

T.C
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ERİŞKİN ERKEK SIÇANLARDA BENZENİN
TESTİS DOKUSU ÜZERİNE
ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
EDA BİLGİÇ
2015

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof. Dr. İ. Enver OZAN

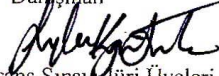


Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK

Danışman



Yüksek Lisans Sınav Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İ. Enver OZAN



Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK



Prof. Dr. Murat AKKUŞ



İTHAF SAYFASI

Sevgili Aileme...

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim sürecinde, eğitimime büyük katkıları olan başta danışman hocam değerli Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK'e, eğitimim sürecince göstermiş olduğu manevi destek ve ilgisinden ötürü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN' a,

Tezimin her aşamasında desteğini gördüğüm, ilgi, öneri ve yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU ve Araştırma Görevlisi Nalan KAYA'ya,

Deneyim, bilgi ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen diğer değerli öğretim üyesi hocalarım Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU, Doç. Dr. Dürrin Özlem TABAK, Yrd. Doç. Dr. Nevin KOCAMAN'a,

Tezimin yürütülmesi konusunda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Dicle Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı' ndan Prof. Dr. Murat AKKUŞ'a,

Tez çalışmamın yürütülmesi konusunda yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji yüksek lisans öğrencisi Osman Fatih YILMAZ ve Emine SARMAN'a,

Tezime sağladığı finansmandan ötürü Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne,

Eğitim hayatım boyunca her zaman maddi ve manevi desteğini esirgemeyen ve yoluma ışık tutan sevgili babam ve anneme sonsuz teşekkür ederim.

ÖZET

Benzen aromatik bir hidrokarbon olup, hoş kokulu ve renksiz bir sıvıdır. Benzen aynı zamanda önemli bir endüstriyel çözücüdür. Plastik, deterjan, pestisid ve diğer kimyasalların üretiminde kullanılır. Bunun yanı sıra kimyasal orjinli bir madde olan benzen çevre kirliliğine de sebep olur. Günümüzde üretilen benzenin % 75'i petrolden sağlanır. Geri kalan kısmı ise maden kömüründen elde edilen katrandır. Benzenin en çok bulunduğu yerler; mineral yağlar, doğal gaz ve sigara dumanıdır. Etil benzen, toluen, ksilen gibi hidrokarbonlara boya, cila, yapıştırıcı benzeri maddeler içinde bulunan aromatik çözücülere mesleklerinde maruz kalanlarda sperm üretiminde ciddi bozulmalar görülür.

Yapılan bu çalışmada benzenin testis dokusunda meydana getireceği etkiler incelenmiştir.

Çalışmada, ortalama 8-10 haftalık ve 250-300 gram ağırlığında 18 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 6'şarlı gruplar olmak üzere 3 gruba ayrıldı. Grup I olan kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. Grup II'ye 1 ml/kg benzen 1. günden başlanıp 9. güne kadar, Grup III'e ise 1,5 ml/ kg benzen 1. günden başlanıp 5. güne kadar orogastrik sonda aracılığıyla verildi.

Deney sonunda sıçanlar dekapite edilerek testis dokuları çıkarıldı ve rutin histolojik takipler yapıldıktan sonra histolojik boyamalar ve TUNEL metodu uygulandı.

Benzene maruz kalan sıçanların testis dokuları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, seminifer tübül epitelinde incelmeye, stoplazmik vakuoller, lümende genişlemeler, seminifer tübül bazal laminaında ayrılma, seminifer tübül epitelinin lümene dökülmesi ve spermatogenik hücrelerde dökülme (deskomasyon), germ hücrelerinde (spermatogonia) dejeneratif değişiklikler, dejenaratif tübül yapıları, seminifer tübüller arasında mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji, atrofi, dev hücre, ödem, ara bağ dokuda düzensizleşme, epitel bütünlüğünün olmayışı, Leydig hücrelerinde piknoz, seminifer tübül epitelinde boşluklu alanlar izlendi.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık

mikroskobu altında incelenmesi sonucunda benzen verilen gruplar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, seminifer túbüllerdeki apoptotik hücrelerde belirgin bir artış olduğu gözlemlendi.

Sonuç olarak, çeşitli nedenlerle benzen maruziyetinin testis dokusunda dejenerasyon ve apoptotik hücre sayısında artışa sebep olduğu gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Benzen, Testis, Histoloji

ABSTRACT

A HISTOLOGICAL STUDY OF THE EFFECTS OF BENZENE ON TESTICULAR TISSUES IN ADULT MALE RATS

Benzene is an aromatic hydrocarbon and a colorless and odorous liquid. Benzene is also an important industrial solvent. It is used in the production of plastics, detergents, pesticides, and other chemicals. In addition, benzene, as a chemical agent, causes environmental pollution. Nowadays, 75% of benzene is obtained from oil. The rest is tar that is produced from coal. Benzene is found mostly in mineral oils, natural gas, and smoke. Serious deterioration is seen in sperm production in people who are exposed to aromatic solvents found in paints, lacquers, adhesive and hydrocarbons such as ethyl benzene, toluene, and xylene in their professions.

In this study, the effects of benzene on testicular tissues were examined.

In this study, 18 Wistar albino male rats, with a mean age of 8-10 weeks and weighing 250-300 grams were used. The rats were divided into 3 groups. Group I, which is the control group, has no application. 1 ml/kg benzene was given to Group II for 9 days starting from the first day, and 1,5 ml/kg benzene was given to Group III for 5 days starting from the first day via orogastric method. By the end of the experiment, the rats were decapitated and their testicular tissues were removed and after routine histological examining, histological staining and TUNEL method was performed.

Compared with the control group, the testicular tissues of rats exposed to benzene; thinning in seminiferous tubule epithelial presented expansions in the cytoplasmic vacuoles, lumen separation in seminiferous tubules basal lamina, affusion of seminiferous tubule epithelium to the lumen and affusion in spermatogenic cells (desquamation), degenerative changes in germ cells (spermatogonia), degenerative tubule structures, mononuclear cell infiltration between seminiferous tubules, hemorrhage, atrophy, giant cells, edema, disorder in intermediate tissues, absence of epithelial integrity, pyknosis in Leydig cells, and hollow areas in the seminiferous tubule

epithelium were observed.

Compared with the control group, the rats exposed to benzene revealed a significant increase in apoptotic cells in the seminiferous tubules as a result of examining TUNEL staining under the light microscope to identify apoptotic cells.

As a result, it was observed that exposing to benzene for various reasons resulted in degeneration in the testicle tissues and an increase in the number of apoptotic cells.

Key Words: Benzene, Testis, Histology

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
İTHAF SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLO LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
KISALTMALAR LİSTESİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Erkek Genital Sistemi	1
1.2. Testislerin Gelişimi	1
1.3. Testisler	2
1.4. Testisin Histolojik Yapısı	4
1.5. Testisin Anatomisi ve Histolojisi	4
1.5.1. Seminifer Tübül Histolojisi	5
1.5.2. Sertoli Hücreleri	7
1.5.3. Spermatogenik Hücreler	7
1.5.4. Leydig Hücrelerinin Histolojisi	8
1.6. Organik Solventler	9
1.6.1. Hidrokarbonlar	9
1.6.2. Aromatik Hidrokarbonların Elde Edilişi ve Kullanım Alanları	10
1.7. Benzen	11
1.8. Apoptozis	13
1.8.1. Kaspazlar	15
1.8.2. Fizyolojik ve Patolojik Koşullarda Apoptoz	16
	18

1.8.3. Hücrelerde Apoptoz Varlığını Belirleyen Yöntemler	
2. AMAÇ	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri	21
3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar	22
3.3. Doku Örneklerinin Alınması	23
3.4. Histokimyasal Boyama	23
3.5. TUNEL Metodu	24
4. BULGULAR	28
4.1. Histolojik Bulgular	28
4.2. TUNEL Bulgular	37
5. TARTIŞMA	40
6. KAYNAKLAR	43

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Organik solventlerin genel sınıflandırılması	9
Tablo 2. Apoptozisin gelişmesini etkileyen faktörler	15
Tablo 3. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	19
Tablo 4. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkibi	22
Tablo 5. Histolojik takip serileri	24
Tablo 6. TUNEL boyama işlemi	26
Tablo 7. TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi	27

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Erkek genital sisteminin anatomisi	1
Şekil 2. Testis kanalları ve epididim kanalları	3
Şekil 3. Seminifer tübül duvarının bir parçası	6
Şekil 4. Seminifer tübül epitelinin hücreleri	6
Şekil 5. Apoptoza uğramış bir hücrenin elektron mikroskobunda görünümü	14
Şekil 6. Kontrol grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü	29
Şekil 7. Grup II. Seminifer tübül epitelinde incelleme, Ara bağ dokuda düzensizleşmeler, lümende genişleme	29
Şekil 8. Grup II. Seminifer tübülde stoplazmik vakuoller ve düzensizleşmeler, epitelde incelleme ve lümende genişlemeler	30
Şekil 9. Grup II. Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma	30
Şekil 10. Grup II. Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma	31
Şekil 11. Grup II. Seminifer tübül epitelinde düzensizleşmeler	31
Şekil 12. Grup II. Dejeneratif tübül yapıları ve bazal laminada incelleme ve ayrılmalar	32
Şekil 13. Grup III. Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma, Spermatogenik hücrelerde dökülme	32
Şekil 14. Grup III. Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma ve epitelde boşluklu alanlar	33
Şekil 15. Grup III. Seminifer tübül epitelinde vakuolleşme, dejenerasyon ve epitelde bütünlüğün olmayışı	33
Şekil 16. Grup III. Stoplazmik vakuoller ve Seminifer tübül epitelinde düzensizleşmeler	34
Şekil 17. Grup III. A. Leydig hücrelerinde piknoz, Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma	34
Şekil 18. Grup III. Seminifer tübüller arasında mononükleer hücre infiltrasyonu, Hemoraji, Ödem	35

Şekil 19. Grup III. A. Seminifer tübül epitelinde incelme ve hücre kaybı, Atrofi, Mononükleer hücre artışı,	35
Şekil 20. Grup III. Seminifer tübül epitelinde epitelinde bozulma ve dev hücre görülmesi	36
Şekil 21. Grup III. Seminifer tübül epitelinin lümene dökülmesi ve dejeneratif tübül yapıları	36
Şekil 22. Kontrol grbunda TUNEL pozitif hücre	37
Şekil 23. Grup II. TUNEL pozitif hücre	38
Şekil 24. Grup III. TUNEL pozitif hücre	38
Şekil 25. Negatif kontrol. TUNEL X 400	39
Şekil 26. Pozitif kontrol. Meme dokusu	39

KISALTMALAR LİSTESİ

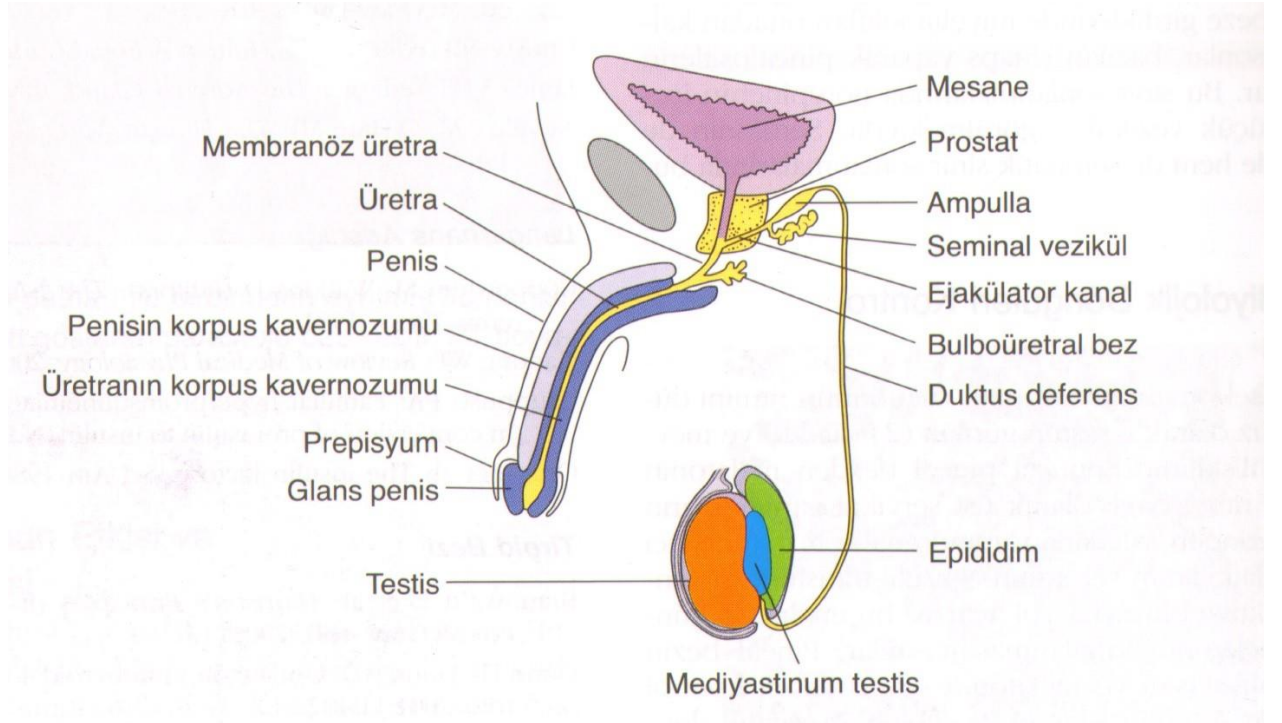
TDF	: Testis Belirleyici Faktör
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
ABP	: Androjen Bağlayıcı Hormon
EM	: Elektron Mikroskobu
ICSH	: Interstisyel Hücre Stimulan Hormonu
ICE	: Interleukin converting enzyne
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
TNFR	: Tümör nekroz faktörü reseptörü
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transpherase Mediated Nick and Labelling
ISEL	: In situ end labelling
ISNT	: In situ nick translation
ELISA	: Enzyme linked immunosobent assay
PAS	: Periyodik Asit-Schiff
H&E	: Hematoksilen Eozin
PO	: Per Oral
PBS	: Phosphate buffered saline
DAB	: Diaminobenzidine
Tdt	: Deoksinükleotidil transferaz
LAP	: Lösin Amino Peptidaz
TNF	: Tümör nekroz faktörü
RDS	: Respiratuvar Distres Sendromu
Nm	: Nanometre
µM	: Mikrometre

1. GİRİŞ

1.1. Erkek Genital Sistemi

Erkek genital sistemi (male genital system), bir çift testis (erkek cins bezleri-gonads), genital boşaltma yolları (excretory ducts), bu yollara açılan yardımcı bezler (accessory genital glands) ve erkek dış genital organı (male external genitalia) penisten meydana gelir (1).

Testisin başlıca iki görevi hormon ve spermatozoon üretmektir. Testiste üretilen başlıca hormon testosterondur. Testosteron spermatogenez, embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşma ve gonadotropin salgısının kontrolü için önemlidir (2).



Şekil 1. Erkek genital sistemi (3).

