



T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



RATLARDA DENEYSEL BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİ MODELİNDE SPERM DNA HASARININ TESPİTİ

Veteriner Hekim Volkan KOŞAL
DÖLERME VE SUNİ TOHUMLAMA ANABİLİMDALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ

İKİNCİ DANIŞMAN

Doç. Dr. Barış Atalay USLU

VAN-2018

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**RATLARDA DENEYSEL BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİ
MODELİNDE SPERM DNA HASARININ TESPİTİ**

Veteriner Hekim Volkan KOŞAL
DÖLERME VE SUNİ TOHURLAMA ANABİLİMDALI
(VETERİNER PROGRAMI)
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ

II. DANIŞMAN
Doç. Dr. Barış Atalay USLU

VAN 2018

KABUL VE ONAY

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalında Volkan KOŞAL tarafından hazırlanan “*Ratlarda Deneysel Benign Prostat Hiperplazisi Modelinde Sperm DNA Hasarının Tespiti*” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.

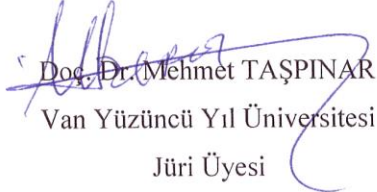
Tez Savunma Tarihi: 16/11/2018



Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ

Akdeniz Üniversitesi

Jüri Başkanı



Doc. Dr. Mehmet TAŞPINAR

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyesi



Dr. Öğr. Üyesi Ahmet UYAR

Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi

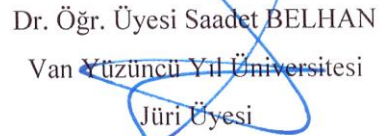
Jüri Üyesi



Dr. Öğr. Üyesi Alper KOÇYİĞİT

Cumhuriyet Üniversitesi

Jüri Üyesi



Dr. Öğr. Üyesi Saadet BELHAN

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Jüri Üyesi

Tez hakkında alınan jüri kararı, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.



Prof. Dr. Semiha DEDE

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

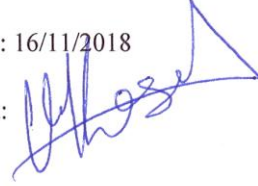
Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Ratlarda Deneysel Benign Prostat Hiperplazisi Modelinde Sperm DNA Hasarının Tespiti" başlıklı tezim; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir. Bu tezdeki bütün bilgiler akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak hazırlanıp, bu kural ve ilkeler gereği, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yapılmış ve kaynak gösterilmiştir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Volkan KOŞAL

Tarih: 16/11/2018

İmza:



TEŞEKKÜR

Akademik hayatım boyunca beni kendi çocuklarından ayrı görmeyen, gerek akademik gerekse özel hayatımda desteklerini esirgemeyen ve ailelerinden biri olarak gören değerli danışman hocalarım Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ ve Doç. Dr. Barış Atalay USLU'ya en içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Mehmet TAŞPINAR, Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN, Dr. Öğr. Üyesi Ahmet UYAR, Dr. Öğr. Üyesi Alper KOÇYİĞİT'e, istatistik analizlerde yardımcı olan Dr. Öğr. Üyesi Can ATEŞ'e, Anabilim Dalı Başkanı Dr. Öğr. Üyesi Saadet BELHAN'a teşekkür ederim.

Öğrenim hayatıma başladığımdan itibaren eğitimin herşeyden önce geldiğini düşünen Babam Özcan KOŞAL, Annem Fatma KOŞAL ve Kardeşim Gökhan KOŞAL'a yıllar boyunca verdikleri emek, sabır ve desteklerinden dolayı teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Koşal V, Ratlarda deneysel benign prostat hiperplazisi modelinde sperm dna hasarı tespiti. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı, Veteriner Programı Doktora Tezi, Van, 2018. Bu çalışmada testosteron hormonu kullanılarak oluşturulan benign prostat hiperplazisi modelinde sperm DNA hasarının tespit edilmesi amaçlandı. Bunun için ortalama 200 gr canlı ağırlığa ulaşmış erkek Albino Wistar Ratlar kullnıldı. Hayvanlar her bir grupta 6 rat olacak şekilde üç gruba ayrıldı. 1. Grup; placebo, 2. Grup; günlük 3 mg/kg dozunda, 3. Grup; günlük 5 mg/kg dozunda testosteron 30 gün süre ile intramusculer olarak yapıldı. Uygulamalar sonunda sacriifiye edilen ratlardan sperma örnekleri alındı. Sperm DNA hasarı, motilite, anormal sperm oranı ve yoğunluk analizleri yapıldı. Sperm DNA hasarı tespitinde COMET yönteminden faydalanılarak hazırlanan preparatlar 0 (hasarsız), 1 (az hasarlı), 2 (hasarlı), 3 (orta hasarlı), 4 (çok hasarlı) olarak derecelendirilerek her grup için yaklaşık 2000 adet sperm sayıldı. Derecelendirme sonucu üç farklı hasar tespit yöntemi kullanılarak hasar oranları tespit edildi. Sperm DNA hasar oranları; 1. grupta %3.87454, 2. grupta %9.35852, 3. grupta %15.2616. Arbitrary unite göre; 1. grupta %1.199262, 2. grupta %4.08116, 3. grupta %6.29845. Genetik hasar indeksine göre; 1. grupta %5.5351, 2. grupta %17.0475, 3. grupta %27.374 değerlerinde hasar boyutu gözlemlendi. Bu verilerin istatistiksel olarak anlamlı olup kullanılan testosteron miktarına bağlı olarak sperm DNA hasarının arttığı tespit edildi ($p<0.001$). Motilite muayenesi sonucu 1. grup %90, 2. grup %80, 3. grup %80 değerlerine sahipti. Uygulanan testosteron düzeyinden bağımsız olarak motilite oranında düşüş gözlemlendi ($p<0.006$). Sperm yoğunluğu muayenesi sonucunda tüm grupların etkilenmediği tespit edildi, istatistiki bir fark bulunamadı ($p>0.05$). Anormal sperm oranı 1. grup %5.75, 2. grup %11.88, 3. grup %17 değerlerine sahipti. Uygulanan testosteron düzeyine bağlı olarak anormal sperm oranında artış tespit edildi ($p<0.001$). Sonuç olarak; ekzojen testosteron hormonu kullanılarak oluşturulan benign prostat hiperplazisi modelinde, sperm DNA hasarının arttığı, motilite ve anormal sperm oranının olumsuz olarak etkilendiği, sperm yoğunluğunun ise etkilenmediği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: COMET, DNA hasarı, sperm.

ABSTRACT

Koşal V. Detection of sperm dna damage in benign prostatic hyperplasia model in rats. Van Yüzüncü Yil University Institute of Health Sciences, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Ph.D. Thesis, Van, 2018. This study aimed to determine the sperm DNA damage in the benign prostatic hyperplasia model using testosterone hormone. For this purpose, male albino wistar rats, which reached an average of 200 g live weight, were used. The animals were divided into three groups of 6 animals in each group. Group 1; placebo, Group 2; 3 mg / kg daily, Group 3; Testosterone was administered intramuscularly for 30 days in a dose of 5 mg / kg daily. Sperm samples were taken from the rats at the end of the applications. Sperm DNA damage, motility, abnormal sperm rate and density analyzes were performed. By using COMET method for sperm DNA damage detection; the preparations were rated as 0 (undamaged), 1 (less damaged), 2 (damaged), 3 (moderately damaged), 4 (very damaged) and approximately 2000 spermatozoa were counted for each group. Damage rates were determined using three different methods of damage assessment. Sperm DNA damage rates according to Percentile Calculation; 1st group % 3.87454, 2nd group % 9.35852 3rd group % 15.2616, according to Arbitrary Unit; 1st group % 1.199262, 2nd group % 4.08116, 3rd group% 6.29845, according to Genetic Damage Index; group 1 % 5.5351%, group 2 % 17.0475, group 3 % 27.374 of the damage dimension was observed. This data was statistically significant and it was determined that sperm DNA damage was increased due to the amount of testosterone used ($p < 0.001$). Motilite examination results were as follows; Group 1 %90, Group 2 %80, and Group 3 %80. A decrease in motility was observed regardless of the testosterone level ($p < 0.006$). It was determined that all groups were not affected as a result of sperm density examination, no statistical difference was found. Abnormal sperm count results in abnormal sperm rates in group 1 (%5.75), in group 2 (%11.88) and in group 3 (%17) respectively. An increase in abnormal sperm was detected depending on the testosterone level ($p < 0.001$). As a result; it was determined that the rate of sperm DNA damage was increased, motility and abnormal sperm ratio were adversely affected and the amount of density was not affected in the benign prostatic hyperplasia model created using the exogenous testosterone hormone.

Key Words: COMET, DNA damage, sperm.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	II
ETİK BEYAN	III
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
İÇİNDEKİLER	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ	XI
TABLolar LİSTESİ	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Ratlarda Erkek Genital Sistem Anatomisi.....	4
2.1.1. Penis.....	4
2.1.2. Testis.....	4
2.1.3. Epididimis.....	4
2.1.4. Ductus deferens.....	5
2.1.5. Ürethra	5
2.1.6. Glandula bulbourethralis.....	5
2.1.7. Glandula preputialis.....	6
2.1.8. Glandula vesicularis.....	6
2.1.9. Prostat.....	6
2.2. Erkek Ratlarda Üreme Özellikleri.....	6
2.2.1. Puberta.....	7
2.2.2. Spermatogenezis.....	8
2.2.3. Spermatogenezisin hormonal kontrolü.....	9
2.3. Testosteron.....	10
2.4. Prostat Biyolojisi.....	11
2.4.1. Prostat üzerine etki eden hormonlar.....	12
2.5. Benign Prostat Hiperplazisi (BPH).....	13
2.5.1. Prostat bezinin fizyolojisi	13

2.5.2. Hiperplazi.....	14
2.5.3. Benign prostat hiperplazisinin etiopatogenezi.....	15
2.6. Sperm DNA hasarı.....	16
2.6.1. Sperm DNA'sındaki hasara neden olan faktörler.....	16
2.6.2. DNA hasarı tespit yöntemleri.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Gereç.....	21
3.2. Grupların Oluşturulması.....	21
3.3. Yöntem.....	21
3.3.1. Spermatolojik muayeneler.....	21
3.3.2. Sperm DNA hasarının tespiti.....	22
3.4. İstatistiksel Analiz.....	26
4. BULGULAR.....	27
4.1. Makroskopik Bulgular.....	27
4.2. Mikroskopik Bulgular.....	28
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
KAYNAKLAR.....	42
ÖZGEÇMİŞ.....	48
EKLER.....	49
Ek 1. Etik Kurul Raporu.....	49
Ek 2. İntihal Raporu.....	50

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin
AOT	: Akridin Orange Test
AÜSS	: Alt Üriner Sistem Semptomları
bFGF	: Bazik Fibroblast Growth Factor
BPH	: Benign Prostat Hiperplazisi
BSA	: Bovine serum albumin
C	: Sitozin
Ca	: Kalsiyum
c-AMP	: Siklik Adenozin Monofosfat
Cl	: Klor
CO₂	: Karbondioksit
COMET	: Tek Hücre Jel Elektroforez Yöntemi
DHT	: Dihidrotestosteron
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
EGF	: Epidermal Growth Factor
ELISA	: Enzyme Linked Immuno-sorbent Assay
FGF	: Fibroblast growth factor
FISH	: Fluorescein In Situ Hybridization
FSH	: Folikül Stümüle Edici Hormon
G	: Guanin
GnRH	: Gonodotropin Releasing Hormon
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
Igf-1	: İnsülin-like Growth Factor
İR	: İyonize Radyasyon
LH	: Luteinizing Hormon
LMA	: Low Melting Agarose
Me₂SO	: Dimethyl sulfoxide
Mg	: Magnezyum
ml	: Mililitre
Na	: Sodyum

ng	: Nanogram
NMA	: Normal Melting Agarose
SCSA	: Sperm Chromatin Structure Assay
SR	: Serbest Radikaller
T	: Timin
TGF-β1	: Tumor Growth Factor - β 1
U	: Urasil
UV	: Ultraviyole



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Kontrol grubu prostat görüntüsü	28
Şekil 2.	3 mg/kg doz grubu prostat görüntüsü.....	28
Şekil 3.	5 mg/kg doz grubu prostat görüntüsü.....	28
Şekil 4.	Sperm DNA hasarı 0 (hasarsız).....	35
Şekil 5.	Sperm DNA hasarı 1 (az hasarlı).....	35
Şekil 6.	Sperm DNA hasarı 2 (hasarlı).....	35
Şekil 7.	Sperm DNA hasarı 3 (orta hasarlı).....	35
Şekil 8.	Sperm DNA hasarı 4 (çok hasarlı).....	36
Şekil 9.	Sperm DNA hasarı 4 (çok hasarlı).....	36

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1.	Yüzdellik hasar.....	29
Tablo 2.	Yüzdellik hasar istatistik verileri.....	29
Tablo 3.	Arbitrary unit	30
Tablo 4.	Arbitrary unit istatistik verileri	30
Tablo 5.	Genetik hasar indeksi.....	31
Tablo 6.	Genetik hasar indeksi istatistik verileri	31
Tablo 7.	Motilite muayenesi	32
Tablo 8.	Motilite muayenesi istatistik verileri.....	32
Tablo 9.	Yoğunluk.....	33
Tablo 10.	Yoğunluk istatistik verileri	33
Tablo 11.	Anormal sperm oranı.....	34
Tablo 12.	Anormal sperm oranı istatistik verileri.....	34

1. GİRİŞ

Spermanın muayenesi ve değerlendirilmesi erkek damızlık seçiminde ve suni tohumlama uygulamalarında oldukça önemlidir. Androlojik muayeneler sonucunda, spermatolojik özelliklerden herhangi birinde veya birkaçında meydana gelen olumsuzluk, fertilizasyonu doğrudan etkileyebilir. Bu amaçla, alınan spermanın laboratuvar koşullarında muayenelerin yapılması şarttır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, spermanın kalitesi ve potansiyel fertilitesi hakkında bilgi edinilmesi mümkün olabilmektedir.

Prostat bezi, vesiküler bezlerin boşaltıcı kanallarının hemen posterior kısmında ürethra boyunca ve onun çevresinde yerleşmiş tek bir bezdir. Bütün memeli hayvanlarda bulunur. Tubulo-alveoler ve kompleks yapıdadır. Tek katlı prizmatik epitellerden oluşan bez, kendisine has kokulu bir salgı (sukkus prostatikus) yapmaktadır. Salgısını, kolloidus seminalise açılan kanallar aracılığıyla spermaya ekler. Yapışkan ve kendine has bir kokusu bulunan prostat bezi salgısı; Klor (Cl), Kalsiyum (Ca), Sodyum (Na), ve Magnezyum (Mg) iyonları yönünden zengindir. Bu salgı spermaların motilite ve fertilitate yeteneğini artırır (Alaçam, 2007).

Benign Prostat Hiperplazi (BPH) histopatolojik bir ifade olup, prostatın stromal ve epitelial katmanlarının hiperplazisi olarak tanımlanmaktadır. Özellikle insanlarda Yaşlanma ile sıklığı artan ve yaşam kalitelerini etkileyen önemli bir sağlık sorunudur. Erkeklerdeki alt üriner sistem semptomlarının (AÜSS) en önemli sebeplerinden biri BPH'dir. Prostat hücrelerinde oluşan bu hiperplazi, programlanmış hücre ölümü (apoptozis) ve hücre proliferasyonu arasındaki dengeye bağlıdır. Bu iki durumu düzenleyen moleküler mekanizmaların bozulması BPH olarak adlandırılan anormal büyümelere yol açmaktadır (Polat ve ark., 1997). Androjenler bu dengeyi epidermal growth faktör (EGF), basic fibroblast growth faktör (bFGF), insülin-like growth faktör-1 (Igf-1) ve tümör growth faktör- β 1 (TGF- β 1) gibi faktörler ile sağlarlar (Yang ve ark., 1997; Djakiew, 2000). BPH'de bu moleküler düzenleyici faktörlerin hücre proliferasyonu lehine bozulması nedeniyle prostatın büyümesi gözlenir (Yurdakul ve Güven, 2006).

