

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



**TESTİSİN STEREOLOJİK METODLAR İLE
İNCELENMESİNDE FARKLI FİKSATİFLERİN ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Güliden TURHAN

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY

İkinci Tez Danışmanı

Öğr. Gör. Dr. Sema SERTER KOÇOĞLU

BALIKESİR-2019

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

**TESTİSİN STEREOLOJİK METODLAR İLE
İNCELENMESİNDE FARKLI FİKSATİFLERİN ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Gülden TURHAN

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Mehmet Faruk AYDIN
Balıkesir Üniversitesi – Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY
Balıkesir Üniversitesi – Üye

Dr. Öğr. Üyesi Fatma FIRAT
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi - Üye

Tez Danışmanı
Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY

Bu araştırma; Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2015/216 nolu proje ile desteklenmiştir.



T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TEZ KABUL VE ONAY

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde
yürütülmüş olan

**“TESTİSİN STEROLOJİK YÖNTEMLER İLE İNCELENMESİNDE FARKLI
FİKSATİFLERİN ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI”**

başlıklı tez çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul
edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06.08.2019

TEZ SINAV JÜRİSİ


Prof. Dr. Mehmet Faruk AYDIN
Balıkesir Üniversitesi
Başkan


Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY
Balıkesir Üniversitesi
Üye


Dr. Öğr. Üyesi Fatma FIRAT
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri
Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Yüksek Lisans Tezi, sınav jüri komisyonu tarafından imzalanarak
03./09/2019 tarihinde teslim edilmiştir.


Prof. Dr. İzzet KARAHAN
Enstitü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tezde kullanılmış olan tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim. (.....)


Gulden TURHAN

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans Eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen, manevi destek ve ilgisini hiçbir zaman eksik etmeyen, akademik bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY' a, tezimin yazım konusunda yol gösterici hocam Öğr. Gör. Dr. Sema SERTER'e ve tez dönemim boyunca bana destek olan ve laboratuvar çalışmalarımın tamamlanması konusunda yardımcı olan Balıkesir Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Patoloji Anabilim Dalına ve Yüksek Lisans Eğitimim boyunca her zaman ve her koşulda yanımda olan hiçbir yardımını ve desteğini esirgemeyen sevgili aileme ve Araş. Gör. Dr. Mustafa KAHRAMAN'a teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

ÖZET	iii
ABSTRAT	iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Testisin Anatomisi	4
2.2. Testisin Histolojisi	6
2.2.1. Seminifer Tübüllerin Histolojik Yapısı.....	6
2.2.2. İntertisyum	15
2.3. Tespit.....	17
2.3.1. Fiziksel Tespit.....	18
2.3.2. Kimyasal Tespit	19
2.3.3. Koagüle Edici Tespit Solüsyonları	20
2.3.4. Koagüle Edici Olmayan Çapraz Bağlar Oluşturan Tespit Solüsyonları	20
2.3.5. İyi Bir Tespit İşlemi İçin Dikkat Edilmesi Gerekenler	24
2.4. Stereoloji	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Deney Hayvanları.....	29
3.2. Dokuların Eldesi	29
3.3. Doku Takibi ve Gömme.....	322
3.4. Kesit Alma	333
3.5. Boyama	344
3.6. Testis Hacminin Stereolojik Yöntemlerle Hesaplanması	40
3.7. İstatiksel İnceleme	42
4. BULGULAR	43
4.1. Farklı Fiksatiflerin Testis Morfolojisi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	43
4.2. Farklı Fiksatiflerin Testis Dokusunun Histokimyasal Yöntemler ile Boyanması Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	50
4.3. Farklı Fiksatiflerin Testis Dokusunun TUNEL Yöntemi ile Boyanması Üzerine Etkilerinin İncelenmesi.....	599

4.4. Farklı Fiksatiflerin Testis Dokusu Hacminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	64
5. TARTIŞMA	74
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
KAYNAKLAR	80
EKLER.....	91
EK-1. ÖZGEÇMİŞ.....	91
EK-2. ETİK KURUL RAPORU	93
EK-3. PROJE SÖZLEŞMESİ.....	94



ÖZET

Testisin Stereolojik Metotlar ile İncelenmesinde Farklı Fiksatiflerin Etkilerinin Karşılaştırılması

Testis dokusunun, histolojik açıdan değerlendirilip stereolojik metodlar ile ölçülmesi ve doku morfolojisini en iyi koruyan fiksatifi belirleyerek PAS (Periyodik Asit Shchiff), MTC (Masson Trichrom) ve TUNEL (TdT mediated dUTP Nick end Labeling) boyaları ile dokunun histolojik özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamız da Sprague Dawley cinsi 20 adet sıçanın testis dokuları dört farklı fiksatif [%10 NTF (Nötral Tamponlu Formaldehit), BF (Bouin Fiksativ), mDF (Modifiye Davidson Fiksativ) ve Stieve's Fiksativ] ile fikse edildi. Fiksasyonun ardından testis dokuları, rutin doku takip işlemine alınıp, parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan elde edilen 5 mikron kalınlığındaki seri kesitler HE (Hematoksilen-Eozin) boyandı. Her testis bloğundan birkaç lam PAS, MTC ve TUNEL boyaları ile boyanarak mikroskopik incelemeleri yapıldı. Seri kesitlerden elde edilen lamalar Cavalier Yöntemi ile testis dokularının hacim hesaplaması yapıldı.

Çalışma sonucunda, mDF ve Stieve's Fiksativleri ile çok az miktarda germ hücreleri arasında ve seminifer tübüllerde çok küçük bir büzülme artefaktı görülmüştür. Bouin Fiksativ ile testisin merkezi alanlarında büzülme artefaktları görülmüştür. %10 NTF Fiksativinin seminifer tübül yapılarında belirgin doku büzülme artefaktları görüldü. BF, mDF ve Stieve's Fiksativleri tespit edilen testis dokularının nükleer detayları %10 NTF ile karşılaştırıldığında daha iyi sonuç alınmıştır. Testis dokusunun PAS, MTC ve TUNEL boyaları ile boyanması sonucu en iyi mDF ve Stieve's Fiksativleri sağlamıştır alternatif olarak BF'yi tercih edilebilir.

Testis dokusunun morfolojik korunumu ve boyanma özellikleri açısından mDF ve Stieve's Fiksativleri ile daha iyi korunmanın sağlandığı gözlenmiştir. BF ile doku büzülme artefaktı daha belirgin gözlenmiş olsada sonuçların güvenilirliği açısından sorun belirtmediği için alternatif olarak tercih edilebilir. Testis dokusu %10 NTF fiksatifi hücresel korumasının kalitesi daha düşük olduğunu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Fiksativ, Hacim, Histokimyasal Boyama, Stereoloji, Testis.

ABSTRACT

Comparison of the Effects of Different Fixatives in the Examination of the Testis with Stereological Methods

The aim of this study was to determine the histological properties of testis tissue by histological evaluation and stereological methods and to determine the fixative that best preserves tissue morphology and to determine the histological properties of tissue with PAS (Periodic Acid Shchiff), MTC (Masson Trichrom) and TUNEL (TdT mediated dUTP Nick end Labeling) dyes.

In our study, testicular tissues of 20 Sprague Dawley rats were fixed with four different fixatives [10% NTF (Neutral Buffer Formaldehyde), BF (Bouin Fixative), mDF (Modifield Davidson Fixative) and Stieve's Fixative] and saline. Following fixation, the testes were embedded in paraffin. Routine tissue was taken to follow-up. Serial sections of 5 micron thickness obtained from paraffin blocks were stained with HE (Hematoxylin-Eosin). Microscopic examination of each testis block was performed by staining with several PAS, MTC and TUNEL stains. The volume of the testicular tissues was calculated with the slides obtained from serial sections and Cavalier Method which is the Stereological Method.

As a result of the study showed a very small shrinkage artifact between mDF and Stieve's Fixatives and a small amount of germ cells and seminiferous tubules. Shrinkage artifacts were observed in the central areas of the testis with Bouin Fixative. Significant tissue shrinkage artifacts were observed in seminiferous tubule structures of 10% NTF Fixative. BF, mDF and Stieve's Fixatives showed better nuclear results compared to 10% NTF. PAS, MTC and TUNEL staining of the testis resulted in the best mDF and Stieve's Fixatives. Alternatively, BF could be preferred.

It was shown that mDF and Stieve's fixatives are more protected in terms of morphological preservation and staining properties of testis tissue. Although tissue shrinkage artifact was more prominent with BF, we supported it with stereological measurement, which is not a problem in terms of the reliability of the results and could be preferred as an alternative. The quality of testicular tissue 10% NTF fixative cellular protection was lower.

Key Words: Fixative, Volume, Histochemical Staining, Stereology, Testis.

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

NTF	: Nötral Tamponlu Formaldehit
BF	: Bouin Fiksatif
mDF	: Modifield Davidson Fiksatif
HE	: Hematoksilen-Eozin
PAS	: Periyodik Asit Shchiff
MTC	: Masson Trichrom
IHK	: Immunohistokimyasal
TUNEL	: TdT mediated dUTP Nick end Labeling
AMH	: Anti Mülleriyan Hormon
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
ABP	: Androjen Bağlayıcı Proteini
PFA	: Paraformaldehit
MR	: Manyetik Resonans
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
NAÖC	: Noktalı Alan Ölçüm Cetvelleri
TdT	: Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
PBS	: Fosfat Tamponlu Salin
NaH ₂ PO ₄	: Sodyum Fosfat, Monobazik, Monohidrat
Na ₂ HPO ₄	: Sodyum Fosfat, Dibazik, Anhidröz
GMA	: Glikol Metakrilat
PFA	: Paraformaldehit
AR	: Androgen Reseptör
PCNA	: Proliferatif Cell Nuclear Antigen
PGP	: Protein Geni Product
GMA	: Glikol Metakrilat

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Testisin Anatomik Yapısı.....	4
Şekil 2.2. Testisin Yapısı.....	7
Şekil 2.3. Seminifer Tübül Yapısı.....	10
Şekil 2.4. Spermatid Hücre Yapısı.....	13
Şekil 2.5. Spermiyum Hücre Yapısı.....	15
Şekil 2.6. Seminifer Tübül ve İntertisyum Kesiti.....	16
Şekil 2.7. Noktalı Alan Ölçüm Cetveli.....	27
Şekil 4.1. %10 NTF Fiksatifine Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x40.....	44
Şekil 4.2. %10 NTF Fiksatifine Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x20.....	45
Şekil 4.3. %10 NTF Fiksatifine Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x10.....	45
Şekil 4.4. BF'ye Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x40.....	46
Şekil 4.5. BF'ye Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x20.....	46
Şekil 4.6. BF'ye Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x10.....	47
Şekil 4.7. mDF'ye Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x40.....	47
Şekil 4.8. mDF'ye Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x20.....	48
Şekil 4.9. mDF'ye Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x10.....	48
Şekil 4.10. Stieve's Fiksatifine Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x40.....	49
Şekil 4.11. Stieve's Fiksatifine Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x20.....	49
Şekil 4.12. Stieve's Fiksatifine Ait Testis Dokusunun HE Boyama Görüntüsü x10.....	50
Şekil 4.13. %10 NTF Fiksatifine Ait Testis Dokusunun PAS Boyama Görüntüsü x40.....	51
Şekil 4.14. %10 NTF Fiksatifine Ait Testis Dokusunun PAS Boyama Görüntüsü x20.....	51
Şekil 4.15. BF'ye Ait Testis Dokusunun PAS Boyama Görüntüsü x40.....	52
Şekil 4.16. BF'ye Ait Testis Dokusunun PAS Boyama Görüntüsü x20.....	52

Şekil 4.17. mDF'ye Ait Testis Dokusunun PAS Boyama Görüntüsü x40	53
Şekil 4.18. mDF'ye Ait Testis Dokusunun PAS Boyama Görüntüsü x20	53
Şekil 4.19. Stieve's Fiksatifine Ait Testis Dokusunun PAS Boyama Görüntüsü x40	54
Şekil 4.20. Stieve's Fiksatifine Ait Testis Dokusunun PAS Boyama Görüntüsü x20	54
Şekil 4.21. %10 NTF Fiksatifine Ait Testis Dokusunun MTC Boyama Görüntüsü x40	55
Şekil 4.22. %10 NTF Fiksatifine Ait Testis Dokusunun MTC Boyama Görüntüsü x20	56
Şekil 4.23. BF'ye Ait Testis Dokusunun MTC Boyama Görüntüsü x40	56
Şekil 4.24. BF'ye Ait Testis Dokusunun MTC Boyama Görüntüsü x20	57
Şekil 4.25. mDF'ye Ait Testis Dokusunun MTC Boyama Görüntüsü x40	57
Şekil 4.26. mDF'ye Ait Testis Dokusunun MTC Boyama Görüntüsü x20	58
Şekil 4.27. Stieve's Fiksatifine Ait Testis Dokusunun MTC Boyama Görüntüsü x40	58
Şekil 4.28. Stieve's Fiksatifine Ait Testis Dokusunun MTC Boyama Görüntüsü x20	59
Şekil 4.29. %10 NTF Fiksatifine Ait Testis Dokusunun TUNEL Boyama Görüntüsü x40	60
Şekil 4.30. %10 NTF Fiksatifine Ait Testis Dokusunun TUNEL Boyama Görüntüsü x20	60
Şekil 4.31. BF'ye Ait Testis Dokusunun TUNEL Boyama Görüntüsü x40	61
Şekil 4.32. BF'ye Ait Testis Dokusunun TUNEL Boyama Görüntüsü x20	61
Şekil 4.33. mDF'ye Ait Testis Dokusunun TUNEL Boyama Görüntüsü x40	62
Şekil 4.34. mDF'ye Ait Testis Dokusunun TUNEL Boyama Görüntüsü x20	62
Şekil 4.35. Stieve's Fiksatifine Ait Testis Dokusunun TUNEL Boyama Görüntüsü x40	63
Şekil 4.36. Stieve's Fiksatifine Ait Testis Dokusunun TUNEL Boyama Görüntüsü x20	63

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Hayvanların, Testis Ağırlıkları ve Tespit Solüsyonlarının Belirlenmesi	30
Tablo 3.2. Doku Takip Protokolü	33
Tablo 3.3. HE Boyama Yöntemi	35
Tablo 3.4. PAS Boyama Yöntemi	37
Tablo 3.5. MTC Boyama Yöntemi	39
Tablo 3.6. TUNEL Boyama Yöntemi	40
Tablo 4.1. Farklı Fiksatif ile Tespit Edilen Testis Dokularının Başlangıç Hacimleri ve Cavalieri yöntemi ile Hesaplanan Hacimlerine Yönelik Betimsel Analiz Sonuçları	65
Tablo 4.2. Farklı Fiksatif ile Tespit Edilen Testis Dokularının Başlangıç Hacimleri ve Cavalieri yöntemi ile Hesaplanan Hacimlerinin “Kruskal Wallis-H Testi” Analizi Bulguları	66
Tablo 4.3. %10 NTF Fiksatif ve BF ile Testis Dokusu Hacminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin “Mann-Whitney U” Analizi Bulguları	67
Tablo 4.4. %10 NTF Fiksatif ve mDF ile Testis Dokusu Hacminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin “Mann-Whitney U” Analizi Bulguları	68
Tablo 4.5. %10 NTF Fiksatif ve Stieve’s Fiksatif ile Testis Dokusu Hacminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin “Mann-Whitney U” Analizi Bulguları	69
Tablo 4.6. BF ve mDF ile Testis Dokusu Hacminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin “Mann-Whitney U” Analizi Bulguları	70
Tablo 4.7. BF ve Stieve’s Fiksatif ile Testis Dokusu Hacminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin “Mann-Whitney U” Analizi Bulguları	71
Tablo 4.8. mDF ve Stieve’s Fiksatif ile Testis Dokusu Hacminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin “Mann-Whitney U” Analizi Bulguları	72

1. GİRİŞ

Üreme, canlıların hayatlarını devam ettirme sürecinde fizyolojik bir gereksinimdir. Sağlıklı bir toplum oluşturulması üreme fizyolojisi ve biyolojisinin iyi bilinip eksiklerinin giderilmesi ile mümkündür. Üreme sistemi en basit canlıdan en gelişmiş biyolojik donanımı olan insana kadar tür ve cinsiyet açısından farklılık gösterir. Üreme sistemi ile ilgili çalışmalar daha çok laboratuvar hayvanları üzerinde yoğunlaşmakta ise de; insan üreme biyolojisi özellikle infertilite ile ilgili deneysel çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir (Speroff and Fritz, 2005; Akbal ve ark., 2006; Terzioğlu ve ark., 2008).

Üreme işlevinin sorunsuz olarak gerçekleşmesi, kadın ve erkekteki anatomik, fizyolojik ve hormonal sistemlerin bir bütün olarak çalışmasına bağlıdır. Günümüzde ağır yaşam şartları, stres, besin zincirinin bozulması ve manyetik alan maruziyeti gibi çevresel faktörlerin üremeyi olumsuz etkilediği düşünülmektedir (Oliva ve ark, 2001; Joffe , 2003; Erkanlı-Şentürk ve ark., 2012).

Testislerde meydana gelebilecek herhangi bir rahatsızlık veya hastalık durumlarında erken tanı, etiyojisinin ortaya çıkarılması, patogenezin açıklanması ve tedavinin seyri açısından dokunun histolojisinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Testis morfolojisinin ve spermatogenik serideki hücrelerin gelişimsel evrelerinin daha iyi incelenebilmesi dokunun en iyi şekilde tespit edilmesi ile mümkündür (Latendresse ve ark., 2002; Tu ve ark., 2011).

Histolojik incelemelerin en önemli aşaması dokunun tespit edilmesidir. Tespitin amacı, dokuların canlıdaki morfolojik özelliklerinin bilinmesi ve mikroanatomik düzeyine en yakın şekli ile korunmasını sağlamaktır (Gün ve ark., 2011). Tespitin amacına yönelik kullanılan çeşitli tespit solüsyonları vardır (Öztürk ve ark., 2002). Her doku için ideal bir tespit solüsyonu bulunmadığından bazı tespit solüsyonları kombine kullanılmaktadır.

Testis dokusunun tespiti birçok organa göre çok daha zordur. Seminifer tübüllerin düşük protein içermesi, bağ dokusunun az miktarda oluşu (Mills ve ark., 1977), seminifer tübüller içerisindeki hassas hücreli ilişkilerinin bütünlüğünün korunması ve dokunun intertisyel boşlukta sıkıca birarada ki bütünselliğinin korunması (Creasy, 2003) dokunun tespitini zorlaştırmaktadır.

Testis dokusunun toksik etkilerinin etkin bir şekilde değerlendirilebilmesi için, tüm dokunun hücre tiplerini değerlendirmek önemlidir (Creasy, 2003; Dutta ve ark, 2012).

İnfertilite çalışmalarında testis dokusu için Bouin fiksatif önerilmektedir (OPPTS, 1998; OECD, 2001; OECD,1995). Bouin fiksatifinin içerisinde ki pikrik asit kullanılması laboratuvar çalışanlarının güvenlik tehlikesi oluşturmaktadır bu amaç ile son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda alternatif olarak mDF fiksatif önerilmiştir (Creasy ve Jonassen, 1999; Latendresse ve ark., 2002; Creasy, 2003). Bazı sınırlı çalışmalarda Stieve's fiksatifinin doku bütünlüğünü morfolojik açıdan iyi koruduğunu ve testis dokusu ile sınırlı çalışma yapıldığı (Mallidis ve ark., 1994) için bizde çalışmamızda Stieve's fiksatifini de tercih ettik. Testis dokusunun, Formaldehit ile tespit edilmesi morfolojik korunumunun yetersiz olduğunu belirgin hücreli büzülmenin olmasına rağmen histopatolojik değişikliklerin tanımlanmasını imkansız kılmasada zorlaştırır (Chapin ve ark, 1984; Hess ve Moore, 1993; Mallidis ve ark., 1994). Formaldehitin, kolay temin edilmesi ve ekonomik olarak daha uygun olup yaygın kullanıma sahip olmasından dolayı rutin olarak laboratuvarlarda tercih edilen fiksatifdir (Pabuççuoğlu, 2016).

Yapısal olarak diğer dokulardan farklı olan testis dokusunun morfolojisik ve histolojik özelliklerinin korunması erkek infertilitesi açısından önemlidir. Bu amaçla testis dokusunun rutin histoloji laboratuvarında kullanılan farklı fiksatifler ile bazı histokimyasal boyamaların dokunun histolojik özelliklerini belirlenip hacminin korunumu önemlidir.

Tespit edilmiş dokularda oluşan hacimsel değişiklikler ve doku büzüşmelerini gösteren en güvenilir yöntem stereolojik metodlardır. Son yıllarda stereolojik metodlar çalışmalarda karşılaşılan problemlere kolay çözüm önerileri ve pratik

özüme ulaşmak isteyenler için sıklıkla tercih edilmektedir (Canan ve ark., 2004). Aynı dokunun farklı fiksatif içerisinde tespit edilmesi sonucunda dokuda oluşabilecek büzüşmeyi stereolojik metodlar kullanılarak gösterilebilir (Altunkaynak ve Altunkaynak, 2006). Testis dokusunun hacmini cavalier metodu ile nokta sayıma yöntemi kullanarak tahmin edilebilir (Weibel, 1979; Noorafshan, 2014).

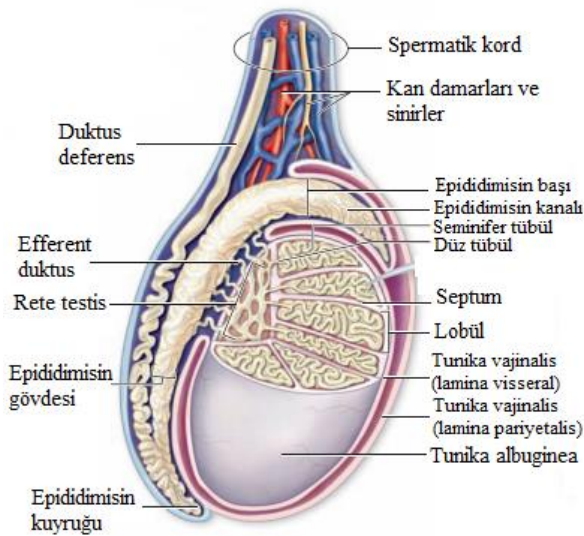
Erkek infertilitesi için önemli olan testis dokusunun morfolojisinin mikroanatomik düzeyinin çok iyi bilinmesi hastalıkların tedavisi ve sonraki çalışmalar için oldukça önemlidir. Çalışmamızda, farklı tespit solüsyonları kullanılarak fikse edilen testis bloklarından seri kesitler alındı ve stereolojik yöntemler ile hacimleri hesaplanarak karşılaştırıldı. Herbir bloktan fazlaca kesitler alındı ve farklı boyamalar (HE, PAS, MTC, vb.) için dokunun tespit solüsyonunda doku üzerindeki boyanmayı nasıl etkilediğini değerlendirildi.

2. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi; ekzokrin (sperm üretimi) ve endokrin (androjenleri sentezleme) işlevleri bulunan bir çift testisten, spermin taşınmasını sağlayan intratestiküler ve ekstratestiküler kanallardan, spermatozoanın beslenmesini sağlayan aksesuar bezlerden ve penisten oluşur (Müftüoğlu ve ark., 2009).

2.1. Testisin Anatomisi

Funikulus spermaticus'un aracılığı ile skrotum içerisine yerleşmiş, erkek üreme hücrelerinin (spermium) ve endojenik hormonların yapıldığı bir çift erkek üreme organı testislerdir (Yücel, 2008). Yetişkin erkek bireylerde ortalama olarak; 4-5 cm uzunluğunda, 2-2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında olan testisler 20-30 g ağırlığındadır. (Solomon, 2002). Testislerin skrotum içerisindeki duruşu organın uzun eksenini yukarıdan aşağıya ve önden arkaya eğik olup, biri çoğunlukla sol testis diğerine göre biraz daha aşağıda bulunur (Yücel, 2008).



Şekil 2.1. Testisin anatomik yapısı (Mescher, 2013).

Testis parenkiması, kalın fibröz bir kapsül olan tunika albuginea ile çevrilidir (Netter, 2012). Dıştan; tunika albugineaya, kaygan bir periton olan tunika vajinalis yapışmıştır (Netter, 2012). Tunika albugineanın içte yer alan ve kan damarlarından zengin katman ise tunika vasküloza olarak adlandırılır.

Tunika vajinalis; testisin arka kenarı hariç testis dokusunun tamamını örten lamina visseralis (epiorchium) ve testisin alt kısmından üst kısmına doğru uzanan lamina parietalis (periorchium) olarak iki yapraktan oluşur (Şekil 2.1) (Sancak ve Cumhuriyet, 2013). Bu iki yaprağı arasında az miktar seröz sıvı içeren potansiyel bir boşluk bulunur ve bu boşluğa cavitus scroti adı verilir (Sancak ve Cumhuriyet, 2013).

Tunika albuginea, testisin içeriğini saran, kalın, sıkı yapılı fibröz tabakadır (Şekil 2.1) (Hatipoğlu, 2012). Genişleme ve elastikiyet özelliği olmayan bu tabaka, dallanmış düz kas hücrelerini, fibroblastları yoğun miktarda içerir. Doku içerisine dağılmış olan kollajen lifler, sperm hücrelerinin efferent duktusa hareket etmesine yardımcı olurlar.

Tunika vasküloza, tunika albugineanın iç yüzeyinde bulunan damar ağı tabakası olup tüm bölmelerin yüzeylerinde bulunur. Böylece testis'in içerisindeki tüm tubuli testiside sarmış olur. Damarlar arasında kalan aralıkları gevşek bağ dokusu doldurur (Arıncı ve Elhan, 2006).

Testisin arterleri; aorta abdominalisin dalı olan sağ ve sol arteria testicularis'dir (Şekil 2.1) (Odar, 1969).

Testisin venleri; testisin arka kısmından kapiller ile birleşerek plexus pampiniformis adı verilen venöz ağı oluşturur. Genellikle iç kasık halkasında plexus pampiniformisler bir araya gelerek vena testikularisi oluştururlar (Şekil 2.1) (Kuran, 1983). Sağ iç spermatik ven sağ renal venin altında vena cava inferiora oblik şekilde girerken, sol testiküler ven sol renal vene, herhangi bir kapak oluşumu bulunmaksızın dik açı ile bağlanır (Netter, 2012).

Testisin lenfatik drenajı; yüzeysel lenf damarları dokunun alt kısmında, iç kısımdaki lenf damarları ise testis ve epididimisin içerisinde yer alır (Arıncı ve

Elhan, 2006). Bu damarlar funikulus spermatikus içerisinde geçerek vena testikularisi izleyerek aortanın ön ve yan kenarındaki nodi preaortici ve nodi aortici lateralise açılır (Yücel, 2008).

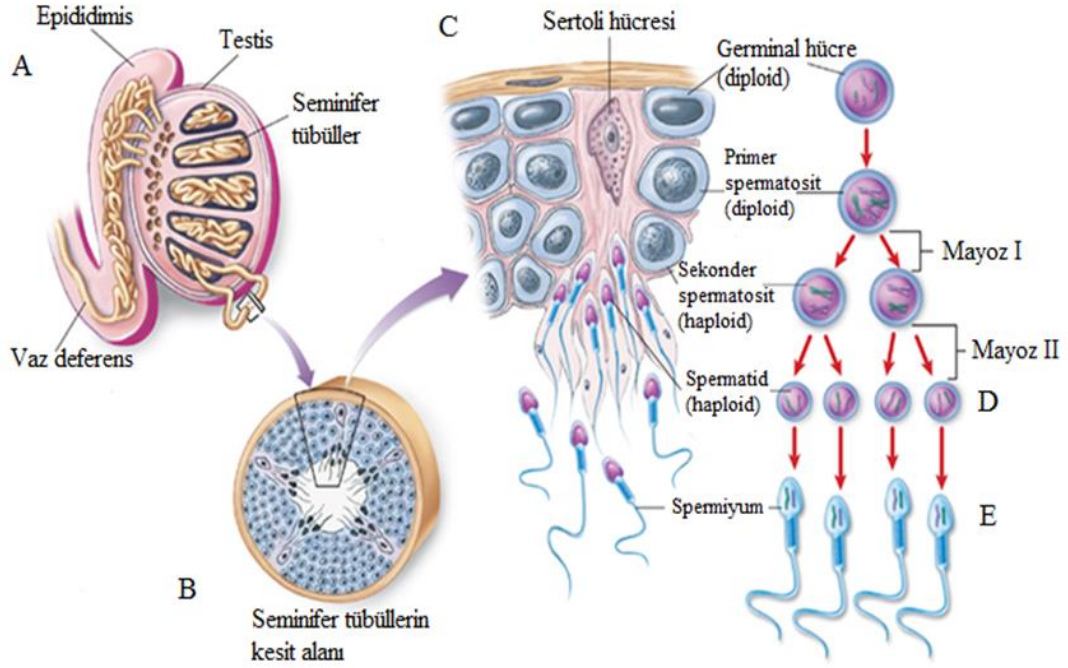
Testisin somatik innervasyonu yoktur, esas olarak renal pleksustan otonomik sinirleri ve intermezenterik sinirleri alır. Sinirler, testis dokusu içerisine testiküler arterin etrafından girerler (Mitchell, 1935).

2.2. Testisin Histolojisi

Testisleri dıştan saran tunika albugineadan köken ince bağ dokusu uzantıları organı sayıları yaklaşık 250 adet olan lobüle ayrılır. Her lobül içerisinde bir ila dört adet kıvrık seminifer tübül yerleşmiştir (Kalthur ve Kalthur, 2017).

2.2.1. Seminifer Tübüllerin Histolojik Yapısı

Testis hacminin %60'ını seminifer tübüller oluşturur (Bharath, 2017). Her tübül yaklaşık 70-80 cm uzunluğunda ve 0,12-0,30 mm çapındadır (Kalthur ve Kalthur, 2017). Seminifer tübüller, spermatogenik kök hücreleri ve Sertoli hücrelerini içermektedir (Şekil 2.2) (Tubules, 1992). Seminifer epitel; bazal membran ile kollajen lifler, fibroblast ve miyoid hücrelerden oluşan bazal tabaka ile çevrilidir (Özenci ve Akkoyunlu, 2006). Bazal laminanın iç katmanı düz kas özelliğinde miyoid hücrelerden oluşur (Solakoğlu ve Ahıslı, 1998). Kasılabilir miyoid hücreler spermatozoanın ve testiküler sıvının seminifer tübülden boşaltım sistemine akışına yardım eden peristaltik dalgalanmaları oluşturur (Demir, 2014).



Şekil 2.2. Testisin yapısı: A. Testis yapısı B. Seminifer tübül transvers kesiti. C. Seminifer tübül kesiti ve Sertoli hücresi. D. Spermatozoid. E. Sperm hücresi. (Reproduction and Development 09.11.2017).

Seminifer tübüllerde; piramidal şekilli epitelyal destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ve spermatogonik hücreleri olan (spermatogonyumlar, spermatozoidler ve spermatozoidler) bulunmaktadır (Şekil 2.2).

