

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

**FARELERDE PUBERTE SONRASI NİKOTİN MARUZİYETİNİN**  
**SPERMATOGONYAL FARKLILAŞMA ÜZERİNE OLASI**  
**ETKİLERİNİN İMMÜN İŞARETLEME YÖNTEMLERİYLE**  
**İNCELENMESİ**

Selin HAZIR  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ebru BALLI

MERSİN-2015

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

**FARELERDE PUBERTE SONRASI NİKOTİN MARUZİYETİNİN  
SPERMATOGONYAL FARKLILAŞMA ÜZERİNE OLASI  
ETKİLERİNİN İMMÜN İŞARETLEME YÖNTEMLERİYLE  
İNCELENMESİ**

Selin HAZIR  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Ebru BALLI

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
BAP-SBE HEB (SH) 2014-2 YL nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 281

MERSİN-2015

## Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Farelerde Puberte Sonrası Nikotin Maruziyetinin Spermatogonyal Farklılaşma Üzerine Olası Etkilerinin İmmün İşaretleme Yöntemleriyle İncelenmesi” başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

03/07/2015

  
Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı


Jüri Başkanı

  
Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Biyofizik Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

  
Doç. Dr. Ebru BALLI

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 27.07.2015.. tarih ve 2015/229... sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

  
Doç. Dr. Fehmi ATEŞ

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince deneyimlerini ve bilgi birikimlerini paylaşarak, beni pek çok konuda aydınlatan, her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm, bana sabırla yol gösteren, başta tez danışmanım Doç. Dr. Ebru BALLI hocama, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ' a, Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ, ve Doç. Dr. Savaş AKTAŞ hocalarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım sırasında, deney hayvanı modeli oluşturma konusunda bana yardımcı olan MEÜ Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Nail Can ÖZTÜRK'e ve Arş. Gör. Turan KOÇ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Bu süreçte, her türlü teorik ve teknik desteklerini sunan MEÜ Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı sorumlusu Dr. Veteriner Hekim Tamer YENER ve tüm çalışanlarına sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Tezimin bulgularının istatistiksel analizleri aşamasındaki yardımlarından dolayı MEÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Arş. Gör. Didem DERİCİ YILDIRIM' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim süresince birlikte görev yaptığım Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma desteklerinden dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak, hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni her zaman maddi ve manevi olarak destekleyen aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. Testis Histolojisi.....	3
2.2. Seminifer Tübüller.....	3
2.3. Seminifer Tübül Epiteli.....	4
2.4. Kemirgenlerde Spermatogenez.....	4
2.5. İnsanlarda Spermatogenez.....	5
2.6. Spermatogonyal Kök Hücreler.....	5
2.6.1. Spermatogonyal Kök Hücrelerin Kökeni.....	6
2.6.2. Spermatogonyal Kök Hücre Nişi.....	6
2.7. Kemirgenlerde Spermatogonyal Farklılaşma .....	7
2.8. İnsanlarda Spermatogonyal Farklılaşma .....	9
2.9. Nikotin.....	10
2.9.1. Nikotinin Kimyasal Özellikleri.....	10
2.9.2. Nikotinin Absorbsiyonu.....	10
2.9.3. Nikotinin Metabolizasyonu.....	11
2.9.4. Nikotinin Toksitesi.....	11
2.10. Nikotin ve Erkek Üreme Sistemi.....	12
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>14</b>
3.1 Çalışmanın Aşamaları ve Deney Gruplarının Oluşturulması.....	14
3.2. Subkutan Enjeksiyon Uygulamasının Alıştırma Dönemi .....	15

3.3. Nikotin Dozunun Hesaplanması .....	15
3.4. Testis Dokularının Elde EdiliŖi ve Fiksasyon.....	16
3.5. IŖık Mikroskopik Doku Takibi İŖlemi.....	17
3.6. Histolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme .....	17
3.7. Hematoksilen–Eozin Boyama Protokolü.....	18
3.8. İmmünohistokimyasal İŖaretleme Protokolü.....	19
3.9. İstatistiksel Analiz.....	21
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>23</b>
4.1. Vücut Ağırlıklarının Zamana Bağlı DeėiŖimi .....	23
4.2. Testis Ağırlıklarının Gruplar Arasında KarŖılaŖtırılması .....	23
4.3. Seminifer Tübüllerin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	23
4.4. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığının Gruplar Arasında Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi.....	33
4.5. Spermatogonyal Hücrelerde İmmünohistokimyasal GDNF Ekspresyonu.....	34
4.6. Spermatogonyal Hücrelerde İmmünohistokimyasal Oct-4 Ekspresyonu.....	46
4.7. Spermatogonyal Hücrelerde İmmünohistokimyasal C-kit Ekspresyonu.....	57
<b>5. TARTIŖMA.....</b>	<b>71</b>
<b>6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....</b>	<b>76</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>78</b>
<b>ÖZGEÇMİŖ.....</b>	<b>85</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil.4.1. P90 K grubu mikrografi x200, H.E.....	24
Şekil.4.2. P90 K grubu mikrografi x400, H.E.....	25
Şekil.4.3. P90 S grubu mikrografi x200, H.E.....	25
Şekil.4.4. P90 S grubu mikrografi x400, H.E.....	26
Şekil 4.5. P90 N grubu mikrografi x200, H.E.....	26
Şekil 4.6. P90 N grubu mikrografi x400, H.E.....	27
Şekil 4.7. P105 K grubu mikrografi x200, H.E.....	27
Şekil.4.8. P105 K grubu mikrografi x400, H.E.....	28
Şekil.4.9. P105 S grubu mikrografi x200, H.E.....	28
Şekil.4.10. P105 S grubu mikrografi x400, H.E.....	29
Şekil.4.11. P105 N grubu mikrografi x200, H.E.....	29
Şekil.4.12. P105 N grubu mikrpgrafi x400, H.E.....	30
Şekil.4.13. P120 K grubu mikrografi x200, H.E.....	30
Şekil 4.14. P120 K grubu mikrografi x400, H.E.....	31
Şekil.4.15. P120 S grubu mikrografi x200, H.E.....	31

<b>Şekil.4.16.</b> P120 S grubu mikrografi x400, H.E.....	32
<b>Şekil.4.17.</b> P120 N grubu mikrografi x200, H.E.....	32
<b>Şekil.4.18.</b> P120 N grubu mikrografi x400, H.E.....	33
<b>Şekil.4.19.</b> GDNF boyamasına ait negatif kontrol x400.....	35
<b>Şekil.4.20.</b> P90 K grubu GDNF boyaması x200 .....	35
<b>Şekil.4.21.</b> P90 K grubu GDNF boyaması x400.....	36
<b>Şekil.4.22.</b> P90 S grubu GDNF boyaması x200.....	36
<b>Şekil.4.23.</b> P90 S grubu GDNF boyaması x400 .....	37
<b>Şekil.4.24.</b> P90 N grubu GDNF boyaması x200.....	37
<b>Şekil.4.25.</b> P90 N grubu GDNF boyaması x400.....	38
<b>Şekil.4.26.</b> P105 K grubu GDNF boyaması x200.....	38
<b>Şekil.4.27.</b> P105 K grubu GDNF boyaması x400.....	39
<b>Şekil.4.28.</b> P105 S grubu GDNF boyaması x200.....	39
<b>Şekil.4.29.</b> P105 S grubu GDNF boyaması x400.....	40
<b>Şekil.4.30.</b> P105 N grubu GDNF boyaması x200.....	40
<b>Şekil.4.31.</b> P105 N grubu GDNF boyaması x400.....	41



<b>Şekil.4.32.</b> P120 K grubu GDNF boyaması x200.....	41
<b>Şekil.4.33.</b> P120 K grubu GDNF boyaması x400.....	42
<b>Şekil.4.34.</b> P120 S grubu GDNF boyaması x200.....	42
<b>Şekil.4.35.</b> P120 S grubu GDNF boyaması x400.....	43
<b>Şekil.4.36.</b> P120 N grubu GDNF boyaması x200.....	43
<b>Şekil.4.37.</b> P120 N grubu GDNF boyaması x400.....	44
<b>Şekil.4.38.</b> P90 K, S ve N grupları arasında GDNF' nin boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması.....	44
<b>Şekil.4.39.</b> P105 K, S ve N grupları arasında GDNF'nin boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması.....	45
<b>Şekil.4.40.</b> P120 K, S ve N grupları arasında GDNF' nin boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması.....	45
<b>Şekil.4.41.</b> Oct-4 boyamasına ait negatif kontrol x400.....	46
<b>Şekil.4.42.</b> P90 K grubu Oct-4 boyaması x200.....	47
<b>Şekil.4.43.</b> P90 K grubu Oct-4 boyaması x400.....	47
<b>Şekil.4.44.</b> P90 S grubu Oct-4 boyaması x200.....	48
<b>Şekil.4.45.</b> P90 S grubu Oct-4 boyaması x400.....	48

Şekil.4.46. P90 N grubu Oct-4 boyaması x200.....	49
Şekil.4.47. P90 N grubu Oct-4 boyaması x400.....	49
Şekil.4.48. P105 K grubu Oct-4 boyaması x200.....	50
Şekil.4.49. P105 K grubu Oct-4 boyaması x400.....	50
Şekil.4.50. P105 S grubu Oct-4 boyaması x200.....	51
Şekil.4.51. P105 S grubu Oct-4 boyaması x400.....	51
Şekil.4.52. P105 N grubu Oct-4 boyaması x200.....	52
Şekil.4.53. P105 N grubu Oct-4 boyaması x400.....	52
Şekil.4.54. P120 K grubu Oct-4 boyaması x200.....	53
Şekil.4.55. P120 K grubu Oct-4 boyaması x400.....	53
Şekil.4.56. P120 S grubu Oct-4 boyaması x200.....	54
Şekil.4.57. P120 S grubu Oct-4 boyaması x400.....	54
Şekil.4.58. P120 N grubu Oct-4 boyaması x200.....	55
Şekil.4.59. P120 N grubu Oct-4 boyaması x400.....	55
Şekil.4.60. P90 K, S ve N grupları arasında Oct-4'ün boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması.....	56

<b>Şekil.4.61.</b> P105 K, S ve N grupları arasında Oct-4'ün boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması.....	56
<b>Şekil.4.62.</b> P120 K, S ve N grupları arasında Oct-4'ün boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması.....	57
<b>Şekil.4.63.</b> C-kit boyamasına ait negatif kontrol.....	58
<b>Şekil.4.64.</b> P90 K grubu C-kit boyaması x200.....	58
<b>Şekil.4.65.</b> P90 K grubu C-kit boyaması x400.....	59
<b>Şekil.4.66.</b> P90 S grubu C-kit boyaması x200.....	59
<b>Şekil.4.67.</b> P90 S grubu C-kit boyaması x400.....	60
<b>Şekil.4.68.</b> P90 N grubu C-kit boyaması x200.....	60
<b>Şekil.4.69.</b> P90 N grubu C-kit boyaması x400.....	61
<b>Şekil.4.70.</b> P105 K grubu C-kit boyaması x200.....	61
<b>Şekil.4.71.</b> P105 K grubu C-kit boyaması x400.....	62
<b>Şekil.4.72.</b> P105 S grubu C-Kit boyaması x200.....	62
<b>Şekil.4.73.</b> P105 S grubu C-kit boyaması x400.....	63
<b>Şekil.4.74.</b> P105 N grubu C-kit boyaması x200.....	63
<b>Şekil.4.75.</b> P105 N grubu C-kit boyaması x400.....	64

<b>Şekil.4.76.</b> P120 K grubu C-kit boyaması x200.....	64
<b>Şekil.4.77.</b> P120 K grubu C-kit boyaması x400.....	65
<b>Şekil.4.78.</b> P120 S grubu C-kit boyaması x200.....	65
<b>Şekil.4.79.</b> P120 S grubu C-kit boyaması x400.....	66
<b>Şekil.4.80.</b> P120 N grubu C-kit boyaması x200.....	66
<b>Şekil.4.81.</b> P120 N grubu C-kit boyaması x400.....	67
<b>Şekil.4.82.</b> P90 K, S ve N grupları arasında C-Kit'in boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması.....	67
<b>Şekil.4.83.</b> P105 K, S ve N grupları arasında C-Kit'in boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması.....	68
<b>Şekil.4.84.</b> P120 K, S ve N grupları arasında C-Kit'in boyanma yoğunluğunun karşılaştırılması.....	68

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 3.1.</b> Deney gruplarının şematik gösterimi.....	15
<b>Çizelge 4.1.</b> Üçlü morfolojik değerlendirmelere ait istatistiksel veri tablosu.....	34

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidine (DAB)
<b>GDNF</b>	Glial Cell-line Derived Neurotrophic Factor
<b>OCT-4</b>	Octamer-binding Transcription Factor 4
<b>P</b>	Postnatal Gün
<b>SKH</b>	Spermatogonyal Kök Hücre
<b>SPG</b>	Spermatogonyum
<b>SOHLH</b>	Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix loop helix protein
<b>LD<sub>50</sub></b>	Ortalama Öldürücü Doz
<b>OSH</b>	Ortalama Standart Hata
<b>K</b>	Kontrol
<b>S</b>	Sham
<b>N</b>	Nikotin
<b>H.E.</b>	Hematoksilen-Eozin

## ÖZET

### Farelerde Puberte Sonrası Nikotin Maruziyetinin Spermatogonyal Farklılaşma Üzerine Olası Etkilerinin İmmün İşaretleme Yöntemleriyle İncelenmesi

Erkeklerde puberte sonrası dönemdeki erken yaşlarda sigara kullanımı çeşitli derecelerde üreme bozukluklarına neden olabilmektedir. Literatürde, sigaranın temel toksik komponenti olan nikotinin erkek üreme biyolojisi üzerine olan etkilerini moleküler düzeyde inceleyen çok az çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada, farelerde puberte sonrasına denk gelen postnatal 60 ve 90. günler arasındaki bir aylık süreçteki nikotin maruziyetinin spermatogonyal farklılaşma sürecini üzerine olan etkisinin morfolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 63 adet 60 günlük C57BL6J soy erkek fare P90, P105 ve P120'de kontrol, sham ve nikotin grupları olmak üzere toplam 9 gruba (n=7/grup) ayrılmıştır. Her bir yaştaki nikotin grubuna P60-90 arasında 3mg/kg dozunda nikotin subkutan olarak enjekte edildi. Sham grubuna serum fizyolojik sıvısı aynı yöntemle verildi. Kontrol grubu farelere ise kesim günlerine kadar hiçbir işlem uygulanmadı. Her yaşa ait farelerin seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıkları morfolojik olarak değerlendirildi. Elde edilen testis dokularındaki GDNF, Oct-4 ve C-kit immünohistokimyasal protein ekspresyonları semikantitatif olarak değerlendirildi.

Morfolojik değerlendirmelerde P90, 105 ve 120 nikotin gruplarına ait farelerin kontrol ve sham gruplarına kıyasla tübül çapı ve germinal epitel kalınlığı parametrelerinde istatistiksel olarak anlamlı azalmanın olduğu gözlemlendi. İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde ise tüm yaşlardaki nikotin grubu GDNF, C-kit Oct-4 protein ekspresyonlarının kontrol ve sham gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı semikantitatif olarak gösterildi. Kontrol ve sham grupları arasında bu değerler açısından anlamlı düzeyde farklılık tespit edilmedi.

Sonuç olarak, elde edilen verilerin hem spermatogonyal farklılaşma çalışmalarına hem de nikotine bağlı üreme bozukluklarının patogenezi mekanizmalarına ışık tutacağı düşünüldü.

**Anahtar Kelimeler:** Nikotin maruziyeti, spermatogonyal farklılaşma, erkek üremesi

## **ABSTRACT**

### **The Immunohistochemical Evaluation of the Effects of After-Puberty Nicotine Exposure on the Spermatogonial Differentiation of Mice.**

It's known that postpuberty smoking in men can lead to breeding problems. The existing literature has still lack of sufficient knowledge on the effects of nicotine exposure on the male breeding. Presently, it's aimed to investigate the effects of nicotine exposure during P60-90 just after the termination of the puberty on the spermatogonial differentiation in mice.

A number of 63 male C57BL6/J mice at the age of P60 were used. Our experimental design consist of 3 age groups (P90, P105 and P120) and main groups as Naive Control, Sham and Nicotine groups (n=7/group). By sub-cutaneous injections, a dose of 3mg/kg/body weight nicotine were given to the nicotine groups of mice. Paralelly, an iso-volumetric saline solution was also admistered to a group of body weight matched mice designated as the sham group. Naive controls were kept lack of any procedures until the harvesting days. Each group of mice testes were analysed for the body and testes weights, the diameter of and thickness of seminiferous tubules and expressions of GDNF, Oct-4 and C-kit proteins were evaluated.

By the morphological values of evaluated seminiferous tubules of nicotine groups as compared to the controls were observed as at lower degrees. A similar trend was also observed in terms of the immunohistochemical assesments of GDNF, Oct-4 and C-kit protein expressions. On the other hand, no significant difference was observed between the two controls.

In conclusion, we postulate that the findings of the present study will illuminate the near future studies for understading the spermatogonial differentiation.

**Key Words:** Nicotine Exposure, Spermatogonial Differentiation, Male Breeding



## 1. GİRİŞ

Erkeklerde puberte sonrası dönemdeki erken yaşlarda sigara kullanımının üreme üzerine olan ve hayat boyu süren olumsuz etkileri bilinmektedir (1). Günümüzde nedenleri tam olarak açıklanamayan içinde zekâ geriliğiyle karakterize gelişimsel kusurlardan, geniş bir yelpazede gözlenen pediatrik ve erişkinlik dönemi kanserleri ve nörodejeneratif hastalıkların da içinde olduğu uzun bir sağlık problemleri listesi bulunmaktadır ve sigara kullanımının bu idiyopatik hastalıkların baş şüphelilerinden biri olduğu düşünülmektedir. Literatürde yaygın olarak gebelik öncesinde ve gebelik sırasındaki maternal sigara kullanımının bir sonraki nesilde yarattığı etkiler üzerinde durulmaktadır (1, 2). Pek çok genetik ve çevresel faktöre ek olarak maternal sigara kullanımının erkek üreme sistemi gelişiminde bazı problemlere yol açabileceği ve dolayısıyla bu durumun sonraki nesilleri de dolaylı olarak etkileyebileceği düşünülmektedir (2). Ayrıca erkekler tarafından sigara kullanımının da erkek üreme biyolojisi üzerindeki olumsuz etkilerinin bir sonraki nesile yansiyabilen çok çeşitli derecelerde sağlık problemlerine yol açabileceğinden kuşulanılmaktadır (1, 2). Sigara içeriğinde birçok kimyasal zararlıyı barındırmakla birlikte esas etken maddelerinden birinin nikotin olduğu bilinmektedir. Nikotinin erkek üreme biyolojisi üzerindeki etkilerini moleküler düzeyde inceleyen çok az sayıda çalışma bulunmaktadır (2). Günümüzde erkek üremesinin altında yatan esas biyolojik olay olarak bilinen spermatogenez'in normal moleküler işleyişi hakkında halen yeterli düzeyde bilgi mevcut değildir. Normal spermatogenez işleyişinde rol oynayan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması şüphesiz ki genetik ve çevresel faktörlerin bu önemli biyolojik olayın işleyişi üzerindeki etkileri hakkında daha etkin anlaşılmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmada, hem spermatogenezin normal işleyişi sırasında rol oynayan bazı moleküler mekanizmaları hem de sigara içerisindeki esas zararlılardan biri olan nikotinin bu moleküler işleyiş üzerindeki olası olumsuz etkilerini incelemeyi amaçlanmıştır.

Çalışmadan elde edilecek sonuçların, erkekler tarafından sigara kullanımının bir sonraki nesilde yapacağı etkilerin anlaşılması için yapılacak çalışmalara temel ön bilgi oluşturacağını öngörmekteyiz.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Testis Histolojisi**

Erkek üreme sistemi testisler, genital boşaltım kanalları, aksesuar cinsiyet bezleri ve penisten oluşmaktadır. Aksesuar cinsiyet bezleri ise seminal veziküller, prostat ve bulboüretal bezler olarak bilinmektedir. Testis, spermatogenez ve steroidogenez olmak üzere başlıca iki fonksiyona sahiptir. Başlıca testosteron olmak üzere androjenler, spermatogenez için gereklidirler, erkek embriyonun fenotipik erkek fetusa embriyonik gelişiminde önemli rol oynarlar ve seksüel dimorfizmden sorumludurlar (3).

Erkek üreme organı olan testisler, sağlı sollu olmak üzere bir çift halinde ve vücut boşluğu dışında yer alan skrotum adı verilen deri içerisinde bulunmaktadırlar. Testisin temel iki görevi hormon ve spermatozoon üretmektir. Testisler, tunika albuginea adı verilen yoğun bağ dokudan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidirler. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturmaktadır. Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar, bezi testiküler lobüller denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırırlar. Tam boşluk şeklinde olmayan bu uzantılar ve bölmeler çoğunlukla birbiriyle ilişkilidir. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül yer almaktadır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) içermektedir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testiküler androjenleri salgılamaktadırlar (3, 4).

### **2.2. Seminifer Tübüller**

Spermatozoonlar seminifer tübüllerde üretilmektedir. Her testiste yaklaşık 250 – 1000 seminifer tübül bulunmaktadır. Her seminifer tübül yaklaşık 150 - 200 µm çapında

ve 30 - 70 cm uzunluğunda olup ve tek bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Seminifer tübüller karmaşık yapıda bir epitel ile döşelidir. Tübüllerin kıvrımlı ve başlangıçta kör uçlu olduğu sonlanırken lümenin daraldığı ve düz tübüller ya da tubuli rekti olarak anılan kısa segmentler halinde devam ettiği bilinmektedir. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlamaktadır. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10 - 20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmında bağlanmaktadır (4).

### **2.3. Seminifer Tübul Epiteli**

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal epitel ya da seminifer epitelden oluşmaktadır. Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmaktadır. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içermektedir. Seminifer epitelde iki tip hücre bulunmaktadır; bunlar Sertoli, destek ya da sustentaküler hücreler ile spermatogenezdeki seriyi oluşturan hücrelerdir. Spermatogenik seri hücreleri 4 - 8 tabaka halinde düzenlenmiştir; işlevleri spermatozoonları üretmektir (3).

### **2.4. Kemirgenlerde Spermatogenez**

Kemirgenlerde, rezerv kök hücre özelliğinde olan Tip A (single) spermatogonyumların (SPG) (As) kendini yenileme ve farklılaşma özelliklerine sahip olduğu bilinmektedir. As'ler farklılaşarak Tip A (paired) Spg'ları (Ap) oluşturmaktadırlar. Ap'ler ise Tip A (aligned) (4, 8, 16, 32) alt birim Spg'lara (Aal) farklılaşmaktadır. Daha sonra Tip Aal Spg'lar farklılaşarak Tip A1 Spg'ları ve 6 bölünme evresiyle Tip A2, A3, A4, Intermediate ve Tip B SPG'ları oluşturmaktadırlar. Tip B SPG'lar ise farklılaşarak primer spermatositleri oluşturmaktadırlar. Primer spermatositler birinci mayoz bölünme ile sekonder spermatositleri, sekonder

spermatositler ise ikinci mayoz bölünme ile spermatidleri oluşturmaktadırlar. Spermatidler farklılaşma basamaklarıyla spermere dönüşmektedir. Kemirgenlerde spermatogenez süreci yaklaşık 8,6 gün sürmektedir (5).

## **2.5. İnsanlarda Spermatogenez**

Spermatogenez, seminifer tübüllerde gerçekleşen SPG'dan sperm gelişimi süreci olarak bilinmektedir. İnsanda, spermatogonyal öncül hücreler fetal hayatta inaktif durumda olmakla beraber puberte ile birlikte mitoz bölünmelerle sayılarını arttırmaktadırlar. İnsanda tanımlanan üç tip SPG bulunmaktadır. Bunlar; Tip A dark (Ad) SPG, Tip A pale (Ap) SPG ve Tip B SPG olarak bilinmektedir. Bunlardan Tip Ad SPG'ların rezerv kök hücre özelliğinde olduğu bilinmektedir. Tip Ad SPG'lar mitotik bölünmelerle spermatogonyal nüfusun belli bir aralıkta tutulmasını ve ek olarak farklılaşarak Tip Ap SPG'ların oluşmalarını sağlamaktadırlar. Tip Ap SPG'lar mitoz bölünmelerle Tip B SPG'lara farklılaşmaktadırlar. Tip B SPG'lar da daha sonra farklılaşarak primer spermatositleri oluşturmaktadırlar. Primer spermatositler ise birinci mayoz bölünme ile sekonder spermatositleri, sekonder spermatositler ise ikinci mayoz bölünmeyi geçirerek haploid sayıda kromozom içeren spermatidleri meydana getirmektedirler. Oluşan spermatidler birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlı oldukları için, SPG'lardan spermatid oluşumuna kadar geçen evreye spermatositogenez denilmektedir. Spermatidlerden sperm oluşumu yani farklılaşma evresi dört basamağı kapsamaktadır. Bunlar; akrozom oluşumu, çekirdeğin kondanse olması, boyun, orta parça ve kuyruk oluşumu ve fazla sitoplazmanın atılması olarak bilinmektedir. Spermatogenez süreci insanda ortalama 72 gün sürmektedir ve puberteden hayatın sonuna kadar döngüsel olarak devam etmektedir (6).

## **2.6. Spermatogonyal Kök Hücreler**

Testisteki erişkin kök hücre popülasyonu olan spermatogonyal kök hücrelerin (SKH'lerin) normal biyolojik aktivitelerinin spermatogenez döngüsünün sağlıklı

işleyebilmesi için şart olduğu bilinmektedir. Bu hücreler postnatal hayatta ortaya çıkmakta ve hayat boyu devamlılığını sürdürmektedir. SKH'ler erişkin fare testisinde 3000 de 1 konsantrasyonunda bulunmaktadır (7). Günümüzde hala, SKH'lerin fenotipik karakterleri ve bu hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyen mekanizmalar hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Diğer erişkin kök hücrelere benzer şekilde, SKH'lerin kendini yenileme ve farklılaşma dengesi çok çeşitli ekstrinsik ve intrinsik faktörler tarafından regüle edilmektedir (8).

### **2.6.1 Spermatogonyal Kök Hücrelerin Kökeni**

Postnatal dönemde, SKH'ler gonositler olarak adlandırılan henüz farklılaşmamış hücrelerden, bu hücreler ise genital kabartıya göç eden ve embriyonik gonad oluşumuna katılan primordial germ hücrelerinden köken almaktadır (8). Gonositlerin SKH'lere dönüşümü erkek farelerde postnatal 0 – 6 günler arasında gerçekleşmekte ve ilk biyolojik aktiviteleri yaklaşık postnatal 3 – 4 günler arasında gözlenmektedir (9). Diğer türlerde, gonositlerin SKH'lere dönüşümü birkaç ay sürmektedir. İnsan ve diğer primatlarda ise bu zaman süreci yıllarla ifade edilmektedir.

Farelerde yapılan çoğu çalışmada, yenidoğan fare testisinde 2 farklı tip gonosit popülasyonu bulunduğu gösterilmiştir; ilk popülasyondaki gonositler kendilerini yenileme bölünmelerini geçirmeden direkt olarak farklılaşmış SPG'lara dönüşürler. İkinci popülasyondaki gonositlerin ise, spermatogenez sürecinin tüm aşamalarını geçirdikleri bilinmektedir (10, 11, 12).

### **2.6.2. Spermatogonyal Kök Hücre Nişi**

SKH'ler, hayat boyu, seminifer epitelin bazal kompartmanında aynı zamanda özelleşmiş mikroçevre olan ve “niş” olarak da adlandırılan bölgede bulunmaktadır. Bu niş kök hücrelerin kendini yenileme, baskılanma, tek ya da çoklu farklılaşma gibi spesifik özelliklerini regüle etmektedir (13, 14). SKH nişinin oluşmasında ve fonksiyonunu yerine getirmesinde somatik hücreler önemli rol oynamaktadır.

Sözkonusu nişin oluşmasında Sertoli hücreleri, peritübüler miyoid hücreler ve Leydig hücrelerinin rol oynadığı bilinmektedir (14).

Sertoli hücreleri, seminifer epitelin tek somatik hücreleri olmakla birlikte; glial hücre bağımlı nörotrofik faktör (GDNF), esas fibroblast büyüme faktörü (Bfgf)ve epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi birçok büyüme faktörünü SKH'lerin büyümesi ve kendilerini yenilemeleri için sekrete etmektedirler (15, 16).

Leydig hücreleri ve peritübüler miyoid hücreler, kan dolaşımıyla gelen maddeleri, SKH'ler ve SPG'ların hayatta kalmaları için kontrol etmektedirler. Tüm bu dış yolakların, kök hücrelerin hayatta kalmaları için kritik rol oynadıkları bilinmektedir (17).

## **2.7. Kemirgenlerde Spermatogonyal Farklılaşma**

Kemirgenlerde, SKH'ler Tip As olarak bilinmektedir. Bu hücrelerin hem bölünerek kendilerini yeniledikleri ve kök hücre popülasyonunu oluşturdukları, hem de farklılaşma yoluna girerek Tip Ap SPG'ları ürettikleri bilinmektedir. Tip As SPG'ların kendilerini yenilemeleri ile Tip Ap SPG'lara farklılaşmaları arasında sıkıca düzenlenmiş bir denge olduğu bildirilmiştir (17, 18). Bu dengenin spermatogenezin hayat boyu sağlıklı bir şekilde sürmesini sağlayan önemli bir işleyiş olduğu düşünülmektedir. Tip As SPG'ların kendilerini yenileme fonksiyonlarını kaybedip sadece Tip Ap SPG'lara farklılaşmaya gitmesi durumunda spermatogenezin devamlılığı için şart olan kök hücre rezervi özelliği taşıyan Tip As SPG hücre popülasyonunun tamamen ortadan kalkacağı düşünülmektedir. Bunun tam aksine, Tip As SPG'ların farklılaşma özelliklerini kaybedip sadece kendilerini yenilemeye doğru yön değiştirmeleri durumunda ise kök hücre rezervinde aşırı artış olacağı düşünülmektedir (4). Mutant fareler kullanılarak yapılan çalışmalarda ID4, ZBTB ve Nanos2 gibi genlerin bu dengenin ayarlanmasında önemli rol oynadıkları gösterilmiştir (18, 19, 20). İlginç olarak, ID4 geninin farelerde bu dengenin ayarlanması sırasında spesifik olarak sadece Tip As SPG'larda eksprese edildiği gösterilmiştir. ID4'ün in vitro ortamda ekspresyonunun azalması SKH'lerin çoğalmasının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (18). Ayrıca, ID4 geninin farelerde çıkartılması, germ hücre silinmesi ve erkek kısırlığı ile sonuçlanmıştır (18).

