



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VİTAMİN E' NİN ALÜMİNYUM SÜLFAT İLE İNDÜKLENEN TESTİS HASARI ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ozal ULFANOV

Aralık, 2018
DENİZLİ

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

VİTAMİN E' NİN ALÜMİNYUM SÜLFAT İLE İNDÜKLENEN TESTİS
HASARI ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ozal ULFANOV

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL

Denizli, 2018

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Ozal ULFANOV tarafından Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL yönetiminde hazırlanan “Vitamin E’ nin Alüminyum Sülfat İle İndüklenen Testis Hasarı Üzerine Koruyucu Etkisi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:


Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL

Pamukkale Üniversitesi



Danışman:

Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL
Pamukkale Üniversitesi



Üye:

Prof. Dr. Kemal ERGİN
Adnan Menderes Üniversitesi



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 09.01.2019 tarih ve 011.16... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Hakan AKÇA
Müdür

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı :

Ozal ULFANOV

İmza

:



ÖZET

VİTAMİN E' NİN ALÜMİNYUM SÜLFAT İLE İNDÜKLENEN TESTİS HASARI ÜZERİNE KORUYUCU ETKİSİ

Ozal ULFANOV

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji AD

Tez Yöneticisi: Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL

Aralık 2018, 54 Sayfa

Alüminyumun yaptığı testis hasarına karşı Vitamin E'nin koruyucu olup olmaması sperm parametreleri değerlendirilerek ve Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling (TUNEL) yöntemi kullanarak incelenmesi amaçlanmıştır.

250-300 gr, 40 haftalık 34 erkek sıçan kullanıldı: Kontrol Grubu: hiçbir işlem yapılmadı, Sham Grubu: 0.2 ml distile su, Vitamin E Grubu: 500 mg/kg Vitamin E, Alüminyum Grubu: 10 mg/kg Alüminyum/0.2 ml distile su, Alüminyum+Vitamin E grubu: 10 mg/kg Alüminyum/0.2 ml distile su+500 mg/kg Vitamin E. Bütün uygulamalar 4 hafta boyunca, haftada 3 kez intraperitoneal (ip) olarak yapıldı. Cauda epididimisten alınan sperm örnekleri androlojik parametreler yönünden değerlendirildi. Kesitler Hemotoksilen/Eozin (H/E) ve TUNEL boya ile boyandı. H/E ile boyanan kesitlerden seminifer tübüllerde epitel kalınlığı, alan hesabı, Johnsen skorlaması yapıldı. Germinal epitelde TUNEL boyamayla apoptotik indeks hesaplandı.

Alüminyum+Vitamin E grubunda Kontrol grubuna göre testis ağırlığında anlamlı azalma saptandı ($p<0,05$). Sperm sayısı, morfolojik değerlendirme, epitel çapı, tübül alanı ve Johnsen skorlamasında gruplar arasında anlamlı farklılık çıkmadı. H/E ile boyanan kesitlerde Kontrol, Sham ve Vitamin E gruplarında genellikle germinal epitel normal morfolojisini korudu. Alüminyum grubunda bazı tübüllerde germinal epitel hücrelerinin arasında bağlantıların kopmuş, bazı tübül lümenlerinde kimliği belirsiz hücrelerin varlığı belirlendi. Alüminyum+Vitamin E grubunda germinal epitelin bütün seri hücreleri ve lümeninde ise sadece olgun spermeler görüldü. TUNEL pozitif hücreler Alüminyum grubunda Kontrol ve Sham grubuna göre anlamlı olarak yükseldi ($p<0,05$). Alüminyum +Vitamin E grubunda apoptotik hücre sayısı Alüminyum grubundan azdı; Kontrol, Sham, Vitamin E gruplarıyla benzerdi ($p>0,05$). Deneysel sıçan modelinde Vitamin E alüminyumun neden olduğu testis hasarında apoptotik hücre sayısını azaltmıştır ($p>0,05$).

Anahtar Kelimeler: Alüminyum, Vitamin E, Testis, TUNEL.

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2017SABE011)

ABSTRACT**PROTECTIVE EFFECT OF VITAMIN E ON ALUMINUM SULPHATE-INDUCED TESTICULAR DAMAGE**

ULFANOV, Ozal

M.Sc. Thesis in Histology and Embryology

Supervisor: Ast. Prof. Nazlı ÇİL

December 2018, 54 Pages

The aim of this study is to determine whether vitamin E is protective against testicular damage of aluminum and to examine it by using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling (TUNEL) method.

250-300 g, 40 week old male rats were used: Control Group; Nothing done, Sham Group: 0.2 ml distilled water, Vit E Group: 500 mg / kg vit E, Aluminum (Al) Group: 10 mg / kg Al / 0.2 ml distilled water, Al + Vit E group: 10 mg / kg Al / 0.2 ml distilled water + 500 mg / kg vit. E. All treatments were performed intraperitoneally (ip) 3 times a week for 4 weeks. Sperm samples taken from cauda epididymis were evaluated in terms of andrologic parameters. The slides were stained with Hematoxylin / Eosin (HE) and TUNEL method. Epithelial thickness, area calculation, Johnsen scoring were performed on H / E stained tissue sections. Apoptotic index was calculated by TUNEL staining in germinal epithelium.

Al + Vit E group had a significant decrease in testicular weight compared to group K ($p < 0.05$). No significant difference was found between the groups in terms of sperm count, morphological evaluation, epithelial diameter, tubule area and Johnsen scoring. In sections stained with H / E, the germinal epithelium generally retained normal morphology in groups K, S and vit E. In the Al group, it was observed that connection between the germinal epithelial cells were broken in some tubules and also the presence of unidentified cells in some tubule lumens was determined. In Al + Vit E group, all spermatogonial cells of the germinal epithelium and only mature sperm are seen in the lumen. TUNEL positive cells were significantly higher in AL group compared to K and S groups ($p < 0.05$). In the Al + Vit E group, the number of apoptotic cells was less than the Al group; similar with the K, S, Vit E groups ($p > 0.05$). In the experimental rat model of the testicular damage caused by aluminum, vit E decreased the number of apoptotic cells.

Keywords: Aluminium, Vitamin E, Testes, TUNEL.

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Coordination Unit through project numbers 2017SABE011.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin yapım aşamasında her konuda yanımda olan, manevi yönden desteğini esirgemeyen; tezin her aşamasında, bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşan tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL ve Prof. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ' a tezin yazım aşamasında bilgi ve deneyimlerini bizimle paylaşan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Esat ADIGÜZEL' e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımın ve deneylerimin yürütülmesi sırasında laboratuvar imkanlarından faydalanmamı sağlayan ve deneyimleri ile bize destek olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Gülçin METE ve anabilim dalı hocalarına, deneylerimde yardımlarını esirgemeyen asistan arkadaşlarım Arş. Gör. Semih Tan, Arş. Gör. Mutlu Yaka ve Arş. Gör. Özen Önal' a, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışan ve emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Hayatım boyunca benden desteklerini ve sevgilerini esirgemeyen, varlıklarından güç aldığım aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	V
ABSTRACT	VI
TEŞEKKÜR	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
TABLolar DİZİNİ	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GİRİŞ	1
1.1. Amaç	2
2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Testis Gelişimi	3
2.2. Testis Histolojisi.....	4
2.2.1. Testis yapısı	4
2.2.2. Seminifer tübüller	4
2.2.3. Sertoli hücresi	5
2.2.4. Spermatogenez	7
2.2.4.1. Spermatogonyal faz	7
2.2.4.2. Spermatozoid faz	8
2.2.4.3. Spermatozoid faz	8
2.3. Sperm Morfolojisi.....	9
2.4. Alüminyumun Özellikleri	11
2.5. Alüminyumun Vücuda Alınımı ve Birikimi	11
2.6. Alüminyum ve Oksidatif Stres	12
2.7. Alüminyumun Toksik Etkileri.....	13
2.8. Alüminyumun Testis Üzerindeki Toksik Etkileri	15
2.9. Alüminyum ve Apoptoz	15
2.10. Vitamin E	16
2.11. Vitamin E' nin Antioksidatif Etkisi	17
2.12. Hipotez	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları	19
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması	19
3.3. Dokuların Alınması ve Testis Ağırlıklarının Ölçümü	20
3.4. Sperm Sayımı ve Morfolojik Değerlendirme	20

3.5. Fiksatiflerin Hazırlanması	20
3.6. Fiksasyon ve Doku Takibi İşlemleri.....	21
3.7. Hemotoksilen/Eozin boyama	22
3.8. Seminifer Tübül Alanlarının ve Seminifer Epitel Kalınlığının Hesaplanması	22
3.9. Modifiye Johnsen Skorlaması.....	23
3.10. TUNEL Boyama	23
3.11. Metil Green Boyasının Hazırlanması	25
3.12. İstatistiksel Analiz.....	25
4. BULGULAR	26
4.1. Testis Ağırlığı, Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi	26
4.2. Al ve Vit E' nin testis Yapısına Etkisi	27
4.2.1. H/E Boyama Bulguları	27
4.2.2. Seminifer tübül alanı, epitel kalınlığı ve modifiye Johnsen skorlaması.....	30
4.3. TUNEL Bulguları.....	33
5. TARTIŞMA	35
6. SONUÇ	42
7. KAYNAKLAR	43
8. ÖZGEÇMİŞ.....	54
9. EKLER	

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 Seminifer tübüller.....	5
Şekil 2. 2 Sertoli hücresi.....	6
Şekil 2. 3 İnsan ve sıçan spermi.....	10
Şekil 4.1 Sıçan sperm morfolojik anormallikleri.....	27
Şekil 4.2 Kontrol, Sham, Vit E gruplarında testisin ışık mikroskopik görüntüsü.....	28
Şekil 4.3 Al' un oluşturduğu testis hasarının H/E görüntüsü.	29
Şekil 4.4 Al' un oluşturduğu testis hasarının H/E görüntüsü.	29
Şekil 4.5 Alüminyum, Alüminyum+Vit E gruplarında testisin ışık mikroskopik görüntüsü.....	30
Şekil 4.6 Ortalama seminifer tübül alanının grafiksel olarak gösterilmesi.	31
Şekil 4.7 Ortalama epitel kalınlığının grafiksel olarak gösterilmesi.	32
Şekil 4.8 Ortalama Johnsen skorlamasının grafiksel olarak gösterilmesi.	32
Şekil 4.9 TUNEL' ile boyanan kesitlerde apoptotik indeks sonuçlarının grafiksel olarak gösterilmesi	Error! Bookmark not defined.
Şekil 4.10 TUNEL boya Kontrol (A), Sham (B), Vit E (C), Alüminyum (D), Alüminyum+Vit E (E) gruplarının testis transvers kesitlerinin TUNEL (+) hücreler (ok) gösterilmiştir (40X).....	Error! Bookmark not defined.
Şekil 4.11 Al verilen grup TUNEL boyama.	34

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3. 1 Doku takibi.....	21
Tablo 3. 2 Hemotoksilen/Eozin boyama protokolü.....	22
Tablo 4. 1 Testis ağırlığı, sperm sayısı, sperm morfolojisi yönünden gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi.....	26
Tablo 4. 2 Testis kesitlerinde seminifer tübül alan, epitel kalınlığı, TUNEL apoptotik indeks, johnsen skorlaması, değerlendirmesi.	30



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ad.....	Tip A koyu spermatogonyum
AI.....	Apopitotik indeks
Al.....	Alüminyum
Ap.....	Tip A açık spermatogonyum
CUR.....	kurkumin
DHT.....	Dihidrotestesteron
DNA.....	Deoksiribo Nükleik Asit
ER.....	Endoplazmik retikulum
H/E.....	Hemotoksilen/Eozin
HDL.....	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
İp.....	İntraperitoneal
LDL.....	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOO.....	Peroksil radikal
LOOP.....	Lipit hiperoksit radikal
LPO.....	Lipit peroksidasyonu
mDF.....	Modifiye Davidson fiksatif
MIF.....	Müllerian-inhibe edici faktör
NO.....	Nitrik oksit
NOS.....	Nitrik oksit sentaz
PFA.....	Paraformaldehid
ROS.....	Reaktif oksijen türleri
RS.....	Reaktif türler
TUNEL.....	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase dUTP Nick end Labeling
Vit E.....	Vitamin E
VLDL.....	..Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

1. GİRİŞ

Erkek infertilitesi, dünya çapında çiftlerin yaklaşık %10-15' ini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur (Tahmasbpour E vd 2014). Erkek infertilitesi, infertilitenin en zor şekli olarak, çevresel etmenler, genetik defektler, fizyolojik ve endokrin yetmezlik ve testis patolojileri gibi çeşitli nedenlerle oluşmaktadır. Erkek infertilitesinin %60-75' nin idiyopatik olmasına rağmen, hastalığa genellikle kalitatif (astenospermi, teratozoospermi ve nekrospermi) ve kantitatif (azoospermi, kriptozoospermi ve oligoasthenozoospermi) anormallikler eşlik eder (Sun X vd 2018).

Alüminyum (Al), en yaygın metaldir ve yer kabuğunda üçüncü en yaygın elementtir (Camargo MM vd 2009). Bu metalın iyonik formu tüm doğa sularında değil aynı zamanda hayvan ve bitki dokuların çoğunda saptanabilir. Al doğal olarak Alüminyum sülfat ve klorür gibi bileşikler oluşturmak için diğer elementlerle kombinasyon halinde bulunur (Verstraeten SV 2008, Cheraghi E vd 2017). İnsanlarda beslenme kaynaklı olarak maruziyet; çeşitli ticari besinlere eklenen Al tuzları, içme suları sanitasyonunda çöktürücü olarak ve gıda ürünlerinin paketlenmesinde kullanılan Al'yi gösterebiliriz. İnsanlar ayrıca, Al'ye aşıllarda, ilaçlarda, kozmetik ürünlerde, güneş kremi ve deodorantlarda, makyaj ürünlerinde beslenme kaynaklı olmayan şekillerde de maruz kalabilirler (Bondy SC 2015, Martinez CL vd 2017). Al'nin bol miktarda bulunması, insanlarda maruz kalma ve buna bağlı sağlık sorunları riskini artırır (Zhang K ve Zhou Q 2005). Yüksek miktarda Al içeren ürünler tüketicinin organlarındaki metalik element konsantrasyonunu arttıracak ve çeşitli dokulara zarar verecektir. Buna ek olarak, insanların spermatozoa ve seminal plazmasında Al seviyesinin yüksek olmasının, sperm canlılığını ve motilitesini azalttığı bildirilmiştir (Guo CH vd 2005, Yousef MI vd 2007). 2018 yılında yapılan bir çalışmada Al'nin düşük dozlarında bile yüksek dozları kadar erkek fertilitesi üzerinde olumsuz etkileri olduğu saptanmıştır.

Yapılan bu çalışmada testis ve epididimiste histolojik özelliklerde ve sperm morfolojisinde değişiklikler saptanmazken, testesteron üretimi, sperm sayısı ve motilitesinde düşüklük saptanmıştır (Mouro GSV vd 2018). Abdel-Moneim' nin 2013 yılında yaptığı çalışmada farelerde 25 mg/kg'de tek bir $AlCl_3$ enjeksiyonu germ hücre dejenerasyonu, tübüler atrofi, spermatogonia ve primer spermatozoidlerde apoptotik hücre ölümünü saptamıştır (Abdel-Moneim AM 2013).

Vitamin E(vit E) potansiyel bir antioksidatif ajandır ve yağda çözünür olduğu için biyolojik membranlarda bulunur (Kutlubay R vd 2007). Vit E, serbest radikal oluşumunu ve testis dokusu gibi biyolojik sistemlerde lipid peroksidasyonunu inhibe eden yağda çözünebilen bir antioksidandır. Vit E, spermatogenezi oksidatif strese karşı korur ve erkek fertilizasyon potansiyelini artırır (Rezaie AH vd 2017). Sarkar ve arkadaşlarının (2006) sıçanlar üzerine yaptığı çalışmada 28 gün süresince her gün verilen vit E' nin (200 mg/kg) sıçanların testis dokusu üzerinde antioksidan etkisi olduğunu bildirmişlerdir (Sarkar D vd 2006). Hasanin ve arkadaşlarının (2018) sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada, uygulanan 400mg/kg vit E seminifer tübülün yapısı ve spermatogenez üzerinde antioksidan etkisi olduğunu göstermiştir. Vit E, akrilamide bağlı oluşan seminifer tübül sayısı, tübül epitel kalınlığı ve epitel spermatogenik seri hücrelerindeki azalmayı ortadan kaldırmıştır (Hasanin NA vd 2018).

1.1. Amaç

Yapılmış çalışmalarda Al'nin yaptığı testis hasarının sperm kalitesi üzerine etkisi ve yaptığı DNA hasarı TUNEL yöntemiyle gösterilmiştir. Bu çalışmada Al'nin yaptığı testis hasarına vit E'nin koruyucu etkisi olup olmadığını sperm sayısı ve morfolojisi değerlendirilerek ve TUNEL yöntemi kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Testis Gelişimi

Testisler üriner sistemle yakın ilişki halinde gelişirler ve üç kaynaktan köken alırlar:

- Ara mezoderm: Posteriyör abdominal duvardaki ürogenital kabartıları oluşturur, miyoid hücrelerinin ve Leydig hücrelerin kaynağıdır.
- Söloomik mezotelyum: Ürogenital kabartıları döşer ve Sertoli hücrelerinin kaynağıdır.
- Primordiyal germ hücreleri, yolk kesesinden gelişmekte olan gonadlara göç ederler ve burada bölünerek spermatogonyumlara farklılaşırlar.

Embriyonik dönemin altıncı haftasında sırasında primordiyal germ hücreleri gonadlara göçü, primer seks kordonlarını oluşturmak üzere indükler. Testis belirleyici faktörün etkisi altında, gonadal kordonlar, seminifer kordonlara farklılaşırlar. Seminifer kordonların oluşumu, Fgf-9 ve Sox-9 genlerin ekspresyonları ile sağlanır. Daha sonra, seminifer kordonlar, seminifer tübülleri, düz tübülleri ve rete testisi oluşturur. 8. Haftadan itibaren testesteronu üreten Leydig hücreleri, seminifer kordonları ayıran mezenkimden gelişirler. Testesteron, mezonefrik Wolf kanallarının büyümesinden ve farklılaşmasından sorumludur. Daha sonra, Wolf kanalları erkek genital sistemin boşaltım kanallarına dönüşür. Seminifer kordonların içerisinde Sertoli hücreleri gelişirler ve önemli hormon Müllerian-inhibe edici faktörü (MIF) üretirler. MIF, Müller kanalındaki hücre proliferasyonunu inhibe eder ve bu inhibisyon da ürogenital kabartıların erkek yönünde gelişimini sağlar. Testesteronun dönüşüm ürünü olan dihidrotestesteron (DHT) dış genital organların gelişimi ve farklılaşmasından sorumludur. Gonadal cinsiyet

DHT'nin bulunmadığı bir durumda dış genital organlar dışı taslağı yönünde gelişmektedir (Ross MH ve Pawlina W 2014, Moore KL vd 2009).

