Kal H.B, Rooij D G.** Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr*, 2000; 56: 353-359.

52. **Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. I.** Apoptotic Cell Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research*, 1996; 40: 351-356.
53. **Tapanainen J S, Tilly J L, Vihko K K, Hsueh A J W.** Hormonal control of apoptotic cell death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol*, 1993; 7: 643-650.
54. **Guney M, Orala B, Demirin H.** Fallopian damage induced by organophosphate insecticide methyl parathion and protective effect of vitamins E and C on ultrastructural changes in rats. *Arch Toxicol Ind Health*, 2007; 7: 429-38.
55. <http://www.androloji.org.tr/images/File/28.Say%C4%B1%20pdf/I1.pdf>. 09.09.2009.
56. **Paxinos G., Watson C.** The Rat Brain. Academic Press Australia, 1994.
57. **Allen A.R.** Surgery of Experimental Lesion of Spinal Cord Equivalent to Crush Injury of Fracture Dislocation of Spinal Column. Philadelphia. *JAMA*, 1911; 57: 878-880.
58. **Emir M.** Effect of Erythropoietin on bcl-2 Gene Expression in Rat Cardiac Myocytes After Traumatic Brain Injury. Elsevier Inc., 2004; 36: 2935-2938.
59. **Emir M, Ozisik K., Cagli K.** Beneficial Effect of Methylprednisolone on Cardiac Myocytes in a Rat Model of Severe Brain Injury. *Tohoku J. Exp. Med.*, 2005; 207: 119-124.
60. **Hang C, Shi J, Sun B.** Apoptosis and Functional Changes of Dipeptide Transporter (PepT1) in the Rat Small Intestine After Traumatic Brain Injury. *Journal of Surgical Research*, 2007; 137: 53–60.
61. **Yildirim E, Solaroglu I, Okutan O, Ozisik K, Kaptanoglu E.** Ultrastructural Changes in Tracheobronchial Epithelia Following Experimental Traumatic Brain Injury in Rats: Protective Effect of Erythropoietin. *The Journal of Heart and Lung Transplantation*, 2004; 23: 1423-9.
62. **Sarkar R, Mohanakumar K.P, Chowdhury M.** Effects of an organophosphate pesticide, quinalphos, on the hypothalamo–pituitary–gonadal axis in adult male rats. *Journals of Reproduction and Fertility*, 2000; 118: 29-38.

63. **Wagner J, Dusick J, Arthur D.L, Cohan P.** Acute Gonadotroph and Somatotroph Hormonal Suppression after Traumatic Brain Injury. *Journal of Neurotrauma*, 2010; 27: 1007–1019.
64. **Akazawa N, Mikami S.** Effects of Vitamin E Deficiency on the Hormone Secretion of the Pituitary-Gonadal Axis of the Rat. *Tohoku J. exp. Med.*, 1987; 152: 221-229.
65. **Kasturi B. S., Stein D. G.** Traumatic Brain Injury Causes Long-Term Reduction in Serum Growth Hormone and Persistent Astrocytosis in the Cortico-Hypothalamo-Pituitary Axis of Adult Male Rats. *Journal Of Neurotrauma*, 2009; 26: 1315–1324.

8.EKLER

Ek-1, Etik Kurul Onayı

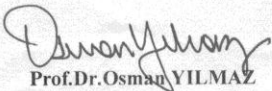
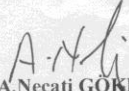
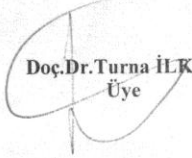
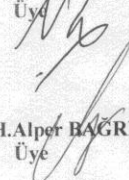
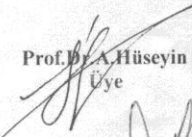
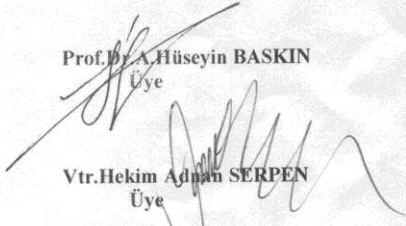
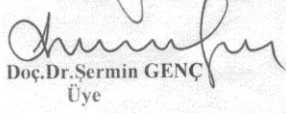
**DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU**
35340, Inciraltı, İzmir-232 4122234
<http://deu.edu.tr/idenyetik/>

Toplantı No : 05/04/2011
Toplantı Tarihi : 18 Şubat 2011

Sayın, Nergiz ŞEREF
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

14/2011 Protokol No'lu; Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı öğrencisi Nergiz ŞEREF'in yürütücüsü olduğu "Sıçanlarda travmatik beyin hasarının testise olası etkilerinin araştırılması" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

 Prof.Dr.Osman YILMAZ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı	 Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN Başkan Yardımcısı
 Prof.Dr.Alper SOYLU Üye	Prof.Dr.Ayşe GELAL Üye (topl.katılmadı)
Prof.Dr.Selman SÖKMEN Üye (topl.katılmadı)	Prof.Dr.O.Nejat SARIOSMANOĞLU Üye
 Doç.Dr.Turna İLKNUR Üye	 Doç.Dr.H.Alper BAĞRIYANIK Üye
Prof.Dr.Abdullah KUMRAL Üye (topl.katılmadı)	 Prof.Dr.A.Hüseyin BASKIN Üye
 Doç.Dr.Tonay İNCEBOZ Üye	 Vtr.Hekim Adnan SERPEN Üye
Ayşe Nur BALIN Üye	 Doç.Dr.Sermin GENÇ Üye

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

ÖZGEÇMİŞ

NERGİZ ŞEREF

TC Kimlik No / Pasaport No:	20522720392
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/İZMİR
Telefon:	0232 412 45 52
Faks:	
e-posta:	nergizseref@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

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

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

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

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Testis, Travmatik beyin hasarı, Işık Mikroskobu

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

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

ÖDÜLLER

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

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Düzenlenme Tarihi: 17/01/2012