



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



RESVERATROL VE DİALİL DİSÜLFİTİN SIÇAN TESTİSİNDE
KADMIYUM İLE OLUŞTURULMUŞ AKUT HASARA ETKİSİ

KIYMET ZÜLAL UYGUL

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

BURSA-2017



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



**RESVERATROL VE DİALİL DİSÜLFİTİN SIÇAN TESTİSİNDE
KADMIYUM İLE OLUŞTURULMUŞ AKUT HASARA ETKİSİ**

KIYMET ZÜLAL UYGUL

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ

KUAP(T)-2015/45- Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu

BURSA-2017

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYAN

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum
“Resveratrol ve Dialil Disülfidin Sıçan Testisinde Kadmiyum ile Oluşturulmuş Akut Hasara Etkisi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Kıymet Zülal UYGUL

Tarih ve İmza

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Kıymet Zülal UYGUL tarafından hazırlanan “Resveratrol ve Dialil Disülfidin Sıçan Testisinde Kadmiyum ile Oluşturulmuş Akut Hasara Etkisi” konulu Yüksek Lisans tezi 01/06/2017 günü, 13:00-14:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Adı-Soyadı

İmza

Tez Danışmanı Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ

Üye Prof. Dr. Semiha ERSOY

Üye Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY

Üye

Üye

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

22/05/2017

Adı Soyadı: Kıymet Zülal UYGUL

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Çalışmamızın konusu; özellikle endüstriyel alanda çalışan işçilerin sıklıkla maruz kaldığı kadmiyum toksisitesinin önlenmesi ya da bu toksisitenin etkilerinin en aza indirgenmesi için önemli antioksidan maddelerden resveratrol, dialil disülfid ve bunların kombinasyonunun sıçan testisinde oluşturulan akut kadmiyum toksisitesi üzerindeki hasar önleyici etkisinin incelenmesidir.

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Zeynep Kahveci

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY FORMU.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET.....	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Testis Hakkında Genel Bilgiler.....	3
2.1.1. Testis Embriyolojisi.....	3
2.1.2. Testisin Yapısı ve Anatomisi.....	5
2.1.3. Testis Histolojisi	7
2.1.3.1. İnterstisyel Doku	7
2.1.3.2. Seminifer Tübüller	8
2.1.3.3. Sertoli Hücreleri	9
2.1.3.4. Spermatogenez.....	11
2.1.3.5. Kan Testis Bariyeri ve Sıkı Bağlantılar	14
2.2. Apoptoz Hakkında Genel Bilgiler	16
2.2.1. Apoptozun Tanımı ve Tarihçesi.....	16
2.2.2. Apoptozun Biyolojik Sürece Etkisi	16
2.2.3. Apoptozu Uğrayan Hücrelerin Karakteristik Özellikleri	18
2.2.4. Apoptozun Düzenlenmesinde Rol Alan Moleküller	19
2.2.5. Apoptozun Mekanizması	20
2.2.6 Spermatogenezde Apoptozun Rolü.....	22
2.3. Kadmiyum Hakkında Genel Bilgiler.....	23
2.3.1. Kadmiyumun Genel Özellikleri.....	23
2.3.2. Kadmiyumun Keşfi	23
2.3.3. Kadmiyumun Çevreye Etkisi.....	24
2.3.4. Kadmiyumun Toksikitesi	25
2.3.5. Kadmiyumun Maruziyeti.....	25
2.3.6. Kadmiyumun Metabolizması.....	26
2.3.7. Kadmiyumun Testis Üzerine Etkileri.....	27
2.4. Resveratrol Hakkında Genel Bilgiler	29

2.4.1. Resveratrolün Genel Özellikleri	29
2.4.2. Resveratrolün Keşfi.....	30
2.4.3. Resveratrolün Metabolizması	30
2.4.4. Resveratrolün Biyolojik Etkileri.....	31
2.4.5. Resveratrolün Apoptoz Üzerine Etkileri	33
2.5. Dialil Disülfid Hakkında Genel Bilgiler	34
2.5.1. Dialil Disülfidin Genel Özellikleri	34
2.5.2. Dialil Disülfidin Biyolojik Etkileri	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	37
3.1. Deney Hayvanları.....	37
3.2. Kimyasallar	37
3.3. Deney Grupları.....	37
3.4. Dokuların Alınması	38
3.5. Testis Ağırlık İndeksi Hesaplaması	38
3.6. Işık Mikroskopik Preparasyon	38
3.6.1. Hematoksilen-Eozin ve Histolojik Skorlama	39
3.6.2. Periyodik Asit-Schiff + Hematoksilen (PAS+H)	40
3.6.3. TUNEL Yöntemi	41
3.6.4. Kaspaz-3 İmmünohistokimyası	42
3.7. İstatiksel Analiz	44
4. BULGULAR.....	45
4.1.Vücut Ağırlığı Farkı.....	45
4.2. Testis Ağırlık İndeksi	45
4.3. Işık Mikroskopik Bulgular	46
4.3.1. İmmünohistokimyasal Bulgular	54
4.3.1.1. TUNEL Bulguları	54
4.3.2.2. Kaspaz-3 Bulguları.....	57
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	61
6. KAYNAKLAR	71
7. SİMGELER ve KISALTMALAR.....	81
8. EKLER.....	83
9. TEŞEKKÜR.....	85
10. ÖZGEÇMİŞ	86

TÜRKÇE ÖZET

“Resveratrol ve Dialil Disülfidin Sıçan Testisinde Kadmiyum ile Oluşturulmuş Akut Hasara Etkisi”

Bu çalışmada, önemli bir çevre kirletici ve dokular üzerine zararlı etkileri olan kadmiyumun erkek fertilitesi üzerine oluşturduğu hasara karşı resveratrolün ve dialil disülfitin koruyucu etkileri araştırıldı.

Yapılan deneyde kadmiyum toksisitesi oluşturmak amacıyla kadmiyumun suda çözölen formu CdCl₂ kullanıldı. CdCl₂ serum fizyolojik içerisinde çözölenek intraperitoneal enjeksiyon ile, resveratrol (RES) serum fizyolojik içerisinde çözölenek oral gavaj ile ve dialil disülfid (DDS) mısır yağı içerisinde çözölenek intraperitoneal enjeksiyon ile uygulandı. Çalışmada 35 adet Wistar albino rat kullanıldı ve 5 grup (A: kontrol, B1: CdCl₂, B2 RES + CdCl₂, B3: DDS + CdCl₂, B4: RES + DDS + CdCl₂) oluşturuldu. Histolojik değışiklikleri değerdirmek için testis dokuları, Hematoksilen ve Eozin, Periyodik asit-Schiff (PAS) boyandı ve modifiye Johnson skorlaması yapıldı. Gruplarda gözlenen apoptoz, TUNEL yöntemi ve aktif kaspaz-3 immunohistokimyası ile değerdendirildi.

Elde ettiğimiz bulgulara göre, B1 grubunda, kadmiyumun seminifer tübüllerde hasara yol açtığı, spermatogenezi durdurduğu ve germ hürcelerinde apoptozu indüklediği gözlendi. B1 grubu ile A grubu karşılaştırıldı, modifiye Johnson skorlama sonuçlarında B1 grubunda anlamlı derecede azalma ve apoptotik indeks sonuçlarında ise anlamlı derecede artış göröldü. Ek olarak, B1 grubuyla B2, B3 ve B4 grupları karşılaştırdı. Modifiye Johnson skorlama sonuçlarında B2 grubunda anlamlı bir farklılık görölmezken, B3 ve B4 gruplarında anlamlı artış göröldü. Ayrıca apoptotik indeks sonuçlarında B2 grubunda anlamlı bir farklılık görölmezken, B3 ve B4 gruplarında anlamlı azalma göröldü.

Sonuç olarak, sıçan testisinde kadmiyum ile oluşturulan akut hasarın baskılanmasında resveratrol ve dialil disülfidin rolüne yönelik bilgiler ortaya konuldu. Resveratrol bu akut hasarın baskılanmasında etkili olmazken dialil disülfid ve resveratrol ile birlikte kullanımı hasarı önlemede etkili bulundu. Literatür analizimize göre bu çalışma kadmiyumun indüklediği testis hasarına karşı dialil disülfidin koruyucu etkilerinin gösterildiği ilk çalışmadır.

Anahtar Sözcükler: Kadmiyum, resveratrol, dialil disülfid, sıçan testis hasarı, apoptoz.

İNGİLİZCE ÖZET

“Effects of Resveratrol and Diallyl Disulfide on Cadmium Induced Acute Rat Testis Damage”

In this study, the protective effects of resveratrol and diallyl disulfide against damage to cadmium on male fertility, which is a major environmental pollutant and harmful effects on tissues were investigated.

In the experiment, water-soluble form of cadmium CdCl₂ was used for the purpose of cadmium toxicity. CdCl₂ was dissolved in saline and administered by intraperitoneal injection, resveratrol (RES) dissolved in saline and administered by oral gavage, diallyl disulfide (DDS) dissolved in corn oil and administered by intraperitoneal injection. In the study, 35 Wistar albino rats were used and 5 groups (A: control, B1: CdCl₂, B2: RES + CdCl₂, B3: DDS + CdCl₂, B4: RES + DDS + CdCl₂) were created. Testicular tissues Hematoxylin and Eosin, Periodic acid-Schiff (PAS) were stained and modified Johnson scoring were performed to evaluate histologic changes. Apoptosis observed in the groups was evaluated by TUNEL method and active caspase-3 immunohistochemistry.

According to our findings, in group B1, cadmium caused damage to seminiferous tubules, stopped spermatogenesis, and induced apoptosis in germ cells. Group B1 and group A were compared, modified Johnson scoring results showed a significant reduction in the B1 group whereas apoptotic index results showed a significant increase. In addition, B1 groups compared to B2, B3 and B4 groups. While there was no significant difference in the B2 group in the modified Johnson scoring results, there were a significant increase in B3 and B4 groups. Furthermore, no significant difference was observed in the B2 group in the apoptotic index results, but a significant decrease in the B3 and B4 groups was observed.

As a result, information on the role of resveratrol and diallyl disulfide of the suppression of cadmium-induced acute damage in the rat testis was presented. While resveratrol is not effective in suppressing this acute damage, Diallyl disulfide and it with resveratrol were found to be effective in preventing of damage.

Key Words: Cadmium, resveratrol, diallyl disulfide, rat testis damage, apoptosis.

1. GİRİŞ

Kadmiyum (Cd) ağır metali, birçok endüstriyel süreç ile ilişkili önemli bir toksik maddedir. Vücutta yavaş yavaş biriken bu ağır metale mesleki maruziyet genellikle pillerin, pigmentlerin imalatı sırasında veya maden ocaklarında meydana gelirken, genel nüfus atmosferden inhalasyonla veya kontamine olmuş içme suları ve yiyecekler yoluyla maruz kalır (ATSDR, 2012 ve WHO, 2000). Bununla birlikte sigarada yüksek konsantrasyonlarda Cd bulunması nedeniyle aktif ya da pasif sigara kullanımı ile maruziyet iki katına çıkmaktadır (ATSDR, 2012 ve Waalkes, 2003).

Cd'a maruz kalma çok sayıda zararlı etkiyle ilişkilendirilmiştir. Karaciğer ve böbrekler başta olmak üzere akciğer, pankreas, testis, plasenta ve kemik gibi çeşitli organların yapıları, fizyolojik ve biyokimyasal fonksiyonları da Cd'dan etkilenebilir (ATSDR, 2012; Byber ve ark., 2016; Marettová ve ark., 2015; Sarkar ve ark., 2013). Yine Cd, direkt sitotoksik etkilere; apoptotik veya nekrotik olaylara yol açabilir (Marettová ve ark., 2015). Cd'un doğrudan etkilediği organlardan biri de testislerdir ve testiküler histopatolojide çeşitli değişikliklere neden olarak kısırılığa yol açar. Spermatogenizi zayıflatır, spermatid gelişimini olumsuz yönde etkiler (Herranz ve ark., 2010). Sertoli hücrelerinde apoptozu indükler (Zhang ve ark., 2010) ve Leydig hücrelerinde morfolojik hasar oluşturabilir (Lafuente ve ark., 2004). Ayrıca bazı çalışmalarda Cd'un kan testis bariyerine zarar verdiği, sıkı bağlantı komplekslerini bozduğu ve spermiyogenezde başarısızlığa neden olduğu gösterilmiştir (Chung ve Cheng, 2001; Siu ve ark., 2009).

Sigarada yüksek miktarda bulunması, endüstriyel alanda yaygın kullanımı ve buna bağlı olarak meslek hastalıklarına neden olmasından dolayı Cd yaygın olarak toksik etkileri çalışılan bir metaldir.

Serbest radikallerin oluşumuna bağlı olarak oluşan oksidatif stres, Cd'in oluşturduğu toksisitenin ana nedenidir. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonunu uyararak hücre membran yapılarını bozar ve lipid peroksidasyonunun erkeklerde infertilite ve sperm fonksiyon bozukluğunda kilit rolü vardır. Antioksidanlar, serbest radikal oluşumunu önleyen ve mevcut radikallerle

reaksiyona girerek daha zararlı formlara dönüşmelerini engelleyen bileşiklerdir (Kara ve ark., 2005; Koca ve Karadeniz, 2005; Lee ve ark., 2012).

Resveratrol (RES), patojenik bir saldırı, morötesi ışığa gibi yaralanmalara veya strese yanıt olarak bitkilerde doğal olarak üretilen bir polifenolik fitoaleksindir. Üzüm, fıstık, çilek, yer fıstığı, ladin, dut ve kurutulmuş köklerinde bulunan bu bileşik, bitkilerde enfeksiyon gelişimini inhibe eder (Sergides ve ark., 2016). İnsanlarda, antioksidan, anti-inflamatuar, antikarsinojenik, antidiyabetik, kardiyoprotektif ve antiaging özellikleri nedeniyle birçok yararlı etkiye sahiptir (Aires ve ark., 2013 ve Bishayee ve ark., 2010). Klinik ve klinik olmayan araştırmalarda yoğun bir şekilde çalışılmış ve çeşitli biyolojik faaliyetlerini açıklayabilen çeşitli etki mekanizmalarını kullanarak çeşitli hedefler üzerinde etkili olduğu bulunmuştur (Sergides ve ark., 2016).

Sarımsak (*Allium sativum* L.), hem hastalık önleyici hem de tedavi edici özellikleri nedeniyle, klinik potansiyelleri açısından yaygın olarak kullanılan soğanlı bir bitki türüdür. Medikal alanda yaygın kullanılmasına rağmen ağır metal toksisitesi üzerine olan etkileri ile ilgili sınırlı bilgi bulunmaktadır (Pari ve ark., 2007). Sarımsak hem suda çözünebilir hem de yağda çözünebilir organosülfür bileşikler içerir. Örneğin dialil sülfid, dialil disülfid (DDS), dialil trisülfid ve ajoene yağda çözünen organosülfür bileşiklerdir. Bunlardan DDS güçlü bir antioksidan kapasiteye sahiptir (Kim ve ark., 2013). Ürotoksisite, genotoksisite, nefrotoksisite, hepatoksisite üzerine güçlü protektif etkileri bildirilmiştir (Fukao ve ark., 2004; Guyonnet ve ark., 2002; Nakagawa ve ark., 2001; Pedraza-Chaverrı ve ark., 2003).

Bu çalışmada, özellikle endüstriyel alanda çalışan işçilerin sıklıkla maruz kaldığı kadmiyum toksisitesinin erkek fertilitesi üzerine oluşturduğu hasarın önlenmesi ya da bu toksisitenin etkilerinin en aza indirgenmesi için bir koruma yöntemi bulmak amaçlanmıştır. Bu amaçla önemli antioksidan maddelerden RES, DDS ve bunların kombinasyonunun sıçan testisinde oluşturulan akut kadmiyum toksisitesi üzerindeki hasar önleyici etkisi incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Hakkında Genel Bilgiler

2.1.1. Testis Embriyolojisi

Kromozomal ve genetik cinsiyet, X veya Y kromozomu taşıyan spermin X kromozomu taşıyan ovum ile fertilizasyonuna bağlıdır. Yedinci hafta sonuna kadar dış genitalerin gelişimi, her iki cinste de birbirine benzer, genital sistem gelişiminin başlangıç dönemine “seksüel gelişimin farklılanmamış safhası” denilmektedir. Cinsiyet farklılaşması 9. haftada ortaya çıkmaya başlasa da 12. haftaya kadar dış genitalerin farklılaşması tam değildir (Moore ve ark., 2008).

4. haftanın başlangıcında, her iki cinste de kloakal membranın kraniyal ucunda mezenşim proliferasyonu sonucu genital tüberkül oluşur. Daha sonra, kısa bir süre içerisinde kloakal membranın her iki tarafından labioskrotal şişkinlikler ve ürogenital katlantılar gelişir. Genital tüberkül hızla uzayarak bir primordiyal fallusu oluşturur. 6. haftanın sonunda, ürorektal septum kloakal membran ile birleştiğinde, kloakal membran; dorsalde anal membran ve ventralde ürogenital membran olmak üzere ikiye ayrılır. Ürogenital membran, üretral katlantılara bağlanmış, median bir oluk olan, ürogenital oluğun tabanında yer almaktadır. Anal membran ve ürogenital membran bir hafta sonra yırtılarak sırasıyla anüs ve ürogenital açıklığı oluşturur (Moore ve ark., 2008).

Testis gelişiminde, Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktör (TBF) için SRY geni anahtar rol oynamaktadır. TBF primer seks kordonlarını uyararak, onların farklılanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar. Seks kordonlarının, kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Dens tunika albuginea'nın gelişimi, fetüste testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenerere olan mezonefroz'dan ayrılır ve kendi mezenterisi olan mezorçiyum ile asılı

hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testis'e farklırlar (Moore ve ark., 2008).

Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. Leydig hücreleri 8. haftadan itibaren, androjenik hormonları salgılamaya başlarlar, testosteron ve androstenedione hormonları mezonefrik duktusların ve dış genitallerin eril olarak farklırlmasını indükler. Testosteron üretimini insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalarda en yüksek değerine ulaşmıştır. Fötal testislerden testosterona ilave olarak glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde sekresyonu da sağlanmaktadır. AMH, Sertoli hücreleri (destek hücreleri) tarafından salgılanır ve puberteden sonra seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik (müllerian) duktusların gelişimini baskılar. Seminifer tübüller, puberteye kadar solid haldedir ve seminifer tübüllerin lümeni puberteden sonra gelişir. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur; 1) Sertoli hücreleri; destek hücreleri olan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler. 2) Spermatogonia; primordial sperm hücreleri olan bu hücreler, primordial germ hücrelerinden farklırlar. Fötal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Sonrasında, testis'in yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testis'in dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktuli'leri (duktuli efferentes) oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder ve bu duktuliler, duktus epididimis'i oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanırlar (Moore ve ark., 2008).

Erkeklerde dış genital organların gelişimi, fetal testisler tarafından üretilen testosteron hormonunun etkisi ile olur ve fallus adını alan genital tüberkülün uzayıp genişlemesi ile penisini oluşturmasıyla karakterizedir (Sadler, 2005). Penisin ventral yüzeyinde, ürogenital katlantılar, ürogenital oluğun lateral duvarlarını oluşturur. Ürogenital sinüsün fallik parçasından uzanan, üretal plağın endodermal hücrelerinin profilyasyonu ile ürogenital oluğun içi döşenir. Ürogenital katlantılar, penisin ventral yüzeyi boyunca birleşerek spongiöz üretra'yı oluştururlar. Yüzey ektodermi, penisin median hattında birleşerek penil rafe'yi oluşturarak spongiöz üretra'yı penisine hapsedmiş olur. Glans penis'in ucunda, ektodermal kökenli içe doğru büyüyen, hücreli bir kordon meydana gelerek penis köküne doğru büyür ve spongiöz üretra ile birleşir. Bu hücreli kordon kanalize olur ve daha önce meydana gelen spongiöz

üretroya bağlanır. Böylece, üretroyanın terminal parçası tamamlanır ve dış üretroyal açıklık glans penis ucuna açılmış olur (Moore ve ark., 2008).

On ikinci haftada, glans penisin periferinde, sirküler bir ektodermal içe büyüme meydana gelir. Bu içe büyüme, kanalize olduğunda, örtücü bir deri katlanması olan, prepus (önderi) oluşur. Penisin, corpus spongiosum ve corpora cavernosa kısımları, fallus mezenşiminden gelişir (Moore ve ark., 2008). Labioskrotal şişkinlikler önce inguinal bölgede yerleşmiştir. Gelişimin daha ileri evrelerinde, kaudal yönde ilerleyerek her şişkinlik kendi tarafındaki hemiskrotumu oluşturur. Hemiskrotum birbirinden skrotal septum ile ayrılmıştır (Sadler, 2005). Katlantıların birleşme çizgisi, skrotal rafe olarak açıkça görülür (Moore ve ark., 2008).

2.1.2. Testisin Yapısı ve Anatomisi

Testisler, sağlı sollu bir çift organdır, boyutları kişiye özgü olmakla birlikte yaklaşık 4–5 cm uzunluğunda, 2.5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 10–14 gr ağırlığındadır. Testisin facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü; margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı; extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu vardır (Arıncı ve Elhan, 1997).

Testisler, embriyonik karın boşluğunun arka duvarında retroperitoneal olarak gelişirler. Fetüsün gelişmesi sırasında göç ederler ve skrotum içinde spermatik kordonların (Funiculus Spermaticus'a) uçlarında asılı durumda bulunurlar. Karın boşluğundan gerçekleştirdikleri bu göç esnasında her testis tunika vajinalis adı verilen ve peritondan gelişmiş olan seröz bir kese taşır. Tunika vajinalis dışta skrotumu döşeyen pariyetal tabaka ile sıkı bağ dokusu yapısında olan tunika albuginea'yı testisin ön ve yan taraflarından saran iç visseral tabakadan oluşturur (Mescher, 2015). Testisin arka tarafının sadece lateral kısmı tunika vajinalis ile örtülüdür. Peritonun bulunmadığı medial bölümde tunika albuginea kalınlaşır. Bu bölgeden epididimis tutunur ayrıca damar, sinir ve kanallar da buradan geçer (Arıncı ve Elhan, 1997). Kapsülün iç kısmını oluşturan tunika vasküloza ise kan damarlarını içeren gevşek bağ dokusudur (Ross ve Pawlina, 2010).

Testis ve epididimis aortanın dalı olan a. testicularisten beslenirler. Testis ve epididimisin venleri önce funiculus spermaticusu saran bir ağ şeklinde plexus

pampiniformisi, daha sonra da birbirleriyle birleşerek v. testicularisi oluştururlar (Arıncı ve Elhan, 1997). Plexus pampiniformis birbirleriyle serbestçe ağzlaşan üç grup venden oluşur: 1) testisten doğan ve vena cavaya girmek üzere spermatik artere eşlik eden ön spermatik ven grubu; 2) pelvis içindeki venlere gitmek üzere vas deferense eşlik eden orta deferensiyal grup; ve 3) spermatik kordonun arka yüzü boyunca seyreden arka grup. Venlerin orta ve arka grupları iç spermatik venle taşınanların dışında kalan kanın testislerden geri dönüşü için bir kollateral dolaşım yolu sağlar (Netter, 2012). Sağ taraftaki v. testicularis; v. cava inferiora, sol taraftaki v. testicularis; v. renalis sinistraya açılır. Testislerde yüzeysel ve derin olmak üzere iki grup lenfatik drenaj bulunur. Yüzeyseli tunika vaginalisin yüzeyselinde, derindeki ise epididimis ve testisin içinde bulunur. Bunlar 4-8 damar şeklinde funiculus spermaticus ile birlikte karın boşluğuna girerler. V. testicularisi takip ederek aortanın ön ve yan tarafındaki lenf nodüllerine açılırlar. Testise T.10.-11. medulla spinalis segmentlerinden kaynaklanan sempatik lifler, damarların çevresindeki pleksuslar aracılığıyla gelir (Arıncı ve Elhan, 1997).

Soğuk kanlı canlılarda evrimsel gelişim ile ortaya çıkan, sperm oluşumu için gerekli belirli moleküler işlemler vücut sıcaklığında gerçekleşmez. Bu işlemlerin gerçekleşmesine izin veren sıcaklık olan 34°C'nin skrotumda korunmasını sağlayan çeşitli mekanizmalar vardır. Her testiküler arter testisten gelen serin kanı içeren pampiniform venöz pleksus ile sarılmıştır (Mescher, 2015). Zıt yönlü akış ısı değişim sistemi ile bu venöz pleksus, arteriyel kandan ısı çeker. Skrotumdan buharlaşmayla uzaklaşan ter de ısı kaybına katkı sağlar. Skrotumun ince dartos kasının skrotumun ve spermatik kordonların kremaster kaslarının kasılması veya gevşemesiyle testislerin vücuda yaklaştırılması veya uzaklaştırılması ile testis sıcaklığı kontrol altında tutulur (Mescher, 2015).

Ratlarda testis organı oval veya silindirikdir. Abdominal, inguinal veya skrotal olarak yerleşiktirler. Epididimisin kaput ve caudası yağ tabakası ile sıkı sıkıya sarılmıştır. Arteria testikularis 3-4 kıvrım yapar. Genital organların eklenti ve bezleri iyi gelişmiştir. Vezikula seminalis uzun dar loplu bir görünüştedir (Yavru ve Yavru, 1996).

2.1.3. Testis Histolojisi

Testislerin temel işlevi; erkek üreme hücreleri, spermatozoonları oluşturmak ve bireye erkeklik özelliklerini kazandıran aldestronları üretmektir. Testisler dışarıdan tunika albuginea adı verilen kalın fibröz kapsül ve kendisine sıkıca yapışık kaygan bir periton olan tunika vaginalis ile kaplıdır (Netter, 2012). Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis yapısını oluşturur. Bu fibröz bölgeden bezin içine uzanan çok sayıda septum, testisi yaklaşık 250 adet piramid şeklinde lobüllere ayırır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile birlikte interstisyel hücreler ve sayıları 1 ile 4 arasında değişen çok kıvrımlı seminifer tübüller bulunur (Mescher, 2015).

2.1.3.1. İnterstisyel Doku

Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından öneme sahiptir. Testislerde seminifer tübüller arasındaki interstisyel doku, fibroblast, lenf damarı ve pencereli kapillerin bulunduğu kan damarlarını içeren gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, faklılanmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Pubertede bir hücre tipi daha işlevsel olarak belirgin olmaya başlar. Bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir ve steroid salgılayan hücre özelliklerini gösterir. Bu hücreler, merkezi çekirdekli, yağ damlacıkları içeren eozinofilik sitoplazmalı, geniş yuvarlak veya poligonal hücrelerdir ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler (Mescher, 2015). Ayrıca bu hücrelerde lipofuksin pigmenti ve çubuk şekilli ayırt edici sitoplazmik kristaller olan Reinke kristalleri sıklıkla bulunmaktadır. Rutin histolojik preparatlarda bu kristaller reflaktidirlere, yaklaşık 3×20 μm boyutlarında ve hücrenin bir protein ürünü oldukları düşünülmektedir (Ross ve Pawlina, 2010).

Leydig hücreleri tarafından testosteron salgılanması, hipofizden salgılanan bir gonodotropin olan luteinizan hormon tarafından tetiklenir (Mescher, 2015). Leydig hücreleri erken fetal yaşam sırasında farklılaşarak testosteron salgılar. Testosteron salgılanması embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu için gereklidir:

- Embriyoda, testosteron ve diğer androjenlerin salgılanması erkek gonadların normal gelişimi için gereklidir.

- Pubertede, testosteron salgılanması sperm üretiminin başlatılmasından, aksesuar cinsiyet bezlerinin salgılarından ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumludur.
- Yetişkinde, testosteron salgılanması spermatogenezin ve sekonder seks karakterlerinin, genital boşaltım kanallarının ve aksesuar cinsiyet bezlerinin devamlılığının sağlanması için gereklidir (Ross ve Pawlina, 2010).

