

**T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**“ALKOLİK RAT TESTİSLERİNDEKİ APOPTOZİS’İN  
KONTROL GRUBUYLA KARŞILAŞTIRILMASI”**

**ARŞ.GÖR. YALIN BAMAÇ**

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM ARAŞTIRMA  
BÜKÜMANTASYON MERKEZİ**

138103

**Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Yüksek Lisans programı için öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak hazırlanmıştır.**

**KOCAELİ  
2003**

**T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**“ALKOLİK RAT TESTİSLERİNDEKİ APOPTOZİS’İN  
KONTROL GRUBUYLA KARŞILAŞTIRILMASI”**

**ARŞ.GÖR. YALIN BAMAÇ**

**Danışman: Prof.Dr.AYDIN ÖZBEK**

**Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin Anatomi  
Yüksek Lisans programı için öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
Olarak hazırlanmıştır.**

**KOCAELİ  
2003**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne**

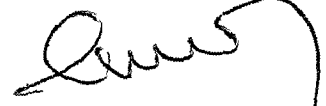
İşbu çalışma , jürimiz tarafından Anatomi Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof.Dr.Aydın ÖZBEK

Üye Doç.Dr.Cengiz ERÇİN

Üye Yrd.Doç.Dr.Tuncay ÇOLAK

**İMZA**



**ONAY:**

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

1.0.19.2003



Prof.Dr.Nejat GACAR  
Enstitü Müdürü  
Mühür

## ÖZET :

Çalışmamızın esas amacı uzun süreli alkol kullanımının erkek gonadlarında meydana getireceği doku zararın araştırılmasıydı. Bu nedenle alkolik rat testisi dokularındaki apoptozisi , kontrol gruptaki testis apoptozisi ile karşılaştırmaya karar verdik.

Çalışmamızda apoptozisin incelenmesi için deney hayvanı olarak Sprague-Dawley ırkı ratlar kullanıldı. Her birinde 10 adet ergin erkek rat bulunan alkolik grup ve kontrol grubu olacak şekilde iki temel deney grubu meydana getirdik . Her iki gruptaki denekler kontrollü sıcaklık (  $22 \pm 3 \text{ C}^\circ$  ) nisbi nem (  $62 \pm 7\%$  ) ve aydınlatma ( günde 12 saat karanlık ve 12 saat aydınlık) olacak şekilde yetiştirildi. Alkolik gruptaki ratlar 12 hafta boyunca etanolü sıvı diyetiyle beslenirken , kontrol grubundakiler de normal izokalorik diyetle beslendi. 12 haftalık sürenin ardından , etanol uygulanmış ratların kan-etanol seviyeleri enzimatik biyokimyasal metodlarla test edildi ve bu deneklerin başarıyla kronik alkolik hale getirildikleri görüldü. Her iki gruba ait testis dokuları , % 10 'luk formaldehit çözeltisinin sol ventrikülden perfüze edilmesiyle fikse edildi ve çıkarıldı. Dokular en az iki gün formaldehit solüsyonunda bekletildi.

Ethanolle dehidre edilmelerinin ardından parafine gömüldü ve immunositokimyasal çalışma için seri parafin kesitler alındı (  $5 \mu$  kalınlıkta) . Apoptotik alanları teşhis etmek için Caspase-3 Ab-4 ( CPP32) antikoru kullanıldı. Daha sonra boyalı kesitler gözlendi ve apoptotik seminifer tubüller fotoğraflandı. Kontrol ve alkolik grup arasında bir karşılaştırmaya gidebilmek için ışık mikroskopunda x400 büyütmede apoptotik hücreler sayıldı. Daha sonra seminifer tubül çaplarını karşılaştırmak için seminifer tubül çapları mikrometrelilikte ışık mikroskopuyla ölçüldü. Bulgular istatistiksel yöntemlerle değerlendirildi ve iki grup arasında yapılan apoptozise yönelik karşılaştırmada , alkolik rat grubunda diğer gruba nazaran belirgin bir apoptotik artış olduğunu gösteren anlamlı farklar bulundu ( $p < 0,05$ ).

Görüldü ki etanol uygulanmış ratlarda , alkole bağlı olarak apoptozis'de bir indüklenme söz konusuydu . Bu bulgular da testisteki doku hasarının alkole de bağlı olabileceğini ispatlamak için yeterliydi.



## SUMMARY :

The aim of our study is to investigate the tissue injury of male gonads , depending on the long-term alcohol usage. On this account , we decided to compare the apoptosis in testis tissues of alcoholic rats with the control group.

For this study Sprague-Dawley rats have used as subject material in investigation of apoptosis.

We composed two main groups ; alcoholic rats and the control group including 10 adult male rats in each. The subjects in each group were housed under controlled temperature (  $22 \pm 3 \text{ C}^\circ$  ) and humidity (  $62 \pm 7\%$  ) and lighting ( 12 h darkness and 12 h lightness a day ). The rats in alcoholic group were fed ethanol in liquid diet for 12 weeks while the control ones were fed normal isocaloric diet. Hence , the blood-ethanol levels of the ethanol-threatened rats were tested in enzymatic biochemical methods and its seen that these subjects had become chronic alcoholic successfully.

The testis tissues of both group were fixed by perfusion of % 10 formaldehyde through left ventricle and taken out after that. These tissues were further fixed in formaldehyde solution for at least 2 days. After dehydration by ethanol they were embedded in paraffin and serial paraffin sections (  $5 \mu$  thickness ) were used for immunohistochemistry. Caspase-3 Ab-4 ( CPP32 ) antibody was used to identify the caspase reaction in apoptotic regions. Hence , the stained sections were sighted and the apoptotic seminifer tubules were photographed. For the comparison of apoptosis between the alcoholic group and the control one , apoptotic germ cells were counted in x 400 magnification in light microscope. And then another analyse was made to identify the diameter of seminifer tubules (ST) . The diameters of ST were measured with the use of light microscope with micrometre. The findings had compared in each other and found significant differences in apoptosis between each group (  $p < 0,01$  ) . Its seen that apoptosis was significantly induced in ETR related to the overuse of ethanol . These findings were sufficient to prove the tissue injury of testis may depend on alcohol usage.

## **TESEKKÜR**

Akademik eğitimim süresince beni yetiştiren ve yardımlarını hiç esirgemeyen değerli hocalarım Prof.Dr.Aydın ÖZBEK , Yrd.Doç.Dr. Tuncay ÇOLAK ve Yrd.Doç.Dr..Belgin BAMAÇ'a , immunositokimyasal boyama ve görüntüleme aşamasında ilgi ve desteğini esirgemeyen Doç Dr.. Cengiz ERÇİN ve Emel ÖZDEN'e , kan-ethanol tetkiklerinin yapılmasında gösterdiği ilgi ve destekten ötürü Yrd.Doç.Dr.Can DUMAN'a , istatistiksel verilerin değerlendirilmesindeki yardımlarından ötürü Serap ÇOLAK'a ve çalışmalatım süresince gösterdikleri destek ve anlayıştan ötürü çalışma arkadaşlarım Yük.Lisans Öğr. Saadet ÖZDEMİR , Arş.Gör.Bariş ÖZTÜRK ve Dok.Öğr.Sabri MEDİŞOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım

# İÇİNDEKİLER

<b>1-GİRİŞ VE AMAC</b>	<b>SAYFA: 1-4</b>
------------------------	-----------------------

<b>2-GENEL BİLGİLER:</b>	<b>5-41</b>
--------------------------	-------------

2.1 : Testislerin Embriyolojik gelişimi	5
2.1.1 : FARKLANMAMIŞ GONAD	5
2.1.2 : TESTİS	6
2.1.3 : GENİTAL KANALLARIN EMBRİYOLOJİSİ	7
2.1.3.1. Farklanmamış evre	7
2.1.3.2. Kanal sisteminin farklılaşması	7
2.1.3.3 Erkek genital kanallar	8
2.1.4. TESTİS'LERİN İNİŞİ	8
2.2. Testislerin mikroskopik yapısı	12
2.2.1. SEMİNİFER TUBÜLLER	12
2.2.1.1 Spermatojenik seri hücreleri	13
2.2.1.2. Sertoli Hücreleri	13
2.2.1.2.1. Sertoli hücrelerinin fonksiyonları.	14
2.2.2. İNTERSTİSYEL DOKU	15
2.2.3. TESTİS'İN KANAL SİSTEMİ VE LOBÜLER YAPISI	15
2.2.4. MEDİASTİNUM TESTİS (CORPUS HIGMORI)	17
2.2.5. KAN – TESTİS BARIYERİ	17
2.3. Testislerin makroskopik yapısı	19
2.3.1 TESTİS'İN TABAKALARI	20
2.3.1.1. Tunica vaginalis testis	20
2.3.1.2. Lamina visceralis (epiorchium)	21
2.3.1.3. Lamina parietalis ( periorchium )	21
2.3.1.4. Tunica albuginea	22

2.3.1.5. Tunica vasculosa	22
2.3.2. TESTİS ' İN ARTERYEL KANLANMASI	22
2.3.3. TESTİS'İN VENÖZ DRENAJ	23
2.3.4. TESTİS'İN LENFATİK DRENAJ	23
2.3.5. TESTİS'İN OTONOM İNNERVASYONU	24
2.4. Testislerin fonksiyonu ve spermatogenesis	26
2.4.1. SPERMATOGENEZİS	26
2.4.1.1. Mayoz	27
2.4.1.2. Mayoz sonrası sperm gelişimi	28
2.4.1.3. Spermin oluşumu	28
2.4.1.4. Spermatogenezi uyaran hormonal faktörler	29
2.4.2. HORMON SEKRESYONU	29
2.4.2.1. Testesteron metabolizması	30
2.4.2.2. Testesteronun fonksiyonları	31
2.4.2.3. Fetal gelişim sürecinde testesteron üretimi	31
2.4.2.4. Testesteronun testisin immesindeki etkisi	32
2.4.2.5. Testesteronun primer ve sekonder seks karakterlerinin gelişimine etkisi	32
2.5. Apoptozis nedir ?	36
2.5.1. MORFOLOJİ	37
2.5.2. PATOJENEZ	38
2.5.3. APOPTOZİS TİPLERİ	39
2.5.3.1. Embriyonal	39
2.5.3.2. Postnatal yaşamda apoptozis	39
2.5.3.2.1. Normal koşullarda apoptozis	39
2.5.3.2.2. Patolojik koşullarda apoptozis	40

### **3-MATERYAL VE METOD: 42-54**

3.1. Hayvanların yetiştirilme aşaması	42
---------------------------------------	----

3.2. Kandaki ethanol miktarının saptanması aşaması	43
3.3. Perfüzyon ve dokuların tespit edilme aşaması	44
3.4. Dokuların preparat haline getirilmesi aşaması	47
3.5. İmmunositokimyasal boyama aşaması	48
3.6. Preparatların incelenmesi , değerlendirilmesi ve fotoğraflanması aşaması	51

**4-BULGULAR :** **55-58**

**5-TARTIŞMA :** **59-67**

**6-SONUÇLAR :** **68**

**7-KAYNAKLAR :** **69-71**

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil 1 :** Gelişimin 8.haftasında testisten geçen transver kesit (A).Testis ve genital kanalın 4.aydaki görünümü (B).

**Şekil 2 :** Gelişimin 6. haftasında (A) erkek ve (B) dişi genital kanallarının şematik çizimi.

**Şekil 3 :** Gelişimin 4. ayında erkek genital kanalları (A) .

Genital kanalların testisin inişinden sonraki şekli (B)

**Şekil 4 :** Testisin aşağı inişinin şematik görünümü . Yaklaşık 2. ayda (A) , 3. ayın ortasında (B) , 7.ayda (C) ve doğumdan hemen sonra (D).

**Şekil 5 :** Testisin seminifer tubülleri ve intestisyumun gösteren histolojik bir kesit.

**Şekil 6 :** Sertoli hücrelerinin bazal laminayla ilişkisini , miyoid hücreleri ve interstisyel hücreleri gösteren şematik şekli.

**Şekil 7 :** Testisin lobüler yapısını ve seminifer tubüllerin Rete testis'e açılışını gösteren şematik çizim.

**Şekil 8 :** Testisleri skrotum içinde , funiculus spermaticus vasıtasıyla asılı haldeki durumunun şematik çizimi.

**Şekil 9 :** Testisin scrotum içindeki elektroforetik yöntemlerle görüntülenmiş fotoğrafı.

**Şekil 10 :** Funiculus spermaticus içindeki yapıları gösteren şematik çizim.

**Şekil 11:** Spermatogenez'deki bölünme evreleri .

**Şekil 12:** Çeşitli yaşlardaki testesteron sekresyonunu yaklaşık değerleri

**Şekil 13 :** Hücrenin , apoptozis ve nekrozda uğradığı morfolojik değişimleri gösteren şematik çizim

## **RESİMLER DİZİNİ**

**Resim 1 :** Alkolik gruba ait 1 No'lu preparatın x 400 büyütmede çekilmiş fotoğrafı.

**Resim 2:** Kontrol grubuna ait 8 No'lu preparatın x 400 büyütmedeki fotoğrafı.

**Resim 3 :** Kontrol grubuna ait 5 No'lu preparatın x 200 büyütmede çekilmiş fotoğrafı.

**Resim 4 :** Alkolik rat grubuna ait 10 No'lu preparatın x 200 büyütmedeki fotoğrafı.

**Resim 5 :** Alkolik rat grubuna ait 2 No'lu preparatın x 400 büyütmedeki fotoğrafı

## **TABLolar DİZİNİ**

**Tablo 1 :** Alkolik ve kontrol grubu ratlardaki apoptotik hücre sayıları. ( Değerler preparat başına 1000 hücre sayımı sonucunda gözlenen apoptotik hücre adedini vermektedir.)

**Tablo 2:** Alkolik gruba ait preparatlarda yapılan random örnekleme ile seçilen seminifer tubül (ST) çaplarını mikrometre ( $\mu\text{m.}$ ) biriminden gösteren tablo.

**Tablo 3:** Kontrol grubu ratlara ait preparatlarda yapılan random örnekleme ile seçilen seminifer tubül (ST) çaplarını mikrometre ( $\mu\text{m.}$ ) biriminden gösteren tablo.

**Tablo 4 :** Kontrol ve alkolik gruplara ait ratların seminifer tubül (ST) çaplarının ortalamasını mikrometre ( $\mu\text{m.}$ ) biriminden gösteren tablo ortalamaları

**Tablo 5 :** Kontrol ve alkolik gruplara ait ortalama apoptotik germ hücresi sayılarını veren tablo. (değerler preparat başına 1000 hücrenin sayımı sonunda elde edilen ortalama değerdir.)

**Tablo 6 :** Alkolik ve kontrol ratların karşılaştırmalı apoptotik hücre sayılarına ve seminifer tubül çaplarına göre p değerlerini , Mann-Whitney U değerlerini ve Wilcoxon W değerlerini gösteren tablo.



## **GRAFİKLER DİZİNİ**

**Grafik 1** : Alkolik ve kontrol grubu ratlar için ortalama seminifer tubül (ST) çaplarını , mikrometre biriminden gösteren grafik.

**Grafik 2** : Alkolik ve kontrol grubuna ait ortalama apoptotik hücre yüzdelerini (%) gösteren grafik.



# 1. GİRİŞ VE AMAÇ:

Alkolün tarihi neredeyse insanlık tarihi kadar eskidir. İnsanlığın yerleşik hayata geçmesiyle alkol üretimi de başlamıştır. İlk bira bundan 8 bin yıl önce Mezopotamyalıların arpayı ekmek yapmak için ilk ıslah etmesiyle yapılmıştır. Sümerlerin 6 bin yıl önce Godin Tepelerinde (Batı İran ve Anadolu) bira ve şarap içtiği bilinmektedir. Daha sonra fermente edilmiş meyve, tahıl ve baldan alkol ederek alkolü, iyice hayatına sokmuştur insanoğlu. Alkol kimi zaman kutsal sayılıp, dini törenlerde kullanılmış, kimi zaman eğlencenin ayrılmaz bir olmuştur. Alkolün icat edilmesiyle birlikte, alkol alışkanlığı da ortaya çıkmıştır. (<http://www.alkol.gen.tr/tarihce.html>)

Alkolizm terimi, ilk defa İsveçli hekim Magnus Huss tarafından, "Alcoholismus Chronicus" (1849) isimli makalede kullanılmıştır. Bu makalenin ardından, kronik alkolizm tıbbi bir terim haline gelmiş ve bir hastalık olarak kabul edilmeye başlanmıştır. Alkolizm, bir kişinin devamlı ve kendisine zarar verecek ölçülerde alkollü içecek almasıyla oluşur. (<http://www.alkol.gen.tr>)

Alkol , içeceklerde etil alkol formunda bulunur ve bu madde meyve ve tahıllardaki karbonhidratların fermentasyonu sonucu ortaya çıkar.Çoğunluğu oniki parmak bağırsağından olmak üzere , mide ve bağırsak mukozasından hiçbir değişikliğe uğramadan emilir.Çok hızlı bir şekilde kana karışır ve dokulara yayılır.Mide boş , içkideki alkol oranı % 10 –20 ise (şarap gibi ) çok çabuk emilir ve etkisi gösterir.Alınan alkolün % 90 – 98 ‘ i karaciğerde metabolize olur.Geri kalanı solunum , idrar ve terle değişmeden atılır.Bir dizi katalitik enzimin etkisiyle önce asetaldehit'e , sonra asetik aside ve daha sonra da su ve karbondioksit'e dönüşür.70 kg. ağırlığındaki bir kişi görünür bir belirti vermeden 10cc. alkolü okside edebilir ancak daha fazla miktarlarda alınır , alkol dokularda birikir , proteinleri denatüre etmeye başlar ve hasar oluştur. (<http://lokman.cu.edu.tr/psychiatry/alkol.htm>)

Son yıllarda alkolizm hızla yayılmaktadır.Kişilerde yaptığı ağır ruhsal ve bedensel hastalıklar yanında kişiler arası ilişkini bozulmasında , aile içi sorunların artmasında , toplumsal sefalet ve önemli ekonomik kayıplarda , yasal sorun ve intihar olaylarının büyük çoğunluğunda , trafik ve iş kazalarında , alkol en başta gelen bir sorumlu durumundadır.

Kronik alkolik bir birey ; alkolden kesilme sendromuna bağlı psikomotor ve psikotik belirtiler ( bağ ağrısı , terleme , iştahsızlık , kusma , kalp çarpıntısı , gste sıkışma , gece korkuları , panik durumu , kırıcı ve saldırgan tavırlar vs.) , alkol hallsinasyonları (- ki bazen bu varsanılar , kişiyi intahara kadar sürükleyebilir) , polinevrik psikozlar , Wernicke hastalığı denen bilinç bulanıklığı ve anlama güçlüğü sendromu , alkol bunaması , alkol paranoyası gibi pek çok zorlukla da başa çıkmak zorundadır. ( Orhan ztrk , 1983)

Arkus senilis: gzn kornea tabakasında yağ halkası , acne rosecea , kırmızı burun , palmar eritem: avuç içinde kırmızılık , asteriksis: elde flapping tremor (büyük amplitdl titreme) , sigara yanıkları: parmak, göğüs vb. , morarıklıklar (düşme ve çarpmalara bağlı) , hepatomegali (karaciğer büyümesi), karın ağrısı , spider anjioma , periferik nöropati (el ve ayaklarda his kusurları, uyuşma vb.) , kan tetkiklerinde anormallikler: GGT, MCV, AST, ALT, rik asit, trigliseritler, üre yükselmesi vb . alkolün neden olduğu klinik fiziksel zararlardan sadece birkaçıdır. (<http://www.alkol.gen.tr/zararlari/bulgular.html>)

Bunların yanında alkol , deride -çabuk buharlaşmasına bağlı olarak- ısı kaybı yaratır , deriyi gerer ve tahriş eder.Kan alkol düzeyi 15 mg/dl üzerine çıkınca mide ve bağırsakları uyarır , mide salgısını arttırır , 100-120 mg/dl' a erişince bulantı ve kusmaya neden olur.Uzun vadede ise mide barsak mukozasında kalıcı hasarlar bırakır.Az miktarlarda çevresel ince kan damarlarını genişletir.Yüzde ve boyunda kızarma olur.Kan alkol düzeyi yükselirse kan basıncı dşer , sok benzeri bir tablo görülür.ADH (antidiüretik hormon) salınımını azaltarak idrar miktarını arttırır.Buna bağlı olarak sıvı ve elektrolit dengesi bozulabilir.Alkol karaciğerde okside olduğundan , karaciğer üzerine doğrudan toksik etkisi olduğu düşünülebilir.Alkoliklerde karaciğer sirozunun meydana gelme olasılığı , alkolik olmayan bireylere nazaran altı kat daha fazladır . Alkol , bireyde protein ve vitamin metabolizmasını da etkileyerek , protein ve vitamin eksikliğine yol açar.Merkezi sinir sistemi üzerine olan etkisi ise depresyon yaratmak üzerinedir.Bu etki anestezik ve narkotiklerinkine benzer.Belli bir seviyenin altında alkol denetimi azalır ve bir canlılık görülür.Aşında bu durum alkolün uyarıcı etkisinden değil , inhibe eden st

merkezlerin (cortex) inhibisyonu sonucudur.Kan alkol düzeyi yükselirse alt merkezler üzerine de baskı yaparak uyanıklılık durumu azalır ; sonunda koma , şok ve ölüm olabilir. ( <http://www.alkol.gen.tr> )

Alkol kullanan herkes alkolik değildir.Ne var ki bu kişiler , alkolik olmaya her zaman bir açık kapı bırakırlar.Alkolün pek çok metabolik bozukluğa yol açmasının yanında , davranış ve duygular üzerine olan etkiler daha çeşitlidir.Kandaki alkol düzeyi % 0,5 iken kişide bir rahatlama meydana getirir.Gevşetici etkisinin yanında alkol karaciğer tarafından şeker yapısında bir maddeye dönüştürülerek beden hücrelerinin gıdası olarak da kullanılabilir.Ancak besleyici diğer maddelerin bulunmadığı durumlarda bu durum aldatıcı bir beslenme demektir.

( Doğan Cüceloğlu , 1996)

Tüm bu görüşlerle birlikte Dünya sağlık teşkilat ( WHO ) , alkolizm ve alkolikler hakkında şu 3 maddelik görüşü ortaya koymuştur :

- 1- Alkolizm bir toplumsal hastalıktır ; Alkolik , hastalıklı bir kişidir.
- 2- Alkolizme iten sebepler , psikolojik ve sosyaldır.Her kişi ve her toplum için kendine hastır.
- 3- Ortaya koyduğu hastalık tabloları birbirinden çok farklıdır.Bu sebeple tedavi ve mücadele yaklaşımlarında tıbbi ve sosyal tedbirler birlikte alınmalıdır.

