

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Dİ-N BÜTİL FİTALAT' IN (DBP) TESTİS ÜZERİNE ETKİSİ VE
RESVERATROL' ÜN OLASI KORUYUCU ÖZELLİĞİNİN ÇEŞİTLİ
MİKROSKOBİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SEYHAN GÜLLEN ÜNAL

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

**ANKARA
OCAK 2011**

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Dİ-N BÜTİL FİTALAT' IN (DBP) TESTİS ÜZERİNE ETKİSİ VE
RESVERATROL' ÜN OLASI KORUYUCU ÖZELLİĞİNİN ÇEŞİTLİ
MİKROSKOBİK YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
SEYHAN GÜLLEN ÜNAL

Tez Danışmanı
Doç. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

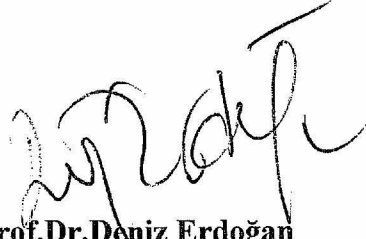
ANKARA
OCAK 2011

Bu Tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Birimi tarafından
01/2010-05 kod numaralı proje ile desteklenmiştir.

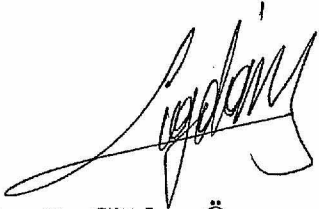
**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Programı
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.**

Tez Savunma Tarihi : 07 /01/2011



**Prof.Dr.Deniz Erdoğan
Gazi Üniversitesi**



**Doç.Dr.Çiğdem Özer
Gazi Üniversitesi**



**Doç.Dr.Gülnur Take Kaplanoğlu
Gazi Üniversitesi**

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	i
İçindekiler	ii
Resimler, Grafikler ve Tablolar	v
Kısaltmalar ve Simgeler	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Testis Embriyolojisi	5
2.2 Testis Anatomisi	7
2.2.1 Testislerin Damar ve Sinirleri	9
2.3 Testis Histolojisi	10
2.3.1 Seminifer Tübüller	11
2.3.2 Sertoli Hücreleri	12
2.3.3 Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenezis	16
2.3.4 İntersitisyel Doku ve Leydig Hücreleri	24
2.4 Testis Fizyolojisi	25
2.5 Endokrin Bozucular	29
2.5.1 Fitalatlar	30
2.5.2 Di-n Bütil Fitalat	31
2.6 Resveratrol	34
2.6.1 Fransız Paradoksu	35
2.6.2 Kalp Sağlığı Üzerine Etkileri	36
2.6.3 Antioksidan Etkileri	37
2.6.4 Antikanserojen Etkileri	38
2.6.5 Antienflamatuar Etkileri	39
2.6.6 Östrojenik Etkileri	40
2.6.7 Antitrombosit Etkileri	40
2.6.8 Kan Yapıcı Etkileri	41

2.6.9 Karaciğer Koruyucu Etkisi	41
2.6.10 Herpes Simpleks Virüsü Üzerine Etkileri	42
2.6.11 Helikobakter pylori üzerine etkileri	42
2.7 Karboksimetil selüloz	44
2.8 Kullanılan Antikorlar	48
2.8.1 C-Kit	48
2.8.2 Anjiyotensin II Reseptörleri	50
2.8.2.1 Anjiyotensin II Tip I Reseptörleri	50
2.8.2.2 Anjiyotensin II Tip II Reseptörleri	52
2.8.3 Östrojen Reseptörleri	53
2.8.3.1 Östrojen Reseptör Alfa	54
2.8.3.2 Östrojen Reseptör beta	54
2.8.4 TUNEL Yöntemi	55
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	58
3.1 Deney Hayvanları ve Gruplandırma	58
3.2. İmmunohistokimyasal Yöntem	59
3.3 TUNEL Yöntemi	60
3.4 İstatistiksel Yöntem	61
4. BULGULAR	63
4.1 İmmünohistokimyasal Bulgular	63
4.2 İstatistiksel Bulgular	69
5.TARTIŞMA	122
6. SONUÇ	139
7. ÖZET	141
8. SUMMARY	143
9. KAYNAKLAR	145
10.EKLER	164
EK-1: Etik Kurul Raporu	164

11.TEŞEKKÜR	165
12.ÖZGEÇMİŞ	167

ŞEKİLLER, RESİMLER VE GRAFİKLER

ŞEKİLLER:

Şekil 1. Spermatogenik hücreler ve Sertoli hücreleri

Şekil 2: Spermatogenezisin şematik görünümü

Şekil 3: Karboksimetil selüloz' un kimyasal formülü

RESİMLER

Resim 1: Kontrol grubu c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400)

Resim 2: Kontrol grubu c-kit tutulumu. (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X 1000)

Resim 3: CMC uygulanan grupta c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400)

Resim 4: CMC uygulanan grupta c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 5: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X100,B X400)

Resim 6: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 7: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X400, B X100)

Resim 8: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 9: 1000 mg/kg DBP uygulanan grupta c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100)

Resim 10: 1000 mg/kg DBP uygulanan grupta c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X400)

Resim 11: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400)

Resim 12: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta c-kit tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 13: Kontrol grubu AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400).

Resim 14: Kontrol grubu AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X 1000).

Resim 15: CMC uygulanan grupta AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400)

Resim 16: CMC uygulanan grupta AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X 1000)

Resim 17: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100)

Resim 18: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 19: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400)

Resim 20: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X 1000)

Resim 21: 1000 mg/kg DBP uygulanan grup AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100)

Resim 22: 1000 mg/kg DBP uygulanan grup AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100)

Resim 23: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400).

Resim 24: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 25: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta AT1 tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 26: Kontrol grubu ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400)

Resim 27: Kontrol grubu ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 28: CMC uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X100,B X400)

Resim 29: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100)

Resim 30: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100)

Resim 31: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100)

Resim 32: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 33: 1000 mg/kg DBP uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X100)

Resim 34: 1000 mg/kg DBP uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X400)

Resim 35: 1000 mg/kg DBP uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 36: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X100)

Resim 37: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X400)

Resim 38: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta ER α tutulumu (İmmunperoksidaz & Hematoksilen, X1000)

Resim 39: Kontrol grubu testis dokusunda TUNEL yöntemi ile apoptozisin belirlenmesi (TUNEL & Metil yeşil, A X 400, B X 100)

Resim 40: CMC uygulanan grup testis dokusunda TUNEL ile apoptozisin belirlenmesi (TUNEL & Metil yeşil, A X 100, B X 1000)

Resim 41: 500 mg/kg DBP uygulanan grup testis dokusunda TUNEL yöntemi ile apoptozisin belirlenmesi (TUNEL & Metil yeşil, A X 100, B X 400)

Resim 42: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grup testis dokusunda TUNEL yöntemi ile apoptozisin belirlenmesi (TUNEL & Metil yeşil, A X 100, B X 1000)

Resim 43: 1000 mg/kg DBP uygulanan grup testis dokusunda TUNEL yöntemi ile apoptozisin belirlenmesi (TUNEL & Metil yeşil, A X 100, B X 400)

Resim 44: 1000 mg/kg DBP uygulanan grup testis dokusunda TUNEL yöntemi ile apoptozisin belirlenmesi (TUNEL & Metil yeşil, X 1000)

Resim 45: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grup testis dokusunda TUNEL yöntemi ile apoptozisin belirlenmesi (TUNEL & Metil yeşil, X 1000)

TABLolar

Tablo 1: Seminifer Epitel Yüksekliği

Tablo 2: Seminifer Tübül Çapı

GRAfİKLER

Grafik 1: Deney gruplarının seminifer epitel kalınlığına göre değerlendirildiği istatistiksel grafik

Grafik 2: Deney gruplarının seminifer tübül çapına göre değerlendirildiği istatistiksel grafik

SEMBOLLER, KISALTMALAR

ABP	:Androjen Bağlayıcı Protein
Ad	:Koyu A Tipi Spermatogonyum
AhR	:Aril hidrokarbon reseptör
AMH	:Anti Müllerian Hormon
Ang II	:Anjiyotensin II
AP	:Açık A Tipi Spermatogonyum
AT1	:Anjiyotensin II Tip I Reseptörü
AT2	:Anjiyotensin II Tip II Reseptörü
BaP	:Benzo(a) piren
BBP	:Benzil bütil fitalat
CagA+	: Sitotoksin ilişkili gen A
Cd	:Kadmiyum
CMC	:Karboksimetil selüloz
COX 1	:Siklooksijenaz 1
DBP	:Di-n bütil fitalat
DEHP	:Di-etil hekzil fitalat
ER	:Östrojen reseptör
FSH	:Folikül stimule eden hormon
GnRH	:Gonadotropin serbestleştirici hormon
2.5 HD	:2,5 Hekzanadiyon
HSV	:Herpes simpleks virüsü
InsI 3	:İnsülin- benzeri faktör 3
LH	:Luteinize eden hormon
MBP	:Mono bütil fitalat
MBzP	:Mono benzil fitalat
MEHP	:Mono-2-etil hekzil fitalat
MEP	:Mono etil fitalat
MIS	:Müller kanallarını baskılayıcı madde
NO	:Nitrik oksit
NOAEL	:Olumsuz etki gözlenmeyen düzey
NTP	:Ulusal Toksikoloji Programı
Prdx6	:Peroksiredoksin 6
RAS	:Renin- Anjiyotensin Sistem
SCF	:Kök hücre faktörü
TDF	:Testis belirleyici faktör
TDS	:Testiküler disgenez sendrom
TdT	:Terminal deoksinükleotid transferaz
TNF-α	:Tümör nekroz faktör
TRPM-2	:Testosterone- repressed prostate message-2
TUNEL	:Terminal dUTP nick end labeling

1.GİRİŞ

Dünyada çeşitli alanlarda kullanılan yüzbinden fazla kimyasal pazarlanmakta ve bunlar hakkında bilgilendirmeler oldukça yetersiz kalmaktadır. Kimyasallara düşük dozlarda etkin kalma bile, özellikle gebe ve çocuklar gibi duyarlı gruplarda, geri dönüşümsüz hasarlara neden olabilmektedir.^{1,2}

Sentetik endokrin bozucular grubunda yer alan di-n-bütil fitalat (DBP) da bu zararlı kimyasallar arasında öne çıkmaktadır.³ DBP'nin emzik, biberon, oyuncak, kan torbası, i.v. infüzyon tüpü ve diğer medikal malzemelerden, besin ambalaj materyali, tekstil, kozmetik ve yapı malzemelerine değin çok çeşitli kullanım alanı bulunmaktadır.^{4,5,6,7} Yapı malzemeleri ve ev eşyalarındaki aşırı kullanım nedeniyle iç ortam havasında dahi saptanabilmektedir. Ev tozunun da önemli bir parçasıdır.⁶ Düşük miktarlarda da olsa içme suyunda bile kirletici olarak saptanmıştır.⁸ Düşük molekül ağırlığına sahip olmaları nedeniyle, sudaki çözünürlük değerleri altındaki derişimlerde, su ve topraktaki mikroorganizmalar için akut ve süreğen toksisiteye sahiptir ve çözünürlükleri arttıkça toksik etkileri artar.⁹ Son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada fitalat ve başlıca metabolitlerinin insan vücudunda varlığı bildirilmiştir.^{10,11}

USEPA tarafından fitalatların çevreye ve insan sağlığına zararlı olduğu bildirilmiş ve öncelikli kirleticiler listesine alınmışlardır.¹²

Son yıllarda yapılan çalışmalarla fitalatların çocuklarda alerjik hastalıklar ve astıma, yetişkinlerde cilt sorunlarına neden olduğu bulunmuştur. Bunun yanında DBP' nin organlara zarar verdiği ve üreme sisteminde hasarlar oluşturduğu bildirilmiştir. Ayrıca hormon

düzeylerinde, karaciğer metabolizmasında ve bağışıklıkta ciddi hasarlara neden olduğu da bilinmektedir.^{6,13}

DBP' nin embriyonal gelişimi olumsuz etkilediği saptanmıştır. Organogenezis sürecinde maternal uygulanmanın yavru sıçanların gelişimini olumsuz yönde etkilediği görülmüştür.¹⁴ Ayrıca embriyonun canlılığı üzerine zararlı etkisi saptanmıştır. DBP, uterusda desidualizasyonu da olumsuz etkiler ve düşüklere neden olur.¹⁵

DBP' nin olgun ve olgunlaşmamış sıçanlarda testiküler disfonksiyona neden olduğu bilinmektedir. Pek çok araştırmacı fetalat esterlerinin başlıca hedefinin sıçan testislerindeki seminifer tübüller olduğunu belirtmiştir.¹⁶

DBP ve diğer fetalat esterlerinin oluşturduğu testiküler hasarın yaşa koşut olduğu belirlenmiştir.^{17,18} Ayrıca DBP'ye etkin kalmada dozun önemi büyüktür; yüksek doz uygulamada spermiyum sayılarında azalma ve üreme sistemi bozuklukları ile birlikte üreme verimliliğinde düşüş gözlenirken, düşük dozlarda bu etkilerin ender olduğu vurgulanmıştır.^{19,20}

Günlük yaşamın hızlı ve yorucu temposu, dengesiz beslenme, uyku düzensizliği, yoğun stres ile toksik maddeler ve bunların vücudumuzda oluşturduğu oksidatif hasar gün geçtikçe daha ciddi boyutlara ulaşmaktadır. DBP de bu koşulları oluşturan önemli etkenlerden biridir. Tüm bu olumsuz koşullara karşı antioksidan olarak adlandırılan bir grup madde, insan hayatını kolaylaştırma ve oluşan hasarları belli ölçüde engelleme, hatta tedavi edebilme yetisine sahiptir. Son dönemde antioksidanlar ve etkilerinin araştırılmasına hız verilse de aslında bazı antioksidanlar yüzyıllardır halk arasında kullanılmaktadır. Yakın geçmişten

günümüze, etkinliği ve yararlılığı üzerinde en çok durulan antioksidan Resveratrol' dür.

Resveratrol (3,4,5'-trans-trihidroksitilben) üzüm ve kırmızı şarapta bulunan doğal antioksidan, trombosit ve lökosit işlevini engelleyici ve endotel reaktivitesini arttırıcı özellikler taşıyan²¹, antikanserojen^{22,23} ve antiinflamatuvar²¹ etkili bir fitoaleksindir. Bu etkileriyle Resveratrol, iyi bir antiaterosklerotik²⁴ ve antihipertansif'dir.²⁵ Antioksidanlığı, hücre koruyucu özelliğinden kaynaklanmaktadır.²⁶ Tüm bu özelliklerinin yanı sıra, Resveratrol DNA hasarını azaltarak, kanser riskini de önlemektedir.²⁷

Resveratrol'ün biyolojik etkileriyle ilgili çalışmalar her geçen gün artmaktadır. Resveratrol'ün östrojen benzeri ve östrojen antagonisti etkiler gösterdiği bildirilmekle birlikte, östrojenle etkileşimi tam olarak bilinmemektedir.²⁷

Çalışmalarda, Resveratrol'ün erkek üreme sisteminde spermatogenezisi arttırdığı, herhangi bir etki ile oluşan hasar durumunda, hasarın zararlı etkilerini durdurduğu, hatta seminifer tübül epitel döngüsünü uyardığı ve apoptozu engellediği saptanmıştır.^{28,29,30,31}

Çalışmamızda, bir endokrin bozucu olan Di-n-bütil fitalat'ın (DBP) testiste oluşturabileceği hasarda antioksidan olarak yeğlenen Resveratrol'ün olası tedavi edici etkilerinin immünohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır. Bu erekle anormal proliferasyon belirteci olan c-kit, etkileşimin hormonal düzeyle olup olmadığını belirlemek için östrojen reseptör α , Leydig hücrelerinin etkilenme derecesini ortaya koyabilmek için AT1 ve apoptozisi simgelemek için TUNEL yöntemi ile inceleme yapıldı. Seminifer epitel kalınlıkları ve tübül

Çapları ölçülerek gruplara göre farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirildi.
Veriler kaynak bulguları ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.TESTİS EMBRİYOLOJİSİ

Bir canlının gelişimi, üreme hücrelerinin döllenme ile oluşturdukları cinsiyet kromozomları (XX, XY) ile belirlense de erkek ya da dişi gonadlarına ait yapısal özellikler embriyonal gelişimin belirli bir evresine değin ayırt edilemezler. Bu sürece farklılaşmamış evre, bu evredeki gonadlara da farklılaşmamış gonad denir.^{32,33}

İlkel üreme hücreleri büyük, yuvarlak şekilli hücrelerdir. Gelişimin 4. haftası başında allantois kesesine yakın vitellus kesesi endoderm hücreleri arasında belirirler. Embriyonun katlanması sırasında vitellüs kesesinin dorsal kısmı embriyonun içinde kalır. İlkel üreme hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca genital şişkinliklere göç ederler. Gelişimin 6. haftasında ilkel üreme hücreleri alttaki mezenşime sokulup, ilkel cinsiyet kordonları içine girerler.^{32,33,34,35}

İlkel üreme hücrelerinin gonadlara ulaşmasından hemen önce ve o sırada genital şişkinliklerin epiteli çoğalır, epitel hücreleri alttaki mezenşim içine gömülürler ve ilkel cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kordonlar yaparlar. İlkel cinsiyet kordonları yüzey epiteliyle bağlantıdadır. İlkel gonadlar dışta korteks, içte medulla bölgelerinden oluşur.^{32,33,34}

Embriyo XY kromozom çifti içeriyorsa medulla testisleri oluşturmak için ileri farklılarken, korteks dejenere olur. Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler için SRY geni, farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişiminde anahtar işlevi görür.³³

Testis belirleyici faktör (TDF), ilkel cinsiyet kordonlarını uyararak, farklanmamış gonad medullasının derinlerine doğru uzamalarına neden olur.^{32,33,36} Kordonlar mediastinum testiste dallanıp birbirleriyle anastomozlaşarak rete testisi oluştururlar. Kalın fibröz bir kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra cinsiyet kordonlarının, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur.^{32,33} Büyüyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılır ve kendi mezenterisi olan mesorşiyuma asılı hale gelir. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, *tubuli rekti* ve *rete testise* farklanırlar.³⁷

Seminifer tübüller, arasındaki mezenşimden interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) farklanır, mezenşimden ayrılırlar. 8. haftadan sonra Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve andosteron) salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik ve dış genital kanalların farklanmasını uyarır.³³ İnsan koryonik gonodotropin (hCG) hormonu testosteron üretimini artırır, hormonun miktarı 8-12 haftalık evrede en yüksek değerine ulaşmıştır. Testosterona ek olarak fetal testisler glikoprotein bir hormon olan Müller kanallarını baskılayıcı madde (MIS) ya da Antimüllerian hormon (AMH) denilen bir hormonu da salgılamaktadır. Müller kanallarını baskılayıcı madde, Sertoli hücrelerince salgılanır. Hormonun salgılanması puberteye değin sürer, daha sonra ise düzeyi azalır. AMH, paramezonefrik kanalların gelişimini baskılar.^{32,37} Seminifer tübüller, puberteye değin kapalıdır, puberteden sonra lumen açılır. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur:

- Sertoli hücreleri; destek hücreleri olarak da adlandırılan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler.^{36,38}
- Spermatogonyum; ilkel spermiyum öncülleridir, ilkel üreme hücrelerinden farklanırlar.³⁶

Fötal testiste, Sertoli hücreleri, tübüllerde çoğunluklu olan hücrelerdir. İlerleyen evrelerde, testisin yüzey epiteli yassılaşıır ve yetişkin testisinin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, duktuli efferentesi oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu kanallar, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar.^{33,35}

28. haftada testisler karın arka duvarından ayrılarak inguinal kanalın derinliğine doğru yer değıştirirler. Genelde de doğumdan önce skrotuma inmiş olurlar.^{32,33,37,39}

2.2.TESTİS ANATOMİSİ

Testisler, iki uyluk arasında deri ve fibromusküler bir torba olan skrotum içerisinde yerleşmiş ve birbirlerinden septum scroti ile ayrılan oval şekilli bir çift organdır. Testislerin her biri 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm eninde, 2-3 cm kalınlığında ve 10-14 gr ağırlığındadır. Bir testisin iki kenarı (margo anterior ve posterior), iki yüzü (facias lateralis ve medialis) ve iki ucu (extremitas superior ve inferior) bulunur.^{40,41,42}

Testisler funiculus spermaticus aracılığı ile skrotum içinde asılıdırlar. Sol funiculus spermaticus daha uzundur bu nedenle sol testis, sağ testisten biraz daha aşağı yerleşimlidir.⁴¹ Funiculus spermaticus'u içten dışa doğru fascia spermatica interna, m.cremaster ile fascia cremasterica ve fascia spermatica externa sarar.⁴⁰ Testislerin skrotum içindeki duruşları boyuna koştı olmayıp, organın uzun eksenini yukarıdan aşağı ve önden arkaya eğik durumdadır.⁴²

Testis dıştan içe tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vaskulosa olarak üç kılıf ile sarılıdır.^{34,36,38,40,43}

Tunica vaginalis, skrotumun iç yüzünü döşeyen lamina parietalis (periorchium) ve testisin üzerini örten lamina visceralis (epiorchium) olarak iki katmandan oluşur.⁴¹ Bu iki katman arasında, az miktarda seröz sıvı bulunur. Tunica vaginalis, fetal yaşamda testislerin karın boşluğundan skrotuma inerken sürükledikleri periton katmanıdır.⁴⁰

Tunica albuginea, testisi dıştan saran, mavimsi-beyaz renkli, sıkı fibröz yapılı bir katmandır. Bu katmanı oluşturan bağ dokusu lif demetleri, farklı yönlerde uzanarak birbirlerinin içine girerler. Tunica albuginea, testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis'i oluşturur. Mediastinum testis'te, testise ait damar ve sinirler ile, rete testis adı verilen kanalcıklar bulunur.⁴²

Tunica vasculosa, tunica albuginea' nın iç yüzünde bulunan damar ağı katmanıdır.⁴¹ Damarlar arasında gevşek bağ dokusu bulunur. Tunica vasculosa, tunica albuginea' nın iç yüzünü ve tübüllerin arasını döşer. Böylece testisin içindeki tüm lobülü testisi sarmış olur. Her bir testiste sayıları 250-400 arasında değişen lobülü testislerin büyüklükleri bulundukları bölgeye göre değişir.^{34,40,41} Testisin kenarında yerleşmiş olan lobülü testislere karşın, testisin ortasındakiler daha büyük ve uzundur. Her bir lopçuk içinde 1-4 arası kıvrıntılı tübül bulunur. Bu yapılara tubuli semineferi contorti (seminifer tübül) denir.⁴³ Her seminifer tübül 30-80 cm uzunluğunda ve 15-250 µm çapındadır. Lobçukların mediastinum testise bakan tepe kısmında bu tüpler gittikçe düzleşir, birbirleriyle birleşip tubuli seminiferi recti'yi oluştururlar.⁴⁰ Tubuli seminiferi rectiler mediastinum testis içine girerek arka ve yukarıya doğru uzanır, birbirleriyle anastomoz yaparak rete testis denilen ağı yaparlar. Rete testis mediastinum testis'in üst bölümünde ductuli efferentes denilen kanallara dönüşür. Bu kanallar testisin arka kenarının üst kısmından tunica albuginea'yı delerek organı terk eder.⁴¹

2.2.1. Testisin Damarları ve Sinirleri

Testis, aorta'nın dalı olan a.testikularis'den beslenir. Bu arter 2.lumbal vertebra düzeyinde aorta abdominalis'ten ayrılarak karın arka duvarında aşağı doğru uzanır. Daha sonra canalis inguinalis' ten geçerek testisi besler.⁴²

Testisin venleri testisin arka kenarından çıkarak, funiculus spermaticus'u saran plexus pampiniformis adı verilen geniş bir ven ağı oluşturur. Plexus pampiniformis yukarıya doğru çıkarken oylumunu azaltarak annulus inguinalis profundus düzeyinde tek bir vena testicularis'e dönüşür. V.testicularis karın arka duvarı üzerinde yukarıya doğru uzanarak solda v.renalis'e, sağda ise v.cava inferior' a dökülür.⁴⁰

Testisin lenfatik boşalımı yüzeyel ve derin olarak iki gruptur. Yüzeyel lenfatikler tunica vaginalisin üzerinde, derindekiler ise epididimis ve testisin içinde bulunur. Bunlar 4-8 damar şeklinde funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna girerler. V.testicularis'i izleyerek birinci lumbal vertebra düzeyinde aortanın her iki yanında bulunan lenf düğümlerine (nodi lymphatici lumbales= paraaortik lenf nodülleri) açılırlar.^{40,41}

Testisi sinirlendiren sinirler medulla spinalis'in T10-11. segmentlerinden gelir. Bu sinirler plexus aorticus ve plexus renalis içinden geçer ve testisleri besleyen damarların çevresinde dolanarak organa ulaşır. Duyusal lifler de sempatik sinirlere eşlik ederler.³⁹

2.3.TESTİS HİSTOLOJİSİ

Erkek üreme sistemi; üreme hücrelerini üreten testisler, bu hücreleri ileten boşaltım kanalları ile sisteme ait yardımcı bezler ve penisten oluşur. Tubuli rekti ve rete testis, testis içi boşaltım kanallarını; duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatorius ve üretra, testis dışı boşaltım kanallarını oluşturur. Bu yollara salgılarını boşaltan bir çift vezikula seminalis, prostat ve bir çift bulboüretral bez olmak üzere üç yardımcı (aksesuar) bez bulunur.^{34,36,38,43,45,46,47,48,49}

Testisler karın boşluğunun dışında skrotum içinde yer alırlar. Bu yerleşimleri, testislerin vücut ısısından 2-3°C derece düşük bir ısıda olmalarını sağlar. Normal spermatogenezis 34°C-35°C'de olaylanır.^{34,36}

Testisler, bileşik tubuler, ekzokrin ve endokrin işlevi olan bir çift bezdir. Testislerin ekzokrin ürünü eşey hücreleri olan spermiyumlar, endokrin ürünü ise Leydig hücrelerince üretilen testosterondur.^{34,50}

Her bir testis, tunika albuginea denilen, düz kas hücreleri içeren düzensiz sıkı bağ dokudan bir kılıf ile çevrilidir.⁴⁶ Bu kılıfı, testisin ön ve yan yüzlerinde peritondan köken alan, seröz bir kese olan, iki yapraklı tunika vaginalis örter.⁴⁷ Tunika vaginalisin dış yaprağı skrotum duvarı, iç yaprağı tunika albuginea ile değinmektedir.³⁸ Tunika albuginea, testisi koruyan bir kılıf olması yanında, içerdiği lifler ve düz kas hücrelerinin kasılmaları sonucu oluşturdukları basınçla seminifer tübüllerde oluşan spermiyumların, taşıyıcı kanallara yönelmesini sağlar.³⁴ Tunika albuginea, dinamik bir kapsül olup, periyodik kasılma erkindedir. Bu kapsülün iç kısmı tunika vaskuloza adı verilen kan damarlarından zengin gevşek bağ dokusu katmanıdır. Tunika vaskuloza, organ içine doğru uzanır ve testisin intersitisyel dokusunu oluşturur.³⁶

Tunica albuginea, testisin arka yüzeyi boyunca organın parankiması içine sokularak üçgen biçimli bir kalınlaşma yapar. Buna mediastinum testis denir.⁴³ Kan ve lenf damarları ve genital boşaltım kanalları mediastinum'dan testise girer ve çıkar.³⁸

Her bir testis, kapsülden ışınal olarak çıkan sıkı bağdoku bölmeleri (septula testis) ile yaklaşık 250 lopçuğa (lobuli testis) bölünmüştür. Lopçukların tabanları testisin dış yüzüne, tepeleri ise mediastinum testis'e bakar.⁴⁸ Septalar tam olmadığından, piramit şekilli lopçuklar birbirleriyle ilişkilidir. Her bir lopçuk, seminifer tübül (tubulus seminiferi convolutus, tubulus seminiferus contortus) denilen; kör bir ucla başlayıp sayıları 1-4 arasında değişen kıvrımlı tübüller içerir.³⁴ Tübüller, mediastinum yakınında sonlanırken lümenleri daralır ve düzleşirler. Bu bölüme düz tübül ya da tubuli rekti (tubulus seminiferi recti) denir.⁵⁰ Testis içi boşaltım yollarından olan tubuli rekti; seminifer tübülleri, mediastinum'da anastomozlaşan kanallar sistemi olan rete testis'e bağlar.⁴⁶ Buradan duktuli efferentes denilen, yaklaşık 10-12 adet kanal tunika albuginea'yı geçerek testis dışına çıkar. Kıvrıntılı olan bu kanallar birbiriyle birleşirler ve tek bir kanal olan duktus epididimis'i oluştururlar.³⁴

2.3.1.Seminifer Tübüller

Spermatogenezisin olaylandığı yapılar olan seminifer tübüllerin her biri yaklaşık 30-80 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadır.⁴⁹ Her iki testiste ortalama 1000 adet bulunur. Tübüllerin toplam uzunlukları yaklaşık 0.5 km kadardır ve testisin % 92'sini oluştururlar.⁴³

Seminifer tübüllerin duvarı dışta, tunika vaskuloza'dan köken alan damar ve sinir ağlarından zengin tunika (lamina) propria denilen bağ doku ile sarılıdır. İki seminifer tüp duvarında iki tip hücre bulunur;⁴⁶

1) Sertoli hücreleri (Epitheliocytus sustenans, destek hücreleri),

2) Spermatogenik hücreler (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler)

Seminifer epitel bir bazal membran ve kollajen lifler, fibroblastlar ve kasılabilir myoid hücrelerden oluşan bir kılıfla çevrelenmiştir. Myoid hücreler hareketsiz spermiyumları rete testise iletmek için gerekli ritmik kasılmalarla yükümlüdür.⁴⁹

Tübüller arasındaki gevşek bağ dokuda, testosteron hormonu sentezleyen Leydig(intersitisyel hücreler), ince kollagen ve retiküler lifler, fibroblastlar, mast hücreleri, az sayıda makrofaj, lenfatik kapillerler, kan damarları ve sinirler bulunur. Testis lopçuklarını dolduran seminifer tübüller ile Leydig hücreleri testisin parankimasını oluştururlar.^{46,50}

2.3.2.Sertoli Hücreleri

Destek hücreleridir. Prizmatik biçimli Sertoli hücreleri, seminifer tübülün bazaline oturur ve çevrelerinde yer alan spermatogenik hücreler arasından lümene değin uzanırlar.⁴⁸ Spermatogenik hücreler ile metabolik etkileşime girerek spermatogenezise desteklik sağlarlar.⁵¹ Bu hücreler; puberteye değin seminifer epitelin baskın hücreleriyken, puberteden sonra seminifer tübül epitelindeki hücrelerin yaklaşık % 10'unu oluştururlar.³³ Sertoli hücre sayısı ile günlük spermiyum üretimi arasında da pozitif bir ilişki vardır.

Sertoli hücre çekirdeği, bazalde yerleşik, oval şekilli ve ökromatiktir. Belirgin çekirdekçik içerir. Sitoplazmada çok sayıda mitokondriyon, yoğun veziküllü Golgi kompleksi, lipid damlacıkları ve lizozomal erke ait çok sayıda vezikül bulunur. Ek olarak çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum, az olarak da granüllü endoplazmik retikulum içerir.⁵¹ Hücre iskeleti vimentin, düşük molekül ağırlıklı sitokeratin 18 ve 19, gelişkin aktin filaman ağı, ara filamanlar ile mikrotubuluslardan oluşur ve bu iskelet yapısı üreme hücrelerine desteklik yapar.³⁴ Sertoli hücre sitoplazmasında ayrıca içerik ve işlevleri henüz tanımlanmamış olan Charcot Bottcher kristaloidleri denilen inklüzyon cisimcikleri tanımlanmıştır.^{45,47}

Hücrelerin apikal ve lateral zarları düzensizdir. Apikal hücre zarının yaptığı girintiler gelişmekte olan spermatogenik hücrelere ev sahipliği yaparlar.⁴⁹

Komşu Sertoli hücreleri bazo-lateral bölgelerinde yerleşik sıkı bağlantılar (zonula okludens) ile birbirleriyle ilişki kurarlar. Bu ilişki kan-testis bariyerini oluşturur. Böylece gelişmekte olan üreme hücreleri bağışıklık sistemi hücreleriyle etkileşmez. Bu hücrelerin yan yüzlerinde bulunan oluklu bağlantılar da iyon ve kimyasal alışverişi sağlar.^{34,36,46,49}

Seminifer tübüller kan-testis bariyeri ile çevre dolaşımdan soyutlanır. Sertoli hücrelerinden madde geçişi çok sıkı denetlenir. Sertoli hücreleri tübüler sıvıyı salgımlarken, salgının içeriğinin denetimiyle yükümlüdür. Tübüler sıvı, çevre intersitisyel sıvıdan oldukça farklıdır; tübüler sıvıda bol miktarda androjenler, östrojenler, potasyum ve amino asitler bulunur.⁵⁰ Kan- testis bariyeri, intersitisyel sıvı ile tübüler sıvı arasındaki farklılığı koruyabilmek ereği ile gereklidir. Gelişmekte olan spermatogenik hücrelere özgü olarak zarlarında sperm- özgü antijen

bulunur. Kan- testis bariyeri işlevini tam olarak yerine getiremediğinde, bu antijen sayesinde bağışıklık sistemi uyarılarak hücrelerin yok edilmesi sağlanır.⁴⁹

Kan-testis bariyeri, üreme hücreleri ile destek hücrelerinin oluşturdukları seminifer epiteli kendi içinde 2 bölgeye ayırır:

1. Bazal bölge: Seminifer tübül bazal membranına yakın bölgedir. Spermatogonyum ve genç spermatositleri içerir.³⁴

2. Adlüminal bölge: Seminifer tübül lümenine yakın bölgedir. Spermatosit ve spermatidleri içerir.

Bu bölmeler spermatogenik hücrelerin mikro çevre içinde birbirlerinden ayrılmadan eş zamanlı olarak büyüyüp gelişmelerine yardım eder.³⁴

Sertoli hücreleri arasındaki bağlantı bölgelerinde diğer epitel hücreleri arasında görülmeyen özellikler vardır. Bunlar; karşılıklı gelen zarların birleşmesiyle elli ya da daha fazla birbirine koşut hattın oluşması, sıkı bağlantı birimlerinin bulunduğu bölgede hücre zarına koşut yassılaşmış endoplazmik retikulum sisternalarının bulunması, hücre zarı ile endoplazmik retikulum sisternaları arasında altıgen şeklinde düzenlenmiş aktin flamanlarının yer almasıdır.³⁶

Sertoli hücrelerinin işlevleri :

- Gelişmekte olan üreme hücrelerine fiziksel destek ve besin sağlamak; seminifer tübül duvarında bazal bölgeden lümene değin uzanan ve sitoplazmaları boyunca yakın ilişkide bulunduğu üreme

hücrelerine desteklik sağlarken, aynı zamanda peritübüler kapillerlere uzak olan spermatogenik seri hücrelerine besin maddelerini iletirler.⁵⁰

- Spermiyogenezis sırasında, artık sitoplazma parçalarının fagositozunu sağlamak.⁴⁹

- Kan-testis bariyerinin oluşturulması ve böylece gelişmekte olan üreme hücrelerinin immunolojik olarak tanınmasının engellenmesi.³⁶

- Androjen bağlayıcı protein (ABP), sentezlemek ve salgılamak. Androjen bağlayıcı protein, Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronu bağlayarak bu hormonun seminifer tübül lümenine ve oradan da epididimise iletilmesine yardımcı olur.³⁴

- Anti-Müllerian (Müllerian inhibe edici) hormonu sentezlemek ve salgılamak. Bu hormon embriyonik gelişimde, erkek fötusta Müller (Paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlar.⁴³

- İnhibin ve aktivin denilen peptid yapıdaki maddeleri sentezlemek ve salgılamak. İnhibin, hipofiz bezi ön lobundan FSH sentez ve salınmasını baskımlarken, aktivin bu durumu uyarır.⁵⁰

- Testiküler transferrin'i sentezlemek ve salgılamak. Demir bu madde sayesinde dış ortamdan alınarak üreme hücrelerine iletilir.⁴⁵

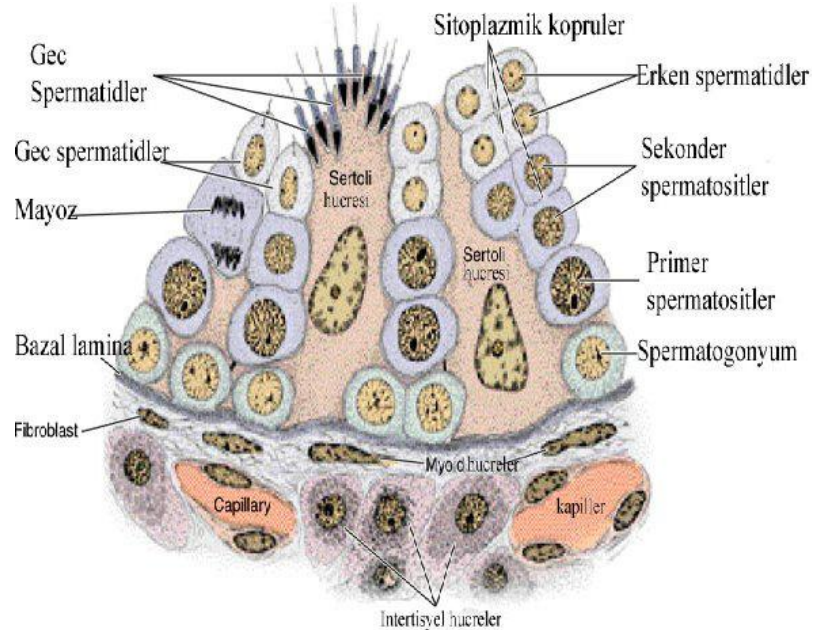
- Granülsüz endoplazmik retikulum sisternaları, mikrotubulus ve mikrofilamanları aracılığı ile farklılaşmasını tamamlayan spermiyumların lümene atılmasında rol oynarlar.⁵¹

Sertoli hücreleri tüm seminifer epitel boyunca uzandığından tübülün yapısal düzenleniminin korunmasında da etkilidirler. Sertoli hücreleri, spermatogenik hücrelere karşı, enfeksiyon, kötü beslenme ve X ışınları gibi çeşitli etkenlere daha dayanıklıdır.³⁴

2.3.3.Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenezis

Spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasında 4 ile 8 katman olarak düzenlenmiştir.

Üreme hücreleri ya da spermatogenik hücreler, Sertoli hücreleri ile birlikte seminifer tübül epitelini oluşturan, düzenli olarak çoğalan ve olgun spermiumlara farklılaşan hücrelerdir.³⁶ Olgunlaşma aşamalarındaki bu hücreler bazaldan lümene doğru spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatit ve spermium olarak sıralanır⁴⁹(Şekil 1).



Şekil 1. Spermatogenik hücreler ve Sertoli hücreleri³⁶

Spermatogenezis, spermatogonyumdan olgun spermiyum oluşmasına değin geçen çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve başkalaşım evrelerini içeren bir süreçtir.⁴⁶ Testiste spermatogenezis hormonal denetim altındadır. Spermatogenezis hipofizden salgılanan FSH (Folikül uyaran hormon) tarafından düzenlenirken, spermatogenezisin sürekliliği için gerekli olan ve Leydig hücrelerince salgılanan testosteron düzeyi de yine hipofizden salgılanan LH (Luteinize eden hormon) tarafından denetlenmektedir.³⁴

Spermiyum üretimi puberte ile başlar ve bir testiste günlük ortalama 50-150 milyon spermiyum üretilir. Olgunlaşma süreci 64 günde tamamlanır.⁴⁵

Spermatogenezis 3 evreye ayrılır.

1) Spermatogonyal evre (Spermatositogenezis):

Spermatogonyumlar, mitoz bölünmelerle sayılarını arttıırırlar ve primer spermatositlere farklanırlar.^{36,50}

2) Spermatosit evresi (Mayoz bölünme):

Primer spermatositler ardı ardına iki mayoz bölünme geçirerek kromozom sayılarını ve DNA'larını indirgerler. Sonuçta haploid kromozoma sahip hücreler olan spermatidler oluşur.^{36,50}

3) Spermatid evresi (Spermiyogenezis):

Spermatidler olgun spermiyumlara farklanırlar.^{36,50}

Spermatogonyumlar bazal bölgede bazal membran ile doğrudan ilişkide olan 12 µm çapında, diğer spermatogenik seri hücreleri içerisinde küçük, diploid spermatogenik hücrelerdir. Kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar.³⁶ Spermatogonyal kök hücreden köken alırlar. Puberteye değin dinlenmede kalıp, bu evrede testosteron hormonunun etkisiyle uyarılarak hücre döngüsüne girerler.⁴⁹ Spermatogonyumlar çok sayıda bölünmeler geçirerek spermatogonyum serilerini oluştururlar. İnsanda yapısal olarak ayırt edilebilen 3 tip spermatogonyum vardır.

Bunlar:

- Koyu A Tipi (Ad) spermatogonyumlar
- Açık A Tipi (Ap) spermatogonyumlar
- B Tipi spermatogonyumlar

Açık A tipi spermatogonyumlar; B tiplerinden daha azdır. Oval veya yuvarlak şekillidirler. Bazal membran üzerine otururlar. Hücre şekliyle uyumlu yuvarlak ya da oval çekirdek ökromatiktir. Genelde tek bir çekirdekçik görülür. A tipi spermatogonyumlarda organeller sitoplazmada dağılmıştır; yuvarlak mitokondriyonlar çekirdek yakınında bulunur, belirgin Golgi kompleksi ve ribozomlar izlenir. Açık A tipi spermatogonyumlar depo hücrelerdir. Gerekğinde spermatogenezi başlatmak için devreye girerler.^{34,36}

Koyu A tipi spermatogonyumlar; bazal membran ile bağlantıları daha fazla olan küçük, uzamış spermatogonyumlardır. Koyu bazofilik boyanan, oval heterokromatik çekirdek içerirler. Seminifer epitelin

kök hücreleridir. Düzensiz aralıklarla bölünerek, yeni koyu ve açık A tipi spermatogonyumları oluştururlar.^{34,36,50}

Spermatogonyumların en yaygın bulunan tipi, B tipidir. Bunlar da bazal membran'a otururlar. Ancak bazal membran ile bağlantıları daha azdır. Hücre çekirdeği yuvarlaktır ve merkezde yerleşmiştir. Çekirdekte bir ya da iki koyu boyanan çekirdekçik bulunur. Sitoplazmada A tiplerine karşın daha çok ribozom bulunur. Mitoz bölünme ile primer spermatositleri oluştururlar.^{36,43}

Koyu ya da açık A tipi spermatogonyumlar kök hücrelerdir. Bölünerek yeni açık ve koyu A tipi spermatogonyumları yaparlar. Koyu A tipi spermatogonyumlar da B tipi hücreleri oluşturmak için bölünürler.

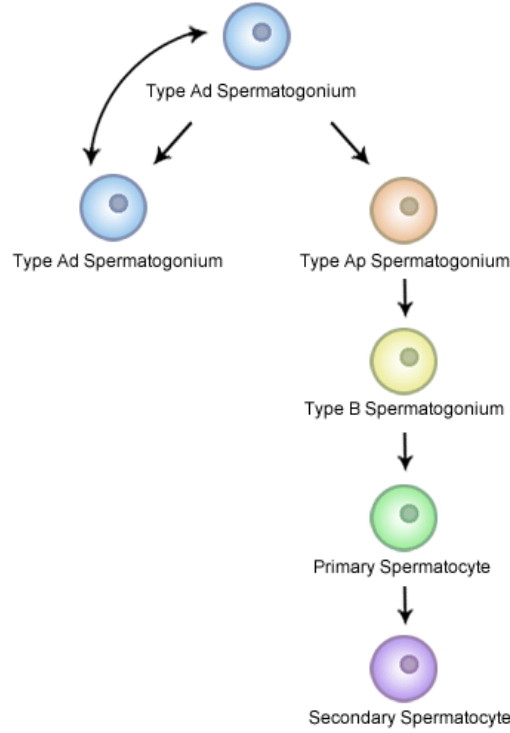
B tipi spermatogonyumlar son mitoz bölünmelerinden sonra primer spermatositlere farklırlar. Böylece spermatositogenezis tamamlanır ve mayoz bölünme evresi başlar.^{33,36,50}

Primer spermatositler; spermatogenik serinin en sık görünen ve en iri hücreleridir. 18 µm büyüklüğündedirler, veziküler görünümlü belirgin bir çekirdek içerirler. Primer spermatositler başlangıçta 46 kromozom sayısına ve 2n DNA'ya sahiptirler. Kısa sürede Mayoz l'in profaz evresine girerler ve DNA' larını 4n'e çıkartırlar. Profaz evresi yaklaşık 3 hafta (22 gün) sürer. Leptoten evresinde, kromozomlar uzun silindirik iplikçikler olarak izlenirler. Zigoten'de homolog kromozomlar yan yana gelirler. Pakiten evresinde, kısa kalın ve belirgin hale gelen kromozomlar dört kromatidden oluşan tetratları yaparlar. Diploten'de, homolog kromozomlar arasında krossing over denilen gen alışverişi gerçekleşir. Pakiten evresi insanlarda yaklaşık 16 gün sürer. Profaz aşamasından sonra çekirdek zarı ortadan kalkar ve homolog kromozomlar

Metafaz I'de ekvatoryal düzlemde dizilirler. Anafaz I'de kutuplara çekilen ve birbirinden ayrılan iki kromatidli kromozomlar, Telofaz I'de haploid sayıda kromozom içeren iki adet sekonder spermatositi oluşturur. Sekonder spermatositler hızla komşu Sertoli hücrelerinin arasından geçerek adluminal bölgeye doğru yer değiştirmeye başlarlar.^{34,36,43,49,50}

Oluşan sekonder spermatositler küçük hücrelerdir ve yeniden DNA eşleşmesi yapmadan (interfaz evresine girmeden) doğrudan mayoz II' nin profaz evresine girdiklerinden, seminifer epitelde sık izlenemezler. Ortalama 8 saatlik bir yaşam süreleri vardır. Sekonder spermatositteki kromatidler, bölünme sonunda ayrılarak her biri bir spermatide gider. Sonuçta n kromozom sayısına sahip 4 adet spermatid oluşur^{43,47,49} (Şekil 2).

II. Mayoz bölünme sonunda spermatidler Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma girintilerine gömülü, kuyrukları lümene uzanmış olarak dururlar. Spermatidler oluştuklarında yuvarlak bir çekirdek ve çok iyi gelişmiş Golgi kompleksi, bol miktarda granüllü endoplazmik retikulum ve mitokondriyonları ile dikkat çekerler. Yuvarlak spermatidler yaklaşık 8 µm çapında hücrelerdir. Spermiyumlara dönüşürken bol hidrolitik enzim depolayarak, organellerini azaltırlar. Sitoplazmalarında kayıplar olur.³⁴



Şekil 2: Spermatogenezisin şematik görünümü⁵⁰

Spermiyogenezis lümene yakın sitoplazma köprüleriyle birbirlerine bağlı spermatid hücre gruplarının, spermiyum oluşturmak için geçirdiği bir seri değişikliktir. Spermiyogeneziste, önce yuvarlak spermatidler uzayarak uzamış spermatidleri yaparlar. Bu süreçte akrozom oluşur, çekirdek yoğunlaşır ve uzar, kuyruk gelişir, sitoplazmanın çoğu kaybolur.³⁴ Memelilerde spermatidlerden spermiyum oluşması 4 aşamada izlenir.

Golgi Evresi: Spermatid çekirdeği etrafında Golgi kompleks bölgesinde veziküllü yapılar çoğalır (proakrozomal veziküller). Bunlar birleşince büyük boşluklu akrozomal vezikül denilen yapılar oluşur. Bu bölgede çekirdek yoğunluğunda artış görülür.⁴³

Çekirdeğin bir kutbunda belirginleşen veziküller içinde akrozomal granül görülür ve bunlar giderek koyulaşıp büyür. Sentriol çifti çekirdeğin karşı kutbuna hareket eder. Sitoplazmadaki mitokondriyonlar hücre çeperine doğru dizilirler.⁴⁹

Başlık (Kep) Evresi: Akrozom, çekirdeğin ön kutbunda kalırken, akrozom vezikülü genişleyerek çekirdeğin ön yarısına yayılır ve baş bölgesinin 2/3' ünü kaplar. Bu evre sonunda çekirdeğin ön kısmını kaplayan akrozomal başlık oluşur.³⁶

Akrozomal Evre: Akrozomal enzimleri içeren granüller vezikülün içini doldurur ve akrozomun yapımı tamamlanır. Akrozom granülleri içinde; proteaz, asit fosfataz gibi çeşitli hidrolitik enzimler bulunur. Bu enzimler hücre içindeyken inaktiftir. Bu sırada çekirdek uzar ve yoğunlaşır. Sitoplazma arkaya itilir. Distal sentriyolden çıkan ve uzayan fibril demeti uzayarak ortada iki, çevrede dokuz çift merkez fibrillerini oluşturur ve kuyruk biçimlenir. Kuyruğun proksimal parçası çevresinde mitokondriyonlar toplanır ve orta parça denilen bölgeyi yaparlar.^{34,50}

Olgunlaşma Evresi: Spermiyogenezin son evresidir. Spermatid türe özgü şeklini alırken Sertoli hücrelerinden ayrılarak lümene verilirler. Sitoplazma artıkları Sertoli hücrelerince fagosite edilir. Lümene verilen spermiyum henüz döllenme yeteneğine sahip değildir ve kendi başına hareket edemez. Fertilizasyon için gereken olgunlaşma ve hareket erki epididimiste kazanılır.^{34,49}

Türler arasında, olgunlaşmış spermiyum yapısında bazı ayrımlar görölse de, tümü baş, boyun ve kuyruktan oluşur.

İnsan spermiyumunun boyu yaklaşık 65 μm ' dir.⁴⁷ Çekirdek ve akrozomu içeren bir baş, kısa bir boyun parçası ve hareketi sağlayan uzun bir kuyruktan oluşur.⁴⁵ Kuyruk; bağlayıcı parça (boyun) , orta parça, esas parça ve son parçadan yapılıdır.^{34,36,43}

Baş (Caput): Akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur.⁴³ Çekirdek yassılaştırmış ve heterokromatiktir. İnsanda açık renk vakuolleri içerir. Yoğun kromatin yapısı içindeki kromatinden yoksun bu aydınlık bölgeler çekirdek vakuolleri olarak adlandırılır. Baş, 4-5 μm uzunluğunda, 2,5-3 μm genişliğinde ve 1 μm kalınlığındadır. Çekirdeğin 2/3 ön kısmını akrozom örter.⁴⁶ Özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom; akrozin denilen tripsin benzeri proteazlar, asit fosfataz, hyalurodinaz ve nöroaminidaz gibi hidrolitik enzimler içerir.^{34,36,43}

Boyun: Spermiyumun hareket merkezi olarak kabul edilen boyun parçası kısadır. Bir çift sentriyol içerir. Proksimal sentriyolden çıkan mikrotubuluslar 9+2 (kinosilyum) düzenlenimi ile aksonemi yaparlar. Aksonemin çevresi yoğun fibröz yapıda halkalarla çevrilidir. Bu bölgede sitoplazma artıkları gözlenir.^{34,50}

Kuyruk: İnsanda 55 μm uzunluğundadır. Aksonem boyundan başlayıp kuyruğun son kısmına değin uzanır. Kuyruk üç parçadan oluşur; orta parça, esas parça ve son parça.^{34,36,49}

Orta Parça (Pars intermedia): Aksonemin (9+2) çevresinde 9 adet dış lifler, onun da çevresinde kuyruğa enerji sağlayan spiral olarak yerleşmiş mitokondriyonlar bulunur. Ortalama uzunluğu 5-7 μm ' dir.⁵⁰

Esas Parça (Pars principalis) : Kuyruğun en uzun bölümüdür. Yedi dış yoğun fibril ile sarılı merkezi aksonem ve bir fibröz

kılıftan oluşur. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf spermiyumun öne hareketi sırasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için gerekli sağlam bir iskelet oluşturur.³⁴

Son Parça (Pars terminalis) : Aksonemi kapsar. Kısa bir sonlanma bölümüdür.³⁶

Sonuçta bir diploid kromozom yapısına sahip bir spermatogonyumdan haploid kromozoma sahip dört olgun spermiyum oluşur. Bu süreç ortalama 64 gün sürer.^{34,36,43}

2.3.4.İntersitisyel Doku ve Leydig Hücreleri

Seminifer tübüller arasındaki boşluklar, kollajen lifler, kan ve lenf damarları, sinir lifleri ve çeşitli hücrelerce doldurulmuştur. Bu hücreler fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve testisin Leydig hücreleridir.^{36,43,49}

Leydig hücreleri endokrin işlevleri nedeniyle kılcal damarlarla ilişkili yerleşim gösterirler ve değişen sayılar içeren topluluklar yaparlar. Bu hücreler steroid hormon sentezleyen hücrelere özgü organel ve enzimlerden zengindir. Leydig hücreleri çok köşeli, yaklaşık 15 µm çapında ve genelde tek çekirdekli hücrelerdir. Çekirdek çoğunlukla ekzantrik duruşlu olup 1 ya da 2 çekirdekçik bulunur. Çekirdek kromatinden yoksundur, bu nedenle soluk boyanır. Sitoplazma asidofiliktir. Sitoplazmalarında iyi gelişmiş Golgi kompleksi, mitokondriyonlar ve lipid damlacıkları içerir. Çok iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulumları vardır. Sitoplazmada peroksizom ve lizozomlar ve yaş ilerledikçe artan oranda da lipokrom pigmenti bulunur. Leydig hücrelerinde işlevleri bilinmeyen, insana özgü olan renksiz, azokarmin ile boyanan ve

büyüklikleri değişebilen Reinke kristalleri bulunmaktadır.^{34,36,43,45,46,47,48,49,51}

Leydig hücreleri, ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesinden sorumlu olan testosteron hormonunu üreterek spermatogenezisin sürekliliğini sağlar. Testosteron, mitokondriyon ve granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce sentezlenir. Leydig hücrelerinin erk ve miktarları hormonal uyarılara bağlıdır.^{34,36}

Embriyonik gelişim sırasında, plasental gonadotropik hormon anne kanından fetusa geçerek, androjenik hormonları üreten fetal testiküler intersitisyel hücreleri uyarır. Hormonlar, embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik intersitisyel hücreler gebeliğin 4. ayına değin farklılaşmış olarak kalırlar. Daha sonra ise testosteron sentezindeki azalmaya koşut gerilerler. Hücreler, gebelik süresince ve hipofizden salınan LH uyarımı altında testosteron sentezine yeniden başladıkları ergenlik öncesi döneme değin dinlenmede kalırlar.^{34,36,49}

Olgun Leydig hücreleri, doğumdan sonraki birkaç hafta dışında, 10 yaşına değin erkek çocuk testisinde bulunmaz. Leydig hücrelerinin sayıları, ergenlikle birlikte artar, ileri yaşlarda azalır. Leydig hücre sayısı 60 yaşındaki bir erkekte, 20 yaşındaki bir erkekteki sayının yarısından da azdır.³⁵

2.4.TESTİS FİZYOLOJİSİ

Testis ekzokrin ve endokrin işleve sahip bileşik tübüler bir bezdir. Testislerin iki önemli işlevi vardır^{45,49,50} :

- Testisin iç salgılama işlevi, Leydig hücrelerinin testosteron, dihidrotestosteron, androstenedion gibi androjenler olarak tanımlanan erkek cinsiyet hormonlarının salgılanmasıdır.⁵² Testosteron en önemli testis hormonudur. Testislerde ve böbrek üstü bezlerinde kolesterolden ya da doğrudan asetil koenzim A' dan sentezlenir. Testosteronun büyük bir kısmı hedef dokularda daha aktif olan dihidrotestosterona dönüşür.⁵³

Leydig hücresi



Testosteron testislerden salgılandıktan sonra, yaklaşık %97'si zayıf bağlarla plazma albumini ya da güçlü bir şekilde cinsiyet hormonu bağlayan globulin olarak adlandırılan 1β globulinle bağlanır. Bağlı hormonun dolaşım sisteminde kalış süresi 30 dakika–1 saat olabilir. Bu süre sonunda testosteron ya dokularda tutulur ya da inaktif ürünlere dönüşerek vücuttan atılır. Dokularda tutunmayan testosteron, karaciğerde başlıca androsteron ve dehidroepiandrosterona dönüşür. Aynı anda her iki yapı glukuronoidlerle ya da sülfatlarla birleşerek bağlı hale getirilir. Bunlar da safra içinde ya sindirim kanalına verilirler ya da idrarla böbreklerden atılırlar.^{35,54}

Testosteron protein sentezini artırır, yıkımını azaltır; böylece büyüme hızını etkiler. Kemik büyümesini durdurur. Testosteron esas etki yeri olan prostat ve diğer birkaç dokuda 5-α redüktaz enzimi aracılığı ile, dihidrotestosterona dönüşür ve sitoplazmik reseptör proteinine bağlanır. Reseptör-hormon kompleksi daha sonra çekirdeğe gider, burada bir çekirdek proteiniyle bağlanarak DNA-RNA kayıt işlemini uyarır. RNA polimeraz aktifleşir ve prostat hücrelerinde RNA içeriği artar, bunu hücrel protein artışı izler. Böylece testosteron vücudun her yerindeki protein sentezini arttırmakla birlikte bu artış daha özgün olarak ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesinden sorumlu olan hedef organ ve dokularda görülmektedir.^{54,55}

Testosteron yüksek yerel etkiyle seminifer tübüllerde spermatogenezisi etkilerken, kana verilerek (endokrin etkiyle) hedef organları (iskelet kası vb.) ve erkek üreme sistemi yardımcı bezlerinin (prostat, vesikula seminalisler, bulboüretal bezler) işlevini düzenler.^{55,56}

Erkek üreme organlarının tümünün yapısı ve işlevleri testosteron varlığına bağlıdır. Testosteron, erkeğe özgü ikincil cinsiyet

özelliklerinin (pubik kıllanma, sakal-bıyık, erkeğe özgü ses, kaslı vücut şekli) ortaya çıkmasından sorumludur.^{34,36}

Fötal yaşam süresince testisler, plasentada oluşturulan koryonik gonadotropinlerle uyarılarak orta düzeyde testosteron salgılar. Bu hormon, fötal gelişim sürecinde ve doğumdan sonra 10. haftaya değin vücutta bulunur. Yaklaşık 10-13 yaşına kadar testosteron üretilmez. Puberte evresinde testosteron yapımı hızla artar. 50 yaşından sonra ise hızı düşüşe geçer, 80 yaşında en üst düzeyin % 20-50' sine iner.⁵⁴

Her iki cinste de cinsel işlevler hipotalamo-hipofizer sistemin denetimi altında olaylanır. Hipotalamik nöronların arkuat çekirdeklerinde yüksek yoğunlukta sentezlenen gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH), hipotalamik hipofizer portal kan yoluyla, hipofiz bezinin ön lobuna taşınır ve LH ve FSH salgılanmasını uyarır. GnRH, 1-3 saatte birkaç dakika süreyle salgılanırlar. LH ve FSH testislerdeki hedef dokular üzerinde siklik adenozin monofosfat ikinci haberci sistemini uyarır. Bu sistem daha sonra hedef hücrelerdeki özgül enzim sistemlerinin aktive olmasını sağlar. LH, Leydig hücrelerinde özgün reseptörlere bağlanarak etki gösterir. Adenohipofizden LH salgısı sürekli değildir, geceleri 90 dakikalık aralıklarla olur. LH dışında prolaktin ve LHRH' da doğrudan Leydig hücrelerini etkileyerek testosteron salgılanmasını etkiler. Salgılanan testosteron düzeyi uyarıcı LH miktarlarıyla doğru orantılıdır. yüksek düzey testosteron varlığı, negatif geri bildirim etkisi ile hipotalamus ve hipofiz ön lobu salgısını azaltarak testosteron sentezininin baskılanmasına neden olur ve hormon düzeyi normale gelir. Buna karşıt olarak, testosteron düzeyinin çok az olması koşulunda hipotalamustan yüksek düzeyde GnRH salgılanır, hipofiz ön lobundan LH ve FSH salgılanması artar ve testiküler testosteron salgısı yükselir.^{34,54,56}

LH dışında spermatogenezisin başlaması ve sürmesinde adenohipofizden salgılanan bir diğer hormon olan FSH da etkilidir. FSH, Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını uyarır ve sonuçta cAMP artışına neden olur. Aynı zamanda androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılanmasını sağlar. ABP, testosteron ile bağlanır ve bunu seminifer tübül lümenine taşır. Böylece spermatogenezis için gerekli oranda testosteron yerel etkisi sağlanmış olur. Bu etki spermatogenezisin başlaması için gereklidir. Spermiyumların azalması FSH salgısını uyarır. FSH salgılanması Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hormonuyla baskılanır. Östrojenler, kadın üreme hormonları, ABP' yi bağlayarak spermatogenezisi azaltır.^{34,36,54}

Testilerin dış salgısı, holokrin bir salgı ürünü olan spermiyumlardır. İnsanda günlük ortalama spermiyum üretimi iki testisten toplam 200 milyondur.^{34,43,36,50,54}

Testosteron üretimi normal vücut sıcaklığında olaylandığı halde normal spermiyum üretimi yaklaşık 35°C' de gerçekleşir. Spermatogenezisin düzenlenmesinde ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35°C' dir. Zengin venöz bir pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin çevresini sarar. Bu anatomik düzenlenim testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan karşı bir ısı akımı sağlar. Diğer etkenler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki kremaster kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir.^{34,35,40}

2.5.ENDOKRİN BOZUCULAR

Endokrin bozucular, canlıda ve onun gelecek kuşaklarında endokrin sistemin işlevini değiştirerek sağlıkla ilgili çeşitli sorunlara neden

olan ekzojen madde ya da madde karışımlarıdır.⁵⁷ Endokrin bozucuların etkisi; hormonların üretimi, salınımı, bağlanması, taşınması, erki, yıkımı ve vücuttan atılımları üzerinedir.³

Canlı üzerindeki etkileri; kişinin yaşına, etkin kalınan doza ve süreye koşut değişmektedir. En belirgin etki küçük yaşlarda görülmektedir. Bu nedenle en yoğun etkilene anne karnında gerçekleşmektedir.^{18,19,58}

2002 yılında Avrupa Birliği'nin endokrin bozucular ile ilgili yayınladığı raporunda özellikle 60 maddenin çevre ve insan sağlığına kesin zararlı olduğu bildirilmiştir. Bu maddeler arasında fitalatlar da yer almaktadır.⁵⁹

2.5.1.FİTALATLAR

Fitalatlar, polivinil klorüd (PVC) ve diğer plastikleri yumuşatmak ereğiyle 1920 yılından günümüze endüstride birçok alanda kullanılan bir grup insan yapımı organik bileşendir.⁶⁰ Pek çok tüketim malında, ayrıca yerleşim alanlarında ve çevrede bulunur.⁵

Yapısı 1,2-benzendikarboksilik asidin dialkil ya da alkil/aril esterleridir. Renksiz, kokusuz (veya az kokulu) yağlı sıvıdırlar. Sudaki çözünürlükleri azdır, yağda iyi çözünürler. Birlikte kullanıldığı madde ile kimyasal bağ oluşturmamaları nedeniyle kararlı değildirler; özellikle yüksek ısıda kolaylıkla ayrılabilir ve buharlaşabilirler.⁶ PVC tipi plastik ürünlerin esnekliğini ve dayanıklılığını sağlamak ereğiyle plastikleştirici olarak kullanılmaktadır.

Biomonitor çalışmaları genel nüfustan her yaş tüketicinin, fitalatlara etkin kaldığını göstermektedir.⁶¹

Fitalat içeren ürünler içerisinde yapı materyali, besin ambalaj materyali, tekstil, oyuncak, çocuk bakım ürünleri (biberon ve emzikler dâhil), kan torbası, IV sıvı torbası, infüzyon seti bulunmaktadır.⁶

Fitalatlar kozmetik , parfüm ve sabunlar dahil kişisel bakım ürünlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Toplumun fitalatlarla etkileşimi genellikle diyet ve kozmetik bakım ürünleri aracılığıyla olmaktadır.^{7,62,63} Özellikle besinler, çeşitli fitalatlara etkin kalmanın önemli bir kaynağı olarak gösterilmektedir.⁶⁴

Fitalatlar peroksizom proliferasyonu yapan ajanlardır. Akut olarak toksik olmadıkları gösterilmiştir. Kronik toksisite laboratuvar hayvanlarında araştırılmıştır. Farklı fitalat esterlerinin toksisite profilleri ve potansiyelleri farklıdır. Özellikle tür, değinim yolu ve yaşı yönünden farklılık gösterirler.^{9,65}

Molekül yapısında farklı sayıda alkol esteri ve dallanma yapılarak kullanım alanları farklı, çeşitli fitalatlar üretilmiştir. Bunlar içerisinde en çok kullanılanlar düşük molekül ağırlıklı di-n- bütıl fitalat (DBP), dietil fitalat ve daha yüksek molekül ağırlığına sahip olan di-(2-etilhekzil) fitalat, diisodesil fitalat ve diisononil fitalattır.³

2.5.2.Di-n-Bütıl Fitalat (DBP)

Di-n-bütıl fitalat (DBP) ($C_{16}H_{22}O_4$) , endüstride kullanılan açık renkli yağlı bir sıvıdır. Fitalik anhidrit ve n-butanol' un tepkimesi ile üretilmektedir. DBP, içme suyundan çocuk mamalarına kadar çeşitli ortamda bulunan düşük düzeyli bir kirletici olarak kabul edilmektedir.¹⁶

Çevresel bulaş hava, su, ya da besinler yoluyla olabilir. Ancak DBP' ye öncelikle besin yoluyla etkin kalınmaktadır. DBP' nin perakende besinlerde gözlenmesinin nedeni, ürünün stoklanma ve nakil dönemlerinde DBP içeren ortamlarda bulunmasıdır. Avrupa Birliği besinlerle değinim halindeki maddelerde fitalat kullanımını kesinlikle yasaklamasına karşın halen varlığı gözlenmektedir. DBP plastıklere kimyasal olarak bağlı değildir ve bu nedenle ambalajlardan besinlere geçebilme olasılığı vardır.^{16,61}

Ağız yoluyla temaslarda hedef organlar karaciğer, böbrek, tiroid ve testistir. Laboratuar hayvanlarında fetal ölüm, malformasyon, karaciğer hasarı, antiandrojenik etki, testiküler hasar, peroksizom proliferasyonu ve özellikle de üreme sisteminde toksisiteye neden oldukları gösterilmiştir.^{9,16}

Besinlerde bulunan bazı fitalik diesterlerin, erkek kemiricilerin ve olasılıkla insanların üreme sistemlerinde hasara neden olabilecekleri bildirilmiştir. Bu sonuçların; fütüsde cinsiyet farklılaşması evresinde, fitalatların endokrin yıkıcı işlevlerinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir.¹⁶ Fitalatlara etkin kalmanın prematüre doğuma neden olduğu gösterilmiştir. Fitalata etkin kalmanın gözlenen ileri etkileri; genç kızlarda prematüre göğüs gelişimi ile yetişkin erkeklerde semen üretimi ve kalitesindeki düşüştür.^{15,65,66}

Fitalatların erkek ve dişi sıçanlarda büyümeyi ve cinsel gelişimi olumsuz yönde etkiledikleri gözlenmiştir. ABD'de Ulusal Toksikoloji Programı'na (NTP) bağlı, insanda üreme risklerinin değerlendirilmesine ilişkin merkezin (CERHR) raporuna göre, deney hayvanlarına gebeliğin 6-15. günlerinde yüksek doz fitalat (BBP, DBP, DEHP ve DINP) uygulaması sonucunda yavrularda, nöral tüp defektleri,

yarık damak ve iskelet anomalileri gibi malformasyonlar gözlenmiştir.^{16,67,68,69,70} DBP verilen sıçanlarda testiste Leydig hücre sayısının önemli derecede arttığı belirlenirken, ters orantılı olarak testesteron düzeylerinin büyük oranda azaldığı bulunmuştur.⁷¹

Araştırmalar sıçanların testiküler toksikanların etkisine en duyarlı deney hayvanı türü olduğunu göstermektedir. Uterus içi etkinliğin gebeliğin 6-20. günlerinde olduğu, 15-17. günlerin özellikle önemli olduğu bildirilmektedir.⁷² Bu dönemde uygulanan DBP doğrudan fetal testise etki ederek Leydig hücre işlevlerinin ya da gelişiminin bozulmasına ve testesteron düzeylerinin önemli ölçüde azalmasına, doğum sonrası evrede ise spermatogenezisi olumsuz etkileyerek spermiyum sayısında azalmaya neden olur.^{71,73, 74} Fetal dönemde fitalatlarla (DEHP, DBP ya da BBP) etkin kalmak kriptorşidizm riskini artırır. Bunun nedeni olarak fitalatların insülin-benzeri faktör 3 (insl3)'ü baskılaması gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda insl3 geninden yoksun deneklerin tümünde kriptorşidizm saptanmıştır.⁷⁵

Pubertal ve erişkin sıçanlarda fitalat uygulamasının, Sertoli hücrelerini de olumsuz yönde etkilediği gösterilmiştir. Üreme hücresi yitimi ya da üreme hücrelerinin seminifer tüp lümenine erken dökülmesi gibi olaylar fitalatların spermatogenik aşamaya özgü etkilerinin olduğunu göstermektedir.^{16,74} Diğer bir çalışmada, iş yerinde DBP ve DEHP' ye etkin kalan kişilerde yüksek MBP yoğunlukları belirlenirken, serbest testosteron düzeylerinin azaldığı, ayrıca LH ve serbest testosteron arasında anlamlı bir oran bulunduğu gözlenmiştir.⁶²

DBP'nin testiküler toksisitesinde yaş önemli bir etkidir.¹⁸ Genç erişkin sıçanlarda üreme toksisitesi yüksek doz etkin kalınma sonrasında görülse de, testiküler hasar daha kısa uygulamalar ile ortaya

çıkar.⁶⁵ Pubertal hayvanlarda erişkinlere karşı daha düşük dozda etkin kalınmanın tübüler atrofi ile birlikte testiküler toksisite ve ciddi testis lezyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca fitalatların toksik etki gösterebilmeleri için 4-6 karbonluk ester yan zincir uzunluğuna sahip olmaları gerektiği belirtilmiştir.^{16,19,76,77}

Hipospadias, kriptorşidizm, anogenital açıklıkta azalma, semen kalitesinde düşme, erişkin erkeklerde fertilitenin azalması gibi bozukluklara "testiküler disgenez sendromu" adı verilmektedir. "Fitalat sendromu" adı da verilen bu bozuklukların insanlarda da görülen olgular olması fitalatlara etkin kalma konusundaki endişeleri artırmaktadır. Ancak eldeki verilerin yetersizliği nedeniyle fitalatlar ile ilgili bilimsel çalışmalar çok daha büyük önem kazanmıştır.^{74,78}

2.6.RESVERATROL

Resveratrol, travmatik zedelenme, UV ışığına etkin bırakılma ya da mantar enfeksiyona yanıt olarak bazı bitkiler tarafından sentezlenen non-flavonoid yapıda polifenolik bir fitoaleksindir.^{27,79} Fitoaleksinler, patojenik mikroorganizmalara karşı bitkilerce korunma amaçlı sentezlenen kimyasal maddelerdir, bu maddelere bitkisel antibiyotikler de denilebilir.^{27,80,81,82} Stilbenlerin alt grubunda yer alan resveratrol 3,4,5-trihidroksi stilben yapısındadır. Trans ve cis olarak iki izomeri vardır. Trans izomerlerinin biyolojik etkileri, cis izomerlerinden daha yüksektir.^{83,84}

Resveratrol steroid olmayan bir bileşik olup östrojen benzeri biyolojik etki sahiptir. Resveratrol'ün molekül formülü $C_{14}H_{12}O_3$ 'tür. Molekül ağırlığı 228,25 g/mol ve erime sıcaklığı 253-255°C' dir.^{27,80} 1940 yılında *Veratrum album*'dan izole edilmiştir.²⁷ Trans-resveratrol ise ilk olarak 1976 yılında Lankcake ve Pryce adlı araştırmacılar tarafından *Vitis*

vinifera (asma)' dan elde edilmiştir. Araştırmacılar bu bileşiğin bitkinin mantar enfeksiyonuna ya da ultraviyole ışınlarla etkin kalması sonucunda sentezlendiğini göstermişlerdir.⁸⁵ 1982 yılında Japonya ve Çin' de geleneksel olarak kullanılan *Polygonum cuspidatum* (Kojo-Kon ya da İdatori çayı) adı verilen bitkinin, mantar enfeksiyonları, çeşitli deri yangıları, karaciğer ve damar hastalıklarını tedavi edici etkisinin olduğu ve bu bitkide resveratrol miktarının en yüksek düzeyde bulunduğu belirtilmektedir.⁸⁶

Resveratrol uzun yıllardır bilinmesine karşın, “**Fransız Paradoksu**”nun fark edilmesi ve 1992’de Siemann ve Creasy tarafından şarabın içindeki etkin madde olarak trans-resveratrol’ün belirlenmesiyle bilim dünyasına girmiştir.^{81,87,88} Resveratrol şarap dışında, üzüm suyu, yaban mersini suyu, yer fıstığı, şerbetçi otu, koyu renkli çikolatalar, kakao likörü, şam fıstığı ve kırmızı dutta da bulunmaktadır.^{87,89} Üzümlerde resveratrol sentezi; asmanın yetiştirildiği toprağa, iklim koşullarına, *Botrytis cinerea* adı verilen küfle enfekte olmasına ve şarapçılıkta kullanılan yöntemlere bağlı olarak değişim göstermektedir. Resveratrol, üzümün kabuklarında ve çekirdeklerinde yoğun olarak bulunmaktadır.^{87,90}

2.6.1.Fransız Paradoksu

Resveratrol’ün bilim dünyasında dikkat çekmesi; Fransız mutfağının son derece yüksek miktarda doymuş yağ, kolesterol içerikli beslenmesi ve yoğun sigara tüketimine karşın, özellikle Bordeaux bölgesinde yaşayanlarda, kalp hastalıklarının yok denecek kadar az görülmesinin bilim adamları tarafından “Fransız paradoksu” olarak değerlendirilmesiyle başlamıştır.^{26,91,92,93,94,95} Bordeaux bölgesinin nemli havasında yetişen “cabernet sauvignon” cinsi üzümlerin kabuğunda oluşan küf mantarına karşı, kabukta oluşan resveratrol adlı antioksidan

maddenin, yüksek kalorili ve yüksek yağ oranlı yiyecekler tüketilmesine karşın, kalp hastalıklarına karşı koruyucu rolü olduğu gözlenmiştir.⁹⁶ Bu buluş sonucunda bazı bilim adamları resveratrolü “100 bin yıldan bu yana beklenen bir buluş” olarak nitelendirmiştir.

Resveratrol’ün emiliminin hızlı olduğu, dokulara kolay taşındığı ve büyük oranda idrar yolu ile atıldığı gösterilmiştir. Resveratrol’ün farklı dokularda farklı etkinliği vardır.²⁷ Bu etkiler :

- Kalp Sağlığı Üzerine Etkileri
- Antioksidan Etkileri
- Antikanserojen Etkileri
- Antienflamatuar Etkileri
- Östrojenik Etkileri
- Antitrombosit Etkileri
- Anjiyogenezis Etkileri
- Hepatoprotektif Etkileri
- Herpes Simpleks Virüsü Üzerine Etkileri
- Helicobacter Pylori Üzerine Etkileri

2.6.2.Kalp Sağlığı Üzerine Etkileri

Resveratrol’ün koroner kalp hastalıkları riskini azalttığı bilinmektedir. Ancak Resveratrol’ün kalp damar sistemi üzerine etkileri ve etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamıştır. Damar endotel hücrelerinden salınan Nitrik Oksit (NO)’ in damar düz kasında kasılma ve gevşeme yanıtları üzerine etkisi olduğu bilinmektedir.⁹⁷ Resveratrol’ün damar genişletici etkisinin, Nitrik oksit antagonizması yolu ile olduğu düşünülmektedir. Resveratrol’ün ve kırmızı şarabın potansiyel kalp koruyucu özelliklerinin yanında, damar basıncını düzenleme, endotel

işlevinin sürekliliğini sağlama gibi etkileri de saptanmıştır.⁸⁷ Bir çalışmada umbilikal ven endotel hücrelerinin, 20 saat süresince kırmızı şarabın ekstraktları ile inkübe edilmesi sonucunda, NO sentezinin 3 kat arttığı gösterilmiştir.⁹⁸ Ayrıca enflamatuar enzimlerin durdurulması ile de kalp koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır. Resveratrol'un kalp damar sistemi üzerindeki olumlu etkilerini östrojen benzeri biyolojik erki ile gerçekleştirmiş olabileceği düşünülmektedir.⁹⁹

2.6.3.Antioksidan Etkileri

Resveratrol'un antioksidan özelliği ve peroksi radikal süpürücü etkisi ile kalbi koruduğu düşünülmektedir. İskemi ve iskemi-reperfüzyon, dokuda lipit peroksidasyonunu arttırmakta, sonuçta da peroksi radikaller oluşmaktadır. Koroner oklüzyonla iskemi ile iskemi - reperfüzyon hasarının oluşturulduğu bir çalışmada resveratrol uygulamasının, koroner damarlarda lipit peroksidasyonunun göstergesi kabul edilen malonildialdehit düzeyini anlamlı olarak azalttığı bildirilmiştir.¹⁰⁰

Düşük yoğunluklu lipoprotein peroksidasyonlarının demir ve bakır iyonları ile arttırıldığı bilinmektedir. Serbest radikal süpürücü etkisinin araştırıldığı bir çalışmada Resveratrol'un demir ve bakır düzeyini anlamlı olarak düşürdüğü gösterilmiştir.¹⁰¹

Kronik etanol kullanımının beyin dahil bir çok organda reaktif oksijen türleri ve lipit peroksidasyonu ile oksidatif hasara yol açtığı bilinmektedir. Bir çalışmada dopaminerjik nöronal hücreler olan pc12 hücrelerinde etanolün lipit peroksidasyonunu arttırarak hücre ölümüne yol açtığı, ancak resveratrol uygulaması ile etanolün olumsuz etkilerinin oluşmadığı gözlenmiştir.¹⁰² Bir diğer çalışmada sıçanlarda, etanol

uygulamasının nöronlarda, lipit peroksidasyonuna oldukça duyarlı olan Na-K ATPaz ve dopamin taşıyıcı protein erkinin azaldığı bulunmuştur. Resveratrol uygulaması ile bu nörodejeneratif değişikliklerin oluşmadığı gözlenmiştir.⁹⁵ Bu çalışmalara dayanılarak; Resveratrol'ün lipit peroksidasyonunu önlediği ve siklooksijenazı baskıladığı sonucuna varılmıştır.

2.6.4. Antikanserojen Etkileri

Resveratrol tüketimi ile meme kanseri riskinde azalma olduğu çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir.^{22,103} Ancak insan meme adenokarsinoma hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada 3-10 µmol/L yoğunluklarda Resveratrol'ün östrojen reseptör bağımlı meme kanser hücrelerinin çoğalmasını arttırdığı saptanmıştır.¹⁰⁴ Aynı hücre tiplerinin kullanıldığı bir diğer çalışmada da, Resveratrol'ün 20-160 µmol/L yoğunluklarda hücre çoğalmasını baskıladığı gösterilmiştir.¹⁰⁵ Bir diğer çalışmada 25 µm Resveratrol uygulanan farelerde deri tümörlerinin sayısı %98, tümörlü fare sayısı ise %88 oranında azaldığı belirtilmiştir.²² Hemopoetik sistemde Resveratrol'ün baskılayıcı etkisi kısmen dönüşümlü, lösemi hücrelerinde ise dönüşümsüzdür. Resveratrol'ün anti kanserojen ve antioksidan etkisiyle lösemi hücrelerindeki çoğalmayı baskıladığı gösterilmiştir.¹⁰⁶ Kemik iliği nakli yapılan hastalarda Resveratrol tümör hücrelerini temizleyerek yineleme oranını azaltmaktadır. Resveratrol ayrıca prostat kanseri üzerinde, kanser hücrelerindeki androjenleri ve reseptörlerinin işlevlerini durdurarak baskılayıcı etki gösterir.¹⁰⁷ Bir çalışmada insan endometriyumundaki kanser hücrelerinde Resveratrol tedavisinin COX-2 ekspresyonunda azalmaya neden olduğu ve bunun da prostoglandin üretimini baskılayarak apoptotik hücre ölümünü tetiklediği bulunmuştur.¹⁰⁸ Bir diğer çalışmada, Resveratrol'ün hücrelerden salınmış VEGF üzerinde doz bağımlı etki gösterdiği ve endometriyal kanser

hücrelerinde hipoksiye neden olarak anjiogenik etkiyi azalttıkları izlenmiştir.¹⁰⁹

Resveratrol'ün antitümör etkisinin, apoptotik hücre aktivasyonunu baskılamak şeklinde olabileceği bildirilmiştir. Apoptotik hücre aktivasyonu; ribonükleotid redüktaz, DNA polimeraz, protein kinaz C, siklooksijenaz-2 aktivitelerinin baskılanması ile gerçekleşir. Sonuç olarak kanser oluşumunun engellenmesi sağlanır.²²

2.6.5. Antienflamatuar Etkileri

Resveratrol'ün antienflamatuar erkinin, proteazlar, kompleman sistemi(tamamlayıcı sistem), bradikininler, NO, sitokinler, adezyon molekülleri ve prostaglandinler gibi, enflamasyondan sorumlu tutulan maddelerin oluşumunu engelleyerek gösterdiği düşünülmektedir.⁸⁷ Trans-resveratrol'ün antioksidan ve antienflamatuar etkisini; immün sistem hücrelerinde yangısal sitokinleri düzenleyerek gösterdiği bilinmektedir.⁸⁷ İn vitro bir çalışmada trans-resveratrol'ün, doğal öldürücü hücrelerin sitotoksitesini azalttığı, CD4 ve CD8 T lenfositlerinde de sitokin üretimini düşürdüğü gösterilmiştir.¹¹⁰ Bir diğer çalışmada Resveratrol'ün hücrel toksisiteyi azalttığı, lenfosit çoğalmasını baskıladığı, lenfosit kökenli interlökinlerin ve tümör nekroz faktörün (TNF- α) üretimini azalttığı saptanmıştır.¹¹¹ Diğer bir çalışmada ise; in vitro olarak üretilen TNF- α , interlökin 1 β ve interlökin 6'nın Resveratrol ile baskılandığı gösterilmiştir.¹¹² Fare karaciğer ve böbrek perfüzyon modelinde Resveratrol'ün tirozin kinaz erkini baskılayarak antienflamatuar etki gösterdiği izlenmiştir.¹¹³

2.6.6.Östrojenik Etkileri

Resveratrol'ün östrojenik ve anti-östrojenik yetisi oldukça dikkat çekicidir. Resveratrol, sentetik bir östrojen olan 33–dietilstilbestrol'e (4,4-dihidroksi-trans-dietilstilben) kimyasal olarak benzer. Bu benzerliği ile östrojen reseptörlerine (ER) kolay bağlanıp, östrojen agonisti gibi erk gösterir. Bazı kültür çalışmalarında Resveratrol'ün östrojen karşıtı gibi hareket ettiği de belirlenmiştir.¹¹⁴ Resveratrol, östrojenin neden olduğu hücre çoğalması, tümör oluşumu ve gelişimini engelleyerek anti-östrojenik etki de göstermektedir.

Son dönemde yapılmış olan in vivo bir çalışmada; Resveratrol, testosteron dahil, farklı cinsiyet hormonlarının dengeleyecisi olarak gösterilmiştir.²⁹ Leydig hücrelerinin de östrojen reseptörleri içerdiği bilinmektedir.¹¹⁵ Resveratrol'ün Leydig hücreleri içinde ER aracılı hücresel yanıtlar üzerinde eş ya da karşıt etkileri tam olarak açıklık kazanmamıştır.

Resveratrol ER α ve ER β 'ya bağlanmaktadır, ancak ER β eş erki, daha yüksektir. ER β reseptöründen zengin dokular, resveratrolün eş erkine daha duyarlıdır. Moleküler düzeyde değişken çalışmalara göre resveratrol ER α ' ya seçici olarak bağlanmaktadır. Trans izomeri Cis izomerine karşı reseptörlere daha duyarlıdır.^{114,116,117}

2.6.7.Antitrombosit Etkileri

Trans–Resveratrol'ün hücre içi kalsiyumu azaltarak trombosit kümeleşmesini engellediği bildirilmiştir.⁹⁰ Bir çalışmada Resveratrol'ün TXB2 ve lipooksijenaz ürünü lökotrienlerin oluşumunu engellediği gösterilmiştir. Ayrıca araşinoik asidin neden olduğu kümelenmeyi baskıladığı saptanmıştır. Resveratrol'ün cis izomerinin kan sulandırıcı

etkisinin daha belirgin olduğu bildirilmiştir.²¹ Resveratrol'ün ADP ve trombin ile aktive edilen trombosit yapışmasında baskılayıcı etkinliği bulunmuştur.¹¹⁸ Kümelenme sırasında artan hücre içi kalsiyumun nedeni; hücre dışındaki kalsiyumun, kanallar aracılığı ile hücre içine alınmasıdır. Resveratrol hücre içi kalsiyum girişini belirgin düzeyde engellemektedir. Farklı olarak resveratrolün trombosit endoplazmik retikulumundaki Ca^{+2} ATPaz baskılayıcısı olan "thapsigargin" aracılığı ile kalsiyum girişini azalttığı da gösterilmiştir.¹¹⁹ Trombin ve ADP ile uyarılan insan trombositlerinin kümeleşmesi üzüm suyu ve şarap ile durdurulmuştur.²⁴ Diğer bir çalışmada ise kollagen ile uyarılan trombositlerde resveratrolün, kümeleşmeyi belirgin oranda baskıladığı sonucuna varılmıştır.¹²⁰

2.6.8.Kan Yapıcı Etkileri

Resveratrol'ün, nötrofil ve makrofajlardan salınan hidrojen peroksit gibi oksidan ajanlar tarafından salınımı uyarılan VEGF ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. Resveratrol'ün kan yapımını arttırarak yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir.¹²¹ Resveratrol'ün siklooksijenaz enzimini baskılaması ile COX1 üzerinden hücre büyümesinin durdurulmasında etkili olduğu saptanmıştır.¹²² Bir diğer çalışmada ise kolon, prostat karsinomu, meme ve epitelyal karsinomlarda anti anjiyogenik özellikler gösterdiği belirtilmiştir.¹²³

2.6.9.Karaciğer Koruyucu Etkisi

Bir çalışmada karaciğer stellat hücrelerinin erkini engelleyen bir bileşimin fibrojenезisi de engelleyebileceği düşüncesiyle; resveratrolün stellat hücre çoğalmasına etkisi araştırılmıştır. Sonuçta resveratrolün sinyal iletim yolağını ve hücre protein döngüsünü baskılayarak, stellat hücrelerinin erkini engellediği bildirilmiştir.⁸⁰ Resveratrol'ün karaciğerden

lipoprotein üretimi ve salgılanmasını baskılayıcı etkisi saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda kırmızı üzümün hepatik LDL reseptör erkini ve HMG-CoA redüktaz yetisini arttırdığı da gösterilmiştir.¹²⁴

2.6.10.Herpes Simpleks Virüsü Üzerine Etkileri

Herpes sympleks hominis; tip 1 ve tip 2 olarak iki türdür. *Herpes simpleks* virüsü(HSV), mukozal, epidermal ve dermal değinim yoluyla bulaşır. Birincil genital herpes enfeksiyonlarının %70-75' inden tip 2, %25-30' undan tip 1 sorumludur. Yineleyen enfeksiyonların ise % 60-88'inden tip 2 sorumlu iken, % 14-25'inden tip 1'in yükümlü olduğu bulunmuştur. HSV-2 ile enfekte edilmiş fare vajinasına, enfeksiyondan 1 saat sonra polietilenglikolde hazırlanmış %19 'luk topikal preparatı günde beş kez sürüldüğünde HSV-2 replikasyonunu on *günde* durdurduğu ve 7.günde asiklovirle hemen hemen aynı etkinliğe ulaştığı belirlenmiştir. Aynı uygulama ile, HSV-1 enfekte fare vajinasındaki enfeksiyonu da baskıladığı ve ekstra vajinal lezyonları da azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca asiklovir grubunda ve plasebo grubunda ölümler gerçekleşirken, resveratrol grubundaki farelerde ölümlerin gerçekleşmediği bildirilmiştir.^{125,126}

2.6.11.Helikobakter Pylori Üzerine Etkileri

Helicobacter pylori, midede kronik yangıya ve onun sonucunda da artan oksijen radikalleriyle DNA hasarına neden olur. Oksidatif hasar, gastrik epitelyal hücre döngüsünün değişmesine ve hücre ölümüne neden olur. Resveratrol, *Helicobacter pylori* bakterilerini seçici biçimde yok eder. Bununla birlikte, midede ülser, gastrit ve kanser gelişimine, sitotoksin ilişkili gen A (CagA+) suşunun neden olduğu düşünülmektedir. Resveratrol'le yapılan bir çalışmaya göre; Resveratrol'ün

in vitro ortamda *Helicobacter pylori* 'nin CagA+ toksininin gelişimi ve büyümesini durdurduğu saptanmıştır.^{127,128}

Resveratrol'ün ayrıca; *Staphylococcus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, dermatofitler, *Penicillium expansum*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum gypseum*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis* 'e karşı antimikrobiyal etkinlik gösterdiği saptanmıştır.^{26,129,130}

Resveratrol'ün, yaşlanmaya karşı etkinlik göstererek, yaşlanmayı yavaşlatıcı hatta yaşam süresini uzatıcı etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu etkiyi, insülin duyarlılığını, sirtuin geninin enzimatik erkini ve mitokondriyon sayısını artırarak ayrıca antioksidan etkisi ile gerçekleştirmektedir.¹³¹

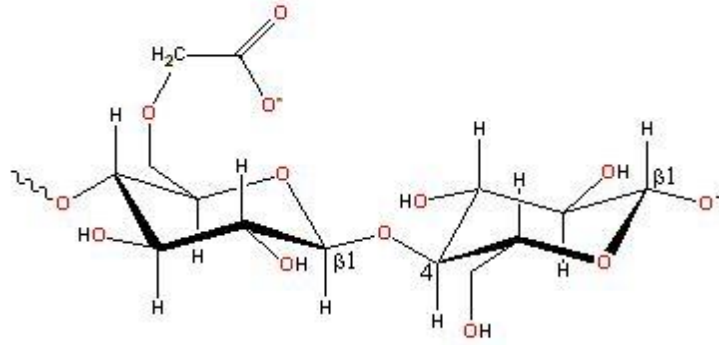
Damar sertliğini önleyici etkisinin; artmış metabolik hız, antioksidan etkinlik, azalmış lipid peroksidasyonu sonucu olabileceği düşünülmektedir.⁸⁷

Resveratrol vücut ağırlığının düzenlenmesine de yardımcı olur. Bir çalışmada, resveratrolün menopoza öncesi ve menopoza sonrası kadınlarda arteriyel genişlemeyi belirgin olarak düzelttiği görülmüştür. Resveratrol'ün; Alzheimer hastalığının engellenmesi, osteoporozun durdurulmasını sağladığı, ayrıca proteinüri, hipoalbuminemi ve hiperlipidemide belirgin düzelmelere neden olduğu bildirilmektedir.²⁷ Resveratrol'ün anti alerjik olduğu saptanmıştır.¹³² C vitamininden 20 kat, E vitamininden ise 50 kat fazla etkili bir antioksidan olduğu için immün sistemi güçlendirmektedir.¹³³

Resveratrol son dönemde her alanda araştırılmaya devam edilen bir fitoaleksindir. Pek çok sistemde, pek çok hastalıkta, yaşam kalitesinin yükseltilmesinde hatta yaşam süresinin uzatılmasında etkinliği kısmen kanıtlanmıştır.

2.7.KARBOKSİMETİL SELÜLOZ

Karboksimetil selüloz ya da sodyum karboksimetil selüloz (CMC) gıdalarda kıvam arttırıcı olarak kullanılan bir katkı maddesidir. Suda çözünebilir bir polimer olan CMC anyonik selülozun karboksile edilmesiyle üretilir ve selüloz eterleri grubuna girer. Kimyasal formülü $C_6H_7O_2(OH)_2OCH_2COO^-$ 'dir, beyaz ile sarı arası renkte ve lifli yapıdadır.^{134,135,136,137} (Şekil 3)



Şekil 3: CMC' nin Kimyasal Formülü

Karboksimetil selüloz sıcak ve soğuk suda çözünebilirken, organik çözücülerde çözünmez. Su/alkol sistemleriyle uyumludur. CMC'nin işlevsel özellikleri selülozun yapısal özelliklerine (örneğin; içerdiği hidroksil gruplarına) bağlıdır. Kullanıldığı ürünlerde viskoziteyi jelleştirmeden arttırır.^{138,139,140,}

CMC'nin doğal pH'ı 8.25 iken ticari olarak daha iyi çözünmesi amacıyla 7-7,5 pH'ta üretilir. Ürünün pH'ı düşürüldükçe, çözünürlüğü de azalır, 4 ve altı pH'larda suda çözünmez hale gelir. Kıvam arttırıcı, su tutucu, sabitleyici, koloit engelleyici, çözünme koruyucu, geciktirici, akıcılığı denetleyici olarak gıdalarda ve diğer endüstrilerde kullanılır. Yağlara ve organik çözücülere karşı dayanıklı, su ve oksijen geçirgenliği olmayan ince katmanlar oluşturur.^{136,138,141,142}

CMC ilk olarak I. Dünya Savaşı sırasında Almanya' da bulunmuş ve o dönemde jelatin yerine kullanılmaya başlanmıştır. Sonraki dönemde yaşanan teknik zorluklar ve üretim maliyetlerinin yüksekliği II. Dünya Savaşı' na değin CMC üretimini geciktirmiştir. II. Dünya Savaşı sonrası suda çözünebilen zambak sıkıntısı yaşanınca, CMC' nin üretimi büyük oranda arttırılmıştır.¹³⁵

CMC' nin çeşitli endüstri dallarında farklı kullanım alanı bulunmaktadır;

- Kozmetikte kıvamlaştırıcı, kıvam koruyucu, koku sabitleyici, su tutucu, katman oluşturucu, jelleştirici ve köpük arttırıcı olarak kullanılır. Diş macunlarında, şampuanlarda, kremlerde, losyonlarda ve jel halindeki ürünlerde de kullanılmaktadır.^{139,143,144,145}

- Eczacılıkta geniş kullanım alanlarına sahiptirler. Uçucu olmayan göz damlalarının içeriklerinde yağlandırıcı olarak kullanılır; gözde kurumayı engeller. Krem, merhem, şuruplar ve losyonlarda kıvamlaştırıcı, sabitleyici ve film oluşturucu olarak kullanılır. Jelleştirici, koyulaştırıcı, kolloit engelleyici ve film oluşturucu olarak yararlanılmaktadır. Yüksek dayanıklılık özelliği ile tablet haplarda bağlayıcıdır.^{139,143,145,146,}

- Duvar kağıdı yapıştırıcılarında ve lateks yapıştırıcılarda koyulaştırıcı ve su tutucu olarak kullanılır. Seramikte ve camcılıkta sırlamada, desenlerin işlenmesinde ve kaplamacılıkta tutturucu, koyulaştırıcı, yağlayıcı ve yapıyı koruyucu olarak yararlanılır.^{144,147}

- Tekstilde kumaş üretiminde bağlayıcı ve kıvam koyulaştırıcı olarak kullanılır.^{139,144,148}

- Deterjanların içeriklerinde kiri çözerek çamaşırlardan uzaklaştırmak ve beyaz yapıyı korumak amaçlı yararlanılır.^{139,144,145,149}

- Baskıcılıkta su koruyucu film oluşturmak, su bazlı mürekkeplerin kıvamını ve akışkanlığı ayarlamak için kullanılır. Kağıt ve kağıt ürünlerinde, hamura eklenerek, kağıdın sertliği artırılır. Kağıt yüzeylerine eklenerek, tutucu, yağa dirençli kat oluşturucu, gözenekli ve dalgalı yapıyı denetleyici olarak kullanılır.^{144,147}

CMC' nin gıda sektöründe kullanıldığı alanlar;

- Unlu ürünlerde kıvamı attırmak, su kaybını indirmek ve yapıyı geliştirmek için kullanılır. Makarna gibi ürünlerde kırılabilirliği azaltmak amacıyla yeğlenir. Unlu ürünlerde ortalama %0.25-0.4 oranında kullanılır.¹³⁵

- Tatlılarda koyulaştırıcı, şeker kristallerinin oluşumunu denetleyici, yapıyı geliştirici topaklanmayı engelleyici olarak kullanılır. Tatlılarda CMC % 0,3-0,8 oranında kullanılır, kokusuz ve tatsız özellikte olması nedeniyle, tatlıların kendilerine özgü tadını bozmaz.^{141,142}

- Protein içeriği yüksek gıdalarda su tutucu, ağız tadını geliştirici ve kıvam koruyucu olarak yararlanılır. Ayrıca CMC kullanımı

protein ayrıştırılmasında uygulanan yöntemlerdendir. Peynir suyundan protein elde etmek için kullanılır.¹⁴¹

- İçeceklerde meyve özütünü korumaya yardımcı, hızlı koyulaştırıcı, ağız tadını geliştirici ve protein içeriğini koruyucu olarak kullanılır.¹³⁵

- Donmuş tatlılarda; buz kristallerinin oluşumunu denetlemek, yapıyı ve ağızda bıraktığı tadı geliştirmek için kullanılır.^{141,142}

- Düşük kalorili ürünlerde kıvam artırıcı olarak yeğlenirken, şuruplarda kıvam koyulaştırıcı ve berraklaştırıcı olarak kullanılır. Ayrıca soslarda kıvamı koyulaştırmaya yardımcıdır.^{135,141,142}

- Hayvan gıdalarında yağlayıcı madde, film oluşturucu, su tutucu, et suyunu koyulaştırıcı ve yapıyı koruyucu olarak kullanılır.^{135,141}

- Dondurma üretiminde % 0,15–0,27 oranında kullanılan karboksimetil selüloz, yüksek su tutma özelliği ile kristalleşmeyi önler ve dondurma karışımının dövülme yetisini artırır.^{135, 142,150}

CMC' nin kullanım alanları son derece geniş olmasına karşın, CMC' nin sağlık üzerine etkilerini araştıran çalışma son derece azdır. Bizim çalışmamızda CMC, çözücü özelliğinden yararlanılarak, Resveratrol'ün çözücüsü olarak kullanılmıştır.

2.8.Kullanılan Antikorlar

2.8.1.C-Kit (CD117)

C-kit, insanlarda 4. kromozomun q11-q12 bölgesinde yerleşik ve 145 kDa ağırlığında bir protoonkogendir. CD117 (KIT) tip III tirozin kinaz reseptörü olup, bazı hücrelerde sinyal iletiminin düzenlenmesinde rol oynar. Hücre farklanması ve büyümesinde de önemlidir.¹⁵¹

Birbirine bağlı iki formu bulunmaktadır. Birincisi kök hücre faktörünün çözünebilir formu olup; gelişimin farklı evrelerinde ve erişkin döneminde hücre çoğalmasının, yaşam süresinin, farklanmasının ve göçünün düzenlenmesinde etkindir. İkinci formu ise, kök hücre faktörünün zar bağımlı formudur. C-kit reseptörünün dengesini artırır, kinaz erkinin hızla azalmasını ve sürdürülmesini sağlar. C-kit zar bağımlı tirozin kinaz reseptörü olması nedeniyle immunohistokimyasal boyamalarda hücre zarlarında işaretlenir.¹⁵²

C-kit; hematopoetik kök hücreler, mast hücreleri, derinin bazal hücreleri, memenin epitel hücreleri, melanositler, interstisyel Cajal hücreleri ve üreme hücrelerinde eksprese edilir. C-kit normal yassı hücrelerde eksprese edilmez. Serviks içi bez epitelinde, pankreas, prostat, mide ve bağırsaklarda da c-kit ile boyanma olmaz. Periferik sinirlerde c-kit ekspresyonu izlenmezken, santral sinir sisteminin bazı bölgelerinde pozitif boyanma gösterilmiştir. Mast hücreleri c-kit ile membranöz ve sitoplazmik boyanma gösterir.¹⁵³

Embriyonal gonadlarda tirozin kinaz reseptörü c-kit ve onun ligandı “kök hücre faktörü” (*Stem Cell Factor* =SCF), ilkel üreme

hücrelerinin yaşamlarını sürdürebilmeleri ve çoğalmaları için gerekli olan genlerdir.

CD117 ligandı, kök hücre faktörü tarafından aktive edilir. Normal c-kit, liganda bağlandığında aktive olan kök hücre faktörüdür. Reseptörün aktivasyon, fosforilasyon kaskadını harekete geçirerek farklı hücre tiplerinde değişik transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Bu aktivasyon apoptozis, hücre farklılaşması, çoğalması, kemotaksi ve hücre adezyonunu düzenler. CD117'nin dimerizasyon ve otofosforilasyonu fosfatidilinositol-3 kinaz/Akt sistemi yoluyla apoptozisi baskıladığı ve Ras/MAP kinaz ve JAK/STAT sinyali yolu ile hücre çoğalmasını arttırdığı bilinmektedir.¹⁵⁴

C-kit/SCF sistemi, ilkel üreme hücrelerinin vitellus kesesindeki gelişim süreçlerinde, gonadlara göçlerinde, gelişmelerinde ve sağ kalımlarında çok önemlidir. C-kit, farede ilkel üreme hücrelerince embriyolojik gelişimin 7. gününden itibaren eksprese edilmeye başlar, gelişimin 12. gününe değin göç yolu boyunca salgılanması sürer. Bu hücrelerin c-kit ekspresyonu, oogeneze ya da spermatogeneze geçişleri için mayoz bölünmeye girerken kesilir. Dişide gonadların oositlerinde c-kit 17,5. günde yeniden eksprese edilmeye başlarken, erkek gonadlarda c-kit ekspresyonu ancak doğumdan sonra başlar.¹⁵⁵

C-kit ve SCF mutant farelerde ilkel üreme hücre sayısının belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Farelerde kısırlıkla birlikte anemi ve pigmentasyon hasarlarının da olduğu saptanmıştır.¹⁵⁶

C-kit geni spermatogenezisin doğum sonrası evrelerinde önemli roller üstlenmektedir. Erişkin testisinde c-kit her tip spermatogonyumdan eksprese olurken, spermatogonyal kök hücreden

salınmamaktadır. C-kit kapasitasyon ve akrozom reaksiyonunda da etkindir.

2.8.2. Anjiyotensin II Reseptörleri

Anjiyotensin (Ang II), Renin-Anjiyotensin Sistemi (RAS)'nin asıl, aktif mediatörüdür. Kan hacmi ve damar geçirgenliğini düzenlemedeki önemli rolleri nedeniyle, kardiyovasküler homeostazda anahtar rol oynar.¹⁵⁷

Ang II'nin testis, ovaryum, böbreküstü bezleri, böbrekler, beyin, hipofiz bezi, damar düz kasları, ve sempatik sinir sistemi gibi geniş bir doku hedefi vardır. Anjiyotensin sadece dolaşımda bulunan bir hormon olmayıp, aynı zamanda beyin, kalp, böbrek ve kan damarları gibi pek çok dokuda da üretilir. Ang II parakrin ve otokrin işlev yapar. Hücre büyümesi, çoğalma ve hücre dışı matriks oluşumunda önemli görevler üstlenmiştir. Ang II, diğer peptid hormonlar gibi hedef hücrelerin zarlarında bulunan reseptörler aracılığı ile etki eder.¹⁵⁸

1980 yılından günümüze değin yapılan çalışmalar sonucunda, Anjiyotensin II tip I reseptör (AT1) ve Anjiyotensin II tip II reseptör (AT2) olarak birbirinden farklı iki alt tipi tanımlanmıştır. Daha sonraki çalışmalar ise AT3 ve AT4 reseptörlerinin varlığını göstermiş olsa da yeterince klonlama çalışmaları yapılmaması nedeniyle bu reseptörlerin işlevleri hakkındaki bilgiler kısıtlıdır.¹⁵⁹

2.8.2.1. Anjiyotensin II Tip I Reseptörü (AT1)

Ang II' nin testisler, ovaryumlar, karaciğer, böbreküstü bezleri, beyin, akciğerler, böbrekler, kalp ve damarları da kapsayan çoğu

organ üzerindeki fizyolojik etkilerinin hemen hemen tümü, hücre yüzeyinde bulunan anjiyotensin II tip I reseptörleri (AT1) tarafından oluşturulur.¹⁶⁰

AT1 yaklaşık 40 kDa ağırlığındadır ve 359 amino asitten oluşmuştur. G-eşleşmiş protein reseptörlerinin yedi transmembran süper ailesine üyedir. AT1 reseptörü, kromozom 3q22'de kodlanmaktadır. Memelilerde AT1 reseptörün alt birimleri olan, AT1A ve AT1B % 95 oranında eşdeğer amino asit dizilimlerine sahiptir. AT1A ve AT1B reseptörleri benzer ligand bağlanımları ve sinyal iletim özellikleri gösterirlerken, doku dağılımları ve transkripsiyonel düzenlenimleri farklıdır. İnsanlarda AT1 reseptörü bulunmaktadır.¹⁵⁹

G protein ailesinin bir üyesi olan AT1 Ang II ile uyarıldığında fosfolipaz, kalsiyum ve protein kinaz C'yi içeren bir dizi hücre içi ikinci mesajcılar aracılığı ile sinyal iletimini gerçekleştirir.¹⁶¹

Ang II'nin vazokonstriksiyon, renin salgılanmasının baskılanması, vazopressin ve aldosteron salınımı, Na⁺ ve su tutulumu, ayrıca üreme sistemindeki işlevleri AT1 tarafından düzenlenir.¹⁶⁰

AT1 erkek üreme sisteminde, Leydig hücre zarlarından eksprese edilmektedir.¹⁶² AT1 reseptörünün ayrıca spermatogenik epitel ve gelişmekte olan spermiyumların kuyruklarında da bulunduğu saptanmıştır. AT1'in spermiyum hareketliliği ve atılımında önemli işlevi olduğu da belirlenmiştir.¹⁶³

2.8.2.2. Anjiyotensin II Tip II Reseptörü

AT1 reseptörlerine benzer olarak, AT2 reseptörü de 41 kDa ağırlığında ve yedi transmembran birim reseptörüdür. %32'si AT1'e benzerlik göstermektedir. Tamamı 363 amino asitten oluşmuştur.¹⁵⁹

Yakın zamana değin Ang II'nin biyolojik işlevlerinin AT1 tarafından yürütüldüğü düşünülürken, son 10 yılda yapılan çalışmalar sonucunda AT2'nin de bu işlevlerin gerçekleştirilmesinde rolü olduğu ortaya çıkmıştır. AT2'nin embriyonik gelişim, hücre farklılaşması, doku onarımı ve programlanmış hücre ölümü gibi karmaşık biyolojik işlevlerin düzenleyicisi olduğu gösterilmeye başlamıştır.¹⁶⁰

Yapılan pek çok çalışma AT2 reseptörünün, AT1'e karşıt etkisinin olduğunu göstermektedir. AT2 reseptörünün AT1'e zıt olarak, büyümeyi baskılayıcı, antihipertrofik ve proapoptotik özellikler taşıdığı belirtilmiştir.¹⁵⁷

AT2 yüksek oranda fetal dokuda gözlenmesine karşın, fetal aorta, gastrointestinal mezenşimal hücreler, bağ doku, iskelet sistemi, beyin ve böbreküstü bezi medullasında da belirlenmiştir. AT2' nin doğumdan sonra ekspresyonunun azalması, erişkinlerde patolojik uyarımlarla sentezinin sağlanabileceğini ve fetal dönemde etkin olduğunu vurgulamaktadır. AT2, ayrıca, düşük oranda böbrekte, akciğer ve karaciğerde saptanmış olmakla birlikte, Ang II'nin işlevindeki rolleri kesinlik kazanmamıştır.¹⁶⁴

2.8.3.Östrojen Reseptörleri

Hormonların, hedef hücrelerine ulaştıklarında etkinliklerini gösterebilmeleri, özgün reseptörlerine bağlanmaları ile sağlanabilir. Hormonlar membran ya da çekirdek reseptörlerine bağlanarak biyolojik etkilerini gösterirler. Östrojenler etkilerini ligand ile aktive olan ve östrojen reseptörü (ER) olarak adlandırılan transkripsiyonel faktörler aracılığı ile göstermektedir ^{165,166} Östrojen reseptörleri ayrıca hücre içi ikincil habercilerin ve membranla ilişkili olan sinyal komplekslerinin aktivitesine de aracılık etmektedir. ¹⁶⁵

Östrojen reseptörleri, çekirdek transkripsiyon düzenleyicisi olarak görev yapan geniş bir steroid reseptör ailesinin üyesidir ve 17 β -östradiol hormonu ile aktive edilirler. Esas görevleri, hedef genlerin ekspresyonlarını düzenlemektir ¹⁶⁷

Östrojen reseptörünün alfa (ER α) ve beta (ER β) olarak iki tipi vardır. İki reseptör proteininin de DNA bağlanma bölgesi oldukça benzer olmasına karşın, molekülün genelindeki amino asit benzerliği düşüktür. Bunun sonucu olarak da farklı ligandlar her iki reseptör proteinine farklı bağlanma ilgisi göstermektedir. ¹⁶⁸

Östrojen reseptörlerinin yarı ömrü 2-4 saat olup yaklaşık olarak 6 saatte bağlanma yetileri azalır. Bu nedenle östrojen etkisinin süreklilik gösterebilmesi için östrojen varlığının devamlı olması gerekmektedir ¹⁶⁹

2.8.3.1.Östrojen Reseptör Alfa

ER α ilk olarak 1958 yılında Elwood Jensen tarafından tanımlanmış, 1986 yılında ilk kez uterustan klonlanmıştır.^{166,170} ER α 595 amino asit içerir ve 66 kDa ağırlığındadır.¹⁷¹ Östrojen reseptör alfa, kromozom 6q25.1'de kodlanmaktadır.¹⁷²

Östrojen reseptör alfa, testiste Leydig ve üreme hücrelerinde eksprese edilirken, aynı zamanda prostat epitelinde, vezikula seminaliste, meme dokusunda, ovaryumda, teka interna hücrelerinde, uterusun epitel ve stromal hücrelerinde eksprese edilmektedir.¹⁷³ Ayrıca epididimis, hipofiz, böbrek, böbrek üstü bezi ve değişen oranlarda da timus, kalp ve karaciğerde mRNA ekspresyonu bildirilmiştir.¹⁷⁴

2.8.3.2.Östrojen Reseptör Beta

Östrojen reseptör beta (ER β), 1996 yılında keşfedilen, 530 aminoasitten oluşan, çekirdek reseptör süper ailesi üyesi bir proteindir ve ER β kromozom 14q22-24'te kodlanmaktadır.¹⁷² Heterodimerik yapısı nedeniyle östrojen sinyalizasyonunda daha etkin bir düzenleyici olduğu öne sürülmektedir.¹⁷⁵ Heterodimerizasyon sonrası ER α 'nın aktivitesini baskılamaktadır. Bu nedenle antiproliferatif bir gen olduğu düşünülmektedir.¹⁷⁶

ER β testis dışında, prostat, vezikula seminalis, meme, ovaryum ve uterusta eksprese edilmektedir.¹⁷³ Mesane, akciğer, epididimis, hipofiz, timus, beyin ve medulla spinaliste de ER β ekspresyonu bildirilmektedir.¹⁷⁴

ER α ile ER β 'nin hormon bağlama özelliklerinin benzer olması aynı hormonlara birbirleri ile karşılaştırılabilir düzeyde yanıt verdiklerini göstermektedir. Ötradiol'ün her iki reseptöre olan çekiciliği benzerdir. Fitoöstrojenler ER α 'ya ER β 'ya karşın daha fazla çekicilik gösterirler.¹⁷⁷

Hücresel düzeyde yapılan çalışmalarda ER α ve ER β , ER negatif hücrelere transfer edildiklerinde ER β 'nin ER α 'yı baskıladığı ve hücrelerin östradiole duyarlılığını azalttığı belirlenmiştir.¹⁷⁸

Sıçan ve farelerde yapılan çalışmalar testislerin fetal, yenidoğan, prepubertal ve yetişkinlik dönemlerinde aromataz aktivitesi yoluyla östrojen üretimine sahip olduğunu göstermektedir. İmmünohistokimyasal çalışmalarda gösterildiği gibi ER α ve ER β reseptörleri tüm bu dönemlerde testislerde eksprese edilmektedir.^{179,180,181} Östrojen reseptörlerinin testislerde Leydig, Sertoli ve üreme hücrelerinde, duktuli efferentes ve epididimide bulunduğu gösterilmiştir. Östrojenin hücrelerin gelişimi ve işlevleri üzerinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Leydig hücreleri ER α ve ER β eksprese ederken, seminifer tübül epiteli esas olarak ER β içerir. Ayrıca birçok hayvan türünde östrojen testis ve rete testis sıvılarında ve interstisyel sıvıda yüksek düzeylerde bulunmaktadır.¹⁸²

2.8.4.TUNEL Yöntemi

Apopitozis, normal fizyolojik koşullarda olaylanan hücre ölümüdür. Apopitozis terimi, ilk olarak İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie tarafından 1972 yılında kullanılmıştır. Bilim adamları apopitozisi canlı dokulardaki hücre azalmalarından sorumlu olan ve yapısal olarak özgün hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır.¹⁸³ Apopitozis

sürecinde gereksinim duyulmayan ya da işlevleri bozulmuş hücreler ortadan kaldırılır. Bu durum normal embriyolojik gelişim ya da ovaryumdaki folliküler atrezide olduğu gibi olağan fizyolojik süreçlerde olaylanabilir. Apoptozis, gelişim ve hücrel homeostazinin korunması için gereklidir.¹⁸⁴ Apoptozisde hücreler kendi otonom düzeneklerine göre programlanmış ölümü gerçekleştirirler. Apoptozisde hücre zar bütünlüğü korunur, böylece hücreler komşu hücrelere zarar vermeden ölürler.

Apoptozise giden hücreler büzülür, hücreler arası bağlantılarını yitirir, yoğunlaşır, kromatin parçalanır ve hücre küçük apoptotik cisimler oluşturmak üzere yıkılır. Apoptotik cisimler makrofajlarca fagositte edilirler.¹⁸⁵

Apoptozisde DNA parçalanması, hücre şeklindeki yapısal değişikliklerle ilişkilidir. Hücrede apoptozisi belirlemek ereği ile kullanılan bir çok yöntem vardır. Apoptozisde ortaya çıkan DNA parçalanmasını gösteren yöntemlerden biri TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transpherase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling*) yöntemidir.¹⁸⁶

TUNEL yöntemi, kimyasal olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş nükleotidler kullanılarak serbest 3'OH uçlarının işaretlenmesi ilkesine dayanır. Reaksiyon tamponuna eklenmiş olan nükleotidlerin, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak, enzimatik olarak DNA'ya bağlanması sağlanır. TdT tek sarmallı ya da çift sarmallı DNA'nın 3'OH uçlarına serbest olarak eklenen nükleotid trifosfatları katalizler. Serbest olarak bulunan nükleotidler digoksinin-konjugat eklenmesiyle bir oligomer oluştururlar. Daha sonra digoksinin ile konjuge olan nükleotidler peroksidaz tepkimesi verebilen anti-digoksinin antikoru ile bağlanması sağlanır. Böylece bağlanmış

peroksidaz antikorunun, immunohistokimyada hassas görünüm sağlayan kromojenik substratlarla bağlanması sağlanır. Sonuç olarak apoptotik cisimciklerde çok yüksek oranda bulunan 3'OH uçlarının hassas ve özel boyanması gerçekleşmiş olur.^{187,188}

TUNEL yöntemi özellikle apoptozisin erken evrelerin gösterilmesi açısından özel ve önemlidir.¹⁸⁶

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Bu çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden sağlanan Wistar Albino cinsi, 20 günlük, 36 adet erkek sıçan kullanıldı.

Denekler Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nde 21-23 °C ısı ve ışık/zaman ayarı 14/10 saat olacak şekilde bakımları sağlandı.

Çalışmada kullanılan sıçanlar 6 gruba ayrıldı:

- 1.Grup: Kontrol grubu (n=6)
2. Grup: Çözücü (Karboksimetilselüloz 10 ml/kg, CMC) (n=6)
3. Grup: 500 mg/kg/gün DBP (n=6)
4. Grup: 500 mg/kg/gün DBP+20 mg/kg Resveratrol+Çözücü (n=6)
5. Grup: 1000 mg/kg/gün DBP (n=6)
6. Grup: 1000 mg/kg/gün DBP +20 mg/kg Resveratrol+Çözücü (n=6). Uygulama gavaj yolu ile yapıldı.

Tüm ilaç uygulamaları 30 gün süresince, günde tek doz ve aynı saatlerde yapıldı. Otuzuncu günün sonunda denekler intramusküler ketamin (45mg/kg) ve ksilazin (5mg/kg) enjeksiyonu ile uyutularak ötenazi gerçekleştirildi. Ötenazi sonrası deneklerin kasık bölgeleri açılarak testis dokuları alındı.

Işık mikroskopik inceleme için 1 cm³'lük parçalara ayrılan testis doku örnekleri %10'luk nötral formalinde 72 saat tespit edildiler. Daha sonra alışlagelmiş doku izleme yöntemlerden geçirilerek parafine gömüldüler. Hazırlanan parafin bloklardan polilizinli camlara 4-5 µm kalınlığında kesitler alınarak indirekt immunohistokimyasal yöntemler ile TUNEL yöntemleri uygulandı.

3.2. İmmunohistokimyasal Yöntem

Çalışmada immünohistokimyasal yöntemler ile C-kit (C-19) tavşan poliklonal antikoru (SC-168, Lot:E1206, Santa Cruz Biotechnology), Anjiyotensin II Tip 1 reseptörü (AT1) (306) tavşan poliklonal antikoru (SC-579, Lot: A2903 Santa Cruz Biotechnology), Östrojen Reseptör α (ERα) (H-184) tavşan poliklonal antikoru (SC- 7207, Lot: G2109 Santa Cruz Biotechnology) kullanılarak boyamalar yapıldı.

Kesitler 37 °C' deki etüvde bir gece tutulduktan sonra deparafinizasyonu kolaylaştırmak için etüv ısısı 57 °C' ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi.

Camlar deparafinizasyonu tamamlamak ereği ile 2 kez 15 dakika ksilolde bırakıldılar. Daha sonra sırasıyla %100 , %96, % 80'lik alkol serilerinden 10'ar dakika geçirilerek ksilolden kurtarılmalari sağlandı.

Dokulardaki alkolü uzaklaştırabilmek ereği ile kesitler 2 kez 5' er dakika distile sudan geçirildiler.

İlk olarak kesitlere 15 dakika % 3'lük hidrojen peroksit uygulanarak endojen peroksit aktivitesi bloke edildi ve PBS (fosfat tamponlu salin) ile camlar 3 X 3 dakika yıkandı. Camlar yıkandıktan sonra

Histostain Plus immünhistokimya kiti kullanıldı (Histostain Plus, Lot: 724944A In Vitro Gen. Camarillo USA). Kesitlere ilk olarak Ultra V blok solüsyonu uygulanarak 10 dk bekletildi. Bloklama aşamasından sonra camlar yıkanmadan ayrı ayrı C-kit (Lot: E1206, Santa Cruz, USA) ve AT1 (Lot: A2903, Santa Cruz, USA) ve ER α (Lot: G2109, Santa Cruz, USA) antikoruna etkin bırakılarak 1 gece +4 ° C' de bekletildi.

Bunu izleyerek oda ısısına alınan preparatlar PBS ile yıkandılar ve 10 dakika süreyle biyotinli sekonder antikora etkin bırakıldılar. Daha sonra yeniden PBS ile yıkanıp yine 10 dakika streptavidinli peroksidaz enzim kompleksine konuldular. Camlar tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kromojen olan DAB (3.3 diamin benzidin) (Liquid DAB –Plus Substrate Kit, Lot: 720221A, In Vitro Gen. Camarillo, USA) uygulanarak gözle görülebilen immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı. Harris Hematoksileni ile zemin boyaması yapılan camlar entellan ile kapatıldı. Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi ve fotoğraflandı.

3.3. TUNEL Yöntemi

Hücrelerde DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenebilmesi ereğiyle in situ apoptozis belirleme kiti (Apoptag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit, Lot: PSO1514711, Chemicon) kullanıldı. Parafin bloklardan polizimli lamlara, 4 μ m kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler 37 °C' deki etüvde bir gece bekletildi, daha sonra 1 saat deparafinizasyon için 57 °C'de tutulan kesitler, deparafinizasyonu tamamlamak ereğiyle iki kez 15' er dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Bunu izleyerek 10' ar dakika sırasıyla %100, %96 ve %80'lik etil alkol serilerinden geçirildi.

Kesitler, alkolden arındırılmak ereğiyle 2X5' er dakika distile sudan geçirildikten sonra 10 dakika 20µg/ml Proteinaz K ile etkin bırakıldılar. PBS ile yıkama sonrasında 15 dakika %3' lük hidrojen peroksit (Lot: K32805897 403, Merck) uygulanan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. PBS ile yıkanan kesitler 10-15 dakika dengeli tamponda ve 60 dakika 37 °C nemli ortamda TdT enziminde (77µL Reaksiyon Buffer+33 µL TdT Enzim) bekletildiler. Ardından oda sıcaklığında önceden ısıtılmış durdurma/yıkama tamponunda 10 dakika bekletildi ve Anti- Digoxigenin' de 45 dakika tutuldular. Tüm aşamalarda PBS ile yıkama yapıldı.Yıkamanın ardından TUNEL pozitif hücreleri gözlemleyebilmek ereği ile DAB ile boyama yapıldı. Zemin boyaması için 5 dakika süreyle Metil yeşili uygulandı.

Boyanan camlar artan alkol serilerinden geçirilerek sudan arındırıldıktan sonra, parlamaları ereği ile 20 dakika ksilolde bekletildi. Entellan ile kapatılan kesitler, Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi ve fotoğraflandı.

3.4. İstatistiksel Yöntem

Her camdan 6 bölge ve her bölgeden bir seminifer tübül gelişigüzel seçildi. Her seminifer tübülde de 6 bölgeden ölçümler yapıldı. Verilerin analizleri Windows için SPSS 16.0 paket programında yapıldı. Seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı dağılımının normale uygun olup olmadığı **Shaphiro Wilk** testiyle araştırıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortanca (25-75) persentil olarak gösterildi.

Araştırma grupları ve izlem zamanları arasında seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı yönünden farkın önemliliği **Bonferroni Düzeltmeli Kruskal Wallis** testi ile değerlendirildi. $P<0.017$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kruskal Wallis test istatistiği sonucunda önemli bulunduğu noktalarda farka neden olan durumları belirleyebilmek ereği ile yine **Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U** testi kullanıldı. $P<0.0056$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1.İmmünohistokimyasal Bulgular

C-Kit İmmün Boyama Bulguları

Kontrol grubu testis dokusunda; seminifer tübüller, ara bağ dokusu ve bağ dokusunda yer alan damar ve Leydig hücre toplulukları normal yapıda gözlemleniyordu. C-kit tutulumu doku genelinde zayıf-orta düzeydeydi. Spermatogonyumlarda immün tepkime son derece zayıfken, primer spermatositlerde sitoplazmik düzeyde ve daha belirgin reaksiyon saptandı. Primer spermatositlerden lümene gidildikçe tutulumun zayıfladığı ilgiyi çekiyordu. Leydig hücre tutulumu da belirgindi (Resim 1). Büyük büyültmeli incelemelerde, primer spermatositlerde tutulumun belirgin sitoplazmik ve zar düzeyinde olduğu izlendi. Diğer hücre tiplerinde ise daha zayıf tutulum ayırt edildi. Tüm seminifer epitelde zar boyanması da dikkat çekiciydi (Resim 2).

CMC uygulanan gruplarda c-kit immunreaksiyonunun kontrol grubuna karşın biraz daha az olduğu, ancak bunun tubulustan tubulusa farklılık gösterdiği belirlendi. Tutulum tüm spermatogenik epitelde zar düzeyinde belirlenirken, primer spermatositlerde sitoplazmik tutulum da sürüyordu (Resim 3). Büyük büyültmeli incelemelerde spermatogonyumlarda yaygın bir tepkime gözlenmezken, diğer epitel hücrelerinde zar tutulumunun yoğunluğu belirgindi. Leydig hücrelerinde de boyanma saptandı (Resim 4).

500mg/kg DBP uygulanan grupta küçük ve büyük büyültmeli incelemelerde; c-kit boyanmasının kontrol ve CMC uygulanan sham kontrol gruplarına karşın son derece azaldığı ilgiyi çekiyordu. Tutulum

genelde zar düzeyindeydi (Resim 5). Büyük büyültmeli resimlerde seminifer epitel ve Leydig hücrelerinde reaksiyon izleniyordu. Seminifer tübül epiteline karşın Leydig hücre tutulumunun daha yoğun olduğu ilgi çekiciydi. Bu hücrelerde tutulum zar ve sitoplazma düzeyindeydi. Sertoli hücrelerindeki c-kit tutulumunun sitoplazmada granüler düzeyde ve orta dereceli olduğu dikkati çekiyordu (Resim 6).

500mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta diğer deney gruplarına karşın tutulumun kontrol grubuna benzer olduğu dikkati çekiyordu. Özgün olarak primer spermatositlerde kuvvetli immunreaksiyonun varlığı belirgindi (Resim 7). Leydig hücre tutulumu kontrole eşdeşti (Resim 8).

1000 mg/kg DBP uygulanan grupta seminifer tübüllerin çoğunun atrofik olduğu, şekil bozukluğu gösterdiği ve düzensizleştiği izleniyordu. Seminifer tübüllerde epitel boyunun göreceli olarak kısaldığı, üreme hücrelerinin büyük çoğunluğunun olgunlaşmadan tübül lümenine döküldüğü dikkat çekiciydi. Yine seminifer tübül duvarında nekroze alanlar belirgindi. Tüm seminifer epitelde, tepkimenin zar düzeyinde olduğu izlendi (Resim 9). Lümeninde olgun spermiyum izlenmezken, büyük büyültmeli incelemelerde spermiyogenez aşamasını geçiren bazı spermatidlerin, Sertoli hücrelerinden ayrılıp baş bölgeleriyle lümenine döndüğü ilgiyi çekiyordu. Leydig hücreleri diğer gruplarla eşdeş yapı sergiliyordu. Büyük büyültmelerde c-kit tutulumunun zar düzeyinde olduğu daha belirgin olarak gözlemlendi (Resim 10).

1000mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta bir önceki gruba karşın yapının biraz daha korunduğu; lümeninde olgun spermiyumların varlığı gözlemlendi. Tüp duvarında tepkimenin daha çok zar düzeyinde olduğu ve Sertoli hücrelerinde de granüler sitoplazmik

tutulunun varlığı belirgindi. Leydig hücrelerinde yoğun c-kit tutulumu dikkati çekti (Resim 11-12).

AT1 İmmün Boyama Bulguları

Kontrol grubunda AT1 tutulumunun seminifer tübül epitelinde özellikle primer spermatositlerde, intersitisyel dokuda da Leydig hücrelerinde yoğunlaştığı belirlendi (Resim 13). Büyük büyültmeli incelemelerde; seminifer epitelde primer spermatosit ve Sertoli hücrelerinde tutulumun ağırlıklı olarak çekirdek düzeyinde olduğu izlenirken, sitoplazmik tutulumun zayıf olduğu ayırt edildi. Leydig hücre tutulumunun da çekirdek ve sitoplazma düzeyinde diğer hücre gruplarına karşın daha kuvvetli olduğu görülmekteydi (Resim14).

CMC uygulanan sham kontrol grubunda da küçük ve büyük büyültmeli resimlerde boyanmanın kontrol grubuyla eşdeğer olduğu saptandı (Resim 15-16).

500 mg/kg DBP uygulanan grupta AT1 tutulumunun seminifer epitelde, primer ve sekonder spermatosit düzeyinde olduğu izlendi. Tepkimenin çekirdekte daha kuvvetli, sitoplazmada zayıf derecede olduğu gözlemlendi. Buna karşın intersitisyel dokuda damarlara yakın konumlu Leydig hücrelerinin daha yoğun boyandığı ilgiyi çekti (Resim 17-18).

500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta seminifer tübüle ait spermatogenik epitel ve intersitisyel alan Leydig hücrelerindeki AT1 tutulumunun kontrol grubuna eşdeğer görünümde olduğu dikkati çekti (Resim 19-20).

1000 mg/kg DBP uygulanan grupta seminifer tübüller incelendiğinde ara bağ dokuda  dem ilgiyi çekerken, hücre-hücre bağlantısının yer yer bozulduğu belirlendi. Bazı bölgelerde de hücrelerin gruplar oluşturduğu, birbirlerine yaklaştıkları ve birbirleriyle birleştikleri görüntüsü ilginçti. İlerleyen dönemde bu hücrelerin çok çekirdekli dev hücreler oluşturabilecekleri d ş n ld . L mende olgun spermiyum yoktu (Resim 21). Bu grupta AT1 tutulumu incelendiğinde, seminifer epitelde imm nreaksiyonun primer spermatositlerde belirgin olduğu, diğer hücre tiplerinde göreceli olarak azaldığı ayırt edildi. Bu grupta spermatogonyumlarda da zayıf AT1 tutulumu olduğu vardı. Leydig hücrelerinde AT1 tutulumu yoğundu (Resim 22).

1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta seminifer tübül lümenlerinin belirgin olduğu, lümende döküntü hücre gruplarının azaldığı dikkati çekti. Bazı tübüllerde seminifer epitel ve dolayısıyla spermatogenezisin normale yakın görünüm sergilediği görülürken, bazı tübüllerde bir önceki grupta görülen yapısal değişikliklerin s rd ğu saptandı. Dejenere tübüllerde epitelde hücre-hücre kaynaşması s rd ğu izlendi. Bu alanlarda hücre bağlantılarının bozuk olduğu ve spermiyumların bir grubunun baş bölgeleriyle lümene dönük olarak konumlandıkları belirlendi. AT1 tutulumunun primer spermatositlerde, sitoplazma ve zar düzeyinde zayıftan-ortaya değiştiği gözlenirken, Leydig hücrelerinde daha yoğun imm noreaksiyonun varlığı ilgiyi çekti (Resim 23). Büyük büyültmeli incelemelerde spermatogonyum çekirdeklerinde de tutulum gözlemleniyordu (Resim 24-25).

ER   İmmün Boyama Bulguları

Kontrol grubunda ER ' nın seminifer epitel ve Leydig hücre çekirdeklerinde yoğun, sitoplazmada ise zayıf olduğu ilgiyi belirlendi.

Seminifer epitelde spermatogonyum ve primer spermatositlerde çekirdek tutulumu belirgin olarak ayırt edilirken, büyük büyütmeli incelemelerde tüm hücre tiplerinde zar düzeyinde de yoğun boyanma olduğu gözlemlendi (Resim 26-27).

CMC uygulanan grupta seminifer epitelde özellikle primer spermatositlerde belirgin çekirdek tutulumu izlendi. İntersitisyel alan Leydig hücreleri de benzer reaksiyonları ile ayırt edildi (Resim 28).

500 mg/kg DBP uygulanan grupta ağırlıklı olarak primer spermatosit ve spermatogonyumlarda çekirdek tutulumu belirginken, diğer seminifer epitel hücrelerinde tutulumun zar düzeyinde olduğu ayırt edildi. Leydig hücrelerinde çekirdek, sitoplazma ve zar düzeyinde yoğun tepkime vardı (Resim29-30).

500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta immün tepkimenin kontrole eşdeğer düzeyde olduğu ayırt ediliyordu; seminifer epitelde ve intersitisyel doku Leydig hücrelerinde çekirdek ve zarda yoğun, sitoplazmada zayıf reaksiyon gözlemlendi (Resim 31-32).

1000 mg/kg DBP uygulanan grupta küçük büyütmeli incelemelerde seminifer tübüllerin atrofik görünüşleri, nekrotik alanlar ve intersitisyel dokudaki ödem dikkat çekiciydi. Bazı seminifer tübüllerin birbirleri ile kaynaşacak düzeyde temas halinde oldukları belirgindi. Bu tübüllerin lümenlerinde hücre debrisisi ayırt edildi (Resim 33-34). Bu grupta diğer gruplara karşı ER α tutulumunun tüm alanlarda daha zayıf olduğu dikkati çekerken, hücre-hücre bağlantılarının olduğu alanlarda tutulumun zar, sitoplazma ve çekirdekte oldukça yoğun olduğu ayırt ediliyordu. Leydig hücre tepkimesi diğer gruplara benzerdi (Resim 35).

1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta ER α tutulumunun kontrole eşdeş olduğu gözlemlendi. Boyanma spermatogonyumlarda çekirdek, primer spermatositlerde ise sitoplazma düzeyindeydi. Diğer seri hücrelerinde reaktivite göreceli olarak azalmıştı. Leydig hücre tutulumu da kontrol grubuna benzerdi (Resim 36-37-38).

TUNEL Yöntemi Bulguları

Kontrol grubunda seminifer tübüllerde TUNEL pozitif hücrelerin çoğunlukla primer spermatositler olduğu ayırt ediliyordu (Resim 39).

CMC uygulanan grupta seminifer epitelde apoptotik ve apoptozise giden hücreler değişik boyanma düzeylerinde ayırt edildi TUNEL pozitif hücrelerin genellikle primer spermatositler olduğu belgindi (Resim 40).

500 mg/kg DBP uygulanan grupta seminifer epitelde ve Leydig hücrelerinde TUNEL pozitif hücrelerin kontrol ve CMC uygulanan sham kontrol gruplarına karşı fazla idi (Resim 41).

Bir önceki gruba karşı, 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta apoptozisin az olduğu, ancak birleşmekte olan hücrelerde varlığı dikkati çekti (Resim 42).

1000 mg/kg DBP uygulanan grupta, küçük, orta ve büyük büyültmelerde testis genelinde TUNEL pozitif hücrelerin son derece arttığı gözlemlendi. Özellikle kaynaşmış hücrelerin apoptozise gittikleri dikkati çekti (Resim 43-44).

1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta TUNEL pozitif hücrelerin bir önceki gruba karşın azaldığı ancak kontrole eşdeğer olmadığı gözlemlendi (Resim 45).

4.2 İstatistiksel Bulgular

Çalışmamızda istatistiksel olarak deney grupları arasında seminifer epitel kalınlığı ve seminifer tübül çapı düzeylerinin değişim gösterip göstermediği istatistiksel olarak değerlendirildi. Kruskal Wallis test istatistiği sonucunun önemli bulunduğu durumlarda, anlamlı farka neden olan grupları tespit etmek amacıyla parametrik olmayan çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey HSD kullanıldı. $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Kruskal-Wallis testi verilerine göre seminifer epitel kalınlığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.001$) (Tablo 1, Grafik 1).

Kontrol grubunun seminifer epitel kalınlığı düzeyi sırasıyla 500 mg/kg DBP ve 1000 mg/kg DBP uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olarak saptandı ($p < 0.001$ ve $p < 0.001$) (Tablo 1, Grafik 1).

Kontrol grubunun seminifer epitel kalınlığının CMC uygulanan gruba göre istatistiksel olarak yüksek olduğu bulundu ($p < 0.001$) (Tablo 1, Grafik 1).

Kontrol grubunun seminifer epitel kalınlığı 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak daha düşük olmasına karşın, 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan gruba göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p<0.001$ ve $p<0.001$) (Tablo 1, Grafik 1).

500 mg/kg DBP uygulanan gruba göre seminifer epitel kalınlığının 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$) (Tablo 1, Grafik 1).

1000 mg/kg DBP uygulanan gruba göre seminifer epitel kalınlığının 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$) (Tablo 1, Grafik 1).

500 mg/kg DBP ve 1000 mg/kg DBP uygulanan gruplar 500 mg/kg DBP+Resveratrol ve 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında resveratrol uygulamasında epitel boyunun yüksek istatistiksel olarak belirlendi ($p<0.001$) (Tablo 1, Grafik 1).

500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan gruba göre seminifer epitel kalınlığının 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görüldü ($p<0.001$) (Tablo 1, Grafik 1).

500 mg/kg DBP uygulana grupta seminifer epitel boyu istatistiksel anlamlı olarak 1000 mg/kg DBP uygulanan gruba göre daha yüksek idi ($p<0.001$) (Tablo 1, Grafik 1).

Kruskall-Wallis testi verilerine göre seminifer tübül çapı değerlendirildiğinde ise, yine gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.001$).

Kontrol grubunun seminifer tübül çapı düzeyi sırasıyla 500 mg/kg DBP ve 1000 mg/kg DBP uygulanan gruplara göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek idi ($p<0.001$ ve $p<0.001$) (Tablo 2, Grafik 2).

500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta seminifer tübül çapı istatistiksel anlamlı olarak 500 DBP uygulanan gruba göre daha yüksek idi. ($p<0.001$) (Tablo 2, Grafik 2).

1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta seminifer tübül çapı istatistiksel anlamlı olarak 1000 mg/kg DBP uygulanan gruba göre daha yüksek idi ($p<0.001$) (Tablo 2, Grafik 2).

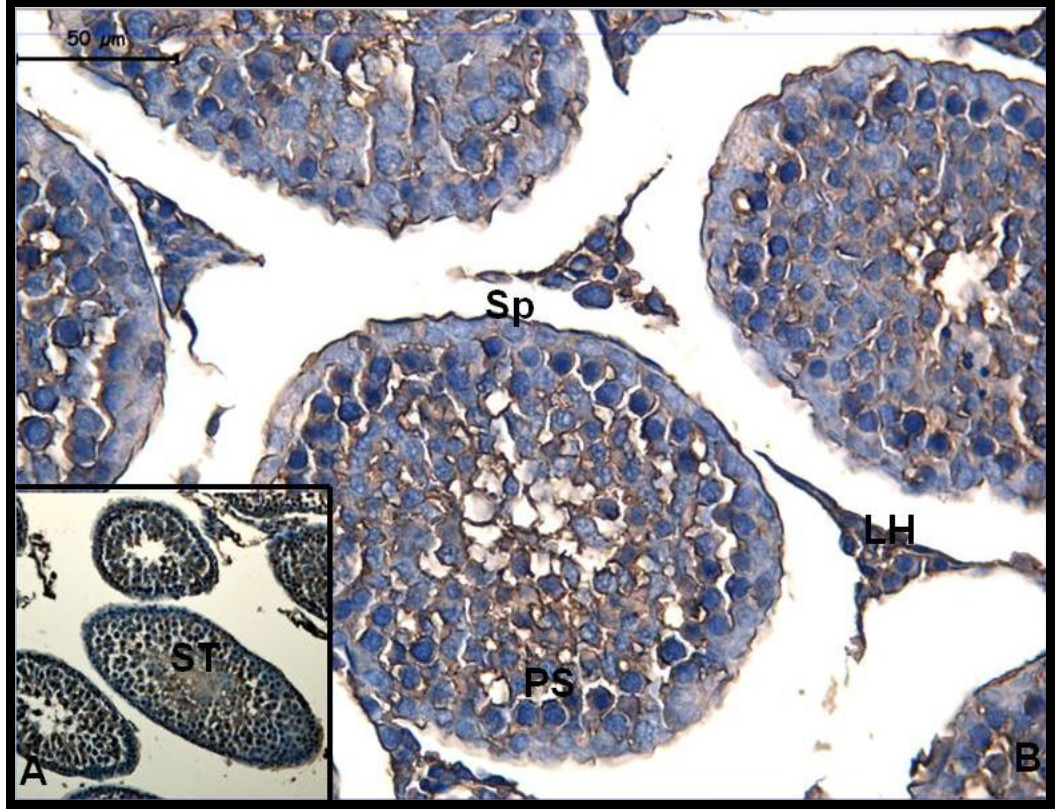
CMC uygulanan grubun seminifer tübül çapı kontrol grubuna karşın istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek idi ($p<0.001$) (Tablo 2, Grafik 2).

500 mg/kg DBP+Resveratrol ve 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan gruplarda seminifer tübül çapı düzeyi kontrol grubuna karşın istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek idi. ($p<0.001$) (Tablo 2, Grafik 2).

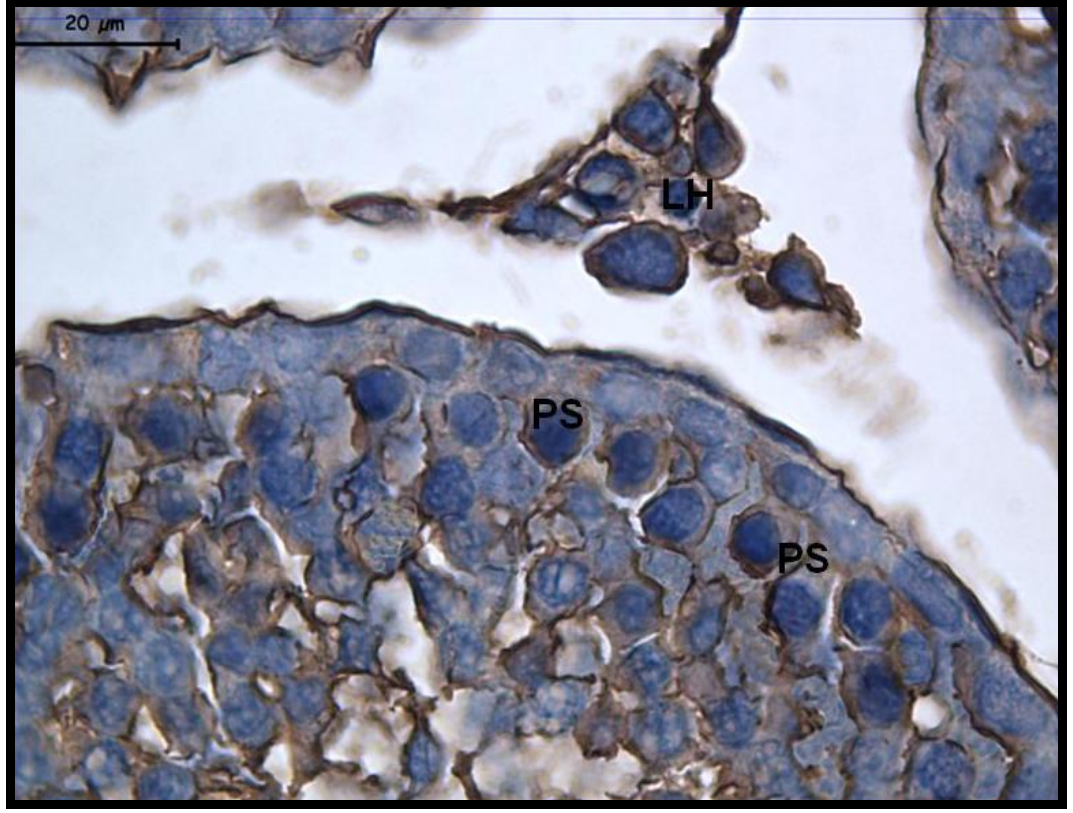
500 mg/kg DBP ve 1000 mg/kg DBP uygulanan gruplar istatistiksel anlamlı olarak 500 mg/kg DBP+Resveratrol ve 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan gruplara göre daha düşük idi ($p<0.001$ ve $p<0.001$) (Tablo 2, Grafik 2).

500 mg/kg DBP uygulana grupta seminifer tübül çapı istatistiksel anlamlı olarak 1000 mg/kg DBP uygulanan gruba karşın daha yüksek bulundu ($p<0.001$) (Tablo 2, Grafik 2).

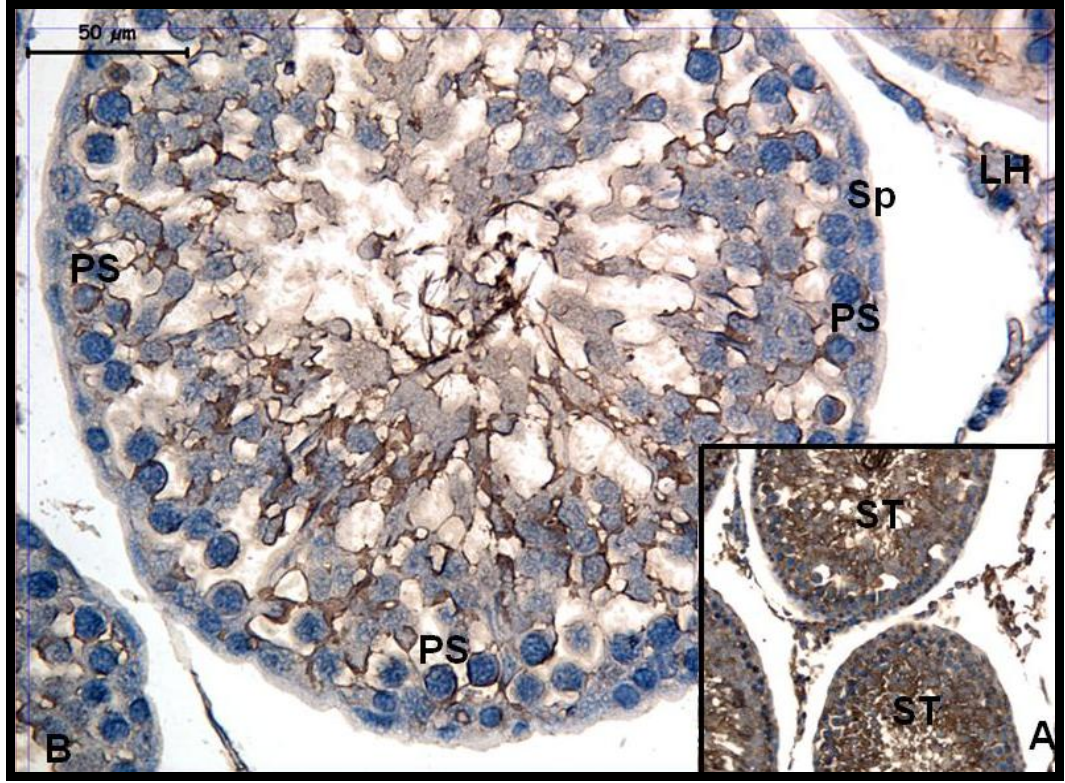
500 mg/kg DBP+resveratrol uygulanan grupta seminifer tübül çapı 1000 mg/kg DBP+resveratrol uygulanan gruba göre istatistiksel anlamlı olarak daha yüksek idi ($p<0.001$) (Tablo 2, Grafik 2).



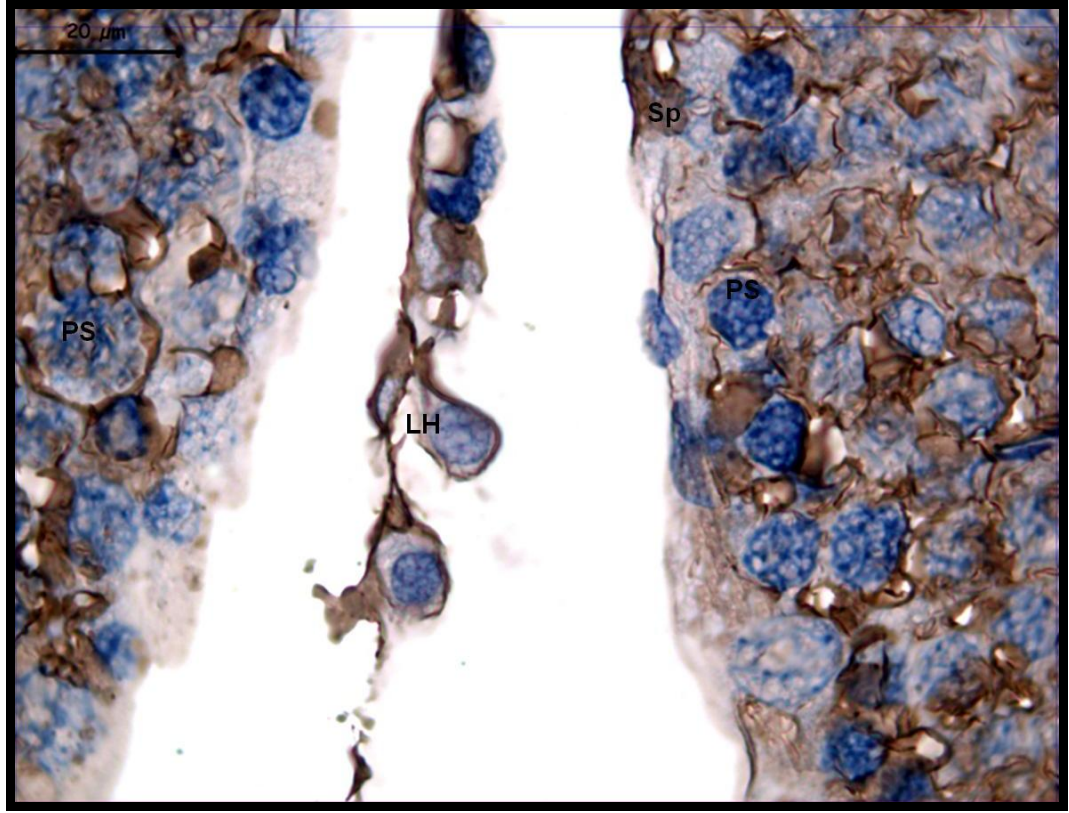
Resim 1: Kontrol grubuna ait c-kit immünboyaması yapılan testis dokusunda; seminifer tübül (ST), çok zayıf tutulum gösteren spermatogonyumlar (Sp), sitoplazmik tutulum gösteren primer spermatositler (PS) izleniyor. Belirgin tutulum gösteren Leydig hücreleri (LH) ayırt ediliyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400).



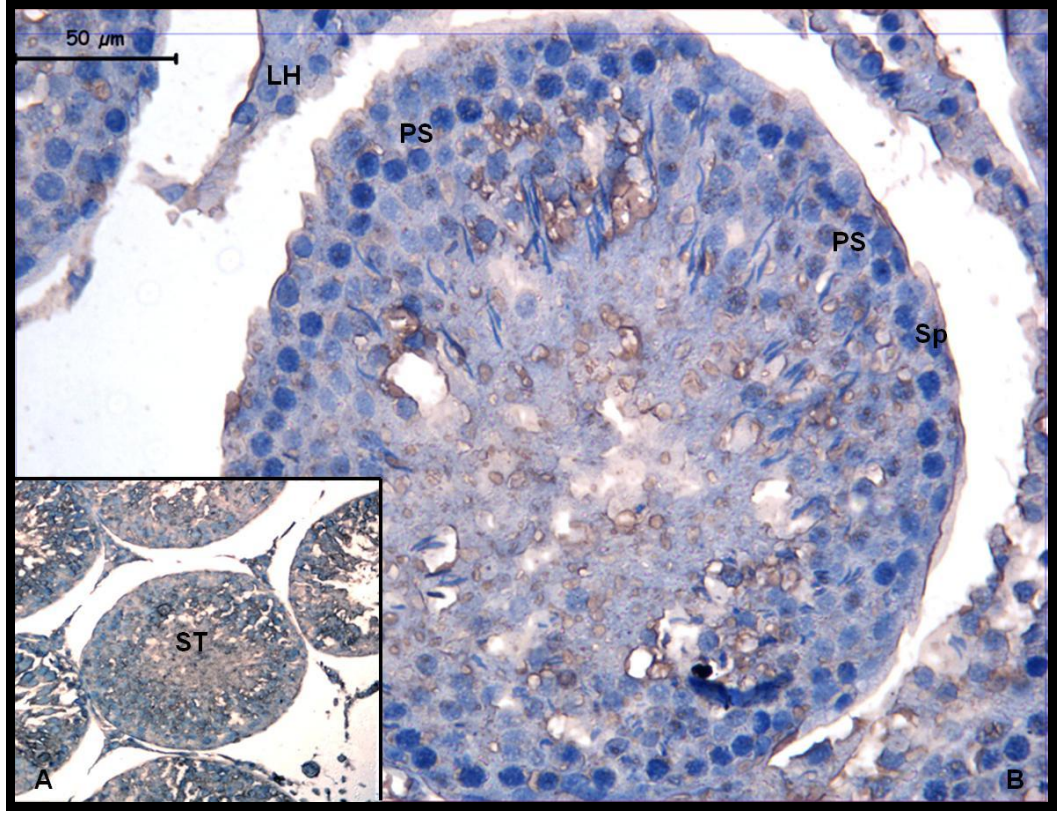
Resim 2: Kontrol grubuna ait c-kit boyaması yapılan testis dokusunda büyük büyültmeli incelemelerde; sitoplazma ve zar tutulumu gösteren primer spermatositler (PS) ve Leydig hücreleri (LH) görülüyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X 1000).



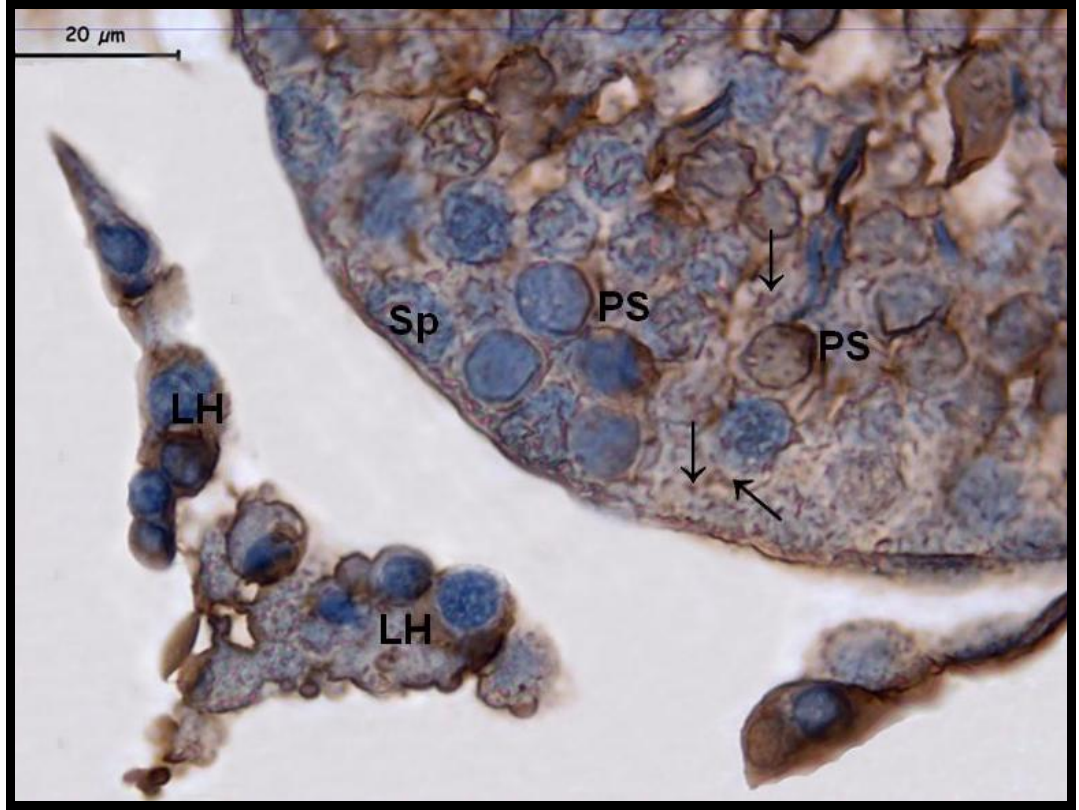
Resim 3: CMC uygulanan gruba ait c-kit boyamasında; seminifer tübül (ST) epitelinde zayıf tutulum gösteren spermatogonyumlar (Sp), zar ve sitoplazma tutulumu gösteren primer spermatositler (PS) izleniyor. Leydig hücrelerindeki c-kit (LH) immünreaktivitesi ayırt ediliyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400).



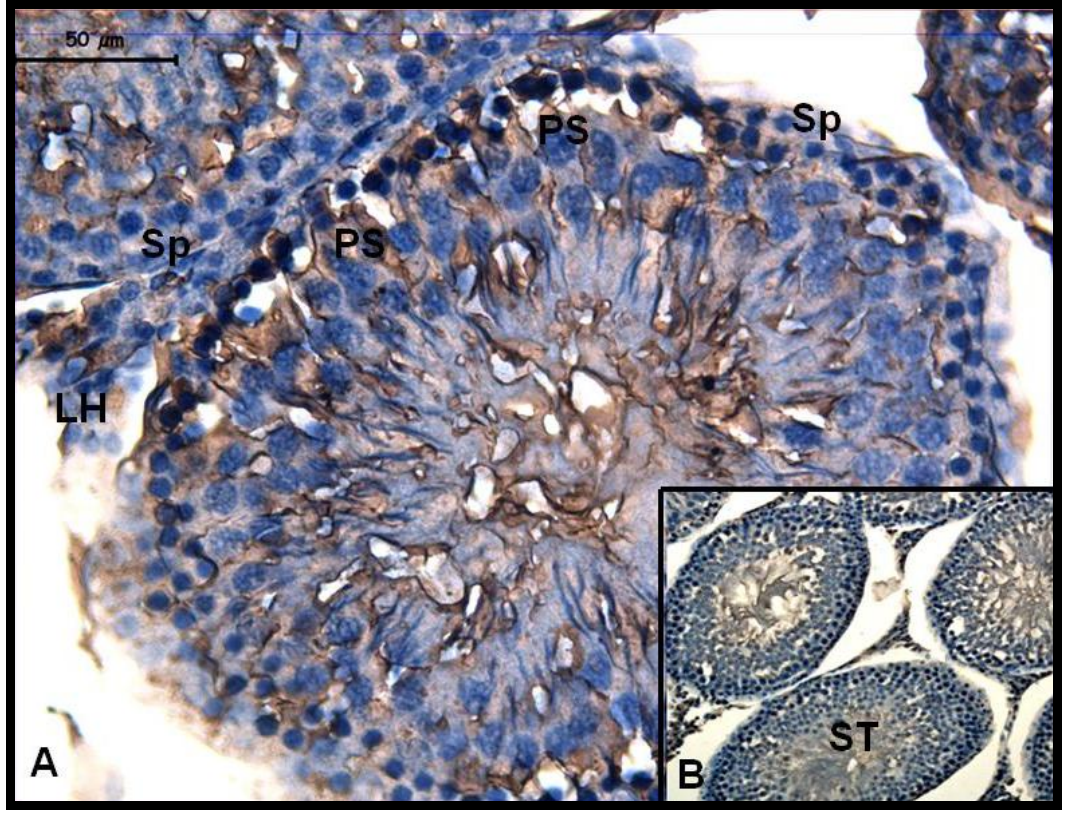
Resim 4: CMC uygulanan grupta testis dokusunda; spermatogonyum (Sp), primer spermatosit (PS) ve Leydig hücrelerinde (LH) c-kit tutulumunun, zarda belirgin olduğu izleniyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen , X1000).



Resim 5: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta c-kit boyamasında; seminifer tübülde (ST), spermatogonyum (Sp) ve primer spermatositler (PS) ile Leydig hücrelerinde (LH) zar düzeyinde çok zayıf tutulum görülüyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen , A X100,B X400).



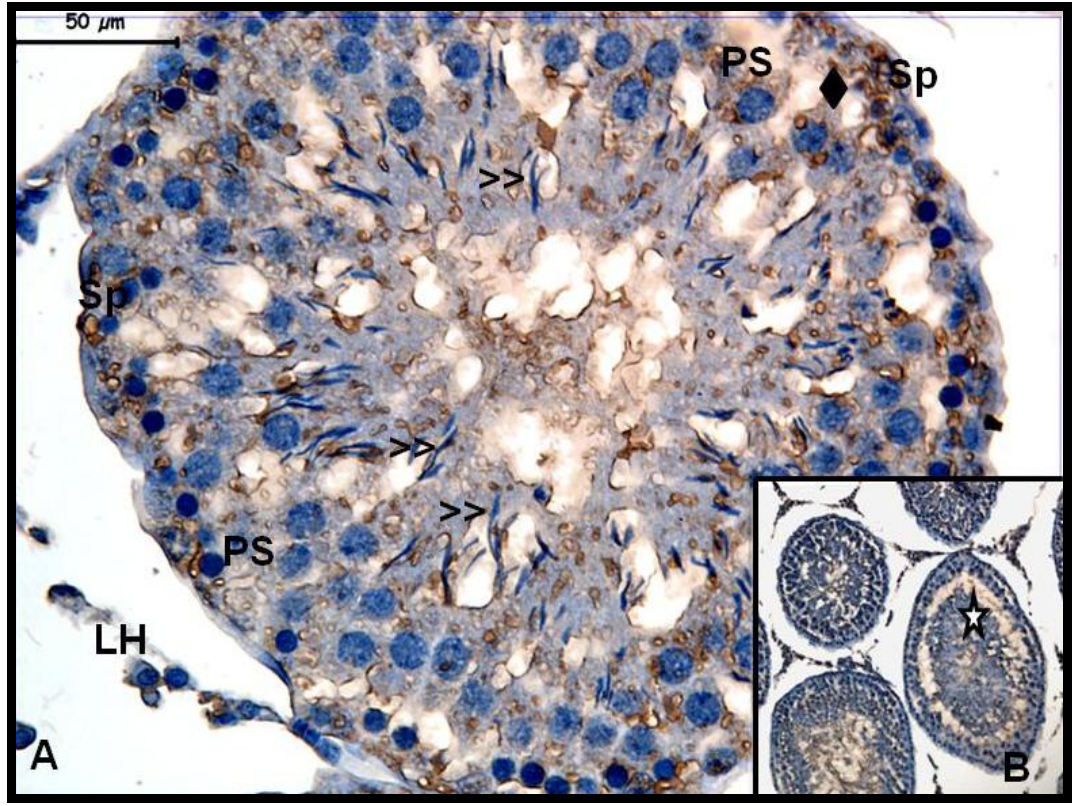
Resim 6: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta c-kit immünreaktivitesinin; spermatogonyum (Sp) ve primer spermatositlerde (PS) zayıf olduğu görülüyor. Sertoli hücrelerinde granüler tutulum (↓) izleniyor. Leydig hücrelerinde (LH) ise zar ve sitoplazmada belirgin c-kit tutulumu ayırt ediliyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen , X1000).



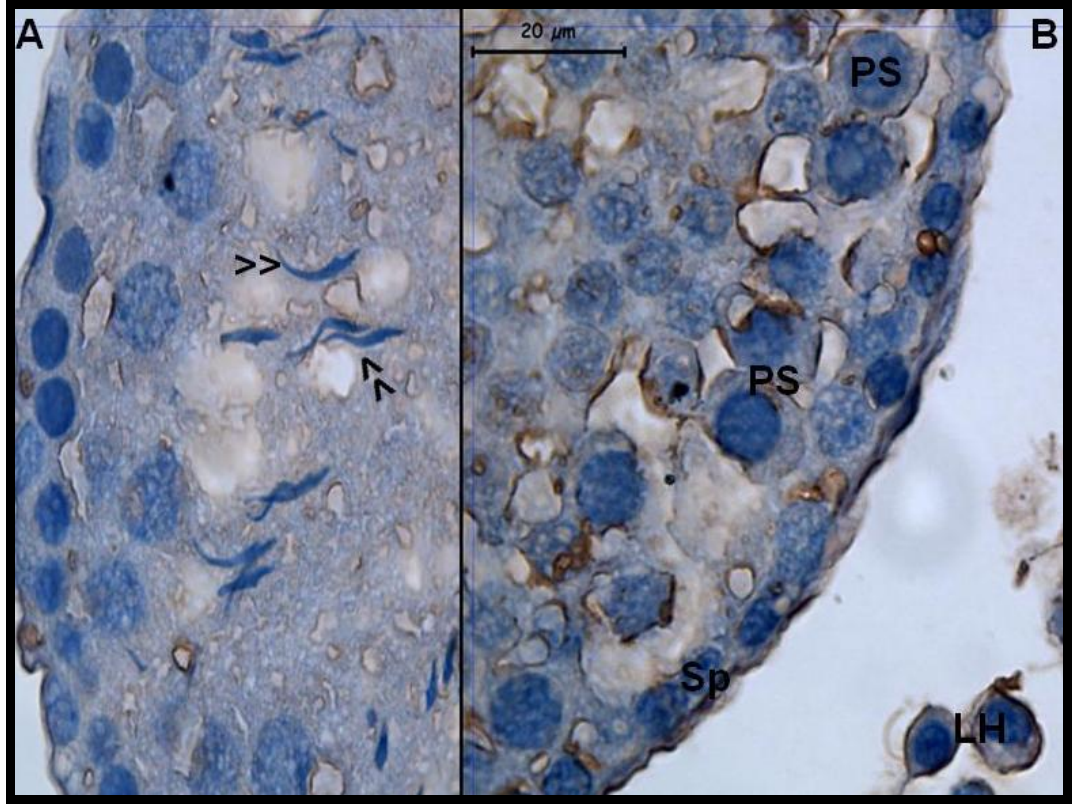
Resim 7: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta c-kit boyamasının özellikle primer spermatositlerde (PS) kuvvetli olduğu görülüyor. ST: Seminifer tübül, Sp: Spermatogonyum, LH: Leydig hücreleri (İmmünperoksidaz & Hematoksilen , A X400,B X100).



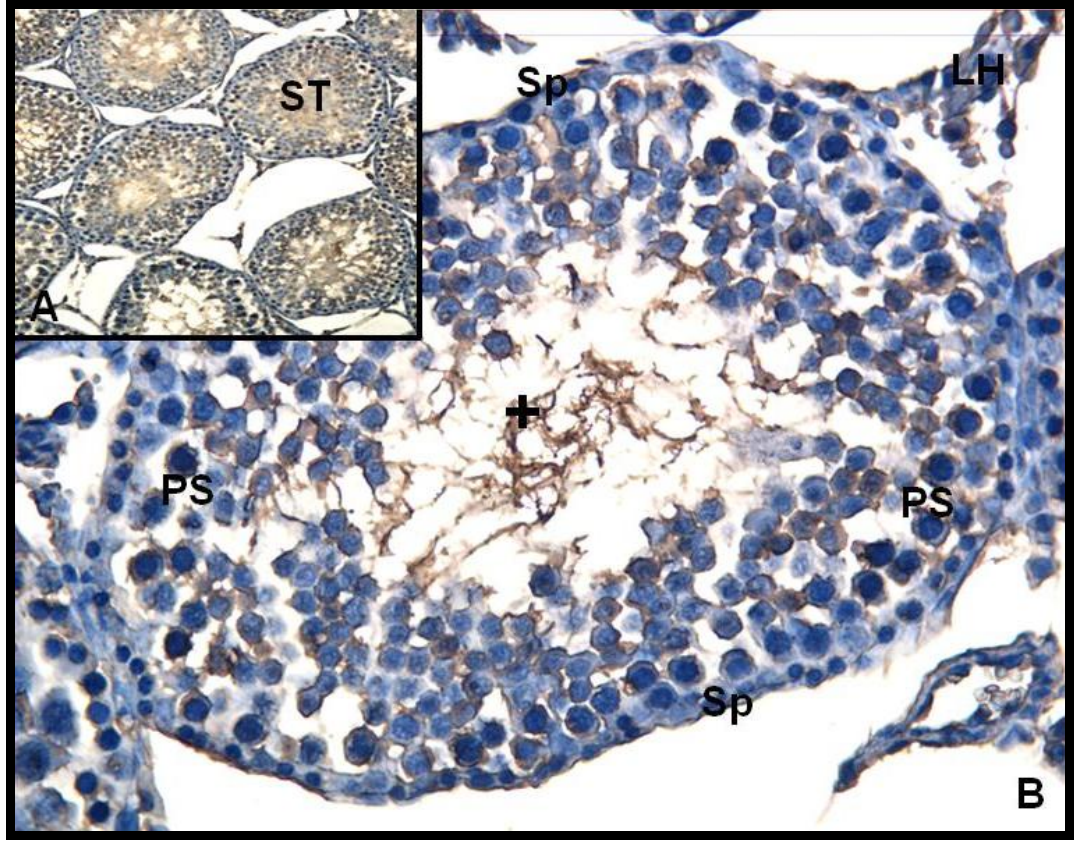
Resim 8: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta; belirgin c-kit tutulumu gösteren Leydig hücreleri (LH) dikkati çekiyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen , X1000).



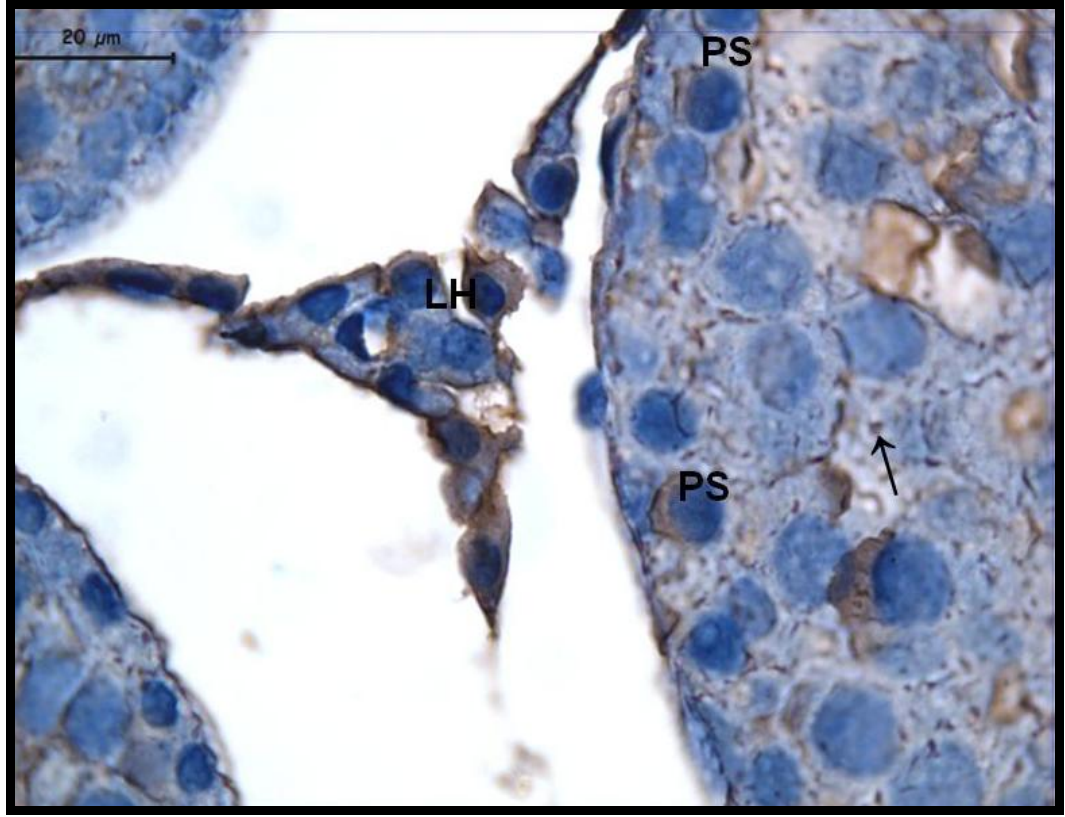
Resim 9: 1000 mg/kg DBP uygulanan grupta; atrofik ve şekil bozukluğu gösteren seminifer tübüller (★) ve seminifer tübül duvarında nekroze alanlar (◆) dikkati çekiyor. Sp:Spermatagonyum, PS: Primer spermatosit, >>: Baş bölgeleri lümene dönük spermiyumlar, LH: Leydig hücreleri (İmmünperoksidaz & Hematoksilen , A X400,B X100).



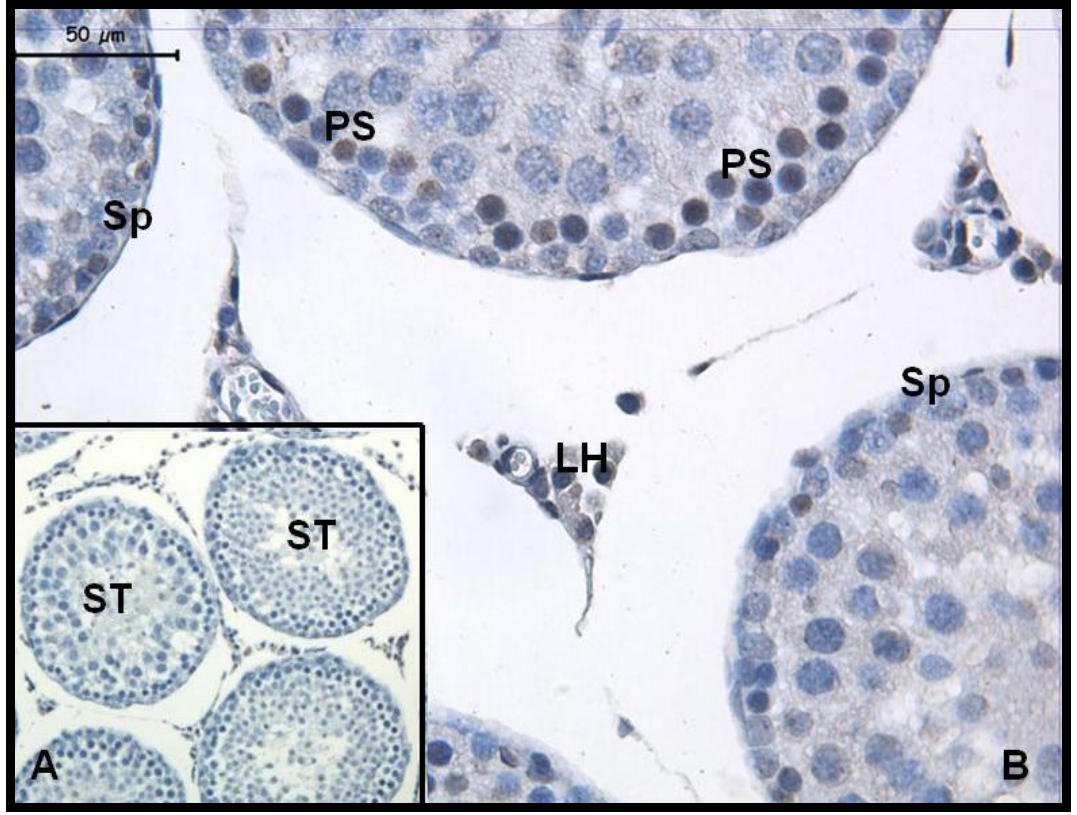
Resim 10: 1000 mg/kg DBP uygulanan grupta; primer spermatosit (PS) ve Leydig hücrelerinde (LH) zar düzeyinde c-kit tutulumu görülüyor. Baş bölgeleri lümene dönük spermiyumlar (>>) dikkati çekiyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen , A X400, B X400).



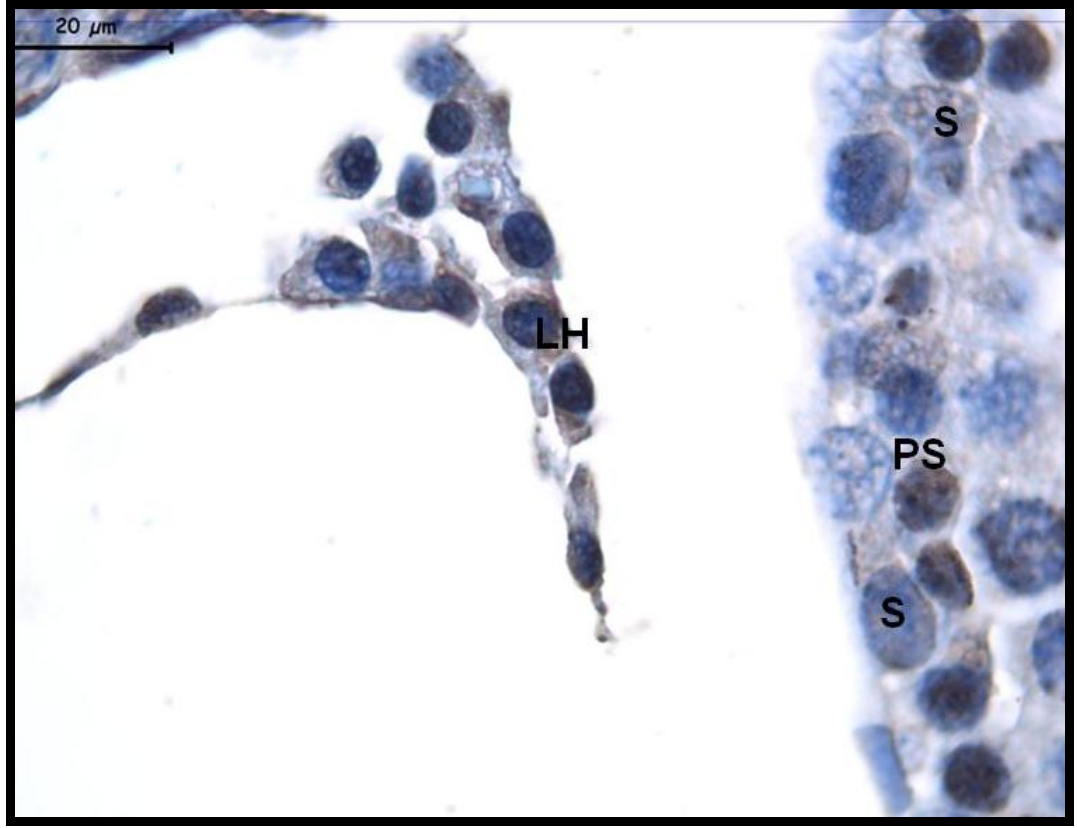
Resim 11: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grup c-kit boyamasında; primer spermatositler (PS) ve seminifer tübül lümeninde olgun spermiyumlar (+) izlenirken, zar tutulumunun belirgin olduğu görülüyor. ST:Seminifer tübül, Sp: Spermatogonyum, LH: Leydig hücreleri (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400).



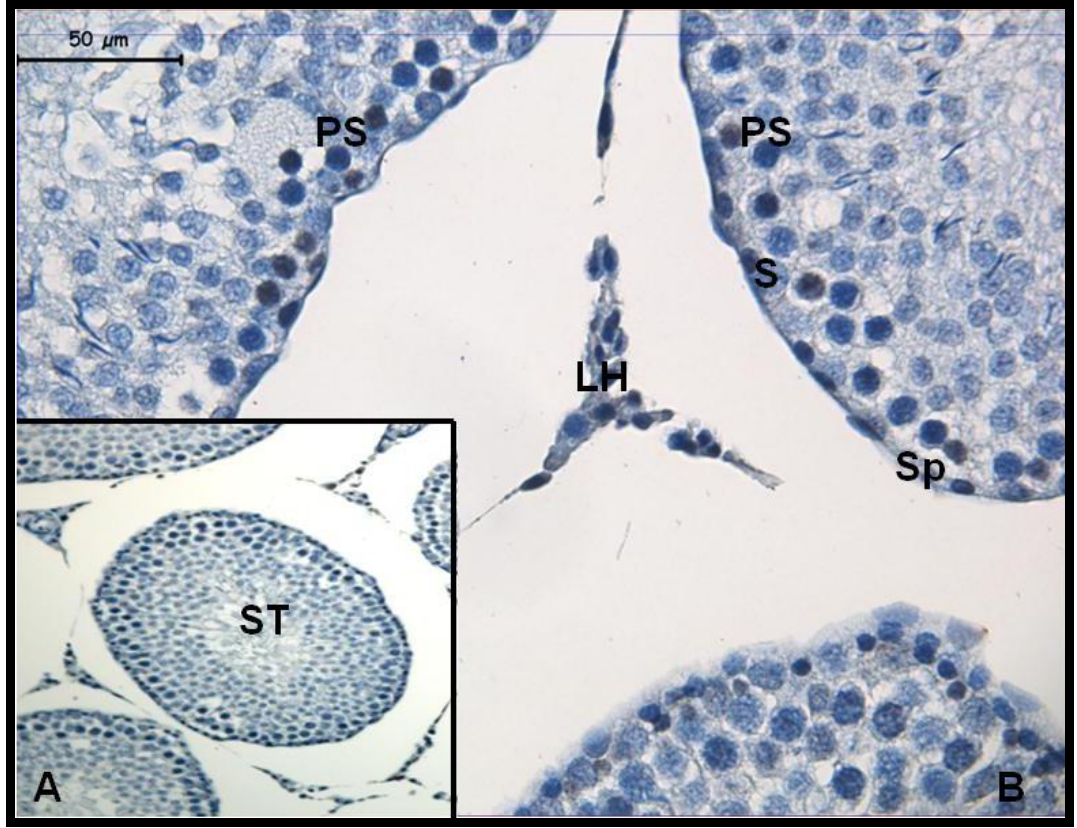
Resim 12: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta, c-kit boyamasında yapılan büyük büyültmeli incelemelerde; zar tutulumunun belirgin olduğu primer spermatositler (PS) ve Sertoli hücrelerinde granüler tutulum (↑) dikkati çekiyor. Aynı büyültmede zar düzeyinde belirgin reaksiyon gösteren Leydig hücreleri (LH) izleniyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X1000).



Resim 13: Kontrol grubuna ait AT1 boyamasında tutulumun, seminifer tübül (ST), primer spermatosit (PS) ve Leydig hücrelerinde (LH) olduğu ayırt ediliyor. Sp: Spermatogonyum (İmmünperoksidaz & Hematoksilen,A X 100, B X 400).



