

1. ÖZET

METİL PARATIONUN TESTİSTE OLUŞTURDUĞU TOKSİK HASARA LİKOPENİN KORUYUCU ETKİSİNİN BİYOKİMYASAL, IŞIK MİKROSKOBİK VE ULTRASTRÜKTÜREL DÜZEYDE İNCELENMESİ

NAZLI CAN

SBE. HİSTOLOJİ & EMBRİYOLOJİ ABD

Çalışmamızda organofosfatlı bir insektisit olan Metil paration (MP)'un oluşturmuş olduğu hasara karşı yüksek kapasitede antioksidan etkiye sahip bir karotenoid olan Likopen (LKP)'in koruyucu etkisi, ışık mikroskopik, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve ultrastrüktürel parametreler doğrultusunda araştırılmıştır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun 72/2008 protokol no'lu 08.08.2008 gün ve 90 sayılı kararı ile çalışmaya başlanmıştır.

Çalışma gruplarımız; I. grup; Kontrol grubu: Ab libutum beslenen hiçbir madde uygulanmamış bazal değerler için kullanılan deney grubu (n=7, 28 gün) II. grup; Sham grubu: MP eklenmemiş 0,5 ml mısır yağı verilen grup (n=7, 28 gün oral gavaj (og.) III. grup; LKP grubu: (4 mg/kg/gün) LKP 0,5 ml mısır yağı içinde çözdürülerek verilen grup (n=7, 28 gün og.) IV. MP deney grubu: 0,28mg/kg/gün (1/50 LD50) MP 0.5 ml mısır yağı içinde çözdürülerek verilen grup (n=7, 28 gün og.) V. grup; MP+LKP deney grubu: 0,28mg/kg/gün MP 0,5 ml mısır yağı içinde çözdürülerek (4 mg/kg/gün) LKP ile birlikte verilen grup (n=7, 28 gün og.) olmak üzere 5 gruba ayrıldı.

Bütün gruplardaki deneklerin sağ testisleri MDA, GPx, SOD ve elektronmikroskop (EM) ölçümleri için ayrıldı. MDA, SOD, GPx ölçümleri için ayrılan dokular spektrofotometrik yöntemle incelendi. EM için ayrılan dokular transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile ince yapı düzeyindeki değişiklikleri incelendi. Sol testis ışık mikroskopik incelemeler için ayrıldı. Histolojik takipten sonra TUNEL yöntemi uygulanarak DNA fragmantasyonu değerlendirildi ve aktif kaspaz-3 immunohistokimyasal (IHC) boyama yapılarak TUNEL değerlendirmeleri desteklendi. Hematoksilen-eozin (H&E) ile boyanarak histolojik değerlendirme ve morfometrik ölçümler yapıldı.

Testiste yapılan histolojik ve morfometrik değerlendirmeye göre, MP grubunun kontrol, sham ve LKP gruplarına göre hasarlı olduğu ve MP+LKP grubunda LKP'nin bu hasarı önlediği gözlemlendi. DNA hasarının değerlendirilmesinde kontrol, sham, LKP ve MP+LKP grupları arasında spermatogonium ve spermatozoidlerde TUNEL pozitif boyanan hücrelerde anlamlı fark gözlenmezken, MP grubunda spermatogonium ve spermatozoidlerde

TUNEL pozitif boyanan hücreler kontrol, sham ve LKP gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu. MP ve MP+LKP grupları karşılaştırıldığında MP+LKP grubunda TUNEL pozitif boyanan hücrelerin sayısında MP grubuna göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi. TUNEL sonuçlarını desteklemek amacı ile yaptığımız aktif kaspaz immunohistokimyasal (IHC) değerlendirmelerine göre; kontrol, sham, LKP ve MP+LKP grupları arasında spermatogonium ve spermatozoidlerde aktif kaspaz IHC pozitif boyanan hücrelerde anlamlı fark gözlenmezken, MP grubunda spermatogonium ve spermatozoidlerde aktif kaspaz IHC pozitif boyanan hücreler kontrol, sham ve LKP gruplarına göre anlamlı derecede yüksek bulundu. MP ve MP+LKP grupları karşılaştırıldığında MP+LKP grubunda aktif kaspaz IHC pozitif boyanan hücrelerin sayısında MP grubuna göre anlamlı derecede azalma gözlemlendi.

Gruplar arası MDA, SOD ve GPx değerleri kıyaslandığında MP grubunda kontrol, sham ve LKP gruplarına oranla MDA düzeyinin artışı ve GPX düzeyinin anlamlı derecede azaldığı gözlemlenirken SOD değerleri istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma göstermiştir. MP grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında MDA düzeyinin anlamlı derecede arttığı GPx düzeylerinin anlamlı derecede azaldığı, SOD değerlerinde ise anlamlı olmayan bir artış gözlemlenmiştir. Ayrıca deneklerin deney başında ve deney sonundaki vücut ağırlıkları ölçülerek değerlendirilmeye alınmıştır.

Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda düşük doz MP 'un testiste oluşturduğu toksik hasara 4mg/kg LKP'nin koruyucu etkisi olduğu fakat hasarı tamamen engellemediğini gördük.

Anahtar kelime: Metil paration, testis, organofosfat, likopen, apoptoz, ultrastrüktürel

1. SUMMARY

PROTECTIVE EFFECT OF LYCOPENE AGAINST TOXIC DAMAGE ON TESTIS CAUSED BY METHYL-PARATHION WITH LIGHT MICROSCOPIC, IMMUNOHISTOCHEMICAL, BIOCHEMICAL AND ULTRASTRUCTURAL PARAMETERS

NAZLI CAN

HISTOLOGY & EMBRYOLOGY DEPARTMENT

In our study, we examined the protective effects of Lycopene, which has a high capacity of antioxidant effect on Methyl parathion (MP) caused testis damage with light microscopic, immunohistochemical, biochemical and electron microscopic parameters.

Study started with the decision of Dokuz Eylül Medical Sciences Institute Ethics Commission dated on 21.11.2008 with number 129 and protocol 72/2008.

Animals were divided into 5 groups. I.group; Control: animals used for basal parameters and fed ad libitum for 28 days. (n=7). II. group; Sham: 0,5 ml corn oil lack of MP applied for 28 days by oral gavage. (n=7). III. group; Lycopene group: (4mg/kg/day) LKP dissolved in 0,5 ml corn oil was applied to animals for 28 days by oral gavage; IV group MP group: 0,28mg/kg (1/50 LD50 mg/kg/day) MP dissolved in 0,5 ml corn oil was applied to animals for 28 days by oral gavage. (n=7). V.group; 1/50 LD50 (0,28 mg/kg/day) MP+LKP group: 0,28 mg/kg MP dissolved in 0,5 ml corn oil was applied to animals with 4 mg/kg/day LKP for 28 days by intragastric sonda.

Right testises of all animals were collected for MDA, GPx, SOD and EM assessments. MDA, SOD and GPx levels were studied with spectrofotometric techniques. Tissues collected for EM were studied with Transmission Electron Microscopy for assessment of fine structures. Left testises were collected for light microscopic evaluations. After histological routine procedures, DNA fragmentations were evaluated with TUNEL assay. Active caspase-3 IHC staining was performed to support TUNEL assay results. Histological evaluations and morfometric measurements were performed on H&E stained sections.

According to histological and morfometric evaluations; MP group was found more damaged than control, sham and LKP groups. According to MP+LKP group's results, LKP found protective against damage significantly. According to DNA fragmentation assay; no significant differences were observed between control, sham, LKP and MP+LKP groups. But in MP group; TUNEL positive spermatogonium and spermatocyte numbers were significantly higher than control, sham and LKP groups. TUNEL positive cell numbers of MP group was more than MP+LKP group. According to active caspase -3 IHC staining assay; no significant

differences were observed between control, sham, LKP and MP+LKP groups. But in MP group; Active caspase-3 IHC positive spermatogonium and spermatocyte numbers were significantly higher than control, sham and LKP groups. Active caspase -3 IHC positive cell numbers of MP group was more than MP+LKP group.

According to MDA, SOD and GPx levels; MDA levels of MP group was found higher and GPx levels found lower than control, sham and LKP groups significantly. SOD levels were lower with no statistical significance. MDA levels increased and GPx levels were decreased significantly and SOD levels were decreased with no statistical significance in MP group as compared with MP+LKP group. In addition, body weights of rats were recorded before and after the experimental process.

According to our study, we observed that 4mg/kg LKP has an important protective effect on toxicological damage of testis caused by low dose of MP application. Nevertheless, LKP cannot completely prevent toxicological injury that MP caused.

Key words: Methyl parathion, testis, organophosphate, lycopene, apoptosis, ultrastructural

2. GİRİŞ VE AMAÇ

Pestisit, zararlı organizmaları engellemek, zararlarını azaltmak için kullanılan madde ya da maddelerden oluşan karışımlardır. Böceklere karşı kullanılan pestisitlere ‘insektisit’ denir. Methyl parathion (MP) kullanılan en toksik organofosfat (OP)’lı insektisit (OPI) lerdendir. MP tarım ve bahçecilikte sebze, meyve, pamuk, mısır, patates buğday ve soya fasulyesinde kullanılmaktadır (1). MP’un yarılanma ömrü bitkiye göre değişim gösterse de azami süre 21 gündür. İlaç kullanımından 21 gün ve altında toplanan besinlerde MP kalıntıları bulunmaktadır. OPI’ler irreversibil inhibitörlerdir. Kan-beyin bariyerini geçebilir ve santral etkiler oluşturabilirler. Organofosfat bileşiklerasetilkolinesteraz (AChE) için oldukça güçlü inhibitörlerdir. İskelet kaslarında fasikülasyona, santral sinir sisteminde duygusal ve davranışsal bozukluklara, koordinasyon bozukluğu ve solunum baskılanmasına neden olurlar (2,3). MP’un üreme sistemi üzerine de toksik etkileri bulunmaktadır. MP menstural siklusda bozulma, ovaryum ağırlığında ve fertilite oranında azalmaya neden olur (2). MP vücut ağırlığında ve buna bağlı testis ağırlığında azalmaya, seminifer tübül yapısında bozukluklara neden olmaktadır. Epididimiste bulunan sperm sayısında azalmaya anormal sperm sayısında artışa, vesiküloseminaliste askorbik asit seviyesinde düşmeye ve fertilite oranında azalmaya neden olmaktadır (4). Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı OP’lerin serbest oksijen radikalleri üretimini arttırarak oksidatif doku hasarına neden olduğunu göstermiştir. Serbest radikaller, özellikle DNA, protein ve hücre fosfolipitlerinin çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girerler. DNA’yı etkileyerek karsinojenik mutasyonlara neden olabilirler.

LKP 600’den fazla doğal çeşidi bulunan bir karotenoiddir (5). LKP’in başlıca kaynakları domates ve bu sebzeden elde edilen ketçap, sos ve domates suyu gibi ürünlerdir (6). Ayrıca karpuz, pembe greyfurt ve pembe kavun LKP içeren diğer besin kaynaklarıdır. LKP göğüs kanseri, prostat kanseri gibi kanser türlerinde koruyucu etkiye sahiptir (7). Testiste reaktif oksijen türlerine (ROS) bağlı oluşan hasara karşı koruyucu etkisi olduğu bilinen LKP’nin infertil erkeklerde sperm motilitesinde artma, anormal sperm sayısında azalmaya neden olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (8).

WHO tarafından oldukça tehlikeli pestisitler listesinde yer alan MP birçok ülkede yasaklanmış olmasına rağmen ülkemizde kullanımı serbesttir. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının yayınlamış olduğu 2007 istatistiksel bilgilerine göre MP Türkiye’de 2007 yılı içerisinde 269.447 litre tüketilmiştir. Bu denli yüksek toksisiteye sahip insektisitlerin

kullanımı, özellikle de bilinçsiz kullanımı hem tarımla uğraşan çiftçilerimizi hem de bu besinleri tüketen halkı tehdit etmektedir.

Bu çalışmanın amacı; MP'nin testis ve spermatogenez üzerine vermiş olduğu olası hasarlar ve bu hasarlar üzerine LKP'nin antioksidan koruyucu etkisini incelemektir. MP'nin testis üzerine beklenen apoptozdaki rolü, oksidatif stres parametreleri üzerine olan etkisi ve testis ince yapısında meydana getirdiği değişiklikler üzerine LKP'nin koruyucu etkisini ışık mikroskopik, biyokimyasal ve ultrastrüktürel düzeyde incelemeyi hedefliyoruz.

Bu çalışma; MP'nin testis ince yapısı üzerindeki etkilerini ultrastrüktürel olarak değerlendiren ilk çalışmadır. Ayrıca; LKP'nin MP'nin testis dokusunda meydana getirdiği hasara karşı koruyucu etkisi de ilk defa çalışılmış ve litaretürlere kaynak oluşturması açısından önemlidir.

3. GENEL BİLGİLER

3.1. TESTİS

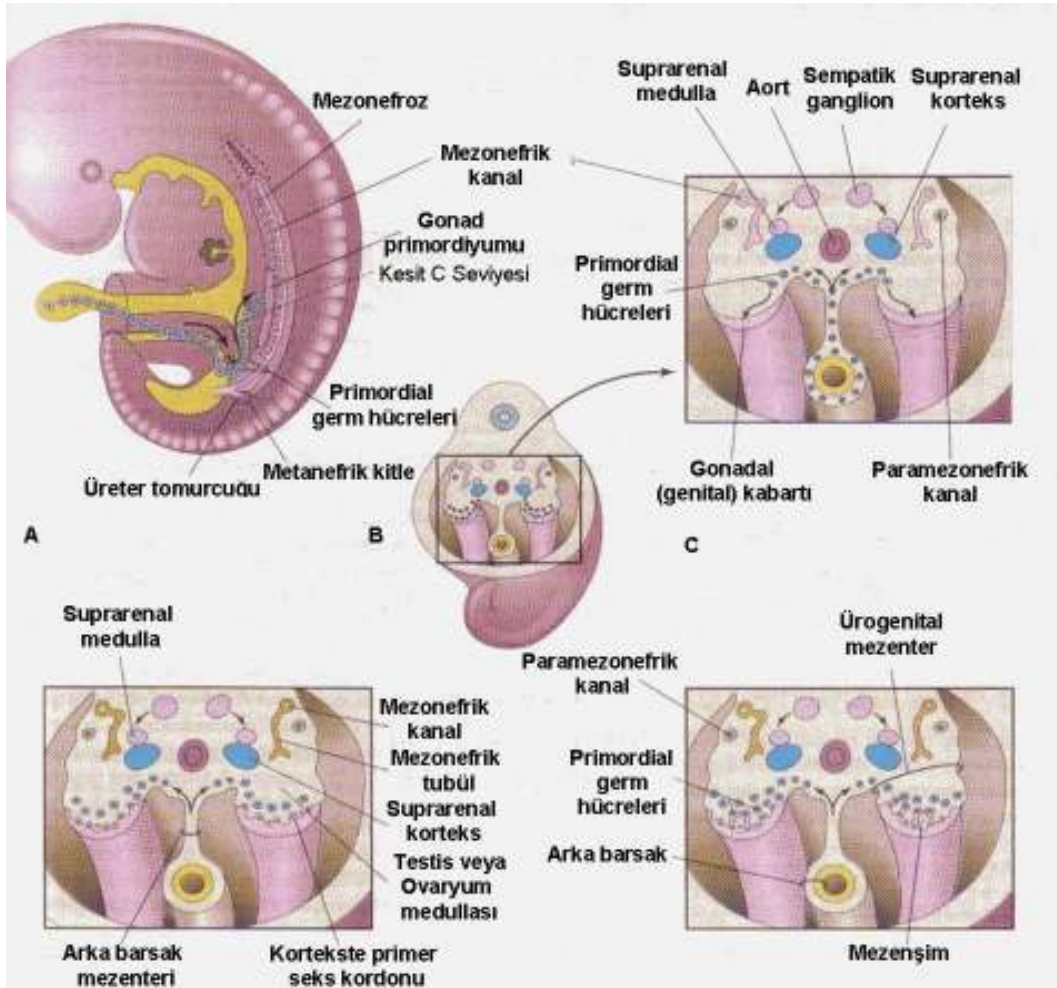
3.1.1. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ

Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti, sekonder oositi dölleyen sperm türüne bağlı olarak fertilizasyonda belirlenir ve X kromozomuna sahip ovumun X veya Y kromozomu taşıyan sperm ile döllemesine bağlıdır. Gelişmekte olan gonadlar XX veya XY kromozom kompleksine sahip olurlar. Yedinci haftadan önce gonadların görünümü her iki cinsten de birbirine benzer, bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıç periyodu 'seksüel gelişiminin farklanmamış safhası' olarak isimlendirilir.

Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar.

- Posterior abdominal duvarın mezotel epitelyumu (mezodermal epitel)
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri

Vitellus kesesi duvarındaki endodermal primordial germ hücrelerinin 3. haftada allantoyisi aşarak barsağın arka kısmında mezenter kökü (Radix mesenterii) 'nün sağında ve solunda mezonefrozun medialindeki mezoteldeki gonadal kabartı (Plica genitalis) içine girmesi ve buradaki hücreleri indüklemesi (5. hafta başı) ile gonad taslakları gelişmeye başlar. Gonadal gelişimin ilk dönemleri 5. haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medialinde, sağ ve solda, mezotel epitelinde çoğalma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin çoğalması ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık 'gonadal (genital) kabartı' oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar primer seks kordonları altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Bu sırada farklanmamış gonad, dışta yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonadın korteksi overe farklılaşır ve medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklılaşır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler ve dejenere olur (9).



Şekil.1: Primordial germ hücrelerinin vitellus kesesi duvarından Plica genitalise göçü (9).

3.1.2. TESTİSİN ANATOMİSİ

Testisler, vücut boşluğunun dışında funikulus spermatikusa asılı olarak skrotum içerisine yerleşmiş, birbirinden septum skroti ile ayrılmış oval şekilli bir çift organdır (10,11). Skrotum deri fibröz kılıflar ve kas liflerinden oluşur. Uyluğun üst kısmının ön tarafında ve symphysis pubica'nın hemen aşağısında bulunan skrotum, embriyolojik olarak sağlı sollu bir çift olup gelişim sürecinde orta hatta kaynaşır, bu kaynaşma yeri raphe skroti olarak isimlendirilir. Raphe skroti ön tarafta penisin alt yüzündeki, arkada ise perineumdaki kaynaşma yeri ile birleşir. Funikulus spermatikusu içten dışa doğru fascia spermatika interna, m. cremasterica fascia cremasterica ve fascia spermatika externa sarar (12,13). Skrotum içerisinde testis, epididimis, duktus deferens' in bir kısmı ve bu organlara gelen damar ve sinirler bulunur. Skrotumun duvarı dıştan içe doğru, cutis (deri), tunika dartos, m. obliquus, internus abdominis'ten köken alan fascia spermatika externa, m. obliquus internus abdominalis'ten köken alan fascia cremasterica ile sarılı m. cremater, fascia transversalis'ten

köken alan fascia spermatica interna ve en içte de peritoneum'un lamina peritonealisinden (periorchium) oluşur (12,14).

Yetişkin bir erkekte her bir testis oval şekilli bir organ olup yaklaşık 4 cm uzunlukta, 2-3 cm genişlikte, 3 cm kalınlıkta ve 10-14 gr ağırlığındadır. Bir testisin iki kenarı (margo anterior ve posterior), iki yüzü (facies lateralis ve medialis) ve iki ucu (extremitas superior ve inferior) bulunur (15,16).

Testisler embriyolojik gelişim sürecinde karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler ve daha sonra periton'un bir kısmını birlikte sürükleyerek skrotum içine inerler. Bu periton katlantısı tunika vaginalis olarak bilinir ve her bir testisin önyan kısımlarını çevreleyerek seröz bir boşluk oluşturur. Bu testislerin skrotum içerisinde kısmen hareketli olmasını sağlar.

Testislerin ve epididimisin beslenmesi aortanın bir dalı olan a. testicularis aracılığı ile sağlanır. Bu arter, 2. lumbal vertebra seviyesinde aorta abdominalisten ayrılır ve karın arka duvarından aşağı doğru uzanır daha sonra kanalis inguinalisten geçerek testis ve epididimisi besler (14).

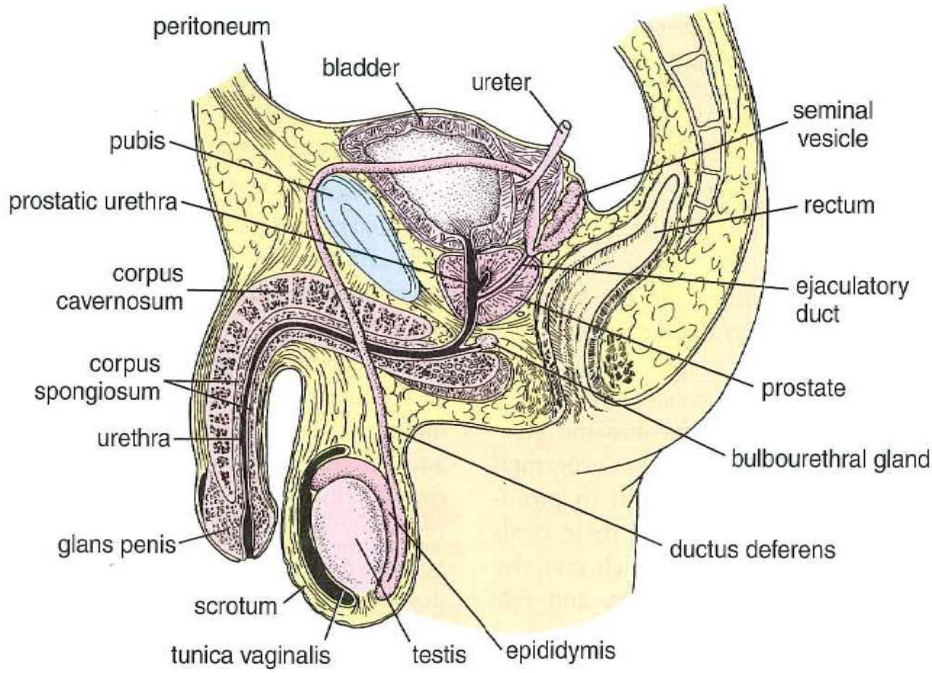
Testis ve epididimis venleri önce funiculus spermaticus' u saran bir ağ şeklinde plexus pampiniformis'i daha sonrada birbirleri ile birleşerek v. testicularisi oluştururlar. Bunların sağ tarafındaki vena cava inferior, sol taraftaki v. renalis sinistra' ya açılır (12).

Testis venleri içerisinde kan testis arterlerinden daha düşük ısıda olup arteriyel kanın ısısını azaltır ve böylece testisteki ısının vücudun diğer kısımlarından daha düşük kalmasına yol açar. Testis içi ısının daha düşük olması (35 °C) spermiyumların normal gelişimine olanak sağlar.

Testisin lenfatik drenajı yüzeysel ve derin olmak üzere iki grupta toplanır. Yüzeysel tunica vaginalisin üzerinde, derindeki ise epididymis ve testis'in içinde bulunur. Bunlar 4-8 damar şeklinde funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna girerler. v. testicularisi izleyerek birinci lumbal vertebra seviyesinde aortanın her iki yanında bulunan lenf nodüllerine (nodi lymphatica lumbales=paraaortik lenf nodülleri) açılırlar (12,13). Testisi inerve eden sinirler medulla spinalisin T 10-11 segmentlerinden gelir. Bu sinirler plexus aorticus ve plexus renalis içinden geçer ve testisleri besleyen damarlar çevresinde organa ulaşır. Sensitif liflerde damarlara eşlik eder (13,17).

3.1.3. TESTİSİN HİSTOLOJİSİ

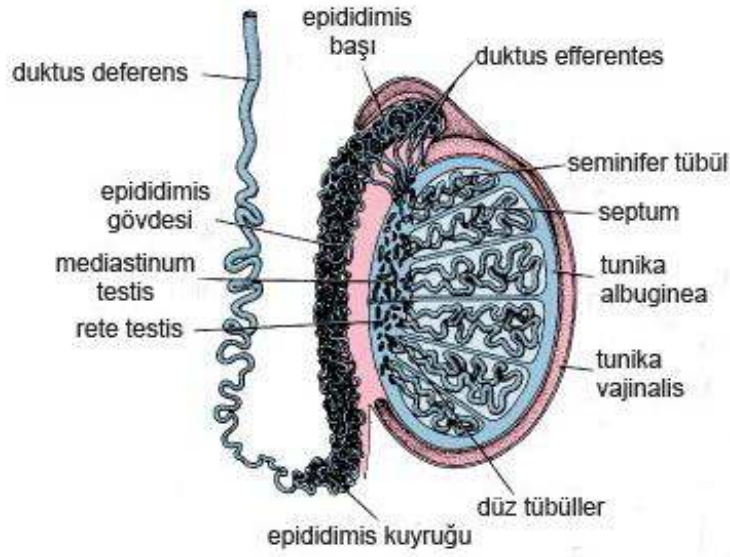
Genital sistem, cins hücrelerinin üretildiği ana organlar, hücreleri ileten kanallar ile bu kanallara açılan yardımcı bezlerden ve dış genital organlardan oluşur. Erkek üreme sistemi, sperm üreten ve sentezleyen ve androjenleri salgılayan testislerden, dışarıya spermatozoa taşınmasından sorumlu olan dış kanallar sistemini oluşturan epididimis, duktus deferens, ejakulatuar kanal ve erkek uretrasının bir parçasından, salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozoaya besin sağlayan aksesuar bezler seminal vezikül, prostat bezi, bülboüretral bezlerden ve erektil dokudan oluşan çiftleşme organı penisten oluşur (18,19).



Şekil 2: Erkek genital sistem histolojisi (11).

Testisler, bileşik tübüler ekzokrin ve endokrin salgı yapan bir çift bezdir. Testislerin ekzokrin ürünü cins hücreleri olan spermiyumlar, endokrin ürünü ise Leydig hücrelerince sentezlenen testosterondur (16). Her bir testis periton kökenli, seröz bir kese olan tunica vaginalis içerisinde bulunur. Testis en dışta tunica vaginalisin visseral yaprağı olan tunica albuginea olarak bilinen sıkı, düzensiz kollajen bağ dokusundan oluşan bir kapsül ile çevrilidir. Bu tabakanın hemen altında oldukça damarlı gevşek bağ dokusundan tunica vasküloza bulunur. Tunica vasküloza, testisin içerisine doğru uzanır ve testisin intersitisyel dokusunu oluşturur. Testisin arka yüzeyi boyunca tunica albuginea testisin parankimasi içerisine sokulur üçgen şeklinde bir kalınlaşma yaparak mediastinum testisi oluşturur. Kan lenf damarları ve genital boşaltım kanalları mediastinum'dan testise girer ve çıkar. Mediastium testisten ışınal olarak çıkan sıkı bağ dokusu bölmeleri (septula testis) testisi

piramit şeklindeki yaklaşık 250 lobüle ayırır. Lobüllerin tabanları testisin dış yüzüne, tepeleri ise mediastium testise bakar. Septalar tam olmadığı için lobüller birbiri ile ilişkidir. Her bir lobül sayıları 1-4 arasında değişen seminifer tübül içerir (18,20). Tübüller mediastinumun yakınında sonlanırken lümenleri daralır ve düzleşir bu bölüm tubuli rekti (tubulus seminiferi rekti) olarak isimlendirilir. Tubuli rekti testis içi boşaltım yollarından biridir ve seminifer tübülleri mediastiumda anastomozlaşmış bir kanallar sistemi olan rete testise bağlar. Tubuli rektinin seminifer tübüle komşu olan yarımında sadece sertoli hücreleri yer alırken, rete testise yakın bölümü kısa mikrovilluslu ve genelde tek bir silia içeren kübik epitelle döşelidir. Rete testisi döşeyen kübik epitel hücreleri de tubuli rektide olduğu gibi mikrovilluslu ve tek bir silyaya sahiptir. Rete testis mediastenum içerisinde dar kanallardan oluşan bir ağ yapısıdır. Buradan duktuli deferens denilen yaklaşık 10-12 adet kanal tunika albuginayı geçerek testis dışına çıkar. Epiteli silli ve silsiz kübik hücrelerden oluşur. Epitel hücrelerinin oturduğu bazal laminanın altında gevşek bağ dokusu ve ince bir düz kas tabakası yer alır. Kıvrımlı bir yapıya sahip bu kanallar birleşerek tek bir kanal olan duktus epididimisi oluştururlar. Duktus epididimis spermiumların toplanma ve depolanma yeridir. Epididimis sterosilyalı yalancı çok katlı epitel ile döşelidir. Epitel de kısa bazal hücreler ile uzun sterosilyalı prizmatik hücreler yer alır. Epitel bir bazal lamina üzerine oturmuştur ve altında ince bir lamina propria en dışta ise ince düz kas katmanı yer alır. Epididimisin kuyruğundan sonra kanal duvarı kalın kas yapıları bir tüp halini alır. Duktus deferens olarak isimlendirilen bu kanalın distal ucu vezikula seminalislerden gelen bir kanal ile birleşir, sonra prostat bezini geçerek üretraya açılır. Prostata girmeden önce duktus deferens genişleyerek ampulla adını alır. Ampullanın son kısmında kanala vezikula seminalisler katılır. Bundan sonra duktus deferens prostada girerek prostadik üretraya açılır. Prostat'a katılan segmente duktus ejakulatoryus denir. Duktus deferens sterosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel, distalde ise değişici epitel ile döşelidir. Epitel hücreleri salgılama işleminden de yükümlüdür (18,20).



Şekil.3: Testis ve genital kanalların şematik gösterimi (11).

Tubuli Seminiferi Kontarti (Seminifer tübül) yapısı

Her biri yaklaşık 150-250 mikrometre (μm) çapında, 30-70 (cm) uzunluğunda, ikili-üçlü anastomozlar yapan, kıvrımlı tübüler yapılardır. Her iki testiste yaklaşık 1000 tübül vardır ve toplam uzunlukları yaklaşık 0.5 km kadardır (21). Bu tübüler yapılar testisin % 92'sini oluşturur. Seminifer tübüllerin duvarı dışta lamina propria denilen bağ dokusu tabakası, içte kalın bir seminifer epitel katmanı ve bunların arasında bulunan bazal lamina'dan oluşur. Lamina proprianın ortalama kalınlığı 8 -10 μm kadardır. Bağ dokusu katmanı fibroblastlardan zengin bir çok kat halinde düzenlenmiş silindirik biçimli tip I kollajen lif bantlarından oluşur. Bazal laminaya yapışık bulunan en içteki katman 3 -5 sıralı düzenlenmiş düz kas özelliği gösteren myoid hücrelerden yapıldır. Tübüller arası gevşek bağ dokusunda, intertisyel hücreler olarak da bilinen Leydig hücre kümeleri, ince kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar, kan damarları ve sinirler bulunur. Seminifer epitel başlıca iki hücre tipi içermektedir. Bunlar Sertoli hücreleri ile çeşitli olgunlaşma aşamasındaki spermatogonik hücrelerdir. Spermatogonik seri hücreleri bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak şekilde 4 ile 8 kat şeklinde düzenlenmişlerdir. (18,22).

Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri bazal membran üzerine oturmuş, uzun piramidal biçimli apikal ve yan yüz farklanmaları olan hücrelerdir. Hücre yan yüz zarları karmaşık içe katlanmalar oluşturur. Bu nedenle hücre yan sınırları ışık mikroskobu ile ayırt edilemez. Lümene bakan apikal hücre membranları da oldukça katlantılı olup seminifer lümen içine çıkıntılar yapar. Sertoli

hücreleri bazalde yerleşik, açık renk ve bazale yerleşmiş bir iki çentikli oval heterokromatid çekirdek ile merkezi yerleşimli büyük bir çekirdekçiğe sahiptirler (21,23).

Çekirdekçik ile birlikte çekirdek zarı altında kümelenmiş iki belirgin kromatin yoğunlaşması özel bir görünüm olan üçlü görünüşü oluşturur. Sitoplazmaların da içerikleri ve işlevleri henüz tanımlanmamış olan Charcot-Bottcher kristaloidleri denilen inklüzyon cisimcikleri vardır.

Seminifer epiteldeki sıkı bağlantılar; diğer sıkı bağlantılardan farklı olarak bazal membrana en yakın konumu ile kendine özgü bir lokalizasyona sahiptir. Testisdeki sıkı bağlantılar, seminifer epitelin 1/3 bazalinde bulunan sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarıyla oluşur ve seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartman olmak üzere iki kompartmana ayırır. Bazal kompartman daha dardır, sıkı bağlantının alt kısmında yer alır ve daha geniş, lümeneye yakın olan adluminal kompartmanı çevreler. Bazal kompartmanda spermatogonyumlar ve preleptoten spermatozoidler bulunurken adluminal kompartmanda diğer germ hücreleri yer alır. Bu kompartmanlar spermatogenez için bir mikro çevre sağlar. Bu hücreler arasındaki sıkı bağlantılar nedeniyle lümen içi yapıları bağ dokusunun etkisinden koruyan bir kan-testis bariyeri oluştururlar. Spermatogonyumların farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar. Seksüel olgunlaşmanın, immunolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması sebebiyle farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immün yanıtı teşvik edebilirler. Kan testis bariyeri, gelişen spermler ve immün sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldırır.

Sertoli hücreleri “ gap junction” denilen birleşmelerle de ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. Bu da seminifer epitel siklusunun koordinasyonunda önemli olabilmektedir (22,24).

Sertoli hücrelerinin birçok işlevi vardır.

- Gelişmekte olan germ hücrelerine fiziksel ve besin desteği sağlamak,
- Spermiyogenez sırasında arta kalan sitoplazmanın fagositozu,
- Sekresyon
- Anti-Müllerian Hormon Üretimi
- **Gelişmekte olan spermatozoidlerin desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin sağlanması:**

Spermatogenez seri hücreleri birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanmış olduklarından, bu hücreler fiziksel olarak yaygın sitoplazmik Sertoli hücre dallanmaları ile desteklenir.

Spermatisitler, spermatidler ve spermatozoonlar kan testis bariyeri ile kan desteğinden izole edildiği için, bu spermatogenik hücreler besin maddelerinin ve metabolitlerin alış verişinde sertoli hücrelerinin aracılığına ihtiyaç duyarlar. Sertoli hücre bariyeri gelişen sperm hücrelerini immünolojik olarak da korur.

- **Fagositoz:**

Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde dökülür. Bu sitoplazmik parçacıklar fagosite edilir ve Sertoli hücre lizozomları tarafından yıkılırlar.

- **Sekresyon:**

Sertoli hücreleri, sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm taşınımı için kullanılan bir sıvı salgılamaktadırlar. Androjen bağlayıcı protein sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından folikül stimüle edici hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlamaktadır. Sertoli hücreleri, testosteronu östradiyol haline çevirebilmektedirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen 'inhibin' adı verilen bir peptid salgılamaktadırlar.

- **Anti-Müllerian Hormon Üretimi:**

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 sağlamaktadır (22).

Sertoli hücrelerinin sitoplazması granülsüz (düz) endoplazmik retikulum ile doludur ancak granüllü endoplazmik retikulum miktarı sınırlıdır. Bol miktarda mitokondriyon içerirler, Golgi kompleksi iyi gelişmiştir ve endolizozomların oluşturduğu çok sayıda vezikül vardır. Hücre iskeleti yapıları gelişmekte olan cins hücrelerine destek işlevi yaptıklarını gösterecek şekilde bol miktardadır ve vimentin, düşük molekül ağırlıklı sitokeratin 18 ve 19, çok iyi gelişmiş aktin filamanları ağı, ara filamanlar ve mikrotubuluslardan oluşur. Sertoli hücrelerinin çekirdeklerinin çevresi 7- 9 nm'lik fibröz elemanlar ile kuşatılmıştır (11,23).

Spermatogenik hücreler ve spermatogenezis

Seminifer tübül epitelini oluşturan hücreler Sertoli hücreleri ile birlikte çeşitli olgunlaşma aşamasındaki germ hücreleridir. Spermatogenik hücreler seminifer tübül epitelinin büyük çoğunluğunu oluşturan hücrelerdir. Bu hücreler bazalden lümeneye doğru farklılaşmanın ve olgunlaşmanın değişik evrelerini göstererek sıralanırlar. Bu sıra; spermatogonium, primer spermatisit, sekonder spermatisit, spermatid ve spermatozoan şeklindedir. Bu süreç erkeklerde puberteyle başlar ve yaşlılığa kadar sürer. Testiste günlük

ortalama 50 -150 milyon spermium üretilir. Olgunlaşma 70 ± 4 bir süreçte tamamlanır. Seminifer epitel döngüsü, belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan olgunlaşma değişiklikleri dizisini tanımlar. Bu döngü insanlarda her seminifer tübülde eş zamanlı olarak gerçekleşmeyip bir dalgalanma halinde gerçekleşir. Bazı lümende serbest spermiumlara rastlanırken bazılarında yalnızca spermatid gözlenebilir. Böylelikle her bölgesinde spermatogenezin farklı evresinin gözleendiği seminifer tübüllerde düzensiz bir görünüme yol açar. Sıçanlarda döngü eş zamanlı olarak gerçekleşir. Her hayvan türünde spermatogenez evrelerinin sayısı farklıdır ve bu farede 12, sıçanda 14, insanda ise 6 adettir (11,25). Spermatogenik (cellulae spermatogenicae) seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4–8 tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Spermatogenez, spermatogonyumdan başlayarak olgun spermium oluşuncaya kadar geçen çoğalma büyüme, olgunlaşma ve başkalaşım evrelerini içeren bir gelişim sürecidir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. Spermatogenez üç fazda gerçekleşir;

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

Spermatositogenez (Yun. Sperma; tohum + kytos; hücre + genesis; üretim) olarak adlandırılan evrede, spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatozitler meydana gelmektedir.

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

Spermatozitlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu gerçekleşen ve spermatidlerin olduğu evre mayoz adını almaktadır.

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

Spermiyogenez ise spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşması süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu dönemdir (14).

Spermatogenez

Spermatogenez, bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş bir germ hücresi olan, spermatogonyum ile başlar. İlkel germ hücresi olan spermatogonyumlar bazal lamina üzerinde bulunan küçük yaklaşık 12 μm çapında, çekirdeği soluk boyanan kromatin içeren diploid germ hücreleridir. Pubertede testosteron hormonunun etkisiyle hücre döngüsüne (siklus) girerler ve mitoz bölünmeyle diğer spermatogonyumlar ve primer spermatoziti oluştururlar. Spermatogonyumların Koyu A Tipi, Açık A Tipi ve B Tipi olmak üzere 3 tipi vardır. Koyu A Tipi spermatogonyumlar küçük, 12 μm çapında, yuvarlak şekilli hücreler olup bol heterokromatin içeren oval çekirdeğe sahiptirler. Koyu A Tipi spermatogonyumlar yedek

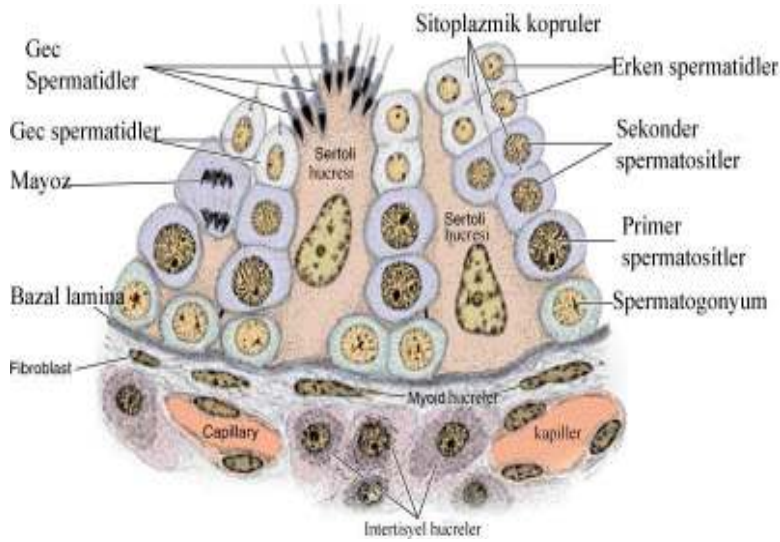
hücrelerdir, mitozla bölünerek diğer Koyu A Tipi spermatogonyumları ve Açık A Tipi spermatogonyumları oluştururlar. B tipi spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. 22 gün süren uzun bir profaz aşamasından sonra hızla birinci mayoz bölünmelerini tamamlayarak sekonder spermatosit denilen ve yalnızca 23 kromozom içeren daha küçük hücelere ayrılırlar. Bu sayıca azalma her hücredeki DNA miktarının eksilmesi ile birlikte olur. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve hızlı bir şekilde ikinci mayotik bölünmeye giren hücrelerdir. Ortalama 8 saatlik bir yaşam süreleri vardır. Sekonder spermatositlerin mayoz bölünmeyi tamamlaması ile 23 kromozoma sahip spermatidler oluşur. Fertilizasyonla bunlar normal diploid sayıya dönerler. Hücre bölünmesindeki indirgeyici işlev sebebiyle mayotik süreç kromozom sayısının türler için sabit, belirli bir miktarda kalmasını sağlar. Yuvarlak spermatidler yaklaşık 8 µm çapında haploid hücrelerdir. Tek bir Açık A Tipi spermatogonyumdan gelişen tüm spermatidler sitoplazmik köprücüklerle birbirlerine bağlıdır (18,22). Spermatidler bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve mitokondriyon içerirler. Golgi kompleksleri iyi gelişmiştir. Spermiumlara dönüşürken bol hidrolitik enzim depolarlar ve organellerinin miktarını azaltırlar. Sitoplazmalarının bir kısmı dökülür, filagellum ve ilgili iskelet yapısı şekillenir. Spermiyogenezis olarak adlandırılan bu süreç, üç faza ayrılabilir;

Golgi Fazı: Spermatidlerin sitoplazması, çekirdeğin yakınında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazmik retikulum (DER) 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. Hyaluronidaz enziminin, korona radiata hücrelerini tubal mukozal enzimler ile birlikte birbirinden ayırdığı ve esteraz, akrozin, nörominidaz enzimlerinin zona pellusidayı erittiği bilinmektedir (9). 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. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve diynein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur.

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 spermatozoonla spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Bu süreç yaklaşık 70 gün sürer. Spermatid spermiyogenezis aşamasını Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma katlantılarında geçirir. Olgun spermiyum spermiyasyon denilen olayla tübül lümenine verilir (26,27)



Şekil.4: Spermatogenik hücre serileri ve Sertoli hücrelerinin şematik gösterimi (22).

İnterstyel Bağ Dokusu

Testis kütlelerinin %25-30'unu gevşek bağ dokusu oluşturur. Bu ara doku içerisinde Leydig hücreleri, fibroblastlar, mast hücreleri, Leydig hücrelerine dönüşebilen farklılaşmamış mezenkimal kökenli hücreler, kılcal damarlar, lenf damarları ve sinirler bulunur (11,14). Seminifer tübül epitelinin çevreleyen lamina propria bağ dokusundan oluşmaktadır. Myoid hücreler (peritübüler kontraktıl hücreleri) ve kollajen lifler seminifer epitelin dış bazal laminasında yer alır. Miyoid hücrelerin sitoplazmasında aktin filamentlerini içermesi ve bazal zarının olmasıyla düz kas hücrelerine benzemektedir (11,19). Miyoid hücreler, hareketsiz spermleri rete testise iletme ritmik kasılma hareketlerinden sorumludur. Spermler bu sayede duktus epididimise ulaşır ve burayı geçtikten sonra hareket etme özelliklerini kazanırlar.

Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri poligonal şekilli ve yaklaşık olarak 15 µm çapında olan hücrelerdir. Bunlar tek nükleus ve 1-2 nükleolus içerirler. İnsanların interstisyel hücrelerinde spesifik olarak, sitoplazmalarında Reinke kristalleri olarak adlandırılan proteinler bulunur (18). Sitoplazmalarında tübüler kristal mitokondriyonlar, bol granülsüz endoplazmik retikulum (AGER) ve iyi gelişmiş golgi kompleksi bulundurur. Böylece tipik steroid üreten hücrelerin yapısal özelliklerini taşır. Bu hücrelerde ayrıca bir miktar granüllü endoplazmik retikulum (GER), lizozomlar, peroksizomlar ve bol lipit damlacıkları vardır. Salgı vezikülleri bulunmaz. Leydig hücreleri sayısı türe göre değişkenlik gösterir. İnsanlarda tek tek ya da küçük gruplar halinde damarlara yakın yerleşirler. Leydig hücreleri, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondriyon ve AGER’ de bulunan enzimlerce gerçekleştirilir. İnterstisyel hücrelerin hem aktiviteleri ve hem de miktarları hormonal uyarımlara bağlıdır (11,28).

3.1.4. TESTİS HİSTOFİZYOLOJİSİ

Spermatogenezin düzenlenmesinde sıcaklık çok önemlidir. Spermatogenez 37°C olan vücut içi sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda meydana gelir. Testis sıcaklığı yaklaşık olarak 35°C’dir. Zengin bir venöz ağ olan pampiniform pleksus testis arterlerinin etrafını sarar. Bu ağlar testis sıcaklığının sürdürülmesinde önemlidir ve sıcaklığı dağıtmak için ters yönlü akımla sıcaklık değişimini sağlamaktadır. Soğuk günlerde, skrotum kası refleks olarak kasılarak testisleri yukarı doğru çeker, testislerin vücuda yaklaştırılması ile 2°C’lik farkın sürekliliği sağlanabilir. Bu şekilde, skrotum teorik olarak, testislere özgül soğutma mekanizması olarak görev yapar. Spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi endokrin faktörler oluşturur (29,30,31). Spermatogenez, hipofizin foliküler stimulan (FSH) ve luteinleştirici hormonlarının (LH) testiküler hücreler üzerindeki etkilerine bağlıdır (22).

Luteinleştirici Hormon (LH):

Hipotalamustan salgılanan gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH) hipofiz bezinin ön lobundan luteinize edici (LH) hormonun salgılanmasını uyarır. LH ise Leydig hücrelerinde bulunan reseptörlere bağlanarak bu hücrelerde kolesterolden normal spermatogenik hücrelerin gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını uyarır. Hipofizden LH salgılanması negatif geri besleme ile düzenlenir. Testosteron sentezinin artması LH salımını baskılar.

Folikül Uyarıcı Hormon (FSH):

Hipotalamustan salgılanan gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH) hipofiz bezinin ön lobundan follikül uyarıcı hormon (FSH) salgılanmaktadır. FSH sertoli hücrelerini

etkileyerek Adenil siklaz yapımını, siklik adenozin trifosfat (cAMP) artısını uyarır. Aynı zamanda Andojen bağlayıcı protein (ABP) 'nin sentez ve salgılanmasını harekete geçirir. Daha sonra bu protein testosterona bağlanarak bu hormonu seminifer tübül lümenine taşır. Böylece spermatogenez uyarılmış olur. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen 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 ABP içerir (22).

Inhibin:

Bu hormon Sertoli hücrelerinde yapılır ve spesifik olarak hipofizden FSH salınımını inhibe eden bir proteindir. İnhibin sürekli salınırsa FSH baskılanır. Üreme hücresi sayısı azalınca da FSH artar (11).

3.2. APOPİTOZ

3.2.1. APOPİTOZUN TANIMI VE TARİHÇESİ

Organizma sürekli bir denge halindedir. Yeni hücreler sentezlenirken, varolan hücrelerin bir kısmı hücre ölümü ile ortadan kaldırılmakta ve böylece denge korunmaktadır. Hücre ölümünün iki tipi vardır, bunlar apoptozis ve nekrozdur (32,33). Her ikisinde de düzenli olarak birbirini izleyen biyokimyasal ve morfolojik olaylar sonucu hücre ölümü meydana gelir (34). Apoptoz hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, programlı, aktif RNA ya da protein sentezi ve enerjiye gereksinim gösteren bir ölüm formudur. Dış çevreden etkilenen bir genetik ve biyokimyasal olaylar dizisidir (35,36). Hücrelerde normal gelişim sırasında meydana gelen ölüm olarak 1842 yılında Vogt tarafından tanımlanmıştır. Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ise ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (37). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır. Köken olarak yunanca bir kelime olan apoptosis; apo (ayrılan) ve ptosis (düşen) terimleri birleştirilerek, 'ağaçtan dökülen yapraklar' olarak tarif edilmiştir (38). 1983 yılında Duke ve arkadaşları, jel elektroforezi ile apoptozis endonükleazların aktive olarak merdiven basamağı denen karakteristik DNA kırıklarına neden olduğunu göstermiştir. Böylece apoptotik hücre ölümünün ilk biyokimyasal kanıtı elde edilmiş ve apoptozisin genetik olarak kontrol edilen fizyolojik mekanizmalarla regüle edilen bir hücre ölümü olduğu ortaya çıkartılmıştır (37).

3.2.2. APOPİTOZUN GÖRÜLDÜĞÜ OLAYLAR

Apopitotik hücreler organizmanın bazı dokularında ve hücrelerinde sürekli olarak oluşmaktadırlar ve bu oluşum ömür boyu devam etmektedir. Böylece ölüm (apoptozis) ve yeniden yapım (mitozis) bu dokularda doku homeostazisini oluşturmak üzere dinamik bir denge halindedir. Bir günde yaklaşık bir milyon hücre apoptozise uğrayarak ölmekte ve yerine yeni hücreler yapılmaktadır. Bu hızda bir hücre ölümü ve yeniden yapımı bir insanın vücut ağırlığının her 24 ayda bir yenilenmesi anlamına gelmektedir (39,40).

Apopitoz fizyolojik ve patolojik olaylar sonucunda gözlenmektedir.

Fizyolojik olaylar

- Embriyogenez ve metamorfoz sürecinde (Müller ve Wolf kanallarının involüsyonu, kalp gibi bazı içi boşluklu organların lümenlerinin oluşması)
- Vertebraların nöron gelişimi sırasında (barsak kripta epiteli gibi sürekli proliferasyon gösteren hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesinde)
- Menstruel siklusta endometriyum hücrelerinde (menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin rejenerasyonu gibi olaylarda)
- T lenfositlerinin kontrolünde (matür T lenfositlerinin antijene bağımlı düzenlenmesinde immatür B lenfositlerinin gelişimi gibi immun sistemin düzenlenmesinde)
- Epiderminin en üst tabakası olan stratum korneumun sürekli dökülüp yenilenmesinde görülür.

Patolojik olaylar

- Her türlü neoplastik oluşumda (hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gibi hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda)
- Hormonlara bağlı dokularda patolojik atrofide, otoimmün hastalıklar sitotoksik T hücreleri ile oluşturulan hücre ölümünde
- Pankreasta ve böbrek tübüllerindeki gibi parankimden zengin dokularda duktus tıkanması sonrası patolojik atrofide apoptozis görülmektedir (41).

3.2.3. MORFOLOJİK VE BİYOKİMYASAL DEĞİŞİKLİKLER

3.2.3.1. Morfolojik Değişiklikler

Yüzey Organellerinin Kaybı

Apopitozise uğrayan hücrenin komşu hücrelerle bağları kesilir. Hücre yüzeyindeki mikrovilluslar ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır (42,43).

Hücre Büzülmesi:

Apopitotik hücre komşu hücreye göre daha küçük ve sitoplazması daha yoğundur. Endoplazmik retikulum dışında diğer hücre organelleri yapılarını korur (44). Sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kalabalık görünür. Hücre zarı sağlam olduğundan nekrozda olduğu gibi bir inflamatuvar reaksiyon gözlenmez (42,45,46).

Kromatin Yoğunlaşması:

Önemli yapısal değişiklik çekirdekten başlayarak izlenir. Çekirdek apopitoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye değişmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür (44,47). Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensizleşir ve ileri evrede küçük çekirdek parçalarına bölünür. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır (45,46).

Sitoplazmik Baloncuklar ve Apoptotik Cisimlerin Oluşması

Hücrede önce yüzeye doğru tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür (42,45).

Apopitozis için morfolojik değişimler olan hücre büzülmesi, kromatin yoğunlaşması, hücre membran tomurcuklanması gelişirken fosfotidilserin açığa çıkar. Sağlıklı hücrelerde plazma membranının içinde bulunan fosfotidilserin apoptotik hücrelerde plazma membranının dış yüzünde bulunur ve fagositik hücreler için sinyal görevi görür (48).

3.2.3.2. Biyokimyasal Değişiklikler

DNA Fragmantasyonu :

Hedef proteinlerden biri olan DNA, endonükleaz ile çapraz bağ yapan bir proteindir. Kaspazlar bu proteini yıkarak endonükleazı serbestleştirir. Çekirdek içine giren Ca^{+2} Mg^{+2} bağımlı endonükleaz, DNA kırıkları oluşturur. Kırıklar nükleozomların arasından mono veya oligonükleozomal olarak meydana gelir. 180 baz çifti ve katları şeklinde kırılma oluşur ve merdiven basamağı adıyla karakterizedir (49).

Hücre İskeletinin Yıkılması;

Kaspazların aktifleştirdiği bir başka protein ise hücre iskeletinin ana bileşenlerinden olan aktini yıkan proteindir. Aktin filamanlarının yıkımı ile hücre normal şeklini kaybeder (50).

Hücre Membranı Değişiklikleri;

Kaspazların etkisiyle hücre zarının asimetrisi bozulur. Plazma zarının iç yüzündeki fosfatidilserin yer değiştirerek zarın dış yüzüne yerleşir. Ayrıca bazı apoptotik hücreler hücre zarlarında thrombospondin adlı adheziv bir glikoprotein ve bazı hücrelerin adhezyon moleküllerini (ICAM 3) içerirler. Bu membran değişiklikleri apoptotik hücrelerin çevre fagositler tarafından fark edilip fagositozlarını sağlarken, transglutaminaz aktivasyonu ile membran proteinlerinde oluşan çapraz bağlanmalar membranların parçalanmasını ve apoptotik cisimlerin oluşmasını sağlarlar (51). Hücreler özelleşmiş yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülüp büzüşürler. Sitoplazmanın yoğunlaştığı ve organellerin birbirine yaklaştığı gözlenir.

Fagositoz;

Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokulardan temizlenir (51).

3.2.4. APOPTOZ MEKANİZMASI

Apoptoz süreci; hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınmasıyla (ekstrensek), DNA hasarına genlerin yanıtıyla (intrensek) veya proteolitik enzimlerin doğrudan hücreye girişiyle (Perforin – Granzim) 3 farklı şekilde gelişebilir (52).

3.2.4.1. Ekstrensek / Reseptör Aracılı Yol

Hücre dışından kaynaklanan ve hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin tutulması ile düzenlenen apoptozdur. Apoptozun dış yolu Tümör Nekroz Faktör (TNF) ailesi hücre yüzey reseptörlerinin ligantlar yolu ile aktive edilmesi ile uyarılır. Hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaların belki de en iyi anlaşılmuş örneği sitokine bağlı dış apoptozis yoludur. TNF-alfa, TNF ile ilişkili apoptozis uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları, bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek ölüme neden olurlar (53). Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarında kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesi (DD) bulunur. Bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlanarak apoptozisin başladığı yerlerdir. Ligandlar bağlandığında 3 Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) ya da Fas molekülü kompleks oluşturur. TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TNFR'e bağlı ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD/Mort-1) denen adaptör proteinlere bağlanır. Bu proteinlerin hem

DD hem de proteazların ölüm oluşturan kısımlarına (DED) bağlanan bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar ölümü başlatan sinyalleme kompleksini (DISC) oluştururlar (49).

3.2.4.2. İntrensek (mitokondrial) Yol

Apoptozun yaygın yolu olan iç yol hücrenin kendi içinden, sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlar. İç sinyaller ile oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynamaktadır. Dış zar geçirgenliğinde artış sonucu mitokondri zarı potansiyelinin bozulması dış zarda hızlı bir şişmeyi izleyerek iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına yol açar. Temel olarak mitokondrideki solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AİF), SMAC ve ENDO G adlı DNaz enzim, sitoplazmaya dağılır. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar (54). Apoptozom, kaspaz 9 u aktive etmek üzere keser, kaspaz 9, diğer kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktive ederek apoptozun gerçekleşmesini sağlar.

3.2.5. APOPTOZ REGÜLATÖRLERİ

Apoptozisi düzenleyen genler cmyc, p53 ve Bcl-2 olarak bilinir ve ürettikleri proteinler aynı adı alır. Apoptozisi baskılayan (anti-apoptotik) ya da indükleyen (pro-apoptotik) proteinler vardır. P53, Bcl-2 ailesi, inhibitör apoptoz proteinleri (IAP), Kaspazlar gibi protein aileleri apoptozis regülatörleridir.

3.2.5.1. Bcl-2 ailesi

Mitokondride dış zar potansiyelinin değişmesi Bcl-2 ailesi adı verilen bir protein grubu tarafından düzenlenir.

Apoptozu baskılayan genler	Apoptozu indükleyen genler
Bcl-2 ailesi grubundan; BHRL-1, Bcl-xl, Bcl-w, Bfl-1, Brag-1, mcl-1, A1 C-ab1 geni A20 Çözünebilir fas P35 Ras onkogeni	Bcl-2 ailesi grubundan; Bad, Bax, Bak, Bcl-xS, Bad, Bik, Hrk1 C-myc p53, p21 Fas (CD95/APO1) FADD/MORT, RIP, FAST İnterlökin dönüştürücü enzim benzeri proteinler (İCE) LOH (MTS1/CDK41)

Şekil.5: Apoptozu baskılayan ve indükleyen genler

Hücrede antiapoptotik aile üyeleri olan Bcl-2, Bcl-x, yine aynı ailenin üyeleri olan Bad, Bim, Bmf, Bid ve BH-3 only proteinleri gibi proapoptotik proteinler tarafından baskılanır. Ailenin proapoptotik üyeleri normal koşullarda inaktif durumdadır, bu nedenle mitokondriyal zar geçirgenliği Bcl-2 ve benzerlerinin etkisi sayesinde değişmez. Ancak çeşitli uyarılar (büyüme faktörünün uzaklaştırılması; Bad'ın, kalsiyum artışı; Bim'in, UV ışınları; Bmf'nin) proapoptotik grubun aktifleşmesine yol açar. Sonuçta Bcl-2, proapoptotik aile üyeleri tarafından baskılanır, Bcl-2 tarafından inaktif durumda tutulan ve yine aynı aileden olan Bak ve Bax proteinleri etkinleşerek mitokondri dış zarında permeabilite geçiş porlarının oluşumuna, zar potansiyelinin değişimine yol açar. Bu da uygulamacı kaspazların aktivasyonu ve apoptozla sonuçlanır. Kaspazlar İAP denen bir grup protein tarafından baskılanır (55).

3.2.5.2. P53 geni

p53, DNA gardiyanı da denen ve bu güne dek üzerinde en çok çalışılan tümör süpresör proteinlerden biridir. P 53 sitoplazmada bulunan ve DNA'nın ya da hücrenin ağır biçimde hasar görmesi durumunda, DNA da belli genlerin aktivasyonuna, böylece yapılarının artmasına (Bax, Apaf-1, Fas) belli genlerin de baskılanmasına (Bcl-2, Bcl-X) yol açarak apoptozu tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür. DNA hasarı, hipoksi ya da onkogenlerin aktivasyonu, sürekli yapılan ama ubiquitinleyici bir protein (mdm2) tarafından belli bir hızda yıkılan p53 ün fosforillenmesine, fosforillenme ubiquitinlemenin bozulmasına yol açar. Miktarı artan p53 çekirdeğe geçerek ilgili genlerin ifade edilmelerini değiştirerek hücreyi apoptoza sokar (56).

3.2.5.3. IAP Ailesi Proteinleri

IAP'lar, antiapoptotik etkilerini direkt kaspazlara bağlanarak, kaspaz inhibisyonu ile gösteren proteinlerdir. Programlanmış hücre ölümünün negatif düzenleyicileridir. Bazı memeli homologları; XIAP, cIAP1, cIAP2, NIAP, Bruce, Survivin, plAP olarak tanımlanmıştır. Apoptozis protein inhibitörleri kaspazları ölüm reseptörleri ve mitokondriyal yol ile inhibe ederler (57).

3.2.5.4. Kaspazlar

Kaspaz; sistein aspartatik asit proteazlar olarak bilinir ve birbirleriyle homolog büyük protein ailesidir (58,59). Kaspazlar, proteolitik yarıklanmayla aktifleşen inaktif granüller olarak üretilir (58). Bu güne kadar yaklaşık 100 kaspaz substratı rapor edilmiştir (59). Kaspaz kaskadını başlatan kaspaz -3,-6 ve -7'dir. Kaspaz ailesi üyelerinden bazıları küçük N-terminal peptidler (Ör: Kaspaz-3,-6,-7) ve geniş N-terminal domainler (Kaspaz-2, -8, -9, -10 ve sitokin aşamasında Kaspaz-1, -4, -5, -11, -12, -13) içerir. ProKaspaz-7 de zimojen tek polipeptid

zinciri içerir. Matür Kaspaz'ın küçük ve geniş altbirimleri arasında bir halka bulunur. Bu alt üniteler arasında ProKaspaz-7 aktivasyonu için bölünme alanları vardır (Ile195– Gln196– Ala197–Asp198). Aktivatör kaspazın aktif bölgesine bağlanması için gerekli aktif bölgedeki esneklikten dolayı bu halka yapısal olarak görünmez (59). İnsanda yapı ve fonksiyonlarına göre 11 değişik kaspaz tarif edilmiştir:

- Başlıca lenfokin yapımında bulunan kaspazlar: Kaspaz-1 (ICE) , -4, -5,11, -12 ,-13,14
- Sonuçlandırıcı (effektör) kaspazlar: Kaspaz-3 (CPP32/Yama) ,- 6 , -7
- Başlatıcı (initiatör) kaspazlar: Kaspaz-2, Kaspaz-8 (FLICE/MACH), -9, 10

3.2.6. SPERMATOGENEZDE APOPİTOZİSİN ROLÜ

Doku canlılığında ve devamında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptozis, testiküler dokuda da sık saptanan bir fenomendir. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır. Normal Spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar (60,61) Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar (62). Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir (63). Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptozis gerçekleştiği bildirilmiştir (64). Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin % 75'i apoptozise maruz kalır (60). Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (61,62). Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artma bulunabilir (65,66). Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (2, 67). Hipofizektomize immature ratlarda hem germinal hem de somatik hücrelerde yaygın apoptozis ortaya çıktığı ve bu olgularda FSH ya da hCG tedavileri ile bu yoğun programlanmış hücre ölümünün engellenebildiği gösterilmiştir.

3.3. PESTİSİTLER

Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) pestisidleri, istenmeyen bitki ve canlıları denetim altında tutmak ya da önlemek amacıyla kullanılan maddelerle bitki büyümesini ayarlayıcı, yaprak dökülmesini sağlayıcı ve nem alıcı olarak kullanılan madde ve maddeler karışımı biçiminde tanımlamaktadır.

Pestisitler etki ettiği canlı çeşitine göre;

Insektisitler (böcekleri öldürenler),

Fungisitler (mantarları öldürenler),

Herbisitler (yabancı otları öldürenler),

Akarisitler (akarları öldürenler),

Rodentisitler (kemiricileri öldürenler),

Nematositler (nematodları öldürenler),

Molluskositler (yumuşakçaları öldürenler) olarak sınıflandırılabilirler.

Pestisitlerin kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. M.Ö. 1500'lere ait bir papirüs üzerinde bit, pireye karşı insektisit hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. 19.yy'da zararlılara karşı inorganik pestisitler kullanılmış, 1940'lardan sonra pestisit üretiminde organik kimyadan faydalanılmıştır. Türkiye'de pestisit tüketimi, 1979'a göre 2002 yılında %45,29'luk bir artış göstermiştir. 1979' dan 2002' ye kadar, etki ettikleri canlı gruplarına göre pestisitlerin tüketimi Şekil6' da gösterilmiştir.

Pestisitler	1079	1987	1994	1996	2002
Insektisitler	2.287.658	3.303.446	2.064.991	3.027.380	2.250.898
Akarisitler	203.208	240.360	192.279	223.857	296.809
Fumigant Nematositler	315.665	322.227	530.738	1.076.661	1.559.489
Rodantisitler Mollusisitler	5.600	2.124	2.509	3.268	1.794
Fungisitler	2.537.315	2.611.960	2.201.406	2.951.191	1.964.292
Herbisitler	2.451.977	3.495.044	3.902.588	3.643.971	3.697.397
Toplam	8.395.848	12.112.267	10.871.792	13.797.488	12.198.917

Şekil.6: 1979' dan 2002' ye kadar, etki ettikleri canlı gruplarına göre pestisitlerin tüketimi

Bu artışa karşın ülkemizde pestisit tüketimi gelişmiş ülkelere göre oldukça düşüktür. Ancak, entansif tarım yapılan Akdeniz, Ege gibi bölgelerin tüketimi Türkiye ortalamasının çok üzerindedir. Türkiye’de genel olarak az pestisit tüketilmesine karşın, en yoğun tüketilen pestisitler çevre ve sağlık açısından önemli riskler taşımaktadır.

Pestisit kullanımının tartışılmaz yararlarına karşın, etkin denetimden yoksun ve aşırı miktarlarda uygulanması insan dahil hedef olmayan diğer canlılarda zehirlenmelere ve ölümlere neden olmakta, ekosistemlerin ve besinlerin kirlenmesine yol açmaktadır. Pestisitlerin yaygın olarak kullanılmasından kısa süre sonra 1950' li yıllarda önce DDT'nin (Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane) daha sonra da kullanılan diğer ilaçların insanlar ve vahşi yaşamda hedef olmayan canlılara zararlı etkileri ortaya konmaya başlanmıştır (68,69). Acil servislere müracaat eden zehirlenme vakalarının büyük bir çoğunluğunun pestisit zehirlenmesi oluşturmaktadır. Pestisit zehirlenmeleri dünya çapında önemli bir sorun oluşturmaktadır. Dünya'da her yıl bu şekilde 1-5 milyon arasında zehirlenme görülmektedir. Her yıl 20000 tarım çalışanı pestisit zehirlenmeleri sonucu hayatını kaybetmektedir. Dünya pestisit üretiminin %25' i, gelişmekte olan ülkelerde kullanılmasına rağmen ölümlerin %99'u bu ülkelerde olmaktadır (2). Tarım ilaçlarının canlılar üzerindeki etkileri fetal yaşamdan itibaren başlamaktadır (70). Bu ilaçlar plasentadan fötüse geçmekte, bunun sonucunda düşükler, hiperpigmente, hiperkeratitik çocuk doğumları görülmektedir. Yapılan hayvan deneylerinde ise radyoaktif işaretli ilaç verilmesinden 5 saat sonra ilacın plasentaya geçtiği, fetüsün göz, sinir sistemi ve karaciğerinde yerleştiği gözlenmiştir (70).

3.3.1. İNSEKTİSİDLER

- Organofosfatlar (OP)
- Karbamatlar
- Organoklorlu Piretrin
- Piretroidler olmak üzere çeşitli gruplara ayrılmıştır.

En toksik olan insektisid grubu OPI dir. OPI'ler normal olarak ester, tiol ester veya fosfor içeren asitlerden elde edilen asit-anhidritlerdir. İreversible inhibitörlerdir. Kan-beyin bariyerini geçebilir ve santral etkiler oluşturabilirler. Etki süreleri reversible inhibitörlere göre daha uzundur. OPI'ler solunum yollarından ve gastrointestinal mukozadan geçerek hızla absorbe edilir ve ayrıca organofosfatlı insektisidler lipofilik oldukları için hızlı bir şekilde deriden de absorbe edilebilirler (71). OP'ların etkileri AchE'ı inhibe ederek sinapslardaki asetilkolin (Ach) birikimine bağlı olarak ortaya çıkar. Ach birikimi başlangıçta stimüle ederken sonrasında santral sinir sisteminde (MSS), somatik sinirlerde, otonomik gangliyalarda,

parasempatik sinir sonlanmalarında ve bazı sempatik sinir sonlanmalarında kolinerjik sinaptik iletiyi paralizye (felç) uğrattır. OP ve karbamatlar AchE (sinir dokusu ve eritrositlerde bulunan) ve butirilkolinesteraz (plazma ve pseudokolinesteraz) içeren karoksilik ester hidrolazlarının güçlü inhibitörleridir (72). Organofosfatlı insektisitler AchE‘ın inhibisyonu sonucu birçok organda da toksik etkiye sebep olmaktadır (73). OPI’ler hem insanlarda hem de hayvanlarda merkezi sinir sistemi (74) immun sistem (75) üriner sistem (76) üreme sistemi, (77) kardiyovasküler sistem (78) gibi bir çok sistemi etkilemekte bununla birlikte kronik maruziyet sonucunda fizyolojik fonksiyon kayıpları (79) ve davranış bozuklukları meydana getirmektedir (80). OP bileşikleri Nöronal kolinesteraz (Che) ve serum kolinesteraz (SChE) inhibitör gibi davrandıkları için doğada nörotoksik maddeler olarak da tanımlanır (81). Pestisitler yalnızca doku ve sistemlere hasar vermemektedir. Aynı zamanda hücre yapısına ve metabolizması üzerine de etki ederek hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olurlar. Hücre işlevlerinin bozulmasına sebep olan faktörlerden biri de pestisitlerin de sebep olduğu serbest radikal oluşumudur. Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron ihtiva eden atom veya moleküllerdir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Serbest oksijen radikalleri, oksijenin kendisi, süperoksid, hidrojen peroksid, geçiş metallerinin iyonları ve hidroksil radikalidir. Serbest radikaller, hücrelerin lipid, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler (82).

<u>Sınıf Ia. Aşırı tehlikeli</u>	<u>Kimyasal özellik</u>	<u>Sınıf Ib. Çok tehlikeli</u>	<u>Kimyasal özellik</u>
<i>Chlorfenvinphos</i>	Fosfat	<i>Azinphos-ethyl</i>	Fosfonotiyonat
<i>Coumaphos</i>	Fosfotiyonat	<i>Azinphos-methyl</i>	Fosfotiyonat
<i>Demeton</i>	Fosfotiyonat	<i>Bromophos-ethyl</i>	Fosfotiyonat
<i>Disulfoton</i>	Fosfotiyonat	<i>Demeton-S-methyl</i>	Fosfotiyonat
<i>Ethoprophos</i>	Fosfotiyonat	<i>Dichlorvos</i>	Fosfat
<i>Fenamiphos</i>	Fosforamid	<i>Dicrotophos</i>	Fosfat
<i>Fensulfotiyon</i>	Fosfotiyonat	<i>Fenthion</i>	Fosfotiyonat
<i>Fonophos</i>	Fosfonotiyonat	<i>Isafenphos</i>	Fosforamidotiyonat
<i>Leptophos</i>	Fosfonotiyonat	<i>Methamidophos</i>	Fosforamidotiyonat
<i>Mephosfolan</i>	Fosforamid	<i>Methidathion</i>	Fosfotiyonat
<i>Mevinphos</i>	Fosfat	<i>Monocrotophos</i>	Fosfat
<i>Parathion</i>	Fosfotiyonat	<i>Omethoate</i>	Fosfonotiyonat
<i>Parathion-methyl</i>	Fosfotiyonat	<i>Pirimphos-ethyl</i>	Fosfotiyonat
<i>Phorate</i>	Fosfotiyonat	<i>Propetamphos</i>	Fosforamidotiyonat
<i>Phosfolan</i>	Fosfonoamidotiyonat	<i>Thiometon</i>	Fosfotiyonat
<i>Phosphamidon</i>	Fosfat	<i>Triazophos</i>	Fosfonat
<i>Prothoate</i>	Fosfotiyonat	<i>Vamidothion</i>	Fosfotiyonat
<i>Sulfotep</i>	Fosfotiyonat		
TEPP	Fosfat		
<i>Terbufos</i>	Fosfotiyonat		
<i>Trichloronat</i>	Fosfonotiyonat		
<u>Sınıf II. Orta derecede tehlikeli</u>	<u>Kimyasal özellik</u>	<u>Sınıf III. Hafif tehlikeli</u>	<u>Kimyasal özellik</u>
<i>Chlorpyrifos</i>	Fosfotiyonat	<i>Acephate</i>	Fosforamidotiyonat
<i>Diazinon</i>	Fosfotiyonat	<i>Bromophos</i>	Fosfotiyonat
<i>Dichlofenthion</i>	Fosfotiyonat	<i>Malathion</i>	Fosfotiyonat
<i>Dimethoate</i>	Fosfotiyonat	<i>Pirimiphos-methyl</i>	Fosfotiyonat
<i>Ethion</i>	Fosfotiyonat	<i>Trichlorfon</i>	Fosfonat
<i>Fenitrothion</i>	Fosfotiyonat		
<i>Phosmet</i>	Fosfotiyonat		
<i>Phoxim</i>	Fosfonoamidotiyonat	<u>Sınıf IV. Akut tehlike olasılığı yok</u>	<u>Kimyasal özellik</u>
<i>Profenofos</i>	Fosfotiyonat	<i>Chlorphoxim</i>	Fosfotiyonat
<i>Prothiofos</i>	Fosfotiyonat	<i>Chlorpyrifos methyl</i>	Fosfotiyonat
<i>Sulprofos</i>	Fosfotiyonat	<i>Temephos</i>	Fosfotiyonat
		<i>Tetrachlorvinphos</i>	Fosfat

Şekil.7: Organofosfat bileşiklerinin etkilerine ve kimyasal özelliklerine göre sınıflandırılması

3.3.1.1. METİL PARATİON

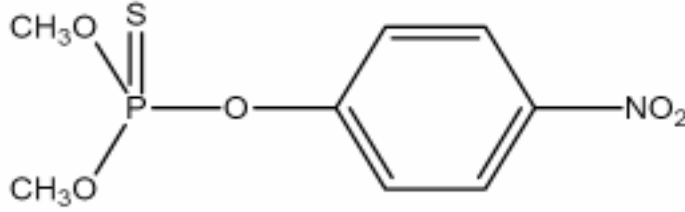
3.3.1.1.1. Metil parationun farmakokinetiği

MP tarım alanında oldukça geniş çapta kullanılan organofosfat grubu bir insektisid olup, ticari olarak üretimi ilk defa 1952 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleştirilmiştir. Dünyanın birçok ülkesinde açık alan ve bahçeler de kullanımı lisanslıdır. Fakat bazı ülkelerde evler de hamam böcekleri ile mücadelede de yasa dışı olarak kullanılmaktadır (83). MP “pamuk zehiri” olarak bilinmektedir ayrıca tarım ve bahçecilikte tarım ürünlerine, lahana, pamuk, mısır, patates buğday ve soya fasulyesinde kullanılmaktadır (84). Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının yayınlamış olduğu 2007 istatistiksel bilgilere göre MP organofosfatlı insektisiti Türkiye’ de 2007 yılı içerisinde 269.447 litre tüketilmiştir.

