

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

**DENEYSEL Dİ-(2-ETİLHEKZİL) FİTALAT
(DEHP) ZEHİRLENMESİNİN PREPUBERTAL
RATLARDA OLUŞTURDUĞU TESTİKÜLER
TOKSİSİTE VE GİNKGO BİLOBA EKSTRAKT
761 (EGb 761)'İN KORUYUCU ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Tuba PARLAK AK

2012

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Aydın GİRGIN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Mine YAMAN



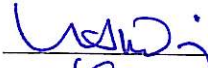
Danışman

Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

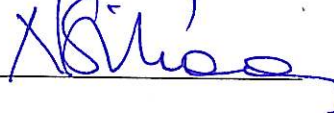
Prof. Dr. Aydın GİRGIN



Prof. Dr. M. Aydın KETANİ



Prof. Dr. Necati TİMURKAAN



Doç. Dr. Mine YAMAN



Doç. Dr. Sema TİMURKAAN



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince ve tez çalışmalarım boyunca bilgi, tecrübe ve hoşgörüsünü benden eksik etmeyen ve her zaman desteğini en yakınımnda hissettiğim danışman hocam sayın Doç. Dr. Mine YAMAN'a teşekkür eder, sonsuz şükranlarımı ve saygılarımı sunarım.

Gerek eğitimim ve gerekse çalışmalarım süresince her türlü bilimsel katkıyı ve laboratuvar imkânını sağlayan başta Histololoji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Aydın GİRGİN'e, Anabilim Dalımızın diğer öğretim üyeleri Doç. Dr. Berrin GENÇER TARAKÇI'ya, Doç. Dr. Sema TİMURKAAN'a ve Araş. Gör. Dr. Ali BAYRAKDAR'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım. Ayrıca tez çalışmama sağladığı katkılardan dolayı Prof. Dr. Necati TİMURKAAN'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Hayatımın her döneminde olduğu gibi doktora eğitimim süresince her türlü fedakârlıkta bulunan sevgili aileme, bu süreç içerisinde tüm sıkıntılarımı benimle paylaşan ve daima yanımda olan eşime ve kızıma sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür eder, kucak dolusu sevgi ve şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi (FÜBAP) Koordinasyon Birimi tarafından VF.11.01 numaralı proje olarak desteklenmiştir. Çalışmaya sağladıkları maddi destekten dolayı FÜBAP kurumuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLO LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Erkek Üreme Sistemi Hakkında Genel Bilgiler.....	5
3.1.1. Testis Anatomisi.....	5
3.1.2. Testis Embriyolojisi	6
3.1.3. Testis Histolojisi.....	8
3.1.3.1. Seminifer Tubuluslar	10
3.1.3.1.1. Spermatogenik Hücreler	12
3.1.3.1.1.1. Spermatogonyumlar.....	13
3.1.3.1.1.2. Primer Spermatositler	14
3.1.3.1.1.3. Sekunder Spermatositler	14
3.1.3.1.1.4. Spermatidler	15
3.1.3.1.1.5. Spermatozoonlar (Spermiyumlar)	17
3.1.3.1.2. Sertoli Hücreleri	18
3.1.3.2. Leydig Hücreleri (İntersitisyel Hücreler)	20
3.1.4. Erkek Genital Sistemin Histofizyolojisi.....	22

3.2. Endokrin Bozucular.....	24
3.2.1. Fitalatlar.....	26
3.2.1.1. Di-(2-etilhekzil) Fitalat (DEHP).....	28
3.2.1.1.1. Di-(2-etilhekzil) Fitalatın Kimyasal Yapısı.....	29
3.2.1.1.2. Di-(2-etilhekzil) Fitalatın Biyotransformasyonu.....	30
3.2.1.1.2.1. Emilimi.....	30
3.2.1.1.2.2. Dağılımı.....	31
3.2.1.1.2.3. Metabolizma ve Eliminasyonu.....	31
3.2.1.1.3. Di-(2-etilhekzil) Fitalatın Toksik Etkileri.....	32
3.2.1.1.3.1. Üreme Sistemi Üzerine Etkisi.....	33
3.2.1.1.3.1.1. Testis ve DEHP İndüklü Oksidatif Stres.....	34
3.2.1.1.3.1.2. Testis ve DEHP İndüklü Apoptozis.....	39
3.3. Ginkgo Biloba.....	41
3.3.1. Ginkgo Biloba Yapraklarının Kimyasal Bileşenleri.....	41
3.3.2. Ginkgo Biloba Yapraklarının Ticari Ekstraktları.....	43
3.3.2.1. Ginkgo Biloba Ekstrakt 761 (EGb 761).....	44
3.3.3. Ginkgo Bilobanın Biyolojik Etkileri.....	44
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
4. 1. Gereç.....	47
4.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	47
4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	48
4.1.3. Hayvan Materyali.....	49
4.1.3.1. Deney Grupları.....	49
4.2. Yöntem.....	50

4.2.1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması.....	50
4.2.2. Rölatif Testis Ağırlığının Hesaplanması	51
4.2.3. Bouin Doku Tespit Prosedürü.....	51
4.2.4. Tamponlu formaldehit doku tespit prosedürü.....	51
4.2.5. Doku kesitlerinin alınması ve boyanması.....	51
4.2.5.1. TUNEL (TdT- mediated dUTP- digoxigenin Nick End Labeling) Metodu...	52
4.2.6. Mikroskopik İnceleme.....	54
4.2.7. Lipit Peroksidasyon Tayini.....	55
4.2.8. Doku GSH-Px Enzim Aktivitesi Tayini	55
4.2.9. Doku GSH Tayini	56
4.2.10. Doku CAT Enzim Aktivitesi Tayini	56
4.2.11. Testosteron Ölçümü	56
4.2.12. İstatistiksel Analiz	57
5. BULGULAR.....	58
5.1. Canlı Ağırlık	58
5.1.1. Yedinci Gün.....	58
5.1.2. On dördüncü Gün.....	58
5.1.3. Yirmi sekizinci Gün	59
5.2. Absolüt ve Rölatif Testis Ağırlıkları.....	59
5.2.1. Yedinci Gün	59
5.2.2. On dördüncü Gün.....	60
5.2.3. Yirmi sekizinci Gün	60
5.3. Mikrometrik Bulgular.....	61
5.3.1. Yedinci Gün.....	61

5.3.2. On dördüncü Gün.....	62
5.3.3. Yirmi sekizinci Gün	62
5.4. Işık Mikroskopik Bulgular.....	63
5.4.1. Yedinci Gün.....	63
5.4.1.1. Kontrol Grubu	63
5.4.1.2. DEHP Grubu	64
5.4.1.3. DEHP + EGb 761 Grubu	65
5.4.1.4. EGb 761 Grubu	65
5.4.2. On dördüncü gün.....	68
5.4.2.1. Kontrol Grubu	68
5.4.2.2. DEHP Grubu	68
5.4.2.3. DEHP + EGb 761 Grubu	69
5.4.2.4. EGb 761 Grubu	70
5.4.3. Yirmi sekizinci Gün	72
5.4.3.1. Kontrol Grubu	72
5.4.3.2. DEHP Grubu	72
5.4.3.3. DEHP + EGb 761 Grubu	73
5.4.3.4. EGb 761 Grubu	74
5.5. Biyokimyasal Bulgular.....	110
5.5.1. Yedinci Gün.....	110
5.5.2. On dördüncü Gün.....	111
5.5.3. Yirmi sekizinci Gün	112
5.6. Testosteron Düzeyleri.....	112
5.6.1. Yedinci Gün.....	113

5.6.2.On dördüncü Gün.....	113
5.6.3. Yirmi sekizinci Gün	114
6. TARTIŞMA.....	116
7. KAYNAKLAR	135
8. ÖZGEÇMİŞ	154

TABLO LİSTESİ

1. Başlıca Endokrin Bozucular	24
2. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemi Dışındaki Etkileri.....	25
3. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemine Etkileri.....	25
4. DEHP’ın Fizikokimyasal Özellikleri	30
5. Ginkgo Biloba Yapraklarının Ana Bileşenleri.....	42
6. Yedinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Canlı Ağırlık Ortalamaları	58
7. On dördüncü Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Canlı Ağırlık Ortalamaları	59
8. Yirmi sekizinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Canlı Ağırlık Ortalamaları	59
9. Yedinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Sağ ve Sol Testis Ağırlıkları ile Rölatif Testis Ağırlıkları	60
10. On dördüncü Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Sağ ve Sol Testis Ağırlıkları ile Rölatif Testis Ağırlıkları.....	60
11. Yirmi sekizinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Sağ ve Sol Testis Ağırlıkları ile Rölatif Testis Ağırlıkları.....	61
12. Yedinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında TSK çapları ve GHK	62
13. On dördüncü Günde Kontrol ve Deney Gruplarında TSK çapları ve GHK	62
14. Yirmi sekizinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında TSK çapları ve GHK.....	63
15. Yedinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Testislerde Mikroskopik Bulgular	67
16. On dördüncü Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Testislerde Mikroskopik Bulgular ..	71
17. Yirmi sekizinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Testislerde Mikroskopik Bulgular	75
18. Yedinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Biyokimyasal Parametre Düzeyleri.....	110
19. On dördüncü Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Biyokimyasal Parametre Düzeyleri	111

20. Yirmi sekizinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Biyokimyasal Parametre Düzeyleri	112
21. Yedinci, On dördüncü ve Yirmi sekizinci Günlerde Kontrol ve Deney Gruplarında Serum Testosteron Düzeyleri.....	113

ŞEKİL LİSTESİ

1. Testis ve epididimis.....	10
2. İnsan seminifer epitelinin şematik gösterimi	12
3. Spermiyogenezisin şematik gösterimi	17
4. Erkekke hormonal mekanizmanın şematik gösterimi	23
5. DEHP’in kimyasal yapısı	29
6. DEHP metabolizması ve bazı önemli metabolitleri	32
7. Ginkgolidler’in kimyasal yapısı.....	42
8. Bilobalid’in kimyasal yapısı	43
9. TUNEL metodunun boyanma mekanizması.....	54
10. Yedinci gün kontrol grubunda testisin histolojik görünümü.....	76
11. Yedinci gün kontrol grubunda testiste TSK’larda Sertoli hücresi.....	76
12. Yedinci gün kontrol grubunda testiste Leydig hücreleri.....	77
13. Yedinci gün kontrol grubunda testiste TSK’larda TUNEL pozitif hücreler	77
14. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK’larda atrofi ile germinal hücrelerde nekroz ve dejenerasyon.....	78
15. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK’ların germinal hücrelerinde deskuamasyon ..	78
16. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK’ların germinal hücrelerinde sayıca azalma ve disorganizasyon	79
17. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK’ların germinal hücrelerinde vakuolizasyon...	79
18. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK’ların bazal membranlarında kalınlaşma	80
19. Yedinci gün DEHP grubunda testiste intersitisyel bölgede ödem ve genişleme ile kapillar konjesyon.....	80
20. Yedinci gün DEHP grubunda testiste normal görünümlü Leydig hücreleri	81

21. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler	81
22. Yedinci gün DEHP grubunda testiste testiste TSK'larda TUNEL pozitif spermatositler ve Sertoli hücresi	82
23. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda hafif şiddette nekrotik ve atrofik değişiklikler	82
24. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda mitotik aktiviteye bağlı rejeneratif değişimler	83
25. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında normal görünüm	83
26. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste intersitisyel bölgede eozinofilik karakterde ödem	84
27. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste normal görünümlü Leydig hücreleri ...	84
28. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler	85
29. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif Sertoli hücreleri	85
30. Yedinci gün EGb 761 grubunda testisin normal histolojik görünümü	86
31. Yedinci gün EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler	86
32. On dördüncü gün kontrol grubunda testisin histolojik görünümü	87
33. On dördüncü gün kontrol grubunda testiste TSK'ların histolojik görünümü	87
34. On dördüncü gün kontrol grubunda testiste TSK'ların çevresinde miyoid hücreler ve bazal membranlarında normal görünüm	88
35. On dördüncü gün kontrol grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücre	88
36. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'larda şiddetli nekroz, atrofi ve dejenerasyon	89
37. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'larda şiddetli nekroz, atrofi ve dejenerasyon	89

38. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'larda şiddetli nekroz, atrofi ve dejenerasyon	90
39. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'larda spermatogenik hücrelerde düzensizlik	90
40. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste bazı TSK'larda spermatogonyumların kısmi yokluğu	91
41. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'ların çevresinde sağlam miyoid hücreler	91
42. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'ların lümeninde çok çekirdekli dev hücre	92
43. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında belirgin kalınlaşma	92
44. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste intersitisyel ödem ve genişleme ile kapillar konjesyon	93
45. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste Leydig hücre hiperplazisi	93
46. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'larda TUNEL pozitif hücreler	94
47. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'da TUNEL Sertoli hücreleri	94
48. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda hafif dejeneratif değişiklikler	95
49. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste bazı TSK'larda spermatogenezis	95
50. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında normal görünüm	96
51. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'ların lümenlerinde çok çekirdekli dev hücreler ile hafif şiddette Leydig hücre hiperplazisi	96
52. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda TUNEL pozitif hücreler	97

53. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda TUNEL pozitif Sertoli hücresi	97
54. On dördüncü gün EGb 761 grubunda testiste; Sertoli hücresi, uzamış spermatid ve peritubuler miyoid hücre ile Leydig hücreleri	98
55. On dördüncü gün EGb 761 grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında normal görünüm.....	98
56. On dördüncü gün EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler	99
57. Yirmi sekizinci gün kontrol grubunda testisin histolojik görünümü	99
58. Yirmi sekizinci gün kontrol grubu testisinde TSK'larda uzamış spermatidler ve bazal membranların normal görünümü	100
59. Yirmi sekizinci gün kontrol grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler	100
60. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda TSK'larda atrofi ile birlikte nekrotik ve dejeneratif değişiklikler	101
61. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste belirgin Leydig hücre hiperplazisi.....	101
62. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste bazı TSK'ların germinal hücrelerinde kısmi rejenerasyon	102
63. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste rejeneratif TSK'ların germinal hücrelerinde mitotik figürler	102
64. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında belirgin kalınlaşma ve Leydig hücrelerinde belirgin hiperplazi	103
65. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste intersitisyel ödem ve genişleme ile kapillar konjesyon	103
66. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste TSK'larda TUNEL pozitif hücreler	104
67. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda hafif dejeneratif değişiklikler ile birlikte çok sayıda spermatogenik hücre	104
68. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda çok sayıda spermatogenik hücre	105

69. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda TSK’larda germinal hücrelerde hacim artışı ve çekirdekte hiperkromazi ile mitotik figürlerde artış	105
70. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK’ların bazal membranlarının normal görünümü	106
71. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste Leydig hücrelerinde normal görünüm.....	106
72. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK’da TUNEL pozitif hücreler	107
73. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK’da TUNEL pozitif spermatositler.....	107
74. Yirmi sekizinci gün EGb 761 grubunda testiste TSK’ların normal histolojik görünümü,.....	108
75. Yirmi sekizinci gün EGb 761 grubunda testiste TSK’ların bazal membranlarının normal görünümü.....	108
76. Yirmi sekizinci gün EGb 761 grubunda testiste Leydig hücrelerinin normal görünümü ..	109
77. Yirmi sekizinci gün EGb 761 grubunda testiste TSK’da TUNEL pozitif hücreler	109
78. Yedinci günde kontrol ve deney gruplarında serum testosteron düzeyleri	113
79. On dördüncü günde kontrol ve deney gruplarında serum testosteron düzeyleri	114
80. Yirmi sekizinci günde kontrol ve deney gruplarında serum testosteron düzeyleri.....	115

1. ÖZET

Deneyisel Di-(2-Etilhekzil) Fitalat (DEHP) Zehirlenmesinin Prepubertal Ratlarda Oluşturduğu Testiküler Toksisite ve Ginkgo Biloba Ekstrakt 761 (EGb 761)'in Koruyucu Etkisinin İncelenmesi

Çalışmada; prepubertal gelişim dönemindeki ratlara farklı sürelerde aynı dozda di-(2-etilhekzil) fitalat (DEHP) verilerek oluşturulan testis hasarı üzerine ginkgo biloba ekstrakt 761 (EGb 761)'in koruyucu etkisi mikroskobik ve biyokimyasal olarak incelendi. Bu amaçla:

1. Yetmiş iki adet 28 günlük Wistar albino cinsi rat; kontrol, DEHP, DEHP + EGb 761 ve EGb 761 olmak üzere 4 ayrı deney grubuna (n=18) ayrıldı. Çalışmanın 7., 14., ve 28. günlerinde her gruptan 6'şar hayvan dekapite edildi. Hayvanlardan alınan testis dokularından parafin bloklar hazırlanarak 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Bu kesitler hematoksil-eozin (H&E), periyodik asit schiff (PAS) & hematoksil ve TdT-mediated dUTP-digoxigenin Nick End Labeling (TUNEL) yöntemleriyle boyanarak ışık mikroskopunda değerlendirildi. Hayvanlardan alınan doku ve serum örnekleri ise malondialdehit (MDA), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT) ve testosteron düzeyleri bakımından biyokimyasal olarak incelendi.

2. Kontrole göre DEHP grubunda canlı ağırlık ve testis ağırlıklarının 7. ve 14. günlerde azaldığı; 28. günde ise önceki deney periyotlarına göre arttığı saptandı. DEHP + EGb 761 grubunda ise tüm deney periyodu boyunca DEHP grubuna kıyasla artmış olduğu belirlendi.

3. Mikroskobik olarak 7. günde DEHP grubunda, tubulus seminiferus kontortus (TSK) çapında ve germinal hücre kalınlığında (GHK) azalma dikkati çekti. TSK'larda dejenerasyon, nekroz ve atrofinin yanı sıra bazal membranda kalınlaşma; germinal hücrelerde ise sayıca azalma, disorganizasyon ve vakuolizasyon gözlenen başlıca bulgular idi. 14. günde gözlenen bulguların 7. günde kiler ile benzer; ancak daha şiddetli olduğu

göze çarptı. TSK’larda ayrıca çok çekirdekli dev hücre formasyonlarına rastlanırken Leydig hücrelerinde hiperplazinin varlığı dikkati çekti. Yirmi sekizinci günde bir önceki deney periyoduna kıyasla bulguların daha hafif seyrettiği ve hatta kısmi rejenerasyonun başladığı saptandı. Bazal membran kalınlaşmasının ve Leydig hücre hiperplazisinin ise arttığı tespit edildi. DEHP + EGb 761 grubunda ise yukarıda bahsedilen bulguların tüm deney periyodu boyunca giderek hafiflediği ve rejenerasyonun baskın olduğu göze çarptı.

4. TUNEL yöntemi ile yapılan değerlendirmelerde kontrole göre DEHP grubunda; 7. günde spermatogenik hücrelerde apoptozisin arttığı, 14. ve 28. günlerde ise bir önceki deney periyoduna göre kademeli olarak azaldığı ortaya kondu. DEHP + EGb 761 grubunda ise tüm deney periyodu boyunca DEHP grubuna kıyasla TUNEL pozitif hücre sayısının giderek azaldığı dikkati çekti.

5. Biyokimyasal olarak 7. ve 14. günlerde kontrol grubuna kıyasla DEHP grubunda serum testosteron düzeylerinde azalma gözlenirken, 28. günde önceki deney periyotlarına göre yükselme saptandı. Tüm deney periyotları boyunca kontrol grubuna kıyasla DEHP grubunda MDA, GSH-Px ve CAT seviyelerinde yükselme; GSH düzeylerinde azalma tespit edildi. DEHP + EGb 761 grubunda ise DEHP grubuna kıyasla testosteron ve GSH düzeylerinde artış gözlenirken; MDA, GSH-Px ve CAT seviyelerinde azalma belirlendi.

Sonuç olarak DEHP’in uygulanan süre ve dozda testis dokusu için oldukça toksik olduğu ve şiddetli yapısal bozukluklara sebep olduğu saptandı. Antioksidan etkiye sahip olan EGb 761’in ise bu hasarı büyük oranda önlediği tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, Di-(2-etilhekzil) fitalat (DEHP), Ginkgo biloba ekstrat 761 (EGb 761), prepubertal rat, testiküler toksisite, TdT- mediated dUTP-digoxigenin Nick End Labeling (TUNEL).

2. ABSTRACT

Analysis of Ginkgo Biloba Extract 761 (EGb 761)'s Protective Effect and Testicular Toxicity of Experimental Di-(2-Ethylhexyl) Phthalate (DEHP) Poisoning in Prepubertal Rats

In this study, the protective effect of ginkgo biloba extract 761 (EGb 761)'s on testicular damage was analyzed microscopically and biochemically by giving the same dose di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) to rats in prepubertal developing stages at different times. For this reason:

1. Seventy-two Wistar albino rats of 28 days were divided into four subject groups of control, DEHP, DEHP + EGb 761 and EGb 761. At the 7th, 14th and 28th days of the study, 6 animals from each group were decapitated. 5 µm thickness of serial sections were taken by preparing paraffin blocks from animal's testicular tissues. These sections were evaluated under a light microscope by staining the methods of hematoxylin- eosin (H&E), periodic acid schiff (PAS) & hematoxylin and TdT- mediated dUTP- digoxigenin Nick End Labeling (TUNEL). Tissue and serum samples taken from animals were analyzed biochemically in terms of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT) and testosterone levels.

2. According to the control, it was determined that live weight and testicular weights decreased in 7th and 14th days but increased in 28th day in terms of the prior experiment periods in DEHP group. Besides, it was found that these values increased in DEHP + EGb 761 group compared to DEHP group throughout the all experimental period.

3. Microscopically, it was found that a decrease in the diameter of tubulus seminiferous contortus (TSC) and germinal cell thickness (GCT) in DEHP group. Degeneration, necrosis and atrophy, as well as thickening of the basement membrane in TSC's and decrease in number, disorganization and vacuolization germinal cells were

observed. Findings of 14th day were similar to 7th day but more severe. While multinucleated giant cell formations were encountered in TSC's; the presence of hyperplasia in Leydig cells drew attention. Findings were also evaluated as more mildly, and even partial regeneration started at 28th day when compared to prior experiment period. An increase in Leydig cell hyperplasia and thickening of the basement membrane was found. The above mentioned findings in DEHP + EGb 761 group gradually abated, and dominated by the regeneration throughout the all experimental period.

4. According to the evaluations of TUNEL method, while it was found that apoptosis increased in spermatogenic cells at the 7th day, it decreased gradually compared to the previous experiment period at 14th and 28th days in DEHP group. In DEHP + EGb 761 group TUNEL positive cell number gradually decreased throughout the all experimental period compared to DEHP.

5. Biochemically, while a decrease in serum testosterone levels was observed in DEHP group at 7th and 14th days compared to control group; an increase was observed at 28th day compared to previous experiment periods. An increase in MDA, GSH-Px and CAT levels but a decrease in GSH levels were observed in DEHP group throughout the all experimental periods when compared to control group. In DEHP + EGb 761 group, an increase in testosterone and GSH levels but a decrease in MDA, GSH-Px and CAT levels were observed compared to DEHP.

In conclusion, it was determined that DEHP is highly toxic to the testis tissue for the application duration and dose and cause to severe structural damage. It was identified that EGb 761 which has antioxidant effect prevents largely this damage.

Key Words: Apoptosis, Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP), Ginkgo biloba extract 761 (EGb 761), prepubertal rats, testicular toxicity, TdT- mediated dUTP-digoxigenin Nick End Labeling (TUNEL).

3. GİRİŞ

3.1. Erkek Üreme Sistemi Hakkında Genel Bilgiler

Bu sistem; spermatozoon (spermiyum) adı verilen eşey (gonad) hücrelerini ve erkek cinsiyet hormonlarını üreten testisler, üretilen spermatozoonların depolanması ve iletilmesinden sorumlu olan genital kanallar, seminal sıvı adı verilen kayganlaştırıcı salgıyı yapıp genital kanallara akıtarak spermiyumların beslenmesini ve taşınmasını kolaylaştıran eklenik genital bezler ile spermayı dışı genital kanala aktaran dış genital organ olan penisten oluşmaktadır (1, 2).

3.1.1. Testis Anatomisi

Testis; hem erkek eşey hücrelerini üreten (spermatogenezis), hem de erkeklik hormonu olan testosteronu ve diğer androjenleri sentezleyen (steroidogenezis) oval şekilli bir organdır. Yarım ay biçimindeki epididimise eklenik olan bu organ, vücut boşluklarının dışında skrotum adı verilen torba içerisinde funikulus spermatikus ile asılı durmaktadır (1, 2, 3, 4, 5). Testis aynı zamanda hücre üreten bir yapı olduğu için sitojenik bez olarak da adlandırılmaktadır. Genetik çeşitliliği ve kromozom sayısını yarıya indirerek, her türün kendisi için spesifik olan kromozom sayısının kuşaktan kuşağa aynı kalmasını sağlayan, mayoz bölünmenin gerçekleştiği yerdir (6). Testiste üretilen başlıca hormon testosteron olmakla birlikte, erkek fizyolojisi için hem testosteron hem de metaboliti olan dihidrotestosteron (DHT) gerekmektedir (1, 3). Testosteron; spermatogenezis, embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşma, gonadotropin salgısının kontrolü, dış genital organlar ve sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişiminden sorumlu steroid bir hormondur (2, 3, 4, 5, 7).

DHT ise, ergenlik (puberte) ve erişkinlik çağlarında pek çok organ ve dokunun gelişimi üzerinde etkilidir (3). Testisten ayrıca daha az öneme sahip olan dehidroepiandrosteron (DHEA) ve androstenedion gibi androjenler de salgılanmaktadır (4).

3.1.2. Testis Embriyolojisi

Testisler, karın boşluğunun arka duvarı üzerinde retroperitoneal olarak gelişip üç kaynaktan köken almaktadır. Ara mezoderm, karın boşluğunun arka duvarındaki ürogenital çıkıntıları oluştururken, mezodermal epitel (söломik mezotelyum) bu çıkıntıları kaplamaktadır. Primordiyal (ilkel) germ (cinsiyet) hücreleri ise vitellus kesesinden gelişmiş olan gonadlara doğru göç ederek spermatogonialara farklılaşmaktadır (5).

Gonadların gelişimi; karın boşluğunun arka duvarı üzerinde, mezonefrozun medial yanında, mezodermal epitelden oluşan kalınlaşmış bölgenin şekillenmesiyle başlamaktadır. Bu bölgede epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu sonucu genital kabartı (krista genitalis) oluşmaktadır. Mezodermal epitel, proliferasyona uğrayarak genital kabartı içerisine parmak benzeri kordonlar (primer ya da medullar seks kordonları) göndermektedir. Bu kabartıya ayrıca; vitellus kesesi duvarının endoderminden köken alan ve daha sonra spermatogonia ya da ovogoniayı oluşturacak olan primordiyal germ hücreleri göç etmektedir. Genital kabartıya ulaşan primordiyal germ hücreleri ise primer seks kordonları ile birleşmektedir (4, 5, 7, 8).

Bu gelişme aşamalarına kadar erkek ve dişi embriyolar morfolojik olarak birbirinin aynısıdır. Her iki cinsiyette de birleşmiş olan primordiyal germ hücreleri

ve seks kordonları, henüz farklılaşmamış olan gonadların medullar ve kortikal bölgelerinde bulunmaktadır. Ayrıca mezonefroz (Wolff kanalı) ve paramezonefroz (Müller kanalı) kanallar eksiksiz bir şekilde yan yana uzanmaktadır. Primer seks kordonlarının, primordiyal germ hücrelerinin, mezonefroz ve paramezonefroz kanalların birlikte görüldüğü, yani erkek ve dişi gonadların aynı olduğu bu aşamaya farklılaşmanın olmadığı aşama (indifferent stage, bipotential stage) adı verilmektedir (5, 7, 8).

İlerleyen aşamalarda erkek embriyolardaki primer seks kordonu hücreleri, testiküler gelişim ve farklılaşmadan direkt olarak sorumlu olan TDF (Testis determining factor= Testis belirleyici faktör) adı verilen proteini üretmeye başlamaktadır (4, 5, 7, 8, 9, 10). TDF'nin etkisiyle ilkel seks kordonlarının medullar bölgesindeki hücreler pre-Sertoli hücrelerine farklılaşırken, kortikal bölgesindeki hücreler dejenerasyona uğramaktadır. Farklılaşmış olan pre-Sertoli hücreleri ise, seminifer kordonların oluşumunu organize etmektedir (4, 5, 7). Erkek cinsiyetinin belirlenmesinde ve testislerin gelişiminde ilk morfolojik belirti olan seminifer kordonların oluşumu sıçanlarda embriyonik dönemin 13. gününe denk gelmektedir (10). Testis kordonlarından daha sonra ise tubuli seminiferi kontorti, tubuli seminiferi rekti ve rete testis gelişmektedir (5).

Pre-Sertoli hücreleri ayrıca paramezonefroz kanalını baskılayıcı bir hormon olan anti-müllerian hormonunu (MIH= Müllerian inhibiting hormone) salgılayarak bu kanalın erkek fetüste gerilemesini sağlamaktadır. Bu hormon, muhtemelen genital kabartıdaki mezenşimal hücrelerin, androjenleri üreten Leydig hücrelerine farklılaşmasını da uyarmaktadır (3, 5). Androjenler mezonefroz kanalın erkek genital boşaltım kanallarına farklılaşmasını

uyarmaktadır. Mezonefroz kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlayan testosteron, dış genital organların gelişmesini ve farklılaşmasını da DHT'nun etkisiyle gerçekleştirmektedir (3, 4, 5).

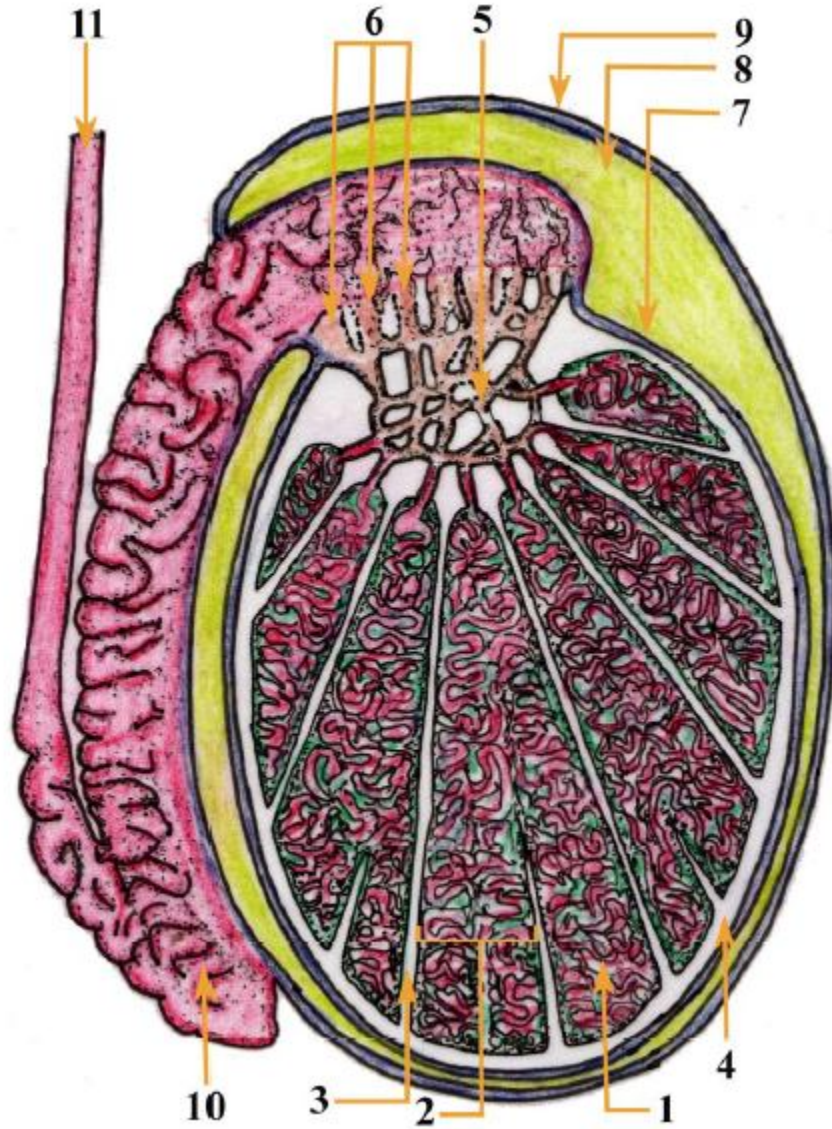
3.1.3. Testis Histolojisi

Testisler, insanlarda yaklaşık olarak gebeliğin 26. haftasında karın boşluğunun arka duvarından kanalis inguinalisi geçerek skrotuma inmektedir (3, 5, 11). Sıçanlarda bu süre postnatal 30- 40. günlere tekabül etmektedir (12). Desensus testis adı verilen bu olayda, testosteronun etkisiyle kısalabilen bir ligament olan gubernakulum önemli bir rol oynamaktadır (5, 13). Bu iniş bazen tamamlanamayarak testislerden biri ya da her ikisi birden skrotuma inmemektedir. Bu olaya kriptorşidizm ya da inmemiş testis adı verilmektedir. Vücut boşluklarının dışında, skrotum içinde yer alan testislerin ısısı normal vücut ısısından 2-3 °C daha düşüktür. Bu sıcaklık normal spermatogenezisin devamı için gereklidir. Spermatogenezis için gerekli olan düşük ısı plexüs pampiniformis, m. kremaster ve tunika dartos ile sağlanmaktadır. Kriptorşidizm olgularında yüksek ısıya maruz kalan testislerde geri dönüşümsüz histolojik bozukluklar meydana gelmekte ve sperm üretilmemektedir (4, 5).

Karın boşluğundan skrotuma inerken testisler beraberinde kan damarları, lenf damarları, otonom sinirler ve peritondan gelişmiş seröz bir kese olan tunika vaginalisi taşımaktadır. Tunika vaginalis dışta pariyetal içte visseral olmak üzere iki yapraktan oluşmaktadır (3, 4, 5). Pariyetal yaprağı sırasıyla; iskelet kası özelliğindeki m.kremaster, gevşek bağ doku, tunika dartos ve skrotum örtmektedir (2, 3, 11). Viseral yaprağın altında ise fibröz bir kapsül olan tunika albuginea

bulunmaktadır. Bu kapsülün oluşturduğu mediastinum testisten ayrılan septula testisler bezi, testiküler lobuller denilen yaklaşık 250- 300 adet piramidal bölmeye ayırmaktadır (1, 2, 3, 4, 11).

Bu fibröz uzantılar tam değildir ve bölmeler çoğunlukla birbirleriyle ilişkilidir. Her lobülde gevşek bağ doku ile sarılı 1-4 adet seminifer tubulus (tubulus seminiferus kontortus) adı verilen kanalcık yer almaktadır. Bu bağ dokusu bol miktarda kılcal ve lenf damarlarını, sinirleri, fibroblastları, mast hücrelerini, makrofajları ve tek tek ya da gruplar halinde yerleşmiş, hormon salgılayan, oval veya poligonal şekilli Leydig hücrelerini içermektedir. Seminer tubuluslar erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, Leydig hücreleri de testiküler androjenleri salgılamaktadır (Şekil 1) (1, 2, 3, 4, 5, 11).



Şekil 1. Testis ve epididimis (14)

1-Tubuli seminiferi kontortiler, 2-Lobuli testisler, 3-Septum testis, 4-Tunica albuginea, 5-Rete testis, 6-Duktuli efferentes testisler, 7-Tunica vaginalis (lamina visseralis), 8-Kavum vaginale, 9-Tunica vaginalis (lamina parietalis), 10-Epididimis 11-Duktus deferens.

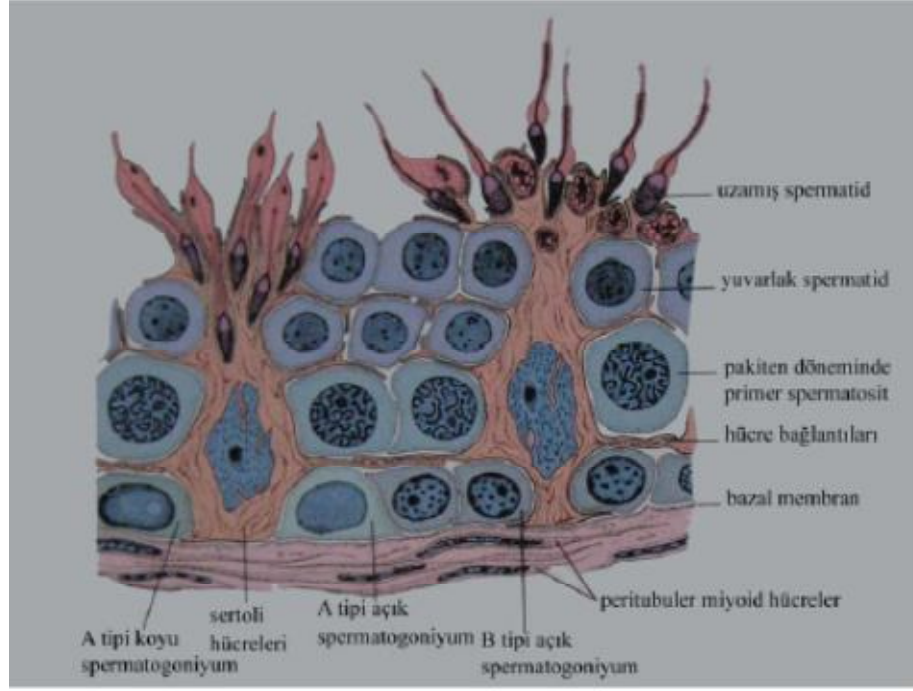
3.1.3.1. Seminifer Tubuluslar

Tunica albugineadan itibaren kör uçlarla başlayarak zikzaklı seyreden, testisin derinlerine doğru ilerleyen, her bir testiste yaklaşık olarak 250- 1000 adet bulunan seminifer tubuluslar (tubuli seminiferi kontorti), 150- 250 μ m çapında ve 30- 80 cm uzunluğundadır (2, 3, 4, 5, 11). Bu tubuluslar histolojik kesitlerde

yuvarlak, oval ya da kıvrımlı olarak görülmektedir (2, 11). Tubuluslar, organın arka tarafında sonlanırken lümenleri daralarak düz tubuluslar ya da tubuli seminiferi rekti olarak devam etmektedir. Bu düz tubuluslar; seminifer tubulusların, epitel ile döşeli anastomoz yapan kanalların oluşturduğu rete testis denilen bir labirente bağlanmasını sağlamaktadır. Bu kanallar yaklaşık 10- 20 adet duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmaktadır (1, 3).

Seminifer tubulusların dışı, tunika propriya olarak adlandırılan; kalın bir bazal membran ile kollagen iplikler, fibroblastlar ve insanda birkaç kat, kemirgenlerde ise tek kattan oluşan kasılabilir, peritubuler miyoid hücre tabakalarından oluşmaktadır. Miyoid hücreler, hareketsiz spermleri ve Sertoli hücreleri tarafından salgılanan sıvıları rete testise ilerleten ritmik kasılma aktivitelerinden sorumludur (5).

Tubulusların içini kaplayan germinal (seminifer) epitelde iki tip hücre vardır; Sertoli ya da destek hücreleri ve spermatogenezisteki seriyi oluşturan spermatogenik hücrelerdir (Şekil 2) (3, 11, 15).



Şekil 2. İnsan seminifer epitelinin şematik gösterimi (5).

3.1.3.1.1. Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik seriye ait hücreler; testislerin erken gelişim sürecinde, vitellus kesesinin endoderminden köken alan ve kista genitalise göç eden primordiyal germ hücrelerinin farklılaşması sonucu oluşmaktadır. Bu hücreler, düzenli olarak bölünmekte ve olgun sperme farklılaşmaktadır. Spermatogenik hücreler ilkelden gelişmişe doğru; spermatogonyum, primer spermatosit, sekonder spermatosit, spermatid ve spermatozoon (spermiyum) şeklinde sıralanmaktadır (3, 5, 11).

Spermatogonyumlardan spermatozoon oluşumuna kadar geçen sürece spermatogenezis adı verilmektedir. Spermatogenezis de kendi içinde spermatositogenezis, mayozis ve spermiyogenezis olmak üzere üç aşamaya ayrılmaktadır. Spermatogonyumlardan primer spermatositlerin oluşumuna kadar geçen evreye spermatositogenezis (spermatogonial faz) adı verilmektedir. Bu

evredeki hücrelerde mitoz bölünme gözlenmektedir. Mayozis (spermatosit fazı) evresi primer spermatositin oluşmasıyla başlayarak spermatid oluşumuyla son bulmaktadır. Bu evredeki primer spermatositler kromozom sayısını yarıya indiren birinci mayoz bölünmeyi geçirerek sekonder spermatositleri meydana getirmektedir. Oluşan sekonder spermatositler de hemen ikinci mayoz bölünmeye girerek spermatidleri oluşturmaktadır. Spermatidlerden spermatozoon oluşumuna kadar geçen sürece ise spermiyogenezis (spermatid fazı) adı verilmektedir. Bu süreçte herhangi bir hücre bölünmesi görülmemektedir (3, 5, 11).

3.1.3.1.1.1. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, bazal kompartımanda bazal lamina ile direkt ilişki halinde olan diploid ($2n$) yapıda, spermatogenezis sürecinin ilkel primitif germ hücreleridir. Yaklaşık olarak 12 μm çapında olan bu hücreler kan-testis bariyerinin dışında yer almaktadır (3, 4). Spermatogenezis sürecinde gözlenen germ hücre kayıpları en yaygın olarak bu dönemde şekillenmektedir (16). Spermatogonial kök hücrelerden köken alan spermatogonyumlar puberteye kadar aktivite göstermemekte, fakat puberte ile birlikte bu hücreler mitoz bölünmeyle çoğalarak yeni hücreler oluşturmaktadır (4, 5).

Puberte döneminde insan seminifer epitelinde rutin histolojik boyamalarda çekirdeklerinin görünüşüne göre üç tip spermatogonyum ayırt edilmektedir. Bunlardan birincisi oval şekilli, güçlü bazofilik ve ince granüler kromatin içeren çekirdeklere sahip A tipi koyu spermatogonyumlardır. Bu hücreler; düzensiz aralıklarla mitoz bölünme geçirerek kök hücre olarak görev yapacak olan A tipi koyu spermatogonyumlar ile daha ileriki hücelere farklılaşacak olan A tipi açık

spermatogonyumları oluşturmaktadır. İkincisi oval şekilli, açık boyanan ve ince granüler kromatin içeren çekirdeklere sahip A tipi açık spermatogonyumlardır. Bu hücreler birkaç başarılı mitoz bölünme geçirerek sayılarını arttırmakta ve B tipi spermatogonyumlara farklılaşmaktadır (4, 5). Üçüncüsü ise B tipi spermatogonyumlardır. Bunlar ise merkezi bir çekirdekçik mevcutken vakuol bulunmayan, dağınık kromatin içeren küresel şekilli çekirdeklere sahiptir (11). B tipi hücreler ardı ardına devam eden mitoz bölünmeler geçirerek primer spermatositleri oluşturmaktadır (4, 5, 11).

3.1.3.1.1.2. Primer Spermatositler

Primer spermatositler, birinci mayoz bölünmenin başlamasından önce adlüminal kompartımana göç etmektedir (11). Bu hücreler, spermatogenik serinin en büyük hücreleridir ve çekirdeklerinde kangal oluşturma sürecinin değişik evrelerinde kromozom bulunması ile tanınmaktadır. Bunlar oluşumlarından hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girmektedir. Bu aşama yaklaşık olarak 22 gün sürdüğünden kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu dönemdeki hücrelerdir (3). Mayoz öncesinde DNA'sını kopyalayan bu hücrelerde kromozom sayısı ($4n$) ve DNA miktarı ($2d$) iki katına çıkmaktadır. Birinci mayoz bölünmenin tamamlanmasından sonra sekonder spermatositler oluşmaktadır (2, 3, 5, 11).

3.1.3.1.1.3. Sekunder Spermatositler

Primer spermatositlerden daha küçük olan bu hücrelerde kromozom sayısı yarıya inmiştir (3, 4, 7). Sekunder spermatositler, diploid ($2d$) miktarda DNA'ya sahiptir ve yeni DNA sentezlemeksizin derhal ikinci mayoz bölünmeye girerek bu

bölünmeyi tamamlamaktadır. Bu süreç çok kısa sürdüğünden histolojik kesitlerde nadiren görülmektedir. Bölünmenin tamamlanmasıyla spermatidler oluşmaktadır (3, 5).

3.1.3.1.1.4. Spermatidler

Spermatidler; haploid (n) yapıda, DNA içeriğine (1d) ve kromozom sayısına (1n) sahip hücrelerdir. Bölünmenin görülmediği bu hücreler, farklılaşma sürecinden geçerek olgun spermatozoonu meydana getirmektedir (5). Seminifer epitelde baskın olarak iki tip spermatid bulunmaktadır. Birincisi Sertoli hücrelerinin sitoplazmik oyuklarına yerleşmiş olan yuvarlak ya da erken spermatidler, ikincisi ise Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasındaki kriptlere yerleşmiş olan uzamış ya da geç spermatidlerdir. Spermatidler, seminifer tubuluslarda lümen yakınında yerleşerek; golgi evresi, kep evresi, akrozom evresi ve maturasyon evresi olarak adlandırılan başkalaşma süreçlerinden geçerek seminifer tubulusun lümenine salınan olgun spermatozoona dönüşmektedir (2, 3, 5, 11).

Golgi evresi; spermatidlerin golgi kompleksinde P.A.S. pozitif granüllerin birikimiyle karakterizedir. Glikoproteinden zengin bu proakrozom granüller birleşerek membranla çevrili akrozomal vezikülü oluşturmaktadır. Akrozomal vezikülün çekirdek membranına tutunduğu bu nokta gelişim halindeki spermiyumun ön kutbunu oluşturmaktadır. Sentriyoller ise bu noktanın aksi yönünde hareket etmektedir. Bu bölgede plazma membranıyla dik açı oluşturacak şekilde lokalize olan distal sentriol, dokuz çift periferik ve bir çift merkezi

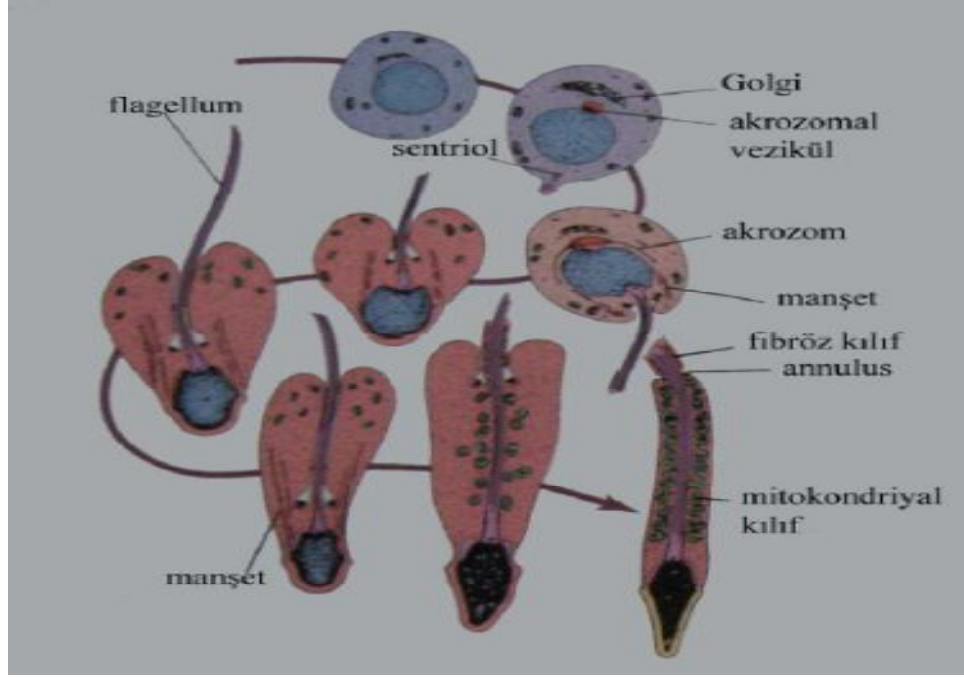
mikrotubulusa sahip olan spermiyum kuyruğunun aksonem kompleksini oluşturmaya başlamaktadır (4, 5).

Kep evresinde; akrozomal vezikülün şekli değişerek çekirdeğin ön yarımını saran akrozomal başlığı oluşturmaktadır. Bu fazda akrozomal başlığın altındaki çekirdek membranı kalınlaşarak çekirdek zarındaki porlar kaybolmaktadır (3, 4, 5).