2.2. Testis Histolojisi

2.2.1. Testis yapısı

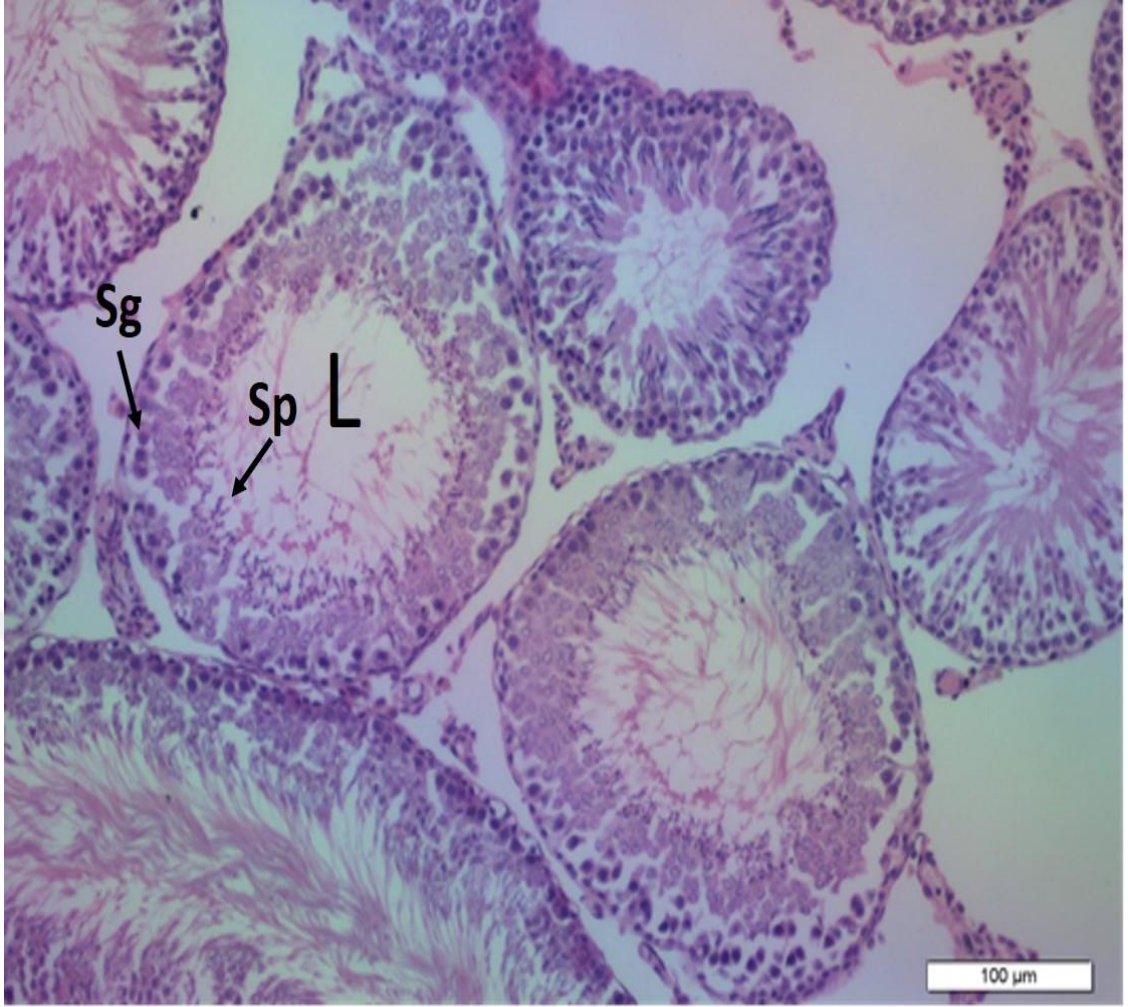
Testisler, sıkı bağ dokusu yapısındaki tunika albuginea kapsülü ile çevrilidir. Kapsülün hemen altında kan damarları içeren gevşek bağ dokusu tunika vasküloza bulunur. Kapsülden bezin içine uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar, bezi yaklaşık olarak 250 lobüle böler.

Tunika albuginea testisin arka yüzü boyunca kalınlaşır ve içeri doğru mediastinumu oluşturur. Testisin her bir lobülü, testesteron salgılayan Leydig hücreleri ve içinde sperm üretilen çok kıvrımlı seminifer tübüllerden meydana gelmektedir (Ross MH ve Pawlina W 2014).

2.2.2. Seminifer tübüller

Her seminifer tübül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluğunda oldukça kıvrıntılı yapılardır. Her bir testisteki seminifer tübüllerin uzunluğu 250 metredir ve bu tübüllerde her gün 2×10^8 sperm üretilir. Seminifer epitel çok katlı epiteldir (Şekil 2.1) ve iki tip hücre popülasyonundan oluşur.

- 1) Sertoli hücreleri büyük, bölünmeyen destek hücreleridir (Şekil 2.2). Bu hücreler puberteye kadar çoğalırlar. Sertoli hücreleri sperm hücre öncüllerini çevreleyen ve bu hücrelerin arasını dolduran uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir.
- 2) Düzenli olarak çoğalan spermatogenik seri hücreleri dört ile sekiz hücre katmanları içerirler ve daha sonra sperme dönüşecek olan hücreleri üretirler.

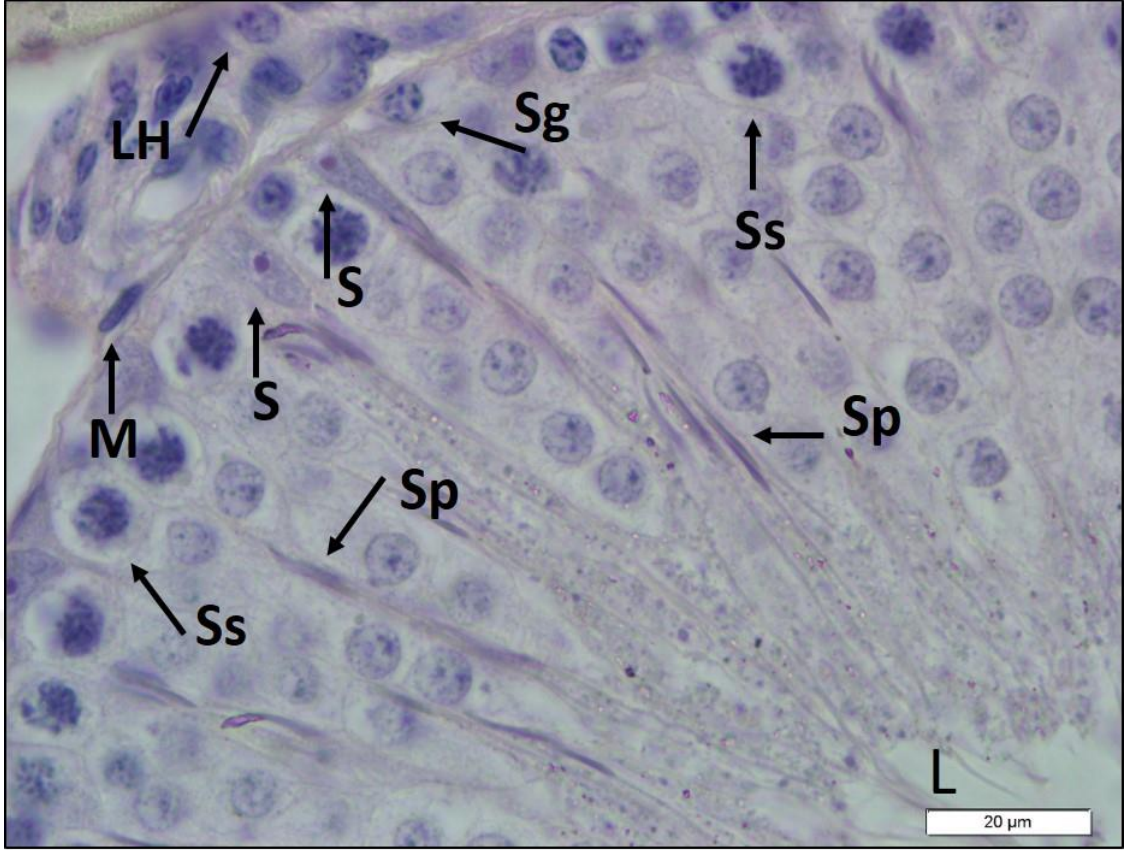


Şekil 2. 1 Seminifer tübüller. H/E boyama, 20X büyütme. L-lümen, Sp-spermatid, Sg-spermatogonyum.

Bağ dokusu yapısındaki peritübüler doku olarak adlandırılan tunica propria fibroblastlardan yoksundur. Tunica propria, seminifer tübülün lamina propriyasından, 3-5 tabaka miyoid hücreden ve kollajen fibrillerden oluşur. Miyoid hücreler bazal lamina ve bol miktarda aktin filamentleri içerir. Bu yüzden düz kas hücreleriyle ilişkili özellik gösterirler ve ritmik kasılmaları seminifer tübüllerde peristaltik dalgalanmaya neden olur. Bu ritmik kasılma spermatozoanın ve Sertoli hücreleri tarafından üretilen testiküler sıvının boşaltım kanal sistemine akışını kolaylaştırır (Ross MH ve Pawlina W 2014).

2.2.3. Sertoli hücresi

Sertoli hücreleri tübüllerin bazal laminasını oluşturan uzun prizmatik bölünmeyen hücrelerdir (Şekil 2.2). Bu hücreler, spermatogenik seri hücrelerin mayoz bölünmeyi tamamladıktan sonra yüzeyine tutundukları destek hücreleridir.



Şekil 2. 2 Sertoli hücresi. H/E boyama, 100X büyütme. Lümen (L), bazal membran miyoid hücre (M), leydig hücre (LH), Sertoli hücre (S), spermatogonyum (Sg), spermatosit (Ss), Sertoli hücresine gömülü spermatidler (Sp).

Oval veya üçgen şekilli 7-9 nm'lik nükleusa sahiptir. Sertoli hücreleri bol miktarda düz endoplazmik retikulum (ER), lizozom, mitokondri, lipid damlacıkları, glikojen granülleri ve az miktarda granüllü ER içeririr (Ross MH ve Pawlina W 2014).

Sertoli hücresinin görevleri:

- Spermatogenik hücrelere metabolik ve fiziksel destek sağlar.
- Kan-testis bariyerini oluşturarak, spermatogenik hücreleri vücudun immün sisteminden korur.
- İşlevsiz sitoplazma atıklarını fagosite eder.
- Üretilen spermleri taşıyan fruktoz bakımından zengin sıvı salgılar.
- Anti müllerian hormon sentezler. Bu hormon, Müller kanalındaki hücre bölünmesini bloke ederek gonadların erkek yönünde gelişimini sağlar.
- Androjen bağlayıcı protein, inhibin ve transferrin sentezler.

2.2.4. Spermatogenez

Spermatogenez, puberteden kısa bir süre önce spermatogonyumların proliferasyonu ile başlar ve yaşam boyunca devam eder. Spermatogonyumdan sperm gelişimi süreci spermatogenez olarak adlandırılır. Spermatogenezin üç farklı fazı vardır:

- Spermatogonyal faz: Bu fazda spermatogonyumlar bölünerek, primer spermatozite farklılaşacak olan spermatogonyumlar ve kendi yerine geçecek olan kök hücreleri oluşturur.
- Spermatozite faz: Primer spermatozitlerin iki kez mayoz bölünmeye uğrayarak haploid hücreli spermatid oluşum sürecidir.
- Spermatid faz: Bu fazda spermatidler olgun sperm hücrelerine farklılaşırlar.

Spermatogenezin son aşamasında spermatidlerin başı sertoli hücresine gömülü haldedir ve spermiyasyon sürecinde seminifer tübül lümenine salınırlar (Ross MH ve Pawlina W 2014).

2.2.4.1. Spermatogonyal faz

Spermatogonyumlar çok sayıda mitoz bölünme geçirirler ve oluşan yeni spermatogonyumlar histolojik preparatlarda nükleus görünümüne göre farklılıklar gösterir. İnsan spermatogonyumları üç tip olarak sınıflandırılır (Ross MH ve Pawlina W 2014):

1. Tip A koyu (Ad) spermatogonyumlar: seminifer epitelin kök hücreleridir, nükleusları ince kromatinli, bazofilik ve ovaldir. Mitoz bölünme ile kendi yerine geçecek olan tip Ad ya da tip A açık (Ap) spermatogonyumları oluşturur.
2. Tip Ap spermatogonyumlar: açık boyanan nükleusları ince kromatinli ve ovaldir. Birkaç kez bölünerek kendi sayılarını artırırlar ve daha sonra tip B spermatogonyumları oluştururlar.
3. Tip B spermatogonyumlar: koyu boyanan yuvarlak nükleusları vardır ve nükleusun çevresi boyunca kümeler şeklinde yoğunlaşmış kromatin bulunur.

2.2.4.2. Spermatozit faz

Bu fazda mitotik bölünme sonucunda tip B spermatogonyular, primer spermatozitleri oluşturur. Daha sonra primer spermatozitler interfaz evresine girer ve Deoksiribo Nükleik Asitleri (DNA) replike ederler. Yani, her bir primer spermatozitte kromozom sayısı $2n$, DNA miktarı $4d$ olur. Her kromozom iki kardeş kromatide yani $4d$ DNA miktarına sahiptir. Primer spermatozitler mayoz 1 girerek kromozom sayısını $2n$ 'den $1n$ 'e, DNA miktarını ise $4d$ 'den $2d$ 'ye indirir. Böylece, haploid kromozoma ve $2d$ miktarında DNA'ya sahip sekonder spermatozitler oluşur. Mayoz 2'de interfaz evresi olmadığı için DNA kendini replike etmeden hücre ikinci kez kromozom sayısını ve DNA miktarını azaltır. Böylece her bir spermatid haploid sayıda kromozoma (tek kromatidli) sahiptir (Ross MH ve Pawlina W 2014).

2.2.4.3. Spermatid faz

Spermatozit fazının son aşamasında oluşmuş spermatid hücresi kromozom ve DNA bakımından haploiddir. Bu fazda bölünme gerçekleşmez, spermatidler bir farklılaşma sürecine girerler ve olgun spermi oluştururlar. Spermatidin olgun sperme farklılaşması 4 fazda tanımlanmıştır.

1. Golgi fazı. Bu fazda glikoprotein bakımdan zengin proakrozomal granüller bir araya gelerek akrozomal vezikülü oluştururlar. Daha sonra akrozomal vezikül genişler ve spermatidin ön kutbunu belirler. Sentryoller akrozomal başlıktan arka kutbuna göç ederler ve aksonem kompleksinin oluşumunu başlatır.
2. Kep fazı. Bu fazda akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde akrozomal kepi oluşturur.
3. Akrozom fazı. Spermin yoğunlaşmış çekirdek içeren başı bazal laminaya, gelişen kuyruk seminifer tübül lümenine yönelmiştir. Aksonomel kompleksin oluşumunu başlatmış olan sentryoller daha sonra nükleusa tutunur ve mikrotübüllerin periferinde yer alan dış yoğun fiberleri oluşturur. Mitokondriler boyun bölgesinin arka kısmına göç ederler ve kaba fibrillerin etrafında sıkı, heliks tarzında bir kılıf oluşturur.
4. Olgunlaşma fazı. Bu fazda spermatid kuyruğu etrafındaki fazla sitoplazma ve rezidüel cisimcik sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek olgun sperme

farklılaşır. Bu aşamada sperm serbest haldedirler, yani kardeş spermatidler arasında olan interselüler köprüler yoktur (Ross MH ve Pawlina W 2014).

2.3. Sperm Morfolojisi

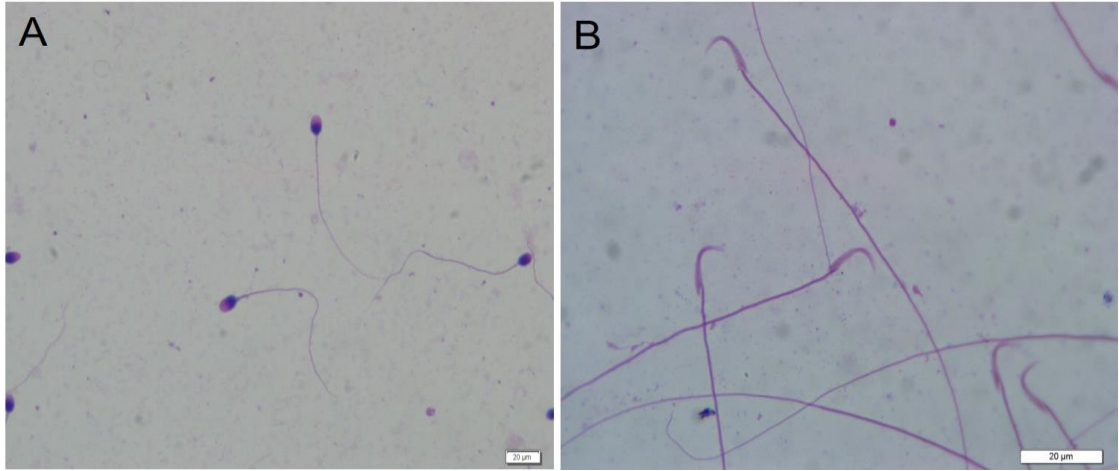
Sperm morfolojisi ilk kez Antoni van Leuwenhook tarafından mikroskopun keşfedilmesiyle tanımlanmıştır. 1980 yılında Dünya Sağlık Örgütü sperm morfolojik sınıflandırmasını yapmıştır. Kruger ile kesin kriterler (1987) kullanılmaya başlanmış ve morfoloji ile gerek fertilizasyon gerekse gebelik oranları arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir (Delilbaşı L vd 2008). Normal morfolojiye sahip sperm baş, boyun ve kuyruk özelliklerine göre incelenir (Şekil 2.3).

Baş: 2-3 μm . en ve 4-5 μm . boyda, düzgün sınırlı, oval, başın %40-%70' ini kaplayacak şekilde bir akrozom olmalı ve vakuol içermemelidir. Baş anomalileri küçük, büyük, yuvarlak, uzamış, amorf, vakuollü olarak sınıflandırılabilir.

Boyun: 4-5 μm . uzunluğunda ve düzgün olmalı ve başın alt kısmına, aksiller konumda bağlanmalıdır. Boyun bölgesinde bulunabilen sitoplazmik cisimcik başın yarısından daha büyük olmamalıdır.

Kuyruk: 50-55 μm . uzunlukta, kıvrımları düzgün, boyun kısmından daha ince olmalıdır. Kısa, kırık, birden fazla kuyruk, kendi eksenini etrafında kıvrılmış, kalın küt görünümlü kuyruklar kuyruk anomalileri hakkında bize bilgi verir (Delilbaşı L vd 2008), (Şekil 2.3).

Sıçan spermeleri için şu anda standart bir sınıflandırma sistemi bulunmamaktadır. Genel olarak sperm morfolojisinin değerlendirilmesi için kullanılan büyütmede, orta parçayı ayırt etmek zordur. Ayrıca sıçan sperminde orta parçanın az sayıda anormalliği bildirilmiştir. Bu nedenle, sadece baş ve kuyruk anomalileri değerlendirilerek inceleme yapılır (Şekil 2.3).



Şekil 2. 3 İnsan ve sıçan spermi. Diff-QUICK boyama. A insan spermi, B sıçan spermi, 100X.

Anormallik örnekleri:

a. Başsız sperm.

Başsız bir kuyruk olarak görülür. Serbest kafalar genellikle bir sperm yaymasında görülür, ancak kuyruk ve kafa birlikte görülmedikçe sayılmazlar.

b. Düzleştirilmiş kafa.

Alternatif isimler, küçülmüş kanca veya muz kafasını içerir. Bu durum, bazen tamamen eğrilik yokluğu ile başın azaltılmış eğrilik dereceleri olarak görülebilir.

c. İğnebaş.

Baş, bir toka veya çivi başını andırır ve kapalı veya eğimli olabilir.

d. Kıvrılmış kuyruk.

Bu genellikle, eksantrik yerleştirme olabileceği kuyruğun ve orta parçanın bağlantı yerinde görülür. Bazen kuyruğun ucunun yakınında bükülme veya kıvrılma olarak görülebilir.

e. Çoklu anormallikler.

Tek bir sperm için çoklu anormalliklerin görülmesinin mümkün olduğuna dikkat edilmelidir (WEB_2. 03.09.2018).

2.4. Alüminyumun Özellikleri

Al, atom ağırlığı 27 olan 3A grup elementidir. Oksijen ve silisyumdan sonra, yer kabuğunda (yaklaşık %8) en çok bulunan elementtir (Imray P 1995). Al hafif ve yumuşak olması, korozyona karşı dayanıklılığı, elektriği yüksek seviyede iletkenliği, kolay şekillendirilmesi gibi özellikleri vardır. Bu yüzden Al, 21. Yüzyıl elementi olarak görülür ve yeni teknolojilerin etkisi ile giderek artmaktadır (Alan S 2008). Doğada Al, çoğu silikat ile ilişkili ve suda çözünmeyen kompleksler oluşturan Al^{+3} olarak bulunur. Bu komplekslerin oluşumu sayesinde, Al biyoyararlılığı oldukça azalır. Nispeten küçük boyutlu Radius ($0,51 \text{ \AA}$) sahiptir. Trivalent pozitif yüküyle birlikte, Al' i komşu atomları üzerinde yüksek polarize edici bir etki bırakır. Bu katyonun amfoterik karakterinden dolayı su çözeltisinde hidrosil kompleksleri oluşturma eğilimi vardır. Fizyolojik pH'da, Al, asidik ortamda kolayca çözünebilen $Al(OH)_3$ 'ü oluşturur. Ayrıca, Al oksijen ve azot içeren bileşiklere, özellikle inorganik ve organik fosfatlara ve bu tür etkileşimler yoluyla birçok biyolojik makromoleküllere bağlanabilir (Ganrot PO 1986).