2.1.3.2. Seminifer Tübüller

Genç yetişkinlerde, seminifer tübüllerde günde ortalama 2×10^8 sperm üretilir. Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Her seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve oldukça kısa ve dar olan düz tübüller aracılığıyla rete testise bağlanır. Rete testis mediastinum testise gömülü, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirenttir (Mescher, 2015). Rete testis, seminifer epitelyumun ürünlerini (testiküler sperm, salgısal proteinler ve iyonlar) toplayan kanallar ağıdır (Kierszenbaum, 2012). Rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısımlarına bağlanmıştır (Mescher, 2015).

Her bir seminifer tübül, tunika propriya tarafından çevrelenmiş bir germinal veya spermatogenik epitel olarak adlandırılan özelleşmiş, çok katlı epitelden meydana gelmiştir (Ross ve Pawlina, 2010).

Germinal epitel iki tip hücreden oluşur;

- Büyük bölünmeyen Sertoli hücreleri; bu hücreler fiziksel ve metabolik olarak gelişen sperm hücre öncüllerine destek verir.
- Bölünebilen spermatogenik seri hücreleri (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler) (Mescher, 2015).

Tunika propriyası tipik fibroblastlardan yoksun çok tabakalı bağ dokusu yapısında olup peritübüler doku olarak da adlandırılmaktadır. İnsanda seminifer tübülün bazal laminasının dışında 3-5 tabaka miyoid hücre ve kollajen fibriller bulunmaktadır. Miyoid hücreler tipik fibroblastların yokluğunda kollajen sentezleme rollerinin işareti olan bir özellik olarak belirgin miktarda granüllü endoplazmik retikulum sergilemektedir. Miyoid hücrelerin ritmik kasılmaları spermatozoanın ve

testiküler sıvının seminifer túbüllerden boşaltım kanal sistemine akışına yardım eden peristaltik dalgalanmaları oluşturur. Miyoid tabakanın dışında kan damarları, yaygın lenf damarları ve Leydig hücreleri bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2010).

Spermatogenik seri hücreleri sayıları dört ile sekiz arasında değişen kümeleşmiş hücre katmanlarını içerirler ve ileride sperm olacak hücreleri üretirler. Spermatogenez sperm üretiminin ilk aşamasıdır ve kök hücre mitozu ile mayozu içerir. Spermiyogenez olarak adlandırılan haploid erkek germ hücrelerinin oluşması süreci ise son aşamadır (Mescher, 2015).

2.1.3.3. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da bilinmektedirler (Ross ve Pawlina, 2010). Fizyolojik önemi ilk olarak Enrico Sertoli tarafından gösterilmiş, uzun prizmatik ya da primidal epitel hücreleridir. Bu hücreler seminifer túbüllerin bazal laminasını oluşturur ve apikal uçları lümene uzanır. Spermatogenik serinin tüm hücreleri Sertoli hücrelerinin uzamış yüzeyleri ile yakın ilişkilidir ve onlardan metabolik ve fiziksel destek sağlarlar (Mescher, 2015).

Ultrastrüktürel incelendiğinde, Sertoli hücrelerinin bol miktarda granülsüz ER, az miktarda granüllü ER, anüler lamel dizileri (Ross ve Pawlina, 2010) iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda küre şekilli ve uzun mitokondri, lipid damlacıkları, glikojen granülleri ve lizozom içerdiği görülmektedir (Ross ve Pawlina, 2010 ve Mescher, 2015). Çekirdekleri tipik olarak oval ya da üçgen şeklindedir, bir ya da daha fazla derin içe katlantılara sahip olabilir, ökromatik boyanır ve belirgin çekirdekçikleri vardır. 7-9 nm'lik bir filament kılıfı çekirdeği sararak onu diğer sitoplazmik organellerden ayırır. Bazı türlerde Sertoli hücre çekirdeği, karyozom adı verilen ve kendine has üç parçalı yapıda, RNA ve DNA içeren cisimcik çifti tarafından yan taraftan kuşatılan bir çekirdekçik içerir.

İnsanda, bazal sitoplazmada karakteristik inklüzyon cisimcikleri (Charcot-Böttcher) bulunmaktadır. Bu ince füziform kristalloidler 10-25 µm uzunluğunda ve 1 µm genişliğindedirler ve rutin histolojik preparatlarda görülebilirler. Transmisyon elektron mikroskopi ile paralel ya da birbirine yaklaşan, düz, yoğun, 15 nm çapında yayıfça düzenlenmiş filament demetleri olarak görülürler. Son çalışmalarla lipoprotein reseptör proteinlerinin birikimi belirlenmiştir. Bu durum, inklüzyon

cisimciklerinin lipid transportunda ve Sertoli hücreleri tarafından lipid metabolizmasında görevli olabileceğini düşündürmektedir (Ross ve Pawlina, 2010).

Sertoli hücreleri, bazolateral hücre zarları arasında özel bağlantı kompleksleri ile kan testis bariyerini oluştururlar. Memelilerdeki en sıkı kan bariyeridir. Bu fiziksel bariyer sayesinde, bağışıklık sistemi olgunlaştıktan ve vücudun kendi hücrelerine karşı toleransı geliştikten sonra ortaya çıkan özgün spermatogenik hücreler, vücudun otoimmün saldırılarından korunur (Mescher, 2015). Bu kompleks bir bölümünde komşu membranlarda 50'den fazla paralel kaynaşma çizgisi içeren oldukça sıkı bir bağlantı (zonula okludens) ile karakterizedir. Bu eşsiz bağlantı kompleksi iki sitoplazmik komponent ile karakterizedir;

- Her hücrenin bağlantı bölgesinde yassılaştırmış bir granülsüz ER sisternası plazma membranına paralel uzanır.
- Granülsüz ER sisternaları ve plazma membranı arasında aktin filament demetleri hekzagonal olarak paketlenmiş halde yer almaktadır (Ross ve Pawlina, 2010).

Sertoli hücreleri arasındaki bağlantılar bazal epitelyal kompartman ve adluminal kompartman olmak üzere iki epitelyal kompartman oluşturur. Spermatogonyumlar, tübüllerin bazal kompartmanında kan testis bariyerinin hemen altında yer alırlar ve lenfositleri ve diğer bağışıklık hücrelerini içeren damarlı interstisyel dokudan yalıtılmamış halde bulunurlar. Yeni oluşan primer spermatositler geçici olarak bu sıkı bağlantıların yapışma moleküllerini bölgesel olarak ayırır ve tübülün adluminal kompartmanına ulaşırlar. Bu sırada spermatositler Sertoli hücrelerine tutunmuş haldedir. Spermatogonyumlar gibi, bütün spermatositler ve spermatidler Sertoli hücrelerinin yüzey katlanmalarının arasındadır. Adluminal göç kan-testis bariyerinin işlevinde herhangi bir aksamaya sebep olmaksızın gerçekleşir, bu durum germ hücrelerinin birbiriyle hücreler arası köprülerle bağlantılı olduğu düşünüldüğünde daha da etkileyici olmaktadır. Sertoli hücreleri de aralarında iyon değişimini sağlayan “gap junction” olarak adlandırılan bağlantılarla birbirine bağlanmışlardır. Bu bağlantılar sıkı bağlantı noktalarındaki geçici değişikliklerin düzenlenmesine ve spermatogenik hücrelerdeki etkinliklerin uyumlu bir şekilde

yürütülmesine yardımcı olur. Spermatidlerin flagellum içeren kuyruğu gelişirken, bu yapılar Sertoli hücrelerinin apikalinden uzanan püsküller olarak görülür.

Sertoli hücrelerini kan testis bariyerini oluşturmasıyla ilişkili olan üç genel görevi vardır:

a) Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi; spermatositler, spermatidler ve gelişmekte olan spermeler, plazma proteinlerinden ve besinlerden kan testis bariyeri nedeniyle izole olduklarından besin ve atık maddelerin üretilip uzaklaştırılmasında sertoli hücrelerine bağımlıdırlar. Sertoli hücreleri spermatogenik hücreleri bağışıklık sisteminden korurken, bu hücrelerin gelişmesi ve farklılaşması için gerekli olan plazma faktörlerini de sağlar.

b) Ekzokrin ve endokrin salgılama; Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere testisten yeni üretilen spermi dışarıya taşıyan bir sıvı salgılar. Testosteronun spermiyogenez için gerekli konsantrasyona ulaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein (ABP) ve besinlerin üretimi folikül uyarıcı hormon (FSH) tarafından desteklenir. Endokrin hücreler olarak Sertoli hücreleri, ön hipofiz bezinden FSH sentezini ve salıverilmesinin geri bildirim ile önleyen inhibin glikoproteinini salgılar. Fetüste, Sertoli hücreleri, AMH olarak adlandırılan glikoproteini üretir. Bu hormon, embriyonik gelişme sırasında Müller kanallarının gerilemesini sağlar ve AMH'nın yokluğunda bu kanallar varlığını sürdürerek dişi üreme sisteminin bir parçası olur.

c) Fagositoz; spermiyogenez sırasında artık cisimcikler olarak atılan fazla sitoplazma fagositozla alınarak Sertoli hücrelerinin lizozomları tarafından sindirilir.

2.1.3.4. Spermatogenez

Spermatogenez puberteden kısa bir süre önce, pitüiter gonadotropinlerin seviyelerinin artmasının etkisi altında kök ve progenitör hücreler olan spermatogonyumların proliferasyonu ile başlar ve yaşam boyunca devam eder (Ross ve Pawlina, 2010). Spermatogonyumlar küçük, yuvarlak ve 12 µm çapında hücrelerdir. Bu hücreler bazal membranın hemen üstündedir ve Sertoli hücrelerinin yüzeyleri ile yakın ilişkili durumdadırlar (Mescher, 2015).

Spermatogonyumun gelişiminin farklı basamakları, şeklindeki küçük farklılıklara ve çekirdeğinin boyanma özelliğine bakarak tanımlanabilir. Koyu renkli ve oval şekilli spermatogonyum kök hücreler olarak hareket eder ve nadir bölünür. Bu hücrenin bölünmesi sonucunda iki tip hücre oluşur. Birincisi kök hücre karakterindedir. Diğeri ise daha soluk boyanan, oval çekirdekli ve progenitör hücrelerde olduğu gibi daha hızlı bölünebilen hücrelerdir.

A tipi spermatogonyumlar çoğu hücre bir sinsityum halinde birbiriyle bağlantılı kalacak şekilde çok sayıda klonal bölünme geçirir. B tipi spermatogonyumlar ise daha küresel ve soluk çekirdekli olanlardır.

B tipi spermatogonyumlar son bir mitoz bölünme daha geçirirler ve iki tane yavru hücre meydana getirirler, bu hücreler büyüyerek ökromatik çekirdekli küresel hücreler olan primer spermatositleri oluştururlar. Primer spermatositler DNA'larını eşlerler ve her bir kromozom iki kromatidden oluşur. Daha sonra mayoz bölünme geçirirler. Bu süreçte homolog kromozomlar bir araya gelerek sinaps oluştururlar, DNA rekombinasyonu olur ve iki hızlı hücre bölünmesiyle haploid hücreler oluşur.

Primer spermatositler diploiddir, 46 kromozom (44+XY) ve 4N DNA içerir. Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu aşaması yaklaşık olarak 3 hafta sürdüğü için, testis kesitlerinde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamada olacaktır. Primer spermatositler spermatogenik serinin en büyük hücreleridir ve sinaps ve rekombinasyonun çeşitli aşamalarında kısmen sıkışmış kromozomlarının bulunması ile tanınırlar (Mescher, 2015).

Birinci mayoz bölünme sonunda, homolog kromozomlar ayrılırlar ve 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Kromozomlardaki bu sayıya azalmaya (46'dan 23'e) her hücredeki DNA miktarının eksilmesi (4N'den 2N'ye) eşlik eder. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa bir süre kalan ve çabucak ikinci mayoz bölünmeye giren kısa ömürlü hücrelerdir.

Sekonder spermatositlerin bölünmesiyle her bir kromozomun kromatidleri birbirinden ayrılır ve iki tane haploid hücre oluşur. Bu hücreler 23 kromozom içerir ve spermatid olarak adlandırılır. Spermatositlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler

arasında S fazı görülmediği için ikinci bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (1N) hücreler meydana gelir. Böylece, mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid kromozom içeren hücreler oluşur. Döllenme ile birlikte, mayozla oluşan bir haploid ovum ve sperm birleşir ve normal diploid kromozom sayısı korunur (Mescher, 2015).

Spermiyogenez: spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoona dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez. Spermiyogenez, akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, kamçı gelişmesini ve sitoplazmanın büyük bir bölümünün kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir. Bu süreçten sonra spermatidler, küçük boyutları, yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nukleusları ile ayırt edilebilirler. Seminifer tübülde lümen yakınında yerleşmişlerdir (Netter, 2012).

Seminifer Epitel Siklusu: Farklılaşmakta olan spermatogonik hücreler seminifer epitelde rastgele düzenlenmiştir. Spesifik hücre tipleri bir arada gruplanmışlardır. Bu gruplaşma, her farklılaşma sürecine giren tip A spermatogonyum çiftinin soyları arasındaki intraselüler köprüler ve senkronize hücrelerin olgunlaşmanın her evresinde, o evre özelliklerini göstermeleri nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Bir seminifer tübülün herhangi bir kısmında farklılaşmanın tüm fazları ardışık olarak oluşur ve kök hücrelerin soyları sitoplazmik köprülerle birbirine bağlı kalırken senkronize bir şekilde mitotik ve meiyotik bölünmelere ve olgunlaşmaya uğrarlar.

Tanımlanabilen her hücre birliği, siklik süreçte bir evre olarak kabul edilmektedir. Seminifer tübülün herhangi bir bölgesinde aynı hücre birliğinin ardışık iki ortaya çıkışı arasındaki evreler serisi seminifer epitelin bir siklusunu oluşturur. Seminifer epitel siklusu insanda düzensiz yamalar şeklinde ortaya çıkar. İnsanda bir kök hücrenin spermatogenez sürecini tamamlaması için yaklaşık 4,6 sıklusa yaklaşık 74 güne ihtiyaç duyulmaktadır. Siklusun uzunluğu ve spermatogenez için gerekli süre sabittir ve her tür için spesifiktir (Ross ve Pawlina, 2010).

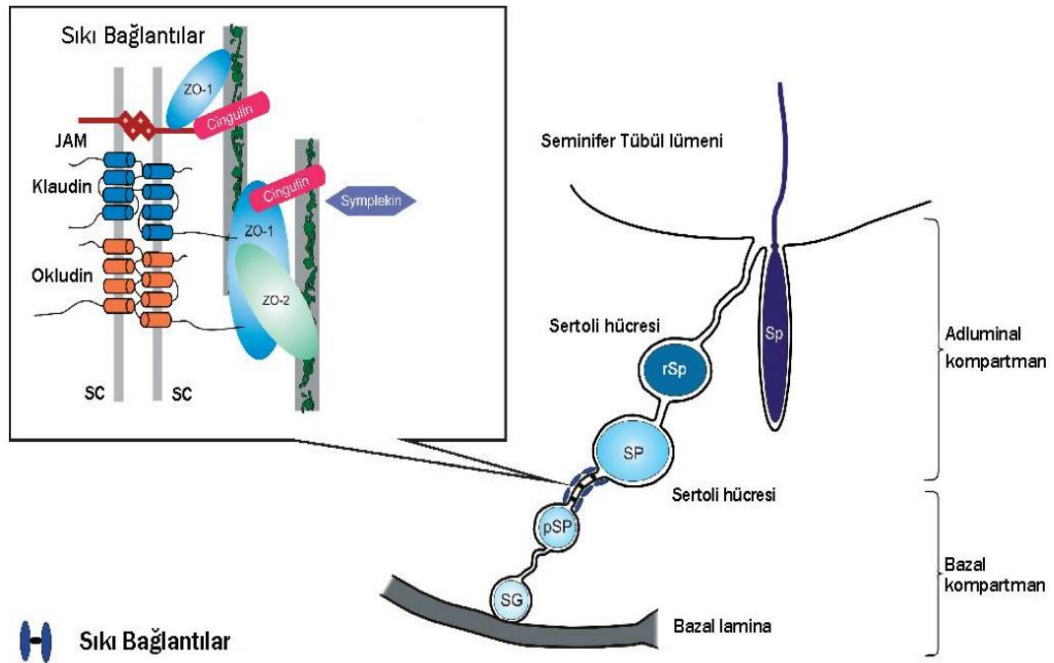
2.1.3.5. Kan Testis Bariyeri ve Sıkı Bağlantılar

Spermatogonyumlar farklılaşırken sperme özgü proteinler ortaya çıkar. Seksüel olgunlaşma, immunolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra meydana geldiği için farklılaşmakta olan sperm hücreleri immün sistem tarafından yabancı olarak algılanabilir ve immün yanıt gelişebilir. Kan testis bariyeri, gelişmekte olan spermler ile immün sistem arasında oluşabilecek herhangi bir reaksiyonu engeller. Bu bariyer seminifer tübüllere immünglobulinlerin geçmesini önler. Böylece, Sertoli hücre bariyeri germ epitelinin otoimmün reaksiyonlardan korunmuş olur. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (tight junctions) bu bariyerin temelini oluşturur. Bu bariyer, kan ile seminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bulunur ve bariyerin bulunması, sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesini sağlar. Testiste bulunan kapiller pencere tiptedirler ve büyük moleküllerin serbest olarak geçişine izin verirler. Bu bariyer erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında görevlidir (Pelletier ve ark., 1997).

Seminifer tübüldeki sıkı bağlantılar seminifer epitelin bazaline yakın bulunan Sertoli hücrelerinin sıkı bağlantılarıyla oluşur. Bu sıkı bağlantılar seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartman olarak iki bölüme ayırır. Bazal bölümde spermatogonyumlar ve preleptoten spermatositler bulunurken adluminal bölümde diğer germ hücreleri bulunur (Tenorio ve ark., 2016). Testisteki sıkı bağlantı kompleksleri periferik membran proteinler dizisi ve 3 farklı sıkı bağlantı integral membran proteinlerinden oluşur. Bunlar; okludin, klaudin ve zonula okludens çeşitleri olan, zonula okludens-1 (ZO-1), zonula okludens-2 (ZO-2), gibi sıkı bağlantı proteinleridir. Sıkı bağlantıların en yüzeyde olanı zonula okludensdir. Ağa benzer bir yapı oluşturacak şekilde katlanma ve kıvrılmalar gösterir. Kabartı ve olukların sayısı ve kaynaşma yerleri germ epitelinin sıvı alışverişi ile çok yakından ilgilidir. Sıkı bağlantı komplekslerinin esas fonksiyonu oldukça sıkı ve güçlü bir tutunma meydana getirmek böylece epitel hücreleri arasından her iki yöne doğru madde geçişini engellemektir. Bazı epitelde elektriksel potansiyeller epitelin molekül transport yeteneğini etkileyerek moleküllerin epitelde geçişini düzenler (Lui, 2002).

Okludin, sıkı bağlantı bölgelerinde yer alır ve kan testis bariyerinin regülasyonunda oldukça önemli bir role sahiptir. ZO-1 ve ZO-2 komponentleri okludin ile direkt bağlantısı olan diğer sıkı bağlantı proteinlerinin arasında bulunur

(Tenorio ve ark., 2016). Okludinin C-terminal bölgesi, bazolateral membranda okludinin hedefi olarak ZO-1'e bağlanır ve sıkı bağlantıda okludin lokalizasyonu için ZO-1'in varlığı gereklidir. Farede okludin Sertoli hücrelerinin bazal bölgelerinde bulunur ve maturasyonla yoğunluğu artar. Sıçan Sertoli hücrelerinde de benzer bulgular göstermesine rağmen, insan ve kobayda Sertoli hücresinde okludinin bulunmadığı bildirilmiştir (Moroi ve ark., 1998). Testis sıkı bağlantılarındaki okludin izoformları türe özgüdür. Testiste okludin Sertoli hücreleri arası bağlantı bölgesinde bazal olarak çok kuvvetli immunreaktivite gösterir. Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında da yaygın bir immunreaktivite görülebilir. Okludinin analog patterni olan ZO-1 immünreaktivitesi Sertoli hücreleri arası bağlantı bölgelerinde, sitoplazmasında ve subselüler alanda daha yoğun olarak görülmektedir (Tenorio ve ark., 2016).



Şekil 1. Sıkı bağlantı bölgeleri (Fink ve ark., 2006).

2.2. Apoptoz Hakkında Genel Bilgiler

2.2.1. Apoptozun Tanımı ve Tarihçesi

Apoptoz, tüm çok hücreli organizmalarda oluşan programlanmış hücre ölümü sürecidir (Cole ve ark., 2016). Apoptoz kelimesi Yunanca, ‘apo’ (ayrı) ve ‘ptosis’ (düşmek) sözcüklerinin birleşmesiyle oluşmuştur. Apoptoz yunanca ağaçtan düşen yaprak veya çiçekten ayrılan petal anlamına gelir. İki veya bir buçuk bin yıl önce, Hippocrates, kırıkların bandajla tedavisinden kaynaklanan kangrenin tanımlanması için apoptoz kelimesi kullanılmıştır. İlginçtir, doku (hücre) ölümünün patolojik bir formunu tarif ediyordu. Apoptoz, 1842'de kurbağa larvası gelişimini inceleyen Alman bilim adamı Carl Vogt tarafından keşfedilmiştir (Caricchio, 2016). 1972'de apoptoz terimi, Kerr, Wyllie ve Currie tarafından bilimsel literatüre tanıtılmış ve canlı dokulardaki hücre azalmasından sorumlu olan, yapısal olarak özgün bir hücre ölüm tipi olarak tanımlanmıştır (Stillwell, 2016).

Sydney Brenner, Robert Horvitz ve John E. Sulston adlı bilim adamları *Caenorhabditis elegans* nematodu üzerinde çalışarak, “programlanmış hücre ölümü ve organ gelişiminin genetik olarak düzenlenmesi” konusuyla 2002 yılında Nobel ödülü kazanmışlardır. *Caenorhabditis elegans* nematodu, 1 mm uzunluğunda, şeffaf, çok hücreli yuvarlak solucanlardır. Bu nematodlarda apoptozu, 3 gen; ced-3, ced-4 ve ced-9 kontrol etmektedir. Mutasyon ile inaktif olmuş ced-3 ve ced-4 genlerini taşıyan nematodlarda apoptozun meydana gelmediği ve normalde ölmesi gereken hücrelerin yaşamaya devam ettiği görülmüştür. Bu sebeple ced-3 ve ced-4 genlerinin ölüm genleri olduğu ve apoptozu indükledikleri, ced-9 geninin ise ölüme karşı koruyan gen olduğunu ve apoptozu inhibe ettiği belirlenmiştir. Bugün bu genlerin insan genomundaki karşılıkları ced-3 için kaspazlar, ced-4 için Apaf-1 ve ced-9 için Bcl-2 gen aileleridir. Apoptoz mitoz gibi normal gelişim için gerekli olduğu gibi organizmanın bütünlüğüne karşı tehdit oluşturan hücreleri yıkmak ve organizmayı korumak için de gereklidir (Çoşkun ve Özgür, 2011).

2.2.2. Apoptozun Biyolojik Sürece Etkisi

Apoptoza, programlı hücre ölümü de denir çünkü kontrollü hücre yıkımı ve ölümüne yol açan iyi tanımlanmış bir seri biyokimyasal olay içerir. Apoptozun kilit

amacı hemoastazı sağlamaktır. Aşırı apoptoz, hipotropiye (hücrelerin kaybına bağlı olarak ortaya çıkan bir organ veya dokunun ilerleyici dejenerasyonuna) neden olurken, yetersiz apoptoz kontrolsüz hücre proliferasyonuna (örn., Kanser) neden olur (Stillwell, 2016).

Doğadaki birçok canlıda; embriyonal süreçten başlayarak, organogenezise kadar geçen tüm gelişim basamaklarında, doku homeostazisinin sağlanmasında ve yaşlanıp ölüncüye kadar geçen tüm yaşam süreci boyunca apoptoz mekanizması gözlenmektedir (Tomatır, 2003).

Embriyonik dönemde: Memeli canlıların embriyogenez sürecinde farklılaşma sürecinde el ve ayak parmak taslaklarının oluşması, ara dokunun ortadan kaldırılması, kan damarlarının sayısının elimine edilmesi, merkezi sinir sisteminin düzenlenmesi, fetüsün cinsel farklılaşması sırasında duktus sisteminin şekillenmesi apoptoz ile gerçekleşir. Kurbağaların kuyrukları da metamorfoz evresinde apoptoz ile kaybolur. Ayrıca gelişimin ileri evrelerinde gözün lens hücreleri apoptozla ortadan kaldırılır ve içleri şeffaf bir protein olan kristalin ile dolar (Çoşkun ve Özgür, 2011).

Postnatal dönemde: Hemoastazın sağlanması, istenmeyen hücrelerin ortadan kaldırılması, organ sistemlerinde hücre sayısının kontrolü, hasarlı ve zararlı hücrelerin ortadan kaldırılması inflamasyonun çözülmesi, gibi pek çok fizyolojik olayda apoptoz görevlidir. Kan üretiminin dengede tutulması, endometriyumun fonksiyonel tabakasının menstruasyon sırasında dökülmesi, menapozda folikül atrezisi, laktasyonun kesilmesinden sonra meme bezlerinin küçülmesi apoptoz ile gerçekleşir. Deri, barsak epiteli, kan hücreleri gibi hücre yapım-yıkımının hızlı olduğu dokularda yaşlanan hücreler apoptozla ortadan kaldırılarak yeni hücelere yer açılır (Tomatır, 2003).

Patolojik durumlar: Apoptoz tümörlerde hem regresyon hem de büyüme aşamasında rol alır. Diyabet, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, bağışıklık sistemi hastalıkları, folliküler atrezi, viral enfeksiyonlar, tümör oluşumu, AIDS, aterosklerozis, miyokard infarktüsü, organ transplantasyonları, oksidatif stres, alkolizm, X ışınları ve radyasyon canlıda apoptoza neden olur (Çoşkun ve Özgür, 2011).

2.2.3. Apoptoza Uğrayan Hücrelerin Karakteristik Özellikleri

Apoptoz, membran değişiklikleri (blebbing, membran simetrisinde kayıp ve kabarcıklanma), hücre büzülmesi, nükleer parçalanma, kromatin yoğunlaşma, DNA parçalanması ve apoptotik cisimciklerin oluşumu gibi çeşitli karakteristik morfolojik değişikliklere neden olur (Stillwell, 2016).

DNA fragmantasyonu: Çekirdekte meydana gelir, geri dönüşümsüzdür. DNA'nın endonükleazlar ile küçük oligonükleozomal fragmanlara parçalanmasıdır. Nükleer kromatinin kümelenir ve nükleer zarf ile sınırlandırılmış fragmanlara bölünür. DNA parçaları kısa ve düzenli aralıklarla kümelendiği için agaroz jel elektroforezi ile "merdiven şeklinde" karakteristik bir görünüm elde edilir.

Hücre hacminde azalma: Hücre iskeletinin kaspazlar tarafından parçalanması nedeniyle hücreler küçülür ve sitoplazma büzülür. Hücre iskeleti elemanları hücre yüzeyine paralel demetler halinde yeniden düzenlenir. Sitoplazma sıkıca paketlenmiş organellerle yoğunlaşır. Endostatik veziküller plazma membranı ile kaynaşır.

Membran kabarcıklanması: Hücre membranında değişiklikler (örn; fosfolipidlerin moleküllerinin membranın sitoplazmik yüzeyinden dış yüzeyine yer değiştirmesi) meydana gelir. Membranın fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir ve membran bütünlüğü bozulmaksızın kabarcıklanma oluşur. Plazma membranı üzerinde blebs olarak bilinen birçok yüzey yapısı geliştirir. Blebsler, hücre iskeletinin apoptoz ile indüklenen parçalanması nedeniyle plazma zarında oluşan düzensiz çıkıntılardır. Bu kabarcıklar sitoplazmanın bir bölümünü alarak hücrelerden koparır ve apoptotik cisimleri oluşturur.

Apoptotik cisimlerin oluşumu ve fagositozu: Hücrenin parçalandığı son basamaktır. Hücre, membran kabarcıklarından köken alan organel ve nükleer materyal içeren membranla çevrili veziküllere parçalanır. Nekrotik hücrelerin hücresel enkazının aksine, apoptotik cisimler fagositleri uyaran kimyasal bir sinyal gönderir. Fagositler, hücre enkazının sızıntı yapmadan, bitişik hücrelere zarar vermeden önce apoptotik hücre cisimlerini hızla fagosite eder ve uzaklaştırır (Stillwell, 2016). Fagositoz enflematuvar yanıt gelişimini engelleyecek kadar kısa sürede (mitozdan 20 kat daha hızlı bir süreç) gerçekleşir.