1.2. Testislerin Gelişimi

Seks kromozom komplekslerinden Y kromozomu taşıyan embriyo da, testisler gelişmektedir. Testislerin gelişimi, koordineli bir seri genin indüksiyonu ile sağlanır (4, 5). İntrauterin yaşamın 3. haftasında vitellus kesesinde gözlenen ilkel cinsiyet hücreleri

gelişimin 5. ve 6. haftalarında dorsal mezenter yoluyla, ameboid hareketler yaparak ilkel gonadlara ulaşır. Embriyonun erkeklik veya dişilik yönünden gelişmeye başlaması 7. haftadan itibaren gerçekleşir (6). İntrauterin yaşamın 10. haftasına kadar ara mezodermden köken alan ilkel gonadlarda ultrasonografik olarak cinsiyet ayrımı yapılamaz (7). Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti, sekonder oositi dölleyen sperm türüne bağlı olarak fertilizasyonla belirlenir (8).

Primordial gonadlar Y kromozomunda bulunan testis belirleyici faktörün etkisine bağlı olarak testislere farklılaşmaya başlar. Bu faktörün varlığında fetüsün cinsiyeti erkek, yokluğunda ise kız tipinde gelişir (7). İlk önce seminifer tübüllerin öncülleri olan primer epitelyal cinsiyet kordonları oluşur. Primer epitelyal cinsiyet kordonları postnatal yaşamda lümeni puberteye kadar uzanan testosterondan zengin sıvıyla doludur. Bu kordonlar puberteyle birlikte uzar, çapları genişler ve lümen oluşur. Artık bu kordonlara seminifer tübül adı verilir. Leydig hücreleri ise seminifer tübüllerin arasındaki ara mezodermden gelişir (9, 10).

Testis belirleyici faktör (TDF), primer seks kordonlarını uyararak, onların farklılaşmamış gonadın medulla derinlerine doğru uzanmasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis oluşur (11). Rete testis tek katlı kübik epitelden oluşan labirent biçimindeki toplayıcı bölümlerdir. Bezin % 20 - % 30 kadarını interstisyel bağ dokusu oluşturur; interstisyel doku da hormon üreten Leydig hücre kümelerinin yer aldığı damarlardan zengin bağ dokusu içerir (9).

Testis kendi periton örtüsü (prosessus vaginalis) ile birlikte 28. haftada aşağıya doğru göçe başlar. 32. haftada inguinal kanaldan geçerek skrotuma ulaşır (10).

1.3. Testisler

Testisler, skrotum içinde spermatik kord ile asılı dururlar ve birbirlerinden septum skroti ile ayrılırlar (1).

Testisler, dıştan içe olmak üzere tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa olmak üzere üç tabaka ile sarılıdır (12, 13, 14).

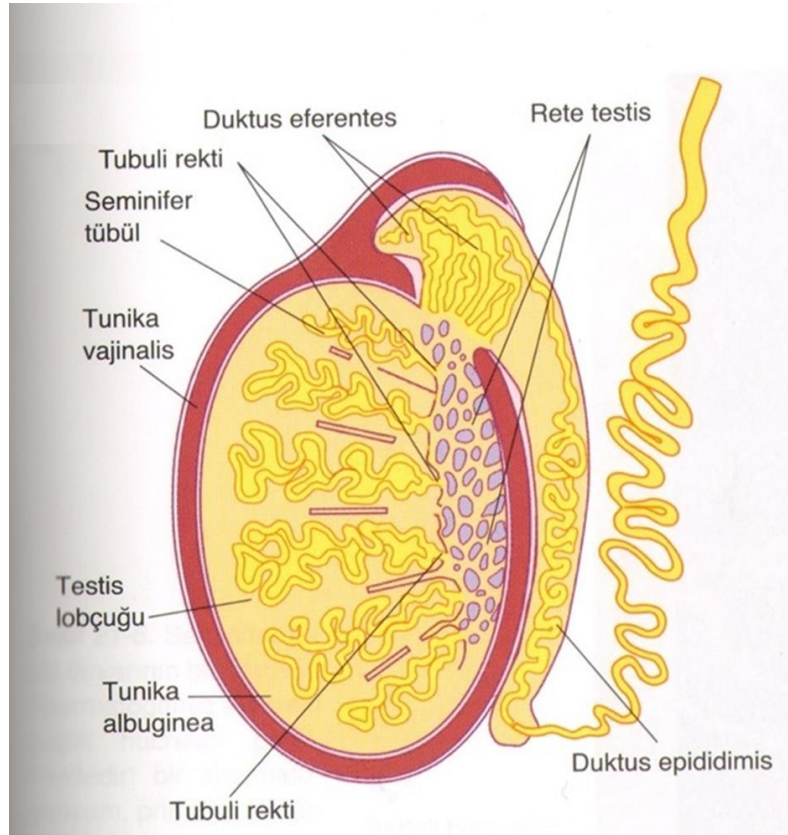
Tunika vaginalis fascia spermatika internanın iç, testisin de dış yüzünü saran

peritonun bir uzantısı olan prosesus vaginalis'in alt ucudur (15). Peritondan köken almış seroz bir kese taşır (1).

Tunica vaginalis, dış parietal ve testisin anterior ve lateral yüzlerinde tunika albugineayı örten, iç visseral olmak üzere iki yapraktan oluşmuştur (13, 16, 17).

Tunica albuginea sıkı ve düzenli bağ dokusundan oluşmuş, mavimsi- beyaz renkli, kalın bir kapsül ile sarılı olup, fibröz bir tabakadır (13, 16, 17). Tunika albugineanın iç kısmı kan damarlarından zengin olup, daha gevşek bir yapıya sahiptir ve buna vasculosa testis denir (1). Tunika albuginea'nın iç yüzünü ve tüm bölmelerin yüzeyini örter. Böylece, testis' in içindeki tüm lobuli testis'i de sarmış olur (12, 13).

Testisler birleşik tubuler hem dış salgı, hem de iç salgı yapan karışık bezlerdir. Ekzokrin salgısı, testis sıvısı ve spermium – spermatozoonlardır. Endokrin salgısı ise steroid yapıda testosteron hormonudur. Bu nedenle testisler, üreme ve hormon salgılama gibi iki önemli işlevle yükümlüdürler (1).



Şekil 2. Testis kanalları ve epididim kanalları (3).

1.4. Testisin Histolojik Yapısı

Testisler, dış tarafta bulunan sıkı bağ dokusundan oluşmuş tunica albuginea'dan uzanan septalar aracılığı ile lobüllere ayrılır (18).

Testisler histolojik yönden;

1- İnterstisyum

2- Seminifer tübüller olmak üzere iki bölümde incelenir.

İnterstisyumda; Leydig hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, kan damarları, sinirler ve lenfatikler bulunur (19).

Organın parankimasını spermatogenezin gerçekleştiği seminifer tübüller oluşturur. Seminifer tübüllerin çevresinde miyoepitelyal (miyoid) hücreler bulunur ve peristaltik hareketlerden sorumludurlar. Seminifer tübüller apikal bağlantı kompleksleriyle birbirine tutunmuş kübik epitel hücreleriyle döşeli tubuli rekti' ye açılır. Bu kanallar da interstisyel dokudan, kan ve lenf damarlarından ve Leydig hücrelerinden zengin, kübik epitelle döşeli bir ağ yapısındaki rete testise bağlanırlar (10).

1.5. Testisin Anatomisi ve Histolojisi

Testisler erkekte üreme organı olup bir çifttir. Yanlardan basık iri badem şeklindedir. Sağ ve sol testis skrotum içinde funikulus spermatikus ile asılı olup birbirlerinden septum skroti ile ayrılırlar. Sol testis sağa göre 1 santimetre (cm) kadar daha aşağıda yer alır. Bunun nedeni kan stazına bağlı olarak sol testisin daha ağır olmasıdır (15).

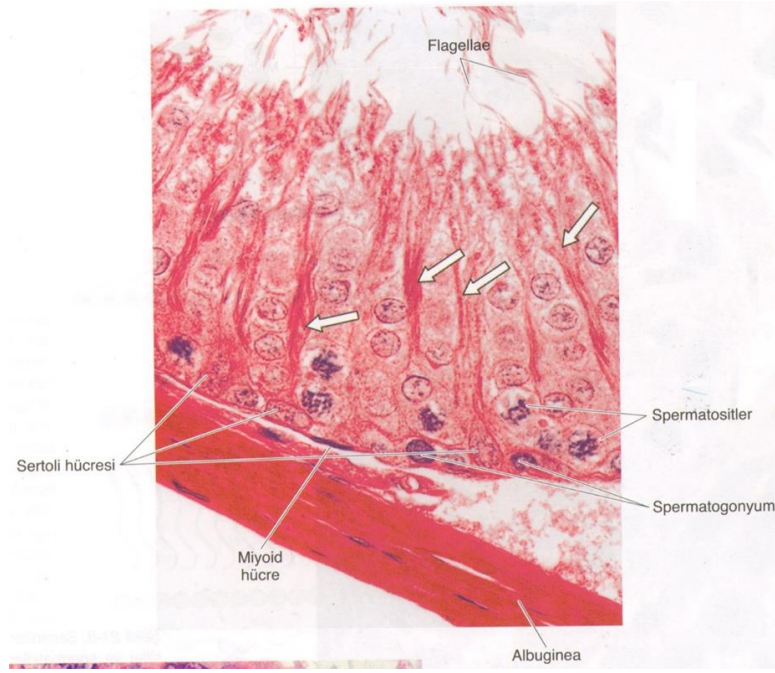
On beş gram ağırlığında oval bir bez olan testis, tunika albuginea adı verilen sıkı fibroelastik bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsülle sarılmış durumdadır. Daha dış kısımdaki visseral katman olan tunika vajinalis kapsülü dıştan sarar. Testisin arka kenarında kapsül kalın bir katlanma şeklinde içeriye doğru uzanır, bu kısım mediastinum testis adını alır. İnce fibröz bölmeler ya da başka bir deyişle septumlar, mediastinumdan ışınal olarak uzanarak insanda kama şeklindeki yaklaşık 250 adet lobülü oluşturur. Lobüller içinde seminifer tübüller bulunur, bunlar kesite farklı düzlemlerde girer çünkü yapıları kıvrımlıdır. Her testiste toplam uzunluğu 280 - 400 m. arasında olan 600-1200 seminifer tübül bulunur (9). Bu yapılar spermlerin oluşum yerleridir. Spermler seminifer

tübüllerden, yaklaşık 6 m boyunda bir başka kıvrımlı tüp olan epididim' e girer. Epididim vaz deferense açılır ve prostat bezine girmeden hemen önce, vaz deferens ampullası adı verilen bir genişleme gösterir (20). Mediastinumda, seminifer tübüller tübüli rektiye (düz tübüllere) ve rete testise boşalır, rete testis birleşerek sayısı altı ile sekiz adet olan duktuli efferent' leri oluşturur. Bu kanallar testis sıvısını ve spermatozoonları epididimisin proksimal bölümüne aktarır (9). Testisleri vücut dışına bağlayan zincirin son bölümünü uretra oluşturur (20).

1.5.1. Seminifer Tübül Histolojisi

Seminifer tübüller, yaklaşık 150-200 µm çapta ve 20-80 cm uzunlukta oldukça kıvrıntılı kanalcıklardır (18). Seminifer tübülleri ayrı bir bağ dokusu, miyoid hücrelerden oluşan bir tabaka ve bir bazal membran çevreler. Seminifer tübül epiteli olağanın dışında, iki hücre grubu barındıran karmaşık çok katlı epitelyum özelliği sergiler: spermatogenik (ya da germ) hücreler ve çoğalma özelliğine sahip olmayan sertoli hücreleri (9).

Seminifer tübüllerin görevi spermatozoonları üretmektir ve bu olay spermatogenez olarak adlandırılır (12). Ayrıca bu hücreler hipofiz bezinden Folikül Stimülan Hormon (FSH)'nun salgılanmasını düzenleyen inhibin, sperm sıvısının genital kanallara gidişine yardımcı olan Androjen Bağlayıcı Protein (ABP)' i salgırlar (1).



Şekil 3. Seminifer tübül duvarı. Hematoksilen & Eozin (3)



Şekil 4. Seminifer tübül epitelinin hücreleri. Hematoksilen & Eozin (3).

1.5.2. Sertoli Hücreleri

Seminifer tübül duvarındaki sertoli hücreleri intra embriyonik sölom epitelinden gelişir (10). Sertoli hücreleri uzun ve sütuna benzeyen hücrelerdir (21). Sertoli hücrelerinin tabanı bazal membran üzerine oturur (9). Sertoli hücreleri bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan prizmatik hücrelerdir. Tübüller arası boşluk ve seminifer tübül lümeni arasında köprü hücreler olarak görev yaparlar (22). Bu hücreler ayrıca apoptoza giden spermatogenik hücrelerin fagositoz edilmesinden de sorumludurlar (23).

Çekirdek olukludur ve heterokramatin kitleleri ile ilişkili geniş bir çekirdekçik içerir (22). Organel bakımından zengin olan sertoli hücrelerini 7-9 nanometre (Nm) kalınlığında bir flaman kılıfı nükleusu sitoplazmik organellerden ayırır (3). Stoplazma düz ve granüllü endoplazmik retikulum, mitokondriyonlar, lizozomlar, lipid damlacıkları, yaygın bir golgi aygıtı ve zengin bir hücre iskeleti (vimentin, aktin, mikrotübüller) içerir (3, 22).

Sertoli hücreleri, Folikül stimulan hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) salgırlar ve sıkı bağlantılarla bağlanmış olduklarından makromoleküllerin geçişine izin vermezler (kan testis bariyeri) (10, 24).

Kan- testis bariyeri kanda bulunan zararlı maddelerin seminifer epitele geçişini engeller ve gelişen spermiumlardaki mebran antijenlerinin kana ve bağışıklık sistemine geçmesini kısıtlar (25).

Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelyumun dominant hücre tipidir (22).

1.5.3. Spermatogenik Hücreler

Bu hücreler vitellus kesesinden köken alan primordial germ hücrelerinden gelmektedirler (26). Spermatogenik hücreler; spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidlerdir (27).

Hücrelerin bazal mebrana en yakın olanları yuvarlak çekirdekli spermatogonyumlardır. Yine yuvarlak çekirdekli olan, ancak kromatini spagettiye benzeyen daha büyük hücreler primer spermatositlerdir. Haploid sekonder spermatositler

seyrek görülür; oluşur oluşmaz bölünerek spermatidleri oluştururlar (9). En olgun spermatogenik hücreler olan spermatidler, sertoli hücrelerinin apikal kısmına tutunup tübül lümeninin kenarını oluştururlar (26).

1.5.4. Leydig Hücrelerinin Histolojisi

Leydig hücreleri, seminifer tubüllerin arasını dolduran interstisyel bağ dokusu içinde, kan kapilleri etrafında, tek tek ya da gruplar halinde bulunurlar. Şekilleri, yuvarlak ya da köşeli olup merkezde yerleşik bir yada iki çekirdekleri bulunur. Lipid damllarından zengin, asidofilik bir sitoplazmaya sahiptirler. Elektron mikroskobu (EM) düzeyinde en belirgin özellikleri, diğer steroid hormon salgılayan hücrelerde görüldüğü gibi sitoplazmalarında çok iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulumun bulunmasıdır (1). Sitoplazmasının köpüksü görünümü testosteron sentezi için depolanan kolesterole bağlı olarak yüksek düzeyde lipid içermesinden kaynaklanır. Hücre yüzeyinde çok sayıda mikrovillus yer alır. Bu hücreler çoğunlukla pencere kapillerler ve küçük lenf damarlarına yakın konumda yerleşmiştir (9). İyi gelişmiş bir golgi kompleksi, fazla sayıda mitokondrionlar, yaşın ilerlemesi ile artan lipokrom pigmenti içerirler (1). İnsanlardaki leydig hücrelerinde, birbirine dik açılı çizgiler şeklinde çok düzenli bir biçimde dizilmiş kristaloid inklüzyonlar (reinke kristalleri) da görülür ancak işlevleri bilinmemektedir (9). Leydig hücrelerinden testosteronla birlikte ve östrojen gibi etkili olan östradiyol salgılanır (19). Testosteron salgılanması, embriyonik gelişim, seksüel olgunlaşma ve üreme fonksiyonu için gereklidir (28).