2.5. Alüminyumun Vücuda Alınımı ve Birikimi

Metalik elementler içerisinde en yaygın olan Al yer kabuğundaki bulunan elementler içerisinde 3. sıradadır (Camorga MM vd 2009). Bu metalin bol bulunurluğu yıllar içerisinde doğal ve insan kaynaklı olarak artmıştır. Al maruziyeti kaçınılmazdır ve gerçek anlamda sonuçları geniş ölçüde bilinmemektedir (Exley C 2012, Exley C 2013). Bu metalin iyonik formu yalnızca tüm doğal sularda değil aynı zamanda hayvan ve bitki dokularının çoğunda saptanabilir. Reaksiyonu nedeniyle, Al doğal olarak alüminyum sülfat ve klorür (Verstraeten SV 2008, Cheraghi E vd 2017) gibi bileşikler oluşturmak için diğer elementlerle kombinasyon halinde bulunur. İnsanlar Al'ye beslenme kaynaklı olsun ya da olmasın maruz kalırlar. Beslenme kaynaklı olarak, çeşitli ticari besinlere eklenen alüminyum tuzlarını; içme suların hazırlanmasında çöktürücü olarak ve gıda ürünlerinin paketlenmesinde, depolanmasında kullanılan Al'yi örnek gösterebiliriz (Fekete V vd 2013). İnsanlar ayrıca, Al'ye aşılarda, ilaçlarda, kozmetik ürünlerinde, güneş kremi ve deodorantlarda, makyaj ürünlerinde Al destekleyici olarak, beslenme

kaynaklı olmayan durumlarda da maruz kalabilirler (Bondy SC 2015, Martinez CL vd 2017). Toprak, su ve çoğu bitkiler Al içermektedirler. Toprak pH'nın 4,5-5' den daha düşük olduğu zaman Al suda çözünmediği için bitki kökleri tarafında absorbe edilebilir. Bu nedenle bitkilerin çoğu Al içerirler (Kim MS vd 2001). Al, besinlere temas ile de geçebilmektedir. Al içeren besinlere örnek olarak: işlenmiş peynirleri, tahıl ürünleri ve bunlarla yapılan tatlıları gösterebiliriz. Bitkisel besinlerden ise çay yüksek miktarda Al içermektedir (Tayfur M vd 2002). Al'yi en fazla taşıma potansiyeline sahip etken çeşme suyudur (Bakar C vd 2009). İnsan vücuduna içme suyundan oral olarak alınan total Al girişi %5'den daha azdır. Bu bağlamda içme suyundaki Al konsantrasyonunun tolere edilebilir miktarı 3.35×10^{-4} mg/kg'dır. Al' un bağırsaklardan geri emilimi ise %0.1-1 seviyesindedir (Deng Z vd 2000). Gastrointestinal sistem bu metale karşı bariyer görevi görmektedir. Geçirgenliği Al kimyasal formuna, pH'sına ve konsantrasyonuna bağlıdır (Alfrey CA vd 1980, Rana SVS 2007).

Vücuda giren vücut ağırlığı başına günlük Al miktarı 0.01-1.4mg/kg'dır. Böylece, 70 kg ağırlığındaki kişilerde total vücut alüminyum düzeyi 30-40 mg arasında değişmektedir (Tayfur M 2002). 2007'de insanlar için tolere edilebilir Al alımı (haftalık), vücut ağırlığı başına 1mg Al/kg olarak belirlenmiştir. Ancak, insanların günlük hayatta bu değerleri aştıkları bilinmektedir (Gonzalez-Weller D vd 2010, Fekete V vd 2013). Vücuda giren Al kemik, akciğer, karaciğer, beyin, kas gibi çeşitli dokularda birikmektedir. Sağlıklı kişilerde her gün biriken Al'un yaklaşık 10-40 µg böbrekler yoluyla atılmaktadır. Günlük Al alımı arttığında bu değer farklılık (200-500 µg) göstermektedir. Ayrıca, Al atılımı safra yoluyla da gerçekleşmektedir (Bakar C vd 2009).

2.6. Alüminyum ve Oksidatif Stres

Biyolojik sistemlerde artmış oksidatif stres, nitrik oksidin (NO) artmış düzeyi ile alakalı bulunmuştur. NO, nitrik oksit sentaz enziminin (NOS) aktivitesi ile l-arjinin'den oluşur ve çok çeşitli dokularda ortaya çıkar, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte rolü vardır (Moncada S vd 1991). NOS ayrıca hayvan testislerinde ve insan üreme organlarında bulunmaktadır, bu da NO'nun steroid hormonların salınımında ve biyosentezinde aracılık ettiğini ve testislerde Leydig hücrelerin işlevini etkileyebileceği sonucunu çıkarmaktadır (Welch C vd 1995). NO ürünlerinin yüksek seviyesi, yüksek

doz Al ile indüklenmiş testiküler hasarlarda rol oynamaktadır ve NO-ilişkin ajanlar erkek sıçanlarda testesteron salınımını baskıladığı bilinmektedir (Guo CH vd 2002).

İn vivo ve in vitro deneysel çalışmalar göstermektedir ki, yüksek Al konsantrasyonu oksidatif strese neden olmaktadır (Sies H vd 2007). Serbest radikallerin fazla sentezlenmesi ve antioksidanları yetersizliği durumunda oksidatif stres görülür. Lipit peroksidasyonu, bağışıklık, büyüme ve üreme gibi fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır (Gladine C vd 2007, Dimri U vd 2010).

Alüminyumun sebep olduğu oksidatif stres birçok yolla ortaya çıkabilir. Lipitlerde oluşan radikaller lipit peroksidasyonuna neden olmaktadır (El-Demerdash FM 2004). Lipit peroksidasyonu çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidan radikaller tarafından alkol, hidroksi asit, etan, pentan ve aldehid gibi çeşitli ürünlerin yıkımıyla sonuçlanan reaksiyonlardır. Lipit peroksidasyon ürünleri zar geçirgenliği ve akışkanlığını azaltarak membrana bağlı enzim ve reseptörlerin inaktivasyonuna neden olur. Bu durum organellerin yapı ve fonksiyonunu bozar (Oteiza PI 1994, Bharathi P vd 2008). Ortamda bulunan Al, çinko, demir gibi ağır metaller oksidatif hasarı direkt başlatmaz. Fakat yapılan in vitro çalışmalarda Al-Fe aracılı lipit oksidasyonunu başlattığı da gözlenmiştir. Ortamda geçiş metallerinin bulunmasının da lipit peroksidasyonunu hızlandırdığı görülmüştür. Al'nin oluşturduğu oksidatif hasar sonucu oluşan, serbest oksijen radikalleri proteinlerde dekarboksidasyon, peptit bağlarının yıkımına, disülfid ve çapraz bağların oluşumuna ve akabinde proteinlerin parçalanarak aktivite kaybına neden olmaktadır (Yerer MB vd 2000). Ayrıca, oluşan oksidatif hasar nükleik asitler düzeyinde de gerçekleşebilir. Başta iyonize hidroksil olmak üzere serbest oksijen radikalleri nükleik asit bağlarının değişimine ve DNA iplikçığı kırılmalarına neden olmaktadır (Verstraeten SV 2008). Al düşük dozlarda bile süperkoil yapıdaki DNA'yı geri dönüşümsüz olarak dekondanse eder (Rao KSJ vd 1993).

2.7. Alüminyumun Toksik Etkileri

Deney hayvanları üzerinde ve diğer invitro testlerde Al nitrat, Al klorid ve Al sülfatın sıçanlarda ortalama oral letal dozu 200-1000mg/kg olarak belirlenmiştir. Al'nin nörotoksik etkilerinin ise günlük 100-200 mg/kg ortalama doz konsantrasyonunda görüldüğü ortaya konmuştur. Al çeşitli mekanizmalar ile başta merkezi sinir sistemini ve diğer sistemleri olumsuz etkileyebilmektedir (Berlyne vd 1970).

Alüminyum, beyin, kemik, böbrek ve kan gibi çeşitli organ sistemlerine toksik etkilere neden olduğu bilinmektedir (Oteiza PL vd 1993). Alzheimer hastalığı ile ilgili çeşitli enzimleri ve diğer biyomolekülleri etkileyebilecek bir çevresel faktör olarak önerilmiştir (Ferreyra MH vd 1994, Nayak P vd 2001). Al'nin doğrudan veya dolaylı etkileşimi ile beyinin farklı bölgelerinde oksidatif strese neden olduğu öne sürülmüştür (Kaizer RR vd 2005, Sumathi T vd 2011).

Beyindeki yükselmiş Al seviyesinin karbonhidrat metabolizmasında, antioksidan savunma sisteminin inhibisyonunda ve kolinerjik sisteminde bozukluklara neden olduğu bildirilmiştir (Moumen R vd 2001, Singla N vd 2012). Hem in vivo hem de in vitro çalışmalarda, Al maruziyetinin mitokondriyal fonksiyonlarda bozulmaya neden olabileceği gösterilmiştir (Niu PY vd 2005). Birçok çalışma Al'nin hücre döngüsü regülasyonu için önemli olan çeşitli genlerin ve proteinlerin ekspresyonunu değiştirebileceğini göstermiştir (Kumar V vd 2009). Ayrıca, Al kalsiyum homeostazında bozulmaya neden olduğu ve apoptotik yol ile etkileşimi de bildirilmiştir. Böylece, bu değişmiş hücre metabolik indekslerin nihayetinde nöronal hücrelerde oksidatif strese neden olmaktan sorumlu olduğu açıktır (Yang SJ vd 2004, Walton JR 2012).

Al kan yapımı üzerinde direkt etkiye sahiptir. Yüksek dozda Al'nin mikrositer anemiye indüklediği gösterilmiştir. Al, demir halkası ve globülin sentezinde azalma ve artmış hemolizis ile anemiye neden olmaktadır.

Kemik dokuda Al artışı düşük kemik oluşum oranı ve kırıkların iyileşmesinde gecikmeye neden olmaktadır (Kausz vd 1999). Al'nin kemik üzerine etkisini dozaj bağımlı olduğu gözlemlenmiştir. Yüksek konsantrasyonlarda Al osteoklastların asit fosfataz aktivitesini, osteoblastların kollajen sentezi, DNA replikasyonu, ornitin dekarboksidaz ve alkalin fosfataz aktivitelerini düşürürken, düşük dozlarının bu aktiviteleri stimüle ettiği görülmüştür (Lieberherr vd 1987).

Soluma maruziyeti respiratuvar sistem üzerine olumsuz etkiler göstermektedir. Solunum yoluyla Al'ye maruz kalan kişilerde öksürük, astım, akciğer fibrozisi veya pulmoner fonksiyon bozukluğu artmıştır (Çabuş N 2012).

Al tuzları DNA'ya bağlanabilir ve RNA, heksokinaz, asit ve alkali fosfatazlar, fosfodiesteraz ve fosfooksidadaz gibi enzimleri inhibe edebilir (Ochmanski W vd 2001). Strong ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Al maruziyetinin glikoz kullanımında, serbest radikal aracılı sitotoksitede, lipid peroksidasyonunda (LPO), gen ekspresyonunda ve protein fosforilasyonunda bozulmalara neden olduğunu

bildirmişlerdir. Al, reaktif oksijen türleri üretmektedir, lipitlerin, proteinlerin ve DNA'nın oksidatif bozulmasına yol açmaktadır (Fatma M ve El-Demerdash 2004).

2.8. Alüminyumun Testis Üzerindeki Toksik Etkileri

Erkek üreme sistemi özellikle testisler ve sperm hücreleri oksidatif hasarlara karşı çok hassastır (Martinez CL vd 2017). Hem testisler hem de sperm hücreleri, çoklu doymamış yağ asitleri açısından zengindir, bu da sonuç olarak reaktif oksijen türleri (ROS) ve dolayısıyla oksidatif hasarın saldırısına karşı duyarlılıklarını artırır (Martinez CL vd 2017, Giovana MO vd 2016). Sperm için zararlı olan aşırı ROS üretimi; erkek infertilitesinin altında yatan sebeplerdendir. (Martinez CL vd 2017). Testislerde oksidatif stres Leydig hücrelerinin steroidojenik kapasitesini bozabilir. Sperm hücrelerinde oksidatif stres bu hücrelerin hareketliliğini ve normal embriyonik gelişmeyi destekleme yeteneklerini etkiler (Giovana MO vd 2016). Yousef MI ve Salama AF (2009), aşırı miktarda Al alımının, hedef organlarda birikimine ve hem insanlarda hem de hayvanlarda testiküler dokularda hasara yol açtığını bildirmiştir (Yousef MI ve Salama AF 2009).

2.9. Alüminyum ve Apoptoz

Al serbest oksijen radikallerini artırarak DNA hasarlarına neden olup, DNA tamir enzimlerinin etkilerini inhibe ederek apoptozu tetikler. Al, Na^+/Ca^{+2} değişimini inhibe edip, mitokondriyal kalsiyumun aşırı birikmesini tetikleyerek hücre depolarizasyonuna neden olmaktadır. Mitokondri içerisinde artan Ca seviyesi sitokrom C salınımı ile mitokondriyal permeabilite transizyon porunun açılmasına ve kaspaz yolağının aktivasyonu ile apoptoza neden olur (Ghribi O vd 2002, Şengül İ ve Şengül D 2012). Al'nin Bcl/Bax oranını değiştiren p53'ün ekspresyonunda artışa neden olarak apoptozu tetiklediği de görülmüştür. Al endoplazmik retikulum stresini tetikleyerek, hücre içi Ca artışına ve Bcl2 seviyelerinde azalmaya neden olur (Dewitt DA vd 2006, Bharathi P 2008). Ayrıca Al, nükleer faktör kappa B ve gadd 153'ü aktive edip, endoplazmik retikulumda stresi tetiklediği görülmüştür (Ghribi O vd 2001). Yani Al,

endoplazmik retikulum aracılı apoptozu mitokondri ilişkili veya mitokondriden bağımsız tetikleyebilir (Ohyagi Y vd 2013). Al ve bu elementten üretilmiş serbest radikaller LPO'ya neden olarak hücre zarı hasarı, Bax gen ekspresyonunun down-regülasyonu, alkalın fosfataz aktivitesini azaltması ve siklik adenosin monofosfat redüksiyonu dahil olmak üzere çok çeşitli mekanizmalarla apoptozu uyarma kabiliyeti olabileceği bildirilmiştir (Cheraghi E vd 2017).

2.10. Vitamin E

Vitamin E (vit E) terimi, trimetil (α), dimetil (β veya γ) ve monometil (δ) tokoferol gibi 8 farklı vitamin formunu kapsamaktadır (Traber MG 1999). Biyolojik olarak en aktif olan ve doğada en bol bulunan α -tokoferoldür (Boydağ BS 1998, Mammadov R 2002).

Emilim bozukluğuna sahip hastalar hariç, sağlıklı bireylerde vit E bağırsaklarda hidroliz edilerek serbest formda emilir (Zingg JM 2007). Doğal olarak insan dokularında bulunduğu gibi bitki ve hayvan dokularında da bulunur (Negis Y vd 2005). E vitamini bileşeni olan α -tokoferol zeytin yağı, ayçiçeği yağı, γ -tokofrol mısır yağı, δ -tokoferolün önemli miktarı soya fasulyesi gibi birçok bitkisel yağda bulunur (Zingg JM 2007).

Vit E vücutta tüm dokularda fakat en çok da yağ dokusunda depolanır. Dokularda mitokondri ve mikrozomlar gibi zarlı yapılarda, yağ hücreleri, bazı endokrin bez hücreleri ve trombositlerde yüksek düzeyde E vitamini bulunmaktadır (Murray RK 2009).

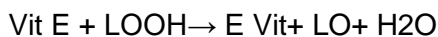
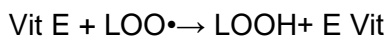
Vücutta vit E'nin emilimi yağların sindirimi ile birlikte yapılır. Çünkü, vit E sadece yağlarda ve organik çözücülerde çözülebilmektedir. Vit E'nin tüm formları vücuda alındıktan sonra intestinal mukozanın fırçamsı kenar hücreleri tarafından diffüzyonla hücre içine alınır. Burada trigliserit, fosfolipit ve kolesterol ile birlikte genellikle şilomikronlara dahil olur. Şilomikronlar aracılığı ile lenfatik sisteme geçip buradan Ductus Thoracicus yoluyla sistemik dolaşıma katılır. Daha sonra vitaminler şilomikronlarla karaciğere taşınır. Karaciğerde α -tokoferol'ü spesifik bir protein α -tokoferol transfer proteini tanır ve onu çok düşük yoğunluklu lipoproteinlere (VLDL) taşır. (Montz FJ vd 1991, Aslam I vd 2000, Singh U vd 2005). VLDL'nin dolaşımdaki lipoprotein lipaz tarafından yıkımı sırasında ortaya çıkan düşük yoğunluklu lipoproteinden (LDL) vit E yüksek yoğunluklu lipoproteine (HDL) transfer edilir. Vit E plazmada en çok LDL'de bulunmasına rağmen yaygın olarak LDL ve HDL tarafından

taşınır (Elangovan N vd 2006). LDL'nin endositozu ile hücre içine alınan vit E burada tokoferol ilişkili protein (TAP) ile birleşip α -tokoferol regülasyonunda görev alır (Glode M vd 1981). α -tokoferol haricindeki vit E'nin diğer bileşenleri karaciğer tarafından alıkonularak karboksietil-hidroksikromanlar şeklinde safra ve idrar yoluyla atılmaktadır (Singh U vd 2005).

Tokoferol vit E'nin biyolojik olarak aktif şeklidir. α -tokoferol konsantrasyonları, membran akışkanlığındaki veya lipitlerdeki değişimleri düzenlemektedir (Tengerdy RP 1990). α -tokoferol'ün hücre membranlarındaki yağ asitlerini korumak, onun antioksidan özelliklerinden biridir. Tokoferoller oksitlenebilen lipitler üzerinde antioksidatif özellikler göstererek hücre membran bölgelerinde spesifik reseptörleri ve sinyal yolağını değiştirirler (Traber MG vd 2007).

2.11. Vitamin E' nin Antioksidatif Etkisi

Vitaminler, oksidatif reaksiyonlar sırasında oluşan reaktif oksijen türlerinin saldırısından su ve lipit hücre bileşenlerini korumakta veya bu oksijen türlerinin eliminasyonunu artırmaktadır (Ortuno J vd 2001). Fazla üretilen reaktif oksijen türleri apoptoza neden olan faktörlerden biridir. Vit E, bu işlemi geciktirebilir ve bunu reaktif oksijen türlerini baskılayarak yapar (Baldi A 2005). Vit E antioksidatif rolünü esansiyel bir kofaktör olarak veya lipit oksidasyonunu ve onların zararlı etkilerinin yayılmasını önleyerek gerçekleştirir. Vit E yetersizliği durumunda artan lipit peroksidasyonu vit E'nin esansiyel kofaktör fonksiyonlarının bozulmasına neden olur (Zingg JM 2007). Vit E yağlarda çözünebilen antioksidandır ve dokularda lipoperoksitlerin sentez ve birikimine karşı korumada önemli rolü vardır. Ayrıca demir birikiminden dolayı ortaya çıkan doku patolojisini azaltmaktadır. Vit E büyüme, üreme, diğer ve doku bütünlüğünün korunması gibi durumlarda antioksidatif etki gösterir (Infante JP 1999, Baldi A 2005). Vit E en önemli antioksidatif etkisi serbest radikalleri temizleyerek, hücre zarı ve hücre içi membranları korumaktır (Niu ZY vd 2009). Vit E membran fosfolipitlerinden veya lipoproteinlerde bulunan çoklu doymamış yağ asitleri tarafından üretilen peroksil radikalleri (LOO) ile reaksiyona girerek lipit hiperoksit radikallerine (LOOH) indirgerler.



Bu biyokimyasal reaksiyon sonucunda zararlı lipit peroksit radikalleri azalır ve böylece dokular serbest radikal saldırısına karşı korunmuş olur. Vit E ayrıca, lipit peroksidasyonunu önleyerek immün yanıtı da artırmaktadır (Chew BP 1996). Steroid üreten dokularda yoğun olarak bulunan vit E lipit peroksidasyonunu önleyerek, sitokrom p-450' nin steroidojenik aktivitelerini korumaktadırlar (Infante JP 1999).

E vitamini, esas olarak hücre zarlarında bulunan önemli antioksidatif moleküllerden biridir. Lipit peroksidasyonu ile reaksiyonların kesilmesi ve moleküler oksijenin tek değerlikli indirgenmesi ve aynı zamanda oksidatif enzimlerin normal aktivitesi sırasında oluşan serbest radikalleri ortadan kaldırdığı düşünülmektedir. Bu radikaller, sperm mitokondrilerinde fosfolipitlerin peroksidasyonuna ve böylece sperm immotilitelerine yol açmaktadır. Vit E radikal temizleyici antioksidan enzimlerin üretimini arttırması mümkündür (Mohammad K vd 2011). Birçok araştırmacı, testislerdeki oksidatif stresin artmasını önlemek için vit E (a-tokoferol) dahil olmak üzere çeşitli antioksidanlar kullanmıştır. Vit E, Sertoli hücrelerinde, pakiten evresindeki spermatositlerde, yuvarlak spermatidlerde yüksek miktarda bulunan güçlü bir antioksidan olduğu kabul edilmiştir. Üreme sisteminde, vit E aktif oksijen radikallerinin spermatogenez üzerindeki zararlı etkilerini önler ve bu nedenle testiküler oksidatif stresi azaltır (Uzun FG vd 2009, Momeni HR ve Eskandari N 2012).

