

T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

ERİŞKİN SIÇANLARDA ETAN DİMETAN SÜLFONAT TARAFINDAN  
OLUŞTURULAN TESTİS HASARININ VE BU HASARIN ÖNLENMESİNDE  
ÇEŞİTLİ VİTAMİNLERİN ETKİNLİĞİNİN DEĞİŞİK YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI

Dr. Murat KILIÇOĞLU

Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR  
2007  
T.C.  
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

**TIP FAKÜLTESİ**

**ERİŞKİN SIÇANLARDA ETAN DİMETAN SÜLFONAT TARAFINDAN  
OLUŞTURULAN TESTİS HASARININ VE BU HASARIN ÖNLENMESİNDE  
ÇEŞİTLİ VİTAMİNLERİN ETKİNLİĞİNİN DEĞİŞİK YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Murat KILIÇOĞLU**

**Histoloji ve Embriyoloji  
Anabilim Dalı  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof.Dr.Varol ŞAHİNTÜRK**

**ESKİŞEHİR  
2007**

## TEŐEKKÖR

Eskişehir Osmangazi Üniwersitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile mesleki açıdan ilerlememi sağlayan sayın hocalarım Prof. Dr. Ergin AÇIKALIN'a, Prof. Dr. Cengiz BAYÇU'ya, Prof. Dr. Firdevs GÜRER'e, Prof. Dr. Erinç ARAL'a, Prof. Dr. Varol ŐAHİNTÖRK'e; ve birlikte çalıőtđım arkadaşım Dr. Dilek BURUKOĐLU'na yardımları ve destekleri için teőekkör ederim.

## ÖZET

**Kılıçoğlu, M. Erişkin sıçanlarda etan dimetan sülfonat tarafından oluşturulan testis hasarının ve bu hasarın önlenmesinde çeşitli vitaminlerin etkinliğinin farklı yöntemlerle araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2007.**

Çalışmamızda tek doz EDS uygulaması sonucunda sıçan testisinde görülen hasarın farklı doz ve sürelerde E vitamini ve C vitamini kullanılarak ne oranda geriye döndürülebildiğini araştırmayı amaçladık. Deneyde her birinde 16 adet erişkin erkek Sprague-Dawley cinsi sıçan bulunan 5 grup oluşturuldu. Grupların, 1-EDS 2-DMSO (dimetilsülfoksit) 3-EDS+E vit, 4-EDS+C vit, 5-EDS+E vit+C vit şeklinde olması planlandı. Her gruptaki 16 hayvan eşit sayıdaki iki alt gruba ayrıldı (enjeksiyon sonrası 7 gün ve 14 gün olmak üzere). Deney öncesi her hayvanın vücut ağırlıkları tek tek tartıldı. EDS ilgili gruplara 75 mg/kg tek doz i.p.olarak, 1:3 oranında dimetilsülfoksit (DMSO) ile saf su içinde çözündürülerek deneyin ilk gününde verildi. E vit 100 mg/kg, C vit ise 200 mg/kg i.p. olarak deney süresi bitene kadar günde tek doz olarak verildi. Gruplardaki hayvanların yarısı 7. gün tartı sonrası anestezi madde verilmesinin ardından (Ketamine+Xylazine 90+10 mg/kg i.p.) derhal servikal dislokasyon ile öldürüldü. Geri kalan hayvanlar ise 14. gün sonunda aynı işlemlerle öldürüldü. Her iki testis çıkarılıp tartıldıktan sonra PAS+Hematoksilin boyama için sol testis Bouin fiksatifine sağ testis ise, immünohistokimyasal boyama için nötral tamponlu formaldehit içine alındı. Rutin testis takibi sonrası bloklanan örneklerden 5µm kalınlıkta kesitler alındıktan sonra PAS+Hematoksilinle boyanarak histopatolojik inceleme yapıldı. Serumda hormon miktarının tayini için gereken kan, göğüs kafesi açılarak doğrudan kalpten alındı. Sonuçta EDS sonrası oluşan testis ağırlığındaki azalma, E ve C vitaminlerinin gerek tek tek, gerekse beraber verilmeleri ile normale döndürülemedi. Ancak E ve C vitaminlerinin histopatolojik skor, serum testosteron seviyesi ve interstisyel Leydig hücreleri üzerine olumlu etki gösterdiği görüldü.

### Anahtar Sözcükler

Etan dimetan sülfonat, testis, E vitamini, C vitamini, sıçan

## ABSTRACT

**Kılıçoğlu, M. The protective effects of vitamin C and E on ethane dimethane sulfonate induced testicular degeneration using different techniques. Eskişehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Medical Speciality Thesis in Department of Histology and Embryology, Eskişehir, 2007.**

We aimed in this study to investigate the potential recovery effects of vitamins C and E in different doses and two different time intervals against ethane dimethane sulfonate (EDS)-induced testicular degenerations. Animal groups that planned to use in this study and their treatments are as follows: Group I: Each animal received a single i.p. dose of EDS, Group II: Each animal received a single i.p. dose of vehicle (dimethylsulfoxide and bidistilled water at 1:3 ratio), Group III: Each animal received a single i.p. dose of EDS, and subsequently daily i.p. injections of vit E, Group IV: Each animal received a single i.p. dose of EDS, and subsequently daily i.p. injections of vit C, Group V: Each animal received a single i.p. dose of EDS, and subsequently daily i.p. injections of vit C+vit E. All groups of the rats subdivided into two subgroups that include 7 rats in each and killed after 7 or 14 days after first injections. The doses that we use were 75 mg/kg bw for EDS, 100 mg/kg bw for vit E, and 200 mg/kg bw for vit C. The body weights (immediately before the start and at the end of the study) and both testicular weights measured. Animals anaesthetized with a mixture of ketamine and xylazine at the doses of 90 and 10 mg/kg bw respectively and then killed by cervical dislocation. Testes processed for routine paraffin technique. Tissue blocks were cut at a thickness of 5 µm and then these were stained either with PAS+hematoxyline method or with immunohistochemistry. Testicular sections were evaluated by light microscopy. Serum testosterone levels were measured. In conclusion we observed that both vitamin E and C have positive effects on histopathologic score, blood testosterone level and amount of Leydig cells in testis tissue.

### **Keywords**

Ethane dimethane sulfonate, testis, vitamin E, vitamin C, rat

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1.GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Testis Anatomisi.....	3
2.2.Testisin Embriyolojisi.....	5
2.3.Testis Histolojisi.....	11
2.4.Testisin Histofizyolojisi.....	25
2.5.Vitamin E.....	28
2.5.1.Vitamin E'nin Biyolojik Sistemlerdeki Rolü.....	28
2.5.2.Vitamin E'nin Biyokimyasal İşlevleri.....	29
2.5.3.Vitamin E'nin Dokular Üzerine Olan Koruyucu Etkisi.....	31
2.6.Vitamin C.....	34
2.6.1. Vitamin C'nin Biyolojik Sistemlerdeki Rolü.....	34
2.6.2. Vitamin C'nin Dokular Üzerine Olan Koruyucu Etkisi.....	35
2.7. Etan Dimetan Sülfonat (EDS).....	36
3.GEREÇ ve YÖNTEM.....	39
3.1.Hayvanlar.....	39
3.2.EDS Hazırlanması ve Uygulaması.....	41
3.3.Vitamin E.....	41
3.4.Vitamin C.....	41

3.5.Dokuların Alınması ve Değerlendirmesi.....	41
3.5.1.İmmünohistokimya Prosedürü.....	42
3.5.2.Testis ağırlık İndeksi Hesaplaması.....	44
3.6.Hormon Analizi.....	44
3.6.1.Serum Testosteron Ölçüm Prosedürü.....	45
3.7.İstatistik.....	45
4.BULGULAR.....	46
4.1.Testis Ağırlık İndeksi.....	46
4.2.Histopatolojik Bulgular .....	48
4.3.Serum Hormon Düzeyi.....	73
4.4.Toplam Testis Ağırlığı.....	76
4.5.Deney Sonu Vücut Ağırlığı Farkı.....	78
5.TARTIŞMA.....	81
5.1. Testis Ağırlık İndeksi.....	81
5.1.1.EDS'nin etkisi .....	81
5.1.2.E ve C Vitaminlerinin Etkisi .....	83
5.1.3.Kilo Kaybı.....	85
5.2.Histopatoloji.....	86
5.2.1.EDS'nin Testis Histolojisine Etkisi .....	86
5.2.2.E Vitamininin Etkisi.....	91
5.2.3.C vitamininin Etkisi.....	94
5.3.Serum Testosteronu.....	97
5.4.Makrofaj Artışı.....	99
6.SONUÇLAR.....	100
KAYNAKLAR.....	101

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

ABP	Androjen bağlayıcı Peptid
AMH	Antimüllerian Hormon
ATP	Adenozin Trifosfat
cm	Santimetre
dk	Dakika
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleikasit
EDS	Etan dimetan sülfonat
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
g	Gram
GSH	Glutasyon Peroksidaz
hCG	İnsan koryonik gonadotropin hormonu
i.p.	Periton içi
L	Lamina
LH	Lüteinizan Hormon
LH-RH	Lüteinizan Hormon Salgılatıcı Hormon
m	Metre
MHC	Major Histokompatibilite Antijeni
MIS	Müllerian İnhibitör Madde
µm	Mikrometre
ml	Mililitre
nm	Nano Metre
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Süperoksit Anyonu
OH <sup>-</sup>	Hidroksil Radikali
pg	Pikogram
SOD	Süperoksit Dismutaz
SRY	Y Kromozomunun Cinsiyet Belirleyen Bölgesi
TAİ	Testis Ağırlık İndeksi
TBS	Tris Buffered Saline
TDF	Testis belirleyici faktör



## ŞEKİLLER

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 4.1-</b> Testis ağırlık indeksi ortalamaları.....	47
<b>Şekil 4.2-</b> Gruplara göre hasar skor puanı ortalamaları.....	49
<b>Şekil 4.3-</b> 7 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alan. (PAS+H).....	50
<b>Şekil 4.4-</b> 7 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alan. (PAS+H) .....	50
<b>Şekil 4.5-</b> 7 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alandaki testosteron pozitif Leydig Hücreleri (→) (İmmün+H) .....	51
<b>Şekil 4.6-</b> 7 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alandaki testosteron pozitif Leydig Hücreleri (→) (İmmün+H).....	51
<b>Şekil 4.7-</b> 14 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alan (PAS+H).....	52
<b>Şekil 4.8-</b> 14 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alan (PAS+H) .....	53
<b>Şekil 4.9-</b> 14 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alandaki testosteron pozitif Leydig Hücreleri (→) (İmmün+H).....	53
<b>Şekil 4.10-</b> 14 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alandaki Leydig Hücreleri (→) (İmmün+H) .....	54
<b>Şekil 4.11-</b> 7 Günlük EDS Grubu: Spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelme (}) ve interstisyel alandaki ödem görülmekte (*) (PAS+H)....	55
<b>Şekil 4.12-</b> 7 Günlük EDS Grubu: Mononükleer hücre sayısında artış, bazal membranda kalınlaşma (→) ve interstisyel alanda ödem görülmekte (PAS+H).....	55

- Şekil 4.13-** 7 Günlük EDS Grubu: Spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelleme görülmekte (İmmün+H).....56
- Şekil 4.14-** 7 Günlük EDS Grubu: Spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelleme, çok çekirdekli dev hücreler görülmekte (→) (İmmün+H) .....56
- Şekil 4.15-** 14 Günlük EDS Grubu: Spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelleme görülmekte (PAS+H).....57
- Şekil 4.16-** 14 Günlük EDS Grubu: Bazal membran kalınlaşması (►), damarlarda konjesyon (→) görülmekte (PAS+H).....57
- Şekil 4.17-** 14 Günlük EDS Grubu: Spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelleme görülmekte (İmmün+H).....58
- Şekil 4.18-** 14 Günlük EDS Grubu: Seminifer tübül duvarında incelleme ve çok çekirdekli dev hücreler (→) görülmekte (İmmün+H).....58
- Şekil 4.19-** 7 günlük EDS+Vit E Grubu: Normale yakın görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alanda ödem gözlenmekte(\*) (PAS+H).....59
- Şekil 4.20-** 7 günlük EDS+Vit E Grubu: İnterstisyel alanda az sayıda Leydig hücresi (→) ve ödem gözlenmekte (PAS+H) .....60
- Şekil 4.21-** 7 günlük EDS+Vit E Grubu: İnterstisyel alanda az sayıda testosteron pozitif Leydig hücreleri (→) ve tübül duvarında hasar gözlenmekte (İmmün+H)..... 60
- Şekil 4.22-** 7 günlük EDS+Vit E Grubu:İnterstisyel alanda az sayıda testosteron pozitif Leydig hücreleri (→) ve tübül duvarında hasar gözlenmekte (İmmün+H).....61
- Şekil 4.23-** 14 günlük EDS+Vit E Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alanda ödem görülmekte (\*) (PAS+H).....61

- Şekil 4.24-** 14 günlük EDS+Vit E Grubu: İnterstisyel alanda damar konjesyonu görülmekte (→). (PAS+H).....62
- Şekil 4.25-** 14 günlük EDS+Vit E Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücreleri görülmekte (İmmün+H).....62
- Şekil 4.26-** 14 günlük EDS+Vit E Grubu:İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücresi (→) görülmekte (İmmün+H)..... 63
- Şekil 4.27-** 7 günlük EDS+Vit C Grubu: Bazal membranda kalınlaşma (→) ve büzüşme görülmekte (PAS+H).....64
- Şekil 4.28-** 7 günlük EDS+Vit C Grubu Bazal membranda kalınlaşma (→) ve spermatojenik seri hücrelerinin lümene dökülmesi görülmekte (PAS+H)..... 64
- Şekil 4.29-** 7 günlük EDS+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücreleri (→) görülmekte (İmmün+H).....65
- Şekil 4.30-** 7 günlük EDS+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücreleri (→) görülmekte (İmmün+H).....65
- Şekil 4.31-** 14 günlük EDS+Vit C Grubu: Normale yakın seminifer tübül yapıları görülmekte (PAS+H).....65
- Şekil 4.32-** 14 günlük EDS+Vit C Grubu: Bazal membranda kalınlaşma (→) görülmekte (PAS+H)..... 66
- Şekil 4.33-** 14 günlük EDS+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücreleri görülmekte (→) (İmmün+H).....67
- Şekil 4.34-** 14 günlük EDS+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücreleri görülmekte (→) (İmmün+H).....67
- Şekil 4.35-** 7 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda damarlarda konjesyon görülmekte (PAS+H)..... 68
- Şekil 4.36-** 7 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: Leydig hücrelerinin (→) ortaya çıkmaya başladığı, tübül duvarının korunduğu görülmekte (PAS+H)... .....69
- Şekil 4.37-** 7 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig Hücreleri görülmekte (→) (İmmün+H .....69

- Şekil 4.38-** 7 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücreleri gözlenmekte (→) (İmmün+H) .....70
- Şekil 4.39-** 14 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: Seminifer tübül duvarının korunduğu görülmekte (PAS+H).....70
- Şekil 4.40-** 14 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda Leydig hücreleri (→) ve makrofaj (►) görülmekte (PAS+H).....71
- Şekil 4.41-** 14 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücreleri görülmekte (→) (İmmün+H).....71
- Şekil 4.42-** 14 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda Leydig hücreleri görülmekte (→) (İmmün+H).....72
- Şekil 4.43-** Gruplara göre ortalama serum testosteron düzeyleri.....74
- Şekil 4.44-** Toplam testis ağırlığı ortalamaları (g).....76
- Şekil 4.45-** Deney sonrası vücut ağırlığı.....78

## TABLOLAR

	Sayfa
<b>Tablo 2.1:</b> Erkek embriyodaki ürogenital yapıların yetişkindeki oluşumları ve kalıntıları.....	10
<b>Tablo 2.2:</b> Sertoli hücrelerinin görevleri.....	23
<b>Tablo 3.1:</b> Deney uygulama şeması (7 günlük grup).....	39
<b>Tablo 3.2:</b> Deney uygulama şeması (14 günlük grup).....	40
<b>Tablo 4.1:</b> TAI'lerinin ortalama±standart sapmaları.....	46
<b>Tablo 4.2:</b> 7 günlük grupların testis ağırlık indekslerinin karşılaştırması.....	47
<b>Tablo 4.3:</b> 14 günlük grupların testis ağırlık indekslerinin karşılaştırması.....	48
<b>Tablo 4.4:</b> Gruplara göre histopatolojik skor puanları ortalamaları....	48
<b>Tablo 4.5:</b> 7 günlük grupların histopatolojik skorlarının karşılaştırması.....	73
<b>Tablo 4.6:</b> 14 günlük grupların histopatolojik skorlarının karşılaştırması.....	73
<b>Tablo 4.7:</b> Gruplara göre serum testosteron düzeyleri ortalama ± standart sapma.....	74
<b>Tablo 4.8:</b> 7 günlük grupların serum hormon düzeylerinin karşılaştırması.....	75
<b>Tablo 4.9:</b> 14 günlük grupların serum hormon düzeylerinin karşılaştırması.....	75
<b>Tablo 4.10:</b> Gruplara göre toplam testis ağırlığı (g), ortalama ± standart sapma.....	76
<b>Tablo 4.11:</b> 7 günlük grupların toplam testis ağırlıklarının karşılaştırması.....	77
<b>Tablo 4.12:</b> 14 günlük grupların toplam testis ağırlıklarının karşılaştırması.....	77
<b>Tablo 4.13:</b> Grupların deney sonu vücut ağırlıkları (g) ortalama ± standart hata.....	78

<b>Tablo 4.14:</b> 7 günlük grupların deney sonu vücut ağırlıklarının karşılaştırması.....	79
<b>Tablo 4.15:</b> 14 günlük grupların deney sonu vücut ağırlıklarının karşılaştırması.....	79

## 1-GİRİŞ VE AMAÇ:

İnfertilite evli çiftlerin yaklaşık %10'unu etkileyen ve olguların yarısının erkekten kaynaklandığı bir hastalıktır. Bu erkekler ya sperm sayısındaki yetersizlik (oligospermi) ya da spermin defektif (azospermi) olmasından dolayı infertildir. Erkek infertilitesinin patogenezi hala tam olarak aydınlatılamamıştır (109).

EDS (etan dimetan sülfonat) doğada bulunmayan ve laboratuarda sentezlenebilen alkilleyici bir madde olup Leydig hücrelerine seçici sitotoksikite gösteren bir ajandır. Testis interstisyumundaki Leydig hücrelerinin tamamen ortadan kalkmasına neden olur. Leydig hücrelerinin yok olduğu ortamda, testisteki hücresel etkileşimlerin araştırılmasında bir model olarak kullanılmaktadır. EDS uygulamasından yaklaşık 3 hafta sonra testiste yeni Leydig hücreleri görülmeye başlanır ve 8-10 hafta sonra Leydig hücreleri tamamen eski sayısına ulaşır. Leydig hücrelerinin bu yenilenme olayı, mezenkimal hücrelerin Leydig hücrelerine dönüşmesi ve bu yeni hücrelerin puberte öncesi dönemdeki gibi mitozu ile gerçekleşir (7, 77, 97).

E vitamini son yıllarda özellikle antioksidan özelliği ve farklı ajanlara karşı vücuttaki koruyucu etkileri ile gündeme gelen bir maddedir (11, 47, 72). E vitamininin antioksidan ve koruyucu etkilerinin doza bağlı olduğu gösterilmiştir (48, 69, 103). Ayrıca spermatogenez üzerine olumlu etkisinin olduğu öteden beri bilinmektedir (2, 60).

C vitamini sülfidril gruplarını ve serbest radikalleri temizleyen, endojen oksidatif DNA hasarına karşı hücreleri koruyan suda çözünen önemli bir antioksidandır. Serbest oksijen radikallerinin etkisiyle dehidroaskorbik asite dönüşen C vitamini glutatyon enzim kompleksi yardımıyla rejenere olur (31). C vitamininin hızlı elektron transferleri yaparak; reaktif oksijen radikallerini temizlediği, lipid peroksidasyonunu

inhibe ettiği ve okside olmuş E vitamini miktarını azalttığı da bilinmektedir (66).

Sıçanlarda EDS uygulaması genellikle spermatogenezin hormonal kontrolü üzerinde çalışma amaçlı olmaktadır (107). Biz bu çalışmamızda tek doz EDS uygulaması sonrasında sıçan testisinde görölen hasarın farklı doz ve süreler E vitamini ve C vitamini kullanılarak ne oranda geriye döndürölebildiğini araştırmayı amaçladık.



## 2-GENEL BİLGİLER:

### 2.1.Testis Anatomisi

Testisler, erkekte temel üreme organı olup, sağlı sollu bir çift halde testis torbası (skrotum) denilen deri bir kese içinde asılı durumda bulunurlar. Testisler, uzun eksenleri yukarıdan aşağıya olup, yanlardan hafif basık ovoid organlardır. Beyaz görümlü ve kendine özgü bir sertliğe sahip olan testislerin büyüklükleri kişiden kişiye değişmekle beraber, ortalama 4-5cm uzunluğunda, 2-3cm genişliğinde, 2-3cm kalınlığında ve 20-30g ağırlığındadır. Testisler yaklaşık aynı büyüklükte olmalarına karşın, sağ testis sola göre % 10 daha ağırdır. Sol testis sağdakine göre biraz daha aşağıda yer alır. Ayrıca. Sıcaklıkları vücut sıcaklığından 3-4°C daha düşüktür (5, 17, 68, 110).

Testisler, karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler (5, 45, 50, 68, 89, 110). Erken fetal dönemde karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yer alan testisler fetus geliştikçe aşağıya doğru hareket ederek doğumdan hemen önce kanalis ingunalis yoluyla skrotuma inerler. Testislerin temel fonksiyonlarını yapabilmeleri için karın boşluğundan skrotuma inmeleri zorunludur. Testisler bu inişleri sırasında karın ön duvarı tabakalarını da sürüklerler. Bu yüzden şu tabakalarla kaplıdır.

- |                              |   |         |
|------------------------------|---|---------|
| a) Deri                      | } | Skrotum |
| b) Tunika dartos             |   |         |
| c) Fasia spermatika eksterna |   |         |
| d) Fasia kremasterika        |   |         |
| e) Fasia spermatika interna  |   |         |
| f) Tunika vaginalis testis   |   |         |

Testisin fascia medialis (iç yan yüz) ve fascia lateralis (dış yan yüz) olmak üzere iki yüzü, margo anterior (ön kenar) ve margo posterior (arka kenar) olmak üzere iki kenarı ekstremities superior (üst uç) ve ekstremities inferior (alt uç) olmak üzere de iki ucu vardır (5, 17, 49, 68, 110).

İç yan yüzü konveks olup, arkada üst kenara yakın bir bölümünden başka, büyük bir parçası tunika vaginalisin visseral laminası ile örtülüdür. Dış yan yüz de konveks ve tunika vaginalis ile örtülü olup testisin üst kenarında olan epididim ile komşudur. Biraz konveks olan arka kenar boydan boya epididim ile komşudur. Ön kenar serbesttir ve tunika vaginalis testisin parietal laminası ile komşudur (5, 17, 49, 68, 110).

Üst uç epididim başı ile örtülü olup burasını saran Lamina visseralis (epiorchium), doğrudan doğruya epididim üzerine atlar ve burada bir oluk meydana getirir. Bu şekilde oluşan kaput epididimisin hemen altında küçük oval bir cisimcik vardır. Appendiks testis denilen bu çıkıntı müller kanalı üst ucunun bir kalıntısıdır. Kaput epididimisin üstünde genellikle appendiks epididimisin denilen bir çıkıntı vardır. Bu ayrılmış bir duktuli efferentestir. Alt uçta ligamentum skrotale denilen elastik ve düz kas liflerinden meydana gelmiş bir skrotal bağ ile skrotuma tutunmuştur (5, 17, 49, 68, 110).

Testisler arterlerini aorta abdominalisten alırlar. Arteria testikularis testise varıncaya kadar karın boşluğunun büyük bir kısmını ve inguinal kanalı geçmek zorundadır. Arteria testikularis, testisin arka kenarından bezin içine sokulur ve mediastinum testiste bir çok dallar verir. Bu dallar septula testisleri izleyerek bezin her tarafına dağılırlar ve zengin kapiller ağı yaparak testis kanalcıklarını sararlar. Arteria testikularis ile arteria vesikalıs superior'un bir dalı olan arteria defferentialıs ve arteria femoralisten gelen ve skrotumda dağılan arteria

pubendae eksterna arasında anastomozlar var ise de arteria testikularis'in bağlanması veya kesilmesi, testiste hasara neden olur.

Venler duktus deferensin etrafında pleksus pampiniformis denilen bir ven ağı meydana getirirler. Bu ağdan önce iki, sonra birer tane vena testikularis meydana gelir. Vena testikularis dekstra, vena kava inferior'e, vena testikularis sinistra, vena renalis'e dökülür.

Sinirler, sempatik ve parasempatik lifler pleksus çöliakustan arteria testikularis çevresinde bulunan pleksus testikularis ile gelirler. Bu sinirler bezlerin çalışmasını kontrol ederler.

Testislerin lenf damarları funikulus spermaticus'u izler ve nodus lenfaticus ile birleşirler (5, 17, 49, 68, 110).

## **2.2. Testisin Embriyolojisi**

Bir canlının gelişimi, üreme hücrelerinin fertilizasyonla oluşturdukları seks kromozomlarının kombinasyonları (XX, XY) ile belirlense de erkek veya dişi gonadlarına ait morfolojik özellikler embriyonal gelişimin belirli bir evresine kadar ayırt edilemezler (13, 34, 36, 50, 91, 79, 89). Bu sürece farklılaşmamış safha, bu safhadaki gonadlara da farklılaşmamış gonad adı verilmektedir.

İlkel cinsiyet hücreleri büyük, yuvarlak ilkel üreme hücreleri olup, en erken 4. haftanın başında allantoisin çıkış noktasının yakınındaki vitellüs kesesinin endoderm hücreleri arasında görülür. Embriyonun katlanması sırasında vitellüs kesesinin dorsal kısmı embriyonun içinde kalır. Bu olurken ilkel cinsiyet hücreleri arka barsağın dorsal mezenteriy boyunca gonadal kabartılara göç ederler. 6. haftada ilkel cinsiyet hücreleri alttaki mezenkime girer ve primer cinsiyet kordonlarına ulaşır.

Burada germ kordanlarını yaparlar ve artık farklılaşmamış evre sona erer (13, 34, 36, 50, 91, 79, 89)

Gonadlar, üç kaynaktan köken alırlar (36, 91, 89)

\*Karın arka duvarını döşeyen mezotel (epitel)

\*Alttaki mezenkim (bağ dokusu)

\*Primordial germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri)

Gonadal gelişimin ilk belirtileri mezonefrozun medial bölgesi üzerindeki çöломik epitelyumun çoğalması ve alttaki mezenkimin yoğunlaşması ile meydana gelir. İnsanda 5. haftada ortaya çıkan bu çoğalma ürünü, genital kabartı olarak bilinir. Parmağa benzer şekilde alt mezenkime doğru inen epiteloid kordonlar henüz yeni gelişen primer seks kordonlarını andırırlar. Farklılaşmamış gonad yapısında dışta korteks, iç kısımda ise medulla bulunur. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklılaşmamış gonadın korteksi overe dönüşür. Medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse medulla testise dönüşür, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur (13, 34, 36, 50, 91, 79, 89).

Seks kromozom kompleksinde bir Y kromozomu taşıyan embriyolarda, genellikle testisler gelişmektedir. Testislerin gelişimi, koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır. Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler için SRY geni, farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu görmektedir. Testis belirleyici faktör (TDF), primer seks kordonlarını uyararak, onların farklılaşmamış gonadın medullasının derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece ağırsı görünümlü rete testis oluşur. Seks kordonlarının (seminifer kordonların) kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. 12. haftada yoğun tunika albugineanın gelişimi, fötüste testikular gelişim için oldukça

karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılır ve kendi mezenterisi olan mesorchium ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklılıklar (34, 36, 50, 91, 79, 89).

Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve androstenedion) salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalerin erkek yönünde farklılaşmasını indükte ederler. Testosteron üretimini insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek değerine ulaşmıştır. Testosterona ilaveten fetal testisler glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. Antimüllerian hormon (AMH), sertoli hücreleri tarafından salgılanır, hormonun salınması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik (müllerian) duktusların gelişimini baskılar (13, 14, 34, 36, 50, 91, 79,89).

Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar yani lümenleri yoktur. Puberteden itibaren lümen gelişir ve seminifer tübülüsleri oluştururlar. Seminifer tübül duvarında 2 tip hücre bulunur.

Sertoli hücreleri, destek hücreleri olan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler.

Spermatogonia, primordial sperm hücreleri olan bu hücreler, primordial germ hücrelerinden farklılıklar.

Sertoli hücreleri, fetal testiste seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktulileri (duktuli efferentes) oluşturan 15-20 adet mezonefrik

tübüller ile devam eder. Bu duktuliler, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanırlar.

28. haftada testisler arka karın duvarından ayrılarak inguinal halkanın derinliğine doğru yer değiştirirler. Sonuçta doğumdan önce genellikle skrotuma inmiş olurlar. Erkek ve dişi embriyonların ikisinde de iki çift üreme kanalı vardır. Mezonefrik kanallar (Wolff), erkek üreme sisteminin gelişmesinde önemli rol üstlenirken, paramezonefrik kanallar (Müller) dişi üreme sisteminin gelişmesinde rol oynarlar. 5 ve 6. haftada üreme sistemi farklılaşmamış dönemde iken üreme kanal çiftleri vardır.

Mezonefrik kanallar mezonefrik böbreklerden idrarı boşaltırlar ve erkek üreme sisteminin gelişmesinde önemli rol üstlenirler (13, 14, 34, 36, 50, 91, 79, 89). 8. haftada fetal testiste yapılan testosteronun etkisiyle mezonefrik kanalın proksimal kısmı oldukça kıvrılır ve epididimisi yapar. Kanalın geri kalan kısmı duktus deferens ve ejakülatuar kanalı yapar. Dişi fetüslerde mezonefrik kanallar daima tamamen kaybolur, sadece birkaç işlevsel olmayan artık kalır.

Paramezonefrik kanallar gonadların ve mezonefrik kanalların yanlarında gelişir ve dişi üreme sisteminin gelişiminde önemli rol üstlenirler. Paramezonefrik kanallar mezonefropların yan taraflarındaki mezotelin longitudinal invajinasyonlarının her yanında meydana gelir. Bu invajinasyonların köşeleri birbirine yaklaşır ve kaynaşarak paramezonefrik kanalları oluşturur. Huni şeklindeki kranyal uçları periton boşluğuna açılır. Paramezonefrik kanallar embriyonun ilerideki pelvis bölgesine ulaşana kadar kaudal olarak mezonefrik kanallara paralel seyrederek. Burada mezonefrik kanalları önden çaprazlar, orta hatta birbirlerine yaklaşır ve Y şeklindeki utero vajinal taslağı oluşturmak üzere kaynaşır. Bu tübüler yapı ürogenital sinüsün arka duvarına uzanır ve bir kabartı (sinüs=Müller tüberkülü) yapar. Sertoli hücreleri fetal testiste erkekleştirici hormonları (testosteron gibi) ve MIS denen bir maddeyi yapar. MIS yapımı 6-7. haftalarda başlar. İnterstisyel

hücreler ise testosteron yapımına 8. haftada başlar. Leydig hücreleri denen bu hücreler germ kordonları arasında kalan mezenkimden farklılaşır ve sayıları 4-6. aylarda en yüksek düzeydedir. Yapımı hCG ile uyarılan testosteron da mezonefrik kanalları erkek üreme kanallarını oluşturması için uyarır MIS ise epitelyal mezenkimal dönüşümle paramezonefrik kanalların yok olmasına neden olur. Mezonefroz dejenere olduğunda bazı mezonefrik tübüller kalır ve duktus eferentese dönüşür. Bu duktuslar mezonefrik kanala açılır. Mezonefrik kanal bu bölgede duktus epididimise dönüşür. Epididimisin distalinde mezonefrik kanal kalın bir düz kas yapısı kazanır ve duktus deferense dönüşür. Her mezonefrik kanalın kaudal ucundan yanlara dışarı doğru büyüyen yapılar seminal vezikülleri oluşturur. Bu bez çifti spermleri besleyen bir salgı yapar. Mezonefrik kanalın vesiküla seminalisin kanalları ile üretra arasında kalan kısmı ejakülatuar kanalı meydana getirir.

**Tablo.2.1** Erkek embriyodaki ürogenital yapıların yetişkindeki oluşumları ve kalıntıları Moore ve Persaud tarafından gösterilmiştir.

<b>Embriyonik yapı</b>	<b>Gelişmiş yapı</b>
İndifferensiye gonad	Testis
Korteks	Seminifer tübül
Medulla	Rete testis
Gubernakulum	Gubernakulum testis
Mezonefrik tübül	Duktuli efferentes Paradidimis
Mezonefrik kanal	Epididimis appendiks Epididimis kanalı Duktus deferens Üreter, pelvis, kaliks, toplayıcı tübüller Ejekulat kanalı, seminal vezikül
Paramezonefrik kanal	Testis appendiks
Ürogenital sinus	Mesane Üretra Prostatik tomurcuk Prostat Bulboüretral bezler
Sinüs tüberkülü	Seminal kollikulus
Fallus	Penis Glans penis Korpus kavernozum penis Korpus spongiosum penis
Ürogenital katlantılar	Penisin ventral görünümü
Labioskrotal kabartı	Skrotum



### 2.3. Testis Histolojisi

Skrotum içinde sağlı sollu yer alan iki adet testis, erkek üreme hücresi spermatozoonun üretildiği ve cinsiyet hormonu testosteronun üretilip salgılandığı hem ekzokrin hem endokrin işlevi olan yapılardır (18, 23, 24, 87, 37, 45, 96, 111). Testisler, gametlerin (sperm, spermatozoa) meydana getirilmesi (gametogenezis, spermatogenezis) ve steroid yapıdaki hormonların üretilip salgılanması (steroidogenezis) ile yükümlüdür. Spermatogenezis testislerin seminifer tübül adı verilen bölümlerinde olaylanır. Testisler, skrotum içinde spermatik kord ile asılı dururlar ve birbirlerinden septum skroti ile ayrılırlar. Testis tunika albuginea denen kalın fibröz bir kapsülle çevrilidir. Arka yüzünde sıkı bağ dokusu kısa bir mesafe boyunca tunika albugineadan içeriye doğru uzanarak mediastinum testis denen damarların girdiği ve duktuli eferentesin organdan çıktığı yeri meydana getirir. Septula testis denen ince fibröz yapılar mediastenden tunika albugineaya doğru ışınal olarak yayılır, testisi ~250 piramidal kompartmana (lobuli testes) ayırır. Testisin periferi yakınında, lobüller septuladaki fenestrasyonlar aracılığıyla birbirleriyle temas halindedir. Fakat bunlar mediastende birleştiklerinden lobüller tamamen ayrıdır.

Testiste 250-350 lobül bulunur (23, 24, 87, 37, 45, 96, 90). Lobüllerin her biri 1-4 seminifer tübül içerir. İnsanda iki testiste toplam 800-1200 seminifer tübül bulunur ve her biri 30-80 cm uzunluğundadır. Bunların çapı 150-250 µm'dir ve oldukça kıvrıntılıdır. Etrafı zengin kapillerlerle çevrilidir. Her testiste seminifer tübülün toplam uzunluğu 300-900 m'dir. Her piramidal lobun daralmış tepesinde seminifer tübüller tubuli rekti denen düz tübüllerle birleşirler. Bu birleşme noktaları, mediastinum testisteki bağ dokusu içerisinde bulunan ve boşlukları epitelle döşeli bir ağı, rete testisi oluştururlar. Buradan sonra duktuli eferentes testisten gelen spermatozoayı duktus epididimise iletir.

Seminifer túbüllerin aralıkları oldukça damarlı gevşek bağ dokusuyla doludur. L.propriyanın gevşek bağ dokusu içersinde damarlar ve bunların da çevresinde Leydig hücre kümeleri vardır (L.propriyanın kalınlaşarak fibröz bir karakter kazanması erkek infertilitesinin nedenlerinden biri olarak kabul edilir).

Seminifer túbüller interstisyumun mezenkimal hücrelerinden köken alan adventisyal hücre tabakasıyla çevrilmiştir. Bu bağlayıcı tabakanın organizasyonu türden türe değişir. Laboratuvar kemirgenlerinde her túbülün etrafında tek katlı yassı poligonal hücrelerin ucuca birleşmesiyle oluşan kesintisiz bir tabaka oluştururlar. Bu hücreler düz kasin bazı ultrastrüktür özelliklerini gösterir ve kasılabilir, fakat atipik şekli ve epitelyal yapısı nedeniyle myoid hücre olarak adlandırılırlar. Kontraktil myoid hücreler desmin gibi miyofilamentleri içerir. Sitoplazmalarındaki aktin demetleri birbirine dik açıyla düzenlenirler. Bu hücreler bu türlerde, seminifer túbüllerde görülen ritmik yüzeyel kasılmalardan sorumludur. Myoid hücreler testosteron için yüzey reseptörlerine sahiptir ve son bir bulguya göre seminifer túbül epitelindeki destek hücrelerinin sentetik etkinliğini etkileyen bir protein yapmaktadır. Myoid hücre tabakası ayrıca kan-testis bariyerinin önemli bir bileşenidir.

Büyük türlerde, koç, domuz ve boğada seminifer túbüller adventisyal hücrelerin birden fazla katıyla çevrelenmiştir. İçteki hücreler myoid hücrelere benzerse de kesintisiz bir epiteloid tabaka oluşturmazlar ve dıştaki hücreler fibroblastlar gibi durmaktadır. Maymun ve insanda düz kasa benzeyen adventisyal hücreler ve seminifer túbül kontraksiyonu yoktur. İnfertil insanlarda seminifer túbüller arasındaki bağ dokusu sıklıkla kalınlaşmıştır (8, 9).

Her bir seminifer túbülü döşeyen epitelde iki tip hücre vardır (18, 23, 24, 87, 37, 45, 96, 90).

**Spermatogenetik Seriyeye Ait Hücreler :**

- \* Spermatogonyumlar (En ilkel erkek cins hücreleridir )
- \* Primer spermatositler
- \* Sekonder spermatositler
- \* Spermatidler
- \*Spermiyumlar (spermatozoalar; en olgun erkek cins hücreleridir.)

Spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerde bulunabilirler. Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu fenomen üç faza ayrılabilir: 1-Spermatositogenez (Yun.Sperma; tohum+kytos; hücre+genesis; üretim) olarak adlandırılan evrede spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir. Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu gerçekleşen ve spermatidlerin olduğu evre mayoz adını alır. 2-Spermiyogenez ise spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşması süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu safhadır. 3-Spermatogenez, bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş bir germ hücresi olan, spermatogonyum ile başlar. Bu, yaklaşık 12 µm çapında, nispeten küçük bir hücredir ve nükleusu soluk boyanan kromatin içerir. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler ve yeni oluşan hücreler iki yol izleyebilir; bir ya da daha fazla mitotik bölünmeden sonra farklılaşmamış kök hücreler olan tip A spermatogonyumlar (sperma+Yun, gone, nesil) olarak devam ederler ya da süregelen mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar.

Tip A spermatogonyumlar spermatogenik serinin kök hücreleridir. Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatositlerden farklılaşan öncül (progenitör) hücrelerdir. Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Bu sırada primer spermatositin 46 (44+XY) kromozomu vardır ve DNA'sı da 4 N'dir. N haploid kromozom sayısını (bu insanlarda 23 adettir) ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını belirtmektedir. Bu profazda, hücreler dört faz leptoten, zigoten, pakiten ve diploten geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar ve sonuçta kromozomlar ayrılır. Genlerdeki "crossing-over" mayozun bu safhalarında oluşur. Daha sonra hücre metafaza girer ve kromozomlar takip eden anafazda her bir kutba doğru giderler. Bu bölünmede profazın yaklaşık 22 gün dolayında bir süre alması nedeniyle incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Spermatogenik seride en büyük hücreler primer spermatositlerdir, bunlar nükleuslarında kangal yapma sürecinin değişik safhalarında kromozomların bulunması ile tanınırlar.

Birinci mayotik bölünmeden sonra sekonder spermatositler denilen ve yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Bu sayıca azalma (46'dan 23'e) her hücredeki DNA miktarının eksilmesi (4 N'den 2 N'e) ile birlikte olur. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayotik bölünmeye giren hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi spermatidlerin oluşmasına yol açar; bunlar 23 kromozom içerir. Birinci ve ikinci mayotik bölünmeler arasında spermatositlerde S fazı (DNA sentezi) görülmediği için ikinci bölünmeden sonra her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (1 N) hücreler meydana gelir. Böylece, mayotik sürecin sonunda haploid sayıda kromozomlara sahip hücreler oluşur. Fertilizasyonla bunlar normal diploid sayıya dönerler. Hücre bölünmesindeki indirgeyici işlev sebebiyle mayotik süreç kromozom sayısının türler için sabit, belirli bir miktarda kalmasını sağlar.

Spermatidler sekonder spermatozoidlerin bölünmesi ile oluşan hücrelerdir. Bunlar, diğer hücrelerden küçük boyutları (7-8 µm çaplı), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan nükleusları ve seminifer tübüllerde lümen yakınında (jokstalüminal) yerleşmeleri ile tanınırlar. Spermatidler spermiyogenez denen karmaşık ve farklılaşma süreci geçirirler. Bu süreçte, akrozom oluşur, nükleus yoğunlaşır ve uzar, flagellum gelişir ve sitoplazmanın çoğu kaybolur. Sonuçta seminifer tübülün lümenine salınan olgun spermatozoon meydana gelir.

Spermiyogenez üç faza ayrılabilir (23, 24, 87, 37, 45, 96, 90).

**Golgi Fazı:** Spermatidlerin sitoplazması, çekirdeğin yakınında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazma retikulumu tübülleri içerir. Küçük PAS-pozitif proakrozomal granüller Golgi kompleksinde birikirler ve bunun hemen sonrasında birleşerek membranla sınırlanmış bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal granülü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek akrozomun olduğu bölgenin karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar ve sentriyoller yeniden nükleusa doğru geri dönerken hareket ettikçe aksonem komponentlerini çevresine sarar.

**Akrozomal Faz:** Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş görür. Bu enzimlerin, korona radiata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Bunlar henüz ovulasyona uğramış yumurtayı çevreleyen yapılardır. Spermatozoonlar ovumla karşılaştığında akrozomun dış membranı birçok bölgede plazma membranı ile kaynaşarak akrozomal enzimlerin boşalmasına yol açar.

Bu işlem akrozomal reaksiyon olarak bilinir ve fertilizasyonun ilk basamaklarından biridir.

Akrozomal faz sırasında hücrenin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelir. Buna ek olarak nükleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler de flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge spermatozoonların hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir.

Mitokondrilerin bu şekilde yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ve yüksek enerji tüketimi ile ilgili olan bölgelerde toplanmasına başka bir örnek teşkil eder. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur.

İmmotil silya sendromu (Kartagener sendromu), hareketsiz spermatozoonlar ve sonuçta infertilite ile karakterizedir. Bu sendrom, hastanın spermatozoonlarında dineinin ya da flagellar hareket için gerekli olan diğer proteinlerin eksikliğine bağlıdır. Bu bozukluk genellikle kronik solunum yolu enfeksiyonları ile birlikte görülür. Çünkü buna benzer bir eksiklik de solunum sisteminde epitel hücrelerinin siliyer aksonemlerinde bulunur.

**Matürasyon Fazı:** Geriye kalan artık stoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlar tübülün lümenine doğru salınırlar. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositte spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynar. Bu ayrıntı aşağıda açıklanan

seminifer epitel siklusunu anlamakta önemli bir rol oynayabilir. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur.

Testislere deneysel <sup>3</sup>H-timidin enjeksiyonu ile gönüllüler üzerinde yapılan araştırmalarda insanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki sürenin yaklaşık 64 gün olduğu gösterilmiştir (23, 24, 87, 37, 45, 96, 90). Sürecin yavaş olmasının yanısıra, spermatogenez, eş zamanlı olarak her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez; bu olay bir dalgalanma biçiminde olur. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümünü açıklar. Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonlar bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. Seminifer epitel siklusu germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her bir siklus yaklaşık  $16 \pm 1$  gün sürer ve spermatogenez 4 siklustan sonra biter ( $64 \pm 4,5$  gün).

Sertoli hücreleri seminifer tübül membranından lümene kadar uzanan çok yüzlü prizmatik hücrelerdir (Hemşire hücre de denir). Yan yüzeyleri germ hücrelerine uyum sağlayacak şekilde girintili çıkıntılıdır. Enine kesitlerde zor seçilirler. Germ hücrelerinin fazlalığı bunların %10-15 izlenmesine olanak verir. Eozinofilik sitoplazmaları, bazale yerleşmiş bir iki çentikli oval çekirdekleri vardır. Çekirdekçik belirgindir. Çekirdekçikle beraber çekirdek zarı altında kümelenmiş iki belirgin kromatin yoğunlaşması çoğu memelide özgün olan tripartide (üçlü) görünüşünü oluşturur. Sitoplazma, hücrenin dikey eksenine paralel yerleşmiş bol mitokondri içerir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda hücrelerin bol miktarda düz endoplazma retikulumu, bir miktar kaba endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri, yağ damlacıkları ile lizozomlar içerdiği gösterilmiştir

(23, 24, 87, 37, 45, 96, 90). Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış çekirdekte çok sayıda kıvrımlar, belirgin bir çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin görülür. Bazı hücrelerde fonksiyonu ve önemi bilinmeyen Charcot-Bottcher kristalloidler de gösterilmiştir.

Sertoli hücreleri çok iyi bir hücre iskeletine sahiptir. Plazmalemma altında ve çekirdek çevresinde çok iyi gelişmiş aktin filamanları ağı vardır. Ara filamanlar az çok hücre eksenine paraleldir. Bu hücrelerde vimentin, düşük molekül ağırlıklı sitokeratin 18,19 pozitif gösterilmiştir. Mikrotübülüsler spermatogenez döngüsünün devresine göre çekirdek çevresi veya çekirdek üst bölgesinde yerleşmiştir. Hiç şüphesiz hücre iskeleti elemanları hücre şeklindeki değişikliğe ve tohum hücrelerinin lümene doğru hareketine katılır. Spermatogenetik seri hücrelerinden farklı olarak çoğalma özelliği göstermeyen Sertoli hücreleri bu konumuyla spermatogenetik hücrelere mekanik desteklik sağlar, beslenmelerine yardımcı olur ve kan yoluyla gelen kimi zararlı maddelerden bu hücreleri korurlar. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopta Sertoli hücrelerinin sınırları belirsiz olarak görülür, çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır. Sertoli-Sertoli bağlantı kompleksi aynı zamanda seminifer epitelini 2 kompartmana böler: Alttaki dar kısım bazal bölüm (bazal kompartman), sıkı bağlantının üzerindeki lümene kadar uzanan geniş kısım ise lümen altı bölümdür. Bu sıkı bağlantı kan-testis bariyerini oluşturur ve lümen altındaki bölmeği bağ dokusundan gelen etkilere karşı korur

a) Bazal kompartman; Spermatogonyum ve genç spermatositleri içerir.

b) Adluminal kompartman; Genç spermatositleri ve spermatidleri içerir.

Bu kompartmanlar spermatogenezis için bir mikroçevre sağlar.



Bitişik Sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar seviyesindeki sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu spermatogonyumlar, içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal kompartmanda yerleşirler. Spermatogonez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup geçerek adluminal kompartmana çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri safhaları kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşturulur. Spermatozoidler ve spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatozoidlerin flagellar kuyrukları geliştikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki çıkıntılar halinde görülürler. Sertoli hücreleri “gap junction” denilen birleşmelerle de ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. Bu da yukarıda bahsedilen seminifer epitel siklusunun koordinasyonunda önemli olabilir.

Sonuç olarak Sertoli hücrelerinin birçok önemli fonksiyonu vardır (87, 37, 45, 96, 90).

Bunlar;

a) Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesinde görevlidirler.

b) Sertoli hücreleri birbirlerine sıkı bağlantı kompleksleri (Tight junction=zonula okludens) vasıtasıyla irtibatlıdır. Sertoli-Sertoli bağlantı komplekslerinin kan-testis bariyerini oluşturduğu saptanmıştır. (23, 37, 45, 96, 90). Spermatozoidler, spermatidler ve spermatozoonlar kan testis bariyeri ile kan desteğinden izole edildiği için, bu spermatogonik hücreler besin maddelerinin ve metabolitlerin alıp verilmesinde Sertoli hücrelerinin aracılığına muhtaçtırlar. Kan-Testis bariyerinin immünolojik anlamda çok önemli bir işlevi vardır (23, 24, 87, 37, 45, 96, 90). Sertoli hücre bariyeri gelişen sperm hücrelerini immünolojik saldırıdan da korur. Şöyleki; spermatozoonlar immün sistem tarafından tabanca olarak tanınırlar. Çünkü, cinsel olgunlaşma immün yeteneğin gelişmesinde çok sonra pubertede olaylanır. Bu nedenle, farklı spermatozoon genetik

hücreler yabancı olarak tanınırlar ve immün yanıtı harekete geçirerek eşey hücrelerinin haraplanmasına neden olan antikorları oluşturabilirler. Ancak, kan-testis bariyeri, immün sistem ile eşey hücreleri arasında her türlü etkileşimi ortadan kaldırarak, antikorların seminifer tübüllere geçmesini önler ve spermatogenetik hücreleri oto-immün reaksiyonlara karşı korur.

Spermatozoonlar testiste iken güçlü pozitiflik gösterirken epididimise geçtiklerinde MHC Class I antijenlerini kaybederler. Bu durum, epididimiste niçin oto-immün reaksiyonlara atılmadıklarını açıklar.

Spermatozoonlar, ilk olarak pubertede üreilmeye başlanır. Bu dönem, bireyin immünokompetan (yabancı molekülleri tanıyabilme ve onlara karşı antikor sentezleyebilme yeteneği) olmalarından çok uzun süre sonradır. Bu nedenle, kan-testis bariyeri spermatogenik hücreleri immün sistemden izole tutmada önemli bir işleve sahiptir. Spermatogenik hücrelerin ve spermatozoonların immün sistemden izole edilmesindeki herhangi bir başarısızlık, sperm-spesifik antikorların üretimiyle sonuçlanır. Vazektomi (duktus deferensin cerrahi olarak çıkartılması; skrotal keseye açılan küçük bir kesiden yapılır) sonrası ve bazı infertilite (kısırlık) olgularında böyle immün yanıtlar görülmektedir. Vazektomi sonrası, immün sistem hücrelerinin hasarlı vas deferens'ten sızan spermatozoonlarla karşılaşması sonucu sperm-spesifik antikorlar üretilir. Bu durumda, spermler genital kanaldaki immün sistemden izole kalamazlar. Bazı infertilite olgularında sperm spesifik antikorlar semende gösterilmiştir. Bu antikorlar spermlerin aglütinasyonuna neden olurlar. Sonuçta, spermlerin hareketlerini ve oosit ile etkileşmesini etkileyerek infertiliteye neden olurlar.

Elektron mikroskop çalışmaları, farklı spermatogenetik hücrelerin birbirlerinden ayrılmadıklarını "sitoplazma köprüleri" ile bağlandıkları göstermiştir. Bu köprüler, koloni içindeki spermatogenetik

hücrelerin gelişiminin aynı zamanda olaylanmasında, hücrelerin beslenmesinde ve genetik bilginin aktarılmasında işlev görürler.

c) Sertoli hücreleri fagositoz olayında görevlidirler. Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde dökülür. Bu sitoplazmik parçacıklar fagosite edilir ve Sertoli hücre lizozomları tarafından yıkılırlar.

d) Sekresyon olayını gerçekleştirirler. Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgırlar. Androjen-bağlayıcı protein sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından FSH ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiyol haline çevirebilirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgırlar.

e) Anti-müllerian hormon üretimini sağlarlar. Ayrıca Müllerian-inhibe edici hormon olarak da isimlendirilen bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise, Wolf (mezonefrik) kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar

f) Testiküler transferrinin sentezlenmesi ve salgılanmasında görev alırlar. Testiküler transferrin de proteindir ve üreme hücrelerine demir taşıdığına inanılmaktadır. Kandaki demir taşıyan protein, serum transferrini, Sertoli hücrelerinin bazalindeki özel reseptörlere bağlanır ve sitoplazmaya alınır. Burada demir serum transferrininden testiküler transferrine aktarılır, bu da demiri seminifer epitelin adluminal kompartmanındaki gelişen üreme hücrelerine gönderir.

Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bunlar özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışını irradyasyonu gibi olumsuz koşullara karşı spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha dayanıklıdırlar. Memelilerde spermatozoonların salınımı muhtemelen hücresel hareketlerin bir sonucudur; bu hareket Sertoli hücrelerinin apeksinde bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentler ile sağlanır. Sertoli hücreleri spermatogenetik hücrelerin bazal membrandan lümene doğru hareketlerinde etkin rol oynar.

g) Sertoli hücrelerinin salgıları arasında başka maddeler de saptanmıştır. Örneğin; seruloplazmin, gama glutamil transpeptidaz aminoasitleri, retinoik asit ve retinol bağlayıcı proteinler, (A vitaminini üreme hücrelerine taşımaktadır.) metaloproteaz (Ekstraselüler matriksin degradasyonunu sağlar.), plazminojen aktivatörü (Spermiyasyonda rol alır.) ve siklik protein-2 (spermatid hareketini sağlar) (17).

Sıçan testisinde kök hücre faktörü Sertoli hücreleri tarafından üretilir, germ hücreleri ve Leydig hücrelerindeki c-kit reseptörüne bağlanır. Bu kök hücre faktörü ile c-kit reseptörü arasındaki ilişki germ hücrelerinin çoğalması, farklılaşması ve apoptozisinde rol oynar. C-kit reseptörü spermatogoniya, spermatosit ve spermatidler üzerinde bulunur. Anti-c-kit monoklonal antikor ACK-2 gibi bir antikor ile kök hücre faktörünün bloke edilmesi çoğalan tip A spermatogoniyaların azalmasına, spermatid matürasyonunun gecikmesine in vitro ortamda tüm germ hücre tiplerinin apoptozisinde artmaya neden olurken, Leydig hücre fonksiyonunda anlamlı bir değişiklik yapmaz (33).

**Tablo 2.2** Sertoli hücrelerinin görevleri

Gelişen germ hücrelerinin beslenmesi ve desteklenmesi
Spermiyोजenez sırasında ortaya çıkan sitoplazma fazlalıklarının fagositozu
Kan-testis bariyerinin oluşturulması
ABP üretimi ve salgılanması
Embriyोजenez sırasında Müller borusunu durdurucu hormonun üretimi ve salgılanması
İnhibin üretimi ve salgılanması
Testiküler transferrin üretimi ve salgılanması
Fruktozdan zengin, spermatozoonları besleyici ve taşınmasını kolaylaştırıcı salgı salgılanması

Testis kütlelerinin %25-30'unu gevşek bağ dokusu oluşturur. Bu ara doku içerisinde Leydig hücreleri, fibroblastlar, mast hücreleri, gonadotrop hormonlara cevap vermek üzere gerektiğinde Leydig hücrelerine dönüşebilen farklanmamış mezenşim hücreleri, bol kılcallar, lenf damarları ve sinirler bulunur. Leydig hücreleri, seminifer tübüller arasındaki üçgenlerde gruplanırlar. Gruplar halinde tunika albuginea, epididimis, spermatik kordon ve mediastinumda da gösterilmişlerdir (23, 24, 87, 37, 45, 96, 90). Testosteron hormonu üretimi ve salgılanmasından sorumludurlar. Neuroendokrin fonksiyonları da vardır. Parakrin olarak oksitosin, substans-P,  $\beta$ -endorfin vb. salgılar. Endokrin fonksiyonlarından dolayı kılcal damarlarla ilişkili değişen boyutlarda topluluklar yaparlar. Testiküler kapillerler pencerelidir ve kan proteini gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine izin verirler. İnterstisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. İki çekirdekli olabilirler. İyi gelişmiş Golgi kompleksi, tübüler kristal mitokondriler ve asidofil sitoplazmalarında yağ

damlacıkları içerirler. Çok iyi gelişmiş granülsüz endoplazma retikulumuna sahiptirler. Bu görünüşleriyle tipik steroid salgısı yapan hücrelere benzerler. Bu hücrelerde salgı granülü bulunmaz, üretilen testosteron ihtiyaca göre sentezlenir ve bekletilmeden kana verilir. Bunların sitoplazmalarında aynı zamanda peroksizom ve lizozomlar bulunur. Yaşla artan miktarlarda izlenen lipokrom pigmenti yer alır. İnsana özgü renksiz Reinke kristalleri gösterilmiştir. Bu kristaller azokarminle boyanır. Elektron mikroskopunda düzgün kristal kafesler şeklinde izlenir. Önemi bilinmemektedir. Enine kesitlerde normal bir erişkin de kıvrıntılı seminifer tübül başına 5 Leydig hücresi sayılır. Olgun Leydig hücreleri normal olarak çocuk testisinde, doğumdan sonraki birkaç hafta dışında, 10 yaşına kadar bulunmaz. Herhangi bir yaştaki çocuğa saflaştırılmış LH enjekte edilirse Leydig hücrelerini geliştiren fibroblastların sayısı artar. Leydig hücrelerinin sayıları ergenlikle artarken ileri yaşta azalır. 60 yaşındaki bir erkekte 20 yaşın yarısından az sayıdadır.

Puberte sırasında belirgin hale gelen, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir nükleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan ve steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler (23, 24, 87, 37, 45, 96, 90). Bu hücre salgıladığı testosteron hormonu (toplam testosteronun % 95'ini üretir, geri kalan %5 surrenal kortekste üretilir) ile spermatogenezi devam ettirir. Testosteron sentezi mitokondri ve düz endoplazma retikulumunda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası iş birliğine bir örnek oluşturur. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik

farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 4 ½ ayına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden salınan luteinizan hormon uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar.

#### **2.4. Testisin Histofizyolojisi**

Testis ekzokrin ve endokrin fonksiyonlu bileşik tübüler bir bezdir (5, 25, 49, 110). Testisin iç salgılama işlevini Leydig hücrelerinin salgıladığı testosteron meydana getirir. Testosteron yüksek lokal etkiyle seminifer tübüllerdeki spermatogenezi etkilerken, kana geçerek erkek üreme sistemine yardımcı bezlerin (prostat, vesikula seminalisler, bulboürethral bezler) işlevini de etkiler. Erkeğe özgü ikincil cinsiyet özelliklerinin (pubik kıllanma, sakal-bıyık, erkeğe özgü ses, müsküler vücut şekli) ortaya çıkmasından sorumludur. Testosteron üretimi adenohipofizden salgılanan LH (luteinleştirici hormon) etkisiyle gerçekleşir. LH, Leydig hücrelerinde kendisine ait reseptörlere bağlanarak etki gösterir. Her ne kadar Leydig hücreleri testisin genel hacminde küçük bir yer tutsa da steroidojenik potansiyelleri çok yüksektir. Adenohipofizden LH salgısı sürekli değil esas olarak geceleri 90 dakikalık aralıklar şeklinde olur. LH dışında prolaktin ve LH-RH (LH-releasing hormon)'da doğrudan Leydig hücrelerini etkileyerek testosteron salgılanmasını etkiler. Testosteronun yükselmesi LH salgılanmasını durdurur. LH dışında spermatogenezin başlaması ve devam etmesinde adenohipofizden salgılanan bir diğer hormon FSH (Folikül uyarıcı hormon)'da etkilidir. FSH Sertoli hücrelerini etkileyerek ABP salgılanmasını sağlar böylece spermatogenez için gerekli oranda testosteronun yerel etkisi sağlanır. Bu etki spermatogenezin başlaması için gereklidir. Germ hücrelerinin azalması FSH salgısını uyarır. FSH

salgılanması Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hormonuyla durdurulur. Östrojenler, kadın cinsiyet hormonları ABP'i bağlayarak spermatogenezisi azaltır.

Testisin dış salgı işlevi, kıvrıntılı seminifer tübüllerin halokrin salgı ürünü spermatozoondur (5, 25, 49, 110). Günlük ortalama spermatozoon yapımı insanda iki testisten ortalama 200 milyondur. Bu büyük bir miktar gibi görünse de diğer türlerle karşılaştırıldığında düşük bir sayıdır. İnsanda her iki testis 800-1200 adet kıvrıntılı tohum borucuğu içerir. Bunların her biri 30-70cm.uzunluğundadır. Oluşan ejakulat miktarı ise 2-5ml.dir. Bu ejakulat 40-100 milyon/ml spermatozoon içerir. Bu sayı 20 milyonun altına düşerse kısırlıktan (infertilite) söz edilir.

37°C olan vücut içi sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin regülasyonunda ısı çok önemlidir. Testiküler ısı 35°C'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir (5, 25, 36, 49, 110). Zengin bir venöz pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Diğer faktörler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki krameter kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir.

Testisin inişindeki bozukluk olan kriptorşidizmde (Yun.kryptos, gizli+orchis, testis), testisler 37°C'ta kalır ve spermatogenez inhibe olur. Çok ileri olmayan vakalarda testisler cerrahi olarak skrotuma indirildikleri takdirde spermatogenez normal olarak devam edebilir. Karın içi sıcaklığında kalan testislerde germ hücrelerinin çoğalması inhibe olur fakat testosteron sentezi devam eder. Bu da kriptorşidizimli seks karakterlerinin gelişmesinin ve ereksiyon oluşmasının nedenini açıklar.



Kötü beslenme, alkolizm ve bazı ilaçların etkisi ile spermatogonyumlarda değişiklikler ve sonuçta spermatozoon yapımında bir azalma ortaya çıkar. X-ışını ve kadmiyum tuzları spermatogenik seri hücrelerine oldukça toksiktirler ve bu hücrelerin ölümüne sebep olarak hayvanda steriliteye yol açarlar (5, 25, 36, 49, 110). Bisülfan germinal hücreler üzerinde etkilidir, gebe sıçanlara verildiğinde bunların erkek yavrularının germinal hücrelerini öldürür. Bu nedenle yavru steril kalır ve seminifer tübülleri sadece Sertoli hücrelerini içerir. Androjen-üreten interstisyel hücre tümörleri erkeklerde erken puberteye yol açabilir.

Bununla birlikte spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi hiç şüphesiz endokrin faktörler oluşturur (5, 25, 36, 49, 110). Spermatogenez, hipofizin folikül stimülan (FSH) ve luteinizan hormonlarının (LH) testiküler hücreler üzerindeki etlilerine bağlıdır. LH interstisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. FSH'un Sertoli hücrelerine etkiyerek adenital siklaz yapımını stimüle ettiği ve sonuçta cAMP'nin artışına yol açtığı ve aynı zamanda da androjen-bağlayıcı proteinin (ABP) sentez ve salgılanmasını sağladığı bilinmektedir. Bu protein testosteron ile bağlanır ve bunu seminifer tübüllerin lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır ve östrojenler ve progesteronlarla inhibe edilir.

Spermatozoonlar epididimise, uygun bir medyum olan testiküler sıvı içinde taşınırlar. Testiküler sıvı Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilir; bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş androjen-bağlayıcı protein içerir.

Spermatogenik hücrelerin farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar. Seksüel olgunlaşmanın, immünolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması sebebiyle farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ

hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immun yanıtı teşvik edebilirler. Kan-testis bariyeri, gelişen sperm ve immun sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldıracaktır. Bu bariyer seminifer tübüllere immunglobulinlerin geçmesini önler ve bu sayede serumlarında çok yüksek düzeylerde sperm antikorları bulunan hastalarda herhangi bir fertilité bozukluğu görülmez. Sertoli hücre bariyeri böylece seminifer epiteli bir otoimmun reaksiyonda korumuş olur.

İnsanda ergenlikle başlayan spermatogenez devamlıdır ve ölene kadar azalarak devam eder (5, 25, 36, 49, 110). Germ hücre epiteli toksik ajanlar, alkol, çeşitli enfeksiyon hastalıkları ve beslenme yetersizliklerine (vitamin A ve E eksikliği) hassastır. Düşük dozlarda bile X-ışınları dejeneré hücre sayısını arttırır, yüksek dozlarda kısırlığa neden olur. Germ hücreleri yüksek ısıdan da etkilenir. Bu nedenle testisin skrotum içinde ve vücut dışında yer alması gerekir. Testisin skrotuma inmediği hallerde (kriptorşidizm) seminifer borucuklar atrofik kalır sadece Sertoli hücreleri, çok az miktarda da spermatogonium izlenir.

## **2.5. E VİTAMİNİ**

### **2.5.1. E Vitamininin Biyolojik Sistemlerdeki Rolü**

E vitamininin gerekli bir besin maddesi olduğu ilk defa 1922 yılında Evans ve Bishop tarafından bulunmuştur. Önceleri X maddesi, daha sonraları antisterilite vitamini, 1936'da buğday tohumundan elde edildikten sonra da tokoferol olarak adlandırılmıştır (48).

E vitamini yağda çözünen bir vitamindir. Bir grup tokol ve tokotrienollerden oluşup hidrofobik özelliği vardır. E vitamini, az miktarda da olsa biyolojik zarlarda bulunur. Yağda çözünen bir vitamin

olmasına karşın taşıdığı hidroksil grubu nedeniyle zayıf amfipatik özellik gösterir. Bu yönüyle kolesterole benzer (103).

Literatürde, E vitamininin etki mekanizması üzerinde çok sayıda birbirine zıt bulgu ve iddialar söz konusudur. Bununla birlikte, E vitamininin temel biyolojik rolünü ve klinik uygulamalarını tam olarak anlamaya yönelik araştırmalar hala yapılmaktadır (4, 30, 40, 41, 99, 100).

Doğada E vitamini etkisi gösteren kimyasal yapıları farklı çeşitli bileşikler bulunmaktadır. Moleküllerdeki yan zincirlerin durumuna ve doymuş ya da doymamış olmalarına göre tokoferoller ve tokotrienoller olmak üzere iki grupta toplanırlar. Bugün alfa, beta, delta, gamma, eta ve zeta olmak üzere altı tokoferol ve altı tokotrienol bilinmektedir (48, 103).

### **2.5.2. E Vitamininin Biyokimyasal İşlevleri**

E vitamininin etki mekanizması konusunda en geniş destek alan görüş antioksidan kuramıdır. Bu kuram, biyolojik sistemlerde E vitamininin bir antioksidan olarak işlev gördüğünü ileri sürer. Kontrolsüz otooksidasyonun (serbest radikal zincir tepkimesi) yol açtığı etkilerden korunan moleküller, hücresel ve alt hücresel zarların çoklu doymamış lipidleridir. İnsan vücudunda lipid peroksidasyonu sonucunda, ateroskleroz, diyabet, retinopati ve karsinogenez gibi rahatsızlıklar ortaya çıkar (4, 40, 41, 48, 84, 99).

Normal hücresel metabolizma sonucu veya vücuda alınan zehirli bileşiklerin metabolizması süresince çeşitli artıklar oluşturulur ve bunlar canlı hücrelere zarar verebilirler. Bu artıklar: süperoksit anyonu ( $O_2^-$ ), hidroksil radikali ( $OH^-$ ) ve bazı serbest radikallerdir (30, 48, 103). Glutatyon peroksidaz (GSH), katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD)

birlikte, organizmaları peroksidan moleküller denen serbest radikaller ve diğer oksitleyici ara maddelerden korumayı amaçlayan bir koruyucu sistem oluştururlar (4, 48, 103).

Bu mekanizma şu şekilde açıklanmaktadır:

Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit anyonunu hidrojen ile birleştirerek hidrojen peroksit ve oksijen açığa çıkarır ( $2O_2 + 2H \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ). Bu şekilde elde edilen hidrojen peroksit, katalaz enzimi veya glutatyon peroksidaz etki eder. Katalaz iki hidrojen peroksiti birleştirerek su ve oksijen ortaya çıkarırken ( $2H_2O_2 + \text{katalaz} \rightarrow 2H_2O + O_2$ ), glutatyon peroksidaz hidrojen peroksitten hidrojen ve indirgenmiş glutatyon oluşturur ( $H_2O_2 + 2GSH \xrightarrow{\text{glutatyon peroksidaz}} 2H + GS-SG$ )

Oksijen metabolitleri, hücrede bulunan zar yapılarındaki fosfolipidlerin çoklu doymamış yağ asitlerine etki ederek zarların normal yapılarını bozar ve hücre ölümü ile sonuçlanabilecek olayları başlatırlar (41, 48, 84, 103).

Hidroksil radikalleri (OH), doğada oldukça tepkisel bir özelliğe sahiptir. Çoklu doymamış bir lipidin peroksidasyonu sonucunda yağ açili (serbest radikal) oluşur.

Bu serbest radikal ya hidrojen çıkarılması  $LH + OH \rightarrow L + H_2O$  şeklinde ya da ek bir tepkimeyle  $LH + OH \rightarrow LHOH$  oluşturulur. Bu yolla oluşan yağ açili radikal, peroksil radikalini oluşturmak üzere oksijen molekülünü etkileyebilir  $L + O_2 \rightarrow LOO$ .

Bu durumda peroksil radikali, çoklu doymamış yağ asitlerine ait daha çok sayıda molekülü etkileyebilir, ya da E vitamini veya diğer

antioksidanlar tarafından tüketilir. Herhangi bir durumda ürün yağ asit hidroperoksittir (LOOH).

Yağ asit hidroperoksiti, koruyucu mekanizmanın son aşaması olarak, glutatyon peroksidaz tarafından hidroksi asite indirgenebilir  $LOOH+2GSH \rightarrow LOH+ H_2O+GS-SG$ . Böylece E vitamini, zincir dağıtıcı peroksil radikallerini (LOO) tutarak zincir kırıcı bir antioksidan olarak davranır (48, 46).

E vitamini, dokularda olduğu gibi, hem depolama sürecinde hem de mide barsak kanalı içindeki doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu süresince ortaya çıkan serbest radikal ara maddelerini temizler (48, 46, 70).

### **2.5.3. E Vitamininin Dokular Üzerine Olan Koruyucu Etkisi**

Moleküler model çalışmaları, E vitamini yan zincirinde bulunan 4' ve 8' nolu karbon atomlarının zarlara bağlı fosfolipidlerdeki araşidonik asit ile stabil bir kompleks oluşturabileceğini göstermiştir (48). E vitamininin daha çok zarlarda yerleşmiş olmasından ve lipidlere bağlı araşidonik asitle kompleks oluşturarak zarların yapısına girmesinden hareket ederek, E vitamininin zarlara bağlı işlevlerinin şunlar olabileceği belirtilmektedir:

- 1) Hücredeki zar yapılarında bulunan uzun zincirli doymamış yağ asitlerinin in vivo veya in vitro bozulmalarına engel olur.
- 2) Doymamış yağ asidi, özellikle araşidonik asit içeren zarların geçirgenliklerini azaltır.
- 3) Zarlara bağlı fosfolipidlerin in vivo fosfolipazlar tarafından bozulmasını önler (48, 103).

E vitamininin dokularda lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan etki gösterdiğini destekleyen bir çok çalışma yapılmıştır (30, 47, 84, 100, 108). E vitamini alyuvarların parçalanmasını engellemekte, çeşitli toksik ajanların (karbontetraklorür, bleomisin, sülfürdioksit vb.) dokulardaki zararlı etkilerine karşı antioksidan koruma göstermektedir (11, 48, 51). Yapılan bir çalışmada, sıçanlarda deneysel kolit modelinde E vitamini verilmesiyle belirgin bir iyileşme görülmüştür (71).

E vitamini, lipid peroksidasyonuna neden olan serbest radikalleri tutarak, kuvvetli antioksidan etki gösterir. E vitamininin Down sendromu ve deneysel mikrosefalideki hasarı, ozon ve azotdioksit toksisitesini, yenidoğan bebeklerdeki hiperoksinin zararlı etkilerini, deneysel olarak oluşturulan akciğer fibrozisi, meme karsinogenezi ve kolon adenokarsinomasını, karaciğer parenkim hücrelerinde multiveziküler lizozom oluşumunu engellediği ve/veya azalttığı bildirilmiştir (69).

E vitamininden yoksun büyüyen çeşitli türdeki hayvanlarda geri dönüşü mümkün olmayan kısırılık ortaya çıkmıştır (108). Sığır Leydig hücrelerinin kültür ortamına E vitamini eklendiğinde, hücrelerin yaşam süresi ve steroidojenik etkinliğinin arttığı görülmüştür (60).

E vitamininin sıçanların hipofiz-gonad eksenine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada E vitamini eksikliğinin, gonad işlevini durduran bir etki göstererek Leydig hücrelerinde hormon sentezini azalttığını feedback mekanizması yoluyla hipofizden LH salınımını arttırdığı saptanmıştır (2).

Oksidatif hasar spermleri direkt olarak etkileyebileceği gibi spermatogenezi etkileyerek de sperm fonksiyonunu bozabilir. İnfertil erkeklerde hasarlı sperm fonksiyonu, lipid oksidasyonu ve spermatozoadaki antioksidan enzimlerin işlev bozukluğu ile ilişkilidir. E vitamini dokulardaki antioksidan sistemlerde serbest radikalleri

temizleyen önemli bir maddedir. Kronik demir intoksikasyonuna bağlı testis oksidasyonu E vitamini verilerek azaltılabilir (59).

Vücutta oksijen konsantrasyonunun normoksidan uzaklaşması sonucu reaktif oksijen radikallerinde artma meydana gelir. Bu artış organizmayı oksidatif strese sokar. Oksijen konsantrasyonunun %40'a çıkması ile periferik dokularda (kalp, akciğer, testis ve iskelet kası) istatistiksel olarak anlamlı derecede E vitamini miktarında artış saptanmıştır. Suda çözünen bir antioksidan olan C vitamininin ise %40'lık oksijen konsantrasyonundan etkilenmediği bildirilmiştir (19).

Omurilik hasarına bağlı erkek infertilitesi; düşük semen kalitesi, düşük sperm sayısı, düşük sperm motilitesi, ve bozuk morfoloji ile ilgilidir. Klinik çalışmalar omurilik hasarı sonrası anormal sperm fonksiyonlarına reaktif oksijen türevlerinin de katkısı olduğunu düşündürmektedir. Omuriliği kesilen sıçanların akut ve kronik dönemlerde E vitamini ile beslendiğinde sperm canlılığının kısmen korunduğu gözlenmiştir. Reaktif oksijen türevlerinin sperm hareketliliğini, fibröz kılıf proteininin tirozin fosforilasyonunu bozarak etkilediği düşünülmektedir (101).

Yine yapılan çalışmalarda C ve E vitaminlerinin hem kurşuna bağlı testis toksisitesini reaktif oksijen türevlerini azaltarak düzelterebileceği, hem de kadmiyuma bağlı hücrel toksisiteyi azaltabileceği gösterilmiştir. Ama bu iki vitamin arasında sinerjik bir etki saptanamamıştır (31).

## 2.6. C VİTAMİNİ

### 2.6.1. C Vitamininin Biyolojik Sistemlerdeki Rolü

C vitamininin yapısı glukozu anımsatmaktadır. Memelilerin büyük kısmında glukozdan türetilir. Öte yandan, insan dahil primatlar ve diğer bazı hayvanlarda (örn. Kobay, bazı yarasalar, kuşlar, balıklar ve omurgasızlar) L-gülolonolakton oksidaz yokluğu bu sentezi önler.

C vitamini, indirgeyici ekivalanların vericisi olarak davrandığında, dehidroaskorbik asite oksitlenir ve bu da vitaminin bir kaynağı olarak davranabilir. C vitamini; moleküler oksijen, nitrat, sitokrom a ve c gibi bileşiklerin indirgenmesine olanak sağlayan +0.08 voltluk bir hidrojen potansiyeline sahip indirgeyici bir ajandır. Aktivitelerinin çoğunda, C vitamininin etki mekanizması aydınlatılmış olmaktan uzak ise de aşağıda, C vitamini için daha iyi belirlenmiş bazı etkiler sunulmaktadır. Çoğunda, C vitamini olaya doğrudan katılmaz. Bunun yerine bir metal kofaktörü indirgenmiş halde tutmak için gerekir. Bunlar monooksijenazlardaki Cu (bakır) ve dioksijenazlardaki Fe'i (demir) kapsar.

1- Kollajen sentezinde, prolinin hidrosilasyonu için gerekir.

2-Tirozin yıkımında, p-hidroksifenilpirüvatın, homojentisata oksidasyonu, C vitamini gerektirir; bu da, maksimal aktivitede rolü olan bakırı indirgenmiş durumda koruyabilir. Sonraki basamak, gene C vitamini gerektiren ferro demir içeren bir enzim olan homojentisat dioksijenazla katalizlenir.

3-Tirozinden adrenalin sentezinde, dopamin  $\beta$ -hidrosilaz basamağında gerek duyulur.

4-Safra asiti oluşumunda, başlangıçtaki  $7\alpha$ -hidrosilaz basamağında gerek duyulur.



5-Böbreküstü bezi, adrenokortikotropik hormon ile uyarılması halinde, içerdiği yoğun C vitamini hızla boşalır ve C vitamininden yoksullaşır. Bu olayın nedeni bilinmemektedir.

6-Demir emilimi, C vitamini varlığında belirgin şekilde artar.

7-C vitamini, suda çözünen genel bir antioksidandır ve sindirim sırasında nitrozaminlerin oluşmasını inhibe edebilir.

C vitamini yetersizliğinin klasik sendromu skorbütür. Bu olay, kendisini, derialtı ve diğer kanamalar, kas halsizliği, yumuşayıp şişmiş dişetleri ve sallanan dişlerle gösteren kusurlu kollajen sentezi ile ilişkilidir. Meyva ve taze sebze yenilmesi ile iyileşir. C vitamininin normal depoları 3-4 ay yeterlidir, ancak ondan sonra, skorbüt belirtileri ortaya çıkar (41).

### **2.6.2. C Vitamininin Dokular Üzerine Olan Koruyucu Etkisi**

Testis membranları poliansatüre yağ asitlerince çok zengindir bundan dolayı oksidatif strese oldukça açıktır. E vitamini gibi bazı antioksidanlar harekete (spor) bağlı testisteki oksidatif stresi ve çeşitli üreme problemlerini azaltabilir. C vitamini testiste steroidogenez ve gametogenezi uyararak harekete bağlı testis hasarını azaltır. Dahası ön hipofizden gonadotropinlerin sentezini ve salınımını artırır (80).

İnsan gibi aerobik metabolizmaya sahip organizmalar reaktif oksijen radikallerinin hasar verici etkilerine karşı kendilerini korumak için katalaz, peroksidaz, süperksit dismutaz ve glutatyon gibi enzim sistemleri geliştirmiştir. C vitamini pestisit, kimyasal mutajenler, ksenobiyotikler ve ağır metallere maruz bırakılan testis dokusunu koruyan antioksidan etkili vitaminlerden biridir. C vitamini oksidanlara maruz kalan E vitamininin antioksidan etkilerini korur ve tamir eder (62).

Demir bakır gibi metaller reaktif oksijen türevleri oluşturarak lipid peroksidasyonu, DNA hasarı ve antioksidan koruma sistemlerinin zayıflatılmasına neden olurlar. Sıçanlara C ve E vitamini verilmesi spermelerde kurşuna bağlı oksidatif stresi, motilite kaybını azaltır ve oosit penetrasyon kapasitesini artırır (39).

## 2.7. ETAN DİMETAN SÜLFONAT (EDS)

Etan dimetan sülfonat (EDS), canlı hücreler üzerinde alkilleştirici ajan olarak etki gösterir. Etilnitrosoüre, tiotepa ve trietilenmelaminin (64) ve oktilfenolün de (74) içinde bulunduğu alkilleştirici ajanların, sperm kromatini yapısında, çekirdek DNA'sının denatürasyona olan eğiliminin artışında etkili olduğu gösterilmiştir (21). Kırk yıl kadar önce, EDS'nin fare ve sıçanlarda kanseri tedavi edici bir ajan olduğu fark edilmiş ve 1966 yılında Jackson tarafından, erişkin erkek sıçanlardaki fertilitiyi önleyici etkisi gösterilmiştir (83, 43). O günden günümüze androjenlerin spermatogenez üzerine olan etkilerini incelemede EDS sıklıkla kullanılmaktadır. EDS'nin yenidoğan ve sütten kesilmemiş sıçanların Leydig hücreleri üzerine sitotoksik olduğu gösterilmiştir. Ayrıca gine domuzu, kurbağa, tavşan ve sürüngenlerdeki erişkin Leydig hücreleri üzerine de sitotoksiktir. Bildircin, fare ve keçi erişkin Leydig hücrelerini etkilemez (90).

EDS'nin Leydig hücrelerini apoptozise götürdüğü mekanizma tam olarak bilinmese de, deneyler EDS'nin glutatyona kovalent bağlanması ve glutatyonun hücrelerde tüketilmesinin, hücre toksisitesi için önemli olduğunu düşündürmektedir. Yapılan çalışmalar, EDS'nin Leydig hücrelerinde apoptozis yanıtını, yeni bir RNA veya protein sentezine gereksinim duymadan, DNA ve proteinleri alkilleyerek uyardığını düşündürmektedir (64).

EDS yetişkin erkek sıçanlara 75 mg/kg dozda verildiğinde Leydig hücrelerinde hızlı bir hasara ve serum testosteron seviyesinde azalmaya neden olur. Leydig hücrelerinde kromatin kondensasyonu ve sitoplazmik vakuolizasyon yanında interstisyel alanda makrofaj artışı gözlenir. Düşük serum testosteron seviyesi nedeni ile LH ve FSH serumda artar (43).

EDS Leydig hücreleri'ni yok etmekle birlikte testis interstisyumunda bulunan mezenkimal hücreler üzerine etkisizdir. EDS uygulanan ratlarda Leydig hücrelerindeki lezyonlar birkaç saat içinde başlar. İlk 12-18 saat Leydig hücre sayısı azalmaz. 24. saatte apoptotik hücrelerin sayısı maksimuma ulaşır ve 48 saatte testiste Leydig hücresi gözlenemez. EDS 1 günde vücuttan atılır. İlk 7-14 gün süresince Leydig hücreleri gözlenemez. 21. günden itibaren ortaya çıkmaya başlar (6, 82, 91, 9, 27,95). EDS sonrası 3. haftada spermatogenezin iyileşmesinin ilk göstergesi uzamış spermatidlerin seminifer tübülde gözlenmesidir (8).

EDS'nin sıçanlara verilmesi düz endoplazmik retikulum da veziküller oluşmasına, golgi aparatının fokal hipertrofisine ve nükleer kromatinin kümelenmesine neden olur. Bu morfolojik değişiklikler apoptoziste meydana gelen değişiklikleri hatırlatmaktadır. Apoptozisi hatırlatan bir diğer durum da ilacın uygulanmasından 24 saat sonra internükleozomal DNA yarıklanmasındaki artmadır. Histolojik çalışmalar EDS uygulamasından 24 saat sonra Leydig hücrelerinin %75'inin yok olduğunu göstermiştir (64).

EDS uygulaması Leydig hücrelerinin tama yakın kaybına neden olurken Sertoli hücre sayısı üzerine etkisizdir. Ayrıca EDS'nin birden fazla dozda uygulanması ilk dozun etkilerini uzatmaz (16, 27, 64, 83, 85, 93, 94, 95, 102, 107).

EDS seçici ve geçici olarak Leydig hücrelerini yok ederken serum ve testis testosteron seviyelerini azaltır. FSH ve LH'nın hipofizden salınımını artırır (10). EDS sonrası testosteron konsantrasyonu 7. günde bir miktar azalarak 0,1 ng/ml'nin altına düşer. 2-3. haftanın sonunda testosteron konsantrasyonu aşamalı bir şekilde artar. LH EDS sonrası 3. haftanın sonuna kadar yüksek kalır (8).

EDS'ye bağlı testis içi testosteron azalması, hipofizektomiye bağlı olduğundan çok daha hızlı ve derin (şiddetli) gerçekleşmektedir. Özellikle spermatositlerin ve spermatidlerin dejenerasyonu veya apoptozisine yol açar. EDS uygulanması sonrasında 14. günde günlük toplam sperm üretimi kontrol grubunun %15'ine kadar düşer (107).

EDS'nin hücre ölümü üzerine etkileri sadece Leydig hücrelerine spesifik değildir. Farklı hücre tipleri EDS'ye farklı miktarda duyarlılık gösterir (77).

### 3-GEREÇ VE YÖNTEM:

#### 3.1. Hayvanlar

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan aldığımız 22 Ağustos 2006 tarih ve 18 sayılı onay ile belirlediğimiz deney gruplarına her birinde 16 adet erişkin erkek Sprague-Dawley cinsi sıçan konuldu. 5 grup oluşturuldu. Her gruptaki 16 hayvan eşit sayıdaki iki alt gruba ayrıldı (7 günlük ve 14 günlük grup olmak üzere). Deney öncesi her hayvanın vücut ağırlıkları tek tek tartıldı. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda anabilim dalımızın hayvan odasında, uygun kafesler içinde barındırılarak standart sıçan pelleti ve çeşme suyu ile serbestçe beslendi.

**Tablo 3.1:** Deney uygulama şeması (7 günlük grup)

Gruplar	0.Gün	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün	5.Gün	6.Gün	7.Gün
<b>EDS</b>	EDS							Ex
<b>DMSO</b>	DMSO							Ex
<b>EDS+VitC</b>	EDS+VitC	VitC	VitC	VitC	VitC	VitC	VitC	Ex
<b>EDS+VitE</b>	EDS+VitE	VitE	VitE	VitE	VitE	VitE	VitE	Ex
<b>EDS+VitC+ VitE</b>	EDS+VitC+ VitE	VitC+ VitE	VitC+ VitE	VitC+ VitE	VitC+ VitE	VitC+ VitE	VitC+ VitE	Ex

Ex testis dokusunun alındığı gündür

**Tablo 3.2:** Deney uygulama şeması (14 günlük grup)

Gruplar	EDS	DMSO	EDS+VitC	EDS+VitE	EDS+VitC+VitE
0. Gün	EDS	DMSO	EDS+VitC	EDS+VitE	EDS+VitC+VitE
1. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
2. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
3. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
4. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
5. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
6. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
7. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
8. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
9. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
10. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
11. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
12. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
13. Gün			VitC	VitE	VitC+VitE
14. Gün	Ex	Ex	Ex	Ex	Ex

Ex testis dokusunun alındığı gündür.

EDS ilgili gruplara 75 mg/kg tek doz i.p.olarak, 1:3 oranında dimetilsülfoksit (DMSO) ile saf su içinde çözündürülerek deneyin ilk gününde verildi. E vit 100 mg/kg, C vit ise 200 mg/kg i.p. olarak deney süresi bitene kadar günde tek doz olarak verildi. Gruplardaki hayvanların yarısı 7. gün tartı sonrası yüksek doz anesteziik madde verilmesinin ardından (Ketamine+Xylazine 90+10 mg/kg i.p.) derhal servikal dislokasyon ile öldürüldü. Geri kalan hayvanlar ise 14. gün sonunda aynı işlemlerle öldürüldü.

Her iki testis çıkarılıp tartıldıktan sonra PAS+Hematoksilin boyama için sol testis Bouin fiksatifine içine ve immünohistokimyasal boyama için sağ testis nötral tamponlu formaldehit içine alındı. Uygun

testis takibi sonrası parafinle bloklanıp 5 µm kalınlıkta kesitler alındıktan sonra histopatolojik inceleme yapıldı.

### **3.2. EDS Hazırlanması ve Uygulanması**

Ticari olarak elde edilemeyen EDS, Jackson ve Jackson'ın (1984) belirttiği şekilde Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Toksikoloji Anabilim Dalı'nda sentezletildi. 75 mg/kg EDS, 0,5 ml DMSO içinde çözülüp 1,5 ml de distile su ilave edilerek intraperitoneal (ip) olarak tek doz verildi (7, 8, 10, 6).

### **3.3. E Vitamini**

Sigma firmasına ait 25 gr'lık  $\alpha$ -Tocopherol vegetable oil isimli ürünü kullanıldı. E vitamini küçük şişelere bölünerek -20 derecelik buzlukta saklandı. Enjeksiyonlar tablo 3.1 ve tablo 3.2'de belirtilen dozlarda i.p. olarak uygulandı.

### **3.4. C Vitamini**

Sigma firmasına ait 25 gr'lık Ascorbic acid isimli ürünü kullanıldı. Enjeksiyonlar tablo 3.1 ve tablo 3.2'de belirtilen dozlarda i.p. olarak uygulandı.

### **3.5. Dokuların Alınması ve Değerlendirilmesi**

Tablo 3.1 ve 3.2'de ex ile belirtilen günlerde sıçanlar tartıldı. Yüksek doz anestezi madde verilmesinin ardından (Ketamine+Xylazine 90+10 mg/kg i.p.) derhal servikal dislokasyon ile öldürüldü. Orta hattın iki yanından kesit atılarak sıçanların karnı açıldı. Sol testis çıkarılıp hassas tartı ile tartıldıktan sonra üzerinde birkaç delik

açılıp Bouin fiksatif içine atıldı (9, 94, 95). Daha sonra sağ testis çıkarılarak tartıldı ve üzerinde delik açılıp nötral formaldehit içine atıldı. Serumda hormon miktarının tayini için gereken kan göğüs kafesi açılarak direkt kalpten alındı. Tüm kan örnekleri alındıkta sonra 2-3 saat içinde serumu ayrılarak, kullanılacağı zamana kadar -80°C de Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında saklandı (87).

Testisler Bouin fiksatifinde 24 saat, nötral formaldehitte ise 48 saat (24 saat sonunda solüsyon tazelenerek) bekletildikten sonra uygun yöntemler kullanılarak takip edildi ve parafin içine gömüldü. Bouin fiksatif kullanılarak fikse edilen dokulardan PAS-Hematoksilin boyası yapılmak üzere 5 µm'lik kesitler alındı. Her bir lam üzerine üç kesit gelecek şekilde toplanan kesitler alınış sırasına göre numaralandırıldı. Her bloktan bu şekilde hazırlanan 10 lam elde edildi. Nötral formaldehit kullanılarak fikse edilen dokularda aynı şekilde lamlar üzerine alınıp numaralandırıldıktan sonra Leydig hücrelerini gösterebilmek için immünohistokimyasal boya ile boyandı.

PAS-Hematoksilin ile boyanan preparatların histolojik incelemesi beş kriter kullanılarak aşağıdaki gibi yapıldı:

1. Seminifer tüp hasarı varsa (1) yoksa (0)
2. Leydig hücre sayısında azalma varsa (1) yoksa (0)
3. Mononükleer hücre artışı varsa (1) yoksa (0)
4. Kan damarlarında konjesyon varsa (1) yoksa (0)
5. İnterstisyel ödem varsa (1) yoksa (0) puan verildi.

### **3.5.1. İmmünohistokimya Prosedürü:**

İmmünohistokimyasal boyama ile Leydi hücre varlığı değerlendirildi.



Lam üzerindeki dokular 60°C'deki etüvde 1 saat bekletilerek parafininin erimesi sağlandı.

Otomatik takip makinesinde rehidrasyon yapıldı

XYLOL 1	5 dk
XYLOL 2	5 dk
XYLOL 3	5 dk
Absolü Alkol	1 dk
96° 1 Alkol	1 dk
96° 2 Alkol	1 dk
90° Alkol	1 dk
80° Alkol	1 dk
70° Alkol	1 dk
Distile Su	5 dk

Rehidrate edilen dokular çelik rafa dizilerek daha önceden içinde 1/9 oranında Citrate Buffer-Distile su içeren düdüklü tencere içine konarak 10 dk kaynatıldı.

Tencere soğuduktan sonra lamalar boyama tablasına alındı. Tablanın oluklarına sıcak su kondu.

Dokunun üzerine Hidrojen peroksidadz damlatılarak 10 dk beklendi.

Distile su ile 1 dk yıkama sonrası TBS (Tris Buffered Saline) ile 2 defa yıkama yapıldı.

Ultra V Blok 5 dk uygulandı.

Testosterona spesifik antikor (abcam ab 8557) doku üzerine damlatılarak 1 gece inkübasyona bırakıldı.

Ertesi gün TBS ile iki kez yıkama yapılarak Biotinylated Goat Anti-Mouse serum 10 dk uygulandı.

TBS ile iki kez yıkama yapıldı.

Streptavidin Peroksidadz 10 dk uygulandı.

TBS ile iki kez yıkama yapıldı.

Kromojen 7dk uygulandı.

Çeşme suyu ile 1 dk yıkandı.

Hematoksin ile 30 sn boyama yapıldı.

Son olarak distile su ile yıkama sonrası lam kurularak kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

### 3.5.2. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) Hesaplaması.

Her bir sıçanın sağ ve sol testis ağırlıkları toplandı, deney sonu vücut ağırlığına bölünerek 100 ile çarpıldı. Çıkan sonuçlar Tablo 4.1. ve Şekil 4.1'de gösterildi.

### 3.6. Hormon Analizi

Serum testosteron düzeyi Rodent Testosteron Elisa Test Kit'i ile Triturus marka bir cihaz kullanılarak ölçüldü. Ölçümler ESOGÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı.

Bu test, kompetitif bağlanma metoduna dayanan solid-faz enzim immün assay'dir. Bilinmeyen miktarda testosteron içeren serum örneği (işaretli olmayan antijen) konjuge testosteronun (işaretli antijen) standart miktarına eklendi. Daha sonra işaretli ve işaretsiz antijenler tabaka üzerinde kaplı bulunan sınırlı sayıdaki goat anti IgG antikörlerinin anti-rabbit testosteronun yüksek afiniteli bağlanma bölgeleri için yarıştırdı. Reaksiyon 37°C de 2 saatlik inkübasyon sonrası gerçekleşti. Bu periyotta bio-spesifik reaksiyon gerçekleşti. Inkübasyon sonrası, serbest antijen yıkanarak ve TMB substrat solüsyonu eklenerek 20 dakika inkübe edildi. Bu esnada mavi bir renk oluştu. Daha sonra stop solüsyonu ilave edilerek, reaksiyon durdurulup, absorbans, 450 nm'de ELİSA tabaka okuyucu kullanılarak ölçüldü. Standartlardan elde edilen değerlerle standart eğrisi oluşturuldu. Örnekteki işaretli antijenin miktarı işaretsiz antijenin konsantrasyonu ile ters orantılıydı. Örnekteki konsantrasyon arttığında, renk şiddeti orantılı

olarak düşmekteydi. Sonuçlar uygun bilgisayar programı kullanılarak okundu.

### **3.6.1. Serum Testosteron Ölçüm Prosedürü:**

10 µl standart, örnek ve kontroller uygun kuyucuklara pipetlendi. Her bir kuyucuğa Testosteron enzim konjugat solüsyonundan 100 µl eklendi. 50 µl Rabbit anti testosteron antikorlarından eklenerek 30 saniye iyice karıştırıldı ve 37°C'de 2 saat inkübe edildi. Kuyucukları kapatmak için parafilm kullanıldı. Sonra kuyucukların içeriği dökülerek tabaka 5 kez yıkama solüsyonu ile (250-300 ml/kuyucuk) yıkandı. Daha sonra içeriği dökülerek 100 µl TMB substrat solüsyonu ilave edilip ve oda sıcaklığında 20dk. beklendi. Bu sürenin sonunda her bir kuyucuğa stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durduruldu ve absorbans 450 nm'de çok kuyucuklu okuyucu ile okundu.

Deneyin sensitivitesi 20 pg/ml,

İntra-assay variation 9.3 %

İnter-assay variation 9.6 %

Deneyin Lineer aralığı 0-1000 pg/ml

### **3.7. İSTATİSTİK**

Testis ağırlık indeksi gruplar arasında tek yönlü varyans analizi ile test edildi. Gruplar arası farklılıkta Tukey HSD testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki Histolojik Toplam Hasar Skorları Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı.

Bütün istatistikler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda SPSS-10.0 istatistik veri analiz programı kullanılarak yapıldı.

#### 4-BULGULAR:

Bulgular testis ağırlık indeksi, histopatolojik bulgular, serum testosteron düzeyi, toplam testis ağırlığı ve deney öncesi ile sonrası vücut ağırlığı farkı olmak üzere 5 ana grupta değerlendirildi.

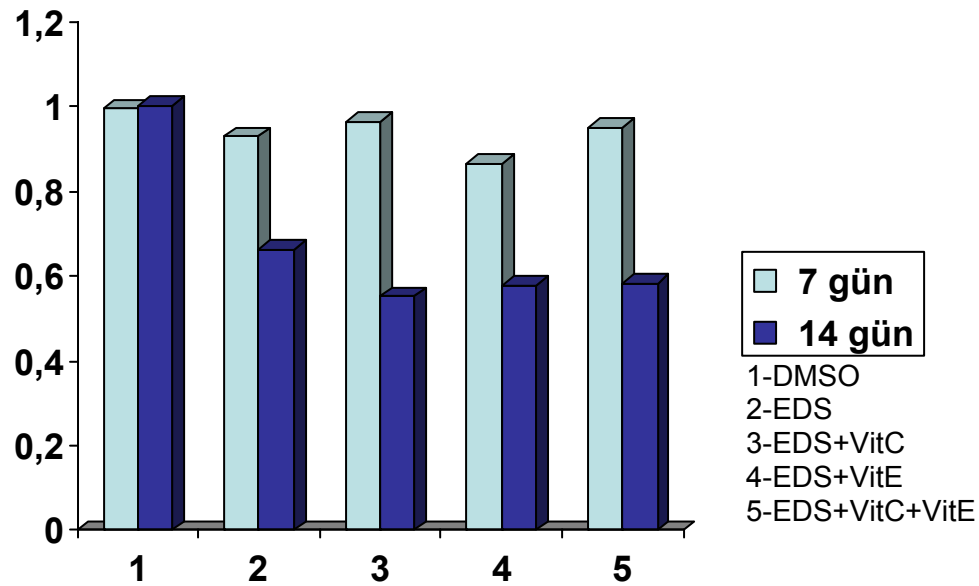
##### 4.1. Testis Ağırlık İndeksi

Tek yönlü varyans analizi kullanılarak yapılan istatistiksel analizde gruplar arasında önemli farklar görüldü ( $F=8,73$   $P=0,000$ ). Daha sonra Tukey testi ile gruplar birbirleri arasında karşılaştırıldı. Gruplara göre TAI'lerinin ortalama±standart sapmaları, Tablo 4.1'de, ortalama TAI'leri Grafik 1'de, görülmektedir.

**Tablo 4.1:** Gruplara göre TAI (%), ortalama±standart sapma.

Gruplar	7 Gün (%)	14 Gün (%)
<b>DMSO</b>	0,9966±0,0988	1,0024±0,0808
<b>EDS</b>	0,9309±0,1076	0,6634±0,1901
<b>EDS+Vit C</b>	0,9649±0,1781	0,5534±0,1153
<b>EDS+Vit E</b>	0,8659±0,1710	0,5799±0,1643
<b>EDS+Vit C+Vit E</b>	0,9508±0,1438	0,5845±0,1453

(Her grup için n=8)



**Şekil 4.1:** Testis Ağırlık İndeksi Ortalamaları

TAİ açısından karşılaştırıldığında 7 günlük gruplar ile 14 günlük gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ( $P=0,0000$ ). Şekil 4.1'de de açıkça görüldüğü gibi 7 günlük grupların TAİ değerleri daha yüksekti.

**Tablo 4.2:** 7 günlük grupların Testis Ağırlık İndeksleri'nin karşılaştırması

	EDS	Vit C	Vit E	VitC+VitE	14. gün kendi grubu
<b>DMSO</b>	$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$
<b>EDS</b>		$P>0,05$	$P>0,05$	$P>0,05$	$P=0,0147^*$
<b>Vit C</b>			$P>0,05$	$P>0,05$	$P=0,0000^*$
<b>Vit E</b>				$P>0,05$	$P=0,0066^*$
<b>Vit C+E</b>					$P=0,0002^*$

7 günlük gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında gruplar arasında bir fark saptanamadı.

**Tablo 4.3:** 14 günlük grupların Testis Ağırlık İndeksleri'nin karşılaştırması

	<b>EDS</b>	<b>VİT C</b>	<b>VİT E</b>	<b>VitC+VitE</b>
<b>DMSO</b>	P=0,0010*	P=0,0000*	P=0,0000*	P=0,0000*
<b>EDS</b>		P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>Vit C</b>			P>0,05	P>0,05
<b>Vit E</b>				P>0,05

14 günlük gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında DMSO grubu ile EDS grubu arasında (P=0,0010), Vit C grubu arasında (P=0,0000), Vit E grubu arasında (P=0,0000), Vit C ve E grubu arasında (P=0,0000) anlamlı fark saptandı. DMSO grubu beklendiği gibi diğer gruplardan daha fazla TAI'ne sahipti.

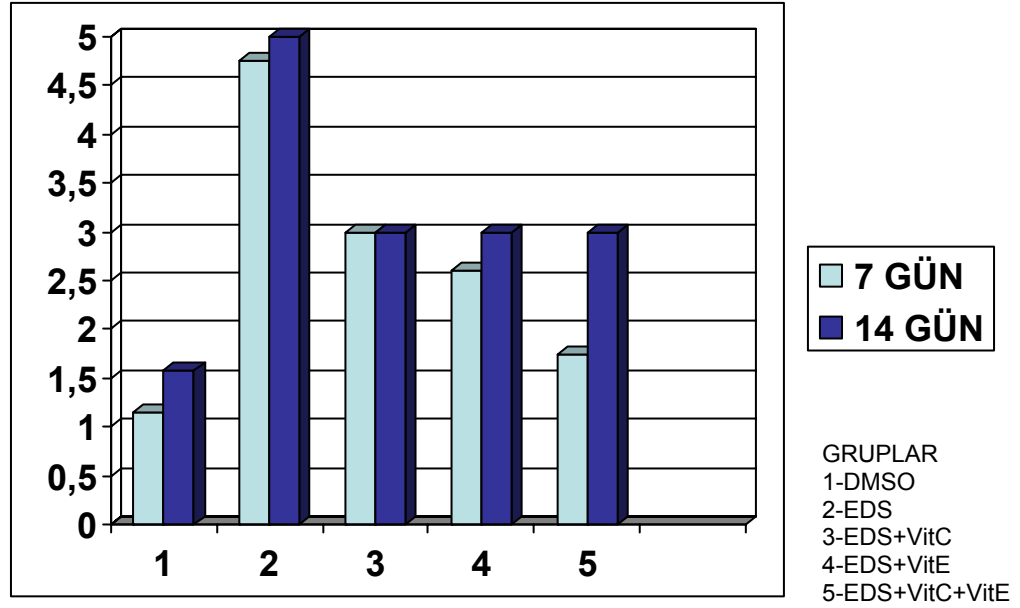
EDS grubu ile vitamin grupları arasında TAI açısından anlamlı fark saptanamadı.

#### 4.2. Histopatolojik Bulgular

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda gruplar arasında anlamlı fark bulundu (P=<0,001). Toplam ortalama histopatolojik skorun gruplara ve zamana göre karşılaştırması Tablo 4.4'de görülmektedir.

**Tablo 4.4:** Gruplara göre histopatolojik skor puanları ortalamaları. 5 puan üzerinden değerlendirilmiştir. 0: patoloji yok, 5: yaygın patoloji var.

<b>GRUP</b>	<b>7 GÜN</b>	<b>14 GÜN</b>
<b>DMSO</b>	1,14	1,57
<b>EDS</b>	4,75	5
<b>EDS+Vit C</b>	3	3
<b>EDS+ Vit E</b>	2,6	3
<b>EDS+ Vit C +Vit E</b>	1,75	3

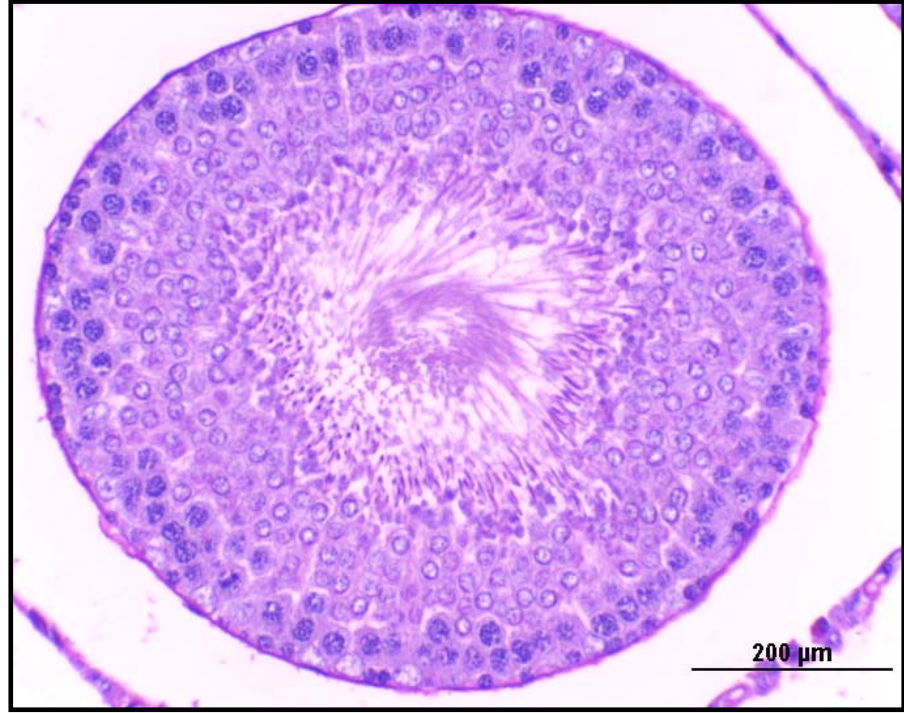


**Şekil 4.2** Gruplara göre hasar skor puanı ortalamaları

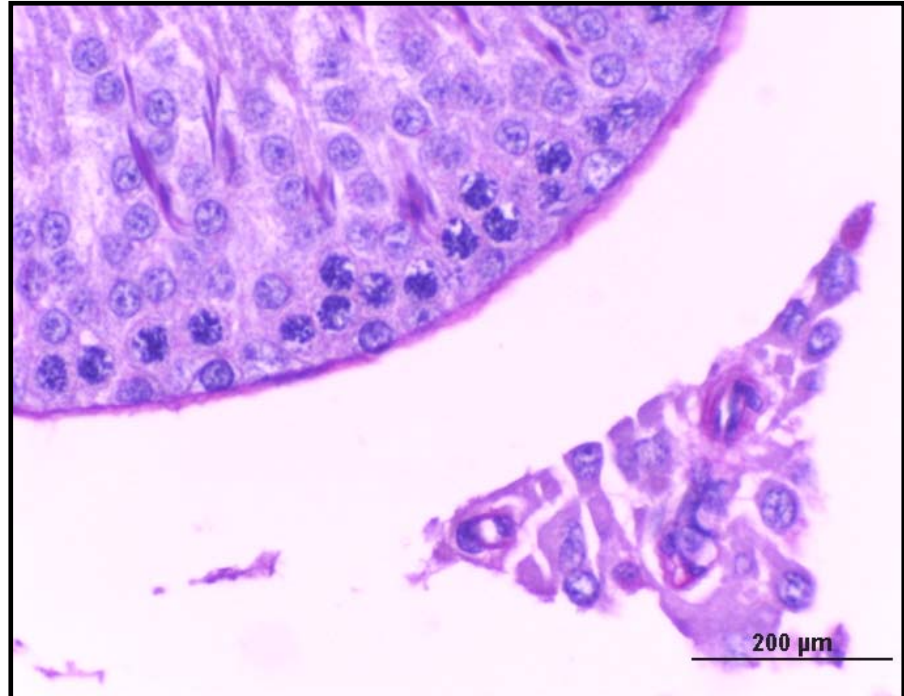
PAS-Hematoksin ile boyanan preparatların incelenmesi sonucunda elde edilen toplam hasar skoru ortalamalarının gruplara göre dağılımı Şekil 4. 2’de görülmektedir.

Grupların toplam hasar skorlarına bakıldığında en yüksek skorun sadece EDS verilen grupta olduğu, en düşük skorun ise DMSO grubunda olduğu görülmektedir. EDS ile birlikte vitamin verilen gruplarda birbirine yakın değerler bulunmuştur. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda 7 günlük EDS grubu ile 7 günlük DMSO grubu arasında, 14 günlük EDS grubu ile 14 günlük DMSO grubu arasında ve 7 günlük EDS grubu ile 7 günlük EDS+Vit C+Vit E grubu arasında anlamlı fark bulundu ( $P < 0,005$ ).

7 Günlük DMSO grubuna ait preparatların histopatolojik incelemesi sonucunda interstisyel alanda ödem haricinde patolojik bir bulgu saptanamadı (Şekil 4.3, 4.4,4.5,4.6).

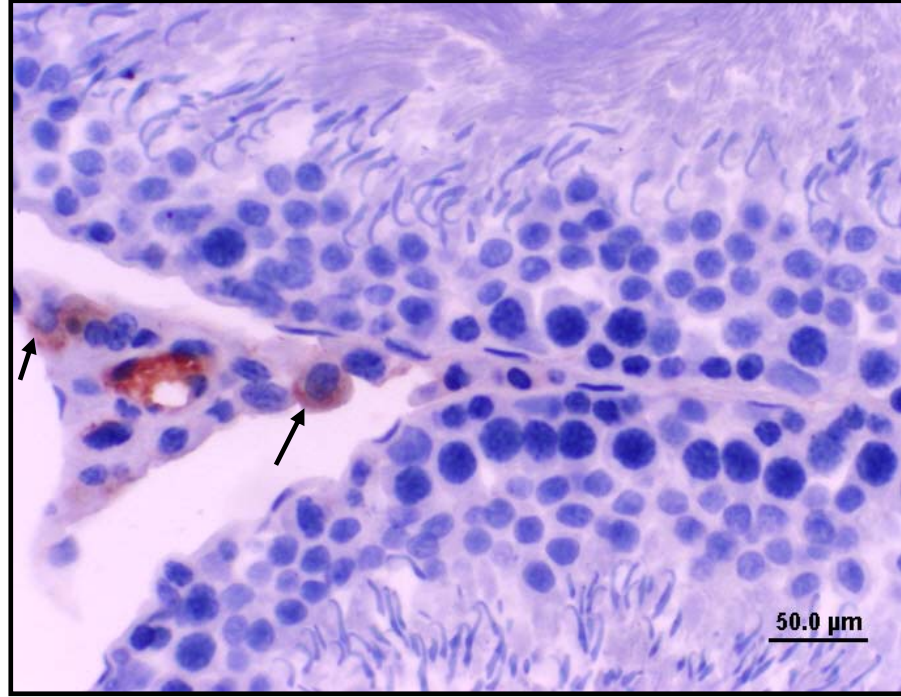


**Şekil 4.3-** 7 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alan (PAS+H).

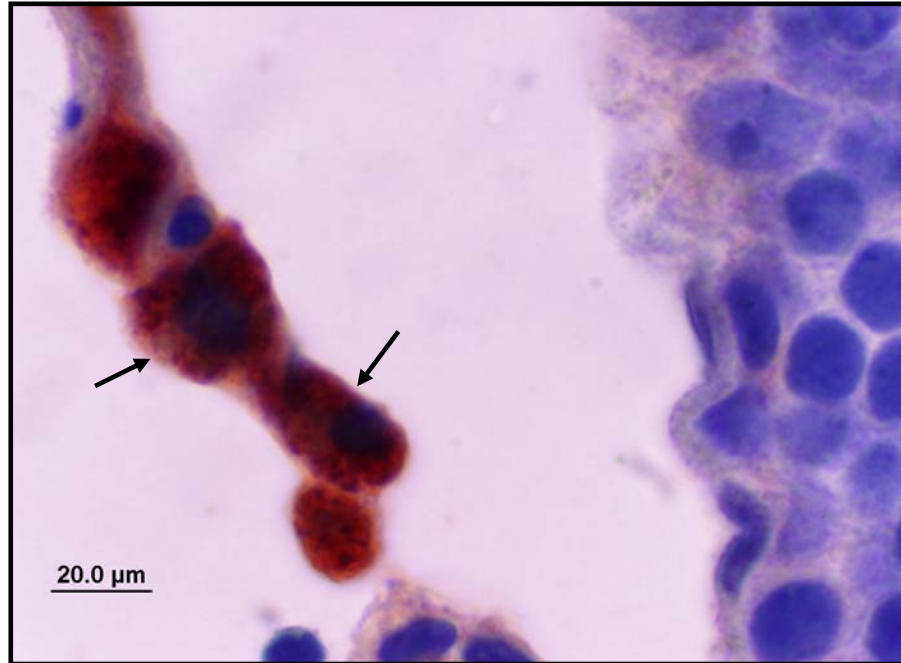


**Şekil 4.4-** 7 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alan (PAS+H).



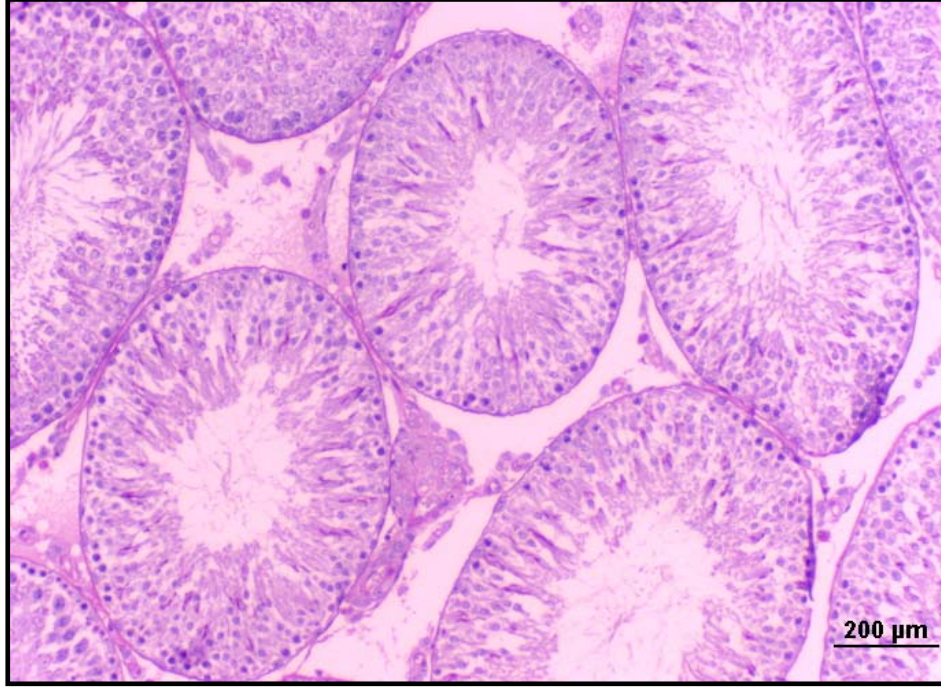


**Şekil 4.5-** 7 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alandaki testosteron pozitif Leydig Hücreleri (→) (İmmün+H).

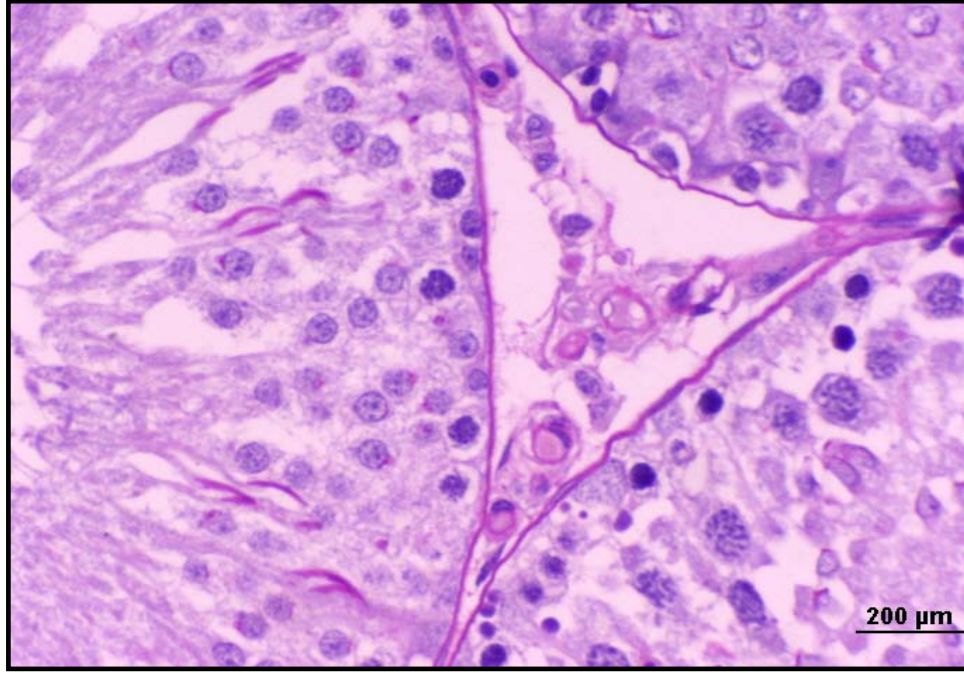


**Şekil 4.6-** 7 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alandaki testosteron pozitif Leydig Hücreleri (→) (İmmün+H).

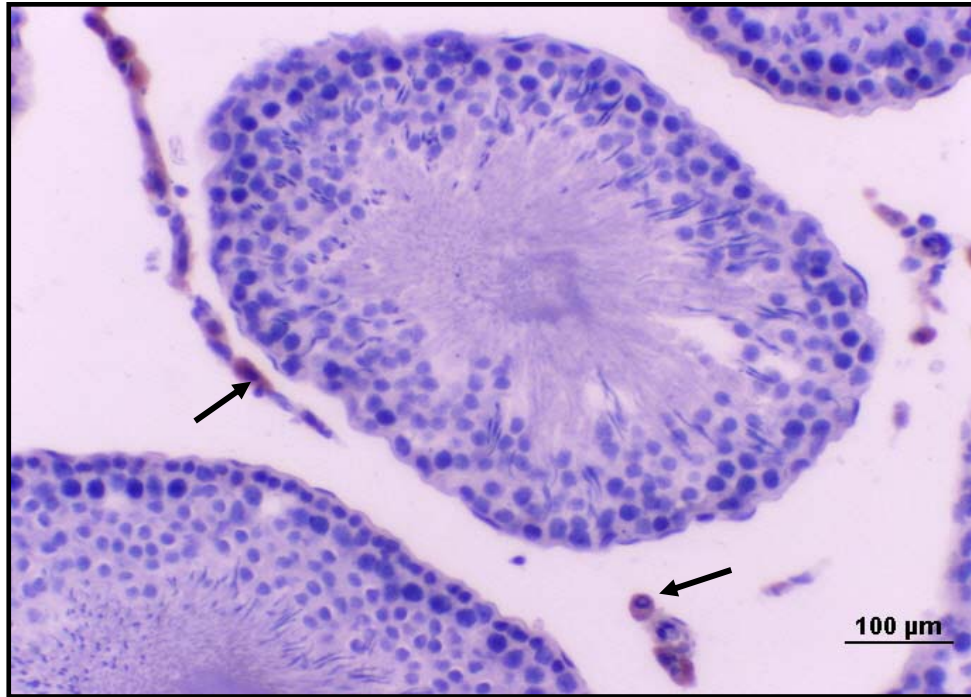
14 Günlük DMSO grubuna ait preparatların histopatolojik incelemesinde tüm preparatlarda interstisyel alanda ödem ve preparatların bir kısmında seminifer tübüllerde hasar saptandı (Şekil 4.7, 4.8, 4.9, 4.10).



**Şekil 4.7-** 14 Günlük DMSO Grubu: Normal görümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alan (PAS+H).

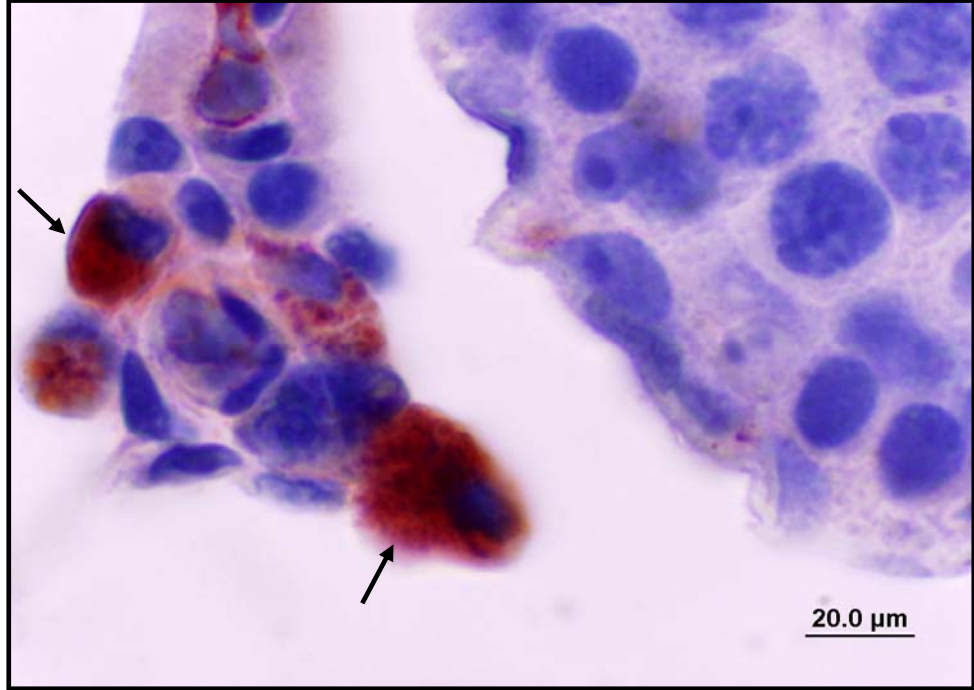


**Şekil 4.8-** 14 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alan (PAS+H).



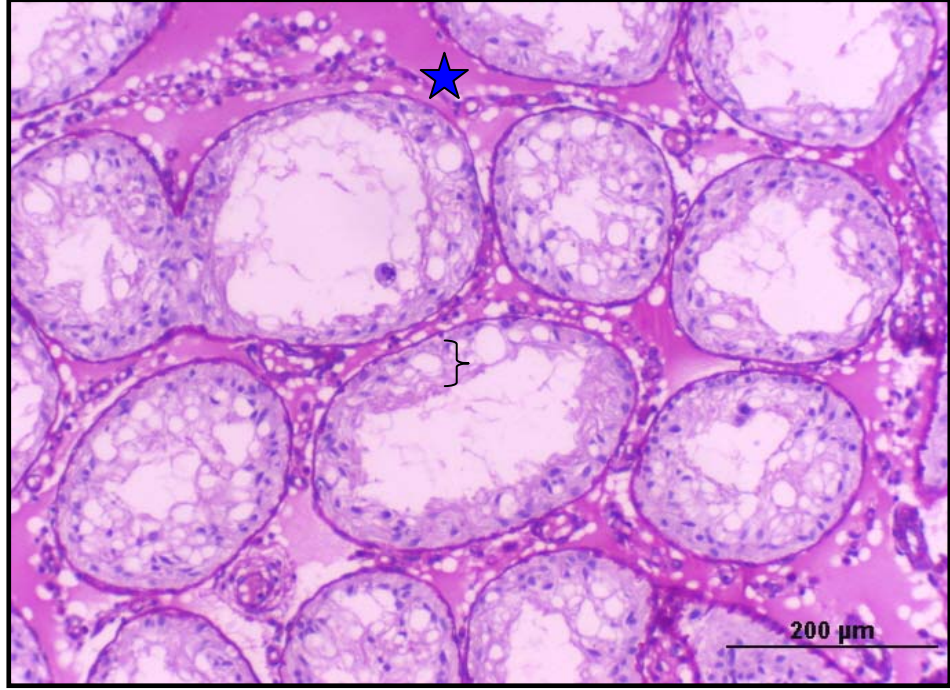
**Şekil 4.9-** 14 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alandaki testosteron pozitif Leydig Hücreleri (→) (İmmün+H).



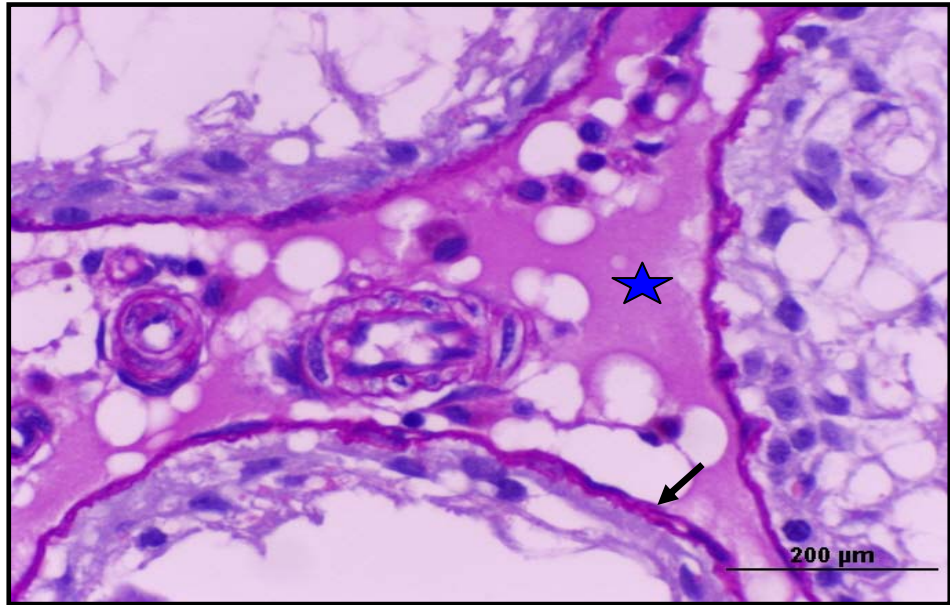


**Şekil 4.10-** 14 Günlük DMSO Grubu: Normal görünümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alandaki Leydig Hücreleri (→) (İmmün+H).

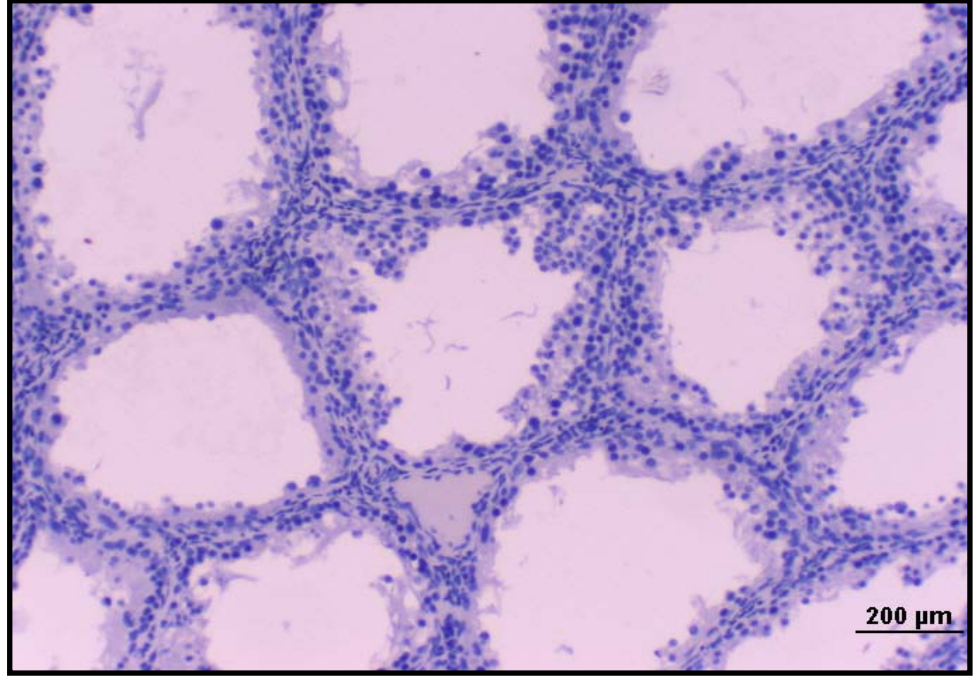
7 Günlük EDS grubunun histopatolojik incelemesinde seminifer tübüllerde ağır hasar (spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelme, bazal membranda kalınlaşma, çok çekirdekli hücreler gözlemlendi), Leydig hücrelerinin tamamen ortadan kaybolduğu, mononükleer hücre sayısında artış, interstisyel alanda makrofajlarda artış, damarların konjesyonu ve ödem gözlemlendi (Şekil 4.11, 4.12, 4.13, 4.14).



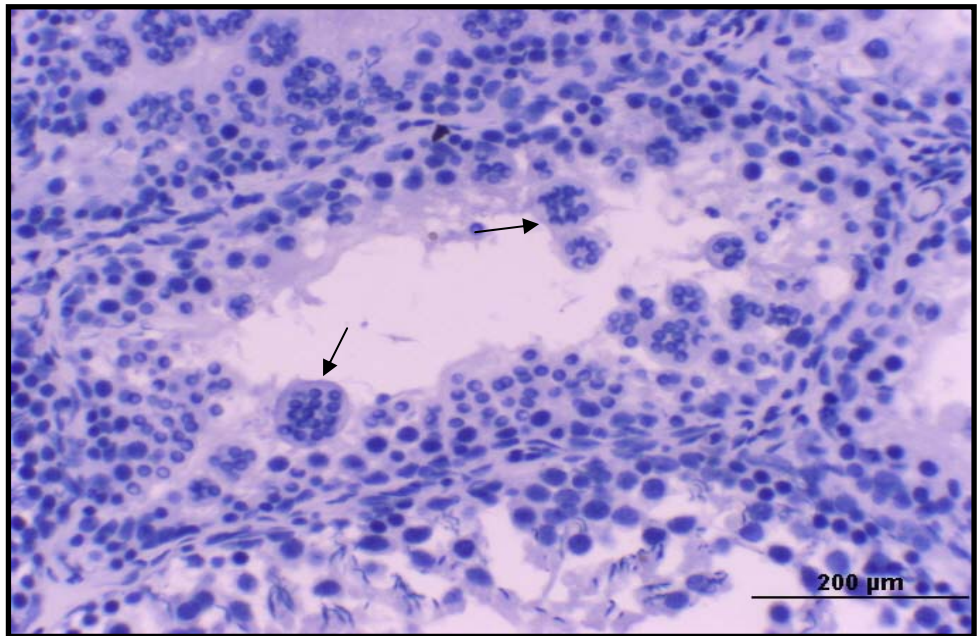
**Şekil 4.11-** 7 Günlük EDS Grubu: Spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelme (}) ve interstisyel alanda ödem görülmekte (\*) (PAS+H).



**Şekil 4.12-** 7 Günlük EDS Grubu: Mononükleer hücre sayısında artış, bazal membranda kalınlaşma (→) ve interstisyel alanda ödem görülmekte (\*) (PAS+H).



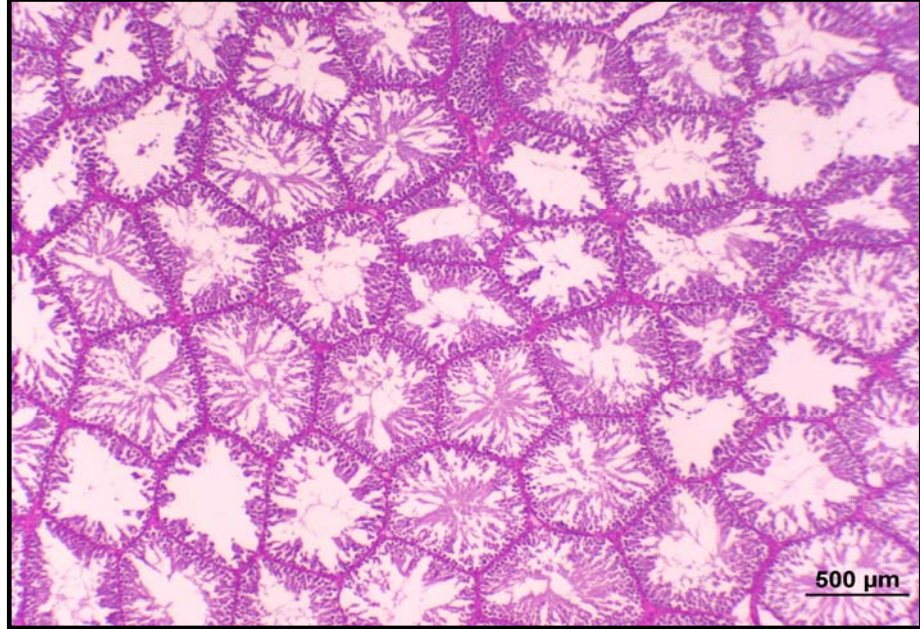
**Şekil 4.13-** 7 Günlük EDS Grubu: Spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelme görülmekte (İmmün+H).



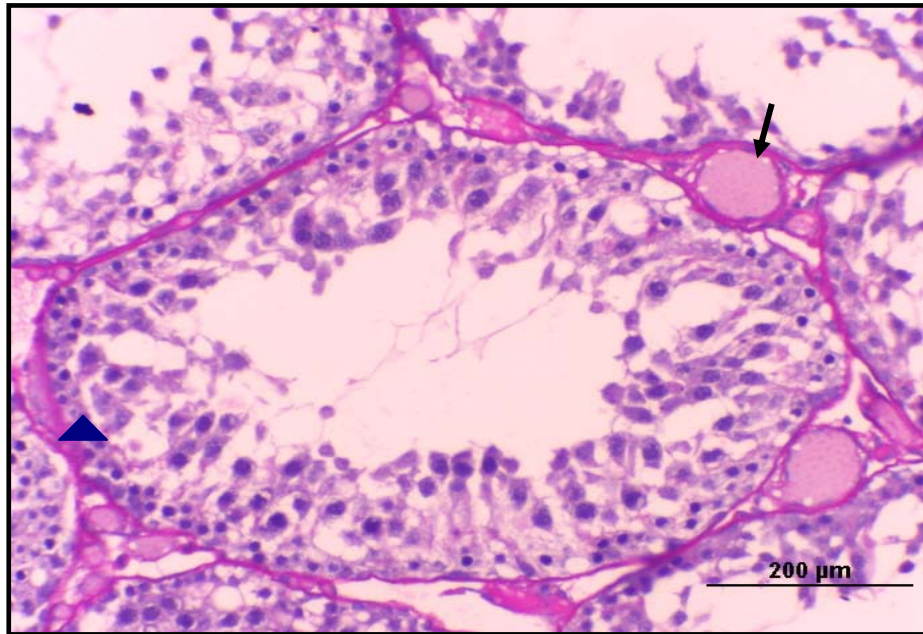
**Şekil 4.14-** 7 Günlük EDS Grubu: Spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelme, çok çekirdekli dev hücreler görülmekte (→) (İmmün+H).



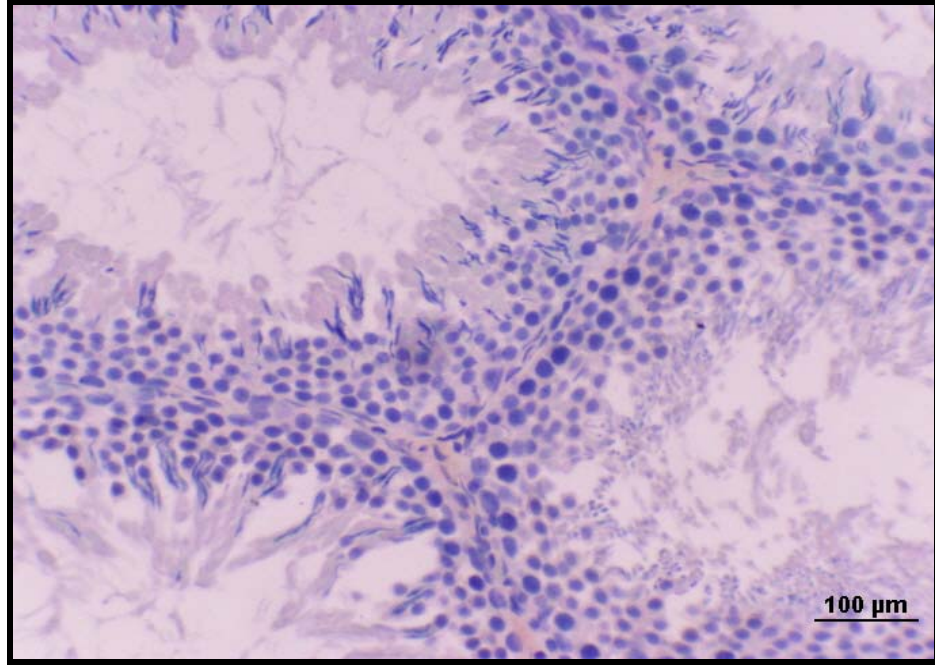
14 Günlük EDS grubunun histolojik incelemesinde 7 günlük EDS grubuna benzer bulgular saptandı. İnterstisyel alanda mononükleer hücrelerin sayısında azalma gözlemlendi (Şekil 4.15, 4.16, 4.17, 4.18).



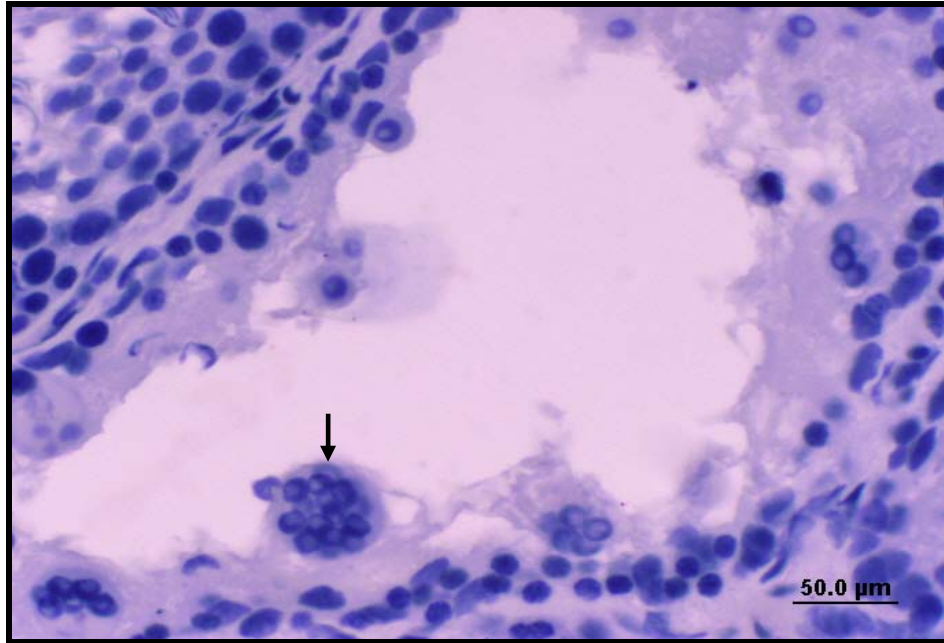
**Şekil 4.15-** 14 Günlük EDS Grubu: Spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelleme görülmekte (PAS+H).



**Şekil 4.16-** 14 Günlük EDS Grubu: Bazal membran kalınlaşması (►), damarlarda konjesyon (→) görülmekte (PAS+H).



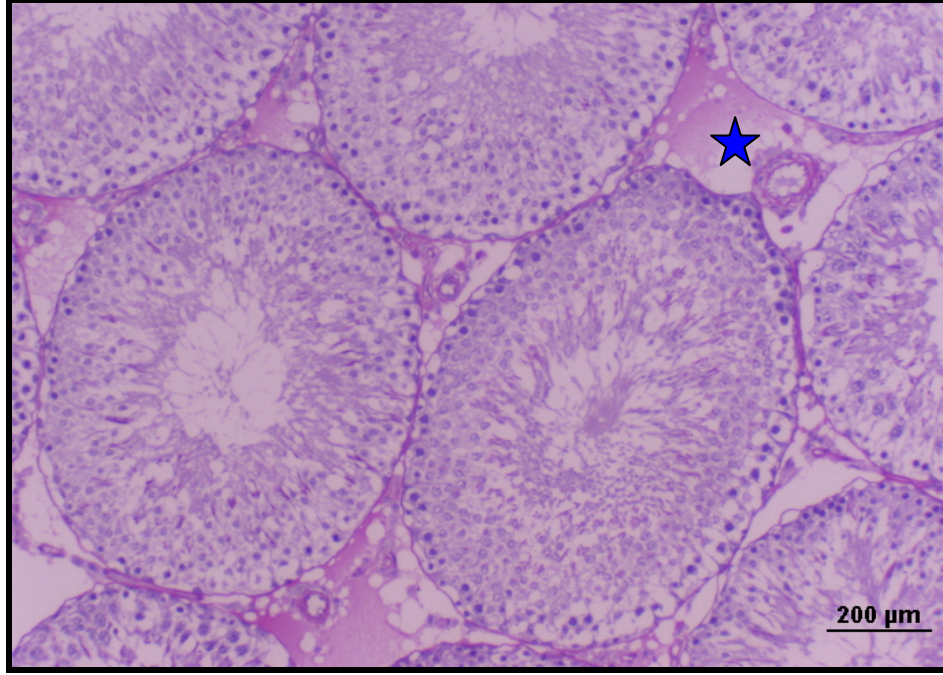
**Şekil 4.17-** 14 Günlük EDS Grubu: Spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelme görülmekte (İmmün+H).



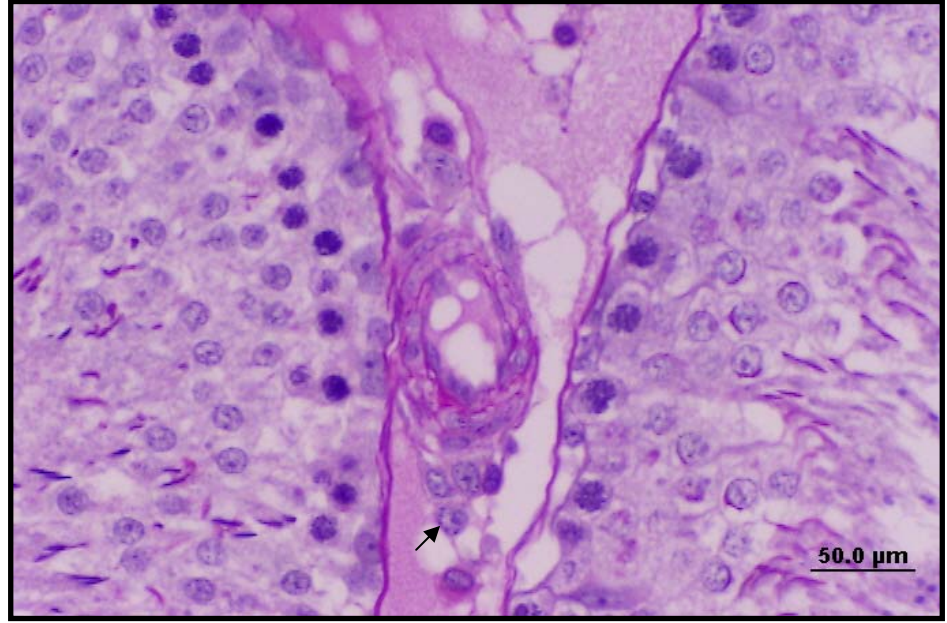
**Şekil 4.18-** 14 Günlük EDS Grubu: Seminifer tübül duvarında incelme ve çok çekirdekli dev hücreler (→) görülmekte (İmmün+H).



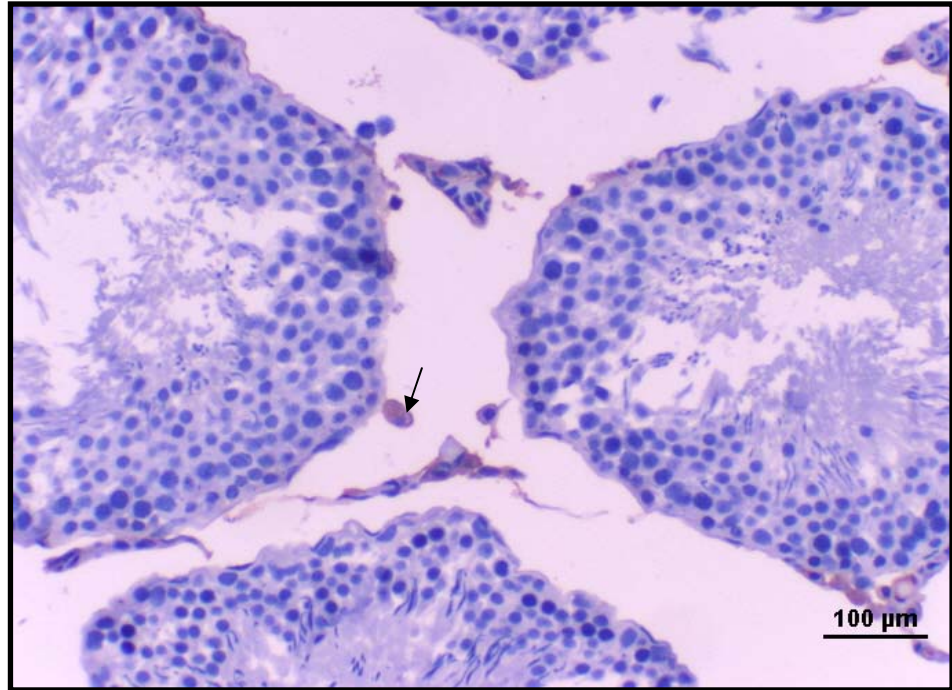
7 Günlük ve 14 günlük EDS+Vit E gruplarında Leydig hücrelerinin yavaş yavaş ortaya çıkmaya başladığı, ama seminifer tübül hasarı ve interstisyel alandaki ödemin devam ettiği gözlemlendi (4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26).



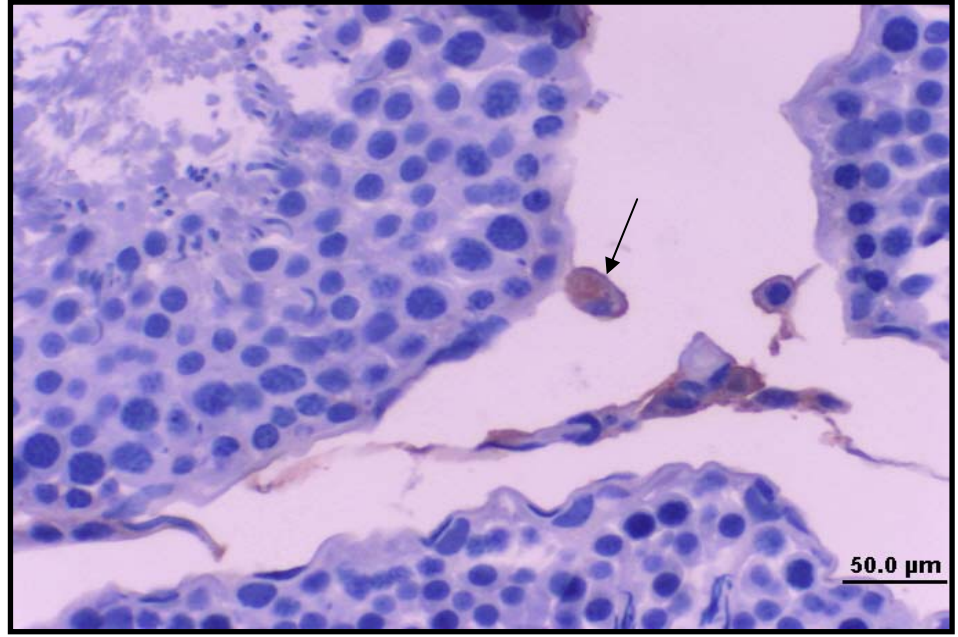
**Şekil 4.19-** 7 günlük EDS+Vit E Grubu: Normale yakın görümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alanda ödem gözlenmekte (\*) (PAS+H).



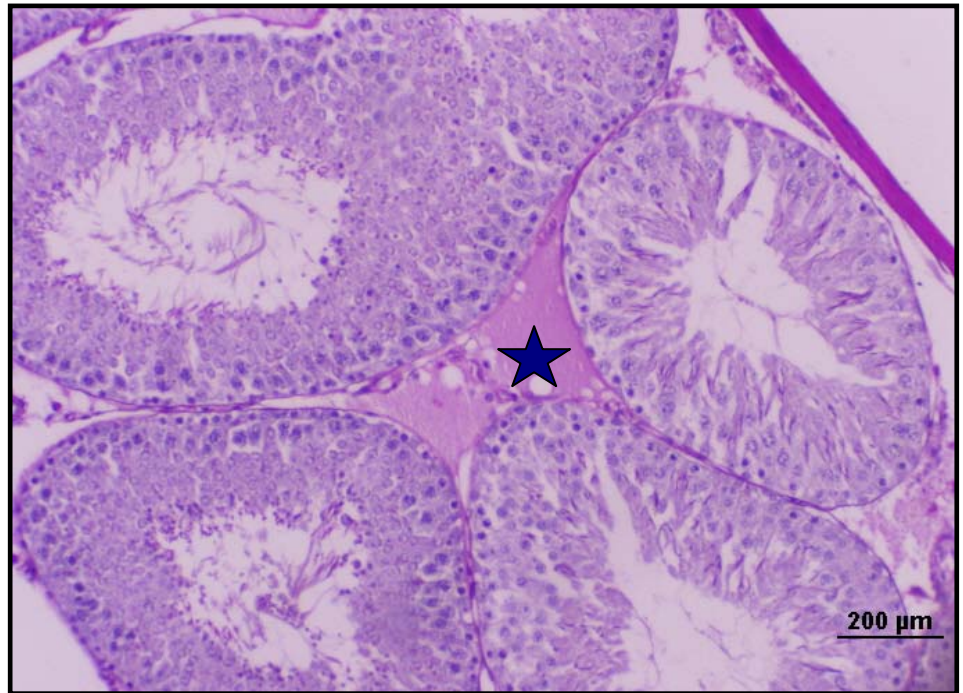
**Şekil 4.20-** 7 günlük EDS+Vit E Grubu: İnterstisyel alanda az sayıda Leydig hücresi (→) ve ödem gözlenmekte (PAS+H).



**Şekil 4.21-** 7 günlük EDS+Vit E Grubu: İnterstisyel alanda az sayıda testosteron pozitif Leydig Hücreleri (→) ve tübül duvarında hasar gözlenmekte (İmmün+H).

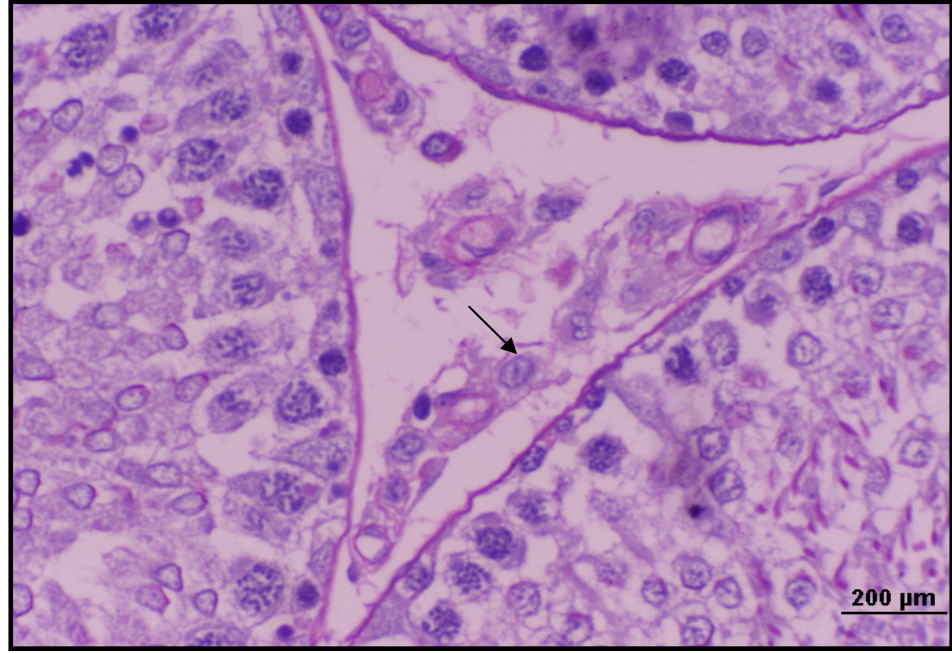


**Şekil 4.22-** 7 günlük EDS+Vit E Grubu:İnterstisyel alanda az sayıda testosteron pozitif Leydig Hücreleri (→) ve tübül duvarında hasar gözlenmekte (İmmün+H).

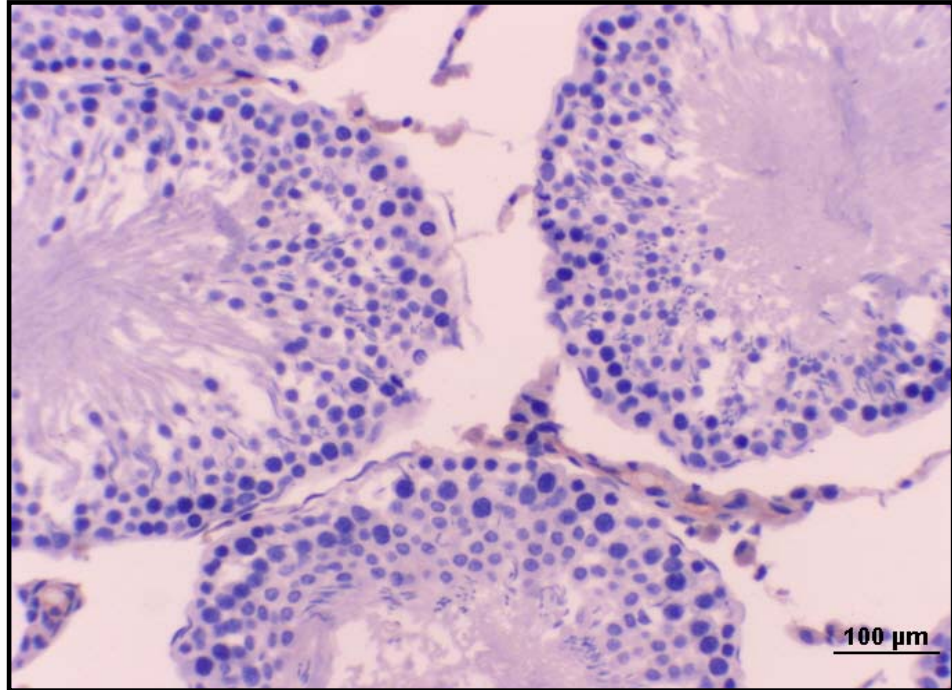


**Şekil 4.23-** 14 günlük EDS+Vit E Grubu: Normal görümlü seminifer tübül yapısı ve interstisyel alanda ödem görülmekte (\*) (PAS+H).

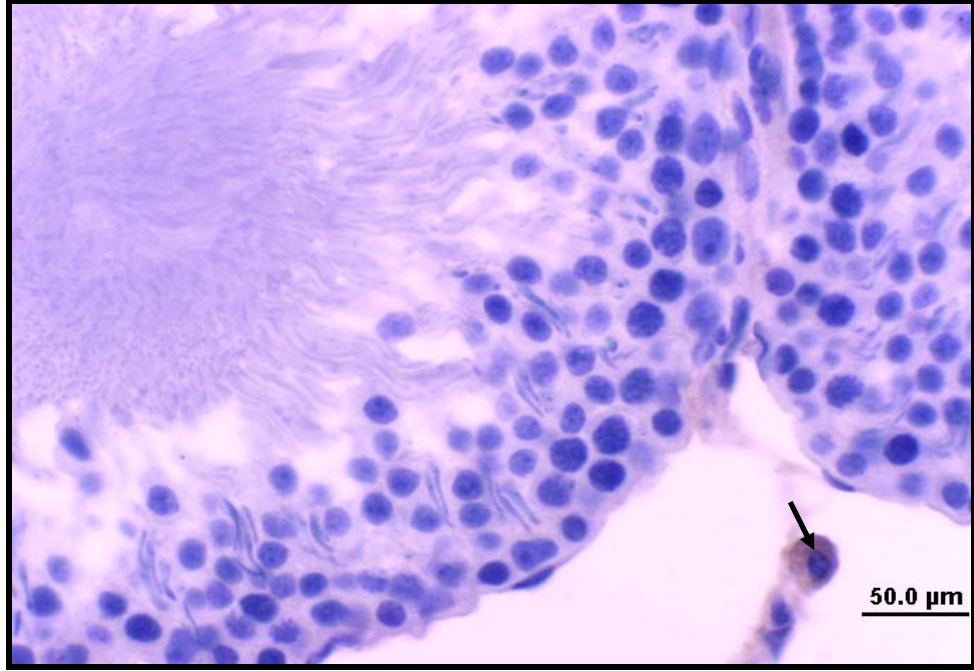




**Şekil 4.24-** 14 günlük EDS+Vit E Grubu: İnterstisyel alanda Leydig hücreleri görülmekte (→) (PAS+H).

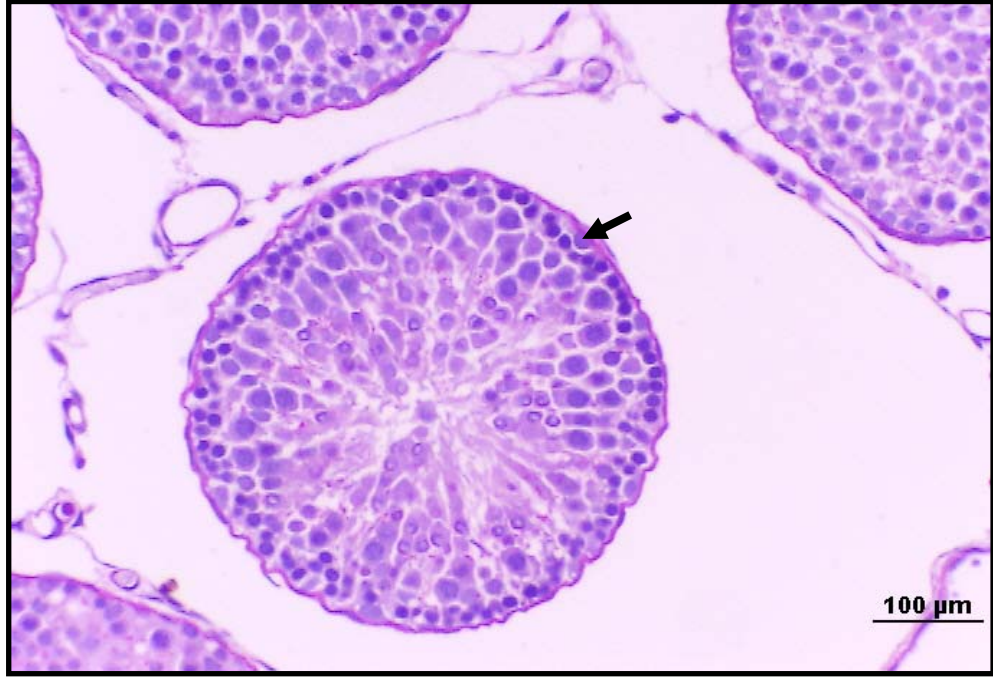


**Şekil 4.25-** 14 günlük EDS+Vit E Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig Hücreleri görülmekte (İmmün+H).

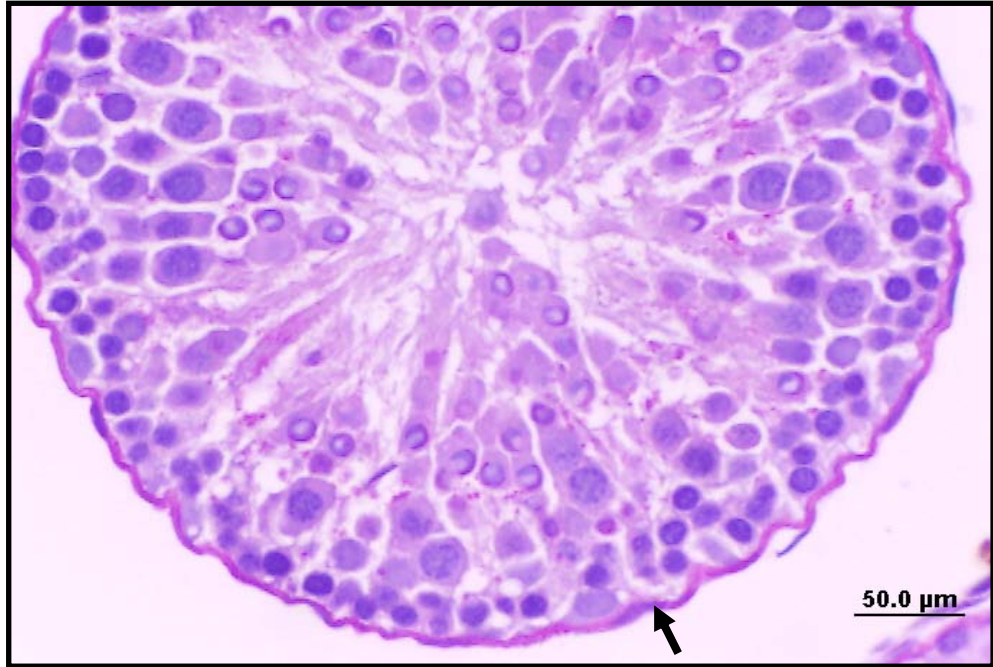


**Şekil 4.26-** 14 günlük EDS+Vit E Grubu:İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücresi (→) görülmekte (İmmün+H).

7 Günlük ve 14 günlük EDS+Vit C gruplarında Leydig hücrelerinin yavaş yavaş ortaya çıkmaya başladığı, ama seminifer tübül hasarı ve interstisyel alandaki ödemin devam ettiği gözlemlendi (4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31,4.32, 4.33, 4,34).

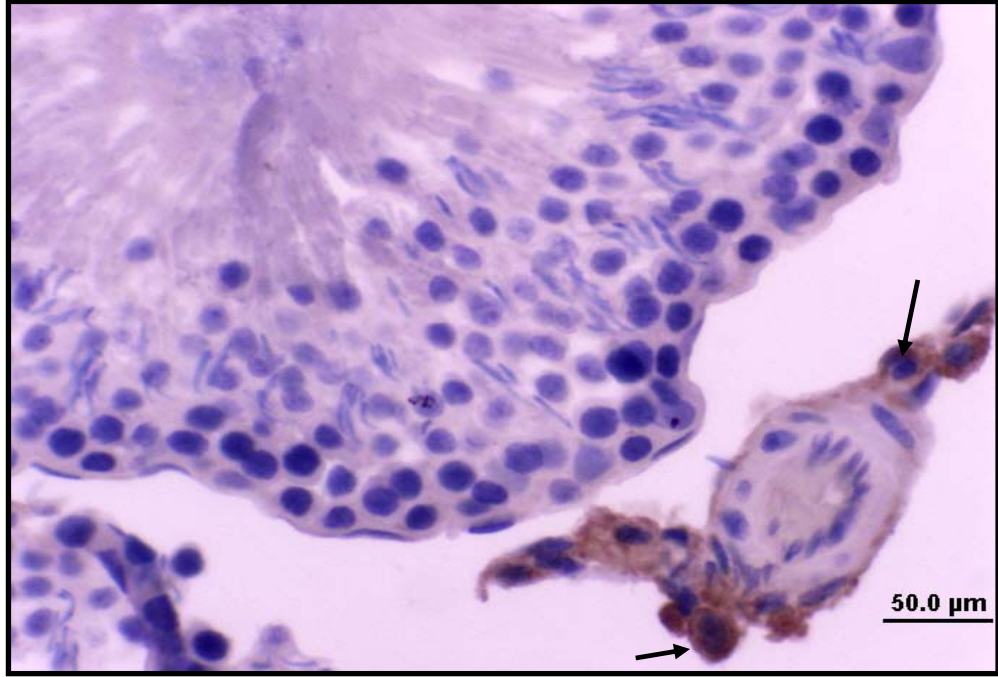


**Şekil 4.27-** 7 günlük EDS+Vit C Grubu: Bazal membranda kalınlaşma (→) ve büzüşme görülmekte (PAS+H).

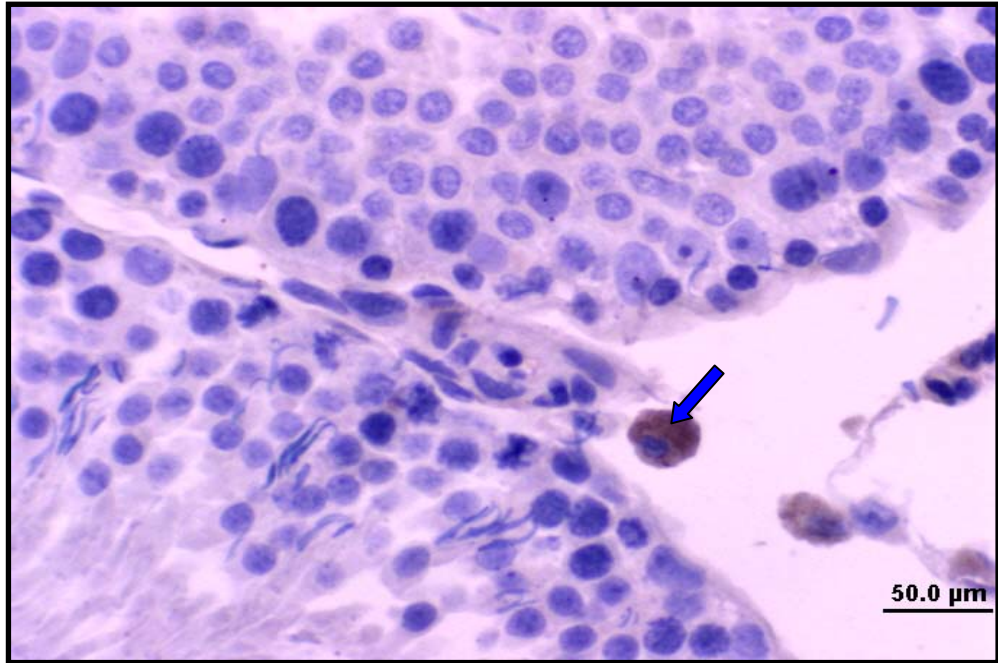


**Şekil 4.28-** 7 günlük EDS+Vit C Grubu Bazal membranda kalınlaşma (→) ve spermatojenik seri hücrelerinin lümene dökülmesi görülmekte (PAS+H).

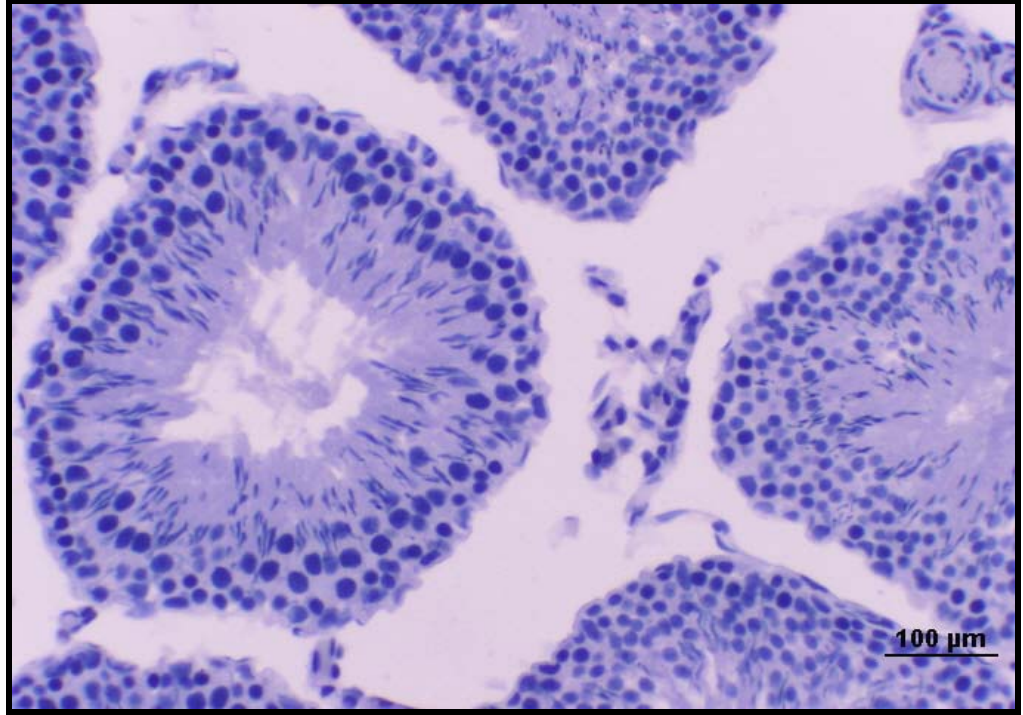




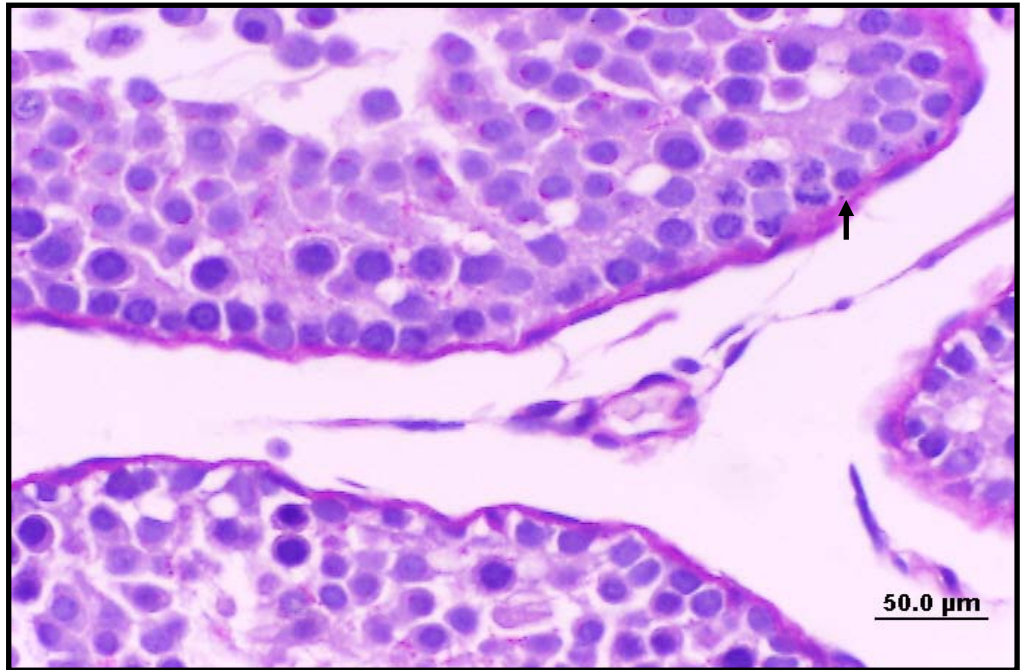
**Şekil 4.29-** 7 günlük EDS+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücreleri (→) görülmekte (İmmün+H).



**Şekil 4.30-** 7 günlük EDS+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücreleri (→) görülmekte (İmmün+H).

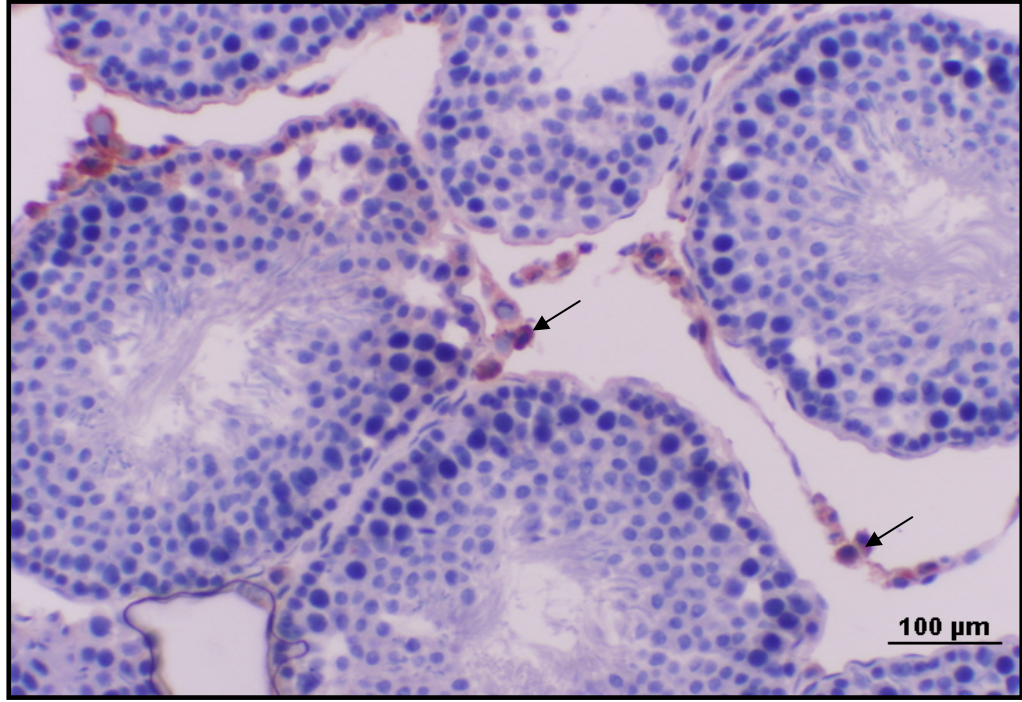


**Şekil 4.31-** 14 günlük EDS+Vit C Grubu: Normale yakın seminifer tübül yapıları görülmekte (PAS+H).

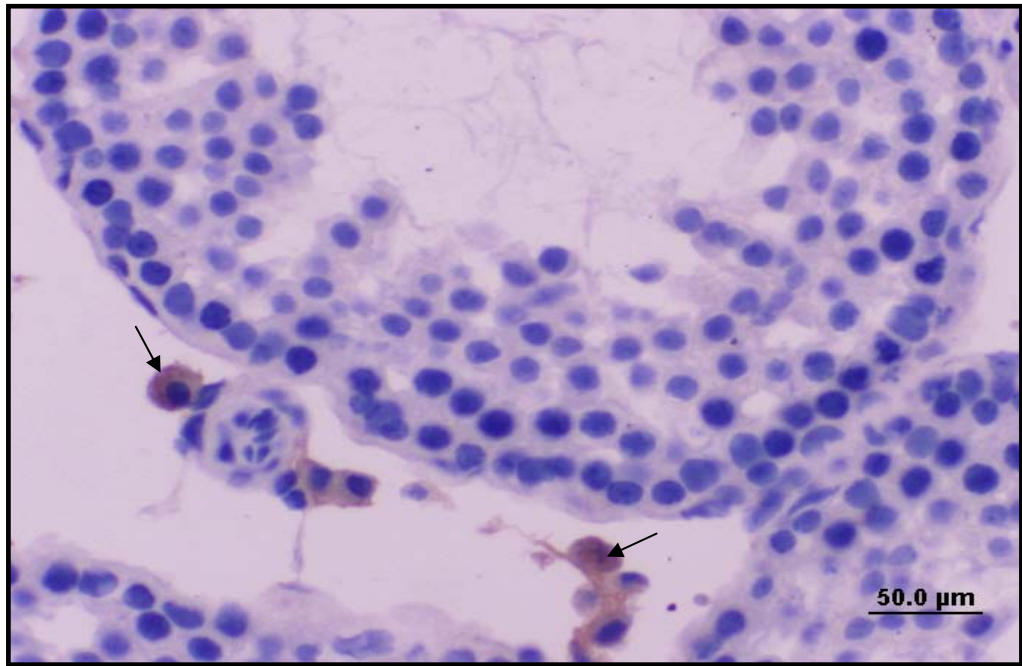


**Şekil 4.32-** 14 günlük EDS+Vit C Grubu: Bazal membranda kalınlaşma (→) görülmekte (PAS+H).





**Şekil 4.33-** 14 günlük EDS+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig hücreleri görülmekte (→) (İmmün+H).

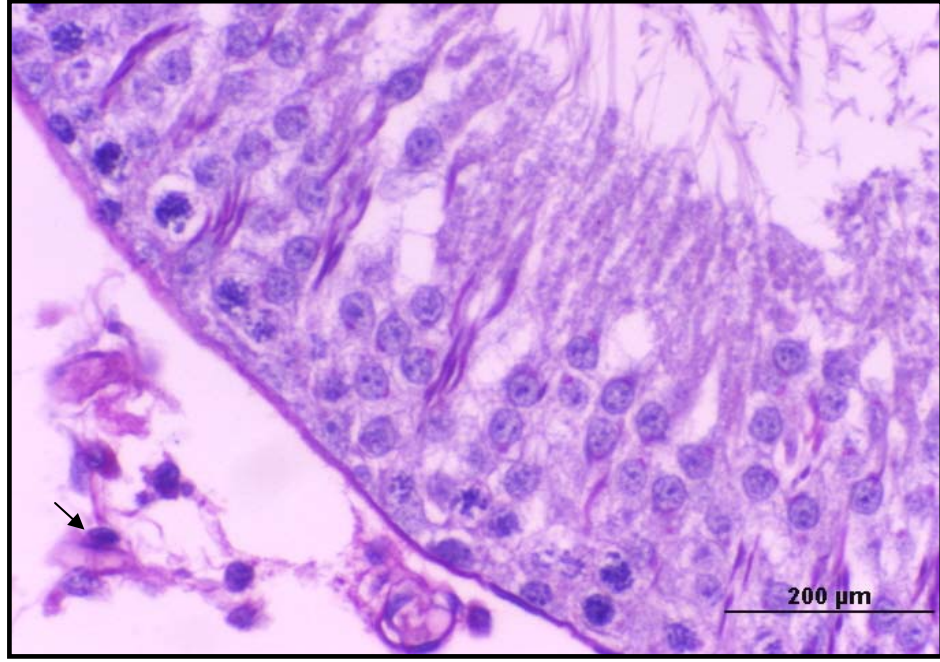


**Şekil 4.34-** 14 günlük EDS+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig Hücreleri görülmekte (→) (İmmün+H).

7 Günlük EDS +Vit C +Vit E grubunda Leydig hücrelerinde azalma ve interstisyel alanda ödem gözlenirken 14 günlük EDS +Vit C +Vit E grubunda bu patolojilere ek olarak seminifer tübüllerde hasar gözlemlendi (4.35, 4.36, 4.37, 4.38, 4.39, 4.40, 4.41, 4.42).



**Şekil 4.35-** 7 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda damarlarda konjesyon görülmekte (PAS+H).

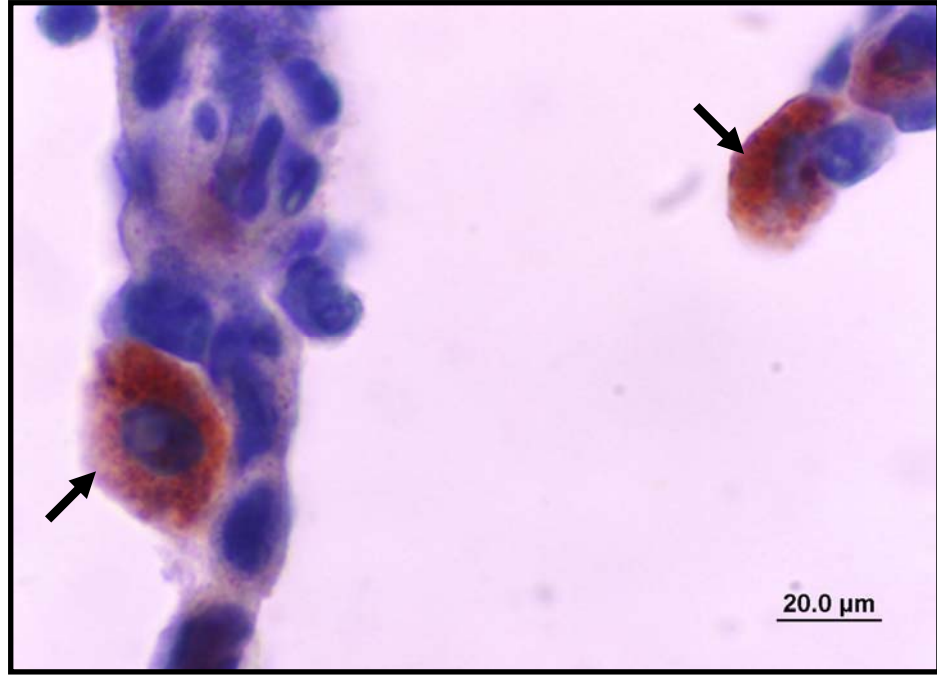


**Şekil 4.36-** 7 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: Leydig hücrelerinin (→) ortaya çıkmaya başladığı, tübül duvarının korunduğu görülmekte (PAS+H).

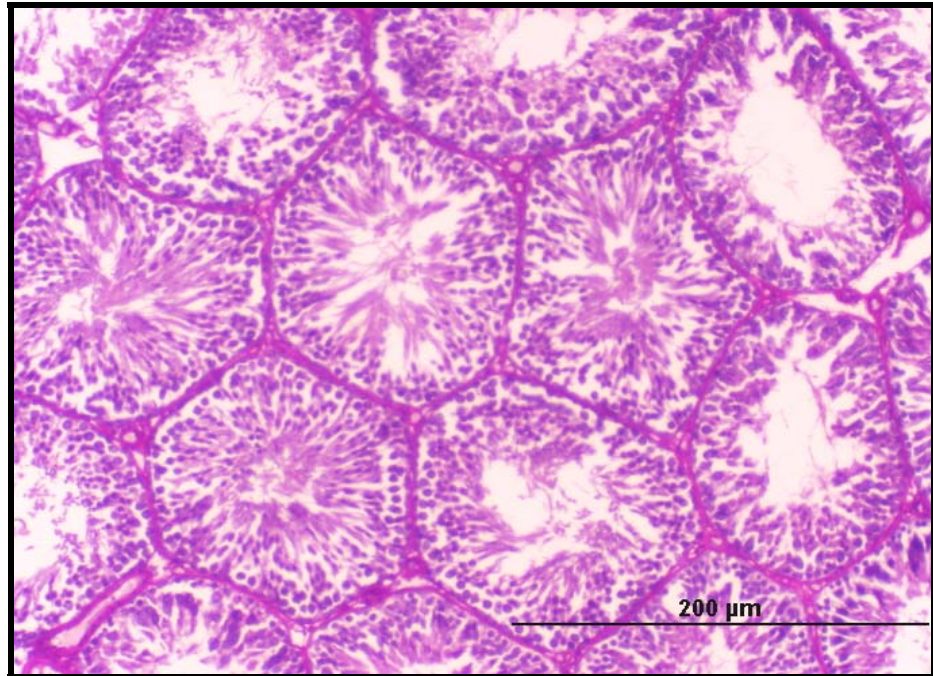


**Şekil 4.37-** 7 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig Hücreleri görülmekte (→) (İmmün+H).

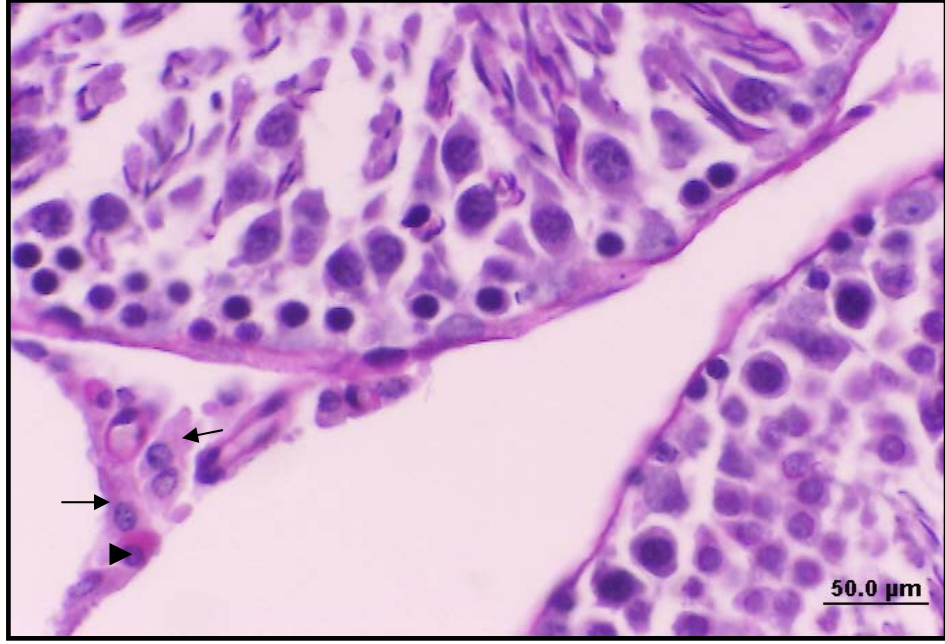




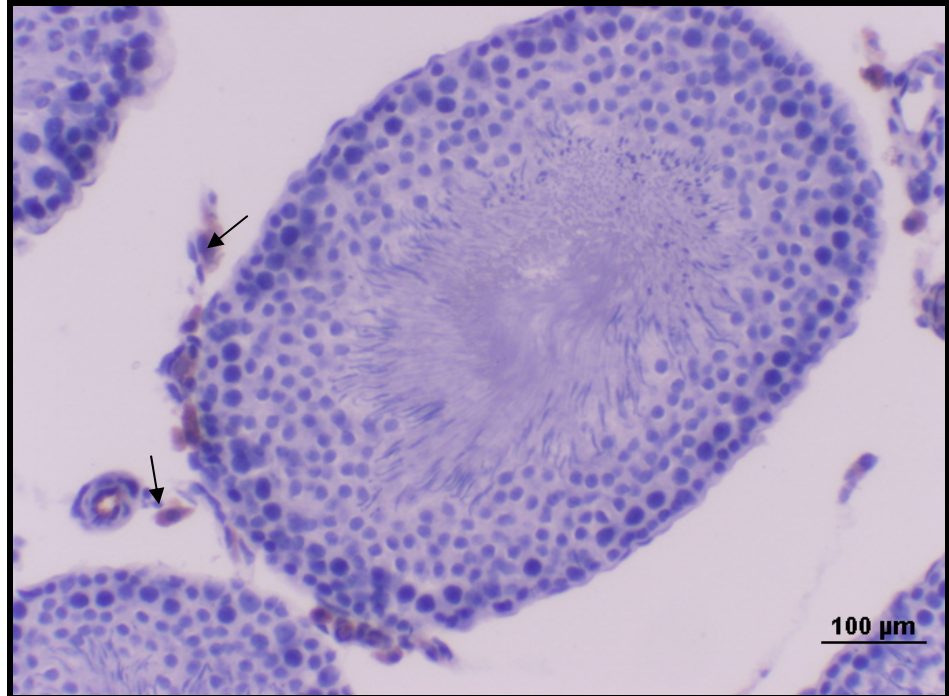
**Şekil 4.38-** 7 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig Hücreleri gözlenmekte (→) (İmmün+H).



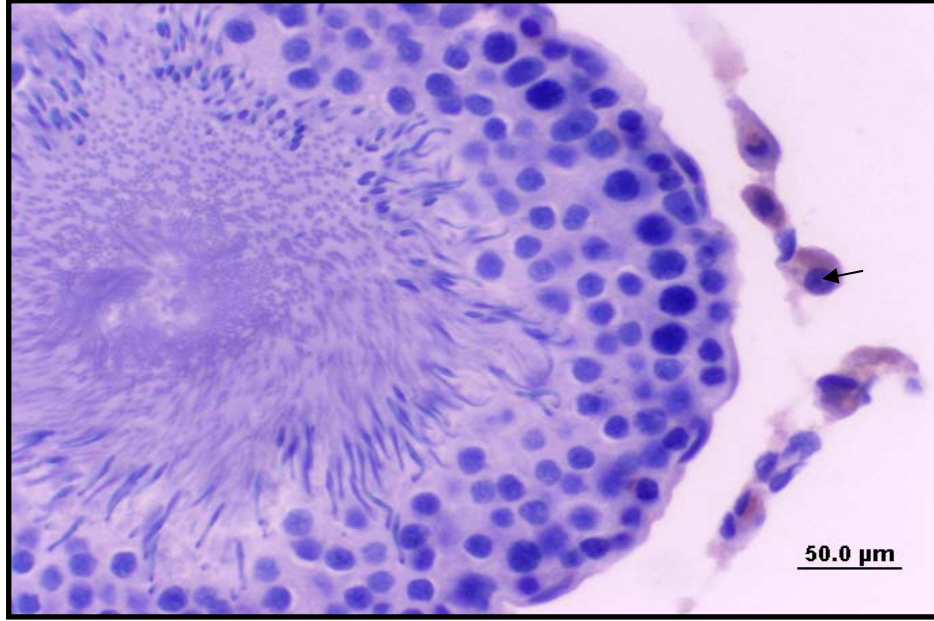
**Şekil 4.39-** 14 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: Seminifer tübül duvarının korunduğu görülmekte (PAS+H).



**Şekil 4.40-** 14 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda Leydig hücreleri (→) ve makrofaj (▶) görülmekte (PAS+H).



**Şekil 4.41-** 14 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda testosteron pozitif Leydig Hücreleri görülmekte (→) (immün+H).



**Şekil 4.42-** 14 günlük EDS+Vit E+Vit C Grubu: İnterstisyel alanda Leydig hücreleri görülmekte (→) (İmmün+H).

**Tablo 4.5: Histopatolojik Skorların P Değerleri****Tablo 4.5: 7 günlük grupların Histopatolojik skorlarının karşılaştırması**

	<b>EDS</b>	<b>Vit C</b>	<b>Vit E</b>	<b>VitC+VitE</b>	<b>14.gün kendi grubu</b>
<b>DMSO</b>	P<0,05*	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>EDS</b>		P>0,05	P>0,05	P<0,05*	P>0,05
<b>Vit C</b>			P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>Vit E</b>				P>0,05	P>0,05
<b>VitC+E</b>					P>0,05

7günlük EDS grubu ile 7 günlük DMSO ve EDS+Vit C+Vit E grupları arasında fark saptandı.

**Tablo 4.6: Histopatolojik Skorların P Değerleri****Tablo 4.6: 14 günlük grupların Histopatolojik Skorlarının karşılaştırması**

	<b>EDS</b>	<b>Vit C</b>	<b>Vit E</b>	<b>VitC+VitE</b>
<b>DMSO</b>	P<0,05*	P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>EDS</b>		P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>Vit C</b>			P>0,05	P>0,05
<b>Vit E</b>				P>0,05

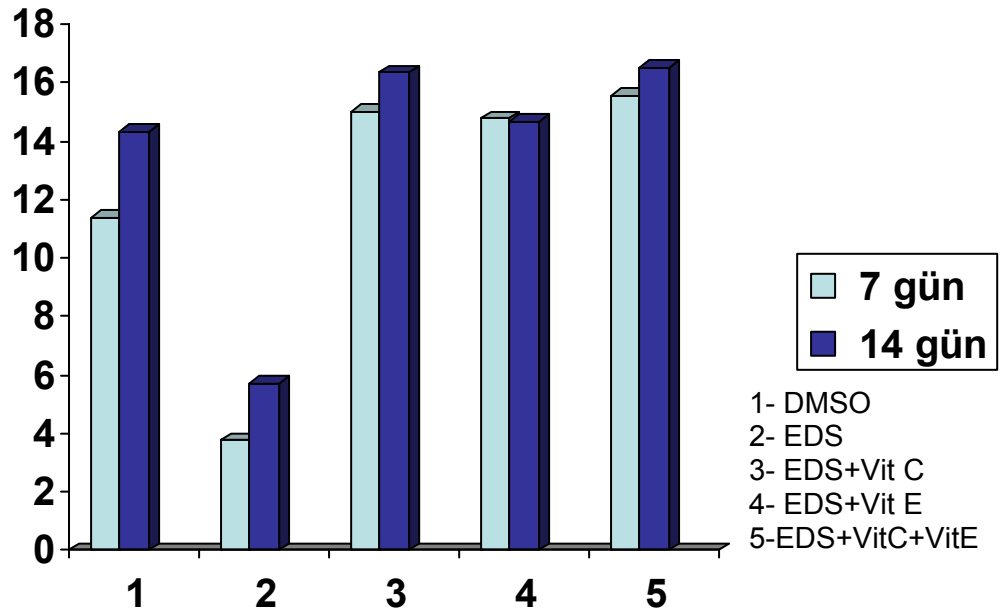
Sadece 14 günlük DMSO ve EDS grubu arasında fark saptandı.

### 4.3. Serum Hormon Düzeyi

Tablo 4.7'de serum testosteron düzeyleri ölçülerek grupların ortalama değerleri gösterilmiştir.

**Tablo 4.7:** Gruplara göre serum testosteron düzeyleri. ortalama±standart sapma, her grup için n=7.

GRUP	7 GÜN	14 GÜN
DMSO	11,52±2,130	14,34±2,162
EDS	3,77±1,672	5,72±4,640
EDS+Vit C	14,78±1,957	14,67±1,058
EDS+ Vit E	15,00±1.147	16,34±2,359
EDS+ Vit C + Vit E	15,55±0,846	16,51±0,932



**Şekil 4.43:** Serum Hormon Düzeyleri

**Şekil 4.43:** Gruplara göre ortalama serum testosteron düzeyleri (pg/ml).



**Tablo 4.8:** 7 günlük grupların serum hormon düzeylerinin karşılaştırması

	<b>EDS</b>	<b>Vit C</b>	<b>Vit E</b>	<b>VitC+VitE</b>	<b>14.gün kendi grubu</b>
<b>DMSO</b>	P=0,0000*	P>0,05	P>0,05	P=0,0221*	P>0,05
<b>EDS</b>		P=0,0000*	P=0,0000*	P=0,0000*	P>0,05
<b>Vit C</b>			P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>Vit E</b>				P>0,05	P>0,05
<b>Vit C+E</b>					P>0,05

DMSO grubu ile EDS grubu arasında (P=0,0000) ve Vit C+E grubu arasında (P=0,0221) anlamlı fark saptandı. Serum testosteron değeri ortalaması en yüksek olan grup Vit C+E grubu iken bunu DMSO grubu takip etti. En düşük testosteron düzeyi EDS grubunda görüldü. EDS grubu ile Vit C, Vit E, VitC+E grupları arasında anlamlı fark saptandı. Sırasıyla serum testosteron düzeyleri fazladan aza Vit C+E, Vit E, Vit C, EDS grubu şeklinde bulundu.

**Tablo 4.9:** 14 günlük grupların serum hormon düzeylerinin karşılaştırması

	<b>EDS</b>	<b>Vit C</b>	<b>Vit E</b>	<b>VitC+VitE</b>
<b>DMSO</b>	P=0,0000*	P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>EDS</b>		P=0,0000*	P=0,0000*	P=0,0000*
<b>Vit C</b>			P>0,05	P>0,05
<b>Vit E</b>				P>0,05

DMSO grubu ile EDS grubu arasında önemli fark saptandı (P=0,0000). DMSO grubu EDS'den önemli miktarda yüksek saptandı.

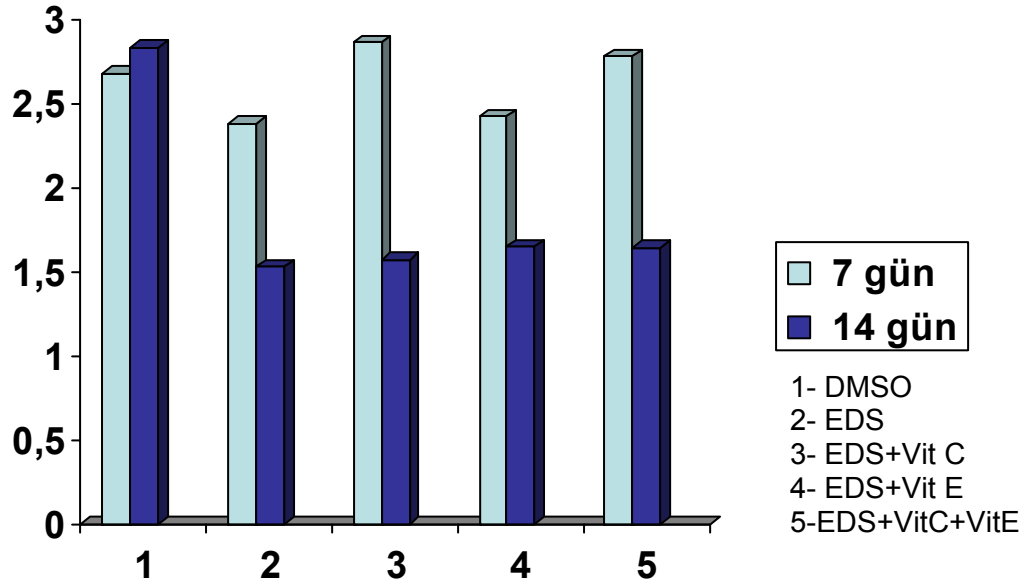
EDS grubu Vit C, Vit E, Vit C+E grupları arasında önemli fark saptandı. Fazladan aza serum testosteron değerleri Vit C+E, Vit E, Vit C ve EDS grubu şeklindedir.

#### 4.4. Toplam Testis Ağırlığı

Tablo 4.10'da gruplara göre toplam testis ağırlıkları karşılaştırılmıştır

**Tablo 4.10** Gruplara göre toplam testis ağırlığı (g), ortalama±standart sapma.

GRUP	7 GÜN	14 GÜN
DMSO	2,684±0,4880	2,836±0,3080
EDS	2,381±0,2940	1,531±0,3680
EDS+Vit C	2,866±0,1817	1,575±0,3160
EDS+Vit E	2,423±0,3520	1,650±0,2258
EDS+Vit C +Vit E	2,782±0,1495	1,645±0,3900



**Şekil 4.44:** Toplam Testis Ağırlığı ortalamaları (g).

**Tablo 4.11:** 7 günlük grupların toplam testis ağırlıklarının karşılaştırması

	<b>EDS</b>	<b>Vit C</b>	<b>Vit E</b>	<b>VitC+VitE</b>	<b>14.gün kendi grubu</b>
<b>DMSO</b>	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>EDS</b>		P>0,05	P>0,05	P>0,05	P=0,0001*
<b>Vit C</b>			P>0,05	P>0,05	P=0,0000*
<b>Vit E</b>				P>0,05	P=0,0004*
<b>Vit C+Vit E</b>					P=0,0000*

Toplam testis ağırlığı açısından 7 ve 14 günlük gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanamadı. 7 günlük EDS grubu 14 günlük EDS grubu ile karşılaştırıldığında (P=0,0001), 7 günlük Vit C grubu 14 günlük Vit C grubu ile karşılaştırıldığında (P=0,0000), 7 günlük Vit E grubu 14 günlük Vit E grubu ile karşılaştırıldığında (P=0,0004) ve 7 günlük Vit C+E grubu 14 günlük Vit C+E grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı fark (P=0,0000) bulundu.

**Tablo 4.12:** 14 günlük grupların toplam testis ağırlıklarının karşılaştırması

	<b>EDS</b>	<b>Vit C</b>	<b>Vit E</b>	<b>Vit C+Vit E</b>
<b>DMSO</b>	P=0,0010*	P=0,0000*	P=0,0000*	P=0,0000*
<b>EDS</b>		P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>Vit C</b>			P>0,05	P>0,05
<b>Vit E</b>				P>0,05

Beklendiği gibi 14 günlük DMSO grubu ile diğer gruplar karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu. DMSO grubunun diğer

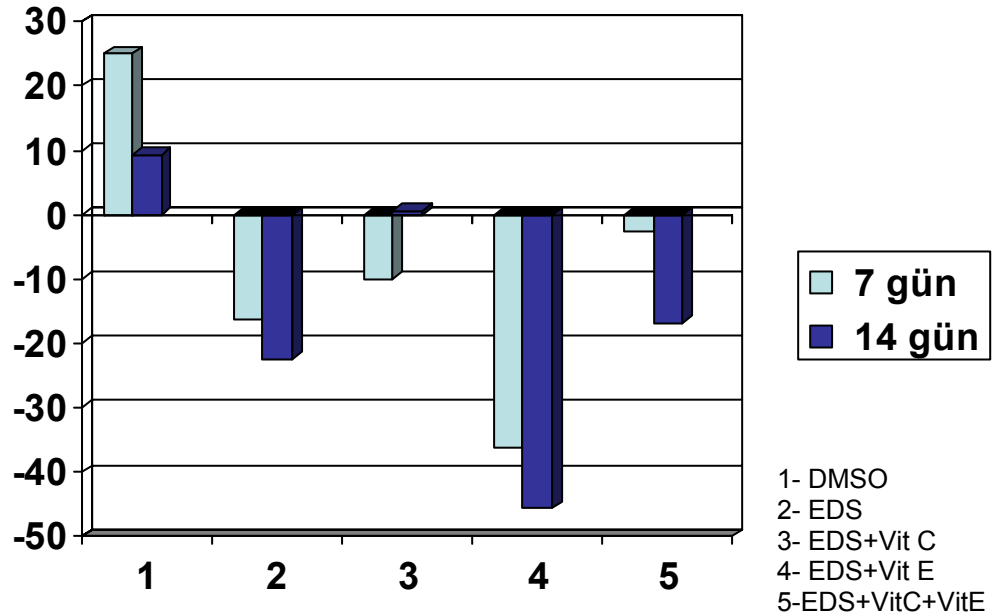
gruplardan yaklaşık  $\pm 1,3$  g daha ağır olduğunu gözlemledik. Diğer grupların birbiri ile karşılaştırmasında bir fark saptayamadık.

#### 4.5. Deney Sonu Vücut Ağırlığı Farkı

Tablo 4.13: Deney öncesi ve sonu vücut ağırlığı farkını göstermektedir

**Tablo 4.13:** Grupların deney sonu vücut ağırlıkları (g) ortalama $\pm$ standart hata.

GRUP	7 GÜN	14 GÜN
DMSO	25,00 $\pm$ 8,45	9,29 $\pm$ 3,17
EDS	-16,25 $\pm$ 5,65	-22,50 $\pm$ 5,90
EDS+Vit C	-10,00 $\pm$ 5,00	0,625 $\pm$ 12,60
EDS+Vit E	-36,25 $\pm$ 9,05	-45,63 $\pm$ 5,13
EDS+Vit C +Vit E	-25,00 $\pm$ 9,59	-16,88 $\pm$ 2,49



**Şekil 4.45:** Deney Sonrası Vücut Ağırlığı

**Tablo 4.14:** 7 günlük grupların Deney Sonu Vücut Ağırlıklarının karşılaştırması.

	<b>EDS</b>	<b>Vit C</b>	<b>Vit E</b>	<b>Vit C+Vit E</b>	<b>14.gün kendi grubu</b>
<b>DMSO</b>	P=0,0066*	P=0,0397*	P=0,0000*	P>0,05	P>0,05
<b>EDS</b>		P>0,05	P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>Vit C</b>			P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>Vit E</b>				P=0,0548*	P>0,05
<b>VitC+VitE</b>					P>0,05

Deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarının karşılaştırmasında DMSO grubunun EDS, Vit C, Vit E gruplarından anlamlı miktarda farklı olduğunu gözlemledik. DMSO grubundaki sıçanlar ortalama 25 g kilo alırken diğer gruplar kilo kaybetmişti. EDS, Vit C, Vit E grupları birbiri ile karşılaştırıldığında kilo değişimi açısından anlamlı fark gözlenmedi. Yalnızca Vit E grubu ile Vit C+E grubu arasında anlamlı fark saptandı. En az kilo kaybı EDS+Vit C+Vit E grubunda iken en fazla kilo kaybı EDS+Vit E grubunda saptandı. 7 günlük gruplar ile 14 günlük gruplar arasında anlamlı fark gözlenmedi.

**Tablo 4.15:** 14 günlük grupların Deney Sonu Vücut Ağırlıklarının karşılaştırması.

	<b>EDS</b>	<b>Vit C</b>	<b>Vit E</b>	<b>Vit C+Vit E</b>
<b>DMSO</b>	P>0,05	P>0,05	P=0,0001*	P>0,05
<b>EDS</b>		P>0,05	P>0,05	P>0,05
<b>Vit C</b>			P=0,0014*	P>0,05
<b>Vit E</b>				P>0,05

14 günlük gruplara bakıldığında DMSO grubu ile Vit E grubu ve Vit C grubu ile Vit E grubu arasında anlamlı fark saptandı. Gruplardan sadece DMSO grubunda kilo artışı olurken en fazla kilo kaybı 7 günlük gruptaki gibi EDS+Vit E grubunda oldu. En az kilo kaybı EDS+Vit C+Vit E grubunda oldu.

## 5-TARTIŞMA:

### 5.1. Testis Ağırlık İndeksi

#### 5.1.1. EDS'nin Etkisi

Yaptığımız çalışmada TAI bakımından 7 günlük gruplar ile 14 günlük gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptadık. Bunu EDS'nin etkisine bağlı olarak Leydig hücrelerinin ancak 2. günde tamamen ortadan kalkmasına ve spermatogonyumların üretiminin bir süre daha devam etmesine bağladık. Bu yüzden 7 günlük grubun TAI 14 günlük gruptan anlamlı derecede yüksek çıktı.

7 günlük grupları kendi içinde karşılaştırdığımızda anlamlı bir fark saptayamadık.

14 günlük gruplar kendi içinde karşılaştırıldığında beklendiği gibi DMSO (kontrol) grubu diğer gruplara göre daha yüksek bir TAI'ne sahipti. EDS grubu ile vitamin grupları arasında fark saptanamamasının nedeni olarak, vitaminlerin yapmış olduğu iyileşmenin testis ağırlığına kısıtlı deney süresi içinde tam olarak yansımaması ve yaptığımız tartma işleminin yeterince hassas olamaması olarak düşündük. Bizim çalışmamıza benzer çalışmalarda bildirilen bazı bulgular aşağıda sıralanmıştır.

Yapılan bir çalışmada EDS sonrası testis ağırlıkları 2 ve 3. günlerde  $1,5\pm 0,1$  gramdan  $1,4\pm 0,02$  grama düşmüş. 7. ve 10. günlerde  $1,3\pm 0,04$  grama kadar gerileme gözlenmiş (67).

EDS'nin Leydig hücrelerini yok etmekle birlikte testis interstisyumunda bulunan mezenkimal hücreler üzerine etkisiz olduğu gözlenmiş. EDS uygulanan sıçanlarda Leydig hücrelerindeki lezyonların

birkaç saat içinde başladığı ilk 12-18 saat Leydig hücre sayısının azalmadığı 24. saatte apoptotik hücrelerin sayısının maksimuma ulaştığı ve 48. saatte testiste Leydig hücrelerinin tamamen ortadan kalktığı saptanmış. İlk 7-14 gün süresince Leydig hücrelerinin gözlenemediği 21. günden itibaren tekrar ortaya çıkmaya başladığı bildirilmiş. EDS'nin 1 günde vücuttan atıldığı da bu çalışmalarda belirtilmiş (6, 82, 91, 9, 27, 95).

Ariyaratne S ve arkadaşları EDS uygulanan sıçanlarla kontrol grubu arasında kilo artışı bakımından anlamlı bir fark saptayamamış. Tüm EDS uygulanan gruplarda 90 ve 150 gün sonunda ortalama testis ağırlığı kontrol grubuna göre anlamlı oranda düşük bulunmuş. En düşük testis ağırlığı 14 ve 21 günlük EDS gruplarında saptanırken, en yüksek testis ağırlığı 150 günlük kontrol grubunda saptanmış (7). EDS uygulanan sıçanların testislerindeki ağırlık kaybı Leydig hücre apoptozisi sonucu oluşan testosteron azalması ve bunun neden olduğu germ hücre azalmasına bağlanmış (7, 87, 98).

Bu görüşü destekleyen başka çalışmalar da vardır.

EDS uygulanan sıçanların Leydig hücrelerindeki gelişmeye LH (Lüteinizan hormon)'un etkisini anlayabilmek için sıçanlara 4 ile 22. günler arasında lüteinizan hormon antiserumu verilmiş. 23. gün EDS+lüteinizan hormon antiserumu uygulanan grubun testis ağırlığı EDS+FSH (Folikül stimüle edici hormon) antiserumu ve EDS+Normal maymun serumu verilenlere göre anlamlı miktarda düşük bulunmuş (87).

Yine benzer bir çalışmada De Kretser ve arkadaşları EDS uygulaması sonrası sıçanlara değişik dozlara testosteron implantları uygulamışlar. Yüksek doz testosteron içeren implantı alan sıçanlarda EDS sonrası testis ağırlığının korunduğunu gözlemlemişler (16).



Ariyaratne S ve arkadaşları hipotiroid, hipertiroid ve normal sıçanlar kullanarak EDS sonrası testis ağırlığına bakmışlar. Hipotiroidizm EDS sonrası Leydig hücrelerinin rejenerasyonunu yavaşlatırken hipertiroidizm hızlandırmış. EDS sonrası vücut ağırlığındaki azalmada testosteronun anabolik etkilerinin yokluğu da etkili olabilir denmiş. Çalışmanın sonuçları göstermiştir ki hipotiroidizm EDS sonrası testis ağırlığının azalmasını hızlandırırken, hipertiroidizm testis ağırlığının azalmasını yavaşlatır. Yani tiroid hormonu mezenkimal hücrelerin Leydig hücrelerine dönüşümü için gereklidir (6).

Prostat ve vezikula seminalis de testisler gibi androjenlerin hedef organları olmaları nedeniyle EDS sonrası birkaç günde kilo kaybederler. 1-3 hafta sonra Leydig hücreleri ile ilişkili olarak en düşük kiloya ulaşırlar (97).

LH (Lüteinizan hormon) ve HCG (İnsan koryonik gonadotropini) hormonları da EDS sonrası testis ve aksesuar seks organlarının kilo kaybını azaltmakta etkilidir (42).

### **5.1.2. E ve C Vitamininin Etkisi**

C ve E vitaminlerinin TAI üzerine olan etkileri bazı çalışmalarda olumlu bazı çalışmalarda olumsuz olarak gözlenmiştir. Aşağıda bu çalışmaların bazıları sunulmaktadır.

Bir organofosfat olan metil paration asetilkolinesteraz ve psödokolinesteraz aktivitesini hedef dokuda inhibe eder. Bu hedef dokular immün sistem, pankreas, karaciğer, kan ve üreme sistemidir. Ayrıca DNA hasarına neden olarak sperm sayısını azaltır. Metil paration ve metil paration+vitamin E veya C verilen gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında 4-6 hafta sonra testisteki sperm sayısında anlamlı azalma ve interstisyel ödem görülmüş. Hem metil paration hem de

metilparation+vitamin verilen gruplarda 4-7 hafta sonra vücut ağırlığında, testis ağırlığında ve rölatif testis ağırlığında azalma görülmüş. Testis ağırlığındaki azalma spermatojenik hücrelerin sayısındaki azalmaya bağlanmış. Vit C ve E testis ağırlığı ve rölatif testis ağırlığı üzerine koruyucu etki gösterememiş (98).

Diğer bir çalışmada kurşun asetatın 10 mg/kg dozda periton içine verilmesi testis dokusunda lipid peroksidasyonunu arttırmış. Kurşun asetat anormal sperm oluşumuna neden olurken, sperm sayısını düşürmüş, testis ağırlığını azaltmış. Kurşun asetatla birlikte Vit C, Vit E, Vit C+E uygulandığında testis ağırlığı normale yaklaşmış. Sonuçta Vit C ve E'nin sperm morfolojisini ve sayısını iyileştirdiği, E vitamininin testisteki oksidatif stresi azaltmada Vit C kadar etkili olmadığı söylenmiş. Vit C ve E'nin birlikte verilmesi kurşun asetata bağlı testis hasarını azaltmada sinerjik etki göstererek ayrı ayrı verilmesine göre daha etkilidir sonucuna varılmış (62).

Poliklorinatlı bifeniller'e maruz kalmak sıçan spermatogenezinde defektlere, testis ve aksesuar seks organlarında ağırlık kaybına neden olmuş. Poliklorinatlı bifeniller testiküler androjenleri azaltmış. Süt veren annelerin uzun süre Poliklorinatlı bifenillere maruz kalması Leydig hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere, LH (lüteinizan hormon) uyarılmasına ve yanıt olarak in vitro ortamda testosteron üretiminde azalmaya neden olmuş. E vitamini lipoproteinlerdeki ve membranlardaki lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu inhibe ederek, C vitamini de hızlı elektron transferleri yaparak reaktif oksijen radikallerini temizler, lipid peroksidasyonunu inhibe eder dolayısı ile Poliklorinatlı bifenillerin testis üzerine olan olumsuz etkilerini azaltabilir denmiş (66).

Samanta PK ve arkadaşları testis membranlarının poliansatüre yağ asitlerince çok zengin olduğunu bundan dolayı oksidatif strese

oldukça açık olduğu söylenmiş. E vitamini gibi bazı antioksidanların harekete (spor) bağlı testisteki oksidatif stresi ve çeşitli üreme problemlerini azaltabileceği, C vitamininin de testiste steroidogenez ve gametogenezi uyararak harekete bağlı testis hasarını azaltabileceği söylenmiş (80).

Tüm bu çalışmalardan bizim çıkardığımız sonuç Vit E ve C'nin testiste oksidasyonu azaltıp serum hormon seviyesini normale yaklaştırarak TAI'ni arttırıcı etki gösterebileceği oldu.

### **5.1.3. Kilo Kaybı:**

Yapılan bir çalışmada her grupta 3'er aylık 8 hayvan bulunan 9 grup Spraque-Dawley cinsi sıçan kullanılmış. Sıfırinci gün 7 grup hayvana 75 mg/kg EDS, periton içine (ip) verilmiş. EDS uygulanan gruplar 3.gün, 7. gün, 14. gün, 21. gün, 28. gün, 40. gün ve 60. gün öldürülmüş. Sıçanlarda vücut ağırlığı deney süresince anlamlı olarak artmış. EDS uygulanan sıçanlarla kontrol grubu arasında kilo artışı bakımından anlamlı bir fark saptanamamış (7).

Yang ZW ve arkadaşları kontrol grubunda ve EDS grubunda 7 veya 12 gün sonunda deney öncesine göre deney sonunda kilo artışı bakımından bir fark saptayamamış. EDS sonrası 7. ve 12. günlerde seminifer tüplerin arasında Leydig hücreleri kontrol grubunun %8'inden daha az iken diğer hücrelerde anlamlı bir fark gözlenememiş (107).

EDS'ye bağlı zona fasikülata hücrelerinde azalma olması dolaşımdaki kortikosteron seviyesini azaltarak anoreksi ve vücut ağırlığında azalmaya neden olur denmiş. Diğer yandan EDS uygulanan erkek ve dişi yenidoğan sıçanlarda vücut ağırlığında azalma gözlenmiş ve büyümedeki bu gecikmenin testis hasarına bağlı olmadığı söylenmiş.

DMSO'nun da zona fasikülata ve zona retikulariste hücre sayısında azalmaya neden olduğu, serum trigliseridlerini arttırdığı gösterilmiş (73).

Bizim çalışmamızda hayvanların ağırlıklarında genel bir azalma gözledik. Bunu kısmen kullandığımız yemlerin kalitesinin düşüklüğüne, kısmen de E ve C vitaminlerinin peritonu irrite etmesi sonucu sıçanların yeterince beslenememesine bağladık.

## **5.2. HİSTOPATOLOJİ**

### **5.2.1. EDS'nin Testis Histolojisine Etkisi**

Leydig hücreleri knock-out edilmiş sıçanlar, Leydig hücrelerinin spermatogenez üzerindeki rolünün ve Leydig hücrelerinin yeniden çoğalmalarının mekanizmasının anlaşılmasında çok yararlı olmuşlardır (77). İşte bu amaçla kullanılacak maddelerin başında EDS gelmektedir.

EDS diferansiye olmuş Leydig hücreleri üzerine seçici olarak sitotoksik etki gösteren alkilleyici bir ajandır (81).

EDS'nin sıçanlara uygulanması sonucu Leydig hücrelerinin sitoplazması ve nukleusunda bazı değişiklikler gözlenir. Bunlar granülsüz endoplazmik retikulumda veziküllerin oluşması, golgi aparatının fokal hipertrofisi ve nükleer kromatinin kümelenmesidir (92). Daha sonra sitoplazma ve çekirdekte fragmantasyona giden dejeneratif değişiklikler ortaya çıkar ve bunu makrofajların fagositozu izler. Bu yapısal değişiklikler, Leydig hücrelerinin EDS'ye yanıt olarak nekroz yerine programlı hücre ölümüne girdiklerini göstermektedir (9, 29, 28, 64).

Araştırmacılar spermatogenezdeki en büyük hasarın EDS uygulamasından 21 gün sonra görüldüğünü, spermatojenik siklusun birçok aşamasındaki tübüllerde germ hücrelerinin sayılarının oldukça azaldığını, seminifer epitelde geniş vakuolizasyonlar görüldüğünü bildirmiştir (83). Diğer bir çalışmada, EDS uygulamasından 3 gün sonra seminifer epitelin kalınlığının biraz azalmasına karşın spermatogenezin devam ettiği, bazı spermatogonyumlarda perinükleer vakuolizasyon gözlemlendiği, EDS sonrası 7. günde ise bu bulgulara ek olarak tübüllerde atrofi görülmüştür (53).

Bizim çalışmamızda da bunlara benzer bulgular saptandı. 1 haftalık EDS grubunun histopatolojik incelemesinde seminifer tübüllerde ağır hasar (spermatojenik seri hücrelerinde sayıca azalma, tübül duvarında incelme, bazal membranda kalınlaşma, çok çekirdekli hücreler gözlemlendi), Leydig hücrelerinin tamamen ortadan kaybolduğu, mononükleer hücre sayısında artış, interstisyel alanda makrofajlarda artış, damarların konjesyonu ve ödem gözlemlendi.

EDS sadece Leydig hücrelerini dejenere etmekle kalmaz aynı zamanda interstisyel alanda mast hücrelerinin sayısını da artırır. İmmatür Leydig hücreleri ise EDS'ye dirençlidir (97).

EDS sıçanlarda kendiliğinden meydana gelen Leydig hücre tümörü üzerinde de dejeneratif etkiye sahiptir. Bu etki yaygın ve ağır nekrozla sonuçlanan kromatin kondensasyonu ve sitoplazmik vakuolizasyondur (105).

Normal Leydig hücreleri EDS ile karşılaştığında hem in vivo hem de in vitro koşullarda apoptozise uğramaktadır. Apoptozisin meydana gelebilmesi için bazı proapoptotik ve antiapoptotik genlere ihtiyacı vardır. Bcl-2 ve Bcl-xl hücreler üzerinde apoptozise karşı koruyucu etki yaparken, Bax Bcl-2'nin etkisini bloke edebilir ve Bak hücre ölümünü

hızlandırır. Fas ligand ise alternatif bir yolakla hücreleri apoptozise götüren bir transmembran proteindir. Bu işi Tümör Nekrozis Faktör ailesinden bir transmembran glikoprotein olan Fas reseptörüne bağlanarak yapar. Normal Leydig hücrelerinde Bcl-2 ve Bax bulunmazken, Bcl-xl bulunur. EDS'a bağlı hücre ölümünde Bcl-xl'de herhangi bir değişiklik gözlenmezken, Fas-L ve Fas-R ekspresyonu artar ve muhtemelen apoptotik kaskadın kaspazlarını uyarır (105).

Bcl-2, Bax ve Bcl-xl ailesindeki üyelerin EDS uygulaması sonrası Leydig hücrelerinde meydana gelen apoptoziste rolünün olmadığını savunan çalışmalarda vardır (52, 91). EDS uygulamasından 6 saat sonra tüm Leydig hücrelerinde FasR ve FasL proteinleri gözlenir. Bu durum FasR proteini aktivasyonunun apoptotik sinyali başlattığını düşündürmektedir. FasR ve FasL proteinlerinin EDS sonrası 48 saatte kaybolması bu proteinlerin sadece interstisyel Leydig hücreleri tarafından salındığını göstermektedir (91).

Kaspazlar birçok hücrede apoptozisin meydana gelmesinde önemli rol oynarlar. Kaspazlar inaktif proenzimler olarak sentezlenirler ve apoptozise giden hücrelerde aktif hale gelirler. Kaspazlar içinde kaspaz-3 apoptotik yolakta anahtar rol oynar. DNA'yı parçalayan DNA fragmentasyon faktörünü etkiler. İn vitro ortamda EDS sonrası kaspaz-3 inhibitörü verilen olgularda apoptozisin baskılandığı gösterilmiştir (52).

EDS'nin Leydig hücreleri üzerindeki apoptotik etkisini, hücrelerdeki glutatyona kovalent bağlar ile bağlanarak glutatyonu tüketmek suretiyle gösterdiğini savunan çalışmalar da vardır (64).

Yani sonuçta EDS Leydig hücrelerini apoptozise zorlamaktadır. Bunu Fas sistemini ve kaspaz-3'ü aktive ederek veya glutatyonu bağlayarak yapmaktadır (3, 64).

EDS sonrası Leydig hücre rejenerasyonu; bir taraftan LH (Luteinize edici hormon) ve tiroid hormonu gibi testis dışı hormonların, bir taraftan da Kit ligand gibi lokal testis faktörlerinin etkisindedir. Anti-Müllerian hormon (Müllerian inhibe edici madde=MIS) ise Sertoli hücreleri tarafından üretilen Leydig hücrelerinin çoğalmasını ve diferansiye olmasını önleyen parakrin bir hormondur (81).

LH (Luteinize edici hormon) Leydig hücre, çoğalmasını direkt veya indirekt olarak büyüme faktörlerini etkileyerek yapar. Yüksek mitojenik aktiviteye sahip Transforming Büyüme Faktörü (TGF- $\alpha$ ) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (IGF-1) gibi faktörler in vivo olarak Leydig hücrelerinde saptanmıştır. Dahası in vitro çalışmalar bu büyüme faktörlerinin 21 günlük sıçan testisinden elde edilen erişkin tip Leydig hücrelerinde DNA sentezini arttırdığını göstermiştir. EDS uygulamasından 3 ila 8 gün sonra sadece Leydig hücreleri kaybolmakla kalmaz bunun yanında 3 $\beta$ -HSD ve TGF $\alpha$  immün reaktivitesi, Relaksin Benzeri Faktör (RLF) mRNA ekspresyonu da kaybolur. Mezenkimal hücrelere benzer morfolojiye sahip interstisyel hücreler EDS'den 3-8 gün sonra bile LH reseptörüne karşı antikor kullanılarak saptanabilir (93).

EDS sonrası Leydig hücreleri birkaç aşamada çoğalırlar.

- 1-) 2. 3. günlerde mezenkimal fibroblast benzeri hücrelerin ve endotelial hücrelerin sayıca artışı gözlenir. Bölünen bu hücreler Leydig hücrelerinin öncüllerini oluştururlar.
- 2-) 4. günden 16. güne kadar normal görünümlü Leydig hücrelerinin farklılaşması gözlenir. 14. günde testosteron seviyesinde anlamlı miktarda artış olur.
- 3-) 16. 25. günler arasında Leydig hücreleri için ikinci bir çoğalma dalgası oluşur. 21. günden sonra testosteron seviyesi normale döner.

4-) 25. günden sonra Leydig hücrelerinin çoğalması iyice yavaşlayarak EDS sonrası 40-50. günlerde normale döner (27).

EDS sonrası Leydig hücrelerinin rejenerasyonunu engelleyen bazı durumlar da vardır. Bunlara örnek olması açısından yapılan birkaç çalışma aşağıdadır.

EDS uygulaması sonrası Leydig hücreleri apoptozise giderken yeni Leydig hücreleri yaklaşık 3.-4. günlerde oluşmaya başlar. Kök hücre faktörü ile c-kit reseptör bağlanmasının inhibe edilmesi yeni Leydig hücrelerinin 3.-4. günlerdeki ilk oluşum dalgasını engellediği gibi 10. gündeki ikinci oluşum dalgasını da engeller. EDS uygulamasından sonra 20. gün civarında olgunlaşmış Leydig hücreleri muhtemelen kök hücre faktörü ile c-kit reseptör bağlanmasını inhibe eden bazı faktörler salgılar ve yeni Leydig hücrelerinin oluşumunu engeller (106).

EDS sonrası testiste 30. günde yeni Leydig hücreleri tamamen oluşur. Eğer testiste bulunan makrofajlar EDS uygulamasından 10 gün öncesi ile 10 gün sonrası arasında baskılanırsa 30 gün boyunca yeni Leydig hücreleri oluşamaz. EDS sonrası 16.-22. günler arasında makrofajlar baskılanırsa normal EDS grubundaki kadar Leydig hücresi oluşur. Bu sonuçlar makrofajların Leydig hücrelerinin farklılaşması için ve EDS sonrası tekrar çoğalması için gerekli olduğunu göstermektedir (28).

Erişkin erkek sıçanlara EDS enjekte edildikten hemen sonra, testosteron ve östradiol içeren kapsüller implante edilmiş. Bu kapsüllerin verilme amacı endojen LH (Lüteinize edici hormon) üretimini baskılayarak testiste Leydig hücrelerinin tekrar çoğalmasını baskılamakmış. Bu çalışmalarda testis ağırlığı ve spermatogenez EDS ve testosteron verilen grup ile kontrol grubu arasında benzer bulunmuş (86).



EDS uygulanmasından sonra Leydig hücrelerinin kaybolup rejenere olması ve steroid aktivitesinin gösterilmesi  $3\beta$ -HSD için immünohistokimyasal olarak boyanarak olur.  $3\beta$ -HSD testis steroidogenezi için anahtar bir enzim ve Leydig hücreleri için spesifik bir belirteçtir (8).

Testiste testosteron sentezinin azalmasının germ hücre apoptozisini arttırdığı gösterilmiştir. Germ hücre apoptozisi ve Fas protein içeriğinin, EDS'in direkt etkisine bağlı olarak oluşmadığı, testisteki testosteron konsantrasyonunun azalması sonucu meydana geldiği ortaya atılmıştır (67).

EDS'nin erkekte testosteron üretimini durdurduğu dozda over ve adrenallerde steroidogenezi etkilemediği gösterilmiştir. Yine EDS'nin genç sıçanlar üzerinde büyümeyi yavaşlatıcı etkisi saptanmıştır. EDS serum trigliserid seviyesini istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltırken toplam kolesterol miktarını arttırmaktadır. DMSO ise tek başına uygulandığında zona fasikülata ve zona retiküleristeki adrenokortikal hücre sayılarını azaltırken serum trigliseridlerini artırır (35).

### **5.2.2. E Vitamininin Etkisi**

Vitamin E hücre membranında bulunan, yağda eriyen en etkili zincir kırıcı, antioksidan vitamindir. Reaktif oksijen radikallerinin neden olduğu lipid peroksidasyonunu sınırlayarak hücre membranının bütünlüğünü korumada önemli bir rolü olduğu düşünülmektedir. Metoksiklor birçok ülkede pestisit olarak kullanılan erkek sıçanlarda üreme anormalliklerine neden olan bir ajandır. Epididimiste oksidatif stresi artırır, sperm sayısını düşürür, östrojenik/antiandrojenik etki gösterir. Metoksiklor ve E vitamininin birlikte verilmesi epididimisi metoksiklorun neden olduğu lipid peroksidasyonundan uzak

tutmaktadır. Bunu antioksidan enzimleri arttırarak, reaktif oksijen radikallerinin üretimini azaltarak ve sperm hareketliliğini bir miktar arttırarak yapmaktadır. E vitamininin büyükbaş hayvan sperminde süperoksit dismutaz aktivitesini arttırdığı da gösterilmiştir (57).

Poliklorinatlı bifeniller tüm dünyada çevresel kontaminasyon ile insan ve hayvanlarda endokrin sistemde hasar yapan bileşiklerdir. Poliklorinatlı bifeniller'e maruz kalmak sıçan spermatogenezinde defektlere, testis ve aksesuar seks organlarında ağırlık kaybına neden olur. İnsanda Poliklorinatlı bifeniller sperm sayısı ve hareketliğinde azalma ile ilişkilidir. Poliklorinatlı bifeniller testiküler androjenleri azaltır. Süt veren annelerin uzun süre Poliklorinatlı bifenillere maruz kalması Leydig hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere, LH stimülasyonuna in vitro ortamda yanıt olarak testosteron üretiminde azalmaya neden olur. E vitamini lipoproteinlerdeki ve membranlardaki lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu inhibe eder. C vitamini hızlı elektron transferleri yaparak reaktif oksijen radikallerini temizler, lipid peroksidasyonunu inhibe eder, okside olmuş E vitamini miktarını azaltır. Leydig hücrelerinde süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, glutamil transpeptidaz ve glutatyon-s-transferaz gibi antioksidan enzimler bulunur. Poliklorinatlı bifeniller bu antioksidan enzimlerin hücresel aktivitesini anlamlı miktarda azaltırken, C veya E vitamini uygulaması enzim aktivitesini normal seviyelere çıkarmaktadır (66).

Ozon havayı kirleten en önemli toksik gazlardan biridir. Ozonun zarar verici etkisi reaktif oksijen radikalleri oluşturmasından kaynaklanır. Reaktif oksijen radikalleri akrozomal reaksiyon ve kapasitasyonu etkileyerek sperm kalitesini düşürür. DNA hasarına, spermatozoa hareketliliğinde azalmaya ve spermatozoa ile oosit birleşmesinde güçlükler yol açar. E vitamini protein-lipid membranları stabilize eder, yağ asitlerinin peroksidasyonunu önler ve serbest radikaller için çöpçü

görevi yapar. C vitamini plazma membranlarının redoks sistemleri için elektron donörüdür. Havadaki artmış ozon konsantasyonu kan testosteron düzeyini ve testisteki 17  $\beta$ -hidroksisteroid dehidrogenaz aktivitesini düşürür. Sadece ozon verilen hayvanlarda yuvarlak spermatidlerde ve spermatozoidlerde azalma, dev spermatid hücreleri ve epitelin bölgesel deskuamasyonu gözlenir. Ozon ile birlikte E vitamini verilen vakalarda spermatogenez normal olarak gerçekleşir (55).

Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali gibi reaktif oksijen türevleri in vivo olarak aerobik metabolizmanın tam olmaması, uyarılmış fagositlerin dokuda artması, radyasyon ve redoks siklus ajanlarına maruz kalma sonucu oluşur. Oksidatif stres, reaktif oksijen türevlerinin vücudun doğal antioksidan korumasını aşması ile oluşur ve DNA, proteinler ve lipidlere zarar verir. Düşük konsantrasyonda reaktif oksijen türevleri proliferasyon, diferansiyasyon ve apoptozisin düzenlenmesi üzerine etkili iken, yüksek konsantrasyonda DNA hasarına, lipid peroksidasyonuna ve protein degradasyonuna neden olur. Akut veya kronik kadmiyuma maruz kalma akciğer, beyin, böbrek, karaciğer, eritrositler ve testiste lipid peroksidasyonuna neden olur. Kadmiyum primer Leydig hücrelerinden testosteron salınımını inhibe eder. Kadmiyum testisteki malondialdehit seviyesini yükselterek veya endojen antioksidanların seviyesini azaltarak reaktif oksijen türevlerinin miktarını artırır. Kadmiyum testisteki steroidogenez üzerine direk inhibitör etkiye sahiptir. C veya E vitamini ile beslenen sıçanlarda reaktif oksijen türevleri üretimi azalır, oksidatif stres azalır ve normal testis fonksiyonları korunur. Lipid peroksidasyonundan korunmak aerobik metabolizmalı organizmalar için çok önemlidir bu yüzden organizmaların ksenobiyotikler, karsinojenler ve toksik radikallere karşı korunmasında etkili iyi organize olmuş antioksidanlara ihtiyacı vardır. C ve E vitaminleri kadmiyuma bağlı hücresel toksisiteyi azaltırlar ama bu iki vitamin arasında sinerjik etki saptanamamıştır (31).

Organofosfat yapılı pestisitler hedef dokularda asetilkolinesterazları ve psödokolinesterazları inhibe ederler. Bu toksik maddelerin etkilediği başlıca dokular pankreas, karaciğer, immün sistem, kan ve üreme sistemidir. Metil parathion sıçanlarda DNA hasarına neden olan bir organofosfattır. Metil parathion uygulanan farelerde anlamlı miktarda anormal sperm artışı ve normal yapılı sperm sayısında anlamlı derecede azalma saptanmıştır. E ve C vitaminlerinin Metil parathion'un yaptığı hasara karşı koruyucu etkilerinin incelendiği bir çalışmada 4. ve 7. hafta sonunda kontrol grubuna göre Metil parathion grubu ve Metil parathion+vitamin grubunda anlamlı miktarda vücut ağırlığı, testis ağırlığı ve rölatif testis ağırlığı kaybı gözlenmiştir. Metil parathion grubu ve Metil parathion+vitamin grubu arasında herhangi bir ağırlık farkı gözlenmemiştir. Metil parathion'un sperm sayısını azaltma mekanizması; Leydig hücrelerindeki azalma sonucu testosteronun azalması, Metil parathion'un kan-testis bariyerini geçerek spermelere direkt zarar vermesi veya seminifer tübüllerde nekroz sonucu olabilir. E ve C vitamininin birlikte kullanılması toksik maddeler tarafından oluşturulan lipid peroksidasyonunu azaltır. Bununla birlikte C vitamini E vitaminini sınırlayan serbest radikalleri yerinden ayırır (98).

### 5.2.3. C Vitamininin Etkisi

C vitamini sağlam seminifer tübüle ait plazmada yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, infertil seminifer tübül plazmasında az bulunur. C vitamini eksikliği insan sperm hareketliliğini azaltır, kan testis bariyerinin bütünlüğünü etkilemezken, spermatositleri spesifik olarak etkiler. Onları apoptozise sürükler. C vitamini kollojenlerin hidrosillenmesi için gereken önemli bir kofaktördür (109).

Kurşun asetatın periton içine enjeksiyonu fare testis dokusunda malondialdehit artışı ile saptanan lipid peroksidasyonunun artışına neden olur. Bu da reaktif oksijen radikallerinin artışı ile ilişkilidir. C

vitamininin insan tedavi dozunda (10 mg/kg) periton içine uygulanması anlamlı derecede testis malondialdehit içeriğini azaltırken, sperm sayısında artış, anormal sperm popülasyonunda azalmaya neden olur. E vitamininin de (100 mg/kg) C vitaminine göre daha düşük ama benzer etkilere sahip olduğu gözlenmiştir. E ve C vitamininin kurşun asetat sonrası birlikte verilmesi tek tek verilmelerine göre daha olumlu etki yapmıştır (62).

Kurşun verilen sıçanlarda sperm sayısının ve hareketliliğinin azaldığı, reaktif oksijen türevlerinin ve lipid peroksidasyonunun arttığı gözlenmiştir. Reaktif oksijen türevlerinin ortamda az miktarda bulunması sperm fonksiyonları için olumlu etki yaparken; çok fazla miktarda bulunması DNA parçalanmasını uyarır, spermdeki mitokondri ve plazma membranını harap ederek sperm fonksiyonunu bozar. Kurşuna bağlı oksidatif stresin C ve E vitaminleri verilerek geriletilebildiği gösterilmiştir (61).

Poliklorinatlı bifeniller (Aroclor 1254) insanlarda sperm hareketliliğini azaltan çevresel kirleticilerdir. Poliklorinatlı bifenillere maruz kalan sıçanlarda sitokrom P450, 3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD ve Leydig hücrelerindeki antioksidan enzimler gibi steroidojenik enzimler azalır. 25 yaş üstü erkeklerde günlük C vitamini alımının artırılması sperm canlılığını, hareketliliğini ve toplam matür sperm sayısını arttırmaktadır. İn vivo ve in vitro çalışmalar kültür ortamındaki Leydig hücrelerinde oksidan ajanların oluşturduğu lipid peroksidasyonunun E vitamini tarafından önlendiğini göstermiştir. Poliklorinatlı bifenillere maruz kalan sıçanlara C ve E vitaminleri verildiğinde Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri ve epididimisteki sperm üzerinde serbest radikallerin oluşturduğu toksisiteyi azalttığı gösterilmiştir (65).

Kadmiyum verilen sıçanların testisinde lipid peroksidasyonunun arttığı, özellikle glutatyonun azaldığı gösterilmiştir. Kaspaz-3 hücre

apoptozisini saptamada kullanılan önemli bir kaspazdır. Metallothionein metallere bağlanan antioksidan bir proteindir. Kadmiyum verilen ratlarda nekrotik hücre ölümü ve metallothionein yerleşiminde değişiklik olur. E vitamini, C vitamini ve selenyumun sinerjik etkileri olduğu lipid peroksidasyonunu azaltıp glutatyon miktarını arttırdığı gözlenmiştir (54).

Kromiyum karsinogen ve mutajen bir ajandır. Çok fazla genotoksik ve sitotoksik potansiyele sahiptir. Kromiyum bileşikleri oksidatif stresi arttırarak laboratuvar hayvanlarında doku hasarına neden olurlar. Lipid peroksidasyonu oksidatif stres için bir gösterge kabul edilir. Metallerle bağlı oksidatif stres olasılıkla testis membranının yüksek miktarda çoklu doymamış yağ asiti içermesinden kaynaklanmaktadır. Kromiyum bileşikleri sıçanlarda anormal sperm miktarını arttırmaktadır. Serum testosteron seviyesini azaltıp FSH seviyesini azaltmaktadır. Diğer organlarla karşılaştırıldığında testis yüksek miktarda glutatyon içermektedir. Glutatyonun spermatojenik seri hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Leydig hücreleri yüksek miktarda glutatyon peroksidaz ve orta derecede süperoksit dismutaz aktivitesi sergilemektedir. Bu antioksidan koruma sisteminin düşüklüğü Leydig hücrelerini oksidan hasara karşı daha fazla korumasız bırakmaktadır. Kromiyum bileşikleri ile C vitamininin birlikte verilmesi anormal sperm popülasyonunda azalmaya ve normal sperm sayısında artmaya neden olur. E vitamini ile de benzer etkileri gözlenmiştir (1).

Çalışmamızda grupların toplam hasar skorlarına baktığımızda en yüksek skorun sadece EDS verilen grupta olduğunu, en düşük skorun ise DMSO grubunda olduğunu saptadık. EDS ile birlikte vitamin verilen gruplarda birbirine yakın değerler bulduk. Kadmiyuma bağlı hücrel toksisiteye karşı sinerjik etkileri saptanamayan C ve E vitaminlerinin EDS'ye karşı sinerjik etkisinden de bahsetmek en azından histopatolojik açıdan mümkün görünmemektedir.

### 5.3 Serum Testosteronu

“Etandimetansülfonat’ın Erişkin Sıçan Testisi Fonksiyonel Yapısı Üzerine Etkileri” konulu bir çalışmada EDS sonrası testosteron seviyeleri serumda ve inkübasyon medyumunda ancak 21. günden itibaren saptanmaya başlanmış (7).

Nina Atanassova ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada EDS uygulamasından 7 gün sonra serum testosteron konsantrasyonu 0,1 ng/ml’nin altına inmiş. 2-3 hafta sonra yeni Leydig hücrelerinin oluşmasıyla testosteron seviyesi normale yaklaşmış. LH (Lüteinizan hormon) 3. haftaya kadar yüksek kalmış (8).

Polychlorinated biphenyl (PCB)’ler insan ve sıçanlarda endokrin sistemi olumsuz etkiler, PCB’lere maruz kalan sıçanlarda spermatogenezde hasar, testis ve aksesuar seks organlarında kilo kaybı gözlenir. PCB uygulanan sıçanlara 100 mg/kg oral Vit C veya 50 mg/kg oral Vit E verildiğinde serum LH (lüteinizan hormon), tiroid stimüle edici hormon ve prolaktin seviyelerinin normale döndüğü gözlenmiş. Sonuçta androjen sentezinin azalmasının sıçan testisinde lipid peroksidasyonunu arttırdığı sonucuna varılmış. Bu da vit C ve E’nin antioksidan etkilerinin neden androjen sentezini normale döndürdüğüünün açıklaması olabilir denmiş (66).

Kadmiyum ile akut veya kronik karşılaşma akciğer, beyin, böbrek, karaciğer, eritrositler ve testis’te lipid peroksidasyonunu artırır. Kadmiyum Leydig hücrelerinin ürettiği testosteron seviyesini doğrudan düşürür. Çalışmada Vit C ve E verilen sıçanlarda kadmiyumun yapmış olduğu testis hasarının azaldığı gözlenmiş. C ve E vitaminlerinin beraber verilmesi ile sinerjik bir etki elde edilememiş (31).

Serum hormon seviyelerinin araştırıldığı bir çalışmada EDS sonrası serum LH (lütinizan hormon) seviyesi kontrol grubuna göre 48 saat içinde anlamlı miktarda artmış, 10-20. günler arasında pik yapmış ve 40. günde kontrol seviyesine inmiş. Serum testosteron seviyesi EDS sonrası 48. saatte ölçülemeyecek düzeye inmiş ve 10. güne kadar bu seviyelerde kalmış. 20. gün civarında serum testosteronu artmaya başlamış ve 40. gün civarında kontrole yaklaşmış. Serum FSH (folikül stimüle edici hormon) seviyesi de LH (lütinizan hormon)'a benzer seyir göstermiş (106).

EDS verilen sıçanlarda 15. gün sonunda serum testosteron düzeyinin DMSO ve tuz çözeltisi verilen sıçanlara göre anlamlı derecede düştüğü buna ek olarak testis ağırlığı, vezikula seminalis ve vücut ağırlığının da kontrole göre düşük olduğu saptanmış. Tek doz EDS verilen sıçanlarda adrenal kortekste birçok atrofik alan oluşumu gözlenmiş. Testosteron üretimini engelleyecek dozdaki EDS adrenal ve overlerde steroidogenezi etkilememiş (73).

Bizim çalışmamızda serum testosteronu açısından bakıldığında DMSO grubu ile EDS grubu arasında ( $P=0,0000$ ) ve Vit C+E grubu arasında ( $P=0,0221$ ) anlamlı fark saptandı. Serum testosteron değeri ortalaması en yüksek olan grup Vit C+E grubu iken bunu DMSO grubu takip etti. En düşük testosteron düzeyi EDS grubunda görüldü.

EDS grubu ile Vit C, Vit E, VitC+E grupları arasında anlamlı fark saptandı. Sırasıyla serum testosteron düzeyleri fazladan aza Vit C+E, Vit E, Vit C, EDS grubu şeklinde bulundu.



#### 5.4 Makrofaj Artışı

“Etan dimetan sülfonat’ın Erişkin Sıçan Testisi Fonksiyonel Yapısı Üzerine Etkileri” konulu çalışmada yazarlar EDS uygulaması sonrası makrofaj sayısındaki artışın 3. gün pik yaptığını ve 28. günden sonra normal seviyelere indiğini tespit etmişler (7).

Yine başka bir çalışmada EDS öncesi 10 gün ile EDS sonrası 10 gün arasında makrofajları baskılanan sıçanlarda EDS sonrası 30. güne kadar Leydig hücre sayısının artmadığı gözlenmiş. Yeni Leydig hücrelerinin oluşumu için makrofajların gerekliliği vurgulanmış (27).

Bizim çalışmamızda en yüksek makrofaj miktarını 2 haftalık EDS grubunda ve 1 haftalık EDS gruplarında gördük. 2 haftalık E ve C vitamini gruplarında orta derecede mononükleer hücre artışı gözlerken diğer gruplarda artış gözlemedik.

## 6-SONUÇ:

TAİ açısından bakıldığında; ne 7 günlük ne de 14 günlük dönemde Vitamin C, Vitamin E, Vitamin C+E gruplarında, EDS grubuna göre bir iyileşme saptanamadı. Toplam testis ağırlığı ve deney sonrası vücut ağırlığı ile deney öncesi vücut ağırlığı arasındaki fark açısından da benzer sonuçlar elde edildi.

Histopatolojik skor puanı açısından bakıldığında sadece 7 günlük gruplardan EDS+Vit C+Vit E grubu EDS grubuna göre anlamlı bir iyileşme gösterdi.

Serum testosteron düzeyi hem 7 hem de 14 günlük dönemde; Vit C, Vit E ve Vit C+E gruplarında kontrol grubuna yaklaştı.

EDS sonrası 14. gün sonunda interstisyel alanda Leydig Hücreleri gözlenemez iken tüm vitamin gruplarında sayıca kontrol grubundan az da olsa Leydig hücresi tesbit edildi.

Sonuçta; EDS sonrası oluşan testis ağırlığındaki azalma E ve C vitaminlerinin gerek tek tek gerek birlikte verilmesi ile normale döndürülemez iken, histopatolojik skor puanı, serum testosteron düzeyi ve interstisyel Leydig hücreleri üzerine olumlu etki gösterdi.

**KAYNAKLAR**

1. Acharya UR, Mishra M, Mishra I, Tripathy RR. Potential role of vitamins in chromium induced spermatogenesis in swiss mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2004;15:53–59.
2. Akazawa N, Mikami SI, Kimura SI. Effects of vitamin e deficiency on the hormone secretion of the pituitary-gonadal axis of the rat. *Tohoku J Exp Med*. 1987;152:221-229.
3. Anderson D, Dobrzynka MM, Jackson LI. Somitic and germ cell effects in rats and mice after treatment with 1,3-butadien and its metabolites, 1,2-epoxybutene and 1,2,3,4-diepoxybutane. *Mutation Research*. 1997;391:233-242.
4. Ando K, Nagata K, Yoshida R. Effects of n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation on lipid peroxidation of rat organs. *Lipids*. 2000;35(4):401-407.
5. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi. Cilt 1-2*. Ankara:Güneş Kitabevi. Isbn 975-7467-28-6;1999.
6. Ariyaratne S, Mills N, Mason JI, Mendis-Handagama C. Effects of thyroid hormone on leydig cell regeneration in the adult rat following ethane dimethane sulphonate treatment. *Biology Of Reproduction*. 2000;63:1115–1123.
7. Ariyaratne S, Kim I, Mills N, Mason I, Mendis-Handagama C. Effects of ethane dimethane sulfonate on the functional structure of the adult rat testis. *Archives of Andrology*. 2003;49:313–326.
8. Atanassova N, Koeva Y, Bakalska M, Pavlova E, Nikolov B, Davidoff M. Loss and recovery of androgen receptor protein expression in the adult rat testis following androgen withdrawal by ethane dimethane sulfonate. *Folia Histochemica Et Cytobiologica*. 2004;44(2):81-86.
9. Bakalska M, Mourdejeva M, Russinova A. Localization of atrial natriuretic factor (ANF) in rat testis after leydig cell destruction: evidence for a potantial role in regulating gonadal function. *Endocrine Regulations*. 1999;33:183-191.

10. Bakalska M, Atanassova N, Angelova P, Koeva I, Nikolov B, Davidoff M. Degeneration and restoration of spermatogenesis in relation to the changes in leydig cell population following EDS treatment in adult rats. *Endocrine Regulations*. 2001;35:209-215.
11. Bilgin UY, Karaöz E, Bengisu H. Sıçanlarda bleomisin nenden olduğu akciğer fibrozisi üzerine e vitamininin etkisi. *Tr J of Medical Sciences*. 1991;15:270-277.
12. Bloom ER, Fawcett DW. A text book of histology. Twelfth edition. London: Chapman & Hall; 1994.
13. Carlson BM. Patten's foundations of embryology. Sixth edition: McGraw-Hill Inc; 1996.
14. Claveria C, Corbella R, Martin D, Diaz C. Protective effects of zinc on cadmium toxicity in rodents. *Biol Trace Elem Res*; 2000;75(1-3):19.
15. De Kretser DM, Meinhard A, Meehan T. The roles of inhibin and related peptides in gonadal function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2000;161:43-46.
16. De Kretser DM, O'Leary PC, Irby DC. Inhibin secretion is influenced by leydig cells: evidence from studies using the cytotoxin ethane dimethane sulphonate. *International Journal of Andrology*. 1989;12:273-280.
17. Dere F. Anatomi ders kitabı. Cilt 1-2. Adana; 1988.
18. Erbenli T. Temel histoloji. 2. Baskı 2. Cilt. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti; 1990.
19. Erkoçak, A. Özel histoloji. Bölüm: Erkek genital system. Beşinci baskı. İzmir: Rekfo; 1984. s. 164-190.
20. Evenson DP, Jost LK, Baer RK. Effects of methyl methane sulphonate on mouse sperm chromatin structure and testicular cell

kinetics. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 1993;21:144-153.

21. Evenson DP, Jost LK. Hydroxyurea exposure alters mouse testicular kinetics and sperm chromatin structure. *Cell Prolif*. 1993;26:147-159.
22. Fariaa RR, Costhek V, Iioa A, et al. Beneficial effects of vitamin c and vitamin e on reserpine-induced oral dyskinesia in rats: Critical role of striatal catalase activity. *Neuropharmacology*. 2005;48:993-1001.
23. Fawcett DW. *Bloom and fawcett: concise histology*. U.S.A: Chapman And Hall; 1997.
24. Fawcett DW. *Histology*. Twelfth Edition: Chapman & Hall; 1994.
25. Friberg L. Cadmium and the kidney. *Environ Health Perspect*. 1984;54:1-11.
26. Gartner LP, Hiatt J. *Colour text book of histology*. First edition. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1997.
27. Gaytan F, Bellido C, Morales C, Reymundo TC, Aguilar TE, Van Rooouen N. Effects of macrophage depletion at different times after treatment with ethylene dimethane sulfonate (EDS) on the regeneration of leydig cells in the adult rat. *Journal of Andrology*. 1994;15(6):558-564.
28. Gaytan F, Bellido C, Morales C. Response to leydig cell apoptosis in the absence of testicular macrophages. *Journal of Reproductive Immunology*. 1995;29:81-94.
29. Gaytan F, Bellido C, Aguilar E. Requirement for testicular macrophages in leydig cell proliferation and differentiation during prepubertal development in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1994;102:393-399.
30. Giakoustidis D, Papageorgiou G, Iliadis S. Intramuscular administration of very high dose of alpha-tocopherol protects liver

from severe ischemia/reperfusion injury. World Journal of Surgery. 2002;26(7):872-877.

31. Gupta RS, Gupta ES, Dhakal BK, Thakur AR, Ahnn J. Vitamin c and vitamin e protect the rat testes from cadmium-induced reactive oxygen species. Mol Cells. ?;17(1):132-139.
32. Güçlü C. Erişkin Erkek Sıçanlarda Etan 1,2 Dimetan Sülfonat (EDS) İle Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine E Vitamininin Etkisi Ve Mast Hücrelerinin Davranışındaki Olası Değişikliklerin İncelenmesi. Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2002.
33. Gülbahçe HE, Lindeland AT, Engel W. Metastatic leydig cell tumor with sarcomatoid differentiation. Arch Pathol Lab Med. 1999;123:1104-1107.
34. Gürsoy E, Koptagel E. Embriyoloji atlası: Esnaf Ofset Matbaacılık; 1997.
35. Dikmen N, Özgünen T. Harper biyokimya: Nobel Tıp Kitabevi; 2004.
36. Hassa H. İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve ivf laboratuvar uygulamaları. Eskişehir: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basımevi; 2003.
37. Henriksen K, Kangasniemi M, Parvinen M. In vitro, follicle-stimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage-specific fashion. Endocrinology. 1996;137(5):2141-2149.
38. Hirsch I, Huang B, Chancellor MB. Spermatogenesis in early and chronic phases of experimental spinal cord injury in the rodent model. Journal of Andrology. 1999;20(1):63-71.
39. Hsu PC, Guo YL. Antioxidant nutrients and lead toxicity. Toxicology. 2002;180:33-44.

40. Ishihara M, Itoh M, Miyamoto K. Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *International Journal of Andrology*. 1999;23(2):85-94.
41. Jaarin K, Renuvathani M, Nafeeza MI. Comparative effect of palm vitamin E and ranitidine on the healing of ethanol induced gastric lesions in rats. *Int J Exp Path*. 1999;80:259-263.
42. Jackson CM, Jackson H. Comparative protective actions of gonadotrophins and testosterone against the antispermatogenic action of ethane dimethane sulphonate. *Journals of Reproduction and Fertility Ltd*. 1984:393-401.
43. Jackson AE, O'Leary PC, Ayers MM, De Kretser DM. The Effects of ethylene dimethane sulphonate (EDS) on rat leydig cells: evidence to support a connective tissue origin of leydig cells. *Biology Of Reproduction*. 1986;35:425-437.
44. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Basic histology*. Ninth edition. Stamford: Appleton & Lange; 1998.
45. Kalaycı Ş. *Histoloji*. Bursa: Uludağ Üniversitesi Basımevi; 1986.
46. Karaöz E, Özcan O, Irmak K. In vitro hidrojen peroksit uygulanmasında kolon mukozasında görülen değişiklikler ve buna e vitamininin etkisi. *Gazi Tıp Dergisi*. 1992;3:177-183.
47. Karaöz E, Dalçık H, Etlik Ö. Sülfürdioksite bağlı karaciğer toksisitesine c ve e vitamini kombinasyonu etkisi. *Yeni Tıp Dergisi*. 1996;13(2):96-99.
48. Karaöz E, Karaöz S. E vitamininin biyolojik sistemlerdeki rolü. *J Nutr and Diet*. 1992;21(1):101-116.
49. Karataş S. Sıçanlarda kadmiyum klorür'ün ( $CdCl_2$ ) testis dokusuna etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir, Şubat, 1998.

50. Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli G. İnsan embriyolojisi.7. Baskı.İstanbul:Alfa Basım Yayım Dağıtım;1992.
51. Kılınç C, Özcan O, Karaöz E.Vitamin e reduces bleomycin-induced lung fibrosis in mice:biochemical and morphological studies.Journal of Basic&Clinical Physiology&Pharmacology.1993;4(3):249-269.
52. Kim JM, Luo L, Zirkin BR.Caspase-3 activation is required for leydig cell apoptosis induced by ethane dimethane sulfonate.Endocrinology.2000;141:1846-1853.
53. Koyuncu D, Açıkalın E, Bayçu C, Şahintürk V.Etan 1,2-dimetan sülfonat (EDS) ve insan koryonik gonadotropin (HCG)'in erişkin sıçan testisindeki hücrel etkileşimler üzerine etkisi.Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi.1998;20(1-2):1-15.
54. Koyutürk M, Yanardağ R, Bolkent Ş, Tunalı S.Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage.Environmental Toxicology and Pharmacology.2006;21:235–240.
55. Krakowska MJ, Bomba G, Jakubowski K.Impact of oxidative stress and supplementation with vitamins e and c on testes morphology in rats.Journal of Reproduction and Development.2006;52(2).
56. Larsen WJ.Human Embryology.First edition.Singapore:Churchill Livingstone Inc;1993.
57. Latchoumycandane C, Chitra KC, Mathur PP.The effect of methoxychlor on the epididymal antioxidant system of adult rats.Reproductive Toxicology.2002;16:161–172.
58. Lejeune H, Habert R, Saez JM.Origin, proliferation and differentiation of leydig cells.Journal of Molecular Endocrinology.1998;20:1-25.
59. Lucesoli F, Fraga CG.Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and a-tocopherol supplementation.Toxicology.1999;132:179-186.



60. Mather JP, Saez JM, Dray F. Vitamin e prolongs survival and function of porcine leydig cells in culture. *Acta Endocrinologica*. 1983;102:470-475.
61. Marchlewicz M, Michalska T, Wiszniewska B. Detection of lead-induced oxidative stress in the rat epididymis by chemiluminescence. *Chemosphere*. 2004;57:1553–1562.
62. Mishra M, Acharya UR. Protective action of vitamins on the spermatogenesis in lead-treated swiss mice. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2004;18:173–178.
63. Moore KL. The developing human clinically oriented embryology. The beginning of human development: first week. Seventh Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company 15-41; 2003.
64. Morris AJ, Taylor MF, Morris ID. Leydig cell apoptosis in response to ethane dimethane sulphonate after both in vivo and in vitro treatment. *Journal of Andrology*. 1997;18(3):274-280.
65. Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K, Arunakaran J. Effects of vitamins c and e on steroidogenic enzymes mRNA expression in polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposed adult rat leydig cells. *Toxicology*. 2007;xx:xxx–xxx.
66. Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K, Arunakaran J. Studies on the protective role of vitamin c and e against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)—induced oxidative damage in leydig cells. *Free Radical Research*. 2005;39(11):1259–1272.
67. Nandi S, Banerjee PP, Zikrin BR. Germ cell apoptosis in the testes of sprague dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1,2-dimethane sulfonate administration: relationship to fas? *Biology Of Reproduction*. 1999;61:70-75.
68. Odar İV. *Anatomi*: Hacettepe Kitapçılık Ltd. Şti; 1986.

69. Özcan O, Karaöz E, Sarsılmaz M. Sıçanlarda karbontetraklorür hepatotoksitesine karşı e vitamininin etkisi. *Tr J Of Medical Sciences*.1992;16:45-54.
70. Özcan O, Karaöz E, Dağdeviren A. The effect of vitamin e on the colonic mucosal alterations induced by rectal hydrogen peroxide administration in the rats. *Gazi Medical Journal*.1993;2:61-67.
71. Özcan O, Karaöz E, Dağdeviren A. Sıçanlarda rektal yoldan uygulanan asetik asitin neden olduğu deneysel kolit ve buna e vitamininin etkisi. *Gata Bülteni*.1993;35:29-37.
72. Özer NK, Azzi A. Effect of vitamin e on the development of atherosclerosis. *Toxicology*.2000;148:179-185.
73. Plecas B, Glavaski A, Savic V, Hristic M, Duric D, Solarovic T. Effects of ethane dimethane sulfonate on the structure of adult male rat adrenal cortex. *Pharmacological Research*.1997;35(6).
74. Raychoudhury SS, Blake CA, Milette CF. Toxic effects of octylphenol on cultured rat spermatogenic cells and sertoli cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*.1999;157:192-202.
75. Regadera J, Martinez-Garcia F, Paniagua R. Androgen insensitivity syndrome. *Arch Pathol Lab Med*.1999;123:225-233.
76. Rodriguez JB, Garcia CM. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: re-evaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif*.1996;29:13-31.
77. Rommerts FFG, Kühne L, van Cappellen GWA, Stocco DM, King SR, Jankowska A. Specific dose-dependent effects of ethane 1,2-dimethane sulfonate in rat and mouse leydig cells and non-steroidogenic cells on programmed cell death. *Journal of Endocrinology*.2004;181:169-178.
78. Ross MH, Romrell LJ, Kaye GI. *Histology-a text and atlas*. Third edition. Baltimore: Williams&Wilkins Company;1995.

79. Sadler TW. Langman's medical embryology. Eight Edition: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
80. Samanta PK, Manna I, Jana K. Effect of L-ascorbic acid supplementation on testicular oxidative stress and endocrine disorders in mature male rats exposed to intensive swimming exercise. *Reproductive Medicine and Biology* 2006;5:145–153.
81. Savla A, Hardy MP, Wu XF, Sottas CM, MacLaughlin DT, Donahoe PK, Lee MM. Müllerian-inhibiting substance inhibits rat leydig cell regeneration after ethylene dimethane sulphonate ablation. *Biology Of Reproduction*. 2004;70:600–607.
82. Sempere MT, Pinilla L, Aguilart E. Follicle stimulating hormone and luteinizing hormone secretion in male rats orchidectomized or injected with ethylene dimethane sulfonate. *Endocrinology*. 1993;133:1173-1181.
83. Sharpe RM, Maddocks S, Kerr JB. Cell-cell interactions in the control of spermatogenesis as studied leydig cell destruction and testosterone replacement. *The American Journal of Anatomy*. 1990;188:3-20.
84. Shvedova AA, Kisin E, Murray A. Enhanced oxidative stress in the skin of vitamin e deficient mice exposed to semisynthetic metal working fluids. *Toxicology*. 2002;176:135-143.
85. Spiteri-Grech J, Barlett JMS, Nieschlag E. Hormonal regulation of epidermal growth factor and insulin like growth factor-1 in adult male hypophysectomized rats treated with ethane dimethane sulphonate. *Journal of Endocrinology*. 1991;129:109-117.
86. Sprando RL, Santulli R, Awoniyi CA, Ewing LL, Zikrin BR. Does ethane 1,2-dimethanesulphonate (EDS) have a direct cytotoxic effect on the seminiferous epithelium of the rat testis? *Journal of Andrology*. 1990;11(4).
87. Sriraman V, Sairam MR, Rao AJ. Evaluation of relative roles of LH and FSH in regulation of differentiation of leydig cells using an ethane 1,2-dimethylsulfonate treated adult rat model. *Journal of Endocrinology*. 2003;176:151–161.

88. Stevens A, Lowe JS. Human histology. Barcelona: Times Mirror Int Publishers Ltd (Mosby); 1997.
89. Şeftalioğlu A. Genel ve özel insan embriyolojisi. Üçüncü Baskı. Ankara: Tıp Ve Teknik Yayıncılık Ltd. Şti; 1998.
90. Tarka-Leeds DK, Suarez JD, Roberts NL, Rogers JM, Hardy MP, Klinefelter GR. Gestational exposure to ethane dimethane sulfonate permanently alters reproductive competence in the cd-1 mouse. *Biology of Reproduction*. 2003;69:959–967.
91. Taylor MF, Boer-Brouwer M, Woolveridge I, Teerds KJ, Morris ID. Leydig cell apoptosis after the administration of ethane dimethane sulfonate to the adult male rat is a fas-mediated process. *Endocrinology*. 1999;140:3797-3804.
92. Taylor MF, Woolveridge I, Metcalfe AD, Streuli CH, Hickman JA, Morris ID. Leydig cell apoptosis in the rat testes after administration of the cytotoxin ethane dimethane sulphonate: role of the bcl-2 family members. *Journal of Endocrinology*. 1998;157:317–326.
93. Teerds KJ, de Boer Brouwer M, Dorrington JH. Identification of markers for precursor and leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. *Biology of Reproduction*. 1999;60:1437-1445.
94. Teerds KJ, de Rooij DG, Rommerts FFG. Development of a new leydig cell population after the destruction of existing leydig cells by ethane dimethane sulphonate in rats: An autoradiographic study. *Journal of Endocrinology*. 1990;126:229-236.
95. Teerds KJ, de Rooij DG, Rommerts FFG. Hormone induced resistance of rat leydig cells to the cytotoxic effects of ethane 1,2-dimethane sulphonate. *Journal of Endocrinology*. 1992;134:85-90.
96. Tekelioğlu M. Genel tıp histolojisi. Ankara: Beta Basım Yayım Dağıtım; 1989.

97. Tsuchida J, Dohmae K, Kitamura Y, Nishimune Y. The role of the c-kit receptor in the regenerative differentiation of rat Leydig cells. *International Journal of Andrology*. 2003;26:121–125.
98. Uzunhisarcıklı M, Kalender Y, Dirican K, Kalender S, Ogutcu A, Buyukkomurcu F. Acute, subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2007;87:115–122.
99. Van Overveld FWPC, Haenen GRMM, Rhemrev J. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. *Chemico Biological Interactions*. 2000;127:151-161.
100. Verma RJ, Nair A. Vitamin e ameliorates aflatoxin induced biochemical changes in the testis of mice. *Asian Journal of Andrology*. 2001;3:305-309.
101. Wang S, Guichun Wang G, Barton BE, Murphy TF, Huang HFS. Beneficial effects of vitamin e in sperm functions in the rat after spinal cord injury. *Journal of Andrology*. 2006.
102. Wang J, Wreford NGM, Lan HY. Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the leydig cells by treatment with ethane dimethane sulphonate and subcutaneous testosterone implants. *Biology of Reproduction*. 1994;51:551-561.
103. Wang X, Quinn PJ. The location and function of vitamin e in membranes. *Molecular Membrane Biology*. 2000;17:143-156.
104. Wheater PR, Burkitt HG, Dainels VG. *Functional histology*. Second edition. Edinburg:Churchill Livingstone;1987.
105. Woolveridge I, Taylor MF, Rommerts FFG, Morris ID. Apoptosis related gene products in differentiated and tumorigenic rat Leydig cells and following regression induced by the cytotoxin ethane dimethane sulphonate. *International Journal of Andrology*. 2001;24:56-64.

106. Yan W, Kero J, Huhtaniemi I, Toppari J. Stem cell factor functions as a survival factor for mature leydig cells and a growth factor for precursor leydig cells after ethylene dimethane sulfonate treatment: implication of a role of the stem cell factor/c-kit system in leydig cell development. *Developmental Biology*.2000;227:169–182.
107. Yang ZW, Kong LS, Guo Y, Yin JQ, Mills N. Histological changes of the testis and epididymis in adult rats as a result of leydig cell destruction after ethane dimethane sulfonate treatment: a morphometric study. *Asian J Androl*.2006;8(3):289–299.
108. Yardımoğlu M, Mısırlıoğlu D. Histological effects of ethanol and protective effects of vitamin e on the morphology of seminiferous tubules of mice. *Anadolu Tıp Dergisi*.2001;3(3):155-159.
109. Yazama F, Furuta K, Fujimoto M, Sonoda T, Shigetomi H, Horiuchi T, Yamada M, Nagao N, Maeda N. Abnormal spermatogenesis in mice unable to synthesize ascorbic acid. *Anatomical Science International*.2006;81:115–125.
110. Yıldırım M. İnsan anatomisi.4. Baskı. İstanbul: Tayf Ofset;1999.
111. Young B, Heath JW. Functional histology. Forth edition. London: Churchill Livingstone;2000.
112. Zirkin BR, Chen H. Regulation of leydig cell steroidogenic function during aging. *Biology of Reproduction*.2000;63:977-981.