İnsanda tüm Leydig hücreleri günde 7 mgr testosteron salgırlar (1). Bu hücrelerde, üretilen testosteron ihtiyaca göre sentezlenir ve bekletilmeden kana verilir. Leydig hücreleri interstisyel hücreleri stimüle eden hormon (ICSH) ve hipofiz ön lobu hormonu olan Folikül Stimulan Hormon (FSH) tarafından denetlenir (19). Pubertede gonadotropik stimülasyona uğrayan Leydig hücreleri yeniden androjen salgılayan hücreler haline gelirler ve yaşam boyu aktif kalırlar (28).

1.6. Organik Solventler

Bir katıyı, sıvıyı ya da gaz maddeyi çözücü olarak çözelti oluşturan sıvı ya da gaz maddelere solvent denir (29). Solvent kavramı kimya alanında kullanılan bir kavram olmakla birlikte bu ifade kimya biliminde çözücü olarak geçmektedir. Bazı solventler karbon içerirler ve karbon içeren solventler organik çözücüler olarak tanımlanırlar (30). İçerdikleri kimyasal maddelere göre tehlikeli madde ve kullanım sonucunda da tehlikeli atık özelliği gösterirler (29). Organik solventlerin sınıflandırılması tablo 1'de gösterilmiştir (31).

Tablo 1. Organik solventlerin genel sınıflandırılması

I. Hidrokarbon solventler
A) Alifatik hidrokarbon solventler
B) Aromatik hidrokarbon solventler
a. Benzen
b. Toluen
c. Ksilen
d. H- flash naphta
C) Naftenik hidrokarbon solventler
II. Terpen solventler
III. Oksijen solventler
IV. Klorlu solventler
V. Nitropafin solventler
VI- Furan solventler

1.6.1. Hidrokarbonlar

Karbon atomunun hidrojen ile oluşturduğu bileşiklere hidrokarbonlar denir. Aromatik hidrokarbonların ilki ve en çok bilineni benzen olduğu için, bu gruba benzen yapılı bileşikler de denir. Milyonlarca yıl önce toprağın altında kalmış olan bitki ve

hayvanların, mikroorganizmalar tarafından parçalanması sonucu karbon içeren bileşikler meydana gelir. Günümüzde ise bu maddeler:

- Taşkömürü
- Petrol
- Asetilen
- Benzoik asit'ten elde edilir (32).

1.6.2. Aromatik Hidrokarbonların Elde Edilişi ve Kullanım Alanları

Doğal olarak da oluşabilen benzen, petrolün önemli bir bileşenidir (33), % 90 dan fazlası petrolden elde edilir. Bunun için yapılan işlem, heksanın halkalandırılarak ve bir kısım hidrojenin uzaklaştırılıp aromatik hidrokarbonlara dönüştürülmesidir. Aromatik hidrokarbonlar oldukça yanıcı (parlayıcı) maddeler olduğundan kullanım sırasında oldukça dikkatli olunmalıdır. Benzen, stiren plastiklerinin üretiminde kullanılan etilbenzenin üretimi için kullanıldığı gibi (34),

Diğer kullanım alanları;

- Kimya sanayiisinde bir çok kimyasal maddenin sentezinde (33),
- Fenol eldesinde, dodesil benzen (bir deterjan) üretiminde (34),
- İlaçlarda, boyalarda, plastiklerde, patlayıcı maddelerde (32),
- Lastik, ayakkabı, kozmetik, deterjan, çeşitli yapıştırıcılar, zırayı mücadele ilaçlarının üretiminde ve otomobil yakıtlarında (29, 33),
- Mürekkep ve mürekkep çıkarıcılarda (35, 29),
- Cila ve reçinlerde, pestisid ve kozmetik ürünler de (29),
- Temizlik ve yağ giderme maddelerinde de sıkça kullanılmaktadır (35).

Çok geniş bir kullanım alanına sahip olan benzen ile yakın temasta bulunan sanayii işçileri, meslekleri gereği bu maddenin toksisitesinden kurtulamazlar. Sonuçta ciddi sağlık problemleri ile karşı karşıya kalırlar (36). Etil benzen, toluen, ksilen gibi hidrokarbonlara boya, cila, yapıştırıcı benzeri maddeler içinde bulunan aromatik çözücülere mesleklerinde maruz kalan kişilerin sperm üretiminde ciddi bozulmalar görülür (37, 38).

Bu çalışma benzen toksisite' sinin testis dokusu üzerine etkilerini incelemek amacıyla yapılmış olup, benzen ile indüklenen sıçanların testis dokusunda histolojik ve histokimyasal değişiklikler meydana getireceği düşünülmektedir.

1.7. Benzen

Benzen ilk kez 1825 de Micheal Faraday tarafından, Londra'daki gaz borularında biriken yağmsı kalıntılardan elde edilmiştir (39, 40). Benzen ve diğer aromatik bileşiklerin ana kaynağı 1940 lara kadar kömür katranı olup, günümüzde ise petroldür (40). Genel olarak yağların çözücüsü olarak bilinen organik çözücüler, günlük hayatımızın her safhasında karşımıza çıkarlar. Özellikle, endüstride yaygın olarak kullanılan bu maddeler, uçucu bileşikler oldukları için, solunum yoluyla canlıları etkilerler (41). Bu bileşikler organizmaya solunum yoluyla girdikleri gibi oral yol ve deri yoluyla da girerek önemli hasarlar oluştururlar (39). Organik solventlerin ciltle teması sonucu deride egzema oluşur (35). Benzen ve bazı diğer zehirli aromatik bileşikler kirli havadan, mangalda pişirilen etin yağlarının bozunma tepkimeleriyle de açığa çıkabilmektedir (34).

Percivall Potts, çalışmasında kömür katranında bulunan bileşiklerin birçoğunun dört ya da daha fazla kaynaşmış benzen halkası içeren yapılar olduğunu göstermiştir. Böyle bileşiklere kanserojen (kansere neden olan kimyasallar) denir. Potansiyel bir kanserojen olan benzo (α) piren, ilk kez kömür katranından 1933'de izole edilmiştir. Benzo (α) piren aynı zamanda sigara katranında bulunur ve tütün ile akciğer kanseri arasında kimyasal bir köprü hazırlar (40). Sigara katranında en az 69 kanserojen ve çeşitli toksinler vardır (42). Ayrıca katranda basit ve karmaşık fenoller, alken ve alkanlar, benzen ve naftalenler bulunur (43). Benzen buharının uzun süreli solunması, kandaki alyuvar ve akyuvarların azalmasına neden olduğundan öldürücü olabilir (34). Yapılan çalışmalarda, dolaylı yoldan akciğerlerin benzen toksisitesinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuşlardır (44).

Benzen ile yapılan ilk çalışmalar benzenin tek başına çok önemli bir toksik ajan olmadığını ortaya koymuştur. Benzen organizmaya girdikten sonra başlıca karaciğerde Sitokrom P450 2E1 enzim sistemi aracılığı ile metabolize olmakta ve ortaya çıkan ara

ürünlerin (hidrokinon, fenol, katekol, benzokinon, mukonaldehit) toksisiteye neden olduğu ileri sürülmektedir (45). Oluşan bu metabolitler genotoksisite, hematoksisite ve lösemi gibi hastalıkların ortaya çıkmasından doğrudan doğruya sorumludurlar (46). Yapılan bir çalışmada, bu ara metabolitlerin yerleştikleri veya bağlı oldukları dokularda birbirleri ile etkileşim içinde oldukları ve bu etkileşimlerin toksisitede ve diğer ciddi rahatsızlıkların oluşumunda kilit rol oynadıkları ileri sürülmüştür (47). Benzen metabolizmasının karaciğerde meydana gelmesi hepatotoksisitenin açığa çıkmasında önemli bir safha olduğunu düşünen Manenti ve arkadaşları, aminon-demetilaz aktivitesinde artış, glikoz 6- fosfataz, alkalın fosfodiesteraz I ve alkalın fosfatazda azalış, fakat glutamijtransferaz enzim aktivitesinin düzeyinde bir değişim olmadığını saptamışlardır (48). Hepatik metabolizma üzerine yapılan başka bir çalışmada, yükseltgenmeye ve konjugasyona katılan enzimlerde bölgesel bir farklılık gözlemlenerek bu durumun kritik bir rol oynadığı gösterilmiştir (49, 50). Benzenin insanda kromozom aberasyonuna da yol açtığı bilinmektedir. Asıl toksik etkisi hematopoetik sistemle ilgili olan benzenin üreme sağlığı bakımından da önemi vardır. Yüksek dozda benzene maruz bırakılan sıçanlarda gebeliğin oluşmadığı yada gebelik meydana gelse bile doğan yavruda malformasyonların olduğu görülmüştür. Ayrıca hematolojik etkileri ile ilgili olmak üzere benzen, anormal uterus kanamalarına da neden olmaktadır (51). Pestisid ve herbisidler kadınlık hormonu benzeri etkileriyle sperm üretimini azaltıp (37), benzenin androjenler üzerine etkisine bağlı olarak spermatogenezis de azalmanın olduğunu (52), benzen verilen gruba ek olarak androjen tedavisinde, spermatogenezisde düzelme olduğu görülmüştür (53).

Testis histolojisi incelendiğinde, benzen verilen sıçanların testislerinde, seminifer tübül epitelinde dev hücre oluşumu, stoplazmik vakuoller, kromatolizis, germ hücrelerinin tübüler lümende çözülmesi (54), spermatogonia ların gelişim aşamasında yapısının bozulduğu ve seminifer tübüllerde küçülmenin olduğu (55), interstisyel Leydig hücreleri sayıları ve büyüklüğünde azalma, yalnızca sertoli hücrelerinin stoplazmalarında değil spermatositlerin nukleuslarında da dejeneratif değişiklikler (56), testislerde küçülme ve spermatogenezisde inhibisyon (57, 58), spermatogenetik hücreler üzerine etki sonucu infertilite (59), benzen doz miktarı arttıkça toksikolojik etkilere bağlı

olarak testis kanserine sebep olabileceği görülmüştür (60), 30 mikrometre (μM) üzerindeki benzen maruziyetlerinde, testiküler germ hücrelerinde apoptozda da artış görülmüştür (61).

1.8. Apoptozis

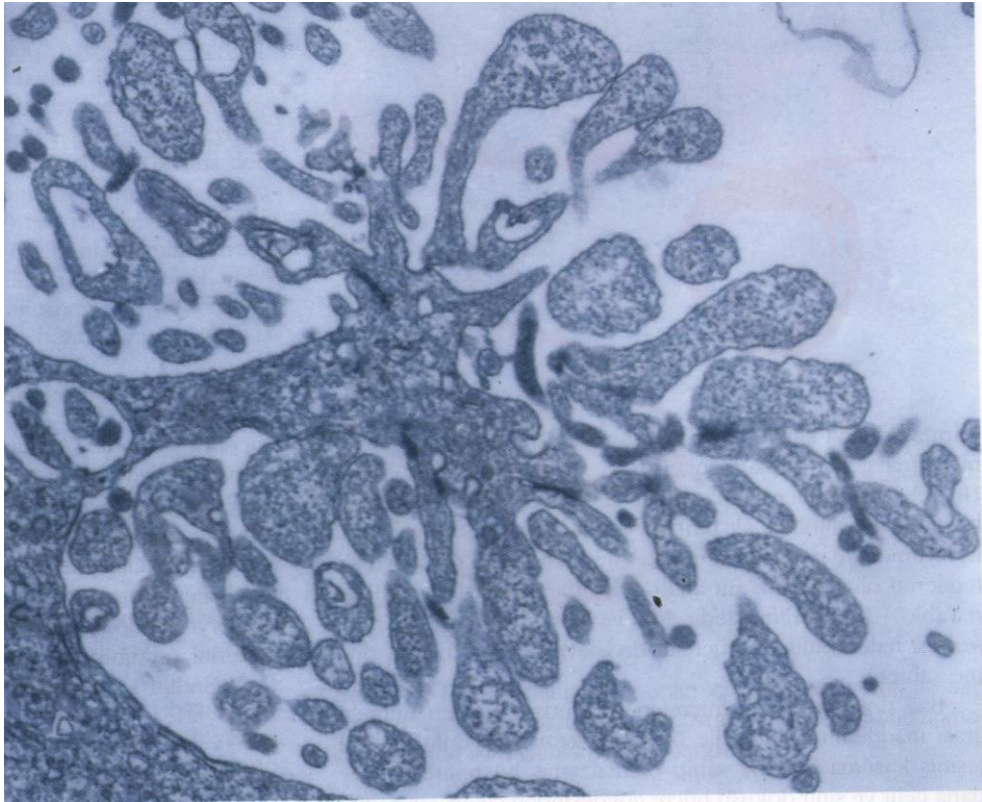
Apoptozis ilk olarak 19. yüzyılda Vogt tarafından keşfedilmiştir (62). Apoptozis ya da programlı hücre ölümünün tanımlanması ile ilgili tarihsel süreç, ilk kez 1885 yılında Fleming tarafından ortaya atılan kromatolizis kavramı ile başlamıştır (62, 63). Apoptozis ile ilgili ilk önemli çalışma 1972 yılında Kerr tarafından yapılmıştır (62). Bu çalışmada Kerr, karaciğerde atrofi gelişmesini çalışırken, hücrelerin farklı bir morfoloji gösterdikten sonra ortadan kalktığını gözlemiştir. Kerr bu olayı önceleri büzüşme nekrozu, bir yıl sonra da apoptozis olarak isimlendirmiş ve başlıca morfolojik özellikleri tanımlamıştır (64). 1990'ların ikinci yarısında apoptozis ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmış (65), 2000'li yıllardan itibaren hücre ölümünde apoptozis dışında başka yolların olduğu da bildirilmiştir (62).

Apoptozis bazı genlerin kontrolündeki bir dizi olaylar sonucu, organizmaya ait tasarlanmış, programlanmış (66) ve enerji gerektiren aktif bir hücre ölümüdür (67). Fizyolojik bir işlem olarak apoptozis, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludurlar (68). Nekroz ise enerjinin kullanılmadığı pasif hücre ölümüdür (67). Hücre zarının ya da hücredeki metabolik süreçlerin çok hızlı ve ağır biçimde hasar gördüğü ve hızla bozulan zar geçirgenliğinin hücre şişmesi ve zarın patlayarak hücre içi maddelerin dışarı saçılmasıyla sonuçlanan nekrotik süreçten farklı olarak apoptozda zar bütünlüğü bozulmaz (69).

Apoptozis üç evrede incelenir. Bunlar başlangıç, infaz ve bitiş evreleridir. Apoptozis birkaç saat ile birkaç gün arasında sürebilir. Hücrenin büzüşmesi, çekirdekte kromatinin yoğunlaşması ve çekirdek zarı kenarına yerleşmesi, DNA parçalanması, karyoreksis (çekirdeğin küçük parçalara ayrılması), stoplazmanın yoğunlaşması, organellerin daha sıkı hale gelmesi, hücre zarında balonlaşmalar (apoptotik cisimler)

oluşması apoptozisin ana yapısal özellikleridir (70). Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunurlar (71).

Yapısal değişimler özellikle infaz evresinde dikkati çeker. Fosfatidilserin normalde hücre zarının iç stoplazmik kısmında yer alır. Apoptozisde ise hücre dışına geçer. Bu değişim, apoptoza giden hücrenin makrofajlar ve diğer fagositoz yapan hücreler tarafından tanınmasını sağlar (70) ve ölen hücreler fagositoz yapan hücreler tarafından temizlenir (72, 73).



Şekil 5. Apoptoza uğramış bir hücrenin elektron mikroskopunda görünümü (3).

Apoptozisin gelişmesini etkileyen faktörler tablo 2’de gösterilmiştir (63).

Tablo 2. Apoptozisin gelişmesini etkileyen faktörler

I. Büyüme faktörü aktivitesinin azalması

- Embriyogenez sırasında
- Devamlı proliferen olan dokularda homeostaz için
- Yaşlılıkta

II. Hormonal aktivitenin azalması (hormonal çekilme)

III. Sitokin (II- 2, TNF) reseptörlerinin aktivasyonu ile

- Sitotoksik T lenfositlerin rol aldığı olaylarda
- Akut enflamasyonda
- Duktus obstrüksiyonunda

IV. Düşük dozda zedeleyici ajana maruz kalma (Örneğin radyasyon, hipoksi, serbest radikaller, ultraviyole, toksin, ısı ve antineoplastik ilaçlara bağlı hücre zedelenmesi)

Apoptozisi tetikleyen başlıca nedenlerden bazıları ise aşağıda sıralanmıştır (74).

- Fizyolojik yaşam sinyallerinin yokluğu ya da ölüm sinyallerinin varlığı
- Hücre aracılı, hedef hücreyi öldürmeyi tetikleyen sitotoksik bağışıklık yanıtları
- Çeşitli ilaç ya da toksinler
- Radyasyon
- Hipertermi
- Hipoksi
- Uzamış açlık
- Artmış stoplazmik kalsiyum' lardır.

1.8.1.Kaspazlar

Apoptotik hücre ölümünde gözlenen morfolojik olaylardan sorumlu temel mekanizma ICE (interleukin converting enzyne) olarak da isimlendiriliren, ondan fazla üyesi bulunan kaspaz ailesinin aktivasyonudur. Bu enzimler endonükleazları aktive ederek DNA sarmalı üzerine ve proteaz etkisiyle direkt sitoplazmadaki proteinler

üzerine etki yaparak birkaç saatte morfolojik değişikliklerin ortaya çıkmasına neden olurlar (63).

Kaspazlar intrasellüler proteazlar olup; apoptozisin gerek direkt, gerekse indirekt morfolojik ve biokimyasal değişikliklerinden sorumlu apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein- proteaz grubu enzimlerdir (75, 76).

Kaspazlar; başlatıcılar (2, 8, 9, 10), infazcılar (3, 6, 7) ve enflamasyoncular ya da sitokin aktivatörleri (1, 4, 5, 11, 12, 13, 14) olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Normalde inaktif halde bulunurlar fakat apoptotik uyarana geldiğinde aktifleşirler ve hiyerarşik bir düzen içinde çalışırlar (77).

Apoptozis mekanizmalarında önemli rol oynayan kaspaz (caspase) aktivasyonlarının, apoptotik hücrelerin fagositozu ile ilgili mekanizmaları ve apoptozisteki mitokondrial membran geçirgenliğindeki değişikliklerle ilgili görevleri tanımlanmıştır (65, 78).

Kaspaz- 1, meme epitel hücrelerinin apoptozunda görev almaktadır. Kaspaz- 2, apoptozisin başlangıç evresinde görev alır (79). Kaspaz- 3, apoptozisin infaz evresinde görev alır. İmmün sistem apoptozisi ile ilgilidir. Apoptozisin çekirdek değişimlerinden sorumludur. Kaspaz- 4 ve kaspaz- 5 beyin hariç pek çok dokuda görülür. Akciğer, karaciğer, ovaryum ve plasentada yüksek düzeyde bulunur. Kaspaz- 8, periferik kan lökositlerinde yüksek düzeyde bulunur. Kaspaz- 8 yokluğunda apoptoz yerine nekroz gerçekleşir. Rekombinant kaspaz- 8 bilinen tüm kaspazları aktive edebilir. Kaspaz- 9 kalp, testis ve ovaryumda yüksek düzeyde bulunur. Kaspaz- 10 kalp, karaciğer ve dalakta yüksek düzeyde bulunur ve insan T hücrelerinin CD95 ile düzenlenen apoptozunda görev alır (77).

1.8.2. Fizyolojik ve Patolojik Koşullarda Apoptoz

Apoptoz fizyolojik koşullarda kemik iliğinde ve karaciğerde işlevsel olmayan antijen reseptörlerinin ortadan kaldırılması (77), normal gelişimsel süreç içerisinde embriyogenez (71, 80), normal menstruel siklusda endometrial hücrelerin yıkımı (81), bağırsak kripta epitelleri gibi sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının

dengelenmesi, timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması (71) gibi pek çok fizyolojik olayda görev alır. Ayrıca zararlı ajanların veya hastalıkların yaptığı hücre hasarlarına veya immün reaksiyonlara yanıtta da rol almaktadır (82). Kanser ve oto- immünite apopitoz eksikliğinden, AIDS ise apopitozun aşırılığından kaynaklanan hastalıklardır (77).

Yaşlılıkta androjen hormon stimülasyonunun ortadan kalkması sonucu, prostat dokusu kısmen epitelyal hücrelerin atrofisine, kısmen de apoptozisine bağlı olarak küçülmektedir (63).

Deneyssel olarak Parkinson hastalığı oluşturan nörotoksinlerin, proapoptik özellikleri, nöron kültürlerinde gösterilmiştir bu hastalıkta substansiya nigra' daki nöronların apopitozu söz konusudur (83).

Hıv- 1 enfeksiyonu santral sinir sisteminde apopitozu uyarır. Primer beyin dokusu kültürleri incelendiğinde nöron ve astrositlerde apopitoz görülür (84).

Kalp hastalıklarının patogeneğinde apopitoz önemli rol oynar. Dilate kardiyomiyopati, miyokardit, kalp yetmeziliği ve iskemik kalp hastalıkları oluşumunda apopitoz temel mekanizmadır (85). Kalp yetmeziliğinin erken evrelerinde, kardiyomiyositler apopitoza daha yakındırlar (86).

Akciğer hastalıklarında RDS (Respiratuvar Distres Sendromu)'de, tip 1 alveol hücrelerinde apopitoz görülebilir. TNF akciğer epitel hücrelerinin apopitotik mekanizmasında da yer alır (87).

Ovaryumlarda germ ve granüloza hücrelerinin elenmesi apopitoz ile gerçekleşir (88).

Pankreas kanserinde LAP (Lösin Amino Peptidaz)'larda artış görülür, nükleer faktör kappa B apopitoz direncine katkıda bulunur (89).

Üriner inkontinansta; sfinkter düz kas hücrelerinin apopitozu görülür (90).

Bu ve benzer örnekler göstermiştir ki, transmembranik sinyali iletimi ile, büyüme faktörleri ve hormonlar gibi, hücre ölüm mekanizmalarını baskılayan faktörlerin ortadan kalkması durumunda apoptozis gerçekleşmektedir. Bunun yanı sıra, tümör nekroz faktörü reseptörü (TNFR) gibi plazma membran reseptörlerinin aktivasyonu ya da düşük dozda çeşitli zedeleyici ajanların ve glikortikoidlerin intraselüler sinyal iletimi ile

apoptoziste görevli proteinlerin sentezininin artması apoptozis oluşumuna katkıda bulunmaktadır (63). Apoptozis tek hücreli organizmalarda ise hücre ölümünün tek yoludur (91).

1.8.3. Hücrelerde Apoptoz Varlığını Belirleyen Yöntemler

Apoptozu tespit etmekte kullanılan yöntemler; hücre yapısındaki değişimlerin gözlenmesi, DNA kırıkları, kaspazlar, parçalanmış substratlar, düzenleyici ya da baskılayıcıların saptanması olarak özetlenebilir (92). Apoptozis için güvenilir biyokimyasal ya da antijenik bir belirleyici bulunmamakla birlikte, apoptozisi histolojik seviyede belirlemek basit bir histokimyasal reaksiyona dayanan, TUNEL (tdt- mediated nick end labeling technique) ya da ISEL (in situ end labelling) olarak isimlendirilen enzimatik in situ işaretleme yöntemi ile mümkün olmaktadır. TUNEL yönteminin bir modifiye şekli olan ISNT (in situ nick translation) yönteminde ise, DNA polimeraz enzimi yardımıyla yine DNA kırıklarının uçlarına işaretlenmiş nükleotidlerin eklenmesi söz konusudur. Apoptozisin saptanmasında son yıllarda güncel olan bir yöntem de monoklonal antikorların kullanılmasıdır. Burada apoptotik hücrelerin kondanse olan kromatin DNA'sının termal denatürasyona karşı artmış duyarlılığından yararlanılmaktadır (93). Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler tablo 3' de gösterilmiştir (94).

Tablo 3. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

I. Morfolojik görüntüleme yöntemleri

- Işık mikroskobu kullanımı
- Floresan mikroskobu/ lazerli konfokal mikroskop kullanımı
- Elektron mikroskobu
- Faz kontrast mikroskobu

II. İmmünohistokimyasal yöntemler

- Aneksin V yöntemi
- TUNEL yöntemi
- M30 yöntemi
- Kaspaz-3 yöntemi

III. Biokimyasal yöntemler

- Agaroz jel elektroforezi
- Western blotting
- Flow sitometri

IV. İmmünolojik yöntemler

- ELISA (enzyme linked immunosobent assay)
- Flourimetrik yöntem

V. Moleküler biyoloji yöntemleri

- DNA microarrays
-

2. AMAÇ

Toplumda infertilite oranı her geçen gün artmaktadır. Çeşitli nedenlerle benzen gibi üreme sağlığını etkileyen kimyasallara maruz kalınması infertilite nedenidir. Modern insanın infertiliteyi tabu olmaktan çıkarmasının bir yolu da benzen gibi kimyasallara karşı daha bilinçli olmasıdır. Bu duyarlı davranış bu oranın azalmasında etkili olacaktır. Bu çalışma sıçanlarda benzen toksisite' sinin testis dokusu üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla yapılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Hayvan deneyleri Etik Kurulu' nun 04.04.2013 tarih ve 49 sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında yapıldı. Çalışma bütçesinin tamamı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)'nin T. F. 13. 26 proje no'lu kararı gereğince karşılandı.

3.1. Deney Hayvanları ve Beslenmeleri

Çalışmada ortalama 8 -10 haftalık ve 250 - 300 gram ağırlığında 18 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. 22 - 25°C oda sıcaklığında 12 saat ışık (7:00 - 19:00) ve 12 saat karanlıkta (19:00 - 07:00) tutulan sıçanlar her gün altları temizlenen kafeslerde beslendi. Sıçanlar havalandırma sistemi bulunan bir ortamda, özel olarak hazırlanmış kafeslerde 6'lı gruplar halinde barındırıldı. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Denekler Yem Sanayi A. Ş. Elazığ Yem Fabrikasında hazırlanan peletler halindeki sıçan yemleriyle beslendi. Sıçanların deneysel uygulama yapılacak safhaya kadar bakımlarına bu şekilde devam edildi. Yemlerin terkibi aşağıdaki Tablo 4'de gösterilmektedir.

Tablo 4. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkihi

Buğday (%)	15
Mısır (%)	10
Arpa (%)	27
Kepek (%)	8
Soya (%)	29,4
Balık Unu (%)	8
Tuz (%)	0,6
Kavimix VM 23-Z (%) *	0,2
Methionin (%)	0,2
DCP (%)**	1,6

* 1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D3, 12 mg E, 0,8 mg K3, 0,8 mg B1, 2,4 mg B2, 1,2 mg B6, 0,006 mg B12 vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0,32 mg Folic acid, 0,02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0,06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

** % 18 fosfor, % 25 kalsiyum, % 0,2 flor'dan oluşur.

3.2. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar

Çalışmada ortalama 250 - 300 gram ağırlığında 18 adet Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar her grupta 6 adet olacak şekilde 3 gruba ayrıldı. Davranışsal değişiklikleri, fiziksel görünüşleri günlük olarak gözlemlenip kaydedildi. Herbir sıçan ayrı ayrı tartılıp ağırlıkları belirlendi. Günlük besin ve su alımları Ad libitum olup her 24 saatte bir ölçülüp kaydedildi.

Grup I (Kontrol Grubu): Deney süresince herhangi bir işlem yapılmadı. Deneklere ad libitum yem ve su verildi (n = 6).

Grup II (1 ml / kg Benzen Grubu): Orogastrik sonda yardımıyla peroral (P. O) olarak, 1. günden başlanıp 9. güne kadar 1 ml / kg benzen her gün sabah saat 11 : 00 de verildi (n = 6).

Grup III (1, 5 ml / kg Benzen Grubu): Orogastrik sonda yardımıyla P. O olarak 1. günden başlanıp 5. güne kadar 1, 5 ml / kg benzen her gün sabah saat 11: 00 de verildi. (n = 6)

3.3. Doku Örneklerinin Alınması

Tüm gruptaki sıçanlar deney sonunda tartıldıktan sonra, ketamin (75 mg/kg) + xylazine (10 mg/ kg) i.p uygulanarak anestezi altında dekapite edilerek çalışma sonlandırıldı. Dekapitasyonun ardından sıçanların testis dokuları hızla çıkarıldı. Çıkarılan testis dokuları histolojik çalışma için Bouin solüsyonu ile tespit edildi ve ardından histolojik ve histokimyasal incelemelere başlandı.

3.4. Histokimyasal Boyama

Her gruptan alınan testis dokuları Bouin solusyonunda tespit edildikten sonra sırasıyla % 50' lik, % 60'lık ve % 70'lik alkollerde yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden (tablo 5) geçirilerek dehidrate edildi. Ksilolde parlatılıp parafin bloklara (Sigma- parplast embedding media, Stenheim, Germany) gömüldü. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen & Eozin (H&E) boyası, Hematoksilen & Eozin (H&E) ve Masson Trikrom metodları ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobunda incelenip fotoğraflandı.

Tablo 5. Histolojik takip serileri

Sıra	İşlem	Süresi
1	% 70 Alkol	2 saat
2	% 80 Alkol	1.5 saat
3	% 96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	% 100 Alkol I	30 dakika
6	% 100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	25 dakika
9	Xylol II	25 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 Saat
12	Yumuşak parafin – Sert parafin	1.5 saat
13	Sert Parafin	3 saat
14	Gömme	

3.5. TUNEL Metodu

Parafin bloklardan 5 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05 %'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hidrojen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37 C'de nemli ortamda çalışma solüsyonu (% 70 µl Reaction Buffer + % 30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop / Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokulara, Anti - Digoxigenin - Peroxidase ile 30 dakika

muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntüledi. Harris hematoksilin ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solusyonu ile kapatıldı. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol dokusunda Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanıldı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskobu Novel N- 800 M incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilin ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Boyama metodu aşağıdaki Tablo 6'da ayrıntılı olarak verilmiştir.