Sertoli Hücreleri

Gelişmekte olan spermatogonik hücreleri çevreleyerek bu hücrelerin arasındaki boşlukları dolduran apikal ve lateral uzantılara sahip düzensiz sınırlı piramidal şekilli epitelyal hücrelerdir (Şekil 2.2.C.) (Kalaycı, 1992). Sertoli hücreleri, puberte dönemine kadar seminifer tübüllerin dominant hücreleridir. Puberte döneminden sonra, seminifer tübül hücrelerinin %10'unu oluşturur. İleri yaştaki erkeklerde spermatogonik hücre sayısı azaldığı zaman sertoli hücreleri tekrar seminifer tübüllerin dominant hücreleri haline gelir (Özenci ve Akkoyunlu, 2016).

Sertoli hücreleri; geniş bir nukleolus ve heterokromatine sahip üçgen biçiminde (Şekil 2.2) olan uzamış oluklu nükleus ile sitoplazmalarında gelişmiş Golgi kompleksi çok sayıda düz endoplazmik retikulum, mitokondria, lizozom organelleri ile vimentin, aktin ve mikrotübüllerden oluşan zengin bir hücre iskeleti içerirler Sertoli hücrelerinin bazal sitoplazmalarında protein yapısında olduğu düşünülen kristalloid cisimcikler olan ‘Charcot-Böttcher’ inklüzyonları görülmekte olup bu inklüzyonların içeriği ve işlevi henüz tanımlanamamıştır (Eroschenko, 2001). Sertoli hücrelerinin lateral ve apikal hücre membranlarının sınırlarının düzensiz oluşu gelişmekte olan spermatogenik hücelere kriptalar sağlar (Özenci ve Akkoyunlu, 2006).

Yan yana bulunan Sertoli hücreleri aralarındaki sıkı bağlantılar, ekstrasitübüler aralıktan intrasitübüler aralığa makromoleküllerin geçişini engeller. Kan-testis bariyerini, peritübüler doku ve Sertoli hücreleri oluşturur (Kalaycı, 1992). Kan-testis bariyeri; seminifer tübüleri, bazal kompartman ve adlüminal kompartmana ayırır. Bu bariyer, spermatogonyumların adlüminal kompartmanda meydana gelen spermatogenezin ileri aşamasından ayırır ve kan kaynaklı antikorlar ile plazma proteinlerini seminifer tübüllerin dışında tutar (Çelik, 2013). İlerlemiş aşamada bulunan spermatogenik hücreler, vücut tarafından yabancı cisim olarak algılanabilir. Spermatogenik hücelere vücut immün yanıt oluşturulabilir. Kan-testis bariyeri gelişmekte olan spermatogenik hücrelerin, membran antijenlerinin kan dolaşımına geçmesini engeller ve gelişen spermatogenik hüceleri immün sistemden korur. Böylece kişinin, kendi sperm hücresine karşı otoimmün yanıt oluşturması ve spermatogenezin bozulması engellenir. Bunun yanı sıra kan-testis bariyeri, kandaki zararlı ve toksik maddelerin gelişmekte olan germinal epiteline geçişini de engeller (Çelik, 2013).

Sertoli hücrelerinin mitotik bölünme özellikleri yoktur. Bu hücreler özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışını ışınımı gibi olumsuz koşullara karşı oldukça dayanıklı olup, bu zararlı etkiler karşısında spermatogenik seri hücelerine göre çok daha dirençlidirler.

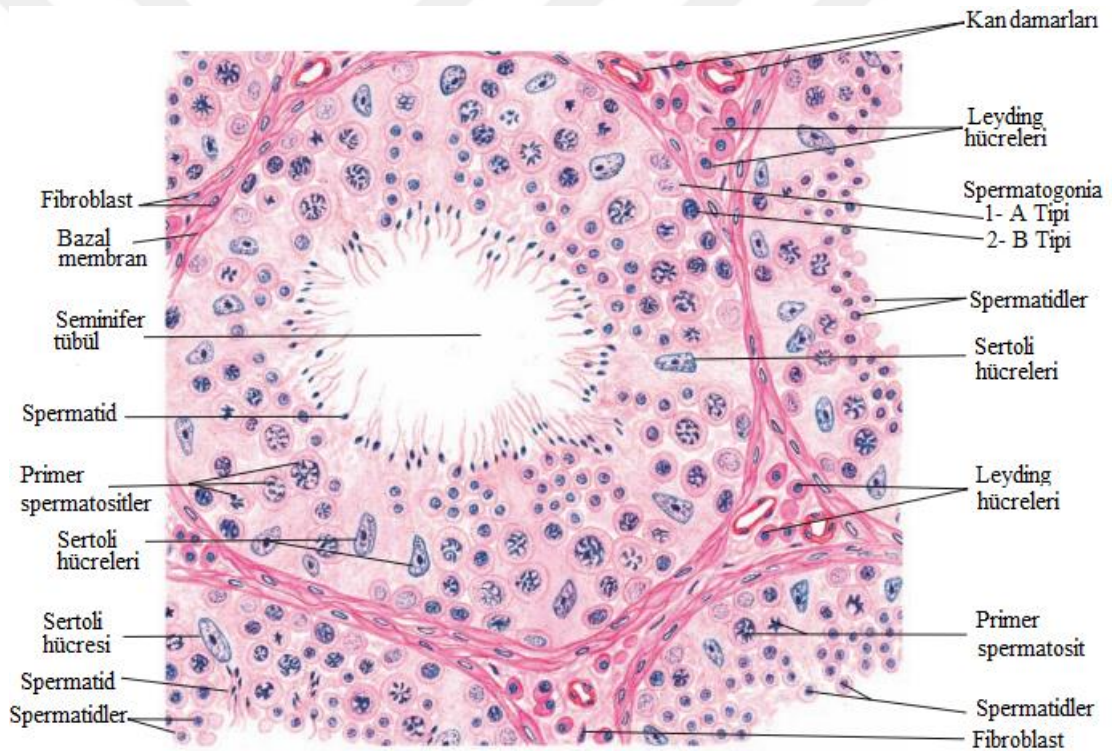
Sertoli hücreleri testis içerisinde birçok önemli görevi bulunmaktadır:

1. Spermatogenik hücreleri destekleyerek, beslenmesini sağlamak ve korunmasına yardımcı olmak ve farklılaşmayı başaramayan spermatogenik hücreleri fagosite etmek (Demir, 2014),
2. Komşu Sertoli hücrelerinin oluşturdukları bariyer ile sperm hücrelerini immünolojik saldırıdan korumak,
3. Spermatozoonların taşınmasını kolaylaştıran ve besleyen früktozdan zengin salgıyı lümenine salgılamak,
4. Olgun spermatidlerin aktin-aracılı kasılmalarla (spermiyasyon) seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak (Özenci ve Akkoyunlu, 2006),
5. Folikül Uyarıcı Hormon (FSH)'un etkisi altında Androjen Bağlayıcı Proteini (ABP) sentezlemek ve spermatogenezin ilerlemesini sağlamak,
6. Aktivini salgılamak,
7. Kan-testis bariyerini oluşturmak,
8. Fetal gelişim döneminde anti-Mülleriyan hormon sentez ve sekresyonu yaparak dişi özelliklerin gerilemesini sağlamak,
9. Testesteronu östradiol haline çevirmek,
10. Spermatidlerin olgunlaşmasında ortaya çıkan fazla sitoplazma parçalarını fagosite etmektir (Demir, 2014).

Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreler, seminifer tübül epitelinde çeşitli olgunlaşma aşamalarında bulunan ve düzenli olarak bölünerek olgun spermelere farklılaşan hücreler olup, dört-sekiz katlı tabaka halinde bulunurlar (Şekil 2.3). Bu hücreler bazal lamina ile ilişkili olup lümenine doğru uzanmaktadır. Sertoli hücrelerinin arasında tıkaçıcı bağlantıların arasında yer almasıyla kan-testis bariyeri dışında kalırlar (Özenci ve Akkoyunlu, 2006). Spermatogenik hücreler, seminifer tübüllerin bazal laminasından lümenine doğru; spermatogonyum, spermatosit (primer-sekonder), spermatid ve spermiyum olarak sıralanmışlardır.

Spermatogonyum: Küçük, yuvarlak, 12 μm çapında, Sertoli hücreleri arasında okludens tipi bağlantıların altında kaldığı için bazal kompartmanda yer alan, bazal lamina ile ilişkili hücrelerdir. Spermatogonyumlar, kökenlerini spermatogonyal kök hücreden alırlar. Spermatogonyumlar kısmen sessiz hücreler olup kanser kemoterapisine karşı dirençlidir. Mitoz bölünen spermatogonyumlar, mayoz bölünen spermatositler ve farklılaşan spermatidler ise radyasyona ve kanser kemoterapisine duyarlıdır. Radyoterapi ve antikanser kemoterapisi sonlandırıldığında, spermatogonyal kök hücreler spermatogenik süreci yeniden oluşturabilirler (Özenci ve Akkoyunlu, 2006). Seminifer tübül epitelinde, spermatogonyumlar çekirdeklerinin görünümüne göre üç tip olarak tanımlanır (Rhu ve ark., 2004).



Şekil 2.3. Seminifer tübül yapısı (Eroschenko, 2001).

Koyu boyanan (dark) Tip Ad spermatogonyumlar: Germinal epitelin kök hücresi olarak kabul edilen, yoğun bazofilik, oval ve heterokromatik çekirdeğe sahip küçük kubbe şeklindeki hücrelerdir. Bu hücreler hücre döngüsüne girmezler ve mitoz bölünme geçirerek yeni Ad ve Ap tipi spermatogonyumlara farklılırlar.

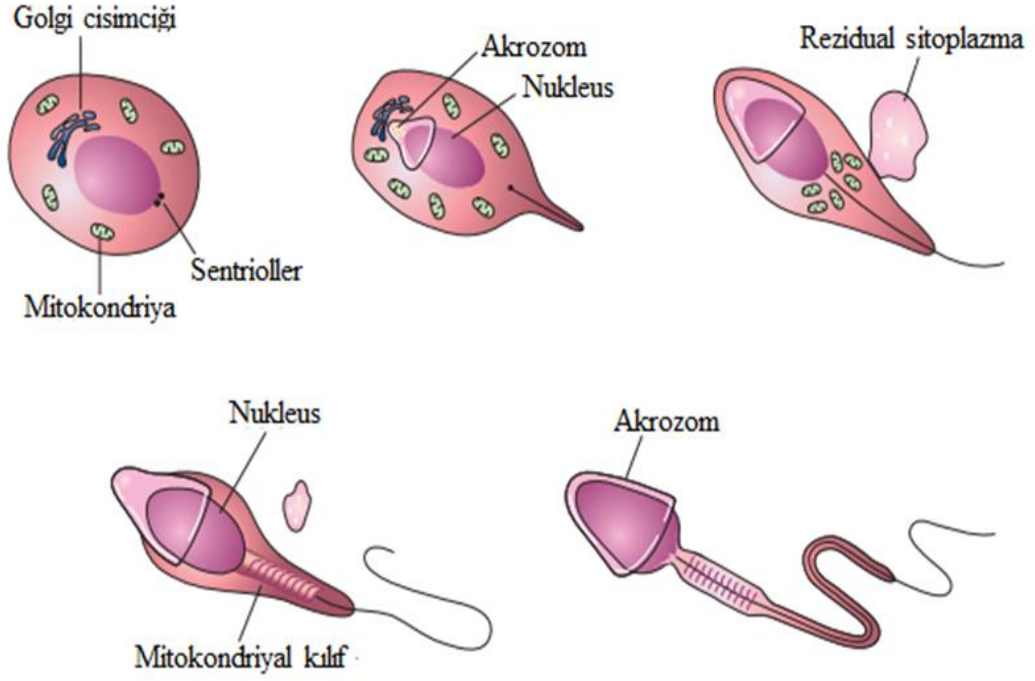
1. Açık boyanan (pale) Tip Ap spermatogonyumlar: Yuvarlak veya oval, ökromatik çekirdek, çok belirgin çekirdekçik ile açık sitoplazmaya sahiptirler. Bu hücreler A1, A2, A3 ve A4 olarak birbirini takip eden serilerden oluşur. Hormonal etkiler ile mitoz ile bölünerek B tipi spermatogonyumlara dönüşürler.
2. B tipi spermatogonyumlar: Yuvarlak şekilli, merkezi yerleşimli çekirdekçiğe sahiptir. Çekirdekleri koyu boyanır. Bu hücreler mitoz bölünmeler geçirerek primer spermatozoidleri oluştururlar (Tellioglu, 1989; Young ve Heat, 2000).

Spermatozoid: Spermatogenik serideki en büyük hücreler primer spermatozoidler olup 46 kromozom (44+XY) ve 4n DNA içerirler. Germinal epitelin orta kısmında yer alan bu hücreler, birinci mayoz bölünmenin profaz evresini yaklaşık 22 günde tamamlamaktadır. Primer spermatozoidlerin birinci mayoz bölünmeyi geçirmesi sonucunda sekonder spermatozoidler oluşur (Bloom ve Fawcett, 1975; De Kretser, 1992; Lowe ve Alan Stevens 1997; Eroschenko, 2008). Birinci mayoz bölünme günler süren uzun bir süreç olduğu için primer spermatozoidler, seminifer tübüllerin en yoğun gözlenen hücreleridir. İkinci mayoz bölünme ise dakikalar içerisinde gerçekleşmektedir (Özenci ve Akkoyunlu, 2006).

Birinci mayoz bölünme sonucunda yoğun kromatin içeren daha küçük çekirdeğe sahip sekonder spermatozoidler oluşur. Sekonder spermatozoidlerin bölünmesi sonucunda iki adet haploid hücre olan 23 kromozom (22+X veya 22+Y) ve n DNA içeren spermatid oluşur (Dym ve Fawcett, 1971; Rooij ve Russell, 2000).

Spermatid Hücreleri: Seminifer tübül içerisinde lümeneye yakın yerleşim gösteren (Şekil 2.3), sertoli hücre sitoplazma kriptaları içerisinde gömülü olarak bulunan, yaklaşık 7-8 µm çapında, küçük, yuvarlak şekilli ve haploid sayıda kromozom taşıyan hücrelerdir. Bu hücreler yoğunlaşmış kromatin içeren nukleusları ile spesifiktir. Olgun spermatidlerin kuyruk kısımları seminifer tübülün lümenine uzanırken, küçük baş kısımları sertoli hücrelerinin sitoplazmasına gömülüdür. Spermatid hücreleri bölünmez, fakat spermiyogenez denilen hücresel bir değişim süreci geçirirler. Spermiyogenez, spermatozoon üretiminin son aşaması olup, spermatidlerin son derece özelleşmiş hücreler olması ve spermiyuma dönüşmesi sürecidir. Spermatid hücrelerinin, olgun spermiyum haline (spermatozoona) dönüştüğü bu hücresel değişim süreci, dört evrede incelenir:

- 1. Golgi Evresi:** Spermatid hücrelerinin, granüllü endoplazmik retikulumunda sentezlenen ve dölleme için gerekli olan hidrolitik enzimler; golgi kompleksinde glikoproteinden zengin ve Periyodik Asit-Schiff (PAS) (+) boyanan, küçük proakrozomal granüller şeklinde birikir. Bu granüller birleşerek, çekirdek zarına yakın, membran ile sınırlı bir akrozomal vezikülün içinde yoğunlaşırlar. Akrozomal kese spermiyumun ön kutbunu belirler; bunun karşı kutbuna da sentriyoller yerleşir ve spermiyumun kuyruğunun şekillenmesini başlatır (Şekil 2.4).
- 2. Şapka Evresi:** Akrozom vezikülü çekirdeğin ön yarısını saracak şekilde yayılarak çekirdek zarına tutunan bir şapka oluşturur (Şekil 2.4). Akrozom; hiyalüronidaz, nörominidaz, asit fosfataz, akrosin, proteaz gibi hidrolitik enzimler içeren özelleşmiş bir lizozom işlevine sahiptir. Bu hidrolitik enzimler, oositin etrafında ki korona radiata hücrelerini birbirinden ayırır ve zona pellusidayı sindirir (Solakoğlu ve Ahışalı, 1998).

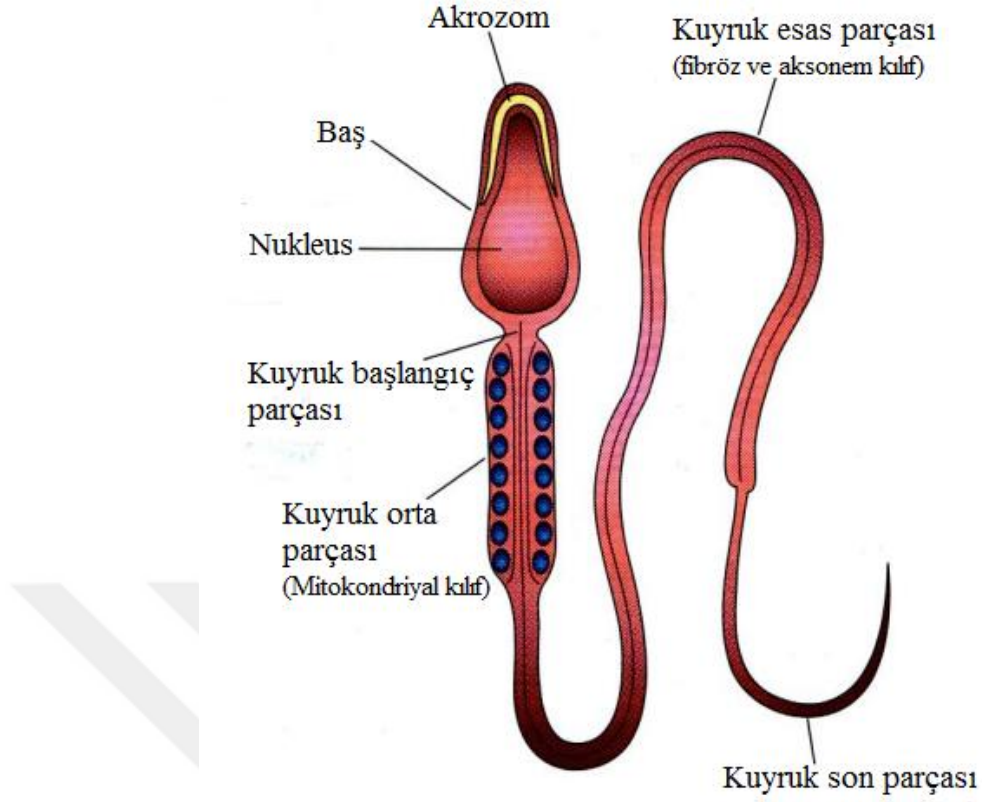


Şekil 2.4. Spermatid hücre yapısı (Moore, 2003).

3. Akrozomal Evre: Hücrenin akrozomu içeren ön kısmı seminifer tübülün bazaline bakar (Şekil 2.4). Hücre çekirdeği yoğunlaşır ve uzar, nükleozomların histon proteinleri, protaminler ile yer değiştirir. Sentriollerden hücre yüzeyine dik duranı, spermiyumun kuyruğunu yapacak flagellumu oluşturur. Aynı sürede sitoplazma flagellum çevresinde hareket edip sarmaya başlar. Mitokondria kuyruğun proksimal kısmı çevresinde spiral olarak toplanmış spermiyumun gövdesini yapar. Mitokondria, spermatozoonun hareketi için gerekli enerji kaynağını sağlar.
4. Olgunlaşma Evresi: Sitoplazma atıkları, sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermiyumun olgunlaşmış kuyruklu hal almasıyla seminifer tübül lümenine bırakılır (Solakoğlu ve Aytekin, 2009).

Spermiyum: Olgun germ hücreleridir (Şekil 2.5). İnsanda spermatogonyum hücrelerinden spermiyumun oluşma süresi yaklaşık 64 gün sürer. Ortalama 60-65 µm uzunluğunda olan spermiyumlar, baş ve kuyruk olarak iki kısımdan oluşmaktadır:

1. Baş (Caput); Akrozom ile sarılmış çekirdekten oluşur (Şekil 2.5) (Özenci ve Akkoyunlu, 2006). Çekirdek yassılaştırmış ve yoğun bir yapıda olup ön yarısını akrozom örter. Akrozom, lizozomlarda da bulunan hidrolitik enzimler (proteazlar, asit fosfatazlar, hiyaluridaz, nörominidazlar ve akrosin) içerir. Akrozomal enzimler oositi saran korona radyata ayırır ve zona pellisuda'yı eritebilir özelliktedir (Özenci ve Akkoyunlu, 2006).
2. Kuyruk (Flagellum); Sil yapısında olup başlangıç, orta, esas ve son parçalardan oluşur (Şekil 2.5).
 - Başlangıç parçası, bir çift sentriyolün bulunduğu dar bir parça olup kuyruğun baş kısmına bitişik kısımdır (Şekil 2.5).
 - Orta parça, sarmal şeklinde dizilmiş mitokondriyonlardan oluşur. Alt sınırı mitokondrial sarmalın annulus kısmında sonlanır (Şekil 2.5) (Özenci ve Akkoyunlu, 2006).
 - Esas parça, mikrotübüler hareketler için sağlam bir iskelet oluşturur. Kuyruğun en uzun parçasıdır. Fibröz ve aksonem ile sarılıdır.
 - Son parça, sadece aksonem içeren, kuyruğun en kısa parçasıdır (Şekil 2.5).



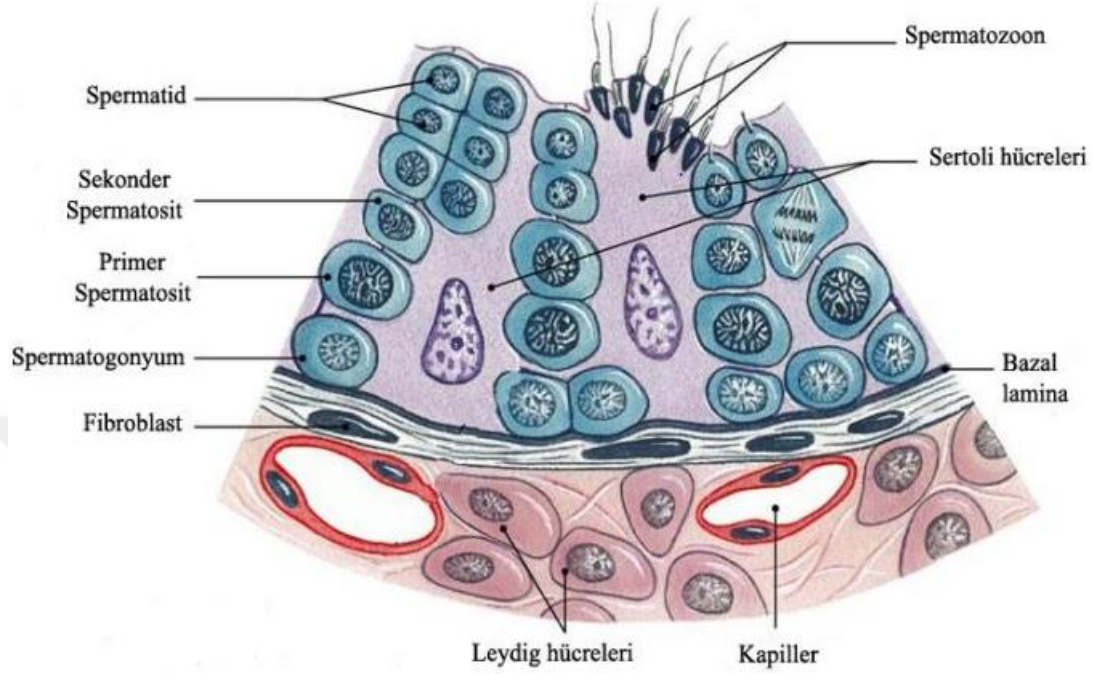
Şekil 2.5. Spermium hücre yapısı (Moore, 2003).

2.2.2. İntertisyum

İntertisyel doku, testis dokusunun %25-30'unu oluşturur. Seminifer tübüller arasında bulunan bağ dokuda mast hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, lenf damarları, sinirler, kapiller ve leyding hücreleri bulunur (Şekil 2.6). Hücre popülasyonunun %10-20'sini tek tek veya gruplar halinde bulunan leyding hücreleri oluşturur (Bharath, 2017). Leydig hücrelerinin çekirdekleri ökromatiktir ve bir-iki çekirdekçik içerir.

Leydig hücrelerinde, luteinize hormon (LH) reseptörü bulunur (Teerds ve ark., 1999). LH ve prolaktin, leydig hücrelerinin işlevini düzenler. Bu hücreler LH ile uyarılması sonucunda mitokondrialara ve düz endoplazmik üretir. Retikulumlarında bulunan enzimler tarafından testosteronu üretilir. Prolaktin ile LH reseptörünün gen

ekspresyonu düzenlenir (Seymen, 2010). Testesteron ile spermatogenez uyarılır. Spermatogenezin inhibe edilmesi östrojen ve progesteron ile olur (Neas, 2010).



Şekil 2.6. Semifer tübül ve intertisyum kesiti (Erkoçak, 1990).

Leyding hücreleri, sekonder seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu hormon olan testosteronun üretiminden sorumlu hücrelerdir. Salgılanan testosteron hormonu direk kana geçer ve spermatogenez devam eder (Ovalle ve Nahirney, 2009).

Spermatogenez için 35°C'lik bir sıcaklık idealdir. Spermatogenez için yüksek ısıya dayanıksız oldukları için ısı düzeyleri birkaç mekanizma ile kontrol edilir. Terleme ile ısı kaybı, kan dolaşımına karşı ısı akımı, yüksek vücut sıcaklıklarında vücuttan dartos kasının kasılması ile uzak tutulup, düşük ısılarda kremaster kasının kasılması ile vücuda doğru çekilmesi bu mekanizmalardan bazılarıdır.

Leydig hücreleri ise ısıya dayanıklı hücreler oldukları için kısırlık durumlarında sperm üretimi bozulmasına rağmen sekonder seks karakterleri ve

libidoda bir bozulma gerçekleşmez (Kayalı, 1989; Stenberg, 1992; Ross ve ark., 2003).

2.3. Tespit

Histolojik doku hazırlama sürecinde, hücre ve hücreler arası ilişkilerin belli bir anının mikroskoplar ile görüntülenmesi amaçlanır (Pabuççuoğlu, 2016). Dokunun mikroskopik olarak hazırlanma sürecinin ilk ve en önemli aşaması dokunun fiksasyonu (tespiti)'dur. Tespit ile hücre ve dokuların canlıdaki haline en yakın biçimde muhafaza edilmesi sağlanır, otoliz ve heteroliz önlenerek, kolaylıkla diffüze olan maddelerin (lizozom vs.) kaybına engel olunarak, dokuların boyalarla ve diğer reaktiflerle boyanması kolaylaştırılır (Pabuççuoğlu, 2016).

Hücreler vücutta buldukları konuma göre farklı şekillerde bulunmaktadır. Hücrelerin yapısını tamamen koruyan ideal tespit solüsyonu bulunmamaktadır (Huang ve Yeung, 2005). Kötü veya zayıf tespit sonucunda hücrelerin şeklinde değişimler olmaktadır. Tanısal olarak uygun olan tespit solüsyonlarının tüm hücre ve hücresel elemanlara ulaşması, hücre morfolojisinin korunması, hücre sınırlarından diğer solüsyonların (boya solüsyonları vs) geçişine izin verilmesi beklenir (Humason, 1979). İdeal olan tespit solüsyonu, hücrelerin lam yüzeyine yapışmasını kolaylaştırır ve boyanma yöntemleri ile uyumludur. Tespit solüsyonunun, dokunun tamamına nüfuz etmesi amacıyla dokular 2-3 mm'lik parçalara ayrılmalıdır. Tespit sonrasında, hücresel özelliklerin aynı kalması ve hücrelerin sitomorfolojik özelliğinin sürekliliği beklenir (Keebler ve Somak, 1992; Koss, 1992; Bibbo, 1997; Woods ve Ellis, 2010).

İdeal olmayan tespit solüsyonu, hücreleri yassılaştırarak, soluk boyanmalarına neden olurken hücrelerin tanımlanmalarını zorlaştırır veya engeller. Kötü bir tespit hücresel kayıplara neden olur ve zeminde artefaktlar oluşturur. Tanısal değeri olan hücrelerin kaybı, tanının eksik olarak verilmesine veya verilememesine neden olur. Yine aynı nedenlerle yoğun olarak üst üste gelen hücre gruplarına ulaşamayan tespit solüsyonu, bu tip grupların değerlendirilmesine engel olmaktadır.

Tespit solüsyonları dokudaki antijeniteyi bir dereceye kadar etkilediği için doku için uygun tespit solüsyonu deneme yanılma yolu ile belirlenebilir (Hewitson ve ark., 2010). İyi bir tespit, sitoplazmanın yapısal özelliklerini korunmasını gerektirmektedir. Kötü yapılan bir tespit sonrası, sitoplazmik dejenerasyonlar ve bütünlük kayıpları izlenebilir.

Doku ve organların tespiti fiziksel veya kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilir (Grizzle ve arkadaşları, 2008).

2.3.1. Fiziksel Tespit

Fiziksel tespit yöntemleri, rutin histoloji pratiğinde çok sık kullanılan metotlar değildir. Küçük boyutlu dokuların hızlı tespiti için hücre içeriğinde artefakt oluşumunu en aza indirdiği için tercih edilmektedir (Huang ve Yeung, 2005). Dokuların ısıtılması, kurutulması, mikrodalga ışınımına maruz bırakılması veya dondurarak kurutulması gibi yöntemler fiziksel tespit yöntemleridir (Grizzle ve arkadaşları, 2008).

Isı ile tespit: Tespitin en basit şeklidir. Isı, proteinleri koagüle eder, lipidleri eritir. Büyük parçaların tespitinde kullanılabilir, fakat hücre bileşenlerinin yapısını bozduğu için pek tercih edilmemektedir.

Kurutma ile tespit: Kan, kemik iliği, ince iğne biyopsileri ve semen gibi yayma preparatların tespitinde tercih edilmektedir.

Mikrodalga ile tespit: Dokunun tespitini hızlandırır. Dokuların ve histolojik kesitlerin tespit süresini 12 saatten 20 dakikaya kadar kısaltır (Kok ve Boon, 2003; Leong, 2005). Formaldehit ile tespit edilecek doku, mikrodalga ile tespitte tehlikeli buhar üreteceği için emniyet önlemlerinin alınması gerekmektedir (Grizzle ve arkadaşları, 2008).

Dondurma (kriyotom) ile tespit: Enzimler, lipidler ve ameliyat parçalarının hızlı tespit edilmesinde tercih edilmektedir. Dokuların büyüklüğü 2 mm'den küçük olmalıdır. Dondurulan dokular kısa sürede sertleştiği için hemen dondurma mikrotomu (kriyomikrotom) ile kesit alınır.

2.3.2. Kimyasal Tespit

Kimyasal tespit, dokuların kimyasal maddeler kullanılarak tespit edilmesidir. Rutinde en sık kullanılan tespit tipi kimyasal tespittir. Fiziksel tespit ile karşılaştırıldığında daha büyük boyutlardaki dokuların tespiti için tercih edilir (Huang ve Yeung, 2005). Dokuları tespit etmek amacıyla kullanılan kimyasallara fiksatif adı verilir. Kimyasal tespit, iki farklı şekilde gerçekleştirilebilir.

İmmersiyon (daldırma) ile tespit: Doku veya organ canlı vücudundan alındıktan sonra sıvı formdaki fiksatif içerisine koyulmasıdır. Rutinde sıklıkla tercih edilen immersiyon tespitidir.

Vasküler perfüzyon ile tespit: Deney hayvanlarının tespitinde kullanılır (Köktürk ve ark., 1999). Vasküler perfüzyon ile deney hayvanlarında tek bir organın tespit edilmesi planlanıyorsa organın kanlanmasıyla sorumlu ana artere tespit solüsyonu verilerek uygulanır.

Birbirinden farklı birçok tespit solüsyonu 1958 yılında Baker tarafından iki grup olarak sınıflandırılmıştır (Baker, 1958; Bancroft ve Stevens, 1982). Tespit solüsyonları asidik ve bazik olmasına göre de sınıflandırılmaktadır (Huang ve Yeung, 2005). Baker, tespit solüsyonlarını koagüle edici tespit solüsyonları ve nonkoagüle edici tespit solüsyonları olarak iki grupta sınıflamıştır.

2.3.3. Koagüle Edici Tespit Solüsyonları

Proteinleri koagüle ederek, yani suda çözünmez hale getirerek etki oluştururlar. Hücresel yapı temel olarak lipoproteinlerin ve kollajen gibi fibröz proteinlerin koagülasyonu ile korunur. Işık mikroskopik düzeyde doku histomorfolojisinin inceleneceği çalışmalarda tercih edilirler. Sitoplazmada topaklanmalara neden oldukları için ve mitokondriayı ve salgı granüllerini iyi koruyamadıkları için ince yapının gözlemleneceği çalışmalarda kullanılamazlar (Grizzle ve ark., 2008).

Dehidrate ve koagüle edici fiksatiflerden en sık kullanılan alkoller (etanol, metanol) ve asetonur. Proteinlerin tersiyer yapısını, çözünürlüklerini bozar ve işlevlerini kaybetmelerine neden olurlar (Grizzle ve ark., 2008).

Diğer koagüle edici fiksatifler, pikrik asit ve trikloroasetik asittir. Proteinlerin iyonize olabilen yan zincirlerindeki yükleri değiştirerek elektrostatik bağların ve hidrojen bağların yapısını bozar, bu da proteinlerin üç boyutlu yapısının bozulmasına neden olur (Grizzle ve ark., 2008).

2.3.4. Koagüle Edici Olmayan Çapraz Bağlar Oluşturan Tespit Solüsyonları

Proteinler içerisinde veya proteinler arasında, nükleik asitler içerisinde veya nükleik asitler arasında ve proteinler ile nükleik asitler arasında çapraz bağlar kurarak fiksatif etki oluşturan kimyasallardır. Formaldehit, gluteraldehit, diğer aldehitler (kloral hidrat, glioksal vb.), merkürük klorit ve çinko klorit gibi metal tuzları ve osmiyum tetroksit gibi diğer metalik bileşikler bu grupta yer alırlar (Grizzle ve ark., 2008). Dokulardan istenilen pH değerini korumak için tampon çözeltisi kullanılır (Huang ve Yeung, 2005). Kullanılan tampon çözeltisinin tespit solüsyonu ile uyumlu olması gerekir (Huang ve Yeung, 2005). Örneğin, tespit solüsyonunu aldehit grubundan kullanılmışsa, amin tamponu kullanılmaz. Çünkü TRİS, ikisi kovalent olarak reaksiyona girer ve her bileşenin istenilen etkisini en aza

indirir (Huang ve Yeung, 2005). Amin ve aldehit grubu kovalent bağlar ile reaksiyona girer ve bileşenlerin etkisini en aza indirir (Grizzle ve ark., 2008).

Tespit solüsyonu, hücreler ve dokular ile uyumlu uygun ozmotik konsantrasyonda olmalıdır. Böylelikle dokular şişmeyecekler ve küçülmeyeceklerdir. Tampon çözeltisi toksik olmamalı ve tespit sırasında morfolojik değişikliklere neden olmamalıdır (Huang ve Yeung, 2005).

Formaldehit (CH₂O)

Çoğu laboratuvarında yaygın olarak kullanılan koagüle olmayan çapraz bağlar oluşturan standart tespit solüsyonu % 10'luk formaldehittir. Formaldehit, birçok dokunun rutin tespiti için kullanılabilir (Adickes ve ark., 1997). Formaldehit, ideal bir fiksatif olarak kabul edilmesine rağmen etkisinin, yumuşak bir fiksatif olduğu düşünülmektedir (Prophet, 1992).

Tampon içermeyen formaldehitin raf ömrü kısalmır. Tampon içermeyen formaldehit yavaş yavaş formik aside oksitlenerek pH'da düşüşe sebep olur. Formik asit, asit formaldehit hematin ile reaksiyona girerek, kahverengi-siyah artefakt pigmenti oluşturur. Bu pigment, mikroorganizmalarla veya diğer patolojik pigmentlerle karışabileceği için sıkıntılıdır (Rolls ve ark., 1994). Formaldehit, keskin kokusu olan renksiz bir sıvı veya gazdır. Cilt ve solunum sistemini etkiler. Gözler, burun ve boğazda ani tahrişe neden olur (Prophet, 1992).

Formaldehit, reaktif hipoksi metil gruplarını oluşturmak için proteinlerin yan zincirleri ile reaksiyon halindedir. Nükleotidleri, serbest amino grupları ile tepkimeye sokarak modifiye edebilir. Formaldehit lipidleri ne korur ne de tahrip eder. Karmaşık lipidler için iyi bir fiksatifdir ancak nötr lipidler üzerinde hiçbir etkisi yoktur (Prophet, 1992). Formaldehit, doymamış lipidler ve kalsiyum iyonları mevcutsa reaksiyona girer, fakat karbonhidratlarla tepkimeye girmeme eğilimi gösterir (Eltoum ve ark., 2001). Formaldehit, lizin, arginin, sistein, tirozin, treonin, serin ve glutamin oluşturan reaktif kompleksleri oluşturan gruplarla reaksiyona girebilir ve bunlar birbirleri ile birleşerek metilen köprüleri (çapraz bağlantılar) veya hidrojen grupları

oluşturabilirler (Eltoum ve ark., 2001). Formaldehit ile tespit sonrası yıkama da dokularda önemli çapraz bağlar kalır (Eltoum ve ark., 2001). Formaldehit ile tespit işleminde hücredeki proteinlerin peptidlerini muhafaza etmesi oldukça önemlidir.

Formaldehit hücrenin proteinlerini çökeltmez fakat hücrenin diğer bileşenlerini hafifçe çökeltir. Bazı hücrenel bileşenleri (albümin vb.) doku takibi sırasında kullanılan alkollerin sertleştirmesini önler (Prophet, 1992). Karbonhidratlar için tercih edilmez fakat proteinleri korur, glikojen ve mukopolisakkaritler üzerinde herhangi bir etki göstermez (Albert ve Johnson, 1998; Mete, 2004).

Formaldehit ile tespit edilmiş dokularda aldehitler proteinlerin çapraz bağlanmasını sağlayarak metilen köprüleri oluşturur (Hewitson ve ark., 2010). Dokunun tespit solüsyonu ile proteinlere bağlanması nispeten hızlıdır fakat metilen köprülerinin oluşumu oldukça yavaş gerçekleşir. Bu nedenle formalin solüsyonu ile tespit işlemi uzun zaman gerektirir (Huang ve Yeung, 2005). Küçük dokuların tespiti büyük dokunun tespitinden daha kısa sürmektedir (Pabuççuoğlu, 2016).

Formaldehit ile tespit edilmiş doku örneklerinde bazı nükleer kabarcıklar görülebilir. Postfiksatif olarak asetik asit kullanıldığında dokularda görülen nükleer kabarcıklar engellenerek ve dokular daha parlak boyanması ve immünohistokimyasal boyamalarda antiijenlerin daha iyi boyandığı gözlenmiştir (Prophet, 1992).

Formaldehit solüsyonunun kendi kendine polimerleşmesini önlemek için dengeleyici olarak metanol ilave edilebilir. Formaldehit solüsyonu kullanılmayıp depolanmasının uzun sürmesi sonucu formik asit oluşumuna sebep olur (Huang ve Yeung, 2005). Metanol ve formik asit dokularda olumsuz etkiye sebep olur. Böyle bir durumda yeni bir formaldehit solüsyonu hazırlanır ve paraformaldehit (PFA) tozundan yapılır ve hemen kullanılmalıdır (Huang ve Yeung, 2005).

Formaldehit solüsyonunun, deriye veya göze temas etmesi veya solunum yoluyla solunması oldukça tehlikelidir. Formaldehit solüsyonunun tahriş edici, aşındırıcı ve alerjik duyarlılığa neden olduğu bilinmektedir. Formaldehit solüsyonunun kanserlere (nazofarangeal ve sinonasal) ve miyeloid lösemiye neden olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenlerden dolayı birçok ülkenin,

işyerinde işçilerin formaldehit solüsyonuna maruz kalmasını sınırlamak için sıkı kurallar vardır.

Formaldehit solüsyonun insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerine rağmen, formaldehit solüsyonu patoloji ve histoloji laboratuvarlarında rutin tespit solüsyonu olarak kullanılmaktadır. Formaldehitin tespit solüsyonu olarak rutinde kullanılması toksik tehdit oluşturduğundan birçok laboratuvar daha güvenli çalışma ortamı oluşturmaya çalışmaktadır. Üstelik, formaldehit solüsyonu eşdeğerinde bir tespit solüsyonu bulunmamaktadır. Formaldehit solüsyonu, moleküler yöntemler de dahil olmak üzere tüm boyama yöntemlerine izin vermesi ve ucuz olması gibi alternatifler içermektedir.

Bouin Tespit Solüsyonu

Bouin tespit solüsyonu suda doyurulmuş pikrik asit, 25 ml formalin ve buzlu gliseal asetik asit kullanılarak hazırlanır (Hewitson ve ark., 2010). Dokular Bouin solüsyonunda 6-24 saat bekledikten sonra elde edilen dokular %70'lik alkole aktarılırlar (Ding, 2015). Bouin solüsyonu ile tespit edilen dokular pikrik asitin nedeniyle olduğu sarı renk alırlar. Bu doz çok küçük biyopsiler için bir avantaj sağlar (Ding, 2015). Beyin ve embriyo dokuları gibi yumuşak ve narin dokular (beyin ve embriyo dokuları gibi), küçük biyopsiler ve özellikle testis biyopsilerinin tespiti için Bouin Fiksatif (BF) tercih edilir. Pikrik asit, nükleoproteinleri çöktürerek, sitoplazmik boyalarla parlak boyanma sağlar (Tapul ve ark., 2012). BF dokulara yavaş yavaş nüfus ettiği için böbrek dokusunun ve hücrelerdeki mitokondrianın yapısını bozar (Hewitson ve ark., 2010). Hücrenin glikojenini ve nükleusunu çok iyi korur, ancak dokunun büzülmesine sebep olur (Latendresse ve ark., 2002; Ananthanarayanan ve ark., 2005). Dokuda aşırı sertleşmeye yol açmaz. Eritrositler kısmen veya tamamen lizise uğrar ve demir ile küçük kalsiyum depoları çözünür.

Modifiye Davidson Tespit Solüsyonu

Formaldehit, distile su, ethanol ve gliseal asetik asitten meydana gelen tespit solüsyonudur. BF ile kullanılan pikrik asit yerine ethanol kullanılması tespit solüsyonunun hızlı penetrasyonunu sağlar ve formaldehit solüsyonuna kıyasla güvenlik ve atık sorunlarına neden olmaz, kullanımı basittir (Kelder ve ark., 2008). Solüsyondaki ethanol, hidrojen bağlarını ve üçüncül yapıları parçalayarak proteinleri denatüre eder. Ethanolün, penetrasyonu hızlı olduğu için gliseal asetik asit tarafından etkilenebilen aşırı büzülmeye neden olur (Ding, 2015). Spermatogenezin evrelendirilmesinde (Latendresse ve ark., 2002) ve göz morfolojisinin değerlendirilmesinde (Ding, 2015) tercih edilir.

Stieve's Tespit Solüsyonu

Formaldehit, distile su, merkürük klorit ve asetik asitten oluşan tespit solüsyonudur. Civalı tespit solüsyonu olduğu için metal kullanılmadan hazırlanır.

2.3.5. İyi Bir Tespit İşlemi İçin Dikkat Edilmesi Gerekenler

İdeal olarak seçilen tespit solüsyonu dokuların protoplazma yapısını değiştirmez ve çapraz bağlanarak stabilize elastik bir jel haline getirilir. Tüm organellerin doğal hallerini korur, fosfolipidleri stabilize eder. Maalesef ideal tespit solüsyonu yoktur. İyi bir tespit için dikkat edilmesi gerekenler:

1. Penetrasyon oranı: Tespit solüsyonunun penetrasyon hızı, difüzyon özelliklerine bağlıdır (Huang ve Yeung, 2005). Dokunun büyüklüğü 4 mm'yi geçmemelidir. Örneğin, formalin solüsyonu ile tespit işleminde 5 mm'lik (5² saat) bir doku için 25 saat süre gerekmektedir.
2. Konsantrasyonu: Farklı hücresel bileşenler, tespit maddesi ve tespit solüsyonu farklı konsantrasyonlarda farklı tepki verirler. Düşük konsantrasyon

içeren tespit solüsyonu uzun zaman gerektirebilir. Yüksek konsantrasyon içeren tespit solüsyonu enzim aktivitelerini yok ederek hasara sebep olabilir (Huang ve Yeung, 2005).

3. Süresi: Tespit için en uygun zaman tespit solüsyonları arasında değişiklik gösterir. İyi bir tespit işleminin gerçekleşmesi için, tespit solüsyonunun diffüzyonu ile dokunun merkezine kadar işlemesi için ve tespit reaksiyonlarının gerçekleşmesi için yeterli zaman verilmelidir. Tespit süresini kısa tutmak dokunun tespit solüsyonuna penetrasyonunu ve makromoleküllerin çapraz bağ oluşumunu engeller (Huang ve Yeung, 2005). Tespit süresinin uzun olması aşırı çapraz bağlanmaya neden olduğu için dokular kırılğan hale gelir (Huang ve Yeung, 2005).
4. Sıcaklık: Tespit ısısı arttıkça tespit solüsyonunun dokuya diffüzyon oranını artırır ve tespit ile doku elementleri arasında ki kimyasal reaksiyon oranını hızlandırır. Ayrıca dokuya tespit solüsyonunun ulaşmadığı kısımda dejenerasyon hızını arttıracaktır. Işık mikroskop çalışmaları için ilk olarak tespit solüsyonunun oda ısısında olması dokunun morfolojisini tam olarak koruması bakımından faydalıdır.
5. Dokunun boyutu: Tespit edilecek dokunun boyutunun 4 mm'den daha kalın olmamalıdır. İdeal olan doku kalınlığı 3 mm'dir.
6. Hacim oranı: Tespit solüsyonunun doku hacmine oranla fazla olması önemlidir. Tespit solüsyonunun dokuya oranının 50:1 olması iyi bir tespitini gerçekleştirmesini sağlar. Çünkü, tespit solüsyonundaki reaktif maddenin efektif konsantrasyonu tespit ilerledikçe tüketilir ve toplam hacimde tespitini kalitesini etkileyebilir.
7. pH ve tamponlar: Tespit solüsyonunun pH'ı dokunun pH'ına yakın olmalıdır. Formaldehitin formik asit olarak parçalanmasının asitli bir solüsyon ürettiği, bunda hemoglobin ile reaksiyona girerek artefakt pigmenti (asit formaldehit hematin) ürettiği bilinmektedir. Formaldehitte olduğu gibi başka tespit solüsyonlarında da önemli olmaktadır. Bu nedenle formaldehitin pH'ı

6,8-7,2'ye tamponlanmaktadır. Elektron mikroskopi çalışmalarında pH önemlidir ve fizyolojik pH ile eşleşmelidir (Carson, 1997).

8. Ozmolarite: Aşırı hipotonik ve hipertonic çözeltiler tarafından fosfolipid membranlar kolaylıkla zarar görebilir. Hipertonik solüsyonlar dokuların büzülmesine, hipotonik solüsyonlar ise dokuların şişmesine sebep olmaktadır. Tespit solüsyonunun hafif hipertonic olması istenmektedir (Huang ve Yeung, 2005).

Sonuç olarak kimyasal tespit kalitesini etkileyecek bir sürü değişken vardır. Elde edilecek görüntülerin 'yaşama uygun' olmasını sağlamak için sonuçları canlı hücre çalışmaları ile karşılaştırılmalıdır (Huang ve Yeung, 2005).

2.4. Stereoloji

Stereoloji, biyolojik araştırmalarda kantitatif histoloji için en iyi uygulama metodu olarak kabul edilir. Stereoloji, iki boyutlu verilerden elde edilen bilgiler ışığında üç boyutlu düzenlemeyi amaçlar. Morfolojik yapıların, tarafsız ve tekrarlanabilir bir şekilde, uygun izotropik ve düzgün bölmelerin tesadüfi örneklenecek düzenlemesini sağlar (Hewitson ve ark., 2010). Nesnenin şekli ve boyutu ya da ilgili parçacıkların frekansı veya hücreler hakkında önyargılı varsayımlarda bulunmadan, çeşitli parametrelerin doğru bir örnekleme tasarımı ile tahmin edilmesi için basit yöntemler sağlayan morfometrinin bir dalıdır (Kaplan ve Canan, 2012). Hücre ve yapıların sayılarını, uzunluklarını, alanlarını ve hacimlerini belirlemek için kullanılır.

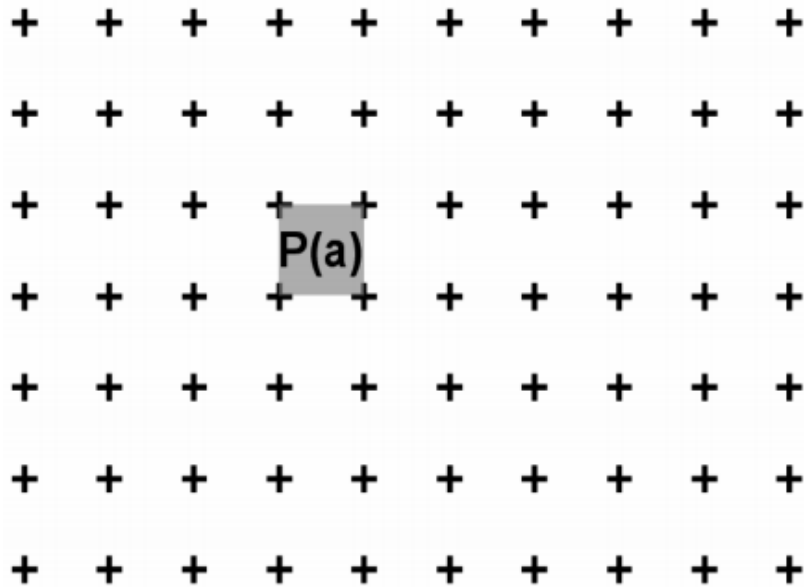
Stereoloji, deneysel hipotezleri doğrulamakta ve reddetmekte önemli rol oynamaktadır. Yani stereolojik tahminlerin sonucu, sistematik hata içermez (Kaplan ve Canan, 2012). Steroloji yöntemleri kullanılarak, Manyetik Resonans (MR) ve Bilgisayarlı Tomografi (BT) görüntüleri üzerinde hacim ve yüzey alanı tahminleri güvenilir bir şekilde yapılabilir (Acer ve ark., 2006).

Genetik ve moleküler teknikler, yapıların biyolojisine yardımcı olurlar. Biyomedikal araştırmacılar ise nicel yaklaşımlar ile dokuların, hücrelerin veya hücreyel organellerin sayısal değişiklikler hakkında morfoloji ve fonksiyon arasındaki korelasyonu araştırır (Hewitson ve ark., 2010).

Stereolojinin kantitatif çalışmalar üzerinde birkaç bilimsel avantajı vardır (Hewitson ve ark., 2010):

- İlk olarak, sonuçlar nümerikdir (öznel değil). Sonuçlar, tekrar edilebilir ve farklı laboratuvarların her zaman doğrulamaları daha kolaydır.
- Gruplar arası karşılaştırmalar kolayca yapılabilir. Özellikle hipotez testleri için faydalı olması sağlanır.
- Sayısallaştırmanın bilgisayar destekli analizidir.

Stereoloji doğrudan ölçüm yapmaz ve genelde test noktalarından veya test çizgilerinden oluşan test alanı ile ölçüm yapar. Stereolojide karşılaşılan zorluk, iki boyutlu bilgilerin analizi ile üç boyutlu düzenlemenin temelini anlatmaktır (Hewitson ve ark., 2010).



şekil 2.7. Noktalı alan ölçüm cetveli.

Stereoloji model temelli stereoloji ve tasarım temelli stereoloji olmak üzere iki alt dalda incelenir. Yapılan çalışmada stereoloji metodlarından Cavalier prensibi kullanılmıştır. Cavalier metodu uygulaması hem kolay, basit ve ucuz olması hem de testis bölgelerinin hacimlerini ayrı ayrı hesaplamaya uygun bir metod olduğu için tercih edilmiştir. Cavalier metodu sık kullanılan stereolojik hacim hesaplama yöntemidir (Howard ve Reed, 1998; Canan ve ark., 2002). Düzensiz bir şekle sahip üç boyutlu nesnelere hacimlerini, hücre sayılarını ve kesit yüzeylerini hesaplamaya yarayan bir yöntemdir. Stereolojide çok sık kullanılan izdüşüm alanı hesaplama yöntemi, Noktalı Alan Ölçüm Cetvelleri (NAÖC)'dir (Şekil 2.9). NAÖC yöntemi ile hacmini hesaplayacağımız yapı eşit kalınlıkta (t) ve paralel parçalara ayrılır. Yapının ilk kesiti mutlaka rastgele örnekleme ile alınmalıdır. Bu örneklemede kesitlerin aralığı ve kalınlığı sabit olmalıdır. NAÖC'de yer alan her artı işaretinin ortası, cetvelin bir noktasını verir ve dört adet nokta arasındaki kısım birim cetvel alanını yani P(a)'yı oluşturur. Cetveldeki her nokta birim alanı temsil ettiği için izdüşüm içerisine düşen toplam nokta sayısı olan $\sum P_i$ ile birim alan değerinin ile çarpılması ilgilenilen izdüşümün toplam alanını yani A_i 'yi verir.

$$A_i = \sum P_i \cdot P(a)$$

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezinden elde edilen Sprague Dawley cinsi erişkin 200-350 gram ağırlığında 20 adet erkek sıçan kullanıldı. Deney süresince sıçanlara içme suyu olarak çeşme suyu verildi ve sıkıştırılmış pelet yemler ile beslendi. Oda sıcaklığında bulunan sıçanlar; 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık periyotlar da barındırıldı.

Tez çalışması için gerekli tüm deneysel işlemler Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.10.2015 tarihli ve 2015-12/07 sayılı toplantısında alınan Etik Kurul İzni ile gerçekleştirildi (bkz. EK-2).

3.2. Dokuların Eldesi

Yüksek dozda eter inhalasyon anestezisi uygulanan sıçanlar servikal diskolasyon ile feda edildi. Servikal dislokasyonun ardından deneklerin vücut ağırlıkları ölçüldü. Skrotal kesi ile çıkartılan sağ ve sol testislerin ağırlıkları ise şu şekilde belirlendi; içerisinde 150 ml fosfat tamponlu salin (PBS) bulunan beher kabı hassas terazi üzerine oturtuldu. Kap ve içerisindeki sıvının darası alındı. Deneklerden çıkartılan testisler, sıvı içerisine atılarak ağırlıkları belirlendi. Fiksatifin testis içerisine penetrasyonunu kolaylaştırmak ve hızlandırmak için her bir testisin tunika albuginea tabakası en az 15 farklı yerinden 18 gauge iğne ile delindi. Arkasından numaralandırılan ve gazlı bez ile boğçalan testisler dört farklı fiksatiften birisi içerisinde fikse edilmeye başlandı. Aynı hayvandan elde edilen sağ ve sol testisin farklı fiksatifler ile fikse edilmesine dikkat edildi (Tablo 3.1.).

Tablo 3.1. Hayvanların ve tespit solüsyonlarının belirlenmesi.

Sıçan numarası	Doku numarası	Testis	Tespit solüsyonu
1	1	Sağ testis	% 10 NTF
	2	Sol testis	BF
2	3	Sağ testis	% 10 NTF
	4	Sol testis	mDF
3	5	Sağ testis	% 10 NTF
	6	Sol testis	Stieve's
4	7	Sağ testis	mDF
	8	Sol testis	BF
5	9	Sağ testis	BF
	10	Sol testis	Stieve's
6	11	Sağ testis	mDF
	12	Sol testis	Stieve's
7	13	Sağ testis	% 10 NTF
	14	Sol testis	BF
8	15	Sağ testis	% 10 NTF
	16	Sol testis	mDF
9	17	Sağ testis	% 10 NTF
	18	Sol testis	Stieve's
10	19	Sağ testis	BF
	20	Sol testis	mDF
11	21	Sağ testis	BF
	22	Sol testis	Stieve's
12	23	Sağ testis	mDF
	24	Sol testis	Stieve's
13	25	Sağ testis	% 10 NTF
	26	Sol testis	BF
14	27	Sağ testis	% 10 NTF
	28	Sol testis	mDF
15	29	Sağ testis	% 10 NTF
	30	Sol testis	Stieve's
16	31	Sağ testis	BF
	32	Sol testis	mDF
17	33	Sağ testis	BF
	34	Sol testis	Stieve's
18	35	Sağ testis	mDF
	36	Sol testis	Stieve's
19	37	Sağ testis	% 10 NTF
	38	Sol testis	BF
20	39	Sağ testis	mDF
	40	Sol testis	Stieve's

Çalışmada kullanılan fiksatifler şu şekilde hazırlandı;

%10 NTF (Bancroft ve Stevens, 2008)

Musluk suyu	900 ml
Formalin (%37'lik Formaldehit solüsyonu).....	100 ml
Sodyum Fosfat Monobazik Monohidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$).....	4 gr
Sodyum Fosfat Dibazik Anhidroz (Na_2HPO_4).....	6.5 gr

900 ml musluk suyu içerisinde Sodyum Fosfat Monobazik Monohidrat ile Sodyum Fosfat Dibazik Anhidroz karıştırılarak eritilir. Üzerine 100 ml formalin eklenir ve karıştırılır.

BF (Bancroft ve Stevens, 2008)

Sature sulu pikrik asit solüsyonu	1500 ml
Formalin (%37'lik Formaldehit solüsyonu)	500 ml
Gliseal asetik asit	100 ml

Öncelikle sature sulu pikrik asit hazırlanır. Distile su ile yapılan %2.1'lik pikrik asit sature bir solüsyon oluşturacaktır. 1500 ml satüre pikrik asit solüsyonuna sırasıyla formalin ve gliseal asetik asit eklenir.

mDF (Bancroft ve Stevens, 2008)

Distile su	500 ml
Formalin (%37'lik Formaldehit solüsyonu)	300 ml
Ethanol	150 ml
Gliseal asetik asit	50 ml

Tüm sıvılar belirtilen hacimlerde ve sırayla karıştırılarak çözelti hazırlanır.

Stieve's Fiksatif (Petersen ve ark., 2014)

Distile su	760 ml
Merkürit klorit	50 gr
Formalin (%37'lik Formaldehit solüsyonu)	200 ml
Gliseal asetik asit	40 ml

Öncelikle merkürit klorit distile su içerisinde eritilir. Arkasından formalin ve gliseal asetik asit eklenir.

Bohça içerisinde ki testis dokuları 5 saat süre ile fikse edildikten sonra her bir testis ortadan enine olacak şekilde iki parçaya ayrıldı. 65mm x 50mm x 18mm boyutlarındaki doku kasetlerine yerleştirilen testislerin aynı fiksatif içerisinde tespitine devam edildi.

%10 NTF Fiksatif içerisinde bulunan dokular tespit aşaması için 48 saat fiksatifte bekletildi. Bouin Fiksatif, mDF, Stieve's Fiksatif içerisinde bulunan dokular tespit aşaması için 24 saat fiksatifte bekletildi.

3.3. Doku Takibi ve Gömme

Testis dokularının tespiti tamamlandığında doku takibine başlandı.

- %10 NTF Fiksatif içerisindeki dokular 48 saat tespit solüsyonunda bekletildi. Tespit işlemi tamamlandıktan sonra dokular akan çeşme suyuna alınarak 4 saat yıkandı. Akan çeşme suyundan sonra dokular %70'lik alkol içerisinde alındı ve 48 saat %70'lik alkol içerisinde ve daha sonra %90'lık alkole alınarak doku takibine başlandı (Tablo 3.2).
- BF ile tespit edilen dokular 24 saat tespit solüsyonunda bekletildikten sonra %70'lik alkol içerisinde alındı ve 48 saat sonunda %70'lik alkol değiştirildi.

Bu dokular %70 lik alkol içerisinde toplamda 120 saat bekletildikten sonra %90'lık alkole alınarak doku takibine başlandı (Tablo 3.2).

- mDF ile tespit edilen dokular 24 saat tespit solüsyonunda bekletildikten sonra %70'lik alkol içerisine alındı ve 48 saat sonunda %90'lık alkole alınarak doku takibine başlandı (Tablo 3.2).
- Stieve's Fiksatif ile tespit edilen dokular 24 saat tespit solüsyonunda bekletildikten sonra dokular %70'lik alkol içerisinde 96 saat sonunda %90'lık alkole alınarak doku takibine başlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Doku takip protokolü.

1. Gün	09:00	%70 Alkol
1. Gün	16:00	%90 Alkol
2. Gün	16:00	%96 Alkol I
3. Gün	09:00	%96 Alkol II
4. Gün	16:00	%100 Alkol I
5. Gün	09:00	%100 Alkol II
5. Gün	10:00	%100 Alkol III
5. Gün	11:00	Ksilen I
5. Gün	11:15	Ksilen II
5. Gün	11:30	Ksilen III
5. Gün	11:45	Parafin I
5. Gün	12:30	Parafin II
5. Gün	13:00	Parafin III
5. Gün	14:00	Bloklama

3.4. Kesit Alma

Testis dokularına, doku takibi işlemi tamamlandıktan sonra parafin bloklama işlemi yapıldı. Daha önce enine iki eşit parçaya bölünmüş olan dokular bir kez daha iki eşit parçaya bölünerek bir testis dokusundan dört eşit parça elde edilmiş oldu. Dokular bloklanırken kesit yüzeylerinin devamlılığına dikkat edildi.

Stereolojik metodlar ile hacim hesaplamasında her bir organdan en az 10-15 adet kesit elde edilmesi gereklidir. Öncelikle; kesit örneklem oranımızı belirlemek için 1 numaralı testis dokusu dokunun başından sonuna kadar kesildi Thermo Fisher Scientific Shandon Finesse 325 model mikrotom ile alınan kesitler 5 µm kalınlığındaydı. Elde edilen kesit sayısına göre; kesit örneklem oranının 1/250 olmasına karar verildi. Ayrıca hem diğer boyamalarda kullanılması hem de yedek kesit havuzu oluşturması amacı ile belirlenen kesitten sonraki 2 kesitte lama alındı.

3.5. Boyama

Testis dokularından elde edilen kesitlere şu dört boyama uygulandı; HE boyaması, PAS boyaması, MTC boyaması ve TUNEL boyaması.

Sayıları 10-17 arasında olan tüm seri kesitler HE ile boyandı. HE boyalı kesitler morfolojinin değerlendirilmesi ve Cavalieri yöntemi ile hacim hesaplaması amacıyla kullanıldı. Yedek kesit havuzunda yer alan lamlar ise PAS, MTC ve TUNEL ile boyandı. PAS boyaması bazal membranın değerlendirilmesi amacıyla, MTC boyaması bağ dokunun değerlendirilmesi amacıyla, TUNEL boyaması ise apoptozun değerlendirilmesi amacıyla uygulandı.

HE Boyaması

Mayer's Hematoksilen ve Eozin Y solüsyonları şu şekilde hazırlandı:

Mayer's Hematoksilen solüsyonu (Bancroft ve Stevens, 2008):

- Hematoksilen 1 gr
- Distile su 1000 ml
- Sodyum iodat 0,2 gr
- Potasyum veya amonyum alum 50 gr
- Sitrik asit 1 gr
- Kloral hidrat SRL 50 gr veya
- Kloral hidrat AR 50 gr

Hematoksilen, distile su, potasyum alum ve sodyum iyodat ısıtılarak çözünmesi beklenir. Klor hidrat ve sitrik asit eklenir ve 5 dakika kaynatılır. Kaynatılan çözeltinin soğuması beklenir ve soğuduktan sonra süzülür.

Eozin Y solüsyonu (Bancroft ve Stevens, 2008):

- Distile su 1000 ml
- Eozin Y 10 gr
- Timol 1 kristal
- Gliseal asetik asit 0,5 ml

Eozin Y, distile su içerisinde eritilir. Daha sonra timol eklenerek homojen karışım olması sağlanır. En son olarak gliseal asetik asit eklenir.

Lamlar 60 derecelik etüvde 20 dakika beklettikten sonra HE boyaması uygulandı (Tablo 3.3.).

Tablo 3.3. HE boyama yöntemi.

Ksilol	2×5 dakika
% 100, %96, %70 etil alkol	3'er dakika
Distile su	2-3 dakika
Mayer's Hematoksilen	8 dakika
Musluk suyu	5 dakika
%1'lik Asit alkol	2-3 saniye
Musluk suyu	2 dakika
Amonyaklı su	5 saniye
Distile su	2 dakika
Eozin Y	3 dakika
% 70, %96, %100 etil alkol	3'er dakika
Ksilol	2×5 dakika

PAS Boyama yöntemi

PAS boyaması, testis dokusunda bazal membranları inceleyebilmek amacıyla yapıldı. Periyodik asit çözeltisi ve schiff reaktifi şu şekilde hazırlandı:

Periyodik asit çözeltisi (Bancroft ve Stevens, 2008):

- Periyodik asit 1 gr
- Distile su 200 cc

Periyodik asit, distile su içerisinde eritilir.

Schiff reaktifi (Bancroft ve Stevens, 2008):

- Kaynamış distile su 200 ml
- Bazik fuksin 1 gr
- Potasyum metabisülfid 2 gr
- %10'luk HCL 10 cc
- Karbon tozu 0.5 gr

Kaynamış distile su içerisinde bazik fuksin ilave edilir. Çözelti 50 dereceye kadar soğuduğunda Potastum Metabisülfid ($K_2S_2O_2$) eklenir ve iyice karıştırılır. Çözelti oda ısısına geldiğinde konsantre HCL ekleyip karıştırılır ve karbon tozu ilave edilip güzelce karıştırılır. Oluşan çözelti şeffaf renktedir ve $+4^{\circ}C$ 'de buzdolabında saklanır.

Lamlar 60 derecelik etüvde 20 dakika beklettikten sonra PAS boyaması uygulandı (Tablo 3.4.).

Tablo 3.4. PAS boyama yöntemi.

Ksilol	2×5 dakika
% 100, %96, %70 etil alkol	3'er dakika
Distile su	2-3 dakika
Periyodik asit	5 dakika
Distile su	5 dakika
Schiff reaktifi	15 dakika
Musluk suyu	5 dakika
Mayer's hematoksilen	3 dakika
Musluk suyu	8 dakika
% 70, %96, %100 etil alkol	3'er dakika
Ksilol	2×5 dakika

MTC Boyama yöntemi

MTC boyaması, testis dokusunun bağ dokusunu inceleyebilmek amacıyla yapıldı. Solüsyon A, B, C ve Harris hematoksilen şu şekilde hazırlandı:

Solüsyon A (Bancroft ve Stevens, 2008):

- Asit fuksin0.5 gr
- Gliseal asetik asit0.5 ml
- Distile su 100 ml.

Asit fuksin, distile su içerisinde eritilir. Daha sonra çözeltiliye gliseal asetik asit eklenerek homojen karışım olması sağlanır.

Solüsyon B (Bancroft ve Stevens, 2008):

- Fosfomolibtik asit 1 gr
- Distile su 100 ml.

Fosfomolibtik asit distile su içerisinde eritilerek homojen karışım elde edilir.

Solüsyon C (Bancroft ve Stevens, 2008):

- Light Green2 gr
- Gliseal asetik asit2.5 ml
- Distile su 100 ml.

Light Green, distile su içerisinde eritilir. Daha sonra çözeltiye gliseal asetik asit eklenerek homojen karışım olması sağlanır.

Harris hematoksilen (Bancroft ve Stevens, 2008):

- Hematoksilen2.5 gr
- Absolü alkol25 ml
- Potasyum alum50 gr
- Distile su500 ml
- Gliseal asetik asit20 ml
- Merkür oksit1.25 gr veya
- Sodyum iodat0.50 gr

Hematoksilen alkol içerisinde düşük ısıda eritilir. Daha sonra karışıma Potasyum alum ve Sodyum alum ilave edilir ve hızlı bir şekilde kaynaması sağlanır. Çözelti kaynamaya başlayınca ocağın altından alınır. Kaynayan karışıma Merkür oksit azar azar ilave edilir. Çözelti koyu mor renk alınca soğuk su dolu bir kap içerisinde tutularak soğuması sağlanır. Oluşan çözelti daha olgun olması için 3 gün sonra kullanılmak üzere koyu renkli bir şişeye alınıp ağzı sıkıca kapatılarak karanlıkta oda ısısında saklanır. Boya kullanacağı zaman gliseal asetik asit ilave edilir (Bancroft ve Stevens, 2008).

Lamlar 60 derecelik etüvde 20 dakika beklettikten sonra MTC boyaması uygulandı (Tablo 3.5.).

Tablo 3.5. MTC boyama yöntemi (Bancroft ve Stevens, 2008).

Ksilol	2×5 dakika
% 100, %96, %70 etil alkol	3'er dakika
Distile su	2-3 dakika
Harris Hematoksilen	15 dakika
Musluk suyu	5 dakika
%1'lik Asit alkol	2-3 saniye
Musluk suyu	5 dakika
Amonyaklı su	5 saniye
Musluk suyu	5 dakika
Solüsyon A	5 dakika
Distile su	2 dakika
Solüsyon B	5 dakika
Solüsyon C	2 dakika
Distile su	2 dakika
%1'lik asetik asit	2 dakika
% 70, %96, %100 etil alkol	3'er dakika
Ksilol	2×5 dakika

TUNEL Boyama Yöntemi

TUNEL boyaması, testis dokusundaki hücrelerde DNA fragmantasyonunu belirleyebilmek ve dokudaki apoptotik hücrelerin boyanması amacıyla yapıldı. TUNEL boyama yöntemi üretici firmanın (Apoptag Plus Peroksidaz In situ apoptosis Kiti, Chemicon International, S7101) talimatları doğrultusunda uygulanmıştır. Pozitif yüklü lamlar 60 derecelik etüvde 20 dakika beklettikten sonra TUNEL boyaması uygulandı (Tablo 3.6.).

Tablo 3.6. TUNEL boyama yöntemi.

Ksilol	2×5 dakika
% 100, %96, %70 etil alkol	3'er dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline), DAB (3,3'-diaminobenzidine)	5 dakika
Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir	
1:500 dilüsyondaki Proteinaz K solüsyonu	7 dakika
PBS	3×5 dakika
Endojen tampon solüsyonu	5 dakika
PBS	3×5 dakika
Equilibration tampon solüsyonu	6 dakika
Çalışma solüsyonu (% 77 µl Reaction Buffer + %33 TdT Enzyme)	60 dakika
Stop/Wash Buffer (1ml)+Distile su (34 ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
PBS	3×5 dakika
DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
PBS	3×5 dakika
Distile su	5 dakika
Harris hematoksilen	3-5 dakika
Distile su	5 dakika
% 70, %96, %100 etil alkol	3'er dakika
Ksilol	2×5 dakika

3.6. Testis Hacminin Stereolojik Yöntemlerle Hesaplanması

Çalışmada kullanılan 20 adet erişkin erkek sıçanlardan elde edilmiş 40 adet testisin hacmi Cavalieri Yöntemi ile hesaplandı. Tüm testis dokularından randomize sistematik örnekleme yöntemi ile 1/250 örnekleme oranı kullanılarak seçilen kesitler HE ile boyandı. Boyalı preparatlar Olympus BX53 mikroskopla 1.25x objektif kullanılarak dijital kamera (Olympus DP73 CCD renkli kamera 17.28 megapiksel) ile fotoğraflandı. Böylece her bir testisten elde edilen ve sayıları 10 ile 17 arasında değişen HE boyalı kesitler fotoğraflanmış oldu.

Elde edilen fotoğraflar kullanılarak Cavalier yöntemi ile testis hacminin hesaplanmasında STEPan izer isimli yazılım kullanıldı (Tschanz ve ark., 2010). Görüntüler üzerine yerleştirilen noktalı alan sayım cetveli kullanılarak herbir organ için toplam nokta sayısı hesaplandı. Her organda nokta sayısı en az 100 idi. Hacim hesaplaması şu formül kullanılarak gerçekleştirildi:

$$V = t \times (a/p) \times \Sigma P$$

V: hacim

t: kesit kalınlığı

(a/p): nokta alanı

ΣP : toplam nokta sayısı

Yapılan hacim hesaplamalarının hassasiyeti birbirinden bağımsız iki faktörün işlevidir. Bunlardan birincisi noise effect olarak adlandırılır. Noise effect şu formül ile hesaplandı:

$$\text{Noise} = 0.0724 \times \frac{B}{\sqrt{A}} \times \sqrt{n \times \Sigma P}$$

$\frac{B}{\sqrt{A}}$: ortalama profil şekli (5 olarak kabul edildi).

ΣP : toplam nokta sayısı

n: kesit sayısı

Diğeri ise toplam alan varyansıdır. Toplam alan varyansı şu şekilde hesaplandı.

$$\text{VAR}_{\text{SURS}} (\Sigma \text{alan}) = \frac{3(A - \text{Noise}) - 4B + C}{240}$$

$$A = P_i \times P_i$$

$$B = P_i \times P_{i+1}$$

$$C = P_i \times P_{i+2}$$

Ardından total varyans hesaplandı.

$$\text{Total varyans } \Sigma P = \text{Noise} + \text{VAR}_{\text{surs}} (\Sigma \text{alan})$$

Son olarak CE (ΣP) değeri hesaplandı.

$$CE (\Sigma P) = \frac{\sqrt{Total\ Varyans}}{\Sigma P}$$

3.7. İstatiksel İnceleme

Gruplardan elde edilen veriler Kruskal-Wallis Testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ olması durumu anlamlı olarak değerlendirildi. Test sonucu anlamlı çıkan değişkenler Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U Testi yapıldı ve $p < 0.0083$ anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında erişkin erkek sıçanlardan elde edilen 40 adet testis dokusu 4 farklı fiksatif ile tespit edildi. Dokulardan alınan kesitler ile HE, PAS, MTC ve TUNEL boyaları boyandı. HE boyalı preparatlar Cavalieri yöntemi ile organ hacmi hesaplamasında kullanıldı. Bu çalışma ile farklı fiksatiflerin;

- Organ yapısı üzerindeki etkisinin incelenmesi,
- Organ kesitlerinin histokimyasal yöntemler ile boyanması üzerindeki etkisinin incelenmesi,
- Organ kesitlerinin TUNEL yöntemi ile boyanması üzerindeki etkisinin incelenmesi,
- Cavalieri yöntemi ile organ hacminin tahmini üzerindeki etkisinin incelenmesi,
- Organda neden olduğu çekmenin incelenmesi amaçlandı.

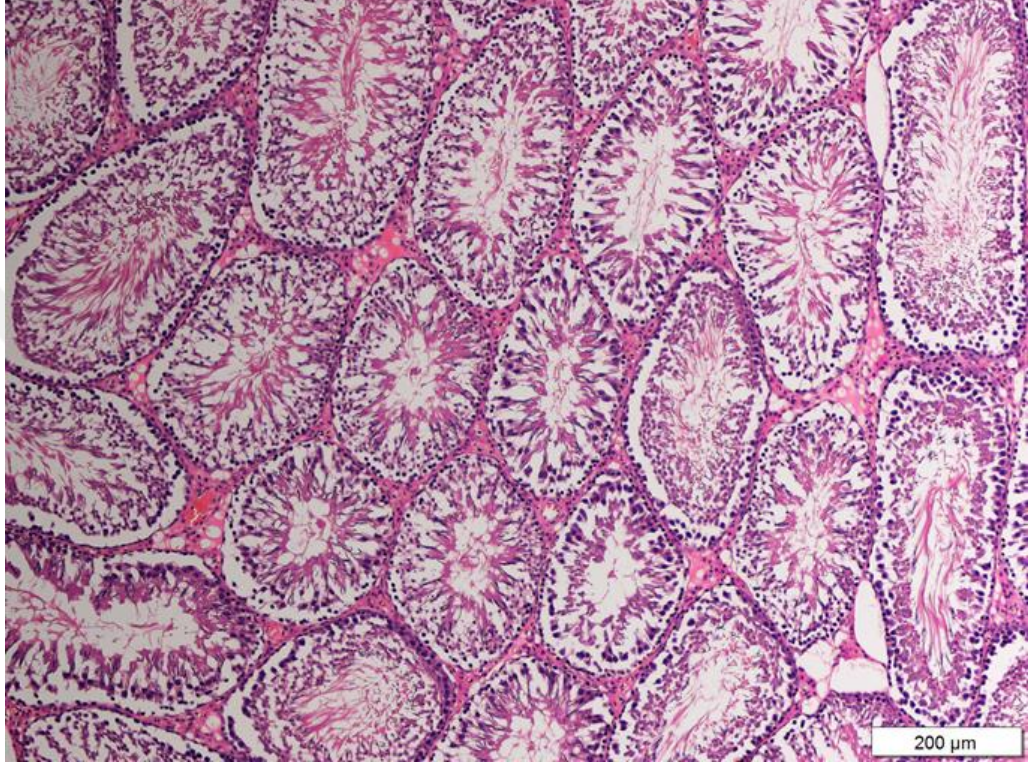
Bu amaçlar doğrultusunda elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

4.1. Farklı Fiksatiflerin Testis Morfolojisi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

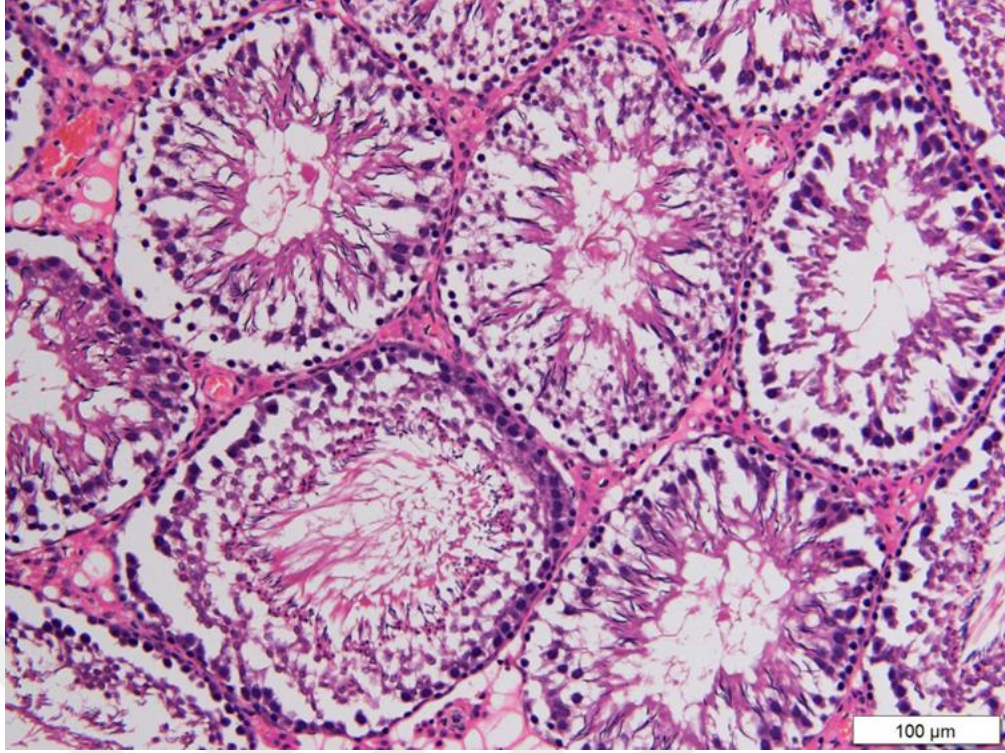
HE boyama yöntemi ile fiksatiflere ait testis dokularının incelenmesi sonucunda, seminifer tübüller, bazal membran, spermatogenik hücreler, lümen ve intertisyel alanların hücresel detay boyanma netliği değerlendirildi.

%10 NTF Fiksatifine ait kesitlerin HE boyanması incelendiğinde, hücresel detayın çok net olmadığı ve seminifer tübül büzüşmeleri gözlemlendi (Şekil 4.1. - 4.3.). BF'ye ait kesitlerin HE boyanması incelendiğinde, hücresel detayın biraz daha iyi olduğunu ve seminifer tübül büzüşmeleri daha az gözlemlendi (Şekil 4.4. - 4.6.).

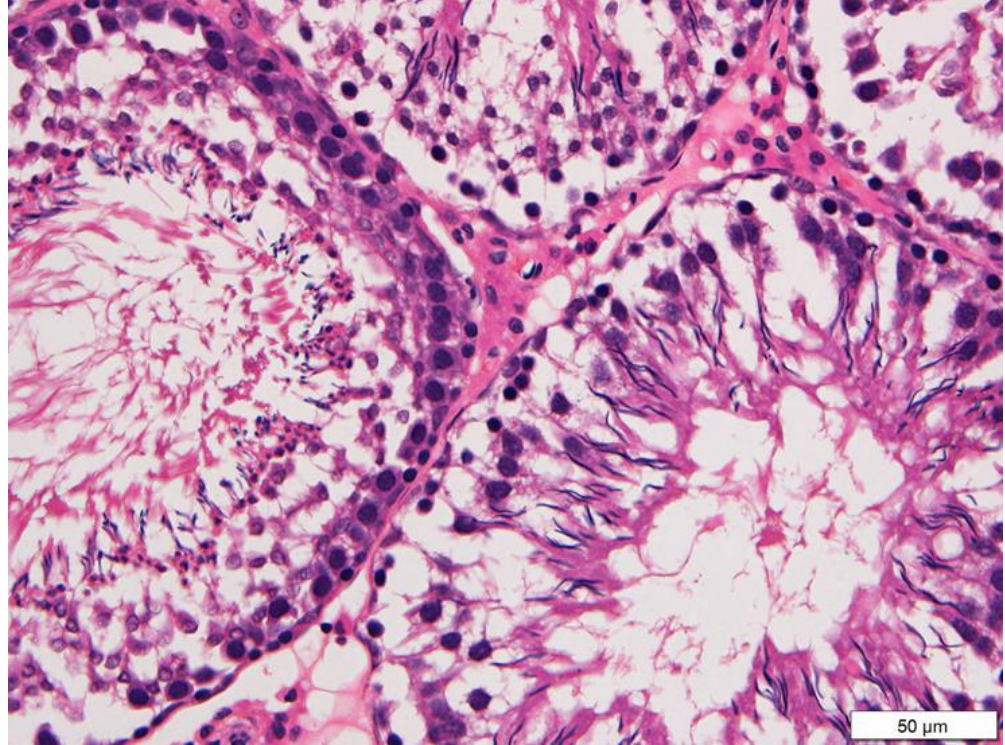
mDF'ye ait kesitlerin HE boyanması incelendiğinde, hücresel detayın çok net gözlemlendiği ve seminifer tübül büzüşmelerinin çok az olduğu onun da organın merkezinde olduğu gözlemlendi (Şekil 4.7. - 4.9.). Stieve's Fiksatifine ait kesitlerin HE boyanması incelendiğinde, hücresel detayın çok iyi olduğu görüldü ve seminifer tübüllerde büzüşme gözlenmedi (Şekil 4.10. - 4.12.).



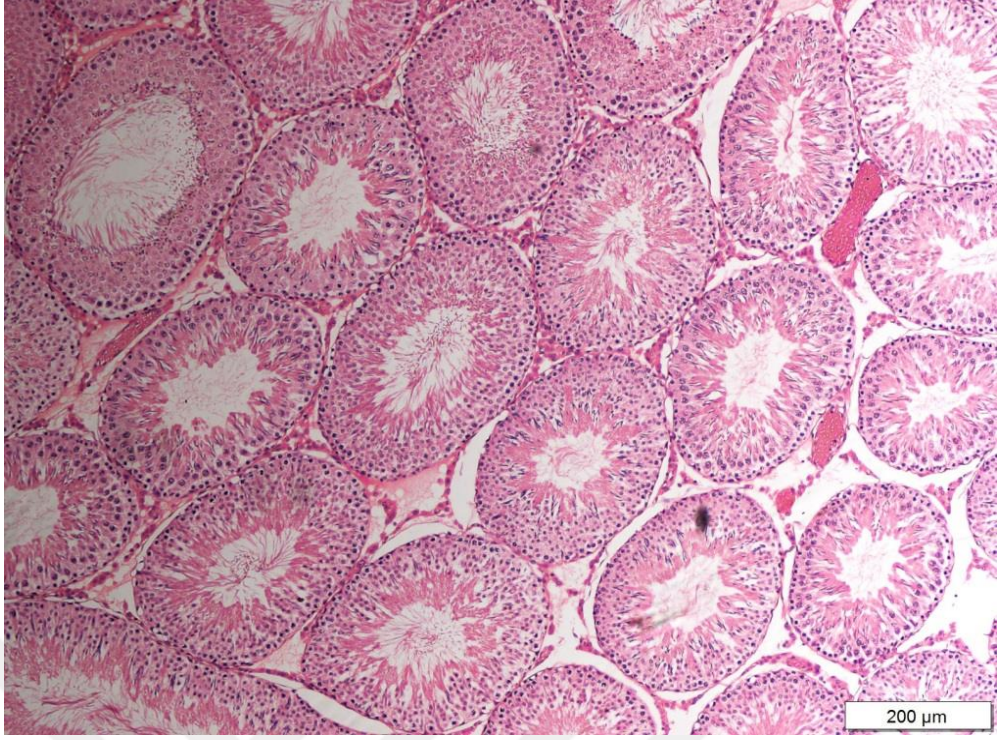
Şekil 4.1. %10 NTF Fiksatifine ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x10



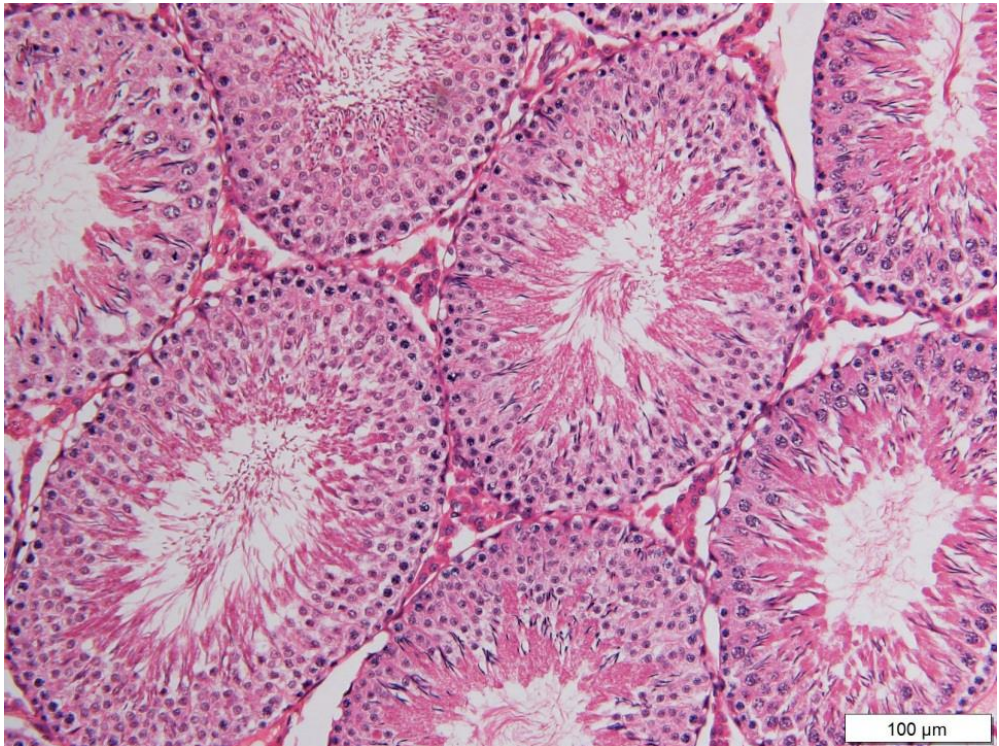
Şekil 4.2. %10 NTF Fiksatifine ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x20



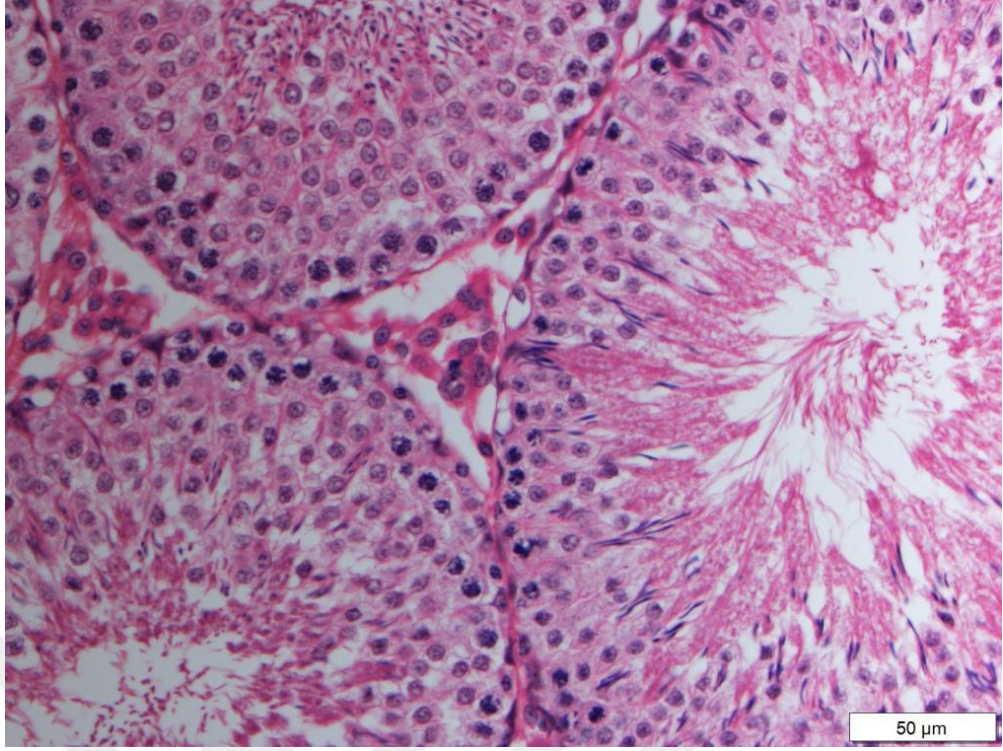
Şekil 4.3. %10 NTF Fiksatifine ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x40



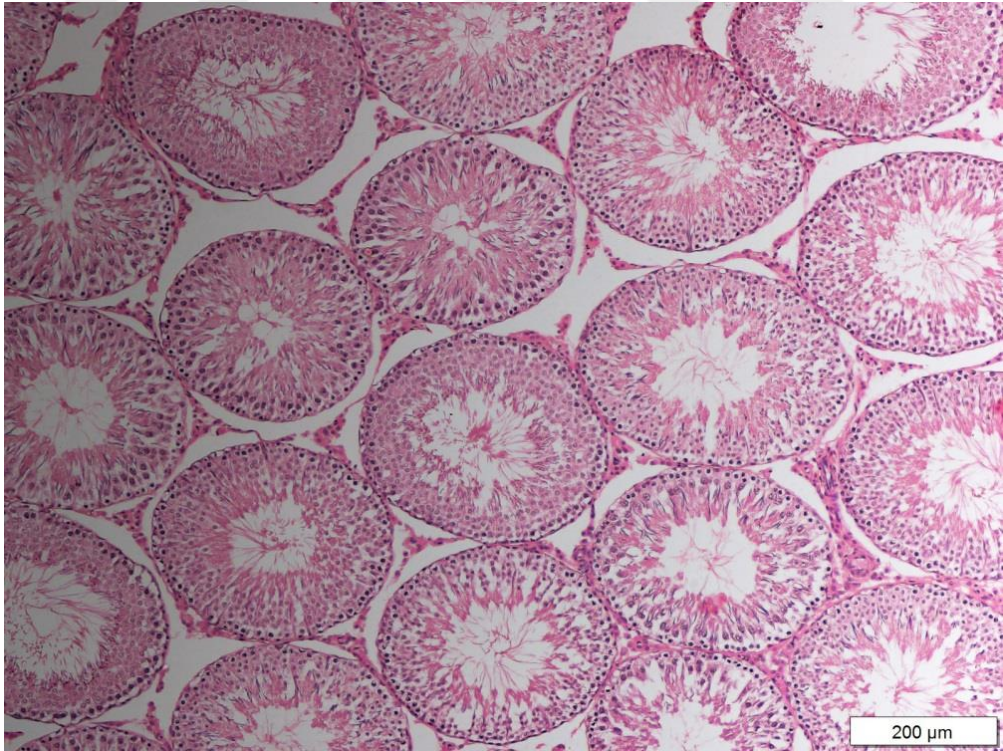
Şekil 4.4. BF'ye ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x10



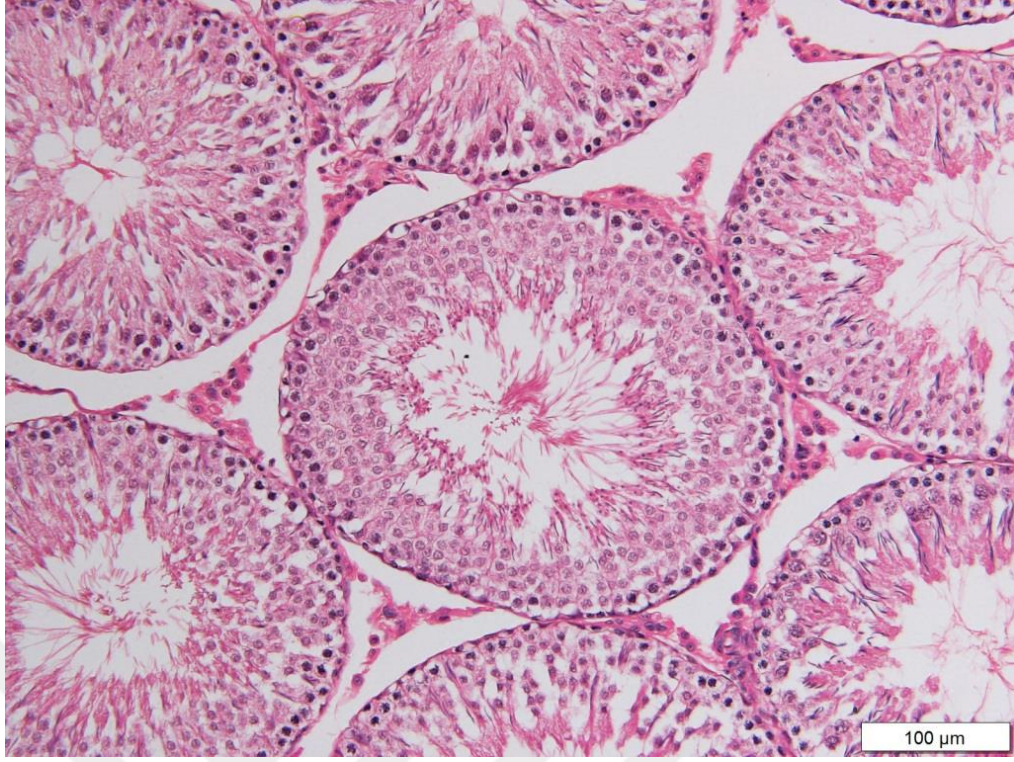
Şekil 4.5. BF'ye ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x20.



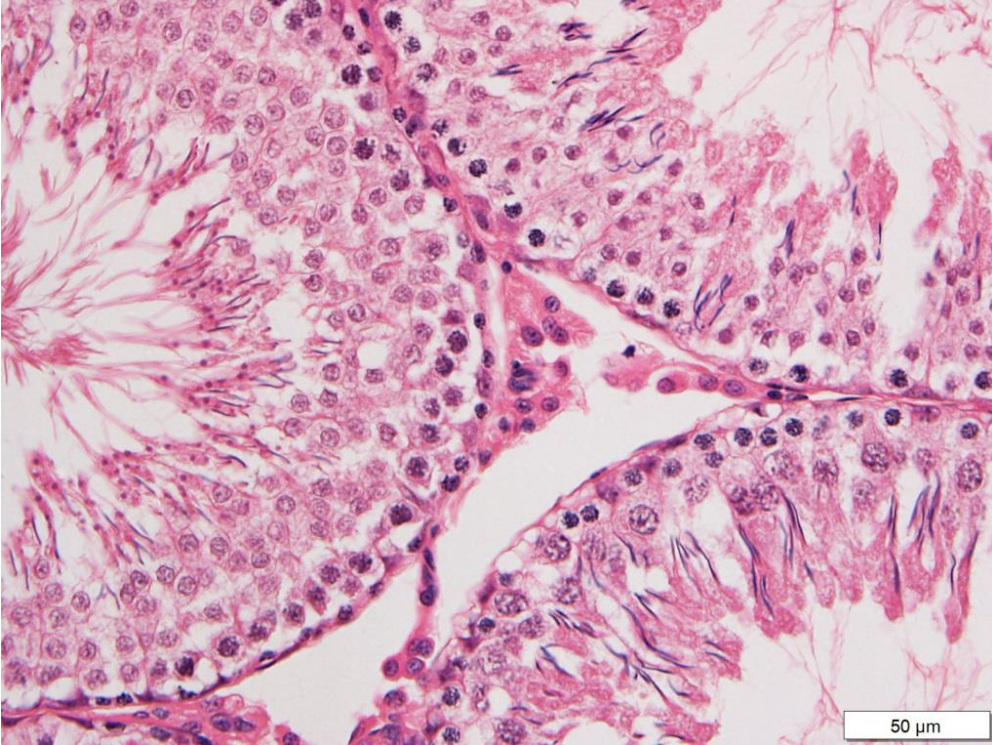
Şekil 4.6. BF'ye ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x40.



Şekil 4.7. mDF'ye ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x10.



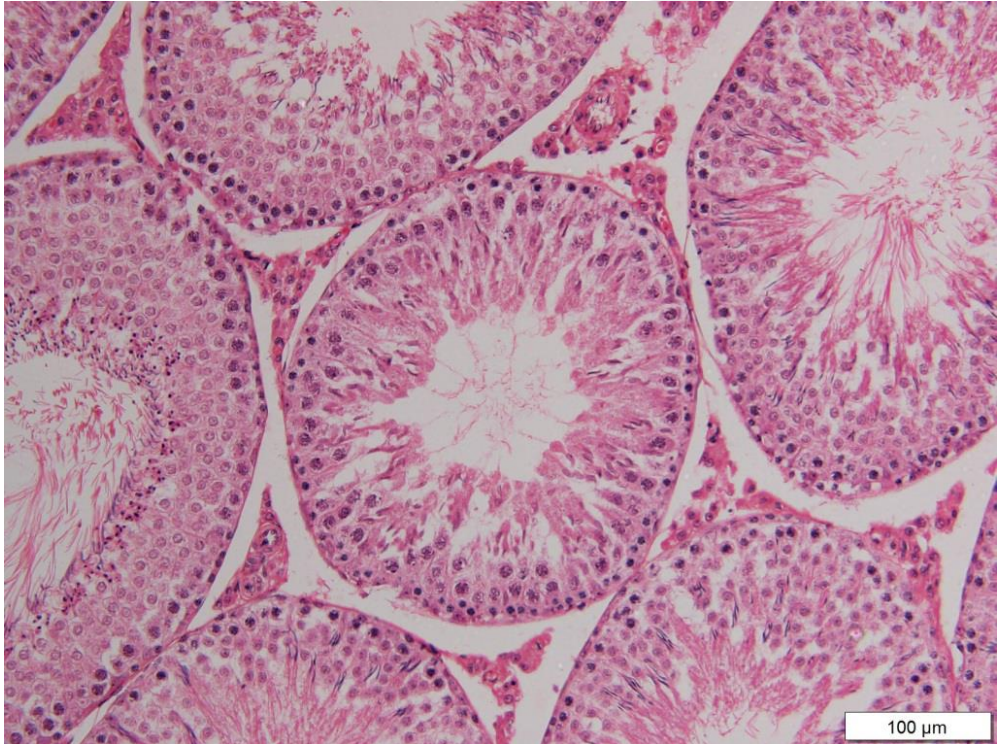
Şekil 4.8. mDF'ye ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x20.



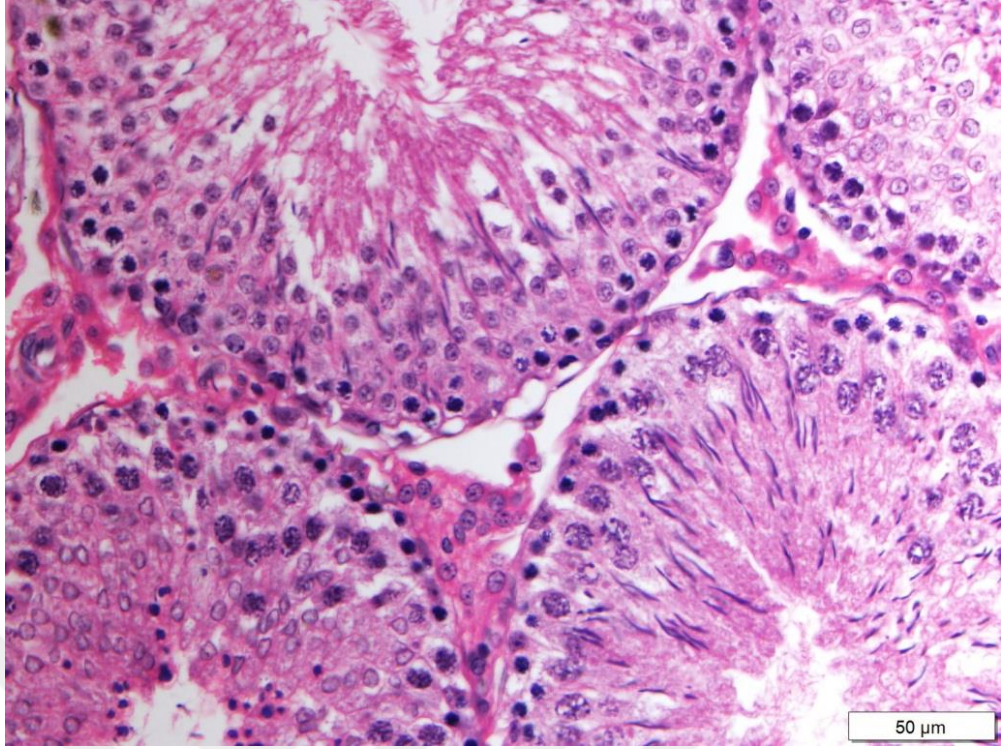
Şekil 4.9. mDF'ye ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x40.



Şekil 4.10. Stieve's Fiksatifine ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x10.



Şekil 4.11. Stieve's Fiksatifine ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x20.

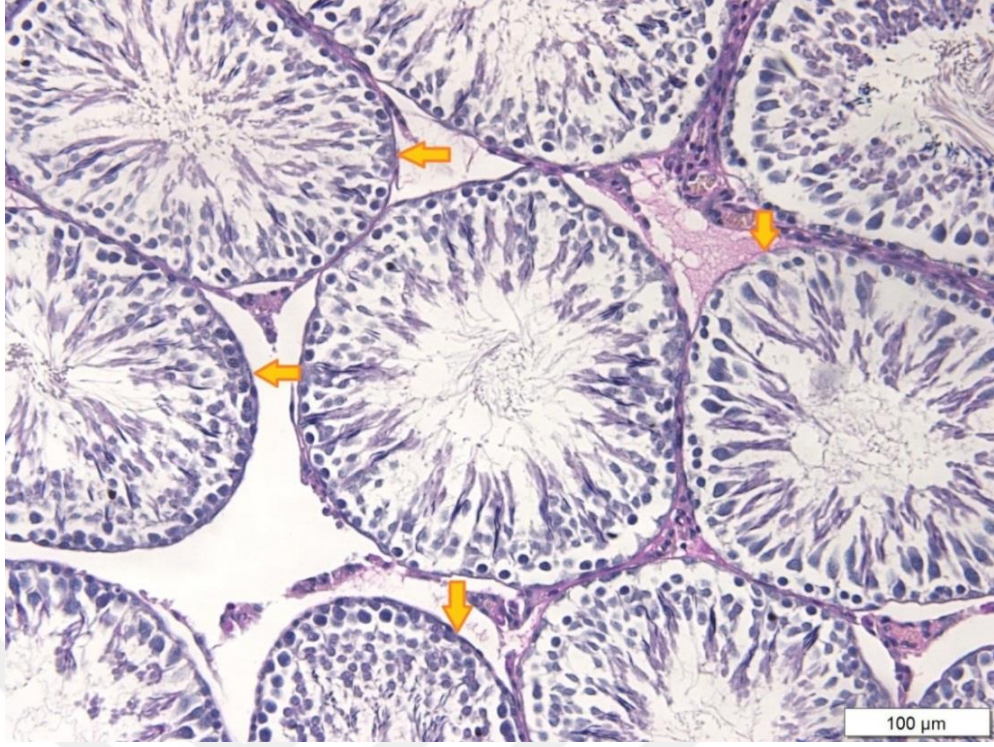


Şekil 4.12. Stieve's Fiksatifine ait testis dokusunun HE boyama görüntüsü x40.

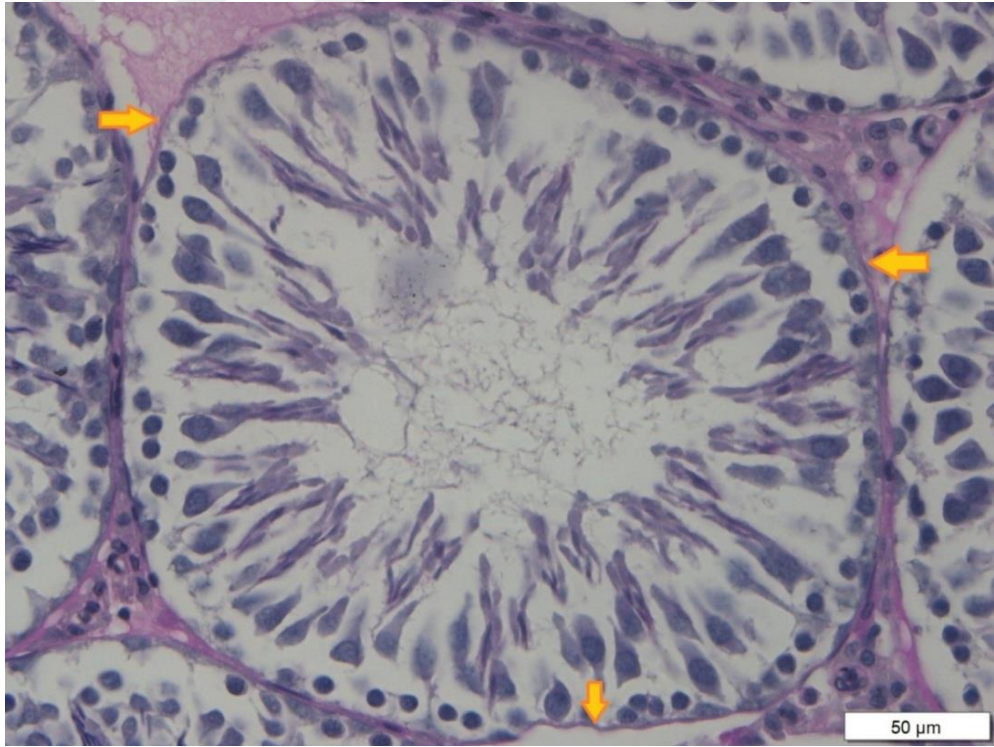
4.2. Farklı Fiksatiflerin Testis Dokusunun Histokimyasal Yöntemler ile Boyanması Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Çalışmamızda her bir testis dokusundan rastgele olarak seçilen lamalar PAS ve MTC ile boyandı.

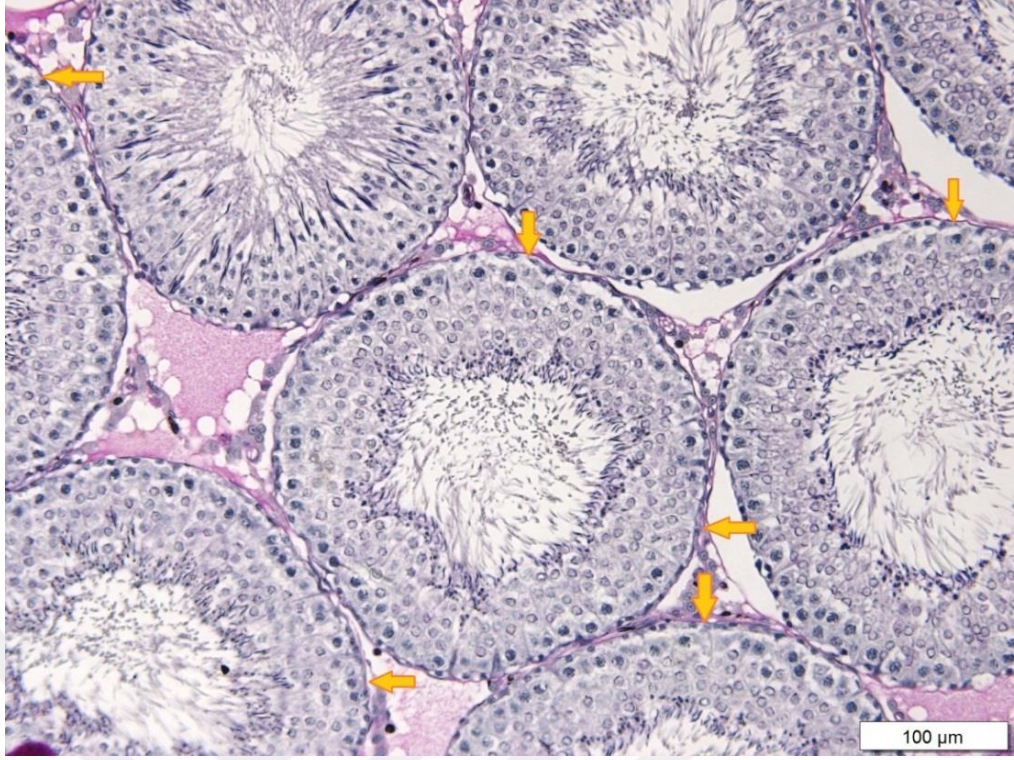
PAS boyama yöntemi ile seminifer tübüllerin bazal membran yapısı değerlendirildi. %10 NTF Fiksatifine ait kesitlerde tübüllerin bazal membranları iyi ayrılmadığı gözlemlendi (Şekil 4.13. ve 4.14.). BF'ye ait kesitlerin incelendiğinde seminifer tübüllerde bazal membranların daha iyi ayrıldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.15. ve 4.16.). mDF'ye ait kesitlerde tübüllerde bazal membran yapıları daha iyi ve net gözlemlendi (Şekil 4.17. ve 4.18.). Stieve's Fiksatifine ait kesitlerde tübüllerin bazal membran ve tunika albuginea yapılarının boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.19. ve 4.20.).



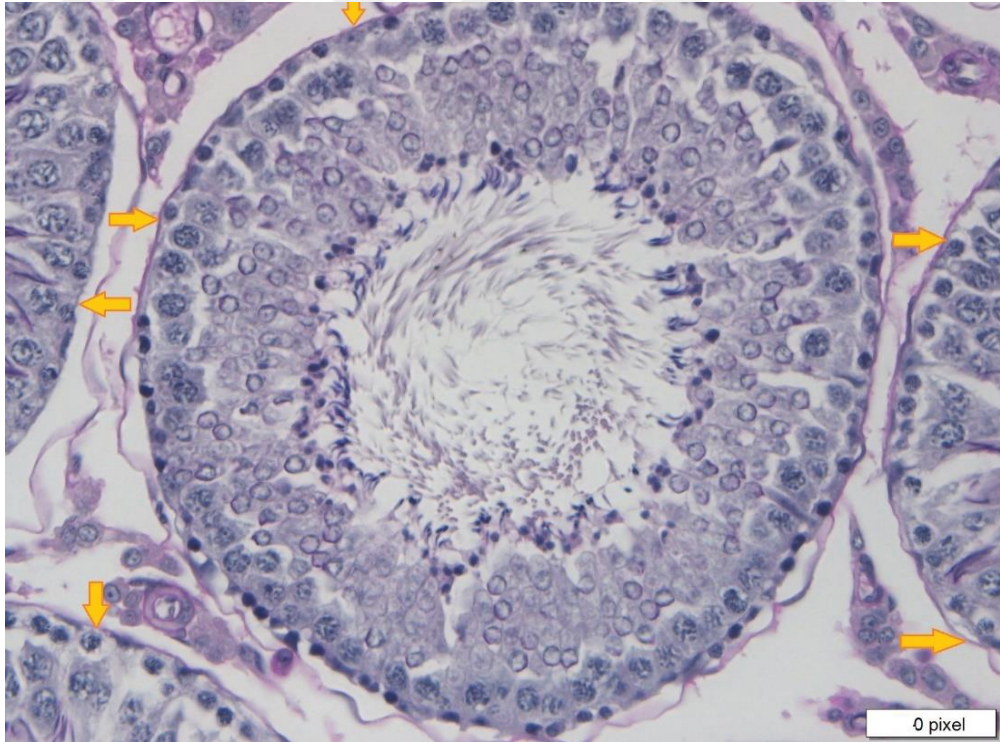
Şekil 4.13. %10 NTF Fiksatifine ait testis dokusunun PAS boyama görüntüsü x20.



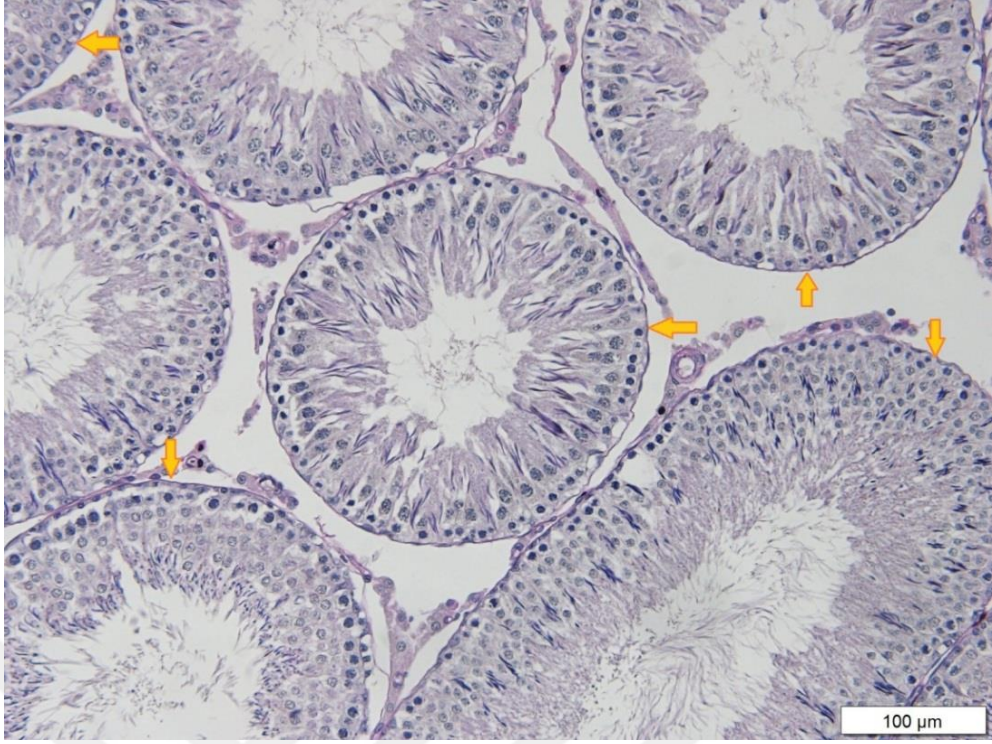
Şekil 4.14. %10 NTF Fiksatifine ait testis dokusunun PAS boyama görüntüsü x40.



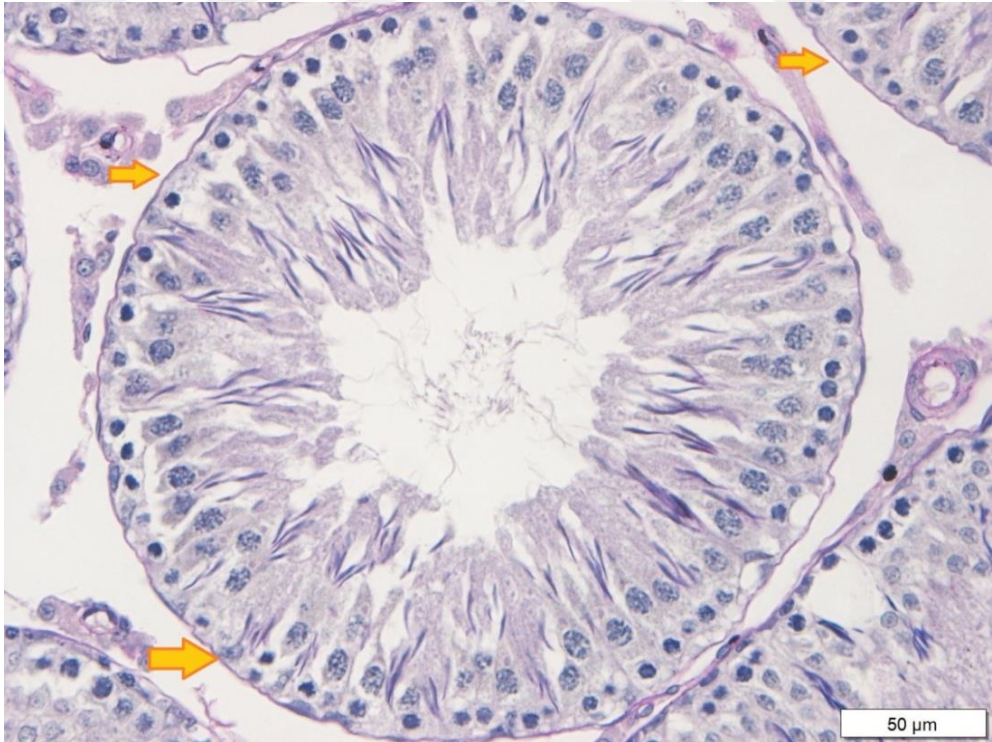
Şekil 4.15. BF'ye ait testis dokusunun PAS boyama görüntüsü x20.



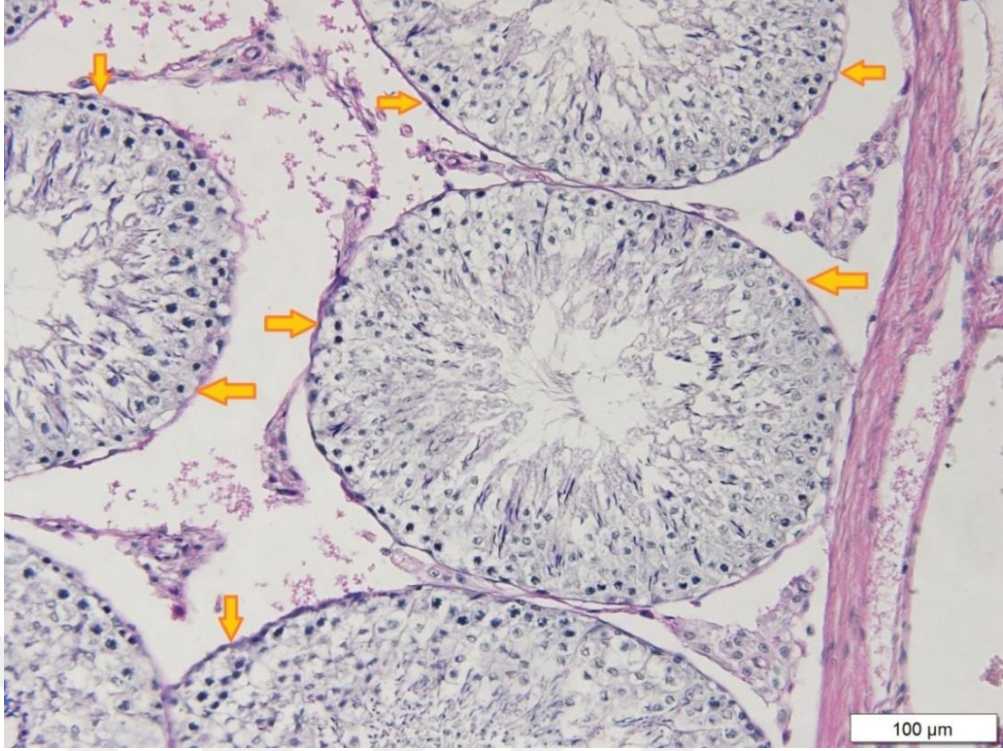
Şekil 4.16. BF'ye ait testis dokusunun PAS boyama görüntüsü x40.



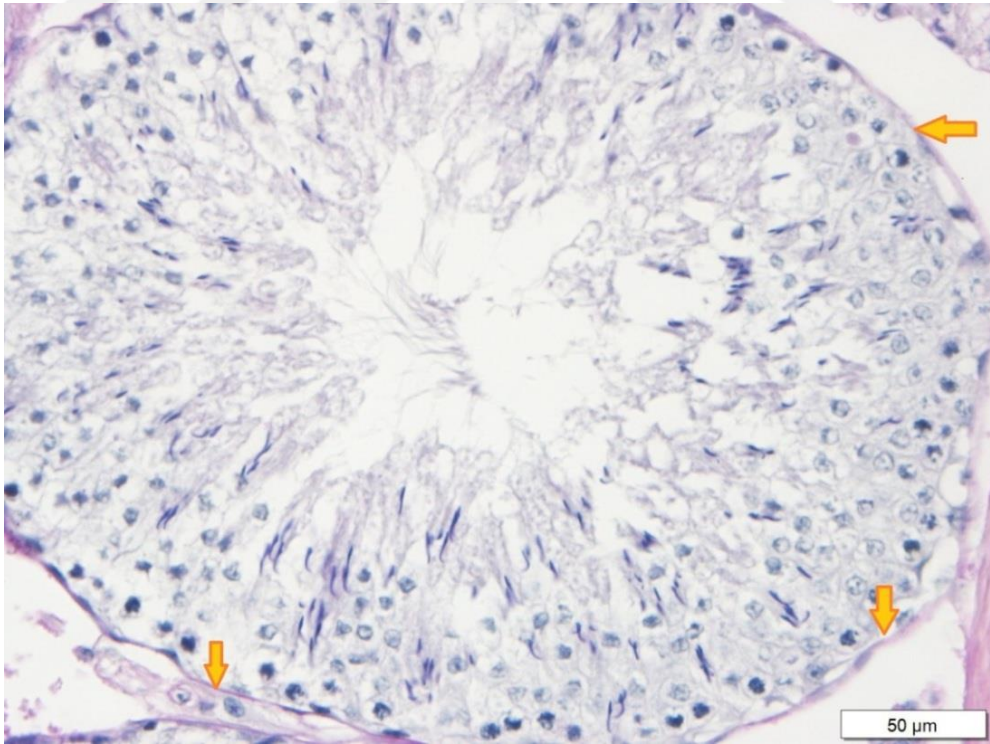
Şekil 4.17. mDF'ye ait testis dokusunun PAS boyama görüntüsü x20



Şekil 4.18. mDF'ye ait testis dokusunun PAS boyama görüntüsü x40.

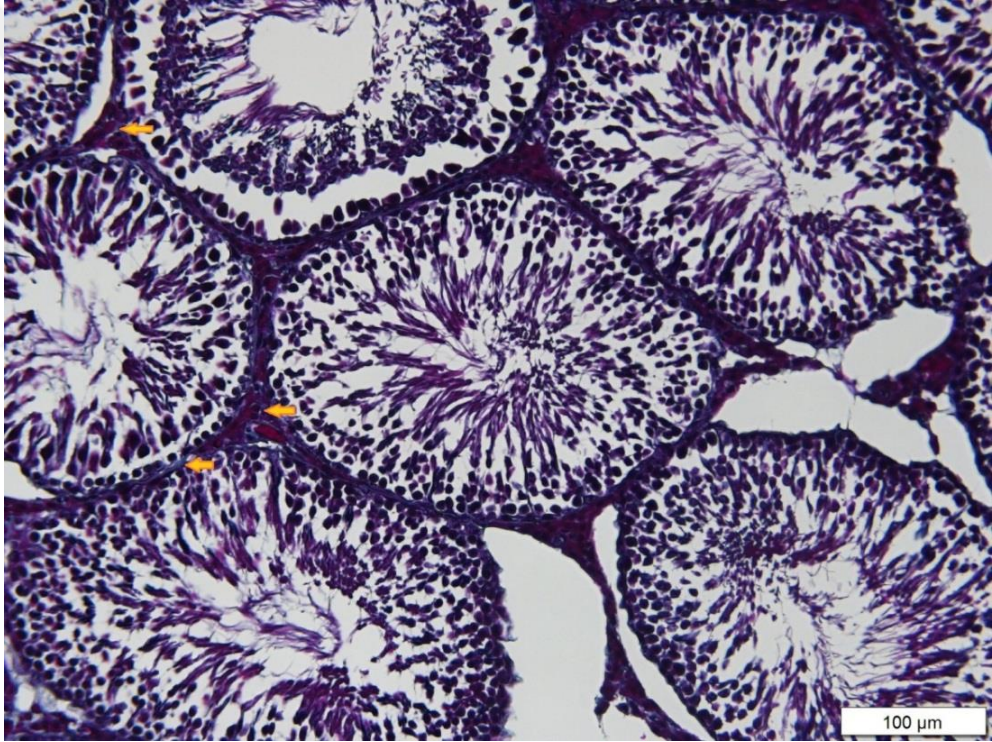


Şekil 4.19. Stieve's Fiksatifine ait testis dokusunun PAS boyama görüntüsü x20.

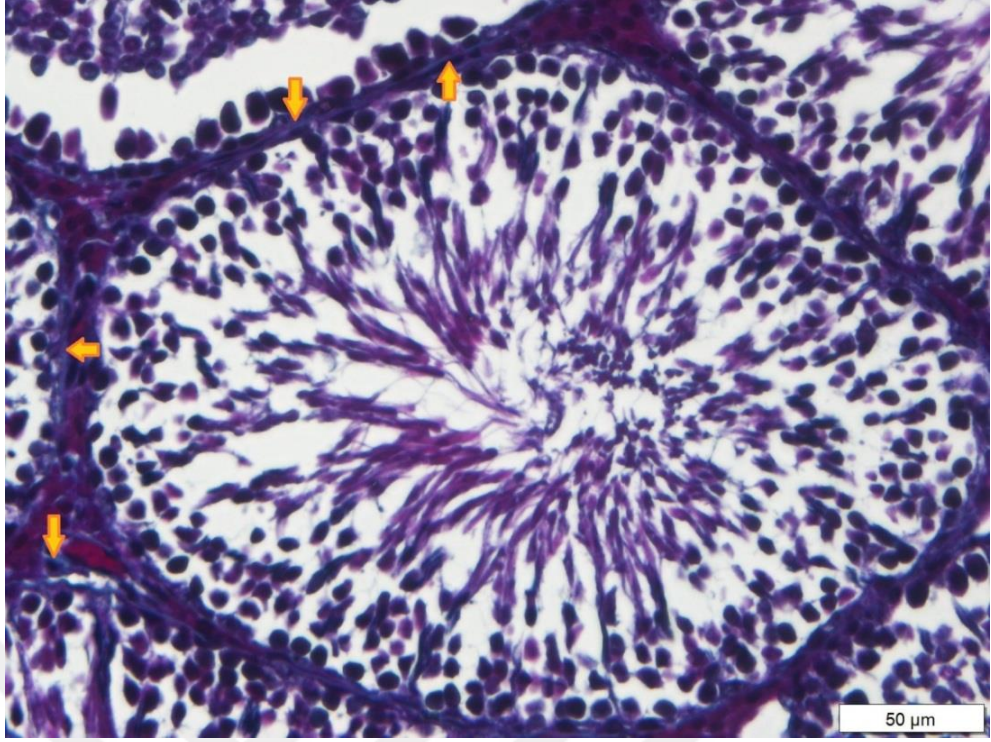


Şekil 4.20. Stieve's Fiksatifine ait testis dokusunun PAS boyama görüntüsü x40.

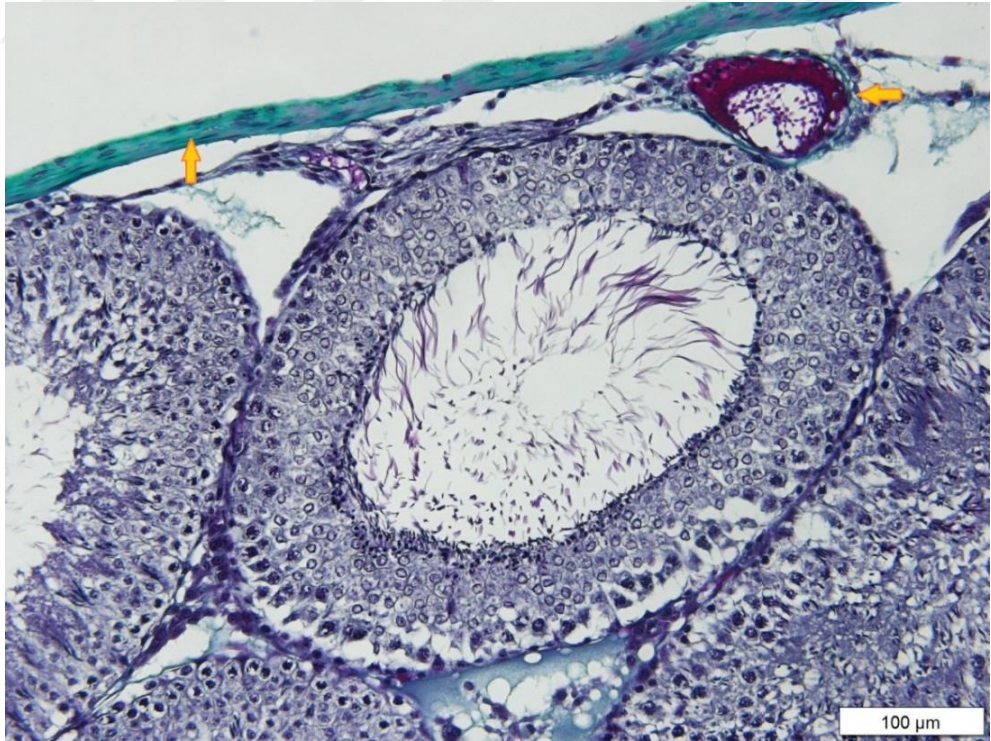
MTC boyama yöntemi ile fiksatiflere ait dokuların incelenmesinde, testisi çevreleyen tunika albuginea ve intertisyel alanlar değerlendirildi. %10 NTF Fiksatifine ait kesitlerin incelenmesinde, testisi çevreleyen bağ dokunun ve intertisyel alanın çok net boyanamadığı gözlemlendi (Şekil 4.21. ve 4.22.). BF'ye ait kesitlerin incelenmesinde, testisi çevreleyen bağ dokunun ve intertisyel alanın daha iyi boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.23. ve 4.24.). mDF'ye ait kesitlerin incelenmesinde, testisi çevreleyen bağ dokunun ve intertisyel alanın daha iyi boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.25. ve 4.26.). Stieve's Fiksatifine ait kesitlerin incelenmesinde, testisi çevreleyen bağ dokunun ve intertisyel alanın boyandığı gözlemlendi (Şekil 4.27. ve 4.28.).



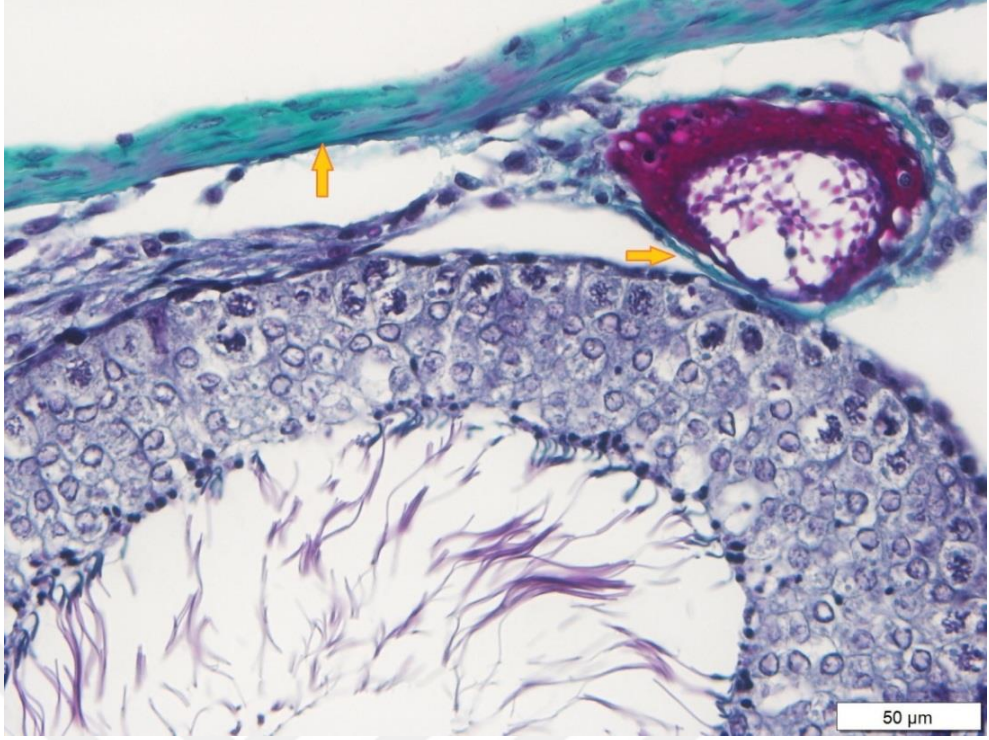
Şekil 4.21. %10 NTF Fiksatifine ait testis dokusunun MTC boyama görüntüsü x20.



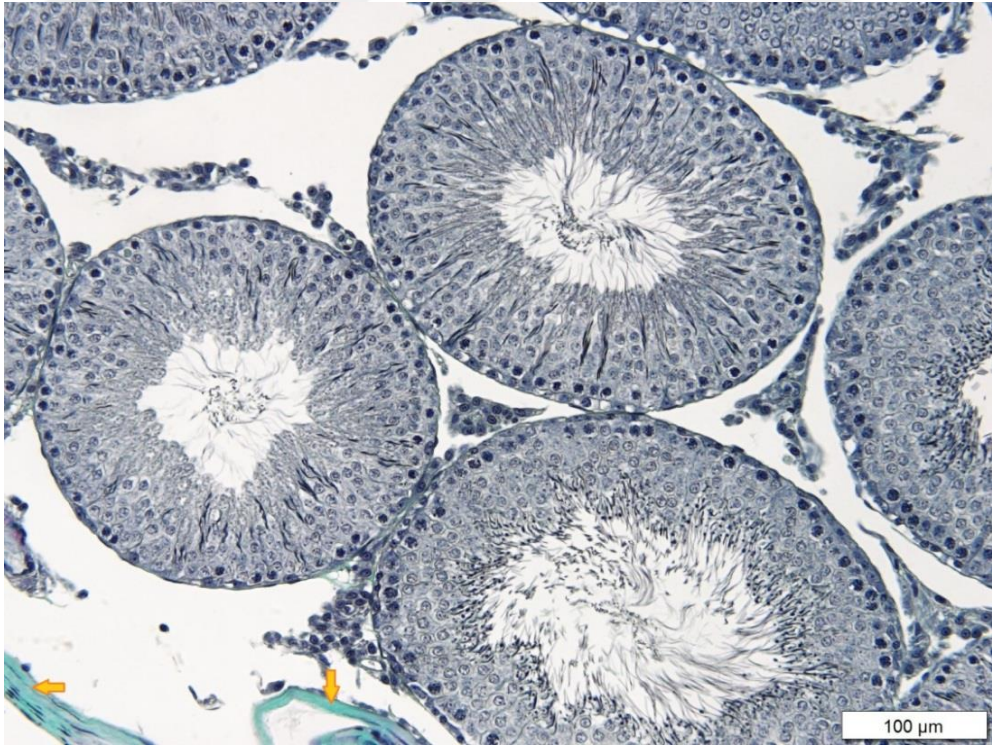
Şekil 4.22. %10 NTF Fiksatifine ait testis dokusunun MTC boyama görüntüsü x40.



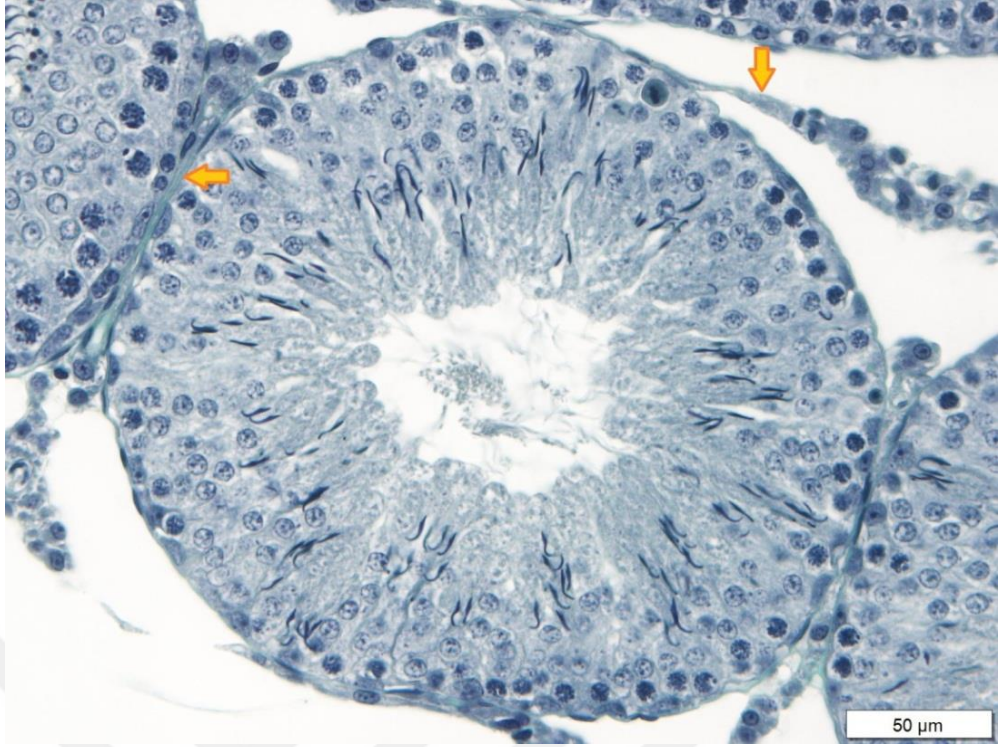
Şekil 4.23. BF'ye ait testis dokusunun MTC boyama görüntüsü x20.



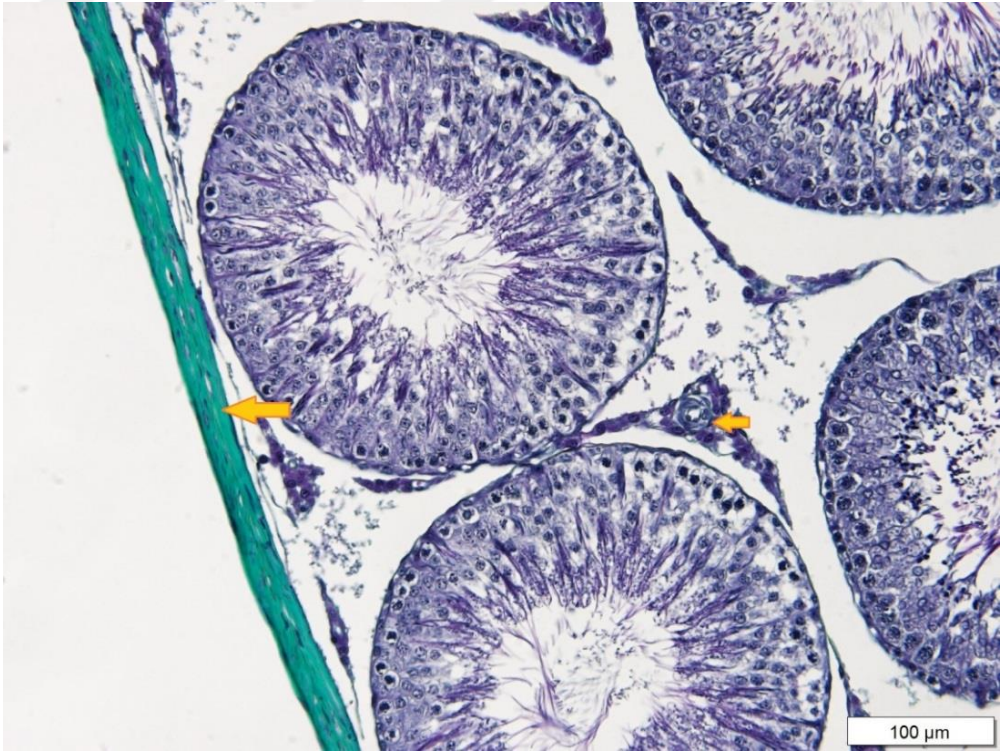
Şekil 4.24. BF'ye ait testis dokusunun MTC boyama görüntüsü x40.



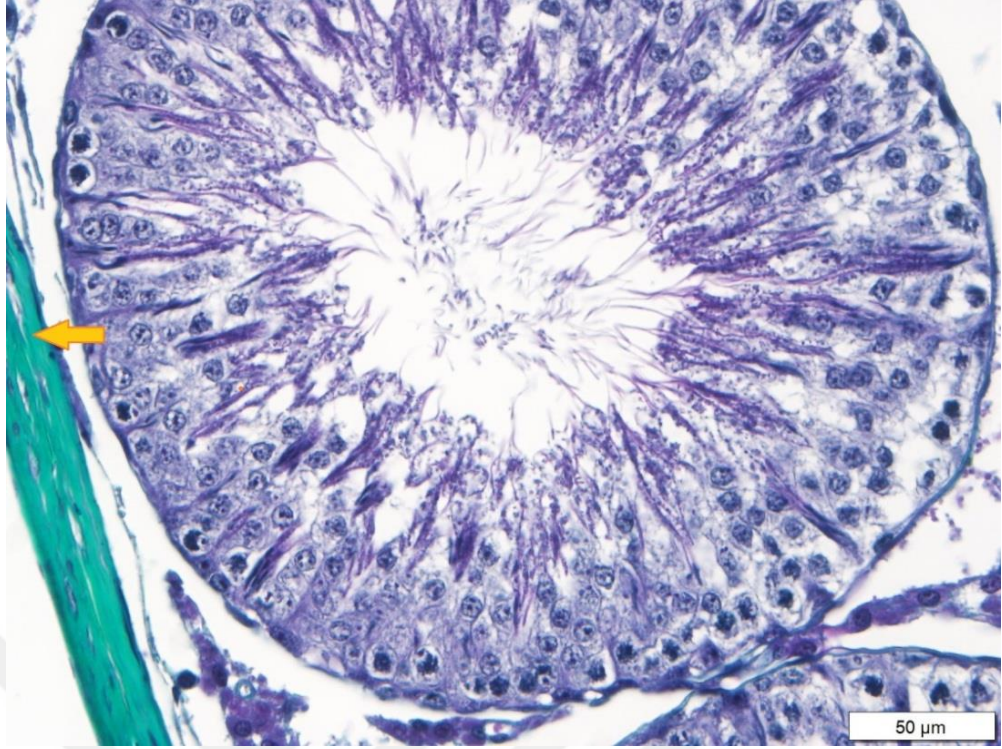
Şekil 4.25. mDF'ye ait testis dokusunun MTC boyama görüntüsü x20.



Şekil 4.26. mDF'ye ait testis dokusunun MTC boyama görüntüsü x40.



Şekil 4.27. Stieve's Fiksatifine ait testis dokusunun MTC boyama görüntüsü x20.

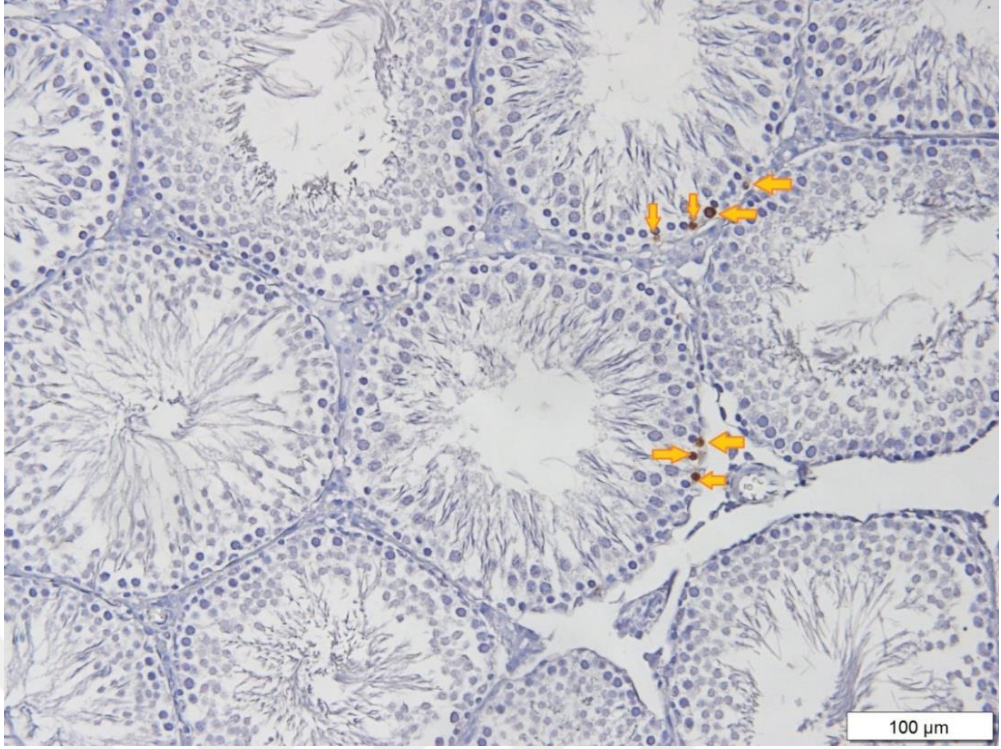


Şekil 4.28. Stieve's Fiksatifine ait testis dokusunun MTC boyama görüntüsü x40.

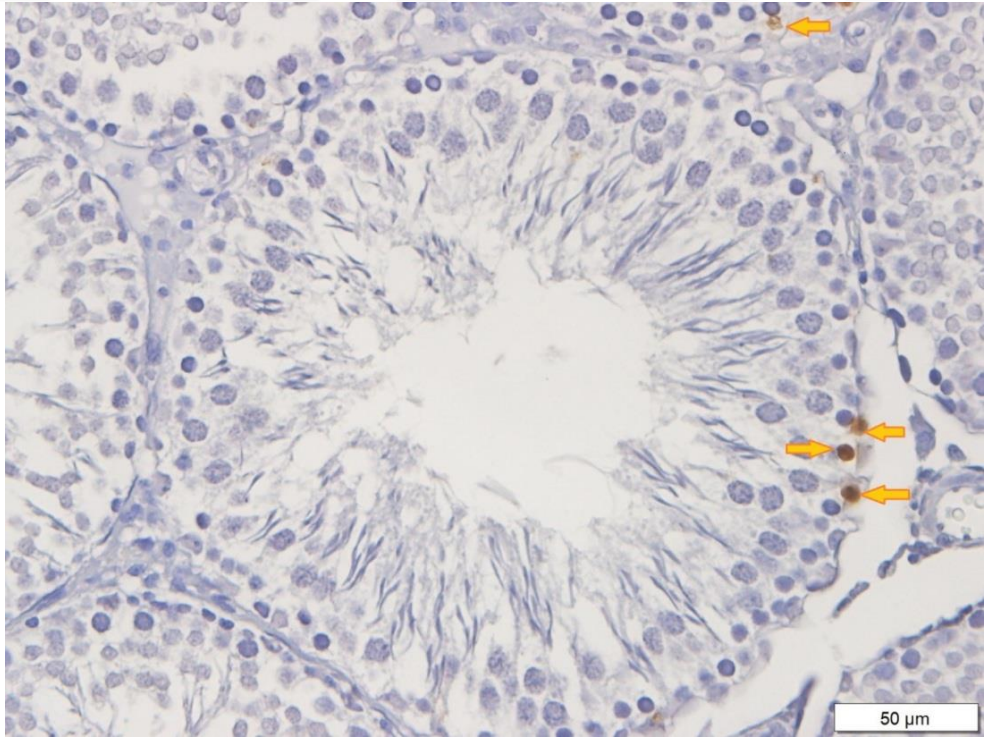
4.3. Farklı Fiksatiflerin Testis Dokusunun TUNEL Yöntemi ile Boyanması Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

Çalışmamızda her bir testis dokusundan rastgele olarak tek bir kesit pozitif yüklü lama alındı ve TUNEL yöntemi ile boyandı.

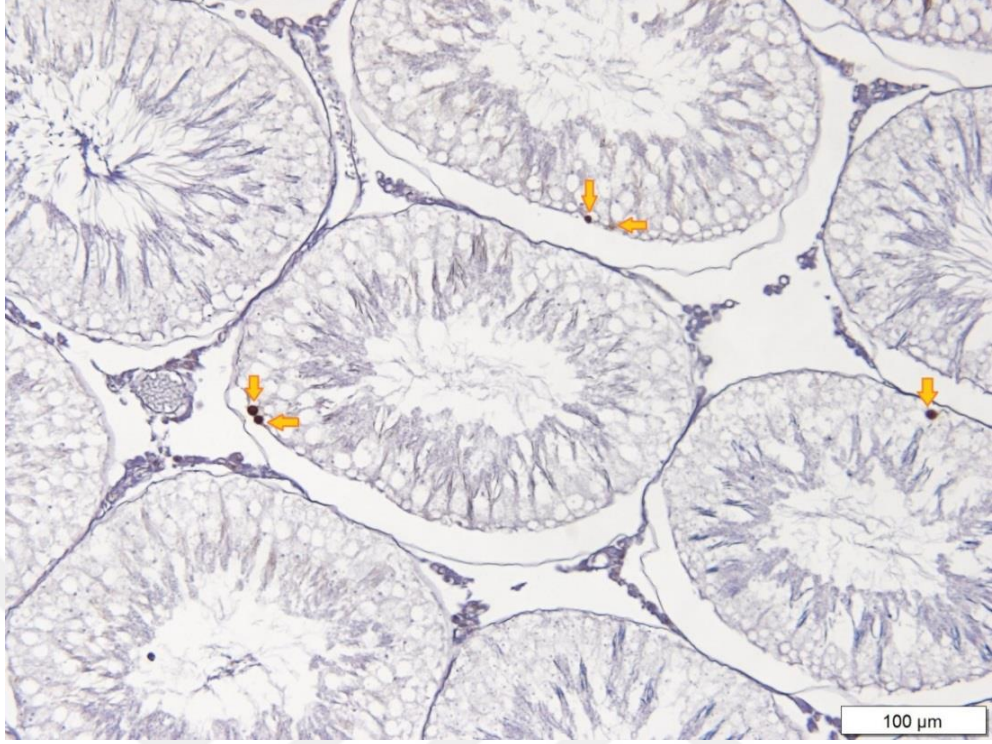
TUNEL boyama yöntemi ile fiksatiflere ait dokuların nukleusları kahverengi olarak boyanmış hücreler, apoptotik hücre olarak değerlendirildi. Kullanılan dört fiksatif ile apoptotik hücrelerde boyanma olduğu gözlemlendi. Boyanma şiddeti açısından gruplar arasında farklılıklar izlenmedi (Şekil 4.29. – 4.36.).



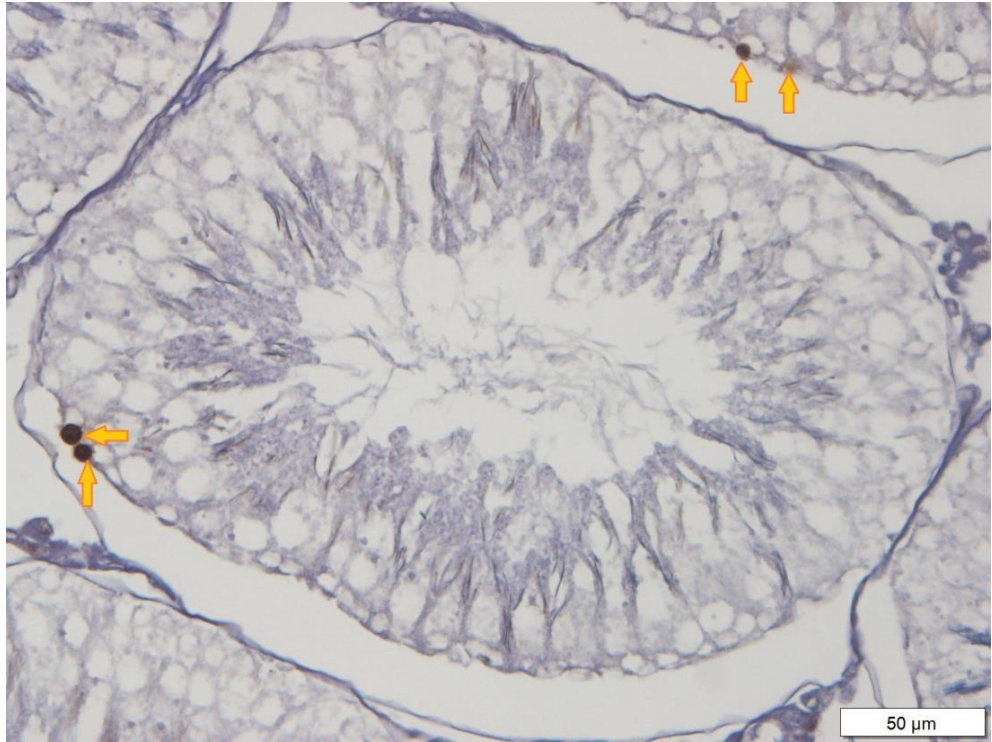
Şekil 4.29. %10 NTF Fiksatifine ait testis dokusunun TUNEL boyama görüntüsü x20.



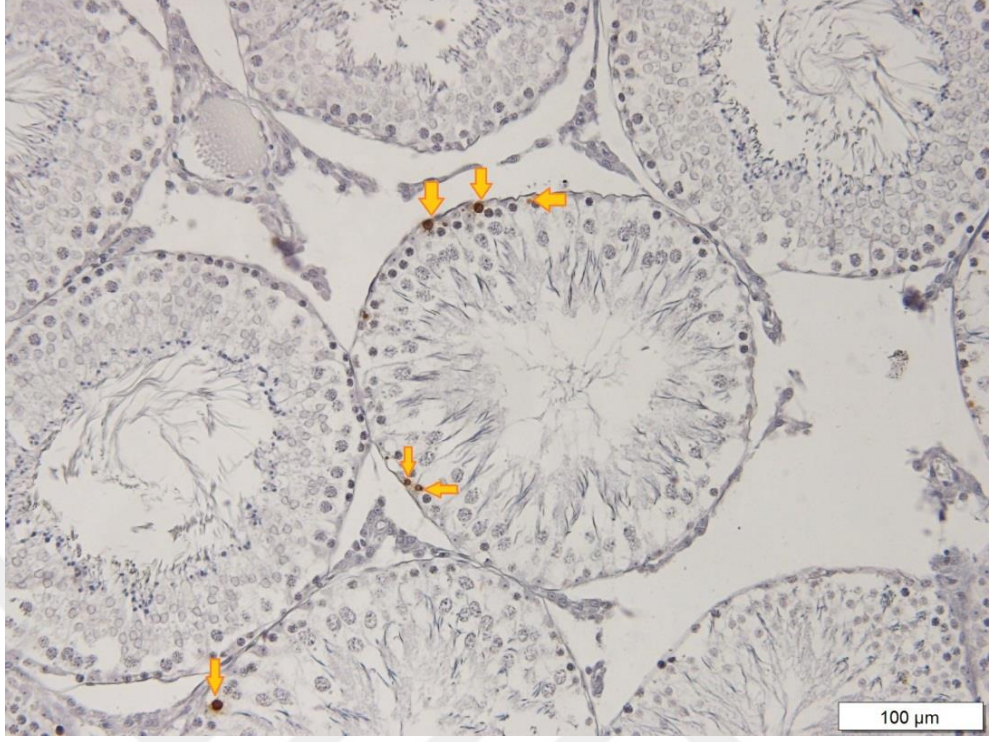
Şekil 4.30. %10 NTF Fiksatifine ait testis dokusunun TUNEL boyama görüntüsü x40.



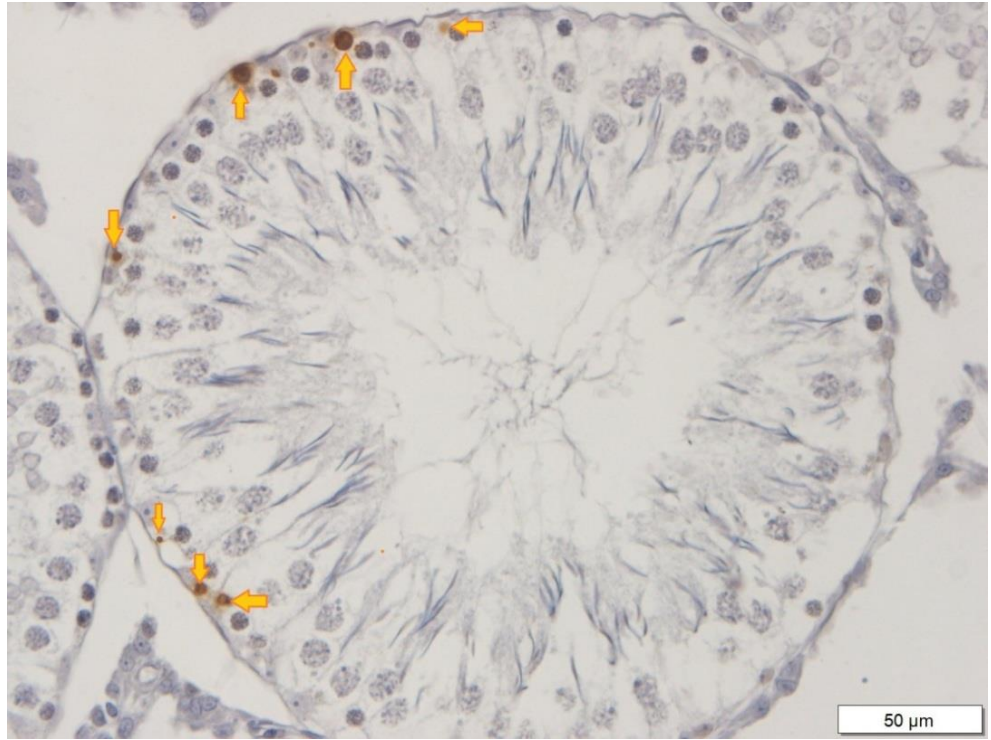
Şekil 4.31. BF'ye ait testis dokusunun TUNEL boyama görüntüsü x20.



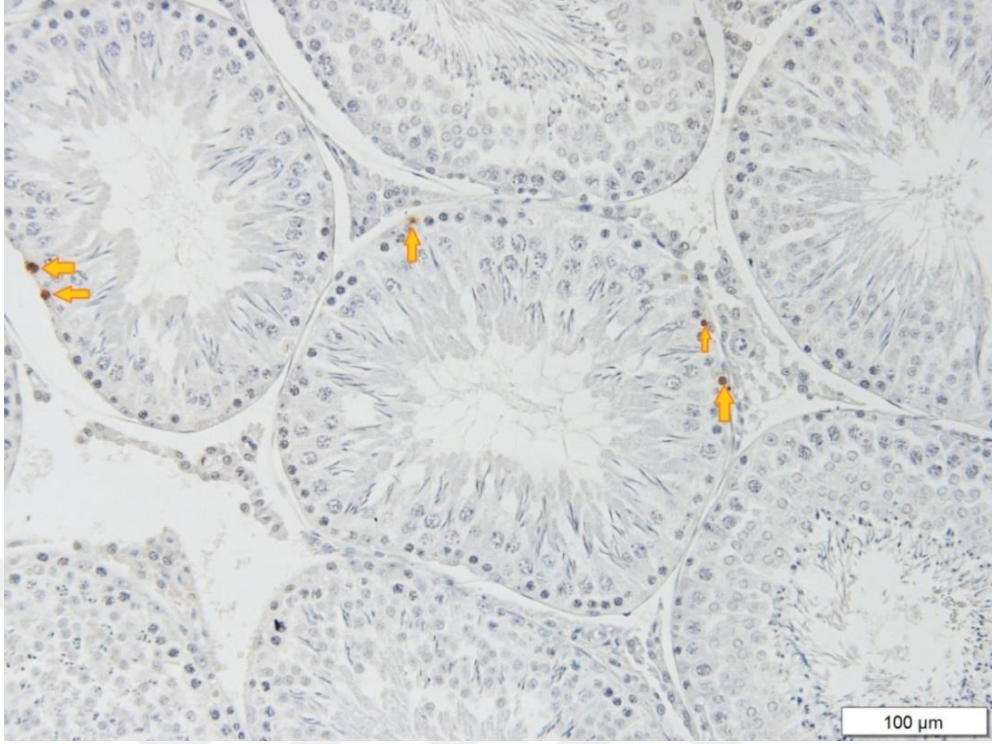
Şekil 4.32. BF'ye ait testis dokusunun TUNEL boyama görüntüsü x40.



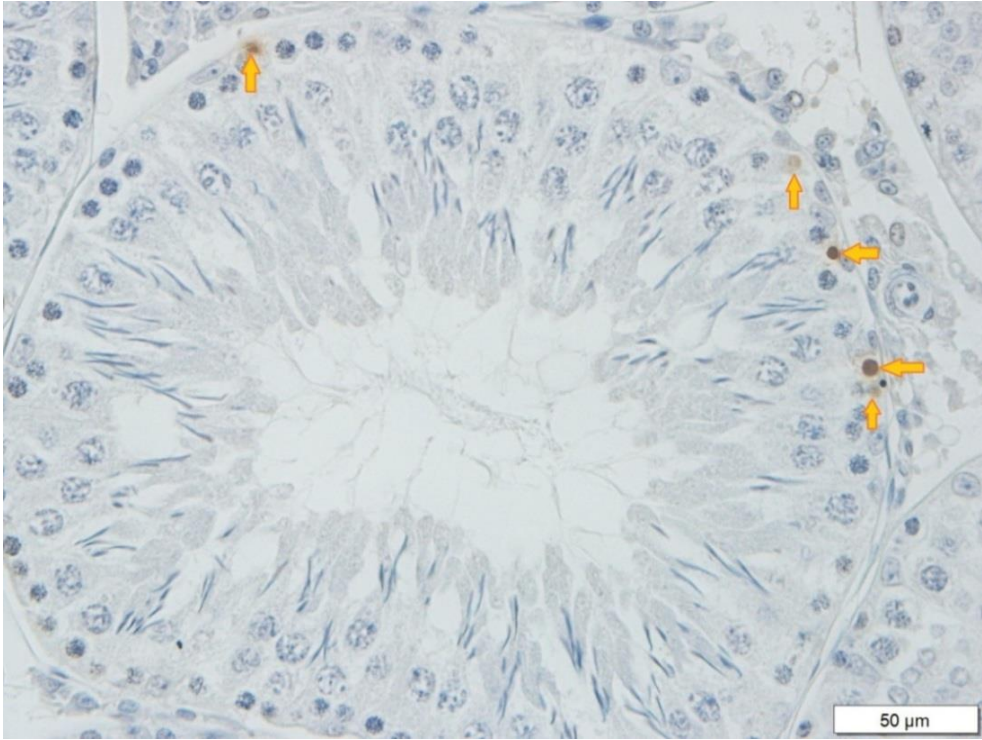
Şekil 4.33. mDF'ye ait testis dokusunun TUNEL boyama görüntüsü x20.



Şekil 4.34. mDF'ye ait testis dokusunun TUNEL boyama görüntüsü x40.



Şekil 4.35. Stieve's Fiksatifine ait testis dokusunun TUNEL boyama görüntüsü x20.



Şekil 4.36. Stieve's Fiksatifine ait testis dokusunun TUNEL boyama görüntüsü x40.

4.4. Farklı Fiksatiflerin Testis Dokusu Hacminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

%10 NTF Fiksatifinin değişkenlerine göre, Vönce ortalamasının $\bar{x}=1.660$ olduğu, Vsonra ortalamasının $\bar{x}=0.552$ olduğu, Çekme ortalamasının $\bar{x}=0.67$ olduğu ve CE ortalamasının $\bar{x}=0.04$ olduğu görülmektedir (Tablo 4.1.). Sıçanların BF değişkenlerine göre, Vönce ortalamasının $\bar{x}=1.678$ olduğu, Vsonra ortalamasının $\bar{x}=0.720$ olduğu, Çekme ortalamasının $\bar{x}=0.57$ olduğu ve CE ortalamasının $\bar{x}=0.03$ olduğu görülmektedir (Tablo 4.1.). Sıçanların mDF değişkenlerine göre, Vönce ortalamasının $\bar{x}=1.667$ olduğu, Vsonra ortalamasının $\bar{x}=0.702$ olduğu, Çekme ortalamasının $\bar{x}=0.58$ olduğu ve CE ortalamasının $\bar{x}=0.03$ olduğu görülmektedir (Tablo 4.1.). Sıçanların Stieve's Fiksatifinin değişkenlerine göre, Vönce ortalamasının $\bar{x}=1.693$ olduğu, Vsonra ortalamasının $\bar{x}=0.774$ olduğu, Çekme ortalamasının $\bar{x}=0.54$ olduğu ve CE ortalamasının $\bar{x}=0.03$ olduğu görülmektedir (Tablo 4.1.).

Sıçanların testis dokusunun ölçeğin geneline ilişkin değişkenlerine göre, Vönce ortalamasının $\bar{x}=1.675$ olduğu, Vsonra ortalamasının $\bar{x}=0.687$ olduğu, Çekme ortalamasının $\bar{x}=0.59$ olduğu ve CE ortalamasının $\bar{x}=0.03$ olduğu görülmektedir (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1. Farklı Fiksatif ile Tespit Edilen Testis Dokularının Başlangıç Hacimleri ve Cavalieri Yöntemi ile Hesaplanan Hacimlerine Yönelik Betimsel Analiz Sonuçları

	Fiksatif	n	\bar{X}	<i>SS</i>	Median	Min.	Max.
Vönce (cm³)	%10 NTF	10	1.660	±0.1200	1.67	1.449	1.831
	BF	10	1.678	±0.1322	1.70	1.446	1.837
	mDF	10	1.667	±0.1227	1.70	1.444	1.811
	Stieve's	10	1.693	±0.1009	1.71	1.51	1.817
	Toplam	40	1.675	±0.1155	1.69	1.444	1.837
Vsonra (cm³)	%10 NTF	10	0.552	±0.1623	0.49	0.403	0.85
	BF	10	0.720	±0.1220	0.69	0.568	0.99
	mDF	10	0.702	±0.1253	0.69	0.538	0.917
	Stieve's	10	0.774	±0.1781	0.71	0.593	1.106
	Toplam	40	0.687	±0.1655	0.68	0.403	1.106
Çekme (%)	%10 NTF	10	67	±10	70	48	75
	BF	10	57	±7	59	38	64
	mDF	10	58	±6	58	48	68
	Stieve's	10	54	±9	55	39	66
	Toplam	40	59	±9	59	38	75
CE (%)	%10 NTF	10	4	±0.5	4	3	5
	BF	10	3	±0.3	3	3	4
	mDF	10	3	±0.4	3	3	4
	Stieve's	10	3	±0.4	3	2	4
	Toplam	40	3	±0.5	3	2	5

Testis dokusunun hacmini fiksatiflere göre stereolojik olarak değerlendirdiğimizde Vönce değişkeni ($\chi^2=0.479$, $p=0.924$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Vsonra değişkeni ($\chi^2=10.707$, $p=0.013$), Çekme değişkeni ($\chi^2=9.017$, $p=0.029$) ve CE değişkeni ($\chi^2=15.039$, $p=0.002$) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 4.2.).

Tablo 4.2. Farklı Fiksatif ile Tespit Edilen Testis Dokularının Başlangıç Hacimleri Ve Cavalieri Yöntemi ile Hesaplanan Hacimlerinin “Kruskal Wallis-H Testi” Analizi Bulguları

	Fiksatif	n	$\bar{x}_{sıra}$	χ^2	<i>sd</i>	p
Vönce (cm³)	%10 NTF	10	18.60	0.479	3	0.924
	BF	10	21.40			
	mDF	10	20.10			
	Stieve's	10	21.90			
Vsonra (cm³)	%10 NTF	10	10,25	10.707	3	0.013
	BF	10	23,30			
	mDF	10	22,55			
	Stieve's	10	25,90			
Çekme (%)	%10 NTF	10	29.95	9.017	3	0.029
	BF	10	18.25			
	mDF	10	18.05			
	Stieve's	10	15.75			
CE (%)	%10 NTF	10	30.35	15.039	3	0.002
	BF	10	16.40			
	mDF	10	20.20			
	Stieve's	10	15.05			

Testis dokusunun hacmini %10 NTF Fiksatif ve BF'ye göre stereolojik olarak değerlendirdiğimizde Vsonra değişkeni ($x^2=6.418$, $p=0.011$) ve Çekme değişkeni ($x^2=5.878$, $p=0.015$) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.3). Fakat CE değişkeni ($x^2=9.335$, $p=0.002$) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. %10 NTF Fiksatif ve BF ile Testis Dokusu Haciminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin “Mann-Whitney U” Analizi Bulguları

	Fiksatif	n	$\bar{x}_{sıra}$	x^2	sd	p
Vsonra (cm³)	%10 NTF	10	7.15	6.418	1	0.011
	BF	10	13.85			
	Toplam	20				
Çekme (%)	% NTF	10	13.70	5.878	1	0.015
	BF	10	7.30			
	Toplam	20				
CE (%)	%10 NTF	10	14.05	9.335	1	0.002
	BF	10	6.95			
	Toplam	20				

Testis dokusunun hacmini %10 NTF Fiksatif ve mDF'ye göre stereolojik olarak değerlendirdiğimizde V_{sonra} değişkeni ($x^2=6.223$, $p=0.013$), çekme değişkeni ($x^2=5.014$, $p=0.025$) ve CE değişkeni ($x^2=5.107$, $p=0.024$) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. %10 NTF Fiksatif ve mDF ile Testis Dokusu Haciminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin “Mann-Whitney U” Analizi Bulguları

	Fiksatif	n	$\bar{x}_{sıra}$	X^2	sd	p
Vsonra (cm^3)	%10 NTF	10	7.20	6.223	1	0.013
	mDF	10	13.80			
	Toplam	20				
Çekme (%)	%10 NTF	10	13.45	5.014	1	0.025
	mDF	10	7.55			
	Toplam	20				
CE (%)	%10 NTF	10	13.15	5.107	1	0.024
	mDF	10	7.85			
	Toplam	20				

Testis dokusunun hacmini %10 NTF ve Stieve's Fiksatiflerine göre stereolojik olarak değerlendirdiğimizde Vsonra değişkeni ($x^2=7.411$, $p=0.006$) ve CE değişkeni ($x^2=9.366$, $p=0.002$) arasında istatiksels olarak anlamlı fark bulunmuştur (Tablo 4.5.). Çekme değişkeni ($x^2=6.242$, $p=0.012$) arasında ise istatiksels olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.5.).

Tablo 4.5. %10 NTF Fiksatif ve Stieve's Fiksatif ile Testis Dokusu Haciminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin "Mann-Whitney U" Analizi Bulguları

	Fiksatif	n	$\bar{x}_{sıra}$	X^2	sd	p
Vsonra (cm³)	%10 NTF	10	6.90	7.411	1	0.006
	Stieve's	10	14.10			
	Toplam	20				
Çekme (%)	%10 NTF	10	13.80	6.242	1	0.012
	Stieve's	10	7.20			
	Toplam	20				
CE (%)	%10 NTF	10	14.15	9.366	1	0.002
	Stieve's	10	6.85			
	Toplam	20				

Testis dokusunun hacmini BF ve mDF'ye göre stereolojik olarak değerlendirdiğimizde Vsonra değişkeni ($\chi^2=0.036$, $p=0.850$), Çekme değişkeni ($\chi^2=0.023$, $p=0.879$) ve CE değişkeni ($\chi^2=1.188$, $p=0.276$) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. BF ve mDF ile Testis Dokusu Haciminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin “Mann-Whitney U” Analizi Bulguları

	Fiksatif	n	\bar{x}_{sira}	χ^2	sd	p
Vsonra (cm³)	BF	10	10.75	0.036	1	0.850
	mDF	10	10.25			
	Toplam	20				
Çekme (%)	BF	10	10.70	0.023	1	0.879
	mDF	10	10.30			
	Toplam	20				
CE (%)	BF	10	9.50	1.188	1	0.276
	mDF	10	11.50			
	Toplam	20				

Testis dokusunun hacmini BF ve Stieve's Fiksatiflerine göre stereolojik olarak değerlendirdiğimizde Vsonra değişkeni ($x^2=0.367$, $p=0.545$), çekme değişkeni ($x^2=0.323$, $p=0.570$) ve CE değişkeni ($x^2=0.300$, $p=0.584$) arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. BF ve Stieve's Fiksatifleri ile Testis Dokusu Haciminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin "Mann-Whitney U" Analizi Bulguları

	Fiksatif	n	$\bar{x}_{sıra}$	X^2	sd	p
Vsonra (cm ³)	BF	10	9.70	0.367	1	0.545
	Stieve's	10	11.30			
	Toplam	20				
Çekme (%)	BF	10	11.25	0.323	1	0.570
	Stieve's	10	9.75			
	Toplam	20				
CE (%)	BF	10	10.95	0.300	1	0.584
	Stieve's	10	10.05			
	Toplam	20				

Testis dokusunun hacmini mDF ve Stieve's Fiksatiflerine göre stereolojik olarak değerlendirdiğimizde Vsonra değişkeni ($x^2=5.72$, $p=0.450$), çekme değişkeni ($x^2=0.282$, $p=0.595$) ve CE değişkeni ($x^2=1.823$, $p=0.177$) arasında ise istatiksels olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.8.).

Tablo 4.8. mDF ve Stieve's Fiksatif ile Testis Dokusu Haciminin Stereolojik Yöntemler ile İncelenmesinin "Mann-Whitney U" Analizi Bulguları

	Fiksatif	n	$\bar{x}_{sıra}$	X^2	sd	p
Vsonra (cm³)	mDF	10	9.50	0.572	1	0.450
	Stieve's	10	11.50			
	Toplam	20				
Çekme (%)	mDF	10	11.20	0.282	1	0.595
	Stieve's	10	9.80			
	Toplam	20				
CE (%)	mDF	10	11.85	1.823	1	0.177
	Stieve's	10	9.15			
	Toplam	20				

Tekli Analiz Sonuçları

Çalışmamızda 4 adet fiksatif olduğundan ve her grupta tekli 6 analiz yapılabildiği için ‘Bonferroni Düzeltmesi’ uygulanarak $p < 0.0083$ olan değerler anlamlı kabul edilmiştir.

Vsonra analizinde %10 NTF Fiksativi ile Stieve’s Fiksativi arasında anlamlı fark çıkmıştır ($p=0.006$). CE analizinde %10 NTF Fiksativi ile BF arasında anlamlı fark çıkmıştır ($p=0.002$). CE analizinde %10 NTF Fiksativi ile Stieve’s Fiksativi arasında anlamlı fark çıkmıştır ($p=0.002$).



5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, testis dokusunu stereolojik yöntemler ile incelemek istediğimizde kullanılacak uygun fiksatif seçmeyi ve testis doku bütünlüğünü en iyi koruyan fiksatifin dokudaki boyanma kalitesini belirlemeyi amaçladık.

Erkek üreme sisteminde önemli yeri olan testis, çevresel ajanlardan ve kimyasallardan çok fazla etkilenen dokulardan bir tanesidir (Kangasniemi ve ark., 1996; Erkanlı-Şentürk ve ark., 2012). Testis doku histolojisinin ve mikroanatomik düzeyinin iyi bilinmesi, testis dokusunda meydana gelebilecek hastalık veya rahatsızlık durumlarında etyolojisinin ortaya çıkarılması, erken tanı, tedavinin seyri ve patogenezin açıklanması açısından gereklidir. Testis morfolojisinin ve spermatogenik serideki hücrelerin gelişimsel evrelerinin mikroanatomik düzeyde daha iyi incelenebilmesi dokunun en iyi şekilde tespit edilmesi ile mümkündür (Dutta ve ark., 2012).

Her dokunun hücresel bileşenlerinin farklı olması dolayısıyla tespit solüsyonları da dokuların morfolojik korunumu açısından değişiklik göstermektedir. Çoğu doku, fiksatifin hızlı penetrasyonunu sağlayacak bir boyutta kesilir, fakat testis dokusu doku bütünlüğü korunarak bütün olarak tespit edilmelidir. Testis dokusu için yapılan çalışmalarda dokunun tübüler bütünlüğünü en uygun koruyan fiksatifler tespit edilmiştir. Fakat çalışmalarda belirli sayıda fiksatif bulunmaktadır (Latendresse ve ark., 2002; Tu ve ark., 2011). Histolojik çalışmalarda bulguların iyi bir şekilde gösterilmesi ve güvenilir olması için doku tespitinin ideal olması gerekir.

Birçok farklı doku ve organ rutin olarak histoloji laboratuvarında HE boyası ile boyanır ve bazen dokunun yapısal ve hücresel özelliklerini göstermek için HE boyası yetersiz kaldığı için özel inceleme ve boyama yöntemlerine gereksinim duyulur. Bu amaçla en sık tercih edilen uygun ve kolay kullanımı olan histokimyasal

boyanmalarının ve IHC boyamasının incelemesidir (Doran, 2005; Howrody ve ark., 2005).

Çalışmamızda 20 adet Srague Dawley cinsi sıçanın testis dokuları alınarak farklı tespit solüsyonlarında (%10 NTF Fiksatif, BF, mDF ve Stieve's Fiksatif) tespit edildi. Tespit olan 40 adet testis dokusu doku takibinden sonra parafin ile bloklandı. Her doku bloğundan rastgele bir sayıdan başlanarak seri kesitler alındı. Seri kesit olan lamlarımız HE boyası ile boyandı ve Cavalier yöntemi ile hacim hesaplaması için kullanıldı. Lamlarımız HE boyası dışında PAS boyası, MTC boyası ve TUNEL boyaları ile boyanıp değerlendirildi.

Çalışmamızda seminifer tübüllerin narin yapısını daha iyi koruyan ve morfolojik detayın daha iyi gösterilmesini sağlayan fiksatif mDF ve Stieve's Fiksatiflerinin olduğu görülmüştür. Seminifer tübül yapılarının hücre içi ve hücresel özellikleri morfolojik yapısına yakın olarak korunumu sağlanmıştır. Böylece testis yapısı bir bütün olarak en doğru şekilde değerlendirilmesi sağlanabilecektir. Doku için en ideal fiksatiften beklenen 'dokunun morfolojik korunumunu en iyi sağlayan ve hücrelerin büzülmesinin en az olmasını sağlamak' olmalıdır. Bunun yanında hücrenin organellerinin korunumunu sağlamak ve hücresel özelliklerinin gösterilmesini sağlamaktır. Doku büzülmesinin merkezi tübüllerde gözlenmesi periferik tübüllerde çok nadir gözlenmesi ile morfolojik detay gösteriminin iyi olan alternatif olarak değerlendirilebilecek Bouin fiksatif olabilir.

Testis ve göz dokusu ile çalışma yapan Latendresse ve ark., testis dokularını BF ve mDF ile tespit etmiş ve sonuçları karşılaştırmışlardır. Testis dokusunun; PAS, HE ve IHC (AR, PCNA ve PGP) ile boyanması en iyi morfolojik detayı mDF'nin gösterdiği izlenmiştir. Dokunun bir bütün olarak tespit edilmesi gerektiği ve dokunun periferik alanların merkezi kısımlarında daha iyi tespit edildiği vurgulanmıştır (Latendresse ve ark., 2002).

Fiksatifin dokuya hızlı bir şekilde nüfuz etmesi tespit kalitesi açısından önemlidir. Yapılan çalışmalarda BF ve mDF'nin içerisindeki gliseal asetik asit nedeniyle testis dokusuna hızlı penetrasyon sağlandığı gösterilmiştir (Tu ve ark, 2011). Gliseal asetik asit proteinleri tespit etmez fakat nükleik asitleri sabitlediği

gösterilmiştir (Kiernan, 1999). Kromozomların korunması ve interfaz çekirdeklerinin kromatinini çökelmek için fiksatiflere dahil edilen gliseal asetik asit sayesinde spermlerin içerisinde ki gelişmekte olan mayotik kromozomlar görselleştirilmiştir (Latendresse ve ark., 2002).

Testis dokusunun tespiti için yaygın olarak BF kullanılır (OECD, 2001). BF içerisinde pikrik asit içerir ve bu nedenle bazik proteinlerle tuzlar oluşturarak çökeltir, yavaş nüfuz eden bir fiksatifdir (Tu ve ark., 2011). BF glikojenin korunması için ideal bir fiksatif olmasına rağmen dokuda aşırı büzölmeye neden olabilir (Kiernan, 1999; Creasy ve Jonassen, 1999). mDF de kullanılan alkol pikrik asitten daha hızlı penetrasyon yeteneğine sahiptir fakat dokunun büzölmesine sebep olur (Tu ve ark., 2011). Latendresse ve arkadaşlarının (2002) yapmış oldukları çalışmada mDF ile tespit olan testis dokularında seminifer tübüllerde çok az büzölme gözlenmiş ve dokunun hücrel netliğinin daha iyi gözlemlendiği vurgulanmıştır.

Testis dokusu ile yapılan bir başka çalışma Tu ve ark. (2011) sıçanlardan elde ettikleri testis dokularını 3 farklı grup oluşturarak her grubu farklı fiksatif [%4 paraformaldehit (PFA), mDF ve BF] ile tespit ettikten sonra HE boyası ile değerlendirilmiştir. Testis dokusu morfoloji detayının en iyi mDF grubunda olduğu, %4 PFA fiksatifi ile dokularda aşırı büzölmenin gözlemlendiği vurgulanmıştır (Tu ve ark., 2011).

Mallidis ve ark. (1994), insan testis dokusundan ince iğne biyopsisi ile yaptıkları bir çalışmada tercih ettikleri 5 farklı fiksatif (Paraformaldehit, BF, Stieve's, Çinko Sülfat ve Çinko Formalin Fiksatifleri) ile dokuları 6 farklı boya (MTC, Van Gieson, PAS, Papanicolau, Giemsa ve HE boyası) ile boyayıp değerlendirmişlerdir. Testis dokusu için en iyi fiksatifin Stieve's Fiksatifi olduğunu, vurgulanmıştır (Mallidis ve ark., 1994).

Çalışmamızda testis doku morfolojisini yetersiz koruduğunu düşündüğümüz %10 NTF Fiksatifi kullanılır. Histoloji laboratuvarlarında rutin olarak %10 NTF kullanılır ve dokular 12-36 saat tespit işleminden sonra doku takibi ve gömme işlemine alınır. Fakat testis gibi narin tübüler yapıları dokular için %10 NTF Fiksatifi ile fikse edilen testis dokularının parafin bloklanması sonucu yetersiz morfolojik

görünümü değerlendirilmiştir (Chapin ve ark., 1984; Hess ve Moore, 1993). %10 NTF ile tespit edilen dokunun plazma membranındaki proteinler üzerindeki olası etkilerinden dolayı sitoplazmanın yoğunlaşmasına sebep olduğu bilinmektedir (Howroyd ve ark., 2005). Seminifer tübül içerisinde ki germ hücrelerinin ve Sertoli hücrelerinin aşırı büzülmesi ve dejeneratif hücre tanımlanmasını oldukça zorlaştırır. Chapin ve arkadaşlarının (1984) yapmış oldukları çalışmada testis dokusunun parafin bloklama işlemi sırasında sıcak parafinin dokuda dehidrasyona sebep olarak büzüşme yarattığı bildirilmiştir. %10 NTF ile tespit edilen testis dokusu için en idealinin parafin bloklama yerine glikol metakrilat (GMA) ile gömme işleminin olduğunu ve bu şekildeki dokunun BF'den daha net morfolojik detaya sahip olduğu vurgulanmıştır (Chapin ve ark., 1984).

Yapılan bazı çalışmalarda yetişkin hayvan testisinin mDF ve BF ile morfolojisinin %10 NTF'den daha iyi koruduğunu göstermiştir (OECD, 2001; Latendresse ve ark., 2002). Fetal sıçanların testisinin boyutu, fiksatif penetrasyonunu daha iyi sağladığı için %10 NTF ile dokunun tespiti başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Barlow ve Foster, 2003; Sharpe ve ark., 2003).

Howroyd ve ark. (2005) fetal sıçanların testis dokularını farklı (%10 NTF, BF ve mDF) fiksatiflerle morfolojik korunumunu incelemişler. Fetal sıçan testislerini %10 NTF Fiksativi ile incelediklerinde seminifer tübüllerde az miktarda doku büzülmesinin olduğunu, intertisyel hücrelerinde de sitoplazmik yoğunlaşmanın olduğunu gözlemlemişler. %10 NTF Fiksativi ile tespit edilen fetal testislerin sitoplazmik büzülmeleri yetişken sıçan testislerinde olduğu kadar aşırı olmamasına rağmen dokunun büzüşmesi toksikoloji çalışmalarında tübüler patoloji açısından tehlikeli olabileceğine değinmişlerdir. BF ve mDF içerisinde ki fetal testis dokularında intertisyel hücrelerinde sadece sitoplazmik yoğunlaşma gözlemlemişler. Fetal testis dokusunda morfolojik korunmasını en iyi mDF ile sağlandığını göstermişlerdir (Howroyd ve ark., 2005).

Çalışmamızda iyi tespit olmuş testis dokularımızın bazal membranlarını ve bağ dokularını histokimyasal (PAS ve MTC) boyalarıyla en güzel gösteren mDF olduğunu ve apoptoz hücrelerin gösterimini sağlayan TUNEL boyanmasında fark görülmediği izlendi.

Benson ve Brush (1996)'un insan testisinde IHK boyanma için formaldehit ve paraformaldehit içeren fiksatiflerin Gluteraldehit Fiksatifine göre daha avantajlı ve daha iyi morfolojik yapıyı korudunu gözlemlemişlerdir. Üreme bozukluklarının histolojik tanısı için, peritübüler hücrelerin immunohistokimyasal yöntemlerle tanımlanmasının daha doğru ve anlamlı olduğunu vurgulamışlardır (Benson ve Brush, 1996).

Howroyd ve ark. (2005) fetal testis ile yapmış oldukları TUNEL çalışmasında en iyi testis morfolojisini mükemmel bir şekilde koruyan ve tüm moleküllerin immunojenikliğini koruyan ideal bir fiksatifin olmadığını ve her antikorun kendine özgü sabitleme gereksinimlerinin ve toleransının olduğu vurgulamışlardır (Howroyd ve ark., 2005).

Testis dokusu ile stereolojik çalışma yapan Mittwoch ve Mahadevaiah (1980), insan fetal gonatların ağırlığının ölçülmesi sonucu sağ gonatın sol gonattan büyük olduğunu belirtmişler. Farklı bir çalışma yapan Wikramanayake (1995), sağ testisin %20 olgusunda sol testisten büyük olduğunu, vücut ağırlığı ile testis boyutları arasında ki korelasyonun anlamlı olduğunu belirtmiş. Malas ve arkadaşlarının (1999) yapmış oldukları çalışmada fetal testisinin sağ testis ile sol testis arasında hacim ve ağırlık parametrelerinin korelasyonunda anlamlı fark olmadığını belirtmişler. Peter ve ark. (2015), çalışmalarında testis dokusunda ki sertoli ve leyding hücrelerinin toplam sayısını, stereolojik yöntem (optik parçalama) ile tahmin etmeye çalışmışlar. Peter ve Pakkenberg (2000), yaşlanma ile beraber testis dokusundaki sertoli ve leyding hücre sayısının etkisini stereolojik yöntem kullanarak araştırmışlar.