Dihidrotestosteron; normal prostat gelişiminde ve BPH’de en önemli role sahip androjendir. Dihidrotestosteron testosteronun aktif formu olduğundan etki düzeyi çok daha fazladır. Prostat dokusu büyüme hızını kontrol altında tutmak için, androjen seviyesinin belli bir düzeyde olması gerekir. Androjen eksikliğinde prostat bezinde belirgin involusyon gözlenir. Beş alfa redüktaz enzimi inhibitörü testosteronun, dihidrotestosterona dönüşümünü sağlayan enzimin aktivitesini ortadan kaldırarak etki eder. Tüm antiandrojen hormonal tedavi yöntemleri prostat epitelinde apoptozisi artırıcı ve hücre proliferasyonunu baskılayıcı özelliğe sahiptirler (Müezzinoğlu, 2010).

Genetik bilginin nesilden nesile, sağlıklı bir biçimde aktarılabilmesi için DNA yapısının korunması önem taşımaktadır. DNA’nın fonksiyonu bazlar üzerindeki polar gruplara bağlıdır. Bu gruplar arasında oluşan hidrojen bağları çift sarmal yapıdaki DNA’yı oluştururlar. DNA bazlarının polar gruplarında meydana gelen kimyasal değişiklikler sonucu DNA replikasyonu sırasında yanlış eşleşme ve mutasyona sebep olmaktadır. Deoksiriboz fosfat iskeletinde oluşan kopmalar, replikasyonu bloke etmesinin yanı sıra yüksek düzeylerde oluştuğunda hücre ölümüne sebep olmaktadır. Her canlı hücrenin DNA yapısında günlük 100’den fazla yanlış kodlanan veya kodlanmaya sebep olan hasar meydana gelebilmektedir (Lindahi, 1990). DNA yapısında oluşan hasarlar spesifik onarım sistemleri tarafından düzeltilmektedir. DNA onarım kapasitesinin üzerinde hasar oluştuğunda veya DNA onarım sistemleri kalıtsal ve edinsel sebeplerden dolayı DNA’da defektler olabilir. Onarım sistemlerindeki bu aksaklıklar sonucu kısa dönemde deoksiribonükleotid trifosfat havuzunun miktar ve bileşiminde değişikliklere, replikasyonun durmasına, transkripsiyon ve protein sentezinin inhibisyonuna, proteolitik aktivitenin indüksiyonuna sebep olurken, uzun vade de mutasyona ve kromozom anomalilerine neden olmaktadır (Johnson ve ark., 1987). Oluşan DNA hasarları düşük seviyede ise DNA onarım mekanizmaları tarafından düzeltilebilmektedir. DNA hasarı yüksek boyutlarda ise apoptotik mekanizmaları uyararak hücre ölümüne sebep olur. Orta düzeydeki DNA hasarları genellikle mutasyonla son bulmaktadır (Halliwell, 1996). DNA hasarı düzeyinin tespit edilmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi tek hücre jel elektroforez yöntemi ya da diğer adıyla Comet yöntemidir. Bu yöntem görsel floresan parlamaya bağlı bir tekniktir (Singh ve ark., 1990). Comet yöntemi, DNA moleküllerinin elektrik yükü ve molekül

ağırlıklarından dolayı elektriksel alanda göç etmeleri esasına dayanır. (Ostling ve Johanson, 1984; Singh ve ark., 1988; Horoz ve ark., 2006).

Literatürde ekzojen testosteron uygulmasının sperm DNA hasarı etkisine ilişkin her hangi bir veri bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında, testosteronun BPH oluşum ve gelişimin sürecinde, spermatogenezis ve sperm genomik DNA'sına genotoksik etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Tamamlanan bu tez çalışması sonucunda, testosteronun doza bağlı sperm genomik DNA hasarına neden olduğu ve spermatogenezis sürecini olumsuz etkilediği ilk kez gösterilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ratlarda Erkek Genital Sistem Anatomisi

2.1.1. Penis

Ratlarda penis, crura penis yoluyla ishiadic kemere bağlanmıştır. Penis gövde ve apikal bezlerden oluşur. Kıkırdaklı ve kemikli bir yapıdan oluşan penis, os penis (os priapi), corpus cavernosum penisi ve ürethranın distal bölümlerini içerir (Krinke, 2000).

2.1.2. Testis

Ratlarda testisler, normal olarak skrotumda bulunurlar. Açık inguinal kanal vasıtasıyla kolayca abdominal boşluğa çekilebilirler. Organ, kalın tunika albuginea ve ince tunika vaginalis ile örtülür. Tunica vaginalis skrotumun iç yüzeyini de kaplar. Yetişkin bir rat testisinde yaklaşık 20 adet tubulus seminiferus kontartus bulunur. Tubulus seminiferus kontartusların oluşturduğu kıvrımlı döngüler rete testisin dorsal kısmına açılırlar (Russel, 1992). Seminifer tubülleri farklı katmanlarda düzenlenmiş germ hücrelerini içeren birkaç katmandan oluşmaktadır. Bu katmanlar; spermatagonia, spermatozoid, spermatidlerden oluşmaktadır. Sertoli hücreleri bazal laminadan tubüler lümenine kadar uzanır. Leydig hücreleri de tubulus seminiferus kontartuslar arasında dağınık olarak bulunmaktadır (Russel ve ark., 1990; Creasy 1997).

2.1.3. Epididimis

Epididimisler; caput, corpus ve cauda olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. Caput kısmı testisin cranialinde, cauda kısmı testisin caudal bölgesine yerleşik olarak bulunmaktadır. Caput kısmında birçok ductus eferentesten oluşan bu yapı ductus epididimise açılır ve buradan vas deferense devam etmektedir. Kanallar siliyatik epitel ile kaplanmıştır. Ductus deferens epididimisin son kısmından çıkarak prostat bezi içerisinden geçer ve ürethranın içerisine açılır (Schaetti ve ark., 1995).

2.1.4. Ductus deferens

Çift olarak bulunan ductus deferens, cauda epididimisten çıkar. Testisin medial bölgesi boyunca uzanır, karın boşluğuna girer. Kontralateral kanala bağlanır, prostatın dorsolateral lobuna nüfuz eder. Genelde seminal veziküler boşaltım kanallarıyla birlikte dorsal olarak ürethra içerisine açılır. Açıldığı bu alan kollikulus seminalis adını alır. Ductus deferensin terminal kısmı, ductus deferens beziyle donatılmıştır. Duvarda siliated kolumnar epitelyal astar, kalın dairesel ve uzunlamasına düz kas tabakası ve adventisva tabakasından oluşmuştur (Krinke, 2000).

2.1.5. Ürethra

Erkek ratlarda ürethra; pelvik kısım (masculina), ürethral ampul (bulboüretal bezin salgılarının toplandığı alan) ve glans peniste son bulan bir yapıdan oluşur. Pelvik ürethranın başlangıç kısmı, ductus deferens'in açıklıkları ve seminal veziküller ile seminal birleşmeyi içeren ampullayı oluşturur. Prostat bezinin boşaltma kanalları ürethranın lateral kısmına açılırken diğer eklenti bezleri posterior kısma açılmaktadır. Ürethranın duvarı, transversal epitelyum hücreleri ve ürethral bezlerle çevrilidir. Submukoza, fibröz ve kavernoöz vasküler dokudan oluşur. Proksimal ürethra genellikle ürethral plug olarak bilinen eozinofilik bir kitle içerir, bu sayede enfeksiyöz etkenlere karşı bir koruma sağlanır (Kunstyr ve ark., 1982; Jokinen, 1990).

2.1.6. Glandula bulbourethralis (Cowper bezi)

Çift taraflı bulunan bulbourethral bezler, erkek aksesuar genital bezlerindedir. Rektumun lateralinde bulunan Gl. bulbourethralis, ischiocavernosus ve bulbocavernosus kasları arasında yer alır. Akıtıcı kanalı ürethranın içerisine açılır. Bu bez büyük olup, çok dallı tubullere sahiptir. Bu tubuller tek katlı müköz ve serömüköz hücrelerle kaplıdır. Hücrelerin yüksekliği piramit şeklinde olup salgı granülleri içerir. Tüm organ çizgili kasla kaplıdır (Krinke, 2000).

2.1.7. Glandula preputialis

Çift olarak bulunan preputial bezler, penisin lateralinde subkutanöz adipöz doku içinde yer alan modifiye yağ bezleridir. Bu bez parietal tabaka ve derinin sınırına açılır (Krinke, 2000).

2.1.8. Vesicula seminalis (Glandula vesicularis)

Çift olarak bulunan, vesicula seminalis dorsalateral olarak idrar kesesine uzanır. Bu bezin ventro-medial tarafı, prostat bezinin dorsocraniyal loblarına dayanır. Her iki seminal kesecik de ortada birleşir ve ürethranın ampullasına açılırlar ve seminal kolkulusda ductus deferensle birleşirler. Seminal vezikül, düz kastan ve uzun kolumnar epitelden oluşan bir duvara sahiptir (Krinke, 2000).

2.1.9. Prostat

Bilateral simetrik prostat üç lobdan oluşur. Dorsocraniyal (kanüle koagülasyon bezi), ventral ve dorsolateral. Dorsocraniyal lob (koagülasyon bezi) seminal veziküle bağlı olarak bulunur. Ventral lob, vezika ürinerianın ventrolateral yüzeyi boyunca bulunur. Dorsolateral lob ürethranın proksimal ucunu kuşatır. Üç lob da seminal kolkulusun yakınında üreter içine açılır. Bu tubuloalveoler bez, epitelden oluşan ve düz kasla çevrili alveollerden (acini) meydana gelir. Epitel tipi, organ içindeki ve fizyolojik evresine bağlı olarak; yalancı çok katlı epitelyum hücrelerinden kübik epitelyum hücrelerine değişebilmektedir (Hebel ve Stromberg, 1986).

2.2. Erkek Ratlarda Üreme Özellikleri

Rat, üreme fizyolojisini incelemek için en popüler deney hayvanlarından biridir. Ratın avantajlarından biri, büyük hayvanlara kıyasla çok daha kısa reproduktif döngülere sahip olmalarıdır. Puberta, östrüs siklusu, gebelik ve emzirme gibi evreler çok daha kısadır. Bu sebeple, üremeye ilişkin deneylerde diğer memeliler için model olarak rat kullanımı bir avantaj oluşturmaktadır (Krinke, 2000).

2.2.1 Puberta

Erkeklerde üreme organlarının gelişimi, Suzuki tarafından 1950'lerin başında Wistar suşları kullanılarak kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır (Suzuki, 1952; Suzuki 1954a,b; Sakuma, 1997). Spermier doğumdan sonraki 20-30'uncu günlerde testiste görülür ve 70'inci günden itibaren ratların %100'ünde testiküler sperm tespit edilebilir. 40'inci günde epididimiste sperm bulunmasına rağmen genel olarak 90'inci gün itibariyle bütün hayvanların epididimisinde sperm tespit edilebilir. Testis ve epididimisin gelişimleri doğum sonrası yaklaşık 70'inci günde tamamlanır.

Prepubertal dönemde testiküler ağırlığın hızla artması, sertoli hücrelerinde folikül stimüle edici hormon (FSH) reseptörlerinin sayısındaki bir artışa bağılı olduğu ileri sürülmüştür (Ojeda ve Urbanski, 1994). Hem FSH hem de testosteron, FSH reseptör sayısını uyarır. Sertoli hücrelerindeki androjen reseptörlerinin sayısı doğumdan sonraki 10-20'inci günlerde ve 35-60 günler arasında artmaktadır. Bunla bağılı olarak androjenlerin puberta döneminde etkili olduğu bilinmektedir (Ojeda ve Urbanski, 1994).

Testisin skrotuma yerleşmesi 30-60. günler arasında olur. Erkek ratların penisi dişi ratın klitorisine benzer ve bu benzerlik doğumdan 30 gün sonrasına kadar cinsiyet ayırımını zorlaştırır. Penisin şekli bu aşamada 'V tipi' dir. Penisin W veya U tipi ilk 20-30. günlerde görülür ve bu hayvanların %100'ünde doğumdan sonraki 70. güne kadar farklılıklar gözlenir. Cinsel olgunluğa erişilen 70. günden itibaren testis ve penisin gelişiminin tamamlandığı, erkek eklenti bezlerinin ağırlıklarında ve gelişimlerinde artış gözlenir (Suzuki, 1954b).

Gonodotropin Releasing Hormon'un (GnRH) hipotalamik seviyeleri, postnatal gelişme sırasında ve hatta yetişkinlik döneminde artmaya devam etmektedir (Ojeda ve Urbanski, 1994). Postnatal gelişme sırasındaki Luteinizing Hormon (LH) ve Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) sekresyonunda tutarsızlıklar vardır. Bu durumun sebebi, LH'nın pulsatil bir şekilde salgılanmasından kaynaklanır. Öte yandan, erkek ratın ergenlik çağının FSH salınımında bir artış ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Serum FSH konsantrasyonu 30-40. günlerde maksimum seviyesine ulaşır (Krinke, 2000).

2.2.2. Spermatogenezis

Testislerde sperm üretim süreci spermatogenezis olarak adlandırılır. Kemiricilerdeki sperm, insanlar ve evcil hayvanlar da dahil olmak üzere diğer memeli türlerinden (Setchell, 1984) daha uzun olup, farede yaklaşık 150-200 µm uzunluğundadır. Ratlarda sperm başı diğer kemirgenlerde olduğu gibi kanca biçimindedir (Eddy ve O'Brien, 1994).

Rat spermatogenezisi hakkında önemli miktarda bilgi birikimi oluşturulmuştur (Russell ve ark., 1990; Kretser ve Kerr, 1995; Sharpe, 1994). Gelişimleri tamamlanan premordial germ hücreleri; sertoli hücreleri ve seminifer tubullerin bazal membranı tarafından sarılırlar. Erkek gonositleri, ergenlikten hemen önce, yani doğumdan yaklaşık 50 gün sonra aktif hale gelir. Bu aşamada bölünmeye başlarlar ve spermatogonialar oluşur ve hayvan sperm üretimini kaybedene kadar bölünmeye devam ederler.

Spermatogonia kabaca üç tipe ayrılır: Tip A, intermediate ve Tip B (Clermont, 1962; Sharpe, 1994). A tipi spermatogonia kendi içerisinde A0 tipi (kök hücreler olarak da bilinir) ve A1-A2-A3-A4 tipi olarak ikiye ayrılır. A0 tipi spermatogonia seminifer tubullerin bazal membranında bulunur ve ikiye bölünme yeteneğine sahiptir. Bu bölünme sonucu oluşan A1 tipi hücrelerden bir tanesi kök hücre olarak tabanda kalmaya devam ederken diğeri spermatogenezis sürecindeki bölünmelerine devam eder. Ratlarda, A1 spermatogonialar 6 mitoz bölünme yapar ve daha sonra primer spermatosit olur. Daha sonra primer spermatositler mayoz bölünme geçirir ve seminifer tübüldeki sertoli hücrelerinin adluminal bileşeninde sekonder spermatosit haline gelirler. Sekonder spermatositler bir mayoz daha geçirerek spermatid adını alırlar. Bu mayoz bölünmeler sonunda her spermatid akrozomal faza giren dört haploid spermatidden biri haline gelir ve akrozom oluşur. Ardından nükleer yoğunlaşma ve uzama safhası gelir. Bu safhayı sitoplazmik eliminasyon ve salınım evresi izler (Clermont, 1962; Sharpe, 1994).