(Adnan Ziyalar ,1999)

Kısaca toplumsal hayata , kişinin sosyal yaşamına ve bedenine verdiği zararların yanında alkol , kişinin cinsel fonksiyonlarını ne şekilde etkilemekteydi. Yaptığımız literatür taramalarında alkolün genital sisteme olan etkisinin diğer dokulara nazaran daha az inceleme alanı bulduğunu gördük.Erkeklerin kadınlara göre alkolizm oranının çok daha yüksek olmasından yola çıkarak ( alkolizmin erkek/kadın cinsiyetleri arasındaki oranı ABD’de 6/1 , İngiltere’de 8/1 , Türkiye’de ise 11,5 / 1 olarak tespit edilmiştir ( <http://lokman.cu.edu.tr/psychiatry/alkol.htm>.) ) çalışmamızı , alkolün , erkeklerin primer cinsiyet organları olan testisler üzerine olan etkisini incelemek üzere yaptık. Bu etkiyi incelerken de dokulardaki programlanmış hücre ölümü olarak da bilinen apoptozis’in testis dokularında alkole bağlı olarak ne şekilde süregeldiğini görmeyi amaçladık.Çünkü normal koşullarda süregelen apoptozis’in ,

toksik etkenlere bağlı olarak indüklediği literatürlerce doğrulanmış bir gerçektir ve eğer alkol de toksik dozda uzun süre kullanılırsa benzer bir apoptotik değişim meydana gelecektir.

Bu beklentimizi doğrulama için deney hayvanı olarak ratları kullanmayı uygun gördük.Çünkü rat üreme sisteminin , insan üreme sistemini çok iyi taklit ettiğini ve bu alandaki çalışmalar için ratların iyi modeller olduğunu ( Mary Ann E., 2001) biliyorduk.

Bu şekilde çalışmamız ; kronik alkolik ratlara ait testis dokusundaki apoptozis'in , normal ratların testis dokusundaki apoptozis ile karşılaştırılması olarak belirlendi.



## 2. GENEL BİLGİLER :

### 2.1. Testislerin Embriyolojik gelişimi :

Emriyonun cinsiyeti genetik açıdan daha fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen , gelişimin daha 7. haftasına kadar erkek veya dişi morfolojik özelliklerine sahip değildirler.Gonadlar, başlangıçta bir çift uzunlamasına, kölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş genital veya gonadal kabarıklık halinde belirirler.Gelişimin 6.haftasına kadar genital kabarıklıklar içinde germ hücreleri mevcut değildir.

Primordiyal germ hücreleri , insan embriyosunda gelişimin erken evrelerinde , yolk kesesinin allantois'e yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler.Ameboid hareketlerle , son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6. haftada da genital kabarıklıkları işgal ederler.Kabarıklıklara ulaşamadıkları takdirde , gonadlar gelişemez. Gonadların over veya testise farklılaşmasında , primordiyal germ hücrelerinin indükleyici bir etkisi vardır.

(Sadler T.W. , 1995)

#### 2.1.1. FARKLANMAMIŞ GONAD :

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce veya ulaşması sırasında , genital kabarıklığın kölomik epiteli proliferer olur ve epitel hücreleri altındaki mezenşimin içine girerler.Bunlar burada primitif cinsiyet kordonları denilen irregüler şekilli kordonları oluştururlar.Hem erkek hem de dişi embriyolarında bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadların birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir.İşte bu devredeki gonad , farklanmamış gonad olarak bilinir. (Sadler T.W. , 1995)

## 2.1.2. TESTİS

:

Eğer embriyo genetik olarak erkek ise , primordiyal germ hücreleri XY cinsiyet kromozom kompleksini taşırlar.Testis belirleyici faktörü (TBF) kodlayan Y kromozomunun etkisiyle , primitif cinsiyet kordonları çoğalmaya devam ederler ve testis veya medullar kordonları oluşturmak üzere , medulla iç kesimlerine doğru ilerler.(Şekil 1-A)

Kordonlar , bezin hilusuna doğru , daha sonra rete testis tubüllerini oluşturacak , ince hücre sıralarından ibaret bir ağ şekline dönüşürler.

Gelişimin daha ileri evrelerinde , testis kordonları yüzeyel epiteliyle olan ilişkilerini kaybederler.Daha sonra , testisin karakteristik özelliği olan tunica albuginea adlı yoğun bir fibröz bağdokusuyla epitelden ayrılmış olurlar.

Dördüncü ayda , testis kordonları atnalı şeklini alır ve bu atnalının uçları rete testis ile devam eder (Şekil 1-B) . Bu durumda artık testis kordonları , primitif germ hücreleri ve bezin yüzeyel epitelinden köken almış Sertoli destek hücrelerinden meydana gelmiştir.

İntestisyel leydig hücreleri , gonadal kabarıklığın orjinal mezenşiminden köken alır.Testis kordlarının arasında bulunurlar ve bu kordların farklılanmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar.Gestastonun 8.haftasında , Leydig hücrelerinde testesteron üretimi başlar.Artık testisler , genital kanal ve dış genital organların cinsiyet farklılanmasını etkileyecek hale gelmiştir.

Puberteye kadar solid halde kalan kordların , pubertede lümenleri açılarak seminifer tubülüsleri oluştururlar.Seminifer tubüller bir kere kanalize olduktan sonra , rete testis tubüllerine katılır ve daha sonra ductuli eferenteslere girerler.Bu eferent duktuslar , mezonefrik sistmin geri kalan boşaltım tubülleridir.Duktus defenrentes olarak bilinen bu kanallar , rete testis ile mezonefrik veya wolkmann kanalları arasında bir bağlantı işlevi görürler (Sadler T.W. , 1995) ( Şekil 1-B ) .

### 2.1.3. GENİTAL KANALLARIN EMBRİYOLOJİSİ :

#### 2.1.3.1. Farklanmamış evre :

Hem erkek hem de dişi embriyoda başlangıçta iki çift genital kanal vardır. Mezonefrik kanallar ve paramezonefrik kanallar. Paramezonefrik kanal , ürogenital kabarıklığın anterolateral yüzeyindeki kölomik epitelin uzunlamasına bir invajinasyonu halinde belirir ( Şekil 2 ). Kanal kranial uçtan kölomik boşluğun içine huni şeklinde bir yapıyla açılır. Kaudal yönde de , önce mezonefrik kanalın lateralinde seyrederek ve onu çaprazladıktan sonra kaudomedial yönde gelişmeye devam eder ( Şekil 2 ) .Orta hatta paramezonefrik kanala aksi yönde yaklaşır. Başlangıçta bir septumla birbirinden ayrılmış olan bu iki kanal , daha sonra birleşerek uterus kanalını oluşturur. Birleşmiş olan kanalların kaudal ucu , ürogenital sinusun arka duvarına doğru ilerleyerek paramezonefrik veya Müllerian tuberkül denilen küçük bir şişliği meydana getirirler. Mezonefrik kanallar , ürogenital sinüse , Müllerian tuberkülün her iki yanından açılırlar. (Sadler T.W. , 1995)

#### 2.1.3.2. Kanal sisteminin farklılaşması :

Genital kanalların ve dış genital organların gelişimi , intrauterin hayat boyunca fetusun dolaşımında bulunan hormonların etkisi altında meydana gelir. Ayrıca , fetusun testislerindeki Sertoli hücrelerinden salgılanan müllerian inhibe edici madde (MIS) veya antimüllerian hormon (AMH) olarak bilinen non-steroid madde de , paramezonefrik kanalların regresyonunu sağlar. Testislerden MIS dışında , hedef doku hücrelerini etkileyen testesteron da salgılanır. Testesteron bu hücrelerde 5-alfa redüktaz enzimiyle dihidrotestesterona dönüştürülür.

Testesteron ve dihidrotestesteron hücre içinde , bu hormonlara karşı özel ve yüksek afinitesi olan bir reseptör proteine bağlanırlar. Bu hormon-reseptör kompleksi de , dokuya spesifik genlerin ve bunların protein ürünlerinin transkripsiyonunu düzenlemek üzere DNA'ya bağlanırlar. Testesteron-reseptör kompleksleri ,



mezonefrik kanalların virilizasyonuna aracılık ederken , dihidrotestesteron-reseptör kompleksleri de , erkek dış genital organlarının farklanmasını sağlar.

Dişi fetusta MIS üretilmediğinden , bu hormonun yokluğunda paramezonefrik kanal sistemi kaybolmayarak uterin tüplere ve uterusu dönüşür.İç genital organların erkek tipinde olmasını belirleyen madde mevcut olmadığından , mezonefrik kanallar geriler.Androjenlerin yokluğunda , farklanmamış dış genital gonadlar , östrojenlerle uyarılarak major , minor labium , klitoris ve vaginaya farklılaşırlar.

### **2.1.3.3 Erkek genital kanallar :**

Mezonefroz gerilerken , epigenital tubüller adı erilen birkaç boşaltım kanalı , rete testis kordonlarıyla ilişki kurup testise ait ductuli eferentes'leri oluştururlar(Şekil –3). Testisin kaudal kutubundaki boşaltım kanalları , paragenital tubüller , rete testis kordonlarıyla birleşmez (Şekil – 3B).Bunların kalıntıları topluca paradidimis olarak bilinirler.

Apendiks epididim adındaki en kranial kısmı dışında , mezonefrik kanallar sebat ederek , ana genital kanalları oluştururlar (Şekil 3) .Mezonefrik kanallar uzayıp , kıvrıntılı bir yapı halini alarak , eferent ductusların giriş yerinin hemen altından itibaren (ductus) epididimis 'i oluştururlar.Mezonefrik kanal , epididimis'in kuyruğundan , vezikula seminalis'in tomurcuğuna kadar , kalın bir adele kılıfına bürünür ve bu bölge ductus deferens adını alır.Bu kanalın seminal vezikülden sonraki parçasına da ejakulatör kanal adı verilmektedir.

Erkekte paramezonefrik kanallar , kranial uçtaki küçük bir kısım dışında (appendiks testis) dejenere olurlar. (Sadler T.W. , 1995)

### **2.1.4. TESTİS'LERİN İNİŞİ :**

Gonadlar gelişmeleri süresince yer değiştirirler ve bu değişiklik sonucunda pelvise inerler.Fakat bu iniş görünüştedir , çünkü gerçekte söz konusu olan pelvis arka duvarının genişlemesidir.Bundan sonra testis hakiki göz sonucu karın boşluğundan dışarı çıkıp skrotum içine girer.Bu olaya “descensus testis” denilir.

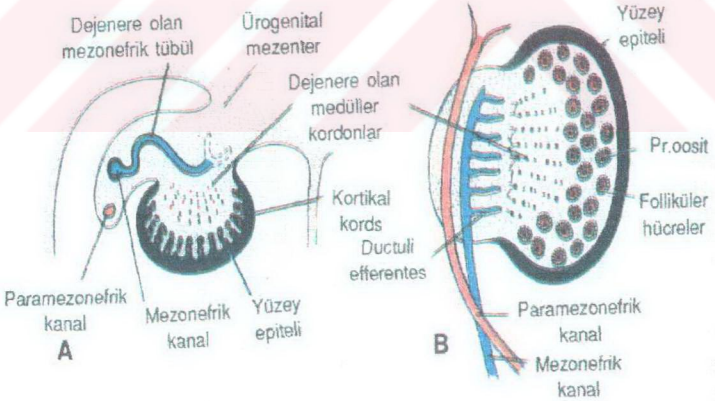
( Halit Kayalı , 1992)

İkinci ayın sonuna doğru , testis ve mezonefroz , karın arka duvarına , ürogenital mezenter ile bağlıdır.Mezonefrozun dejenerasyonu ile , bu bağlar sadece gonadın mezenteri haline gelir.Bu mezenter kaudalde bir ligament haline gelir ve kaudal genital ligament adını alır (Şekil-4A).Ayrıca testisin kaudal kutbundan uzanan , ekstraselüler matriksten zengin , yoğun mezenşimal bir yapı da gubernakulum olarak bilinir.Testisin aşağı inişinden önce , bu mezenşimal bant , inguinal bölgede internal ve eksternal abdominal oblik kasların arasında sonlanır.Daha sonra testis inguinal halkaya doğru inmeye başlarken , gubernakulumun ekstraabdominal kısmı oluşur ve inguinal bölgeden skrotal şişliğe doğru büyür.Testisler inguinal kanaldan geçerken , gubernakulumun ekstraabdominal kısmı skrotum tabanına temas eder. ( Gubernakulum dişilerde de oluşur ama rudimenter kalır . )Testisin inişini kontrol eden faktörler tam olarak belli değildir.Ancak intraabdominal göçün gubernakulumun ekstraabdominal parçasının uzamasıyla gerçekleştiği ; organların büyümesinin intraabdominal basıncı artırarak inguinal kanaldan geçişi sağladığı ve gubernakulum'un ekstra-abdominal kısmının regresyonunun da testisin skrotum içine doğru olan inişini tamamlamasını sağladığı sanılmaktadır.Bu süreç şüphesiz androjen ve MIS gibi hormonlardan da etkilenmektedir.İniş sırasında , testisler aorta tarafından beslenmeye devam eder.İniş sırasında testisler aorta tarafından beslenmeye devam eder ve testiküler damarlar başlangıçtaki lumbar lokalizasyondan , skrotum içindeki testislere doğru uzanırlar.

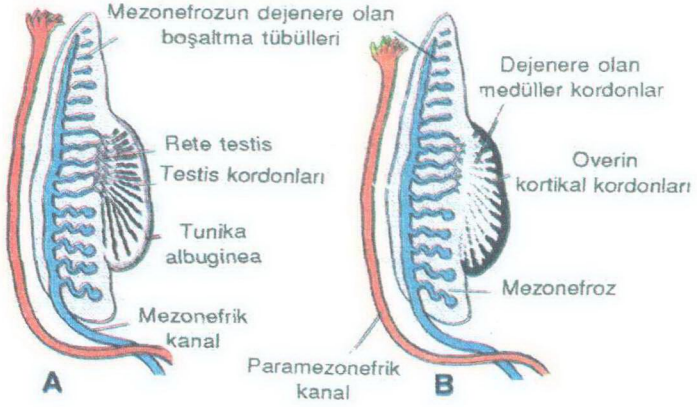
Testislerin aşağı inişinden bağımsız olarak , kölomik boşluk peritonu da , karın ön duvarının orta hattının her iki yanına doğru birer cep ( evaginasyon ) meydana getirir.Vajinal process olarak bilinen bu periton cepleri , gubernakulum testisin skrotal şişliğine doğru olan seyrini takip ederler (Şekil-4B). Musküler ve fasyal tabakalarla birlikte skrotal şişkinliğe doğru ilerleyen vajinal proses inguinal kanalı meydana getirir. Testisler inguinal kanaldan ve pubik kemiğin üzerinden geçerek , doğumda skrotal bölgeye inmiş olurlar. Daha sonra testis , vajinal prosesin bir katlantısıyla sarılır (Şekil-4C). Testisi saran bu peritoneal tabakaya , tunika vajinalis'in visseral tabakası , peritoneal kesenin diğer kısımlarına da tunika vajinalis'in parietal tabakası denir (Şekil-4D).Vajinal process lümeni ile peritoneal

kaviteyi birbirine bağlayan bu dar kanal doğumda veya doğumdan kısa bir süre sonra kapanır.

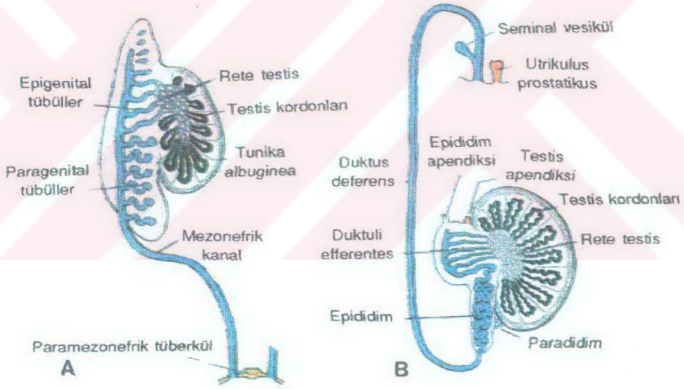
Testisler , vajinal proses'den türeyen peritoneal tabaka dışında , içinden geçtiği karın ön duvarı tabakalarıyla da örtülüdür.Transversalis fasyası ; internal spermatic fasyayı , internal oblik kas ; kremaster kasını ve fasyasını , eksternal oblik kas da ; eksternal spermatic fasyayı oluşturur.Transversus abdomini kası da bu bölgenin üzerinde arkus yaptığı ve göç yolu üzerinde bulunmadığı için , bir tabaka oluşturmaz.Farklanmamış kanal sistemi ve dış genital organlar , hormonların etkisiyle gelişir. Testis tarafından salgılanan testesteron , mezonefrik kanalların (vas deferens-epididim) gelişimini stimüle ederken , müllerian inhibe edici madde (MIS) , paramezonefrik kanalları (dişi kanal sistemi) baskılar.Dihidrottestesteron , dış genital organların , penisin , skrotumun ve prostatın gelişimini uyarır.Testis hormonlarının yapımındaki veya hedef oragn duyarlılığındaki bozukluklar , maternal ve plasental östrojenlerin hakimiyetine neden olarak , dişi karakterlerin daha öne çıkmasına yol açar. (Sadler T.W. , 1995)



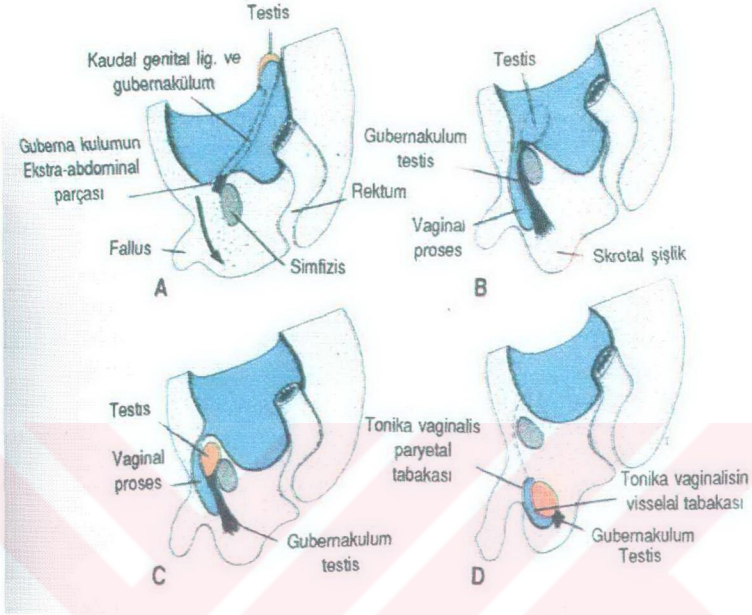
Şekil – 1 : Gelişimin 8.haftasında testisten geçen transvers kesit (A).Testis ve genital kanalın 4.aydaki görünümü (B). (Sadler T.W. , 1995)



Şekil 2 : Gelişimin 6. haftasında (A) erkek ve (B) dişi genital kanallarının şematik çizimi. (Sadler T.W., 1995)



Şekil 3 : Gelişimin 4. ayında erkek genital kanalları (A) . Genital kanalların testisin inişinden sonraki şekli (B) . (Sadler T.W., 1995)



Şekil 4 : Testisin aşağı inişinin şematik görünümü . Yaklaşık 2. ayda (A) , 3. ay ortasında (B) , 7.ayda (C) ve doğumdan hemen sonra (D). (Sadler T.W. , 1995)

## 2.2. Testislerin mikroskopik yapısı :

### 2.2.1. SEMİNİFER TUBÜLLER :

Her bir seminifer tubül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm. uzunluktadır.Karmaşık yapıda çok katlı epitel ile döşelidir.Bir testisteki tubüllerin toplam uzunluğu 250 m civarındadır (Şekil-5).

Kıvrımlı tubüller bir şebeke oluştururlar ve bu şebekedeki her tubül başlangıçta kör uçludur ve dallara ayrılır.Her bir tubül sonlanırken lümen daralır ve tubuli recti bilinen kısa segmentler olarak sürerler.Bu düz tubüller , seminifer tubüllerin rete testis denilen , epitel ile döşeli bir labirente bağlanmasını sağlarlar.Mediastinum'un bağdokusunda bulunan rete , 10-20 ductülü eferentes ile caput epididimis'e bağlanmıştır. ( L. Carlos Junqueira , 1989 )



Seminifer tubüller bir fibröz bağdokusu kılıfı , belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal veya seminifer epitelden oluşmuştur.

Seminifer tubülü saran tunica propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur.Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış miyoid hücrelerden oluşmuştur (**Şekil-6**).

Epitel 2 tip hücreden meydana gelmektedir :

- 1- Sertoli ya da destek hücreleri
- 2- Spermatogenik seri'yi oluşturan hücreler

2.2.1.1 Spermatogenik seri hücreleri : Bazal lamina ve tubül lümeni arasında dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir.Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar.Bunlar erkek erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerde bulunabilirler (**Şekil-6**). ( L. Carlos Junqueira , 1989 )

Bu hücrelerin bu şekilde izlene tabakaları arasında kademeli bir şekilde spermatogenezin aşamalarını temsil eder. ( Mehmet Yıldırım , 2000 )

2.2.1.2. Sertoli Hücreleri : Spermatogenik serideki hücreleri kısmi olarak saran uzamış piramidal hücrelerdir.Sertoli hücrelerinin tabanları basal laminaya tutunur.Apikal uçları ise sıklıkla seminifer tubülün lümenine uzanır (**Şekil-6**).

Işık mikroskopta sertoli hüccesinin sınırları belirsiz olarak görülür , çünkü bunların spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları vardır.Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda hüccenin bol miktarda düz endoplasmik retikulumu , bir miktar kaba endoplasmik retikulumu , iyi gelişmiş bir golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ve lizozom içerdiği görülmüştür.Sıklıkla üçgen biçiminde uzamış nükleusta çok sayıda kıvrımlar , belirgin bir nükleolus ve az miktarda hematokromatin görülür.

Bitişik sertoli hücceleri birbirine spermatogonyumlar seviyesinde birbirlerine sıkı bağlantılarla bağlanmışlardır.Sertoli hücceleri "gap junction" denilen

birleşmelerle de ilişki kurarlar ve bu yola hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. ( L. Carlos Junqueira , 1989 )

#### **2.2.1.2.1. Sertoli hücrelerinin fonksiyonları :**

A-) Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi , korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi :

Spermatogenik seri hücreleri birbirine sitoplasmik köprülerle bağlanmıştır.Bu hücreler şebekesi fiziksel olarak , yaygın Sertoli hücre dallanmaları ile desteklenmiştir.Spermatositler , spermatidler ve spermatozoonlar kan-testis bariyeri ile kan desteğinden izole edildiği için , bu spermatogonik hücreler besin maddelerinin alınıp verilmesinde Sertoli hücrelerinin aracılığına muhtaçtırlar.Sertoli hücreleri ayrıca gelişen sperm hücrelerini immunolojik saldırılardan da korur.