Tip Ap ve Tip Aal SPG'lar spermatogonyal farklılaşmanın öncülleri olarak görünmelerine rağmen, son zamanlarda Tip Ap ve Tip Aal SPG'ların da kök hücre potansiyeline sahip oldukları yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir (21). Diğer yandan, spermatogonyal farklılaşmadaki dengenin korunmasında rol oynayan bir başka önemli gen olan Nanos2'nin ise Tip As ve Tip Ap SPG'larda eksprese edildiği gösterilmiştir (20). Farelerde postnatal hayatta Nanos2 geninin çıkartılması ya da ekspresyonunun arttırılması sırasıyla farklanmamış SPG'ların silinmesi ya da birikmesiyle sonuçlanmıştır (20). Yukarıda bahsedilen spermatogonyal farklılaşmada önemli fonksiyonu olduğu ortaya konulan genlerin yanı sıra GDNF adı verilen sinyal yolunun da bu biyolojik süreçte önemli roller üstlendiği yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir (21, 22, 23). Bir büyüme faktörü olan GDNF esas olarak Sertoli hücreleri ve peritübüler miyoid hücreler tarafından salgılanmaktadır (24, 25, 13). Bu büyüme faktörünün in vitro ortamda SKH çoğalmasını ciddi ölçüde aktive ettiği gösterilmiştir (26, 27, 28). GDNF'nin ekspresyonu ile birlikte spermatogonyal yenilenmede önemli rolü olan ID4 ve Bcl6b gibi genlerin de aktive olduğu gösterilmiştir (18, 29). GDNF'nin fazla eksprese olması durumunda farklılaşmamış SPG'ların arttığı, ekspresyonun olmadığı durumlarda ise SKH'lerin kayboldukları ve germ hücrelerinin belirgin şekilde azaldığı gözlenmiştir (22, 30).

Sonuç olarak, GDNF ekspresyonunun SKH'lerin kendini yenilemesi ve farklılaşması arasındaki dengenin düzenlenmesinde çok önemli olduğu görülmektedir. Bu sinyal yolu spermatogonyal yenilenmenin düzenlenmesinde bilinen en güçlü mekanizmadır (26, 27, 28, 29, 30).

Spermatogonyal farklılaşmanın bir sonraki basamağı olan, Tip Aal SPG'ların geç formlarının A1 SPG'a farklılaşmasında ise bir tirozin kinaz reseptörü olan C-Kit adlı genin önemli rol oynadığı gösterilmiştir (31, 32). C-Kit geninin çıkarılması durumunda Tip Aal Spg'dan A1 SPG'un farklılaşmasının bloke olduğu gösterilmiştir (32, 33). Spermatogonyal farklılaşmada önemli rol oynayan bir diğer önemli faktör ise spermatogenez ve oogeneze özel temel sarmal döngü sarmal (Sohlh) proteinleridir. Farelerde bu protein ailesine ait Sohlh1 geninin Aal, A1-4, Intermediate ve Tip B SPG'larda eksprese olduğu (34), ailenin diğer üyesi olan Sohlh2 geninin ise tüm Tip A SPG formlarında (As, Ap, Aal, A1-4) eksprese edildiği gösterilmiştir (34). Dikkat çekici bir şekilde farklılaşmış Tip B SPG'larda Sohlh1 geninin eksprese olduğu, Sohlh2



geninin ise eksprese olmadığı gösterilmiştir (35). Bu iki genden herhangi birinin genetik olarak çıkarılması durumunda anormal spermatozoid oluşumuna eşlik eden infertilitenin ortaya çıktığı gözlenmiştir (34, 36). Bazı genetik çalışmalarda bu genlerin ekspresyon düzeylerinde oluşan değişikliklerin C-Kit geninin ekspresyonunda da önemli değişimlere yol açtığı gösterilmiştir (34, 37).

## 2.8. İnsanlarda Spermatogonyal Farklılaşma

İnsan SPG'ları morfolojik kritere göre; Tip Ad, Tip Ap ve Tip B olarak sınıflandırılmaktadır. Tip Ad SPG'lar, ince granüler kromatinli koyu bazofilik boyanan heterokromatik oval nükleusa sahip hücreler olarak bilinmektedirler. Bu hücreler seminifer epitelin rezerv kök hücre popülasyonu olup en immatür hücreler olarak bilinirler. Belirli aralıklarla bölünerek hem yeni Tip Ad SPG'ları hem de farklılaşarak Tip Ap SPG'ları oluşturmaktadırlar. İnce granüler kromatinli açık renk boyanan önkromatin nükleusa sahip olan Tip Ap SPG'lar mitozla bölünerek Tip B SPG'ları meydana getirmektedirler. Tip B SPG'lar ise, genel olarak nüklear zarf boyunca ve merkezî bir nükleolusun çevresinde geniş kümeler oluşturacak şekilde yoğunlaşmış kromatini bulunan yuvarlak nükleuslara sahiptirler (38).

Yakın geçmişte, erişkin primat testisinde SKH'lerin fenotipik ve moleküler karakteristikleri tanımlanmıştır. İnsan SPG'larının karakteristiği hakkındaki bilgiler ise oldukça kısıtlıdır (39). Yapılan çalışmalarda, Tip Ad SPG'larının daha immatür özelliğe sahip olduklarını gösteren plazma membran proteini bileşeni olan EXOSC10 molekülünü yüksek oranda eksprese ettikleri, Tip Ap ve Tip B SPG'ların ise Tip Ad'lerden farklı olarak hücre proliferasyonu ile karakterize olan Ki-67 molekülünü yüksek oranda eksprese ettikleri gösterilmiştir (40). Yukarıda bahsedilen genlerin yanı sıra, CD49f, CD133, PLZF, SSEA-4, MAGE-4, GPR-125, VASA, DAZL ve CD90 gibi genlerin de insan SPG'larında yoğun bir şekilde eksprese olduğu gösterilmiştir (41, 42, 43, 44). Bu konuyla ilgili çok sayıda araştırma bulunmasına rağmen, günümüzde hala erişkin insan SKH'lerine ait moleküler ve fenotipik karakteristiklerin yeteri kadar aydınlatılmadığı yaygın olarak kabul görmektedir (44).

## 2.9. Nikotin

Sigara kullanımını gelişmekte olan ÷lkelerde özellikle gençler ve erişkinler arasında önlenabilir ölüm nedenlerinden biri olup halk sağlığını tehdit etmektedir. Sigara dumanı toksik ve karsinojenik etkisi bulunan 4000'den fazla kimyasaldan oluşan kompleks bir karışım olarak bilinmektedir (45). Sigaranın major toksik bileşeni; piridin ve pirolidin halkasından oluşan ve *Nicotiana tobacum* bitkisinin yapraklarından izole edilen kuvvetli bir alkaloid olan nikotin olarak bilinmektedir (46, 47).

### 2.9.1 Nikotinin Kimyasal Özellikleri

Nikotinin kimyasal adı; (S)-3-(1-Methyl-2-pyrroli-dinyl) pyridine'dir. Sıvı, renksiz, uçucu, suda çözünebilen toksik bir bileşiktir. Hava ve ışığa maruz kaldığında renk değiştirerek sarı ve koyu kahve renye dönüşmekte ve böylece viskozitesi artmaktadır. Nikotin, en yüksek oranda tütün bitkisinin yapraklarında bulunmaktadır. Normal bir sigara 20 mg nikotin içermesine rağmen yakarak içildiği için vücuda 0,5-1,5 mg arasında nikotin alınmaktadır (48).

### 2.9.2 Nikotin Absorbsiyonu

Nikotinin hücresele membranlarda absorpsiyonu pH bağımlı bir olay olarak bilinmektedir. Ph asidik ise nikotin iyonize olmakta ve hücresele membranlardan kolayca geçememektedir. Fizyolojik pH' da (pH=7,4) ise nikotinin iyonize olmadığı, bu sayede hücresele membranlardan kolayca geçtiği, %5'inin plazma proteinlerine bağlandığı ve %60-80'inin solunum yolu ile absorbe olduğu bilinmektedir. En hızlı absorpsiyon alveoller ile geniş yüzeye sahip olan akciğerlerde gerçekeşmektedir. Az bir kısmı asidik ortamı nedeniyle midede absorbe olmakta daha alkali pH' ya ve geniş yüzeye sahip olan ince barsakta ise daha fazla absorpsiyon gerçekeşmektedir (49, 50).

Otopsi örneklerinde yapılan çalışmalar sonucunda en yüksek afinitenin karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde en az afinitenin ise yağ dokusunda olduğu rapor edilmiştir (51). Ayrıca, plasental membranları geçerek fôtusa ulaşabildiği de bilinmektedir. Nikotin atılımı ise feçes, üre, gastrik sıvı, ter ve süt bezleri yoluyla gerçekleştirmektedir. İnsan kanında yarı ömrünü 2-3 saatte tamamlayarak kaybolmaktadır (52, 53).

### **2.9.3 Nikotin Metabolizasyonu**

Nikotin insanlarda karaciğer tarafından 6 primer ve birçok yan metabolite metabolize olmaktadır (54, 55, 56, 57). Memelilerde en önemli metaboliti kotinindir ve insanlarda alınan nikotinin %70-80 kadarı C-oksidasyonu yoluyla kotinine metabolize olmaktadır. Metabolizasyonu; sitokrom P450 bağımlı monooksijenazlar ile gerçekleşen nikotinin hidrosilizasyonu ve sitozolik bir enzim aracılığı ile nikotinin yerini tutabilecek bir aldehit olan kotininin üretimi ile başlamaktadır. Nikotinin C-oksidasyonu ile kotinine metabolize olmasından sorumlu enzim P450 2A6 olarak bilinmektedir (54).

### **2.9.4. Nikotin Toksikitesi**

Deney hayvanlarında nikotinin ortalama öldürücü dozu ( $LD_{50}$ ) değişkendir ve bu değişkenliğin kullanılan hayvan türünden ve nikotinin verilme yönteminden kaynaklandığı rapor edilmiştir (58). Farelerde vücut ağırlığına göre intravenöz olarak verilen nikotinin  $LD_{50}$  değeri 7,1 mg/kg iken intraperitoneal olarak verilen nikotinin  $LD_{50}$  değeri 5,9 mg/kg olarak belirlenmiştir (58, 59). Sıçanlarda vücut ağırlığına göre oral yolla verilen nikotinin  $LD_{50}$  değerinin ise 50 mg/kg ile 60 mg/kg arasında olduğu tespit edilmiştir (60). Kemirgenlerde nikotinin toksik etkisine duyarlılığın genetik olarak belirlendiği düşünülmektedir (61).

## 2.10. Nikotin ve Erkek Üreme Sistemi

Günümüzde sigara sağlığı tehdit eden ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılan maddelerden biri olarak kabul görmektedir (62). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 yılında yayınladığı verilere göre dünya popülasyonunun üçte biri yani yaklaşık 1 milyar 300 milyon kişi sigara içmektedir (63). Sigara kullanımı, akciğer, böbrek, özefagus, kolon ve mesane kanserlerinin yanı sıra, kronik astım, solunum yetmezliği, amfizem, diabetes mellitus, kardiyovasküler sistem hastalıkları gibi çok sayıda sağlık sorununa neden olmaktadır. Günümüzde erkek bireylerin sigara kullanımının sperm sayısında, konsantrasyonunda, motilitesinde ve morfolojisinde olumsuz etki yarattığı açıkça bilinmektedir.

Yapılan bir çalışmada sigara içen ve içmeyen erkek bireylerin sperm konsantrasyonları karşılaştırılmış ve sigara içen bireylerin sperm konsantrasyonlarının içmeyen erkek bireylere göre %13 oranında daha düşük olduğu rapor edilmiştir (64). Yapılan başka bir çalışmada, erkek fareler sigara dumanına maruz bırakılmış ve epididimis dokularından spermler izole edilerek morfolojik olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak; baş-boyun defektleri ve kuyruk defektleri görülme sıklığının %20 oranında arttığı rapor edilmiştir (65). Yapılan diğer bir çalışmada ise, sigaradaki majör toksik komponent ve doğal bir alkaloid olan nikotinin, plazma proteini olan tübüline bağlanarak sperm nükleusunda mikrotübül polimerizasyonunu bozduğu ve dolayısıyla da mayoz mekiğinin bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir. Mayoz mekiğinin kutup-kutup uzunluğunun normalden daha kısa, ekvatoryal uzunluğun ise normalden daha geniş olduğunu gözlemlenmiştir. Ayrıca, kromozomların biraraya gelemediği yani kromozomal ayrılma defektleri olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre nikotinin kromozom sayısında artma ya da azalmaya neden olabileceği rapor edilmiştir (66, 67).

Memelilerde nikotinin metaboliti olan kotinin seminal plazma bileşiminde tespit edilmiştir, dolayısıyla kan- testis bariyerini geçebildiği anlaşılmıştır (68, 69). Sigara içen ve içmeyen erkek bireylerin seminal plazma kotinin seviyesinin karşılaştırıldığı bir çalışmada sigara içmeyen bireylerin kotinin seviyesinin 1ng/mol, sigara içen bireylerin ise 15ng/mol olduğu rapor edilmiştir (70).

Sigara dumanında bulunan çeşitli mutajenik, karsinojenik maddeler ve nikotin oksidatif strese neden olan reaktif oksijen türevlerini içermektedirler. Oksidatif stres ilk

olarak sperm DNA'sında hasara neden olmakta ve oluşan bu hasar sonucunda infertilite gözlenebilmektedir. İkinci olarak oksidatif stres, spermın mitokondriyal membrandan zengin orta parçasında hasar oluşturmakta ve hücre içindeki ATP'nin hızlı kaybıyla sperm motilitesinde azalma gözlenmektedir (71).

Literatürde yer alan bir başka çalışmada ise, daha önce doğum yapmamış dişi sıçanlara çiftleşme işleminin 2 hafta öncesinden süt kesimine kadar günlük 1mg/kg dozunda subkutan enjeksiyon yolu ile nikotin enjekte edilmiş ve gebe kalmaları sağlanmıştır (72). Yeni nesildeki sham ve nikotin grubu annelerden doğan erkeklerin testis ve epididimis dokuları postnatal 7. ve 26. haftalarda histolojik olarak karşılaştırılmıştır. Sham grubuna ait seminifer tübüllerin oldukça düzenli olduğu ve spermatojenik hücre serisine ait tüm hücrelerin gözlendiği rapor edilmiştir. Buna karşın, nikotin grubuna ait seminifer tübüllerin ise morfolojisinin yüksek oranda bozulduğu, vakuol oluşumuyla beraber spermatojenik hücre serisine ait tabaka kalınlığının azaldığı ve hücrelerin lümenine doğru döküldüğü bildirilmiştir (72).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmanın Aşamaları ve Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi (MEÜ) Tıp Fakültesi Dekanlığı, Hayvan Etik Kurul Başkanlığı'nın onay raporu ile yürürlüğe girmiştir. Çalışmamızda deney hayvanı modeli oluşturulması, gerekli dokuların elde edilmesi ve dokuların kullanım aşamasına kadar muhafaza edilmesi işlemleri, MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan elde edilmiş 63 adet 60 günlük C57BL6J soy erkek fare kullanılmıştır. Çalışmamız üç ana yaş grubu (P90, P105 ve P120) ve her yaş grubu kendi içerisinde kontrol (K), sham (S), nikotin (N) olmak üzere üç alt grubu içermektedir. Tüm yaş günlerindeki N grubu farelere 4 hafta boyunca (60. yaş gününden 90. yaş gününe kadar) hergün her seferinde vücut ağırlıklarına göre 3 mg/kg dozunda subkutan enjeksiyon yoluyla serum fizyolojik içerisinde çözdürülmüş 100 µL hacminde nikotin (Sigma N-0267) solüsyonu uygulanmıştır. Uygulanan doz orta düzey içiciliği modellemektedir. Tüm yaş günlerindeki S grubu farelere 100 µL hacimde serum fizyolojik sıvısı aynı zaman aralığında ve aynı yöntemle verilmiştir. Nikotin ve serum fizyolojik uygulamaları fareler 90. yaş gününe gelince sona erdirilmiştir. Deney tasarısında belirlenen P90, P105 ve P120. yaş günlerinden P90 nikotinin akut etkisini ortaya koymuştur. P105 insanlarda sigara bırakıldıktan 6 ay sonraki, P120 ise 12 ay sonraki etkisini ortaya koymuştur. Fareler 90, 105 ve 120. yaş günlerine kadar standart laboratuvar kafeslerinde barındırılarak (her bir yaş grubu için n=7) ilgili yaş günlerinde uygun anestezi altında bilateral testis dokuları çıkarılmış ve halen anestezi altındayken dekapite edilerek sakrifiye edilmişlerdir. K grubu fareler ise kesim günlerine kadar hiçbir uygulama yapılmayarak standart laboratuvar şartlarında barındırılmış ve aynı günlerde (90, 105 ve 120. günler) diğer iki gruba uygulanan işlemler uygulanmıştır.

**Çizelge 3.1.** Deney gruplarının şematik gösterimi.

P90	P105	P120
K (n: 7)	K (n: 7)	K (n: 7)
S (n: 7)	S (n: 7)	S (n: 7)
N (n: 7)	N (n: 7)	N (n: 7)

### **3.2. Subkutan Enjeksiyon Uygulamasının Alıştırma Dönemi**

Çalışmamızda subkutan enjeksiyon uygulamasının S ve N grubu fareler üzerinde oluşturabileceği muhtemel stresin etkilerini en aza indirmek amacıyla; asıl deney başlangıç günü olan P60'den 1 hafta önce (54. günde) deneylerde uygulanacak hacime denk serum fizyolojik solüsyonu 1 hafta boyunca hergün subkutan enjeksiyon yöntemiyle söz konusu grup farelere uygulanmıştır. Bu bir haftalık süreçte her bir farenin kafes içi rutin davranışlarında stres benzeri davranışlar olup olmadığı gün içerisinde periyodik olarak gözlenmiş ve vücut ağırlıkları ölçülmüştür.

### **3.3. Nikotin Dozunun Hesaplanması**

Yukarıda bahsedildiği üzere çalışmamızda 3 mg/kg dozunda sıvı nikotin solüsyonu ve ona denk hacimde serum fizyolojik sıvısı farelere subkutan enjeksiyon yoluyla verilmiştir. Söz konusu hesaplama 30 günlük deney süresince tüm farelerin ortalama 25 gr ağırlığında olduğu kabul edilerek hesaplanmıştır. Her bir fareye tek bir seferde 3 mg/kg dozunda nikotin solüsyonu 100 µL hacminde verilmiştir. Bu işlem 30 gün boyunca tekrarlanmıştır.

3 mg/kg doz için; 25 gr bir farenin alması gereken nikotin miktarı 0,075 mg olarak hesaplanmıştır. Çalışmamız için kullandığımız nikotin solüsyonu, 490 µL olup içinde 500 mg nikotin içermektedir. Buna göre bu solüsyonun 0,0735 µL hacminde 0,075 mg nikotin olduğu hesaplanmıştır. Söz konusu hacimdeki nikotin solüsyonuna 99,9265 µL hacminde steril serum fizyolojik solüsyonu ekleyerek bir fareye tek seferde vereceğimiz 100 µL hacimde ve 3mg/kg dozunda nikotin solüsyonu elde edilmiştir.

Fakat söz konusu hacimlerin küçüklüğü ve 30 gün boyunca her gün 27 fareye nikotin uygulaması yapılacağı düşünüldüğünde ilgili solüsyonun çoklu hazırlık aşamalarındaki hata payının yüksek olabileceği öngörüldüğünden dolayı, tüm deneyler için gerekli olan (30gün X 27 fare) nikotin solüsyonu tek seferde hazırlanmıştır. Buna göre, stok nikotin solüsyonundan;  $30 \text{ gün} \times 27 \text{ fare} \times 0,0735 \text{ } \mu\text{L} = 59,535 \text{ } \mu\text{L}$  hacminde nikotin solüsyonu uygun bir mikro pipet aracılığıyla çekilerek; üzerine  $80940,465 \text{ } \mu\text{L}$  serum fizyolojik solüsyonu eklenmek suretiyle  $81 \text{ mL}$  hacminde ( $3 \text{ mg/kg}$  dozunda) nikotin solüsyonuna dönüştürülmüştür. Tüm bu işlemler steril koşullarda gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan bu ana stoktan her 3-4 deney gününde bir yeteri miktarda solüsyon  $5 \text{ mL}$ 'lik steril enjektörün içerisine alınıp daha sonra her deney günü steril insülin enjektörlerine  $100 \text{ } \mu\text{L}$  çekilerek farelere deri altı enjeksiyon yoluyla verilmiştir. S grubu farelere ise; N grubu farelere denk olarak her bir uygulamada  $100 \text{ } \mu\text{L}$  hacmindeki serum fizyolojik solüsyonu aynı yöntemle uygulanmıştır. Tüm deneyler boyunca her bir fareye deri altı enjeksiyonu her seferinde yeni ve steril insülin enjektörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### **3.4. Testis Dokularının Elde Edilişi ve Fiksasyon**

K, S ve N grubuna ait farelerin testis dokuları P90, P105 ve P120'de  $50 \text{ mg/kg}$  Ketamin ve  $8 \text{ mg/kg}$  Ksilazin anestezisi altında izole edilmiştir. Çıkarılan testis dokuları hızlıca  $+4^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta  $0,1\text{M}$ 'lık sodyum fosfat ile tamponlanan  $\%4$ 'lük paraformaldehit tespit solüsyonu içerisinde 24 saat immersiyon fiksasyonuna alınmıştır. Histolojik takip tüm deney dokuları izole edilene kadar gerçekleştirilmemiştir. Bu süre boyunca testis dokuları  $+4^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta  $0,1\text{M}$ 'lık sodyum fosfat ile tamponlanan  $\%0,1$ 'lik paraformaldehit tespit solüsyonu içerisinde muhafaza edilmiş ve solüsyon haftalık olarak yenisiyle değiştirilmiştir. Tüm gruplara ait testis dokularının elde edilmesiyle birlikte, dokular parafin bloklara gömülmeden önce laboratuvarımızda rutin olarak kullanılmakta olan ışık mikroskopik doku takibi protokolüne uygun şekilde takip edilmiştir. Daha sonra parafin bloklara tekli olarak gömülen testis dokularından polilizin kaplı lamlara  $5 \text{ } \mu\text{m}$ 'lik mikrotom kestileri alınarak histolojik ve immünohistokimyasal boyamalar için hazır hale getirilmiştir.



### 3.5. Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi

Işık mikroskopik inceleme için P90, P105 ve P120'lere ait yukarıda verilen protokole uygun şekilde fikse edilmiş testis dokuları musluk suyunda 24 saat yıkandıktan sonra aşağıdaki histolojik takip protokolüne alınmıştır.

1. Etil alkol (%70)	15 saat
2. Etil alkol (%80)	45 dk
3. Etil alkol (%90)	45 dk
4. Etil alkol (%96)	45 dk
5. Etil alkol (%96)	45 dk
6. Etil alkol (%96)	45 dk
7. Etil alkol (%96)	45 dk
8. Ksilol	15 dk
9. Ksilol	15 dk
10. Ksilol- Parafin (1:1)	1 saat
11. Ksilol- Parafin (1:2)	15 dk
12. Parafin	15 dk
13. Parafin	2,5 saat
14. Bloklama	

### 3.6. Histolojik ve İmmünohistokimyasal İnceleme

Parafin bloklardan elde edilen 5 µm'lik kesitler Hematoksilen – Eozin (H.E.) boyama yöntemiyle boyanmıştır. Ayrıca bu kesitler anti-Oct-4 (Abcam), GDNF (Santa Cruz) ve C-kit (Cell Signaling) primer antikorları ile işaretlenerek ışık mikroskopik olarak incelenmiştir.

Farklı yaş gruplarına ait gruplardaki GDNF, Oct-4 ve C-kit protein ekspresyonlarının semi-kantitatif olarak karşılaştırılması amacıyla immünohistokimyasal H skorlaması yöntemi kullanılmıştır (73, 74, 75). Buna göre her gruba ait

her bir fare testisinden elde edilen 5 µm aralıkdaki üç ardışık kesitte boyanan immünohistokimyasal görüntüler kullanılmıştır. Gerçekleştirilecek analiz için kesitlere ait görüntüler Nikon Eclipse Ti marka inverted mikroskobunun 40 büyütme objektifi kullanılarak alınmıştır. Parlak-alanlı görüntüler her antikora uygun kurulum ve ışık zamanına göre alınmıştır. İmmünohistokimyasal boyalı görüntüler halka açık kullanıma olan Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD) görüntü analiz yazılımı kullanılarak 16-bit renk formatına dönüştürülüp daha sonra kalibrasyon ayarı, 256 seviyeli gri skalaya göre ayarlanmıştır. Görüntüsü alınan testis dokusundaki kesitler yukarıda bahsedilen her bir kesitteki (testis/üç kesit) en az iki tübül görüntüsünde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra her bir tübül dört eşit parçaya bölünerek sol alt kadranda lokalize olan ardışık her iki hücrenin (10 adet hücre) periferleri aynı yazılımın ilgi alanının yazılımdaki *serbest el seçeneği* yardımıyla çevrelenerek boyanma yoğunlukları ölçülmüştür. Her bir nükleusun gri skalaya göre ölçülen boyanma piksel yoğunluk değerleri; 0-30 = 0 (boyanma yok), 30-60 = 1 (az boyanma), 60-90 = 2 (orta boyanma), 90-120 = 3 (kuvvetli boyanma) dilimlerine bölecek şekilde skorlanmıştır. Bunun sonucunda her bir kesit için az boyanan hücrelerin yüzdesi x 1 +, orta boyanan hücrelerin yüzdesi x 2 +, iyi boyanan hücrelerin yüzdesi x 3 + denklemi ile 0-400 arasında bir immünohistokimyasal H skoru elde edilmiştir. Elde edilen H skorları K, S ve N grupları arasında parametrik olarak karşılaştırılmıştır.

### 3.7. Hematoksilen - Eozin Boyama Protokolü

Mikrotomla non- adheziv lamlara 5 µm kalınlığında alınan kesitlere uygulanan işlemler aşağıda belirtilmiştir.

1. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 58 °C etüv içersinde 1 saat bekletildi.
2. Ksilol 20 dk
3. Ksilol 20 dk
4. Etil alkol (%96) 10 dk
5. Etil alkol (%90) 10 dk
6. Etil alkol (%80) 10 dk

7. Distile su ile yıkandı.
8. Hematoksilen 90 sn
9. Musluk suyu ile durulanıncaya kadar yıkandı.
10. Amonyak solüsyonuna batırılıp çıkarıldı.
11. Musluk suyu ile yıkandı.
12. Asit alkol solüsyonuna batırılıp çıkarıldı.
13. Musluk suyu ile yıkandı.
14. Eozin 35 sn
15. Etil alkole (%80) batırılıp çıkarıldı.
16. Etil alkole (%90) batırılıp çıkarıldı.
17. Etil alkole (%96) batırılıp çıkarıldı.
18. Kesitler kurumaya bırakıldı.
19. Ksilol 40 dk.
20. Kesitler entellan ile kapatıldı.

### **3.8. İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü**

Mikrotomla adhesiv lamlara 5µm kalınlığında alınan kesitlere uygulanan işlemler aşağıda belirtilmiştir.

1. Kesitler deparafinizasyon işlemi için 58 °C etüv içersinde 1 saat bekletildikten sonra aşağıdaki işlemlerden geçirildi.
2. Ksilol 2 x 5 dk
3. Etil alkol (% 100) 2 x 3 dk
4. Etil alkol (% 96) 3 dk
5. Etil alkol (% 70) 3 dk
6. Etil alkol (% 50) 3 dk
7. Kesitler distile su ile yıkandı.
8. Fiksasyon ve parafine gömülmekten kaynaklanan antijenik maskelenmeyi ortadan kaldırmak için kesitler sitrik asit çözeltisinde (pH: 6.0), 90°C' de 20 dakika kaynatılıp 20 dakika soğumaya bırakıldı.

9. Kesitler endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için %3'lük hidrojen peroksit ile oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
10. Kesitler taze hazırlanmış fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile 3 x 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
11. Dokuların permeabilitesini arttırmak için kesitler % 1'lik Triton-X çözeltisinde 30 dakika inkübe edildi.
12. Kesitler taze hazırlanmış fosfatlı tuz tamponu (PBS) ile 3 x 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
13. Kesitlerin etrafı hidrofobik kalem ile çizildi.
14. Nonspesifik antikor bağlanmasını ve bundan dolayı oluşabilecek zemin boyanmasını engellemek için protein block ile 10 dakika inkübe edildi.
15. Dokuların üzerindeki protein blok uzaklaştırılarak yıkama yapılmadan PBS içerisinde % 0,2 Triton-X ve % 1,5 normal keçi serumu ile sulandırılmış primer antikor damlatıldı. Kesitler nemli çember içinde +4°C sıcaklıkta 14-18 saat inkübe edildi.
16. Kesitler PBS ile 3 x 5 dakika inkübe edildi.
17. Biotin bağlı sekonder antikor ile oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
18. Kesitler PBS ile 4 x 5 dakika inkübe edildi.
19. Streptavidin peroksidaz ile oda ısısında 10 dakika inkübe edildi.
20. Kesitler 2 x 5 dakika PBS ile inkübe edildi.
21. Kesitler 2 x 5 dakika TBS ile inkübe edildi.
22. Peroksidaz substratı olan diaminobenzidin (DAB) damlatıldı ve boyanma yoğunluğu mikroskop altında kontrol edilerek 1- 2 dakika inkübe edildi.
23. Kesitler 2 x 5 dakika PBS ile inkübe edildi.
24. Kesitler 2 x 5 dakika TBS ile inkübe edildi.
25. Metil yeşili ile 10 saniye zıt boyama yapıldı.
26. Kesitler çeşme suyuna batırılıp çıkarılır.
27. Kesitler distile su içine batırılıp çıkarıldı.
28. Etil alkol (%50) 15 dk
29. Etil alkol (%50) 15 dk
30. Etil alkol (%70) 15 dk
31. Etil alkol (%70) 15 dk

32. Etil alkol (%95)	15 dk
33. Etil alkol (%95)	15 dk
34. Etil alkol (%100)	10 dk
35. Etil alkol (%100)	10 dk
36. Etil alkol (%100)	10 dk
37. Ksilol: Alkol (1:1)	10 dk
38. Ksilol	10 dk
39. Ksilol	10 dk
40. Ksilol	10 dk
41. Entellan ile kapatıldı.	