Ratlarda spermatogenik siklusun seminifer tubullerde gerçekleşen 14 evresi tanımlanmıştır. Seminifer tubul segmental bir düzenlemeye sahiptir ve her tubulün her kesiti homojen bir aşamayı gösterir. Dört veya beş farklı nesil germ hücrelerinin senkronize edilmesini kontrol eder (Perey ve ark., 1961; Sharpe, 1994). Ratda bulunan

seminifer tubuller, bu segmental yapıyla iyi karakterize edilirken, insan ve diğler evcil hayvanlarda genellikle birkaç aşamalı mozaik desen gözlenir. Ratlarda, bu 14 kademedden oluşan döngünün tamamlanması 12 gün sürmektedir. Ratlarda spermatogoninin sperme dönüşüm süreci toplam 48 gün sürmektedir (Perey ve ark., 1961; Sharpe, 1994).

2.2.3 Spermatogenezisin hormonal kontrolü

Hipotalamustan salgılanan dekapeptid yapıdaki GnRH, hipofiz ön lobundan FSH ve LH salınımını sitümüle eder. LH intersitisyel hücrelerden androjen salınımını uyarır. Salgılanan bu androjenler kan yoluyla üreme sisteminin gelişmesine ve sekonder cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkmasına neden olur. Androjenler, hipotalamus ve hipofiz bezleri üzerine negatif feedback etki oluşturarak GnRH, FSH ve LH'nın salgılanmalarını baskılar. FSH ise sertoli hücreleri üzerinde bulunan reseptörler ile birleşerek androjen bağlayıcı protein (ABP) üretiminde, spermatogenezisin uyarılmasında, testosteronun dihidrotestosteron ile östrojene dönüşmesinde, spermiyasyonda ve inhibin salgılanmasında görev alır (Hafez, 2000).

İnhibin hormonu, yaptığı negatif feedback mekanizma ile hipofiz ön lobunu baskılayarak FSH salınımını kontrol altında tutar. Aynı mekanizma yoluyla testosteron, LH ve FSH salınımlarını kontrol eder. Prolaktin hormonu, testosteron hormonunun salınması sırasında Leydig hücreleri üzerinde bulunan LH reseptörlerini artırır (Sönmez, 2004).

FSH'ın spermatogenezis üzerindeki etkisi Sertoli hücreleri tarafından yönlendirilir. Peptid hormonları doğumdan sonraki 16-19 gün süresince oluşan kan-testis bariyerinden dolayı spermatositlere ve spermatidlere doğrudan erişemezler (Kretser ve Kerr, 1995). Buna karşı, testosteron kan testis bariyerini kolayca geçebilmektedir. Yetişkin ratlarda interstisyel sıvıdaki testosteron seviyesinin (50 ng / mL'den fazla) testiküler (yaklaşık 30 ng / mL) ve periferik venöz sıvıdan (10 ng/mL'dan düşük) daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Testosteronun testislerde spermatogenezis üzerine parakrin ya da otokrin etkisi olduğu tespit edilmiştir (Sharpe, 1994). Androjen varlığı; germ hücrelerinde bulunurken, reseptörler, Leydig hücrelerinde, peritübüler hücrelerde, Sertoli

hücrelerinde ve rat testisindeki çoğu arter kas tabakasında bulunur. Bu nedenle, spermatogenezis üzerine testosteron etkisinin ikincil sırada olduğu düşünülmektedir. Sertoli hücrelerinin rollerinden biri, ABP'in üretimidir. ABP gibi Sertoli hücrelerinden FSH'ya ve testosteron uyarısına tepki olarak salgılanan bazı faktörlerin spermatogeneziste rol oynayabileceği de ileri sürülmektedir (Sharpe, 1994).

2.3. Testosteron

Testosteron, LH uyarımı ile Leydig hücrelerinden sentezlenen steroid yapılı bir hormondur. Testosteronun erkeklerde spermatogenezis, sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişimi ve korunmasını içeren androjenik ve vücut gelişimini sağlayan anabolizan etkileri vardır (Knobil ve Neill, 1998).

Testosteron, C27 kolesterolden köken almaktadır. C27 kolesterol ilk olarak C21 steroidlerine ve sonunda testosteronun en yaygın formu olan C19 androjene dönüştüren birkaç steroidogenik hücre enzimi hareketi ile sentezlenir. Bu reaksiyon dizisi, testisin interfiztik bölmesinde barındırılan Leydig hücrelerinde gerçekleşir. Çoğu hayvan türünde Leydig hücreleri, testisin toplam hacminin <math>< 10\%</math>unu oluşturur. Bunun yanı sıra neredeyse tüm steroidler Leydig hücreleri tarafından sentezlenir. Leydig hücresindeki testosteron biyosentezi, ön hipofiz bezinden salgılanan bir glikoprotein olan LH ile düzenlenir. Bu düzenleme, Leydig hücrelerinde bulunan LH reseptörleri ile LH'nın etkileşimiyle sağlanır. LH'nın bu eylemine aracılık eden ikincil mesajcı olan siklik adenzin monofosfat (c-AMP) aracılık eder (Knobil ve Neill, 1998).

Steroid hormonların biyosentezi, çoğu türün adrenal, ovaryum, testis ve plasentasında spesifik sterodiogenik hücrelerde gerçekleşir. Daha düşük miktarlarda steroidler beyinde ve diğer periferik dokulardan sentezlenir. Beyin ve periferik dokulardan sentezlenen steroidler, özellikle de nöroaktif steroidlerin fonksiyonu henüz tam olarak tanımlanmamıştır. Steroidlerin hormonal rolleri organizmanın homeostazi için vazgeçilmezdir; adrenal mineralokortikoid, aldesteron, tuz dengesi, kan basıncı kontrolü, adrenal glukokortikoidler, kortizol, kortikosteron, karbonhidrat metabolizması, stres yönetiminde rol alırlar. Üreme fonksiyonu ovaryum steroidlerine, progesteron, östrojene ve testosterona bağımlıdır. Nitekim steroid hormonların düzgün

konsantrasyonları ve eylemleri olmaksızın, yaşam mümkün değildir. Tüm steroid hormonlar, tür veya dokudan bağımsız olarak, kolesterolden köken alır. Kolesterol, daha önce listelenen C21 veya C19 steroid hormonlarından birine belirli bir dizi reaksiyonda dönüştürülen C27 çoklu bağlanmış bileşiktir. Steroid hormon biyosentezi için kolesterol kaynağı türlerden türlere ve hatta organdan organa kadar değişebilir. Kolesterol, asetattan köken alır ve hücre içinde sentezlenir. Üç ana kaynaktan birinden gelir; hücrede depolanan kolesterol esterlerinin hidrolizinden, düşük yoğunluklu lipoprotein ve yüksek yoğunluklu lipoprotein kullanımından oluşmaktadır (Knobil ve Neill, 1998).

2.4. Prostat Biyolojisi

Prostat 20-50 lopçuktan oluşan tubulo-alveoler bir erkek eklenti bezidir. Prostatın ortasından urethra geçmektedir. Prostat, salgısını 20 kadar küçük kanalcık aracılığı ile buraya aktarır. Tek katlı prizmatik epitellerinde çekirdek, değişik yüzeylerde bulunur. İntersitisyumda düz kas hücreleri ve esnek teller bulunmaktadır. Salgı alveolleri değişik büyüklükte bulunmaktadır. Salgı hücreleri yapısında granül ve lipit içermektedir. Prostatın son kısımlarında asidofilik ve granül benzeri topluluklar gözlenir. Bunlar, prostat salgısının yoğunlaşp kireçleşmesi sonucunda oluşan prostat taşlarıdır. Salgı hücreleri, sitrik asit, kalsiyum, fosforik asit, asit fosfataz, bir çeşit pıhtılaşma enzimi ve fibrinolizin içeren koyu, süt görünümünde ve alkali özellikte bir sıvı salgılar. Özellikle fibrinolizin, dişi genital kanalda pıhtılaşmış spermayı sıvılaştırarak akıcı özellikte olmasını sağlar. Spermadaki asit fosfataz ve sitrik asit düzeyi, prostat işlevinin normal olup olmadığını gösterir. Prostat sıvısının türe özgü bir kokusu vardır, insanda kestane çiçeğinin kokusuna benzer. Spermanın kendine özgü kokusu genellikle bu sıvıdan kaynaklanmaktadır. Ejakülasyon sırasında prostat kapsül, düz kas demetleri, duktus deferensle eş zamanlı olarak kasılır. Bu sayede prostat bezinin süt görünümdeki sıvısı spermaya karışır. Prostat salgısının alkali özelliği ovumun döllelenmesinde çok önemlidir. Çünkü ductus deferens sıvısında spermlerin ortama saldıkları metabolik son ürün olan karbondioksit (CO₂), bu sıvının asit özellik kazanmasına neden olur. Bu da sperm hareketlerini sınırlar, yavaşlatır ve dölleme yeteneklerini azaltır. Bunun yanı sıra vagina salgısı da asidik bir karaktere sahiptir (pH: 3.5-5). Spermler bu asit ortamda uygun şekilde hareket edemezler. Bu nedenle, prostatın alkali özellikteki salgısı ortam pH'sının

asidik olmasını engeller. Alkali özellikteki prostat salgısı, çiftleşme sırasında artarak spermayı sulandırır, asit özellikte olan vagina ve diğer salgıları nötrleştirerek spermilerin içinde bulunduğu ortamı nötr ya da hafif alkali (pH 7-7.5) yapar (Yılmaz, 1999). Sperm, ortam pH değeri 6-6.5 ulaşana kadar optimal hareketliliğini gösteremez. Tüm bu sebeplerden dolayı, prostattan salgılanan sıvının, diğer eklenti bezlerinden salgılanan sıvıları ve ortam pH'sını nötrleştirmesi, hareket ve fertilizasyon yeteneğinin artması ile sonuçlanır (Guyton ve ark., 1996).

Prostat bezindeki büyüme ve regresyonun dolaşımdaki androjen varlığı veya yokluğuna bağlı olarak değişmektedir. Androjenlerin bu organ üzerinde etkisi prostatın büyümesinde merkezi bir rol oynar. Sık görülen bir enfeksiyon bölgesi olması, benign ve malign büyüme gözlenmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Bu hastalıkların önlenmesi, tanı ve tedavisi için, normal prostatın biyolojisinin anlaşılması önem taşımaktadır (Knobil ve Neill, 1998).

2.4.1. Prostat üzerine etki eden hormonlar

Androjenler

Prostat; büyüme, farklılaşma, yapısal ve işlevsel bütünlüğün korunması için androjene bağımlıdır. Testis androjenin ana kaynağıdır. Kastre edilmiş bir erkeğe androjen uygulamak, prostatik büyümeyi tekrar aktifleştirecektir. Prostat için tespit edilen en güçlü mitojenlerden biri 5 alfa-dihidrotestosterondur. Bu nedenle BPH'nin klinik tedavisinde prostatta 5 alfa-dihidrotestosteron düzeyini düşürmek için 5 alfa-redüktaz inhibitörleri kullanılmaktadır (Knobil ve Neill, 1998).

Testisin androjenik olmayan etkisi

Testisin prostat büyümesindeki rolünün onun androjen üretebilme yeteneğinden kaynaklandığıyla ilişkili genel bir kabul vardır. Güncel araştırmalar, testisin prostat büyümesini teşvik etmek için androjen ile birlikte çalışan, büyük olasılıkla doğada bulunan ve nonandrojenik bir madde ürettiği kavramını da desteklemektedir. Bu nonandrojenik testiküler faktör prostatın androjenin duyarlılığını arttırmak için prostatik büyümeyi doğrudan veya dolaylı olarak stimule edebilmektedir. Bu yapı, dolaşımdaki

androjen seviyesinin azaldığı göz önüne alındığında, yaşlanan erkeklerde devam eden prostatik büyümenin paradoksuna ilişkin olası bir açıklama sunmaktadır (Knobil ve Neill, 1998).

Östrojen

Prostatik büyümede östrojenin rolü önemlidir. Östrojen reseptörleri prostatik stromal hücrelerde tespit edilmiştir. Bu nedenle stromanın prostatik büyümede östrojenin hedefi olabileceği teorisi düşünülmektedir (Knobil ve Neill, 1998).

2.5. Benign Prostat Hiperplazi (BPH)

BPH, genellikle yaşlanmayla bağlı olarak gözlenen bir durumdur (Kandel ve ark., 1986). BPH üriner disfonksiyona sebebiyet veren hastalıklardan biri olarak uzun yıllardır bilinmektedir. Milattan önce 1500'lü yıllardan kalan Mısır papirüslerinde konusu geçmiş olup, papirüslerden 1000 yıl sonra da Hipokrat'ın yazılarında konuya dikkat çekilmiştir (Shapiro ve ark., 1992). 1960'lı yılların başından itibaren yapılan birçok araştırmaya rağmen, erkeklerde gözlenen prostat büyümesinin etiyojisi, fizyolojisi ve sebep-sonuç ilişkisi hakkında tam olarak kesin bir kanıya varılamamıştır (Shapiro ve ark., 1992).

2.5.1. Prostat Bezinin Fizyolojisi

Epitelyal hücreler ve bu hücrelerin yakın çevresindeki ultrastruktürel iskelet sistemi doku matriksi adını almaktadır. Bu yapının esas elemanları, membran matriksi, hücre iskeleti, nükleer matriks ve ekstrasellüler matrikstir. Bu yapılar arası bağlantı ve etkileşimler, prostatın gelişimi ve fonksiyonunda önemli rol oynamaktadır ve tüm bunlar günümüzde modern hücre biyolojisinin en çok araştırılan konularındandır. Salgısında sitrik asit (güçlü bir metal iyonu bağlayıcısı), spermin (alifatik poliamin), çinko, kolesterol, lipitler (prostatik antibakteriyel faktör), seminin (likefaksiyondan sorumlu proteaz enzim aktivitesine sahip olup diğer ismi prostate spesifik antijen), prostatitik asit fosfataz, leucine amino peptidaz, laktik dehidrogenaz, immunoglobulinler, C-3 kompleman, transferrin, prostate spesifik protein 94 ve Zn-alfa-2 glikoprotein bulunmaktadır. Bu organik molekül, element ve protein yapılı maddelerin biyolojik

fonksiyonları tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (Singaravelu ve ark., 2015; Coffey ve ark., 1992).

2.5.2. Hiperplazi

Bir organda hücre sayısı ve organ büyüklüğü, hücre çoğalması ve hücre ölümü arasındaki dengeye bağlıdır. Bir organda büyüme sadece hücre çoğalması ile olmaz, aynı zamanda hücre ölümünde azalma ile de olmaktadır. Deneysel modellerde yapılan çalışmalarda androjenler ve büyüme faktörlerinin hücre çoğalmasını uyardığı tespit edilmiştir. BPH'nin erken dönemlerinde hızlı bir hücre çoğalması olmasına rağmen, hastalık oluştuktan sonra bu çoğalmanın dengede kaldığı ya da azaldığı gözlenmiştir. Androjenler prostatta normal hücre çoğalması ve değişimi için gereklidir. Bunun yanı sıra aktif olarak hücre ölümünü inhibe etmektedirler (Juniewicz ve ark., 1994).

