



T. C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ASPARTAMIN TESTİSTE NEDEN OLDUĞU APOPTOTİK  
ETKİYE KARŞI KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİN  
KORUYUCU ETKİSİ**

Semiha TÜRE  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

Düzce, 2020

Form:6

## KABUL VE ONAY

**Histoloji ve Embriyoloji** Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan  
“Aspartamın Testiste Neden Olduğu Apoptotik Etkiye Karşı Kafeik Asit Fenil Esterin Koruyucu Etkisi “  
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 24/01/2020

TEZ SINAV JÜRİSİ

  
Prof. Dr. Meryem ÇAM  
Düzce Üniversitesi  
Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR  
Düzce Üniversitesi  
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Tülin FIRAT  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi  
Üye



Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 20 / 02 / 2020 tarih ve 2020/96 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

  
Prof. Dr. Adnan ÖZÇETİN  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

09.03.2020



SEMİHA TÜRE

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren çok değerli hocam Prof. Dr. Meryem ÇAM'a,

Tez konusunu seçerken isteklerimi göz önünde bulundurup bana yardımcı olan, çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde, oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı şekillendiren tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR'a,

Çalışmamın her aşamasında bana destek vererek katılım sağlayan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Hakan SOYLU'ya,

Araştırmamın uygulanmasına olanak sağlayan, yardımlarıyla her zaman destek olan Vet. Hek. Ali GÖK'e,

Çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen, tezimle ilgili her türlü sorunda içtenliğiyle öneri ve desteğini veren, yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü konuda yanımda olan Nurhilal ELCİYAR, Defne Rana OĞUZ ve Nurcan ŞAHAN'a,

Beni bu günlere sevgi ve saygı kelimelerinin anlamlarını bilecek şekilde yetiştirerek getiren, benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, hayatımın her evresinde bana destek olan, bu hayattaki en büyük şansım olan aileme,

Çalışma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen, üzüntüme ve sevincime ortak olan, bu süreçte gösterdiği sabır ve sevgisiyle desteğini hep hissettiren, her zaman yanımda olan, beni cesaretlendiren ve başarabileceğim şeylerin farkına varmamı sağlayan güzel insan, nişanlım Ruhi AÇIKGÖZ'e teşekkür ederim.

SEMİHA TÜRE

2020

## ÖZET

### ASPARTAMIN TESTİSTE NEDEN OLDUĞU APOPTOTİK ETKİYE KARŞI KAFEİK ASİT FENETİL ESTERİN KORUYUCU ETKİSİ

Semiha TÜRE

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR

Ocak 2020, 76 sayfa

Günümüzde infertilite, gittikçe artan bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Birçok faktör infertiliteye doğrudan ya da dolaylı olarak sebep olmaktadır. Aspartam tatlandırıcı olarak özellikle çeşitli gıda ve gazlı içeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Aspartamın başka dokular üzerine toksik etkisinin olduğu çalışmalarda gösterilmiştir ama testis üzerine olan apoptotik etkisiyle ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Kafeik Asit Fenetil Ester ise bal arıları tarafından üretilen propolisin bir bileşenidir. Fenolik bir bileşik olan CAPE'in antioksidan, antienflamatuar, antiviral, antikanser gibi birçok özelliği vardır. Çalışmamızda Aspartamın testis üzerinde varsa olumsuz etkisini göstermeyi ve Kafeik Asit Fenetil Ester ile bu olumsuz etkilerin ne kadar azaltılabileceğini görmeyi amaçladık. Deney için 2-3 aylık, 29 tane erkek fare kullanıldı. Denekler; Kontrol, Sham, CAPE, ASP ve CAPE+ASP olmak üzere beş gruba ayrıldı. ASP ve CAPE+ASP grubuna da gavaj yoluyla 50 mg/kg dozunda aspartam verildi. 35 gün boyunca CAPE ve CAPE+ASP grubuna intraperitoneal olarak 20 mg/kg dozunda CAPE verildi. Testis dokularında yapılan histolojik incelemelerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Cleaved Kaspaz-3 ve Kaspaz 8 kullanılarak yapılan immunohistokimyasal boyamada ise deney grupları arasında bir farklılık bulunmadı. P53 ekspresyonunun ASP grubunda anlamlı olarak azaldığı, CAPE+ASP grubunda ise ASP grubuna göre anlamlı olarak yükseldiği tespit edildi. Sonuç olarak 50 mg/kg dozda aspartamın testiste apoptozisi arttırmadığı gözlemlendi. P53 ekspresyonunun azalmasının bunda etkili olabileceği düşünüldü. CAPE tedavisinin p53 düzeyini yükseltmesi koruyucu olabileceğini gösterdi.

**Anahtar sözcükler:** Aspartam, CAPE, Cleaved kaspaz 3, Kaspaz 8, P 53

## ABSTRACT

### THE PROTECTIVE EFFECT OF CAFEIC ACID PHENETHYL ESTER AGAINST APOPTOTIC EFFECT OF ASPARTAM ON TESTIS

Semiha TÜRE

Master Thesis, Department of Histology and Embryology

Supervisor Asst. Prof. Kayıhan KARAÇOR

January 2020, 76 pages

Infertility appears to be an increasing problem today. Many factors cause infertility directly or indirectly. Aspartame is widely used as a sweetener, especially in various food and carbonated drinks. It has been shown in studies that aspartame has a toxic effect on other tissues, but there is no study on its apoptotic effect on testis. Caffeic Acid Phenethyl Ester is a component of propolis produced by honey bees. CAPE, which is a phenolic compound, has many properties such as antioxidant, anti-inflammatory, antiviral and anticancer. In our study, we aimed to show the negative effect of Aspartame on the testis, and to see how much these negative effects can be reduced with Caffeic Acid Phenethyl Ester. 29 male mice, 2-3 months old, were used for the experiment. These mice were randomly divided into 5 groups. The groups were Kontrol, Sham, CAPE, ASP and CAPE + ASP. ASP and CAPE + ASP group were given aspartame at a dose of 50 mg / kg by gavage. The CAPE and CAPE + ASP groups were given intraperitoneally 20 mg / kg dose of CAPE for 35 days. Histological examinations in the testicular tissues did not differ significantly between the groups. In immunohistochemical staining using Cleaved Kaspaz-3 and Kaspaz 8, there was no difference between the experimental groups. It was determined that P53 expression decreased significantly in the ASP group and increased significantly in the CAPE + ASP group compared to the ASP group. As a result, it was observed that aspartame at 50 mg / kg dose did not increase apoptosis in the testis. It was thought that a decrease in P53 expression may have an effect on this. CAPE treatment increased p53 level showed that it can be protective.

**Keywords:** Aspartame, CAPE, Caspase 8, Cleaved Caspase 3, P 53

# İÇİNDEKİLER

<b>BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>iii</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>TABLolar</b> .....	<b>ix</b>
<b>KISALTMALAR ve SİMGELER</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç.....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>2</b>
2.1. Erkek Üreme Sistemi.....	2
2.2. Testis Anatomisi .....	3
2.2.1. Spermatik kordon .....	4
2.3. Testis Embriyolojisi.....	6
2.4. Testis Fizyolojisi .....	9
2.5. Testis Histolojisi.....	11
2.5.1. Sertoli hücreleri: .....	12
2.5.2. İnterstisyel doku .....	13
2.5.3. Leydig hücreleri .....	13
2.5.4. Kan-testis bariyeri: .....	14
2.5.5. Spermatogenetik hücreler (germ hücreleri) ve spermatogenez:.....	15
2.5.6. Spermiyogenez .....	18
2.5.7. Testis içi kanallar .....	19
2.5.8. Spermin yapısı.....	20
2.6. Epididimis Histolojisi .....	21
2.7. Apoptoz .....	21
2.7.1. Apoptozun moleküler mekanizması.....	23
2.7.2. Kaspaz 3 yöntemi .....	26
2.7.3. Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi.....	27
2.7.4. Apoptozisin genetik kontrolü .....	29
2.8. Spermatogenezde Apoptozisin Rolü .....	30
2.9. Aspartam.....	32

2.9.1. Aspartamın kimyasal yapısı ve metabolizması .....	32
2.10. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE) .....	35
2.10.1. Kafeik asit fenetil esterin etki mekanizması .....	36
2.10.2. CAPE'nin antioksidan etkileri .....	36
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>38</b>
3.1. Deney Hayvanları .....	38
3.2. İzlenen Yol .....	39
3.3. İntraperitoneal Enjeksiyon Uygulaması .....	40
3.4. Gavaj Uygulaması .....	40
3.5. Cerrahi Prosedür .....	40
3.6. Semen Analizi .....	41
3.7. Işık Mikroskopik İnceleme .....	41
3.7.1. Doku takibi ve parafin blok hazırlama .....	41
3.7.2. Hematoksilen-eozin boyama prosedürü .....	43
3.7.3. Gomori-trikrom boyama prosedürü .....	44
3.7.4. Pas boyama prosedürü .....	45
3.7.5. İmmunohistokimyasal incelemeler .....	46
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>49</b>
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular .....	49
4.1.1. Histolojik bulgular .....	49
4.2. Spermiyogram Bulguları .....	53
4.3. İmmunohistokimyasal Bulgular .....	55
4.3.1. Kaspaz-3, kaspaz 8 ve P 53 immün işaretleme .....	55
4.3. İstatiksel Analiz .....	57
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>59</b>
<b>6. KAYNAKLAR .....</b>	<b>64</b>
<b>7. EKLER .....</b>	<b>75</b>
Ek 1: Etik Kurul Onayı .....	75
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>76</b>



## ŞEKİLLER

Şekil 1. Testisin erkek üreme sistemindeki şematik gösterimi.....	2
Şekil 2. Testisin sagittal kesitinin şematik gösterimi.....	4
Şekil 3. Beş haftalık embriyonun TBF varlığında yedinci haftadaki testis gelişimi .....	8
Şekil 4. Seminifer tübül içersinde yer alan hücrelerin şematik gösterimi .....	16
Şekil 5. Seminifer tübül.....	18
Şekil 6. Spermiyogenez aşamaları ve spermin yapısı.....	20
Şekil 7. İntrinsik ve ekstinsik apoptotik yolak .....	25
Şekil 8. Aspartamın kimyasal yapısı .....	34
Şekil 9. CAPE molekül yapısı .....	36
Şekil 10. Deney hayvanlarının bulunduğu kafesler.....	38
Şekil 11. Skrotumun kesilerek testisin açığa çıkarılması .....	41
Şekil 12. Testisin alınıp, bouinde fikse edildikten sonra kasetleme işlemi .....	42
Şekil 13. Testis dokusunun parafin blok haline getirilmesi ve mikrotomda kesilmesi ..	43
Şekil 14. İmmunohistokimyasal olarak boyanan örneklerin fotoğraflarının çekilmesi..	48
Şekil 15. Grupların testis ağırlıklarına ait grafik.....	49
Şekil 16. Tüm gruplara ait Hematoksilen-Eozin Boyaması .....	50
Şekil 17. Tüm gruplara ait Gomori-Trikrom Boyaması .....	51
Şekil 18. Tüm gruplara ait PAS boyaması .....	52
Şekil 19. Grupların toplam sperm sayıları.....	53
Şekil 20. Tüm gruplara ait sperm yayması, Hematoksilen-Eozin Boyama.....	54
Şekil 21. Testis dokusunun P 53 ve kaspaz 3 ile immunohistokimyasal boyaması .....	55
Şekil 22. Testis dokusunun kaspaz 8 ile immunohistokimyasal boyaması.....	56
Şekil 23. Testis dokusunun Fosforile-p53 aracılığıyla immunohistokimyasal boyanma yoğunluğunu gösteren grafik .....	57
Şekil 24. Testis dokusunun Caspase-8 aracılığıyla immunohistokimyasal boyanma yoğunluğunu gösteren grafik .....	58

## TABLÖLAR

<b>Tablo 1.</b> Aspartamın Kimyasal Özellikleri .....	34
<b>Tablo 2.</b> Deney Grupları, Maddeler ve Veriliş Yolları .....	39



## KISALTMALAR ve SİMGELER

<b>µl</b>	:	mikrolitre
<b>µm</b>	:	mikrometre
<b>ABP</b>	:	Androjen Bağlayıcı Protein
<b>AEC</b>	:	Amino Etil Karbazol
<b>ASP</b>	:	Aspartam
<b>ATP</b>	:	Adenozin Trifosfat
<b>BMP</b>	:	Bone Morphogenic Protein
<b>CAPE</b>	:	Kafeik Asit Fenetil Ester
<b>Cdk</b>	:	Siklin-Bağımlı Kinazlar
<b>DAB</b>	:	Di Amino Benzidin
<b>DED</b>	:	Death effector domain
<b>DER</b>	:	Düz Endoplazmik Retikulum
<b>DMSO</b>	:	Dimetil sülfoksit
<b>DRC</b>	:	Death Receptör Kompleksi
<b>FADO</b>	:	Fas bağımlı ölüm domain proteini
<b>FAO</b>	:	Food and Agriculture Organization
<b>FASL</b>	:	Fas Ligand
<b>FDA</b>	:	U.S. Food and Drug Administration
<b>FSH</b>	:	Folikül uyarıcı hormon
<b>g</b>	:	gram
<b>gER</b>	:	Granüllü Endoplazmik Retikulum

<b>GnRH</b>	:	Gonadotropin Releasing Hormone
<b>Ig</b>	:	İmmunoglobulin
<b>İHK</b>	:	İmmunohistokimya
<b>İP</b>	:	İntraperitoneal
<b>JECFA</b>	:	Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
<b>LH</b>	:	Lüteinleştirici hormon
<b>MDA</b>	:	Malondialdehid
<b>MTX</b>	:	metotreksat;
<b>PAS</b>	:	Periyodik asit-Schiff
<b>PBS</b>	:	phosphate buffered saline
<b>PS</b>	:	Fosfatidil Serin
<b>ROS</b>	:	Reaktif Oksijen Türleri
<b>SCI</b>	:	Science Citation Index
<b>SRY</b>	:	Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesi
<b>TBF</b>	:	Testis Belirleyici Faktör
<b>TNF</b>	:	Tümör nekrozu faktörü
<b>WHO</b>	:	World Health Organization

# 1. GİRİŞ ve AMAÇ

## 1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

İnfertilite, son zamanlarda büyük bir problem haline gelmiştir. Bu problemin altında birçok sebep yatmaktadır. Erkek fertilitesi spermatogenez ile başlar, taşınma, yardımcı organlarla depolanma ve uygun şekilde aktarılma ile tamamlanır. Bu aşamada spermin sayısal yetersizliği, yapısal sorunlar gibi birçok durum erkek fertilitisini etkileyebilmektedir<sup>1</sup>. Genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörler de infertiliteye yol açabilir. Sigara, alkol, hazır gıdalardaki kimyasal maddeler, teknolojik aletlerin sık kullanımı gibi faktörler bunlardan bazılarıdır. Yaygın olarak tüketilen, yapay tatlandırıcı olan aspartam özellikle çeşitli gıda, gazlı içecek ve ilaçlarda kullanılmaktadır. Laboratuvar hayvanları ve insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda aspartamın, gastrointestinal sistemde metanol, aspartik asit ve fenilalanine metabolize olduğu ifade edilmiştir. Aspartam sindirildikten sonra %50 fenilalanin, %40 aspartik asit ve %10 metanolden oluşmaktadır<sup>1</sup>. Metanol bunların arasında en zararlı olanıdır ve karaciğerde metabolize olmasıyla formaldehit meydana gelir. Formaldehit ise daha sonra birçok dokuda formik aside oksitlenir<sup>2,3</sup>. FDA, aspartamın kabul edilebilir günlük alım miktarını ADI 50 mg / kg / gün olarak belirlemişken, JECFA (Gıda Katkı Maddeleri Üzerinde Ortak FAO / WHO Uzman Komitesi) bu değeri 40 mg /kg vücut ağırlığı / gün olarak ifade etmiştir<sup>4</sup>. FDA ve JECFA' nın vermiş olduğu kabul edilebilir bu değerlere rağmen son zamanlarda yapılan bazı çalışmalarda aspartamın günlük 20mg/kg verildiğinde bile bir multipotansiyel karsinojenik ajan olduğu ileri sürülmüştür<sup>4</sup>.

CAPE, propolisin biyolojik olarak aktif bileşenlerinden biri olup antioksidan, antienflamatuar, antiviral, antikanser gibi etkisi geniş olan bir maddedir. En önemli özelliklerinden birisi de tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisidir<sup>5</sup>.

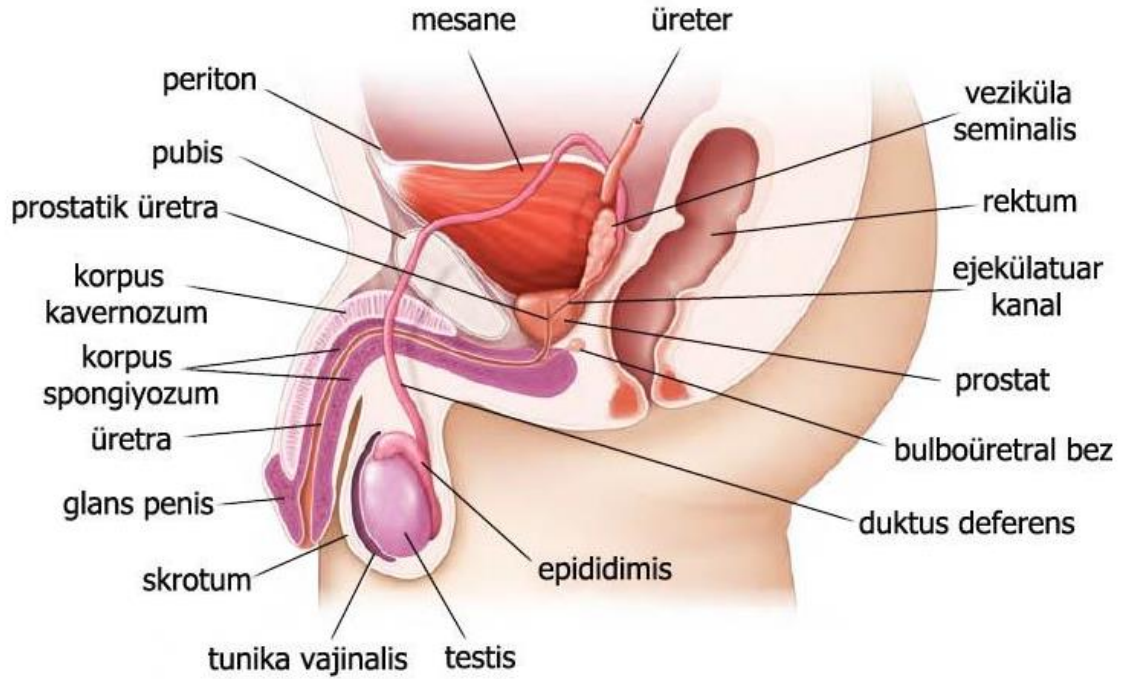
Bu çalışmada, aspartamın testis üzerinde varsa olumsuz etkisini gösterecek ve Kafeik Asit Fenetil Ester ile bu olumsuz etkilerin ne kadar azaltılabileceğini göstermiş olacağız.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek üreme sistemi; testis, yardımcı bezler ve genital kanallardan meydana gelir. Testislerin hormon ve spermatozoon üretmek gibi iki önemli görevi vardır. Testosteron, testiste üretilen başlıca hormonlardan biridir. Bu hormon, spermatogenez, embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşma ve gonadotropinin kontrolü için önemlidir<sup>6</sup>.

Genital kanallar ve yardımcı bezler ise düz kasların kasılmaları ile spermatozoonları dışarıya doğru sürükleyen salgıları üretir. Bu salgılar aynı zamanda spermatozoonlara gerekli olan besinleri sağlar. Spermatozoonlar, genital kanallar ve yardımcı bezlerin salgıları penis aracılığıyla dışı üreme sistemine bırakılan semeni oluşturmaktadır<sup>6</sup>.



Şekil 1. Testisin erkek üreme sistemindeki şematik gösterimi<sup>7</sup>

## 2.2. Testis Anatomisi

Erkek üreme organı olan testis, skrotum adı verilen bir kese içersinde yer alır, sağ ve sol olmak üzere burada asılı halde bulunur. Oval, yanlardan basık bir şekle sahiptir ve her ikisi de yaklaşık aynı büyüklüklüktedirler.

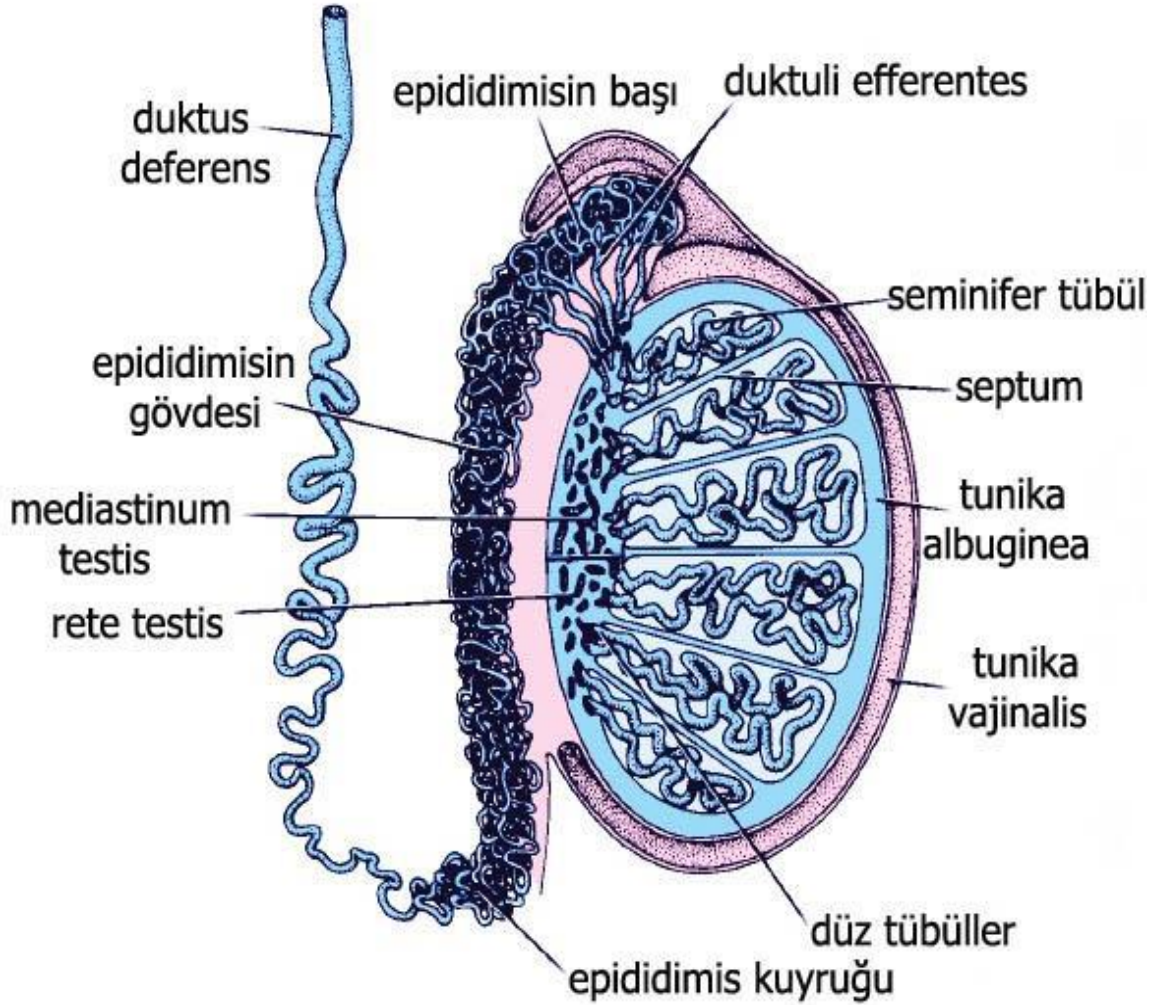
Testislerin boyutu her türde farklılık gösterebilir ancak ortalama 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm kalınlığında ve 2-3 cm genişliğinde olabilmektedir. Ağırlıkları ortalama 10-15 gramdır. Aynı büyüklükte olmalarına rağmen sol testis sağ testise göre genellikle 1 cm aşağıda yer almaktadır. Sağ testis ise sol testise göre %10 daha fazla ağırlığa sahiptir. Isıları vücut ısısından 3-4 °C daha düşüktür<sup>8</sup>. Testisler, temel fonksiyonlarını yerine getirebilmek için karın boşluğundan skrotuma inmek zorundadırlar<sup>9</sup>. Fetal dönemin başında, karın boşluğunda böbreklere yakın halde bulunurlar, fetüs büyüdükçe aşağıya inerler. Doğum öncesi inguinal kanaldan skrotum içerisine inişini tamamlarlar. Ayrıca bu yolla skrotuma inerken karın ön duvarı kaslarını da kendisiyle birlikte sürüklerler<sup>8</sup>. Testisi, dıştan içe doğru 3 tabaka sarar. Bu tabakalar tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosadır.

**Tunica vaginalis:** Dışta paryetal tabaka, içte viseral tabaka olmak üzere iki tabakadan meydana gelir. Bu iki tabaka arasında seröz bir sıvı vardır<sup>10</sup>.

**Tunika albuginea:** Testisleri dıştan saran kalın, sıkı fibröz bağ dokusu yapısına sahip bir tabakadır. Testisin arkasından içeri girerek kalınlaşır ve bu arada 'mediastinum testis' adı verilen yapıyı meydana getirir. Mediastinum testisten çıkan uzantılara ise 'septula testis' adı verilir. Bu uzantılar testisi, sayıları 200'ü aşan bölmelere ayırır<sup>11</sup>. Her lobül içinde de tubuli 'seminiferi kontorti' denen kanalcıklar bulunur. Spermiyumlar bu kanalcıkların duvarlarında gelişimlerini tamamlar. Seminifer tübüllerin başlangıç kısmı kıvrıntılı, son kısmı ise düz bir yapıdan oluşur. 'Tubuli rekti' denilen bu düz kısımlar mediastinum testisin fibröz dokusu arasına girer. Burada kanalların anastomozu sonucu 'rete testis' denilen ağ meydana gelir. Rete testisi yapan kanalcıklar mediastinum testisin üst ucunda 'duktuli efferentes' adı verilen kanallarla devam ederler. Duktuli efferentes ise tunika albugineayı delerek testislerden epididimise ulaşır<sup>9</sup>.

**Tunika vasküloza:** Kan damarlarını içeren gevşek bir bağ dokudan oluşur. Tunika albugineanın iç kısmında yer alır ve testis içindeki tüm yüzeyleri kaplar<sup>12</sup>.

Testislerin kanlanması, abdominal aortadan çıkan arteria testikularisler ile gerçekleşir. Testisin arka kısmından çıkan küçük venler birleşerek plexus pampiniformis denilen venöz ağı meydana getirirler. Testislerin venöz kanı sağda vena cava inferiora, solda ise vena renalis'e geçer. Testislerin innervasyonu ise 9-12 torakal spinal segmentten çıkan otonom sinirler ile gerçekleşir<sup>13</sup>.



Şekil 2. Testisin sagittal kesitinin şematik gösterimi <sup>7</sup>

### 2.2.1. Spermatik kordon

İnguinal kanaldan başlayıp, kanalın uzunluğu boyunca devam eder. Yüzeysel veya dış inguinal kanaldan çıkar ve testisin skrotumda asılı kalmasını sağlar. Spermatik kordon içinde testiküler damar ve sinirler, ilioinguinal sinir, genitofemoral sinirin genital dalı,



kremasterik damarlar ile duktus deferens bulunur. Fasiyal katmanlar karın duvarının katmanlarıyla devam eder. İnternal spermatik fasiya, transvers fasyadan meydana gelmiştir ve spermatik kordon etrafında ince, gevşek bir tabaka meydana getirir. Kremaster kasını oluşturan iskelet kası liflerini içeren kremaster fasiyası, iç oblik kastan köken alır. Dış spermatik fasiya dış oblik aponevrozu ile kesintisiz devam eder<sup>12</sup>.

### 2.2.1.1. Testiküler-skrotal arter sistemi

Vazal ve kremasterik arterler aracılığıyla testiküler arter tarafından kanlanan testisler, üç ayrı arteriyel sistem tarafından desteklenir. Bunlar;

1. Testiküler (İnternal spermatik) arter
2. Kremasterik (Eksternal spermatik) arter
3. Vazal (Deferensiyel) arter

**Testiküler arter:** testisi besleyen ana damardır. Toplam kan akımının 2/3'ünü sağlar. Aortanın ön yüzünden ve böbrek arterinin ortalama 3 cm altından çıkar. Kasık kanalına kadar devam eder ve spermatik kord yapılarının arasına girer. Bir ya da daha fazla dallara ayrılır ve testis arka yüzüne ulaşarak ve tunika albugineayı geçer. Seminifer tübüller arasındaki interlobüler arteriollerini oluşturmak üzere ana dalları ayrılır. Bu ana damar testiküler arter olmasına rağmen internal kremasterik ve vazal arterlerle arasında birçok kaynaşma olabilir<sup>14</sup>. Testiküler arter, testise girdiğinde üç dala ayrılır. Bunlar; inferior testiküler arter, internal arter ve kapital arterdir. Kapital arter epididimisin kan ihtiyacını karşılar. Bu dallanmanın düzeyi oldukça değişkenlik gösterirken, çalışmaların %31-%88 inde inguinal kanal içinde oluştuğu bildirilmiştir<sup>15,16</sup>.

**Kremasterik arter:** kan akımının 1/6'sını sağlayan bu arter tunika vajinalisin asıl besin kaynağıdır. Mediastinumda deferensiyel ve testiküler arterlerle birleşir ve tunika vaginalisin üzerinde ağsı bir yapı oluşturarak sonlanır<sup>14</sup>.

**Vazal arter:** kremasterik arterde olduğu gibi testisin kan akımının 1/6'sını sağlar. Vaz deferens ve epididimi besleyen arterdir. Testise yakın bir yerde, testiküler arterle birleşir. Testiküler arter vazal artere bağlandığı zaman kremasterik arterin de aracılığıyla, testis kan akımını artırır ve regülasyon sağlar. Bu regülasyon, testisi atrofiden korumak için yeterli olsa da spermatogenezi korumada yetersiz kalır<sup>14</sup>.

### 2.2.1.2. Testiküler-skrotal venöz sistem

Testiküler venöz kan akımı dört ayrı yapıyı içermektedir. Bunlar;

1. Testiküler (İnternal spermatik) ven
2. Kremasterik (Eksternal spermatik) ven
3. Vazal (Deferensiyel) ven
4. Gubernakuler ven

**Testiküler ven:** ince duvarlı ve zayıf bir yapısı vardır. Sağ tarafta vena cava inferiora eğik, solda ise renal vene dik olarak açılır ve testiküler artere eşlik eder. Sol testisin daha aşağı pozisyonda olması ve sol testiküler venin daha yüksekte olması nedeniyle sağdakinden 8-10 cm daha uzundur. İnterior vena cavanın daha fazla kan akışıyla olan çekiş etkisiyle sağdaki drenajı arttırdığı düşünülmektedir<sup>17</sup>.

**Kremasterik ven:** spermatik kordun arkasında yer alan kremasterik ven, dış inguinal kanal alanında yüzeysel ve derin inferior epigastrik venlere ve yüzeysel eksternal ile derin pudental venler yardımıyla eksternal iliak vene açılır<sup>14</sup>.

**Vazal ven:** Vaz deferens ile birleşik olan bu ven, superior-inferior vezikal venler yoluyla internal iliak vene dökülür<sup>14</sup>.

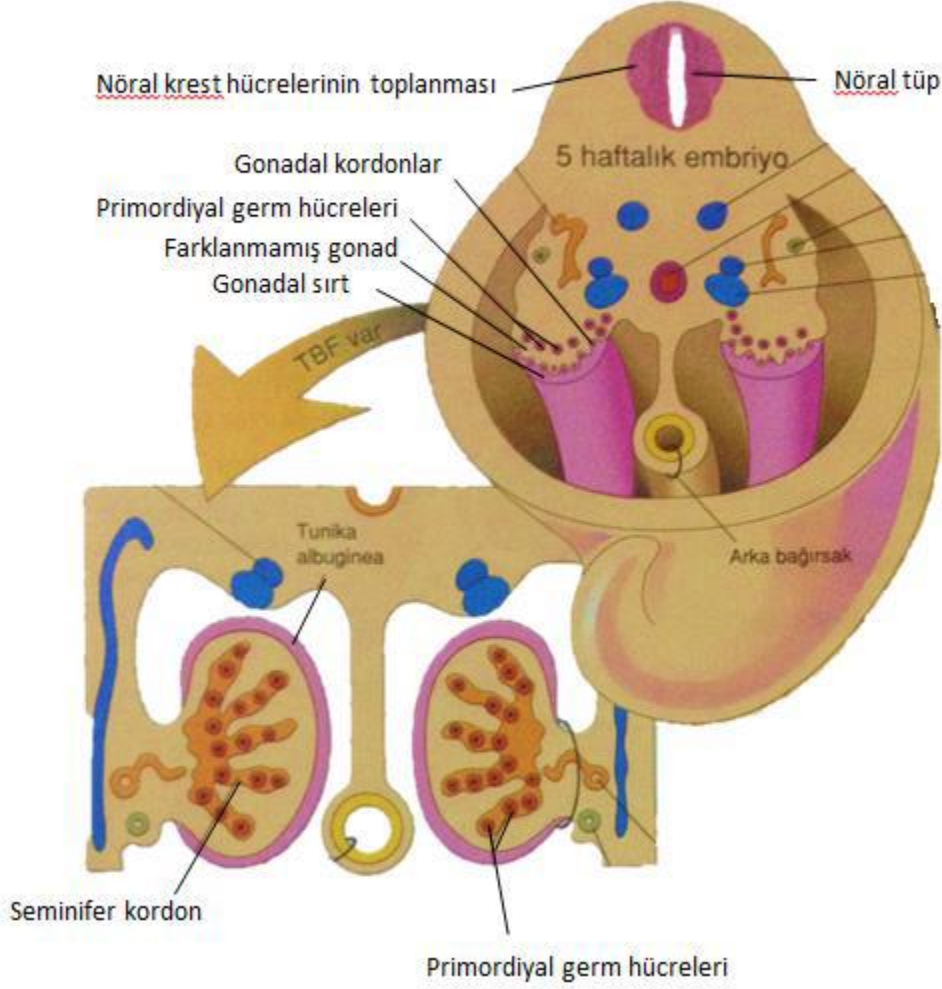
**Gubernakuler ven:** Safen ven ve eksternal pudental ven yoluyla eksternal iliak vene dökülür. İntratestiküler küçük venler, testis yüzeysel venlerine ve rete testiste hiler venlere açılırlar, daha sonra testis ve epididimden kaynaklanan venler, mediastinumdan çıkar ve duktus deferens önünde ve testiküler arter çevresinde 8-12 venden oluşan bir ağ halinde serbest anastomoz yapan 3 ayrı ven grubu pampiniform pleksusu oluştururlar<sup>14</sup>.

### 2.3. Testis Embriyolojisi

Gametler, gebeliğin ikinci haftasında epiblast içinde oluşan ve yolk kesesine göç eden primordial germ hücrelerinden köken alırlar<sup>18</sup>. Embriyonik gelişimin 4-6. haftaları arasında, yaklaşık olarak 10-100 adet primordiyal germ hücresi ameboid hareketlerle vitellus kesesinden bağırsak tüpüne, oradan da mezenter boyunca vücut arka duvarının sağ ve sol yanlarına göç ederler<sup>20</sup>. Primordial germ hücreleri ilk yolk kesesinde gözlenirler. Primordial germ hücrelerinin göçü BMP-4 (Bone Morphogenic Protein) tarafından düzenlenir. Göç sırasında mitoz bölünme ile sayıları giderek artar. Vücut

arka duvarında, 10. torasik vertebra hizasında, mezenşim içinde yaklaşık olarak 2500-5000 primordiyal germ hücresi yer alır ve bir çift genital kabarıklık oluşturmak üzere mezonefroz hücreleriyle sölomik örtü epitelinin hücrelerini, çoğalmaları için uyarırlar. Sölomik epitelyal kordonlar, farklanmamış gonadın dış korteks ve iç medulla bölgelerini oluşturmak için, gonadal kabarıklığın mezenşimi içine doğru büyürler. Altıncı haftada gonadal kabarıklıklara yerleşirler<sup>18</sup>. Fetal gelişimin 7. haftasına kadar her iki cinsiyet için genel tek bir gonad tipi vardır. Bu dönem gonadal gelişimin farklılanmamış evresidir. Bundan sonra erkek bireyi oluşturmak üzere farklılanmamış gonadın korteksi geriler ve medullası testisi oluşturur<sup>19</sup>. Gonad üzerindeki erkek veya dişi yönündeki farklılaşma 7. haftada gonadda gözlenir<sup>20</sup>. Gonadların over veya testise farklılaşmasından primordiyal germ hücreleri belirleyici roldedir<sup>21</sup>.

Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktör etkisiyle (TBF) için SRY geni, farklılanmamış gonadın testis gelişiminde önemli bir rol oynar. TBF, gonadal kordonları uyarır. Kordonlar ilerleyen zamanda testis ve meduller kordonları oluşturmak üzere gonadın iç bölgesine göç ederler ve bezin hilusuna doğru ince hücre sıralarından oluşan bir ağ meydana getirirler. İlerleyen zamanda testis kordonları yüzey epiteli ile olan bağlantısını kaybeder ve testis yüzeyi yoğun fibröz yapıdaki tunika albuginea ile epitelden ayrılır ve puberteye kadar kapalı bir şekilde kalırlar. Gestasyonun 16-20. haftaları arasında testis kordonları at nalı şeklini alır ve bu kordonların uçları rete testis olarak devam eder. Bu dönemde testis kordonları, germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden köken alan sertoli hücrelerinden meydana gelmektedir. Fetal testisin seminifer tübüllerinin büyük bir çoğunluğu sertoli hücrelerinden oluşur. Seminifer tübüller puberteye kadar solid halde kalırlar. Tübüllerin lümeni, puberteden sonra gelişir<sup>22</sup>.



Şekil 3. Beş haftalık embriyonun TBF varlığında yedinci haftadaki testis gelişimi<sup>23</sup>

Testesteron üretimini sağlayarak dış genital organlardaki farklılaşmada rol oynayan Leydig hücreleri testis kordonları arasında bulunan interstisyel dokudaki mezenkimal hücrelerin değişimi sonucu ortaya çıkar. Gebeliğin 20. haftasında testisin %50'sini oluşturan Leydig hücreleri doğuma doğru giderek azalır<sup>23</sup>. Pubertede testis kordonlarının lümenleri seminifer tübüleri meydana getirir. Seminifer tübüller rete testis lümenine bağlanır ve sonrasında duktuli efferentes ile devam ederler. Duktus efferens kanalları rete testis ile mezonefrik kanal arasında ilişkiyi sağlar. Mezonefrik kanallar ana genital kanalları oluştururlar. Epigenital tübüller rete testisin kordonları ile birleşip duktus efferensleri, paragenital tübüller ise rete testis kordonları ile birleşemeyip kalıntı halindeki paradidimi oluşturur. Duktus efferenslerin giriş yerinin altında mezonefrik kanallar uzayarak ductus epididimi oluşturur. Epididimin kuyruk kısmından seminal vezikül tomurcuğuna kadar uzanan kas tabaka ile sarılı kanal duktus deferens, seminal

vezikülden sonraki kanal ise ejakulatuar kanal olarak adlandırılır. Paramezonefrik kanal testikular appendiksi oluşturan kranial ucu dışında dejenere olur. Normal spermatogenezisin gerçekleşebilmesi için testislerin vücut ısısından 3-4 derece daha serin olan skrotuma inmesi gerekir. Fetal hayatın 3. ayından itibaren testisler skrotuma inmeye başlar<sup>24,25</sup>.

#### **2.4. Testis Fizyolojisi**

Testisler oval bir şekle sahip olup, vücudun dışında skrotum içersinde asılı halde bulunurlar. Uzunluğu 4-6 cm, hacmi 20-25 ml' dir. Embriyonal dönemin başında vücut boşluğunda bulunan testisler, doğumdan önce yaklaşık 7-8. aylarda skrotuma inerler<sup>26,27</sup>. Vücut sıcaklığının (37°C) altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenez için ısı çok önemlidir<sup>6</sup>. Skrotum sıcaklığı vücut sıcaklığının yaklaşık 3-4 °C altındadır. Testislerin karın boşluğunun dışında bulunmasının sebebi spermatogenez için daha düşük sıcaklığın (32-35°C) zorunlu olmasıdır. Sağlanması gereken bu sıcaklık çok önemlidir. Çünkü testislerdeki sıcaklık artışı, seminifer tübül hücrelerine hasar vererek spermatogenezini engelleyebilir. Bu işlemlerin gerçekleşmesine izin veren sıcaklık olan 34-35 °C'nin skrotumda korunması için çeşitli mekanizmalar vardır. Zengin bir venöz pleksus olan 'pampiniform pleksus' her bir testiküler arterin etrafını sarar ve testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan zıt yönlü ısı akımını sağlar. Skrotumdan buharlaşma ile uzaklaşan ter de ısı kaybına yardımcı olur. Skrotumun ince dartos kasının ve spermatik kordonların kremaster kaslarının kasılması veya gevşemesiyle testislerin vücuda yaklaştırılması veya uzaklaştırılması ile testis sıcaklığı kontrol altında tutulur<sup>6</sup>.

Sperm üretimi, depolanması, salgılanması ve testosteron üretimi testislerin başlıca görevleri arasında yer alır. Testislerin yapısında seminifer tübüller bulunur. Burası spermlerin oluşum yeridir. Seminifer tübüller, bazal membran ve peritübüler hücre tabakası ile çevrilidirler. Peritübüler hücreler, peristaltik hareketten sorumlu hücrelerdir. Bu hücreler kasılarak spermlerin epididime doğru ilerlemesine yardımcı olurlar<sup>27</sup>. Spermler ilk olarak seminifer tübüllerden epididime geçer. Epididim vaz deferense açılır ve prostat bezine girmeden hemen önce genişlemeye başlar. Prostatın her iki tarafında yer alan seminal veziküller, ampullanın prostat girişine açılır, hem ampulla

hem de seminal vezikül içerikleri ortak bir ejakülatör kanal aracılığıyla prostat gövdesinden geçerek internal üretraya boşalır<sup>28</sup>.

Endokrin faktörler spermatogenez üzerinde en önemli etkiyi gösterirler. Spermatogenez, hipofizden FSH ve LH hormonlarının testiküler hücrelerdeki etkilerine bağlıdır<sup>28</sup>.

**FSH:** Hipotalamustan salgılanan gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipofizden ön lobundan FSH salınımını stimüle eder. FSH sertoli hücrelerinden inhibin, aktivin ve ABP salgılanmasını uyarır. Spermatogenez östrojen ve progesteronlarla inhibe edilirken testosteron ile uyarılır. Spermatozoonlar epididimise, testiküler sıvı içinde taşınırlar. Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilen testiküler sıvı; proteinler, steroidler, iyonlar ve testosteronla birleşmiş ABP içerir. Testosteron ABP'e bağlanarak tübül lümenine taşınır ve spermatogenez başlar<sup>27</sup>.

Inhibin sertoli hücrelerinde sentezlenen bir proteindir ve hipofizden FSH salınımını baskılar. Üreme hücresi sayısı azalınca da FSH artar<sup>29</sup>.

**LH:** Hipotalamustan salgılanan gonodotropin salgılatıcı hormon (GnRH) hipofizden ön lobundan LH salgılanmasını uyarır. LH interstisyel hücreleri etkileyerek spermatogenez seri hücrelerinin normal gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını uyarır. Prolaktin ile birlikte Leydig hücre fonksiyonunun düzenlenmesinde yardımcı olur. Prolaktin, LH reseptörünün gen ekspresyonunu düzenler. Prolaktin artışı, Leydig hücrelerinden androjenlerin sentezini azaltarak spermatogenez zayıflatabilir ve bu da infertiliteye neden olur. Hipotalamo hipofizer kontrol ile testosteron, negatif geri bildirimde bulunarak LH sekresyonu 2 yolla baskılar;

1. Ön hipofize direk etki eder ve gonadotropik hücrelerin GnRH'a cevap olarak daha az salgı yapmalarını sağlar.

2. Hipotalamusu etkiler ve GnRH'ın salgı şiddetini düşürür. Bu da gonadotropinlerin salgılanmasını azaltır<sup>30</sup>.

## 2.5. Testis Histolojisi

Seksüel olgunlaşmayı ve sperm üretimini sağlayan testisler, ekzokrin (spermiyum üretimi ve atılımı); holokrin tipte sekresyon ve endokrin fonksiyonu (testosteron üretimi) gibi olan bir çift organdır. Skrotum içinde yer alan testisler, dıştan üç tabakalı kalın bir kapsül ile sarılıdır. İlk tabaka olan tunika vajinalis, testislerin karın boşluğundan skrotuma inerken birlikte sürüdüğü iki katlı periton tabakasıdır.

Anterolateral yüzeyde bulunur, mezotel ile kaplıdır. Orta tabaka olan tunika albugenia, yoğun bir fibroelastik bağ dokusu tabakasıdır. Testisin arka yüzünde kalınlaşarak 'mediastinum testis' adı verilen yapıyı oluşturur. Testise giren ve çıkan kan damarları, lenf damarları ve kanallar bu tabaka içinde yer alırlar. Bu fibröz alandan bezin içine doğru uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar testisi yaklaşık 250 adet piramidal lobüle bölmektedir. Her lobül içerisinde sperm üretildiği 1-4 adet seminifer tübül ile leydig hücrelerinin bulunduğu bağ doku yer almaktadır.

Genellikle kıvrımlı kanallara sahip olan seminifer tübüller, testis hacminin büyük bir bölümünü oluştururlar. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testiküler androjenleri salgırlar. Her testiste yaklaşık 250-1000 seminifer tübül bulunur. Genç yetişkinlerde, seminifer tübüllerde günde ortalama  $2 \times 10^6$  sperm üretilir. Her tübül 150-250  $\mu\text{m}$  çapında ve 30-70 cm uzunluğundadır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık 250 metredir. Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümen daralır ve 'tubuli rekti' adını alarak, kısa segmentler halinde devam eder. Bu tübüller, seminifer tübüllerin rete testis adı verilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır<sup>7</sup>.

Her bir seminifer tübül, germinal veya seminifer epitel adı verilen çok tabakalı özel bir epitelden oluşmuştur. Epitel altında yer alan tunika propria özel bir bağ dokusudur. Fibroblast içermeyen bu tabaka fibröz bağ doku ile kaplıdır ve en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış 3-5 sıra miyoid hücre ve kollajen lif tabakası içerir. Kemirgenler de bu tabaka tek sıra yassı bir tabaka halindedir. Bu hücreler düz kas

hücrelerine benzer şekilde bazal lamina ile sarılı aktin filamentlerden zengin hücreler olarak gözlenirler. Ayrıca tübüllerin zayıf bir şekilde kasılmasını sağlarlar<sup>31</sup>.

Germinal epitel iki tip hücreden oluşur: Bunlar büyük bölünmeyen Sertoli destek hücreleri hücreleri ve bölünebilen spermatogenik (4-8 tabaka halinde) seri hücreleridir<sup>32,33</sup>.

**2.5.1. Sertoli hücreleri:** Gelişmekte olan spermiyumları destekleyen, koruyan ve besleyen hücrelerdir. Tam olarak farklılaşmış olgunlaşmamış spermatogenetik hücreleri fagosite ederek ortadan kaldırma yeteneğine sahiptirler<sup>31</sup>.

Destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da bilinmektedirler. Bu hücreler puberteden sonra çoğalmazlar. Komşu spermatogenik hücreleri çevreleyen ve onların arasındaki boşlukları dolduran, apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir<sup>30</sup>. Tabanları bazal membrana oturmuş, gövdeleri tübül lümenine kadar uzanan en büyük hacimli hücrelerdir. Az sayıda, düzenli aralıklarla yerleşen bu hücrelerin sınırları oldukça belirsizdir<sup>30</sup>. Çekirdekleri kromatince fakir, tipik olarak oval ya da üçgen şeklindedir. Ökromatik boyanırlar ve çekirdekçik belirgin olarak seçilir. Sertoli hücrelerinin soluk boyanan sitoplazmalarının apikal bölümlerinde gelişmekte olan spermatidlerin başları bulunur. Organel bakımından zengindirler. Mitokondri, düz endoplazmik retikulum ve salgı granülleri çok sayıdadır. Hücrelerin arasına yerleşmiş çok sayıda lizozom bulunmaktadır. Bu hücreler birbirleriyle zonula okludens tipi bağlantı kurarlar. Bu bağlantı seminifer tübül lümenini sararak kesintisiz bir hücre tabakası meydana getirir. Bu tabaka kan-testis bariyeri olarak görev yapar<sup>30,34</sup>. Spermatogonyumlardan sırasıyla 'spermatosit' ve 'spermatid' adı verilen hücreler oluşur. Bu hücreler sertoli hücrelerinin yan duvarları boyunca lümeneye doğru göç ederler. Spermatositler sertoli hücrelerinin yan duvarlarında, spermatidler ise apikal duvarlarındaki oyuklar içerisine yerleşirler<sup>30</sup>.

Sertoli hücrelerinin görevleri şunlardır;

- Spermiyumların beslenmesini ve korunmasını sağlarlar.
- Spermatogenez esnasında oluşan artıkları fagosite ederler.



-FSH kontrolü altında ABP salgılanmasını sağlarlar. Bu protein, testosteronu bağlayarak seminifer içerisinde birikmesini sağlar. Ayrıca, FSH salınım ve sentezini baskılayan inhibin isimli bir peptid salgılar.

-Embriyonal gelişme sırasında erkek fetusta müller kanalının regresyonunu sağlayan AMP üreten sertoli hücreleri, sperm transportu için kullanılan bir sıvı da salgılar<sup>32,35,36</sup>.

-Testestorona bağlanarak, seminifer tübül lümeni içerisinde spermatogenez için gerekli olan testestoron yoğunluğunu arttıran ABP üretimi ve salınımını sağlar<sup>37</sup>.

### **2.5.2. İnterstisyel doku**

Testisin seminifer tübülleri arasındaki interstisyel doku, fibroblast, lenf damarı ve pencereli kapillerlerin bulunduğu kan damarlarını içeren gevşek bağ dokusundan oluşur. İnce kollajen ve retiküler liflerden zengin olan bu doku, Leydig hücreleri, fibroblastlar, farklılaşmamış mezenkim hücreleri, mast hücreleri, kan ve lenf damarları ve testiküler sinirleri içermektedir<sup>20,38</sup>.

### **2.5.3. Leydig hücreleri**

İntersitisyel hücreler olarak da bilinen Leydig hücreleri yuvarlak ya da poligonal şekle sahip olup, merkezi çekirdekli, çekirdekçiği belirgin, lipid damlacıklarından zengin eozinofilik sitoplazmalı hücrelerdir<sup>4</sup>. Leydig hücreleri çok sayıda mikrovilluslara sahiptir. Belirgin bir veya iki adet çekirdekçiği vardır. Sitoplazmalarında bol miktarda düz endoplazmik retikulum, mitokondri, golgi, lipid damlacıkları ve lipofuksin pigment granülleri bulunur<sup>30,32,34,39</sup>. Bu hücreler, steroid hormon olan testosteron üretirler. Testosteron, ikincil erkek cinsiyet özelliklerinin oluşumunu destekler. Düz endoplazmik retikulum ve mitokondride bulunan enzimler tarafından sentezlenir. İnterstisyel hücreler tarafından sentezlenen testosteron salgılanması, hipofizden salgılanan bir gonadotropin olan LH tarafından tetiklenir. Bu bağlamda, testosteron salgılanması ergenlik döneminde hipotalamusun gonadotropin salgılayıcı hormonu üretmesiyle başlar<sup>4</sup>.

#### 2.5.4. Kan-testis bariyeri:

Spermatogonyumların farklılaşması sperme özgü proteinlerin ortaya çıkmasına yol açar. Seksüel olgunlaşmanın, immunolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra ortaya çıkması sebebiyle farklılaşmakta olan sperm hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve germ hücrelerinin ölümüne sebep olabilecek bir immün yanıtı teşvik edebilirler. Kan-testis bariyeri, gelişen spermler ve immün sistem arasında oluşabilecek herhangi bir etkileşimi ortadan kaldırır. Bu bariyer seminifer tübüllere immünglobulinlerin geçmesini önler ve bu sayede serumlarında çok yüksek düzeyde sperm antikorları bulunan hastalarda herhangi bir fertilitte bozukluğu görülmez. Kan-testis bariyeri seminifer epiteli bir otoimmün reaksiyondan korumuş olur. Kan ile seminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması, sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesini açıklayan bir durumdur. Testiküler kapillerler pencere tiptedirler ve büyük moleküllerin serbest olarak geçişine izin verirler. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar (tight junctions) bu bariyerden sorumludurlar. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemli rol oynarlar<sup>40</sup>.

Seminifer epiteldeki sıkı bağlantılar; adherens bağlantılar ve desmozomların membrandaki lokalizasyonu ile oluşur. Sıkı bağlantılar bazal laminanın yanındaki seminifer epitelin bazal kompartmanındaki Sertoli hücreleri arasında bulunur. Testisteki sıkı bağlantı bölgesi, periferal membran proteinler dizisi ve zonula okludens çeşitleri olan, zonula okludens-1 (ZO-1), zonula okludens-2 (ZO-2), okludin, klaudin gibi 3 farklı sıkı bağlantı integral membran proteinlerinden oluşur. Bunlardan en yüzeyde olanı zonula okludenstir. Ağa benzer bir yapı oluşturacak şekilde katlanma ve kıvrılmalar gösterir. Kabartı ve olukların sayısı ve kaynaşma yerleri epitelin sıvı alışverişi ile çok yakından ilgilidir. Sıkı bağlantının esas fonksiyonu oldukça sıkı bir tutunma meydana getirerek, epitel hücreleri arasından her iki yöne doğru madde geçişini engellemektir<sup>41</sup>. Sıkı bağlantı bariyerinde yer alan okludin kan testis bariyerinin regülasyonunda çok önemli rolü vardır. Okludin ile direkt bağlantısı olan diğer sıkı bağlantı proteinleri arasında bulunan bağlantı komponentleri ZO-1 ve ZO-2'dir<sup>42</sup>.

Okludin C-terminal bölgesi, bazolateral membranda Okludin'in hedefi olarak ZO-1'e bağlanır ve sıkı bağlantıda okludin lokalizasyonu için ZO-1'in varlığı gereklidir. Farede okludin Sertoli hücrelerinin dip bazal bölgelerinde bulunur ve maturasyonla yoğunluğu artar. Sıçan Sertoli hücrelerinde de benzer bulgular göstermesine rağmen, insan ve kobayda Sertoli hücresinde okludin bulunmadığı bildirilmiştir<sup>7</sup>.

Testisteki sıkı bağlantılarında bulunan okludin izoformları türe özgüdür. Okludin sertoli hücreleri arası bağlantı bölgesinde bazal olarak çok kuvvetli immunreaktivite gösterir. Sertoli hücrelerinin sitoplazmalarında da yaygın bir immunreaktivite görülebilir. Okludin analog patterni olan ZO-1 immunreaktivitesi sertoli hücreleri arası bağlantı bölgelerinde, sitoplazmasında ve subselüler alanda daha yoğun olarak görülmektedir<sup>43-45</sup>.

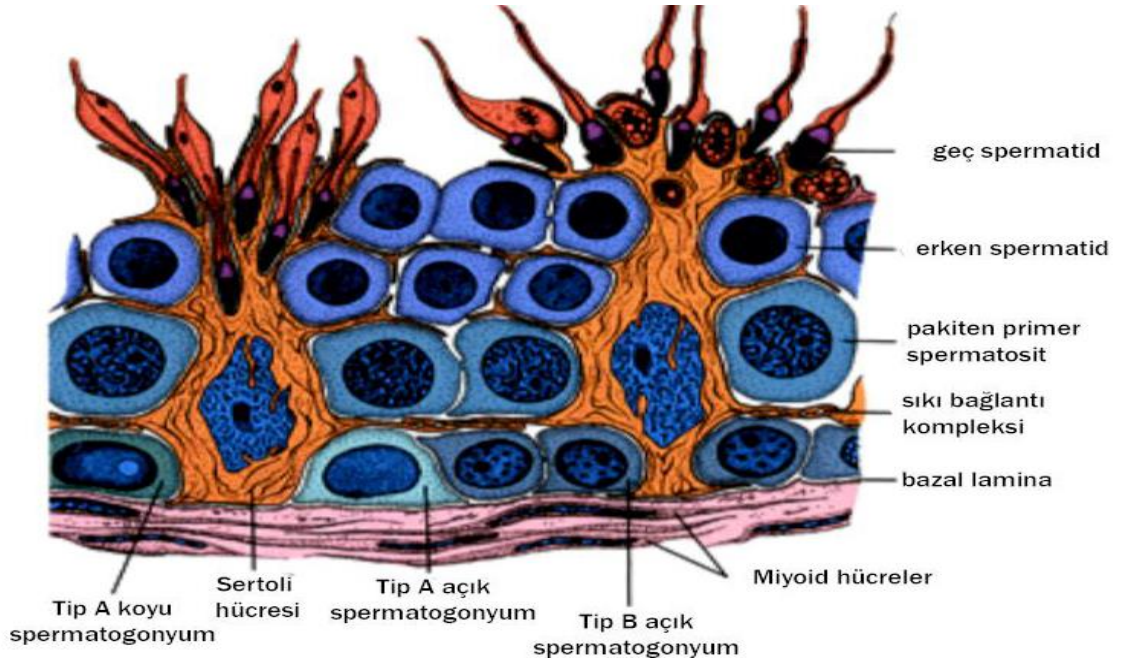
Seminifer tübülde sperm üretimi; Spermatozoon üretim süreci (Spermatogenez) ve Spermatozoon üretiminin son aşaması ve spermatidlerin spermatozoona dönüşme süreci (Spermiyogenez) olmak üzere iki aşamada gerçekleşir.