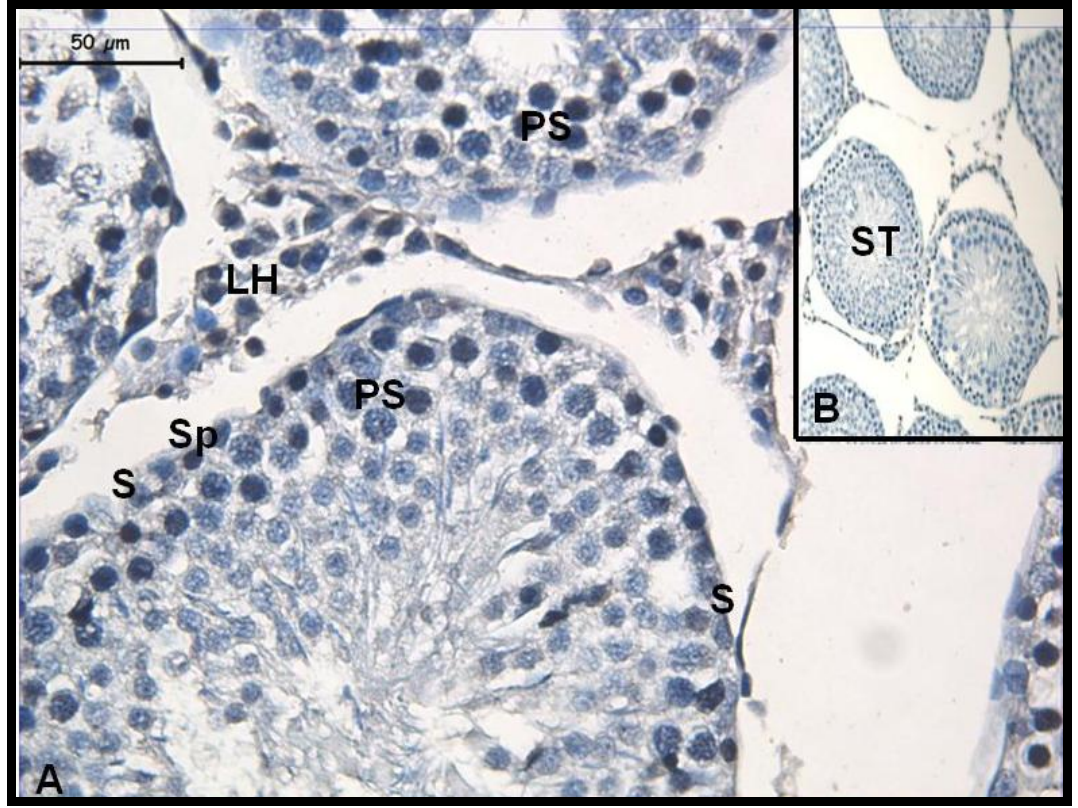
Resim 14: Kontrol grubuna ait AT1 boyamasında yapılan büyük büyültmeli incelemelerde; primer spermatosit (PS), Sertoli hücreleri (S) ve Leydig hücrelerinde (LH) çekirdek ve sitoplazma tutulumu izleniyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X 1000).



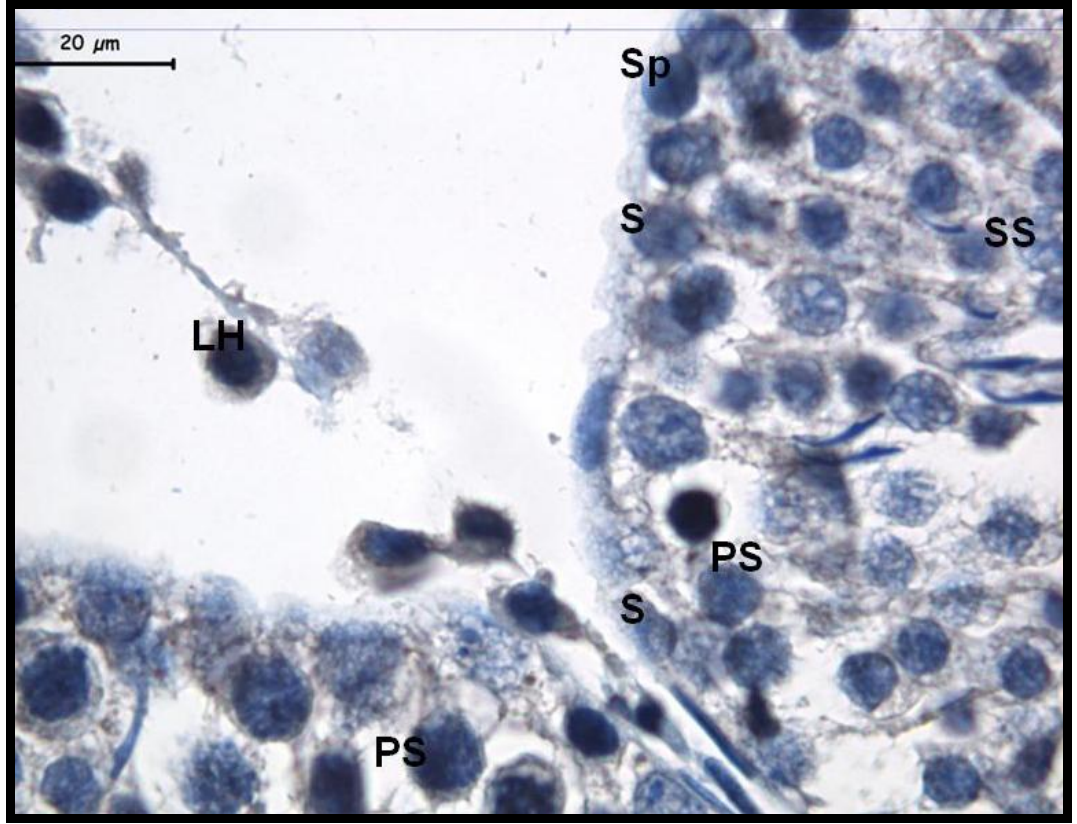
Resim 15: CMC uygulanan grupta doku genelinde AT1 immünreaktivitesi görülüyor. Sp: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, S: Sertoli hücresi, LH: Leydig hücresi (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400).



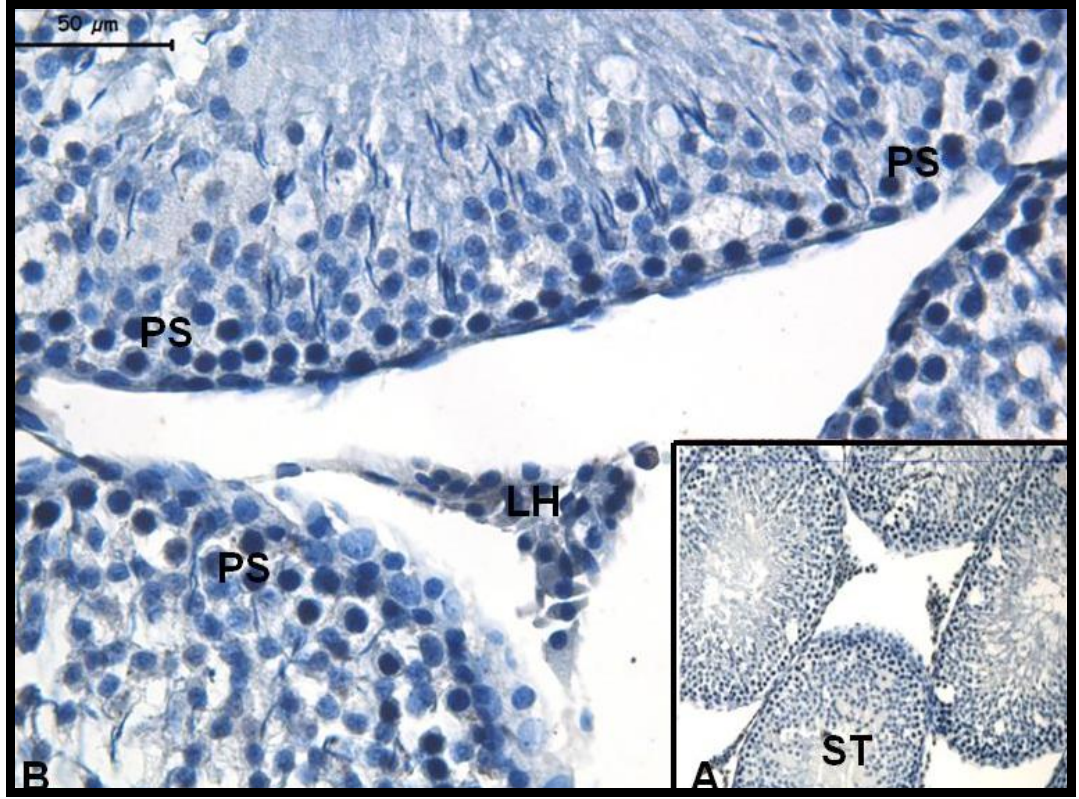
Resim 16: CMC uygulanan grupta AT1 immünreaktivitesinin kontrol grubuna eşdeğer olduğu izleniyor. Sp: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, S: Sertoli hücresi, LH: Leydig hücresi (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X 1000).



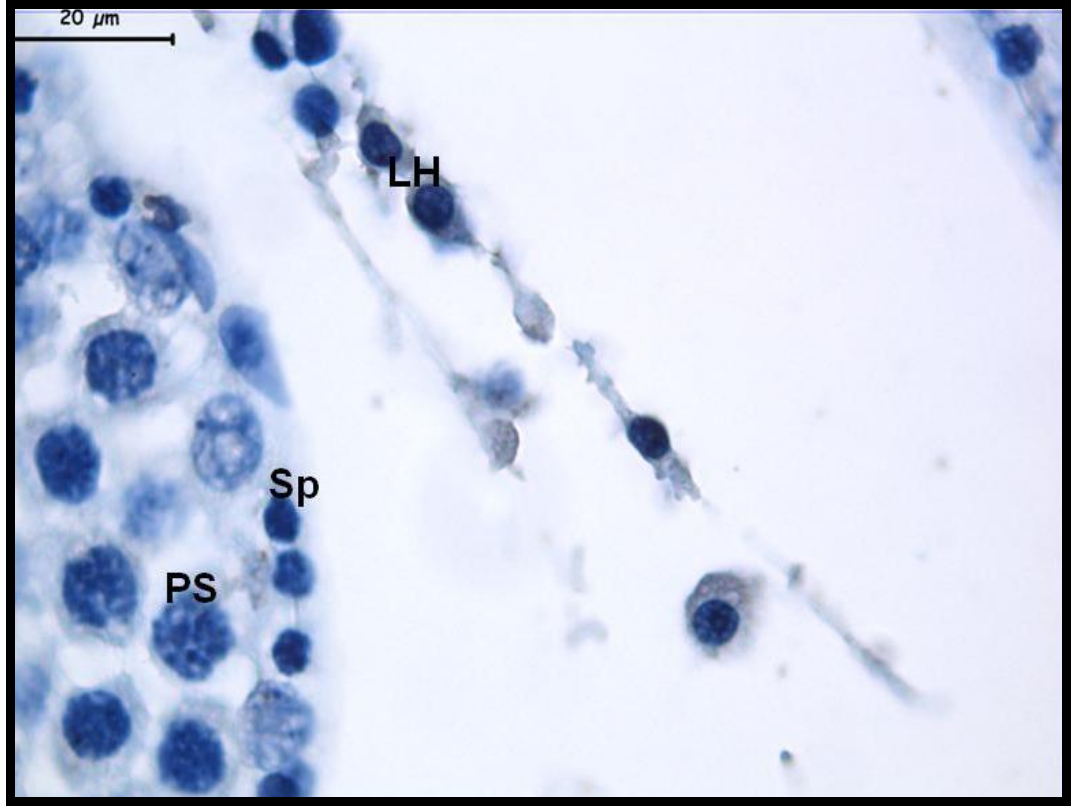
Resim 17: 500 mg/kg DBP uygulanan grup AT1 immünreaktivitesinin, intersitsiyel dokuda damarlara yakın konumlu Leydig hücrelerinde (LH) daha kuvvetli olduğu ilgiyi çekiyor. ST: Seminifer tübül, Sp: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, S: Sertoli hücresi (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100).



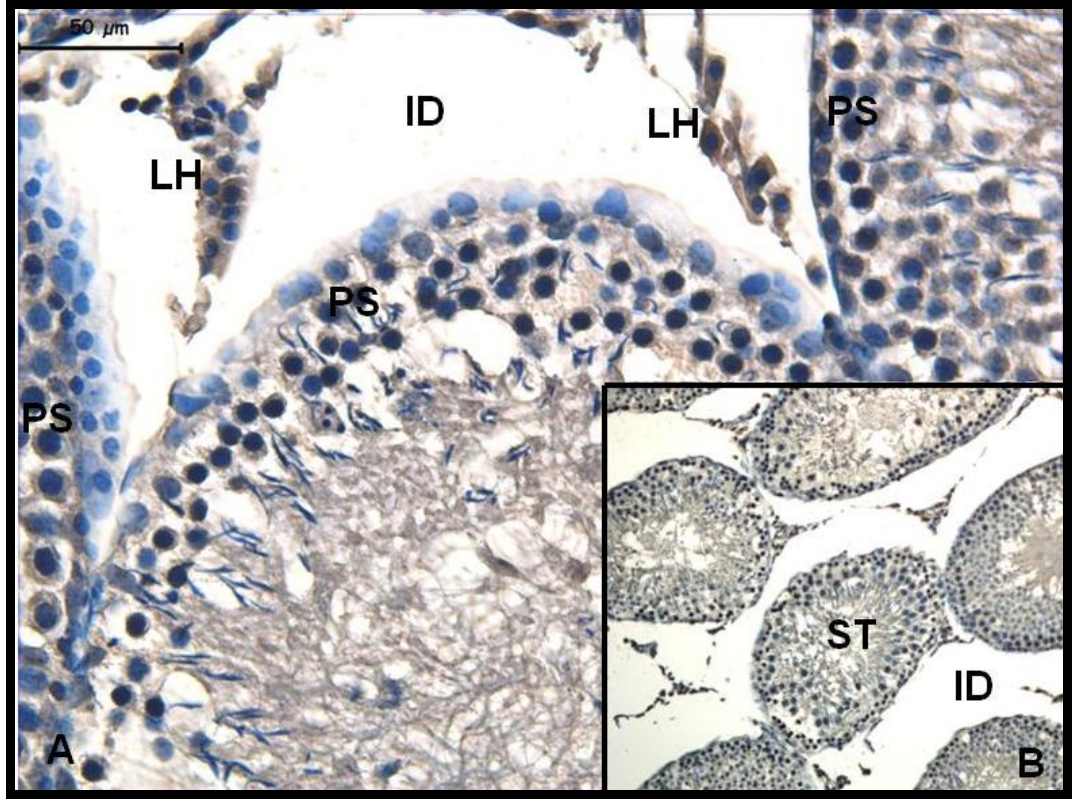
Resim 18: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta AT1 boyamasında yapılan büyük büyültmeli incelemelerde; primer (PS) ve sekonder spermatositlerde (SS) belirgin çekirdek, zayıf sitoplazmik tutulum ayırt ediliyor. Leydig hücre (LH) tutulumunun kuvvetli olduğu görülüyor. Sp: Spermatogonyum, S: Sertoli hücresi (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X1000)



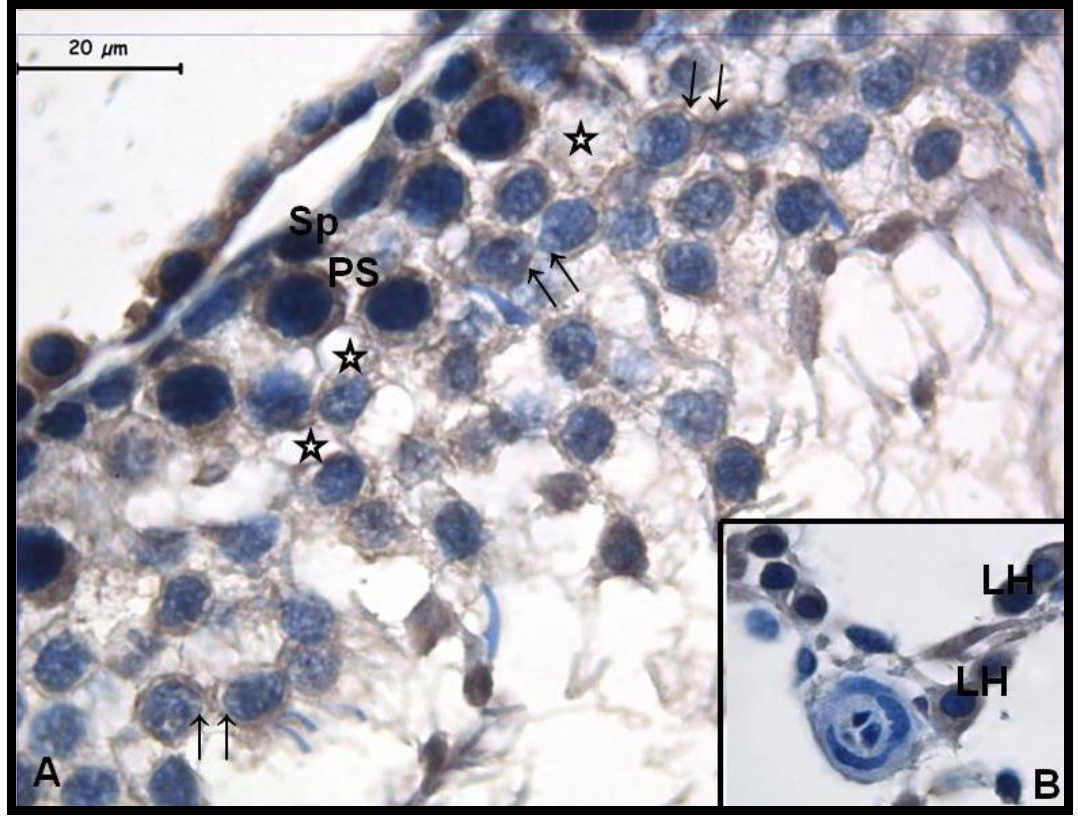
Resim 19: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grup AT1 tutulumunun kontrole eşdeş olduğu izleniyor. ST: Seminifer tübül, (PS): Primer spermatosit, (LH): Leydig hücreleri (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400).



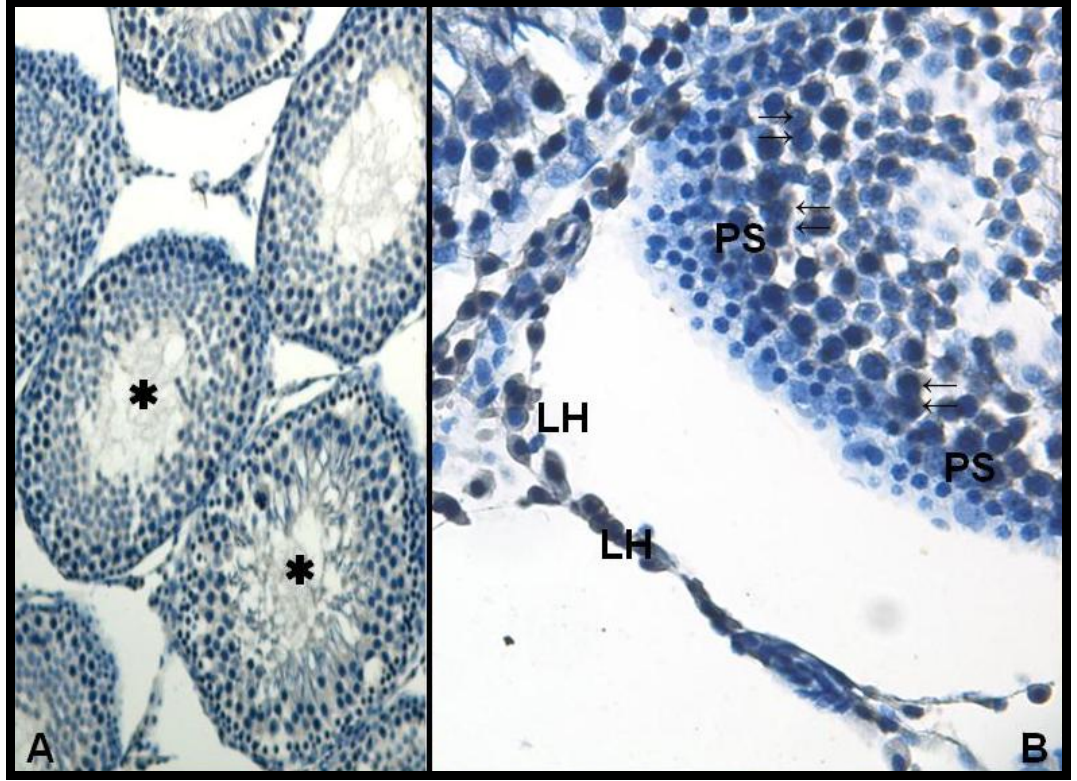
Resim 20: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta yapılan büyük büyütmeli incelemelerde de AT1 tutulumunun bir önceki bulguyu desteklediği görülüyor. LH: Leydig hücreleri, PS: Primer spermatosit, Sp: Spermatogonyum (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X 1000).



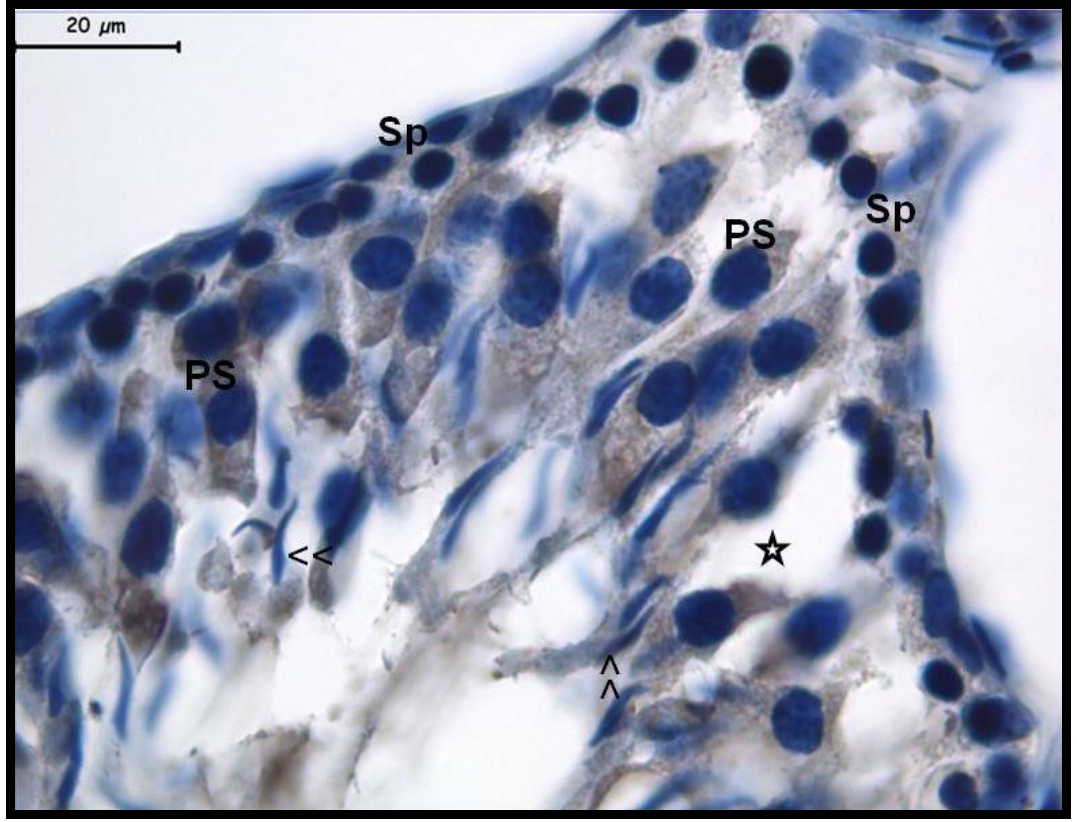
Resim 21: 1000 mg/kg DBP uygulanan grupta intersitisyel dokudaki ödem (ID) ilgiyi çekiyor. ST: Seminifer tübül, Sp: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, LH: Leydig hücresi (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100).



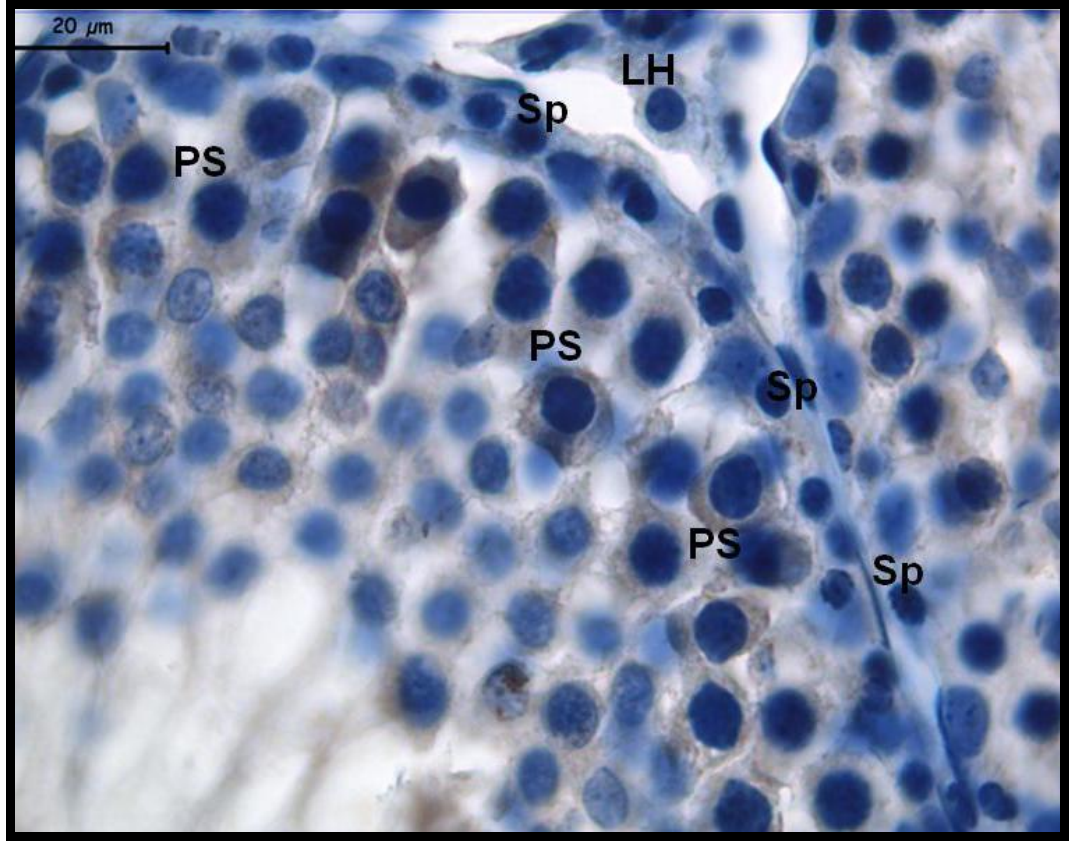
Resim 22: 1000 mg/kg DBP uygulanan grup AT1 boyamasında; spermatogonyumlarda (Sp) zayıf ve primer spermatositlerde (PS) ortadan kuvvetliye değişen AT1 tutulumu izleniyor. Leydig hücrelerinin yoğun AT1 immünreaktivitesi gösterdiği görülüyor. Birbirleriyle kaynaşan spermatogenik epitel hücreleri (↑↑) ve hücre-hücre bağlantısının bozulduğu alanlar dikkati çekiyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100).



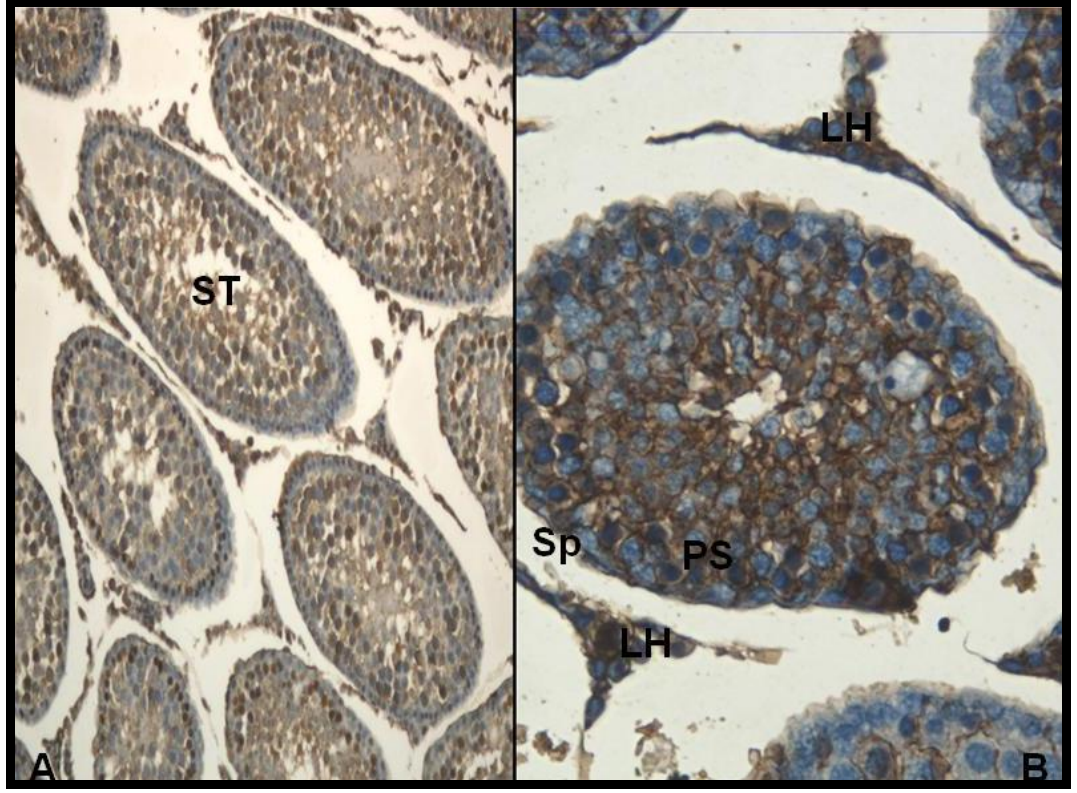
Resim 23: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta AT1 boyamasında, normal görünüm sergileyen seminifer tübüller (*) izlenirken hücre-hücre kaynaşmasının olduğu alanlar (↑↑) ayırt ediliyor. PS: Primer spermatosit, LH:Leydig hücreleri (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400).



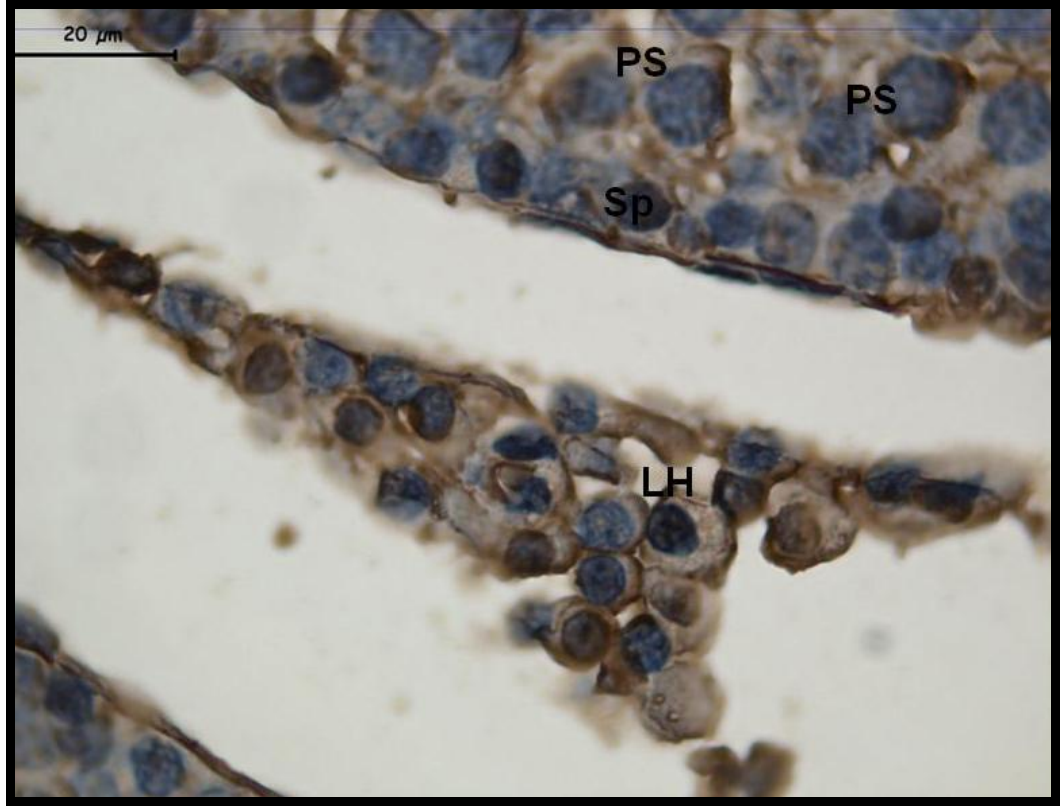
Resim 24: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta daha büyük büyütmelerde, hücre-hücre bağlantısının bozulduğu alanlar (★) ile baş bölgeleri ile lümene dönmüş spermiyumlar (>>) görülüyor. Sp:Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X1000).



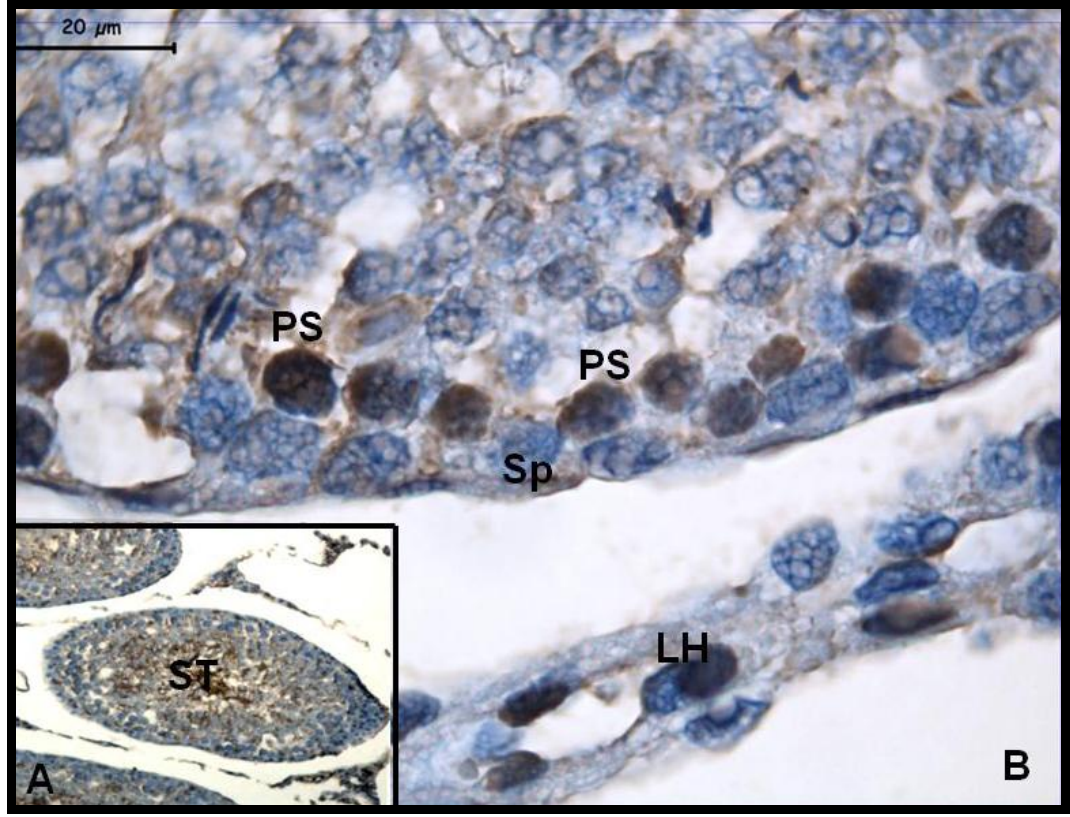
Resim 25: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grup AT1 immünreaktivitesinin primer spermatositlerde (PS) zayıf-orta düzeyde, Leydig hücrelerinde (LH) ise daha yoğun olduğu ilgiyi çekiyor. Sp: Spermatogonyum (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X1000).



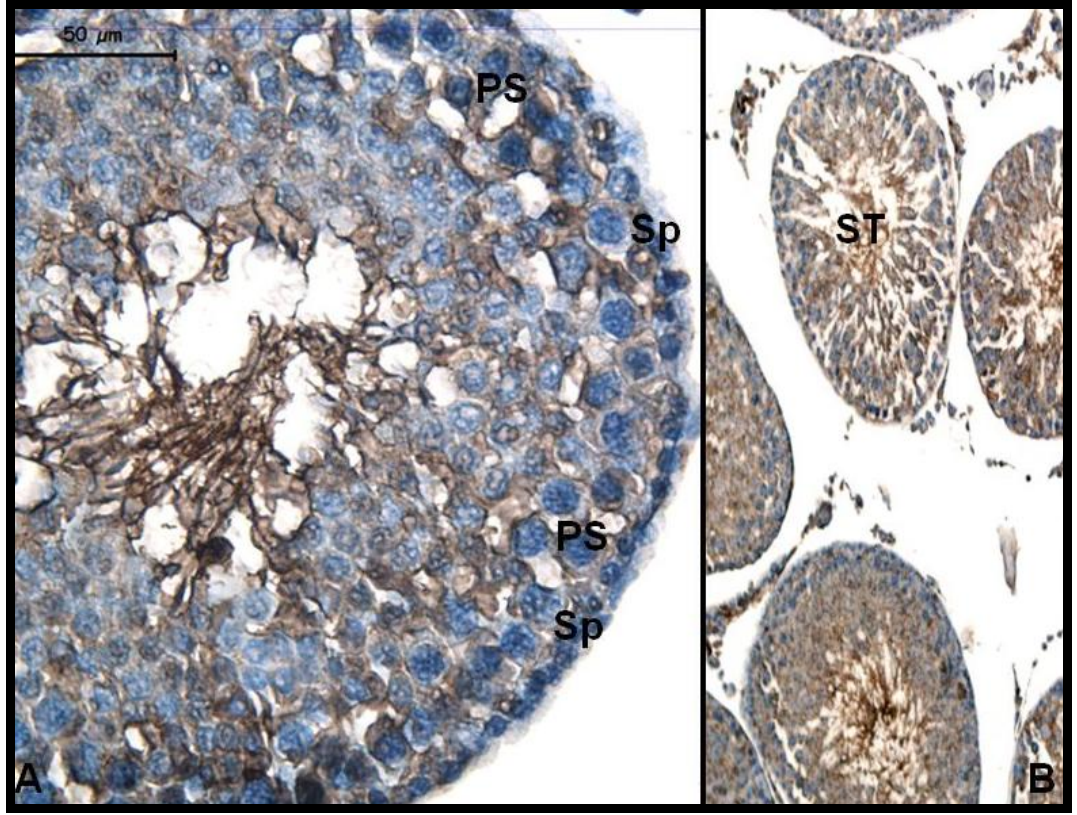
Resim 26: Kontrol grubuna ait ER α immün boyamasında; seminifer tübül (St) ve Leydig hücre (LH)  ekirdeklerinde yoğun, sitoplazmada ise zayıf tutulum izleniyor. Seminifer epitelde, spermatogonyum (Sp) ve primer spermatosit (PS) hücre çekirdeklerinde kuvvetli tutulum izleniyor. ( mm nperoksidaz & Hematoksilen, A X 100, B X 400).



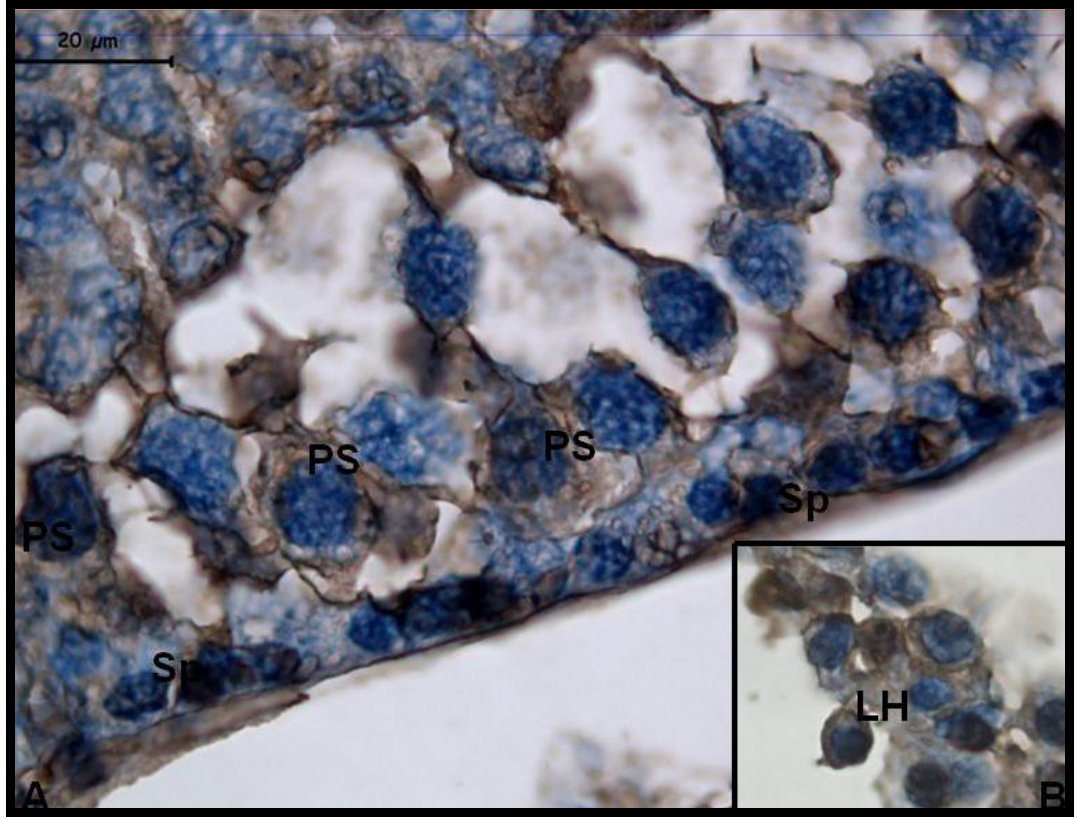
Resim 27: Kontrol grubuna ait daha büyük büyültmeli resimlerde, ER α tutulumunun, özellikle primer spermatosit (PS) ve Leydig hücrelerinde (LH) çekirdek ve zar düzeyinde belirgin olduğu görülüyor. Sp:Spermatogonyum (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X1000).



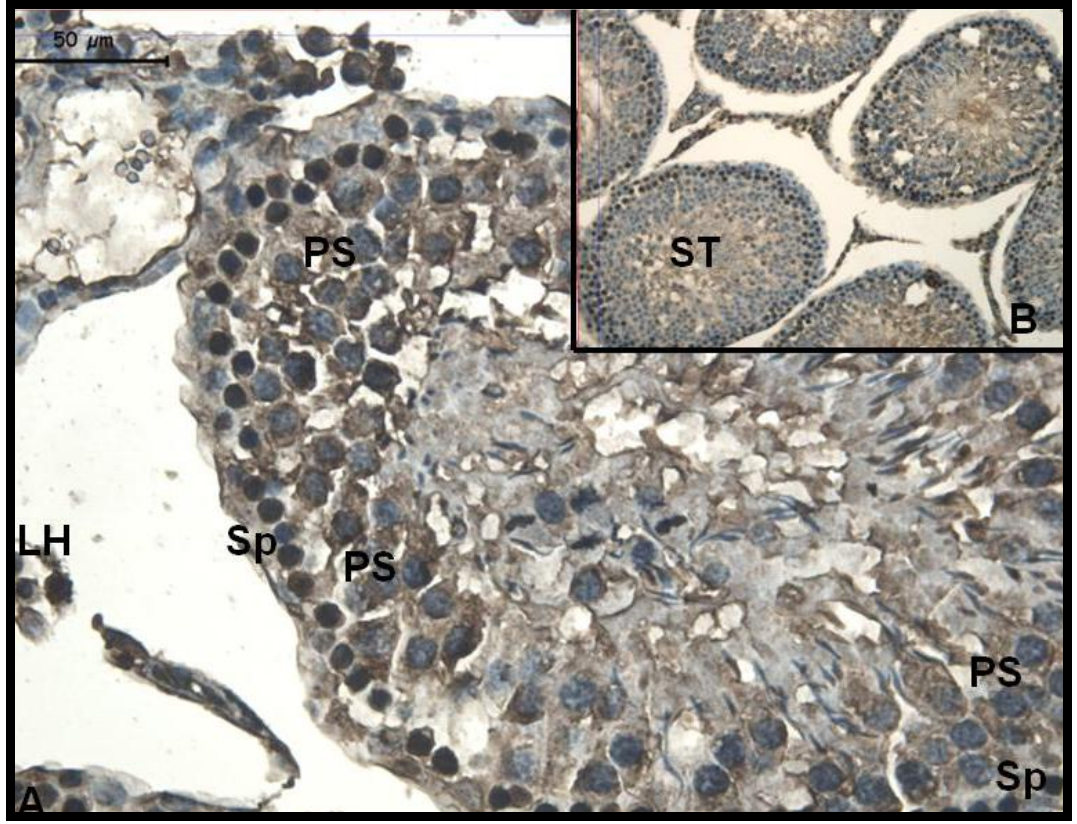
Resim 28: CMC uygulanan grup $ER\alpha$ boyamasında; özellikle primer spermatosit (PS) ve Leydig hücrelerinde (LH) belirgin çekirdek tutulumu izleniyor. Sp: Spermatogonyum. (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X100,B X400).



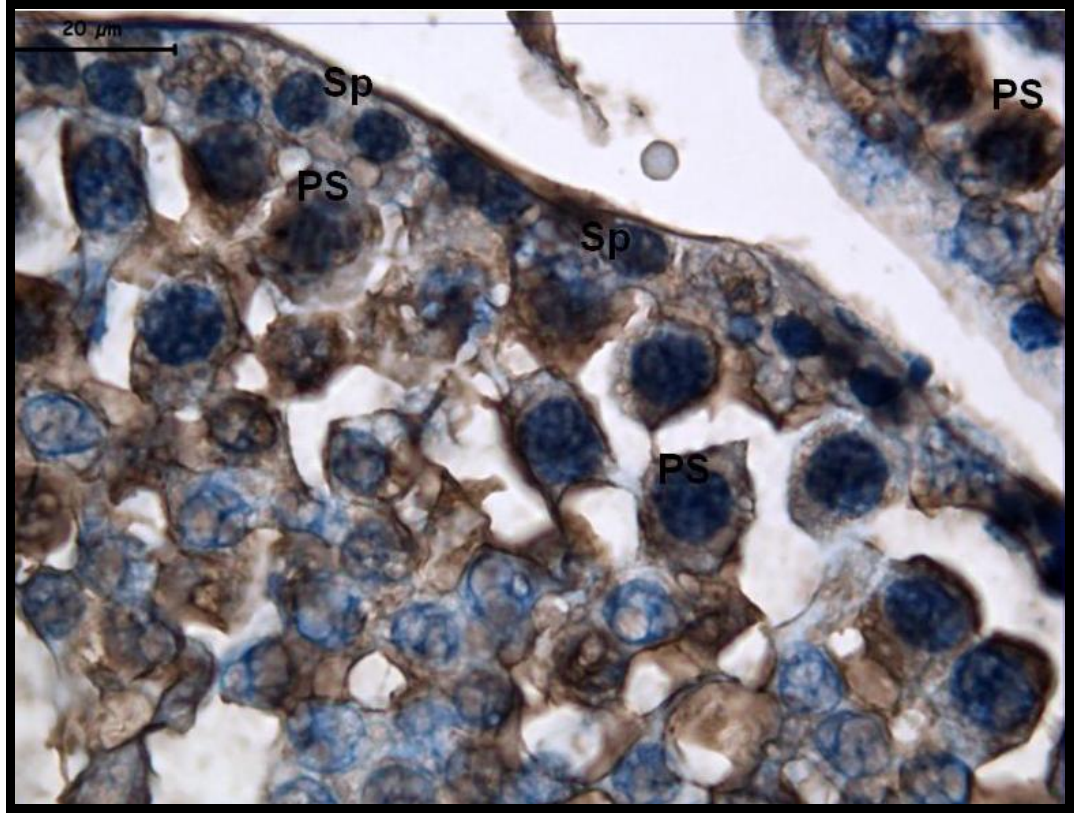
Resim 29: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta ER α boyanmasının doku genelinde azaldığı ayırt ediliyor. ST: Seminifer tübül, Sp: Spermatogonyum, PS: primer spermatosit (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100).



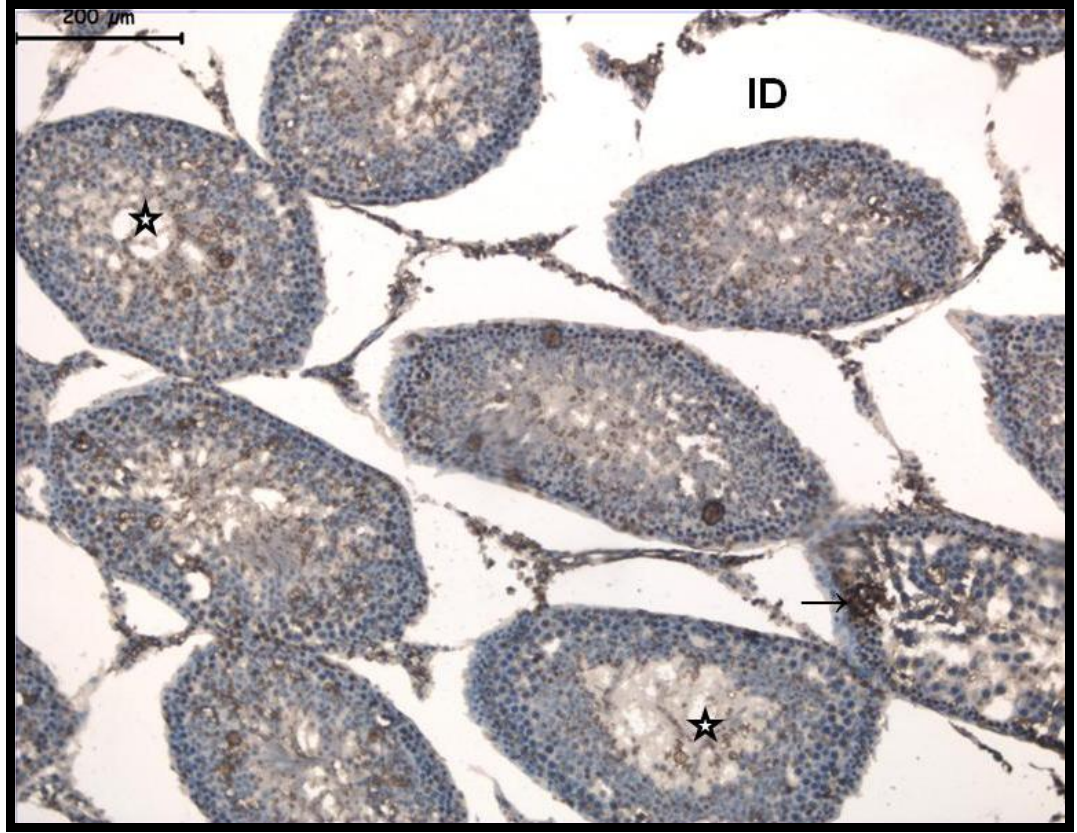
Resim 30: 500 mg/kg DBP uygulanan grupta spermatogonyum (Sp) ve primer spermatositlerde (PS) ER α immünreaktivitesi görülüyor. Leydig hücrelerindeki (LH) yoğun reaksiyon dikkati çekiyor ( mm nperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100).



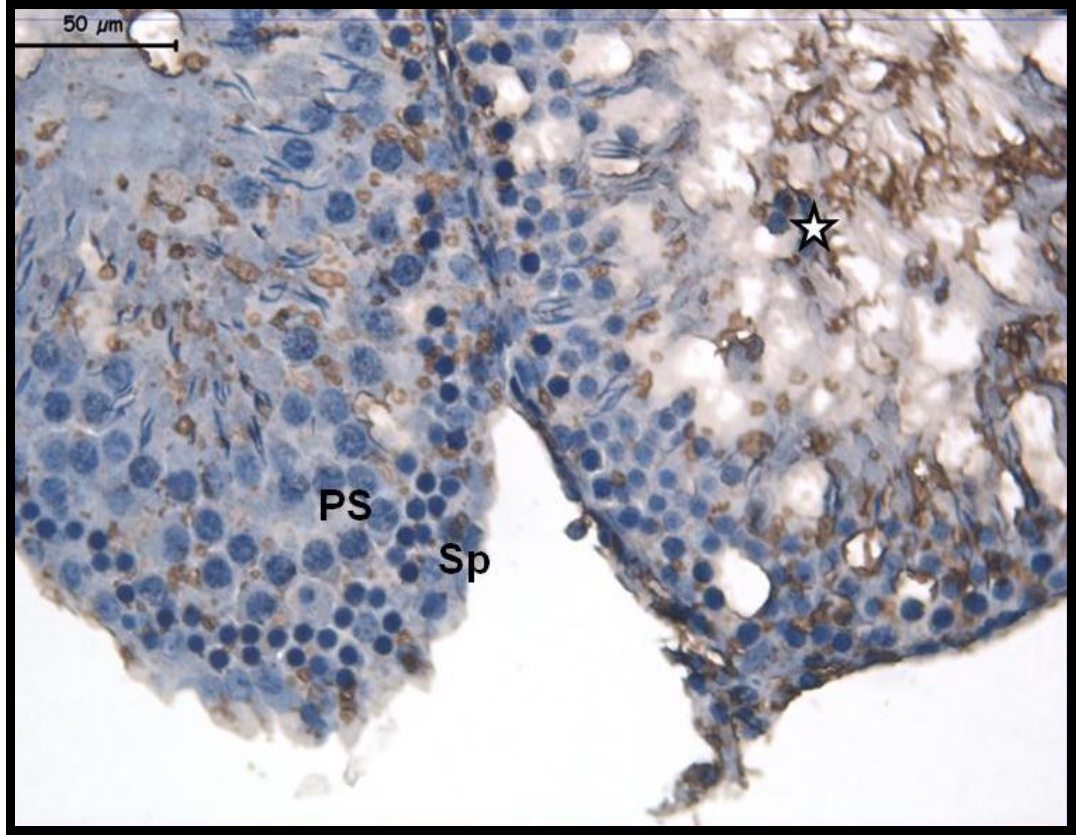
Resim 31: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta ER α boyanmasının kısmen arttığı izleniyor. ST: Seminifer tübül, Sp: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit, LH: Leydig hücreleri (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, A X400,B X100).



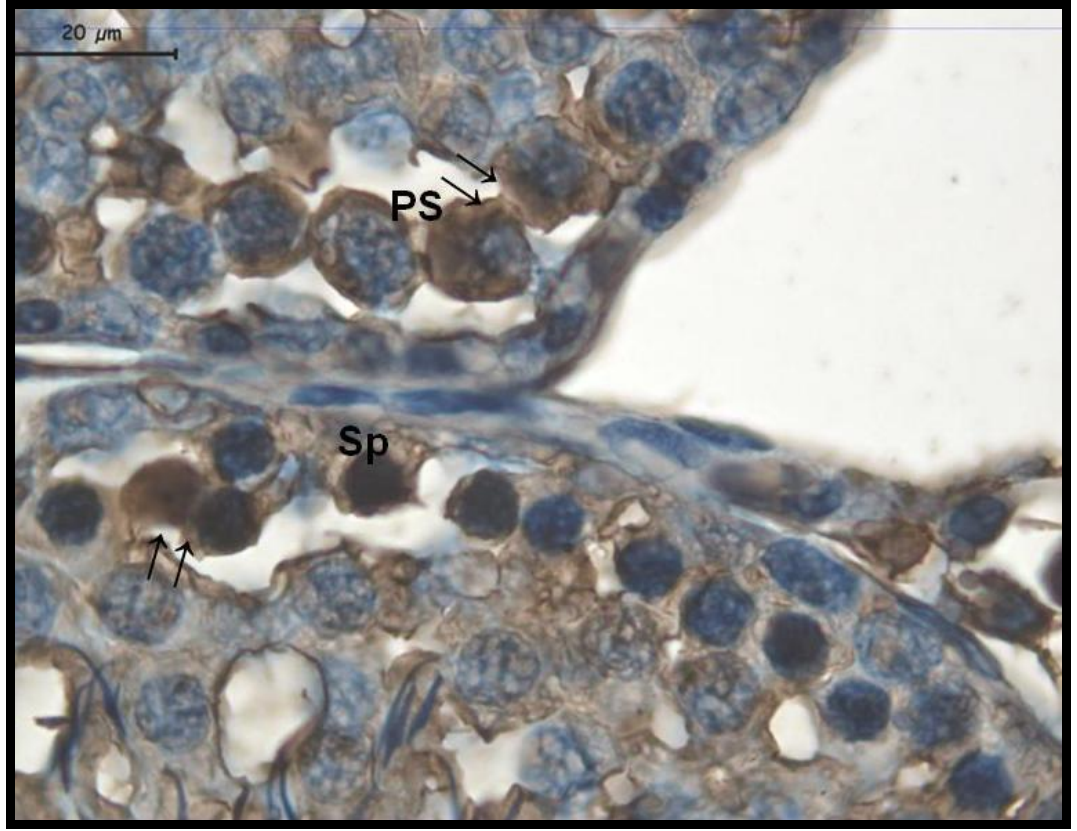
Resim 32: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta ER α boyanmasında; çekirdek, sitoplazma ve zar düzeyinde tutulum gösteren spermatogonyum (Sp) ve primer spermatositler (PS) ayırt ediliyor. (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X1000).



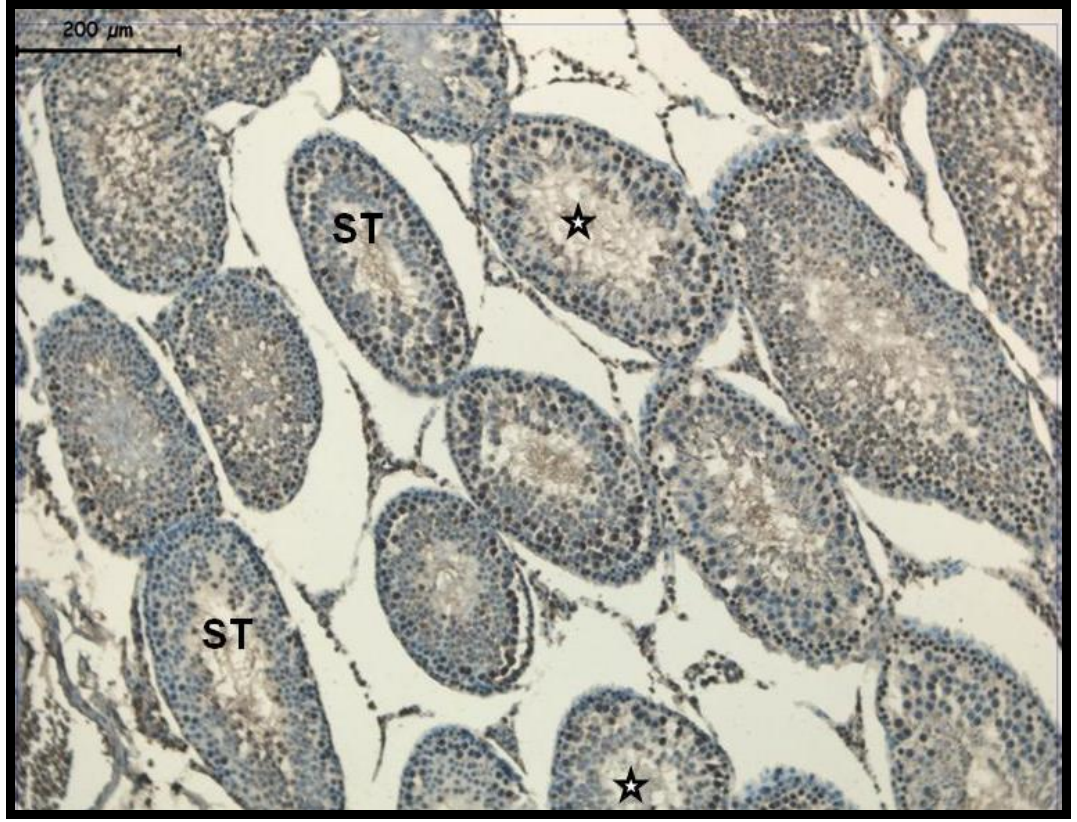
Resim 33: 1000 mg/kg DBP uygulanan grup ER α boyanmasında doku genelinde tutulumun zayıf olduğu görülüyor. Dejenere seminifer tübüller (★) ve seminifer tübüldeki nekrotik alanlar (→) ile ödemli interstisyel doku (ID) dikkati çekiyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X100).



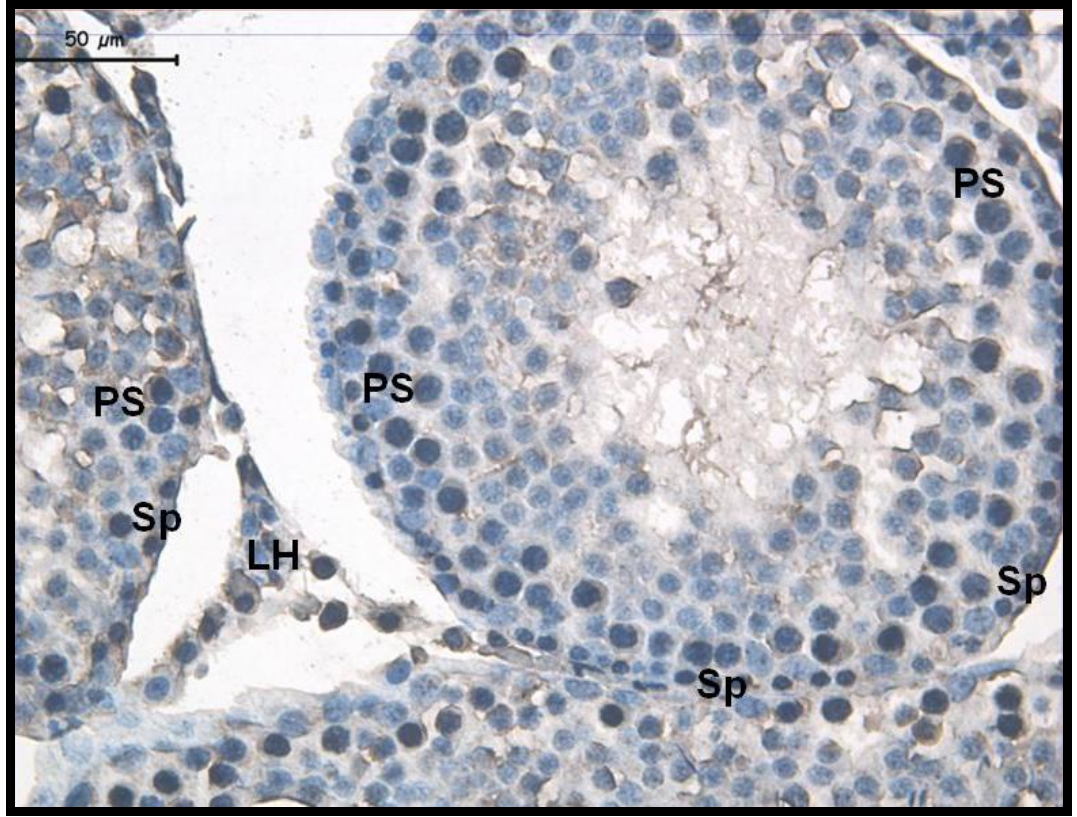
Resim 34: 1000 mg/kg DBP uygulanan grupta; lümende hücre debrisi içeren seminifer tübüller (★) ilgiyi çekiyor. Sp: Spermatogonyum, PS: Primer spermatozit ( mm nperoksidaz & Hematoksilen, X400).



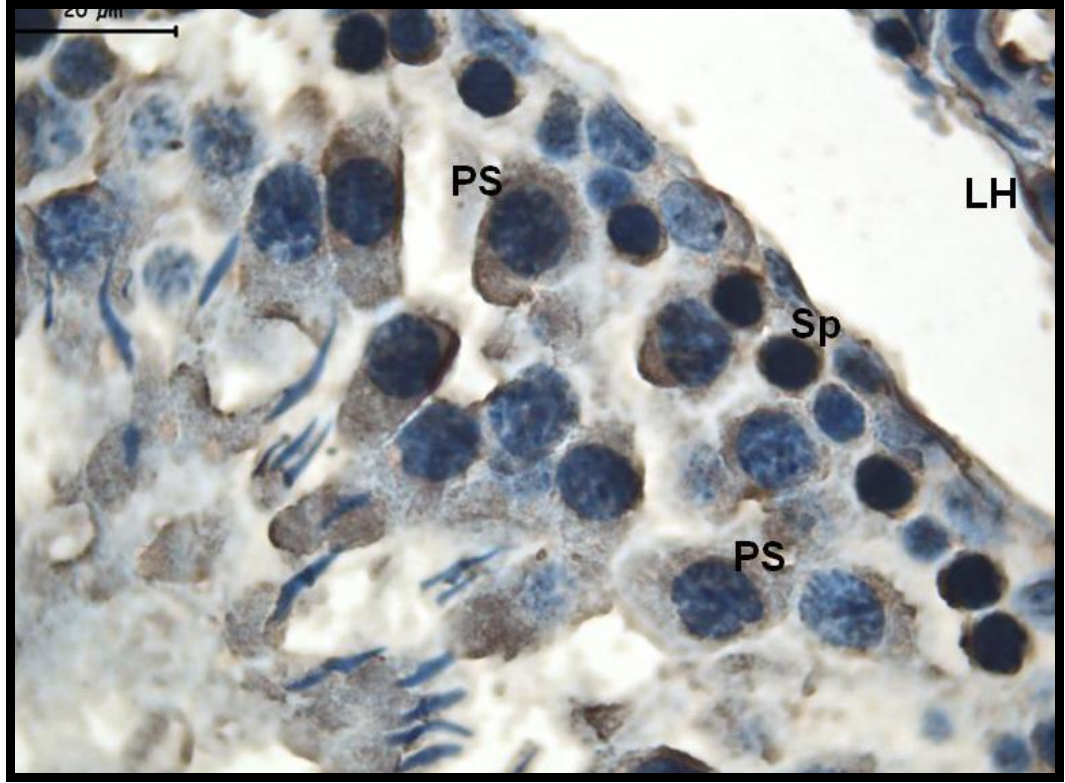
Resim 35: 1000 mg/kg DBP uygulanan grupta hücre-hücre bağlantılarının oluştuğu alanda (↑↑), çekirdek, sitoplazma ve zarda belirgin ERα tutulumu dikkati çekiyor. Sp: Spermatogonyum, PS: Primer spermatosit (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X1000).



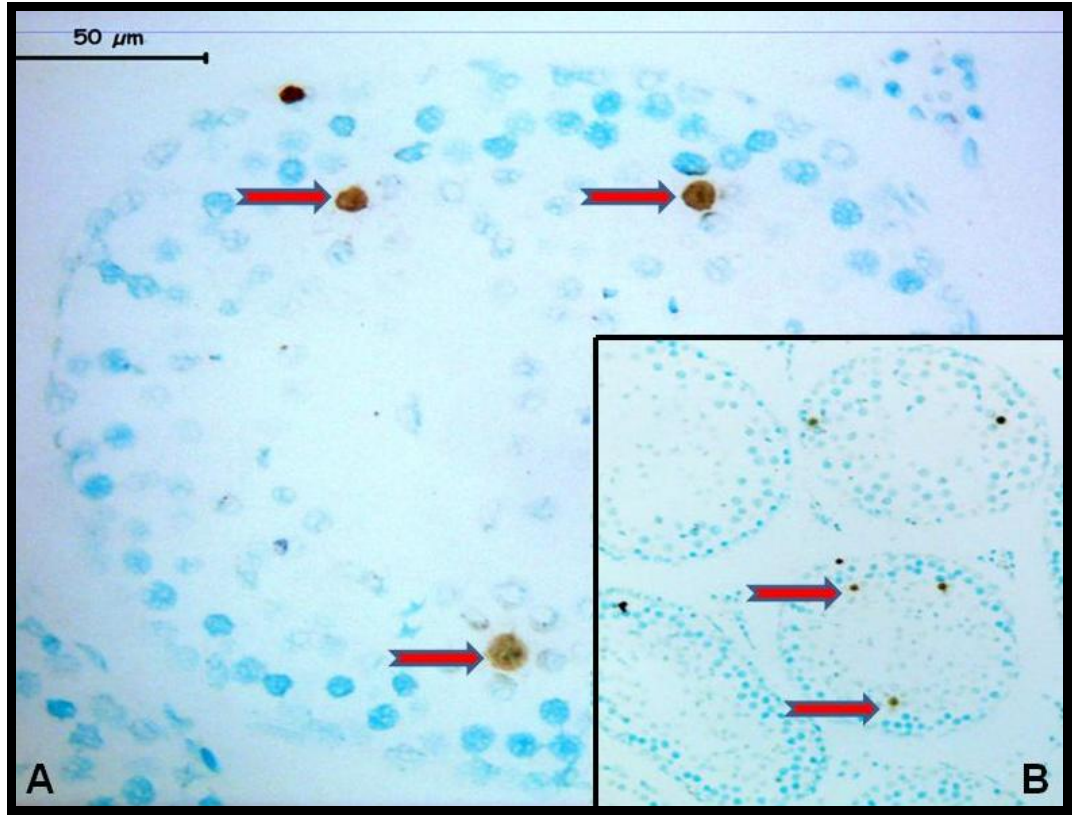
Resim 36: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta ER α boyanmasında; tutulumun zayıf olduğu izleniyor. Normal yapıda seminifer tübüller (ST) ile dejenere (★) tübüller görülüyor (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X100).



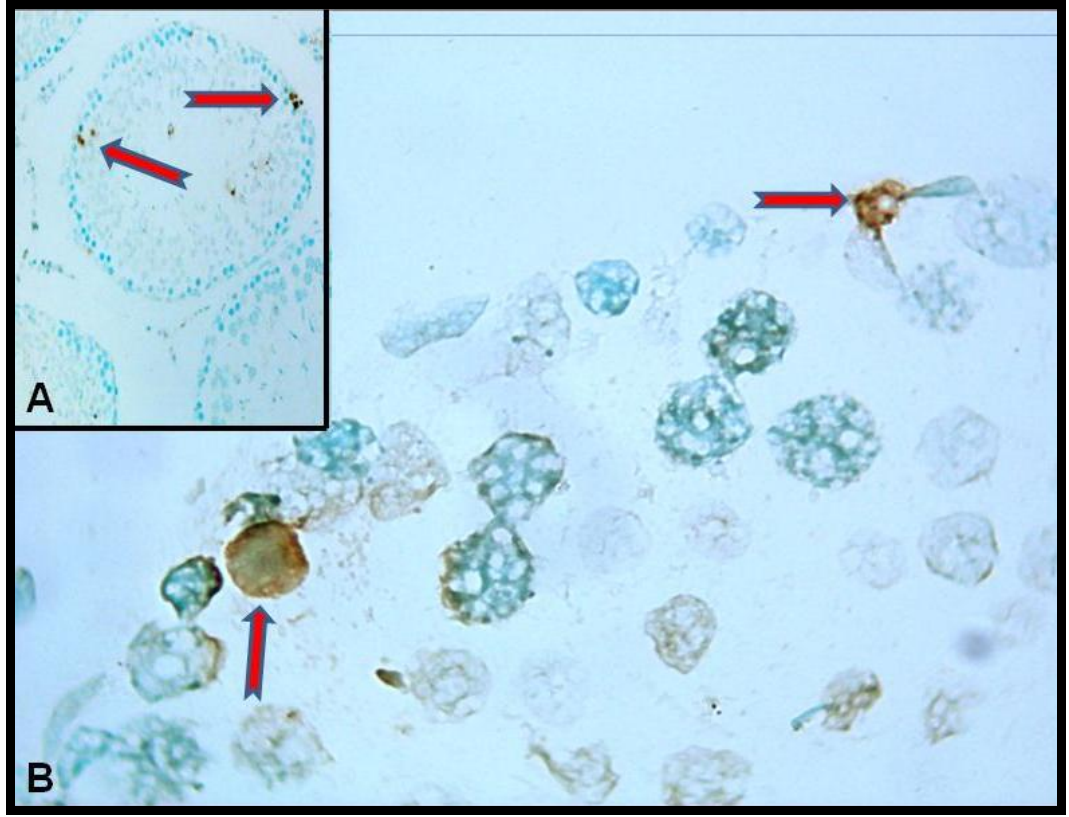
Resim 37: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta, primer spermatositlerde (PS) ER α tutulumu izleniyor. Leydig hücrelerinin (LH) çekirdek, zar ve sitoplazma tutulumu gösterdiği dikkati çekiyor. SP: Spermatogonyum. (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X400).



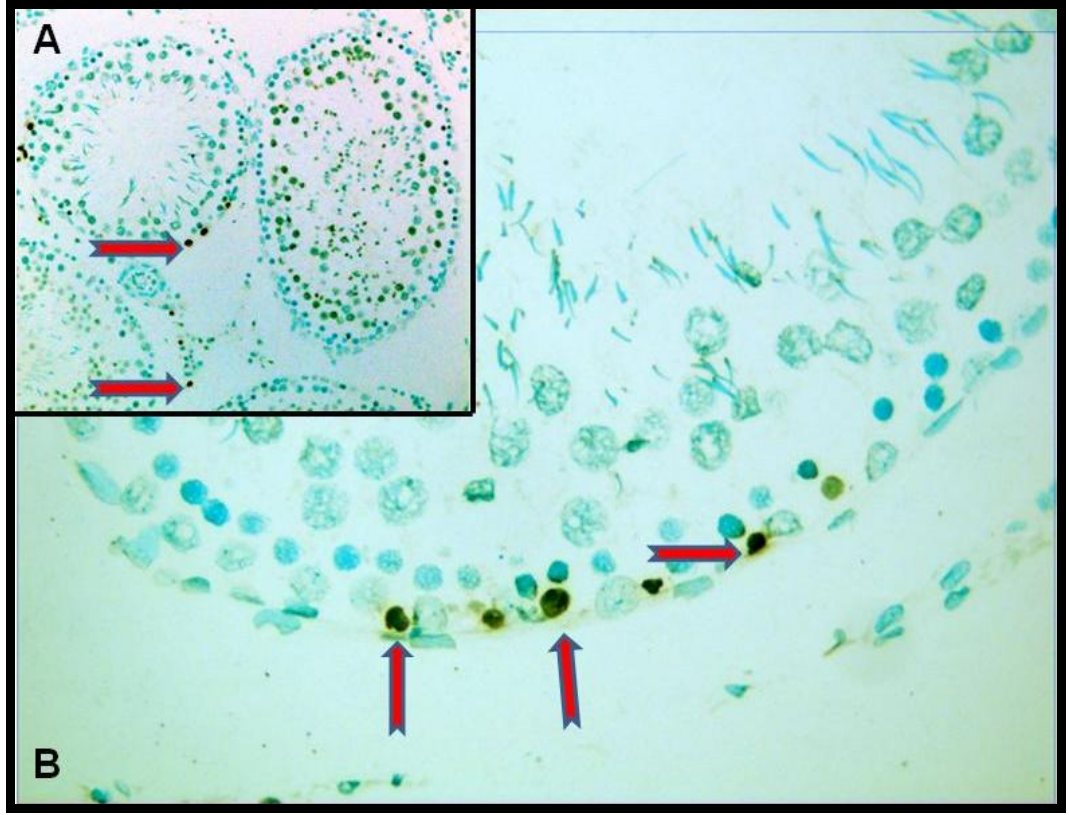
Resim 38: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta ER α immünreaktivitesinin kontrole eşdeş olduğu ayırt ediliyor. SP: Spermatogonyum, PS: Primer spermatositler, LH: Leydig hücreleri (İmmünperoksidaz & Hematoksilen, X1000).



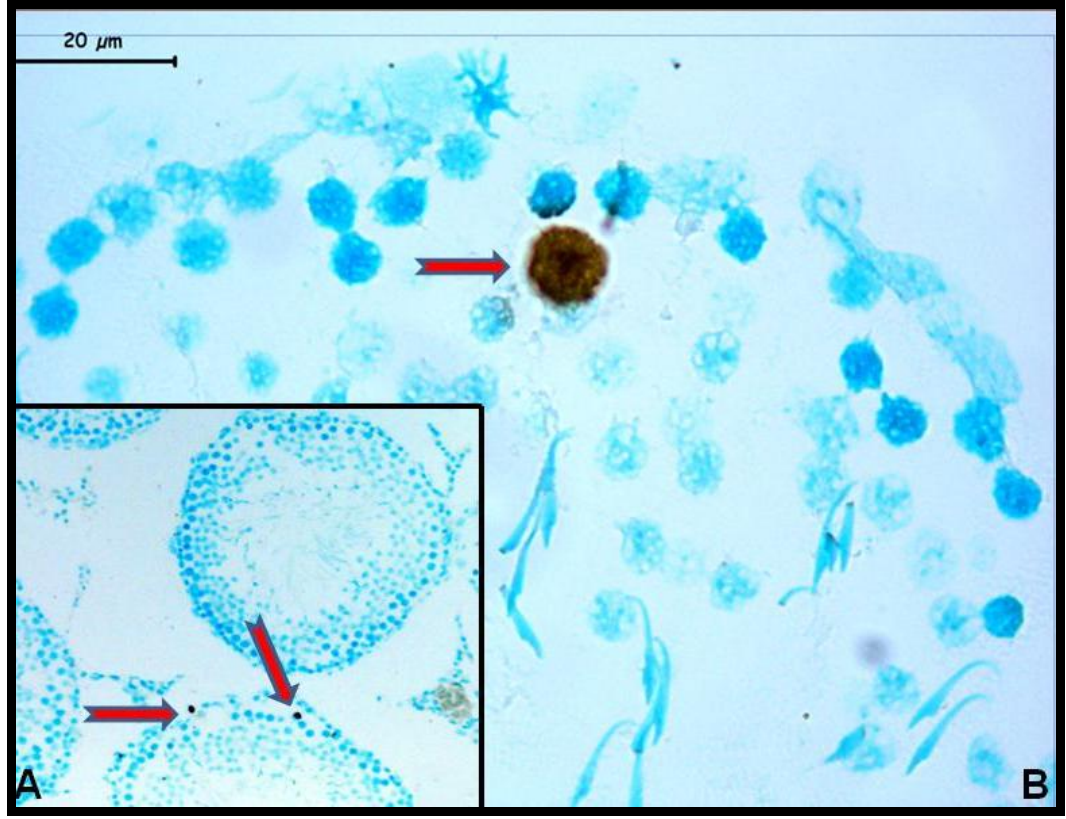
Resim 39: Kontrol grubu testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmesinde seminifer tübüllerde az sayıda apoptotik hücreler (→) izleniyor (TUNEL & Metil yeşil, A X 400, B X 100).



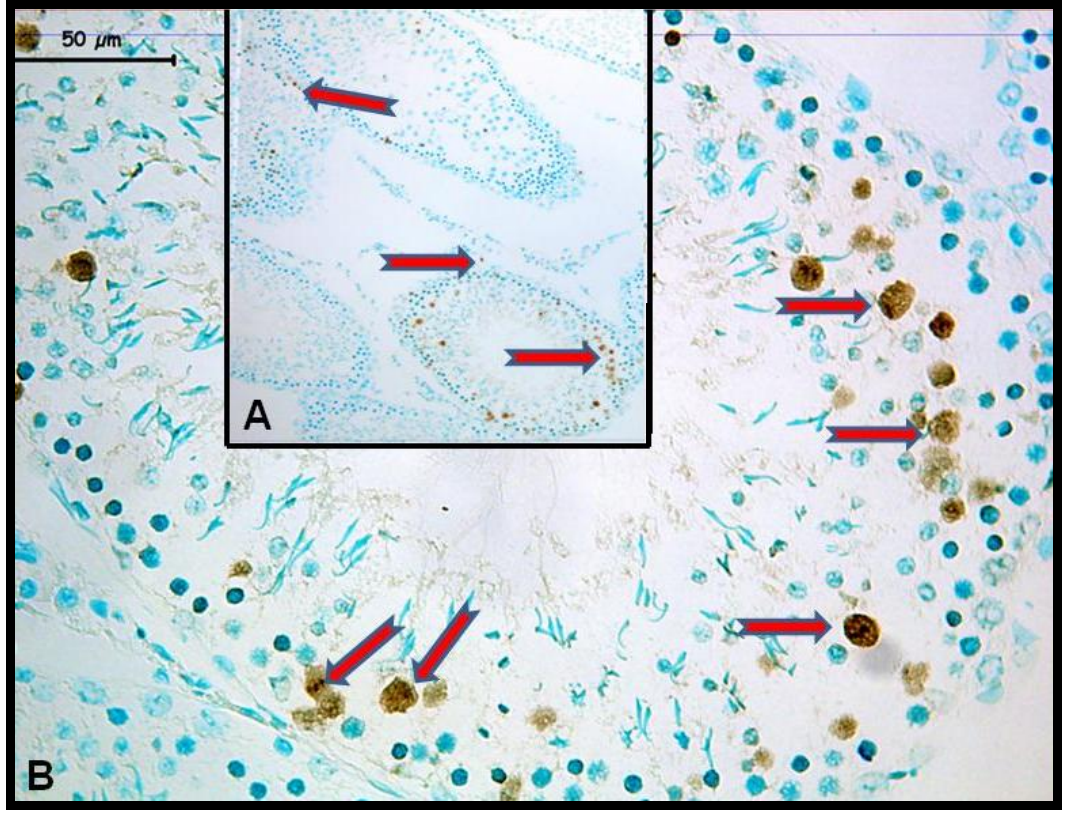
Resim 40: CMC uygulanan grup testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmesinde; seminifer tübüllerde apoptotik hücreler (→) ayırt ediliyor (TUNEL & Metil yeşil, A X 100, B X 1000).



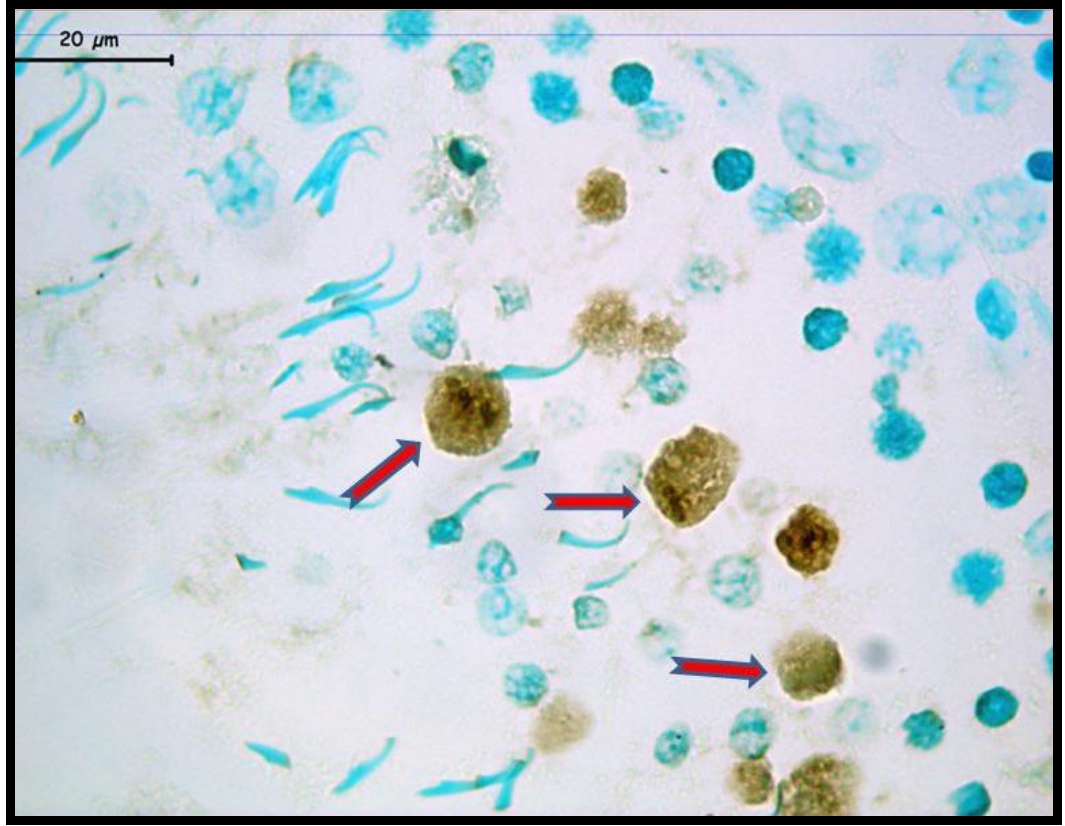
Resim 41: 500 mg/kg DBP uygulanan grup testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmesinde; seminifer epitelde ve Leydig hücrelerinde daha yoğun oranda apoptotik hücreler (→) dikkati çekiyor (TUNEL & Metil yeşil, A X 100, B X 400).



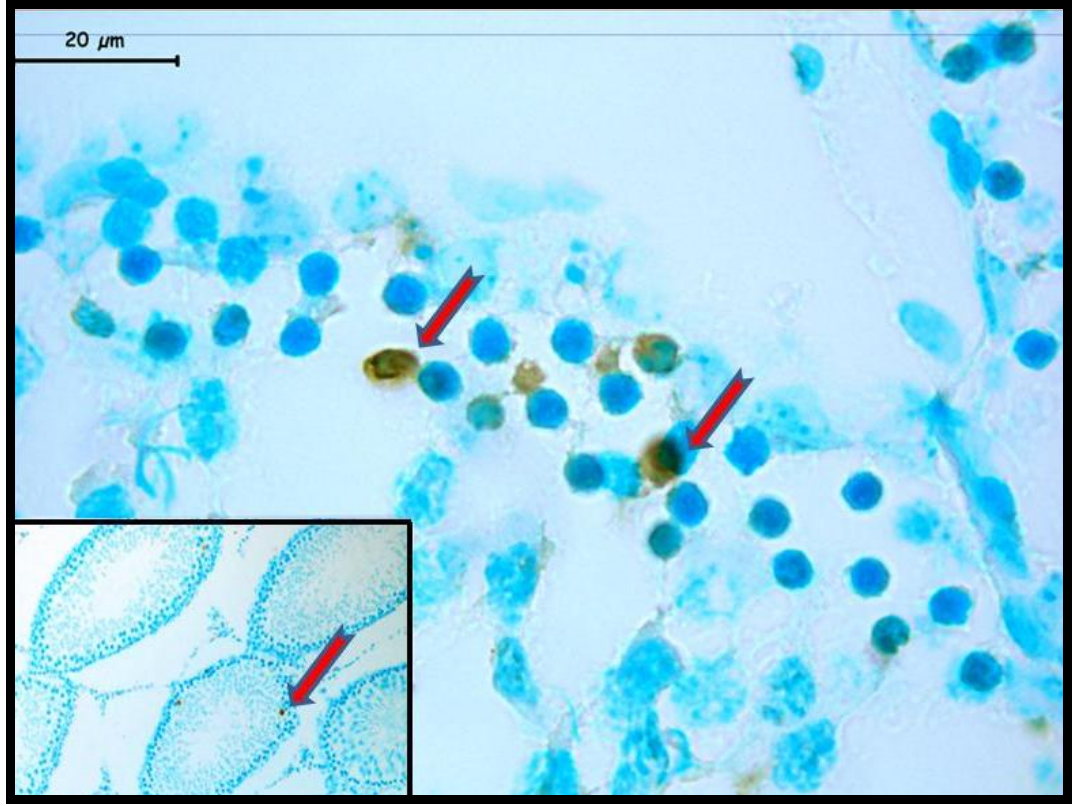
Resim 42: 500 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grup testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmesinde; seminifer tübüllerde, daha az miktarda apoptotik hücreler (→) görülüyor (TUNEL & Metil yeşil, A X 100, B X 1000).



Resim 43: 1000 mg/kg DBP uygulanan grup testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmesinde; özellikle seminifer epitelde apoptotik hücrelerin (→) arttığı, kaynaşan hücrelerin de TUNEL pozitif olduğu ilgiyi çekiyor. Leydig hücrelerinde de pozitiflik belirgin olarak izleniyor (TUNEL & Metil yeşil, A X 100, B X 400).



Resim 44: 1000 mg/kg DBP uygulanan grup testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmesinde; apoptotik hücrelerin (→) diğer gruplara karşı arttığı görülüyor (TUNEL & Metil yeşil, X 1000).



Resim 45: 1000 mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grup testis dokusunun TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmesinde; kısmen azalmış apoptotik hücreler (→) izleniyor (TUNEL & Metil yeşil, X 1000).

Tablo 1: Gruplara ait seminifer epitel kalınlığı ölçümlerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler ve yüzdelik değerleri.

Tanımlayıcılar

GRUPLAR	İstatistik					
	Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum	Çeyrekler Arası Genişlik
Tübül Duvar Kalınlığı Kontrol	59,88	12,90	58,21	26,60	129,25	16,98
500 DBP	36,36	18,48	31,44	4,08	116,37	27,38
1000 DBP	29,03	9,54	28,69	2,83	65,11	12,30
CMC	49,05	10,46	48,85	4,14	88,71	13,49
500 DBP + RES	71,11	17,50	68,21	37,50	161,69	21,34
1000 DBP + Res	55,39	18,30	53,82	12,42	119,91	22,12

Yüzdelikler

GRUPLAR			Yüzdelikler		
			25	50	75
Tukey's Hinges	Tübül Epitel Kalınlığı	Kontrol	50,35	58,21	67,26
		500 DBP	21,84	31,44	49,19
		1000 DBP	22,87	28,69	35,13
		CMC	42,115	48,85	55,57
		500 DBP + RES	59,09	68,21	80,425
		1000 DBP + Res	42,615	53,82	64,705

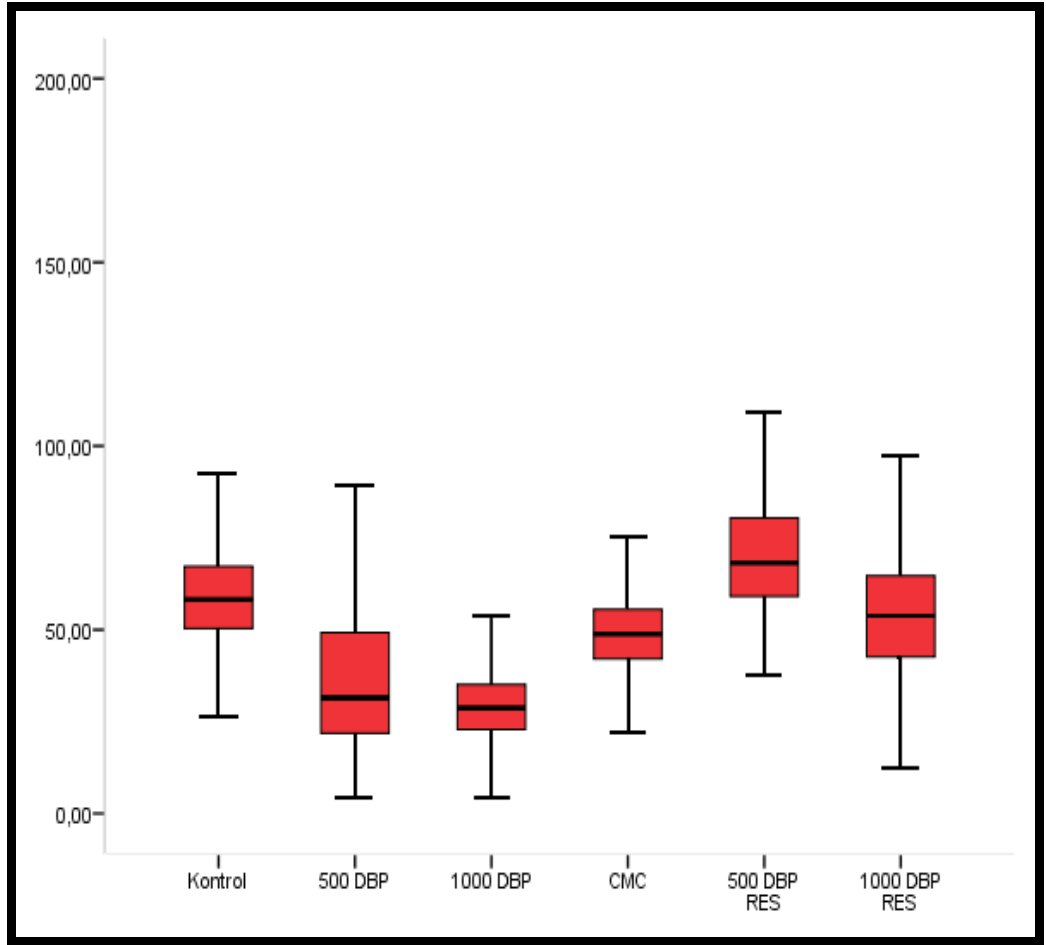
Tablo 2: Gruplara ait seminifer tübül çap kalınlığı ölçümlerine ilişkin tanımlayıcı istatistikler ve yüzdelik değerleri.