BPH bir “kök hücre” problemi gibi görülebilir. Tahminen normal prostatta uyuyan kök hücreler nadiren bölünür, fakat bölünme olduğunda da DNA sentez ve çoğalmasına gidişte ikinci tip geçici hücre çoğalma kapasitesinde bir artış yapar ve böylece prostattaki hücre sayısı korunur. Çoğalan hücreler son değişim safhasından geçip olgun hale geldiklerinde, programlanmış hücre ölümüne gitmeden önce belirli bir yaşam ömrüne sahiptirler. Yaşın ilerlemesi bu maturasyon sürecinde bir blok oluşturarak, son değişim safhasına ulaşan hücre sayısını azaltır ve böylece toplam ölüm oranını düşürür. İnsanlara gözlenen BPH'sine sahip bireylerde yapılan bir çalışmada, büyük prostatlarda hücresel duyarlılık markırı yüksek oranda bulunmuş ve bu hücrelerin birikiminin prostat büyümesi ile gelişiminde etiyolojik rol oynayabileceği düşünülmüştür. Hormonların kök hücre popülasyonu üzerindeki etkileri sadece ilerleyen yaşla ortaya çıkmaz, aynı zamanda embriyonik ve neonatal gelişimde de etkilidir (Isaacs ve Coffey, 1989). Prostat hacmi bezde bulunan potansiyel kök hücre sayısı ile orantılı olarak ifade edilebilir. Postnatal androjen etkisi ile oluşacak erken prostatik dokunun daha sonra gelişecek hormonal etkili prostatik büyümede önemli ölçüde etkisi vardır. Puberta ve yaşlanmadaki testiküler androjenlerin varlığı BPH gelişimi için gereklidir. Puberta önce kastre edilen erkeklerde ya da androjen yapım ve fonksiyonunu etkileyen genetik hastalığı olanlarda BPH gelişmemektedir. Androjen reseptörleri ve Prostatik Dihidrotestosteron (DHT) yaşlanma ile beraber yüksek kalırken, periferal testosteron

seviyesi düşmektedir. Prostatta nükleer membrana bağlı olan 5 alfa redüktaz enzimi, testosteronu dokulardaki esas androjen olan DHT'ya dönüştürür. Prostatik androjenin %90'ını oluşturan DHT, esas olarak testiküler androjenlerden köken alır. Adrenal androjenler prostatik androjenin %10'unu kapsamalarına rağmen, bu hormon kaynağının BPH etiolojisindeki rolü fazla değildir. Hücre içerisinde DHT ve testosteron aynı androjen reseptör proteinine bağlanır. Dihidrotestosteron, testosterondan daha güçlü bir androjen olduğundan dolayı androjen reseptörüne olan affinitesi daha yüksektir. Dihidrotestosteron androjen reseptörüne bağlandıktan sonra, bu reseptör kompleksi çekirdekdeki DNA bağlanma bölgesine tutunarak, androjen bağımlı transkripsiyonun artışına sebep olur ve protein sentezi stimüle edilir (McConnell, 1995). Normal prostatik gelişim ve sekretuar fizyoloji için androjenlerin önemli olmasına rağmen, testosteron ve de DHT yaşlı insan prostatında büyümeye neden olan direkt mitojenik etkiye sahip değildir. Prostat diğer androjen bağımlı organlardan farklı olarak yaşam boyu androjenlere cevap verebilme yeteneğini sahiptir. Örneğin peniste puberta tamamlandıktan sonra androjen reseptör salınımı çok düşük değerlere kadar azalır. Prostatik stromal ve epitel hücrelerin sofistike bir parakrin tipte bağlantıları bulunmaktadır. Stromal hücre sekresyon proteini, epitel hücre değişimini regüle etmektedir. Böylece BPH, normalde hücre çoğalmasını inhibe eden stromal komponentteki defekte bağlı olarak çoğalma için bir durdurma mekanizmasının kaybıyla oluşmaktadır. Bunların yanı sıra büyüme faktörleri ile steroid hormonlar arasındaki ilişki, hücre çoğalmasına karşı hücre ölümü arasındaki dengeyi değiştirerek BPH'ya neden olmaktadır. Bu konuda en etkili büyüme faktörünün, temel fibroblastik büyüme faktörü olduğu tespit edilmiştir (McConnell, 1995).

2.5.3. Benign prostat hiperplazisinin etiyopatogenezi

BPH, histopatolojik olarak, prostatın periürethral alanlarında artmış epitelyal elemanlar, bağ dokusu, vasküler yapılar ve hiperplaziye uğramış düz kas olarak tanımlanmaktadır. Yeni epitelyal bez oluşumu normalde fetal gelişim sırasında görüldüğünden dolayı, BPH'daki epitel formasyonunun artışı, Cunha ve ark., (1983) tarafından, stromal hücrelerin indüksiyonuyla, embriyonik yeniden uyanım teorisiyle izah edilmiştir. Bu konuda bir başka teori de programlı hücre ölümünün bozulması

nedeniyle dengenin hücre çoğalması yönünde artmasıdır (Isaacs ve Coffey, 1989). Androjenlerin ve growth faktörlerin prostatik büyümeyi stimüle ettikleri deneysel olarak bilinmekle olup prostatik büyümeyi sadece bu iki faktörle ilişkilendirmemek gerekmektedir. BPH'nin etyopatogenezinde rol oynayan faktörler aşağıda sıralanmıştır.

- Androjenler
- Androjen Reseptörü
- Dihidrotestosteron ve 5 α -Redüktaz
- Östrojenler
- Apoptozisin Regülasyonu
- Stromal-Epitelial Etkileşim
- Büyüme Faktörleri

2.6. Sperm DNA Hasarı

2.6.1. Sperm DNA'sındaki hasara neden olan faktörler

Spontan değişimler sonucu oluşan hasar

Yanlış eşleşme: DNA hasarının en önemli sebeplerinden biri DNA sentezi sırasında bazların yanlış eşleşmesinden kaynaklanmaktadır. Ökaryotlarda DNA replikasyonu sırasında normalde; Adenin (A)-Timin (T), Guanin (G)-Sitozin (C) baz eşleşmesi gerekirken, sağlıklı bireylerde yanlış baz eşleşmesi gözlenebilmektedir. Bunun yanı sıra, rekombinasyon ve onarım işlemleri esnasında da yanlış baz eşleşmeleri olabilmektedir (Sharma ve ark., 2004).

Bazların kimyasal yapısında meydana gelen değişimler: Bazların yapısal izomerlerinin oluşumu, bazdaki eşleşme özelliğini değiştirebilmektedir. Pürin ve pirimidin bazlarındaki azot atomları genel olarak -NH₂ formunda bulunurken, çeşitli durumlarda tautomerik formu olan -NH dönüşebilmektedirler. Sitozin ve Adenin, spontan bir şekilde deaminasyona uğramasından kaynaklı Urasil (U) ve Hipoksantine dönüşmektedirler. DNA yapısında U bulunması biyolojik olarak büyük önem teşkil etmektedir. Urasili uzaklaştırma kabiliyeti bulunmayan bazı *E.Coli* türlerinde mutasyon hızında artış ve G-C → A-T transisyonunun olduğu gözlenmiştir (Duncan, 1980). DNA

yapısındaki hipoksantin bulunması potansiyel bir mutajenik etki oluşturmaktadır. Replikasyon esnasında hipoksantin sitozin ile eşleşmekte ve A-T → G-C mutasyonuna sebebiyet vermektedir (Fernandez ve ark., 2003).

Baz kaybı: DNA yapısının temel iskeletini oluşturan pürin ve pirimidin bazları termal dayanıklılıklarından dolayı hidrolitik baz kaybına uğrar ve sonucunda pürin veya pirimidin bazlarından uzaklaştırılmış bölgeler açığa çıkar. Bu baz kayıpları replikasyonu etkileyebileceği gibi pürin veya pirimidin bazlarından uzaklaştırılmış bu bölgelerde fosfodiester bağının kolayca hidrolize uğramasından kaynaklı zincir kırıkları da oluşmaktadır (Fernandez ve ark., 2003).

Serbest radikaller: Serbest radikaller (SR) hücre yaralanması, hücresel solunum, bazı enzimatik reaksiyonlar ve fagositoz esnasında endojen olarak üretilebilmesinin dışında kanserojen maddeler, pestisitler, hava kirliliği ve iyonize radyasyon gibi çevresel faktör kaynaklı bir şekilde ekzojen olarak organizmada oluşmaktadır. SR, DNA da bulunan deoksiriboz fosfat iskeletinde deformasyona, pürin ve pirimidin bazlarında spesifik modifikasyona, tek veya çift zincir kırıklarına, abazik alanlara baz modifikasyonuna, DNA-protein çapraz bağ oluşumuna neden olmaktadır. Deoksiriboz iskeletinin oksidasyonu; baz salınımını ve DNA zincir kırıklarına sebep olurken, mutasyonlar; oksidatif baz modifikasyonu sonucu oluşmaktadır (Dinçer ve Akçay, 2000).

Bireysel farklılıklara bağlı meydana gelen DNA hasarları

Yaş: Yaşın ilerlemesiyle spermlerde meydana gelen DNA hasar boyutunun arttığı ve hasarlı hücrelerin ortadan kaldırılmasının zorlaştığı tespit edilmiştir (Narendra ve ark., 2003).

Hormonlar: Yapılan bir çalışma sonucu, testosteronun, spermatogenezis esnasında DNA kırılmasında ve bağlanmasında rol alan DNA topoizomera II enzimi ekspresyonunun pozitif düzenleyicisi olduğu tespit edilmiştir (Başar ve ark., 2005).

Genotoksik maddeler: Yapılan çalışmalar sonucu, akrilonitril, siklofosfamid, tamoksifen, akrilamid ve stiren gibi pek çok genotoksik etkiye sahip maddenin sperm yapısında bulunan DNA 'da hasara sebep olduğu ortaya çıkmıştır (Türk ve ark., 2006).

Seminal plazma: Yetersiz antioksidan bulunması durumunda spermelerin maruz kaldıkları oksidatif stres boyutunda artış gözlenir. Oksidatif strese maruz kalan sperm DNA'larında hasarın arttığı tespit edilmiştir (Türk ve ark., 2006).

Spermanın işlenmesi aşamalarında kullanılan tekniklere bağlı DNA hasarları

Spermanın sulandırılması: Konu hakkında yeterli bilgi olmaksızın, alabalık ve çipuralarda yapılan çalışmalarda 1:6 ve 1:20 oranında sulandırılan spermalarda sulandırma oranına bağlı olarak DNA hasar boyutunun yaklaşık %30'dan %40'a yükseldiği tespit edilmiştir (Cabrita ve ark., 2005).

Spermanın kısa süreli saklanması: Domuz spermasında yapılan çalışmalar ışığında, elde edilen verilerde farklı sıcaklık ortamlarında ve çeşitli sulandırıcılar kullanılarak kısa süreli bekletilen spermalarda DNA hasarı boyutunun ortam koşullarına ve süreye bağlı olarak olumsuz etkilendiği tespit edilmiştir (Boe-Hansen ve ark., 2005, Fraser ve Strzezek, 2003)

Reaktif oksijen moleküllerine maruz kalma: Reaktif oksijen türevlerinden olan hidrojen peroksitin kullanıldığı çalışmalarda DNA hasar boyutunu arttırdığı saptanmıştır. Bunun yanı sıra süperoksit dismutazın kullanıldığı çalışmalarda herhangi bir etki bulunamamıştır (Baumber ve ark., 2003).

Çevresel kökenli DNA hasarları

İyonize radyasyon: İyonize radyasyon (İR) DNA üzerindeki etkisini doğrudan veya dolaylı bir şekilde gösterebilmektedir. Radyasyonun enerjisinin doğrudan DNA ile etkileşmesi doğrudan etkiye sebep olurken, açığa çıkan enerji sonucu uyarılan moleküllerin DNA ile etkileşiminden kaynaklı hasar gözlenmektedir. İyonize radyasyondan etkilenen DNA'da zincir kırıkları ve baz hasarları meydana gelmektedir (Dinçer ve Akçay, 2000).

Ultraviyole ışınlar: Dalga boyu 240-400 nm aralığında bulunan ultraviyole (UV) ışınlar iki şekilde DNA hasarına sebep olmaktadır (Dinçer ve Akçay, 2000).

Alkilleyici maddeler: DNA yapısında bulunan nükleofilik merkezlere affinitesi olan alkilleyici maddeler bu alanlara saldırarak DNA alkilasyonuna sebep olurlar. Alkilasyon sonucu DNA yapısı bozularak hasar ortaya çıkmaktadır (Dinçer ve Akçay, 2000).

Çapraz bağlayıcılar: Mitomisin, nitröz asit, nitrojen mustard, kükürt mustard, bazı platinyum türevleri, diamino diklorid, fotoaktive olmuş psoralenler; DNA yapısında zincir içinde ve zincirler arasında çapraz bağ oluşmasına sebep olurlar. Çapraz bağların oluşması sonucunda zincirler ayrılmaz, replikasyon ve transkripsiyon durur (Fernandez ve ark., 2003).

2.6.2. DNA Hasarı Tespit Yöntemleri

Günümüz en çok kullanılan DNA hasarı tespit yöntemleri; tek hücre jel elektroforezi (Comet), Flow cytometric terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated fluorescein dUTP nick end labeling (Tunel), sperm chromatin structure assay (SCSA)' dir (Sharma ve ark., 2004). Bu yöntemler dışında sperm kromatin dispersiyon, enzyme linked immuno-sorbent assay (ELISA), elektron mikroskop, akridin oranj testi (AOT), in situ translasyon analizi, likit kromatografi ve fluorescence in situ hybridization (FISH) yöntemleride DNA hasar tespiti için tercih edilmektedir (Agarwal ve Said, 2003; Fernandez ve ark., 2003; Floyd ve ark., 1986). Bu yöntemler dışında DNA yapısının belirlenmesinde, gimsa CMA3, metil yeşil ve anilin mavi gibi boyama metotlarıda da bulunmaktadır (Esterhuizen ve ark., 2000).

COMET (Tek Hücre Jel Elektroforezi)

COMET, labil bölgeler ve DNA tamir mekanizmasında ki bozukluklardan dolayı oluşan DNA daki zincir kırıklarının boyutunun tespitinde kullanılan DNA hasar tespit yöntemlerindendir (Aravindan ve ark., 1997). DNA hasar boyutunun hesaplanmasında tercih edilmesinin başlıca sebepleri; yüksek duyarlılığının bulunması, farklı birçok ökaryotik hücre çeştinde kullanılabilir olması, çalışma için az sayıda hücrenin yeterli

olması gibi avantajlarından kaynaklanmaktadır. Bunun yanı sıra sıcaklık, süre ve ışık gibi etkenler hasar boyutunu arttırabileceğinden çalışma ortamının soğuk ve karanlık olması tercih edilmelidir (Abdulkerim ve ark., 2004). DNA'ya bağlanan boya sonucu ortaya çıkan kuyruklu yıldız benzeri yapılar incelenir. Kuyruk uzunluğu ve nükleus çaplarına göre derecelendirilir. DNA yapısındaki çift zincir kırıkları baş kısmında toplanırken, çift ve tek zincir kırıkları COMET'in kuyruk kısmında toplanarak uzama gösterirler (Sakkas ve ark., 2002).

COMET yöntemi; uygulamanın maliyetinin düşük olması, hassas ve hasar oranının tespitindeki güvenilirlik comet yöntemini daha kullanılabilir kılmaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar baz alındığında SCSA ve TUNEL yöntemlerine göre sperm DNA hasarı tespitinde daha duyarlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (Morris ve ark., 2002; Donnelly ve ark., 2000).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulun'un 05/05/2016 tarihli 2016/04 kararı ile yapılmıştır.

Çalışmada 18 adet Albino Wistar Rat kullanıldı. Ratlar rastgele 3 gruba ayrıldı. Sperma, sakrifiye edilen ratların epididimislerinden punksiyonla elde edildi. Alınan spermaların mikroskobik muayenesi ısıtma tablalı faz-kontrast mikroskop ile yapıldı. Sperm DNA hasarı tespiti için COMET yöntemi uygulandı.