#### **2.5.5. Spermatogenetik hücreler (germ hücreleri) ve spermatogenez:**

Spermatogenez cinsel olgunluk çağında kök ve progenitör hücreler olan spermatogonyumların proliferasyonu ile başlar ve bununla birlikte yeni hücreler oluşur. Bazal membrana yakın, spermatogenetik hücrelerin en primitif olanları spermatogonyumlardır ve sertoli hücrelerinin yüzeyleriyle yakın ilişki halindedirler. Spermatogonyumlar küçük, yuvarlak ve 12 µm çapında hücrelerdir, soluk boyanırlar. İnsanda olgunlaşmasını 64 günde tamamlarlar ve çoğalma yeteneği olan hücrelerdir<sup>20</sup>. Puberteye kadar spermatogenetik hücrelerden yalnızca spermatogonyumlar mevcutken, puberteden sonra hormonal etki ile bu hücreler mitozla çoğalmaya başlarlar ve diğer tip hücreleri meydana getirirler<sup>32-35</sup>. Spermatogonyumlar koyu renkli ve oval şekilli hücrelerdir. Kök hücre olarak hareket ederler ve nadir bölünürler. Bu hücrelerin bölünmesi sonucunda iki tip hücre oluşur. Birincisi Tip A spermatogonyumlardır. Bunlar kök hücre özelliğindedir. Diğeri ise Tip B spermatogonyumlardır. Daha soluk boyanırlar, oval bir çekirdeğe sahip ve progenitör hücrelerde olduğu gibi daha hızlı bölünebilen hücrelerdir<sup>4</sup>.

**Tip A koyu spermatogonyumlar:** İnce granüllü, yoğun bazofilik boyanan ve oval çekirdeğe sahip hücrelerdir. Düzensiz aralıklarla bölünürler. Tip A koyu spermatogonyumların seminifer epitelin kök hücresi olduğu düşünülmektedir. **Tip A açık spermatogonyumlar** ise açık renk boyanan ince granüllü hücrelerdir. Ardışık birkaç mitotik bölünme ile sayılarını arttıırırlar<sup>7</sup>.

**Tip B spermatogonyumlar:** Tip A'dan büyük hücrelerdir. Kromatin içeren yuvarlak çekirdeklere sahiptirler. Mitozla çoğalan bu hücrelerden primer spermatositler oluşur<sup>22,32</sup>.



Şekil 4. Seminifer tübül içersinde yer alan hücrelerin şematik gösterimi<sup>43</sup>

**Spermatosit Fazı Mayoz:** Bu fazda primer spermatositler mayoz bölünmeye başlarlar ve hem kromozom sayısını hem de DNA miktarını azaltırlar. Primer spermatositler, seminifer tübül epitelinin ortasında bulunan, hacmi en büyük hücrelerdir. Oluştuktan hemen sonra mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Bu safha uzun sürdüğünden dolayı çok sayıda görülen bu hücreler, 46 kromozom taşırlar. Primer spermatositlerin mayoz bölünmesi sonucu her bir kromozomun kromatidleri birbirinden ayrılır ve iki tane haploid hücre oluşur. Bu hücelere sekonder spermatosit adı verilir ve 23 kromozom içerirler. Kromozomlardaki sayıca azalmaya her hücredeki DNA miktarının eksilmesi eşlik eder. Sekonder spermatositler, interfazda çok kısa süre kalırlar ve hemen

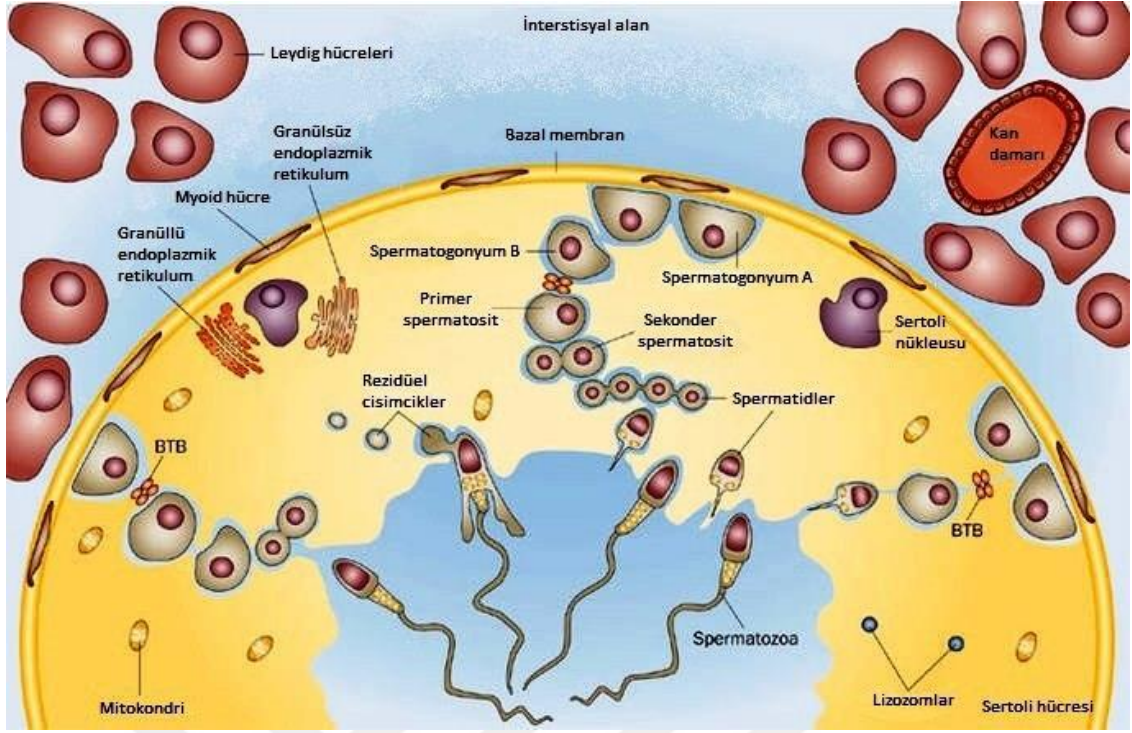
ikinci mayoz bölünmeye girerler. Bu yüzden kesitlerde görülmeleri güçtür. Kısa ömürlü hücrelerdir<sup>43-47</sup>. Spermatidler ise sekonder spermatositlerin bölünmesi ile oluşurlar, şekil değiştirerek spermiyuma dönüşürler<sup>20,32</sup>.

Spermatositlerde birinci ve ikinci mayoz bölünmeler arasında S fazı DNA sentezi görülmediği için, ikinci bölünmeden sonra her hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (1N) hücreler meydana gelir. Böylece, mayoz bölünmenin sonunda haploid kromozom içeren hücreler oluşturur. Döllenme ile birlikte, mayoz ile oluşan bir haploid ovum ve sperm birleşir ve normal diploid kromozom sayısı korunur<sup>4</sup>.

Spermatogonezi uyaran hormonal faktörler;

1. Testosteron, testislerde Leydig hücrelerinden salgılanır. Sperm yapımının ilk aşaması olan testisin germinal hücrelerinin büyüme ve bölünmeleri için gereklidir.
2. LH, ön hipofiz bezinden salgılanır ve Leydig hücrelerini testosteron salgılanması için uyarır.
3. FSH ise ön hipofiz bezinden salgılanır ve sertoli hücrelerini uyarır. Bu uyarı gerçekleşmezse spermatidlerin spermelere dönüşümü (spermiyogenez olayı) olanaksızdır.
4. Östrojenler, FSH ile uyarılan sertoli hücrelerinde testosteron ile gerçekleşir. Bu yüzden spermiyogenez için gereklidirler.
5. Büyüme hormonu ve diğer pek çok hormon testislerin temel metabolik işlevlerinin kontrolü için gereklidir. Büyüme hormonu, özellikle spermatogonyumların ilk bölünmesinde rol oynar.

Hipofize bağlı cücelikte olduğu gibi, bu hormonun yokluğunda spermatogenez ya yoktur ya da ciddi boyutlarda eksiktir ve bu nedenle infertiliteye neden olur<sup>28</sup>.



Şekil 5. Seminifer tübül<sup>48</sup>

### 2.5.6. Spermijenez

Spermijenez spermatozoon üretiminin son ve sıcaklığa duyarlı aşamasıdır. Ayrıca spermatidlerin, erkek DNA'sını ovuma aktarmak için son derece özelleşmiş hücreler olan spermatozoonlara dönüşme sürecidir<sup>4</sup>. Spermijenez, akrozom oluşumunu, nükleus yoğunlaşmasını ve uzamasını, flagellum gelişmesini ve sitoplazmanın çoğunun kaybolmasını içerir<sup>4</sup>. İkinci mayoz ile oluşan haploid spermatidler adluminal kompartmanda yerleşmiş durumdadır ve farklılaşarak spermijuma dönüşürler<sup>49</sup>. Bu süreçte hücrelerde bölünme olmaz ve kromozom sayısı sabit kalır. Haploid kromozumlu spermiumun döllenmesi sonucunda diploid hücre oluşur. Sonuçta, daha sonra seminifer tübül lümenine salınan olgun spermatozoon meydana gelir<sup>30</sup>. Spermijenez 4 fazı içerir. Bunlar; Golgi fazı, Kep fazı, Akrozomal faz ve Maturasyon fazıdır. Bu olaylar esnasında spermatid, sertoli hücresinin plazma membranına özelleşmiş yapılar ile tutunmuş durumdadır<sup>30</sup>.

**1.Golgi Fazı:** Bu faz, spermatidin Golgi kompleksinde PAS pozitif granüllerin bulunması ile karakterizedir. Proakrozomal granüller, golgi kompleksinde birikir ve akrozomal vezikül denilen nüklear zarfa komşu, membranla sınırlandırılmış akrozomal

vezikülü oluşturmak üzere bir araya gelirler. Bu fazda akrozomal vezikül genişler ve içeriği artar. Sentriyoller de jukstanuklear bölgeden spermatidin arka kutbuna göç ederler. Bir tanesi bazal cisimcik olarak hareket eder ve flagella aksonemini oluşturan 9 periferik mikrotübül çiftinin ve 2 merkezi mikrotübül parçasının bir araya gelmesini başlatır<sup>4</sup>.

**2.Kep Fazı:** Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nükleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve akrozom adını alır. Akrozom, hiyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz hidrolitik enzimlerini içerir<sup>4</sup>.

**3.Akrozomal Faz:** Bu fazda nükleus uzar ve daha yoğun hale gelir. Sentriollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondriler de flagellumun proksimal kısmı etrafında toplanarak orta parçayı oluşturur. Bu bölge spermatozoon hareketlerinin enerji kaynağını oluşturur<sup>4</sup>.

**4.Maturasyon Fazı:** Geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermatozoonlar seminifer tübülün lümenine salınırlar. Spermatozoonlar, epididimise testis sıvısı olarak adlandırılan ve Sertoli hücreleri ve rete testis tarafından üretilen uygun bir sıvı ile aktarılır. Bu sıvı steroidler, proteinler, iyonlar ve testosteronla ilişkili androjen bağlayıcı protein içerir<sup>4</sup>.

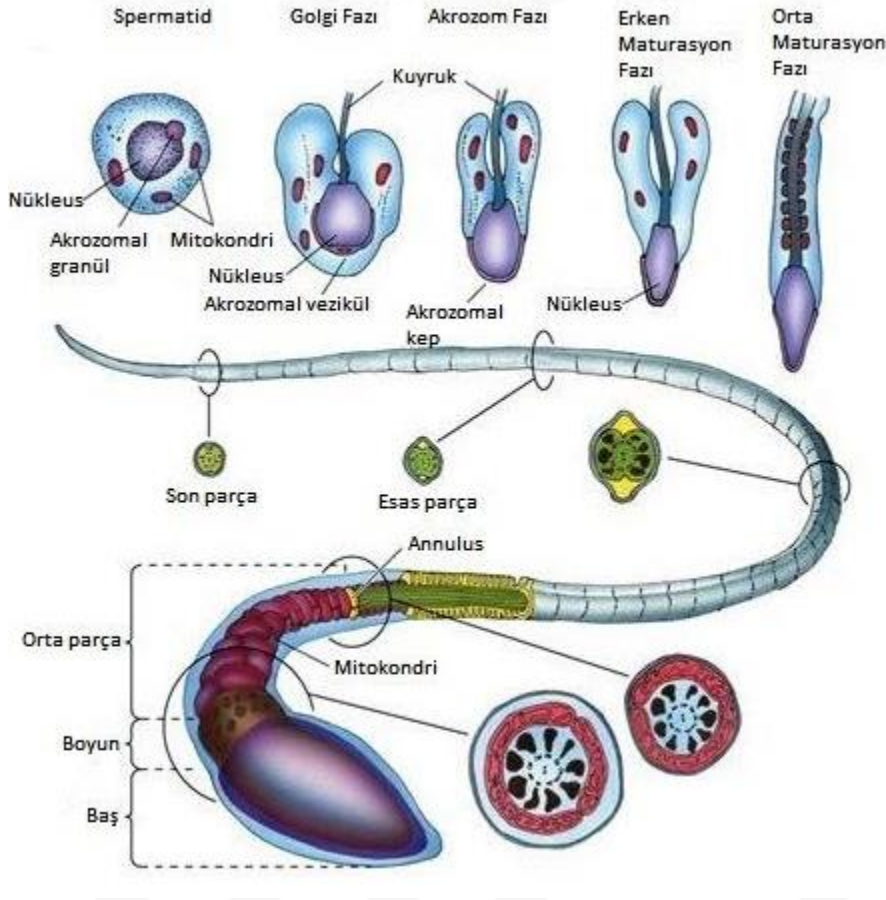
### 2.5.7. Testis içi kanallar

Testis içi genital kanallar tubuli rekti, rete testis, duktuli eferentestir. Bu kanallar, Seminifer tübüllerden gelen sıvıyı ve spermatozoonları duktus epididimise taşımakla görevlidir<sup>4</sup>.

**Tubuli rekti:** Başlangıçta sertoli hücrelerinden oluşur. Sonra sıkı bağ dokusu ile sarılı prizmatik epitele dönüşür. Tubuli rekti rete testisin içine boşalır<sup>4</sup>.

**Rete testis:** Tunika albugenianın kalınlaşmasıyla oluşan mediastinum içinde yer alır. Prizmatik epitel ile dōşeli anastomozlaşan kanallar sistemidir<sup>4</sup>.

**Duktuli eferentes:** Rete testisten epididimise uzanan 10-20 kanaldır. Epiteli silyalı ve silyasız kübik hücrelerden oluşur. Epitel tarak şeklindedir. Bazal hücreler lümene ulaşmaz ve kök hücrelerdir. Silyasız hücreler seminifer tübüllerden salgılanan sıvının çoğunu absorbe eder. Silyalı hücreler epididimise doğru hareketi sağlar. Bazal laminanın altında ince, sirküler bir kas tabakası vardır<sup>4</sup>.



Şekil 6. Spermiyogenez aşamaları ve spermin yapısı<sup>50</sup>

### 2.5.8. Spermin yapısı

Spermatogenez sonunda oluşan olgun sperm hücresi, yaklaşık 60 µm uzunluğunda olup, baş, boyun, orta parça ve kuyruk kısımlarından oluşur. Bir bağlantı parçası ile baş kuyruğa bağlıdır. Spermin baş ve kuyruk kısımları bir plazma membranı ile sarılıdır. Plazmalemma ile çevrili baş kısmı, 4-5 µm uzunluğunda, 2,5-3,5 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığında olup, akrozom ile çekirdeği içerir. Akrozom, çekirdeğin ön yarısını örter ve hidrolitik enzimler içerir. Bu enzimler, oositi saran korona radyata ve zona pellusidadan spermin geçişini kolaylaştırmak için fertilizasyon anında salınır. Bağlantı parçasında yer alan distal sentriyol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapar. Kuyruk; orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 3 kısımdan oluşur. Sarmal olarak dizilmiş mitokondriyonların oluşturduğu kısım olan orta parça, 9+2 mikrotübül yapısındaki aksonem ile yoğun dış fibrilleri içerir.



Kuyruğun en uzun parçası olan esas parça, yoğun fibril ile sarılı bir aksonem ve bir fibröz kılıftan oluşurken, son parça sadece aksonemi içerir<sup>30</sup>.

## **2.6. Epididimis Histolojisi**

Epididimis, testisin süperiyör ve posteriyör yüzeyleri boyunca uzanır. Ortalama 7,5 cm uzunluğunda, hilal şekline benzeyen bir yapıya sahiptir. Epididimis kanalı üç ana bölümden oluşur. Bunlar; baş(kaput), gövde(korpus) ve kuyruk(kauda) bölümüdür. Epididimis, duktuli efferents, duktus epididimis ve bunlarla ilişkili düz kaslardan, damarlardan ve bağ dokusundan meydana gelmektedir<sup>30</sup>.

Duktus epididimis, yaklaşık 4-6 m uzunluğunda kıvrımlı bir tüp yapısına sahiptir. Bu uzun kanal, etrafını saran bağ doku ve kan damarları ile birlikte epididimisin kuyruk ve gövdesini oluşturur. Yuvarlak bazal hücreler ve silindirik hücrelerden meydana gelen yalancı çok katlı silindirik epitel ile döşelidir. Bu hücreler peristaltik kasılmalarla spermin kanallar boyunca ilerlemesine yardımcı olur. Düz kas hücreleri ve kapiller damarlardan zengin bağ dokusu ile çevrelenmiş bazal lamina üzerine oturur.

Epitel hücrelerin yüzeyleri stereosilyalar ile kaplıdır. Duktus epididimis epiteli spermatogenez süresince oluşan artık cisimciklerin ortadan kaldırılmasına ve sindirilmesine katılır<sup>4</sup>. Duktus epididimis esas hücre ve bazal hücre olmak üzere iki tip hücre içerir:

Esas hücreler, lümeneye doğru uzanan, stereosilyalara sahip, uzun prizmatik hücrelerdir<sup>30</sup>.

Bazal hücreler ise, bazal laminanın üzerinde bulunur ve küçük yuvarlak bir yapıya sahip hücrelerdir. Bu hücreler, kanal epitelinin kök hücreleridir. Testisten epididimise giren yeni üretilmiş spermler, duktus epididimis boyunca geçişleri sırasında motilite ve oositi fertilize etme yeteneği kazanarak olgun hale gelirler<sup>30</sup>.

## **2.7. Apoptoz**

Embriyonik gelişim ve yaşlanma sırasında, dokulardaki hücre popülasyonunu korumak için homeostatik bir mekanizma olan apoptoz fizyolojik bir süreçtir. Bağışıklık reaksiyonlarında olduğu gibi, hücrelerin hastalık yada zararlı maddelerle hasar görmesi

gibi durumlarda savunma mekanizması olarak ortaya çıkar<sup>51,52</sup>. Apoptoz, canlının kendi otonom mekanizması tarafından düzenlenen, zararlı ve istenmeyen hücrelerin, enerji kullanılarak, iz bırakmadan öldürülmesi olarak tanımlanır. Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen bu terim olarak ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır<sup>53</sup>. Germ hücrelerinin gelişiminde, bozuk olan hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal sperm üretiminde rol oynar<sup>54</sup>. Aynı zamanda kanser başta olmak üzere birçok patolojik durumda da görevi vardır<sup>55</sup>. Bunun yanı sıra ovulasyon sonrasında geride kalan folikül hücrelerinin ve emzirme sırasında oluşan süt bezlerinin ortadan kaldırılması gibi, gelişimi endokrin bağımlı dokuların yok edilmesinde de rol oynamaktadır<sup>55</sup>.

Canlılarda, bölünmeyle artan hücre sayısı, hücre ölümleriyle dengelenir. Eğer organizmada bir hücreye artık ihtiyaç duyulmuyorsa, hücre içi ölüm programları aktif edilir ve o hücrenin intihar süreci başlatılır<sup>56</sup>. Hücrelerde görülen iki tip ölüm şekli vardır: Bunlar apoptozis ve nekrozdur. Temel olarak ikisi de hücrenin gerçekleştirdiği ölüm şekli olarak görülse de morfolojik ve gösterdiği etki birbirlerinden farklıdır. Nekrozda apoptozun aksine organellerin şişmesi gözlenir.

Bunun yanı sıra apoptoz sonrasında inflamasyon meydana gelmezken nekrozda inflamasyon gerçekleşir ve komşu hücreler de nekrozdan olumsuz etkilenir<sup>47</sup>.

Apoptoz, hücrenin sitoplazma, hücre zarı ve çekirdek gibi organellerindeki değişimler sonucunda oluşur<sup>57</sup>. Çekirdekte kromatinlerin yoğunlaşması, hücrenin hacim kaybederek büzölmeye başlaması, DNA'nın kırılması, apoptotik cisimcik oluşumu ve makrofajlar tarafından apoptotik cisimciklerin fagosite edilme olaylarını içerir<sup>58</sup>. Apoptozisin erken döneminde, plazma zarı aracılığıyla diğer hücreler ve hücrenin ekstrasellüler matriks ile olan bağlantıları ayrılır. Hücre büzölmeye başlar, yüzeyindeki mikrovilluslar ve diğer hücrelerle yaptıkları özel bağlar ortadan kalkar, hücre yüzeyi yuvarlaklaşır<sup>59,60</sup>. Apoptotik hücrelerin sitoplazması daha yoğundur ve bu hücreler komşu hücreye göre daha küçüktürler<sup>61</sup>. Sitoplazmada sisternalar vezikül ve vakuolleri oluşturmak üzere kabarır ve endoplazmik retikulum genişler<sup>60</sup>. Burada sitoplazma yoğunluğu arttığı için organeller kabarık görünür. Kabarık sisternalar hücre zarı ile birleşerek tomurcuklanmalar oluştururlar. Hücrede önce yüzeye doğru

tomurcuklanmalar olur. Bunlardan bazıları sitoplazma parçacıkları içeren ve sıkı biçimde paketlenmiş organellerden oluşan zarla sarılı apoptotik cisimlere dönüşür<sup>59,60</sup>. Bu cisimler komşu normal parankimal hücreler veya makrofajlar tarafından fagosite edilir<sup>61,62</sup>.

Çekirdek apoptoziste odak noktasıdır. Hücreden hücreye geçmekle birlikte genellikle çekirdek büzülür<sup>59,60</sup>. Kromatin çok yoğun bir hale gelir ve parçalar halinde bir araya toplanır. Çekirdek porları seçilemez. Çekirdek şekli düzensiz hale gelir ve ileri evrede çekirdek küçük parçalara bölünür. Çekirdek burada zar bütünlüğünü hasara uğratmadan 'karyoreksis' olarak isimlendirilen bir olay ile yapıdan ayrılır<sup>63</sup>. Çekirdekçik genişler ve granülleri kaba granüller halinde dağılır<sup>59,60</sup>. Bu morfolojik değişiklikler kaspazlar tarafından bazı proteinlerin kırılması ile başlatılabilir. Aktif kaspaz-3 ve kaspaz-6 bu proteinleri kırarlar. DNA'nın 108-200 baz çifti uzunluğunda parçalara bölünmesi apoptozisin en önemli özelliklerinden biridir. Apoptotik cisimciklerin fagositik hücrelerce tanınabilmesi için de plazma zarında çeşitli değişiklikler gerçekleştirilir<sup>37</sup>. Bu değişimlerden en önemlisi, normalde plazma zarının iç yüzünde bulunan fosfatidil serin (PS) molekülünün programlı hücre ölümünün erken evresinde zarın dış yüzüne geçmesidir. Normal şartlarda PS, plazma zarının iç yüzeyinde bulunur. Ancak, apoptozisin erken evresinde zarın dış yüzeyinde yer alır. Bu değişim sayesinde komşu hücreler ve makrofajlar, PS'nin hücrenin dış yüzeyine çıkması ile hücreyi tanır ve apoptotik cisimciklerin fagositozunu gerçekleştirmesinde yardımcı olur<sup>64</sup>.

### **2.7.1. Apoptozun moleküler mekanizması**

Apoptoz, genler, proteinler, sinyal yolları, tetikleyiciler ve moleküllerin büyük bir bölümünü içeren bir sistemdir. Apoptozun moleküler mekanizması kaspaz bağımlılığına göre iki farklı yoldan meydana gelir. Birbirine bağlı bu iki yolak kaspaz proteazların hücre içi mekanizmasını aktive ederek apoptozu kontrol eder<sup>57,65</sup>.

Hücre ölüm mekanizmasını başlatan uyarının kaynağına bağlı olarak intrinsik (mitokondriyal) ve ekstrinsik (ölüm reseptör yolağı) olmak üzere 2 tür yolak vardır<sup>57,65</sup>. Eğer ölüm uyarısı hücrenin kendisinden geliyorsa 'intrinsik yolak' olarak adlandırılırken, programlı hücre ölümüne uğrayacak olan hücrenin dışındaki bir

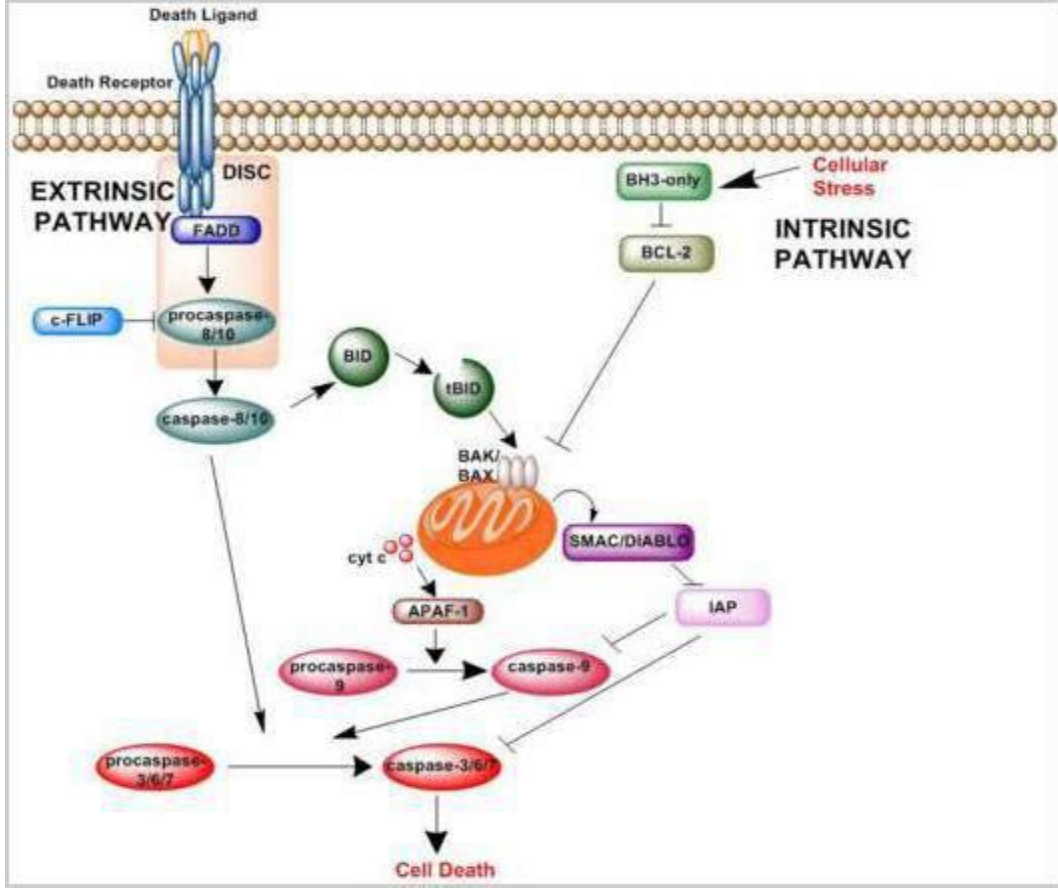
kaynaktan geliyorsa bu 'extrinsik yolak' olarak adlandırılır<sup>57,65,66</sup>. İntrinsik yolda, hücrel hasar ya da strese karşı reaksiyona giren BCL-2 protein ailesi üyeleri mitokondri aracılığıyla kaspazlara bağlanır. Ekstrinsik yolda ise immün efektör hücreler üzerinde eksprese edilen ölüm ligandlarına yanıt veren hücre yüzeyi ölüm reseptörleri yoluyla kaspazları aktive eder<sup>67</sup>.

### **2.7.1.1. İntrinsik yolak**

İntrinsik, diğeri bir ismi ile mitokondriyal yolak, BCL-2 protein ailesi tarafından kontrol edilir, düzenlenir ve mitokondriyal dış membran geçirgenliği (MOMP) ile apoptoz gerçekleştirilir<sup>68</sup>. MOMP, kaspaz yolağını aktive etmek için mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c gibi faktörlerin transfer olmasını sağlar. MOMP mitokondriden proteinleri sitoplazmaya salınımını sağladığı zaman hücre, için apoptoz geri dönüşümsüz bir hale gelir. MOMP'dan sonra, kaspaz aktivasyonu birkaç dakika içinde gerçekleşir ve bu da hücre ölümüne yol açar<sup>69</sup>. İntrinsik yolak içerisinde rol oynayan BCL-2 proteini antiapoptotik bir proteindir ve diğeri antiapoptotik moleküllere bağımlıdır<sup>70</sup>.

### **2.7.1.2. Ekstrinsik yolak**

Ekstrinsik yolak da apoptoz, transmembran reseptörleri aracılığıyla gerçekleşir. Tümör nekroz faktörü (TNF) reseptör geni süper ailesi üyeleri olan FasR, TNFR, DR3-5 reseptörlerine sırasıyla Fas Ligandı (FasL), Apol3L ve Apol2L ligandlarının bağlanmasıyla sinyal aktivasyonu oluşur<sup>71</sup>. Bu yolun aktive edilmesiyle kaspaz-10 ya da kaspaz-8'in tetiklendiği gözlemlenir. Tetiklemenin sonucunda apoptotik mekanizma başlatılır ve hücre kendini ölüme sürükler. Hem intrinsik yolda hem de ekstrinsik yolda ortak olarak oluşan aspartik asit kalıntıları, kaspazlar için spesifik sistein proteazlarının aktivasyonuna yol açar<sup>69</sup>.



Şekil 7. İntrinsik ve ekstinsik apoptotik yolak<sup>72</sup>

Omurgalılarda apoptotik yolakta etkili olan proteinler kaspazlar olarak adlandırılır. Apoptozun hücre içi uygulayıcısı olan kaspazlar sistein proteazlarıdır ve apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşurlar. Hem intrinsik yolakta hem de ekstrinsik yolakta rol alırlar. Kaspaz ailesi, apoptozun başlatılması ve uygulanmasında önemli göreve sahiptir<sup>73</sup>. Aktif bölgelerinde sistein taşırlar ve aspartik asitten sonraki peptid bağını kırarlar. Kaspazlar, normalde sitoplazmada aktif olmayan proenzimler olarak yer almaktadır. Ancak proteolitik parçalanmadan sonra aktif olurlar ve kaspaz aktivasyonu başlamış olur. İlk olarak inaktif proteinler şeklinde sentezlenen bu enzimler çeşitli yollarla aktive edildikten sonra, hücresel düzeydeki tetrapeptit yapıları tanır ve substratı, bir aspartat rezidüsünü karboksil tarafından ayırır. Bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler sonucunda, hücre ölümü esnasında birçok sellüler ve morfolojik değişimler meydana gelir<sup>74</sup>. Mitokondride hücre zarının hasar görmesini ve bunların neticesinde zar değişimleri, hücre iskeleti ve çekirdek değişimine neden olan hasarlar gerçekleşir<sup>75</sup>.

Kaspazlar Yangı Kaspazları, Başlatıcı ve Sonlandırıcı Kaspazlar olmak üzere üç ana grupta incelenir.

1. Yangı Kaspazları: Kaspaz 1, Kaspaz 4, Kaspaz 5, Kaspaz 11, Kaspaz 12, Kaspaz 13, Kaspaz 14

2. Başlatıcı Kaspazlar: Kaspaz 2, Kaspaz 8, Kaspaz 9, Kaspaz 10

3. Sonlandırıcı Kaspazlar: Kaspaz 3, Kaspaz 6, Kaspaz 7

Apoptozu belirlemede kullanılan en yaygın yöntem immunohistokimyasal yöntemidir. Bunlardan biri Kaspase-3 işaretleme yöntemidir<sup>75</sup>.

### **2.7.2.Kaspaz 3 yöntemi**

Sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz 3, immunohistokimyasal metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz 3 ekspres ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptoza yol açan ajanın kaspaz 3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilinirse apoptotik hücreler bu yöntemle tespit edilebilirler<sup>76</sup>.

Apoptozda, özellikle aspartat kalıntılarında olan peptitleri yıkıma uğratmaktadır ve temel fonksiyonları ise DNA polimeraz enzim aktivitesini engelleyerek hücrenin apoptoza uğrayıp yok edilmesini sağlamaktır<sup>77</sup>. Mitokondri, normal koşullarda ATP oluşturmak için sitokrom c bulundurur. Mitokondrial stres şartlarında serbest duruma gelen sitokrom c, apoptotik hücre ölümünde kaspaz-3 aktivasyonu için önemli bir rol üstlenmektedir<sup>78</sup>. Kaspaz-3 aktif hale geldikten sonra kesim işlemi tek bir özel noktada, farklı yollarla direkt ya da indirekt etki ile gerçekleşmektedir. Kaspaz-3'ün aktif hale gelerek hedef proteinlerdeki spesifik bölgelerde kesim işlemini gerçekleştirmesi ile morfolojik değişiklikler yapması apoptoz oluşumu için önemlidir<sup>79</sup>.

#### **2.7.2.1. Apoptoziste kaspaz-3'ün yeri ve önemi**

Kaspazlar iskemi sonrasında ve genetik kontrolle aktive olurlar. Geçici iskeminin in-vivo modellerinde kaspazları inhibe eden ajanlar yaralanmayı azaltmada oldukça etkilidir. Kaspaz-1 ve kaspaz-3 iskemide başlayan hücre ölümü ile ilgili kaskadın en önemli mediatörleridir. Chen ve ark. kaspaz-3'ün gecikmiş nöronal ölüme aracılık

ettiğini rapor etmişler ve kaspaz-3 inhibitörlerinin hücre ölümü üzerine etkilerinin kaspaz-1 inhibitörlerine göre daha etkili olduğunu bildirmişlerdir<sup>80</sup>. Diğer kaspazlar gibi kaspaz-3' te prokaspaz olarak sentez edilir. Nöronlarda apoptotik hücre ölümü kaskadında aktif forma dönerler. Kaspaz- 3, kaspaz-6, kaspaz-8, kaspaz-9 ve kaspaz-10 ile birlikte aktive edilir. Kaspaz-3'te kaspaz-6 ve -7'yi aktive eder. Apoptozisin efektör fazında önemli rol oynayan kaspaz-3'ün nöronal gelişim ve yaralanmada oldukça önemli olduğu gösterilmiştir. Bu proteazın bozulması nörolojik defektlere yol açar. Deneysel iskemi ve travmatik beyin hasarlanması sonucunda nöronal hücre ölümüne kaspaz-3 aktivitesi katkıda bulunur. Bu iki yaralanmada da kaspaz inhibitörleri apoptozisi azaltmakla kalmayıp ayrıca hayvanlarda fonksiyonel iyileşme ile sonuçlanmıştır. DNA fragmantasyonunda, DNAase aktivasyonuna sebep olan kaspaz-3'ün direk rolü olduğu düşünülmektedir. Kaspaz-3 geninin kromozom 8 üzerinde lokalize olduğu bilinmektedir. Bu gen embriyonik dönemin 4. günden itibaren gelişimden sorumludur. Kaspaz-3' teki eksiklik ciddi nörolojik gelişim problemlerine hatta 3 haftalık embriyoda ölüme neden olabilmektedir<sup>81,82</sup>.

### **2.7.3. Dış sinyallerle apoptozisin tetiklenmesi**

Birbirini tamamlayan ölüm aktivatörlerinin (Fas-L ve TNF) hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır. Kaspaz-8 (kaspaz-9) gibi diğer kaspazları uyarır ve hücrenin fagositozuna yol açar.

Buna Sitotoksik-T hücrelerinin hedef hücre yüzeyine bağlanarak Fas-L üretmesi sonrası oligodendrositlerde görülen apoptotik dejenerasyon ya da ölüm örnek verilebilir<sup>83,84</sup>. SCI reseptörleri Fas ve p-75 ile bağlantılı halde bulunurlar. Bu reseptörler tümör nekroz faktör reseptör (TNFR) gen ailesinin üyeleridir. Bu genlerin apoptotik hücre ölümünü başlatan kaspaz kaskadını aktive ettiği bilinmektedir<sup>85</sup>. Diğer sistemlerde de oligodendrositlerde olduğu gibi apoptozis oluşumunda Fas ve p-75'in sorumlu olduğu gösterilmiştir<sup>85</sup>.

Fas reseptörünün, Fas ligand (Fas-L) ile karşılıklı etkileşimi FADD (Fas bağımlı ölüm domain proteini) aracılığı ile olur ve bunun sonucunda da kaspaz-8 aktive edilerek apoptotik döngü başlar<sup>85,86</sup>.

### 2.7.3.1. Kaspaz 8

Kaspaz ailesinden olan Kaspaz 8, nadir olarak alternatif isimlerle de kullanılmaktadır. Kaspaz 8'e verilen alternatif isimler FLICE, MACH, Mch5 olarak karşımıza çıkmaktadır. Kaspaz 3 ve Kaspaz 8'in katalitik bölgelerinin uzunlukları, aktif bölgelerinde sistein yer alması ve aktivasyonları için gerekli formun şekillenmesi bakımından yakın benzerlik gösterirler<sup>77</sup>. Kaspaz 8, kaspaz 3'ün aspartat rezidülerini karboksil ucundan keserek kaspaz 3'ü aktifleştirir ve apoptozun başlamasına, gerçekleşmesine aracılık eder<sup>79,87</sup>. Aktif kaspaz 8'in etki ettiği spesifik bölgeleri üzerinden kesim yaptığı substratlar arasında kaspaz ailesinden birçok üye ile birlikte birkaç substrat molekül vardır. Örneğin; Kaspaz 3, Kaspaz 4, Kaspaz 6, Kaspaz 7, Kaspaz 9, Kaspaz 10, Kaspaz 13, gibi moleküller kaspaz 8'in etki ettiği moleküller arasındadır<sup>87</sup>. Başlatıcı ve sonlandırıcı kaspazların fonksiyonları birbirinden oldukça farklıdır. Kısa pro-domain içeren kaspazlardan olan kaspaz 3, diğer kısa pro-domain içeren kaspazlar gibi başlatıcı kaspazlar tarafından meydana getirilen proteolizis sonucunda aktive edilirler. Başlatıcı kaspazlardan olan Kaspaz 8'in ölüm-reseptör kompleksine (DRC) bağlanması ile prokaspaz 3 kesilerek aktif kaspaz 3 oluşumu sağlanmaktadır. Kaspaz 8 aynı zamanda BID, Bcl-2/Bax ailesine ait molekülleri de keserek apoptozu indükleyebilmektedir. Ayrıca, Kaspaz-8 TNF protein ailesi tarafından dış apoptotik yolağın uyarılması ile programlı hücre ölümünü başlatıcı kaspaz olarak görev almaktadır<sup>88</sup>.

Kaspaz-8'in pro-kaspaz-8a (496 aa), pro-kaspaz-8b (479 aa), pro-kaspaz-8c (464 aa), prokaspaz-8e (235 aa), pro-kaspaz-8g kaspaz-8L (538 aa) ve kısa kaspaz (108 aa) olmak üzere birçok izoformu bulunmaktadır<sup>88</sup>.

İnaktif durumdaki Prokaspaz 8'in N-terminal prodomain kısmında iki DED homolog domaini bulunmaktadır. Prokaspaz 8 reseptöre bağlı adaptöre (Mort 1) bağlanarak DED kısımlarında homofilik etkileşimler meydana getirir. Proenzimin bağlanması ile oluşan aktivasyondan sonra, kaspaz 8 apoptoz sinyali oluşturmada, oluşan sinyal sonucunda da kaspaz 3 aktivasyonu proteolitik yolla ya da indirekt olarak kesmektedir. Kaspaz-8 proteini, 2.kromozomun uzun kolunun (q) 33 ile 34. pozisyonu arasında yerleşen kaspaz-8 geni tarafından kodlanmaktadır<sup>89</sup>.



## 2.7.4. Apoptozisin genetik kontrolü

### 2.7.4.1 Antiapoptotik proteinler

Protoonkogenler, hücrelerin normal büyüme ve gelişmesini düzenleyen genlerdir. Bu genler aktive olup mutasyona uğradıklarında onkogen adını alır. Onkogenler, hücrenin aşırı büyüme ve bölünmesi doğrultusunda uyarımı gerçekleştirir. Hücrenin büyüme ve bölünmesini aktive edici genleri baskılayan ve dengeleyen genler ise tümör baskılayıcı genlerdir<sup>90-92</sup>.

Son yapılan çalışmalar, bazı onkogenlerin ve tümör baskılayıcı genlerin programlı hücre ölümünü kontrol ettiğini göstermektedir<sup>93</sup>. Omurgalılarda apoptozisi düzenleyen genler c-myc, p-53 ve bcl-2 ailesi olarak bilinmektedir ve üretimini sağladıkları proteinler de aynı adlarla anılmaktadır<sup>70,94-96</sup>.

#### 2.7.4.1.1. P 53:

P53, apoptozisi düzenleyen aynı zamanda tümör baskılayıcı bir genidir. Birçok hücrel proteine bağlanan ve gen ekspresyonunda yer alan p53;

- Çevresel şartlara ve hücrel duruma göre hücre döngüsünün kontrolü,
- DNA tamiri ve sentezi,
- Hücre farklılaşması, genomik şekillenme ve programlı hücre ölümü gibi durumlarda rol oynamaktadır<sup>97,98</sup>.

Kaspaz 3, 7, 8 ve 9 enzimlerini aktive ederek apoptozu uyarmakta ve tümör oluşumunu engellemektedir.

Normal koşullarda asıl görevi, DNA herhangi bir durumda hasar görürse eğer hücre siklusunu durdurup, hasarlı olan DNA'nın tamir edilmesi için hücreye zaman kazandırmaktır. Ancak oluşan hasar tamir edilemeyecek kadar büyükse bu kez p53 zit etki göstererek hücreyi apoptoza götürür<sup>88,113</sup>. DNA'nın zarar gördüğü hücrelerde p53 protein düzeyinde belirgin bir artış olur ve hücre siklusu G<sub>1</sub> 'de bloke olur. Büyümenin durmasından sonra DNA onarımı, hücre DNA'sının çoğaldığı S fazına geçmeden önce tamamlanır. Eğer genomda hasar büyük ise hücre apoptoza uğrar<sup>99-102</sup>. P 53 proteini,

genomu dönüştürücü etkisi olan mutasyonlardan temizlenene kadar hücrenin S fazına geçişini engellediği için "genom koruyucusu" olarak tanımlanır.

p53'ün etkinliği, gen üzerinde meydana gelen değişiklikler ile kopyalama sonrası fosforilasyon değişikliği ile hücresel ya da viral diğer proteinlerle etkileşmesi ile değişebilir. Mdm-2 denilen bir hücresel proto-onkogeni, p53 proteinine bağlanarak bir yapı oluşturur. Yüksek mdm-2 konsantrasyonları p53 proteininin gen kopyalama faaliyetini engeller ve onun tümör baskılayıcı görevini inaktive eder<sup>103-105</sup>. P 53 aktivasyonu "sikline bağlı kinaz (cdk)" inhibitörü p21WAF1/CIP1'in ve büyümeyi durduran GADD45 geninin kopyalanmasını arttırarak hücre döngüsünün durmasına sebep olur. Cdk'nın başlattığı hücre siklusu bazı yapıların fosforilasyonu ile devam eder<sup>106</sup>. P 21 proteinin artması cdk'nın kendi substratlarını fosforile etmesini engeller. Böylece hücre siklusunun G<sub>1</sub>'den S fazına ilerlemesi durdurulur. P 53 geni mutant olan tümör hücrelerinde görülen DNA hasarından sonra hücre döngüsünün G<sub>1</sub>'de durdurulamaması hasarlı DNA kalıbı kullanılarak DNA'nın çoğalmasına sebep olur. P 53 proteini mutant olan hasarlı hücreler, G<sub>1</sub> fazında durmazlar, onarım için yeterli zaman da olmadığından bir sonraki S fazında hata iki katına çıkar<sup>107</sup>. P 53 'e bağlı hücre siklusunun G<sub>1</sub> 'de durması için p 21 gereklidir. P 21 eksik olan hücrelerde, DNA hasarından sonra hücre döngüsü normal G<sub>1</sub> evresinde durmaz. P 21 mitozun tamamlanması için DNA replikasyonunun başlangıcına da katılabilir. Bazı hücre tiplerinde p53' ün kopyalama ile Bax yapımını uyardığı görülmektedir<sup>95</sup>. P 53 tarafından kopyalama ile uyarılan bir diğer gen olan IGFBP3 insülin benzeri büyüme faktörü- 1' e bağlanır ve apoptozu önleyici sinyal oluşumunu engeller. P 53'ün uyardığı PAG608 geni hücre içine taşındığında hücre ölümüne sebep olabilir. Son olarak p53' ün hücrelik oksidasyonunu arttıran bir gen grubunu stimüle edebildiği belirlenmiştir<sup>108</sup>.

Günümüzde antitümör olarak kullanılan ilaçların birçoğu, p53 proteini seviyesini arttırmaya yöneliktir. Bunun sonucunda hasar tamir edilebilir veya apoptoz uyarılabilir<sup>109,110</sup>.

## **2.8. Spermatogeneizde Apoptozisin Rolü**

Doku canlılığında ve devamında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkin olan apoptozis, testiküler dokuda da sık görülen

bir durumdur. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır. Normal spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ek olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda önemli rol oynar<sup>111,112</sup>. Apoptoz, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar<sup>113</sup>. Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için gereklidir<sup>114</sup>. Apoptozun, spermatogenez sırasında bilinen iki görevi vardır; germ hücre sayısını sertoli hücrelerinin destekleyebileceği sayıda tutmak ve oluşabilecek anormal spermatozoonları azaltmaktır<sup>115</sup>.

Kerr tarafından yapılan bir çalışmada testiste devamlı olarak spontan apoptoz gerçekleştiği bildirilmiştir<sup>116</sup>. Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin %75'i apoptoza maruz kalır<sup>117</sup>. Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı sağlamaya yönelik fizyolojik bir cevap olarak tanımlanmıştır<sup>70,118</sup>.

Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde artış görülebilir<sup>114,120-124</sup>. Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozunun hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir<sup>123,124</sup>. Gonadotropin ya da testosteron eksikliği testislerde germinal hücre kaybına yol açar<sup>125</sup>. Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan duyarlılığı da programlanmış hücre ölümlerini arttıran bir başka nedendir<sup>126</sup>. Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan bazı dış uyaranların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptoz gerçekleşir ve spermatogenezde bozulma ve infertilite meydana gelebilir<sup>53,71,110</sup>. Sperm apoptozu ve sperm DNA'sında oluşan hasar, erkek infertilitesi için potansiyel ve kullanışlı belirleyiciler olarak kabul edilir. Yapılan çalışmalarda apoptozun normal spermatogenezis sırasında germinal hücre ölümü mekanizmasının altında yatan nedenlerden biri olup, pek çok memeli türünde spermatogenezisi düzenleyen önemli mekanizmalardan biri olduğunu gösterilmektedir<sup>115,127,128</sup>.

İnfertil olan erkek hastalarda, ROS ile artmış sperm hasarının, sitokrom c, kaspaz 9 ve 3'ün yüksek seviyeleri ile arasında apoptozu işaret eden korelasyon olduğu gösterilmiştir<sup>129</sup>.

## 2.9. Aspartam

Yaygın olarak kullanılan, sentetik tatlandırıcı olan Aspartam, 1965 yılında G.D. Searle Company'de çalışan James Schlatter tarafından keşfedilmiştir<sup>4</sup>. Sükrozdan 200 kat daha tatlı olmasına rağmen şeker alımını sınırlandırması gereken veya kısıtlaması gereken insanlar için çok daha düşük kalorili bir maddedir<sup>130</sup>. Aspartam (L-fenilalanin N-L- $\alpha$ -aspartil-1-metil ester) dünya çapında yaygın olarak 1981'den beri kullanılan yapay bir tatlandırıcıdır. FDA tarafından genel amaçlı tatlandırıcı olarak sınıflandırılan aspartam 100'den fazla ülkede kullanım için onaylanmıştır ve 6000'den fazla yiyecek ve içecekte bulunur<sup>131</sup>. Bundan dolayı aspartam içeren ürünlerin aynı anda tüketimiyle doz aşımına uğranmaması için günlük alım değerine belirli kısıtlamalar getirilmiştir. Günlük önerilen maksimum tüketim değeri Avrupa'da 40 mg/kg, ABD'de 50 mg/kg'dir<sup>133</sup>.

Aspartam; bugünkü üretimi yılda 15500 tonu bulmakla birlikte, 500'ü ilaç olmak dünya çapında 200 milyondan fazla insan tarafından tüketimi gerçekleştirilmektedir<sup>131,132</sup>.

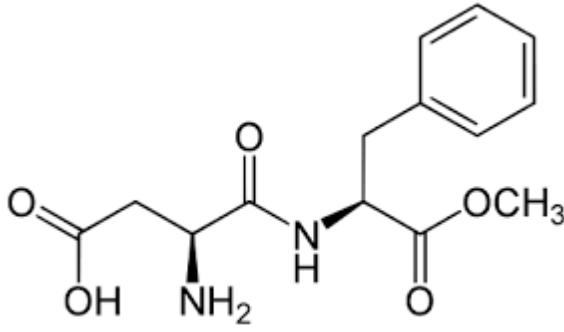
### 2.9.1. Aspartamın kimyasal yapısı ve metabolizması

Aspartam, L-aspartik asit ve L-fenilalaninin metil ester bağıyla birleştirilmesiyle üretilen bir yapay tatlandırıcıdır<sup>134</sup>. Maddenin  $\alpha$  ve  $\beta$  olmak üzere iki farklı kimyasal formu vardır, fakat sadece  $\alpha$  formu tatlıdır<sup>135</sup>. Kemirgenlerin ve insanların gastrointestinal yolunda aspartik asit, fenilalanin, metanol ve diketopiperazin olmak üzere 4 farklı yapıya indirgenir<sup>136</sup>. Diketopiperazin, aspartam yapısındaki metil grubunun ayrılması sonucu dipeptidin siklik bir yapı oluşturmak üzere N- ve C-terminalinin birleşmesiyle meydana gelmektedir<sup>137</sup>. Bu madde aynı zamanda 30°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda parçalanma ürünü olarak da oluşabilmektedir. Metanol, aspartamın yapısında bulunan metil ester bağının ince bağırsağın üst kısmında pankreatik kimotripsin ile hidrolize edilmesi sonucu açığa çıkmaktadır ve bağırsak tarafından hemen emilmektedir<sup>138</sup>. Dokularda alkol dehidrogenaz tarafından oksidasyonu gerçekleşen metanol formaldehite dönüşmektedir. Aşırı reaktif bir ara ürün

sonucunda, format, açığa çıktığı tespit edilmiştir<sup>139</sup>. Bu reaktif ara ürünün DNA üzerindeki etkilerini araştırmak üzere aspartamdaki formaldehit oluşturan karbon atomu <sup>14</sup>C ile işaretlenmiş ve aspartam kökenli formaldehitin DNA-protein kovalent bağlarını oluşturmada rol oynadığı tespit edilmiştir<sup>140</sup>. Metanolü her ne kadar meyve gibi doğal kaynaklardan da alıyorsak da, maddenin kimyasal yapısı gereği bu yapının monomerlerini vücudun doğal kaynaklarda olduğu gibi algılaması olası görülmemektedir. Bunu doğrular nitelikte, bitkisel ürünlerden alınan metanol pektine bağlı olduğundan sindirim sisteminden herhangi bir zarara yol açmadan geçerken, aspartam yapısında bulunan metil ester bağı zayıf olduğundan hemen parçalanıp serbest metanol oluşumuna yol açmaktadır. Bu durum her ne kadar madde önerilen doz sınırları içerisinde alınsada, biyokimyasal yapısının göz ardı edilemeyecek etkilerini ortaya koymaktadır<sup>141</sup>.

Fenilalanin ve aspartik asit dipeptidi ise diğer peptidlerin hidrolizi ile aynı biçimde gerçekleştirilir. Oluşan serbest aminositlerden aspartik asidin herhangi bir olumsuz etkisi gözlenmezken, fenilketonüri hastalığına sahip bireylerde fenilalanin hidroksilaz enzimi bulunmadığından kanda ve beyinde fenilalanin birikimi sonucu toksik etki yaratma durumuna rağmen aspartamın bir sorun yaratmadığı tespit edilmiştir<sup>141</sup>.

Aspartam beyaz renkli, kristal toz halinde, kokusuz fakat yoğun tatlı bir maddedir. Aspartam kütlece şekerle aynı kalori değeri vermesine karşın (4 kcal/g), şekerle oranla yaklaşık 200 kat daha az seviyede eklenebilir ve böylelikle benzer tatlılığı daha az net kalori alımı ile sağlayabilmektedir. Bu özelliği aspartamın dünya çapında yiyecek ve içeceklerde düşük kalorili ya da kalorisiz tatlandırıcı olarak kullanılmasına neden olmaktadır<sup>133,142</sup>. Aspartamın kimyasal özellikleri Tablo 2.1’de ve aspartamın kimyasal yapısı Şekil 2.8’de gösterilmektedir<sup>142-144</sup>.



**Şekil 8.** Aspartamın kimyasal yapısı<sup>145</sup>

**Tablo 1.** Aspartamın Kimyasal Özellikleri

Kimyasal adı:	N-L-α-aspartil-L-fenilalanin 1-metil ester
Kimyasal formülü:	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>
Molekül ağırlığı:	294.31
İzoelektrik nokta	pH 5.2
Erime noktası	246-247°C

Aspartam kuru ortamlarda çok dayanıklıdır fakat sulu çözeltilerde uzun süreli ısı işlem sırasında bozunmaktadır. Sudaki çözünürlüğü pH ve sıcaklığa bağlıdır. PH düştükçe çözünürlüğü artmakta olup, maksimum çözünürlüğe pH 2.2’de ulaşmaktadır. Aspartam, düşük pH’larda stabil bir tatlandırıcı olması nedeniyle, kola ve benzeri alkolsüz diyet içeceklerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Suda ve alkolde çok az miktarda çözünürken, katı ve sıvı yağlarda çözünmemektedir<sup>146</sup>. Ağız yoluyla alınan aspartam hızla içerdiği amino asitlere aspartat ve fenilalanin ve metanole metabolize olmaktadır<sup>147</sup>. Aspartamın absorbe ve metabolize olması iki şekilde gerçekleşebilir;

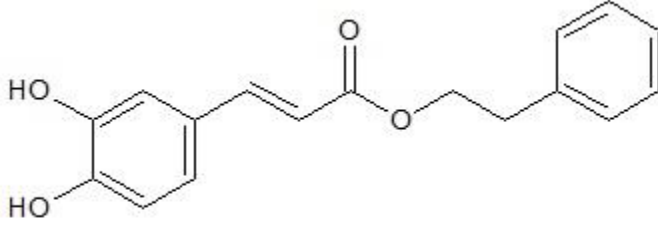
- 1) İntestinal lümende proteolitik ve hidrolitik enzimlerce aspartat, fenilalanin ve metanole hidrolize olur, bu bileşikler lümeden emilir ve portal dolaşıma girer.
- 2) Peptid transport mekanizmasıyla doğrudan mukoza hücrelerince absorbe edilir ve aspartat, fenilalanin ve metanole hidrolize olur ve portal dolaşıma girer<sup>148</sup>.

## 2.10. Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)

Propolisten izole edilen CAPE 1988 yılında Grunberger ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Yaptıkları çalışmada CAPE bileşimini uygun koşullarda izole etmelerinin yanı sıra, aynı zamanda kimyasal olarak da sentezlemişlerdir. Propolisten izole edilen CAPE'nin kimyasal ve fiziksel özellikleri ile kimyasal olarak sentezlenmiş CAPE ile karşılaştırılmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir<sup>149</sup>. CAPE, arıların bitkilerden topladığı özütün içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir. Bununla birlikte antioksidan, antiinflamatuvar, antiviral, antimikrobiyal, antiproliferatif ve antikanser gibi birçok etkiye sahiptir<sup>150,151</sup>. Çok uzun aromatik ve alifatik yapıda karbon grupları taşıdığı için aynı zamanda lipofilik özellik gösterirler. Böylelikle, hücre zarından kolayca geçmesi mümkün olmaktadır<sup>152</sup>. Ayrıca bazı araştırmalar CAPE'yi, oksidatif stres, diyabet, nörodejenerasyon ve anksiyete gibi pek çok patolojiye karşı etkili bir çözüm olarak göstermektedir<sup>153,154</sup>.

Eski yıllarda propolis “alternatif tıp” olarak antibakteriyel ve antiinflamatuvar etkileri başta olmak üzere birçok sebeple tedavi amaçlı olarak kullanılmış, iyileştirici rolünün olduğunun gözlenmesi sonucu kullanımı yaygınlaşmıştır<sup>155</sup>. Son zamanlarda ise dünyanın farklı ülkelerinde sağlıklı içecek sınıfında ve günlük birkaç dozda alınabilecek kapsül ve tablet formlarında piyasaya sunulmakta ve bu geniş etkileri sebebiyle insanlar tarafından yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca tıp dünyasında da CAPE'e olan ilgi gittikçe artmaktadır<sup>156</sup>. CAPE ile birlikte propolisin aktif bileşenlerinden olan diterpenoidler ve diğer bazı fenolik bileşiklerin antitümör etkinlikleri oldukça belirgindir. CAPE'nin hücre membranlarını rahatlıkla geçmesine fırsat verecek fenil ve polihidrokarbon zinciri ile birlikte taşıdığı iki adet hidroksil grubu, (-OH) CAPE'ye kuvvetli antioksidan özellik kazandırmaktadır<sup>156</sup>.

CAPE'nin molekül formülü  $C_{17}H_{16}O_4$  tür. Molekül ağırlığı 284.31 gr./mol'dür. CAPE'in kimyasal yapısı Şekil 2.9'da verilmiştir. Kimyasal olarak kafeik asit ile fenetil alkollerinin reaksiyonu sonucunda sentezlenebilmektedir<sup>156</sup>.



**Şekil 9.** CAPE molekül yapısı

CAPE, birçok biyolojik aktivitede hayati rolü olan katekol halkaları içinde hidroksil grupları olan bir polifenoldür<sup>155</sup>. CAPE, beyaz ve kristalize toz seklindedir. Suda çözünmez fakat etanol, metanol, aseton ve dimetil sülfoksitte (DMSO) çözünür. Bu çözücüler içinde CAPE'nin çözünürlüğü yaklaşık 10 mg/ml dir<sup>157</sup>. CAPE; farklı ayırma yöntemleri ile propolisden ayrılabilceği gibi, %91.2 ve %96 molar dönüşüm oranına sahip kafeik asit ve fenetil alkollerinden respons yüzey metodolojisini kapsayan birkaç metotla da kimyasal olarak sentezlenebilir<sup>157</sup>.

### **2.10.1. Kafeik asit fenetil esterinin etki mekanizması**

CAPE, Human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) integras gibi enzimlerin güçlü bir inhibitörüdür<sup>155</sup>. Bunun yanı sıra biyokimyasal ve fizyolojik olarak en dikkati çeken etkisi NF- $\kappa$ B'nin çok spesifik bir inhibitörü olmasıdır<sup>155,158,159</sup>. NF- $\kappa$ B bağışıklık sistemi, enflamatuar yolak ve apoptozda önemli rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür<sup>158, 159</sup>. CAPE yapıca flavonoidlere benzer ve iki halkasal yapı içerir. Bu halkasal yapılardan bir tanesinde iki adet hidroksil grupları sayesinde redoks reaksiyonlarında aktif rol oynayarak koruyucu özellik göstermektedir<sup>160</sup>. Çok düşük konsantrasyonlarda bile reaktif oksijen türlerini ortadan kaldırarak organizmada lipoksijenaz inhibitörü (1-50  $\mu$ M) ya da nükleer faktör B (NF- $\kappa$ B) inaktivatörü (90 $\mu$ M) olarak etkinlik göstermektedir<sup>161</sup>.

### **2.10.2. CAPE'nin antioksidan etkileri**

CAPE'nin yapısı, güçlü bir antioksidan olan katekol içerir<sup>162</sup>. Bu antioksidan özellikleri birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur. Koruyucu etkinliğini hasarlı dokuda glikoliz ve pentoz fosfat yolunun bütünlüğünü koruyarak gerçekleştiren, bir



antioksidandır. Bu etkinliğini, nükleik asit sentezini artırıp hasarı azaltarak ve sitrik asit siklusunu da daha aktif tutarak sağlamaktadır<sup>163,164</sup>. Bilimsel çalışmalarda kullanılan CAPE'nin, -20°C'de depolanması gereklidir aksi halde tüm biyolojik aktivitesini kaybeder<sup>155</sup>.

Son çalışmalar CAPE nin in vivo olarak ROS reaktif oksijen türleri, malondialdehid (MDA) ve peroksinitritin oluşumunu önlediğini göstermiştir. CAPE 10 mikro mol/ml konsantrasyonda insan nötrofillerinde ROS üretimini bloke edebilir ve ksantin/ksantin oksidaz sistemini tamamen baskılayabilir. Ayrıca CAPE oksidatif hasara karşı güçlü bir antilipoperoksidatif sitoprotektif potansiyel sergiler<sup>165</sup>.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız, Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 2018/5/5 no'lu karar ile onay alınarak (Bkz: Ek-1) Düzce Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütülmüştür. Ayrıca Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 2019.04.01.905 proje numarası ile desteklenmiştir.

#### 3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada 2-3 aylık ve 30-40 gr ağırlığında 29 adet erkek fareler kullanılmıştır. Kullanılan fareler rastgele CAPE, CAPE+ASPARTAM ve ASPARTAM gruplarına yedişerli, KONTROL VE KONTROL SHAM gruplarına ise dörderli olarak ayrılmıştır.



Şekil 10. Deney hayvanlarının bulunduğu kafesler.

Gruplar;

- Grup 1: Aspartam ve CAPE muamelesi olmadan Kontrol grubu olarak belirlendi.(n=4 )
- Grup 2: Kontrol Sham grubu olarak belirlendi, 35 gün boyunca intraperitoneal olarak zeytinyağı+DMSO uygulandı (n=4(DMSO:50µl/kg+Zeytinyağı:5550µl/kg) (Zeytinyağı: Blue Ocean+DMSO: GB174809 ))

- Grup 3: CAPE kontrol grubu olup 35 gün boyunca intraperitoneal olarak CAPE(Lot:2-ZPK-179-1) uygulandı. (n =7, CAPE:20 mg/kg.)

- Grup 4: Aspartam grubuna 35 gün boyunca gavaj yoluyla aspartam (CANDAREL 19030717 SK02 2024 uygulandı.) ( n =7, Aspartam:50 mg/kg.)

- Grup 5: CAPE+ASPARTAM grubuna ise 35 gün boyunca gavaj yoluyla aspartam ve intraperitoneal olarak CAPE uygulandı. (n=7, aspartam:50mg/kg ;CAPE:20 mg/kg.)

**Tablo 2.** Deney Grupları, Maddeler ve Veriliş Yolları

GRUP NO	GRUP ADI	VERİLEN MADDELER	VERİLEN MİKTAR	HAYVAN SAYISI
1	KONTROL	Salin	1 ml/kg	4
2	KONTROL SHAM	Zeytinyağı+DMSO (35 gün)	5,6 µl/kg	4
3	CAPE	CAPE (35 gün)	20 mg/kg	7
4	ASPARTAM	Aspartam (35 gün)	50 mg/kg	7
5	CAPE+ASPARTAM	CAPE+Aspartam (35 gün)	20 mg/kg ve 50 mg/kg	7

### 3.2.İzlenen Yol

- İlk olarak maddelerin günlük ne kadar doz verilmesi gerektiği hesaplandı. Farelerin ağırlıkları ölçüldü. Ortalama ağırlığın 38 mg/kg olduğu belirlendi.

- Kontrol Sham grubuna 5550 µl/kg oranında zeytinyağı 50 µl/kg oranında DMSO olmak üzere toplamda 5,6 ml oranında çözelti hazırlandı.
- CAPE için 20 mg/kg X 38 mg/kg X 8 gün x 14 hayvan = 85,12 mg/kg
- Farelerin 8 günlük CAPE dozu 85,12 mg/kg, 14 hayvan için ise günlük doz 0,02 X 38 X 14 hayvan =10,64 mg/kg olarak hesaplandı.
- Aspartam için 50 mg/kg X 38 mg/kg X 8 gün X 14 hayvan=212,8 mg/kg
- Farelerin 8 günlük aspartam dozu 212,8 mg/kg olarak hesaplandı.
- Daha sonra tüm fareler ortalama 22 °C oda ısısında, 60± 5% nem ve 12:12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldu. Farelerin buldukları kafeslerin düzenli olarak bakımları yapıldı. Gerek yem gerekse suya serbest erişimi sağlandı.
- Gruplara ayrılan hayvanlara 35 gün boyunca 08.00-12.00 saatleri arasında Tablo 1'de belirtilen maddeler uygulandı. 5. Haftanın sonunda fareler, anesteziye alındı.

### **3.3. İntraperitoneal Enjeksiyon Uygulaması**

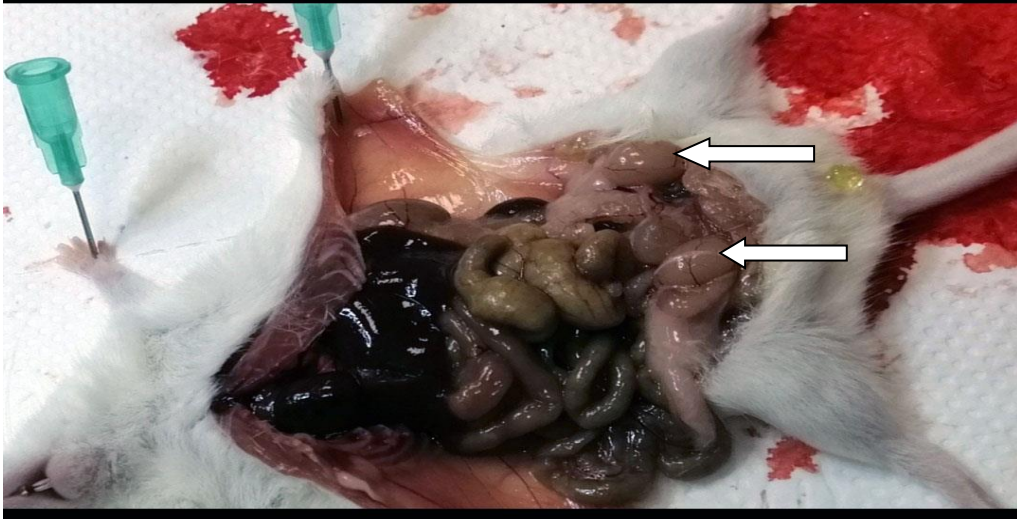
Deney için kullanılan fare uygun bir şekilde tutulduktan sonra, abdomen bölgesinin sağ veya sol alt kadrana insülin enjektörü ile 45 derecelik bir açıyla deriye girildi. Deri altında bir miktar ilerledikten sonra enjektör hafifçe itilerek, karın kaslarına geçilir. Bu işlem sırasında visseral organlara ve bezlere zarar verilmemesine dikkat edilmiştir. 35 gün boyunca CAPE ve SHAM gruplarına intraperitoneal enjeksiyon uygulaması yapılmıştır.

### **3.4. Gavaj Uygulaması**

ASPARTAM ve CAPE+ASPARTAM gruplarını oluşturan farelere, insülin enjektörü ve gavaj iğnesi yardımıyla, 35 gün boyunca ASPARTAM gavaj yoluyla verilmiştir.

### **3.5. Cerrahi Prosedür**

Tüm gruplarda, her bir hayvan ketamin (90 mg/kg) ve ksilazin (10 mg/kg) ile anesteziye alındıktan sonra testisler ve epididimis, skrotum katman katman kesilerek ulaşılmıştır. Daha sonra testis ve epididimis dikkatlice çıkarılmıştır.



**Şekil 11.** Skrotumun kesilerek testisin açığa çıkarılması. Okla gösterilen alanlar testisleri göstermektedir.

### **3.6. Semen Analizi**

Sperm sayısı plazma içerisindeki sperm yoğunluğunu göstermektedir. Semen analizi için, fareden alınan kauda epididim petri kabı içerisine alındı. 1cc serum fizyolojik ile sulandırıldı. Petri kabı içerisindeki kauda epididimden, bisturi ve pens kullanılarak, tiftikleme yöntemi ile spermler açığa çıkarıldı. Manuel Yöntemle derinliği 0.01 mm, alanı 0.01 mm<sup>2</sup> olan 1ml'lik Makler Sayım Kamarası ile semen incelemesi yapıldı. 20x'lik büyütme ile mikroskop altında spermler sayıldı. 100 kareden herhangi yukardan aşağıya ve sağdan sola 10 karedeki hareketli ve hareketsiz spermler sayılıp  $1 \times 10^6$  ile çarpılır ve ortalaması alındı. Yapılan bu semen analizinde semenin fiziksel özellikleri, sayısı ve morfolojisi değerlendirildi. Petri kabında kalan sperm örneğinden birer damla alındı ve lamlara damlatılarak yayma yapıldı.

Sperm yaymaları Hematoksilen- Eozin Boyaması ile boyandı.

### **3.7. Işık Mikroskopik İnceleme**

#### **3.7.1. Doku takibi ve parafin blok hazırlama**

Uygulama prosedürü aşağıda belirtilen sırayla yapıldı.

- a. Dokular bouin solüsyonu içinde yaklaşık 24 saat fikse edildi.
- b. Kasetleme işlemi yapıldı. Her bir doku kendi grubuna özgü şekilde kasetlendi.



**Şekil 12.** Testisin alınıp, bouinde fikse edildikten sonra kasetleme işlemi

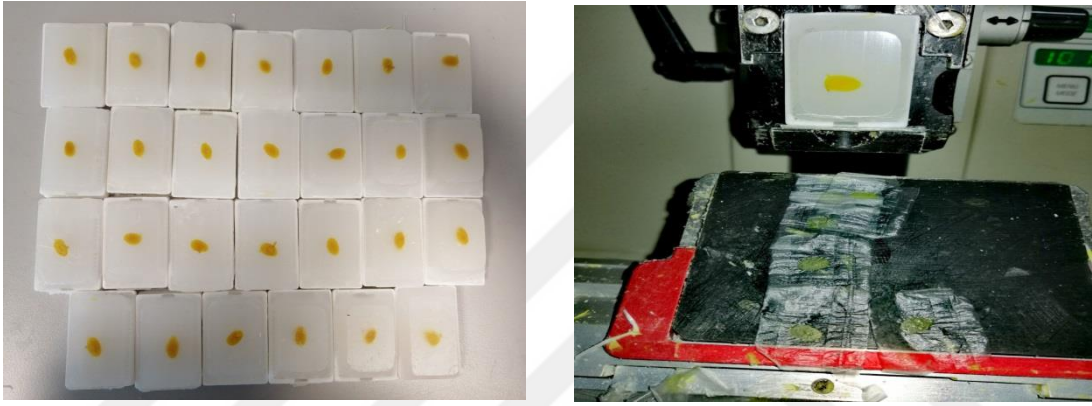
**c.** Dokular kasetlendikten sonra %10'luk formaldehit ile yaklaşık 24 saat fikse edildi.

**d.** Bu işlemden sonra sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi.

- %70'lik etil alkolde 15 dakika
- %80'lik etil alkolde 15 dakika
- %90'lık etil alkolde 30 dakika
- %90'lık etil alkolde 30 dakika
- %96'lık etil alkolde 30 dakika
- %96'lık etil alkolde 30 dakika
- %96'lık etil alkolde 30 dakika
- %96'lık etil alkolde 45 dakika
- Asetonda 45 dakika bekletildi.
- Ksilol-1'de 10 dakika bekletildi.
- Ksilol-2'de 20 dakika bekletildi.
- Parafin-1'de 75°C sıcaklıktaki etüvde 10 dakika bekletildi.
- Parafin-2'de 75°C sıcaklıktaki etüvde 20 dakika bekletildi
- Parafin-3'de 75°C sıcaklıktaki etüvde 30 dakika bekletildi

**e.** Döküm aşaması: Dokular etüv içerisindeki parafinde bekletildikten sonra içinde parafin bulunan metal gömme kaplarının içerisine yerleştirildi ve oda sıcaklığında parafinin donması sağlandı. Böylece dokularımız parafin blok haline getirildi

f. Parafine gömülü dokuların blokları mikrotom ile kesmek için hazırlandı. Bloklar ( Leica RM 2125 RT) mikrotom cihazına yerleştirildi ve 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu kesitler ilk önce sıcak su havuzuna alınarak düzleştirildi, daha sonra hematoksilen ve masson trikrom boyaması için rodajlı lam (CITOPLUS MICROSCOPE SLIDES) üzerine alınarak boyamaya hazır hale getirildi. Lam üzerine alınan bu dokuların bir kısmı genel histolojik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (HE), bir kısmı da Masson-Trikrom ve Pas boyaması ile boyandı. Ayrıca Cleaved Caspase-3 , caspase 8 ve P 53 immunohistokimyasal boyamalar için pozitif şarjlı lamlara (MENZEL GLASER SUPER FROST MICROSCOPE SLIDES) alındı.



Şekil 13. Testis dokusunun parafin blok haline getirilmesi ve mikrotomda kesilmesi

### 3.7.2. Hematoksilen-eozin boyama prosedürü

Rodajlı lamlara alınan kesitler rutin inceleme için Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi ile boyandı. Uygulama prosedürü aşağıda belirtilen sırayla yapıldı.

1-Parafin kesitler 75°C sıcaklıktaki etüvde 40 dakika bekletildi. Böylece doku dışındaki parafinin erimesi sağlandı.

2- İki ayrı ksilen kabında 15'er dakika olmak üzere toplam 30 dakika ksilende bekletildi. Böylece doku içi parafinin erimesi sağlanmış oldu.

3- %96'lık etil alkole 10 defa,

4- %80'lik etil alkole 10 defa,

5- %70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.

- 6- Akan suda yıkandı.
- 7- Hematoksilende 2 dakika bekletildi.
- 8- Akan suda yıkandı.
- 9- Asit alkole 2 defa daldırıldı.
- 10- Akan suda yıkandı.
- 11- Amonyaklı suya 2 defa daldırıldı.
- 12- Akan suda yıkandı.
- 13- %70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 14- Eozine 10 defa daldırıldı.
- 15- Akan suda yıkandı.
- 16- %70'lik etil alkole 10 defa
- 17- %80'lik etil alkole 10 defa
- 18- %96'lık etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 19- 1-2 dakika etüvde bekletildi.
- 20- Ksilende 10 dakika bekletildi.
- 21- Üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

### **3.7.3. Gomori–trikrom boyama prosedürü**

- 1- Parafin kesitler 75°C sıcaklıktaki etüvde 30 dakika bekletildi.
- 2-30 dakika ksilolde deparafinize edildi.
- 3-%96'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 4-%80'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 5-%70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 6-Akan suda yıkandı.
- 7-Bouin solüsyonunda 75°C sıcaklıktaki etüvde 30 dakika bekletildi.



- 8-3 ayrı kapta bol su ile yıkandı.
- 9-Hematoksilende 1 dakika tutuldu.
- 10-Üç ayrı kapta bol suyla yıkandı.
- 11-Trikrom solüsyonunda 45 dakika bekletildi.
- 12-%0,5'lik asetik asitle diferansiye edildi.
- 13-Akan suda yıkandı.
- 14-%70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 15-%80'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 16-%96'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 17-1-2 dakika 75°C sıcaklıktaki etüvde bekletilerek kurutuldu.
- 18-Ksilolde 10 dakika bekletildi.
- 19-Oda sıcaklığında kuruyan lamalar entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

#### **3.7.4. Pas boyama prosedürü**

- 1- Parafin kesitler 75°C sıcaklıktaki etüvde 40 dakika bekletildi.
- 2- İki ayrı ksilen kabında 15'er dakika olmak üzere toplam 30 dakika ksilende bekletildi.
- 3-Kesitler hidrate edildi.
  - a.%96'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
  - b.%80'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
  - c.%70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.
- 4-Bol suyla yıkandı.
- 5-Distile suyla yıkandı.
- 6-%0,5 periyodik asitte 5 dakika bekletildi.
- 7-Distile suyla yıkandı.
- 8-Schiff bazında 10 dakika bekletildi.

9-Akan suyun altında 5 dakika yıkandı. Kesitlerin rengi pembeye döndü.

10-Hematoksilende 2 dakika bekletildi.

11-Bol suyla yıkandı.

12-Kesitler dehidrate edildi.

a. %70'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.

b. %80'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.

c. %96'lik etil alkole 10 defa daldırıldı.

13-1-2 dakika etüvde bekletildi.

14- Ksilende 10 dakika bekletildi.

15- Üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

### **3.7.5. İmmünohistokimyasal incelemeler**

İmmünohistokimyasal işaretleme için pozitif şarjlı lamlara alınan kesitler bir gece boyunca 37°C'lik etüvde bekletildi. Kaspaz-3, boyaması için Thermo Scientific™ Caspase 3 (p175 lot:45), Biotinylated Goat Anti-Rabbit Polyclonal Antibody; sekonder olarak ise Thermo Scientific™ Lab Vision™ UltraVision™ Detection System (lot: AUB180119AA) anti-Polyvalent HRP/DAB kit kullanıldı.

Testis dokularına immünohistokimya tekniği uygulanarak cleaved caspase-3, kaspaz-8 ve P 53'ün hücrel dağılımı belirlenmiştir.

#### **3.7.5.1. Cleaved kaspaz-3, kaspaz 8 ve P53 immün işaretleme**

a. Bir gece önceden 56 °C'lik etüvde bekletilen kesitler ertesi sabah deparafinizasyon için iki kere 10'ar dakika ksilollerden geçirildi ve her birinde 5 dakika olmak kaydıyla %100, %90, %80, %70'lik alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi.

b. Kesitler 7 dakika distile suda çalkalandı.

c. Antijenik maskelenmenin giderilmesi amacıyla, kesitler 0.01 M sitrat tamponuna

(2,10 gr sitrik asit) 900 ml distile su (dH<sub>2</sub>O) içersinde çözdürülerek hazırlandı. NAOH ile pH:6'ya ayarlandı) konularak mikrodalga fırında 4 ve 3'er dakika 750 Watt'ta kaynatıldıktan sonra 20 dakika boyunca oda ısısında soğumaya bırakıldı. Ardından fosfat tamponlu tuz tamponunda (PBS) 2x5 dakika yıkandı. (PBS: 2,85 gr. Disodyum Hidrojen Fosfat, 16 gr. Sodyum Klorür, 0,8 gr. Potasyum Dihidrofosfat 2 lt. distile su (dH<sub>2</sub>O) eklenerek hazırlandı.) pH: 7.2-7.4 arasında ayarlandı.

d. Endojen peroksidaz aktivitesinin giderilmesi amacıyla kesitler %3'lük hidrojen peroksit ile 20 dakika inkübe edildi.

f. 3x5 dakika PBS ile yıkandı.

g. Kesitlerin etrafı hidrofobik kalemle (Pap-pen) çizildi.

h. Kesitler oda sıcaklığında ve nemli ortamda özgül olmayan Immunoglobulin Ig bağlanmalarını önlemek amacıyla bloklama serumu (Large Volume V Block Thermo Scientific LOT: AUB180119AA) ile 7 dakika muamele edildi.

Serumun fazlası alınarak kesitler, caspase-3, caspase-8 primer antikoru ile +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Kontrol kesitlerine primer antikor yerine uygun izotip kontrol uygulandı. (Cleaved Caspase-3 (D 175) Lot:45), (phospho P 53: (THR 81) Lot: 131224), (Caspase-8 Lot: AO312 )

1. Ertesi gün kesitler PBS ile üç defa beşer dakika yıkandı. Daha sonra sırasıyla, 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor (Biotinylated Goat Anti-Rabbit Cat: TR-015-BN) ve 20 dakika HRP-konjuge streptavidin ya da AP-konjuge streptavidin (Streptavidin Peroksidase Thermo Scientific Lot: SHR180118AB) kompleksi ile oda ısısında nemli ortamda inkübe edildi. Her iki uygulama sonrasında da PBS ile 3 defa 5'er dakika yıkama yapıldı.

i. Sinyalleri geliştirmek için dokular 5 dakika Di Amino Benzidin (DAB) kromojeni ile muamele edilecek ve musluk suyunda yıkandı. DAB: 30 µl DAB kromojen, 500 µl DAB substrat kullanılarak hazırlandı. (DAB substrate Lot:53746, DAB kromojen Lot:53145)

j. Kesitlere Mayer's Hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.

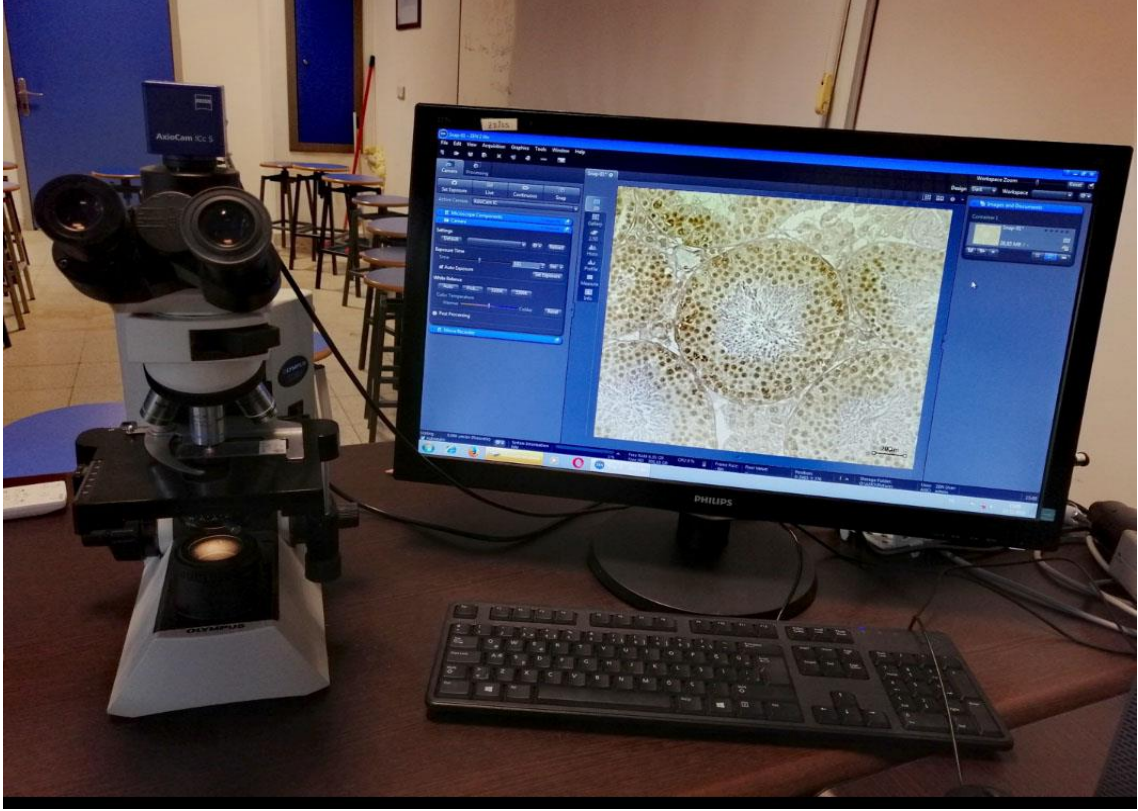
k. Akan suda yıkanan kesitler her birinde 10 dip olmak kaydıyla %70, %80, %90'lık alkol serilerinden geçirildi.

l. %100'lük alkolde 4 dakika tutularak dehidrate edildi.

m. Her iki ksilolde 10 dakika bekletildi.

n. Oda sıcaklığında kuruyan lamalar entellan kapatma solüsyonu ile kapatıldı.

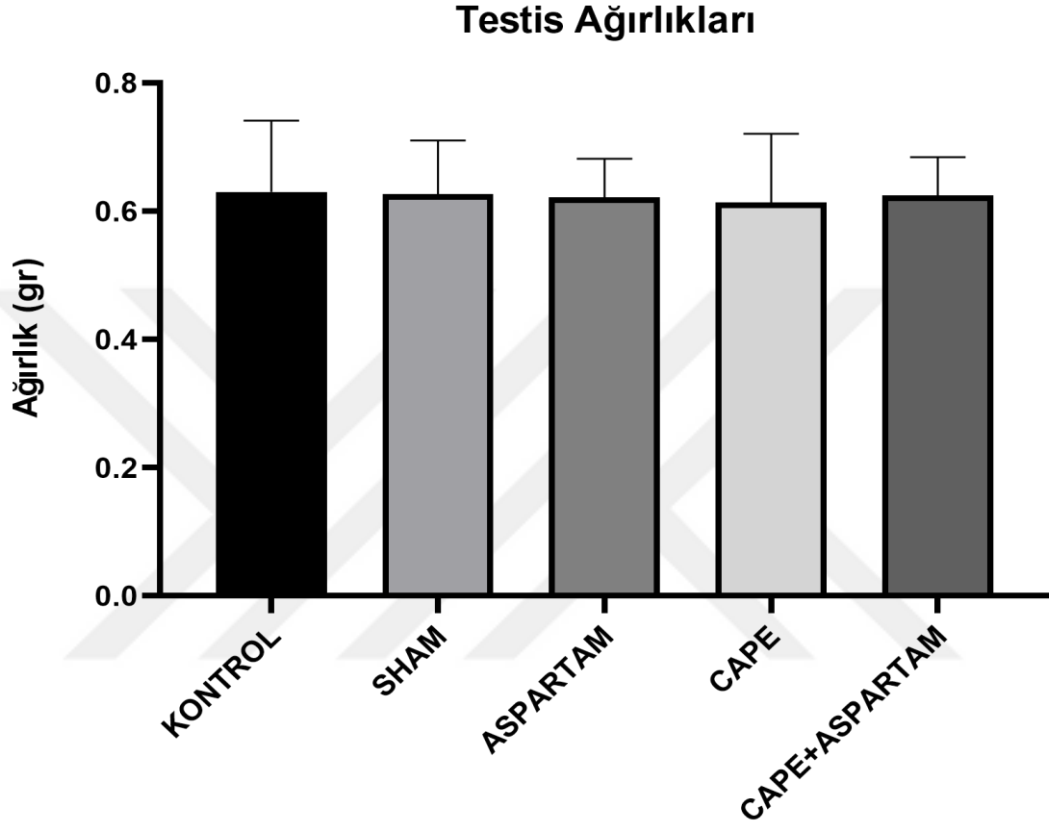
o. İstatiksel analiz için fotoğrafları çekildi.