Tanımlayıcılar

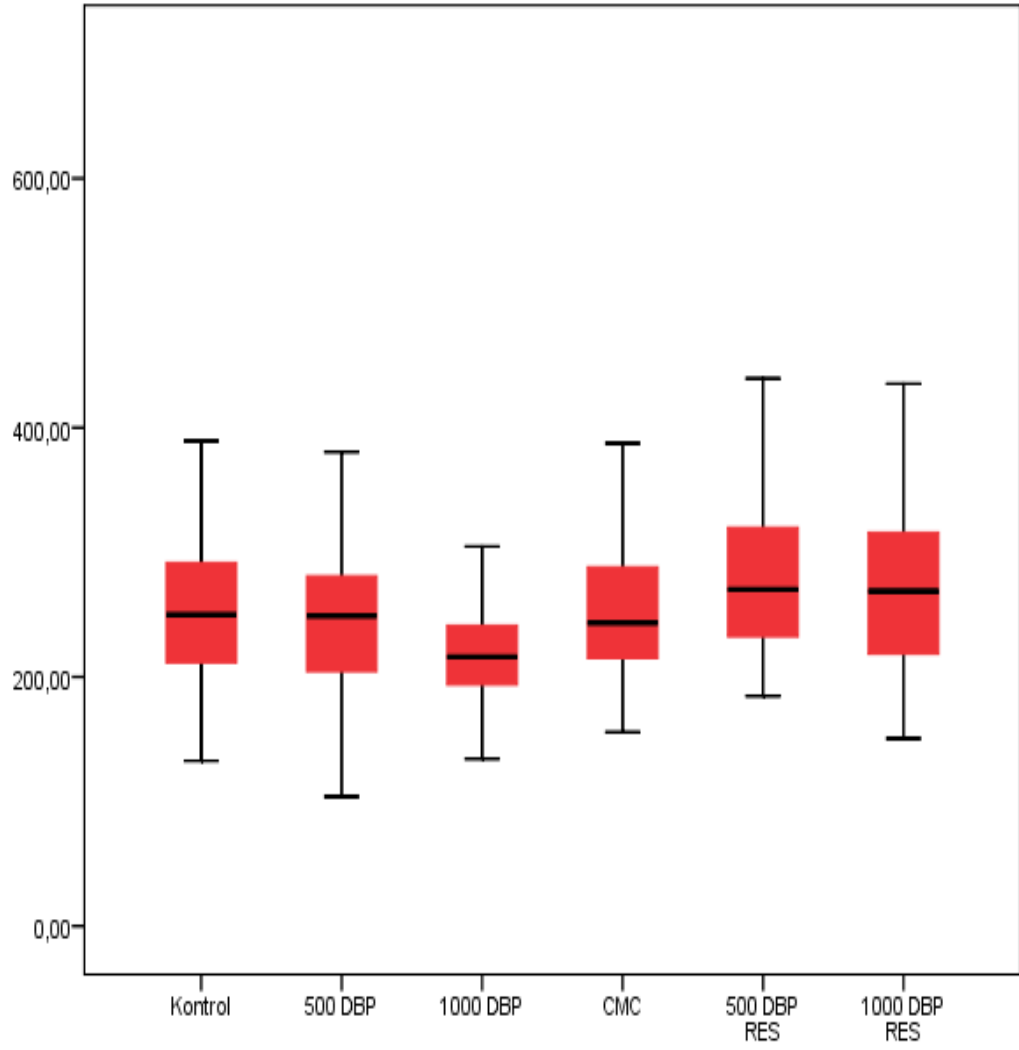
GRUPLAR		İstatistik					
		Ortalama	Standart Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum	Çeyrekler Arası Genişlik
Seminifer Tübül Çapı	Kontrol	253,42	60,87	249,95	132,55	427,44	80,18
	500 DBP	250,73	66,30	248,89	103,98	634,97	77,13
	1000 DBP	223,02	47,17	216,14	134,35	435,53	47,76
	CMC	256,74	56,86	243,28	155,67	509,29	73,20
	500 DBP + RES	285,58	78,50	270,10	101,02	605,03	87,84
	1000 DBP + Res	272,36	64,76	268,75	150,51	464,60	97,68

Yüzdelikler

GRUPLAR			Yüzdelikler		
			25	50	75
Tukey's Hinges	Seminifer Tübül Çapı	Kontrol	211,55	249,95	291,62
		500 DBP	204,35	248,89	281,04
		1000 DBP	193,70	216,14	241,33
		CMC	214,99	243,28	288,09
		500 DBP + RES	232,43	270,10	319,78
		1000 DBP + Res	218,47	268,75	315,92



Grafik 1: Gruplara göre seminifer epitel kalınlığı değerleri.



Grafik 2: Gruplara göre seminifer tüp çapı değerleri.

5.TARTIŞMA

1920' li yıllardan bu yana endüstride önemli bir yer kaplayan, 1950' lerden sonra ise PVC üretimi ile kullanım alanını daha da arttıran fitalat grubu, günümüzde hayatımızın her alanında kullanılmaktadır. Bu grubun en önemli üyelerinden biri de Di-n-bütil fitalat'tır (DBP).

DBP fitalik anhidrit ile n-butanol' ün reaksiyonu sonucunda üretilmektedir. DBP, PVC yapımında plastikleştirici olarak kullanılmaz, tipik olarak lateks yapıştırıcıların bir bileşeni olarak kullanılır. Ayrıca kozmetik ve diğer kişisel bakım ürünlerinde, boya çözücü olarak ve eldivenlerden besinlere kadar daha pek çok üründe kullanılmaktadır.^{16,189}

Çoğu kişi DBP' ye öncelikle gıda yoluyla etkin kalmaktadır. DBP gıdaların içerisine, gıda ambalajlamada kullanılan paketler yolu ile geçer. Paket, özellikle yağlı gıdalarla temas sonrası çözünüp göç eder. Kozmetik ve benzeri ürünlerde ise deri yoluyla temas söz konusudur.^{7,64}

Kohn ve arkadaşları 2000 yılında oluşturdukları derlemede, uzman kurulla uyumlu olarak, insanların %95' inin 10 µg/kg/gün' den az DBP' ye etkin kaldıkları tahmininde bulunmuşlardır. Özellikle 20-40 yaş arası kadınların diğer cins ve yaştaki kişilere göre daha fazla DBP' ye etkin kaldıklarını saptamışlardır.⁵⁸

Blount ve arkadaşları idrar analizi yaparak, insanların küçük bir yüzdesinin 30 µg/kg/gün, hatta bazılarının 100 µg/kg/gün oranında DBP' ye etkin kaldıklarını belirlemişlerdir. Yüksek oranda etkin kalmanın parfüm, tırnak cilası, saç spreyi gibi kişisel bakım ürünleri kullanımından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür.²⁰⁷

DBP ile yoğun etkin kalma insan sağlığını önemli ölçüde etkilemektedir. Son 20 yıldır fitalatların sağlık üzerine etkileri araştırılmaktadır. Pek çok hayvan çalışmasında DBP' nin özellikle üreme sistemi gelişimini olumsuz yönde etkilediği saptanmıştır. Son yıllarda fitalatlara etkin kalma ile erkek üreme sisteminde görülen bozuklukları ilişkilendiren çalışmaların sayıca hızla arttığı gözlenmektedir.

Dickson-Spillmann ve arkadaşları yaptıkları araştırmada iki amaca yönelmişlerdir; birincisi tüketicilerin besin yoluyla fitalata etkin kalışlarını modellemek. İkincisi ise, tüketicilerin doğal ve sağlıklı bir diyetle olan ilgileri, sentetik besin kimyasallarına karşı risk algıları ve besin yoluyla fitalata etkin kalma arasındaki ilişkiyi incelemektir. Ayrıca bu çalışma, besin yoluyla kirleticilere etkin kalmanın, fiziksel gerçekliğiyle psikolojik boyutlarını ilişkilendiren ilk disiplinler arası çalışma olmuştur. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar, doğal ve sağlıklı beslenme modelleri sürdürenlerin de, beslenme konusunda ilgisiz olanların da fitalata etkin kaldıklarını göstermişlerdir. Bu durum, besinlerle temas halindeki maddelerde fitalat kullanımını kısıtlayacak kuralların önemini göstermektedir. Bu çalışma tüketicilerin, besinler dışındaki kaynaklardan etkin kaldıkları fitalat düzeyi ile yüksek oranda fitalata etkin kalan grupların belirlenmesi için kapsamlı bir risk ölçümü yapılması ve fitalat kaynaklı sağlık risklerine karşı önlem alınması için yol gösterici bir çalışma olmuştur.⁶¹

Yapılan kaynak taramalarında DBP' nin büyüme, gelişme ve üreme üzerine etkilerini inceleyen pek çok araştırmaya rastlanmıştır. Çalışmaların çoğunluğu DBP' ye etkin kalan gebe sıçanların, erkek embriyolarında DBP' nin üreme sistemi gelişimi üzerine olası etkileri ile ilgilidir. Yeni doğan, puberte öncesi ve yetişkin gruplarına ait çalışmalar yok denecek kadar azdır. DBP'nin testis üzerine etkisi ve Resveratrol'ün

bu koşullarda olası koruyucu özelliğinin tartışıldığı bir çalışmaya da rastlanmamıştır.

Wilson ve arkadaşları uterus içi DBP, DEHP ya da benzil-bütıl fitalat (BBP) temasıyla kriptidorşizm oranının arttığını ve bunun insülin-benzeri faktör 3(İnsI3) etkisiyle gerçekleştiğini düşünmüşlerdir. İnsI3 testisin inişinde özellikle abdominal faza etkisi olan gubernakulumun gelişiminde rol almaktadır. Çalışma sonucunda DBP ve BBP' nin, İnsI3 mRNA düzeylerini DEHP' den daha belirgin oranda düşürdüğü belirlenmiştir.⁷⁵

Gray ve arkadaşları DBP ve Di-etil hekzil fitalat (DEHP)' ın erkek üreme sistemi üzerindeki etkilerini karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. 500 mg/kg/va/gün DBP ve eşmolar konsantrasyonda 750 mg/kg/va/gün DEHP gebeliğın 14. gününden laktasyonun 3. gününe değın gebe Sprague Dawley sıçanlarına uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda 2 grup için de benzer sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bunlar; testis, prostat ve epididimis ağırlığında azalma, testiküler ve epididimal atrofi ve agenezisidir. Ortaya çıkan sonuç iki grup içinde benzer olsa da, DEHP' nin DBP' den daha toksik olduğı belirtilmiştir.¹⁹¹

Kondo ve arkadaşları puberte öncesi ve olgun sıçan testislerine di-n-bütıl fitalat (DBP) metaboliti olan, mono bütıl fitalatın (MBP) yaşa koşut etkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda, ağız yoluyla MBP verilen puberte öncesi sıçanlarda testis hasarının olgun sıçanlara karşı fazla olduğı belirlenmiştir. Ayrıca olgunlaşmamış testislerin MBP' ye karşı daha hassas olabileceğı ve MBP' nin puberte öncesi sıçanlarda testiküler atrofi ve seminifer tübüllerdeki üreme hücrelerinin apoptozunu uyardığı saptanmıştır.¹⁹⁰

Bizim çalışmamızda da sıçanlarda DBP'nin 500 ve 1000mg/kg dozlarında gençlikten ergenliğe değin testiste etkileri araştırılmış, Kondo ve arkadaşlarının bulgularına uyumlu olarak artan doza koşut testiste seminifer tübül atrofisi, seminifer epitel boyunda azalma, lümende hücre debrisinin birikimi gibi yapısal dejeneratif değişiklikler izlenmiştir. C-kit antikoru ile spermatogenezis incelendiğinde ise DBP'nin artan dozuna koşut tutulumun azaldığı gözlenmiş, bu bulgu c-kit yolağı üzerinden döngünün bozulduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir. Ayrıca yine yapılan çalışmalara koşut, artan DBP dozuna bağlı olarak apoptotik hücre sayısının da arttığı gösterilmiştir.

Son yıllarda fitalat ile etkin kalmanın erkek üreme sisteminde bozukluklara neden olduğunu gösteren çalışmaların sayısı hızla artmaktadır. Fitalat temasının belirlenmesinde kullanılabilecek biyolojik göstergelere ilişkin veriler yetersiz olmakla birlikte, idrarın iyi bir belirteç olduğu kabul edilmekte ve fitalat metabolizmasının hızlılığı nedeniyle üriner metabolit düzeyleri temas göstergesi olarak kullanılmaktadır.¹⁹²

Çin'de insan üzerinde yapılan bir çalışmada Pan ve arkadaşları, DBP ve DEHP' ye etkin bırakılmış 74 fabrika işçisi ile bu fitalatlara etkin kalmayan aynı yaşlarda ve sigara içen 63 işçinin idrar ve kan örneklerini incelemişlerdir. Sonuçta DBP ve DEHP' ye etkin kalan işçilerde, etkin kalmayanlara göre mono-bütil fitalat (MBP) ve mono-2-etil hekzil fitalat (MEHP) konsantrasyonlarının önemli ölçüde yükseldiği, bununla birlikte serbest testosteron düzeylerinin ise belirgin oranda azaldığı saptanmıştır. MBP ve MEHP düzeyleri ile testosteron ve östradiol düzeyleri arasında negatif bir uyum saptanırken, LH düzeyleri ile pozitif uyum bulunmuştur. LH ve serbest testosteron arasında ise anlamlı bir uyum belirlenmiştir. Testosteron düzeyindeki azalmanın LH düzeylerini negatif geri bildirim mekanizmasını tetikleyerek arttırdığı ve artan LH

düzeylerinin Leydig hücrelerini testosteron salgılatmaya zorladığı, ancak LH düzeylerinin kısa sürede normale döndüğü bildirilmiştir.⁶²

Bu çalışmada Leydig hücrelerinin DBP uygulamasına yanıtını inceleyebilmek ereği ile bir stres işaretleyicisi olan ve özellikle Leydig hücrelerinde eksprese edilen AT1 tutulumu değerlendirildiğinde, artan DBP dozuna koşut Leydig hücrelerinde AT1 immünboyanmasının arttığı belirlenmiştir. Bu bulgu Pan ve arkadaşlarının çalışmaları ile uyumlu olarak DBP'nin Leydig hücrelerinde yapısal bir bozukluk ve sonuçta testosteron üretiminde bir azalmaya neden olabileceğini düşündürmüştür. Çalışmamızda testiste östrojen reseptör düzeyleri incelendiğinde ise kaynak verilerinden ayrıcalı olarak DBP ve östrojen düzeyleri ile ilgili negatif bir uyum belirlenmiş, artan DBP dozuna karşın östrojen reseptör immünreaktivitesinin azaldığı gözlenmiştir.

Duty ve arkadaşlarının 338 erkek üzerinde yaptıkları başka bir çalışmada ise, kolonya, traş losyonu ve saç bakım ürünleri kullanan kişilerin idrarlarındaki fitalat metabolit düzeyleri araştırılmıştır. Sonuçta idrarda diğer metabolitlere oranla mono etil fitalat (MEP) düzeylerinin daha yüksek, DBP metaboliti olan, mono bütıl fitalat'ın ise daha az olduğu saptanmıştır. Ayrıca kolonya ve traş losyonunda diğer bakım ürünlerine oranla daha yüksek oranda fitalat metaboliti saptanmıştır.⁶³

Benzer bir çalışmada Hauser ve arkadaşları medikal ve kişisel bakım ürünleri kullanan çeşitli erkeklerin idrarlarındaki, DBP ve bütıl benzil fitalatın (BBP) metabolitleri olan, mono bütıl fitalat (MBP) ve mono benzil fitalat (MBzP) düzeyleri ile kişilerin semen kalitesini incelemişlerdir. Sonuçta fitalat metabolitlerinin semen parametreleri ile arasında bir ilişki belirlenememiştir. Ayrıca bu metabolitlerin hepsi idrarda yüksek

düzeylerde saptanmış ve artan fetalat düzeyine bağlı düşük sperm sayısı ve kalitesi gözlenmiştir.⁶⁶

Martino-Andrade ve arkadaşları yaptıkları çift doz çalışmada gebe sıçanları DBP ve DEHP' ye etkin bırakıp, erkek embriyonların üreme sistemi gelişimini incelemişlerdir. Çalışmada 4 grup oluşturulmuştur; Kontrol, 100mg/kg/va DBP uygulanan grup, 150 mg/kg/va DEHP uygulanan grup ve 100 mg/kg/va DBP+150 mg/kg/va DEHP uygulanan grup. Uygulama gebeliğin 13. gününden 21. gününe değin sürdürülmüştür. Sonuçta DBP+ DEHP verilen grubun testosteron düzeylerinde anlamlı bir düşüş belirlenirken, düzensiz seminifer tübüller ve çok çekirdekli spermatogenik hücreler gözlenmiştir.¹⁹³

Bu çalışmada artan dozda DBP uygulamasının seminifer epitel boyunu kısalttığı istatistiksel olarak belirlenmiştir. Ayrıca özellikle 1000mg/kg DBP uygulanan grupta seminifer tübüllerde belirgin atrofi ve şekil bozukluğu ile birlikte, lümende olgun spermiyumların olmadığı izlenmiştir. Hauser ve arkadaşlarının çalışmalarına koşut bunun, semende düşük spermiyum sayısı sonucu ortaya çıktığı düşünülmüştür.

Başka bir çalışmada Shultz ve arkadaşları uterus içi DBP' ye etkin bırakılan fetal sıçan testislerindeki gen ekspresyonunu incelemişlerdir. Gebeliğin 12. gününden 21. gününe değin bir gruba mısır yağı, diğer gruba 500 mg/kg/gün DBP ve son gruba da 50 mg/kg/gün flutamid verilmiştir. Sonuçta DBP'ye etkin bırakılan grupta c-kit ekspresyonunun düştüğü, TRPM-2 (Testosterone-repressed prostate message-2) ekspresyonunun ise arttığı rapor edilmiştir. Aynı zamanda gebeliğin 19 ve 21. günlerinde testiküler testosteron ve androstenedion düzeylerinin azaldığı, buna koşut 19. günde progesteron düzeylerinin de arttığı belirlenmiştir.⁷³

Bizim çalışmamızda Shultz ve arkadaşlarından ayrıcalı olarak gençlikten erginliğe değin DBP uygulaması yapılmış ve 500mg/kg ve 1000mg/kg dozlarında, artan doza koşut aynı araştırmacıların bulguları ile uyumlu olarak c-kit tutulumunun azaldığı belirlenmiştir.

DBP' nin erkek üreme sistemi üzerine oluşturduğu etkiler incelendiğinde, DBP' nin öncelikli hedeflerinin Leydig ve Sertoli hücreleri olduğu belirlenmiştir.^{71,73,74,194}

Benzer şekilde uterus içi DBP' ye etkin kalan fetal sıçan testislerindeki değişikliği belirlemek ereğiyle Mylchreest ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, ilk olarak testiküler Leydig hücre işlevlerinin ya da gelişiminin bozulduğunu belirlemişlerdir. Ayrıca Sertoli hücre disfonksiyonu, testosteron düzeylerinde önemli oranda azalma, üreme hücrelerinde dökülme ve seminifer tübül atrofi gözlemlendiği de bildirilmiştir.⁷¹

Lehmann ve arkadaşları uterus içi erkek sıçanların üreme sistemi gelişiminde DBP' nin doza bağlı etkisini araştırmışlardır. Gebe Sprague-Dawley sıçanlarından bir grup kontrol olarak belirlenip yalnızca mısır yağı verilmiştir, diğer gruplara sırasıyla 0.1,1.0,10, 50,100 ve 500 mg/kg/gün dozlarında DBP gavaj yolu ile uygulanmıştır. DBP gebeliğin 12. gününden 19. gününe değin uygulanmıştır. Sonuçta ≥ 50 mg/kg/gün DBP dozunun fetal testiküler testosteron düzeyini anlamlı derecede düşürdüğü saptanmıştır. Ayrıca DBP' nin doz bağımlı olarak, kolesterol taşınımı için gerekli anahtar gen ve proteinlerin ekspresyonlarını azalttığı, bununla birlikte steroidogenezis gibi işlevleri engelleyerek erkek üreme sistemi gelişimini olumsuz etkilediği saptanmıştır.¹⁹

Duty ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği başka bir çalışmada üriner fitalat metabolitleri ile serum FSH, LH, SHBG, testosteron ve inhibin-B düzeyleri arasındaki ilişki incelenmiş, monobenzil fitalat (MBzP) düzeylerinin FSH'daki düşüş ile uyumlu olduğu, inhibin-B'deki artışla monobutil fitalat (MBP) düzeyleri arası tam sınırdaki olmak üzere bir istatistiksel ilişki olduğu bulunmuştur. Diğer fitalat metabolitleri ile serum hormon düzeyleri arası bir ilişki kurulamamıştır.¹⁹⁵

Fitalatların testiküler toksikliğinde deney hayvanının yaşı belirleyici faktördür. Genç erişkin sıçanlarda üreme sistemi gelişim toksisitesi yüksek dozlarda görülse de, testiküler hasarlar nispeten daha kısa uygulama ile ortaya çıkar. Pubertal hayvanlarda erişkin hayvanlara oranla daha düşük dozlarda toksisitenin ortaya çıktığı ve tübüler atrofiyle beraber testiküler toksisite ve ciddi testis hasarları görüldüğü belirlenmiştir.¹⁹⁶

Bizim çalışmamızda da düşük doz DBP uygulanmasının dahi seminifer epitelde apoptozise neden olduğu, artan doz uygulamanın TUNEL pozitif hücre sayısını arttırdığı belirlenmiştir.

Mylchreest ve arkadaşları başka bir çalışmada gebelik ve süt verme dönemlerinde değişik dozlarda DBP'ye etkin bırakılan gebe CD sıçanlarının erkek embriyonlarında üreme sisteminde oluşan değişiklikleri incelemişlerdir. Bu erekle dişi CD sıçanlara gebelikten doğum sonrası 20. güne değin, günde 0, 250, 500 ve 750 mg/kg dozlarında DBP uygulanmıştır. Sonuç olarak günde 250mg/kg ve üstü dozda DBP'ye etkin kalan sıçanların erkek yavrularında iç ve dış genital organların yapısal olarak bozuk olduğu, koşut olarak seminifer tübül epitelinde de geri dönüşümsüz hasarın varlığı bildirilmiştir.²⁰

Kim ve arkadaşları DBP' ye etkin bırakılan, yeni doğan erkek sıçanların üreme sistemi gelişimlerini incelemişlerdir. Doğum sonrası 5.günden 14.güne değin erkek sıçanlara 5,10 ve 20 mg/kg dozlarında DBP, kontrol grubuna ise mısır yağı deri altına uygulanmıştır. Sonuçta 20 mg/kg DBP' ye etkin kalan yeni doğan erkek sıçanların testis, veziküla seminalis ve Cowper bezlerinde gelişim bozukluğu belirlenmiştir. Ayrıca sıçan testis ve vas deferenslerinde de histomorfolojik olarak oldukça belirgin hasar saptanmıştır. Araştırmacılar DBP'nin gelişimin erken evrelerinde androjen reseptör ve östrojen reseptör β' yı engelleyerek anti-androjenik bir yol izlediğini öne sürmüşlerdir.⁷⁶

Zhang ve arkadaşları gebelik ve süt verme dönemlerinde değişik dozlarda DBP'ye etkin bırakılan gebe Sprague Dawley sıçanların erkek yavrularında üreme sistemini incelemişlerdir. Bu erkek gebeliğin 1.gününden doğum sonrası 21. güne değin 0, 50, 250 ve 500 mg/kg dozlarında DBP gündelik yeme karıştırılarak verilmiştir. Çalışma sonucunda 250 mg/kg ve üstü dozlarda DBP' ye etkin kalan birincil erkek soyların üreme sistemlerinde ciddi hasarlar saptanmıştır. Testislerde atrofi, az gelişmiş veya eksik epididimis, inmemiş testis, epididimal sperm parametrelerinde düşüş, epididimis ve prostat organ/vücut ağırlığı oranının azalması gözlenmiştir. Bu sonuçlar erkek üreme sisteminin DBP'nin ana hedef organı olduğunu göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada vücut ağırlığı ve erkek üreme sistemiyle ilgili doku bozukluğuna dayanılarak NOAEL (Olumsuz etki gözlenmeyen düzey) 50 mg/kg/va/gün olarak belirlenmiştir.⁷⁷

Hiposphadias, kriptorşidizm, anogenital açıklıkta azalma, semen kalitesinde düşme, erişkin erkeklerde fertilitenin azalması gibi bozukluklara "testiküler disgenez sendromu" adı verilmektedir."Fitalat sendromu" adı da verilen bu bozuklukların insanlarda da görülen olgular olması fitalatlara etkin kalma konusundaki endişeleri arttırmakla birlikte

kesin kanıtların bulunmadığı ya da verilerin yetersiz olduğu görülmektedir. Bu nedenle konu ile ilgili çalışmalar sürdürülmektedir.¹⁹⁷⁻¹⁹⁸

Mahood ve arkadaşları gebelik döneminde DBP' ye etkin kalmanın, erkek fötuslarda anormal Leydig hücre oluşumu ve disgenezisde olası rolünü inceledikleri çalışmalarının sonucunda DBP' ye etkin kalmanın testis disgenezisini tetiklemede anahtar bir rol oynadığı saptanmıştır.⁷⁸

Fisher ve arkadaşları gebelik döneminde DBP' ye etkin kalan erkek fötusların, insan testiküler disgenezis sendrom (TDS) için uygun bir model olup olmayacağını araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda gözlenen Leydig hücre hiperplazisi, düşük testosteron düzeyleri ve olgunlaşmamış yada anormal gelişmiş Sertoli hücrelerinin varlığı, gebelikte DBP' ye etkin kalmanın TDS' nin tanımlanmasında uygun bir model olabileceğini ortaya koymuştur.⁷⁴

Başka bir çalışmada Zhang ve arkadaşları uterus içi DBP' ye etkin bırakılan fötal sıçanların testislerinde farklı protein ekspresyonlarını belirlemeyi amaçlamışlardır. Sonuçta pek çok farklı protein ekspresyonu tespit edilmiştir ancak, oksidatif hasara karşı hücreleri koruyan bir protein olan Peroksiredoksin (Prdx6)' nin DBP' ye etkin bırakılan gruplarda, kontrol grubu testislerine karşın daha fazla eksprese edildiği belirlenmiştir. Prdx6' nin özellikle Leydig hücrelerinde ekspresyonunun arttığı saptanmıştır. Bu çalışma DBP' nin testis dokularında neden olacağı olası oksidatif hasara karşı, çeşitli proteinlerle anti oksidan etki yaratılabileceği konusunda yol gösterici olmuştur.¹⁹⁹

Ema ve arkadaşları gebeliğin geç döneminde DBP uygulanan sıçanların erkek fötuslarda üreme sisteminin gelişimi için

duyarlı günleri belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarının sonucunda gebeliğin 15-17. günlerinin DBP' nin olumsuz etkilerine karşı en duyarlı dönem olduğunu saptamışlardır.⁷²

Yapılan diğer çalışmaları destekler nitelikte Kleymenova ve arkadaşları gebelikte DBP' ye etkin kalan sıçanların erkek fötuslarının üreme sistemlerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda DBP'ye etkin kalan fötuslarda düşük testosteron düzeyleri, anormal Leydig hücre oluşumu ve çok çekirdekli spermatogenik hücreler gözlenmiştir. Ayrıca DBP' ye etkin kalmanın fetal Sertoli hücrelerinin vimentin hücre iskeletini değiştirdiği ve Sertoli hücresi-spermatosit bağlantısını bozduğu saptanmıştır. Araştırmacılar DBP' nin erkek fötusunda hedefin Sertoli hücresi olduğunu bununla birlikte, Sertoli hücresi ve üreme hücreleri arasındaki anormal etkileşimin çok çekirdekli spermatogenik hücre gelişiminde bir rol oynadığını bildirmişlerdir.²⁰⁰

Bu çalışmada da özellikle yüksek doz DBP' nin seminifer epitel boyunda kısalma, lümende olgun spermiyumun olmaması ve seminifer epitel hücrelerin bağlantı bölgelerinde açılmalar şeklinde dejeneratif değişikliklere neden olduğu gözlenmiştir. Kleymenova ve arkadaşlarının bulgularına koşut olarak DBP' nin Sertoli hücrelerini etkileyerek hücre-hücre bağlantısını bozduğu, buna bağlı çok çekirdekli hücre gruplarının oluştuğu düşünülmüştür. Ayrıca seminifer tübüllerde baş bölgeleri ile lümene dönük spermiyumlar gözlenmiş, bu bulgu Sertoli hücre dejenerasyonuna bağlı olarak spermiyogenezisin tamamlanamadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Ferrara ve arkadaşları çalışmada uterus içi etkin kalınan DBP' nin, fetal ve doğum sonrası erkek üreme hücrelerindeki gelişime, kısa ve uzun dönem etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada uterus içi DBP'

ye etkin kalmanın doğum öncesi dönemde gonosit gelişimi/farklılaşması ve doğum sonrasında erkek üreme hücresi gelişimi/çoğalmasının zamanlamasını doğrudan değiştirdiği belirlenmiştir. DBP'nin doğum öncesi ve doğum sonrası dönemde erkek üreme hücre gelişimini geciktirdiği saptanmıştır.²⁰¹

Bu çalışmada da özellikle 1000mg/kg DBP uygulanan grupta seminifer epitel boyunun kısa olması ve lümende yer yer spermatidlerin varlığı Ferrara ve arkadaşlarının bulgularına koşut, DBP'nin spermatogenezisi yavaşlattığı ve bozduğu sonucunu doğurmuştur.

Günlük hayatın hızlı ve yorucu temposu, dengesiz beslenme, uyku düzensizliği, yoğun stres ile toksik maddeler ve onların vücudumuzda meydana getirdiği oksidatif hasar gün geçtikçe daha ciddi boyutlara ulaşmaktadır. DBP de bu kötü koşulları oluşturan önemli etkenlerden biridir. Tüm bu olumsuz şartlara karşı antioksidan olarak adlandırılan bir grup madde, insan hayatını kolaylaştırma ve oluşan hasarları belli ölçüde engelleme, hatta tedavi edebilme yetisine sahiptir. Son dönemde antioksidanlar ve etkilerinin araştırılmasına hız verilse de aslında bazı antioksidanlar yüzyıllardır halk arasında kullanılmaktadır. Yakın geçmişten günümüze, etkinliği ve yararlılığı üzerinde en çok durulan, en dikkat çekici antioksidan Resveratrol' dür.

Resveratrol uzun yıllardır Çin, Japonya gibi ülkelerde değişik hastalıkların tedavisinde, Hindistan'da ayurveda tedavi sisteminde kullanılmaktadır.⁸⁰ Ancak tüm dünyada dikkat çekmesini sağlayan esas olay Fransa' da meydana gelmiştir. Bol yağlı ve kırmızı etten zengin beslenen Fransız toplumu incelendiğinde, Fransızların Amerika ve İngiltere gibi ülkelerde yaşayan insanlara göre kalp damar hastalıkları ve bu nedenle gerçekleşen ölüm olaylarının anlamlı düzeyde az olduğu

bulunmuştur.⁹³ Daha sonra bu durum Fransa' daki düzenli şarap tüketimi ile açıklanmıştır.

De Lorgeril ve arkadaşlarının araştırmaları sonucunda Fransa'da yüksek kan basıncı ve yüksek kolesterol seviyesi gibi nedenlerle koroner kalp hastalıklarından ölüm oranlarının diğer batı ülkelerine kıyasla oldukça düşük olduğu bulunmuştur. Daha sonra bu durum " Fransız Paradoksu " olarak adlandırılmıştır.²⁰²

Resveratrol'ün yapılan pek çok araştırma sonucunda anti-enflamatuvar²¹, antioksidan¹⁰¹, anti-apoptotik²⁰³, sitoprotektif¹¹¹, anti-kanser²² ve kardiyoprotektif²⁴ etkileri bulunmuştur. Resveratrol'ün erkek üreme sistemi üzerine etkileri 2000' li yıllardan sonra araştırılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalar birbiriyle koşut olarak devam etmektedir. Bununla birlikte Resveratrol ile ilgili halen pek çok soru işareti ve açıklanmayan konular bulunmaktadır.

Kasdallah-Grissa ve arkadaşları oksidatif stresin artışına neden olan kronik etil alkol uygulaması sonrası, Resveratrol'ün lipid peroksidasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak, Resveratrol'ün testis, beyin, kalp gibi organlara ek olarak karaciğerde de etil alkol kaynaklı lipid peroksidasyonunu engelleyebildiği ve oksidatif hasara karşı koruyucu etkiye sahip olabileceği belirlenmiştir.²⁰⁴

Eybl ve arkadaşları CD farelerinde kurkumin, Resveratrol ve melatonin gibi doğal antioksidanların, kadmiyum (Cd) kaynaklı oksidatif hasara karşı antioksidan etkilerini karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. Sonuç olarak, kurkumin, Resveratrol ve melatoninin Cd kaynaklı lipid peroksidasyonuna karşı koruma sağladıkları ve Cd uygulanan farelerin

dokularında kadmiyum düzeylerini düşürmeksizin, antioksidan etkinlikle iyileşme sağladıklarını göstermişlerdir.²⁰⁵

Ara ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sıçanlarda kronik biliyer tıkanmanın neden olduğu testis hasarında Resveratrol'un koruyucu etkisi araştırılmıştır. Swiss albino sıçanların safra kanalları 28 gün süresince bağlanarak biliyer siroz oluşturulmuştur. Sıçanlar 3 gruba ayrılmıştır. Grup 1: Sham, Grup 2: Safra kanalı bağlanan grup, Grup3: Safra kanalı bağlanan+10mg/kg Resveratrol uygulanan grup. Çalışmanın sonucunda safra kanalı bağlanan sıçanlarda intraperitoneal olarak Resveratrol verilmesinin antioksidan düzeyini arttırdığı ve oksidatif testis hasarını azalttığı gösterilmiştir.²⁰⁶

Forgacs ve arkadaşları fare primer Leydig hücre kültürünün testosteron üretimine Resveratrol'un etkisini incelemişlerdir. Primer Leydig hücre kültürleri, 48 saat süresince 1,56-200 μ M konsantrasyonda Resveratrol' e etkin bırakılmıştır. Sonuçta 12,5-50 μ M Resveratrol' un testosteron üretimini arttırdığı belirlenmiştir.¹¹⁵

Başka bir çalışmada Juan ve arkadaşları yetişkin sıçanların testisleri ve spermatogenezis'e, *trans*-resveratrol'un etkisini incelemişlerdir. 24 adet Sprague Dawley sıçanı 2 gruba ayrılmıştır.1.Grup; Kontrol (karboksimetil selüloz), 2.Grup; 20mg/kg/gün resveratrol+10g/L karboksimetil selüloz olarak belirlenmiş ve deney 90 gün sürdürülmüştür. Çalışmanın sonucunda, fotokimyasal trans-resveratrolün yeni bir aktivitesi gösterilmiştir. Bu bileşiğin yetişkin sıçanlara günlük ağız yoluyla uygulanmasının hipotalamus-hipofiz gonadal aksisin uyarılması yoluyla, spermatogenezisi arttırdığı gözlenmiştir. Çalışma, resveratrol uygulamasının sağlıklı sıçanlarda gonadotropin salgılanmasını uyardığını

ve bu yolla spermiyumlardaki artışı gösteren ilk çalışma olması nedeniyle de önem taşımaktadır.²⁹

Bu çalışmada da artan dozlarda DBP'nin 20mg/kg Resveratrol uygulanmasında testiste koruyuculuğu incelenmiş, Juan ve arkadaşlarının çalışmaları ile uyumlu olarak seminifer epitel ve spermatogenezisde olumlu etki gösterdiği belirlenmiştir. Ancak bu etkisinin yüksek doz DBP uygulamasında tam yeterli olmadığı görülmüştür. Sonuç olarak yüksek doz DBP uygulanmasında Resveratrol dozunun artırılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Jiang ve arkadaşları, Resveratrol'ün koruyucu etkisinin olası mekanizmasını aydınlatmak için tasarladıkları araştırmalarında doğal toksinler 2,5-hekzanadiyon (2,5HD) tarafından zarar gören testiste, Resveratrol'ün koruyucu etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada 40 erkek SD sıçan rastgele 5 gruba ayrılmıştır. Grup A normal olarak yetiştirilmiştir ve Grup B, C, D ve E ilk 5 hafta süresince % 1'lik 2,5 HD 'ye etkin bırakılmış, sonraki 9 hafta süresince Grup C, D ve E' ye farklı dozlarda (sırasıyla 20, 40 ve 80 mg/ [kg x d]) Resveratrol uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda, 2,5-HD nedeni diszoosperminin ardından, Resveratrol'ün küçülmüş seminifer tubüllerin yeniden gelişimini destekleyebildiği, c-kit gen ekspresyonunun yeniden başlamasının ve c-kit proteinin yeniden görünmesine aracılık edebildiği gösterilmiştir. Resveratrol ile görülen bu etki, Resveratrol'ün artan dozda kullanımına bağlı olarak değerlendirilmiştir. Benzer şekilde Resveratrol'ün yalnızca hücresel düzeyde değil, ayrıca gen ve protein düzeylerinde de iyileştirici etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir.³⁰

Bizim çalışmamızda da DBP ile birlikte 20mg/kg Resveratrol uygulamasının c-kit ekspresyonunu arttırdığı gözlenmiştir.

Revel ve arkadaşları, Benzo(a)piren'e (Bap) etkin kalmanın sperm DNA'sında hasar ve apoptoza etkisi ile doğal aril hidrokarbon reseptör (AhR) antagonisti olan Resveratrol'un olası hasarlara koruyucu özelliğini değerlendirdikleri çalışmalarında 2 deney düzeneği oluşturmuşlardır. Öncelikle Bap'ın etkilerini gözlemleyebilmek ereğiyle Balb C fareleri 7 gruba ayrılmıştır ve 5 hafta boyunca değişik dozlarda (0, 0.5, 1, 3, 5, 10, 30 ve 50 mg/kg/hafta) Bap uygulamışlardır. 5. hafta sonunda, artan doza koşut Bap enjeksiyonunun apoptozu arttırdığı saptanmıştır. İkinci bir deney düzeneğinde 2 grup oluşturulmuştur. 1. Grup; mısır yağı+ Bap (5 mg/kg/hafta), 2. Grup; Bap + Resveratrol (50 mg/kg/hafta) olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda, farelerin Bap'a etkin kalmasının spermatogenezisde toksik bir etki oluşturduğu ve sperm yoğunluğunda azalmaya neden olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, Resveratrol'ün, üreme işlevinde, toksik maddenin etkilerinin önlenmesinde iyileştirici işlev gösterdiği, sperm DNA hasar ürünlerinin oluşumunu ve apoptozu önemli ölçüde azaltabildiği saptanmıştır.³¹

Uğuralp ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında, deneysel testis torsiyonu sonrası Resveratrol uygulamasının, testiküler üreme hücrelerinin apoptozu üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Sonuçta Resveratrol'ün testislerde üreme hücre apoptozunu azaltabileceği gösterilmiştir.⁴⁴

Bu çalışmada da DBP'nin neden olduğu olumsuz etkiye Resveratrol'ün koruyucu özelliği incelendiğinde, özellikle yüksek doz DBP uygulanan grupta Revel ve Uğuralp'in bulgularına koşut Resveratrol'ün apoptozisi azalttığı belirlendi. Ancak kaynak verilerinden ayrıcalık olarak bizim çalışmamızda Resveratrol'ün Leydig hücre apoptozisini de engellendiği gözlemlendi.

Shin ve arkadaşları trans-resveratrol'ün erkek üreme sistemi işlevlerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada ex vivo olarak penis ereksiyonu, in vivo olarak da sperm sayısı ve kalitesi incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda trans-resveratrol'ün kan testosteron düzeylerini, sperm sayılarını ve epididimal sperm hareketliliğini arttırmanın yanında, penis ereksiyonunu da tetikleyerek üreme işlevinde olumlu bir etkiye neden olduğu belirlenmiştir.¹⁷

Sonuç olarak DBP uygulamasının artan doza koşut seminifer tübüllerde atrofi, şekil bozukluğu, nekrotik alan oluşumu ve seminifer epitelde hücre kaynaşması şeklinde döngüsel ve hormonal değişikliklere neden olduğu, Resveratrol'ün ise döngüsel yönden koruyucu etki gösterebildiği, ancak tam yeterli olamadığı, hormonal olarak ise belirgin etkinliğinin bulunmadığı kanısına varıldı.

6.SONUÇ

Gençlikten erginliğe değin artan dozlarda DBP uygulamasında Resveratrol'ün testiste koruyucu etkisini değerlendirdiğimiz çalışmamızda, DBP uygulamasının artan doza koşut seminifer tübüllerde atrofi, şekil bozukluğu, nekrotik alan oluşumu ve seminifer epitelde hücre kaynaşması şeklinde yapısal dejenerasyonlara neden olduğu belirlendi.

Testiste hücre proliferasyonu, göçü ve farklanmasının önemli işaretleyicisi olan c-kit immünboyamalarında artan doza koşut DBP uygulamasının tutulumu azalttığı, Resveratrol'ün ise düşük doz DBP uygulamasında ekspresyonunu koruduğu, ancak yüksek dozlarda yetersiz kaldığı belirlendi. Bu bulgu, artan doza koşut DBP'nin c-kit yolağından hücre proliferasyon ve göçünü olumsuz etkileyerek, seminifer epitel boyunun kısalması ile sonuçlanan döngü bozukluğuna neden olabileceğini düşündürdü. Resveratrol uygulamasının ise düşük doz DBP uygulamasında döngüsel süreçte koruyucu etki gösterdiği, ancak yüksek doz uygulamada bozulan spermatogenezis ve spermiyogenezisi düzeltmede yetersiz kaldığı belirlendi.

Spermatogenezis ve spermiyogenezis sürecinde seminifer epitel ve özellikle Leydig hücrelerinde etkin bir stres işaretleyicisi olan AT1 immünreaksiyonunun da DBP uygulaması ile arttığı, Resveratrol ile kısmen geri döndüğü ancak Leydig hücre tutulumunun yüksek doz DBP ve Resveratrol uygulanan grupta halen korunduğu saptandı. Bu bulgu DBP'nin testosteron sentezini olumsuz etkilemiş olabileceği kanısını uyandırdı. Testosteron sentezinin bozulmasının ise spermatogenezisi olumsuz etkileyerek, seminifer epitel boyundaki kısalmadan ikincil olarak yükümlü olabileceğini düşündürdü. Resveratrol uygulamasının AT1 dağılımı açısından belirgin bir etkinlik gösteremediği saptandı.

Bir endokrin bozucu olan DBP' nin testis östrojen reseptör düzeyine etkisini incelediğimizde ise gruplar arasında çok anlamlı farklılıklar olmamakla birlikte, yüksek doz DBPnin östrojen reseptör düzeyini azalttığı, Resveratrol'ün ise endokrin koruyuculuk yönünden yeterli olamadığı kanısını uyandırdı.

TUNEL yöntemi ile testiste apoptotik hücre değerlendirilmesi yapıldığında, özellikle yüksek doz DBP'nin Leydig hücrelerini de içererek tüm hücre tiplerinde apoptozisi arttırdığı belirlenirken, apoptozisin seminifer epitelin özellikle kaynaşmakta olan hücrelerinde olduğu dikkati çekti. Bu bulgu, anormal hücre döngüsü sonucunda dokudaki hücre dengesini sağlayabilmek adına apoptozisin artmış olabileceği sonucunu uyandırdı. Resveratrol uygulamasının ise düşük doz DBP uygulamasında apoptotik süreçte koruyucu etki gösterdiği, ancak yüksek doz uygulamada apoptozisi engelleyemediği belirlendi.

Yapılan istatistiksel değerlendirmede de DBP verilen gruplarda epitel boyunun ve seminifer tübül çapının diğer gruplara karşı azaldığı, Resveratrol uygulanan gruplarda ise bu azalmanın geri döndürüldüğü görüldü.

Sonuç olarak DBP uygulamasının artan doza koşut testiste olaylandırdığı döngüsel ve hormonal değişikliklere, Resveratrol'ün döngüsel yönden koruyucu etki gösterebildiği, ancak tam yeterli olamadığı, hormonal olarak ise belirgin etkinliğinin bulunmadığı kanısına varıldı.