Tablo 6. TUNEL boyama işlemi

Sıra	İşlem	Süresi
1	60°C etüv	Bir gece
2	Xylol	3x15 dakika
3	% 100, % 96, % 80, % 70 etil alkol	3'er dakika
4	PBS	5 dakika
5	Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir
6	1: 500 dilüsyondaki Proteinaz K solüsyonu	20 dakika
7	PBS	3x5 dakika
8	Endojen peroksit blokajı yapılır	3 dakika
9	PBS	3x5 dakika
10	Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11	Çalışma solüsyonu (% 77 µl Reaction Buffer + % 33 TdT Enzyme)	60 dakika
12	Stop/Wash Buffer (1 ml) +Distile su (34 ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13	Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14	PBS	10 dakika
15	DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16	PBS	3x5 dakika
17	Distile su	5 dakika
18	Harris hematoksilen	1 dakika
19	Distile su	5 dakika
20	% 80, % 96 ve % 100 etil alkol	1'er dakika
21	Xylol	2x5 dakika
22	Kapatma medyumu kullanılarak lamel ile kapatma.	

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde boyamanın yaygınlığı esas alındı. TUNEL boyamanın yaygınlığı 0'dan + 3'e kadar sayı ile semi- kantitatif olarak skorlandı (tablo 7).

Tablo 7. TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Az
+2	Orta
+3	Şiddetli

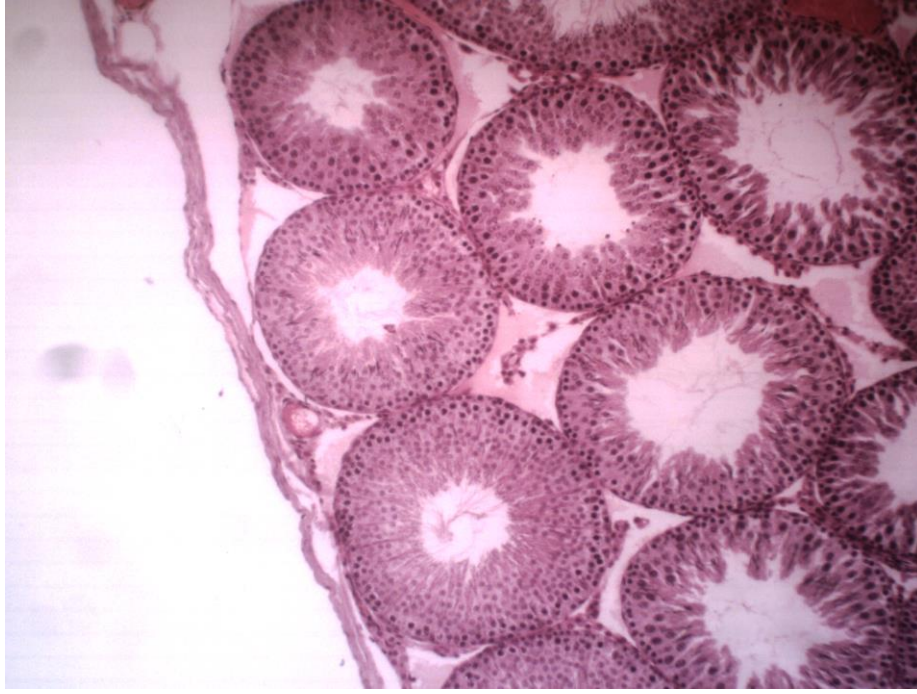
4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

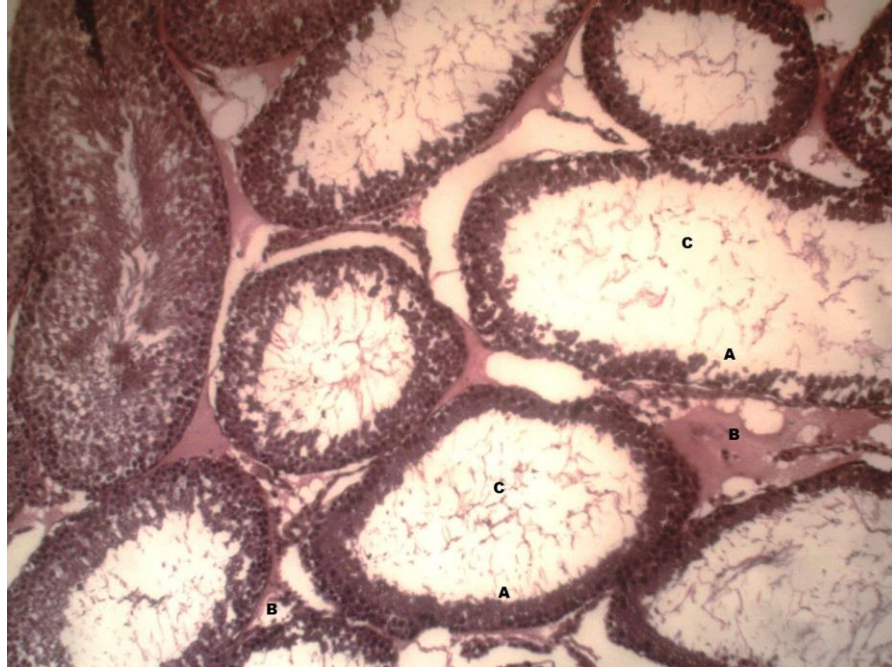
Tüm grupların Hematoksilen & Eozin, Masson Trikrom ve Periyodik Asit Schiff ile boyalı preparatlarının ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; kontrol grubu testis dokusunda seminifer tübüller, seminifer tübüllerin bazal laminası spermatogenik seriye ait hücreler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri normal yapıda izlendi (şekil 6).

Kontrol grubu ile benzen verilen grup II karşılaştırıldığında; seminifer tübül epitelinde incelmeye ve lümen genişlemeye, ara bağ dokuda düzensizleşme (şekil 7, 8), stoplazmik vakoller (şekil 8), seminifer tübül bazal laminasında ayrılma (şekil 9, 10), seminifer tübül epitelinde düzensizleşmeler (şekil 11), dejeneratif tübül yapıları, bazal laminada incelmeye ve ayrılma (şekil 12) gözlemlendi.

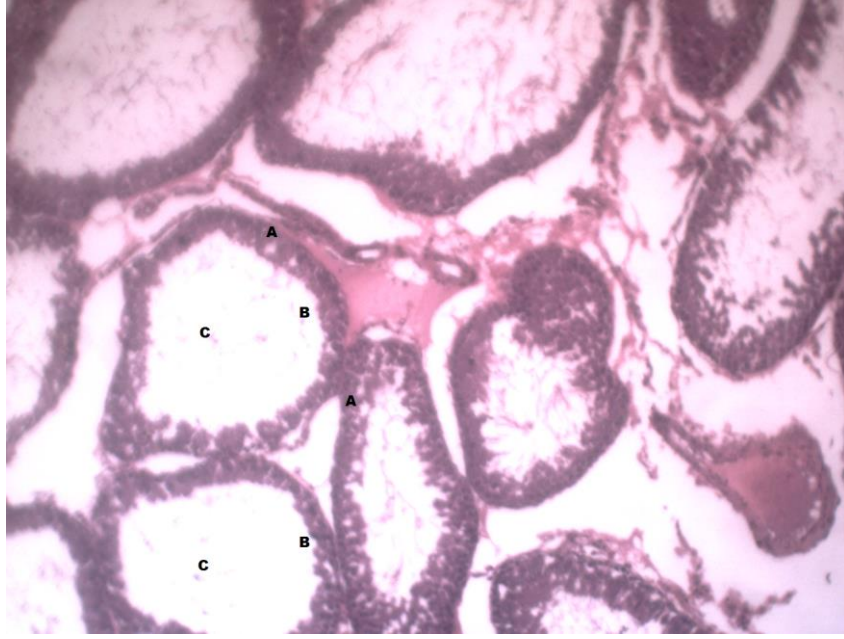
Grup III' teki rat testisleri incelendiğinde dejeneratif değişikliklerin daha fazla olduğu izlendi. Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma ve spermatogenetik hücrelerde dejenerasyona bağlı dökülme (deskomasyon) (şekil 13), seminifer tübül bazal laminasında ayrılma ve epitelde boşluklu alanlar (şekil 14), epitelde bütünlüğün olmayışı ve stoplazmik vakuoller (şekil 15, 16), Leydig hücrelerinde piknoz (şekil 17), seminifer tübüller arasında mononükleer hücre infiltrasyonu, hemoraji ve ödem (şekil 18), atrofi, mononükleer hücre artışı (şekil 19), seminifer tübül epitelinde bozulma ve dev hücre görünümü (şekil 20), seminifer tübül epitelinin lümenine dökülmesi ve dejeneratif tübül yapıları (şekil 21) izlendi.



Şekil 6. Kontrol grubuna ait testis dokusunun histolojik görünümü (H&E X 10)



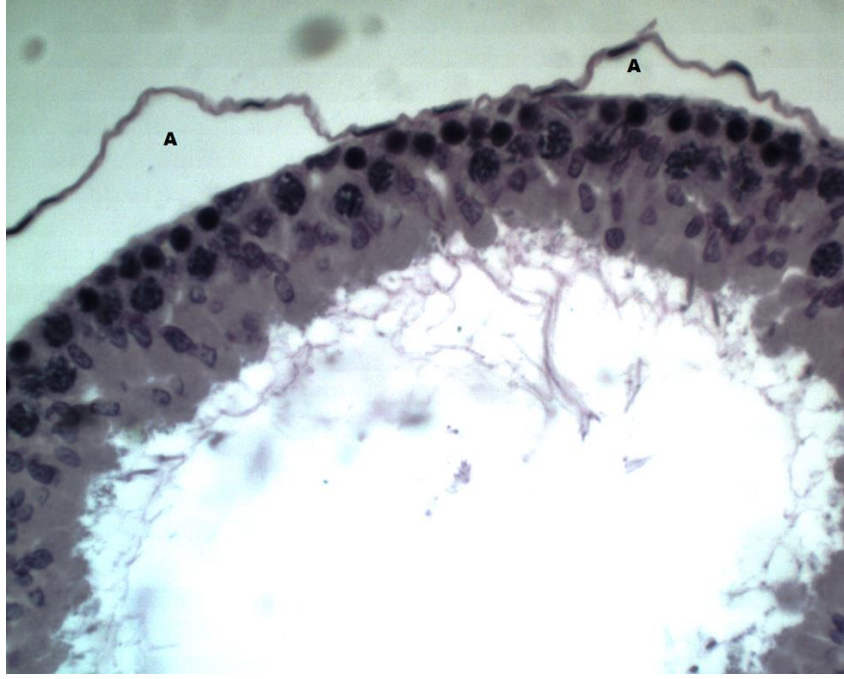
Şekil 7. Grup II. Seminifer tübül epitelinde incelmeye (A), Ara bağ dokuda düzensizleşmeler (B), lümende genişleme (C) (H&E X 10)



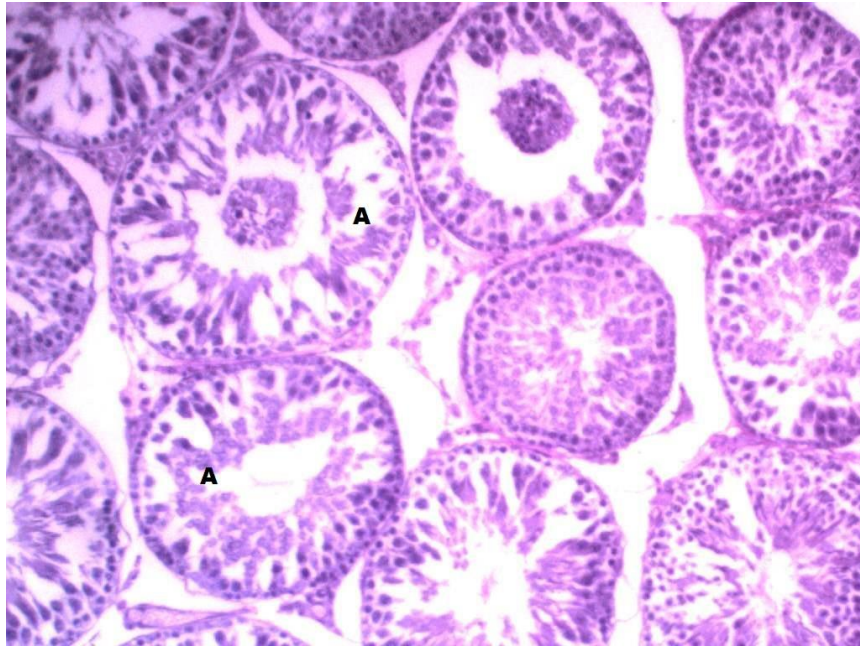
Şekil 8. Grup II. Seminifer tübülde stoplazmik vakuoller (A) ve düzensizleşmeler (B), epitelde incelmeye ve lümende genişlemeler (C) (H&E X 10)



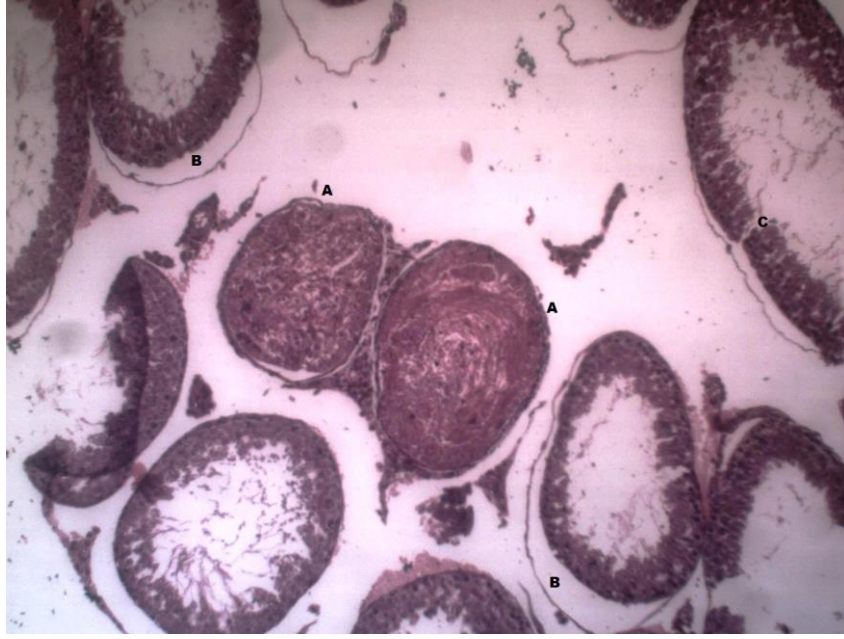
Şekil 9. Grup II. Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma (A) (H&E X 10)



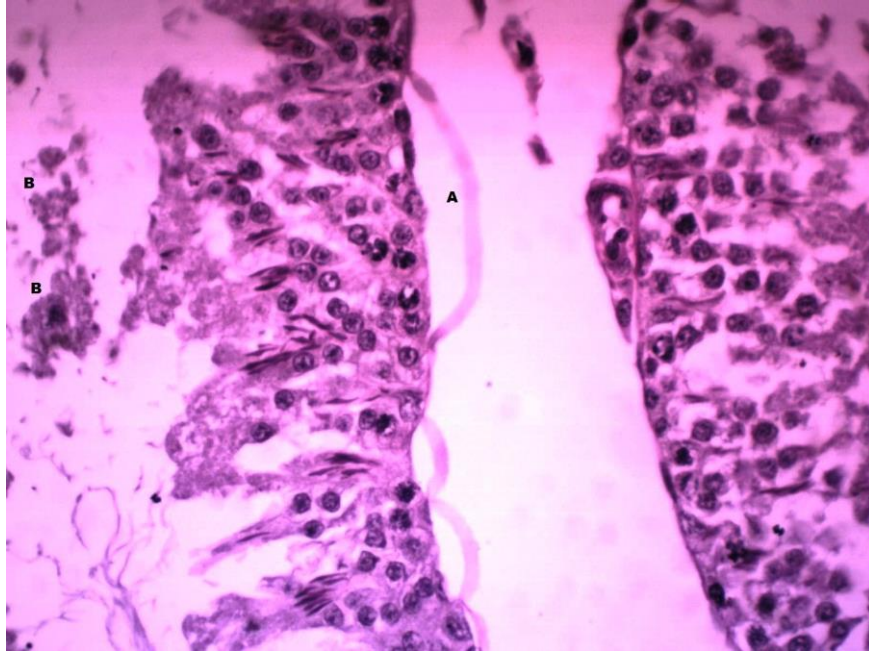
Şekil 10. Grup II. Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma (A) (PAS X 40)



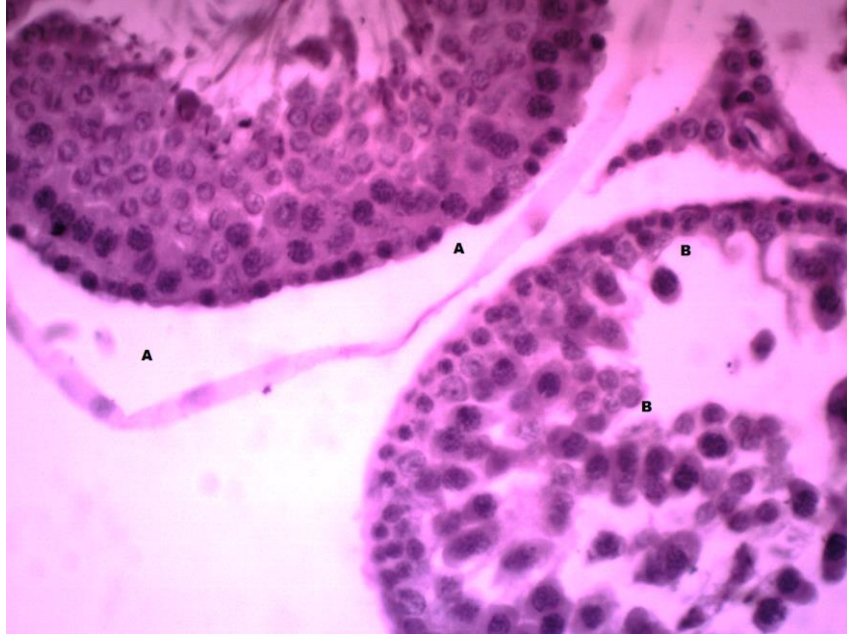
Şekil 11. Grup II. Seminifer tübül epitelinde düzensizleşmeler (A) (PAS X 10)



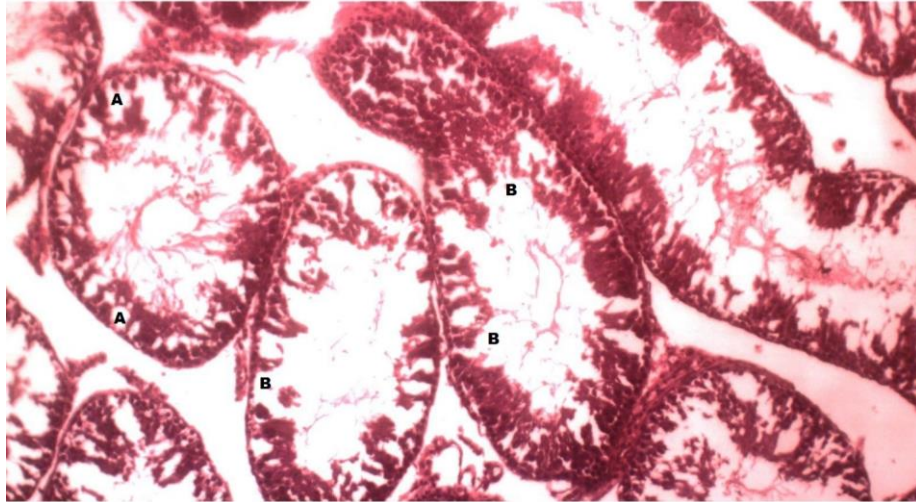
Şekil 12. Grup II. Dejeneratif tübül yapıları (A) ve bazal laminada ayrılmalar (B) ve incelme (C) (H&E X 10)



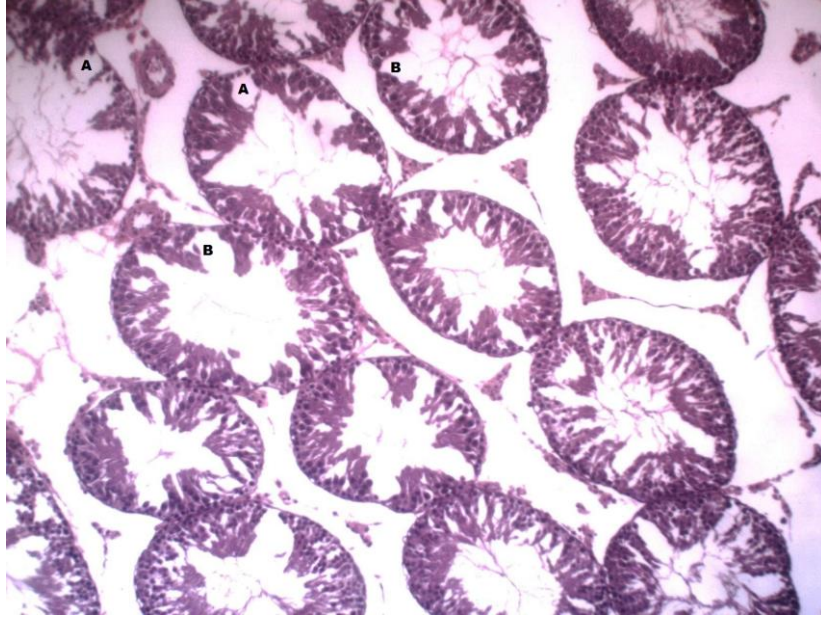
Şekil 13. Grup III. Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma (A), Spermatogenik hücrelerde dökülme (B), (PAS X 40)



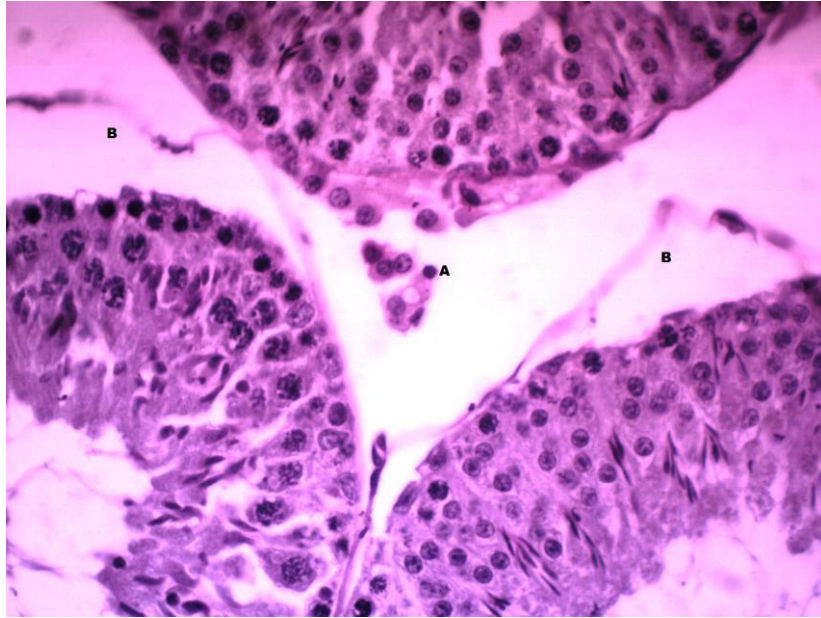
Şekil 14. Grup III. Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma (A) ve epitelde boşluklu alanlar (B) (PAS X 40)



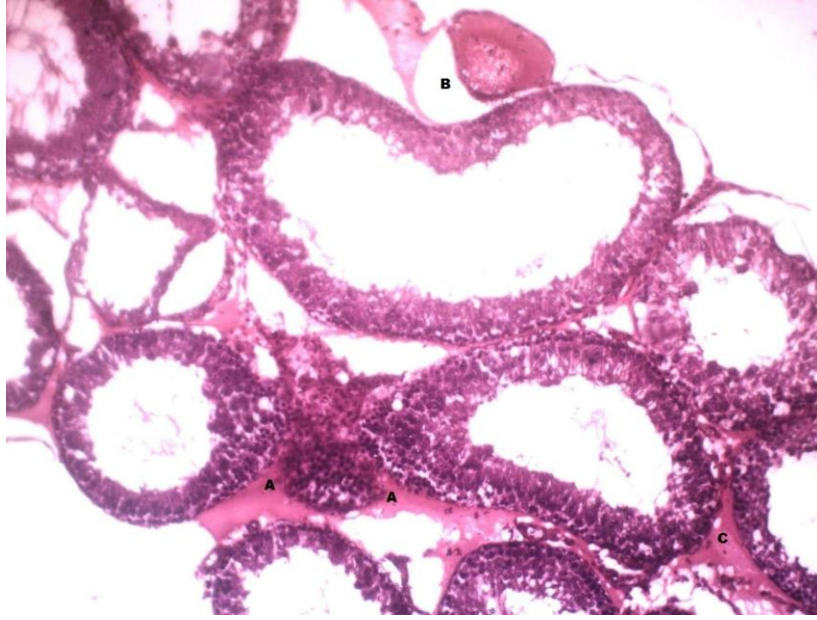
Şekil 15. Grup III. Seminifer tübül epitelinde vakuolleşme (A), dejenerasyon ve epitelde bütünlüğün olmayışı (B) (H&E X 10)



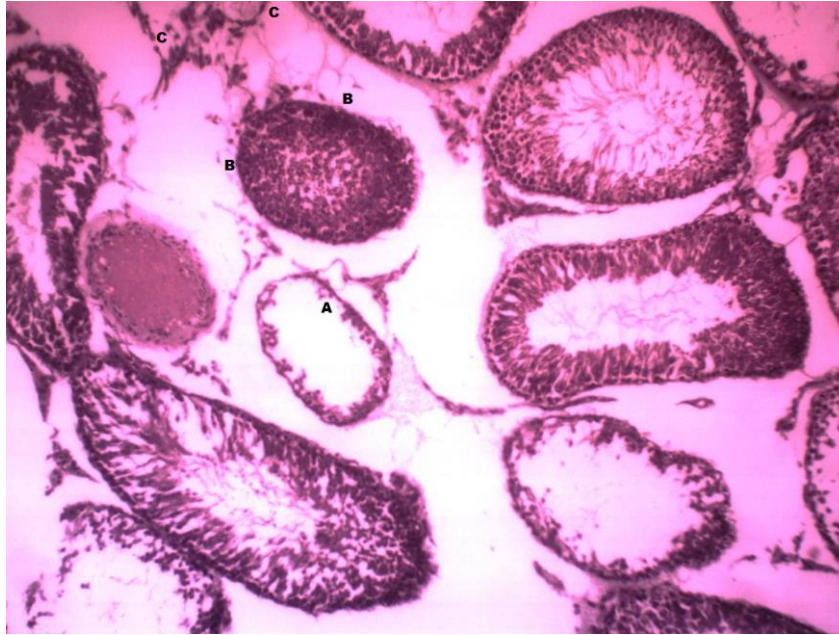
Şekil 16. Grup III. Stoplazmik vakuoller (A) ve Seminifer tbl epitelinde dzensizleşmeler (B) (H&E X 10)



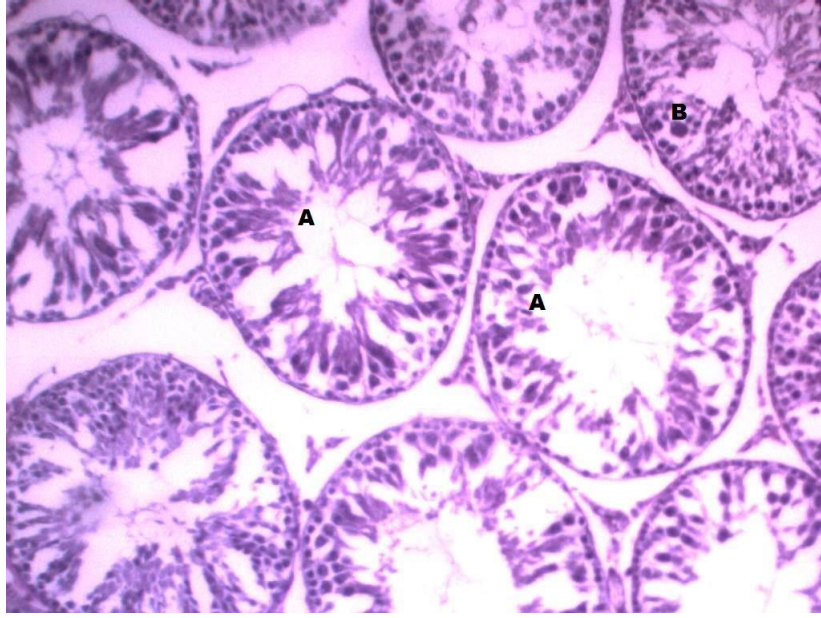
Şekil 17. Grup III. Leydig hücrelerinde piknoz (A), Seminifer tübül bazal laminasında ayrılma (B) (PAS X 40)



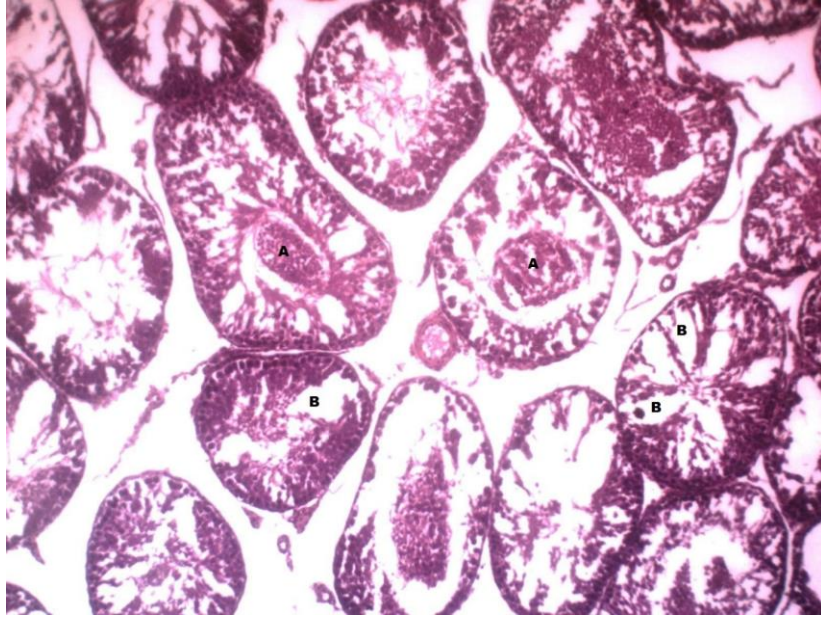
Şekil 18. Grup III. Seminifer tübüller arasında mononükleer hücre infiltrasyonu (A), Hemoraji (B), Ödem (C) (H&E X 10)



Şekil 19. Grup III. Seminifer tübül epitelinde incelme ve hücre kaybı (A), Atrofi (B), Mononükleer hücre artışı (C), (Masson Trikrom X 10)



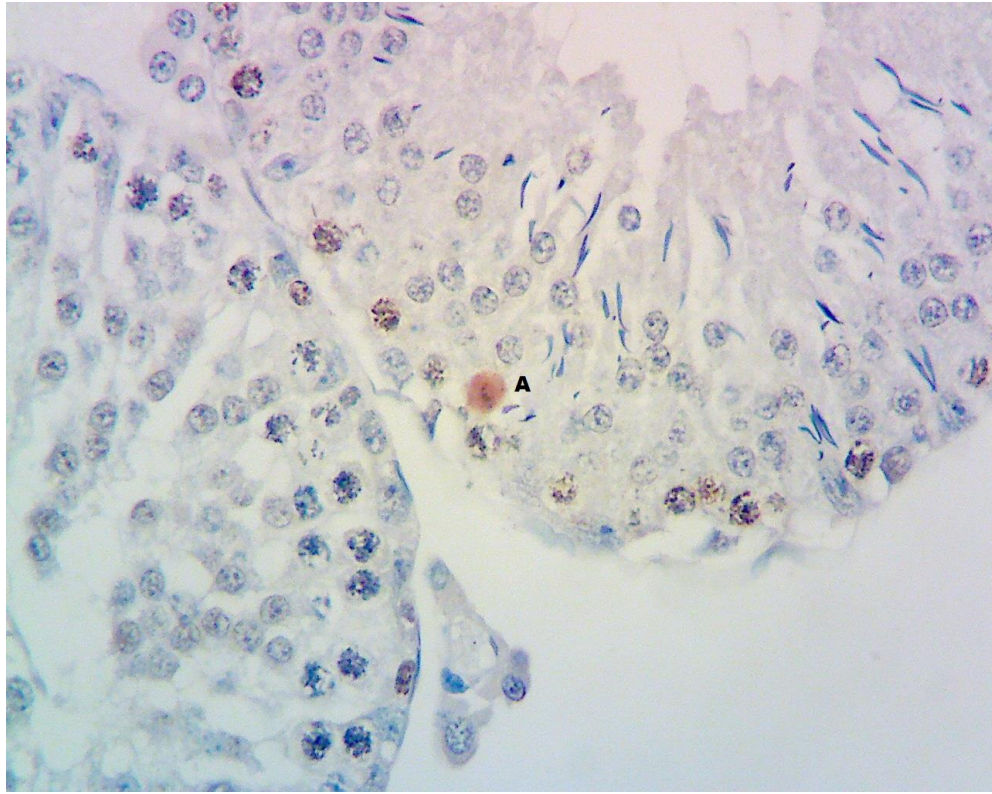
Şekil 20. Grup III. Seminifer tübül epitelinde epitelinde bozulma (A) ve dev hücre görünümü (B) (PAS X 10)



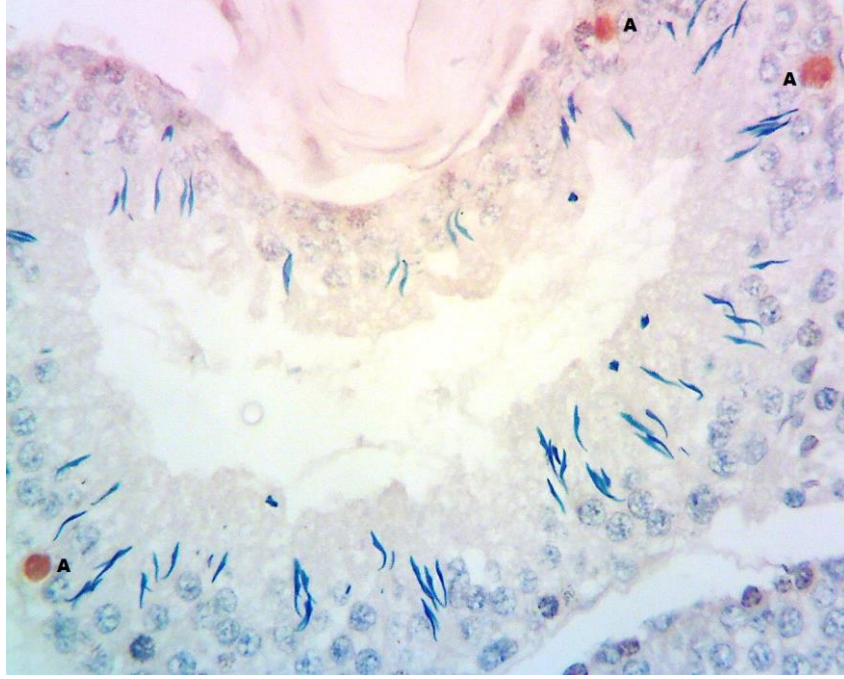
Şekil 21. Grup III. Seminifer tübül epitelinin lümene dökülmesi (A) ve dejeneratif tübül yapıları (B) (H&E X10)

4.2. TUNEL Bulgular

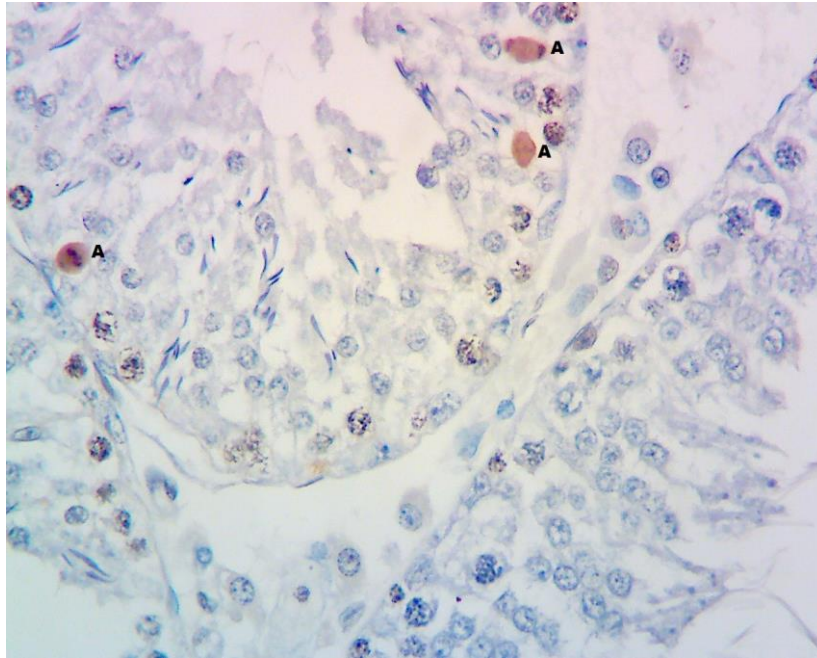
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskopi altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği kontrol grubunda +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 22). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında G2 ve G3 gruplarında +3 yaygınlığında olduğu görüldü (Şekil 23, Şekil 24). G2 ve G3 grupları arasında TUNEL pozitifliğinde herhangi bir fark gözlemlenmedi. Negatif kontrolde TUNEL pozitifliği saptanmadı (Şekil 25). Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı (Şekil 26).



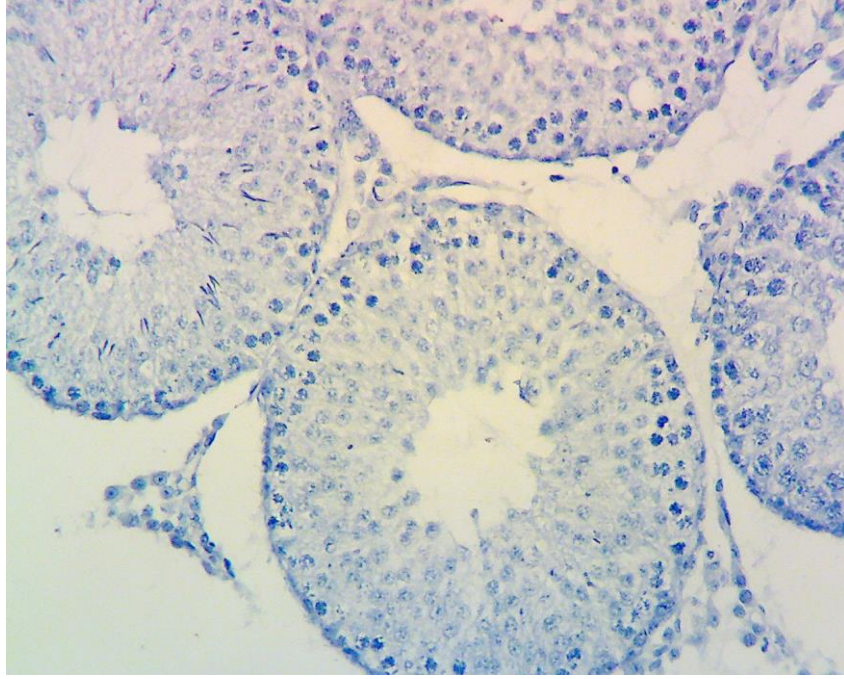
Şekil 22. Kontrol grubunda TUNEL pozitif hücre (A). TUNEL X 400.



Şekil 23. Grup II. TUNEL pozitif hücre (A). TUNEL X 400



Şekil 24. Grup III. TUNEL pozitif hücre (A). TUNEL X 400



Şekil 25. Negatif kontrol. TUNEL X 400



Şekil 26. Pozitif kontrol. Meme dokusu (A). TUNEL X 400

5. TARTIŞMA

Genel olarak yağların çözücüsü olarak bilinen organik çözücüler, günlük hayatımızın her safhasında karşımıza çıkarlar. Özellikle, endüstride yaygın olarak kullanılan bu maddeler, uçucu bileşikler oldukları için, solunum yoluyla canlıları etkilerler (41). Bu bileşikler organizmaya solunum yoluyla girdikleri gibi oral yol ve deri yoluyla girerek önemli hasarlar oluştururlar (39).

Organik solventlerin ciltle teması sonucu deride egzemaya (35), buharının uzun süreli solunması, kandaki alyuvar ve akyuvarların azalmasına (34), genotoksisite, hematoksisite ve lösemiye (47), karaciğerde hepatotoksisiteye (49), hepatik metabolizma üzerine yapılan başka bir çalışmada yükseltgenmeye ve konjugasyona (50, 51) ve kromozom aberasyonuna yol açtığı bilinmektedir (52). Asıl toksik etkisi hematopoetik sistemle ilgili olan benzenin üreme sağlığı bakımından da önemi vardır. Daha önce yapılan çalışmalarda yüksek dozda benzen maruz bırakılan sıçanlarda gebeliğin oluşmadığı yada gebelik meydana gelse bile doğan yavruda malformasyonların olduğu ve anormal uterus kanamalarına da neden olduğu görülmüştür (52).

Singh R.K ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; kontrol grubundaki testis histolojisini incelediklerinde bütün germ hücre tiplerinde (spermatogenezis, primer spermatosit, seminifer tübüllerdeki spermatid), sertoli hücreleri ve interstisyal Leydig hücrelerinin normal morfolojik görünümünde olduğunu gözlemişlerdir. Benzen verilen sıçanların testislerinde ise, seminifer tübül epitelinde dev hücre oluşumu, stoplazmik vakuoller, kromatolizis, germ hücrelerinin tübüler lümene dökülmesi, Leydig hücrelerinin uzamış görünümleri ve boyutlarında azalmalar, Seminifer tübüldeki dejenerasyonun yüksek doz benzen alan grupta, daha belirgin ve fazla olduğunu gözlemişlerdir (54). Bizde yapmış olduğumuz bu çalışmada seminifer tübül epitelinde denerasyona bağlı düzensizleşme ve incelmeler, dev hücre oluşumu, seminifer tübülde stoplazmik vakuoller, seminifer tübül epitelinde ve spermatogenik hücrelerde dökülmeler, Leydig hücrelerinde piknoz gözlemledik. Bu bulgular büyük oranda bulgularımızla uyum göstermesine rağmen kromatolizis açısından herhangi bir değerlendirme yapamadık.

Ravindranath H. ve ark. yaptıkları çalışmalarında; spermatogenesisizde inhibisyon, seminifer tübüllerde hasar, interstisyel Leydig hücrelerinin sayı ve büyüklüğünde azalma, yalnızca sertoli hücrelerinin stoplazmalarında değil spermatositlerin nukleuslarında da dejeneratif değişiklikler gözlemişlerdir (56).

Saito K. ve ark. yaptıkları çalışmalarında benzenin testis üzerine etkisine bağlı olarak testislerde küçülmeye sebep olduğunu gözlemişlerdir (58). Bu çalışmadan yola çıkarak Chidrawar ve ark. yaptıkları çalışmalarında benzenin testislerde küçülmeye yol açtığını teyit edip ek olarak stresinde önemli bir etken olduğunu ortaya koymuşlardır (57).

Beardsley A. ve ark. yaptıkları çalışmalarında benzenin androjenler üzerine etkisine bağlı olarak spermatogenesis de azalmanın olduğunu ortaya koymuşlardır (52). Bu çalışmadan yola çıkarak Aladakatti RH. ve ark. yaptıkları çalışmalarında benzen sonrası seminifer tübül epitelinin yapısını dikkate almış bu bağlamda benzen verilen grubu ek olarak androjen tedavisine tabii tutmuş, spermatogenetik hücrelerde ve spermatogenesisde düzelme olduğunu gözlemişlerdir (53).

Ralph E. ve ark yaptıkları çalışmalarında benzenin sperm üretimi üzerine etkisinin olduğunu, spermatogonia' ların gelişim aşamalarında yapısını bozduğunu söylemişlerdir (55).

Cardenas- Valencia I. ve ark. yapmış oldukları çalışmada benzenin spermatogenetik hücreler üzerine etkisi olduğunu ve bunun sonucu olarakta infertiliteye neden olduğunu ortaya koymuşlardır (59). Bizde çalışmamızda benzenin spermatogenik hücrelere etkisi sonucu seminifer tübüllerin atrofiye uğradığını ve bunun sonucunda da infertiliteye neden olabileceğini düşündük.

Fareler üzerinde yapılan başka bir çalışmada verilen benzenin doz miktarı arttıkça, toksik etkisi nedeniyle testislerdeki spermatogenetik hücreler, sertoli hücreleri ve seminifer tübül epitelinde dejeneratif değişikliklere neden olup testis kanserine sebep olabileceği ileri sürülmüştür (60).

Shi Y. ve ark. yaptıkları çalışmalarında 30 μ M üzerindeki benzen maruziyetlerinde, testiküler germ hücrelerinde apoptozda artışa sebep olduğunu gözlemişlerdir. Aynı bulgular bizim çalışmamızla da paralellik göstermiştir (61).

Bizde alışmamızda benzer şekilde histopatolojik olarak benzen verilen gruplardaki sıçanların testis dokularını kontrol grubuyla kıyasladığımızda seminifer tübüllerde küçülme ve yer yer atrofi, seminifer tübül epitelinde dev hücre oluşumu, stoplazmik vakuoller, spermatogenetik hücrelerde dejenerasyon, sertoli hücrelerinin bazal membranlarında yer yer incelme ve ayrılmalar, interstisyal bağ dokuda bazı kesitlerde mononükleer hücre artışı ve benzenin oluşturduğu inhibisyona bağlı olarak deskomasyon (dökülme) olduğunu gözlemledik. Yüksek dozda benzene maruz kalan sıçanların testislerinde, oluşan bu dejeneratif değişikliklerin daha çok arttığını gözlemledik.

Apoptozisin belirlenmesi için yapmış olduğumuz TUNEL boyama sonuçlarına göre benzen verilen gruplarda kontrol grubuna nazaran apoptozisde de artış olduğunu fakat bu gruplar arasında herhangi bir fark olmadığını gözlemledik. Çalışmamızdaki bulgular literatür bilgileri ile paralellik göstermiştir.

Sonuç olarak; çeşitli nedenlerle benzen maruziyetinin testis dokusunda dejenerasyon ve apoptotik hücre sayısında artışa sebep olduğu gözlendi. Spermatogenetik hücreler üzerine etki sonucu infertiliteye ve maruz kalınan benzen doz miktarı arttı toksikolojik etkilere bağlı olarak testis kanserine sebep olabileceği kanaatine varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. Şeftalioğlu A. Genel & Özel İnsan Embriyolojisi. 3. Baskı, Ankara, 1998: 8- 11.
2. Aktaş C. Skrotal Hipertermi Uygulanan Sıçanların Leydig Hücrelerinin Morfolojik Olarak İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Edirne: Trakya Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2007.
3. Janqueira L. C., Carneiro J. Temel Histoloji: Text & atlas. Solakoğlu S. Aytekin Y. (Çeviri Editörleri). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 426.
4. Moore KL, Persaud TVN. Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri. Müftüoğlu S, Atilla P, Kaymaz F (Çeviri Editörleri). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri, 2009: 176 – 178.
5. Thompson MW, McInnes RP, Willard HE. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 5th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1991.
6. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Dalkıç H (Çeviri Editörü). 8. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri, 2009: 262-265.
7. Langman's. Medikal Embriyoloji. Can Başaklar A (Çeviri Editörü). 9. Basım, Ankara: Palme Yayıncılık, 2005: 328.
8. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M., Okar İ., Dalkıç H., (Çeviri Editörler). İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri, 2002: 323-329, 730.
9. Saunders Elsevier. Netter Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviri Editörleri). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri. 2009: 379- 386.
10. Klinisyen. Fizyoloji - Histoloji - Embriyoloji. Dağdeviren A, Selçukbircik S (Çeviri Editörleri). 3 . Baskı, İstanbul: Tusdata Ltd. Şti. 2007: 319- 325.
11. Moore Persaud. İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Okar İ, Dalkıç H (Çeviri Editörü). 6. Baskı, İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, 2002: 325.
12. Leeson T. S., Leeson C. R., Paparo A. A. Text / Atlas of Histology. Philadelphia: W.B. Saunders Co. Jangueria LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y (Çeviri editörü). İstanbul: Nobel Kitabevi, 2003.
13. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti., 2001.

14. Eşrefoğlu M. Genel ve Özel Histoloji. Malatya: Pelikan Yayıncılık, 2004: 305 – 308.
15. Arıncı K, Elhan A. Anatomi 1. cilt. 2. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi 1997; 417 – 420.
16. Trainer T.D. Histology of the normal testis. Am J Surg Pathol 1987; 11: 797- 809
17. Kuran O. Sistematik Anatomi. 3. Baskı, İstanbul: Filiz Kitabevi, 1993.
18. Abraham L. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R. (Çeviren). 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık 2006.
19. Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. Histology A Text and Atlas. 4. Th edition, Philedelphia, Lippincott: Williams & Wilkins. 2003: 689 -696.
20. Yiğit G. Tıbbi Fizyoloji. 11. Baskı, Yüce Yayınları A. Ş & Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti, 2006: 996.
21. Junquera LC, Carneiro J. Temel Histoloji. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviri Editörleri) . İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2009: 419- 431.
22. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R (Çeviri Editörü) 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2006: 532.
23. Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. In vivo analysis of Phagocytosis of Apoptotic cells by testicular Sertoli cells. Mol Reprod Dev. 71 (2): 77 - 166. 2005
24. Kenehara H, Song K, Ueda H, Shiota N, Azuma H, Katsuoka Y, Miyazaki H, Miyazaki M. Involvement of Angiotensin II Receptor Subtypes During Testicular Development in Rats. Int J. Androl 21 (4): 186-195.1998.
25. Eroschenco VP. Di Fiore. Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle, Demir R. (Çeviren). 10. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2008.
26. Özel HB, Tek Taraflı Testis Torsiyonuna Karşı Testiste Testiküler Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Aktivitesindeki Değişimlerin Histolojik ve Histoşimik Olarak Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.
27. Karagöz E . Özel Histoloji. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp. Fak.Yayımları. 2002; 196 – 199.

28. Ross MH, Kaye GI. and Pawlina W. Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. Taylor C. Scogna KH. Ajello JP (Çeviri Editörleri). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2006: 710, 730.
29. Perry RH, Chilton CH. Chemical Engineering's Handbook. Aiche Journal 2004; 20 (1) : 205.
30. Gül E. "solvent nedir ". www.bigustam.com/solvent-nedir/ 2006
31. Ecelak "Organik Solventler Genel Sınıflandırma". www.ecelak.com/files/c_solventler%20Genel%20Sınıflandırma.pdf. 1995
32. Topal G., Bağ H. Genel kimya 4 (organik kimya). 2. Baskı, Ankara: Pegem Akademi, 2011; 2: 38 - 76.
33. World Health Organization: Environmental Health Criteria. Benzene. Genov, 150.
34. Ralph H., Petrucci, William S., Harwood F. Geoffrey herring. Genel kimya ilkeler ve modern uygulamalar 2. Cilt. Uyar T., Aksoy S., İnam R. (Çeviri Editörleri). 8. Baskı, Ankara: Palme yayıncılık, 2008: 1075- 1076.
35. Tekin V. "Solvent Nedir" www.grafikerler.net/19/06/2007
36. Grilli S, Lutz WK, Parodi S. Possible implications from result of animal studies in human risk estimations for benzene, nonlinear doseresponse relationship due to saturation of metabolism. Canser Research Clinical Oncology. 1987; 113: 349-358.
37. Ersan F. "Erkek infertilitesi" . www.drfehithyeersan.com/?q=49&I=2&id=12/02/11/2012
38. Aslan K. "sperm sayısını arttırma yolları". <http://blog.milliyet.com.tr/kemalasan/02/11/2012>
39. İvizler A. Organik kimyaya giriş. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi, 1988.
40. Fessenden Fessenden, Logue. Organik kimya. Uyar T. (Çeviri Editörü). 1. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti, 2001: 473-474.
41. Vural N. Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1984.
42. Smoking and tobacco control, monograph 13. Risks associated with low machine measured yields of tar and nicotine. 2001; 5: 260.
43. Smoking and health: A report of the surgeon general. 1979.

44. Povvley MW., Carlson GP. Species comparison of hepatic and pulmonary metabolism of benzene. *Toxicology*, 1999; 139 (3): 207-217.
45. Rogene FH. Species Differences in the Metabolism of Benzene. *Environ Health Perspect*, 1996; 106 (6) : 1173-1175.
46. Ganousis LG., Goon T., Zygiewska KK., Ross WD. Metabolism in mouse Bone Marrow Stroma: Study of activation and detoxification of benzene metabolites. *Mol. Pharmacol*, 1992; 42 (6) : 1118-1125.
47. Subrahmanyam W., Doane PS., Steinmentz KL., Ross D. Smith MT. Phenol-Induced stimulation of hydroquinone bioactivation in mouse bone marrow in vivo: Possible implications in benzene myelotoxicity. *Toxicology*, 1990; 62 (1) : 107-116.
48. Manenti G., Dragani TA., Della GP. Effects of phenobarbital and 1,4-Bis [2-(3,5 dichloropyridyloxy)] Benzene on differentiated functions in mouse liver. *Chem. Biol. Interact*, 1987; 64 (1-2) : 83-92.
49. Hedli CC., Hoffmann MJ., Ji S., Thomas PE., Synder R. Benzene metabolism in the isolated perfused mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997; 146 (1) : 60-68.
50. Lattanzi G., Bartoli S., Bomora B., Colacci A., Grilli S., Niero A., Mazzullo M. In vivo and in vitro interaction of 1,2- Dichlorobenzene with Nucleic Acids and Proteins of mice and rats. *Tumori*, 1991; 76 (4) : 339-344.
51. Bilir N. "Çalışma Hayatı ve Üreme Sağlığı". 2002; 11: 3-89.
52. Beardsley A., O' Donnell L. Characterization of normal spermiation and spermiation failure induced by hormone suppression in adult rats. *Biol reprod*. 2003; 68: 307-1299.
53. Aladakatti RH., Nazeer Ahamed R. Changes in sertoli cells induced by azadirachta indica a juss leaves in albino rats. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*. 2005; 16: 67-80.
54. Singh RK., Bansode FW. Benzene- induced histopathological changes and germ cell population dynamics in testes of Sprague Dawley rats. *J Environ Biol*. 2011; 32: 687- 694.
55. Ralph E., Linder Rex A. Hess., Lillian F. Strader. Testicular toxicity and infertility in male rats treated with 1,3- dinitrobenzene. 2009; 477- 489.

56. Ravindranath H., Aladakatti Mukhtar Ahmed., R. Nazeer Ahamed., Mukhtar Ahmed G. Ghodesawar. Effect of benzene leaf extract of *ocimum sanctum* on testis and spermatogenic pattern in albino rats. *International journal of current research*. 2010; 5: 22-29.
57. Chidrawar VR., Chitme HR., Patel KN., Racharla VR., Dhoraji NC., Vadaliala KR. Effects of *Cynodon dactylon* on stress- induced infertility in male rats. *J Young Pharm* 2011; 3 (1) : 26- 35.
58. Saito K., Donnell L., Mclachlan RL., Robertson DM. Spermiation failure is a major contributor to early spermatogenic suppression caused by hormone withdrawal in adult rats. *Endocrinology*. 2000; 141: 85- 2779.
59. Cardenas- Valencia I., Nieto J., Gasco M., Gonzales C., Rubio J., Portella J., Gonzales GF. *Tropaeolum tuberosum* (mashua) reduces testicular function. Effect of different treatment times. *Andrologia*. 2008; 40: 352- 357.
60. Toxicology and carcinogenesis studies of divinylbenzene- HP (Cas No. 1321- 74- 0) in F344/ N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies). *National Toxicology Program*. 2004; 18 (4) : 9- 285.
61. Shi Y., Song Y., Wang Y., Liang X., Hu Y., Yu H., Guan X., Cheng J., Yang K. β - Benzene hexachloride induces apoptosis of rat Sertoli cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNKs and FasL. *Environmental Toxicology* 2011; 26 (2) : 124-135.
62. Zhanga A., Wub Y., Laic HWL., Yewc DT. Apoptosis- A Brief Review. *Neuroembryology*. 2004; 5 (3): 47- 59.
63. Mocan Kuzey G. *Temel Patoloji*. Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 2007; 21-26.
64. Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26 (4): 239-245
65. Savill J. Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *Br Med Bull*. 1997; 53 (3): 491-508.

66. Nemes Z JR., Friis RR., Aeschlimann D., Saurer S., Paulsson M., Fesus L. Expression and activation of tissue transglutaminase in apoptotic cells of involuting rodent mammary tissue. *Eur J Cell Biol.* 1996; 70 (2) : 125-33.
67. Zeiss CJ. The Apoptosis- Necrosis Continuum: Insights from Genetically Altered Mice. *Vet Pathol.* 2003; 40: 481-495.
68. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 73 – 665
69. Solakoğlu Z. Apoptoz varlığı yada yokluğu bir hastalık nedeni: Klinik fizyopatoloji, Klinik Gelişim 2009; 22 (3) : 20 – 25
70. White E. Death- defying acts: a meeting review on apoptosis. *Genes and Development.* 1993; 7: 2277- 2284.
71. Cohen JJ. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; 103 (4) : 54 – 548
72. White E. Life, Death and Pursuit of Apoptosis. *Genes Dev.*1996; 10: 1-15.
73. Büyükgebiz O., Caferler JS. Apoptozis. *Sendrom.* 2001; 13 (1): 102-107
74. McCracken DJ., Orreniusb S. Signal Transduction Pathways in Apoptosis. *Stem Cells.* 1996; 14: 619- 631.
75. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6: 1028-1042
76. Saraste A., Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 2000; 45: 528- 537
77. Aşan E., Dağdeviren A. Moleküler Histoloji Hücre. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti., 2012; 2: 154- 166
78. Gottlieb RA: Mitochondria and apoptosis. *Biol Signals Recept.* 2001; 10 (3- 4): 147- 61.
79. Guo Y., Srinivasula SM., Druilhe A., Alnemri TF., Alnemri ES. Caspase- 2 Induces Apoptosis by Releasing Proapoptotic Proteins from Mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry.* 2002; 277 (16): 13430-13437
80. Majno G., Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995; 146 (1) :3 – 15

81. Hopwood D., Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *Pathol.* 1976; 119 (3) : 66- 159.
82. Norbury CJ., Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 367- 401
83. Tatton WG., Chalmers- Redman R., Brown D., Tatton N. Apoptosis in Parkinson's Disease: Signals for Neuronal Degradation. *Ann Neurol.* 2003; 53 (3): 61- 72.
84. Shi B., De Girolami U., He J., Wang S, Lorenzo A et al. Apoptosis Induced by HIV-1 Infection of the Central Nervous System. *J. Clin. Invest.* 1996; 98 (9): 1979- 1990.
85. Riedl SJ., Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 2007; 8: 405.
86. Crow MT., Mani K., Nam YJ., Kitsis RN. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res.* 2004; 95 (10): 957- 70.
87. Kuwano K., Yoshimi M., Maeyama T., Hamada N., Yamada M et al. Apoptosis Signaling Pathways in Lung Diseases. *Medicinal Chemistry.* 2005; 1: 49- 56.
88. Johnson AL., Bridgham JT. Caspase- mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction.* 2002; 124: 19- 27.
89. Westphal S., Kalthoff H. Apoptosis: Targets in Pancreatic Cancer. *Molecular Cancer.* 2003; 2: 6.
90. Srasser H., Tiefenthaler M., Steinlechner M., Bartsch G., Konwalinka G. Urinary incontinence in the elderly and age- dependent apoptosis of rhabdosphincter cells. *The Lancet.* 1994; 354:9- Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology.* 2007; 8: 405.
91. Lumacci F., Basso S. Apoptosis: Life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid diseases. *Thyroid* 2002; 12 (1) : 27 – 34.
92. Nevriere R., Fauvel H., Chopin C., Formstecher P., Marchetti P. Caspase Inhibition Prevents Cardiac Dysfunction and Heart Apoptosis in a Rat Model of Sepsis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163: 218- 225.
93. Hill MM., Adrain C., Martin. Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv.* 2003; 3 (1): 19- 26.

94. Karaboğa F. Deneysel Diyabetik Fare Beyin Dokusundaki Apoptotik Değişiklikler Üzerine D3 Vitamininin Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Noroloji Anabilim Dalı, 2010.

ÖZGEÇMİŞ

07. 11. 1986 yılında Diyarbakır' da doğdum. 2003 yılında Fatih Lisesinden mezun oldum. 2006 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bitlis Sağlık Yüksek Okulu'nu kazandım ve 2010 yılında mezun oldum. 2010 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesinde işe başladım. 2012 yılında da Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım. Eğitim hayatım halen devam etmektedir.