Şekil 14. İmmunohistokimyasal olarak boyanan örneklerin fotoğraflarının çekilmesi.

## 4. BULGULAR

Deney sonrası tartılan testis ağırlıkları Tablo 4.1 ve Grafik 4.1’de gösterilmiştir. Gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi. ( $p < 0.0001$ ).



Şekil 15. Grupların testis ağırlıklarına ait grafik.

### 4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

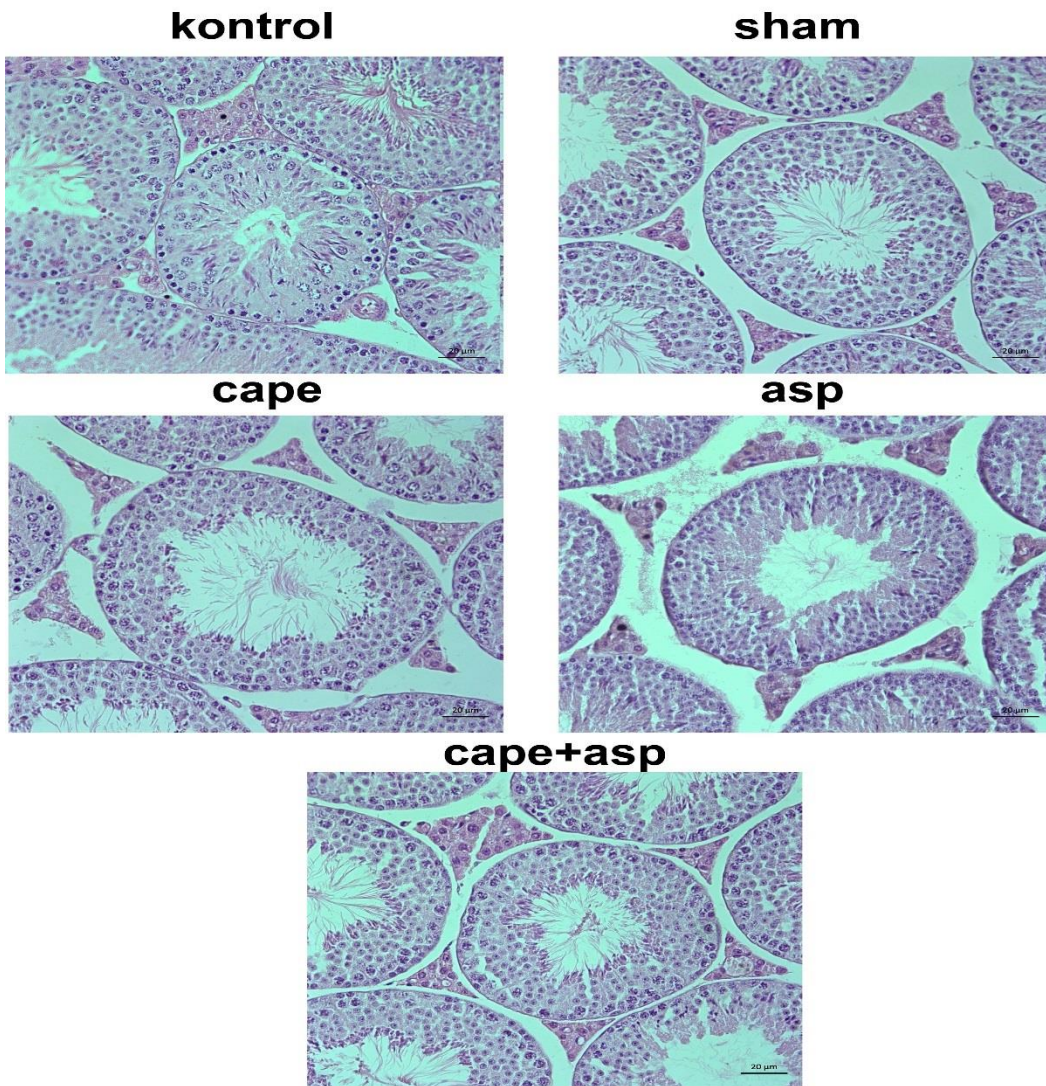
#### 4.1.1. Histolojik bulgular

Sham ve kontrol grubuna ait testis dokularında herhangi bir yapısal bozukluk yoktu. Seminifer tübüllerin ve spermatogenik hücrelerin yapısal bütünlüklerini koruduğu görüldü. Aspartam grubu, tedavi grubu ve diğer grup olan ASP+CAPE grubuna ait testis dokularında da aynı şekilde histopatolojik bir değişiklik gözlenmedi. Gruplar arasında herhangi bir fark görülmedi, tübül yapıları normal ve tübül içi sperm yoğunluğu birbirine benzer şekildeydi.

## Hematoksilen-eozin (H-E);

Testis dokusunun genel morfolojisini ortaya koymak için Bouin solüsyonunda tespit edilen dokuların kesitlerine H-E boyası uygulandı. Tüm gruplara ait H-E ile boyanmış kesitlerde seminifer epitel morfolojisi düzgün ve hasarsız olarak izlendi, seminifer epiteli oluşturan sertoli hücreleri ile bunların desteklediği, germinal hücrelerin düzenli bir seri oluşturacak şekilde yerleştikleri gözlemlendi.

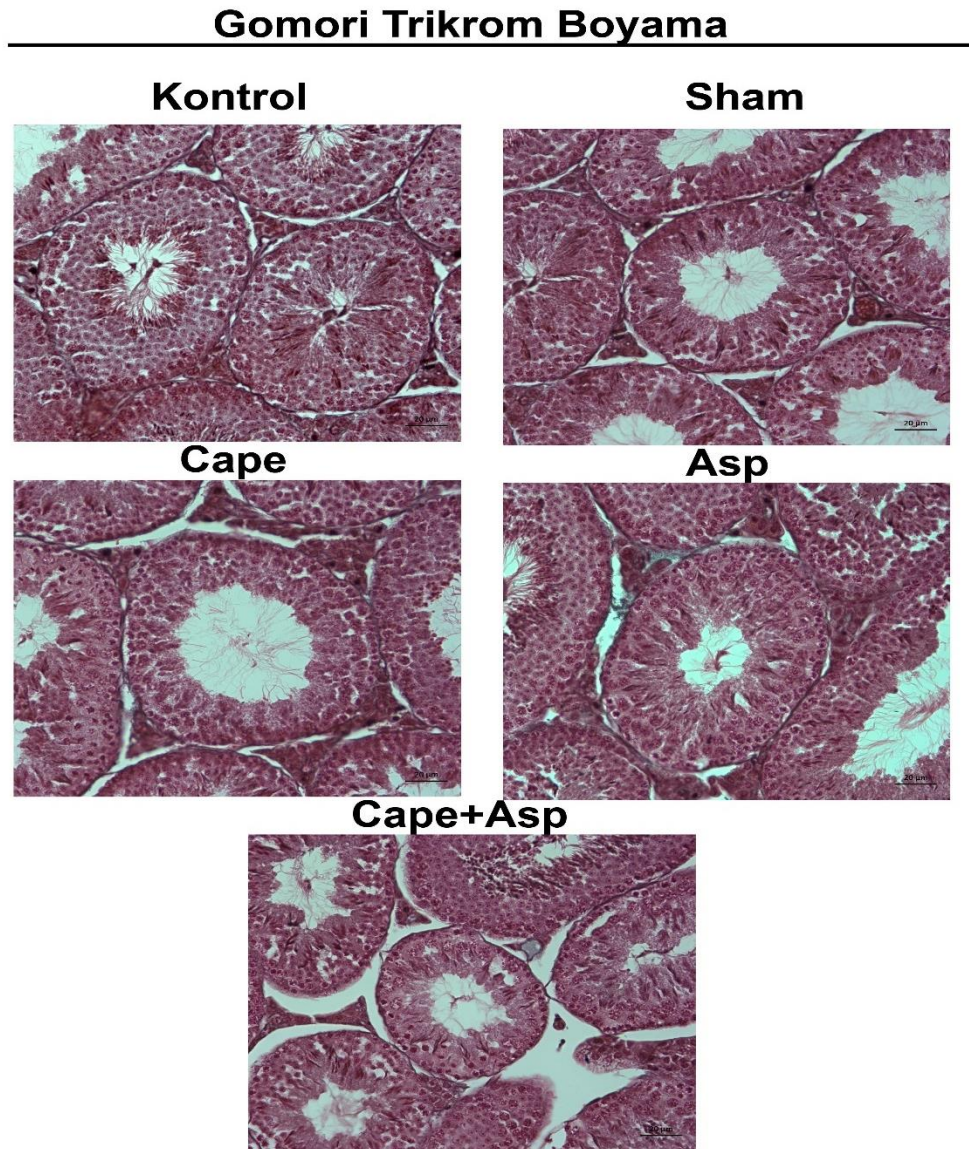
## Hematoksilen & Eozin Boyama



Şekil 16. Tüm gruplara ait Hematoksilen-Eozin Boyaması,40x.

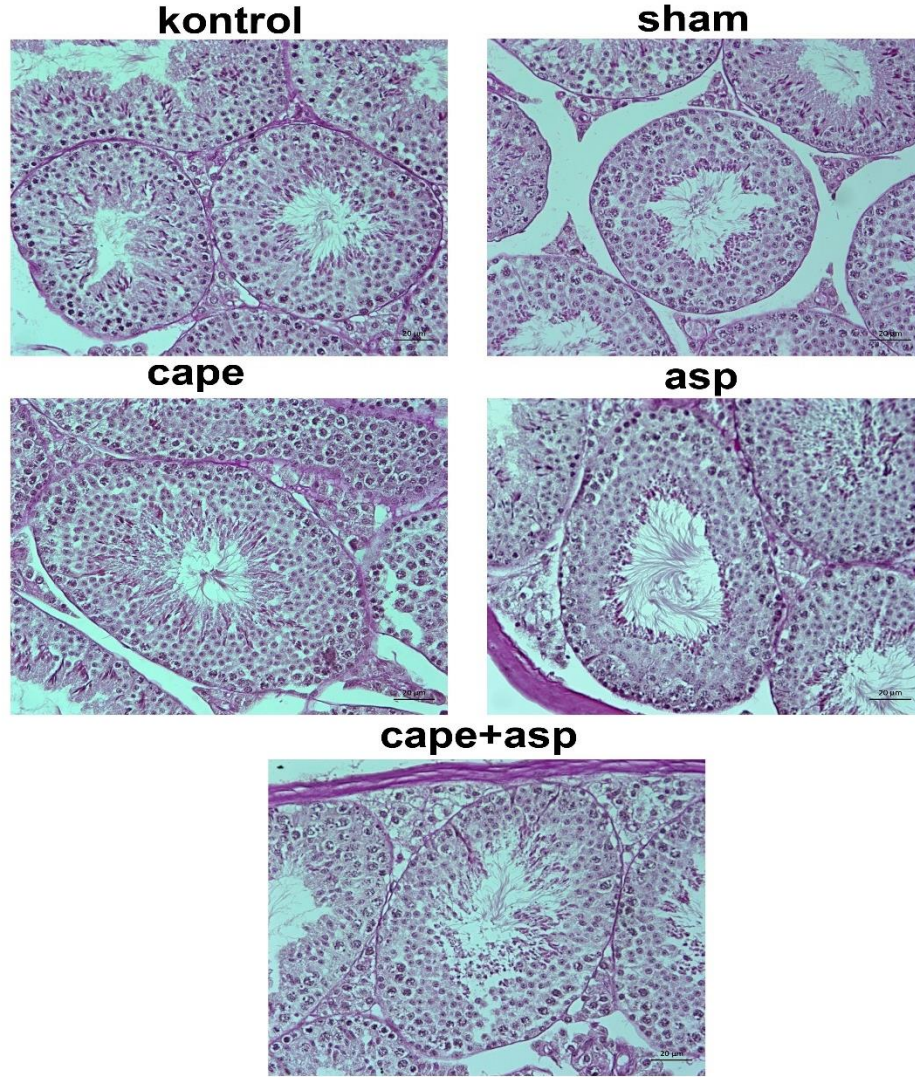
### **Gomori-Trikrom;**

Testis dokusunun genel morfolojisini ortaya koymak ve ara dokuyu oluşturan bağ doku yapısını incelemek amacıyla Bouin solüsyonunda tespit edilen doku kesitlerine Gomori-Trikrom boyası uygulandı. Tüm gruplara ait testis kesitlerinde seminifer tübül morfolojisi ara doku ile devamlılık gösterecek şekilde düzgün ve hasarsız morfoloji görüldü. Tübüller arası bağ doku hasarsız morfolojide ve belli bir kollajen yoğunluğuna sahip olarak izlendi.



**Şekil 17.** Tüm gruplara ait Gomori-Trikrom Boyaması,40x.

## PAS BOYAMA



**Şekil 18.** Tüm gruplara ait PAS boyaması,40x.

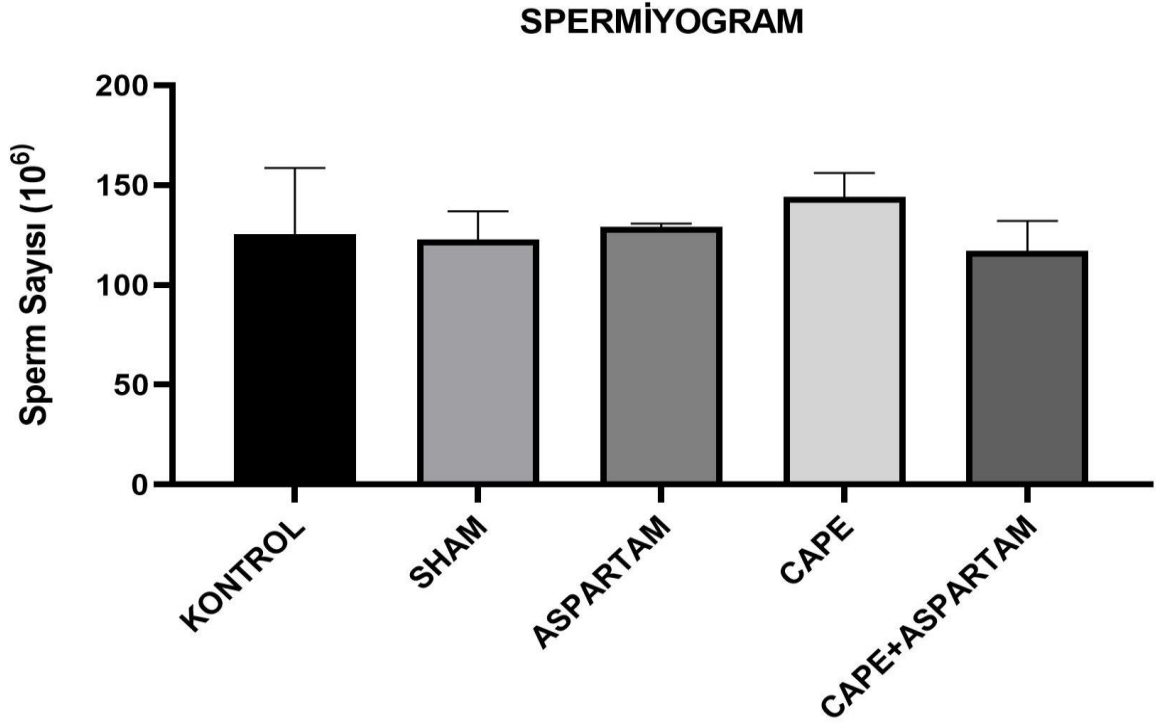
### PAS;

Bazal membrandaki değişiklikleri izlemek için, PAS ile boyalı kesitler incelendiğinde tüm gruplarda bazal membran yapılarının ve seminifer tübülerin düzenli morfolojide olduğu gözlemlendi. Seminifer tübüllerde bulunan spermatogenik seriyi oluşturan, bazaldan lümeneye doğru sırası ile spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermatidler görüldü. Tübüllerin etrafında düzgün görünümde interstisyel bağ dokusu gözlemlendi.



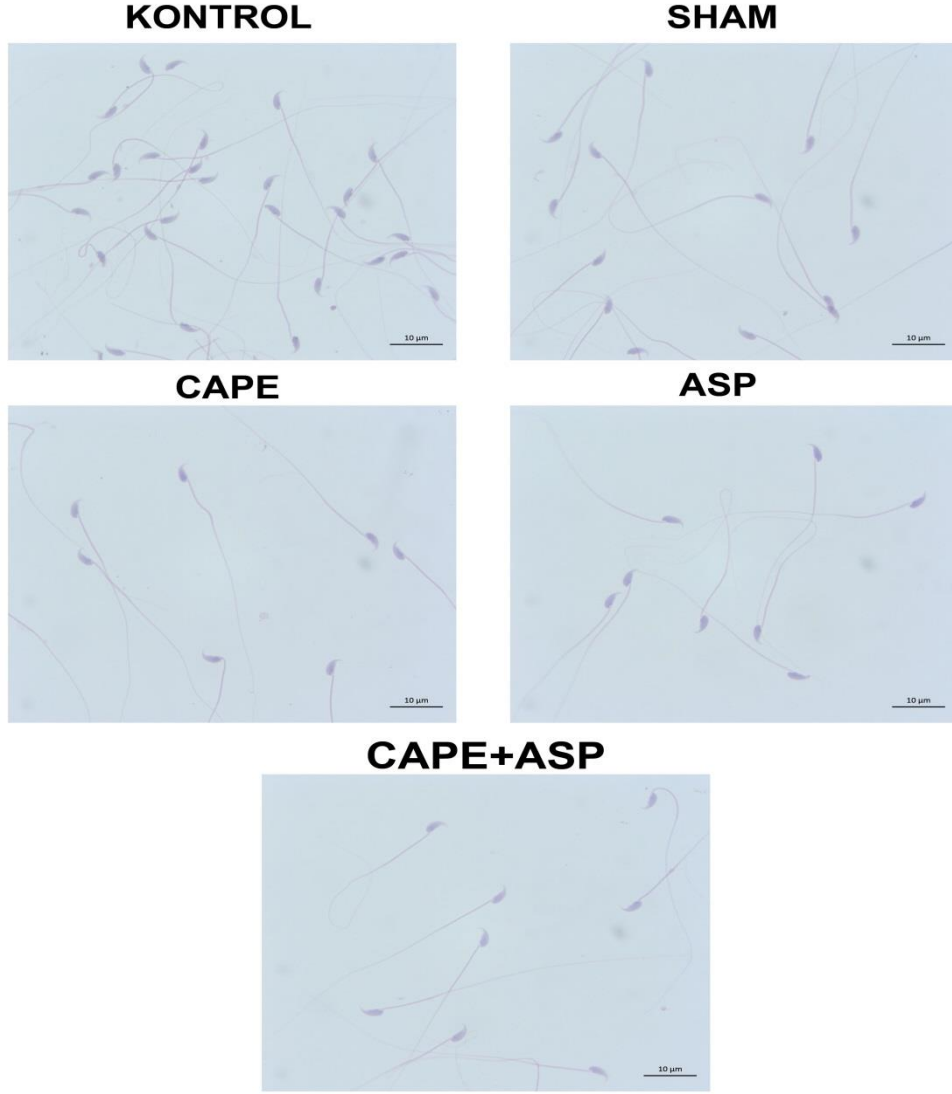
## 4.2. Spermiyogram Bulguları

Epididimisin kauda bölgesinden elde edilen sperm örneklerinin toplam sayıları şekil 19’da gösterilmiştir.



Şekil 19. Grupların toplam sperm sayıları.

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ( $p < 0,0001$ ).



**Şekil 20.** Tüm gruplara ait sperm yayması, Hematoksilen-Eozin Boyama, 100x.

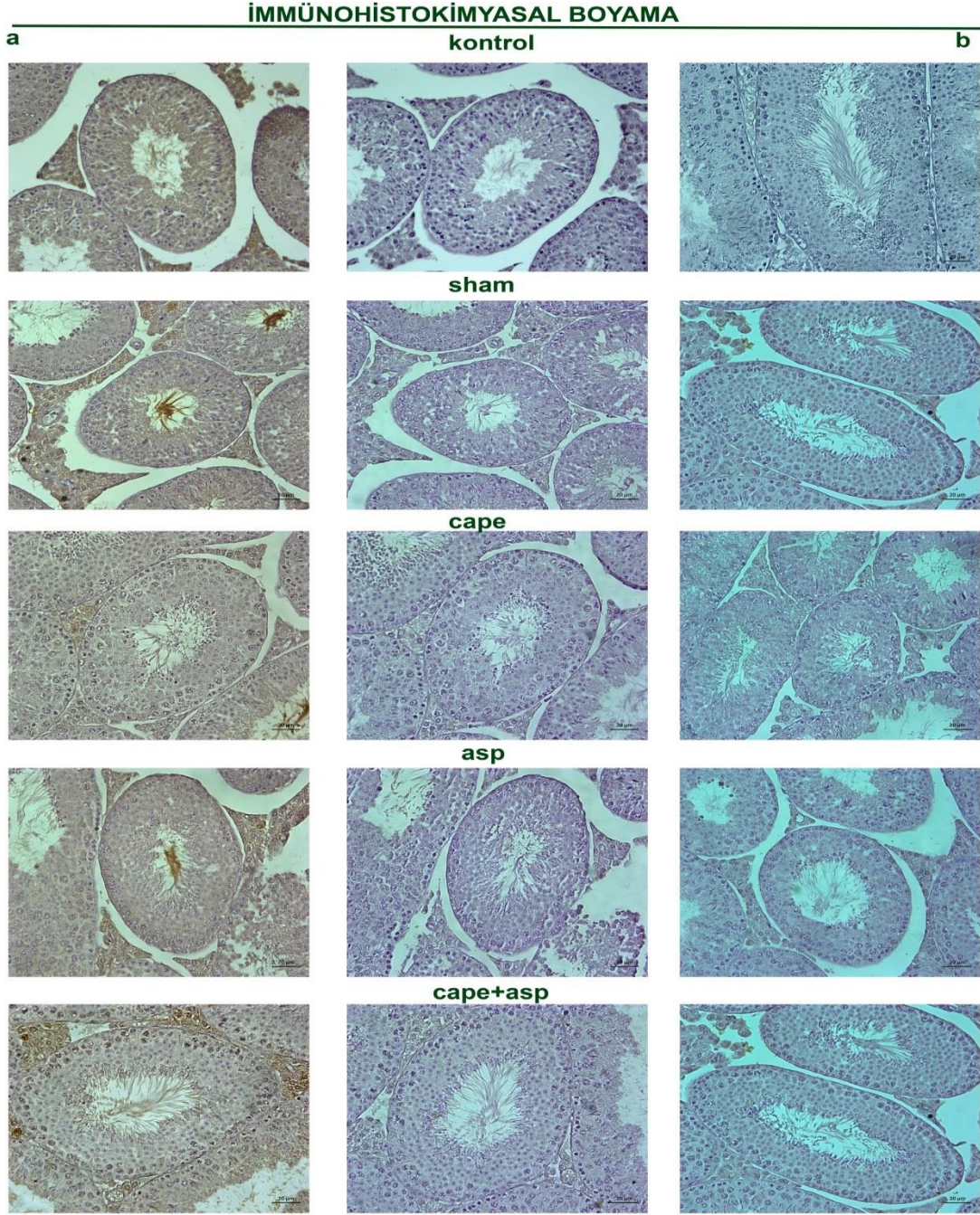
Sperm morfolojisi ise alınan örneklerden yapılan yayma preparatlarında değerlendirildi. İnsan sperminden farklı olarak fare sperm morfolojisi normal, baş ve kuyruk olarak sınıflandırıldı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı. ( $p < 0,0001$ ).

Yaptığımız çalışmada, ip olarak 20 mg/kg CAPE ve oral olarak 50 mg/kg dozunda uygulanan ASPARTAM; testis ağırlığını, sperm sayısını ve sperm morfolojisini değiştirmedir.

### 4.3.İmmunohistokimyasal Bulgular

#### 4.3.1. Kaspaz-3, kaspaz 8 ve P 53 immün işaretleme

Testis dokusundaki apoptotik hücreleri belirlemek için Kaspaz-3 immün işaretleme yapıldı. Ancak dokularda boyanma gözlenmedi.

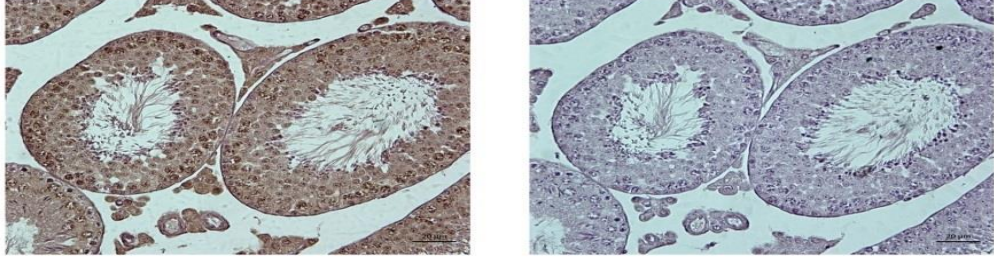


**Şekil 21.** Testis dokusunun P 53 ve kaspaz 3 ile immunohistokimyasal boyaması

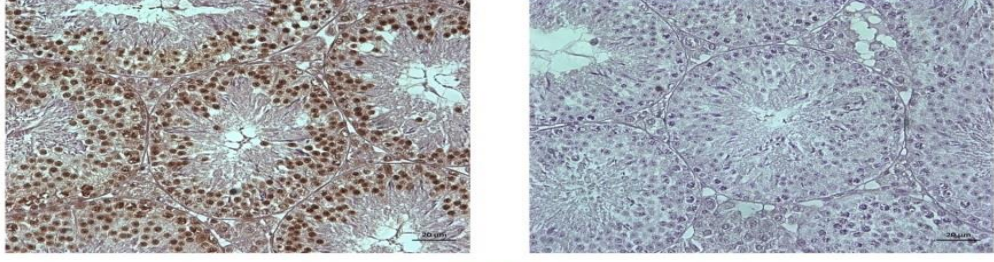
**a:** p 53, **b:** Cleaved kaspaz 3 boyamalarını göstermektedir.

## immünohistokimyasal boyama

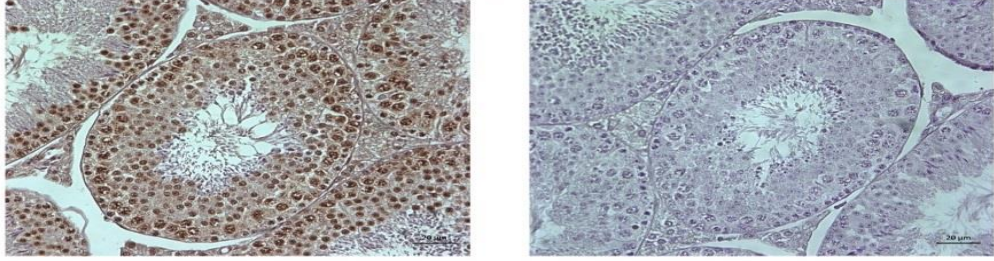
### kontrol



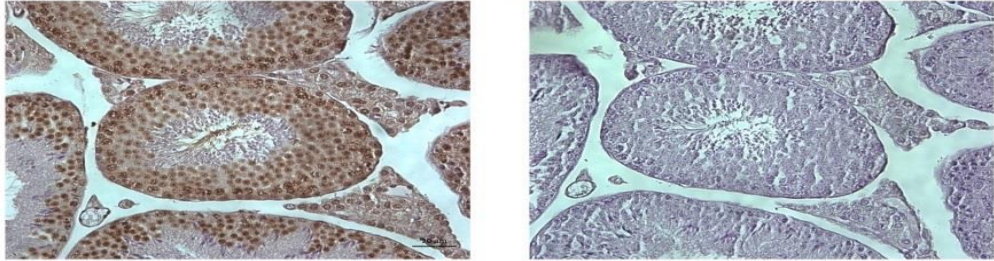
### sham



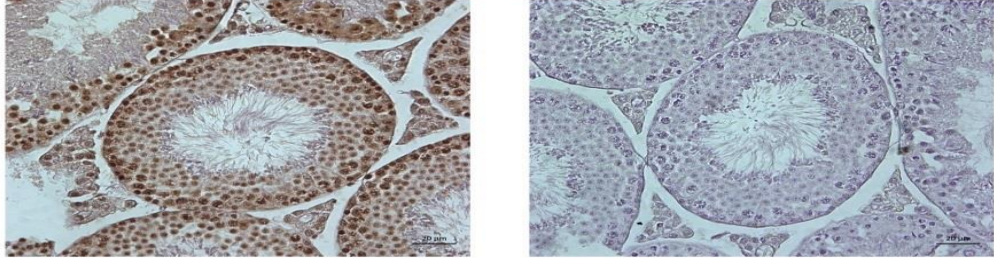
### cape



### asp



### cape+asp

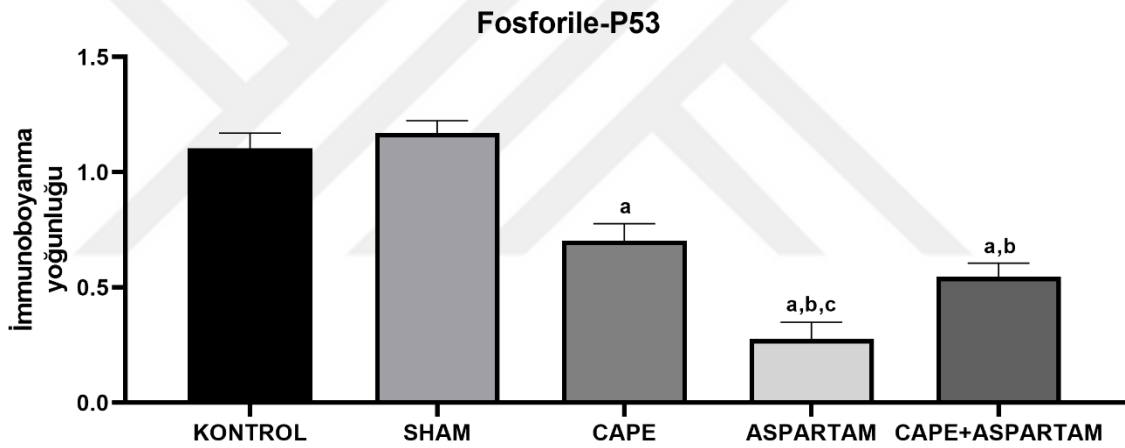


Şekil 22. Testis dokusunun kaspaz 8 ile immunohistokimyasal boyaması.

Kaspaz 8 ve P 53 immun boyaması yapılan kesitlerde tüm gruplara ait testis dokusunda spermatogenik seriye ait çok sayıda hücre pozitif boyandı.

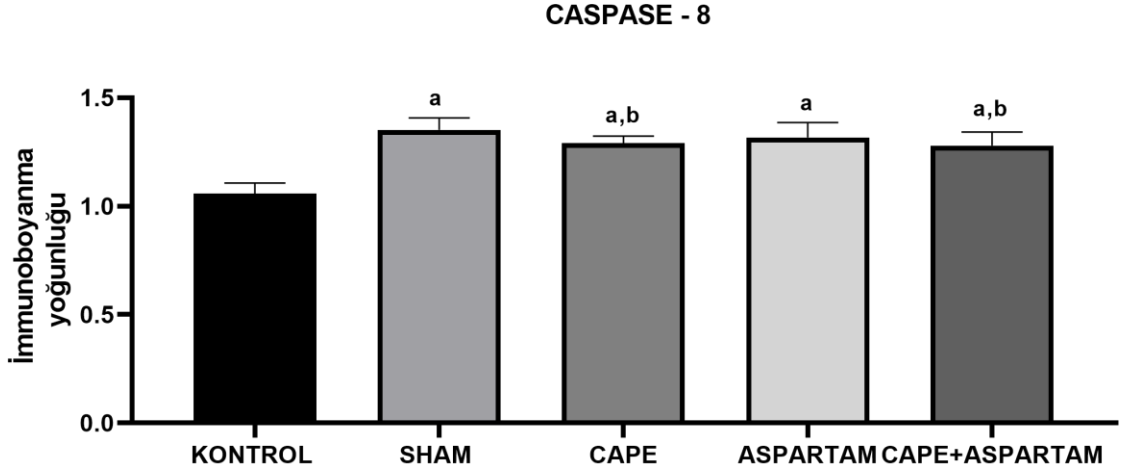
### 4.3. İstatiksel Analiz

Fotoğrafi çekilen dokuların boyanma yoğunlukları İMAGEJ programı kullanılarak bulundu. Toplam alanın, boyanmış hücrelere bölünmesiyle bulunan sonuç bize boyanma yoğunluğunu gösterdi. Daha sonra istatistiksel analiz için GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanıldı. Analizler için deney ile kontrol grupları arasındaki farkı tespit etmek üzere tek yönlü varyans analizi “One-way ANOVA” kullanıldı. Gruplar arası ortalama varyansının, grup içi dağılım varyansına oranı  $P < 0.0001$  olarak hesaplandığında veriler anlamlı olarak kabul edildi. Ancak gruplar arasındaki standart sapmalar birbirine eşit olmadığından, bu anlamlılığın hangi gruplar arasında olduğunu tespit etmek için Holm-Sidak testi yapıldı. Böylece hangi gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık olduğu belirlendi.



**Şekil 23.** Testis dokusunun Fosforile-p53 aracılığıyla immunohistokimyasal boyanma yoğunluğunu gösteren grafik. CAPE: Kafeik Asit Fenetil Ester, a; kontrol ve sham grubuna göre, b; CAPE grubuna göre, c; CAPE+ ASPARTAM grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Buna göre P53 aspartam grubunda tüm gruplara göre anlamlı olarak düşmüştür. CAPE grubunda DMSO nedeniyle Kontrol ve Sham grubuna göre düşmüştür. CAPE+Aspartam grubunda Aspartam grubuna göre anlamlı olarak yükselmiştir.



**Şekil 24.** Testis dokusunun Caspase-8 aracılığıyla immunohistokimyasal boyanma yoğunluğunu gösteren grafik. CAPE: Kafeik Asit Fenetil Ester, a; kontrol grubuna göre, b; sham grubuna göre istatistiksel anlamlılığı göstermektedir.

Kontrol grubuna tüm gruplarda anlamlı bir yükseklik olmasına rağmen Sham, CAPE, Aspartam ve CAPE+Aspartam grupları arasında anlamlı bir farklılık yoktur.

## 5. TARTIŞMA

İnfertilite, son zamanlarda insanların yaklaşık %10-15' ini etkileyen önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir<sup>168</sup>. Gün geçtikçe ciddi bir sorun haline gelen bu durumun nedenleri arasında doğrudan ya da dolaylı birçok faktör yer almaktadır. Bu faktörler çevresel etmenler, genetik defektler, fizyolojik-endokrin yetmezlik ve testis patolojileri gibi çeşitli sebeplerden kaynaklanabilmektedir. Erkek üreme sisteminin önemli bir parçası olan testis çevresel faktörlerden en çok etkilenen dokulardan biridir. Isı artışı, kimyasal maddeler ve elektromanyetik dalgaların neden olduğu radyasyon spermatogeneze en çok zarar veren çevresel faktörlerdir. Radyasyon, yüksek ısı ve toksik kimyasal birikimlerin sonucu spermatogonyal dejenerasyon olabilir<sup>169</sup>. Spermatozoon üretiminin çeşitli nedenlerden dolayı zarar görmesinin belirlenmesiyle, birçok araştırmacı farklı toksik ajanların testiste oluşturduğu değişiklik ve hasarı araştırmaya başlamışlardır<sup>170</sup>.

Apoptoz, spermatogenezde iki önemli göreve sahiptir. Bunlar; germ hücre sayısını, sertoli hücrelerinin destekleyebileceği sayıda tutmak ve oluşabilecek anormal spermatozoonları azaltmaktır<sup>115</sup>. Fakat zarar görmüş apoptotik germ hücrelerinin uzaklaştırılmasında bir problem ile karşılaşılırsa, semen içerisinde anormal sperm sayısı yükselir ve bu da düşük fertiliteye neden olur<sup>171</sup>. Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir<sup>123,124</sup>. Gonadotropin ya da testosteron eksikliği gibi hipospermatogeneze neden olan tüm durumlarda da apoptozis gerçekleşebilir<sup>125</sup>. Seminifer tübül epiteli ısı, radyasyon gibi durumlara karşı oldukça hassastır. Bu durum da germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini artıran bir diğer sebeptir. Sonuçta, ortamda testiküler yapıyı bozan dış uyarıcılar varsa eğer fizyolojik olmayan düzeyde apoptoz meydana gelir ve spermatogenezde bozukluklar ve infertilite görülebilir<sup>126</sup>. Normal spermatogenez için hücre iskeleti yapılarının organize olmaları gerekir. Testislere, mikrotübüllerin parçalanmasına sebep olan bir faktör uygulandığında germinal epitelde dökülmeler meydana gelir. Mikrotübül organizasyonunu değiştiren toksik faktörler, spermatogenezde de olumsuz yönde etkilemektedir<sup>172,173</sup>.

Yapılan literatür taramasında aspartamın dokular üzerinde olumsuz etkisini gösteren çalışmalar olduğu görülmüştür. Ancak aspartamın testis üzerine apoptotik etkilerini gösteren kayda değer bir çalışma yoktur. Yapılan bu çalışmada normal boyama yöntemleri, cleaved caspase-3, caspase-8 ve p53 immünohistokimyasal boyamaları ile aspartamın testis dokusu üzerinde apoptotik etkisinin olup olmadığını ve eğer apoptotik etkisi varsa, bu durumu düzeltmek için Kafeik Asit Fenetil Esterin (CAPE) koruyucu etkisini göstermek amaçlanmıştır.

Aspartam ile ilgili çalışmaları incelediğimizde aspartam toksisitesinin doza bağımlı olduğu bildirilmiştir<sup>175</sup>. Reno ve Bowles aspartamın en az 500 mg/mL'de kromozom kırıklarına yol açtığını ifade etmişlerdir<sup>176</sup>. Biz çalışmamızda, farelere günlük 50 mg/kg dozunda Aspartam uyguladık. Fakat yapılan histolojik ve immunohistokimyasal boyamalar sonucunda anlamlı bir sonuç bulamadık. FDA aspartamın kabul edilebilir günlük miktarının 50 mg/kg olduğunu belirtmiştir. Bizim anlamlı bir sonuç bulamamızın sebebi doz düşüklüğü olabilir. Bulduğumuz sonuç aspartamın etkilerinin doza bağımlı olduğunu desteklemektedir. Ayrıca FDA tarafından kabul edilen günlük dozun zarar vermediğini doğrular niteliktedir.

Yapılan bir diğer çalışmada Albino sıçanlarda ve üreme hücrelerinde kromozomal kırıklar ve DNA parçalanmalarının meydana geldiği tespit edilmiştir<sup>177</sup>. Abd-Elfatah ve arkadaşları, 50.4 mg/kg dozunda 9 hafta boyunca verdikleri Aspartam, Swiss albino farelerinde kromozomal kırıklar, mikronükleus oluşumu ve sperm morfolojisinde değişim gözlemlemişlerdir<sup>178</sup>. HeLa hücre hattında yapılan bir çalışmada, aspartamın *TP53*, *BAX* ve *BCL2* gibi apoptotik genlerin mRNA ekspresyonunda artışa sebep olduğu bulunmuştur. Aspartamın kanser hücrelerindeki apoptoz sürecini yavaşlattığını göstermişlerdir<sup>179</sup>. Bunun yanı sıra Katalin ve arkadaşlarının 40 mg/kg dozunda Aspartam uygulayarak lenf nodu, kemik iliği, timus, böbrek, karaciğer, dalak ve akciğer üzerinde yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna göre dalak ve akciğer dışındaki organların P 53 ekspresyonları artmıştır. Ancak dalak ve akciğer dokularında ise p 53 ekspresyonun azaldığı görülmüştür<sup>175</sup>.



Biz ise çalışmamızda Aspartam verdiğimiz gruplarda P 53 ekspresyonunun azaldığını gözlemledik. Bu sonuçlar bize aspartamın bazı dokularda apoptoz sürecini aktive ettiğini, bazı dokularda ise apoptozis sürecini yavaşlattığını göstermektedir.

90 gün boyunca, günlük 40 mg/kg Aspartam verilen ratların spermlerinin baş kısımlarında (mikrosefali, bisefali, amorf ve asefalik) defektler ve kuyruk anomalileri gözlenmiştir. Bunun yanı sıra sperm konsantrasyonunda, canlılığında ve motilitesinde azalmalar gözlenmiştir<sup>4</sup>. Bu morfolojik defektler kontrol gruplarında anlamlı olarak azalmış ve aspartam ile tedavi edilen epididimal spermlerle karşılaştırıldığında normal morfolojiden sapmamıştır<sup>4</sup>. Yaptığımız çalışmada 35 gün boyunca günlük 50 mg/kg dozunda Aspartam verilen gruplar ile kontrol grupları arasında sperm morfolijisinde, sperm konsantrasyonunda anlamlı sonuçlar gözlenmedi. Sperm sayıları tüm gruplarda birbirine yakın bir değere sahipti. Aspartam uygulanan gruplarda ise beklediğimiz gibi anomaliler görülmedi, spermler normal baş, kuyruk morfolijisine sahipti. FDA' nın belirttiği günlük dozu uygulamamıza rağmen, yapılan önceki çalışmaya göre farklı sonuç bulmamızın nedeni; uygulanan sürenin daha kısa olması olabilir. 35 gün boyunca uygulanan Aspartam, bu sebeple sperm morfolojisinde anomali meydana getirmemiş olabilir.

Testiste oksidatif stres, germ hücrelerinde fonksiyon bozukluğuna neden olan başlıca sebeplerden biridir. Antioksidanlar, hücreleri oksidatif DNA hasarına karşı korur ve spermatogenezde önemli bir role sahiptir<sup>4</sup>. Hücrelerin Aspartam toksisitesine duyarlılığındaki değişiklikler, oksidan ve antioksidan enzimlerinin aktivitelerindeki dengesizlik ile açıklanabilir<sup>4</sup>.

Khan ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmada CAPE' nin nöroprotektazi, anti-enflamatuar ve antiapoptotik özelliklere sahip olduğu belirlenmiştir<sup>166</sup>. CAPE' nin güçlü antioksidan özellikleri Özyurt ve arkadaşlarının<sup>181</sup> 2004 yılında ve Mollaoğlu ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptığı çalışmalarda belgelenmiştir<sup>182</sup>. Yapılan başka bir çalışmada ise, CAPE' nin iskemi / reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin lipid peroksidasyonunun, hücre sağkalımının ve hücre apoptozunun düzenlenmesi ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir<sup>160,183,184</sup>.

Yapılan diğer çalışmalarda ise CAPE'nin apoptozu azalttığı ifade edilmiştir<sup>183,184</sup>. Armağan ve arkadaşları 2008 yılında, CAPE'nin MTX ile indüklenen testiküler toksisiteye karşı koruduğunu göstermişlerdir<sup>185</sup>. Murugesan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, CAPE' in testis dokularında zararlı koşullara karşı koruyucu etkilerinin olduğu sonucuna varılmıştır<sup>186-187</sup>. Mukaddes ve arkadaşlarının çalışmasında ise erkek sıçanın iskemi / reperfüzyon+ CAPE'ye maruz kalmasından sonra, testisler genellikle, normal testiküler yapıyı göstermiştir<sup>188</sup>. Çalışmamızda Aspartamin testis dokusu üzerindeki olası apoptotik etkisinin gösterilmesi ve CAPE'in koruyucu etkilerinin aydınlatılması amaçlanmıştır. Bu amaçla tüm gruplara ait testis kesitleri ilk olarak H&E, Gomori Trikrom ile boyanmış ve histopatolojik olarak incelenmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında HE ve Gomori Trikrom boyamalarında CAPE ile diğer gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu. Tüm gruplara ait testis kesitlerinde seminifer tübül morfolojisi ara doku ile devamlılık gösterecek şekilde düzgün ve normal olarak görüldü. Diğer bir aşamada kesitlerimizi, aspartamin akrozom ve testis bazal membranı gibi yapılarda hasar verip vermediğini gözlemlemek ve CAPE'in bu yapıları ne kadar koruyabildiğinin tespiti için PAS ile boyadık. Ancak yaptığımız çalışmada, PAS boyamasında gruplar arasında herhangi bir fark gözlemleyemedik. Bunun sebebi beklediğimizin aksine aspartamin kabul edilebilir dozlarda testis dokusuna zarar vermemiş olması olabilir.

Bu zamana kadar olan çalışmaların bazıları aspartamin tüketimi maksimum dozun altında olsa dahi zarar verdiğini tespit ederken, bazı çalışmalar ise anlamlı bir etki saptayamamıştır<sup>180</sup>. Muthuraman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, tümör baskılayıcı gen olan p53'ün mRNA ekspresyonunun aşağı regülasyonu ile kanser hücrelerinde apoptoz sürecini bastırdığını ve aspartamin kanser hücrelerindeki apoptoz sürecini yavaşlattığını ifade etmişlerdir. Aspartamin HeLa hücrelerindeki apoptoz sürecini yavaşlatmak için güçlü bir madde olabileceği sonucuna varmışlardır<sup>189</sup>. Yaptığımız bu çalışma aspartamin zarar verdiğini teyit eden çalışmalar referans alınıp, fakat etki saptamayan diğer çalışmalar da göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmiştir. Aspartamin testiste oluşturabileceği apoptozu ve CAPE'in testisi ne derece koruyabildiğinin tespiti yapılan histolojik incelemelerde gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Gruplarda, seminifer tübül yapılarında bozukluğa, germinal epitellerde düzensizliğe ve lümenlerinde hücre döküntülerine rastlanmadı.

Aspartamın testiste oluşturabileceği apoptozu ve CAPE'in testisi ne derece koruyabildiğinin tespiti için apoptozun geri dönüşsüz basamağı olan Cleaved Caspase-3 immun boyama yöntemini kullandık. Yaptığımız bu immunohistokimyasal boyamada gruplar arasında anlamlı bir fark gözlemleyemedik. Testis dokusunda özellikle etkisini görmek istediğimiz aspartam verilen gruplarda testis dokularında pozitif bir boyanma olmadı. Apoptozis başlatıcı Kaspaz 8 ile yapılan immun boyamada pozitif boyanmalar gözlemlendi. Kontrol grubuna göre tüm gruplarda anlamlı bir yükseklik olmasına rağmen SHAM, CAPE, Aspartam ve CAPE+Aspartam grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Bu sonuç bize testis dokusunda kabul edilen dozlarda uygulanan aspartamın apoptozisi uyarmadığını gösterdi.

P 53 immun boyaması ile gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi. Aspartam grubunda diğer gruplara göre anlamlı düşüş gözlemlendi. CAPE+ASP grubunda ASP grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu CAPE'in ASP'in etkisini engellediğini göstermektedir. Bu sonuç bize aspartamın kabul edilen dozlarda testis dokusunda apoptozisi uyarmadığını ve testiste p53 aktivasyonunu azaltarak hücrelerin apoptoza gidişini yavaşlattığını göstermektedir. CAPE'in p53 düzeyini yükseltmesi koruyucu olabileceğini gösterdi.

Sonuç olarak FDA'nın kabul edilebilir en yüksek doz olarak belirlediği 50mg/kg aspartam dozunun kısa sürede testiste apoptozisi arttırmadığını tespit ettik. Daha uzun süreli deneyler yapılarak bu sonucun teyid edilmesi durumunda bu dozun infertilite riski oluşturmayacağı söylenebilir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Anon., 2004 a; Walters, 2001; Küçükkömürler, 1996; Maisons, 2002
2. MA. Lebda, KM. Sadek, YS. El-Sayed. Aspartame and Soft Drink-Mediated Neurotoxicity in Rats: Implication of Oxidative Stress, Apoptotic Signaling Pathways, Electrolytes and Hormonal Levels. *Metab Brain Dis* (2017) 32:1639–1647.
3. A Iyaswamy, AK Kammella, C Thavasimuthu, W Wankupar, W Dapkupar at al. Oxidative stress evoked damages leading to attenuated memory and inhibition of NMDAReCaMKIIeERK/CREB signalling on consumption of aspartame in rat model. *J ournal of food and drug analysis* 26(2018) 903 -916
4. I Ashok, PS Poornima, D Wankhar, R Ravindran and R Sheeladevi. Oxidative stress evoked damages on rat sperm and attenuated antioxidant status on consumption of aspartame, *International Journal of Impotence Research* (2017) 29, 164–170
5. Biray Ç, Gündüz C, Yılmaz B, Şahin F, Topçuoğlu N. The Evaluation of Cytotoxic and Apoptotic Effect of Propolis and Its Extracts Caffeic Acid Phenethyl Ester and Cinnamic Acid in Human Acute T Cell Lymphoblastic Leukemia Cell Line (ccrf-cem). *Ege Tıp Dergisi* 45(2) : 83 – 92, 2006.
6. Junqueira LC, Carneiro J. *Temel Histoloji*. Ed: Aytekin Y, Solakoğlu S, 11. Baskı, pp.431, İstanbul: Nobel, 2006.
7. Moroi S., Saitou M., Fujimoto K., Sakakibara A., Furuse M., Yoshido O., Tsukita S.: Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol*. 274:1708-17. 1998
8. Tortora GJ DB. *Principles Anatomy and Physiology*. 12. Ed. John Wiley & Sons 2009. P.1082-93
9. ARINCI, K. ve ELHAN A., (2006). *Anatomi*, 1. Cilt Güneş Kitabevi, ISBN, 975- 7467-29-4- Ankara.
10. Sancak B, Cumhuriyet M (1999). *Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar*. 5. Baskı. ODTÜ yayıncılık, Ankara- Vannini V, Dianzani U, Rosa E (1999). *Anatomi atlası*. 7. Baskı. Çevirenler: Vural F, Özkuş K, Akkın MS, Ertem DA, Tanyeli E, Vural ZE, Birol Basın Yayın Dağıtım ve Ticaret Ltd. Sti, İstanbul, 160-161, Gilroy AM (2015). *Anatomi Temel Ders Kitabı*, 1. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 118-220.
11. Vannini V DU, Rosa E. *Anatomi atlası*. 7 ed. Birol Basın Yayın Dağıtım ve Ticaret Ltd. Sti, İstanbul 1999. 160, 1 p.
12. Standring S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. Forty-first ed. Elsevier, 2016
13. Toprak M, Akkın MS (1996). *Anatomi Ders Kitabı*. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul, 844-861- Sancak B, Cumhuriyet M (1999). *Fonksiyonel Anatomi Baş-Boyun ve İç Organlar*. 5. Baskı. ODTÜ yayıncılık, Ankara.
14. Gürbüz N. Testisin vasküler anatomisi. *İnfertilite*, 2006: 333-336.
15. Jarow JP. Clinical significance of intratesticular arterial anatomy. *The Journal of urology*, 1991, 145: 777-779.
16. Beck EM, Schlegel PN, Goldstein M. Intraoperative varicocele anatomy: a macroscopic and microscopic study. *The Journal of urology*, 1992, 148: 1190-1194.

17. Shafik A, Moftah A, Olfat S, Mohi-el-Din M, el-Sayed A. Testicular veins: anatomy and role in varicoceles and other pathologic conditions. *Urology*, 1990, 35: 175-182.
18. Edremitođlu M. Fizyoloji Histoloji Embriyoloji Kitabı,TUSEM Yayıncılık,2019,ANKARA,P.8
19. Kierszenbaum AL. (2006). *Histology and Cell Biology. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giri\_*. 1st ed, Çeviri editörü: Demir R, Palme Yayıncılık,Ankara
20. Şeftalioğlu A (editör). Genel ve özel insan embriyolojisi. 3. Baskı. Ankara: Feryal Matbaası; 1998; 346-50.
21. Sadler TW. Urogenital system. *Langman's Medical Embryology*. 6 th ed. Williams& Wilkins, Baltimore 1990; 257-78
22. Persaud M. (2002). *Human Embryology. İnsan Embriyolojisi*. 6th ed, Çeviri editörü: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
23. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (10. Baskı), Dalçık H (Ç. Edt), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2016, 260- 262
24. Larsen WJ. *Human Embryology*. Churchill Livingstone, Second Edition, New York.1997; 373-88
25. Husmann DA, Levy JB. Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology* 1995;46: 267-76
26. James a. O'Neill, Marc I. Rowe, Arnold Coran, Eric Fonkalsrud *Pediatric Surgery Vol. 2* Mosby; 5 edition Nashville 1998; 1073-1106
27. Widmaier E RH. *Vander insan fizyolojisi*. 10 ed: Güven Kitabevi; 2010. 657-78 p
28. Guyton AC, Hall JE. Erkekte Üreme İşlevleri ve Hormonal İşlevler. In:Çavuşoğlu H, Çađlayan-Yeđen B, editors. *Tıbbi Fizyoloji*. 11. Ed2007. P. 996-1010.
29. Gavazza, M., Catala, A., 2001. The effect of -tocopherol on the lipid peroxidation of mitochondria and microsomes obtained from rat liver and testis. *Mol. Cell. Biochem.* 225, 121–128
30. Ross MH, P.W., Erkek üreme sistemi, in *Histoloji konu anlatımı ve atlas, ilişkili hücre biyolojisi ve moleküler biyoloji*, B. B., Editor 2014. P. 787,788.
31. Eşrefoğlu M,*Histoloji Atlası*,1.baskı ,İstanbul Tıp Kitabevleri,2018,p 303,304
32. Leeson T.S., Leeson C.R., Paparo A.A. *Text / Atlas of Histology*. Philadelphia: W.B.Saunders Co., 1988
33. Kuran O. *Sistematik Anatomi*. 3. Baskı, İstanbul: Filiz Kitabevi, 1993
34. Fawcett D.W. *A textbook of histology*. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1986.
35. Tanyolaç A. *Özel Histoloji*. 3. Baskı, Ankara: Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd. Şti., 1993
36. Bortolussi M, Zanchetta R, Belvedere P, Colombo L. Sertoli and Leydig cell numbers and gonadotropin receptors in rat testis from birth to puberty. *Cell Tissue Res* 1990; 260: 185–191
37. Eroschenko V.P, Editör Demir R. DiFiore'nin *Histoloji Atlası*,12.baskı,Palme yayıncılık,2013,479.
38. Jost A, Magre S, Agelopoulou R. Early stages of testicular differentiation in the rat.*Hum Genet* 1981; 58: 59–63.

39. Trainer T.D. Histology of the normal testis. Am J Surg Pathol 1987; 11: 797-809
40. Janguerial LC., Carneiro J., Kelley OR.: Temel histoloji (Çev: Aytekin Y.,Solakoğlu S., Ahışalı B.) syf: 407-419, 431-433, Barış kitabevi, 1998.
41. Lui W., Dolores M., Lee W. M., Cheng C. Y.: Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis. Biology of Reproduction,68:1087-1097. 2003.
42. Gumbiner B., Lowenkopf T., Apatira D.: Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. Proc Natl acad Sci U SA.88:3460-64. 1991
43. Feldman G. J., Mullin J.M., Ryan M.P. Occludin: structure, function and regulation. Advanced Drug Delivery Reviews, 57:883-917, 2005.
44. Pelletier R. M., Okawara Y., Vitale M.L., Anderson J.M.: Differential distribution of the tight junction associated protein ZO-1 isoforms in Guinea pi sertoli cell: a possible association with f-actin and G-actin. Biology of reproduction 57: 367-376. 1997
45. Siu M. K. Y., Cheng C. Y.: Extracellüler matrix: Recent advances on its role in junction dynamics in the seminiferous during spermatogenesis. Biology of reproduction. 71: 375-391. 200
46. Nagata S. (1997). Apoptosis by death factor, Cell, 88:355-365
47. Nikoletopoulou, V., M. Markaki, K. Palikaras and N. Tavernarakis (2013). "Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy." Biochim Biophys Acta 1833(12): 3448-3459
48. Rato L, Alves MG, Socorro S, Duarte AI, Cavaco JE, Oliveira PF. Metabolic regulation is important for spermatogenesis, Nature Reviews Urology, 2012, 9, 330- 338.
49. ABRAHAM, L.K., (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi, (Çev.Ed.: Demir, R.), Palme Yayıncılık, ISBN, 9944-341-02-9, Ankara
50. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology (2. Baskı), Saunders Company, Philadelphia, 2001, 494- 495.
51. Norbury C, Hickson I. DNA hasarına karşı hücre sel tepkiler. Annu Rev Pharmacol Toksikol, 2001; 41: 367- 401
52. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptozis: A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics.Br. Jurnal Cancer 26:239- 245,1972
53. Alles A, Alley K, Barrett JC et al. Apoptosis: a general comment. 1991, FASEB, s. 5:2127-8.
54. Burz, C., I. Berindan-Neagoe, O. Balacescu and A. Irimie (2009). "Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets." Acta Oncol 48(6):811-821.)
55. Pınarbaşı E. Apoptozis(Programlı Hücre Ölümü). [yazan] Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B Yıldırım A. Moleküler Biyoloji. s.l. : Nobel Yayın Dağıtım, 2010, s. 425-470
56. Lawen, A., 2003. Apoptosis an Introduction, BioEssays, 25, 888-896
57. Abbro, L. and Dini, L., 2003. Common Morphological Features of Apoptotic Cell Blebs, Italian Journal of Zoology, 70(4), 297-299.
58. Balakumran A, Champbell G A, Maslen M T. Calcium channel blockers induce thymic apoptosis in vivo in rats. Toxicol Appl Pharmacol 139: 122-127, 1996
59. Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. Nature 284: 555-556, 1980

60. Cohen J J. Apoptosis: The physiological pathway of cell death. *Hosp Pract* 15: 35-43, 1993
61. Hengartner, M. O., 2001. Apoptosis: Corraling the Corpses, *Cell Journal*, 104, 325–328. Higuchi, A., Yonemitsu, K., Koreeda, A. and Tsunenari, S., 2003. Inhibitory Activity of Epigallocatechin Gallate (EGCG) i Paraquat-Induced Microsomal Lipid Peroxidation-A Mechanism of Protective Effects of EGCG Against Paraquat Toxicity, *Toxicology*, 183,143-149.
62. Robertson, J.D., Orrenius, S. and Zhivotosky, B., 2000. Nuclear Events in Apoptosis, *Journal of Structural Biology*, 129, 346-358
63. Yıldırım, İ.H., Koçak, N. ve Yıldırım, S.C., 2012. Programlı Hücre Ölümü; Literatür Bilgilerinin Türkçe Derlemesi, *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 2(3), 58-66
64. Elmore S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death, *Toxicologic Pathology*, 35:495-516.
65. Rastogi RP, Sinha R, Sinha RP. (2009). Apoptosis: molecular mechanisms and pathogenicity, *EXCLI Journal*, 8:155-181
66. Ashkenazi, A. (2015). "Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions." *J Clin Invest* 125(2): 487-489
67. Kalkavan, H. and D. R. Green (2018). "MOMP, cell suicide as a BCL-2 family business." *Cell Death Differ* 25(1): 46-55.
68. Pena-Blanco, A. and A. J. Garcia-Saez (2018). "Bax, Bak and beyond -mitochondrial performance in apoptosis." *FEBS J* 285(3): 416-431.
69. Gibson, C. J. and M. S. Davids (2015). "BCL-2 Antagonism to Target the Intrinsic Mitochondrial Pathway of Apoptosis." *Clin Cancer Res* 21(22): 5021-5029.
70. Rai, N. K., K. Tripathi, D. Sharma and V. K. Shukla (2005). "Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing." *Int J Low Extrem Wounds* 4(3): 138-144.
71. Zaman, S., R. Wang and V. Gandhi (2014). "Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies." *Leuk Lymphoma* 55(9): 1980-1992.
72. Mishra S, Vinayak M. Role of Ellagic Acid in Regulation of Apoptosis ByModulating Noveland Atypical PKC in Lymphoma Bearing Mice, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 15(281), 2-8, 2015.
73. Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA (1995): Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376 (6535), 37–43.
74. Altunkaynak, B.Z. ve Özbek, E., 2008. Programlanmığ Hücre Ölümü: Apoptoz Nedir?, *Tıp Araştırmaları Dergisi*, 6, 93-104., Feng, Y., Wang, N., Ye, X., Li, H., Feng, Y., Cheung, F., Nagamatsu, T., 2011. Hepatoprotective Effect and its Possible Mechanism of Coptidis rizoma Aqueous Extract on Carbon Tetrachloride-Induced Chronic Liver Hepatotoxicityin Rats, *Journal of Etnopharmacology*, 138, 683-690, Aslan, A., Can, M.İ., 2014. Milk thistle Impedes the Development of Carbontetrachloride-Induced Liver Damage in Rats Through Suppression of Bcl-2 and Regulating Caspase Pathway, *Life Sciences*, 117, 13-18. Accorsi, A., Zibae, A., Malagoli, D., 2015. The multifaceted activity of insect caspases, *Journal of Insect Physiology*, 76, 17–23.
75. Ulukaya E, 2010. Hücre siklusu ve apoptozis İn: Akciğer Kanserleri Tanı ve Tedavide Temel İlkeler ve Uygulamalar, [http:// biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis](http://biyokimya.uludag.edu.tr/CellCycleApoptosis)
76. Aslan, A., 2011. Ratlarda Azoksimetan Uygulanarak Oluşturulan Kolorektal Kanserde Likopenin Siklooksijenaz-2 (Cox-2), Kaspaz-3, Kaspaz-9, Bax, Bcl-2, P53 Proteinlerinin

Ekspresyonu ve DNA Hasarı Üzerine Etkisi, Doktora Tezi, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Elazığ

77. Yılmaz, İ., 2005. Erişkin Ratlarda Deneysel Varikozel Oluşturulması Sonrası Testislerde Germ Hücrelerinde Apoptozis Düzeylerinin Yükselmesi ve Yükselmiş Olan Apoptozisin Varikozektomi Sonrası Gerileme Düzeyi ve Süresinin Tunel Yöntemi ile Değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul., Kuwahata, M., Kubota, H., Kanouchi, H., Ito, S., Ogawa, A., Kobayashi, Y., Kido, Y., 2012. Supplementation with Branched-Chain Amino Acids Attenuates Hepatic Apoptosis in Rats with Chronic Liver Disease, *Nutrition Research*, 32, 522-529.
78. Kim PK, Mahidara R, Seolo W. The role of caspase-8 in resistance to cancer chemotherapy. *Drug Resist Updat.* 5:293-6, 2001.
79. Chen J, Nagayama T, Jin K, Stetler RA, Zhu RL, Graham SH, Simon RP. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience* 1998 :4914-4928.
80. Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.*2000 ;10:649-55.
81. Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 ; 15:725-31.
82. Keane R W, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea J R, Krajewski S, Reed J C, Dietrich W D. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 60: 422-429,2001
83. Lou J, Lenke L G, Ludwig F J, O'Brien M F. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 36: 683-690, 1998.
84. Banasiak K J and Haddad G G. Hypoxia-induced apoptosis: effect of hypoxic severity and role of p53 in neuronal cell death. *Brain Res* 797: 295-304, 1998.
85. Kromer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere J L and Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *Fedn Am. Soc. exp. Biol.* 9: 1277-1287, 1995.
86. Meller, R., Skradski, S., L., Simon, R., P. (2002). Expression Proteolysis and Activation of Caspases 6 and 7 During Rat C6 Glioma Cell Apoptosis. *Neurosci Lett.* 10: 324, 33-36.
87. Scaffidi, C., et al., FLICE is predominantly expressed as two functionally active isoforms, caspase-8/a and caspase-8/b. *J Biol Chem*, 1997. 272(43): p. 26953-8.
88. Where can I find additional information about CASP8? 2014 [cited 2014 10/06/2014]; Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/CASP8>
89. Akins P T, Liu P K, Hsu C Y. Immediate early gene expression in response to cerebral ischemia: Friend or Foe ?. *Stroke* 27: 1682- 1687, 1996.
90. Millerk D M, Blume S, Borst M. Oncogenes: Malignant transformation and modern medicine. *Am J Med Sci* 300: 59-65, 1990
91. Nowell P C. Cytogenetics of tumor progression. *Cancer* 65: 2172-2175, 1990
92. Caotes P J, Hales S A, Hall P A. The association between cell proliferation and apoptosis; studies using cell cycle-associated proteins Ki67 and DNA polymerase alpha. *J Pathol* 178: 71-7, 1996
93. Choi W S, Lee E H, Chung C W. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. *J Neurochem* 77:1531-1541, 2001



94. Newton K, Strasser A: The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 8: 68-75, 1998
95. Nakano R. Apoptosis: Gene directed cell death. *Horm Res* 48:2-4, 1997.
96. De Senedetti V, Bennett WP, Greenblatt MS, Harris CC. P53 tumor suppressor gene: Implications for iatrogenic cancer and cancer therapy. *Med Pediatr Onca/* 1996; Suppl 1:2-11.
97. Schmid M, Carson DA. Ccll cycle regulation and hematological disorders. In: Beutler E, Lichtman MA, Caller BS, Kipps TJ, Seligsohn U (eds): *Williams Hematology*, sixth edition, McGraw-Hill Company, New York, 2001; ppl31-41.
98. Hikim SPA, Swerdloff SR, 1999. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*, 4 (1): 38-47
99. Iliakis G. Cell cycle regulation in irradiated and nonirradiated cells. *Semin Onca/* 1997; 24:602-15.
100. Malkin D. Regulation of cellular proliferation effects on alteration of normal signaling pathways. *Med Pediatr Onca/* 1996; Suppl 1:20-4.
101. Chen X. The p53 family: same respons, different signals? *Mo/ Med Taday* 1999; 5:387-92.
102. Offer H, Erez N, Zurer I, Tang X, et al. The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA. *Carcinogenesis* 2002;23(6): 1025-32.
103. Kirsch DG, Kastan MB. Tumor-suppressor p53: Implications for tumor development and prognosis. *J C/in Onca/* 1998; 16:3158-68.
104. Chang F, Syrjanen S, Syrjanen K. Implications of the p53 tumor-suppressor gene in elinical oncology. *J C/in Onca/* 1995;13: 1009-22
105. Marks DI, Kurz BW, Link MP, Ng E, Shuster JJ et al. Altered expressian of p53 and mdm-2 proteins at diagnosis is associated with early treatment failure in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J C/in Onca/* 1997; 15:1158-62
106. Sherr CJ, Roussel MF. Starting and stooing G1 phase. In: Gorin N, Foa R, Mannucci PM (eds). "Education Programme 1996- Education Sessions of the 2nd Meeting of the European Haematology Association, 29 May-1 June, Paris, France", Blackwell Science Ltd, Glasgow, 1996:110-1.
107. Pazarbaşı A, Kasap M. Kanser genetiği. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2003, 12: 328-340
108. Prokocimer M, Ratter V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: Projectian on the hernatologic cell lineages. *B/ood* 1994; 84:2391-411
109. Thompson CB. Apotosis in The Pathogenesis of Autoimmune Disease. *Clin Immunol Immunopathol.* 1995, 267: 1456-1462
110. Korsmeyer S J. Regulators of cell death. *Reviews.* 11: 101-105,1995
111. Sinha Hikim A P, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X-H, Swerdloff R S. Spontaneous germ celi apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmedceli death. *J Clin Endoc and Metab*, 83: 152,1998.
112. Sharpe R M: Regulation of spermatogenesis. in *The Physiologyof Reproduction*. Edited by Knobil E, Neill J D. Raven Press. New York, pp: 1364-1434, 1994

113. Beumer T L, Roepers L H, Gademan S U, Lock M T W, Tycho KB, Kal H B, Rooij D G. Apoptosis Regulation in the testis: Involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development*. 56: 353-359, 2000.
114. Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol*. 86: 598-606, 2000
115. Sakkas ve ark., 2003. SAKKAS, D., SELİ, E., BİZZARO, D., TAROZZI, N., and MANİCARDİ, G.C., (2003). Abnormal Spermatazoa in the Ejaculate: Aborti ve Apoptosis and Faulty Nuclear Remodelling During Spermatogenesis. *Reprod Biomed Online*. 7,428-432 .
116. Kerr J B. Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of celi types and frequency during the spermatogenetic cycle. *J Reprod Fertil*, 95: 825-830, 1992
117. Hsueh A J W, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonodal Celi Apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research*. 51: 432-457, 1996.
118. Hikim S, Amiya P, Wang C, Leung A, Swerdloff R S. Involvement of Apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin releasing hormone antagonist treatment. 57: 136-141, 2000.
119. Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, Vassali P. An early and massive wave of germinal celi apoptosis is required for the development of functional spermatogenesis. *Embo J*, 24: 2262-2270, 1997.
120. Davis J R, Firlit C F. The germinal epithelium of cryptorchid testes, experimentally induced in prepubertal and adult rats. *Fertil Steril*. 17: 187-200, 1986.
121. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalio A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic Celi Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research*. 40: 351-356, 1996.
122. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of radical oxygen species in rat testicular germ celi apoptosis induced by heat stress. *Biol Repr*. 61: 393-399, 1999.
123. Tapanainen J S, Tilly J L, Vihko K K, Hsueh A J W. Hormonal control of apoptotic celi death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular celi survival factors. *Mol Endocrinol*, 7: 643-650, 1993
124. Yin Y, Hawkins K L, Devvolf W C, Morgantaler A. Heat stress causes testicular germ celi apoptosis in adult mice. *J Androl*. 18: 159-165, 1997.
125. Lin W W, Lamb D J, Lipshultz L I, Kim E D. Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. *Int Urol Nephrol*. 31(3): 361-370, 1999
126. Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis parternelicitada by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *J Androl*. 19: 487-497, 1998.
127. Ok E, Oz ZS, 2007. Sperm hücrelerinde apoptoz. *Androloji Bülteni*, cilt 30: 215-218.
128. Weng LS, Taylor LS, Morshedi M, Schuffner A, Duran HE, Beebe S, Oehninger S, 2002. Caspase activity and apoptotic markers in ejaculated human sperm. *Mol Hum Reprod*, 8 (10): 984-991.
129. Wang X, Sharma R, Sikka S, Thomas A, Falcone T, Agarwal A. Oxidative stress is associated with increased apoptosis leading to spermatozoa DNA damage in patients with male factor infertility. *Fertil Steril*, 2003; 80: 531-535

130. AK Choudhary, RS Devi. Effects of aspartame on hsp70, bcl-2 and bax expression in immune organs of Wistar albino rats. *The Journal of Biomedical Research*, 2016 30(5): 427–435.
131. Soffritti, M., Padovani, M., Tibaldi, E., Falcioni, L., Manservigi, F., Belboggi, F., 2014, The carcinogenic effects of aspartame: The urgent need for regulatory re-evaluation, *American Journal of Industrial Medicine*, 57, 383-397.
132. Andreatta, M.M., Munoz, S.E., Lantieri, M.J., Eynard, A.R., Navarro, A., 2008, Artificial sweetener consumption and urinary tract tumors in Cordoba, Argentina, *Prev Med*, 47,136-139.
133. Talbot, J.M., Fisher, K.D., 1978, The need for special foods and sugar substitutes by individuals with diabetes mellitus, *Diabetes Care*, 1, 231-240
134. Magnuson BA, Burdock GA, Doull J, Kroes RM, Marsh GM, Pariza MW, et al. Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies. *Crit Rev Toxicol* 2007; 37: 629-727.
135. Kirkland, D., Gatehouse, D., 2015, Aspartame: A review of genotoxicity data, *Food and Chemical Toxicology*, 84, 161-168.
136. Ranney, R.E., Opperman, J.A., Maldoon, E., McMahon, F.G., 1976, Comparative metabolism of aspartame in experimental animals and humans, *Toxicol Environ Health*, 2, 441-451.
137. Borthwick, A.D., 2012, Diketopiperazines: Synthesis, reactions, medical chemistry, and bioactive natural products, *Chemical Reviews*, 112 (7), 3641-3716
138. Monte, W., 1984, Aspartame: Methanol and public health, *J Appl Nutr*, 36, 42-54.
139. Liesivuori, J., Savolainen, H., 1991, Methanol and formic acid toxicity: biochemical mechanisms, *Pharm and toxic*, 69, 157-163
140. Gombos, K., Varjas, T., Orsos, Z., Polyak, E., Peredi, J., Varga, Z., Nowrasteh, G., Tettinger, A., Mucsi, G., Ember, I., 2007, The effect of aspartame administration on oncogene and suppressor gene expressions, *in vivo*, 21, 89-92.
141. Siragusa, R.J., Cerda, J.J., Baig, M.M., Burgin, C.W., Robbins, F.L., 1988, Methanol production from the degradation of pectin by human colonic bacteria, *Am J Clin Nutr*, 47,848-851.
142. Trefz, F., Sonnevile, L., Matthis, P., Benninger, C., Lanz-Englert, B., Bickel, H., 1994, Neuropsychological biochemical investigations in heterozygotes for phenylketonuria during ingestion of high dose aspartame (a sweetener containing phenylalanine), *Human Genetics*, 93 (4), 369-374.
143. Medeiros RA, Carvalho AE, Rocha-Filho RC, Fatibello-Filho O. Simultaneous square-wave voltammetric determination of aspartame and cyclamate using a boron-doped diamond electrode. *Talanta* 2008; 76: 685-689.
144. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, editors. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*. 6 th ed. UK and USA: Pharmaceutical Press and the American Pharmacists Association; 2009.
145. Altuğ T, Elmacı Y. *Tatlandırıcılar. İçinde: Altuğ T, editör. Gıda Katkı Maddeleri. 3. Baskı. İzmir: Sidas Medya Ltd. Şti.; 2009. s.201-223.*
146. Budavari, S., 1989, Aspartame, *The Merck Index*, In: Rahway, N.J. (ed.), 861, Merck & Co, New Jersey, USA, 859
147. Wafwoyo W, Hansen PMT, Chism GW. Interaction of aspartame with selected hydrocolloids: solubility of aspartame. *Food Hydrocolloid* 1999; 13: 299-302.

148. Janssen PJCM, Heijden CA. Aspartame: review of recent experimental and observational data. *Toxicology* 1988; 50: 1-26.
149. Çam H. Sıçanlarda aspirin ile uyarılan gastritin önlenmesinde kafeik asit fenetil ester'in etkinliğinin araştırılması. *Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta, 2007*
150. Pandurangan, M., Enkhtaivan, G., Mistry, B., Chandrasekaran, M., Noorzai, R., Kim, D.H., 2015, Investigation of role of aspartame on apoptosis process HeLa cells, *Saudi Journal of Biological Sciences*, doi: 10.1016/j.sjbs.2015.06.001.
151. Borelli F, Izzo AA, et al. Effect of a propolis extract and caffeic acid phenethyl ester on formation of aberrant crypt foci and tumors in the rat colon. *Fitoterapia*. 2002; 73 (1):38-43
152. Son S, Lewis BA. Free radical scavenging and antioxidative activity of caffeic acid amide and ester analogues: Structure-activity relationship. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50 (3): 468-72.
153. Grunberger, D., Banerjee, R., Eisinger, K., Oltz, E. M., Efros, L., Caldwell, M., Estevez, V., Nakanishi, K. (1988). "Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis," *Experientia*, 44, 230–232.)
154. Aviello, A., Scalisi, C., Fileccia, R., Capasso, R., Romano, B., Izzo, A Borrelli, F. (2010). "Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester, a plant-derived polyphenolic compound, on rat intestinal contractility," *Eur J Pharmacol* 640:163 – 167.
155. Murtaza, G., Sajjad, A., Mehmood, Z., et al. (2015). "Possible molecular targets for therapeutic applications of caffeic acid phenethyl ester in inflammation and cancer," *J Food Drug Anal*; 23:11–18.
156. Akyol S, Ozturk G, Ginis Z, et al. In Vivo and In Vitro Antineoplastic Actions of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE): Therapeutic Perspectives. *Nutrition and Cancer*. 2013; volume 65, Issue 4
157. MF. Tolba, HA. Omar, SS. Azab, AE. Khalifa, AB. Abdel-Naim at al. Caffeic Acid Phenethyl Ester: A Review of Its Antioxidant Activity, Protective Effects against Ischemia-reperfusion Injury and Drug Adverse Reactions. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2016 Oct 2;56(13):2183-90.
158. Gun A, Ozer MK, Bilgic S, Kocaman N and Ozan G. Effect of caffeic acid phenethyl ester on vascular damage caused by consumption of high fructose corn syrup in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016; 2016: 1-8.
159. Altuntas A. Sıçanlarda deneysel amfoterisin B nefrotoksisitesinde oksidatif stresin ve olası oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil esterinin etkilerinin araştırılması. *Çocuk Hastalıkları Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Isparta 2008: 48.*
160. Koltuksuz U, Irmak MK, Karaman A, Uz E, Var A, Ozyurt H, et al. Testicular nitric oxide levels after unilateral testicular torsion/detorsion in rats pretreated with caffeic acid.
161. Natarajan, K., Singh, S., Terrence R. Burke, Jr., Grunberger, D., Aggarwal, BB.: Caffeic Acid Phenethyl Ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 9090-9095, 1996.
162. Yılmaz, HR., Sadık, S., Özyurt, H., Iraz, M., Yıldırım, Z., Akyol, Ö.: Sıçanlarda sisplatinle oluşturulan nefrotoksisitede metabolik enzim aktivitelerine kafeik asit fenetil ester'in etkisi. *Van Tıp Dergisi*, 11 (1): 1-6, 2004.
163. İlhan, A., Iraz, M., Gurel, A., Armutcu, F., Akyol, O.: Caffeic Acid Phenethyl Ester exerts a neuroprotective effect on CNS against pentylene tetrazol-induced seizures in mice. *Neurochemical Research*, 29 (12): 2287-2292, 2004.

164. Uz, E., Yılmaz, HR., Iraz, M., Fadilloğlu, E., Özyurt, H., Söğüt, S., Akyol, Ö.: Effects of vitamin E and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on methabolic enzymes of rats with experimental liver ischemia-reperfusion injury. *Ege Tıp Dergisi*, 41 (2): 77- 82, 2002.
165. Dilber Y, Inan S, Ercan GA, Sencan A. The role of CAPE in PI3K/AKT/mTOR activation and oxidative stress on testis torsion. *Acta Histochem.* 2016 Jan;118(1):31-7.
166. Khan M, Elango C, Ansari MA, Singh I, Singh AK. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. *J. Neurochem* 2007;102:365–77.
167. Chen, H. C., Chen, J. H., Chang, C., Shieh, C. J. (2011). Optimization of ultrasound accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology. *Ultrason. Sonochem.* 18:455–459.
168. Wang, X., Bowman, P.D., Kerwin, S.M., Stavchansky, S., “Stability of caffeic acid phenethyl ester and its fluorinated derivative in rat plasma”, *Biomed. Chromatogr.*, 21: 343-350 (2007).
169. Tahmasbpour E, Balasubramanian D, Agarwal A. A multifaceted approach to understanding male infertility: gene mutations, molecular defects and assisted reproductive techniques (ART). *J Assist Reprod Genet* 2014; 31 (9): 1115–1137.).
170. Yang HS., Han DK., Kim JR., Sim JC. (2006). Effects of -tocopherol on cadmium-induced toxicity in rat testis and spermatogenesis. *J. Korean Med Sci*, 21:445-51.
171. MILLS, R.G. The Pathological Changes in the Rat Testes in Epidemic Pneumonia. *J. Exp. Med.*, (1919); 30:505-529.
172. ANZAR, M., He L., BUHR, M.M., KROETSCH, T.G., and PAULS, K.P., (2002). Sperm Apoptosis in Fresh and Cryopreserved Bull Semen Detected by Flow Cytometry and its Relation Ship With Fertility. *Biology of Reproduction* .66,354-360.
173. Wiebe JP, Kowalik A, Gallardi RL, Egeler O, Clubb BH. (2000). Glycerol disrupts tight junction–associated actin microfilaments, occludin, and microtubules in Sertoli cells. *J Androl*, 21(5): 625-635.
174. Butchko, H.H., Stargel, W.W., Comer, C.P., Mayhew, D.A., Benninger, C., Blackburn, G.L., 2002, Precilinal safety evaluation of aspartame, *Regul Toxicol Pharmacol*, 35, 7-12., Magnuson, B.A., Burdock, G.A., Doull, J., Kroes, R.M., Marsh, G.M., Pariza, M.W., Spencer, P.S., Waddell, W.J., Walker, R., Williams, G.M., 2007, Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations and toxicological and epidemiological studies, *Critical Reviews in Toxicology*, 37, 629 – 727.
175. Gombos K, Varjas T, Orsós Z, Polyák É, Peredi J, Varga Z, et al. The effect of aspartame administration on oncogene and suppressor gene expressions. *In Vivo (Brooklyn)*. 2007;21(1):89–92.).
176. Reno, F.E., Bowles, C.A., 1972, SC-19192: An evaluation of mutagenic potential employing the in vivo cytogenetics method in the rat, Hazelton Laboratories Inc, Vienna, VA.
177. Stegink LD. Aspartame metabolism in humans: acute dosing studies. In: Stegink LD, Filer LJ, editors. *Aspartame-Physiology and Biochemistry*. New York: Marcel Dekker, Inc; 1984. s:509-553.
178. Abhilash M, Paul MVS, Varghese MV, Nair RH. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 1203-1207.
179. Abd-Elfatah, A.A.M., Ghaly, I.S., Hanafy, S.M., 2012, Cytotoxic effects of aspartame (diet sweet) on the histological and genetic structures of female albino rats and their offspring, *Pak J Biol Sci*, 15, 904-918.


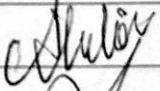

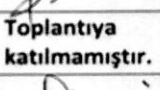
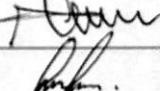
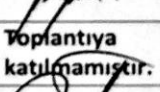

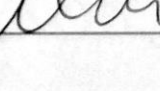
180. Schernhammer, E.S., Bertrand, K.A., Birmann, B.M., Sampson, L., Willett, W.C., Feskanich, D., 2012, Consumption of artificial sweetener and sugar-containing soda and risk of lymphoma and leukemia in men and women, *Am J Clin Nutr*, 96, 1419-1428.
181. SEN, S., CHAKRABORTY, R., SRĠGDHAR, C., REDDY, YSR., De, B., Free Radicals, Antioxidants, Diseases and Phytomedicines: Current Status and Future Prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*.(2010); 3(1):91-100.
182. IUBMB Life. 65:699–709.3. Ozyurt, H., Sogut, S., Yildirim, Z., Kart, L., Iraz, M., Armutcu, F., Temel, I., Ozen, S., Uzun, A., Akyol, O., 2004. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on bleomycine-induced lung fibrosis in rats. *Clin. Chim. Acta* 339, 65–75.
183. Mollaoglu, H., Gökçimen, A., Ozguner, F., Oktem, F., Koyu, A., Demirin, H., Gokalp, O., Cicek, E., 2006. Caffeic acid phenethyl ester prevents cadmium-induced cardiac impairment in rat. *Toxicology* 227, 15–20.
184. Uz E, Sogut S, Sahin S, Var A, Ozyurt H, Gulec M, et al. The protective role of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on testicular tissue after testicular torsion and detorsion. *World J. Urol* 2002;20:264–70.
185. Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A and Somay A: Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: Mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod* 24: 1717-1725, 2009.
186. Armagan, A., Uzar, E., Uz, E., Yilmaz, H. R., Kutluhan, S., Koyuncuoglu H.R., Soyupek, S., Cam, H. And Serel, T. A. (2008). Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate-induced oxidative stress in testes of rat. *Hum. Exp. Toxicol.* 27:547–552.
187. Zini, A., Schlegel, P.N., 2003. Effect of hormonal manipulation on mRNA expression of antioxidant enzymes in the rat testis. *J. Urol.* 169, 767–771.
188. Murugesan, P., Muthusamy, T., Balasubramanian, K., Arunakaran, J., 2005. Studies on the protective role of vitamin C and against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)-induced oxidative damage in Leydig cells. *Free Radic. Res.* 39, 1259–1272.
189. Mukaddes E, Mehmet G, Hakan P, and Ahmet A (2005) Effects of melatonin and caffeic acid phenethyl ester on testicular injury induced by myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Fundamental and Clinical Pharmacology* 19(3): 365–372.
190. Pandurangan M, Enkhtaivan G, Mistry B, Chandrasekaran M, Noorzai R, Kim DH. Investigation of role of aspartame on apoptosis process in HeLa cells. *Saudi J Biol Sci* 2016;23(4):503–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.06.001>.

## 7. EKLER

### Ek 1:Etik Kurul Onayı

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI**  
**ETİK KURUL BAŞVURU KARARI**

Dr. Öğr. Üyesi Kayıhan KARAÇOR tarafından kurulumuza sunulan "Aspartamin Testiste Neden Olduğu Apoptotik Etkiye Karşı Kafeik Asit Fenetil Esterin Koruyucu Etkisi" isimli araştırma başvuru projesi etik yönden değerlendirilmiş olup; yönergemiz ilkelerine göre proje etiği açısından "UYGUN OLDUĞUNA" oy birliği / oy çokluğu ile karar verilmiştir.

Toplantı Tarihi: 07/11/2018	Karar No: 2018/5/5	
UNVAN, ADI, SOYADI, GÖREVİ	KARAR	İMZA
Doç. Dr. Ertuğrul KAYA Başkan	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Murat KABAKLIOĞLU Başkan Vekili		Toplantıya katılmamıştır.
Ali GÖK Veteriner	UYGUNDUR	
Prof. Dr. Şerif DEMİR Üye	UYGUNDUR	
Doç. Dr. Şengül CANGÜR Üye	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Akif KETEN Üye		Toplantıya katılmamıştır.
Dr. Öğr. Üyesi Meral KEKEÇOĞLU Üye	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Pınar GÖÇ RASGELE Üye	UYGUNDUR	
Dr. Öğr. Üyesi Emel ÇALIŞKAN Üye		Toplantıya katılmamıştır.
İzzet GÜÇLÜ Üye	UYGUNDUR	
Merve UĞUR Üye	UYGUNDUR	

**Düzce Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Yerel Etik Kurulu**  
Düzce Üniversitesi, Deneysel Hayvanlar Uygulama ve Araştırma Merkezi,  
Konuralp Yerleşkesi, Merkez, 81620, Düzce.  
0380 5421416 – Dahili: 4171 Faks: 0380 5421302

## ÖZGEÇMİŞ

21.09.1993 tarihinde Bolu'da doğdum. İlköğretimi Mudurnu Zafer Türk İlköğretim Okulu'nda tamamladım. 2011 yılında Mudurnu Çok Programlı Lisesi'nden mezun olarak aynı yıl Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji (İngilizce) bölümünde eğitim almaya hak kazandım. Üniversite eğitimim devam ederken 2014 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Biyokimya Anabilim Dalı'nda staj eğitimi aldım. 2015 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi'nde Pedagojik Formasyon Eğitimi aldım. 2016 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Biyoloji (İngilizce) Bölümü'nden mezun oldum. 2017 yılında Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım.