

T.C.

FIRAT ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ETANOLÜN SIÇAN TESTİS DOKUSUNDA MEYDANA
GETİRDİĞİ APOPTOTİK DEĞİŞİKLİKLER ÜZERİNE
ELETTARIA CARDAMOMUM 'UN ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Esra ERDEM

2013

ONAY SAYFASI

Doç. Dr. Oktay BURMA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

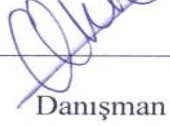
Prof. Dr. Enver OZAN



Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

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

Doç. Dr. Dürrin Özlem DABAK



Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

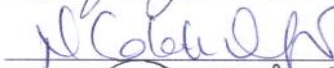
Prof. Dr. Enver OZAN



Prof. Dr. Leyla KAYITCI



Prof. Dr. Nezman GÖLAKOĞLU



Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU



Yrd. Doç. Dr. Ebru ÖNALAN



Sevgili Aileme...

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tez konumun seçimi, yürütülmesi ve değerlendirilmesinde tecrübelerinden yararlandığım değerli danışman hocam Doç. Dr. Dürrin Özlem DABAK 'a ve araştırma sırasında, tezimin değerlendirme aşamasında ilgi, öneri ve yardımlarından ötürü Yrd. Doç. Dr. Tuncay KULOĞLU 'na,

Eğitimim süresince beni yönlendiren, manevi desteğini esirgemeyen Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Enver OZAN 'a,

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım diğer değerli öğretim üyesi hocalarım sayın Prof. Dr. Leyla CANPOLAT KOYUTÜRK 'e, sayın Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU 'na,

Tez çalışmamda yardımcı olarak katkıda bulunan Uzm. Dr. Nevin KOCAMAN 'a ve sevgili arkadaşım Gülşah AKIN 'a,

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

Manevi desteğini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	i
ONAY SAYFASI	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
KISALTMALAR LİSTESİ	xi
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ	5
3.1. Testis Anatomisi.....	5
3.1.1. Tunica vaginalis testis.....	5
3.1.2. Tunica albuginea.....	6
3.1.3. Tunica vasculosa.....	7
3.2. Testis Embriyolojisi	8
3.3. Testis Histolojisi.....	13
3.3.1. Spermatogenez.....	17
3.4. Etanol (Etil Alkol)	21
3.5. Apoptozis.....	23
3.5.1. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler.....	31
3.5.1.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri.....	31
3.5.1.1.1. Işık Mikroskobu Kullanımı	31
3.5.1.1.1.1. Hematoksilen boyama.....	31

3.5.1.1.1.2. Giemsa boyama.....	32
3.5.1.1.2. Floresan Mikroskobu/Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı	32
3.5.1.1.3. Elektron Mikroskobu.....	33
3.5.1.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu	33
3.5.1.2. İmmünohistokimyasal Yöntemler	33
3.5.1.2.1. Anneksin V Yöntemi.....	33
3.5.1.2.2. TUNEL Yöntemi	34
3.5.1.2.3. M30 Yöntemi	36
3.5.1.2.4.Kaspaz-3 Yöntemi	37
3.5.1.3.Biokimyasal Yöntemler	37
3.5.1.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi.....	37
3.5.1.3.2. Western Blotting.....	37
3.5.1.3.3. Flow Sitometri	38
3.5.1.4. İmmünolojik Yöntemler.....	38
3.5.1.4.1. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)	38
3.5.1.4.2. Flourimetrik Yöntem	39
3.5.1.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri.....	39
3.5.1.5.1. DNA Microarrays	39
3.5.2. Apoptozisin Spermatogenezdeki Rolü.....	40
3.6. Elettaria cardamomum	41
4. GEREÇ VE YÖNTEM	44
4.1. Deney Hayvanları.....	44
4.2 Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar	45

4.3. Histolojik Çalışmalar.....	46
4.4. TUNEL Boyama.....	47
5. BULGULAR.....	51
5.1. Histolojik Bulgular.....	51
5.2. TUNEL Bulgular.....	57
6. TARTIŞMA.....	60
8. KAYNAKLAR.....	66
9. ÖZGEÇMİŞ.....	76

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler	31
Tablo 2. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkihi.....	45
Tablo 3. Histolojik takip serileri.....	47
Tablo 4. TUNEL boyama prosedürü.	49
Tablo 5. TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi.....	50

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. İnsan testisinin midsagittal kesiti.	6
Şekil 2. Embriyoda genital kabarıklık bölgesi.....	9
Şekil 3. Primordial germ hücrelerinin vitellus kesesinden genital kabarıklığa göçü.	10
Şekil 4. Testis gelişiminin şematik gösterimi.	11
Şekil 5. Testis dokusu kesitinde seminifer tübüller ve bunların arasına yerleşmiş Leydig hücreleri..	13
Şekil 6. Çevre doku ile birlikte seminifer tübülün bir parçası.	15
Şekil 7. Seminifer (germinal) epitelin ultrastrüktürel yapısı.	20
Şekil 8. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozisin tetiklenmesi.....	27
Şekil 9. Apoptosom	28
Şekil 10. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması.	29
Şekil 11. Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptozis.....	30
Şekil 12. Normal ve Apoptotik İnsan Lökosit Hücresi.....	32
Şekil 13. TUNEL metodu uygulanmış rat testis dokusunda kahverengi boyanmış apoptotik hücreler.....	34
Şekil 14. TUNEL metodunun prensibinin şematik gösterimi	36
Şekil 15. Grup I. Testis dokusunda normal yapıda seminifer tübüller ve interstisyel Leydig hücreleri.....	52
Şekil 16. Grup I. Testis dokusunda normal yapıda seminifer tübüller ve tübül bazal membranı	52
Şekil 17. Grup II. Testis dokusunda peritübüler alanda vasküler konjesyon.....	53

Şekil 18. Grup II. Testis dokusunda atrofik ve dejenere seminifer tübül epiteli .	53
Şekil 19. Grup II. Testis dokusunda seminifer tübüllerde bazal membran invaginasyonları	54
Şekil 20. Grup II. Testis dokusunda seminifer tübüllerde spermatogenik seriye ait olgunlaşmasını tamamlamamış hücrelerde lümene dökülmeler.	54
Şekil 21. Grup III. Testis dokusunda peritübüler vasküler konjesyon	55
Şekil 22. Grup III. Testis dokusunda tübül bazal membranında invaginasyonlarda azalma	55
Şekil 23. Grup III. Testis dokusunda seminifer tübüllerde dejenerasyon.....	56
Şekil 24. Grup III. Testis dokusunda olgunlaşmasını tamamlamamış spermatogenik seriye ait hücrelerde lümen içerisine dökülmeler ve kan damarı	56
Şekil 25. Grup I. TUNEL pozitif hücre	57
Şekil 26. Grup II. Artmış TUNEL pozitif hücreler	58
Şekil 27. Grup III. TUNEL pozitif hücre.....	58
Şekil 28. Negatif kontrol. TUNEL.....	59
Şekil 29. Pozitif kontrol. Meme dokusu	59

KISALTMALAR LİSTESİ

ABP	: Androjen bağlayıcı protein
ACF	: Anormal kript odakları
AMH	: Antimüllerian Hormon
AOM	: Azoksimetan
Apaf-1	: Apoptotik proteaz aktive edici faktör
ATP	: Adenozin trifosfat
DAB	: Diaminobenzidin
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
E.R.	: Endoplazmik retikulum
Fas-L	: Fas- ligand
FSH	: Folikül uyarıcı hormon
FADD	: Fas bağımlı ölüm domain proteini
GrB	: Granzim B
GSH	: Redükte glutasyon
IL-1	: İnterlökin-1
İ.p.	: İntraperitoneal
hCG	: İnsan Koryonik Gonodotropin Hormonu
LH	: Lüteinleştirici hormon
H&E	: Hematoksilen - Eozin
MDA	: Malondialdehit
MİM	: Müllerian inhibitör madde

- PAS** : Periyodik Asit-Schiff
- PBS** : Phosphate buffered saline
- PCNA** : Prolifere edici hücre nükleer antijeni
- PS** : Fosfatidilserin
- ROS** : Reaktif oksijen türleri
- SOD** : Süperoksit dismutaz
- SRY** : Y kromozomu üzerindeki seks belirleyici bölge
- TdT** : Deoksinükleotidil transferaz
- TDF** : Testis belirleyen faktör geni
- TNF** : Tümör nekroz faktör
- TUNEL** : Terminal deoxynucleotidyl transpherase- mediated
deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling

1. ÖZET

Etanol (etil alkol) testis toksini olarak bilinmektedir. *Elettaria cardamomum* (Cardamom) ise ülkemizde kakule adı ile bilinen tohumları baharat olarak da kullanılan bir bitkidir. Cardamomun başlıca anti-inflamatuar ve antioksidan olmak üzere dokulara birçok olumlu etkileri bulunmaktadır.

Bu çalışmada etanol ile oluşturulan testis hasarına karşı Cardamom'un koruyucu etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmada 21 adet erişkin Wistar Albino tipi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar 3 gruba ayrıldı. Kontrol grubuna; 10 gün boyunca her gün intraperitoneal (i.p.) yolla 5 ml serum fizyolojik, Etanol grubuna; 10 gün boyunca her gün aynı volümde i.p. yolla 5 ml serum fizyolojik + etanol (3 g/kg) ve Etanol + Cardamom grubuna; 10 gün boyunca her gün i.p. yolla serum fizyolojik + etanol (3 g/kg) ile birlikte oral olarak Cardamom (500 µL/kg) uygulaması yapıldı. Deney sonunda testis dokuları çıkarılıp rutin histolojik takipler yapıldıktan sonra histolojik boyamalar ve TUNEL metodu uygulandı.

Etanole maruz kalan sıçanlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında testis dokularında peritübüler vasküler konjesyon, seminifer tübüllerde dejenerasyon, tübül bazal membranında invaginasyonlar ve olgunlaşmasını tamamlamamış spermatogenetik seriye ait hücrelerin lümen içine dökülmeleri gözlemlendi. Etanol ile birlikte Cardamom uygulanan grupta ise peritübüler vasküler konjesyon, tübül bazal membran invaginasyonlarında düzelme gözlenmesine rağmen seminifer tübül dejenerasyonu ve spermatogenetik seriye ait hücrelerin lümen içine dökülmelerinde belirgin bir iyileşme görülmedi.

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucunda kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Etanol verilen grupta seminifer tübüllerdeki apoptotik hücrelerde belirgin bir artış vardı. Etanol ile birlikte Cardamom verilen grupta ise seminifer tübüllerdeki apoptotik hücrelerin etanol verilen gruba göre azaldığı belirlendi.

Sonuç olarak; Cardamom'un Etanolün testis seminifer tübüllerinde meydana getirdiği apoptotik hücre artışına karşı koruyucu olumlu etkilerinin olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Etanol, Testis, Cardamom, Apoptozis

2. ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF EFFECTS OF ELETTERIA CARDAMOMUM ON THE APOPTOTIC ALTERATIONS INDUCED BY ETHANOL IN RAT TESTES

Ethanol (ethyl alcohol) is known as a testicular toxin. Elettaria cardamomum (cardamom) known as kakule in our country and seeds of it are used as a herbal spice. Cardamom has beneficial effects on tissues such as anti-inflammatory and anti-oxidant properties.

The aim of this study was to investigate preventive effects of Cardamom on testicular damage induced with ethanol. Twenty-one adult male Wistar rats were used in the study. The rats were divided into 3 groups, saline-treated group, ethanol(3 g/kg)-treated group, ethanol (3 g/kg)-and Cardamom (500 µL/kg)-treated group. Ethanol was administrated daily (in 5ml saline) intraperitoneally for 10 days, and the same volume of saline was administrated for the controls. Cardamom was administrated orally for 10 days. At the end of the experiment, testes tissues collected from the animals were processed by using routine paraffin techniques. The sections of testes were stained by histological dying and TUNEL method.

Peritubular vascular congestion, degeneration in seminiferous tubules, invaginations of tubular basement membrane and sloughing of immature germinal cells to the lumen were observed in ethanol-treated group compared to the controls. Although peritubular vascular congestion and invaginations of tubular basement membrane were improved, degeneration in seminiferous tubules and

sloughing of immature germinal cells to the lumen were not significant improvement in Ethanol and Cardamom treated group compared to the controls.

TUNEL-positive cells were markedly increased in the seminiferous tubules in ethanol-treated group compared to the controls. TUNEL-positive cells were decreased in the seminiferous tubules in Cardamom treated group compared to the ethanol-treated group.

In conclusion, it was determined that Cardamom had protective positive effects on apoptotic cell increment in seminiferous tubules induced by ethanol.

Key Words: Ethanol, Testis, Cardamom, Apoptosis

3. GİRİŞ

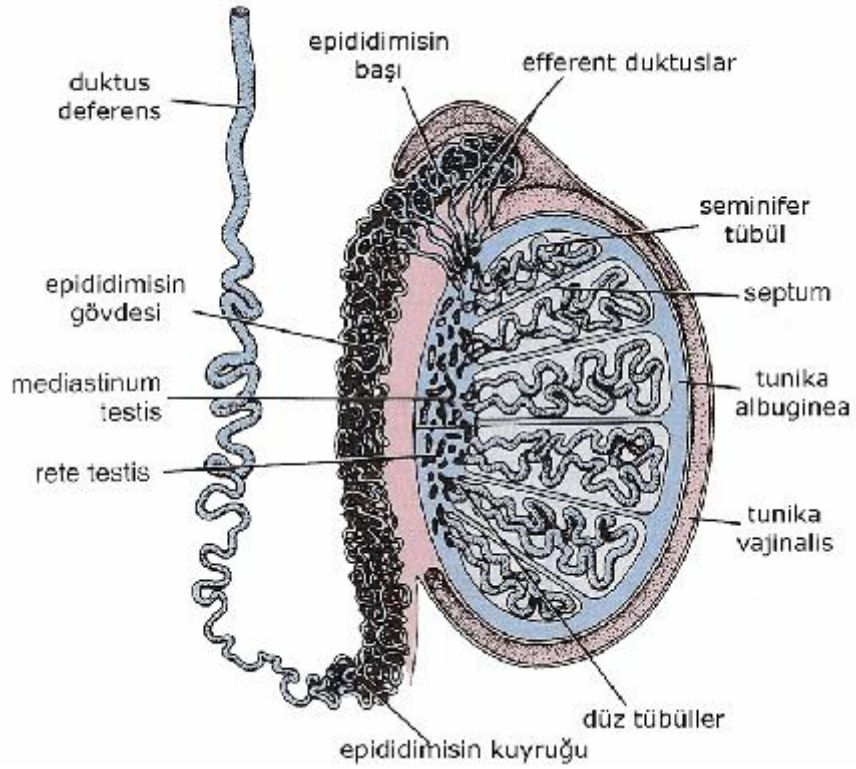
3.1. Testis Anatomisi

Erkeklerde temel üreme organı olan testisler, sağlı sollu bir çift olup scrotum içerisinde funiculus spermaticus aracılığıyla asılı olarak bulunurlar. Her bir testisin facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior olmak üzere iki ucu vardır. Sol testis sağ testise göre genellikle 1 cm daha aşağıda bulunmaktadır (1).

Oval şekilli ve yanlardan biraz basık olan testisler, yaklaşık olarak 4-5 cm uzunluğunda, 2-3 cm kalınlığında, 2-3 cm genişliğinde ve 10-14 gr ağırlığında olup septum scroti ile birbirlerinden ayrılırlar. Testisler, dıştan içe doğru olmak üzere tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa olmak üzere üç tabaka ile sarılırlar (2-4).

3.1.1. Tunica vaginalis testis

Tunica vaginalis testis, fascia spermatica internanın iç, testisin de dış yüzünü saran seröz peritoneal zarıdır. İki yapraktan oluşur. İç yaprağı olan lamina visceralis testis epididymis'in üzerini örterken; dış yaprağı lamina parietalis ise scrotumun iç yüzünü örter. Lamina visceralis ve lamina parietalis embriyonal hayatta testislerin karın boşluğundan scrotum'a inerken önlerinde sürükledikleri peritoneumdur (2, 3, 5).



Şekil 1. İnsan testisinin midsagittal kesiti (6).

3.1.2. Tunica albuginea

Testisi yoğun bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevreleyen sıkı yapılı, mavimsi-beyaz renkli, fibröz bir tabakadır. Bu tabakayı oluşturan beyaz fibröz demetler, farklı yönlere uzanarak birbirlerinin içine girerler. Tunica albuginea, testis arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen yapıyı oluşturur. Mediastinum testiste testise ait damar ve sinirler ile beraber, rete testis adı verilen sperm kanalcıkları bulunur (2, 3, 5).

3.1.3. Tunica vasculosa

Tunica albuginea'nın iç yüzünde yerleşmiş bir damar ağı tabakası olup, Tunica albuginea'nın iç yüzünü ve tüm bölmelerin yüzeylerini örter. Böylece, testis'in içindeki tüm lobuli testis'i de sarmış olur (2-4). Tunica albuginea'nın iç yüzünden çıkan, bağ dokusundan oluşmuş septula testisler, testis parankimasını yaklaşık olarak 250 kadar lobüllere ayırırlar. Piramit biçiminde olan bu lobüllerin taban kısımları perifere, tepe kısımları ise mediastinum testise yönelmiştir. Her bir lobçuk içinde tubuli seminiferi kontorti adı verilen kıvrıntılı seyirli 3-4 adet kanalcık bulunur. Bu tüpler kör bir uçla başlar ve tüpler arasında gevşek bağ dokusu bulunur. Bu tüplerin yaklaşık olarak sayısı her bir testiste 400 - 600, uzunlukları 70 - 80 cm, çapları da 0,1-0,3 mm kadardır. Lopçukların mediastinum testise bakan tepe kısımlarında bu boruların seyri gittikçe düzleşir ve birbirleriyle birleşerek sayıları 20- 30 'a iner. Tubuli seminiferi rekti denilen bu tüplerin, çapları da genişleyerek 0,5 mm olur. Tubuli seminiferi rektiler mediastinum testisin fibröz dokusu içine girerek arkaya ve yukarı doğru uzanır. Mediastinum testise ulaşan bu kanalcıklar seyri esnasında birbirleriyle anastomoz yaparak rete testis denilen ağı oluştururlar. Mediastinum testisin üst bölümünde rete testisten ayrılan sayıları 12-14 arasında değişen kanallar ductuli efferentes testisleri yaparlar. Bu testisin arka kenarlarının üst kısımlarında tunica albugineayı delerek dışarı çıkarlar. Bunlar da caput epididymis'i meydana getirirler. Ductuli efferentes testisler kaput epididimiste ductus epididimis denilen kanala açılır. Epididimiste spermiyumlar depo edilir ve olgunlaşmasının son safhasını tamamlar (2, 4, 5).

Testis ve epididymis, aorta abdominalis'in dalı olan a.testicularis'ten beslenir. a. testicularis, a. renalislerin biraz aşağısında aortanın ön yüzünden

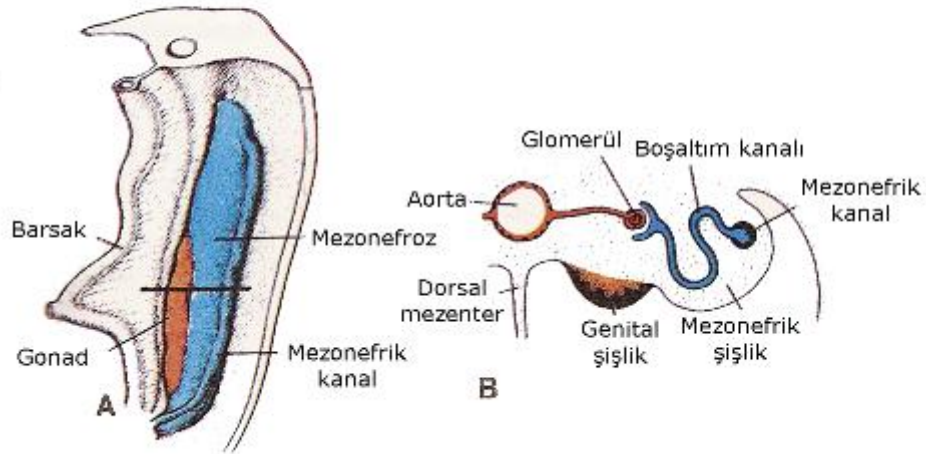
ayrılan bir çift arterdir. a. testicularis birçok dala ayrılır. Bu dallardan 2 ve ya 4 tanesi ductus deferens boyunca uzanarak epididimisi besler. Diğer dalları tunica albugineanın arka kısmını delerek testise girer ve bu organı besler. Testis ve epididimisin venleri ise önce funiculus spermaticus'u saran plexus pampiniformis'i, daha sonra da birbirleri ile birleşerek v.testicularis'i oluştururlar. Sağdaki v.cava inferior'a dökülürken sol taraftaki ise v.renalis sinistra'ya açılır. T₁₀₋₁₁. medulla spinalis segmentlerinden kaynaklanan sempatik lifler, damarların çevresindeki plexuslar aracılığı ile gelir. Plexus testicularis erkeklerde a. testicularis etrafında testise uzanır, dalları da epididimis ve duktus deferense gider. Üst bölümü plexus aorticus abdominalis ve plexus renalisten, alt bölümü ise plexus hypogastricus superior ve inferiordan lifler alır (7).

3.2.Testis Embriyolojisi

Ürogenital sistem, embriyonun dorsal vücut duvarından köken alan ara mezodermden gelişir. Dördüncü hafta başında embriyonun horizontal planda katlanması sırasında ventrale çekilen bu mezoderm somitlerle olan bağlantısını kaybeder. Dorsal aortun her iki yanında uzanan longitudinal mezoderm kabartısı ürogenital kabartı olarak adlandırılır. Ürogenital kabartı nefrojenik kordon olarak adlandırılan kısmı üriner sistemi, gonadal kabartı olarak adlandırılan kısmı ise genital sistemi meydana getirir. Nefrojenik kordonun servikal ve yukarı toraksik bölgelerinden pronefrozlar, aşağı toraksik, lumbar ve sakral bölgelerinden ise mezonefrozlar ve metanefrozlar gelişir. Pronefrozlar fonksiyonel olmayan yapılardır ve insan embriyosunda ilk olarak dördüncü haftanın başlangıcında ortaya çıkarlar. Mezonefrozlar, oldukça genişlemiş ve uzamış boşaltıcı organlardır

ve dördüncü haftanın sonuna doğru rudimenter yapılar olan pronefrozların kaudalinde ortaya çıkarlar. Daha iyi gelişmiş olan mezonefrozlar kalıcı böbrekler oluşuncaya kadar, yaklaşık dört hafta boyunca ara böbrekler olarak embriyoda işlev görürler. Metanefrozlar, kalıcı, esas böbrekleri oluşturan sistemdir (8).

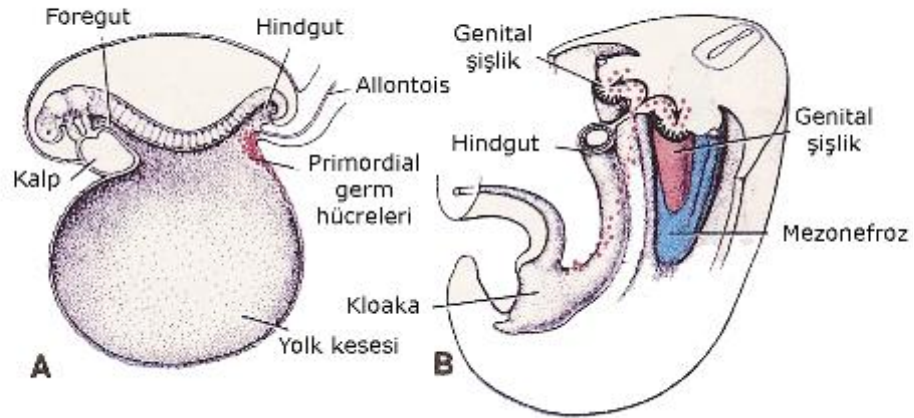
Gelişimin ilk safhaları beşinci haftada ortaya çıkar. Mezonefrozun medialinde, mezotel epitelinde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık-gonadal kabartı- oluşur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar –gonadal kordonlar- altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklılanmamış gonad artık, dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklılanmamış gonadın korteksi overe differensiyel olur, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklılanır, korteks bir takım kalıntıları dışında geriler, dejenere olur (8).



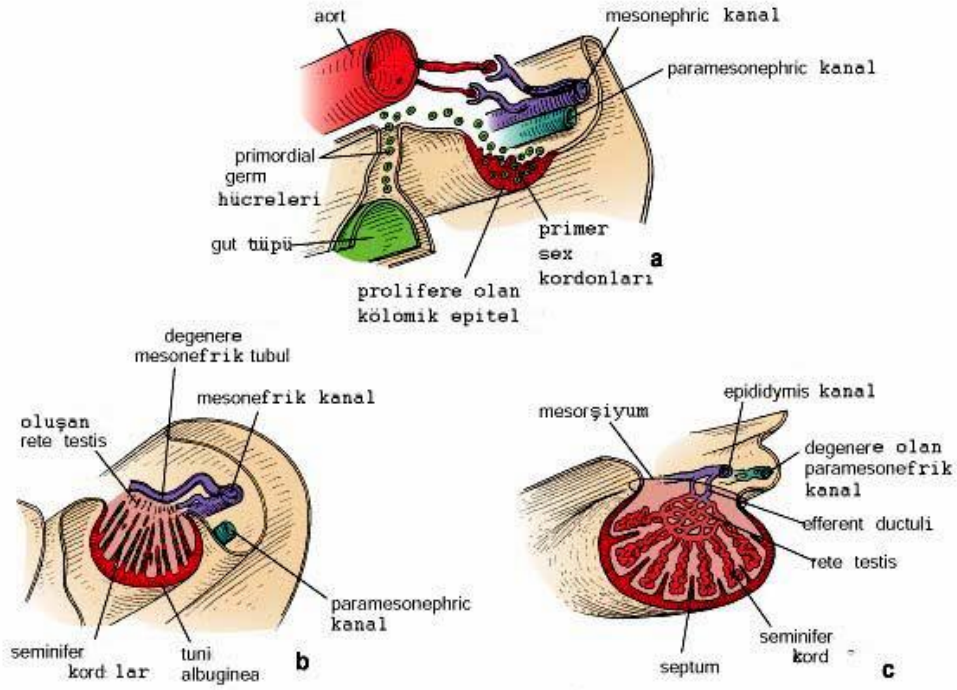
Şekil 2. A. Genital kabarıklık ve mezonefroz arasındaki ilişkiyi gösteren çizim.

B. Mezonefroz ve genital kabarıklıktan A' da belirtilen seviyeden geçen transvers kesit (6).

Gelişimin dördüncü haftasında büyük yuvarlak primordial germ hücreleri allantoisin başlangıç yerine yakın, vitellus kesesi duvarında endodermal hücreler arasında görülmeye başlarlar. Embriyonun katlanmaları sırasında vitellus kesesinin dorsal parçası embriyo içine alınır. Bu alınma işlemi gerçekleşirken primordial germ hücreleri arka barsağın dorsal mezenteri yoluyla gonadal kabartılara göç ederler (Şekil 2). Primordial germ hücrelerinin göçlerinden hemen önce ya da göçleri esnasında gonadal kabartının sölom epiteli tekrar çoğalır ve altındaki mezenşime yayılarak düzensiz primitif seks kordonlarını oluşturur. Altıncı hafta sırasında primordial germ hücreleri altındaki mezenşim içerisine girerler ve primer seks kordonlarına dahil olurlar (8).



Şekil 3.A. Üç haftalık embriyoda yolk kesesi duvarında, allantois bağlantısına yakın bir yerde primordial germ hücrelerini gösteren şematik çizim.
B. Primordial germ hücrelerinin, son barsak ve dorsal mezenter boyunca genital kıvrıma doğru giden göç yolu (6).



Şekil 4. Testis gelişiminin şematik gösterimi (9).

Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti, sekonder oositi döleyen sperm türüne bağlı olarak fertilizasyonda belirlenir. Y kromozomu, farklılaşmamış gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir. Testis belirleyen faktör geni TDF - testis determining factor- için gerekli olan SRY geninin-sex determining region of the Y chromosom- Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet belirleyen bölgesinde yerleştiği saptanmıştır. SRY geni farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişiminde bir anahtar fonksiyonu görmektedir. TDF primer seks kordonlarını uyararak, onların farklılaşmamış gonadın medulla derinlerine uzamasına neden olur, kordonlar burada dallanarak birbirleriyle anastomoz yaparlar ve böylece rete testis oluşur. Seminifer kordonların kalın bir fibröz kapsül olan tunica albuginea geliştikten sonra yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Giderek genişleyen testis, gerileyen

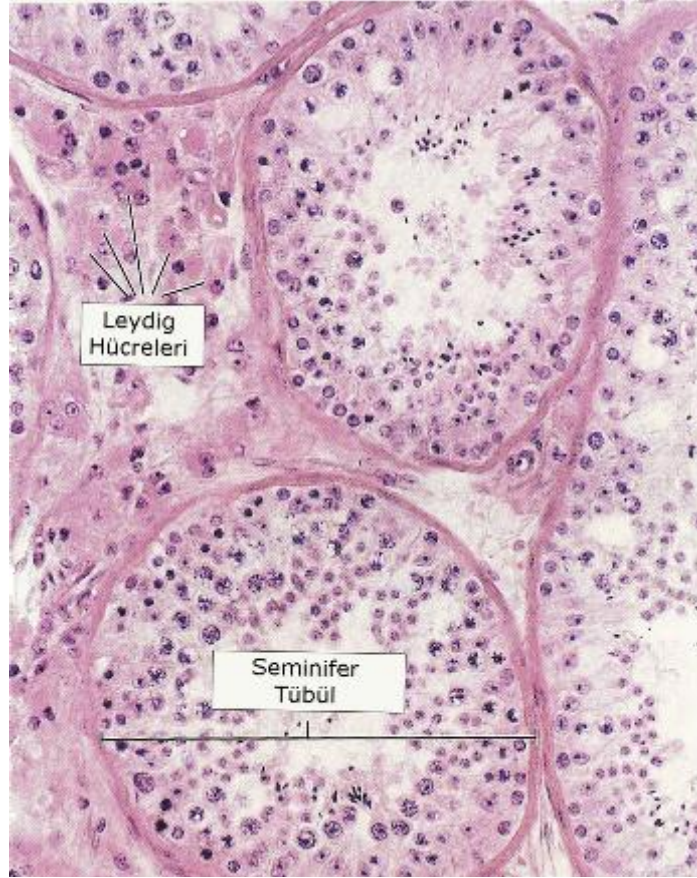
mezonefrozdandan ayrılır ve mezoşiyum denilen kendi mezenteri ile asılı durur. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farkanırlar. Seks kordonları, bu evrede, primordial germ hücrelerini ve sölom epitelinden köken alan sertoli hücrelerini içerirler. Seminifer tübüller, interstisyel hücreleri (Leydig hücreleri) oluşturan mezenşim ile ayrılırlar. Sekizinci haftadan itibaren Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve androstenedion) salgılamaya başlarlar. Bu hormonlar mezonefrik kanalların ve dış genitallerin maskülin olarak farkanmasını uyarırlar. Testosteron üretimini insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu stimüle eder, hormonun miktarı 8-12 haftalık dönemde en yüksek değerine ulaşmaktadır (8).

Fetal testiste sertoli hücreleri glikoprotein bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MİM) adı verilen bir hormonu da salgılamaktadır. AMH sertoli hücreleri tarafından salgılanır ve hormonun salgılanması puberteye kadar devam eder daha sonra ise seviyesi azalır. AMH, paramezonefrik duktusların gelişimini baskılar (8).

Testisler yaklaşık yirmi altıncı haftada posterior karın duvarından skrotuma inerler. Testisin konumundaki bu değişme, embriyo bedeninin uzaması ve pelvis genişlemesi ile birlikte olur. Ayrıca testislerin alt kutuplarını gelişen skrotuma bağlayan, testosterona duyarlı ligamentum gubernakulumun, testosteron salınımıyla kısılması da etkilidir. Testisler, abdominal kavite ve skrotum arasında dar bir geçit olan inguinal kanaldan geçerek skrotuma inerler (8, 9).

3.3. Testis Histolojisi

Testisler, dış tarafta bulunan sıkı bağ dokusundan oluşmuş tunica albugineadan uzanan septalar aracılığı ile lobullere ayrılır. Her lobül içerisinde spermin üretildiği 1-4 adet seminifer tübül ve Leydig hücrelerini (interstisyel hücreler) içeren bağ doku stroması (Şekil 5) yer almaktadır (10).



Şekil 5. Testis dokusu kesitinde seminifer tübüller ve bunların arasına yerleşmiş Leydig hücreleri izlenmekte (6).

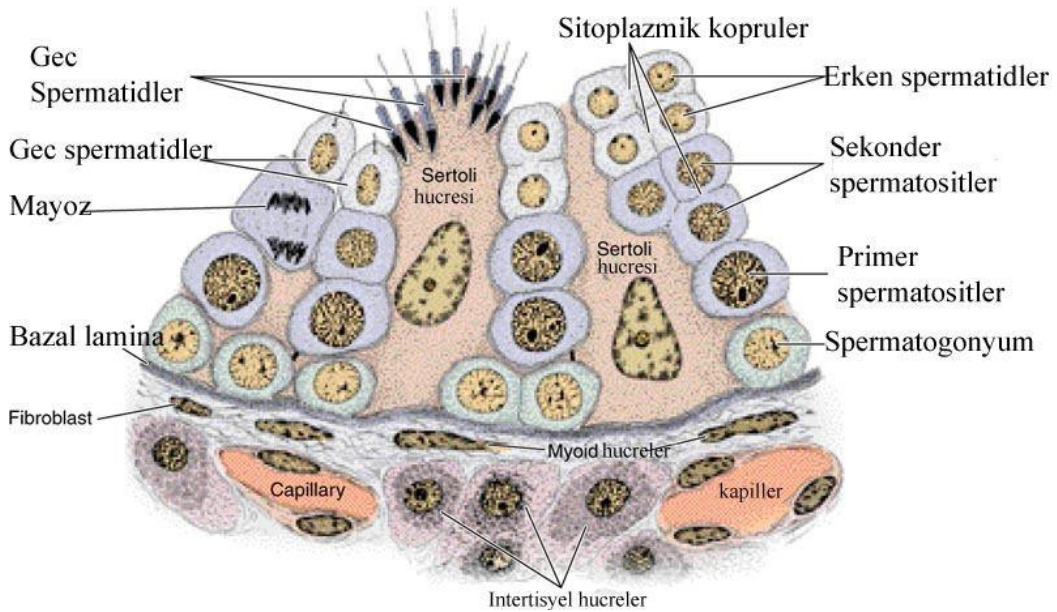
Seminifer tübül, yaklaşık 150-200 µm çapta ve 20-80 cm uzunlukta oldukça kıvrıntılı kanalcıklardır. Seminifer tübüller, anastomoz gösteren kıvrımlar şeklinde başlar, mediastinuma doğru birbirlerine yaklaşılarak kısa boşaltma kanalı

olan tubuli rektiye yaparlar. İki ucu U şeklinde olan bu túbüller de rete testise açılırlar (10).

Seminifer túbüller, fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal (seminifer) epitelden oluşur. Seminifer túbül epiteli, sertoli (destek) hücreleri spermatogenik hücreler olmak üzere iki temel hücre popülasyonundan oluşan çok katlı yassı epiteldir. Seminifer túbüllerin görevi spermatozonları üretmektir ve bu olay spermatogenez olarak adlandırılır. Sertoli hücreleri, spermatogenez serisindeki hücreleri saran uzun, piramidal hücrelerdir. Bu hücrelerin tabanları bazal laminaya tutunurken apikal uçları ise sıklıkla seminifer túbülün lümenine uzanır. Sayıları az olup düzenli aralıklarla yerleşen bu hücrelerin apikal ve lateral hücre membranlarının sınırları oldukça düzensizdir (4)

Sertoli hücreleri seminifer epitelin tüm kalınlığı boyunca yer alır. Bu karmaşık biçim rutin Hematoksilin & Eozin (H& E) preparatlarda gözlenmez. Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde bu hücrelerde sıklıkla üçgen biçiminde uzamış olan çekirdek, belirgin olarak seçilen çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin bulunur. Sertoli hücrelerindeki belirgin olan çekirdek, bu hücrelerin arasında ve çevresinde sıralar halinde yerleşmiş olan spermatogenik hücrelerden kolayca ayrılmalarını sağlar. Organel bakımından zengin olan sertoli hücrelerini 7-9 nm kalınlığında bir flaman kılıfı nükleusu sitoplazmik organellerden ayırır. Sitoplazmada çok sayıda endoplazmik retikulum, az granüllü endoplazmik retikulum, golgi kompleksi, çok sayıda mitokondri, değişen miktarlarda mikrotúbüller, lizozomlar, lipid damlaları, veziküller, glikojen granülleri ve flamanlar bulunur (11).

Yan yana bulunan sertoli hücreleri, bazolateral bölgelerinde sıkı bağlantılarla birbirlerine tutunarak kan-testis bariyerini oluştururlar. Bu bağlantılar, seminifer epiteli bazal ve adluminal kompartman olmak üzere iki kompartmana bölerler. Bu bariyerin altında yer alan bazal kompartmana spermatogonyumlar yerleşmiştir. Spermatogenez sırasında, spermatogonyumların bölünmesi sonucu oluşan bazı hücreler bu bağlantılardan bir şekilde geçerek, bariyerin üzerinde yer alan adluminal kompartmana ulaşırlar. Sertoli hücreleri, gap junction adı verilen birleşmelerle de ilişki kurarlar ve bu yolla hücrelerin kimyasal ve iyonik alışverişini sağlarlar. Bu da seminifer epitel siklusunun koordinasyonunda önemlidir. Kan-testis bariyeri kanda bulunan zararlı maddelerin seminifer epitele geçişini engeller ve gelişen spermiyumlardaki membran antijenlerinin kana ve bağışıklık sistemine geçmesini kısıtlar. Bu yolla ferdin kendi spermine karşı otoimmün bir cevabını, antikor oluşmasını ve kısırlığın uyarılmasını önler (12).



Şekil 6. Çevre doku ile birlikte seminifer tübülün bir parçası (13).

Sertoli hücreleri, gelişmekte olan spermatogenetik hücreleri destekler, korur, besler; spermiyogenezin sonunda spermatidler tarafından atılan artık cisimcikler olarak adlandırılan fazla hücre kısımlarının lizozomlar tarafından fagositozunu ve sindirimini sağlar; kasılarak olgun spermatidlerin tübül lümenine salınımını kolaylaştırır ve lümeneye iyon ve proteinlerden zengin bir sıvı salgılar. Sertoli hücreleri, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında androjen bağlayıcı protein (ABP) sentezler. Bu protein, spermatogenez için gerekli olan testosteron yoğunluğunu sağlar. Sertoli hücreleri testosteronu östradiol haline çevirebilir. Aynı zamanda bu hücreler FSH üzerine negatif feedback etkisi olan inhibin ve pozitif feedback etkisi olan aktivini de salgırlar (14). Sertoli hücreleri, embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta müller (paramezonefrik) kanalların gerilemesini sağlayan bir glikoprotein olan anti-müllerian hormon üretimini de gerçekleştirir. Bu hücreler ayrıca apoptoza giden spermatogenik hücrelerin fagositoz edilmesinden de sorumludur (15). Sertoli hücreleri içerisindeki androjen, kısmen seminifer epitel mikroçevresini kontrol ederek germ hücre farklılaşmasını düzenlemektedir (16).

Spermatogenik hücreler seminifer tübül epitelinin diğer hücreleri olup düzenli olarak çoğalıp matür sperme farklılaşırlar. Bu hücreler vitellus kesesinden köken alan primordial germ hücrelerinden gelmektedirler. Spermatogonyumlar, en immatür spermatogenik hücreler olup bazal lamina üzerinde yerleşmişlerdir. En olgun spermatogenik hücreler ise spermatidlerdir ve sertoli hücrelerinin apikal kısmına tutunup tübül lümeninin kenarını oluştururlar (6).

Peritübüler doku olarak da bilinen tunika propria, birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal lamina yapışık olan en içteki katman, düz kas

özellikleri de gösteren yassılaşımiş miyoid hücreler içerir. Ultrastrüktrel düzeyde miyoid hücreler düz kas hücrelerinin özelliği olan çok sayıda aktin flamanı içerir. Ayrıca fibroblast yokluğunda kollogen sentezlediklerini belirtecek şekilde çok sayıda granüllü endoplazmik retikuluma sahiptirler. Miyoid hücrelerin ritmik kontraksiyonları, spermatozoa ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden boşaltıcı kanal sistemine akışına yardımcı olan peristaltik dalgalanmaları oluşturur. Miyoid tabakanın dışında, Leydig hücreleriyle birlikte geniş lenf damarları ve kan damarları da bulunur (9).

Leydig hücreleri (interstisyel hücreler), yuvarlak ya da çokgen şekilli, çekirdeği merkezde, eozinofilik sitoplazması bulunan, küçük lipit damlacıklarından zengin hücrelerdir. Bu hücrelerde lipofuksin pigmenti ve çubuk şekilli sitoplazmik kristaller olan reinke kristalleri de bulunur. Leydig hücreleri, mitokondrilerinde ve düz endoplazmik retikulumlarında bulunan enzimler tarafından testosteronu üretirler. Testosteron salgılanması, embriyonik gelişim, seksüel olgunlaşma, üreme fonksiyonu ve fertilitte (17) için gereklidir. Bu hücreler, erkek fetüsün erken farklılaşma döneminde aktiftir ve fetal hayatın beşinci ayından itibaren inaktif hale gelir. İnaktif Leydig hücrelerini fibroblastlardan ayırt etmek güçtür. Pubertede gonadotropik stimölasyona uğrayan Leydig hücreleri yeniden androjen salgılayan hücreler haline gelirler ve yaşam boyu aktif kalırlar (9).

3.3.1. Spermatogenez

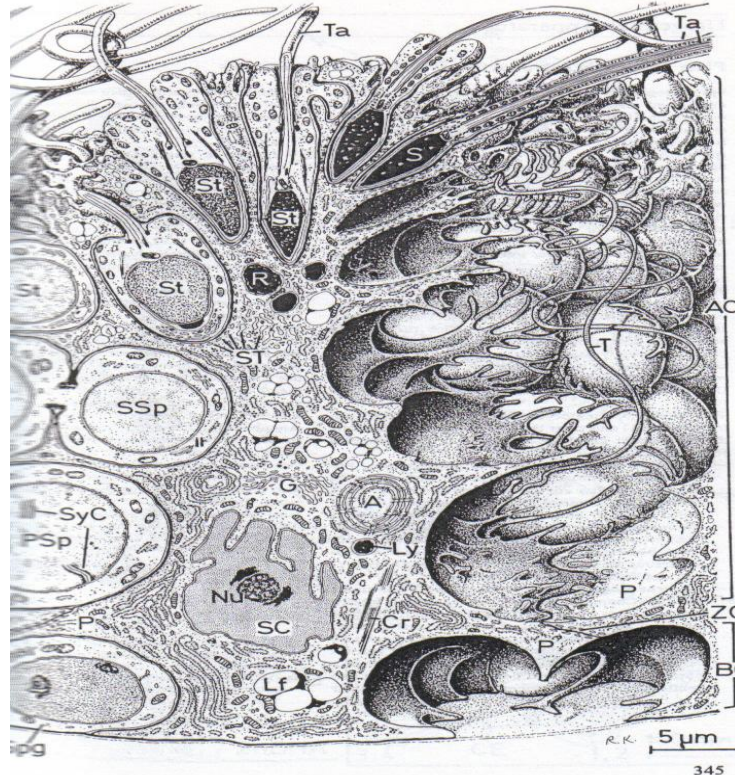
Spermatogonyumlar seminifer tübüllerin bazal membranlarına bitişik olarak yerleşmişlerdir (12, 18). Cinsel olgunluk çağında spermatogonyum

hücreleri mitoz bölünmeyle çoğalmaya başlar ve yeni hücreler oluşur. Genellikle üç tür spermatogonyum üretilir. Soluk spermatogonyum A' ların sitoplazmaları açık boyanır ve soluk, ince granüllü kromatin içeren yuvarlak veya oval nükleusa sahiptirler. Koyu spermatogonyum A soluk spermatogonyum A'ya benzer; fakat kromatini daha koyu olarak boyanır. Spermatogonyum B'ler farklı miktarda kromatin içeren küresel çekirdeğe sahiptir ve çekirdekçikleri merkezi olarak yerleşmiştir. Spermatogonyum A'lar germinal epitelin kök hücreleri olarak görev alırlar ve diğer spermatogonyum A'lar ile spermatogonyum B'lere dönüşürler. Spermatogonyum B'ler son mitoz bölünmelerinden sonra primer spermatositleri verirler. Primer spermatositler, çekirdeklerinin farklı kromatin aktiviteleri nedeniyle farklı görünüm yansıtırlar. Bu hücreler olgunlaşmalarından hemen sonra birinci mayoz bölünmenin profazına girerler. Bu bölünmenin profaz aşaması yaklaşık yirmi iki gün sürdüğü için, kesitlerde görülen spermatositlerin çoğu bu aşamada izlenir. Primer spermatositler seminifer tübüllerde gözlenen en belirgin ve en büyük germinal hücrelerdir. Bu hücreler germinal epitelin orta kısmına yerleşmişlerdir. Sitoplazmalarında kaba kümeler halinde veya ince iplikler halinde kromatin içeren büyük bir çekirdek görülür. Primer spermatositler birinci mayoz bölünmesini geçirerek çekirdekleri daha yoğun kromatin içeren, daha küçük hücreler olan sekonder spermatositleri verirler. Sekonder spermatositler, oluştuktan kısa bir süre sonra ikinci mayoz bölünmesi geçirirler. Bu nedenle seminifer tübül kesitlerinde çoğunlukla gözlenmezler. Sekonder spermatositlerin bölünmesi spermatidlerin oluşmasıyla sonuçlanır (11).

Spermatidler primer ve sekonder spermatositlerden oldukça küçüktürler. Bu hücreler sertoli hücreleri ile sıkı ilişkide olacak şekilde, seminifer tubullerin

lūmenine yakın kısımlarında gruplar halinde yerleşmişlerdir. Bu bölgede spermatidler spermiyogenez adı verilen işlem ile spermatozoonlara farklılaşırlar. Spermiyogenez aşamasında önce flagellum sonra akrozom gelişir. Olgunlaşmakta olan spermatidlerin küçük, koyu boyanan baş kısımları sertoli hücrelerinin sitoplazmaları içine gömülüdür. Kuyruk kısımları ise seminifer tūbūl lūmenine doğru serbest olarak uzanır (12).

Spermatogenez, hipofiz bezinin adenohipofiz kısmında yerleşmiş olan gonadotrop hücreler tarafından üretilen FSH ve lūteinleştirici hormon (LH) 'ların uygun düzeylerinde gerçekleşir. LH interstisyel Leydig hücrelerinden testosteron üretilmesini uyarır (12). FSH testiste, sertoli hücrelerindeki kendi reseptörlerini etkiler ve spermatogenezin sürdürülmesinde önemli bir rol oynar (19). Bu hormon sertoli hücrelerini uyarak ABP'in üretilmesini sağlar. ABP normal spermatogenez için gerekli olan testosteronun seminifer tūbūllerde yoğunlaşmasını sağlar. Spermatogenezin normal devamı için seminifer tubullerde yüksek düzeyde testosterona gereksinim vardır (12). ABP'in aşırı üretimi, testis içi androjen seviyelerini düşürmekte ve sonuç olarak spermatogenezde ilerleyen bir bozukluk görülmektedir (20).



Şekil 7. Seminifer (germinal) epitelin ultrastrüktürel yapısı. Spg: Spermatogonium, Psp: Primer spermatosit, Ssp: Sekonder spermatosit, St: Spermatid, SC: Sertoli hücresi (21).

İnhibin hormonu hipofizden FSH üretimini baskılar veya önler. Erkek sekonder seks karakterlerinin gelişmesi kadar, yardımcı üreme bezlerinin yapı ve fonksiyonlarının sürdürülmesi de yeterli testosteron düzeyine bağlıdır. Hormonlardan başka testisin ısısı da spermatogenezde önemli rol oynar (12). Normal spermatogenez için, skrotum ısısı vücut ısısından daha düşük olmalıdır (12, 22). Bu ısı bazal vücut ısısından 2-3 °C daha düşük düzeydedir. Testisin skrotumda yerleşmesi bu ısı düşüklüğünü, bir dereceye kadar sağlar. Aynı şekilde, venöz pampiniform pleksus (sarmaşığa benzer ağ), testiküler arterleri sararak zıt yönde ısı değişimini gerçekleştirir. Testiküler arterlerle testise giden kan

soğutulur; buna karşılık testisten venlerle vücuda dönen kan ise ısıtılır (12). Memeli sperminin, fertilizasyon için uygun hale gelebilmesi için, testisten ayrıldıktan sonra mutlaka fizyolojik değişim serilerinden geçmesi gerekmektedir (23).

3.4. Etanol (Etil Alkol)

XIV. yüzyıldan itibaren ilaç olarak kullanılan etanol, kimyada mayalanmış içkilerin damıtılması ile elde edilen sıvı olarak tanımlanır. Etanolün zararlı etkileri XVIII. yüzyıldan itibaren anlaşılmaya başlanmış ve çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (24). Etanol ilk metabolit ürünü olan asetaldehid yolu ile mutajenik etkisini gösterir. Asetaldehid, DNA zincirleri arasında bağlantı bölgelerini ve kardeş kromatidleri değiştirir, kromozomal aberasyonlara neden olur (25). Etanol alındıktan sonra, mide ve ince bağırsaktan değişmeden emilmekte daha sonra, kan düzeyi oranında vücudun tüm dokularına ve sıvılarına geçmektedir. Emilen alkolün % 10'undan daha azı değişmeden idrar, ter ve solunumla atılmaktadır. Etanol, akut alkolizmde asıl etkilerini merkezi sinir sistemi üzerine yapar ve alkol alımı devam etmediğinde gerileyen hepatik ve gastrik değişiklikleri başlatabilir. Kronik alkolizmde, özellikle karaciğer ve mide olmak üzere, vücudun tüm organ ve dokularında morfolojik değişiklikler oluşur (26). Karaciğerde siroz (26), midede ülser, beyinde serebellar atrofi ve dejenerasyon, gözde optik nöropati (26), kalpte kardiomyopati (26-28), iskelet kasında miyopati, pankreasta akut veya kronik pankreatit (26) görülmektedir.

Testis dışardan verilen veya alınan toksik maddelerden kolaylıkla etkilenmektedir. Değişik toplumlarda yaygın olarak kullanılan etanol reproduktif toksin olarak kabul edilen bir ajandır (29) ve etanol toplumlarda yaygın olarak

kötüye kullanılan ilaçlar arasındadır. Deney hayvanları ve insanlarda üreme fonksiyonu ve cinsel davranışı baskılar. Ayrıca etanol testislerde oksidatif stres üzerinden testiküler hasara neden olmaktadır (29). Yapılan birçok çalışma etanol uygulamasın insanlarda ve hayvanlarda erişkin testis fonksiyonlarında inhibitör etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Erkeklerde kronik etanol kullanımı testislerde atrofiye sperm üretiminde azalmaya ve testosteron düzeyinde düşüğe neden olur (30). Etanol kapasitasyon süresince, kapasitasyon işlemi spesifik olarak etkileyerek spermatozoonların dölleme yeteneğini azaltmaktadır (31). Ayrıca histolojik incelemelerde seminifer tübül çaplarında azalma ve germ hücrelerinde kayıp rapor edilmiştir. Kronik etanol kullanımı gonadal disfonksiyona neden olur, spermatogenetik olayları baskılar, seminifer tübül siklusundaki tüm aşamalarda spermatogonyumların proliferatif aktivasyonunu azaltır (32, 33). İnsan ve laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalar, kronik etanol alınımı sonucunda erkek üremesinde çeşitli patolojik değişiklikler olduğunu göstermiştir (34, 35). Bu değişiklikler, spermatogenez ve sperm motilitesinde bozulmaları, testis aksesuar bezi morfolojisi bozulmalarını, reproduktif organ ağırlığının azalmasını, kauda epididimal sperm içeriğinde azalmaları ve epididimal sperm matürasyonunda bozulmaları içerir. Ayrıca reproduktif hormonal homeostazı değişimleri, libido azalması, boşalma problemleri ve iktidarsızlık erkeklerde alkol bağımlılığı ile ilişkili olmuştur (36, 37).

Hayvanlarda yapılan çalışmalarda etanolün yetişkin sıçan testislerinde germ hücrelerinin apoptozisinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (32, 38, 39). Etanole maruz kalmanın laboratuvar hayvanları ve insanlarda erkek üreme sistemine olumsuz etkileri olduğu ve testis dokusunda apoptozisi arttırdığı

bilinmektedir (32). Ayrıca alkolün testosteron üretimini inhibe ettiği ve testis atrofisine yol açtığı da belirlenmiştir (40, 41). Etanolün farklı hücre tiplerinde apoptozisi artırma mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. Bu dönemde artan apoptozisin, yetişkinlerde anormal spermatogeneze neden olabileceği düşünülmektedir. Çünkü neonatal dönemde germ hücrelerinin normal gelişimi yetişkinde sağlıklı spermatogenezis süreci için önemlidir (42). İnsan vücudunda beslenme kökenli bir savunma mekanizması gibi çeşitli antioksidanlar vardır (43, 44). İnsan beslenmesi radikal temizleme aktivitesi dahil olmak üzere, antioksidan kapasitesine sahip olan farklı bileşikler dizinini içerir (45). Beslenme antioksidan temsilcilerinden en önde gelenler; karotenoidler, askorbat, tokoferol ve flavinoidlerdir (45).

Alkole indüklenen toksik etkilerden testisi koruma amaçlı olarak uygulanan antioksidanların olumlu etkileri göz önüne alındığında, bu çalışmanın sonucunda bitkisel kökenli bir antioksidan olan Cardamom'un alkolün testis dokusunda arttıracığı apoptozise karşı bu apoptozisi azaltacak olumlu etkilerinin olabileceği düşünülmektedir.

3.5. Apoptozis

Programlanmış hücre ölümü olarak tanımlanan apoptozis, bir hücrenin tek başına çevre doku ve hücreleri etkilemeden yaşamına son vermesidir. Apoptozis ile hücre özgül gelişimi sırasında veya çevresel uyaranlara yanıt olarak ölçülü ve genetik kontrolü olan bir süreç sonunda yok olur. Ölen bu hücreler ise, fagositoz yapan hücreler tarafından temizlenirler (46, 47).

Apoptozis, organizma tarafından düzenlenen enerji bağımlı hücre ölümüdür. Bu süreç, programlı hücre ölümü olarak adlandırılır ve doku

homeostazının korunmasında önemli bir role sahip olduğu gibi, fetal gelişim ve erişkin dokulardaki pek çok fizyolojik olayda da önemli rollere sahiptir. Fizyolojik hücre ölümü, hücre intiharı, hücre kaybı terimleri de aynı anlamda kullanılabilen ve literatürde yer alan diğer ifadelerdir.

Hücre ölümüyle ilgili ilk bilgiler 1920 yılında ışık mikroskobunun ve yeni boya yöntemlerinin keşfiyle başlamış ve ilk tanımlanan terim nekroz olmuştur. Programlanmış hücre ölümü terim olarak ilk kez 1965 yılında kullanılmıştır. Apoptozis terimi ise ilk kez 1972 yılında J. F. K. Kerr tarafından (48) iskemiye maruz kalan dokunun etrafında nekrozdan farklı olarak gerçekleşen diğer bir ölüm şekli için tanımlamıştır (49, 50). Kerr, fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını gözlemlemiş ve organellerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak adlandırmıştır (48).

Hücre ölümü genellikle apoptozis ve nekroz olarak iki ana başlık altında sınıflandırılır. Nekroz; pasif, katabolik bir süreç olup her zaman patolojik bir olaydır. Histolojik bulguları mitokondrial ve nükleer şişme, organellerin bozulması, nükleus etrafındaki kromatinin yoğunlaşması şeklinde devam ederek, DNA'nın nükleer ve sitoplazmik membranında bozulma ile giden bir süreçtir (51, 52). Apoptozis ise nekrozun tersine, multisellüler organizmalarda fizyolojik koşullarda oluşur. Gelişimin normal bir parçasıdır ve enerji gerektiren aktif bir süreçtir (51, 53, 54). Apoptozis değişik doku ve hücre tiplerinde oluşabilecek morfolojik ve biyokimyasal seyri ile kompleks bir olgudur (55, 56). Teorik olarak apoptoz, çeşitli travmatik hücre dışı lezyonlar ya da genetik faktörlerle aktive edilen ve hücrenin kendisi tarafından programlanmış bir mekanizma vasıtasıyla hücre ölümünü kontrol eden aktif bir işlem olup, hücrenin intiharı olarak

tanımlanabilir. Böylece hormonal olarak aktif çeşitli maddeler, iyonize radyasyon ve kemoterapiyi içeren travmatik ajanlar vasıtasıyla gerçekleşen hücrele lezyonların ya da genetik faktörlerle aktive edilen hücrele intihar programının apoptozise neden olduğu söylenebilir (57). Fizyolojik bir işlem olarak apoptozis, normal gelişim sırasında ve olgun organizmadaki çeşitli hücre tiplerinin tahribi esnasında spesifik hücrelerin kaybindan sorumludur. Apoptotik hücre sayısı kişinin ya da organizmanın sağlıklı ya da hasta oluşunu belirlediğinden, apoptozisin fonksiyonel mekanizmaları hücrede denge unsurudur (58). Bu da demektir ki; apoptozis oranının azalması ile hücre sayısı artar aksine eğer apoptozis oranı artarsa hücre sayısı azalır ve istenmeyen doku tahribatı meydana gelir. Hücre proliferasyonu nasıl ki mitoz ile belirlenmekte ise belirli bir dokuda olması gereken hücre sayısı da apoptozis ile belirlenir (59, 60).

Apoptotik ölüm sinyali alan hücrenin kromatini yoğunlaşmaya başlar. Benzer şekilde sitoplazma da yoğunlaşır ve hücrenin boyutları küçülmeye başlar. Bir süre sonra hücre apoptotik cisimcik denilen daha küçük parçalara bölünür. Bu parçacıkların en büyük özelliği, fragmente olmuş nükleusların ve parçalanmış hücreye ait tüm yapıların plazma membranı ile kaplanarak immün sistemi inflamasyon yönünde uyarmamasıdır. Apoptotik cisimcikler, yüzeylerinde yeni sinyal yapıları ortaya çıkarır ve bu sinyalin uyarısı ile yandaki hücre tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılır (56, 61).

Apoptozis tek hücreli organizmalarda hücre ölümünün tek yoludur (62). Çok hücreli organizmalarda ise genetik oluşumlu hücre hasarının bloke edilmesi ya da hücrenin tamamen yok edilmesi apoptozis vasıtasıyla gerçekleşir. Böylece hasarın yayılması ve tümör oluşumu gibi zararlı olasılıklar engellenmiş olur (63).

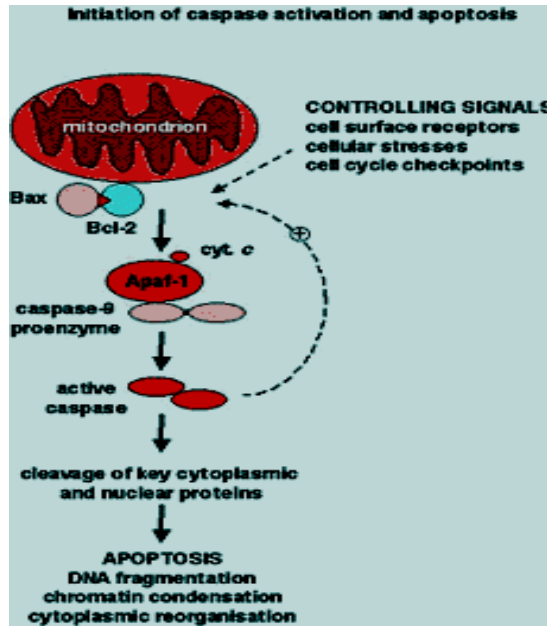
Apoptozis normal gelişimsel süreç içerisinde embriyogenez (64, 65), normal menstruel siklusda endometrial hücrelerinin yıkımı (66), barsak kripta epitelleri gibi sürekli çoğalan hücre gruplarında hücre sayısının dengelenmesi (65), timusun gelişimi sırasında otoreaktif T hücrelerinin ortadan kaldırılması (65) gibi pek çok fizyolojik olayda görev alır. Apoptotik hücre ölümü regülasyonundaki defektler hücre birikiminin olduğu kanser, restenoz gibi hastalıklara yol açabildiği gibi, hücre yıkımının arttığı otoimmün rahatsızlıklar, nörodejeneratif hastalıklar, alzheimer gibi rahatsızlıklara da yol açabilmektedir (67, 68). Hafif şiddette fiziksel ve toksik uyarılara maruz kalan dokularda da apoptozis görülür. Örnek olarak hipertermi, düşük doz sitotoksik ilaçlar, iyonize radyasyon, hafif travma, hafif hipoksi gösterilebilir (69). Bu anlamda apoptozis spesifik bir uyarana maruz kalan hücrenin, bu uyarıya aktif olarak verdiği düzenleyici bir cevaptır (60). Apoptozisli hücreler sağlıklı doku içinde dağılmış şekilde bulunur (65).

Apoptozisin indüklenmesi birçok hücrenin sitoplazmasında inaktif olarak bulunan kaspaz (cysteinyl aspartate-specific proteinases) adı verilen sitozolik enzimlerin aktivasyonu ile olmaktadır. Kaspazlar intrasellüler proteazlar olup; apoptozisin gerek direkt, gerekse indirekt morfolojik ve biokimyasal değişikliklerinden sorumlu apoptotik hücre ölümü esnasında önemli rol oynayan multigen ailesinden oluşan sistein-proteaz grubu enzimlerdir. Hücre ölümü sırasında meydana gelen pek çok sellüler ve morfolojik değişimler, bu enzimlerin rol oynadığı birtakım süreçler neticesinde gelişir (70).

Kaspaz aracılı apoptozisin aktivasyonunda üç ayrı yolun varlığı bilinmektedir;

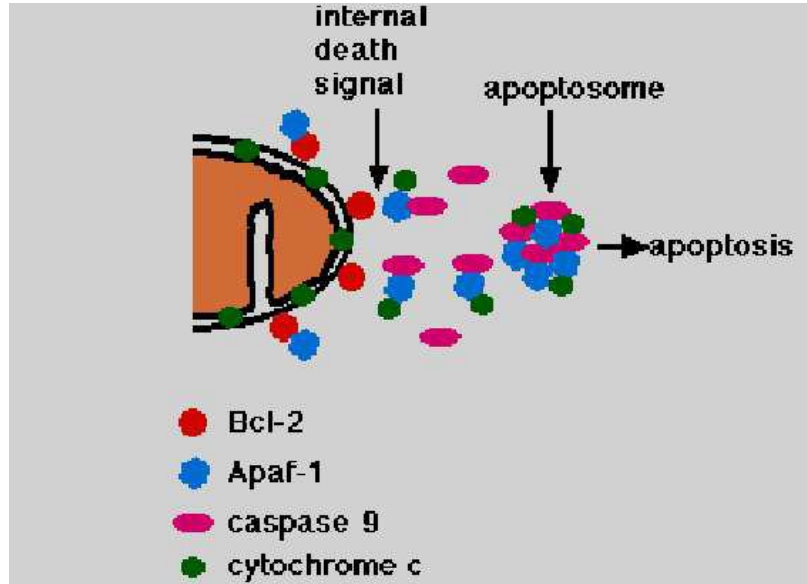
- Mitokondri / Sitokrom-C aracılı apoptozis
- Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptozis
- Endoplazmik retikulum aracılı apoptozis

Mitokondri / Sitokrom-C aracılı apoptozis; Mitokondri normal şartlar altında adenozin trifosfat (ATP) oluşturmak üzere sitokrom-c ihtiva eder. Mitokondrial stres durumlarında serbestlenen sitokrom-c apoptotik hücre oluşumunda kaspaz-3 aktivasyonu için önemli rol teşkil eder (71 -73). Bu yolda mitokondri tarafından kontrol edilen apoptotik proteaz aktive edici faktör (Apaf-1) ve kaspaz-9 bulunmaktadır (74- 76). Ko-faktör nukleotid trifosfat (d-ATP ve ATP) ile aktive edilen sitokrom-c ve apaf-1 birleşerek prokaspaz-9'u aktive eder. Aktive kaspaz-9 da kaspaz-3'u aktive ederek diğer kaspaz kaskadının tetiklenmesini sağlar (76, 77).



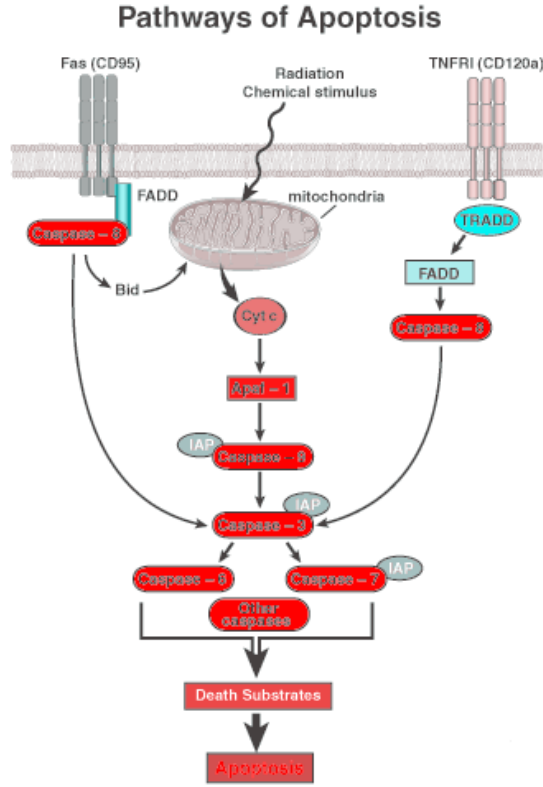
Şekil 8. Mitokondri/sitokrom-c aracılı apoptozisin tetiklenmesi (76) .

Sağlıklı bir hücre mitokondrisinin dış membranında Bcl-2 proteini yer alır (78, 79). Bcl-2, Apaf-1 proteininin bir molekülünü bağlar. Bcl-2 neden olduğu internal hasarla mitokondride çatlaklar oluşturarak Apaf-1 ve Sitokrom-C salınımına yol açar. Bu iki protein kaspaz-9 moleküllerine bağlanır (74, 76, 80).



Şekil 9. Apoptosom (76) .

Bu proteolitik aktivite ile sitoplazmada yapısal proteinlerin sindirimi, kromozomal DNA'nın degradasyonu ve hücrenin fagositozu sağlanır (72, 77, 81).



Şekil 10. Mitokondri/Sitokrom-C aracılı apoptozis oluşturulması (77).

Hücre yüzey reseptörleri aracılığı ile tetiklenen apoptozis; Birbirini tamamlayan ölüm faktörlerinin (Fas- ligand (Fas-L) ve Tumor necrosis factor (TNF) hücre yüzeyindeki Fas ve TNF reseptörlerine bağlanmasıyla sitoplazmaya kaspaz-8'i aktive eden sinyaller yayılır (Şekil 11).

Kimyasal, fiziksel ya da viral enfeksiyonlarla hasar görmüş hücrelerde, interlökin-1 (IL-1) gibi pro-enflamatuar sitokinlerin etkisi ile hücre yüzey Fas ekspresyonu başlar. Bu süreç Fas antijeninin up-regülasyonu olarak adlandırılır ve bu süreç sırasında sitotoksik T hücreleri de Fas-L yapımı için uyarılırlar ve Fas-FasL bağlanması ile prokaspaz 8 ve 2' nin aktivasyonu sağlanır (82) . Böylece hücrenin apoptozise gitmesi indüklenmiş olur (83). Fas-Fas-L etkileşimi FADD (Fas bağımlı ölüm domain proteini) aracılığıyla olur (84). Bir yandan da, ilk kez

3.5.1. Apoptozisin Saptanmasında Kullanılan Yöntemler

Apoptozisi tespit etmek için çok çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. 1972 yılında, apoptozis terimi ilk kez kullanıldığında hücrenin morfolojik görünümüne göre karar verilmişti. Oysa günümüzde, morfolojik değerlendirmenin yanında apoptozise özgü olduğu bilinen bazı aktivasyonların (örneğin aktif kaspaz-3 tayini) moleküler düzeyde belirlenmesiyle de tespit edilebilmektedir. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şöyledir (91). (Tablo 1)

Tablo 1. Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

I.	Morfolojik görüntüleme yöntemleri
II.	İmmünohistokimyasal yöntemler
III.	Biyokimyasal yöntemler
IV.	İmmunolojik yöntemler
V.	Moleküler biyoloji yöntemleri

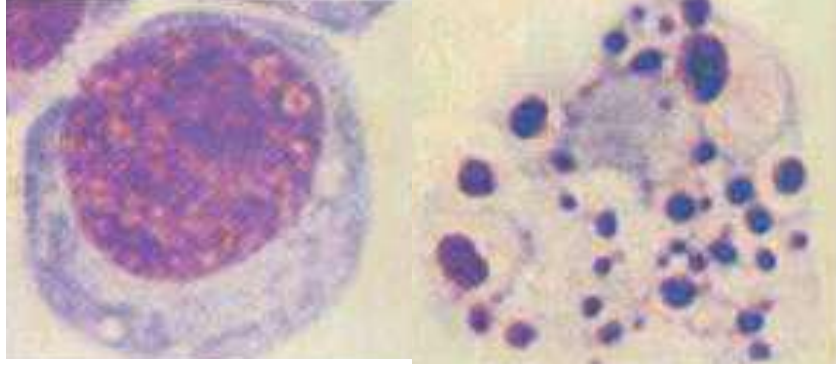
3.5.1.1. Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri

3.6.1.1.1. Işık Mikroskobu Kullanımı

3.5.1.1.1.1. Hematoksilen boyama

Hematoksilen boyama hem hücre kültürü çalışmalarında hem de doku boyamalarında kolaylıkla kullanılabilir. Apoptotik hücrelerin saptanmasında genellikle ilk metot olarak başlanması uygundur ve çeşitli açılardan (örn. ilk değerlendirme, maliyet) diğer metotlara karşı avantaj sağlar. Hematoksilen boyamada, hematoksilen boyası kromatini boyadığından apoptotik hücreler

nukleus morfolojisine göre değerlendirilir. Apoptozise özgü değişiklikler iyi bir boyama yapılmışsa kolayca gözlenebilir (92, 93).



Şekil 12. Normal ve Apoptotik İnsan Lökosit Hücresi (92).

3.5.1.1.1.2. Giemsa boyama

Giemsa ile boyamada hematoksin ile boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisi esas alınarak apoptotik hücreler tanınır. Sitoplazma sınırları hematoksin boyamaya göre daha iyi seçilebilmekle birlikte hematoksin boyamaya belirgin bir üstünlüğü yoktur (94).

3.5.1.1.2. Floresan Mikroskobu/Lazerli Konfokal Mikroskop Kullanımı

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir. Bu boyama yöntemindeki prensip şudur: Bu yöntemlerde canlılığın belirleyicisi, hücrenin plazma membranının (hücre zarının) intakt olup olmadığıdır. Membranı intakt olan (canlı) hücreler propidium iyodur gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri

boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskobu ile tanınabilirler. Kuşkusuz bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayırımı hematoksilen boyamada olduğu gibi nükleus morfolojisine bakılarak yapılır (92, 94).

3.5.1.1.3. Elektron Mikroskobu

Morfolojik değişikliklerin en doğru olarak gözlemlendiği bir yöntemdir. Sitoplazmik küçülme, kromatin kondansasyonu ve fragmentasyonu izlenebilirken, mitokondrinin durumu, hücre zarı ya da nükleus membranının bütünlüğünün bozulup bozulmadığı gibi subsellüler detaylar da incelenebilir (94).

3.5.1.1.4. Faz Kontrast Mikroskobu

Bu tür mikroskop sadece hücrelerin kültür ortamında, flask veya plate'lerde büyütüldüğü çalışmalarda, hücreyi veya hücre topluluğunu incelemek amacıyla kullanılır (92).

3.5.1.2. İmmünohistokimyasal Yöntemler

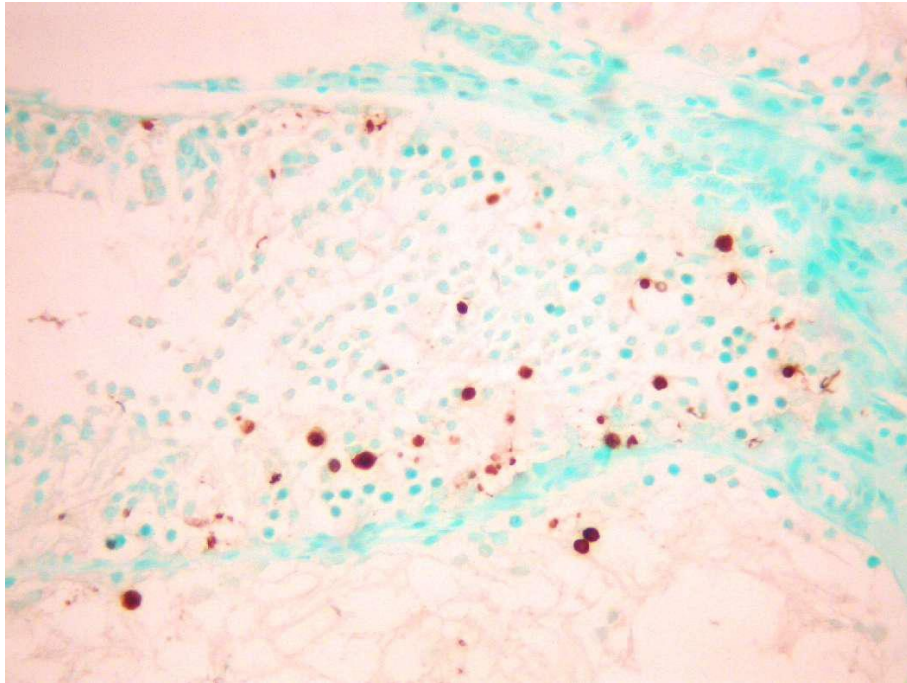
3.5.1.2.1. Anneksin V Yöntemi

Normal hücrelerde hücre zarının sitoplazmik yüzünde fosfatidilserin (PS) bulunmaktadır. Eğer hücre apoptozise giderse normalde iç yüzde yerleşmiş olan PS molekülleri hücre zarının dış yüzüne transloke olurlar. Dış yüze transloke olan

PS'ler, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenmiş Anneksin V kullanılarak görünür hale getirilirler. Böylece apoptotik hücreler saptanmış olur. Bu yer değiştirme hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı apoptotik hücre ölümünün erken dönemlerinde meydana gelir. Anneksin-V, hücrenin dış yüzeyine transloke olan fosfatidilserine bağlanabilen bir protein olduğu için, floresan bir madde (örn. FITC) ile işaretlenerek apoptotik hücre görünür hale getirilebilir (95-97).

3.5.1.2.2. TUNEL Yöntemi

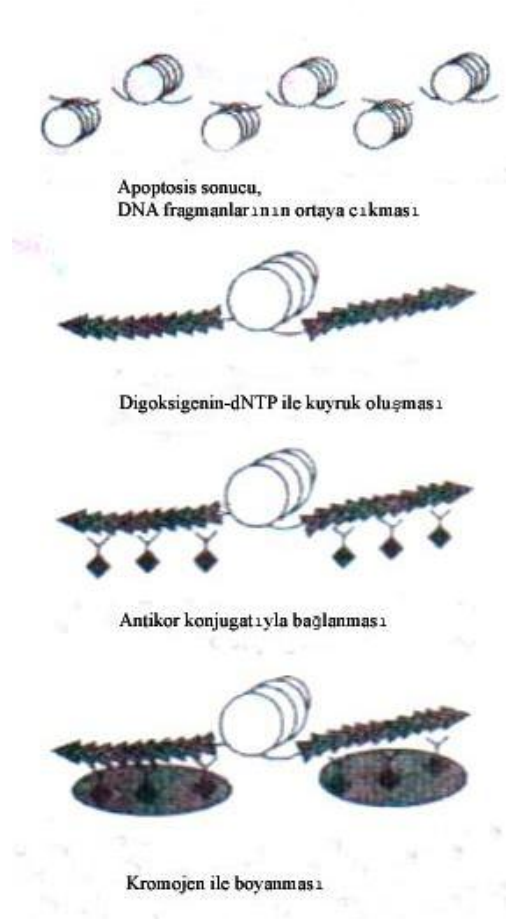
DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar (94, 98, 99). Parafin bloklar, donmuş kesitler, kültürü yapılmış solüsyon halindeki veya "plate"lere ekilmiş, ya da lameller üzerinde büyütülmüş hücrelerde apoptozisin varlığı TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transpherase- mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling) metoduyla saptanabilir (92) (Şekil 13).



Şekil 13. TUNEL metodu uygulanmış rat testis dokusunda kahverengi boyanmış apoptotik hücreler (92).

Bu yöntemle, DNA kırıklarının serbest 3'OH uçları modifiye nükleotidlerle enzimatik olarak işaretlenir. DNA fragmentasyonundan kökenlenen bu yeni DNA uçları, morfolojik olarak gözlenebilen nükleuslarda ve apoptotik cisimciklerde bulunurlar. Bu yöntemle kromatin kondensasyonu oluşmuş ve DNA kırıkları bulunan erken evre apoptozise özgüdür. Daha sonra nükleusda major morfolojik değişiklikler oluşmaya başlar (100, 101).

TUNEL metodu, kimyasal olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş nükleotidler kullanılarak serbest 3'OH uçlarının işaretlenmesi prensibine dayanır. Reaksiyon tamponuna eklenmiş olan nükleotidler, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak enzimatik olarak DNA'ya bağlanması sağlanır. TdT tek sarmallı ya da çift sarmallı DNA'nın 3'OH uçlarına serbest olarak eklenen nükleotid trifosfatları katalizler. Serbest olarak bulunan nükleotidler digoksinin-konjugat eklenmesiyle bir 24 oligomer oluştururlar. Daha sonra digoksinin ile konjuge olan nükleotidler peroksidaz reaksiyonu verebilen anti-digoksinin antikoru ile bağlanması gerçekleşir. Böylece bağlanmış peroksidaz antikoru, immunohistokimya ve immunositokimya hassas görünüm sağlayan kromojenik substratlarla bağlanması sağlanır. Sonuç olarak apoptotik cisimciklerde çok yüksek oranda bulunan 3'OH uçlarının hassas ve spesifik boyanması gerçekleşir (102) (Şekil 14).



Şekil 14. TUNEL metodunun prensibinin şematik gösterimi (103).

3.5.1.2.3. M30 Yöntemi

M30 yönteminde apoptotik hücreler sitokeratin 18'in kaspazların etkisiyle kırılması sonucu ortaya çıkan yeni antijenik bölgenin immunohistokimyasal yöntemle boyanması prensibine göre belirlenir. Sadece sitokeratin 18'i ekspres eden dokularda kullanılması mümkündür. Bu dokular epitelyal kaynaklı dokulardır (92, 104).

3.5.1.2.4.Kaspaz-3 Yöntemi

Kaspaz-3 yöntemi ile sadece apoptotik hücrelerde oluşan aktif kaspaz-3 IHC metoduyla belirlenebilir. Bunun için, dokunun kaspaz-3 eksprese ettiğinin bilinmesi ya da çalışılan dokuda apoptozise yol açan ajanın kaspaz-3'ü kırıp kırmadığının bilinmesi gerekir. Ancak, bu bilirse apoptotik hücreler bu metodla tespit edilebilirler (92, 95).

3.5.1.3.Biokimyasal Yöntemler

3.5.1.3.1. Agaroz Jel Elektroforezi

DNA Fragmentasyonu: DNA kırıklarının gösterilebildiği bir başka yöntemdir. Apoptoziste DNA, 180 baz çifti ve bunun katlarına karşılık gelen noktalardan (internükleozomal bölgelerden) kırıldığı için merdiven görüntüsü "ladder pattern" oluşur. Bu bulgu apoptozisin karakteristik özelliğidir ve nekroziste görülmez. O yüzden apoptozisi nekrozisten ayırmada faydalı yöntemlerden biridir (92).

3.5.1.3.2. Western Blotting

- Substrat kırılmaları
- Aktif kaspazın belirlenmesi
- Sitokrom c salıverilmesi

Bu metot yardımıyla apoptozise özgü bazı proteinlerin eksprese olup olmadıklarının (örn. bcl-2) ya da kırılıp kırılmadıklarının (örn. kaspaz-3) saptanması mümkündür, sitokrom c'nin mitokondriye çıkıp çıkmadığının belirlenmesi de bu metotla belirlenebilir. Yalnız, sitokrom c tespitinde önce alt-

fraksiyonlama yapılarak hücrelerin mitokondriyal ve sitoplazmik fraksiyonları ayrılır. Ardından, normalde sitoplazmik fraksiyonda bulunması beklenmeyen sitokrom c'nin bu fraksiyonda tespit edilmesi halinde hücrelerin apoptozise gittikleri anlaşılır (94).

3.5.1.3.3. Flow Sitometri

- DNA azalması
- Annexin V

Flow sitometri yardımıyla, işaretlenmiş antikor kullanılarak apoptoziste eksprese olduğu bilinen her hangi bir hücre yüzey proteininin saptanması mümkündür. Böylece apoptotik hücreler belirlenebilir. Kolay uygulanabilir olması, aşırı uzun zaman almaması ve kantitatif sonuç verebilmesi açısından klinikte apoptozis deteksiyonu açısından kullanışlıdır. Özellikle iki şekilde apoptozis deteksiyonu yapılır;

1. Floresan bir madde olan propidium iyodur kullanılarak,
2. Annexin V kullanılarak (92, 95, 105,106).

Birincisinde, kompleks bilgisayar işlemlerinin kullanılarak hücre boyutu ile içerdiği DNA miktarının kıyaslanarak, azalan DNA miktarının apoptozis lehine olduğu gerçeğinden hareketle, apoptotik hücre popülasyonu tayin edilir (92).

3.5.1.4. İmmünolojik Yöntemler

3.5.1.4.1. ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay)

- DNA fragmentasyonu

- M30 düzeyi

ELISA ile gerek kültürü yapılmış hücre populasyonlarında gerekse insan plazmasında DNA fragmentasyonunu tespit etmek mümkündür. Aynı şekilde M30 düzeylerinin ölçümü de mümkündür (92, 95).

3.5.1.4.2. Flourimetrik Yöntem

- Kaspaz aktivasyonu (Hücre kültürü)

Kültürü yapılmış hücrelerde kaspaz aktivitesinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde ilgili kaspazın antikorunun bulunduğu "plate"lere hücre lisatlarının konulması ile kaspaz molekülleri tutulur ve sonra ortama kaspazların parçaladığı ve kendisine floresan bir maddenin tutunduğu bir substrat ilave edilir. Ortamdaki kaspaz aktivitesiyle orantılı olarak ortaya çıkan floresanın şiddeti fluorimetre ile ölçülerek kaspaz aktivitesi saptanır (92).

3.5.1.5. Moleküler Biyoloji Yöntemleri

3.5.1.5.1. DNA Microarrays

- Gen ekspresyon dereceleri (mRNA)
- Hücre ölüm reseptörleri
- Kaspazlar

DNA microarray teknolojisi henüz çok yeni ve çok pahalı bir yöntemdir. Fakat yakın bir gelecekte tıp pratiğini radikal bir biçimde değiştirme iddiası taşıyan bu teknoloji ile aynı anda ve kısa bir süre içinde (önceden aylarca sürerken) yüzlerce hatta binlerce genin ekspresyon derecelerinin (mRNA'larının) tespiti mümkün olabilecektir. Böylece, apoptozise özgü hücre yüzey ölüm

reseptörlerinin ekspresyon durumları hakkında geniş bilgi edinme olanağı doğacaktır (92).

3.5.2. Apoptozisin Spermatogenezdeki Rolü

Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır. Normal Spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar (107, 108) . Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyada programlı hücre ölümüne yol açar. Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoanın normal gelişimi için mutlak gereklidir (109).

Testiste, defektif germ hücrelerinin yok edilmesine yönelik bu işlemde erkek germ hücrelerinin % 75 'i apoptozise maruz kalır (110). Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (111, 112). Ayrıca, gonadotropin ya da testosteron eksikliği dışında maturasyon arresti ve hipospermatogeneze yol açan tüm klinik durumlarda da apoptozis görülebilir (113). Seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon veya soğutma gibi faktörlere olan sensitivitesi de germ hücrelerinin programlanmış hücre ölümlerini arttıran diğer bir faktördür (114). Sonuçta, testiküler fizyolojiyi bozan ekzojen stimulanların varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilir (48, 65, 115).

3.6. *Elettaria cardamomum*

Elettaria cardamomum (Cardamom) ülkemizde kakule adı ile bilinen zencefilgiller ailesinden Batı ve güney Hindistan gibi sıcak bölgelerde yetişen, tohumları baharat olarak da kullanılan bir bitkidir. Yakın Doğu ülkelerinde tohumu kahve tohumu ile birlikte toz haline getirilerek kullanılmaktadır (116). Cardamom'un başlıca anti-inflamatuar ve antioksidan olmak üzere dokulara birçok olumlu etkileri bulunmaktadır (45, 117- 120).

Pek çok hastalığın tedavisi için bitkilerin kullanımına olan ilgi giderek artmakta ve bitkilerle tedavi yaygınlaşmaktadır. Bitkilerle ve bitki ekstraktları ile yapılan çalışmaların sayısındaki artış da bu düşünceyi desteklemektedir. Beslenme antioksidan temsilcilerinden en önde gelenler; karotenoidler, askorbat, tokoferol ve flavinoidlerdir (45).

Zencefilgiller ailesinden olan (maton) ülkemizde “kakule” adı ile bilinir (116). Güney Asya kökenli, çok yıllık, çalimsı, 2-4 m boylu, büyük yapraklı, beyaz çiçekli bir bitkidir. Cardamom, başlıca Güney Hindistan, Sri Lanka, Tazmania ve Guatemala’ da yetişmektedir (121). Meyveleri 7-15 mm uzunlukta ve 6-8 mm genişlikte, oval, üç köşeli, sarı-yeşil kapsüllüdür. Her meyvede 3 mm uzunluk ve 2 mm genişlikte, kırmızımsı siyah, köşeli, 15-20 adet tohum bulunur. Tatlımsı, aromatik, keskin bir kokusu vardır ve acımsı bir lezzete sahiptir. Baharatı uçucu yağ, sabit yağ ve reçine içerir. 100 g baharatta 311 kcal enerji, 8.3 g su, 10.8 g protein, 6.7 g yağ, 68.5 g karbonhidrat, 11.3 g lif, 5.8 g kül, 383 mg Ca, 14 mg Fe, 229 mg Mg, 178 mg P, 1119 mg K, 18 mg Na, 7 mg Zn ve 1 mg Niasin bulunmaktadır. Uçucu yağ 1,8-sineol (% 25-45), α -terpinil asetat (% 28-34), α -terpineol, jeranil asetat, nerolidol, linalol, linalil asetat, nerol, borneol, metil

heptenon, neril asetat ve monoterpenlerden oluşmaktadır (122). Cardamom Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, Mn, Fe, Cu ve Zn gibi değişken bileşimler içermektedir (123). Uçucu yağ da sineol içermektedir.

İştah açıcı ve gaz söktürücü etkileri bulunan Cardamom Yakın Doğu ülkelerinde kakule tohumu, kahve tohumu ile birlikte toz edilerek kakuleli kahve olarak tüketilmektedir (116). Cardamom'un anti-inflamatuar ve antioksidan etkileri bulunmaktadır.

Halk tıbbında zihne kuvvet verici, nezleyi sökücü, bulantı ve kusmayı kesici, ağız kokusunu giderici, sara (epilepsi) hastalığını tedavi edici ve hazımsızlığı giderici olarak kullanılmaktadır (124, 125). Ayrıca kakulenin baş ağrısı ve kas tutulmaları üzerinde etkili olduğu ileri sürülmektedir (126, 127). Cardamom'un tohum kabuğundan ayrılan daha koyu renkli tohumları toz haline getirilerek yemek baharatı olarak kullanılır (121). Antik çağlarda Hindistan 'da kullanılan Cardamom, tarih boyunca tüm baharatların sultanı (128) olarak bilinir. Kakule bir baharat olarak, mutfaklarda köri; kahve, kek, ekmek, tatlı yemekler ve içecekler için tatlandırıcı olarak kullanılır (128). Tohum ve uçucu yağı, alkollü ve alkolsüz içecekler, dondurulmuş tatlılar, şekerlemeler, fırın ürünleri, pudingler, çeşniler, et suyu içeren besinler, et ve et ürünleri de dahil olmak üzere çeşitli gıdaların aromasında bileşen olarak kullanılır, aynı zamanda bir baharat olarak Fas' a özgü güveç yapımında ve genellikle et içeren yemeklerde yemekleri daha da lezzetlendirmek için kullanılır (121). Cardamom, bir gaz giderici olarak kullanılır ve Kuzey Avrupa'da pişirme ve pasta yapımında kullanılır. Cardamom yağı ise çok sayıda kozmetik ürünlerde kullanılır. Ayrıca mumyalama sırasında

anti-çürük olarak kullanılır (121). Son yıllarda Cardamom esansiyel yağının biyolojik aktivitesi üzerine bazı çalışmalar yayınlanmıştır.

Cardamom' un geleneksel başka bir kullanım alanı da Çin ve Hindistan' da barsak gazlarının tedavisi için ve sindirim ilacı olarak kullanılır (128). Cardamom yağı güzellik ürünlerinin birçoğunda kullanılır (129). Aynı zamanda masaj yağlarına ve losyonlara eklenir ayrıca sabunlara, deterjanlara ve parfümlere rahatlatıcı özellikler katar (128). Cardamom'un trombosit agregasyonunu önleyici aktivite gösterdiği belirtilmiştir (131).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 14.10.2010 tarih ve 2010/108 Sayılı kararı ile etik yönden uygun bulunarak Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi (FÜDAM) biriminde ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji laboratuvarında yapıldı. Çalışma bütçesinin tamamı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FÜBAP)' nin T.F. 11. 09 proje no' lu kararı gereğince karşılandı.

4.1. Deney Hayvanları

Deneylerde kullanılan 21 adet 8 haftalık erişkin Wistar albino cinsi erkek sıçanlar, FÜDAM biriminden temin edildi. Hayvanlar FÜDAM hayvan laboratuvarında buldukları ortamın sıcaklığı 22–25 °C arasında sabit tutularak 12 saat ışık (07:00-19:00) ve 12 saat (19:00- 07:00) karanlıkta takip edildi. Sıçanlar özel olarak yaptırılan kafeslerde beslendi ve her gün altları temizlendi. Tüm hayvanlara aynı standart sıçan yemi verilerek add libitum su ve yiyecek alımları sağlandı. Yemler; çelik kaplarda, su; cam biberonlarda normal çeşme suyu olarak verildi. Hayvan yemleri Elazığ Yem Sanayi A.Ş. Yem Fabrikası'nda hazırlandı. Yemlerin terkibi Tablo 2' de gösterildi.

Tablo 2. Deney hayvanlarına verilen sıçan yeminin terkihi.

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

*1 gramında: 4800 IU A, 960 IU D₃, 12 mg E, 0,8 mg K₃, 0,8 mg B₁, 2,4 mg B₂, 1,2 mg B₆, 0.006 mg B₁₂ vitaminleri, 16 mg Nicotin amid, 3,2 mg Cal. D. Panth. 0.32 mg Folic acid, 0.02 mg D-Biotin, 50 mg Cholin Chloride, 20 mg Zinc Bacitracin, 32 mg Mn, 16 mg Fe, 24 mg Zn, 2 mg Cu, 0,8 mg I, 0,2 mg Co, 0.06 mg Se, 4 mg Antioksidan ve 200 mg Ca.

4.2 Deney Gruplarının Oluşturulması ve Deneysel Uygulamalar

Çalışmada ortalama 250 gr ağırlığında 21 adet Wistar Albino erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar her grupta 7 adet olacak şekilde 3 gruba ayrıldı.

Grup I (Kontrol Grubu): 10 gün boyunca sıçanlara her gün i.p. olarak 5 ml serum fizyolojik uygulanan grup. (n=7)

Grup II (Etanol grubu):10 gün boyunca sıçanlara her gün i.p. olarak 5 ml serum fizyolojik + etanol karışımı (3gr/kg etanol) (Etanol: Cas No: 64-17-5, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. A.B.D.) uygulanan grup. (n=7)

Grup III (Etanol + Cardamom grubu):10 gün boyunca sıçanlara her gün i.p. olarak 5 ml serum fizyolojik + etanol karışımı (3gr/kg etanol) ile birlikte oral olarak 500 µL/kg Cardamom (Cas No: 8000-66-6, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO. A.B.D.) uygulanan grup. (n=7)

Tüm gruplardaki sıçanlar deney sonunda ketamin (75mg/kg) + xylazine (10mg/kg) i.p. uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların testis dokuları hızla çıkarılıp bouin solüsyonu ile tespit edildi ve ardından histolojik ve histokimyasal incelemelere başlandı.

4.3. Histolojik Çalışmalar

Her gruptan alınan testis dokuları bouin solüsyonunda tespit edildikten sonra sırasıyla % 50'lik, % 60'lık ve % 70'lik alkollerde yıkandı. Yıkanan dokular rutin histolojik takip serilerinden (Tablo 3) geçirilerek dehidrate edildi. Ksilolde parlatılıp parafin bloklara (Sigma- paraplast embedding media, Stenheim, Germany) gömüldü. Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen & Eozin (H&E) boyası ve Periyodik Asit Schiff (PAS) metodları ile boyandı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus BH-2) incelenip fotoğraflandı.

Tablo 3. Histolojik takip serileri

1	%70 Alkol	2 saat
2	%80 Alkol	1,5 saat
3	%96 Alkol I	30 dakika
4	% 96 Alkol II	30 dakika
5	%100 Alkol I	30 dakika
6	%100 Alkol II	30 dakika
7	Alkol + Xylol	15 dakika
8	Xylol I	15 dakika
9	Xylol II	15 dakika
10	Yumuşak parafin + Xylol	45 dakika
11	Yumuşak parafin	1 saat
12	Yumuşak parafin + Sert parafin	1,5 saat
13	Sert parafin	3 saat
14	Gömme	

4.4. TUNEL Boyama

Parafin bloklardan 5-6 µm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Üretici firmanın talimatları doğrultusunda ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon, cat no: S7101, USA) kullanılarak apoptoza giden hücreler belirlendi.

Xylene ile deparafinize edilen dokular, dereceli alkol serilerinden geçirilerek phosphate buffered saline (PBS) ile yıkandı. 0.05% 'lik proteinase K ile 10 dakika inkübe edilen dokular, endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için % 3 hydrogen peroxide ile 5 dakika inkübe edildi. PBS ile dokular yıkandıktan sonra, 6 dakika Equilibration Buffer ile inkübe edilip, 37° C' de nemli ortamda çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) ile 60 dakika inkübe edildi. Stop/Wash Buffer da 10 dakika bekletilen dokular, Anti-Digoxigenin-Peroxidase ile 30 dakika muamele edildi. Diaminobenzidine (DAB) substratı ile apoptotik hücreler görüntülendi. Harris hematoksilen ile zıt boyası yapılan kesitler uygun kapatma solüsyonu ile kapatıldı. Pozitif kontrol için meme dokusu kullanıldı. Negatif kontrol dokusunda Tdt enzimi yerine Reaction Buffer kullanıldı. Hazırlanan preparatlar araştırma mikroskopunda (Olympus-BH2) incelenerek değerlendirildi ve fotoğraflandı. TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde Harris hematoksilen ile maviye boyanmış çekirdekler normal, kahverengi nükleer boyanma gösteren hücreler apoptotik olarak değerlendirildi. Boyama metodu aşağıdaki tabloda ayrıntılı olarak verilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4. TUNEL boyama prosedürü.

İşlem	Süre
1 60°C etüv	Bir gece
2 Xylol	3X15 dakika
3 %100, %96, %80, %70 etil alkol	3'er dakika
4 PBS	5 dakika
5 Kesitlerin çevreleri sınırlayıcı kalem ile çizilir.
6 1:500 dilüsyondaki Protinaz K solüsyonu	20 dakika
7 PBS	3X5 dakika
8 Endojen peroksit blokajı (% 3 H ₂ O ₂)	3 dakika
9 PBS	3X5 dakika
10 Equilibration tampon solüsyonu	10 dakika
11 Çalışma solüsyonu (%70 µl Reaction Buffer + %30 TdT Enzyme) 37°C'de	60 dakika
12 Stop/Wash Buffer (2ml) +Distile su (68ml) Oda sıcaklığında	10 dakika
13 Anti-Digoxigenin-Peroxidase	30 dakika
14 PBS	3X5 dakika
15 DAB Dilution Buffer + DAB Substrate	5-10 dakika
16 PBS	3X5 dakika
17 Distile su	5 dakika
18 Harris hematoksilen	1-5 dakika
19 Distile su	5 dakika
20 %80, %96 ve %100 etil alkol	1'er dakika
21 Xylol	2X5 dakika
22 Kapatma medyumunu kullanılarak lamel ile kapatma.

TUNEL boyamanın değerlendirilmesinde boyanmanın yaygınlığı esas alındı. TUNEL boyamanın yaygınlığı 0'dan +4'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (Tablo 5).

Tablo 5. TUNEL boyanma yaygınlığının derecesi

Derece	Anlamı
0	Yok
+1	Çok Az
+2	Az
+3	Orta
+4	Şiddetli

5. BULGULAR

5.1. Histolojik Bulgular

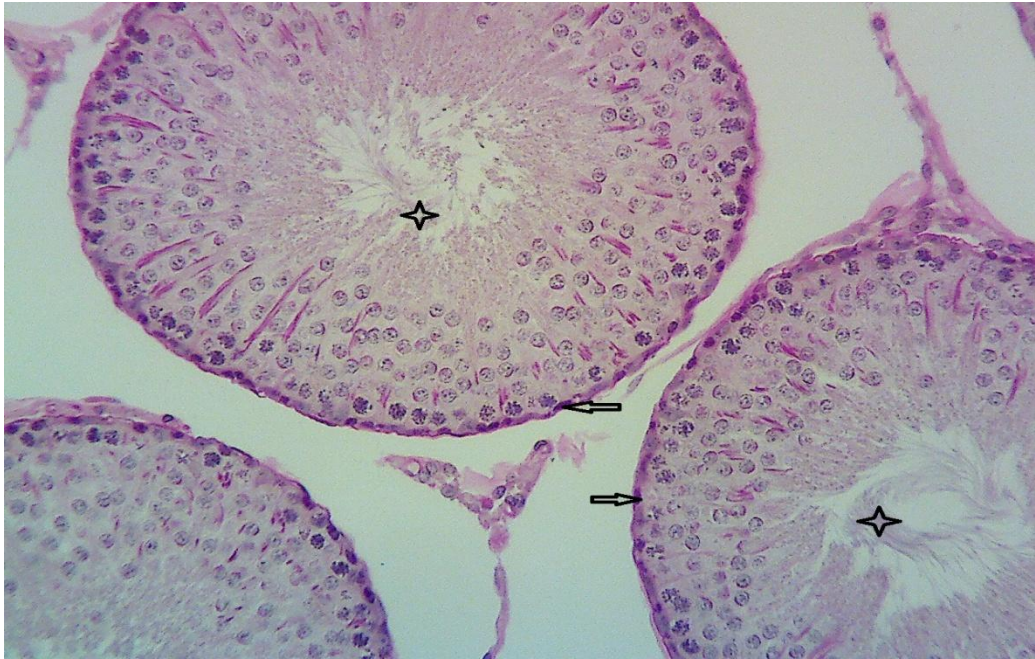
Tüm grupların Hematoksilen & Eozin ve Periyodik Asit Schiff ile boyalı preparatlarının ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; kontrol grubu testis dokusunda seminifer tübül kesitleri, Leydig hücreleri ve tübül bazal membranı normal yapıda izlendi (Şekil 15, 16).

Kontrol grubu (Şekil 15, 16) ile karşılaştırıldığında etanol verilen grupta testis dokularında peritübüler vasküler konjesyon (Şekil 17), çok sayıda atrofik ve dejenere seminifer tübüller (Şekil 18) ve bununla birlikte seminifer tübül bazal membranında invaginasyonlar ayırt edildi (Şekil 19). Ayrıca bazı tübüllerde spermatogenetik seriye ait hücrelerinin lümen içine dökülmeleri gözlemlendi (Şekil 20).

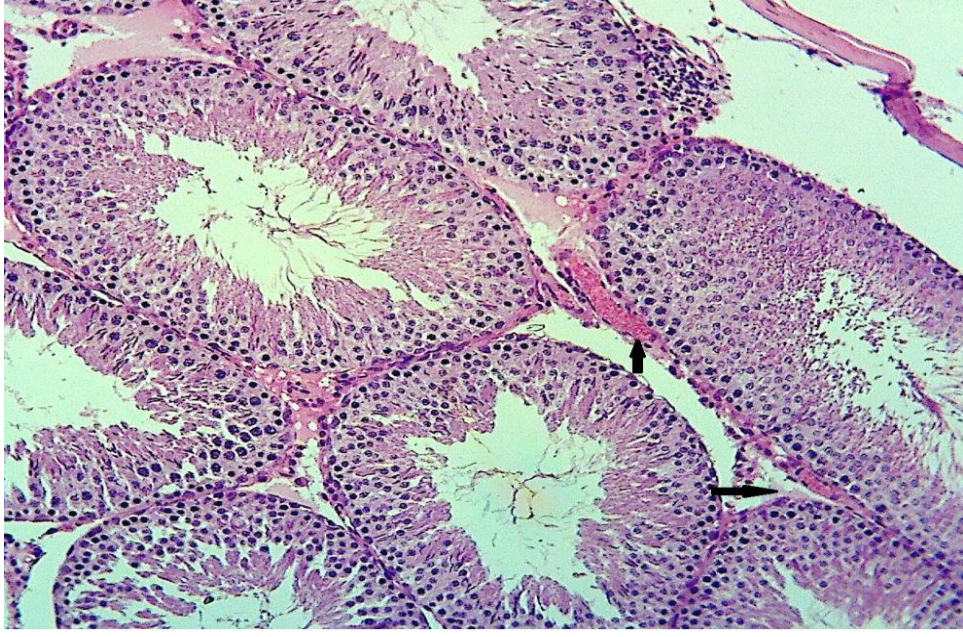
Etanol ile birlikte Cardamom uygulanan grupta ise peritübüler vasküler konjesyon (Şekil 21, 24) ve tübül bazal membranında invaginasyonlarda (Şekil 22) düzelme gözlemlendi. Ancak, seminifer tübüllerde dejenerasyon (Şekil 23) ve spermatogenetik seriye ait hücrelerinin lümen içine dökülmeleri (Şekil 24) daha az sayıda tübülde izlenmekle birlikte devam etmekteydi.



Şekil 15. Grup I. Testis dokusunda normal yapıda seminifer tübüller (✦)
ve interstisyel Leydig hücreleri (⇨). H & E 400 X



Şekil 16. Grup I. Testis dokusunda normal yapıda seminifer tübüller (✦)
ve tübül bazal membranı (⇨). PAS 400 X



Şekil 17. Grup II. Testis dokusunda peritübüler alanda vasküler konjesyon

(→). H & E 400 X

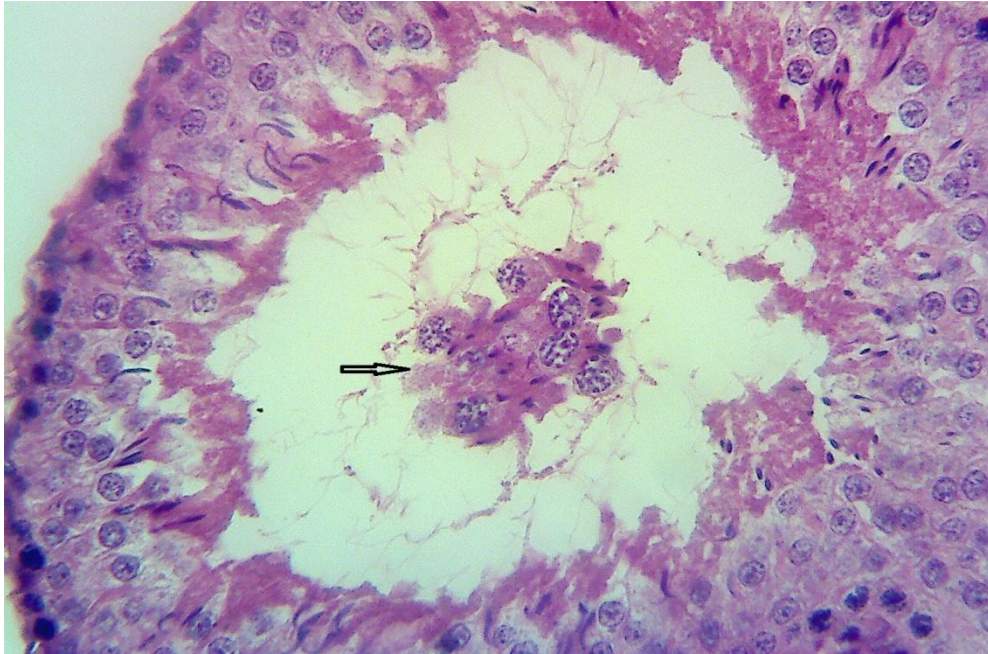


Şekil 18. Grup II. Testis dokusunda atrofik ve dejenere seminifer tübül

epiteli (⇔). H&E 400 X



Şekil 19. Grup II. Testis dokusunda seminifer tübüllerde bazal membran invaginasyonları (⇨⇩). PAS 400 X



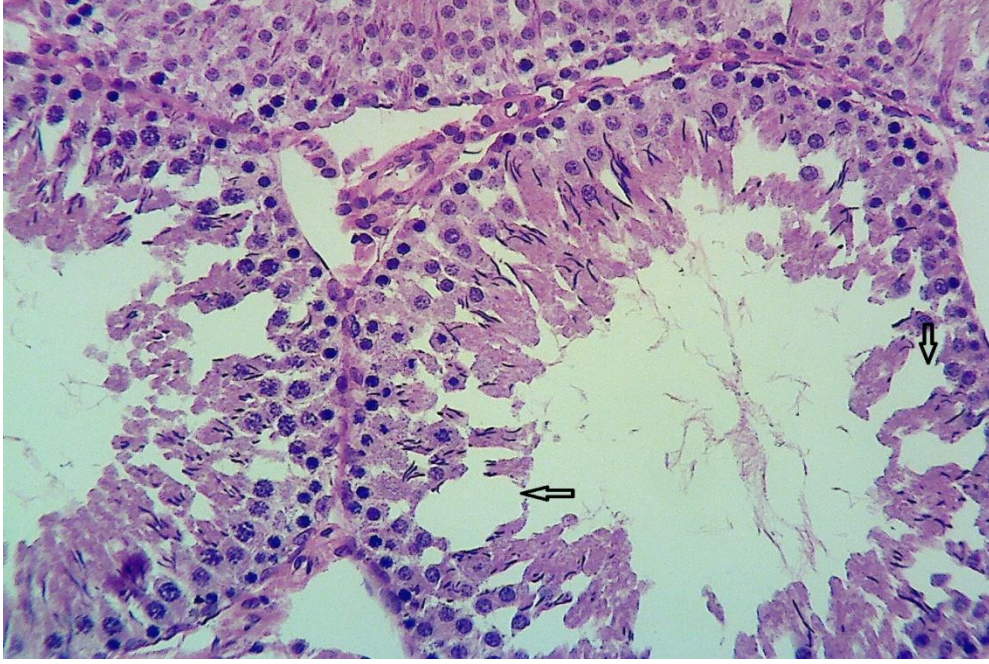
Şekil 20. Grup II. Testis dokusunda seminifer tübüllerde spermatogenik seriye ait olgunlaşmasını tamamlamamış hücrelerde lümene dökülmeler (⇨⇩). PAS 400 X



Şekil 21. Grup III. Testis dokusunda peritübüler vasküler konjesyon (**➡**). H&E 400 X

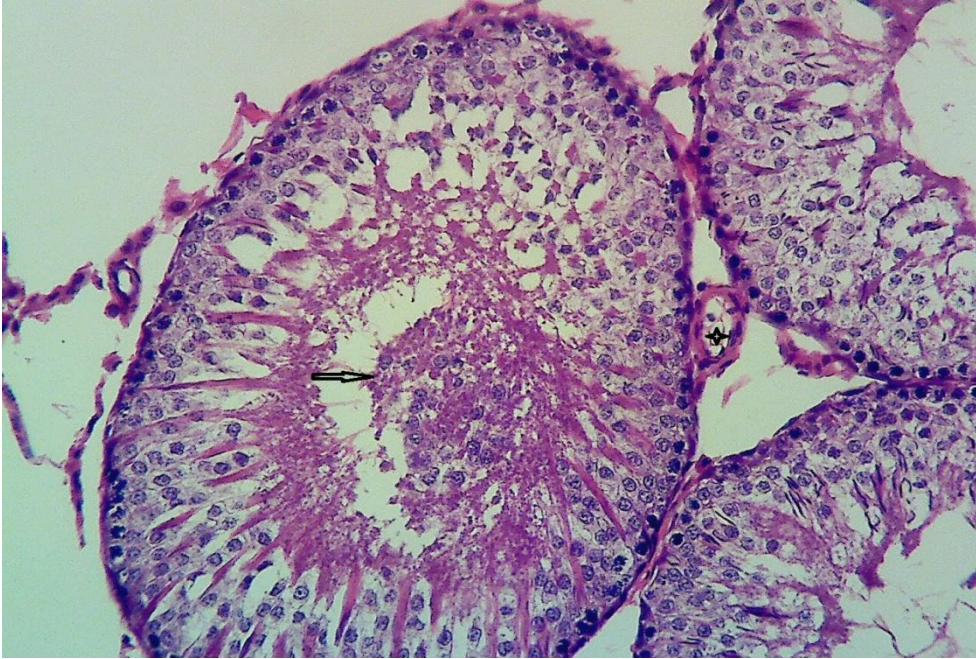


Şekil 22. Grup III. Testis dokusunda tübül bazal membranında invaginasyonlarda azalma (**⇨**). PAS 400 X



Şekil 23.Grup III. Testis dokusunda seminifer tübüllerde dejenerasyon

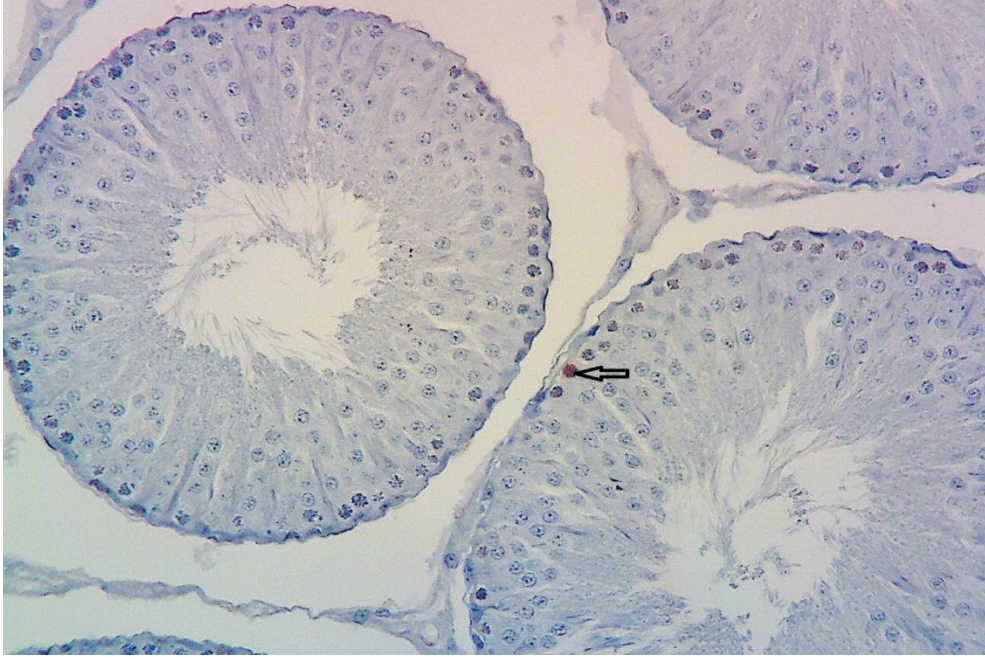
(⇨). H & E 400 X



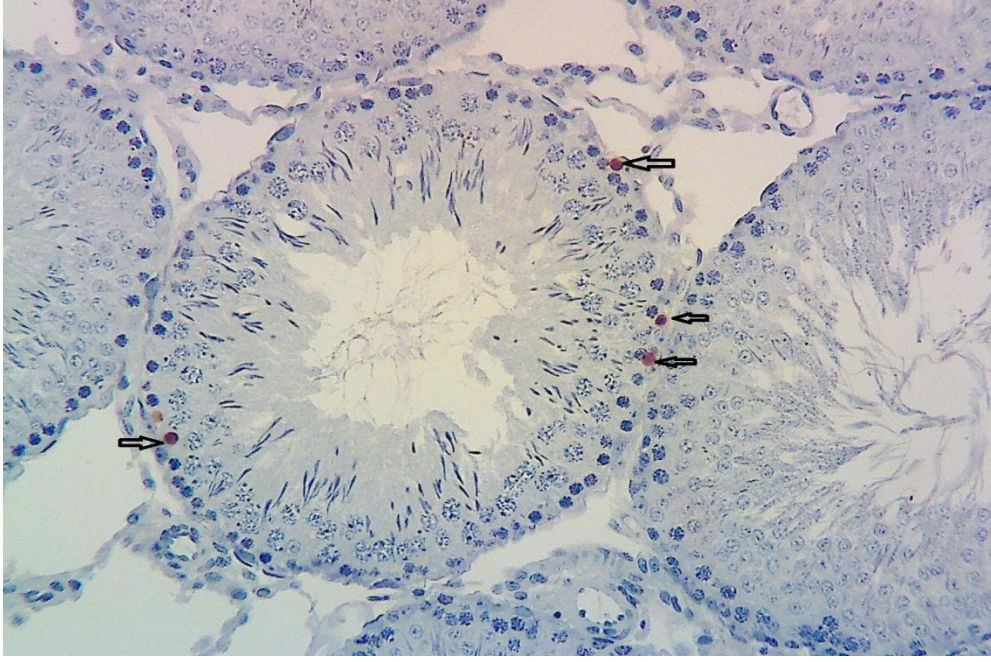
Şekil 24. Grup III. Testis dokusunda olgunlaşmasını tamamlamamış spermatogenik seriye ait hücrelerde lümen içerisine dökülmeler (⇨). Kan damarı (✦) H & E 400 X

5.2. TUNEL Bulgular

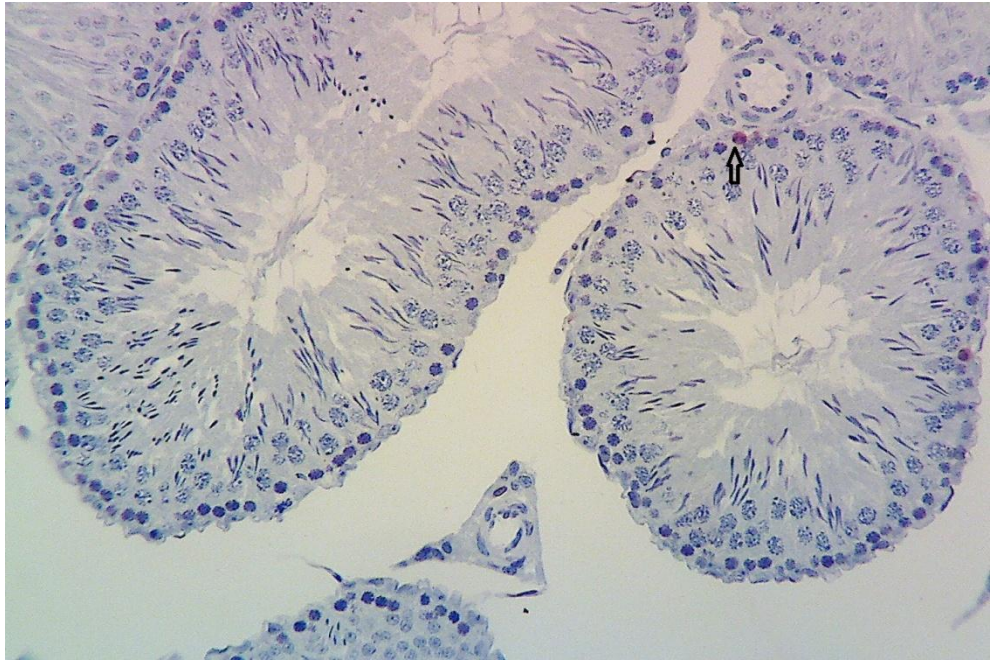
Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; TUNEL pozitifliği kontrol grubunda +1 yaygınlığında gözlemlendi (Şekil 25). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında etanol verilen grupta belirgin bir artış vardı ve +3 yoğunluğunda olduğu görüldü (Şekil 26). TUNEL pozitifliğinin Cardamom verilen tedavi grubunda ise etanol verilen gruba göre azaldığı, kontrol grubuna yakın olduğu izlendi ve +2 yoğunluğunda değerlendirildi (Şekil 27). Negatif kontrolde TUNEL pozitifliğinin saptanmadığı görüldü (Şekil 28). Pozitif kontrol için meme dokusu (Şekil 29) kullanıldı.