2.12. Hipotez

H1: Vitamin E, alüminyumun oluşturduğu testis hasarında antioksidan etkisiyle apoptotik hücre sayısını azaltır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu tarafından 24.05.2018 tarihinde PAUHADYEK-2017/02 nolu kararıyla onaylanmıştır. Çalışmamız için gerekli hayvanlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi'nden alındı. Ortalama ağırlıkları 250-300 gr olan 40 haftalık 34 adet Wistar-Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Tüm denekler için önerilen optimum çevresel koşullar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Araştırma Birimi tarafından sağlanmıştır. Çalışma süresi boyunca sıçanlar, uygun oda ısısı ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), nem ortamında ($\%60\pm 5$) ve 12 saatlik aydınlık-karanlık periyotları bulunan laboratuvar koşullarında takip edildi. Sıçanların musluk suyu ve $\%21$ ham protein içeren pelet yemlere serbest ulaşımı sağlanmıştır.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda, kontrol grubunda 6 sıçan, diğer gruplarda 7 sıçan olacak şekilde 5 grup oluşturuldu.

1. Kontrol Grubu (n=6): Bu grupta bulunan sıçanlara hiçbir işlem yapılmadı.
2. Sham Grubu (n=7): Bu gruptaki her bir sıçana 0.2 ml distile su 4 hafta boyunca haftada 3 kez olacak şekilde ip enjeksiyon yapıldı.
3. Vitamin E Grubu (n=7): Bu gruptaki her bir sıçana 500 mg/kg vit E 4 hafta boyunca haftada 3 kez olacak şekilde ip enjeksiyon yapıldı (Kutlubay R vd 2007).

4. Al Grubu (n=7): Bu gruptaki her bir sıçana 10 mg/kg Al sülfat/0.2 ml distile suda çözülerek 4 hafta boyunca haftada 3 kez olacak şekilde ip enjeksiyon yapıldı.
5. Al+Vit E grubu (n=7): Bu gruptaki her bir sıçana 10 mg/kg Al sülfat/0.2 ml distile suda ve 500 mg/kg vit E 4 hafta boyunca haftada 3 kez olacak şekilde ip enjeksiyon yapıldı (Cheraghi E vd 2017).

3.3. Dokuların Alınması ve Testis Ağırlıklarının Ölçümü

Sıçanlara ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin-hidroklorür (10 mg/kg) olacak şekilde ip olarak anestezi uygulandı. Anestezi altında hayvanların karın duvarı açıldı, epididimis ve testisler çıkartıldı. Testisler çevre yağ dokudan temizlendi ve hassas terazi ile tartıldı.

3.4. Sperm Sayımı ve Morfolojik Değerlendirme

Testisler çıkartıldıktan sonra, kauda epididimis alındı ve 2 ml izotonik solüsyon içerisinde parçalandı. Solüsyonda 1 damla Makler kamerasına koyuldu. Işık mikroskopu altında 40x büyütmede 100 karede spermler sayıldı. Sperm hücrelerinin toplam sayısı $10^6/ml$ olarak ifade edildi.

Kauda epididimisten elde edilen sperm örnekleri her sıçan için iki lam olarak yayıldı. Havada kurutma ile kurutulan örnekler morfolojik değerlendirme için DİFF QUICK metoduyla boyandı ve lamlar ışık mikroskopunda 100x büyütmede görüntülendi. Her lamda toplam 200 sperm hücresi incelendi ve normal, baş ve kuyruk anormallik oranları yüzde olarak ifade edildi. Sperm morfoloji yüzdesi = anormal (baş, kuyruk) sperm sayı x 100 / 200.

3.5. Fiksatiflerin Hazırlanması

Testisleri fikse etmek için kullandığımız modifiye Davidson fiksatifinin (mDF) hazırlanışı aşağıda verilmiştir:

%37-%40 formalin 30 ml

%100 etanol	15 ml
Asetik asit	5 ml
Distile su	50 ml

Testisleri fikse etmek için kullandığımız paraformaldehidin (PFA) hazırlanışı aşağıda verilmiştir:

PFA	4 gr
1X PBS	100 ml

PFA 60° C' de 3 saat boyunca karıştırılarak çözüldü ve pH 7.4 olarak ayarlandı (Wang H vd 2016).

3.6. Fiksasyon ve Doku Takibi İşlemleri

Testis çevresindeki yağ dokudan temizlendikten sonra fiksatifin nüfuz etmesini kolaylaştırmak için her iki uçta 15-20 noktadan insülin enjektörü ile delikler açıldı. Tüm dokular, doku-fiksatif oranı 1:10'dan (g/ml) fazla olacak şekilde önce modifiye Davidson Fiksatifinde (mDF) 3 saat boyunca fikse edildi. Sonra testisler horizontal olarak ikiye bölündü. Testisler 6 saat mDF'de fikse edildikten sonra 18 saat boyunca paraformaldehidde (PFA) bekletildi. Tüm fiksasyon işlemleri 4°C'de yapıldı. Daha sonra rutin doku takibi işlemi (Tablo 3.1) uygulanarak her sıçana ait testisler parafin bloklara gömüldü. Her parafin bloktan 5 µm'lik kesitler alındı (Wang H vd 2016).

Tablo 3. 1 Doku takibi

Kullanılan kimyasallar	Uygulanan süre
mDF	6 saat
%4 PFA	18 saat
%70' lik alkol	1 saat
%80' lik alkol	1 saat
%95' lik alkol	1 saat
%100' lik alkol	1 saat
%100' lik alkol	1 saat
Ksilen I	1 saat
Ksilen II	1 saat
Ksilen III	1 saat
Parafin I	1 saat
Parafin II	1 saat
Parafin III	1 saat
Bloklama	

3.7. Hemotoksilen/Eozin boyama

Hemotoksilen/Eozin boyama yönteminin basamaklar Tablo 3.2' de gösterildiği gibi uygulanmıştır (Çil N 2014).

Tablo 3. 2 Hemotoksilen/Eozin boyama protokolü.

Kullanılan kimyasallar	Uygulama süresi
Ksilen I	30 dk
Ksilen II	30 dk
% 100'lik alkol	5 dk
%90'lik alkol	5 dk
%80'lik alkol	5 dk
%70'lik alkol	5 dk
%50'lik alkol	5 dk
Distile su	10 dk
Hemotoksilen	1.5 dk
Akar suda yıkama	1 dk
Eozin	3 kere daldır çıkar
%50'lik alkol	2 dk
%70' lik alkol	2 dk
%80' lik alkol	2 dk
%90'lik alkol	2 dk
% 100'lik alkol	2 dk
Ksilen I	10 dk
Ksilen II	10 dk
Kapatma işlemi	Entellan ile

3.8. Seminifer Tübül Alanlarının ve Seminifer Epitel Kalınlığının Hesaplanması

Her grup için parafin bloklardan Leica RM-2125 Rotary Microtom cihazı ile 5 µm'lik kesitler alındı ve H/E boyama yöntemi ile boyandı. 20X büyütmede seminifer tübüllerin transvers kesitlerinde seminifer tübül epitel kalınlığı (µm) ve seminifer tübül alanı (µm²) hesaplanmıştır. Her gruptaki bütün sıçanlarda rastgele 10 alan her alanda 4 seminifer tübül ölçüldü (Mouro GSV vd 2018). Kesitler Olympus BX-51 ışık mikroskobuna takılı Olympus PP72 Digital Kamera ile incelenerek resimlendi.

3.9. Modifiye Johnsen Skorlaması

H/E ile boyanan kesitler, spermatogenezi değerlendirmek için ışık mikroskobu altında incelenmiştir. Modifiye Johnsen skorlaması spermatogenezi sınıflandırmak için kullanıldı. Bu sistem, olgunluk sırasına göre düzenlenmiş ana hücre tiplerinin yokluğuna veya varlığına göre, 1 ila 10 arasında bir ölçekte spermatogenezin başarısını tanımlar. Johnsen skorunun 9 veya 10 olması normal histolojiyi gösterir, 8 puan hipospermatogenezi gösterir, 3-7 skoru matürasyon durması, 2 skoru germinal hücre aplazisi (sadece Sertoli hücreleri) ve 1 skoru tübül fibrozu temsil eder.

Her testis için 30 tübül germinal epitelyumu değerlendirildi ve her bir sıçan için modifiye Johnsen skoru hesaplandı (Erdemir F vd 2014).

1. Seminifer epitelyum yok.
2. Yalnız Sertoli hücresi var. Germinal hücre yok.
3. Yalnız spermatogonia var.
4. Spermatid veya spermatozoa yok, birkaç spermatozoid var.
5. Spermatid veya spermatozoa yok, çok sayıda spermatozoid var.
6. Spermatozoa, geç spermatid yok, birkaç erken spermatid var.
7. Spermatozoa ve geç spermatid yok, çok sayıda erken spermatid var.
8. Her tübülde 5 spermatozoadan daha az, birkaç geç spermatid var.
9. Hafif bozulmuş spermatogenez, birçok geç spermatid, düzensiz epitel.
10. Tam spermatogenez.

3.10. TUNEL Boyama

Her gruptan 5 µm kalınlıktaki kesitler polilizinli lam üzerine alındı. Apoptoz için ApopTag Plus Peroxidase Ğn Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore, Lot: 2990142 USA) kullanıldı.

1. Kesitler önce 3 kez değiştirilen ksilende 15'er dk bekletildiler ve deparafinize edildiler.
2. 2 kez %100' lük alkolde 5'er dk bekletildi.
3. %95'lik alkolde 3 dk bekletildi.
4. %70'lik alkolde 3 dk bekletildi.

5. PBS solüsyonunda 5 dk yıkandılar.
6. Proteinaz K solüsyonunda oda ısısında 15 dk bekletildi.
7. 2 kez değiştirilmiş distile suda 2'şer dk yıkandılar.
8. %3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂)'de oda ısısında 5 dk bekletildi.
9. 2 kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda 5'er dk yıkandılar.
10. Equilibration Buffer içinde oda ısısında 1 dk inkübe edildiler.
11. Kesitlere TdT enzimi uygulanarak etüvde 37°C de nemli ortamda 1 saat bekletildi.
12. Kesitler daha sonra Working Stop /Wash Buffer solusyonunda 15 saniye çalkalandılar ve 10 dk oda ısısında inkübe edildiler.
13. 3 Kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda 1'er dk yıkandılar.
14. Oda ısısındaki kesitlere anti- digoxigenin peroksidaz damlatılarak oda ısısında nemli ortamda 30 dk bekletildiler.
15. 4 Kez değiştirilmiş PBS solüsyonunda oda ısısında 2'şer dk yıkandılar.
16. Kesitlerin üzerine DAB solüsyonu damlatılarak 10 dk bekletildiler.
17. Kesitler 3 kez değiştirilmiş distile suda 1'er dk yıkandı ve son olarak distile suda 5 dk bekletildi.
18. Zıt boyama için preparatlar %0.5'lik metilgreen içerisinde 10 dk bekletildi.
19. 3 kez değiştirilmiş distile suda 30'ar saniye çalkalandılar.
20. Kesitler 3 kez değiştirilmiş %100'lük butanölden hızlı bir şekilde çalkalanarak geçirildiler.
21. Ksilen I de 2 dk tutuldu.
22. Ksilen II de 2 dk tutuldu.
23. Ksilen III de 2 dk tutuldu.
24. Kesitler en son olarak entellan damlatılarak kapatıldılar (Çil N 2014).

Apoptotik indeks: TUNEL metodu kullanılarak spermatojenik hücre apoptozisi değerlendirildi. Nukleusları kahverengi boyananlar TUNEL pozitif hücre olarak kabul edildi. Her lamda 5 rasgele alan seçildi. Her alanda 200 spermatojenik hücre sayıldı. Apoptotik indeks (Aİ) şu şekilde hesaplandı.

Aİ = Pozitif hücreler x 100 / Total hücre sayısı (Li W vd 2014).

3.11. Metil Green Boyasının Hazırlanması

0.1 M Sodyum asetat aşağıdaki şekilde hazırlandı:

Sodyum asetat, trihidrat	1.36 gr
Distile su	100 ml

Sodyum asetat karıştırılarak çözüldü ve asetik asit damlatılarak pH 4 olarak ayarlandı.

Metil green boyasının (0.5%) hazırlanması:

Metil green	0.5 gr
0.1M Sodyum asetat	100 ml

Karıştırıcıda 4 saat boyunca karıştırıldı ve pH 4 olarak ayarlandı.

3.12. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 24.0 paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca (en küçük – en büyük değerler) ve kategorik değişkenler sayı ve yüzde olarak verilmiştir. Verilerin normal dağılıma uygunluğunun incelenmesinde Shapiro Wilk testi kullanılmıştır. Bağımsız grup farklılıkların karışlaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi (Post-hoc olarak Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Testis Ağırlığı, Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Testis ağırlıklarında gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Fakat gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında kontrol grubuna göre Al+vit E grubunda testis ağırlığının anlamlı olarak düşük olduğu saptandı ($p < 0.05$). Sıçanların epididimisten alınan sperm örneklerinin sayımı sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0.05$). Sperm hücreleri morfolojik olarak değerlendirildiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı. Fakat Al verilen grupta diğer gruplara göre normal morfolojide sperm sayısının daha az olduğu görüldü ($p > 0.05$). Grupların kuyruk anomalisi oranları birbirine yaklaşık değerdeyken, baş anomalisi oranlarının Al'li grupta fazla olduğu görüldü ($p > 0.05$, Tablo 4.1, Şekil 4.1).

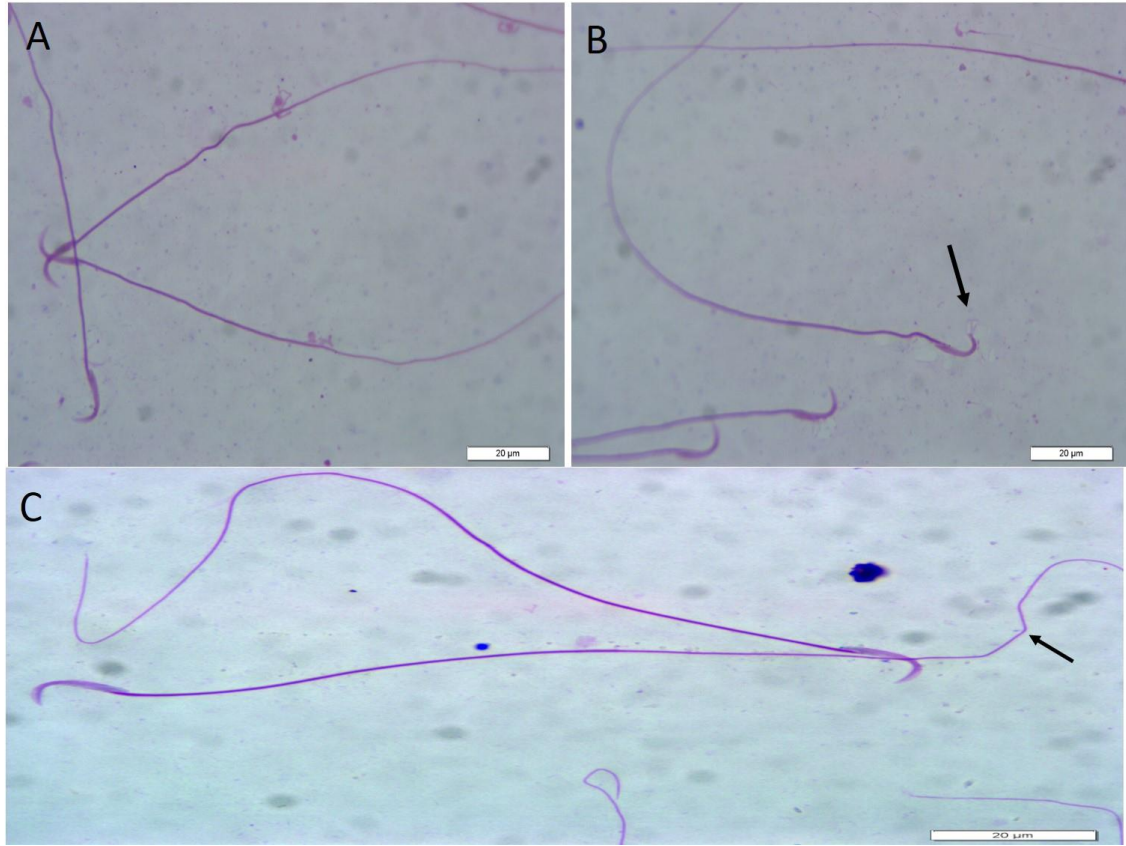
Tablo 4. 1 Testis ağırlığı, sperm sayısı, sperm morfolojisi yönünden gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi.

		Baş (%)	Kuyruk (%)	Normal (%)	Testis ağırlık (gr)	Sperm sayısı($10^6/ml$)
Kontrol	A.O \pm S.S	8,17 \pm 6,15	37,17 \pm 8,23	54,67 \pm 8,24	3,63 \pm 0,31	46,33 \pm 9,73
	Med (min - maks)	8 (2 - 18)	36 (28 - 52)	53,5 (46 - 70)	3,61 (3,28 - 4,1)	48 (32- 55)
Sham (0.2 ml distille su)	A.O \pm S.S	8,43 \pm 4,35	36,43 \pm 6,95	55,14 \pm 6,62	3,56 \pm 1,63	38,86 \pm 13,02
	Med (min - maks)	8 (3 - 14)	37 (26 - 46)	54 (46 - 65)	3,01 (2,3 - 7,17)	41 (25 - 55)
Vitamin E (500mg/kg)	A.O \pm S.S	8,86 \pm 4,6	33,71 \pm 9,89	57,86 \pm 11,39	3,25 \pm 0,33	-
	Med (min - maks)	8 (4 - 18)	33 (16 - 48)	58 (36 - 74)	3,22 (2,89 - 3,88)	-
AL (10mg/kg)	A.O \pm S.S	10,5 \pm 6,47	38,17 \pm 9,39	51,5 \pm 11,74	3,3 \pm 0,29	33,57 \pm 9,11
	Med (min - maks)	9,5 (2 - 20)	38 (23 - 52)	55,5 (33 - 65)	3,35 (2,91 - 3,71)	36 (20 - 44)
AL (10mg/kg)+ Vitamin E	A.O \pm S.S	7 \pm 3,32	35,43 \pm 8,54	57,71 \pm 7,95	2,68 \pm 0,91	44,57 \pm 24,41
	Med (min - maks)	6 (3 - 12)	32 (27 - 53)	58 (42 - 66)	2,72 (0,78 - 3,64)	43 (1 - 78)

(500mg/kg)

Gruplar	0,824	0,873	0,514	0,037*	0,254
Arası p				(AL + Vit E – Kontrol)	

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis Varyans Analizi ile incelenmiştir.



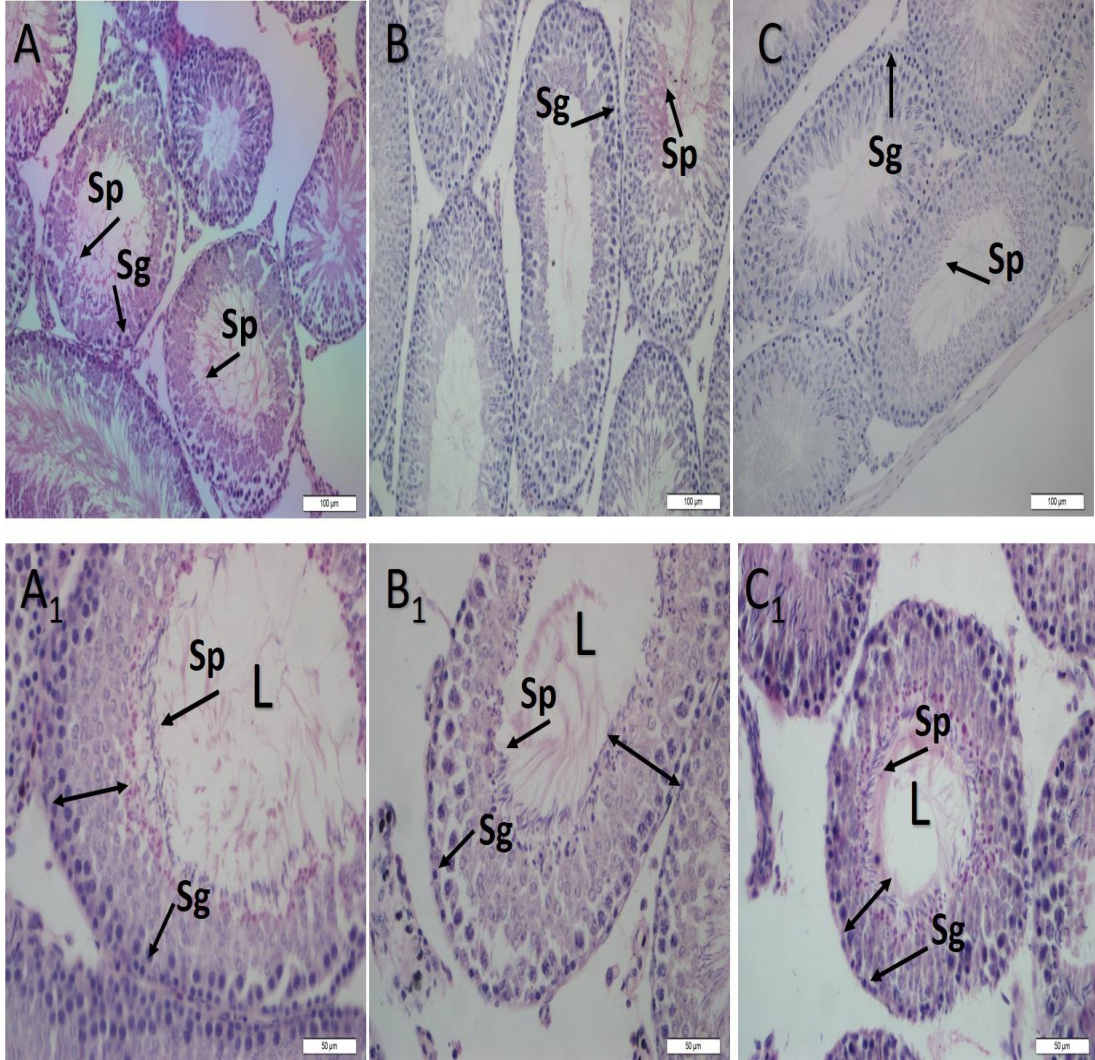
Şekil 4.1 Sıçan sperm morfolojik anormallikleri. Diff-QUICK boyama. A normal morfoloji, B anormal baş (ok), C anormal kuyruk (ok), 100X.

4.2. Al ve Vit E' nin testis Yapısına Etkisi

4.2.1. H/E Boyama Bulguları

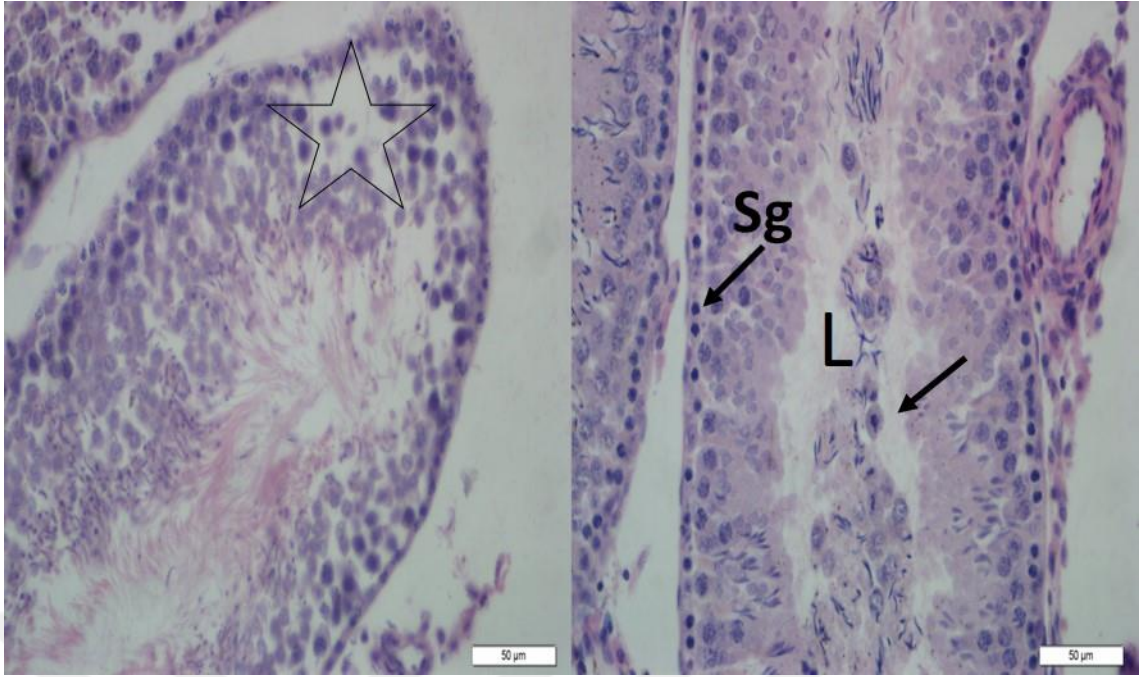
Kontrol gruplarında hücrelerin bütünlüğü korunduğu görüldü. Bütün kesitlerde germinal epiteli bütün katmanları görülmektedir. Hücreler arasındaki bağlar sağlam olarak görüldü. Germinal epitelin bütün hücre tipleri görüldü. Lümeninde sadece olgun sperm hücreleri görüldü. Sham ve vitamin E grubunda kesitlerde yeryer hücreler

arasında kopmalar olmasına rağmen germinal epitel bütünlüğü korunduğu görüldü. Bazı tübüllerin lümenleri boş olarak gözlenirken, bazı tübül lümenlerinde olgun spermeler görüldü (Şekil 4.2).

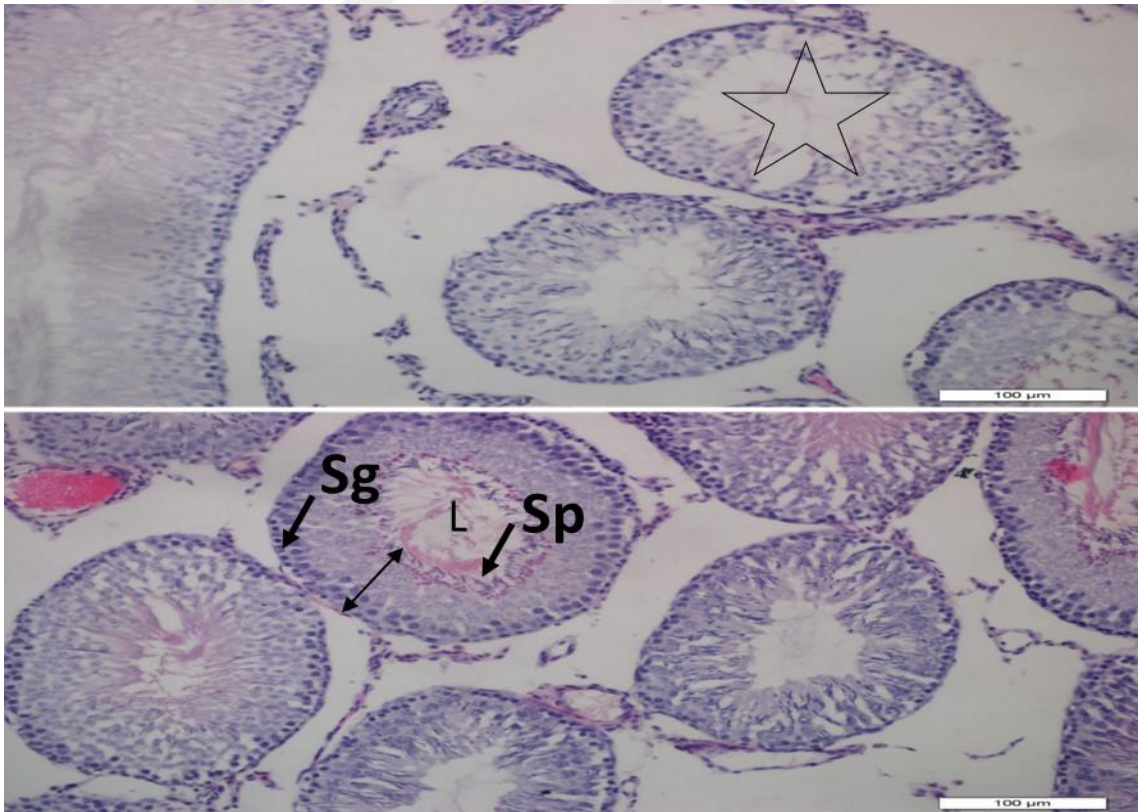


Şekil 4.2 Kontrol (A, A1), Sham (B, B1), Vit E (C, C1) gruplarında testisin ışık mikroskopik görüntüsü. Germinal epitel (çift ok başı), spermatid (Sp), spermatogonyum (Sg) ve lümen (L), H/E boyanmıştır. A, B, C kesitleri 20X, A1, B1, C1 kesitleri 40X büyütmede fotoğraflanmıştır.

Alüminyum uygulanan grupta germinal epitelde yer alan hücreler arasında kopmalar görüldü. Bazı tübüllerde germinal epitelin bütün katmanları görülürken, bazı tübüllerde erken spermatidler görülmedi (Şekil 4.3). Al'li grupta lümeninde geç spermatidlere ek olarak primer ve sekonder spermatositlere rastlandı. Bazı tübüllerde lümeninde eozinotik madde birikimi gözlemlendi (Şekil 4.3-4.5).

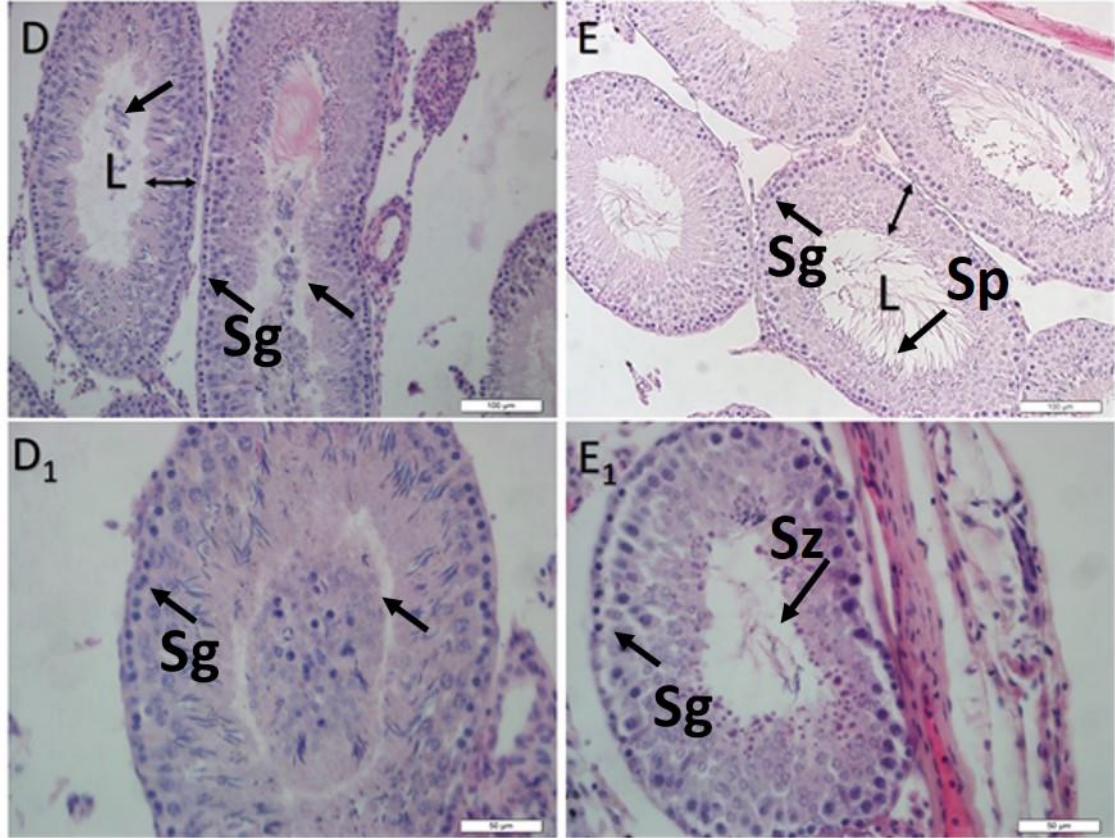


Şekil 4.3 Al' un oluşturduğu testis hasarının H/E görüntüsü. 40X büyütmede. Lümen (L), spermatogonyum (Sg), kimliği belirsiz spermatojenik hücreler (siyah ok), hücreler arası kopmalar (yıldız).



Şekil 4.4 Al' un oluşturduğu testis hasarının H/E görüntüsü. 20X büyütmede. Lümen (L), spermatogonyum (Sg), spermatid (Sp), germinal epitel (çift ok başı), hücreler arası kopmalar (yıldız).

Al+Vit E grubunda Al'li gruptan farklı olarak kontrol grubuna benzer bir şekilde germinal epitel tabakası korundu ve germinal epitelin bütün seri hücreleri görüldü. Hücreler arasında bağlantı genel olarak korundu. Al'li gruptan farklı olarak Al+Vit E grubunda lümende sadece olgun spermiler görüldü (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Alüminyum (D, D1), Alüminyum+Vit E (E, E1) gruplarında testisin ışık mikroskopik görüntüsü. Germinal epitel (çift ok başı), spermatogonyum (Sg), spermatid (Sp), spermatozoa (Sz), kimliği belirsiz spermatojenik hücreler (siyah ok), lümen (L), H/E boyanmıştır. D, E kesitleri 20X, D1, E1 kesitleri 40X büyütmede fotoğraflanmıştır.

4.2.2. Seminifer tübül alanı, epitel kalınlığı ve modifiye Johnsen skorlaması

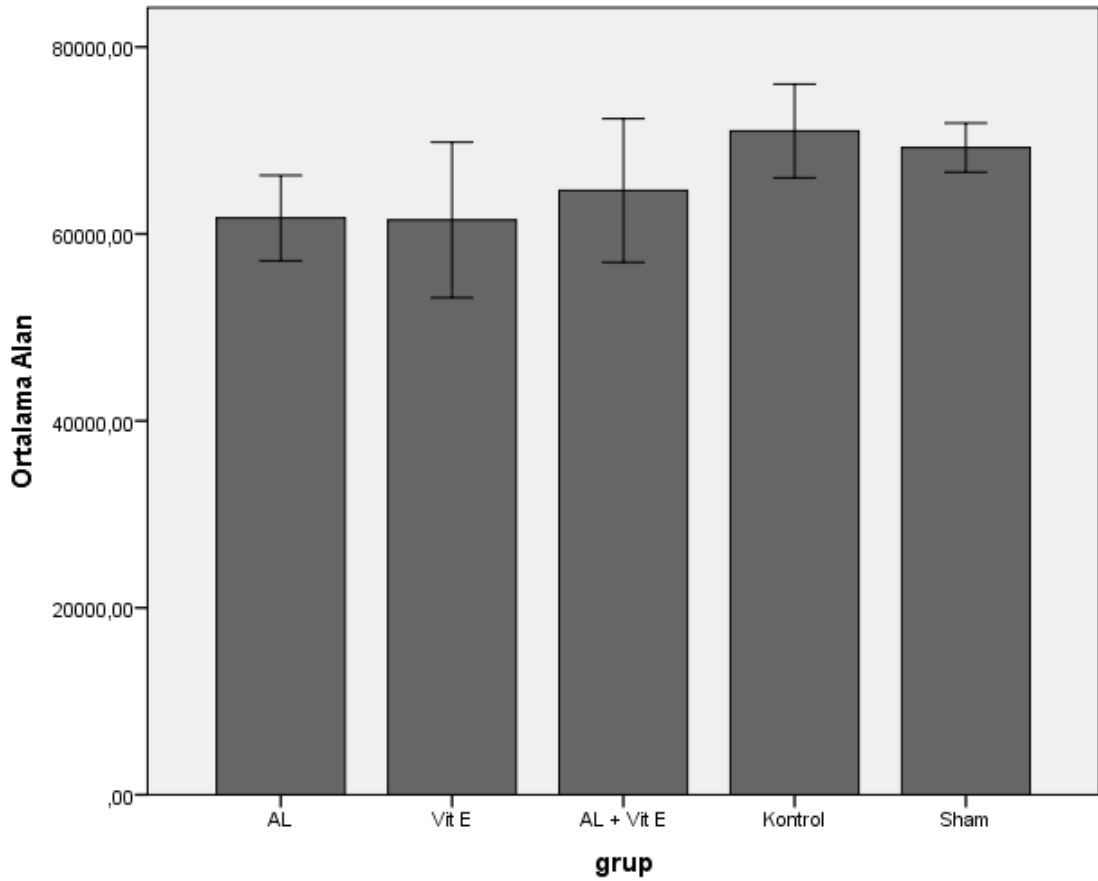
Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında seminifer tübül alanı sonuçlar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 4.2, Şekil 4.6).

Tablo 4. 2 Testis kesitlerinde seminifer tübül alan, epitel kalınlığı, TUNEL apoptotik indeks, johnsen skorlamasının değerlendirilmesi.

Gruplar		Tübül alanı (μm^2)	Epitel kalınlığı (μm)	Apoptotik indeks (%)	Johnsen skoru
Kontrol	A.O \pm S.S	71016,4 \pm 5015,83	80,42 \pm 13,53	3,1 \pm 2,59	9,32 \pm 0,25
	Med (min - maks)	70296 (65650 - 78822)	78,46 (67 - 102,49)	2,6 (0,8 - 7,1)	9,23 (9,13 - 9,76)

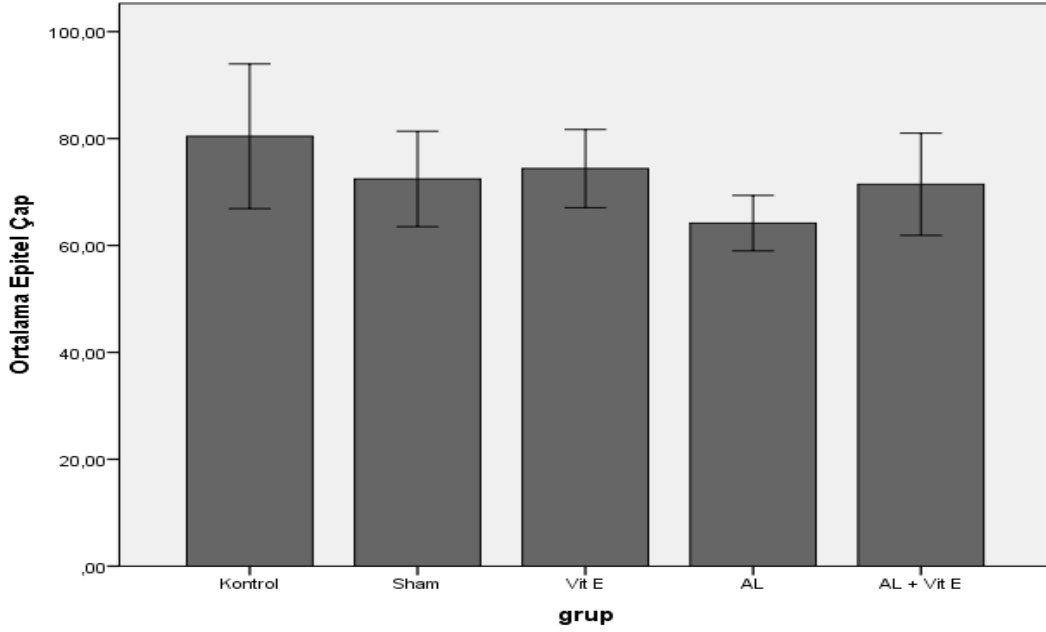
Sham (0.2 ml distille su)	A.O ± S.S	69228,2 ± 2629,44	72,42 ± 8,92	2,27 ± 1,94	8,94 ± 0,21
	Med (min - maks)	70197 (64673 - 71234)	70,99 (62,58 - 86,08)	1,6 (0,8 - 6,1)	8,9 (8,73 - 9,16)
Vitamin E (500mg/kg)	A.O ± S.S	61492,2 ± 8323,65	74,38 ± 7,3	3,89 ± 1,6	9,24 ± 0,15
	Med (min - maks)	61960 (51648 - 73656)	74,6 (63,04 - 81,29)	4,1 (1,6 - 5,8)	9,23 (9,06 - 9,43)
Alüminyum (10mg/kg)	A.O ± S.S	61704,33 ± 4571,21	64,18 ± 5,19	20,57 ± 3,72	8,93 ± 0,26
	Med (min - maks)	62663,5 (56198 - 67767)	64,64 (55,7 - 70,58)	19,3 (17 - 26,6)	8,93 (8,56 - 9,23)
Alüminyum (10mg/kg)+ Vitamin E (500mg/kg)	A.O ± S.S	64641,17 ± 7678,24	71,43 ± 9,55	7,14 ± 7,55	9,03 ± 0,4
	Med (min - maks)	66719,5 (52376 - 75040)	69,82 (63,92 - 89,85)	2,3 (1 - 17,2)	9,2 (8,26 - 9,3)
Gruplar arası p		0.058	0.082	0.004* (AL - Sham, AL - Kontrol)	0.063

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; Gruplar arası farklılıklar Kruskal Wallis Varyans Analizi ile incelenmiştir.