B-) Fagositoz :

Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması , artık cisimler şeklinde dökülür.Bu sitoplasmik parçalar fagosite edilir ve sertoli lizozomları tarafından yıkılırlar.

C-) Sekresyon :

Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tubüllere , genital kanallar yönünde akan ve sperm transportu için kullanılan bir sıvı salgırlarlar.

\*Androjen-bağlayıcı-protein sekresyonu , sertoli hücreleri tarafından FSH ve testesteron kontrolü altında gerçekleşir.Bu protein seminifer tubül içinde spermatogenez için gerekli olan testesteronun yoğunlaşmasını sağlar.

\* Sertoli hücreleri testesteronu östradiol haline çevirebilirler.

\* Bu hücreler aynı zamanda , anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınımını önleyen inhibin adı verilen bir peptid de salgırlarlar.

D-) Anti-Müllerain Hormon üretimi :

“ Müllerain inhibe edici hormon ” olarak da bilinen bu hormon embriyonik gelişim sırasında erkek fütusta Müller kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir.

\*\*\* Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda türeme periyodu boyunca bölünmezler. Enfeksiyon , kötü beslenme , x-ışını irradasyonu gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklıdır. Bu dayanıklılıkları spermatogenik seri seri hücrelerine nazaran çok daha fazladır. ( L. Carlos Junqueira , 1989 )

### 2.2.2. İNTERSTİSYEL DOKU :

Testisin seminifer tübülleri arasındaki boşluklar bağdokusu birikintileri , sinirler , kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapillarlar pencerelidirler ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler.

Bağdokusu çeşitli tipte hücreler içerir ;

Bunlar arasında fibroblastlar , farklılaşmış bağdokusu hücreleri , mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Puberta sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir. Steroid salgılayan hücrelerin özelliklerini gösteren bu hücreler Leydig hücreleridir (interstisyel hücreler) (Şekil-6).

Bu hücreler sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testesteron hormonunu üretirler. Bu hücreler poligonal veya yuvarlak şekilli olan ve merkezi nükleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması olan hücrelerdir. ( L. Carlos Junqueira , 1989 )

### 2.2.3. TESTİS'İN KANAL SİSTEMİ VE LOBÜLER YAPISI :

Tunica albuginea ve septula testis'ler arasındaki boşluklarda uzun tüplerin oluşturduğu bez kümeleri bulunur. Sayıları 200-300 arasında değişen ve lobuli testis denilen bu bez kümelerinin büyüklükleri , buldukları yere göre farklıdır. Testis'in ortasında bulunanlar daha büyük ve uzundur.

Piramit şeklinde olan lobuli testis'lerin taban kısımları periferde , tepe kısımları ise mediastinum testis'e yönelmiştir (Şekil-7) . Her bir lobçuk , 1 ila 3 veya



daha fazla küçük tüpler şeklindeki bezden oluşur.Kıvrıntılı seyrinden dolayı bu tüplere tubuli seminiferi contorti denilir.Bu tüpler kör bir uçla başlar ve tüpler arasında gevşek bağdokusu bulunur.Bu tüplerin yaklaşık olarak sayısı 400-600 (bir testis'te) , uzunlukları 70 ila 80 cm. çapları da 0,1-0,3 mm. kadardır. ( L. Carlos Junqueira , 1989 )

Lobcukların mediastinum testis'e bakan tepe kısımlarında , bu borucukların seyri gittikçe düzleşir ve birbirleriyle birleşerek yaklaşık 20 ila 30'a iner.Tubuli seminiferi recti denilen bu tüplerin çapları da genişleyerek 0,5mm kadar olur.Tubuli seminiferi recti'ler , mediastinum testis'in fibröz dokusu içine girerek arkaya ve yukarıya doğru uzanır.Bu kanallar seyri esnasında birbirleriyle anastomoz yaparak rete testis ( Haller ağı ) denilen ağı oluştururlar.

Rete testis , mediastinum testis'in üs bölümünde sayıları 12 ila 15 arasında değişen kanallar şekline dönüşür.Ductuli efferentes testis denilen bu kanallar , testis'in arka kenarının üst kısmında , tunica albuginea'yı delerek dışarıya çıkarlar.Dışarı çıkan kanallar önce düz olarak uzanır , daha sonra kalınlaşarak kıvrıntılı bir seyirle lobçukları oluştururlar. Lobuli coni epididymis denilen bu lobcukların yükseklikleri yaklaşık 1 cm.'dir.Bunların tepe kısımları testis'e , taban kısımları ise epididymis'e bakar.

Her bir lobçuk açıldığı zaman boyu 15-20cm.'yi bulan tek bir kanaldan oluştuğu görülür.Ductuli efferentes testis'ler , capu epididymis'de ductus epididymisdenilen kanala açılır. İşte bu caput epididymis'i , sayıları 12-15 arasında değişen tubuli coni epididymis ve bunların açıldığı ductus epididymis'in başlangıç kısmı oluşturur.Açıldığı zaman yaklaşık 6cm. uzunluğunda olan ductus epididymis , testis'in arka kenarında kümeler oluşturarak corpus epididymis ve caudo epididymis'i oluşturur.Epididymis'in kıvrımlarını gevşek bağdokusu birbirine bağlar.Epididymis'de spermium'lar depo edilir ve olgunlaşmasının son safhasını tamamlar ( L. Carlos Junqueira , 1989 ) (Şekil-7).

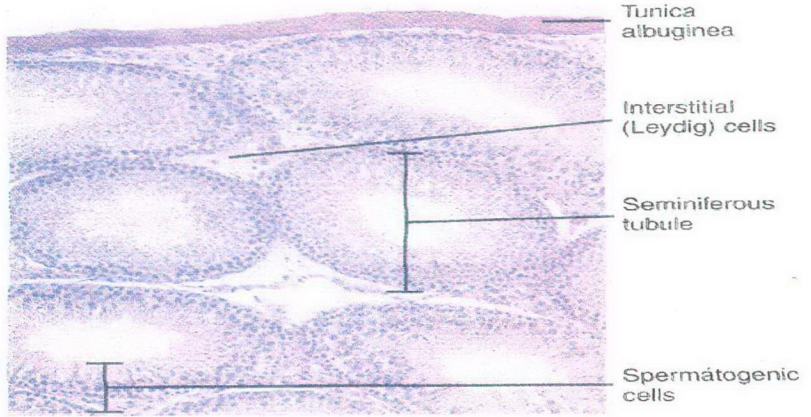
#### 2.2.4. MEDIĀSTĪNUM TESTĪS ( CORPUS HĪGMORĪ ) :

Yarım bölme şeklindeki bu yapı , testis'in üst ucundan alt ucuna kadar uzanır ve yukarı kısmı daha geniştir.Mediastinum testis'in ön ve yan kısımlarından çıkan bölmeler , testis'i saran tunica albuginea'ya tutunurlar.Septula testis denilen bu bölmeler testis'i piramit şeklinde bölmelere ayırırlar.Tabanı perifere , tepesi ise mediastinum testis'e bakan bu boşluklarda tubuli seminiferi contorti ve tubuli seminiferi recti denilen tüp şeklindeki bezler bulunur.Mediastinum testis'den damarlar ve kanallar girip çıkarlar. ( L. Carlos Junqueira , 1989 )

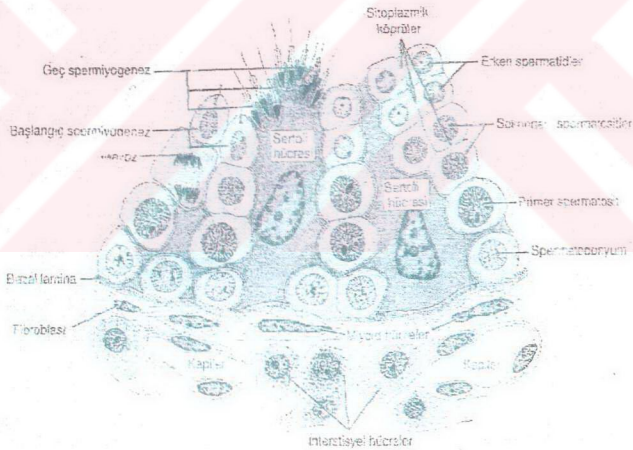
#### 2.2.5. KAN – TESTĪS BARĪYERĪ :

Kan ile seminifer tubüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması testiküler sıvı içine , kandan çok az maddenin geçmesini açıklar.Testiküler kapillarlar pencerelidir ve büyük moleküllerin serbest olarak geçişine izin verirler.Erkek germ hücrelerinin kanadn gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemli olan bu bariyer , sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı ve tkayıcı bağlantılar ile oluşturulur. ( L. Carlos Junqueira , 1989 )

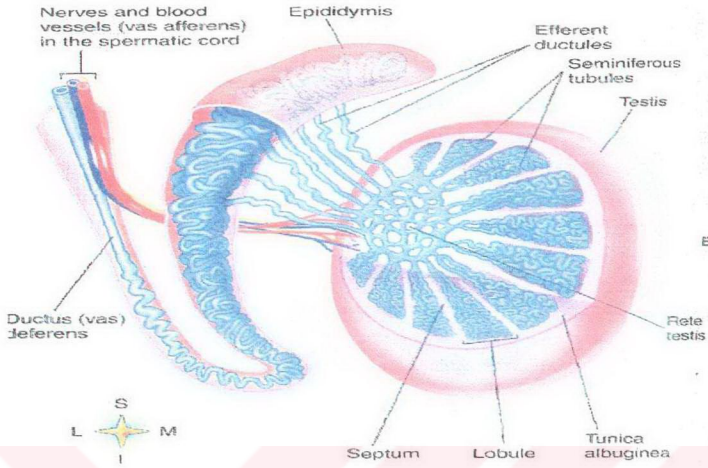
Sertoli hücrelerinin arasındaki sıkı bağlantıdan meydana gelen ve kan-testis bariyeri olarak adlandırılan bu yapı , yüzeylerinden somatik hücrelerden farklı antijenler taşıyan ve yeni gelişen sperm hücrelerini izole ederek , vücudun immun sisteminden korurlar. Eğer bu antijenler tubül epiteli dışına çıkıp , bazal membrandan da sızarak kan akımına karışsalardı , otoimmun bir reaksiyon meydana gelecekti. ( Gary A. Thiboudeau , 2003 )



**Şekil 5 : Testisin seminifer tubülleri ve intestisyumun gösteren histolojik bir kesit. ( Gary A. Thibodeau ,2003)**



**Şekil 6 : Sertoli hücrelerinin bazal laminayla ilişkisini , miyoid hücreleri ve interstiyel hücreleri gösteren şematik şekli ( L. Carlos Junqueira , 1989 ).**



Şekil 7 : Testisin lobüler yapısını ve seminifer tubüllerin Rete testis'e açılışını gösteren şematik çizim. ( Gary A. Thibodeau ,2003)

### 2.3. Testislerin makroskobik yapısı :

Testisler memeli çoğunda eksternal ( yani skrotal ) bir organ iken balık , amfibi , sürüngen ve kuşlarda intraabdominal bir yerleşim gösterir. Ancak yine balina ve yunus gibi deniz memelilerinde intraabdominal bir konumdayken , fok balıklarında inguinal bir yerleşime sahiptir. ( Gray's Anatomy, 1995 )

Funiculus spermaticus'a asılı durumda bulunan , testisler sağlı-sollu bir çift olup , scrotum içinde bulunurlar (Şekil-8). İri birer badem büyüklüğünde olan testisler yaklaşık 4-5cm. uzunluğunda , 2.5 cm genişliğinde , 3 cm kalınlığında ve 10-14 g. ağırlığındadır ( K. Arıncı , 2001 ) (Şekil- 9).

Testisin üst ucunda yukarıdan aşağıya doğru uzanan küçük yassı bir cisim görülür. Appendix testis denilen bu cisim Müller kanalının abdominal ucunun artığıdır ve kadınlarda tuba uterina'nın abdominal ucuna tekabül eder. Buna benzer



ikinci küçük bir uzantı ise testis'in ön kenarının yukarı kısmında epididymis'in başından aşağıya doğru sarkar. Appendix epididymis denen bu oluşum mezonefroz'a ait embriyonal bir artıktır. ( İ. Veli Odar , 1979)

Testis'in facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü , margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı , extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere de iki ucu vardır. Testislerin uzun eksenleri tam vertikal yönde bulunmaz. Üst ucu biraz önde ve dışta , alt ucu ise biraz arkada ve içte bulunur. Konveks ön kenarı biraz daha dışa-aşağıya doğru , daha düz olan arka kenarı da , biraz yukarı-içe doğru bakar. Buna göre uzun eksenini yukarıdan aşağıya , dıştan içe ve önden arkaya meyilli olarak bulunur.

Testis'in ön kenarı , her iki yüzü ve uçları düz olup , visceral periton (epiorchium) ile kaplıdır. Arka kenarının sadece lateral kısmı peritonla örtülüdür. Peritonsuz olan medial bölümüne , epididymis tutunur ve buradan damar-sinirleri ve kanalları geçer. ( K. Arıncı , 2001 )

### 2.3.1 TESTİS'İN TABAKALARI :

Testisi saran katmanlar olarak yüzeyden itibaren ; deri , m. dartos , fascia perinealis superficialis , fascia spermatica externa , fascia cremasterica , fascia spermatica interna , tunica vaginalis'in lamina parietalis ve visceralis'i , tunica albuginea ve tunica vasculosa'yı sayabiliriz. Ancak bunlardan son 3'ü testis kapsülü adı altında ayrıca gruplandırılır. Rat ve tavşanların isole edilmiş testiküler kapsülleri incelendiğinde , bunların kolinerjik ve adrenerjik ajanlara karşı spontan kontraksiyonlar gösterdiği görülmüştür. ( Gray's Human anatomy , 1995)

Testis ; lamina visceralis ( epiorchium ) , tunica albuginea ve tunica vasculosa olmak üzere 3 tabaka ile sarıdır.

#### 2.3.1.1. Tunica vaginalis testis :

Fascia spermatica interna'nın iç , testis'in de dış yüzünü saran seröz bir zarıdır. Embriyonik dönemde karnı boşluğunu döşeyen parietal periton , scrotum'a

doğru bir cep şeklinde çıkıntı gönderir. Saccus vaginalis denilen bu çıkıntı , scrotum'un tabakalarından en içte bulunan fascia spermatica interna'ya gevşek olarak tutunur.Daha sonra periton kesesinin sışında scrotum'a inen testis , saccus vaginalis'e arka tarafından gömülerek peritonla kaplanır.Böylece saccus vaginalis'in , bir testisi örten lamina visceralis ( epiorchium ) kısmı , bir de fascia spermatica interna'ya yapışan lamina parietalis ( periorchium ) kısmı oluşur.Erişkinlerde bu iki yaprağa tunica vaginalis testis denilir.Saccus vaginalis'in testis'in üst ucundan anulus inguinalis profundus'a kadar olan bölümü kapanarak bir kordon şeklini alır ve karın boşluğu ile olan bağlantısı kesilir.İki yaprak arasında kalan kılcak aralığa ise cavum serosum scroti denir ve içinde eklem sıvısına benzer bir miktar kaygan sıvı bulunur. ( K.Arıncı , 2001 )

#### **2.3.1.2. Lamina visceralis (epiorchium) :**

Epididymis'in büyük kısmı ile arka kenarının medial bölümü hariç , testisi örter ve bu iki oluşumu birbirine bağlar.Testis ve epididymis'in arka kenarlarından , lamina parietalis olarak fascia spermatica interna'nın iç yüzüne geçer.Epididymis'in baş kısmını testis'in üst ucuna bağlayan tunica vaginalis bölümüne lig.epididymis superius , kuyruk kısmını testis'in alt ucuna bağlayan tunica vaginalis bölümüne ise lig.epididymis inferius denir. ( K.Arıncı , 2001 )

#### **2.3.1.3. Lamina parietalis (periorchium) :**

Peritoneum'un fascia spermatica interna'yı döşeyen kısmıdır.Funiculus spermaticus'un ön ve iç kısmında yukarıya doğru biraz uzar.Bu nedenle lamina visceralis'den daha geniştir.Lamina parietalis'in iç yüzü düzdür ve mezotel ile kaplıdır.

Saccus vaginalis'in oblitere olan üst bölümü , genellikle gevşek bağdokusu içinde bir kordon şeklinde görülür.Bazen karın boşluğunu döşeyen peritonu , tunica vaginalis testis'e bağlayan bir bağ şeklinde görülür.Bazen de yavaş yavaş kaybolur.Bazen oblitere olmaz ve bunun sonucu olarak , karın boşluğu ile cavum scroti birbiriyle bağlantılı olur.Bu gibi durumlarda bir nevi indirekt fitik oluşmuş sayılır. ( K.Arıncı , 2001 )

#### 2.3.1.4. Tunica albuginea :

Testis'i saran mavimsi beyaz renkli , sıkı yapılı fibröz bir tabakadır.Bu tabakayı oluşturan beyaz fibröz demetler , farklı yönde uzanarak birbirinin içine girer.Tunica albuginea'yı arka kenarı hariç olma üzere , dıştan tunica vaginalis testis'in lamina visceralis'i (epiorchium) örter.Peritonun bulunmadığı arka kenara epididymis tutunur ve buradan testis'in damar ve sinirleri girip çıkar. (K.Arıncı , 2001)

Tunica albugine'a kollagen lifler içermesi nedeniyle kapsülde bir elastikiyet ve genişleme sağlar.Yırtıldığı zaman ise testis kanalcıkları dışarıya taşar.Bu olay testisin iç basıncının fazla olduğunu ve tunica albuginea'nın bu basınca karşı koyduğunu göstermektedir.Tunica albuginea testis'in arka kenarında bez içine sokulur ve tam olmayan vertikal bir bölme meydana getirir ( mediastinum testis ) . Bu bölmeye corpus higmori de denir. ( Ahmet Çimen , 1996)

#### 2.3.1.5. Tunica vasculosa :

Tunica albuginea'nın iç yüzünde bulunan damar ağı tabakasıdır.Damarlar arasında kalan aralıkları da gevşek bağdokusu doldurur.Tunica vasculosa , tunica albuginea'nın iç yüzünü ve tüm bölmelerin yüzlerini döşer.Böylece testis'in içindeki tüm lobuli testis'i de sarmış olur. ( K.Arıncı , 2001 )

#### 2.3.2. TESTİS ' İN ARTERYEL KANLANMASI :

Testiküler arterler uzun bir seyirle aorta abdominalis'in antero-lateral kısmından ve renal arterlerin hemen aşağısından çıkarlar.Oblik bir yönelimle retroperitoneal olarak ilerlerler , ureterleri ve eksternal iliak arterlerin inferior kısımlarını önden çaprazlarlar ve anulus inguinalis profundus'a gelirler.Canalis inguinalis'e girer ve anulus inguinalis superficialis le kanalı terk ederler ve testisleri beslemek üzere spermatik kord'a dahil olurlar(Şekil-10).

( Keith L. Moore , 1999 )

Scrotum' da kıvrıntılı bir seyir gösteren a.testicularis birçok dalına ayrılır.Bu dallardan 2-4 tanesi ductus deferens boyunca uzanarak epididymis'i besler (rr.epididymales) ve a.ductus deferens ile anastomoz yaparlar.Diğer dalları tunica albuginea'nın arka kısmını delerek testis'e girer ve bu organı

besler.A.testicularis'den ayrılan 1-2 ince dal üreter'i ( rr.ureterici ) , inguinal kanalda verdiği 1-2 dal da m.cremaster'i besler. ( K.Arıncı , 2001 )

### 2.3.3. TESTİS'İN VENÖZ DRENAJ

Erkeklerde bulunan bu ven kadınlardaki v.ovarica'ların karşılığıdır.Testis'in arka kısmından çıkan birçok dal , epididymis'ten çıkan dallarla birleşerek plexus pampiniformis denilen kıvrıntılı bir ven plexus'u oluşturur (**Şekil-10**). Hacim itibarıyla plexus pampiniformis , funiculus spermaticus'un önemli bir kısmını oluşturur. ( K.Arıncı , 2001 )

Plexus pampiniformis bezi sabit bir sıcaklıkta tutarak , aynı zamanda testis'in termoregülatör sisteminin de bir parçası olmaktadır. ( Keith L. Moore , 1999 ).

Birçok venin oluşturduğu bu plexus , ductus deferens'in ön tarafında yukarı çıkar ve anulus inguinalis superficialis'in hemen aşağısında , 4 veya 5 adet ven şekline döndürür.Bu venler anulus inguinalis profundus'tan karın boşluğuna girerken birleşerek sayıları 2'ye iner. Peritoneum ile m.psoas major'un ön yüzü arasında , a.testicularis'lerin yan taraflarında uzanırken tekrar birleşerek tek bir ven haline döndürülür.V.testicularis dextra dar bir açı ile v.cava inferior'a , v.testicularis sinistra ise dik açı ile v.renalis sinistra'ya açılır. ( K.Arıncı , 2001 ).

% 8 olguda da sağ v.testicularis , v.renalis'e dökülür.V.testicularis'in vv.scrotales post. , vv.pudenta ext. ve v.cremasterica ile anastomozları vardır. ( Mehmet Yıldırım , 2000 )

### 2.3.4. TESTİS'İN LENFATİK DRENAJ

Testis'lerin lenfatik drenajı esas itibarıyla lumbal ( lateral aortic ) ve preaortik lenf nodlarına yapılmaktadır. ( Keith L. Moore , 1999 ).

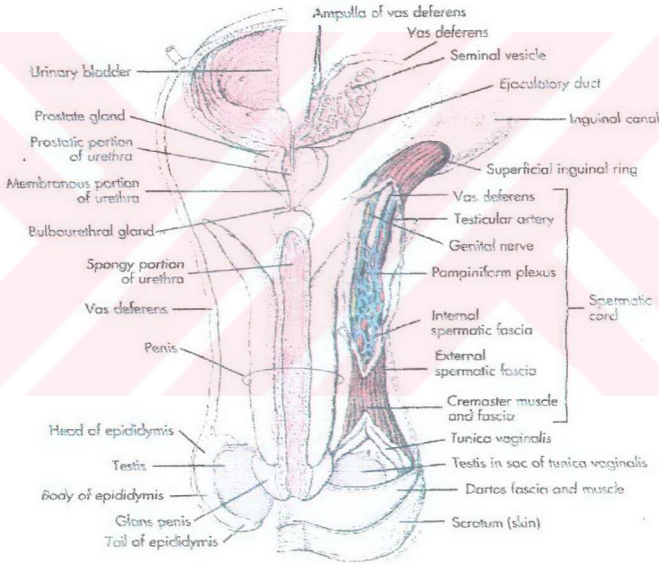
Detaylı inceleyecek olursak ; Testis'in lenf damarları yüzeysel ve derin olmak üzere 2 grupta toplanırlar.Yüzeysel olanı , tunica vaginalis'den , derin olanı ise epididymis ve testis'in kendisinden başlar. Bu lenf damarları önce funiculus spermaticus içinde , sonra da a.testicularis'lerle birlikte seyrederek (**Şekil-10**). 4-8 topalayıcı damar şeklinde a.testicularis'in üreteri çaprazladığı seviyeye kadar ,



m.psoas major'un ön yüzü boyunca uzanır ve nodi lumbales grubuna dahil olan nodi aortici laterales ve nodi preortici'lere açılırlar.( K.Arıncı , 2001 ).