Bu çalışmada deney grubu olarak rat tercih etmemizin nedeni; ratların diğer hayvan türlerine kıyasla sperm DNA hasarına daha dayanıklı olmalarıdır (delBarco-Trillo ve ark. (2017).

3.2. Grupların Oluşturulması

1. Grup (n=6): Kontrol grubu. Ratlar üzerinde hiçbir uygulama yapılmadı. Çalışmada prostat bezleri ayrıldı, spermanın mikroskobik muayenesi yapıldı ve spermelerde DNA hasarına bakıldı.

2. Grup (n=6): 30 gün süreyle 3 mg/kg dozunda İM olarak testosteron propionat uygulandı. Uygulama sonunda prostat bezleri ayrıldı, spermanın mikroskobik muayenesi yapıldı ve spermelerde DNA hasarı bakıldı.

3. Grup (n=6): 30 gün süreyle 5 mg/kg dozunda İM olarak testosteron propionat uygulandı. Uygulama sonunda prostat bezleri ayrıldı, spermanın mikroskobik muayenesi yapıldı ve spermelerde DNA hasarı bakıldı.

3.3. Yöntem

3.3.1. Spermatolojik Muayeneler

Motilite muayenesi: Spermanın epididimis punksiyonu yapıldıktan hemen sonra, 38°C'ye ayarlanmış ısıtma tablası üzerindeki lam üzerine alındı. Lamel 45° 'lik

bir açıyla bırakıldı ve mikroskopun x40'lık büyütmesinde (% olarak) motiliteleri tespit edildi (Hafez, 2000).

Yoğunluk muayenesi: Epididimis punksiyonundan sonra içerisinde 0.5 ml hayem solüsyonu bulunan ependorflara, 0.1 ml olacak şekilde sperma örnekleri eklenerek homojenizasyon sağlandı. Thoma lamında sayımı yapıldı (Hafez, 2000).

Anormal spermatazoon oranı: Epididimis punksiyonu ile elde edilen sperma 0.5 ml Hancock solüsyonu konulan ependorflara alındı ve x40'lık büyütmede en az 400 sperm incelenerek baş, boyun ve kuyruk anomalilerine göre sınıflandırılarak oran belirlendi (Hafez, 2000).

3.3.2. Sperm DNA Hasarının Tespiti

Sperm DNA hasarının tespitinde Comet Assay yöntemi kullanıldı. Bu yöntem, genotoksisite testlerinden biri olup ve son yıllarda kullanımı artan, tek hücre elektroforezini ayrıntılı olarak açıklamaktadır. Hücre örneği olarak sperm kullanıldı. Comet testi olarak isimlendirilmesinin nedeni, hasarlı DNA'ların hasar büyüklüğüne göre yürümesi ve boyama sonunda mikroskop altında incelendiğinde hasarlı kısmın kuyruklu yıldız şeklinde görüntülenmesidir.

Comet Assay'de Kullanılan Malzemeler

1. Elektroforez Tankı: Midi olarak sınıflandırılan ve orta kısmı yani tray'in yerleştiği yerin geniş olduğu elektroforez tankları tercih edildi.
2. Etüv veya su banyosu
3. Floresan mikroskop
4. Erlen, beher (250, 500 ml'lik)
5. Metal tepsi
6. Şale
7. Lam ve lamel.
8. Ependorf tüpler
9. NMA (Normal Melting Agarose): Standart erime sıcaklığına sahip agaroz. Bu tip agarozları yatay elektroforezlerde DNA ve RNA yürütürken kullanıldı.

10. LMA (Low Melting Agarose): Erime sıcaklığı normal erime sıcaklığına sahip agarozla göre düşük olan agarozdur.

Solüsyonların Hazırlanması

- **10x TBE hazırlanması**

Tris : 81gr

Borik Asit :41 gr

EDTA (0.5M) :30ml (0.5M EDTA: 18.61gr EDTA+ 2gr NaOH + 80 ml dH₂O)

Toplam 750ml'ye tamamlandı.

TBE olarak nötral TBE (pH=7) kullanılır.

- **Lizing Stok Solüsyonu hazırlanması**

NaCl : 146.1 gr

EDTA : 37.2 gr

Tris : 1.2 gr

Yukarıda belirtilen maddeler hazırlandı ve 1000 ml'lik mezür içerisine alındı ve üzerine 10gr NaOH eklendi. Solüsyonun pH değeri 10 olacak şekilde ayarlandı. Solüsyon +4°C'de muhafaza edildi.

- **Lizing solüsyonu**

Her çalışma öncesinde taze olarak hazırlandı.

Lizing solüsyonu Lizing stok solüsyon : 99 ml

Triton X : 1 ml

Na lauril sarkosinat : 1 gr

DTT (65 ml için) : 0.09 gr

Çalışma öncesinde bu solüsyon hazırlanıp +4°C'de muhafaza edildi.

Hazırlarken DTT hariç tüm solüsyonlar eklendi ve karıştırıldı. Bu solüsyon daha sonra şaleye aktarıldı.

Solüsyon hazırlandıktan sonra 0,09 gr DTT şaleye doğrudan eklendi. Mikropipet yardımıyla çözünmesi sağlandı. Solüsyon içerisinde Triton-X bulunduğundan solüsyon köpürme ihtimaline karşı ve DTT'nin çözüldüğünden emin olmak için bu karıştırma işlemi 5 dakika süresince yapıldı.

Steril PBS: pH değeri 7 olacak şekilde hazır tabletlerden hazırlandı.

Çalışma öncesi kullanılacak lamların NMA ile kaplanması: Bu işlemde öncelikle %1'lik NMA hazırlandı. Bunun için; 1gr NMA tartıldı. 100 ml steril PBS içerisinde mikrodalga içerisinde eritildi ve eritilen NMA 100 ml'lik bir şale içerisine boşaltıldı, sıvı halde ve sıcak olan NMA 60-70 °C'ye kadar soğutuldu. Ardından, daha önce hazırlanan temiz lamlar şale içerisine daldırıldı ve kurutuldu. Bu şekilde lamlar NMA ile kaplandı.

Çalışma sistemiği: COMET testinin güvenilirliği açısından karanlık bir ortama ihtiyaç duyulur.

Öncelikle lizing solüsyonu hazırlanıp +4°C'de soğutuldu.

- 1 XTBE hazırlandı ve +4 °C'ye soğutuldu.

- +4°C'te bulunan LMA önceden çıkartıldı ve 37 °C'de,

- NMA kaplı lamlar çalışma öncesinden çıkarılıp bekletildi.

- İnce metal tepsi soğuk buz akülerinin üzerine düzgün olarak yerleştirilerek soğutuldu.

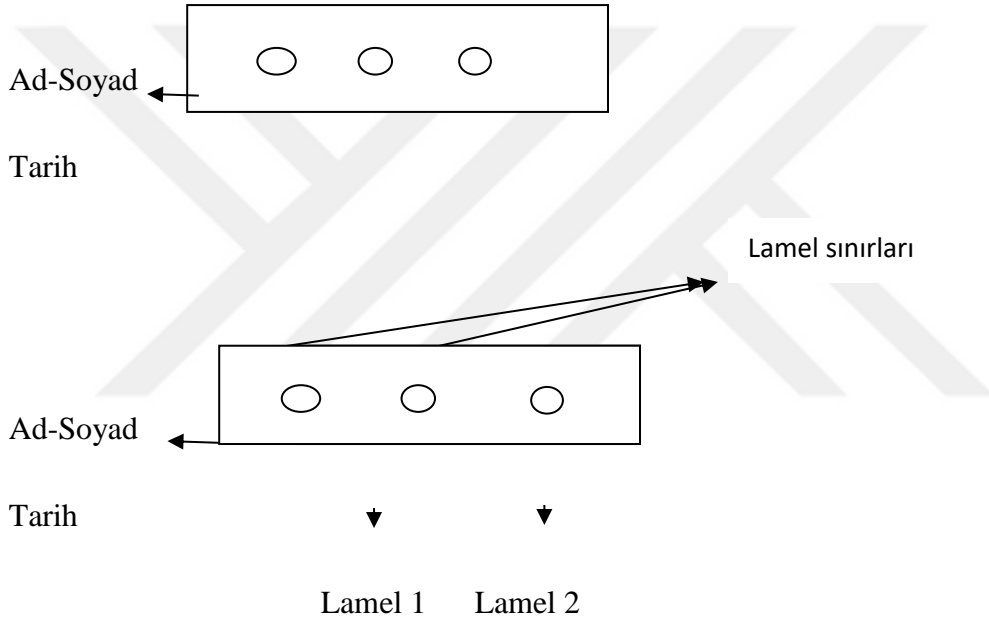
1. Sperma 1200rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısım atıldı.

2. Örneğin üzerine 1ml PBS eklendi ve yavaşça karıştırıldı.

3. Bu esnada 37 °C'ye getirilen LMA, su banyosu içerisine yerleştirildi.

4. Örnekten mikropipet yardımıyla her bir NMA ile kaplı preparat başına 100.000 hücre olacak şekilde hücre alınıp, bir ependorf tüpünde su banyosundaki LMA ile karıştırıldı.

5. Bu karışımı oda sıcaklığında bekleyen lamaların üzerine mikropipet ile 3 damla eklenerek homojen bir şekilde yayıldı.
6. Bu damlaların üzeri lamel ile kapatılıp damlaların homojen bir şekilde yayılması sağlandı.
7. Lameller kapatıldıktan sonra, daha önceden buz (veya akü) üzerinde bekletilen tepsi üzerine lamalar dizilerek 20-25 dakika donmaları beklendi. Daha sonra lameller kaydırılarak alındı, agarozun kalkmamasına dikkat edildi.



8. Lameller kaldırıldıktan sonra preparatlar önceden hazırlanıp +4' te şale içerisinde bekleyen lizing solüsyonuna bırakıldı, +4 °C'de 1 saat beklendi.
9. Solüsyona 1 saat sonunda 15 µl Proteinaz K eklenip solüsyon birkaç kez yavaşça karıştırıldı. 37°C' de 2 saat inkübe edildi.
10. İnkübasyon süresi tamamlanan preparatlar elektroforez tankına yerleştirilip üzerine soğuk TBE solüsyonu eklendi. TBE seviyesi lamaların üzerini 3-5 mm geçecek biçimde ayarlanıp etrafı ışık almayacak biçimde siyah bir naylon ile örtüldü. Tankın üzerine ve kenarlarına soğuk aküleri koyarak TBE'in soğuk kalması sağlandı.

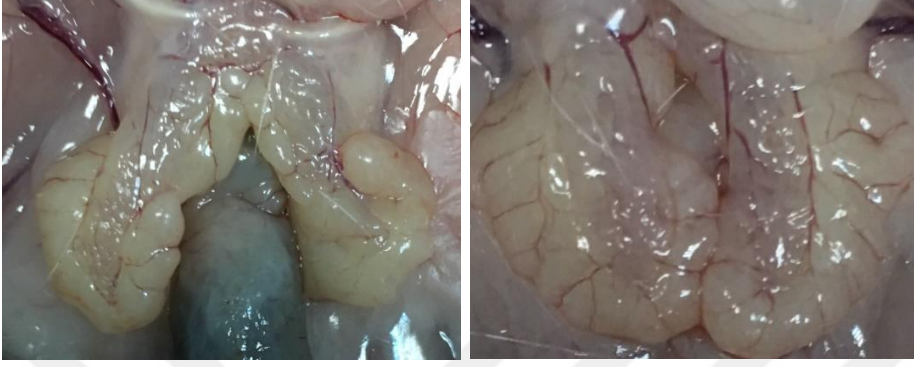
11. Lamlar soğuk 1XTBE' de 20 dakika bekletildi.
12. Bekleme işlemi tamamlandıktan sonra tankın üstü açılmadan elektroforezi 25 dakika 26V' da yürütüldü. Yürütme aşaması bitince preparatlar tanktan alınıp oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Daha sonra +4 °C'te bulunan preparat kutusuna yerleştirildi.
13. Preparat kutusunda +4 °C'de bulunan lamlar, 8µg/ml konsantrasyonunda EtBr her preparatta 50µl EtBr 3 damla olacak şekilde boyanıp üzerleri lamel ile kapatıldı.
14. Floresan mikroskop altında her gruptan 2000 sperm homojen olacak şekilde sayıldı.
15. Değerlendirme; Sıfır (0) değeri hasarsız hücreyi, Bir (1) değeri az hasarlı hücreyi, iki (2) değeri hasarlı hücreyi, üç (3) değeri orta hasarlı ve dört (4) değeri çok hasarlı hücreyi temsil edecek şekilde yapıldı (Anderson ve Dhavan, 2016).

3.4. İstatistiksel Analiz

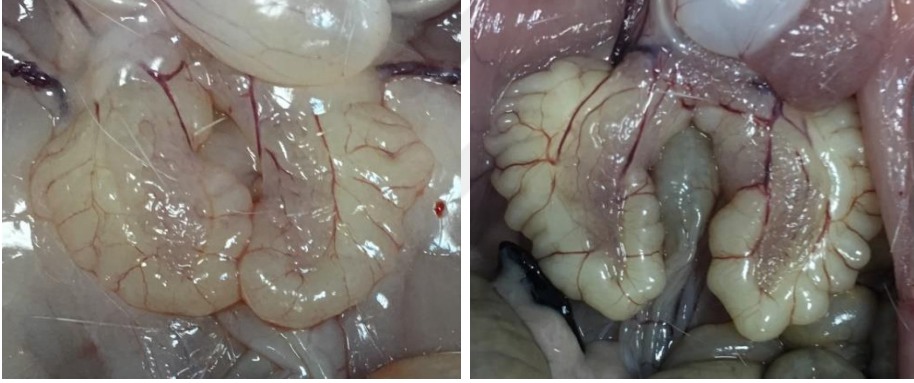
Elde edilen tüm değişkenler önemlilik testlerine geçilmeden önce normallik yönünden Shapiro-Wilk ve varyansların homojenliği yönünden Levene testi ile incelendi. Değişkenler arası farklılığın istatistiksel açıdan kontrolü Kruskal Wallis testi ile yapıldı. Gruplar arası farklılığın anlamlı çıktığı değişkenler için ileri aşama testi olarak Mann-Whitney U testi'nden yararlanıldı. Tüm istatistiksel analizler minimum %5 hata payı ile incelendi. Bu süreçte SPSS 14.01 (IBM Corporation) paket programından yararlanıldı.

4. BULGULAR

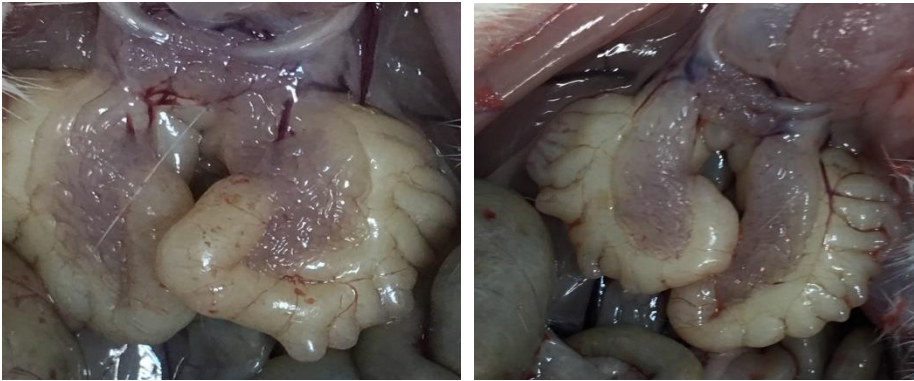
4.1. Makroskobik Bulgular



Şekil 1. Kontrol grubu prostat görüntüsü.



Şekil 2. 3 mg/kg doz grubu prostat görüntüsü.



Şekil 3. 5 mg/kg doz grubu prostat görüntüsü.