Akrozomal evrede; spermatidler spermatozoonun baş kısmını oluşturacak tarafi bazal laminaya bakacak şekilde yön değiştirip Sertoli hücreleri içine gömülmektedir. Böylece arka kutup tubulus lümenine yöneldiğinden gelişim halinde olan flagellum lümene doğru uzamasını sürdürmektedir. Yoğunlaşan spermatid çekirdeği yassılaşmakta ve uzamaktadır. Çekirdek ve ön kısmında bulunan akrozom, hücre membranına bitişik pozisyon alırken hücre sitoplazmasının çoğu arka kutba doğru yer değiştirmektedir. Akrozomal başlığın arka kısmında perinükleer halka ve gelişmekte olan flagelluma doğru uzanan mikrotubuluslardan oluşan, manşet adı verilen yapı şekillenmektedir. Aksonemal gelişimin başlangıcından hemen sonra oluşan bu yapı spermatid çekirdeğinin yoğunlaşması ve uzaması sürecinin tamamlanmasına az bir süre kala ortadan kaybolmaktadır. Daha önce spermatidin arka kutbuna göç etmiş olan proksimal sentriol ve perisentrional matriks baş ile kuyruğu birleştiren birleştirici parçayı (boyun bölgesi) oluşturmaktadır (3, 4, 5).

Son faz olan maturasyon evresinde; spermatid içerisindeki atık cisim olarak da adlandırılan sitoplazma fazlalığı Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilmektedir. Böylece olgunlaşmamış olan spermatozoon Sertoli hücrelerinden

ayrılarak seminifer tubulusun lümenine salınmaktadır. Bu olaya spermiyasyon adı verilmektedir. Gelişimini tamamlayan spermatozoonlar fizyolojik olgunluğa epididimis içerisinde ulaşmaktadır (Şekil 3) (4, 5).



Şekil 3. Spermiyogenezisin şematik gösterimi (5).

3.1.3.1.1.5. Spermatozoonlar (Spermiyumlar)

Spermatozoon; baş, boyun ve kuyruk olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır. Kuyruk da kendi içinde orta parça, ana parça ve son parça olmak üzere üç bölüme ayrılmaktadır (3, 4, 5, 11, 15).

Baş; türler arasında oldukça farklılık gösteren bir yapıdadır. Bunun uç kısmında golgi kompleksinden köken alan özel tip lizozomal yapı (akrozom) bulunmaktadır. Akrozom; hiyaluronidaz, asit fosfataz, akrozin, asit peptidaz ve nörominidaz gibi çeşitli enzimleri içermektedir. Spermatozoon, korona radiata ve zona pelusida gibi engelleri bu enzimler sayesinde aşmaktadır (2, 3, 11).

Boyun; spermatozoonun hareket merkezi olarak kabul edilmektedir. Bir bazal plak ile başlayan boyun, baş ile eklemli bir bağlantıya sahiptir. Geriye doğru proksimal ve onun da gerisinde distal sentriyol bulunmaktadır. Distal sentriyolden, spermatozoonun kuyruğunu şekillendiren flagellum gelişmektedir (2, 3, 5, 11).

Kuyruk; orta parça, ana parça ve son parça olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır ve 40-50 µm uzunluğundadır (3, 5).

3.1.3.1.2. Sertoli Hücreleri

Destekleyici hücreler olarak da bilinen Sertoli hücreleri, testisin işlevi açısından büyük bir öneme sahiptir. Bu hücreler; gelişmekte olan spermatozoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesinde rol oynamaktadır. Ayrıca olgun spermatidlerin seminifer tubulusun lümenine salınımının kolaylaştırılması, buna ilaveten fagositoz yapma, sekresyon ve kan-testis bariyerinin oluşturulması gibi görevleri vardır (2, 3, 4, 5, 15).

Tubulus seminiferus kontortusun bazal membranına hemidesmozomlar yardımı ile bağlanan Sertoli hücreleri, kendisine bitişik olan spermatogenik hücreleri, lateral ve apikal uzantıları vasıtasıyla saran ve aralarını dolduran piramidal hücrelerdir (1, 3, 5).

Sıçanlarda, Sertoli hücrelerinin proliferasyonu fetal yaşamın 16. gününde başlamaktadır ve doğuma iki gün kala maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Doğum sırasında sıçan testisinde yaklaşık bir milyon Sertoli hücresi vardır ve proliferasyon eskisine nazaran yavaşlaşa da devam etmektedir. Postnatal 15. günde Sertoli hücre sayısı maksimum sayıya (40 milyon) ulaşmaktadır. Daha

sonra proliferasyon duraklayarak, farklılaşma başlamakta ve Sertoli hücre sayısı erişkin dönem boyunca sabit kalmaktadır. Sertoli hücrelerinin proliferasyonu, postproliferatif farklılaşması ve olgunlaşması erişkin sıçanlarda eksiksiz bir spermatogenezis oluşumu için vazgeçilmezdir (17).

Bazal membrandan tubulus lümenine doğru uzanan Sertoli hücreleri, ince granüler yapıda oldukça büyük bir sitoplazmaya sahiptir. Sitoplazmada çok sayıda yuvarlak ve çomak şekilli mitokondri, iyi gelişmiş Golgi aygıtı, lizozomlar, veziküller, lipit damlaları, glikojen granülleri ve filamanlar bulunmaktadır. Ayrıca iyi gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum ve çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum da mevcuttur. Genellikle derin bir yarık ve büyük bir çekirdekcik içeren çekirdeğin, yeri ve şekli değişkendir (2, 3, 4, 5, 11).

Sertoli hücrelerinin bazolateral kısımları birbiriyle zonula okludens ya da diğer adıyla tight junction türü sıkı bağlantılar kurarak kan-testis bariyerini oluşturmaktadır. Böylece zonula okludenslerin altında ve üstünde iki bölme şekillenmektedir. Bazal membranla zonula okludensler arasındaki alana 'bazal (ekstratubuler) kompartıman', zonula okludenslerden itibaren tubul lümeni tarafındaki alana ise 'adlüminal (intratubuler) kompartıman' adı verilmektedir (2). Spermatogonyumlar ve preleptoten spermatositler bazal bölümde yer alırken preleptoten sonrası primer spermatositler, sekonder spermatositler ve spermatidler adlüminal bölümde yer almaktadır (5, 11). B tipi spermatogonyumların mitotik bölünmeleriyle oluşan genç spermatositler bazal kompartımanda bulunmaktadır. Gelişme halinde olan bu hücreler zonula okludens adı verilen sıkı bağlantı noktalarını geçerek adlüminal kompartımana ulaşmaktadır. Bu olay şöyle gerçekleşmektedir; öncelikle genç spermatositlerin altında Sertoli hücre uzantıları

oluşmaya başlamakta ve oluşan bu uzantılar birbiriyle zonula okludens türü bağlantılar yapmaktadır. Bu arada genç spermatositlerin üzerindeki eski bağlantılar çözölmektedir. Böylece adlüminal kompartımana geçen spermatositler mayoz bölünme ve spermiyogenezisi burada tamamlamaktadır (5). Erken gelişme aşamasındaki spermatogenik hücrelerle de desmozom benzeri bağlantılar yapan Sertoli hücreleri, yine birbirleriyle de gap junction adı verilen sıkı bağlantılar oluşturarak bu yolla hücreler arasında iyonik ve kimyasal madde alışverişini sağlamaktadır (3, 4, 5).

Testis, pencereci tipte kılcal damarlara sahip olduğundan büyük moleküllerin damar dışına çıkması mümkündür. Kan-testis bariyeri, damar dışına çıkmış olan bu büyük moleküllerin, adlüminal kompartımana girmesine izin vermeyerek, burada bulunan spermatogenik hücreleri, bu maddelerin zararlı etkilerinden korumaktadır. Cinsel olgunluğa bağışıklık sisteminin gelişiminden sonra erişildiği için, farklılaşan sperm hücreleri bağışıklık sistemi tarafından yabancı olarak algılanabilmektedir. Bu durum ise germinal hücreleri yok edebilecek bir immun yanıtı yol açabilmektedir. İşte kan-testis bariyeri, gelişmekte olan sperm ile bağışıklık sistemi arasında şekillenebilecek herhangi bir etkileşimi önlemektedir. Dolayısıyla Sertoli hücrelerinin oluşturduğu bu bariyer seminifer epiteli otoimmun bir davranışa karşı korumaktadır (3, 4, 5, 18).

3.1.3.2. Leydig Hücreleri (İntersitisel Hücreler)

Leydig hücreleri yoğun asidofilik ve ince granüler sitoplazmalı, çoğunlukla hücrenin merkezi dışında lokalize olmuş büyük yuvarlak çekirdekli hücrelerdir (2, 3). Çoğunlukla yuvarlak ya da poligonal şekilli olan bu hücrelerin

küçük ve iğ şeklinde olgunlaşmamış form olarak düşünülen tipleri de mevcuttur. Leydig hücreleri, steroid sentezleyen diğer hücreler gibi lipid damlacıkları, karakteristik tubuler tip mitokondriyonlar ve gelişmiş bir granülsüz endoplazmik retikulum içermektedir (3, 5, 11, 12).

Leydig hücreleri kümeler halinde bulunmaktadır. Bu kümelerin büyüklükleri değişkendir ve çevresinde bol miktarda kılcal damar, lenf damarı ve sinirler mevcuttur (3, 4, 5).

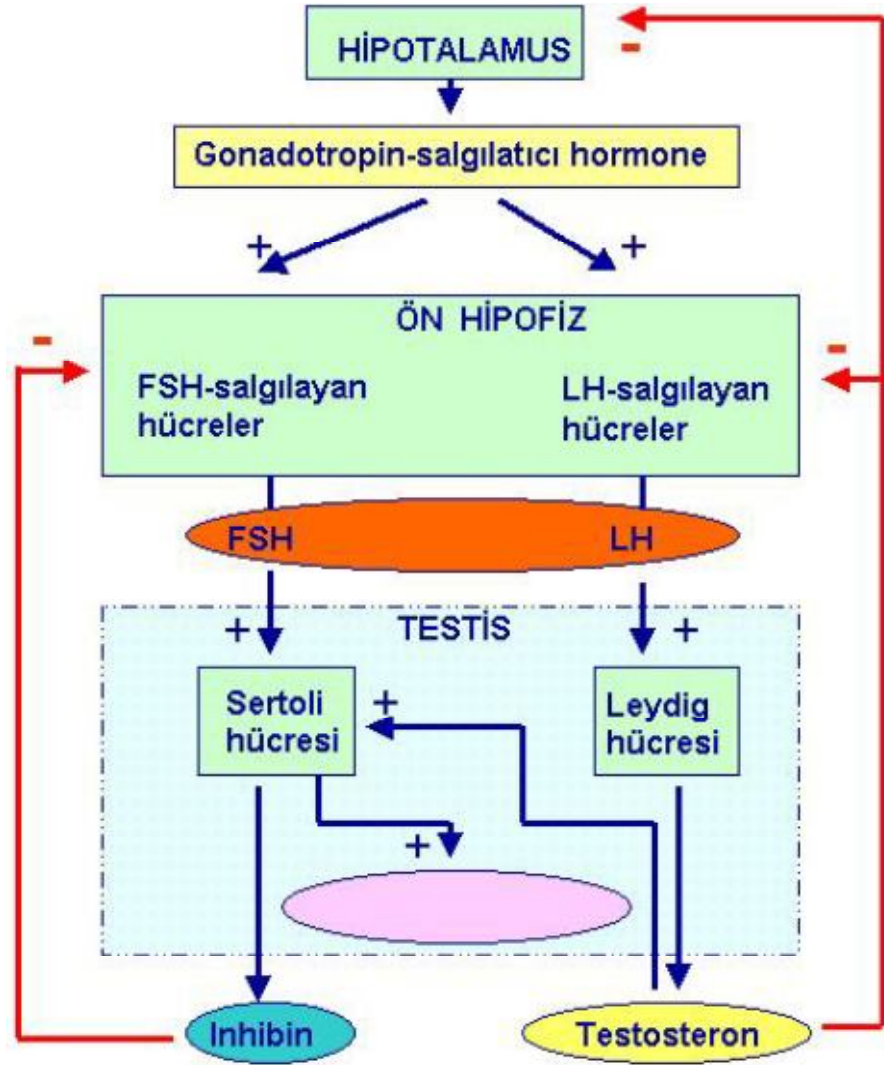
Sıçanlarda Leydig hücreleri ilk olarak embriyonik gelişimin 15. gününde ortaya çıkmaktadır ve androjen sentezi ile sekresyonu yapmaya başlamaktadır. Leydig hücreleri prepubertal dönemde, mezenşimal prekürsör hücrelerden farklılaşmaktadır. Bu farklılaşma sonucunda postnatal 28. günde morfolojik olarak belirlenebilen ilk Leydig hücreleri oluşmaktadır. Oluşan bu hücrelerin bölünmesiyle erişkin Leydig hücre popülasyonu şekillenmektedir (17).

Testisin endokrin kısmını meydana getiren bu hücrelerin en önemli görevi androjenlerin özellikle de testosteronun sentezi ve salgılanmasıdır. Leydig hücrelerince üretilen testosteron, embriyonal dönemde; gonadların normal bir şekilde gelişiminden, pubertal dönemde; sperm üretimi ve aksesuar cinsel bezlerinin sekresyonunun başlaması ile sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişmesinden ve erişkinlerde; spermatogenezisin, sekonder cinsiyet karakterlerinin ve cinsel salgı bezlerinin fonksiyonlarının devam ettirilmesinden sorumludur (4, 5). Leydig hücrelerinden testosteron sentezi ve salgılanması; hipofiz ön lobundan salgılanan LH (luteinleştirici hormon, erkekte = intersititial cell stimulating hormone= ICSH) tarafından uyarılmaktadır (4, 5, 19).

3.1.4. Erkek Genital Sistemin Histofizyolojisi

Hipotalamustan salgılanan gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH); hipotalamus ile hipofiz arasında iki yönlü akım gösteren mikrovasküler portal dolaşım yoluyla sistematik dolaşıma geçmeden, yüksek konsantrasyonlarda hipofiz ön lobuna ulaşarak buradan glikoprotein yapısındaki gonadotropik hormonların [FSH (folikül stimüle edici hormon) ve LH= ICSH] salgılanmasını sağlamaktadır. Salgılanan bu gonadotropinler kan dolaşımına geçerek testislere ulaşmaktadır. ICSH ve hipofiz ön lobundan salgılanan diğer bir hormon olan prolaktin, Leydig hücre fonksiyonlarını düzenlemektedir. ICSH, Leydig hücrelerinden androjen salgılanmasını stimüle etmektedir. Salgılanan testosteron belirli bir seviyenin üstüne çıktığında negatif geri bildirim mekanizmasıyla hem hipotalamustan GnRH, hem de hipofizden ICSH salınımını inhibe etmektedir. İnsanlarda testosteron; testiste, dolaşım kanından 200 kat daha fazla konsantrasyonda bulunmaktadır. Bu yüksek konsantrasyon, spermatogenik hücrelerin proliferasyonu ve farklılaşması için gereklidir. FSH ise Sertoli hücrelerinde bulunan reseptörleri aracılığıyla, Sertoli hücrelerinden inhibin ve aktivin gibi glikoprotein yapısındaki hormonların salgılanması sağlamaktadır. İnhibin, adenohipofizden FSH salınımını inhibe ederken aktivin stimüle etmektedir (Şekil 4) (2, 4, 5, 20).

Testosteron ve DHT'a oldukça yüksek bağlanma affinitesine sahip olan androjen bağlayıcı protein (ABP) üretimi, Sertoli hücreleri tarafından FSH ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilmektedir. Böylece seminifer tubulus içinde spermatogenezis için gerekli olan yüksek testosteron yoğunluğu sağlanmış olmaktadır (4, 5).



Şekil 4. Erkeklerde hormonal mekanizmanın şematik gösterimi (21).

3.2. Endokrin Bozucular

Endokrin bozucular; endokrin sistemin gelişimini ve fonksiyonunu değiştiren, ekzojen madde veya madde karışımlarıdır. Bu maddeler, hormonların üretim, salınım, bağlanma, taşınma, aktivite, yıkım ve vücuttan atılımları üzerine etki etmektedir. Doğada doğal olarak bulunabildiği gibi değişik sentetik ve endüstriyel ürünlerin içerisinde de yer almaktadır (Tablo 1) (22, 23).

Tablo1. Başlıca Endokrin Bozucular (24)

Fitoöstrojenler	Daidzein, Genistein, Ekuol, Zearalanon, Formononetin, vs.
Organohalojenler	Dioksinler, Furanlar, Pentaklorofenol, Hekzaklorobenzen, vs.
Pestisitler	Endosulfan, Metoksiklor, Vinklozin, Ketokonazol, Heptaklor, vs.
Fitalatlar	Di-(2-etilhekzil) fitalat, Di-etilhekzil fitalat, Butil benzil fitalat, Di-n-butil fitalat, Dietil fitalat, Di-hekzil fitalat, Di-n-fenil fitalat, Diklorohekzil fitalat, vs.
Ağır metaller	Arsenik, Kadmiyum, Uranyum, Kurşun, Civa
İlaçlar	Doğum kontrol hapları, Simetidin, Dietilstilbestrol
Diğerleri	Bisfenol A, B ve F, Etan dimetan, Sulfonat, Metanol, vs.

Temizlik malzemeleri, fungusitler (mantar ilaçları), pestisitler (zararlı canlıları öldüren ilaçlar), herbisitler (yabani otları yok eden ilaçlar) ile boyalar, plastikler ve çözücüler gibi organik kimyasalların endokrin bozucu olma potansiyeli vardır. Bu maddelerin çoğunun yağda eriyerek yağ dokusunda birikerek veya yıkılıp zararsız hale getirilmeleri işlemi zor olduğu için vücutta uzun süre kalıp zararlı etkilerde bulunabilirler (23, 25).

Endokrin bozucuların insan sağlığı ile ilgili etkileri incelendiğinde, özellikle üreme sisteminde değişik mekanizmalarla birçok patolojiye yol açtığı ve bunun dışında pek çok sistem üzerinde de etkili olduğu tespit edilmiştir (Tablo 2) (26, 27, 28, 29).

Tablo 2. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemi Dışındaki Etkileri (24)

	Dişi	Erkek
Kanser	Uterus kanseri ve meme kanseri gelişme riskinin artması, vajinal adenokarsinom, vs	Testis kanseri riskinin artması, prostat kanseri gelişme riskinin artması veya azalması
Teratojenik etkileri	İskelet kalsifikasyonları, ventriküllerde genişleme, gebelerde yavru sıçan sayısının azalması, intrauterin ölüm, abortus, vs	
Tiroid fonksiyonları	Fötal tiroid hormon bozuklukları, tiroid hormonu konjugasyon bozukluğu, serum tiroksin seviyelerinde düşüklük	
Kardiyovasküler etkiler	Trombosit agregasyon bozuklukları, vs	
Kemik	Epifizlerin erken ya da geç kapanması, vs	
Diğer	Postnatal büyüme bozuklukları, vücut ağırlığı azlığı, erkek/kız yavru oranının bozulması	

Endokrin bozucuların zararlı etkileri açısından, yaşamın hangi döneminde maruz kalındığı, maruz kalınan doz ve etkilenme süresi de önem taşımaktadır. Maruziyetin yaşamın erken dönemlerinde olması, etkilenme süresinin uzaması veya dozun artması gibi durumlarda oluşabilecek olumsuz etki daha da şiddetli olabilmektedir (23). Endokrin bozucular, gonadların intrauterin gelişiminden üreme fonksiyonlarına kadar her safhayı etkileyerek, çok çeşitli bozukluklara neden olabilmektedir (Tablo 3) (22).

Tablo 3. Endokrin Bozucuların Üreme Sistemine Etkileri (24)

Dişi	Erkek
Kuşkulu genitalya	Kuşkulu genitalya
İnfertilite	İnfertilite
Laktasyon	Hipospadias
Erken menarş	Kriptorşidizm
Erken ve geç puberte	Ektopik testis
Ovaryumda folikül atrezisi	Testis atrofi
Yenidoğanda hemorajik over	Testis ve prostat ağırlığının azalması
Hipoplastik ve atrofik uterus, vs	Seminifer tubulus atrofi, vs

Endokrin bozucuların çoğu, östrojenik etkili olmakla birlikte antiöstrojenik ve antiandrojenik etkili olan bozucular da bulunmaktadır (22, 29).

Bugün için sentetik endokrin bozuculardan bazılarının organlarda apoptotik etki yaptığı gösterilmiştir. Özellikle gonadlarda oluşan apoptotik hücre ölümünün en önemli nedenlerinden birinin oksidatif stres olduğu ileri sürülmektedir. Normal şartlarda antioksidan enzimler, organizmada oluşan reaktif oksijen radikallerini zararsız hale getirmektedir. Ancak, endokrin bozucuların çok değişik mekanizmalar ile antioksidan enzimleri inhibe ettiği ve ortamda reaktif oksijen radikallerinin artmasıyla apoptotik hücre ölümüne neden oldukları düşünülmektedir. Literatürde de erkek üreme fonksiyonları ile ilgili çalışmalarda endokrin bozucuların özellikle testiküler dokularda apoptozise yol açtığı bildirilmektedir (24).

3.2.1. Fitalatlar

Avrupa Birliği'nin 2002 yılında yayınladığı endokrin bozucular ile ilgili raporunda yüzlerce kimyasal madde içinde, çevre ve insan sağlığına zararı net olarak gösterilmiş 60 madde bulunmaktadır. Bu maddeler arasında çok önemli bir yere sahip olan fitalatlar; güçlü, sentetik endokrin bozuculardır (24, 30).

Fitalatlar, endüstride 1920 yıllarından beri birçok alanda kullanılan insan yapımı kimyasal maddelerdir. Yapısı 1,2-benzen dikarboksilik asitin dialkil veya alkil/aril esterleri olan bu maddeler, renksiz, kokusuz (veya az kokulu) ve yağlı sıvılardır. Sudaki çözünürlükleri azdır, yağda iyi çözünmektedir. Beraber kullanıldığı madde ile kimyasal bir bağ yapmadıkları için fitalatlar stabil değildir. Özellikle yüksek ısıda kolaylıkla ayrılabilmekte ve buharlaşabilmektedir (30).

Fitalatlar; plastik endüstrisinde, üretimdeki artan ticari kullanımından dolayı, bir takım plastik formülasyonlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Oyuncaklarda, bebek biberonlarında, polivinil klorid (PVC) kaplamada, gıda

paketlemede, biyomedikal aletlerde ve daha birçok alanda plastifiyan (yumuşatıcı) olarak kullanımından dolayı günlük hayatta fitalatlara maruz kalmak mümkündür. (31). Bunlar biyolojik çevrelerde tehlikeli kirleticiler olarak bulunmaktadır (32).

Bazı fitalatların; endokrin fonksiyonu bozabileceği, reproduktif ve gelişimsel toksisiteyi indükleyebileceği gösterilmiştir (33). Evlerde ve hastanelerde kullanılan birçok malzemenin içinde bulunan bu kimyasalların direkt steroid hormon yani androjen sentezini inhibe ettiği gösterilmiştir (34). Swan ve arkadaşları, erkek çocuklarda anogenital mesafe ile anne idrarındaki fitalat düzeyleri arasında bir ilişkinin olduğunu ve bu nedenle fitalatların, emzik ve oyuncakların içerisinden çıkartıldığını bildirmiştir (35).

Fitalik asit esterlerinin laboratuvar hayvanlarında fertilitiyi azalttığı ve testiküler atrofiyi indüklediği gösterilmiştir (36, 37, 38). Bu sebeple fitalik asit esterlerinin testiküler toksisitesine duyarlılıkta belirgin bir tür farklılığı olduğu belirtilmiştir (39, 40). Hatta bir türün (fare) farklı suşları arasında bile ayırt edilebilir farklılıklar olduğu görülmüştür (41).

Belirli fitalik asit türleri ile oluşturulan oral yollu toksisite; farmakolojik ve biyokimyasal olarak değerlendirildiğinde yaşa bağlı farklılıklar da görülmüştür (42). Yapılan çalışmalarda pubertal dönemdeki ratlara kıyasla prepubertal dönemdeki hayvanlarda bu toksik ajan ve metabolitin daha yüksek oranda absorbe edildiği belirlenmiştir (43). Kondo ve arkadaşları da, prepubertal ve yetişkin erkek sıçanlara fitalat verdiklerinde prepubertal sıçanların testislerinde daha belirgin hasarın oluştuğunu tespit etmişlerdir (44).

Molekül yapısında farklı sayıda alkol esteri ve dallanma yapılarak değişik amaçlar için birçok fitalat üretilmiştir. Bunlar içerisinde en çok kullanılanlar di-(2-

etilhekzil) fitalat (DEHP), diisodesil fitalat ve diisononil fitalat ile daha düşük molekül ağırlıklı olan dietil fitalat ve dibutil fitalattır. DEHP'nin yüksek etkinliği ve düşük maliyetli olması, kullanımının diğer fitalatlardan daha fazla olmasının ana nedenidir (45).

Günlük hayatta sıklıkla karşılaşılan fitalatların insan sağlığına olumsuz etkileri son yirmi yıldır yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir. En sıklıkla maruz kalınan fitalatın DEHP olması, bu fitalatın etkilerinin diğer fitalat türevlerine oranla çok daha fazla araştırılması gerekliliğini beraberinde getirmektedir.

3.2.1.1. Di-(2-etilhekzil) Fitalat (DEHP)

Fitalat türleri arasında en yaygın olarak kullanılan DEHP, ilk kez 1939'da Amerika Birleşik Devletleri'nde üretilmeye başlanmıştır (30, 46, 47). İlk yıllarda PVC ürünlerinin % 50'sinden fazlasında kullanılırken, bu miktar son yıllarda azalmaya başlamıştır. DEHP'nin 2000'li yılların başında insan sağlığına olumsuz etkilerinin belirlenmesi ile özellikle yemek paketi kapları, bebek çingirakları, diş kaşıyıcıları ve oyuncaklarda kullanımı Avrupa ve Amerika genelinde yasaklanmıştır (30).

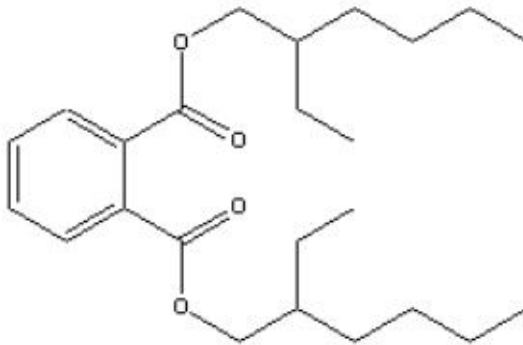
Di-(2-etilhekzil) fitalat; üretim, kullanım ve imha edilme safhalarının hepsinde doğaya karışmaktadır (48, 49, 50, 51). Yani bu maddenin önemli bir kısmı yiyeceklerde, iç oda havasında ve toprakta bulunmaktadır. Dolayısıyla omurgasız hayvanlarda, balıklarda ve bitkilerde biyolojik birikimi olmaktadır. Ancak daha gelişmiş hayvanlarda ve insanlarda metabolize olduğu için biyomagnifikasyon görülmemektedir (52).

İnsanların DEHP ile en sık etkilendiği durum besinler yoluyla olmaktadır. Besinler; üretimi, paketlenmesi ve saklanması sırasında plastik materyal ve

dolayısıyla da DEHP ile birçok kez kontamine hale gelmektedir. Anne sütünde ve mamalarda da varlığının belirlenmesi, bu maddeye maruziyetin hayatın ilk yıllarında başladığını göstermektedir (30). Besinlerden sonra en sık etkilendirme ortamı havası ile olmaktadır. DEHP aerosol partiküllere kuvvetlice bağlandığından ev ortamında bulunan tozlarda DEHP'nin varlığı belirlenmiştir. Suda çözünürlüğünün az olması ve düşük buhar basıncı nedeniyle açık havada ve suda daha az miktarda bulunmaktadır. Tıbbi malzemeler ve teknik araçların plastik özellikte olan kısımlarında en sık kullanılan fitalat türevi DEHP olduğu için (52, 53) tedavi sırasında doğrudan kana karışma yolu, DEHP'nin diğer bir kontaminasyon şekli olmaktadır (42, 54, 55, 56, 57, 58).

3.2.1.1.1. Di-(2-etilhekzil) Fitalatın Kimyasal Yapısı

Di-(2-etilhekzil) fitalat, fitalik anhidrit ile 2-etilhekzanol'un (2-EH) reaksiyonu ile üretilmektedir. Reaksiyon, bir asit veya metal katalistin varlığında ya da yüksek sıcaklıkta meydana gelmektedir (Şekil 5, Tablo 4) (59).



Şekil 5. DEHP'nin kimyasal yapısı (59).

Tablo 4. DEHP’ın Fizikokimyasal Özellikleri (59)

Özellik	Değer
Kimyasal formülü	C ₂₄ H ₃₈ O ₄
Molekül ağırlığı	390.62
Buhar basıncı	25 °C’de 1.0 × 10 ⁻⁷ mmHg
Erime noktası	- 47 °C
Kaynama noktası	386 °C
Özgül ağırlığı	0.986
Sudaki çözünürlüğü	Esasen çözünmez (3 µg/L)
Log K _{ow}	7.50

3.2.1.1.2. Di-(2-etilhekzil) Fitalatın Biyotransformasyonu

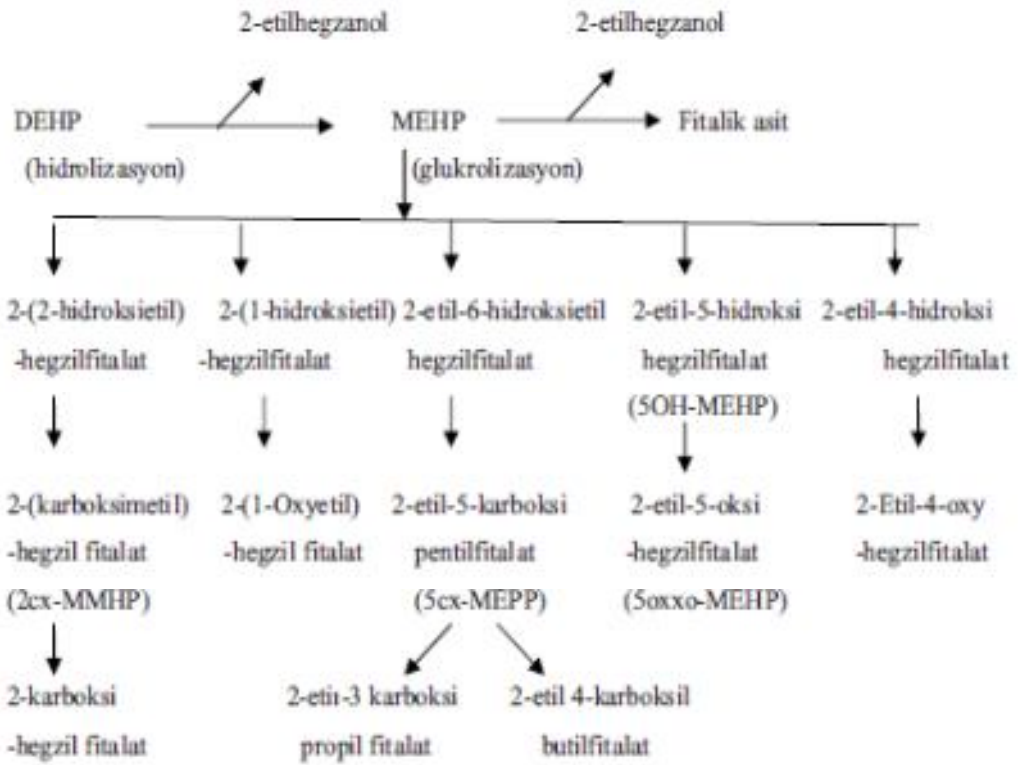
Di-(2-etilhekzil) fitalat ile yapılan biyotransformasyon çalışmalarının birçoğu hayvan deneyleri ile gerçekleştirilmektedir. İnsanlarda çalışılması etik olarak mümkün olmadığından sadece kazara bu madde ile karşılaşan veya gönüllü olarak alan kişilerde çalışmalar yapılabilir. Bu nedenle DEHP’ın metabolik yolağı ile ilgili birçok bilinmeyen nokta bulunmaktadır. Asıl temas yolunun ağız yolu olması (% 90) nedeniyle bu konuda çalışmalara daha sıklıkla rastlanılmaktadır (60).

3.2.1.1.2.1. Emilimi: İnsanlarda ağızdan alınan DEHP’ın gastrointestinal sistemden yaklaşık % 20- 25’inin emilebildiği düşünülmektedir. Deriden emilim azdır. Hayvan çalışmalarında ise ağızdan, deriden ve solunum yolu ile emilebildiği gösterilmektedir (52).

Ağızdan alınan DEHP, ince bağırsakta ve diğer dokularda nonspesifik esterazlar özellikle de pankreatik lipazlar tarafından hızlıca hidrolize edilerek veya esterifiye edilerek eşit oranda major metaboliti olan Mono-(2-etilhekzil) fitalata (MEHP) veya 2-EH’e çevrilerek emilmektedir. MEHP’ın ise testis atrofisinde asıl etken olduğu bildirilmektedir (48, 49, 61, 62, 63, 64, 65, 66).

3.2.1.1.2.2. Dağılımı: Fitalatların % 80'i kanda lipoproteinlere bağılı olarak bulunurken, albüminler ile zayıf bağı yapmaktadır. Major metaboliti olan MEHP ise serbest halde veya albuminlere bağılı halde bulunmaktadır. Fare deneylerinde tek doz, işaretlemiş intravenöz DEHP uygulamasından 24 saat sonra, madde metabolitlerinin idrar ve dışkı ile atıldığı gösterilmiş, safra yolunda da bu maddenin bulunabileceğı belirtilmiştir (52).

3.2.1.1.2.3. Metabolizma ve Eliminasyonu: DEHP ince bağırsak ve pankreas başta olmak üzere karaciğer, böbrek, deri, akciğer ve plazmada bulunan lipaz enzimi ile ana metaboliti olan MEHP'a dönüşmektedir. MEHP'ın önemli bir kısmı ileri metabolizma ile farklı sayıda oksidatif reaksiyondan geçerek 30'dan fazla metabolite ayrılmaktadır (67). Bu metabolitlerin yaklaşık % 65'i glukuronik asit ile konjuge halde idrar yolu ile vücuttan atılmaktadır. Diğer metabolitler ve nonkonjuge DEHP ise dışkı yolu ile atılmaktadır (Şekil 6) (52, 67).



Şekil 6. DEHP metabolizması ve bazı önemli metabolitleri (67).

3.2.1.1.3. Di-(2-etilhekzil) Fitalatın Toksik Etkileri

Di-(2-etilhekzil) fitalatın özellikle üreme sisteminde ciddi toksik hasarlar meydana getirdiği; ayrıca solunum sistemi, endokrin sistem, gastrointestinal sistem, üriner sistem, kardiyovasküler sistem, hematopoetik sistem, immünolojik ve lenforetiküler sistem ile nörolojik sistem üzerinde de olumsuz etkiler oluşturduğu bilinmektedir (30).

Di-(2-etilhekzil) fitalatın vücut ağırlığı üzerinde oluşturduğu olumsuz etkiler ile ilgili yapılan literatür taramalarında, canlı ağırlık kazanımını azalttığı yönünde bilgiler bulunmaktadır (68). Kemiriciler ile yapılan çalışmalarda beş gün veya daha uzun sürede 1000 mg/kg/gün dozunda DEHP alan hayvanlarda kilo kaybı görülmüştür. Kontrol grubu ile aralarında kilo alımı veya çalışmanın

sonunda ulaşılan ağırlıklar arasında %10'dan daha fazla bir fark saptanmış ve bu durum istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir (69, 70).

3.2.1.1.3.1. Üreme Sistemi Üzerine Etkisi

Çevresel endokrin bozucu kimyasallar arasında yer alan DEHP, erkek üreme organlarında en yaygın olarak çalışılan toksik maddelerden birisidir (48, 49, 64). Shaffer ve arkadaşlarının bir hayvan modelinde DEHP ile indüklenen testiküler hasarın varlığını ortaya koymasıyla beraber bu alanda geniş çalışmaların yapılmaya başlandığı bildirilmiştir (71). Deneysel çalışmalarda bu maddenin testislerde ve seminifer tubuluslarda atrofiye, ayrıca testis ağırlığında ve fertilitede azalmaya sebep olduğu kesinlik kazanmıştır (31, 38, 48, 49, 72). DEHP'in ayrıca üreme sisteminin diğerk parçaları olan vezikula seminalis, epididimis ve prostat bezinin ağırlıklarında da azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir (73, 74, 75).

Yapılan literatür araştırmalarında DEHP'in spermatogenik bozukluğu indüklediği ileri sürölmüştür (52, 76, 77). Buna ilavaten spermatogenezis sürecinin devamı için gerekli olan Sertoli hücrelerinin fitalatların primer hedefi olduğu literatürlerle ortaya konmuştur (36, 37, 78, 79). Bu fitalatların, hem Sertoli hücreleri arasındaki hem de bu hücreler ile germ hücreleri arasındaki iletişimi zayıflatarak Sertoli hücre bağılantı komplekslerini bozduğu; bu bozukluğa bağılı olarak da apoptozis yoluyla germ hücre kayıplarının ve Sertoli hücre fonksiyon değışikliklerinin olduğu ifade edilmiştir (68, 80).

Üreme sistemi üzerinde DEHP'in meydana getirdiği toksik etkilerin en fazla göröldüğü dönem, gelişim ve maturasyonun hızlı olduğu intrauterin (fetal)

ve pubertal dönemlerdir (30). Gebelik ve laktasyon dönemlerinde DEHP uygulanan sıçanların yavrularında penil morfolojik anomaliler (hipospadias), kriptorşidizm, testiküler ve epididimal atrofi veya agenezis, küçük veya hiç olmayan aksesuar cinsiyet organları, anogenital mesafede azalma, kalıcı meme büyümesi veya kadınsı meme başı gibi androjen hassas organlarda etkilenim olduğu gösterilmiştir (81). Özellikle gelişim dönemindeki hayvanlarda; DEHP'in bu antiandrojenik etkilerinin görülmesi, daha çok testis dokusunda zedelenme sonucu intrauterin testosteron eksikliğine yol açmasına bağlı olabileceğini, androjen reseptörleri üzerine belirgin bir etkisinin olmadığını düşündürmektedir (67, 82). Ayrıca DEHP etkilenimi olan sıçanların intrauterin ve postnatal testis boyutları ile testosteron seviyelerinin kontrol grubuna göre daha az olduğu saptanmıştır (83). DEHP indüklü testiküler toksisiteye karşı pubertal hayvanların erişkin hayvanlara göre daha duyarlı oldukları yani DEHP'in pubertal gelişim üzerine de etkisinin bulunduğu tespit edilmiştir (84). Puberteden önce DEHP teması kesildiğinde ise değişikliklerin geri dönüşümlü olabildiği belirtilmiştir (30).

3.2.1.1.3.1.1. Testis ve DEHP İndüklü Oksidatif Stres

Oksijen, canlılar için hayati önemi olan bir moleküldür ve hücrede enerji üretim süreçlerinde kullanılmaktadır. Serbest oksijen radikalleri ise, enerji üretim süreçlerinin doğal bir yan ürünü olup yüksek düzeyde reaktif ve potansiyel olarak zararlı maddelerdir (85). Serbest radikaller hücrelerde DNA'ya, proteinlere ve lipidlere saldırarak zarar vermektedir. Serbest radikallerin zararlı etkilerinden korunmak için hücreler bunları nötralize eden antioksidanlar üretmektedir. Serbest

radikallerin oluşum hızı ve bunların antioksidanlar tarafından nötralize edilme hızı arasında bir denge bulunması beklenmekte ve böylece hücre serbest radikallerin olumsuz etkilerinden korunmaktadır. Eğer bu denge serbest radikaller lehine bozulursa, yani yapımdan daha yavaş nötralize edilirlerse, hücrede serbest radikaller artmaktadır. Serbest radikallerin hücrede artışı ve hücre fonksiyonları üzerinde yaptıkları olumsuz etkiye ‘oksidatif hasar veya stres’ adı verilmektedir (86).

Spermatogenezis, saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyal oksijen tüketimini göstermektedir. Ancak bu dokudaki düşük oksijen miktarı, hem spermatogenezis hem de Leydig hücresi steroidogenezisinde oksidatif stres oluşturacağı için, testis kendisini serbest radikallerin hasarından koruyabileceği mekanizmalar geliştirmektedir (87, 88). Testis bu korunmayı sağlamak için süperoksit dismutaz (SOD) ve katalaz (CAT) gibi çeşitli antioksidan enzimlerin yanı sıra çinko, E ve C vitaminleri, melatonin ve sitokrom c gibi serbest radikal temizleyicilerini içermektedir (89). Antioksidan enzimler, reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı hücresel savunmanın gerekli bir kısmıdır. SOD, plazma membranının lipid peroksidasyonunu (LPO) önleyerek hem ekstrasellüler hem de intrasellüler süperoksit anyonunu temizlemektedir (90). ROS’ne karşı bireysel savunmanın ikinci sırası çeşitli peroksitlerin detoksifikasyonuna neden olan ve sperm membranında LPO etkisini inhibe eden, GSH/ GSSG oranını sürdüren glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutatyon redüktaz (GR) tarafından sağlanmaktadır (91). Oksidatif stres, testiste germ hücre apoptozisini indükleyen büyük faktörlerden

birisi olduğu için bu organ glutatyon (GSH), askorbik asit ve E vitamini gibi antioksidanların oldukça yüksek konsantrasyonlarına sahiptir (92, 93). Bu antioksidanlar oksidatif DNA hasarına karşı germ hücrelerini korumakta (94) ve spermatogeneziste önemli roller oynamaktadır (95, 96). Bu gerçekler oksidatif strese karşı savunma mekanizmasının spermatogenezisin sürdürülmesinde ve testiküler atrofinin önlenmesinde kritik roller oynadığını işaret etmektedir. Fakat testis atrofisine sebep olan tehlikeli stresten germ hücrelerini koruyan antioksidanların mekanizması belirsiz kalmaktadır (38).

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, molekül ağırlığı düşük ve çok etkin moleküller olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller hidroksil, süperoksit, nitrik oksit ve lipid peroksit radikalleri gibi değişik kimyasal yapılara sahiptir. Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Oksijen, süperoksit grubuna ($O_2^{\cdot -}$) bazı demir-kükürt içeren yükseltgenme-indirgenme enzimleri ve flavoproteinlerin etkisiyle indirgenmektedir. Son derece etkin olan ve hücre hasarına yol açan süperoksit grubu, bakırlı bir enzim olan SOD aracılığıyla H_2O_2 ve oksijene çevrilmektedir. Süperoksit grubundan daha zayıf etkili olan H_2O_2 , dokularda bulunan CAT, peroksidaz ve GSH-Px gibi enzimlerle su ve oksijen gibi daha zayıf etkili ürünlere dönüştürülerek etkisiz kılınmaktadır (86).

Nitrik oksit (NO) vasküler endotelden kaynaklanan önemli bir serbest radikal moleküldür. Bu madde vazodilatasyonu düzenlemekte ve apoptozisin indüklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (97). NO düşük dozlarda fizyolojik olayların farklılaşmasında biyolojik mediatör olarak fonksiyon yapmaktadır, yüksek dozlarda ise DNA hasarı ve hücre ölümüne sebebiyet vermektedir. NO'nın

DNA’da pürin ve pirimidinin deaminasyonuna neden olarak DNA zincirinde kırılmaya ve mutasyonlarda artışa sebep olduğu bildirilmektedir (98). NO’nin oksidatif DNA hasarını tetiklemesiyle (99) veya DNA tamir mekanizmalarını inhibe etmesiyle apoptozis sürecinin başladığı ileri sürülmektedir (100).

Nitrik oksit üretiminden sorumlu enzim olan Nitrik oksit sentazın (NOS) artan seviyesi, fazla miktarda NO üretimine yol açmaktadır (101). NOS, nöronal (nNOS), endotelial (eNOS) ve indüklenebilir (iNOS) olmak üzere 3 büyük izoforma sahiptir. eNOS Ca^{2+} bağımlıdır ve testisler dahil birçok dokuda ortaya çıkarken, iNOS Ca^{2+} bağımsızdır ve inflamator sitokinler veya iskemi maruziyetinden sonra dokularda indüklenmektedir (102). eNOS, testiste Leydig hücreleri, Sertoli hücreleri, spermatositler ve spermatidlerde belirlenebilmektedir (101, 103). NO ve NOS’ın sperm motilitesi, germ hücre apoptozisi ve maturasyonu, Sertoli hücresinin tight junction bağlantıları ve Leydig hücre steroidogenezisi gibi fonksiyonların bir kısmını düzenlediği düşünülmektedir (104).

Testis; hem spermatogenezis hem de steroidogenezis süreçlerini desteklemek amacıyla antioksidan açıdan korunmasına rağmen, bazı endojen ve ekzojen faktörlerin bu savunmayı alt üst ettiği ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir. Meydana gelen rahatsızlıklar; kriptorşidizm, testiküler torsiyon, varikosel, hipertiroidizm, diyabet, enfeksiyon, reproduktif hormon dengesizliği ve zenobiyotiklerin etkisidir (105, 106). Ayrıca erkek germ hücresinin membranı çoklu doymamış yağ asitlerinden zengin olduğu için özellikle LPO’na meyillidir (107) ve dolayısıyla bu hücrelerde, serbest radikaller tarafından oluşturulan spermatozoa hasarının duyarlılığında yüksek seviyedeki DNA sentezi ve hücresel

proliferasyon da aynı zamanda önemli bir rol oynamaktadır (108, 109). Reprodüktif sistemde oluşan bozukluklar sonucunda; erkek germ hücre hattında ve spermatozoada DNA hasarı, testiküler antioksidan enzim aktivitesinin bozulması, oksidatif stres ve LPO'nun indüklenmesi, ROS temizleyicilerinin kaybı, testiküler SOD ve CAT baskılanması gibi olumsuz etkiler görülmektedir (89).

Di-(2-etilhekzil) fitalat uygulamasının testiste oksidatif stresi tetikleyerek serbest radikal üretimini arttırdığı ve bu radikallerin de seminifer tubulus epiteline zarar verdiği bildirilmiştir. Rat testisinde oral yollu DEHP toksikasyonuna bağlı olarak GSH ve askorbik asit azalmasıyla birlikte, ROS'nin (O_2^- ve H_2O_2) arttığı belirlenmiştir (38). Yine başka bir çalışma DEHP'in antioksidanların hücresel seviyelerini azaltmasına karşın, kültüre edilmiş hepatositlerde LPO'nu arttırdığını göstermiştir (58).

Testiküler dokulardaki oksidatif durum, LPO ile indüklenmiş ROS'nin direkt bir indikatörü olan malondialdehit (MDA) konsantrasyonlarından tahmin edilebilmektedir (110, 111). DEHP uygulanan ratların testislerinde ayrıca, antioksidan seviyelerinde düşme ve GSH-Px ve CAT gibi antioksidan enzim aktivitelerinde yükselmenin görülmesi oksidatif stresin arttığını göstermektedir. Biyokimyasal çalışmalar da, DEHP uygulanan hayvanların testis ve serum örneklerinde, çinko, askorbik asit ve oksidatif stresin önemli bir indikatörü olan GSH konsantrasyonlarının azaldığını bildirmektedir (38, 112).

Testosteron, testiste spermatogenezisin sürdürülmesinde kritik rol oynayan bir hormondur (76). Spermatogonial/ spermatosit gelişiminde önemli bir görevi

olan testosteron Leydig hücreleri tarafından ICSH stimülasyonu altında salgılanmaktadır (113). DEHP uygulanan hayvanların serum analizlerinde Leydig hücre disfonksiyonunun varlığı işaret edilerek testosteron seviyelerinde belirgin bir azalmanın olduğu gösterilmektedir (114, 115).

3.2.1.1.3.1.2. Testis ve DEHP İndüklü Apoptozis

Apoptozis, bir hücrenin programlı ölümüne yol açan fizyolojik bir süreçtir. Bu süreç canlılarda normal spermatogenezis için gereklidir (116). Ancak testis; hipertermi, inflamasyon, radyasyon, testiküler toksik madde ve germ hücre apoptozisini indükleyen çeşitli stres faktörlerine maruz kalarak oksidatif hasara uğramaktadır (38, 74, 117, 118). Bu peroksidatif hasar sonucunda artan NO, süperoksit anyonları, hidroksil radikalleri gibi çeşitli toksik serbest radikaller, DNA yapısında ve endotelde hasar oluşturarak germinal hücre apoptozisine sebep olabilmektedir (106, 119, 120).