7.ÖZET

Bu çalışmada, bir endokrin bozucu olan Di-n-bütil fitalat'ın (DBP) testiste oluşturabileceği hasarda antioksidan olarak yeğlenen Resveratrol'ün olası koruyucu etkilerinin immünohistokimyasal yöntemlerle incelenmesi amaçlandı.

Çalışmada 20 günlük 36 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Her grupta 6 denek olacak şekilde 6 grup oluşturuldu. I. Grup: Kontrol, II. Grup: Çözücü (Karboksimetilselüloz,CMC 10 ml/kg), III.Grup : 500 mg/kg/gün DBP , IV.Grup : 500 mg/kg/gün DBP+20 mg/kg/gün Resveratrol, V. Grup: 1000 mg/kg/gün DBP, VI. Grup: 1000 mg/kg/gün DBP+20 mg/kg/gün Resveratrol. Süre sonunda alınan testis dokuları alışılmış ışık mikroskop izlem yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı. Bloklardan alınan kesitlere proliferasyon belirlemek amacıyla c-kit, seminifer epitel ve özellikle Leydig hücrelerinin stres derecesini gözlemleyebilmek ereğiyle AT1, etkileşimin hormonal düzeyle olup olmadığını belirlemek ereğiyle östrojen reseptör α antikorları ile indirekt immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. Apoptozisi simgelemek için ise TUNEL yöntemi kullanıldı. Her gruptan 6 denekte, 6 alanda spermatogenik epitel boyu ölçülerek Shapiro Wilk testi, Bonferroni Düzeltmeli Kruskal Wallis testi ve Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi ile istatistiksel değerlendirme yapıldı.

C-kit immun boyamasında 500mg/kg ve 1000 mg/kg DBP uygulanan gruplarda, artan DBP dozuna koşut, tutulumun kontrol ve CMC uygulanan sham kontrol gruplarına karşın azaldığı, 500mg/kg DBP+Resveratrol uygulanan grupta reaktivitenin kontrol grubuna benzer olduğu izlenmiştir.1000 mg/kg DBP+Resveratrol verilen grupta da Resveratrol'ün tam yeterli olamadığı saptandı.

AT1 tutulumunun 500 mg/kg ve 1000 mg/kg DBP uygulanan gruplarda arttığı, Resveratrol uygulanan gruplarda da bu olumsuz etkinin kısmen geri döndüğü ancak Leydig hücre tutulumunun yüksek doz DBP ve Resveratrol uygulanan grupta halen korunduğu belirlendi.

DBP' nin testis östrojen reseptör düzeyine etkisini incelendiğinde, gruplar arasında çok anlamlı farklılıklar olmamakla birlikte, yüksek doz DBP' nin östrojen reseptör düzeyini azalttığı, Resveratrol'ün ise endokrin koruyuculuk yönünden yeterli olamadığı izlendi.

TUNEL yöntemi ile yapılan incelemelerde, özellikle yüksek doz DBP' nin tüm hücre tiplerinde apoptozisi arttırdığı belirlenmiştir. Resveratrol uygulamasının ise düşük doz DBP uygulamasında apoptotik süreçte koruyucu etki gösterdiği, ancak yüksek doz uygulamada apoptozisi tam olarak engelleyemediği saptandı.

Yapılan istatistiksel değerlendirmede de DBP verilen gruplarda epitel boyunun ve seminifer tübül çapının diğer gruplara karşın azaldığı, Resveratrol uygulanan gruplarda ise bu azalmanın geri döndürüldüğü görüldü.

Sonuç olarak DBP uygulamasının artan doza koşut testiste olaylandırdığı döngüsel ve hormonal değişikliklere, Resveratrol'ün döngüsel yönden koruyucu etki gösterebildiği, ancak tam yeterli olamadığı, hormonal olarak ise belirgin etkinliğinin bulunmadığı kanısına varıldı.

8.SUMMARY

In this study it was aimed to observe the possible protective effects of Resveratrol which is preferable as a antioxidant against the damage of an endocrine disruptor di n butyl phthalate on testicles with the help of immunohistochemical methods.

36 male albino Wistar rats, which are 20 days old are used. They divided into 6 separate groups. Each group has 6 experimental subjects. I. Group: Control, II. Group: Solvent (Carboxymethyl cellulose, CMC 10 ml/kg), III. Group : 500 mg/kg/day DBP , IV. Group : 500 mg/kg/day DBP+20 mg/kg/day Resveratrol , V. Group: 1000 mg/kg/day DBP, VI. Group : 1000 mg/kg/day +20 mg/kg/day Resveratrol. At the end of this time, after gathered testicle tissues were observed with light microscope paraffin blocks were prepared. C-kit was used on sections that are taken blocks to observe proliferation, AT1 used in order to observe the stress rate of seminiferous epithel especially Leydig cells and immunohistochemical staining with estrogen receptor α anticor used to observe whether interaction was at hormonal level or not. TUNEL method to sembolize apoptosis, was used. Spermatogenetic epithel length are measured at 6 area for 6 experimental subjects per group. Shapiro Wilk Test, Kruskal Wallis Test with Bonferroni correction and Mann Whitney U Test with Bonferroni correction are used.

In c-kit immune staining, at groups that are treated with 500mg/kg and 1000 mg/kg DBP, depending on increasing DBP dose, the involvements decrease extremely in contrast to control and CMC applied sham control groups. On the other hand, at 500mg/kg DBP+Resveratrol applied groups conversely to other groups, involvements are similar to control group. At 1000 mg/kg DBP+Resveratrol applied group, it was observed that Resvaratrol was not enough.

The rise of the involvement of AT1 at 500 mg/kg and 1000 mg/kg DBP treated groups; at Resveratrol applied groups partial return of the negative effect was observed; but involvement of Leydig cells at high dose of DBP and Resveratrol treated groups was still preserved.

When effect of DBP on testicles and estrogen receptor level are examined, although significant differences between groups are not seen, it is observed that high doses of DBP decrease estrogen level and it is also observed that Resveratrol is not enough in endocrine protection ability.

Observation made with the TUNEL method, it was determined that especially high-dose of DBP increased apoptosis in all cell types. Resveratrol application in the apoptotic process, it showed that the protective effect with low-dose DBP but not prevention apoptosis with high-dose application.

Also the statistical evaluation indicated that, in contrast to other groups, at DBP treated groups, epithelium height and diameter of seminiferous tubules decreased but this reduction were returned back at Resveratrol applied group.

As a result, these lead us to conclusion that the increasing application of DBP dose negatively affects the cell cycle of the testicular structure parallelly, and Resveratrol can show cyclic protective effect against hormonal and cyclic changes but this is not fully adequate and there is no hormonal effects.

9. KAYNAKLAR

- 1.** Çetinkaya S. Endokrin çevre bozucular ve ergenlik üzerine etkileri. Dicle Tıp Dergisi 2009; 36 (1) : 59-66,
- 2.** Kavlock R, Daston G, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, et al. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the US EPA-sponsored workshop. Environmental health perspectives 1996; 104(Suppl 4): 715.
- 3.** Disruptors E, et al. Endokrin Bozucular. Journal of Current Pediatrics 2008; 6: 76-82.
- 4.** Petersen J, Breindahl T, et al. Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. Food Additives & Contaminants: Part A 2000; 17(2): 133-141.
- 5.** Graham P, et al. Phthalate ester plasticizers--why and how they are used. Environmental health perspectives 1973; 3: 3.
- 6.** Hauser R, Calafat A, et al. Phthalates and human health. Occupational and environmental medicine 2005; 62(11): 806.
- 7.** Koo H, Lee B, et al. Estimated exposure to phthalates in cosmetics and risk assessment. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 2004; 67(23): 1901-1914.
- 8.** Mylchreest E, Wallace D, Cattley RC, Foster P, et al. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di (n-butyl) phthalate during late gestation. Toxicological Sciences 2000; 55(1): 143.
- 9.** Mikula P, Svobodova Z, Smutna M, et al. Phthalates: Toxicology and Food Safety-a Review. Czech J. Food Sci. Vol 23(6): 217-223.
- 10.** Adibi J, Perera F, Jedrychowski W, Camann DE, Barr D, Jacek R, Whyatt RM, et al. Prenatal exposures to phthalates among women in New York City and Krakow, Poland. Environmental health perspectives 2003; 111(14): 1719-1723.
- 11.** Rozati R, Reddy P, Reddanna P, Mujtaba R, et al. Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. Fertility and sterility 2002; 78(6): 1187-1194.

- 12.** <http://www.epa.gov/iris/subst/0038.htm>
- 13.** Ayaz A, Yurttagül M, et al. BESİNLERDEKİ TOKSİK ÖĞELER-II. 2008
- 14.** Ema M, et al. Antiandrogenic effects of dibutyl phthalate and its metabolite, monobutyl phthalate, in rats. *Congenital anomalies* 2002; 42(4): 297-308.
- 15.** Makato E, Emiko M, Kunio K, et al. Effects of dibutyl phthalate on reproductive function in pregnant and pseudopregnant rats. National Institute of Health Science, Japan. 1999; June.
- 16.** NTP-CERHR, 2003c. Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-n-butyl phthalate (DBP). NIH Publ No. 03-4486.
- 17.** Shin S, Jeon J, Park D, Jang MJ, Choi JH, Choi BH, Joo SS, Nahm SS, Kim JC, Kim YB, et al. Trans-resveratrol relaxes the corpus cavernosum ex vivo and enhances testosterone levels and sperm quality in vivo. *Archives of Pharmacal Research* 2008; 31(1): 83-87.
- 18.** Higuchi T, Palmer J, Gray Jr LE, Veeramachaneni DN, et al. Effects of dibutyl phthalate in male rabbits following in utero, adolescent, or postpubertal exposure. *Toxicological Sciences* 2003; 72(2): 301.
- 19.** Lehmann K, Phillips S, Sar M, Foster P, Gaido KW, et al. Dose-dependent alterations in gene expression and testosterone synthesis in the fetal testes of male rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Toxicological Sciences* 2004; 81(1): 60.
- 20.** Mylchreest E, Cattley RC, Foster P, et al. Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di (n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicological Sciences Soc Toxicology* 1998; 43: 1-47
- 21.** Kimura Y, Okuda H, Arichi S, et al. Effects of stilbene derivatives on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochimica et biophysica acta* 1985; 837(2): 209.
- 22.** Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CWW, Fong HHS, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275(5297): 218.

- 23.** Mgbonyebi O, Russo J, Russo IH, et al. Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells. *International journal of oncology* 1998; 12(4): 865.
- 24.** Pace-Asciak C, Rounova O, Hahn SE, Diamandis EP, Goldberg DM, et al. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy human subjects. *Clinica chimica acta* 1996; 246(1-2): 163-182.
- 25.** Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ, et al. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res.* 2000 Aug 18;47(3):549-55.
- 26.** Filip V, Plockova M, et al. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chemistry* 2003; 83(4): 585-593.
- 27.** Aggarwal B, Shishodia S, et al. Resveratrol in health and disease, CRC Press. (2005).
- 28.** Jiang Y, Peng T, Luo Y, Li MC, Lin YH, et al. Resveratrol helps restore spermatogenesis after testis injury induced by 2, 5-hexanedione. *Zhonghua nan ke xue= National journal of andrology* 2007; 13(7): 592.
- 29.** Juan M, Gonzalez-Pons E, Munuera T, Ballester J, Rodriguez-Gil JE, et al. trans-Resveratrol, a natural antioxidant from grapes, increases sperm output in healthy rats. *Journal of Nutrition* 2005; 135(4): 757.
- 30.** JIANG Yong-guang, PENG Tao, LUO Yong, LI Ming-chuan, LIN Yun-hua, et al. Resveratrol reestablishes spermatogenesis after testicular injury in rats caused by 2,5-hexanedione. *Chin Med J* 2008;121(13):1204-1209
- 31.** Revel A, Raanani H, Younglai E, Xu J, Han R, Savouret JF, Casper RF, et al. Resveratrol, a natural aryl hydrocarbon receptor antagonist, protects sperm from DNA damage and apoptosis caused by benzo(a)pyrene. *Reproductive Toxicology* 2001; 15: 479–486
- 32.** Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çev.), 6. Basım, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.
- 33.** Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji. Başaklar A.C. (Çev.), 9. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2005.

- 34.** Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R (Çev.), Ankara, Palme Yayıncılık, 2006
- 35.** Akdeniz E. Testiste Spermatogenik Hücrelerde $\beta 1$ İntegrinler ve Fibronektin Dağılımı. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi ; 2004.
- 36.** Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology A Text and Atlas with Cell and Molecular Biology. 4. Basım. Baltimore, Philadelphia, 2003.
- 37.** Take G. Genital Sistem Embriyolojisi Ders Notu. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı; 2009.
- 38.** Eroschenko VP. Di Fiore Histoloji Atlası. Demir R. (Çev.). 10.Baskı. Palme Yayıncılık, 2008.
- 39.** Ensari E. Gebelikte Olaylanan Deneyisel Hipokside Ginkgo Biloba' nın Testis Dokusunda Olası Etkisinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2010.
- 40.** Hatipoğlu MT, Hatipoğlu HG. Yüksekokullar Anatomi Ders Kitabı. Ankara: Selvi Yayınevi; 2006.
- 41.** Leonhardt H, Kahle W, Platzer W. Anatomi Atlası Karın ve İç Organlar. Kazancıgil A, Atay T, (Çev.), Cilt 2, 4. Basım, İstanbul, Arkadaş Tıp Kitapları, 1986.
- 42.** Snell RS. Klinik Anatomi. Yıldırım M (Çev.) . 6.Baskı. İstanbul. Nobel Kitabevi. 2004.
- 43.** Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook Of Histology. 3. Basım, Philadelphia: WB Saunders Company; 2007.
- 44.** Uguralp S, Usta U, Mizrak B, et al. Resveratrol may reduce apoptosis of rat testicular germ cells after experimental testicular torsion. European journal of pediatric surgery 2005; 15(5): 333.
- 45.** Netter FH, Ovalle WK, Nahirney PC. Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çev.), Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri, 2009.
- 46.** Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. Özel Histoloji. 2.Basım, Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2007.
- 47.** Erdoğan D, Hatipoğlu MT, Görgün M, Ilgaz C. Genel Histoloji. 3.Basım, Ankara: Hatiboğlu Yayınevi; 2008.

48. Akay MT. Genel Histoloji. 5. Baskı. Ankara:Palme Yayınevi; 2001.
49. Junqueira LC, Carneiro J, Kelly RO. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S. (Çev.). 10.Baskı. İstanbul. Nobel Kitabevi 2006.
50. Ilgaz C. Genital Sistem Histolojisi Ders Notu. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı; 2009.
51. Akay MT . Sitoloji. 2. Basım. Ankara: 1998.
52. Costanzo LS. Fizyoloji. Özgünen KT, Özgünen T (Çev.). 3. Basım. Ankara. Güneş Kitabevi, 2003.
53. Bozdoğan Ö. Fizyoloji. 2. Basım. Ankara; Palme Yayıncılık. 2004.
54. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H, Çağlayan Yeğen B (Çev.). 11.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2007
55. Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji.15. Basım, Ankara: 2005.
56. Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. Türk Fizyoloji Bilimler Derneği (Çev).20.Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi, 2002.
57. Safe S, et al. Endocrine disruptors and human health: is there a problem. Toxicology 2004; 205(1-2): 3-10
58. Kohn MC, Parham F, Masten SA, Portier CJ, Shelby MD, Brock JW, Needham LL, et al. Human exposure estimates for phthalates. *Environmental Health Perspectives*. 2000; 108: A440-A442
- 59.http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/bkh_report.pdf
60. Liu P, Tseng F, et al. Comparative suppression of phthalate monoesters and phthalate diesters on calcium signalling coupled to nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of Toxicological Sciences* 2009; 34(3): 255-263.
61. Dickson-Spillmann M, Siegrist M, Keller C, Wormuth M, et al. Phthalate Exposure Through Food and Consumers' Risk Perception of Chemicals in Food. *Risk Analysis* 2009; 29(8): 1170-1181.

62. Pan G, Hanaoka T, Yoshimura M, Zhang S, Wang P, Tsukino H, Inoue K, Nakazawa H, Tsugane S, Takahashi K, et al. Decreased serum free testosterone in workers exposed to high levels of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP): a cross-sectional study in China. *Environmental health perspectives* 2006; 114 (11): 1643.

63. Duty S, Ackerman R, Calafat AM, Hauser R, et al. Personal care product use predicts urinary concentrations of some phthalate monoesters. *Environmental health perspectives* 2005; 113(11): 1530.

64. Foster PMD, Cattley RC, Mylchreest E, et al. Effects of Di-n-butyl Phthalate (DBP) on Male Reproductive Development in the Rat: Implications for Human Risk Assessment. *Food and Chemical Toxicology* 2000; 38: 97-99

65. Erkekoğlu ÜP. Selenyum Eksikliği Olan Ve Selenyum Suplementasyonu Yapılan Sıçanlarda Di-2-(Etilhekzil)Ftalat'ın Reprodüktif Toksisitesinin Değerlendirilmesi. Doktora Tezi. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2009.

66. Hauser R, Meeker J, Duty S, Silva MJ, Calafat AM, et al. Altered Semen Quality in Relation to Urinary Concentrations of Phthalate Monoester and Oxidative Metabolites. *Epidemiology* 2006;17(6): 682-691.

67. NTP (National Toxicology Program). (2000). NTP-CERHR Expert Panel Report on Di(2-ethylhexyl) phthalate. NTP-CERHR-00. U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction Ekim 2000. İnternet Adresi: <http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/dehp/DEHP-final.pdf>.

68. NTP (National Toxicology Program). (2003). NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Butyl Benzyl Phthalate (BBP). NIH Pub. 03-4487. U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. Mart 2003. İnternet Adresi: http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/phthalates/bbp/BBP_Monograph_Final.pdf.

69. NTP (National Toxicology Program).2003d.NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di-n-Butyl Phthalate (DBP). NIH Pub. 03-4486. U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. İnternetAdresi:http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/phthalates/dbp/DBP_Monograph_Final.pdf.

70. NTP (National Toxicology Program). 2003c. NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Di-isononyl Phthalate (DINP). NIH Pub. 03-4484. U.S. Department of Health and Human Services, National Toxicology Program, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction. Mart2003. İnternetAdresi:http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/phthalates/dinp/DiNP_Monograph_Final.pdf.

71. Mylchreest E, Sar M, Wallace DG, Foster P, et al. Fetal testosterone insufficiency and abnormal proliferation of Leydig cells and gonocytes in rats exposed to di (n-butyl) phthalate. *Reproductive Toxicology* 2002; 16(1): 19-28.

72. Ema M, Miyawaki E, Kawashima K, et al. Critical period for adverse effects on development of reproductive system in male offspring of rats given di-n-butyl phthalate during late pregnancy. *Toxicology letters* 2000; 111(3): 271-278.

73. Shultz VD, Phillips S, Sar M, Foster PM, Gaido KW, et al. Altered gene profiles in fötal rat testes after in utero exposure to di(n-butyl) phthalate.

74. Fisher J, Macpherson S, Marchetti N, Sharpe RM, et al. Human'testicular dysgenesis syndrome: a possible model using in-utero exposure of the rat to dibutyl phthalate. *Human Reproduction* 2003; 18(7): 1383.

75. Wilson V, Lambright C, Furr J, Ostby J, Wood C, Held G, Gray LE, et al. Phthalate ester-induced gubernacular lesions are associated with reduced insl3 gene expression in the fetal rat testis. *Toxicology letters* 2004; 146(3): 207-215.

76. Kim H, Kim T Shin JH, Moon HJ, Kang IH, Kim IY, Oh JY, Han SY, et al. Neonatal exposure to di (n-butyl) phthalate (DBP) alters male reproductive-tract development. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 2004; 67(23): 2045-2060.

77. Zhang Y, Jiang X, Chen B, et al. Reproductive and developmental toxicity in F1 Sprague-Dawley male rats exposed to di-n-butyl phthalate in utero and during lactation and determination of its NOAEL. *Reproductive Toxicology* 2004;18(5): 669-676.

78. Mahood I, Hallmark N, et al. Abnormal Leydig cell aggregation in the fetal testis of rats exposed to di (n-butyl) phthalate and its possible role in testicular dysgenesis." *Endocrinology* 2005; 146(2): 613.

79. Cantos E, Garcia-Viguera C, de Pascual-Teresa S, Tomas-Barberan FA, et al. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of Cv. Napoleon table grapes. *J. Agric. Food Chem* 2000; 48(10): 4606-4612.

80. Fremont L, et al. Minireview - Biological effects of resveratrol. *Life Sci.* 2000; 66(8): 663-673.

81. Gerogiannaki-Christopoulou M, Athanasopoulos P, Kyriakidis N, Gerogiannaki AI, Spanos M, et al. trans-Resveratrol in wines from the major Greek red and white grape varieties *Food Control* 2006; 17 (9): 700-706,

82. Serazetdinova L, Oldach K, Lörz H, et al. Expression of transgenic stilbene synthases in wheat causes the accumulation of unknown stilbene derivatives with antifungal activity. *Journal of plant physiology* 2005; 162(9): 985-1002

83. Goldberg DM, Tsang E, Karumanchiri A, Diamandis E, Soleas G, Ng E, et al. Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal Chem.* 1996; 68 (10) : 1688-94.

84. Burkitt MJ, Duncan J, et al. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys.* 2000; 381(2) : 253-63.

85. Langcake P, Pryce RJ, et al. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the vitaceae as a response to infection or injury, *Physiol. Plant Pathol* 1976; 9:77-86.

86. Arichi H, Kimura Y, Okuda H, Baba K, Kozawa M, Arichi S, et al. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. *Chem. Pharm. Bull.* 1982; 30:1766-1770.

87. Soleas, G, Diamandis E, Goldberg DM, et al. Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry* 1997; 30(2): 91-113.

88. Siemann E, Creasy L, et al. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 1992; 43(1): 49.

- 89.** Sobolev V, Cole R, et al. trans-Resveratrol content in commercial peanuts and peanut products. *J. Agric. Food Chem* 1999; 47(4): 1435-1439.
- 90.** Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM, et al. Wine as a Biological Fluid : History , Production and Role in Disease Prevention. *J. Clin. Lab. Anal.* 1997; 11: 287-313.
- 91.** Renaud S, de Lorgeril M, et al. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 1992; 339(8808): 1523-1526.
- 92.** İkizler M, Dernek S, Erkasap N, Kaygısız Z, Sevin B, Kural T, et al. The Hemodynamic Efficacy of Resveratrol on Reperfüzyon Injury in Isolated Rat Hearts. 2003; 11: 91-9
- 93.** Stanley LL, Mazier MJP, et al. Potential explanations for the French Paradox. *Nutrition Research* 1998; 19: 3-15.
- 94.** Kopp P, et al. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the French paradox? *Eur J Endocrinol.* 1998 Jun;138(6):619-20.
- 95.** Sun A, Simonyi A, Sun GY, et al. The French paradox and beyond: neuroprotective effects of polyphenols1, 2. *Free Radical Biology and Medicine* 2002; 32(4): 314-318.
- 96.** Fraga C, et al. *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition and Pharmacology.* Wiley (2009).
- 97.** Furchgott R, et al. Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circulation Research* 1983; 53(5): 557.
- 98.** Leikert J, Räthel T, Wohlfart P, Cheynier V, Vollmar AM, Dirsch VM, et al. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002; 106(13): 1614.
- 99.** Söylemez H. Sigara Dumanına Maruz Bırakılmış Sıçanlarda Resveratrolün Testis Dokusundaki Antioksidan Etkisinin Araştırılması Uzmanlık Tezi. Malatya:İnönü Üniversitesi ; 2006.
- 100.** Hung L, Su M, Chu WK, Chiao CW, Chan WF, Chen JK, et al. The protective effect of resveratrols on ischaemia-reperfusion injuries of rat hearts is correlated with antioxidant efficacy. *British journal of pharmacology* 2002; 135(7): 1627-1633.

- 101.** Fauconneau B, Waffo-Teguo P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, Merillon JM, et al. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life sciences* 1997; 61 (21): 2103-2110.
- 102.** Sun A, Chen Y, James-Kracke M, Wixom P, Cheng Y, et al. Ethanol-induced cell death by lipid peroxidation in PC12 cells. *Neurochemical research* 1997; 22(10): 1187-1192.
- 103.** Levi F, Pasche C, Lucchini F, Ghidoni R, Ferraroni M, La Vecchia C, et al. Resveratrol and breast cancer risk. *European Journal of Cancer Prevention* 2005; 14(2):139.
- 104.** Gehm B, McAndrews J, Chien PY, Jameson JL, et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997; 94(25): 14138.
- 105.** Mgbonyebi O, Russo J, Russo IH, et al. Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells. *International journal of oncology* 1998; 12(4): 865.
- 106.** Surh Y, Hurh Y, Kang JY, Lee E, Kong G, Lee SJ, et al. Resveratrol, an antioxidant present in red wine, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells. *Cancer letters* 1999; 140(1-2): 1-10.
- 107.** Aggarwal B, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y, et al. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer research* 2004; 24(5A): 2783.
- 108.** Sexton É, Van Themsche C, Leblanc K, Parent S, Lemoine P, Asselin E, et al. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. *Molecular Cancer* 2006; 5(1): 45.
- 109.** Dann J, Sykes P, Mason DR, Evans JJ, et al. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor in endometrial tumour cells by resveratrol and EGCG. *Gynecologic oncology* 2009; 113(3): 374-378.
- 110.** Falchetti R, Fuggetta MP, Lanzilli G, Tricarico M, Ravagnan G, et al. Effects of resveratrol on human immune cell function. *Life Sci.* 2001 Nov 21;70(1):81-96.

- 111.** Gao X, Xu Y, Janakiraman N, Chapman RA, et al. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. *Biochemical pharmacology* 2001; 62(9): 1299-1308.
- 112.** Marier J, Chen K, Prince P, Scott G, del Castillo JRE, Vachon P, et al. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , interleukin-1, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2005; 69(2): 151.
- 113.** Bertelli A, Giovannini L, Stradi R, Bertelli A, Tillement JP, et al. Plasma, urine and tissue levels of trans-and cis-resveratrol (3, 4', 5-trihydroxystilbene) after short-term or prolonged administration of red wine to rats. *International journal of tissue reactions* 1996; 18(2-3): 67.
- 114.** Bowers J, Tyulmenkov V, Jernigan SC, Klinge CM, et al. Resveratrol acts as a mixed agonist/ antagonist for estrogen receptors { α } and { β }. *Endocrinology* 2000; 141(10): 3657.
- 115.** Forgacs Zs, Somosy Z, Telbisz A, Massanyi P, Lukac N, et al. Effect of resveratrol on the testosterone production of mouse primary leydig cell culture. 2004
- 116.** Henry L, Witt D, et al. Resveratrol: phytoestrogen effects on reproductive physiology and behavior in female rats. *Hormones and behavior* 2002; 41(2): 220-228.
- 117.** Matsumura A, Ghosh A, Pope GS, Darbre PD, et al. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2005; 94(5): 431-443
- 118.** Zou J, Huang Y, Chen Q, Wei EH, Hsieh T, Wu JM, et al. Resveratrol inhibits copper ion-induced and azo compound-initiated oxidative modification of human low density lipoprotein. *IUBMB Life* 1999; 47(6): 1089-1096.
- 119.** Dobrydneva Y, Williams R, Blackmore PF, et al. trans-Resveratrol inhibits calcium influx in thrombin-stimulated human platelets. *British journal of pharmacology* 1999; 128(1): 149-157.
- 120.** Bertelli AA, Giovannini L, Bernini W, Migliori M, Fregoni M, Bavaresco L, Bertelli A, et al. Antiplatelet activity of cis-resveratrol. *Drugs Exp Clin Res.* 1996; 22(2):61-3.

121. Khanna S, Roy S, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK, et al. Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radical Biology and Medicine* 2001; 31(1): 38-42.

122. Igura K, Ohta T, Kuroda Y, Kaji K, et al. Resveratrol and quercetin inhibit angiogenesis in vitro. *Cancer letters* 2001; 171(1): 11-16.

123. Cao Y, Cao R, Bråkenhielm E, et al. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 2002; 13(7): 380-390.

124. Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E, et al. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *Journal of Nutrition* 2003; 133(3): 700.

125. Docherty J, Fu M, Hah JM, Sweet TJ, Faith SA, Booth T, et al. Effect of resveratrol on herpes simplex virus vaginal infection in the mouse. *Antiviral research* 2005; 67(3): 155-162.

126. Docherty J, Fu M, Stiffler BS, Limperos RJ, Pokabla CM, DeLucia AL, et al. Resveratrol inhibition of herpes simplex virus replication. *Antiviral research* 1999; 43(3): 135-145.

127. Mahady G, Pendland S, et al. Resveratrol inhibits the growth of *Helicobacter pylori* in vitro. *The American Journal of Gastroenterology* 2000; 95(7): 1849.

128. Mahady G, Pendland S, Chadwick LR, et al. Resveratrol and red wine extracts inhibit the growth of CagA+ strains of *Helicobacter pylori* in vitro. *The American Journal of Gastroenterology* 2003; 98(6): 1440.

129. Tegos G, Stermitz F, Lomovskaya O, Lewis K, et al. Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2002; 46(10): 3133.

130. Docherty J, Fu M, Tsai M, et al. Resveratrol selectively inhibits *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 47(2): 243.

131. Baur J, Pearson K, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, Lewis K, et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006; 444(7117): 337-342

132. Cheong H, Ryu S, Kim KM, et al. Anti-allergic action of resveratrol and related hydroxystilbenes. *Planta Med* 1999; 65(3): 266-268.

133. Keskin N, Noyan T, Kunter B, et al. Resveratrol ile Üzümden Gelen Sağlık. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2009; 29(5): 1273-1279.

134. Chaplin M. CMC chemical structure and properties [internette].2009 [13 Ekim 2010 okundu]. Available from: URL: <http://www.lsbu.ac.uk/water/hycmc.html>

135. Chichester CO. *Advances in Food Research*.12. Basım. New York: Academic Press Inc. 1963.

136. Imeson A. *Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents*. 1. Basım. Oxford: Wiley- Blackwell; 2009

137. Adinugraha M, Marseno D, et al. Synthesis and characterization of sodium carboxymethylcellulose from cavendish banana pseudo stem (*Musa cavendishii* LAMBERT). *Carbohydrate Polymers* 2005; 62(2): 164-169.

138. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Meeting, World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Compendium of Food Additive Specifications: Addendum 10 (FAO Food and Nutrition Paper)Roma: FAO; 2002.

139. Ash I, Ash M, editörler. *Handbook of Fillers, Extenders, and Diluents*. 2. Basım. Endicott (NY): Synapse Information Resources Inc. ; 2007.

140. Baker C.Methylcellulose&Sodium Carboxymethylcellulose: Uses in Paper Conservation[internete]. 2009 [13 Ekim 2010 okundu]. Available from: URL: <http://cool.conservation-us.org/coolaic/sg/bpg/annual/v01/bp01-04.html>

141. Zecher D, Gerrish T. *Thickening and gelling agents for food*. 2. Basım. New York. Aspen Publication; 1997.

142. Belitz HD, Grosch W, Schieberle P.*Food Chemistry*. 4. Basım. Berlin: Springer; 2009.

143. Toğrul H, Arslan N, et al. Production of carboxymethyl cellulose from sugar beet pulp cellulose and rheological behaviour of carboxymethyl cellulose. *Carbohydrate Polymers* 2003; 54(1): 73-82.

144. Heydarzadeh HD, Najafpour GD, Nazari-Moghaddam AA, et al. Catalyst-Free Conversion of Alkali Cellulose to Fine Carboxymethyl Cellulose at Mild Conditions. *World Applied Sciences Journal* 2009; 6 (4): 564-569.

145. Niculae Olaru LO, Aurel Stoleriu DT, et al. Carboxymethylcellulose synthesis in organic media containing ethanol and/or acetone. *Journal of Applied Polymer Science* 1998; 67(3): 481-486.

146. Buch JG. Clinically Oriented Pharmacology. [internette]. 2010 [13 Ekim 2010 okundu]. Available from: URL: <http://www.books.google.com>

147. He X, Wu S, et al. Preparation of sodium carboxymethyl cellulose from paper sludge. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 2009; 84(3): 427-434.

148. Fijan R, Basile M, Sostar-Turk S, Zagar E, Zigon M, Lapasin R, et al. A study of rheological and molecular weight properties of recycled polysaccharides used as thickeners in textile printing. *Carbohydrate Polymers* 2009; 76(1): 8-16.

149. Marco FW. Laundry detergent containing cellulose acetate anti-redeposition agent. S.C. Patent. 4, 235, 735, 1980.

150. Clarke C. The science of ice cream. 1. Basım. Cambridge: The Royal Society of Chemistry; 2004.

151. Ashman L, et al. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *The international journal of biochemistry & cell biology* 1999; 31(10): 1037-1051

152. Smithey B, Pappo A, Hill DA, et al. C-kit expression in pediatric solid tumors: a comparative immunohistochemical study. *The American journal of surgical pathology* 2002; 26(4): 486.

153. Gibson P, Cooper K, et al. CD117 (KIT): a diverse protein with selective applications in surgical pathology. *Advances in Anatomic Pathology* 2002; 9(1): 65.

154. Tan P, Jayabaskar T, Yip G, Tan Y, Hilmy M, Selvarajan S, Bay BH, et al. p53 and c-kit (CD117) protein expression as prognostic indicators in breast phyllodes tumors: a tissue microarray study. *Modern pathology* 2005; 18(12): 1527-1534.

- 155.** Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M, et al. Stem cell factor/c-kit system in spermatogenesis. *Human Reproduction Update* 1999; 5(5): 535.
- 156.** Öktem G, Altay A, et al. Erkek genital sisteminde kök hücre ve kök hücrenin kaynakları.
- 157.** Parlakpınar H, Yanılmaz M, Ağlamış S, Acet A, et al. Kardiyovasküler Sistem ve Anjiyotensin II Tip 2 Reseptörü (AT2). *Journal of Inonu University Medical Faculty* 2010; 11(1): 49.
- 158.** Leung P, Chan H, Wong PYD, et al. Immunohistochemical localization of angiotensin II in the mouse pancreas. *The Histochemical Journal* 1998; 30(1): 21-25.
- 159.** De Gasparo M, Catt K, Inagami T, Wright JW, Unger TH, et al. International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacological reviews* (2000). 52(3): 415.
- 160.** Kaschina E, Unger T, et al. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. *Blood pressure* 2003; 12(2): 70-88.
- 161.** Duncan J, Scholey J, Miller JA, et al. Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in humans: physiology and pathophysiology of the genotypes. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 2001; 10(1): 111.
- 162.** Douglas G, O'Bryan M, Hedger MP, Lee DKL, Yarski MA, Smith AI, Lew RA, et al. The novel angiotensin-converting enzyme (ACE) homolog, ACE2, is selectively expressed by adult Leydig cells of the testis. *Endocrinology* 2004; 145(10): 4703.
- 163.** O'Mahony O, Djahanbakhch O, Mahmood T, Puddefoot JR, Vinson GP, et al. Angiotensin II in human seminal fluid. *Human Reproduction* 2000; 15(6): 1345.
- 164.** Ozono R, Wang Z, Moore AF, Inagami T, Siragy HM, Carey RM, et al. Expression of the subtype 2 angiotensin (AT2) receptor protein in rat kidney. *Hypertension* 1997; 30(5): 1238.
- 165.** Enmark E, Gustafsson JA et al. Oestrogen receptors - an overview. *J Intern Med.* 1999; 246(2):133-8.
- 166.** Dubey RK, Jackson EK, Keller PJ, Imthurn B, Rosselli M. Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptorindependent mechanism. *Hypertension* 2001;37:640-4.

- 167.** Olefsky JM, et al. Nuclear receptor mini review series. *J Biol Chem* 2001; 276: 36863-36864.
- 168.** Gruber CJ, Wieser F, Gruber IM, Ferlitsch K, Gruber DM, Huber JC. Current concepts in aesthetic endocrinology. *Gynecol Endocrinol* 2002;16(6):431-41.
- 169.** Atasu T, Tahmay S. Jinekoloji. Birinci Baskı. İstanbul: Universal Bilimsel Yayınları,1996.
- 170.** Couse JF, Bunch DO, Lindzey J, Schomberg DW, Korach KS, et al. Prevention of the polycystic ovarian phenotype and characterization of ovulatory capacity in the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Endocrinology*. 1999;140(12):5855-65.
- 171.** Babiker FA, De Windt LJ, Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doenemdans PA, et al. Estrogenic Hormone Action in The Heart: Regulatory Network and Function, *Cardiovasc. Res* 2002; 53:709–719.
- 172.** Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagerkrantz S, Lagerkrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 4258-4265.
- 173.** Pelletier G, El-Alfy M, et al. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 4835-4840.
- 174.** Pearce ST, Jordan CV, et al. The biological role of estrogen receptors alpha and beta in cancer. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 2004; 50: 3-22.
- 175.** Cowley SM, Parker MG, et al. A comparison of transcriptional activation by ER α and ER β . *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 69: 165–175.
- 176.** Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Wärrä A, Weihua Z, et al. Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002; 9: 1–13.
- 177.** Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson J et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 1997; 138: 863.

- 178.** Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA, et al. Estrogen receptor β acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 2000; 19: 4970-4978.
- 179.** O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER, et al. Estrogen and spermatogenesis. *Endoc Reviews*. 2001; 22(3):289-318.
- 180.** Korach KS, et al. Insights from the study of animals lacking functional estrogen
- 181.** Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR, et al. Expression of estrogen receptor β (ER β) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry. *J Endocrinol*. 1997; 154: 13-16.
- 182.** Hess RA, et al. Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. *Rev Reprod*. 2000; 5:84-92.
- 183.** Kerr J, Wyllie A, Currie AR, et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 1972; 26(4): 239.
- 184.** Altunkaynak BZ, Özbek E, et al. Programlanmış Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir? *Tıp Araştırmaları Dergisi* 2008;6(2):93-104.
- 185.** Majno G, Joris I, et al. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology* 1995; 146(1): 3.
- 186.** Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, et al. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 1999; 99(21): 2757.
- 187.** Deng X, Wang Y, Chou J, Cadet JL, et al. Methamphetamine causes widespread apoptosis in the mouse brain: evidence from using an improved TUNEL histochemical method. *Molecular Brain Research* 2001; 93(1): 64-69.
- 188.** de Torres C, Munell F, Ferrer I, Reventós J, Macaya A, et al. Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Neuroscience letters* 1997; 230(1): 1-4.
- 189.** Stales C, Peterson D, Parkerton TF, Adams WJ, et al. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere* 1997; 35(4): 667-749.

- 190.** Kondo T, Shono T, Suita S. Age-specific effect of phthalate ester on testicular development in rats. *Journal of Pediatric Surgery* 2006; 41: 1290– 1293
- 191.** Gray Jr L, Ostby J, Furr J, Price M, Veeramachaneni DN, Parks L, et al. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicological Sciences* 2000; 58(2): 350.
- 192.** Calafat AM, McKee RH, et al. Integrating biomonitoring exposure data into the risk assessment process: phthalates [diethyl phthalate and di(2- ethylhexyl) phthalate] as a case study. *Environmental Health Perspectives* 2006;114: 1783-1789.
- 193.** Martino-Andrade A, Morais R, Botelho GGK, Muller G, Grande SW, Carpentieri GB, Leão GMC, Dalsenter PR, et al. Coadministration of active phthalates results in disruption of foetal testicular function in rats. *International journal of andrology* 2009; 32(6): 704-712.
- 194.** Shirota M, Saito Y, Imai K, Horiuchi S, Yoshimura S, Sato M, Nagao T, Ono H, Katoh M, et al. Influence of di-(2-ethylhexyl)phthalate on fötal testicular development by oral administration to pregnant rats. *Journal of Toxicological Sciences* 2005; 30: 175-194.
- 195.** Duty SM, Calafat AM, Silva MJ, Ryan L, Hauser R, et al. Phthalate exposure and reproductive hormones in adult men. *Human Reproduction* 2005; 20: 604-610.
- 196.** Gray T, Butterworth K, Gaunt IF, Grasso P, Gangolli SD, et al. Short-term toxicity study of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Food and cosmetics toxicology* 1977; 15(5): 389-399
- 197.** Swan S, et al. Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environmental research* 2008; 108(2): 177-184.
- 198.** Phillips K, Tanphaichitr N, et al. Human exposure to endocrine disrupters and semen quality. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 2008; 11(3): 188-220.
- 199.** Zhang W, Shen H, Ma L, Shen B, Xu Z, Wang X, et al. Differential expression of peroxiredoxin 6 in fetal rat testis following in utero exposure to di (nbutyl) phthalate. *Toxicology* 2007; 240(1-2): 86-95.

200. Kleymenova E, Swanson C, Boekelheide K, Gaido KW, et al. Exposure in utero to di (n-butyl) phthalate alters the vimentin cytoskeleton of fetal rat Sertoli cells and disrupts Sertoli cell-gonocyte contact. *Biology of reproduction Soc Study Reprod* 2005; 73: 3-82

201. Ferrara D, Hallmark N, Scott H, Brown R, McKinnell C, Mahood IK, Sharpe RM, et al. Acute and long-term effects of in utero exposure of rats to di (n-butyl) phthalate on testicular germ cell development and proliferation. *Endocrinology* 2006; 147(11): 5352.

202. de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Mamele N, Monjaud I, Touboul P, Delaye J, et al. Effect of a Mediterranean type of diet on the rate of cardiovascular complications in patients with coronary artery disease insights into the cardioprotective effect of certain nutriment. *Journal of the American College of Cardiology* 1996; 28(5): 1103-1108.

203. Turkmen D, Yurtcu E, Ergun MA, Menevse A, et al. The Apoptotic Effect Of Resveratrol On Human Epidermoid Larynx Carcinoma Cell Line Hep-2. *Gazi Medical Journal* 2007; 18(3): 117.

204. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, Gharbi N, Kamoun A, El-Fazaa S, et al. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol and Alcoholism* 2006; 41(3): 236.

205. Eybl V, Kotyzova D, Koutensky J, et al. Comparative study of natural antioxidants-curcumin, resveratrol and melatonin-in cadmium-induced oxidative damage in mice. *Toxicology* 2006; 225(2-3): 150-156.

206. Ara C, Yılmaz M, Sağır V, Kırımlıoğlu H, Karabulut AB, Yılmaz S, et al. Kolestaz Sonrası Testiste Oluşan Oksidatif Strese Karşı Resveratrolün Etkisi. *C.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi* 2007; 29 (3): 84-89

207. Blount BC, Silva MJ, Caudill SP, Needham LL, Pirkle JL, Sampson EJ, Lucier GW, Jackson RJ, Brock JW, et al. Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108: 979-982

10.EKLER



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

22.12.2009

SAYI : B.30.2.GÜN.0.05.06.00/138-17602
KONU:

Sayın

Doç.Dr.Gülnur TAKE
Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi

G.Ü.ET-09.069 kod numaralı ve *“Di-n-bütıl fitalat’ın (DBP) kadın ve erkek üreme sistemi organlarına etkisi ve Resveratrol’un olası koruyucu özelliğinin yapısal olarak incelenmesi”* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-09.069 and entitled *“The effects of Di-n-bütıl fitalat (DBP) in male and female reproductive system organs and the possible protective effects of Resveratrol: Microscopic Study”* is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.


Prof.Dr.Gökhan ALPASLAN
Gazi Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanı

Ek1: Etik kurul raporu

11. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimlerini paylaşarak, bana ayaklarımı yere sağlam basmayı öğreten kıymetli hocam Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Deniz Erdoğan başta olmak üzere, yüksek lisansa başladığım günden bu yana her günü kaliteli ve keyifle geçirmemi sağlayan, her zaman ve her konuda desteğini hissettiğim, danışmanım olmasından ömür boyu mutluluk duyacağım, anlayış ve sabır timsali sevgili Tez Danışmanım Sayın Doç. Dr. Gülnur Take Kaplanoğlu' na, ilerlememde katkıları olan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Tahir Hatipoğlu'na, Sayın Prof. Dr. Celal Ilgaz'a ve Sayın Prof. Dr. Suna Ömeroğlu'na, hiç ummadığım anda karşıma çıkıp tekrar hayat bulmamda bana ışık olan ve yoluma devam etmeyi bana hatırlatan Sayın Doç. Dr. Çiğdem Elmas' a; tezimin deney ve yazım aşamasında desteğini ve yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Güleser GÖKTAŞ' a, Arş. Gör. Gülce Naz YAZICI SARAÇ' a ve Uzm. Dr. Fatma HELVACIOĞLU' na; kendisine gıptayla baktığım benim sevgili rol modelim Anabilim Dalı personelimiz Şemsi ÖZTÜRK' e; benden daha umutsuz bir vaka olsada, tanımaktan ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım ortağım Erhan' a; çok renkli ve farklı yönleriyle beni hep şaşırtan ve iyi ki tanımışım dediğim sevgili dönem arkadaşlarıma;

Yılların bana iyiki de getirdiği ancak bir türlü götüremediği fahri kız kardeşim Anıktar' a; bazen zorla, bazende keyifle yanımda olup beni yalnız bırakmayan DBP'nin açılımını 3 ayda ezberleyen sevgili kuzenim İsmail'e, daha fazla okumanın kimseye bir zarar vermeyeceğini bilen ve bana hep destek olan sevgili "okursever" ailelerime;

Bu zorlu yolda iyi günde de kötü günde de her daim yanımda olan, tezimi kendi tezi gibi kabullenip bu yaştan sonra okula gönderip beni

KARDELEN yapan, yanında olmaktan hep huzur ve mutluluk duyduğum sevgili sponsorum, sevgilim, eşim, çekirdek ailemin ilk üyesine sonsuz teşekkürlerimi sunarım... Hep yanımda olmanız dileğiyle...

12. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında İskenderun'da doğdum. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2004 yılında mezun oldum. İlaç sektörü, işletme ve öğretmenlik gibi çeşitli sektörlerde belirli dönemlerde çalıştıktan sonra, 2008 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.