### 2.3.5. TESTİS'İN OTONOM İNNERVASYONU

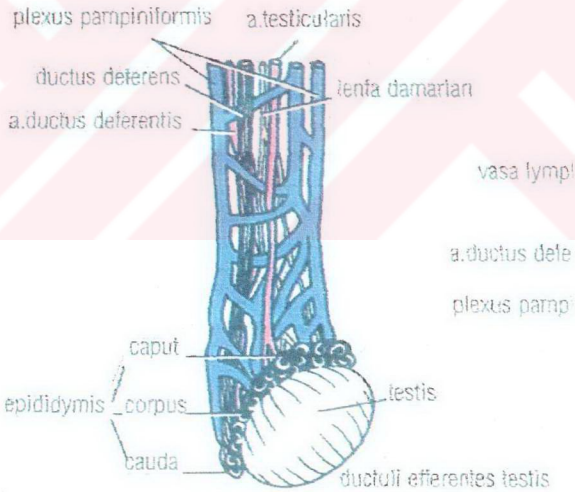
Testis ve funiculus spermaticus , plexus testicularis , plexus hypogastricus ve plexus vesicalis'lerden gelen liflerle innerve olurlar.Plexus testicularis esas olarak plexus aorticus'dan türer.İçinde sempatik postganglionik ve visceral afferent lifler vardır.Bu plexus'un preganglionik lifleri , splanchnic sinirler içindedir.Testis'i innerve eden preganglionik lifler 10. ve daha yukarıdaki torakal segmentlerden çıkarlar.Affrentler 1.lumbal ve daha üst segmentlere giderler. ( Fahri Dere , 1999.)



Şekil 8 : Testisleri skrotum içerisinde , funiculus spermaticus vasitısıyla asılı haldeki durumunun şematik çizimi. ( David T. Lindsay , 1996 )



Şekil 9 : Testisin scrotum içindeki transilluminasyon yöntemiyle görüntülenmiş fotoğrafı. ( Gary A. Thibodeau ,2003)



Şekil 10 : Funiculus spermaticus içindeki yapıları gösteren şematik çizim ( Richard S. Snell , 1995)

## 2.4. Testislerin fonksiyonu ve spermatogenezis:

Testislerin 2 temel fonksiyonu vardır :

- 1- Spermatogenezis
- 2- Hormon sekresyonu

### 2.4.1. Spermatogenezis :

Spermium ilk olaak pubertedekeyken oluşur ve ileri yaşlara kadar yapımı sürekli devam eder. Erkeklerde reproduktif hayatın kesin bir sonu yoktur. (Nuran Gökhan , 1986)

Normal spermatogenezis , testisin karın boşluğundaki ısıdan daha düşük ısıda olması ile gerçekleşebilir. Testisler scrotumda yerleştikleri zaman , karın ısısından 3C° daha düşük ısıda bulunurlar. Scrotum içindeki testiküller sı kontrolü tam olarak anlayışlamamıştır ; fakat m.cremaster ve m.dartos'un kasılmaları refleks olarak scrotal derinin yüzeysel alanını değiştirebilir. Son zamanlarda anlayışıldığı üzere , funiculus spermaticus içindeki v.testicularis'ler plexus pampiniformis'i oluştururlar ve a.testicularis'lerin dalları ile birlikte uzanırlar. Olasılıkla testislerin ısısının sabitlenmesinde ters yönde ısı değişim mekanizması ile katkıda bulunurlar. Buradan anlayışılacağı üzere karından sıcak olarak arterle gelen kanın ısısı , venler tarafından alındığından , ısısı düşük olan kan testise ulaşabilir. (Richard S. Snell , 1995)

Seminifer tubüllerde , spermatogonia adı verilen çok sayıda germinal epitel hücresi bulunmaktadır. Spermatogoniumlar , tubüler yapının dış kenarında , 2-3 tabaka halinde yer almaktadır. Bu hücreler sürekli proliferasyonla kendilerini yenilerler. Hücrelerin bir bölümü , spermiumların oluşumunu sağlayan son aşamalara kadar farklılaşırlar. Spermatogenezin ilk evresinde , germinal epitelin bazal membranına bitişik olarak yerleşim gösteren tip-A spermatogonium hücreleri , 4 kez bölünme geçirerek , küçük farklılıklar gösteren 16 hücre grubu oluşturur. Bu hücreler tip-B spermatogoniumlardır (Şekil-11).

Bu aşamada spermatogoniumlar merkeze yönelik sertoli hücreleri boyunca yerleşirler. Sertoli hücreleri oldukça büyük hücrelerdir. Tubül merkezinde , lümene giden tüm yollardaki spermatogonium hücre dizilerini , sitoplazmik uzantılarıyla

kuşatarak onlara destek olurlar. Sertoli hücreleri birbiriyle , bazal ve yan bölgelerindeki membranların sıkı bağlantılarıyla yakınlık kurarlar.Bu bağlantılarla oluşan membran duvarları , tubüller çevresindeki kapıllarlar arasında bir bariyer oluşturur.Bu duvar sayesinde spermatogoniumların , spermatozoa'ya dönüşümünü engelleyebilecek immunoglobulinler gibi büyük protein moleküllerinin , tubül içinde yol almaları önlenir.Bu sırada , spermatozoa'ya dönüşecek spermatogoniumlar , bu engeli aşarak Sertoli hücrelerinin sitoplazmik uzantılarıyla bağlantı kurarlar.Sertoli hücreleriyle bu yakın ilişki spermatozon gelişiminin ileri evrelerinde de devam eder. (Guyton&Hall , 1996)

#### **2.4.1.1. MAYOZ :**

Ortalama 24 günlük bir süreç içinde , bariyeri aşarak Sertoli hücre tabakasına ulaşan her bir spermatogonium , büyük bir değişim evresine girer ve büyük bir "primer spermatosit" oluşturmak üzere genişlerler.Bu 24 günlük evre sonunda , her primer spermatosit , 2 "sekonder spermatosit" i oluşturmak üzere bölünürler.Bu normal bir bölünme değildir.Bu nedenle bölünmeye " ilk mayotik bölünme " adı verilir.(Şekil- 11)

Bölünmenin ilk aşamasında 46 kromozomdaki tüm DNA'lar ikiye katlanır.46 kromozomun herbiri ,sentromerde birarada bulunan bağlı kromatidler halindedir.Bu iki kromatid'de kromozomların genleri ikiye katlanmıştır.Bu anda primer spermatosit , 2 sekonder spermatosit haline dönüşür.Kromozomların herbir çifti , herbiri 2 kromatid taşıyan , 23 kromozom halinde dağılır , sekonder spermatositin birine yerleşirler.Öte yanda , 23 kromozom'da öteki spermatosite yerleşir.2-3 gün içinde , ikinci bir mayotik bölünme gerçekleşir.Bu bölünme evresinde 23 kromozomun herbirindeki iki kromatid , sentromerden uzak bölgeleri yerleşir.Bunun sonucunda 23 kromozomlu iki hücre seti ortaya çıkar.Her dizinde , ayrı ayrı yavru spermatidler bulunmaktadır.

Bu iki mayotik bölünmenin önemi , oluşan her spermatid'te , orijinal spermatogoniumların yarı genine sahip 23 kromozomun taşınmasıdır.Bu nedenle dişi ovumu döleyen spermatozon , genetik materyalin yarısını , fertilize olan ovum ise diğer yarısını içerir. (Guyton&Hall , 1996)



#### 2.4.1.2. MAYOZ SONRASI SPERM GELİŞİMİ:

Mayozdan sonra ilk bir iki hafta içinde , her spermatid kendisini kuşatan Sertoli hücreleri tarafından , fiziksel olarak yeniden şekillendirilir.Bu şekillenme ;

- 1- Sitoplazmadan bir miktar kayıp
- 2- Nukleusunda kromatin materyalin , yoğun bir baş oluşturmak için yeniden organize olması
- 3- Kalan sitoplazma ve hücre membranlarının , bir kuyruk oluşturmak üzere , hücrenin bir bölümünde toplanması

sonucunda , spermatid'in yavaş yavaş bir spermatozon(sperm) haline gelmesiyle sonlanır. (Guyton&Hall , 1996)

Total anlamda spermatogenezis 'in bu aşamalardan geçmesiyle meydana gelen total süre 65-70 gündür. ( Mehmet Yıldırım , 2000 )

#### 2.4.1.3. SPERMİN OLUŞUMU :

Spermatidler ilk oluşum döneminde , epiteloid hücre karakterleri taşırlar.Ancak kısa bir süre içinde , her bir spermatid , uzamaya başlar , spermatozoona dönüştüklerinde , baş ve kuyruk bölgesinden oluşurlar.Baş kısmında hücrenin yoğun nükleusu , ince bir sitoplazma ve çevrelerinde , hücre membranı bulunur.Başın üst iki ön ve dış tarafında , Golgi aygıtından oluşan kalın bir başlık , "akrozom" bulunur.Akrozom , tipik bir hücrede lizozomlarda bulunan enzimleri içerir.Bunlar , dokuların proteoglikan filamentlerini sindirebilen "hialuronidaz" ve proteinleri sindirebilen güçlü "proteolitik enzimler"dir.Bu enzimler spermin , ovumu fertilize etmesinde önemli rol oynar. (Guyton&Hall , 1996)

Kuyruk bölgesinde "flagellum" adı verilen 3 önemli komponent bulunur :

- 1- 11 mikrotübülün oluşturduğu merkezi iskelet , aksonema
- 2- Aksonema'yı kuşatan ince bir hücre membranı
- 3- Kuyruğun proximal kısmında , aksonema çevresinde mitokondri topluluğu

Spermiyumlar ortam elverişli ise çok çabuk hareket ederler ve dakikada 3-3,6 m. yol alabilirler.Spermiyumların uzunluğunun 55-60 mikron olduğunu söylersek ,bir sperm 1 saniyede kendi uzunluğu boyunca yol katedebilir demektir. ( İ.Veli Odar , 1979)

#### 2.4.1.4. SPERMATOGENEZİ UYARAN HORMONAL FAKTÖRLER :

1-Testesteron :Testislerde interstisyumda yerleşim gösteren Leydig hücrelerinden salgılanır.Sperm oluşumunda germinal hücrelerin bölünme ve gelişmeleri için gereklidir.

2-Luteinizan hormon : Hipofiz ön lobundan salgılanarak , Leydig hücrelerini uyarır ve testesteron salgılanmasını sağlar.

3-Folikül stimülan hormon : Hipofiz ön lobundan salgılanır , Sertoli hücrelerini uyarır. Bu stimülasyon olmaksızın spermatidlerin , spermilere dönüşmesi olanaksızdır.

4-Östrojenler : Folikül stimülan hormonla uyarılmış sertoli hücrelerinden salgılanırlar.Spermiogenez olayında belki de en önemli hormonlardır.Sertoli hücreleri aynı zamanda östrojen ve androjenleri bağlayabilen “androjen bağlayıcı” bir protein de salgırlar.Protein , hormonları , seminifer tubül lümenindeki sıvı içine taşır ve hormonların her ikisi de spermin olgunlaşmasına yardım eder.

5-Büyüme hormonu : ( ve diğer pek çok hormon ) testislerin temel metabolik fonksiyonu için gereklidir.Büyüme hormonu özellikle spermatogoniumların erken bölünmesini hızlandırır.Hipofizer cücelikte olduğu gibi , hormonun yokluğunda spermatogenez ciddi boyutlarda yetmezlik gösterir veya tümüyle ortadan kalkar. (Guyton&Hall , 1996)

#### 2.4.2. HORMON SEKRESYONU :

Öncelikle testesteronun testiste interstisyel Leydig hücrelerinden salgılanması konusuna açıklık getirelim :

Testisler testesteron , dihidrotestesteron , androstenedion gibi genelde androjen adıyla tanımlanan pekçok erkek seks hormonu salgırlar.Testesteron diğer androjenlere göre daha fazla miktarda bulunduğundan , en önemli testis hormonu



olarak kabul edilebilir. Ancak testesteronun çoğu olmasa bile büyük bir kısmı , hedef dokularda daha aktif olan dihidrotestesterona dönüşür.

Testesteron , interstisyel Leydig hücrelerinde oluşturulur. Bu hücreler seminifer tubüller arasında interstisyel alanda yer alır ve erkek testis kütlelerinin % 20'sini oluşturur. Leydig hücreleri testislerin testesteron salgılamadığı çocukluk döneminde , hemen hemen hiç görülmezler. Bunun yanında yeni doğan erkek çocukta yaşamın ilk birkaç ayında ve puberte sonrası erişkin dönemde bol miktarda bulunurlar. Her iki dönemde de testisler bol miktarda testesteron salgırlar. Testis tümörlerinin geliştiği durumlarda ise , interstisyel Leydig hücrelerinden çok fazla miktarda testesteron salgılanır. Son olarak testisin germinal epiteli , X-ışınlarıyla tedavi sırasında ya da aşırı sıcak nedeniyle haraplandığında , haraplanmayan Leydig hücreleri testesteron salgılamaya devam eder. Vücutun başka yerlerinde de androjen salgılanması mümkündür . Androjen terimi , maskülinizan etkileri olan steroidleri tanımlamak için kullanılır. Kuşkusuz , testesteronun kendisi ve testisler dışında vücudun farklı bölgelerinde de üretilen erkek seks hormonları da bu tanımın içindedir. Örneğin adrenal bezler , en az 5 farklı androjen salgırlar. Ancak bunların tümünün maskülinizan etkisi normalde o kadar azdır ki ( erişkin bir erkekte total % 5'den daha az ) , kadında bile pubis ve aksillar kılların büyümesi dışında önemli bir maskülinizan etki yapmazlar. Ancak adrenal androjen üreten adrenal hücrelerin tümörlerinde , aşırı düzeyde androjen salgılandığından , erkeğe özgü sekonder seks karakterlerinin tümü bu hastalarda ortaya çıkar. (Guyton&Hall , 1996)

Çok az da olsa overlerde embriyonik kalıntı halinde bulunan hücrelerden tümörler gelişebilir ve bu olay kadında aşırı düzeyde androjen salgısına neden olur. Bu tip tümörlere arrhenoblastoma adı verilir. Normal overler de az miktarda androjen salgılanmaktadır ancak bu önemsizdir.

#### **2.4.2.1. Testesteron metabolizması :**

Testislerden salgılandıktan sonra testesteronun yaklaşık % 97 'si zayıf bağlarla plazma albumini ya da daha sıkı bir şekilde , seks hormonu bağlayan globulin olarak bilinen  $\beta$  - globulinlere bağlanırlar.

Bağlı hormonun dolaşım sisteminde kalış süresi 30 dakika , 1 saat bazen de daha uzun olabilir.Bu sürenin sonunda testesteron ya dokularda fikse olur , ya da inaktif ürünlere dönüşerek vücuttan atılır.

Dokularda fikse olan testesteronun çoğunluğu hücre içinde , dihidrotestesterona dönüşür.Bu olayın gerçekleştiği hedef organlar ise erişkinlerde özellikle prostat bezi , erkek fetusta eksternal genital organlardır.Testesteronun bazı etkileri bu dönüşüme bağlıdır ancak diğer etkilerde bu dönüşümün rolü olmaz.

Testesteronun yıkımı ve atılması şu şekilde özetlenebilir :

Dokularda fikse olmayan testesteron , karaciğerde başlıca androstenon ve dehidroepiandrosterona dönüşür.Aynı anda her iki yapı glukronidlerle veya sülfatlarla birleşerek bağlı hale gelirler.Bunlar da safra içinde sindirim kanalından veyahut da idrarla böbreklerden atılırlar. (Guyton&Hall , 1996)

#### **2.4.2.2. Testesteronun fonksiyonları :**

Testesteron genel olarak , vücudun belirgin erkek karakterlerinin oluşumundan sorumludur. Fötal yaşam sürecinde , testisler plasentada oluşan koryonik gonadotropinlerle uyarılarak , orta düzeyde testesteron salgırlar.Bu hormon fetal gelişim periyodunda ve hatta doğumdan sonra 10 ya ad daha çok haftalar süresince vücutta bulunur.Bu nedenle çocukluk çağı boyunca 10-13 yaşına kadar testesteron üretilmez.Daha sonra puberte döneminde ön hipofiz gonadotropik hormonların uyarısıyla testesron yapımı hızla artar. 50 yaşından sonra da hızla düşmeye başlar.80 yaşında maksimum düzeyin % 20 – 50 'sine ulaşır.(Şekil-12) (Guyton&Hall , 1996)

#### **2.4.2.3. Fetal gelişim sürecinde testesteron üretimi :**

Testesteron erkek fetus testislerinde , embriyonik hayatın yaklaşık 7. haftasında yükselmeye başlar.Erkek ve kadın seks kromozomu arasındaki önemli fonksiyonel farklılık , erkek kromozomunun gelişmekte olan genital plaktan testesteron , kadın kromozomunun ise östrojenlerin sekresyonunu sağlamasıdır.Gebe hayvanlara yüksek dozda erkek seks hormonları enjekte edildiğinde , fetus dişi bile

olsa , erkek seksüel organlarının geliştiği görülür.Aynı şekilde erkek fetusta erken evrede testislerin çıkarılması , dişi seks organlarının gelişmesine neden olur.

Bu nedenle ilk önceleri genital plaktan , daha sonra fetal testislerden salgılanan testesteron hormonu erkek vücut karakterlerinin gelişmesinden sorumludur.Örneğin vajina ile klitoris yerine , penis veya skrotumun oluşmasını sağlarlar.Aynı şekilde prostat bezi , seminal veziküller , erkek genital kanallarının gelişimini kolaylaştırırken , bunun yanında dişi genital organlarının baskılanmasına neden olurlar. (Guyton&Hall , 1996)

#### **2.4.2.4. Testesteronun testisin inmesindeki etkisi :**

Testisler genellikle gebeliğin son 2-3 ayında yeterli düzeyde testesteron salgılanmasıyla , skrotuma inerler.Erkek çocuk testisleri normal olduğu halde ,skrotuma inmemiş olarak doğmuşsa , testesteron verilerek genellikle olağan bir şekilde skrotuma indirilebilir.Ancak inguinal kanalların etstislerin geçebilmesi için , yeterince geniş olması gereklidir. Yeni doğmuş çocuğun testislerinde Leydig hücrelerini uyaran gonadotropik hormonların uygulanması koşulunda da , testesteron salgılarlar.Bu da , testislerin inmesini sağlayabilir.Böylece testislerin inmesini uyaran faktörün , testesteron olduğu , testesteronun fetal yaşam sırasında , erkek seksüel gelişimi için önemli bir hormon olduğunu göstermektedir. (Guyton&Hall , 1996)

#### **2.4.2.5. Testesteronun primer ve sekonder seks karakterlerinin gelişimi üzerine etkisi :**

Puberte sonrasında , testesteron salgısının yeniden başlaması ile penis , skrotum ve testislerde 20 yaşından önce , yaklaşık 8 kat kadar büyüme görülür.Buna ek olarak , testesteron sekonder seks karakterlerini geliştirir. Bu olay , puberteden itibaren başlar ve olgunluk döneminin sonuna kadar sürer. Sekonder seks karakterleri , seksüel organlara ek olarak aşağıda belirtildiği şekilde , erkekle kadının ayırımında yardımcıdır.

- Vücut kıllarının dağılımında etkileri :

Testesteron kılların büyümesine neden olur.Bu kıllar (1) pubis çevresinde , (2) yukarı doğru linea alba çevresinde bazen göbeğe ve daha yukarı doğru , (3) yüzde , (4) genellikle göğüste ve (5) daha az ölçüde de vücudun sırt gibi diğer bölgelerinde bulunur.Aynı şekilde vücudun farklı bölümlerinde de kılların belirginleşmesini sağlar.

- Kellik :

Testesteron , başın tepe kısmında saçların büyümesini yavaşlatır.Bir kişi eğer fonksiyonel testislere sahip değilse kel olmaz.Bunun yanında pekçok erkek asla kel olmaz , çünkü kellik 2 iki faktöre bağlı ortaya çıkar. İlki , kelliğin gelişimi için genetik bir zemin olmalıdır. İkincisi , bu genetik zemin üzerine yüksek miktarda androjen hormonun eklenmesi düşünülebilir.Uygun genetik altyapısı olan bir kadında , uzun süre androjenik bir tümör geliyorsa , erkekte olduğu gibi kellik başlar.

- Sese etkisi :

Testesteron testislerin salgıladığı ya da vücuda enjekte edildiğinde , larenks mukozasının hipertrofiye uğramasına ve larenksin genişlemesine neden olur.Bu durum , önce rölatif olarak akortsuz “çatlak” bir sesin oluşumuna yol açar.Fakat ses giderek değişir ve tipik bas erkek sesi karakterini alır.

- Deri ve akne gelişimine etkisi :

Testesteron tüm vücutta derinin kalınlaşması ve derialtı dokusunun güçlenmesini sağlar.Testesetron , yağ bezlerinin bir kısmında veya tümünde sekresyonu artırır.Yüzdeki yağ bezlerinin fazla salgı yapması , özellikle çok önemlidir , çünkü bu bezlerin aşırı sekresyonları akneye neden olur.Bu nedenle erkek vücudunun ilk kez testesteron ile karşılaştığı adölesan evrenin en tipik özelliği aknelerdir.Deri , yıllar sonra testesterona adapte olur ve aknelerden kurtulur.

- Protein oluşumu ve kas gelişimine etkisi :

Erkeğe özgü en önemli karakterlerden biri , püberte sonrasında kasların çok fazla gelişmesidir.Öyle ki kas kitlesindeki bu artış , kadınlara oranla hemen hemen % 50 daha fazladır. Bu , vücudun öteki bölümlerinde de , protein içeriğinin artması ile



birlikte görülmektedir. Derideki değişimlerin pekçoğu , protein depolanmasına bağlı olarak gelişir ve hatta sesin değişmesi de testesteronun anabolik etkisine bağlıdır.

Vücudun kas yapısına etkisi nedeniyle , testesteron ( veya onun yerine sentetik androjen ) atletlerde , kas performansını yükseltmek için çokça kullanılmaktadır. Ancak bu uygulamaya şiddetle karşı çıkılmaktadır. Çünkü testesteron kullanımının , uzun vadede harap edici etkileri bulunmaktadır. Bunun yanında testesteron , ileri yaşlarda “gençlik hormonu ” olarak kas gücünü ve sertliğini korumak için de kullanılmaktadır.