Negatif kontrol amacıyla ayrılan kesitlere primer antikor içermeyen PBS içerisinde % 0,2 Triton- X ve % 1,5 normal keçi serumu damlatıldı. Daha sonra protokole aynı şekilde devam edildi.

### 3.9. İstatiksel Analiz

Değişik verilere ait analizler çoklu sütun içeren, zamana bağlı değişimi gösteren çoklu çizgi tablolarıyla ortalama  $\pm$  standart hata veya Box-Plot sütunları şeklinde sunulmuştur. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA, uygun bir post hoc testi ve gerekirse *t* testi kullanılmıştır.  $P < 0,05$  olan veriler anlamlı kabul edilmiştir. Değişkenlerin normal dağılıma uygun olup olmadıkları Shapiro Wilk testi ile incelenmiştir. Dağılım varsayımı sağlandığı durumda sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma şeklinde, sağlanmadığı durumda medyan [min.-max.] şeklinde özetlenmiştir. Kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde cinsinden özetlenmiştir. İki den fazla grup karşılaştırmasında dağılım varsayımı sağlandığı durumda ANOVA, sağlanmadığı durumda Kruskal Wallis testinden yararlanılmıştır. İki den fazla bağımlı grup karşılaştırılmasında dağılım varsayımı sağlandığı durumda tekrarlanan ölçümlü varyans analizi, dağılım varsayımı sağlanmadığı durumda Friedman testinden yararlanılmıştır. Analizler MedCalc v.12.3.0 programı ile yapılmıştır.  $p < 0,05$  istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.

## **4. BULGULAR**

### **4.1. Vücut Ağırlığının Gruplar Arasında Karşılaştırılması**

P90, P105 ve P120'deki K, S ve N grubu farelerin tüm deney süresi boyunca vücut ağırlıkları ölçüldü. N grubu farelerin vücut ağırlığının deney süresince diğer iki gruba kıyasla daha düşük kaldığı gözlemlendi. Deneyin son günü olan P120'de ise hem N hem de S grubu farelerin vücut ağırlıklarının kontrol grubuna kıyasla daha düşük kaldığı gözlemlendi.

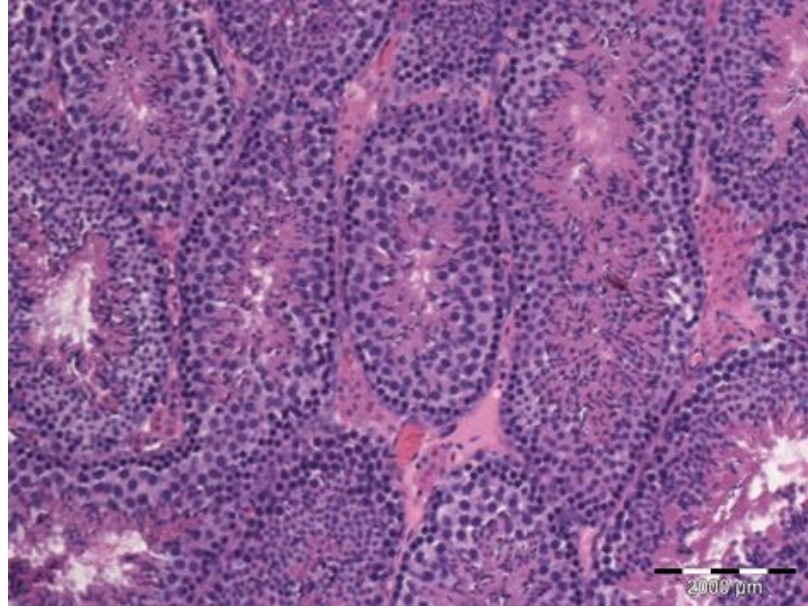
### **4.2. Testis Ağırlıklarının Gruplar Arasında Karşılaştırılması**

K, S ve N grubu farelerin P90, P105 ve P120'de testis ağırlıkları mg cinsinden ölçüldü. P105 ve P120'de N grubu farelerin testis ağırlıkları K ve S gruplarına kıyasla daha düşük olduğu gözlemlendi. P90'da ise gruplar arasında farklılık gözlemlenmedi.

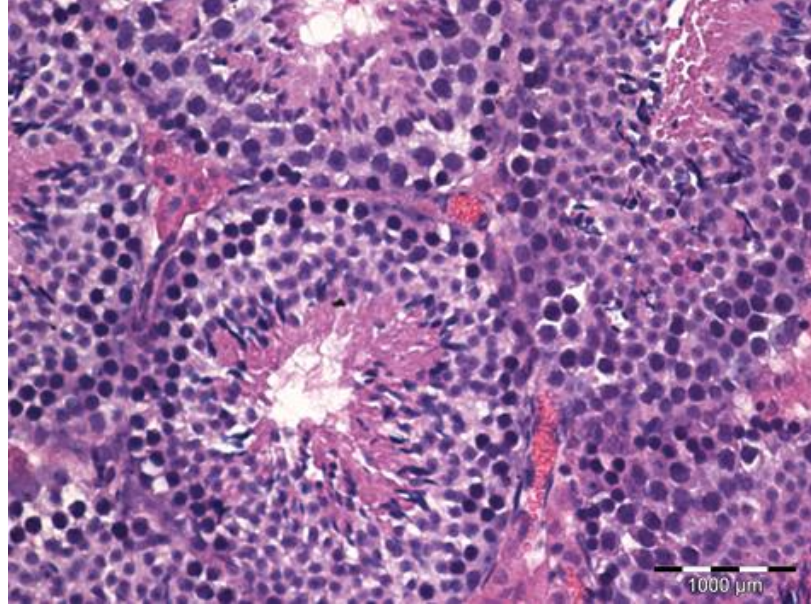
### **4.3. Seminifer Tübüllerin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi**

K, S ve N grubu farelerin P90, P105 ve P120'de testis dokuları H.E. ile boyanarak histolojik olarak değerlendirildi. Tüm yaş günlerindeki K ve S grubu farelerde, seminifer tübül içindeki germinal hücrelerin normal döngüde seyrettiği, interstisyel alan dokusunun bütünlüğünü koruduğu, seminifer tübüllerin normal morfolojide olduğu gözlemlendi (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15, 4.16, 4.17, 4.18). Tüm yaş günlerindeki N grubu farelerde seminifer tübül epitelinde muhtemelen hücreler arası sıkı bağlantıların kaybına bağlı olarak hücreler arası mesafenin genişlediği, epitel içerisinde boşlukların oluştuğu, hücreler arasında yer yer vakuolizasyonun var olduğu ve lümeneye doğru epitel bütünlüğünün bozulduğu gözlemlendi. Ayrıca seminifer tübül lümeninde spermatogenezin etkilendiğini gösteren immatür

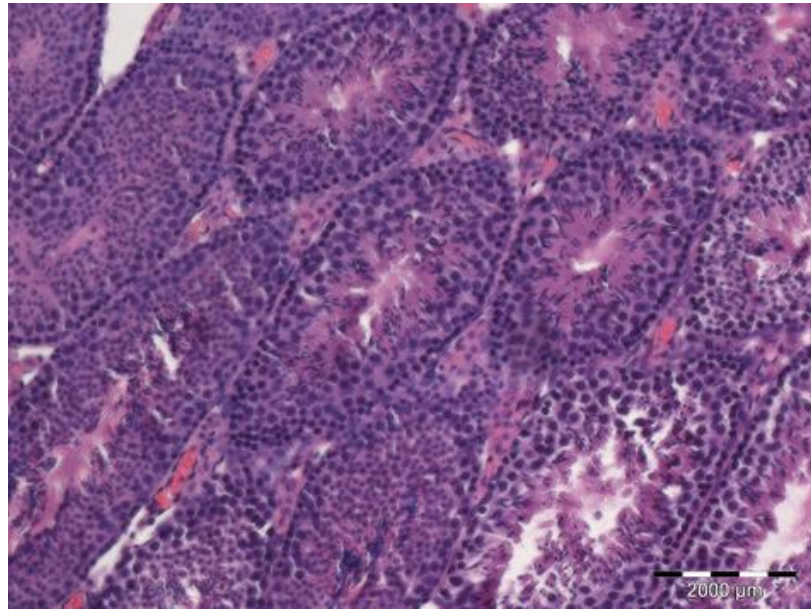
spermatojenik hücrelerin varlığı ve seminifer tübül epitelı dejenereşyonunun belirgin olduğu tübüllerde çok nükleuslu dev hücre varlığı dikkati çekmekteydi. Bazı tübüllerde spermatojenik hücre kaybına bağlı olarak seminiferöz epitel kalınlığının oldukça azaldığı ve buna bağlı olarak da lümen çapının genişlediği gözlemlendi. Ayrıca interstisyel alanda doku bütünlüğünün korunmadığı izlendi.



**Şekil 4.1.** P90, Kontrol grubu mikrografı. Normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum, x200, H.E.

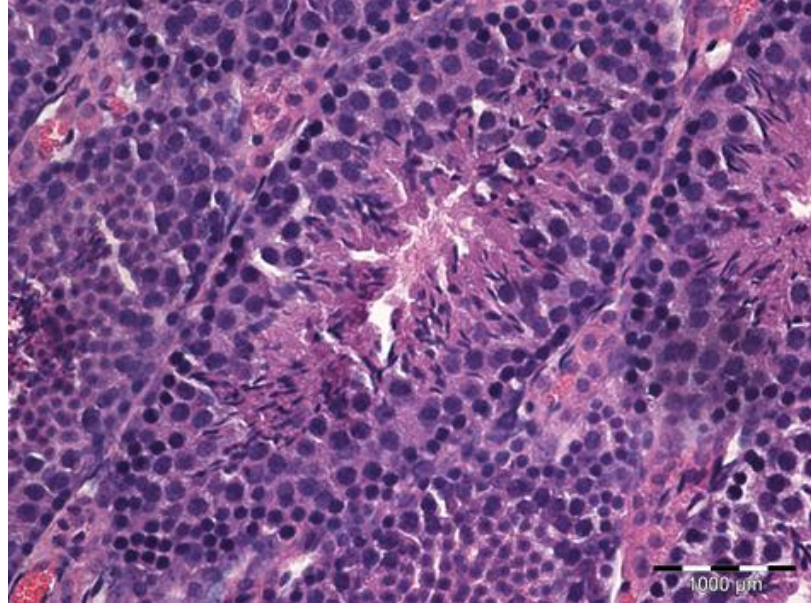


**Şekil.4.2.** P90, Kontrol grubu mikrografi. Yüksek büyütmede normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum x400, H.E.

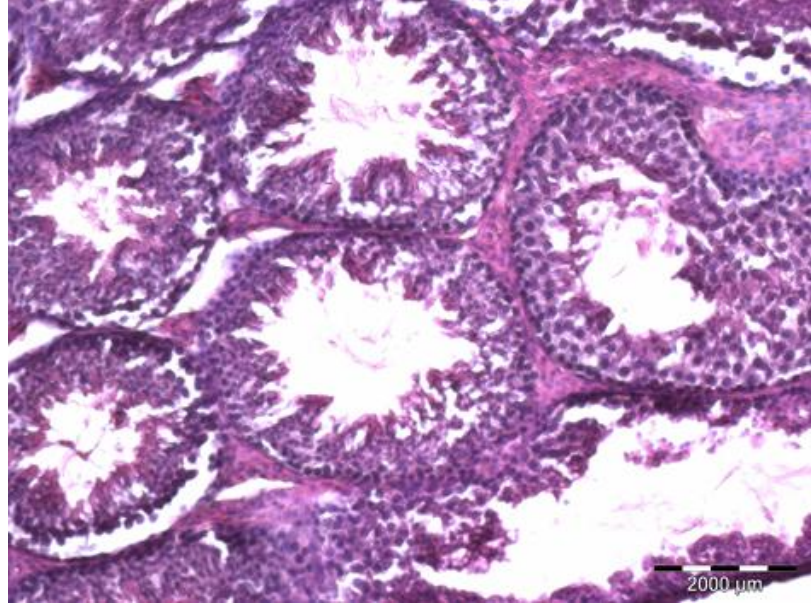


**Şekil.4.3.** P90, Sham grubu mikrografi. Normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum, x200, H.E.

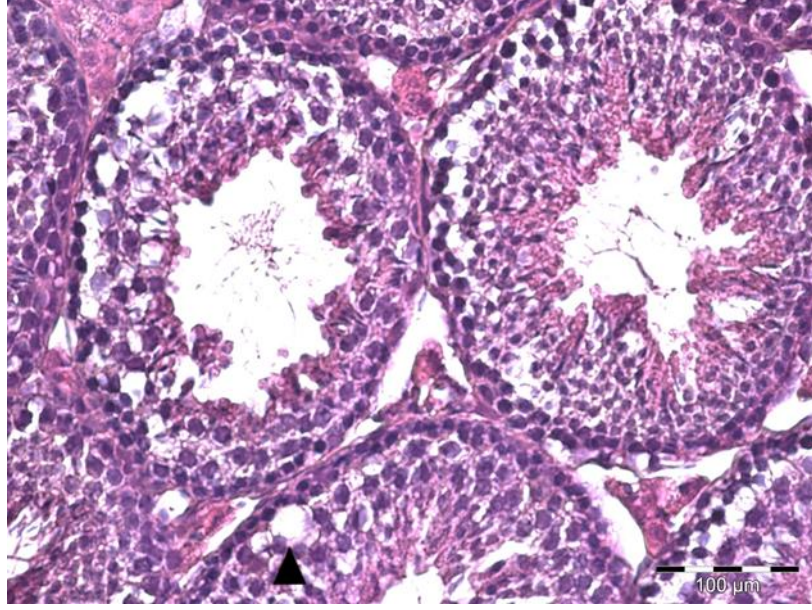




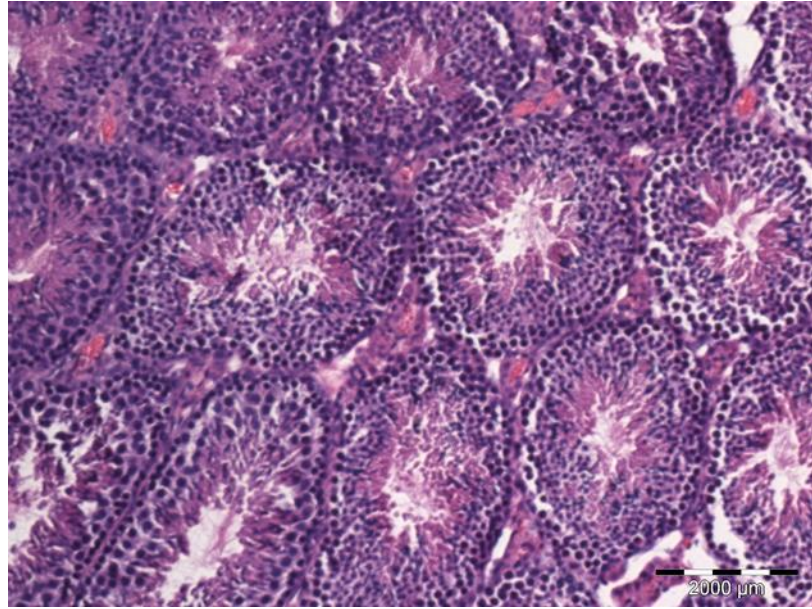
**Şekil.4.4.** P90, Sham grubu mikrografı. Yüksek büyütmede normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum, x400, H.E.



**Şekil.4.5.** P90, Nikotin grubu mikrografı. Epitel bütünlüğünün bozulduğu ve epitel içerisinde boşlukların oluştuğu seminifer tübüller ve interstisyum x200, H.E.

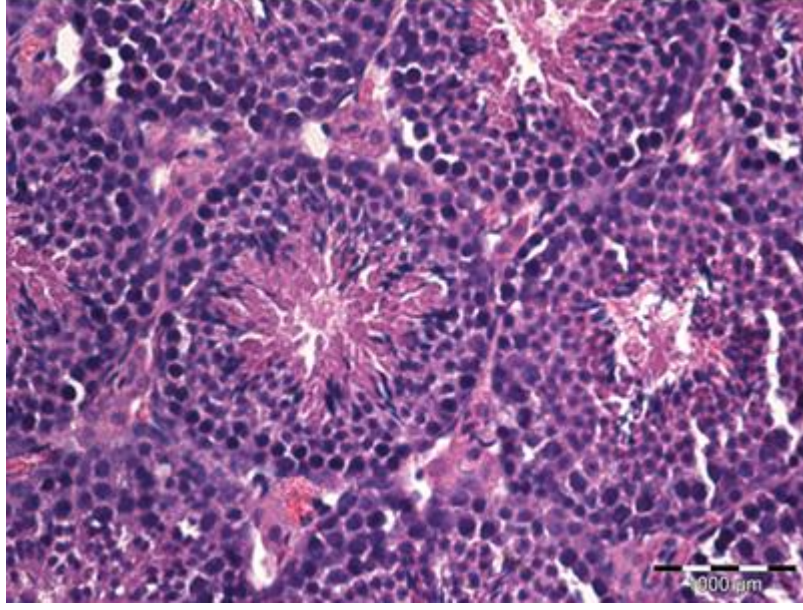


**Şekil.4.6.** P90, Nikotin grubu mikrografı. Yüksek büyütmede seminifer Tübül epitelinde dejeneratif değişiklikler ve hücreler arası vakuolizasyon (ok başı), x400, H.E.

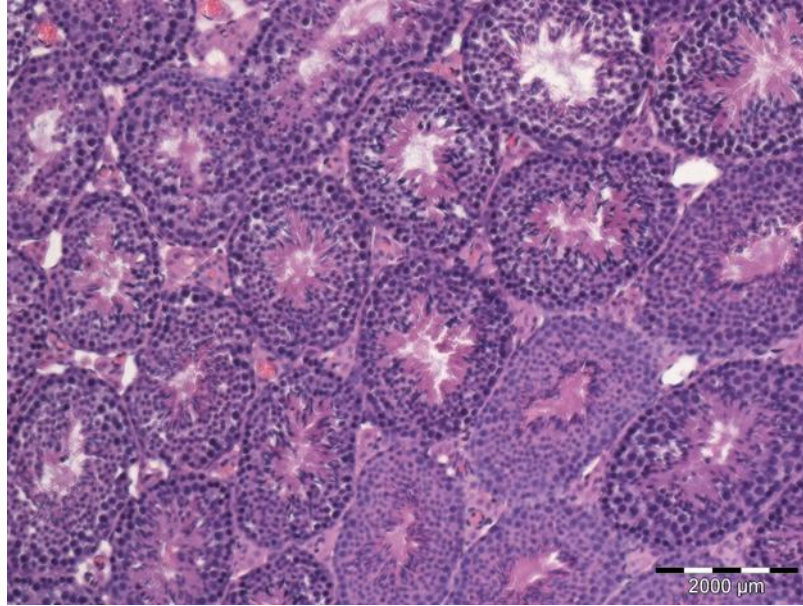


**Şekil.4.7.** P105, Kontrol grubu mikrografı. Normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum, x200, H.E.

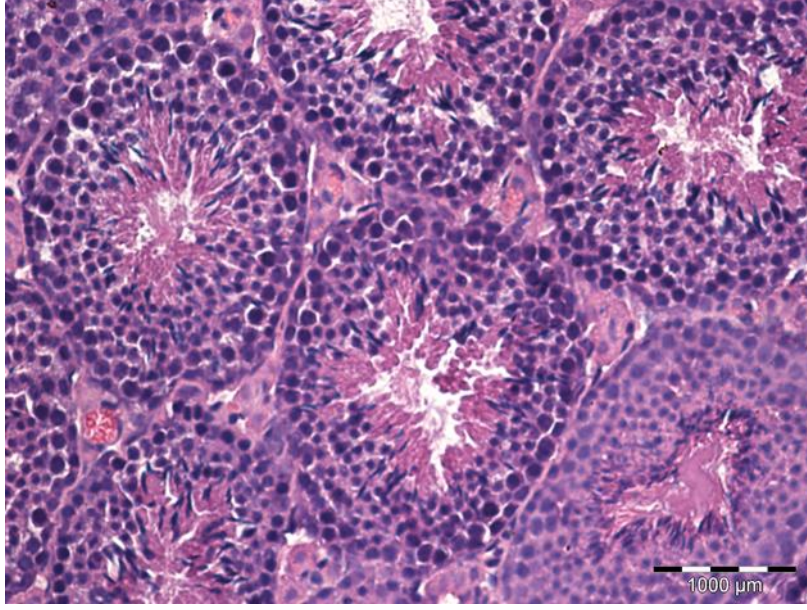




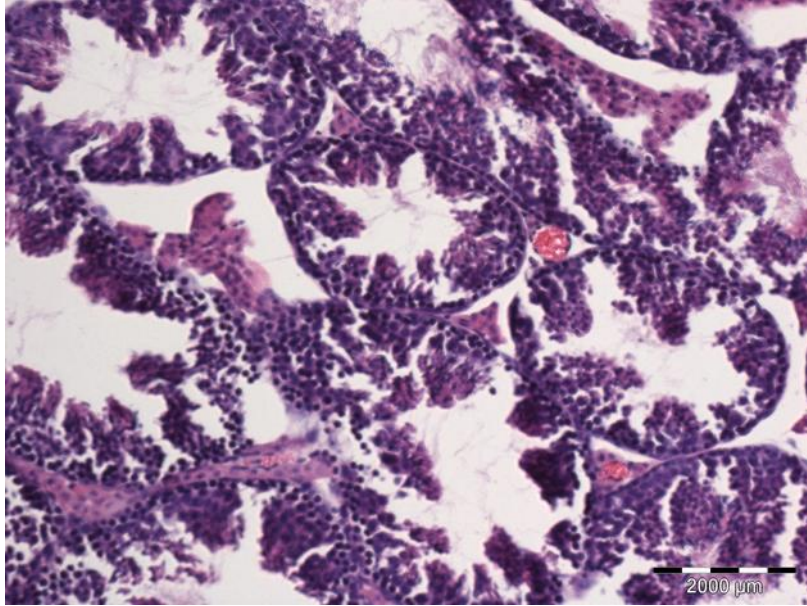
**Şekil.4.8.** P105, Kontrol grubu mikrografi. Yüksek büyütmede normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum, x400 H.E.



**Şekil.4.9.** P105, Sham grubu mikrografi. Normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum, x200, H.E.

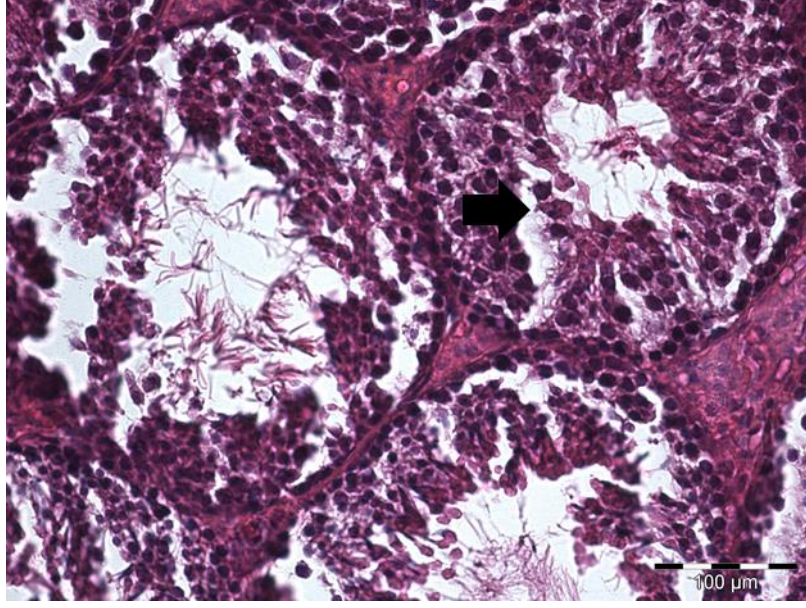


**Şekil.4.10.** P105, Sham grubu mikrografi. Yüksek büyütmede normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum, x400 H.E.

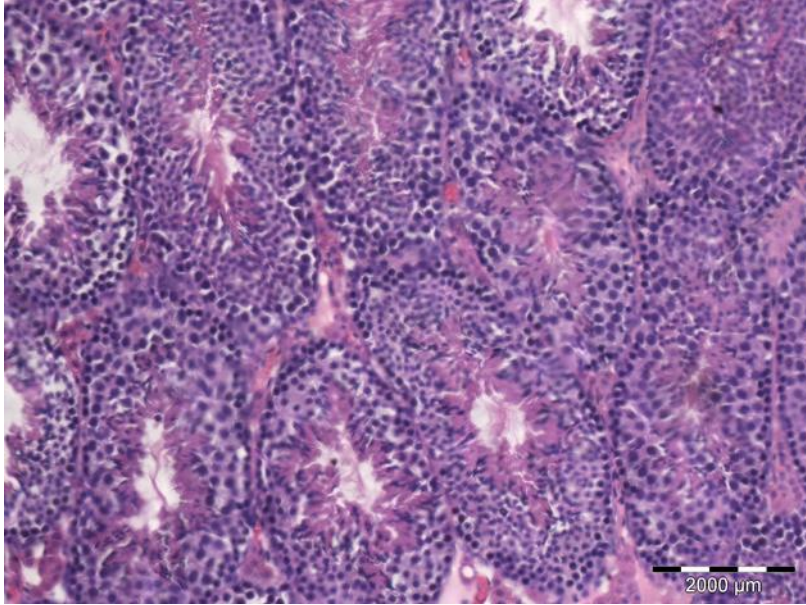


**Şekil.4.11.** P105, Nikotin grubu mikrografi. Epitel bütünlüğünün bozulduğu ve epitel içerisinde boşlukların olduğu seminifer tübüller ve interstisyum, x200, H.E.

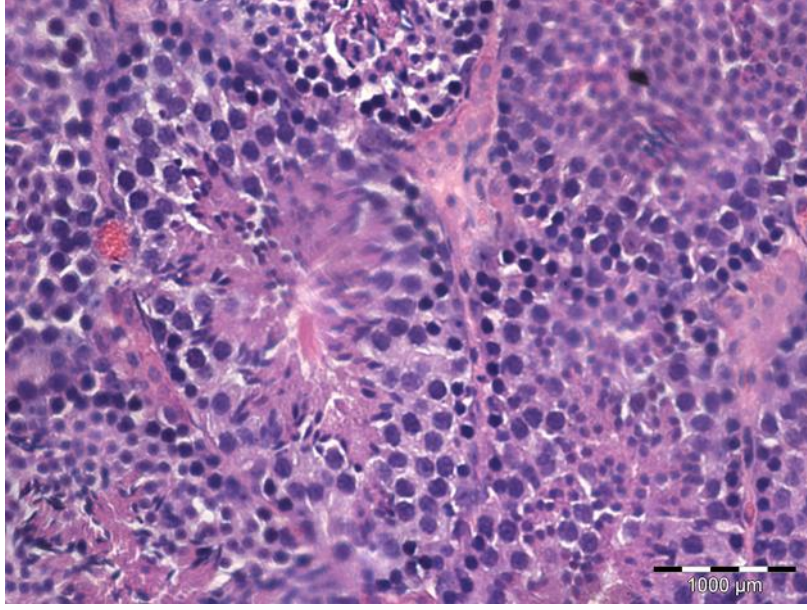




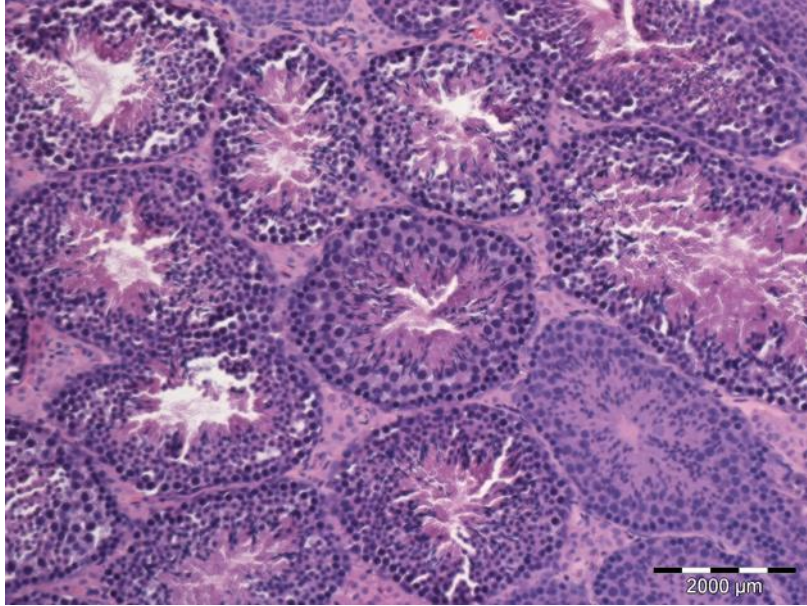
**Şekil.4.12.** P105, Nikotin grubu mikrografı. Yüksek büyütmede seminifer tübül epitelinde dejeneratif değişiklikler ve lümene dökülmüş immatür germ hücreleri (ok), x400, H.E.



**Şekil.4.13.** P120, Kontrol grubu mikrografı. Normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve intersitisyum,x200, H.E.

