

**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERİŞKİN ERKEK FARELERDE 2,4 D-AMİN İLE**  
**OLUŞTURULAN TESTİS HASARI ÜZERİNE**  
**MELATONİNİN ETKİSİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SEVDA KENAN**

**DANIŐMAN: YRD. DOÇ. DR. DİLEK BURUKOĞLU DÖNMEZ**

**MART 2014**

**T.C.**  
**ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜŐÜ**  
**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ERİŞKİN ERKEK FARELERDE 2,4 D-AMİN İLE**  
**OLUŞTURULAN TESTİS HASARI ÜZERİNE**  
**MELATONİNİN ETKİSİ**

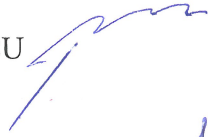
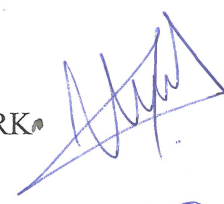

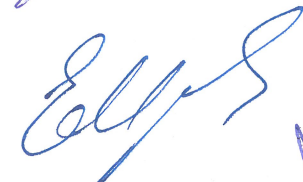

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SEVDA KENAN**

**DANIŐMAN: YRD. DOÇ. DR. DİLEK BURUKOĞLU DÖNMEZ**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

Sevda KENAN'ın Yüksek Lisans Tezi olarak hazırladığı "Erişkin erkek farelerde 2,4 D - amin ile oluşturulan testis hasarı üzerine melatoninin etkisi" başlıklı bu çalışma Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddesi uyarınca değerlendirilerek "KABUL" edilmiştir.

		Tarih
Üye	Prof. Dr. Cengiz BAYÇU	
Üye	Prof. Dr. Varol ŞAHİNTÜRK	
Üye	Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ	
Üye	Prof. Dr. Emel ULUPINAR	
Üye	Yrd. Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU DÖNMEZ	

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 11.03.2014 tarih ve 994/4633 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

  
Prof. Dr. Kazım ÖZDAMAR  
Enstitü Müdürü

## ÖZET

Erişkin erkek farelerde 2,4 D-amin ile oluşturulan testis hasarı üzerine melatoninin etkisi.

Dihidroksifenoksiasetikasit (2,4 D-amin), bitki öldürmede kullanılan bir ajandır. 2,4 D-amin testiküler hücrelere hasar vererek erkek üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde etkiler. Melatonin, pineal bezden salgılanan ve antioksidan özellikleri iyi bilinen bir hormondur. Bu çalışmada 2,4 D-amin uygulanmış erkek farelerin testisleri üzerinde 2,4 D-amin'in oluşturduğu hasarda melatoninin etkisini incelemeyi amaçladık.

Bu çalışmada toplam 28 adet erişkin Swiss-albino türü erkek fare kullanıldı. Deney hayvanları; Kontrol grubu, 2,4 D-amin grubu, Melatonin grubu, 2,4 D-amin+melatonin grubu olmak üzere toplam 4 gruba ayrıldı. Bu deney hayvanlarından; kontrol grubuna 55 gün boyunca 3 günde bir belirlenen dozda distile su, 2,4 D-amin grubuna 55 gün boyunca 3 günde bir 320 mg/kg 2,4 D-amin, melatonin grubuna 55 gün boyunca 3 günde bir tek dozda 10 mg/kg melatonin, 2,4 D-amin+melatonin grubuna ise 55 gün boyunca 3 günde bir 320 mg/kg 2,4 D-amin ve 55 gün boyunca 3 günde bir 10 mg/kg melatonin intraperitoneal yolla uygulandı. Deney hayvanları deney süresi sonunda anestezik madde ile uyutuldu ve testis dokusu örnekleri Bouin solüsyonu içerisine alındı. Örnekler rutin histolojik işlemlerin ardından bloklandı. Her bir bloktan 3 µm kesit alınarak Hematoksilen-Eozin ve Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen boylarıyla boyandı ve mikroskopik incelemeleri yapıldı.

Çalışma sonucunda elde edilen bulgulara göre, kontrol grubundaki farelerin testislerinde normal histolojik yapı, 2,4 D-amin uygulanmış farelerin testislerinde yoğun spermatogenetik hücre hasarı, 2,4 D-amin+melatonin verilen grupta ise azalmış hücre hasarı gözlemlendi.



Sonuçta, 2,4 D-amin'in erkek farelerin testisleri üzerinde toksisiteye yol açtığı, melatoninin ise 2,4 D-amin'in testislerde oluşturduğu bu hasarı azalttığı görüldü.

**Anahtar sözcükler:** 2,4 D-amin, melatonin, fare, testis

## SUMMARY

Effect of melatonin on testicular damage induced by 2,4 D-amine effect in adult mice.

Dichlorophenoxy acetic acid (2,4 D-amine) used in herbicidal agent. 2,4 D-amine negatively affects male reproductive functions by damaging testicular cells. Melatonin is a hormone secreted by pineal gland with well-known whose antioxidant properties. In this study, we aimed to investigate the effects of melatonin on the damage induced by 2,4 D-amine of testicles of male mice.

In this study, a total of 28 adult male Swiss-albino mice were used. Experimental animals were divided into four groups which were control group, 2,4 D-amine group, melatonin group, 2,4 D-amine+melatonin (55 days). Control group this group was applied serum a determined dose SF was applied once a day for 55 days into the control group. 2,4 D-amine group has been applied 320 mg/kg of 2,4 D-amine every 3 days for 55 days, Melatonin group was applied 10 mg/kg melatonin with a single dose every three days for 55 days. 2, 4 D-amine+melatonin (55 days) was applied 320 mg/kg of 2,4 every in 3 days for 55 days and 10 mg/kg of melatonin every 3 days for 55 days intraperitoneally. At the end of the experimental period all the groups were sacrificed anesthesia and testis tissue samples were fixed in bouin solution, 3 µm sections were obtained from each block and stained with Hematoksilin Eosin and Periodic Acid Schiff+Hematoksilin staining and finally were investigated under the light microscope.

According to the findings of the study, the normal histological structure of testes of rats were observed in the control group, intense spermatogenic cell damage in the testes of male rats treated 2,4 D-amine and decreased cell damage in the 2,4 D-amine and melatonin treated group were.

In conclusion, it was observed that the 2,4 D-amine causes toxicity on male mice testes, and melatonin reduces that damage of the 2,4 D-amine in the testes.

**Keywords:** 2,4 D-amine, melatonin, mice, testes

## İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	i
ÖZET	ii
SUMMARY	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLO DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Testis'in Embriyolojisi	3
2.1.1. Testislerin inişi	5
2.2. Testis'in Anatomisi	7
2.2.1. Testis'in damar ve sinirleri	8
2.3. Testis'in Histolojisi	9
2.3.1. Testisler	10
2.3.2. Seminifer tübüller	11
2.3.3. Spermiyogenez	13
2.3.4. Sertoli hücreleri	16
2.3.5. İnterstisyel doku	18
2.3.6. Testisin histofizyolojisi	19
2.3.7. Kan-testis bariyeri	20
2.4. Dihidroksifenoksiasetikasit-amin= $C_8H_6Cl_2O_3$	20
2.4.1. 2,4 D-amin'in fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri	20
2.4.2. 2,4 D-amin'in absorpsiyonu, dağılımı, atılımı	22
2.4.3. 2,4 D-amin'in üretimi ve tüketimi	22
2.4.4. 2,4 D-amin'in kullanım alanları	23
2.4.5. 2,4 D-amin'in doğada izlediği yol	23
2.4.6. 2,4 D-amin'in insanda biyolojik yarı ömrü	24
2.4.7. 2,4 D-amin'in canlılar üzerine etkileri	24

<b>2.5. Melatonin</b>	25
<b>2.5.1. Tanımı ve yapısı</b>	25
<b>2.5.2. Melatonin biyosentezi ve metabolizması</b>	28
<b>2.5.3. Melatoninin etki mekanizması</b>	29
<b>2.5.4. Melatoninin antioksidan etkisi</b>	31
2.5.4.1. Direk antioksidan etkisi	31
2.5.4.2. Antioksidan enzim aracılı antioksidan etkisi	32
2.5.4.3. Prooksidan enzim aracılı antioksidan etkisi	32
<b>3. GEREÇ–YÖNTEM</b>	34
<b>3.1. Deney Hayvanları</b>	34
<b>3.2. Kimyasallar</b>	35
<b>3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü</b>	35
<b>3.4. Bouin Çözeltilisinin Hazırlanması</b>	35
<b>3.5. Dokuların Alınması</b>	35
<b>3.6. Testis Ağırlıklarının Ölçümü</b>	36
<b>3.7. Işık Mikroskobu için Dokuların Hazırlanması</b>	36
<b>3.8. Periyodik Asit–Schiff+Hematoksilen (PAS+H)</b>	
Boyasının Hazırlanışı	37
<b>3.9. Kesitlerin Alınması ve Boyanması</b>	38
<b>3.10. Histolojik Değerlendirme</b>	40
<b>3.11. İstatistiksel Analiz</b>	41
<b>4. BULGULAR</b>	42
<b>4.1. İstatistiksel Bulgular</b>	42
4.1.1. <i>Gruplara göre vücut ağırlıkları-testis ağırlıkları karşılaştırması</i>	42
4.1.2. <i>Deney öncesi-deney sonrası ağırlık kıyaslaması</i>	44
4.1.3. <i>Deney sonrası testis ağırlık kıyaslaması</i>	45
<b>4.2. Histolojik Bulgular</b>	46
4.2.1. <i>Kontrol grubu</i>	46
4.2.2. <i>2,4 D-amin grubu</i>	46
4.2.3. <i>Melatonin grubu</i>	46
4.2.4. <i>Melatonin+2,4 D-amin grubu</i>	47

<i>4.2.5. Kontrol grubu, Melatonin grubu, 2,4 D-amin grubu,</i>	
<i>2,4 D-amin +Melatonin grubu karşılaştırması</i>	47
<b>5. TARTIŞMA</b>	56
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	65
<b>KAYNAKLAR DİZİNİ</b>	66

## **TABLO DİZİNİ**

<b>Tablo 1.</b> 2,4 D-amin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri	21
<b>Tablo 2.</b> Doku takip yöntemine ait süreler	37
<b>Tablo 3.</b> Hematoksilen & Eozin boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri	39
<b>Tablo 4.</b> PAS+H boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri	40
<b>Tablo 5.</b> Gruplara göre ilk ağırlık-son ağırlık karşılaştırması	42
<b>Tablo 6.</b> Gruplara göre sağ testis-sol testis karşılaştırması	43
<b>Tablo 7.</b> Deney öncesi deney sonrası ağırlık kıyaslaması	44
<b>Tablo 8.</b> Sağ testis-sol testis ağırlık kıyaslaması	45

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Testis'in anatomik yapısı	8
Şekil 2. Testis'in anatomik ve histolojik yapısı	10
Şekil 3. Spermin yapısı	13
Şekil 4. Sertoli hücresi ve spermatogenik seri hücreleri	17
Şekil 5. Melatoninin antioksidan özellikleri	27
Şekil 6. Melatonin hormonunun biyokimyasal sentezi	30
Şekil 7. Kontrol grubunda testis dokusunun histolojik görünümü	48
Şekil 8. Kontrol grubunda testis dokusunun histolojik görünümü	49
Şekil 9. Melatonin grubunda testis dokusunun histolojik görünümü	50
Şekil 10. 2,4 D-amin grubunda testis dokusunun histolojik görünümü	51
Şekil 11. 2,4 D-amin grubunda testis dokusunun histolojik görünümü	52
Şekil 12. 2,4 D-amin grubunda testis dokusunun histolojik görünümü	53
Şekil 13. 2,4 D-amin+melatonin grubunda testis dokusunun histolojik görünümü	54
Şekil 14. Kontrol grubu, melatonin grubu, 2,4 D-amin grubu, 2,4D-amin+melatonin grubunda testis dokusunun histolojik görünümleri	55



## **GRAFİKLER DİZİNİ**

<b>Grafik 1.</b> Gruplar arası ilk ağırlık kıyaslaması	42
<b>Grafik 2.</b> Gruplar arası son ağırlık kıyaslaması	43
<b>Grafik 3.</b> Deney öncesi deney sonrası ağırlık kıyaslaması	44
<b>Grafik 4.</b> Sağ testis-sol testis ağırlık kıyaslaması	45

## SİMGELER ve KISALTMALAR

ABP	Androjen bağlayıcı protein
AFA	Arilamin formamidaz
AFMK	N-asetil-N <sup>2</sup> -formil-5-metoksikinüramin
AMH	Antimüllerian hormon
AMK	N-asetil-5-metoksikiynuramin
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
cm	Santimetre
DNA	Deoksiribonükleik asit
FSH	Folikül uyarıcı hormon
hCG	İnsan koryon gonadotropin hormonu
H-E	Hematoksilen-eozin boyası
H10MT	Hidroksiindol-O-metiltransferaz
IL	İnterlökin
IFN- $\gamma$	İnterfenon gamma
i. p	Periton içi
LDL	Düşük dansiteli lipoproteinler
LH	Luteinleştirici hormon
LPO	Lipid peroksidasyonu
m	Metre
Mm	Mikrometre
MCF	İnsan meme adenokarsinom hücre serisi
MİM	Müllerian inhibitör madde
ML1	Yüksek affiniteli melatonin bağlanma yeri
ML2	Düşük affiniteli melatonin bağlanma yeri
NAS	N-asetil-serotonin
NAT	N-asetiltransferaz
NK	Natural killer
PAS+H	Periyodik asit schiff+hematoksilen boyası

RNA	Ribonükleik asit
SRY	Cinsiyet belirleyici gen
TBF=TDF	Testis belirleyici faktör
TDO	İndolamin 2,3-dioksijenaz
$\alpha$	Alfa
2,4 D-amin	Dihidroksifenoksiasetikasit-amin

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dihidroksifenoksiasetikasit-amin (2,4 D-amin) ilk kez bitki büyüme regülatörü olarak 1942 yılında Zimmerman ve Hithoock tarafından geliştirilmiş ve herbisit olarak 1944 yılında Hammer ve Tukes tarafından kullanılmıştır. 2,4 D-amin; asit, mineral tuz ve ester şeklinde formüle edilmiştir. Ester yapısında olanlar yağ içerisinde; amin, tuz ve asitler ise su içerisinde eritilir.

2,4 D-amin molekül ağırlığı: 266,1

Sudaki çözünürlüğü: 3kg/1 (20°C)

Formülü:  $C_{10}H_{13}C_2NO_3$  (91)

2,4 D-amin bileşiklerden klorofenoksiler grubu içinde incelenen bir fenoksi asittir. Biyolojik etkisi dikkate alındığında "ksenobiyotikler" (xenobiotic=yalancı biyolojik etkililer) grubunda incelenir. Ayrıca bu herbisit portakal ajanı (agent orange) olarak da isimlendirilir (87).

Herbisitler hücre bölünmesi, hücre uzaması, protein sentezi ve solunum gibi bitki metabolizmasını düzenleyen hormonal dengeyi bozarlar. 2,4 D-amin yaklaşık 50 yıldır dünyada yaygın olarak kullanılan bir herbisittir ve bitki metabolizmasında gerçekleşen enzim aktivitesi, nükleik asit sentezi, protein sentezi ve hücre bölünmesi gibi bazı olayları etkileyerek bitki gelişimini engeller (66).

2,4 D-amin'in seminal vezikül üzerinde androjenik etkilere sahip olabileceği ve bu çevresel kirleticinin erkek üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebileceği öngörülmüştür (12). 2,4 D-amin'in aynı zamanda testiküler hücelere hasar verebileceği, sperm hücrelerinin tükenmesine ve çeşitli malformasyonlara neden olabileceği saptanmıştır (93).

2,4 D-amin'in, amin ve ester formlarının da testis ağırlığının artmasına ve testislerde atrofiye neden olabildiği öngörülmüştür (16). 2,4 D-amin; seminifer tübüllerde atrofiye, spermatogenik hücre sırasında bozulmaya, testis hasarına, tunika

albuginea'da ve seminifer tübül çapında azalmaya ve spermatogenik hücrelerin lümene dökülmesine neden olmaktadır. Bu sonuçlara göre, 2,4 D-amin testis dokusunda ciddi histopatolojik hasarlara neden olmaktadır (66).

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), pineal bez tarafından sirkadiyan ritim ile karanlıkta salgılanan bir hormondur. Vücutta endokrin sistemin düzenlenmesi, immun fonksiyonun arttırılması, düz kas tonusunun ayarlanması ve gonadal fonksiyonların baskılanması gibi birçok fizyolojik işlevlerde görev alır.

Melatonin hormonu indolamine ailesinin bir üyesidir ve onun elektron - donör özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidan özelliğine sahiptir. Melatonin hormonu, hem yağda hem de suda çözünebilir özelliğe sahip olduğu için, nükleus dahil hücrenin her organeline ulaşabilir. Bu zellik, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlamaktadır. Melatonin pineal bezden salgılanan ve antioksidan özellikleri iyi bilinen bir hormondur (42). Değişik yollarla toksik olan oksijen ve nitrojen radikallerini yıkar ve antioksidatif enzimleri uyarır (13). Melatonin reme sistemi üzerinde genel olarak inhibitör etkiye sahiptir (59). Epifiz bezi tarafından salgılanan melatoninin, güçlü bir serbest radikal süpürücü olduğu son zamanlarda gösterilmiştir (1).

Bu bilgiler işığında bu çalışmanın amacı; erkek farelere verilen 2,4 D-amin etken maddesinin, erkek farelerin testisleri üzerinde oluşturduğu hasarın tespit edilmesi ve bu süre boyunca verilen melatoninin bu hasar üzerindeki koruyucu etkilerinin araştırılmasıdır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Testis'in Embriyolojisi**

Yedinci hafta sonuna kadar dış genitalerin gelişimi, her iki cinstede birbirine benzer. Cinsiyet farklılaşması 9. haftada ortaya çıkmaya başlar ancak 12. haftaya kadar dış genitalerin farklılaşması tam değildir.

12. haftanın başlangıcında, her iki cinstede kloakal membranın kranial ucunda mezenşim proliferasyonu sonucu genital tüberkül oluşur. Daha sonra, kısa bir süre içerisinde kloakal membranın her iki tarafından labioskrotal şişkinlikler ve ürogenital katlantılar gelişir. Genital tüberkül hızla uzar ve bir primordiyal fallus oluşur. Altıncı haftanın sonunda, ürorektal septum kloakal membran ile birleştiğinde, kloakal membran; dorsalde anal membrana ve ventralde ürogenital membrana bölünür. Ürogenital membran, üretral katlantılara bağlanmış, median bir oluk olan, ürogenital oluğun tabanında yer alır. Anal membran ve ürogenital membran bir hafta sonra yırtılır ve sırasıyla anüs ve ürogenital açıklık oluşur. Dişi fetuslarında üretra ve vajina, ortak bir boşluk olan vestibüle açılır (62).

Farklanmamış dış genitalerin erkek yönünde gelişmeleri, fetal testisler tarafından üretilen testosteron hormonunun etkisiyle olmaktadır. Fallus, uzayıp, genişlediğinde, penisi oluşturur; penisin ventral yüzeyinde, ürogenital katlantılar, ürogenital oluğun lateral duvarlarını oluşturur. Ürogenital oluk, ürogenital sinüsün fallik parçasından uzanan, üretral plağın endodermal hücrelerinin proliferasyonu ile döşenir. Penisin ventral yüzeyi boyunca, ürogenital katlantılar, birbirleriyle birleşerek spongios üretra'yı oluştururlar. Yüzey ektodermi, penisin median hattında birleşerek penil rafe'yi oluşturur, böylece spongios üretra penis içerisinde hapsedilir. Glans penis'in ucunda, ektodermal kökenli içe doğru büyüyen, hücresel bir kordon meydana gelir, bu oluşum penis köküne doğru büyür ve spongios üretra ile birleşir. Bu hücresel kordon kanalize olarak, daha önce meydana gelen spongios üretraya bağlanır. Bu şekilde, üretranın terminal parçası tamamlanır ve dış üretral açıklık glans penis ucuna açılmış olur.

On ikinci haftada, glans penisin periferinde, sirküler bir ektodermal içe büyüme meydana gelir. Bu içe büyüme, kanalize olduğunda, örtücü bir deri katlanması olan, prepus (önderi) meydana gelir. Penisin, corpus spongiosum ve corpora cavernosa kısımları, fallus mezenşiminden gelişir. Labioskrotal şişkinlikler birbirlerine doğru büyüyerek sonuçta birleşirler ve skrotum meydana gelir. Katlantıların birleşme çizgisi, skrotal rafe olarak açıkça görülür (62).

Seks kromozom kompleksinde bir Y kromozomu taşıyan embriyolarda, genellikle testisler gelişmektedir. Testislerin gelişimi, koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır.

Kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler için SRY geni, farklanmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu görmektedir. Testis belirleyici faktör (TDF) primer seks kordonlarını uyararak, onların farklanmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis oluşur.

Seks kordonlarının kalın bir fibröz kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra, yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Dens tunika albuginea'nın gelişimi, fetüste testiküler gelişim için oldukça karakteristiktir. Genişleyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefroz'dan ayrılır ve kendi mezenteri olan mesorchium ile asılı hale geçer. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testis'e farklırlar.

Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşimden ayrılırlar. 8. haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve androstenedione) salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik duktusların ve dış genitalerin maskülin olarak farklanmasını indükte ederler. Testosteron üretimini insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık peryot'ta en yüksek değerine ulaşmıştır. Testosterona ilaveten fetal testisler glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MİM) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. Antimüllerian hormon, Sertoli hücreleri (destek hücreleri) tarafından salgılanır,

hormonun salınması puberteye kadar devam eder, daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik (müllerian) duktusların gelişimini baskılar.

Seminifer tübüller, puberteye kadar solid halde kalırlar (yani, lümenleri yoktur) puberteden itibaren lümen gelişir. Seminifer tübül duvarında iki tip hücre bulunur;

- 1.) Sertoli hücreleri, destek hücreleri olan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler.
- 2.) Spermatogonia, primordial sperm hücreleri olan bu hücreler, primordial germ hücrelerinden farklıdır.

Fötal testiste, Sertoli hücreleri, seminifer tübüllerde çoğunluğu oluşturur. Daha sonraki gelişme sırasında, testis'in yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testis'in dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent duktuli'leri (duktuli efferentes) oluşturan 15-20 adet mezonefrik tübüller ile devam eder. Bu duktuliler, duktus epididimis'i oluşturan mezonefrik duktus ile bağlanırlar (63).

### ***2.1.2. Testislerin inişi***

Testislerin inişi aşağıdaki faktörlerle ilişkilidir;

- a.) Testislerin büyümesi ve mezonefrik böbreklerin atrofisi, testislerin posterior abdominal duvar boyunca, kaudal yönde hareketine müsaade etmektedir.
- b.) MİM ile uyarılan paramezonefrik kanalların atrofisi, testislerin transabdominal olarak, derin inguinal halkalara doğru hareketini sağlamaktadır.
- c.) Processus vajinalisin büyümesi, testislerin inguinal kanal boyunca skrotuma ilerlemelerinde rehberlik etmektedir.



Yirmialtıncı haftada, testisler posterior abdominal duvardan, retroperitoneal olarak (peritonun dışında) derin inguinal halkalara doğru inerler. Testislerdeki bu pozisyonel değişiklik, fetal pelvisin genişlemesi ve embriyonun boyutlarında uzama ile birlikte olmaktadır. Testislerin transabdominal hareketleri, büyük oranda rölatif bir harekettir, abdomenin kraniyal parçasının, kaudal parçasından uzaklaşmasına bağlıdır. Testislerin inguinal kanallar boyunca skrotuma inmelerindeki sebepler, çok az oranda bilinmekle birlikte, bu durumun fötal testislerce üretilen androjenlerle kontrol edildiği kabul edilmektedir. Testislerin inişinde gubernakulumun rolü kesin değildir. Gubernakulum, başlangıçta processus vaginalisin, inguinal kanalları oluşturmaları sırasında, processus vajinalise, anterior karın duvarı boyunca bir yol oluşturur. Gubernakulum aynı zamanda, testisi skrotuma bağlar ve testisin skrotuma inişinde rehberlik yaptığı kabul edilir. Testislerin inguinal kanala geçişinde aynı zamanda, karın içi organların büyümesine bağlı olarak, intraabdominal basınç artışının da rol oynadığı düşünülmektedir.

Testislerin, inguinal kanallardan skrotuma inişi, genellikle 26. haftada başlar ve 2-3 gün devam eder. Testisler, periton ve processus vaginalis dışından geçerler. Testisler skrotuma girdikten sonra, inguinal kanal, spermatik kord etrafında kasılır. Terminde doğmuş yeni doğanların % 97'den fazlasında, her iki testis de skrotum içerisinde bulunur. Doğumdan sonraki ilk üç ay içerisinde, inmemiş testislerin çoğu skrotuma iner.

Testislerin skrotuma iniş şekli, duktus deferensin niçin ureteri anteriordan çaprazladığını ve testiküler kan damarlarının seyrini açıklamaktadır. Testiküler damarlar, testisler posterior abdominal duvar seviyesinde iken oluşurlar. Organlar, skrotuma inişi sırasında, duktus deferens ve damarları da beraberinde taşınırlar. Testis ve duktus deferens aşağı indiklerinde, karın duvarının fasiyal uzantıları ile sarılırlar.

Transvers fasiyanın uzantısı, iç (internal) spermatik fasiya'yı oluşturur.

İnternal oblik kas ve fasiya uzantıları, kremasterik kası ve fasiya'yı meydana getirir.

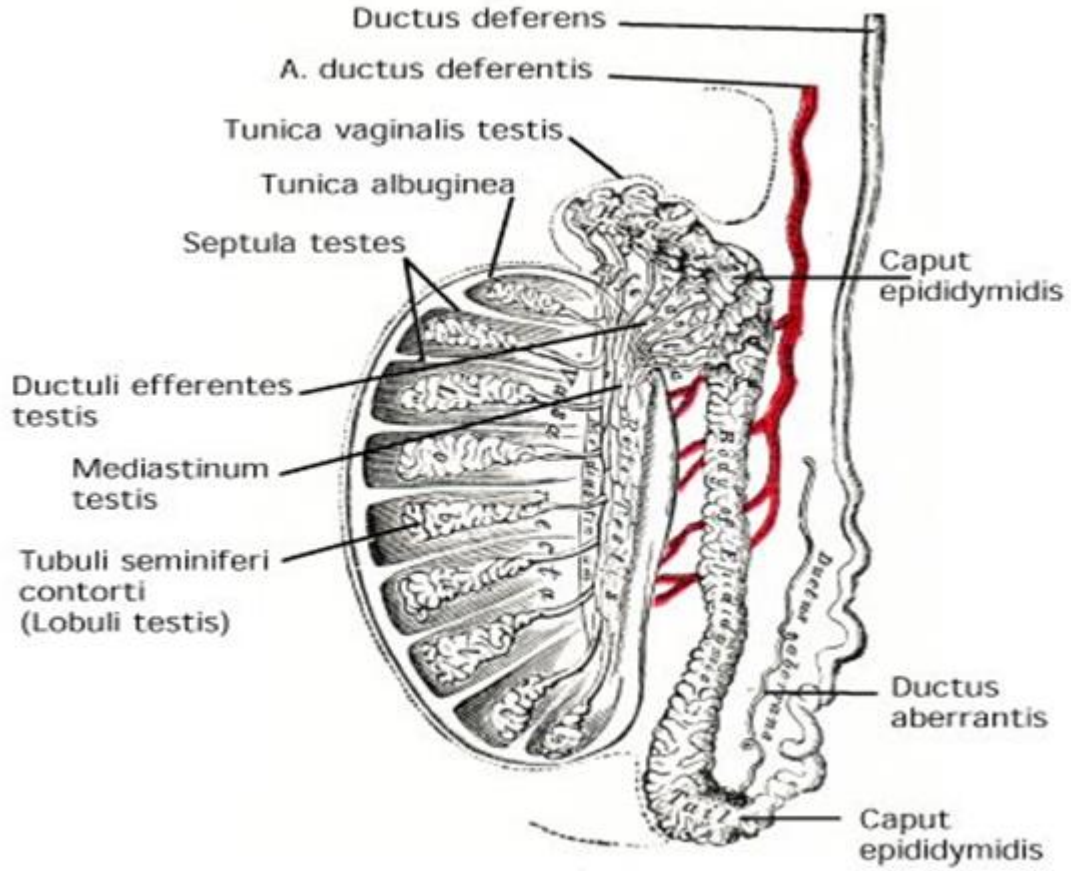
Eksternal oblik aponevroz uzantıları, eksternal spermatik fasiya'yı oluşturur.

Skrotum içerisinde, testis, processus vajinalisin distal ucu içerisine doğru uzanır. Perinatal dönem sırasında, processus vajinalisin bağlayıcı sapı, genellikle oblitere olur ve testisle ilişkili, izole bir peritoneal kese olan, tunika vajinalis olarak kalır (64).

## **2.2. Testis'in Anatomisi**

Testis ovalimsi bir organ olup scrotum içinde funiculus spermaticus'a asılıdır. Genellikle sol testis sağa göre daha aşağıdadır. Testisler, tunica albuginea denilen sert bir kılıfla örtülüdür. Testisler sperm (spermatozoa; erkek üreme hücreleri) ve özellikle testosteron hormonu üretirler. Spermiler, kısa düz borucuklarla (tubuli seminiferi recti) rete testis'e bağlanan tubuli seminiferi contorti'lerde oluşur.

Herbir testis'in yüzeyi funiculus spermaticus ve epididymis'e tutunduğu yer hariç tunica vaginalis'in lamina visseralis'i ile örtülüdür. Tunica vaginalis, kısmen testisi örten kapalı bir periton kesesi olup embriyonik processus vaginalis'in kapanan distal artığıdır. Tunica vaginalis'in lamina visseralis'i testis, epididymis ve ductus deferens'in alt bölümünü sarar. Tunica vaginalis'in yarık şeklindeki sinüs epididymis'i corpus epididymis'i ile testisin posterolateral yüzeyi arasındadır. Tunica vaginalis'in lamina parietalis'i, fascia spermatica interna'ya komşu olup lamina visseralis'ten daha çok yayılır ve yukarıda funiculus spermaticus'un distalde kısa bir bölümünü örter. Sinüs vaginalis'teki az miktardaki sıvı parietal ve visseral yaprakları birbirinden ayırarak testis'in scrotum içinde serbestçe hareketini sağlar (Şekil 1).



Şekil 1. Testis'in anatomik yapısı (24)

### 2.2.1. Testis'in damar ve sinirleri

A.testicularis, a.renalis'in hemen altında olarak aorta abdominalis'ten orijin alır. M.psoas major'un önünde olarak aşağıya doğru ilerleyen a.testicularis, anulus inguinalis profundus'tan geçerek funiculus spermaticus'a katılır. Margo posterior'dan testis dokusu içine giren a.testicularis, mediastinum'da birçok dala ayrılır. Bu dallar septula testis'leri izleyerek dağılırlar. A.testicularis'in a.ductus deferentis, a.cremasterica ve aa.pudendae externae'lerle zengin anastomozları vardır.

Testis'in venöz kanını direne eden venler önce plex.pampiniformis'i oluştururlar. Bu pleksustan çıkan 2 ven daha sonra birleşerek tek bir v.testicularis oluştururlar. V.testicularis sağda v.cava inferior'a, solda v.renalis'e dökülür. % 8 olguda sağ

v.testicularis de v.renalis direne olur. V.testicularis'in vv.scrotales posteriores, vv.pudendae externae ve vv.cremastericae ile anastomozları vardır.

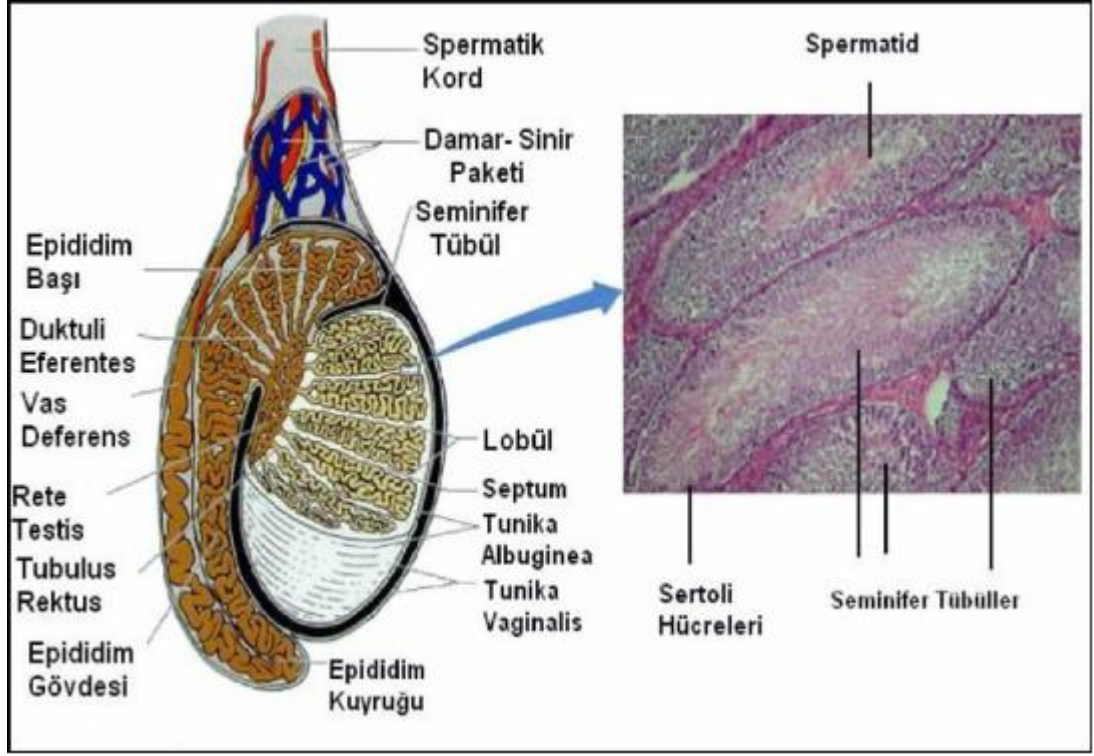
Testis lenfası 4-8 damar halinde funiculus spermaticus içinde olarak nodi paraaortici'e ulaşır.

Testis otonom sinirlerle innerve edilir. Sempatik ve parasempatik lifler plexus testicularis'i oluştururlar. Plexus testicularis'e ait sinirler a.testicularis ve a.ductus deferentis'ler etrafında olarak testis'e ulaşır. Sempatikleri med.spinalis'in T<sub>10-12</sub> segmentlerinden, parasempatikleri ise n.vagus'tan orijin alır (88).

### **2.3. Testis'in Histolojisi**

Erkek üreme sistemi haploid erkek gametin (spermatozoa, tekil spermatozoon veya sperm) devamlı üretimi, beslenmesi ve geçici olarak depolanmasından; erkek seks hormonlarının (androjenler) sentezi ve sekresyonundan sorumludur.

Erkek üreme sistemi; sperm üreten ve sentezleyen ve androjenleri salgılayan testislerden; dışarıya spermatozoa taşınmasından sorumlu olan dış kanallar sistemini oluşturan epididimis, vaza deferens, ejakülatuar kanal ve erkek uretrasının bir parçasından; salgıları semen kitlesini oluşturan ve ejaküle spermatozoaya besinler sağlayan aksesuar bezler seminal vezikül, prostat bezi ve bulbo üretral bezlerden ve erektil dokudan oluşan çiftleşme organı penisten oluşur (12, 66, 84, 87, 91) (Şekil 2).



Şekil 2. Testis'in anatomik ve histolojik yapısı (20)

Testis, epididimis ve vaza deferensin başlangıç kısmı tunika vajinalis denilen mezotelyum döşeli boşluğu içine alan deriyle kaplı bir cep olan skrotal kese içinde yer alırlar (44).

### 2.3.1. Testisler

Testisler, tunika albuginea adı verilen yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidir. Tunika albuginea testisin arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar (septum), bezi testis lobçukları/bölmeleri denilen yaklaşık 250 adet piramidal bölmeye ayırır. Bu uzantılar kesintisiz değildir ve çoğunlukla bölmeler birbiriyle bağlantılıdır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 adet seminifer tübül yer alır. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve Leydig hücreleri adı verilen interstisyel hücreleri içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testis androjenleri salgılar.

### 2.3.2. Seminifer túbüller

Her bir seminifer túbül yaklaşık 150-250 µm çapında ve 30-70 cm uzunluktadır, karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşelidir. Bir testisteki túbüllerin toplam uzunluğu 250 m civarındadır. Kıvrımlı túbüller bir şebeke oluştururlar. Bu şebekedeki her túbül başlangıçta kör uçludur ve dallara ayrılır. Her bir túbül sonlanırken lümen daralır ve düz túbüller yada tubuli rekti adıyla bilinen kısa segmentler halinde sürer. Bu düz túbüller, seminifer túbüllerin rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Mediastinumun bağ dokusunda bulunan rete, 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır. Seminifer túbüller bir fibröz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelten oluşur.

Seminifer túbülü saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olarak bulunan en içteki katman düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış miyoid hücrelerden oluşur.

Epitel iki tip hücreden meydana gelmektedir: Sertoli ya da destek hücreleri ve spermatogenik seriyi oluşturan hücreler. Spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve túbül lümeni arasını dolduracak 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermatozoonları oluştururlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerde bulunabilirler. Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu fenomen üç faza ayrılabilir: Spermatositogenez (Sperma;tohum+kytos;hücre+genesis;üretim) olarak adlandırılan evrede spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelir. Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu gerçekleşen ve spermatidlerin olduğu evre mayoz adını alır. Spermiyogenez ise spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşması süreci geçirerek spermatozoonları oluşturduğu safhadır.

Spermatogenez, bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş bir germ hücresi olan, spermatogonyum ile başlar. Bu, yaklaşık 12 µm çapında, nispeten küçük bir hücredir ve nükleusu soluk boyanan kromatin içerir. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler ve yeni oluşan hücreler iki yol izleyebilir; bir ya da daha fazla mitotik bölünmeden sonra farklılaşmamış kök hücreler olan tip A spermatogonyumlar (sperma+Yun, göne, nesil) olarak devam ederler ya da süregelen mitotik sikluslar boyunca farklılaşarak tip B spermatogonyumları oluştururlar.

Tip A spermatogonyumlar spermatogenik serinin kök hücreleridir. Tip B spermatogonyumlar ise primer spermatositlere farklılaşan öncül (progenitor) hücrelerdir. Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Bu sırada primer spermatositin 46 kromozomu vardır ve DNA'sı da 4 N'dir. Bu profazda, hücreler dört faz-leptoten-zigoten-pakiten ve diploten geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar ve sonuçta kromozomlar ayrılır. Genlerdeki "crossing over" mayozun bu safhalarında oluşur. Daha sonra hücre metafaza girer ve kromozomlar takip eden anafazda her bir kutba doğru giderler. Bu bölünmede profazın yaklaşık 22 gün dolayında bir süre alması nedeniyle incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Spermatogenik seride en büyük hücreler primer spermatositlerdir, bunlar nükleuslarında kangal yapma sürecinin değişik safhalarında kromozomların bulunması ile tanınırlar.

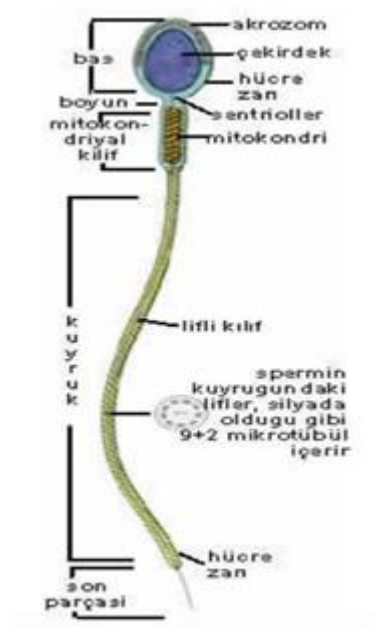
Birinci mayotik bölünmeden sonra sekonder spermatositler denilen ve yalnızca 23 kromozom içeren daha küçük hücreler oluşur. Bu sayıca azalma her hücredeki DNA miktarının eksilmesi ile birlikte olur. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayotik bölünmeye giren hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi spermatidlerin oluşmasına yol açar; bunlar 23 kromozom içerir. Birinci ve ikinci mayotik bölünmeler arasında spermatositlerde S fazı (DNA sentezi) görülmediği için ikinci bölünmeden sonra her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid hücreler meydana gelir. Böylece, mayotik sürecin sonunda haploid sayıda kromozomlara sahip hücreler oluşur. Fertilizasyonla bunlar normal diploid sayıya dönerler. Hücre bölünmesindeki

indirgeyici işlev sebebiyle mayotik süreç kromozom sayısının türler için sabit, belirli bir miktarda kalmasını sağlar (13).

### 2.3.3. Spermiyogenez

Spermiyogenez, spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoon'a dönüşme sürecidir. Bu süreçte hücre bölünmesi gerçekleşmez.

Spermatidler, küçük boyutları (7-8  $\mu\text{m}$  çapta), yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren nükleusları ile ayırt edilebilirler. Seminifer tübüllerde lümen yakınında yerleşmişlerdir. Spermiyogenez, akrozom oluşumunu, çekirdek yoğunlaşmasını ve uzamasını, kamçı gelişmesini ve sitoplazmanın büyük bir bölümünün kaybolmasını içeren karmaşık bir süreçtir (Şekil 3). Sonuçta, daha sonra seminifer tübül lümenine bırakılan olgun spermatozoon oluşur. Spermiyogenez üç evreye ayrılabilir.



Şekil 3. Spermin yapısı (24)



### *Golgi Fazı*

Spermatidin sitoplazması, çekirdeğin yakınında yer alan belirgin bir golgi kompleksi, mitokondriyumlar, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazma retikulumu tübüllerini içerir. Proakrozomal granüller olarak adlandırılan PAS - pozitif küçük granüller golgi kompleksinde birikir ve daha sonra birleşerek zarla sınırlı bir akrozom vezikülünün içinde yer alan tek bir akrozom granülü oluştururlar. Sentriyoller göç ederek, oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma yerleşirler. Kamçı aksonemi oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden çekirdeğe doğru göç ederken hareket ettikçe aksonem bileşenleri çevresine sarılır.

### *Akrozomal Evre*

Akrozom vezikülü ve granülü, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra akrozom adını alır. Akrozom, hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozom bu yüzden özelleşmiş bir lizozom gibi işlev görür. Bu enzimlerin, oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Spermatozoonlar bir oositle karşılaştığında, akrozomun dış zarı birçok bölgede spermatozoonun plazma zarı ile kaynaşarak akrozom enzimlerinin hücre dışına boşalmasını sağlar. Bu işlem akrozom reaksiyonu olarak bilinir ve döllenmenin ilk basamaklarından biridir.

Spermiyogenezin bu evresinde, spermatid seminifer tübülün tabanına doğru yönelir ve aksonem lümene doğru uzanır. Ayrıca, çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden biri gelişerek kamçıyı oluşturur. Mitokondriyumlar da kamçının proksimal kısmı etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge, spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur. Mitokondriyumların bu şekilde yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ile ilgili ve enerji tüketimi yüksek olan bölgelerde yoğunlaşmasının başka bir örneğini oluşturur. Kamçı hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur.

Geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlar tübülün lümenine bırakılırlar (40).

#### *Matürasyon Fazı*

Geriye kalan artık sitoplazma, Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlar tübülün lümenine doğru salınırlar.

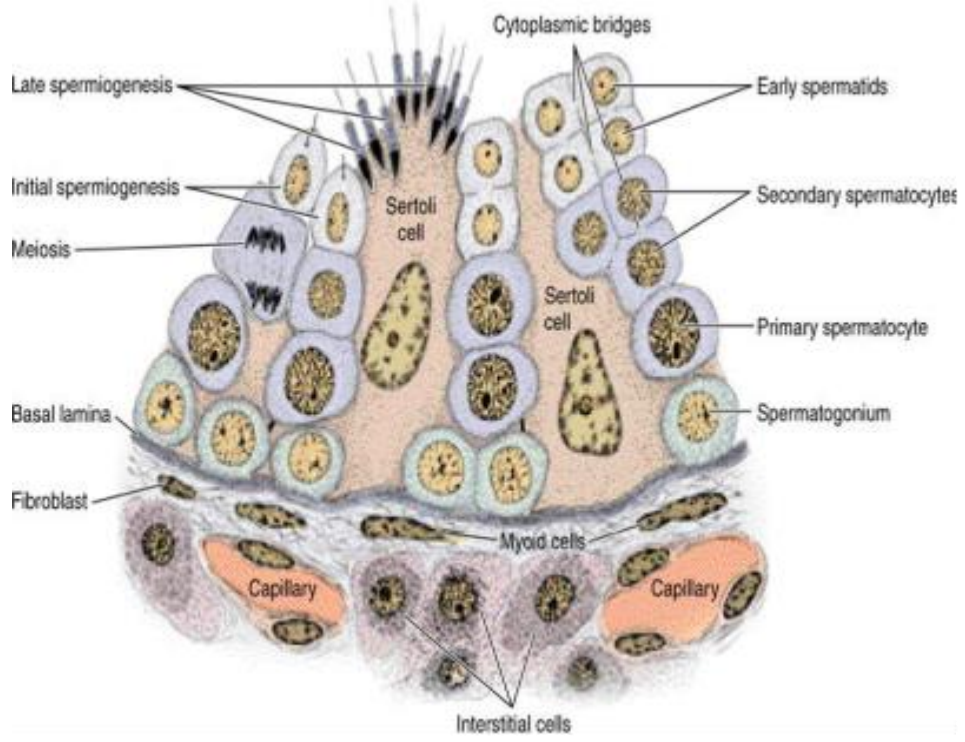
Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositte spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynar. Bu ayrıntı aşağıda açıklanan seminifer epitel siklusunu anlamakta önemli bir rol oynayabilir. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma olur.

Testislere deneysel <sup>3</sup>H-timidin enjeksiyonu ile gönüllüler üzerinde yapılan araştırmalarda insanda spermatogonyum safhası ile spermatozoon oluşumu arasındaki sürenin yaklaşık 64 gün olduğu gösterilmiştir. Sürecin yavaş olmasının yanısıra, spermatogenez, eş zamanlı olarak her seminifer tübülde aynı anda gerçekleşmez; bu olay bir dalgalanma biçiminde olur. Bu durum her bölgesinde spermatogenezin farklı bir safhasının izlendiği seminifer tübüllerin düzensiz görünümünü açıklar. Aynı zamanda neden seminifer tübüllerin bazı bölgelerinde spermatozoonlar bulunduğu halde diğer bölgelerde sadece spermatidlerin bulunduğunu da açıklamaktadır. Seminifer epitel siklusu germinal epitelde belli bir hücre evresinin ardışık iki görünümü arasında oluşan matürasyon değişiklikleri dizisini ifade eder. İnsanda her bir siklus yaklaşık  $16 \pm 1$  gün sürer ve spermatogenez 4 siklustan sonra biter ( $64 \pm 4,5$  gün) (40).

### **2.3.5. Sertoli hücreleri**

Sertoli hücreleri testislerin işlevi açısından çok önemlidir. Bu hücreler spermatogenez serisindeki hücreleri saran uzun, piramidal hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, tepe kısımları ise çoğunlukla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopunda, spermatogenik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda yan uzantı nedeniyle, Sertoli hücrelerinin sınırları iyi belirlenemez. Elektron mikroskopu ile yapılan çalışmalarda, bu hücrelerin çok sayıda düz endoplazma retikulumu, az granüllü endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş Golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozomlar içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış çekirdeğinde çok sayıda girinti, belirgin çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin bulunur.

Yan yana bulunan Sertoli hücreleri, hücrenin alt yan yüzlerinde engelleyici sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunarak kan-testis bariyerini oluştururlar. Spermatogonyumlar, bu bariyerin altında yer alan bazal bölmede yerleşmiştir. Spermatogenez sırasında, spermatogonyumların bölünmesi sonucu oluşan bazı hücreler bu bağlantı noktalarından bir şekilde geçerek, bariyerin üzerinde yer alan adluminal bölmeğe ulaşırlar. Spermatisitler ve spermatidler, bariyerin üzerinde Sertoli hücrelerinin yan ve üst kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatisitlerin kamçı kuyrukları geliştikçe, bunlar Sertoli hücrelerinin üst uçlarından çıkan saçaklar halinde görülürler (13) (Şekil 4).



Şekil 4. Sertoli hücresi ve spermatogenik seri hücreleri (24)

Sertoli hücreleri "aralık bağlantıları" (gap junction) adı verilen birleşmelerle de bağlanmıştır; bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. Bu da, yukarıda sözü edilen seminifer epitel döngüsünün ilişkilerinde önemli olabilir.

Sertoli hücrelerinin birkaç işlevi vardır;

1-) Gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin düzenlenmesi. Yukarıda anlatıldığı gibi spermatogenez serisindeki hücreler birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanmışlardır. Bu hücre ağı, Sertoli hücrelerinin yaygın sitoplazmik dallanmaları ile fiziksel olarak desteklenir. Spermatozitler, spermatidler ve spermatozoonlar kan-testis bariyeri ile kan dolaşımından yalıtıldığı için, bu spermatogenik hücreler besin maddelerinin ve metabolitlerin alınıp verilmesinde Sertoli hücrelerine bağımlıdır. Sertoli hücrelerinin oluşturduğu bariyer gelişen sperm hücrelerini bağışksal saldırıdan da korur.

2-) Fagositoz. Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde atılır. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosite edilir ve sindirilir.

3-) Salgılama. Sertoli hücreleri sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve spermlerin taşınması için kullanılan bir sıvı salgılar. Androjen-bağlayıcı protein üretimi folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında Sertoli hücreleri tarafından gerçekleştirilir ve seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaştırılmasını sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiole çevirebilir. Bu hücreler aynı zamanda, ön hipofiz bezinden FSH sentezini ve salgılanmasını önleyen inhibin adı verilen bir peptid salgılar.

4-) Anti-Müllerian hormon üretimi. Ayrıca Müller kanalını baskılayıcı hormon olarak da adlandırılan ve dönüştürücü büyüme faktörü ailesine üye bir glikoprotein olan bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller kanallarının gerilemesini sağlar. Testosteron ise Wolf kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlar.

5-) Kan-testis bariyeri. Seminifer tübüllerin iç kısmıyla kan arasında bir bariyerin bulunması, testis sıvısında kandan gelen çok az madde bulunmasına yol açar. Testis kapilleri pencereci tiptedir ve büyük moleküllerin geçişine izin verir. Spermatogonyumlar kanda bulunan maddelere kolayca ulaşabilir. Ancak, Sertoli hücreleri arasında bulunan engelleyici bağlantılar, bir bariyer oluşturarak büyük moleküllerin Sertoli hücreleri arasındaki boşluğa taşınmasını engeller. Böylece, spermatogenezin daha ileri aşamalarındaki germ hücreleri, kandaki zararlı maddelere karşı korunmuş olur.

6-) İnhibin B üretimi. İnhibin B hipofizdeki FSH üretimini engeller (13)

### **2.3.6. İnterstisyel doku**

Testisin seminifer tübülleri arasındaki boşluklar bağ dokusu birikintileri, sinirler, kan ve lenfatik damarlarla doldurulmuştur. Testiküler kapiller pencerecidir ve kan

proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine müsaade ederler. İnterstisyel alandaki lenf damarlarının oluşturduğu yoğun şebeke, bu organdan alınan interstisyel sıvı ile lenf sıvısının bileşimindeki benzerliği açıklamaktadır. Bağ dokusu çeşitli tipte hücreler içerir; bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Püberte sırasında ek bir hücre tipi belirgin hale gelir, bu yuvarlak ya da poligonal şekilli olan ve merkezi bir nükleusu ve küçük lipid damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazması bulunan bir hücredir. Steroid salgılayan hücre özelliklerini gösteren bu hücreler, testisin interstisyel ya da Leydig hücreleridir. Bu hücreler, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler. Testosteron sentezi mitokondri ve düz endoplazma retikulumunda bulunan enzimlerce gerçekleştirilerek, hücre organelleri arası işbirliğine bir örnek oluşturur.

İnterstisyel hücrelerin hem aktivitesi ve hem de miktarları hormonal uyarılara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında üretilen plasental gonadotropik hormon maternal kandan fetusa geçer ve androjenik hormonları üreten bol miktardaki fetal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonların bulunması embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 4 ½ ayına kadar tamamen farklılaşmış olarak kalırlar; bundan sonra testosteron sentezinde görülen bir azalma ile birlikte gerilerler. Daha sonra gebelik boyunca ve hipofizden salınan luteinizan hormon uyarımı altında testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenmede kalırlar (13).

### ***2.3.7. Testisin histofizyolojisi***

37°C olan vücut içi sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezin regülasyonunda ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35°C'dir, bu birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Zengin bir venöz pleksus her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Diğer faktörler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki krameter kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir (13).

### **2.3.8. Kan-testis bariyeri**

Kan ile seminifer túbüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması testiküler sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesini açıklar. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemli olan bu bariyer, Sertoli hücrelerinin arasındaki tıkaçıcı bağlantılar ile oluşturulur.

Spermatogonyal hücrelerin farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkması yol açar. Seksüel olgunlaşmanın, immünolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması sebebiyle farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immun yanıtı teşvik edebilirler. Kan-testis bariyeri, gelişen spermler ve immun sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldıracaktır. Bu bariyer seminifer túbüllere immunglobulinlerin geçmesini önler ve bu sayede serumlarında çok yüksek düzeylerde sperm antikorları bulunan hastalarda herhangi bir fertilitte bozukluğu görülmez. Sertoli hücre bariyeri böylece seminifer epiteli bir otoimmün reaksiyondan korunmuş olur (13).

## **2.4. Dihidroksifenoksiasetikasit-amin= $C_8H_6Cl_2O_3$**

### **2.4.1. 2,4 D-amin'in fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri**

2,4 D-amin beyaz-sarı renkte pul, toz, kristal ve katı madde halinde bulunabilir, fenolik aromaya sahiptir (92). Fenoksiherbisitler, ticari preparatlarda amin, ester ve tuzları türevlerinde bulunabilirler. Bununla beraber etkin maddesi serbest asit formudur (41, 80).

Tablo 1. 2,4 D-amin'in fiziksel ve kimyasal özellikleri(44).

Molekül Formülü	$C_{10}H_{13}C_2NO_3$
Molekül Ağırlığı	221.04 g/mol
Suda Çözünürlüğü	900 mg/L
Erime Noktası	138 °C
Kaynama Noktası	160 °C
Buhar Basıncı	0mm Hg (20°C) 1.4x10-7mm Hg (25°C)
pKa	2.3



#### **2.4.2. 2,4 D-amin'in absorpsiyonu, dağılımı, atılımı**

2,4 D-amin gastrointestinal bölge tarafından iyi bir şekilde absorbe edilmektedir. Bu bileşiklerin akciğerler tarafından emilmesi daha düşük seviyededir. Deriden emilimi ise minimum miktarlarda olur. 2,4 D-amin'in akciğer ve deriden bileşikleri absorblanabilir. Klorofenoksi bileşiklerinin yağ yapılarında birikiminden anlamlı bir şekilde söz edilmez.

Altı-sekiz saat arasında 1 mg/kg 2,4 D-amin uygulanan domuzların kan, karaciğer, böbrek ve akciğerlerinde ve sığırcaların dalaklarında 2,4 D-amin birikimi gözlenmiştir. Kas ve beyinde ise düşük seviyede gözlenmiş olup aradan 24 saat geçtiğinde ise dokularda ilaca rastlanmamıştır. Sadece altı gün daha eser miktarda hayvanların laktaz asidinde gözlenebilmektedir. 2,4 D-amin sığırcalarda ve domuzlarda doğrudan plasentaya geçer. Sığırcaların uterus, plasenta, fetus ve amniyonik sıvılarında % 20 oranında 2,4 D-amin maddesi tespit edilmiştir. Tavukların yumurtalarında düşük seviyelerde gözlenir (26). 2,4 D-amin çoğu türde oral doz uygulamasından sonraki 8 saat içinde yüksek plazma konsantrasyonuna ulaşmaktadır (25). 2,4 D-amin'in 5 mg/kg vücut ağırlık dozunun verildiği insanlarda emilimi tam ve hızlıdır. Plazmada yüksek seviyenin, bir çalışmada 4 saatten sonra meydana geldiği belirtilirken, benzer bir çalışmada da 7 saat içinde meydana geldiği belirtilmiştir (50, 77). Gebe memelilerde herbisit tek dozunun % 17'si plasentaya geçerek embriyoya ulaşabilmektedir (53).

Sonuç olarak; 2,4 D-nin'in gastrointestinal sistemden iyi bir şekilde emildiği, bileşiklerinin ise akciğer ve deriden daha kolay emildiği bildirilmiştir (41).

#### **2.4.3. 2,4 D-amin'in üretimi ve tüketimi**

Dünya'nın her yerinde yaygın olarak kullanılan herbisitlerin tüketim miktarları, her tarafta toksik etkilerinin artması nedeniyle, gelişmiş ülkelerde azaltılırken, diğer ülkelerde ekonomik tercihler sonucu kullanımı büyük boyutlara ulaşmaktadır.

Otuz bin ton olarak tahmin edilen dünyanın yıllık 2,4 D-amin tüketimi, tüketilen toplam herbisitinin onda biridir. İngiltere’de 1975 yılında üretilen 2,4 D-amin miktarı beş bin tona ulaşmıştır. Amerika Birleşik Devletleri’nde, sadece 1981 yılında üç yüz bin ton herbisit tüketilmiştir. Yıllara göre artış ürkütücüdür.

Ülkemizde de kullanımı fazladır. Kayıtlara göre sadece Sivas’ta 1986-1987 yıllarında yaklaşık 120 ton 2,4 D-amin tüketilmiştir (65).

2,4 D-amin’in prostat kanser hücre kültürlerinde androjenik etki gösterdiği bildirilmiştir. Tarımda 2,4 D-amin spreyleyici olarak çalışan erkeklerde zaman içerisinde azospermi, nekrospermi ve teratospermi geliştiği bildirilmiştir (10).

#### ***2.4.4. 2,4 D-amin’in kullanım alanları***

2,4 D-amin; amin tuzları, alkali metal tuzları ya da esterleri çeşitli biçimlerde meralarda, çimlendirme ve golf alanlarında, parklarda ve hububat etkili yerlerde zararlı geniş yapraklı otlara karşı öldürme, orman ve ağaçlandırma bölgelerinde zararlı bitkileri, çalıları ve sağlıklı ağaçları baskılama amacıyla kullanılmaktadır. Granüler 2,4 D-amin su herbisiti olarak göllere, havuzlara ve sulama kanallarına uygulanmaktadır. Çok küçük dozlarda bahçecilikte büyüme düzenleyicisi olarak yararlanılmaktadır (48).

#### ***2.4.5. 2,4 D-amin’in doğada izlediği yol***

2,4 D-amin havada, suda, toprak üzerinde ve bitki yüzeylerinde fotolizis sonucu bozulmaya uğrar. Topraktaki 2,4 D-amin, hızlı bir şekilde hidroliz olmakla birlikte; plazmitler aracılığı ile olduğu kanıtlanan mikrobik yıkımı da artık bilinen bir gerçektir. Suda dört aya kadar bozulmadan kalabilen 2,4 D-amin burada en çok fotolizis ile bozulmakta, anaerobik şartlarda mikrobik yıkıma uğradığı ileri sürülmektedir. 2,4 D -amin’in sulu çözeltileri fotodekompozisyona uğradığı zaman son oksidasyon ürünü karbondioksittir (11, 17, 18, 48, 71).

2,4 D-amin'in bitkilerdeki metabolizması: yan zincirin indirgenmesi, aromatik zincirin hidroksilasyonu ve bitkinin kendi bileşenleri ile konjugasyonu biçiminde üç mekanizma ile olur (30, 31, 48, 56).

#### **2.4.6. 2,4 D-amin'in insanda biyolojik yarı ömrü**

Bireysel farklılıklar yanında, çok çeşitli çevresel faktörler de 2,4 D-amin'in vücutta alıkonmasını etkiler. 2,4 D-amin'in tek oral dozları için, kan plazmasındaki biyolojik yarı ömrü yaklaşık bir gün olarak ardışık dozlarda ise ortalama 42 saat olarak bulunmuştur (48, 77).

#### **2.4.7. 2,4 D-amin'in canlılar üzerine etkileri**

Belirli periyotlarda kuyrukları 2,4 D-amin türevi kimyasal bileşiklerin çözeltilerine batırılan fareler ölmüşlerdir; bu da oldukça etkili bir dermal emilimini işaret eder (19, 36).

2,4 D-amin'in 335 mg/litre plazma düzeyi insanlarda hiç bir zehirlenme belirtisi göstermezken, genel olarak 447-826 mg/litre plazma düzeyi arasında öldürücü olduğu haber verilmektedir (4,28).

Bu kimyasalın yüksek derişimlerinin ratlarda düşük vücut ağırlığına neden olduğu, ayrıca gebe memelilerde yapılan tek doz denemelerinde, azımsanamayacak bir oranda plasentayı geçerek fetüse ya da embriyoya ulaştığı belirtilmiştir (14).

Bu herbisit ile şiddetli zehirlenmiş hayvanlarda kan beyin bariyerinin kısmen bozulduğu ve birikimine bağlı olarak depresyona neden olduğu ileri sürülmektedir. Arka bacaklarda gözlenen yarı felç durumu miyotoksik etkisine işarettir (29).

Gebe farelere 124 mg/kg 2,4 D-amin vücut ağırlığı dozu her gün verilirse yavrularda yarık damağa neden olur ayrıca 1 mm/kg vücut ağırlığı dozu fetal ağırlığı azaltırken, fetüs ölümünü de artırır. Bu bulgular teratojenik ya da fetotoksik olduğunu destekler görünmektedir (73).

Karaciğer, böbrek ve üreme sisteminde işlevsel bozukluklar, periferik sinir sisteminde ve dolaşım sisteminde anormallikler, merkezi sinir sisteminde elektroensefalografik değişimler, şüursuzluk ile birlikte özgün belirtiler 2,4 D-amin ile etkileşen bireylerde rastlanmıştır (34).

Zorunlu ya da rastlantı ile uzun süre herbisitle karşı karşıya kalan insanlarda istatistiksel olarak yumuşak doku sarkomlarının ve karın bölgesi kanserlerinin görülme oranının arttığı bulunmuştur. Ayrıca kromozomal bozukluklar görüldüğü de belirtilmektedir (43, 69).

Herbisit 2,4 D-amin kas laktat dehidrogenaz enzim aktivitesini artırırken, kan serum alkalik fosfat ve laktat dehidrogenaz enzimleri düzeyinde azalışa neden olmaktadır. 2,4 D-amin, rat karaciğerinde peroksizom artışına paralel olarak katalaz ve asetiltransferaz enzimleri aktivitesini artırırken, kan lipid düzeyini düşürmektedir (81).

## **2.5. Melatonin**

### ***2.5.1. Tanımı ve yapısı***

Pineal bezden sentezlenen bir nörohormon olan melatonin yapıca N-asetil 5 metoksi triptamindir. Melatonin (N-acetyl-5methoxytryptamine), pineal bez tarafından sirkadiyen ritimde ve karanlıkta salgılanan bir hormondur (52).

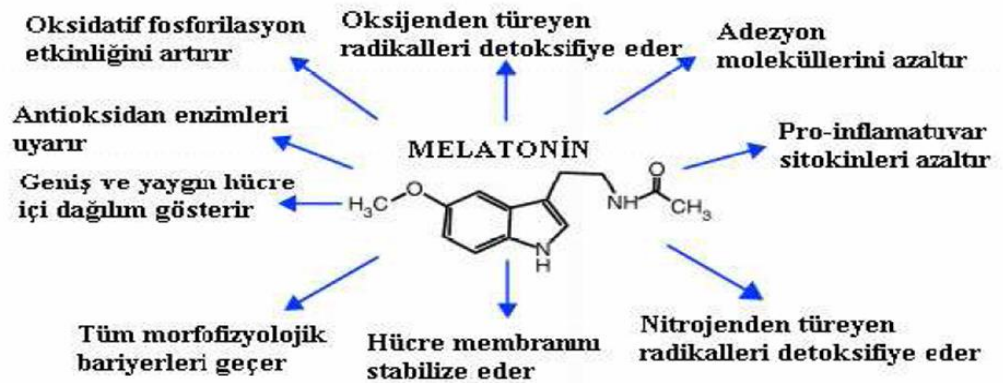
Pineal bez (epifiz bezi) insanlarda üçüncü ventrikülün arkasında, mezensefalunun superior kollikusları arasındaki alanda yer almaktadır. Yaklaşık 50-200 mg ağırlığındaki pineal bez septum ile ayrılan hücre lobüllerine sahiptir. Nöroglia ve pinealosit adı verilen iki çeşit hücre tipine sahiptir. Anatomik yerleşimi nedeniyle radyolojik olarak belirleyici bir özelliği vardır. Pineal bez yaşla birlikte çeşitli derecelerde kalsifikasyon göstermesine rağmen hayat boyu aktivasyonunu sürdürmektedir (21). Nöroendokrin bez olarak kabul edilen pineal bezin endokrin fonksiyonu sinirsel innervasyona bağlı olarak gerçekleşmektedir. Gözlere gelen aydınlık ya da karanlık uyarılarına bağlı olarak pineal bezden melatonin salgılanmaktadır. Karanlıkta melatonin salgılanmasında artış olması sebebiyle karanlık hormonu olarak da adlandırılmaktadır (21). Pineal bezden ve diğer organlardan salgılanan melatonin, hormondan daha çok bir antioksidan ve anti enflamatuar özelliği taşıyan bir maddedir. İlk olarak 1917 yılında tanımlanan melatonin 1958 yılına kadar izole edilememiştir. Melatonin, 1958 yılında dermatolog Lerner tarafından belirlenmiştir (61). Melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) ilk olarak sığır hipofizinden izole elde edilmiştir. Özellikle memelilerde bu maddenin oluşumu ve salınımı geceleri uyku sırasında artmakta ve kan düzeyleri yükselmektedir. Gece oluşabilen melatoninin N-asetil serotonin üzerine hidroksiindol-O-metiltransferaz etkisiyle oluştuğu kabul edilmekte ve bu enzimin melatonin sentezinde kontrol noktası olarak görev yaptığı bildirilmektedir (59). Pinealositler tarafından üretilen melatoninin keşfinden bugüne birçok önemli fonksiyonu tespit edilmiştir. Melatonin gece boyunca  $\beta$  adrenerjik reseptörlerinin postsnaptik aktivasyonu ile salınmaktadır. Melanositlerin gece süresince salımı nedeniyle karanlık alanda kimyasal salımı gerçekleşmektedir. Işık pinealosit aktivasyonunu inhibe ederek melatonin sentezini azaltmaktadır. Pinealositler ışık yoğunluğundaki değişikliklere cevap vererek suprakiazmatik çekirdek üzerine etki ederek sirkadyen ritmi senkronize ederler; bu ritm özellikle biyolojik saat ile örneğin hipotalamusun suprakiazmatik çekirdeği ile yönetilmektedir. Melatoninin sentezi noradrenerjik mekanizma ile kontrol edilir ki bu gözden gelen nöral stimulus ile indirekt olarak düzenlenmektedir. Işık yoğunluğu ile ilgili bilgiler suprakiazmatik çekirdeğe retino hipotalamik yol ile ulaşmaktadır. Bundan sonra elektiriksel nöral sinyaller üst servikal korda ve superior servikal gangliana iletilmekte, pineal (epifiz) beze postganglionik sempatik fibriller boyunca ulaştırılmaktadır. Sağlıklı bireylerde en fazla melatonin sentezi gece yarısı ile saat 02:00 arasında meydana gelmektedir. Bununla

birlikte gün boyunca minimum üretim olmaktadır. Karanlıkta noradrenalinlerin salımının gerçekleşmesi ile birlikte pineal enzimler melatonin sentez ve salımını aktive ederler. Melatoninin sirkadyen sinyali fotoperiodik memelilerde, tekrarlanan sıklısta mevsimsel değişiklikler ile gerçekleşmekte ve onun bağlanacağı membran reseptörlerini de etkilemektedir. Bir çok çalışmada melatoninin çok kompleks özelliklerinin olduğu belirtilmektedir. Bu araştırmalarda melatoninin reseptörler üzerindeki aktivitesinden bağımsız olan etki mekanizmaları ve hücreler arası ilişkileri vurgulanmaktadır. Bu yüzden Melatonin çok güçlü bir serbest radikal temizleyicisi olarak da işlev yaptığı gösterilmiştir. (21).

Melatonin vücutta endokrin sistemin düzenlenmesi, immun fonksiyonun artırılması, düz kas tonusunun ayarlanması ve gonadal fonksiyonların baskılanması gibi birçok fizyolojik işlevlerde görev alır (6).

Melatonin hormonu indolamine ailesinin bir üyesidir ve onun elektron-donör özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidan özelliğine sahiptir. Melatonin hormonu, hem yağda hem de suda çözünebilir özelliğe sahip olduğu için, nükleus dahil hücrenin her organeline ulaşabilir. Bu özellik, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlamaktadır (6).

Sonuç olarak melatonin sadece bir hormon olarak değil, aynı zamanda moleküler hasara karşı güçlü bir koruyucu olarak etki göstermektedir



Şekil 5. Melatoninin antioksidan özellikleri (52)

### **2.5.2. Melatonin biyosentezi ve metabolizması**

Melatonin hormonu, pineal bez yapısında bulunan ve parankimal hücrelerin çoğunluğunu oluşturan pinealositler tarafından sentezlenir. Bu hücreler tarafından gerçekleştirilen melatonin sentezi için triptofan aminoasitine gereksinim vardır. Kan dolaşımından pinealosit içerisine alınan triptofan, ilk önce triptofan 5-hidroksilaz enzimi aracılığıyla 5-hidroksitriptofan'a, 5-hidroksitriptofan ise L-aromatik aminoasit dekarboksilaz (dopa dekarboksilaz) vasıtasıyla 5-hidroksitriptamin'e (serotonin) çevrilir. Serotonin de N-asetiltransferaz (NAT) ile N-asetilserotonin'e ve son olarak N-asetilserotonin, hidroksiindol-O-metiltransferaz (HIOMT) enzimi tarafından melatonine dönüştürülür (13, 22, 23, 45, 49).

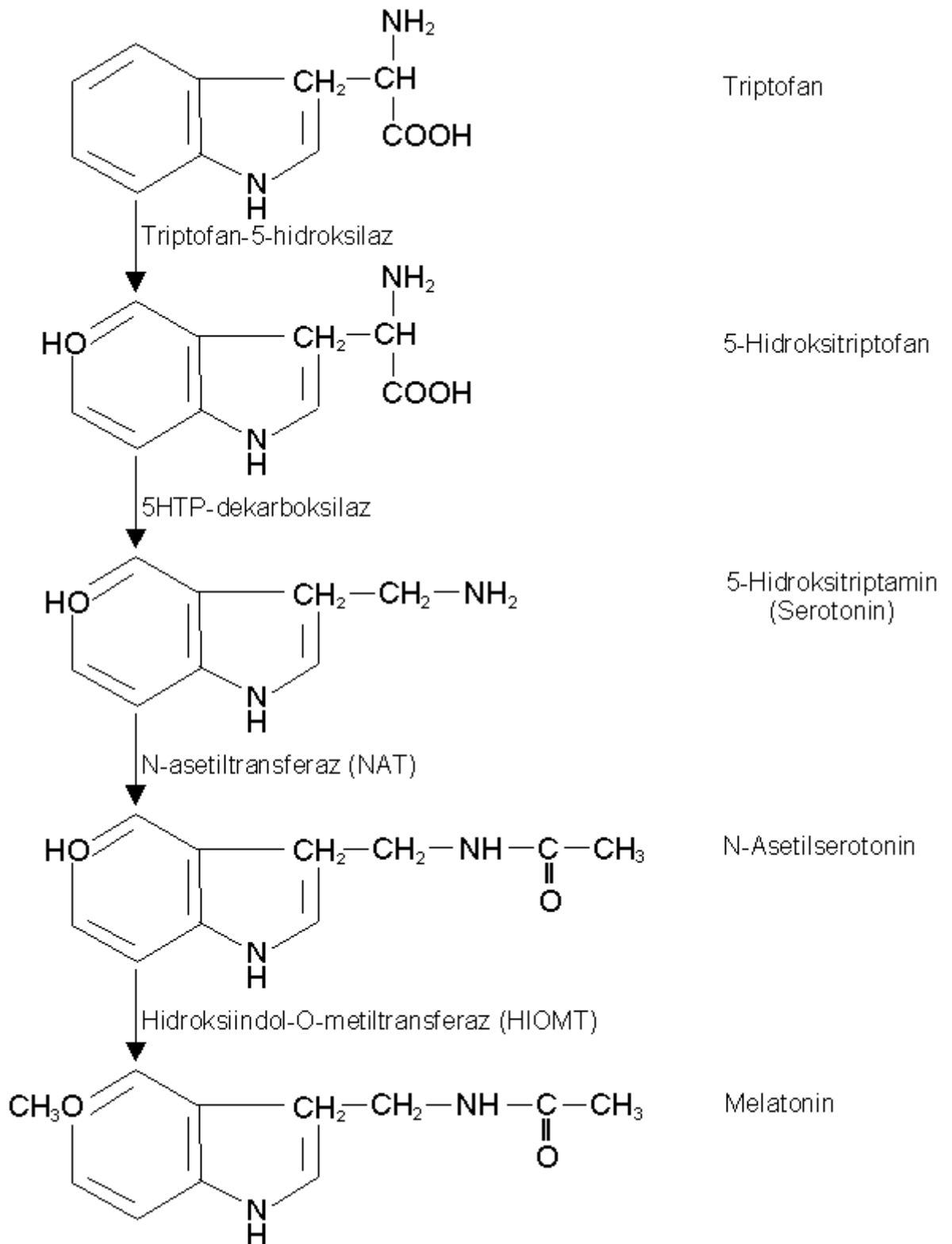
Melatonin sentezlendikten sonra depolanmaz. Düşük molekül ağırlık ve lipofilik, hidrofilik özelliklerinden dolayı pasif diffüzyonla dışarı atılır. Kanda bulunan melatonin % 70 oranında plazma albuminine bağlıdır. Dolaşımdaki melatonin beyin omurilik sıvısı da dahil olmak üzere tüm biyolojik sıvılara dağılır. Melatonin anneden fetüse plasental yol, yenidoğanda süt ile geçmektedir. Melatoninin kandaki yarılanma süresi 10-40 dakikadır. Esas olarak karaciğerde metabolize olmaktadır (86).

### **2.5.3. Melatonin etki mekanizması**

Melatonin lipid çözünürlüğünden dolayı hücre membranını kolaylıkla geçer ve tüm hücre organellerine nüfuz edebilir. Fizyolojik etkilerini hem reseptör aracılığıyla, hem de reseptörden bağımsız olarak gösterebildiği bildirilmiştir. Beyinde ve suprakiazmatik nükleusta melatonine ait membran reseptörleri belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda melatonin reseptörü klonlanmış ve G proteine bağlı reseptör ailesine ait olduğu gösterilmiştir. Periferik immün hücrelerde melatonine ait membran reseptörlerinin varlığı saptanmıştır. Bunlar ikinci haberci olarak cAMP'i kullanırlar. Melatoninin nükleusta bağlandığı bölgeler hem merkezi sinir sisteminde hem de periferik dokuda bulunmaktadır ve klonlanmıştır. Melatoninin reseptörden bağımsız etkileri de vardır. Bu etkilerinde aracı olarak kalmodulin kullanılır ve Ca<sup>+2</sup> ile ilişkili olan hücre içi olaylar değişikliğe uğrar (52).

Melatoninin farmakolojik olarak tanımlanmış iki membran reseptörü bulunmaktadır. ML1, yüksek affiniteli (pikomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yeri olup, a ve b alt tipleri gösterilmiştir. ML2 ise, düşük affiniteli (nanomolar konsantrasyonlarda) bağlanma yerleri olarak tanımlanmıştır. ML1 reseptörlerinin aktivasyonu, G proteini üzerinden, adenilat siklazı inhibe ederek, hedef hücrelerde siklik AMP (sAMP) düzeyini düşürür. Bu reseptörler, muhtemelen, retinal fonksiyonların, sirkadiyen ritimlerin ve üremenin regülasyonunda rol oynamaktadır. ML2 reseptörlerinin aktivasyonu ve dağılımı hakkında henüz kesin bilgi mevcut değildir.





Şekil 6. Melatonin hormonunun biyokimyasal sentezi (22)

#### **2.5.4. Melatoninin antioksidan etkisi**

Melatoninin antioksidan özelliği ilk kez Lanas ve ark tarafından ortaya konulmuş ve daha sonraki yapılan çalışmalarla bu durum desteklenmiştir. Melatoninin antioksidan özelliğini 3 ana başlık altında toplamak mümkündür (78).

##### **2.5.4.1. Direk antioksidan etkisi**

Melatoninin direkt olarak  $O_2$ , OH,  $H_2O_2$ , HOCl, NO,  $ONOO^-$  gibi oksidatif strese neden olan serbest radikalleri detoksifiye ettiği ve bunların biyomoleküller üzerindeki zararlı etkilerini önlediği bildirilmektedir. Melatoninin yapısında bulunan pirol halkası melatonine antioksidan özellik kazandırır.  $O_2$  varlığında, melatoninin pirolhalkasının indolamin 2,3-dioksijenaz (İDO) ile enzimatik ya da hemin ile nonenzimatik olarak yıkımı, yüksek reaktiviteye sahip olan, N<sup>1</sup>-asetil-N<sup>2</sup>-formil-5-metoksikinüramin (AFMK) oluşumu ile sonuçlanır. Aynı zamanda  $H_2O_2$  varlığında melatoninin AFMK oluşturduğu ve radikal tutucu etki gösterdiği belirtilmektedir. (8, 37, 75, 78).

Melatonin yüksek bir afinite ile OH radikalini bağlayarak, indolil katyon radikalini oluşturmaktadır. Bu radikalde  $O_2$ 'yi yakalayarak AFMK'ya dönüşmektedir. Daha sonra AFMK arilamin formamidaz (AFA)'nın katalizlediği reaksiyonla N<sup>1</sup>-asetil-5-metoksikinüramin (AMK)'e dönüşmektedir. Ayrıca OH varlığında indolil radikali, 3-hidroksimelatonin oluşturmaktadır. Oluşan bu metabolitin idrar seviyesi radikal oluşum miktarının göstergesi olarak kullanılmaktadır. Yapılan karşılaştırmalı çalışmalarda melatoninin en güçlü antioksidanlardan biri olduğu gösterilmektedir. Melatonin, zincir reaksiyonlarını kırabilen alfatokoferol, askorbat ve GSH gibi antioksidanlardan farklı olarak LPO'yu peroksil radikalini yakalayarak sonlandırmaktadır. Bu antioksidanlarla kıyaslandığında melatoninin GSH'dan 5 kat ve mannitolden 14 kat daha güçlü bir şekilde OH radikalini yakaladığı in vitro çalışmalarda gösterilmiştir (37, 82).

Melatonin 5-OH-triptofan, 5-OH-triptamin ve serotonin ile kıyaslandığında, NO oluşumunu azaltan en güçlü indol olduğu belirlenmiştir. Melatoninin doza bağımlı bir

şekilde, in vitro koşullarda, ONOO<sup>-</sup>'in neden olduğu oksidasyonu önlediği ve kendisi nitrasyona uğrayarak ONOO<sup>-</sup>'i detoksifiye ettiği; in vivo modelde de nitrotirozin oluşumunu baskıladığı gösterilmiştir (21, 78).

#### 2.5.4.2. Antioksidan enzim aracılı antioksidan etkisi

Melatoninin GSH-Px, GSSG-Rd, glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve glutamilsistein sentetaz, SOD gibi bazı antioksidan enzimlerin gen ekspresyonlarını artırarak oksidatif stresi baskıladığı ortaya konulmuştur (8, 21). Yapılan hayvan modeli çalışmalarında gündüze kıyasla, gece öldürülen ratların beyin GSH-Px aktivitesinin daha yüksek bulunması, melatoninin antioksidan etkisine bağlanmaktadır (51) Melatoninin etkisi ile beyin, pineal bez, kalp, akciğer, karaciğer, bağırsak, eritrosit aktivitelerinin, yaklaşık olarak % 22 ile % 138 oranında arttığı belirtilmiştir. Ratlarda özellikle beyin dokusu, karaciğer ve böbrekte GSH-Px aktivitesinin melatonin uygulamasından 3 saat sonra arttığı görülmüştür (70). Bir diğer çalışmada pinealektomi yapılan ratlarda beyin, akciğer ve karaciğer, GSH-Px aktivitelerinde anlamlı düşüşler tespit edilmiştir (75). Sürekli karanlıkta bırakılan kuşların beyininde GSSG-Rd aktivitesinin daha yüksek olduğu, melatonin uygulanan ratlarda karaciğer GSSG-Rd aktivitesinin yaklaşık 2 kat arttığı, deney hayvanlarında ekzojen melatonin ile aktivitenin arttığı bildirilmiştir (74).

İnsan endotel hücrelerinde melatonin etkisi ile G-glutamilsistein sentetazın total GSH içeriğinin yükseldiği, öne sürülmüştür (84). Ratlara uygulanan melatoninin beyin dokusunda Mn-SOD ve CuZn-SOD sentezini artırdığı ve beyin dokusunu oksidatif hasara karşı koruduğu ayrıca melatoninin fetüs üzerine olan etkisine bakıldığında, anne rata verilen melatoninin plasentadan geçerek fetüsün beyininde SOD aktivitesini arttırdığı gösterilmiştir (83).

#### 2.5.4.3. Prooksidan enzim aracılı antioksidan etki

Melatoninin oksidan-antioksidan sistem üzerine olan bir başka etkisi de, prooksidan enzimleri inhibe ederek serbest radikal oluşumunu azaltmasıdır. In vitro ve

in vivo şartlarda, melatoninin fizyolojik konsantrasyonlarda NO ve ileri aşamada ONOO<sup>-</sup> oluşumuna sebep olan nitrik oksit sentetaz (NOs) aktivitesini, inhibe ettiği bildirilmektedir. NOs üzerine inhibe edici etkisi bilinen melatoninin beyin iskemi/reperfüzyon modelinde düzeltici etkisi olabileceği belirtilmektedir (5, 35).

Oksidatif doku hasarına yol açan kainik asit, sentetik seks steroidleri, siklosporin A, streptozotosin, alloksan, adriyamin, L-sistein gibi toksinlerle indüklenen oksidatif stresin melatonin ile önlenemediği, in vivo çalışmalar da gösterilmiştir (38, 72, 86).

Melatonin hem lipid hem de suda çözünebilmektedir, bu sayede organizmada geniş alanda antioksidan etki göstermektedir. Melatonin için bilinen bir bariyer olmaması, melatoninin tüm hücre içi komponentlere ulaşabilmesini sağlamaktadır. Aynı şekilde melatonin kan-beyin bariyerini ve plasentayı rahatlıkla geçebilmektedir. Bu özellikleri sebebiyle melatonin hücre zarını, organelleri ve çekirdeği serbest radikal hasarından koruyabilmektedir. Hücre membranının fosfolipid tabakasının dış yüzeyine tutunan melatonin, serbest radikallerle membrandan önce temasa geçer ve onları inhibe eder. Böylece membran korunmuş olur. Melatonin hücrenin çekirdeğine kadar ulaşabilme özelliği sayesinde DNA' nın oksidatif hasara karşı korunmasında önemli bir üstünlük sağlamaktadır. Ayrıca melatonin H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, OH, gibi mitokondriyal solunum zincirinden kaynaklanan radikallerin üretimini azaltmaktadır. Melatonin diğer antioksidanlardan farklı olarak, çok yüksek dozlarda uzun süre kullanımlarda dahi toksik bir etki göstermediği belirtilmektedir (74).

Birçok deneysel çalışmada melatoninin, patogenezinde serbest radikal hasarın olduğu düşünülen Alzheimer hastalığı, epilepsi, infeksiyöz ve enflamatuar hastalıklar ve yaşlanma gibi fizyolojik sürecin tedavisinde yararlı etkisi gösterilmiştir (57).

Genel olarak melatoninin antioksidan özelliklerine bakıldığında, proinflamatuar sitokinlerin ve adezyon moleküllerinin sentezinin azaltılmasını da kapsayan çok geniş bir etki alanına sahip olduğu görülmektedir (21).

### 3. GEREÇ-YÖNTEM

Çalışmamızın yazımı sırasında kullandığımız biyolojik ve tıp terimlerinin yazımı ve Türkçeleştirilmesinde Histoloji ve Embriyoloji terimleri sözlüğü kullanılmıştır (45).

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda, 3 aylık 20-40 g ağırlığında toplam 28 adet erişkin erkek Swiss Albino cinsi fare kullanıldı. Hayvanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda anabilim dalımız hayvan odasında, uygun kafesler içinde barındırılarak serbestçe beslenmeleri ve su içmeleri sağlandı. Çalışmamızda yapılan tüm işlemler Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 27.03.2013 tarihli ve 211 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Deney hayvanları; Kontrol grubu, 2,4 D-amin grubu, Melatonin grubu ve 2,4 D-amin+Melatonin grubu olarak 4 gruba ayrıldı.

1) Kontrol grubu: Kontrol grubu farelerine, 55 gün boyunca 3 günde bir olmak üzere vücut ağırlıklarına göre hacmi hesaplanarak belirlenen dozda distile su i.p. olarak verildi (90).

2) 2,4 D-amin grubu: Bu gruba 55 gün boyunca 3 günde bir 320 mg/kg 2,4 D-amin intraperitoneal yolla verilmiştir (90).

3) Melatonin grubu: Bu gruba 55 gün boyunca 3 günde bir 10 mg/kg melatonin, intraperitoneal yolla uygulanmıştır (60).

5) 2,4 D-amin+Melatonin: Bu gruba 55 gün boyunca 3 günde bir 320 mg/kg 2,4 D-amin ve 55 gün boyunca 3 günde bir 10mg/kg melatonin intraperitoneal yolla uygulanmıştır (60, 90).

### 3.2. Kimyasallar

2,4 D olarak, Agrofarm Kimya San. ve Tic. AŞ, ruhsat sahibi ve imalatçısı = Safa Tarım A.Ş.tarafından, antioksidan olarak melatonin, SIGMA firmasından temin edildi.

### 3.3. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Deney başından itibaren hayvanların vücut ağırlıkları uygulanacak madde dozlarını belirlemek üzere günlük olarak tartıldı. Deney sonunda ağırlıkları tartılarak kaydedildi.

### 3.4. Bouin Çözeltisinin Hazırlanması

Dokuların tespitinde kullanılacak Bouin çözeltisi aşağıdaki şekilde hazırlandı;

Doymuş pikrik asit çözeltisi	75 ml
Formaldehit (% 40)	25 ml
Glasiyal asetik asit	5 ml

Molekül ağırlığı kadar tartılan pikrik asit (12,2 g) 1000 ml saf su içerisinde çözüldü. İyice çözdürülmesine dikkat edilerek gerekli miktarda pikrik asit kullanıldı. Çözelti kullanılmadan önce süzüldü. Bouin çözeltisini hazırlamak için önce doymuş pikrik asit çözeltisi ile formaldehit, daha sonra üzerine yavaşça glasiyal asetik asit ilave edilerek karıştırıldı (88).

### 3.5. Dokuların Alınması

Hayvanlar 55. günün sonunda vücut ağırlıkları ve testis ağırlıkları ölçülüp kaydedildikten sonra ketamin (ketalar 90 mg/kg)+ksilazin (alfazyne 10 mg/kg) i.p. olarak verilerek servikal dislokasyon ile öldürüldü. Hayvanların karın bölgesi açılarak testisleri çıkarıldı.

### **3.6. Testis Ağırlıklarının Ölçümü**

Çevre dokularından iyice temizlenen testislerin her biri Ohaus (Adventurer Pro AV264C) marka hassas terazi ile tartıldı. Testis ağırlıkları her sıçan için ayrı ayrı sağ ve sol olmak üzere tartılarak kaydedildikten sonra, sol testisler Bouin çözeltisine ve sağ testisler ise % 10'luk formaldehit içerisine alındı.

### **3.7. Işık Mikroskobu için Dokuların Hazırlanması**

Çıkarılan sol testislerin üzerine Bouin çözeltisi, sağ testislerin üzerine ise % 10'luk formaldehit döküldükten sonra testislerin uzun eksenlerine dik olacak şekilde enjektör ucu ile testislerin kapsüllerine karşılıklı birkaç delik açıldı. Fiksatif içerisindeki testis dokuları sertleştikten sonra testisler enine olacak şekilde önce ortadan iki eşit parçaya ve daha sonra bu parçalar da yeniden ikiye bölünerek kasetlere alındı. Dokular fiksatiflerin içerisinde toplam 48 saat bekletildi ve daha sonra rutin doku takibi işlemi uygulanarak her hayvana ait parafin bloklar hazırlandı. Her testisten 2 blok elde edildi. Parafin bloklar hazırlamak için kullanılan doku takip yönteminin basamakları Tablo 1'de gösterilmiştir. Doku takip yöntemine ait süreler her basamağa ait zaman birimi aksi belirtilmediği durumda saat olarak anlaşılmalıdır.

**Tablo 2.** Doku takip yöntemine ait süreler

<b>KİMYASAL MADDE</b>	<b>UYGULAMA SÜRESİ(Saat)</b>
Bouin Çözeltisi	48
% 70 Alkol	1
% 80 Alkol	1
% 90 Alkol	1
% 95 Alkol	1
% 95 Alkol	1
% 100 Alkol	1
% 100 Alkol	1
Ksilol I	10 dk
Ksilol II	10 dk
% 50 Parafin - % 50 Ksilol	1
Parafin I	1
Parafin II	1
Parafin III	1
Bloklama	

% 10'luk formaldehit ile tespit edilen kontrol ve deney gruplarına ait dokular rutin histolojik işlemlerden geçirilerek parafin blok haline getirildi.

### **3.8. Periyodik Asit-Schiff+Hematoksilen (PAS+H) boyasının hazırlanışı**

Kesitlerin boyanmasında kullanılacak boya çözeltisi aşağıdaki şekilde hazırlandı.

A. Periyodik asit 1 g

Saf su 200 ml

B. Schiff çözeltisi; Bazik fuksin 1 g

Saf su 200 ml

C. Potasyum metabisülfid 2 g



D. Hidroklorik asit 2 ml

E. Aktif kömür 2 g

Schiff çözeltisi boyama yapılmadan 1 gün önce hazırlandı. Periyodik asit saf suda çözdürüldü ve kaynatıldı. Kaynatılan çözeltiliye bazik fuksin eklenerek karıştırıldı ve 50°C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra 2 g potasyum metabisülfid eklenerek karıştırıldı. Oda sıcaklığına geldiğinde 2 ml hidroklorik asit eklenerek karıştırıldı, sonra 2 g aktif kömür eklenip yeniden karıştırıldıktan sonra karanlık ortamda oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Çözelti kullanılmadan önce süzöldü.

### **3.9. Kesitlerin Alınması ve Boyanması**

Her bloktan 60 µm trim aralığı ile 3 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her lam üzerinde 2 kesit olacak şekilde ve kesitin alınma sırasına göre lamlar numaralandı. Her bloktan alınan 3 µm kalınlığındaki seri kesitlerden oluşan 2 adet lam ışık mikroskopunda inceleme için Hemotoksilen-Eozin (H-E) ve Periyodik Asit Schiff (PAS)+Hematoksilen (H) ile boyandı.

Boyama yönteminin basamakları ve uygulama süreleri Tablo 3 ve Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri.

<b>KİMYASAL MADDE</b>	<b>UYGULAMA SÜRESİ (dk)</b>
Ksilol I	15
Ksilol II	15
% 96 Alkol I	5
% 96 Alkol II	5
% 90 Alkol	5
% 80 Alkol	5
% 70 Alkol	5
Distile Su	5
Hematoksilen	1
Çeşme Suyunda Yıkama	Suyun rengi şeffaf olana kadar
Eozin	5
% 70 Alkol	2
% 80 Alkol	2
% 90 Alkol	2
% 96 Alkol I	2
% 96 Alkol II	2
Ksilol I	5
Ksilol II	5
Lamların Kapatılması	

Tablo 4: PAS+H boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri.

KİMYASAL MADDE	UYGULAMA SÜRESİ (dk)
Ksilol I	20
Ksilol II	20
% 96 Alkol I	2
% 96 Alkol II	3
% 90 Alkol	3
% 80 Alkol	3
% 70 Alkol	3
Distile Su	1
Periyodik Asit	5
Distile Su	2
Schiff Çözeltisi	15
Çeşme Suyu	2
Hematoksilen	1,5
Çeşme Suyu	2
% 70 Alkol	2
% 80 Alkol	2
% 90 Alkol	2
% 96 Alkol I	2
% 96 Alkol II	2
Ksilol I	5
Ksilol II	5
Lamların Kapatılması	

### 3.10. Histolojik Değerlendirme

H-E ve PAS+H ile boyanan kesitlerin histolojik değerlendirmesi için DP 70 dijital kamera ile donatılmış Olympus B<sub>x</sub>51 ışık mikroskobu (Olympus Corp. Tokyo, Japonya) kullanıldı. Hazırlanan preparatlar, bazal membran, spermatogenik seri hücreler, Sertoli hücreleri, Leydig hücreleri, bağ dokusunda yer alan hücre, lif, damar yapısı ve damarlardaki kanlanma açısından değerlendirme yapılarak grupları temsil eden görüntüler elde edildi. Elde edilen histolojik bulgular, istatistiksel bulgular ile karşılaştırıldı.

### **3.11. İstatistiksel Analiz**

Tüm veri analizleri SPSS 21.0 paket programları ile yapılmıştır. Sürekli nicel veriler; n, ortalama ve standart sapma olarak ifade edilmiştir. Normal dağılım gösteren ve bağımsız 4 gruptan oluşan değişkenlere One Way Anova “Bu testin çoklu karşılaştırmaları Tukey HSD” testleri ile analiz edilmiş olup, yine normal dağılım gösteren, bir değişkene ait ikili ölçüm değerleri için Eşleştirilmiş T Testi uygulanmıştır. Değişkenler arasındaki ilişkiyi belirleyebilmek için normalite testleri sonucuna göre, normal dağılım göstermeyen değişkenlere Spearman Correlation testleri uygulanmıştır.  $p < 0.05$  olasılık değerleri önemli olarak kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İstatistiksel Bulgular

#### 4.1.1. Gruplara göre vücut ağırlıkları-testis ağırlıkları karşılaştırması

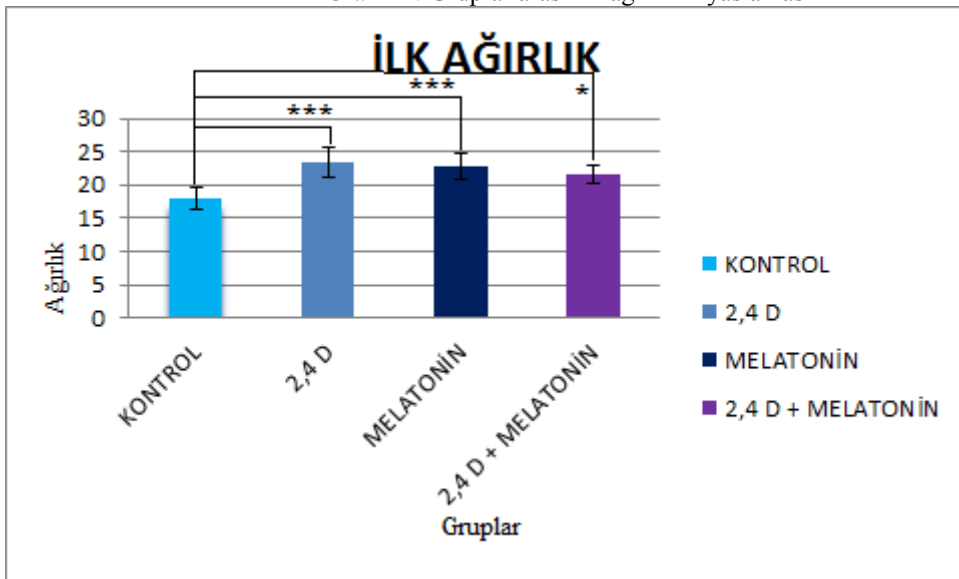
Grupların istatistiksel olarak ilk ağırlıklarına bakıldığında, gruplar arasında anlamlı bir farklılık söz konusudur (Tablo 5, Grafik 1). Kontrol grubu; 2,4 D-amin ile Melatonin arasında ileri düzeyde bir farklılık olduğu görülmektedir. Kontrol grubu ile, Melatonin grubu arasında önemli düzeyde bir farklılık olduğu görülmektedir.

**Tablo 5.** Gruplara göre ilk ağırlık - son ağırlık karşılaştırması

	Gruplar	Ortalama	±Standart Sapma	p değeri
İlk Ağırlık	Kontrol grubu	18,00	±1,63	p<0,001***
	2,4D-amin grubu	23,42	±2,29	
	Melatonin grubu	22,71	±1,97	
	2,4D-amin+Melatonin grubu	21,57	±1,27	
Son Ağırlık	Kontrol grubu	20,07	±2,35	p<0,001***
	2,4 D-amin grubu	28,55	±2,93	
	Melatonin grubu	27,35	±1,28	
	2,4D-amin+Melatonin grubu	23,74	±4,37	

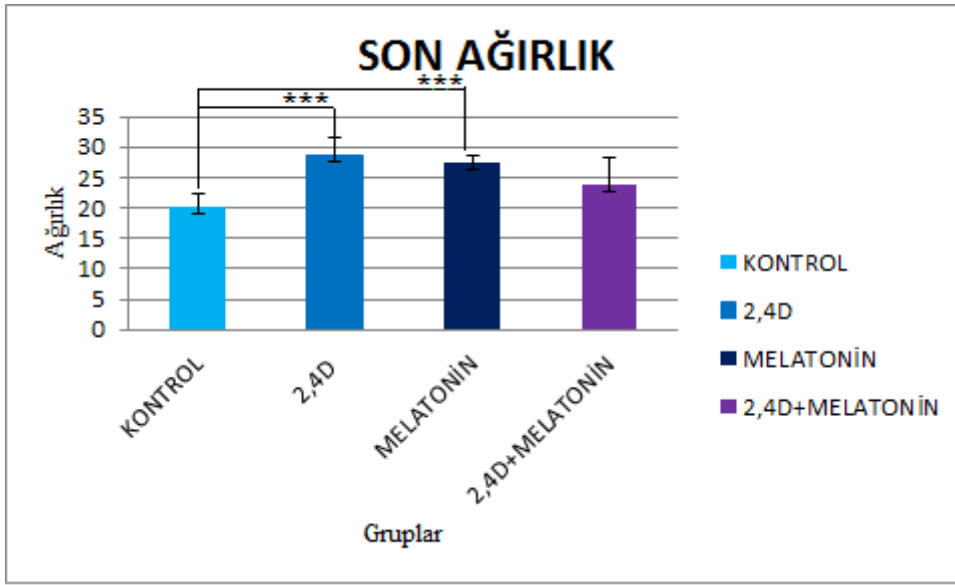
One Way Anova

Grafik 1. Gruplar arası ilk ağırlık kıyaslaması



Gruplar arası son ağırlıklara istatistiksel olarak bakıldığında, Kontrol grubu ile, 2,4 D-amin ve Melatonin grubu arasında ileri düzeyde bir farklılık olduğu görülmüştür. Kontrol grubuna göre 2,4 D-amin+Melatonin grubu arasında son ağırlıkta bir artış yaşanmış olsada kontrol grubunun son ağırlıklarına göre 2,4 D-amin+Melatonin grubu arasında anlamlı bir farklılık söz konusu değildir (Grafik 2).

Grafik 2. Gruplar arası son ağırlık kıyaslaması



Gruplar arası sağ ve sol testis kıyaslaması yapıldığında sağ testiste kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda önemli düzeyde bir farklılık görülmektedir ( $p=0,032^*$ ). Gruplar arası karşılaştırılan sol testiste kontrol grubuna göre tüm gruplarda önemli düzeyde bir farklılık görülmektedir ( $p=0,033^*$ ).

**Tablo 6.** Gruplara göre sağ testis - sol testis karşılaştırması

	Gruplar	Ortalama	Standart Sapma	p değeri
Sağ Testis	Kontrol grubu	0,084	$\pm,017$	$P=0,032^*$
	2,4D-amin grubu	0,11	$\pm,021$	
	Melatonin grubu	0,10	$\pm,019$	
	2,4D-amin+Melatonin grubu	0,09	$\pm,015$	
Sol Testis	Kontrol grubu	0,088	$\pm,014$	$P=0,033^*$
	2,4D-amin grubu	0,11	$\pm,023$	
	Melatonin grubu	0,11	$\pm,018$	
	2,4D-amin+Melatonin grubu	0,10	$\pm,018$	

One Way Anova

#### 4.1.2. Deney öncesi deney sonrası ağırlık kıyaslaması

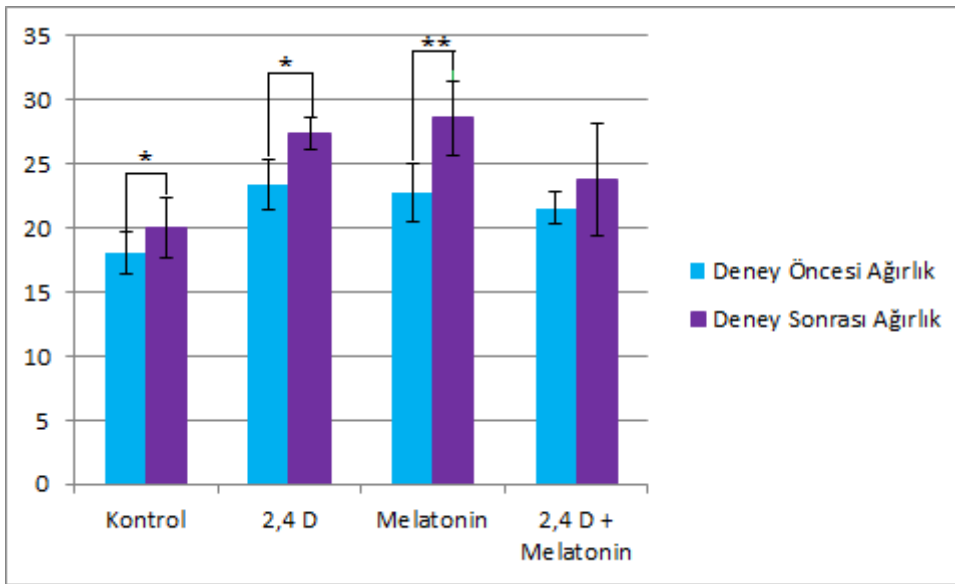
Gruplar arası deney öncesi ağırlık ile deney sonrası ağırlık kıyaslandığında kontrol grubu ve 2,4 D-amin grubunda önemli düzeyde bir farklılık görülmüştür (kontrol grubu  $p=0,042^*$ ) (2,4 D-amin grubu  $p=0,018^*$ ). Melatonin grubunun deney öncesi ve deney sonrası ağırlıkları kıyaslandığında çok önemli düzeyde bir farklılık olduğu görülmüştür (melatonin grubu  $p=0,005^{**}$ ). 2,4 D-amin+melatonin grubunun deney öncesi deney sonrası ağırlıklarına bakıldığında ise anlamlı bir farklılık olmadığı göze çarpmaktadır ( $p=0,300$ ) (Tablo 7, Grafik 3).

**Tablo 7.** Deney öncesi deney sonrası ağırlık kıyaslaması

	Deney öncesi ağırlık		Deney sonrası ağırlık		p
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	
Kontrol Grubu	18,00	$\pm 1,63$	20,07	$\pm 2,35$	0,042*
Melatonin grubu	22,72	$\pm 1,98$	27,36	$\pm 1,28$	0,005**
2,4D-amin grubu	23,43	$\pm 2,30$	28,56	$\pm 2,93$	0,018*
2,4D-amin+Melatonin grubu	21,57	$\pm 1,27$	23,74	$\pm 4,37$	0,300

(t testi) (\* $p<0,05$  \*\* $p<0,01$  \*\*\* $p<0,001$  NS: Anlamlı değil)

**Grafik 3.** Deney öncesi deney sonrası ağırlık kıyaslaması



#### 4.1.3. Deney sonrası testis ağırlık kıyaslaması

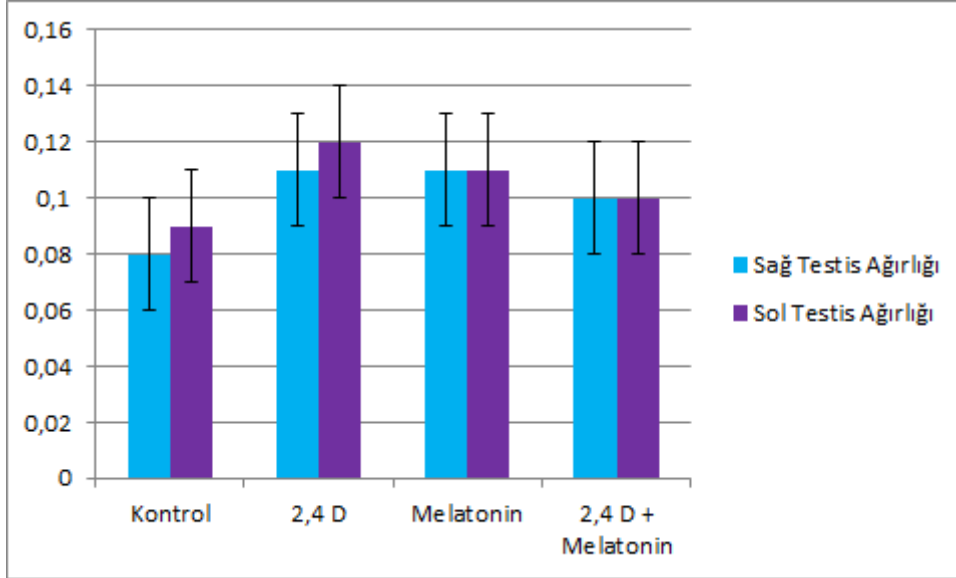
Gruplar arasında sağ ve sol testis ağırlıkları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde bir fark olmadığı gözlenmiştir. Kontrol grubunda ve 2,4 D-amin grubunda bir farklılık gözüküyor olsa da anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür ( $p=0,078$  kontrol grubu,  $p=0,280$  2,4 D-amin grubu) (Tablo 8, Grafik 4)

**Tablo 8.** Sağ testis - sol testis ağırlık kıyaslama

	Sağ Testis		Sol Testis		p
	Ortalama	Standart Sapma	Ortalama	Standart Sapma	
Kontrol Grubu	0,08	$\pm 0,02$	0,09	$\pm 0,01$	0,078ns
Melatonin Grubu	0,11	$\pm 0,02$	0,11	$\pm 0,02$	0,200ns
2,4D amin Grubu	0,11	$\pm 0,02$	0,12	$\pm 0,02$	0,280ns
2,4D amin+Melatonin Grubu	0,10	$\pm 0,02$	0,10	$\pm 0,02$	0,380ns

(t testi) (ns: Anlamlı değil)

**Grafik 4.** Sağ testis - sol testis ağırlık kıyaslaması



Sağ ve sol testisler arasında istatistiksel fark bulunmadı (Hepsi  $p > 0,05$  ns).



## **4.2. Histolojik Bulgular**

Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçan testislerinin genel görünümünü saptamak için H-E ve PAS+H boyaları uygulanmıştır.

### **4.2.1. Kontrol grubu**

Kontrol grubunu oluşturan fare testis örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde, seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri, spermatogonyum, primer spermatosit ve spermatid, Sertoli hücresi ve tübüllerde devam eden spermatogenez normal yapıda görülmektedir (Şekil 7). İnterstisyel alan ve Leydig hücreleri normal yapıdadır. (Şekil 7). PAS+H ile boyadığımız testis örneklerinde PAS pozitif boyanmış bazal membran ve tunika albuginea yapısı normal yapıda gözlemlendi (Şekil 8).

### **4.2.2. 2,4 D-amin grubu**

2,4 D-amin verilen deney grubunu oluşturan fare testis dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde ise seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler, vakuolizasyon ve yoğun hücresel kayıplar ile birlikte incelmiş tübül duvarı ve bazı tübüllerde atrofi görüldü. İnterstisyel alanda ise açılmalar dikkat çekti (Şekil 9).

Tunika vaskulozadaki damarlarda kongesyon, seminifer tübüllerin lümeninde yoğun hücresel dökülmeler ve bazı tübüllerde atrofi görüldü. İnterstisyel alanda ise ödem gözlemlendi (Şekil 10). Buna karşılık bazal membran yapısı ise normal olarak gözlemlendi (Şekil 10).

### **4.2.3. Melatonin grubu**

Melatonin antioksidan deney grubunu oluşturan fare testis örneklerinin ışık mikroskopik incelenmesinde, gerek bazal lamina ve gerekse seminifer tübül yapıları

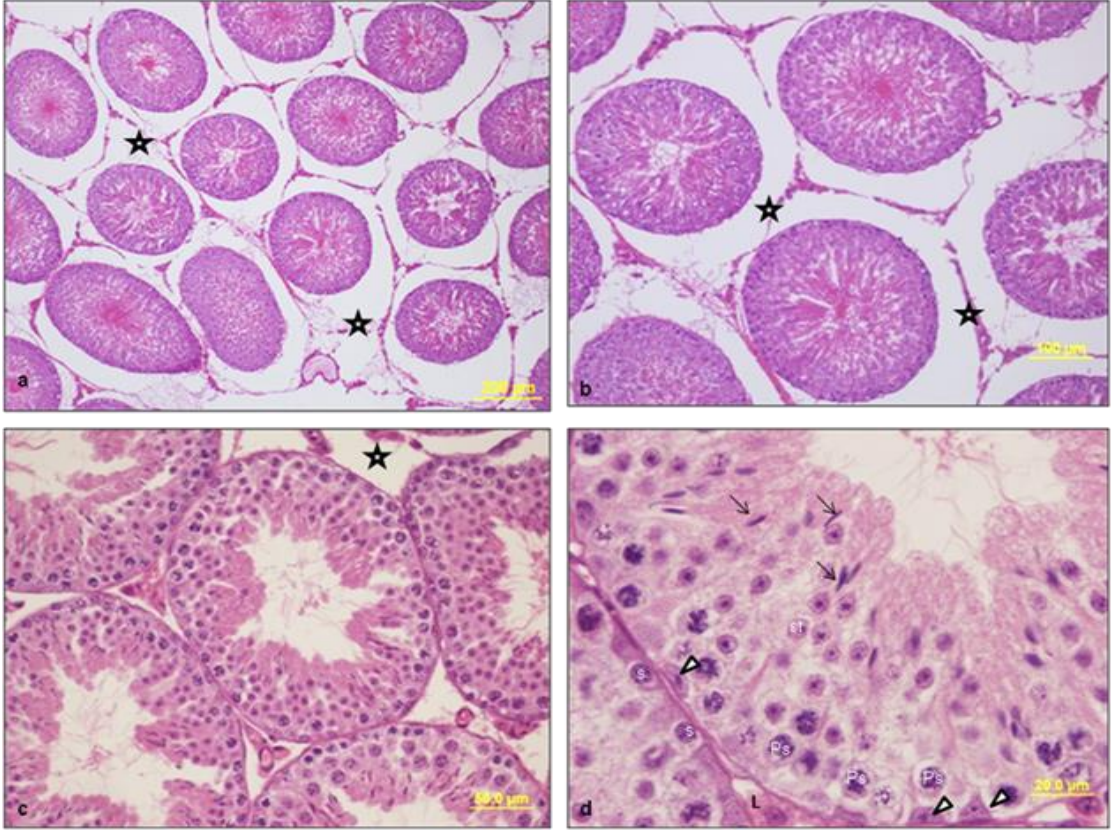
kontrol grubuna benzer bir yapı gösteriyordu. Ayrıca spermatogenezin normal devam ettiği gözlemlendi. Bazal lamina yapısı normal görüldü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri; spermatogonyum, primer spermatosit, spermatid hücresi ve Sertoli hücresi normal olarak görüldü. İnterstisyel alandaki hücre yapılarıyla birlikte Leydig hücreleri ve damar yapıları normal görünümdeydi (Şekil 11).

#### ***4.2.4. Melatonin+2,4 D-amin grubu***

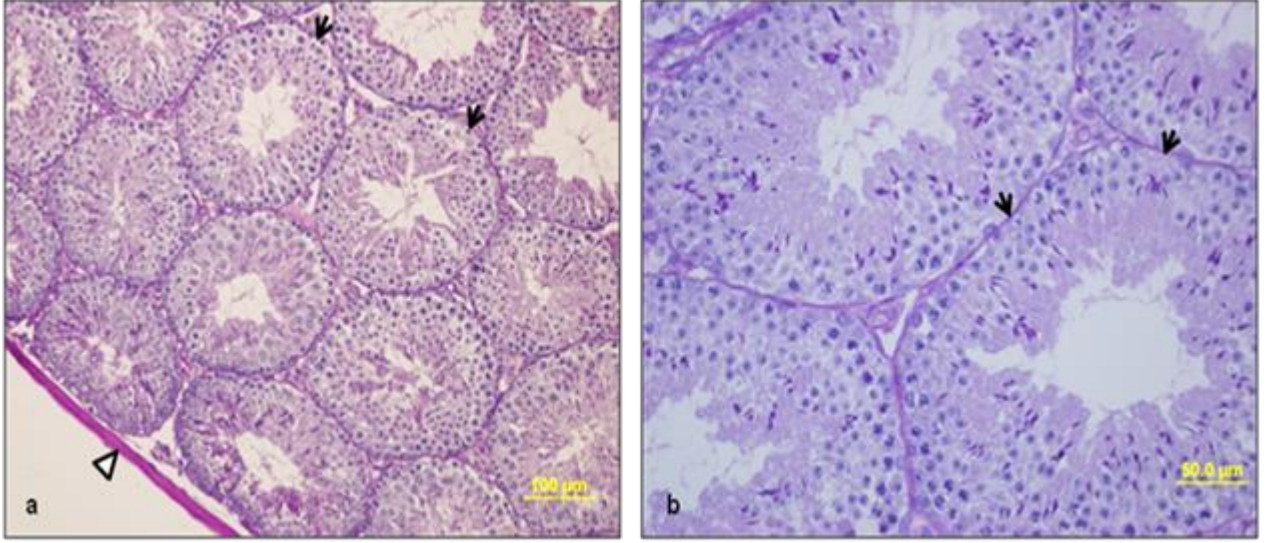
2,4 D-amin ile birlikte Melatonin verilen grupları oluşturan fare testis örnekleri üzerinde yapılan ışık mikroskopik incelemelerde, bazı tübülde hasarın az da olsa devam ettiği ve lümende hücresel dökülmeler izlenmekle birlikte testiste genel olarak tübüler hasarın azaldığı, spermatogenik hücrelerin korunduğu ve spermatogenezin devam ettiği görüldü. Ayrıca interstisyel alanda normale yakın görünümlü Leydig hücreleri görüldü (Şekil 12). Tek başına 2,4 D-amin verilen gruplarda spermatogonyum ve yer yer primer spermatositlerde görülen hücresel bozukluklar, 2,4 D-amin+Melatonin verilen gruplarda ender olarak görüldü. Ayrıca tübül etrafındaki bazal lamina yapısı ve tunika albuginea yapısı normal görüldü (Şekil 13).

#### ***4.2.5. Kontrol grubu, Melatonin grubu, 2,4 D-amin grubu, 2,4 D-amin+Melatonin grubu karşılaştırması***

Kontrol grubunda normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri ile interstisyel alan normal görüldü. Melatonin grubunda normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri ile interstisyel alan normal görüldü. 2,4 D-amin grubunda seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejenerasyon değişiklikler ve hücresel kayıplar ile birlikte incelmiş tübül duvarı ve bazı tübüllerde atrofi görüldü. İnterstisyel alanda ise açılmalar dikkat çekti. 2,4 D-amin+Melatonin grubunda bazı tübüllerde lümende hücresel dökülmeler izlense de testiste genel olarak normale yakın korunmuş seminifer tübül yapıları ve spermatogenik hücreler ile birlikte birçok tübülde devam eden spermatogenez dikkat çekti (Şekil 14).

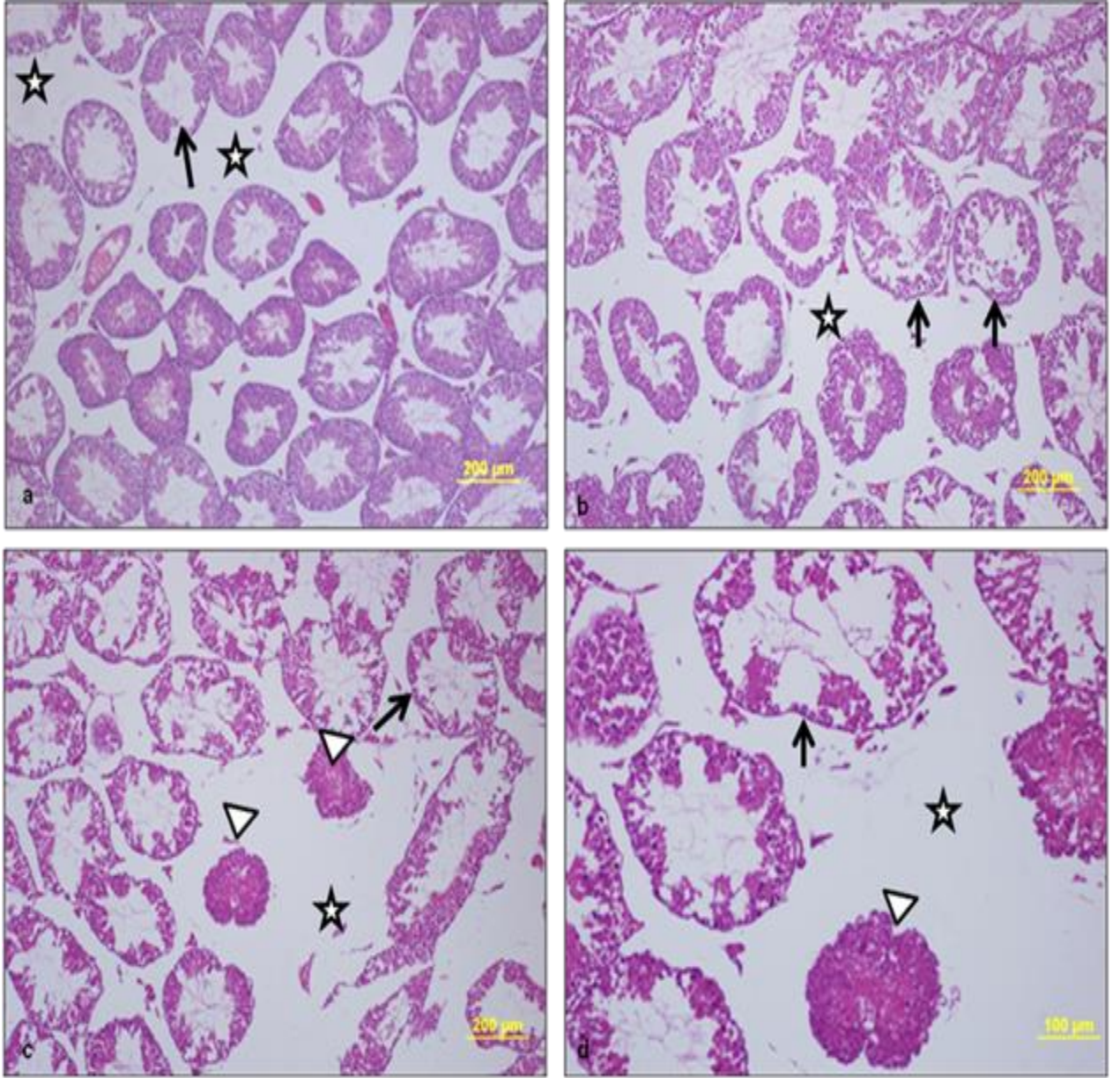


**Şekil 7. Kontrol grubunda testis dokusunun histolojik görünümü:** Normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri; Sertoli hücresi ( $\Delta$ ), spermatogonyum (s), primer spermatozoid (Ps) ve spermatid ( $\rightarrow$ ) ve tübüllerde devam eden spermatogenez görülmekte. Normal görünümlü interstisyel alan (\*) ve Leydig hücreleri (L) izlenmekte. (a'da bar: 200 $\mu$ m, b'de bar: 100 $\mu$ m, c'de bar: 50.0 $\mu$ m, d'de bar: 20.0 $\mu$ m, HE) (a-d).



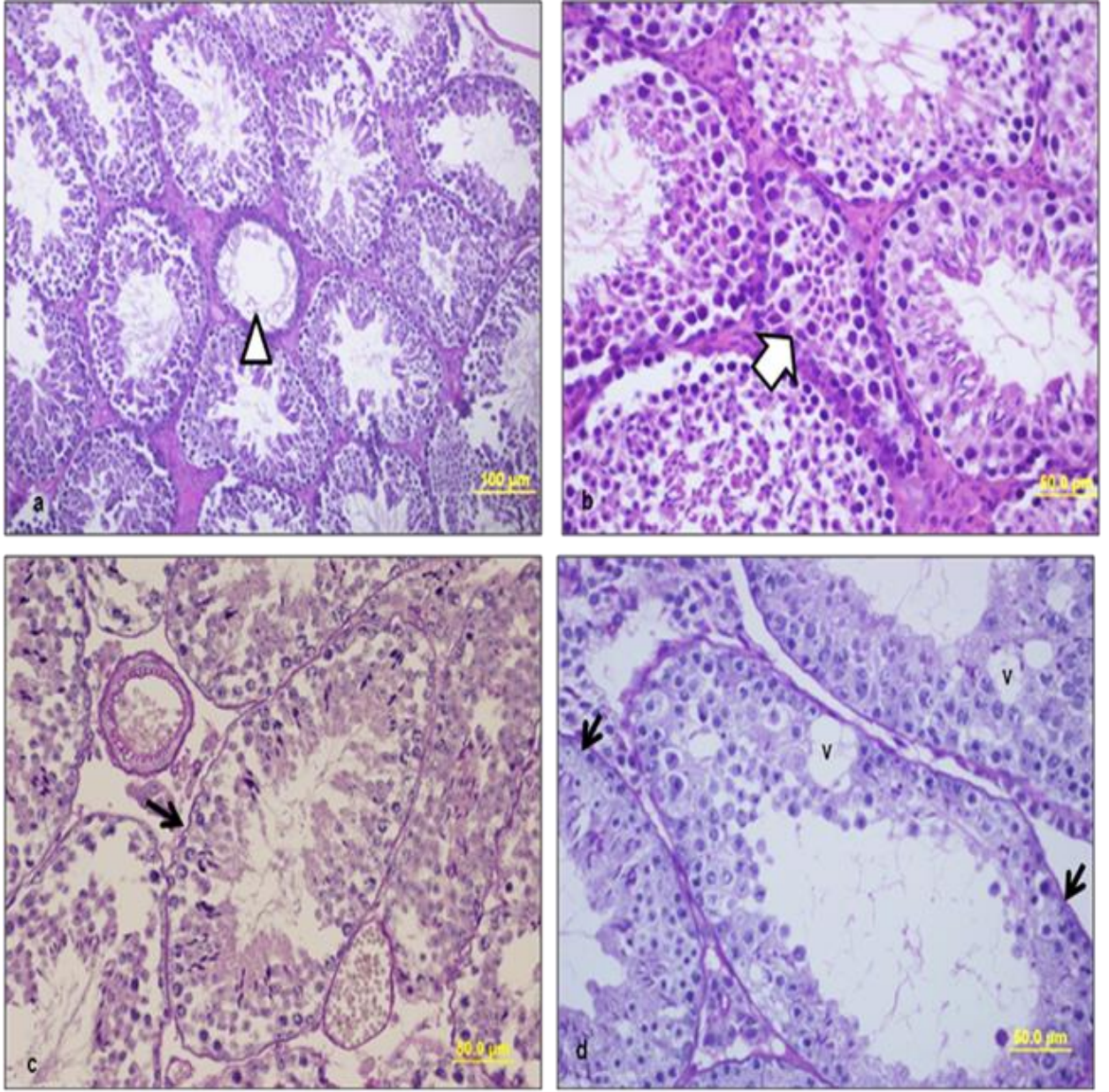
**Şekil 8. Kontrol grubunda testis dokusunun histolojik görünümü:** Normal yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı (→) ve tunika albuginea (Δ) yapısı izlenmekte (a'da bar: 100µm, b'de bar: 50.0µm, PAS+HE) (a-b).





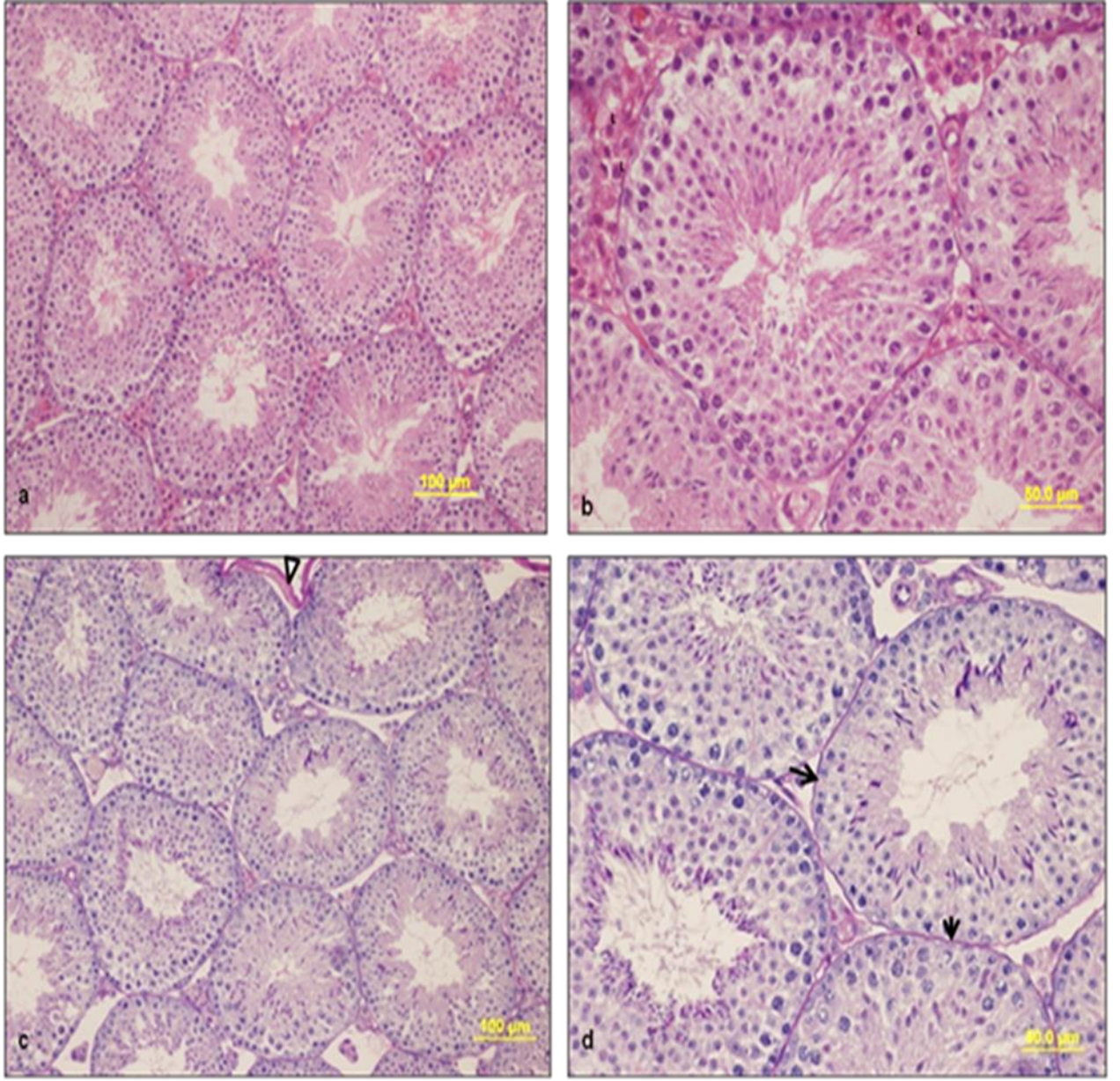
**Şekil 9. 2,4 D-amin grubunda testis dokusunun histolojik görünümü:** Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve hüresel kayıplar (→) ile birlikte incelmış tübül duvarı ve bazı tübüllerde atrofi görülmekte (Δ). İnterstisyel alanda ise açılmalar (\*) dikkat çekmekte (a'da, b'de, c'de bar: 200μm, d'de bar: 100μm, HE) (a-d).





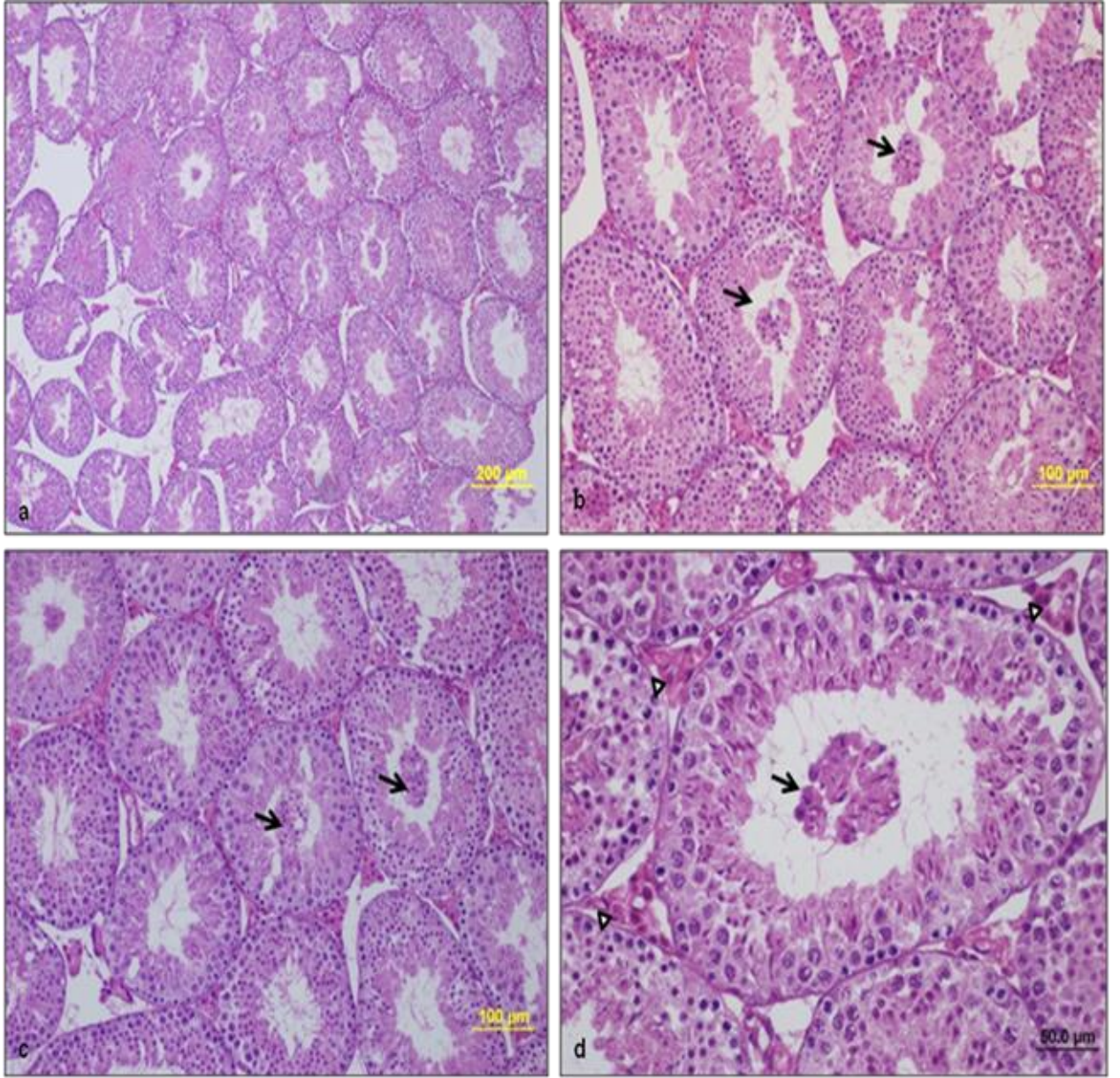
**Şekil 10. 2,4 D-amin grubunda testis dokusunun histolojik görünümü:** Tunika vaskulozadaki damarlarda kongesyon ( $\Delta$ ), seminifer tübüllerin lümeninde yoğun hücresel dökülmeler ( $\rightarrow$ ) ve bazı tübüllerde atrofi (kalın ok) görülmekte. Ayrıca bazı tübüllerde tübül duvarındaki yoğun hücresel kayıplar ile birlikte incelmış tübül duvarı ( $\bullet$ ) görülmekte. İnterstisyel alanda ise ödem ( $*$ ) dikkat çekmekte (a'da bar: 100 $\mu$ m, b,c,d'de bar: 50 $\mu$ m, HE) (a-d).





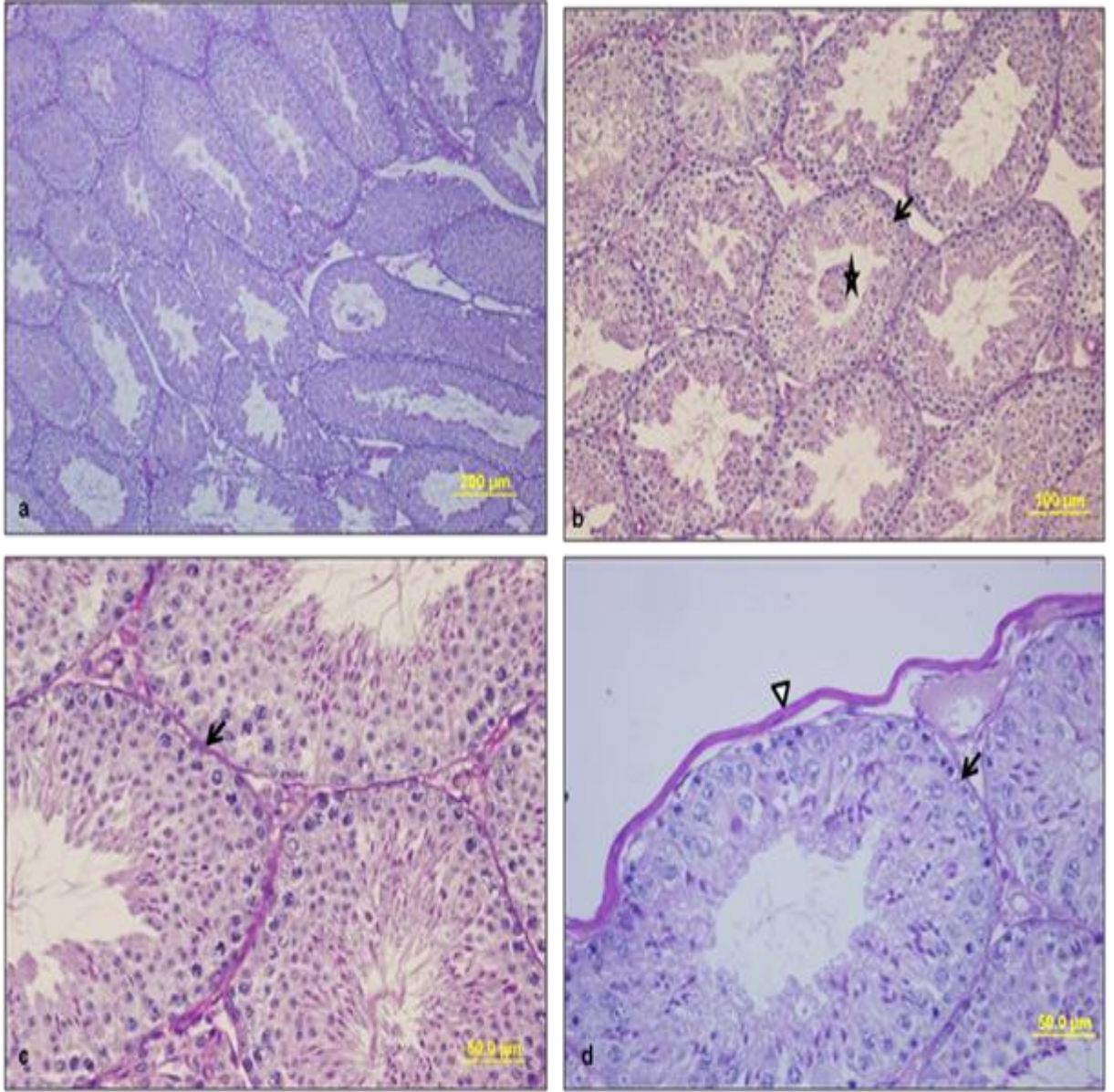
**Şekil 11. Melatonin grubunda testis dokusunun histolojik görünümü:** Normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri ile interstisyel alan görülmekte (bar: 100µm, bar: 50.0µm, HE, a-b). Ayrıca normal yapıdaki PAS pozitif bazal membran yapısı (→) ve tunika albuginea (Δ) yapısı izlenmekte (a'da-c'de bar: 100µm, b'de d'de bar: 50.0µm, PAS+HE, c-d).



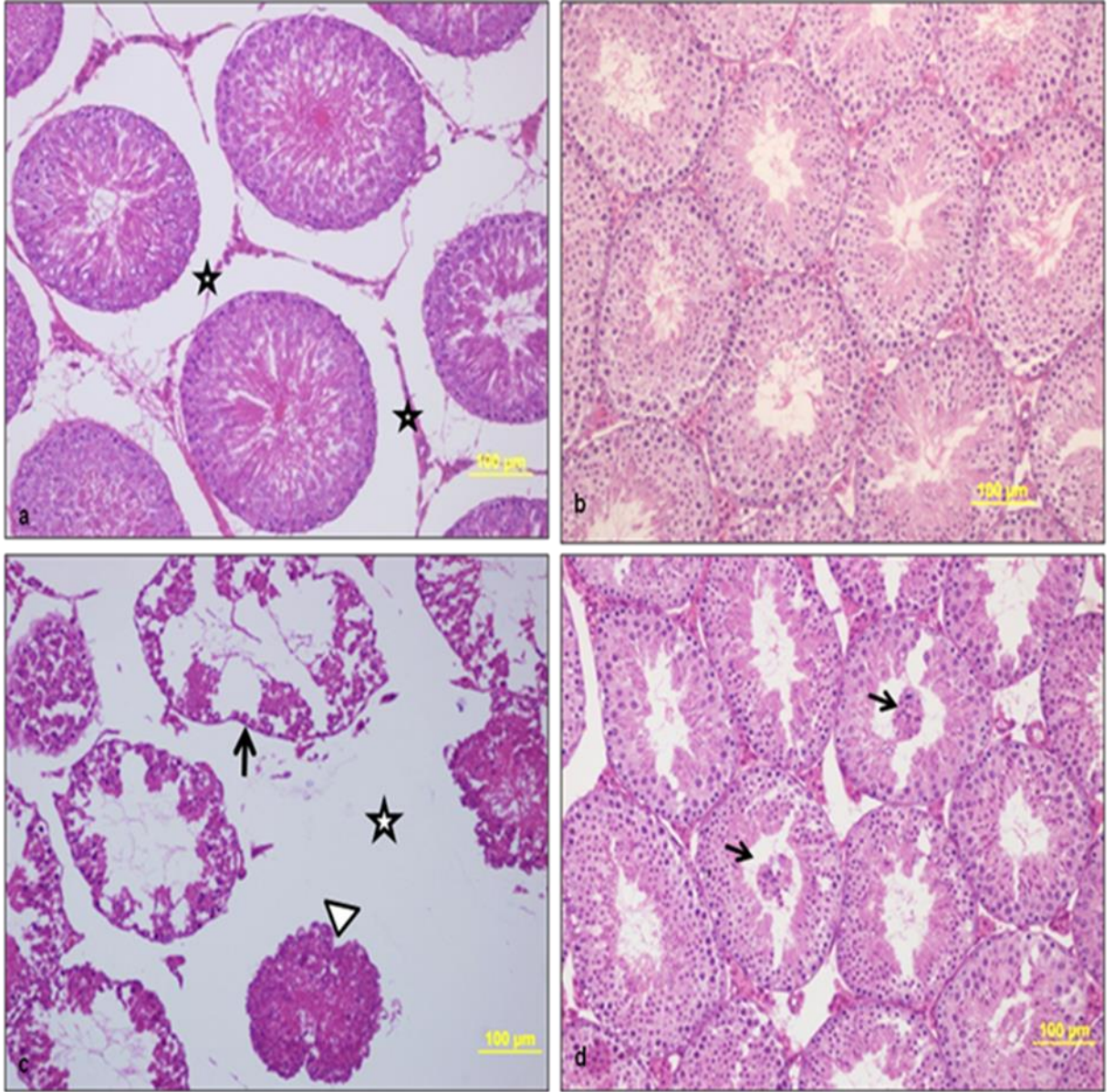


**Şekil 12. 2,4 D-amin+Melatonin grubunda testis dokusunun histolojik görünümü:** Bazı tübüllerde lümende hücresel dökülmeler izlense de (→) testiste genel olarak normale yakın korunmuş seminifer tübül yapıları, spermatogenik hücreler ile birlikte birçok tübülde devam eden spermatogenez dikkat çekmekte. Ayrıca intersitisyel alanda da korunmuş Leydig hücreleri (Δ) görülmekte (a'da bar: 200µm, b'de-c'de bar: 100µm, d'de bar: 50.0µm, H-E) (a-d).





**Şekil 13. 2,4 D-amin+Melatonin grubunda testis dokusunun histolojik görünümü:** Bazı tübüllerde lümende hüresel dökülmeler izlense de (\*) testiste genel olarak normale yakın korunmuş seminifer tübül yapıları, spermatogenik hücreler ile birlikte birçok tübülde devam eden spermatogenez dikkat çekmekte. Ayrıca normale yakın görünümlü PAS pozitif bazal membran yapısı (→) ve tunika albuginea (Δ) yapısı izlenmekte (a'da bar: 200µm, b'de bar: 100µm, c ve d'de bar: 50.0µm, PAS+HE, a-d).



**Şekil 14. Kontrol grubu, melatonin grubu, 2,4 D-amin grubu, 2,4 D-amin+melatonin grubunda testis dokusunun histolojik görünüşleri:** Kontrol grubunda normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri ile interstisyel alan (\*) (a), melatonin grubunda normal yapıdaki seminifer tübüller ve tübül duvarındaki spermatogenik hücre serileri ile interstisyel alan (b), 2,4 D-amin grubunda seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücrelerde dejeneratif değişiklikler ve hüresel kayıplar (→) ile birlikte incelmış tübül duvarı ve bazı tübüllerde atrofi görülmekte (Δ). İnterstisyel alanda ise açılmalar (\*) dikkat çekmekte (c), 2,4 D-amin+melatonin grubunda bazı tübüllerde lümen hüresel dökülmeler izlense de (→) testiste genel olarak normale yakın korunmuş seminifer tübül yapıları ve spermatogenik hücreler ile birlikte birçok tübülde devam eden spermatogenez dikkat çekmekte (d). (a-b-c-d bar: 100 μm, H-E).



## 5. TARTIŞMA

Herbisitler hücre bölünmesi, hücre uzaması, protein sentezi ve solunum gibi bitki metabolizmasını düzenleyen hormonal dengeyi bozarlar. 2,4 D-amin yaklaşık 50 yıldır dünyada yaygın olarak kullanılan bir herbisittir ve bitki metabolizmasında gerçekleşen enzim aktivitesi, nükleik asit sentezi, protein sentezi ve hücre bölünmesi gibi bazı olayları etkileyerek bitki gelişimini engeller (66).

2,4 D-amin'in seminal vezikül üzerinde androjenik etkilere sahip olabileceği ve bu çevresel kirleticinin erkek üreme fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyebileceği öngörülmüştür (12). 2,4 D-amin'in aynı zamanda testiküler hücelere hasar verebileceği, sperm hücrelerinin tükenmesine ve çeşitli malformasyonlara neden olabileceği saptanmıştır (93).

2,4 D-amin'in, amin ve ester formlarının da testis ağırlığının artmasına ve testislerde atrofiye neden olabildiği öngörülmüştür (16). 2,4 D-amin; seminifer tübüllerde atrofiye, spermatogenik hücre sırasında bozulmaya, testis hasarına, tunika albuginea'da ve seminifer tübül çapında azalmaya ve spermatogenik hücrelerin lümene dökülmesine neden olmaktadır. Bu sonuçlara göre, 2,4 D-amin testis dokusunda ciddi histopatolojik hasarlara neden olmaktadır (66).

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine), pineal bez tarafından sirkadiyan ritim ile karanlıkta salgılanan bir hormondur. Vücutta endokrin sistemin düzenlenmesi, immun fonksiyonun arttırılması, düz kas tonusunun ayarlanması ve gonadal fonksiyonların baskılanması gibi birçok fizyolojik işlevlerde görev alır.

Melatonin hormonu indolamine ailesinin bir üyesidir ve elektron-donör özelliğinden dolayı güçlü bir antioksidan özelliğine sahiptir. Melatonin hormonu, hem yağda hem de suda çözünebilir özelliğe sahip olduğu için, nükleus dahil hücrenin her organeline ulaşabilir. Bu özellik, DNA'nın oksidatif hasara karşı korunmasında, melatonine bir üstünlük sağlamaktadır. Melatonin pineal bezden salgılanan ve antioksidan özellikleri iyi bilinen bir hormondur (42). Değişik yollarla toksik olan

oksijen ve nitrojen radikallerini yıkar ve antioksidatif enzimleri uyarır (13). Melatonin üreme sistemi üzerinde genel olarak inhibitör etkiye sahiptir (59). Epifiz bezi tarafından salgılanan melatoninin, güçlü bir serbest radikal süpürücü olduğu son zamanlarda gösterilmiştir (1).

Çalışmamızda, 2,4 D-amin'e bağlı fare testis hasarında melatoninin olası etkisi araştırılmıştır ve çalışmamızın sonuçlarına göre, 2,4 D-amin'in testisler üzerinde hasara sebep olduğu ve 2,4 D-amin ile birlikte melatonin verilmesi durumunda testislerdeki bu hasarın belli bir ölçüde düzelme sağladığı gösterilmiştir.

2,4 D-amin ile yapılan bir çalışmada, farelerde 2,4 D-amin'lerin testosteron salgısının azalmasına neden olduğu, buna karşılık testikular dokudan östrojen salgılanmasını, progesteron ve prolaktin salgılarını arttırdığı, menstrual siklusta anormalliklere neden olduğu saptanmıştır. Ayrıca tarımda çalışan ilaçlama yapan erkek işçilerde sperm sayısının azaldığı, şekillerinde anormalliklerin meydana geldiği gözlenmiştir (37, 52).

Özdeş ve ark. (2006), 2,4 D-amin herbisitinin oral kullanımının sıçan testislerinde oluşturduğu histopatolojik etkilerini incelemiştir. Bu amaçla, yaklaşık 200-250 gr ağırlığında olan Wistar Albino erkek sıçanlar; kontrol, düşük, orta ve yüksek doz olmak üzere her biri 6 sıçan içeren 4 gruba ayrılmıştır. Kontrol grubu sıçanlara standart pellet yem verilirken düşük, orta ve yüksek doz 2,4 D-amin sırasıyla 20, 40, 80 mg/kg dozda laboratuvar pellet yemlerine emdirilerek 28 gün boyunca oral yolla verilmiştir. Araştırma neticesinde; deney gruplarında dozla doğru orantılı olarak seminifer tübüllerde atrofi, spermatogenik hücre sırasında bozulma ve yüksek doz gruplarında testis hasarları saptanmıştır. Ayrıca, tunika albuginea'da ve seminifer tübül epiteli çapında azalma ve spermatogenik hücrelerin lümene dökülmesine neden olmuştur. Bu sonuçlara göre, 2,4 D-amin testis dokusunda histopatolojik hasara neden olmuştur. Bu çalışmada bulunan sonuçlar da yapmış olduğumuz araştırma çalışması ile paralellik göstermektedir (79).

Marrison ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise bu herbisitleri uygulayan işçilerde prostat kanseri riskinin arttığı gösterilmiştir (61).

2,4 D-amin'in sıçanların testis dokusu üzerine etkilerinin incelendiği çalışmada dejeneratif değişiklikler, tunika albuginea kalınlıklarında artan doza bağlı olarak incelmeler gözlemlenmiştir (66).

Joshi ve arkadaşlarının 2012 yılında yapmış oldukları çalışmada, her grupta 6 fare olmak üzere toplamda 24 swiss albino fareyle çalışılmıştır. Kontrol grubu, 1. grup: 50 mg/kg b.wt/day 2,4 D-amin 30. ve 45. günlerde, 2. grup: 100 mg/kg b.wt/day 2,4 D-amin 30. ve 45. günlerde, 3.grup: 150 mg/kg b.wt/2,4 D-amin 30. ve 45. günlerde incelenmiştir. Sperm hareketliliğine, testislerde sperm yoğunluğuna ve histolojik bulgulara bakılmıştır. 30. günde sperm yoğunluğu bozulmuş ve spermelerin hareketleri normale oranla düşmüştür, 45. günlerde ise sperm yoğunluğunda önemli oranda hasar ve sperm hareket yoğunluğunun önemli oranda azaldığı görülmüştür. 50 mg/kg grubunda 30. günde testis dokusunun histolojik görüntüsü incelendiğinde spermatogenik hücre sayısında azalma tespit edilmiştir ve lümenin sperm atıkları ile dolu olduğu görülmüştür, 50 mg/kg grubunda 45. günde hasarlı seminifer tübül ve hasarlı spermatazoalar, düzensiz ve dejenere olmuş seminifer tübül epiteli dikkat çekmektedir. 100 mg/kg grubunun 30. günündeki testis dokusunun histolojik görüntüsü incelendiğinde Leydig hücrelerinin sayıca az olduğu, sperm sayısında önemli oranda azaldığı ve tübüller arası büyük boşluklar oluştuğunu tespit etmişlerdir. 100 mg/kg grubunun 45. günündeki testis dokusunun histolojik görüntüsü incelendiğinde lümenin içinde çok fazla sayıda döküntü hücrelerin olduğunu tespit etmişlerdir. 150 mg/kg grubunun 30. günündeki testis dokusunun histolojik görüntüsü incelendiğinde ise şiddetli dejenere değişiklikler, germinal epitelyum düzensiz ve gevşek, intertübüller açıklıkta çok az bağ dokusu olduğunu görmüşlerdir. 150 mg/kg grubunun 45. günündeki testis dokusunun histolojik görüntüsü incelendiğinde büzüşmüş seminifer tübüller, intertübüller alandaki artan boşluk ve lümende sperm hücresi olmadığı görülmüştür (39).

Biz de çalışmamızda gruplar arasında 55. günlerde swiss albino cinsi fare testis dokusunun histolojik görüntüsünü inceledik. Kontrol grubu fare testis dokusunun

histolojik görüntüsüyle, 2,4 D-amin grubunun fare testis dokusunun histolojik görüntüsü karşılaştırıldığında bu çalışmaya benzer sonuçlar elde ettik.

Yılmaz ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları çalışmada, Mus Musculus cinsi fare kullanılmış ve böbrek örnekleri incelenmiştir. Kontrol grubuna etanol i.p olarak, 2,4 D-amin grubuna ise 338 mg / kg vücut ağırlığı dozu 3 günde bir i.p olarak verilmiştir. Enzim aktiviteleri ölçülmüştür ve böbrek doku kesitleri incelenmiştir. 2,4 D-amin böbrek doku kesitlerinde oldukça toksik hasara neden olduğu gösterilmiştir (90).

Alexander ve ark.'nın yapmış olduğu araştırmada; çiftlikte yaşayan 2,4 D-amin herbisitine maruz kalan çiftçi aile bireylerinde 2,4 D-amin asit miktarını araştırarak sistemik doz tahmini yapmışlardır. İncelemeye konu olan, çiftlikte yaşayan aileler Minnesota ve Güney Carolina'da lisanslı uygulayıcılardan seçilmiştir. Çiftlikte yaşayan aile üyelerinden 2,4 D-amin uygulanmadan 1 gün önce ve 2,4 D-amin uygulamasından 3 gün sonra 24 saat aralıklarla idrar örnekleri alınmıştır. Medyan idrar 2,4 D-amin konsantrasyonları, 2,4 D-amin uygulanmasından sonra uygulayıcılar için 2,1 ve 73,1 microg/L'dir. Çocuklar için 1,5 ve 2,9 microg/L ve eslerde 1,2 microg/L bulunmuştur. Geometrik ortalama sistemik doz (kilogram vücut ağırlığı başına mikrogram), uygulayıcılarda 2,46 microg/L, eşlerde 0,8 microg/L, 4-11 yaş arasındaki çocuklarda 0,32 microg/L, 12 yaş veya daha büyük çocuklarda 0,12 microg/L, bütün çocuklarda 0,22 microg/L olarak bulunmuştur. U.S.EPA.'nın (2002) belirlediği referans doz (RfD) ise 0,01 mg/kg/gün veya 10µg/kg/gün'dür. Yine sıçanlarda 2 yıl boyunca yapılan biyodenyelerde 1,0 mg/kg/gün dozda zararlı etkisinin gözlenmediği belirtilmiştir. Türkiye'de 2,4 D-amin grubu herbisitlere üretim ve ilaçlamada çalışmaları nedeni ile maruz kalan 28 kişinin idrar analizlerinde ise 0,06-9,51 ppm arasında 2,4 D-amin saptanmıştır (66, 82).

2,4 D-amin grubu pestisitlerin ayrıca sıçanların üreme aktiviteleri üzerinde etkili oldukları bilinmekte olup, Linscombe ve Lick yaptığı araştırmada, 2,4 D-amin'in 5, 20 ve 80 mg/kg vücut ağırlığı / gün'lük alınımının dişi sıçanlarda vücut ağırlığının azalmasına, böbrek lezyonlarının gelişmesine sebep olduğu gözlenmiştir (54). Bir diğer

çalışmada, hamile Sprague Dawley sıçanlara gavaj yöntemiyle mısır yağı karıştırılmış 2,4 D-amin'in 12.5, 25, 50, 75 ve 88 mg/kg/gün'lük dozları 6-15 gün süreyle uygulanmış olup, sıçanlarda herhangi bir anne ölümüne rastlanılmamasına rağmen hayvanların doğurganlıklarının 50 mg/kg/gün'den daha büyük dozlarla beslenenlerde azaldığı gözlenmiştir (54).

Lochry'nin yapmış olduğu çalışmada ise; hamile Fischer 344 sıçanlara mısır yağı ile karıştırılmış 2,4 D-amin pestisiti 8, 25 ve 75 mg/kg/gün esasına göre gavaj ile verilmiş, yüksek dozlarda (75 mg/kg/gün) sıçanların vücut ağırlıklarının azaldığı, hayvanların iskelet sisteminde 7. servikal ve 14. rudimentari kaburgalarında anatomik değişimlerin olduğu gözlenmiştir (55). 2,4 D-amin'lerin dermal toksik etkilerinin incelenmesi amacıyla yapılan bir diğer çalışmada ise 2,4 D-amin'lerin 100, 120, ve 1000 mg/kg/gün'lük dozları günlük 6 saat süre ile haftanın 5 günü tavşanlara uygulanmış (toplam 21 gün) ve sonuçta 100 mg/kg/gün ve daha üzeri dozlara maruz kalan tavşanların derilerinde aşırı keratinleşme, akantosis, ödem ve epidermal hiperplazia'ya rastlanmıştır (79).

2,4 D-amin'in sıçanların ovaryum dokusunda da dejeneratif değişikliklere neden olduğu görülmüştür. Folikül hücrelerinde atrezi ve yüksek dozlarda ovaryum hasarları oluşmuştur (9). Yapılan bir başka çalışmada; oktilfenol ve 17 estrodiyol maddelerine maruz bırakılan lepistes bireylerinin gonadları incelenmiş, bunlarda anne kanalıyla embriyoya geçen ve su yoluyla ergin bireylerin maruz kaldığı toksisitenin ovaryum, testis ve karaciğerde yaptığı hasarlar gözlenmiştir (46, 79).

Amerika'da tarımda kullanılan 2,4 D-amin ve MCPA (4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid-amin)'lerinde de dahil olduğu herbisitlerin % 60'dan fazlasının, hayvanlardaki endokrin ve üreme sistemini bozma potansiyeli olduğu belirtilmiştir (78, 79).

2,4 D-amin ve fenoksi asetik asit'den üretilmiş herbisitlerin kullanımına bağlı olarak Batı Minesota'da insanlarda merkezi sinir sistemi, dolaşım/solunum, ürogenital veya kas ve iskelet anomalileri normalden daha sık görülmeye başlanmıştır (47, 88).

Hayvan türlerine göre LD50 seviyesinin farklılıklar göstermesine karşın 2,4 D-amin'in hayvanlar için orta şiddette toksik olduğu söylenebilir (89). Dünya Sağlık Örgütüncü memeli hayvanlarda ve kuşlarda 2,4 D-amin'in teratojenik ve embriyotoksik dozunun 10 ppm olduğu ve öldürücü dozunun ise 100-300 ppm arasında değiştiği bildirilmektedir. Örneğin LD50 değerleri sıçanlarda ve Kuzey Amerika bildircinlerinde sırasıyla 764 mg/kg ve 500 mg/kg'dır. Ayrıca 2,4 D-amin maddesinin memeliler üzerindeki toksisitesi bulunmuş ve LD50 değeri tespit edilmiştir (91). Bazı hayvanlar; örneğin köpekler, 2,4 D-amin'e sıçanlar ve insanlardan daha fazla hassasiyet gösterirler. 2,4 D-amin'e maruz kalmış çimlerden oluşmuş bölgelerle temas halinde bulunan köpeklerde kötü huylu tümörler oluştuğu bildirilmiştir (38, 79).

Mountassif ve ark'ı (2008) ise yapmış olduğu çalışmada, 2,4 D-amin (1,5 ve 3 mg/kg/gün) ile 4 hafta beslenen Jerboalarda (*Jaculus orientalis*), karaciğer enzim aktivitelerinde ve lipid peroksidasyon enzim aktivitesinde hasarlar meydana geldiğini bildirmiştir (65). Ayrıca, karaciğerde hepatosit hiperplazi meydana geldiğini, testiste seminifer tübüllerde nekroz, beyinde ise çok çekirdekli hücrelerin normalden büyük oluşumlar meydana getirdiğini bildirmişlerdir (79). Bizim çalışmamızdaki bulgular incelendiğinde de, seminifer tübüllerde nekroz olduğu görülmüştür.

Melatoninin endojen olması, toksik olmaması, vücut sıvılarına hızlı bir şekilde difüze olması, tüm hücre kompartmanlarına penetre olması, in vivo olarak potent olması, özellikle yüksek toksik etkiye sahip OH için güçlü bir nötralize edici olması ve pro-oksidan olayda yer almadan antioksidan enzimleri stimule etmesi gibi sahip olduğu önemli fonksiyonları hasarlı hücrenin iyileştirilmesinde kullanılabileceği fikrini akla getirmektedir (10).

Sönmez ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada; 24 adet 200-250 gr ağırlığında Wistar cinsi ergin erkek sıçanlar rasgele olarak dört gruba ayrılmıştır. Birinci grup kontrol; ikinci grup deney süresince (28 gün) alkol içeren sıvı diyet alan; üçüncü grup deney boyunca alkol içeren sıvı diyet ile birlikte 40 mg/kg/gün intraperitoneal C vitamini alan; dördüncü grup deney süresince alkol içeren sıvı diyet ile birlikte 4 mg/kg/gün intraperitoneal melatonin alan sıçanlardan oluşturulmuştur. Deney



süresince alkol içeren sıvı diyet alan gruptaki sıçanların testis dokularında ödem, damarlarda dilatasyon ve konjesyon tespit edilmiştir. Bazı seminifer tübüllerde atrofi, spermatogenetik seriye ait hücrelerde lümen içine dökülme, dejenerasyon ve seminifer tübül epitelinde vakuolizasyon gözlenmiştir. Melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda ise nispeten bazı bulgularda düzelme gözlenmesine rağmen hasarın devam ettiği görülmüştür. Dejenere olan hücrelerde eNOS immunoreaktivitesinde artış saptanmıştır. Melatonin ve C vitamini uygulanan gruplarda boyamada değişiklik saptanmıştır. eNOS immunoreaktivitesi yapılan boyamada intertisyel Leydig hücrelerinde (++), bazı spermatogenetik seriye ait hücrelerde (+) ve tunika albugineada (+) boyanma ayırt edilmiştir. Sonuç olarak kronik alkol tüketiminin testis dokusunda hasara yol açtığı, ancak bu hasarın melatonin ve C vitamini verilmesi ile kısmen düzeldiği belirlenmiştir (79).

Kurcer ve arkadaşları melatonin uygulamasının testiste iskemi reperfüzyon ile oluşturulan histopatolojik bozuklukları düzelttiğini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmada melatonin verilen sıçanların testis dokusunda alkol alan gruba göre germinal epiteldeki dökülmede ve atrofik seminifer tübüllerde azalma gözlenmiştir. Alkol grubunda görülen ödem ve damarlarda dilatasyon, melatonin uygulanan sıçanlarda bu hasarların önemli ölçüde düzeldiği gözlenmiştir. Alkol ile oluşturulan testis hasarına melatoninin koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (47).

Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara benzer bulgular gözlenmiştir. Atrofik tübülleri, spermatagonik serideki hücre dejenerasyonlarını, interstisyel alandaki önemli orandaki açılma hasarlarını melatonin hormonunun önemli oranda düzelttiği gözlenmiştir.

Melatoninin en iyi bilinen etkileri üreme fizyolojisiyle ilgili olanlarıdır. Melatonin doğrudan hipotalamus düzeyinde GnRH salgılanması üzerine etkisiyle LH salgılanmasını inhibe etmektedir. Hipertiroidide ise tiroid hormon düzeylerindeki artışa paralel olarak LH seviyelerinde veya testosteron salınımında önemli artışlar meydana gelmektedir (93).

Aktaş ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada, kontrol, torsiyon, torsiyon-detorsiyon ve torsiyon-detorsiyon-melatonin verilmiş grup olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Melatonin grubu 20, 50, 100 mg/kg olmak üzere uygulanmıştır. Deney sonucu incelenen elektron mikroskop görüntülerine göre 20 mg/kg ve 50 mg/kg dozda melatonin uygulanan grupların tam olarak testis hasarını iyileştiremediği, 100 mg/kg dozda melatonin uygulanan gruptaki hasarların iyileştiği ve kontrol grubuna yakın görünümde spermatogenik seri hücreleri, normal görünümlü Leydig hücreleri olduğu gösterilmiştir. Ve 100 mg/kg dozdaki melatoninin iskemi/reperfüzyon hasarını önlediğide dikkat çekmektedir (1).

Çalışmamızın bulgularına göre 10 mg / kg dozda uygulanan melatoninin normal görünümlü spermatagonik hücreler ve normal görünümlü Leydig hücrelerinin yanında yer yer hasarlı hücrelerinin devam ettiğini görülmüştür.

Moğulkoç ve arkadaşlarının hipertiroidi oluşturulan ve melatonin uygulanan sıçanlar üzerinde yapmış olduğu bir çalışmada, çalışma oluşan gruplarda, kontrol grubu "G1", sham-T4 "2 hafta boyunca intraperitoneal 0.5 ml/gün serum fizyolojik uygulanan" grubu "G2", hipertiroidi oluşturulan "2 hafta boyunca intraperitoneal 0.3 mg/kg/gün tiroksin uygulanan" grup "G3", hipertiroidi oluşturulan ve melatonin uygulaması yapılan "2 hafta boyunca intraperitoneal 0.3 mg/kg/gün tiroksin ve 3 mg/kg/gün melatonin uygulanan" grup "G4" olmak üzere toplam 24 adet Spraque - Dawley cinsi erişkin erkek sıçan üzerinde gerçekleştirilmiştir. On beş gün süren çalışmanın bitiminde deney hayvanlarından kan örneklerinde serum T3, T4 ve total testosteron düzeyleri tayin edilmiştir. Hipertiroidi de melatonin uygulamasının tiroid hormonları ve testosteron salınımında önemli bir baskılanmaya yol açtığını göstermektedirler (59).

Melatoninin başta sirkadyen ritim olmak üzere uyku, duygu durumu, immunité, termoregülasyon, cinsel olgunlaşma ve üreme gibi çeşitli biyolojik olaylarla ilişkisi bildirilmiştir (10).

Yapılan çalışmalarda beynin çeşitli alanlarında, kan damarlarında,ovaryumlarda, bağırsaklarda ve karaciğerde melatonin reseptörlerinin varlığı gösterilmiştir. Melatonin

pineal bezden salgılanmasını takiben dolaşım yolu ile hedef hücrelerdeki membran reseptörlerine bağlanmaktadır (10).

Melatonin güçlü bir radikal süpürücü ve antioksidandır (75). Melatoninin insandaki rolü, son dönemlerde giderek daha iyi belirlenmeye başlamıştır. Vücut ısısı ve uyku regülasyonundaki açık etkileriyle birlikte, puberte ve üreme sistemi üzerinde de etkinliği muhtemel olan melatoninin, insan sirkadiyan ritmi için de önemli olduğu ortaya konulmaktadır (21).

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. 2,4 D-amin, 55 gün boyunca 3 günde bir 320 mg/kg dozunda verildiğinde, vücut ağırlığında önemli düzeyde ağırlık artışına neden olmuştur.

2. 2,4 D-amin, testis üzerinde oldukça toksik etki göstermektedir. Spermatogenez hücrelerinde yoğun hasar ve hücresel dökülmelere neden olarak spermatogenezi olumsuz yönde etkiler, tübüllerde yoğun hasara ve atrofiye neden olmaktadır. Ayrıca interstisyel alanda açılmalara ve ödeme neden olmaktadır.

3. 55 gün boyunca 3 günde bir 10 mg/kg verilen melatonin, testis ağırlığında önemli bir değişikliğe yol açmazken, vücut ağırlığında çok önemli düzeyde artışa yol açtığı gözlenmiştir.

4. 55 gün boyunca 3 günde bir 320 mg/kg 2,4 D ile 10 mg/kg melatonin verilen grupta, testis ağırlığı ve vücut ağırlığında artış gözlenmemiştir.

5. Melatonin'in, 2,4 D'nin toksitesini nasıl önlediğinin ortaya konmasında ileri enzimatik, biyokimyasal ve immünohistokimyasal düzeyde yapılacak araştırmalar bu konuda ek bilgiler ve kanıtlar sağlayabilir.

Dünya Sağlık Teşkilatı ve Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu tarafından oluşturulan pestisit kategorilerinde, 2,4 D-amin'ler çok özel amaçlar için izin verilebilecek pestisit grubunda yer almıştır. Diğer ülkelerde durum böyle iken, ülkemizde ise üreticiler 2,4 D-amin ve diğer pestisitleri, istediği miktarda satın alarak, istediği oranda kullanabilmektedir. Bilinçsiz pestisit kullanımının tarım ürünlerinde hasat sonrası tolere edilebilir sınırların çok üstünde pestisit kalıntısı içerdiği, bunun da bir kısım sağlık sorunlarına yol açması nedeni ile üreticilerin zaman zaman zor durumda kaldıkları bilinmektedir. Tarım ürünlerinde kullanılan ilaçların üretim evresinden, tüketicilerin kullanımına kadar olan aşamada titizlikle takip edilmesi gerekmektedir. Ülkemizde de 2,4 D-amin herbisiti kullanılmasının yasaklanması ve/veya birtakım sınırlandırmaların getirilmesi gerekmektedir (41).

## KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Aktaş, A; Tuncer, M.C; Yıldırım, A., Nergiz, Y.& Akkuş, M., 2011, Protective effects of melatonin on testicular torsion and detorsion damage in Sprague-Dawley rats. *Int. J. Morphol.*, 29:7-15
2. Alexander, B.H, Mandel, J.S., Baker, B.A., Burns, C.J., Bartels, M.J., Acquavella, J.F., Gustin, C., 2007, Biomonitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid exposure and dose in farm families, *Environ Health Perspect*, 115, 370-376.
3. Alihemmati A, 2006, Gebelik Döneminde Elektromanyetik Alana Maruz Bırakılan Ratlarda ve Yavrularda Melatonin'in Tiroid Bezi üzerine etkilerinin incelenmesi, Doktora Tezi, DokuzeYLül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 124 s.
4. Andreasik, Z., Kolon, S. An Smalik, R., 1979, Health status exaluation in workers packaging the herbicide "Pielik" (Cholorophenol), *Arch. Hig.Rad.Toksikol.*30:599-602
5. Arnold., E.K., et al., 1989, Pharmacokinetics of chlorinated phenoxy acid herbicides, *Veterinary Human Toxicology*, 31, 121-5.
6. Arslan D., 2010, 2.3.7.8-Tetraklorodibenzo-p-dioksin ile sıçan beyinde oluşturulan oksidatif hasar üzerine Melatoninin etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 74 s.
7. Bettahi I, Guerrero JM, Reiter RJ, Osuna C., 1998, Physiological concentrations of melatonin inhibit the norepinephrine-induced activation of prostaglandin E2 and cyclic AMP production in rat hypothalamus: a mechanism involving inhibition of nitric oxide synthase. *J Pineal Res.*; 25:34-40.
8. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D., 1998, Antioxidant properties of melatonin-an emerging mystery. *Biochem Pharmacol.*; 56:1265-1272.
9. Biçer, S., 2005, Bir herbisit olan 2,4 D'nin sıçanlarda ovaryum dokusu üzerine etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 85 s.
10. Brzezinski A., 1997, Melatonin in humans. *N Engl J Med.*;336:186-195.
11. Boval, B. And Smith, J.M., 1973, Photodecomposition of 2,4-dichlorophnoxy acetic acid. *Chem.Eng.Sci.*, 28: 1661-1675.
12. Bulmuş, Ö, 2007, Endosulfan, Cypermethrin, 2,4 D ve Trifluralin'in androjenik ve Anti-androjenik etkilerinin ratlarda Hershberger metoduyla araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, 92 s.
13. Cagnacci A., 1996, Melatonin in relation to physiology in adult humans. *J Pineal Res* 21, 200-213.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

14. Campel, M, 1986, Studies an enzyme activities in rat intoxicated with 2,4 D. Bromatol. Chem. Toxicol., 19(2):91-94.
15. Carlos Junqueira L, Carneino J, O.Kelley R., 1998, Barış Kitabevi.
16. Charles, J., M., Cunny, H., C., Wilson, R. ,D., BUS, J., S., 1996, Comparative subchronic studies on 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid, Amine, and Ester in Rats ,Fundamental and applied toxicology 33, 161-165, Article no:0153.
17. Cripps, R.E. and Roberts, T., Microbial degradation of herbicides.in: Hill, I:R and Wright , S.J.L., ed:, 1978, Pesticide microbiology-microbial aspects of pesticide behaviour in the environment, London, New York, Son Francisco, Academic Press, pp 669,730.
18. Crosby, D.G and Tutass, H.O., 1996, Photodecomposition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid J.agric.Food Chem., 14:596.
19. Courtney, K.D., 1977, Prenatal effect of herbicides: evaluation by the prenatal development index. Arch.environ.Contamin.Toxicol., 6:33-46.
20. Çelik, S., 2011, Uzun süreli cep telefonu kullanımının testis histopatolojisi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji Anabilim Dalı, 65 s. (yayınlanmış)
21. Deniz E, 2005, Kronik nitrik oksit sentaz inhibisyonu oluşturulan sıçanlarda melatoninin kan basıncı ve miyokardiyal iskemi-reperfüzyona bağlı infarkt alanına etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı, Elazığ, 68 s.
22. Erdoğan E, 2010, Kortikal displazi oluşturulmuş sıçanlarda melatonin kannabinoid-1 reseptörü ilişkisi,Tıpta Uzmanlık Tezi, TC. Genelkurmay Başkanlığı Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Tıbbi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı, Ankara, 99 s.
23. Erlich S.S., Apuzzo M.L.J., 1985, The pineal gland: anatomy, physiology and clinical significance. J Neurosurg 63, 321-341.
24. Ermiş, I.I., 2012, Anabolik androjenik steroid uygulanmış erkek sıçanlarda eritropoietinin testis dokusu üzerine koruyucu etkilerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 99 s. (yayınlanmış)
25. Erne, K., 1966, Distribution and eleminationof chlorinated phenoxyacetic acid in animals, Acta Vet Scand.,7, 240-256.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

26. Extoxnet., 1996, Extension toxicology network, pesticide information profiles, Oregon State University.
27. Fallin, E, Montgomery, M.L., Freed, V.H., 1973, The metabolism and distribution of 2,4,5-T in female rats, *Toxicol. and Applied Pharm.*, 24, 555-563
28. Federova, L.M. and Beloa, R.S: 1974 Inclusion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in organs of animals. *Gig.İ.Sanit.*, 39: 105-107.
29. Fetisov, M.I., 1966, Occupational hygiene in the application of hebicides of the 2,4 D group. *Hyg.Sanit.*, 31 (7-9): 383-386.
30. Feung,C.S., Hamilton, R.H. and Withom, F.H.: 1971, Metabolism of 2,4 dichlorophenoxyacitic acid by saybean cotyledon callus tissue cultures. *J.agric.Food Chem.*, 19: 474-479.
31. Fleeher, J.R. and Steen, R., 1971, Hydroxylation of 2,4 D in several weed species. *Weed sci.*,19 : 507-510.
32. Garry, V.F., Schreinemachers, D., Harkins, M.E., Griffith, J., 1996, Pesticide appliers, biocides, and birth defects in rural Minnesota, *Environ. Health Perspect*, 104, 394-399.
33. Giusti P, Lipartiti M, Franceschini D, Schiavo N, Floreani M, Manev H.,1996, Neuroprotection by melatonin from kainate-induced excitotoxicity in rats. *FASEB J.*; 10(8): 891-896.
34. Gorzinski, S.J., 1987, Acute pharmokinetik and subchronic toxicological studies of 2,4-dichlorophenoxy-acet,c acid. *Fundom.Appl.Toxicol.*,9 : 423 – 435.
35. Guerrero JM, Reiter RJ, Ortiz GG, Pablos MI, Sewerynek E, Chuang JL., 1997, Melatonin prevents increases in neural nitric oxide and cyclic GMP production after transient brain ischemia and reperfusion in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Pineal Res.*; 23: 24-31.
36. Halliop, J., Tocman, A. And Latalski, M., 1980, Ultrastructural investigations and myeloperoxidase determinations in rat neutrophils in acut poisoning with 2,4 Dichlorhenoxyacetic acid. *Acta haematol.Pol.*,11: 249-257,
37. Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX., 1993, The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev.*; 17: 347-357.

## KAYNAKLAR DİZİNİ ( devam ediyor)

38. İbrahim, M.A., G.G., Bond, T.A., Burke, P., Cole, F.N., Dost, P.E., Enterline, M., Gough, R.S., Greenberg, W.E., Halperin, E., McConell, I.C., Munrun, A., Sweendberg, S.H., Zahm, J.D., Graham, 1991, Weight of the evidence on the human carcinogenicity of 2,4 D, Environ. Health. Perspect., 96, 213-222.
39. Joshi, S.C., Timbewal, P., Sharma, A.,at Sharma, P., 2012, Evaluation of toxic effect of 2,4 D (2,4 Dichlorophenoxyaceticacid) on fertility and biochemical parameters of male reproductive system of albino mices, Academic Sciences, 1-5, 5 p.
40. Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2005, Temel Histoloji, (Çev.: Aytakin, Y., Solakoğlu, S., ) Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s. 418-434
41. Kalıpcı, E., 2011, 2,4 D Herbisitleri ve Endüstriyel atık sularının ekotoksik etkilerinin azaserin-sıçan modelinde karaciğer ve pankreasta araştırılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Çevre Mühendisliği Anabilim Dalı, 105 s
42. Karaca, Ö., Pekmez ,H., Kuş ,M.A., Akpolat, N., Öğetürk, M. ,Kuş ,İ.,2011, Deneysel karbon tetraklorür toksisitesi sonucu karaciğerdeki İŞP70 immunoreaksiyon artışı üzerine melatonin hormonunun etkisi, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıp Dergisi, 25: 73-76.
43. Kawashima, Y., et. al., 1984, Effects of 2,4 Dichlorophenoxy acetic Acid and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid on peroxisomal enzymes in rat liver. Biochem.Pharmacol. 33, 241-245, 1984
44. Keleştimur H., 1996, İnsanda pineal bezin fonksiyonları, Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 10, 141 - 147.
45. Kierszenbaum A.L., MD, PhD, 2001, (Çev., Demir R.) Palma Yayıncılık
46. Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., 2002, Effects of octylphenol and 17-estradiol on the gonads of guppies (Poecilia reticulata) exposed as adults via the water or as embryos via the mother, Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 134, 45-55.
47. Kurcer Z, Oguz E, Ozbilge H, et al., 2008, Effect of melatonin on testicular ischemia/reperfusion injury in rats: is this effect related to the proinflammatory cytokines fertil steril; 89 : 1468-73.
48. Kuş İ., Sarsılmaz M., 2002, Pineal bezin morfolojik yapısı ve fonksiyonları, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi 22, 221-226.
49. Kuş M.A., 2011, Pinealektomi yapılan sıçanlarda melatonin hormonunun hipokampus üzerindeki etkisi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, Elazığ, 99 s.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

50. Kohli, J.D., Khana, R.N., Gupta, B.N., Dhar, M.M., Tandon, J.S., Sircar, K.P., 1974, Absorption and excretion of 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid in man, *Xenobiotica*, 4, 97-100.
51. Kotler M, Rodriguez C, Sainz RM, Antolin I, Menendez - Pelaez A., 1998, Melatonin increases gene expression for antioxidant enzymes in rat brain cortex. *J Pineal Res.*; 24: 83-89.
52. Lerda, D., Rizzi, R., 1991, Study of reproductive function in persons occupationally exposed to 2,4 D, *Mutation Research*, 262 p.
53. Lindquist, N.G., Ulberg, S., 1971, Distribution of the herbicides 2,4,5-T and 2,4 D in pregnant mice, Accumulation in the yolk sac epithelium, *Experientia*, 27, 1439-1441.
54. Linscombe, V.A., Lick, S.J., 1994, Evaluation of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid isopropylamine salt in the Chinese hamster ovary cell/hydroxanthine-guanine phosphoribosyl transferase (CHO/HGPRT) forward mutation assay. Unpublished Report No. M-004725-017 from The Dow Chemical Co., Midland, MI, USA. Submitted to WHO by industry task force II on 2,4 D research data, Indianapolis, IN, USA.
55. Lochry, E.A., 1990, Developmental toxicity study of 2,4 D dimethylamine salt (2,4 DDMA) administered orally via gavage to CrI:CD BR VAF/Plus presumed pregnant rats, Unpublished Report. No:320 - 001 from Argus research Laboratories, Perkasie, PA, USA. Submitted to WHO by the industry task force II on 2,4 D research data, Indianapolis, Indiana, USA.
56. Loos, M.A., 1969, Phenoxyalkanoic acids. In Kearney, P.C, and Kaufman, D.D., ed. Degradation of herbicides, New York, Macel Deccer, PP 1-49.
57. Mayo JC, Sainz RM, Tan DX, Hardeland R, Leon J, Rodriguez C et al., 2005, Antiinflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK), in macrophages. *J Neuroimmunol*; 165: 139 - 149.
58. Mazarean, H.H., Dux, L., Guba, F., 1977, Changes of metabolism during experimentally induced myotonia of rats. I: Alteration in lactate and malate dehydrogenase isoenzyme activities. *Biochem.Med.*, 22: 350-358.
59. Moğulkoç R., Baltacı A., K., 2002, Hipertiroidi oluşturulan ratlarda intraperitoneal melatonin uygulamasının tiroid hormonları ve testosteron salınmasına etkisi, Selçuk Üniversitesi Merom Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı, Konya, Genel Tıp Derg; 12: 129-132.
60. Mohamadghasemi, F., Faghani M. At Khajehjahami S., 2010, The Protective Effects of Melatonin on the Histological Changes of Testis in Bisulfan-Treated Adult Mice. *J Reprod Infertil*; 11:147

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

61. Morrison, H., et al., 1993, Farming and prostate cancer mortality, American Journal of Epidemiology, 137, 270 - 280.
62. Moore, K.L., 2008, İnsan embriyolojisi, (Çev: Dalçık, H., Yıldırım, M.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s. 271 - 272
63. Moore, K.L., 2002, İnsan embriyolojisi, (Çev: Yıldırım, M.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 560 s.
64. Moore, K.L., 2003, The developing human clinically oriented embryology, the beginning of human development: first week, seventh edition, 15 - 41 p.
65. Mountassif, D., Kabine, M., Mouchid, K., Mounaji, K., Latruffe, N., El Kebbaj, M.S., 2008, Biochemical and histological alterations of cellular metabolism from jerboa (*Jaculus orientalis*) by 2,4 Dichlorophenoxyacetic acid: effects on D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase, Pestic Biochem Phys, 90, 87-96.
66. Özdaş, E., Ateş, U., Uyanıkgil, Y., Baka, M., Yavaşoğlu, A., Biçer, S., Ergen, G., 2006, Bir Herbisit olan 2,4 D (Diklorofenoksiasetikasit)'in sıçanlarda Testis Dokusu Üzerine Etkisi, Ege Tıp Dergisi:45:169-174.
67. Özdem M., 2011, Deneysel Periodontitiste melatoninin periodontal kemik yıkımı ve oksidatif stres parametrelerine etkisi, Doktora Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji Anabilim dalı, 109 s.
68. Pablos MI, Reiter RJ, Ortiz GG, Guerrero JM, Agapito MT, Chuang JI, Sewerynek E., 1998, Rhythms of glutathione peroxidase and glutathione reductase in brain of chick and their inhibition by light. Neurochem Int.; 32: 69 - 75.
69. Palmer, J.S.: 1972, Toxicity of 45 organic herbicides to cattle, sheep and chickens. İn: Production Research Raport, Washington, DC, Agricultural Research Service, pp 1-38.
70. Pahkla R, Zilmer M, Kullisaar T, Rago L., 1998, Comparison of the antioxidant activity of melatonin and pinoline in vitro. J Pineal Res. 1998; 24: 96-101.
71. Pemberton, J.M., 1966, Pesticide degrading pasmids: a biological answers to environmental pollution by phenoxy-herbicides. Ambio, 8:202-205.
72. Pierrefiche G, Topall G, Courboin G, Henriet I, Laborit H., 1993, Antioxidant activity of melatonin in mice. Res Commun Chem Pathol Pharmacol.; 80:211-223.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

73. Presscott, I.F., Park, J. And Darrien, I., 1979, Threat-ment of severe 2,4-D and mecoprop intoxication with alkaline diuresis.Br.J.clin.Pharmacol.,7: 111-116.
74. Reiter RJ., 1993, Interactions of the pineal hormone melatonin with oxygen-centered freeradicals: a brief review. Braz J Med Biol Res.; 26: 1141-1155.
75. Reiter RJ, Tan DX., 2003, Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemicreperfused heart. Cardiovascular Research. 58: 10-19.
76. Reiter RJ, Tan DX, Qi W, Manchester LC, Karbownik M, Calvo JR. ,2000, Pharmacology and physiology of melatonin in the reduction of oxidative stress in vivo. Biol Signals Recept. 9: 160-71.
77. Sauerhoff, M.W., Braun, W.H., Blau, G.E. and Gehring, P.J., 1977, The fate of 2, 4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4 D) following oral administration to man.Toxicology, 8: 3-11.
78. Short, P., Colborn, T., 1999, Pesticide use in the U.S. and policy implications: a focus on herbicides, Toxicol. Ind. Health, 15, 240-275.
79. Sönmez M,F, Selvi F., Balcıoğlu E., 2010, Melatonin ve C Vitamini'nin Kronik alkolik sıçanların testis dokusundaki hasar ve eNOS İmmunreaktivitesi üzerine etkileri Effect of Melatonin and Vitamin C on Damage and Expression of Endothelial NOS in Testes of Chronic Alcoholic Rats, Sağlık Bilimleri Dergisi (Journal of Health Sciences) 19 1 - 11.
80. Sota-Grabinska, E., Wisniowska, E., Kalka, J., 2003, Toxicity of selected synthetic auxines-2,4 D, MCPA derivatives to broadleaved and cereal plants, Crop Protection, 22, 355-360.
81. Stauber,D.J.;, 1987, Vietnam vet exposure to Agent Orange (letter).J.Occup.Med.,29:726.
82. Tan DX, Poeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR., 1993, The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen saffrole in vivo. Cancer Lett.; 70:65-71.
83. Thomas L, Drew JE, Abramovich DR, Williams LM., 1998, The role of melatonin in the human fetus (review). Int J Mol Med.; 1:539-543.
84. Urata Y, Honma S, Goto S, Todoroki S, Iida T, Cho S et al.,1999, Melatonin induces gamma-glutamylcysteine synthetase mediated by activator protein-1 in human vascular endothelial cells. Free Radic Biol Med.;27:838-847.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

85. Vural, N., Burgaz, S., 1984, A gas chromatographic method for determination of 2,4-residues in urine after occupational exposure, Bull.Environ. Contam. Toxicol., 33, 518-524.
86. Yamamoto H, Tang H., 1996, Melatonin attenuates L-cysteine-induced seizures and lipidperoxidation in the brain of mice. J Pineal Res.; 21:108-113.
87. Yelkovan, İ., 1989, 2,4 D (2,4 Diklorofenoksiasetikası)' nin fare karaciğerindeki G-6-P DH (Glukoz -6-Fosfat dehidrogenaz) enzim aktivitesi üzerine etkisinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Cumhuriyet Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 88 s.
88. Yıldırım, M., Topografik Anatomi 2. Baskı, 2008, Nobel Kitabevleri Ltd.Şti., İstanbul.
89. Yıldırım Z., 2011, Ehrlich Solid Tümörlü farelerde melatonin ve gece ışık uygulamasının karşılaştırılmalı etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Bölümü, 104 s.
90. Yılmaz, H.R., Yüksel, E., Türköz Y., 2004, The effect of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid on some antioxidant enzymes in kidneys of the second cross of springs mice, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Isparta, Tıp Fakültesi Dergisi; 11: 6 - 9
91. Yönten, V., 2006, Bitkisel hormonlardan 2,4 D amin ve böcek öldürücülerden 2, 2-dikloro vinil fosfat (dichlorvos) 'ın orijinal, yüzeyi HNO<sub>3</sub> ve Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ile değiştirilmiş bentonit üzerine adsorbsiyonlarının incelenmesi, Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalı.
92. Walters, J., 1999, California Department of Pesticide regulation, www.cdpr.ca.gov.
93. 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4 D), 2010, Toxicity and Exposure Assessment for Children's Health, Chemical Summary, U. S .EPA.

## **ÖZGEÇMİŞ**

### **Bireysel Bilgiler**

Adı Soyadı: Sevda KENAN

Doğum Tarihi ve Yeri: 01.05.1987 Eskişehir/Merkez

Uyruğu: T.C

Medeni Durumu: Bekar

İletişim Adresi: skenan@windowslive.com

### **Eğitim Durumu**

2006-2011 Anadolu Üniversitesi Biyoloji Bölümü, ESKİŞEHİR

2002-2006 Hoca Ahmet Yesevi Y.D.A. Lise, ESKİŞEHİR

1994-2002 Yenikent İlköğretim Okulu, ESKİŞEHİR

### **Yabancı Dil İngilizce**

### **Üye Olunan Bilimsel Kuruluşlar**

Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği (THED)

### **Bilimsel Etkinlikler**

Klinik Embriyoloji Derneği (KED)-Embriyoloji/Androloji kursu-ANKARA, KASIM, 2012.

Kök Hücre Sempozyumu-Celal Bayar Üniversitesi-ÇEŞME, NİSAN, 2012.