4.2. Mikroskopik Bulgular

Tablo 1. Yüzdellik hasar.

Hasar derecesi	Yüzdellik Hesaplama					Toplam Sayılan hücre	Toplam Hasarlı hücre	DNA Hasar Oranı (%)
	0	1	2	3	4			
Kontrol	2084	58	18	6	2	2168	84	3.87454
3 mg/kg	2063	120	38	28	27	2276	213	9.35852
5 mg/kg	1749	185	48	44	38	2064	315	15.2616

Tablo 2. Yüzdellik hasar istatistik verileri.

	Kontrol (n,%)	3 mg (n,%)	5 mg (n,%)	Toplam	p
Hasarlı	84 (13.7)	213 (34.8)	315 (51.5)	612 (9.4)	<0.001
Hasarsız	2084 (35.3)	2063 (35.0)	1749 (29.7)	5896 (90.6)	
Toplam	2168 (33.3)	2276 (35.0)	2064 (31.7)	6508 (100)	

Kontrol grubu, 3mg/kg ve 5 mg/kg doz grupları sperm DNA hasar yüzdeleri kıkare analizi ile karşılaştırılmış ve sperm DNA hasar yüzdeleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Kıkare analizi ile yapılan ikili grup karşılaştırmaları sonucunda gruplar arasında farkların yine $p<0.001$ düzeyinde anlamlı olduğu gözlenmiştir.

Tablo 3. Arbitrary unit.

	Arbitrary Unit					Toplam	Yalnızca 2,3,4	DNA Hasar Oranı (%)
	0	1	2	3	4			
Kontrol	2084	58	18	6	2	2168	26	1.199262
3 mg/kg	2063	120	38	28	27	2276	93	4.086116
5 mg/kg	1749	185	48	44	38	2064	130	6.29845

Tablo 4. Arbitrary unit istatistik verileri.

	Kontrol (n,%)	3 mg (n,%)	5 mg (n,%)	Toplam	p
Hasarlı	26 (10.4)	93 (37.3)	130 (52.2)	249 (3.8)	<0.001
Hasarsız	2142 (34.2)	2183 (34.9)	1934 (30.9)	6259 (96.2)	
Toplam	2168 (33.3)	2276 (30.9)	2064 (31.7)	6508 (100)	

Kontrol grubu, 3mg/kg ve 5 mg/kg doz grupları sperm DNA hasar oranları arbitrary unite göre değerlendirilmiş, kikare analizi ile karşılaştırılmış ve sperm DNA hasar oranlarında arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Kikare analizi ile yapılan ikili grup karşılaştırmaları sonucunda gruplar arasında farkların yine $p<0.001$ düzeyinde anlamlı olduğu gözlenmiştir.

Tablo 5. Genetik hasar indeksi.

Genetik hasar indeksi						Toplam	Katsayı çarpımı	Hasar oranı (%)
	0	1	2	3	4			
Kontrol	2084	58	18	6	2	2168	120	5.5351
3 mg/kg	2063	120	38	28	27	2276	388	17.0475
5 mg/kg	1749	185	48	44	38	2064	565	27.374

Tablo 6. Genetik hasar indeksi istatistik verileri.

	Kontrol (n,%)	3 mg (n,%)	5 mg (n,%)	Toplam	p
Hasarlı	120 (11.2)	388 (36.2)	565 (52.7)	1073 (16.7)	<0.001
Hasarsız	1964 (36.7)	1888 (35.3)	1499 (28)	5351 (83.3)	
Toplam	2084 (32.4)	2276 (35.4)	2064 (32.1)	6424 (100)	

Kontrol grubu, 3mg/kg ve 5 mg/kg doz grupları sperm DNA hasar oranları Genetik hasar indeksine (Ghi) göre değerlendirilmiş, kikare analizi ile karşılaştırılmış ve sperm DNA hasar oranlarında arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.001$). Kikare analizi ile yapılan ikili grup karşılaştırmaları sonucunda gruplar arasında farkların yine $p<0.001$ düzeyinde anlamlı olduğu gözlenmiştir.

Tablo 7. Motilite muayenesi.

Hayvan No	Kontrol	3 mg/kg	5 mg/kg
1	80	70	40
2	80	60	70
3	90	70	60
4	80	80	20
5	90	60	20
6	80	60	80

Tablo 8. Motilite muayenesi istatistik verileri.

Grup	N	Arit. Ort.	Std. Hata	Std. Sapma	Medyan	P	Harf
Kontrol	6	83.33	2.11	5.16	80.00	0.006	a
3 mg	6	66.67	3.33	8.16	65.00		b
5 mg	6	48.33	10.46	25.63	50.00		b

Kontrol grubu, 3mg/kg ve 5 mg/kg doz grupları arasında motilite oranları kıkare analizi ile karşılaştırılmış istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Tablo 9. Yoğunluk.

Hayvan No	Kontrol	3 mg/kg	5 mg/kg
1	3.15×10^9	4.37×10^9	1.99×10^9
2	1.53×10^9	2.66×10^9	2.45×10^9
3	2.69×10^9	1.61×10^9	4.17×10^9
4	2.13×10^9	4.02×10^9	3.34×10^9
5	2.42×10^9	2.01×10^9	2.88×10^9
6	2.28×10^9	2.84×10^9	2.08×10^9

Tablo 10. Yoğunluk istatistik verileri.

Grup	N	Arit. Ort.	Std. Hata	Std. Sapma	Medyan	P
Kontrol	6	2.37	0.22	0.54	2.35	0.645
3 mg	6	2.92	0.44	1.09	2.75	
5 mg	6	2.82	0.34	0.83	2.67	

Kontrol grubu, 3mg/kg ve 5 mg/kg doz grupları arasında sperm yoğunlukları kikare analizi ile karşılaştırılmış istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Tablo 11. Anormal sperm oranı.

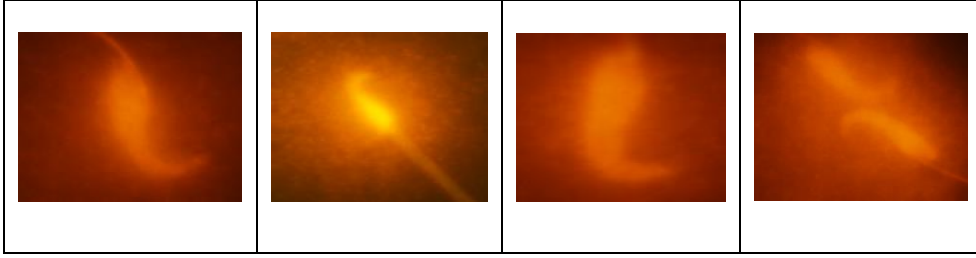
Hayvan No	Kontrol	3 mg/kg	5 mg/kg
1	20	31	73
2	25	42	63
3	23	46	72
4	22	49	54
5	26	54	81
6	23	60	62

Tablo 12. Anormal spermatazoa oranı istatistik verileri.

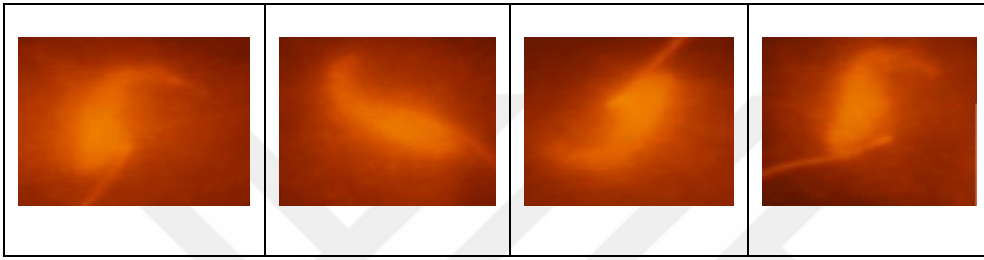
Grup	N	Arit. Ort.	Std. Hata	Std. Sapma	Medyan	p	Harf
Kontrol	6	5.79	0.22	0.53	5.75	0.001	c
3 mg	6	11.75	1.02	2.51	11.88		b
5 mg	6	16.96	1.01	2.47	17.00		a

Kontrol grubu, 3mg/kg ve 5 mg/kg doz grupları arasında anormal spermatazoa oranları kıkare analizi ile karşılaştırılmış istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

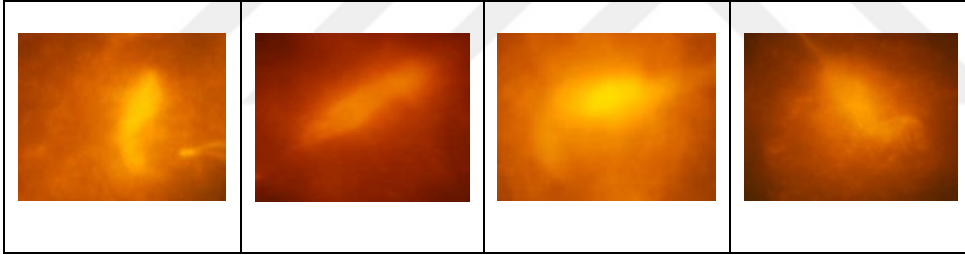
Sperm DNA Hasar Boyutları



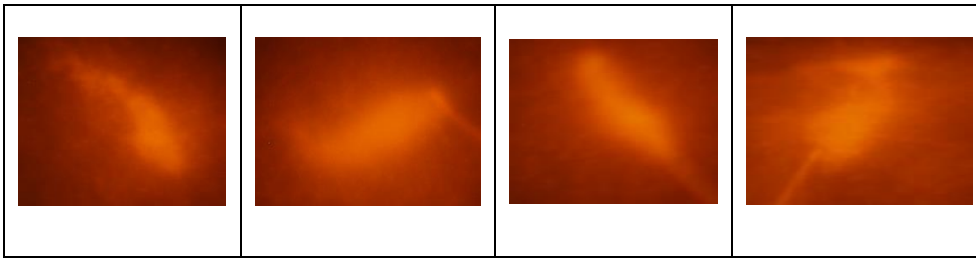
Şekil 4. Sperm DNA hasarı 0 (hasarsız).



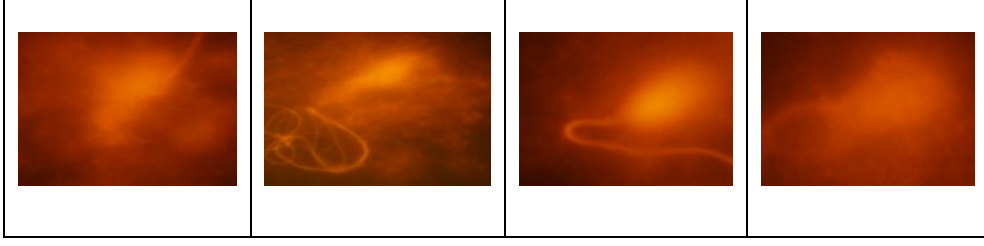
Şekil 5. Sperm DNA hasarı 1 (az hasarlı).



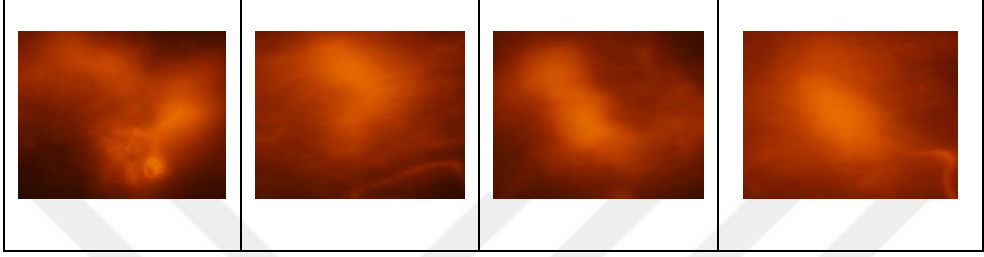
Şekil 6. Sperm DNA hasarı 2 (hasarlı).



Şekil 7. Sperm DNA hasarı 3 (orta hasarlı).



Şekil 8. Sperm DNA hasarı 4 (çok hasarlı).



Şekil 9. Sperm DNA hasarı 4 (çok hasarlı).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemirgen prostatında BPH modeli oluşturmak için değişik ajanlar kullanılmaktadır. Bu ajanlar arasında en sık kullanılanı testosteron propionattır (Hieble, 2011). Bu nedenle bu tez çalışması kapsamında da BPH modeli için testosteron propionat seçilmiştir.

Pourmarin ve ark. (1998) tarafından yapılan bir çalışmada, Sprague-Dawley cinsi ratlarda BPH oluşturmak için testosteron propionatın 3mg/kg dozda 15 gün boyunca kullanıldığı bildirilmiştir. Aşırı aktif mesane sendromunda oksibütinin etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada ise Sprague-Dawley cinsi ratlarda testosteron propionatın 3 mg/kg dozda kullanılması ile prostat hipertrofisi oluşturulduğu belirtilmiştir (Julia ve ark., 2006). Wistar cinsi ratlarda testosteron propionat (3 mg/kg, 4 hafta) ile oluşturulan BPH modelinde ise oral kateksin tedavisinin antihiperplastik etkisi değerlendirilmiştir (Cho ve ark., 2007). Banerjee ve ark. (1994), Brown Norvay cinsi ratlarda prostatın androjene yaşa ve loba spesifik olarak yanıtını değerlendirmişlerdir. Androjen olarak testosteron ile doldurulmuş ve subkutan olarak implante edilmiş silikon tüpleri kullanmışlardır. Holtzman cinsi 3 aylık 42 adet ratda prostat hiperplazisi oluşturmak için 25 mg dozunda testosteron enanthate kullanılmıştır (Gonzales ve ark., 2007). Gonzales ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada testosteronun prostat üzerindeki etkisini sadece ağırlık artışı ile değerlendirmişlerdir. Yaptığımız bu tez çalışmasında ise testostereone propionat 3mg/kg ve 5mg/kg dozunda 30 gün süreyle uygulanmıştır. Çalışma sonunda yapılan makroskopik incelemede doza bağlı olarak prostat hacminde artış tespit edilmiştir. Bu bulgu Pourmarin ve ark. (1998), Cho ve ark., (2007), Banerjee ve ark. (1994), Gonzales ve ark. (2007)'nin çalışmalarıyla benzerlik göstermektedir.

Katz ve ark. (1989) yaptıkları bir çalışmada 350-375 g ağırlığındaki Sprague-Dawley cinsi ratlarda prostat büyümesinde erken faz androjen uyarısı esnasındaki gen aktiviteleri değerlendirilmiştir. Araştırmacılar deneyin başlangıcında tüm ratları cerrahi yolla kastre etmişler, kastrasyon sonrası ventral prostat lobunda regresyonun meydana gelmesi için 7 gün beklemişlerdir. Bu 7 gün boyunca testosteron propionat 2 mg/kg dozunda 12 saat aralıklarla uygulanmıştır. Bu çalışmada testosteronun prostat üzerine

etkileri genetik düzeyde değerlendirilmiştir (Katz ve ark., 1989). Yaptığımız tez çalışmasında da Wistar albino cinsi ratlara sadece testosteron propionat 3 mg/kg ve 5 mg/kg düzeyinde kullanılmış ve sonucunda prostat hiperplazisine bağlı sperm DNA hasarı gerçekleştirmiştir. Bu sonuçlar Katz ve ark.(1989)'nın çalışma sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir.

BPH gelişiminin altında yatan moleküler mekanizmayı araştırmak için Kim ve ark.(2009) tekrarlayan fenilefrin uygulamaları ile Wistar cinsi ratlarda kronik α -1 adrenerjik stimülasyonu yaparak rat prostatında insan BPH'ına benzer histomorfolojik değişiklikler oluşturmuşlardır. Fenilefrin 0 mg/kg, 1 mg/kg, 5 mg/kg veya 10 mg/kg gün dozunda 4, 7, 14 veya 28 gün uygulanmıştır. Bunun sonucunda makroskopik olarak prostat hiperplazisi şekillendiğini belirlemişlerdir (Kim ve ark. 2009). Yapılan bu çalışmada da, testosteron propionat 3mg/kg ve 5mg/kg dozunda 30 gün süreyle uygulanmış ve çalışma sonunda yapılan mikroskopik incelemede doza bağlı olarak prostat hacminde artış tespit edilmiştir. Yapılan bu tez çalışmasıyla Kim ve ark.(2009)'nın yaptığı çalışmadaki sonuçlara benzer sonuçlar alınmıştır. Her iki çalışmada da BPH olduğu bu açıdan fenilefrin ile testosteron propionatın benzer etkiler oluşturduğu gözlenmiştir.

Çalışma süresince gözlem altında olan hayvanlarda ilk iki hafta sürecinde agresif davranışlar, libido ve ağırlık artışı gözlenmiş fakat son haftaya girildiğinde hayvanlarda durgunluk dikkat çekecek boyutlarda arttığı tespit edilmiştir.

Günümüzde sperm DNA hasarı tespitinde kullanılan birçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler; Anilin Mavi boyaması, AOT, COMET, SCSA, Toulın Mavi boyaması, TUNEL olarak sıralanmaktadır. Yöntemler karşılaştırıldığında aralarındaki farklılıklar; çalışma prensibi, yöntem ve avantajları göz önüne alındığında COMET yöntemi tercih edilmiştir. Ayrıca COMET hem çift zincir kırıkları hem de tek zincir kırıklarını tespit edebilmesi, özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmaması ve duyarlılığı diğer test yöntemlerine kıyasla daha yüksek olmasından dolayı bu çalışmada tercih edilmiştir.

COMET yönteminin ortam pH'sına bağlı olarak Alkali ve Nötral COMET olmak üzere iki farklı türü bulunmaktadır. İki yöntem karşılaştırıldığında çalışma materyalinin sperm olmasından dolayı ortam pH'sı büyük bir önem arz etmektedir. Alkali ortamda spermler daha çok denatüre olacağından DNA hasarı artacaktır. Çalışmada kullanılan spermlerin ortam koşullarından olumsuz etkilenecek verilerde negatif bir etki oluşturmaması açısından Nötral COMET uygulaması yapılmıştır (Fairbairn ve ark., 1995; Simoniello ve ark., 2009).

Sarıözkan ve ark. (2012), tavşan spermasında yaptıkları çalışmada 15°C'de muhafaza edilen spermanın, sperm motilitesini artırdığı, DNA hasarlarını azalttığı yönünde önemli tespitlerde bulunmuşlar, muhafaza sıcaklığının; motilite, DNA yapıları ve sperm membranının protein-lipit kompleksini dengelemek için önemli faktörlerden biri olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışmada bu faktörler göz önüne alınarak verimli sonuçlar elde etmek amacıyla ortam sıcaklığı 20°C olan karanlık bir ortam tercih edilmiştir. Bu tez çalışmasında uygulanan ortam koşulları ile Sarıözkan ve ark.(2012)'nin uyguladığı ortam koşulları benzerlik göstermektedir.

Sperm DNA hasarı Aitken ve de Iuliis (2010), tarafından iki temel nedene dayandırılmıştır. Bu nedenlerden birincisi; spermiyogenezis kusurudur. Bu kusur nükleohistonlarında fazla kromatin varlığı, anormal protaminasyon, yüksek seviyede doymamış yağ asidi içerirler germinal epitelden premature olarak salınan disfonksiyonel hücrelerden kaynaklanmaktadır. Bu disfonksiyonel sperm hücrelerinin zona pellusidaya bağlanma kapasiteleri düşüktür. İkinci neden ise oksidatif strestir. Bir ROS olan hidrojen peroksit (H₂O₂)'in mitokondriler tarafından salınması sonucu DNA hasarı olduğu gözlenmektedir (Aitken ve de Iuliis, 2010).

Zilli ve ark. (2003), yapmış oldukları çalışmada, kryoprotektan olarak kullandıkları BSA ve Me₂SO'ı levrek balığı spermasına eklemişlerdir. Natif sperma örneklerinde COMET yöntemi ile yapılan DNA hasarı tespitinde hasar oranı %32.7 iken, kryoprotektan kullanıp dondurulup çözündürülen örneklerde bu oranı %38.2 olarak tespit etmişlerdir. Mohammed ve ark. (2005), aldıkları sperma örneklerine H₂O₂ ekleyerek COMET yöntemi ile sperm DNA hasarına baktıklarında, hasar oranının %55.45 ten %72.15'e çıktığını tespit etmişlerdir. Richard ve Scott (2003), yapmış

oldukları çalışmada temiz alanlardan ve marina yakınlarından almış oldukları Mavi Midyelerde (*M. edulis*) COMET yöntemi ile spermatolojik parametrelere ve sperm DNA hasarına bakmışlardır. Bünyesinde Bakır (Cu) ve H₂O₂ konsantrasyonu yüksek olan midyelerde sperm DNA hasarının arttığını tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada kullanılan testosteron propionat sperm DNA hasarını %3.18'den %9.36 ve %15.2'ye çıkarmıştır. Yapılan bu çalışmada ilk uygulamadan son uygulamaya kadar olan dönemde 4 kat daha fazla miktarında bir DNA hasarı oluşturulurken, kryoprotektanda 1.3 kat, H₂O₂'de ise 1.16 kat daha fazla bir hasar artışı meydana gelmiştir. Bu bulgulara bakıldığında testosteron propionat kryoprotektan ve H₂O₂'e göre daha fazla miktarda DNA hasarı oluşturmuştur.

Elde edilen sonuçlar hasar tespiti hesaplanmasında kullanılan 3 farklı yöntem ile değerlendirildi. Bu yöntemler; yüzdelik hasar oranı, arbitrary unit ve genetik hasar indeksine göre hesaplandı. Sırasıyla sperm DNA hasar boyutları; yüzdelik hasar oranı; %3.87, %9.35, %15.26 olarak, arbitrary unite göre; %1.19, %4.08, %6.29 olarak, genetik hasar indeksine göre; %5.53, %17.04, %27.37 olarak hesaplanmıştır. Kullanılan bu yöntemler sonucu elde edilen verilerin istatistik analizleri değerlendirildiğinde yöntem fark etmeksizin sperm DNA hasar oranının kullanılan testosteron düzeyiyle doğru orantılı olarak anlamlı oranlarda arttığı gözlemlendi (p<0.001).

Rönnberg (1980)'in infertil erkeklerde yapmış olduğu bir çalışmada, Clomiphene Sitrat (östrojen antagonisti) kullanmışlardır. 3 ay boyunca günlük 50 mg/kg dozda Clomiphene Sitrat verilmiştir. Sonuçta FSH, LH, testosteron, östrojen hormonlarının arttığı ve bunun yanı sıra sperm yoğunluğunun ortalama 13.3×10^9 'dan 28.7×10^9 'a çıktığı tespit edilmiştir. Netter ve ark. (1980), yapmış oldukları çalışmada, oligospermi olguları çinko sülfat ile tedavi edilmeye çalışılmıştır. Kullanılan çinko sülfat plazma testosteron seviyesini ortalama 3.5 mg/ml'den 5.4 mg/ml'ye çıkardığı tespit edilmiştir. Artan plazma testosteron seviyesi sperma yoğunluğunu 8×10^9 ml'den 20×10^9 ml çıkardığı gözlenmiştir. Yapılan bu çalışmada sperma yoğunluk oranları düzeyinde gruplar karşılaştırıldıklarında istatistiksel olarak önemli bir fark bulunamamıştır (p>0.05). Yoğunluğun tüm gruplarda ortalama bir değere sahip olması dışarıdan verilen testosteron hormonu sperm üretiminde olumlu veya olumsuz herhangi

bir etkiye sahip olmadığını göstermektedir ($p>0.05$). Rönnerberg (1980) ile Netter ve ark. (1980)'nin yaptıkları çalışmada kullandıkları ajanlara bağlı olarak spermada yoğunluk artmıştır. Fakat bizim yaptığımız çalışmada kullanılan testosteron propionatın sperm yoğunluğu üzerine herhangi bir etki göstermediği belirlenmiştir. Bunun nedeninin normalde 58 gün süren spermatogenezisin ancak 30 günde bu uygulamanın yapılmasıdır. 60 gün süren bir uygulama yapılırsa idi muhtemelen sperm yoğunluğunda da bir artışın görülmesi mümkün olabilirdi.

Sönmez ve ark. (2004), Wistar ratlarda askorbik asitin sperm parametreleri üzerine etkisine baktıkları çalışmada; motilite oranı üzerinde istatistiksel bir fark yaratacak etki bulunmazken, sperm yoğunluğu ve plazma testosteron seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit etmişlerdir. Yapılan bu çalışmada motilite bakımından gruplar birbirleriyle karşılaştırıldıklarında testosteron uygulanan gruplarda istatistiksel olarak düşüş gözlenmiştir. Motilite oranında ki bu düşüş istatistiksel olarak karşılaştırıldığında uygulanan testosteronun dozuna bağlı olmadığı tespit edilmiştir ($p<0.05$). Bunun sebebinin doz aralığının geniş olmamasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bulgu testosteron propionatın, askorbik asite göre motiliteyi olumsuz yönde etkilediğini ortaya koymaktadır.

Surveen ve ark. (2011), yapmış oldukları çalışmada sperm DNA hasarını minimum indirmek için farklı yıkama teknikleri uygulamışlardır. Density gradient ve Swim up yöntemlerinin kombine bir şekilde uygulanması sonucu DNA hasarına sahip sperma örneklerinde hasar düzeyinin düşürülebileceği kanısına varmışlardır.

Çalışmada anormal sperm oranının kullanılan testosteron hormonu dozuna bağlı olarak arttığı tespit edilmiştir. Anormal sperm oranı ve DNA hasarına sahip sperm oranları birbirleri arasında paralel bir etkileşime sahip olduğu tespit edilmiştir. Anormal sperm oranındaki artışın sperm DNA hasarını artırdığı saptanmıştır ($p<0.001$).

Sperm DNA bütünlüğü, sadece genetik materyalin gelecek nesillere başarılı bir biçimde aktarılmasında değil fertilizasyonun düzgün bir şekilde gerçekleşmesi ile kaliteli embriyo gelişimi ve gebeliğin devamlılığı açısından da önem taşımaktadır. Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, sperm DNA hasarının, fertilizasyon potansiyeli,

gebelik ve canlı doğum oranları ile ters ilişkili olduğu gösterilmektedir (Duarte ve ark., 2017; Simon ve ark., 2013). Bu tez çalışması verileri, infertilite kliniklerinde spermatogenezin desteklenmesi amacıyla yapılan testosteron tedavilerinde doza ve süreye bağlı olarak testosteronun sperm DNA hasarına neden olabileceğini ortaya koymaktadır. Bu nedenle, klinik testosteron uygulamalarında bu durum gözardı edilmemelidir. Ayrıca sperm DNA hasarının yeni doğan anomali riskini ve çocukluk çağı kanser riskini arttırabildiği de öne sürülmüştür (Sawyer ve ark., 2003; Sorahan ve ark., 2001).

Bu tez çalışması sonucunda elde edilen veriler ışığında, ekzojen testosteron hormonu kullanılarak oluşturulan BPH modelinde sperm DNA hasarı oranının arttığı, motilite ve anormal sperm oranının olumsuz olarak etkilendiği ancak yoğunluğun etkilenmediği ilk defa bu tez çalışmasıyla ortaya konulmuştur.

Bu çalışmanın sonuçlarından yola çıkarak gerek spermatogenezis aşamasında gerekse sperma alma ve değerlendirme aşamalarında konunun moleküler genetik yaklaşımlarla daha detaylı ve çeşitli ajanlar kullanılarak araştırılmasının yanı sıra; testis ve prostat histopatolojisi ile bazı kan parametrelerinin analizleri yapılarak çalışılmasında da yeni ve daha net verilerin elde edilmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- Abdulkerim B, Birşen B, Mehmet U, Duygu E, Muhlise A. Kriyoprezervasyonun genotoksik etkilerinin comet yöntemi ile araştırılması. In Turk J Biochem. 2004;29(1): 1-176.
- Agarwal A, Said MT. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. Hum Reprod Update.2003;9(4):331-45.
- Aitken RJ, De Iuliis GN (2010). On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. Mol Hum Reprod. 2010;16(1):3–13.
- Alaçam E. Evcil Hayvanlarda Doğum ve İnfertilite. Ankara: Medisan Yayınevi; 2007.
- Anderson D, Dhawan A. The Comet Assay in Toxicology (2nd Edition). Royal Society Of Chemistry: Cambridge, UK; 2016.
- Aravindan GR, Bjordahl J, Jost LK, Evenson DP. Susceptibility of human sperm to in situ DNA denaturation is strongly correlated with DNA strand breaks identified by singlecell electrophoresis. Exp Cell Res. 1997;236(1):231-37.
- Auger-Pourmarin L, Roubert P, Chabrier PE. Endothelin receptors in testosterone induced prostatic hypertrophy in rats. Jpn J Pharmacol. 1998;77(4):307-10.
- Banerjee PP, Banerjee S, Dorsey R, Zirkin BR, Brown TR. Age and lobe specific responses of the brown Norway rat prostate to androgen. Biol Reprod. 1994;51(4): 675-84.
- Başar M, Çakan M, Emir L, Aydos K, (2005). Spermden Doğuma. www. androloji. org. tr DNA hasarlarının erkek infertilitesinde önemi. (Erişim 10.06.2014).
- Baumber J, Ball BA, Linfor JJ, Meyers SA. Reactive oxygen species and cryopreservation promote dna fragmentation in equine spermatozoa. J Androl. 2003;24(4):621-28.
- Boe Hansen GB, Ersboll AK, Greve T, Christensen P. Increasing storage time of extended boar semen reduces sperm DNA integrity. Theriogenology. 2005;63(7):2006-2019.
- Cabrita E, Robles V, Rebordinos L. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. Cryobiology. 2005;50(2):144-53.
- Cho YH, Ha US, Lee CB, Sohn DW, Kim SW. The antihyperplastic effect of oral catechin ingestion in a rat model of benign prostatic hyperplasia. Eur Urol Suppl. 2007;6(2):34.
- Clermont Y. Quantitative analysis of spermatogenesis of the rat: a revised model for the renewal of spermatogonia. Animal Journal Anatomy. 1962;111:111-29.
- Coffey DS, Walsh PC, Retik AB, Stamey TA, Vaughan ED. Physiology of Male Reproduction in Campbell's Urology. Philadelphia: W.B. Saunders Company; 1992:225-56.

- Creasy DM. Evaluation of testicular toxicity in safety evaluation studies: the appropriate use of spermatogenic staging. *Toxicology Pathology*. 1997;25(2):119-31.
- Cunha CR, Chung LWK, Shannon JM. Hormone-induced morphogenesis and growth: Role of mesenchymal-epithelial interactions. *Recent Prog Hormone Re*. 1983;39:559-98.
- delBarco-Trillo J, Garcí'a-A'lvarez O, Soler AJ, Tourmente M, Garde JJ, Roldan ERS. A cost for high levels of sperm competition in rodents: increased sperm DNA fragmentation. *Proc R Soc B*. 2016;283:20152708.
- Dinçer Y, Akçay T. DNA hasarı. *Turk J Biochem*.2000;25(2):73-9.
- Djakiew D. Dysregulated expression of growth factors and their receptors in the development of prostate cancer. *The Prostate*. 2000;42:150-60.
- Donnelly ET, O'Connell M, McClure N, Lewis SE. Differences in nuclear DNA fragmentation and mitochondrial integrity of semen and prepared human spermatozoa. *Hum Reprod*. 2000;15(7):1552-61.
- Duarte C, Nunez V, Wong Y, Vivar C, Benites E, Rodriguez U, Vergara C, Ponce J. Impact of the Z potential technique on reducing the sperm DNA fragmentation index, fertilization rate and embryo development. *JBRA Assisted Reproduction*. 2017;21(4):351-55.
- Duncan BK. Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature*. 1980;287(9):560-61.
- Eddy EM, O'Brien DA. Spermatogenesis. Knobil E, Neill DJ. *The physiology of reproduction*, 2nd Edition. New York; Raven Press; 1994:29-77.
- Esterhuizen AD, Franken DR, Lourens JGH, Prinsloo E, Van Rooyen LH. Sperm chromatin packaging as indicator of invitro fertilization rates. *Hum Reprod*. 2000;15(3):657-61.
- Fairbairn, DW, Olive PL, Oneill KL. The comet assay a comprehensive review. *Mutat Res*. 1995;339:37-59.
- Fernandez JL, Mouriel L, Rivero MT, Goyanes V, Vasquez R, Alvarez JL. The sperm chromatin dispersion test: a simple method for the determination of sperm DNA fragmentation. *J Androl*. 2003;24:59-66.
- Floyd RA, Watson JJ, Harris J, West M, Wong PK. Formation of 8- hydroxy-2 deoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986;137:841-46.
- Fraser L, Strzezek J. The use of comet assay to assess DNA integrity of boar spermatozoa following liquid preservation at 5°C and 16°C. *Folia Histochem Cytobiol*. 2003;42(1):4955.
- Gonzales GF, Vasquez V, Rodriguez D, Maldonado C, Mormontoy J, Portella J, Pajuelo M, Villegas L, Gasco M. Effect of two different extracts of red maca in male rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia. *Asian J Androl*. 2007;9(2):245-51.
- Guyton AC, Hall JE. *Textbook Of Medical Physiology*. WB Saunders: Philadelphia; 1996.

- Hafez B, Hafez ESE. Reproduction in farm animals. (7. Baskı) Amerika: Lippincott Williams and Wilkins; 2000.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd Ed. Oxford: Oxford University Press; 1996:247-53.
- Hebel R, Stromberg MW. Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat. Woerthsee: BioMed Verlag; 1986:71-9.
- Hieble JB. Animal models for benign prostatic hyperplasia. *Handb Exp Pharmacol.* 2011;202:69-79.
- Horoz M, Bolukbas C, Bolukbas F, Kocyigit A, Aslan M, Koylu AO, Gumus M, Celik H, Koksall M. Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection Mutation. *Mutat Res.* 2006;596:137-42.
- Isaacs JT, Coffey DS. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate Suppl.* 1989;2:22-50.
- Johnson RT, Collins AR, Squires S, Mulliner AM, Elliot GC, Downes CS. DNA repair under stress. *J Cell Sci.* 1987;6:263-88.
- Jokinen MP, Boorman GA, Eustis SL, Elwell MR, Montgomery CA, MacKenzie WF. *Pathology Of The Fisher Rat.* San Diego: Academic Press; 1990: 109-26.
- Julia-Guilloteau V, Mevel K, Oudot A, Bernabe J, Denys P, Chartier-Kastler E, Alexandre L, Giuliano F. Prostate hypertrophy induced by testosterone: effect of oxybutynin in an experimental model of overactive bladder in conscious rats. *Eur Urol Suppl.* 2006;5(2):119.
- Juniewicz PE, Berry SJ, Coffey DS. Requirement of testis in establishing sensitivity of canine prostate to develop benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 1994;152(3):996-1001.
- Kandel LB, Harrison LH, McCullough DL. Transurethral laser prostatectomy: Creation of a technique for using the Neodymium-Yttrium- Aluminium-Garnet (YAG) laser in the canine model. *J Urol.* 1986;133:110.
- Katz AE, Benson MC, Wise GJ, Olsson CA, Bandyk MG, Sawczuk IS, Tomashefsky P, Buttyan R. Gene activity during the early phase of androgen-stimulated rat prostate regrowth. *Cancer Res.* 1989;49(21):5889-94.
- Kim J, Yanagihara Y, Kikugawa T, Ji M, Tanji N, Masayoshi Y, Freeman MR. A signaling network in phenylephrine-induced benign prostatic hyperplasia. *Endocrinology.* 2009;150(8):3576-83.
- Knobil E, Neill JD. *Encyclopedia of Reproduction Vol:4.* Amerika: Academic Press; 1998: 80-1.
- Knobil E, Neill JD. *Encyclopedia of Reproduction Vol:4.* Amerika: Academic Press; 1998: 784-89.
- Knobil E, Neill JD. *Encyclopedia of Reproduction Vol:4.* Amerika: Academic Press; 1998: 77.

- Kretser DM, Kerr JB. Spermatogenesis. Knobil E, Neill DJ. The Physiology of Reproduction, 2nd Edition. New York: Raven Press; 1995: 1177-290.
- Krinke JG. The Handbook of Experimental Animals, The Laboratory Rat. İngiltere: 2000: 288-312.
- Krinke JG. The Handbook of Experimental Animals, The Laboratory Rat. İngiltere: 2000: 145-52.
- Kunstry I, Küpper W, Weisser H, Naumann S, Mescow C. Urethral plug-a new secondary male sex characteristic in rat and other rodents. Labrotory Animals. 1982;16: 151-55.
- Lindahl T. Repair of intrinsic DNA lesions. Mutat Res. 1990;238(3):305-11.
- McConneli JD. Prostatic growth: New insights into hormonal regulation. Br J Urol. 1995;76(1):5-10.
- Mohammad HNE, Salehi M, Razavi S, Anjomshoa M, Rozbahani S, Moulavi F, Mardani M. Effect of sperm DNA damage and sperm protamine deficiency on fertilization and embryo development post-ICSI. Reproductive BioMedicine. 2005;11(2):198-205.
- Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR. The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. Hum Reprod. 2002;17(4):990-98.
- Müezzinoğlu B. 5 α redüktaz inhibitörlerinin prostat histopatolojisinde yaptığı değişiklikler. Bull Urooncol. 2010;4:62-4.
- Narendra PS, Charles HM, Richard EB. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. Fertil Steril. 2003;80(6):1420-30.
- Netter A, Hartoma R, Nahoul K. Effect of zinc Administration on plasma testosterone, Dihydrotestostereno, and sperm count. Arch Androl. 1980;7:69-73.
- Ojeda SR, Urbanski. Pubertas. HF Knobil E, Neill DJ. The pyhsiology of reproduction, 2nd Edition. New York; Raven Press: 1994: 363-409.
- Ostling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiationinduced dna damage in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun. 1984;123:291-98.
- Perey B, Clermont Y, Leblond CP. The wave of the seminiferous epithelium in the rat. Am J Anat. 1961;108:47-77.
- Richard FL, Scott S. Use of the single gel electrophoresis/comet assay fer detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Mutation Resarch. 2003;554(1):43-64.
- Rönnerberg L. The effet of clomiphene citrate on different sperm parameter and serum hormone levels in preselected infertile men: a controlled double –blind cross-over study. Int J Androl. 1980;3:479-86.
- Russel LD, Mohr U, Dungworth DL, Capen CC. Pathobiology of the aging rat. Washington DC: ILSI Press; 1992: 395-405.

- Russell LD, Ettlin RA, Hikim APS, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater; Cache River Press: 1990.
- Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi T, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod*,66, 1061-67.
- Sakuma Y, Maeda KI, Tsukamura H, Yokoyama A. Neural control of Reproduction: physiology and behavior. Tokyo: Japan Scientific Societies Press;1997: 155-64.
- Sarıözkan S, Cantürk F, Yay A, Akçay A. The Effect of Different Storage Temperature on Sperm Parameters and DNA Damage in Liquid Stored New Zealand Rabbit Spermatozoa. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*.2012;18(3):475-80.
- Sawyer DE, Mercer BG, Wiklendt AM, Aitken RJ. Quantitative of genespecific DNA damage in human spermatozoa. *Mutat Res*. 2003;529:21-34.
- Sawyer DE, Roman SD, Aitken JR. Relative susceptibilities of mitochondrial and nuclear DNA to damage induced by hydrogen peroxide in two Mouse germ cell lines. *Redox Report*. 2001;6(3):182-84.
- Schaetti PH, Argentino-Storino A, Heinrichs M, Mirea D, Popp A, Karbe E. Aberrant craniopharyngeal structures within the neurohypophysis. *Exp Toxic Pathology*. 1995;47:129-37.
- Setchell BP, Austin CR, Short RV. Germ Cells and Fertilization. *Reproduction in Mammals Vol 1*. Cambridge: Cambridge University Press; 1984: 63-101.
- Shapiro E, Becih MJ, Nartonto V. The relative proportion of stromal and epithelial hyperplasia is related to the development of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 1992;147:1293-97.
- Sharma RK, Said T, Agarwal A. Sperm DNA damage and clinical relevance in assessing reproductive outcome. *Asian J Androl*. 2004;6:139-48.
- Sharpe RM, Knobil E, Neill DJ. The physiology of reproduction, 2nd Edition. New York: Raven Press; 1994: 1363-434.
- Simon L, Proutski I, Stevenson M, Jennings D, McManus J, Lutton D, Lewis SE. Sperm DNA damage has negative association with live birth rates after IVF. *Reprod Biomed Online*. 2013;26:68-78.
- Simoniello MF, Gigena F, Poletta G, Loteste A, Kleinsorge E, Campana M, Scagnetti J, Parma MJ. Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish. *Bull environ contam toxicol*. 2009;83:155-58.
- Singaravelu G, Rahimi S, Krauchunas A, Rizvi A, Dharia S, Shakes D, Smith H, Golden A, Singson A. Forward Genetics Identifies a Requirement for the Izumo-like Immunoglobulin Superfamily spe-45 Gene in *Caenorhabditis elegans* Fertilization. *Current Biology*. 2015;25:3220-224.
- Singh NP, Danner DE, Tice RR, Brant, L, Schneider EL. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay): its importance in human biology. *Mutat Res*. 1990;37:123.

- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 1988;175:184-91.
- Sorahan T, McKinney PA, Mann JR, Lancashire RJ, Stiller CA, Birch JM, Dodd HE, Cartwright RA. Childhood cancer and parental use of tobacco: findings from the interregional epidemiological study of childhood cancer (IRESCC). *Br J Cancer.* 2001;84:141-46.
- Sönmez M, Türk G, Yüce A. The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats. *Theriogenology.* 2004;63:2063-72.
- Surveen Ghumman S, Satish Kumar Adiga SK, Dinesh Upadhy D, Guruprasad Kalthur G, Varshini Jayaraman V. Combination of swim-up and density gradient separation methods effectively eliminate DNA damaged sperm. *J Turkish-German Gynecol Assoc.* 2011;12:148-52.
- Suzuki Y. Studies on the development of the sexual maturation in the male: I. New kinds of ejaculatory responses in the rat and their application as the indicator of sexual activity. *Jpm. J. Vet. Sci.* 1952;14(2):115-26.
- Suzuki Y. Studies on the development of the sexual maturation in the male: III. Morphological changes in penis and analysis of the sexual maturation process in the rat. *Jpm J Sci.* 1954a;16(2):87-100.
- Suzuki Y. Studies on the development of the sexual maturation in the male: II. The growth of sexual organs and the metabolic change of testis in the rat. *Jpm J Sci.* 1954b;16(1):1-12.
- Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi.* 2006;20(1):85-95.
- Yang G, Timme TL, Park SH. Transforming growth factor beta 1 transduced mouse prostate reconstitutions: 2. induction of apoptosis by doxazosin. *Prostat.* 1997;33:157-63.
- Yılmaz B. Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi (1. Baskı). Feryal Matbaacılık: Ankara; 1999: 345-46.
- Yurdakul T, Güven S. Benign prostat hiperplazisi (BPH) ve apoptozis. *Journal Of Ankara University Faculty Of Medicine.*2006;59(3):132-36.
- Zilli L, Schiavone R, Zonno V, Storelli C, Vilella S. Evaluation of DNA damage in *Dicentrarchus labrax* sperm following cryopreservation. *Cryobiology.* 2003;47:227-35.

ÖZGEÇMİŞ

Volkan KOŞAL, 1988 yılında Ankara’da doğdu. İlköğretim eğitimini Kayseri’de tamamladı. Eğitimine Kuleli Askeri Lisesinde devam ederek 2006 yılında mezun oldu. 2007 yılında Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesini kazanarak 2013 yılında Veteriner Hekim olarak mezun oldu. 2013 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’na atanarak Doktora eğitimine başladı. Halen Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.



EKLER

EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ
YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmanın Adı <i>Title of the Research</i>	Ratlarda Benign Prostat Hiperplazisi Modelinde Sperm DNA Hasarının Tespiti Detection of Sperm DNA Damage in Benign Prostatic Hyperplasia Model in Rats	
Araştırmacı(lar) <i>Investigator(s)</i>	Yürütücü / <i>Chief investigator</i> : Doç. Dr. Barış Atalay USLU Yardımcı Araştırmacı(lar) / <i>Co-investigator(s)</i> : Araş. Gör. Volkan KOŞAL	
Araştırmanın Başlama Tarihi / <i>Research Starting Date</i> : 05.05.2016		
Araştırmanın Bitiş Tarihi / <i>Research Completion Date</i> : 05.10.2017		
Proje Süresi / <i>Total Time of Project</i> : 16 Ay		
Proje No / <i>Project Number</i> : --		
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / <i>Funding institution(s) (if available)</i> : ÖYP Bütçesi		
Destek Şekli ve Miktarı / <i>Type and amount of funding</i> : 10.000 TL		
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 26/04/2018 tarih ve 2018/04 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 26/04/2018 (decision number 2018/04).		
	BAŞKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
ÜYE	ÜYE Prof. Dr. Sıddık KESKİN	ÜYE
Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	ÜYE Doç. Dr. Atilla DURMUŞ	Prof. Dr. Suphi DENİZ
ÜYE Prof. Dr. Nalan ÖZDAL	ÜYE Dr. Öğr. Ü. Oruc ALLAHVERDİYEV	ÜYE Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
ÜYE Dr. Öğr. Ü. Ferda KARAKUŞ	ÜYE Dr. Öğr. Ü. Şükrü ÖNALAN	ÜYE Dr. Öğr. Ü. Canser Yılmaz DEMİR
ÜYE Dr. Öğr. Ü. Necer ŞAHİN AYDINYURT		Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET
ÜYE Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU		

EK 2. Tez Orjinallik Raporu.

	<p style="text-align: center;">T.C. VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ Sağlık Bilimleri Enstitüsü</p>	
DOKTORA TEZİ ORJİNALLİK RAPORU		

Tarih: 26/11/2018

Tez Başlığı / Konusu: RATLARDA DENEYSEL BENİGN PROSTAT HİPERPLAZİSİ MODELİNDE SPERM DNA HASARININ TESPİTİ

Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 63 sayfalık kısmına ilişkin, 26/11/2018 tarihinde şahsım/tez danışmam tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orjinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 9(Dokuz) dur.

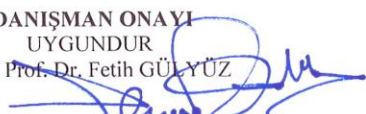
Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words)

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.


Volkan KOŞAL

Öğrencinin Adı Soyadı	Volkan KOŞAL
Anabilim Dalı	: Dölerme ve Suni Tohumlama Anabilim Dalı
Öğrenci No	139301035
Statüsü	: <input type="checkbox"/> Yüksek Lisans <input checked="" type="checkbox"/> Doktora
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR Prof. Dr. Fetih GÜLYÜZ 	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR 