

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**TESTİSTE YER ALAN HÜCRELERDE AKUT VE KRONİK
KADMIYUM ALIMINA BAĞLI HÜCRE ÖLÜMÜNÜN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Sibel ÇETİNBAŞ

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

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat TOSUN**

Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon birimi tarafından 17.SAĞ.BİL.29 proje numarası ile desteklenmiştir.

Tez No: 2019-019

2019-AFYONKARAHİSAR

KABUL VE ONAY

Afyonkarahisar Sağlık Bilimlerin Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı

çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından

Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : ... / ... /

Prof.Dr. Murat TOSUN

Jüri Başkanı

Doç. Dr. Tolga ERTEKİN

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL

Üye

Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Esra GÖKALP'in "Melatonin Ve 13-Cis-Retinoik Asitin Ykg-1 Glioblastoma Multiforme Hücre Hattında Telomeraz Aktivitesi Üzerine Olan Etkilerinin Karşılaştırılması: İn Vitro Çalışma" başlıklı tezi .../.../..... günü saat 'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özal ÖZCAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerini bana aktaran, tez konumun seçilmesi, yürütülmesi ve tamamlanmasında yardımlarını esirgemeyen Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Murat TOSUN'a;

Yüksek lisans eğitimim ve tez süreci içinde karşılaştığım soru ve sorunların çözümü için elinden gelen desteği gösteren Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Dr. Esra ASLAN'a

Tez çalışmam sırasında pratik uygulamalarda yardımları ile katkı sağlayan Afyon Veterinerlik Fakültesi Besin-Gıda Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Ulaş ACARÖZ ve Laborant ve Sağlık Bölümü Anabilim Dalı Başkanı Sayın Dr. Öğretim Üyesi Hasan Hüseyin DEMİREL'e

Deney hayvanları çalışmalarım sırasında yardımları sayesinde sorunların giderilmesini sağlayan Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi Veteriner Hekimi Sayın Engin GÖKSEL'e

Çalışmamın istatistiksel değerlendirilmesinde yardımlarından dolayı İstatistik Anabilim Dalı Öğretim Görevlisi Sayın Prof. Dr. İsmet DOĞAN'a

Yüksek lisans eğitimim ve tez süreci içerisinde arkadaşlık ve destekleri için Yüksek lisans öğrencilerinden Deniz Emre Koç, Tuğçe ALADAĞ ve Kübra KUMALAR'a, ayrıca deneyler sırasında yardımlarıyla Afyon Veterinerlik Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Doktora öğrencisi Tayfun DİKMEN e,

Ve hayattaki en büyük desteğim olan canım annem Nevin EYMÜR kardeşim Melek ÇETİNBAŞ ve müstekbal eşim Olgu BAYDEMİR' e en içten duygularıyla sevgi ve saygılarımı sunarım...

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY.....	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER.....	vii
TABLolar.....	viii
1.GİRİŞ	1
1.1.Erkek Genital Sistemi Anatomisi.....	2
1.1.1.Testisler	2
1.2.Erkek Genital Sistemi Histolojisi.....	4
1.2.1.Erkek Üreme Sistemine Genel Bakış	4
1.2.2.Testislerin Histolojisi	6
1.2.3.Seminifer Tübüller	7
1.2.4.Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenez	8
1.2.5.Spermiyogenez.....	9
1.2.6.Testis İçi Genital Kanallar	13
1.2.7.Genital Boşaltım Kanalları.....	15
1.2.8.Yardımcı Üreme Bezleri	16
1.3.Testis Embriyolojisi	19
1.3.1.Primordiyal Germ Hücrelerinin Göçü.....	19
1.3.2.Testis Oluşumu.....	19
1.4.Testis Fizyolojisi	21
1.5.Kadmiyum.....	22
1.5.1.Kadmiyumun Çevreye Etkisi	23
1.5.2.Kadmiyumun Organlar Üzerine Etkisi.....	25
1.6.Hücre Ölümü	28
1.6.1.Apoptozis	28
1.6.2.Otofaji	30
1.6.3.Nekroz.....	32
2.GEREÇ VE YÖNTEM.....	34
2.1 Etik Kurul.....	34
2.2. Deney Hayvanları.....	34

2.3.Deney Grupları.....	34
2.4. Kimyasallar	35
2.5.Dokuların Alınması.....	35
2.6. Testis Ağırlıklarının Ölçülmesi.....	36
2.7. Işık Mikroskobu İçin Dokuları Hazırlanması	36
2.8.Kesitlerin Alınması ve Boyanması.....	37
2.8.1.Hematoksilen-Eozin Boyama:	37
2.8.2 PAS Boyama	38
2.8.3.İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü	39
2.9.Görüntü Analiz.....	39
2.10.İstatistiksel Analiz.....	40
3.BULGULAR	41
3.1.Testis Ağırlığı Ölçümleri	41
3.2. Johnsen Skorum Sonuçları	42
3.3.İmmunohistokimyasal Bulgular	45
3.4.İstatistiksel Analiz Sonuçları.....	49
4.TARTIŞMA	51
5.SONUÇ.....	58
ÖZET	59
SUMMARY	61
KAYNAKLAR.....	63
ÖZGEÇMİŞ.....	71

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABP	Androjen-bağlayıcı protein
CD	Kadmiyum
m	Metre
cm	Santimetre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
DER	Düz yüzlü endoplazmik retikulum
FSH	Folikül sitümüle hormon
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
LH	Luteinizan hormonu
TDF	Testis belirleyici faktörün
PAP	Prostatik asit fosfataz
PSA	Prostad spesifik antijen
PBS	Phosphate tampon çözeltisi
TBS	Tris tampon çözeltisi
Zn	Çinko

ŞEKİLLER

Şekil 1.1 Testisin anatomik yapısı.....	3
Şekil 1. 2 Erkek genital sistem kompetentini gösteren şematik diyagramı	5
Şekil 1. 3 Testis ve üreme yollarını gösteren şematik çizimi	7
Şekil 1. 4 İnterstiyeel alan ve leydig hücreleri	11
Şekil 1. 5 Seminifer tübülün şematik gösterimi.....	13
Şekil 1. 6 Testis gelişim evreleri şematik gösterimi	20
Şekil 2.1 Ratların anestezi altında uyutulup karın bölgesinin açılması	35
Şekil 2. 2 Ratlardan testis dokusunun çıkarılması	35
Şekil 2. 3 Testislerin gömülmeden önce nötral formalin içine alınması	36
Şekil 2. 4 Testislerin parafin içerisine gömülmesi.....	36
Şekil 2. 5 Gömülmüş blokların etiketlenmesi.....	36
Şekil 3. 1 Grupların sağ testis ve sol testis ağırlık ortalamaları.....	41
Şekil 3. 2 Kontrol grubuna ait testis dokusunun histolojik görüntüsü Hematoksilen-Eozin boyaması.....	43
Şekil 3. 3 Rat testis dokularının histolojik görüntüsü Hematoksilen-Eozin boyaması.....	43
Şekil 3.4 Kontrol grubuna ait testis dokusunun histolojik görüntüsü Pas boyaması..	44
Şekil 3.5 Rat testis dokularının histolojik görüntüsü Pas boyaması.....	44
Şekil 3.6 Deney gruplarında testis dokularında RIP3 İmmün boyaması.....	45
Şekil 3.7 Deney gruplarında testis dokularında Calretinin İmmün boyaması	45
Şekil 3.8 Deney gruplarında testis dokularında Caspase-3 İmmün boyaması.....	47
Şekil 3.9 Deney gruplarında testis dokularında Beclin 1 İmmün boyaması.....	47
Şekil 3.10 Gruplar arası Leydig hücre sayımı ortalamaları	49

TABLÖLAR

Tablo 3.1. Sağ Testis Ağırlığı, Sol Testis Ağırlığı Değerleri.	41
Tablo 3.2 Grupların Johnsen Skoru Değerleri	42
Tablo 3.3. Gruplararası Karşılaştırmalar Sonucu Elde Edilen Johnson Skoru, p Değerleri..	42
Tablo 3.4. Gruplararası Karşılaştırmalar Sonucu Elde Edilen Calretinin, p Değerleri	49
Tablo 3.5. Calretinin Sayım Değerleri	50



1.GİRİŞ

Majör toksik ajanlardan biri olan ve canlılar üzerindeki toksik etkileri bilinen kadmiyum (Cd), maden cevherlerinden doğrudan doğruya üretilmeyen ağır metallere dendir (Baldwin ve Marshall, 1999). Kadmiyum, diğer ağır metaller gibi hem çevresel hem de mesleki maruziyetlerle insan sağlığını tehdit etmektedir ve birçok insan aktivitesi ile çevremizde açığa çıkan bir metaldir (Leoni, 2002). Doğada yayılma hızı yüksektir ve insan yaşamı için gerekli elementlerden biri değildir. Tarım sektöründe yaygın ve kontrolsüz sentetik gübre kullanımı, bunun yanı sıra seracılıkla üretilen sebze ve meyvelerin, Cd ile kirlenmiş topraklarda yetişen tahılların, sanayi ve diğer atıklarla kirlenen sularda beslenen su ürünlerinin, Cd ile kirlenmiş içme sularının, memeli hayvanların karaciğer, böbrek gibi iç organlarının tüketimi, hava kirliliği, kahve, çay, kömür yakılması, yüksek sigara bağımlılığı oranı ve buna bağlı yüksek oranda pasif içicilik göz önüne alındığında insan sağlığı hem gıdalarla hem de solunum yoluyla büyük ölçüde Cd toksisitesi tehdidi altındadır (Tekelioğlu, 2002). Yapılan deneysel çalışmalar göstermiştir ki, Cd'ye maruz kalmaya bağlı olarak organlardaki dağılımı ve buna bağlı olarak aktivasyon bölgeleri değişmektedir (Karataş, 1998). Cd enjeksiyon yoluyla ya da içme suyuyla oral olarak alınmasıyla; testis, prostat, karaciğer, akciğer ve böbrek gibi organlarda şiddetli hasarlara sebep olduğu gösterilmiştir. Ancak bu hasarların şiddeti, Cd'a maruz kalma süresine ve Cd'un dozuna göre değişmektedir (Karataş, 1998; Gavett ve Oberdorster, 1994). Genel bir çevresel ağır metal ve endokrin bozucu olan kadmiyum (Cd), testis üzerinde toksik etkileri bulunmaktadır. Cd, spermatogenez indeksinde azalmaya neden olurken sperm miktarını ve hareketliliğini olumsuz yönde etkilemektedir. Cd, Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı kompleksini bozarak spermatogenik seriye ait hücrelerde hasara neden olur ve spermatogenezi olumsuz etkiler. Kadmiyum,germ hücrelerinde otofaji apoptoz, ve nekroza sebep olmaktadır. Kadmiyumun sebep olduğu testiküler nekroz sonucu, kalıcı infertilite ortaya çıkabilmektedir. Testis dokusundaki kadmiyum seviyesi arttıkça seminifer tübüllerdeki apoptozis oranı artmakta ve semen parametrelerindeki düzelme azalmaktadır (Rencüzoğulları, 2006; Hew, 1993).

Çalışmamızda; bu bilgilere bağlı olarak kadmiyumun rat testislerinde oluşturduğu doku hasarının nasıl ve ne düzeyde olduğu, doza bağlı bir değişim olup olmadığını incelemek için tez çalışması olarak yaptık.

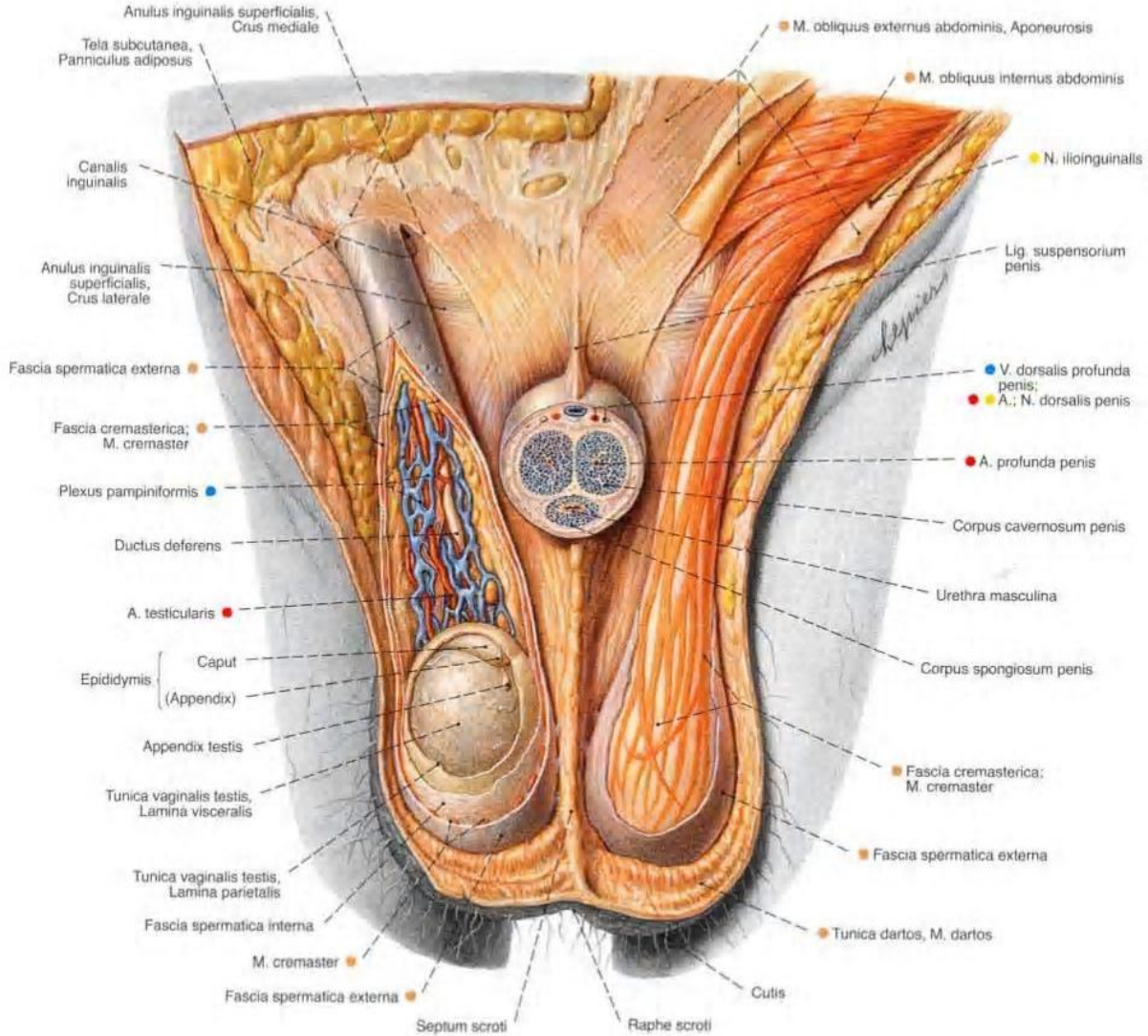
1.1. Erkek Genital Sistemi Anatomisi

Erkekte üreme organları, temel üreme organı (gonad, testis) ile iletilici yollar (Viae genitales), eklenti bezler ve penisten oluşur (Yıldırım, 2012). Üreme organları, yerleşim yerlerine göre iç ve dış üreme organları olarak iki grupta incelenir. Testisler, üretraya kadar olan genital yollar ile eklenti bezler iç genital organlar olarak incelenir. Perinede yer alan organlar ise dış genital organlar olarak incelenir (Sancak ve Cumhuriyet, 2008).

1.1.1. Testisler

Skrotumun içinde funikulus spermatikus asılı biçimde bulunan, erkek üreme hücrelerinin yapıldığı bir çift organdır (Şekil 1.1). Üst ucu öne ve dışa, alt ucu arkaya ve içe dönük oblik pozisyonda skrotumda durur. Testisler eliptik şekildedir. Facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu vardır. Her testisin ağırlığı yaklaşık 11-14 gr olup genelde sol testis sağdakine göre bir cm daha aşağıdadır (Sancak ve Cumhuriyet, 2015). Testisler yaklaşık beş cm uzunlukta, iki buçuk cm genişlikte, üç cm kalınlıktadırlar ve iri bir badem şeklindedirler (Arıncı ve Elhan, 2014). Testislerin üst ucunda kadınlarda tuba uterinanın abdominal ucuna karşılık gelen appendiks testis denen küçük yassı bir yapı vardır. Testislerin arka kenarında bulunan epididimisin medialinde, margo posteriorda funikulus spermatikus vardır (Sancak ve Cumhuriyet, 2015). Visseral periton (epiorşiyum) testisin düz ve konveks olan ön kenarını, her iki yüzünü ve uçlarını kaplar. Arka kenarının ise lateral

kısmı peritonla kaplıdır. Medial kısmı peritonsuzdur ve buraya epididimis tutunur. Buradan damarları, sinirleri ve kanalları geçer (Arıncı ve Elhan., 2014).



Şekil 1.1 Testisin anatomik yapısı

(Sobotta İnsan Anatomisi Atlasından alınmıştır).

Tunica vaginalis; fasya spermatica interna ve skrotum'un iç yüzünü döşeyen lamina parietalis ve testisi saran lamina visceralis (epiorşiyum) katmanlarını oluşturur. Katmanlar arasında testislerin hareketine olanak sağlayan sıvı bulunur (Moore ve ark., 1998). Testisler tunika vaginalisten başka dıştan içe doğru tunika albuginea ve tunika vasküloza ile sarılmıştır. Tunika albuginea epiorşiyumun altında bulunan kalın fibröz

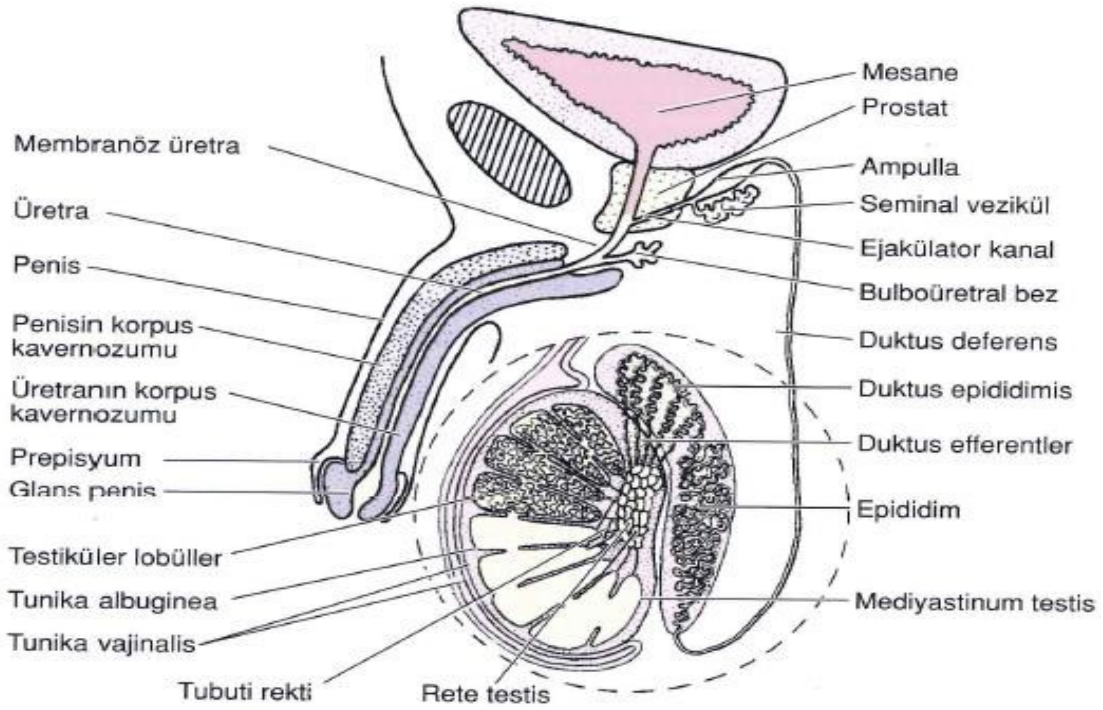
tabakadır. Testisin arka kenarından testis parankimine doğru mediastinum testis (corpus higmorei) denen dikey bir yarım bölme gönderir. Mediastinum testisin ön ve yan kısımlarından birçok fibröz bölme (septula testis) çıkar, testis parankiminden geçer ve tunika albugineanın iç yüzüne uzanarak testisi 250-300 lobcuğa (lobuli testis) böler (Yıldırım, 2016). Lobuli testislerin içindeki tubuli seminiferi concorti denen kıvrımlı kanalcıklar testis parankimini oluşturur. Her bir kanalcık tubuli seminiferi rekti denen mediastinum yakınındaki düz kanalcığa uzanır. Bütün kanalcıklar mediastinumda ağ yaparak rete testisi oluşturur. Lobuli testislerde üretilen spermiumlar rete testis ve ductuli efferentesten geçerek epididimise ulaşır. Tunika vasküloza testis parankimini sarar ve tunika albugineanın iç yüzünü örter. Testisin damar ağından oluşur. Testisin arteriyel kanlanması aorta abdominalisin dalları olan sağ ve sol a. testicularis ile sağlanır. Her bir testisin arka kısmından çıkan küçük venler birleşir ve plexus pampiniformis venöz ağını oluşturur. Funiculus spermaticus ve canalis inguinalisten geçerek karın boşluğuna ulaşır. Bu pleksustan çıkan iki ven birleşerek v. testicularisi oluşturur. Sağda v. testicularis dextra v. cava inferior'a solda v. testicularis sinistra v. renalis sinistra' ya dökülür. Lenf damarları funiculus spermaticus ile beraber karın boşluğuna geçer nodi aortici laterales ve nodi preaorticiye dökülür. Testisler medulla spinalisin torakal on ve on birinci segmentlerinden gelen sinirlerle inerve edilir. Plexus aorticus ve renalisten geçerek testisleri besleyen damarların çevresinde organa ulaşır (Sancak ve Cumhuriyet, 2015; Yıldırım, 2016).

1.2.Erkek Genital Sistemi Histolojisi

1.2.1.Erkek Üreme Sistemine Genel Bakış

Erkek üreme sisteminde, testesteron gibi androjenlerin sentez ve salgılanmasından sorumlu olan testisler bulunmaktadır. Bu üreme sistemi, spermiyogenezis ve

spermatogenezis süreçleri sonunda sperm üretimini meydana getirir. Testisler dışarıya spermin aktarılmasından sorumlu olan genital boşaltım kanallarından oluşmaktadır. Genital boşaltım kanalları ise, duktus eferentes, duktus epididimis, duktus deferentes, ve erkek üretrasından oluşmaktadır (Şekil 1.2). Veziküla seminalis, spermin beslenmesi için besin kaynağı oluşturur ve semenin sperm dışındaki kısmını oluşturmakta görev alır. Veziküla seminalis, aksesuar cinsiyet bezleri, prostad, bulboüretral bezler ve penisten meydana gelmektedir (Ross MH ve Pawlina W, 2014; Kierszenbaum AL, 2006).



Şekil 1. 2 Erkek genital sistem kompetentini gösteren şematik diyagramı

(Jangueria ve Carneiro, 2003)

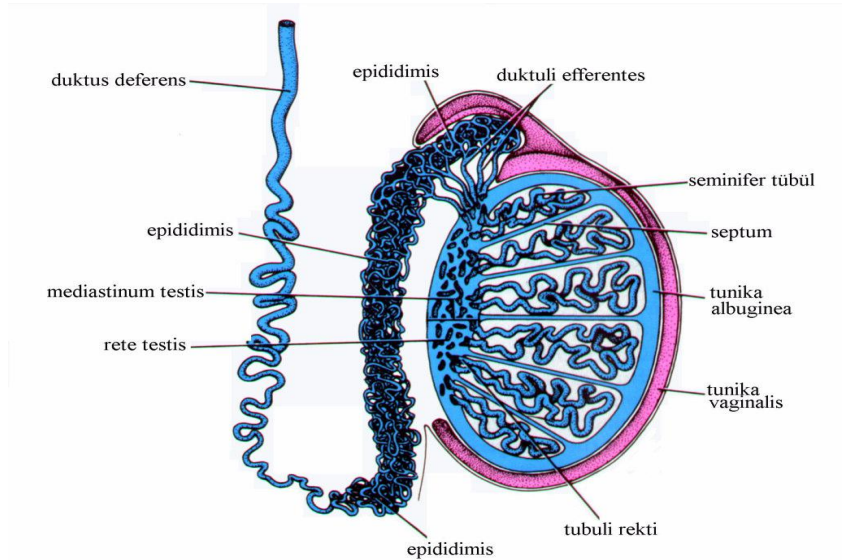
1.2.2. Testislerin Histolojisi

Yetişkin testisleri, vücut boşluğu dışında yer alan ve skrotal kese adı verilen cep şeklinde bir yapıdır. İçerisinde uzanan bir çift oval biçiminde organdır. Testislerden her biri anterior abdominal duvarın tabakaları ile devamlılık gösteren ve skrotum içerisine uzanan bir muskulofasiyal kesenin ucunda asılıdır. Testisler funiculus spermaticus aracılığıyla abdominal duvara bağlıdırlar (Ross ve Pawlina, 2014). Testisler, sıra dışı bir kalınlıkta olduğu gibi bağ dokusu yapısındaki kapsül olan tunika albuginea tarafından sarılmaktadır. Tunika albuginea testisin posterior yüzünde kalınlaşır ve kalınlaşan bu bölgeye mediastinum testis denir. Bu fibröz yapı testislerin bez yapısına doğru hareket eder ve testiküler lobül olarak adlandırılan yaklaşık 250 ila 300 piramidal lobül oluşturur. Lobüllerin her birinde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1 ile 4 adet seminifer tübül denilen ince tübül yapısı içerir. Seminifer tübülleri saran bağ dokusu kan ve lenf damarlarınca zengindir. Bu bağ dokusu içerisinde aynı zamanda sinirler, makrofajlar ve testis bağ dokusuna özelleşmiş ve adrojen salgı yapan Leydig hücreleri bulunmaktadır. Seminifer tübüller, erkek üreme hücresi olan spermatozoonların oluştuğu ve birçok görevinin yanında spermatogonyumlara destekleyen sertoli hücrelerinin bulunduğu kısımlardır. Her bir Seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 50 cm uzunluğundadır. Seminifer tübüller U şeklindeki iki ucu rete testise açılan tübül yapılardır ve alışılmışın dışında karmaşık yapıdaki spermatogenik serileri ile sertoli hücrelerini içeren çok katlı bir epitel ile kaplıdır. Sertoli hücrelerine, destek hücreleri ya da sustentaküler hücrelerde denir. Bu hücreler komşu spermatogenik seri hücreleri arasındaki boşlukları dolduran böylelikle seminifer tübüllere yapısal olarak düzen veren, çok sayıda apikal ve lateral uzantıları olan prizmatik görünümde hücrelerdir (Ross ve Pawlina, 2014; Kierszenbaum, 2006; Jangueria ve ark., 2006). Spermatogenik hücreler düzenli olarak spermatogenezis geçirerek olgun sperme dönüşen hücreler olup, Spermatogonium olarak adlandırılan kök hücre görevi gören immatür spermatogenik hücreler bazal lamina üzerindedirler. Spermatid adı verilen matür hücrelerde sertoli hücrelerinin lümene bakan apikal kısımlarına tutunmuşlardır. Spermatogenezin ardından spermin son halini aldığı spermiyogenezis başlar. Spermatid fazının sonunda oluşan artık olan spermler sertoli hücrelerinin apikalinden lümene bırakılır. Peri tübüler doku adı verilen tunika propria

çok tabakalı bir bağ dokusudur ve seminifer tübülleri saran bu bağ 13 dokusu çok sayıda kan damarları, yaygın lenf damarları, seminifer tübülünün bazal laminasının dışında 3-5 tabaka miyoid hücre ve kollajen fibrillerden oluşmaktadır. Kıvrımlı yapıdaki her bir seminifer tübül sonlanırken lumeni daralır ve tubuli rekti denilen düz tübüller olarak devam eder. Bu tübüller, seminifer tübülleri rete testise bağlar. Rete testis, seminifer epitelyumun ürünleri olarak isimlendirdiğimiz testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonları toplayan kanallar ağıdır. 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmını bağlar (Ross ve Pawlina, 2014; Kierszenbaum, 2006; Jangueria ve ark., 2006).

1.2.3.Seminifer Tübüller

Çok katlı epitel hücrelerinden oluşan 30-70 cm uzunluğunda, 150-250 µm çapında tübüllerden oluşmuştur. Spermatogenez bu tübüllerde meydana gelmektedir. Tübüller arasında, bağ dokusu yapısındaki interstisiyel doku yer alır. 1-4 adet tübül bir araya gelmesiyle testis lobüllerini oluşturur. Tübüller lobülün tepesine doğru sonlanırken daralır ve düz tübüller (tubuli rekti) adı verilen kısa bölümü oluşturur (Şekil 1.3).



Şekil 1.3 Testis ve üreme yollarını gösteren şematik çizimi

(Ross, Romrell, Histoloji. A Text and Atlas, 5th ed.'dan modifiye edilmiştir.)

Tubuli rekti seminifer tübüllerin dolambaç şeklindeki birbiri ile bağlantı yapan rete testis adı verilen kanallara ba lanmasını sa lar. Rete testis 10-20 adet kanaldan oluşan duktuli efferentese ba lanır. Duktuli efferentes de duktus epididimis olarak adlandırılan 4-6 m uzunlukta kıvrıntılı bir kanal ile duktus deferense ba lanır. Duktus deferens daha sonra prostata girer. Duktus ejakulatoryus ile devam ederek prostatik üretraya açılır ( zdamar ve Sorkun, 2002). Seminifer tübüller dıştan bazal membran ile çevrili germinal epitalden oluşmaktadır. Germinal epitel, dıştan bazal lamina ile kollajen lifler ve kasılabilir miyoid hücrelerden oluşan  zelle mi  bir fibröz doku tarafından sarılmıştır. Bu fibröz dokuya peritübüler doku ya da membrana probria denir (Tekelio lu, 2002)

1.2.4.Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenez

Spermatogenik hücreler primordiyal germ hücrelerinden köken alır ve  o alıp farklılaşarak olgun spermleri oluşturur. Spermatogenik hücreler seminifer epitelyumda sıralı halde bulunur (Ross ve Pawlina, 2011). Seminifer tübülün bazal laminasının altında diploid yapıda spermatogonyum hücreleri vardır (Kierszenbaum ve Tres, 2012). Çapları 12 mikrometre olan küçük yuvarlak hücrelerdir (Mescher, 2015). Spermatogonyum hücreleri sertoli hücrelerinin sıkı bağlantıları altında olduğundan kan testis bariyerinin dışındadır. Spermatogonyumlar ergenlik döneminde mitoz ile bölünmesiyle Tip A ve Tip B spermatogonyumları oluştururlar (Kierszenbaum ve Tres, 2012). Spermatogenezin başlangıcını sağlayan Spermatogonyumların proliferasyonur (Mescher, 2015). Spermatogonyum B hücreleri mitoz bölünme geçirmesiyle primer spermatositleri meydana getirir (Ross ve Pawlina, 2011). Primer spermatositler  kromotik çekirdekli, yuvarlak hücrelerdir (Mescher, 2015). Spermatositler Sertoli hücrelerinin okludensleri üzerinde olduğu için kan testis bariyerinin içinde bulunmaktadır. Spermatogonyumlar primer spermatositlerden 2 kat daha az DNA miktarına sahiptir (Kierszenbaum ve Tres, 2012). Primer spermatositler spermatogenik hücreler arasında en büyük hücrelerdir. Primer spermatositlerin kromozomları sıkı paketlenmi tir. Öncelikle primer spermatositler sekonder spermatositleri oluşturmak için birinci mayozu gerçekleştirirler. Sonrasında sekonder

spermatisitler ikinci mayozu gerçekleştirip kardeş kromatidleri birbirinden ayırarak spermatidleri oluşturur. Sekonder spermatisitler hızlı bir şekilde ikinci mayozu gerçekleştirir ve kısa ömürlü olarak tanımlanır (Mescher, 2015). Kardeş kromatidlerin ayrılmasıyla haploid yapıda bulunan spermatidler, Sertoli hücrelerinin kriptaları içinde gömülü halde bulunmaktadır ve spermiyogenez olarak adlandırılan farklılaşmayla birlikte spermiyumları oluştururlar (Kierszenbaum ve Tres, 2012; Mescher, 2015).

1.2.5.Spermiyogenez

Spermiyogenez 4 ana yol ile gerçekleşir:

Golgi Fazı: Proakrozom granülleri glikoproteinler bakımından zengindir. Bu granüller çekirdek zarı bitişişindeki akrozomal veziküldeki membrana bağlı olarak vezikül halinde birleşir. Vezikülün içeriği artar ve büyür. Spermin ön kutbunu akrozomal vezikülün yeri belirler ve olgun sentriyoller spermatidin arka kutbuna göç eder. Distal sentriyol, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturan iki merkezi mikrotübül montajını ve dokuz periferik mikrotübül çiftlerini başlatır (Ross ve Pawlina, 2016).

Kep Fazı: Akrozomal vezikül, çekirdeğin ön yarısı üzerine yayılır ve yeniden şekillendirilen yapıya akrozomal başlık olarak adlandırılır. Çekirdek zarının akrozomal başlığın altındaki kısmı, gözeneklerini kaybeder ve daha kalın hale gelerek nükleer içerikte yoğunlaşmaya başlar (Ross ve Pawlina, 2016)

Akrozom Fazı: Spermatidin baş kısmı sertoli hücresine gömülür, kendiliğinden yön değiştirir ve bazal tabakaya doğru bakar. Gelişen flagellum, seminifer tübülün lümenine kadar uzanır ve spermatidin yoğunlaşan çekirdeği düzleşir yassı bir hal alır. Çekirdek ve akrozom ön plazma membranının yanındaki bir konuma hareket eder. Sitoplazma posterior olarak yer değiştirir. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna doğru uzanan silindirik bir kılıf halindedir ve manşeti oluşturmak için organize olurlar. Flagelumun gelişimini başlatan sentriyoller, olgunlaşmamış sentriyole çekirdeğin derin olmayan bir oluğuna bağlanmaya başlar. Sonrasında, gelişmekte olan spermilerin boyun bölgesini oluşturmak üzere modifiye

edilir. Sentriyollerden dokuz kalın lif çekirdeğe bağlanıp gelişir. Aksonem mikrotübülleri çevresindeki dış yoğun lifler kuyruğa doğru uzanır ve bu lifler nükleusu flagellum ile birleştirir. Plazma membran, büyüyen kamçıyı örtmek için posterior olarak hareket eder bu sırada manşet kaybolur. Plazma membran, mitokondri boyun bölgesindeki kaba liflerin etrafının hemen arka uzantısında sıkı, sarmal sargılı bir kılıf oluşturur ve sitoplazmanın geri kalanından göç eder. Bu bölge, sperm kuyruğunun orta parçasıdır. Fibröz kılıfın distalindeki kısa kuyruk kısmı son parça adı verilir (Ross ve Pawlina, 2016).

Olgunlaşma Fazı: Spermatid farklılaşmasının son fazı olmasıyla birlikte olgun spermatozoon oluşturmak için spermatidin çevresindeki aşırı sitoplazma azalır. Sonrasında sertoli hücreleri fazladan sitoplazmayı fagosite eder ve spermatidler birbirine bağlı halde olmayıp sertoli hücrelerinden ayrılırlar (Ross ve Pawlina, 2016).

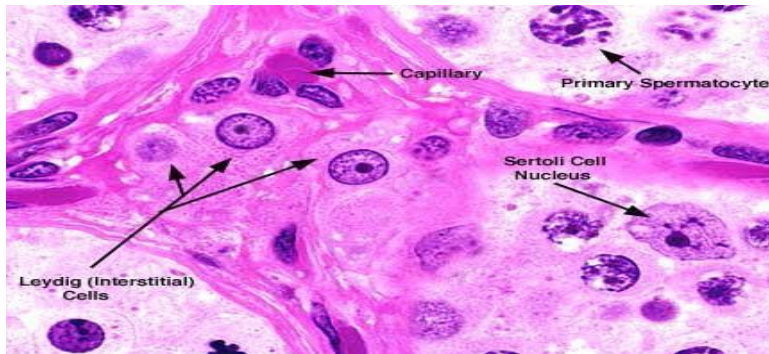
İnterstisyel Alan

İntersiyel alan testisin seminifer tübülleri arasındaki yerdir. İntersiyel alanda Leydig hücreleri, farklılaşmış bağ dokusu hücreleri, gevşek bağ dokusu elemanları olan fibroblaslar, kan ve lenfatik damarları, sinirler, mast hücreleri ve makrofajlar bulunmaktadır. Testiküler kapillerler pencere tipte olup kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine olanak sağlar. İntersiyel alanın, lenf damarlarından zengin olması bu organdan alınan intersiyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliğini açıklamaktadır (Ross ve Pawlina, 2011)

Leydig Hücreleri

1903 yılında Bouin ve Ancel tarafından spermatogenezde ve sekonder seks karakterlerinin oluşumunda görev aldıklarını ayrıca testiküler hormonları sentezledikleri rapor edilmiştir (Swerdloff ve Wang, 1993). Leydig hücreleri belirgin bir çekirdek ve 1-2 çekirdekçik içeren, büyük poligonal şekillidir. Yaklaşık olarak 15 µm çapında eozinofilik hücreler olan Leydig hücreleri; seminiferöz tübüllerin

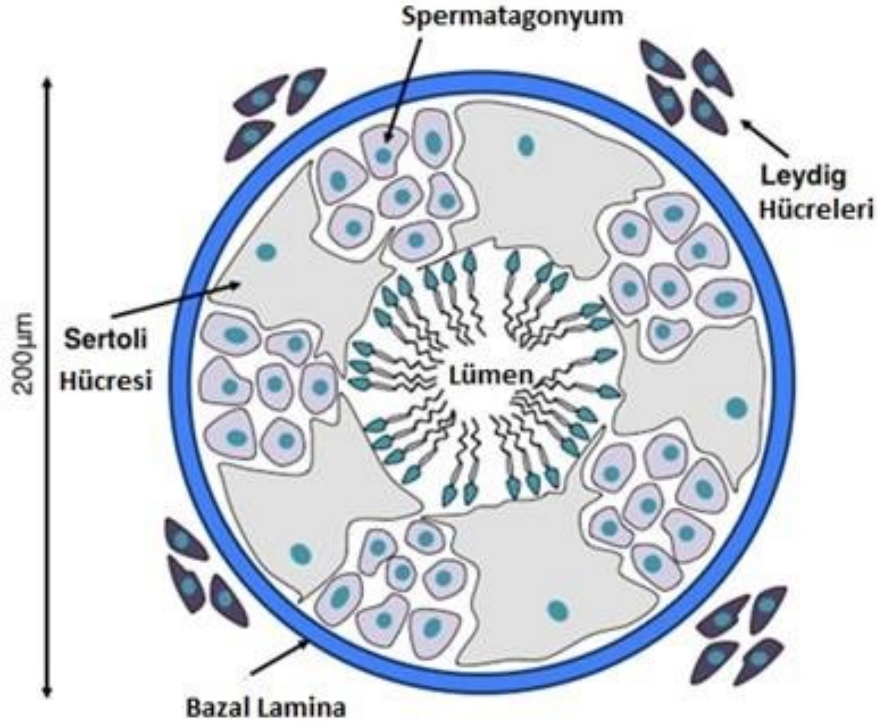
etrafındaki interstisyel alanda düzensiz hücre toplulukları şeklinde yerleşmişlerdir (Şekil 1.4). İnterstisyel alan testiküler hacmin yaklaşık %12-15'ini kaplar ve Leydig hücreleri dışında, kan damarları, sinir lifleri, lenfatikler, bağ dokusu elemanları ve makrofajları içerir (Nieschlag ve ark., 2010; Michael, Ross ve Pawlina, 2011; Leslie ve Gartner, 2011). Yetişkin sıçan testisinde yaklaşık 50X106 adet Leydig hücresi bulunur. Yetişkin insan testisinde bu sayı, 200X106 'ya ulaşmakta olup ve interstisyel alanın yaklaşık %10-20'sini oluşturur (Nieschlag ve ark., 2010 ; Simpson ve ark., 1987). Leydig hücreleri, sitoplazmalarında yaygın lipid damlacıkları, karakteristik tübüler kristallı mitokondriyonlar ve iyi gelişmiş agranüler endoplazmik retikülömlere sahiptir. İnsan Leydig hücre sitoplazmasına özgü olarak çubuk şekilli olan ve fonksiyonları henüz bilinmeyen, Reinke kristalleri olarak adlandırılan inklüzyonlar bulunur (Nieschlag ve ark., 2010; Michael ve Ross ve Pawlina, 2011 ; Leslie ve Gartner, 2011). Yapılan fonksiyonel ve morfolojik çalışmalarda, testiste testosteron ve diğer steroid hormonların üretiminden sorumlu olan Leydig hücrelerinin, fetal hayattan yetişkinliğe kadar, 2 ayrı hücre hattından yani fetal ve yetişkin Leydig hücre popülasyonundan geliştiği bildirilmiştir (O'Shaughnessy ve ark ., 2006; Lording ve De Kretser, 1972; Habert, Lejeune ve Saez, 2001; Chen ve ark., 2009). Fetal Leydig hücreleri, androjen üreterek fetusun maskulinizasyonunda rol oynar ve yetişkin Leydig hücreleri tarafından sentezlenen androjen; spermatogenez, cinsel dürtüler ve erkek sağlığı için oldukça önemlidir (O'Shaughnessy ve ark., 2006; Lording ve De Kretser, 1972; Habert ve ark., 2001; Chen ve ark., 2009).



Şekil 1. 4 İnterstiyeel alan ve leydig hücreleri (Michael ve Ross,2011)

Sertoli Hücresi

Destek hücreleri olarakta bilinen Sertoli hücreleri, seminifer epitelin bazalinden lümenine doğru uzayan, prizmatik hücrelerdir (Johnson, 1991; Hess ve França, 2005). Sertoli hücresi, tübüller arası boşluk ve seminifer tübüller arasında köprü hücreler olarak görev yapar (Kierszenbaum, 2006). Sertoli hücresinde ökromatik iri bir nükleus, bir veya daha fazla belirgin nükleolus, bol miktarda düz yüzlü endoplazmik retikulum (DER), iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda lizozom ve mitokondriler bulunur. Aynı zamanda glikojen, lipit damlacıkları ve albumin kristalleri de mevcuttur. Dayanıklı yapıda ki bu hücreler, vimentin, aktin ve mikrotübüllerden oluşan zengin bir hücre iskeletine sahiptir (Hess ve França, 2005; Tanyolaç, 1999). Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelyumun dominant hücre tipidir. Puberteden sonra, seminifer tübülleri döşeyen hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. Daha ileri yaştaki erkeklerde spermatogenetik hücre popülasyonu düştüğü zaman, sertoli hücreleri tekrar epitelin ana elemanı haline gelir. Sertoli hücrelerinin fonksiyonları, gelişmekte olan spermatogenetik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemektir. Ayrıca, spermatogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan rezidual (artık) cisimcikler olarak adlandırılan fazla hücre kısımlarını fagosite etmek, olgun spermatidlerin aktin aracılı kasılmalarla, seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak ve seminifer tübül lümenine proteinler ve iyonlardan zengin bir sıvı yaymaktır (Şekil 1.5). Sertoli hücreleri folikül sitümüle hormon (FSH) uyarımına cevap verirler. FSH, androjen-bağlayıcı protein (ABP) sentezini ve sekresyonunu düzenler. ABP testosteron ve dihidrotestosteron androjenlerine yüksek bağlanma afinitesinde olan bir salgısal proteindir. Androjen-ABP kompleksinin fonksiyonu henüz bilinmemekle birlikte, bu kompleks epididimisin proksimal kısımlarına taşınır. Sertoli hücreleri inhibin ve aktivin alt ünitelerini (α ve β alt üniteleri) salgırlar. İnhibin ($\alpha\alpha$ heterodimeri) hipotalamus ve ön hipofizden salınan gonodotropin salgılayıcı bir faktördür ve FSH üzerine negatif feedback (geri etki) bir etki gösterir. Aktivin ise ($\alpha\alpha$ veya $\beta\beta$ homodimer) FSH salınımı üzerinde pozitif bir etki gösterir. Sertoli hücreleri puberteden sonra postmotiktir. Erişkin testisinde mitotik hücre bölünmesi gözlenmez (Kierszenbaum, 2006).



Şekil 1. 5 Seminifer tübülün şematik gösterimi (Kierszenbaum, 2006).

1.2.6. Testis İçi Genital Kanallar

Testis içi genital kanallar; tubuli rekti, rete testis ve duktus efferentes, olarak bilinmektedir.

Tubuli rekti

Seminifer tübüllerin bir çoğu loplu bir yapıya sahip olup, bu tübüllerin her iki ucu tubuli rekti adı verilen ve dallanma göstermeyip düz olan tübüllerle rete testise bağlanır. Tubuli rekti, testisin mediastinumunda yer alan tubuli rektide spermatogenik hücrelerin dereceli olarak kaybolması nedeniyle tübüllerde sadece sertoli hücreleri bulunmaktadır. Tubuli rektinin başlangıç kısmı sıkı bağ dokusu yapısında olan bir

kılıfı ile desteklenmesiyle beraber kübik epitelyum ile döşeli ana kısım ile devam etmektedir (Jangueria ve ark., 2006).

Rete testis

Rete testis apikal yüzeyi mikrovilluslar ve tek bir sil içeren kübik epitel ile döşelidir. Tubuli rekti mediastrimun vasküler bağ dokusu içerisinde oldukça karmaşık bir yapıyla birbirlerine bağlanan kanallarlardan oluşan rete testisin içine boşalır. Rete testise ulaşan spermelerin kuyruklarında zayıf bir titreşim hareketi gözlenmektedir (Ross ve Pawlina, 2014; Jangueria ve ark., 2006).

Duktuli efferentes

İnsanda yaklaşık olarak 20 adet duktuli efferentes bulunmaktadır ve bunlar mediastinumun süperiör uçundaki rete testisin kanallarını duktus epididimisin proksimal parçasına bağlarlar. Testisten çıkan duktus efferentes son derece kıvrımlı bir hal alırken 6-10 adet konik kütle oluşturan yapıları ile epididimisin baş kısmını oluşturup koni vaskülozi adını almaktadır (Ross ve Pawlina, 2014). Duktuli deferentes luminal yüzeye testere dişi görünümü veren yalancı çok katlı prizmatik epitelyum ile döşelidir. Epitelyal kök hücre olarak görev yapan bazal hücreler prizmatik hücreler arasında bulunurlar. Prizmatik hücreler silyumlu olup silyum bulundurmayan prizmatik hücrelerde ise çok sayıda mikrovillus apikal yüzeyde invaginasyonlar, pinositotik veziküller ve endositotik yapı ile ilişkili diğer sitoplazmik içerik bulundurmaktadır. Duktuli efferenteste silyasız hücreler tarafından seminifer tübüllerden salgılanan sıvının çoğu geri emilir. Spermiyumların epididimise doğru süpürülmesi silyalı hücrenin sağlamış olduğu sıvı akımı ile olmaktadır. Duktuli efferentes tübülleri epididimise doğru ilerledikçe birleşip epididimisin duktus epididimisini oluşturur (Ross ve Pawlina, 2014; Jangueria ve ark., 2006; Kierszenbaum, 2006).

1.2.7.Genital Boşaltım Kanalları

Spermiyumları penil yollara doğru taşıyan kanallar duktus epididimis, duktus deferens (vas deferens) 'dur

Duktus epididimis

Duktus epididimis ve duktus deferens ikisi beraber epididimisi oluşturmaktadır olup, duktus epididimis bol kıvrımlı bir yapıya sahiptir ve yaklaşık 4-6 µm uzunluğunda bir yapıdan oluşmaktadır. Epididimis üç ana bölüme ayrılır; baş, gövde ve kuyruk. Baş kısmını duktus deferens oluştururken gövde ve kuyruk kısmını duktus epididimis oluşturmaktadır. Testiste yeni üretilmiş ve epididimise giren sperm, duktus epididimiste ilerlerken hareket ve fertilizasyon yeteneği kazanır böylece artık epididimisin son kısmında toplanan sperm, ileri doğru hareket yeteneği göstermektedir. Duktus epididimis yuvarlak bazal hücreler ile birlikte stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitelle döşelidir. Bu hücrelerin üzerine oturdukları bazal lamina, düz kas hücreleri ve kan kapillerlerinden zengin bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Prizmatik esas hücrelerinin yüzeylerinde bulunan stereosilyalar, epididimin baş bölgesinde dallanmalar göstermektedir. Stereosilyalar uzun olup kuyruk bölgesinde bulunan prizmatik hücrelerin stereosilyaları ise daha kısadır. Prizmatik esas hücreler, lizozom ve iyi gelişmiş bir golgi aygıtı içermektedir. Epididimis içerisinde eferent kanalcıklarda ve duktus epididimisin esas hücreleri tarafından testiküler sıvının yaklaşık %90' ı emilmektedir.

Bazal hücreler ise bir kök hücre görevi üstlenerek esas hücrelerin farklılaşmamış öncülleri olarak bilinmektedir ve epitelyum içerisinde halo hücreleri olarak isimlendirilip göç eden lenfositler bulunmaktadır. Duktus epididimisin bağ dokusunda bulunan düz kasların peristaltik hareketleri ile spermin hareket yeteneğini kazanmasını sağlayana kadar kanallar boyunca ilerlemesi sağlanmış olur (Ross ve Pawlina, 2014)

Duktus deferens

Duktus deferens bir diğer adı ile vas deferens spermin izlediği yolun en uzun boşaltım kanalı olarak bilinmektedir. Yapısı kalın müköler duvarlı olup epididimisin kuyruk kısmının düz bir tüp olarak devamını oluşturarak prostatik üretraya açılır. Duktus

deferentesin en bilindik özelliği dar kalın bir düz kas tabakaya ve bir lümene sahip olmasıdır. Vaz deferens yüzeyi yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşeli olmasıyla birlikte epitelyum hücrelerin yüzeyi stereosilyalıdır ve elastik liflerden zengin bağ dokusu lamina propriayı oluşturmaktadır. Dışta ve içte longitudinal, ortada sirküler kalın bir kas tabakasından oluşmuştur. Duktus deferens spermatik kordonun bir parçasıdır ve prostata girmeden önce genişleyip ampulla denilen kısmı oluşturur. Bu alan epitel kalınlaşması ve fazla sayıda kıvrımlar yapması ile bilinmektedir. Ampullanın son kısmında seminal veziküller duktusa katılırlar (Junqueira ve Carneiro, 2003).

1.2.8.Yardımcı Üreme Bezleri

Erkek üreme sisteminin yardımcı üreme bezleri; Veziküla seminalis, prostat bezi ve bulboüretal olarak bilinmektedir. Veziküla seminalis ve prostat androjenlerin kontrolü altında seminal sıvının çoğunu üretir (Junqueira ve Carneiro, 2003).

Veziküla seminalis

Veziküla seminalis diğeri bir değışle seminal veziküller, mesanenin posteriyoründe, duktus deferentesin ampullasına paralel olarak konumda bulunmaktadır. Seminal veziküller iki adet yaklaşık 15 cm uzunluğunda ve yüksek oranda katlantılı tübüler bir bezdir (Ross ve Pawlina, 2014). Salgı histolojik yapısına bakıldığında, tek katlı kübikten yalancı çok katlı prizmatığe doğru değışen ve protein sentezleyen hücre yapısına sahip bir epitel ile örtölüdür. Granüllerinde zengin epitelyum katlantılı mukoza kıvrımları içermektedir. Veziküla seminalisin lamina probriasi elastik liflerden zengindir ve dairesel, uzunlamasına düz kas tabakaları ile çevrili olup salgısı visköz beyazımsı sarı renktedir. Bu salgı Sperm aktivitesi için gerekli olan fruktozdan zengindir ve sitrat, inositol, prostaglandinler gibi çeşitli proteinleri de içermektedir. Veziküla seminalis tarafından üretilen androjenlerin kontrolü altında ve seminal sıvıya salgılanan fruktoz gibi karbonhidratlar sperm hareketleri için gerekli enerji kaynağını

oluşturdukları gibi insan ejakülatının %70' ini oluşturmaktadır (Junqueira ve Carneiro, 2003; Ross ve Pawlina, 2014).

Prostat

Prostat, erkek üreme sisteminin en büyük yardımcı üreme bezi olup büyüklüğü ve şekli ceviz benzemektedir. Prostat dallanmış, 30-50 adet tübüloalveoler bezden oluşmaktadır. Bu bezlerin kanalları ise prostatik üretraya açılır. Seminal sıvı oluşumuna katkı yapmak prostat bezinin ana görevidir. Yetişkin prostat parankimi, santral zon denilen merkezi bölgedir ve prostat bezinin içerisinden geçen ejakulatuar kanalını sarmaktadır. Bu bez dokusu %25' ini oluşturur. Merkezi zon yalancı çok katlı bir epitel ile döşelidir. Ayrıca ikinci olarak periferik zondan söz edilmektedir. Prostat bez dokusunun %70' ini periferik zon oluşturmaktadır ve epiteli daha düzgündür. Prostat kanserinin geliştiği bölge başlıca periferik zondur. Bölgelerden bir diğeri de transizyonel (geçiş) zonudur ve prostatik üretrayı çevrelemektedir. Bu zon prostat bezinin %5' lik kısmını oluşturmaktadır ve son olarakta periüretral yani mukozal ve submukozal bezleri içeren zon bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2014; Junqueira ve Carneiro, 2003). Prostatik bezlerin lümeninde çoğunlukla glikoproteinden zengin 0,2-2 mm küçük yuvarlak cisimcikler bulunmaktadır. Bu cisimcikler prostat taşları olup korpora amilasea olarak adlandırılır. Sayıları yaşla birlikte artar ve çoğunlukla kalsiyum birikmesi ile oluşan kireçleşmiş bu cisimciklerin işlevleri tam olarak bilinmemektedir. Prostat bezi, fibrinolizin, sitrik asit, prostatik asit fosfataz (PAP) ve prostat spesifik antijen (PSA) salgılar. Hücreler çok miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve golgi kompleksine sahip olup salgı ürünleri prostat- spesifik asit fosfataz, amilaz prostat-spesifik antijen ve semenin likefaksiyonunda rol alan fibrinolizin içermektedir. Prostatın salgısı asidik olup pH değeri 6,5 'dur. (Junqueira ve Carneiro, 2003; Ross ve Pawlina, 2014).

Bulboüretal bez

Cowper bezleri bir diğ er adı ile Bulbo retal bezler, ürogenital diyaframda yer almaktadır. Çapları 3-5 mm olan küçük boyutlu yapılardır ve bu bezler preseminal sıvıyı salgılayan tek katlı k  bik epitele sahip olan t  b loalveoler bezlerdir. Bulbo retal bezler salgılarını penil üretraya boşaltırlar. Preseminal sıvı, çok miktarda galaktoz, sialik asit, alaktozamin galakturonik asit, metilpentoz içerir. Bu sıvı kayganlaştırmacı bir fonksiyona sahiptir (Junqueira ve Carneiro, 2003; Ross ve Pawlina, 2014).

Penis

Korpus kovernozom iki erektile doku k  tesidir. Korpus spongiozum ise bir ventral erektile doku k  tesi olup penisi oluşmaktadır. Üretranın spongiozum parçası korpus spongiozumun içinde yer alır. Tunika albuginea ile birbirine bağlanmış bu üç yapı yine tunika albugineanın oluşturduğu bir kapsüle sarılmıştır. Korpus kavernozom ve korpus spongiyozom, bir arterle beslenip venöz). Kanallarla boşaltılan sinüzoidleri içerir. Korpus kovernozomun düzensiz şekilli vasküler boşlukları düz kas tabakası ile sarılmıştır. Tunika albuginea içerisinde birleşerek korpus kovernozomda çapraz geçiş yaparak bu düz kas demetleri trabek laları oluşturur ve düzensiz vasküler boşlukları saran subendotelial yastıkları bulunmaktadır. Prostadın intersitisyel dokusunda çok sayıda sinir sonlanmaları ve lenf damarları bulunması ile ereksiyon sırasında penise kan akışını arttırması için genişleyerek Helisin arterlerinin kan ile dolmasıyla vasküler boşlukların sertliği ve boyutları artmaktadır. Penis ince bir deri ile çevrelenmiştir. Penisin ince olan derisi glans penis hariç alttaki gevşek bağ doku ile gevşek bir şekilde bağlı durumdadır. Glans peniste deri oldukça incedir olup bağ dokusuna sıkıca bağlıdır (Ross ve Pawlina, 2014)

1.3.Testis Embriyolojisi

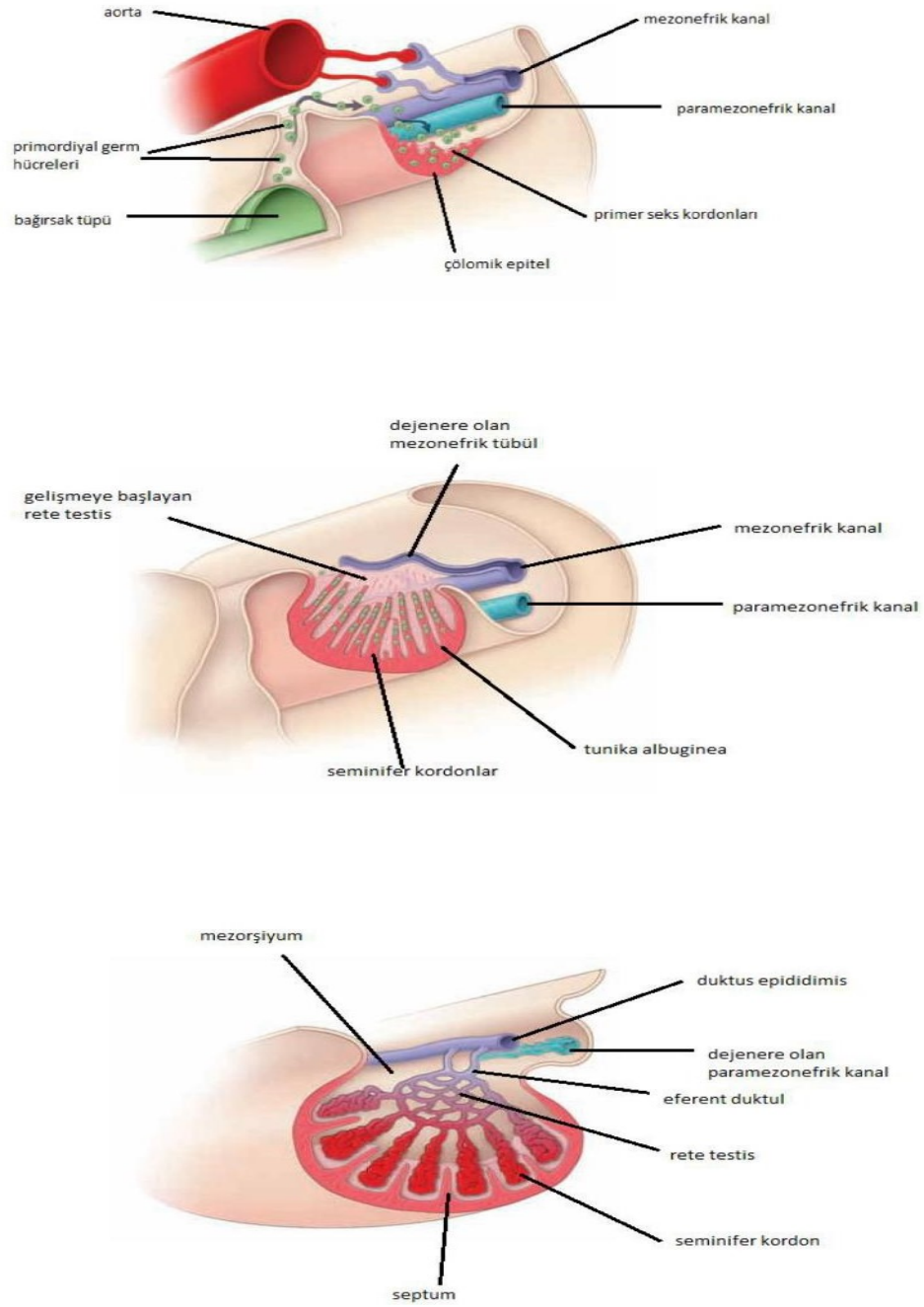
1.3.1.Primordiyal Germ Hücrelerinin Göçü

Primordiyal germ hücreleri allontois orijinine yakın olan yolk kesesinin endodermal hücrelerinden köken alır (Moore ve ark., 2016). 4. haftada primordiyal germ hücreleri mezenterin dorsali boyunca yol alır ve 5. haftada primitif gonadlara ulaşır. Sonrasında 6. Haftada genital kabartılara yerleşirler (Sadler, 2005). Primordiyal germ hücreleri, primitif gonadlara ulaşmadan önce ve ulaştığında genital kabartının endodermal hücreleri ve çöломik mezotelyum hücreleri çoğalarak mezenşime gömülürler ve primitif cinsiyet kordonlarının oluşumunu indükler (Sadler, 2005; Ross ve Pawlina, 2016).

1.3.2.Testis Oluşumu

Döllenme sırasında Y kromozomunun olup olmaması durumunda genetik cinsiyet belirlenir. Gelişimin 7. haftasına kadar testisler gelişmez. Gonadal cinsiyet, Y kromozomun kısa kolunun cinsiyet belirleyici bölgesinde bulunan SRY geninin varlığı ile belirleyip SRY geni tarafından kodlanan testis belirleyici faktörün (TDF) moleküler bölgesi, DNA'nın spesifik bölgesine bağlanarak DNA'nın yapısını değiştirir. Yapısı değişen DNA halka şeklini alarak diğer transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasına da yardımcı olmuş olur. Bu bağlanan transkripsiyon faktörler de testis ve diğer erkek cinsiyet organlarının gelişiminde rol alır (Ross ve Pawlina, 2016). Testis belirleyici faktörün kodlanması ile primitif cinsiyet kordonları proliferasyon olarak medullanın içine doğru yol almaktadır. Artan kordonlar, ağ oluşturarak hilusa dağılır ve rete testis tübüllerini oluşturur. İlerleyen evrelerde fibröz bağ dokusu olan tunika albuginea, testis kordonları ile yüzey epiteli arasına girip birbirinden ayırır (Şekil 1.6). Gelişimin 4. ayında kordonlar at nalı şeklini alarak uçları rete testis ile birleşmektedir. Testis kordonları farklılaşmaya başladığı zaman kordonların arasında bulunup mezenşimden köken alan Leydig hücreleri de gelişir. 8. haftada gelişen Leydig hücreleri testosteron üretimine başlarlar. Ekspres olan testosteron, genital kanal ve dış genital organların

gelişimini etkileyip lümeni olmayan testis kordonları pubertede lümene olacak şekilde seminifer tübüllere dönüşürler. Seminifer tübüller, rete testis ile birleşerek duktuli efferentese bağlanır. Sonrasında duktuli efferentes, mezonefrik kanalları birbirine bağlayarak duktus deferens oluşturur (Sadler TW, 2005).



Şekil 1. 6 Testis gelişim evreleri şematik gösterimi (Sadler TW, 2005)

1.4.Testis Fizyolojisi

Erkek üreme sisteminin fonksiyonlarının esas görevi spermatozoon'la spermatogenesis'i oluşturmaktır. Ayrıca spermatogenesis için gerekli olan testosteron hormonunun salgılar. İnterstial alanda yerleşmiş olan Leydig hücreleri tarafından testosteron hormonu testislerde salgılanır. Bu hormon sperm yapımındaki germinal hücrelerinin bölünmesinde ve gelişiminde gereklidir. Testis içindeki a.testicularis ve v.testicularis'ler birbirlerine paralel bir şekilde bulunmaktadır, bu şekilde olması ters akım halinde olup, testosteron ve ısı alış verişini sağlar. Testislerin scrotum'da asılı olması sayesinde sıcak havalarda gevşeyip sarkması ve soğuk havalarda m.cremaster kasının kasılmasıyla vücuda yaklaşarak testisin ısı değişkenlerinden ve diğer etkenlerden etkilenmesini önlemiş olur. Bu durumlar sperm oluşumu için oldukça önemlidir (Tosun, 1998; Guyton ve Hall, 2006; Ganong, 1999).Folikül uyarıcı hormon (FSH) hipofiz bezinden salgılanıp Sertoli hücrelerini uyarır. Fakat uyarı olmadan spermatogenesis olayı gerçekleşmez. Hipofizden salgılanan Luteinizan hormonu da (LH), Leydig hücrelerini uyararak testosteron salınımını sağlar (Guyton ve Hall, 2006; Berne ve ark., 2008). Yardımcı bezlerden salgılanan sıvı içinde bulunan spermin beslenmesini sağlayan fruktoz, uretral ve vaginal asiditeyi nötrleştiren alkali ortam ve fosfolipidler semen içinde spermin hareketini artırıcı etki göstermektedirler. Semen 3-4 ml boyutundadır, içerisinde ortalama 300-500 milyon sperm bulunmaktadır. Semen pH'ı yaklaşık olarak 7,5 civarında olup yapısında bulunan hiyalüronidaz enzimi vaginanın muköz salgısını eritip, sperm hareketlerini artırıcı etki yapmaktadır (Guyton ve Hall, 2006; Noyan, 1993). Sperm akrozomunda bol miktarda hiyalüronidaz ve proteolitik enzimler depolanmaktadır. Hiyalüronidaz, granüloza hücrelerindeki hücreleri bir arada tutan hiyalürinik asit polimerlerini monomerlerine ayırır. Proteolitik enzimler de yumurtaya bağlı olan yapısal elemanların proteinlerini sindirir. Ovum fallop tüplerine atıldığında etrafında fazlaca granüloza hücre tabakası bulunur ve sperm ovuma ulaşmadan önce hücre tabakasını geçmek zorundadır. Sonrasında ovumun çevresinde zona pellusida denilen kalın örtüyü delmelidir. Bu enzimler sperm'in ovuma ulaşması için önemli enzimlerdir ve ilk sperm ovuma girdikten sonra, oosit zarlarından kalsiyum salınımı başlayıp buna bağlı birçok kortikal

granül ekzositozla oositten perivitelin boşluğuna bırakılır. Bu granüllerde daha fazla spermin oosite girmesini engellemiş olur (Guyton ve Hall J, 2006).

1.5.Kadmiyum

Kadmiyum (Cd) önemli bir çevresel ve endüstriyel kirleticilerden biri olup, canlılar üzerinde çeşitli toksik etkileri olduğu bilinmektedir (Tekelioğlu, 2002). Kadmiyum, çinko (Zn) üretimine eşlik eden bir metal olarak üretilmiştir ve çinko üretiminde kullanılıncaya kadar havaya, yiyeceklere ve suya doğal süreçlerle önemli miktarlarda karışmamasına rağmen günümüzde kadmiyum da çevre kirliliğine sebep olan ağır metaller arasında yerini almıştır (Elinder ve Piscator, 1978; Sab Dart, 1996). Metal alaşımları halinde pillerin, plastik maddelerin ve pigmentlerin yapısına giren kadmiyum organizmada pek çok toksikolojik etkiye sahiptir (Ughey ve ark.,1984; Habeebu ve ark., 1998). Kadmiyumun çevresel miktarında son birkaç yüzyıl içinde önemli derecede artış göstermesinin önemli nedenlerinden biri de, biyolojik yarılanma ömrünün oldukça uzun olmasıdır (Elinder ve Piscator 1978; Suzuki, 1984; Koçak, 2004). Kadmiyum, düşük konsantrasyon da bile biyolojik sistemler üzerinde son derece zararlı bir etkiye sahiptir. Kadmiyum toksisitesinin moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Bu metalin organizmadan atılımı için herhangi bir vücut mekanizması olmadığından dokularda birikim gösterir (Sultan ve ark., 1998). Çoğu metallerde olduğu gibi kadmiyum için de esas hedef organ karaciğer olmasına rağmen, bu toksik metalin böbrek, akciğer, duodenum, pankreas, kemik ve testis dokularında birikip, sitolojik ve histolojik hasara sebep olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Merian ve Weinheim, 1991; Gavett ve Oberdorster, 1994). Deneysel ve çevresel olarak bu metale maruz kalınması halinde testis atrofisi, infertilite, böbrek fonksiyon kaybı, karaciğer hasarı, solunum ve sindirim sistemi bozuklukları ve anemi gibi ciddi rahatsızlıklar oluşmaktadır. Kadmiyumun çeşitli hücrelerin ince yapısı üzerindeki toksik etkileri ise çekirdek membran hasarı, kromatin yoğunlaşması, mitokondri kristallerinde hasar ve sonunda hücre ölümüdür (Kalay ve Karatas,1999; Hamada, ve ark., 1997).Kadmiyumun üretimi ve kullanımı arttıkça sadece endüstride çalışanlar değil, aynı zamanda genel popülasyon da kadmiyumun

toksik etkisine maruz kalır. Kadmiyum diğer ağır metallere karşılaştırıldığında suda çözünme özelliği en yüksek olan elementtir. Bu nedenle doğada yayılma hızı yüksektir ve insan yaşamı için gerekli elementlerden biri değildir. Suda çözünabilir özelliğinden dolayı Cd^{+2} halinde bitki ve deniz canlıları tarafından biyolojik sistemlere alınır. Kadmiyumun canlılar üzerindeki toksik etkilerinin mekanizması günümüzde hala tartışmalı olup yoğun olarak araştırılmaktadır.

Tarım sektöründe yaygın ve kontrolsüz sentetik gübre kullanımı ve bunun yanı sıra seracılıkla üretilen sebze ve meyvelerin, kadmiyumla kirlenmiş topraklarda yetişen tahılların, sanayi ve diğer atıklarla kirlenen sularda beslenen su ürünlerinin, kadmiyumla kirlenmiş içme sularının, memeli hayvanların karaciğer, böbrek gibi iç organlarının tüketimi, hava kirliliği, kahve, çay, kömür yakılması, yüksek sigara bağımlılığı oranı ve buna bağlı yüksek oranda pasif içicilik göz önüne alındığında toplumumuzun hem gıdalarla hem de solunum yoluyla büyük ölçüde kadmiyum toksisitesi tehdidi altında olduğu açıkça bilinmektedir. Kadmiyumun yıllık doğaya yayılma miktarı 25.000–30.000 tondur ve bunun 4.000–13.000 tonu insan faaliyetlerine bağlı olarak ortaya çıkar (Tekelioğlu, 2002; Hamada, ve ark., 1997).

1.5.1.Kadmiyumun Çevreye Etkisi

Üretimi 1900’lü yıllardan günümüze 20.000 kat artan kadmiyumun %77’si nikel-kadmiyum pil, %11’i pigment, %8’i kaplama ve %4’ü de diğer endüstriyel ürünlerin üretimi için kullanılmaktadır (Nordberg ve ark., 2005)

Kadmiyum ve bileşikleri; pigment ve boya üretimi, matbaacılık, tekstil, fotoğrafçılık, florasan lamba üretimi, mücevhercilik, oymacılık, otomobil sanayisinde ve başta domuzlar olmak üzere evcil hayvanların askariasislerine karşı antihelmintik olarak kullanılırken, pestisitler, yarı iletkenler de bulunmaktadır (Kaya ve Akar, 2002; Olabarriete ve ark., 2001). Kadmiyumun nikel alaşımı yapılarak alkali pillerin üretimi, plastik madde üretimi, lehim üretimi, kadmiyum kaplamalı mutfak malzemeleri ve galvanoplastide kullanılmaktadır (Casalino ve ark.,2002). Sentetik polimer yapımı, cam sanayi, çinko yapımı, yan ürün olarak kurşun ve çinko

rafinerilerinde, fosfatlı gübrelerde, petrokimya ve çelik endüstrisinde, motorlu araç ve uçak endüstrilerinde ve seramik yapımında kullanılır (Bereket ve Yücel, 1990). Kadmiyum motorlu taşıtların akümülatör ve karbüratörlerinde alaşım olarak bulunur ve yanma ürünü şeklinde dışarıya atılır. Kadmiyum, motor yağının yanması ve lastiklerin aşınması sonucu atmosfere yayılmaktadır (Bereket ve Yücel, 1990). Önemli bir kadmiyum kaynağı da sigaradır. Bir sigara 1-2 µg kadmiyum içerir ve bunun %10'u solunumla alınır. Günde bir paket sigara içmek günlük kadmiyum alınımini iki katına çıkarmaktadır (Goyer, 1996). Kadmiyum tütün yapraklarında birikmektedir. Yetişkinler için ulusal geometrik ortalama kan kadmiyum düzeyi 0.47 µg / L'dir. Sigara içenler için ortalama kan kadmiyum düzeyleri 1.58 µg/L gibi yüksek bildirilmiştir. İnsanlarda haftalık olarak alınmasına izin verilen kadmiyum miktarı 400-500 µg (veya 50- 150 µg/gün) olarak sınırlandırılmıştır (Kaya ve Akar, 2002). İlk olarak 1817'de bulunan bu element, sık olarak kullanılmadığı için elli yıl sonra birinci dünya savaşında kalay metalinin yokluğu nedeniyle kadmiyum kalayın yerini almış ve besin kaplarının kaplanmasında kullanılmıştır (Merian, 1991 ve Ihan, 2003). Ancak asit özellikteki besinlere geçen kadmiyumun insan ve hayvanlarda zehirlenmeye yol açması nedeniyle kısa zamanda kullanımı bırakılmıştır. İkinci dünya savaşında yine kalay yokluğu kadmiyumun konserve kaplarda kalay yerine kullanılmasına yol açmıştır. Yeniden ortaya çıkan zehirlenme olayları ile kullanımı yasaklanmıştır. Buna rağmen kadmiyum hala endüstride birçok alanda kullanılmaktadır (Karataş, 1998; Friberg, 1984). 1946'da Japonya'da " tai-itai" hastalığı adı verilen epidemik olayın Japonya'da kurşun ve kadmiyum filizlerinin çıkarıldığı maden ocaklarının atıklarının Jintzu nehrini kirletmesi sonucu ortaya çıktığı belirlenmiştir. Bu hastalık, nehrin civarında yaşayan halkın sulama ve içme suyu olarak nehirden yararlanmasının sonucunda, suyu kirleten kadmiyum ve kurşunun besin zinciri ile (pirinç, bakla gibi), burada yaşayan insanlara ulaşmasıyla ortaya çıkmıştır. Yıllar sonra " tai-itai", "ouch-ouch" veya "çok ağrılı" anlamına gelen şiddetli romatizmal ağrılarla dikkati çeken olay kendini göstermiştir (Merian, 1991). Kadmiyum zehirlenmesinin neden olduğu anlaşılan bu olay birçok epidemiyolojik çalışmalara yol açmıştır. Kadmiyumun biyolojik yarılanma ömrünün uzun olması nedeniyle biyoakümülyasyonu ile toprakta kontaminasyon meydana gelmektedir. Kadmiyum ve kadmiyum bileşikleri, 1993

yılında IARC (Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı) tarafından insan için karsinojenik olarak (Grup I) sınıflandırılmıştır.

1.5.2.Kadmiyumun Organlar Üzerine Etkisi

Kadmiyuma maruz kalan işçilerde sıkça görülen kadmiyum nefrotoksitesinin en erken bulgusu düşük moleküler ağırlıklı proteinüri formunda, tübüler disfonksiyondur. Ancak proteinürinin derecesi zaman ile değişmektedir. Kadmiyumun indüklediği tübüler proteinürinin, birçok işçide en azından birkaç yıl süreyle geri dönüşümsüz olduğu ileri sürülmüştür (Taylor ve ark., 1993).Kadmiyum, DNA kırılmalarına ve lipid peroksidasyona neden olabilir. Yapılan çalışmalarda, kadmiyum toksisitesinin proksimal tübülüs hücrelerinde apoptoza yol açtığı gösterilmiştir. Kadmiyumun önemli nefrotoksik etkilerinden birisi de, tübüler hücre nekrozu ve inflamasyonu sonucu intersitisyel fibroze neden olmasıdır (Suzuki,1980). Kadmiyum böbreklerden sonra en yüksek konsantrasyonda karaciğer birikim gösterdiğinden, hepatotoksik etkilerinin belirlenmesi de oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda çevresel kadmiyum maruziyetinde, kadmiyum ile ilişkili karaciğer enzim yüksekliği ya da serum albümin düşüklüğü saptanmamıştır (Yamano, 1998). Kadmiyum toksisitesinin karaciğerdeki erken bulgularından biri de, mitokondriyal fonksiyonun bozulmasıdır (Hamada ve ark., 1997). Kadmiyumun mitokondri üzerine toksik etkisi, mitokondriyal iç zarın geçirgenliğinin artışından daha çok, kadmiyumun karaciğer hücrelerinde glutatyon miktarını artırmasına ve glutatyon peroksidaz aktivitesini azaltmasına bağlanmaktadır. Kadmiyum, hücre lizozomları içinde birikmektedir ve lizozomal zarın bütünlüğünün bozulmasına neden olmaktadır. Lizozomal proteazların ve fosfolipazların salınması, hepatosit sitotoksitesine neden olan bir dizi olaylar zincirini başlatmaktadır. Akut olarak yüksek dozda kadmiyum içeren gaz karışımlarına maruz kalmak ölümcül seyreden akut kimyasal pnömoniye neden olabilir. Ancak kronik kadmiyum maruziyetinin solunum sistemi üzerine etkileri daha önemli gibi görünmektedir. Toplumda sigara kullanımı, sürekli ve düşük doz kadmiyum maruziyetinin en önemli nedenidir. Kadmiyumun gerek sigara kullanımı ile gerekse mesleki risk grubunda çalışanlarda solunum yolu ile kronik olarak alınması,

solunum sisteminde zararlı etkilere neden olmaktadır. Bu hasarın şiddeti ve oluşma zamanı, kadmiyumun alınan dozuna ve süresine bağlıdır ve genellikle yıllar içinde ortaya çıkar. Kadmiyum endüstrisi çalışanlarında burun, farinks ve larinkste kronik inflamasyon geliştiği bildirilmiştir (Frıberg ve ark., 1986). Kadmiyuma maruz kalan işçilerde ve sigara kullanıcılarında kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOA) sıklıkla görülmektedir. Bu hastalarda, amfizemin varlığı gerek klinik gerekse radyolojik olarak da gösterilmiştir. Kadmiyum aracılıklı apopitoza, Clara hücreleri ve tip II hücrelerin duyarlı olduğu ve bu apopitotik etkinin p53 ve Bax genlerindeki artış ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Habeebu ve ark., 1998).

Kadmiyum maruziyeti nedeniyle oluşan kalsiyum metabolizma bozuklukları ve kemik hastalıkları, normal çevresel maruziyetin olduğu Japon toplumunda görülmektedir ve Itai-itai hastalığı olarak adlandırılmaktadır. Bu hastalığın ana özellikleri, ağırlı kemik kırıklarına eğilim yaratan osteomalazi, osteoporoz ve böbrek tübüler disfonksiyondur. Kadmiyum, kalsiyum fosfat ve vitamin D metabolizmasını bozarak kemikler üzerine etkili olabilmektedir. Kadmiyuma maruz kalan işçilerde kemik metabolizma bozuklukları olduğu bildirilmiştir. Bu kişilerde kadmiyuma bağlı osteomalazi görülebilmektedir. Kronik kadmiyum maruziyetinin, kemik kütlesinin azalmasına, kemik kırılmalarının insidansının artışına neden olduğu gösterilmiştir (Ohta ve ark., 2000). Yapılan histolojik çalışmalarda, kronik kadmiyum uygulanmasının kemiklerde Havers kanallarında dilatasyona, perisellüler sahanın ve metafizyal kortikal kemik içine doğru hiperplastik kemik iliğinin genişlemesine neden olduğu saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda kronik kadmiyum maruziyetinin, özellikle yaşlı kadınlar başta olmak üzere her iki cinste de osteoporoz ve osteoporoza bağlı kemik kırıkları riskinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Ohta ve ark.,2000).Böbrek ve karaciğerin yanı sıra kadmiyum kalpte de depolanmaktadır. Ancak böbrek ve karaciğerle karşılaştırıldığında, kalp dokusundaki kadmiyum konsantrasyonu nispeten düşüktür. Düşük konsantrasyonlarda da olsa kadmiyumun, kalpte metabolik ve yapısal bozukluklara neden olduğu ve hipertansiyon etiyolojisinde rol oynadığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Bobillier ve ark., 2006; Asagba ve ark., 2004). Yapılan birçok deneysel çalışmanın sonucunda, gebeliğin geç döneminde kadmiyum tuzlarının verilmesinin plasental hasara neden olduğu ve gebeliğin erken döneminde kadmiyumun, eksensefali, hidrocefali gibi teratojenik etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

Fare embriyo kültürlerinde 123mg/L dozunda kadmiyumun, kapanmış olan nöral tüpün yeniden açılmasına neden olduğu bildirilmiştir. İnsan plasentası toksik kadmiyum aktivitesine duyarlıdır (Suzuki, 1984; Jiang ve ark., 1995). Kadmiyum, çinko, bakır, demir, selenyum gibi diğer elementlerin metabolizmasını etkileyerek fetusa zarar verebilir. Gebelikte kadmiyum toksisitesinden önemli oranda sigara içimi sorumludur. Sigara içen annelerin bebeklerinde düşük doğum ağırlığı görülme insidansı artmıştır ve plasental kütlenin artışı söz konusudur. Ancak sigara içen annelerde anne sütünde kadmiyum bulunmamıştır (Kalay M, 1995; Bobillier, 2006). Uzun süre kadmiyuma maruz kalınması sonucu özellikle erkek ve dişi üreme sisteminde, yapısal ve fonksiyonel bozukluklar meydana gelmektedir (Boscolo ve ark., 1985; Haffor ve ark., 2004). Memeli testisleri kadmiyuma oldukça duyarlıdır. Kadmiyum, spermlerin motilitesinde ve spermatogenez indekisinde azalmaya neden olmaktadır (Shimada ve ark., 2002; Bench ve ark., 1999). Kadmiyumun sebep olduğu testiküler nekroz, kalıcı infertiliteye neden olabilmektedir. Kadmiyumun erkek infertilitesindeki moleküler etkileri tartışmalı olmakla birlikte, kronik kadmiyum uygulamasında, kadmiyumun sperm kromatinine katılarak fertilitede azalmaya neden olduğu ileri sürülmüştür (Merian ve ark., 1991). Dişi sıçanlar üzerinde yapılan deneysel çalışmalarda, ovulasyona yakın zamanda kadmiyum verilmesinin ovulasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bunun yanı sıra kadmiyumun ovaryan granüloza hücrelerinde, folikül stimule edici hormon (FSH) ve cAMP ile uyarılan progesteron birikimini önlediği bildirilmiştir (Massányı ve ark., 1995; Massanyı ve ark., 2005; Prasad ve ark., 2004).Kadmiyumun toksisitesinde hedef organlardan biride testistir (Chung ve ark., 1987). Kadmiyumun testiküler tümörler dahil olmak üzere birçok patolojik olguda etiyolojik bir faktör olduğu düşünülmektedir. Kadmiyum sıçanlarda üreme üzerine toksik etki yapmakta ve testiküler nekroz oluşturmaktadır. Kadmiyum spermatojenik hücrelere de etki etmekte ve fertilitiyi önemli ölçüde düşürmektedir (Fowler ve ark., 1982,). Seminifer tübüllerdeki atrofi sonucu sperm yapımı da durmaktadır (Cameron ve ark., 1963; Walker ve ark., 1984).

1.6.Hücre Ölümü

Yakın zamana kadar hücre ölümünün 2 yolla gerçekleştiği düşünülmekteydi. Bunlardan birincisi apoptoz, programlı hücre ölümü olarak tanımlanmaktadır. Bunun karşısı olan ve raslantısal olarak ortaya çıkan, programsız hücre ölümü nekroz da tanımlanan ikinci hücre ölüm şeklidir. Uzun yıllar programlı hücre ölümü ile apoptoz eş anlamlı olarak kullanılmış olsa da, 1960 yılından beri alternatif programlı hücre ölüm yollarının olduğu bilinmektedir. Omurgasızlarda tipik apoptoz morfolojisi ile uyuşmayan programlı hücre ölümlerinin gösterilmesi ve organogenez döneminde görülen hücre ölümlerinde de tipik apoptoz morfolojisi gözlenmemesi üzerine 1990'da Clark ve arkadaşları hücre ölümünü morfolojik olarak üçe ayırmışlardır. Hücre ölümünün morfolojik sınıflandırılmasında apoptoz tip 1 hücre ölümü, otofaji tip 2 hücre ölümü, non-lizozomal parçalanma ise tip 3 hücre ölümüdür. En az üzerinde durulan tip 3 hücre ölümü nekroza benzer morfolojik özelliklere sahiptir (Gozuacik ve Kimchi, 2004).

1.6.1.Apoptozis

Apoptoz fizyolojik hücre ölümünü ifade eder. Teorik olarak ise apoptoz; çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanmaktadır (Kerr, ve A.H, 1972). Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücresel lezyonların ya da genetiksel faktörlerin aktivesi sonucu hücresel intihar programının apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir (Searle ve ark.,1982). Fizyolojik bir işlem olarak apoptoz, normal gelişim sırasında ve olgun mekanizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybından sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozun fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur (Thompson, 1994). Apoptoz, gelişimsel

morfolojide oynayan hücre ölümünün son derece düzenli olduğu bir olaydır, aynı zamanda hücre sayısını kontrol eder ve hücrelerin hasarını giderir bu nedenle tümör baskılanmasında önemli rol oynamaktadır (Lumachi ve Basso, 2002). Hücre büyümesi, farklılaşması ve apoptoz arasındaki denge vücutta bulunan net hücre sayısını etkiler ve bu olaylardaki hatalı gelişmiş tümörlerin oluşmasına neden olur. Apoptoz vücuttaki ana tümör baskılama (Evan ve Vousden, 2001) mekanizmasıdır, çünkü yoğun DNA hasarı olan ve dolayısı ile kanserin meydana gelme potansiyeline sahip olan hücreleri yok eder. Örneğin; güneş yanmasından sonra derinin soyulması gerçekte UV' ye maruz kalmaya bağlı olarak yoğun DNA hasarına karşı hücrelerde meydana gelen apoptoz olayıdır. Bu olay cilt kanserine karşı önemli bir savunmadır. DNA hasarı hücrelerin eliminasyonu tüm organizmayı kanserden korur (Evan ve Vousden, 2001). Apoptoz, genetik programın ifade edilmesine gerek duyan aktif bir programdır ve her hücre bunu yapabilme kabiliyetini gösterir (Searle ve ark., 1982). Apoptoza uğrayan hücre fagositoz sırasına makrofajlar yutulur ve komşu hücreler apoptoza uğrayan hücrelerin göstermiş olduğu moleküler fosfatidilgliserinleri tanır (Thompson, 1994). Apoptoz hücrenin büzülmesi, tomurcuklanması ve kromatin kondensasyonu ve fragmentasyonu ile karakterize edilerek son derece düzenli bir olaydır. Apoptoz, çoğu zaman nekroz ile karıştırılabilir. Fakat nekroz olayında hücre membranları geçirgen hale gelir ve hücre içeriği etraftaki dokulara dağılır ve inflamasyona neden olur (Searle ve ark., 1982).

Apoptozun Moleküler Mekanizması

Büyüme faktörü sinyal yollarında kinazların asal rol oynaması gibi, apoptoz mekanizmasında ölüm reseptörleri, adaptör proteinler ve kaspazlar adı verilen belirli proteazlar merkezinde rol oynarlar. Proteoliz kaspazlar tarafından katalize edilir ve hücresel komponentlerin düzenli bir şekilde yıkılmasına yardım eder ve bu durum apoptoza özeldir (Howley ve Fearnhead, 2008). Hücrelerin apoptoza uğrayabilmesi için hücre dış yolaktaki ölüm reseptörlerinden gelen 'ölüm faktörleri' adı verilen sinyallerin alınması, DNA hasarı ya da oksidatif stres gibi iç yolaktaki fiziksel/kimyasal etkenler tarafından uyarılması ile kaspazlara bağlanıp onları aktive

etmektedir (Olson ve Kornbluth, 2001). Kaspazlar ise aktive olan DNAaz'lar aracılığı ile DNA'nın yıkımına sebep olur. Kaspazlar proteinleri sadece aspartik asit (20 amino asitten biri) bulunan bölgelerinden kıran bir moleküler makas gibi rol oynayan spesifik proteazlardır. Kaspazlar her iç ve dış olmak üzere her iki yolda da asal rol oynarlar (Barr ve Tomei, 1994).

1.6.2.Otofaji

Otofaji, hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır. Kısa ömürlü proteinlerin ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanmasına karşın, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofajinin sistemi tarafından parçalanırlar ve oluşan yapı taşları hücre kullanımı için yeniden kazandırılırlar (Shintani ve Klionsky, 2004; Ohsumi, 2001). Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (auto) yeme (phagy) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyoloji koşullarda, besin elde etmek için hücre içindeki yapıları nasıl parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmıştır. Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (Shintani ve Klionsky, 2004; Ohsumi, 2001). Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sistemin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Shintani ve Klionsky, 2004; Mizushima ve ark., 2008). Ayrıca araştırmalar, otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir (Yang ve ark., 2008). Otofajinin açlık durumunda hücresel yapı taşlarının yıkılarak geri dönüşümü ve hücrenin enerji depolarını yenileyerek apoptotik hücre ölümünü engellediği ya da zıt olarak hücre ölümüne yol açtığı gösterilmesine ek olarak apoptozla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Maiuri ve ark., 2007; Liang ve ark., 2007). Bazı durumlarda otofaji ve apoptoz hücrede birbirine zıt

etkiler yapabilmektedir. Bu durumda, otofaji hücre ölümüne karşı bir hayatta kalma mekânı olarak çalışarak, apoptozun durdurulmasına ve ölümün engellenmesine yol açmaktadır. Otofaji metabolik stres, ilaç ya da radyasyon hasarıyla karşı karşıya kalan hücrede anormal ve hasarlı proteinlerin yok edilmesinde ve genomik DNA'nın hasardan korunmasında önemlidir. Otofaji yokluğunda tümör hücrelerinde, DNA hasarı, gen amplifikasyonu ve kromozomal anormallikler artmaktadır (Karantza-Wadsworth ve ark., 2007). Yine aynı doğrultuda olmak üzere, otofajinin; meme, prostat ve kolon kanserlerindeki inhibisyonu, bu hücrelerin radyoterapiye olan ölüm cevabını artırmaktadır (Mathew ve ark., 2007). Otofaji kendi başına hücre ölümüne sebep olmaksızın apoptotik hücre ölümüne yardımcı olabilmektedir. Örneğin; besin yokluğunda otofajiye bağımlı hücre ATP düzeyinin sürdürülmesi apoptoz'un önemli belirteçlerinden olan fosfatidilserinlerin hücre zarının dışına transferini sağlar. (Qu ve ark., 2007). Literatürdeki bilgilerden yola çıkarak otofajinin hücreyi nasıl ölüme götürdüğü konusu tam olarak aydınlatılamamıştır. Sitoplazma, hayati organeller ve hayatta kalmayı sağlayıcı bazı proteinlerin otofaji tarafından yıkıldığı bilinmektedir. Örneğin, uzun süre aktive olan otofaji, mitokondri sayısını ve sitoplazma miktarını azaltmaktadır. Otofaji tarafından anti-oksidant enzimin parçalanmasının hücredeki reaktif oksijen türleri (ROS) miktarını artırarak hücreyi ölüme götürmektedir. RIP/JNK sinyal yolunun ve Bcl-2 protein ailesinin otofajik hücre ölümünü aktive ettiği tespit edilmiştir (Maiuri, ve ark., 2007; Liang ve ark., 2007). Otofaji mekanizmalarında rol oynayan proteinlerin çoğu otofaji ile bağlantılı proteinlerdir ya da Atg proteinleri (30'dan fazla Atg geni tanımlanmıştır) 'dir (Maiuri ve ark., 2007). Atg proteinlerinin bir kısmı ve çeşitli protein kompleksleri otofajik keseciklerin oluşumunda ve otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır. Otofajinin temel moleküler mekanizması; Atg1-Atg13- Atg17 kinaz kompleksi, 3. sınıf phosphoinositol 3 fosfat (PI3F) kinaz, Vps34'un aktivitesini düzenleyen Atg6 protein (memelilerde Beclin-1) kompleksi, iki ubiquitin benzeri sistem ve Atg9 ve döngü sistemi olarak dört basamakta özetlenebilir (Maiuri ve ark., 2007; Liang ve ark., 2007). PI3F'in görevi, kendisine bağlanma özelliğine sahip ve kesecik oluşumunda rol oynayan proteinleri ve protein gruplarını PAS'a yönlendirmektir. Bu şekilde çekirdeği oluşan otofagozom membranının uzaması ve kesecik halini alması ise iki ubiquitinlenme benzeri sistem tarafından kontrol edilmektedir (Liang ve ark., 2007).

Bunlardan birincisinde; Atg12 proteininin Atg5 proteinine kovalent bağ ile bağlanır ardından Atg12'ye bağlanmış Atg5, Atg16 ile de birleşerek izolasyon membranının dış yüzeyine tutunur İkincisinde ise; biyolojide az rastlanan bir reaksiyonla, Atg8 (memelilerde MAP-LC3 ya da kısaca LC3) proteininin, bir fosfatidiletanolamin (FE) yağ molekülüne kovalent bağ ile bağlanır ve Atg12-Atg5-Atg16 kompleksi oluşur, Atg8/LC3'un FE'ye bağlanması için, Atg8 ya da LC3'un C-ucundaki beş aminoasitin Atg4 proteazı tarafından kesilmesi ve sondan 6. aminoasit olan glisin ortaya çıkarılması FE molekülü glisine bağlanarak Atg8/LC3'un FE'ye bağlanması sonucunda PAS'a zar taşınır ve zar uzar. Ayrıca Atg4, kesecik oluşumu sonrasında görevi tamamlanan LC3 proteinlerini yağdan kopararak yeniden kullanılmalara neden olmaktadır (Mizushima ve ark.,2008; Maiuri ve ark., 2007; Liang ve ark., 2007). Atg9 ve döngü sistemi otofajik zardan otofagozom oluşumunda rol oynamaktadır (Thorburn, 2008). Otofagozom daha sonra geç endozom veya lizozomla birleşerek taşıdığı kargonun parçalanmasına sebep olmaktadır (Thorburn, 2008)

1.6.3.Nekroz

Nekroz, hipoksi, fiziksel hasar, hipertermi, kompleman aktivasyonu, UV ışık gibi zararlı uyaranlar sonucu oluşan patolojik hücre ölümüdür. Nekrozda enerji ve madde metabolizmasında düzensizlik vardır. Metabolik değişikliklere yapısal değişiklikler eşlik eder. Nekroz uzun yıllar apoptozun karşıtı olan ve raslantısal olarak ortaya çıkan, programsız hücre ölümü olarak tanımlanmıştır. Ancak son zamanlarda nekrozun da başlatılması ve kontrolünde programlı kontrol mekanizmalarının olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu nedenle 2005''de Nomenclature Committee on Cell Death (NCCD)'' de hücre membran bütünlüğünün bozulduğu, hücrede şişme ve organellerde parçalanmanın görüldüğü morfolojik bir terim olarak tanımlanması uygun görülmüştür (Kroemer ve ark., 2009). Nekrozun karakteristik özelliği ölümün hücre gruplarında ortaya çıkmasıdır. Nekrozda en temel yapısal değişiklik membran bütünlüğünün bozulmasıdır. Membran geçirgenliğinin artması ve bunun sonucunda da sitoplazmanın ve çekirdek içeriğinin hücreler arasındaki boşluğa salınması nedeniyle nekrozun ortaya çıktığı bölgede inflamatuvar olaylar gözlenmektedir. Hücre ölümü,

genetik olarak kontrol ediliyorsa programlıdır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda üçüncü bir hücre ölüm yolu olarak otofaji üzerine durulmaktadır. Otofaji ile ilgili ulaşılan bilgi birikimi sonrasında apoptoz artık programlı hücre ölümüyle eş anlamlı olarak kullanılmamaktadır. Apoptoz ve otofaji ilişkili hücre ölümü programlı hücre ölümünün temel iki çeşidi olarak kabul edilmektedir (Kroemer ve ark.,2009).



2.GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Etik Kurul

Çalışmamız kapsamında öncelikle Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'ndan (AKÜHADYЕК) 28.09.2017 tarihli, 49533702/150 referans numaralı etik kurul onayı alındı.

2.2. Deney Hayvanları

Çalışmamızda her bir grupta 6 adet erkek Wistar Albino tipi 250-300 gr ağırlığında rat olmak üzere toplam 30 adet hayvan kullanıldı. Ratlar çalışma süresince Deney Hayvanları Merkezinde bakılıp takip edildi. Standart koşullar altında 12 saat karanlık, 12 saat ışık ve 25 ± 2 ° C sıcaklık altında bakıma tabi tutuldu. Hayvanlar yeterli miktarda yiyecek ve suya serbestçe erişebildi ve çalışma sonunda sakrifikasyonları ve testis örnek alma işlemleri bu merkezde tamamlandı

2.3.Deney Grupları

Kontrol grubu. Ratlara 21 gün süreyle Kadmiyum klorürü çözmek için kullanılacak olan distile su oral yoldan gavajla 1 cc olarak verildi.

Grup 1: Hergün gavajla sırasıyla 0,2 mg/kg kadmiyum oral yoldan verildi.

Grup 2: Hergün gavajla sırasıyla 0,5 mg/kg kadmiyum oral yoldan verildi

Grup 3: Hergün gavajla sırasıyla 1 mg/kg kadmiyum oral yoldan verildi.

Grup 4'de ise kadmiyum klorürün LD50 dozu olan 107 mg/kg steril serum fizyolojik içinde çözülüp tek doz halinde i.p. olarak sadece 1 kez verildi.

2.4. Kimyasallar

Kadmiyum klorür, $CdCl_2$, abcr ab119554 ,Caspase3(Santacruz, Texas, USA), Beclin1(Santacruz, Texas, USA), Calretinin(Thermo Scientific RB-9202-R7), RIP3 (Santacruz, Texas, USA), Sekonder antikorlar; Large Volume HRP Polymer (RTU), (Thermo, USA), Mayer's Hematoxylin, (Thermo, USA), Hydrogen Peroxide % 35 ,(Merck Millipore, Almanya), Methanol, (Merck, Almanya) ,Large Volume UltraAb Diluent, (Thermo, USA)

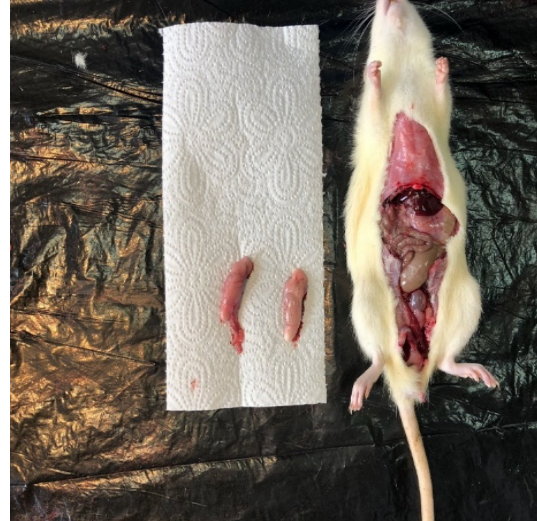
Hydrophobic PAP PEN, (Japonya) ,Large Volume Vision Mount, (Thermo, USA), AEC Single /Plus (Abcam, UK), PBS, (Sigma, USA), Citrate buffer, pH 6.0 (Thermo, USA), Su Bazlı Kapatma Solüsyonu, (Thermo, USA), Hematoksilen (Sigma, USA), Eozin (Thermo, USA)

2.5.Dokuların Alınması

Tüm hayvanlar cerrahi işlemten 12 saat öncesinden itibaren aç bırakıldı, 5 mg/kg Xylazine ve ketamin flakon 40 mg/kg intramuskuler(im) yoldan verilerek uyutuldu (Şekil 2.1) ve derhal hayvanların karın bölgesi açılarak testisleri çıkarıldı (Şekil 2.2)



Şekil 2.1 Ratların anestezisi altında uyutulup karın bölgesinin açılması



Şekil 2.2 Ratlardan testis dokusunun çıkarılması

2.6. Testis Ağırlıklarının Ölçülmesi

Çevre dokularından temizlenen testislerin her biri hassas terazide titizlikle tartıldı. Testis ağırlıkları her sıçan için sağ ve sol olmak üzere ayrı ayrı tartıldıktan sonra, her iki testiste Bouin tespitine alındı.

2.7. Işık Mikroskobu İçin Dokuları Hazırlanması

Çıkarılan sağ ve sol testisler Bouin çözeltilisine alındıktan sonra testislerin uzun eksenlerine dik olacak şekilde enjektör ucu ile testislerin kapsüllerine karşılıklı birkaç delik açıldı. Fiksatif içerisindeki testis dokuları sertleştikten sonra testisler enine olacak şekilde önce ortadan iki eşit parçaya ve daha sonra bu parçalar da yeniden ikiye bölünerek kasetlere alındı. Dokular fiksatiflerin içerisinde bekletildi (Şekil 2.3) ve daha sonra rutin doku takibi işlemi uygulanarak (Şekil 2.4) her hayvana ait parafin bloklar hazırlandı (Şekil 2.5).



Şekil 2.3 Testislerin gömülmeden önce nötral formalin içine alınması



Şekil 2.4 Testislerin parafin içerisine gömülmesi



Şekil 2.5 Gömülmüş blokların etiketlenmesi

2.8.Kesitlerin Alınması ve Boyanması

Parafin bloklardan 5 µm kalınlıkta kesitler klasik ve pozitif şarjlı lamlara alındı. Dokular genel morfolojik özellikleri)ve nekrozu değerlendirmek için Hematoksilen-Eozin ve PAS boyaları ile boyandı. Apoptotik, otofajik, nekroptotik hücre ölümlerini değerlendirmek için immunohistokimyasal boyama uygulandı.

2.8.1.Hematoksilen-Eozin Boyama:

- Deparafinizasyon
 - Dokular parafinden temizlenmeleri için bir gece 65 °C lik etüvde bekletildi.
 - 2 saat Xylene solüsyonunda bekletilerek preparatlar temizlendi.
- Rehidratasyon
 - Saf alkolde 1 dakika
 - %90 alkolde 1 dakika
 - %80 alkolde 1 dakika
 - %70 alkolde 1 dakika
 - Çeşme suyunda yıkama
- Boyama
 - Hematoksilen 4 dakika
- Akarsuda bolca yıkandı.
 - Eozin 1,5 dakika
- Dehidratasyon
 - %70 alkolde yıkama
 - %80 alkolde yıkama
 - %90 alkolde yıkama

- Saf alkolde yıkama
- Xylene solüsyonunda bekletildi.
- Entellan ile kapatıldı.

Boyama sonunda tüm kesitler ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

2.8.2 PAS Boyama

- Rehidratasyon
 - Saf alkolde 1 dakika
 - %90 alkolde 1 dakika
 - %80 alkolde 1 dakika
 - %70 alkolde 1 dakika
 - 5 dk distile suda bekletildi
- Periyodik Asit te 5 dk bekletildi
- Boyama
- Akarsu altında 10 dk yıkandı.
 - Shiff de 15 dk bekletildi
 - Akarsu altında 15 dk yıkandı
 - Hemotoksilen Gill de 3 dk bekletildi
 - Akarsu altında 15-30 sn çalkalandı
- Dehidratasyon
 - %70 alkolde yıkama
 - %80 alkolde yıkama
 - %90 alkolde yıkama
 - Saf alkolde yıkama
- Xylene solüsyonunda 15 dk bekletildi.
- Entellan ile kapatıldı.

Boyama sonunda tüm kesitler ışık mikroskobu altında değerlendirildi.

2.8.3.İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü

Hücre ölüm tiplerinden apoptozisin intrinsek yolağını belirlemek için Caspase-3, otofajik hücre ölümünü değerlendirmek için Beclin 1, nekroptotik hücre ölümünü değerlendirmek için RIP3 ve Calretinin primer antikorları ile boyandılar ve immunohistokimyasal metot uygulandı. İmmunohistokimyasal boyama için öncelikle pozitif şarjlı lamlara alınan kesitler, deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemleri sonrasında sitrat tampon solüsyonuyla (pH =6.0) mikrodalgada antijen retrieval işlemine tabi tutuldu. Dokulardaki endojen peroksidazı bloke etmek için %3'lük H₂O₂'de bekletilen kesitler, sonrasında zemin boyanmalarını engellemek için sekonder antikor olarak kullanılan HRP kit içeriğinde bulunan blocking solüsyonuyla muamele edildi. İnkubasyon aşamasında, kesitler üzerine ayrı ayrı olacak şekilde birincil antikorlar olan Caspase3(Santacruz, Texas, USA), , Beclin 1(Santacruz, Texas, USA),Calretinin(Thermo Scientific RB-9202-R7) ve RIP3 (Santacruz, Texas, USA) ile 1/100 dilüsyonda damlatıldı ve +4 °C'de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yıkama sonrasında kesitler sekonder antikor olarak HRP kit (Large Volume Anti-polyvalent HRP, Thermo Scientific) ile boyandı ve kromojen olarak AEC uygulandıktan sonra Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapıp aköz kapama solüsyonuyla kapatıldı.

Işık mikroskopik değerlendirmede, dokularda birbirinden bağımsız alanlarda x4 lük ve x10 luk objektif büyütmede 6 alanda yer alan immunopozitiflikler sayıldı.

2.9.Görüntü Analiz

Her kesitten 30 farklı tübül seçilerek Johnsen skorlaması uygulandı. Daha sonra elde edilen bu veriler istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Görüntü Analizi sırasında kesitlerdeki testiküler yaralanma ve spermatogenezis, Johnsen'in ortalama testiküler biyopsi skoru (MTBS) kriterleri kullanılarak histopatolojik olarak değerlendirildi (S.G., Johnsen, 1970). Johnson skorlaması spermatogenetik sürecin değerlendirilmesinde kullanılan güvenilirliği yüksek bir skorlamadır. Bu skorlamaya göre;

- 10: Tübüller mükemmel ve tam spermatogenez.
- 9: Çok sayıda spermatozoa var, düzensiz spermatogenez.
- 8: Sadece birkaç sperm var.
- 7: Spermatozoa yok, fakat birçok spermatid var.
- 6: Sadece birkaç spermatid.
- 5: Spermatozoa veya spermatid yok, ancak birçok spermatosit var.
- 4: Sadece birkaç spermatosit mevcut.
- 3: Sadece spermatogonia mevcut.
- 2: Hiç germ hücresi yok.
- 1: Ne germ hücreleri nede sertoli hücreleri yok.

2.10.İstatistiksel Analiz

Tüm veriler SPSS for Windows 21.0 ticari istatistik analiz yazılımı ile analiz edildi. Gruplar arası farklılığın belirlenmesinde Kruskal Wallis testi, Kruskal Wallis testi sonucunda farklılığı yaratan grup ya da grupların belirlenmesinde ise çoklu karşılaştırma testlerinden Dunn testi kullanıldı. Grupların kendi içinde ağırlıklarının karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

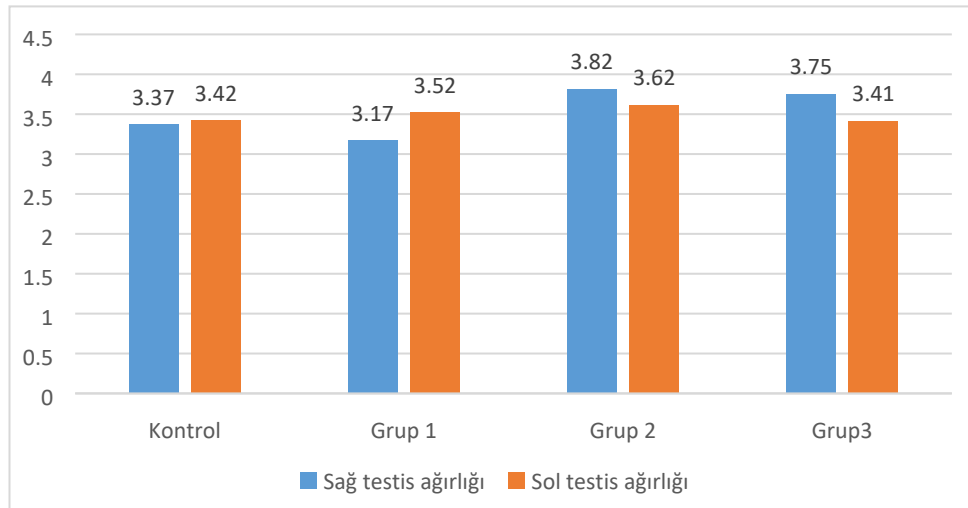
3.BULGULAR

3.1.Testis Ağırlığı Ölçümleri

Yaptığımız testis analizlerinde sağ ve sol testis te herhangi bir şekilde verilen dozların testis ağırlığına etki etmediği (Şekil 3.1) görüldü ($p>0,05$). (Tablo 3.1)

Tablo 3.1. Sağ Testis Ağırlığı, Sol Testis Ağırlığı Değerleri (Değerler ortalama±standart sapma (median) değeri şeklinde verilmiştir. n: Gruplardaki toplam hayvan sayısı. Her satırda aynı harflere sahip gruplar arasındaki fark anlamlıdır).

GRUPLAR				
	Kontrol (n=6)	Grup 1 (n=6)	Grup 2 (n=6)	Grup 3 (n=6)
Sağ Testis Ağırlığı (g)	3,37±0,54 (3,39)	3,17±0,39 (3,67)	3,82±0,30 (3,67)	3,75±0,55 (3,52)
Sol Testis Ağırlığı (g)	3,42±0,36 (3,62)	3,52±0,52 (3,31)	3,62±0,59 (3,31)	3,41±0,62 (3,50)



Şekil 3.1 Grupların sağ testis ve sol testis ağırlık ortalamaları

(Değerler gram olarak verilmiştir).

3.2. Johnsen Skorlama Sonuçları

Testiküler hasar ve spermatogenezis, Johnsen'in ortalama testiküler biyopsi skoru (MTBS) kriterleri kullanılarak histopatolojik olarak değerlendirildi (Johnsen, 1970). Her gruba ait ratlardan elde edilen kesitlerden her preparat için 30 farklı tübül Johnsen skorlamasına dahil edildi.

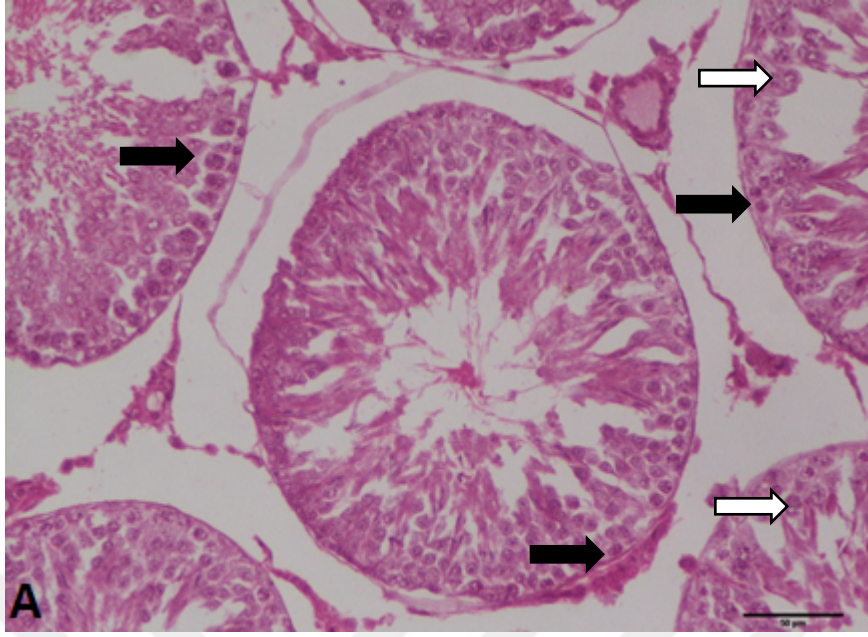
Yapılan analiz sonucu kontrol grubunun çoğunda skor sonucu 10 olarak tespit edildi (Şekil 3.2), (Şekil 3.4). Akut grubunda skor ortalama 6 olarak tespit edildi (Şekil 3.3) ve spermatozoa olmadığı fakat spermatid bulunduğu gözlemlendi (Şekil 3.5) (Tablo 3.2) Akut grubunun Johnsen skorunun sadece (kontrol ve grup 1) istatistiksel olarak anlamlı düşüklük gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). Grup 3 de (kontrol ve grup 1) istatistiksel olarak anlamlı düşüklük gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). Grup 2 de ise sadece (kontrol) istatistiksel olarak anlamlı düşüklük gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$), (Tablo 3.3).

Tablo 3.2 Grupların Johnsen Skoru Değerleri (Değerler ortalama±standart sapma (median) değeri şeklinde verilmiştir. n: Gruplardaki toplam hayvan sayısı. Her satırda aynı harflere sahip gruplar arasındaki fark anlamlıdır).

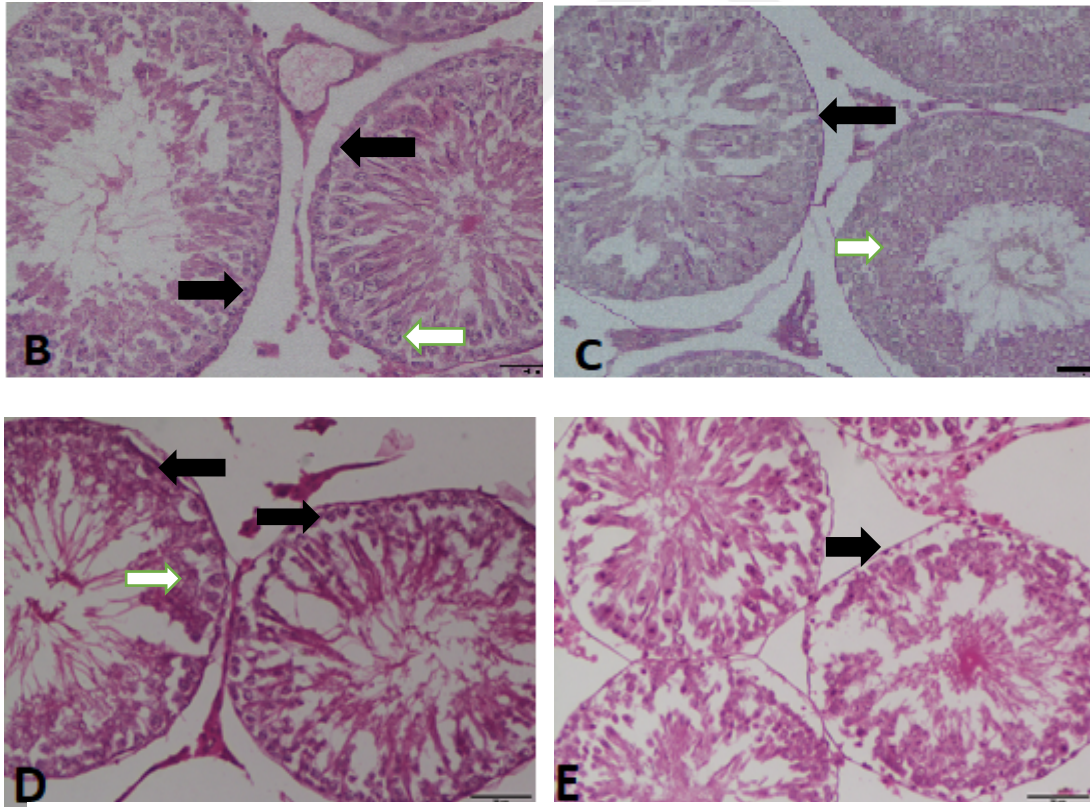
GRUPLAR					
	Kontrol (n=6)	Grup 1 (n=6)	Grup 2 (n=6)	Grup 3 (n=6)	Akut Grup (n=6)
Johnsen Skoru	9,83±0,41 ^a	8,83±0,41 ^b	7,66±0,51 ^c	6,83±0,75 ^d	6,16±0,75 ^d

Tablo 3.3. Gruplararası Karşılaştırmalar Sonucu Elde Edilen Johnson Skoru, p Değerleri.($p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup, anlamlı fark çıkanlar * işareti ile gösterilmiştir).

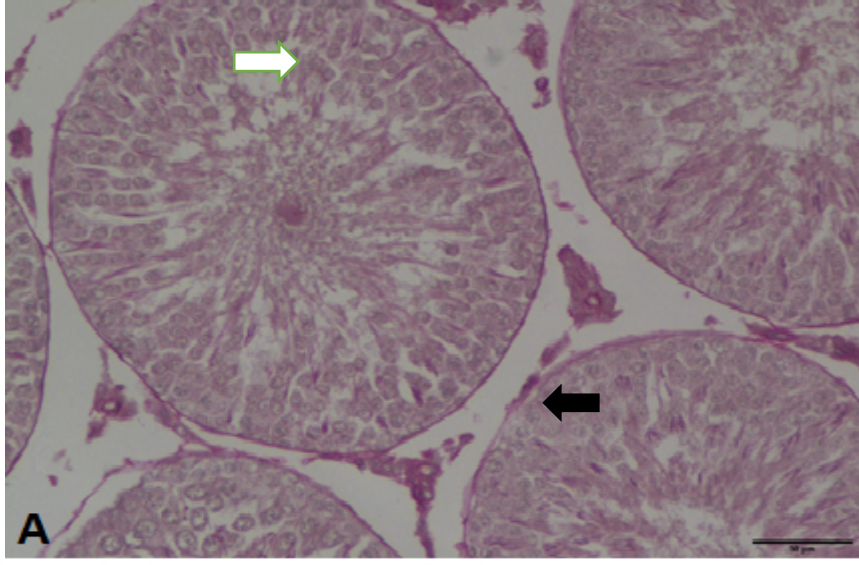
	Akut-Grup 3	Akut-Grup 2	Akut-Grup 1	Akut-Kontrol	Grup 3-Grup 2	Grup 3-Grup 1	Grup 3-Kontrol	Grup 2-Grup 1	Grup 2-Kontrol	Grup 1-Kontrol
Johnsen Skoru	0,47	0,07	0,001*	0,00*	0,29	0,01*	0,00*	0,15	0,01*	0,26



Şekil 3.2 Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu, H-E.
(Siyah oklar spermatogonyum, beyaz oklar primer spermatositleri göstermektedir).

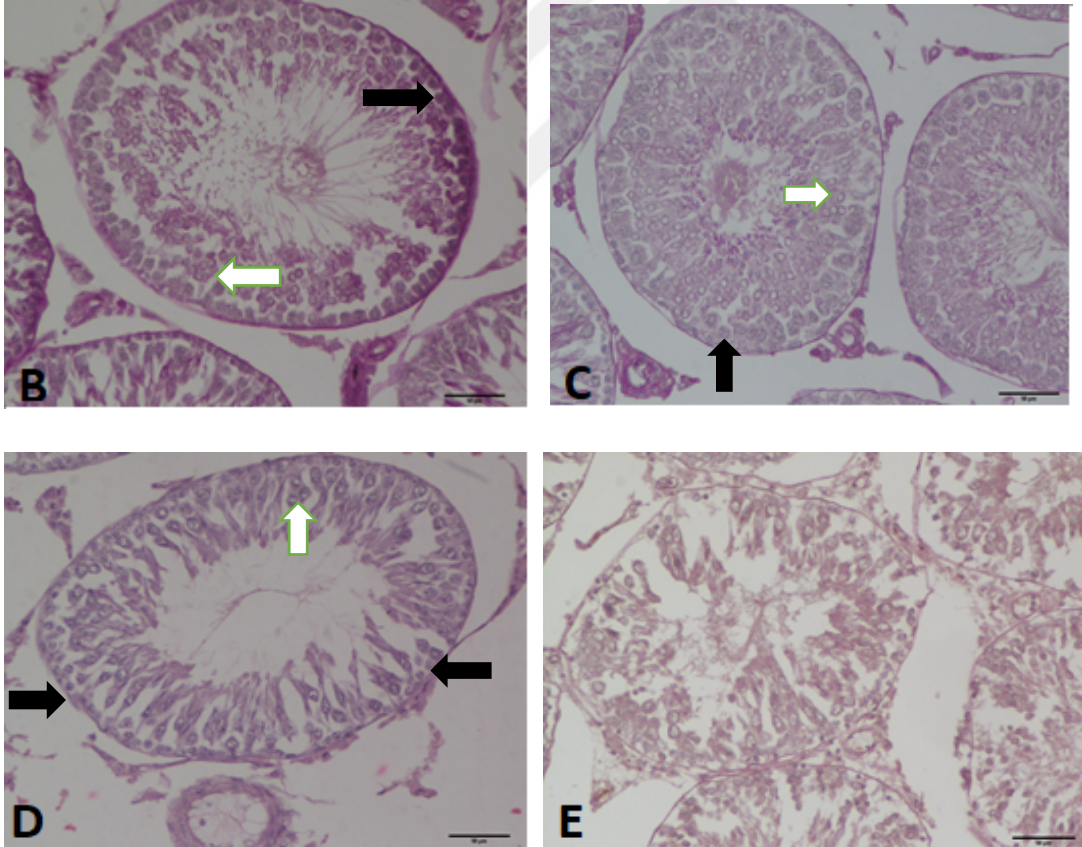


Şekil 3.3 Rat testis dokularının histolojik görüntüsü B;Grup 1,C;Grup 2, D;Grup 3,E;Grup 4 Akut Doz Grubu H-E (Siyah oklar spermatogonyum, beyaz oklar primer spermatositleri göstermektedir).



Şekil 3.4 Kontrol Grubuna Ait Testis Dokusu, Pas Boyası.

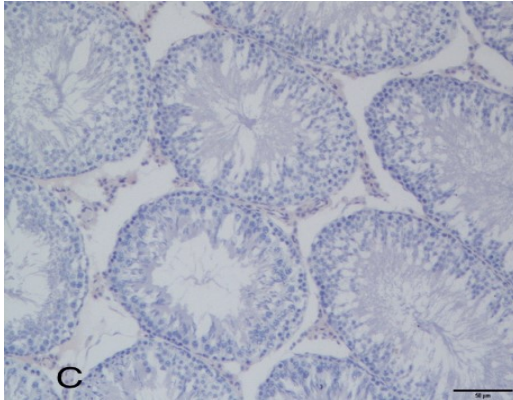
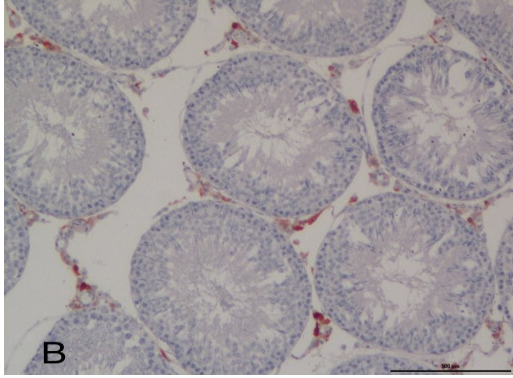
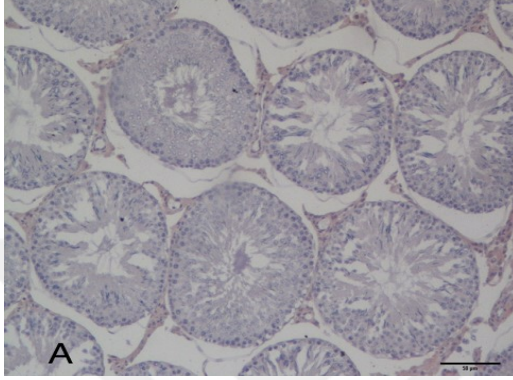
(Siyah oklar spermatogonyum, beyaz oklar primer spermatositleri göstermektedir).



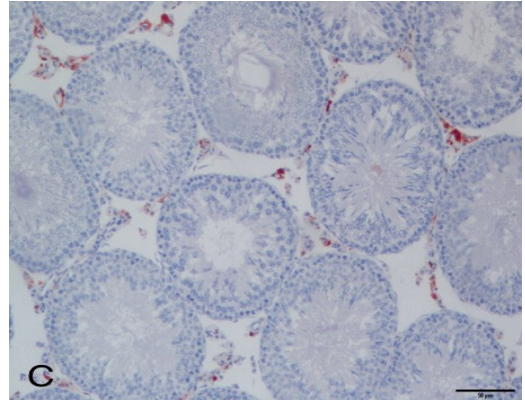
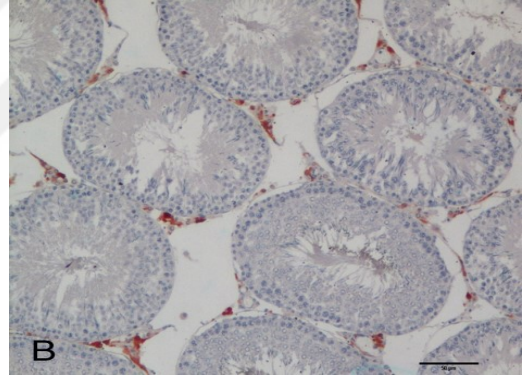
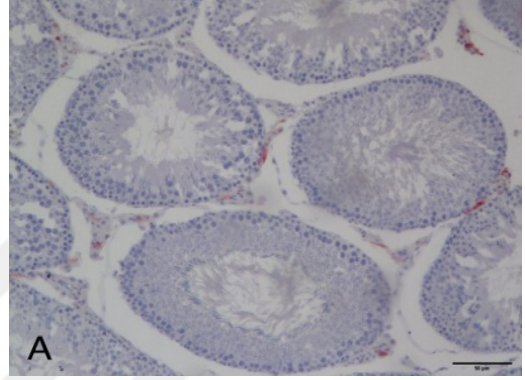
Şekil 3.5 Rat testis dokularının histolojik görüntüsü B;Grup 1,C;Grup 2, D;Grup 3,E;Grup 4 Akut Doz Grubu Pas boyası (Siyah oklar spermatogonyum, beyaz oklar primer spermatositleri göstermektedir).

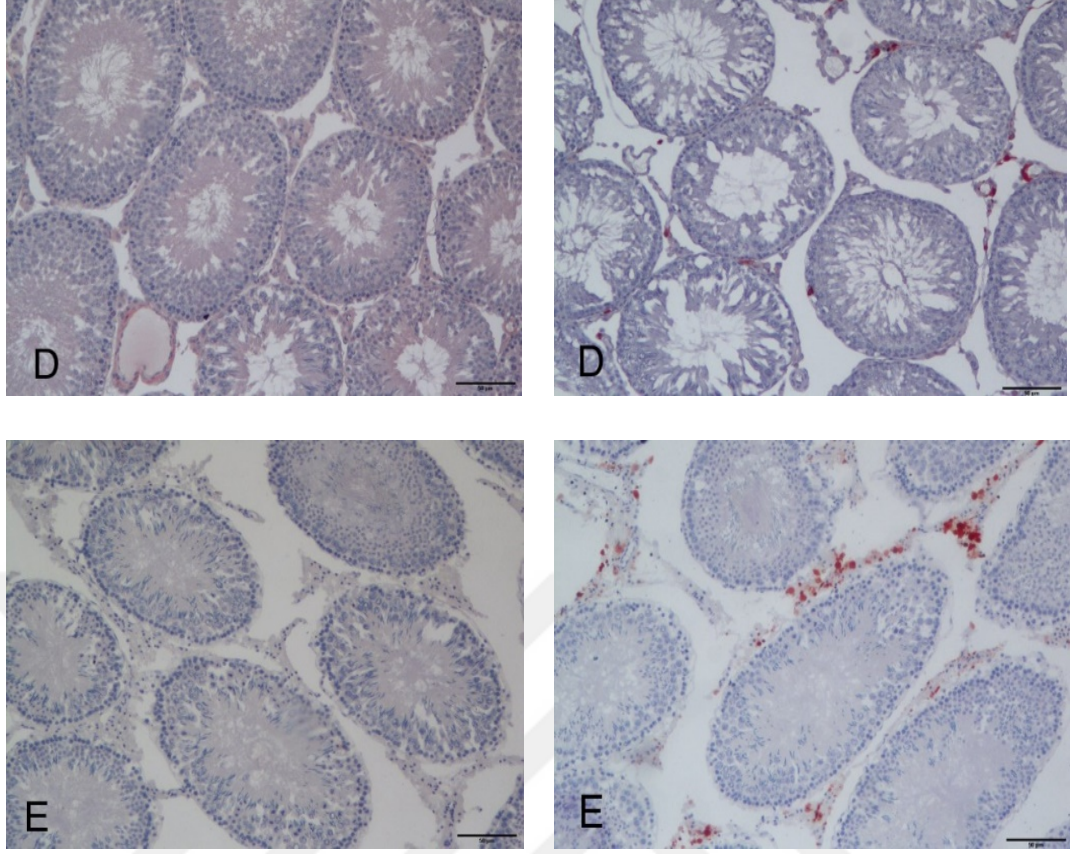
3.3.İmmunohistokimyasal Bulgular

Şekil 3.6 Deney gruplarında testis dokularında RIP3 İmmün boyaması, A; Kontrol grubu, B; Grup 1, C; Grup 2, D; Grup 3, E; Grup 4, Akut doz grubu



Şekil 3.7 Deney gruplarında testis dokularında Calretinin İmmün boyaması, A; Kontrol grubu, B; Grup 1, C; Grup 2, D; Grup 3, Grup 4, Akut doz grubu

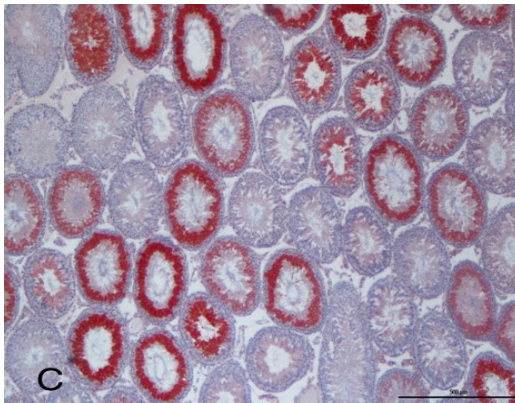
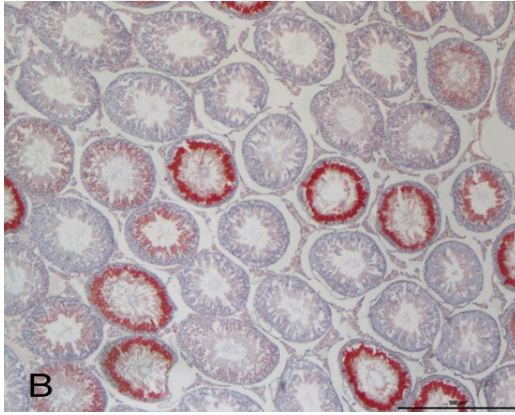
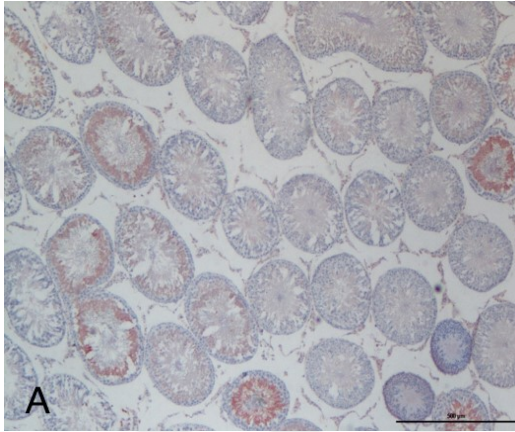




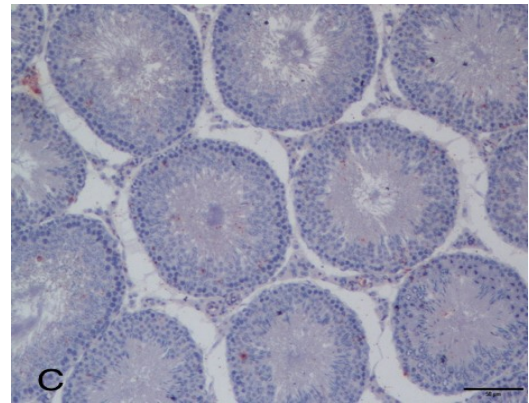
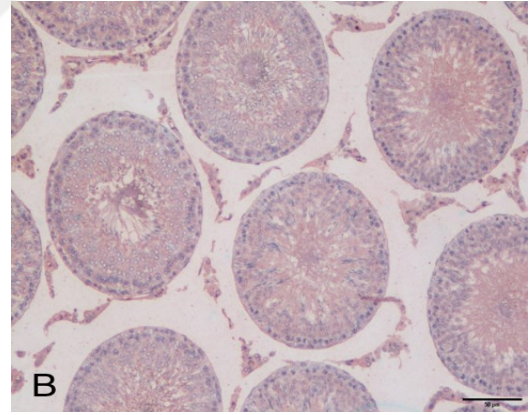
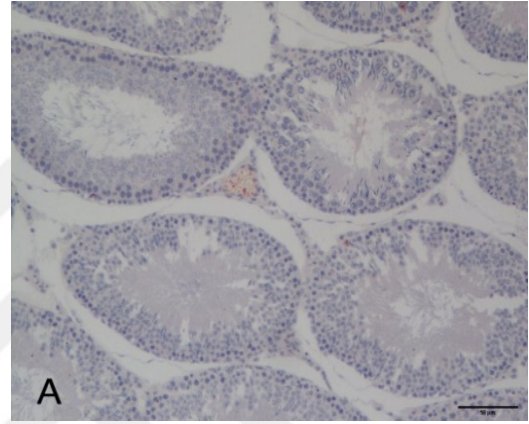
Nekroptotik hücre ölümü belirteci olan RIP3 ekspresyonu sadece Grup 1 de tespit edildi (Şekil 3.6). Diğer gruplarda herhangi bir ekspresyon tespit edilemediği için bu parametrenin istatistiksel analizi yapılamadı . Diğer yandan Leydig hücre sayımında ise Calretinin ekspresyonunda Grup 2 de yüksek bir etkiye sahip olduğunu (Şekil 3.10) Grup 1 ve Akut doz grubunda belirgin bir artışın olduğunu Grup 3 de ise azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 3.7) ve gruplar arası karşılaştırmada Grup 3 (grup 1, grup 2 ve akut) istatistiksel olarak anlamlı düşüklük gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo3.4). Kontrol grubunda (grup 2 ve akut)) istatistiksel olarak anlamlı düşüklük gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$). Grup 1 de ise sadece (grup 2) istatistiksel olarak anlamlı düşüklük gösterdiği tespit edildi ($p<0,05$) (Tablo 3.5). İntrensek apoptotik yol belirteci olan Caspase 3 pozitifliğinin Grup 1 ve Grup 2 de yüksek derecede tespit edilirken Grup 3 de pozitifliğin azaldığını hatta akut dozda herhangi bir etkinin olmadığını gözlemlendi (Şekil 3.8) fakat istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Otofajik hücre ölümü belirteci olan Beclin 1 ekspresyonu değerlendirmesinde ise hiç

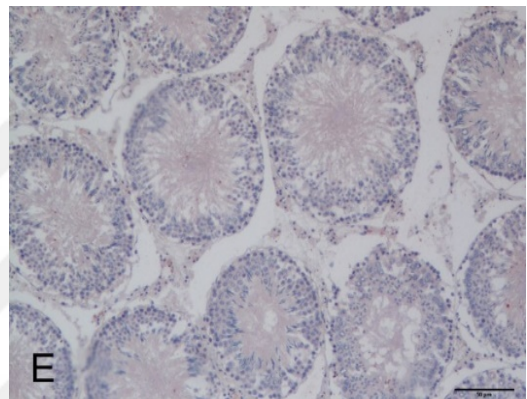
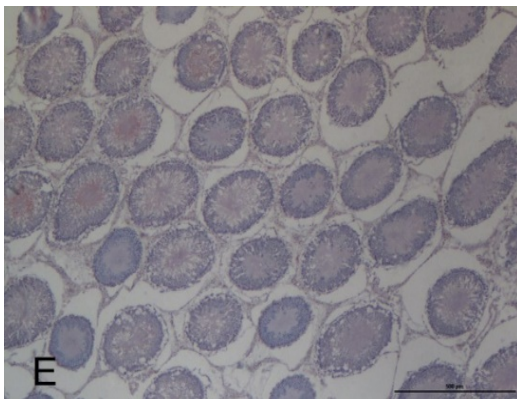
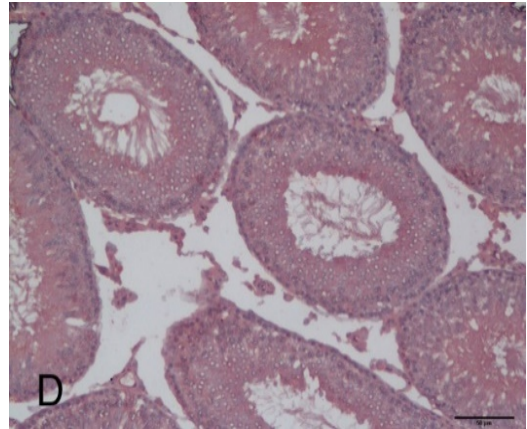
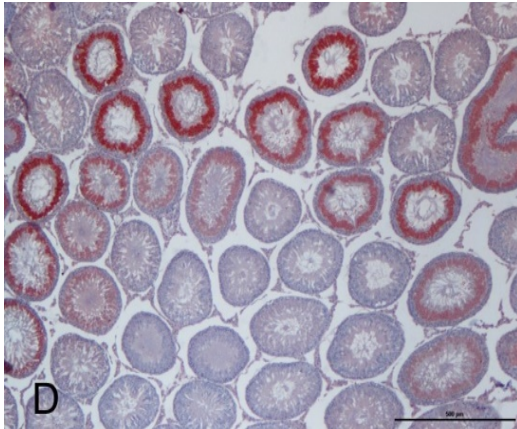
bir grupta ekspresyon olmadığı tespit edildi (Şekil 3.9). Dolayısıyla bu parametre ile ilgili istatistiksel analiz yapılmadı.

Şekil 3.8 Deney gruplarında testis dokularında Caspase-3 İmmün boyaması, A; Kontrol grubu, B; Grup 1, C ; Grup 2, D; Grup 3, E ; Grup 4, Akut doz grubu



Şekil 3.9 Deney gruplarında testis dokularında Beclin 1 İmmün boyaması, A; Kontrol grubu, B; Grup 1, C; Grup 2, D; Grup 3, E ; Grup 4, Akut doz grubu

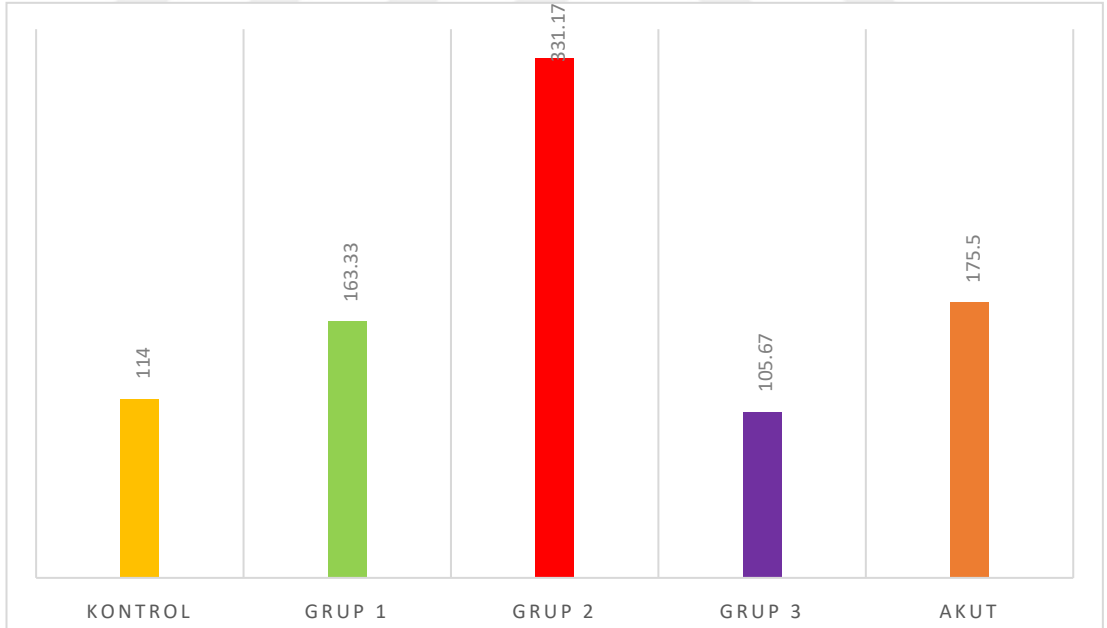




3.4.İstatistiksel Analiz Sonuçları

Tablo 3.4. Calretinin sayım değerleri (Değerler ortalama±standart sapma (median) değeri tabloda verilmiştir. n: Gruplardaki toplam hayvan sayısı. Her satırda aynı harflere sahip gruplar arasındaki fark anlamlıdır) ($p < 0,05$)

Grup	N	Ortalama	Standart Sapma	Median
Kontrol	6	114,00	11,472	116,50
Grup 1	6	163,33	18,250	170,50
Grup 2	6	331,17	21,739	333,50
Grup 3	6	105,67	5,680	106,50
Akut	6	175,50	13,925	181,50



Şekil 3.10 Gruplar arası Leydig hücre sayımı ortalamaları

Tablo 3.5. Gruplararası Karşılaştırmalar Sonucu Elde Edilen, Calretinin p Değerleri.($p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiş olup, anlamlı fark çıkanlar * işareti ile gösterilmiştir).

	Grup 3- Kontr ol	Grup 3- Grup-1	Grup-3 Akut	Grup- 3 Grup- 2	Kontr ol- Grup 1	Kontrol - Akut	Kontr ol- Grup 2	Grup- 1 Akut	Grup- 1 Grup- 2	Akut- Grup- 2
Calre tinin	0,57	0,02*	0,003*	0,00*	0,07	0,01*	0,00*	0,51	0,03*	0,14

4.TARTIŞMA

Kadmiyum ağır bir metal olup, insanlar ve hayvanlar için toksiktir. Biyosferdeki en yaygın çevresel kirleticilerden biri olarak bilinir (Goyer ve ark., 2001; Siu ve ark., 2009; Çolakoğlu ve ark., 2011; Fouad ve ark. 2013). Kadmiyum, sülfür (kadmiyum sülfat), oksijen (kadmiyum oksit), klorid (kadmiyum klorür) gibi elementlerle birleşik haldedir. Kadmiyum öncelikle kadmiyum içeren pigment üretimi (Elinder ve ark., 1985), akü sanayi, nikel-kadmiyum pil üretimi (Adams, 1992), gübreler (Zwenni ve ark., 1992), kadmiyum içeren malzemeler ile (Syers ve ark., 1986; Taylor, 1997) metal kaplamada kullanılmaktadır (Elinder ve ark., 1985; Serah ve ark., 2012). Kadmiyum bunların haricinde dengeleyici olarak sentetik elyaf ve plastik sanayinde, floresan lamba ve televizyon tüpleri yapımında, kullanılmaktadır (Boğa, 2007). Kadmiyuma maruziyetinin diğer bir kaynağında sigaradır (Serah ve ark., 2012; Fouad ve ark., 2013). Kadmiyumun hepatotoksisite, renal toksisite, nörotoksisite ve özellikle infertilite, kanser ile de bağlantılı olduğu saptanmıştır (Wong ve Klaassen, 1982; Din ve Frazier, 1985; Jamall ve Smith, 1985; Waalkes ve ark., 1988; Yang ve ark., 2006; Serah ve ark., 2012).

Bununların haricinde birçok çalışmada, çevresel olarak düşük doz altında kalındığında da olumsuz etkileri olduğu rapor edilmiştir. Çilenk ve ark. (2016) 32 albino rat ile yaptıkları çalışmada; günlük olarak 1 mg/kg Cd verilmesi durumunda, Cd'nin interstisyuma ve seminifer tübüllere anlamlı derecede hasar verdiği bulunmuştur (Çilenk ve ark., 2016). Adamkovicova ve ark.'nın (2016) 40 adet yetişkin erkek wistar'la yaptığı çalışmada, 90 gün boyunca 30 mg/L Cd uygulanması sonucunda, normal morfolojisinde ve sperm motilite ciddi anlamda azalma görülmüştür ($p<0,001$) (Adamkovicova ve ark., 2016). Kadmiyumun düşük tek doz (0,05ve1,0 mg/kg) uygulandığı yetişkin erkek ratlarda, spermiyasyon başarısızlığı, s sperm diferansiyasyonu, düşük sperm derişimi olduğu saptanmıştır (Hew ve ark ., 1993 ; Xu ve ark., 2001) . Düşük dozlarda (1,6 ve 7,4 mg/kg, 14gün) kronik olarak kadmiyuma maruz bırakılan yetişkin ratlarda, sperm derişimini, serum testosteronun uyarılması ciddi derecede baskılandığı saptanmıştır (Laskey ve ark., 1984). İçme sularına kadmiyum(5 mg/L ve 50 mg/L, 4 hafta) eklenen ratlarda, doza bağlı olarak sperm derişiminde anlamlı derecede azalma olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte, sperm

kuyruklarındaki kalsiyum L-tipi voltaj bağımlı kalsiyum kanal mRNA türevlerinin ekspresyonunu etkilediğini de ortaya konulmuştur (Benoff ve ark., 2007). Kadmiyumun farklı dozlarının bir çoğunda diğer organlar etkilenmiyorken, testis üzerinde 24–48 saat içinde hasar oluştuğu rapor edilmektedir. Bunun yanı sıra, spesifik sinyal iletim yolları ve sinyal molekülleri, p38 mitojen-aktif protein kinaz gibi (MAPK) bozulmasıyla birlikte, kadmiyumun kantestis bariyerinde defekte neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca; kadmiyumun bir endokrin bozucu ve Zn^{2+} ve/veya Ca^{2+} ile birlikte hücresel olayları bozarak oksidatif stres indükleyicisi olarak, testise zarar verdiği rapor verilmiştir (Siu ve ark., 2009). In vivo ve in vitro olarak canlılığını yitirmeyecek düzeyde uygulanan kadmiyumun, Sertoli hücreleri ve spermatosit hücreleri arasındaki bağlantıyı bozduğu, Leyding hücrelerinin salgıladığı serum testosteron ve human koryonik gonadotropin salınımı azalttığı saptanmıştır (Siu ve ark., 2008; Laskey ve Phelps, 1991). Bu yüzden, Sertoli ve Leyding hücrelerinin kadmiyumun toksik etkileri için hedef olmasıyla beraber hipotalamus ve hipofizde birikmesiyle, prolaktin seviyesinin düşmesine neden olduğu rapor edilmiştir (Lafuente, 2001). Tüm bu sonuçlar doğrultusunda; hem doğrudan (testis, kan-testis bariyeri ve hipotalamus-hipofiz yolu) hem de dolaylı (değişen hormon salınımı) olarak, kadmiyumun üreme sistemi üzerinde belirgin bir toksik etkileri görülmektedir. Bu gibi durumlar, kadmiyumun metalik hormon görevi üslendiği hipotezini tutarlı bir şekilde doğrulamaktadır (Byrne, 2009). Kadmiyum verilmesi sonucunda akut stres durumunda açığa çıkan cytoplasmic Myc protein (C-myc) ve early growth response 1 (Egr-1) ekspresyonunda yükselme görülürken DNA-tamir genlerinin ve başta Caspase 3 (Casp3) olmak üzere proapoptotik genlerin ekspresyonunda azalma olduğu gözlenmiştir. Bu durumda kadmiyumun karsinogenezi indüklediği düşünülebilir (Öktem ve ark., 2001)

Kadmiyum kan-testis bariyerini bozmaktadır. Kadmiyum germ hücrelerinde kayıba, ödem, hemoraji ve nekrozise sebep olmaktadır bu sonuçta infertiliteyle sonuçlanan sağlık problemlerine neden olmaktadır (Hotchkiss ve ark., 2009)

Akut ve kronik kadmiyum verilmesi sonucunda erkek sıçanlarda kan testosteron seviyesini etkilemektedir. İntratestiküler kadmiyum uygulanmasıyla birlikte; spermatogenezi geçici olarak duraklattığı, spermatozoa konsantrasyonunu düşürdüğü ve anormal yapıları sperm sayısını artırdığı rapor edilmektedir. Bunun

haricinde balık testislerinde germinal zon üzerinde toksik etkilere neden olduğu, kemiricilerde Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıları bozup kan-testis bariyerini hasara uğrattığı gibi spermatogenik hücrelerde yapısal bozukluklara sebep olduğu gözlenmiştir (Elmore, 2007). Çalışmalar, üreme organlarının kadmiyuma karşı aşırı derecede duyarlı olduğunu ortaya konulmaktadır. Bununla beraber, günümüzde kadmiyumun neden olduğu testis defeklerinin altında yatan sebebler ve çalışmalar çok az bulunmaktadır. Bazı araştırmacılar, patolojik mekanizmalar için apoptoz yolağı ve oksidatif stresin mitokondriyal membran üzerindeki etkileri hakkında araştırtma yapmışlardır. Bazı araştırmacılar ise metabolizma üzerine olan etkileri olabileceğini düşünmektedirler (Öktem ve ark., 2001; Elmore, 2007; Hotchkiss ve ark., 2009).

Çalışmamızda diğer çalışmalardan farklı olarak hem akut LD50 dozunda ve hem de kronik farklı alım dozlarında kadmiyumun testislerde oluşturabileceği hücre ölümünü araştırmayı amaçladık.

Hücre ölümü, homeostazın sağlanması ve hastalıklardan korunma adına geliştirilen bir mekanizmadır ve birçok moleküler yolağı içeriğinde bulundurmaktadır. Aktif ya da programlı hücre ölümü, çok hücreli organizmalarda homeostazın korunması, potansiyel hasarlı ve ya enfekte hücrelerin elenmesi için gerekmektedir. (Cooper ve Hausman 2015; Green ve Llambi 2015; Ranjan ve ark., 2016). Hücre ölüm çeşitleri;otofaji, nekroz , apoptoz, ve atipik hücre ölüm şekilleri (paraptoz, mitotik katastrof, anoikis, eksitotoksisite, wallerian dejenerasyon, piroptoz, pironekroz, entozî vb.) olarak sınıflandırılabilir (Zhang ve ark., 2015).

Apoptoz; çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlarla genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak tanımlanmaktadır (Kerr ve Wyllie.,1972). Hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücresel lezyonların ya da genetiksel faktörlerin aktivesi sonucu hücresel intihar programının apoptoza neden olduğu tespit edilmiştir (Searle ve ark., 1982). Apoptozun düzenlenmesinde; kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküllerin yanında p53, kaspazlar, sitokrom c gibi proteinler ve mitokondriler rol oynamaktadır. Apoptoz mekanizmasında kaspazlar adı verilen belirli proteazlar merkezde rol oynarlar. Proteoliz kaspazlar tarafından katalize

edilir ve hücrenel komponentlerin düzenli bir şekilde yıkılmasına yardım eder ve bu durum apoptoza özeldir (Howley ve H.O., 2008). Hücrelerin apoptoza uğrayabilmesi için hücre dış yolaktaki ölüm reseptörlerinden gelen ‘ölüm faktörleri’ adı verilen sinyallerin alınması, DNA hasarı ya da oksidatif stres gibi iç yolaktaki fiziksel/kimyasal etkenler tarafından uyarılması ile kaspazlara bağlanıp onları aktive etmektedir (Olson ve Kornbluth, 2001). Kaspazlar ise aktive olan DNAaz’lar aracılığı ile DNA’nın yıkımına sebep olur. Kaspazlar proteinleri sadece aspartik asit (20 amino asitten biri) bulunan bölgelerinden kıran bir moleküler 45 makas gibi rol oynayan spesifik proteazlardır. Kaspazlar her iç ve dış olmak üzere her iki yolda da asal rol oynarlar (Coşkun ve Özgür, 2011; Cooper ve Hausman, 2015)

Farelerde yapılan bir çalışmada; tüm vücut ve skrotal ısı maruziyetinin, testis ağırlığı, oksidatif stres, apoptotik leydig hücrelerinde gözlenen apoptozda artış ve germ hücrelerinin azalması dahil olmak üzere, farelerin testislerine zararlı etkileriyle sonuçlandığını bildirilmiştir (Li ve ark., 2013)

Çalışmamızda apoptozisin intrinsek yolağını belirlemek için Caspase-3 enzimini kullandık. Caspase 3 pozitifliğinin Grup 1 ve Grup 2 de yüksek derecede tespit edilirken Grup 3 de pozitifliğin azaldığını hatta akut dozda herhangi bir etkinin olmadığını gözlemledik

Otofaji, kelime anlamı olarak kendi kendini (auto) yeme (phagy) anlamına gelir ve hücrenin açlıkla karşılaştığı fizyoloji koşullarda, besin elde etmek için hücre içindeki yapıları nasıl parçalandığını ifade etmek amacı ile kullanılmıştır. Hücre içi makro moleküllerin ve organellerin bir kesecik içine alınarak lizozomlara yönlendirilmesi ve lizozomla birleşerek burada parçalanmasına yol açan bir mekanizmadır. Kısa ömürlü proteinlerin ubiquitin-proteozom sisteminde parçalanmasına karşın, uzun ömürlü proteinler ve hücre içi organeller otofajinin sistemi tarafından parçalanırlar ve oluşan yapı taşları hücre kullanımı için yeniden kazandırılırlar (Shintani ve Klionsky., 2004; Ohsumi, 2001). Yapılan ilk çalışmalarda otofajinin, besin yokluğunda hücre içi moleküllerin geri dönüşümünü sağlayarak hücrenin stres ortamına uyumuna yardım ettiği böylelikle hücre homeostazisinin korunmasında etkili bir yol olduğu gösterilmiştir (Shintani ve Klionsky., 2004; Ohsumi Y, 2001). Son on yılda yapılan çalışmalar ise otofajinin; metabolizmanın

düzenlenmesi, morfogenez, hücre farklılaşması, yaşlanma, hücre ölümü ve bağışıklık sistemin bir parçası olarak hücre içi patojenlerin yıkımında da etkili bir rol oynadığını ortaya koymuştur (Shintani ve Klionsky., 2004; Mizushima ve ark., 2008). Araştırmalar, otofaji anormalliklerinin, kanser, enfeksiyon hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar gibi önemli sağlık sorunlarının da nedenleri arasında yer aldığını göstermektedir (Yang ve ark., 2008). Otofajinin açlık durumunda hücre sel yapı taşlarının yıkılarak geri dönüşümü ve hücrenin enerji depolarını yenileyerek apoptotik hücre ölümünü engellediği ya da zıt olarak hücre ölümüne yol açtığı gösterilmesine ek olarak apoptozla ilişkili olduğu tespit edilmiştir (Maiuri ve ark., 2007; Liang ve ark., 2007). Otofagozomun oluşumunun düzenlenmesi ile ilgili olarak en az 30 adet Atg proteini, 3PI3K, m-TOR, AMPK (AMP-aktif protein kinaz), Beclin-1, gibi otofaji aktivasyonunda görev alan proteinler bulunmaktadır (Aparicio ve ark., 2016). Hasarlanmış 50 ya da işlevselliği bozulmuş proteinlerin ortadan kaldırılması otofaji yolu ile gerçekleşmektedir. Çevresel birçok etken de hücrelerde otofaji mekanizmasını tetiklemektedir (Komatsu ve ark., 2007). Patofizyolojik koşullar varlığında, otofajik ve apoptotik moleküler mekanizmalar arasında çapraz etkileşim olduğu yapılan daha önceki çalışmalarla bildirilmiştir (Zhang ve ark., ; Gallagher, 2016). Fizyolojik koşullar altında, Beclin-1 ve Bcl-2, otofaji yolunun aktivasyonunu inhibe eden kompleks bir bileşik oluşturur. Hipoksi koşullarında ise, HIF-1 α 'nın ekspresyonu, BNIP3'ü önemli ölçüde artırır. BNIP3, Bcl-2 veya Bcl-XL ile reaksiyona girer ve sonunda, Beclin-1 / Bcl-2 kompleks bileşiminden Beclin-1'i serbest bırakacak olan heterodimeri oluşturur. Ardından, serbest kalan Beclin-1 otofaji yolunu aktive eder (Lessene ve ark., 2008). İmmünohistokimyasal olarak yapılan analizlerde, Beclin-1 'in spermatogonik hücre serileri ve interstisyel hücreler içerisinde lokalize olduğunu doğrulamıştır (Deretic, 2011)

Bizde çalışmamızda otofajik hücre ölümünü değerlendirmek için Beclin 1 proteinini kullandık fakat Beclin 1 ekspresyonu değerlendirmesinde ekspresyonun gruplar üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını gözlemledik.

Nekroz, rastgele gelişen, genler tarafından kontrol edilemeyen düzensiz bir süreçtir. En yaygın nedeni hipoksidir. Arsenik, siyanid, insektisitler gibi toksik maddeler ve kadmiyum gibi ağır metaller nekroza neden olur. Kadmiyum germ hücrelerinde apoptoz ve nekroza sebep olmaktadır. Kadmiyumun sebep olduğu

testiküler nekroz sonucu, kalıcı infertilite ortaya çıkabilmektedir. Testis dokusundaki kadmiyum seviyesi arttıkça, seminifer tübüllerdeki apoptozis oranı artmakta ve semen parametrelerindeki düzelme azalmaktadır (Kerr ve ark., 1972; Thompson, 1994). Yapılan bir çalışmada 1 mg/ml intraperitoneal kadmiyum uygulamasından 24 saat sonra testislerde şiddetli ödem, daha uzun süreli uygulamalarda ise atrofi, tübüllerde nekroz ve tübüller arası bağ dokusunda fibrozis meydana geldiği belirtilmektedir (Howley ve Fearnhead, 2008)

Dışarıdan gelen fiziksel ve kimyasal uyarılar (ısı, yanma, toksik md.) hücrenin iyon dengesini bozar ve ATP üretimini azaltır. Bu durumda gerçekleşen ATP noksanlığı, iyon pompası yetersizliğine yol açar, mitokondriyal ROS üretimi artar, nonapoptotik proteazlar aktive olur, ve Ca^{++} kanalları açılır (Nicholson, 1999; Youle ve Strasser, 2008). Böylece hücre sıvı alır ve organeller şişer. Plasma membran bütünlüğü bozulur ve osmotik basınç nedeniyle hücre patlar. Hücre ölümünü takiben hücre içeriğinin hücreler arası boşluğa salınması yangı (enflamasyon, iltihaplanma) olayına sebep olur. Bu olayın karakteristik özelliği makrofaj ve nötrofillerin nekrotik dokuya göç etmesidir. Göç eden bu hücreler nekrotik dokuyu fagosit eder. Bu nedenle enflamasyon nekrozun önemli bir işaretidir (Nicholson, 1999; Youle ve Strasser, 2008). Nekrozis mekanizmasında Fas, TNF reseptörlerinin aktivasyonu veya hücrel stres sonucu RIP1 ve RIP3 (Receptor interacting proteinler) aktive olur. RIP1 ve RIP3 mitokondriyonu ya direkt aktive eder ya da NADPH oksidazın oluşturduğu ROS ile indirekt olarak etkileyip nekrozu indükler⁴. Nekrotik uyarı ayrıca PARP'i aktive eder. PARP1 de kalpain aktivasyonu, RIP kinazların aktivasyonu ya da PAR polimerazlar yoluyla nekroza neden olur. (Nicholson, 1999; Youle ve Strasser, 2008).

Çalışmamızda nekroptotik hücre ölümünü değerlendirmek için RIP3 ve primer antikorlarıyla immunohistokimyasal metot uygulandı. Nekroptotik hücre ölümü belirteci olan RIP3 ekspresyonu sadece Grup 1 de tespit edildi

Calretinin, kalsiyum bağımlı EF-el yapısına sahip intrasellüler bir proteindir (King ve Hasleton, 2001; Rogers, 1987). Birbiri ardına gelen kendine has aminoasit sırasıyla karakterizedir, kalsiyum bağlı bölümler sarmal-döngü-sarmal şeklinde katlanmıştır (Rogers ve ark., 1990). Kalsiyum bağlayıcı proteinler hücre içinde kalsiyum konsantrasyonundaki değişime bağlı olarak enzim, kanal ve yapısal

proteinlerin aktivitelerini düzenlerler (Ivanov ve ark., 2001). Bu proteinlerin büyük bir bölümü EF-el adı verilen ortak kalsiyum bağlayıcı motife sahiptir. Kalsiyum iyonu, üremeden apoptozise kadar birçok hücrel fonksiyonun kontrolünden sorumlu ikincil haberci moleküldür (Bouschet ve Henley, 2005). Calretinin ilk kez santral ve periferel nöral dokularda tarif edilmiştir (Doglioni ve ark., 1996; Festeh ve ark., Abati, 2001; Leers ve ark.,1998). Daha sonra nonnöral hücreler, adipositler, böbrek tubulusları, Leydig ve Sertoli hücreleri, ekrin bezler ve mezotelyal hücrelerde de bulunmuştur (Dei Tos ve Doglioni, 1998; Doglioni ve ark., 1996).

Çalışmamızda Calretinin ekspresyonunda Grup 2 de yüksek bir etkiye sahip olduğunu Grup 1 ve Akut doz grubunda belirgin bir artışın olduğunu Grup 3 de ise azalma olduğu gözlemlendi.

5.SONUÇ

Çalışmamızda elde edilen sonuçlarda;

Yüksek doz kadmiyumun tek dozda alımı ani hayvan ölümlerine neden olduğu saptandı.

Ayrıca yüksek doz alımının 24 saat sonra testislerin çapında belirgin azalmaya sebep olduğu tespit edildi.

Doza bağlı kadmiyum alımının anormal seminifer tübül yapısı, spermatogenik epitelyal germ hücrelerinin kısmi kaybı ve spermatogenik seride eksiklikler olduğu tespit edildi.

Kadmiyumun ürogenital sistem üzerindeki olumsuz etkileri olduğu kanısına varılarak başka çalışmalarla da tekrar değerlendirilmesini düşünmekteyiz.

ÖZET

Testiste Yer Alan Hücrelerde Akut Ve Kronik Kadmiyum Alımına Bağlı Hücre Ölümünün Değerlendirilmesi

Kadmiyum tarımsal ve endüstriyel işlemlerde yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır ve çevreye salınarak hava, toprak ve su kirliliğine neden olur. Hızlı endüstriyel ve tarımsal gelişmelere bağlı olarak kadmiyum kirliliği, yaygın sorun haline gelmiştir. Çünkü kadmiyuma maruz kalma hem genel popülasyon hem de belirli meslek grupları için bir risk oluşturmaktadır. Kadmiyum, vücutta 40 yıla kadar kalabilir, bu nedenle uzun süre insan sağlığına zarar verebilir ve üreme hormon düzeylerini etkileyebilmekte, sperm kalitesini düşürebilmekte ve hatta erkek infertilitesine neden olabilmektedir. Bununla birlikte, günümüzde kadmiyum kaynaklı testis hasarının altında yatan mekanizma çalışmaları sınırlıdır. Ancak gerek erkek ve gerekse dişi üreme sistemi üzerinde toksisitesini belirleyen mekanizmalar açık değildir.

Bizde yaptığımız tez çalışmamızda, kadmiyumun sıçan testisleri üzerindeki zararlı etkilerini ve bu süreçte hücre ölümünün önemini inceledik. 30adet Wistar Albino tipi erkek rat 5eşit gruba ayrılarak kullanıldı. Gruplar Kontrol grubu, Grup 1, Grup 2, Grup 3 ve akut doz grubu olacak şekilde düzenlendi. Ratlara 21 gün süreyle Kadmiyum klorür gavajla verildi. Deney sonunda, ratlar sakrifiye edildi ve testis dokuları alındı. Histolojik takip yapılan testisler immünohistokimyasal boyama yapılarak histopatolojik olarak incelenip, immünopozitif hücreler sayılarak oranlandı ve sonuçlar istatistiksel olarak analiz edildi. Aynı zamanda testis ağırlıklarına bakılarak gelişim açısından incelendi

Sonuç olarak; Hematoksilen-eozin ve pas boyamada, kontrol grubunda herhangi bir histopatolojik bulguya rastlanmazken Grup 3 ve akut dozda dejeneratif testis dokusu, anormal seminifer tübül yapısı gözlemlendi. Beclin 1 ekspresyonu tüm gruplarda negatifken RIP3 ekspresyonu sadece Grup 1 de pozitiflik gösterdi. Caspase-3 pozitifliği Grup 1 ve Grup 2 dozlarında yüksek derecede mevcutken, Grup 3 de azaldığını akut grupta ise negatif oldukları gözlemlendi. Calretinin pozitiflikleri Grup 2 de yüksek bir etkiye sahip olduğunu Grup 1 ve Akut doz grubunda belirgin bir artışın olduğunu Grup 3 de ise azalma olduğu gözlemlendi. Kadmiyumun ürogenital sistem üzerindeki olumsuz etkileri olduğu kanısına varılarak başka çalışmalarla da tekrar değerlendirilmesini düşünmekteyiz. Bu sayede Kadmiyum aracılı testis hasarlarının etyolojisi ve tedavisinde uygun metodolojinin belirlenmesine katkı sağlanabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Kadmiyum, Testis, Histopatoloji, Apoptoz, Nekroz, Otofaji.



SUMMARY

The Evaluation Of The Cell Death In Acute and Chronic Intake of Cadmium Induce Testicular Cells

Cadmium is a chemical commonly used in agricultural and industrial processes and is released into the environment causing air, soil and water pollution. Cadmium pollution, due to rapid industrial and agricultural developments, has become a common problem. Because exposure to cadmium is a risk for both the general population and certain occupational groups. Cadmium can remain in the body for up to 40 years, thus damaging human health for a long time and may affect reproductive hormone levels, reduce sperm quality and even cause male infertility. However, the mechanism studies underlying the testicular damage caused by cadmium are limited. However, the mechanisms that determine the toxicity of both male and female reproductive systems are not clear.

In our thesis study, we examined the harmful effects of cadmium on rat testes and the importance of cell death in this process. 30 Wistar Albino male rats were divided into 5 groups. The control group was arranged as Group 1, Group 2, Group 3 and acute dose group. Cadmium chloride was given to the rats by gavage for 21 days. At the end of the experiment, rats were sacrificed and testicular tissues were taken. Histological examination of the testes was done by histopathological examination and immunopositive cells were counted and the results were statistically analyzed. At the same time, testis weights were examined for development.

As a result; In hematoxylin-eosin and rust staining, no histopathological findings were observed in the control group, while degenerative testicular tissue and abnormal seminiferous tubule structure were observed in Group 3 and acute doses. Beclin 1 expression was negative in all groups, while RIP3 expression was positive only in Group 1. While Caspase-3 positivity was high in Group 1 and Group 2 doses, it was decreased in Group 3 and negative in the acute group. The positivity of calretin was found to be high in Group 2, significant increase was seen in Group 1 and acute dose

group and decreased in Group 3. We think that cadmium may have negative effects on urogenital system and be reevaluated with other studies. In this way, it will be possible to contribute to the determination of the appropriate methodology in the etiology and treatment of Cadmium mediated testicular injuries.

Keywords: Cadmium, Testis, Histopathology, Apoptosis, Necrosis, Autophagy



KAYNAKLAR

- ADAMKOVÍCOVA M, TOMAN R, MARTĚŇÁKOVÁ M, OMELKA R, BABOSOVÁ R, KRAJCOVÍCOVA V, ET AL. (2016) Sperm motility and morphology changes in rats exposed to cadmium and diazinon. *Reprod Biol Endocrinol*; 14: 42. doi: 10.1186/s12958-016-0177-6 and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (9): p. 741-52.
- ARINCI K, ELHAN A. (2014) Anatomi. Güneş tıp kitabevleri; 330- 333.
- ASAGBA SO, OBI FO. (2004) Effects of Oral Cadmium Exposure on Renal Glomerular and Tubular Functions in The Rat *J Appl Sci Environ Mgt*; 8: 29–32.
- BALDWIN DR, MARSHALL WJ. (1999 May); 36 Heavy metal poisoning and its laboratory investigation. *Ann Clin Biochem.* (Pt 3):267-300. Review. PubMed PMID: 10376071.
- BARR, P.J. AND L.D. Tomei (1994). Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology (N Y)*,. 12(5): p. 487-93.
- BENCH G, CORZETT MH, MARTNELL R, ET AL. (1999) Cadmium Concentrations in the Testes, Sperm, and Spermatids of Mice Subjected to Long- Term Cadmium Chloride Exposure. *Cytometry*; 35: 30–36.
- BENOFF S, AUBORN K, MARMAR JL, HURLEY IR. (2008) Link between low-dose environmentally relevant cadmium exposures and asthenozoospermia in a rat model. *Fertil Steril*;89(2 Suppl):e73–9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.12.035
- BEREKET G, YÜCEL E, (1990) Monitoring of Heavy Metal Pollution of Traffic Origin in Eskişehir. *Doğu-Tr J Chem*, 14,; 266-271.
- BERNE RM, LEVY MN, KOEPPEN BM, STANTON BA, (2008). Çeviri; Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Fizyoloji, 5. Baskı, Güneş Tıp Kitabevi, Ankara.
- BOBILLIER SC, MAUPOIL V, BERTHELOT A. (2006) Metallothionein Induction in The Liver, Kidney, Heart and Aorta of Cadmium and Isoproterenol Treated Rats, *Journal of Applied Toxicology*; 26: 47–55.
- BOSCOLO P, SACCHETTONI-LOGROSCINO G, RANELLETTI FO, ET AL. (1985) Effects of Long Term Cadmium Exposure on The Testis of Rabbits, Ultrastructural study. *Toxicol Lett*; 24: 145-9.
- BOUSCHET T, HENLEY JM. (2005) Calcium as an extracellular signalling molecule: Perspectives on the calcium sensing receptor in the brain. *C. R. Biol.*;328:691-700.
- BYRNE C, DIVEKAR SD, STORCHAN GB, PARODI DA, AND MARTIN MB. (2009) Cadmium – a metallohormone? *Toxicol Appl Pharmacol*;238:266–71. doi: 10.1016/j.taap.2009.03.025

- CAMERON E, FOSTER CL. (1963) Observation on the histological effects of sublethal doses of cadmium chloride in the rabbit. The effects on the testis. *J Anat* ; 97: 296-280.
- CASALINO E, CALZARETTI G, SBLANO C, LANDRISCINA C, (2002) Molecular Inhibitory Mechanisms of Antioxidant Enzymes in Rat Liver And Kidney By Cadmium. *Toxicol*; 179, 37-50.
- CHEN H, GE RS, ZIRKIN BR. (2009) Leydig cells: From stem cells to aging. *Mol Cell Endocrinol*; 306(1-2):9-16.
- CHUNG A, MAINES MD. (1987) Differential effect of cadmium on gsh-peroxidase activity in the leydig and the sertoli cells of rat testis. *Biochemical Pharmacology*; 36: 1367-1372.
- CHUNG NP, CHENG CY. (2001) Is cadmium chloride-induced intersertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology*;142:1878– 88. doi: 10.1210/endo.142.5.8145
- ÇİLENK KT, ÖZTÜRK İ, SÖNMEZ MF. (2016) Ameliorative effect of propolis on the cadmium-induced reproductive toxicity in male albino rats. *Exp Mol Pathol* ;101:207–13. doi: 10.1016/j. yexmp.2016.08.004
- ÇOLAKOĞLU N, KÜKNER A, KARA H, VE ARK. (2004) Sıçan Testis Dokusunda Kadmiyum Klorür'ün Olusturduğu Yapısal Değişiklikler ve Bu Değişiklikler Üzerine Metallothionein'nin Etkileri: Işık Mikroskopik Çalışma. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*; 24: 201-206.
- DAVISON AG, NEWMAN AJ, TAYLOR JD, ET AL. (1988) Cadmium Fume Inhalation and Emphysema. *Lancet*; 26: 663-667.
- DEI TOS AP, DOGLIONI C. (1998) Calretinin: A novel tool for diagnostic immunohistochemistry. *Adv Anat Pathol* .;5:61-66.
- DOGLIONI C, DEI TOS AP, LORINO L ET AL. (1996) Calretinin: A novel immunocytochemical marker for mesothelioma. *Am J Surg Pathol*.;20:1037-1046.
- edged sword. *Science*.. 306(5698): p. 990-5.
- ELİNDER CG, PİSCATOR M. (1978) Cadmium and Zinc Relationships. *Environmental Health Perspectives* ; 25: 129-132.
- ELMORE S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. 35: 495–516. 31.
- EVAN, G.I. AND K.H. VOUSDEN, (2001), Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*.. 411(6835): p. 342-8.
- FESTCH PA, ABATİ A. (2001) Immunocytochemistry in effusion cytology: A contemporary review. *Cancer*;93:293-308.

- FOWLER AJ, SINGH DH, DWIVEDI C. (1982). Effect of cadmium on meiosis. Bull. Environm. Contam. Toxicol.; 29: 412-415.
- FRIBERG L, ELINDER CG, KJELLSTROM T. (1986). Cadmium and Health: A Toxicological and Epidemiological Appraisal. CRC Press Boca Raton; 2: 247-255.
- FRIBERG L. (1984). Cadmium and the Kidney. Environ Health Perspect.;54, 1-11
- GANONG WF, (1999). Çev.Ed: Türk Fizyolojik Bilimler Derneği, Tıbbi Fizyoloji, 19.baskı, Ankara.
- GAVETT SH, OBERDORSTER G. (1994). Cadmium Chloride and Cadmium Metallotionein-Induced Pulmonary Injury and Recruitment of Polymorphonuclear Leukocytes. Exp Lung Res; 20: 517-537.
- GOYER R, (1996). Toxic Effect of Metals. In: Casarett and Doull's Toxicology. Mc-Graw And Hill Inc, Pp.; 699-701.
- GOZUACIK D, KIMCHI A. (2004). Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. Oncogene. 23:2891-2906.
- GUYTON AC, HALL JE, (2006). Çeviri Editörleri: Çavuşoğlu H., Çağlayan Yeğen B., Tıbbi Fizyoloji, 11.basım, Yüce yayımları A.Ş & Nobel Tıp Kitabevleri.
- HABEEBU SSM, LIU J, KLAASSEN CD. (1998). Cadmium-induced Apoptosis in Mouse Liver. Toxicol Appl Pharmacol ; 149: 203-209.
- HABERT R, LEJEUNE H, SAEZ JM. (2001). Origin, differentiation and regulation of fetal and adult Leydig cells. Mol Cell Endocrinol; 179(1-2):47-74.
- HAFFOR AS, ABOU-TARBOUSH FM. (2004). Testicular Cellular Toxicity of Cadmium: Transmission Electron Microscopy Examination. J Environ Biol; 25: 251-8.
- HAMADA T, TANIMOTO A, SASAGURI Y. (1997). Apoptosis Induced by Cadmium. Apoptosis; 2: 359-367.
- HESS RA, FRANÇA LR. (2005). Sertoli Cell Biology. Edited by Skinner MK. and Griswold MD, Elsevier Academic Press, California, USA,; 19-36.
- HEW KW, ERICSON WA, WELSH MJ. (1993) a single low cadmium dose causes failure of spermiation in the rat. Toxicol Appl Pharmacol;121:15-21. doi: 10.1006/taap.1993.1123
- HEW KW, HEATH GL, JIWA AH, et al. (1993) Cadmium in Vivo Causes Distruption of Tight Junction-Associated Microfilaments in Rat Sertoli Cells. Biol Reprod; 49: 840-9.
- HOTCHKISS RS, STRASSER A, MCDUNN JE, SWANSON PE. (2009). Cell Death, N Engl J Med. 361:1570-1583.
- HOWLEY, B. AND H.O. Fearnhead (2008). Caspases as therapeutic targets. J Cell Mol Med., 12(5A): p. 1502-16.

- HOWLEY, B. AND H.O. FEARNHEAD, (2008). Caspases as therapeutic targets. *J Cell Mol Med*, 12(5A): p. 1502-16. *Introduction to Pathology*. 6th edition. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders,
- IVANOV DB, PHİLİPOVA MP AND TKACHUK VA. (2001). Structure and functions of classical cadherins. *Biochemistry*;10:1174-11786.
- JANGUERİA LC, CARNEİRO J, KELLEY OR. (2006). Temel histoloji (Çev: Aytekin Y., Solakoğlu S., Ahışalı B.), Barış kitabevi,. s: 407-419, 431-433.
- JIANG HM, HAN GA, GAO HF, ET AL. (1995). The Correlation Studies of Maternal Zinc Level and Fetal Malformation. I. Study on the Antagonism of Compound Zinc Preparation to Cadmium-Induced Fetal Malformation. *Acta Academ Medi Shandong*; 33: 115-118.
- JOHNSON KE. (1991). *Histology and Cell Biology*. 2nd ed. USA: Harwal Publishing Company.
- KALAY M, KARATAS S. (1999). Kadmiyumun *Tilapia nilotica*'da Kas, Beyin ve Kemik (Omurga Kemigi) Dokularındaki Birikimi. *Tr J of Zoology*; 3: 985-991.
- KARANTZA-WADSWORTH, V., ET AL., (2007). Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev*,. **21**(13): p. 1621-35.
- KARATAŞ S. (1998). Sıçanlarda Kadmiyum Klorürün (Kadmiyumcl₂) Testis Dokusuna Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, şubat,
- KAYA S, AKAR F, (2002). Metaller, Diğer inorganik ve Radyoetkin Maddeler. In: Kaya S, Pirinçci , Bilgili A. Editörler, *Veteriner Hekimliğinde Toksikoloji*. Medisan Yay, 2. Baskı,; 207-250.
- KERR, J.F., A.H. WYLLİE, AND A.R. CURRIE, (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*,. 26(4): p. 239-57.
- KİERSZENBAUM AL. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Palme Yayıncılık, Ankara, (Çeviri Editörü: Demir R.). S: 672-683
- KİNG JE, HASLETON PS. (2001). Immunohistochemistry and the diagnosis of malignant mesothelioma. *Histopathology*.;38:471-476.
- KNİGHT RA, KUMAR S, LİPTON SA, MALORNI W, NUÑEZ G, PETER ME, TSCHOPP J, YUAN J, PİACENTİNİ M, ZHİVOTOVSKY B, MELİNO G (2009). Nomenclature Committee on Cell Death 2009. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*.
- KOÇAK M. (2004). Kronik Kadmiyum Toksisitesinin Hemostatik Sisteme Etkileri, Doktora Tezi, Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

- LAFUENTE A, MARQUEZ N, PÉREZ-LORENZO M, PAZO D, ESQUIFÍNO AI. (2001). Cadmium effects on hypothalamic-pituitary-testicular axis in male rats. *Exp Biol Med* (Maywood) 2001;226:605–11.
- LASKEY JW, PHELPS PV. (1991). Effect of cadmium and other metal cations on in vitro Leydig cell testosterone production. *Toxicol Appl Pharmacol*;108:296–306.
- LASKEY JW, REHNBERG GL, LAWS SC, HEIN JF. (1984). Reproductive effects of low acute doses of cadmium chloride in adult male rats. *Toxicol Appl Pharmacol*;73:250–5.
- LEERS MPG, AARTS MMJ, (1998). Theunissen PHMH. E-cadherin and Calretinin:a useful combination immunohistochemical markers for differentiation between mesothelioma and metastatic adenocarcinoma. *Histopathology*;32:209-216.
- LEONI G, BOGLIOLO L, DEIANA G, BERLINGUER F, ROSATI I, PINTUS PP, LEDDA S, NAITANA S. (2002 Jul-Aug). Influence of cadmium exposure on in vitro ovine gamete dysfunction. *Reprod Toxicol*;16(4):371-77.
- LESLIE P. GARTNER JLH. (2011). *Concise Histology*. 4th Ed: Elsevier.
- LHAN F. (2003). Evcil Hayvanlarda Testis Dejenerasyonları, *YYÜ Vet. Fak. Derg.*; 14:51-56
- LIANG J., ET AL., (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol.*, 9(2): p. 218-24.
- LIANG J., ET AL., (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol.*, 9(2): p. 218-24.
- LORDING DW, DE KRETZER DM. (1972). Comparative ultrastructural and histochemical studies of the the interstitial cells of the rat testis during fetal and postnatal development. *J Reprod Fertil*; 29(2):261-9.
- LUMACHI F. AND S. BASSO, (2002). Apoptosis: life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid diseases. *Thyroid.*, 12(1): p. 27-34.
- MAIURI M.C., ET AL., (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 8(9): p. 741-52.
- MARSELT AFW, SUZUKI KT, ROELOFSEN AM, ET AL. (1986). Increase of Cadmium-Thiolate Clusters As a Measure of Morfological Non- Toxic Cadmium Accumulation in the Rat Liver. *Toxicology*; 33-41.
- MASSÁNYI P, TOMAN R, NAJMIK F. (1995). Concentrations of Cadmium in Ovary, Oviductus, Uterus, Testis and Tunica Albuginea of Testis in Cattle. *J Environ Sci Health*; 30: 1685-1692.
- MASSANYI P, UHRIN V, TOMAN R, ET AL. (2005). Ultrastructural Changes of Ovaries in Rabbits Following Cadmium Administration. *Acta Vet Brno*; 74: 29–35.
- MATHEW R., ET AL., (2007). Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.*, 21(11): p. 1367-81.
- MERIAN M, WEINHEIM NY. (1991). *Cadmium and Their Compounds in the Environment*, VCH, Basel, Cambridge ; 803-851.
- MESCHER A. (2015). *Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap*. Nobel Tıp Kitapevleri,

- MİCHAEL H. ROSS WP. (2011). Histology: A Text And Atlas: With Correlated Cell And Molecular Biology. 6th Ed. 351 West Camden Street. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins,
- MİZUSHİMA, N., ET AL., (2008). Autophagy fights disease through cellular selfdigestion. Nature,. 451(7182): p. 1069-75.
- MOORE KL, PERSAUD TVN, LOND F. (1998). Introduction to the Developing Human ; 323-341.
- MOORE KL, PERSAUD TVN, TORCHİA MG.(2016) The developing human : clinically oriented embryology, 10th ed, Elsevier, Nat Rev Mol Cell Biol,. 2(3): p. 211-6.
- NİCHOLSON DW. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates and function during apoptotic cell death. Cell Death Differ. 6:1028-104225)
- NİESCHLAG E, BEHRE HM AND NİESCHLAG S. (2010). Andrology; Male Reproductive Health and Dysfunction. 3th Ed. Springer: Germany.
- NORDBERG GF, NOGAWA K, NORDBERG M, FRİBERG LT, (2005). Cadmium. In: Handbook on The Toxicology Of Metals, Eds; Nordberg GF, Fwler BA, Nordberg M, Friberg L, 3rd Edition, Academic Press, New York, Usa; 445-486.
- NORDBERG M. (1984). General Aspects of Cadmium:Transport, Uptake and Metabolism by the Kidney, Environmental Health Perspective; 54: 13-20.
- NOYAN A, (1993). Üreme Fizyolojisi, Fizyoloji, Sekizinci Baskı, Meteksan Anonim Şirketi.
- OHSUMİ, Y., (2001). Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nat Rev Mol Cell Biol,. 2(3): p. 211-6.
- OHTA H, YAMAUCHI Y, NAKAKITA M, ET AL. (2000). Relationship between Renal Dysfunction and Bone Metabolism Disorder in Male Rats after Long-term Oral Quantitative Cadmium Administration. Industrial Health; 38: 339-355.
- OLABARRİETE J, LAZOU B, YURİC C, CAMBAR J, CAJARAVİLLE M, (2001). In Vitro Effects of Cadmium on Two Different Animal Cell Models. Toxicol In Vitro;; 511-517.
- OLSON, M. AND S. KORNBLUTH, (2001). Mitochondria in apoptosis and human disease. Curr Mol Med,. 1(1): p. 91-122.
- O'SHAUGHNESSY PJ, BAKER PJ, JOHNSTON H. (2006). The foetal Leydig cell differentiation, function and regulation. Int J Androl ; 29(1):90-5.
- ÖKTEM S., ÖZHAN M., ÖZOL D. (2001). Apoptozisin Önemi,, Toraks Dergisi,2(1):91-95
- ÖZDAMAR S, SORKUN H. (2002). Genel Embriyoloji. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Kayseri: 4-6.
- PRASAD AS, BAO B, BECK FW, ET AL. (2004). Antioxidant Effect of Zinc in Humans, Free Radical Biology & Medicine; 37: 1182–1190.
- QU, X., ET AL., (2007). Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. Cell,. 128(5): p. 931-46.

- RENCÜZOĞULLARI N. (2006). Ratlarda Deneyisel Olarak Oluşturulan Kadmiyum Toksikasyonu Üzerine Likopenin Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Mkü Sağ Bil Estitüsü,
- ROGERS J, KUAN M, ELLİS J. (1990). Calretinin and other CaBPs in the nervous system. *Adv Exp Med Biol.*;269:195-203.
- ROGERS J. (1987). Calretinin: A gene for a novel calcium binding protein expressed principally in neurons. *J Cell Biol.*;105:1343-1353.
- ROSS HM, PAWLİNA W. (2014). Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile Çeviri Editörü: Barış Baykal 6. baskı.. S:784-809
- ROSS MH AND PAWLİNA W. (2016). Histology: A text and atlas: with correlated cell and molecular biology. 7th edition Baltimore, Wolters Kluwer Health,
- ROSS MH, PAWLİNA W. (2011). Histology A Text And Atlas. 6th Ed. Baltimore, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.; 784-816
- SAB DART ID. (1996). Committee Draft, Evidence um Developmental and Reproductive Toxicity of Cadmium. Reproductive and Cancer Hazard Assessment Section (RCHAS), .
- SADLER TW. (2005). Langman Medikal Embriyoloji. 11. Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık,
- SANCAK B VE CUMHUR M, (2008). Foksiyonel Anatomi (Baş-Boyun Ve İç Organlar), 4.Baskı,Odtü Yayıncılık, Ankara
- SANCAK B, CUMHUR M. (2015). Fonksiyonel anatomi. 9. baskı. ODTÜ yayıncılık; 291-293
- SEARLE, J., J.F. KERR, AND C.J. BİSHOP, (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.*, 17 Pt 2: p. 229-59.
- SHIMADA H, NAGANO M, YASUTAKE A, ET AL. (2002).Wistar- Imamichi Rats Exhibit a Strong Resistance to Cadmium Toxicity. *Journal of Health Science*; 48: 201-203.
- SHİNTANİ, T. AND D.J. KLİONSKY, (2004). Autophagy in health and disease: a doubleedged sword. *Science.*, 306(5698): p. 990-5.
- SİMPSON BJ, WU FC, SHARPE RM. (1987). Isolation of human Leydig cells which are highly responsive to human chorionic gonadotropin. *J Clin Endocrinol Metab*; 65(3):415-22.
- SİU ER, MRUK DD, PORTO CS, CHENG CY. (2009). Cadmium induced testicular injury. *Toxicol Appl Pharmacol*;238:240–9. doi: 10.1016/j.taap.2009.01.028
- SİU ER, WONG EW, MRUK DD, SZE KL, PORTO CS, CHENG CY. (2009). An occludin-focal adhesion kinase protein complex at the bloodtestis barrier: a study using the cadmium model. *Endocrinology*;150:3336–44. doi: 10.1210/en.2008-1741
- SKOWERSKI M, KONECKI J, CZECHOWICZ K, ET AL. (1997). Effects of Interaction between Cadmium and Selenium on Hepatic Metabolism in Mice. Part I: The Study on DNA, RNA and Protein Synthesis Activities in Mouse Hepatocytes. *Med Sci Monit*; 3: 642-647.

- SULTAN SM, HABEEBU LJ, KLAASSEN CD. (1998). Cadmium-Induced Apoptosis in Mouse Liver, Toxicology and Applied Pharmacology; 149: 203–209.
supposedly different processes. Apoptosis, 13(1): p. 1-9.
- SUZUKI KT. (1984). Studies of Cadmium Uptake and Metabolism by the Kidney, Environmental Health Perspective.; 54: 21-30.
- SUZUKI Y. (1980). Cadmium Metabolism and Toxicity in Rats after Long-term Subcutaneous Administration. J Toxicol Environ Health ; 6: 469-482.
- SWERDLOFF RS, WANG C. (1993). Androgens and aging in men. Exp Gerontol; 28(4-5):435-46.
- TANYOLAÇ A. (1999). Özel Histoloji. 3. Baskı. Ankara: Yorum Basın Yayın;
- TAYLOR J, ENNEVER FK. (2008). Toxicological Profile for Cadmium. Inc Cleveland September
- TAYLOR J, ENNEVER FK. (1993). Cadmium, ATSDR Toxicological Profiles Atlanta Ga Life Systems. Inc Cleveland.
- TEKELİOĞLU M. (2002). Özel Histoloji, İnce Yapı ve Gelişme, Erkek Üreme Sistemi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara; 231-244.
- THOMPSON, E.B., (1994). Apoptosis and steroid hormones. Mol Endocrinol,. 8(6): p. 665-73.
- THORBURN, A, (2008). Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two
- TOSUN M, (1998). İnsan Gonadlarının İntrauterin Gelişiminin Histolojik Değerlendirilmesi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Embriyoloji (TIP) Anabilim Dalı, Doktora Tezi-Konya.
- UGHEY E, FELL GS, SCOTT R, ET AL. (1984). Histopathology of Early Effects of Oral Cadmium in the Rat Kidney, Environmental Health Perspectives 1984; 54: 153-161.
- WALKER EM JR, GALE GR, GREENE WB, VESELY J, NICHOLSON JH, ATKINS LM, SMITH AB, JONES MM, HENNIGAR GR. (1984). Effects of substituted dithiocarbamates on the testicular toxicity of cadmium. Res Commun Chem Pathol Pharmacol. Dec;46:449-67.
- XU LC, WANG SY, YANG XF, WANG XR. (2001). Effects of cadmium on rat sperm motility evaluated with computer assisted sperm analysis. Biomed Environ Sci;14:312–7.
- YAMANO T, SHIMIZU M, NODA T, (1998). Age-Related Change in Cadmium- Induced Hepatotoxicity in Wistar Rats: Role of Kupffer Cells and Neutrophils. Toxicology and Applied Pharmacology; 151: 9–15.
- YANG, C., ET AL., (2008). Autophagy is associated with apoptosis in cisplatin injury to renal tubular epithelial cells. Am J Physiol Renal Physiol,. 294(4): p. F777-87.
- YILDIRIM M, (2012). İnsan Anatomisi, Yedinci Baskı, Nobel Tıp Kitapevi.
- YILDIRIM M. (2016). Topografik Anatomi. 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri.
- YOULE R, STRASSER A. (2008). The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 9:47–59.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Afyonkarahisar ilinde doğdum. İlk ve Ortaokul eğitimimi Oruçoğlu ilköğretim okulunda, lise eğitimimi, Afyonkarahisar Cumhuriyet Lisesinde tamamladım. 2009 yılında Denizli Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi İngilizce- Biyoloji Bölüm'ünde üniversite eğitimine başladım. 2014 -2015 yılları arasında Erasmus programı ile Romanya'nın Oradea şehrine gidip biyoloji eğitimimi tamamladım. 2015-2016 yılları arasında Pedagojik Formasyon Eğitimini tamamlayarak, 2017 yılında Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim dalında yüksek lisans eğitimine başladıktan sonra bu alanda kendimi yetiştirmek için ulusal ve uluslar arası kongrelere katıldım;

- Uluslararası Sözlü Bildiri
 - Murat Tosun, Sibel Çetinbaş Kadmiyum alımının rat testislerinde oluşturduğu histopatolojik değişikliklerin incelenmesi İnes Uluslararası Kongresi, Alanya 2018
- Ulusal Sözlü Bidiri
 - Murat Tosun, Sibel Çetinbaş, Esra Gökalp, Mustafa Kabu, Esra Aslan Boraks alımına bağlı mide mukozasında görülen değişikliklerin histolojik değerlendirilmesi THED Ulusal Kongresi Antalya 2018