Çalışmamızda, testis dokusu için rutinde en çok tercih ve birçok çalışma da tercih edilen fiksatifleri kullandık (Tu ve ark., 2011; Latendresse ve ark., 2002). Bu fiksatiflerin de avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Çalışmamızda ki amacımız testis dokusunu stereolojik yöntemler ile incelemek istendiğinde kullanılacak uygun fiksatifin seçilmesidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, testis dokusu için rutinde kullanılan ve kullanılması önerilen dört farklı fiksatif ile stereolojik yöntemler kullanılarak dokunun incelenmesi için kullanılacak uygun fiksatif açısından değerlendirdik. Testis dokusunu Vçekme değişkenine göre anlamlı fark bulunamamıştır ($p < 0.05$). Testis dokusunu stereolojik olarak hacmini değerlendirdiğimizde en iyi mDF ve Stieve's Fiksatifleri daha sonra BF anlamlı olarak üstün bulunmuştur ($p < 0.0083$). BF alternatif olarak değerlendirilebilir. %10 NTF Fiksatif ile testis dokusunun aşırı büzüşmesi sonucu stereolojik olarak dokunun haciminde küçülme olduğu gözlenmiştir ($p > 0.0083$).

KAYNAKLAR

Akbal C, Tamdır Y, Türkeri L. Testis kanseri ve infertilite. *Üroonkoloji Bülteni*, 2006, 4: 8-11.

Albert SB, Johnson A. *Essential Cell Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc. New York. 1998.

Altunkaynak BZ, Altunkaynak ME. Farklı fiksasyon işlemlerinin karaciğer boyutu üzerine etkisi: stereolojik bir çalışma. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2006, 13(3): 151-156.

Ananthanarayanan, V, Pins, M.R, Meyer, RE, and Gann, PH. Immunohistochemical assays in prostatic biopsies processed in Bouin's fixative. *Journal Clin. Pathol*. 2005, 58: 322–324

Arıncı K, Elhan A. *Anatomi*. 4. Baskı. Ankara, Güneş Kitapevi Ltd Şti., 2006: 330-334.

Baker JR. *Principles of Biological Microtechnique*. London: Methuen.1958: 19-139.

Barlow NJ and Foster PM. Pathogenesis of male reproductive tract lesions from gestation through adulthood following in utero exposure to Di(n-butyl)phthalate. *Toxicol pathol*. 2003, 31: 397-410.

Bancroft JD. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Edinburg London Melbourne and New York. 1990: 53-74.

Bancroft JD, Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques*. Edinburgh: Churchill Livingstone.2008: 72-82.

Benson DM, Busch R. Fixation of testicular tissue for immunohistochemical and ultrastructural examination. *Andrologia*. 1996, 28: 27-33.

Bharath R. Physiology and Endocrinology of Spermatogenesis. In: Gunasekaran K ve Pandiyan N (eds). *Male Infertility a Clinical Approach*. 2017. New Delhi, Springer India, 2017: 17-25.

Bibbo M. *Comprehensive Cytopathology*. W. B. Saunders Philadelphia, 1997: 889-900.

Bloom W, Fawcett DW. *Textbook of histology*. Philadelphia 1975: 796-834.

Bolender DL, Kaplan S. Basic embryology. In: Polin RA, Abman SH, Rowitch DH, Benitz WE, Fox WW, eds. *Fetal and neonatal physiology*. 5. Baskı. Philadelphia, Elsevier. 2017: 23-38.

Canan S, Bahadır A, Yişdırım Ş, Odacı E, Şahin B, Baş O, Çolakoğlu S, Bilgiç S, Kaplan S. Stereolojik uygulamalarda kullanılan pratik gereçler ve bilgisayar destekli stereolojik analiz cihazları. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2004, 24: 672-680.

Carson FL. *Histoteknoloji* . 2. baskı. Chicago: ASCP Basın, 1997: 352-365.

Chapin RE, Ross MD, Lamb JC. Immersion fixation methods for glycol methacrylate-embedded testes. *Toxicol Pathol*. 1984, 12: 221-227.

Creasy DM. Evaluation of testicular toxicology: a synopsis and discussion of the recommendation proposed by the society of toxicologic pathology. *Birth Defects Research B: Development and Reproductive Toxicology*. 2003, 68(5): 408-415.

Creasy DM, Jonassen H. Histological fixation of testes: Use of Davidson's fluid as an Bouin's fluid. *Vet pathol*. 1999, 36: 518.

Çelik Ç. Erkek üreme sistemi. İçinde: *diFiore'nin Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileri ile*, Demir R, (Çeviri editörü). *diFiore's Atlas of Histology with Functional Corrolations*, Eoschenko V. 12. Baskı, Ankara, Pame Yayınları, 2013: 477-504.

De Kretser DM. The Testes. *Bailliere's Clinical Endocrinology and Metabolism Journal*. International Practice and Research. London,1992, 6:2: 235-331.

Demir N. Erkek Üreme Sistemi. İçinde: Baykal B, (editör). Histoloji Konu Anlatımlı ve Atlas *Histology: A Text And Atlas 6/E*, Ross MH, Pavlina. 6. Baskı, Ankara, Palme Yayınları, 2014: 698-738

Ding S. Effects of tissue fixation on Raman spectroscopic characterization of retina. Ziraat ve Biyosistem Mühendisliği. Yüksek lisans tezi, Ames, Iowa: Iowa Üniversitesi, 2015.

Doran F. Histokimya. *Aegean Pathology Journal*. 2005, 2: 62-70.

Dutta D, Mills P, Mills NC. Fixation Temperature Affects DNA Integrity in the Testis as Measured by the TUNEL Assay. *Toxicology Pathology*. 2012, 40: 667-674.

Dym M, Fawcett DW. Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biology of Reproduction*. 1971, 4(2): 195-215.

Eldred WD, Zucker C, Karten HJ, Yazulla S. Comprasion of fixation and penetration enhancement techniques for use in ultrastructural immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1983, 31: 285-292.

Eltoum, Fredenburgh J, Myers RB, Grizzle WE. Dokuların fiksasyon teori ve pratiğine giriş. *J Histotechnol*. 2001, 24: 173 -190.

Eltoum, Fredenburgh J, Grizzle WE. . Fiksasyonda ileri kavramlar: 1. Fiksasyonun immünohistokimya, fiksasyonun reversibilitesi ve proteinler, nükleik asitler ve sabit

ve işlenmiş dokulardan diğer moleküllerin geri kazanımı üzerindeki etkileri. 2. Fiksasyon gelişim yöntemleri. *J Histotechnol*. 2001, 24: 201-210.

Erkanlı-Şentürk G, Ersoy-Canıllıoğlu Y, Umay C, Demiralp-Eksioğlu E, Ercan F. Distribution of Zonula Occludens-1 and Occludin and alterations of testicular morphology after in utero radiation and postnatal hyperthermia in rats. *International Journal Experimental Patholog*. 2012, 93: 438-449.

Erkoçak A. *Özel Histoloji*. 2. Baskı, Ankara, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları. 1990: 166-194.

Eroschenko VP. *Di Fiore's Atlas of Histology With Functional Correlations*. 9. Edition. Ankara, Palme Yayıncılık, 2001: 251-265.

Eroschenko VP. *diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Eleventh Edition. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2008: 409-431.

Gartner PG, Hiatt JL. *Color Text Book of Histology*. 3rd ed. Philadelphia, WB Saunders Co, 2006.

Gray H. *Anatomy of the Human Body*. Philadelphia, Lea & Febiger, 2000.

Grizzle WE, Fredenburg JL, Myers RB. *Fixation of Tissues*. In: Bancroft JD, Gamble M(eds). *Theory and Practice of Histological Techniques*, 8th ed. John Canelon(UK); Kathleen Neely(USA) 2008: 53-74.

Gün H, Demirbağ E, Çınar K. Farklı Fiksatiflerin Bazı Dokular İçin Uygunluğunun Belirlenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*. 2011, 15(2): 75-79.

Hatipoğlu MH. *Anatomi ve Fizyoloji*, 16. Baskı. Ankara, Hatipoğlu Yayınevi, 2012: 276.

Hayran M, Hayran M. *Sağlık Araştırmaları İçin Temel İstatistik*. 2. Baskı. Ankara, Azim Matbaacılık, 2018: 418.

Hess RA, Moore BJ. histological fixation of testes. In: *Methods in Toxicology*, Vol 3, Part A. *Male Reproductive Toxicology*. Chapin RE, Heindel JJ (eds). Academic Press Inc, San Diego, CA. 1993: 86-94.

Hewitson TD, Wing B, Becker GJ. Tissue Preparation for Histochemistry: Fixation, Embedding, and Antigen Retrieval for Light Microscopy. In: Hewitson TD, Darby IA (eds). *Histology Protocols, Methods in Molecular Biology*. USA, Humana basın, 2010: 3-19.

Howrody P, Hoyle-Thacker R, Lyht O, Willams D, Kleymenova E. Morphology of the fetal rat testis preserved in different fixatives. *Toxicologic pathology*. 2005, 33: 300-304.

Huang BQ, Yeung EC. Chemical and physical fixation of cells and tissues: an overview. *Springer International Publishing Switzerland*. 2015: 23-32.

Humason GL. *Animal Tissues Techniques*, Ed: A.C. Barlett. San Francisco: The Maple-Vail Book Manufacturing Group. Fourt Ed. 1979: 26-28.

Jingsheng F, Holstein AF. Preservation of testicular tissue before fixation. *Andrologia*. 1990, 22: 361-368.

Joffe M. Infertility and environmental pollutants. *British Medical Bulletin*. 2003, 68: 47-70.

Kalaycı Ş. *Histoloji*. Bursa:Uludağ Üniversitesi Basımevi. 1986.7.

Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli G. *İnsan embriyolojisi*.7.Baskı.İstanbul:Alfa Basım Yayım Dağıtım;1992.

Kalthur SG ve Kalthur G. Anatomy and Development of the Male Reproductive System. In: Gunasekaran K ve Pandiyan N (eds). *Male Infertility a Clinical Approach*. 2017. New Delhi, Springer India, 2017: 1-14.

Kangasniemi M, Huhtaniemi I, Meistriich ML. Failure of spermatogenesis to recover despite the presence of a spermatogonia in the irradiated LBNF1 rat. *Biol Reprod*, 1996, 54: 1200-1208.

Kaplan S, Canan S. *Unbiased Stereological Techniques*. NeuroQuantology 2012, 10(1): 9-10.

Kayalı H. *Özel Histoloji*. İstanbul Üniversitesi Film Merkezi, İstanbul, 1989.

Keebler C.M., Sormak T.M.(Eds). *The manual of Cytotechnology*. Chicago 1992: 1431-1432.

Kelder W, Inberg B, Plukker JTM, Groen H, Baas PC, and Tiebosch ATMG. *Effect of modified Davidson's fixative on examined number of lymph nodes and TNM-stage in colon carcinoma*. European Journal of Surgical Oncology (EJSO). 2008, 34(5): 525- 530.

Kiernan JA. Histological and histochemical methods: Threory and practice. 3rd ed. Oxford: *Butterworth-Heinemann Press*. 1999: 11-35.

Kok LP, Boon ME. *Microwaves for the art of microscopy*. Leyden: Coulomb Press. 2003.

Koss, L.G.: *Diagnostic Cytology and Ist Histopathological Basis*. 4. Baskı. J.B Lippincott, Philadelphia. 1992, 1-10/623-632.

Köktürk S, Ceylan S, Yardımoğlu M, Dalçık H, Gonca S. Farklı tespit solüsyonlarıyla perfüzyon ve immersiyon tespit yöntemlerinin değişik dokularda ışık mikroskopik düzeyde karşılaştırılması. *Genel Tıp Dergisi*. 1999, (4): 135-139.

Kuran O. *Sistematik Anatomi*. İstanbul, Filiz Kitabevi. 1983: 512-514.

Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM. Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: Comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicologic Pathology*. 2002, 30(4): 524-533.

Leica, Microsystems. Malzeme Güvenlik Bilgi Formu:% 10 Millonig'in Tamponlanmış Formalin. 2007; [http://www.leica-microsystems.com/index.php?id=1504&tx_leicaproducts_pi1\[showUid\]=3299&tx_leicaproducts_pi1\[tab\]=downloads&cHash=49baf1391ce5bcd25cd31e224782b369](http://www.leica-microsystems.com/index.php?id=1504&tx_leicaproducts_pi1[showUid]=3299&tx_leicaproducts_pi1[tab]=downloads&cHash=49baf1391ce5bcd25cd31e224782b369) 30.12.2017.

Leong AS, Leong Y. *Microwavr Technology For Light Microscopy And Ultrastructural Studies*. Bangkok: Milestone. 2005.

Malas MA, Gökçimen A, Sulak O. Stereoloji yöntemiyle fötal dönemdeki testis hacminin hesaplanması. *T Klin Tıp Bilimleri*. 1999: 19.

Mallidis C, Volpe V, Ostör A, Lopata A, Baker HWG. Fixation and staining of testicular tissue. *The journal of histotechnology*. 1994, 17(2): 111-114.

Mescher LA. *Junqueira's Basic Histology*, 13th ed. London, McGraw-Hill. 2013: 429-448.

Mete Ö. Patolojide Temel Histopatolojik Laboratuar Teknikleri. *Türk Patoloji Derneği Meslek içi eğitim Kursu*. 2004, 3: 1-33

Mills NC, Mills TM, Means TM. Morphological and biochemical changes which occur during postnatal development and maturation of the rat testis. *Biol. Reprod*. 1977: 124-130.

Mitchell GA. *The Innervation of the Kidney, Ureter, Testicle and Epididymis*. *J Anat* 1935, 70(Pt 1): 10-32. Mittwoch U, Mahadevaiah S. Comparison of development of human fetal gonads and kidneys. *J. Reprod. Fertil*. 1980, 58(2): 463-467.

Mittwoch U, Mahadevaiah S. *Comparison of development of human fetal gonads and kidneys*. J Reprod Fertil. 1980; 58(2); 463-467.

Moore KL. *The Developing Human Clinically Oriented Embryology, The Beginning of Human Development*. First Week, 8. Edition, 2003: 15-41.

Neas JF. *The cell, Embriyoloji Atlas*. New York: Churchill Livingstone. 2010, 78.

Netter FH, MD. *The Netter Collection of Medical Illustrations Volume 2: Reproductive System*. Tıraş B, Güler İ. *Cilt:2 Üreme Sistemi*, Ankara, Güneş Tıp Kitabevleri. 2012: 2-26.

Noorafshan A. Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research. *Annals of Anatomy – Anatomischer Anzeiger*. 2014, 196(1): 57-66.

Odar İV. *Anatomi*, 6. Baskı. Ankara, Yeni Desen Matbaası, 1969: 292-304.

Oliva A, Spira A, Multigner L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Human Reproduction Science*, 2001, 16(8): 68-76.

Organization for Economic Co-Operation and Development. Reproduction/developmental toxicity screening test. In: *Guideline for testing of chemicals*. Paris: OECD. 1995: 1–10.

Organization for Economic Co-operation and Development. Proposal for updating Guideline 416: two generation reproduction toxicity study. In: *Guideline for testing of chemicals*. Paris: OECD. 2001: 1–13.

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Proposal for updating guideline 416: Two generation reproduction toxicity study. In: *OECD guideline for testing of chemicals*. Paris. 2001: 1-13.

Ovale WK, Nahirney PC. *Netter Temel Histoloji*. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çeviri editörleri), Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri. 2009.

Özenci ÇÇ, Akkoyunlu G. Spermatogenez. İçinde: *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Demir R, (Çeviri editörü). *Histology and Cell Biology*, Kierszenbaun AL, MD, PhD. Ankara, Palme Yayıncılık, 2006: 531-550.

Öztürk NP, Kahveci Z, Eyigör Ö, Sırmalı ŞA. Pankreas Dokusunun Değişik Yöntemlerle Fiksasyonu. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2002, 28(3):71-75.

Pabuççuoğlu HU. Makroskopik Değerlendirme ve Tespit(Fiksasyon). http://www.turkpath.org.tr/files/2_makroskopi_tespit_UP_metin.pdf 15.08.2016.

Pertersen PM, Pakkenberg B. Stereological Quantitation of Leyding and Sertoli Cells in the Testis From Young and old Men. *Image anal stereol*. 2000: 19; 215-218.

Pertersen PM, Seierqe K, Pakkenberg B. The Total Number of Leyding and Sertoli Cells in the Testes of Men Across Various Age Groups – A Stereological Study. *Journal of Anatomy*. 2015: 266; 175-179.

Prophet EB. Fixation. In: Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington, Armed Forces Institute Of Pathology, 1992: 25-28.

Rolls GO, Çiftçi NJ, Hall JB. Histolojik ve sitolojik preparatlardaki eserler. Woods A ve Ellis R edsinde. *Laboratuvar histopatolojisi*. New York: Churchill Livingstone, 1994, 5.3-1-5: 3-29.

Rooij PK, Russell LD. Development of the male reproductive system. In: *Clinical urologic endocrinology*. London: Springer; 2013: 11-24.

Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas with Cell and Molecular Biology*. 4 edition. Lippincott Williams & Wilkins. 2003

Ryu BY, Orwig KE, Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. *Phenotypic and functional characteristics of male germline stem cells in rats*. Dev Biol. 2004; 274: 158-170.

Sancak B, Cumhuri M. Erkek Genital Organları (Organa Genitalia Masculina). İçinde: *Fonksiyonel Anatomi Baş Boyun ve İç Organlar*. Sancak B, Cumhuri M(editörler). 7. Baskı. Ankara, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş. Yayınları. 2013: 286-291.

Sarsılmaz M. *İnsan Anatomisi*, 1. Baskı. İstanbul, Akademi ve Basın Yayıncılık, 2014: 589-592.

Seymen CM. Ehrlich Ascites Tümör Olgularında Antioksidan Uygulamasını Testis Dokusuna Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. Ankara: Gazi Üniversitesi. 2010.

Sharpe RM, McKinnell C, Kivlin C, Fisher JS. Proliferation and functional maturation of sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction*. 2003, 125: 769-784.

Snell RS. *Clinical anatomy*. 3. Baskı. Boston, Brown and Company. 1986: 168-175.

Stenberger LA. *Immunocytochemistry*. 2nd ed. John Wiley and Sons, New York. 1979.

Solakoğlu S, Ahışhalı B. Erkek Üreme Sistemi. İçinde: *Temel Histoloji*, Aytekin Y, (Çeviri editörü). *Junqueira's Basic Histology*, Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. 8. Baskı. İstanbul, Barış Kitabevi. 1998: 407-422.

Solomon EP. *Introduction to Human Anatomy and Physiology*. Süzen LB. *İnsan Anatomisi ve Fizyolojisine Giriş*, 4. Baskı. İstanbul, Birol Yayın Dağıtım ve Ticaret A.Ş. 2002: 248-249.

Speroff L, Fritz MA. *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, 8th ed. USA, Lippincott Williams and Wilkins Press. 2005: 1337.

Sternberg SS. *Histology for pathologist*. Raven Press Lt, New York. 1992: 731-9.

Tapul L, Akyüz A, Albayrak M, Aydın İ, Gül C, Özdemir İ, Özdemir Ü, Özyaman S. Histokimyasal Teknikler. İçinde: Tapul L(editör). *Genel Embriyoloji ve Histoloji Uygulama/Tekniker Kitabı*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri. 2012: 69-72.

Teerds KJ, Boer-Brouwer M, Dorrington HJ, Balvers M, Ivell R. Identification of markers for precursor and leydig cell differentiation in the adult rat testis following ethane dimethyl sulphonate administration. *Biol Reprod*. 1999; 60(6): 1437-45.

Tekelioğlu M. *Genel Tıp Histolojisi*. Beta Basım Yayım Dağıtım. Ankara; 1989.

Terzioğlu F, Yücel Ç, Karatay G. *Sigara ve İnfertilite*. 1. Baskı. Ankara, Klasmat Matbaacılık. 2008: 23.

Tschanz SA, Burri HH, Weibel ER. A Simple Tool for Stereological Assessment of Digital Images: the STEPanizer. *Journal of Microscopy*. 2011: 243; 47-59.

Tu L, Yu L, Zhang H. Morphology of rat testis preserved in three different fixatives. *Huazhong University of Science and Technology and Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. 2011, 31(2): 178-180.

Tubules AR. Testosterone and Spermatogenesis. *J. Androl*. 1992, 13(2): 172-184.

Tunalı Y. Erkek Üreme Sistemi. İçinde: *BRS:Embriyoloji*, İrez T, Erkan M, (Çeviri Editörleri). *BRS:Embryology*, Dudek RW. 1. Baskı, İstanbul, İstanbul Tıp Kitapevleri. 2016: 180-189.

U.S. Environmental Protection Agency. 1998. Health effects test guidelines. OPPTS 870.3800. Reproduction and fertility effects. Available at http://www.epa.gov/OPPTS_harmonized/870_health_effects_test_guidelines/series/870_3800.pdf.

Young B, Heath JW. *Functional Histology*. Churchill Livingstone. 2000.

Yücel AH. *Erkek Genital Sistem(Systema Genitale Masculinum)*. İçinde: Gövsa Gökmen F (editör). *Sistemik Anatomi*, 2. Baskı. İzmir, İzmir Güven Kitapevi. 2008: 547-564.

Weibel ER. *Stereological methods. Practical methods for biological morphometry*. Academic Press, London. 1979.

Wikramanayake E. Testicular size in young adult sinhalase. *International Journal of Andrology*. 1995, 18(1): 29-31.



EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER	
Adı Soyadı	: Gülden TURHAN
Doğum tarihi	: 04.03.1987
Doğum yeri	: Çan
Medeni hali	: Bekar
Uyruğu	: T.C.
Adres	: Balıkesir Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 10600 Balıkesir
Tel	: 0266 244 00 10
Faks	: 0266 244 00 11
E-mail	: guldenn_turhan@hotmail.com
EĞİTİM	
Lise	: Çanakkale Sağlık Meslek Lisesi (2005)
Önlisans	: Çanakkale Sağlık Hizmetleri ve Meslek Yüksek Okulu (2007)
Lisans	: Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi (2008-2011)
YABANCI DİL BİLGİSİ	
İngilizce	: Orta derecede
ÜYE OLUNAN MESLEKİ KURULUŞLAR	
	Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği

EK-2. ETİK KURUL RAPORU

T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görkle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE

ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	<i>Testisin stereolojik metotlar ile incelenmesinde farklı fiksatiflerin etkilerinin karşılaştırılması</i>
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ	Yrd. Doç. Dr. Bahar SUNAY
	KURUMU	Balıkesir Üni. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Gülden TURHAN
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Gülden TURHAN'ın Yüksek Lisans Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01.01.2016 – 30.06.2016
	KULLANILACAK HAYVAN TURU VE SAYISI	20 Adet Erkek Sıçan
DESTEKLEYİCİ KURULUŞ	Balıkesir Üniversitesi BAPK'na Başvurulacak	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2015 - 12 / 07	Tarih : 20.10.2015
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletmesine oy birliğiyle çöklüğü ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması. 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması. 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi. 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması. 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Kasım ÖZLÜK Başkan	Tıp- Fizyoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Levent BÜYÜKÜYSAL Başkan Yardımcısı	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. M. Muhtar KAHRAMAN Üye	Vet- Patoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Aydın İPEK Üye	Ziraat- Zootečni	Ziraat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Sibel TAŞ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Doç. Dr. Elif ATICI Üye	Tıp -Deontoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Doç. Dr. Serdal DİKMEN Üye	Vet- Zootečni	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Yrd. Doç. Dr. Bulent EDİZ Üye	Tıp - Biyoistatistik	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
İbrahim YAŞAR Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Avukat	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Taner GÜLER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Ziraat Yüksek Mühendisi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Faruk KUÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	ÜD-DEHYUAM	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			

* Araştırma ile ilişkisi

EK-3. PROJE SÖZLEŞMESİ

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ SÖZLEŞMESİ

MADDE 1- Balıkesir Üniversitesi tarafından desteklenmesine karar verilen 2015/216 no' lu, "Hünnapın Sıçanlarda Testis İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerindeki Etkileri " isimli projenin, Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesiyle belirlenen esaslar dahilinde yürütülmesi ve sonuçlandırılması amacıyla Balıkesir Üniversitesi Rektörü Prof. Dr. Kerim ÖZDEMİR ile proje yürütücüsü Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY arasında aşağıda belirlenen koşullarla iş bu sözleşme imzalanmıştır.

MADDE 2- Proje yürütücüsü, projenin Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönergesi ve bu sözleşme hükümlerinde öngörülen amaç, kapsam, süre ve diğer hususlara uygun olarak yürütülmesi ve sonuçlandırılmasından sorumludur.

MADDE 3- Desteklenmesi kabul edilen projenin amaç, kapsam, süre, program, yardımcı araştırmacılar ve bütçesinde yapılacak değişiklikler, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun kararıyla mümkündür.

MADDE 4- Bilimsel Araştırma Projeleri kapsamında alınan demirbaşlar bölüm ayniyat mutemetlerine zimmetlenir. Adı geçen demirbaş ürününün proje bitim tarihinden itibaren 1 (bir) ay içerisinde iade edilmesinden proje yürütücüsü sorumlu olup, iade işleminin belirlenen süre içerisinde yapılmamasının sonucunda proje yürütücüsü ürün bedelini karşılayacağını kabul eder.

MADDE 5- Proje yöneticisi, aşağıdaki tarihlerde ara ve sonuç raporlarını istenilmeden teslim etmek zorundadır :

.../.../2015 1. Ara Rapor

.../.../2015 2. Ara Rapor

.../.../2016 3. Ara Rapor

... / ... / 4. Ara Rapor

... / ... / 5. Ara Rapor

.../.../..... Kesin Rapor

Ayrıca istenildiğinde proje ile ilgili ayrıntılı bilgileri ve kayıtları Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna vermekle yükümlüdür. Ara Raporlarının, kabul edilebilir mazeret bildirmeksizin bu sözleşme ile belirlenen tarihlerde teslim edilmemesi halinde proje yürütücüsüne ödeme yapılmaz bu durumda Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu projeyi iptal edebileceği gibi proje yürütücüsünün değiştirilmesine de karar verebilir.

Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenen projeler Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunun ve / veya bu komisyonun belirleyeceği proje izleyicileri tarafından yerinde incelenebilir; proje yürütücüsü izleyicilere istenilen her türlü belgeyi vermekle yükümlüdür.

MADDE 6- Proje yürütücüsü, sonuçlanan projenin tüm yönlerini ve sonuçlarını kapsayan Kesin raporunu sözleşme tarihinin sona ermesinden itibaren dört ay içinde Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nce hazırlanmış olan "Kesin Rapor" formatına uygun olarak Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine vermekle yükümlüdür. **Kesin Raporun kabul edilen sürede sunulmaması veya kabul edilebilir bir mazeret bildirilmemesi halinde proje iptal edilir.**

Bilimsel Araştırmalar ciltlenmiş olarak sunulan "Kesin Raporu" Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından incelendikten sonra kabul edilebilir veya gerekli düzeltmelerin yapılması istenebilir. Yapılan değişikliklerden sonra **Kesin Raporu** yeniden değerlendirilir. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından Kesin Raporda yapılması istenilen değişiklikler için tanınan süre azami proje süresinin kullanılmış olması halinde 2 ayı geçemez.

MADDE 7- Proje yürütücüsünün gerçekçi gerekçeler sunması koşuluyla, projeye en fazla toplam bütçesinin %50'si kadar ek ödenek ve / veya 1 yıla kadar ek süre verilmesi konusu Komisyon tarafından değerlendirilebilir.

MADDE 8- Proje yürütücüsü, tamamlanan proje ile ilgili veri, kayıt ve dokümanları en az 10 yıl saklamak zorundadır.

MADDE 9- Proje yürütücüsü, proje ile ilgili verileri ve bulguları, yayınladığı her türlü yazı, makale ve sunduğu bildirimlerde "**Balıkesir Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.**" ibaresini belirtmek zorundadır.

MADDE 10- Proje ile ilgili çalışmaların sürdürülmesinde, işyeri ve proje personeli yönünden çalışmanın gerektirdiği her türlü güvenlik önlemlerinin alınmasından proje yürütücüsü sorumludur.

MADDE 11- Bilimsel Araştırma Birimi Komisyonunca desteklenmek suretiyle ele alınan bu projenin sonucunda 17.7.1963 tarih ve 278 sayılı Kanunun 2/a maddesine göre bir ihtira meydana gelirse bu ihtira aynı kanunun 21. maddesi uyarınca Bilimsel Araştırma Birimi Komisyonuna ait olacaktır. Ancak Bilimsel Araştırma Birimi Komisyonunun bu ihtiradan dolayı usulüne uygun olarak istihsal edeceği patenti satma yahut kiralama yolu ile elde edeceği bedel veya kiranın %30'u ihtirayı yapan veya yapanlara verilecektir.

MADDE 12- Projeden elde edilen bilimsel sonuçların telif hakkı Balıkesir Üniversitesine aittir.

MADDE 13- Proje kapsamında alınan araç-gereç vb. Üniversitemiz Öğretim Elemanlarının kullanımına açıktır.

MADDE 14- Bu sözleşme ile öngörülen toplam maddi destek miktarı ve ödeme planı bilimsel araştırma projeleri ödeneklerinin nakit akışında meydana gelebilecek kısıntıların neden olacağı aksamalar mücbir sebep olarak kabul edilir ve bu nedenle taraflar sorumlu tutulamazlar.

MADDE 15- Lisansüstü Öğrenim Araştırma projelerinden tez basımı dışında, bir (1) yıl içinde yayın yapılmadığı takdirde, tez yürütücüsü tezi yapanında adının geçmesi koşuluyla tezden yayın hazırlamak hakkına da sahiptir.

MADDE 16 – Projeler kapsamında alınan makine ve teçhizat için ayrıca oda, derslik, laboratuvar vb. gibi yerler talep edilmeyecektir.

MADDE 17 - Projeyi desteklemek amacıyla Balıkesir Üniversitesi tarafından **2015 yılı için Sarf Malzeme Kalemine 4.000,00 TL , Makine Teçhizat Kalemine TL, Hizmet Kalemine..... TL, Yolluk Kalemine TL olmak üzere toplamda 4.000,00 TL** ödenek sağlanacaktır.

MADDE 18- .../.../2015 tarihinde taraflarca imzalanan bu sözleşmenin yürürlük süresi yıldır. Proje yürütücüsüne ek süre verilmesi halinde bu sözleşme ek sürede de geçerli olup, ayrı bir sözleşme imzalanmaz.

MADDE 19 –Proje kapsamındaki, yazışmalar, ara rapor, sonuç raporu, harcama işlemleri ve takibinde tüm sorumluluk proje yürütücüsüne ait olup, bu işlemlerden doğabilecek hata ve zararlar proje yürütücüsü tarafından karşılanır.

MADDE 20- Sözleşme giderleri Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından ödenir.

MADDE 21- Anlaşmazlık halinde yetkili merci Balıkesir Mahkeme ve İcra Daireleridir.

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ

Adına

Prof. Dr. Kerim ÖZDEMİR
R E K T Ö R

PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ


Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY
Öğretim Üyesi