Pestisit	ABD’ de kullanım	AB’de kullanım	Türkiye’de TÜKETİM(kg –L)
Atrazin	Kısıtlanmıştır	-	73.376
Benomil	-	Geri Çekilmiş	10.081
Bifentrin	Kısıtlanmıştır	-	425
Karbofuran	Kısıtlanmıştır	-	13.954
DNOC	Yasaklanmıştır	Geri Çekilmiş	60.646
Fenvalerat	-	Geri Çekilmiş	1.792
Metamidofos	Kısıtlanmıştır	-	47.823
METİL PARATİON	Kısıtlanmıştır	-	246.828
Monokrotofos	Yasaklanmıştır	-	47.823
Forat	Kısıtlanmıştır	-	408
Oxydematon-metil	Kısıtlanmıştır	-	7.871
TOPLAM			790.036
<i>Tüm pestisitler arasında MP tüketim miktarı</i>			<i>% 6.47</i>

Şekil.8: Tarım ve Köy İşleri Bakanlığının yayınlamış olduğu 2007 istatistiksel verileri

MP'nin moleküler formülü $C_8H_{10}NO_5PS$ ' dir ve moleküler ağırlığı 263.21 dir. MP'un yapısal formülü şekil 9'de gösterilmiştir.



Şekil.9: MP'nin yapısal formülü

MP saf maddesi oda sıcaklığında renksiz kristaller şeklindedir ve birçok organik çözücüde hızlı bir şekilde çözülebilmektedir (85). Erime noktası 35-36 °C'dir. Alkali ortamlarda hızla hidroliz olmakta ve sıcaklıkla çeşitli izomerlerine parçalanmaktadır. MP EPA'nın yaptığı sınıflandırmaya göre yüksek toksisiteye sahip insektisitlerden bir tanesidir. Lipitte yüksek oranda çözülebilmektedir. Bu yüzden deri, solunum ve sindirim yolundan hızlı bir şekilde absorbe olmaktadır. MP'nin büyük bir kısmı idrarla, bir kısmıda feçes yoluyla atılmaktadır.

3.3.1.1.2. Metil Paration' un Metabolizması

MP'nin metabolize edilmesinde dört farklı mekanizma rol oynamaktadır.

Bunlar;

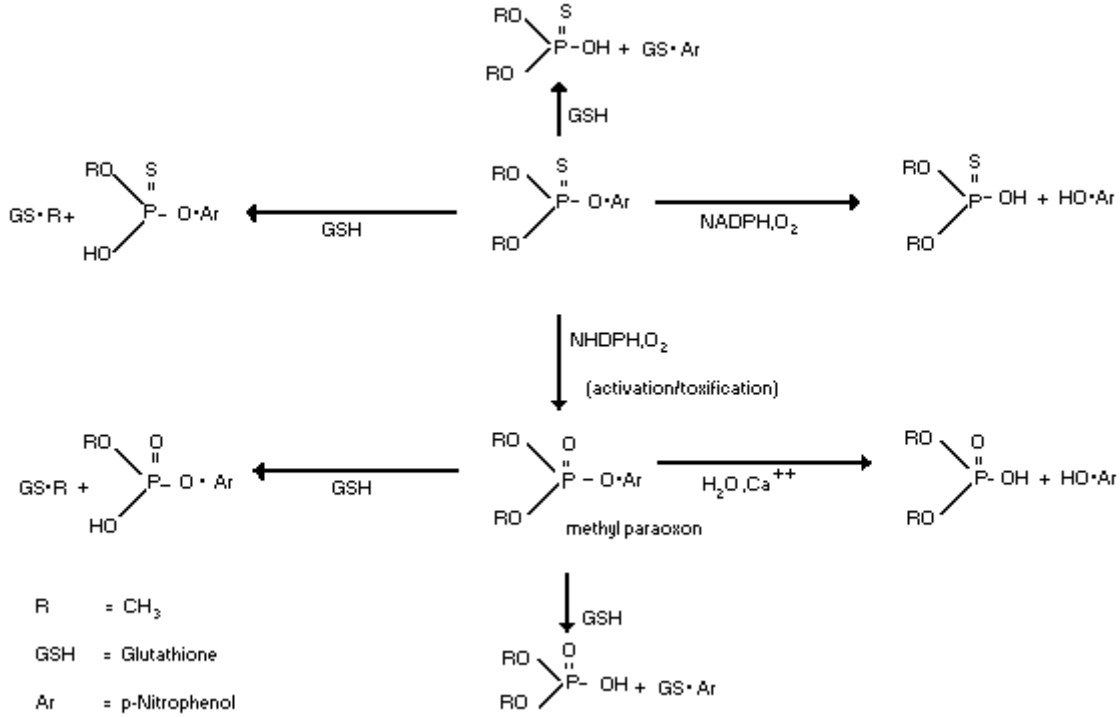
- 1- Oksidasyon
- 2- Hidroliz
- 3- Dearilasyon
- 4- Dealkilasyon 'dur.

Reaksiyonda da görüldüğü gibi, metil parationun aril grubu okside edilir ve bunun sonucunda ise dimetil tiyofosfat ve 4- nitrofenol oluşur. Daha sonra 4- nitrofenol'de glukuronidasyona uğratarak 4- nitrofenol glukuronid oluşur. Bu reaksiyonun gerçekleşmesi için NADPH gereklidir.

MP'nin enzimatik hidroliz yoluyla detoksifiye edilmesinde ilk olarak, MP oksidatif desülfürasyona uğrattılır ve bunun sonucunda da toksik bir oksijen analogu olan metil paraoksonun oluşur. Daha sonra ise oluşan metil paraokson enzimatik hidroliz yoluyla dimetil fosfat ve 4- nitrofenole dönüştürülür.

Dearilasyon basamağında glutasyon ariltransferaz enzimi MP'deki aril grubunu glutatyona transfer ederek dimetil tiyofosfat oluşumu sağlamaktadır. Bi sonraki reaksiyonda metil paraokson yine glutasyon ariltransferaz enzimi tarafından dimetil fosfat ve 4-nitrofenole dönüştürülmektedir. Bu reaksiyonlarda meydana gelen temel olay bileşiklerdeki aril grubunun

glutatyona transfer edilmesidir. MP'nin glutatyona bağlı metabolizmasında rol oynayan diğer bir detoksifikasyon yolu da bileşikteki alkil grubunun glutasyon alkiltransferaz enzimi tarafından uzaklaştırılmasıdır. Bu reaksiyon sonucunda MP'den desmetil MP, metil paraoksondan ise O- metil- 4- nitrofenol oluşur. Daha sonra bu bileşiklerde idrarla dışarı atılarak vücuttan uzaklaştırılır.(86)



Şekil.10: Mp'nin memelilerdeki mekanizması (86)

3.3.1.1.3. Metil parationun Etki Mekanizması

MP de diğer organofosfatlı insektisitler gibi hedef dokularda etkilerini Ach'i yıkan AchE'yi inhibe ederek gösterirler. Ach sinir sisteminde bulunan bir nörotransmitter maddedir. Kolinerjik sinir uçlarında kolinin enzimatik asetilasyonu ile sentez edilir. Bu olayı katalizleyen enzim, kolinasetilaz enzimidir. Asetil kaynağı mitokondrilerde sentez edilen asetil koenzim A'dır. Ach'nin sinir liflerinin uçlarında sentezlenir daha sonra yaklaşık 40 nanometre çapındaki küçük veziküllerin içerisine taşınır. Her vezikül içerisinde yaklaşık 10.000 Ach molekülü olmak üzere oldukça yoğun biçimde depolanır. Bir aksiyon potansiyeli sinir uçuna ulaştığında sinir ucu bol miktarda voltaj kapılı kalsiyum kanalına açılır. Sonuç olarak sinir ucunun içerisinde kalsiyum konsantrasyonu 100 kat artar; bu da Ach veziküllerinin sinir ucu zarıyla birleşme hızını 10.000 kat arttırır. Bu birleşme birçok vezikülün yırtılmasına neden olarak sinaptik aralığa Ach ekzositozuna olanak sağlar. Genellikle 125 kadar vezikül her aksiyon potansiyeli ile yırtılır. Daha sonra birkaç milisaniye

içerisinde Ach, AchE ile asetat iyonu ve koline parçalanır. Kolin tekrar Ach oluşturulmasında kullanılmak üzere aktif olarak sinir ucuna geri alınır. Bu olaylar zinciri 5-10 milisaniye içinde gerçekleşir. MP ve onun aktif metaboliti olan metil paraokson da etkilerini AchE enzimi inhibe ederek gösterirler (87). Metil paraokson, AchE enziminin aktif sitesini fosforile ederek enzimi inaktif hale getirir. Enzimle metil paraoksonun bağlanması ilk birkaç saat içinde geri dönüşümlü olabilir. Fakat 24–48 saat sonra daha sağlam kovalent bağların oluşması ile geri dönüşümsüz bir hal almaktadır. Enzimin fosfat grubundaki alkil yan zinciri uzaklaştırılır ve bunun yerine bir hidroksil grubu bağlanır. Bu şekilde değişime uğrayan enzimin tekrar aktivite göstermesi mümkün değildir. AchE enziminin inhibe olması sinapslarda Ach'nin hidrolizini engellemiş olur ve bunun sonucunda ise sinapslarda Ach birikmeye başlar. Bu durumda da kolinerjik reseptörlerin aşırı uyarılmasına sebep olur (88). Op' lar AchE'ın aktif kısmındaki fosfor radikallerine kovalent bağlarla bağlanarak enzimi irreversible olarak inhibe ederler. Toksisitesinin şiddeti, AchE'ın inhibisyon derecesine bağlıdır. Ach miyonöronal birleşme yerlerinde, parasempatik ve beyindeki postgangliyonerler liflerin uçlarında ve bütün otonomik ganglionlarda birikir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar bazı organofosfatların serbest oksijen radikalleri üretimini arttırarak oksidatif doku hasarına neden olduğunu göstermiştir. Serbest radikaller, özellikle DNA, protein ve hücre fosfolipitlerinin çoklu doymamış yağ asitleri olmak üzere organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girerler. DNA'yı etkileyerek karsinojenik mutasyonlara neden olabilirler (89). Karsinojenik ksenobiyotikler, hücre içindeki sitokrom p450, peroksizomlar ve mitokondriyondaki enzimatik sistemleri değiştirerek veya indükleyerek serbest radikaller oluştururlar. Serbest radikaller hücreyi koruyan enzimatik veya enzimatik olmayan antioksidan sistemleri inhibe eder veya taşıyabileceklerinden fazla yük yükleyerek onların koruma mekanizmalarını engellerler. Hücrede oksidatif hasar oluşturarak lipit peroksidasyonu, deoksiribonükleik asit hasarı veya protein değişikliklerine yol açarlar. Bunlar da azalmış gap junction aracılıklı haberleşme, transkripsiyon faktörlerinin (AP-1, NF-kB) aktivasyonu, intrasellüler kalsiyum ve pH değişiklikleri veya apoptoza yol açabilir (90).

3.4. SERBEST RADİKALLER VE REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ

Serbest radikaller yapılarında eşleşmemiş tek elektron içeren ve bu nedenle reaktif özellik taşıyan moleküllerdir. Serbest radikallerin proton ve elektron sayısı birbirine eşit olmadığından dayanıksızdır. Radikaller bir başka molekülden elektron alarak elektron çifti oluşturabilir buna oksidasyon denir veya tek elektronunu bir başka moleküle verebilir buna da redüksiyon denir. Böyle radikal olmayan bir yapının, radikal şekle dönüşmesine neden olan

moleküllere “kısaca serbest radikaller, oksidan moleküller veya en doğru şekliyle reaktif oksijen türevleri (ROS)” denir (91,92).

Serbest radikaller 3 şekilde ortaya çıkar;

1- Kovalent bağlı bir molekülün homolitik bölünmesi, Bu durumda ortaya çıkan her bir parçada ortak elektronlardan biri bulunur.

2- Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi,

3- Bir moleküle elektron eklenmesi (93).

En önemli serbest radikaller oksijen kaynaklı olup bunların bazılarını şöyle sıralayabiliriz;

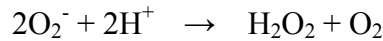
Süperoksit Radikalleri (O_2^-)

Oksijenin tek bir elektron alarak redükte duruma geçmesiyle oluşur. Serbest radikal olmasına rağmen kendi başına doku hasarı oluşturmaz. Diğer serbest radikaller için kaynak görevi görür. Ayrıca Haber-Weiss reaksiyonuyla hidroksil radikaline ve NO ile reaksiyona girerek peroksinitrit radikaline dönüşmesi söz konusudur (93).

Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

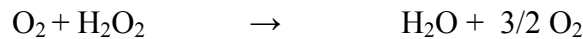
Oksijen molekülünün 2 elektronla redükte hale geçmesi ile meydana gelir. H_2O_2 yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden direk radikal değildir ancak demir, bakır gibi metal iyonlarının varlığında hidroksil radikalini oluşturduğu için zararlı olarak kabul edilen ve zararlardan kolaylıkla geçebilen, uzun ömürlü bir oksidandır. H_2O_2 üretimi dimutasyon işlemiyle de olur. Bu işlem SOD katalizöründe hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüştürür.

SOD



H_2O_2 biyolojik sistemlerde radikal oluşumuna neden olduğundan ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Bu işlem güçlü antioksidan enzimler olan GSH-Px ve katalaz katalizöründe aynı reaksiyonda gerçekleşir (94).

Katalaz/GSH-Px



Hidroksil Radikali (OH)

Hidrojen peroksitin O_2^- , Fe^{+2} , Cu^+ iyonları varlığında parçalanmasıyla oluşur. Serbest radikaller içinde en sitotoksik ve en reaktif olanıdır. Yarı ömrü çok kısa olduğundan hücre dışına çıkmadan katalize edilir. Yine de üretildiği yerde ciddi hasar yapabilir (93).

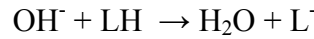
OH^- radikalinin doymamış yağ asitlerinden H^+ kopararak başlattığı tepkimelerin aksine, O_2^- doymamış yağ asitleri ile tepkimeye girerek hidroperoksitlerin oluşumuna neden olur (95).

Nitrik Oksit (NO)

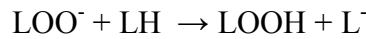
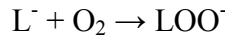
NO kolaylıkla kimyasal reaksiyona giren, çok kısa yarı ömürlü, biyolojik membranlardan hızla geçebilen bir serbest radikaldir ve süperoksitle reaksiyona girerek peroksinitrit (ONOO^-), nitrojen dioksit (NO_2) ve peroksinitroz asit (ONOOH) gibi sitotoksik radikallere dönüşür (93).

Peroksil Radikali (LOO^-)

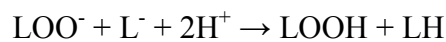
Lipit peroksidasyonu, serbest radikaller ile başlayan, membranlarda bulunan fosfolipitlerin çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olan ve böylece membran lipit yapısını değiştirerek hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan kimyasal bir olaydır (96). Lipit peroksidasyonunda zincirleme reaksiyonların başlatılması için tetikleyici faktör gereklidir. Bu faktörün OH^- radikali olduğu kabul edilmektedir. Lipit peroksidasyonu, çoklu doymamış yağ asitlerinin zincirleme bir radikal reaksiyonudur ve üç aşamadan oluşur (97). Başlama safhasında OH^- radikali, bir yağ asidinin (LH) metilen molekülünden bir hidrojen atomu (H^+) kopararak bir lipit radikali (L^-) oluşturur. Bu reaksiyon hem membran lipitleri hem de besinsel yağlar için geçerlidir.



İlerleme ve yıkım safhası zincirleme reaksiyona uğrayan lipit radikaline O_2 ilavesi ile devam eder ve lipit peroksil radikali (LOO^-) ile lipit peroksit oluşur.



Tek elektron üzerinden yeniden yapılanma lipidin parçalanması ile sonuçlanır. Üç veya daha fazla çift bağa sahip yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu malon dialdehit (MDA) oluşmaktadır. Oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanmasına ve polimerizasyonuna neden olur. Sonuç olarak deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi intirensel membran özelliklerini değiştirir. Bu yıkım ürünleri mutajeniktirler. DNA veya proteinlerle reaksiyona girebilirler (98,99).
Sonlanma safhası: Zincir reaksiyonu antioksidanlar tarafından sonlandırılabilir.



Reaktif Oksijen Partikülleri

Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit radikali (O ₂ -)	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)
Hidroksil radikali (OH-)	Lipid hidroperoksit (LOOH)
Alkoksil radikali (LO-)	Hipoklorit (HOCl)
Peroksil radikali (LOO-)	Singlet oksijen (.O ₂)

Şekil.11: Reaktif oksijen partikülleri

3.4.1. SERBEST RADİKALLERİN ETKİLERİ:

3.4.1.1. Proteinlere Etkileri:

Doymamış bağ ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallerle reaktivitesi yüksek olduğu için; triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metyonin, sistein gibi aminoasitleri içeren proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Glutasyon redüktaz ve gliseraldehit 3 fosfat dehidrojenaz gibi reaktiviteleri için yukarıdaki aminoasitlere bağımlı olan enzimler, serbest radikallerden kolaylıkla etkilenerek inhibe edilirler (100,101).

Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerde fragmantasyon ve çapraz bağlanmalar meydana gelebilir. Bunlar da protein fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir.

3.4.1.2. Nükleik Asitler ve DNA'ya Etkileri:

DNA yapısında oksidatif hasara yol açan birçok faktör vardır. Bunlar (iyonize radyasyon, çeşitli kimyasallar) aşırı derecede serbest radikaller meydana getirip direkt olarak DNA'da hasara yol açabilirler. Direkt etkinin yanında DNA'da tamir defektleri oluşturup da hasara yol açabilirler. Oluşan bu serbest radikaller, DNA'yı etkileyerek hücrede mutasyonlara ve ölüme yol açarlar (102).

3.4.1.3. Membran Lipidlerine Etkileri:

Hücre membranı serbest radikaller için kritik bir bariyerdir, çünkü serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim için bu bariyeri geçmek zorundadırlar. Lipid peroksidasyonu serbest radikallerin en önemli etkilerindendir. Lipid peroksidasyonu kuvvetli yükseltgeyici bir radikalın etkisiyle başlayan ve membran yapısındaki doymamış yağ asitlerinin yıkımıyla sonuçlanan kimyasal bir olaydır. Lipid peroksidasyonu lipid hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşiklerine dönüşmesiyle son bulur. Bu ürünlerden başlıcaları olan malonildialdehit ve 4-hidroksinonenal (4-HNE), proteinlere ve DNA'ya bağlanarak kalıcı değişiklikler oluştururlar (102).

3.4.2. **SERBEST RADİKALLERİN KAYNAKLARI**

Endojen ve eksojen kaynaklı olarak iki gruba ayırabiliriz:

3.4.2.1. **Endojen kaynaklar:**

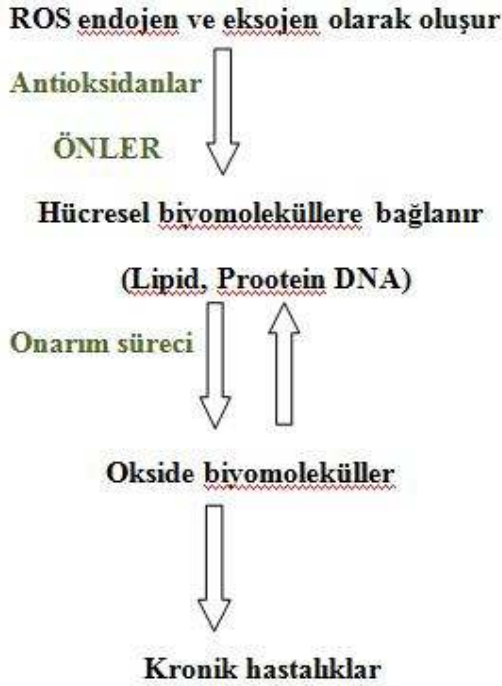
- Tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiyotikler gibi küçük moleküllerin otooksidasyonu
- Çözünür enzimler ve proteinler; ksantin oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz, triptofan dioksijenaz, dihidroorotat dehidrogenaz, aminoasit oksidaz gibi enzimler, hemoglobin vb.
- Hücre mitokondriyumunda bulunan elektron transport sistemi
- Peroksizomlarda bulunan enzimler ve nükleus membranı ve endoplazmik retikulumda bulunan elektron transport sistemleri
- Peroksizomlar; oksidazlar, flavoproteinler
- Plazma membranı; lipoksijenaz, NADPH oksidaz, prostaglandin sentetaz, lipid peroksidasyonu.
- İntoksikasyon, iskemi, travma gibi durumlara bağlı olarak meydana gelen oksidatif stres
- Makrofaj gibi fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlama

3.4.2.2. **Eksojen kaynaklar:**

- Pestisitler, sigara, solventler, anestezikler, hava kirliliği, elektromanyetik alan, hiperoksijenasyon
- İyonizan radyasyon, stres
- Alkol, uyuşturucu, karsinojen maddeler, sıcak şoku güneş ışınları
- Metotreksat, cisplatin, doksorubisin, bleomisin gibi çeşitli antineoplastik ajanlar (82,103)

3.5. **ANTIOKSİDAN MADDELER**

Antioksidanlar, hücrede ve hücreler arası sıvadaki serbest radikalleri etkisiz hale getiren maddelerdir. Oksidan – antioksidan dengesinin bozulması sonucunda, antioksidan mekanizmalar bozulur, bu olaya deplasyon denir. Deplasyon durumunda serbest radikal etkinliği artarak hücre zedelenmesine ve ölümüne neden olur (82). Oksijen kaynaklı serbest radikallerin başlattığı oksidatif hücre hasarı olayına oksidatif stres denir.



Şekil.12: Antioksidanların ROS üzerine etki yolağı (104).

Oluşan serbest radikallerin toksisitesi ya direkt olarak radikal temizleyicilerle yada indirekt olarak antioksidanlarla antagonize edilir. Direkt radikal temizleyiciler, radikallerin başlattıkları zincirleme reaksiyonları ilk basamaklarda durdurarak radikallerin etkisinin artmasını engel olurlar. İndirek radikal temizleyiciler ise radikal süpürücü etki ile reaksiyona girmezler, daha zararsız moleküllere dönüştürerek veya diğer moleküllerden serbest radikal oluşmasını engelleyerek antioksidan etki gösterirler (105).

Endojen ve eksojen kaynaklı olmak üzere antioksidanlar 2 gruba ayılır.

Endojen Antioksidanlar

Enzimatik Endojen Antioksidanlar

- Süperoksit Dizmutaz (SOD)
- Katalaz (CAT)
- Glutasyon peroksidaz (GPx)
- Glutasyon redüktaz
- Glutasyon -S- transferaz
- Mitokondrial sitokrom oksidaz
- Hidroperoksidaz

Enzimatik Olmayan Endojen Antioksidanlar

Makromoleküler Antioksidanlar

- Seruloplazmin
- Transferin
- Ferritin
- Hemoglobin
- Myoglobin

Mikromoleküler Antioksidanlar

- Vitamin E, C,A
- Tiyol içerenler
- Glukoz
- Ürik asit
- Bilirubin
- Albumin
- Melatonin
- Selenyum

Eksojen antioksidanlar

Vitamin eksojen antioksidanlar

- α -tokoferol (vitamin E)
- β -karoten
- Askorbik asit (vitamin C).
- Folik asit (folat)

İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar

- Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol, aldehit, tungsten)
- NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar, (diphenylene iodonium))
- Rekombinant süperoksit dismutaz
- Trolox-C (vitamin E analogu)
- Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran ebselen ve asetilsistein)
- Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
- Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)

- Nötrofil adezyon kuvvet inhibitörleri
- Sitokinler (TNF ve IL-1)
- Barbitüratlar
- Demir şelatörleri

Gıdalardaki eksojen antioksidanlar

- Butylated hydroxytoluene (BHT)
- Butylated hydroxyanisole (BHA)
- Sodium benzoate
- Ethoxyquin
- Propylgalate
- Fe-superoxyde dismutase
- **LİKOPEN**

3.6. ANTIOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Yaşam sürekliliği açısından hücrelerde hemostazis önem taşımaktadır. Normal şartlarda çeşitli stres faktörleri hücrel dengeyi sürekli değiştirmektedir. Bu stres yapan faktörlere karşı korunmada, hücrenin kendi geliştirdiği ve serbest radikal zincir reaksiyonlarını inhibe eden bazı bileşikler rol almaktadır (106). Endojen antioksidan savunma sistemi sayesinde bütün dokuların oluşan oksijen radikallerini bir dereceye kadar nötralize etme yetenekleri vardır. ROS, hücrel savunma mekanizmasını harekete geçirmektedir (107). Antioksidan savunmada fizyolojik ve farmakolojik stratejiler önemlidir. Bunlar arasında koruma, önleme ve yenileme bulunmaktadır(108). Antioksidanlar aşağıdaki mekanizmalardan biri ile oksidanları inaktif duruma getirmektedir.

3.6.1. ANTIOKSİDAN ETKİ TİPLERİ

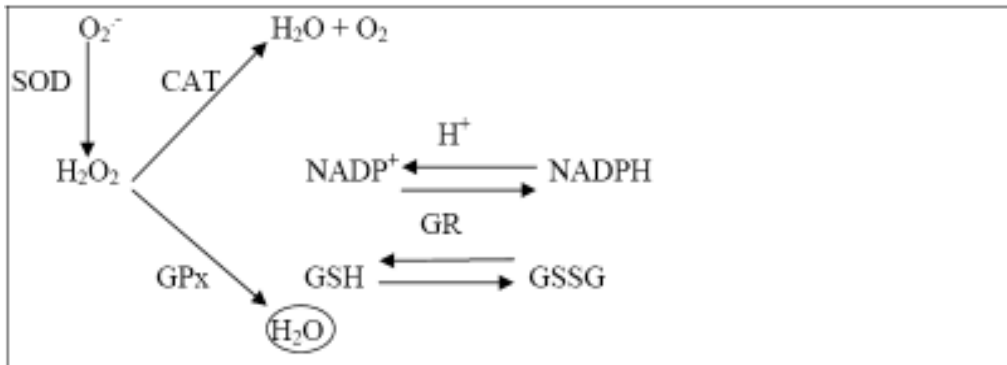
- a. Toplayıcı etki
- b. Bastırıcı etki
- c. Onarıcı etki
- d. Zincir kırıcı etki

Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine “toplayıcı etki” denir. Bu etki antioksidan enzimler SOD, GPx ve CAT tarafından gerçekleştirilir. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan veya inaktif şekle dönüştüren olaya “bastırıcı etki” denir. Vitaminler, flavonoidler, trimetazidin, mannitol ve antosiyanidinler böyle etkiye sahiptir.

Serbest oksijen radikallerini kendilerine bağlayarak (hemoglobin gibi) zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye “zincir kırıcı etki” denmektedir.

Normal şartlar altında tepkimeli oksijen türleri singlet oksijen ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 'yi ve organik hidroperoksitleri içermektedirler ve bunların seviyesi endojen antioksidan enzimlerden olan SOD, GPx ve CAT tarafından kontrol edilmektedir (107,109). Antioksidan savunma sistemi ile enzimatik ve non-enzimatik bileşikleri içerdiğinden koruma gerçekleşmektedir. Enzimatik bileşenleri arasında SOD, CAT ve GPx bulunmaktadır (82). SOD, $O_2^{\cdot-}$ 'in H_2O_2 'e dönüşümünü sağlamaktadır. H_2O_2 , GPx ve CAT sayesinde $O_2^{\cdot-}$ ve H_2O 'ya dönüşmektedir (107). GPx, redükte glutasyonu (GSH), okside glutasyon (GSSG) formuna oksitleyen, sitozol ve mitokondride SOD tarafından üretilen H_2O_2 'i uzaklaştıran temel enzimdir. Lipid peroksitlerinin indirgenmesini de katalizler. Glutasyon redüktaz (GR), okside glutasyonun, GSH dönüşümünü sağlayarak dolaylı antioksidan etki göstermektedir (82). Enzimatik olmayan endojen antioksidan savunma sisteminin en önemli bileşeni olan glutasyon, karaciğerde, genetik bilgiye gerek olmadan glutamat, sistein ve glisinden sentezlenebilen bir tripeptiddir. Çok önemli bir antioksidan olan glutasyon, serbest radikal ve peroksitlerle reaksiyona girerek hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Şekil 13'de organizmadaki endojen antioksidan mekanizması gösterilmiştir (110).

SOD, temel antioksidan enzimdir. 3 çeşidi vardır: Sitoplazmik- Mitokondrial- Hücre dışı SOD Cu-Zn ve Mn içeren iki tip enzimden, Cu-Zn içereni sitoplazmada, diğeri ise mitokondride bulunmaktadır (111). Mitokondrinin, serbest radikal üretiminin kaynağı olabileceği düşünülmektedir. $O_2^{\cdot-}$, mitokondriyal aktiviteyle solunumda oluşmaktadır. Mitokondri aktif SOD içerdiğinden, H_2O_2 'nin artışına sebep olmaktadır. H_2O_2 ise mitokondriyal GPx aktivitesini bozmaktadır (112). Oksidanların olduğu durumlarda GSH'ın yükseltgenmiş formu GSSG oluşmaktadır. Oksidanların uzaklaştırılmasında etkili olan bu reaksiyon GPx tarafından katalizlenmektedir. İndirgenmiş GSH oluşumu, NADPH oksidasyonuna dayanan GSSG'un indirgenmesi ile gerçekleşmektedir (113).



Şekil.13: Organizmadaki endojen antioksidan mekanizması

3.6.2. LİKOPEN

Bitkisel antioksidanların iki önemli sınıfı karotenoidler ve polifenollerdir. Karotenoidler, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen pigmentlenmiş bileşiklerin bir ailesidir. Tetraterpen yapısında olup 600'den fazla doğal çeşidi bulunmaktadır. Hayvanlar ve insanlar tarafından sentezlenmeyip dışarıdan besinlerle alınırlar. Karotenoidler meyve ve sebzelerde mikro komponentler olarak bulunurlar ve onlara genellikle sarı, turuncu, kırmızı renklerini veren pigment bileşikleridir. (114). Karotenoid bakımından zengin gıdaların tüketilmesinin sağlık açısından önemli faydalarının olduğu bilinmektedir. Bu faydaların çoğu da oksidatif hasara karşı koruyucu özelliğine dayanmaktadır. Karotenoidlerin antioksidan özellikleri reaktif oksijen türevlerini yakalama yeteneğine bağlıdır (115).

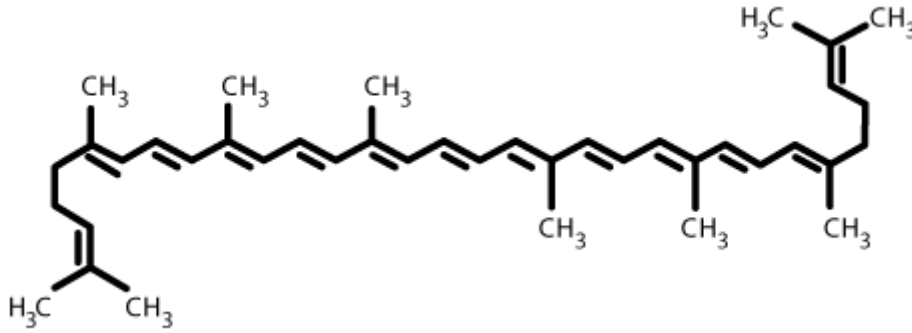
Karotenoidler üzerine yapılan bir çalışmada, antioksidan aktivitenin; likopen> - tokoferol> -karoten> β -kriptoksantin> zeaksantin = β karoten > lutein sırasıyla değiştiği bildirilmiştir (116). LKP, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından fotosentez esnasında ışığı emmek ve fotosensitizasyona karşı korumak için sentezlenen doğal bir pigmenttir. Domates, işlenmiş domates ürünleri guava (tropikal bir meyve), kuşburnu, karpuz, kayısı ve pembe greyfurt gibi birçok meyve ve sebzeye kırmızı rengini veren LKP'dir (117,118,119).

KAROTENOİD KONSANTRASYONLARI (MG/100G)*										
Gıdalar	likopen	α -karoten	β -karoten	γ -karoten	nörosporen	ζ -karoten	fitofluen	fitoten	lutein	Zeaksantin
Salça	55,45	0	1,27	9,98	6,95	0,84	3,63	8,36	0,34	0
Domates sosu	17,98	0	0,45	3,17	2,48	0,29	1,27	2,95	eser	0
Ketçap	17,23	0	0,59	3,03	2,63	0,33	1,54	3,39	0	0
Domates püresi	16,67	0	0,41	2,94	2,11	0,25	1,08	2,40	0,09	0
Makarna sosu	15,99	0	0,44	3,02	3,15	0,34	1,56	2,77	0,16	0
Domates suyu	10,77	0	0,27	1,74	1,23	0,18	0,83	1,90	0,06	0
Domates	9,27	0	0,23	1,50	1,11	0,21	0,82	1,86	0,08	0
Greyfurt	3,36	0	2,34	1,38	0,38	0	0,01	0,02	0	0
Papaya	2,52	0,02	0,22	0,01	0,05	0,19	0,44	0,68	0,02	0,02
Kayısı	0,01	0,02	1,59	0,08	0	0,04	0,36	0,59	0,09	0
Kuru Kayısı	0,86	1,60	8,56	0,13	0	0,14	2	2,27	0,36	0
Portakal	0	0,02	0,06	0,004	0,01	0,1	0,06	0,08	0,35	0,25

Şekil.14: Doğada bulunan karotenoid konsantrasyonları (120).

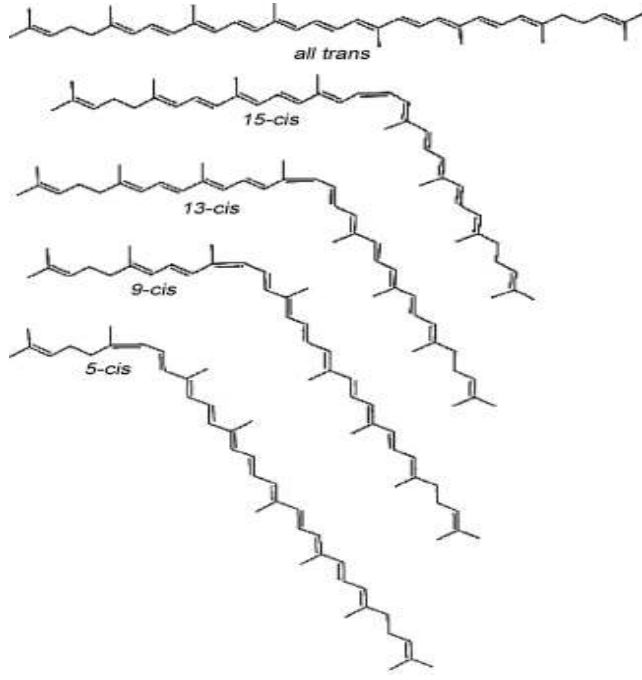
3.6.2.1. Likopenin Kimyasal Yapısı

Karotenoidlerin antioksidan özellik ve fonksiyonları onların kimyasal yapılarından kaynaklanır. Çünkü bu yapıda tekli ve konjuge çift bağı bir sistemde 40 C üniti (C=C) kuyruk kuyruğa bağlanarak tetraterpen yapıda uzar (Şekil.15). Bu özellik de onların O_2^- , toplamalarına izin verir Karotenoidlerin bu radikal toplama özellikleri sayesinde, çoğu epidemiyolojik olan çalışmalarla, kanser, kalp rahatsızlıkları, dejeneratif göz hastalıkları gibi ciddi rahatsızlıklara karşı koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir (121,122). LKP tüm karotenoidlerde olduğu gibi asitlik $C_{40}H_{56}$ yapısından türemiştir. LKP, düz bir sıra halinde düzenlenmiş 11 adet çift ve 2 adet tekli bağ içeren hidrokarbon zincirin açık formundan oluşur. Alfa-karoten zincirinin sonunda açık bir β -halkası bulunur.



Şekil.15: Likopenin kimyasal yapısı

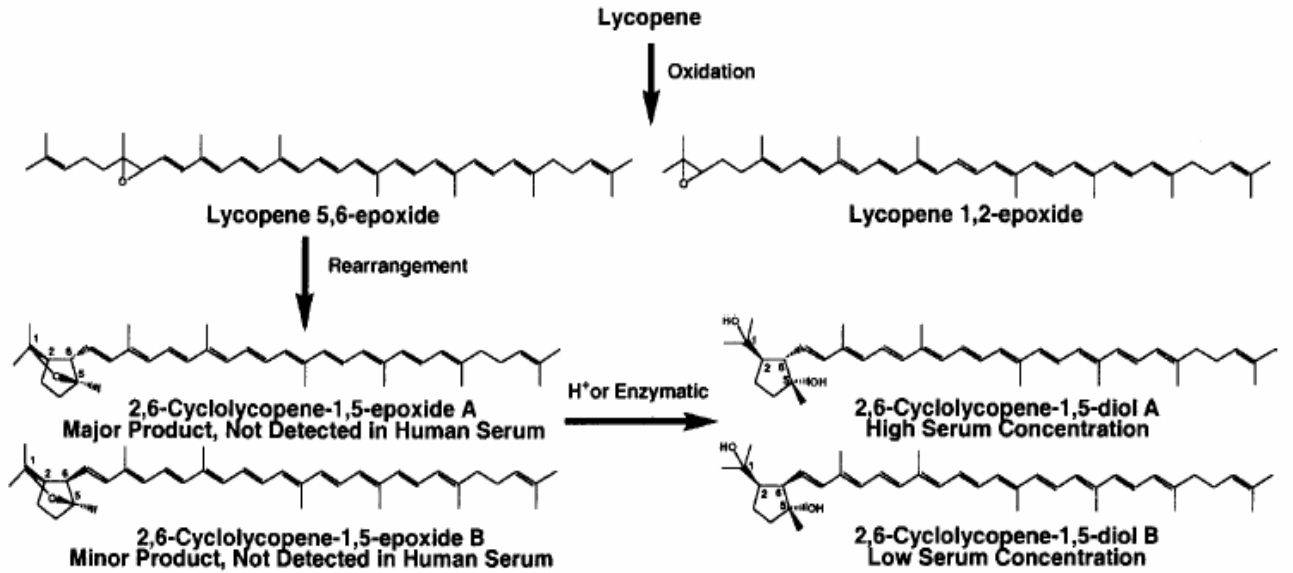
Kimyasal reaksiyonlarda yüksek veya düşük enerjide bu bağlar trans formundan mono veya poli cis izomerizasyonuna maruz kalabilir. LKP genellikle tüm trans ve 5-cis, 9-cis, 13-cis ve 15-cis izomeri formu ile tanınır (123,124).



Şekil.16: Likopenin cis- trans izomerik formları

Doğada LKP başlıca bütün izomerik formlarında bulunmaktadır (125). Ancak, onun cis izomerik formu ışık, termal enerji ve kimyasal reaksiyonlarla mono veya poli izomerizasyona uğrayabilmektedir. Son derece stabil bir molekül olmakla birlikte oksidatif, termal ve fotodegradasyona uğrayabilir. Çalışmalar LKP'nin termal işlem ve depo şartları altında stabil olacağını göstermiştir (126). LKP insan vücudunda yaygın olarak dağılmıştır ve serumda bulunan asıl karotenoidlerden biridir. Karaciğer, böbrek, adrenal bezler, testis, over ve prostat gibi farklı dokularda da bulunur (127,128). Plazma ve dokulardaki LKP düzeyleri diyetle alınımına bağlıdır. LKP'nin biyolojik aktivitesinin başlıca antioksidan özelliklerine dayandığı düşünülmektedir. Bununla birlikte gap junction iletişimi kolaylaştırmak, immün sistemin uyarılması, endokrin aracılı yollar ve hücre döngüsünün düzenlenmesi gibi diğer mekanizmalar da öne sürülmüştür. LKP'nin cilt üzerine antioksidan koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. LKP, cilt hücreleri arasındaki bağları kuvvetlendirmektedir. Diğer bir yararlı etkisi, ultraviyole ışınlarına karşı koruma sağlamasıdır. LKP aynı zamanda kolesterol düşürücü özelliğe de sahiptir. LKP göğüs, rahim, karaciğer, prostat kanserlerine karşı koruyucu etkiye sahiptir ayrıca kalp damar hastalıkları, kemik ve cilt sağlığı açısından koruyucu etkisi bulunan LKP, antioksidan özelliğiyle yaşlanma sürecini de yavaşlatmaktadır (129,130). LKP'nin emilimi diğer yağda çözünebilir bileşiklere benzemekle birlikte sölomikron aracılı bir mekanizma ile sindirim kanalından olmaktadır. LKP besinlerle alındıktan sonra lipit misellerle birleşip pasif difüzyonla intestinal mukozadan emildikten sonra sölomikronlarla birleşerek karaciğere taşınmak için lenfatik sisteme salıverilmekte ve

daha sonra da lipoproteinlere bağlanarak farklı organlara taşınmaktadır. Besinlerle alınan LKP'nin insanlarda % 10-30 kadarı emilir. İşlenmiş domates ürünlerindeki LKP'in çiğ domatesle kıyaslandığında daha iyi emildiği bildirilmiştir (123). İşlenmiş domates ürünlerinden LKP'in artmış emilimi, LKP'in cis-izomerinin biyoyararlanımının trans-izomerinden daha fazla olması ile ilişkilidir. Çünkü cis izomerler safra asit misellerde ve birleştiği sölomikronlarda daha fazla çözünmektedir (123). LKP doğal lipofilik karakterde olduğundan düşük dansiteli lipoprotein (LDL) ve çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) yapılarında yer alırken yüksek dansiteli lipoproteinlerde (HDL) bulunmaz. LKP emildikten sonra çeşitli organlara taşınır ve dokularda birikir. LKP testis, karaciğer, prostat ve adrenal bezlerde en yüksek konsantrasyonlarda bulunur. LKP ve oksidasyon ürünleri insan sütü ve diğer vücut sıvılarında mevcuttur (130,131).



Şekil.17: Likopen oksidasyon mekanizması

LKP ile m-kloroperbenzoik asid oksidatif reaksiyonları ile ilk ürünün 1,2 ve 5,6 pozisyonlarında okside olduğu saptanmıştır. LKP 1,2-epoksit oldukça stabil özellikte iken 5,6 epoksit türevi anstabilidir ve kolayca siklize olarak 2,6 siklolikopen-1,5-epoksit A ve B karışımları haline gelir. Her ne kadar insan serumunda bu ilk türevler saptanamamışsa da uygun olan siklik dioller 2,6-siklolikopen1, 5-diolleri tesbit edilmiştir. LKP metabolitlerinin domates kökenli ürünlere bağlı olabileceği düşünülse de serumdaki bu metabolitlerin miktarı domates ve domates kökenli ürünlerdeki düşük miktarlardaki LKP miktarı ile açıklanamamakta, bu neden ile insan serumundaki LKP metabolitlerinin kaynağı çok iyi anlaşılamamaktadır (132,133,134).

3.6.3. TESTİS, REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİ VE ANTIOKSİDAN SİSTEM

Spermatogenez, spermatogoniumların proliferasyonu, mayoz ve spermiyogenez aşamalarından oluşan erkek germ hücre gelişiminde kompleks bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyel oksijen tüketimini göstermektedir. Testisteki zayıf vaskülarizasyondan dolayı testisteki oksijen miktarı düşüktür. Hem spermatogenez hem de Leydig hücresi oksidatif stresle hasar görebildiği için testisteki düşük oksijen miktarı, testisi serbest radikallerin hasarından koruyabilecek mekanizmaların başında gelmektedir (135,136).

Testis serbest radikallerin hasarından korunabilmek için çeşitli antioksidan enzimler ve serbest radikal temizleyicilere sahiptir. Bu antioksidan savunma sistemleri oldukça önemlidir, çünkü peroksidatif hasar testiküler torsiyondan diyabete ve ksenobiyotik maruziyeti gibi koşullarda patolojik sonuçları destekleyen bozuk testiküler fonksiyonun tek önemli sebebiymiş gibi kabul edilir (137,138). Testiküler mikroçevredeki düşük oksijen miktarına rağmen testis; fazla miktarda doymamış yağ asitlerinin ve ROS oluşturan sistemlerin varlığı nedeniyle, oksidatif sitrese karşı hassas hale gelmektedir. ROS; mitokondriden ve ksantin- ve NADPH- oksidazları içeren çeşitli enzimlerden ve ayrıca sitokrom P450'lerden oluşabilir. Testis ROS karşı hem enzimatik hem de non-enzimatik öğelerden oluşan antioksidan sistemler içermektedir (139,140).

SOD; süperoksit anyonu hidrojen perokside ve oksijen molekülüne dönüştüren ve antioksidatif reaksiyonların tam ortasında rol oynayan önemli bir enzimdir. SOD1 (CuZnSOD) sitosolik, SOD2 (MnSOD) mitokondriyal, SOD3 (ECSOD) ekstraselüler olmak üzere 3 izozimi vardır. Testiste her 3 formu da vardır (141).

4. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma, MP'nin testiste oluşturduğu toksik hasara LKP'nin koruyucu etkisini incelemek amacı ile deneysel olarak oluşturulmuştur.

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Biriminden (DETFAB) temin edilen, Wistar suşu toplam 30 erkek sıçan (250-300gr) kullanıldı. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür seçildi. Tüm hayvanlar deney sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırıldı. Hayvanlar dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslendi.

5 çalışma grubu oluşturuldu. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlendi:

I. grup; Kontrol grubu: Ab libutum beslenen hiçbir madde uygulanmamış bazal değerler için kullanılan deney grubu (n=7)

II. grup; Sham grubu: MP eklenmemiş 0,5 ml mısır yağı 28 gün süre ile oral gavaj (o.g) yöntemiyle verildi.(n=7)

III. grup LKP grubu: (4 mg/kg /gün) LKP 0,5 ml mısır yağı içinde çözdürülerek 28 gün süre ile o.g yöntemiyle verildi (n=7)

IVgrup; MP deney grubu: 0,28mg/kg (1/50 LD50 mg/kg/gün) MP 0.5 ml mısır yağı içinde çözdürülerek 28 gün süre ile o.g yöntemiyle verildi.(n=7)

V. grup; MP+LKP deney grubu: 0,28mg/kg (1/50 LD50 mg/kg/gün) MP 0,5 ml mısır yağı içinde çözdürülerek (4 mg/kg/gün) LKP ile birlikte 28 gün süre ile o.g yöntemiyle verildi(n=7).

MP'nin toksik etkisine karşı araştırmacı ve personel maske ve eldiven kullanıldı. Toksik maddelerin hazırlanması inhalasyonla zehirlenme riskine karşın çeker ocakta yapıldı. Sakrafikasyondan sonra hayvanlar ve ortaya çıkan atıklar, tıbbi atık torbalarına alınarak deney hayvanları multidisiplin laboratuvarı tarafından hastanenin imha bölümüne gönderilerek kurallara uygun koşullarda yok edildi.

Tüm bu çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Etik Kurulu'nun 72/2008 protokol no'lu 08.08.2008 gün ve 90 sayılı etik kurulu onayı doğrultusunda gerçekleştirildi.

4.1. METİL PARATİON' UN HAZIRLANIŞI

MP, 98% lik saflıkta Zirai Mücadele Merkezi, (Ankara, Türkiye) den temin edildi. 1/50 LD50 (0,28mg/kg) MP dozu hazırlamak için herbir gruptaki ratların ortalama ağırlıkları 270 gr olarak hesaplandı. Bir ratın günlük alması gereken dozaj 0,075 mg MP olarak hesaplandı. 0,075 mg MP 'yi elde edebilmek için 500 ml MP solüsyonu içerisinde 360 mg solüsyon alındı. Bu solüsyon 1' e 10 distile su ile dilue edilerek ratlara 0,5 ml yağ içerisinde 20 µl MP solüsyonu o.g ile verildi.

4.2. LİKOPEN' İN HAZIRLANIŞI

Lycopene 10%FS (Redivivo TM, Code 7803) DSM Nutritional Products (İstanbul Türkiye) den temin edildi. 4 mg/kg LKP dozu hazırlamak için her bir gruptaki ratların ortalama ağırlıkları 270 gr olarak ölçüldü. Bir ratın günlük alması gereken dozaj 1,1 mg LKP olarak hesaplandı. 1,1 mg LKP elde edebilmek için (50gr içerisinde 5mg saf LKP bulunan solüsyondan) 11mg ratlara 0,5 ml yağ içerisinde o.g uygulaması ile verildi.

4.3. DOKU ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

Deney süresi biten sıçanların ağırlıkları sakrifikasyondan önce hassas terazi ile tartıldı. Sonra sıçanlar eter anestezisi altında perfüze edildi. Perfüzyonun ardından testis dokuları çıkarıldı. Sol testisleri ışık mikroskopik inceleme için %10'luk tamponlu formaldehide sağ testisleri elektron mikroskopik inceleme için %2,5'luk gluteraldehide ve spektrofotometrik ölçüm için buz içerisinde muhafaza edildi homojenat hazırlandı ve -80 °C ye kaldırıldı. %10'luk tamponlu formaldehitte 2 gün bekletilen testis dokuları rutin histolojik takip işlemlerinden geçirildi.

4.4. RUTİN İŞİK MİKROSKOBİK DOKU TAKİBİ PROTOKOLÜ

Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi.

- %70'lik alkol (20 dk.)
- %80'lik alkol (20 dk.)
- %96'luk alkol (20 dk.)
- %96'luk alkol (20 dk.)
- Aseton 1 (20 dk.)
- Aseton 2 (20 dk.)
- Aseton 3 (20 dk.)
- Aseton 4 (20 dk.)
- Ksilol 1 (30 dk)
- Ksilol 2 (30 dk)

- Parafin 1 (1 saat)
- Parafin 2 (1 saat)

Dokular parafine gömüldü. Mikrotom yardımıyla dokulardan 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak örnekler lizinli lamlara alındı. Örneklerin bir kısmı Hematoksilen-Eosin (H&E) boyası ile rutin ışık mikroskopunda incelenmek üzere boyandı. Alınan 5'er µm'lik kesitler 24 saat 60°C etüvde bekletildikten sonra TUNEL yöntemiyle boyandı.

4.4.1. **JOHNSEN TESTİKÜLER BİYOPSİ SKORU**

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

Şekil.18: Johnsen Testiküler Biyopsi Skor Tablosu

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

4.4.2. PAS (PERİYODİK ASİT ŞİFF) PROTOKOLÜ

Lizinli lamlara alınan 5 µ'luk kesitler 56–60 °C da bir gece etüvde bekletildi. Şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidratasyon sağlanarak 1-2 dakika distile suda bekletildi. Pappen ile boyanacak alan çizildi. Doku üzerine Periyodik asit damlatıldı oda ısısında 23 dk bekletildi. Musluk suyu ile yıkandı. 1dk musluk suyunda bekletildi. Kurutma kâğıdı ile etrafı temizlenen dokular üzerine Şiff damlatıldı 20 dk oda ısısında bekletildi. Musluk suyu ile yıkandı. 5 dk musluk suyunda bekletildi. Kurutma kâğıdı ile etrafı temizlenen dokular üzerine hematoksilen damlatıldı, 1,2 dk bekletildi. Musluk suyu ile yıkandı. 5 dk musluk suyunda bekletildi. Artan Alkol serilerinden geçirildi (%100, %96, %80, %70) 20'şer dk 3 değişim ksilolde bekletildi. Entellan ile kapatıldı.

4.5. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELER

4.5.1. TUNEL PROTOKOLÜ

DNA fragmantasyonu TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate DNA nick-end labelling) kiti ile gösterildi. Bu yöntemde biyotinlenmiş nükleotid, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzimini kullanarak DNA'nın 3'-OH ucuna bağlanır. Daha sonra işaretlenmiş streptavidin bu biyotinlenmiş nükleotidlere bağlanır. Bu prosedüre göre fragmanite nükleuslar koyu kahverengi olarak boyanır. DNA kırığının antikör ile terminal uçtan işaretlenmesi esasına dayanır. Hazır kit solüsyonlarından birinci şişe enzim solüsyonu ikinci şişe işaretleme (Label) solüsyonudur. Boyamaya başlanmadan önce bu solüsyonların karıştırılarak TUNEL reaksiyon karışımının hazırlanması gerekir. Bunun için ikinci şişeden 100µl negatif kontrolde kullanılmak üzere ayrıldı. Kalan stok solüsyonun üzerine ilk şişeden 50µl eklendi iyice vortekslendi. Böylece 500µl lik reaksiyon karışımı elde edildi. 400µl %30luk stok H₂O₂ (Hidrojen peroksit) 3,6 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) ile karıştırılarak %3'lük H₂O₂ hazırlandı. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizildi ve lamlar PBS ile yıkandıktan sonra belirlenen alana %3'lük H₂O₂ konuldu ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi. Preparatlar PBS ile yıkandı. Belirlenen alanın etrafındaki fazla sıvı alındıktan sonra reaksiyon karışımı dokunun tamamını kapatacak şekilde konuldu ve 60dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı. 3 kez PBS ile yıkayıp fazla sıvısı kurulan lamların üzerine 50µl Converted POD (3.şişe) ilave edildi ve 30dk 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Bu süre içinde bir sonraki basamakta kullanılacak olan DAB yarım saat önceden hazırlandı. Bunun için 300 µl DAB substratı 2700 µl DAB dilisyonu ile karıştırılarak ve

karanlık bir yerde bekletildi. İnkübasyon süresi sonunda 3 kez PBS ile yıkayıp fazla suyu alınan lamın üzerine, hazırlanan DAB solüsyonunu koyulup yaklaşık 2dk beklenildi. Preparatlar distile suyla yıkandı. Lamaların üzerine Harris Hematoksilen konulup 10-15 sn beklenecek zemin boyaması yapıldı ve yine distile suyla yıkandı. Lamalar kurutulmadan alkol ve ksilol serilerinden geçirilip entellan ile kapatıldı.

4.5.2. AKTİF KASPAS IHC PROTOKOLÜ

İmunohistokimyasal analizler, hücre ve dokulardaki var olan özel proteinlerin belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Aşağıda belirtilen üç temel adım uygulanır:

- 1) Primer antikor özel antijene bağlanır,
- 2) Antijen-antikor kompleksi, bir konjugasyon enzimi yardımıyla ikinci bir antikorla bağlanır,
- 3) Substrat ve kromojen varlığında, bu enzim antijen-antikor bağlanma bölgesinde renkli bir depozite dönüşür. Görünüm ışık mikroskopunda histopatolojik olarak değerlendirilir.

Lizimli lamlara alınan 5 µ'luk kesitler 56–60 °C da bir gece etüvde bekletildi. Şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Sırasıyla %96, %80, %70 azalan alkol serilerinden geçirilip hidrasyon sağlanarak 5' er dakika iki değişim distile suda bekletildi. Boyanacak alanın etrafı PapPen ile çizilerek alan kısıtlandı ve dokuların PBS ile yıkandı. Kurutma kâğıdı ile PBS' i alınan dokular üzerine proteinaz K damlatılarak 37 °C de 30 dk tutuldu. Etüvden çıkarılan dokular PBS ile yıkandı. 400µl %30luk stok H₂O₂ (Hidrojen peroksit) 3,6 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) ile karıştırılarak %3lük H₂O₂ hazırlandı. ve doku üzerine damlalık yardımı ile Endojen peroksidazı inhibe etmek amacı ile 15 dakika %3'lük H₂O₂ konuldu ve 10 dk. oda sıcaklığında bekletildi. PBS ile yıkandı. Kesitler 1 saat bloklama solüsyonu ile inkübe edildi. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırılıp yıkama yapılmadan, 1/50 oranında hazırlanmış olduğumuz primer antikor 1 gece +4° C de bekletildi. PBS ile yıkandı. Kesitler anti-mouse biotin sekonder antikor karışımında (Vecstatin kiti içerisinde bulunan biyotinlenmiş serum ile biyotinlenmiş sekonder antikor 1'e 3 oranında karıştırıldı.) 30 dakika muamele edildi. PBS ile yıkandı. Kesitler anti-mouse streptavidin sekonder antikor (Kit içerisinde bulunan streptavidin solüsyonunun A şişesi ile B şişesi birebir oranında karıştırılarak elde edildi) ile 30 dakika boyandı. PBS ile yıkandı. Reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla 100 µl diaminobenzidine (DAB) ile boyandı. Distile su ile yıkandı. Mayyars hematoksilen ile zemin boyaması yapıldı. Artan alkol serilerinden(%70, %80 %96, %100' lük) geçirilerek dehidrasyon yapıldı. 3 kez 20 dakika ksilene ile sefflaştırma yapıldı. Entellan ile kapatıldı.

4.6. ROS VE ANTIOKSİDAN TAYİNİ

4.6.1. DOKU HOMOJENATLARININ HAZIRLANMASI

Doku örnekleri 2 ml soğuk potasyum klorür (2,24 gr PKI + 200ml distile su) içinde ultrasonik homojenizatörde 1 dk süreyle homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri sırasında örnekler buz üstünde tutuldu. Homojenat +4°C’de ve 10.000 g devirde 15 dk santrifüj edildi ve süpernatandan enzim ve protein ölçümü yapıldı. Örnekler ölçüm yapılana kadar - 80°C’de saklandı.

4.6.2. SPEKTROFOTOMETRİK MDA (MALONDİALDEHİT) ÖLÇÜMÜ

- Daha önceden –80 °C’deki doku homojenatları 10 dakika oda ısısında çözüldü.
- 200 µL’lik örnekler tüplere konuldu.
- Her tüpe 10’ar µL probukol eklendi. (Bioxytech, Oxis Research, MDA 586®)
- Her tüpe 640 µL R1 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice vortekslendi.
- Her tüpe 150 µL R2 solüsyonundan eklendi.
- Dikkatlice vortekslendi.
- 45°C de 60 dakika inkübe edildi.
- Temiz bir süpernatan için örnekler santrifüj edildi (ör. 10,000 X g 10 dakika).
- Temiz süpernatan kısım ölçüm küvetine konularak spektrofotometre ile 586 nm absorbansla ölçüldü (HACH-LANGE DR 5000®).

4.6.3. SPEKTROFOTOMETRİK GLUTATYON PEROKSİDAZ (GPx) ÖLÇÜMÜ

- Daha önceden –80 °C’deki doku homojenatları oda ısısında çözüldü.
- Spektrofotometrenin absorbansı 340 nm ye ayarlandı (sıcaklık 23-25°C).
- Distile su ile sıfırlanarak ölçüm yapıldı.
- Çabucak örnek tampon solüsyonla 1/10 oranında dilüe edildi. (Ör 30 µL + 270 µL tampon)
- (Bioxytech Oxis research GPx 340®).
- Pipetle ölçüm küvetine, 350 µL Tampon solüsyonu, 350 µL NADPH reaktifi, 70 µL örnek konuldu.
- Küvet spektrofotometreye yerleştirildi.
- Küvete 350 µL dilüe tert-Butyl Hydroperoxide reaktifi eklenerek köpürtmeden pipetle karıştırıldı.
- 3 dakika boyunca A340 nm’de değişim kaydedildi.

- Çalışma solüsyonu dilüe edildi. 1/100 dilution of tert-Butil Hidroksit: 0.05 mL tert-Butil
- Hidroksit stoktan + 4.95 mL distile su, 1/100 ara solüsyon dilüesi, 0.2 mL ara solusyon + 19.8 mL distile su) (HACH-LANGE DR 5000®).

4.6.4. **SOD (SÜPEROKSİT DİSMUTAZ) AKTİVİTESİNİN ÖLÇÜMÜ**

SOD değerleri, SOD ticari kiti ile (Ransod, Randox internetional, inc), spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Doku Homojenatları kit prosedürüne göre hazırlandıktan sonra Arcitect 16000 (Abbott, USA) cihazıyla spektrofotometrik olarak ölçüldü.

4.7. ULTRASTRÜKTÜREL İNCELEME

4.7.1. **ELEKTRON MİKROSKOBİK DOKU TAKİBİ**

- Diseksiyon ile testis dokusundan 1 mm³ parçalar alınarak %2,5 fosfat tamponlu gluteraldehid içerisinde fiksasyon yapıldı.
- Örnekler Sorenson fosfat buffer ile 3–4 kez değiştirilerek 15–20 dakika yıkandı. (glutaraldehit şişelerinden boşaltılıp üzerine tampon solüsyonu konur).
- Örnekler 1 kısım PBS+1 kısım osmium tetroksit (OsO₄) solüsyonu karışımında 1 saat bekletildi. (ependorf tüplerin içine 500 µl OsO₄ + 500 µl tampon konuldu). (Bu işlem her şişe için otomatik pipet kullanılarak yapılır. Tüpler alüminyum folyo ile kapatılıp oda sıcaklığında 1 saat karanlık ortamda bekletildi.)
- PBS ile 15–20 dakika yıkanır (Üç küçük beher içine PBS konur. OsO₄' ten çıkan parçalar çalkalanır. Çıkan parçalar kurutma kağıdında süzdürülüp en son içinde tampon olan eppendorf tüpe konur.)
- Dehidratasyon İşlemi
 - % 70 Alkol10 dakika
 - %100 (Absolu) Alkol.....10 dakika
 - %100 (Absolu) Alkol.....10 dakika
 - Propilen oksit (Merk®).....15 dakika
 - Propilen oksit15 dakika
- İnfiltrasyon işlemleri
 - Dokular kurumayacak şekilde 1:1 oranında hazırlanan propilen oksit + araldit karışımına alındı. Oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.
 - Arada hafif hareketlerle karıştırıldı.

- Araldite CY212 Resin (TAAB®) ve DDSA (dodecenyl succinic anhydride TAAB®) (1:1) oranında karıştırıldı her şişeye 2 mL konuldu. Dokular yeni araldit karışımında yaklaşık 6-12 saat bekletildi.
- Araldite CY212 Resin (TAAB®) ve DDSA (TAAB®) 1:1 oranında hazırlanan bu yeni karışıma (gömülecek materyal sayısına göre hesaplanarak) BDMA (Benzyl Dimethylamine TAAB®) ilave edilerek gömme materyali hazırlandı. Bu karışım içine gömülen dokular 60°C 'lik etüvde 48 saat polimerize edildi.
- Daha sonra yarı ince kesitleri alınarak toluidin mavisiyle boyanıp alan belirlendi.
- Belirlenen alanlardan ince kesitler formuvar kaplı gridler üzerine alındı.
- Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlaması yapıldı ve trasmisyon elektron mikroskopunda (Carl Zeiss Libra 1200) değerlendirildi.

4.8. VERİ DEĞERLENDİRME

Çalışma sürecinde elde edilen parametrik veriler değerlendirilirken morfometrik ölçümleri UTHSCSA Image Tool 3.00 programı ile yapıldı. İstatistiksel analizler SPSS (Statistical Package for Social Sciences) 15.0 bilgisayar paket programında yapıldı. Değerlendirmede ortalama, standart sapma, ANOVA varyans analizi, Post Hoc, Tukey testi kullanıldı. Nonparametrik verilerde ise Wilcoxon testi kullanıldı. Tüm sonuçlarda $p < 0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi

5. BULGULAR

5.1. VÜCUT AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Deneyin başlangıç ve bitiş tarihlerinde tartılan deneklerin ağırlıkları arasındaki farklar Wilcoxon testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. $p < 0,05$ den küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Başlangıç ağırlıklarına bakıldığında grupların ağırlık düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $286,14 \pm 12,64$ gr, Sham grubunda $281,14 \pm 11,58$ gr, LKP grubunda $287,86 \pm 13,68$ gr, MP grubunda $285,57 \pm 12,88$ gr ve MP+LKP grubunda $288,57 \pm 10,81$ gr olarak saptandı.

Son ağırlıklarına baktığımızda; Kontrol grubunda $306,71 \pm 11,54$ gr, Sham grubunda $302,57 \pm 11$ gr, LKP grubunda $308,86 \pm 12,03$ gr ve MP grubunda $262,00 \pm 10,86$ gr MP+LKP grubunda $3294,29 \pm 10,21$ gr olarak saptandı (Şekil 19)

Kontrol grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü. ($p=0,016$).

Sham grubunda da başlangıç ve son ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi ($p=0,016$).

LKP grubunda da yine başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü. ($p=0,017$)

MP grubunun başlangıç ve son ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü. ($p=0,017$)

MP+LKP grubunun başlangıç ve son ağırlıklarını karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı görüldü. ($p=0,028$) (Şekil.19)

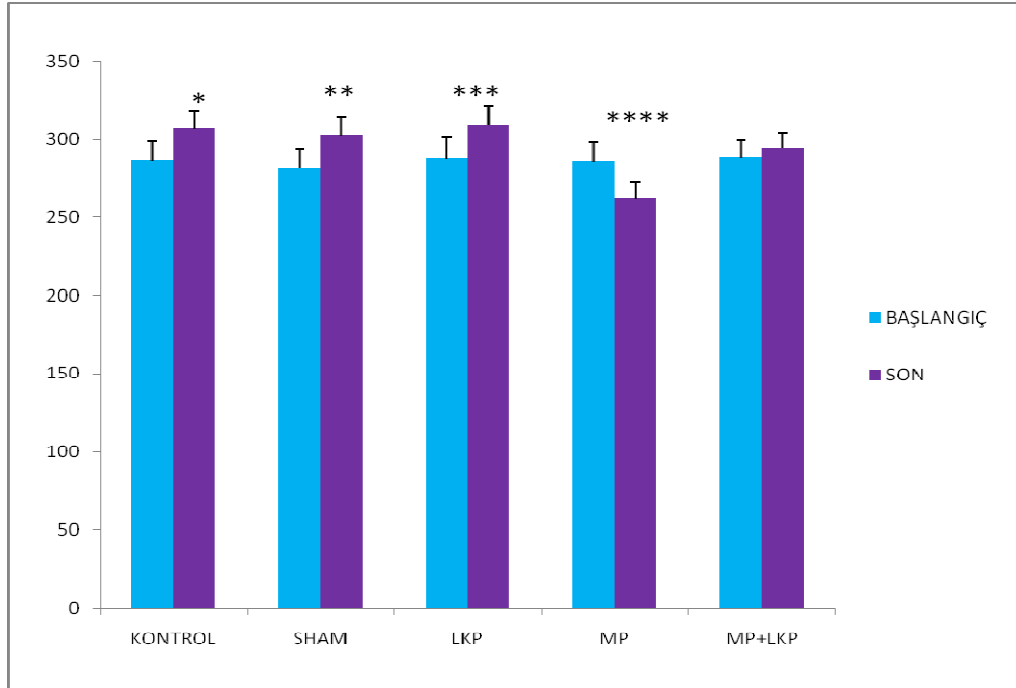
Şekil.19: Başlangıç ve sonuç vücut ağırlıklarının değerlendirilmesi

*Kontrol grubu ratların son ağırlıklarının başlangıç ağırlığına göre anlamlı artış gösteren grup

** Sham grubu ratların son ağırlıklarının başlangıç ağırlığına göre anlamlı artış gösteren grup

*** LKP grubu ratların son ağırlıklarının başlangıç ağırlığına göre anlamlı artış gösteren grup

**** MP grubu ratların son ağırlıklarının başlangıç ağırlığına göre anlamlı artış gösteren grup



5.2. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR

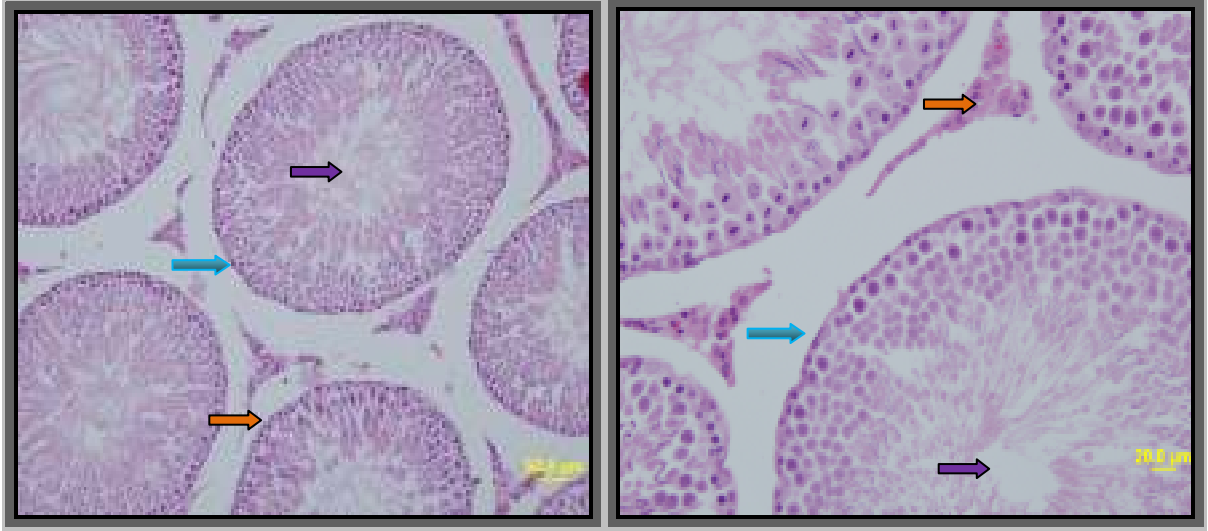
Kontrol grubunda; testis dokusunun parankimasını seminifer tübüller, intersisyel alanda Leydig hücreleri ve intertisyel bağ dokusu oluşturuyordu. İntertisyel bağ dokusu gevşek olup, kan ve lenf damarları bulunuyordu. Buradaki kapillerler etrafında toplanmış olan Leydig hücreleri düzensiz poligonal biçimli, eozinofilik sitoplazmalı, büyük eksantrik yerleşim gösteren çekirdeğe sahipti. Leydig hücreleri arasında yassı çekirdekli bağ dokusu hücreleri de izlenmekteydi. Seminifer tübüller geniş intertisyel doku içinde heterojen bir yapı göstermekteydi. Tübülleri çevreleyen miyoid hücreler yassı ve uzun çekirdekleri ile ayırt ediliyordu. Seminifer tübüllerin duvarında bazal membran üzerine oturmuş spermatogonyumlar, spermatozoidler ve spermatozoidler izlendi. Bunların arasında yer yer Sertoli hücreleri bulunmaktaydı. Tübüllerin merkezinde gelişmiş ve gelişmekte olan spermatozoidler mevcuttu. Bazı tübüllerde ise spermatogonyumlar, spermatozoidler ve Sertoli hücreleri izlenirken gelişmekte olan spermiyuma rastlanmadı. İntertisyel dokuda makrofaj veya mast hücresi saptanmadı. (Şekil.20,21)

Sham grubu da histolojik olarak değerlendirildiğinde kontrol grubu ile aynı görüntüyü sergilemiştir. (Şekil.22,23)

LKP grubunda da kontrol grubu ile uyumlu testis dokusu gözlenmiştir. (Şekil. 24,25)

MP grubunda; Seminifer tübüllerin çoğunda spermatogenik hücrelerin sayısında azalma gözlenmiştir. Çoğu seminifer tübüllerde nekroz ve intersitisiyel dokularda da ödem tespit edilmiştir. (Şekil. 26,27,28,29)

MP + LKP grubunda; Testislerde bazı seminifer tübüllerinde spermatogenik hücreler azalmıştır. Özellikle seminifer tübüllerin bazalına yakın olan hücrelerde bazal laminadan ayrılmalar tespit edilmiştir. İnterstisiyel dokularda hiçbir değişiklik tespit edilmemiştir. (Şekil.30,31,32,33).



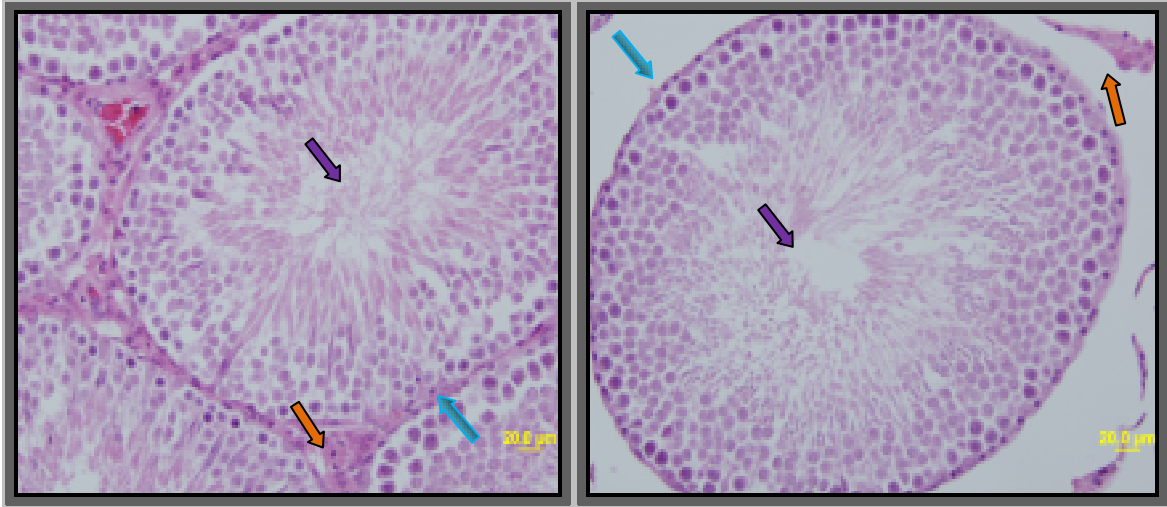
Şekil.20,21: Kontrol grubuna ait testis kesiti

Kontrol grubuna ait normal görünümlü testis

→ Seminifer tübül

→ Lümen

→ İntertisyel alan



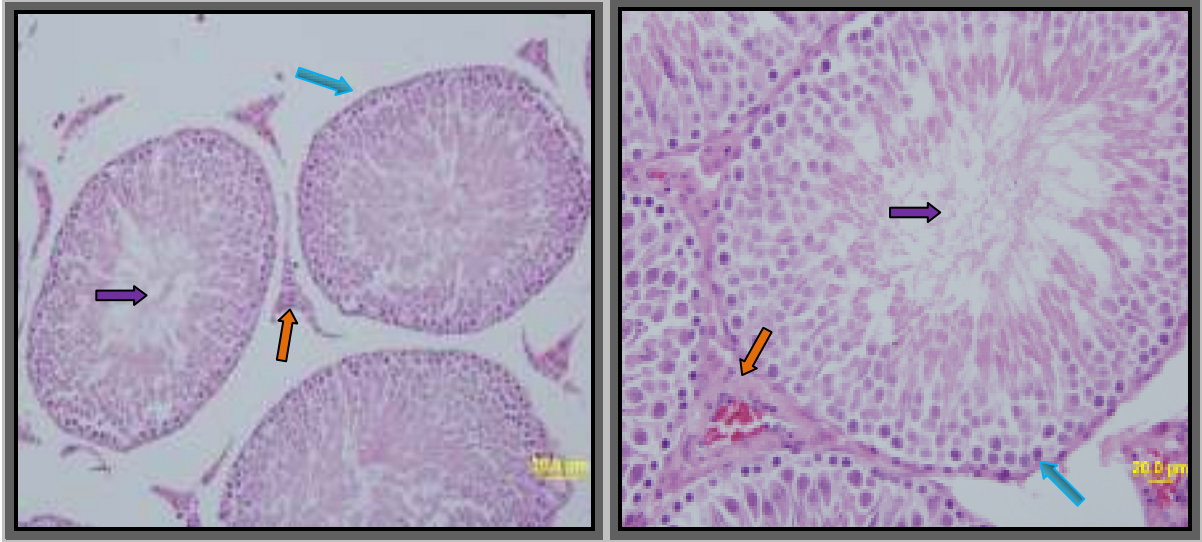
Şekil. 22,23: Sham grubuna ait testis kesiti

Sham grubuna ait normal görünümlü testis

→ Seminifer tübül

→ Lümen

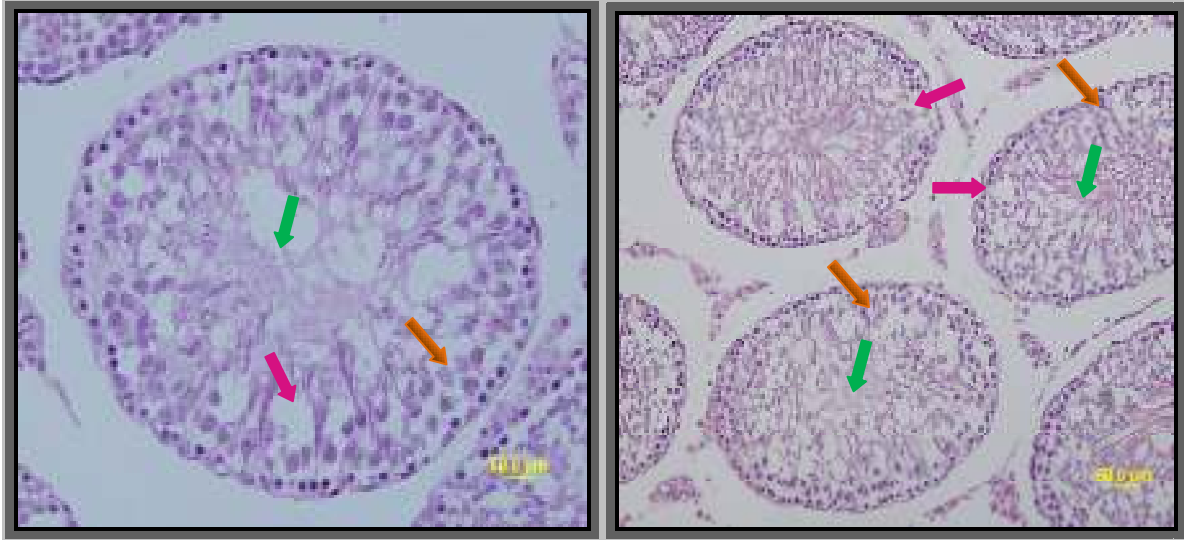
→ İntertisyel alan



Şekil. 24,25: LKP grubuna ait testis kesiti

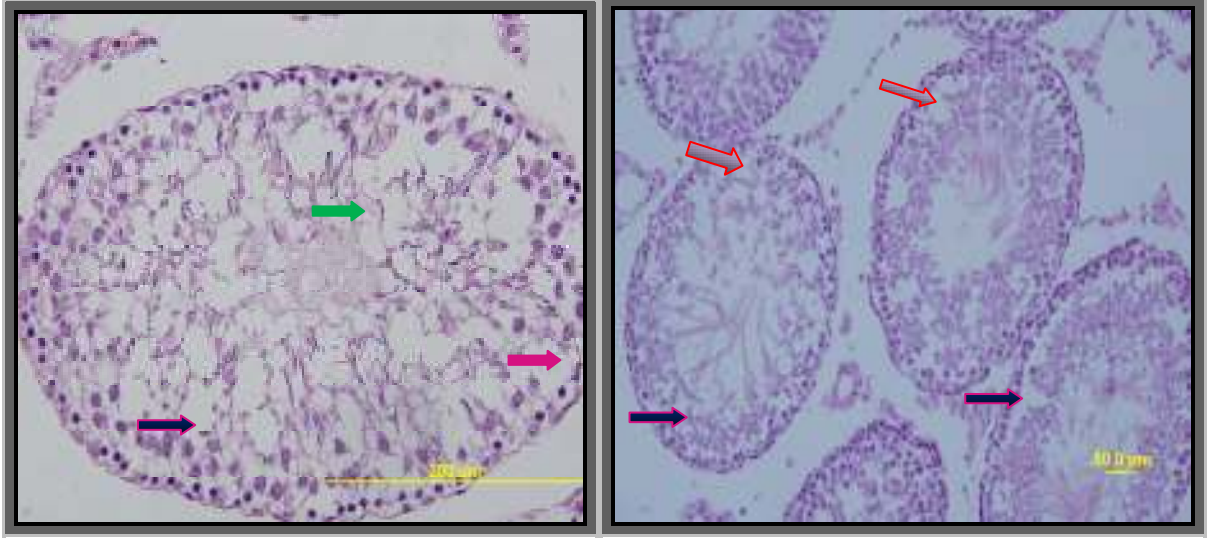
LKP grubuna ait normal görünümlü testis

- Seminifer tübül
- Lümen
- İntertisyel alan



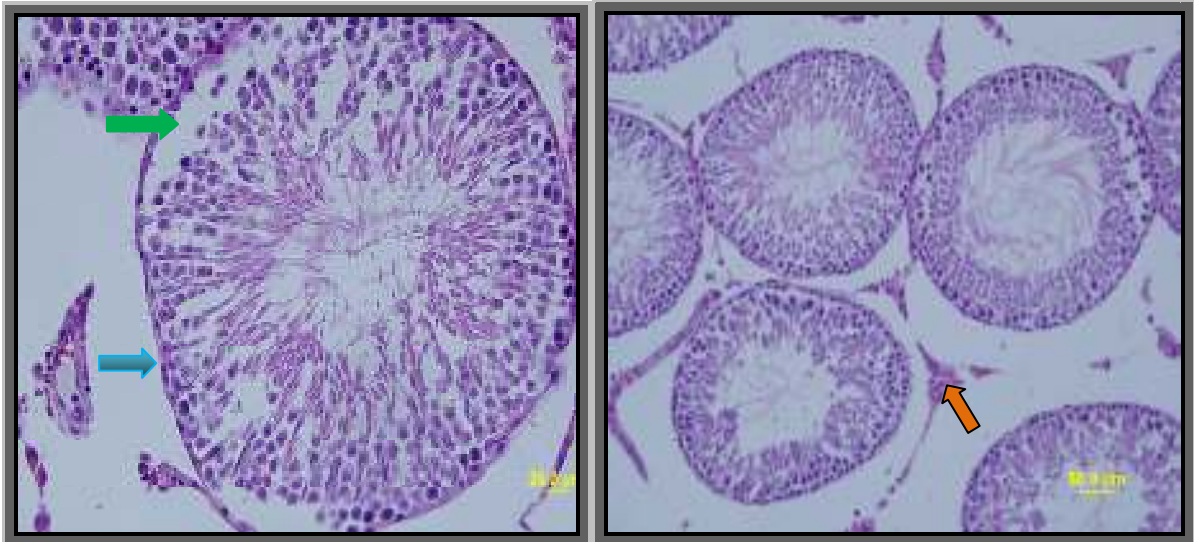
Şekil. 26,27: MP grubuna ait testis kesiti

- Germinal epitelde düzensizlik
- Lümende hücre döküntüsü
- Sertoli hücre kaybı



Şekil. 28,29: MP grubuna ait testis kesiti:

- Seminifer tübül de nekroz
- Germinal epitelde düzensizlik
- Lümente hücre döküntüsü
- Sertoli hücre kaybı



Şekil.30,31: MP+LKP grubuna ait testis kesiti

- Seminifer tübül
- Germinal epitelde ayrılmalar
- İntertisyel alan



Şekil.32,33: MP+LKP grubuna ait testis kesiti

- Seminifer tübül
- Lümen
- İntertisyel alan

5.2.1. SEMİNİFER TÜBÜL ÇAP ÖLÇÜMÜ

Çalışmamızda gruplar arası seminifer tübül çap ölçümü karşılaştırılmasında One Way ANOVA testi kullanılmıştır. $p < 0.05$ ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kontrol grubu seminifer tübül çap ölçümü yapıldığında ortalama $335,99 \pm 0,74 \mu\text{m}$ olarak saptandı. Sham grubu seminifer tübül çap ölçümü yapıldığında ortalama $334,56 \pm 0,63 \mu\text{m}$ olarak saptandı. LKP grubu seminifer tübül çap ölçümü yapıldığında ortalama $335,68 \pm 1,18 \mu\text{m}$ olarak saptandı. MP grubu seminifer tübül çap ölçümü yapıldığında ortalama $219,66 \pm 1,11 \mu\text{m}$ olarak saptandı. MP+LKP grubu seminifer tübül çap ölçümü yapıldığında ortalama $317,97 \pm 1,17 \mu\text{m}$ olarak saptandı.

Kontrol, sham, LKP grupları arasında seminifer tübül çap ölçümü bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı (kontrol-sham $p=0,85$, kontrol-LKP $p=0,99$, sham-LKP $p=0,93$).

Kontrol grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda kontrol gruba göre daha dar bulunmuştur. (kontrol-MP $p=0,0001$)

Sham grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda sham gruba göre daha dar bulunmuştur. (sham-MP $p= 0,0001$)

LKP grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda LKP gruba göre daha dar bulunmuştur. (LKP-MP p=0,0001)

Kontrol grubu, MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (kontrol-MP+LKP p=0,001)

Sham grubu, MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (sham-MP+LKP p=0,001)

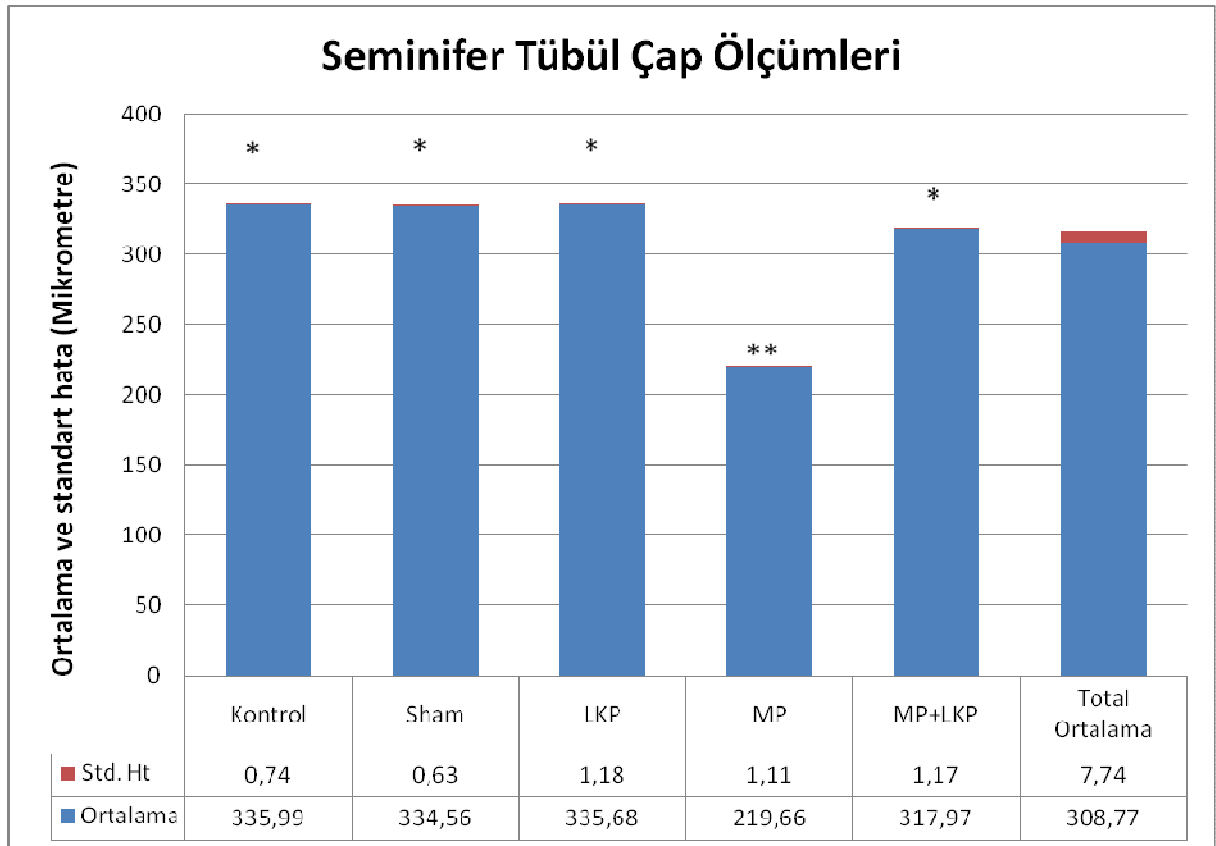
Kontrol grubu, MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki seminifer tübül çap ölçümü farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. (LKP-MP+LKP p=0,001)

MP grubu ve MP+LKP gruplarının seminifer tübül çap ölçümü arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP+LKP grubunda daha geniştir (p=0,0001).(Şekil.34)

Şekil.34: Seminifer tübül çap ölçüm değerlendirilmesi

*MP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar

**MP+LKP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar



5.2.2. GERMİNAL EPİTEL KALINLIK ÖLÇÜMÜ

Çalışmamızda gruplar arası germinal epitel kalınlıkları karşılaştırılmasında One Way ANOVA testi uygulanmıştır. $p < 0.05$ ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kontrol grubu germinal epitel kalınlık ölçümü yapıldığında ortalama $85,96 \pm 0,88 \mu\text{m}$ olarak saptandı. Sham grubu germinal epitel kalınlık ölçümü yapıldığında ortalama $86,11 \pm 1,11 \mu\text{m}$ saptandı. LKP grubu germinal epitel kalınlığı ölçümü yapıldığında ortalama $86,66 \pm 0,63 \mu\text{m}$ olarak saptandı. MP grubu germinal epitel kalınlık ölçümü yapıldığında ortalama $47,28 \pm 0,38 \mu\text{m}$ olarak saptandı. MP+LKP grubu germinal epitel kalınlık ölçümü yapıldığında ortalama $83,62 \pm 1,07 \mu\text{m}$ olarak saptandı.

Kontrol, sham, LKP grupları arasında germinal epitel kalınlığı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı (kontrol-sham $p=1$, kontrol-LKP $p=0,98$, sham-LKP $p=0,99$).

Kontrol grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki germinal epitel kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda daha ince bulunmuştur. (kontrol-MP $p=0,0001$)

Sham grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki germinal epitel kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda daha ince bulunmuştur. (sham-MP $p=0,0001$)

LKP grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki germinal epitel kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda daha ince bulunmuştur. (LKP-MP $p=0,0001$)

Kontrol grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldıklarında aralarındaki germinal epitel kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (kontrol-MP+LKP $p=0,33$)

Sham grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldıklarında aralarındaki germinal epitel kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (sham-MP+LKP $p=0,27$)

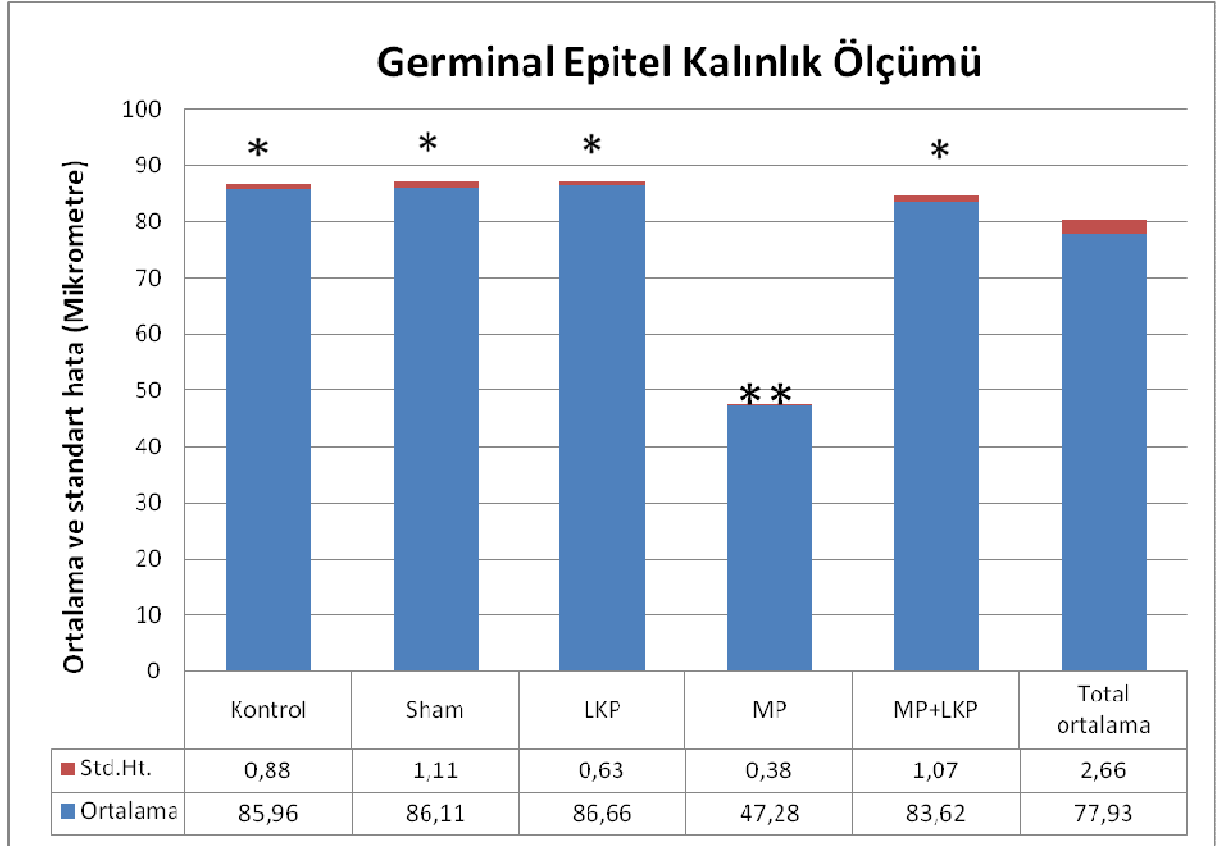
LKP grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldıklarında aralarındaki germinal epitel kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (LKP-MP+LKP $p=0,12$)

MP grubu ve MP+LKP gruplarının germinal epitel kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP+LKP grubunda daha kalındır ($p=0,0001$). (Şekil.35)

Şekil.35: Germinal epitel kalınlık ölçüm değerlendirilmesi

*MP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar

**MP+LKP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar



5.2.3. BAZAL MEMBRAN KALINLIK ÖLÇÜMÜ

Çalışmamızda gruplar arası bazal membran kalınlıklarının karşılaştırılmasında One Way ANOVA testi uygulanmıştır. $P < 0.05$ ten küçük olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kontrol grubu bazal membran kalınlık ölçümü yapıldığında ortalama $4,02 \pm 0,3 \mu\text{m}$ olarak saptandı. Sham grubu bazal membran kalınlık ölçümü yapıldığında ortalama $4,06 \pm 0,1 \mu\text{m}$ saptandı. LKP grubu bazal membran kalınlığı ölçümü yapıldığında ortalama $4,03 \pm 0,4 \mu\text{m}$ olarak saptandı. MP grubu bazal membran kalınlık ölçümü yapıldığında ortalama $7,3 \pm 0,2 \mu\text{m}$ olarak saptandı. MP+LKP bazal membran kalınlık ölçümü yapıldığında ortalama $4,6 \pm 10,4 \mu\text{m}$ olarak saptandı.

Kontrol, sham, LKP grupları arasında bazal membran kalınlığı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı (kontrol-sham $p=1$, kontrol-LKP $p=1$, sham-LKP $p=1$).

Kontrol grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda daha ince bulunmuştur. (kontrol-MP $p=0,0001$)

Sham grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda daha ince bulunmuştur. (sham-MP $p=0,0001$)

LKP grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda daha ince bulunmuştur. (LKP-MP $p=0,0001$)

Kontrol grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldıklarında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (kontrol-MP+LKP $p=0,51$)

Sham grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldıklarında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (sham-MP+LKP $p=0,08$)

LKP grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldıklarında aralarındaki bazal membran kalınlık farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (LKP-MP+LKP $p=0,58$)

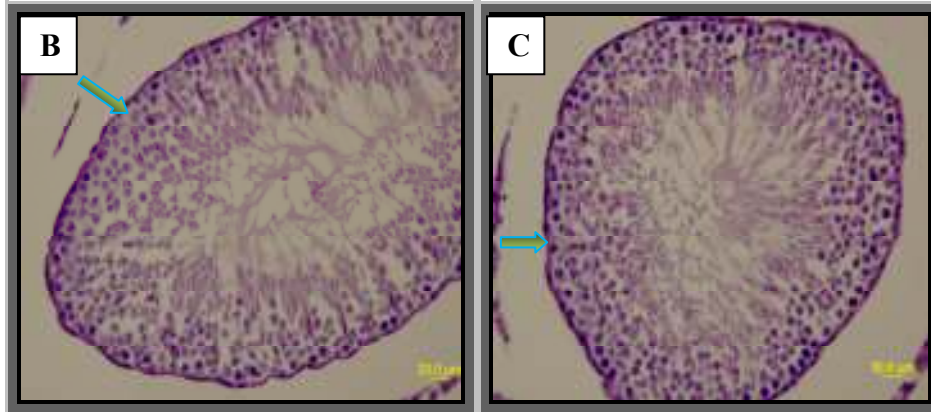
MP grubu ve MP+LKP gruplarının bazal membran kalınlık ölçümleri karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP+LKP grubunda daha kalındır ($p=0,0001$). (Şekil 36,37)

Şekil.36: Bazal membran kalınlık ölçüm değeriendirilmesi

* MP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar

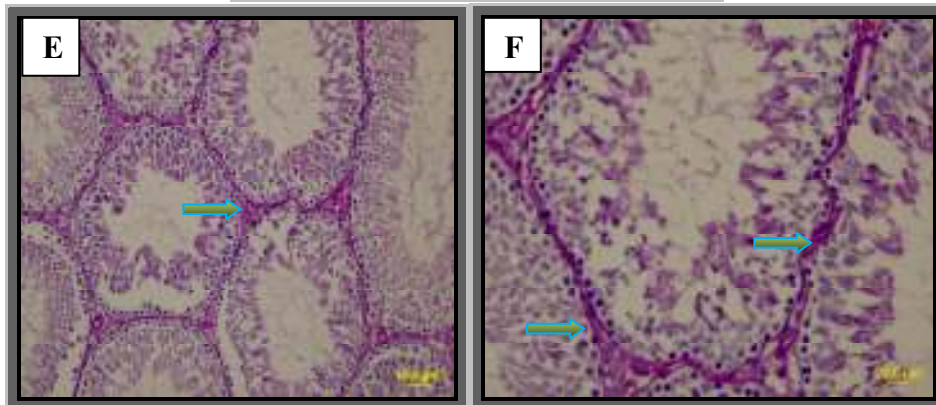
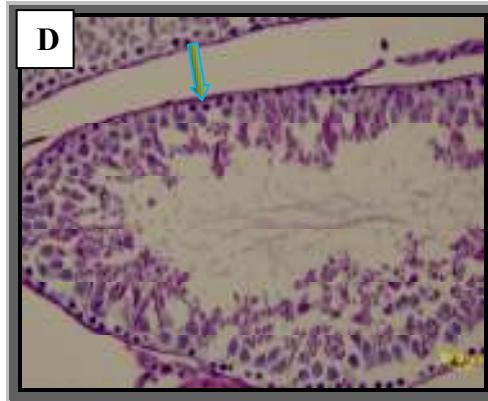
**MP+LKP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar





Şekil. 37:A; Kontrol, B; sham, C; LKP grubuna ait testis kesiti 'PAS (+) boyama'

→ Bazal membran



Şekil. 38:D; MP+LKP Grubu, E,F; MP Grubu testis kesiti PAS (+) Boyama

→ Bazal membran

5.2.4. *JOHNSEN TESTİKÜLER BİYOPSİ SKORU*

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

Kontrol grubu skor ortalaması $9,5 \pm 0,15$ olarak saptandı. Sham grubu skor ortalaması $9,14 \pm 0,13$ saptandı. LKP grubu skor ortalaması $9,21 \pm 0,13$ olarak saptandı.

MP grubu skor ortalaması; $6,61 \pm 0,15$ olarak saptanmıştır. MP+LKP grubu skor ortalaması; $8,97 \pm 0,1$ olarak saptanmıştır.

Kontrol, sham, LKP grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında aralarında Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı (kontrol-sham $p=0,934$ kontrol-LKP $p=0,56$, sham-LKP $p=0,10$).

Kontrol grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki Johnsen Testiküler Biyopsi Skor farkı istatistiksel olarak anlamlıdır. (kontrol-MP $p=0,0001$)

Sham grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki Johnsen Testiküler Biyopsi Skor farkı istatistiksel olarak anlamlıdır. (sham-MP $p= 0,0001$)

LKP grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki Johnsen Testiküler Biyopsi Skor farkı istatistiksel olarak anlamlıdır. (LKP-MP $p=0,0001$)

Kontrol grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki Johnsen Testiküler Biyopsi Skor farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (kontrol-MP+LKP $p=0,06$)

Sham grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki Johnsen Testiküler Biyopsi Skor farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (sham-MP+LKP $p= 0,89$)

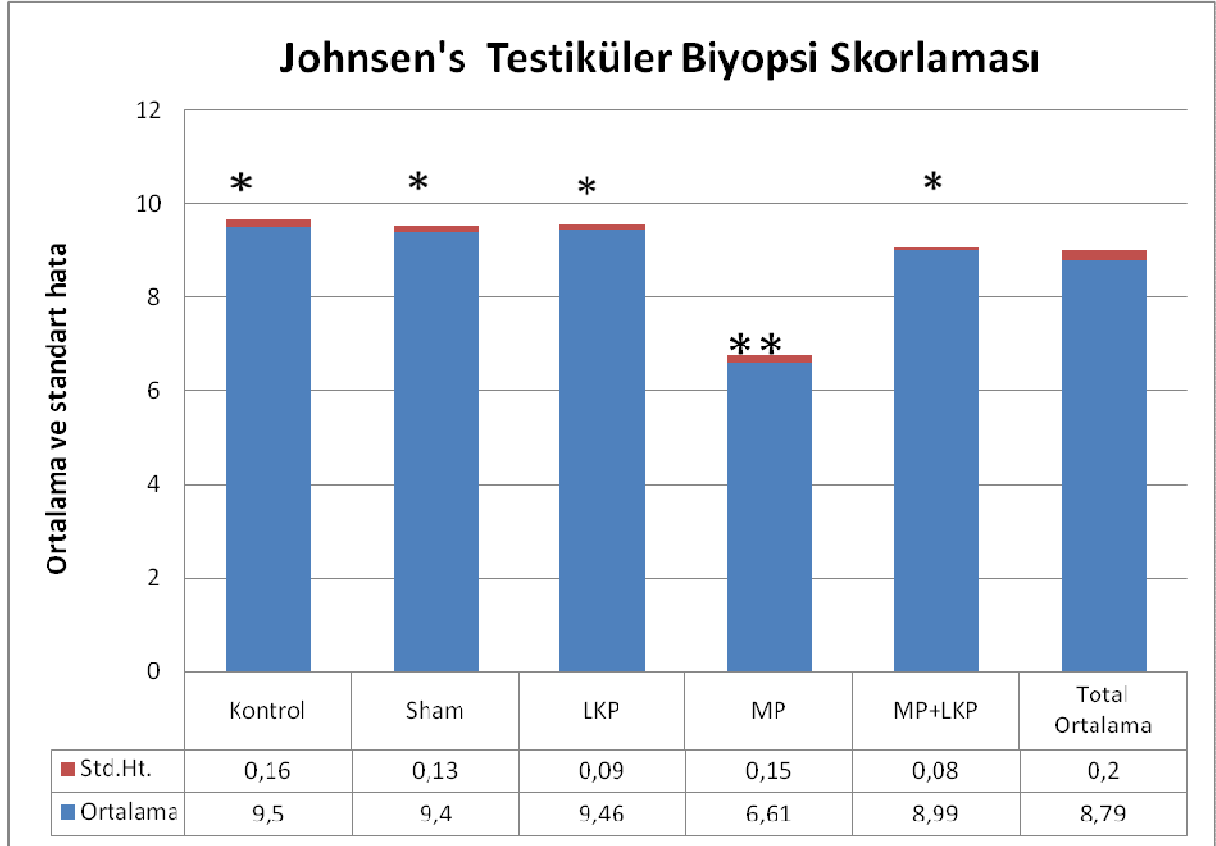
LKP grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki Johnsen Testiküler Biyopsi Skor farkı istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. (LKP-MP+LKP $p=0,70$)

MP grubu ve MP+LKP gruplarının Johnsen Testiküler Biyopsi Skor farkı istatistiksel olarak anlamlı ve MP+LKP grubunda daha yüksektir ($p=0,0001$). (Şekil.39)

Şekil.39: Testis Johnsen testiküler biyopsi skor değerlendirilmesi

*MP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar

**MP+LKP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar



5.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

TUNEL boyama yöntemi ile seminifer tübülde bulunan spermatogenik hücreler incelendi. Seminifer tübüllerde bulunan spermatogenik hücrelerin DNA fragmantasyonlarının değerlendirilmesi için TUNEL pozitif boyama yapıldı. Deney gruplarındaki her bir hayvanın seminifer tübüllerinde bulunan 100 spermatogonium ve 100 spermatozoid hücreleri ayrı ayrı sayılarak değerlendirilme yapıldı.

Çalışmamızda testis dokusunda, TUNEL pozitif boyanan hücrelerin karşılaştırılmasında One Way ANOVA testini kullandı. $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5.3.1. TUNEL POZİTİF HÜCRE SAYIMI

5.3.1.1. SPERMATOGONİYUM TUNEL HÜCRE SAYIMI

Kontrol grubu seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatogonium sayımı yapıldığında ortalama $06,75 \pm 0,85$ olarak saptandı. Sham grubu seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatogonium hücre sayımı yapıldığında ortalama $7,25 \pm 0,48$ olarak saptandı. LKP grubu seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatogonium hücre sayımı yapıldığında ortalama $6,5 \pm 0,65$ olarak saptandı. MP grubu seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatozoid hücre sayımı (TUNEL) yapıldığında ortalama $30,5 \pm 2,75$ olarak saptandı. MP+LKP grubu seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatogonium hücre sayımı yapıldığında ortalama $11,00 \pm 1,87$ olarak saptandı.

Kontrol, sham, LKP grupları arasında seminifer tübüllerdeki TUNEL pozitif spermatogoniyum hücre sayısı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (kontrol-sham $p=0,99$, kontrol-LKP $p=1,00$, sham-LKP $p=0,99$)

Kontrol grubu MP grubu ile karşılaştırıldığında TUNEL pozitif spermatogoniyum hücre sayısı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (kontrol-MP $p=0,0001$)

Sham grubu MP grubu ile karşılaştırıldığında TUNEL pozitif spermatogoniyum hücre sayısı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (sham-MP $p= 0,0001$)

LKP grubu MP grubu ile karşılaştırıldığında TUNEL pozitif spermatogoniyum hücre sayısı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda fazla bulundu. (LKP-MP $p=0,0001$)

Kontrol grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatozoid hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (kontrol-MP+LKP p=0,36)

Sham grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatogonium hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (sham-MP+LKP p= 0,47)

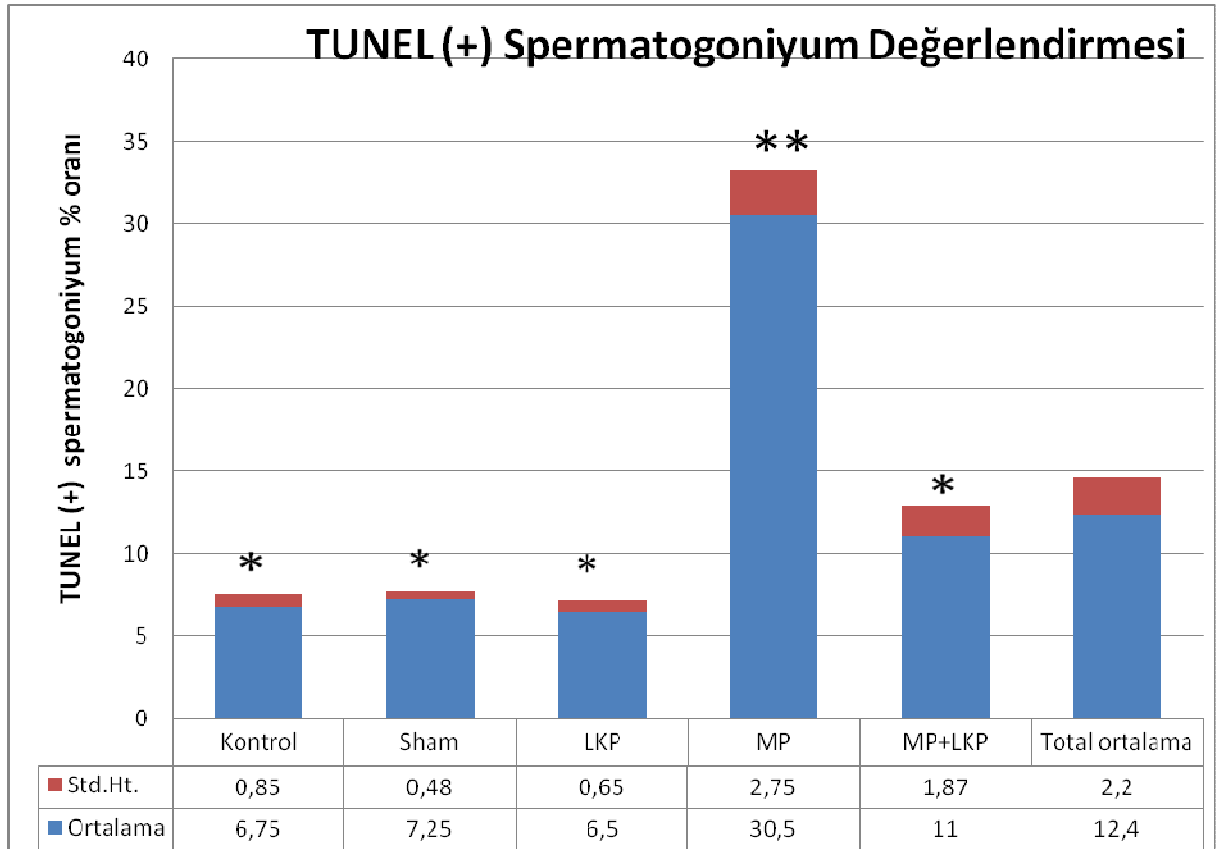
LKP grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatogonium hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (LKP-MP+LKP p=0,31)

MP grubu ile MP+LKP karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (MP-MP+LKP p=0,0001) (Şekil 40)

Şekil.40: Spermatogonium TUNEL hücre sayılarının değerlendirilmesi

*MP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar

**MP+LKP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar



5.3.1.2. *SPERMATOSİT TUNEL HÜCRE SAYIMI*

Kontrol grubu seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatozit sayımı yapıldığında ortalama $11,75 \pm 0,85$ olarak saptandı. Sham grubu seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatozit hücre sayımı yapıldığında ortalama $13,0 \pm 1,08$ olarak saptandı. LKP grubu seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatozit hücre sayımı yapıldığında ortalama $12,0 \pm 0,91$ olarak saptandı. MP grubu seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatozit hücre sayımı yapıldığında ortalama $43,25 \pm 2,95$ olarak saptandı. MP+LKP grubu seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatogonium hücre sayımı yapıldığında ortalama $15 \pm 1,82$ olarak saptandı.

Kontrol, sham, LKP grupları arasında seminifer tübüllerindeki TUNEL pozitif spermatogonium hücre sayısı karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (kontrol-sham $p=0,99$, kontrol-LKP $p=1,0$ sham-LKP $p=0,99$)

Kontrol grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (kontrol-MP $p=0,0001$)

Sham grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (sham-MP $p=0,0001$)

LKP grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (LKP-MP $p=0,0001$)

Kontrol grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerdeki TUNEL pozitif spermatozit hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (kontrol-MP+LKP $p=0,67$)

Sham grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerdeki TUNEL pozitif spermatozit hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (sham-MP+LKP $p=0,92$)

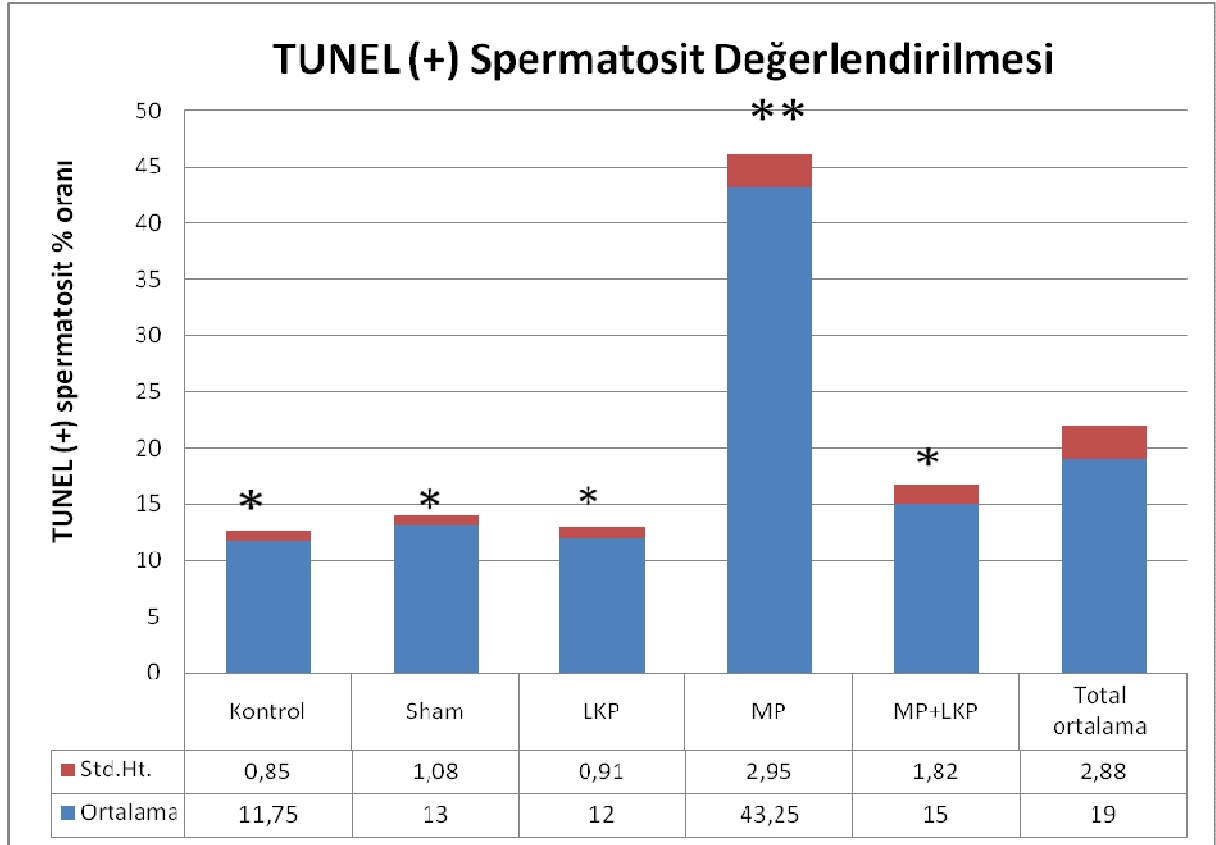
LKP grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerdeki TUNEL pozitif spermatozit hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (LKP-MP+LKP $p=0,73$)

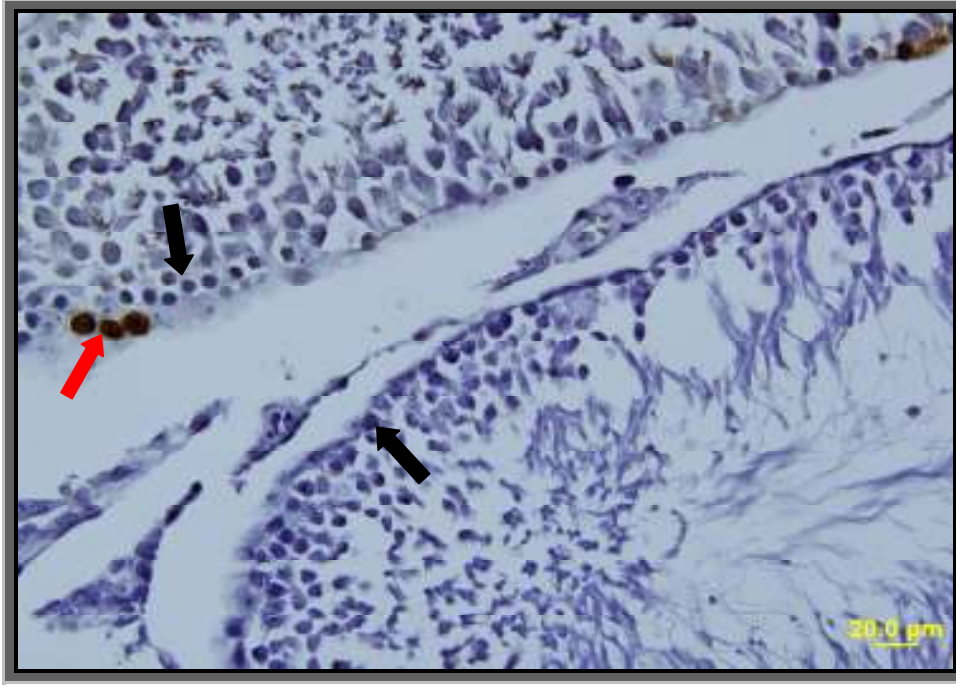
MP grubu ile MP+LKP karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (MP-MP+LKP $p=0,0001$)(Şekil, 41)

Şekil.41: Spermatozit TUNEL hücre sayılarının değerlendirilmesi

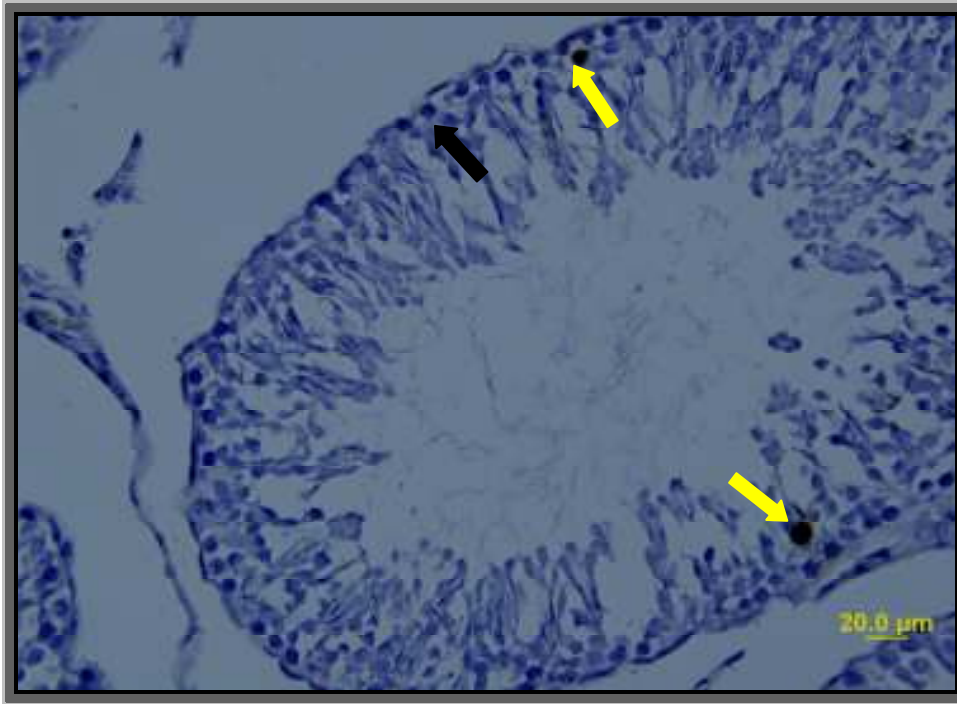
*MP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar

**MP+LKP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar







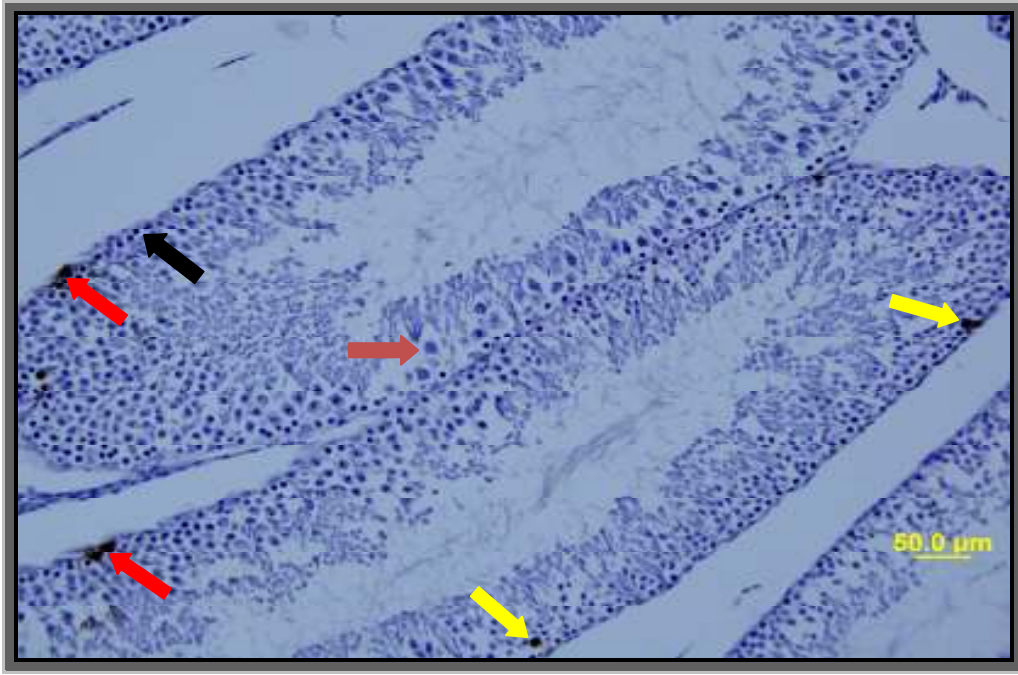


Şekil.42: Kontrol grubu TUNEL değerlendirilmesi



Şekil. 43: Kontrol grubu TUNEL değerlendirilmesi





-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatogonium
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatogonium
-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatosit
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatosit

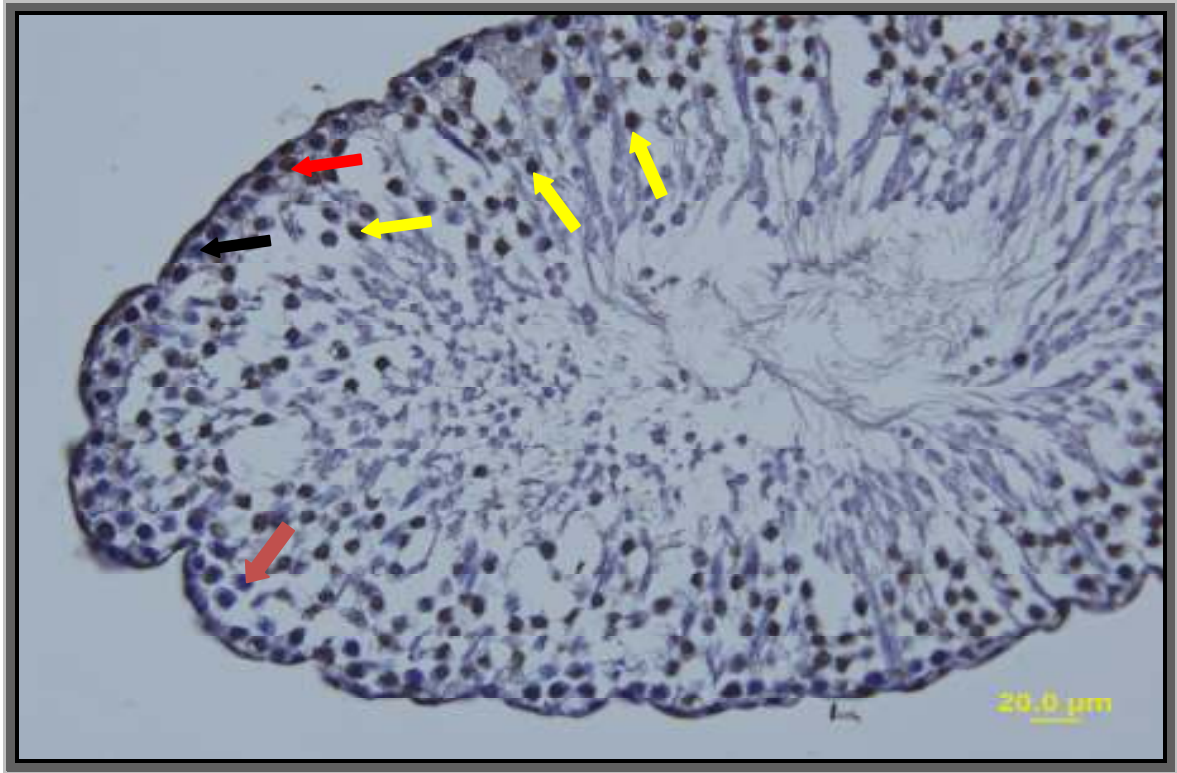


Şekil. 44: Sham grubu TUNEL değerlendirilmesi

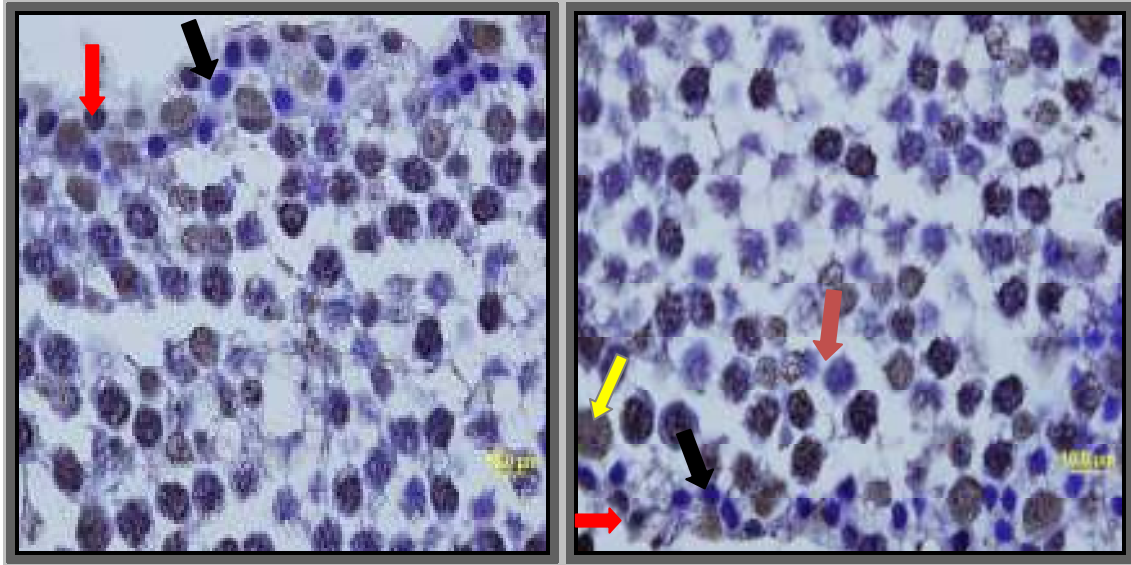


Şekil. 45: LKP grubu TUNEL değerlendirilmesi





-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatogonium
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatogoni
-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatosit
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatosit

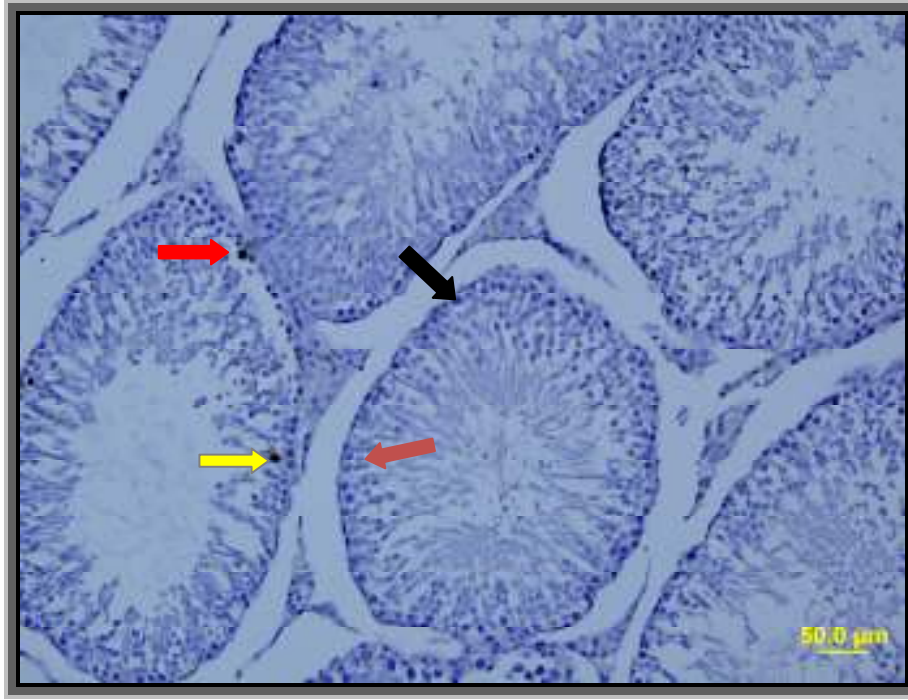


Şekil. 46: MP grubu TUNEL değerlendirilmesi

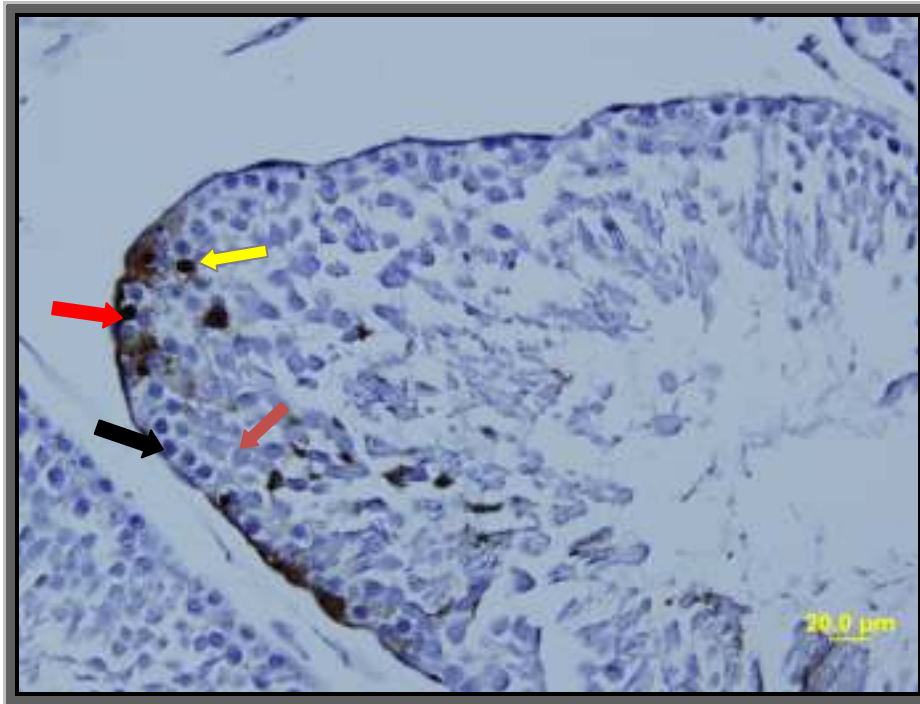


Şekil. 47,48: MP grubu TUNEL değerlendirilmesi





-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatogonium
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatogoni
-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatosit
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatosit



Şekil. 49: MP+LKP grubu TUNEL değerlendirilmesi



Şekil. 50: MP+LKP grubu TUNEL değerlendirilmesi

-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatogonyium
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatogonyium
-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatosit
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatosit

5.3.2. AKTİF KASPAZ-3 IHC (+) HÜCRE SAYIMI

5.3.2.1. SPERMATOGONİYUM AKTİF KASPAZ-3 IHC HÜCRE SAYIMI

Kontrol grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium sayımı yapıldığında ortalama $6,00 \pm 0,91$ olarak saptandı. Sham grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı yapıldığında ortalama $7,25 \pm 0,75$ olarak saptandı. LKP grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı yapıldığında ortalama $6,75 \pm 1,11$ olarak saptandı. MP grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatosit hücre sayımı yapıldığında ortalama $28,00 \pm 1,48$ olarak saptandı. MP+LKP grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı yapıldığında ortalama $10,75 \pm 1,11$ olarak saptandı.

Kontrol, sham, LKP grupları arasında seminifer tübüllerdeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayısı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (kontrol-sham $p=0,92$, kontrol-LKP $p=0,99$, sham-LKP $p=0,98$)

Kontrol grubu MP grubu ile karşılaştırıldığında aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayısı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (kontrol-MP $p=0,0001$). Sham grubu MP grubu ile karşılaştırıldığında aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayısı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (sham-MP $p=0,0001$). LKP grubu MP grubu ile karşılaştırıldığında aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayısı bakımından aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda fazla bulundu. (LKP-MP $p=0,0001$)

Kontrol grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (kontrol-MP+LKP $p=0,53$)

Sham grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (sham-MP+LKP $p=0,21$)

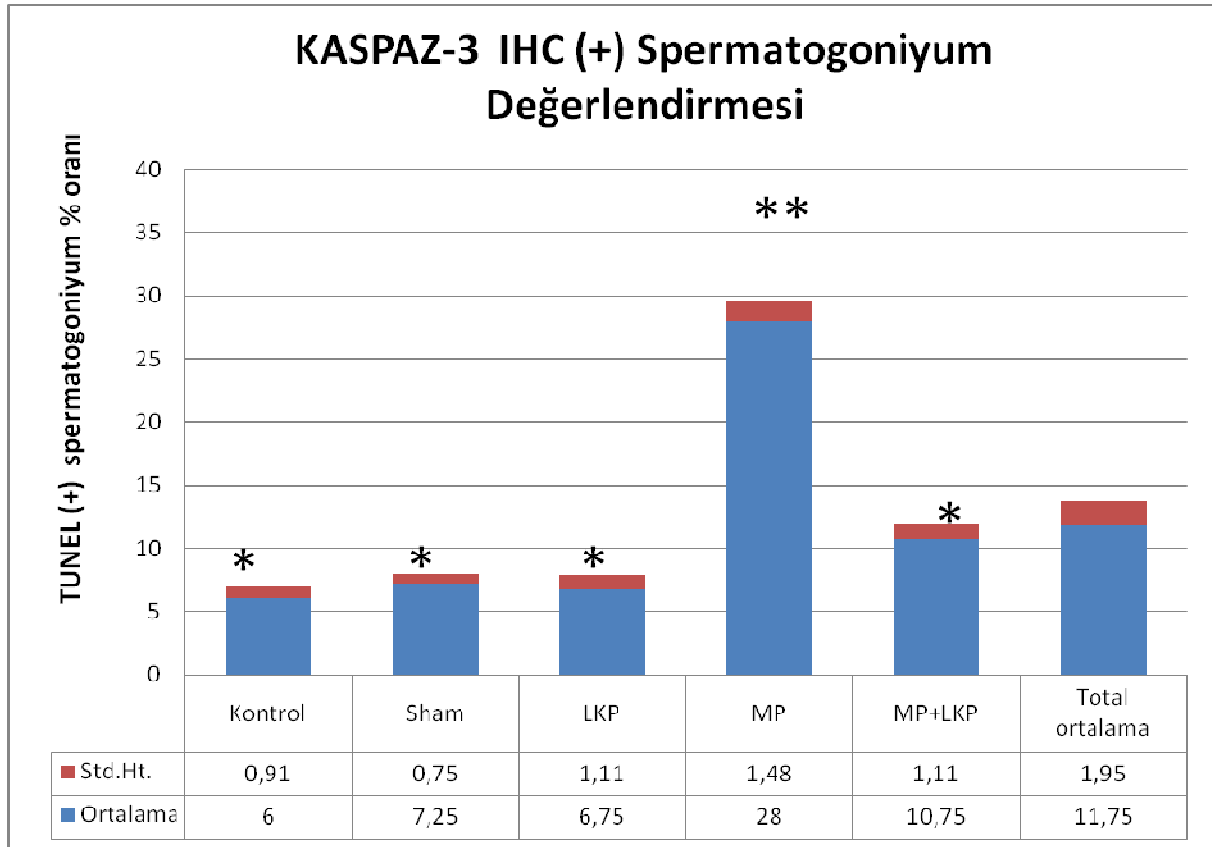
LKP grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatogonium hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (LKP-MP+LKP $p=0,12$)

MP grubu ile MP+LKP karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (MP-MP+LKP $p=0,0001$)

Şekil.51: Spermatogonium aktif kaspaz-3 IHC (+) hücre sayılarının değerlendirilmesi

*MP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar

**MP+LKP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar



5.3.2.2. SPERMATOSİT AKTİF KASPAZ-3 IHC HÜCRE SAYIMI

Kontrol grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatosit sayımı yapıldığında ortalama $7,50 \pm 0,87$ olarak saptandı. Sham grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatosit hücre sayımı yapıldığında ortalama $9,25 \pm 0,85$ olarak saptandı. LKP grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatosit hücre sayımı yapıldığında ortalama $8,50 \pm 1,04$ olarak saptandı. MP grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatosit hücre sayımı yapıldığında ortalama $31,75 \pm 1,89$ olarak saptandı. MP+LKP grubu seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatosit hücre sayımı yapıldığında ortalama $11,75 \pm 0,85$ olarak saptandı.

Kontrol, sham, LKP grupları arasında seminifer tübüllerindeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatozoid hücre sayısı karşılaştırıldığında istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (kontrol-sham $p=0,83$, kontrol-LKP $p=0,97$ sham-LKP $p=1,00$)

Kontrol grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu (kontrol-MP $p=0,0001$). Sham grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (sham-MP $p= 0,0001$). LKP grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu (LKP-MP $p=0,0001$).

Kontrol grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerdeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatozoid hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (kontrol-MP+LKP $p=0,13$)

Sham grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerdeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatozoid hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (sham-MP+LKP $p= 0,57$)

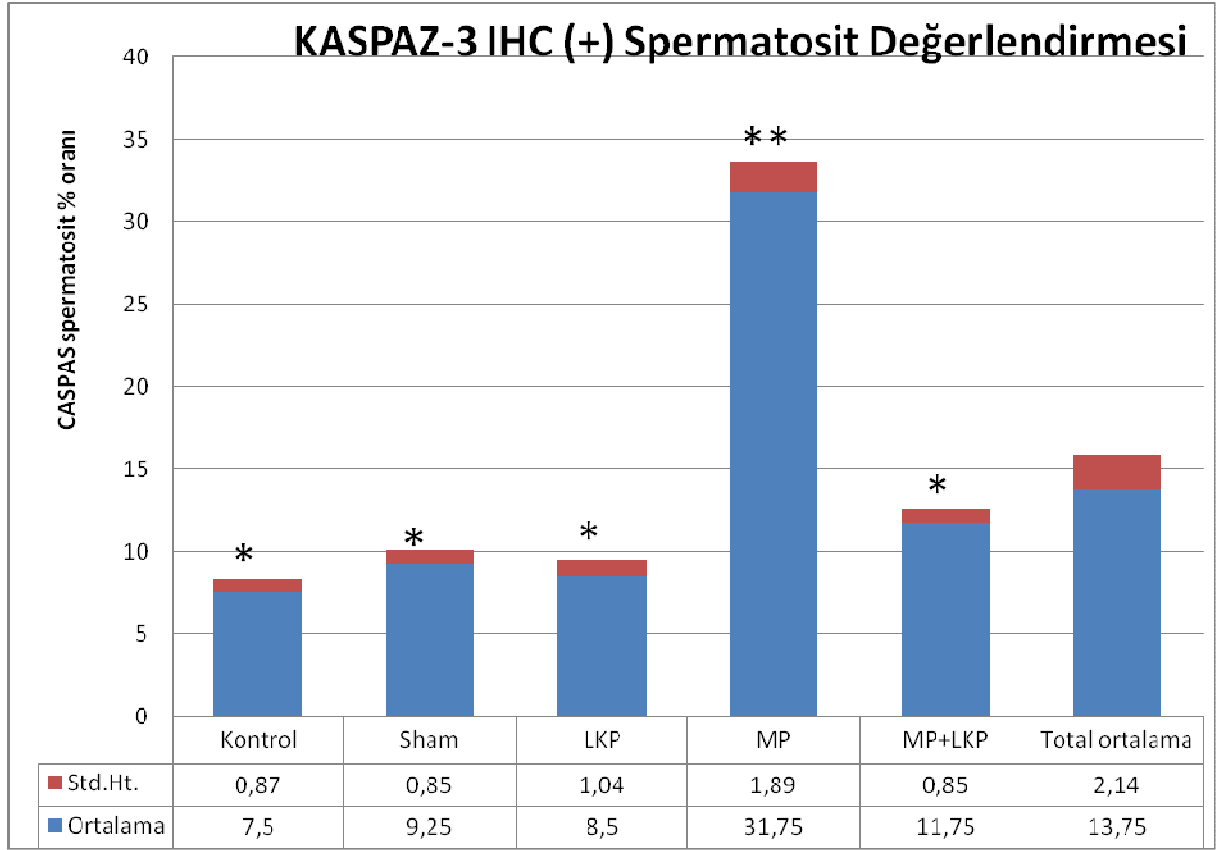
LKP grubu MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında gruplar arasında seminifer tübüllerdeki aktif kaspaz-3 IHC (+) spermatozoid hücre sayımı bakımından istatistik olarak anlamlı fark saptanmadı. (LKP-MP+LKP $p=0,33$)

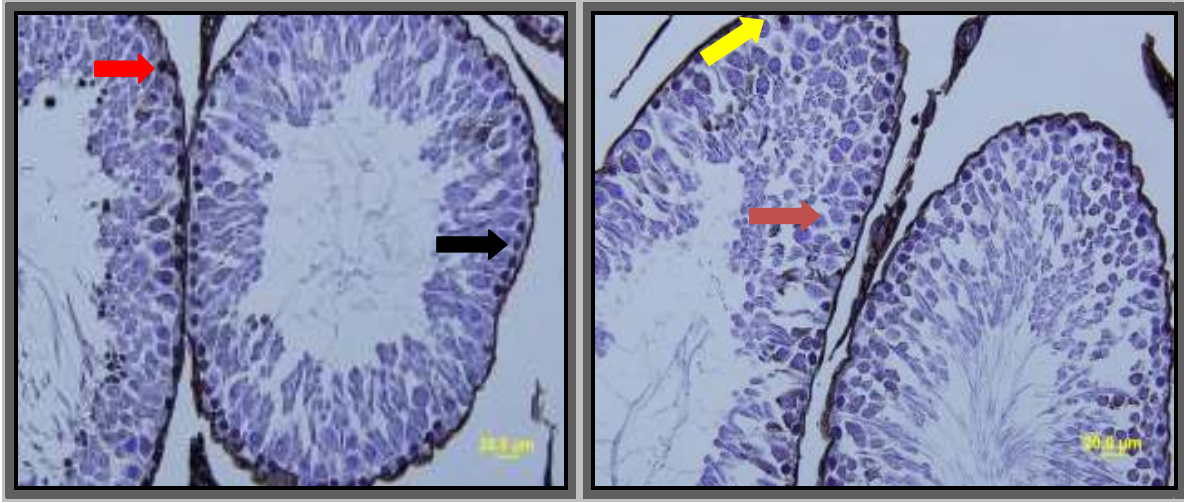
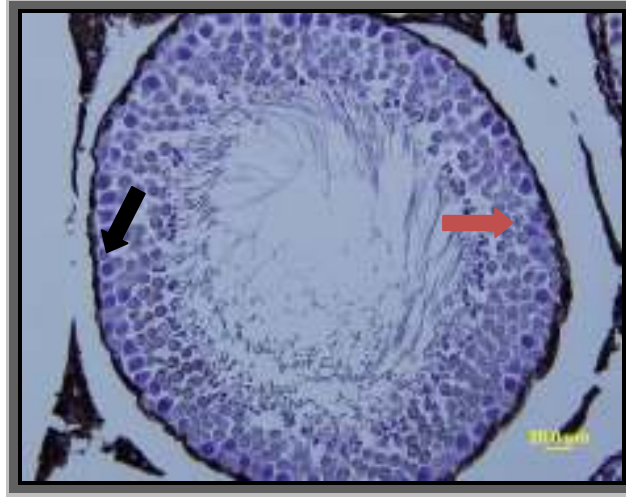
MP grubu ile MP+LKP karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı ve MP grubunda yüksek bulundu. (MP-MP+LKP $p=0,0001$)

Şekil.52: Spermatozit aktif kaspaz-3 IHC (+) hücre sayılarının değerlendirilmesi





*MP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar

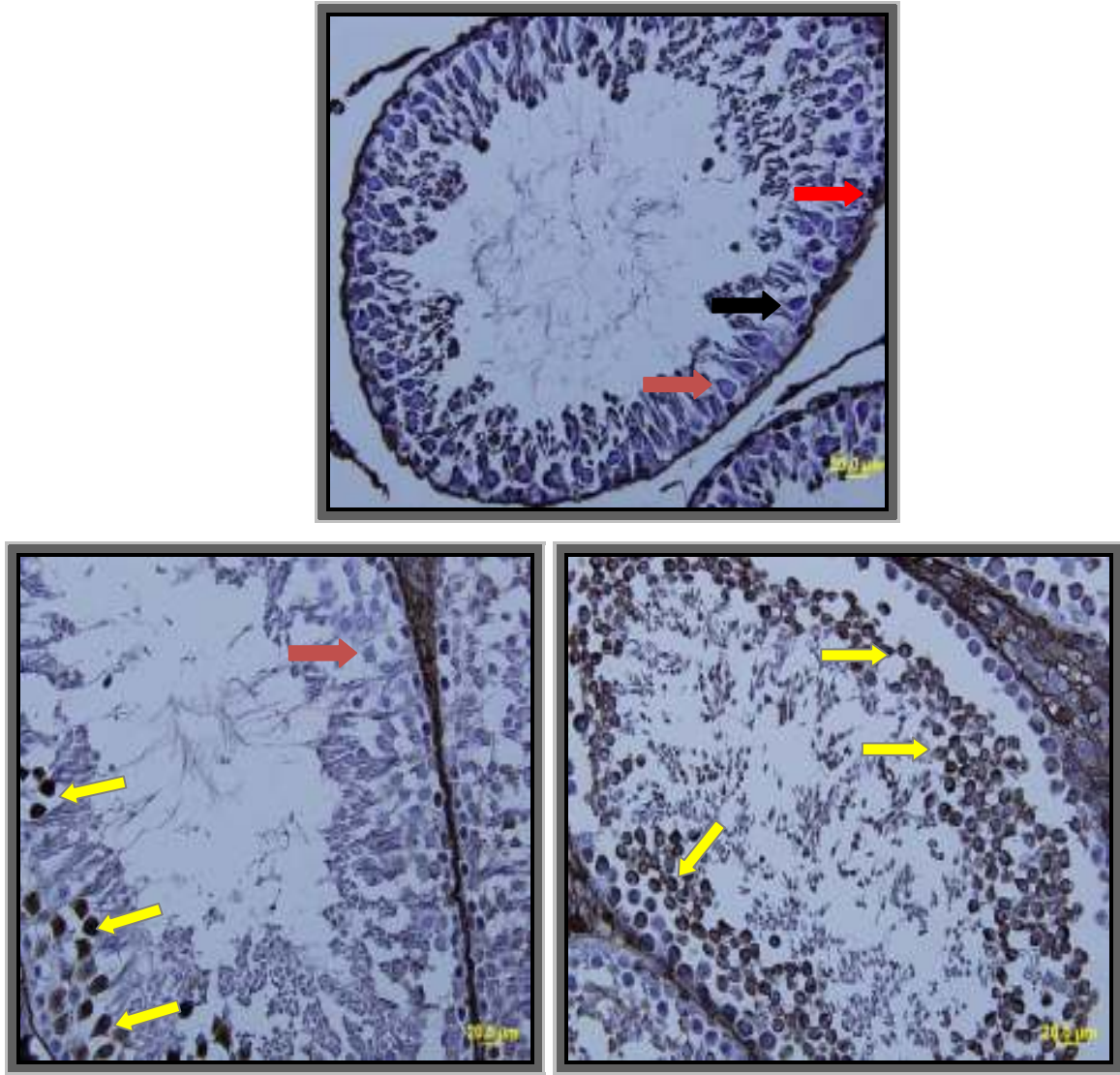
**MP+LKP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar









Şekil.53: A, Kontrol grubu, B, Sham grubu C, LKP grubu Aktif Kaspaz IHC (+) değerlendirilmesi

-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatogonium
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatogonium
-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatosit
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatosit



Şekil. 54: A,MP+LKP grubu, B,C MP grubu Aktif Kaspaz IHC (+) değerlendirilmesi

-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatogonium
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatogoni
-  TUNEL pozitif kahverengi boyanan spermatosit
-  TUNEL negatif mavi boyanan spermatosit

5.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR

5.4.1. MDA DÜZEYLERİ

Çalışmamızda testis dokusunda, MDA düzeylerinin karşılaştırılmasında One Way ANOVA testini kullandık. $p < 0.05$ olduğunda istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Gruplar arasındaki MDA düzeylerinin ortalaması $8,81 \pm 0,33 \mu\text{M}$ olarak saptandı.

Grupların MDA düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $7,69 \pm 0,11 \mu\text{M}$, sham grubunda $7,84 \pm 0,13 \mu\text{M}$, LKP grubunda $7,65 \pm 0,17$, MP grubunda $12,51 \pm 0,12$ MP+LKP grubunda $8,36 \pm 0,36 \mu\text{M}$ olarak saptandı.

Kontrol sham LKP grupları arasında MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Kontrol sham $p=0,99$; kontrol LKP $p=1,00$; LKP sham $p=0,96$)

Kontrol grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında, MP'nin verdiği hasardan dolayı MDA düzeyleri kontrol sham LKP gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. (kontrol, MP $p= 0,0001$)

Sham grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında, MP'nin verdiği hasardan dolayı MDA düzeyleri kontrol sham LKP gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. (sham, MP $p= 0,0001$)

LKP grubu, MP grubu ile karşılaştırıldığında, MP'nin verdiği hasardan dolayı MDA düzeyleri kontrol sham LKP gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. (LKP, MP $p= 0,0001$)

Kontrol grubu, MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (kontrol, MP+LKP $p= 0,16$)

Sham grubu, MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (sham, MP+LKP $p= 0,37$)

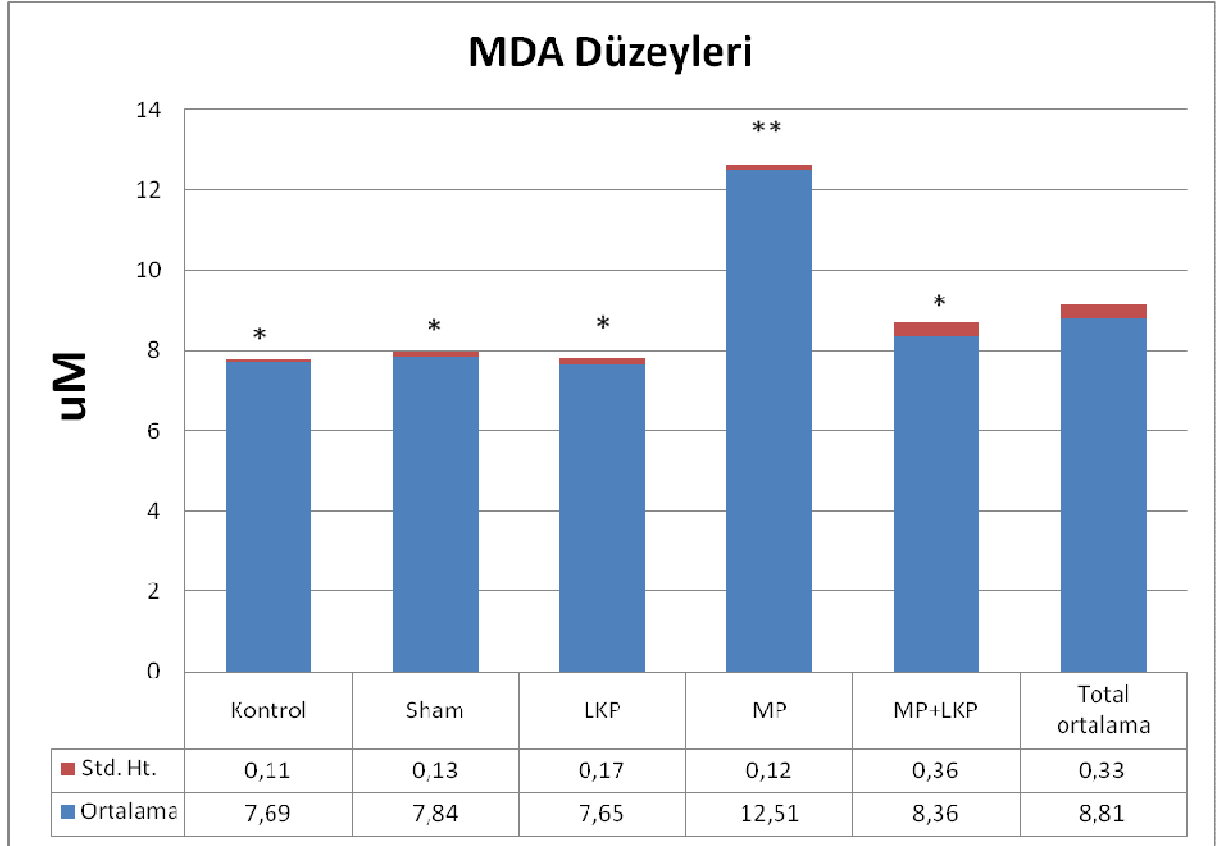
LKP grubu, MP+LKP grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki MDA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. (LKP-MP+LKP $p= 0,12$)

MP ve MP+LKP gruplarını karşılaştırdığımızda MP grubunun MDA değerleri MP+LKP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,001$).

Şekil.55: Testis dokusu MDA düzeyleri

*MP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar

**MP+LKP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar



5.4.2. GPx DÜZEYLERİ

Antioksidan kapasitesi GPx düzeyleriyle saptandı ve tüm çalışma gruplarında ortalama $97,27 \pm 4,71$ mU/mL bulundu.

Gruplara arasında, testis dokusu GPx düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $117,55 \pm 1,45$ mU/mL, sham grubunda $113,49 \pm 1,22$ mU/mL, LKP grubunda $117 \pm 1,19$ mU/mL MP+LKP grubunda $92,30 \pm 1,64$ mU/mL MP grubunda ise ortalama $46,02 \pm 1,23$ mU/mL olarak saptandı.

Kontrol sham LKP grupları arasında GPx düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Kontrol sham $p=0,24$; kontrol LKP $p=0,99$; LKP sham $p=0,38$)

Sham grubu ile MP grubu karşılaştırıldığında, MP'nin verdiği hasardan dolayı GPx düzeyleri sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. (sham, MP $p= 0,0001$)

Likopen grubu ile MP grubu karşılaştırıldığında, MP'nin verdiği hasardan dolayı GPx düzeyleri LKP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. (LKP, MP p= 0,0001)

Kontrol grubu ile MP+LKP grubu karşılaştırıldığında GPx düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (kontrol, MP+LKP p= 0,001)

Sham grubu ile MP+LKP grubu karşılaştırıldığında GPx düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (sham MP+LKP p= 0,001)

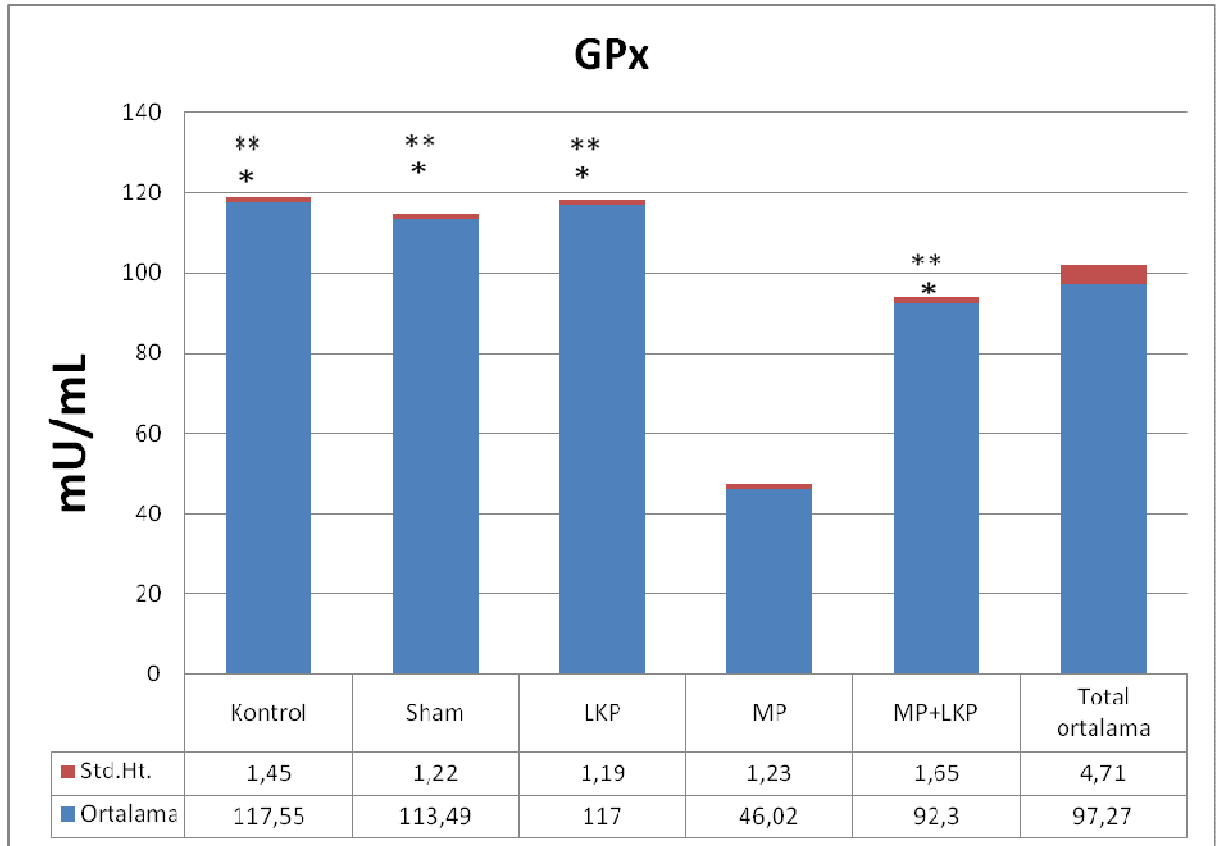
LKP grubu ile MP+LKP grubu karşılaştırıldığında GPx düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. (LKP, MP+LKP p= 0,001)

MP ve MP+LKP gruplarını karşılaştırdığımızda MP grubunun GPx değerleri MP+LKP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu (p=0,001).

Şekil.56: Testis dokusu GPx düzeyleri

*MP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar

**MP+LKP grubu ile anlamlılık gösteren gruplar



5.4.3. SOD DÜZEYLERİ

Antioksidan kapasitesi SOD düzeyleriyle saptandı ve tüm çalışma gruplarında ortalama $213,38 \pm 0,99$ U/mg.P bulundu.

Gruplar arasında, testis dokusu SOD düzeyleri ortalamaları; Kontrol grubunda $215,43 \pm 3,09$ U/mg.P, sham grubunda $214,47 \pm 1,52$ U/mg.P, LKP grubunda $215,07 \pm 2,54$ U/mg.P, MP+LKP grubunda $213,84 \pm 1,68$ U/mg.P MP grubunda ise ortalama $207,02 \pm 1,51$ U/mg.P olarak saptandı.

Kontrol, sham, LKP grupları birbirleri ile karşılaştırıldığında SOD düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (Kontrol sham $p=0,99$; kontrol LKP $p=1,00$; LKP sham $p=1,00$)

Kontrol grubu MP grubu ile karşılaştırıldığında, SOD düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasada yüksek bulundu. (kontrol, MP $p=0,07$)

Sham grubu MP grubu ile karşılaştırıldığında, SOD düzeyleri sham grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasada yüksek bulundu. (sham, MP $p=0,13$)

LKP grubu MP grubu ile karşılaştırıldığında, SOD düzeyleri LKP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasada yüksek bulundu. (LKP, MP $p=0,09$)

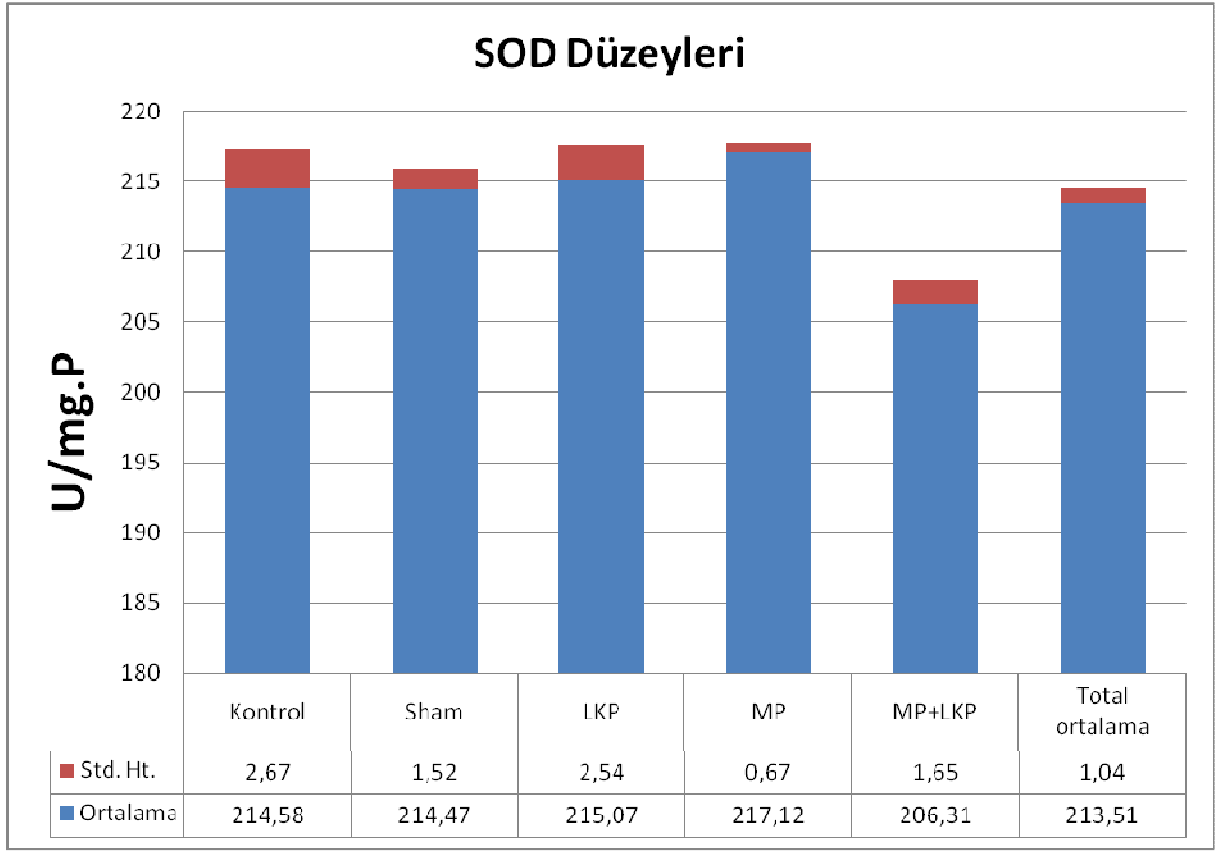
Kontrol grubu ile MP+LKP grubu karşılaştırıldığında SOD düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (kontrol, MP+LKP $p=0,98$)

Sham grubu ile MP+LKP grubu karşılaştırıldığında SOD düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. (sham, MP+LKP $p=1,00$)

LKP grubu ile MP+LKP grubu karşılaştırıldığında SOD düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. (LKP, MP+LKP $p=0,99$)

MP ve MP+LKP gruplarını karşılaştırdığımızda MP grubunun MDA değerleri MP+LKP grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmasada MP+LKP grubu SOD değerleri MP grubuna göre yüksek bulundu ($p=0,19$).

Şekil.57: Testis dokusu SOD düzeyleri



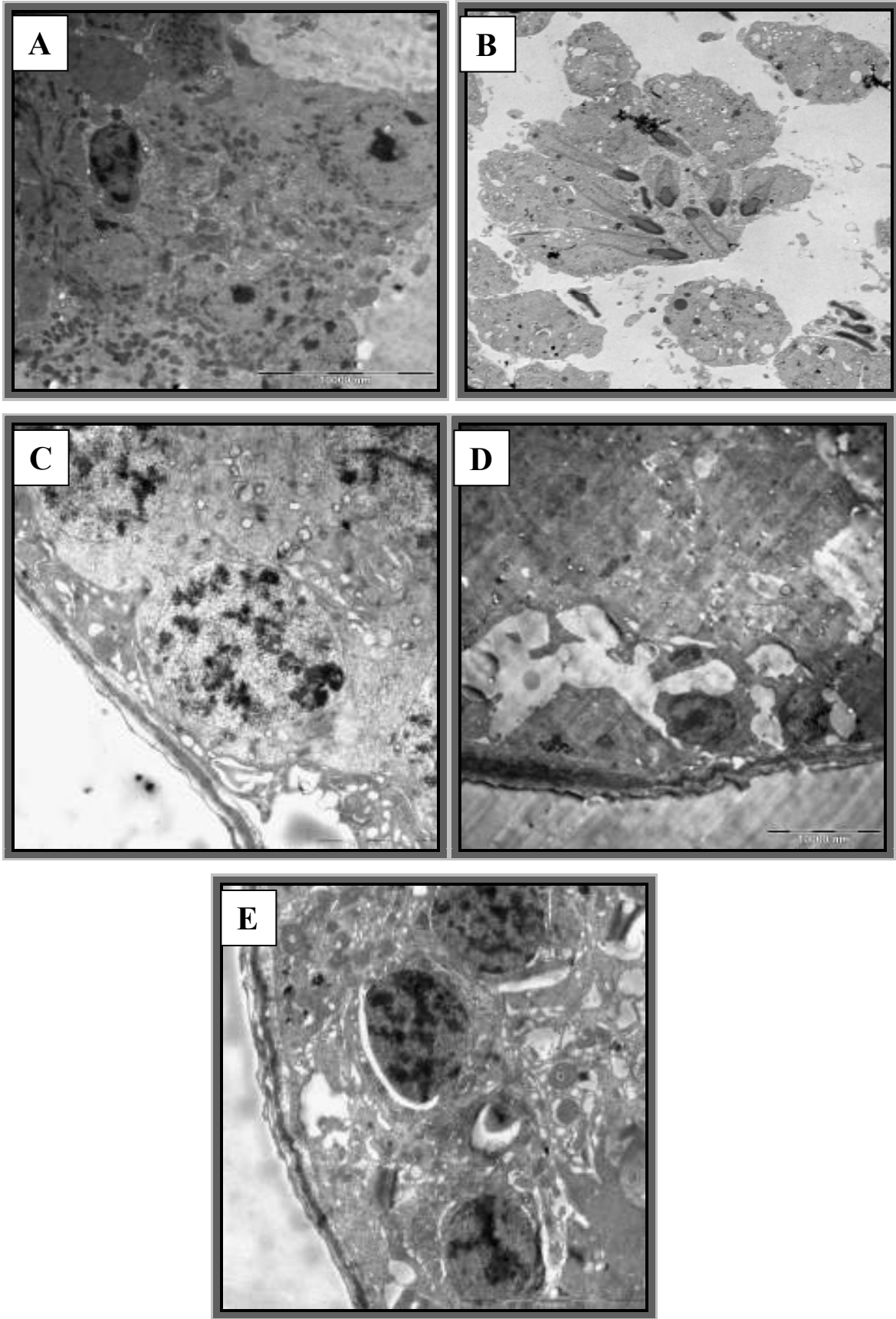
5.5. ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR

Kontrol grubunda, seminifer tübüleri saran bazal membranın en iç kısmı, bazal lamina üzerinde spermatogoniumlar ve sertoli hücreleri bulunmaktaydı. Bazal membranda epitel ve düz kas özelliği gösteren miyoid hücreler bulunmaktaydı. Miyoid hücrelerin üst ve alt taraflarında kollajenler demetlerine rastlanmaktaydı. Sertoli hücreleri sitoplazmasında bazale yakın çekirdek ve çekirdekcik bulunmaktaydı. Çekirdeğe yakın kısımlarda gelişmiş golgi kompleksi ve lizozomlar gözlenmekteydi. Diğer sitoplazmik bölgelerde ve özellikle apikalde yoğunlaşmış AGER bol miktarda gözlenirken, çekirdek yakınlarında lokalize bir miktar GER gözlenmekteydi. Mitokondriler tübüler veya veziküler yapıdaydı. Sertoli hücrelerinde küçük lipid damlacıkları yaygın şekilde gözlenmekteydi. Sertoli-Sertoli bağlantılarının altında spermatogonyumlar bulunmaktaydı. Spermatogonyumların çekirdekleri elipsoid şekilde ve merkezi yerleşimliydi. Sertoli hücre sitoplazmaları ile sarılmış olarak gözlenen primer spermatositler gelişigüzel dağılmış mitokondrilere sahipti. Primer ve sekonder spermatositlerin üzerinde tipik bir şekilde oldukça gelişmiş golgi kompleksine sahip spermatidler yer almaktaydı. Seminifer tübülün lümene yakın kısımlarında farklı gelişme evrelerinde gözlenen spermatozoonlar bulunmaktaydı.

Sham ve LKP gruplarında da, kontrol grubu ile uyumlu Sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreleri içeren germinal epitel hücrelerinin normal sitoplazmik yapıları gözlenmiştir.

MP grubunda spermatogenik hücre yapılarında bozulma nükleer membranda düzensizlik, kromatin dağılımında bozukluk, spermatogonyum hücre bağlantılarında gevşeme, sertoli-sertoli bağlantılarında dejenerasyon, ayrıca bazı mikrograflarda Sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreler aralarındaki mesafenin genişlediği gözlenmiştir.

MP+LKP grubunda bazı seminifer tübüllerde spermatogenik hücre yapısında bozukluklar gözlenmiştir. (Şekil.51)



Şekil 58: Kontrol (A), Sham (B), LKP (C), MP (D), MP+LKP (E) gruplarına ait elektron mikroskopik mikrograflar.

6. TARTIŞMA

Pestisit kullanımının tartışılmaz yararlarına karşın etkin denetimden yoksun ve aşırı miktarlarda uygulanması insan dahil hedef olmayan diğer canlılarda zehirlenmelere ve ölümlere neden olmakta, ekosistemlerin ve besinlerin kirlenmesine yol açmaktadır. MP (O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate) ziraatte kullanılan geniş spektrumlu OP'li bir insektisittir (69). MP "pamuk zehiri" olarak da bilinmektedir ve sebze, meyve, pamuk, mısır, patates, buğday ve soya fasulyesinde kullanılmaktadır (84).

OPI olan MP' nun düşük kronik dozlarına, içme suyu ya da besinlere kontaminasyonu ile maruz kalınmaktadır. Akut ve kronik çalışmalar MP'nin memelilere çok toksik olduğunu göstermiştir. Memeliler MP'ye oral, dermal ve inhalasyon yoluyla maruz kalmaktadır. MP yalnız memelilerde değil aynı zamanda balıklara, kuşlara ve hedef olmayan diğer omurgasızlarda da toksik etkiye neden olmaktadır (142,143).

OP bileşikleri AchE için oldukça güçlü inhibitörlerdir. İskelet kaslarında fasikülasyona, santral sinir sisteminde duygusal ve davranışsal bozukluklara, koordinasyon bozukluğu ve solunum baskılanmasına neden olurlar (2,3). MP, hematopoietik sistem (kolinesteraz inhibisyonu), kardiyovasküler sistem (kardiyovasküler lezyonlar, kalp/vücut ağırlığı oranında artış), üreme sistemi (plasental morfoloji, fibroz ve hemoraji ve seminifer tübüllerde DNA sentezinin inhibisyonu), sinir sistemi (baş ağrısı, uykusuzluk, baş dönmesi ve hafıza bozuklukları) dahil birçok sistemde hasara neden olmaktadır (144).

Bu tez çalışmasında MP'nin oral 1/50 LD50 dozu olan 0,28 mg/kg doz erkek ratlara verilmiştir. Bu tezin amacı düşük dozda MP'nin erkek ratların testisleri üzerine etkisinin ve bu etkiye güçlü bir antioksidan olan LKP'nin koruyucu etkisinin ışık mikroskopik, immunohistokimyasal, biyokimyasal ve ultrastrüktürel düzeyde incelenmesidir.

MP'nun oral LD50 dozu erkek ratlarda 14 mg/kg, dişi ratlarda ise 24 mg/kg olarak tespit edilmiştir (145).

Institoris ve ark 2004'de yapmış oldukları çalışmada, 0,218 mg/kg ve 0,872 mg/kg MP'i ratlara oral yolla uyguladıktan sonra ratlarda nörotoksik ve immünotoksik değişiklikler olduğunu ifade etmişlerdir (146).

OP'lere maruz kalan deney hayvanlarında vücut ağırlığında azalma gözlenmiştir (147,148). Uzunhisarçıklı ve arkadaşları vücut ağırlığındaki azalmanın besin tüketimindeki azalmaya bağlı olduğunu bildirmişlerdir (149). Zhu ve ark., ratlara 1 mg/kg dozda dermal yol ile uygulanan MP'nin 7 gün sonra vücut ağırlığında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (150). Yousef ve ark., fenvalerate uygulaması sonucu vücut ağırlığında meydana gelen

azalmanın fenvalerate'in somatik hücreler üzerine sitotoksik etkisinden ya da gastrointestinal kanalda besinlerin anormal absorpsiyonu ile ilişkili olabileceğini bildirmişlerdir (151).

Bu çalışmada MP ve MP+LKP verilen gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deney sonunda vücut ağırlığında azalma tespit edilmiştir.

Pestisitler erkek ratlarda çeşitli histopatolojik ve sitopatolojik değişikliklere neden olmaktadır (152,153). OPI'ler, testislerde spermatogenik hücrelerin sayısında azalmaya neden olurlar (152). Khan ve arkadaşlarının 2001 yılında yapmış olduğu bir çalışmada bir OPI olan Acephate'nin büyük ölçüde spermatogenik hücre sayısında azalmaya neden olduğu, Khan ve arkadaşlarının yapmış olduğu başka bir çalışmada organofosfat olan fosforotiolatın spermatogenezi inhibe ettiği rapor edilmiştir (154). Pestisitlere maruz kalmış ratlarda ölü ve anormal sperm oluşumunda önemli derecede artış olduğu ifade edilmiştir (155).

Dutta ve arkadaşlarının 2003 yılında yapmış olduğu bir çalışmada Diazinon' un (OP) testis üzerindeki ana etkisinin spermatozoa gelişiminin tamamen veya kısmen durdurmasına bağlı olduğu kanısına varılmıştır (156). OP'li bir insektisit olan Phoxim'in ratlarda günlük sperm üretiminde azalmaya sebep olduğu başka bir çalışmada ifade edilmiştir (157). Joshi ve arkadaşlarının yapmış olduğu 2003 yılındaki bir çalışmada 30mg/kg/day uygulanan MP'nin rat testisinde seminifer tübüllerde epitelde düzensizlik, lümende hücre döküntüleri, tamamen primer spermatosit kaybı ve spermatidlerin de tamamen yok olduğunu bildirmişlerdir (148).

Narayana ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 3,5 mg/kg MP 25 gün verilmiş ve son uygulamadan 17 gün sonra ratlar sakrifiye edilmiştir. Testisleri üzerine yapılan histopatolojik çalışmalarda Jhonson's skorlamasına göre testis içerisinde bulunan seminifer tübül skor ortalamalarının 5,8 (spermatid ve spermatozoa yok 5-10 spermatid var) olduğu bildirilmiştir (158).

Biz de yapmış olduğumuz çalışmada Johnson's skorlamasına göre testis içerisinde bulunan seminifer tübül hasar ortalamalarını 6,6 olarak bulduk. Yapmış olduğumuz skorlama bu makale ile uyumludur.

2007 yılında Uzunhisarcıklı ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ratları, kontrol grup (0,28 mg/kg dozda mısır yağı), Vitaminli grup (200 mg/kg vitamin E + C), MP uygulanan grup (0,28 mg/kg MP) MP+vit C+vit E uygulanan grup. (0,28 mg/kg MP ve 200 mg/kg vitamin E + C) olmak üzere 4 gruba ayırmış ,4 hafta sonunda vücut ve buna bağlı testis ağırlığında azalma olduğu gözlenmiştir. Testislerde testiküler sperm sayısında anlamlı derecede azalma, bazı seminifer tübüllerde spermatik hücreler sayısında azalma, intersitisyel alanda ödem, ve bazı seminifer tübüllerde nekroz gözlenmiştir (149).

Biz de çalışmamızda 28 gün süre ile 0,28mg/kg MP uygulanan ratlarda seminifer tübül çaplarında azalma, seminifer tübüllerde spermatogenik hücrelerde dökülme, ve bazı seminifer tübüllerde nekroz gözlemledik. Yapmış olduğumuz çalışmadaki parametreler bu çalışma ile uyumludur.

Sarabia ve arkadaşları bir OPI olan diazinonun akut ve subkronik uygulanması sonucunda germinal epitel kalınlığında azalma olduğunu ve bu azalmaya melatonin koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir (159).

Bizde yapmış olduğumuz çalışmada MP grubunda germinal epitel kalınlığı anlamlı derecede düşerken MP+LKP grubunda epitel kalınlığında artış olmuştur.

Bustos ve arkadaşları spermatogonium ve preleptoden spermatozoidler üzerindeki apoptozis değerlendirerek organofosfatların etkilerini araştırmışlar ve apoptotik hücrelerin anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir (160).

Bu çalışmada, TUNEL değerlendirmesinde; MP grubunda spermatogonium ve spermatozoidlerdeki apoptozis kontrol, sham ve LKP gruplarına göre anlamlı bir şekilde arttığını gördük.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda pestisitlerin oluşturdukları toksik etkilerin, üretilen serbest radikaller tarafından meydana gelen oksidatif strese, memeli ve diğer organizmaların çeşitli dokularında artan lipid peroksidasyonuna bağlı olduğuna dikkat çekilmektedir (161,162). Serbest radikaller yüksek reaktivitelerinden dolayı membran çoklu doymamış yağ asitleri ile etkileşerek peroksidasyonu başlatmaktadır.

Çelik ve arkadaşları 19 ve 38 mmol MP'yi 28 gün boyunca ratların içme suyuna eklemişler ve ratların çeşitli dokularındaki MDA düzeylerini ölçmüşlerdir. 19 mmol eritrosit, beyin, dalak dokularında istatistiksel olarak anlamlı böbrek ve kalp dokularında da istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış olduğu gösterilmiştir, 38 milimol uygulanan ratların beyin, karaciğer böbrek kalp dalak dokularında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu gösterilmiştir (163). Kalender ve arkadaşlarının böbrek dokusu üzerinde yapmış oldukları çalışmada 0,28 mg/kg MP'nin lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA düzeyinde anlamlı derecede artış olduğunu bildirmiştir (164).

Biz de çalışmamızda yapmış olduğumuz lipid peroksidasyonun değerlendirilmesinde MP verilen grupta MDA düzeylerinde kontrol, sham, LKP gruplarına göre anlamlı bir artış olduğunu gördük .

Oksijeni metabolize eden tüm hücrelerde bulunan SOD, GPx ve CAT enzimleri serbest oksijen radikallerinin hasarına karşı en önemli defans mekanizmalarını oluştururlar. Normal koşullarda hücrelerde bulunan hidrojen peroksit ve diğer peroksitlerin yıkımını

katalize eden GPx, lipid peroksidasyonunun başlamasını ve gelişmesini engelleyen önemli bir enzimdir (165,166).

Bu çalışmada MP uygulanmış testis dokusundaki GPx değerlerinin düştüğünü gözlemledik.

Çelik ve arkadaşları 19 ve 38 milimol MP 'nu 28 gün boyunca ratların içme suyuna eklemişler ve ratların çeşitli dokularındaki SOD düzeylerini ölçmüşlerdir. Akciğer ve eritrositlerde SOD aktivitesinde azda olsa azalma olduğunu göstermişlerdir (163).

Bu çalışmada MP uygulanmış testis dokusundaki SOD değerlerinin düştüğünü gözlemledik. Güneya ve ark. 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada MP'nin fallop tüplerinde MP'nin oluşturmuş olduğu hasarı ultrastrüktürel olarak değerlendirmiş ve fallop tüplerinde şuşu hasarı oluşturduğunu göstermişlerdir (2).

Akbarsha ve arkadaşları spermatozoa üzerinde diazinon ve malathion'un oluşturduğu hasarı ultrastrüktürel olarak incelemiş ve spermatozoa ince yapısında hasara neden olduğunu göstermiştir (167).

Bu çalışmada; spermatogenik hücre yapılarında bozulma, nükleer membranda düzensizlik, kromatin dağılımında bozukluk, spermatogonyium hücre bağlantılarında gevşeme, sertoli-sertoli hücre bağlantılarında dejenerasyon, ayrıca bazı mikrograflarda Sertoli hücreleri ile spermatogenik hücreler aralarındaki mesafenin genişlediği ve MP+LKP grubunda LKP'nin koruyucu etkisi ile MP grubuna göre spermatogenik hücre serilerinde normal görünüm ve normal görünümlü sertoli hücreleri gözlendi, bunun yanısıra bazı tübüllerde spermatogenik hücre serilerinde bozukluklar da MP+LKP grubunda gözlenmiştir.

Doğada 600'den fazla doğal çeşidi bulunan karotenoidlerden biri LKP'dir (168). LKP' nin başlıca kaynakları domates ve bu sebzededen elde edilen ketçap, sos ve domates suyu gibi ürünlerdir (169). Ayrıca karpuz, pembe greyfurt ve pembe kavun LKP içeren diğer besin kaynaklarıdır. LKP göğüs kanseri, prostat kanseri gibi kanser türlerinde koruyucu etkiye sahiptir(170).

Stahl ve arkadaşlarının 1998'de yaptıkları bir çalışmada, diyetle sağlanan havuç suyu yada domatesin DNA tamir yeteneğini artırıcı etkisi bildirilmiştir(171). Yaping ve arkadaşları'nın 2002'de yaptıkları bir çalışmaya göre, LKP singlet oksijen süpürücü, nitrojen dioksit, sülfonil serbest radikallerini toplayıcı, lenfosit DNA'sı ve hücre zarlarındaki oksidatif hasarı engelleyici özellikleri olduğu bildirilmiştir(172).

LKP' nin ROS'a bağlı oluşan hasara karşı koruyucu etkisi olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (8). Breinholt ve ark., ratlarda antioksidan ve ilaç metabolize eden enzimler üzerine LKP'in etkilerini araştırdıkları bir çalışmada, LKP'in karaciğerde SOD, GSH-Px ve

GSH-redüktaz aktivitelerini önemli derecede indüklediği, CAT aktivitesi üzerine ise herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (173).

Ateşşahin ve ark. 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada sisplatinle oluşturulmuş testiküler hasara LKP'in koruyucu etkisini araştırmışlar ve 4mg/kg LKP'in sisplatinin neden olduğu seminifer tübül çapında azalma, germinal epitel kalınlığında artma gibi testiküler hasarlara LKP'nin koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca sisplatinin neden olduğu MDA artışını LKP anlamlı derecede düşürdüğü yine yapılan çalışmada gösterilmiştir. Antioksidan kapasiteyi göstermek amacıyla testis dokusunda GPx düzeylerine bakılmış ve sisplatinle bağlı azalan GPx miktarını LKP'in anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir (174). Ateşşahin ve ark. 2006 yılında yapmış olduğu başka bir çalışmada adriamisin kullanımında testiste oluşabilecek toksik hasara LKP'in koruyucu etkisini araştırmışlar ve 4 mg/ kg LKP' nin testis dokusunda sperm motilitisinde artışa, adriamisin neden olduğu seminifer tübül çapındaki azalmayı önlediği, seminifer tübül çapında artışa neden olduğu, germinal epitel kalınlığında artışı sağladığı ayrıca yüksek MDA düzeylerinde anlamlı bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (175).

Bizde yapmış olduğumuz çalışmada MP maruziyeti sonucu oluşan seminifer tübül çapında azalma, epitel kalınlığında azalma gibi testiküler hasara 4 mg/kg LKP'in anlamlı derecede koruyucu olduğunu gözlemledik. Ayrıca yapmış olduğumuz çalışmada MP grubunda MDA düzeyleri artmış ve MP+ LKP gruplarında LKP etkisi ile MDA seviyelerinde anlamlı bir azalma tesbit edilmiştir. Çalışmamız da baktığımız parametrelerden biri de GPx seviyeleridir. MP gruplarında düşmüş olan GPx miktarı MP+LKP gruplarında anlamlı derecede artmıştır. SOD değerleri ise MP grubuna göre büyük oranda yükselmiştir.

Bu çalışmada, TUNEL değerlendirmelerinde; MP+LKP grubunda LKP etkisi ile TUNEL pozitif spermatogonium ve spermatozoid sayısında MP grubuna göre anlamlı bir azalma meydana gelmiştir.

7. SONUÇ ve ÖNERİLER:

MP verilen grupta primer spermatogonium ve spermatositlerdeki DNA hasarına uğrayan hücre sayıları yüksek bulunmuştur. Bu da MP'nin testis üzerinde DNA hasarına neden olduğunu kanıtlamaktadır.

MP grubundan elde ettiğimiz yüksek seviyedeki MDA düzeyi ve düşük seviyedeki GPX ve SOD düzeyleri MP'nin oksidatif strese de neden olduğunun bir kanıtıdır.

Çalışmamızda kullandığımız dozdaki LKP'nin oksidatif stres parametreleri üzerine anlamlı derecede etkisinin olduğunu gördük.

Gruplar arasındaki seminifer tübül çaplarını karşılaştırdığımızda MP'nin seminifer tübül çaplarında azalmaya neden olduğu sonucuna vardık. Çalışmamızda kullandığımız dozdaki LKP'in seminifer tübül çap ölçümlerinde anlamlı bir artışa neden olduğu ama yinede tamamen bir genişleme oluşmadığı gözlenmiştir.

Çalışmamızda MP germinal epitel kalınlığında azalmaya, bazal membran kalınlığında artışa, spermatogenetik hücrelerde dökülmeye, seminifer tübüllerde nekroza neden olmuştur.

Immunohistokimyasal olarak TUNEL ve Aktif KASPAZ-3 IHC boyamalarında MP grubunda pozitif boyanan hücre sayılarının anlamlı derecede arttırmıştır. MP+LKP grubunda ise LKP etkisi ile pozitif boyanan hücre sayılarında anlamlı derecede azalma olmuştur.

Ultrastrüktürel incelemeler doğrultusunda seminifer tübül ince yapısında MP'nun hasara neden olduğu ve MP+LKP grubunda LKP'nin etkisine bağlı bu hasarda azalma gözlenmiştir.

Çalışmamızda kullandığımız dozdaki LKP testiste oluşan toksik hasarı anlamlı bir şekilde engellemiş fakat tamamen ortadan kaldıramamıştır.

Yukardaki sonuçlar doğrultusunda, MP'nin düşük dozlarada da, testis dokusunda toksik etki sonucu hasara neden olduğunu gözlemledik. Bir çok ülkede kullanımı yasaklanmış olan MP'nin ülkemizde de 'kullanımı yasak olan insektisitler' grubuna dahil edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

MP+LKP grubunda gözlemlediğimiz sonuçlar doğrultusunda LKP'nin MP'nin oluşturduğu toksik hasarı önleyici etkisi olduğu gördük. Özellikle Ege ve Akdeniz bölgesinde ve tüm Türkiye'de bol miktarda kullanılan MP'nin toksit etkilerini en aza indirmek için domates ve türevlerinden elde edilen LKP'nin tüketiminin koruyucu olduğunu düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR:

1. Elsa Salazar-Arredondo, Mari'a de Jesu's Soli's-Heredia, Elizabeth Rojas-Garcı'a: Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their metabolites in human spermatozoa. *Reprod Toxicol.* 25(4):455-60. (2008)
2. Guneya M., Orala B., Demirin H.: Fallopian damage induced by organophosphate insecticide methyl parathion, and protective effect of vitamins E and C on ultrastructural changes in rats. *Toxicol Ind Health.* Aug;23(7):429-38 (2007)
3. Prashanthi N., Narayana K., A. Nayanatara: The reproductive toxicity of the organophosphate pesticide O, O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate (methyl parathion) in the male rat. *Morphologie.* 2007 Oct;91(294):173-9. (2007)
4. Joshi S., Mathur R., Gajraj A: Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 14 91-98(2003)
5. Kuper C.F., Fraile N., Estrella A., Oteroc C.. Ninety-day oral toxicity study of lycopene from *Blakeslea trispora* in rats: D. Jonker, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 37 396–406(2003)
6. Ateşşahin A.,Türk G. ,Karahan İ.: Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Nutr Rev, Clinton SK,* 56, 35–51. (1998)
7. Salman H., Bergman M. , Djaldetti M.: Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomed Pharmacother.* Jul;61(6):366-9. (2007)
8. Ateşşahin A, Karahan İ, Türk: Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol.* 2006 Jan;21(1):42-7. Epub 2005 Jun 24. (2008)
9. Moore K.M, Persaud T.V.N Persaud Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi. Nobel Tıp Kitabevi, 323- 325 (2002)
10. Hatipoğlu, M.T.: *Anatomi ve Fizyoloji* , 12. Baskı, Hatipoğlu Yayınevi Ankara 178-184 (2001)
11. ROSS, M. H Kaye, G. I, Pawlina, EW: *Histology , Text and Atlas* , Fourt Edetion, 683-710 , Williams & Wilkins , AWolters Kluver Company, Philadelphia, 729- 748 (2003)
12. Arıncı K., Elhan A. *Anatomi cilt, 3. Baskı, 329-337* Güneş kitapevi, Ankara (2001)
13. Gökmen F.G. *Sistematik Anatomi, Birinci baskı, İzmir Güven Kitapevi, İzmir* 549-559 (2003)

14. Snell R.S. Uygulamalı Anatomi , Türkçe 1. Baskı Türkiye Klinikleri Yayın evi, Ankara 135-142 (1993)
15. Owalle W. Nahirney P. C. Netter 'S Essential Histology 978-1-929007 (2009)
16. Erbenli T.; Histoloji II, 2. Baskı 156-172, SBAD Yayınları, Ankara, (1996)
17. Bedia S, CUMHUR, M.; Fonksiyonel Anatomi Baş Boyun ve İç organlar, 1. Baskı , 322- 328, Metu Press, Ankara (1999)
18. Gartner L.P., Hiatt J.L.: Color Textbook of Histology. Second Ed.,487- 508 W.B Saunders Company, Philadelphia, (2001)
19. Kierszenbaum AL. (Çeviri Editörü: Demir R.): Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş, Palme Yayıncılık , Ankara, (2006)
20. Irwin, Berman.: Color Atlas of Histology. Second Ed., Appleton & Lange, Connecticut, (1998)
21. Erkoçak A. Özel Histoloji, Genital Sistem, Ankara üniversitesi tıp fakültesi yayınları, 2.baskı,:166-194 Ankara (1990)
22. Jangueria LC., Carneiro J., Kelley OR.: Temel histoloji (Çev: Aytekin Y., Solakoğlu S., Ahışhalı B.) syf: 407-419, 431-433, Barış kitabevi, (1998)
23. Tekelioğlu M. Özel Histoloji, ince yapı ve gelişme, Erkek Üreme Sistemi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 1. Baskı,:231-244 Ankara (2002)
24. Hermo Cyr D. G., Egenberger L., Mertineit N., Laird D.W.: Cellular Immunolocalization of occludin during embryonic and postnatal development of the mouse testis and epididymis, Endocrinology, 140: 3815-3825, (1999)
25. Madgar I, Weissenberg R, Lunafeld B, Goldwasser B. Controlled trial of high spermaticvein ligation for varicocele in infertile men. Fertil Steril,; 63-120. (1995)
26. 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;69:959-967(2003)
27. Henriksen K, Kangasniemi M, Parvonen M.In vitro, folliclestimulating hormone prevents apoptosis and stimulates deoxyribonucleic acid synthesis in the rat seminiferous epithelium in a stage-specific fashion.Endocrinology.;137(5):2141-2149. (1996)
28. Özdamar S, Çetin N Sorkun H. Genel Embriyoloji, E.Ü.T.F Yayınları Kayseri:4-15. (2002)

29. Ganong, W.F., Ganong Tıbbi Fizyoloji, (Çev: Doğan A.), Barış Kitapevi, İstanbul- (1995)
30. Guyton, A.C. at Hall, J.E., Textbook of medical physiology, Harcour Brace, 9th Edition – (1996)
31. Seeley, R.R., Stephens, T.D. at Tate, P., , Essential of Anatomy and Physiology, Third Edition, MC Graw Hill, North America. (1999)
32. Ameisen J S. The origin of programmed cell death. Science 272: 1278,. 58 (1996)
33. Thompson C B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science 267: 1456-1462, (1995)
34. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death apoptosis. Eur J Endocrin 18: 482-491, (1998)
35. Majno G, Joris I: Apoptosis, oncosis and necrosis: An overview of cell death. Am J Pathol; 146:3-15. (1995)
36. Özorun Y. Apoptosis. In: Robbins S. Cotran R, Kumar V. Basic Pathology fifth edition. Philadelphia: WB Saunders company.: 14-5 (1992)
37. Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer 26: 239-245, (1972)
38. Fauser BCJM, Rutherford AJ, Strauss JF, Van A: Molecular biology in reproductive medicine; Parthenon Publishing Group Inc. New York (1999)
39. Hengartner M.O.The Biochemistry Of Apoptosis. Nature . 407;(2000)
40. Ulukaya E., Apoptozis Ders Notları, Uludag Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. http://biyokimya.uludag.edu.tr/apoptozis_ders_notu.pdf
41. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. Toxicol Pathol.;35(4): 495– 516. (2007)
42. Balakumran A, Champbell G A, Maslen M T. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. Toxicol Appl Pharmacol 139: 122-127, (1996)
43. Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284: 555- 556, (1980)
44. Donepudi M., Grutter M.G. Structure and zymogen activation of caspases. Biophysical Chemistry;101 –102:145–53 (2002)
45. Cohen J J. Apoptosis. Immunol Today 14: 126-130, (1993)
46. Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284: 555- 556, (1980)

47. Twigg J., Fulton N., Gomez E., Irvine D.S., ve ark. Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum Reprod*;13(6):1429–36. (1998)
48. Lu J, Ashwell K, Ken W S, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine* 25: 1859-1866, (2000)
49. Brooks N.L.: Apoptotic Markers in Ejaculated Human Spermatozoa. http://etd.uwc.ac.za/usrfiles/modules/etd/docs/etd_init_5617_1174551574. (2006)
50. Sheikh MS, Fornace Aj-Jr. Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol*;182: 171-181 (2000)
51. Mountz JD, Zhou T, Apoptosis and autoimmunity. In: Kopman WJ, ed. *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions*. Lippincott-Williams&Wilkins (2001)
52. Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS, *Apoptosis*, 6: 103–116, (2001)
53. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.*;35(4): 495–516. (2007)
54. Ow Y-L P., Green R.D., Hao Z., Mak T.W.: Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Vol 9 :532-542 July; (2008)
55. Solakoğlu Z. İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, İstanbul Apoptoz Varlığı ya da Yokluğu Bir Hastalık Nedeni www.Stetuskop.com/4
56. Gewies A. Introduction to apoptosis: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev> <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/aporev.htm>
57. Keith B, Elkon. Apoptosis. In: Edward D. Herris JR. Shaun R. Kelley's *Textbook of Rheumatology* sixth edition Volum1. Philadelphia: W.B. Sonders Company, 291-300
58. Donepudi M., Grutter M.G. Structure and zymogen activation of caspases. *Biophysical Chemistry*;101 –102:145–53 (2002)
59. Hengartner M.O. The Biochemistry Of Apoptosis. *Nature*; 407 (2000)
60. Sinha Hikim A P, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X-H, Swerdloff R S. Spontaneous germ celi apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed celi death. *J Clin Endoc and Metab*, 83: 152,(1998)
61. Sharpe R M: Regulation of spermatogenesis. in *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E, Neill J D. Raven Press. New York, pp: 1364-1434, (1994)

62. Beumer T L, Roepers L H, Gademan S U, Lock M T W, Tycho K B, Kal H B, Rooij D G. Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development*. 56: 353-359, (2000)
63. Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol*. 86: 598-606, (2000)
64. Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of celi types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil*, 95: 825-830, (1992)
65. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic Celi Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Celi Survival. *Pediatric Research*. 40: 351-356, (1996)
66. Davis J R, Firlit C F. The germinal epithelium of cryptorchid testes, experimentally induced in prepubertal and adult rats. *Fertil Steril*. 17: 187-200, (1986)
67. Tapanainen J S, Tilly J L, Vihko K K, Hsueh A J W. Hormonal control of apoptotic celi death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular celi survival factors. *Mol Endocrinol*, 7: 643-650, (1993)
68. Sultatos, L.G., "Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides", *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 43: 271-289 (1994)
69. Elsa Salazar-Arredondo, Mari'a de Jesu's Soli's-Heredia, Elizabeth Rojas-Garci'a: Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their metabolites in human spermatozoa. *Reprod Toxicol*. 2008 Aug; 25(4):455-60. Epub (2008)
70. Suresh C. Joshi, Reena Mathur, Anita Gajraj: Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 14 91-98(2003)
71. Karalliadde, L. C., "Organophosphorus poisoning and anesthesia", *Anesthesia*, 54: 1073-1088 (1999)
72. Kwong TC. Organophosphate pesticides: biochemistry and clinical toxicology. *Ther Drug Monit*.;24(1):144-9. (2002)
73. Sultatos, L.G., "Mammalian toxicology of organophosphorus pesticides", *J. Toxicol. Env. Health*., 43: 271-289 (1994)

74. Betrosian, A., Balla, M., Kafiri, M., Kofinas, G., Marki, R. And Kakouri, A., "Multiple systems organ failure from organophosphate poisoning", *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 33 (3): 257-260 (1995).
75. Neishabouri, E.Z., Hassan, Z.M., Azizi, E. And Ostad, S.N., "Evaluation of immunotoxicity induced by diazinon in C57bl/6 mice", *Toxicology*, 196: 173-179 (2004)
76. Rodrigo, L., Hernandez, A.F., Lopez-Caballero, J.J., Gil, F., And Pla, A., "Immunohistochemical evidence for the expression and induction of paraoxonase in rat liver, kidney, lung and brain tissue. implications for its physiological role", *Chem-Biol. Interact.*, 137: 123-137 (2001)
77. Joshi, S.C., Mathur, R., Gajraj, A. And Sharma, T., "Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats", *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 14: 91-98 (2003)
78. Yavuz, T., Altuntaş, I., Delibaş, N., Yıldırım, B., Candır, O., Cora, A., Karahan, N., İbrişim, E. And Kutsal, A., "Cardiotoxicity in rat induced by methidathion and ameliorating effect of vitamins E and C", *Hum. Exp. Toxicol.*, 23: 323-329 (2004)
79. Kedzierski, A., "Psychological effects of chronic exposure to organophosphate pesticides-review of the literature", *Med. Pr.*, 41 (2): 92-94 (1990).
80. Bazylewicz-Walczak, B., Majczakowa, W. And Szymczak, M., "Behavioral effects of occupational exposure to organophosphorus pesticides in female green house planting workers", *Neurotoxicology.*, 20 (5): 819-826 (1999).
81. Narayana K., Prashanthi N., Nayanatara A., Neonatal methyl parathion exposure affects the growth and functions of the male reproductive system in the adult rat
Revised 20 September; Accepted 20 September (2006)
82. Akkuş, İ., "Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri", *Mimoza Yayınevi, Sağlık dizisi 5, Konya* 1-132 (1995).
83. Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Bairy LK, An organophosphate insecticide methyl parathion (o- o- dimethyl o-4-nitrophenyl phosphorothioate) induces cytotoxic damage and tubular atrophy in the testis despite elevated testosterone level in the rat. *J Toxicol Sci* Aug;31(3):177-89. (2006)
84. Salazar E. -Arredondo a,b, Mari'a de Jesu' s Soli's-Herediaa, Elizabeth Rojas-Garci'a a,c, Isabel Hern'andez-Ochoaa, Betzabet Quintanilla-Vegaa, Sperm chromatin alteration and DNA damage by methyl-parathion, chlorpyrifos and diazinon and their metabolites in human spermatozoa *Reproductive Toxicology* 1-6; (2008)
85. WHO, "Environmental Health Criteria: Methyl parathion", *IPCS, Geneva*, (1993).

86. Hertel. F. Methyl Parathion, Fraunhofer Institute of Toxicology and Aerosol Research, Hanover, 73
87. Chambers, J.E., Chambers, H.W., Snawder, J.E., Target site and activation of the neurotoxic organophosphorous insecticide parathion in partially hepatectomized rats. 48, 1023-1029. (1991)
88. Proctor, N.H., Hughes, S.P., Fishman, M.L., eds. Chemical hazards of the workplace. 2nd ed. Philadelphia, PA: JB Lippincott Company, 340-344 (1988)
89. Kazanç MB. Antioksidan vitaminler. Sendrom. Temmuz,;14-23 (1997)
90. Stephen B, Kyle L, Yong X, Cynthia A, Donald E, Earl F, James E. Role of oxidative stress in the mechanism of dieldrin's hepatotoxicity. Annals of Clinical and Laboratory Science; 27(3) : 196-208. (1997)
91. Aitken RJ, Clarkson JS. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. J Androl.;9(6):367-76. (1988)
92. Onat, T., Emerk, K.: Temel Biyokimya, Saray Medikal Yayıncılık, 1.Baskı, 2.Cilt Bornova/İzmir,(1996)
93. Mateo AO, Aleixandren MA. Nitric oxide reactivity and mechanisms involved in its biological effects. Pharmacological Research.;42(5):48-559 (2000)
94. Dündar, Y., Aslan, R.: Hücre Moleküler Statüsünün anlaşılmasında ve Fizyolojik Önem Açısından Radikaller-Antioksidanlar. Cerrahi Tıp Bilimleri Derg. İnsizyon, 2(2): 134-142, (1999).
95. Mansouri A, Demeilliers C, Amsellen S, Pessare D, Fromenty B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse, liver, brain, heart and skeletal muscles: protective effects of antioxidants. J Pharmacol Exp Ther;298:737-43 (2001)
96. Halliwell B, Gutteridge JMC, Free radicals in biology and medicine, 3rd Ed., oxford university pres; (2001)
97. Nyska A, Kohen R, Oxidation of biological systems: oxidative stres phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantificatio. Toxicol pathol., 30, 620-650. (2002)
98. Murrant CL, Reid MB. Detection of reactive oxygen and reactive nitrogen species in skeletal muscle. Microscopy Research and Technique;55:236-248 (2001)
99. Köse K, Doğan P. Lipid Peroksidasyonu. Erciyes Tıp Dergisi;Ek-1:340-50. (1992)
100. Erden M, Bor NM. Changes of reduced glutathione, glutathione peroxidase after radiation in guinea pigs. Biochemical Med. 31: 217-227, (1984)

101. Mitchell JB, Russo A. The role of glutathione in radiation and drug induced cytotoxicity. *Br J Cancer*. 55: 96-104, (1987)
102. Blakely WF. Hydrogen peroxide induced base damage in DNA. *Radiat Res*. 121: 338-343, (1990)
103. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies JM. Biochemistry and pathology of radical mediated protein oxidation. *Biochem J*;324: 1-18. (1997)
104. A.V. Raoa, L.G. Raob Invited review Carotenoids and human health *Pharmacological Research* 55 207–216(2007)
105. Cheeseman K, Slater T. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*;49:481-493;(1993)
106. Menteş G, Eröz B. Harper'ın Biyokimyası. Barış Yayınevi, İstanbul. 1993, s.306-7.
107. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119(6):598-620. (1992);
108. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215(2):213-9. (1993);
109. Szelenyi I, Brune K. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. *Dig Dis Sci* 33: 865-71(1988);
110. Kwiczen S, Brzozowski T, Konturek SJ. Effect of reactive oxygen species action on gastric mucosa in various models of mucosal injury. *Journal of Physiology and Pharmacology*;53(1):39-50. (2002)
111. Brzozowski T, Kwiczen S, Konturek PC, Konturek SJ, Mitis-Musiol M, Duda A, Bielanski W, Hahn EG. Comparison of nitric oxide-releasing NSAID and vitamin C with classic NSAID in healing of chronic gastric ulcers; involvement of reactive oxygen species. *Med Sci Mont* 7(4):592-9. (2001)
112. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N, Garcia Ruiz C, Colell A, Miranda M, Mari M, Ardite E, Morales A. GSH transport in mitochondria: defense against TNF-induced oxidative stress and alcohol-induced defect. *Am J Physiol*;273:7–17. (1997)
113. Hanzel CE, Villaverde MS, Verstraeten SV. Glutathione metabolism is impaired in vitro by thallium(III) hydroxide. *Toxicology*;207(3):501–10. (2005)
114. Rao AV, Rao LG. (2007). Carotenoids and human health. *Pharm Res* 55: 207-216.
115. Rao AV, Ray MR, Rao LG. Lycopene. *Advances In Food and Nutrition Research*; 51:99-164. (2006)
116. Stahl W, Junghans A, Boer BD, Driomina ES, Briviba K, Sies H. Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett* 427(2): 305-308. (1998)

- 117.Rao AV, Agarwal S.. Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: A review. *Nutr Res* 19(2): 305-323. (1999)
- 118.Shi J, Mazza G, Maguer M. Lycopene from tomatoes. *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects* 2: 136-152(2002)
- 119.Shixian Q, Dai Y, Kakuda Y, Shi J, Mittal G, Yeung D, Jiang Y. Synergistic antioxidative effects of lycopene with other bioactive compounds. *Food Rev Int* 21(3): 295-311. (2005)
- 120.Khachik F., Spangler CJ., Smith JC. Jr., Canfield LM., Steck A., Pfander H.: Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum.*Anal Chem.* 15;69(10):1873-81, (1997)
- 121.Stahl W., Sies H.: Bioactivity and protective effects of natural carotenoids *BBA*Molecular basis of disease vol. 1740:2:101-107, (2005)
- 122.Kucuk O., Sarkar FH., Djuric Z., Sakr W., Pollak MN., Khachik F., Banerjee M., Bertram JS., Wood DP. Jr.: Effects of lycopene supplementation in patients with localized prostate cancer.*Exp Biol Med (Maywood).* 227(10):881-5, (2002)
- 123.Bramley PM.: Is lycopene beneficial to human health? *Phytochemistry.* 54(3):233 - 236, Review (2000)
- 124.Khachik F., Carvalho L., Bernstein PS., Muir GJ., Zhao DY., Katz NB.: Chemistry, distribution and metabolism of tomato carotenoids and their impact on human health. *Exp Biol Med (Maywood).* 227(10):845-51, (2002)
- 125.Clinton SK. Lycopene: Chemistry, biology, and implications for human health and disease. *Nutr Rev* 1: 35-51. (1998)
- 126.Agarwal A, Shen H, Agarwal S, Rao A. Lycopene content of tomato products: its stability, bioavailability and in vivo antioxidant properties. *J Med Food* 4(1): 9-15
- 127.Agarwal S, Rao VA. Tomato lycopene and its role in human health and chronic diseases. *CMAJ* 2000;163:739-744. (2001).
- 128.Cohen L. A review of animal model studies of tomato carotenoids, lycopene, and cancer chemoprevention. *Experimental Biology and Medicine* 2002;227:864-868.
- 129.Clinton SK, Zaripheh S, Monaco MH, Donovan SM, Erdman JW, Testosterone and Food Restriction Modulate Hepatic Lycopene Isomer Concentrations in Male F344 rats. *J Nutr*, 131(6), 1746-1752. (2001)
- 130.Stahl W, Sies H Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. *BBA* molecular basis of disease vol., 1740(2), 101-107. (2005)

- 131.Rao AV, Agarwal S. Bioavailability and in vivo antioxidant properties of lycopene from tomato products and their possible role in the prevention of cancer. *Nutr Cancer*;31:199–203. (1998)
- 132.Kaplan LA., Lau JM., Stein EA.: Carotenoid composition, concentrations, and relationships in various human organs. *Clin Physiol Biochem.* 8(1):1-10.(1990)
- 133.Clinton SK., Emehiser C., Schwartz SJ., Bostwick DG., Williams AW., Moore BJ., Erdman JW. Jr.: cis-trans lycopene isomers, carotenoids, and retinol in the human prostate *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 5(10):823-33, (1996)
- 134.Khachik F., Askin FB., Lai K.: Distribution, bioavailability, and metabolism of carotenoids in humans. In: Bidlack WR, Omaye ST, Meskin MS, Jahner D. Eds. *Phytochemicals, a New Paradigm.* Lancaster, PA: Technomic Publishing, Chapter 5: pp77– 96, (1998).
- 135.Free MJ, Schluntz GA, Jaffe RA. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biol Reprod*; 14:481-488. (1976)
- 136.Chen H, Liu J, Luo L et al. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol*;40:728-736. (2005)
- 137.Banfi B, Molnar G, Maturana A et al. A Ca (2+)-activated NADPH oxidase in testis, spleen, and lymph nodes. *J Biol Chem*; 276:37594-37601. (2001)
- 138.Kumagai A, Kodama H, Kumagai J et al. Xanthine oxidase inhibitors suppress testicular germ cell apoptosis induced by experimental cryptorchidism. *Mol Hum Reprod.*; 8:118-123. (2002)
- 139.Zini A, Schlegel PN. Catalase mRNA expression in the male rat reproductive tract. *J Androl*;17:473-480. (1996)
- 140.Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M. Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *J Androl*; 13. (1992)
- 141.Mruk DD, Silvestrini B, Mo MY et al. Antioxidant superoxide dismutase - A review: Its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*; 65:305-311(2002)
- 142.Solecki, R., Fagi, A.S., Pfeil, R. And Hilbig, V., “Effects of methyl parathion on reproduction in the Japanese quail”, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57: 902-908. (1996)
- 143.Fanta, E., Rios, F.S.A., Romao, S., Vianna, A.C.C. And Freiburger, S., “Histopathology of the fish *Corydoras paleatus* contaminated with sublethal levels of

- organophosphorus in water and food”, *Ecotoxicology and Environment Safety*, 54: 119-130 (2003).
144. Edwards, F.L. And Tchounwou, P.B., “Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure- A Scientific Review”, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2 (3-4): 430-441 (2005)
145. Gains, T.B., “The acute toxicity of pesticides to rats”, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2: 88-99 (1960).
146. Institoris, L., Papp, A., Siroki, O. And Banerjee, B.D., “Comparative investigation of behavioral, neurotoxicological, and immunotoxicological indices in detection of subacute combined exposure with methyl parathion and propoxur in rats”, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 270-277 (2004)
147. Chung, M.K., Kim, J.C. And Han, S.S, “Developmental toxicity of flupyrazofos, a new organophosphate insecticide, in rats”, *Food and Chemical Toxicology*, 40: 723-729 (2002).
148. Joshi, S.C., Mathur, R., Gajraj, A. And Sharma, T., “Influence of methyl parathion on reproductive parameters in male rats”, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 14: 91-98 (2003)
149. Uzunhisarcikli, M., Kalender, Y., Dirican, K., Kalender, S., Ogutcu, A., And 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*, 87: 115–122 (2007).
150. Zhu, H., Rockhold, R.W., Baker, R.C., Kramer, R.E. And Ho, I.K. “effects of single or repeated dermal exposure to methyl parathion on behavior and blood cholinesterase activity in rats”, *Journal of Biomedical Science*, 8. 467-474 (2001).
151. Yousef M.I., Ibrahim, H.Z., Salem, H.M., Hassan, G.A., Helmi, S. And Bertheussen, K., “Hematological and biochemical change induced by carbofuran and glyphosate in rabbits”, *Environmental Nutrition Interaction*, 3: 179–194 (1999).
152. Farag, A.T., Eweidah, M.H., Tayel, S.M. And El-Sebae, A.H., “Developmental toxicity of acephate by gavage in mice”, *Reproductive Toxicology*, 14: 241-245 (2000)
153. Mahgoub AA, El-Medany AH. Evaluation of chronic exposure of the male rat reproductive system to the insecticide methomyl. Department of Pharmacology, College of Medicine, King Saud University, P. O. Box 22452, Riyadh 11495, Saudi Arabia. *Pharmacol Res.* Aug;44(2):73-80. (2001)

- 154.Khan IA, Reddy BV, Mahboob M, Rahman MF, Jamil K. J Effects of phosphorothionate on the reproductive system of male rats. *Biology Division, Indian Institute of Chemical Technology, Hyderabad Environ Sci Health B. Jul;36(4):445-56,(2001)*
- 155.Okamura, A., Kamijima, M., Shibata, E., Ohtani, K., Takagi, K., Ueyama, J., Watanabe, Y., Omura, M., Wang, H., Ichihara, G., Kondo, T., And Nakajima, T., “A coprehensive evaluation of the testicular toxicity of dichlorvos in Wistar rats” *Toxicology, 213: 129-137 (2005)*
- 156.Dutta HM., Meijer HJM. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analyzis. *Environmental pollution,; 125: 355-360.(2003)*
- 157.Xu, L., Zhan, N., Liu, R., Song, L, Wang, X., “Joint action phoxim and fenvalerate on reproduction in male rats”, *Asian J. Androl., 6: 337-341, (2004).*
- 158.Ateşşahin A. Yılmaz S, Karahan İ, Çeribaşı O, Karaoğlu A Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicityand oxidative stress in *Toxicology 212 116–123(2005)*
- 159.Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregón E. Melatonin prevents damage elicited by the organophosphorous pesticide diazinon on mouse sperm DNA. *Ecotoxicol Environ Saf. Feb;72(2):663-8. Epub 2008 Jun 20. (2009)*
- 160.Bustos E. -Obregón & Patricio González-Hormazábal Mıce testicular damage elicited by malathion *Int. J. Morphol., 21(2):155-159, (2003).*
- 161.Hazarika, A., Sarkar, S.N., Hajare, S., Kataria, M. and Malik, J.K., “Influence of malathion pretreatment an the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study”, *Toxicology, 185: 1-8 (2003)*
- 162.Oruç, E.Ö. and Üner, N., “Combined effects of 2,4-d and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Orochromis niloticus*”, *Comp. Biochem. Physiol., 127: 291–296 (2000)*
- 163.Çelik İ., Süzek H., Subacute effects of methyl parathion on antioxidant defense systems and lipid peroxidation in rats *Food and Chemical Toxicology 46 2796–2801(2008)*
- 164.Kalender S ,Kalender Y,Durak D, Öğütçü A, Uzunhisarcikli M., Çevrimli M, Yildirim M. Methyl parathion induced nephrotoxicity in male rats and protective role of vitamins C and E Received 18 October 2006; accepted 15 November (2006)

165. Seven A, Candan G. Antioksidant defense systems. *Cerrahpaşa J Med.* 27: 41-50. (1996);
166. Tekcan M. Oksidatif stres-antioksidan sistemler ve testis Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AD derleme 131-135
167. M. A. Akbarsha, P. N. L. Latha and P. Murugaian Retention of cytoplasmic droplet by rat cauda epididymal spermatozoa after treatment with cytotoxic and xenobiotic agents *Journal of Reproduction and Fertility* 120, 385–390(2000)
168. D. Jonker, C.F. Kuper, N. Fraile, A. Estrella, and C. Rodriguez Oteroc. Ninety-day oral toxicity study of lycopene from *Blakeslea trispora* in rats *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 37 396–406(2003)
169. Ateşşahin A., Gaffari T., İzzet K.: Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Nutr Rev*, 56, 35–51. Clinton SK, (1998)
170. H. Salman , M. Bergman , M. Djaldetti: Lycopene affects proliferation and apoptosis of four malignant cell lines. *Biomed Pharmacother.* Jul;61(6):366-9. Epub 2007 Mar 19(2007)
171. Stahl W., Junghans A., de Boer B., Driomina ES., Briviba K., Sies H.: Carotenoid mixtures protect multilamellar liposomes against oxidative damage: synergistic effects of lycopene and lutein. *FEBS Lett.* May 8;427(2):305-8, (1998)
172. Yaping Z., Suping Q., Wenli Y., Zheng X., Hong S., Side Y., Dapu W.: Antioxidant activity of lycopene extracted from tomato paste towards trichloromethyl peroxy radical CCl₃O₂ *Food Chemistry*, 77 , 209-212, (2002)
173. Breinholt V, Lauridsen ST, Daneshvar B, Jakobsen J. Dose-response effects of lycopene on selected drug-metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. *Cancer Lett* 154 201-210. (2000)
174. Ateşşahin A., Yılmaz S., Karahan İ., Çeribaşı AO., Karaoğlu A., Effects of lycopene against cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats *Toxicology* 212 116–123(2005)
175. Ateşşahin A, Türk G, Karahan I, Yılmaz S, Ceribaşı AO, Bulmuş O, Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril.* Apr;85 Suppl 1:1216-22, (2006)