2.2.4. Apoptozun Düzenlenmesinde Rol Alan Moleküller

Bcl-2 gen ailesi: Apoptoz regülasyonunda Bcl-2 gen ailesi görevlidir. Bu ailenin tanımlanmış 20 üyesi vardır. Bir hücrenin apoptoza eğilimli olup olmaması Bcl-2 ailesi genlerinin heterodimer ya da homodimer formuna bağlıdır. Bcl-2 ailesi birbirine zıt 2 gruptan oluşur; 1) Proapoptotik üyeler ve 2) Antiapoptotik üyeler.

Proapoptotik proteinler hücrede fazla ise hücre apoptoza eğilimlidir. Antiapoptotik proteinler fazla ise hücre apoptoza daha az eğilimlidir. Sitolozde yer alan proapoptotik üyeler Bax, Bid, Bad, BclXs, Bak, Bim, Puma ve Noxa'dır. Bu proteinler, Sitokrom-c ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını artırarak apoptozu indüklerler. Antiapoptotik üyeler ise Bcl-2, Bcl-xL ve Mcl-1'dir. Bu proteinler de mitokondriyon dış membranında, endoplazmik retikülümde ve çekirdek zarında yer alırlar. Por oluşumunu sağlayıp iyon transportunu düzenlerler. Özellikle hücredeki Ca^{2+} oranını kontrol ederler. Ayrıca kaspazların öncü formlarıyla AIF ve sitokrom-c salınımını bloke ederek apoptozu inhibe ederler (Çoşkun ve Özgür, 2011).

Kaspazlar: Apoptoz, nekroz ve inflamasyonda rol oynayan 12 proteazdan oluşan bir ailedir. Sistein proteazlardır ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Hücrede inaktiftirler, ancak proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler. Hücreyi içeriden yok eden aktive edilmiş kaspazlardır. Bunlara "cellat" proteinler de denir.

100 farklı hedef proteini keserek apoptoza neden olurlar. 3 tiptirler:

I- Başlatıcı kaspazlar; (Kaspaz 2,8,9,10),

II- Efektör kaspazlar (Kaspaz 3,6,7),

III- İnflamatuar kaspazlar (Kaspaz 1,4,5,11,12,13,14) (Çoşkun ve Özgür, 2011).

Sitokrom-c: Sitokrom-c proteini oldukça küçük, 104 amino asitlik tek bir zincirdir. Sitokrom-c gevşek olarak mitokondriyal iç zarın dış yüzeyine bağlanır. Mitokondriden serbest bırakıldığında, suda hemen çözünür. Sitokrom-c'nin temel fonksiyonu, elektron taşıma zincirinin önemli bir oksidan indirgeme bileşenidir. Koenzim Q, sitokrom-c redüktaz ve sitokrom c oksidaz arasında elektronlar transfer eder. Sitokrom-c'nin ikinci önemli fonksiyonu, apoptozda olan anahtar ilişkisidir (Stillwell, 2016).

Seramid: Membrana bağlı asid sfingomyelinaz aktivasyonunun bir ürünüdür. Plasma membran hasarına karşı bir sinyal olduğu düşünülmektedir (Çoşkun ve Özgür, 2011).

FAS (APO-1 veya CD95): 24 üyeli TNF reseptör ailesinin en iyi tanımlanmış üyesidir. Bağışıklık sisteminde hücre ölümünü kontrol eden Fas hücre reseptörü sitotoksik T hücreleri ve naturel killer hücreleri üzerinde bulunur. 43 kDa molekül ağırlığındaki Fas proteini hücre yüzeyinde kendi reseptörüne bağlanır ve reseptör trimerizasyonunu sağlar. Aktive olmuş reseptörler FADD reseptör molekülü ile birleşir. Bu şekilde; Fas reseptörünün karboksil ucuna yakın 80 aminoasitlik bölgenin uyarılmasıyla prokaspazlar aktive olur ve apoptoz başlar. Fas ve TNF alfa dışında TRAIL ve TRAIL reseptörleri de benzer yolla apoptozu uyarabilir (Çoşkun ve Özgür, 2011).

2.2.5. Apoptozun Mekanizması

Apoptoz mekanizması son derece karmaşıktır. Çok aşamalı hücre sinyalleri tarafından kontrol edilen çoklu adımları ve çoklu yolları içerir. Apoptoz, hücre içinden veya dışından gelen çeşitli sinyaller aracılığıyla ile başlar. Bu sinyaller iki ana apoptotik yolu aktive ederler; Ekstrinsik (hücre dışı/hücre ölüm reseptörü) ve instrinsik (hücre içi/mitokondriyal) yolu (Stillwell, 2016).

Hücre dışı uyarıcılar: Toksinler, hormonlar, büyüme faktörleri, nitrik oksit ve sitokinleri içerir. Bunlar plazma membranını direk geçebilirler veya membran üzerinde bulunan transmembran proteinleri ile etkileşerek sinyali hücre içine iletirler. Her iki durumda da plazma membranı doğrudan etkindir. Hücre içi uyarıcılar glukokortikoidler, ısı, radyasyon, besin yetersizliği, viral enfeksiyon, hipoksi ve

artmış hücre içi Ca^{2+} konsantrasyonunu içerir. Strese tepki olarak üretilirler (Stillwell, 2016).

İnstrinksik yol: Hücre içi uyarıcılar esas olarak mitokondrinin aktivasyonuna neden olurlar. Hücre dışı uyarıcılar ise, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerini granzim/perforin sistemi yoluyla etki ederler. Mitokondri, dış etkenlerle de aktive olabildiğinden apoptozun gelişmesinde merkezi bir role sahiptir (Ayaşlıoğlu, 2001).

Apoptotik sinyallerin başlıca hedefi mitokondrial membranlar ve özellikle de iç membrandır. İlk apoptotik sinyaller, proapoptotik proteinlerden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive eder, Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirir. Mitokondri membranları üzerinde gözenek oluşumunu artırarak mitokondride şişmeye veya doğrudan mitokondriyal zarın hasar görerek içerisindeki apoptotik efektörleri sızdırılmasına neden olur. Mitokondriden sızan bileşikler arasında, küçük proteinler, sitokrom-c, Smac (Second mitochondria-derived Activator of Caspase), Endo-G (Endonukleaz-G), Ca^{2+} ve AIF bulunur (Stillwell, 2016).

Normal koşullar altında, apoptoz protein inhibitörü (IAP) sitoplazmada serbest olarak bulunur ve IAP'ler, hücrenin normal olarak yaşaması için kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engelleyerek apoptotik kaspaz yollarını kapatır. Mitokondriden sızan Smac ve sitokrom-c molekülleri IAP'lere bağlanır, onları devre dışı bırakır ve böylece apoptozun ilerlemesine izin verir. Bu nedenle, apoptoz, dolaylı olarak mitokondrial permeabilite ile düzenlenir. AIF, çekirdeğe transloke olur ve parçalara ayırır. ENDO-G de DNA'yı parçalar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılımıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz-9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD (Kaspaz aktive edici DNaz)'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmante olmasına neden olur (Çoşkun ve Özgür, 2011).

Ekstrinsik yol: Apoptozun hücre dışı indüksiyonunda yer alan iki temel mekanizma vardır: TNF ile indüklenen apoptoz ve Fas-Fas ligand aracılı apoptoz. Her iki yolda da sinyal iletimi TNF reseptörü (TNFR) ailesinin üyeleri ile gerçekleşir. Apoptozun başlıca hücre dışı indükleyicisi olan TNF, aktive edilmiş makrofajlar tarafından üretilen bir sitokindir. TNF, insan vücudundaki çoğu hücrede yaygın olarak bulunan hücre yüzey transmembran reseptörleri TNF-R1 ve TNF-R2'ye bağlanır. TNF'nin TNF-R1'ye bağlanması, plazma membranının iç yaprağı üzerinde bulunan Fas reseptörünün 'Fas'a bağımlı ölüm bölgesi adaptör proteini' (FADD)'ni oluşturur. Bunun üzerine 'TNFR bağımlı ölüm bölgesi adaptör proteini' (TRADD) uyarılır.

Apoptozun ekstrinsik yolunun başlıca indükleyicisi olarak bilinen Fas-ligand, Fas-reseptörüne (Apo-1 veya CD95) bağlanır ve timerik yapı oluşturur. Bu reseptör aynı zamanda TNF reseptör ailesinin bir üyesidir. Aktive edilmiş Fas-reseptörizasyonu FADD üretir. FADD, apoptoz sürecinde merkezi bir bileşendir. FADD, daha sonra apoptozu tetikleyen kaspaz kaskadının diğer üyelerini aktive eden prokaspaz-8'in oluşumuna yol açar (Stillwell, 2016).

Apoptozda hücreyi parçalayan yani apoptotik morfolojinin oluşumunu sağlayan etkenler "effektörler" olarak bilinirler. DNA tamiri ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler. Hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar. Apoptoz aktive edildikten 1 saat ya da daha uzun bir süre sonra DNA da tek iplikte bir çentikle başlayan çok karakteristik ve geri dönüşsüz bir parçalanma görülür (Tomatır, 2003).

2.2.6 Spermatogenezde Apoptozun Rolü

Spermatogenez sırasında, apoptoz, spermatogonyum ve spermatositler arasında ortaya çıkan yaygın bir durumdur ve hücrelerinin %75'i apoptoza maruz kalır. Normal testiste, uygun germ hücresi yoğunluğu, spermatogonyumların belli orandaki apoptozu ile belirlenir. Germ hücrelerindeki bu seçim spermatozoanın gelişimi için gereklidir. Bu şekilde kusurlu germ hücrelerinin yok edilmesi sağlanır. Apoptotik hücre seçilimi, spermatogenezin erken gelişim evresinde başlar ve sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasında uygun sayısal oran sağlamaya yönelik bir fizyolojik yanıt olarak tanımlanmaktadır (Kerr, 1992). Beumer ve ark. (2000)

yaptıkları çalışmayla normal testiste (apoptozu indüklenmemiş) germ hücre yoğunluğunun BAX molekülü ile düzenlendiği, fakat Bcl-2 ve Bcl-xs moleküllerinin spermatogonial apoptozun düzenlenmesi üzerine etkisinin tartışmalı olduğunu bildirmişlerdir (Beumer ve ark., 2000). Ayrıca, germ hücrelerinin apoptozu, kriptorşit testis, yüksek sıcaklık, iyonize radyasyona maruz kalım gibi dış faktörler tarafından da indüklenebilir (Kerr, 1992).

2.3. Kadmiyum Hakkında Genel Bilgiler

2.3.1. Kadmiyumun Genel Özellikleri

Kadmiyum, atom numarası 48 ve atom ağırlığı 112.40'dır. Özgül ağırlığı 8,6, ergime ısısı 230,9 °C ve kaynama ısısı 765 °C olan II-B grubu bir metal elementtir. Saf Cd, yumuşak, gümüş-beyaz renktedir (ATSDR, 2012).

Doğal olarak oluşan izotopu radyoaktif değildir. Doğada kadmiyum oksit, kadmiyum klorür, kadmiyum sülfat ve kadmiyum sülfid şeklinde mineral formlarda bulunur. Kadmiyum klorür ve kadmiyum sülfat su içinde çözünebilir (Godt ve ark., 2006 ve Mendez-Armenta ve Rios, 2011).

Kaynağı çinko ve kurşun cevherleridir, çinko cevheri % 0.2 - 4.5 Cd içerir. Ticari olarak Cd cevheri üretimi çinko madenciliğine bağlıdır ve çinkonun rafinasyonu sırasında yan ürün olarak elde edilir. Cd'un, buhar basıncı yüksek olup atmosferde hızla kadmiyum oksit olarak oksitlenir (ATSDR, 2012).

2.3.2. Kadmiyumun Keşfi

Cd elementi 1817 yılında Almanya'da ikisi de kimyacı olan Friedrich Stromeyer ve Karl Samuel Leberecht Hermann tarafından eş zamanlı olarak çinko karbonat bileşiği saflaştırılması esnasında keşfedilmiştir (Godt ve ark., 2006). Cd maruziyetinden kaynaklanan toksik etkileri ilk olarak gözlemleyenler klinik tıp araştırmacılarıdır. Sovet adında bir araştırmacı, 1858 yılında, kadmiyum karbonat tozunu cilalama ajanı olarak kullanan kişilerde, bu bileşiğin hem solunması hem de oral alınımı ile akut gastrointestinal semptomların yanı sıra solunum rahatsızlıklarına da neden olduğunu rapor etmiştir. 1920 yılında, Stephens, işçilerde Cd zehirlenmesini bildirmiştir (Nordberg, 2009). Eczacı olan Schwartze ve Alsberg

(1923) Cd ile hayvan deneyleri yaparak kuşlar ve köpekler de dâhil olmak üzere birçok omurgalıda çeşitli klinik bulgu ve organlarında morfolojik değişikliklerin olduğunu bildirerek Cd ile ilgili ilk toksikolojik katkıyı sağlamışlardır (Schwartz ve Alsberg, 1923).

1955 yılında Dr. Kono'nun 17. Japon Pratik Cerrahlar Derneğinde bildirdiği "itai itai" hastalığı Cd'un neden olduğu oldukça ağrılı, Japonya'nın Toyama bölgesine endemik bir hastalıktır. Bu bölgedeki kurşun ve kadmiyum filizlerinin çıkarıldığı maden ocaklarının atıkları ile Jintuzu nehrini kirletmesi sonucu, Cd sulama ve içme suyu yoluyla besin zincirine katılarak insanlara ulaşmıştır (Tsuchiya, 1969). Yıllar sonra nehrin civarında yaşayan halkta 'itai-itai' veya 'ouch-ouch' diye adlandırılan Cd toksisitesi, şiddetli romatizmal ağrılarla kendini göstermiştir.

2.3.3. Kadmiyumun Çevreye Etkisi

Cd ve bileşikleri; küresel olarak kullanılmakta ve ticaret yapılmaktadır. Cd endüstride, % 83'ü piller, % 8'i pigmentler, % 7'si kaplama ve kaplama levhaları, % 1,2'si plastik stabilizatörleri, % 0.8'si demir harici alaşımlar, fotovoltaik cihazlar gibi tüketici ürünlerinde kullanılmaktadır.

Cd, toprağa suya ve atmosfere çeşitli yollarla yayılır. Ayrıca suda yaşayan organizmalarda ve tarım ürünlerinde birikebilir (ATSDR, 2012).

Cd atmosfere antropojenik olarak bakır ile nikelin rafinasyonu ve fosil yakıtların yanması ile salınmasının yanı sıra volkanik aktivite, orman yangınları ve rüzgârlar gibi doğal kaynaklar vasıtasıyla da dağılmaktadır (Waisberg ve ark., 2003).

Cd ve bileşikleri toprakta taşınabilirliği pH ve organik madde miktarı gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğundan kontamine olduğu ortama göre değişir. Genel olarak, Cd, organik maddeye güçlü bir şekilde bağlanır ve bitkiler vasıtasıyla besin zincirine girer (ATSDR, 2012). Toprağa yüksek konsantrasyonda kadmiyum içerebilen fosfatlı gübreler, bazı pestisitler ve kanalizasyon suları ile yayılır (Thornton, 1992).

Kadmiyum bileşiklerinin suda çözünen formları, su kaynaklarına; sanayii bölgelerinden, içme sularına ise; galvanizli çinko boru, lehimler ve bazı metal bağlantı parçaları içindeki yabancı malzemelerden kontamine olmaktadır (WHO, 2004).

2.3.4. Kadmiyumun Toksisitesi

Cd'un düşük miktarlarda bile dokular üzerinde son derece zararlı etkileri vardır. Çoğu ağır metalde olduğu gibi Cd toksisitesi için de karaciğer hedef organdır. Ancak, bu metal böbrek, akciğer, kemik, pankreas, duodenum ve testis dokularında birikip, sitolojik ve histolojik hasara sebep olmaktadır. Deneysel veya çevresel olarak bu metale maruziyet sonucunda böbrek fonksiyon kaybı, karaciğer hasarı, testis atrofi, infertilite, solunum ve sindirim sistemi bozuklukları ile anemi gibi ciddi rahatsızlıklar meydana gelmektedir (Godt ve ark., 2006; Klaassen ve ark., 2009; Nordberg ve ark., 1994).

Cd'un toksisitesi ultrastrüktürel düzeyde incelendiğinde, Xu ve ark. (2017)'nin fare nöron hücrelerinde yaptıkları bir çalışmada kadmiyumun, mitokondrielerde şişme, parçalanma, azalma, krista yapısında bozulma ve mitokondriyal matraste elektron yoğunluğunun azalması gibi anormal görünüme, ayrıca çekirdek membran hasarı ve kromatin yoğunlaşmasına neden olduğunu bildirmişlerdir (Xu ve ark., 2017).

Cd, hücrelerin antioksidan sistemlerini değiştirir ve membran lipidlerinin peroksidasyonunu artırarak farklı dokularda oksidatif hasarı indüklemektedir. Oksidatif stresi; 1) Sülfhidril gruplarını inaktive etmek 2) çinko, selenyum ve bakır gibi önemli eser metaller ile ilgili homeostazı bozmak ve 3) Ca²⁺'a bağlı sinyal yollarını kesintiye uğratmak olmak üzere üç yolla oluşturur (Prozialeck ve ark., 2006).

2.3.5. Kadmiyumun Maruziyeti

Cd alımın yoluna, doza ve maruz kalma süresine bağlı olarak çeşitli organlara zarar verebilir. Cd maruziyeti, akciğer, renal, endometrial, göğüs, gastrik ve prostat kanseri insidansında artış ile ilişkilendirildiğinden, IARC tarafından bir insan kanserojeni olarak sınıflandırılmıştır (ATSDR, 2012 ve Kossowska ve ark., 2013).

Mesleki maruziyette risk iş yerine bağlı olarak değişir. En yüksek maruziyet riski, Cd, alaşımları ve bileşiklerinin üretimi ve işlenmesi ile elektronik atıkların geri dönüşümünde oluşur (ATSDR, 2012). Cd'a maruz kalan işçilerde, kadmiyum maruziyeti büyük ölçüde soluma ile gerçekleşmektedir Cd buharına akut olarak

maruz kalınması, akciğerde ödem, kanama ve inflamasyon oluşumuna ayrıca karsinogeneze neden olur. Havada 10-50 µg/m³ kadmiyum bulunması ve çalışma süresince 10 m³ hava solunması durumunda bir işçinin günlük kadmiyum alımı 100-500 µg olarak kabul edilmektedir. OSHA, 8 saatlik iş günü boyunca Cd'un havadaki yasal sınırını ortalama 5 µg/m³ olarak belirlemiştir (ATSDR, 2012 ve Klaassen ve ark., 2009).

Mesleki olmayan maruziyet başta bu elementin nispeten yüksek konsantrasyonlarını içeren sigara dumanından kaynaklanmaktadır (WHO, 2000). Tütün bitkisi topraktan aldığı Cd'ü önemli miktarda yapraklarında biriktirir. Günde bir paket sigara içenlerde kan-Cd seviyesi yaklaşık 1-3 µg/gün'dür. Yetişkinler için ortalama kan kadmiyum seviyesi 0.38 µg/L iken sigara içenlerde bu oran 1.58 µg/L'dir. Sigara içenler ile içmeyenlerin vücut dokularındaki Cd düzeylerinin karşılaştırılmasıyla sigara içenlerde kan kadmiyum seviyesinin kabaca iki katına çıktığı doğrulanmaktadır(ATSDR, 2012; Waalkes, 2003).

Sigara içmeyenlerde kadmiyum maruziyetinin ana nedeni kontamine olmuş gıda ve içme sularıdır. Gıdalar ile alınan günlük Cd miktarı ortalama 10-25 µg kadardır, ancak çevresel Cd oranları ile değişiklik gösterebilir (WHO, 2000).

2.3.6. Kadmiyumun Metabolizması

Cd uzun bir biyolojik yarılanma ömrüne (insanlarda ~20-40 yıl) sahip olduğu için vücutta birikir (ATSDR, 2012; Mendez-Armenta ve Rios, 2011; Sarkar ve ark., 2013; WHO, 2000). Vücuda pulmoner veya gastrointestinal yollarla giren Cd emildikten sonra başlangıçta albumin ve diğer büyük proteinlere bağlanarak plazmada taşınır. Ulaşılan ilk organ karaciğerdir ve akut Cd maruziyetinin ana organıdır. Cd-albümin kompleksi karaciğerde ayrıştırılır. Serbest bırakılan Cd, karaciğerde metalotiyoinin sentezini başlatır (Nordberg ve ark., 1994). Metalotiyoinler, çoğunlukla metal detoksifikasyonuna katılan düşük molekül ağırlıklı sistein aminoasidi bakımından zengin proteinlerdir ve yüksek afiniteli bir şekilde Cd'ü kendisine bağlayarak zararsızlaştırır (Klaassen ve ark., 2009). Hepatositlerde nekroz ve apoptoz oluşturduktan sonra Cd-metalotiyoin kompleksleri sinüzoidlere geçer. Buradan, emilen Cd'un bir kısmı, kadmiyum-glutatyon konjugatları şeklinde safra yoluyla entero-hepatik döngüye girer. Biliyer sistemde enzimatik olarak Cd-

sistein kompleksine indirgenmiş olan kadmiyum yeniden ince bağırsaklardan geçer (Godt ve ark., 2006).

Cd-metallotionein kompleksinin bir kısmı ise düşük molekül ağırlığından dolayı plazma içinde serbestçe hareket eder. Diğer organlara ve öncelikli olarak böbreğe ulaşır. Böbrekte glomerüler membrandan kolayca taşınarak tübüler sıvıya geçer. Burada proksimal tüpün fırçamsı kenarlı hücreleri tarafından hücre içine alınan kompleks lizozomlar da ayrıştırılır, Cd serbest bırakılır (Nordberg ve ark., 1994). Sonuçta tübüler hücrelerde nekroz oluşturur. Böbrek uzun süreli Cd maruziyetinin ana organıdır (Godt ve ark., 2006).

Serbest Cd basit difüzyona ek olarak, hücre membranlarında bulunan taşıyıcı proteinler vasıtasıyla hücre içine alınır. Taşıyıcı proteinlere, kalsiyum ve çinkoya benzerliği nedeniyle yarışmalı olarak bağlanır. Cd'un, çinko, demir ve bakır gibi elementlerle aynı mekanizmayla hücre içine alınımı bu esansiyel elementlere olan ihtiyacın karşılanamamasına ve sonucunda eksikliğine neden olur (Brzóska ve Moniuszko-Jakoniuk, 2001; Lekesizcan ve Sönmez, 2016). Ayrıca, Cd'un, Ca²⁺ bağlayıcı glikoprotein yapıda bir transmembran olan E-Cadherinin konformasyonunu değiştirebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Waisberg ve ark., 2003). E-Cadherin, özellikle epidermal hücrelerde hücre-hücre adezyonlarında önemli bir rol oynamaktadır. Bu sonuçlar, E-cadherinin kadmiyum toksisitesi için direkt bir moleküler hedef olabileceğini göstermektedir (Godt ve ark., 2006).

2.3.7. Kadmiyumun Testis Üzerine Etkileri

İnsan ve çeşitli memeli türlerinde yapılan birçok çalışma, Cd'un testiküler histopatolojide çeşitli değişikliklere neden olduğunu ve kısırılığa yol açtığını göstermektedir. Testislerde Cd toksisitesinin başlangıcı hızlıdır. Cd enjeksiyonundan 24 saat sonra testisler şişer ve ödem izlenir ayrıca hemorajik inflamasyon ve nekroz oluşur (Klaassen ve ark., 2009; Siu ve ark., 2010).

Kadmiyumun germinal epitel üzerine etkisi: Cd maruziyeti ile seminifer tübüllerde vakuolizasyon, germinal hücrelerde dejenerasyon, nekroz ve apoptoz görülmektedir. Dejenere olan germinal hücreler seminifer tübül lümenine dökülür (Goyer ve ark., 2004; Marettová ve ark., 2015). Düşük doz Cd'un tekrarlı enjeksiyonları da spermatogenezi zayıflatır. Düşük dozlarda uzun süre CdCl₂ alınımı,

sıçan testisinde belirgin morfolojik veya proliferatif değişiklikler olmadan germinal epitelin apoptotik indeksini artırır aynı zamanda spermatogonyum ve spermatosit sayısında azalma meydana getirir (Herranz ve ark., 2010). CdCl₂, spermatidlerin gelişmesinde hücre polaritesinin kaybedilmesine ve yanlış yönlenmesine neden olur (Marettová ve ark., 2015).

Kadmiyumun Sertoli hücreleri üzerine etkisi: Cd uygulaması Sertoli hücrelerinde geniş bir yelpazede yapısal ve morfolojik değişiklikler meydana getirir. Doza bağlı bir şekilde CdCl₂'nin Sertoli hücrelerinin proliferasyonunu inhibe ettiği ve büyümeyi olumsuz yönde etkilediği ayrıca ince yapıyı bozduğu bildirilmiştir. Cd uygulamasının Sertoli hücrelerinde neden olduğu bu morfolojik değişiklikler DNA hasarını ve apoptozu indükler (Zhang ve ark., 2010). Cd'a maruz bırakılan sıçanlarda, Sertoli hücrelerinin çekirdeğinde; kromatin yoğunlaşması ve ayrılmış nükleer denses bölgeler, endoplazmik retikulumda; lamel genişlemesi, mitokondrilerinde; şişme ve sitoplazmada patolojik vakuoller rapor edilmiştir (Bizarro ve ark., 2003).

Cd'un Sertoli-Sertoli hücre arayüzünde bulunan sıkı bağlantı kompleksleri üzerindeki etkisi doza bağlı olarak geri dönüşümlüdür. Düşük doz Cd, hücre sayısını ve canlılığını etkilemeden, Sertoli hücresi sıkı bağlantılarını seçici olarak bozabilmektedir. Yüksek doz Cd, bağlantı komplekslerinin yapısını oluşturan oklüdin, N-cadherin ve vimentin proteinlerinin yapısını tamamen bozar ve proteinlerin sentezini inhibe ederek bağlantının yeniden kurulmasını engeller (Bekheet, 2010). Setchell ve Waites'in yaptığı bir çalışmada, Cd toksisitesinin kan testis bariyerine verdiği hasar, interstisyumda bulunan mikro damarlardan daha önce olduğundan, kan testis bariyerindeki sıkı bağlantı komplekslerinin, mikro damarlardaki sıkı bağlantılara göre Cd toksisitesine karşı daha savunmasız olduğu gösterilmiştir (Setchell ve Waites, 1970).

Kadmiyumun Leydig hücreleri üzerine etkisi: Cd, testis dokularını, testis fonksiyonunu bozarak ve androjen sekresyonu önemli ölçüde düşürerek etkiler. Erkek kemirgenlerde Cd, testosteron, LH, FSH hormonlarının dolaşımdaki seviyelerini önemli ölçüde değiştirmiştir. Uzun süre düşük doz Cd maruziyeti Leydig hücrelerinde morfolojik hasar oluşturabilmektedir (Lafuente ve ark., 2004). Cd maruziyetinden 12 ay sonra, hücrelerde ultrastrüktürel olarak, mitokondrilerde şişme

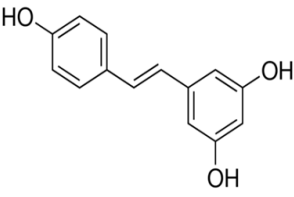
ve krista kaybı, nükleer kromatinde yoğunlaşma, sitoplazmada vakuolizasyon gibi dejeneratif görüntüler ortaya çıkmıştır (Blanco ve ark., 2010). Leydig hücreleri mitokondri ve mikrozom membranlarının yüksek oranda lipid içeriği nedeniyle Cd kaynaklı lipid peroksidasyona karşı daha duyarlıdır.