Apoptozis klasik olarak, hücre ölüm reseptörleri olarak bilinen Fas ve TNFR-1'in (Tümör Nekroz Faktör Reseptör-1) ilgili ligandları ile uyarılması sonucu indüklenmektedir. Bu hücre yüzey reseptörleri membranda bulunmaktadır ve TNFR (Tümör Nekroz Faktör Reseptör) ailesinin üyesidir. Fas; lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, bazı tümör hücrelerinde, akciğerlerde, hatta miyokarda bulunmakta ve ilgili ligandına FasL (Fas ligand) adı verilmektedir. FasL, TNF (Tümör Nekroz Faktör) ailesinin bir üyesidir ve sitotoksik T lenfositleri ile NK (Natural Killer) hücrelerinde bulunmaktadır. Fas ve TNFR-1; ligandlarıyla bağlandıklarında ölüm uyarısı almış olan bir seri protein, protein interaksiyonlarından geçmektedir. Öncelikle kendilerine doğal olarak bağlı

bulunan ve ölüm bölgeleri (death domain) adı verilen TRADD (TNFR-1 associated death domain) ve FADD (Fas associated death domain) ile interaksiyona girmektedir. Bu ölüm bölgeleri ise prokaspaz 8'i aktifleştirerek kaspazların kaskad tarzında aktivasyonlarını başlatmaktadır. Hücre içinde ayrıca bu ölüm bölgelerini inhibe eden bazı proteinler de bulunmaktadır (121, 122).

Apoptozis genotoksik ajanların etkisiyle oluşturulan ağır DNA hasarına yanıt olarak apoptozisin bir modülatörü olan p53 proteininin indüksiyonuyla da başlatılabilmektedir. İndüklenen p53, bir pro-apoptotik Bcl-2 ailesi üyesi olan Bax'ın indüksiyonuna yol açarak apoptozisi başlatmaktadır. p53 Bax'ın indüksiyonu haricinde ayrıca Fas ve DR5 gibi hücre yüzey ölüm reseptörlerinin indüksiyonuna neden olarak da apoptozisi başlatabilmektedir. Apoptozis ayrıca oksidatif stres sonucu açığa çıkan ROS'nin mitokondri, plazma membranı ve genom üzerinde oluşturabileceği hasarlara bağlı olarak da başlatılabilmektedir (123).

Hayvanlarda nongenotoksik epigenetik bir karsinogen olduğu bilinen DEHP'nin geri dönüşümlü olarak intersellüler gap junctional iletişimi inhibe ettiği ve bu sebeple hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve apoptozisi üzerinde etkisi olduğu belirtilmektedir (124). DEHP tarafından tetiklenen spermatogenik bozukluğun mekanizmasının detayları tam olarak açıklanamamıştır. Ayrıca DEHP toksikasyonunda testislerdeki atrofinin nedeni spermatosit apoptozisi olmasına karşın, germ hücrelerini apoptozise götüren yol da tam olarak aydınlatılamamıştır (38). Apoptotik hücre ölümünde; kalsiyum- kalmodulin bağımlı protein kinaz-fosfataz sisteminin, kalsiyum bağımlı endonükleaz veya membran LPO'nun

uyarılmasının DNA kırılması ve hücre ölümüne neden olan mekanizmalar olduğu ileri sürülmektedir (99).

3.3. Ginkgo Biloba

Ginkgo biloba (*Syn. Salisburia adiantifolia Sm. S. biloba Hoffmag*), 30 m. boyunda yapraklarını döken ve vatanı Çin olan dioik bir ağaçtır. Ginkgoiaae sınıfının dünyada yetişen tek üyesi olup aynı zamanda Mabet ağacı, Kızsaçı ağacı ve Japon Eriği adlarıyla da bilinmektedir. Cins adı Japonca Yin-Kwo = gümüş renkli meyveden gelen Ginkgo biloba, Japonya ve Çin’de kutsal bitki olarak kabul edilmekte ve tapınakların etrafında yetiştirilmektedir (125).

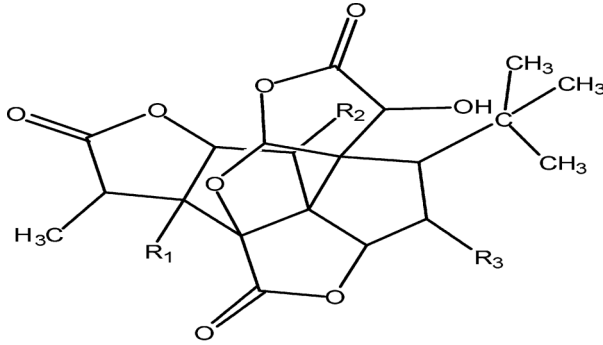
Ginkgo biloba, varlığını sürdüren hiçbir yakın türü bulunmayan, benzersiz bir ağaçtır (126). Günümüzde Asya, Avrupa, Kuzey Amerika, Yeni Zelanda ve Arjantin’de yaygın olarak yetiştirilmektedir (127). Ginkgo yapraklarının ekstraktı film kaplı tabletler, oral sıvılar veya enjektabl solüsyonlar şeklinde Avrupa ve Amerika’da temin edilebilmektedir (128).

3.3.1. Ginkgo Biloba Yapraklarının Kimyasal Bileşenleri

Ginkgo biloba yaprakları çok sayıda kimyasal bileşen içermektedir ve bu yaprak ekstraktının ana bileşenleri olan ginkgolidler diterpen terpenoidlerdir (Tablo 5). Ginkgolidler aynı moleküler geometrik iskelete sahip olmalarına rağmen hidroksil fonksiyonel gruplarının sayısı ve geometrik yerleşiminden kaynaklanan yapısal farklılıklar bulunmaktadır (Şekil 7) (128).

Tablo 5. Ginkgo Biloba Yapraklarının Ana Bileşenleri (129)

Etken madde grubu		Bileşikler
Terpenoidler	Diterpenler	Ginkgolidler A, B, C, J, M
	Seskiterpen	Bilobalid
	Triterpenler	Steroller
Flavonoidler (Flavonoller, Flavonol glikozitleri ve Aglikonlar)		Kaemferol, Rutin, Luteolin vs.
Biflavanoidler		Ginkgetin, İsoinkgetin vs.
Organik asitler		Benzoik asit türevleri (ginkgolik asit) vs.
Poliprenoller		di-trans-poli-sis-octadekaprenol
Diğerleri		Kardoller, Stereoidler, Fenoller vs.

**Ginkgolides**

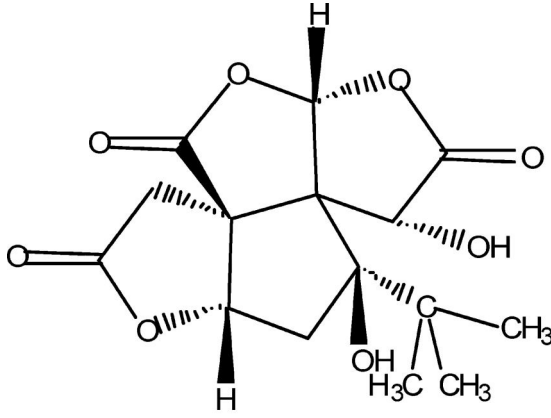
	R1	R2	R3
Ginkgolide A	OH	H	H
Ginkgolide B	OH	OH	H
Ginkgolide C	OH	OH	OH
Ginkgolide J	OH	H	OH
Ginkgolide M	H	OH	OH

Şekil 7. Ginkgolidlerin kimyasal yapısı (128).

Ginkgo biloba yapraklarının bir diğer ana bileşeni olan bilobalid ise seskiterpen terpenoid sınıfındandır (Tablo 5, Şekil 8). Bilobalidin biyogenezi hala açıklanamamış olup ginkgolidlerin degradasyon ürünü olabileceği düşünülmektedir (128).

Ginkgo bilobanın temel bileşenleri olan hem ginkgolidler hem de bilobalid, ginkgo bilobanın biyolojik ve/veya farmakolojik aktivitelerini sergilemektedir. Flavanoidler ise, çoğunlukla glikozit türevleri olarak meydana

gelmektedir. Ginkgo bilobanın içerdği temel flavanoidler kuersetin, kaemferol ve izoramnetindir ve bunlar yapısal olarak birbirlerine yakındır (128).



Bilobalide

Şekil 8. Bilobalid'in kimyasal yapısı (128).

Ginkgo bilobanın gerek yaprakları gerekse meyveleri tedavi edici özelliklere sahip olmasına rağmen toksik etkili bileşikler de taşımaktadır. Bu toksik maddelerin başında Ginkgolik asitleri gelmektedir. Ginkgolik asitleri potent allerjenler olarak nitelendirilmektedir. Taze tohumlar temas sonucu dermatit ve allerjik reaksiyona neden olmaktadır. Ginkgo yaprakları da alerjen etkili bu grup bileşikleri taşımakta olup, hazırlanan ekstrede bunların uzaklaştırılması işlemi uygulanmaktadır (130).

3.3.2. Ginkgo Biloba Yapraklarının Ticari Ekstraktları

Ginkgo biloba yapraklarının ticari ekstraktları su- aseton veya su- etanol ile zenginleştirilerek flavanoid veya terpen trilakton içeriklerinde standardize edilmiştir. Standardize edilmiş ekstraktlar; % 22- 27 flavonoid glikozitler, % 5- 7 terpen laktonlar (yapısında % 2.8- 3.4 ginkgolid A, B, ve C ile % 2.6- 3.2 bilobalid bulunan) ve 5 mg/kg'dan (5 ppm) daha az ginkgolik asitleri içermektedir (131). Kuru yapraklarından, aseton- su ile hazırlanan ekstreler temizleme işlemi yapıp etkin madde konsantrasyonu artırılarak kullanılmaktadır.

3.3.2.1. Ginkgo Biloba Ekstrakt 761 (EGb 761)

Flavonoid glikozitler ve terpenoidler gibi iki büyük fonksiyonel bileşimi içeren, standardize ve konsantre edilmiş kimyasal bir ürün olan EGb 761, son zamanlarda farmakolojik olarak hazırlanmıştır (132, 133). Bu standardize edilmiş ekstrakt ya da patentli ticari adıyla EGb 761'in sentezi 27 basamaklı bir ekstraksiyon işlemini gerektirmektedir. Bu işlemin son ürünü, % 24 flavonoid glikozitleri (kuersetin, kaemferol, izoramnetin vb.), % 6 terpenoidleri (yapısında % 3.1 ginkgolid A, B, C, ve J ile % 2.9 bilobalid bulunan), % 5- 10 organik asitleri ve diğer bileşenleri içermektedir (125, 126). Ginkgo biloba yaprak ekstraktının belirtilen terapötik etkisi muhtemelen terpen trilaktonlar (ginkgolidler ve bilobalid) ve flavanoid glikozitler ile sağlanmaktadır (131).

Ginkgo biloba ekstrakt 761, önce Almanya daha sonra diğer Avrupa ülkelerinde ruhsatlandırılmıştır (134). Standardize edilmiş ve temizlenmiş olan bu ekstre günümüzde 30 ülkede kaveri, ginkgold vb. gibi değişik isimler altında satışa sunulmaktadır. Bunun yanında değişik yapıda yaklaşık 24 farklı ticari isimde Ginkgo biloba yaprak ekstresi Amerika' da satılmaktadır (130). Türkiye'de ise bu ekstrenin 9 preparatı bulunmaktadır (125).

3.3.3. Ginkgo Bilobanın Biyolojik Etkileri

Ginkgo bilobanın biyolojik aktivitesi için çok sayıda aktif maddenin meydana getirdiği ortak etki anlamında olan polivalent etki deyimi kullanılmaktadır. In vivo ve in vitro farmakolojik çalışmalar, bu polivalent etkinin damar ile dokuyu koruyucu ve algılamayı arttırıcı etki olmak üzere iki şekilde meydana geldiğini ortaya koymaktadır (134).

Kardiyovasküler sistem üzerine etkisi bulunan Ginkgo biloba; Avrupa, Amerika ve diğer ülkelerde, yaşlılığa bağlı hafıza kaybı, Alzheimer algılama kayıpları, bunama, performans bozuklukları, kulak çınlaması ve baş dönmesi gibi merkezi sinir sistemi hastalıklarında da günümüzde sıkça kullanılmaktadır (135, 136, 137, 138).

Ginkgo biloba yaprak ekstraktının biyolojik etkileri; nörolojik bozukluklar ve nöral hasarın düzeltilmesi, kan akımının arttırılması, antagonizma ve anti-inflamatuvar etkinin oluşturulması, anksiyete gelişiminin engellenmesi, ilaç metabolizması enzimlerinin modülasyonu ve bitki- ilaç etkileşimlerinin oluşumu, antitümoral ve antimikrobiyal aktivitenin geliştirilmesi, antioksidan etki ile ilaç, kimyasal ve ağır metaller ile indüklenmiş toksisiteye karşı koruyucu etkilerin oluşturulmasını içermektedir (128).

Ginkgo biloba yaprak ekstraktı; antioksidan etkileri, platelet aktive edici faktörün inhibisyonunu, membran akışkanlığında değişiklikleri (sinyal transdüksiyonu) ve glukokortikoid sentezinin inhibisyonunu içeren birkaç mekanizma aracılığıyla görev yapabilmektedir. Ginkgo biloba yaprak ekstraktının belirtilen faydalı etkileri, temel etki mekanizmalarının biri veya birçoğunun kombinasyonu ile kanalize edilebilmektedir. Yapısındaki flavanoid bileşenlerinin; kapillar kırılabilirliğe karşı korumada antioksidan ve anti-inflamatuvar ajanlar olarak, doku yaralanması ile oluşan ödemi azaltmada ise serbest radikalleri temizleyiciler olarak rol oynadıklarına inanılmaktadır (128, 139, 140, 141).

Ginkgo biloba ekstraktının hayvan ve insanlarda serbest radikalleri temizlemesi ve oksidatif stresi azaltması ise antioksidan özellikleri ile ilişkilidir

(142, 143). Ginkgo bilobanın bu özelliğinden dolayı radyasyon ile indüklenmiş kromozom hasarına karşı koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir (144).

Ginkgo biloba bileşenlerinin farmakolojik, reproduktif, biyokimyasal ve sitolojik etkileri ile ilgili bilgiler mevcuttur (137, 145, 146, 147). Testiküler germ hücre apoptozisi ile ilgili çalışmalar EGb 761'in testiküler hasara ve apoptozise karşı koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (148, 149). EGb 761'in apoptozisle ilişkili genlerin etkisini hafiflettiği, serbest radikallerin üretimini azalttığı ve çeşitli tipte hayvansal doku ve hücrelerde antioksidan enzimlerin aktivitesini arttırdığı (110, 132, 139), eksojen toksik uyarımın sonucuna karşı ise hücre koruyucu ajan olarak kullanıldığı gösterilmiştir (149).

Yapılan çalışmalar, çevresel endokrin bozucu bir kimyasal olan DEHP ile etkilendirme sonucunda öncelikli olarak üreme sisteminin etkilendiğini ve DEHP'in antiandrojenik ve/veya östrojenik etkiler gösterdiğini öne sürmektedir. DEHP'in üreme sisteminde meydana getirdiği bu toksik etkilere, pubertal döneme kıyasla prepubertal dönemin daha duyarlı olduğu ve oluşan hasarın da daha şiddetli olarak görüldüğü bilinmektedir. Günlük yaşantımızın birçok alanında plastik ürünlerin kullanıldığı ve plastik içeren maddelerin büyük çoğunluğunda da DEHP olduğu düşünülürse sağlık açısından ne kadar çok risk altında olunduğu açığa çıkmaktadır. Tüm bu bilgilerden yola çıkılarak, sunulan çalışmada DEHP'in prepubertal dönemdeki rat testisinde oluşturduğu subakut toksisite üzerine güçlü antioksidan ve antiapoptotik özellikleriyle bilinen EGb 761'in koruyucu etkisinin hem ışık mikroskopik düzeyde hem de biyokimyasal olarak incelenmesi ve yeni araştırmalara ışık tutması amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4. 1. Gereç

4.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Beslenme sondası 50 cm, 6 numara (Kaishou)

Enjektör 5, 10 ml (Ayset)

Jel ve pıhtı aktivatörü jelli tüp 8.5 ml (Improve)

Hassas terazi 0,01g- 500g (Gibertini)

Soğutmalı santrifüj (Hettich Universal 320 AR)

Derin dondurucu -21 °C (Arçelik 2553 D)

Manyetik karıştırıcı (Kotterman)

Etüv (Herdeus)

PH metre (Consort C533)

Kızaklı mikrotom (Reichert)

Su banyosu (Nüve NB 5)

Poli- L- lizin kaplı lam 25x75 mm (Patolab)

1/4'ü tıraşlanmış lam 25x75 mm (Isolab)

Mikropipet 5- 50 µl (Jencons Sealpette), 100- 1000 µl (Medispec- plus)

Mavi ve sarı pipet ucu (Isolab)

Fotomikroskop (Olympus BX- 51)

Spektrofotometre (UV- 1700 Shimadzu)

ELISA Reader (Diareader ELX 800 NB)

4.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Di-(2-etilhekzil) ftalat (DEHP) (Acros, New Jersey, USA)

Ginkgo biloba ekstrakt 761 (EGb 761) Teboka® Fort 50 ml Damla (Abdi İbrahim, İstanbul, TÜRKİYE)

Mısır yağı (Sigma- Aldrich St. Louis, MO, USA)

In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche, Mannheim, GERMANY)

Tunel Dilution Buffer (Roche, Mannheim, GERMANY)

UltraVision Detection System Anti-Polyvalent, HRP/AEC (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA)

Proteinase K (Roche, Mannheim, GERMANY)

Aqueous mounting medium (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA)

Liquid blocker PAP pen (Daido Sangyo, Tokyo, JAPAN)

ELISA Testosteron kiti (Dia Metra, İTALYA)

% 96, % 100 Ethanol (Merck, ALMANYA)

Xylol (Carlo Erba, İTALYA)

Parafin (Merck, ALMANYA)

4.1.3. Hayvan Materyali

Bu çalışmada Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırmalar Merkezi (FÜDAM)'nden temin edilen 28 günlük (4 haftalık) prepubertal (cinsel olgunluk öncesi) dönemdeki (ortalama 60 g) 72 adet Wistar albino cinsi erkek rat kullanıldı. Aynı birimde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık, 22 ± 1 °C sıcaklık ve % 55 ± 5 rutubetli ortamın sağlandığı klimalı odalarda barındırılan ratlara, standart ticari rat pellet yemi (Elazığ Yem Fabrikası, Elazığ, TÜRKİYE) ve musluk suyu *ad libitum* olarak verildi. Deneysel uygulamalara başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu (FÜHADEK)'nden onay alındı (Toplantı tarihi: 07.07.2010, Toplantı sayısı: 2010/11, Karar no: 64) ve yönergede yer alan etik ilkelere uyularak çalışma gerçekleştirildi.

4.1.3.1. Deney Grupları

Deney hayvanları her grupta 18 adet olacak şekilde rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı ve çalışma süresi 28 gün olarak belirlendi.

1. Grup (Kontrol): 28 gün boyunca kontrol grubu hayvanlarına gün aşırı olarak sadece 5 ml/kg miktarında mısır yağı gastrik gavaj yoluyla uygulandı.

2. Grup (DEHP): Uygulamanın ilk 14 günü boyunca gün aşırı olarak 5 ml/kg mısır yağı içerisinde 2 g/kg dozunda DEHP çözdürülerek gastrik gavaj yoluyla hayvanlara verildi. Geriye kalan son 14 gün boyunca ise yine gün aşırı ve gastrik gavajla sadece 5 ml/kg mısır yağı uygulandı.

3. Grup (DEHP + EGb 761): Uygulamanın ilk 14 günü boyunca deney hayvanlarına gün aşırı olarak 5 ml/kg mısır yağı içerisinde 2 g/kg dozunda DEHP

ve 1 saat sonrasında 50 mg/kg dozunda EGb 761 gastrik gavaj yoluyla verildi. Geriye kalan 14 gün boyunca ise yine gün aşırı ve gastrik gavajla sadece 50 mg/kg dozunda EGb 761 uygulaması yapıldı.

4. Grup (EGb 761): 28 gün boyunca gün aşırı olarak 50 mg/kg dozunda EGb 761, gastrik gavaj yoluyla deney hayvanlarına uygulandı.

Çalışmada kullanılan DEHP'in dozu Park ve arkadaşları (150); EGb 761'in dozu ise Akgül ve arkadaşları (106) tarafından önerilen dozlara göre belirlendi. Hayvanların canlı ağırlıkları ise haftalık olarak tartılarak sonuçlar kaydedildi.

4.2. Yöntem

4.2.1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Çalışmanın 7., 14., ve 28. günlerinde her gruptan 6'şar adet hayvanın önce canlı ağırlıkları tartılarak kaydedildi. Daha sonra dietil eter ile derin bir şekilde anestezi edildi ve kalpten punksiyon yoluyla steril, jelli ve vakumlu serum çıkarma tüplerine kan örnekleri alındı. Bunu takiben dekapitasyon yöntemiyle ötenazileri yapıldı. Sağ ve sol testis dokuları hızlı bir şekilde vücuttan uzaklaştırılarak hassas terazi ile tartılıp ayrı ayrı sonuçlar kaydedildi. Alınan testis örnekleri; biyokimyasal olarak MDA, GSH, GSH-Px ile CAT enzim aktivitesi düzeylerini belirlemek için -20 °C'de ölçüm zamanına kadar saklandı. Histopatolojik değerlendirmelerde kullanılmak amacıyla, her iki testisin aynı bölgesinden alınan örnekler ise hem tamponlu formaldehit hem de Bouin tespit solüsyonlarına bırakıldı. Testosteron analizi için ayrılan kan örnekleri ise oda sıcaklığında, 45° eğimle pıhtılaşmaya bırakıldı ve daha sonra 3500 rpm devirde 12

dakika santrifüj edildi. Elde edilen serum örnekleri -21 °C’de değerlendirme zamanına kadar muhafaza edildi.

4.2.2. Rölatif Testis Ağırlığının Hesaplanması

Rölatif testis ağırlığı = Testis ağırlığı/Canlı ağırlık X 100 olarak belirlendi.

4.2.3. Bouin Doku Tespit Prosedürü

Dokular Bouin solüsyonunda 5- 6 saat kadar trimlenmeden, 12- 16 saat kadar da trimlenerek tespit edildi. Daha sonra % 50, 70, 80, 96 I, 96 II, 100 I ve 100 II’lik alkol serilerinden geçirilen dokular xylol I, xylol II ve xylol III serilerinden de geçirilerek 45 °C’lik etüvde xylol- parafin karışımında 1 gece bırakıldı. Bunu takiben üç ayrı parafin serisinde birer saat süreyle bekletilerek parafin bloklar hazırlandı.

4.2.4. Tamponlu Formaldehit Doku Tespit Prosedürü

Tamponlu formaldehit solüsyonunda dokular 24- 30 saat süreyle tespit edildikten sonra 12- 24 saat kadar akarsuda yıkamaya bırakıldı. Daha sonra % 70’lik alkol serisi ile başlayarak Bouin doku yürütme prosedüründe olduğu gibi devam edildi.

4.2.5. Doku Kesitlerinin Alınması ve Boyanması

Hazırlanan parafin bloklardan kızaklı mikrotomda 5 µm kalınlığında poli-L- lizin kaplı ve 1/4’ü tıraşlanmış lamlara seri kesitler alındı. Bu kesitlere 24 saat ya da daha uzun süreyle oda ısısında kurutma yapıldı. Kesitler, rutin histolojik incelemeler için hematoksilen- eozin (H&E) ve TSK’ların bazal membranlarını

kalınlaşma yönüyle değerlendirmek için periyodik asit schiff (PAS) & hematoksilin yöntemlerine göre boyanarak ışık mikroskobunda incelendi. Bouin solüsyonu ile tespit edilip parafine gömülmüş doku kesitlerine histokimyasal bir teknik olan TUNEL (TdT- mediated dUTP- digoxigenin Nick End Labeling) boyama yöntemi uygulanarak, ışık mikroskobunda apoptotik hücrelerin kolorimetrik incelemesi yapıldı.

4.2.5.1. TUNEL (TdT- mediated dUTP- digoxigenin Nick End Labeling) Metodu

Bu yöntem; hücrelerde ortaya çıkan apoptotik sinyaller sonucu, DNA ipliğinde meydana gelen kırıkların *in situ* olarak belirlenmesi esasına dayanmaktadır. Bu DNA parçacıklarının serbest 3'- OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) aracılığında biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenmekte ve daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin- horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilmektedir. AEC, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturmakta ve ters boyama yapılarak işlem sonlandırılmaktadır (Şekil 9) (123).

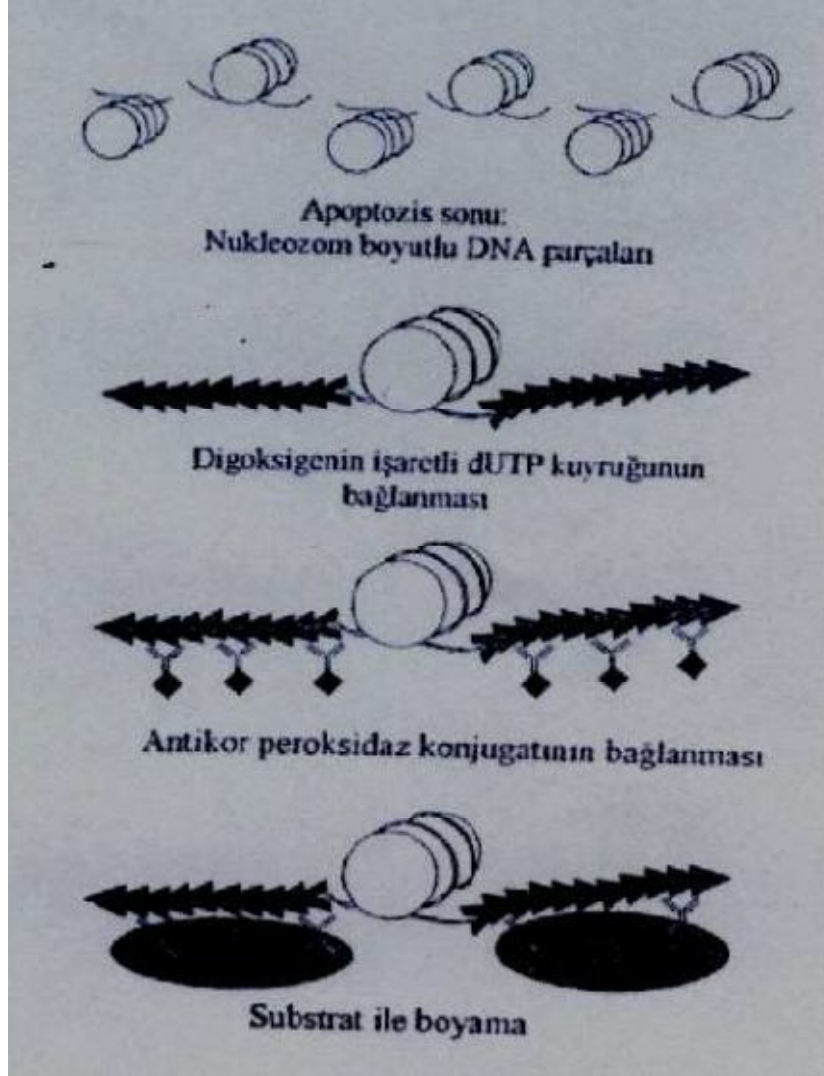
Gavrieli ve arkadaşları (151), Xiaozhong ve arkadaşları (152); Khaki ve arkadaşları (153) ile Negoescu ve arkadaşları (154) tarafından önerilen TUNEL metodunda bazı modifikasyonlar yapılarak ve kiti üreten firma talimatlarına uyularak TUNEL protokolü uygulandı.

Boyama işlemine başlamadan önce, kesitler 60 °C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Daha sonra 2 kez, 20'şer dakika ksilol solüsyonlarında

deparafinizasyon uygulandı. % 100 ve % 96'lık alkol serilerinde 5'er dakika rehidratasyon işlemi yapıldı. Kesitler önce distile suya alındı ve arkasından PBS solüsyonunda 5 dakika yıkandı. Kesitler kurularak dokuların etrafı immün kalemle çizildi. Enzim uygulaması için kesitler, 20 µg/ml Proteinase K ile 10 dakika inkübe edildi. Sonrasında kesitler 3 kez, 5'er dakika PBS solüsyonlarında yıkandı ve ardından endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3'lük H₂O₂'de (200 ml methanole 6 ml H₂O₂ eklenerek) 10 dakika bekletilerek PBS solüsyonunda yıkandı. Bu arada TUNEL solüsyonunun hazırlanması aşamasına geçildi.

TUNEL (reagent) solüsyonunun hazırlanması için; mikropipet yardımıyla enzim solüsyonu (vial 1) içeren mavi godeden 50 µl, işaretleme (label) solüsyonu (vial 2) içeren pembe godeden ise 450 µl alınarak karıştırıldı. Ek olarak karışıma 500 µl Tunel dilution buffer solüsyonu eklenerek dilüe edildi. Böylece dilüsyon oranı ½ oldu. Pozitif kontrol için bu karışımdan her doku kesitine 25- 50 µl damlatıldı. Label solüsyonu (vial 2) içeren pembe godede geriye kalan 100 µl işaretleme solüsyonu ise negatif kontrol için kullanıldı. Kesitler 37 °C'lik etüvde 1 saat süreyle nemli ve karanlık ortamda (humidified chamber) bekletildikten sonra PBS solüsyonunda yıkandı. PBS solüsyonundan çıkarılan kesitlerin kenarları kurulandı ve dokuların üzerini kaplayacak şekilde 50 µl Converter- POD (vial 3) solüsyonu damlatılarak 30 dakika bekletildi. Ardından yine PBS solüsyonu ile yıkanan kesitler kurularak AEC kromojen ile 10- 15 dakika muamele edildi. Sonrasında kesitler 3 kez, 5'er dakika PBS solüsyonlarında yıkandı ve zemin boyaması için Mayer hematoksilende 30 saniye hafif bir zıt boyama yapıldı.

Çeşme suyunda mavileştirilen doku kesitlerinin kenarları kurularak aqueous mounting medium ile kapatıldı.



Şekil 9. TUNEL metodunun boyanma mekanizması (123).

4.2.6. Mikroskopik İnceleme

TUNEL metodu ve diğer yöntemlerle boyanan kesitler binoküler başlıklı fotomikroskop özelliğine sahip ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi. Ayrıca tubulus seminiferus kontortus (TSK) çapları ve germinal hücre kalınlığı (GHK), tüm gruplardaki hayvanlardan elde edilen preparatların 5 farklı

alanında 5'er adet olmak üzere toplam 25 tubulusun ışık mikroskopunda mikrometrik oküler ile X 400 büyütmede incelenmesiyle ölçüldü.

4.2.7. Lipit Peroksidasyon Tayini

Lipit peroksidasyon miktarı, tiyobarbitürik asit reaktif türlerinin konsantrasyonuna göre ölçüldü (155). MDA miktarı, lipit peroksidasyonun göstergesi olarak belirtilmektedir. Örnek numuneden bir hacim ve stok çözeltiden iki hacim (0,25 N HCl içerisinde % 0,375 tiyobarbitürik asit ve % 15 trikloroasetik asit) santrifüj tüpünde karıştırıldı. Çözelti 15 dakika kaynar suda ısıtıldı ve soğutuldu. Çökelti 2500 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek ayırım sağlandı. Sonra 532 nm'de test örnekleri spektrofotometrik olarak okundu. Sonuçlar nmol/g protein olarak belirtildi.

4.2.8. Doku GSH-Px Enzim Aktivitesi Tayini

GSH-Px aktivitesinin, Lawrence ve Burk metoduna göre ölçümü yapıldı (156). Reaksiyon karışımında 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH= 7), 1 mM EDTA, 1 mM sodyum azide, 0,2 mM redükte NADPH, 1 EU/ml okside glutatyon redüktaz (GSSG), 1 Mm GSH, 0,2 Mm H₂O₂ içermektedir. Enzim kaynağından 0,1 ml alınarak 0,8 ml yukarıdaki karışımdan ilave edildi. Bu ilave karışıma 0,1 mL peroksit solüsyonu ilave edilerek reaksiyon başlatılmadan önce 25 °C'de inkübe edildi. 5 dakika içerisinde 340 nm'de absorbansları spektrofotometrik olarak ölçülerek alındı. Sonuçlar IU/g protein olarak ifade edildi. Protein miktarı da Lowry ve arkadaşlarının metoduna göre ölçüldü (157).

4.2.9. Doku GSH Tayini

Örnek GSH miktarı; Sedlak ve Lindsay metodu kullanılarak, 412 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümü yapıldı (158). Örnekler % 50 TCA (trikloroasetik asit) ile çöktürüldü ve 5 dakika 1000xg devirde santrifüj edildi. Çöktürülen örneğin üst fazından 0,5 ml alınarak 2 ml Tris- ETDA tamponu (0,2 M, pH= 8,9) ve 0,1 ml 0,01 M 5,5’-ditiyo-bis-2-nitrobenzoik asit ilave edildi. Bu karışım oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi ve spektrofometrede 412 nm’de absorbansları ölçülerek alındı. Sonuçlar nmol/g protein olarak belirtildi.

4.2.10. Doku CAT Enzim Aktivitesi Tayini

Testiküler dokudaki katalaz aktivitesi; Aebi metodu kullanılarak, 240 nm’de spektrofotometrik olarak H_2O_2 ’in ayrışmasının ölçümü ile belirlendi (159). Dokular, 30 mM KCl ve % 0,1 Triton X-100 içeren 10 mM potasyum fosfat tamponunun (pH= 7,4) 10 hacim miktarında homojenize edildi. Homojenatlar, 4 °C’de 20 dakika süreyle 10000g devirde santrifüj edildi. Çöktürülen örneklerde katalaz enzim aktivitesi ölçüldü. Sonuçlar kU/g protein olarak belirtildi.

4.2.11. Testosteron Ölçümü

Serbest haldeki serum testosteron konsantrasyonu; ELISA testosteron kitinin üretici firma talimatlarına göre uygulanmasıyla doğrudan immunoenzimatik olarak belirlendi. Derin dondurucuda -20 °C’de muhafaza edilen serum örnekleri analiz yapılmadan önce 1 gece + 5 °C’de bekletildi. Daha sonra bu örnekler ile kit ayıraçlarının oda sıcaklığına (22- 28 °C) kavuşması sağlandı. Mikropileytin standart olarak belirlenen kuyucuklarına (S_0 , S_5) 20 µl standart solüsyonu, örnek olarak belirlenen her bir kuyucuğuna ise ilgili serum

örneğinden 20 µl çekilerek bırakıldı. Mikropileytin bir kuyucuğu ise kör olarak belirlenip boş bırakıldı. Sonra standart ve örnek kuyucuklarının her birine 100 µl konjugat ilave edilerek 37 °C’lik etüvde 1 saat inkübe edildi. Daha sonra bu kuyucuklara 300 µl distile su eklenerek 3 kez yıkandı. Kurulanan mikropileytin tüm kuyucuklarına 100 µl TMB substratı ilave edildikten sonra oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 15 dakika inkübe edildi. Son olarak tüm kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu eklendi ve mikropileyt nazıkçe sallanıp homojenize edildikten sonra, ELISA Reader cihazında 450 nm’de absorbanslar okundu. Sonuçlar ise ng/ml olarak ifade edildi.

4.2.12. İstatistiksel Analiz

Çalışmadan elde edilen veriler, SPSS for Windows 15.0 paket programı (Windows/SPSS® Inc, Chicago, USA) kullanılarak değerlendirildi. 7., 14., ve 28. günlerde gruplar arasında değişkenler açısından oluşan farklılıkların belirlenmesinde normalite ve homojenite testleri yapılarak parametrik olmayan test varsayımları karşılandığından, Kruskal Wallis Varyans Analizi ile gruplar arasındaki farklılıklar belirlendi. Daha sonra bu farklılıkların hangi gruplardan kaynaklandığını tespit etmek için ise Mann Whitney U testi kullanıldı. Ayrıca gruplar arasında TSK çapı ve GHK parametreleri açısından oluşan farklılıklar ise ANOVA (One Way of Analysis Variance) ile Duncan testi kullanılarak belirlendi. Sonuçlar $\pm$ standart hata (SH) olarak ifade edildi ve $p < 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Canlı Ağırlık

5.1.1. Yedinci Gün

Çalışmanın başlangıcında ve 7. gününde olmak üzere, kontrol ve deney gruplarını oluşturan hayvanların canlı ağırlık ortalamaları Tablo 6’da verilmiştir. Başlangıç canlı ağırlık değerleri yönünden tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olmadığı saptandı ($p>0.05$). Yedinci gün canlı ağırlık değerleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında, kontrol ve EGb 761 gruplarına göre DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarındaki azalmanın anlamlı olduğu dikkati çekti ($p<0.05$).

Tablo 6. Yedinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Canlı Ağırlık Ortalamaları (g)

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
Başlangıç canlı ağırlığı	62,50 $\pm$ 3,60 ^a	59,83 $\pm$ 3,56 ^a	59,83 $\pm$ 5,48 ^a	63,67 $\pm$ 3,37 ^a
7. gün canlı ağırlığı	80,50 $\pm$ 3,77 ^a	73,67 $\pm$ 7,16 ^b	74,83 $\pm$ 6,46 ^b	83,17 $\pm$ 3,84 ^a

Aynı satırda yer alan (a, b) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$).

5.1.2. On dördüncü Gün

Kontrol ve deney grupları arasında başlangıç canlı ağırlık değerleri bakımından önemli farklılıkların şekillenmediği tespit edildi ($p>0.05$). On dördüncü günde canlı ağırlık değerleri açısından diğer gruplar ile karşılaştırıldığında DEHP grubunda istatistiksel açıdan anlamlı bir azalmanın ($p<0.05$) olduğu ve bu değer 7. güne göre de azaldığı göze çarptı (Tablo 7).

Tablo 7. On dördüncü Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Canlı Ağırlık Ortalamaları (g)

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
Başlangıç canlı ağırlığı	55,50 ± 0,81 ^a	56,50 ± 1,06 ^a	53,50 ± 2,04 ^a	53,50 ± 1,10 ^a
14. gün canlı ağırlığı	100,17± 2,33 ^a	70,83 ± 3,48 ^b	80,50 ± 7,55 ^{ab}	102,33 ± 4,09 ^a

Aynı satırda yer alan (a, b) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir (p<0.05).

5.1.3. Yirmi sekizinci Gün

Başlangıç canlı ağırlık değerleri bakımından kontrol ve deney grupları arasında önemli farklılıkların bulunmadığı saptandı (p>0.05). Yirmi sekizinci gün canlı ağırlık değerleri bakımından diğer gruplar ile karşılaştırıldığında DEHP grubunda anlamlı bir azalmanın (p<0.05) olduğu dikkati çekti (Tablo 8). Fakat DEHP grubuna ait bu değerlerin önceki deney periyotlarına göre arttığı tespit edildi.

Tablo 8. Yirmi sekizinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Canlı Ağırlık Ortalamaları (g)

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
Başlangıç canlı ağırlığı	59,83 ± 1,33 ^a	58,33 ± 1,76 ^a	60,00 ± 1,00 ^a	57,50 ± 3,00 ^a
28. gün canlı ağırlığı	135,83± 6,61 ^a	90,67± 2,64 ^b	132,83 ± 6,47 ^a	139,33± 10,08 ^a

Aynı satırda yer alan (a, b) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir (p<0.05).

5.2. Absolut ve Rölatif Testis Ağırlıkları

5.2.1. Yedinci Gün

Kontrol ve deney grubu hayvanlarına ait sağ testis, sol testis ve rölatif testis ağırlıkları Tablo 9’da sunulmuştur. Sağ ve sol testis ağırlığı ile rölatif testis ağırlığı değerleri bakımından kontrol ve EGb 761 grupları ile DEHP grubu karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir azalmanın olduğu göze çarptı (p<0.05).

Tablo 9. Yedinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Sağ ve Sol Testis Ağırlıkları (g) ile Rölatif Testis Ağırlıkları (TA/CA x 100)

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
Sağ testis ağırlığı	0,42 ± 0,00 ^a	0,28 ± 0,04 ^b	0,36 ± 0,04 ^{ab}	0,44 ± 0,03 ^a
Sol testis ağırlığı	0,40 ± 0,00 ^a	0,26 ± 0,04 ^b	0,32 ± 0,04 ^{ab}	0,41 ± 0,03 ^a
Rölatif testis ağırlığı	1,10 ± 0,10 ^a	0,70 ± 0,06 ^b	0,77 ± 0,02 ^{ab}	1,14 ± 0,10 ^a

Aynı satırda yer alan (a, b) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir (p<0.05). TA: Testis Ağırlığı CA: Canlı Ağırlık.

5.2.2. On dördüncü Gün

Absolüt ve rölatif testis ağırlığı değerlerinin, kontrol ve EGb 761 gruplarına göre hem DEHP hem de DEHP + EGb 761 gruplarında anlamlı bir şekilde azaldığı (p<0.05); aynı zamanda bir önceki deney periyoduna kıyasla da bu azalmanın olduğu tespit edildi (Tablo 10).

Tablo 10. On dördüncü Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Sağ ve Sol Testis Ağırlıkları (g) ile Rölatif Testis Ağırlıkları (TA/CA x 100)

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
Sağ testis ağırlığı	0,50 ± 0,03 ^a	0,20 ± 0,01 ^b	0,32 ± 0,02 ^b	0,56 ± 0,06 ^a
Sol testis ağırlığı	0,49 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,02 ^b	0,31 ± 0,01 ^b	0,55 ± 0,06 ^a
Rölatif testis ağırlığı	1,08 ± 0,09 ^a	0,50 ± 0,03 ^b	0,63 ± 0,02 ^b	0,85 ± 0,06 ^a

Aynı satırda yer alan (a, b) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir (p<0.05). TA: Testis Ağırlığı CA: Canlı Ağırlık.

5.2.3. Yirmi sekizinci Gün

Sağ ve sol testis ağırlığı ile rölatif testis ağırlığı değerlerinin diğer gruplara oranla DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında, istatistiksel açıdan anlamlı şekilde azaldığı dikkati çekti (p<0.05). Absolüt ve rölatif testis ağırlığı

değerlerindeki istatistiksel farklılığın DEHP ve DEHP + EGb 761 grupları arasında da meydana geldiği ($p<0.05$) göze çarptı (Tablo 11). Fakat 7. ve 14. gün deney periyotları ile kıyaslandığında DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarına ait bu değerlerin arttığı saptandı.

Tablo 11. Yirmi sekizinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Sağ ve Sol Testis Ağırlıkları (g) ile Rölatif Testis Ağırlıkları (TA/CA x 100)

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
Sağ testis ağırlığı	$0,85 \pm 0,08^a$	$0,34 \pm 0,03^c$	$0,55 \pm 0,03^b$	$0,90 \pm 0,03^a$
Sol testis ağırlığı	$0,84 \pm 0,10^a$	$0,33 \pm 0,03^c$	$0,57 \pm 0,02^b$	$0,91 \pm 0,04^a$
Rölatif testis ağırlığı	$1,26 \pm 0,12^a$	$0,51 \pm 0,02^c$	$0,70 \pm 0,05^b$	$1,53 \pm 0,02^a$

Aynı satırda yer alan (a, b,c) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$). TA: Testis Ağırlığı CA: Canlı Ağırlık.

5.3. Mikrometrik Bulgular

5.3.1. Yedinci Gün

Tubulus seminiferus kontortus çap ortalamaları ve GHK yönünden kontrol ve deney gruplarını oluşturan hayvanlara ait değerler Tablo 12’de verilmiştir. TSK çap ortalamaları bakımından karşılaştırma yapıldığında, kontrol grubu ile deney grupları arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıkların olduğu saptandı ($p<0.05$). Ortalama TSK çapı değerlerinin; kontrol ve EGb 761 gruplarına göre, DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında azaldığı, kontrol grubu ile EGb 761 grubu karşılaştırıldığında ise kontrole göre EGb 761 grubunda ortalama TSK çapının daha yüksek olduğu dikkati çekti ($p<0.05$).

Germinal hücre kalınlığı yönünden gruplar karşılaştırıldığında, tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıkların var olduğu tespit edildi ($p<0.05$).

GHK değerlerinin, DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azaldığı; EGb 761 grubunda ise yükseldiği göze çarptı ($p<0.05$).

Tablo 12. Yedinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında TSK Çapları ve GHK (μm)

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
TSK çapı	161,70 $\pm$ 0,77 ^b	139,55 $\pm$ 0,80 ^c	140,43 $\pm$ 1,04 ^c	186,83 $\pm$ 1,31 ^a
GHK	58,40 $\pm$ 0,45 ^b	35,37 $\pm$ 0,75 ^d	38,68 $\pm$ 0,74 ^c	62,52 $\pm$ 0,90 ^a

Aynı satırda yer alan (a, b, c, d) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$).

5.3.2. On dördüncü Gün

Gruplar arasında mikrometrik ölçümler ile hesaplanan TSK çapı ortalamaları ve GHK değerleri bakımından yapılan karşılaştırmalarda, tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıkların olduğu belirlendi ($p<0.05$). Bahsedilen değerlerin kontrol grubuna göre, DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında azaldığı; EGb 761 grubunda ise arttığı ($p<0.05$) göze çarptı (Tablo 13).

Tablo 13. On dördüncü Günde Kontrol ve Deney Gruplarında TSK Çapları ve GHK (μm)

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
TSK çapı	165,90 $\pm$ 1,07 ^b	117,15 $\pm$ 1,37 ^d	140,03 $\pm$ 0,96 ^c	182,85 $\pm$ 1,32 ^a
GHK	57,00 $\pm$ 0,59 ^b	39,67 $\pm$ 0,85 ^d	44,57 $\pm$ 0,75 ^c	63,57 $\pm$ 0,96 ^a

Aynı satırda yer alan (a, b, c, d) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$).

5.3.3. Yirmi sekizinci Gün

Kontrol ve deney gruplarını oluşturan hayvanların TSK çap ortalamaları ve GHK değerleri Tablo 14’de verilmiştir. TSK çap ortalamaları yönünden tüm gruplar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıkların olduğu dikkati çekti ($p<0.05$). Kontrol grubuna göre, DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında azalmış

TSK ap ortalaması değerleri ile EGb 761 grubunda artmış TSK ap ortalaması değerlerinin anlamlı olduğu dikkati çekti ($p<0.05$).

Germinal hücre kalınlığı değerleri bakımından tüm gruplar karşılaştırıldığında, kontrol ve EGb 761 gruplarına göre DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ($p<0.05$). GHK değerlerindeki istatistiksel farklılığın DEHP ve DEHP + EGb 761 grupları arasında da meydana geldiği göze çarptı ($p<0.05$). nceki deney periyotları ile karşılaştırıldığında DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarına ait ortalama TSK apı ve GHK değerlerinin arttığı saptandı.

Tablo 14. Yirmi sekizinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında TSK çapları ve GHK (μm)

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
TSK apı	$206,20 \pm 1,32^b$	$146,53 \pm 0,94^d$	$158,55 \pm 0,88^c$	$210,85 \pm 1,43^a$
GHK	$66,30 \pm 0,89^a$	$43,33 \pm 0,64^c$	$47,60 \pm 0,61^b$	$67,53 \pm 1,22^a$

Aynı satırda yer alan (a, b, c, d) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$).

5.4. Işık Mikroskopik Bulgular

5.4.1. Yedinci Gün

Kontrol ve deney gruplarını oluşturan hayvanların testislerindeki mikroskopik değişimler Tablo 15’de özetlenmiştir.

5.4.1.1. Kontrol Grubu

Testislerin yapılan ışık mikroskopik incelemelerinde düzgün bir morfolojiye sahip oldukları görüldü. TSK’larda; bazal membran üzerine yerleşmiş spermatogonyumlar ve lümenlerini oluşturan germinatif epitelde birkaç kattan oluşan primer spermatosit katmanı ile birlikte sekunder spermatosit formasyonları

da mevcut idi (Şekil 10). Gelişme sürecindeki bu spermatositler, oval çekirdekli immatür Sertoli hücrelerinin arasına lokalize olmuş durumda idi. PAS & hematoxilen ile boyamada TSK'ların bazal membranlarının normal görünümde olduğu saptandı (Şekil 11). İntersitisyel bölge ve Leydig hücreleri normal görünümde idi. Bu hücrelerin eozinofilik sitoplazmaları ve eksantrik yerleşimli çekirdekleri mevcut idi (Şekil 12).

TUNEL prosedürü ile boyanan kesitler incelendiğinde bazı TSK'larda birkaç pozitif hücreye rastlandı. Bu hücrelerin bazal membrandan uzaklaşan ve fizyolojik olarak apoptozise uğrayan spermatogenik seriye ait spermatositler olduğu belirlendi (Şekil 13).

5.4.1.2. DEHP Grubu

Testislerde mikroskopik olarak, TSK'larda atrofi ile birlikte germinal hücrelerde nekroz ve dejenerasyonun baskın olduğu değişiklikler gözlemlendi (Şekil 14). DEHP uygulamasının TSK'larda spermatogenik hücre popülasyonunu bozduğu tespit edildi ve buna bağlı olarak da germinal hücrelerde sayıca azalma, deskuamasyon ve disorganizasyon saptandı (Şekil 15-16). Ayrıca TSK'larda germinal hücrelerde vakuolizasyon ile birlikte bazal membranlarda kalınlaşma dikkati çekti (Şekil 17-18). İntersitisyel alanların ödem nedeniyle genişlediği ek olarak kapillar damarlarda konjesyonun varlığı saptandı (Şekil 19). Leydig hücreleri ise bu deney periyodu boyunca normal görünümde izlendi (Şekil 20).

Kontrol grubuna göre, DEHP grubunda TUNEL ile oldukça fazla sayıda apoptozise uğramış spermatogenik hücrelerin bulunduğu tespit edildi. TUNEL boyanmanın yalnızca hücre çekirdeği ile sınırlı olduğu gözlemlendi (Şekil 21). Leydig

hücrelerinde pozitif boyanmaya rastlanmazken tek tük Sertoli hücresinde TUNEL pozitiflik saptandı ( ekil 22).

5.4.1.3. DEHP + EGb 761 Grubu

DEHP grubunda gözlenen nekrotik ve atrofik değişikliklerin, bu grupta hafif şiddette meydana geldiği tespit edildi ( ekil 23). TSK'lardaki yapının tamamıyla düzgün olmadığı ve tek tük korunmuş spermatogenik hücrenin varlığı dikkati çekti. Bazı tubuluslarda germinal hücrelerde vakuolizasyon izlenirken, tubulusların bir kısmında ise mitotik aktiviteye bağlı rejeneratif değişimler gözlendi ( ekil 24). Bu grupta tek başına DEHP uygulanan gruba göre bazal membranların normal görünümde olduğu tespit edildi ( ekil 25). İntersitisyel alanlarda eozinofilik karakterde ödemin varlığı saptandı ( ekil 26). Leydig hücrelerinde ise herhangi bir değişime rastlanmadı ( ekil 27).

Bu deney grubunda, TUNEL pozitiflik gösteren spermatogenik hücre sayısının ve boyanma yoğunluğunun DEHP grubuna kıyasla azaldığı görüldü ( ekil 28). Sertoli ve Leydig hücrelerinin boyanma özellikleri bir önceki grupla benzerdi ( ekil 29).

5.4.1.4. EGb 761 Grubu

Testislerin mikroskopik incelemeleri sonucunda kontrol grubuna benzer şekilde, normal histolojik görünümlerini korudukları tespit edildi. TSK'larda; bazal membran üzerine oturmuş spermatogonyumlar, lümene doğru dizilim gösteren birkaç sıralı spermatogenik seri hücreleri ve bazalden lümene kadar uzanan Sertoli hücreleri mevcuttu İntersitisyel bölge ve bu bölgedeki Leydig hücreleri kontrol grubunda olduğu gibi normal görünümde idi ( ekil 30).

Bu grupta bazı TSK'ların germinatif epitelinde fizyolojik apoptozise uğramış birkaç TUNEL pozitif hücre görüldü (Şekil 31).

Tablo 15. Yedinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Testislerde Mikroskopik Bulgular

Bulgular	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
TSK'larda atrofi	—	++	+	—
Germinal hücrelerde nekroz	—	++	+	—
Germinal hücrelerde dejenerasyon	—	++	+	—
Germinal hücrelerde sayıca azalma	—	++	+	—
Germinal hücrelerde deskuamasyon	—	++	+	—
Germinal hücrelerde disorganizasyon	—	++	+	—
Germinal hücrelerde vakuolizasyon	—	++	+	—
TSK'ların bazal membranında kalınlaşma	—	+	—	—
TSK'larda rejenerasyon	—	—	+	—
İntersitisyel bölgede ödem, genişleme ve kapillar konjesyon	—	+	+	—
Spermatogenik hücrelerde apoptozis	+	++++	+++	+

(-) bulgu yok, (+) hafif, (++) orta, (+++) şiddetli, (++++) çok şiddetli

5.4.2. On dördüncü Gün

Kontrol ve deney gruplarını oluşturan hayvanların testislerindeki mikroskopik bulgular Tablo 16’da sunulmuştur.

5.4.2.1. Kontrol Grubu

Testislerin ışık mikroskopik incelemesinde, TSK’ların normal morfolojiye sahip oldukları ve bu dönemde spermatogenezisin başlamış olduğu belirlendi. TSK’lar; bazal membran üzerine oturmuş çok belirgin spermatogonyumları, membrandan uzaklaşmaya başlamış primer spermatositleri ve tubulus lümenine yakın olarak yerleşmiş çok sayıda yuvarlak spermatidi içeriyordu. Ayrıca bazı TSK’larda uzamış spermatidlere de rastlandı (Şekil 32, 33). Gelişmekte olan bu hücreler Sertoli hücrelerinin arasına lokalize olmuş durumda idi. Buna ilaveten TSK’ların bazal membranları normal görünümde idi ve çevresinde tek katlı peritubuler miyoid hücre tabakası gayet belirgindi (Şekil 34). İntersitisyel bölge ve bu bölgede bulunan Leydig hücreleri normal histolojik görünümünde idi.

Bazı tubuluslarda fizyolojik olarak apoptozise uğramış, birkaç TUNEL pozitif hücreye rastlandı (Şekil 35).

5.4.2.2. DEHP Grubu

Testiste; TSK epitellerinde nekroz nedeniyle tubuler atrofinin şiddetlendiği ve dejenerasyonunun da devam ettiği dikkati çekti (Şekil 36-38). TSK’larda spermatogenik hücrelerde düzensizlik tespit edildi (Şekil 39). Bazı tubuluslarda bazal membran üzerine yerleşmiş spermatogonyumların kısmen, spermatositler ile spermatidlerin ise büyük oranda silindiği göze çarptı (Şekil 40). Buna karşın

tubuler yapının korunduğu ve miyoid hücre tabakasının bozulmadığı görüldü (Şekil 41). Ayrıca TSK'ların lümeninde çok çekirdekli dev hücre formasyonuna rastlandı (Şekil 42). Bazal membrandaki kalınlaşmanın 7. gün DEHP grubuna göre daha belirginleştiği tespit edildi (Şekil 43). İntersitisyel bölgede ödem, genişleme ve kapillar damarlarda konjesyon görüldü (Şekil 44). Bir önceki deney periyodunda gözlenmemekle birlikte, bu periyotta Leydig hücrelerinin hiperplaziye uğradıkları göze çarptı (Şekil 45).

TUNEL pozitif apoptotik hücre sayısının 7. gün DEHP grubuna göre azaldığı ve apoptozise uğrayan hücrelerin genellikle lümene yakın olarak yerleşmiş spermatositler olduğu tespit edildi (Şekil 46). Spermatogonyum ve Sertoli hücrelerinde ise TUNEL pozitifliğin az sayıda olduğu belirlendi (Şekil 47).

5.4.2.3. DEHP + EGb 761 Grubu

DEHP ile oluşturulan hasara karşı EGb 761 uygulanan bu grup testislerin ışık mikroskopik incelemesinde; DEHP grubuna ait testislerdeki yoğun atrofik ve nekrotik değişimlerin yerini hafif şiddette dejeneratif değişikliklerin aldığı saptandı (Şekil 48). Bu grupta, DEHP grubunun aksine spermatogenezisin varlığı dikkati çekti (Şekil 49). TSK'ların çoğunda rejenerasyon, artan mitoz aktivitesi şeklinde gözlenirken; bazı tubuluslarda dev hücre formasyonlarına rastlandı. DEHP grubu ile karşılaştırıldığında bu grupta TSK'ların bazal membranları normal görünümde idi (Şekil 50). Ek olarak DEHP grubuna göre intersitisyel bölgelerin normale yakın bir görünüm sergiledikleri ancak hafif şiddette Leydig hücre hiperplazisinin bulunduğu tespit edildi (Şekil 51).

Bu gruptaki TUNEL pozitif hücre sayısının DEHP grubuna göre belirgin bir şekilde azaldığı belirlendi (Şekil 52). TUNEL ile pozitifliğin, büyük oranda

spermatozitlerde gözlenmekle birlikte DEHP grubuna benzer şekilde Sertoli hücrelerinde de olduğu dikkati çekti (Şekil 53).

5.4.2.4. EGb 761 Grubu

Testislerde mikroskopik olarak; TSK morfolojilerinin düzgün olduğu göze çarptı. Kontrol grubunda olduğu gibi spermatogenezis sürecinin normal seyrettiği bu grupta TSK'ların bazal membranı üzerine oturmuş spermatogonyumlar, spermatogenik seriye ait spermatozitler ve tubulus lümenine yakın olarak yerleşmiş çok sayıda yuvarlak ve uzamış spermatidler saptandı. İntersitisyel bölge ve Leydig hücreleri normal yapıda gözlemlendi (Şekil 54). TSK'larda bazal membranların normal görünümde oldukları saptandı (Şekil 55).

Apoptotik hücre sayısı bakımından EGb 761 grubu ile kontrol grubunun benzer olduğu tespit edildi (Şekil 56).

Tablo 16. On dördüncü Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Testislerde Mikroskopik Bulgular

Bulgular	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
Germinal hücrelerde nekroz	–	+++	–	–
TSK’larda atrofi	–	+++	–	–
Germinal hücrelerde dejenerasyon	–	+++	++	–
Germinal hücrelerde sayıca azalma	–	+++	–	–
Germinal hücrelerde deskuamasyon	–	+++	–	–
Germinal hücrelerde disorganizasyon	–	+++	–	–
Germinal hücrelerde vakuolizasyon	–	+++	+	–
Çok çekirdekli dev hücre formasyonu	–	+	++	–
TSK’ların bazal membranında kalınlaşma	–	++	–	–
TSK’larda rejenerasyon	–	–	++	–
İntersitisyel bölgede ödem, genişleme ve kapillar konjesyon	–	++	+	–
Leydig hücrelerinde hiperplazi	–	++	+	–
Spermatogenik hücrelerde apoptozis	+	+++	++	+

(-) bulgu yok, (+) hafif, (++) orta, (+++) şiddetli

5.4.3. Yirmi sekizinci Gün

Kontrol ve deney gruplarını oluşturan hayvanların testislerindeki mikroskobik değişimler Tablo 17’de özetlenmiştir.

5.4.3.1. Kontrol Grubu

Testiste TSK’larda tam bir spermatogenezisin şekillendiği dikkati çekti. Spermatogenik seriye ait spermatogonyumların, yuvarlak ve uzamış spermatidlerin çok belirgin olduğu; ayrıca tubulus lümenlerinde spermiyumların varlığı tespit edildi (Şekil 57). Gelişmekte olan bu spermiyumlar kuyruk lümende, baş tubulus duvarına yönelik, Sertoli hücrelerinin arasına lokalize olmuş durumda idi. TSK’ların bazal membranları normal yapıda idi (Şekil 58). İntersitisyel bölge ve Leydig hücreleri de normal görünümünde idi.

Bazı TSK’larda fizyolojik olarak apoptozise uğramış birkaç TUNEL pozitif hücre görüldü (Şekil 59).

5.4.3.2. DEHP Grubu

Testislerde mikroskobik olarak; TSK’larda atrofi ile birlikte nekrotik ve dejeneratif değişimlerin halen devam ettiği ve bu lezyonlara ilave olarak 14. gün DEHP grubuna göre bu grupta Leydig hücre hiperplazisinin daha şiddetli olduğu göze çarptı (Şekil 60-61). Ek olarak, bu grupta bazı TSK’larda germinal hücrelerde kısmi rejenerasyonun şekillendiği saptandı (Şekil 62). Rejeneratif TSK’larda spermatogonyumlar ve birkaç sıralı spermatogenik hücreler ile birlikte germinal hücrelerde mitotik figürlerin varlığı tespit edildi (Şekil 63). Önceki deney periyotlarına ait DEHP gruplarına oranla bu grupta bazal membranlardaki

kalınlaşmanın arttığı dikkati çekti (Şekil 64). İntersitisyel bölgede bir önceki deney periyoduna benzer vasküler değişikliklerin şekillendiği saptandı (Şekil 65).

Bu grupta TUNEL pozitif apoptotik germinal hücre yoğunluğunun, 14. gün DEHP grubuna göre belirgin bir şekilde azaldığı tespit edildi. TUNEL pozitif reaksiyon veren hücrelerin genellikle spermatositler olduğu ve boyanma yoğunluklarının hafiflediği dikkati çekti (Şekil 66).

5.4.3.3. DEHP + EGb 761 Grubu

Mikroskopik olarak testislerde; sadece hafif şiddette dejeneratif değişiklikler ile birlikte TSK'larda çok fazla sayıda spermatogenik hücrenin varlığı belirlendi (Şekil 67-68). DEHP grubuna göre belirgin rejenerasyonun görüldüğü bu grupta birçok TSK'daki germinal hücrelerde hacim artışı, çekirdekte hiperkromazi ve mitotik figürlerde artış dikkati çekti (Şekil 69). DEHP grubu ile karşılaştırıldığında bazal membranın normal görünümde olduğu saptandı (Şekil 70). İntersitisyel bölge ve Leydig hücrelerinin normal görünüm sergiledikleri tespit edildi (Şekil 71).

DEHP ile oluşturulan testis hasarında germinal hücrelerdeki apoptozis sayısını, EGb 761'in belirgin bir şekilde azalttığı tespit edildi (Şekil 72). TUNEL ile pozitiflik gösteren hücrelerin büyük çoğunluğunun spermatositler olduğu ve DEHP grubuna oranla bu hücrelerin boyanma yoğunluğunun çok daha hafif olduğu dikkati çekti (Şekil 73).

5.4.3.4. EGb 761 Grubu

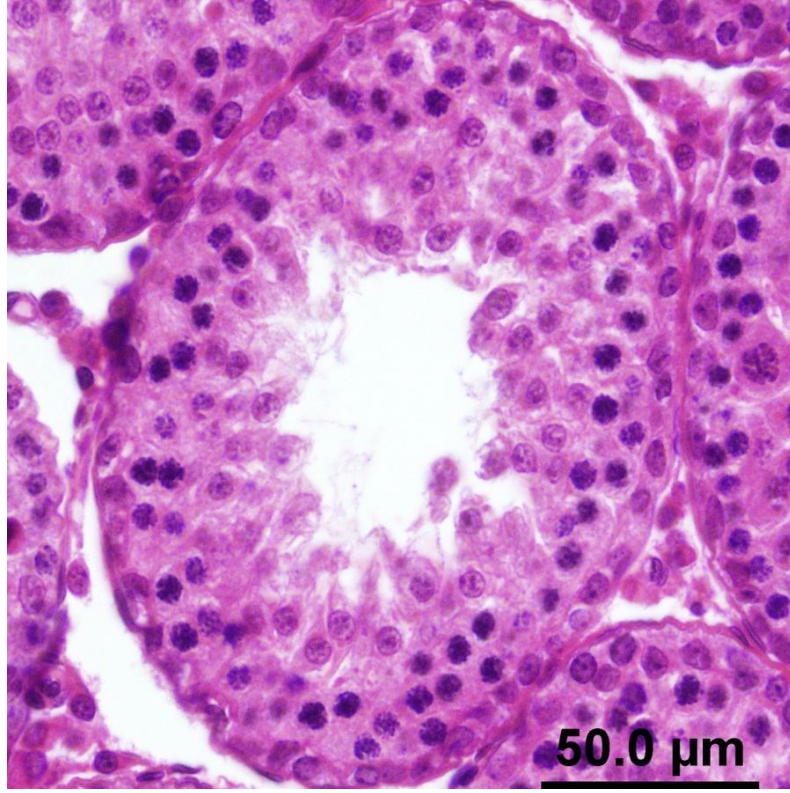
Tek başına 28 gün boyunca EGb 761'in verilen bu grupta mikroskopik olarak testislerin; kontrol grubunda olduğu gibi normal morfoloji sergiledikleri ve TSK'larda tam bir spermatogenezisin şekillendiği tespit edildi (Şekil 74). Spermiyumlar kuyruk lümende baş tubulus duvarına yönelik, Sertoli hücrelerinin arasına lokalize olmuştu ve bazal membranlar normal durumda idi (Şekil 75). İntersitisyel bölge ve Leydig hücreleri kontrol grubunda olduğu gibi normal görünümünde idi (Şekil 76).

Apoptotik hücre sayısı bakımından EGb 761 grubu ile kontrol grubunun benzer olduğu tespit edildi (Şekil 77).

Tablo 17. Yirmi sekizinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Testislerde Mikroskopik Bulgular

Bulgular	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
TSK'larda atrofi	–	+	–	–
Germinal hücrelerde nekroz	–	+	–	–
Germinal hücrelerde dejenerasyon	–	++	+	–
Germinal hücrelerde sayıca azalma	–	+	–	–
Germinal hücrelerde deskuamasyon	–	+	–	–
Germinal hücrelerde disorganizasyon	–	+	–	–
Germinal hücrelerde vakuolizasyon	–	+	–	–
TSK'ların bazal membranında kalınlaşma	–	+++	–	–
TSK'larda rejenerasyon	–	+	+++	–
Leydig hücrelerinde hiperplazi	–	+++	–	–
İntersitisyel bölgede ödem, genişleme ve kapillar konjesyon	–	++	–	–
Spermatogenik hücrelerde apoptozis	+	++	+	+

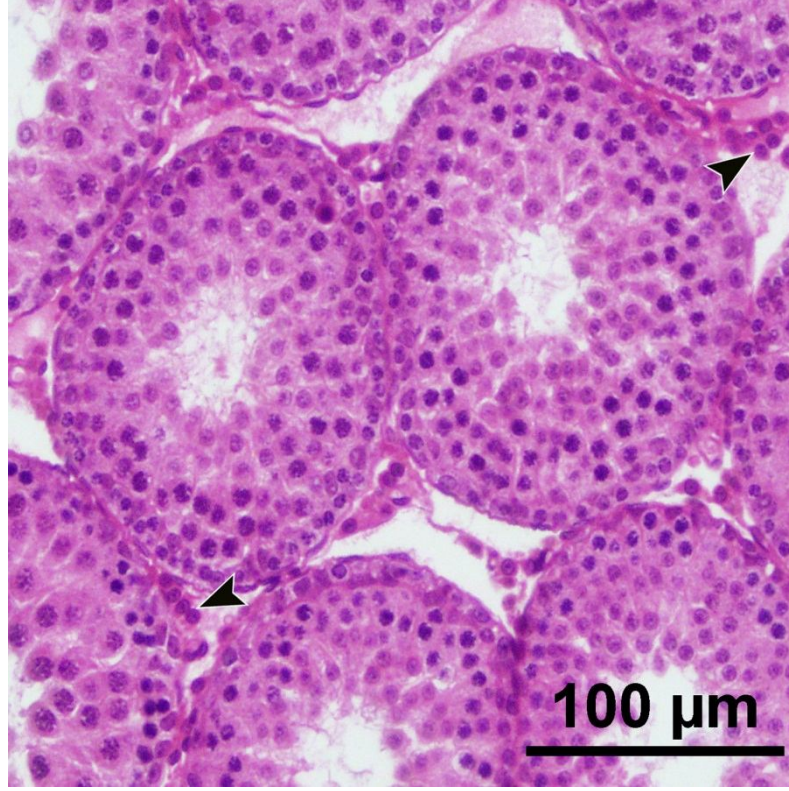
(-) bulgu yok, (+) hafif, (++) orta, (+++) şiddetli



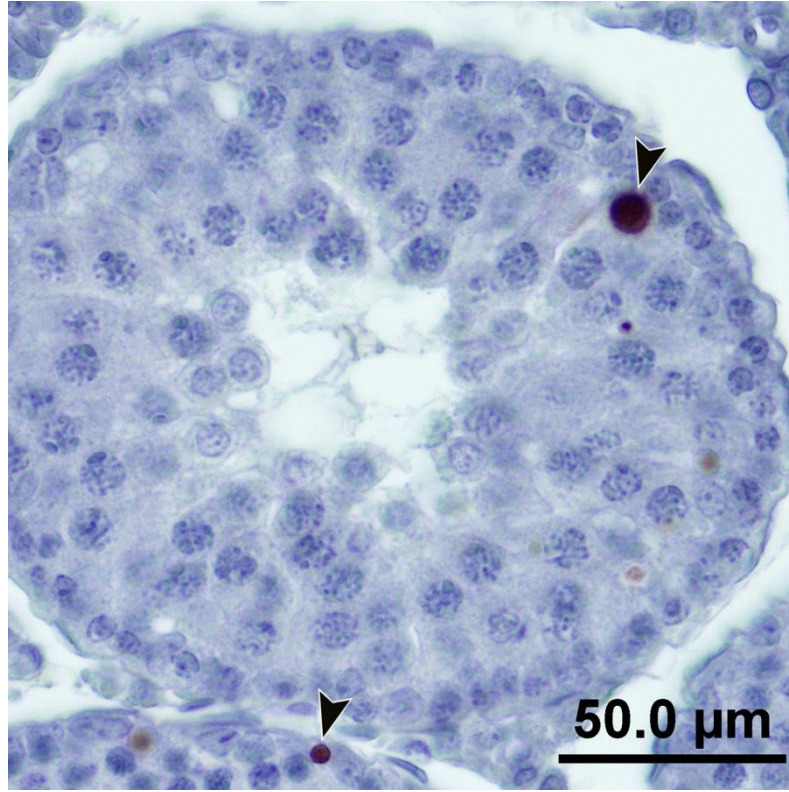
Şekil 10. Yedinci gün kontrol grubunda testisin histolojik görünümü, H&E.



Şekil 11. Yedinci gün kontrol grubunda testiste TSK'larda Sertoli hücresi (ok başları), PAS & H.



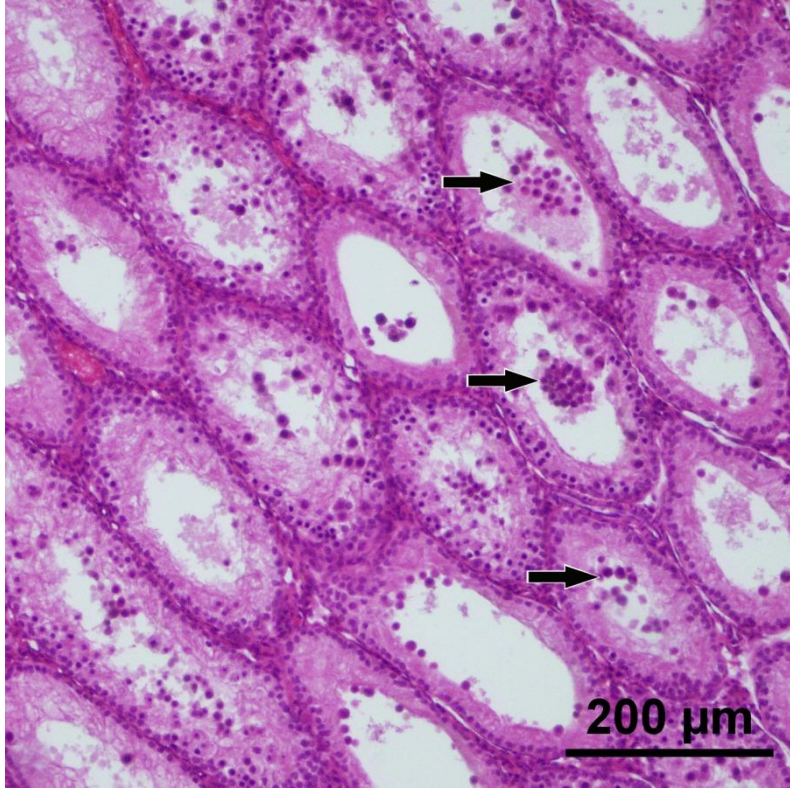
Şekil 12. Yedinci gün kontrol grubunda testiste Leydig hücreleri (ok başları), H&E.



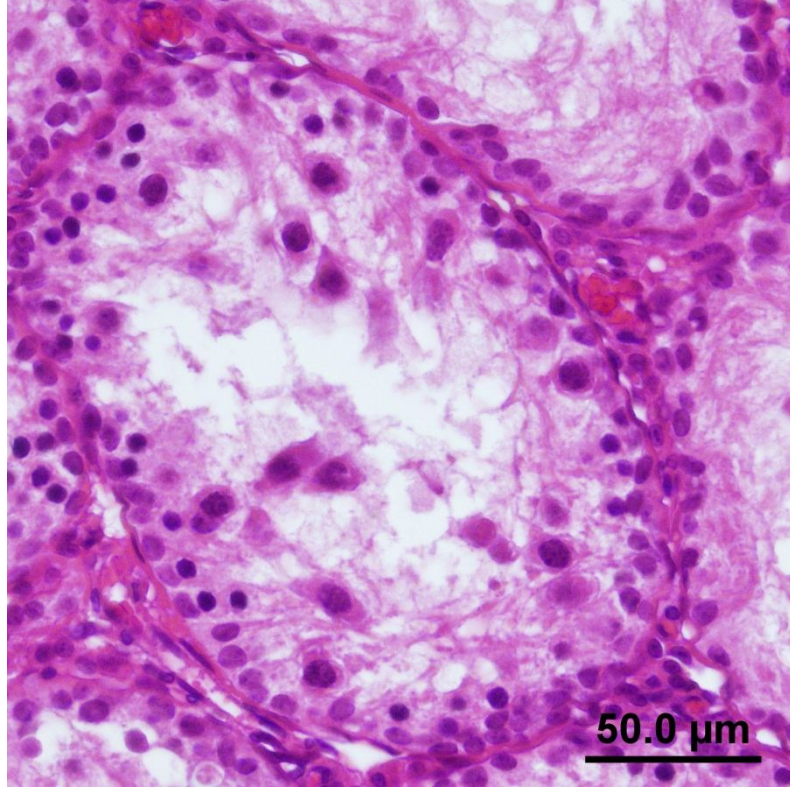
Şekil 13. Yedinci gün kontrol grubunda testiste TSK'larda TUNEL pozitif hücreler (ok başları), TUNEL.



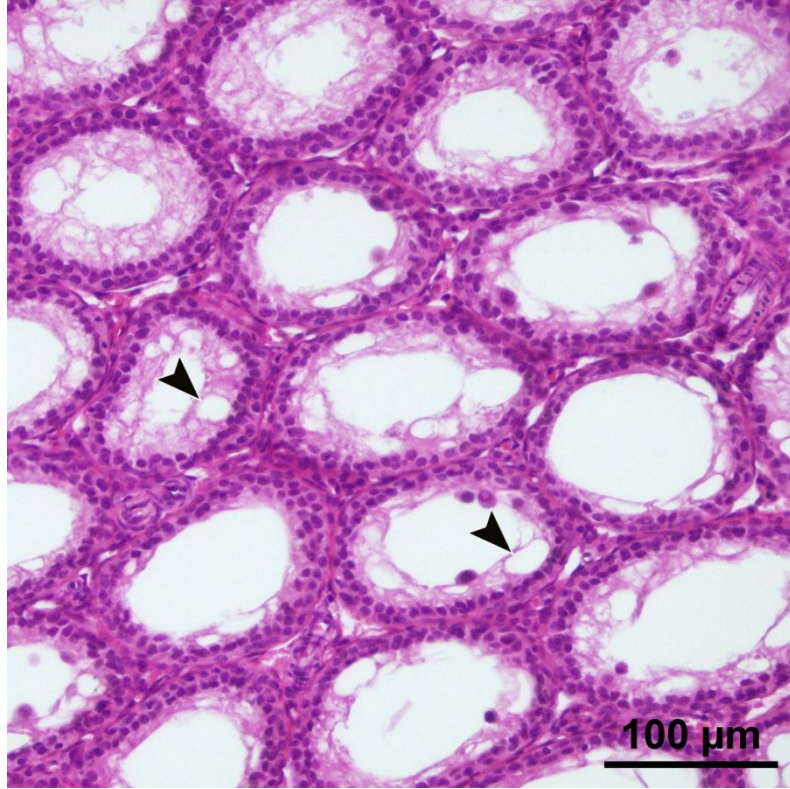
Şekil 14. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK'larda atrofi ile germinal hücrelerde nekroz ve dejenerasyon, H&E.



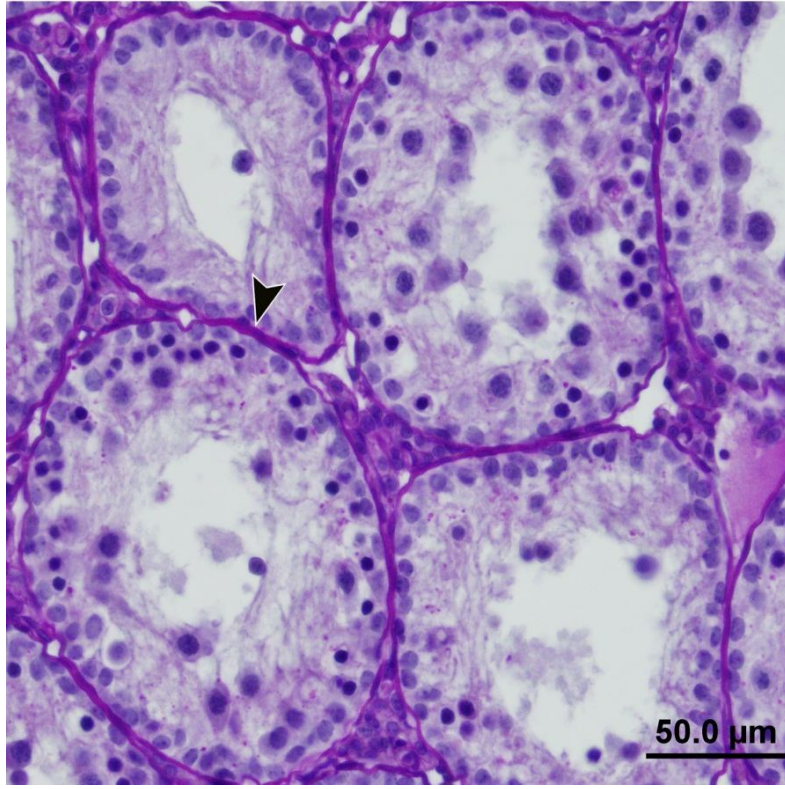
Şekil 15. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK'ların germinal hücrelerinde deskuamasyon (oklar), H&E.



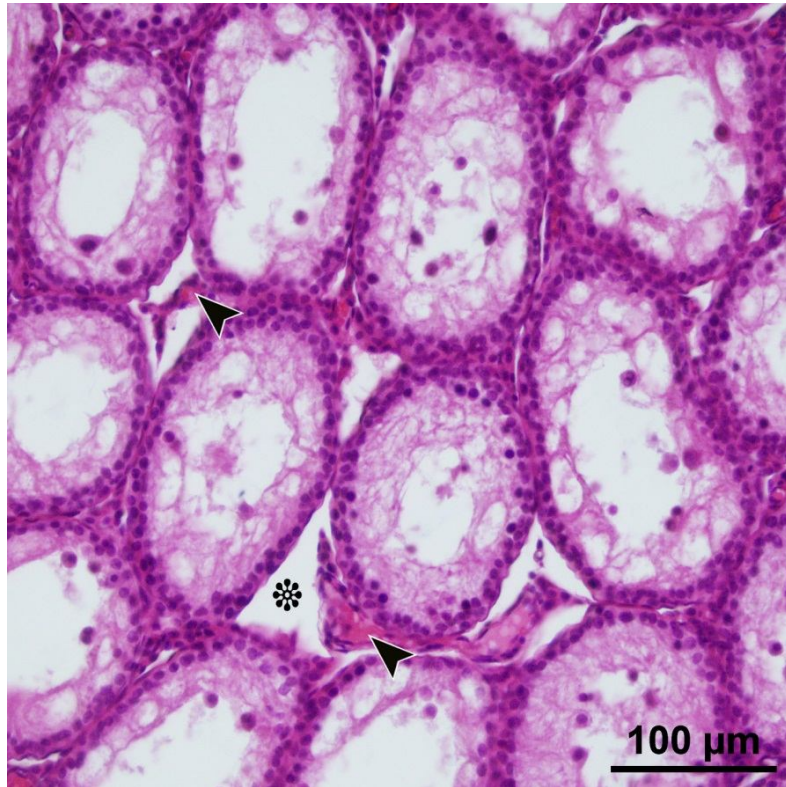
Şekil 16. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK'ların germinal hücrelerinde sayıca azalma ve disorganizasyon, H&E.



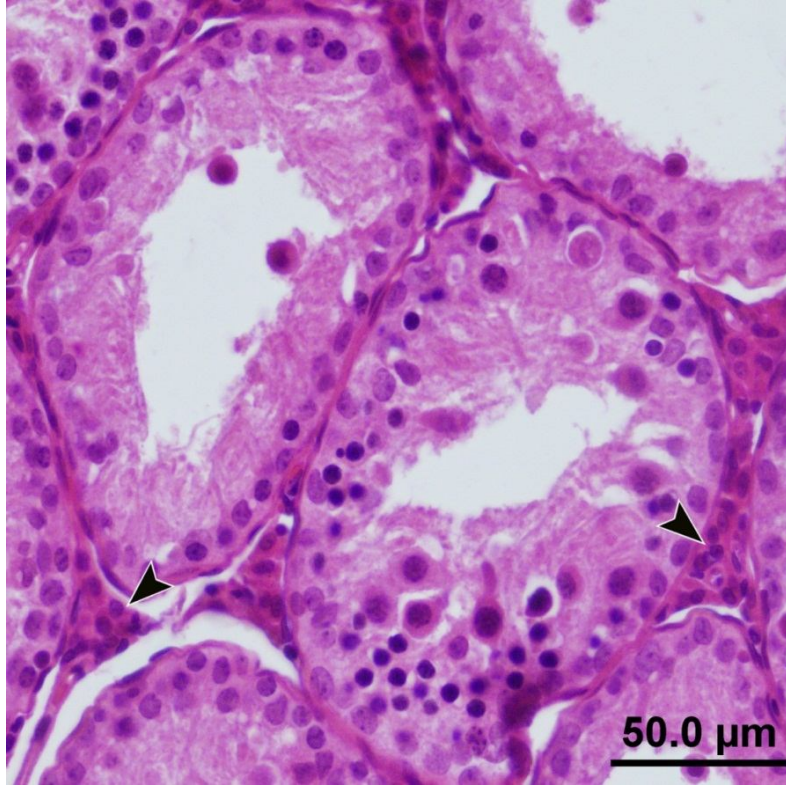
Şekil 17. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK'ların germinal hücrelerinde vakuolizasyon (ok başları), H&E.



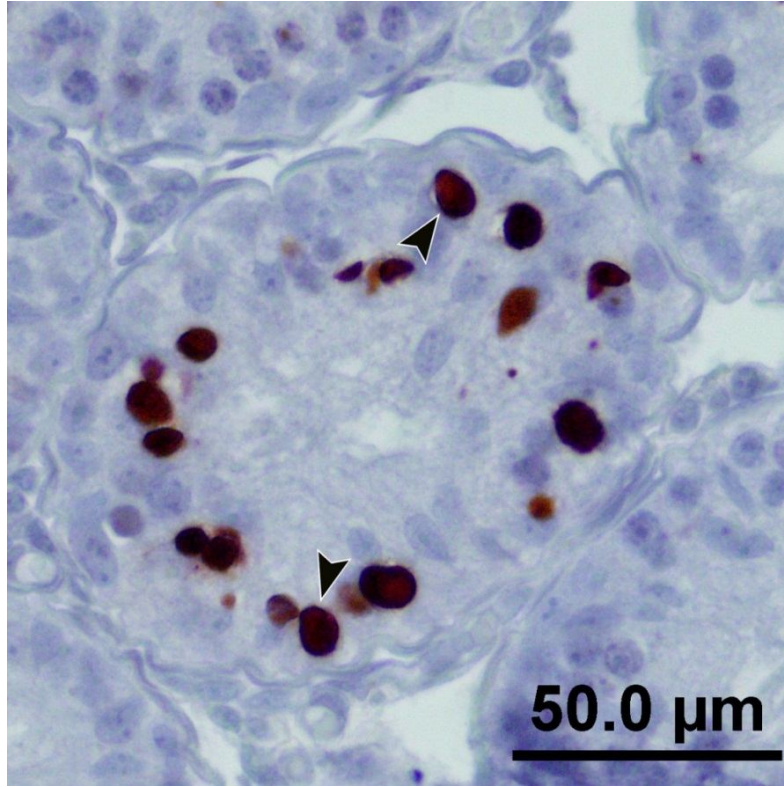
Şekil 18. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında kalınlaşma (ok başı), PAS & H.



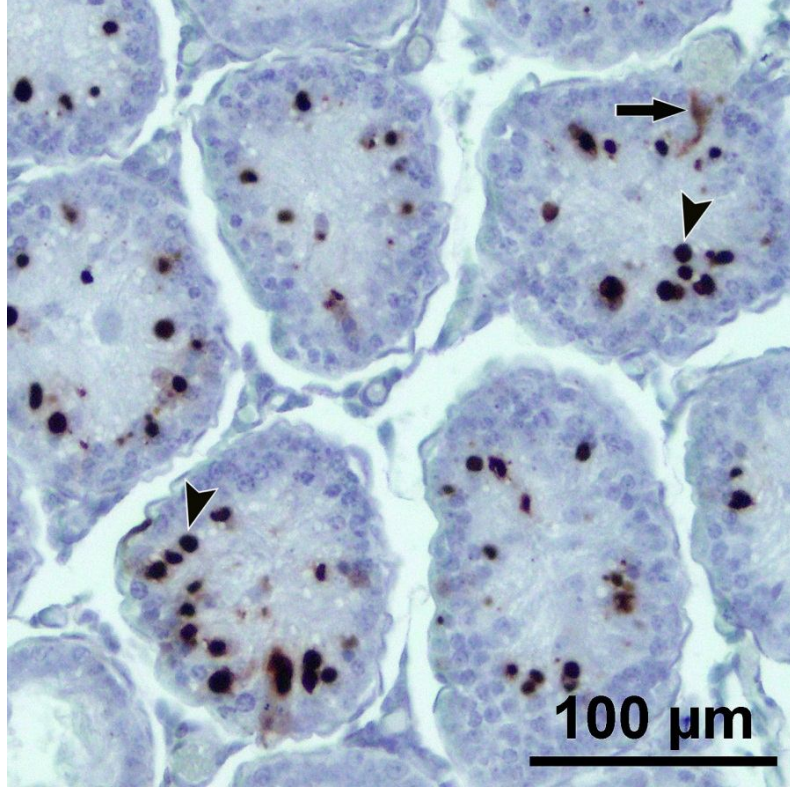
Şekil 19. Yedinci gün DEHP grubunda testiste intersitisyel bölgede ödem ve genişleme (yıldız) ile kapillar konjesyon (ok başları), H&E.



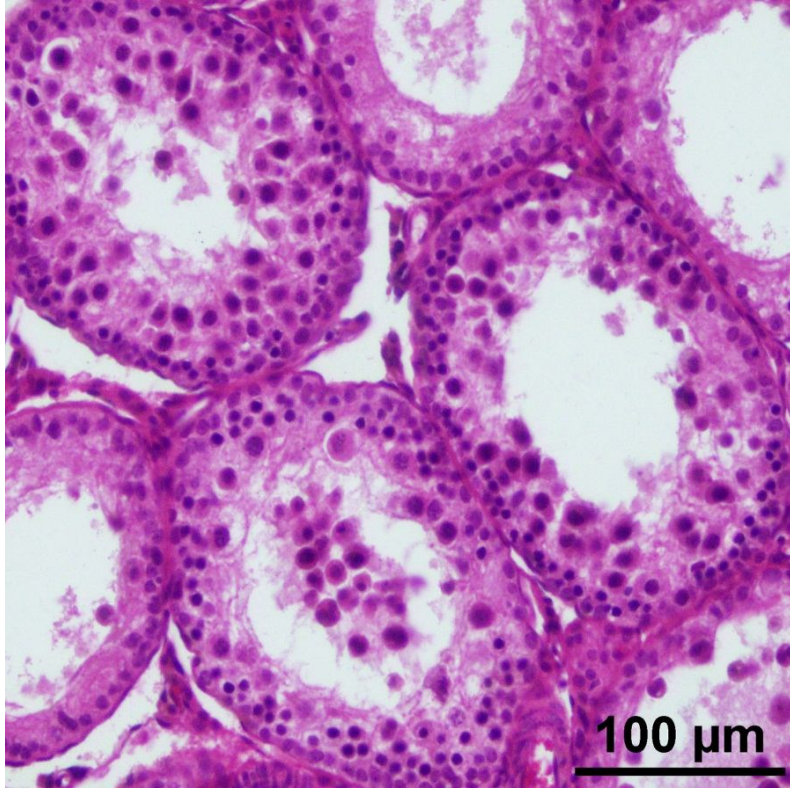
Şekil 20. Yedinci gün DEHP grubunda testiste normal görünümlü Leydig hücreleri (ok başları), H&E.



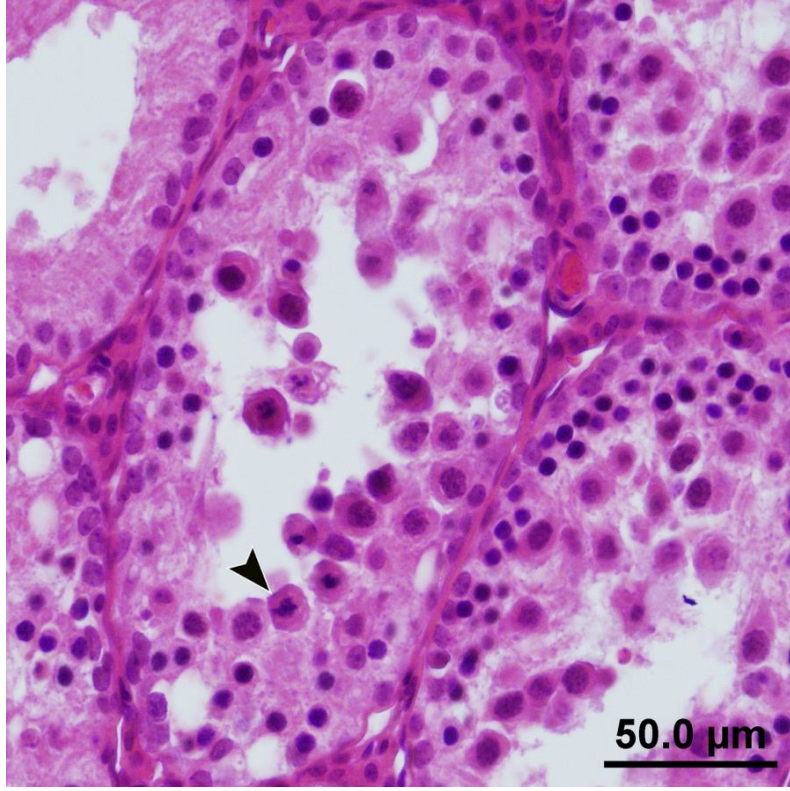
Şekil 21. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler (ok başları), TUNEL.



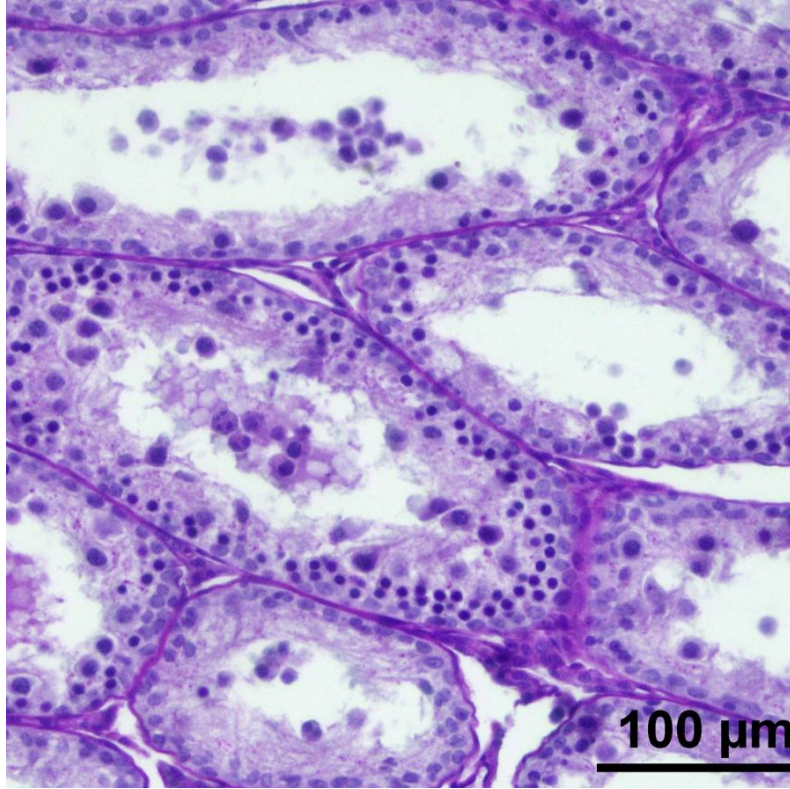
Şekil 22. Yedinci gün DEHP grubunda testiste TSK'larda TUNEL pozitif spermatositler (ok başları) ve Sertoli hücresi (ok), TUNEL.



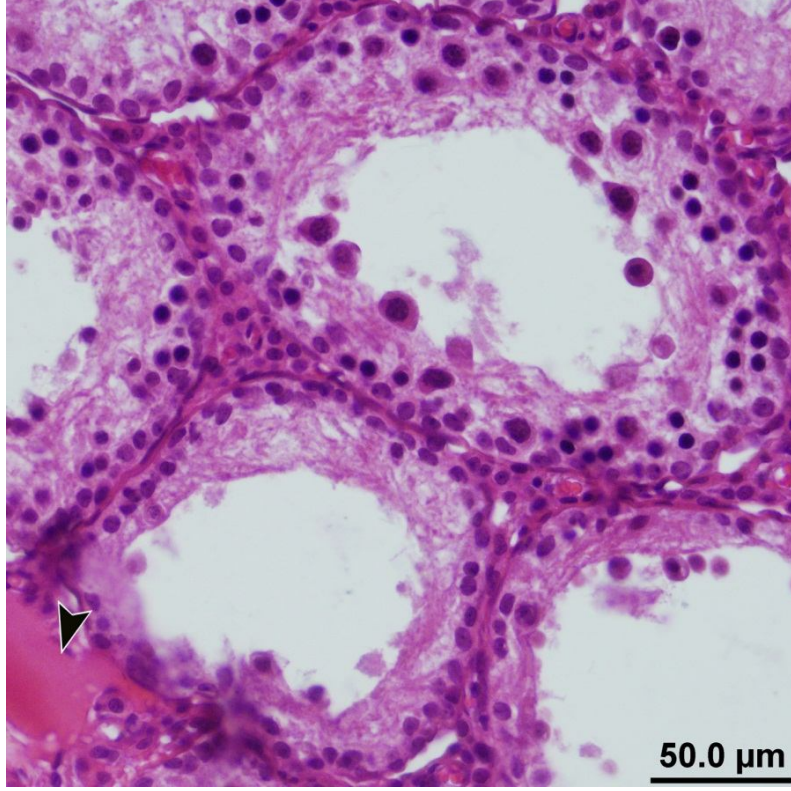
Şekil 23. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda hafif şiddette nekrotik ve atrofik değişiklikler, H&E.



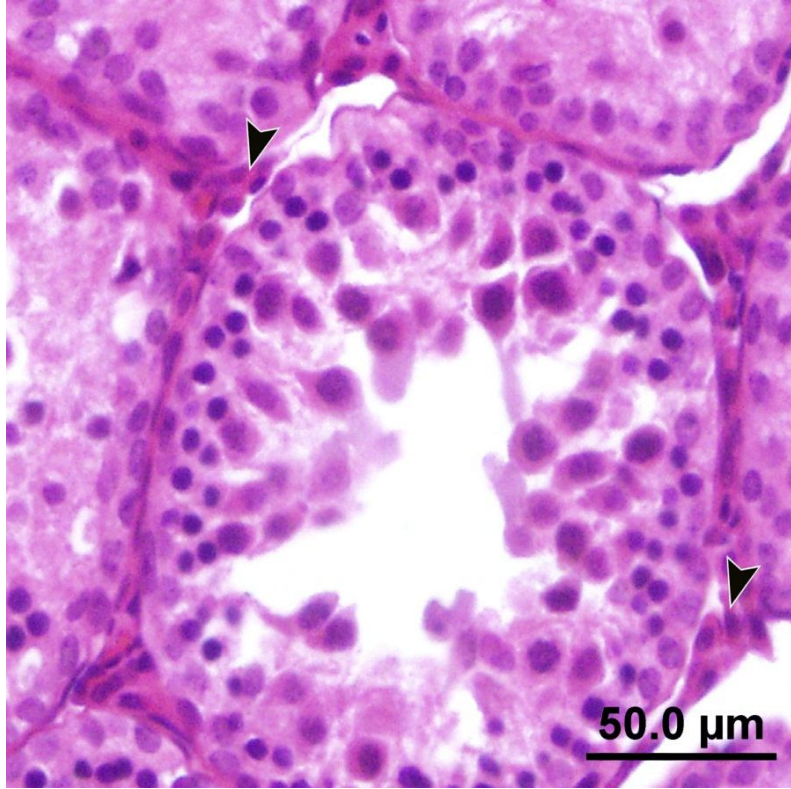
Şekil 24. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda mitotik aktiviteye bağlı rejeneratif değişimler (ok başı), H&E.



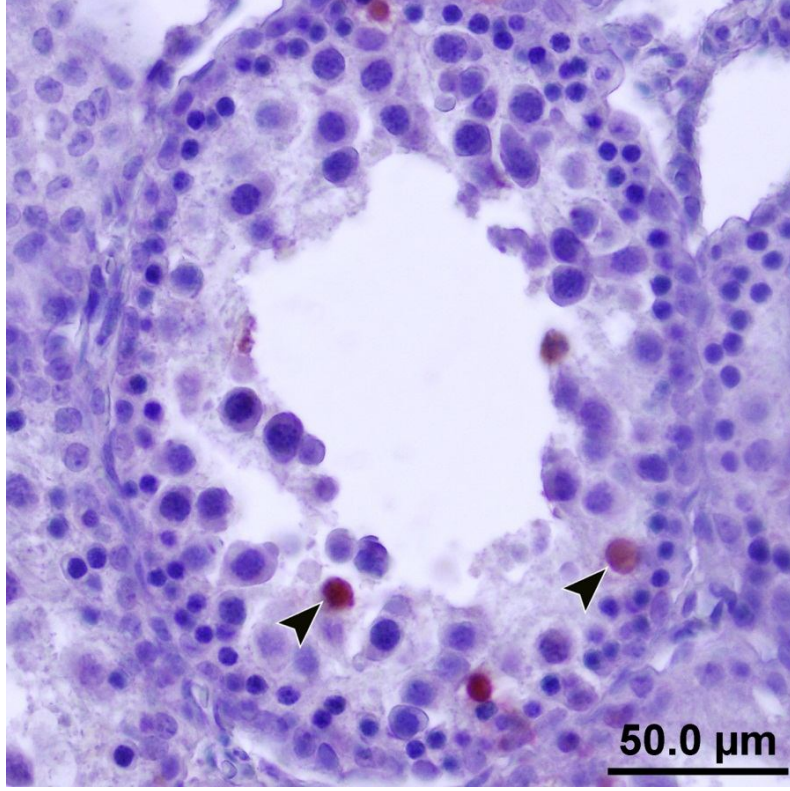
Şekil 25. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında normal görünüm, PAS & H.



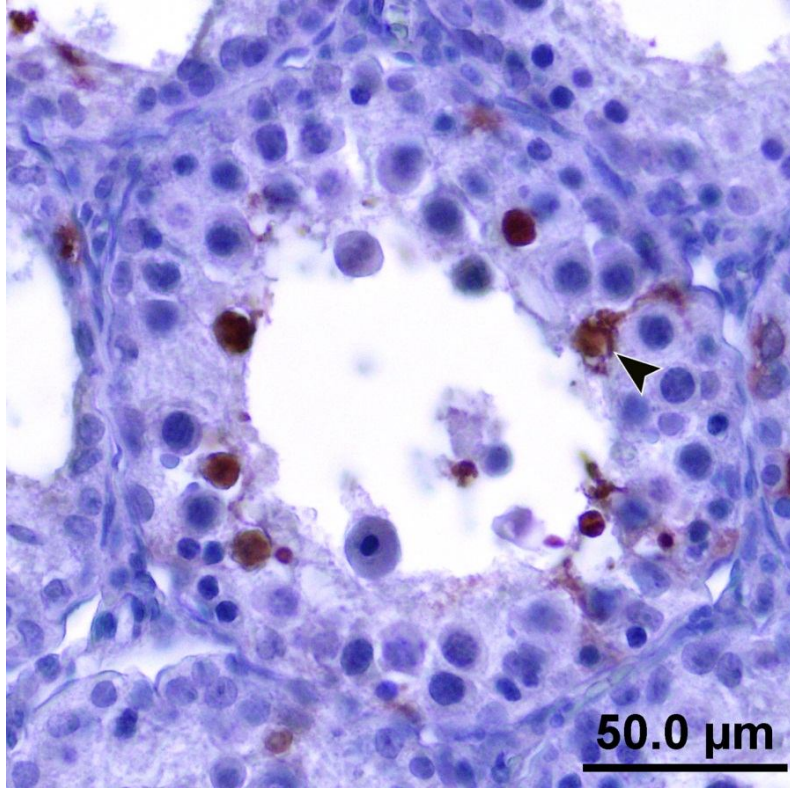
Şekil 26. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste intersitisyel bölgede eozinofilik karakterde ödem (ok başı), H&E.



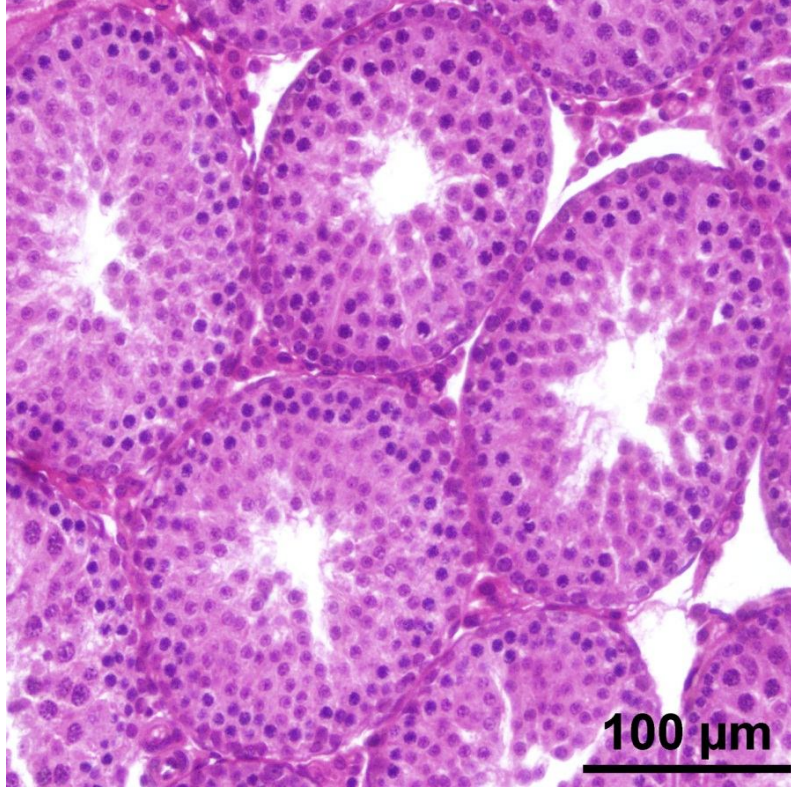
Şekil 27. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste normal görünümlü Leydig hücreleri (ok başları), H&E.



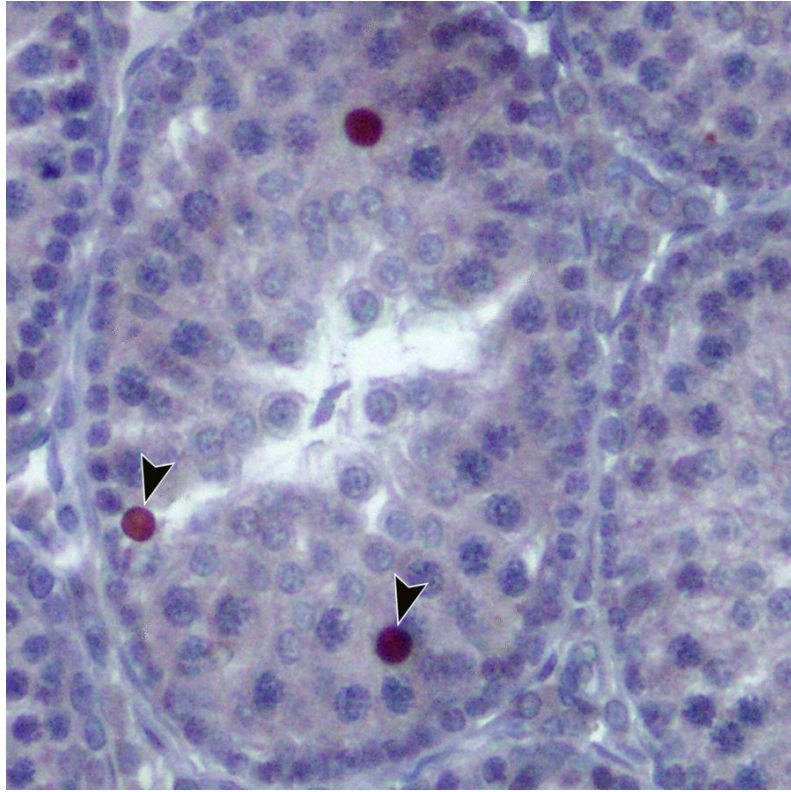
Şekil 28. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler (ok başları), TUNEL.



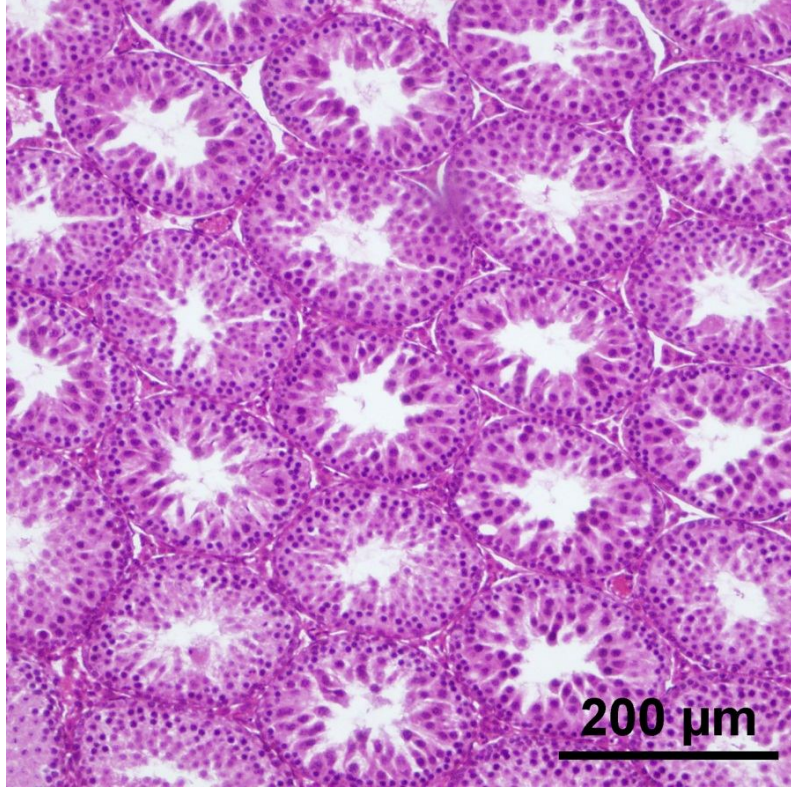
Şekil 29. Yedinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif Sertoli hücreleri (ok başı), TUNEL.



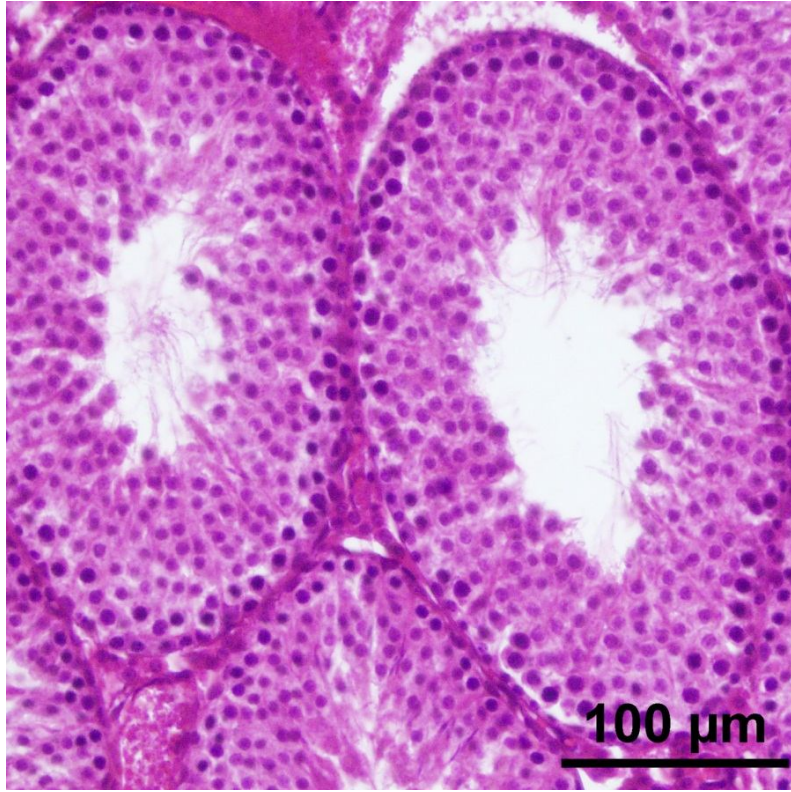
Şekil 30. Yedinci gün EGb 761 grubunda testisin normal histolojik görünümü, H&E.



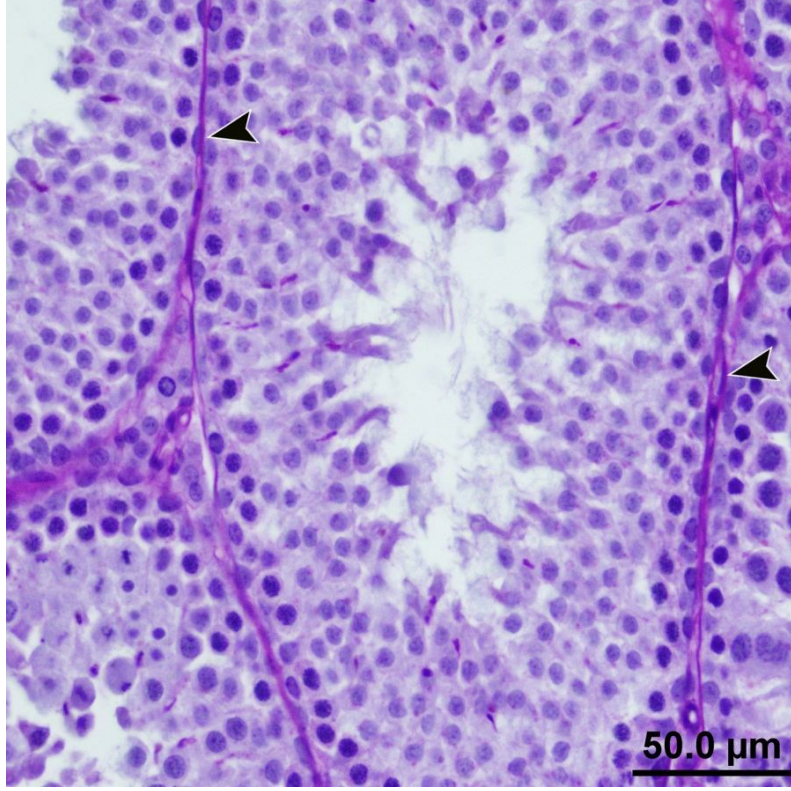
Şekil 31. Yedinci gün EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler (ok başları), TUNEL x 400.



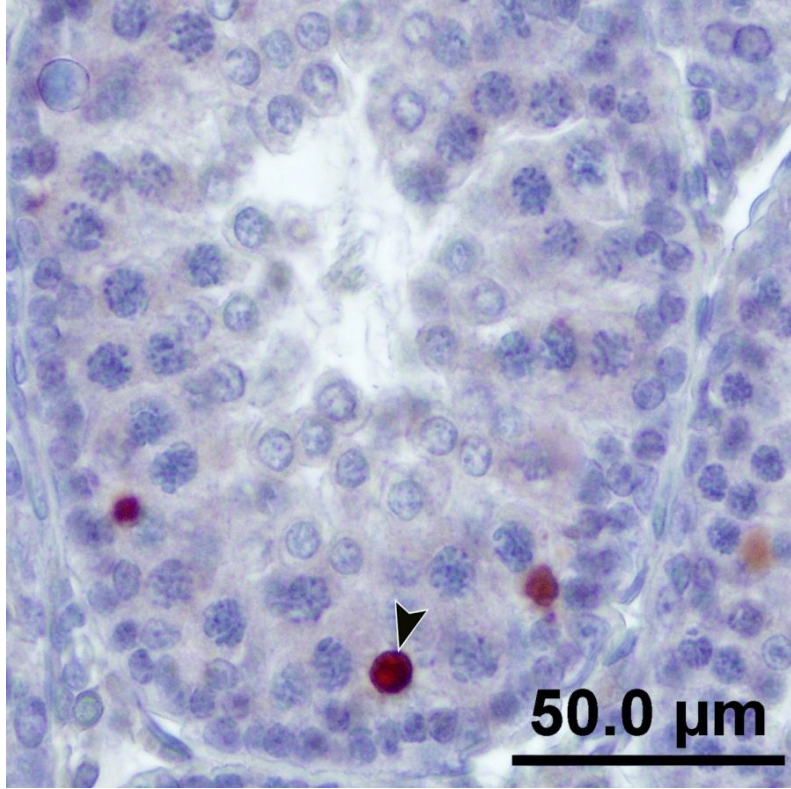
Şekil 32. On dördüncü gün kontrol grubunda testisin histolojik görünümü, H&E.



Şekil 33. On dördüncü gün kontrol grubunda testiste TSK'ların histolojik görünümü, H&E.



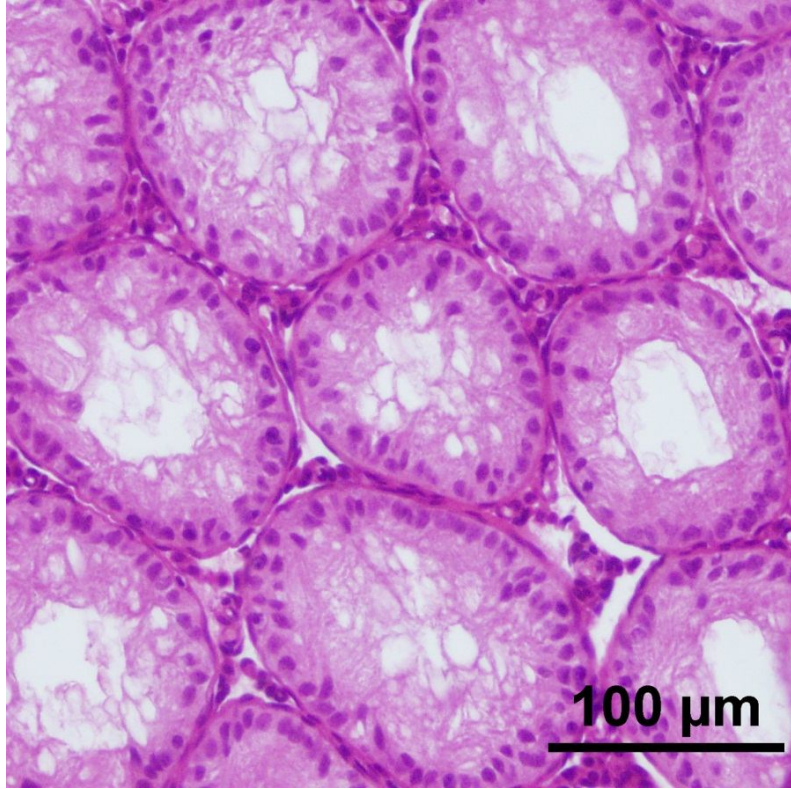
Şekil 34. On dördüncü gün kontrol grubunda testiste TSK'ların çevresinde miyoid hücreler (ok başları) ve bazal membranlarında normal görünüm, PAS & H.



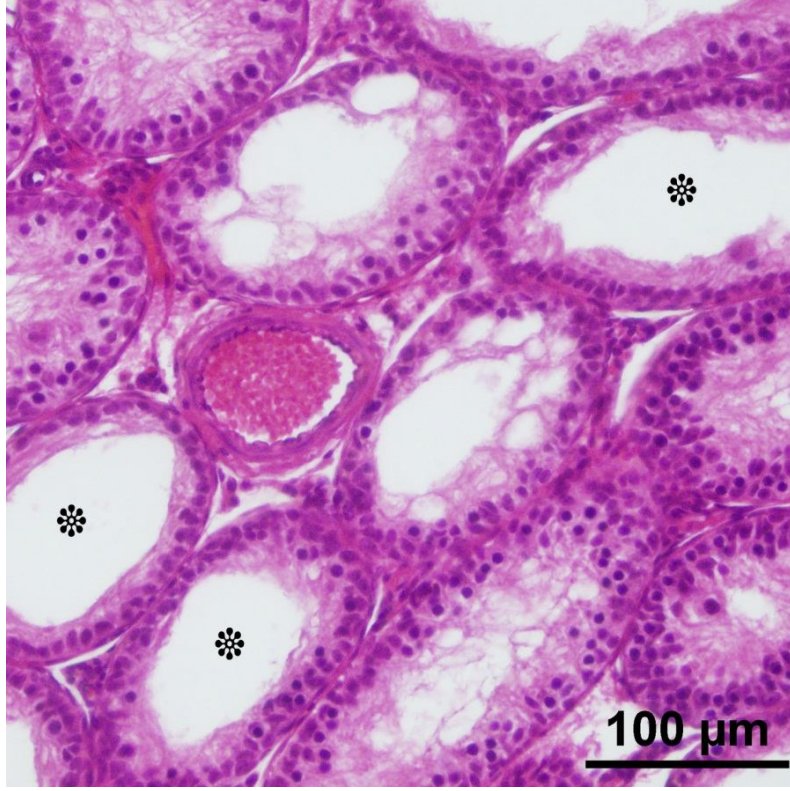
Şekil 35. On dördüncü gün kontrol grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücre (ok başı), TUNEL.



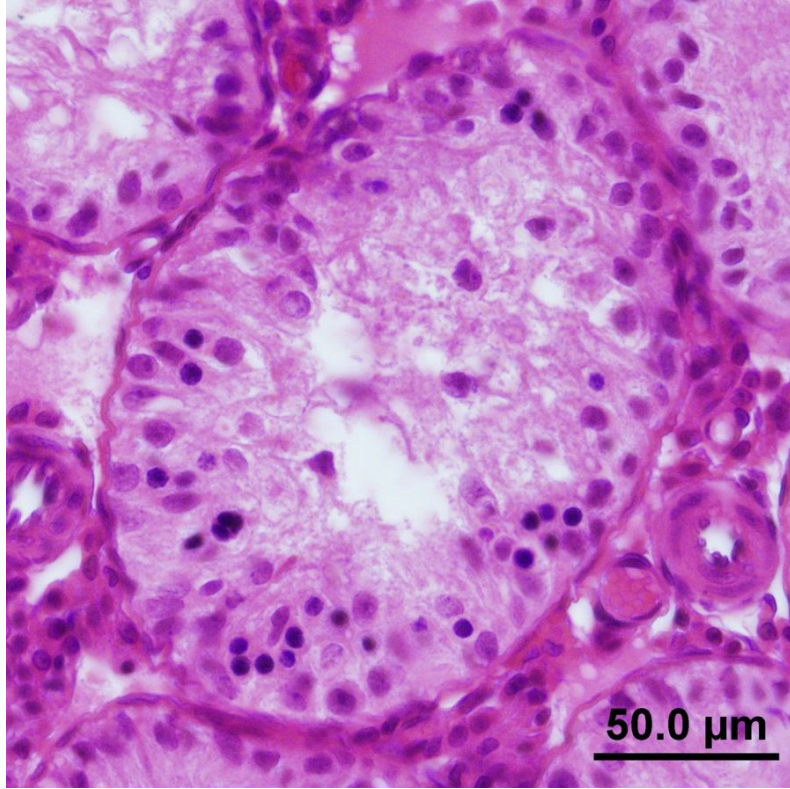
Şekil 36. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK’larda şiddetli nekroz, atrofi ve dejenerasyon, H&E.



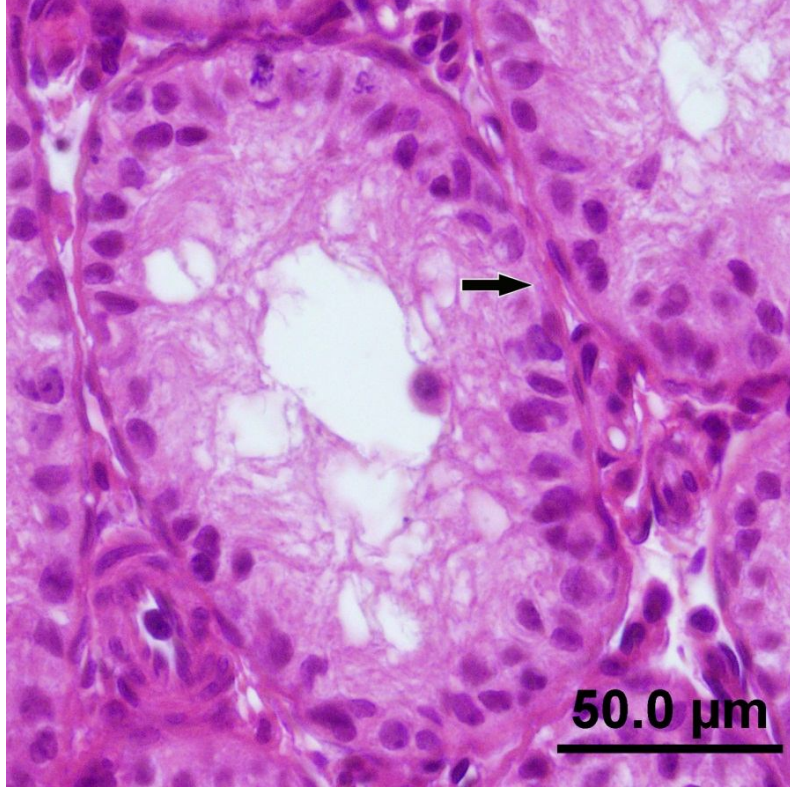
Şekil 37. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK’larda şiddetli nekroz, atrofi ve dejenerasyon, H&E.



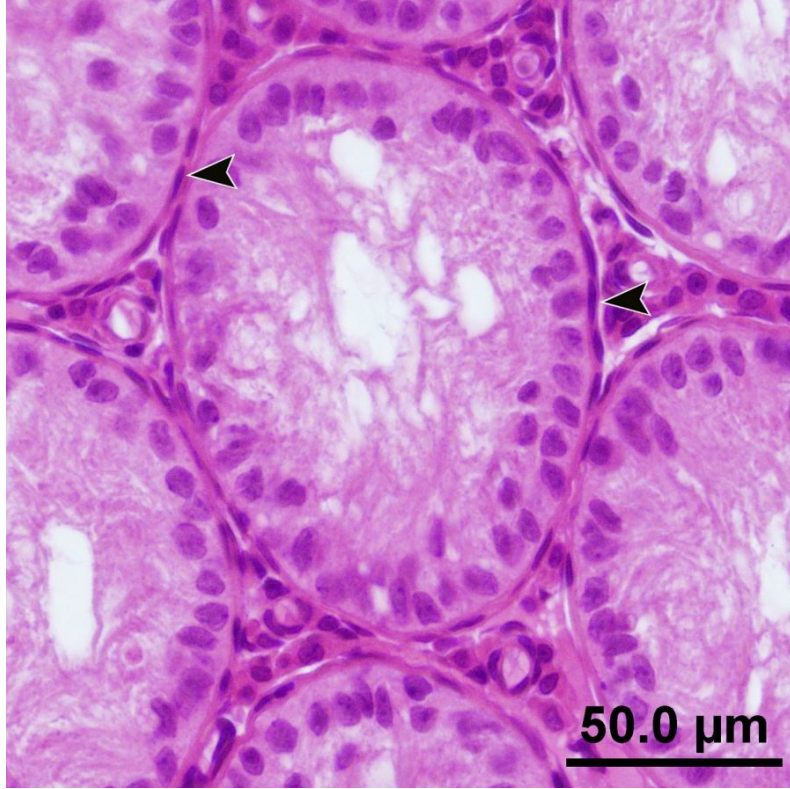
Şekil 38. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'larda şiddetli nekroz (yıldızlar), atrofi ve dejenerasyon, H&E.



Şekil 39. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'larda spermatogenik hücrelerde düzensizlik, H&E.



Şekil 40. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste bazı TSK'larda spermatogonyumların kısmi yokluğu (ok), H&E.



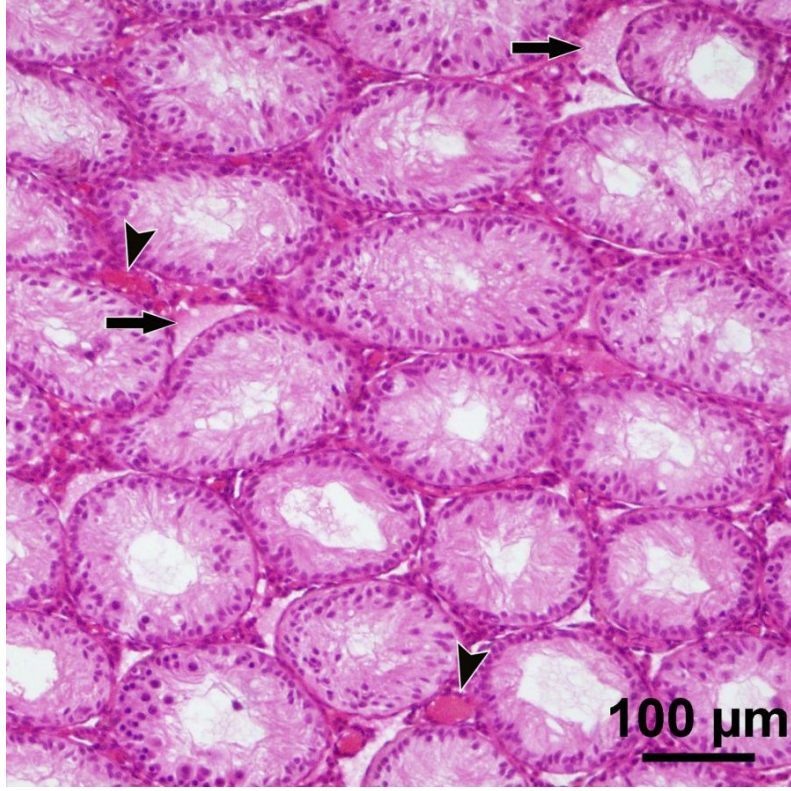
Şekil 41 On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'ların çevresinde sağlam miyoid hücreler (ok başları), H&E.



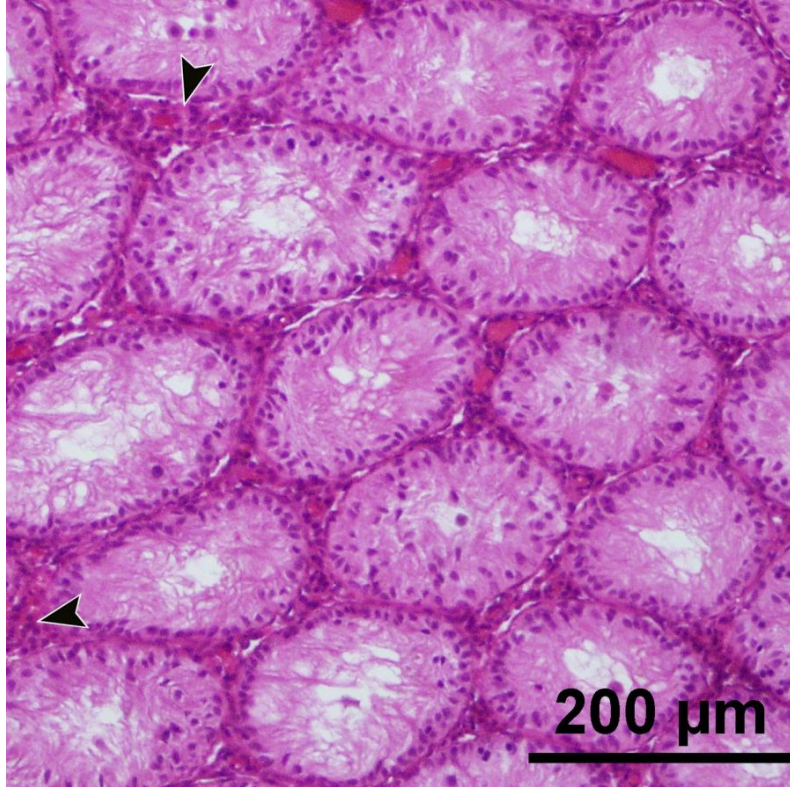
Şekil 42. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'ların lümeninde çok çekirdekli dev hücre (ok başı), H&E.



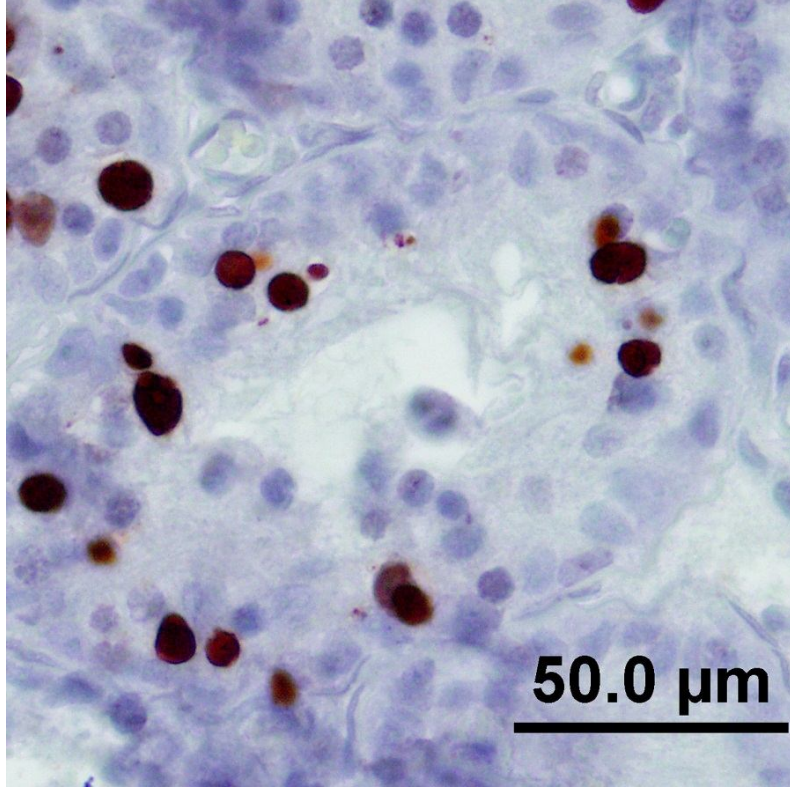
Şekil 43. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında belirgin kalınlaşma (ok başı), H&E.



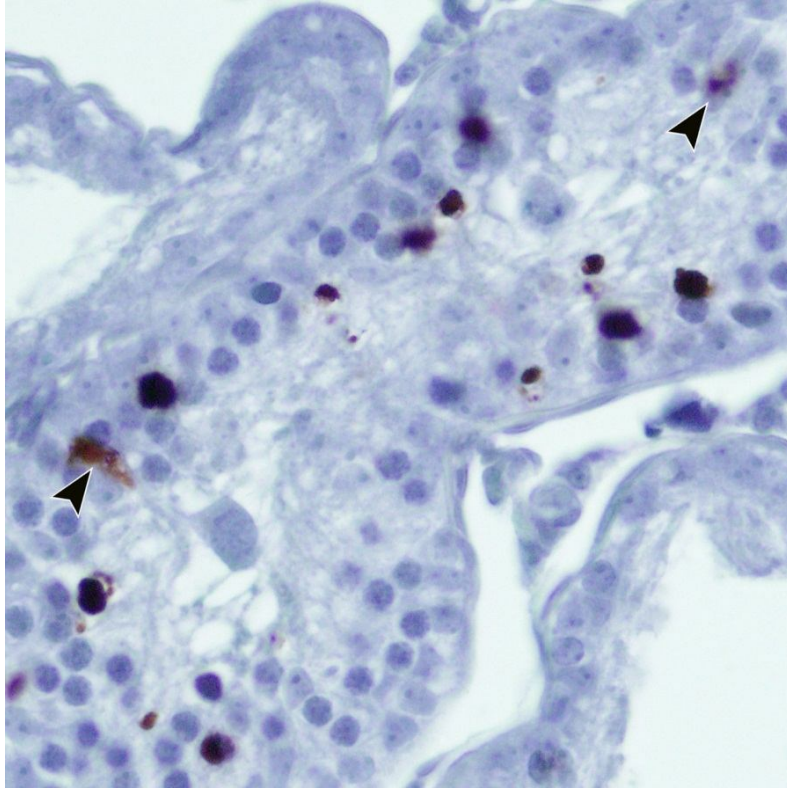
Şekil 44. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste intersitisyel ödem ve genişleme (oklar) ile kapillar konjesyon (ok başları), H&E.



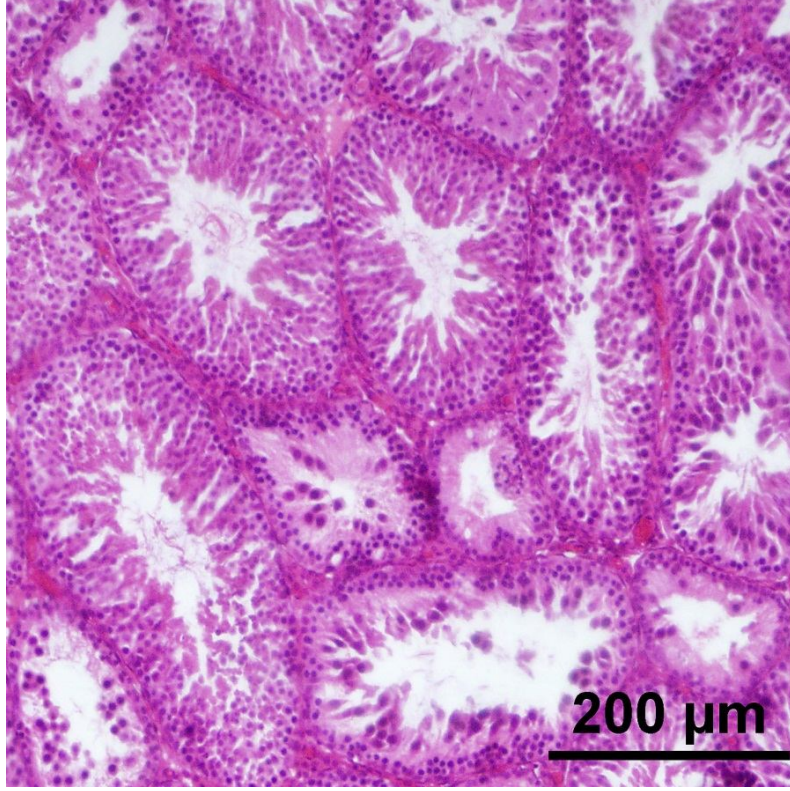
Şekil 45. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste Leydig hücre hiperplazisi (ok başları), H&E.



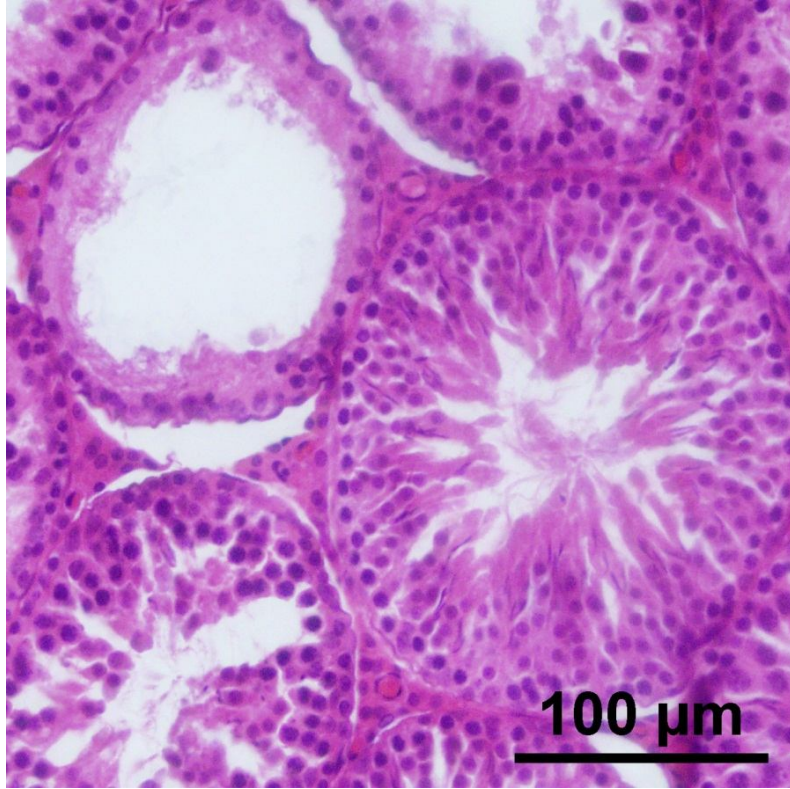
Şekil 46. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK’larda TUNEL pozitif hücreler, TUNEL.



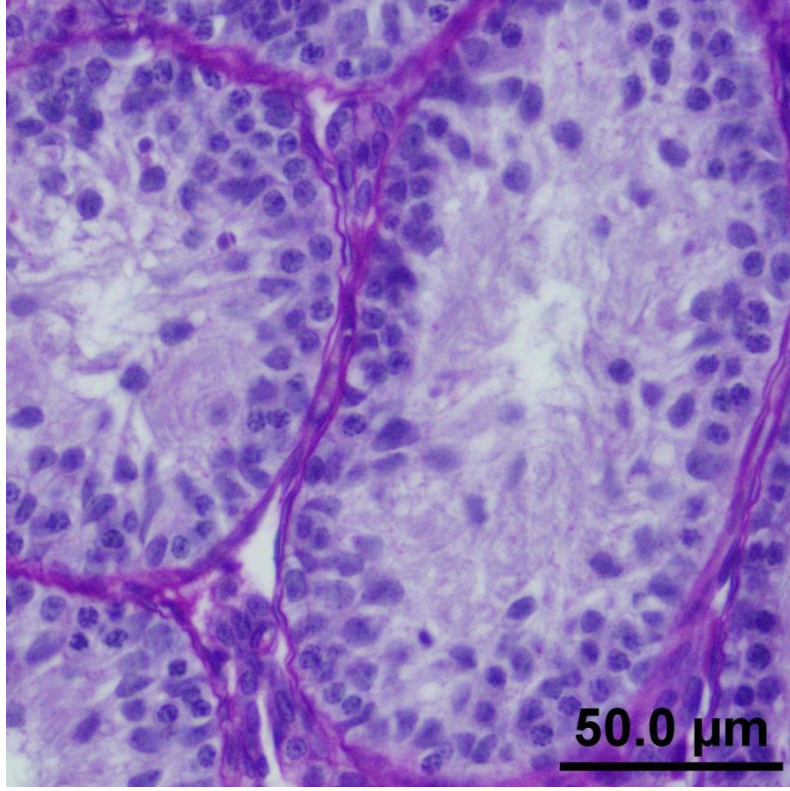
Şekil 47. On dördüncü gün DEHP grubunda testiste TSK’da TUNEL Sertoli hücreleri (ok başları), TUNEL x 400.



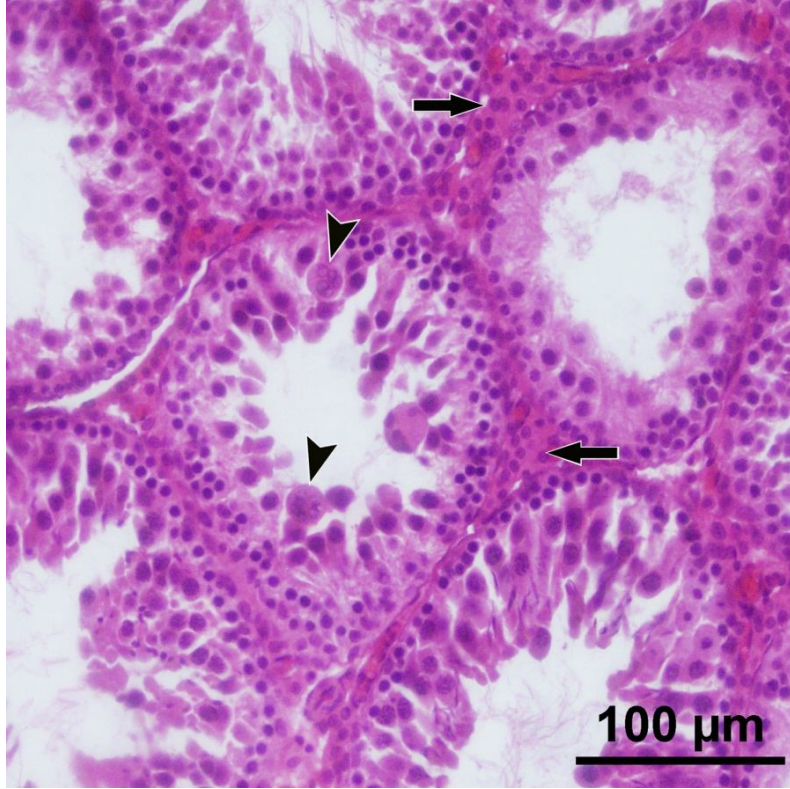
Şekil 48. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda hafif dejeneratif değişiklikler, H&E.



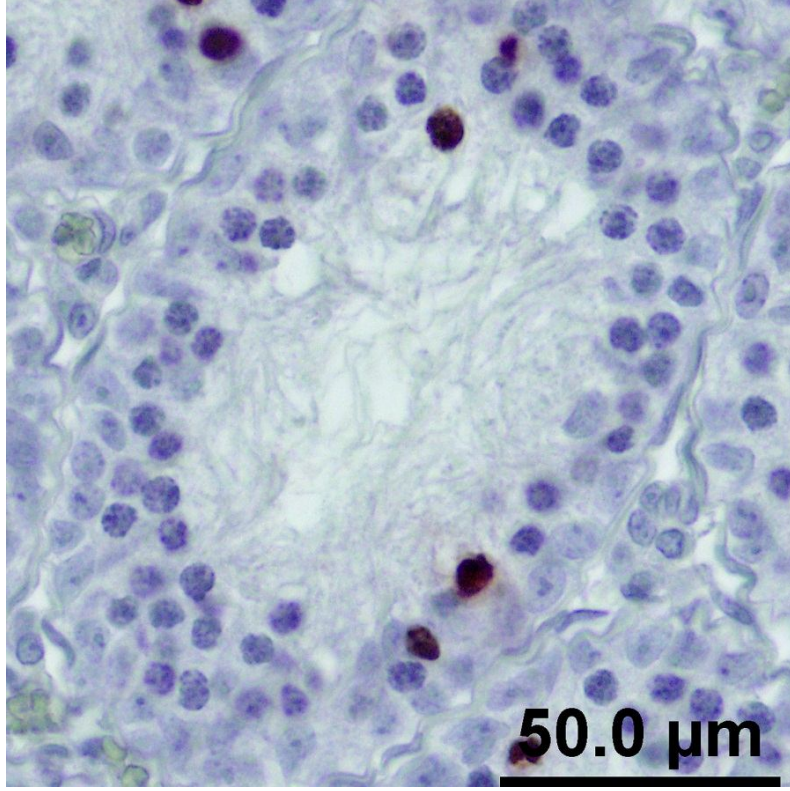
Şekil 49. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste bazı TSK'larda spermatogenezis, H&E.



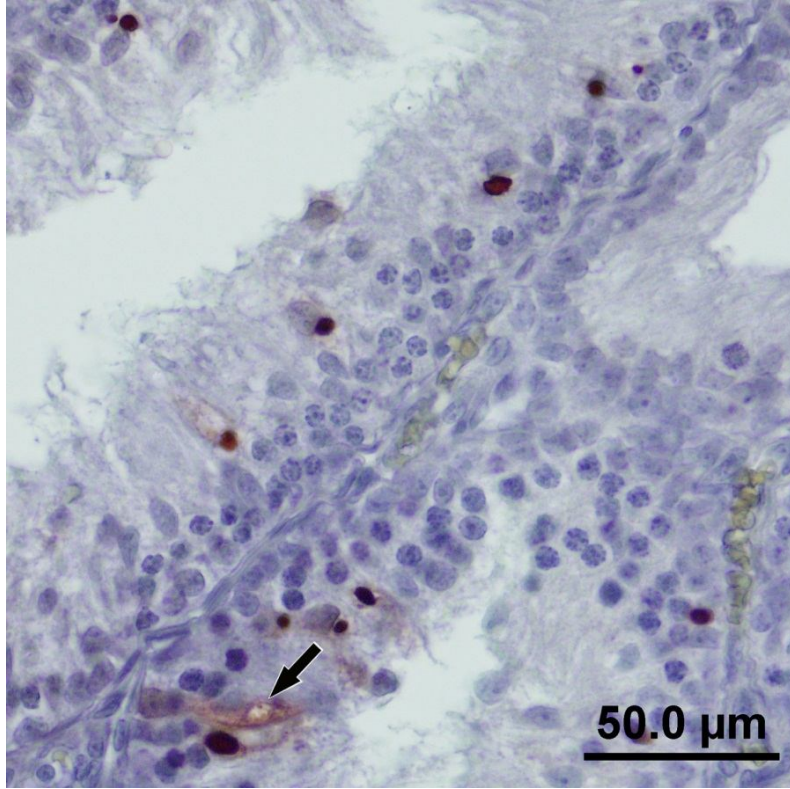
Şekil 50. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında normal görünüm, PAS & H.



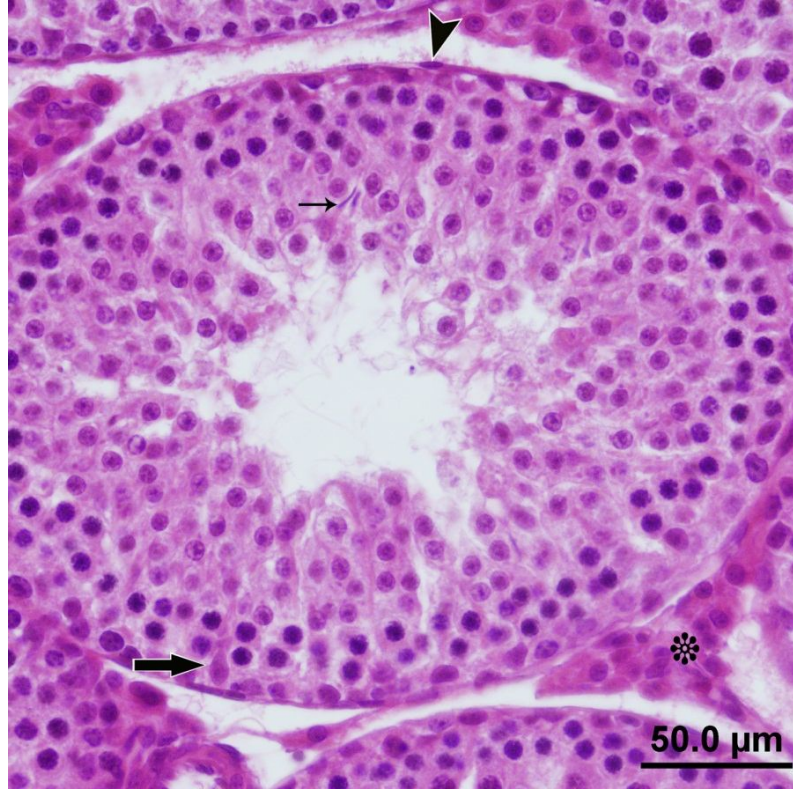
Şekil 51. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'ların lümenlerinde çok çekirdekli dev hücreler (ok başları) ile hafif şiddette Leydig hücre hiperplazisi (oklar), H&E.



Şekil 52. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda TUNEL pozitif hücreler, TUNEL.



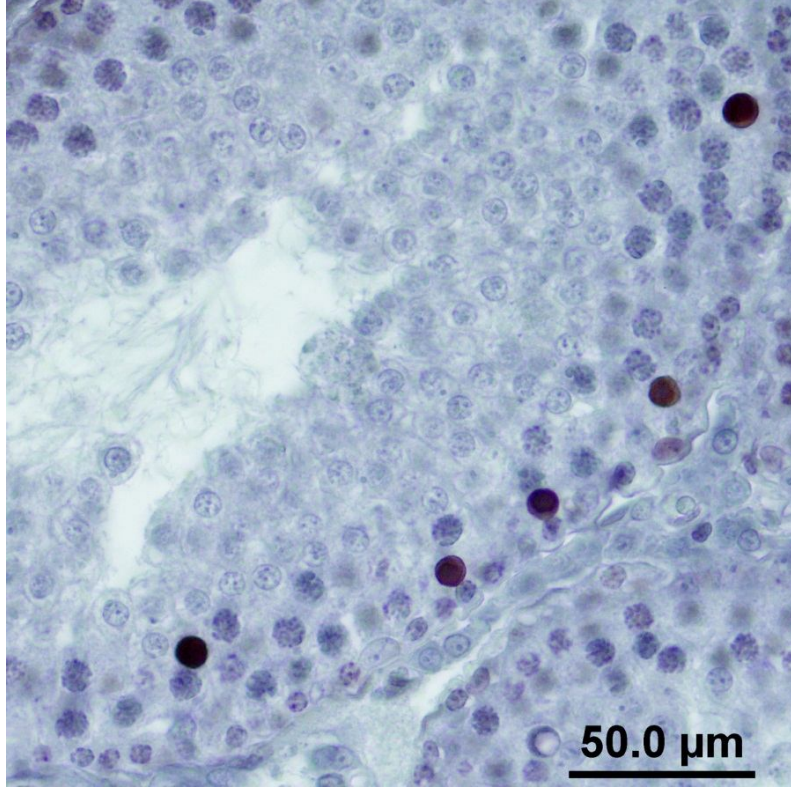
Şekil 53. On dördüncü gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda TUNEL pozitif Sertoli hücresi (ok), TUNEL.



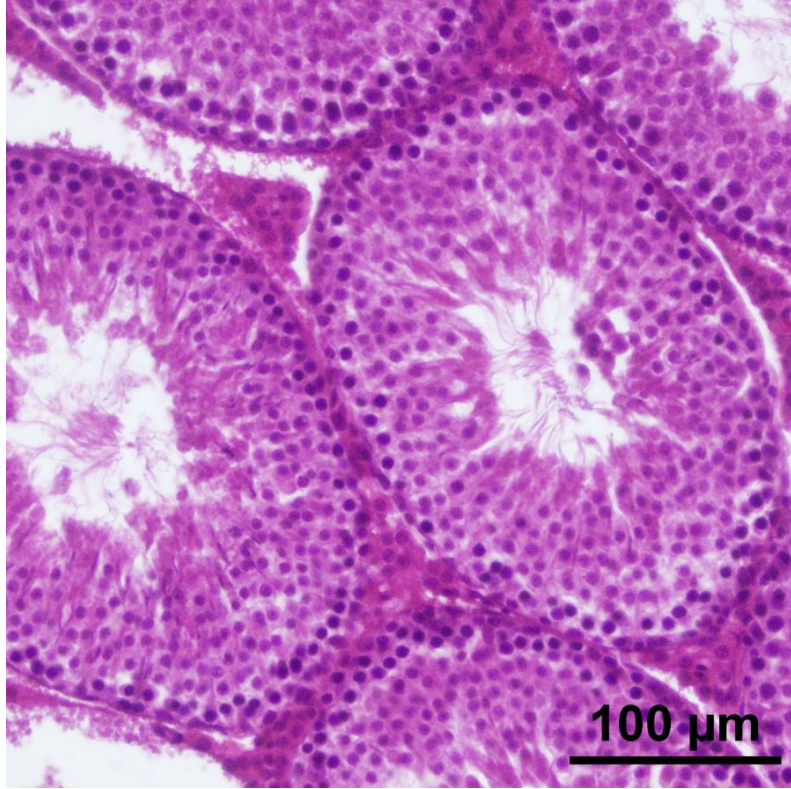
Şekil 54. On dördüncü gün EGb 761 grubunda testiste; Sertoli hücresi (kalın ok), uzamış spermatid (ince ok) ve peritubuler miyoid hücre (ok başı) ile Leydig hücreleri (yıldız), H&E.



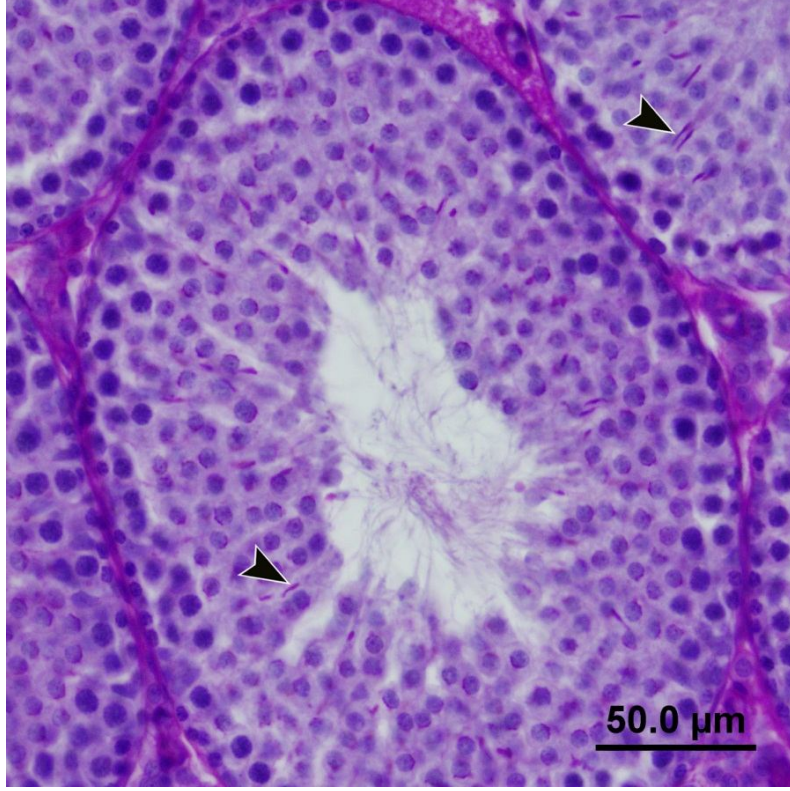
Şekil 55. On dördüncü gün EGb 761 grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında normal görünüm, PAS & H.



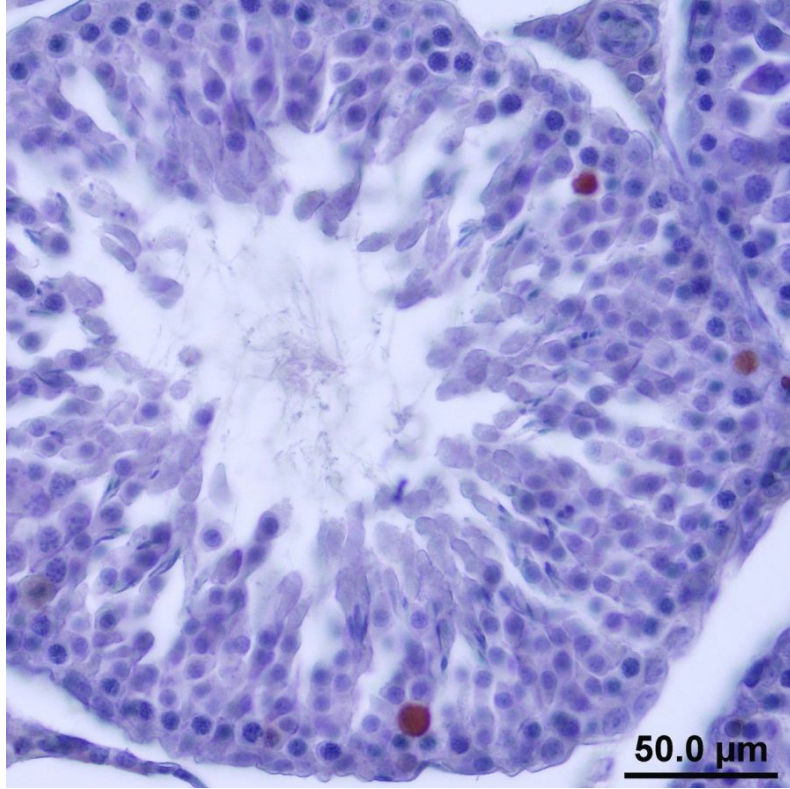
Şekil 56. On dördüncü gün EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler, TUNEL.



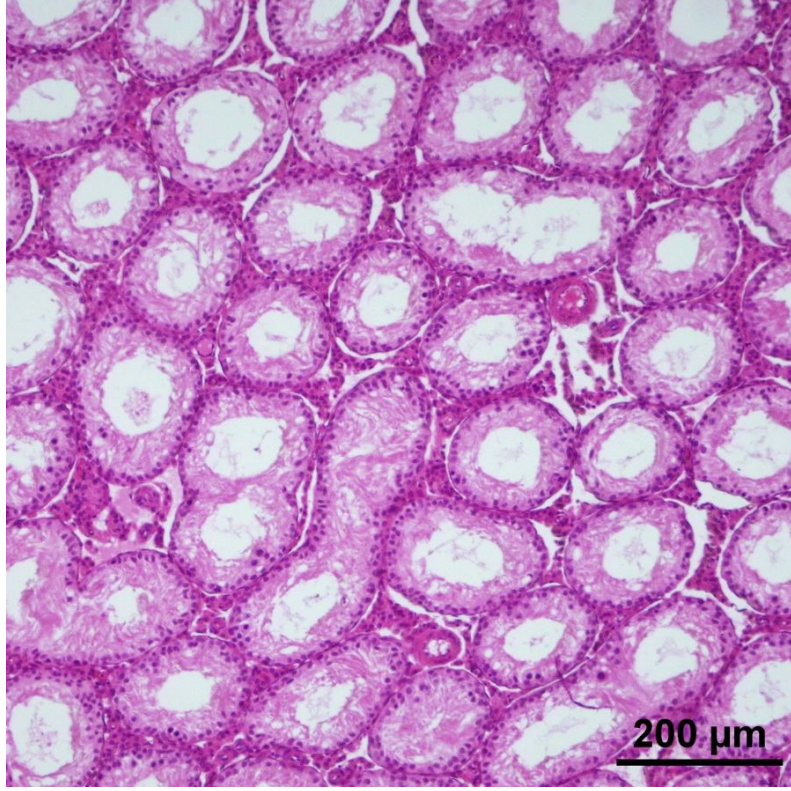
Şekil 57. Yirmi sekizinci gün kontrol grubunda testisin histolojik görünümü, H&E.



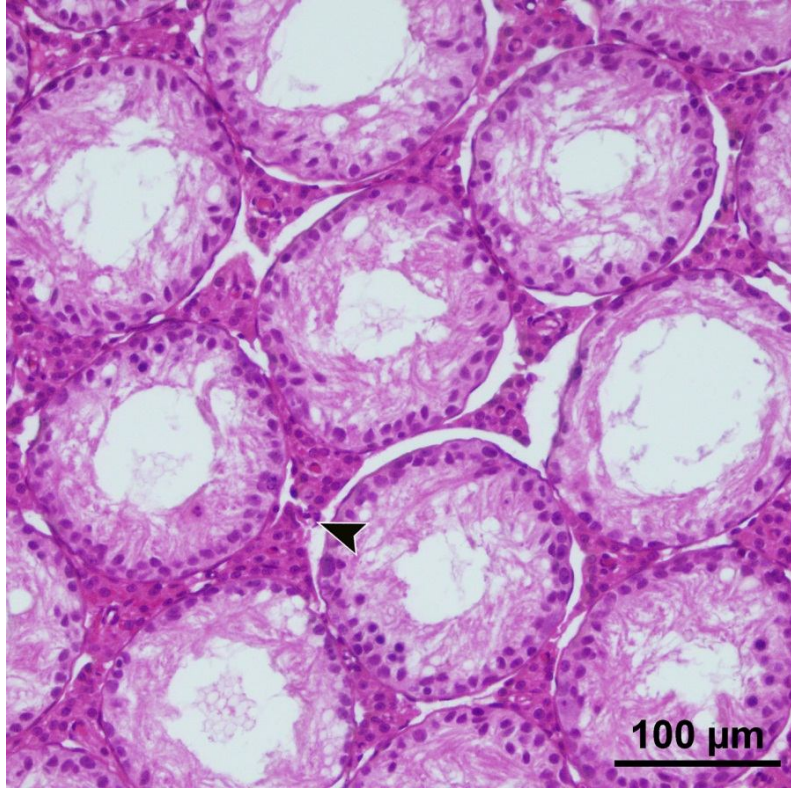
Şekil 58. Yirmi sekizinci gün kontrol grubu testisinde TSK'larda uzamış spermatidler (ok başları) ve bazal membranların normal görünümü, PAS & H.



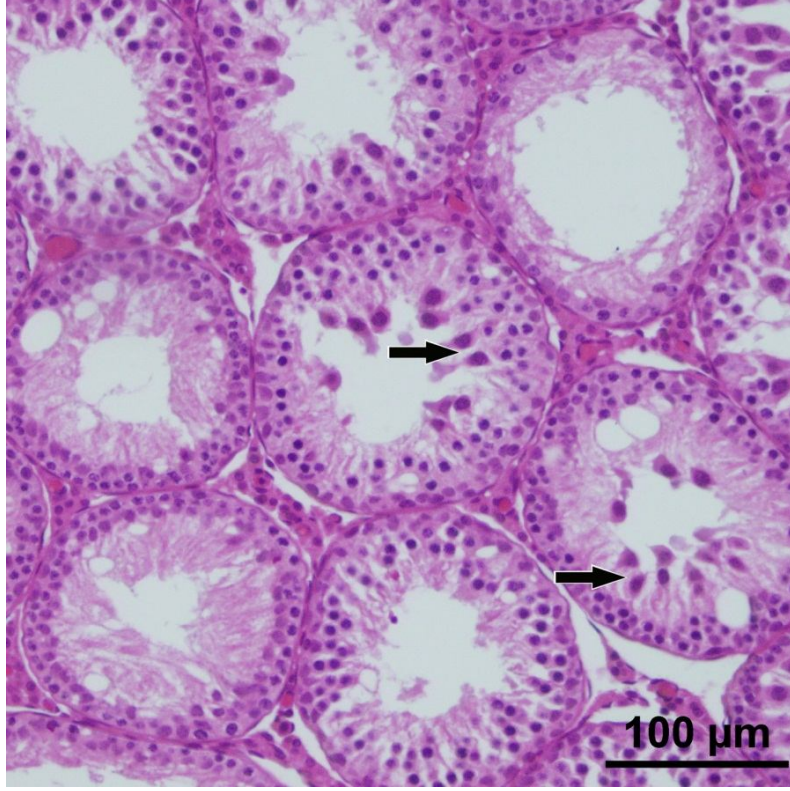
Şekil 59. Yirmi sekizinci gün kontrol grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler, TUNEL.



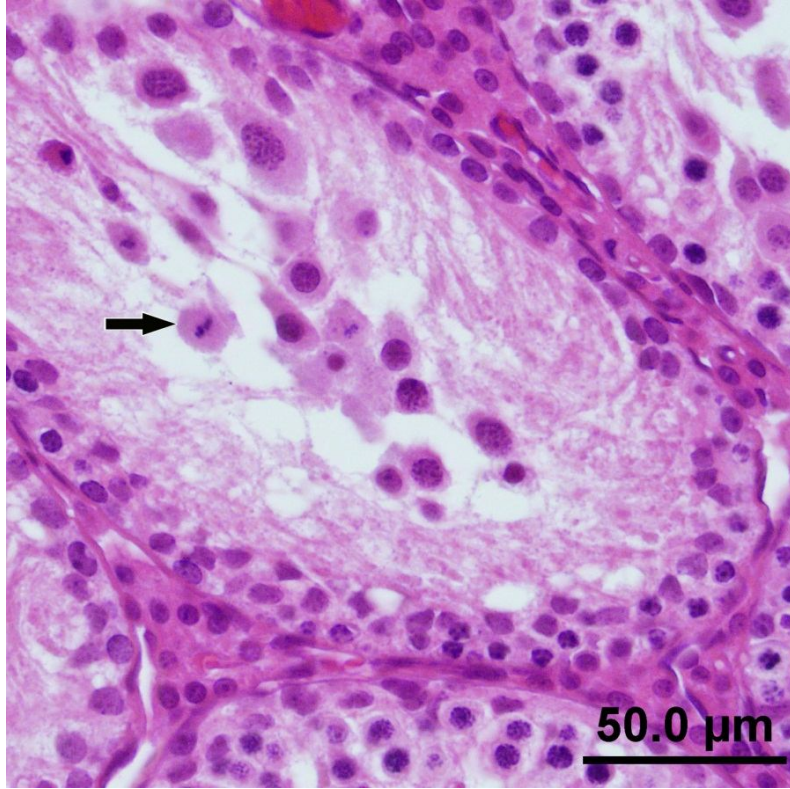
Şekil 60. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda TSK'larda atrofi ile birlikte nekrotik ve dejeneratif değişiklikler, H&E.



Şekil 61. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste belirgin Leydig hücre hiperplazisi (ok başı), H&E.



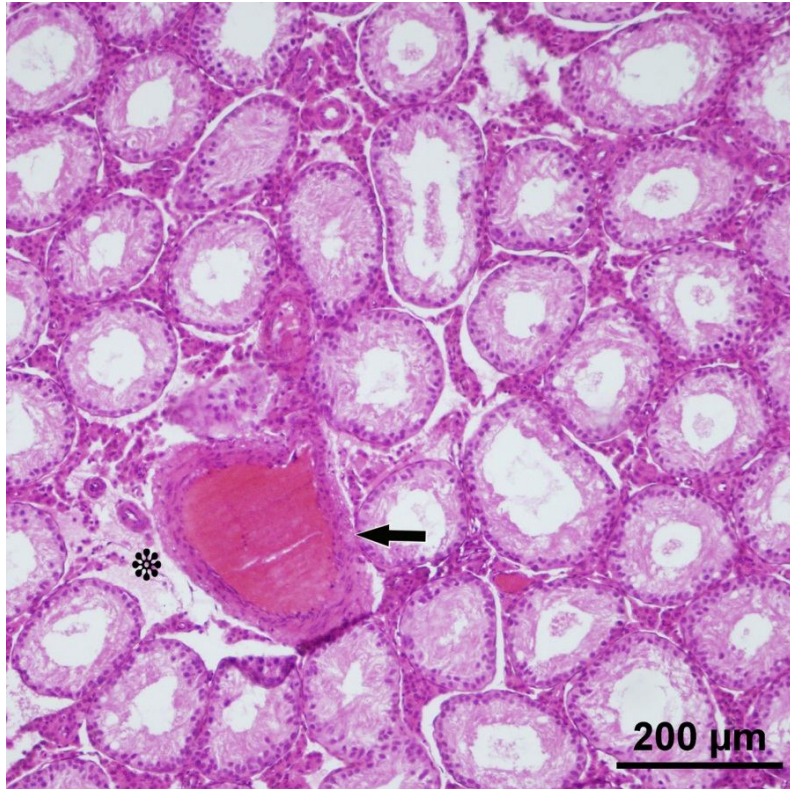
Şekil 62. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste bazı TSK'ların germinal hücrelerinde kısmi rejenerasyon (oklar), H&E.



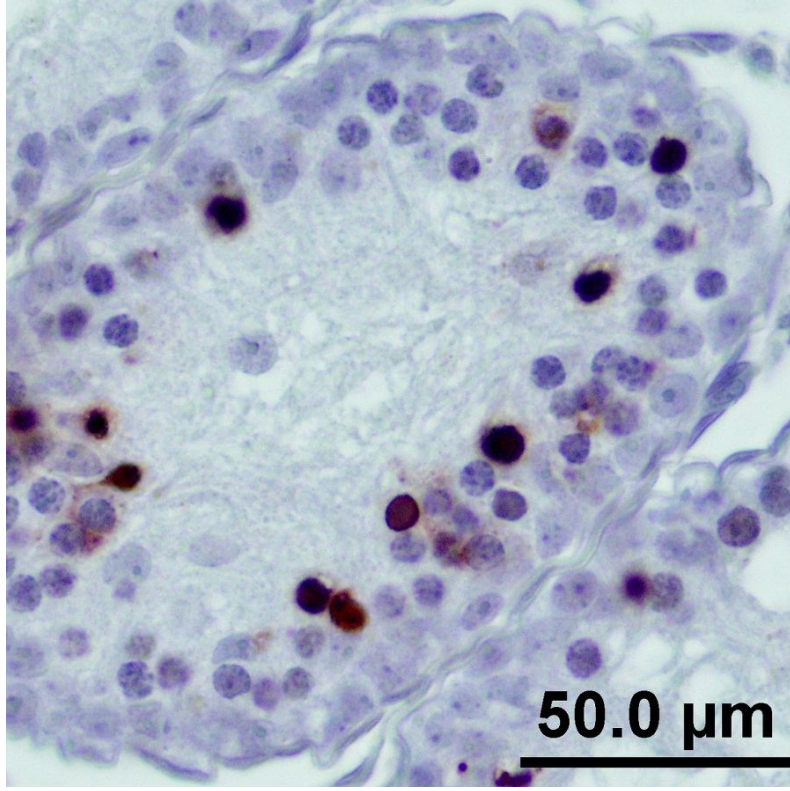
Şekil 63. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste rejeneratif TSK'ların germinal hücrelerinde mitotik figürler (ok), H&E.



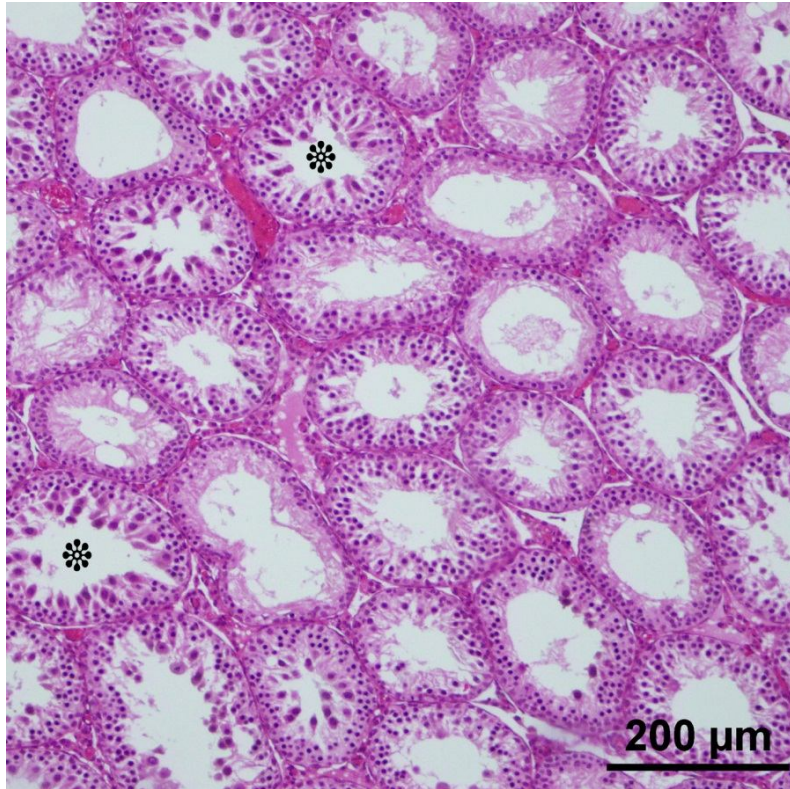
Şekil 64. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarında belirgin kalınlaşma (ok başları) ve Leydig hücrelerinde belirgin hiperplazi (yıldız), PAS & H.



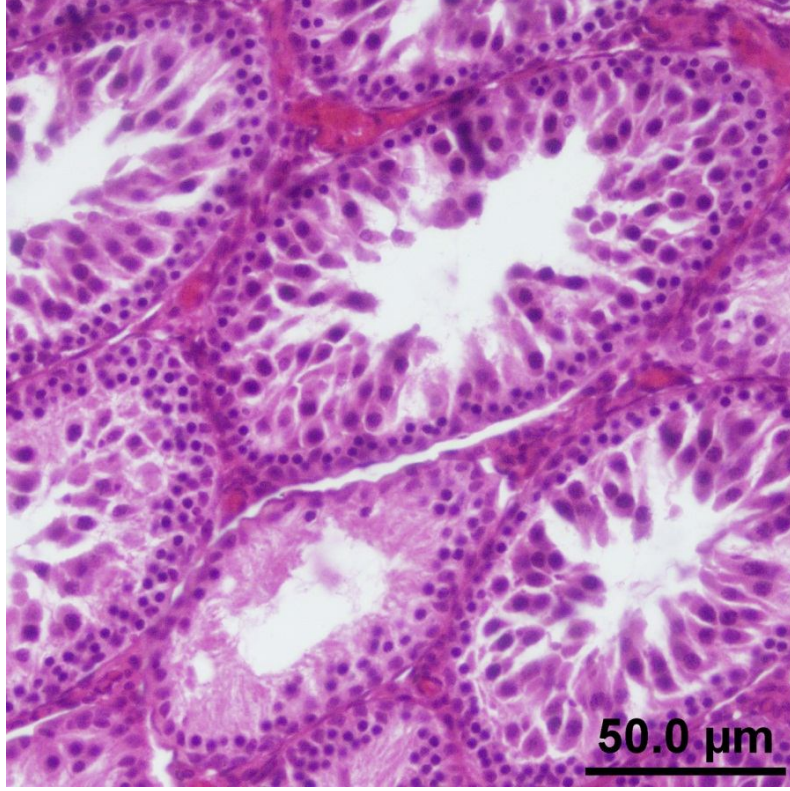
Şekil 65. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste intersitisyel ödem ve genişleme (yıldız) ile kapillar konjesyon (ok).



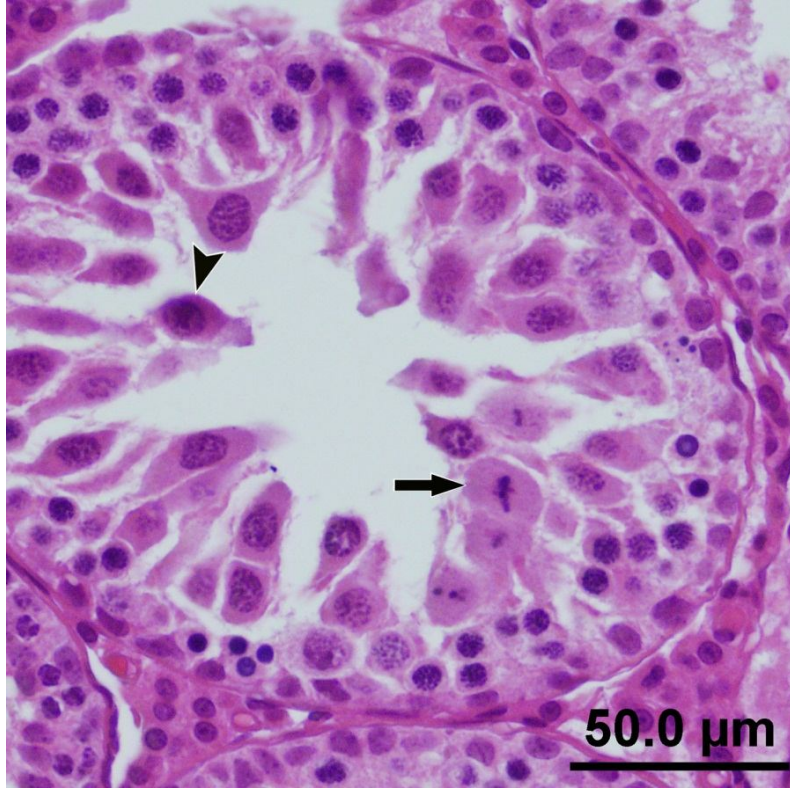
Şekil 66. Yirmi sekizinci gün DEHP grubunda testiste TSK'larda TUNEL pozitif hücreler, TUNEL.



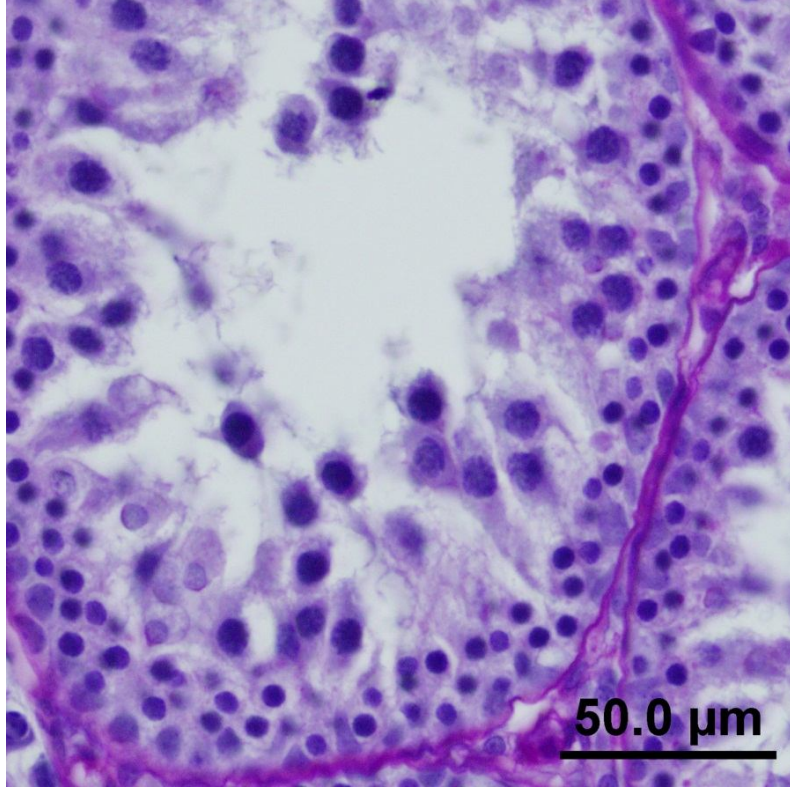
Şekil 67. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda hafif dejeneratif değişiklikler ile birlikte çok sayıda spermatogenik hücre (yıldızlar), H&E.



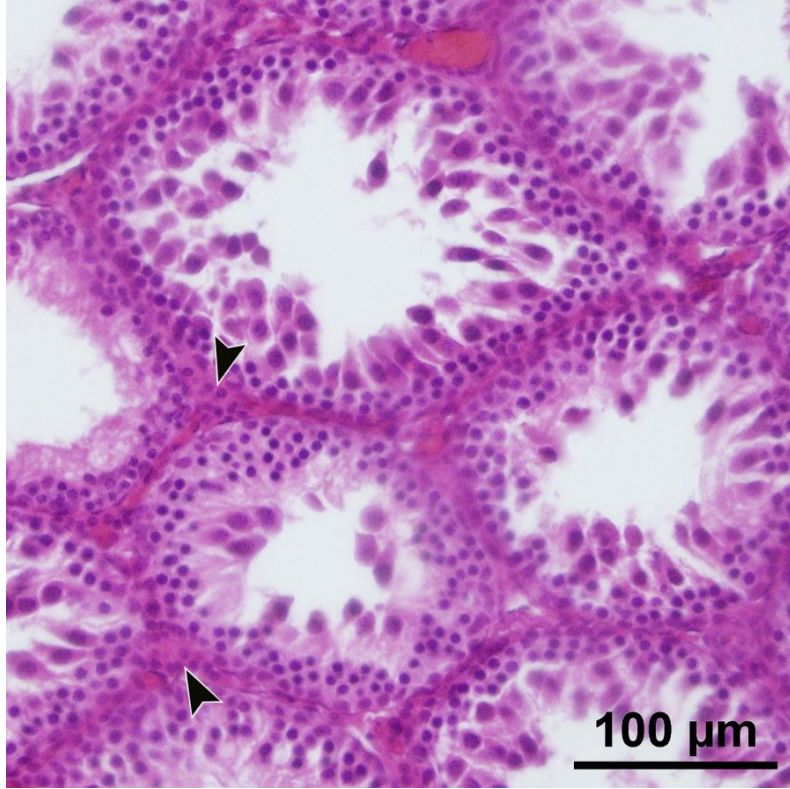
Şekil 68. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'larda çok sayıda spermatogenik hücre, H&E.



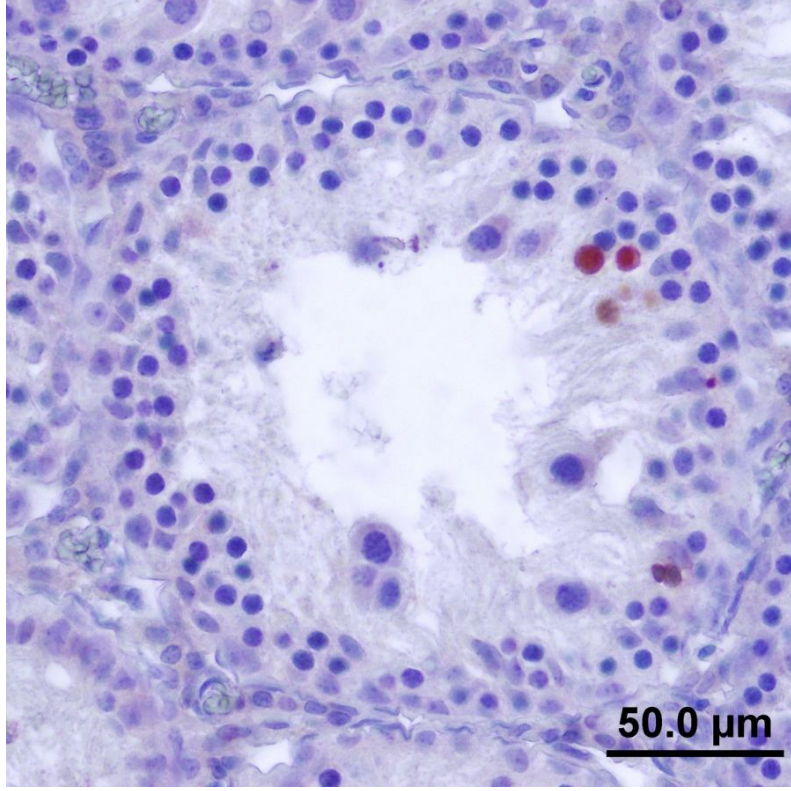
Şekil 69. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda TSK'larda germinal hücrelerde hacim artışı ve çekirdekte hiperkromazi (ok başı) ile mitotik figürlerde (ok) artış, H&E.



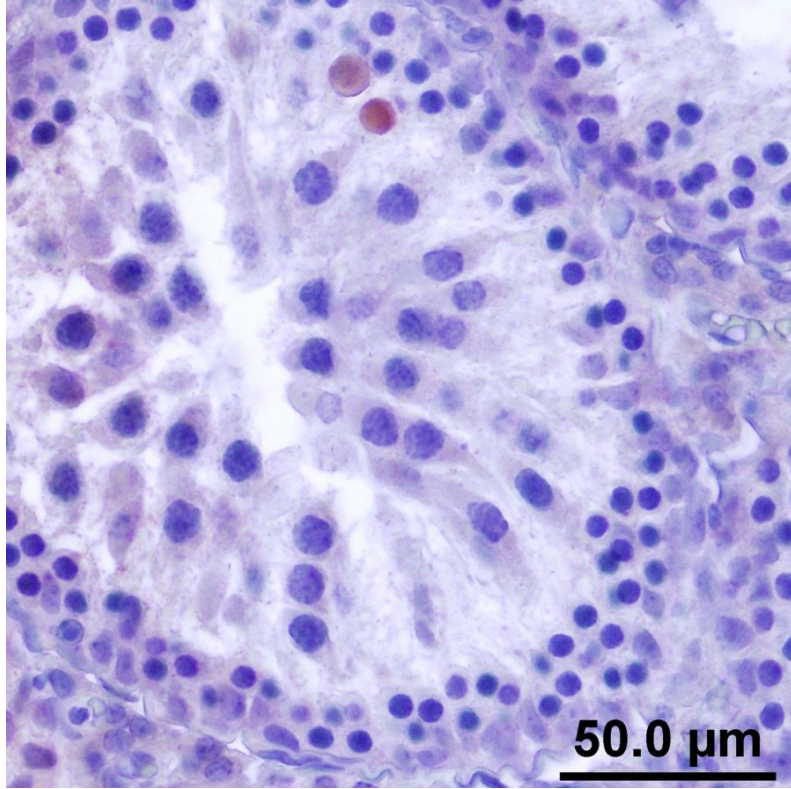
Şekil 70. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarının normal görünümü, PAS & H.



Şekil 71. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste Leydig hücrelerinde normal görünüm (ok başları), H&E.



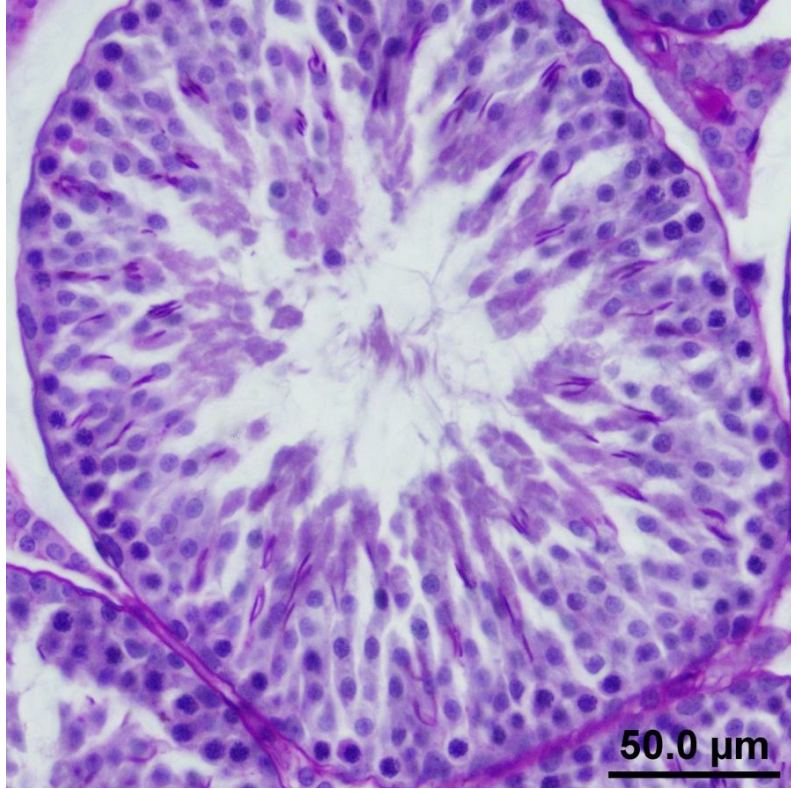
Şekil 72. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler, TUNEL.



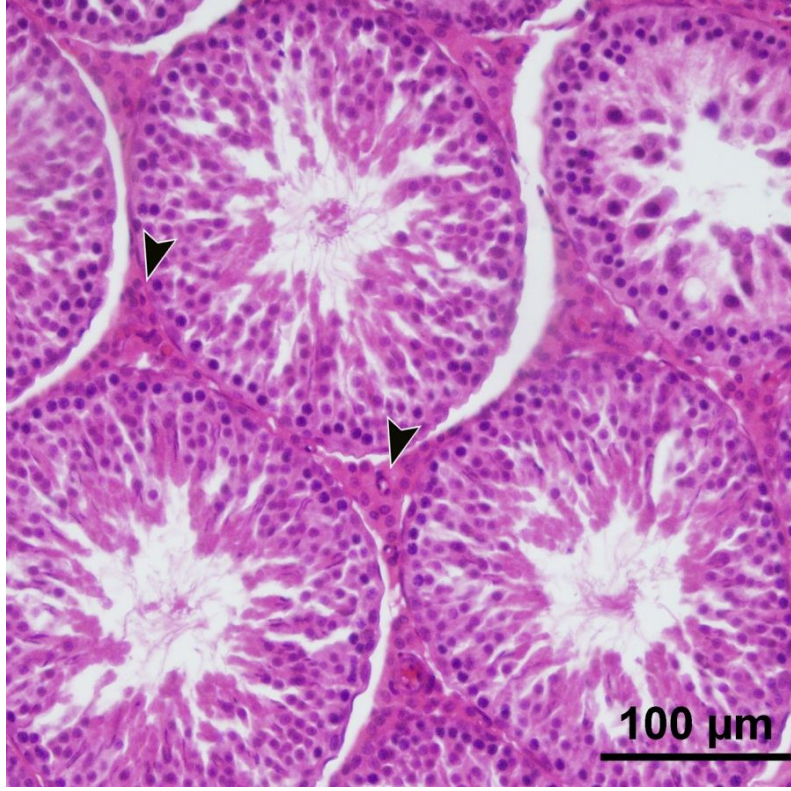
Şekil 73. Yirmi sekizinci gün DEHP + EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif spermatositler, TUNEL.



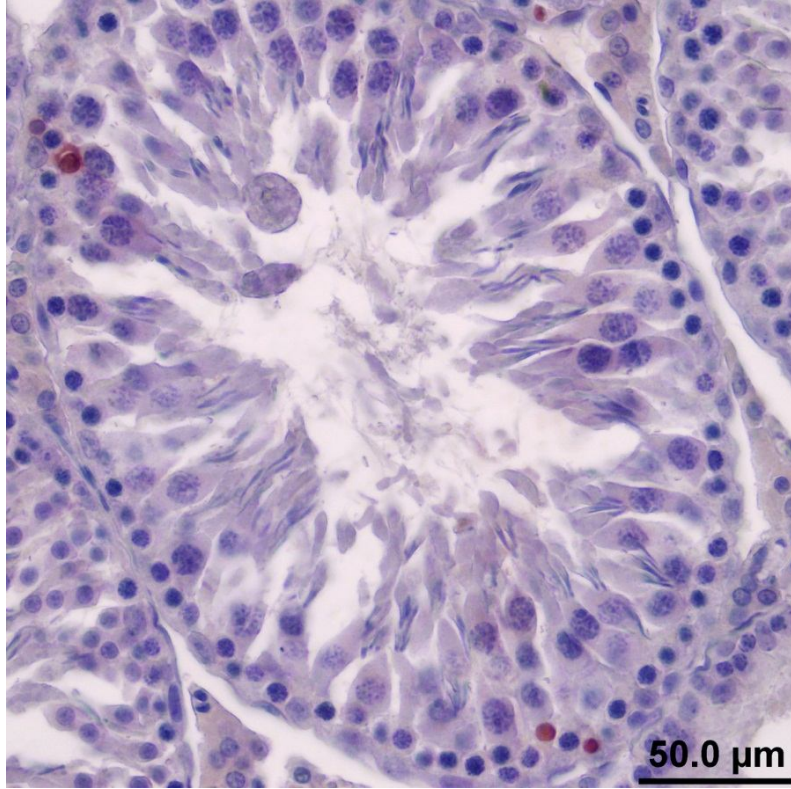
Şekil 74. Yirmi sekizinci gün EGb 761 grubunda testiste TSK'ların normal histolojik görünümü, H&E.



Şekil 75. Yirmi sekizinci gün EGb 761 grubunda testiste TSK'ların bazal membranlarının normal görünümü, PAS & H.



Şekil 76. Yirmi sekizinci gün EGb 761 grubunda testiste Leydig hücrelerinin normal görünümü (ok başları), H&E.



Şekil 77. Yirmi sekizinci gün EGb 761 grubunda testiste TSK'da TUNEL pozitif hücreler, TUNEL.

5.5. Biyokimyasal Bulgular

5.5.1. Yedinci Gün

Çalışmanın 7. gününde kontrol ve deney gruplarını oluşturan hayvanlara ait MDA, GSH, GSH-Px ve CAT düzeyleri Tablo 18’de özetlenmiştir. MDA, GSH-Px ve CAT seviyelerinin kontrol ve EGb 761 gruplarına göre, DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında istatistiksel açıdan önemli şekilde arttığı tespit edildi ($p<0.05$). DEHP ve DEHP + EGb 761 grupları arasında da GSH-Px ve CAT seviyeleri bakımından farklılık mevcut idi ($p<0.05$).

GSH değerleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında, kontrol ve EGb 761 gruplarına göre azaldığı dikkati çekti ($p<0.05$). Bu değerler yönünden istatistiksel farklılığın DEHP ve DEHP + EGb 761 grupları arasında da meydana geldiği göze çarptı ($p<0.05$).

Tablo 18. Yedinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Biyokimyasal Parametre Düzeyleri

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
MDA (nmol/g protein)	50,04 ± 3,00 ^c	178,42 ± 50,41 ^a	81,57 ± 10,56 ^b	55,19 ± 2,00 ^c
GSH (nmol/g protein)	5,77 ± 0,40 ^a	5,22 ± 0,11 ^c	5,36 ± 0,10 ^b	6,20 ± 0,22 ^a
GSH-Px (IU/g protein)	2,82 ± 0,63 ^c	3,88 ± 0,92 ^a	3,72 ± 0,70 ^b	2,94 ± 0,49 ^c
CAT(kU/g protein)	23,97 ± 6,51 ^c	34,12 ± 10,23 ^a	29,76 ± 0,10 ^b	25,34 ± 4,58 ^c

Aynı satırda yer alan (a, b, c) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$).

5.5.2. On dördüncü Gün

Kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlara ait MDA, GSH, GSH-Px ve CAT düzeyleri Tablo 19’da sunulmuştur. MDA, GSH-Px ve CAT seviyeleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında, kontrol ve EGb 761 gruplarına göre DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında önemli şekilde arttığı tespit edildi ($p<0.05$). Bu değerler yönünden DEHP ve DEHP + EGb 761 grupları arasında da istatistiksel farklılığın meydana geldiği göze çarptı ($p<0.05$). Önceki deney periyoduna göre 14. günde DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında MDA ve GSH-Px seviyelerinin düştüğü; CAT seviyesinin ise yükseldiği belirlendi.

GSH seviyelerinin DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında, kontrol ve EGb 761 gruplarına göre azaldığı ($p<0.05$); fakat 7. gün ile kıyaslandığında yükseldiği saptandı. GSH değerlerindeki istatistiksel farklılık DEHP ve DEHP + EGb 761 grupları arasında da dikkati çekti ($p<0.05$).

Tablo 19. On dördüncü Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Biyokimyasal Parametre Düzeyleri

	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
MDA (nmol/g protein)	60,88 ± 0,45 ^c	75,97 ± 0,27 ^a	70,58 ± 0,13 ^b	60,93 ± 0,30 ^c
GSH (nmol/g protein)	8,74 ± 0,47 ^a	6,14 ± 0,10 ^c	6,65 ± 0,10 ^b	9,07 ± 0,32 ^a
GSH-Px (IU/g protein)	2,15 ± 0,40 ^c	2,48 ± 0,59 ^a	2,33 ± 0,39 ^b	2,16 ± 0,48 ^c
CAT(kU/g protein)	37,88 ± 8,88 ^c	89,29 ± 51,62 ^a	52,32 ± 29,89 ^b	38,28 ± 7,62 ^c

Aynı satırda yer alan (a, b, c) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$).

5.5.3. Yirmi sekizinci Gün

MDA, GSH-Px ve CAT düzeyleri bakımından gruplar incelendiğinde DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında, kontrol ve EGb 761 gruplarına göre istatistiksel açıdan anlamlı şekilde arttığı dikkati çekti ($p<0.05$). Bu değerlerdeki farklılık ($p<0.05$) DEHP ve DEHP + EGb 761 grupları arasında da mevcut idi (Tablo 20). On dördüncü gün deney periyodu ile karşılaştırıldığında 28. günde DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında MDA, GSH-Px ve CAT seviyelerinin belirgin bir şekilde düştüğü tespit edildi.

GSH seviyelerindeki azalma kontrol ve EGb 761 gruplarına göre DEHP grubunda istatistiksel açıdan anlamlı idi ($p<0.05$) ve bu değerde önceki deney periyotlarına göre yükselme belirlendi.

Tablo 20. Yirmi sekizinci Günde Kontrol ve Deney Gruplarında Biyokimyasal Parametre Düzeyleri

	Kontrol	DEHP	DEHP+ EGb 761	EGb 761
MDA (nmol/g protein)	50,69 $\pm$ 0,31 ^c	57,00 $\pm$ 0,37 ^a	55,87 $\pm$ 0,34 ^b	51,76 $\pm$ 0,25 ^c
GSH (nmol/g protein)	8,72 $\pm$ 0,06 ^a	7,83 $\pm$ 0,28 ^b	8,33 $\pm$ 0,24 ^{ab}	9,02 $\pm$ 0,40 ^a
GSH-Px (IU/g protein)	1,79 $\pm$ 0,54 ^c	2,20 $\pm$ 0,67 ^a	2,10 $\pm$ 0,50 ^b	1,76 $\pm$ 0,58 ^c
CAT(kU/g protein)	34,48 $\pm$ 8,03 ^c	85,36 $\pm$ 42,43 ^a	52,08 $\pm$ 20,44 ^b	37,92 $\pm$ 7,08 ^c

Aynı satırda yer alan (a, b, c) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir ($p<0.05$).

5.6. Testosteron Düzeyleri

Çalışmanın 7., 14. ve 28. günlerinde kontrol ve deney gruplarındaki hayvanlara ait serum Testosteron düzeyleri Tablo 21’de özetlenmiştir.

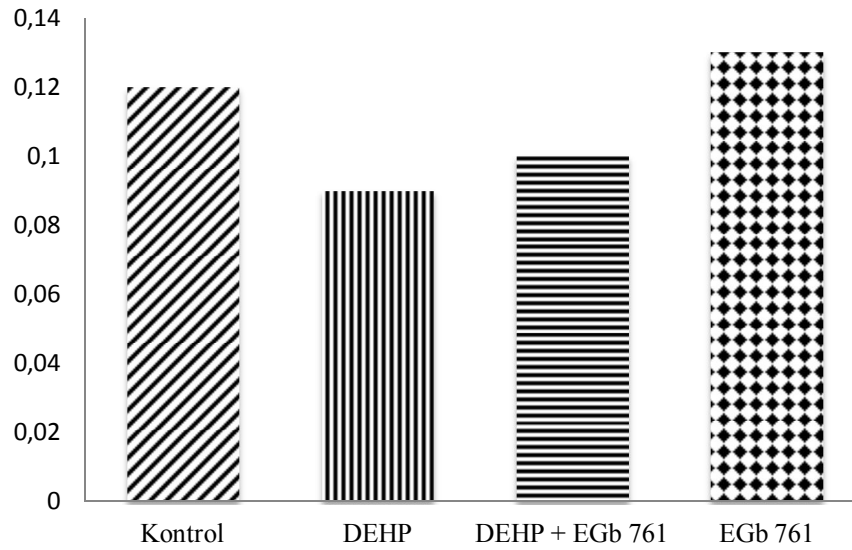
Tablo 21. Yedinci, on dördüncü ve yirmi sekizinci günlerde kontrol ve deney gruplarında serum testosteron düzeyleri (ng/ml)

Testosteron	Kontrol	DEHP	DEHP + EGb 761	EGb 761
7. gün	0,12 ± 0,02 ^a	0,09 ± 0,03 ^b	0,10 ± 0,02 ^b	0,13 ± 0,03 ^a
14. gün	0,16 ± 0,01 ^a	0,08 ± 0,03 ^c	0,14 ± 0,01 ^b	0,17 ± 0,01 ^a
28. gün	5,10 ± 2,60 ^a	0,41 ± 0,36 ^c	0,66 ± 0,32 ^b	5,13 ± 2,82 ^a

Aynı satırda yer alan (a, b, c) farklı harflerle gösterilen gruplar arası fark önemlidir ($p < 0.05$).

5.6.1. Yedinci Gün

Serum Testosteron seviyelerinin kontrol ve EGb 761 gruplarına göre DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında azaldığı ($p < 0.05$) tespit edildi (Tablo 21, Şekil 78).

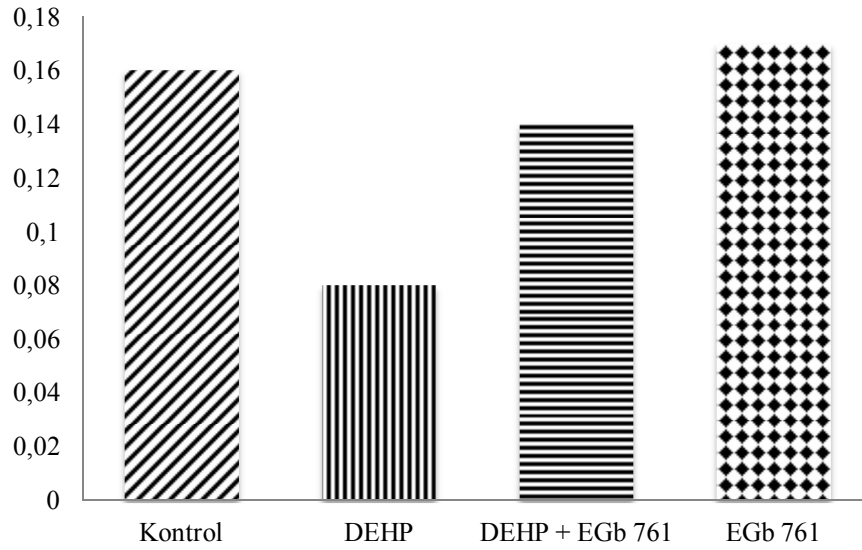


Şekil 78. Yedinci günde kontrol ve deney gruplarında serum testosteron düzeyleri.

5.6.2. On dördüncü Gün

Serum Testosteron düzeylerinin kontrol ve EGb 761 grupları ile karşılaştırıldığında, DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında istatistiksel açıdan

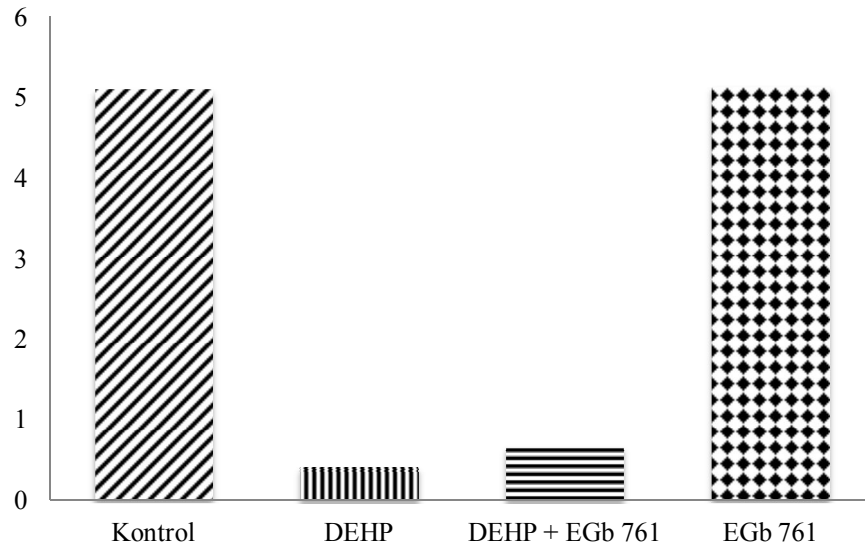
anlamlı şekilde azaldığı dikkati çekti ($p<0.05$). Testosteron seviyelerindeki farklılık DEHP ve DEHP + EGb 761 grupları arasında da istatistiksel olarak anlamlı idi ($p<0.05$) (Tablo 21, Şekil 79). Önceki deney periyoduna göre 14. günde serum Testosteron değerlerinin DEHP grubunda düştüğü; DEHP + EGb 761 grubunda ise yükseldiği saptandı.



Şekil 79. On dördüncü günde kontrol ve deney gruplarında serum testosteron düzeyleri.

5.6.3. Yirmi sekizinci Gün

Serum Testosteron değerlerinde istatistiksel açıdan önemli farklılık, kontrol ve EGb 761 grupları ile karşılaştırıldığında DEHP ve DEHP + EGb 761 gruplarında meydana geldi ($p<0.05$). DEHP ve DEHP + EGb 761 grupları arasında da bu değer yönünden farklılık ($p<0.05$) mevcut idi (Tablo 21, Şekil 80). Ayrıca önceki deney periyotlarına göre 28. günde bu grupların serum testosteron düzeylerindeki belirgin yükseliş dikkati çekti.



Şekil 80. Yirmi sekizinci günde kontrol ve deney gruplarında serum testosteron düzeyleri.

6. TARTIŞMA

Endüstriyel ve çevresel kirleticilerden biri olan DEHP'nin, canlıların reproduktif sistemi üzerine olumsuz etkileri ile endokrin bozucu özelliği bilinmektedir. Bu çalışmada, DEHP'nin prepubertal dönemdeki ratların testisinde oluşturduğu toksisite ve apoptotik etki üzerine, hücre koruyucu bir ajan olduğu bilinen EGb 761'in protektif etkisi araştırıldı.

Çevrede bulunan birçok doğal ve sentetik madde, omurgalı ve omurgasız canlı türlerinde endokrin sistemi etkileyebilmektedir (160, 161). Bu tür çevresel kalıcı bileşimlerin, hem insanlarda hem de yaban hayatında artan üreme sağlığı problemlerinden sorumlu olduğu kabul edilmektedir (162, 163, 164). Son yıllarda çevresel endokrin bozucu bileşimlerin erkek reproduksiyonu üzerinde oluşturduğu olumsuz etkilerin; testiküler kanserde, hipospadiasda, kriptorşidizmde ve azalmış semen kalitesi oranlarında bir artışa sebep olduğu öne sürülmektedir (165). Deneysel sonuçlar, belirli fitalat türlerinin endokrin fonksiyonu bozabileceğini; reproduktif ve gelişimsel toksisiteyi indükleyebileceğini göstermektedir (33, 166, 167).

Fitalatların laboratuvar hayvanlarında testiküler atrofiyi tetikleyerek fertilitiyi azalttığı, özellikle sıçan ve farelerde bu hasara bağlı olarak erkek üreme sisteminde bozukluklara yol açtığı birçok literatürde bildirilmektedir (168, 169, 170, 171). Bu hayvan türleri arasında fitalat esterlerine karşı hassasiyetin var olduğu (39, 40) ve hatta aynı türün değişik suşları arasında bile ayırtedilebilir farklılıkların olduğu rapor edilmektedir (41).

Heindel ve Powell ile Sjöberg ve arkadaşları fitalat esterlerine genç ratların daha duyarlı olduklarını belirterek; emilim, dağılım ve metabolizmanın genç ve

olgun ratlar arasında farklı olduğunu göstermiştir (43, 172). Yapılan çalışmalarda pubertal dönemdeki ratlara kıyasla prepubertal dönemdeki hayvanlarda bu toksik ajan ve metabolitinin daha yüksek oranda absorbe edildiği (173) ve testislerinde daha belirgin hasarın olduğu belirlenmiştir (44). Ayrıca, prepubertal dönemdeki ratların testis dokusunda akut, subakut ve kronik dönemli toksisite oluşturduğu bildirilmektedir (174). Yine genç ratların apoptozis sürecindeki değişiklikleri değerlendirmek için daha uygun bir hayvan modeli olduğu kabul edilmektedir (64).

Di-(2-etilhekzil) ftalatın intravenöz yola oranla oral olarak meydana getirdiği testiküler hasarın daha şiddetli olduğu bildirilmektedir (175). Ayrıca DEHP'nin toksik etkisinin uygulama süresi ve doz artışına bağlı olarak şiddetlendiği de yapılan çalışmalarla gösterilmektedir (150, 176, 177). Andrade ve arkadaşlarının, Wistar albino cinsi ratlarda yaptıkları bir çalışma ile doza bağlı olarak DEHP uygulamasının, seminifer tubuluslarda germ hücre farklılaşmasını azalttığı, yani yüksek dozda DEHP'nin antiandrojenik etkisinin daha şiddetli olduğu belirtilmiştir (178). Buna ilaveten düşük dozda uzun süreli DEHP uygulamasının doku hasarının şiddetini devam ettirdiği, yani DEHP toksisitesinde zamanın da önemli bir faktör olduğu ifade edilmektedir (83). Ishihara ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise % 1 DEHP uygulanan ratların testislerinde birkaç seminifer tubulus spermatogenik bozukluk sergilerken, % 2 DEHP verildiğinde 2., 4. ve 6. haftada hasar şiddetinin artış gösterdiği saptanmıştır (177). Bu sebeple DEHP'nin günlük yaşamda insanların en sık maruz kalabileceği dozda ve oral yolla uygulanması, ayrıca zaman periyodunun dikkate alınması pratik açıdan önem arz etmektedir (150).

Çalışmamızda DEHP deney grubunu oluşturan ratlara, 14 gün süreyle gün aşırı olarak 5 ml/kg mısır yağı içerisinde 2 g/kg dozunda DEHP gastrik gavaj yoluyla verilerek uygulamanın 7., 14. ve 28. günlerindeki değişiklikler incelendi. Uyguladığımız süre ve dozdaki DEHP'in deney hayvanlarında canlı ağırlık ile absolüt ve rölatif testis ağırlıklarında azalmaya neden olduğu görüldü. Daha önce yapılan araştırmalarda da buna benzer sonuçların görüldüğü bildirilmiştir (68, 72, 150, 171, 179, 180).

Testiküler doku, oksidatif stresten hem serum gibi ekstrinsik hem de antioksidan enzimler gibi intrinsik faktörlerle korunmaktadır (109). Ancak bazı endojen ve ekzojen faktörlerin bu savunmayı alt üst ettiği ve oksidatif stres meydana getirdiği bilinmektedir (105). Dokudaki ROS'nin miktarı ve antioksidan enzimlerin aktivitesi oksidatif stresin durumunu yansıtmaktadır (181). Testiküler toksik madde gibi ekzojen ajanlarla indüklenmiş LPO; MDA'nın yüksek, GSH'nin ise düşük konsantrasyonları ile dokuda oksidatif stresin varlığını ifade etmektedir (110, 111). Ratlarda DEHP uygulamasının oluşturduğu testis toksisitesi üzerine yapılan çalışmalarda da; SOD ve GSH gibi antioksidan seviyelerinde düşme ile GSH-Px ve CAT gibi enzimlerde yükselmenin görülmesi, DEHP'in serbest radikal tetikleyicisi olduğunu ortaya koymaktadır (38, 114, 115). Buna paralel olarak yaptığımız çalışmada; biyokimyasal olarak MDA konsantrasyonunda artışın, GSH seviyesinde düşüşün, GSH-Px ve CAT gibi enzim düzeylerinde yükselişin belirlenmesi yukarıda bahsedilen literatür sonuçları ile bulgularımızın benzer olduğunu göstermektedir.

Testosteron hormonu spermatogenezis süreci için oldukça önemlidir ve Leydig hücreleri tarafından üretilmektedir. Testosteron sentezi Leydig

hücrelerindeki StAR (Steroidogenic Acut Regulatory) proteini, sitokrom P450scc, 3 β - ve 17- β HSD gibi genlerin ekspresyonuna bağlıdır. DEHP toksikasyonunun Leydig hücrelerinin testosteron üretimini olumsuz bir şekilde etkileyerek inhibe ettiği, pek çok çalışma ile bildirilmektedir (180, 182, 183, 184, 185). Bu inhibisyon iki faktörle ilişkilidir. Birincisi düşük hipofizal LH sekresyonu ve ikincisi de azalmış steroidogenik enzim aktivitesidir. Her iki faktör de Leydig hücrelerinin primer fonksiyonu olan testosteron biyosentezi ve sekresyonunu etkilemektedir. LH, gelişen Leydig hücrelerinin farklılaşması sürecini uyarmakta ve erişkin hücrelerde steroidogenik enzim gen ekspresyonu ile hücre volümünü sürdürmektedir (186). DEHP'in, gelişim süresince hipofiziyal LH sekresyonunu azaltması, Leydig hücrelerinin androjenik biyosentez kazanımını azaltarak, steroidogenik kapasitenin olumsuz etkilenmesine yol açmaktadır (187).

Oishi, DEHP uygulanan ratların testislerinde ve serum örneklerinde testosteron seviyesinin azaldığını belirtmiştir (76). Benzer şekilde, Miura ve arkadaşları DEHP uygulanan erişkin farelerin serum analizlerinde, testosteron konsantrasyonunun Leydig hücre disfonksiyonuna bağlı olarak önemli bir şekilde azaldığını ve istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu göstermiştir (114). Buna ilaveten DEHP toksisitesinin antioksidan enzim aktivitelerinde azalmaya, ROS'de ve lipid peroksitlerde ise artışa sebep olduğu rapor edilmiştir (38). Leydig hücrelerinin, özellikle yapılarında ultrastruktürel değişikliklere yol açan ROS'nin ekstrasellüler kaynaklarına duyarlı oldukları ifade edilmiştir (184). Yukarıda verilen literatür bilgileri doğrultusunda Leydig hücrelerinde histopatolojik bir bozukluk görülmemesine rağmen, lipid peroksit seviyelerindeki artışın ve testiküler steroidogenezis inhibisyonunun Leydig hücre disfonksiyonuna yol açtığı

düşünülmektedir. Akingbemi ve arkadaşları ise yaptıkları bir çalışmada, Long-Evans cinsi ratların DEHP ile kronik maruziyeti sonucunda Leydig hücre hiperplazisinin indüklendiğini ve bunun da serum hormonlarının düzeyleri ile ilişkili olduğunu tespit etmiştir (188).

Sunulan bu çalışmanın deney periyotları boyunca, DEHP uygulanan prepubertal ratların serum testosteron seviyelerinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında düşüşün olduğu görülmüş ve istatistiki açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızın 7. ve 14. günlerinde DEHP uygulanan hayvanlarda serum testosteron düzeylerinin kademeli bir şekilde azaldığı; 28. gününde ise önceki deney periyotlarına göre yükseldiği dikkati çekmiştir. Çalışmanın 28. gününde testosteron düzeylerinde gözlenen bu artışın sebebi tam olarak açıklanamamasına rağmen DEHP'in serum testosteron seviyelerinde oluşturduğu bu değişikliklerin Leydig hücrelerinde meydana gelen disfonksiyon ve hiperplaziye bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Cammack ve arkadaşları DEHP'in rat testisinde; TSK çapında azalmaya ve GHK'da kısmi tükenmeye bağlı olarak bir takım testiküler değişikliklere sebep olduğunu bildirmektedir (175). Dorostghoal ve arkadaşları da DEHP'in doz artışı ile birlikte kronik olarak, TSK çapında ve GHK'da azalmaya sebep olduğunu belirtmektedir (189). Çalışmamızın deney süresi boyunca DEHP uygulaması ile ortalama TSK çapında ve GHK'da azalmanın görülmesi bulgularımızın literatür sonuçlarıyla paralel doğrultuda olduğunu göstermektedir.

Testislerde primordiyal germ hücrelerinin, fetal periyot boyunca sürekli ve düzenli olarak dejenerasyona uğrayıp sayılarını sabitlediği bilinmektedir (190, 191). Spermatogenik hücre apoptozisi; doğumdan itibaren başlayıp gelişme ve

yetişkinlik dönemleri boyunca devam ederek spermatogenezisin sürekliliğini sağlamakta (41, 192, 193) ve seminifer epitel siklusunun farklı dalgalarında meydana gelmektedir (194, 195, 196, 197, 198). Spermatogenik hücre dejenerasyonu ayrıca kriptorşidizm, iskemi- reperfüzyon, hipofizektomi, gonadotropin-releasing hormon (GnRH) antagonistleri, ısı ve ilaç tedavisi gibi deneysel manipulasyon şartları altında da oluşmaktadır (199, 200, 201).

Apoptozisi düzenleyen hücresel mekanizmalar ve sinyal transdüksiyon olayları hakkında tam olarak yeterli bilgi bulunmamakta ve günümüzde de bu konu hakkında yoğun araştırmalar yapılmaktadır (202). Apoptozisten sorumlu mekanizma hala tartışmalıdır, fakat serbest radikallerle doğrudan mitokondriyal yaralanma (203) veya proapoptotik Bcl-2 aile proteinleri tarafından dolaylı mitokondriyal depolarizasyon, bu sürecin kritik bileşenleri olarak öne sürülmektedir (204).

Di-(2-etilhekzil) fitalat tarafından tetiklenen spermatogenik bozukluğun mekanizmasının detayları tam olarak açıklanamamıştır. DEHP toksikasyonunda testislerdeki atrofinin nedeni spermatosit apoptozisi olmasına karşın, germ hücrelerini apoptozise götüren yol tam olarak aydınlatılamamıştır (38). Son zamanlarda Fas aracılı apoptozisin, testiste fitalatlar tarafından indüklenen apoptozisi açıklamak için olası bir mekanizma olduğu öne sürülmektedir. Bu modele göre fitalatlar Sertoli hücreleri ile Fas ligandın ve germ hücreleri ile Fas'ın varlığını arttırmaktadır. Fas ligand bağlayıcı ise, germ hücre membranında Sertoli hücrelerinden Fas'a kadar germ hücre ölümünü başlatmaktadır (205). Yani fitalat maruziyetinde Sertoli hücreleri doğrudan veya dolaylı olarak apoptozisin kontrolünü sağlamaktadır (206).

Sertoli hücreleri; spermatogenik hücrelerin beslenme ve desteklenmesini sağlama, bu hücrelerin farklılaşmasını düzenleme ve kan-testis bariyerini oluşturma gibi önemli fonksiyonları yerine getirmektedir (3). Fawcett, Handel, Vogl ve arkadaşları spermatogenik hücre anormalliklerinin Sertoli hücresinin durumu ile ilgili olduğunu öne sürmüş (207, 208, 209); Boekelheide ve arkadaşları da Sertoli hücre disfonksiyonunun germ hücre etkilerine aracılık edebileceğini bildirmiştir (210). Ayrıca Monsees ve arkadaşları üreme sistemini etkileyen toksik maddelerin genel olarak ratlarda Sertoli hücrelerini hedeflediğini ve erkek infertilitesini indüklediğini bildirmiştir (211). Üreme sistemini etkileyen bu toksik maddelere ilaveten fitalatların da Sertoli hücrelerini primer hedef olarak, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler açısından etkilediği öne sürülmüştür (64). DEHP uygulamasının postnatal gelişim sürecindeki deney hayvanlarında Sertoli hücrelerinde morfoloji ve fonksiyon bozukluğu ile hücre proliferasyonunda azalmaya sebep olduğu bildirilmiştir (212, 213, 214).

Awal ve arkadaşları çalışmalarında fitalat alınımla; vakuolizasyon, seminifer tubulus akıcı yapısının inhibisyonu, mitokondriyal süksinat dehidrojenaz aktivitesinin kaybı, transferrin sekresyonunun inhibisyonu ve glikolitik yolda anormallikler gibi Sertoli hücre değişikliklerinin meydana geldiğini belirtmektedir (215). Bu Sertoli hücre değişikliklerinin; spermatosit ve spermatidlerde dejenerasyona, spermatogenik hücrelerde ayrılmaya, tubulus epitelinde zayıflamaya ve en sonunda tubuler lumende sıyrılmaya yol açtığı öne sürülmektedir (39, 46, 64, 216). Bu çalışmada DEHP ile oluşturulan testis hasarını gösteren bulguların önceki çalışmalarda bahsedilen sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmüştür. Sertoli hücre değişikliklerinin varlığı ise sunulan çalışmada da bu

hücrelerin DEHP toksisitesinde asıl hedef olduğunu ve buna bağlı olarak normal spermatogenik aktivitenin sürdürülmesinde yeterince etkili olmadıklarını göstermektedir.

Testiste DEHP indüklü apoptozis öncelikli olarak Sertoli hücreleri yerine pakiten spermatositlerde görülmektedir. Sertoli hücreleri, pakiten spermatositler ve yuvarlak spermatidlerden daha yüksek miktarda GSH, E vitamini ve GSH-ilişkili enzim konsantrasyonlarını içerdiği için apoptozise karşı dayanıklıdır. Bu düşük antioksidanlarla ilişkili enzim aktivitelerini içeren spermatositlerde sitokrom c'nin salınımı artmakta ve Sertoli hücrelerinde germ hücre ölümünü başlatan Fas/Fas ligand sistemi aktifleşerek testiste germ hücre apoptozisini indüklemektedir (108, 217). Yaptığımız çalışmanın deney sürecinde de DEHP ile indüklenmiş apoptozisin öncelikli olarak spermatogenik seriye ait hücrelerde tespit edildiği tek tük olarak da Sertoli hücrelerinde belirlendiği görülmüştür. Bu apoptotik hücrelerin daha çok bazal membrandan uzaklaşmaya başlamış olan spermatogenik seriye ait spermatositler olduğu saptanmıştır. Bu bulgular Yoganathan ve arkadaşları (217) ile Bauche ve arkadaşlarının (108) sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Di-(2-etilhekzil) fitalatın, testiste meydana gelen apoptozis oranında belirgin bir artış meydana getirdiği bilinmektedir (64). Park ve arkadaşları, 2 g/kg dozunda uygulanan DEHP'in testiste apoptozisi ve germinal epitelin nekrozunu indükleyerek spermatogenik hücre popülasyonunu bozduğunu ve spermatogeneziste bozukluğa sebep olduğunu göstermiştir. Uygulamanın 3. gününden itibaren apoptotik hücrelerin belirginleştiği, 7. günde ise apoptozis ile birlikte nekrozun (germinal epitelin sıyrılması) şekillendiği ve bunun da ciddi

testiküler atrofi ile sonuçlandığı bildirilmiştir. TUNEL pozitif hücreler ile oluşturulan Apoptotik İndeksde (AI), kontrol grubu ile deney grubu karşılaştırıldığında apoptotik hücre sayısının belirgin bir şekilde arttığı tespit edilmiştir (150). Kasahara ve arkadaşları DEHP uygulamasından 12 saat sonra, TSK'larda sayıca artan TUNEL pozitif hücrelerin çoğunun, öncelikle apoptozise uğrayan spermatositler olduğunu göstermiştir (38). Prepubertal ratlarda DEHP uygulaması ile yapılan bir çalışmanın 2. gününde apoptotik hücre sayısının kontrol grubuna göre arttığı, 7. ve 30. günlerde ise bu sayının gittikçe azalarak kontrol grubuna yaklaştığı saptanmıştır (68). Yukarıda belirtilen bilgilere paralel olarak, sunulan çalışmada DEHP grubu deney hayvanlarının kontrol grubuna kıyasla TSK'larındaki apoptotik hücre yoğunluğunun ilk uygulamadan sonra şiddetlendiği, daha sonraki uygulamalarda ise önceki deney periyoduna nazaran bu yoğunluğun kademeli bir şekilde hafifleyerek stabil kaldığı ve yine kontrol grubu değerlerinin üzerinde olduğu görülmüştür. Apoptotik hücre yoğunluğunda gittikçe meydana gelen bu rölatif azalmanın, DEHP'in spermatogeneziste duraklamaya ve dolayısıyla TUNEL pozitif reaksiyon veren germinal hücrelerin sayısında ciddi azalmaya sebep olması ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Yapılan başka bir çalışma ile % 2 DEHP uygulanan farelerde, spermatogenik bozukluğun ve fokal dejenerasyonun ilk olarak 5. günde, neredeyse tüm spermatositler ile spermatidlerin kaybolduğu ve her TSK'da sadece birkaç spermatogonyum ile birlikte Sertoli hücrelerinin kaldığı şiddetli spermatogenik duraklamanın ise 12. ve 15. günlerde görüldüğü öne sürülmüştür. Ancak 15. günde germ hücrelerinin tamamıyla silindiği bu tubulusların dışında, birkaç tane çoğalmış spermatogonyum ile tek tük apoptotik germ hücrelerini içeren

daha iyi tubuluslara da rastlanmıştır. Deney sürecinin 35. gününde ise hasar gören seminifer epitelin belirgin bir şekilde rejenere olduğu görülmüştür (176). Yaptığımız deneysel çalışmada Ablake ve arkadaşlarının bulgularına benzer olarak; uygulamanın 7. gününde testiküler hasarın başladığı ve 14. gününde bu hasarın daha da şiddetlenerek devam ettiği gözlemlendi. DEHP uygulamasının kesilerek deney sürecinin devam ettirildiği 28. günde ise dokunun genelinde dejeneratif etkinin baskın olduğu fakat çok az tubulusda da rejenerasyonun varlığı tespit edildi.

Di-(2-etilhekzil) fitalat uygulaması ile TSK'ların lümeninde germ hücre orjinli çok çekirdekli dev hücrelerin ve intersitisyel bölgede ödemin varlığı saptanmıştır (150). Buna benzer başka bir çalışmada ise, TSK'larda ciddi hasarlar belirlenmesine rağmen miyoid hücre yıkımının görülmediği ifade edilmiştir (176). Park ve arkadaşları DEHP uygulaması sonucunda intersitisyel bölgedeki Leydig hücrelerinin deneysel periyot boyunca normal görünümlerini koruduklarını öne sürerken (150) başka araştırmacılar DEHP'nin Leydig hücrelerinde hiperplaziyi indüklediğini savunmuştur (188, 218, 219). Deney sürecimizin 7. gününde Leydig hücrelerinde normal görünüm izlenirken, 14. gününde hiperplazinin meydana geldiği ve 28. gününde ise belirginleştiği göze çarptı. Ayrıca çalışmamızın tüm deney periyotlarında gözlenen intersitisyel ödem ve sağlam miyoid tabaka ile 14. gününde TSK lümeninde belirlenen çok çekirdekli dev hücre formasyonu gibi bulguların yukarıda bahsedilen literatür sonuçları ile benzer olduğu tespit edildi.

Yapılan araştırmalar DEHP uygulamasının laboratuvar hayvanlarının testis dokusu üzerinde patolojik bozukluklar oluşturarak, üreme kapasitelerinde ciddi düşümlere sebep olduğunu göstermektedir (174). Farklı süre ve dozdaki

DEHP'nin özellikle gelişim sürecini etkileyerek infertiliteye sebep olduğunu gösteren veriler göz önüne alındığında, endüstriyel sahalarda çevrenin DEHP ile kontaminasyonuna karşı tedbirler alınması gerektiği önem arz etmektedir.

Organizmada oksidatif stres oluşturan değişik oksidanlara karşı antioksidan savunma sistemi bulunmaktadır (177, 220, 221, 222, 223, 224). Canlı hücrelerde bulunan protein, lipid, karbohidrat ve DNA gibi okside olabilecek maddelerin oksidasyonunu önleyen veya geciktirebilen maddelere 'antioksidanlar' ve bu olaya da 'antioksidan savunma' adı verilmektedir (89). Antioksidan savunma sistemi; serbest radikallerin aşırı üretilmesini engelleyerek, oluşan serbest radikallerin etkisini azaltarak veya oluşan oksidatif hasarı ya azaltarak ya da onararak etkisini göstermektedir. Antioksidan savunma sistemi hücre içi ve hücre dışı olarak ikiye ayrılmaktadır (221, 222, 223). Hücre içi savunma sisteminin enzimatik antioksidanları; SOD, CAT ve GSH-Px'tir. Enzimatik olmayan hücre içi antioksidanlar; GSH, membranlara bağlanabilen alfatokoferol, beta-karoten, askorbat, transferin, seruloplazmin ve bilirubindir. Hücre dışı savunma sistemi ise; metallothionein gibi serbest radikal yok ediciler, Zn gibi iz elementler ve A, C, E gibi antioksidan vitaminlerden oluşmaktadır (177, 223, 224). Bu antioksidanların serbest radikallere karşı hücreleri koruyucu özellikleri bulunmaktadır.

Vücutta bulunan antioksidan savunma sistemleri, serbest radikalleri tesirsiz hale getirmeye çalışmaktadır. Ancak savunma sistemlerinin yeterli olmadığı durumlarda güncel bir metod olarak erkek infertilitesinde de kullanılan antioksidan terapi devreye girmektedir. Oksidatif stres kaynaklı rahatsızlıkta, endojen kaynaklı antioksidanlar etkili olmadıklarından dolayı ekzojen kaynaklı

antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır. DEHP'nin dokularda serbest radikal üretimini tetikleyerek oksidatif stres oluşturduğu bilinmektedir (38, 114, 115, 167, 225). Bu oksidatif strese bağlı olarak oluşan toksisite, bahsedilen antioksidanlar sayesinde önlenebilmektedir (168, 177, 224).

Ishihara ve arkadaşları, testislerde % 2 DEHP'nin oluşturduğu toksisite üzerine C ve E vitamin kombinasyonu ile olumlu sonuçlar elde edildiğini bildirmiştir (177). Erkekoğlu ve arkadaşları ise selenyumun redoks düzenleyicisi olarak kritik bir role sahip olduğunu ve buna bağlı olarak testiküler dokuları, DEHP'nin oksidatif stres aktivitesinden koruduğunu ortaya koymuştur (226). Böylece uygulanan antioksidan terapi ile LPO potansiyelinin azaltılması; sperm kalitesi ve fertilizasyon oranlarının gelişmesiyle paralellik göstermektedir (89).

Sunulan bu çalışmada DEHP toksisitesine karşı hücre dışı savunma sisteminin bir elemanı olan EGb 761 kullanıldı. Çalışmamızda DEHP + EGb 761 grubu deney hayvanlarına uygulamanın ilk 14 günü boyunca gün aşırı olarak 5 ml/kg mısır yağı içerisinde 2 g/kg dozunda DEHP ve 1 saat sonrasında da 50 mg/kg dozunda EGb 761 gastrik gavaj yoluyla verildi. Geriye kalan 14 gün boyunca ise yine gün aşırı ve gastrik gavajla sadece 50 mg/kg dozunda EGb 761 uygulaması yapıldı. Uygulamanın 7., 14. ve 28. günlerindeki değişiklikler incelendi.

Ginkgo biloba ağacının yeşil yapraklarının özütü olan Ginkgo biloba ekstraktı (EGb), doğal bir antioksidandır ve bu ekstraktın standardize edilmiş preparasyonu EGb 761'dir (227). EGb 761; antioksidan, anti-inflamatuvar ve immun cevap modülasyonunu içeren çeşitli biyolojik aktivitelere ve farklı farmakolojik etkilere sahiptir (228, 229). EGb 761'in antiplatelet ve antisitokin

özellikleri dışında ayrıca vazodilatasyonu düzenlediği; arter, ven ve kapillar damarlar aracılığıyla kan akımını geliştirdiği ve artan penil kan akışı ile erkek iktidarsızlığına çözüm olduğu belirtilmektedir (135, 136, 230).

Ginkgo biloba ekstrakt 761'in (EGb 761) antioksidan etkisi, ana bileşenleri olan flavanoidler ve terpenoidlerdeki bazı bileşimlerine bağlanmaktadır (139, 230, 231). EGb 761'in, ROS'ne karşı antioksidan enzimlerin potansiyelini arttırarak oksidatif stresi yok ettiği bilinmektedir (142, 143, 232). EGb 761'in oluşturduğu bu antioksidan savunma sistemi, CAT ve SOD gibi enzimler aracılığıyla etkisini göstermektedir (233). Buna karşın DEHP alınımının, serbest radikallerin aşırı üretimini tetikleyerek oksidatif stres oluşturduğu, bu oksidatif stresin de spermatogenik hasar ve germ hücre apoptozisi ile ilişkili olan yoğun testiküler hasara yol açtığı daha önce ifade edilmiştir (38, 114, 115, 167, 225). Testiküler hasarın göstergesi olan MDA konsantrasyon artışı, LPO'nun en çok bilinen belirtilerindendir. EGb 761'in testis üzerindeki profilaktik etkisi ise; CAT ve SOD gibi enzim seviyelerinin onarılarak LPO miktarının azaltılması esasına dayanmaktadır (233).

Yapılan çalışmalar ayrıca EGb 761'in antiapoptotik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir (234, 235). Yeh ve arkadaşları doksorubisin ile testiste oluşturulan oksidatif ve apoptotik hasara karşı EGb 761'in koruyucu ve iyileştirici etkilerinin olduğunu belirtmiştir. Ancak bu antiapoptotik etkiyi oluşturan mekanizmayı tam olarak açıklayamamıştır (149). Bazı araştırmacıların ifadeleri doğrultusunda EGb 761'in nöronal hücrelerde beta-amiloid tarafından indüklenen apoptozisi; mitokondriyal membran potansiyellerini etkileyerek, Bcl-2 aile üyelerini düzenleyerek ve kaspaz 3 aktivitesini baskılayarak hafiflettiği

bildirilmiştir (231, 236, 237). Bu bilgilere dayanarak, Yeh ve arkadaşları EGb 761'in mitokondri bağımlı yolak aracılığı ile antiapoptotik etki gösterdiğini ifade etmiştir (149).

Akgül ve arkadaşları, EGb 761'in testiküler iskemi/ reperfüzyon yaralanması sonucu meydana gelen apoptozise karşı, antioksidatif özellikleriyle ilişkili olan anti-apoptotik bir etkiye sahip olduğunu ve bu yaralanmaya karşı testisleri, NO sistemi aracılığıyla koruduğunu bildirmiştir (148). Vasküler endotel kaynaklı bir serbest radikal olan NO; düşük dozlarda fizyolojik olayların farklılaşmasında biyolojik mediatör olarak görev yaparken, yüksek dozlarda DNA hasarı ve hücre ölümüne sebebiyet vererek apoptozisin indüklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (97, 238). NO'in üretiminden sorumlu enzim olan NOS'ın artan seviyesi, fazla miktarda NO üretimine yol açmaktadır (101). Akgül ve arkadaşlarının yaptıkları başka bir çalışmada ise testiküler torsiyondan sonra iskemi/ reperfüzyon yaralanmasının, germ hücre apoptozisi ve NOS konsantrasyonunu arttığı; EGb 761'in ise bu olumsuz etkileri azalttığı tespit edilmiştir (106). Kanter'in yaptığı histopatolojik bir çalışmada, testiste iskemi/ reperfüzyon hasarı sonucu hem testiküler NOS ekspresyonunun hem de germ hücre apoptozisinin arttığı fakat EGb 761'in alınımıyla bu parametrelerin azaldığı ve oluşan bu hasarın düzeldiği belirtilmiştir (239). Miura ve arkadaşlarının çalışmasında ise, farelere DEHP uygulanmasıyla testislerde biriken MEHP'in özellikle, NO ile serbest radikallerin peroksidasyonu sonucu üretilen Nitrojen oksit (NOx) konsantrasyonunu arttırdığı ve spermatogeneziste duraklamaya sebep olduğu saptanmıştır (114). Bizim çalışmamızda da DEHP uygulamasından sonra apoptozisin indüklenmesiyle oluşan testiküler hasarın bahsedilen literatürlere

paralel olarak NO konsantrasyon artışına bağlı olduğu düşünülebilmektedir. Bu bilgiler ışığında DEHP'in oluşturduğu testiküler hasarın, EGb 761'in antiapoptotik özelliğine bağlı olarak çalışma süresince gittikçe düzeldiği tespit edilmiştir.

Uyguladığımız süre ve dozdaki DEHP'in deney hayvanlarının; canlı ağırlık, absölüt ve rölatif testis ağırlıklarında azalmaya neden olduğu daha önce literatürlerle de bildirilmiştir (68, 150, 171, 180). Antioksidan özellikteki C ve E vitaminlerinin kombinasyonu ile DEHP'in neden olduğu canlı ağırlık kazanımı ve testis ağırlıklarındaki azalmanın engellendiği Ishihara ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (177). Bu antioksidan vitaminler gibi hücre dışı savunma sisteminin bir üyesi olan EGb 761'in, doksorubisinin indüklediği canlı ağırlık kazanımı ile absölüt ve rölatif testis ağırlıklarındaki azalmayı önlediği tespit edilmiştir (149). Çalışmamızda da DEHP'in bu parametrelerde sebep olduğu azalmanın EGb 761 uygulaması ile önlediği ve literatür sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür.

Di-(2-etilhekzil) fitalat uygulanan ratların testislerinde belirlenen LPO'nun, serbest radikallerin üretimi ile sonuçlandığı ve bu radikallerin de TSK epiteline zarar verdiği literatürler ile daha önce ortaya konmuştur (38, 176). EGb 761'in ise testisteki bu hasarı; membranları stabilize etme, LPO'nu önleme gibi çeşitli mekanizmalarla ortadan kaldırdığı belirtilmiştir (128, 142). EGb 761'in, ROS'nin üretimini söndürerek ve antioksidan enzim deaktivasyonunu koruyarak testiste doksorubisin indüklü oksidatif stresi iyileştirdiği bildirilmiştir. Yani, EGb 761 uygulamasının hem MDA hem de GSH seviyelerindeki anormallikleri nötralize ettiği ayrıca SOD ve GSH-Px gibi antioksidan enzim aktivitelerini normale dönüştürdüğü tespit edilmiştir (149). Amin ve arkadaşları; sisplatin

indüklü testiküler hasar sonucunda değişen MDA konsantrasyonu ile SOD ve CAT enzim aktivitelerinin, EGb 761 uygulaması ile iyileştiğini belirtmiştir (240). Yaptığımız çalışmanın biyokimyasal verileri literatürler ışığında değerlendirildiğinde, yukarıda bahsedilen parametreler ile bulgularımızın uyumlu olduğu görülmüştür.

Ginkgo biloba ekstrakt 761'in, seksüel fonksiyon bozukluklarına karşı baskılayıcı role sahip bitkisel bir ajan olduğu (241) ve deneysel olarak genç ratlarda serum testosteron seviyelerindeki artışa bağlı olarak, seksüel performansı artırdığı bildirilmiştir (242). Ayrıca Tip 2 diyabetik ratlarda Leydig hücre hasarı sonucu azalan serum testosteron düzeyinin EGb 761 uygulaması ile giderek arttığı ileri sürülmüştür (243). Yapılan bu çalışmanın deney periyotları boyunca, DEHP uygulanan prepubertal ratların serum testosteron düzeylerinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında azaldığı görülmüş ve istatistiki açıdan anlamlı olarak kabul edilmiştir. EGb 761'in ise ilerleyen deney periyotlarında, kontrol ve EGb 761 gruplarının seviyelerine ulaşmasa da serum testosteron düzeylerini yükselttiği tespit edilmiştir.

Di-(2-etilhekzil) fitalatın rat testisinde; TSK çapında ve GHK'da azalmaya bağlı olarak bir takım testiküler değişikliklere sebep olduğu daha önce bildirilmiştir (175, 189). Kanter, yaptığı bir çalışmada ratların testislerinde iskemi/reperfüzyon yaralanması sonucu ilerlemiş bir germinal epitel dejenerasyonunun şekillendiğini ve ortalama TSK çapında azalmanın olduğunu belirtmiştir. EGb 761 uygulaması ile bu testiküler hasarın düzeldiğini, ortalama TSK çapının neredeyse kontrol grubuna yakın olduğunu tespit etmiş ve bu bulguyu, EGb 761'in tubuluslardaki spermatik hücre proliferasyonuna olan faydalı etkileri ile

ilişkilendirmiştir (239). Çalışmamızın deney süresi boyunca DEHP uygulaması ile ortalama TSK çapında ve GHK’da azalmanın görülmesi; EGb 761 verildiğinde ise bu parametrelerde artışın saptanması, bulgularımızın literatür sonuçlarıyla paralel doğrultuda olduğunu göstermektedir.

Di-(2-etilhekzil) fitalatın germ hücre apoptozisini indükleyerek, testiste meydana gelen apoptozis oranında belirgin bir artış meydana getirdiği daha önce belirtilmiştir (150). Erkekoğlu ve arkadaşları ratlarda 10 gün süreyle DEHP uygulamasının; germ hücre apoptozisini tetikleyerek, TUNEL pozitif hücrelerin sayısını arttırdığını fakat selenyum verildiğinde bu hücrelerin sayıca azaldığını belirterek DEHP toksisitesinde selenyumun koruyucu bir etkiye sahip olduğunu ifade etmiştir (226). Yeh ve arkadaşları 7 gün boyunca doksorubisin verilen ratlarda, EGb 761 ile tedavi edilenlere göre daha çok TUNEL pozitif boyaması olduğunu göstererek, testiste doksorubisinin proapoptotik; EGb 761’in ise antiapoptotik etkiye sahip olduğunu işaret etmiştir (149). Wistar albino cinsi ratlarda testiküler iskemi/ reperfüzyon yaralanması sonucu indüklenen testiküler torsiyon/ detorsiyonun, germ hücre apoptozisini arttırdığı; EGb 761 uygulamasının ise apoptotik germ hücrelerinin reaktivitesini ve sayısını belirgin bir şekilde azalttığı bildirilmiştir (106; 239). Yukarıda belirtilen bilgilere paralel olarak, sunulan çalışmada DEHP’in indüklediği TUNEL pozitif hücre sayısının, EGb 761’in antiapoptotik etkisiyle gittikçe çok belirgin bir şekilde azaldığı görülmüştür.

Di-(2-etilhekzil) fitalatın testiste germ hücre apoptozisini ve germinal epitelin nekrozunu indükleyerek spermatogenik hücre popülasyonunu bozduğu ve spermatogeneziste bozukluğa sebep olduğu bilinmektedir (150). Ishihara ve

arkadaşları DEHP'in sebep olduğu spermatogenezisteki duraklamanın, C ve E vitamin kombinasyonunun uygulanması ile ortadan kalktığını; spermatogenik durumun kontrol grubu ratlara ulaşmasa da belirgin bir şekilde düzeldiğini ifade etmiştir (177). Ablake ve arkadaşları DEHP uygulaması neticesinde hasarlanan seminifer epitelin, deney sürecinin 35. gününde ilk önemli rejenerasyonu gösterdiğini; C ve E vitamin kombinasyonunun takviyesi ile de 25. gün gibi erken bir sürede belirgin olarak rejenere olduğunu bildirmiştir. Deney sürecinin 35. gününde DEHP uygulanan farelerde spermatogenezisteki duraklama hala devam ederken C ve E vitamin kombinasyonunun takviyesi ile TSK'larda birçok spermatidin görüldüğü tespit edilmiştir (176). Ratlarda doksorubisinin mikroskobik olarak TSK'larda şişmeye ve spermatidlerde tükenmeye sebep olarak spermatogenik yapıları bozduğu; EGb 761 uygulamasının ise bu anormallikleri belirgin bir şekilde iyileştirerek spermatogenik yapı bütünlüğünü koruduğu bildirilmiştir (149). Testiküler iskemi/ reperfüzyon yaralanması ile ilgili yapılan bir çalışmada meydana gelen germinal hücre düzeninde bozukluk, intersitisyel bölgede hemoraji ve konjesyon varlığı gibi olumsuz sonuçlar üzerine EGb 761'in iyileştirici etkilerinin olduğu; TSK'ların ve germinal hücrelerin daha düzgün yapıda oldukları ve neredeyse normal morfoloji gösterdikleri belirtilmiştir (106). Literatür bulgularına benzer olarak yaptığımız deneysel çalışmada da, DEHP'in oluşturduğu testiküler hasarın EGb 761 uygulaması ile kademeli olarak düzeldiği gözlenmiştir. Çalışmanın 7. gününde spermatogenezisteki duraklamanın devam ettiği; 14. gününde çoğunlukla düzelmiş TSK ve spermatogenik hücre yapısının görüldüğü; 28. gününde ise iyileşmenin çok daha belirgin olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak; günümüzde birçok bitki ekstraktının antioksidan fonksiyonları hakkında oldukça fazla sayıda çalışma bulunmaktadır. Fakat DEHP indüklü testiküler hasara karşı koruyucu etkisi olan bitkisel ajanlar hakkında çok az bilgi mevcuttur. Hatta DEHP toksisitesine karşı EGb 761'in koruyucu etkisi olduğuna dair daha önce yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızda kullanılan DEHP'in uygulanan süre ve doz göz önüne alındığında testis dokusu için oldukça toksik olduğu ve histolojik yapıyı bozduğu saptanmıştır. Bu çalışmadaki bulgular antioksidan etkiye sahip olan EGb 761'in, DEHP'in testiste oluşturduğu hasarı önemli ölçüde önlediğini göstermektedir. DEHP ve EGb 761 arasındaki bu ilişkinin daha ayrıntılı olarak incelenmesi ve mekanizmalarının daha net bir şekilde açığa çıkarılmasının ileri düzeydeki çalışmaların yapılması ile mümkün olacağı kanaatindeyiz. Çalışmamızın, DEHP indüklü reproduktif toksisiteye karşı EGb 761'in gösterdiği koruyucu etkinin altında yatan moleküler mekanizmanın ortaya konmasında enzimatik ve biyokimyasal analizler ile immunohistokimya ve hücre kültürü düzeyinde yapılacak araştırmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Ergün L. Erkek genital sistem. Özer A (Editör). Veteriner Özel Histoloji. Nobel Yayın Dağıtım, Bursa 2008: 251-268.
2. Tanyolaç A. Erkek genital sistem. Özel Histoloji. Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd. Şti, Ankara 1999: 132-143.
3. Junqueira LC, Carneiro J. Erkek üreme sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviri Editörleri). Temel Histoloji. Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti, İstanbul 2006: 431-447.
4. Kierszenbaum AL. Reproductive system. Histology and Cell Biology. An Introduction to Pathology. Second Edition, Mosby Elsevier, Philadelphia 2007: 569-612.
5. Ross MH, Pawlina W. Male reproductive system. Histology. A Text and Atlas. With Correlated Cell and Molecular Biology. Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2006: 728-759.
6. Sağlam M, Aştı RN, Özer A. Genel Histoloji. Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd. Şti, Ankara 1997: 101-107, 122-132.
7. Petersen RO, Sesterhenn IA, Davis DJ. Ürologic Pathology. Third Edition. Lippincott Williams & Wilkins, China 2009: 313-325.
8. Levine E, Cupp AS, Skinner MK. Role of neurotrophins in rat embryonic testis morphogenesis (cord formation). Biol Reprod 2000; 62: 132-142.
9. Gaskell TL, Esnal A, Robinson LL, Anderson RA, Saunders PT. Immunohistochemical profiling of germ cells within the human fetal testis: identification of three subpopulations. Biol Reprod 2004; 71: 2012-2021.
10. Uzun M, Westfall SD, Dirks KA, Skinner MK. Embryonic testis cord formation and mesonephric cell migration requires the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. Biology of Reproduction 2002; 67: 1927-1935.
11. Young B, Heath JW. Male Reproductive System. Wheater's Functional Histology, A Text and Colour Atlas. Fourth Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh 2000: 328-335.
12. Çöven N. Prenatal ve Postnatal Dönemdeki Ratlarda Testisin Histogenezisi Üzerinde Işık Mikroskopik Çalışmalar. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 1994.
13. Heyns CF. The gubernaculum during testicular descent in the human fetus. J Anat 1987; 153: 93-112.

14. Wheeler PR, Burkitt HG, Daniels VG. Functional Histology. Edinburgh London Melbourne and New York 1987: 329- 336.
15. Kerr JB. Atlas of Functional Histology. Mosby, Barcelona 1999: 339-358.
16. Mori C, Nakamura N, Dix DJ, Fujioka M, Nakagawa S. Morphological analysis of germ cell apoptosis during postnatal testis development in normal and Hsp 70-2 knockout mice. Dev Dynamic 1997; 208: 125-136.
17. O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER. Estrogen and spermatogenesis. Endocr Rev 2001; 22: 289-318.
18. Levy S, Serre V, Hermo L, Robaire B. The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the brown norway rat. J Androl 1999; 20: 356-365.
19. Roberts KP, Zirkin BR. Androgen regulation of spermatogenesis. Ann NY Acad Sci 1991; 637: 90-106.
20. Özbey İ. Erkeklerde hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın yapısı (derleme). Androloji Bülteni 2006; 25: 132-137.
21. Kahveci N. Erkeklerde üreme ve hormonal fonksiyonlar. <http://tip.uludag.edu.tr/fizyoloji/dosya/erkeklerde-ureme.pdf/> 13.09.2012.
22. Bigsby R, Chapin RE, Daston GP, et al. Evaluating the effects of endocrine disruptors on endocrine function during development. Environ Health Perspect 1999; 107: 613-618.
23. Lee MM. Endocrine disruptors. A Current Review of Pediatric Endocrinology 2007; 109-118.
24. Yeşilkaya E. Endokrin bozucular. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi. Güncel Pediatri 2008; 6: 76-82.
25. Solomon GM, Schettler T. Environment and health. 6. Endocrine disruption and potential human health implications. CMAJ Canadian Medical Association Journal 2000; 1116: 1467-1474.
26. Massart F, Parrino R, Seppia P, Federico G, Saggese G. How do environmental estrogen disruptors induce precocious puberty? Minerva Pediatr 2006; 58: 247-254.
27. McLachlan JA, Simpson E, Martin M. Endocrine disruptors and female reproductive health. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab 2006; 20: 63-75.
28. Kelce WR, Wilson EM. Antiandrogenic effects of environmental endocrine disruptors. In: Metzler M (Editor). The handbook of environmental chemistry, endocrine disruptors part 1. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001; 39-61.

29. Metzler M, Pfeiffer E. Chemistry of natural and anthropogenic endocrine active compounds. In: Metzler M (Editor). The Handbook of environmental chemistry, endocrine disruptors part 1. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001; 63-80.
30. Durmaz E, Özmert EN. Fitalatlar ve çocuk sağlığı. Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi 2010; 53: 305-317.
31. Andriana BB, Tay TW, Tachiwana T, et al. Effects of mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes in rats in vitro. Okajimas Folia Anat Jpn 2004; 80(5-6): 127-136.
32. Peakall DB. Phthalate esters: occurrence and biological effects. Residue Rev 1975; 54: 1-41.
33. Adibi JJ, Perera FP, Jedrychowski W, et al. Prenatal exposure to phthalates among women in New York city and Karkow, Poland. Environ Health Perspect 2003; 111: 1719-1722.
34. Giusti RM, Iwamoto K, Hatch EE. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. Ann Intern Med 1995; 122: 778-788.
35. Swan SH, Main KM, Liu F, et al. Decrease in anogenital distance among male infants with prenatal phthalate exposure. Environ. Health Perspect 2005; 113:1056-1061.
36. Gray TJB, Beamand JA. Effect of some phthalate esters and other testicular toxins on primary cultures of testicular cells. Food Chem. Toxicol. 1984; 22: 123-131.
37. Gray TJB, Butterworth KR. Testicular atrophy produced by phthalate esters. Arch. Toxicol. (suppl) 1980; 4: 452-455.
38. Kasahara E, Sato EF, Miyoshi M, et al. Role of oxidative stress in germ cell apoptosis induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate. Biochem. J. 2002; 365:849-856
39. Gray TJB, Rowland IR, Foster PMW, Gangolli SD. Species differences in the testicular toxicity of phthalate esters. Toxicol Lett 1982; 11: 141-147.
40. Richburg JH, Nanez A, Williams LR, Embree ME, Boekelheide K. Sensitivity of testicular germ cells to toxicants induced apoptosis in gad mice that express a nonfunctional form of Fas ligand. Endocrinology 2000; 140: 852-858.
41. Koji T. Male germ cell death in mouse testes: possible involvement of Fas and Fas ligand. Med Electron Microsc 2001; 34: 213-222.
42. Sjöberg POJ, Bondesson UG, Sedin EG, Gustaffson JP. Exposure of newborn infants to plasticizers: plasma level of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate during Exchange transfusion. Transfusion 1985; 25: 424-428.

43. Sjoberg P, Lindqvist NG, Ploen L. Age-dependent response of the rat testes to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ Health Persp* 1986; 65: 237-242.
44. Kondo T, Shono T, Suita S. Age-Specific effect of phthalate ester on testicular development in rats. *J Pediatr Surg* 2006; 41: 1290-1293.
45. Bradbury J. UK panics over phthalates in babymilk formulae. *Lancet* 1996; 347: 1541.
46. Boekelheide K. Sertoli cell toxicants. In *The Sertoli cell*. In: Russel LD, Griswold MD (Editors). Clearwater FL. Cache River Press 1993; 551-557.
47. Giammona CJ, Sawhney P, Chandrasekaran Y, Richburg JH. Death receptor response in rodent testis after mono-(2-ethylhexyl) phthalate exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002; 185: 119-127.
48. Thomas JD, Thomas MJ. Biological effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and other phthalic acid esters. *Crit Rev Toxicol* 1984; 13: 22973-22981.
49. Albro PW. The biochemical toxicology of di-(2-ethylhexyl) phthalate and related phthalates: testicular atrophy and hepatocarcinogenesis. *Rev Biochem Toxicol* 1987; 8: 73-119.
50. Reiter LW, De-Rosa C, Kavlock RJ, et al. The U.S. federal framework for research on endocrine disrupters and an analysis of research programs supported during fiscal year 1996. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106: 105-113.
51. Nakai M, Tabira Y, Asai D, et al. Binding characteristics of dialky phthalates for the estrogen receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1999; 254: 311-314.
52. Staples CA, Peterson DR, Parkerton TF, Adams WJ. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere* 1997; 35: 667-749.
53. ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). US Department of Health and Human Services Public Health Service. Atlanta; GE, 2002.
54. Hilman LS, Goodwin SL, Sherman WR. Identification and measurement of plasticizer in neonatal tissues after umbilical catheters and blood products. *New England Journal of Medicine* 1975; 292: 381-385.
55. Faouzi MA, Dine T, Gressier B, et al. Exposure of hemodialysis patients to di-(2-ethylhexyl) phthalate. *International Journal of Pharmacology* 1999; 180: 113-121.
56. Manojkumar V, Deepadevi KV, Arun P, et al. Changes in the concentration of erythrocyte membrane during storage of blood in di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) plasticized polyvinyl chloride (PVC) blood storage bags. *Indian Journal of Medical Research* 1999; 109: 157-163.

- 57.** Peck CC, Odom DG, Friedman HI, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) accumulation in whole blood and red cell concentrates. *Transfusion* (Bethesda, Md.) 1979; 19: 137-146.
- 58.** Manojkumar V, Padmakumaran Nair KG, Santhosh S, et al. Decrease in the concentration of vitamin E in blood and tissues caused by di-(2-ethylhexyl) phthalate, a commonly used plasticizer in blood storage bags and medical tubing. *Vox Sang* 1998; 75: 139-144.
- 59.** CMA. Comments of the Chemical Manufacturers Association phthalate esters panel in response to request for public input on seven phthalate esters. FR Doc. 99-9484. Washington, DC: Chemical Manufacturers Association, 1999.
- 60.** NTP-CERHR. National Toxicology Program. Center for the evaluation of risks to human reproduction. Monograph on the potential human reproductive and developmental effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). US Department of Health and Human Services. November 2006, NIH Publication No. 06-4476.
- 61.** Albro PW, Thomas R, Fishbein L. Metabolism of diethylhexyl phthalate in rats, isolation and characterization of the urinary metabolites. *J Chromato* 1973; 76: 321-330.
- 62.** Lake BG, Phillips JC, Linnell JC, Gangolli SD. The in vitro hydrolysis of some phthalate diester by hepatic and intestinal preparations from various species. *Toxicol Appl Pharmacol* 1977; 39: 239-248.
- 63.** Pollack GM, Li RC, Ermer JC, Shen DD. Effects of route of administration and repetitive dosing on the disposition kinetics of di-(2-ethylhexyl) phthalate and its mono-de-esterified metabolite in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1985; 79: 246-256.
- 64.** Richburg JH, Boekelheide K. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate rapidly alters both sertoli cell vimentin filaments and germ cell apoptosis in young rat testes. *Toxicology and Appl Pharmacology* 1996; 137: 42-50.
- 65.** Rowland IR, Contrel RC and Philips JC. Hydrolysis of phthalate ester by the gastro-intestinal contents of the rat. *Food Cosmet Toxicol* 1977; 15: 17-21.
- 66.** Gray TJ, Butterworth KR, Gaunt IF, Grasso GP, Gangolli SD. Short-term toxicity study of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Food Cosmet Toxicol* 1977; 15: 389-399.
- 67.** Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. New metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2005; 79: 367-376.

68. Sobarzo CM, Lusting L, Ponzio R, Denduchis B. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on N-cadherin and catenin protein expression in rat testis. *Reproductive Toxicology* 2006; 22: 77-86.
69. Dostal LA, Jenkins WL, Schwetz BA. Hepatic peroxisome proliferation and lipolipidemic effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal and adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987; 87: 81-90.
70. Dostal LA, Weaver RP, Schwetz BA. Transfer of di-(2-ethylhexyl) phthalate through rat milk and effects on milk composition and the mammary glands. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987b; 91: 315-325.
71. Shaffer CB, Carpenter CP, Smyth HJ. Acute and subacute toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate with note upon its metabolism. *J Ind Hyg Toxicol* 1945; 27: 130-135.
72. Oishi S. Prevention of di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced testicular atrophy in rats by co-administration of the vitamin B12 derivative adenosylcobalamin. *Arch Environ Contam Toxicol* 1994; 26: 497-503.
73. Lamb JC, Chapin RE, Teague J, et al. Reproductive effects of four phthalic acid esters in the mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1987; 88: 255-269.
74. Richburg JH. The relevance of spontaneous and chemically induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicol Lett* 2000; 112-113: 79-86.
75. Iona S, Klinger FG, Sisti R, et al. A comparative study of cytotoxic effects of N-ethyl-N-nitrosourea, adriamycin and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on mouse primordial germ cells. *Cell Biol Toxicol* 2002; 18: 131-145.
76. Oishi S. Effects of co-administration of di-(2-ethylhexyl) phthalate and testosterone on several parameters in the testis and pharmacokinetics of its mono-de-esterified metabolite. *Archives of Toxicology* 1989a; 63: 289-295.
77. Oishi S. Enhancing effects of luteinizing hormone-releasing hormone on testicular damage induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicology Letters* 1989b; 47: 271-277.
78. Dalgaard M, Nellemann C, Lam HR, Sorensen IK ve Ladefoged O. The acute effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on testes of prepubertal wistar rats. *Toxicol Lett* 2001; 122: 69-79.
79. Suominen JS, Linderborg J, Nikula H, et al. The effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate, adriamycin and N-ethyl-N-nitrosourea on stage-specific apoptosis and DNA synthesis in the mouse spermatogenesis. *Toxicol Lett* 2003; 143: 163-173.

- 80.** Fiorini C, Tilloy-Ellul A, Chevalier S, Charuel C, Pointis G. Sertoli cell junctional proteins as early targets for different classes of reproductive toxicants. *Rep Toxicol* 2004; 18: 413–421.
- 81.** Gray LEJ, Ostby J, Furr J, et al. Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP and DINP but not DEP, DMP or DOTP alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol Sci* 2000; 58: 350-365.
- 82.** Clark K, Cousins IT, Mackay D. Assessment of critical exposure pathways. In: Staples CA (Editor). *The handbook of environmental chemistry*. Springer-Verlag New York 2003; 227-262.
- 83.** David RM, Moore MR, Finney DC, et al. Chronic toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate in rats. *Toxicol Sci* 2000a; 55: 433-443.
- 84.** Andrade AJ, Grande SW, Talsness CE, Grote K, Chahoud I. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity. *Toxicology* 2006; 227: 185-192.
- 85.** Janos Z, Krishnamurti D. Oxidative stress and disease 10: nutrients and cell signalling. Taylor & Francis, 2005: Önsöz.
- 86.** Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi/Office Journal of the Turkish Nephrology, Association* 1997; 3-4: 92-95.
- 87.** Free MJ, Schluntz GA, Jaffe RA. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. *Biol reprod* 1976; 14: 481-488.
- 88.** Chen H, Liu J, Luo L, et al. Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol* 2005; 40: 728-736.
- 89.** Tekcan M. Oksidatif sistem-antioksidan sistemler ve testis (derleme). *Androloji Bülteni* 2009; 37: 131- 136.
- 90.** Agarwal A, Said TM. Carnitines and male infertility. *Reprod Biomed Online* 2004; 8(4): 376-384.
- 91.** Lenzi A, Picardo M, Gandini L, et al. Glutathione treatment of dyspernia: effect on the lipoperoxidation process. *Hum Reprod* 1994; 9: 2044-2050.
- 92.** Rao AV, Shaha C. Role of glutathion S- transferases in oxidative stress-induced male germ cell apoptosis. *Free Radical Biol Med* 2000; 29: 1015-1027.
- 93.** Yang Y, Cheng JZ, Singhal SS, et al. Role of glutathion S- transferases in protection against lipid peroxidation. Overexpression of HGSTA2-2 in K562 cells protects against hydrogen peroxide-

induced apoptosis and inhibits JNK and caspase 3 activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 19220-19230.

94. Fraga CG, Motchnik PA, Shigenaga MK, et al. Ascorbic acid protects against endogenous oxidative DNA damage in human sperm. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1991; 88: 11003-11006.

95. Chinoy NJ, Mehta RR, Seethalakshmi L, Sharma JD, Chinoy MR. Effects of vitamin C deficiency on physiology of male reproductive organs of guinea pigs. *Int J Fertil* 1986; 31: 232-239.

96. Bensoussan K, Morales CR, Hermo L. Vitamin E deficiency cause incomplete spermatogenesis and affects the structural differentiation of epithelial cells of the epididymis in the rat. *J Androl* 1998; 19: 266-288.

97. Shiraishi K, Yoshida K, Naito K. Activation of endothelial nitric oxide synthase in contralateral testis during unilateral testicular torsion in rats. *Arch Androl* 2003; 49: 179-190.

98. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, et al. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1992; 89: 3030-3034.

99. El-Gohary M, Awara WM, Nassar S, Hawas S. Deltamethrin-induced testicular apoptosis in rats: the protective effects of nitric oxide synthase inhibitor. *Toxicology* 1999; 132: 1-8.

100. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when and where? *Nitric oxide* 1997; 1: 107-120.

101. Taneli F, Vatansever S, Ulman C, et al. The effect of spermatic vessel ligation on testicular nitric oxide levels and germ cell specific apoptosis in rat testis. *Acta Histo-chem* 2005; 106: 459-466.

102. Pagliaro P. Differential biological effects of products of nitric oxide (NO) synthase: it is not enough to say NO. *Life Sci* 2003; 73: 2137-2149.

103. Zini A, Abithol J, Girardi SK, et al. Germ cell apoptosis and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression following ischemia-reperfusion injury to testis *Arch Andol* 1998; 41: 57-65.

104. Kono T, Saito M, Kinoshita Y, et al. Realtime monitoring of nitric oxide and blood flow during ischemia-reperfusion in the rat testis. *Mol Cell Biochem* 2006; 286: 139-145.

105. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, et al. Role of radical oxygen species in rat testicular germ cell apoptosis induced by heat stress. *Biol Reprod* 1999; 61: 393-399.

106. Akgül T, Karagüzel E, Sürer H, et al. Ginkgo biloba (EGb 761) affects apoptosis and nitric-oxide synthases in testicular torsion: an experimental study. *Int Urol Nephrol* 2009; 41: 531-536.

- 107.** Lenzi A, Gandini L, Lombardo F, et al. Polyunsaturated fatty acids of germ cell membranes, glutathione and blutathione-dependent enzyme-PHGPx: from basic to clinic. *Contraception* 2002; 65: 301-304.
- 108.** Bauche F, Fouchard MH, Jegou B. Antioxidant system in rat testicular cells. *FEBS Lett* 1994; 349: 392-396.
- 109.** Sikka SC. Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. *J Androl* 2004; 25: 5-18.
- 110.** Timioğlu O, Kutsal S, Ozkur M, et al. The effect of EGb 761 on the doxorubicin cardiomyopathy. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 1999; 106:181-192.
- 111.** Atessahin A, Turk G, Karahan I, et al. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil steril* 2006; 85: 1216-1222.
- 112.** Oishi S, Hiraga K. Testicular atrophy induced by phthalic acid esters: effect on testosterone and zinc concentrations. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 53: 35-41.
- 113.** McLahlan JA. Environmental signalling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 2001; 22: 319-341.
- 114.** Miura Y, Naitoi M, Ablake M, et al. Short-term effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on testes, liver, kidneys and pancreas in mice. *Asian J Androl* 2007; 9(2): 199-205.
- 115.** Pereira C, Mapuskar K, Rao CV. Effect of diethyl phthalate on rat testicular antioxidant system: a dose-dependent toxicity study. *Pesticide Biochem and Physiol* 2008; 90: 52-57.
- 116.** Sinha Hikim AP, Swerdloff RS. Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod* 1999; 4: 38-47.
- 117.** Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, et al. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999; 140: 1709-1717.
- 118.** Hasegawa M, Wilson G, Russell LD, Meistrich ML. Radiation-induced cell death in the mouse testis: relationship to apoptosis. *Radiat Res* 1997; 147: 457-467.
- 119.** Akgür FM, Kılınç K, Aktuğ T. Reperfusion injury after detorsion of unilateral testicular torsion. *Urol Res* 1993; 21: 395-399.
- 120.** Lysiak JJ, Nguyen QA, Kirby JL, Turner TT. Ischemia-reperfusion of the murine testis stimulates the expression of proinflammatory cytokines and activation of c-jun N-terminal kinase in a pathway to E-selectin expression. *Biol Reprod* 2003; 69: 202-210.

- 121.** Kierszenbaum AL. Cell Signaling. Histology and Cell Biology. Andrew Hall, Mosby Elsevier, Canada 2007: 97-103.
- 122.** Ross MH, Pawlina W. The Cell Nucleus. Histology. Scogna KH. Williams & Wilkins, USA 2006: 88-91.
- 123.** Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 2003: 15- 26.
- 124.** Trosko JE, Chang CC, Upham B, et al. Epigenetic toxicology as toxicant-induced changes in intracellular signalling leading to altered gap junctional intercellular communication. Toxicol Lett 1998; 102: 71-78.
- 125.** Coşkun M. Ginkgo biloba L (Ginkgoaceae) ve önemi. Başer KHC, Kırimer N (Editörler). 14. Bitkisel ilaç hammaddeleri toplantısı. Bildiriler. Eskişehir, 29-31 Mayıs 2002, web yayın tarihi: Haziran 2004.
- 126.** Salvador RL. Herbal medicine-Ginkgo. CPJ/RPC 1995; 52(July-August): 39-41.
- 127.** Huh H, Staba EJ. Botany and chemistry of Ginkgo biloba L. J Herbs Spices Med Plants 1992; 1(1-2): 91-124.
- 128.** Chan PC, Xia Q, Fu PP. Ginkgo biloba leave extract: biological, medicinal and toxicological effects. Journal of Environmental Science and Health Part 2007; 25: 211-244.
- 129.** van Beek TA. Ginkgolides and bilobalide: their physical, chromatographic and spectroscopic properties. Bioorg Med Chem 2005; 13(17): 5001–5012.
- 130.** Mazza G, Oomach BD. “Botanicals and teas, functional foods and nutraceutical series herbs” chemistry, pharmacology and clinical applications of st john woth and ginkgo biloba. In: Mazza G, Oomach BD (Editors). Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, USA 2000; 131-175.
- 131.** Juretzek W. Recent advances in ginkgo biloba extract (EGb 761). Springer-Verlag Tokyo 1997; 341-358.
- 132.** Logani S, Chen MC, Tran T, Le T, Raffa RB. Actions of ginkgo biloba related to potential utility for the treatment of conditions involving cerebral hypoxia. Life Sci 2000; 67: 1389–1396.
- 133.** Shen J, Wang J, Zhao B, et al. Effects of EGb 761 on nitric oxide and oxygen free radicals, myocardial damage and arrhythmia in ischemia-reperfusion injury in vivo. Biochim Biophys Acta 1998; 1406: 228-236.
- 134.** de Feudin FV. Ginkgo biloba extract (EGb761) from chemistry to the clinic. Ullstein Medical Wiesbaden, 1998.

- 135.** Baron-Ruppert G, Luepke NP. Evidence for toxic effects of alkylphenols from ginkgo biloba in the hen's egg tests (HET). *Phytomedicine* 2001; 8: 133-138.
- 136.** Boniel T, Dannon P. The safety of herbal medicines in the psychiatric practice. *Harefuah* 2001; 140: 780-783.
- 137.** Hecker H, Johannison R, Koch E, Siegersa CP. In vitro evaluation of the cytotoxic potential of alkylphenols from Ginkgo biloba L. *Toxicology* 2002; 177: 167-177.
- 138.** McKenna DJ, Jones K, Hughes K. Efficacy safety and use of ginkgo biloba in clinical and preclinical applications. *Alternative Therapies in Health and Medicine* 2001; 7: 70-86, 88-90.
- 139.** Defeudis FV, Papadopoulos V, Drieu K. Ginkgo biloba extracts and cancer: a researches area in its infancy. *Fundam Clin Pharmacol* 2003; 17: 405-417.
- 140.** Gohil K. Genomic responses to herbal extracts: lessons from in vitro and in vivo studies with an extract of ginkgo biloba. *Biochem pharmacol* 2002; 64: 913-917.
- 141.** Lu G, Wu Y, Mak YT, et al. Molecular evidence of the neuroprotective effect of ginkgo biloba (EGb 761) using bax/bcl-2 ratio after brain ischemia in senescence- accelerated mice, strain prone-8. *Brain res* 2006; 1090: 23-28.
- 142.** Pietri S, Seguin JR, d'Arbigny P, Drieu K, Culcasi M. Ginkgo biloba extract (EGb 761) pretreatment limits free radical-induced oxidative stress in patients undergoing coronary bypass surgery. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997; 11: 121-131.
- 143.** Seif-El-Nasr M, El-Fettah AA. Lipid peroxide, phospholipids, glutathione levels and superoxide dismutase activity in rat brain after ischemia: effect of ginkgo biloba extract. *Pharmacol Res* 1995; 32: 273-278.
- 144.** Alaoui-Youssefi A, Lamproglou I, Drieu K, Emerit I. Anticlastogenic effects of ginkgo biloba extract (EGb761) and some of its constituents in irradiated rats. *Mutation Researches* 1999; 445: 99-104.
- 145.** Al-Yahya AA, Al-Majed AA, Al-Bekairi AM, Al-Shabanah OA, Qureshi S. Studies on the reproductive, cytological and biochemical toxicity of ginkgo bilobas in Swiss albino mice. *J. Etnopharmacol* 2006; 107: 222-228.
- 146.** Sasaki K, Hatta W, Wada K, et al. Effects of extracts of ginkgo biloba leaves and its constituents on carcinogen-metabolizing enzyme activities and glutathione levels in mouse liver. *Life science* 2002; 70: 1557-1567.

147. Vogensen SB, Stromgaard K, Shindou H, et al. Preparation of 7-substituted ginkgolide derivatives: potent platelet activating factor (PAF) receptor antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry* 2003; 46: 601-608.
148. Akgül T, Ayyıldız A, Nuhoglu B, et al. Ginkgo biloba (EGb 761) usage attenuates testicular injury induced by testicular ischemia/reperfusion in rats. *Int Urol Nephrol* 2008; 40(3): 685-690.
149. Yeh YC, Liu TJ, Wang LC, et al. A standardized extract of ginkgo biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *British Journal of Pharmacology* 2009; 156: 48-61.
150. Park JD, Habeebu Sultan SM, Klaassen CD. Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate in young sprague-dawley rats. *Toxicology* 2002; 171: 105-115.
151. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119: 493- 501.
152. Xiaozhong Yu, Kubota H, Wang R, Saegusa J, Ogawa Y, Ichihara G, et al. Involvement of Bcl-2 Family Genes and Fas Signaling System in Primary and Secondary Male Germ Cell Apoptosis Induced by 2-Bromopropane in Rat. *J Toxicology and Applied Pharmacolog* 2001; 174: 35- 48.
153. Khaki A, Heidari M, Novin MG, Khaki AA. Adverse effects of ciprofloxacin on testis apoptosis and sperm parameters in rats. *Iranian Journal of Reproductive Medicine* 2008; 6(2): 71- 76.
154. Negoescu A, Guillermet CH, Lorimier PH, et al. TUNEL apoptotic cell detection in archived paraffin-embedded tissues. *Biochemica* 1998; 3: 36- 41.
155. Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal Biochem* 1966; 16: 359- 364.
156. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952- 958.
157. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265- 275.
158. Sedlak J, Lindsay RH. Estimation of total, protein- bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192- 205.
159. Aebi H. Catalase. In: *Methods in Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU (editor), Academic Press, New York, 1983; 276- 286.

- 160.** Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect.* 1993; 101: 378-384.
- 161.** Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, et al. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 11-65.
- 162.** Tyler CR, Jobling S, Sumpter JP. Endocrine disruption in wildlife: a critical review of the evidence. *Rev Toxicol* 1998; 28: 319-361.
- 163.** McLachlan JA. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 2001; 22: 319-341.
- 164.** Kloas W. Amphibians as a model to study endocrine disruptors. *Int Rev Cytol* 2002; 216: 1-57.
- 165.** Skakkebeak NE, Rajpert-De Meyts E, Main KM. Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001; 16: 972-978.
- 166.** Foster PM, Thomas LV, Cook MW, Gangolli SD. Study of the testicular effects and changes in zinc excretion produced by some n-alkyl phthalates in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980; 54, 392-398.
- 167.** Erkekoglu P, Rachidi W, De Rosa V, et al. Protective effect of selenium supplementation on the genotoxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate treatment in LNCaP cells. *Free Radic Biol Med* 2010a; 49: 559-566.
- 168.** Erkekoglu P, Zeybek ND, Giray B, et al. Reproductive toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate in selenium-supplemented and selenium-deficient rats. *Drug Chem Toxicol* 2011a; 34: 379-389.
- 169.** Kwack SJ, Kim KB, Kim HS, Lee BM. Comparative toxicological evaluation of phthalate diesters and metabolites in sprague-dawley male rats for risk assessment. *J Toxicol Environ Health A* 2009; 72: 1446-1454.
- 170.** Lyche JL, Gutleb AC, Bergman A, et al. Reproductive and developmental toxicity of phthalates. *J Toxicol environ* 2009; 12: 225-249.
- 171.** Noriega NC, Howdeshell KL, Furr J, et al. Pubertal administration of DEHP delays puberty, suppresses testosterone production and inhibits reproductive tract development in male sprague-dawley and long-evans rats. *Toxicol Sci* 2009; 111: 163-178.
- 172.** Heindel JJ, Powell CJ. Phthalate ester effects on rat sertoli cell function in vitro: effect of phthalate side chain and age of animal. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1992; 115: 116-123.

- 173.** Teirlynck O, Kaufman JM, Bogaert MG, Roels H. Testicular toxicity induced by single dosing of di and mono-(2-ethylhexyl) phthalate in the rat. *Toxicol Lett* 1988; 40: 85-91.
- 174.** NTP_CERHR. National Toxicology Program. Center for the evaluation of risks to human reproduction. Expert panel report on di-(2-ethylhexyl) phthalate. US Department of Health and Human Services. October 2000.
- 175.** Cammack JN, White RD, Gordon D, et al. Evaluation of reproductive development following intravenous and oral exposure to DEHP in male neonatal rats. *International Journal of Toxicology* 2003; 22: 159-174.
- 176.** Ablake M, Itoh M, Terayama H, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate induces severe aspermatogenesis in mice, however subsequent antioxidant vitamins supplementation accelerates regeneration of the seminiferous epithelium. *International journal of andrology* 2004; 27: 274-281.
- 177.** Ishihara M, Itoh M, Miyamoto K, et al. Spermatogenic disturbance induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate is significantly prevented by treatment with antioxidant vitamins in the rat. *International Journal of Andrology* 2000; 23: 85-94.
- 178.** Andrade AJM, Grande SW, Talsness CE, et al. A dose response study following in-utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Reproductive effects on adult male offspring rats. *Toxicology* 2006b; 228: 85-97.
- 179.** Parmar D, Srivastava SP, Singh GB, Seth PK. Testicular toxicity of di-(2-ethylhexyl) phthalate in developing rats. *Vet Human Toxicol* 1995; 37: 310-313.
- 180.** Kim HS, Saito K, Ishizuka M, Kazusaka A, Fujita S. Short period exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate regulates testosterone metabolism in testis of prepubertal rats. *Arch Toxicol* 2003; 77: 446-451.
- 181.** Singal PK, Iliskovic N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. *New England Medicine* 1998; 339: 900-905.
- 182.** Akingbemi BT, Youker RT, Sottas CM, et al. Modulation of rat leydig cell steroidogenic function by di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Biol Reprod* 2001; 65: 1252-1259.
- 183.** Mylchreest E, Wallace DG, Cattley RC, Foster MD. Dose-dependent alterations in androgen-regulated male reproductive development in rats exposed to di(n-butyl) phthalate during late gestation. *Toxicol Sci* 2000; 55: 143-151.
- 184.** Jones HB, Garside DA, Liu R, Roberts JC. The influence of phthalate esters on leydig cell structure and function in vitro and in vivo. *Exp Mol Pathol* 1993; 58: 179-193.

- 185.** Parks LG, Ostby JS, Lambright CR, et al. The plasticizer diethylhexyl phthalate induces malformations by decreasing fetal testosterone synthesis during sexual differentiation in the male rat. *Toxicol Sci* 2000; 58: 339-349.
- 186.** Ewing LL, Zirkin BR. Leydig cell structure and steroidogenic function. *Recent Prog Horm Res* 1983; 39: 399-404.
- 187.** Hardy MP, Zirkin BR. Leydig cell function. In: Lipschultz LI, Howards SS (Editors.), *Infertility in the Male*, 3rd ed. New York: Mosby; 1997: 59-70.
- 188.** Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP. Phthalate-induced leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances. *Pro Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 775-780.
- 189.** Dorostghoal M, Zardkaf A, Dezfoolian A. Chronic effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on stereological parameters of testis in adult wistar rats. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences* 2010; 13(4): 170-176.
- 190.** De Rooji DG, Lok D. Regulation of the density of spermatogenesis in the seminiferous epithelium of the Chinese hamster. II. Differentiating spermatogenesis. *Anat Rec* 1987; 217: 131-136.
- 191.** Coucouvanis EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, Spack EG, Jones PP. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp Cell Res* 1993; 209: 238-247.
- 192.** Lee J, Richburg J, Ship EB, Meistrich ML, Boekelheide K. The Fas system a regular of testicular germ cell apoptosis is differentially up-regulated in sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 1999; 140: 852-858.
- 193.** Roosen-Runge E. Germinal cell loss in normal metazoan spermatogenesis. *J Reprod Fertil* 1973; 35: 339-348.
- 194.** Creasy DM, Beech LM, Gray TJB. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate and mono- n-pentyl phthalate on the ultrastructural morphology of rat sertoli cell in sertoli/germ cell co-cultures: correlation with the in vivo effects of di-n-pentyl phthalate. *Toxicol In vitro* 1988; 2: 83-95.
- 195.** Allan DJ, Harmon BV, Roberts SA. Spermatogonial apoptosis has three morphologically recognizable phases and shows no circadian rhythm during normal spermatogenesis in the rat. *Cell Prolif* 1992; 25: 241-250.

- 196.** Packer AI, Besmer P, Bachvorava RF. Kit ligand mediates survival of type A spermatogonia and dividing spermatogonia and dividing spermatocytes in postnatal mouse testes. *Mol Reprod Dev* 1995; 42: 303-310.
- 197.** Bianco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C. Spontaneous germ cell death in the testis of the adult rat takes the form of apoptosis: reevaluation of cell types that exhibit the ability to die during spermatogenesis. *Cell Prolif* 1996; 29: 13-31.
- 198.** Print CG, Loveland KL. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis. *BioEssays* 2000; 22: 423-430.
- 199.** Sinha-Hikim AP, Wang C, Leung AS. Involvement apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology* 1995; 136: 2770-2775.
- 200.** Cai L, Hales BF, Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cell of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod* 1997; 55: 1368-1376.
- 201.** Nandi S, Banerjee PP, Zirkin BR. Germ cell apoptosis in the testes of sprague-dawley rats following testosterone withdrawal by ethane 1, 2 dimethane sulfonate administration: relationship to Fas? *Biol Reprod* 1999; 61: 70-75.
- 202.** Corcoran GB, Fix L, Jones DP, et al. Apoptosis: molecular control point in toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; 128: 169-181.
- 203.** Doroshow JH. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. *Cancer Res* 1983; 43: 460-472.
- 204.** Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1998; 95: 4997-5002.
- 205.** Richburg JH, Nanez A, Ga OH. Participation of the Fas-signalling system in the initiation of germ cell apoptosis in young rat testes after exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; 160: 271-278.
- 206.** Yao PL, Lin YC, Richburg JH. TNF alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to sertoli cell injury in rodents is partially regulated by MMP2. *Biol Reprod* 2009; 80: 581-589.
- 207.** Fawcett DW. Ultrastructure and function of the sertoli cell. In: Astwood VEB and Greep RO (Editors). *Handbook of physiology, 7. Endocrinology*. American Physiological Society, Bethesda, Maryland 1975; 21-25.

208. Handel MA. Effects of colchicines on spermiogenesis in the mouse. *J Embriol Exp Morphol* 1979; 51: 73-83.
209. Vogl AW, Linck RW, Dym M. Colchicine induced changes in the cytoskeleton of the golden-mantled ground squirrel (*Spermophilus lateralis*) Sertoli cells. *Am J Anat* 1983; 168: 99-108.
210. Boekelheide K, Neely MD, Sioussat TM. The sertoli cell cytoskeleton: a target for toxicant-induced germ cell loss. *Toxicol Appl Pharmacol* 1989; 101: 373-389.
211. Monsees TK, Franz M, Gebhardt S, et al. Sertoli cell as a target for reproductive hazards. *Andrologia* 2000; 32: 239-246.
212. Sharpe RM, Mc Kinell C, Kivlin C, Fisher J.S. Proliferation and functional maturation of sertoli cells and their relevance to disorders of testis function in adulthood. *Reproduction* 2003; 125: 769-784.
213. Awal MA, Kurohmaru M, Andriana BB, Kanai Y, Hayashi Y. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces testicular alterations in male guinea pigs at prepubertal stage. *Tissue and cell* 2005; 37: 167-175.
214. Dalgaard M, Qstergaard G, Lam HR, Hansen EV, Ladefoged O. Toxicity study of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in combination with acetone in rats. *Pharmacology & Toxicology* 2000; 86: 92-100.
215. Awal MA, Kurohmaru M, Ishii M, et al. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces spermatogenic cell apoptosis in guinea pig testes at prepubertal stage in vitro. *Int J Toxicol* 2004; 23: 349-355.
216. Grasso P, Heindel JJ, Powell CJ, Reichert J. Effects of mono-(2-ethylhexyl) phthalate, a testicular toxicant, on follicle-stimulating hormone binding to membranes from cultured rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 1993; 48: 454-459.
217. Yoganathan T, Eskild W, Hansson V. Investigation of detoxification capacity of rat testicular germ cells and sertoli cells. *Free Radic Biol Med* 1989; 7: 355-359.
218. Ljungvall K, Karlsson P, Hulten F, et al. Delayed effects on plasma concentration of testosterone and testicular morphology by intramuscular low-dose di-(2-ethylhexyl) phthalate or estradiol benzoate in the prepubertal boar. *Theriogenology* 2005; 64: 1170-1184.
219. Foster PM, Mylchreest E, Gaido KW, Sar M. Effects of phthalate esters on the developing reproductive tract of male rats. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 231-235.
220. Park JD, Liu Y, Klaassen CD. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals. *Toxicology* 2001; 163: 93-100.

221. Elgazar V, Razanov V, Stoltenberg M, et al. Zinc-regulating proteins, ZnT-1 and metallothionein I/II are present in different cell populations in the mouse testis. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2005; 53(7): 905-912.
222. Fang YZ, Yang S, WU G. Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. *Nutrition* 2002; 18, 872-879.
223. Koyuturk M, Yanardag R, Bolkent S, Tunalı S. Influence of combined antioxidants against cadmium induced testicular damage. *Environmental toxicology and pharmacology* 2006; 21: 235-240.
224. Erkekoglu P, Giray B, Rachidi W, et al. Effects of di (2-ethylhexyl) phthalate on testicular oxidant/ antioxidant status in selenium- deficient and selenium- supplemented rats. *Enviromental toxicology* 2011, DOI: 10. 1002/ tox.20776.
225. Erkekoglu P, Rachidi W, Yüzügüllü OG, et al. Induction of ROS, p53, p21 in DEHP and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. *Food Chem. Toxicol.* 2011b; 49: 1565-1571.
226. Erkekoglu P, Zeybek ND, Giray B, Asan E, Hincal F. The effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate exposure and selenium nutrition on sertoli cell vimentin structure and germ-cell apoptosis in rat testis. *Arch Environ Contam Toxicol* 2012; 62: 539-547.
227. Sierpina VS, Wollschlaeger B, Blumenthal M. Ginkgo biloba. *Am Fam Physician* 2003; 68: 923-926.
228. Pehlivan M, Dalbeler Y, Hazinedaroğlu S, et al. An assessment of the effect of ginkgo biloba (EGb 761) on ischemia reperfusion injury of intestine. *Hepatogastroenterology* 2002; 49(43): 201-204.
229. Zeybek N, Gorgulu S, Yagci G, et al. The effect of ginkgo biloba (EGb 761) on experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2003; 115(2): 286-293.
230. De Smet PA. Herbal remedies. *N Engl J Med* 2002; 347: 2046-2056.
231. Smith JV, Luo Y. Studies on molecular mechanisms of ginkgo biloba extract. *Appl Microbiol Biotechnol* 2004; 64: 465-472.
232. Ahlemeyer B, Krieglstein J. Pharmacological studies supporting the therapeutic use of ginkgo biloba extract for alzheimer's disease. *Pharmacopsychiatry suppl* 2003; 1: 8-14.
233. Grotto D, Maria LS, Valentini J, et al. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects formalondialdehyde quantification. *Quim Nova* 2009; 32(1): 169-174.

234. Eckert A, Keil U, Kressmann S, et al. Effects of EGb 761 ginkgo biloba extract on mitochondrial function and oxidative stress. *Pharmacopsychiatry* 2003; 36: 15-23.
235. Yenilmez A, Kilic FS, Sirmagul B, et al. Preventive effects of Ginkgo biloba extract on ischemia-reperfusion injury in rat bladder. *Urol Int* 2007; 78(2):167-172.
236. Bastianetto S, Ramassamy C, Dore S, et al. The ginkgo biloba extract (EGb 761) protects hippocampal neurons against cell death induced by beta-amyloid. *Eur J Neuro Sci* 2000; 12: 1882-1890.
237. Luo Y, Smith JV, Paramasivam V, et al. Inhibition of amyloid beta- aggregation and caspase-3 activation by the ginkgo biloba extract EGb 761. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 12197-12202.
238. Lue Y, Sinha Hikim AP, Wang C, Leung A, Swerdloff RS. Functional role of inducible nitric oxide synthase in the induction of male germ cell apoptosis, regulation of sperm number, and determination of testes size: evidence from null mutant mice. *Endocrinology* 2003; 144: 3092-3100.
239. Kanter M. Protective effects of ginkgo biloba (EGb 761) on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats. *Experimental and Molecular Pathology* 2011; 91: 708-713.
240. Amin A, Mahmoud-Ghoneim D, Syam MI, Daoud S. Neural network assessment of herbal protection against chemotherapeutic-induced reproductive toxicity. *Theoretical Biology and Medical Modelling* 2012; 9: 1.
241. Cohen AJ, Bartlik B. Ginkgo biloba for antidepressant-induced sexual dysfunction. *J Sex Marital Ther* 1998; 24, 139-143.
242. Yeh KY, Pu HF, Kaphle K, et al. Ginkgo biloba extract enhances male copulatory behavior and reduces serum prolactin levels in rats. *Hormones and Behavior* 2008; 53: 225-231.
243. Wu XY, Wang WY, Wang RR, et al. Ginkgo biloba extract enhances testosterone synthesis of Leydig cells in type 2 diabetic rats. *National journal of andrology* 2008; 14(4): 371-376.

8. ÖZGEÇMİŞ

15.03.1985 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da Atatürk İlkokulu, Mustafa Kemal Ortaokulu ve Elazığ Lisesi'nde tamamladıktan sonra 2002 yılında Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'ne girdim ve 2007 yılında lisans eğitimimi tamamladım. 2007 yılının Eylül ayında F.Ü. Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım. 2009 yılının Mayıs ayında Tunceli Üniversitesi Tunceli Meslek Yüksek Okulu Arıcılık Bölümü'ne Öğretim Görevlisi olarak atandım. Halen T.Ü. T.M.Y.O.'nda Öğretim Görevlisi olarak görev yapmaktayım.