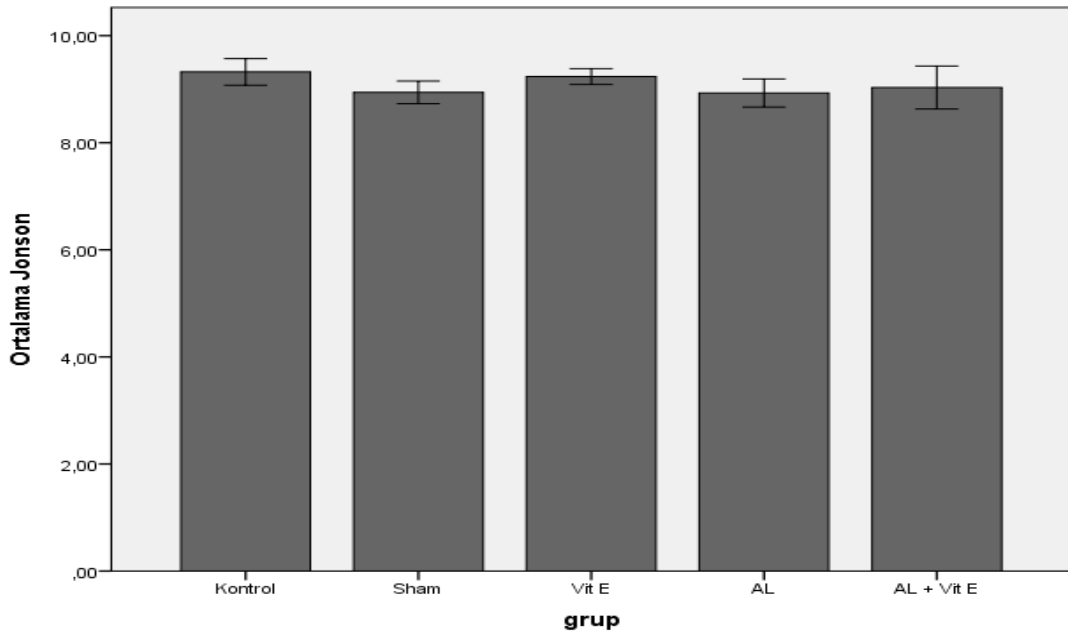
Şekil 4.6 Ortalama seminifer tübül alanının grafiksel olarak gösterilmesi.

Seminifer epitel kalınlığında anlamlı bir fark görülmedi. Fakat, ortalama epitel kalınlığının AI verilen grupta en düşük olduğu (64,64); AI+Vit E (74,6) grubunda kontrol grubuna (78,46) yakın olduğu görüldü ($p>0.05$, Tablo 2, Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Ortalama epitel kalınlığının grafiksel olarak değerlendirilmesi.

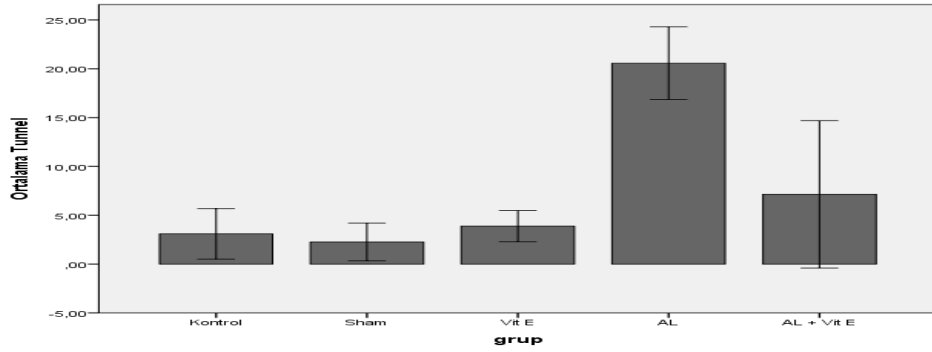
Her testisteki spermatogenezini değerlendirmek için yapılan modifiye Johnsen skorlamasında gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi (Tablo 2, Şekil 4.8).



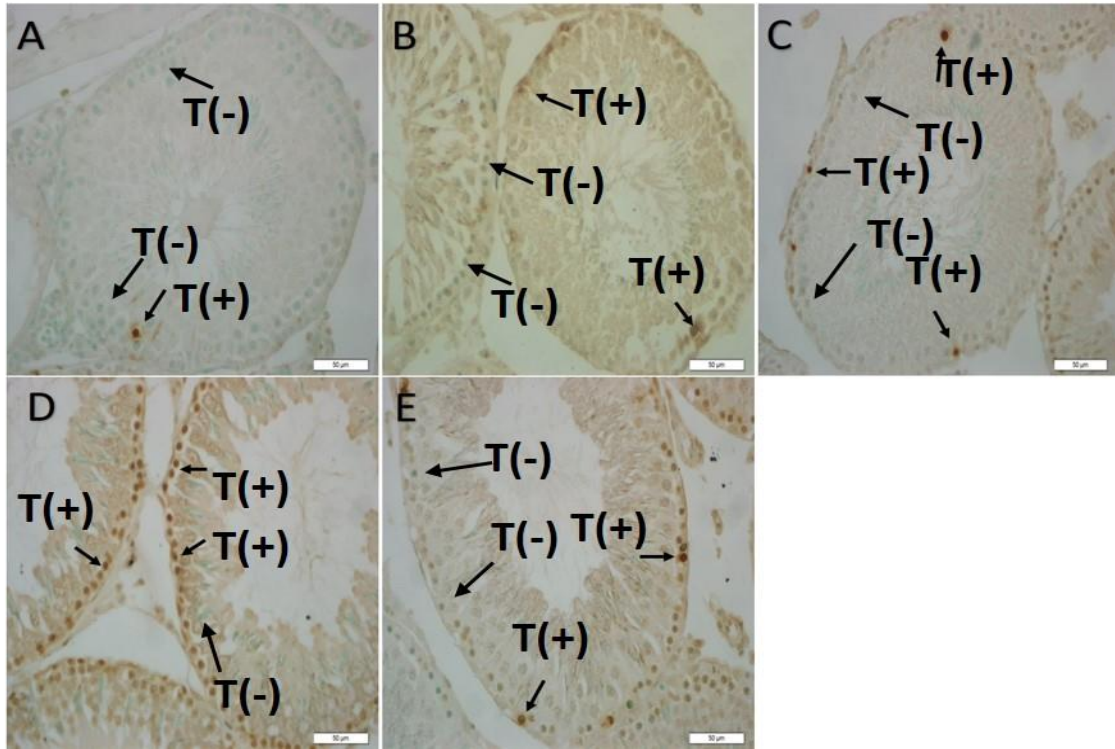
Şekil 4.8 Ortalama Johnsen skorlamasının grafiksel olarak gösterilmesi.

4.3. TUNEL Bulguları

TUNEL pozitif hücreler AL verilen grupta Kontrol ve Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Al+Vit E grubunda apoptotik hücre sayısının Al verilen gruba göre az sayıda olması ve Kontrol, Sham, Vit E gruplarıyla paralellik gösteriyordu ama anlamlı değildi ($p>0,05$), (Tablo 4.2, Şekil 4.9, 4.10).

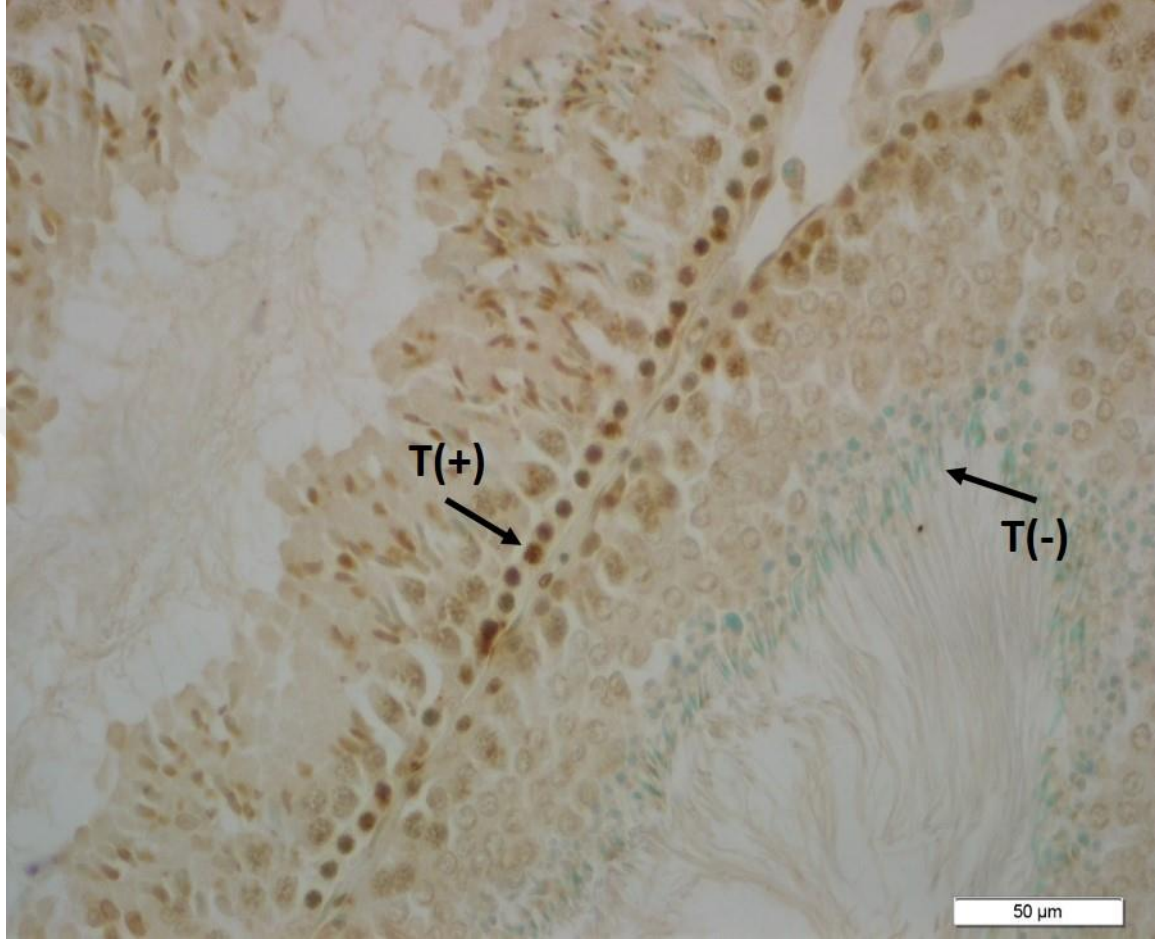


Şekil 4.9 TUNEL' ile boyanan kesitlerde apoptotik indeks sonuçlarının grafiksel olarak gösterilmesi.



Şekil 4.10 TUNEL boya Kontrol (A), Sham (B), Vit E (C), Alüminyum (D), Alüminyum+Vit E (E) gruplarının testis transvers kesitlerinin TUNEL (+) hücreler (T(+)), TUNEL (-) hücreler (T(-)) gösterilmiştir (40X).

TUNEL boyama yapılan preparatlarda Al uygulanan grupta özellikle spermatogonial hücrelerdeki apoptoz görüldü. Alınan kesitlerde bazı seminifer tübüllerde lümeneye bakan yüzdeki geç spermatid ve spermatozoaların TUNEL negatif olduğu gözlemlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11 Al verilen grup TUNEL boyama. T(+): TUNEL pozitif hücre, T(-): TUNEL negatif hücre, 40X.

5. TARTIŞMA

Bizim çalışmamızda, TUNEL pozitif hücreler AL verilen grupta Kontrol ve Sham grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0,05$). Bütün gruplarla birlikte Al verilen gruptaki bazı tübül lümenlenlerinde görülen spermlerin TUNEL (-) olması bizim çalışmada Al' yi 4 hafta süreyle verilmesinden dolayı; Al'nin sadece spermatogoniaları ve öncül spermatositleri etkilediğini düşündürmüştür.

Farelerde yapılan 25 mg/kg'lık $AlCl_3$, dozu leydig hücrelerinde ve germ hücrelerinde degradasyon, tübüler atrofi, spermatogonia hücrelerinin apoptoza bağlı ölümü, primer spermatosit ve mitokondride hasara neden olmuştur (Abdel-Moneim AM 2013). Cheraghi ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada, 28 gün boyunca sıçanlara İp olarak 10 mg/kg Al klorür verilmiştir. Al klorür ile muamele edilen sıçanlar diğer gruplara kıyasla TUNEL pozitif hücrelerini önemli ölçüde arttığını göstermişlerdir (Cheraghi E vd 2017). Colitti ve arkadaşlarının (2000) yaptığı çalışmada, vit E reaktif oksijen türlerinin neden olduğu lipid peroksidasyonunu önlemesi ve apoptozun inhibisyonu ile ilişkili Bcl-2'nin üretimini kontrol ettiği görülmüştür (Colitti M vd 2000). Al oksidatif strese, kan testis bariyerini geçmesine, lipid peroksidasyonunun artmasına ve sonuç olarak testisin biyolojik zararının bozulmasına neden olmaktadır. Öte yandan curcuminin testis üzerindeki koruyucu etkisi, Leydig hücrelerinde ve seminifer tübüllerin spermatojenik hücrelerinde oksidatif stres sonucunda ortaya çıkan hücresel hasarı ve apoptozu inhibe ettiği gösterilmiştir (Gupta SC vd 2012).

Bizim çalışmamızda, bütün gruplar TUNEL boyama yöntemi ile boyanmış apoptotik hücreler sayılarak Al hesaplanmıştır. 10 mg/kg alüminyum sülfat dozu uygulanan sıçanlarda Cheraghi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada olduğu gibi apoptotik hücre sayısında artış gözlenmiştir

Semen kalitesindeki düşüş, erkek üreme sisteminin çevresel toksikantlar için ana hedeflerden biri olduğunu göstermektedir. Bu da çevresel kirleticilere çeşitli düşük dozlarda maruziyetin erkek üreme sistemini etkilediği anlamına gelir (Nordkap L vd 2012). Al klorür ile muamele edilen sıçanlarda sperm sayısının, hareketliliğin, canlılığın, morfolojisinin, vücut ve testis ağırlıklarının anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır. 112 gün boyunca Al'a maruz bırakılmış sıçanların kontrol gruplarına göre düşük parankima ve testis ağırlığı gözlemlenmiştir (Mouro GSV vd 2017). Zhu YZ (2014) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, $AlCl_3$ maruziyeti kontrol grupları ile karşılaştırıldığında testislerin ve epididimisin ağırlık ve katsayılarını önemli ölçüde baskılamış, bu da $AlCl_3$ maruziyetinin sıçanlarda testis ve epididimisin büyümesini engellediğini göstermektedir (Zhu YZ vd 2014). Sayed ve arkadaşlarını (2015) yaptığı çalışmada, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, 50 mg/kg Al sülfat uygulanan sıçanlarda vücut ağırlığı artışında ve testis ağırlığında anlamlı bir düşüş olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, çinko sülfat ve E vitamini ayrı ayrı veya Al intoksikasyon ile kombinasyon halinde muamele edilen sıçanların vücut ağırlığı kazancı ve testis ağırlığında bir iyileşme göstermişlerdir. Hem çinko hem de Vit E'nin kombine etkisi daha güçlü etki yaratmıştır (Sayed MR 2015). Khattab ve arkadaşlarının (2010) yaptığı çalışmada, Al tuzlarının vücut ağırlığında azalmaya neden olduğunu, bu azalmayı ise gıda tüketimindeki azalma ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir (Khattab HAM vd 2010). Yang ve arkadaşlarının (2006) yaptığı çalışmada, 2,4 ve 8 mg/kg dozunda verilen kadmiyum testis ağırlığında, spermatidler ve leydig hücre sayısında azalma, Sertoli ve inflamatuvar hücre sayısında artışa neden olmuştur. Vit E ile tedavi edilen sıçanların testis ağırlıklarında, nekroz ve inflamatuvar hücre sayısında düşüş gözlenmiştir (Yang H vd 2006). Üreme organlarındaki ağırlığın azalması, mevcut çalışmada gözlemlenen testosteron düzeyindeki azalmaya bağlı olabileceği gibi, sıçan testislerinde indüklenen oksidatif hasara da bağlı olabilir (El-Ashmawy IM vd 2007). Al ayrıca bazı araştırmacılar tarafından bildirildiği üzere hem insan hem de hayvanlar üzerinde üreme toksisitesine sahiptir. Lobet ve arkadaşları, daha önce alüminyum nitratla muamele edilen erkek fareler ile çiftleştirilen dişi farelerde gebelik oranının azaldığını bulmuşlardır. Ayrıca, daha yüksek dozlarda alüminyum nitrata maruz kalan farelerin testislerinde spermatosit ve spermatidlerin nekrozunu ve testis ve epididimal ağırlığın azaldığını gözlemlenmişlerdir (Sayed M vd 2015). 2012 yılında yapılan bir çalışmada, 8 haftalık bir periyodun son 3 gününde gavaj yolu ile verilen Al klorür (100 mg/kg) diğer gruplarla karşılaştırıldığında testis ağırlığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmemiştir (Ige SF vd 2012).

Biz çalışmamızda 10 mg/kg dozunda Al sülfat verdiğimiz sıçanlarda testis ağırlığı yönünden anlamlı bir farklılık görülmedi. Fakat, Al+vit E grubunda testis ağırlığının Kontrol grubuna göre düşük bulundu ($p<0.05$). Çalışmamızda her sıçanın sadece sakrifiye edildikten sonra aldığımız testislerin ağırlığını ölçtük. Deney başlangıcında ve sakrifikasyondan önce sıçanların ağırlığını ölçmemiş olmamızın bu sonuca neden olduğunu düşünmekteyiz.

Sperm sayısı ve sperm morfolojisi, erkek hayvanlarda ve insanlarda üreme fonksiyonunu yansıtmaktadır (Xia Y vd 2009). Sperm sayısı, belirli bir hacimdeki seminal sıvının sperm içeriğidir. Yousef (2009) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Al klorür ölü spermleri artırırken, sperm konsantrasyonunu ve motilitesini azalttığını bulmuşlardır (Yousef MI vd 2009). Martinez ve arkadaşları (2017) insan-beslenme seviyesinde 60 günlük Al maruziyetinin sıçanlarda sperm hareketliliğinde düşüşe, morfolojik olarak sperm anormalliklerine ve sperm üretimini baskılayarak sperm kalitesini düşürdüğünü göstermişlerdir. Bu fonksiyonel bozukluklar düşük ROS üretimi, lipid peroksidasyonu ve üreme organlarındaki çeşitli redoks dengesizlikleriyle birlikte görülmektedir. Ayrıca, Al maruziyetinin testis, epididimis ve prostatta RS birikiminin ve MDA seviyesinin artması sonucu oksidatif stres oluşturduğunu göstermiştir (Martinez CL vd 2017). İnsan spermatozoa ve seminal plazmada Al'nin yüksek konsantrasyonu, düşük sperm motilitesi ve canlılığı ile ilişkilidir (Hovatta O vd 1998, Guo C vd 2005b). Son zamanlarda insan spermindeki Al içeriği, sperm kalitesindeki düşüş ile ilişkili bulunmuştur. Klein ve arkadaşlarının (2014) yaptığı çalışmada, 62 Fransız hastada sperm örnekleri incelenmiş sperm sayısı düşük olan hastalarda semende yüksek konsantrasyonda Al saptanmıştır (Klein JP vd 2014). Erkek üreme sisteminde Al farelerde epididimal sperm sayısında azalışa neden olmuştur (Lobert JM vd 1995). Testis işlevi ve sperm üretimi ile ilişkilendirilirse ağır metallerin çoğunluğu zararlı bulunmuş olup toksik ajan olarak davranmaktadır (Guo CH vd 2006). Metallerin, kemirgenlerde ve insanlarda düşük semen kalitesine, anormal sperm morfolojisine ve düşük sperm sayısına neden olarak spermatogenezi etkilediği gösterilmiştir (Pizent A vd 2012). 16 hafta boyunca her gün 34 mg/kg $AlCl_3$ uygulanan tavşanların, sperm aktivitelerinde ve sayılarında anlamlı bir azalma olduğunu göstermişlerdir (Sun X vd 2018). Falana ve arkadaşlarının (2017), 75 mg/kg ve 150 mg/kg vücut ağırlığı dozunda alüminyum klorür tüm androlojik parametrelerde (sperm sayısı, sperm motilitesi, sperm morfolojisi ve serum testosteronu) herhangi bir değişiklik görülmemiştir. Ancak, 300 mg/kg vücut ağırlığı dozunda $AlCl_3$ 'ün, androlojik parametrelerde azalma gözlenmiştir (Falana B vd 2017). Mouro ve arkadaşları (2017) sıçanlara gavaj ile 112 gün boyunca 6.7×10^{-5} , 3.35×10^{-4} , 10 ve 40 mg / kg'da Al klorüre maruz bırakmışlar. 40 mg/kg Al'ye

maruz bırakılmış sıçanlarda düşük sperm motilitesi görülürken diğer dozlar etkili anlamlı bir sonuç görülmemiştir (Mouro GSV vd 2017). Acharya ve arkadaşları (2008), 5 ve 8 hafta boyunca İp olarak uygulanan vit E'nin (100mg/kg) farelerde anlamlı olarak sperm hücre sayısını arttırdığını gözlenmiştir (Acharya UR vd 2008).

Çalışmamızda 4 hafta boyunca, haftada 3 kez 10 mg/kg dozunda ip olarak verilen Al sülfat verilen grupta kauda epididimisten alınan sperm örneklerinde sperm sayısını ve sperm hareketliliğini etkilemediğini gözlemledik. Acharya UR ve arkadaşlarının (2008) yaptığı çalışmada farelerde vit E'nin sperm sayısını arttırdığını söylemelerine rağmen, bizim çalışmamızda 500 mg/kg vit E uygulaması sperm sayısını gruplar arasında anlamlı olarak değiştirmemiştir.

Sperm morfolojisinin değerlendirilmesi, anormal spermlerin toplam spermelere oranıdır (Yousef MI vd 2009). 128.36 mg/kg ve 256.72 mg/kg'lık $AlCl_3$ maruziyeti kontrol gruplarıyla karşılaştırıldığında sperm sayısı azalmıştır, anormal sperm sayısında önemli miktarda artış gözlemlenmiştir (Zhu YZ vd 2014). Arumugam ve arkadaşlarının (2016) yaptığı çalışmada, sıçanlara 60 gün boyunca 50 mg/kg ve 100 mg/kg Al klorür maruz bırakılmıştır. Al klorür muamelesi, kontrol grupları ile karşılaştırıldığında sperm canlılığı, sperm sayısı ve sperm motilitesinde azalma, anormal sperm sayısında ise artma olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, Al amonyum sülfatla muamele edilen sıçanlarda (0, 50 ve 500 ppm) kauda epididimisindeki sperm sayısı ve morfolojik olarak anormal sperm yüzdesi değişmemiştir (Hirata Koizumi M vd 2011). 40 mg/kg Al'ye maruz bırakılmış sıçanlarda normal spermatozoa ve baş, orta parça ve kuyruk anormal sperm yüzdesi açısından gruplar arasında fark görülmemiştir (Mouro GSV vd 2017).

Bizim çalışmamızda, sperm morfolojisi kauda epididimisten alınan örneklerden yapılan yayma preparatlarında değerlendirilmiştir. İnsan sperminden farklı olarak sıçan sperm morfolojisi normal, baş ve kuyruk olarak sınıflandırılmıştır. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır.

Kutlubay (2007) yaptığı çalışmada, sıçanlardaki 5 mg/kg'lık Al dozu seminifer tübüllerin germinal epitelyumları normalden daha ince, spermatidlerin hemen hemen hepsi yok olmuş, sperm sayısı düşük ve lümeninde hiç sperm görülmemiştir. Hücreler arası bağların koptuğu, seminifer tübül lümeninde serbest halde birçok hücre tespit edilmiştir. Vit E muameli gruplarda normal histoloji gözlemlenmiştir (Kutlubay R vd 2007). Al toksisitesini değerlendirmek için yapılan deneysel çalışmalarda, hormonal dengesizlik, sperm kalitesinde düşüş, üreme organlarındaki histolojik anormallikler ve infertiliteyle alakalı bulgular insan çalışmalarını destekler şekilde bulunmuştur (Ige SF

vd 2012, Mohammad NS vd 2015). Mouro (2017) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Al'ye maruz bırakılan sıçanların testis doku yapısında, Sertoli hücrelerinde, farklı gelişim aşamalarındaki germ hücrelerinde (spermatogonia, spermatozoidler, erken ve geç spermatidler) ve spermatozoa ile lümende histolojik değişiklikler gözlenmemiştir (Mouro GSV vd 2018). Diğer bir çalışmada, 300 mg/kg dozunda verilen Al klorür testiste ciddi hasara neden olduğu saptanmıştır. Testis histolojik incelemede maturasyonunu tamamlayamamış germ hücreleri ile birlikte lümende spermatozoa yokluğu gözlenmiştir (Falan B vd 2017). Bizim çalışmamızda da, Al'li grupta lümende geç spermatidlere ek olarak primer ve sekonder spermatozoidler görülmüştür. Al ile muamele edilen sıçanların testislerinde cinsiyet hormonlarında ve androjen reseptörlerinin ekspresyonunda anlamlı olarak azalmaya neden olduğunu bildirilmiştir (Sun H vd 2011). Alüminyum triklorür (34 mg/kg; 25 mg/kg), sıçanlarda ve farelerde testis ve epididimisin yapısını bozmuştur (Sun X vd 2018). Ige ve arkadaşları (2012) 100 mg/kg dozundaki $AlCl_3$ maruziyetinin erkek sıçanlarda spermatogenik hücrelerin dejenerasyonu ve oksidatif hasara yol açtığını öne sürmüştür (Ige SF vd 2012). Martinez ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada, Al verilen sıçanların seminifer tübül lümeninde spermatogenik hücre sayısı azalmıştır. Matür spermatogenik hücrelerin yokluğu ya da azlığıyla karakterize seminifer tübül sayısı artmıştır (Martinez CL vd 2017). Yapılan bir çalışmada, Al sülfat ile oral olarak uygulanan sıçan grubunun histopatolojik incelemesi, testislerde belirgin değişiklikler olduğu tespit edilmiştir; bu durum, spermatogenik hücrelerde azalma ile ilişkili olan seminifer tübüllerin fokal deorganizasyonuna neden olmuştur. Tübüllerin birçoğunda, spermaların eksik olduğu gibi spermatozoidlerin ve spermatidlerin dejenerasyonu görülmüştür. Aynı zamanda, Al'ye maruz bırakılmış sıçanların çinko sülfat ve / veya E vitamini ile muamele edilmesi, alüminyum sülfatın indüklediği histopatolojik değişikliklerde gözle görülür bir iyileşme göstermiştir (Sayed MR vd 2015). Al-Attar A (2011) ve arkadaşları 7 hafta boyunca (haftada 5 kez) ağır metallerin neden olduğu testis hasarı üzerine vit E'nin koruyucu etkisini araştırmışlardır. Sonuç olarak uygulanan ağır metaller testis hasarına, seminifer tübüllerde spermatogonia, primer spermatozoid, sekonder spermatozoid, spermatid ve spermalarda azalmaya neden olmuştur. İntraperitoneal olarak uygulanan vit E testis hasarını, histopatolojik sonuçlarında düşüşe neden olmuş ve kontrol gruplarıyla benzerlik göstermiştir (Al-Attar A 2011).

Bizim çalışmamızda, Al'li grupta germinal eptildeki hücreler arasındaki kopmaların gözlenmesi, bazı tübüllerde erken spermatidlerin görülmemesi, yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir. Al+Vit E grubunda Al'li gruptan farklı olarak Kontrol grubuna benzer bir şekilde germinal epitel tabakası korunmuştur ve

hücrelerarası bağlantıların sağlamlaştığı görülmüştür. Al'li gruptan farklı olarak Al+Vit E grubunda lümeninde sadece olgun spermiler bulunmaktadır.

Martinez ve arkadaşlarının (2017) sıçanlar üzerinde yaptığı çalışmada, Al muamelişi sıçanlarda seminifer tübüllerin kalınlığı kontrol grubunda 70.56 μm 'den 8.3 mg/kg Al maruziyetinden sonra 53.96 μm 'ye, en yüksek doz olan 100 mg/kg Al maruziyetinden sonra ise 52.04 μm 'ye kadar azalmıştır (Martinez CL vd 2017). Sıçanlara İp olarak verilen 10 mg/kg Al dozu, seminifer tübüllerin çapında ve germinal epitel kalınlığında kontrol grubuna kıyasla önemli bir azalma ile dejenerasyona ve nekroza yol açmıştır. Buna ek olarak, seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı ve tübülün lümen çapı kurkumin (CUR) ile tedavi edilen sıçanlarda ve kontrol grubuna benzerlik göstermiştir (Cheraghi E vd 2017). Mouro ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada, gavaj ile verilen 112 gün boyunca 6.7×10^{-5} , 3.35×10^{-4} , 10 ve 40 mg / kg'lık Al dozu, seminifer tübüllerin uzunluğu, epitel kalınlığı, tübüler çap, tübül somatik indeksi gibi diğer stereolojik parametreleri etkilememiştir (Mouro VGS vd 2017). Atlıgan D (2013) ve arkadaşların yaptığı çalışmada, sıçanlarda obezite kaynaklı oksidatif hasarı oluşturmak için 8 haftalık bir süre boyunca yüksek kalorili ve yağ içeren diyetle beslenmişler. Testiküler dokuların histopatolojik incelemesinde, modifiye Johnsen skorlaması açısından tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görememişlerdir (Atlıgan D vd 2013).

Çalışmamızda, seminifer tübül epitel kalınlığı, tübül alanı ve modifiye Johnsen skorlamasında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunamamıştır. Bu da, yapılan diğer çalışmaları destekler niteliktedir.

Önemli bir antioksidan olan vit E, hücre sel bileşenlerin oksidasyonunu ve toksik oksidasyon ürünlerinin oluşumunu önler (Herrera E ve Barbas C 2001). Vit E eksikliği sonucu oluşan oksidatif stres normal spermatogenez ve testosteron üretimini olumsuz yönde etkiler (Giovana MO vd 2016). Vit E, lipit radikallerini temizlemede etkilidir ve membranlarda ve lipoproteinlerde lipit peroksidasyonunu önleme işleviyle güçlü bir zincir kırıcı antioksidan olarak kabul edilir (Traber MG ve Atkinson 2007). Vit E bir antioksidan olarak, spermatozoayı, reaktif oksijen türlerine ve lipit peroksidasyona karşı koruyan ana membran koruyucularından biri olduğunu bildirmişlerdir (Yousef MI vd 2003). Rajendar B (2011) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, vit E (a-tokoferol) muamelesi, kadmiyum ile indüklenen sıçan testlerinde histolojik ve biyokimyasal değişiklikleri önemli ölçüde azalttığını bulmuşlardır (Rajendar B vd 2011). Genellikle, vit E ve çinko sülfat takviyesi, Eggert-Kruss (2002) ve Viguera-Villasenor (2011) tarafından bildirilen antioksidan ve serbest radikal temizleyici özellikleri nedeniyle spermatojenik aktivitede önemli bir rol oynar (Eggert-Kruse W vd 2002, Viguera-

Villasen RM vd 2011). Ayrıca, vit E'nin membranlarda bulunan çoklu doymamış yağların oksidasyonunu önleyen ve peroksi radikallerini stabilize eden, dolayısıyla morfolojik testiküler değişikliklerini azaltan ve doğurganlığı destekleyen güçlü bir antioksidandır (Viguera-Villasen RM vd 2011). Kutlubay ve arkadaşları (2007) vit E'nin, erkek sıçanlarda Al toksikasyonunun neden olduğu testiküler hasara karşı güçlü bir antioksidan etkisi olduğunu bulmuşlardır (Kutlubay R 2007). Vit E'nin, total lipit ve kolesterol seviyeleri de dahil olmak üzere farklı biyokimyasal parametreler üzerinde Al'un toksik etkisini azalttığını ve bu etkiyi antioksidan özelliklerine bağladığını bildirmişlerdir (El-Demerdash FM 2004). Ayrıca, Zingg JM (2007), Vit E'nin, serbest radikal atağının erken evresindeki hücre membranlarını koruyan lipit peroksidasyonuna karşı ilk savunma hattı olarak kabul edildiği belirtilmiştir (Zingg JM 2007). Son zamanlarda, Vit E'nin, dioksinle muamele edilen erkek farelerde LH, FSH ve testesteron seviyelerindeki düşüşü ve GnRH'deki azalmayı kısmen giderildiği bildirilmiştir (Yin HP vd 2011). Sıçanlara verilen civa klorür interstisyel dokuda ödeme, spermatozoidlerde nekroza ve seminifer tübüllerde histopatolojik hasara neden olmuştur. İntraperitoneal olarak verilen vit E civa korürün neden olduğu histopatolojik etkileri azalttığı görülmüştür (Kalender S vd 2013). Lucesoli F ve Fraga CG (1999) 6 hafta süresince kronik demir ile indüklenen testis hasarını 200 mg/kg vit E'nin ortadan kaldırdığını göstermişlerdir (Lucesoli F ve Fraga CG 1999). Hasanin NA (2018) ve arkadaşları akrilamide ile indüklenen sıçan testisleri üzerine vit E'nin (400mg/kg) koruyucu etkisini araştırmışlardır. Akrilamid ve vit E ile muamele edilen sıçanların akrilamide maruz kalan gruba kıyasla artmış epitel yüksekliği vit E'nin koruyucu etkisini kanıtlamıştır (Hasanin NA vd 2018).

Yaptığımız çalışmada, ip olarak 500 mg/kg dozunda uygulanan vit E testis ağırlığını, sperm sayısını ve sperm morfolojisini değiştirmemiştir. Al maruziyetinin seminifer tübüllerde yaptığı hücreler arası kopmalar, tübül lümeninde görülen kimliği belirsiz hücrelerin, Al+vit E gruplarında görülmemesi vit E'nin tedavi edici etkisinin bir göstergesi olabilir. Ayrıca, Al'ye maruz kalan sıçan testislerinde TUNEL (+) apoptotik hücre sayısının fazla olması ve Al+vit E grubunda bu sayının azalması vit E'nin oksidatif hasarı azalttığına bir işarettir.

6. SONUÇ

Deneysel sıçan modelinde vit E'nin aliminyumun neden olduğu testis hasarında tedavi edici etkisi olduğunu düşünmekteyiz. Vit E güçlü bir antioksidandır. Al maruz kalan sıçanlarda yaptığımız vit E tedavisinin apopitotik hücre sayısını anlamlı olarak azaltmadı. Fakat, Alüminyum+vit E verilen grupta apopitotik hücre sayısının az olması bize grupların artırılarak daha ileri çalışmalar yapılması gerekliliğini gösterdi.

7. KAYNAKLAR

Abdel-Moneim AM. Effects of taurine against histomorphological and ultrastructural changes in the testes of mice exposed to aluminium chloride. *Arh. Hig. Rada Toksikol* 2013; 64 (3): 405–414.

Acharya UR, Mishra M, Patro J, Panda MK. Effect of vitamins C and E on spermatogenesis in mice exposed to cadmium. *Reproductive Toxicology* 2008; 25: 84-88.

Alan S. Alüminyum Raporu. *Orta Anadolu İhracatçı Birlikleri Genel Sekreterliği*, 2008.

Al-Attar A. Antioxidant effect of vitamin E treatment on some heavy metals-induced renal and testicular injuries in male mice. *Journal of Biological Sciences* 2011; 18: 63–72.

Alfrey CA, Hegg M, Craswell P. Metabolism and toxicity of aluminum in renal failure. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 1509–1516.

Altıgan D, Parlaktaş BS, Uluocak N, Erdemir F, Kılıc S, Erkorkmaz U, Huseyin O, Markoc F. Weight Loss and Melatonin Reduce Obesity-Induced Oxidative Damage in Rat Testis. *Adv Urol* 2013; 836121

Aslam I, Fishel S, Moore H, Dowell K, Thornton S. Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future. *Hum Reprod* 2000; 15: 2154-9.

Bakar C, Baba A, Metaller ve İnsan Sağlığı: Yirminci Yüzyıldan Bugüne ve Geleceğe Miras Kalan Çevre Sağlığı Sorunu. 1. *Tıbbi Jeoloji Çalıştayı* 2009.

Baldi A. Vitamin E in dairy cows. *Livestock Production Science* 2005; 98: 117-122.

Berlyne GM, Ben AJ, Pest D, Weinberger J, Stern M, Gilmore GF, Levine R. Hyperaluminumemia from aluminum resinosis in renal failure. *Lancet* 1970; 2; 494.

Bharathi P, Vasudevaraju M, Govindaraju AP, Palanisamy K, Sambamurti KSJ, Rao. Molecular toxicity of aluminium in relation to neurodegeneration. *Indian J Med Res* 2008;128: 545-556.

Boydağ BS. Deneysel diabetes mellitusta gelişen hemodinamik değişiklikler üzerine vitamin E' nin etkisi. Uzmanlık Tezi. **ESOGÜ Tıp fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı**, Eskişehir, 1998.

Bondy SC. Low levels of aluminum can lead to behavioral and morphological changes associated with Alzheimer's disease and age-related neurodegeneration. *Neurotoxicology* 2015; 52: 222–229.

Buraimoh AA, Ojo SA, Hambolu JO and Adebisi SS. Histological study of the effect of aluminium chloride exposure on the testis of Wistar rats. *American International Journal of Contemporary Research* 2012; 2 (5): 114–122.

Camargo MM, Fernandes MN, Martinez CB. How aluminium exposure promotes osmoregulatory disturbances in the neotropical freshwater fish *Prochilus lineatus*. *Aquat Toxicol* 2009; 94 (1): 40–46.

Cheraghi E, Golkar A, Roshanaei K, Alani B. Aluminium-Induced Oxidative Stress, Apoptosis and Alterations in Testicular Tissue and Sperm Quality in Wistar Rats: Ameliorative Effects of Curcumin. *International Journal of Fertility and Sterility* 2017; 11 (2): 166-175.

Chew BP. Importance of antioxidant vitamins in immunity and health in animals. *Animal Feed Science and Technology* 1996; 59: 103-114.

Colitti M, Stradaoli G, Stefanon B. Effect of α -tocopherol deprivation on the involution of mammary gland in sheep. *Journal of Dairy Science* 2000; 83: 345-350.

Çabuş N, Oğuz EO, Tufan AÇ, Adıgüzel E. A histological study of toxic effects of aluminium sulfate on rat hippocampus. *Biotech Histochem* 2015; 90 (2): 132-9.

Çil N, Oğuz EO, Mete E, Çetinkaya A, Mete GA. Effects of umbilical cord blood stem cells on healing factors for diabetic foot injuries. *Histochem* 2017; 92 (1): 15-28.

Dawson EB, Ritter S, Harris WA, Evans DR, Powell LC. Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels. *Biol. Trace Elem. Res* 1998; 64: 215–219.

Delilbaşı L. In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri, **Güneş Tıp Kitabevleri**, Ankara, 2008, s.67-68.

Deng Z, Coudray C, Gouzoux L, Mazur A, Rayssiguier Y, Pepin D. Effects of acute and chronic coingestion of AlCl₃ with citrate or polyphenolic acids on tissue retention and distribution of aluminum in rats. ***Biol Trace Elem Res*** 2000; 76: 245–256.

Dewitt DA, Hurd JA, Fox N, Townsend BE, Griffioen KJ, Ghribi O. Peri-nuclear clustering of mitochondria is triggered during aluminum maltolate induced apoptosis. ***J Alzheimers Dis*** 2006; 9: 195-20.

Dimri U, Sharma MC, Yamdagni A, Ranjan R, Zama MMS. Ranjan psoroptic mange infestation increases oxidative stress and decreases antioxidant status in sheep. ***Veterinary Parasitology*** 2010; 168: 318-322.

Djouina M, Esquerre N, Desreumaux P, Vignal C, Body-Malapel M. Toxicological consequences of experimental exposure to aluminum in human intestinal epithelial cells. ***Food Chem Toxicol*** 2016; 91: 108–116.

Eggert-Kruse W, Zwick EM, Batschulat K, Rohr G, Armbruster FP, Petzoldt D, et al. Are zinc levels in seminal plasma associated with seminal leukocytes and other determinants of semen quality?. ***Fertility and Sterility*** 2002; 77 (2): 260–269.

Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, Chu ST. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. ***Toxicology*** 2006; 222 (1-2): 60-70.

El-Ashmawy IM, Saleh A and Salama OM. Effects of marjoram volatile oil and grape seed extract on ethanol toxicity in male rats. ***Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*** 2007; 101 (5): 320–327.

El-Demerdash FM. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. ***Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*** 2004; 18: 113-121.

Erdemir F, Atilgan D, Firat F, Markoc F, Parlaktas BS, Sogut E. The effect of Sertraline, Paroxetine, Fluoxetine and Escitalopram on testicular tissue and oxidative stress parameters in rats. ***Int Braz J Urol*** 2014; 40: 100-8.

Exley C. Elucidating aluminium's exposome. ***Curr. Inorg. Chem*** 2012; 2: 3–7.

Exley C. Human exposure to aluminium. ***Environ. Sci. Process*** 2013; 1807–1816.

Falana B, Adeleke O, Orenolu M, Osinubi A, Oyewopo A. Effect of D-ribose-L-cysteine on aluminum induced testicular damage in male Sprague-Dawley rats. ***JBRA Assisted Reproduction*** 2017; 21 (2): 94-100.

Fatma M. El-Demerdash. Antioxidant effect of vitamin E and selenium on lipid peroxidation, enzyme activities and biochemical parameters in rats exposed to aluminium. ***Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*** 2004; 18: 113–121.

Fekete V, Vandevijvere S, Bolle F, Van LJ. Estimation of dietary aluminum exposure of the Belgian adult population: evaluation of contribution of food and kitchenware. **Food Chem. Toxicol** 2013; 55: 602–608.

Ferreira-Moyano H, Barragan EL. Environmental factors in the etiology of Alzheimer's dementia and other neurodegenerative diseases. In: Isaacson RL, Jensen KF, editors. The vulnerable brain and environmental risks: toxins in air and water. **Plenum Press** 1994; 3: 43–63.

Ganrot PO. Metabolism and possible health effects of aluminum. **Environ Health Perspect** 1986; 65: 363–441.

Ghribi O, Herman MM, DeWitt DA, Forbes MS, Savory J. A β (1-42) and aluminum induce stress in the endoplasmic reticulum in rabbit hippocampus, involving nuclear translocation of p53 and NF- κ B. **Molecular brain research** 2001; 96 (1): 30-38.

Ghribi O, Herman MM, Savory J. The endoplasmic reticulum is the main site for Caspase-3 activation following aluminum-induced neurotoxicity in rabbit hippocampus. **Neurosci Lett** 2002; 324: 217-21.

Gladine C, Rock E, Morand C, Bauchart D, Durand D. Bioavailability and antioxidant capacity of plant extracts rich in polyphenols, given as a single acute dose, in sheep made highly susceptible to lipoperoxidation. **British Journal of Nutrition** 2007; 98: 691-701.

Glode M, Robinson J, Gould FS. Protection from Cyclophosphamide-Induced Testicular Damage with an Analogue of Gonadotropin-Releasing Hormone. **Lancet** 1981;1 (8230): 1132-4.

Gonzalez-Weller D, Gutierrez AJ, Rubio C, Revert C, Hardisson A. Dietary intake of aluminum in a Spanish population (Canary Islands), **J. Agric. Food Chem** 2010; 58 (19):10452–10457.

Guo CH, Huang CJ, Chiou YL, and Hsu GSW. Alteration of trace element distribution and testis ACE activity in mice with high peritoneal aluminum. **Biol. Trace Elem. Res** 2002; 86: 145–157.

Guo CH, Liao SY, Yuan CY, and Hsu GSW. Effects of peritoneal aluminum overload on polyamines and nitric oxide contents of testes and epididymis in the mice. **Environ. Toxicol. Pharmacol** 2006; 21: 1–7.

Guo CH, Lu YF, and Hsu GSW. The influence of aluminum exposure on male reproduction and offspring in mice. **Environ. Toxicol. Pharmacol** 2005b; 20: 135–142.

Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities. **Clin Exp Pharmacol Physiol** 2012; 39 (3): 283–299.

Hasanin NA, Sayed NM, Ghoneim FM and Al-Sherief SA. Histological and Ultrastructure Study of the Testes of Acrylamide Exposed Adult Male Albino Rat and Evaluation of the Possible Protective Effect of Vitamin E Intake. **J Microsc Ultrastruct** 2018; 6 (1): 23-34.

Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. **Journal of Physiology and Biochemistry** 2001; 57 (2): 43–56.

Hirata-Koizumi M, Fujii S, Ono A, Hirose A, Imai T, Ogawa K. Evaluation of the reproductive and developmental toxicity of aluminum ammonium sulfate in a twogeneration study in rats. **Food Chem Toxicol** 2011; 49: 1948–59.

Hovatta O, Venäläinen ER, Kuusimäki L, Heikkilä J, Hirvi T, and Reima I. Aluminium, lead and cadmium concentrations in seminal plasma and spermatozoa, and semen quality in Finnish men. **Human Reprod** 1998; 13: 115–119.

Ige SF, Akhigbe RE. The role of Allium Cepa on aluminum-induced reproductive dysfunction in experimental male rat models. **J Hum Reprod Sci** 2012; 5 (2): 200–205.

Imray P, Moore MR, Callan PW, Lock W. Aluminium, **Rundle Mall**, Australia, 1995, p.34.

Infante JP. A function for the vitamin E metabolite α -tocopherol quinone as an essential enzyme cofactor for the mitochondrial fatty acid desaturases. **FEBS Letters** 1999; 446: 1-5.

Jamalan M, Ghaffari MA, Hoseinzadeh P, Hashemitabar M, Zeinali M. Human sperm quality and metal toxicants: protective effects of some flavonoids on male reproductive function. **Int. J. Fertil. Steril** 2016; 10 (2): 215–223.

Kaizer RR, Correa MC, Spanevello RM, Morsch VM, Mazzanti CM, Gonçalves JF, Schetinger MR. Acetylcholinesterase activation and enhanced lipid peroxidation after long-term exposure to low levels of aluminum on different mouse brain regions. **J Inorg Biochem** 2005; 99: 1865–1870.

Kalender S, Uzun FG, Demir F, Uzunhisarcıklı M, Aslantürk A. Mercuric chloride-induced testicular toxicity in rats and the protective role of sodium selenite and vitamin E. **Food and Chemical Toxicology** 2013; 55: 456–462.

Kausz AT, Antonsen JE, Hercz G, Pei Y, Weiss NS, Emerson S, and Sherrard DJ. Screening plasma aluminum levels in relation to aluminum bone disease among asymptomatic dialysis patients. **Am. J. Kidney Dis** 1999; 34: 688- 693.

Khattab HAM, Abdallah IZA and Kamel GM. Grape seed extract alleviate reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. **Journal of American Sciences** 2010; 6 (12): 1200–1209.

Kim MS, Clesceri LS. Aluminum exposure: a study of an effect on cellular growth rate. **Sci Total Environ** 2001; 278 (1-3): 127-35.

Klein JP, Mold M, Mery L, Cottier M, Exley C. Aluminum content of human semen: implications for semen quality. **Reprod. Toxicol** 2014; 50: 43–48.

Kumar V, Bal A, Gill KD. Aluminium-induced oxidative DNA damage recognition and cell-cycle disruption in different regions of rat brain. **Toxicology** 2009; 264: 137–144.

Kutlubay R, Oğuz EO, Can B, Güven MC, Sınık Z, Tuncay ÖL. Vitamin E Protection from Testicular Damage Caused by Intraperitoneal Aluminium. **International Journal of Toxicology** 2007; 26: 297–306.

Li W, Ning JZ, Cheng F, Yu WM, Rao T, Ruan Y, Yuan R, Zhang XB, Du Y, Xiao CC. MALAT1 promotes cell apoptosis and suppresses cell proliferation in testicular ischemia-reperfusion injury by sponging MiR-214 to modulate TRPV4 expression. **Cell Physiol Biochem** 2018; 46: 802-814.

Liaberherr M, Grosse B, Cournot-Witmer G, Harman-Erlee M P, Balan S. Aluminum action on Mouse bone cell metabolism and response to PTH and 1,25 (OH)₂D₃. **Kidney Int** 1987; 31: 736-743.

Llobet J M, Colomina MT, and Sirvent JJ. Reproductive toxicology Lucesoli F, Fraga CG. Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and α-tocopherol supplementation. **Toxicology** 1999; 132: 179-186.

Mammadov R. Vitaminler. **Nobel yayıncılık Ankara** 2002; 32-40.

Martinez CL, Escobar AG, Urango-Ocio JA, Peçanha FM, Vassallo DV, Exley C, Miguel M, Wiggers GA. Aluminum exposure for 60 days at human dietary levels impairs spermatogenesis and sperm quality in rats. **Reproductive Toxicology** 2017; 73: 128–141.

Mohammad K, Moslemi, Samaneh T. Selenium–vitamin E supplementation in infertile men: effects on semen parameters and pregnancy rate. **International Journal of General Medicine** 2011; 4: 99–104.

Mohammad NS, Arafa MH, Atteia HH. Coenzyme Q10 and fish oils synergistically alleviate aluminum chloride-induced suppression of testicular steroidogenesis and antioxidant defense. **Free Radic. Res** 2015; 49 (11): 1319–1334.

Momeni HR, Eskandari N. Effect of vitamin E on sperm parameters and DNA integrity in sodium arsenite-treated rats. **Iran J Reprod Med** 2012; 10: 249-256.

Moncada S, Palmer RM, and Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol. Rev** 1991; 43: 109– 142.

Montz FJ, Wolff AJ, Gambone JC. Gonadal protection and fecundity rates in cyclophosphamide-treated rats. **Cancer Res** 1991; 51 (8): 2124-6.

Moore KL, Persaud TVN. İnsan Embriyolojisi, Dalçık H, Yıldırım M, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2009, s.262-272.

Moumen R, Ait-Oukhatar N, Bureau F, Fleury C, Bouglé D, Arhan P, Neuville D, Viader F. Aluminium increases xanthine oxidase activity and disturbs antioxidant status in the rat. **J Trace Elem Med Biol** 2001; 15: 89–93.

Mouro VGS, Menezes TP, Lima GDA, Domingues RR, Ana Souza CF, Oliveira JA, Matta SLP, Mariana Machado N. How Bad Is Aluminum Exposure to Reproductive Parameters in Rats? **Biol Trace Elem Res** 2018; 183: 314–324.

Mur JM, Wild P, Rapp R, Vautrin JP, Coulon JP. Demographic evaluation of the fertility of aluminium industry workers: influence of exposure to heat and static magnetic fields. **Hum. Reprod** 1998; 13 (7): 2016–2019.

Murray RK. Harper Biyokimya, **Nobel Tip Kitapevleri**, 2009, İstanbul, p:928.

Nayak P, Chatterjee AK. Effects of aluminium exposure on brain glutamate and GABA systems: an experimental study in rats. **Food Chem Toxicol** 2001; 39: 1285–9.

Negis Y, Zingg JM, Ogru E, Gianello R, Libinaki R, Azzi A. On the existence of cellular tocopheryl phosphate, its synthesis, degradation and cellular roles: a hypothesis. **IUBMB Life** 2005; 57: 23-25.

Niu PY, Niu Q, Zhang QL, Wang LP, He SE, Wu TC, Conti P, Di Gioacchino M, Boscolo P. Aluminum impairs rat neural cell mitochondria in vitro. **Int J Immunopathol Pharmacol** 2005; 18: 683–689.

Niu ZY, Liu FZ, Yan L, Li WC. Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. **Poultry Science** 2009; 88: 2101-2107.

Nordkap L, Joensen UN, Blomberg MJ, Jorgensen N. Regional differences and temporal trends in male reproductive health disorders: semen quality may be a sensitive marker of environmental exposures. **Mol. Cell. Endocrinol** 2012; 355: 221–230.

Ochmanski W, Barabasz W. Aluminum-occurrence and toxicity for organisms. **Przegł Lek** 2000; 57: 665–8.

Lobet JM, Colomina MT, and Sirvent JJ. Reproductive toxicology of aluminium in male mice. **Fundam. Appl. Toxicol** 1995; 25: 45–51.

Lucesoli F and Fraga CG. Oxidative stress in testes of rats subjected to chronic iron intoxication and alpha-tocopherol supplementation. **Toxicology** 1999; 132 (2-3): 179-86.

Ohayagi Y, Miyoshi K. Aluminium and Alzheimer's Disease: An Update. **J Alzheimers Dis Parkinsonism** 2013; 3: 2.

Ortuno J, Esteban MA, Cuesta A, Meseguer J. Effect of oral administration of high vitamin C and E dosages on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune system. ***Veterinary Immunology and Immunopathology*** 2001; 79: 167-180.

Oteiza PI. A mechanism for the stimulatory effect of aluminum on iron-induced lipid peroxidation. ***Arch Biochem Biophys*** 1994; 308: 374-9.

Oteiza PL, Keen CL, Han B, Golub MS. Aluminum accumulation and neurotoxicity in swiss-webster mice after long-term dietary exposure to aluminum and citrate. ***Metabolism*** 1993; 42: 1296-300.

Ourique GM, Saccol EMH, Pes TS, Glanzner WG, Schiefelbein SH, Woehl VM, Baldisserotto B, Pavanato MA, Gonçalves PBD, Barreto KB. Protective effect of vitamin E on sperm motility and oxidative stress in valproic acid treated rats. ***Food and Chemical toxicology*** 2016; 95: 159-167.

Pastacı N, Bahtiyar N, Karalük S. Köpeklerde Alüminyum Toksikasyonunun Alzheimer Hastalığı Üzerine Etkisi. ***TUBAV Bilim Dergisi*** 2010; 3 (3): 271-5.

Pizent A, Tariba B, Zivkovic T. Reproductive toxicity of metals in men. ***Arh Hig Rada Toksikol*** 2012; 63: 35-46.

Rajendar B, Bharavi K, Rao GS, Kishore PV, Kumar PR, Kumar CS, et al. Protective effect of alphas-tocopherol on biochemical and histological alterations induced by cadmium in rat testes. ***Indian Journal of Physiology and Pharmacology*** 2011; 55 (3): 213-220.

Rana SVS (2007) Environmental pollutions: health and toxicology. Alpha Science International, Oxford.

Rao KSJ, Rao BS, Vishnuvardhan D, Prasad KV. Alteration of superhelical state of DNA by aluminium (Al). ***Biochim Biophys Acta*** 1993; 1172: 17-20.

Rezaie AH, Razi M, Amniattalab A, Malekinejad H, Molavi M. Co-Administration of Vitamin E and Testosterone Attenuates The Atrazine-Induced Toxic Effects on Sperm Quality and Testes in Rats. ***Cell J*** 2017; 19 (2): 292-305.

Ross MH, Paulina W Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas, 6. Baskıdan Çeviri, Baykal B, ***Lippincott Williams and Wilkins***. Philadelphia USA 2011, s.784-802.

Sarkar D, Maiti R, at Ghosh D. Management of fluoride induced testicular disorders by calcium and Vitamin-E co-administration in the albino rat. ***Reproductive Toxicology*** 2006; 22: 606-612.

Sayed M, Rawi and Fatma M, Seif Al Nassr. Zinc sulphate and vitamin E alleviate reproductive toxicity caused by aluminium sulphate in male albino rats. **Toxicology and Industrial Health** 2015; 31 (3): 221–234.

Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005; 135: 969–972.

Singh U, Devaraj S, Jialal I: Vitamin E, oxidative stress, and inflammation. **Annual Review of Nutrition** 2005; 25: 151-174.

Singla N, Dhawan DK. Regulatory role of zinc during aluminium-induced altered carbohydrate metabolism in rat brain. **J Neurosci Res** 2012; 90: 698–705.

Sumathi T, Shobana C, Kumari BR, Nandhini DN. Protective role of *Cynodon dactylon* in ameliorating the aluminium-induced neurotoxicity in rat brain regions. **Biol Trace Elem Res** 2011; 144: 843–853.

Sun H, Hu C, Jia L, Zhu Y, Zhao H, Shao B, et al. Effect of aluminium exposure on serum sex hormones and androgen receptors expression in male rats. **Biological Trace Element Research** 2012; 144 (1–3): 1050–1058.

Sun X, Sun H, Yu K, Wang Z, Liu Y, Liu K, Zhu Y, Li Y. Aluminum Chloride Causes the Dysfunction of Testes Through Inhibiting the ATPase Enzyme Activities and Gonadotropin Receptor Expression in Rats. **Biol Trace Elem Res** 2018; 183: 296–304.

Şengül İ, Şengül D. İskemik Ön Koşullanma ve Sonradan Koşullanma Mekanizmalarından Biri Olarak Kalsiyum. **Düzce Tıp Dergisi** 2012; 14 (3): 74-79.

Tahmasbpour E, Balasubramanian D, Agarwal A. A multifaceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). **J Assist Reprod Genet** 2014; 31 (9): 1115–1137.

Tayfur M, Ünlüoğlu İ, Bener Ö. Alüminyum ve Sağlık. **Gıda Dergisi** 2002; 27 (4): 305-9.

Tengerdy RP. Vitamin E, immune response, and disease resistance. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1990; 587: 24-33.

Traber MG, Arai H. Molecular mechanism of vitamin E transport. **Annual Review of Nutrition** 1999; 19: 343-355.

Traber MG, Atkinson. Vitamin E, antioxidant and nothing more. **Free Radical Biology and Medicine** 2007; 43 (1): 4–15.

Uzun FG, Kalender S, Durak D, Demir F, Kalender Y. Malathion-induced testicular toxicity in male rats and the protective effect of vitamins C and E. **Food Chem Toxicol** 2009; 47: 1903-1908.

Verstraeten SV, Aimo L, Oteiza PI. Aluminium and lead: molecular mechanisms of brain toxicity. **Arch Toxicol** 2008; 82 (11): 789–802.

Vigueras-Villasenor RM, Ojeda I, Gutierrez-Perez O, Chavez-Saldana M, Cuevas O, Maria DS, et al. Protective effect of a-tocopherol on damage to rat testes by experimental cryptorchidism. *International Journal of Experimental Pathology* 2011; 92 (2): 13–19.

Walton JR. Aluminum disruption of calcium homeostasis and signal transduction resembles change that occurs in aging and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 2012; 29: 255–273.

Wang H, Yang L, Ji YL, Chen YH, Hu J, Zhang J, Zhang C, Xu DX. Different fixative methods influence histological morphology and TUNEL staining in mouse testes. *Reproductive Toxicology* 2016; 60: 53–61.

WEB_2. Rat Sperm morphological assessment. http://www.irdg.co.uk/Sperm_morphology.pdf, (alındığı tarih: 03.09.2018).

Welch C, Watson ME, Poth M, Hong T, and Francis GL. Evidence to suggest nitric oxide is an interstitial regulator of Leydig cell steroidogenesis. *Metabolism* 1995; 44: 234–238.

Xia Y, Hao G, Yang Y. Study on reproductive and immune toxicity of male rats exposed to As₂O₃. *Wei Sheng Yan* 2009; 38: 720-2.

Yang H, Han D, Kim JR, Sim JC. Effects of -Tocopherol on Cadmium-Induced Toxicity in Rat Testis and Spermatogenesis. *J Korean Med Sci* 2006; 21: 445-51.

Yang SJ, Lee JE, Lee KH, Huh JW, Choi SY, Cho SW. Opposed regulation of aluminum-induced apoptosis by glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor in rat brains. *Brain Res Mol Brain Res* 2004; 127: 146–149.

Yerer MB, Aydoğan S. Oksidatif Stres ve Antioksidanlar, Derleme. *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2000; 9 (1): 49-53.

Yin HP, Xu JP. Effect of vitamin E on reproductive hormones and testis structure in chronic dioxin-treated mice. *Toxicology and Industrial Health* 2011. DOI: 0748233711408381.

Yousef MI, Abdallah GA and Kamel KI. Effect of ascorbic acid and vitamin E supplementation on semen quality biochemical parameters of male rabbits. *Animal Reproduction Science* 2003; 76: 99–111.

Yousef MI, Kamel KI, El-Guendi MI, El-Demerdash FM. An in vitro study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: the protective role of some antioxidants. *Toxicology* 2007; 239 (3): 213–223.

Yousef MI, Salama AF. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and Chemical Toxicology* 2009; 47: 1168–1175.

Zhang F, Sun X, Yu H, Yang X, Song M, Han Yet al. Effects of aluminum trichloride on the cartilage stimulatory growth factors in rats. *Biometals* 2017; 30 (1): 143–150.

Zhang K, Zhou Q. Toxic effects of Albased coagulants on Brassica chinensis and Raphanus sativus growing in acid and neutral conditions. *Environ Toxicol* 2005; 20 (2): 179–187.

Zhu YZ, Sun H, Yang Fu, Wang J, Song M, Li M, Li YF, Miao LG. Effects of sub-chronic aluminum chloride on spermatogenesis and testicular enzymatic activity in male rats. *Life Sciences* 2014; 102: 36-40.

Zingg JM. Vitamin E: An overview of major research directions. *Molecular Aspects of Medicine* 2007; 28: 400-422.



8. ÖZGEÇMİŞ

Ozal Ulfanov 19 mayıs 1993' de saatlı' da doğmuştur. İlköğretim, ortaokul ve lise eğitimini Osman Mirzeyev adına Shirinbey Köy Orta Okulu' nda bitirmiştir. 2014 yılında Azerbaycan Devlet Pedagoji Üniversitesi Kimya Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümünden mezun olmuştur. 2016 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Bölümünde yüksek lisansa başlamıştır.

9. EKLER





T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı :60758568-020/35729
Konu :Başvurunuz hk.

24/05/2018

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL.

İlgi :29/04/2018 tarihli dilekçeniz.

"Vitamin E'nin Alüminyum sülfat ile indüklenen testis hücre popülasyonları üzerine koruyucu etkisinin stereolojik yöntemlerle gösterilmesi" konulu PAUHADYEK-2017/02 nolu çalışmanızda **istenilen değişiklikleriniz** görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmada değişiklikler uygun bulunmuş olup, ayrıca çalışmanın sorumlu yürütücüsü Prof.Dr. Emin Oğuzhan OĞUZ iken, Dr.Öğr.Üyesi Nazlı ÇİL olması ve çalışmanın adının **"Vitamin E'nin Alüminyum sülfat ile indüklenen testis hasarı üzerine koruyucu etkisi"** olarak değiştirilmesinde **Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna ve 40 adet Wister-Albino cinsi erkek sıçan** kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. Funda Fatma BÖLÜKBAŞI HATİP
Başkan