2.4. Resveratrol Hakkında Genel Bilgiler

2.4.1. Resveratrolün Genel Özellikleri

Çeşitli doğal ürünler, hem hastalık önleyici hem de tedavi edici özellikleri nedeniyle, klinik potansiyelleri açısından incelenmektedir. Bu bileşikler arasında, güçlü anti-fungal özelliklere sahip viniferinler ve bitki antibiyotikleri olarak bilinen fitoaleksinler bulunmaktadır (Pervaiz, 2004). Fitoaleksinler, bitki savunma mekanizmalarının ürünleri ve sekonder (ikincil) metabolitlerdir. RES (3,5,4-trihidroksistilben) stilben ailesine ait bir polifenoldür ve yapısı bir metilen köprüsü ile birleşen iki aromatik halkadan oluşur. Basit kimyasal yapısı nedeniyle bu bileşik, çeşitli reseptörler ve enzimlerle etkileşime girebilir ve bu sayede bir dizi yolakta aktivatör veya inhibitör gibi davranır. Cis veya trans konfigürasyonunda ve glikosile edilmiş formda bulunabilir (Bhat ve ark., 2001; Soleas ve ark., 1997). RES'ün bazı özellikleri tablo 1'de yer almaktadır.

Tablo 1. RES'ün fiziksel özellikleri (Sigma Aldrich a).

Kapalı formül	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Açık formül	
Sinonimleri	Trans-resveratrol 3,4',5-Trihydroxy-trans-stilbene, 5-[(1E)-2-(4-Hydroxyphenyl)ethenyl]-1,3-benzenediol
Molekül Ağırlığı	228.24
Çözünürlük	Suda kolayca çözünür

2.4.2. Resveratrolün Keşfi

RES ilk kez Michio Takaoka tarafından 60 yıl önce *Veratum grandiflorum* (Yalancı Helleborus)'un reçinesinde keşfedilmiştir. 1977'de Langcake bu bileşiğin mantar enfeksiyonuna veya ultraviyole ışığa maruz kalma durumunda üzüm asmalarının (*Vitis vinifera*) yaprak dokuları tarafından yanıt olarak sentezlendiğini bulmuştur (Le Corre ve ark., 2005). Daha sonraları, yer fıstığı, çilek, poligonyum kökleri ve geleneksel oryantal ilaç bitkileri gibi pek çok bitkide bulunmuştur. RES'ün östrojenik ajan dietilstilbestrole yapısal benzerliği nedeniyle fitoöstrojen olduğu bildirilmiştir (Bhat ve ark., 2001).

Fransa'nın Güneyinde yaşayan Fransızların yağlı bir diyetle beslenmeleri ve sigara alışkanlıklarına rağmen koroner kalp hastalığına bağlı ölüm oranı oldukça düşüktür. Fransız paradoksu olarak adlandırılan bu durum kısmen şarap tüketimine atfedilmiştir, özellikle kırmızı şarap (Hung ve ark., 2000). Düzenli şarap alımının, HDL'de artışa, LDL'de ve pıhtılaşmada azalmaya neden olarak kardiyovasküler hastalıklarla ilgili risk faktörlerini %32 azalttığı görülmüştür. Bu durum kırmızı şarabın içerdiği polifenollerle, özellikle damar düz kaslarını gevşetici etkisi olan RES ile açıklanabilir. Üzüm kabuğu ve çekirdeğinde bulunan polifenoller kırmızı şarap yapılırken alkolle fermentasyon sırasında şaraba geçer. Beyaz şarabın içeriğinde polifenol konsantrasyonu oldukça azdır. Çünkü yapımında üzüm, kabuk ve çekirdeklerinden fermentasyon öncesi arındırılır (Katırcıoğlu, 2007).

2.4.3. Resveratrolün Metabolizması

RES oral yoldan vücuda alındıktan sonra, büyük oranda jejunumdan, az bir miktarda ileumdan olmak üzere yaklaşık %70'i geri emilirken kalanı fecesle dışarı atılır. Absorbe edilen resveratrol kısa bir süre de kan dolaşımına katılır. RES enterositlerden çözünebilir bir formda salınır. Dokulara albümin ile taşınır. RES hidrofilik konjuge hale gelerek hücre içine kolayca pasif difüzyon ve taşıyıcı aracılı geçiş ile alınır. RES biyotransformasyonu esas olarak karaciğer mikrozomlarında az miktarda da bağırsaklarda gerçekleşir. İnsan hücreleri üzerine yapılan bir çalışmada, resveratrol ağırlıklı olarak sülfat konjuge olarak ve çok az miktarda glikuronid konjugatı olarak salınırken, sıçanlarda RES metabolizmasının büyük çoğunluğu

glukuronidasyonu içermektedir. İnsan sindirim sistemi, polifenolleri oksitleyen enzimler içerir. Glikozilasyon, resveratrolün enzimatik oksidasyonunu inhibe eder, böylece biyolojik aktivitesini korur ve stabilitesini ile biyoyararlanımını artırır (Signorelli ve Ghidoni, 2005).

2.4.4. Resveratrolün Biyolojik Etkileri

RES biyolojik olarak oldukça geniş yelpazede aktiviteye sahiptir. Bunlardan en iyi bilinenleri; antioksidan, antiinflamatuvar, antikanserojen, kardiyoprotektif, nöroprotektif, vazodilatör, östrojenik, kan yapıcı, karaciğer koruyucu ve yaşlanmayı önleyici etkileridir.

Resveratrolün Antioksidan Etkisi: RES'ün doğal antioksidan rolü çeşitli antioksidan mekanizmalarla açıklanabilir. RES canlı hücrelerde oksidatif strese bağlı gelişen zararlı etkileri; 1) Mitokondride oluşan süperoksit ve hidroksil radikallerini yakalayıp, 2) Fenton reaksiyonu ürünleri tarafından indüklenen lipid peroksidasyonunu inhibe ederek, 3) Koenzim Q ile yarışarak ve ROS oluşum yerinde oksidatif zincir kompleksini inhibe ederek azalttığı düşünülmektedir (Soleas ve ark., 1997).

Resveratrolün Fitoöstrojen Etkisi: Fitoöstrojenler, doğal olarak oluşan bitki bileşiklerinin çeşitli bir grubudur. Yapısal olarak östradiole benzerdirler ve bu nedenle östrojenik veya antiöstrojenik etkilere neden olabilirler (Svechnikov ve ark., 2010). RES'ün östrojenik ve anti-östrojenik karakteri oldukça dikkat çekicidir. RES, sentetik bir östrojen olan dietilstilbestrol (4,4-dihidroksi-trans-dietilstilben)'e kimyasal olarak benzemektedir. RES'ün fitoöstrojenik karakteri, östrojen-duyarlı hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyen endoplazmik retikulum (ER) üzerinde bulunan α ve β östrojen reseptörlerine aktif bağlama kapasitesi ile doğrulanmış olsa da RES'ün ER'ler üzerindeki etkileri hala tartışmalıdır. Örneğin, MCF-7 kültür hücrelerinde, Gehm ve ark. (Gehm ve ark., 1997), RES'un E2 (dietilstilbestrol: sentetik östrojen) ile kombine edildiğinde bir süperagonist gibi davrandığını, Lu ve Serrero (Lu ve Serrero, 1999) ise RES'ün, E2 varlığında ve yokluğunda E2 tarafından indüklenen progesteron reseptör ekspresyonunun baskılanmasıyla görülen antiöstrojenik aktiviteye neden olduğunu bildirmiştir. Son zamanlarda, farklı hücre tipleri ve RES'ün farklı dozlarıyla yapılan çalışmalar sonucunda, RES'ün bir ER

agonisti olarak hareket etme kabiliyetinin farklı hücre tiplerine ve doza bağlı olarak değiştiği ve RES'ün seçici bir ER modülatörü olarak işlev gördüğü söylenebilir (Bhatve ark., 2001; Le Corre ve ark., 2005).

Resveratrolün Kardiyoprotektif Etkileri: Polifenollerin özellikle antioksidan gibi geniş spektrumlu biyolojik aktivitelerinden dolayı kardiyovasküler etkileri olduğu düşünülmektedir (Bhat ve ark., 2001). RES, kalp damar hastalıkları üzerine; 1) koroner damarları genişleterek, 2) ventriküler aritmiyi azaltarak, 3) trombosit agregasyonunu ve düz kas proliferasyonunu inhibe ederek, 4)glikoz metabolizmasını iyileştirerek ve 5) lipit profilini düzelterek koruyucu etki gösterir (Soleas ve ark., 1997). Sato ve ark. (2000)'in yapmış olduğu bir çalışmada resveratrolün, sıçan izole kalp modelinde, kalbi iskemik hasardan koruduğunu gösterilmiştir. Ek olarak lipit peroksidasyonunu göstermek için uygun bir belirteç olan malonaldehit düzeylerine bakıldığında ise malonaldehit düzeylerinin azaldığı gösterilmiştir (Sato ve ark., 2000). Damar tıkanıklığına neden olan LDL oksidasyonu veya platelet toplama gibi atherogenesis'in farklı bölümlerine karşı iyi bir ajandır. Resveratrol'un hem şelatlayıcı hem de serbest radikal süpürme mekanizmaları ile LDL peroksidasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Bernhard ve ark., 2000). Aynı zamanda RES'ün bakır şelatörü olarak diğer flavonoidlerden daha etkili olduğu bilinmektedir (Ulrich ve ark., 2005).

Resveratrolün Terapötik ve Kanseri Önleyici Etkileri: Kanseri kemopreventif ajanları, bir veya daha fazla karsinogenez evresine müdahale ederek tümörigenez insidansını azaltmak üzere tasarlanmıştır. RES'ün kanseri önleyici ve terapötik potansiyeli son yıllarda yoğun olarak incelenmiştir ve çok çeşitli hücre hatlarında yapılan sistematik çalışmalarda, kemopreventif ajan olarak kullanılmaya başlanmıştır (Bhat ve ark., 2001). Hayvan modellerinde, tümör başlangıcına etkisi, antimitojen ve serbest radikalleri inhibe etmesi ile antioksidan özelliğinden kaynaklanmaktadır. Tümör gelişimini uyarıcı bir enzim olan COX-1'in inhibisyonu ile tümör ilerleme aktivitesini azalttığı gözlenmektedir. RES, COX-1 enzimini %98 oranında inhibe etmektedir (Yar ve ark., 2010).

RES kanserojeninin farklı aşamalarında çeşitli yolları etkiler, hücre döngüsünü modüle eder ve çeşitli kanser hücreleri dizilerinde apoptoza neden olur (Bhat ve ark., 2001).

Jang ve ark. (Jang ve ark., 1997) tarafından fare meme organ kültürü modeli üzerinde yapılan çalışmada RES'ün kanserojenezin üç büyük aşamasını etkilediği ve preneoplastik lezyonların oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir.

2.4.5. Resveratrolün Apoptoz Üzerine Etkileri

RES'ün insan meme kanseri hücrelerinin proliferasyonunu ve canlılığını in vitro olarak doğrudan inhibe ettiği gösterilmiştir. RES ile indüklenen hücre proliferasyonunda azalma, aynı zamanda hücre ölüm oranlarının da artmasına neden olmuştur. RES'ün çeşitli düzenleyici mekanizmalar yoluyla, meme kanseri hücre hatlarında apoptozu indüklediği gösterilmiştir. MDA-MB-231 hücre hattında ise RES apoptozu indiklemediği için, apoptoz indüksiyonunun, hücre tipine spesifik olduğu düşünülmüştür (Le Corre ve ark., 2005).

Tümör önleyici p53, hücre döngüsünün durması ve apoptozun aktivasyonu yoluyla hücre büyümesini engeller. Kanser hücrelerinde p53'ün RES ile indüklenen serin fosforilasyonu, p53'ün asetilasyonu ile gen ekspresyonunu sağlar. RES ile indüklenen p53 aracılı apoptoz esas olarak mitokondriyal yolağı aktive eden bağımlı ve bağımsız mekanizmalar yoluyla oluşur. RES, proapoptotik Bax ve Bak ekspresyonunu artırır ve antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL'yi inhibe eder. RES uygulamasıyla, proapoptotik moleküllerin artıp, antiapoptotik moleküllerin azalması apoptoz indüksiyonuna katkıda bulunur. Kaspazlar apoptoz yolağının önemli bileşenleridir. Hücre ölümü programının aktivasyonunda hayati öneme sahip basamak kaspaz-9'un ve kaspaz-3'ün aktivasyonudur. RES uygulaması, meme kanseri hücre hattında kaspaz-3'ü aktive eder. Aynı zamanda, kanser hücrelerinde kaspaz-3 geninin delesyonundan dolayı prokaspaz-3'ten yoksun olan MCF-7 hücre hattında kaspaz-9 aktivitesini uyarmaktadır. RES'ün bu antiproliferatif aktivitesi, apoptotik hücre ölümünün indüklenmesinden ve hücre döngüsü kontrolünün bozulmasından kaynaklanmaktadır (Le Corre ve ark., 2005)

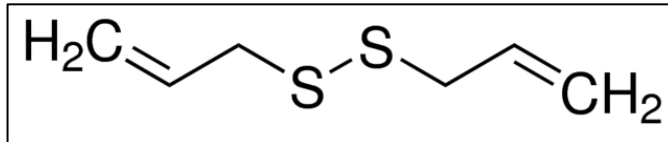
2.5. Dialil Disülfid Hakkında Genel Bilgiler

2.5.1. Dialil Disülfidin Genel Özellikleri

Dialil disülfid (DDS ya da 4,5-ditiya-1,7-oktadien) sarımsağın yağda çözülen organosülfür bileşiklerinden önemli bir tanesidir. Sarımsağın buharla damıtılmasıyla sarımsı, suda çözünmeyen ve güçlü bir kokuya sahip sarımsak yağı elde edilir. Dialil disülfid sarımsak yağında dialil trisülfid ve dialil tetrasülfid ile birlikte bulunur. Sarımsağın ezilmesi sırasında salınan allisin'nin ayrışmasıyla üretilir (Yi ve Su, 2013).

Fiziksel olarak, DDS'in yoğun sarımsak kokusu vardır. % 80 saflıkta açık sarı olan bu sıvı 138-139 °C'de kaynar, yaklaşık 1,0 g/ml yoğunluğa ve 20 °C'de 1 mmHg buhar basıncına sahiptir. Non-polar olduğundan suda çözünmez, katı yağlar, sıvı yağlar, lipitler ve heksan ya da toluen gibi non-polar çözücüler içinde çözünebilir (Sigma Aldrich b).

Kimyasal olarak, DDS kolayca H₂O₂ ya da parasetik asit ile allisine oksidize edilebileceği gibi allisin de sırasıyla dialil disülfid ve trisülfid'e hidroliz olabilir. Sıvı kükürt ile DDS reaksiyona girdiğinde neredeyse 22 kükürt atomu içeren uzun dialil polisülfid zincirlerinin bulunduğu bir karışım oluşturur (Yi ve Su, 2013). DDS ısıtıldığında kompleks bir karışım vererek bozunmaktadır. DDS'in karbon-kükürt bağları, kükürt-kükürt bağlarından 16 kcal mol⁻¹ daha zayıf olduğundan, ısıtıldığında DDS'in çift bağlarının kırılmasıyla allyldithio radikalleri oluşur, sonraki reaksiyonlar damıtılmış sarımsak yağında eser miktarda bulunan diğer çeşitli organosülfür bileşiklerini üretir (Block ve ark., 1988). Bir katalizör varlığında, DDS, 1-alkiltio-3-alkiltio-1-propen ve 1,3-di (alkiltio) propen oluşturan alkil halojenürle kombine edilebilir (Amosova ve ark., 1986).



Şekil 2. DDS'in kimyasal gösterimi (Sigma Aldrich b)

2.5.2. Dialil Disülfitin Biyolojik Etkileri

DDS'in etkileri; kanserojenlerin detoksifiye edilmesi, DNA adüktlerinin oluşumunun bastırılması, antioksidan olarak ROS üretiminin baskılanması, hücre döngüsü kontrol noktalarının düzenlenmesi, apoptoz ve hücre farklılaşmasının uyarılması, histon modifikasyonu, anjiyogenezin ve hücre invazyonunun inhibisyonu gibi metabolize edici enzimlerin aktivasyonunu içerir (Yi ve Su, 2013).

DDS, sağlıklı hücrelerde toksik etkilere neden olmadığı ve kansere karşı çok hedefli tedavi veya koruma özelliği olduğu için prospektif bir ajandır.

Dialil disülfitin kanser önleyici etkisi: Büyük epidemiyolojik çalışmalar, sarımsağın kanser prevalansının azaltılmasında önemli bir rol oynadığını göstermektedir. Galeone ve ark. (2006), Güney Avrupa'da sarımsak alım sıklığı ile birkaç yaygın kanser riski (Oral kavite ve farinks, özofagus kanseri, kolorektal kanser, larinks kanseri, göğüs kanseri, yumurtalık kanseri, prostat kanseri ve böbrek hücresi kanseri dâhil olmak üzere) arasında ters bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir (Galeone ve ark., 2006).

Sarımsak içerisindeki organosülfür bileşiklerin bazıları kanserojen aktivasyonu inhibe eder, faz II detoksifikasyon işlemlerini hızlandırır, hücre döngüsünün durmasına neden olur; Apoptozu indükler, histon asetilasyonunu artırır, hücrel redoks durumunu modüle eder ve çoklu ilaç direnci gelişimine katılır (Yi ve Su, 2013).

Deney hayvanları çalışmaları, DDS'in sitokrom P450'ye bağlı monooksijenazların modülasyonu, kanserojen aktivasyonunun inhibisyonu veya faz-II enzimlerinin indüklenmesi ve kanserojen detoksifikasyonunun hızlandırılması yoluyla çeşitli kimyasal kanserojenler tarafından indüklenen kansere karşı koruma sağlayabileceğini kanıtlar (Arunkumar ve ark., 2007). Buna ek olarak, DDS kanser metabolizmasında yer alan enzimlerin modülasyonu yoluyla olası kanserojenin ilk aşamasında koruyucu etki göstermektedir (Siess ve ark., 1997).

Dialil disülfitin hücre döngüsüne etkisi: Hücreler, DNA hasarına karşı karmaşık ve özelleşmiş cevaplar geliştirmiştir. Bu yanıtların merkezinde, hücre döngüsünün ilerlemesini durduran ve onarım sürecini kolaylaştıran DNA hasarının

"kontrol noktaları" vardır. Çalışmalar birçok insan kanser hücre hatlarında DDS'in antiproliferatif özelliğinin, G1 fazındaki hücrelerin oranını azaltma ve G2/M fazındaki hücreleri bloke etme kabiliyetiyle ilişkili olduğunu göstermiştir (Yi ve Su, 2013). DDS uygulaması histon hiperasetilasyonunu hızlı bir şekilde indüklemektedir. Histon hiperasetilasyon ile antiproliferatif etkilerde (G2/M fazında hücre döngüsünün durması) artmaktadır (Druesne-Pecollo ve ark., 2008).

Dialil disülfidin antioksidan etkisi: DDS, artan oksitatif stres karşısında, manganez süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimlerin konsantrasyonlarında ki azalmayı önlemektedir. Ayrıca, nitrik oksit üretimini inhibe etmektedir (Pedraza-Chaverrí ve ark., 2003). Ek olarak DDS, MDA konsantrasyonunda belirgin bir düşüşe neden olarak lipid peroksidasyonuna karşı da koruyucu etki gösterir (Kim ve ark., 2015).

Dialil disülfidin anti-inflamatuar etkisi: DDS, NF- κ B ve MAPKs gibi sinyal yollarının inhibisyonu ve proinflamatuar sitokinlerin üretimini düzenleyebilme yeteneğinden dolayı anti-inflamatuar etki göstermektedir (Kim ve ark., 2015 ve Park ve ark., 2012).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (HADYEK)'nin 26.05.2015 tarih ve 2015-07/05 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak yapılmıştır. Çalışma bütçesinin tamamı Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi KUAP(T)-2015/45 proje no'lu kararı gereğince karşılanmıştır.

Çalışmaya 35 adet, 400-500 gr ağırlığında, *Wistar albino* cinsi erişkin erkek sıçan alındı. Deneyler süresince sıçanlar, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda, her bir kafeste en fazla 4 adet sıçan olmak koşuluyla barındırılarak, serbestçe beslenmeleri ve su içmeleri sağlandı.

3.2. Kimyasallar

Yapılan deneyde Cd toksisitesi oluşturmak amacıyla Cd'un suda çözülen formu $CdCl_2$ kullanıldı. Etken madde olarak kullandığımız, kadmiyum klorür ($CdCl_2$), resveratrol (RES) ve dialil disülfid (DDS) Sigma'dan temin edilmiştir. $CdCl_2$ serum fizyolojik (SF) içerisinde çözülerek intraperitoneal (i.p) enjeksiyon ile, RES SF içerisinde çözülerek oral gavaj (Palsamy ve Subramanian, 2011) ile ve DDS mısır yağı (Pedraza-Chaverrı ve ark., 2003) içerisinde çözülerek i.p. enjeksiyon (Di ve ark., 2015) ile uygulanmıştır.

3.3. Deney Grupları

Deney hayvanları her grupta 7'şer adet olmak üzere 5 gruba ayrıldı.

Grup A (kontrol grubu): Herhangi bir uygulamaya maruz kalmayan denekler.

Grup B (deney grubu): Akut kadmiyum toksisitesi oluşturulan deneklerin yer aldığı gruplar.

Grup B1 (CdCl₂): 5 gün boyunca her gün oral gavaj ile 1 ml SF ve i.p olarak 0,5 ml mısır yağı verildi. 6. gün 1 mg/kg CdCl₂ i.p olarak uygulandı ve 48 saat sonra sakrifiye edildi.

Grup B2 (RES+CdCl₂): 5 gün boyunca her gün 1ml SF içerisinde 5 mg/kg RES oral gavaj ile uygulandı. 6. gün 1 mg/kg CdCl₂ i.p olarak uygulandı ve 48 saat sonra sakrifiye edildi.

Grup B3 (DDS+CdCl₂): 5 gün boyunca her gün 0,5 ml mısır yağı içerisinde 50 mg/kg DDS i.p olarak uygulandı. 6. gün 1 mg/kg CdCl₂ i.p olarak uygulandı ve 48 saat sonra sakrifiye edildi.

Grup B4 (RES+DDS+CdCl₂): 5 gün boyunca her gün 1ml SF içerisinde 5 mg/kg RES oral gavaj ile ve 0,5 ml mısır yağı içerisinde 50 mg/kg DDS ip olarak uygulandı. 6. gün 1 mg/kg CdCl₂ i.p olarak uygulandı ve 48 saat sonra sakrifiye edildi.

3.4. Dokuların Alınması

Deney başlangıcında hayvanların vücut ağırlıkları uygulanacak madde dozlarını belirlemek üzere tartıldı. Hayvanlar 8. günde de vücut ağırlıkları ölçülüp kaydedildikten sonra derin eter anestezisi altında servikal dislokasyon ile sakrifiye edildi. Hayvanların karın bölgesi açılarak testisleri çıkarıldı. Çevre dokularından iyice temizlenen testislerin ağırlıkları tartılıp kayıt edildi ve ışık mikroskopik incelemeler için hazırlandı.

3.5. Testis Ağırlık İndeksi Hesaplaması

Deney hayvanlarına ait sağ ve sol testis ağırlığı toplamı aşağıdaki formüle göre hesaplanarak her bir hayvan için testis ağırlık indeksi (TAİ) aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Sahinturk ve ark., 2007);

$$TAİ: [(sağ+sol testis ağırlıkları toplamı)/vücut ağırlığı] \times 100$$

3.6. Işık Mikroskopik Preparasyon

Tüm gruplardan ışık mikroskopik incelemeler için alınan testis doku örnekleri %10'luk formalin ile fikse edildi. Dokular fikse olduktan sonra doku takibi işlemine geçildi (tablo 2).

Tablo 2. Doku takibi.

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 50'lik alkol	2 saat
2	% 70'lik alkol	2 saat
3	% 90'lik alkol	2 saat
4	% 96'lik alkol-I	2 saat
5	% 96'lik alkol-II	Gece boyu
6	Ksilen I	1,5 saat
7	Ksilen- II	1,5 saat
8	Parafin-I	1,5 saat
9	Parafin-II	1,5 saat
10	Parafin-III	1 saat
11	Gömme	

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler, genel morfolojik değerlendirme ve kantitatif analiz yapabilmek için Hematoksilin-Eosin (H&E) boyaması ve bazal membranı değerlendirebilmek için Periyodik Asit-Schiff +Hematoksilen (PAS +H) boyaması ile boyandı.

3.6.1. Hematoksilen-Eozin ve Histolojik Skorlama

H&E boyama için alınan kesitler 1 gece boyunca 60°C'lik etüvde bekletildi ve ksilen ile deparafinize edildi (tablo 3).

Tablo 3. H&E boyaması.

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 96'lık alkol	3 dk
2	% 90'lık alkol	3 dk
3	% 70'lık alkol	3 dk
4	Çeşme suyu	3 dk
5	Harris'in Hematoksileni	10 dk
6	Çeşme suyu	Suyun rengi şeffaf olana kadar
7	Asit alkol	1 dip
8	Çeşme suyu	3 dk
9	Amonyaklı su	1 dip
10	Çeşme suyu	3 dk
11	Eozin	2 dk
12	Çeşme suyu	Suyun rengi şeffaf olana kadar
13	% 70'lık alkol	7 dips
14	% 90'lık alkol	7 dips
15	% 96'lık alkol	7 dips
16	Ksilen-I ve Ksilen-II	20 dk
18	Lamların kapatılması	

H&E ile boyalı kesitlerde 40x büyütmede, rastgele seçilen 10 seminifer tübülde Erdemir ve ark. (2012) tarafından değiştirilmiş, modifiye Johnsen skorlama sistemi ile değerlendirildi (Erdemir ve ark., 2012) (tablo 4).

Tablo 4. Modifiye Johnsen Skorlaması.

Skor	Modifiye Johnsen Skorlaması
10	Tam spermatogenez ve tam tübül
9	Seminifer epitel mevcut ama dağınık, birçok geç spermatid
8	Sadece birkaç geç spermatid
7	Hiç geç spermatid yok ancak birçok erken spermatid
6	Birkaç erken spermatid, spermatogenezin spermatid aşamasında durması
5	Hiç spermatid yok, birçok spermatositler
4	Birkaç spermatosit, spermatogenezin primer spermatosit aşamasında durması
3	Sadece spermatogonyum
2	Hiç germ hücresi yok, yalnızca sertoli hücreleri
1	Hiç germ hücresi veya Sertoli hücresi yok

3.6.2. Periyodik Asit-Schiff + Hematoksilen (PAS+H)

Kesitlerin boyanmasında kullanılacak boya solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı (Demir, 2001; Suvarna ve ark., 2013);

Solüsyon A- Periyodik asit 1 gr

Saf su 200 ml

Solüsyon B- Schiff çözeltisi;

Bazik fuksin 1 gr

Saf su 200 ml

Potasyum metabisülfid 2 gr

Hidroklorik asit 2 ml

Aktif kömür 2 gr

Periyodik asit saf suda çözüldü. Schiff çözeltisi boyama yapılmadan bir gün önce hazırlandı. Saf suya bazik fuksin eklenerek kaynatıldı ve 50°C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra 2 gr potasyum metabisülfid eklenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığına geldiğinde 2 ml hidroklorik asit eklenerek karıştırıldı ve 2 gr aktif kömür

eklenip yeniden karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortamda ve oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Çözelti kullanılmadan önce süzüldü. PAS+H boyama yöntemi basamakları ve süreleri tablo 5’de verildi.

Tablo 5. PAS+H boyama yöntemi basamakları ve süreleri.

Kimyasal madde	Uygulama süresi (dk)
Ksilol I	20 dk
Ksilol II	20 dk
%96 Alkol	3 dk
%90 Alkol	3 dk
%70 Alkol	3 dk
Distile Su	5 dk
Periyodik asit	5 dk
Distile Su	2 dk
Schiff çözeltisi	15 dk
Çeşme suyu	2 dk
Mayer’in Hematoksilin	1,5 dk
Çeşme suyu	2 dk
%70 Alkol	2 dk
%90 Alkol	2 dk
%96 Alkol	2 dk
Ksilen I	20 dk
Ksilen II	20 dk
Lamların kapatılması	

H&E ve PAS+H ile boyanan kesitlerin histolojik değerlendirmesi için Olympus BX–FLA Reflected Light Fluorescence Attachment adapte edilmiş Olympus BX50 mikroskopta 40X objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP71 CCD renkli kamera, 1,5 million pixel) ile bilgisayar ekranına alınan görüntüler üzerinde gerçekleştirildi. Tüm preparatlar bu mikroskopta incelenerek her gruptan fotoğraf çekildi.

3.6.3. TUNEL Yöntemi

Apoptoz tayini için in situ DNA kırık uç işaretleme yöntemi kullanıldı ve kit içerisinde önerilen aşağıdaki işlem sırasıyla uygulandı (Roche, In Situ Apoptosis Detection Peroksidase kit, POD, Ref: 11684817910, USA). TUNEL yöntemi basamakları ve süreleri tablo 6’da verildi.

Tablo 6. TUNEL yöntemi basamakları ve süreleri.

Sıra	İşlem	Süresi
1	Deparafinizasyon / Redihrasyon	
2	Distile su	5 dk
3	PBS (fosfat buffer saline tampon) (pH: 7.4)	2×5 dk
4	1:16 oranında H ₂ O ₂ :metanol(%100'lik) karışımı	10 dk
5	PBS	2×5 dakika
6	Triton X-100 uygulaması	10 dk, -20°C'de
7	PBS	6×5 dakika
8	1:1 oranında Enzim: Label uygulaması	1 saat, 37°C'de
9	Pod solüsyonu	30 dk, 37°C'de
10	PBS	2×5 dakika
11	DAB (diaminobenzidine) substrat solüsyonu	10 dakika
12	PBS	2×5 dakika
13	Zıt boya olarak Harris' hematoksilen	1 dip
14	Çeşme suyu	1 dakika
15	% 70'lik alkol	7 dips
16	% 90'lik alkol	7 dips
17	% 96'lik alkol	7 dips
18	Ksilen I	20 dakika
19	Ksilen II	20 dakika
20	Lamların kapatılması	

Negatif kontrol için kullanılan kesitin üzerine yalnızca label damlatıldı.

Apoptotik indeks (AI), her kesitte 10 adet yuvarlak şekilli seminifer tübül rastgele seçilerek değerlendirildi. Seminifer tübüldeki TUNEL pozitif hücrelerin sayısı tübüldeki tüm hücrelerin toplam sayısına bölündü ve sonuç 100 ile çarpıldı. (AI = TUNEL pozitif hücre / toplam hücre x 100) (Odacı ve ark., 2016)

3.6.4. Kaspaz-3 İmmünohistokimyası

Elde edilen parafin bloklardan 5 µm kalınlığındaki kesitler poly-Llysne ile kaplı lamlar üzerine alındıktan sonra lamlar immünohistokimyasal olarak boyandı. İmmünohistokimyasal boyama Avidin biyotin- peroksidaz yöntemi (ABC Metodu) ile gerçekleştirildi. Primer antikor olarak kaspaz-3 monoklonal immünglobulin G (IgG) (Cellsignaling, Cleaved Caspase-3 (Asp175)(5A1E) Rabbit mAb) kullanıldı. Kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama basamakları ve süreleri tablo 7'de verildi.

Negatif kontrol kesitlerinede primer antikor yerine normal bloklayıcı serum kullanıldı.

Kaspaz-3 boyaması, TUNEL boyamasında gösterilen apoptotik hücrelerin varlığını doğrulamak amacıyla yapıldığından kaspaz-3 boyanan hücrelerin değerlendirilmesi de TUNEL pozitif hücrelerin değerlendirilmesine benzer hesaplama ile gerçekleştirildi.

Kaspaz-3 hesaplaması, her kesitte 10 adet tam yuvarlak şekilli seminifer tübül rastgele seçilerek değerlendirildi. Seminifer tübüldeki kaspaz-3 pozitif hücrelerin sayısı tübüldeki tüm hücrelerin toplam sayısına bölündü ve sonuç 100 ile çarpıldı. (Kaspaz-3 hesaplaması = kaspaz-3 pozitif hücre / toplam hücre x 100)

Tablo 7. Kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama yöntemi basamakları ve süreleri.

Sıra	İşlem	Süresi
1	Deparafinizasyon / Rehidrasyon	
2	Distile su	5 dakika
3	TRIS tamponu (pH: 7.4)	2×5 dakika
4	Antijen retrieval (sodyum-sitrat tamponu)	20 dakika 100°C' de
5	TRIS tamponu	2×5 dakika
6	1:9 oranında H ₂ O ₂ :metanol(%50'lik) karışımı	20 dakika
7	TRIS tamponu	2×5 dakika
8	Blokkıng (horseradish peroksidaz)	2 saat
9	Primer antikor (Caspase-3 Ab, 1/200 dilüsyon)	2 gece
10	TRIS tamponu	2×5 dakika
11	Sekonder antikor (Donkey anti-rabbit, 1/100 dilüsyon)	2 saat
12	TRIS tamponu	2×5 dakika
13	ABC kromojen	30 dakika
14	TRIS tamponu	2×5 dakika
15	DAB (diaminobenzidine) substrat solüsyonu	45 dakika
16	TRIS tamponu	2×5 dakika
17	Zıt boya olarak Harris' hematoksilen	1 dip
18	Çeşme suyu	1 dakika
19	% 70'lik alkol	7 dips
20	% 90'lık alkol	7 dips
21	% 96'lık alkol	7 dips
22	Ksilen	2×20 dakika
24	Lamların kapatılması	

3.7. İstatiksel Analiz

Sayısal verilerin istatistiksel analizi SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 13.1, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) (SPSS) programı kullanılarak yapıldı. Her bir gruba ait sayısal veriler ortalama \pm standart sapma (SS) olarak verilerek Kruskal Wallis varyans analizi (ikili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi) ile karşılaştırıldı ve karşılaştırmalarda $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışma kapsamında tüm deney hayvanlarında vücut ağırlığı farkı, testis ağırlıkları, ışık mikroskopik olarak H&E, PAS+H ve immünohistokimyasal TUNEL ve kaspaz-3 boyamalar gerçekleştirilerek aşağıdaki bulgular elde edildi.

4.1.Vücut Ağırlığı Farkı

Tüm deney gruplarının deney öncesi vücut ağırlıkları ile deney sonrası vücut ağırlıkları tartıldı ve farkları hesaplandı. Vücut ağırlığı farkları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplara arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Tüm gruplarda deneklerin ağırlık kaybettiği görüldü. Gruplara göre vücut ağırlığı farkları ortalama (ort) ve standart sapma (SS) değerleri tablo 8’de verildi.

Tablo 8. Gruplara göre vücut ağırlıkları farkı ortalama ve standart sapma değerleri.

Gruplar	Ort±SS
A (kontrol)	24,3333±5,07718
B1 (CdCl ₂)	21,2857±6,66803
B2 (RES+CdCl ₂)	30,1429±7,51008
B3 (DDS+CdCl ₂)	39,2857±4,16170
B4 (RES+DDS+CdCl ₂)	20,2857±5,79702

4.2. Testis Ağırlık İndeksi

Gruplara göre TAI indekslerine ait ortalama ve standart sapma değerleri tablo 9’ da verildi. TAI değerlerinin istatistiksel karşılaştırmalarında (Kruskal Wallis testine göre) gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı.

Tablo 9. Gruplara göre TAI ortalama ve standart sapma değerleri.

Gruplar	Ort±SS
A (kontrol)	1,1133±0,04490
B1 (CdCl ₂)	1,1327±0,06187
B2 (RES+CdCl ₂)	1,1678±0,05810
B3 (DDS+CdCl ₂)	1,2970±0,04389
B4 (RES+DDS+CdCl ₂)	1,3440±0,08740

4.3. Işık Mikroskopik Bulgular

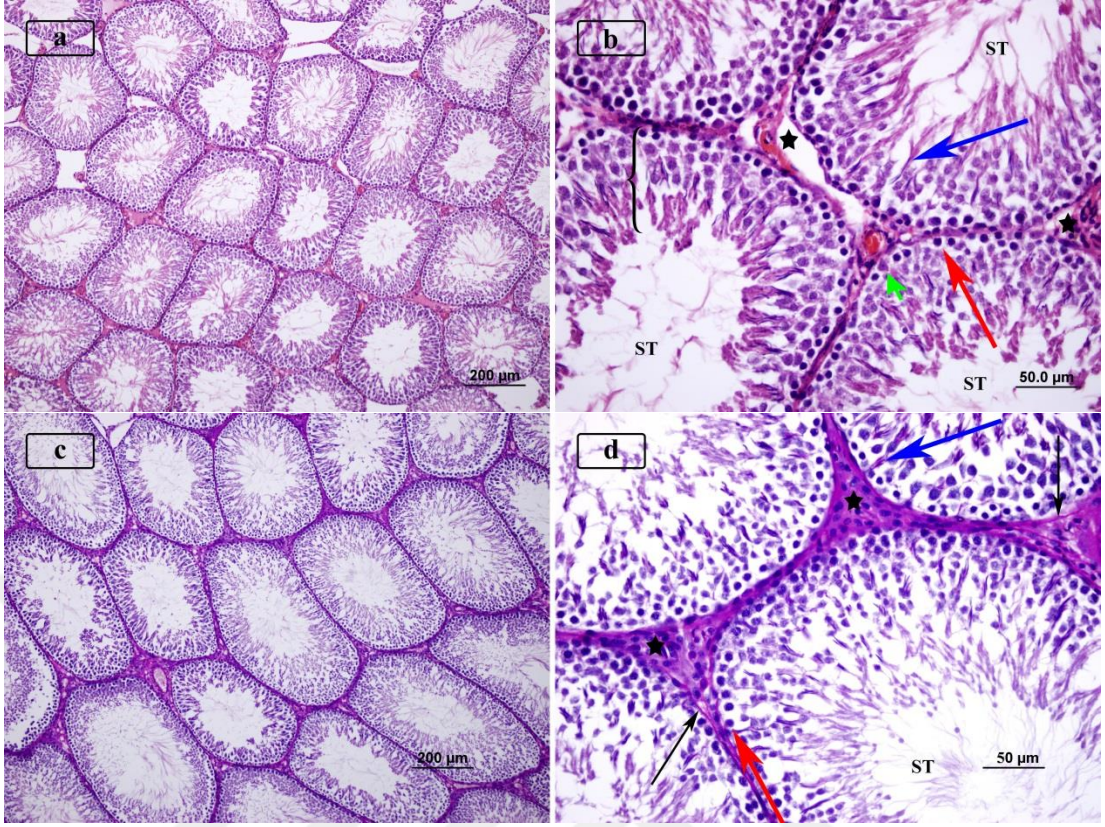
Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçan testislerinde genel görünümünü saptamak için H&E ve PAS+H ile boyanan kesitler değerlendirildi. Buna göre, A (kontrol) grubuna ait testis dokusu örneklerinde yapılan incelemelerde, seminifer tübül yapıları, bazal membran, interstisyel alan ve bu alanda bulunan Leydig hücreleri normal yapıda gözlendi (şekil 3). Tübül duvarları; bazal membran üzerine oturmuş, düzgün bir spermatogenezi, belirgin spermatogonyumları ve spermatogenetik seri hücrelerini içeriyordu (şekil 3-b ve şekil 3-d). Seminifer tübül lümeninde spermatozoonlar mevcuttu, gelişmekte olan spermatozoonlar apikal sitoplazmaya gömülü şekilde kuyruk lümeninde, baş tübül duvarına yönelik ve Sertoli hücrelerinin arasına lokalize durumdaydı (şekil 3-b ve şekil 3-d). İnterstisyel alandaki damarlar normal görünümdeydi ve damarlar çevresinde Leydig hücreleri normal görünümlü oldukça çok ve belirgindi (şekil 3-b ve şekil 3-d).

B1 (CdCl₂) grubuna ait testis dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde ise dejenerasyon oldukça belirgindi (şekil 4-a ve şekil 4-c). Bu grupta testis dokusunda seminifer tübüllerde düzensizlik ile vakuolizasyon vardı ve spermatogenik hücre katmanında azalma olduğu dikkati çekti (şekil 4-a, şekil 4-b ve şekil 4-d). Pek çok tübülde de hücreler arası ve hücre bazal membran arası bağlantı komplekslerinin dejenerasyonuna bağlı olarak spermatogenik hücre serilerinin tübül duvarından ayrıldığı ve lümeneye döküldüğü görüldü (şekil 4-b, şekil 4-c ve şekil 4-d). Tübül duvarında spermatogenezin hiç bir evresi ayırt edilemiyordu. Ayrıca interstisyel ödeme bağlı olarak birbirlerinden uzaklaşmış seminifer tübüller, bağ dokusunda azalma ve damarlarda konjesyon gözlendi (şekil 4).

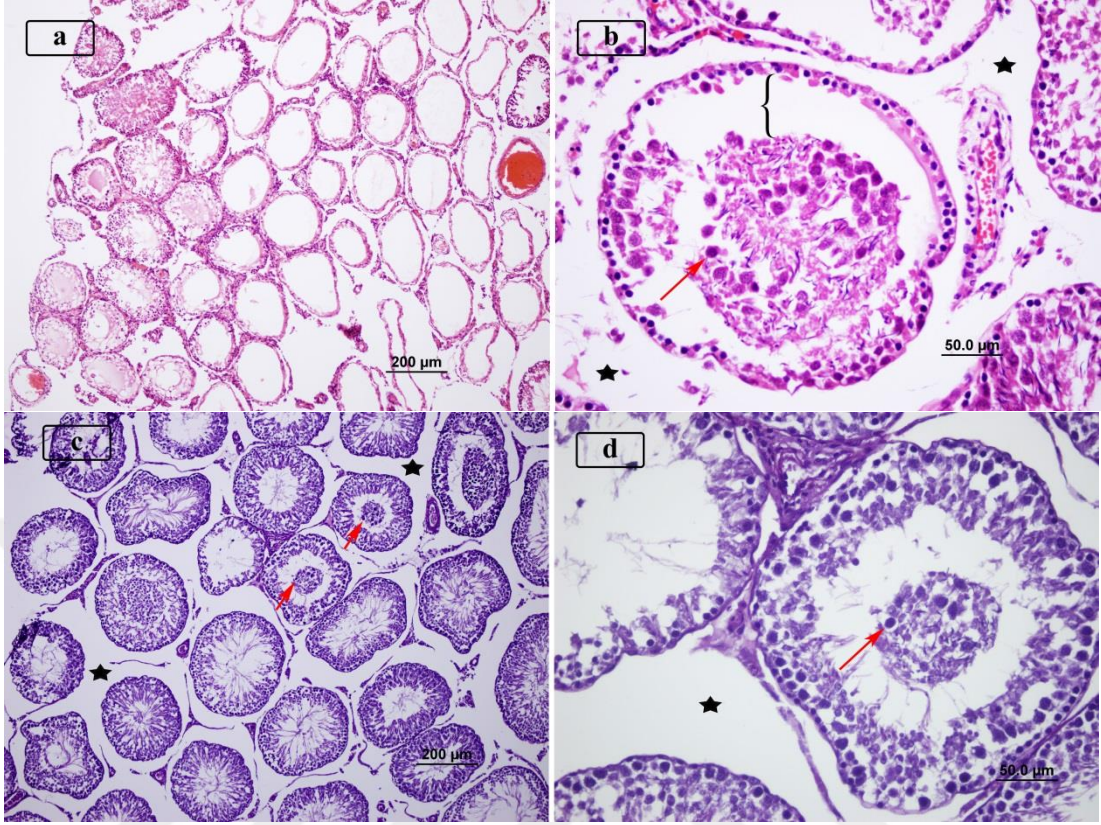
B2 (RES+CdCl₂) grubuna ait testis dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde elde edilen bulgular sadece kadmiyum uygulanan gruba eşdeşti. İntersitisyel alanda yoğun ödem ve inflamasyon vardı (şekil 5). Kan damarlarında konjesyon ve dağılmalar görüldü (şekil 5-a, şekil 5-c ve şekil 5-d). Ayrıca intersitisyel alanda Leydig hücreleri seçilemiyordu (şekil 5-b ve şekil 5-d). Seminifer tübüllerde ödem vardı ve bazı tübüller de atrofikti (şekil 5-a ve şekil 5-b). Germ hücre serisinin dağınık olduğu, bazal membrandan ayrıldığı ve lümene döküldüğü görüldü (şekil 5-d).

B3 (DDS+CdCl₂) grubuna ait testis dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde, seminifer tübül duvarlarında hafif vakuolizasyon görülmekteydi fakat lümene dökülmüş germ hücreleri yoktu (şekil 6). Ayrıca düzgün bir spermatogenez, belirgin spermatogonyumlar ve diğer spermatogenetik seri hücreleri seçilebiliyordu. İntersitisyel alanda Leydig hücreleri belirgin ve kan damarları normal durumdaydı (şekil 6-d).

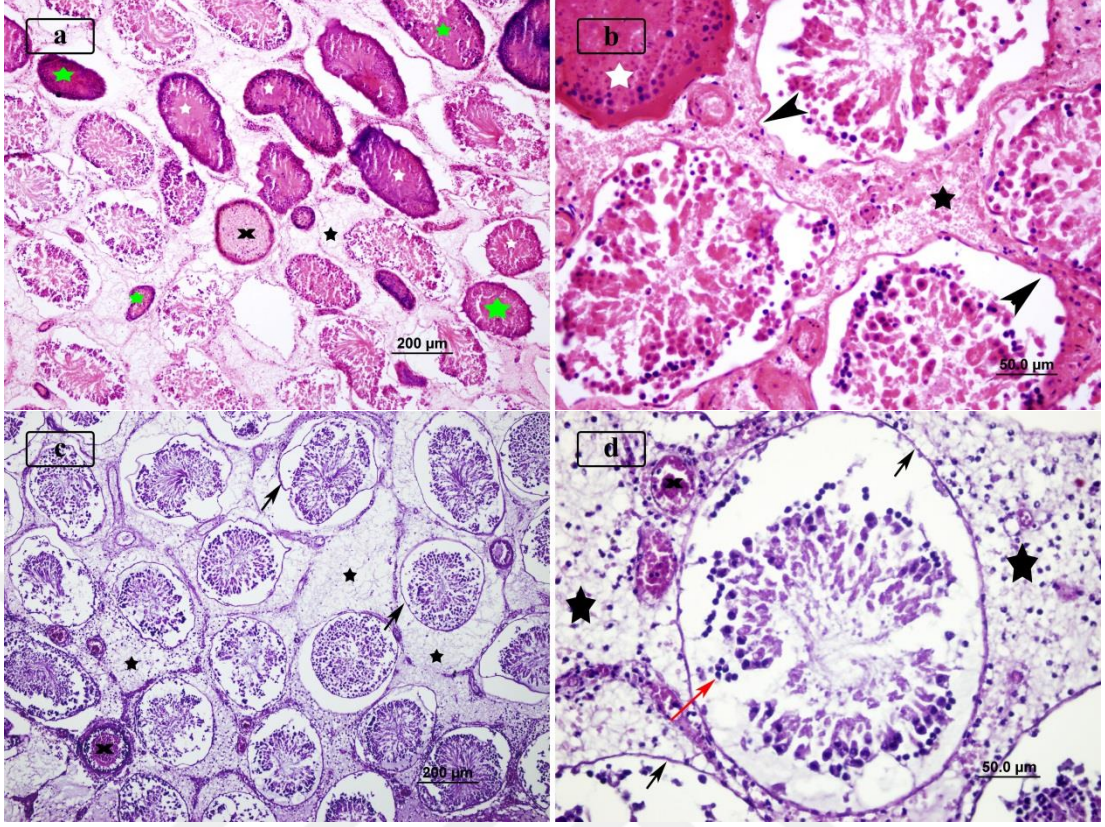
B4 (RES+DDS+CdCl₂) grubu testis doku örnekleri ışık mikroskopik incelemelerinde, gerek bazal membran ve gerekse seminifer tübül yapıları kontrol grubu ile eşdeşti (şekil 7-a ve şekil 7-c). Düzgün seminifer tübül yapısı, interstisyel alanda belirgin Leydig hücreleri ve normal kan damarları gözlemlendi. Spermatogenezin normal olduğu ve spermatozoa üretiminin de devam ettiği görüldü (şekil 7).



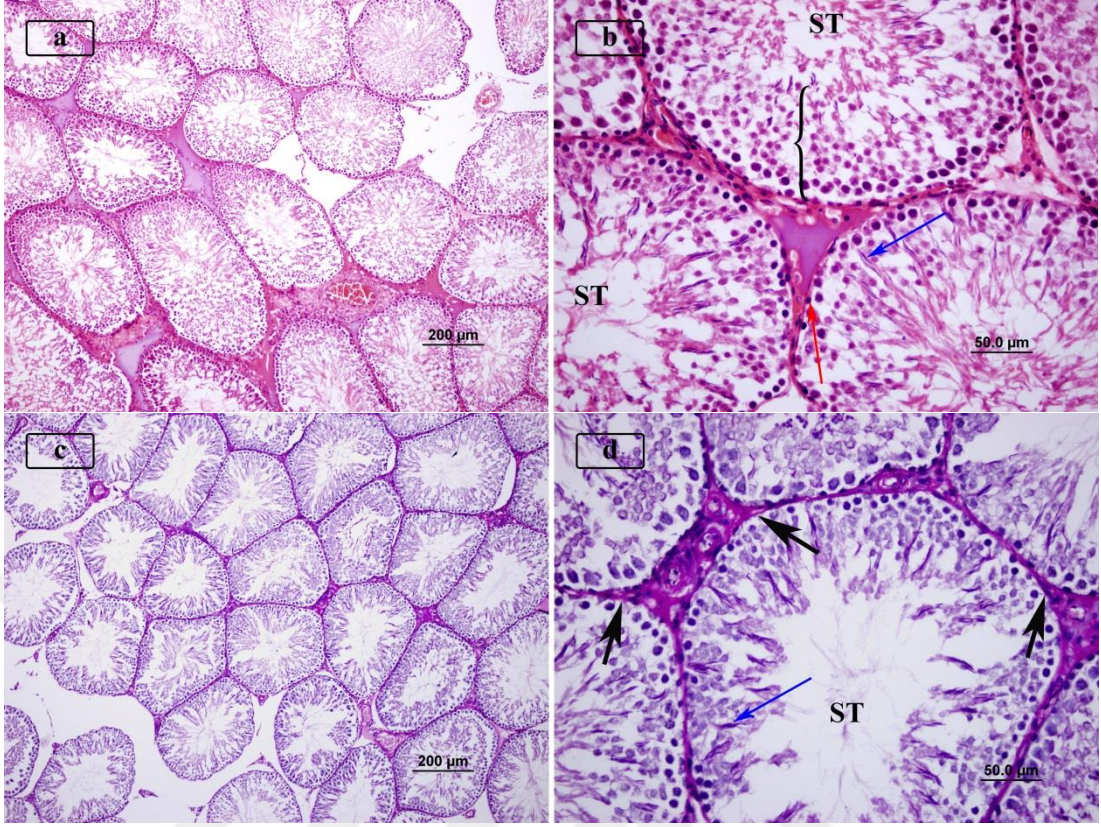
Şekil 3. A (Kontrol) grubu testis dokusunun histolojik görünümü: Seminifer tübüller (ST) ve interstisyel alan (siyah yıldızlar) normal görünümde; germ hücre serisi (siyah parantez), Sertoli hücreleri (yeşil ok), spermatogonyumlar (kırmızı ok) ve gelişmekte olan spermatozoonlar (mavi ok). Bazal membran (siyah ok) tam, intakt ve germ hücre serisi üzerine oturmuş durumda görüldü (a'da 10x, b'de 40x büyütme ve H&E boyama, c'de 10x, d'de 40x büyütme ve PAS+H boyama).



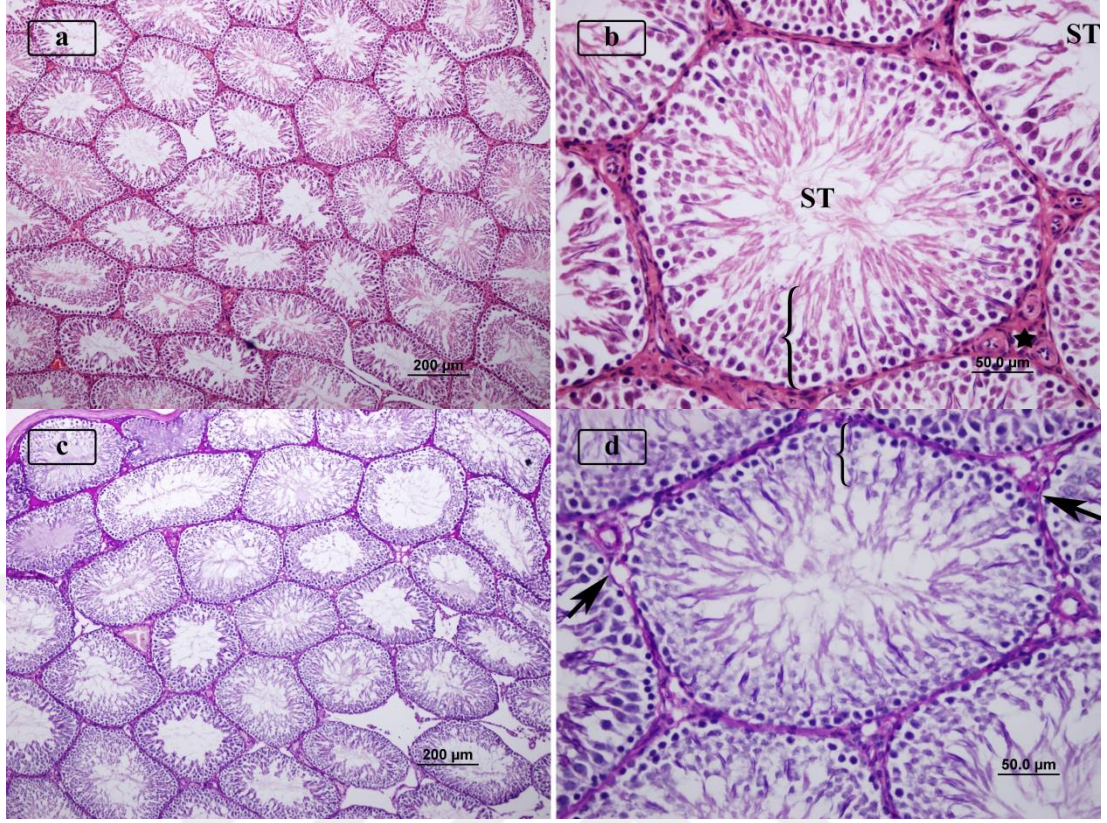
Şekil 4. B1 (CdCl₂) grubu testis dokusunun histolojik görünümü: Seminifer tübüllerde spermatogenik hücre katmanında azalma (a paneli), spermatik seride ayrılmalar (siyah parantez) ve tübül lümenine dökülen germ hücreleri (kırmızı ok) ile intersitisyel alanda açılmalar (siyah yıldız) ve kan damarlarında konjesyon (a paneli) görüldü (a'da 10x, b'de 40x büyütme ve H&E boyama, c'de 10x, d'de 40x büyütme ve PAS+H boyama).



Şekil 5. B2 (RES+CdCl₂) grubu testis dokusunun histolojik görünümü: İntersitisyel alanda yoğun ödem ve inflamasyon (siyah yıldız), kan damarlarında konjesyon (siyah X), seminifer tübüllerde ödem (beyaz yıldız) ve atrofik tübüller (yeşil ok), bazal membrandan (siyah ok) ayrılan ve lümeneye dökülen germ hücreleri (kırmızı ok) görüldü (a'da 10x, b'de 40x büyütme ve H&E boyama, c'de 10x, d'de 40x büyütme ve PAS+H boyama).



Şekil 6. B3 (DDS+CdCl₂) grubu testis dokusunun histolojik görünümü: Seminifer tübüllerde (ST) düzgün bir spermatogenez (siyah parantez), belirgin spermatogonyumlar (kırmızı ok), gelişmekte olan spermatozonlar (mavi ok). Bazal membran (siyah ok) tam, intakt ve germ hücre serisi üzerine oturmuş durumda görüldü (a'da 10x, b'de 40x büyütme ve H&E boyama, c'de 10x, d'de 40x büyütme ve PAS+H boyama).

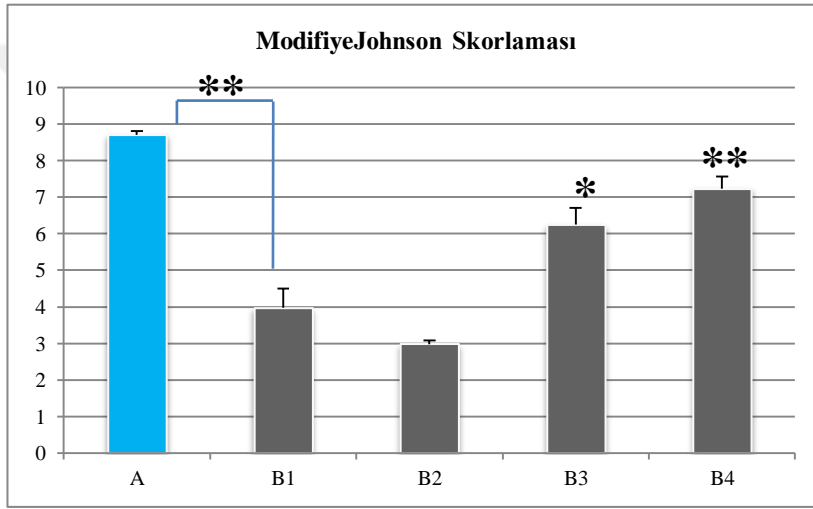


Şekil 7. B4 (RES+DDS+CdCl₂) grubu testis dokusunun histolojik görünümü: Seminifer tübüller (ST) ve interstisyel alan (siyah yıldızlar) normal görünümde; germ hücre serisi (siyah parantez), bazal membran (siyah ok) tam, intakt ve germ hücre serisi üzerine oturmuş durumda görüldü (a'da 10x, b'de 40x büyütme ve H&E boyama, c'de 10x, d'de 40x büyütme ve PAS+H boyama).

Seminifer tübüllerde ki spermatogenez modifiye Johnsen skoruna (Erdemir ve ark., 2012) göre değerlendirildi. Modifiye Johnsen skorlamasına göre gruplara ait ortalama ve standart sapma değerleri tablo 10 ve grafik 1'de verildi. Modifiye Johnson skorlamasının istatistiksel karşılaştırmalarında (Kruskal Wallis testine göre) gruplar arasında anlamlı fark saptandı ve ikili grupların karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. Kontrol grubuyla B1 (CdCl₂) karşılaştırıldığında modifiye Johnson skorunun anlamlı ölçüde azaldığı görüldü (p=0,001). B1 grubuyla B2 (RES+CdCl₂), B3 (DDS+CdCl₂) ve B4 (RES+DDS+CdCl₂) grupları karşılaştırıldı ve B2 (RES+CdCl₂) grubunda anlamlı bir değişim görülmezken (p=0,073), B3 (DDS+CdCl₂) ve B4 (RES+DDS+CdCl₂) gruplarında anlamlı artış görüldü (sırasıyla, p=0,011 ve p=0,001).

Tablo 10. Gruplara göre modifiye Johnson skorlaması ortalama ve standart sapma değerleri.

Gruplar	Ort±SS
A (kontrol)	8,7±0,11255
B1 (CdCl ₂)	3,97±0,52767
B2 (RES+CdCl ₂)	2,9857±0,10335
B3 (DDS+CdCl ₂)	6,24±0,46744
B4 (RES+DDS+CdCl ₂)	7,22±0,33432



Grafik 1. Modifiye Johnson skorlaması grafiksel gösterimi. A (kontrol), B1 (CdCl₂), B2 (RES+CdCl₂), B3 (DDS+CdCl₂), B4 (RES+DDS+CdCl₂).

Tablo 11. Gruplar arası modifiye Johnson skorlamasının istatistiksel değerlendirmesi. A (kontrol), B1 (CdCl₂), B2 (RES+CdCl₂), B3 (DDS+CdCl₂), B4 (RES+DDS+CdCl₂).

Gruplar	Anlamlılık değerleri
A/B1	p=0,001 **
B1/B2	p=0,073
B1/B3	p=0,011 *
B1/B4	p=0,001 **

4.3.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

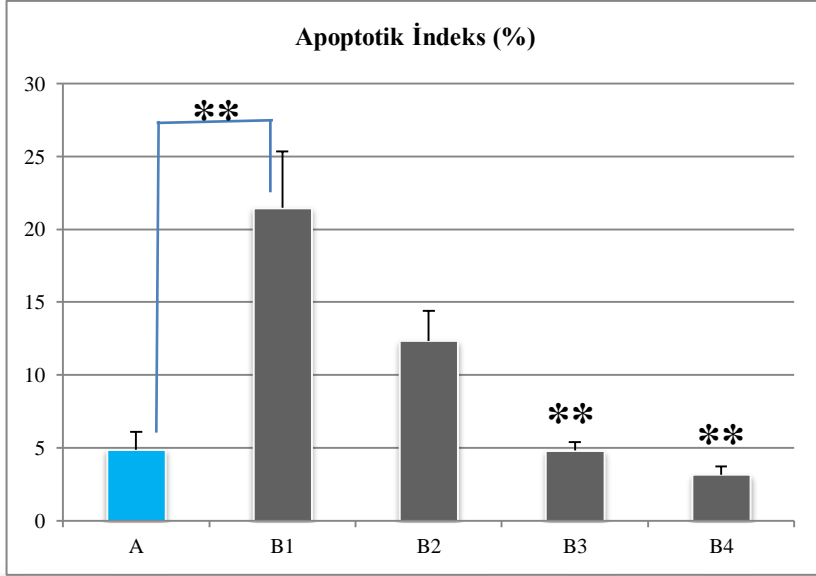
Çalışmamızda, apoptozun varlığını ortaya koymak için her gruba ait testis doku kesitlerinde yapılan TUNEL boyaması ve TUNEL boyamasında gösterilen apoptotik hücrelerin varlığını doğrulamak amacıyla yapılan kaspaz-3 immünohistokimyası değerlendirildi.

4.3.1.1. TUNEL Bulguları

Gruplara göre TUNEL tekniği ile değerlendirilen AI'e ait ortalama ve standart sapma değerleri tablo 12 ve grafik 2'de verildi ve istatistiksel karşılaştırmalarda (Kruskal Wallis testine göre) gruplar arasında anlamlı farklılık saptandı. İkili grupların karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı ve tablo 12'de verildi. Kontrol grubuyla B1 karşılaştırıldığında AI'nın anlamlı ölçüde arttığı görüldü ($p=0,001$). B1 (CdCl_2) grubuyla B2 ($\text{RES}+\text{CdCl}_2$), B3 ($\text{DDS}+\text{CdCl}_2$) ve B4 ($\text{RES}+\text{DDS}+\text{CdCl}_2$) grupları karşılaştırdı ve B2 ($\text{RES}+\text{CdCl}_2$) grubunda anlamlı bir değişim görülmezken ($p=0,106$), B3 ve B4 gruplarında anlamlı azalma görüldü (sırasıyla, $p=0,001$ ve $p=0,001$). Kontrol grubuna ait testis dokularında apoptoz özellikle spermatogonyumlarda, B1 (CdCl_2) ve B2 ($\text{RES}+\text{CdCl}_2$) grubu testis dokularında ise çoğu spermatogonyum, spermatid ve Leydig hücrelerinde gözlemlendi. B3 ($\text{DDS}+\text{CdCl}_2$) ve B4 ($\text{RES}+\text{DDS}+\text{CdCl}_2$) gruplarında apoptoz kontrol grubuna benzerdi (şekil 8, şekil 9, şekil 10, şekil 11, şekil 12).

Tablo12. Gruplara göre AI ortalama ve standart sapma değerleri.

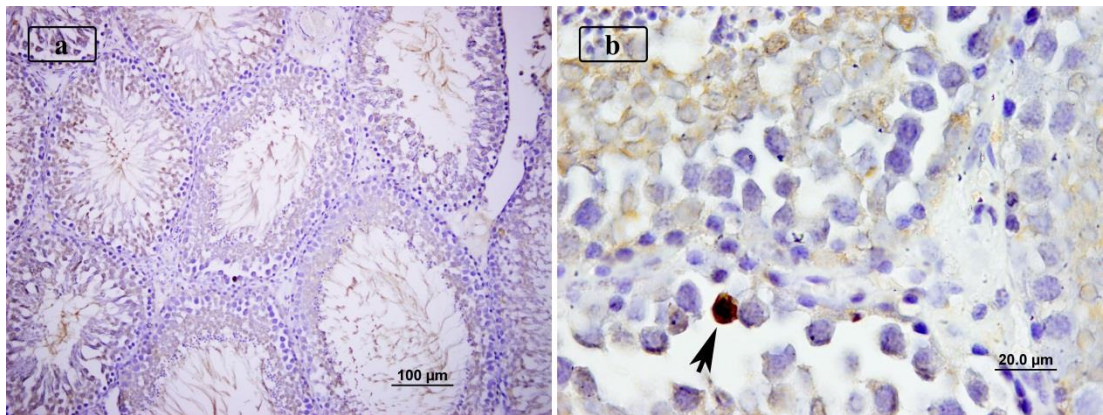
Gruplar	Ort±SS
A (kontrol)	4,8850±1,21093
B1 (CdCl_2)	21,4541±3,90295
B2 ($\text{RES}+\text{CdCl}_2$)	12,3572±2,05276
B3 ($\text{DDS}+\text{CdCl}_2$)	4,8257±0,59331
B4 ($\text{RES}+\text{DDS}+\text{CdCl}_2$)	3,1681±0,55538



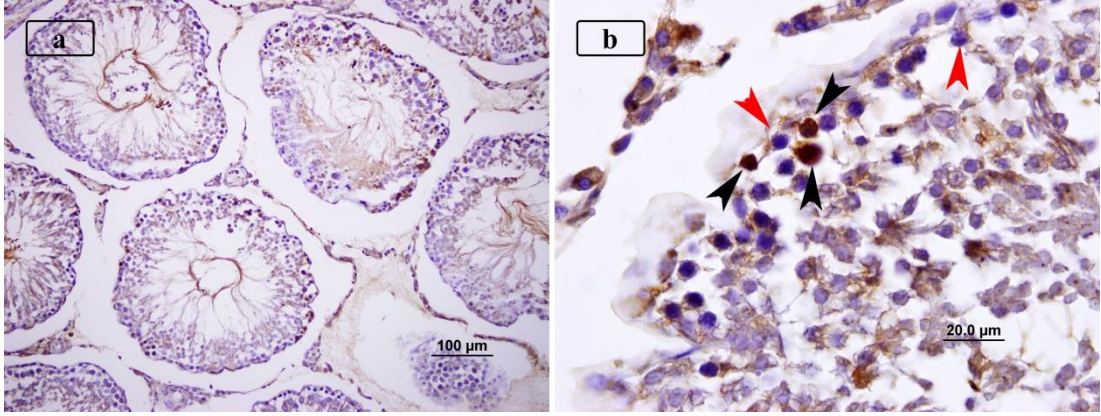
Grafik 2. Apoptotik indeksin grafiksel gösterimi. A (kontrol), B1 (CdCl₂), B2 (RES+CdCl₂), B3 (DDS+CdCl₂), B4 (RES+DDS+CdCl₂).

Tablo 13. Gruplar arası AI'nın istatistiksel değerlendirilmesi. A (kontrol), B1 (CdCl₂), B2 (RES+CdCl₂), B3 (DDS+CdCl₂), B4 (RES+DDS+CdCl₂).

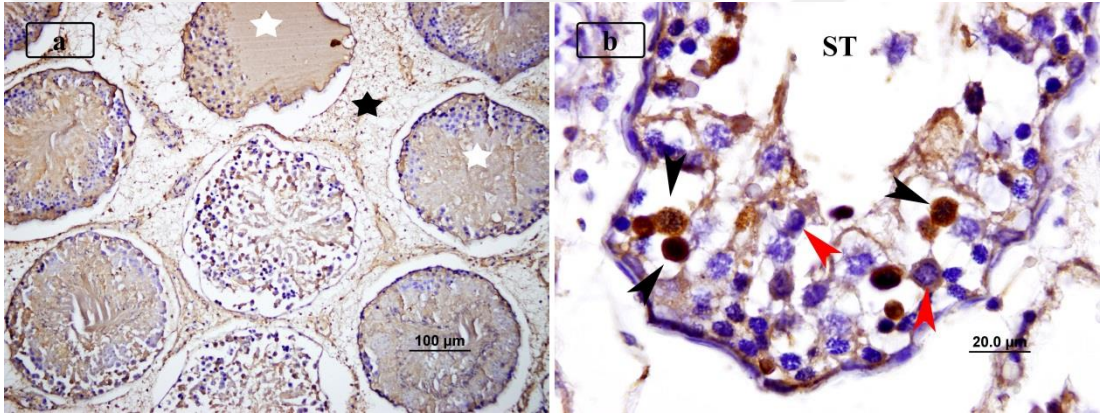
Gruplar	Anlamlılık değerleri
A/B1	p=0,001 **
B1/B2	p=0,106
B1/B3	p=0,001 **
B1/B4	p=0,001 **



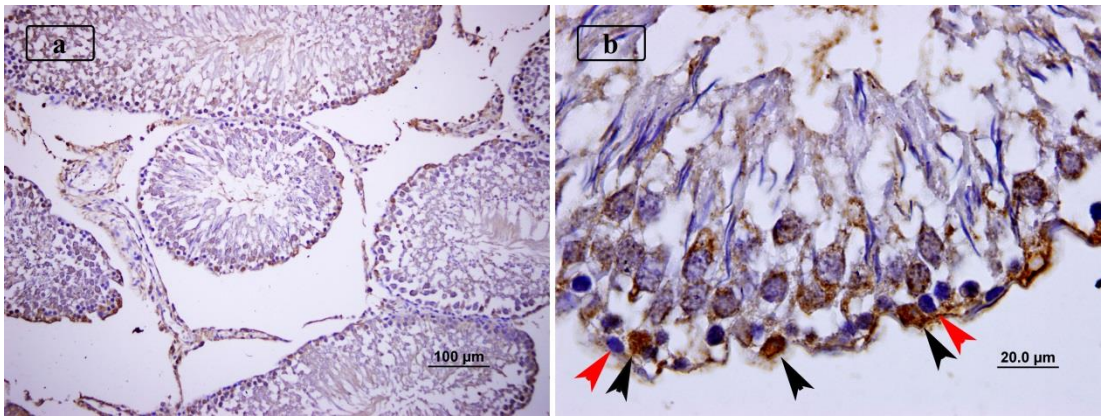
Şekil 8. A (Kontrol) grubu testis dokusu TUNEL boyama: TUNEL pozitif hücre (siyah ok), (a'da 20x, b'de 100x büyütme ve TUNEL boyama)



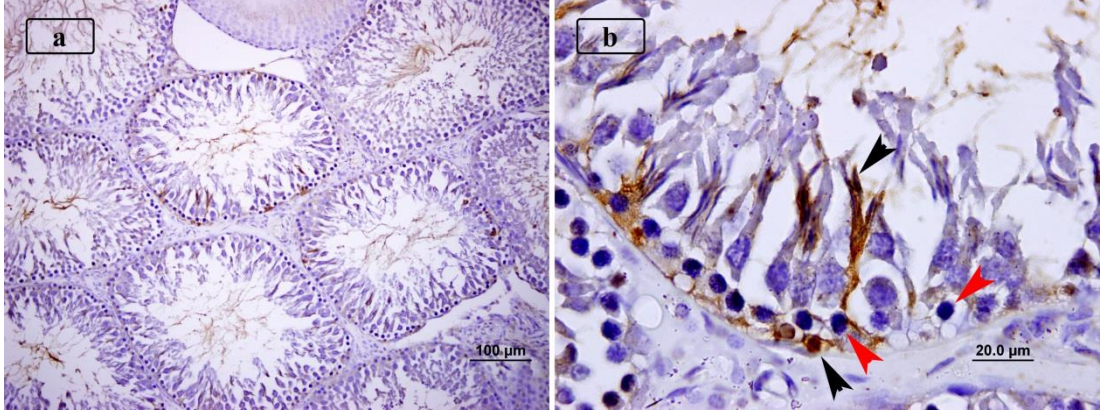
Şekil 9. B1 (CdCl_2) grubu testis dokusu TUNEL boyama: TUNEL pozitif hücreler (siyah ok), TUNEL negatif hücreler (kırmızı ok), (a'da 20x, b'de 100x büyütme ve TUNEL boyama).



Şekil 10. B2 ($\text{RES}+\text{CdCl}_2$) grubu testis dokusu TUNEL boyama: TUNEL pozitif hücreler (siyah ok), TUNEL negatif hücreler (kırmızı ok), intersitisyel alanda yoğun ödem ve inflamasyon (siyah yıldız), atrofik tübül (beyaz yıldız), (a'da 20x, b'de 100x büyütme ve TUNEL boyama).



Şekil 11. B3 ($\text{DDS}+\text{CdCl}_2$) grubu testis dokusu TUNEL boyama: TUNEL pozitif hücreler (siyah ok), TUNEL negatif hücreler (kırmızı ok), (a'da 20x, b'de 100x büyütme ve TUNEL boyama).



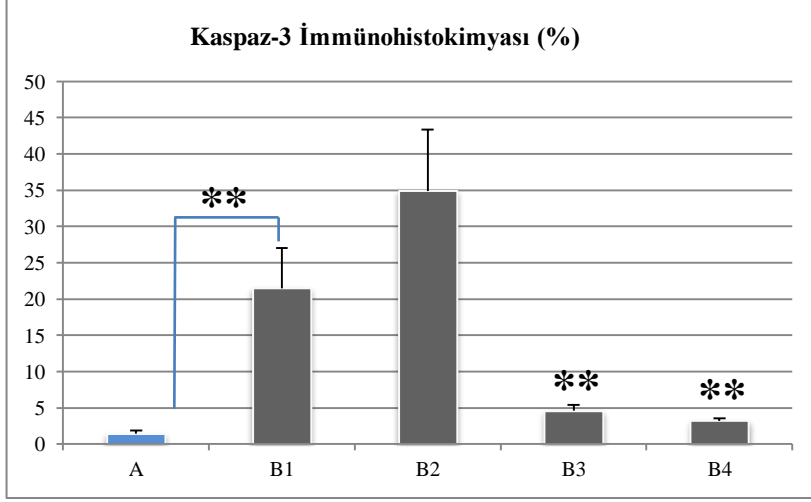
Şekil 12. B4 (RES+DDS+CdCl₂) grubu testis dokusu TUNEL boyama: TUNEL pozitif hücreler (siyah ok), TUNEL negatif hücreler (kırmızı ok), (a'da 20x, b'de 100x büyütme ve TUNEL boyama).

4.3.2.2. Kaspaz-3 Bulguları

Kaspaz-3 immünohistokimyasal boyanma apoptotik indeks (AI) hesaplama yöntemine göre hesaplandı. Kaspaz-3 hesaplamasına ait ortalama ve standart sapma değerleri tablo 14 ve grafik 3'de verildi ve istatistiksel karşılaştırmalarda (Kruskal Wallis testine göre) gruplar arasında anlamlı fark saptandı. İkili grupların karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı ve tablo 15'de verildi. Kontrol grubuyla B1 karşılaştırıldığında kaspaz-3 hesaplamasının anlamlı ölçüde arttığı görüldü ($p=0,03$). B1 grubuyla B2, B3 ve B4 grupları karşılaştırdı ve B2 grubunda anlamlı bir değişim görülmezken ($p=0,181$), B3 ve B4 gruplarında anlamlı azalma görüldü (sırasıyla, $p=0,001$ ve $p=0,001$). Tüm gruplarda kaspaz-3 immünohistokimya bulguları ile TUNEL bulguları paralellik gösterdi (şekil 13, şekil 14, şekil 15, şekil 16, şekil 17).

Tablo14. Gruplara göre kaspaz-3 hesaplamasının ortalama ve standart sapma değerleri.

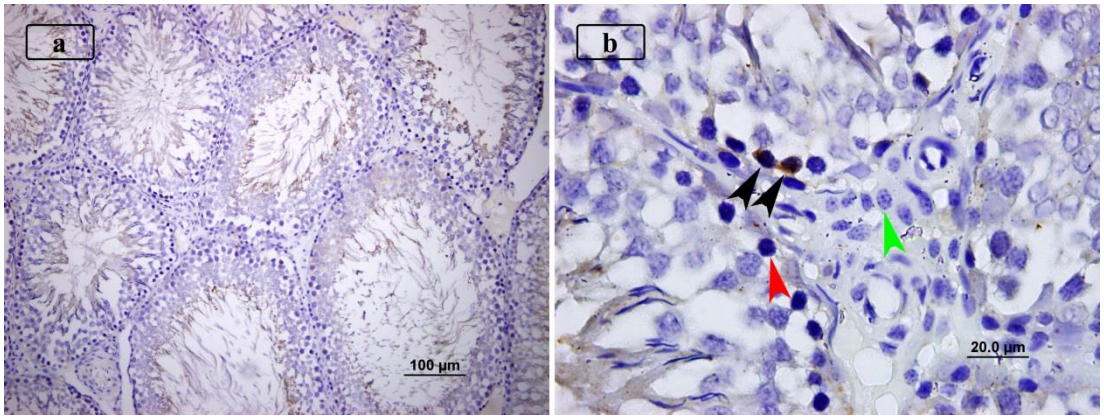
Gruplar	Ort±SS
A (kontrol)	1,4277±0,47951
B1 (CdCl ₂)	21,4916±5,51563
B2 (RES+CdCl ₂)	34,9062±8,44201
B3 (DDS+CdCl ₂)	4,6101±0,82167
B4 (RES+DDS+CdCl ₂)	3,2089±0,35998



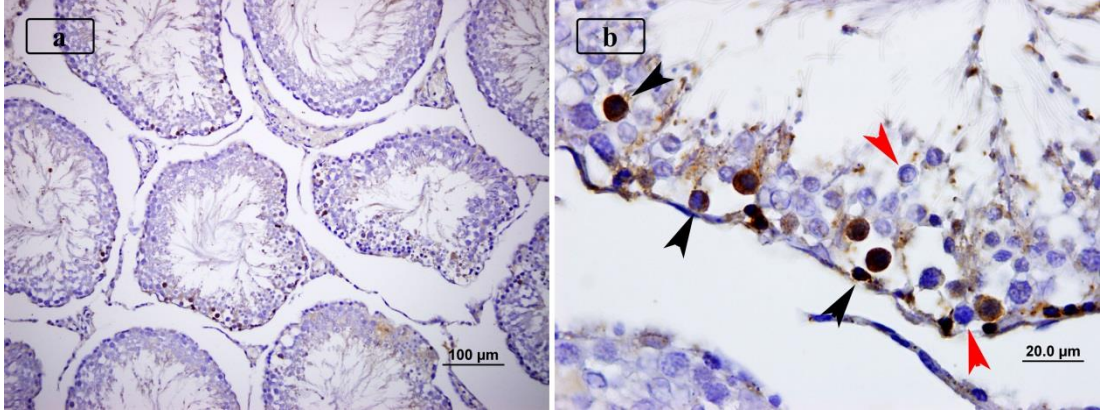
Grafik 3. Kaspaz-3 hesaplaması grafiksel gösterimi. A (kontrol), B1 (CdCl₂), B2 (RES+CdCl₂), B3 (DDS+CdCl₂), B4 (RES+DDS+CdCl₂).

Tablo 15. Gruplar arası kaspaz-3 hesaplamasının istatistiksel değerlendirmesi. A (kontrol), B1 (CdCl₂), B2 (RES+CdCl₂), B3 (DDS+CdCl₂), B4 (RES+DDS+CdCl₂).

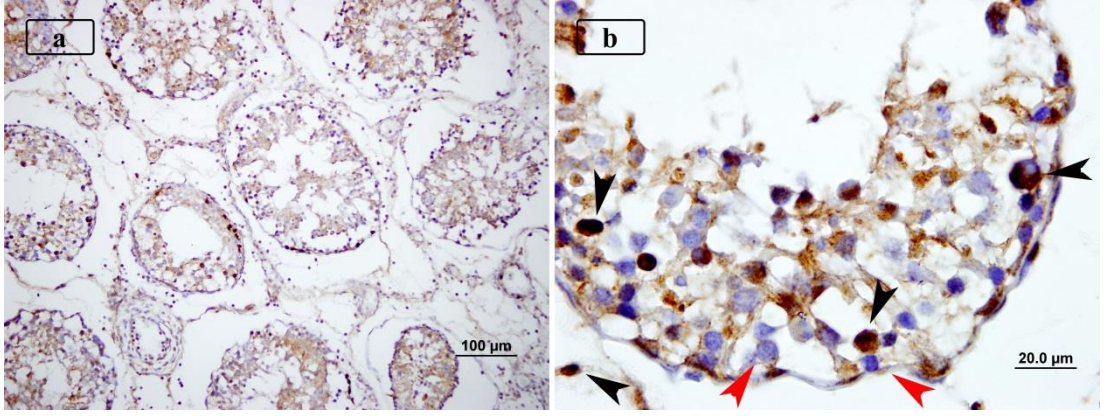
Gruplar	Anlamlılık değerleri
A/B1	p=0,003 **
B1/B2	p=0,181
B1/B3	p=0,001 **
B1/B4	p=0,001 **



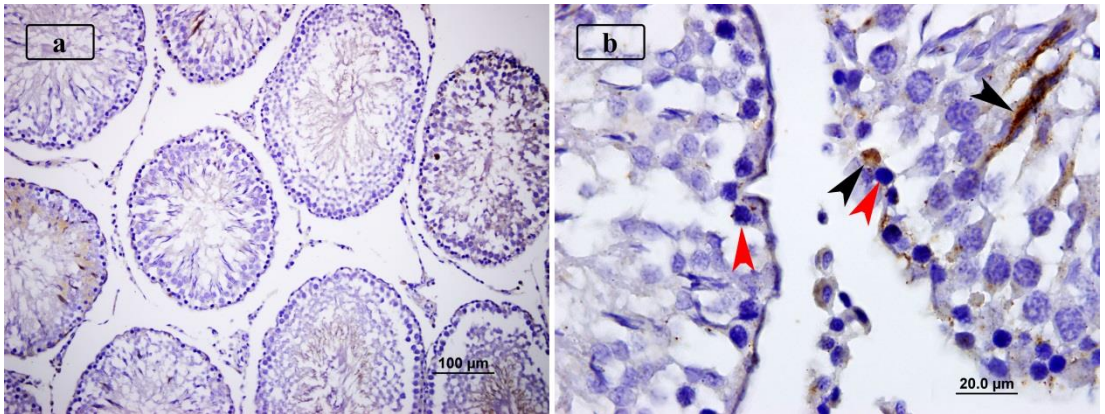
Şekil 13. A (Kontrol) grubu testis dokusu kaspaz-3 immünohistokimyası: Kaspaz-3 pozitif hücreler (siyah ok), kaspaz-3 negatif spermatogonyum (kırmızı ok), kaspaz-3 negatif Leydig hücresi (yeşil ok), (a'da 20x, b'de 100x büyütme ve kaspaz-3 immünohistokimyası).



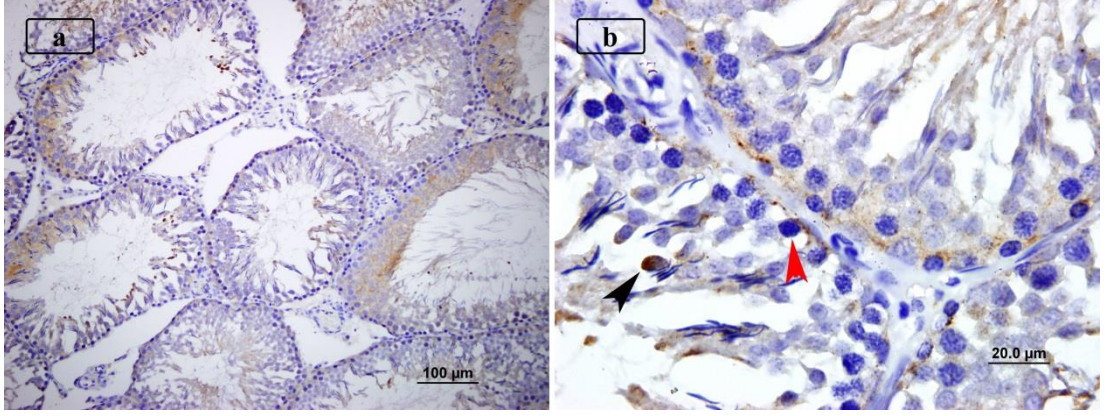
Şekil 14. B1 (CdCl_2) grubu testis dokusu kaspaz-3 immünohistokimyası: Kaspaz-3 pozitif hücreler (siyah ok), kaspaz-3 negatif hücreler (kırmızı ok), (a'da 20x, b'de 100x büyütme ve kaspaz-3 immünohistokimyası).



Şekil 15. B2 ($\text{RES}+\text{CdCl}_2$) grubu testis dokusu kaspaz-3 immünohistokimyası: Kaspaz-3 pozitif hücreler (siyah ok), kaspaz-3 negatif hücreler (kırmızı ok), (a'da 20x, b'de 100x büyütme ve kaspaz-3 immünohistokimyası).



Şekil 16. B3 ($\text{DDS}+\text{CdCl}_2$) grubu testis dokusu kaspaz-3 immünohistokimyası: Kaspaz-3 pozitif hücreler (siyah ok), kaspaz-3 negatif hücreler (kırmızı ok), (a'da 20x, b'de 100x büyütme ve kaspaz-3 immünohistokimyası).



Şekil 17. B4 (RES+DDS+CdCl₂) grubu testis dokusu kaspaz-3 immünohistokimyası: Kaspaz-3 pozitif hücreler (siyah ok), kaspaz-3 negatif hücreler (kırmızı ok), (a'da 20x, b'de 100x büyütme ve kaspaz-3 immünohistokimyası).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızda, önemli bir çevre kirletici ve düşük miktarlarda bile dokular üzerine son derece zararlı etkileri olan kadmiyumun erkek fertilitesi üzerine oluşturduğu hasar araştırılmış ve önemli antioksidan maddelerden resveratrol, dialil disülfid ve bunların kombinasyonlarının bu hasarı ne derece ve ne yönde etkilediği belirlenmeye çalışılmıştır.

Tez çalışması kapsamında: A grubu hiçbir uygulama yapılmayan hasar grubunun kontrolü olan grup; B1 grubu sadece akut dozda CdCl₂ uygulanan aynı zamanda koruyucu etkilerinin araştırıldığı RES ve DDS'nin kontrolü olan grup; B2 grubu 5 gün boyunca RES verildikten sonra 6. gün akut dozda CdCl₂ verilen grup; B3 grubu 5 gün boyunca DDS verildikten sonra 6. gün akut dozda CdCl₂ verilen grup; B4 grubu RES ve DDS'nin 5 gün boyunca birlikte uygulandığı ve 6. gün akut dozda CdCl₂ verilen grup olmak üzere 5 grup oluşturulmuştur. Elde edilen verilerden öncelikle A grubu ile B1 grubunun sonuçları karşılaştırılarak verilen kadmiyumun hasar oluşturup oluşturmadığı araştırılmıştır. Ek olarak B1 grubu ile B2, B3 ve B4 grupları karşılaştırılarak uygulanan maddelerin etkileri araştırılmıştır.

Elde edilen sonuçların dikkate alınan parametreler açısından karşılaştırmaları;

Vücut Ağırlığı Farkı:

Tüm gruplarda deneklerin deney öncesi vücut ağırlıkları ile deney sonrası vücut ağırlıkları tartılıp farkları hesaplandığında anlamlı olmamakla birlikte tüm deneklerin ağırlık kaybettiği görüldü. Kontrol grubunda da aynı oranda kilo kaybının görülmesi deneklerin deney stresine maruz kalmış olabileceğini düşündürdü.

Işık Mikroskopik Bulgular:

Kadmiyum özellikle çinkonun rafinasyonu esnasında ortaya çıkar (ATSDR, 2012). Damek-Poprawa ve Sawicka-Kapusta isimli araştırmacıların bir çelik fabrikası çevresinde ve çinko ergitme tesisi alanında yaptıkları bir saha çalışmasında,

ağır metallere (kadmiyum ve kurşun) maruz kalmış kemiricilerin dokularında bu ağır metallerin histopatolojik değişikliğe neden olduğunu göstermişlerdir (Damek-Poprawa ve Sawicka-Kapusta, 2004). Ağır metallerin organizmadaki metabolizması kemirgenler ve insan dokularında benzer olduğu için, analiz edilen çelik fabrikalarında olduğu gibi benzer sanayi bölgelerinde, çinko ergitme araçlarından yayılan emisyonların insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturduğu düşünülmektedir.

Kadmiyumun çok düşük miktarlarına maruz kalınması halinde bile dokulara ciddi zararlı etkileri vardır ve yarılanma ömrü uzun olduğu için karaciğer (Nordberg ve ark., 1994) ve böbrek (Gonick, 2008) gibi çeşitli organlarda birikebilir. Kadmiyum toksisitesi, böbrek ve karaciğer hasarı, testiküler ve prostat disfonksiyonu, kemiklerde osteomalazi, hipertansiyon ve büyüme geriliğine neden olur. Ayrıca, merkezi sinir sisteminde bozulmaya, yetersiz laktasyona ve hematokrit değerlerinde düşüşe neden olmaktadır (Damek-Poprawa ve Sawicka-Kapusta, 2004).

Kadmiyuma maruz kalma doğurganlık, anormal embriyonik gelişim, doğum öncesi ölüm ve cinsel işlev bozukluğu gibi üreme performansı ölçümlerini azaltmaktadır. Hayvanlarda kadmiyum plasentayı geçebilir ve yüksek dozlar plasental zedelenme ile cenin ölümüne neden olabilir (Marettová ve ark., 2015). Gebelik öncesinde ve sırasında kadmiyuma maruz kalan hayvanlarda iskelet anormallikleri bildirilmiştir (ATSDR, 2012).

Deney gruplarımızdan alınan H&E ve PAS+H boyanan kesitler Modifiye Johnsen Skorlama sistemi (Erdemir ve ark., 2012) ile değerlendirilerek, seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenezin yeterliliğinin kantitatif olarak (Dasdag ve ark., 1999) değerlendirilmesi sonucunda B1 (CdCl₂) grubunda dejenerasyonun oldukça belirgin olduğu görülmüştür. Ayrıca modifiye Johnsen skoru kadmiyuma maruz kalan grupta kontrole göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur. Bu bulgu kadmiyum maruziyetin spermatogenezi bozduğunu göstermektedir.

Birçok çalışma, kadmiyumun testiküler histopatolojide çeşitli değişikliklere neden olduğunu göstermiştir. Kadmiyum toksisitesi testislerde hızlıdır. İntraperitoneal veya subkutanöz enjeksiyon yoluyla verildiğinde, akut kadmiyum

kaynaklı hasar testislerde kendini hemorajik inflamasyon, dejenerasyon ve organın bozulması, seminifer túbüllerde vakuolizasyon ile kendini gösterir (Klaassen ve ark., 2009 ve Siu ve ark., 2010). Ayrıca yüksek doz kadmiyumdan sonra seminifer túbülerin çapında belirgin bir azalma ve bununla birlikte túbüler hacim yoğunluğunun anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir (De Souza Predes ve ark., 2010).

Bizim çalışmamızda da bu raporlara paralel olarak B1 (CdCl₂) grubu deneklerin testis dokularında intersitisyel alanda ödem, kan damarlarında konjesyon gözlemlendi. Seminifer túbüllerde düzensizlik ve vakuolizasyon görülürken germinal hücre katmanında azalma olduğu görüldü.

Sertoli hücreleri, kendini yenileme ve spermatogonial kök hücrelerin olgun spermilere farklılaşmasını desteklemekte önemli rol oynamaktadır (Kubota ve ark., 2004). Aynı zamanda, testisin bazal kompartman ile aduluminal kompartman boşluğu içinde gelişmekte olan germ hücreleri arasında önemli bağlantı sağlar. Bu nedenle, Sertoli hücre fonksiyonunun düzenlenmesi doğrudan germinal hücrelerin gelişimini etkiler. Chung ve Cheng isimli araştırmacıların yaptıkları çalışmada kadmiyumun sıçan testisinde Sertoli-Sertoli hücre bağlantılarında doza bağlı olarak bozulmaya neden olduğunu bildirmişlerdir (Chung ve Cheng, 2001). Bir başka çalışmada sıçanlara i.p tek doz 1 mg/kg CdCl₂ enjeksiyonundan sonra, Sertoli hücrelerinin bazal bağlantı bölgelerindeki mikroflaman demetlerinin parçalanarak kan testis bariyerinde bozulmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Hew ve ark., 1993).

Kadmiyumun Sertoli hücresi ve kan testis bariyeri üzerine olan bu olumsuz etkileri bizim çalışmamızda da B1 grubunda germ hücrelerinin túbül duvarından ayrılarak lümene dökülmesi bulguları ile gözlenmiştir.

Resveratrol başta üzüm olmak üzere pek çok bitki de stres faktörüne karşı yanıt olarak sentezlenen, fitoaleksinin yapısında bir bileşiktir (Athar ve ark., 2007). Resveratrol önemli bir antioksidan (Olas ve ark., 2006), antikanserojen (Patel ve ark., 2010) ve anti-inflamatuvar (Hoshino ve ark., 2011)'dir ve ayrıca östrojen agonisti (Bowers ve ark., 2000 ve Wallerath ve ark., 2002)'dir. Bunun yanı sıra azot oksit üretimini artırarak oksidatif stresten dokuyu koruyarak vazodilatör etki de

göstermektedir (Chen ve Pace-Asciak, 1996; Orallo ve ark., 2002; Rakici ve ark., 2005).

Deney gruplarımıza ait hem H&E boyanan hem de PAS+H boyanan kesitler mikroskop altında incelendiğinde B2 (RES+CdCl₂) grubunda, B1 (CdCl₂) grubuna benzer olarak yoğun ödem, kan damarlarında konjesyon ve dağınıklar görüldü. Seminifer tübüllerde ödem vardı ve bazı tübüllerde atrofikti. Germ hücre serisinin dağınık olduğu, bazal membrandan ayrıldığı ve lümeneye döküldüğü görüldü. Modifiye Johnson skorlama bulgularıda B1 grubu ile B2 grubu arasında anlamlı bir fark olmadığını gösterdi.

Çalışmamızda kullandığımız sıçanlar, 8 aylık, yaşlı hayvanlar olduğundan histolojik değerlendirmede karşımıza çıkan atrofik tübüllerin yaşlanmaya bağlı olarak gelişmiş olabileceği düşünüldü.

Çalışmamızda, Palsamy ve Subramanian (2011)'nin çalışmasına benzer olarak resveratrolü oral ve 5 mg/kg olacak şekilde uyguladık. Referans aldığımız bu çalışmada resveratrolün diyabetli sıçan böbreklerinde streptozotosin-nikotinamid ile indüklenen oksidatif stresi hafiflettiği, anti inflamatuvar ve koruyucu etkiler gösterdiği rapor edilmiştir (Palsamy ve Subramanian, 2011).

Faid ve ark. (2015)'nin diyabetli sıçan testislerinde yaptıkları çalışmada 5 mg/kg resveratrolün 5 gün uygulanması ile diyabetin neden olduğu oksidatif stresi hafiflettiğini ve kaspaz-3 molekülünün aktifleşmesini engelleyerek apoptozu inhibe ettiğini öne sürmüşlerdir (Faid ve ark., 2015). Benzer doz kullanılan pek çok çalışma bulunmaktadır (Hussein ve Mahfouz, 2016; Li ve ark., 2015; Palsamy ve ark., 2010; Silan, 2008).

Türedi ve ark (2015)'lerinin sıçanlarda yaptığı çalışmada doksorubisin kaynaklı testis hasarına karşı 21 gün boyunca i.p olarak uygulanan 20 mg/kg resveratrolün antiapoptotik ve antiperoksidatif etkiler göstererek fertiliteye pozitif katkı sağladığını göstermişlerdir (Türedi ve ark., 2015).

Juan ve ark. (2002)'nin erkek sıçanlara, günde bir kadeh kırmızı şarap içen bir kişinin alabileceği miktardan 1000 kat daha fazla olan miktarda (20 mg/kg) trans-resveratrolü 28 gün boyunca uygulayarak büyüme ve gelişme üzerindeki etkisini

değerlendirmişlerdir. Bulgularında deneklerin yüksek doz resveratrolden anlamlı olarak etkilenmediğini göstermişlerdir (Juan ve ark., 2002).

Bu raporların aksine 2014 yılında Ranawat ve ark.'nın erkek *Swiss albino* farelerde yaptıkları çalışmada birçok önemli biyolojik fonksiyona sahip güçlü bir antioksidan olmasına rağmen resveratrolün pro-oksidan gibi davranabildiğini ve testis dokusunda hasar yaratan etkilere neden olduğunu ortaya koymuşlardır. Resveratrolün prooksidan yeteneği, testiküler histomorfolojideki değişiklikler dışında sperm motilitesini ve spermatozoon konsantrasyonunu düşürdüğünü ve resveratrol ile indüklenen ROS üretimindeki artışın, testiküler dokudaki lipit peroksidasyonunu arttırdığı, bu da doku morfolojisinde ve spermatogenezde değişikliğe neden olan ana etkenlerden biri olduğu bildirilmiştir (Ranawat ve ark., 2014).

Bizim çalışmamızda da resveratrolün kadmiyum uygulaması ile birlikte böyle bir pro-oksidan etki göstermiş olabileceğini düşündürmüştür. İkinci bir görüş olarak bizim çalışmamızda resveratrolün beklenen koruyucu etkiyi gösterememesinin nedeni kadmiyum ile indüklenen testiküler hasara, belirlenen dozun yetersizliği olabilir. Üçüncü bir görüş ise resveratrolün ve kadmiyumun sahip oldukları güçlü östrojen ve androjen benzeri özellikleri (Gehm ve ark., 1997; Lu ve Serrero, 1999; Svechnikov ve ark., 2010; Takiguchi ve Yoshihara, 2006) nedeni ile henüz bilmediğimiz bir yolakla bu sonuca ulaşmamıza neden olmuş olabilir.

Kanser önleyici bir komponent olarak düşünülen sarımsak yağı 20'den fazla organosülfür bileşiği içerir. Bu bileşikler arasında, ikincil metabolitlerin önemli bir bileşenini oluşturan dialil disülfid; kanser, genotoksisite, nefrotoksisite ve ürotoksisitenin önlenmesinde güçlü bir bileşiktir (Fukao ve ark., 2004; Guyonnet ve ark., 2002; Nakagawa ve ark., 2001; Pedraza-Chaverri ve ark., 2003).

Lee ve ark. (2014b)'nın karbon tetraklorürün (CCl_4) indüklediği oksidatif karaciğer hasarına karşı 5 gün oral olarak uygulanan 50 mg/kg dialil disülfidin; antioksidan enzimlerin ekspresyonunu arttırdığını ve aynı zamanda CCl_4 ile indüklenen karaciğer hasarında inflamatuvar mediatörlerin ekspresyonunu azalttığını göstermişlerdir (Lee ve ark., 2014b).

Pedraza-Chaverri ve ark. (2003) 4 gün boyunca 50 mg/kg uygulanan dialil disülfidin, sıçanlarda gentamisin ile indüklenen oksidatif stresi hafiflettiğini ve gentamisin kaynaklı böbrek hasarını önlemede yararlı olduğunu ortaya koymuşlardır (Pedraza-Chaverri ve ark., 2003).

Dialil disülfidin sıçanlarda siklofosfamid ile indüklenen testiküler toksisiteye karşı koruyucu etkiye sahip olduğunu bildirilmiştir (Kim ve ark., 2013). Bu çalışma dialil disülfidin testiküler toksisite üzerine etkisinin araştırıldığı ve literatüre geçen tek çalışmadır. Ayrıca dialil disülfidin ağır metal toksisitesi üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Kim ve ark. (2013) çalışmasına paralel olarak bizim çalışmamızda da; B3 (DDS+CdCl₂) grubuna ait histolojik bulgularımız uygulanan kadmiyuma karşı DDS'in koruyucu etkisi olduğunu göstermektedir. Kadmiyum ile birlikte dialil disülfid uygulanan sıçanların testis dokularındaki bazı tübüllerde epiteller arası vakuol oluşumu görüle bile seminifer tübüllerin büyük kısmı normal gözlenmiştir. B1 grubu ve B3 grubu modifiye Johnson skorlama sonuçları karşılaştırıldığında spermatogenezin anlamlı olarak korunduğu görülmektedir. Dialil disülfidin akut kadmiyum alımına karşı spermatogenez süreci üzerindeki olumsuz etkiyi kompose ettiğini düşündürmüştür.

B1 grubu ile B4 grubu modifiye Johnson skorlama sonuçları karşılaştırıldığında B4 grubu skorlama sonucunda görülen anlamlı artışın ($p < 0,001$), resveratrol ve dialil disülfidin birlikte uygulandığı B4 grubunda akut kadmiyum maruziyetine karşı bu iki bileşiğin birlikte testiküler histomorfolojiyi ve spermatogenezini koruduğunu göstermiştir.

İmmünohistokimyasal Bulgular:

Apoptoz, çok hücreli organizmalardaki istenmeyen veya hasar görmüş hücreleri ortadan kaldırmak için kullanılan oldukça düzenli bir süreçtir. Çeşitli çalışmalar yetişkin kemirgenlere kadmiyum uygulamasının testislerde germ hücresi apoptozu ile sonuçlandığını göstermiştir (Ozawa ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2010; Zhou ve ark., 1999)

Çalışmamızda apoptozu belirlemek için hem TUNEL hem de proapoptotik protein olan kaspaz-3 immünohistokimyası yapılmış ve gruplar arasında karşılaştırma yapabilmek için apoptoz, kantitatif olarak apoptotik indeks ile belirlenmiştir.

TUNEL ve kaspaz-3 boyanma sonuçlarında, kontrol grubuna ait testis dokusu kesitlerinde apoptotik hücreler TUNEL pozitif ve kaspaz-3 pozitif hücrelerin bulunması ve kontrol grubu apoptotik indeksi ortalamasının 4,8 olması spermatogenez sırasında kusurlu germ hücrelerinin yok edilmesi veya Sertoli hücreleri ile germ hücreleri arasında uygun sayısal oranın sağlanmasına yöneliktir. Spermatogenez sırasında apoptoz yaygın görülen bir durumdur (Kerr, 1992).

Herranz ve ark (2010)'ın Wistar sıçan testisleri ile yaptıkları çalışmada deneklere 12 ay boyunca kadmiyum içeren su vermişlerdir. Sonuçlarında düşük dozlarda uzun süre CdCl₂ alınımı, sıçan testisinde belirgin morfolojik veya proliferatif değişiklikler olmadan germinal epitelin apoptotik indeksini artırdığını aynı zamanda spermatogonyum ve spermatozoid sayısında azalma meydana getirdiğini rapor etmişlerdir.

Othman ve ark. (2014)'nın kadmiyumun *Wistar albino* sıçan testis dokusunda oksidatif strese ve apoptoza neden olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada kadmiyumun kaspaz-3 ekspresyonunu artırdığı rapor edilmiştir (Othman ve ark., 2014). Propolisin, testislerde kadmiyuma bağlı germ hücresi apoptozu üzerine etkilerini araştırıldığı bir çalışmada da apoptozun belirlenmesinde TUNEL yöntemi kullanılmıştır (Çilenk ve ark., 2016).

Literatürlere paralel olarak çalışmamızda, B1 (CdCl₂) grubunda, seminifer tübüllerde görülen TUNEL pozitif ve kaspaz-3 pozitif hücrelerin miktarının oldukça çok olması kadmiyumun apoptozu indüklediğinin göstergesidir. Ayrıca kontrol grubu ile karşılaştırdığında gerek apoptotik indeks olsun gerekse kaspaz-3 değerlendirmesi açısından B1 grubu değerleri anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Resveratrolün kanser hücrelerinde, proapoptotik Bax ve Bak ekspresyonunu arttırdığı ve antiapoptotik Bcl-2 ve Bcl-xL'yi inhibe ettiği bildirilmiştir. İnsan meme

kanseri hücrelerinde resveratrol, hücre proliferasyonunda azalma, aynı zamanda hücre ölüm oranlarının da artmasına neden olmuştur (Le Corre ve ark., 2005; Siu ve ark., 2009). Seçici apoptoz indüksiyonunun, patolojik bozuklukların ve kanserin dönüşümü ve ilerlemesinin önlenmesi için umut verici bir strateji olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Chung ve Cheng, 2001).

Yuluğ ve ark. çalışmasında metotreksat ile indüklenmiş testiküler hasara karşı 10 gün boyunca i.p olarak uygulanan 20 mg/kg resveratrolün oksidatif stres ve apoptotik hücre ölümünü azalttığı ve metotreksat ile indüklenen oksidatif hasara karşı spermatogenezi koruduğu bildirilmiştir (Yuluğ ve ark., 2015).

Verilen literatürler ışığında resveratrolün antikanserojen etkilerinin yanında oksidatif strese karşı antioksidan etkisinden bahsedilebilir.

Bizim çalışmamızda B2 grubunda yoğun apoptoz gözlenmiştir. Apoptotik indeks ve kaspaz-3 değerlendirme sonuçları B1 grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Resveratrolün akut kadmiyum alımına karşı apoptotik etkiyi değiştiremediği görülmüştür. Bu bulgunun resveratrolün kadmiyum ile indüklenmiş hasarlı hücreleri seçici apoptoz indüksiyonu ile apoptoza yöneltmiş olabileceğini düşündürmüştür.

Lee ve ark. (2014a), dialil disülfitin sıçanlarda akut etanol ile indüklenen gastrik mukozal hasar üzerinde belirgin bir gastroprotektif etki sağladığını ortaya koymuşlardır. Dialil disülfitin bu gastroprotektif etkileri, artmış glutatyon seviyesi, artan antioksidan enzim aktiviteleri ve düşük lipid peroksidasyonu ile gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada apoptoz; TUNEL yöntemi ve kaspaz-3 boyamasıyla gösterilerek dialil disülfitin etanol ile indüklenmiş gastrik mukoza hasarına karşı apoptotik indeksde azalma sağladığı bildirilmiştir (Lee ve ark., 2014a).

Lee ve ark. (2014b) karbon tetraklorürün (CCl₄) indüklediği apoptotik hücre sayısında artışa karşı 5 gün oral olarak uygulanan 50 mg/kg dialil disülfitin, TUNEL pozitif ve kaspaz 3 pozitif hücre sayısını azalttığını bildirmişlerdir (Lee ve ark., 2014b).

Benzer olarak bizim çalışmamızda da TUNEL pozitif ve kazpaz-3 pozitif hücreler B3 grubuna ait kesitlerde oldukça az görülmüştür. B1 grubu ile B3 grubu apoptotik indeks değerleri karşılaştırıldığında B3 grubunda apoptotik indeksin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür ($p<0,001$). Bu bulgular dialil disülfitin, kadmiyum ile indüklenen testiküler hasara karşı koruyucu etki gösterdiğini düşündürmüştür.

Bu bulgu, yaygın olarak tüketilen sarımsakta bulunan bir antioksidan olan dialil disülfitin, testiste ağır metal toksisitesine karşı yararlı koruyucu bir ajan olabileceğini düşündürmektedir.

Resveratrol ve dialil disülfitin birlikte uygulandığı B4 grubunda ise akut kadmiyum maruziyetine karşı bu iki bileşiğin birlikte kadmiyum kaynaklı apoptozu engellediği elde edilen bulgularla ortaya konulmuştur. B1 grubu ile B4 grubu apoptotik indeks sonuçları karşılaştırıldığında B4 grubunda apoptotik indeks anlamlı olarak azalmıştır ($p<0,001$). Bu durumda resveratrol ve dialil disülfid kombinasyonunun kadmiyum kaynaklı apoptozu önlediği söylenebilir.

Dialil disülfid, spermatogenezi koruduğu gibi kadmiyum kaynaklı apoptozu da önlemiştir. Bu koruyucu etkilerin altında yatan mekanizmaları daha iyi aydınlatmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmasına rağmen, dialil disülfid, ağır metal toksisitesinden kaynaklanan erkek infertilitesine karşı umut verici bir protektif ajan olabilir.

İnfertilite nedenlerinin % 30'unu erkek infertilitesi oluşturmaktadır ve yardımcı üreme teknolojileri (IVF/ICSI) maliyetli olmakla birlikte, mevcut tedavi yöntemleride spesifik değildir. Kadmiyum ile kontaminasyon riskinin yüksek olduğu ülkelerde erkek infertilitesinin önlenmesi ile ilgili çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, bu çalışmadan elde edilen veriler, kadmiyumun neden olduğu erkek infertilitesine karşı önleyici ve tedavi edici çalışmalara katkıda bulunabilir.

Sonuç olarak; çalışmamızda sıçan testisinde kadmiyum ile oluşturulan akut hasarın baskılanmasında resveratrol ve dialil disülfidin rolüne yönelik bilgiler ortaya konmuştur. Belirlediğimiz dozda resveratrol bu akut hasarın baskılanmasında etkili olmazken dialil disülfid ve resveratrol ile birlikte kullanımı hasarı önlemede etkili bulunmuştur.

6. KAYNAKLAR

Aires V, Limagne E, Cotte AK, Latruffe N et al (2013) Resveratrol metabolites inhibit human metastatic colon cancer cells progression and synergize with chemotherapeutic drugs to induce cell death. *Molecular Nutrition and Food Research* 57: 1170-1181.

Amosova SV, Nosyreva VV, Musorin GK et al (1986) Synthesis of 1-alkylthio-3-allylthio-1-propenes by the reaction of diallyl disulfide with allyl halides in the alkali-metal hydroxide-DMSO superbasic system. *Journal of Organic Chemistry of the USSR* 22: 5.

Arıncı K, Elhan A (1997). *Anatomi. 2. Baskı, Güneş Kitapevi, Ankara, s: 44-49.*

Arunkumar A, Vijayababu MR, Gunadharini N et al (2007) Induction of apoptosis and histone hyperacetylation by diallyl disulfide in prostate cancer cell line PC-3. *Cancer Letters* 251: 59-67.

Athar M, Back JH, Tang X et al (2007). Resveratrol: a review of pre-clinical studies for human cancer prevention. *Toxicol Appl Pharmacol* 224: 274-283.

ATSDR (2012) Toxicological Profile for Cadmium. *Journal Public Health. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Journal Public Health* 1-487

Ayaşlıoğlu E (2001). Apoptoz. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 21: 57-62.

Bekheet SHM (2010) Cadmium chloride rapidly alters both BTB tight junction proteins and germ cells in young rat testes. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences* 2: 59-74.

Bernhard D, Tinhofer I, Tonko M et al (2000) Resveratrol causes arrest in the S-phase prior to Fas-independent apoptosis in CEM-C7H2 acute leukemia cells. *Cell death and differentiation* 7: 834-842.

Beumer TL et al (2000) Apoptosis regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 family members. *Molecular Reproduction and Development* 56: 353-359.

Bhat KPL, Kosmeder JW, Pezzuto JM (2001) Biological effects of resveratrol. *Antioxidant & Redox Signaling* 3: 203-213.

Bishayee A, Darvesh AS, Politis T et al (2010) Resveratrol and liver disease: From bench to bedside and community. *Liver International* 30: 1103-1114.

Bizarro P, Acevedo S, Niño-Cabrera et al (2003) Ultrastructural modifications in the mitochondrion of mouse Sertoli cells after inhalation of lead, cadmium or lead-cadmium mixture. *Reproductive Toxicology* 17: 561-566.

Blanco A, Moyano R, Molina López AM et al (2010) Preneoplastic and neoplastic changes in the Leydig cells population in mice exposed to low doses of cadmium. *Toxicology and Industrial Health* 26: 451-457.

Block E, Iyer R, Grisoni S et al (1988) Lipoxygenase inhibitors from the essential oil of garlic. Markovnikov addition of the allyldithio radical to olefins. *Journal of the American Chemical Society* 110: 7813-7827.

Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC et al (2000) Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 141: 3657-3667.

Brzóska M, Moniuszko-Jakoniuk J (2001) Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food and Chemical Toxicology* 39: 967-980.

Byber K, Lison D, Verougstraete V et al (2016) Cadmium or cadmium compounds and chronic kidney disease in workers and the general population: A systematic review. *Critical Reviews in Toxicology* 46: 191-240.

Caricchio R (2016) Chapter 21-Apoptosis, Autophagy, and Necrosis. *Systemic Lupus Erythematosus*, pp: 185–190.

Chen CK, Pace-Asciak CR (1996) Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *General Pharmacology* 27: 363-366.

Chung NPY, Cheng CY (2001) Is cadmium chloride-induced inter-Sertoli tight junction permeability barrier disruption a suitable in vitro model to study the events of junction disassembly during spermatogenesis in the rat testis? *Endocrinology* 142: 1878-1888.

Cole L, Kramer PR, Cole L et al (2016) Chapter 2.3–Apoptosis, Growth, and Aging. *Human Physiology, Biochemistry and Basic Medicine* pp: 63-66.

Çilenk KT, Öztürk İ, Sönmez MF (2016) Ameliorative effect of propolis on the cadmium-induced reproductive toxicity in male albino rats. *Experimental and Molecular Pathology* 101: 207-213.

Çoşkun G, Özgür H (2011) Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 20: 145-158.

Damek-Poprawa M, Sawicka-Kapusta K (2004) Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland. *Environmental Research* 96: 72-78.

- Dasdag S, Ketani MA, Akdag Z et al (1999) Whole-body microwave exposure emitted by cellular phones and testicular function of rats. *Urological Research* 27: 219-223.
- De Souza Predes F, Diamante MAS, Dolder H (2010) Testis response to low doses of cadmium in Wistar rats. *International Journal of Experimental Pathology* 91: 125-131.
- Demir R (2001) *Histolojik boyama teknikleri*. Palme Yayıncılık, Ankara, s: 184-185.
- Di C, Han L, Zhang H et al (2015) Diallyl disulfide attenuated carbon ion irradiation-induced apoptosis in mouse testis through changing the ratio of Tap73/ Δ Np73 via mitochondrial pathway. *Nature Publishing Group* 86: 1-11.
- Druesne-Pecollo N, Chaumontet C, Latino-Martel P (2008) Diallyl disulfide increases histone acetylation in colon cells in vitro and in vivo. *Nutrition Reviews* 66: 65-67.
- Erdemir F, Atilgan D, Markoc F, Boztepe O et al (2012) The effect of diet induced obesity on testicular tissue and serum oxidative stress parameters. *Actas urologicas españolas* 36: 153-9.
- Faid I, Al-Hussaini H, Kilarkaje N (2015) Resveratrol alleviates diabetes-induced testicular dysfunction by inhibiting oxidative stress and c-Jun N-terminal kinase signaling in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 289: 482-494.
- Fink C, Weigel R, Hembes T et al (2006). Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in Sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ. *Neoplasia* 8: 1019–27.
- Fukao T, Hosono T, Misawa S (2004) The effects of allyl sulfides on the induction of phase II detoxification enzymes and liver injury by carbon tetrachloride. *Food and Chemical Toxicology* 42: 743-749.
- Galeone C, Pelucchi C, Levi F (2006) Onion and garlic use and human cancer. *The American Journal of Clinical Nutrition* 84: 1027-32.
- Gehm BD, Mcandrews JM, Chien PY et al (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Physiology* 94: 14138-14143.
- Godt J, Scheidig F, Grosse-Siestrup C et al (2006) The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology* 1: 22.
- Gonick HC (2008) Nephrotoxicity of cadmium and lead. *Indian Journal of Medical Research* 128: 335-352.

Goyer RA, Liu J, Waalkes MP (2004) Cadmium and cancer of prostate and testis. *BioMetals* 17: 555-558.

Guyonnet D, Belloir C, Suschetet M et al (2002) Mechanisms of protection against aflatoxin B1 genotoxicity in rats treated by organosulfur compounds from garlic. *Carcinogenesis* 23: 1335-1341.

Herranz LM, Teba F, Martín R et al (2010) Quantitative changes in rat seminiferous epithelium after chronic administration of low doses of cadmium and zinc : A stereological study. *The Open Andrology Journal* 2: 27-36.

Hew KW, Heath GL, Jiwa H et al (1993) Cadmium in vivo causes disruption of tight junction-associated microfilaments in rat Sertoli cells. *Biology of reproduction* 49: 840-9.

Hoshino J, Park EJ, Kondratyuk TP et al (2011) Selective synthesis and biological evaluation of sulfate- conjugated resveratrol metabolites. *Journal of Medicinal Chemistry* 53: 5033–5043.

Hung LM, Chen JK, Huang SS et al (2000) Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research* 47: 549-555.

Hussein MMA, Mahfouz MK (2016) Effect of resveratrol and rosuvastatin on experimental diabetic nephropathy in rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 82: 685-692.

Jang M, Cai L, Udeani GO et al (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-20.

Juan ME, Vinardell MP, Planas JM (2002) The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *The Journal of nutrition* 132: 257-60.

Kara H, Karataş F, Canatan H (2005) Effect of single dose cadmium chloride administration on oxidative stress in male and female rats. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* 29: 37-42.

Katırcıoğlu FE (2007) Uzun süre resveratrol ile beslenmiş sıçanların karaciğer, akciğer, böbrek ve kalp dokularında resveratrol miktarının belirlenmesi. Gazi Üniversitesi, Farmakoloji Ana Bilim Dalı, Yüksek lisans tezi.

Kerr JB (1992) Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *Journal of Reproduction and Fertility* 95: 825-30.

Kierszenbaum AL ve Tres LL (2012) *Histology and Cell Biology: An introduction to pathology*. 3rd edition, Saunders, Philadelphia, pp:531-564.

Kim SH, Lee IC, Baek HS et al (2013) Protective effect of diallyl disulfide on cyclophosphamide-induced testicular toxicity in rats. *Laboratory Animal Research* 29: 204-11.

Kim SH, Lee IC, Ko JW et al (2015) Diallyl disulfide prevents cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in rats through the inhibition of oxidative damage, MAPKs, and NF- κ B pathways. *Biomolecules and Therapeutics* 23: 180-188.

Klaassen CD, Liu J, Diwan BA (2009) Metallothionein protection of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238: 215-220.

Koca N, Karadeniz F (2005) Gıdalardaki doğal antioksidan bileşikler. *Gıda Dergisi* 30: 229-236.

Kossowska B, Dudka I, Gancarz R et al (2013) Application of classic epidemiological studies and proteomics in research of occupational and environmental exposure to lead, cadmium and arsenic. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 216: 1-7.

Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL (2004) Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 16489-16494.

Lafuente A, González-Carracedo A, Romero A et al (2004) Cadmium exposure differentially modifies the circadian patterns of norepinephrine at the median eminence and plasma LH, FSH and testosterone levels. *Toxicology Letters* 146: 175-182.

Le Corre L, Chalabi N, Delort L et al (2005) Resveratrol and breast cancer chemoprevention: molecular mechanisms. *Molecular nutrition & food research* 49: 462-71.

Lee IC, Baek HS, Kim SH et al (2014a) Effect of diallyl disulfide on acute gastric mucosal damage induced by alcohol in rats. *Human & Experimental Toxicology* 34: 227-239.

Lee IC, Kim SH, Baek HS et al (2014b) The involvement of Nrf2 in the protective effects of diallyl disulfide on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage and inflammatory response in rats. *Food and Chemical Toxicology* 63: 174-185.

Lee KM, Lee IC, Kim SH et al (2012). Melatonin attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia* 44: 796-803.

Lekesizcan A, Sönmez MF (2016) Sıçan testis dokusunda kadmiyum ile oluşturulan hasar üzerine etil pirüvatın etkilerinin araştırılması. *Fırat Tıp Dergisi* 21: 17-23.

- Li E, Guo Y, Wang G et al (2015) Effect of resveratrol on restoring spermatogenesis in experimental cryptorchid mice and analysis of related differentially expressed proteins. *Cell Biology International* 39: 733-740.
- Lu R, Serrero G (1999) Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. *Journal of Cellular Physiology* 179: 297-304.
- Lui WY (2002) Sertoli cell tight junction dynamics: Their regulation during spermatogenesis. *Biology of Reproduction* 68: 1087-1097.
- Marettová E, Marett M, Legáth J (2015) Toxic effects of cadmium on testis of birds and mammals: A review. *Animal Reproduction Science* 155: 1–10.
- Mendez-Armenta M, Rios C (2011) Cadmium Neurotoxicity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 23: 350-358.
- Mescher AL (2015) Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap. Çeviren: Solakoğlu S, 13. baskı, Nobel Yayınevi, İstanbul, s:429-448.
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG (2008) *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 8th edition, Saunders Elsevier, USA, pp: 262-279.
- Moroi S, Saitou M, Fujimoto K et al (1998) Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *the American Physiological Society* 32: 0–9.
- Nakagawa H, Tsuta K, Kiuchi K et al (2001) Growth inhibitory effects of diallyl disulfide on human breast cancer cell lines. *Carcinogenesis* 22: 891–897.
- Netter FH (2012) *The Netter Collection of Medical Illustration, Vol 2: Reproductive System*. Elsevier Saunders, pp: 9-26.
- Nordberg GF (2009) Historical perspectives on cadmium toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238: 192-200.
- Nordberg GF, Jin T, Nordberg M (1994) Subcellular targets of cadmium nephrotoxicity: cadmium binding to renal membrane proteins in animals with or without protective metallothionein synthesis. *Environmental Health Perspectives* 102: 191-194.
- Odacı E, Hancı H, Yuluğ E et al (2016) Effects of prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field on 60-day-old rat testis and epididymal sperm quality. *Biotechnic & Histochemistry* 91: 9-19.
- Olas B, Nowak P, Kolodziejczyk J et al (2006) Protective effects of resveratrol against oxidative/nitrative modifications of plasma proteins and lipids exposed to peroxynitrite. *Journal of Nutritional Biochemistry* 17: 96-102.

Orallo F, Alvarez E, Camiña M et al (2002) The possible implication of trans-resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Molecular pharmacology* 61: 294-302.

Othman MS, Nada A, Zaki HS et al (2014) Effect of *Physalis peruviana* L. on cadmium-induced testicular toxicity in rats. *Biological Trace Element Research* 159: 278-287.

Ozawa N, Goda N, Makino N (2002) Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *Current* 109: 457-467.

Palsamy P, Sivakumar S, Subramanian S (2010) Resveratrol attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress, proinflammatory cytokines and protects hepatocytes ultrastructure in streptozotocin–nicotinamide-induced experimental diabetic rats. *Chemico-Biological Interactions* 186: 200-210.

Palsamy P, Subramanian S (2011) Resveratrol protects diabetic kidney by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammatory cytokines via Nrf2-Keap1 signaling. *Biochimica et Biophysica Acta* 1812: 719-731.

Pari L, Murugavel P, Sitasawad SL et al (2007) Cytoprotective and antioxidant role of diallyl tetrasulfide on cadmium induced renal injury: An in vivo and in vitro study. *Life Sciences* 80: 650-658.

Park HY, Kim ND, Kim GY et al (2012) Inhibitory effects of diallyl disulfide on the production of inflammatory mediators and cytokines in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *Toxicology and Applied Pharmacology* 262: 177-184.

Patel KR, Brown VA, Jones DJL et al (2010) Clinical pharmacology of resveratrol and its metabolites in colorectal cancer patients. *Cancer Research* 70: 7392-7399.

Pedraza-Chaverri J, González-Orozco AE, Maldonado PD et al (2003) Diallyl disulfide ameliorates gentamicin-induced oxidative stress and nephropathy in rats. *European Journal of Pharmacology* 473: 71-78.

Pelletier RM, Okawara Y, Vitale ML et al (1997) Differential distribution of the tight-junction-associated protein ZO-1 isoforms alpha+ and alpha- in guinea pig Sertoli cells: a possible association with F-actin and G-actin. *Biology of reproduction* 57: 367-76.

Pervaiz S (2004) Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resistance Updates* 7: 333-344.

Prozialek WC, Edwards JR, Woods JM (2006) The vascular endothelium as a target of cadmium toxicity. *Life Sciences* 79: 1493-1506.

Rakici O, Kiziltepe U, Coskun B et al (2005) Effects of resveratrol on vascular tone and endothelial function of human saphenous vein and internal mammary artery. *International Journal of Cardiology* 105: 209-215.

Ranawat P, Khanduja KL, Pathak CM (2014) Resveratrol - an ingredient of red wine abrogates the reproductive capacity in male mice. *Andrologia* 46: 650-658.

Ross MH, Pawlina W (2010) *Histology: A Text and Atlas, with Correlated Cell and Molecular Biology*. 6th Edition, Williams & Wilkins Press, Baltimore, pp: 784-829.

Sadler TW (2005) *Langman's Medikal Embriyoloji*. Çeviren: Başaklar AC, 9. baskı, Palme Yayıncılık., Ankara, s:328-353.

Sahinturk V, Guclu C, Baycu C (2007) Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats. *Asian Journal of Andrology*, 9: 117-124.

Sarkar A, Ravindran G, Krishnamurthy V (2013) A brief review on the effect of cadmium toxicity: from cellular to organ level. *International Journal of Bio-Technology* 3: 17-36.

Sato M, Ray PS, Maulik G et al (2000) Myocardial protection with red wine extract. *Journal of cardiovascular pharmacology* 35: 263-8.

Schwartz EW, Alsberg CL (1923) Studies on the pharmacology of cadmium and zinc with particular reference to emesis. *Journal of the Franklin Institute* 195: 582-583.

Sergides C, Chirilă M, Silvestro L et al (2016) Bioavailability and safety study of resveratrol 500 mg tablets in healthy male and female volunteers. *Experimental and Therapeutic Medicine* 11: 164-170.

Setchell BP, Waites GM (1970) Changes in the permeability of the testicular capillaries and of the "blood-testis barrier" after injection of cadmium chloride in the rat. *The Journal of endocrinology* 47: 81-6.

Siess MH, Le Bon AM, Canivenc-Lavier MC et al (1997) Modification of hepatic drug-metabolizing enzymes in rats treated with alkyl sulfides. *Cancer Letters* 120: 195-201.

Sigma Aldrich a. Product Specification of Resveratrol.
http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/R5/R5010/R5010-BULK_SIGMA_.pdf

Sigma Aldrich b. Product Specification of Diallyl disulfide.
http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/COFAInfo/SigmaSAPQM/SPEC/SM/SMB00378/SMB00378-BULK_SIGMA_.pdf

Signorelli P, Ghidoni R (2005) Resveratrol as an anticancer nutrient: Molecular basis, open questions and promises. *Journal of Nutritional Biochemistry* 16: 449-466.

Silan C (2008) The effects of chronic resveratrol treatment on vascular responsiveness of streptozotocin-induced diabetic rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31: 897-902.

Siu ER, Mruk DD, Porto CS et al (2010) Cadmium-induced testicular injury. *Toxicology and Applied Pharmacology* 238: 240-249.

Siu ER, Wong EWP, Mruk DD et al (2009) An occludin-focal adhesion kinase protein complex at the blood-testis barrier: A study using the cadmium model. *Endocrinology* 150: 3336-3344.

Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM (1997) Resveratrol: A molecule whose time has come? And gone? *Clinical Biochemistry* 30: 91-113.

SPSS. Statistical Package for the Social Sciences. Chicago, IL, USA: SSPS Inc.

Stillwell W (2016) *An Introduction to Biological Membranes*, Chapter 24- Cell Death, Apoptosis. 2nd edition, Elsevier, pp: 539–546.

Suvarna SK, Layton C, Bancroft JD (2013) *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques*. 7th ed, Journal of Chemical Information and Modeling pp:53.

Svechnikov K, Izzo G, Landreh L et al (2010) Endocrine disruptors and leydig cell function. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Article ID 684504.

Takiguchi M, Yoshihara S (2006) New aspects of cadmium as endocrine disruptor. *Environmental sciences : an international journal of environmental physiology and toxicology* 13: 107-116.

Tenorio F, Neto L, Bach PV et al (2016) Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 59: 10-26.

Thornton I (1992) Sources and pathways of cadmium in the environment. *IARC scientific publications* 1992: 149-62.

Tomatır AG (2003) Apoptoz: Programlı Hücre Ölümü. *Turkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences* 23: 499-508.

Tsuchiya K (1969) Causation of Ouch-Ouch disease (Itai-Itai Byo). *Keio Journal Medicine* 18: 181-194.

Türedi S, Yuluğ E, Alver A et al (2015) Effects of resveratrol on doxorubicin induced testicular damage in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 67: 229-235.

Ulrich S, Wolter F, Stein JM (2005) Molecular mechanisms of the chemopreventive effects of resveratrol and its analogs in carcinogenesis. *Molecular Nutrition & Food Research* 49: 452-461.

Waalkes MP (2003) Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533: 107-120.

Waisberg M, Joseph P, Hale B et al (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis 192: 95-117.

Wallerath T, Deckert G, Ternes T et al (2002) Resveratrol, a polyphenolic phytoalexin present in red wine, enhances expression and activity of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 106: 1652-1658.

WHO (2000) Air quality guidelines for Europe. *Environmental Science and Pollution Research*. 2nd edition. WHO Regional Publications, Copenhagen, pp:136-139

WHO (2004) Guidelines for drinking-water quality, 3rd edition, WHO Regional Publications, Geneva, pp: 317-319.

Xu MY, Wang P, Sun YJ et al (2017) Joint toxicity of chlorpyrifos and cadmium on the oxidative stress and mitochondrial damage in neuronal cells. *Food and Chemical Toxicology* 103: 246-252.

Yar AS, Menevse S, Alp E et al (2010) The effects of resveratrol on cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 mRNA and protein levels in diabetic rat kidneys. *Molecular Biology Reports* 37: 2323-2331.

Yavru N, Yavru S (1996) *Deney Hayvanları*. Konya, Veteriner. Fakültesi Yayınları ss:56.

Yi L, Su Q (2013) Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. *Food and Chemical Toxicology* 57: 362-370.

Yuluğ E, Turedi S, Alver A et al (2015) Effects of resveratrol on methotrexate-induced intestinal injury. *The ScientificWorld Journal* 116: 676-680.

Zhang M, He Z, Wen L et al (2010) Cadmium suppresses the proliferation of piglet Sertoli cells and causes their DNA damage, cell apoptosis and aberrant ultrastructure. *Reproductive biology and endocrinology* 8: 97.

Zhou T, Zhou G, Song W et al (1999) Cadmium-induced apoptosis and changes in expression of p53, c-jun and MT-I genes in testes and ventral prostate of rats. *Toxicology* 142: 1-13.

7. SİMGELER ve KISALTMALAR

- a.:** Arter
ABC: Avidin biyotin kompleksi
ABP: Androjen bağlayıcı protein
AI: Apoptotik indeks
AIF: Apoptoz indükleyici faktör
AMH: Antimüllerian hormon
Apaf-1: Apoptotik proteaz aktive eden faktör
ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry
Ca²⁺: Kalsiyum
CAD: Kaspaz aktive edici DNaz
CCl₄: Karbon tetraklorür
Cd: Kadmiyum
CD95: Cluster of differentiation 95
CdCl₂: Kadmiyum klorür
COX: Siklooksijenaz
DAB: Diaminobenzidin
E2: Dietilstilbestrol
Endo-G: Endonükleaz-G
ER: Endoplazmik retikulum
FADD: Fas'a bağımlı ölüm bölgesi adaptör proteini
FSH: Folikül uyarıcı hormon
H&E: Hematoksilen & Eozin
H₂O₂: Hidrojen peroksit
hCG: İnsan koryonik gonadotropin
HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
IAP: Apoptoz protein inhibitörü
IARC: International Agency for Research on Cancer
ICAD: İnaktif kaspaz aktive edici DNaz
kDa: Kilo-dalton
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH: Luteinizan hormon
NF-κB: Nüklear faktör-κB
OSHA: Occupational Safety and Health Administration
PAS+H: Periyodik Asit-Schiff + Hematoksilen
PBS: Fosfat buffer saline tampon
ROS: Reaktif oksijen türleri
Smac: Second mitochondria-derived Activator of Caspase
SRY: Cinsiyet belirleyici bölge Y
T.: Toraks
TAİ: Testis ağırlık indeksi
TBF: Testis belirleyici faktör

TNF: Tumor nekrozu faktörü
TNFR: Tumor nekrozu faktör reseptörü
TRADD: TNFR bağımlı ölüm bölgesi adaptör proteini
TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand
v.: Ven
WHO: World Health Organization
ZO-1: Zonula okludens-1
ZO-2: Zonula okludens-2



8. EKLER

8.1. Şekil Listesi

- Şekil 1. Sıkı bağlantı bölgeleri (Fink ve ark., 2006).
Şekil 2. Dialil disülfidin kimyasal gösterimi (Sigma Aldrich b).
Şekil 3. A (Kontrol) grubu testis dokusunun histolojik görünümü.
Şekil 4. B1 (CdCl₂) grubu testis dokusunun histolojik görünümü.
Şekil 5. B2 (RES+CdCl₂) grubu testis dokusunun histolojik görünümü.
Şekil 6. B3 (DDS+CdCl₂) grubu testis dokusunun histolojik görünümü
Şekil 7. B4 (RES+DDS+CdCl₂) grubu testis dokusunun histolojik görünümü
Şekil 8. A (Kontrol) grubu testis dokusu TUNEL boyama
Şekil 9. B1 (CdCl₂) grubu testis dokusu TUNEL boyama
Şekil 10. B2 (RES+CdCl₂) grubu testis dokusu TUNEL boyama
Şekil 11. B3 (DDS+CdCl₂) grubu testis dokusu TUNEL boyama
Şekil 12. B4 (RES+DDS+CdCl₂) grubu testis dokusu TUNEL boyama
Şekil 13. A (Kontrol) grubu testis dokusu kaspaz-3 immünohistokimyası
Şekil 14. B1 (CdCl₂) grubu testis dokusu kaspaz-3 immünohistokimyası:
Şekil 15. B2 (RES+CdCl₂) grubu testis dokusu kaspaz-3 immünohistokimyası
Şekil 16. B3 (DDS+CdCl₂) grubu testis dokusu kaspaz-3 immünohistokimyası
Şekil 17. B4 (RES+DDS+CdCl₂) grubu testis dokusu kaspaz-3 immünohistokimyası

8.2. Tablo Listesi

- Tablo 1. Resveratrolün fiziksel özellikleri (Sigma Aldrich a).
Tablo 2. Doku takibi.
Tablo 3. H&E boyaması.
Tablo 4. Modifiye Johnsen Skorlaması.
Tablo 5. PAS+H boyama yöntemi basamakları ve süreleri.
Tablo 6. TUNEL yöntemi basamakları ve süreleri.
Tablo 7. Kaspaz-3 immünohistokimyasal boyama yöntemi basamakları ve süreleri.
Tablo 8. Gruplara göre vücut ağırlıkları farkı ortalama ve standart sapma değerleri.
Tablo 9. Gruplara göre TAI ortalama ve standart sapma değerleri.
Tablo 10. Gruplara göre modifiye Johnson skorlaması ortalama ve standart sapma değerleri.
Tablo 11. Gruplar arası modifiye Johnson skorlamasının istatistiksel değerlendirmesi.
Tablo 12. Gruplara göre AI ortalama ve standart sapma değerleri.
Tablo 13. Gruplar arası AI'nın istatistiksel değerlendirmesi.
Tablo 14. Gruplara göre kaspaz-3 hesaplamasının ortalama ve standart sapma değerleri.
Tablo 15. Gruplar arası kaspaz-3 hesaplamasının istatistiksel değerlendirmesi.

8.3. Grafik Listesi

Grafik 1. Modifiye Johnson skorlaması grafiksel gösterimi.

Grafik 2. Apoptotik indeksin grafiksel gösterimi.

Grafik 3. Kaspaz-3 hesaplaması grafiksel gösterimi.



9. TEŞEKKÜR

Tezin her aşamasında ve yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini, özverilerini, bilgilerini, zamanlarını ve güler yüzünü esirgemeyen çok değerli tez danışmanım Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ'ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim süresince akademik olarak yetişmemde büyük emekleri olan, öğrencileri olma şansı bulduğum engin bilgi ve tecrübeleriyle gerek bilimsel gerekse sosyal olarak çok şey öğrendiğim, zor anlarımda yanımda olan, beni her an destekleyen ve doğruya yönlendiren değerli hocam Prof. Dr. Şahin A. SIRMALI'ya teşekkür ederim.

Tezim sırasında her türlü yardımlarından ve eğitim sürecimdeki tüm emeklerinden dolayı Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Semiha ERSOY'a ve diğer tüm Öğretim Üyeleri, Prof. Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU, Prof. Dr. F. Zehra MİNBAŞ, Prof. Dr. Özhan EYİGÖR ve Doç. Dr. Berrin AVCI'ya teşekkür ederim.

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki çok sevdiğim arkadaşlarım Ceren OY, Duygu YURTSEVEN, Gökten KUŞPINAR, Cihan ÇAKIR'a ve biyoloğumuz Ayşe AKBAŞ'a teşekkür ederim.

Tezimin deney ve yazım aşamasında desteğini gördüğüm ve bana yardımcı olan arkadaşlarım Gülçin EKİZCELİ ve Sema KOÇOĞLU'na ayrıca çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamı KUAP(T)-2015/45 no'lu proje olarak destekleyen Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Son olarak beni bugünlere getiren, maddi manevi her zaman beni destekleyen, koşulsuz anlayış ve sevgi gösteren canım annem Selvinaz UYGUL ve canım babam Murat UYGUL'a sonsuz saygılarımı sunar teşekkür ederim.

Kıymet Zülal Uygul

10. ÖZGEÇMİŞ

28 Nisan 1989 yılında Gümüşhane’de doğdu. Lise öğrenimini Ali Fuat Kadirbeyoğlu Anadolu Lisesinde tamamladı. 2008 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2012 yılında onur öğrencisi olarak mezun oldu. 2013 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

Burslar ve Ödüller

GÜSİAD Bursu - 2009-2010 eğitim ve öğretim yılı

Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Bölüm İkinciliği.

Sertifika Bilgileri

B2 Seviyesi İngilizce Sertifikası
Bursa Teol Dil Okulları - 05.2017

Deney Hayvanı Kullanım Sertifikası
Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu - 07.2014

Primer ve Sekonder Hücre Kültürü Teknikleri Sertifikası.
Society For Molecular Cancer Research in Turkey and Istanbul - 07.2014

Pedagojik Formasyon Sertifikası
Karadeniz Teknik Üniversitesi Eğitim Bilimleri - 06.2012

Yabancı dil

İngilizce

Bildiriler

KZ. Uygul, D. Gök Yurtseven, Z. Minbay, Ö. Eyigör. Non-Pregangliyonik Edinger-Westphal Çekirdeğinin Besin Alımı Üzerine Etkisinde Glutamatın Düzenleyici Rolü XIII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi,2016 Uluslararası Katılımlı, Kongre kitabı, İzmir, Türkiye, Mayıs 2016.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ

TEZ ÇOĞALTMA VE ELEKTRONİK YAYIMLAMA İZİN FORMU

Yazar Adı Soyadı	Kıymet Zülal Uygul
Tez Adı	Resveratrol ve Dialil Disülfidin Sıçan Testisinde Kadmiyum ile Oluşturulmuş Akut Hasara Etkisi
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Bilim Dalı	
Tez Türü	Yüksek Lisans Tezi
Tez Danışman(lar)ı	Prof. Dr. Zeynep Kahveci
Çoğaltma (Fotokopi Çekim) İzni	<input checked="" type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimin sadece içindekiler, özet, kaynakça ve içeriğinin % 10 bölümünün fotokopi çekilmesine izin veriyorum <input type="checkbox"/> Tezimden fotokopi çekilmesine izin vermiyorum
Yayımlama İzni	<input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin veriyorum <input checked="" type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasının ertelenmesini istiyorum 1 yıl <input type="checkbox"/> 2 yıl <input type="checkbox"/> 3 yıl <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Tezimin elektronik ortamda yayımlanmasına izin vermiyorum

Hazırlamış olduğum tezimin yukarıda belirttiğim hususlar dikkate alınarak, fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere Uludağ Üniversitesi Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı tarafından hizmete sunulmasına izin verdiğimi beyan ederim.

Tarih: 22/05/2017

İmza:

RİT-FR-KDD-12/00