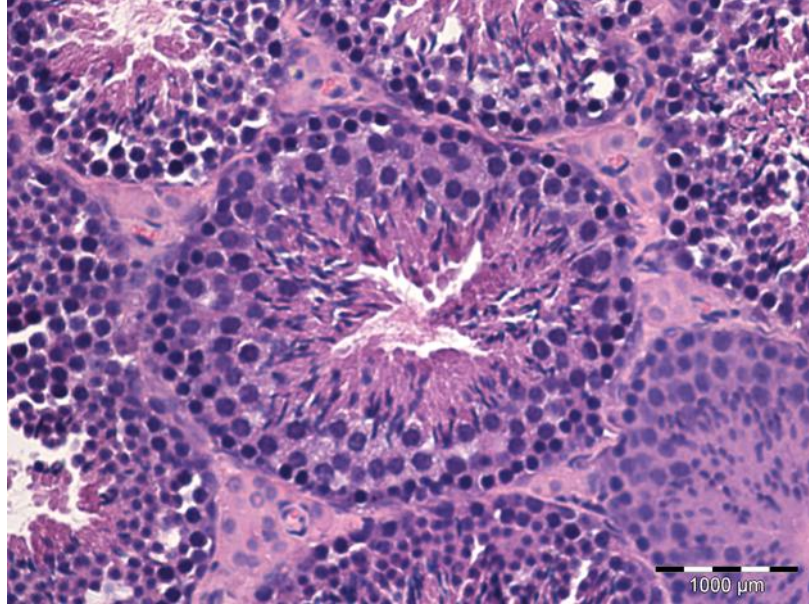


**Şekil.4.14.** P120, Kontrol grubu mikrografı. Yüksek büyütmede normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum, x400, H.E.

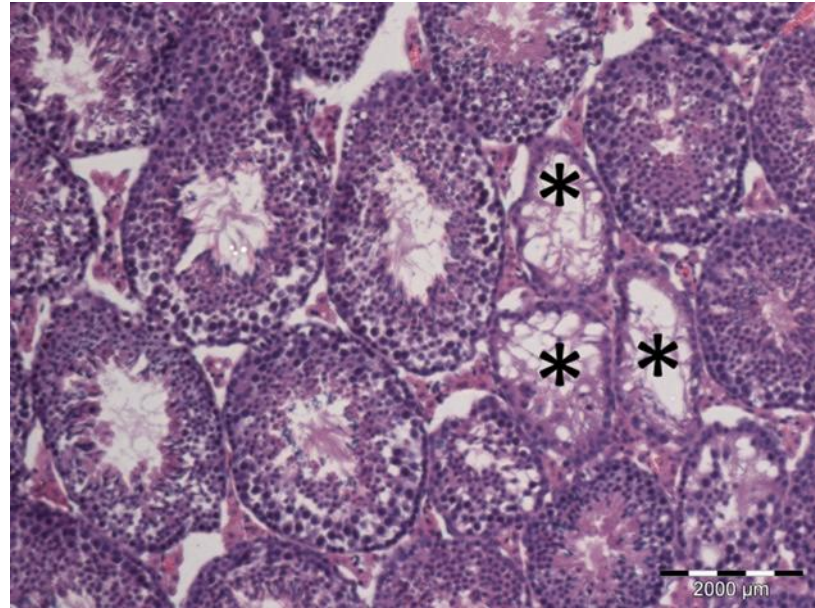


**Şekil.4.15.** P120, Sham grubu mikrografı. Normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum, x200, H.E.

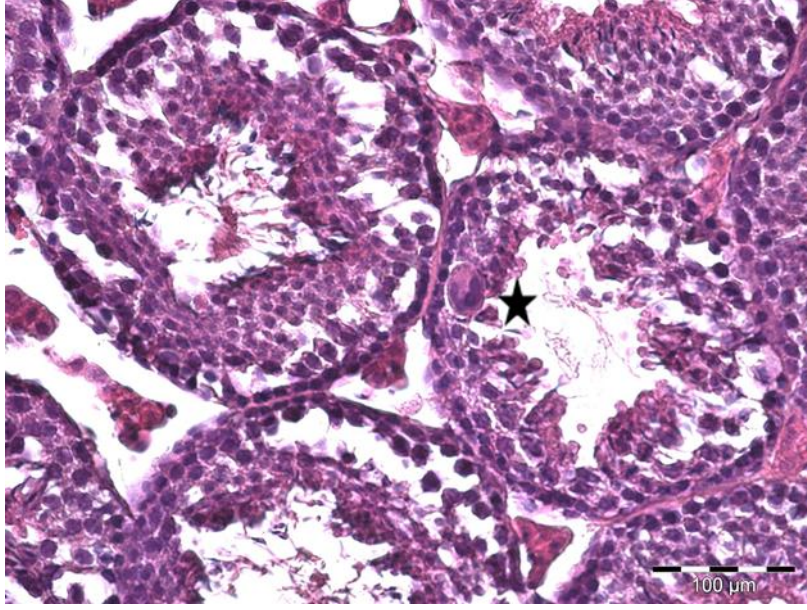




**Şekil.4.16.** P120, Sham grubu mikrografı. Yüksek büyütmede normal morfolojik özelliklere sahip seminifer tübüller ve interstisyum, x400, H.E.



**Şekil.4.17.** P120, Nikotin grubu mikrografı. Dejenere seminifer tübüller (asteriks), bazı seminifer tübüllerde spermatojenik hücre kaybı, x200, H.E.



**Şekil.4.18.** P120, Nikotin grubu mikrografı. Seminifer tübül epitelinde dejenerasyon, spermatojenik hücre kaybı ve çok nükleuslu dev hücre (yıldız), x400, H.E.

#### **4.4. Seminifer Tübül Çapı ve Germinal Epitel Kalınlığının Gruplar Arasında Değerlendirilmesi**

K, S ve N grubu farelerin P90, P105 ve P120’de seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı parametreleri µm cinsinden ölçülerek değerler her bir yaş grubu içerisindeki gruplar arasında Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) yöntemiyle üçlü olarak karşılaştırıldı. Söz konusu parametreler açısından her bir yaş grubu içerisindeki K ve S grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, N gruplarına ait değerlerin diğer iki gruba kıyasla anlamlı düzeyde azalmış olduğu tespit edildi ( $p<0,01$ ). Karşılaştırmalara ait istatistiksel bilgiler Çizelge 4.1.’de sunulmuştur.

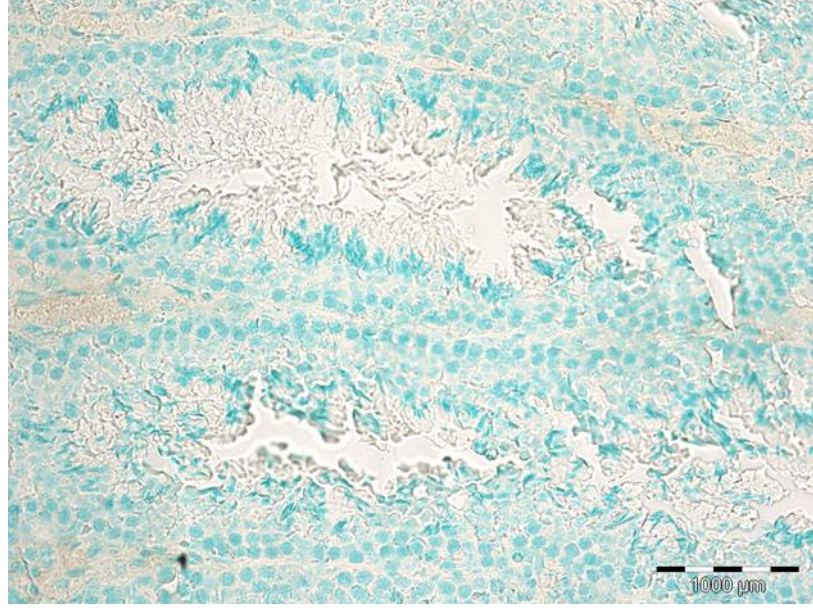


**Çizelge 4.1.** Her bir yaş grubunda K, S ve N gruplarının; seminifer tübül çapı ve epitel kalınlığı parametreleri ( $\mu\text{m}$ ) açısından üçlü karşılaştırılması sonucunda elde edilen ortalama  $\pm$  standart hata (OSH) ve Tek Yönlü Varyans Analizi sonucunda elde edilen P ve F istatistik değerleri yukarıdaki çizelgede sunulmuştur.

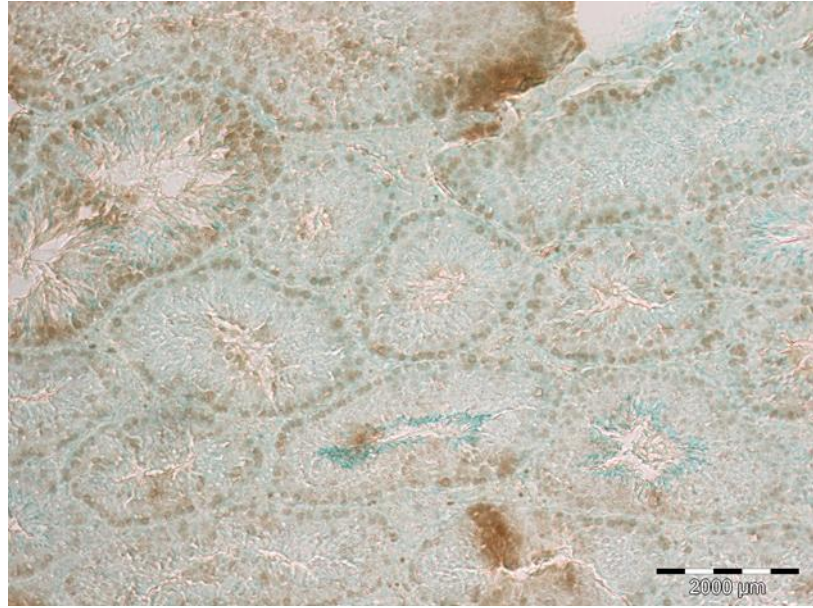
İlgili Analiz (OSH=1 ANOVA=2)	P90			P105			P120		
	K	S	N	K	S	N	K	S	N
<b>Seminifer Tübülü Kalınlığı (<math>\mu\text{m}</math>)</b>									
1	276 $\pm$ 2 6	259 $\pm$ 30	225 $\pm$ 24	285 $\pm$ 1 3	282 $\pm$ 5	262 $\pm$ 1 1	287 $\pm$ 1 1	283 $\pm$ 16	269 $\pm$ 7
2	P<0,001 F=55,6			P<0,001 F=66,5			P<0,001 F=48,4		
<b>Epitel Kalınlığı (<math>\mu\text{m}</math>)</b>									
1	84 $\pm$ 9	87 $\pm$ 4	69 $\pm$ 5	86 $\pm$ 7	80 $\pm$ 2	71 $\pm$ 3	87 $\pm$ 4	87 $\pm$ 6	71 $\pm$ 3
2	P<0,001 F=95,2			P<0,001 F=132,2			P<0,001 F=209,1		

#### 4.5. Spermatogonyal Hücrelerde İmmünohistokimyasal GDNF Ekspresyonu

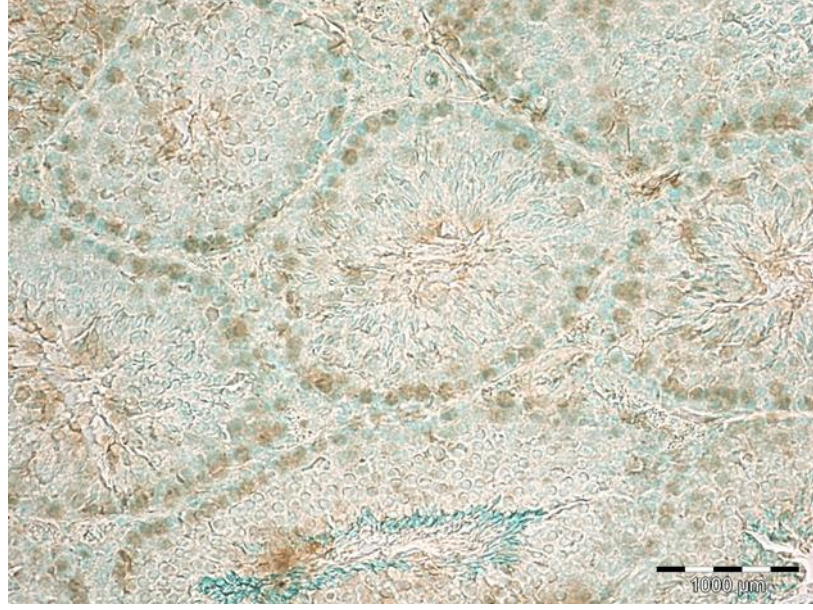
Çalışmamızda P90, P105 ve P120 yaş gruplarındaki K, S ve N grubu farelerin spermatogonyal farklılaşmasında görev alan GDNF proteininin immünohistokimyasal ekspresyonu semi-kantitatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4.19, 4.20, 4.21, 4.22, 4.23, 4.24, 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29, 4.30, 4.31, 4.32, 4.33, 4.34, 4.35, 4.36, 4.37). GDNF ekspresyonu H Skoru değerinin parametrik ANOVA testiyle her bir yaş grubu içinde (P90, P105 ve P120) gruplar arasında üçlü karşılaştırılmasında K ve S grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, N grubunun diğer iki gruba kıyasla anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edildi. (P90 p<0,001, P105 p<0,001, P120 p=0,01) (Şekil 4.38, 4.39, 4.40).



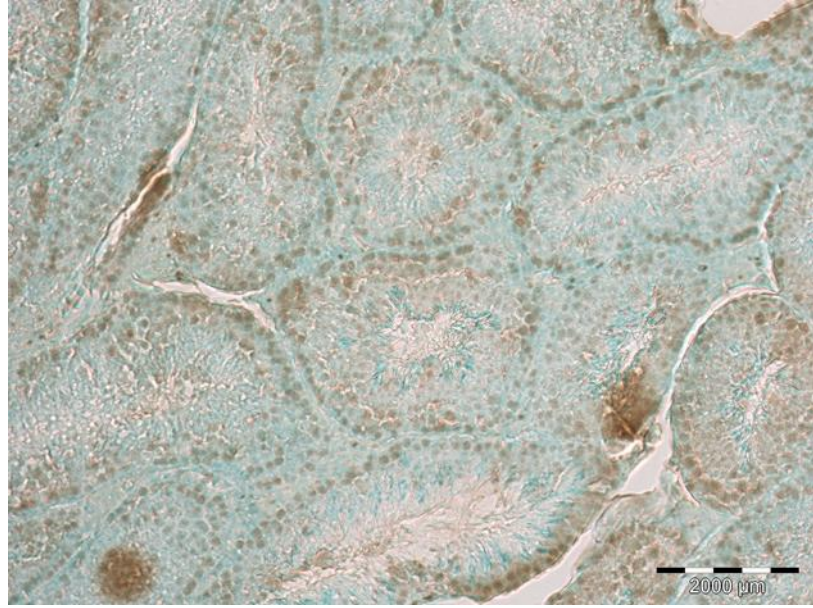
Şekil.4.19. GDNF boyamasına ait negatif kontrol boyaması, x400.



Şekil.4.20. P90, Kontrol grubu GDNF boyaması, x200.

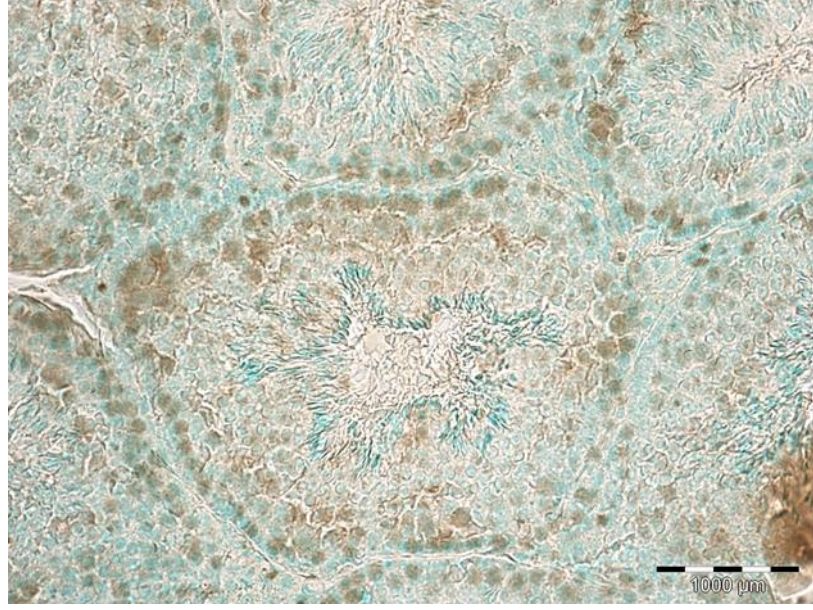


Şekil.4.21. P90, Kontrol grubu GDNF boyaması, x400.

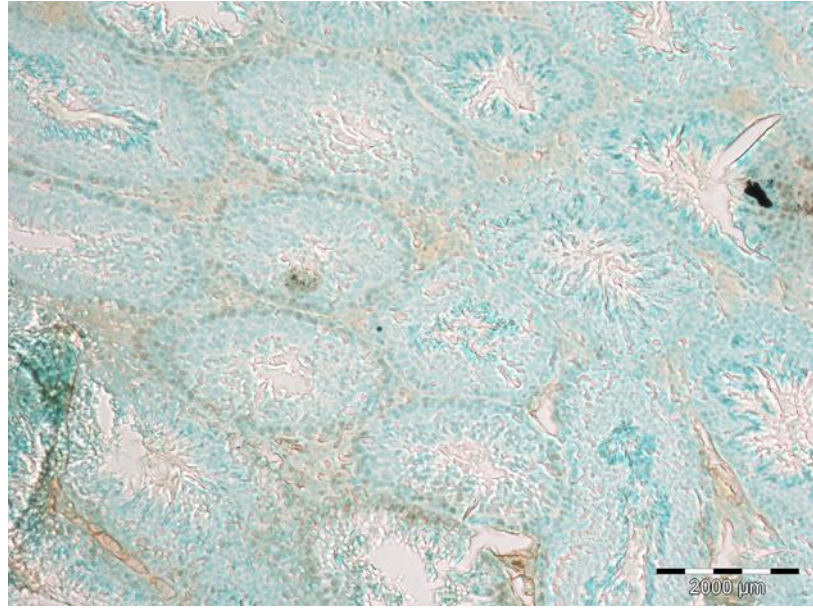


Şekil.4.22. P90, Sham grubu GDNF boyaması, x200.

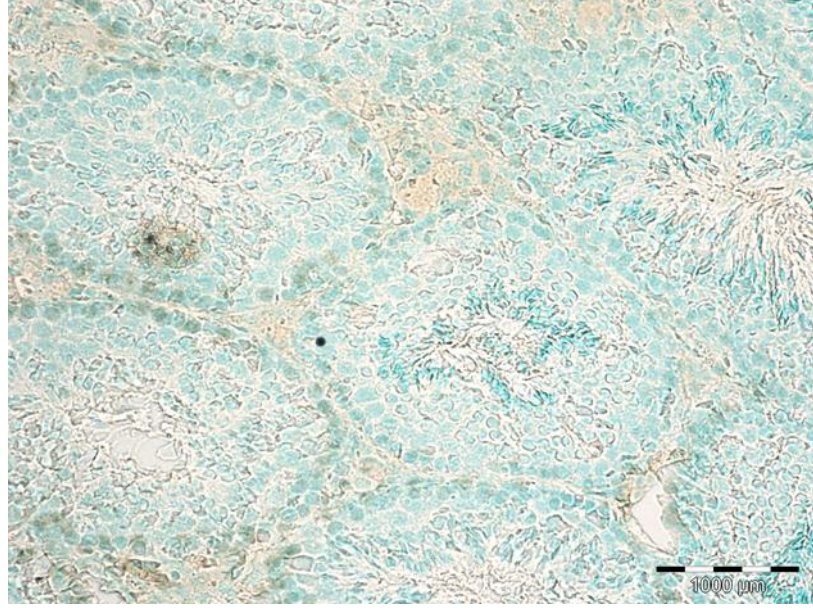




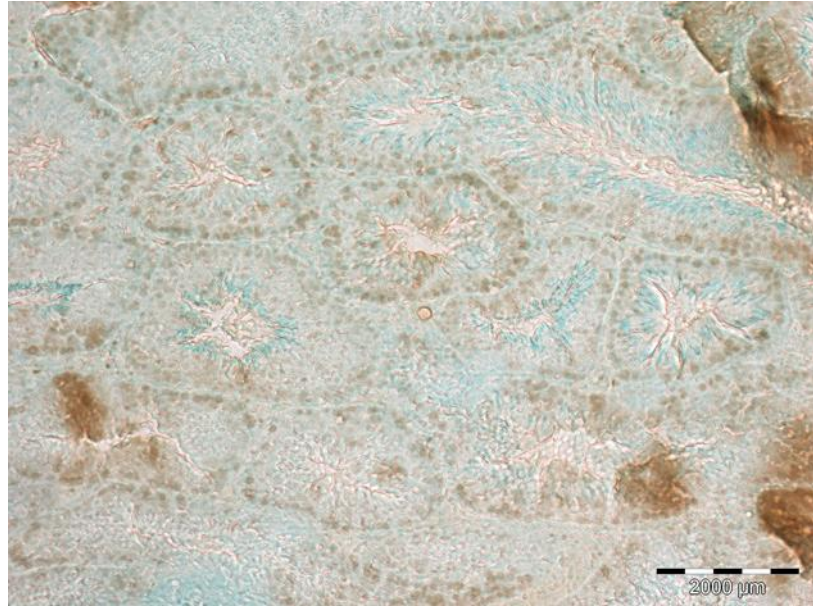
Şekil.4.23. P90, Sham grubu GDNF boyaması, x400.



Şekil.4.24. P90, Nikotin grubu GDNF boyaması, x200.

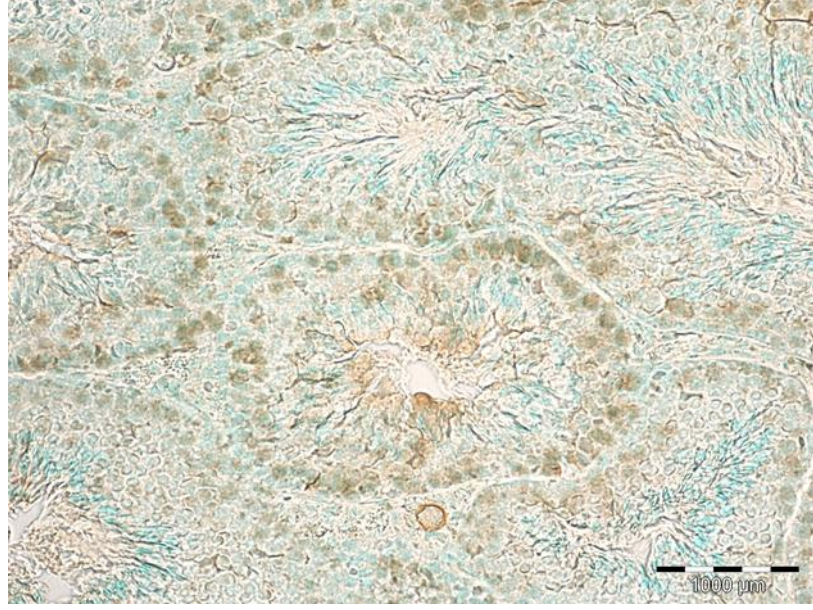


Şekil.4.25. P90, Nikotin grubu GDNF boyaması, x400.

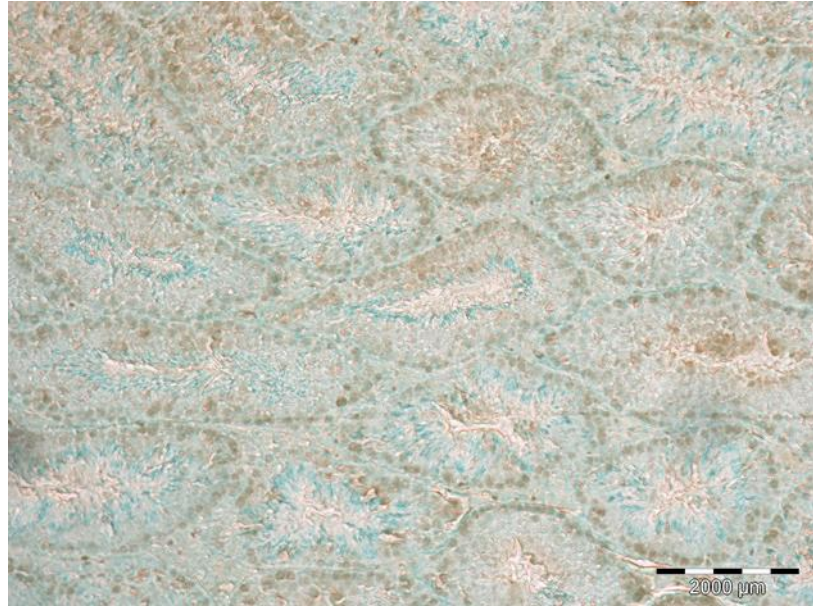


Şekil.4.26. P105, Kontrol grubu GDNF boyaması, x200.

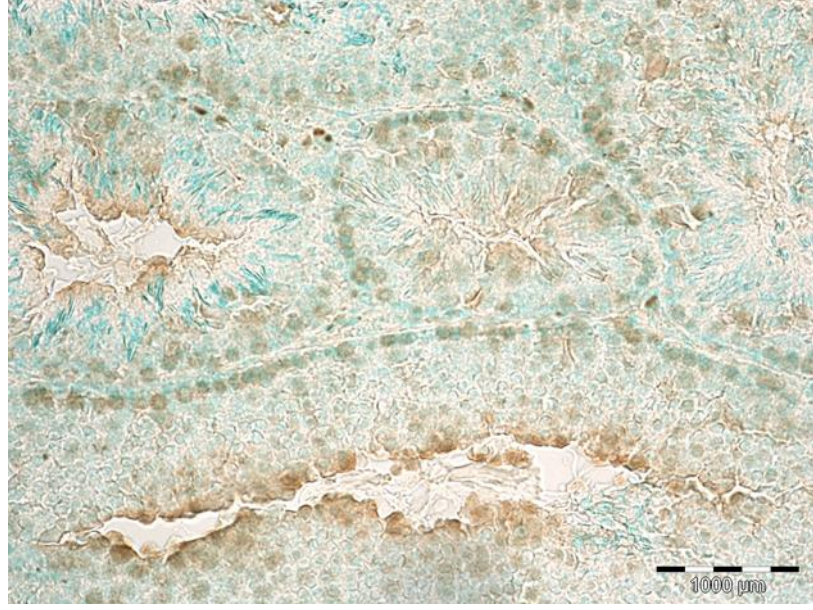




Şekil.4.27. P105, Kontrol grubu GDNF boyaması, x400.



Şekil.4.28. P105, Sham grubu GDNF boyaması, x200.

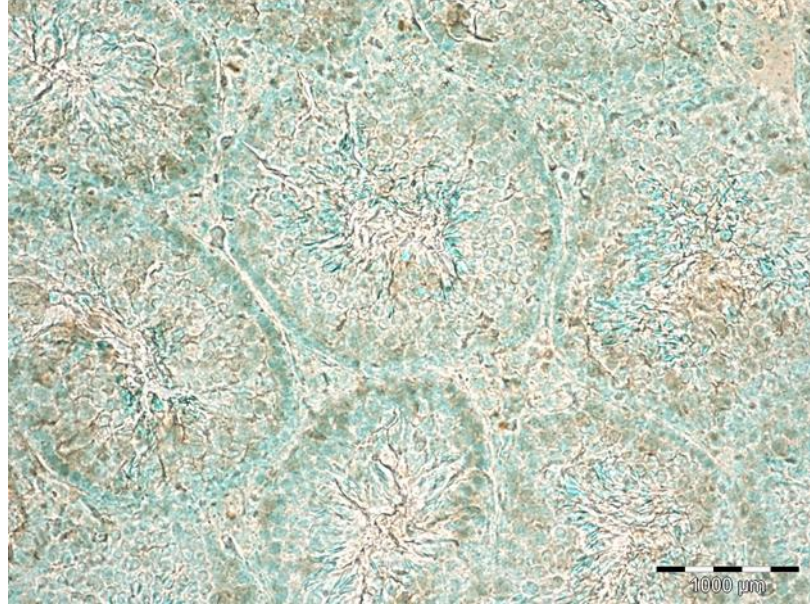


Şekil.4.29. P105, Sham grubu GDNF boyaması, x400.

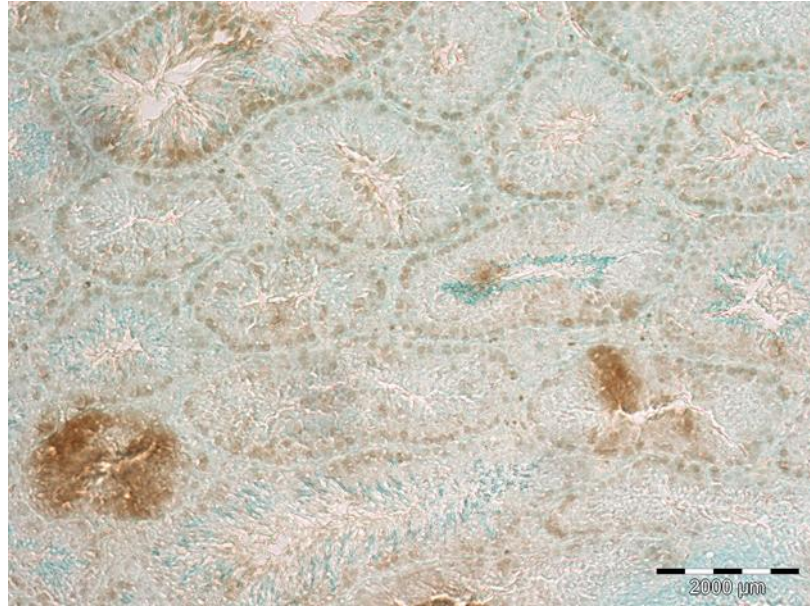


Şekil.4.30. P105, Nikotin grubu GDNF boyaması, x200.



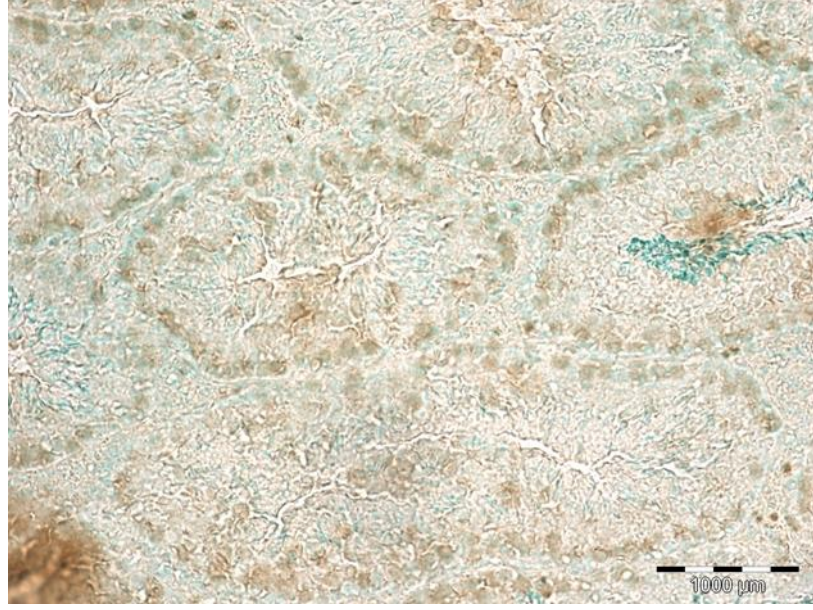


**Şekil.4.31.** P105, Nikotin grubu GDNF boyaması, x400.

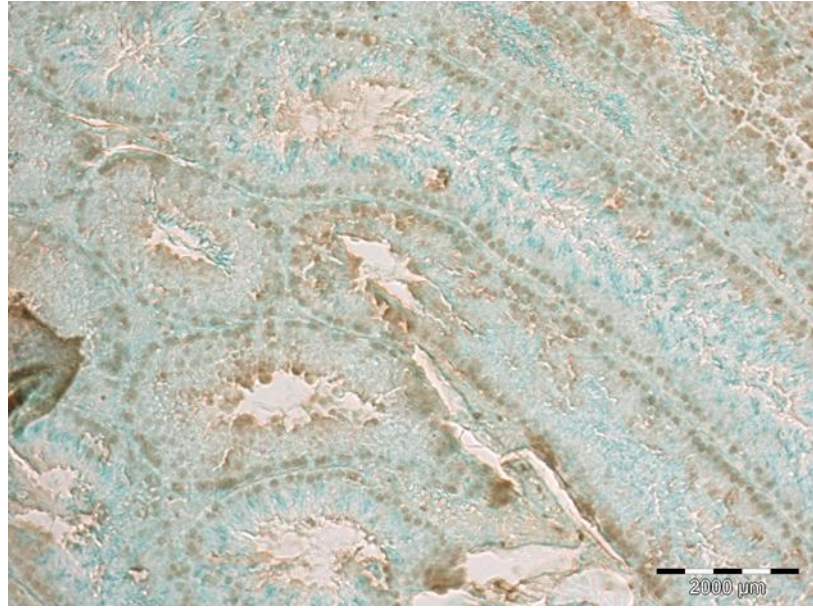


**Şekil.4.32.** P120, Kontrol grubu GDNF boyaması, x200.

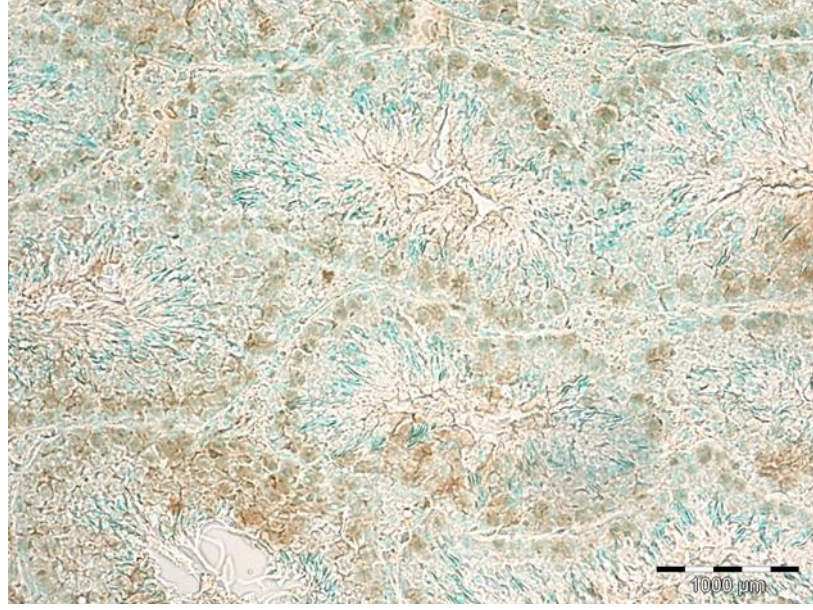




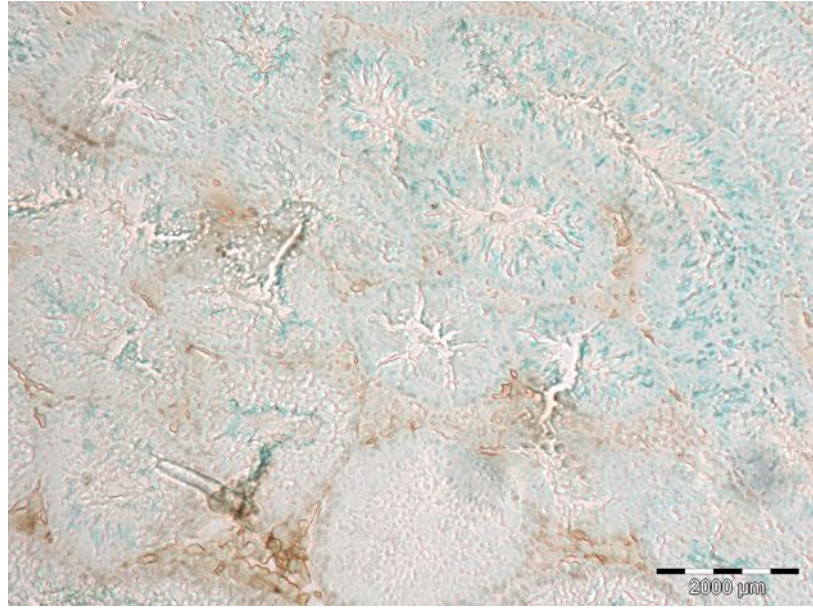
**Şekil.4.33.** P120, Kontrol grubu GDNF boyması, x400.



**Şekil.4.34.** P120, Sham grubu GDNF boyması, x200.

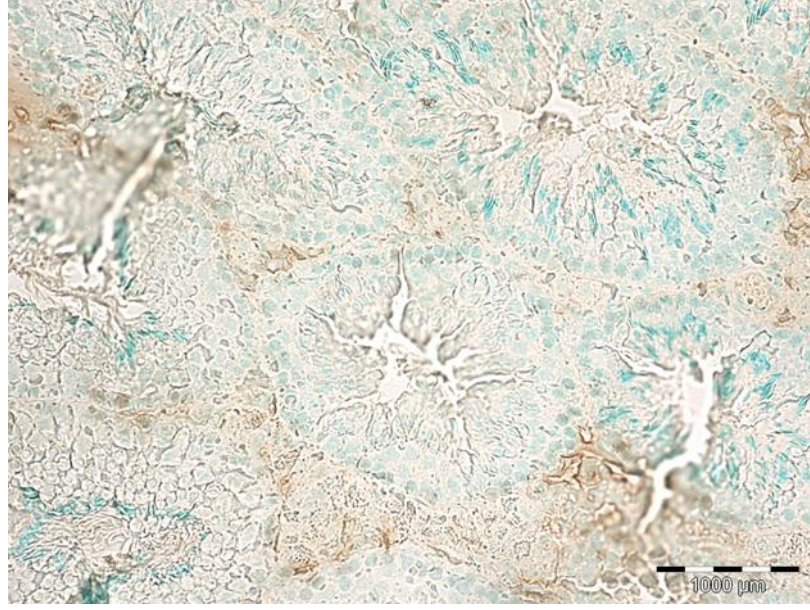


Şekil.4.35. P120, Sham grubu GDNF boyaması, x400.

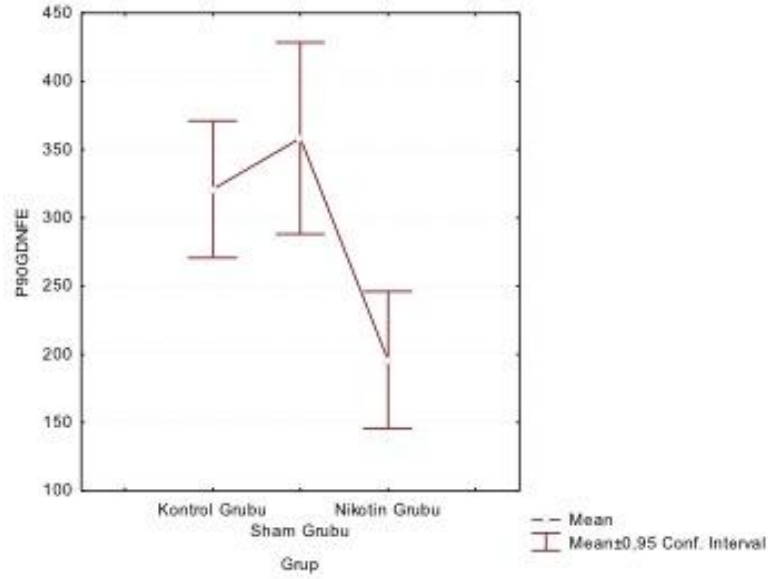


Şekil.4.36. P120, Nikotin grubu GDNF boyaması, x200.

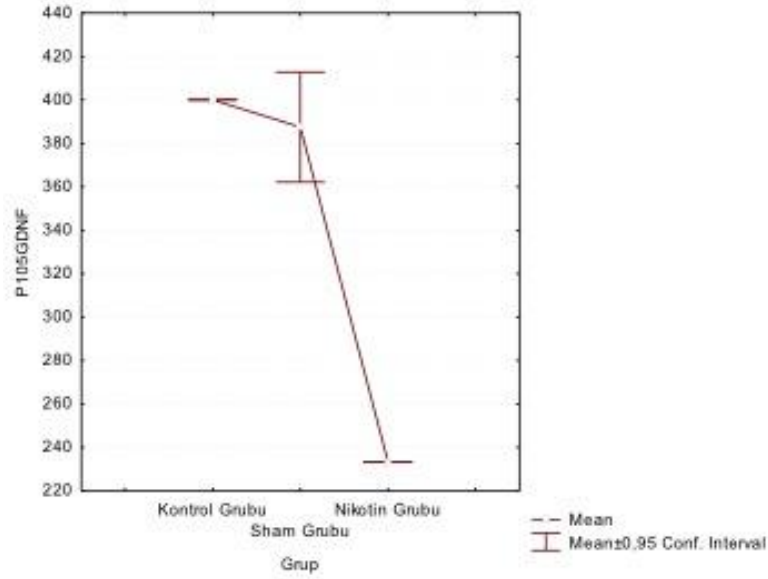




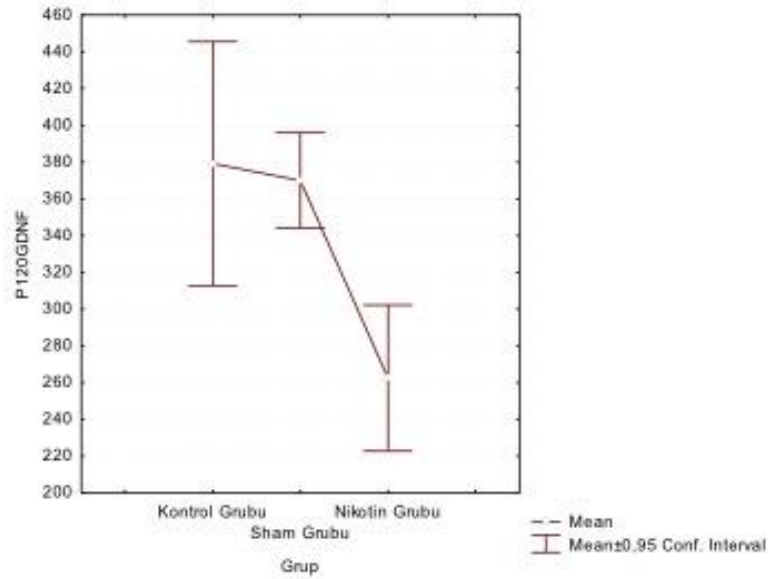
Şekil.4.37. P120, Nikotin grubu GDNF boyaması, x400.



Şekil 4.38. P90 GDNF H Skoru düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. ( $p < 0.001$ ) Bu farklılığın kaynağını tespit etmek amacıyla post hoc test uyguladığımızda, nikotin grubunun diğer gruplardan farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).



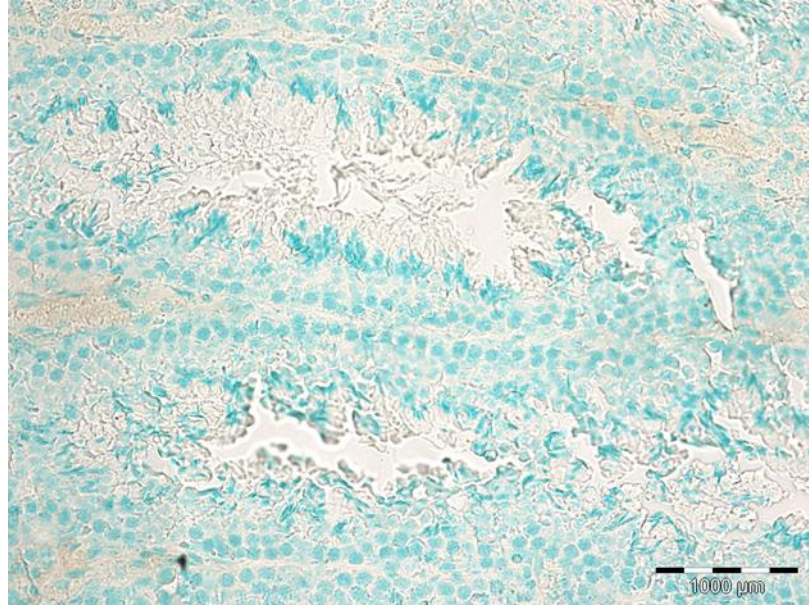
**Şekil 4.39.** P105 GDNF H Skoru düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. ( $p < 0.001$ ) Bu farklılığın kaynağını tespit etmek amacıyla post hoc test uyguladığımızda, nikotin grubunun diğer gruplardan farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).



**Şekil 4.40.** P120 GDNF ekspresyon düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. ( $p = 0.001$ ) Bu farklılığın kaynağını tespit etmek amacıyla post hoc test uyguladığımızda, nikotin grubunun diğer gruplardan farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).

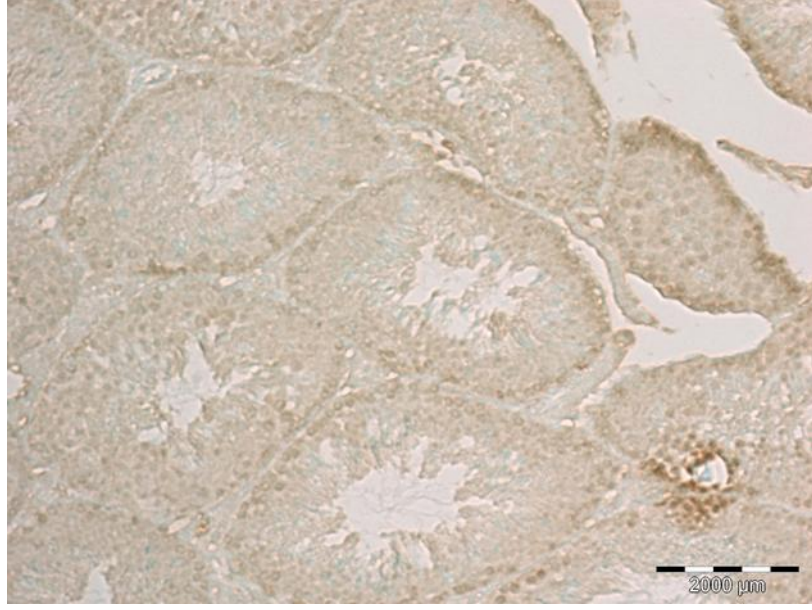
#### 4.6. Spermatogonyal Hücrelerde İmmünohistokimyasal Oct-4 Ekspresyonu

Çalışmamızda P90, P105 ve P120 yaş gruplarında K, S ve N grubu farelerdeki SKH'leri belirlemek amacıyla Oct-4 proteininin immünohistokimyasal ekspresyonu semi-kantitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.41, 4.42, 4.43, 4.44, 4.45, 4.46, 4.47, 4.48, 4.49, 4.50, 4.51, 4.52, 4.53, 4.54, 4.55, 4.56, 4.57, 4.58, 4.59). Oct-4 ekspresyonu H Skoru değerinin parametrik ANOVA testiyle her bir yaş grubu içinde (P90, P105 ve P120) farklı gruplar arasında üçlü karşılaştırılmasında, K ve S grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmezken, N grubunun diğer iki gruba kıyasla anlamlı düzeyde düşük olduğu tespit edilmiştir. (P90  $p=0,05$ , P105  $p=0,01$ , P120  $p<0,001$ ) (Şekil 4.60, 4.61, 4.62). İmmünohistokimyasal H Skorlarının üçlü karşılaştırma analizlerine ait istatistiksel değerler tablo halinde sunulmuştur (Çizelge 4.2).

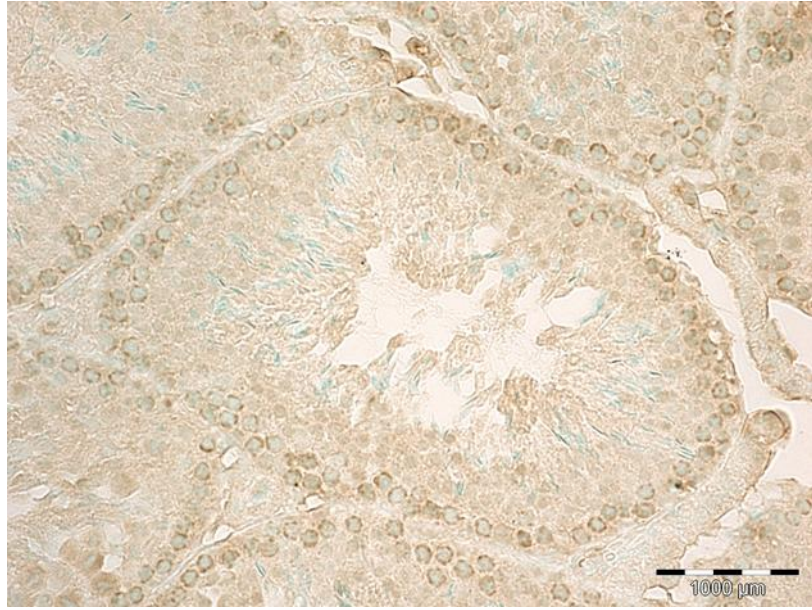


Şekil.4.41. Oct-4 boyamasına ait negatif kontrol boyaması, x400.

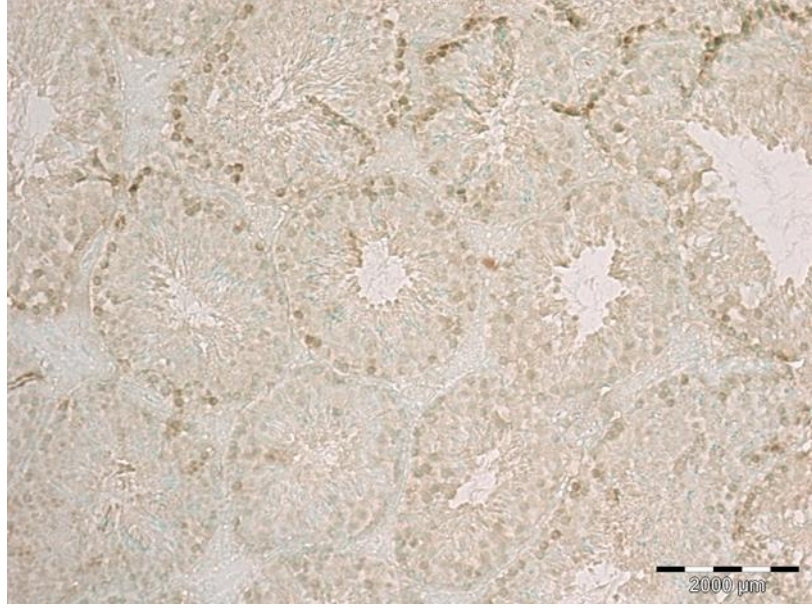




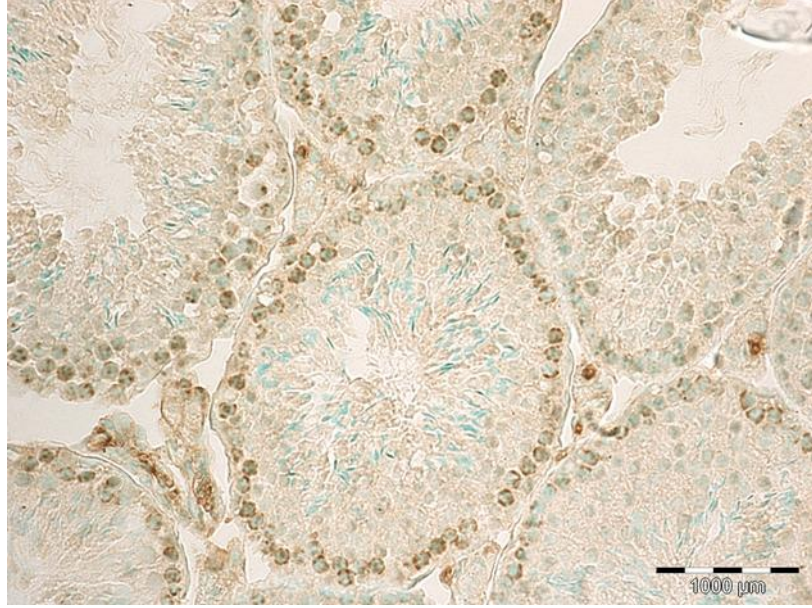
Şekil.4.42. P90, Kontrol grubu Oct-4 boyaması, x200.



Şekil.4.43. P90, Kontrol grubu Oct-4 boyaması, x400.

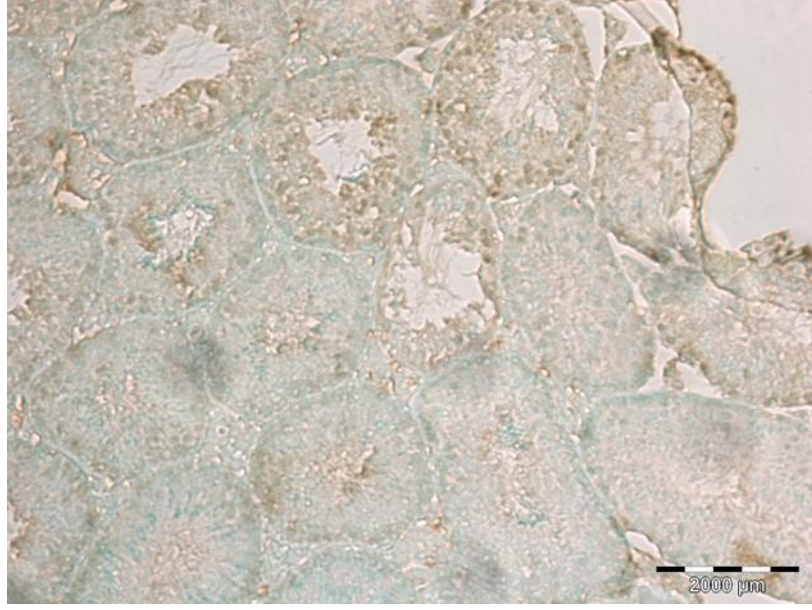


Şekil.4.44. P90, Sham grubu Oct-4 boyaması, x200.

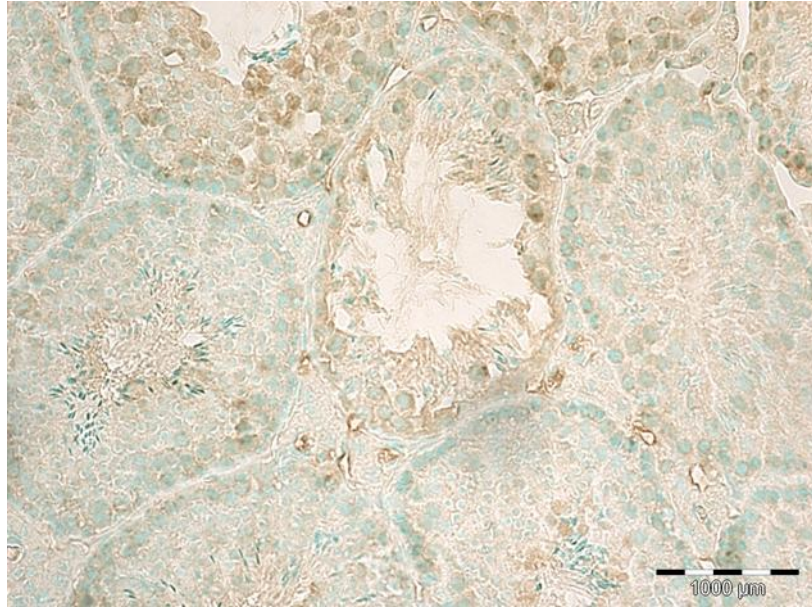


Şekil.4.45. P90, Sham grubu Oct-4 boyaması, x400.



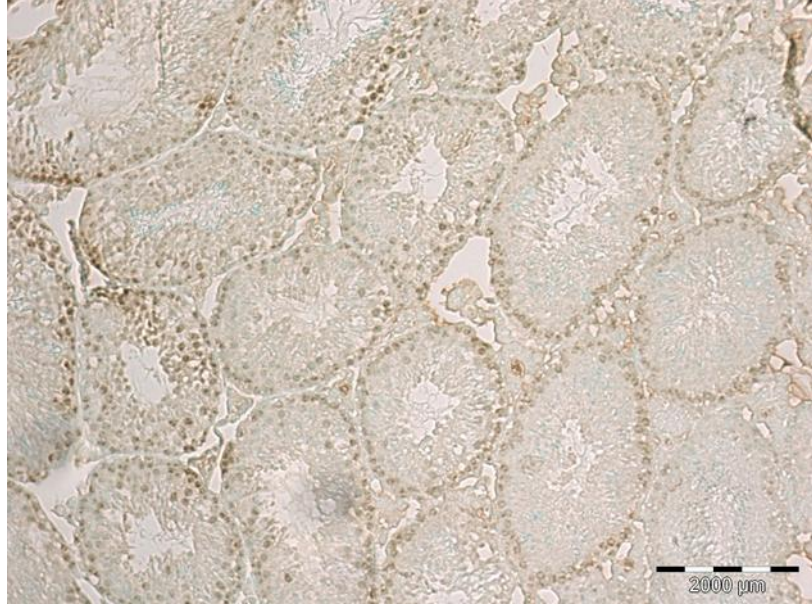


Şekil.4.46. P90, Nikotin grubu Oct-4 boyaması, x200.

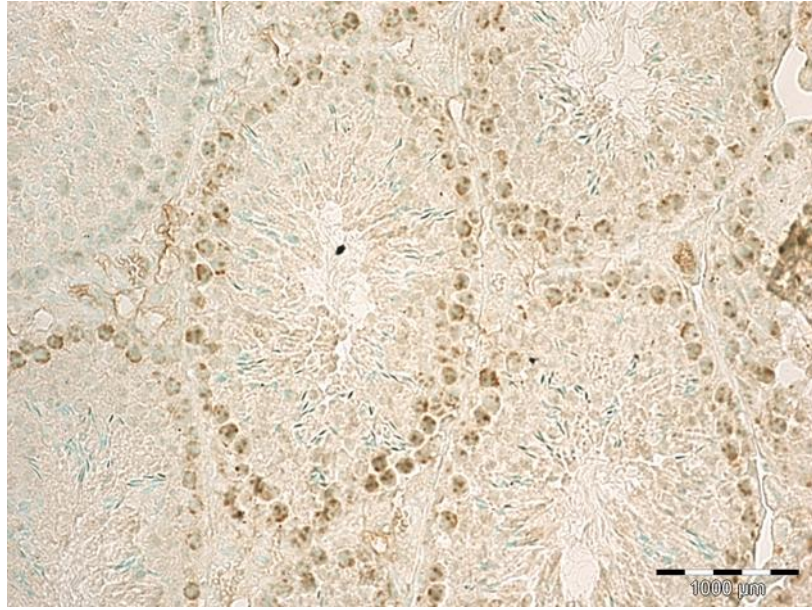


Şekil.4.47. P90, Nikotin grubu Oct-4 boyaması, x400.

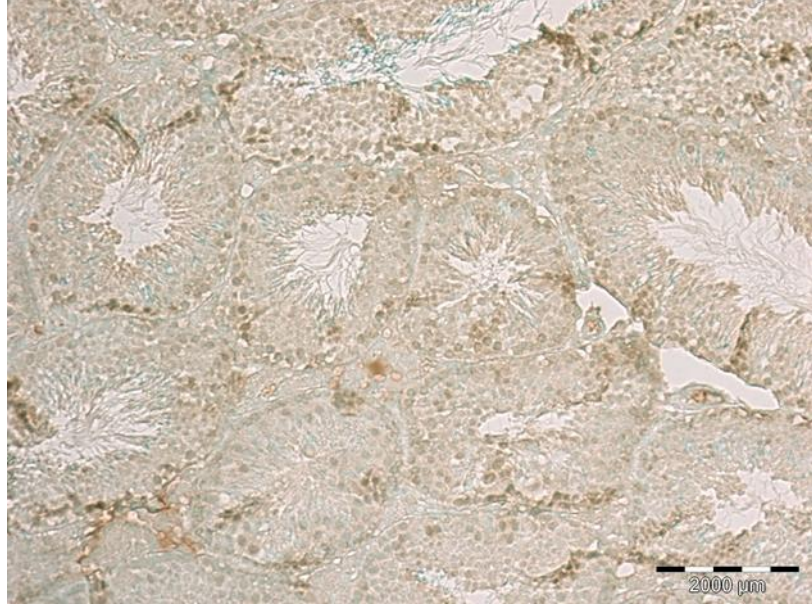




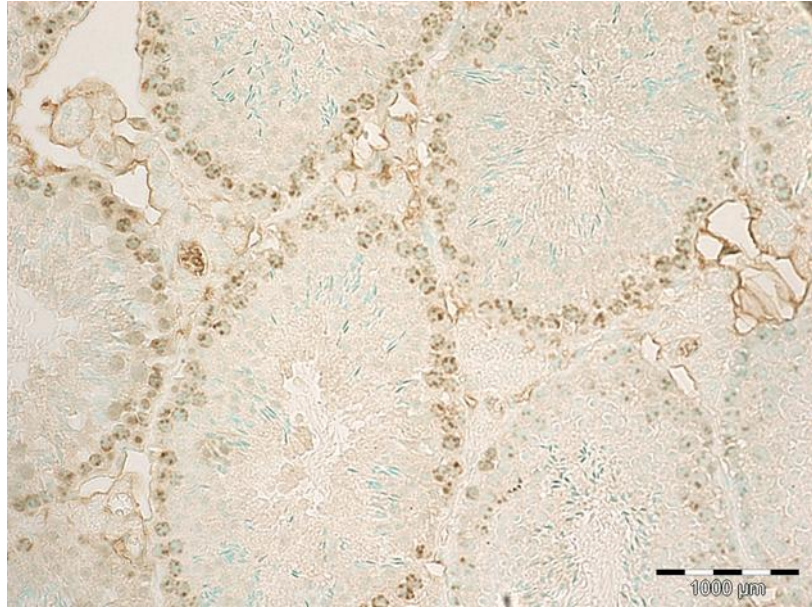
**Şekil.4.48.** P105, Kontrol grubu Oct-4 boyaması, x200.



**Şekil.4.49.** P105, Kontrol grubu Oct-4 boyaması, x400.

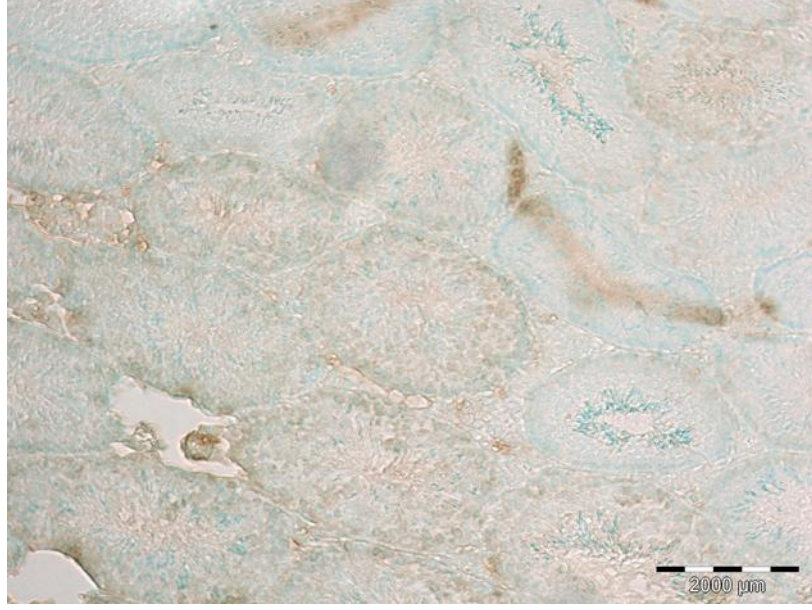


Şekil.4.50. P105, Sham grubu Oct-4 boyaması, x200.

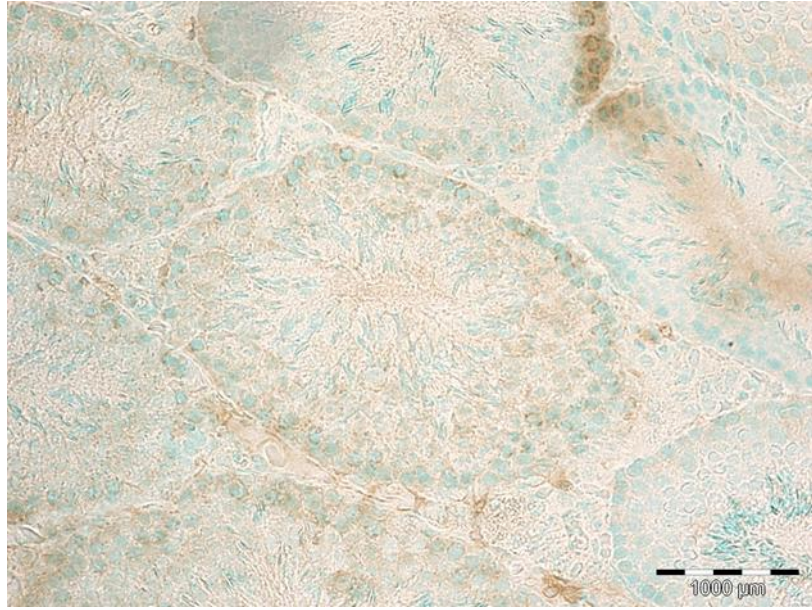


Şekil.4.51. P105, Sham grubu Oct-4 boyaması, x400.

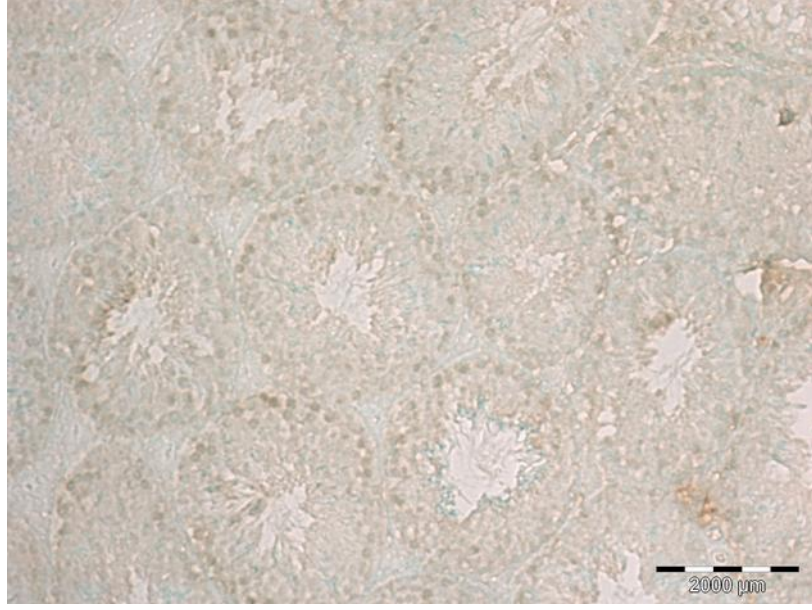




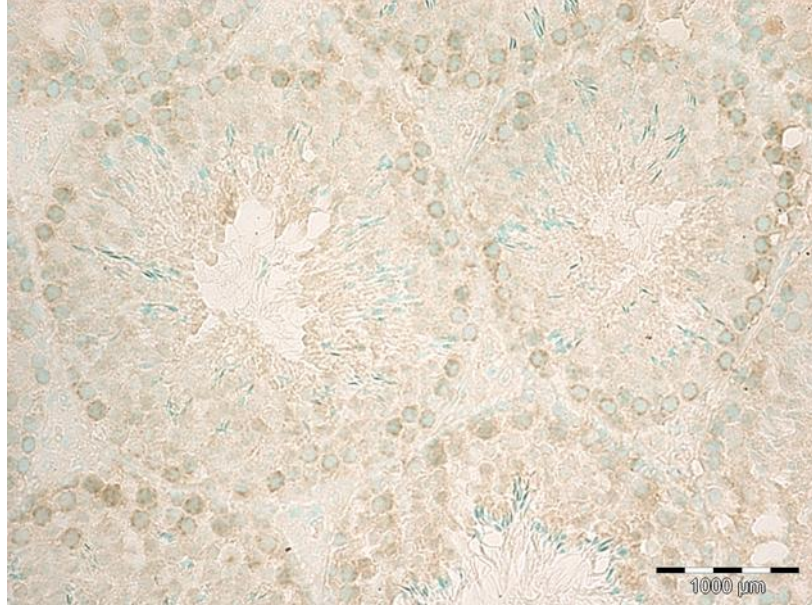
Şekil.4.52. P105, Nikotin grubu Oct-4 boyaması, x200.



Şekil.4.53. P105, Nikotin grubu Oct-4 boyaması, x400.

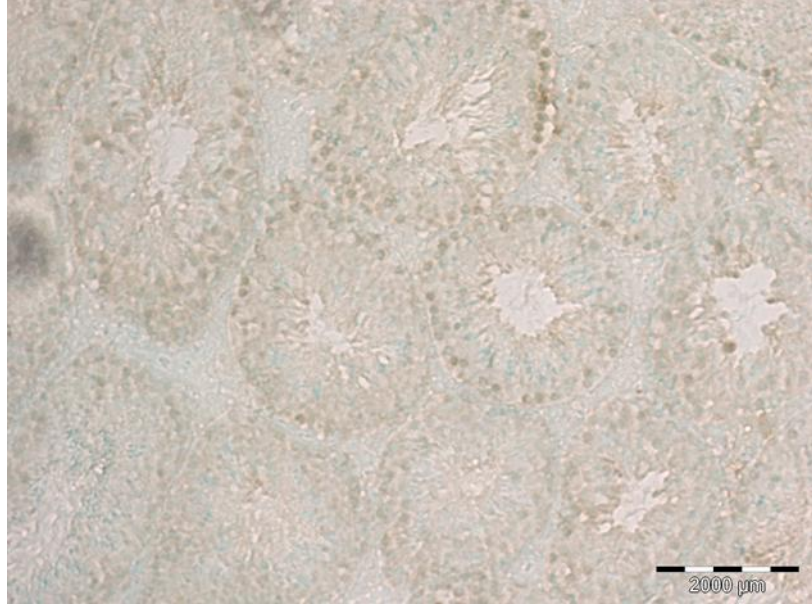


Şekil.4.54. P120, Kontrol grubu Oct-4 boyaması, x200.

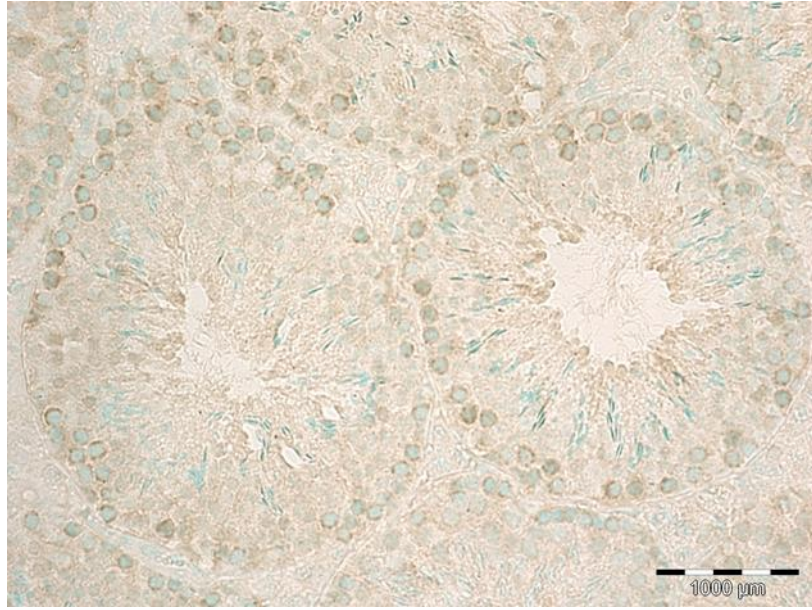


Şekil.4.55. P120, Kontrol grubu Oct-4 boyaması, x400.

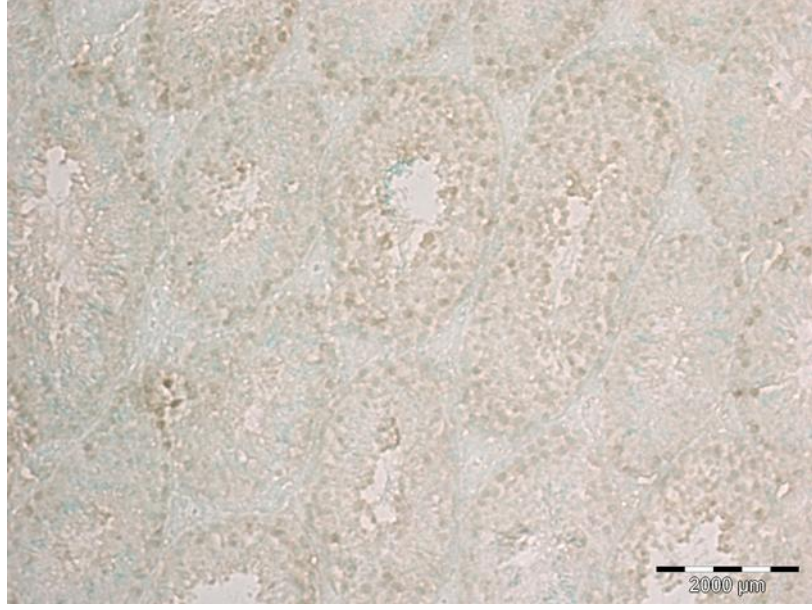




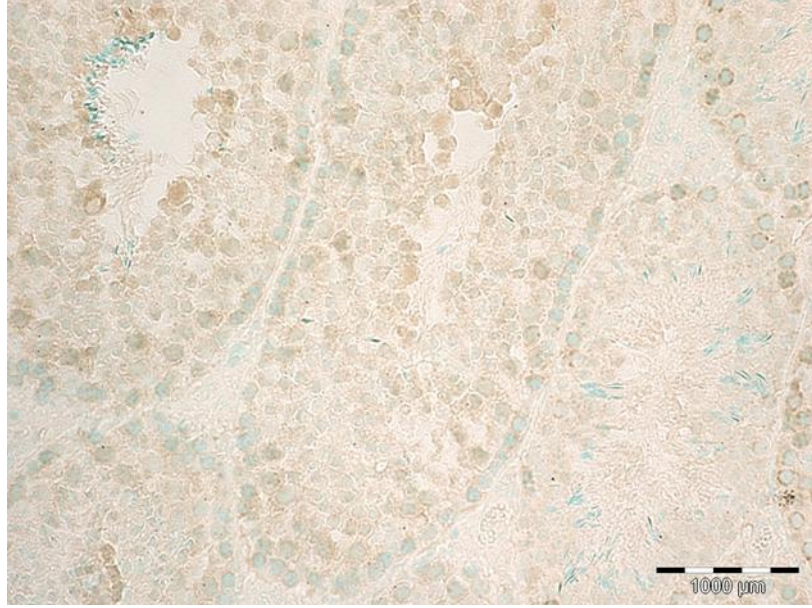
Şekil.4.56. P120, Sham grubu Oct-4 boyaması, x200.



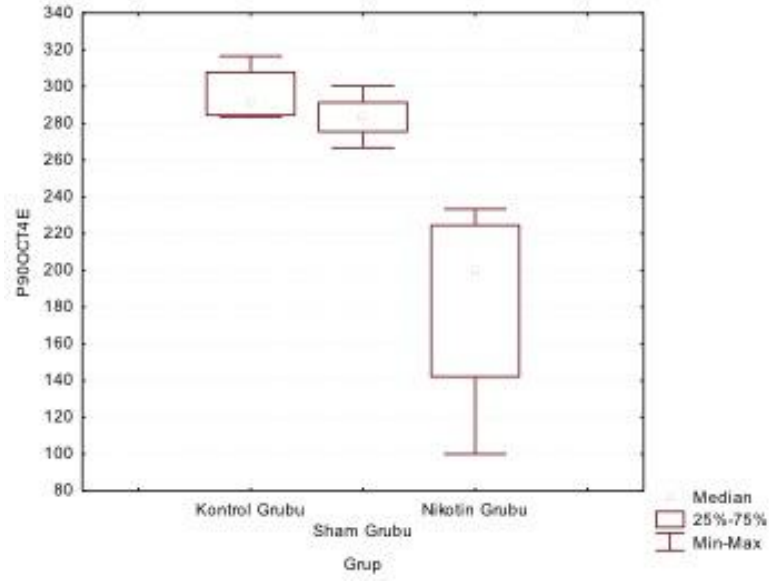
Şekil.4.57. P120, Sham grubu Oct-4 boyaması, x400.



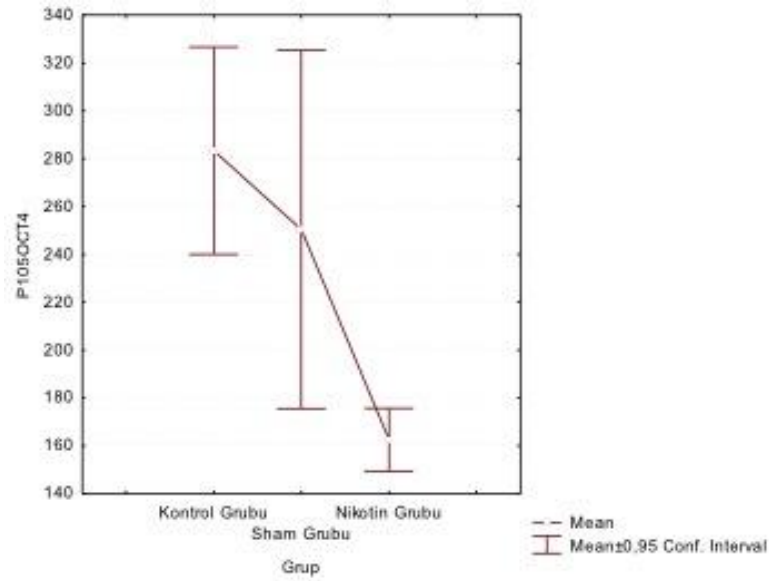
Şekil.4.58. P120, Nikotin grubu Oct-4 boyaması, x200.



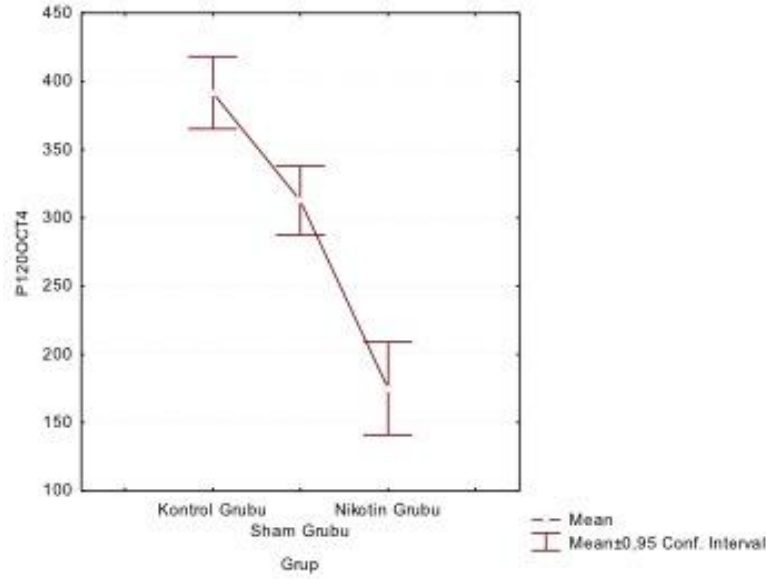
Şekil.4.59. P120, Nikotin grubu Oct-4 boyaması, x400.



**Şekil 4.60.** P90 Oct-4 H Skoru düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. ( $p=0.015$ ) Bu farklılığın kaynağını tespit etmek amacıyla post hoc test uyguladığımızda, nikotin grubunun diğer gruplardan farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).



**Şekil 4.61.** P105 Oct-4 H düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. ( $p= 0.001$ ) Bu farklılığın kaynağını tespit etmek amacıyla post hoc test uyguladığımızda, nikotin grubunun diğer gruplardan farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

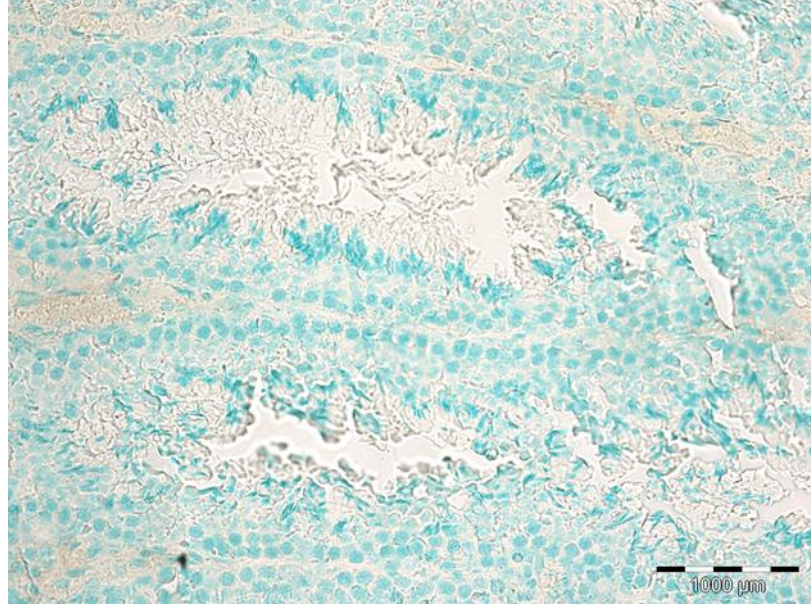


**Şekil 4.62.** P120 Oct-4 H Skoru düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. ( $p < 0.001$ ) Bu farklılığın kaynağını tespit etmek amacıyla post hoc test uyguladığımızda, tüm grupların birbirinden farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).

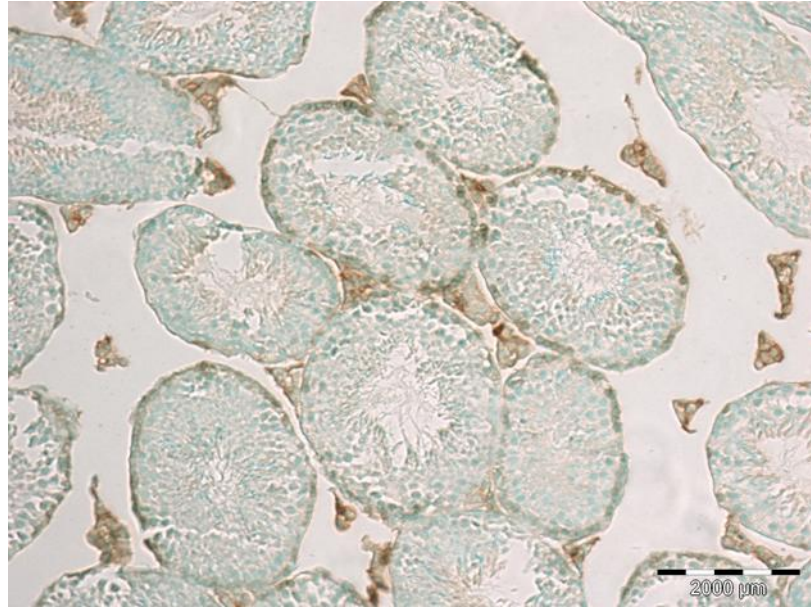
#### 4.7. Spermatogonyal Hücrelerde İmmünohistokimyasal C-kit Ekspresyonu

Çalışmamızda P90, P105 ve P120 yaş gruplarında K, S ve N grubu farelerin spermatogonyal farklılaşmasında görev alan C-kit proteininin immünohistokimyasal ekspresyonu semi-kantitatif olarak belirlenmiştir (Şekil 4.63, 4.64, 4.65, 4.66, 4.67, 4.68, 4.69, 4.70, 4.71, 4.72, 4.73, 4.74, 4.75, 4.76, 4.77, 4.78, 4.79, 4.80, 4.81). Parametrik ANOVA testiyle P90 ve P120’de K ve S grupları arasında istatistiksel bir fark gözlenmezken, N grubunda C-kit ekspresyonunun diğer iki gruba kıyasla anlamlı düzeyde daha az olduğu tespit edilmiştir (P90  $p < 0,001$ , P120  $p = 0,03$ ). P105’de ise K, S ve N grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmemiştir (P105  $p = 0,07$ ) (Şekil 4.82, 4.83, 4.84). İmmünohistokimyasal H Skorlarının üçlü karşılaştırma analizlerine ait istatistiksel değerler tablo halinde sunulmuştur (Çizelge 4.2).

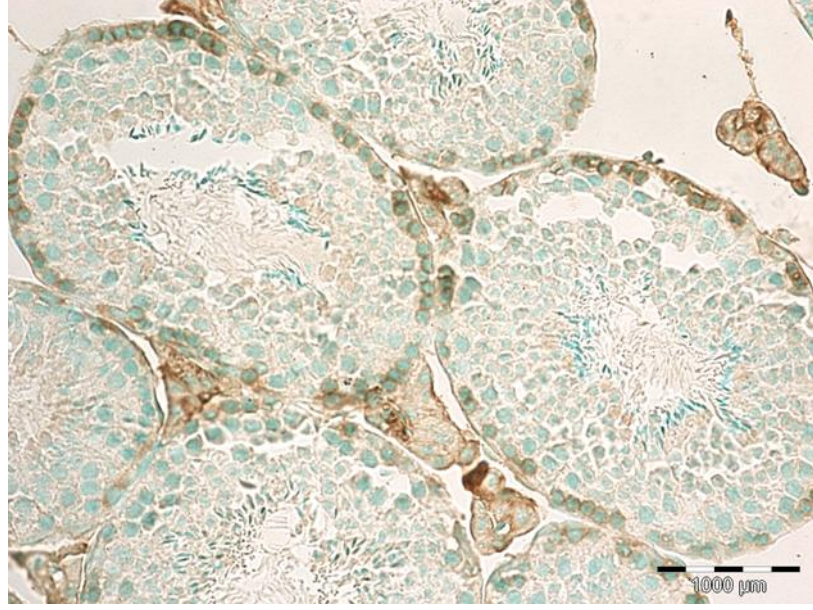




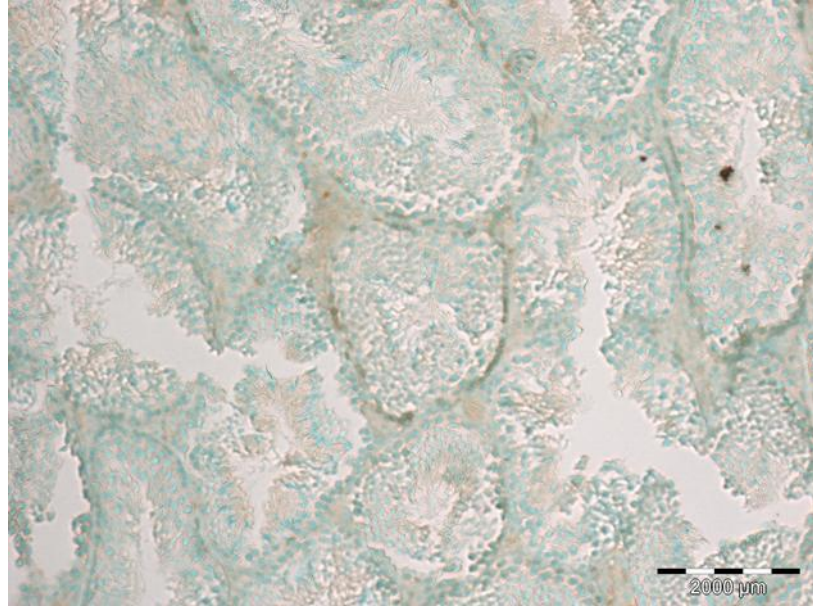
Şekil.4.63. C-kit boyamasına ait negatif kontrol boyaması, x400.



Şekil.4.64. P90, Kontrol grubu C-kit boyaması, x200.

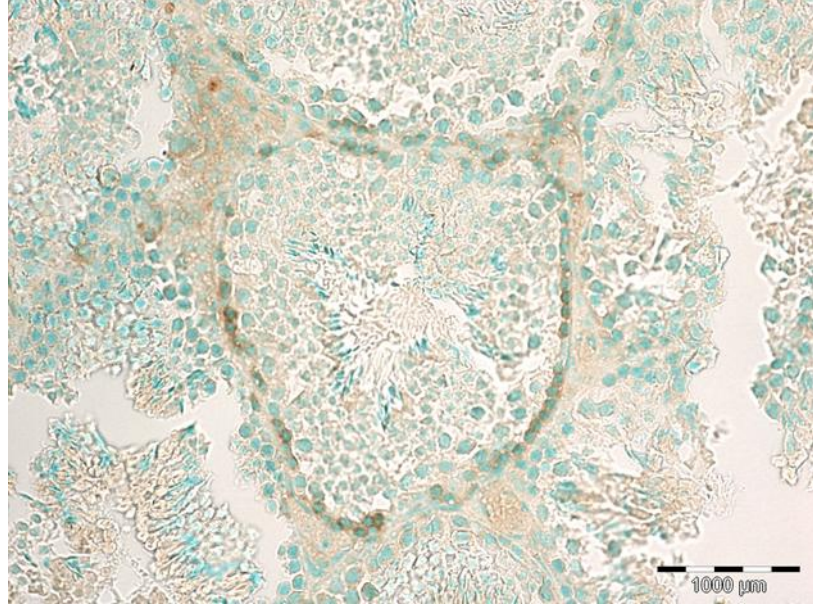


Şekil.4.65. P90, Kontrol grubu C-kit boyaması, x400.

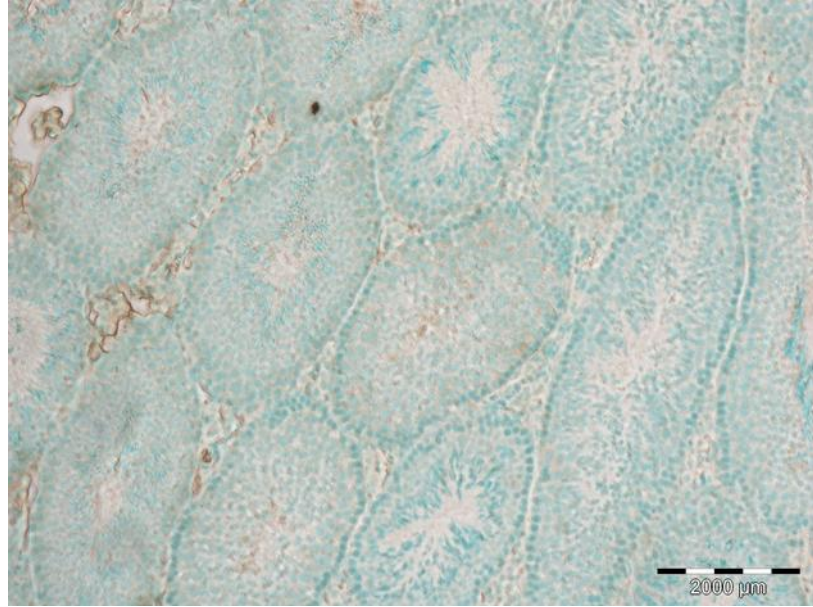


Şekil.4.66. P90, Sham grubu C-kit boyaması, x200.

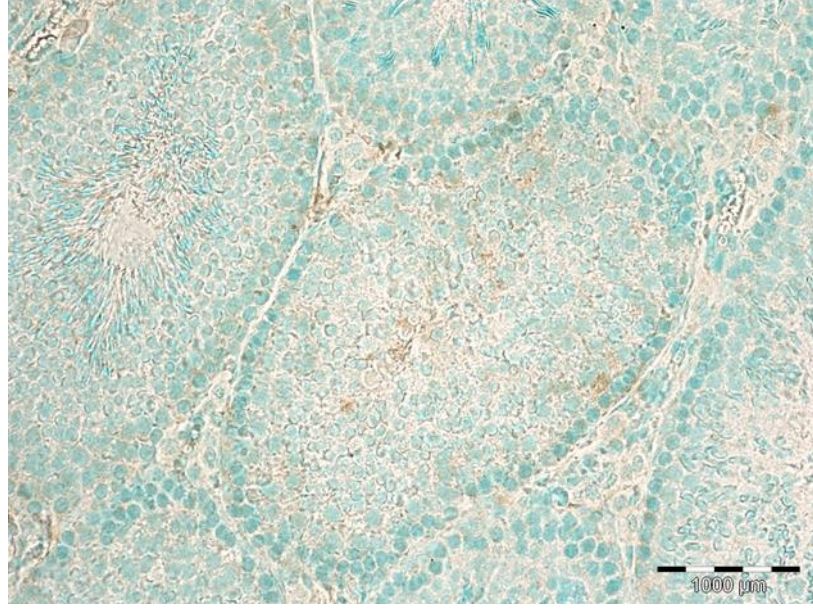




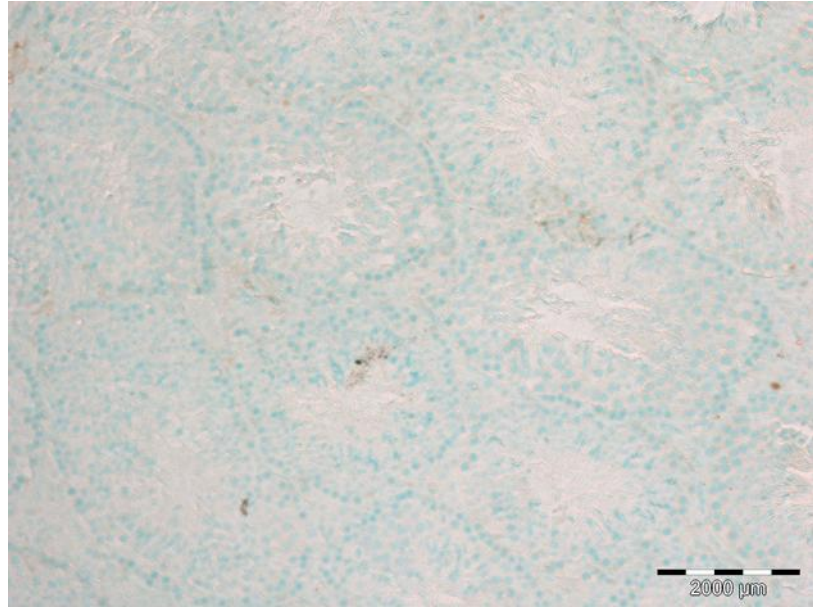
Şekil.4.67. P90, Sham grubu C-kit boyaması, x400.



Şekil.4.68. P90, Nikotin grubu C-kit boyaması, x200.

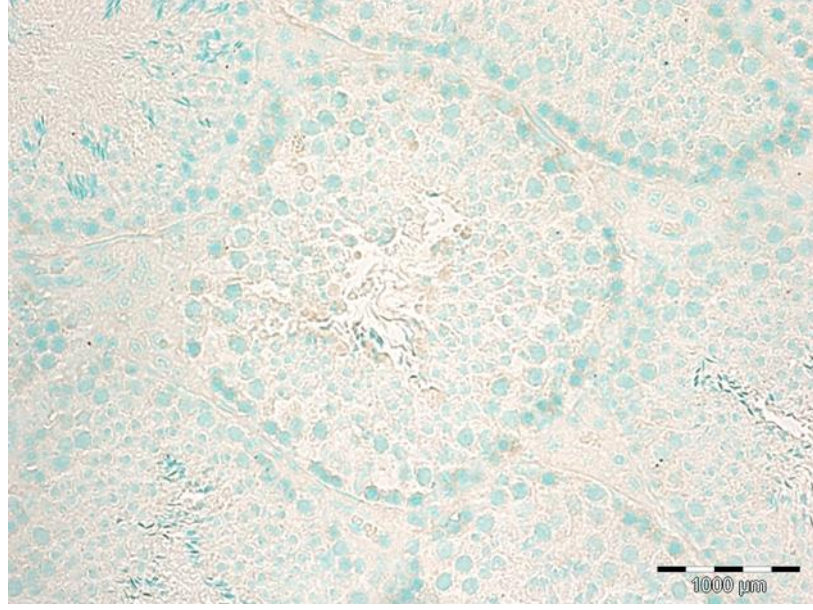


**Şekil.4.69.** P90, Nikotin grubu C-kit boyaması, x400.

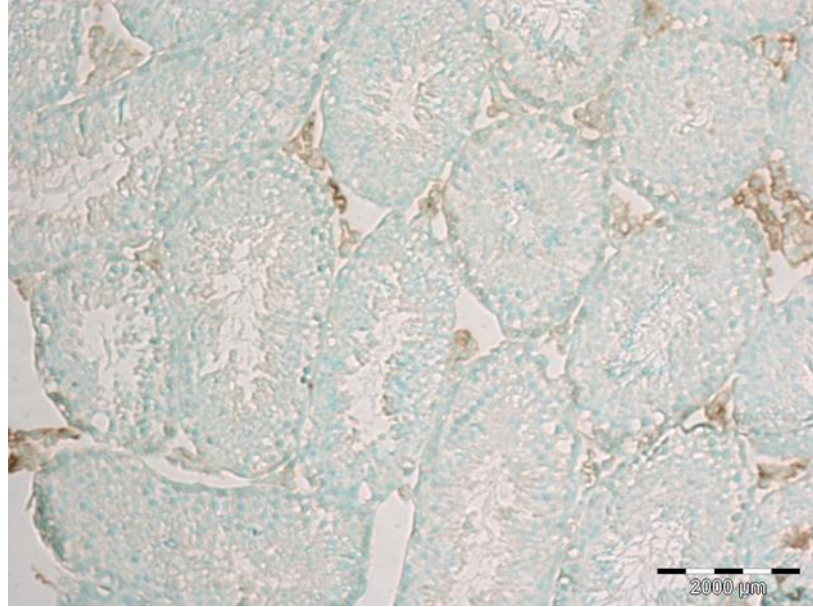


**Şekil.4.70.** P105, Kontrol grubu C-kit boyaması, x200.



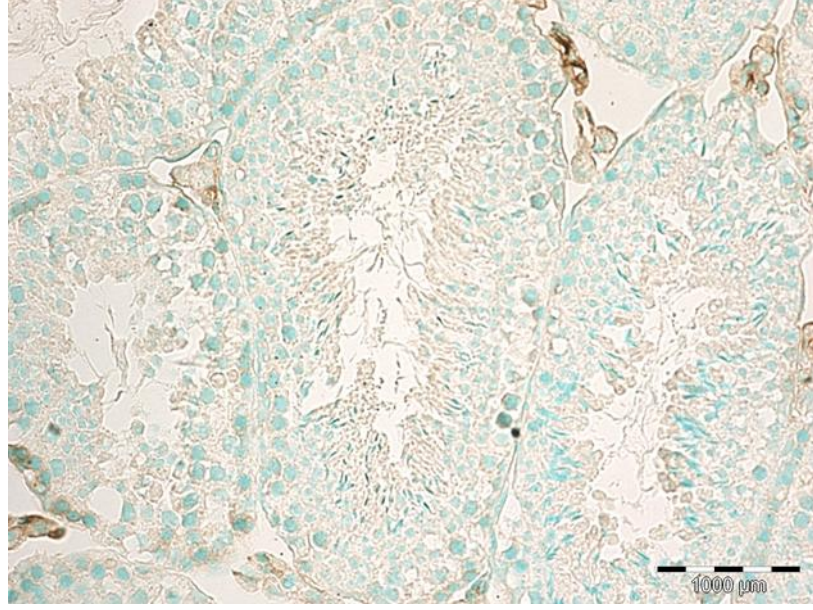


Şekil.4.71. P105, Kontrol grubu C-kit boyaması, x400.

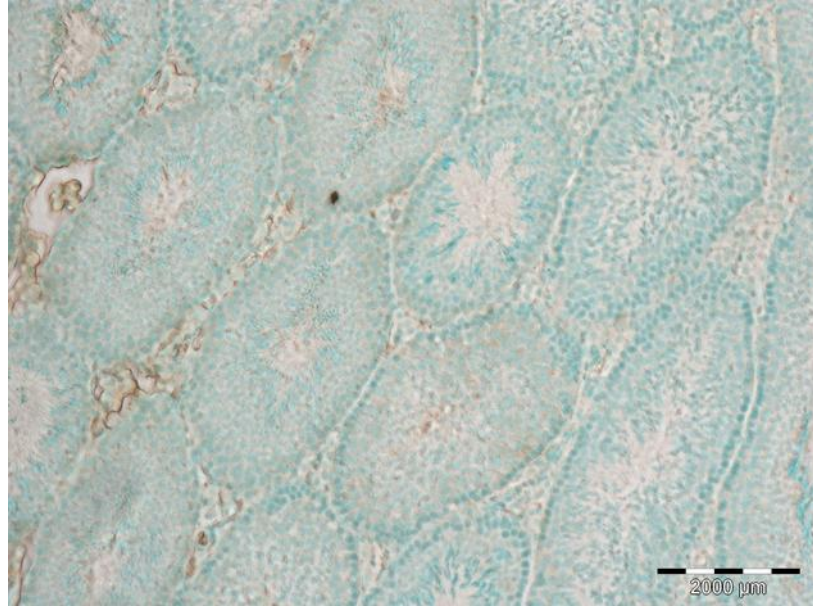


Şekil.4.72. P105, Sham grubu C-Kit boyaması, x200.

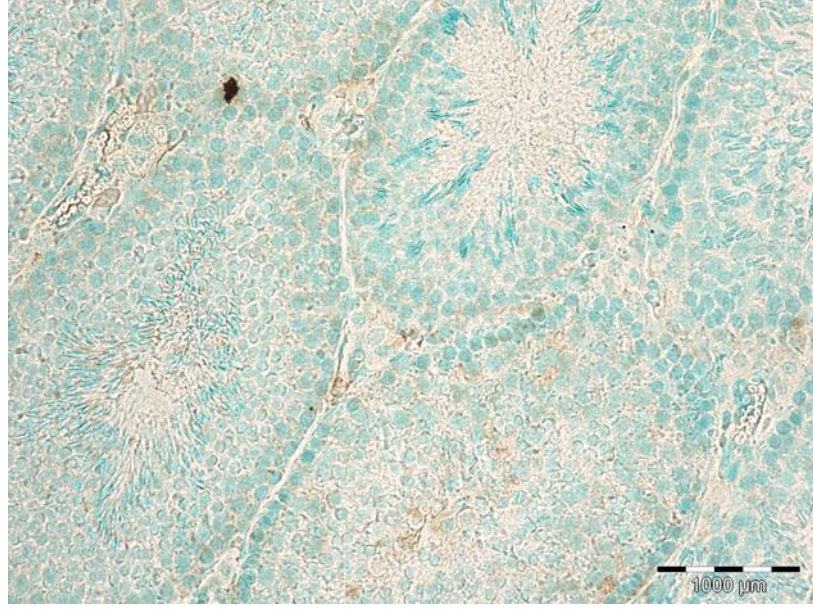




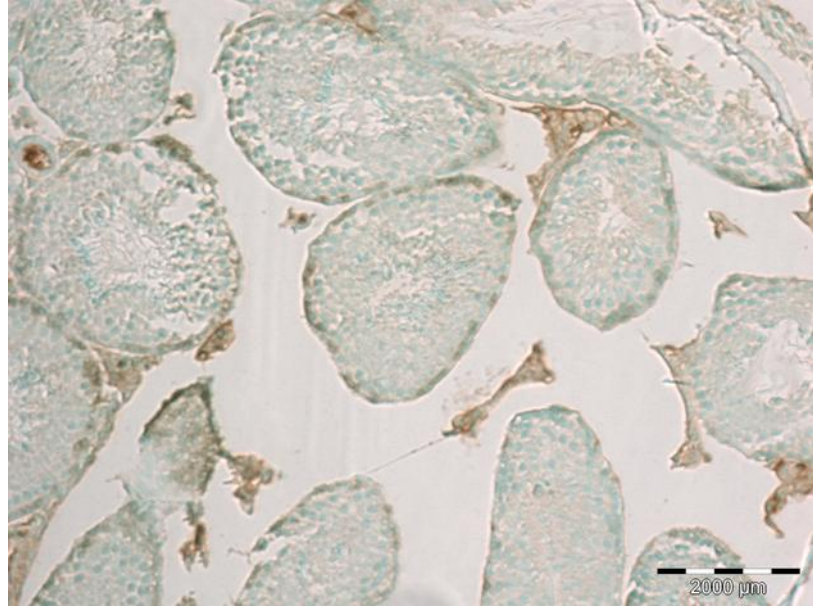
**Şekil.4.73.** P105, Sham grubu C-kit boyaması, x400.



**Şekil.4.74.** P105, Nikotin grubu C-kit boyaması, x200.

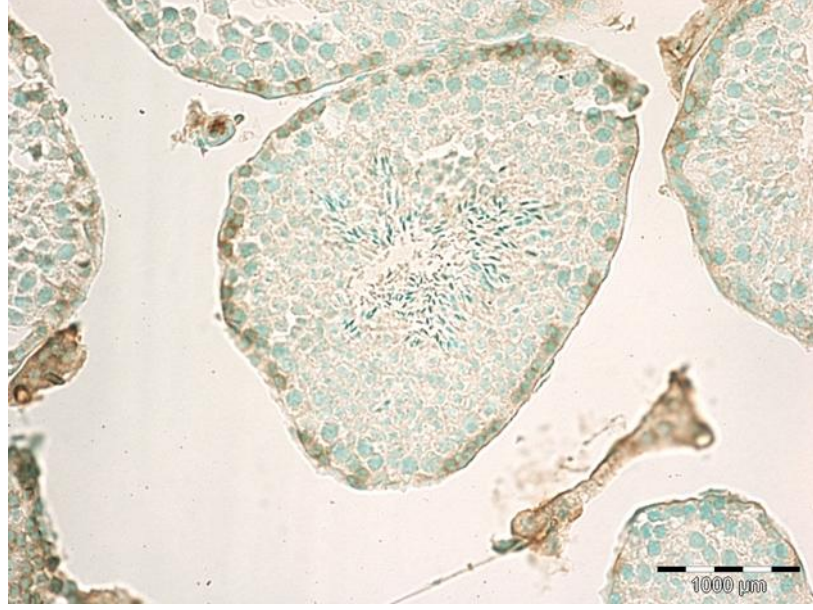


Şekil.4.75. P105, Nikotin grubu C-kit boyaması, x400.

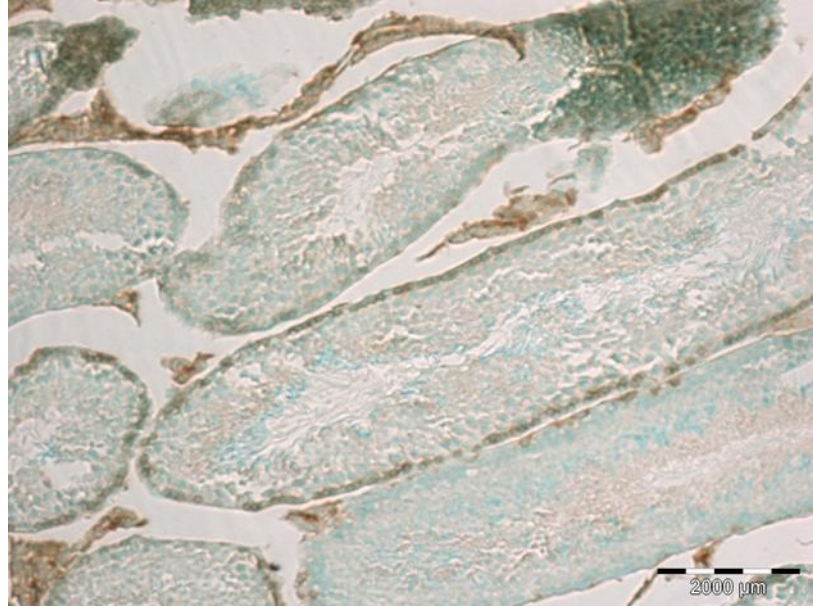


Şekil.4.76. P120, Kontrol grubu C-kit boyaması, x200.

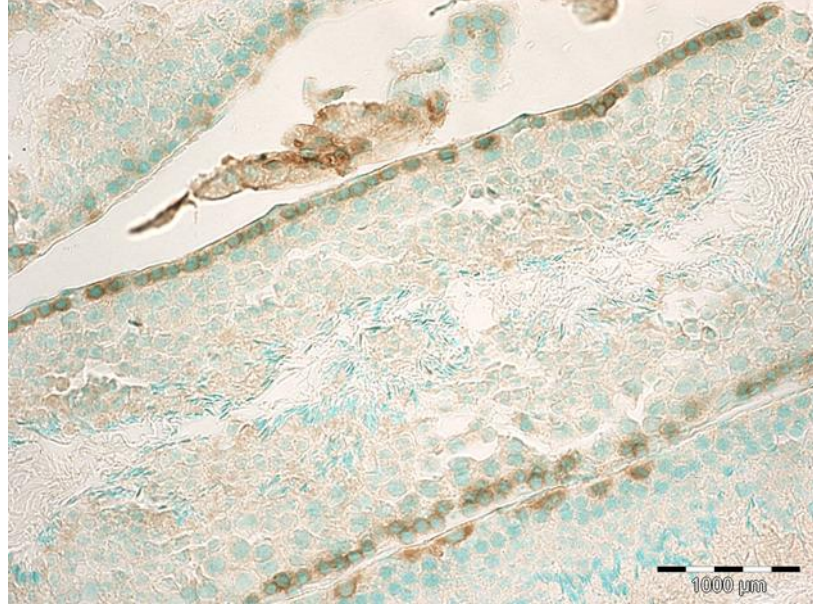




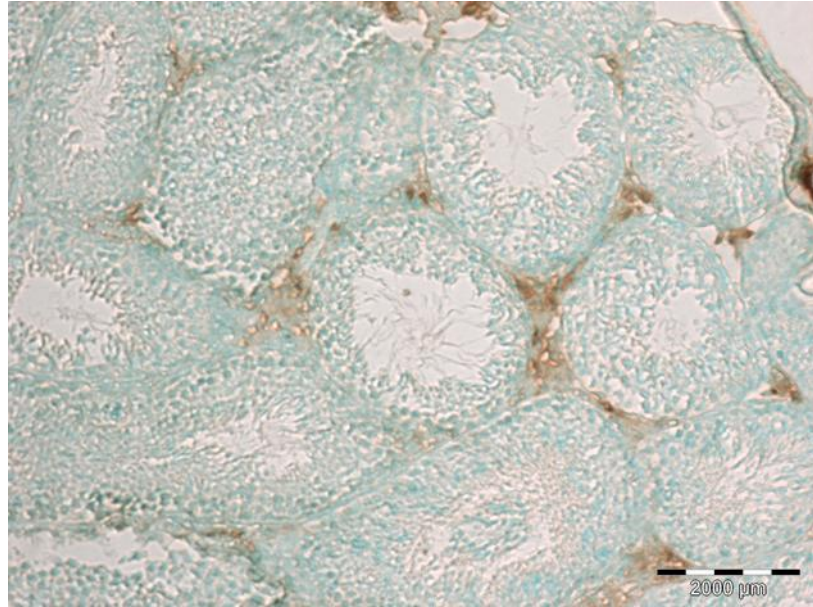
Şekil.4.77. P120, Kontrol grubu C-kit boyaması, x400.



Şekil.4.78. P120, Sham grubu C-kit boyaması, x200.

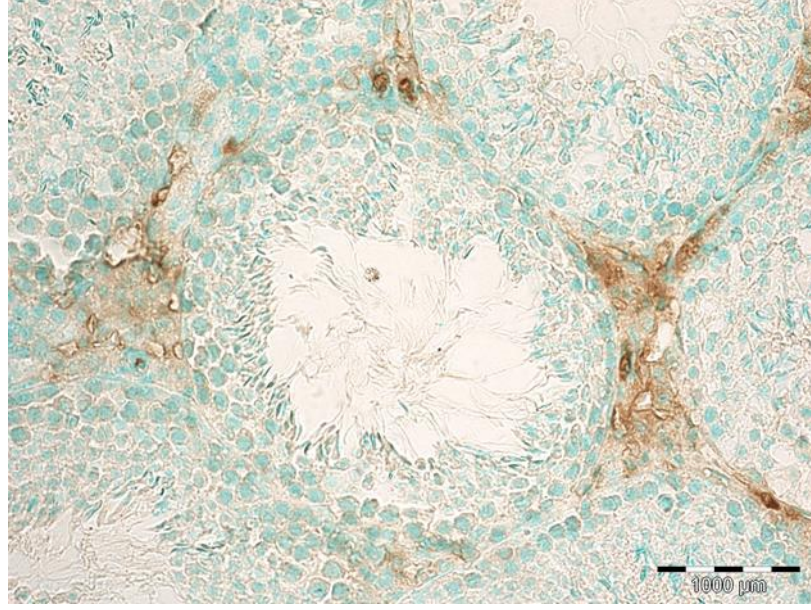


**Şekil.4.79.** P120, Sham grubu C-kit boyaması, x400.

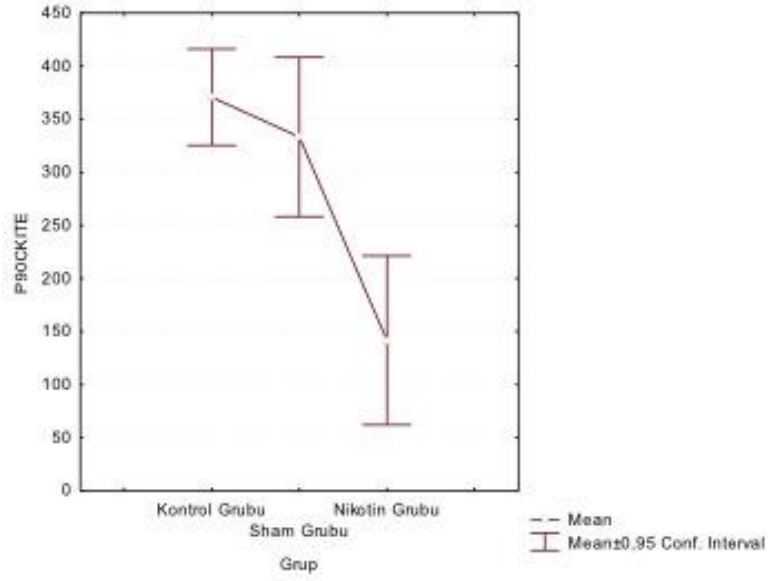


**Şekil.4.80.** P120, Nikotin grubu C-kit boyaması, x200.



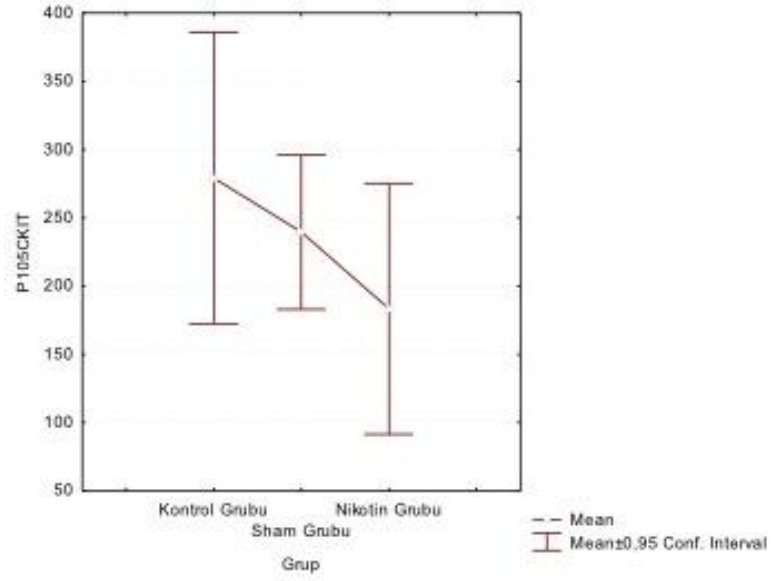


Şekil.4.81. P120, Nikotin grubu C-kit boyaması, x400.

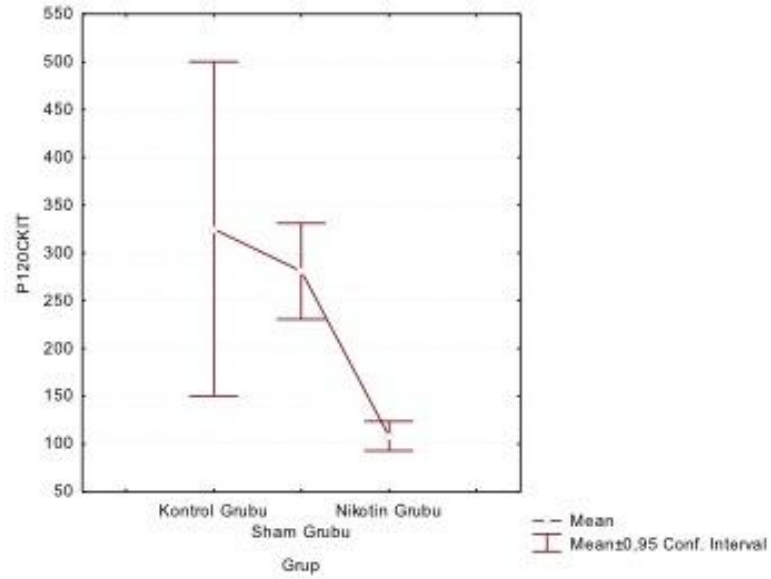


Şekil 4.82. P90 C-Kit H Skoru düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. ( $p < 0.001$ ) Bu farklılığın kaynağını tespit etmek amacıyla post hoc test uyguladığımızda, nikotin grubunun diğer gruplardan farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ).





**Şekil 4.83.** P105 C-Kit H Skoru düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktur ( $p=0.097$ ).



**Şekil 4.84.** P120 C-Kit H Skoru düzeyleri bakımından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık vardır. ( $p=0.003$ ) Bu farklılığın kaynağını tespit etmek amacıyla post hoc test uyguladığımızda, nikotin grubunun diğer gruplardan farklı olduğu tespit edilmiştir ( $p<0.05$ ).

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada farelerde puberte sonrası ilk süreçte nikotin maruziyetinin spermatogonyal farklılaşma üzerine etkisi morfolojik ve immünohistokimyasal olarak incelendi. Nikotin maruziyetine bağlı oluşan seminifer tübül hasarını morfolojik olarak değerlendirmek için, tüm yaş günlerine ait K, S ve N gruplarındaki farelerin seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıkları ölçüldü. Tüm yaş günlerine ait N gruplarında bu iki parametrenin K ve S gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğu gösterildi. Bu parametrelerin azalmış olması, N grubu hayvanlarda spermatogenezin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmediğini göstermektedir. Ayrıca, histolojik olarak değerlendirildiğinde, tüm yaş günlerine ait N grubu farelerin seminifer tübüllerinde yüksek oranda dejenerasyon, Sertoli hücreleri ile SPG'lar arasında açılmalar ve yer yer vakuolizasyon, seminifer tübül lümeninde spermatogenezin etkilendiğini gösteren immatür spermatojenik hücreler, interstisyel alan dokusunun bütünlüğünde bozulma olduğu gözlemlendi. Nesseim ve ark. (76) da yaptıkları çalışmada 8 hafta boyunca farklı dozlarda (2, 4 ve 6 mg/kg) nikotin uyguladıkları albino sıçanların seminifer tübül çaplarının ve germinal epitel kalınlıklarının S gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca yaptıkları histolojik değerlendirmede seminifer tübüllerde önemli oranda dejenerasyon, hücreler arasında vakuol oluşumu ve SPG'ların lümenine doğru döküldüğünü göstermişlerdir. Mosbaha ve ark. (77) ise 2 ay boyunca 1 mg/kg dozunda nikotin uyguladıkları sıçanların seminifer tübül lümenlerinin S gruplarına kıyasla artmış olduğunu tübüllerde yapısal bozulma, tübüller arasında konjesyon ve çok nükleuslu dev hücrelerin varlığını tespit etmişlerdir. Ping ve ark. (78) da yapmış oldukları çalışmada 100 gün boyunca 5 mg/kg dozunda nikotin uyguladıkları sıçanların S grubuna kıyasla hem seminifer tübül çaplarının hem de germinal epitel kalınlıklarının azaldığını göstermişlerdir. Ayrıca nikotin maruziyetinin seminifer tübüllerde dejeneratif etki yarattığını ve çoğunun morfolojik olarak bozulduğunu, interstisyel alanda azalma olduğunu ve spermatojenik hücrelerin lümenine doğru döküldüğünü rapor etmişlerdir (78).

Çalışmamızda, tüm yaş günlerine ait nikotin grubu farelerde testiste interstisyel alanda lokalize olan Leydig hücrelerinin sayısında azalma olduğu gözlemlendi. Leydig

hücrelerinin başta testosteron olmak üzere androstenedion sentezinden sorumlu olduğu ve bu hormonların sentezinin spermatogenezin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesi için şart olduğu bilinmektedir (3). Kim ve ark. (79) yaptıkları çalışmada farelerden elde ettikleri Leydig hücrelerini kültür ortamında 100 mM konsantrasyonda nikotinle 24 saat inkübe etmişler ve daha sonra faz kontrast mikroskobu altında incelemişler ve sonuç olarak N grubundaki Leydig hücrelerinin K grubuna kıyasla hem daha küçük morfolojide olduğunu hem de sayılarının daha az olduğunu rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada nikotinin, apoptozis belirteci olan Caspase-3 enzim aktivitesinin K grubuna kıyasla anlamlı düzeyde arttırdığını yani apoptozisde belirgin bir artış olduğu göstermişlerdir. Kuladip ve ark. (80) da yapmış oldukları çalışmada, albino sıçanlara 12 hafta boyunca 0,6 mg/kg dozunda nikotin enjekte etmişler ve daha sonra sıçanlardan elde ettikleri kan örneklerinde büyüme hormonu (GH), folikül stimüle edici hormon (FSH), lüteinizan hormon (LH) ve testosteron seviyelerini değerlendirmişlerdir. N grubu sıçanların bu 4 hormon düzeylerinin K grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldığını gözlemlemişlerdir. Bu araştırmacılar sonuç olarak, nikotin maruziyetinin hipotalamus-hipofiz aksını bozarak, spermatogenezin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan hormonların sentezlenmelerini inhibe ettiğini ve seminifer tübüllerde gözlenen dejenerasyonların bu hormonların sentezinin bozulmasından kaynaklanabileceğini öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda da seminifer tübüllerde gözlenen dejenerasyonların nikotin maruziyetinden etkilenen Leydig hücrelerinin fonksiyonlarının bozulması ve hormon sentezinin bozulmasından kaynaklandığı düşünüldü.

Yapılan bazı çalışmalarda deney hayvanlarına aynı doz nikotin verilmesine karşın farklı derecelerde hasar oluşum nedeninin; deneylerde kullanılan hayvan türü farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Deneysel çalışmalarda genel olarak kemirgen türleri kullanılmakla birlikte, aynı çalışma alanında farklı tür deney hayvanının hatta aynı tür olsa bile farklı genetik alt yapıya sahip soyların kullanıldığı bilinmektedir. Bu nedenle nikotin uygulamasının benzer doz ve maruziyet süreçlerinde olsa dahi farklı tür ya da soy deney hayvanlarında farklı etkiler yapabileceği düşünülmektedir. Literatürdeki çalışmalar incelendiği zaman C57BL6/J soyu farelerde nikotin maruziyeti sonrasında testiste seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve testis doku histolojik yapısını inceleyen başka bir çalışmaya rastlanmamıştır. Fakat

yukarıda özetlendiği üzere farklı tür deney hayvanları kullanılmasına rağmen nikotine bağlı olarak oluşan bu parametrelerdeki bozulmalar çalışmamızla uygunluk göstermektedir.

Bir spermatogenez döngüsünün yaklaşık olarak insanlarda 72, farelerde ise 8,6 gün olduğu düşünüldüğünde, deney tasarısında belirlenen farklı günlerden olan P90 nikotinin akut etkisini, P105 insanlarda sigara bırakımından 6 ay sonrasını, P120 ise 12 ay sonrasını modellemektedir. Çalışmamızda, tüm yaş günlerindeki nikotin grubu farelerin seminifer tübüllerinde dejenerasyon gözlemlendi. Nikotin maruziyeti sona erdikten sonra ilerleyen zamanlarda seminifer tübül morfolojisinde iyileşme gözlemlenmedi. Literatürde yer alan bir çalışmada (76), albino sıçanlara farklı dozlarda (2, 4 ve 6 mg/kg) nikotin enjeksiyonu 8 hafta boyunca uygulanmıştır ve sonraki 8 hafta iyileştirme evresine bırakılmıştır. Sonuç olarak, 2 mg/kg dozunda nikotin uygulanan ve iyileştirme evresine bırakılan grupta iyileşme gözlemlenmiştir. Diğer 2 dozun (4 ve 6 mg/kg) iyileşme evresi için daha uzun süreye ihtiyaç olabileceği düşünülmüştür. Mosbaha ve ark. (77) yaptıkları çalışmada N grubu sıçanlara 2 ay boyunca 1 mg/kg dozunda nikotin enjeksiyonu yapmışlardır. Nikotine bağlı olarak oluşan dejeneratif değişikliklerin iyileşmesi için de deney gruplarına bir de nikotin iyileştirme grubu eklemiştirler. Nikotin iyileştirme grubuna da 2 ay boyunca 1 mg/kg dozunda nikotin enjekte etmişler ve iyileştirme amaçlı kullanılan, antioksidan özelliğiyle bilinen yeşil çay ekstratını 10 g/kg dozunda 2 ay boyunca gavaj yoluyla vermişlerdir. 2 ayın sonunda N grubunda seminifer tübüllerde yüksek oranda dejenerasyon ve intersitisyel alan dokusunda azalmalar olduğunu gözlemlenmişler. Nikotin iyileştirme grubunda ise, nikotinin yarattığı dejeneratif etkinin ortadan kalkmaya başladığını ve seminifer tübüllerin normal morfolojiye yakın olduğunu gözlemlenmişler. Bu bilgiler ışığında, iyileşme sürecinde etkili olan faktörlerin değişken olduğunu düşünmekteyiz.

Literatürde, erkek üreme biyolojisi konusunda gerçekleştirilmiş deneysel nikotin çalışmalarında spermatogenez üzerinde oluşan hasar derecesi, seminifer tübül morfolojisi, sperm sayısı, canlılığı, morfolojisi, motilitesi ve biyokimyasal parametreler düzeyinde incelenmiştir (76, 77, 78, 79, 80). Bu tez çalışmasında ise, puberte sonrası nikotin maruziyetinin spermatogenezin sağlıklı bir şekilde işleyebilmesi için ön şart olarak kabul edilen spermatogonyal farklılaşma süreci üzerine etkilerini incelemek amaçlandı. Bu amaçla, spermatogonyal farklılaşmanın farklı evrelerini gösteren 3

önemli proteinin (Oct-4, C-Kit ve GDNF) immünohistokimyasal ekspresyonları incenlendi. Bunlardan Oct-4; SKH'leri, C-kit farklılaşmakta olan spermatogonyumları (31, 32, 33) ve GDNF ise bu iki hücre tipi arasındaki popülasyonun dengesini (26, 27, 28) görebilmek amacıyla kullanıldı. İmmünohistokimyasal boyamalar neticesinde her üç spermatogonyal belirtece ait semi-kantitatif ekspresyon skorlarının N grubu farelerde K ve S grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmış olduğu tespit edildi. Bu bilgiler ışığında, N grubunda Oct-4 immünopozitif hücrelerin diğer gruplara göre azalmış olması nikotinin bu germinal tabakadaki yeni doğan kök hücre popülasyon hacmini azalttığını işaret etmektedir. Mevcut literatürde nikotin maruziyeti sonrasında seminifer tübüllerde SKH sayısını inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Diğer yandan çalışmamızda N gruplarında spermatogonyal hücre tabakasında C-kit eksprese eden hücre popülasyonunun da K gruplarına kıyasla azalmış olması nikotin maruziyetinin farklılaşmış spermatogonyal hücre sayısını da azalttığını göstermektedir. Literatürde nikotinin testiküler C-kit ekspresyonu üzerine etkisini inceleyen hiçbir çalışma bulunmamasına rağmen, C-kit geninin çıkarıldığı farelerde Tip Aal SPG'dan A1 SPG'un farklılaşmasının bloke olduğu ve bu hayvanlarda infertilite geliştiği gösterilmiştir (31, 32). Bu çalışmada ise C-kit genine herhangi bir müdahale olmamasına rağmen nikotin maruziyeti sonucunda C-kit ekspresyonunun K gruplarına kıyasla oldukça azaldığı gözlemlendi. Diğer yandan, proliferen olan fakat farklılaşma yoluna ya da lokal kök hücre havuzuna tekrar katılma kararı arasındaki dengeyi sağladığı bilinen GDNF ekspresyonunun da nikotine bağlı olarak azalması bu hücreler arasındaki farklılaşma kararının dengesinin bozulduğunu işaret etmektedir. Literatürde nikotinin spermatogenez işleyişinde önemli etkileri olan bu proteinler üzerindeki etkilerini inceleyen hiçbir çalışmaya rastlanmadı. Fakat farklı kimyasal zararlıların aynı proteinler üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalar olduğu görüldü. Tanigaki ve ark. (81) yaptıkları çalışmada farelere etkin bir antitümör ajan olan doksorubisin maddesini 0,15 mg/kg dozunda 5 hafta boyunca haftada 2 kez enjekte ettikten sonra doksorubisin grubunda C-kit ekspresyonunun K grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldığını rapor etmişlerdir.

Caires ve ark. (82) ise yaptıkları çalışmada C57BL6/J soy farelere farklı dozlarda (0,5, 1,25 ve 2,5 g/kg) etanol uygulamışlar ve daha sonra Real Time PCR yöntemini kullanarak testis dokusundan total GDNF RNA'sını izole etmişlerdir. Sonuçta farklı



dozları içeren etanol gruplarında GDNF gen ekspresyonunun K grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azaldığını gözlemişlerdir.

Bu çalışma ile puberte sonrası nikotin maruziyetinin spermatogonyal farklılaşmayı aksattığı, seminifer tübüllerde dejeneratif etki yarattığı ve bu dejeneratif etkinin iyileşebilmesi için bu çalışmada belirlenen zaman dilimlerinden daha uzun zamana ihtiyaç olduğu hatta ek olarak antioksidan etkileri bulunan maddeleri kullanmanın yararlı olduğuna dair önemli ipuçları elde edildi.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda puberte sonrası dönemde nikotin uygulanarak ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal inceleme sonuçları kontrol grubuyla karşılaştırmalı olarak değerlendirildiğinde aşağıda belirtilen sonuçlara varılmıştır.

1. İlk post-pubertal evrede nikotin maruziyeti sonucunda seminifer tübül çaplarında ve germinal epitel kalınlıklarında azalmalar olduğu gözlemlendi. Bu durumun, ya nikotinin doğrudan testis dokusu üzerine olan olumsuz etkisi ile ya da nikotinin hipotalamus-hipofiz aksını bozarak spermatogenezin sağlıklı bir şekilde ilerlemesini sağlayan hormonların sentezini inhibe etmesiyle meydana geldiği düşünüldü.
2. Nikotin uygulanan grupların testis doku örneklerinin ışık mikroskopik bulgularında seminifer tübüllerde dejeneratif değişiklikler olduğu, seminifer tübüllerde düzensizleşme, epitel bütünlüğünde bozulma ve hücreler arası mesafelerde artış olduğu, spermatojenik seriye ait hücrelerin lümene doğru döküldüğü, interstisyel alanda azalmalar olduğu ve bu alanda lokalize olan Leydig hücrelerinin sayılarının azaldığı gözlemlendi. Bu morfolojik değişimlerin de nikotinin testis ve testiküler hormon mekanizmaları üzerine olan olumsuz etkileri neticesinde oluştuğu düşünüldü.
3. 30 gün süren (P60-P90) nikotin enjeksiyonundan sonraki 15. (P105) ve 30. (P120) günlerde iyileşmeye alınan farelerin seminifer tübüllerinde ve interstisyel alan dokusunda belirgin bir düzelmeye gözlenmemesi, nikotin maruziyetinin yarattığı dejeneratif değişikliklerin kısa vadede geri dönüşebilir nitelikte olmadığını gösterdi.
4. Deneysel uygulamalarda nikotin dozunun ve uygulama süresinin artırılması durumunda daha şiddetli ve kalıcı dejeneratif değişikliklerin oluşabileceği düşünüldü.
5. Literatür incelemelerinde deneysel nikotin çalışmalarında ek olarak iyileştirme grubu varlığı gözlemlendi. İyileştirme grubun da ise antioksidan özelliği ile bilinen

çeşitli bitkilerin kullanıldığı gözlemlendi. Çalışmamızın sonuçları da dikkate alındığında testis dokusunda oluşan hasara karşı antioksidan kullanımının yararlı olabileceği düşünüldü.

6. Bu çalışma ile puberte sonrası ilk post-pubertal süreçte nikotin maruziyeti sonucunda spermatogonyal farklılaşma için önemli etkileri olan 3 proteinin (GDNF, C-kit ve Oct-4) ekspresyonlarının immünohistokimyasal inceleme ile anlamı düzeyde azaldığı gözlemlendi.

Sonuç olarak tüm dünyada yaygın kullanımı olan nikotinin erkek üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkilerinin moleküler mekanizması bugüne kadar tam olarak anlaşılamamıştır. Çalışmamız postpubertal dönemde nikotin kullanımının testiste spermatogonyal farklılaşma için önemli yeri olan 3 proteinin (GDNF, C-kit ve Oct-4) ekspresyonlarının immünohistokimyasal olarak incelendiği ilk çalışma olması nedeniyle önem taşımaktadır. Spermatogonyal farklılaşma için gerekli olan bu 3 protein spermatogenez sürecinin farklı basamaklarındaki spermatogonyal hücreleri işaretlemektedir. Oct-4 SKH'leri, C-kit farklılaşmakta olan SPG'ları, GDNF ise SKH'ler ile farklılaşmakta olan SPG'lar arasındaki dengeyi göstermektedir. Çalışmamızda tekli olarak işaretlemeler yapıldı. İleride yapılacak çalışmalarda immünfloresan yöntemi ile ikili boyamalar yapılması durumunda nikotinin spermatogonyal farklılaşma üzerinde yarattığı olumsuz etkinin hücresel karakterinin daha net aydınlanabileceği düşünüldü. Ayrıca nikotinin testis ve testiküler hormonal mekanizmalar üzerine olan etkilerinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi ve spermatogenez sürecine olan etkilerinin daha net bir şekilde açığa çıkarılmasının biyokimyasal, moleküler ve immünohistokimyasal düzeyde yapılacak ileri çalışmalar ile mümkün olacağı kanısındayız.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- **Rydell M, Magnusson, Cnattingius S, Graath F, Svensson AC, Galanti MR.** Exposure to maternal smoking during pregnancy as a risk factor for tobacco use in adult offspring. *Am. J. Epidemiol*, **2014**; 179: 1409-17.
- 2- **Paccola CC, Neves FM, Cipriano I, Stumpp T, Miraglia SM.** Effect of prenatal and lactation nicotine exposure on rat testicular interstitial tissue. *Andrology*, **2014**; 2: 175-85.
- 3- **Ross MH, Pawlina W.** *Histology A text and atlas*. 6th Ed, Baltimore, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, **2011**: 784-79.
- 4- **Junqueira LC, Carneiro J.** *Basic Histology Text & Atlas*. 10th ed, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, **2006**: 431-47.
- 5- **Jan SZ, Hamer G, Repping S, deRooy DG, Van Pelt AMM, Vormer TL.** Molecular control of rodent spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2012**; 1822:1838-50.
- 6- **Sadler TW.** Medikal Embriyoloji. 11. Baskı Ankara: Palme Yayıncılık **2011**; 246-63.
- 7- **Tegelenbosch RAJ, de Rooij DG.** A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutat Res*, **1993**; 290:193-200.
- 8- **Oatley JM, Brinster RL. Brinster.** Regulation of Spermatogonial Stem Cell Self-Renewal in Mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **2008**; 24: 263-286.
- 9- **McLaren A.** Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol*, **2003**; 262:1-15.
- 10- **de Rooij DG.** Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol*, **1998**; 79: 67-80.
- 11- **de Rooij DG, Russell LD.** All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *JAndrol*, **2000**; 21: 776-98.

- 12- **Yoshida S, Sukeno M, Nakagawa T, Ohbo K, Nagamatsu G, Suda T, Nabeshima Y.** The first round of Mouse spermatogenesis is a distinctive program that lacks the self-renewing spermatogonia stage. *Development*, **2006**; 133:1495–505.
- 13- **de Rooij DG.** The spermatogonial stem cell niche. *Microscopy Research and Technique*, **2009**; 72: 580-585.
- 14- **Kostereva N, Hofmann MC.** Regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Reproduction in Domestic Animals*, **2008**; 43 386-392.
- 15- **Hofmann MC, Braydich-Stolle L, Dym M.** Isolation of male germ line stem cells; influence of GDNF. *Development Biology*, **2005**; 279:114-24.
- 16- **Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL.** 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*, **2004**; 10: 16489-16494.
- 17- **Hofmann MC.** GDNF signalling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **2008**; 288: 95-103.
- 18- **Oatley MJ, Kaucher AV, Racicot KE, Oatley JM.** Inhibitor of DNA binding 4 is expressed selectively by single spermatogonia in the male germline and regulates the self-renewal of spermatogonial stem cells in mice. *Biol. Reprod*, **2011**; 85: 347–356.
- 19- **Buass FW, Kirsh AL, Sharma M, McLean DJ, Morris JL, Griswold MD, de Rooij DG, Braun RE.** Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet*, **2004**; 36: 647–652.
- 20- **Sada A, Suzuki A, Suzuki H, Saga Y.** The RNA-binding protein NANOS2 is required to maintain murine spermatogonial stem cells. *Science*, **2009**; 325: 1394–1398.
- 21- **Nakagawa T, Sharma M, Nabeshima Y, Braun RE, Yoshida S.** Functional hierarchy and reversibility within the murine spermatogenic stem cell compartment. *Science*, **2010**; 328: 62–67.
- 22- **Meng X, Lindahl M, Hyvonen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, Raatikainen-Ahokas A, Sainio K, Rauvala H, Lakso M, Pichel JG, Westphal H, Saarman M, Sariola H.** Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*, **2000**; 287: 1489–1493.
- 23- **Naughton CK, Jain S, Strickland AM, Gupta A, Milbrandt J.** Glial cell-line derived neurotrophic factor mediated RET signalling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biol. Reprod*, **2006**; 74: 314–321.



- 24- **Katoh-Semba R, Miyazaki N, Yoshida A, Nakajima H, Nakagawa C, Kitajima S, Matsuda M.** Distribution and immunohistochemical localization of GDNF protein in selected neural and non-neural tissues of rats during development and changes in unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Neurosci R*, **2007**; 59: 277–287.
- 25- **Spinnler K, Kohn FM, Schwarzer U, Mayerhofer A.** Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Hum. Reprod*, **2010**; 25: 2181–2187.
- 26- **Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL.** Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A*, **2004**; 101: 16489–16494.
- 27- **Nagano M, Ryu BY, Brinster CJ, Avarbock MR, Brinster RL.** Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol. Reprod*, **2003**; 68: 2207–2214.
- 28- **Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T.** Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum-or feeder-free conditions. *Biol. Reprod*, **2005**; 72: 985–991.
- 29- **Oatley JM, Avarbock MR, Telaranta AI, Fearon DT, Brinster RL.** Identifying genes important for spermatogonial stem cell self-renewal and survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **2006**; 103:9524–9529.
- 30- **YoMoGida K, Yagura Y, Tadokoro Y, Nishimune Y.** Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biol. Reprod*, **2003**; 69: 1303–1307.
- 31- **Schrans- Stassen BH, van de Kant HJ, de Rooij DG, van Pelt AM.** Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology*, **1999**; 140:5894–5900.
- 32- **De Rooij DG, Okabe M, Nishimune Y.** Arrest of spermatogonial differentiation in jsd/jsd, SI17H/SI17H, and cryptorchid mice. *Biol. Reprod*, **1999**; 61: 842–847.
- 33- **Sawada K, Sakamaki K, Nishimune Y.** Effect of the W mutation, for white belly spot, on testicular germ cell differentiation in mice. *J. Reprod. Fertil*, **1991**; 93: 287–294.
- 34- **Ballow D, Meistrich ML, Matzuk M, Rajkovic A.** Sohlh1 is essential for spermatogonial differentiation. *Dev. Biol*, **2006**; 294:161–167.
- 35- **Toyoda S, Miyazaki T, Miyazaki S, Yoshimura T, Yamamoto T, Tashiro F, Yamato E, Miyazaki J.** Sohlh2 affects differentiation of KIT positive oocytes and spermatogonia. *Dev. Biol*, **2009**; 325:238–248.

- 36- **Suzuki H, Ahn HW, Chu T, Bowden W, Gassei K, Orwing K, Rajkovic A.** SOHLH1 and SOHLH2 coordinate spermatogonial differentiation. *Dev. Biol*, **2011** 36: 301–312.
- 37- **Hao J, Yamamoto M, Richardson TE, Chapman KM, Denard BS, Hammer RE, Zhao GQ, Hamra FK.** Sohlh2 knockout mice are male-sterile because of degeneration of differentiating type A spermatogonia. *Stem Cells*, **2008**; 26: 1587–1597.
- 38- **von Kopylow K, Staeger H, Spiess AN, Schulze W, Will H, Primig M and Kirchhoff C.** Differential marker protein expression specifies rarefaction zone-containing human Adark spermatogonia. *Reproduction*, **2012**; 143: 45–57.
- 39- **Maki CB, Pacchiarotti J, Ramos T, Pascual M, Pham J, Kinjo J, Anovre S, Izadyar F.** Phenotypic and molecular characterization of spermatogonial stem cells in adult primate testes. *Hum Reprod*, **2009**; 24: 1480–1491.
- 40- **Scholzen T and Gerdes J.** “ The Ki-67 protein: from the known and the unknown.” *Journal of Cellular Physiology*, **2000**; vol. 182, no.3, pp. 311-322.
- 41- **Conrad S, Renninger M, Hennenlotter J, Wiesner T, Just L, Bonin M, Aicher W, Buhning HJ, Mattheus U, Mack A, Wagner HJ, Minger S, Matzkies M, Reppel M, Sievert KD, Stenzl A, Skutella T.** Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature*, **2008**; 456: 344–349.
- 42- **Costoya JA, Hobbs RM, Barna M, Cattoretti G, Manova K, Sukhwani M, Orwig KE, Wolgemuth DJ, Pandolfi PP.** Essential role of PLZF in maintenance of spermatogonial stem cells. *Nat. Genet*, **2004**; 36: 551-553.
- 43- **Dym M, He Z, Jiang J, Pant D, Kokkinaki M.** Spermatogonial stem cells unlimited potential. *Reprod Fert Dev*, **2009**; 21: 15-21.
- 44- **He Z, Kokkinaki M, Jiang J, Dobrinski I, Dym M.** Isolation, characterization and culture of human spermatogonia. *Biol Reprod*, **2010**; 2: 363-372.
- 45- **Church DF, Pryor WA.** Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect*, 1985; 64: 111–126.
- 46- **Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL.** Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*. **2005**; Mar: 57(1):79-115.
- 47- **Trushin N & Hecht SS.** Stereoselective metabolism of nicotine and tobaccospecific N-nitrosamines to 4- hydroxy-4-(3-pyridyl)butanoic acid in rats. *Chem. Res. Toxicol*, **1999**; 12: 164-71.
- 48- **Karaconji IB.** Facts about nicotine toxicity. *Arh High Rada Toxicol*, **2005**; 56(4): 363.

- 49- **Dempsey D, Tutka P, Jacob P 3rd, Allen F, Schoedel K, Tyndale RF, and Benowitz NL.** Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clin Pharmacol Ther*, **2004**; 76: 64–72.
- 50- **Benwell ME, Balfour DJ, and Anderson JM.** Evidence that tobacco smoking increases the density of (-)-[3H]nicotine binding sites in human brain. *J Neurochem*, **1988**; 50: 1243–1247.
- 51- **Yildiz D.** Nicotine, its metabolism and an overview of its biological effects. *Toxicol*, **2004** May; 43(6): 619-32.
- 52- **Hukkanen J, Jacob P 3rd, Benowitz NL.** Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev*, **2005** Mar;57(1):79-115.
- 53- Harm reduction in nicotine addiction, Helping people who can't quit. *A report by the Tobacco Advisory Group of the Royal College of Physicians*, London: RCP, **2007**.
- 54- **Nakajima M, Yamamoto M, Nunoya K, Yokoi T, Nagashima K, Inoue K, Funae Y, Shimada N, Kamataki T, Kuroiwa Y.** Role of human cytochrome MP4502A6 in C-oxidation of nicotine. *Drug Metab Dispos*, **1996**; 24(11):1212-7.
- 55- **Hsieh J, Gage FH.** Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev*, **2004**; 14(5):461–469.
- 56- **Cheung P, Lau P.** Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol*, **2005**; 19(3):563–573.
- 57- **Reik W, Dean W, Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, **2001**; 293(5532):1089–1093.
- 58- **Kurukuti S, Tiwari VK, Tavoosidana G, Pugacheva E, Murrell A, Zhao Z, Lobanenko V, Reik W, Ohlsson R.** CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to Igf2. *Proc Natl Acad Sci*, **2006**; 103(28):10684–10689.
- 59- **Gossel TA, Bricker JD.** *Principles of Clinical Toxicology*. 3rd. Ed. New York NY Raven Press **1994**; 124-29.

- 60- **Klaasen CD, Amdur MO, Doull J.** Cassaret and Doull's Toxicology. *Basic the science of poisons*. 5th. ed. McGraw-Hill, New York, NY; **1995**; 260-67.
- 61- **Marks MH, Burch JB, Collins AC.** Genetic of nicotine response in four inbred strains in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, **1983**; 226:296-301.
- 62- **Behr J, Nowak D.** Tobacco smoke and respiratory disease. In: D'Amato G, Holgate ST; eds. *The Impact of Air Pollution on Respiratory Health*. First Ed. Sheffield: ERS Journals Ltd. *Eur Respir Mon*, **2002**;21: 161-79.
- 63- **Vernaev V, Tournaye H, Osmanagaoglu K, Verheyen G, Van Steirteghem A, Devroey P.** Intracytoplasmic sperm injection with testicular spermatozoa is less successful in men with nonobstructive azoospermia than in men with obstructive azoospermia. *Fertil Steril*, **2003 Mar**;79(3): 529-33.
- 64- **Vine MF.** Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl*, **1996**; 19: 323-37.
- 65- **La Maestra S, De Flora S, Micale RT.** Effect of cigarette smoke on DNA damage, oxidative stress, and morphological alterations in mouse testis and spermatozoa. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*.**2014**; 218(1): 117-22.
- 66- **Rubes J, Lowes D, Moore D.** Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men. *Fertil Steril*. **1998**; 70: 715-23.
- 67- **Robbins WA, Vine MF, Truong KY, Everson RB.** Use of FISH to asses effect of smoking, caffeine and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ. Mol. Mutagen*. **1997**; 30: 175-83.
- 68- **Pacifici R, Altieri I, Gandini L.** Nicotine, cotinine and trans-3 cotinine levels in seminal plasma of smokers: effects of sperm parameters. *Ther. Drug. Monit*. **1993**; 15: 358-63.
- 69- **Pacifici R, Altieri I, Lenzi A.** Environmental tobacco smoke: nicotine and cotinine concentrations in semen. *Environ. Res*. **1995**; 68: 69-72.
- 70- **Hammadeh ME, Hamad MF, Montenarh M, Fischer-Hammadeh C.** Protamine contents and P1/P2 ratio in human spermatozoa from smokers and non-smokers. *Human Reproduction*, **2010**; Vol.25, No.11 pp. 2708–2720.
- 71- **Guz J, Gackowski D, Foksinski M, Rozalski R, Zarakowska E, Siomek A, Szpila A, Kotzbach M, Kotzbach R, Olinski R.** Comparison of Oxidative Stress/DNA Damage in Semen and Blood of Fertile and Infertile Men. *Plos One*, **2013**; Vol.8 (7).
- 72- **Lagunov A, Anzar M, Sadeu JC, Khan MIR, Bruin JE, Woynilowicz AK, Buhr M, Holloway AC, Foster WG.** Effect of in utero and lactational nicotine exposure on the male reproductive tract in peripubertal and adult rats. *Reproductive Toxicology*, **2011**; 31: 418-23.

- 73- **Mahmoud H, Mahmoud O, Layasadat K, Naeim A.** Dexamethasone effects on Bax expression in the mouse testicular germ cells. *Folia Histochem Cytobiol*, **2009**; 47: 237–241.
- 74- **Deschildre C, Ji JW, Chater S, Dacheux F, Selva J, Albert M.** Expression of galectin-3 and its regulation in the testes. *Int J Androl*, **2007**; 30: 28–40.
- 75- **Kim H, Kang TY, Joo HG, Shin T.** Immunohistochemical localization of galectin-3 in boar testis and epididymis. *Acta Histochem*, **2006**; 108: 481–485.
- 76- **Nesseim WH, Haroun HS, Mostafa E, Youakim MF, Mostafa T.** Effect of nicotine on spermatogenesis in adult albino rats. *Andrologia*, **2011**; 43: 398–404.
- 77- **Mosbaha R, Yousef MI, Mantovanida A.** Nicotine-induced reproductive toxicity, oxidative damage, histological changes and haematotoxicity in male rats: The protective effects of green tea extract. *Experimental and Toxicologic Pathology*, **2015**; 67: 253–259.
- 78- **Ping NC, Noor HH, Durriyyah SHA.** Effects of *Nigella sativa* (*Habbatus sauda*) Oil and Nicotine Chronic Treatments on Sperm Parameters and Testis Histological Features of Rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **2014**; 218293: 7 pages.
- 79- **Kim KH, Joo KJ, Park HJ, Kwon CH, Jang MH, Kim CJ.** Nicotine induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells. *Fertil Steril*, **2005**; 83: 1093–1099.
- 80- **Jana K, Samanta PK, Kumar De D.** Nicotine diminishes testicular gametogenesis, steroidogenesis, and steroidogenic acute regulatory protein expression in adult albino rats: possible influence on pituitary gonadotropins and alteration of testicular antioxidant Status. *Toxicol Sci*, **2010**; 116(2): 647–59.
- 81- **Tanigaki R, Sueoka K, Tajima H, Nakabayashi A, Sato K.** C-kit expression in spermatogonia damaged by doxorubicin exposure in mice. *J. Obstet. Gynaecol. Res*, **2013**; Vol. 39, No. 3: 692–700.
- 82- **Caries KC, Shima CM, de Avila J, McLean DJ.** Acute ethanol exposure affects spermatogonial stem cell homeostasis in pre-pubertal mice. *Reprod. Toxicol*, **2012**; 33: 76-84.



## **ÖZGEÇMİŞ**

05.06.1988 tarihinde Adana ilinde doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini Mersin ilinde tamamladı. 2012 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen- Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2012 Eylül ayında Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.