- Kemik büyümesi ve Kalsiyum depolanmasına etkisi :

Puberteyi izleyerek ya da uzun süreli testesteron enjeksiyonlarından sonra , kemiklerin kalınlıkları artar ve büyümeleri yanında , kalsiyum tuzlarının da önemli ölçüde depolandığı görülür. Böylece testesteron hem kemik matriksin total miktarını artırır , hem de kalsiyum depolanmasını sağlar. Kemik matriksindeki artışın , testesteronun proteinler üzerinde genel anabolik etkisi sonucunda olduğu , kalsiyum tuzlarının birikiminin ise , kemik matriksin artmasına bağlı sekonder bir etki olduğu sanılmaktadır.

Son olarak testesteron pelvis üzerinde de spesifik etkiye sahiptir. (1) Pelvisin daha dar ve (2) daha uzun olmasını sağlar. (3) Kadındaki geniş , oval pelvis yapısı yerine , huniye benzer şekil almasına yol açar ve (4) pelvisin yük taşımaya karşı direncini çokça artırır. Testesteron yokluğunda , erkeğin pelvisi kadınınkinden benzer bir şekilde gelişir.

Testesteron ayrıca uzun kemiklerde epifizlerin erken kapanmasına neden olur. Böylece büyümenin hızlı olmasına rağmen , epifizlerin erken kapanması , hiç testesteron salgısı olmadan erişeceği uzun boya sahip olmasını engeller. Hatta normal erişkin erkeklerin boyu da , puberte öncesi kastre edilmiş kişilerin boyundan biraz daha kısadır.

-Bazal metabolizmaya etkisi :

Yüksek dozda testesteron enjeksiyonu , bazal metabolizma hızını , % 15 kadar artırabilir. Hatta adölesan ve erken erişkinlik dönemlerinde testislerden salgılanan normal testesteron miktarı bile , bazal metabolizmayı testislerin aktif

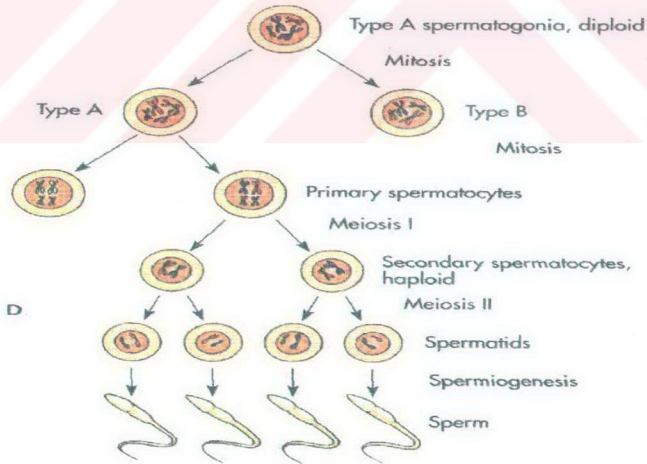
olmadığı döneme göre % 5 ile 10 oranında hızlandırabilir. Metabolizma üzerine bu hızlandırıcı etki , muhtemelen testesteronun protein anabolizması üzerine etkisinin indirekt sonucudur. Protein miktarının , özellikle enzimlerin artışı tüm hücrelerde aktiviteyi arttırmaktadır.

- Eritrositler üzerine etkisi :

Kastre edilmiş bir erişkine , normal dozda testesteron enjekte edilecek olursa ,  $\text{mm}^3$  deki eritrosit sayısı % 15- 20 artış gösterir. Bunun yanında , erkeklerde eritrosit sayısının , kadınlardaki ortalamaya göre yaklaşık 700.000 daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu farklılık , testesteronun eritrosit yapımındaki direkt etkisinden çok , belki de testesteron uygulamasından sonra , metabolik hızın artışına bağlı olabilir.

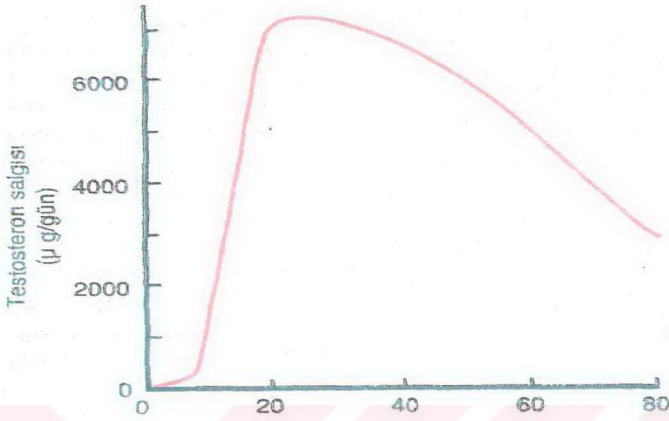
- Elektrolit ve su dengesine etkisi :

Birçok steroid hormon böbreğin distal tubülüslerinde Na reabsorpsyonunu arttırabilir. Testesteron da aynı etkiye sahip bir hormondur. Ancak adrenal menarokortikoidlerle karşılaştırıldığında , etkisinin çok küçük olduğu anlaşılır. Bununla beraber puberte sonrası erkekte , kan ve ekstraselüler sıvı hacmi , ağırlıklarına oranla daha fazla bulunur. (Guyton&Hall , 1996)



Şekil 11: Spermatogenez'deki bölünme evreleri . (David T. Lindsay , 1996)





Şekil 12: Çeşitli yaşlardaki testesteron sekresyonunu yaklaşık değerleri. (Guyton&Hall , 1996)

## 2.5. APOPTOZİS NEDİR ?

Hücre ölümü farklı şekillerde ortaya çıkabilmektedir. Temel olarak kabul edilmiş 3 tipte hücre ölümü vardır : Onkozis , nekrozis ve apoptozis... ( Murat Tosun , 2002)

Bu hücre ölümü tiplerinden Apoptozis , Yunanca kökenli bir kelimedir ve “ yerinden ayrılarak sessizce düşmek ” anlamına gelir.

Nekrozda genellikle yanyana bulunan bir grup hücre ölür. Apoptozis’de saçılmış halde tek tek hücrelerin , atık bırakmadan ölümü bahis konusudur. Apoptozis , hücrenin nükleusu ile beraber kondansasyon göstermesi , sonra membranla çevrili parçacıklara ayrılması ve parçacıkların fagosite edilip sindirilmesidir. Apoptozis’de hücrelerde önce büzülme , sitoplazmanın yoğunlaşması , hücre membranının girintili çıkıntılı hal alması ve nükleus’ta büzülme görülür. Bundan sonra hücre parçalara ayrılır. ( Münevver Yenerman , 1994 )

Apoptozis'e giden hücrenin 3 karakteristik niteliği ; (1) kromatin yoğunlaşması ve membran kabarcıklarının oluşması , (2) DNA'nın nükleozom boyutunda parçalanması ve (3) RNA ve protein sentezi bu sonuncu olayın "programlı hücre ölümü" veya hücre intiharı olarak ek tarifine gerek göstermektedir , çünkü ölmekte olan hücrelerdeki aktif metabolizmayı belirtir.Apoptozise yol açan olaylar dizisi çok açık değildir, fakat günümüzde endojen endonükleazın belki de sitozolik kalsiyumu arttırarak DNA'nın parçalanması ve sonuçta hücrenel değişikliklere neden olmasıyla bağdaştırılabilir. ( Vinay Kumar ,1995 )

Apoptozis , genellikle fizyolojik bir olaydır.Emrional yaşamda ve postnatal dönemde , normal koşullarda ve kimi hastalıklarda görülebilir.İntrauterin yaşamda kullanılmayan ve gereksiz olan hücreler ölür ve atık bırakmadan ortadan kalkar.Böylece hücrelerin mitoz ile çoğalmaları dengelenir.

Embriyonik dönemde , erişkin tipteki dokuların oluşumunda apoptozis önemli bir mekanizmadır.Kimi teratojenlerin , embriyolojik gelişme sırasında program dışı masif hücre apoptozis'ine neden olabileceği ve böylece kimi kongenital anomalilerin oluşabileceği ileri sürülmektedir. ( Münevver Yenerman , 1994 )

Apoptozis bu özelliğiyle , hücre popülasyonunu kontrol altında tutan biyolojik bir mekanizmadır.Bu regülasyon mekanizması , normal koşullarda selektif hücre delesyonu olayı biçiminde görülür.Apoptozis 'de ölen hücrelerde açığa otoliz olmaz ve hücrenin parçalanma ürünleri çevreye yayılmaz. Oysa nekrozda hücrenin parçalanması ile çevreye iltihabı başlatan maddeler yayılır.

Apoptozis postnatal yaşamda , atrofide , tümörün büyümesi ve gerilemesinde rol oynar. Apotosis , radyasyon ve radyomimetik sitotoksik ilaçlarla da meydana gelebilir. ( Münevver Yenerman , 1994 )

### **2.5.1. MORFOLOJİ :**

Hücrelerin nükleus parçacıkları ve intakt organellerini içeren sitoplazma kısımları , membran ile sarılarak değişik çapta yuvarlak veya oval cisimleri oluşturur. Bu cisimcikler serbest halde veya hücreler içinde bulunurlar.Bunlara *apoptozis cisimcikleri* denilir.Organelleri içeren sitoplazma parçacıkları çok küçük değilse ,

ışık mikroskobunda H-E boyaması ile eozinofil , eğer sitoplazma ribozomlardan zengin ise , bazofil cisimcikler halinde görülebilir.

Nukleus parçacıkları , çevrelerinde dar bir sitoplazma içerirler ve ışık mikroskobunda aynı boya ile mor noktalar halinde seçilebilirler.Mor nokta bigi görünen bu cisimcikler , lenf gangliyonlarında , folliküllerin germinatif merkezlerindeki makrofajlar tarafından alınır ve böylece Flemming'in boyanabilen cisimciklerini içeren hücreler meydana gelmiş olur.Bu cisimler foliküllerin merkezlerinde serbest halde de görülebilirler.

Bazı apoptozis cisimcikleri , sitoplazma içerisinde dağılmış kromatin içerirler.Apoptozis cisimcikleri , yalnız makrofajlar değil , çevredeki başka hücreler , örneğin epitel hücreleri tarafından da alınabilir , habis tümör hücreleri içinde de görülebilirler.Hücreler içindeki apoptozis cisimcikleri , lizozomlarda sindirilebilir. Sindirilemeyen kalıntılar lizozomlarda *atık cisimcikleri* oluştururlar.Elektron mikroskobu ile hücre dışında ve içindeki cisimcikler daha da kolay görülebilir.Apoptozis cisimciklerine nekroz alanlarının çevresinde de rastlanır.

### 2.5.2. PATOJENEZ :

Apoptozis'de önce nukleus ve sitoplazma daralır ve koyu boyanır.Bu nedenle buna eskiden " büzülme nekrozu " denilirdi.

Hücrelerin nukleus ve sitoplazmalarında tomurcuklanma biçiminde çıkıntılar meydana gelir.Bu çıkıntılar apoptozis cisimciklerinin oluşumuna öncülük eder.Daha sonra hücrenin nukleus parçacıkları , invaginasyonlar oluşturan nukleus membranı , infarkt organelleri içeren sitoplazma kısımları ise , derin invaginasyonlar meydana getiren sitoplazma membranı ile sarılır ve hücre değişik çapta veya oval parçacıklara ayrılır.Hücrelerde bu olay birkaç dakikada tamamlanır.

Apoptozis cisimcikleri makrofajlar tarafından alınır.Membranla sarılı bu parçacıklar yeni yerlerinde fagozomları oluşturur ve lizozom enzimleri ile lizis olur.

Böylece ortamda , serbest halde hücre artıkları bulunmaz ve devamında yangısal bir reaksiyon da izlenmez. Bu cisimciklerin hücreler içine alınması , sindirilip ışık mikroskobunda görünmez hale gelmesi olayı birkaç saat sürer.

Apoptozis olayı , dokulardaki kinetik maddelerin etkisindedir.Fizyolojik apoptozis , çevresel etkilerle başlatılır ve normal doku gelişmesine yardım eder.

Apoptozis'i kontrol altında tutan faktörler tam olarak bilinmemektedir.

**\*\* Nekroz dejeneratif bir fenomendir.Nekrozda plazma membranının fonksiyonel devamlılığı kesintiye uğramıştır.ATP önemli ölçüde azalmıştır.Hücre fonksiyonları geri gelmeyecek biçimde durmuştur.Apoptozis'de ise hücrenin kendi kendisini destrüksiyona uğratması için enerjiye ve makromoleküler senteze ihtiyacı vardır. Apoptozis'in erken döneminde ATP düzeyi normaldir. Hücre , sodyum ve potasyumunun plasma membranından geçişi gibi enerjiye bağlı etkinliklerini sürdürür.**

Apoptozis oluşumunda endonükleaz enziminin de rolü vardır.Endonükleaz enziminin noksan olduğu hücrelerde apoptozis görülmez.Nukleus'da kalsiyum ve magnezyuma bağımlı endonükleaz enzimi , fizyolojik veya hücre zararı ile ilgili stimullarda aktive olur ; fakat kuvvetli toksik etki , endonükleazı yok eder. (Münevver Yenerman , 1994)

### **2.5.3. APOPTOZİS TİPLERİ :**

#### **2.4.3.1. Embriyonal :**

Embriyonal yaşamda dokuların gelişmeleri sırasında hücreler , sayıca olması gerekenden fazla miktarda olduğunda , delesyona uğrarlar ve dokuların normal gelişmesi sağlanır.Bu programlanmış ölüm , hücreler içinde ve dokular arasındaki etkileşim ile olur.

Daha önce belirtildiği gibi kimi teratojen etkiler bu düzende bozukluk meydana getirip , kongenital anomalilere neden olabilir.

#### **2.5.3.2. Postnatal yaşamda apoptozis :**

##### **2.5.3.2.1. Normal koşullarda apoptozis :**

Normal lenfoid dokularda , germinal merkezlerde asidofil parçacıklar ve boyanabilen cisimcikler denilen yapılar görülür. Bunlar ve normal menstruasyonda endometrium bezlerindeki bazofilik cisimler , apoptozis ile meydana gelir.



Memede menstrüel siklus sonunda ve corpus luteum involusyonunda apoptozis görülür.

Apoptozis karaciğer hücrelerinde , sürrenal korteks , prostat , bağırsak kriptlerindeki hücrelerde , testiste seminifer tubül hücrelerinde de görülür. Yavaş ve hızlı yenilenen apoptozis ile denge sağlanır.

Timus involusyonunda da apoptozis görülür.

#### **2.5.3.2.2. Patolojik koşullarda apoptozis :**

\* Radyasyon ve sitotoksik ilaçlar : Normal dokularda ve kimi habis tümörlerde radyasyon ve radyomimetik sitotoksik ilaçlarla ilk dozda apoptozis olur.

\* Atrofiye apoptozis : Hücrelerin sayılarının azalmasında apoptozisin de rolü vardır.Bu tip atrofilerde piknoz ve karyoliz gösteren hücrelere rastlanır.Bu değişiklik apoptozis'e ait ön değişiklik olabilir.

Ductus pancreaticus 'un bağlanması ile , eksojen asinar hücrelerde apoptozis olur ve pankreas atrofisi görülür.

Hormona bağımlı atrofiler de apoptozis ile olur.Endokrin hormonlara bağımlı dokuların hücrelerinde , tropik hormonların azalması ile delesyon olur ve apoptozis görülür.Ayrıca kalan hücrelerin de hacmi azalır ve atrofi meydana gelir.

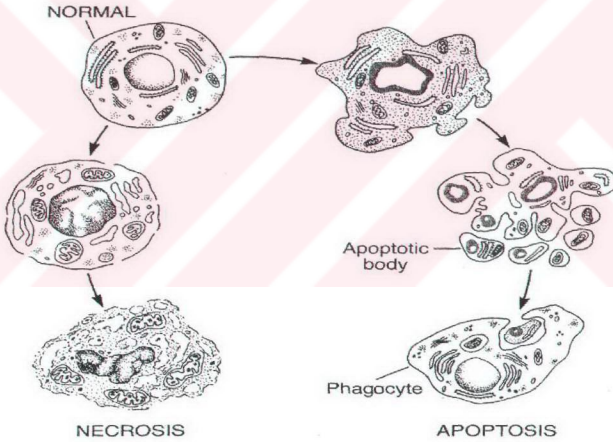
Glukokortikoidlerin verilmesi ile meydana gelen timus atrofisinde ve başka lenfoid dokuların küçülmesinde apoptozis'in rolü vardır.

\* Hücresele immunité ve apoptozis : Hücresele immunitéde çeşitli yollarla apoptozis olur.Hücre ölümü , graft-versus-host hastalığında olduğu gibi lenfosit infiltrasyonu ile birliktedir.Deneysel çalışmada T-lenfositleri ve doğal öldürücü (NK) hücreler , hedef hücrelerinde apoptozis'e neden olabilirler.Bazı deri hastalıklarında , epidermin bazal katmanlarında hücrelerden kimileri yerlerinden kopup derm içine düşer. Liken planus'da görülen civatte cisimcikleri böyle oluşur.Civatte cisimcikleri çevresinde lenfosit topluluklarının görülmesi , oluşumda hücresele immunitenin rolünü düşündürmüştür.

Kronik aktif hepatitte güve yeniği gibi olan nekrozun çevresindeki lenfosit infiltrasyonunun bulunduğu yerlerde apoptotik hücre cisimcikleri görülmüştür. (Münevver Yenerman , 1994). Bu apoptotik hücre parçacıklarına , Councilman cisimcikleri de denir ve bunlar hepatit'de karaciğer hücrelerinde bulunurlar. (Vinay Kumar , 1995)

\* Habis tümörde apoptozis : Tritiyumlu timidin ile işaretleme yöntemi kullanılarak habis tümörlerde hücrelerin çoğalma hızı incelenir ve tümörün büyüme hızı ile kıyaslanırsa , her zaman ikisi arasında uygun bir paralellik görülmeyebilir. Bu gözlemler tümörün büyümesinde spontan hücre kaybının önemli bir kontrol faktörü olduğu fikrini geliştirmiştir.

Birçok tümörlerde spontan hücre kaybı , nekroz , dökülme ve migrasyon dışında apoptozis ile de olur. (Münevver Yenerman , 1994)



Şekil 13 : Hücrenin apoptozis ve nekrozda uğradığı morfolojik değişimleri gösteren şematik çizim.



### 3. MATERYAL ve METOD:

#### 3.1. Hayvanların yetiştirilme aşaması :

Çalışmamız alkolik rat testisi dokusuna özel bir çalışma olduğundan , ilk ve öncelikli hedefimiz kronik alkolik rat temin edebilmektir. Bu amaçla Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Dr.Gökalp Yıldırım Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı 'nda (DETAB) üretilen Sprague-Dawley ırkı 20 adet rat kullanıldı. Çalışma ve kontrol grupları için denekler , 10 alkolik 10 kontrol olmak üzere 2 gruba ayrıldı ve yetiştirmelerine bu yönde devam edildi. Aşağıda ayrıntılarını verdiğimiz tüm çalışma aşamaları sırasında , Helsinki Deklerasyonu 'na titizlikle uyuldu ve Kocaeli Üniversitesi Etik Kurulu'dan , 394 / 6 no'lu karar yazısı alınmasıyla da çalışma ile ilgili her türlü izin alınmış oldu.

Ergin kontrol grubu ratlar ;  $22 \pm 3$  C° sıcaklığında ve  $62 \pm 7\%$  nisbi rutubet kontrollü oda koşullarında yetiştirildi. Bu süreç içinde odanın ışıklandırması 12 saat karanlık , 12 saat aydınlık esasına göre yapıldı (Saat 8:00 a.m. - 8:00 p.m. arası aydınlık olacak şekilde)

( T.Utkan , 2001)

Kontrol grubunun bakımı için , rat yetiştirmek üzere tasarlanmış 32 x 25 x 15 cm ölçülerinde sert plastik aksamı ve üst kısmı yemlik ve suluk için şekillendirilmiş kafesler kullanıldı. 5 kontrol grubu rat için tek bir kafes kullanılması yeterli oldu (toplam 2 kontrol , 2 alkolik grup kafesi kullanıldı). Sıvı gıda olarak 500ml. 'lik suluklarla normal içme suyu verildi. Katı gıda ise izokalorik rat pelet yemleri ile karşılandı. Su ve katı yem her gün aynı saatte ( 11:00 a.m) tazelenmek üzere değiştirildi.

Alkolik rat grubu ise 5'erli iki ayrı kafese alındı ve bu şekilde yetiştirildi. Kafesler ve katı gıda beslenmesi , yukarıda bahsettiğimiz şekilde kontrol gruplarında uygulandığı gibiydi. Tek fark , hayvanların kronik olarak alkolik hale getirilmesi amacıyla , sıvı gıda diyetinde yapılan değişiklikten ibaretti.

Kronik alkolik hale getirme işlemi yaklaşık 12 hafta sürmekteydi. Bu süre içerisinde hayvanları içme suyuna konulacak alkol oranının % 5 'den % 20 'ye kadar tedrici olarak artırılması gerekiyordu ( Thomas C.K. Chan , 1983 ).

Bu periyodun başlangıcında hayvanların içme suyu , 475 ml. suya 25ml. ethanol olacak şekilde hazırlandı. Bu % 5 lik sıvı alkol diyeti hayvanlara 2 hafta süreyle verildi. Daha sonra alkol düzeyi tedrici olarak 12. haftanın sonuna kadar şu şekilde artırıldı:

Sıvı diyetin uygulandığı hafta	Sıvı diyetteki alkol oranı
0 – 2. haftalar arası	% 5
2 – 4. haftalar arası	% 7,5
4 – 6. haftalar arası	% 10
6 – 8. haftalar arası	% 12,5
8 – 10. haftalar arası	% 15
10 – 12. haftalar arası	% 20

### 3.2. Kandaki ethanol miktarının saptanması aşaması:

12. haftanın sonunda hayvanların kronik alkolik olup olmadığının anlaşılması gerekiyordu. Bunun için de hayvanlarda plazma - alkol düzeyi tespit edilmeliydi. Bu amaçla hafif ether anestezisi altındaki hayvanlardan , intrakardiyak yolla 0,5 ml. kan alındı. Bu kan , sadece plazmada çalışılacağı için normal kan tüpüne ( anti-koagülan içermeyen ) konuldu ve alkol ölçümü Kocaeli Üniversitesi Uygulama ve Araştırma Hastanesi Laboratuvarı'nda yapıldı.

Analizin yapılabilmesi için Beckmann CX-9 cihazından yararlanıldı. Test için de Bucher ve Redetzki'nin enzimatik metodunun Sigma Diagnostic Alcohol (procedure No:332-UV) tarafından modifiye edilmiş kitiyle çalışıldı.

Bu kitin prensipte çalışma prensibi ; serum , plazma , total kan veya idrardaki ethanolün 340nm. dalga boyunda enzimatik determinasyonu esasına dayanır.

Kit çalışmaya başladığımda aşağıdaki kimyasal reaksiyon meydana gelir :



Bu reaksiyon şu anlama gelir. Kite bulunan ADH ( alcohol dehydrogenase ) , örnekteki ethanolün , acetaldehyde'e oksidasyonunu katalize ederken , aynı zamanda yine kite yer alan NAD ( nicotinamide adenine dinucleotid ) 'yi de NADH'a redükler. Oluşan NADH , 340 nm. dalga boyundaki ışımı absorbe etme özelliğindedir. Absorbe edilen ışın miktarı NADH miktarını , bu değer de dolaylı yoldan okside olan ethanol miktarını ( yani örnekteki ethanol konsantrasyonunu) bize verecektir. (Sigma Diagnostic Chemical Company , 1995)

Bu yöntemle hazırlanan , 28.02.2003 tarihli , 127 no'lu Technicon opERA Analiz raporuna göre kandaki , plazma - alkol seviyesi 49 mg / dl. idi.

### 3.3. Perfüzyon ve dokuların tesbit edilme aşaması :

Bu bulguların ardından artık rat dokularının vasküler perfüzyona tabi tutulması ve vücut dışına alınması gerekiyordu ki bunun için de önce hayvanların anestezisi sağlanmalıydı. Bu amaçla ; 35 cm. çapında , kapağı dahil tüm cephesi cam olan , yalnızca tabanında ethere batırılmış pamuk içeren bir hazneye sahip bir anestezi düzeneği temin edildi.

Ayrıca dokuların vasküler perfüzyonu için de ayrıca bir perfüzyon düzeneği hazırlandı. Bu düzende 1 adet serum standı , 1'er litrelik 2 adet % 0,9 ' luk izotonik NaCl solüsyonu , 4 litre kadar hazırladığımız % 10'luk formol solüsyonu , 4 adet serum seti , diseksiyon amaçlı tel ızgara , dokuları saklamak için yine içlerinde %10'luk formol içeren saklama kapları , bistüri , makas , pens , aletlerin sterilizasyonu için zefiran solüsyonu , eter anestezinin devamlılığı için içinde eterli pamuk bulunan geniş ağızlı tüp yer almaktaydı.

İlk olarak kendi sağlık güvenliğimiz için önlük , maske ve eldivenler giyildi ve kullanacağımız tüm non-steril disseksiyon materyali % 96'lık etil alkolle temizledikten sonra , zeytin solüsyonunda bekletildi.

Her iki rat grubundan da ( alkolik ve kontrol ) denekler , sırayla önce ether kavanozuna alındı. Denekler yaklaşık 30-40 saniye sonra ether inhalasyonu sebebiyle derin anesteziye girdiler. Anesteziye girdiğinden ve reflekslerinin kaybolduğundan emin olduğumuz denekler önce , supine pozisyonda olacak şekilde disseksiyon ızgarasına yatırıldı. Anesteziden uyanmaması için , yine önceden hazırladığımız içinde eterli pamuk bulunan geniş ağızlıklı tp hayvanın ağzı ve burnunu içine alacak şekilde yerleştirildi. Hayvanların el ve ayakları iyice yanlara açılarak ızgaraya penslerle tutturuldu. Bu şekilde hayvanın disseksiyonu perfüzyonu sırasında bize daha rahat bir çalışma alanı oluştu. Hayvanlar bu süre zarfında abdominal tp solunum yapmaya devam ediyorlardı.

Disseksiyon işlemi öncelikle arcus costalis'in altından transvers bir insizyonla başladı. Daha sonra bir pens ile processus xiphoides yakalandı ve bunun her iki yanından kostalar , supero-lateral yönde makasla kesilmeye başlandı. Sonuncudan , birinciye doğru tüm kostaları kestikten sonra processus xiphoides yukarıya kaldırarak torakal kavite tümüyle açığa çıkarıldı. Kalp bu esnada normal ritmini sürdürmekteydi. Ancak diaphragma , disseksiyon sırasında kesildiğinden dolayı hayvanı bu şekilde uzun süre yaşatamayacaktık ki bu da bizim açımızdan vasküler perfüzyona başlamak için daha az bir süre demektir.

nce kalp , basis'inden bir pensle sabitlendi ve vakit kaybedilmeden % 0,9 'luk izotonik NaCl solüsyonu ihtiva eden serum setinin iğnesi kalbin sol ventrikülünden içeri batırıldı. Ardından serum açıldı ve kalbin kendi sistolnden faydalanarak bu izotonik solüsyonun tüm vcoda yayılması sağlandı. 5-10 saniye sonra kalbin sağ atriumunda makasla bir kesik oluşturuldu ve geri dönen kanın dışarı akması sağlandı.

Bu yöntemin amacı sol ventrikülden verdiğimiz sıvının tüm vücudu dolaşması , geri dönen kanın ise sağ atriumdan akarak vücudu terk etmesini. Böylece büyük dolaşımı kullanarak izotonik solüsyon ile kanın yer değiştirmesi sağlandı.



İşlemin ilk dakikasında gördüğümüz ilk belirti akciğerlerin pembe rengini kaybederek mermer beyazı bir renk almasıydı.Çünkü dokularda artık kan yerine serum fizyolojik solüsyonu dolaşıyordu ve ilk olarak akciğerin bu tür tepki vermesi ise küçük dolaşımın , büyük dolaşımdan daha önce ve çabuk devir-daim etmesiyle açıklanabilirdi. Daha sonra ise ilk renk değişimi , albino olan ve normalde koyu kırmızı göz rengine sahip olan bu ratların gözlerinde meydana geldi.Gözler şeffaflaştı ve cam görünümü aldı. Bu renk değişiminin ardından kısa bir sürede kalp de zayıfladı ve (disseksiyonun başlamasından yaklaşık 1,5 dk. sonra) durdu. Artık sağ atriumdan da çok daha açık renkte bir kan gelmekteydi.Kalbin durması ve pompalama vazifesinin sona ermesinin ardından, sıvımızın ilerlemesi , yüksekte duran solüsyonun sahip olduğu daha yüksek atmosferik basınç ile mümkün oldu. Bu işlem sağ atriumdan tamamen şeffaf renkte solüsyon gelene kadar sürdü. Artık karaciğer gibi daha koyu renkte ve daha periferde yer alan organlar da mermer rengini almaya başlamıştı. NaCl verme sürecine bu noktada son verildi ki bu da perfüzyonun başlamasından sonraki 4. dakikaydı.

NaCl ile dolaşım sistemi tamamen yıkandıktan sonra artık dokuların fikse edilmesi için artık aynı yolla % 10' luk formol solüsyonu verilmeye başlandı.İzotonik NaCl solüsyonu verilmesine son verildi ve aynı yükseklikte duran ve formol içeren solüsyon , ayrı bir serum setiyle yine sol ventrikülden içeri verilmeye başlandı. Bu yolla daha önce izotonik tuzlu su ile yıkadığımız , kandan arınmış dokularda % 10 'luk formol dolaşmaya ve sonunda da sağ atriumdan dışarı akmaya başladı.Bu işlem de yaklaşık 5 dk. kadar sürdü.

İzotonik NaCl solüsyonu ile yıkamadan farklı olarak bu safhada gözlediğimiz ; formol veriliminin yaklaşık ikinci dakikasından itibaren , önce masseter kaslarında başlayan , ardından intercostal kaslara yayılan ve daha sonra da ekstremitelere kendini belli eden klonik konvülsiyonlardı. Hayvan öldükten 4-5 dk. sonra görülen bu konvülsiyonlar da formolün sinir dokusu üzerine olan eksitan etkisiyle açıklanabilirdi.

Formol verilmeye başladıktan 5 dk. sonra tüm seti kapatıldı. Artık dokularda formol solüsyonu bulunmaktaydı. İlk etapta abdominal kaviteye median hatta bir kesit atıldı. Bağırsaklar dışarı alınarak pelvik kavite iyice açığa çıkarıldı. Testisler , skrotumdan itilerek pelvis'den karşılandı. Tam tersi bir işlem yani skrotumdan kesikle testise ulaşmak daha zahmetli olacaktı zira bu esnada testis'i de kesme riskine dikkat etmek zorunda kalınacaktı. Testis , abdominal kaviteye kadar çekerek funiculus spermaticus gevşetildi. Ve sonunda funiculus spermaticus da kesilerek testis 'i vücut dışına çıkarıldı. Her testis bu yolla çıkarıldıktan sonra , bir süre bekleyeceği % 10 formol içeren saklama kaplarına alındı.

Kontrol grubu ratlara da aynı perfüzyon işlemi uygulandı , ancak karışmamaları için , onların dokuları alkolik ratlarınkinden farklı saklama kaplarına alındı.

#### 3.4. Dokuların preparat haline getirilmesi aşaması :

Kontrol ve alkolik gruplara ait fare testisler , ilk iş olarak saklama kaplarındaki formolden arıtılmak için izotonik solüsyonla yıkandı. Daha sonra her bir dokuya bistüri ile sagittal bir kesit atıldı ve dokular bu şekilde 2 eşit yarıma ayrıldı. Dokular her iki yarımını içine alacak şekilde kartuşlara yerleştirildi. Kartuşlar silindirik şeklinde küçük bir konteynere alındı. Bu konteyner de takip cihazına yerleştirildi. Bu takip cihazı **Leica TP1020** idi. Bu takip cihazı bir anda 12 adet konteyneri alabilecek şekilde dizayn edilmiş , silindirik bir sistemdi. Burada her bir konteyner sırasıyla alkol , aseton , xylol ve parafin'den geçiriliyordu. Bu geçiş sırası ve süresini makine sırayla her 12 konteyner için de otomatik olarak düzenlemekteydi. Bu sistemde dokularımız 1 gece kaldı.

Ardında dokular takip cihazından çıkarıldı ve **Leica** 'nın **EG1160 model** döküm aletine alındı. Burada her bir kartuş ve içindeki dokunun parafine gömülme işlemi yapıldı. Bu şekilde bloklanmış dokuların uygun kahlılıkta kesitleri alındı.

Kesit alma işlemi **Leica SM2000R** markalı mikrotomda yapıldı. Elimizdeki tüm örneklerden , 5µm. kahlılıkta kesitler alındı ve lam üzerine aktarıldı.



Lamın üzerindeki bu doku etüve ( NÜVE FN500 ) alındı ve 56 C° 'de 1 gece bekletildi. Ancak bu , dokunun parafin bloktan sonra alınmış kesitiydi ve dolayısıyla içerdiği parafin maddesinden de ayrılması gerekiyordu. Bu amaçla preparatlarımızı parafinden arıtmak için sırasıyla xylol'den , absulut alkolden ve % 96 'lık alkolden geçirdik ve preparatlarımızı deparafinize etmiş olduk.Bu solüsyonların preparatta birikmemesi için preparatı distile suyla yıkadık. Bu haliyle dokumuz lamın üzerinde yapışmış ve bloklandığı parafin maddesinden de arınmış şekildeydi ve artık boyama işlemine hazırdı.

### 3.5. İmmünohistokimyasal boyama aşaması :

Preparatlarımız içinde sitrat buffer solüsyonu bulunan bir kaba alındı ve 30dk. mikrodalgada fırında fırınladı.( 10 dk. high , 10 dk. med-high , 10 dk. high temperature olmak üzere).

Sitrat buffer solüsyonunu daha önceden şu şekilde hazırlandı ;

#### **A solüsyonu**

2,1 g.sitrik asit

50 cc. distile suda çözülecek

#### **B solüsyonu**

4 g. NaOH tuzu

50 cc. distile suda çözülecek

Sitrat buffer oluşturmak üzere A solüsyonun tamamı ve B solüsyonunun da 13 cc.'si karıştırıldı. Bu karışım 1 lt.suya tamamlandı. ( Ortaya çıkan solüsyonun pH'sı yaklaşık 6 olmalıdır.)

Bu şekilde hazırlanmış sitrat buffer 'lı solüsyonda 30 dk mikrodalgada ısıtılan preparatlar daha sonra dışarı alındı ve bu kez yine aynı kabın içerisinde 20dk. kadar oda ısısında ( 24 C° ) soğumaya bırakıldı.

Daha sonra preparatlarımız tris buffer solüsyonuna alındı.

Bu solüsyonu da şu şekilde hazırladık :

### A solüsyonu

6,1 g. tris  
50 cc. distile suda eritilecek  
tamamlanacak.

### B solüsyonu

4,5 cc. HCl  
50 cc'ye distile suyla

A solüsyonunun tamamı ve B solüsyonunun da 37 cc.' si karıştırıldı ve distile suyla 1 litreye tamamlandı.(Tampon amaçlı olarak hazırladığımız bu solüsyonun da pH'sı 7,6 idi. )

5 dk.sonra preparatlarımız bu solüsyondan çıkarıldı ve dokuların çevresini hidrofobik özelliğe sahip olan Super Pap-pen kalemle daire içine alındı.

Bu kalemle çevrelediğimiz alanın içine hidrojen peroksit damlatıldı . 5 dk bekledikten sonra üzerindeki hidrojen peroksit döküldü ve tekrar preparatlar tris buffer'dan geçirildi ( yine 5 dk. ).

Bu işlemin ardından preparatımıza Ultra-Block-V solüsyonu damlatıldı .Daha sonra preparatlarımız bu solüsyondan da uzaklaştırıldı ve üzerine 1/100 olarak dilüe ettiğimiz antikorumuz damlatıldı. (Nabil A.S.Eid et al . , 2002)

Kullandığımız antikor Rabbıt kökenli poliklonal bir antikor olan **Caspase-3 Ab-4 CPP32** 'dir . Neomarkers'in immunositokimyasal boyama (formalin/parafin) , Western Blotting ve immunopresipitasyonda yaygın şekilde kullanım imkanı bulan bir antikordur.Hücresel lokalizasyonu , ağırlıklı olarak sitoplazma olmak üzere bazı nükleer boyamaları da kapsar.(Neomarkers data sheet , Rev.110602H )

Ek bir bilgi olarak ; Caspase'lar , apoptotik reaksiyon sonucu ortaya çıkan 3 ana komponentten biridir.Diğer ikisi Bcl-2 ailesinden proteinler ve Apaf-1/CED-4 proteinlerdir.Tüm apoptotik caspase'lar , kan pıhtılaşmasında rol oynayan zymoijenlerin analogları olarak , normal hücre içinde inaktif enzimler şeklinde zaten bulunurlar.Ne zaman ki hücre apoptozis'e doğru bir gidişat gösterir , o zaman bu enzimler 1-2 aşamalı proteolitik bir mekanizmanın neticesinde açığa çıkan bazı peptidlerce aktif hale gelir(Imawati Budihardjo et al. , 1999) .

Bizim kullandığımız antikor olan Caspase-3 Ab-4 antikoruna da , apoptotik bir hücrede aktif hale geçen caspase'lar ile reaksiyona girer ve bu hücreler perinükleer

veya nükleer olarak boyanır.Bu tip boyama hücrenin caspase + olduğu sonucunu verir.

Antikorun damlatılmasından sonraki işlemler :

- 1- Preparatlara Caspase-3 Ab-4 CPP32'nin damlatılmasının ardından 1 saat bu şekilde beklendi.
- 2- Daha sonra preparatlar distile suyla yıkandı ve yine 5dk.'lık tris buffer solüsyonuna alındı.
- 3- Tris buffer banyosundan çıkarılan preparatlara bu kez de Biotinylated Goat Anti-Rabbit damlatıldı ve 10 dk. da bu şekilde beklendi.
- 4- Preparatlar yıkandı ve tekrar tris buffer solüsyonunda beklemeye alındı.  
( Buffer da kalma süresi yine 5 dk. )
- 5- Daha sonra preparatlara Streptavidin peroxidase damlatıldı. Bu madde de preparatların üzerinde 10 dakika kaldı.
- 6- Preparatlar tekrar yıkandı ve tekrar 5 dakikalık tris buffer banyosuna alındı.
- 7- Preparatların üzerine kromojen damlatma safhasına gelindi ki bu amaçla TA-007-HAC chromogen 'i kullanıldı.Totali 7 ml. olan bu konsantre kromojen solüsyonunu , kendi özel substratı (Large volume AEC Substrat – TA-125-HAS) ile her cc. dilüent solüsyona 1 damla/ kromojen olacak şekilde sulandırıldı.Elde ettiğimiz kromojen de her preparata 1 damla olacak şekilde preparatlara damlatıldı.Kromojen , doku üzerinde 10 dakika kadar kaldı. Bu süre içinde dokulardaki boyanma kendini gösteriyordu ki bu da antikorumuzun çalıştığının kanıtıydı.
- 8- Kromojen kullanımının ardından tekrar preparatlar distile suyla yıkandı.
- 9- Preparatın zıt boyamasını yapmak için de biz Mayer- hemotoxylen-eosin kullanıldı.Preparatlar , yaklaşık 3 dakika kadar hemotoxylen-eosin banyosuna tabi tutuldu ve ardından da çıkarılıp yine distile suyla yıkandı.
- 10- Bu haliyle doku mikroskobik inceleme için uygundu.Üzerlerine lamel yapıştırmak için Ultramount (TA-060-UM) yapıştırıcı damlatıp üzerlerini lamelle kapattıldı.

### 3.6. Preparatların incelenmesi , değerlendirilmesi ve fotoğraflanması aşaması :

Preparatlarımızı incelemek için Olympus-Optica model U-DO marka mikrometreli ışık mikroskopundan yararlanıldı.Önce kontrol ve alkolik gruplara ait preparatlar Caspase-3 reaksiyonu yönünden genel incelemeden geçirildi. Apoptotik bölgeler tanımlandı. Daha sonra gördüğümüz apoptotik ve non apoptotik hücreler Nikon coolpix 995 model dijital kamera ile x 200 ve x 400'lük büyütmelelerde fotoğraflandı. ( Resim 1 , 2 , 3 , 4 ,5 )

Ardından çalışmamızın istatistiksel kısmı için gerekli verileri elde etmek amacıyla ilk olarak her iki gruptaki seminfer tubüllerin çapları , mikrometreli mikroskopumuzda ölçüldü.Bu ölçüm x 100 büyütmeyle yapıldı.

Alkolik ve kontrol gruplarına ait 10'ar preparattan , rastgele seçtiğimiz 20'ser seminfer tubüllün çapı ölçüldü ve bu verilerden kaba bir çizelge elde edildi. Dolayısıyla her iki grubumuz için de elimizde 200'er tane seminfer tubül çapı ölçümü oldu (Tablo 2 ve Tablo 3). (x 100 büyütmede , mikrometrenin 100 birimi , 1 mm.'ye karşılık gelmektedir.

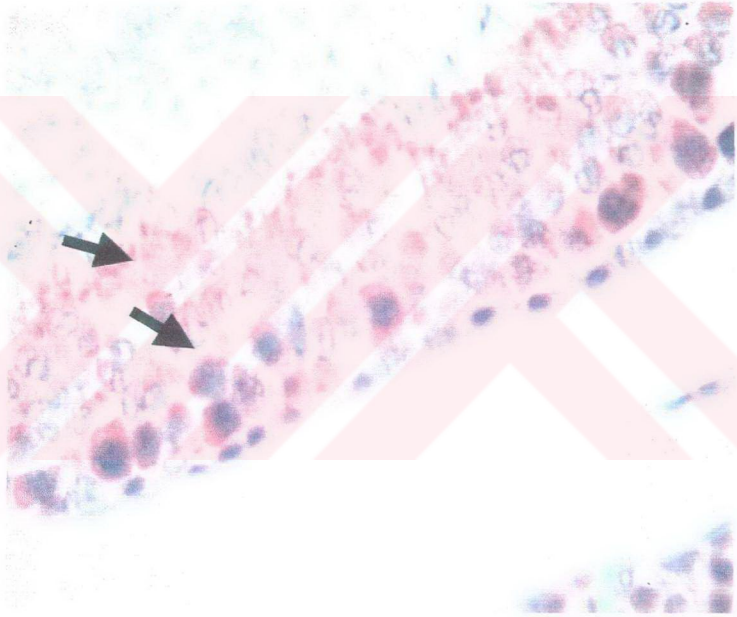
Apoptotik hücre sayımı için de yine preparatların herbirinden rastgele seçtiğimiz 10 alanda , ışık mikroskopunda x 400 büyütmede hücre sayımı yapıldı.(Mallat et al. , 1997. , Lydia Nakapoulou et al. , 2001).

Apoptozis için pozitif reaksiyonun , hücrenin nükleer ve perinükleer bölgelerindeki kahverengi / siyah renklenme ile karakterize olduğu bilinmektedir ki bu tip hücrelerin sayısal değerlendirmesini yapabilmek için de , seçtiğimiz 10 alanda , x 400 büyütmede , toplam 1000 adet germ hücresi sayıldı (apoptotik ve non-apoptotik) (Keith F. Izban et al. , 1999. , Nabil A.S.Eid et al. , 2002).

Apoptotik hücre miktarı için de , bu 1000 hücre içindeki apoptotik hücrelerin sayısal kaydı ayrıca tutuldu. Bu şekilde 10 alkolik – 10 kontrol olmak üzere 20 preparattan 1000'er hücre sayılmış ve bunlardaki apoptotik ve non-apoptotik germ hücrelerinin sayısal değerlerine ulaşılmış oldu (Tablo-1).

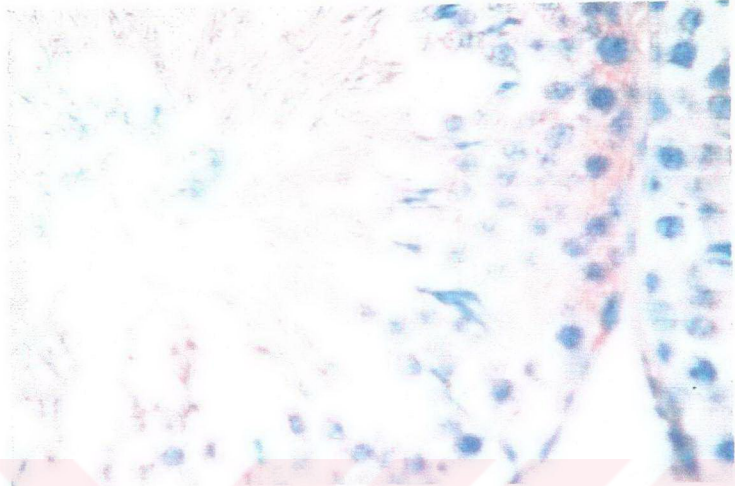
Bu çalışmada apoptotik hücre incelemeleri sadece germ hücrelerine yönelik yapıldı . Leydig hücreleri veya sertoli hücrelerindeki apoptozis olguları kapsama dışında bırakıldı.

Elde ettiğimiz değerlerin istatistiksel anlamını açıklayabilmek için bilgisayar ortamında bu tarz verileri değerlendirebilmek için hazırlanmış bir software olan SPSS programı kullanıldı. Verilerimiz , bu programa girilerek hem seminifer tubül çapları , hem de apoptotik germ hücresi sayıları için p değeri , Mann-Whitney U değeri ve Wilcoxon W değerleri elde edildi.

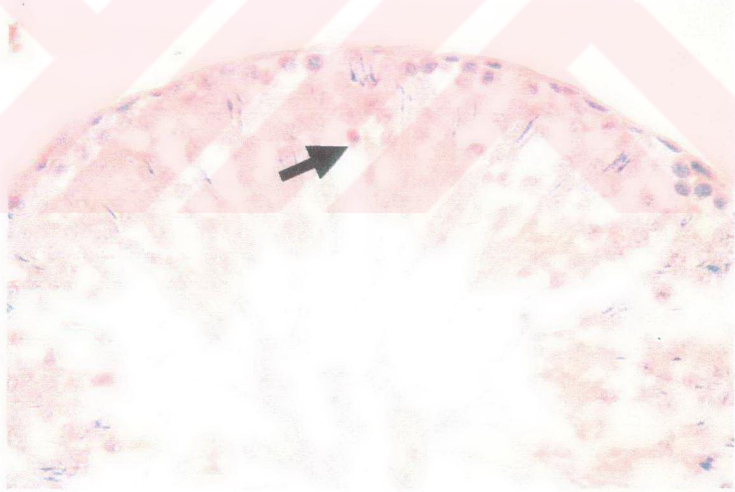


**Resim 1** : Alkolik gruba ait 1 No'lu preparatın x 400 büyütmedeki görüntüsü. Apoptotik germ hücreleri oklarla gösterilmiştir.

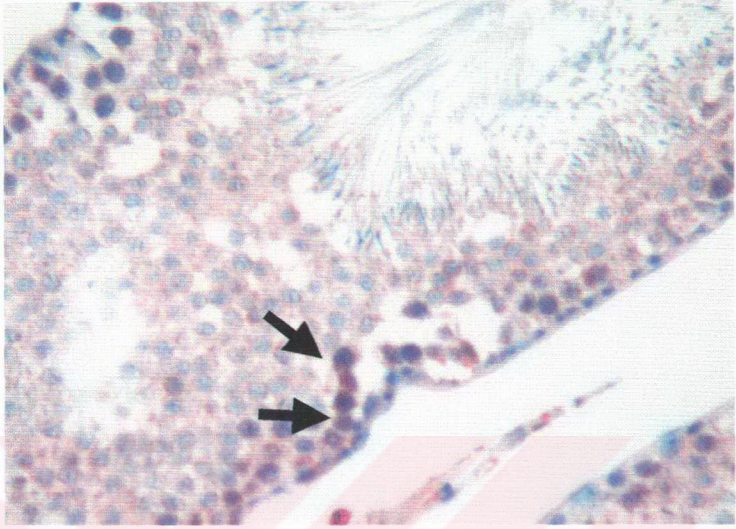




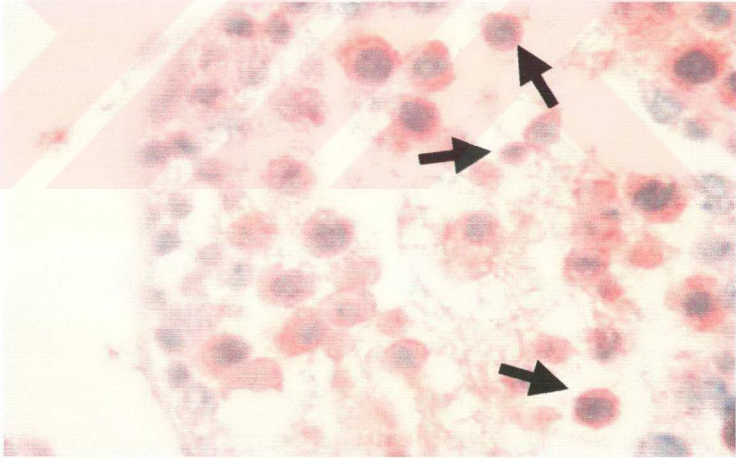
**Resim 2:** Kontrol grubuna ait 8 No'lu preparatın x 400 büyütmedeki fotoğrafı. Apoptotik hücre görülmekte dolayısıyla germ hücrelerinde belirgin bir Caspase boyaması da izlenmemektedir.



**Resim 3 :** Kontrol grubuna ait 5 No'lu preparatın x 200 büyütmede çekilmiş fotoğrafı. Tüm ST içerisindeki tek bir apoptotik germ hücresi ok ile gösterilmiştir.



**Resim 4:** Alkolik rat grubuna ait 10 No'lu preparatın x 200 büyütmedeki fotoğrafı. Apoptotik germ hücre grubu oklarla gösterilmiştir.



**Resim 5:** Alkolik rat grubuna ait 2 No'lu preparatta x 400 büyütmede izlenen bir dizi apoptotik germ hücresi oklarla gösterilmiştir.

## 4. BULGULAR :

Yapılan ölçümlerde elde edilen verilerin tablo ve grafikler aşağıdaki gibi düzenlenmiştir.

	Alkolik grup	Kontrol grubu
1.örnek	88	28
2.örnek	132	44
3.örnek	72	32
4.örnek	108	40
5.örnek	124	32
6.örnek	78	44
7.örnek	80	36
8.örnek	96	28
9.örnek	97	40
10.örnek	100	36

**Tablo 1 :** Alkolik ve kontrol grubu ratlardaki apoptotik hücre sayıları. ( Değerler preparat başına 1000 hücre sayımı sonucunda gözlenen apoptotik hücre adedini vermektedir.)

ST örneği	Alkolik rat grubuna ait preparatlar ' a ait çaplar ( $\mu\text{m}$ .)									
	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-8	A-9	A-10
1 örnek	240	220	230	240	220	250	220	220	290	240
2. örnek	260	250	230	230	230	240	220	230	280	270
3. örnek	220	300	230	230	260	240	230	230	230	270
4. örnek	260	300	260	240	260	230	270	260	240	240
5. örnek	250	260	250	240	250	240	280	230	280	240
6. örnek	300	240	260	240	250	290	280	250	250	270
7. örnek	270	220	260	250	230	250	250	260	240	320
8. örnek	250	270	230	230	230	290	250	250	260	260
9. örnek	240	260	220	280	220	230	230	250	260	270
10. örnek	200	280	270	290	200	240	240	250	230	280
11. örnek	250	250	250	290	250	240	320	260	290	310
12. örnek	260	290	240	310	280	240	240	280	310	310
13. örnek	300	300	230	260	240	250	230	270	250	270
14. örnek	220	240	230	260	220	270	220	230	260	260
15. örnek	270	250	220	220	230	230	240	250	280	280
16. örnek	230	230	300	280	250	270	250	260	270	300
17. örnek	220	220	260	270	260	210	250	240	270	270
18. örnek	200	240	270	250	210	260	290	230	260	280
19. örnek	240	240	280	220	280	270	290	230	270	280
20. örnek	250	230	300	240	240	290	280	250	320	320

**Tablo 2:** Alkolik gruba ait preparatlarda yapılan random örnekleme üzerinden , seçilen seminifer tubül (ST) çaplarını mikrometre ( $\mu\text{m}$ .) biriminden gösteren tablo.



Kontrol rat grubuna ait preparatlar ' a ait çaplar ( $\mu\text{m}$ .)										
ST örneği	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7	K-8	K-9	K-10
1. örnek	300	340	340	350	300	330	300	300	290	330
2. örnek	320	330	300	320	300	300	300	310	280	330
3. örnek	320	300	320	320	320	330	310	320	300	320
4. örnek	350	320	330	320	340	310	310	320	310	300
5. örnek	350	340	340	300	310	310	290	310	300	280
6. örnek	300	340	340	340	300	340	280	330	320	270
7. örnek	290	320	370	310	300	350	300	310	300	300
8. örnek	300	290	390	310	310	330	300	340	340	310
9. örnek	320	330	300	300	310	310	310	320	320	300
10. örnek	320	320	290	350	310	300	310	340	300	320
11. örnek	300	310	320	340	350	320	320	330	290	340
12. örnek	340	280	340	310	340	300	350	350	310	310
13. örnek	340	300	350	320	340	300	350	300	300	270
14. örnek	320	350	350	320	360	300	310	310	320	300
15. örnek	350	320	300	330	330	320	310	310	320	310
16. örnek	300	360	310	350	330	300	300	320	310	320
17. örnek	310	300	340	340	310	310	290	310	330	310
18. örnek	350	320	300	300	310	340	300	310	300	300
19. örnek	320	320	320	300	300	330	320	310	300	280
20. örnek	360	300	310	300	320	290	300	320	290	310

**Tablo 3:** Kontrol grubu ratlara ait preparatlarda yapılan random örnekleme üzerinden , seçilen seminifer tubül (ST) çaplarını mikrometre ( $\mu\text{m}$ .) biriminden gösteren tablo.

	Alkolik grup	Kontrol grubu
Ortalama ST çapları ( $\mu\text{m}$ .)	254,2	316,6

**Tablo 4 :** Kontrol ve alkolik gruplara ait ratların seminifer tubül (ST) çaplarının ortalamasını mikrometre ( $\mu\text{m}$ .) biriminden gösteren tablo ortalamaları

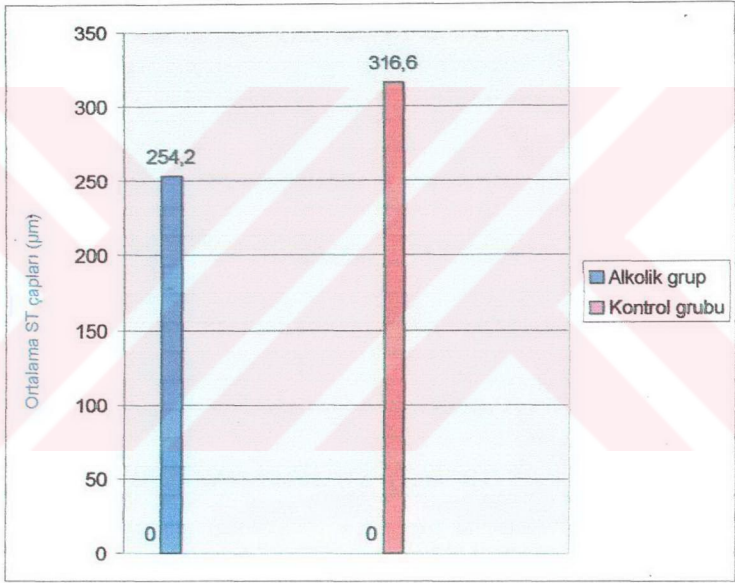
	ALKOLİK GRUP	KONTROL GRUBU
Ortalama apoptotik germ hücresi	97,55555556	36

**Tablo 5 :** Kontrol ve alkolik gruplara ait ortalama apoptotik germ hücresi sayılarını veren tablo. (değerler preparat başına 1000 hücrenin sayımı sonunda elde edilen ortalama değerdir.)

	p değeri	Mann-Whitney U	Wilcoxon W
Apoptotik germ hücresi sayıları için	0,000	0,500	56,0
Seminifer tubül çapları için	0,000	0,500	67,5

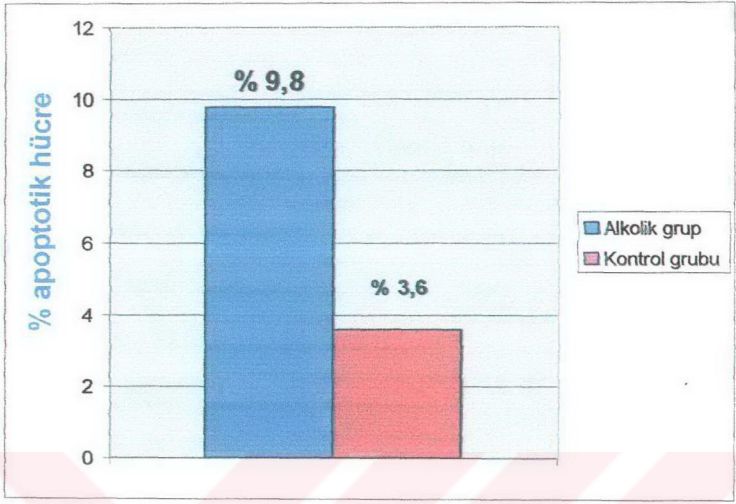
**Tablo 6 :** Alkolik ve kontrol ratların karşılaştırmalı apoptotik hücre sayılarında ve seminifer tubül çaplarına göre p değerlerini , Mann-Whitney U değerlerini ve Wilcoxon W değerlerini gösteren tablo.

## GRAFİKLER :



**Grafik 1 :** Alkolik ve kontrol grubu ratlar için ortalama seminifer tubül (ST) çaplarını , mikrometre biriminden gösteren grafik.





**Grafik 2 :** Alkolic ve kontrol grubuna ait ortalama apoptotik hücre yüzdelerni (%) gösteren grafik.

## 5. TARTIŞMA :

Günümüzde alkolizm , insan sağlığını doğrudan etkileyen tehdit unsurlarından birisidir.Dünyada alkolizmin yaygınlaşması , araştırmacıları , alkolün insan vücudu üzerine etkilerini araştırmaya itmiştir.Bu çalışmalar ilk önceleri alkolün tipik klinik etkilerinin gözlemlendiği karaciğer üzerine yoğunlaşırken , daha sonra alkolün karaciğer dışındaki vücut organlarını da etkileyebileceği düşünülmüş ve çalışmaların kapsamı bu bağlamda genişletilmiştir..

Biz bu çalışmalardan esinlenerek alkolün ; erkek primer cinsiyet organı olan testisler üzerindeki etkisini incelemeye karar verdik.Bu incelemeyi yaparken de özellikle testisin lobüler yapı taşlarından biri olan seminifer tubüllerin ve spermatogenezis'te temel rol oynayan germ hücrelerinin , alkolün dejeneratif etkisinden ne derece etkileneceğini araştırdık.Bizim düşüncemize göre testisin bu komponentlerinin alkolden gördüğü zararları anlamanın en iyi yolu da , hem tubüllerin hem de tubüller içindeki germ hücrelerinin apoptozis eğilimlerini araştırmaktır.

Genel anlamda apoptozis , nekrozdan morfolojik ve biyokimyasal olarak kesin olarak ayrılmış bir hücre ölümü tipidir.Apoptozis konsepti bundan 26 yıl önce (1972) Kerr ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olsa da apoptozis'in nasıl oluştuğunun mekanizması günümüze kadar pek açıklanamamıştı.Son 5 yılda bu hücre içi ölüm programındaki anahtar komponentlerin moleküler identifikasyonunun sonucunda apoptozis'i anlayabilme üzerine büyük aşamalar katedildi. (Imawati Budihardjo , 1999)

Son 20 yıldır apoptozis'le ilgili 24000'den fazla makale yayınlanmıştır. Bunların 21000'inin son 5 yılda yayınlanmış olması bu alana olan ilgiye güncel patlamayı açığa çıkarmaya yeterlidir.Testis ve apoptozis'in birlikte incelenmesi de ise Oysaki 1970-1994 yılları arasındaki testis-apoptozis incelemeleri için yayınlanan toplam makale sayısı 50'yi bulmamaktadır.( bu veriler Medline üzerinde yapılan "testis ve apoptozis" taraması ardından oluşmuştur) (John Richburg , 2000). Bu

veriler bizim çalışmamızın güncel bir çalışma olduğunu ve son 5 yılda üzerine sıkça eğilinen bir konuya temas ettiğini göstermektedir.

Alkol ve erkek üreme sistemi üzerine Mary Ann E. (2001) yaptığı çalışmada alkol kullanımının erkek üreme sistemindeki etkilerini açıklamaya çalışmıştır.Bu araştırmacı alkol kullanımının , erkek üreme isitemindeki hormonlar ve endokrin bezlerin ortak bir sistemi sayılabilecek hipotalamo-hipofizyo-gonadal eksenindeki (HPG) , her üç komponenti de etkilediğini söylemiştir.Aynı araştırmacı alkol kullanımının , düşük testesteron ve üreme hormonlarının çok az salınımıyla karakterize bir durum yarattığını dile getirmiştir. Ratlardaki kronik alkol kullanımı da yine ratların kendi üreme yeterlilikleri ve dölleme sağlıklarını da derinden etkilemektedir ( Mary Ann E. (2001)).Biz de kendi çalışmamızda kronik alkol alınımının ratların testisleri üzerine yıkıcı etkisi olduğu ; hem apoptotik germ hücre sayısının alkolik ratlarda daha fazla olması , hem de seminifer tubül çaplarının daha daralmış olduğunu göstererek ortaya çıkarmaya çalıştık.

Alkolün erkek üreme sistemine etkisi ile ilgili birçok çalışma ratlar üzerine yapılmıştır.Çünkü rat modelleri kendi bedenlerinde insan üreme sistemini taklit eder.Bazı araştırmacılar göstermiştir ki hem akut hem de kronik alkol uygulamaları , ergin ve pubertal ratlardaki düşük hypothalamik LHRH ve hypophysial LH seviyeleriyle ilişkilidir.Ve daha sonraki çalışmalar da alkolün testislerdeki testesteron salınımını inhibe ettiğini öne sürmüştür. (Mary Ann E., 2001 ) Biz de aynı sebeplerden dolayı çalışmamızda rat modellerini kullandık.

Rat testislerindeki germ hücrelerinde oluşan apoptozis'in yaşla veya diyet kısıtlamasıyla artıp artmayacağını ortaya koymaya çalışan çalışmalara da rastladık.(Christopher J. Barnes , 1999). Aynı araştırmada 4 - 13 ve 23 aylık ratlara kontrol grubuna adlibitum yem verilirken , çalışma grubuna ise % 40 yem kısıtlaması uygulanmıştır.Apoptozis , yapılan PAS boyamanın ardından x400 büyütmede bakılarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar göstermiştir ki adlibitum yem verilen ratlarda yaş artışına bağlı olarak apoptotik seminifer tubül sayısında anlamlı bir artış bulunurken , apotozis-pozitif tubüllerdeki apoptotik germ hücresi sayısında

ise bir azalma vardı.23 aylık ratlardaki normal ve diyet kısıtlaması yapılmış gruplar arası yapılan karşılaştırmada ise ; kısıtlanmış grupta hem apoptotik seminifer tubül yüzdelerinde , hem de bunlardaki apoptotik hücre sayılarında anlamlı bir artış vardı.Artan yaş , diyet kısıtlaması yapılmasa bile , apoptotik germ hücre apoptozis'i yüzdesinde anlamlı bir artışa neden olmuştur ( Christopher J. Barnes , 1999) .Bu da bize çalışmamızdaki gibi sadece alkolün apoptotik hücre sayısını değiştirmeyeceğini bununla beraber yukarıdaki araştırmacının da belirttiği gibi yaşlanma ve diyetin de hücrelerdeki apoptozis'i etkilediğini göstermiştir. Buradan yola çıkarak bütün ratların diyet , oda sıcaklığı , yaş ve yaşadıkları ortam aynı olduğu için ratları eşit olması gerektiğini kabul ettik.Aynı yaştaki ratlara izokalorik anlamda ve miktarca eşit diyet vererek , yaş ve diyetin apoptozis üzerindeki etkisini ortadan kaldırdık.Bu şekilde ethanol uygulanmış ratlardaki artmış apoptozis tablosunun tek sorumlusunun , oral yolla verdiğimiz alkol solüsyonu olduğunu kabul ettik.

Krista E. ve arkadaşları (1997) , testesteronun erişkin insan seminifer tubüllerindeki apoptozis'i regüle etmesini araştırmıştır. Bu çalışmada erişkin insan testislerindeki apoptozis'in gelişiminin incelenmesi ve identifikasyonu için in vitro bir model geliştirilmiştir.Örnekler prostat veya testis kanserli ve orşidektomi yapılmış bireylerden alınmıştır.Seminifer tubüller bu örneklerden izole edilmiş ve serumsuz şartlar altında saklanmış daha sonra testesteron ortamında bırakılmıştır.İlk 4 saatlik , 0,000001 ve 0,0001 mol/L konsantrasyonda testesteron inkubasyonundan , apoptozis'de anlamlı bir baskılanma tespit edilmiştir.Apoptozis'in incelenmesi için yapılan immunositokimyasal çalışmada antikor olarak anti-DIG-AB , Boehringer Mannheim ; 1:10000 solüsyonu kullanılmış ve vakalar hem ışık hem de elektron mikroskopunda incelenmiştir (Krista E. ve arkadaşları (1997)).Çalışmamızda da interstisyel dokuda leydig hücrelerinde benzer apoptotik tablolara rastlanmış ancak bu hücrelerin apoptotik eğilimlerindeki farklılaşma çalışmamızın kapsamının dışında bırakılmıştır.

Michiharu Miaura ve arkadaşları (2002) , rat testislerinde sıcaklık uygulamasının ardından oluşan apoptozis'i ve apoptozisle ilgili genleri incelemiştir. Bu çalışmada fare testisine ısı uygulamanın ardından gelişen apoptozis'in



düzenleyicileri açıklanmaya çalışılmış ve ısı stresine bağlı germ hücre apoptozis'inin moleküler mekanizması tartışılmıştır. Apoptozis incelenmesi için anti-Bcl-2 (1:1000) , anti-Bcl-xl ( 1:1000 ) rabbit poliklonal antikoları ve anti-Fas ( 1:200 ) kullanılmıştır. Bcl-xl seviyesinde anlamlı bir farklılık izlenmemiştir. Ancak Bcl-2 seviyesi ısı uygulamasından 7 gün sonra anlamlı bir düşüş göstermiştir. Fas-1 ısı uygulamasından sonraki 1-3 gün içerisinde anlamlı bir artış göstermiştir. seviyesi ise

Genel bakışta testise ısı uygulanmasından 3 gün sonra , bilateral testis ağırlıklarında anlamlı bir azalma meydana gelmiştir. Apoptotik hücre sayılarında ve apoptotik tubül yüzdelğinde ise 1 gün içerisinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Yaptığımız çalışmada bütün ratlar eşit oda sıcaklığında ( $22 \pm 3$  C°) , eşit nem ortamında ( $62 \pm 7\%$ ) , eşit ebatlardaki kafelerde ( $32 \times 25 \times 15$  cm. boyutlarda ve kafes başına 3 adet rat olacak şekilde) beslenmiştir. Bu şekilde de ısının rat testisindeki germ hücreleri üzerindeki etkisi de ekarte edilmiştir.

Literatür taramamız sırasında , bizim çalışmamıza amaç , method ve elde edilen sonuçlar yönünden en yakın olan çalışma Nanil A.S. ve arkadaşlarının (2002) yaptığı " Fas sistemi ve aktif Caspase'ların , ethanol uygulanmış ratların testiküller germ hücresi apoptozis'indeki etkileri " başlıklı çalışmaydı. Bu araştırmacıların deyimiyle Fas , çeşitli dış zorlamalara maruz kalmış deney hayvanlarındaki , testis hasarıyla ilintili germ hücresi apoptozis'inin düzenlenmesine karışan bir sistemdir. Araştırmacılar artan testis apoptozis'inin düzenlenmiş Fas sistemi tarafından yönetildiği ve aktif caspase'ların ethanol uygulamasına bağlı testis dokusu hasarında rol alabileceği hipotezini test etmişlerdir. 12 hafta boyunca Wistar ratları hem Lieber-DeCarli'nin ethanolü sıvı diyetiyle , hem de isokalorik normal diyetle 12 hafta boyunca beslenmişlerdir. Ethanol uygulanmış ratların (ETR) testislerindeki sertoli hücresi vakuolizasyonu ve germ hücre dejenerasyonunu , hem ışık hem de elektron mikroskopunda gözlemlenmiş , bu gözlemler sonucunda seminifer tubül (ST) çapları açısından kontrol grubunda ortalama  $261 \pm 46,2$   $\mu\text{m}$  , alkolik gruptaki ratlar (ETR) için de  $160,5 \pm 23$   $\mu\text{m}$  değerlerini bulmuşlardır. Buna göre ST çaplarının ETR'da , kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldığını ( $p < 0,01$ ) ortaya koymuşlardır (Nanil A.S. ve arkadaşları , 2002) . Bizim çalışmamızda benzer yöntemle hem kontrol hemde kronik alkolik hale getirilmiş ratların testis seminifer



tübül (ST) çapları arasında , ETR'da kontrol grubuna kıyasla , azalma yönünde anlamlı bir fark bulduk ( $p<0,01$ ).Bu bakımdan sonuçlarımız ile Nabil ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlar arasında paralellik bulunmaktadır. Nabil ve arkadaşlarının (2002) , araştırma sonuçlarına göre apoptotik ST 'lerin ve apoptotik germ hücrelerinin yüzde değerleri de , ETR 'da kontrollere oranla anlamlı biçimde artmıştı ( $p < 0,01$ ). Bu çalışmanın ana bulgusu , ETR'daki artmış germ hücre apoptozis'inin , uyarılan Fas sistemi ve artan Caspase-3 , -8 ve -9 aktiviteleriyle ilişkili olmasıdır.Bizim çalışmamızın sonuçları da apoptotik germ hücresi değerleri yönünden yine bu araştırmacıların sonuçlarıyla paralellik gösteriyordu.Biz de aynı şekilde ETR ratlardaki apoptotik germ hücresi sayıları ile kontrol grubu ratlardaki apoptotik germ hücreleri sayısına oranla anlamlı bir artış tespit ettik ( $p < 0,01$ ). Öyle ki Nabil ve arkadaşlarının bulunduğu apoptotik germ hücresi yüzdeleri kontrol grupları için yaklaşık % 2,5 , alkol uygulanmış ratlar (ETR) için ise yaklaşık % 10 gibi bir değerdedi.Bizim sonuçlarımız da bu değerler kontrol grubu için % 3,8 , ETR için ise % 9,6 olarak tespit edildi.Bu araştırmadan farklı olarak biz farklı Sprague-Dawley ırkı ratlarla , farklı bir etanol diyetiyle ve sadece Caspase aktivitesi üzerine çalıştık.

Bazı araştırmacılar Caspase-3'ün apoptotik hücrelerde ne tip bir lokalizasyona yöneldiğini çalışmalarında belirtmiş ve Caspase-3 pozitif reaksiyon veren apoptotik bir hücrenin mikroskop altında nasıl izleneceğini belirtmişlerdir.Bunlardan biri Keith F. Izban ve arkadaşlarının (1999) , “ Interleukin-1β çevirici enzimin , Ced-3 ailesi protease'ların ve Caspase-3/CPP32 'ın Hodgkin hastalığında , karakterizasyonu” isimli çalışmasıydı. Keith F. Izban ve arkadaşları (1999) , 11 tane NLPHD (nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease) vakasından alınıp , formalinde fikse edilip , prafin bloklara gömülmüş dokular üzerinde çalışmışlardır.Bu dokuları , 4 mikron kalınlığında kesitlere ayırarak , 1:200 dilüsyonda hazırlanmış Caspase-3 CPP32 ile immunositokimyasal boyamaya tabi tutmuşlardır.Gözlemlerine göre ; apoptozis'e yönelik Caspase pozitif reaksiyonu , hücrenin nükleer ve perinükleer bölgelerinde görülen kahverengi/siyah renkli boyama ile karakterize bir tablodur.Bu tarzdaki apoptotik hücreler x400 büyütmede 1000-hücre sayımı üzerinden değerlendirilmiştir.Dokularda , normal dokular ile kıyaslandığında anlamlı bir apoptotik hücre sayısı ve Caspase-3 reaksiyonu

gözlenmiştir.Biz de bu araştırmacılar gibi apoptozisin immunositokimyasal yöntemle identifikasyonu için Caspase-3 (CPP32) antikorunu kullandık.Sonuçta da Caspase-3 'ün hücre içi lokalizasyonu açısından benzer bir görüntüyle karşılaştık.Ayrıca hücrelerimizi sayarken de tıpkı Keith F. Kezban ve arkadaşları gibi x 400 büyütmede 1000 hücre sayımı yaptık.

“Alkolün erkek üreme sistemine etkisi” konulu çalışmalarında Wright ve arkadaşları (1991) , alkolün erkeklerde , libido kaybı , impotans ve steriliteye neden olduğunu , testiküler hücelere ve beyindeki kontrol merkezlerine verilen direkt zararın bu seksüel disfonksiyonu açıklamaya yeterli olduğunu söylemişlerdir.Alkol kullanımı ve reproductive fonksiyon kaybı arasındaki ilişki uzun zaman önce kabul edilmiştir.Eksik seksüel fonksiyonun ( hipogonadizm ) , sterilit , libido kaybı , impotans, prostat bezindeki hacim azalması ve sperm üretimindeki azalmayla karakterize olan belirti ve semptomları , alkol kullanımıyla ilgilidir.Hypogonadizm ; alkolün testis üzerine olan direkt etkisinin yanında , beynin gonadal fonksiyonları regüle eden kısımları üzerine olan etkisiyle de ilgilidir.Testisin sperm üretiminden sorumlu hüceleri tüm testis hacminin %95'ini oluştururlar.Bu nedenle sperm üretimindeki bir bozukluk testis atrofisiyle de karakterize bir tabloya neden olabilir .

Araştırmacılar alkolün , testisin her iki fonksiyonuna olan direkt etkisini araştırmışlardır.İzole edilmiş Leydig hüceleri üzerinde yapılan çalışmalarda , alkol metabolizması ürünü olan acetaldehyde'in bu hücelere üzerine diğerlerinden daha çok zararı olduğunu bulmuşlardır.Spermatogenez için de Gavalier ve Van Thiel , kronik alkolik insan ve ratlarda çalışmış ve seminifer tübüllerdeki germ hüceleri sayılarını incelemişlerdir (Wright ve arkadaşları (1991)) . Biz de kendi çalışmamızda alkolün seminifer tübüllerdeki germ hücelelerini apoptozis yönünden inceledik.Ancak model olarak sadece rat testislerini kullanmamız mümkün oldu.Bizim bulgularımıza göre alkol kullanımı , germ hücelerin apoptozis'e eğilimini arttırmıştı ve bu da daha az sağlam germ hücresi ve dolayısı ile daha az sperm üretimi demektir.Bu sebeple , Wright ve arkadaşlarının alkol kullanımının sperm üretimini baskıladığı yönündeki açıklamalarını , kendi bulgularımız ışığında desteklemekteyiz.

Aynı araştırmacılar bu zararın neden meydana geldiğini ise şu şekilde açıklamışlardır : Alkol metabolizması kendi başına testis hasarı meydana getirir.Alkolün temel metabolik döngüsü , alkolün , karaciğerde bulunan alkol dehidrojenaz (ADH) enzimiyle , asetaldehit'e dönüşmesidir.Günümüz alışmaları göstermiştir ki testis , karaciğerdeki ADH enziminden daha farklı yapıda bir ADH içermektedir. Bu testiküler ADH , retinol (vit-A formu) 'ü , normal spermatogenezde esansiyel bir bileşik olan retinal'e eviriren bir fonksiyon gösterir. Ne zaman ki ADH alkolü metabolize etmek için aşırı oranda kullanılırsa , spermatogenez de retinal 'in sentezinin bloke olmasıyla birlikte indirekt olarak bloke edilir.Testiste Acetaldehyde üretimi , sülfür içeren bir bileşik olan glutathione'un seviyesini de azaltır.Glutathion'un ana görevi , membranları ve diğer bazı yağ dokularını lipid peroxidasyonundan korumaktır.Bu da uzun süre alkol kullanımı neticesinde ,testis hasarı meydana getirmektedir(Wright ve arkadaşları (1991)). Tüm bu bulgular bizim dokularımızda alkol kullanımı neticesinde neden böyle bir apoptotik eğilim olduğunu ispatlar niteliktedir.

Draga Stiblar ve arkadaşları (2001) , apoptozis'i gelişim sırasında izlenen bir majör fenomen olarak nitelendirmişler ve apoptozis'in doku homeostazında da kritik bir rol oynadığına dikkat çekmişlerdir. Bu çalışmayı yaparken Draga ve arkadaşları , insan testisi biopsilerinden hazırlanan örneklerde apoptotik germ hücre varlığı ve sıklığını gözlemlemişlerdir.Dokular , azospermili , anejekulasyonlu , oligo-astheno ve teratospermili toplam 55 hastada yapılan testis biopsileriyle elde edilmiş. Sonuçlar germ hücre apoptozis'i varlığını kanıtlamakla birlikte , sertoli hücrelerinde apoptotik bir bulgu olmadığını göstermiştir.Artmış apoptotik index , normale karşılaştırılan azospermili bireylerde gözlenmiştir.Bu çalışmanın neticesi , infertil insanlardan alınan testiküler dokularda , germ hücre apoptozis'i olduğunu ispatlamış ancak sertoli hücrelerinin ise apoptotik olmadığı görölmüştür.Bu araştırmacılar göre ; apoptozis , çok sayıda patolojik durumda da izlenmektedir(Draga Stiblar ve arkadaşları (2001)). Biz deneyimizde uzun süreli oral alkol vermek suretiyle bu patolojiyi kasıtlı olarak yarattık ve apoptozis yönünden kontrol gruplarına göre anlamlı bir artış tespit ettik.



Draga Stiblar ve arkadaşları (2001) spermatogenesis'i de , germ hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonuna ait dinamik bir işlem olarak tanımlamışlar ve normal spermatogenez boyunca , çok sayıda testiküler germ hücresi de apoptozis'e maruz kaldığını belirtmişlerdir.Biz de deneyimiz sonucunda kendi yetiştirdiğimiz ve normal spermatogenezis göstermesi gereken kontrol grubu ratlarımızda %3,9 oranında apoptotik germ hücresine rastladık ki bu sonucumuz da Draga ve arkadaşlarının sonuçlarıyla benzeşmektedir.

John Richburg ve arkadaşları ( 2000 ) 'na göre germ hücrelerinin apoptozis yolu ile eliminasyonu normal fizyolojik koşullar altında spontan bir şekilde meydana gelmektedir ve kimyasal kökenli testis hasarlarında da bu durum artmayla birlikte izlenir.Gerçi çok sayıda değişik apoptozis-bağıntılı madde testislerde inceleme yeri bulmuştur ancak tertiküler germ hücre apoptozis'ini regüle eden moleküler ve sellüler mekanizma tam anlamıyla anlaşılammıştır.Bu çalışmada germ hücre apoptozis'inin spermatogenezdeki etkisi ve apoptozis'deki olası anahtar regülatörler açıklanmıştır. Çalışmada görülmüştür ki ; germ hücre proliferasyonu , diferensiasyonu ve apoptozis arasındaki balans , spermatogenez üzerinde kritik bir rol oynamaktadır. Bizim çalışmamız , John ve arkadaşlarının kendi çalışmalarında bahsettiği kimyasal kökenli testis hasarı oluşturma prensibine dayanıyordu ve onların bahsettiği apoptozis'deki artışı biz de kendi çalışmamız neticesinde gördük.

Zhu Q ve arkadaşları ( 2000 ) , kronik alkol alımının testiküler atrofiye ve erkeklerde infertiliteye neden olduğunu belirtmişlerdir.Araştırmalarında kronik alkol uygulaması için Sprague Dawley ırkı ratlarını Liber-Decarlie sıvı ethanol diyetiyle 9 hafta boyunca beslemişlerdir.Akut ethanol uygulaması için ise az bir volümde %20'lik ethanol çözeltisini intratestiküler injeksiyon yoluyla ratlara vermişlerdir.Apoptozis'de devreye girecek proteinlerin tanımlanabilmesi için ise reverse-polymerase-chain-reachion ( rPCR ) ve Western blotting yöntemlerini kullanmışlardır.

Sonuçta görmüşlerdir ki ethanolllü diyetle beslenen gruptaki ratlarda , izokalorik yemle beslenen kontrol grubuna oranla testiküler DNA fregmentasyonunda bir artış görülmüştür.Ethanol ayrıca spermatogoniaların ve

spermatisitlerin sayısında da bir azalmaya sebep olmuştur.Direkt intratestiküler ethanol verilimi de yine DNA fregmantasyonunda ve germ hücre apoptozis'inde bir benzer bir artışa sebep olmuştur. Biz , yaptığımız çalışmada akut alkol veriliminin doğuracağı sonuçları incelemesek de , kronik alkol diyeti uygulamasının ardından Zhu ve arkadaşlarının bulgularını destekler nitelikte bir germ hücre apoptozis'i gördük.

Tüm bu literatür karşılaştırmalarının , değerlendirmelerinin üzerine , bizim çalışmamızın bulgularını da ekleyerek gördük ki , alkol kullanımı testislerde gözle görülür bir hasara neden olmaktadır. Alkolün metabolize olmasıyla ortaya çıkan yan ürünler açık bir şekilde testiküler germ hücrelerini apoptozis'e sürüklemekte bu da sperm üretimini doğrudan baskılamaktadır. Alkol metabolitlerinin , seminifer tubülleri de apoptozis'e sürüklediği ve çaplarını daralttığı gerçeği de biz ve birçok araştırmacıya ait çalışmalarda ortaya atılan ortak bir görüş olmuştur.



## 6. SONUÇLAR :

- 1- Elde ettiğimiz bulgular ışığında gördük ki kronik alkol kullanımı erkek gonadlarında , germ hücrelerindeki apoptozisi indüklemekte ve apoptotik germ hücresi yüzdesinde anlamlı bir artış meydana getirmektedir ( $p<0,05$ ).  
(Alkolik grupta tespit edilen apoptotik germ hücrelerinin toplam germ hücresine oranı % 9,8 , kontrol grubu için ise bu değer % 3,6 olarak bulunmuştur.)
- 2- Sağlıklı germ hücrelerinin azalması , dolaylı olarak erkeğin sperm üretimini sayıca ve kalite anlamında geriletmektedir.
- 3- Bu çalışmayla yine açığa çıkmıştır ki , testisin lobüler yapısındaki en önemli yapıtaşı sayılabilecek olan seminifer tubüllerin çapları da alkol kullanımına bağlı olarak anlamlı şekilde azalmıştır ( $p<0,05$ ).  
(Alkolik grupta ST çaplarının ortalama değeri 254,2  $\mu\text{m}$  , kontrol grubu için ise 316,6  $\mu\text{m}$  olarak bulunmuştur.)
- 4- Hem seminifer tubül çapları hem de germ hücrelerindeki apoptozis artışına bağlı bulgularımız göstermiştir ki uzun vadede alkol kullanımı erkeğin üreme yeteneğinde gözle görülür bir gerilemeye yol açacaktır.

## 7. KAYNAKLAR :

- 1- <http://www.alkol.gen.tr/tarihce.html>,
- 2- <http://www.alkol.gen.tr/zararlari/bulgular.html> ,
- 3- Orhan Öztürk : Ruh sağlığı ve hastalıkları ,Türkiye sinir ve ruh sağlığı derneği yayını no:7 , Ankara , 1983 ,
- 4- <http://lokman.cu.edu.tr/psychiatry/alkol.htm>
- 5- Doğan Cüceloğlu : İnsan ve davranışı , Büyük fikir kitapları dizisi : 96 , Remzi kitabevi , İstanbul , 1996.
- 6- Adnan Ziyalar : Sosyal psikiyatri , ISBN: 975-411-283-5 , Çevik matbaacılık , İstanbul , 1999 .
- 7- Sadler , T.W.: Medical Embryology .Seventh edition . Williams&Wilkins , Baltimore USA. , 1995.
- 8- Halit Kayalı , Güngör Şaturoğlu , Mustafa Taşyürekli : İnsan Embriyolojisi , Alfa Basım Yayın Dağıtım , Yayın No 29 , İstanbul , 1992.
- 9- L. Carlos Junqueira , Jose Carneiro , Robert O. Kelley : Basic Histology . Sixth edition. Appleton & Lange , Norwalk ,Connecticut , California , 1989.
- 10- Gary A. Thibodeau , Kevin T. Patton : Anatomy and physiology - fifth edition by Mosby year book inc. , Missouri , USA , 2003
- 11- David T. Lindsay : Functional Human Anatomy , Mosby Year book inc. , Missouri , USA , 1996.
- 12- Gray's Human anatomy , Thirty-eight edition , Chuchill Livingstone , 1995
- 13- Mehmet Yıldırım : Topografik anatomi , Nobel Tıp Kitabevleri , İstanbul – Eylül 2000.
- 14- Kaplan Arıncı , Alaiitin Elhan : Anatomi . 3.Basım . Güneş Kitabevi Ltd.Şti. , Sıhhiye-Ankara , 2001.
- 15- Keith L. Moore , Arthur F. Dalley II : Clinically oriented anatomy . Fourth edition , Lippincott Williams &Wilkins , Baltimore / Maryland 21201-2436 , USA , 1999.
- 16- Ahmet Çimen : Anatomi , Uludağ Üniversitesi Güçlendirme Vakfı yayınları No: 87 , Bursa , 1996.

- 17- İbrahim Veli Odar : Anatomi Ders Kitabı , Fakülte Kitabevi , Diyarbakır, 1979.
- 18- Richard S. Snell : Clinical anatomy . Fifth edition , Little Brown & Company , Washington D.C. , USA , 1995.
- 19- Fahri Dere : Anatomi atlası ve ders kitabı . Beşinci baskı – 2.cilt . Adana Nobel Tıp Kitabevi , Adana , 1999.
- 20- Nuran Gökhan , Hayrūnisa Çavuşođlu , Abidin Kayseriliođlu :İnsan Fizyolojisi – II . Filiz Kitabevi , İstanbul , 1986.
- 21- Arthur C. Guyton , John E. Hall , Tıbbi Fizyoloji – 9. baskı , Nobel Tıp Kitabevleri , Çapa , İstanbul , 1996.
- 22- Gary A. Thibodeau , Kevin T. Patton : Anatomy & Physiology . Fifth edition . Mosby St.Luis , Missouri / USA , 2003
- 23- Murat Tosun , Serpil Kalkan : Apoptozis ve önemi . Sendrom dergisi . vol : 14 , Haziran 2002
- 24- Münevver Yenerman : Genel Patoloji . Cilt-2 . Üçüncü Basım. Nobel Tıp Kitabevleri Çapa / İstanbul , 1994
- 25- Vinay Kumar , Ramzi S. Cotran , Stanley L. Robins : Basic Pathology , fifth edition , Nobel Tıp Kitabevleri , Çapa – İstanbul , 1995 .
- 26- T. Utkan , F.Erden , F.Yıldız , S.Özdemirci , G.Ulak , M.N.Gacar . Chronic ethanol consumption impairs adrenoceptor and mediated purinoceptor-mediated relaxations of isolated rat detrusor smooth muscle. BJU International , vol : 88 , p.278-283 , 2001.
- 27- Thomas C.K. Chan , Morley C. Sutter : Ethanol consumption and blood pressure . Life Sciences , Vol : 33 , 1983
- 28- Sigma Diagnostic Chemical company , Diagnostics division , Linkline : 0800 373731, Dorset , United Kingdom , 1995
- 29- NeoMarkers Data Sheet . Rev 110602H . Lab vision corp. 47790 Westinghouse Dr.Fremont CA 94539 , USA.
- 30- Imawati Budihardjo , Holt Oliver , Michael Lutter , Xu Luo , Xiodong Wang : Biochemical pathways of Caspase activation during apoptosis , Annu.Rev.Cell.Dev.Biol , 15:269-290 , 1999)

- 31- John Richburg : The revelance of spontaneus- and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology , Toxicology Letters 112-113 , 79-86 , 2000.
- 32- Mary Ann Emanuelle , Nicholas Emanuelle : Alcohol and male reproductive system , Alcohol research and health , vol.25-4 , 282-287 , Washington2001
- 33- Christopher J. Barnes , Benjamin W. Covington , Makau Lee , Josefa Blanco Rodriguez , The Journals of Gerontology , vol.54-A , 199-206 , 1999
- 34- Krista Erkkila , Kenth Henriksen , Virve Hirvonen , Sakari Rannikko , Jaakko Salo , Martti Parvinen , Leo Dunkel : Testesteron regulates apoptosis in adult human seminiferus tubules in vitro. , The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism , vol.82 , No:7 , 2314-2321 , 1997.
- 35- Nabil A.S.Eid , Masa-Aki Shibata , Yoko Ito , Ken Kusakabe , Hanna Hammad , Yoshinori Otsuki : Involvement of Fas system and active caspases in apoptotic signalling in testicular germ cells of ethanol threated rats. , Internationa Journal of Andrology , 25:159-167 , 2002.
- 36- Keith F. Izban , Tamara Wrone –Smith , Eric D. Hsi , Bertram Schintzer , Maria Euginia Quevedo , Serkan Alkan : Characterization of interleukin 1- $\beta$  conversting enzyme/ Ced-3-Family protease , Caspase-3/ CPP32 in Hodgkin disease , American Journal of Pathology , vol.154-5 , 1999.
- 37- Wright , Harlan I. , Gavalier , Judith S. : Effects of alcohol on the male reproductive system , Alcohol & Health Research , vol-15 , issue 2 , 1991.
- 38- Zhu Q , Meisinger J. , Emanuelle N.V. , Emanuelle M.A. , La Paglia N. , Van Thiel D.H. : Ethanol exposure changes apoptosis within testis. , Alcohol clinical Exp.Research , 24-10 : 1550-6 , 2000 .
- 39- Draga Stiblar Martincic, Irma Virant Klun , Barnko Zorn , Helena Meden Vrtovec : Germ cell apoptosis in the human testis : Pflügers Arch – Eur J Physiol , 442 , 2001.