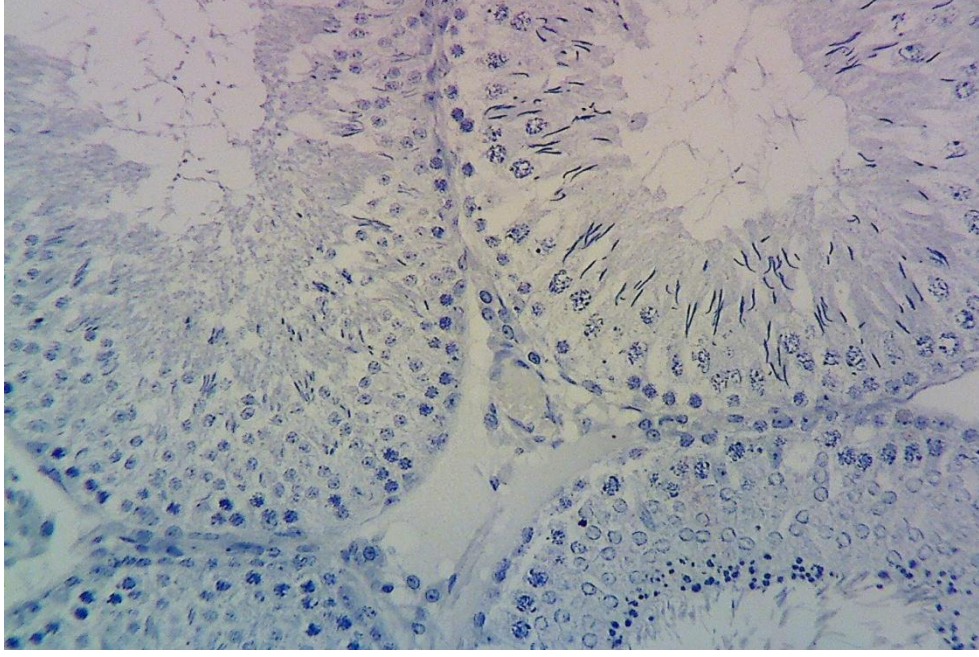
Şekil 25. Grup I. TUNEL pozitif hücre (⇨). TUNEL 400 X



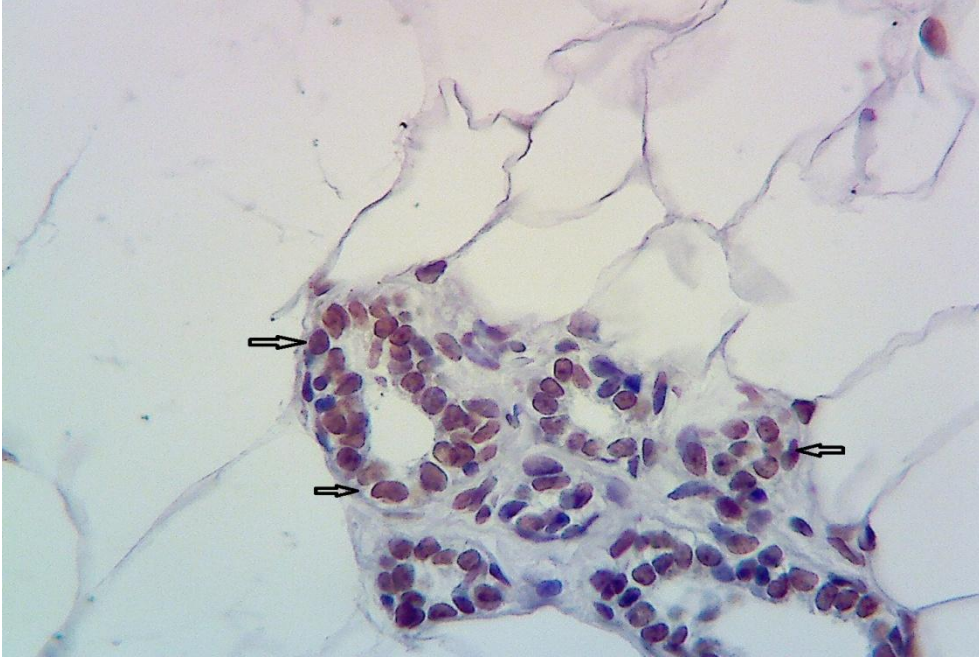
Şekil 26. Grup II. Artmış TUNEL pozitif hücreler (⇨). TUNEL 400 X



Şekil 27. Grup III. TUNEL pozitif hücre (⇨). TUNEL 400 X



Şekil 28. Negatif kontrol. TUNEL 400 X



Şekil 29.Pozitif kontrol. Meme dokusu (\Rightarrow) TUNEL 400 X

6. TARTIŞMA

XIV. yüzyıldan itibaren ilaç olarak kullanılan etanol, kimyada mayalanmış içkilerin damıtılması ile elde edilen sıvı olarak tanımlanır (24). Kronik alkolizmde, özellikle karaciğer ve mide olmak üzere, vücudun tüm organ ve dokularında morfolojik değişiklikler oluşur (26) . Kronik alkolizmde, Karaciğerde siroz (26) , midede ülser, beyinde serebellar atrofi ve dejenerasyon, gözde optik nöropati (26) , kalpte kardiomyopati (26-28), iskelet kasında miyopati, pankreasta akut veya kronik pankreatit (26) görülmektedir. Ayrıca etanolün bir erkek üreme sistemi toksini (130), özellikle de bir testis toksini olduğu bilinmektedir (132-135). Kronik etanol alan erkeklerde, üreme bozuklukları (135-137), testis atrofisi ve testis ağırlığında azalma, seksüel bozukluklar, spermatogenezis bozuklukları (138) ve fertilitate bozuklukları (138, 139) görülmektedir. Kronik etanol kullanımı, alkolik erkeklerde hipotalamus-hipofiz-gonad aksını bozmakta (38), plazma testosteronunu ve testosteron yapım oranını düşürmekte (140) ve infertiliteye neden olmaktadır.

Etanol kullanımı spermatogonyumların çoğalma aktivitesini ve spermatogenetik aktiviteyi de azaltmaktadır (32). Önceki çalışmalar etanolün seminifer tübül döngüsünün bütün evrelerinde spermatogonyumların çoğalma aktivitesini düşürdüğünü göstermiştir (33).

Etanolün bu etkilerinin oluşumunda oksidatif stresin önemli bir rolü olduğu bilinmektedir. Bu nedenle oksidatif strese karşı antioksidan tedavi seçenekleri önerilmektedir. Alkolle indüklenen toksik etkilerden testisi koruma amaçlı olarak uygulanan bazı antioksidanların (curcumin, resveratrol, apricot) (141-143) olumlu etkileri gözönüne alındığında, bu çalışmanın sonucunda

antioksidan etkisi olduğu bilinen Cardamom'un alkolün testis dokusunda oksidatif strese bağlı gelişebilen apoptozisi azaltacak olumlu etkilerinin düşüncesinden yola çıkılmıştır.

Cardamom'un anti-inflamatuvar, antioksidan (117-120), anti-mikrobiyal ve analjezik etkileri bilinmektedir. Ayrıca Cardamom'un lipit peroksidasyon ürünlerini, kısmen yok ettiği söylenmiştir (120).

Hayvan deneylerinde kronik alkol kullanımı germ hücre hasarı gibi dejeneratif değişikliklere yol açtığı gözlenmiştir. Etanol farelerde, testis ağırlığı (137, 144-147), testosteron düzeyi (145), spermatogonium, spermatosit, spermatid (148), epididimal sperm (144, 148) ve motil spermatozoa sayısında (144, 146, 147) azalmaya; testis ve seminifer tübül çaplarında küçülmeye (148); immatür germ hücrelerinin seminifer tübül lümenine dökülme sıklığı (137, 146) ve sperm morfoloji bozukluğunda (146) artışa neden olmuştur. Etanol sıçanlarda, plazma FSH düzeylerinin (149) artmasına; plazma testosteron düzeyleri (132, 149, 150), testis ağırlığı (149, 150) ve germ hücreleri sayısının (149) azalmasına; testis atrofi oluşumuna (132, 138, 150), seminifer tübüller (150) ve bunların lümen çaplarında (144) küçülmeye neden olmuştur.

Araştırmamızda histolojik olarak, etanol verilen grupta testis dokularında peritübüler vasküler konjesyon, atrofik ve dejenere seminifer tübüller, tübül bazal membranında invaginasyonlar ile spermatogenetik seriye ait hücrelerin olgunlaşmalarını tamamlamadan lümen içine döküldükleri gözlendi. Etanol ile birlikte Cardamom uygulanan grupta ise peritübüler vasküler konjesyon ve tübül bazal membranında invaginasyonlarında belirgin düzelme gözlenmesine rağmen seminifer tübüllerde dejenerasyon ve spermatogenetik seriye ait hücrelerinin

lümen içine dökülmeleri devam etmekteydi. Çalışmamızdaki histopatolojik bulgular literatürlerde gözlenen bulgularla uyumluydu.

Vücutta oksidan madde düzeylerinin artmış ve enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidan kapasitenin azalmış olması olarak tanımlanan oksidatif stres, son yirmi yıldır toksikolojik araştırmaların odağı haline gelmiştir (151). Serbest radikaller için bir substrat görevi gören malondialdehit (MDA) (152), doymamış yağ asitlerinin yıkımlanması sonucu oluşan dokulardaki lipid peroksidasyonun son ürünüdür. Glutatyon (GSH), hücre metabolizmasına katılan, hücre bütünlüğünün muhafazası için esansiyel bir bileşiktir (153, 154).

Oksidatif stres erkek infertilitesi etiyolojisinde önemli bir faktördür. Etanol metabolizması testislerde testiküler MDA artışı ve testiküler glutatyon düzeylerindeki azalmayla kendini gösteren oksidatif stresi oluşturur (29). Etanol metabolizmasının bir sonucu olarak lipid peroksidasyonu oluşmaktadır (155). Lipid peroksidasyonu, lipid peroksidasyonunun son ürünü olarak bilinen MDA'nın (156) oluşumu ile ölçülmektedir (29). Testisler seviyesinde, oksidatif stres Leydig hücrelerinin steroidojenik kapasitesini bozabilir bunun sonucunda da germinal epiteli normal spermatozoadan farklılaştırır (157).

Etanol, Sertoli hücrelerinin sekreter fonksiyonunu olumsuz etkilemekte, testis içinde oksidatif stresi; apoptotik spermatositler ve spermatogoniumların sayısını artırmaktadır. Emanuele ve ark. yaptıkları çalışmalarında etanolün testiste oksidatif stres oluşturduğunu ve hücre ölümünü arttırdığını tespit etmişlerdir (158). Bu yüzden alkol suistimaliyle, germ hücrelerinde etanol kaynaklı apoptozis artışı ve testiküler atrofi erkeklerde kısırlığa neden olabilir (38). Etanolün hem kimyasal hem de fiziksel olarak hücre membran hasarına yol açtığı bilinmekte

olup alkol araştırmaları etanol ile uyarılan biyokimyasal mekanizmalar üzerinde yoğunlaşmıştır (159).

Daha önceki çalışmalar etanolün önemli derecede bütün spermatogonia ve spermatositlerdeki apoptotik hücre sayısını arttırdığını göstermiştir (32). Zhu ve arkadaşları da etanole maruz kalınmasının spermatositler, spermatogonialar ve testiküler germ hücrelerinde apoptozisi arttırdığını ifade etmişlerdir (38).

Çalışmamızda ise apoptotik hücrelerin belirlenmesi için yapılan TUNEL boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında literatür bilgilerine uyumlu bir şekilde etanol verilen grupta seminifer tübüllerdeki apoptotik hücrelerde belirgin bir artış vardı. Etanol ile birlikte Cardamom verilen grupta ise etanol verilen gruba göre seminifer tübüllerdeki apoptotik hücrelerin yoğunluğunun azaldığı ve kontrol grubuna daha yakın olduğu izlendi.

Etanole maruz kalmanın laboratuvar hayvanlarının yanı sıra insanlarda da erkek üreme sistemine ciddi olumsuz etkileri olduğu ve testis dokusunda apoptozisi arttırdığı bilinmektedir (32).

Apoptozis vücudumuzda bir çok dokuda düzenleyici rolü olan fizyolojik bir olaydır. Normal spermatogenezin gerçekleşebilmesi için de belli bir oranda gereklidir. Testislerde germ hücrelerinin apoptozisi fizyolojik şartlar altında meydana gelir ayrıca anormal germ hücrelerinin matürasyonu ve normal germ hücrelerinin aşırı üretimini önlemeye yardımcı olur (160). Patolojik şartlar altında bazı çevresel toksinlere maruz kalma apoptozis aracılığı ile germ hücrelerinin büyük bir bölümünün dejenerasyonuna, spermatogenezde bozulmalara ve infertiliteye neden olur (160).

Çalışmamızda da TUNEL metodu uygulayarak, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Etanol verilen grupta literatüre uyumlu bir şekilde apoptozis aracılığı ile germ hücrelerinin dejenerasyonunda belirgin bir artış olduğunu gözlemledik.

Reaktif oksijen türleri (ROS)' nin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için vücutta bazı savunma mekanizmaları geliştirilmiştir. Bunlar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinirler. Antioksidan moleküller endojen ve eksojen kaynaklı yapılar olup, oluşan oksidan moleküllerin neden olduğu hasarı hem hücre içi hem de hücre dışı savunma ile etkisiz hale getirilirler. Hücre içi serbest radikal toplayıcı enzimler asıl antioksidan savunmayı sağlamaktadır. Bu enzimler süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon S-transferaz, glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz, katalaz ve sitokrom oksidazdır (161, 162).

Dhuley ve ark. yaptıkları çalışmada sıçanlarda Cardamom kullanımı sonucu antioksidan enzim aktivitesinde önemli bir artış bulunduğu için GSH içeriğinin de önemli derecede yenilendiğini ifade etmişlerdir (120). Abdel-Wahhab ve arkadaşları ise Cardamom ve karanfil ekstraktlarının MDA düzeylerinde önemli azalmalara sebep olduğu göstermişlerdir (163).

Çalışmamızda apoptozisin belirlenmesi için uyguladığımız TUNEL metodu sonuçlarımız literatür bilgileri ile uyumlu olmakla birlikte, tedavi olarak verdiğimiz Cardamom'un apoptozis üzerine olumlu etkilerinin antioksidan özelliğine bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak; etanolün testiste belirgin histopatolojik değişiklikler oluşturduğu, bu histopatolojik değişiklikleri Cardamom'un azalttığı fakat

tamamen iyileştirmediği gözlenmiştir. Aynı zamanda, etanolün testiste apoptozisi anlamlı olarak arttırdığı, Cardamom'un bu apoptozis artışına karşı koruyucu olumlu etkilerinin olduğu, ileride Cardamom'un klinik olarak kullanılması amacıyla etanol ve Cardamom doz ve süreleri ile ilgili daha geniş çalışmaların yapılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Cumhur M. Temel Anatomi. Ankara : Metu Pres, 2001.
2. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. 3. Baskı, Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti., 2001.
3. Trainer T.D. Histology of the normal testis. Am J Surg Pathol 1987; 11: 797-809.
4. Leeson T.S., Leeson C.R., Paparo A.A. Text / Atlas of Histology. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1988. Junqueira LC, Carneiro J. Temel Histoloji. (Çeviri editörü; Prof. Dr. Yener Aytekin). İstanbul: Nobel Kitabevi, 2003.
5. Kuran O. Sistematik Anatomi. 3. Baskı, İstanbul: Filiz Kitabevi, 1993.
6. Özel HB, Tek Taraflı Testis Torsiyonunda Karşı Testiste Testiküler Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim Aktivitesindeki Değişimlerin Histolojik ve Histoşimik Olarak Değerlendirilmesi. Doktora Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2009.
7. Sancak B, Cumhur M. Fonksiyonel Anatomi. Ankara: Metu Pres, 1999.
8. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M. Okar İ. Dalçık H. (Çeviri Editörler). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2002 : 323-329,730.
9. Ross MH, Kaye GI. and Pawlina W. Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. Taylor C. Scogna KH. Ajello JP (Çeviri Editörleri). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2006: 710, 730.
10. Abraham L. Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R. (Çeviren). 1. Baskı, Ankara Palme Yayıncılık 2006.
11. Junqueira L.C. Carneiro J. Temel Histoloji: Text&atlas. Solakoğlu S. Aytekin Y. (Çeviri Editörleri). Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul 2008 : 426.
12. Eroschenco VP. Di Fiore. Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle, Demir R. (Çeviren). 10. baskı, Boston: Palme Yayıncılık, Ankara. 2008.
13. Jangueria LC., Carneiro J., Kelley RO. Temel histoloji. Aytekin Y., Solakoğlu S., hışalı B. (Çeviri Editörleri), Barış kitabevi, 1998.
14. Kenehara H, Song K, Ueda H, Shiota N, Azuma H, Katsuoka Y, Miyazaki H, Miyazaki M. Involvement of angiotensin II receptor subtypes during testicular development in rats. Int J. Androl 1998; 21 (4): 186-195.
15. Nakagawa A, Shiratsuchi A, Tsuda K, Nakanishi Y. In vivo analysis of phagocytosis of apoptotic cells by testicular Sertoli cells. Mol Reprod Dev. 2005;71(2): 166-77.
16. Meng J, Holdcraft RW, Shima JE, Griswold MD, Braun RE. Androgens regulate the permeability of the blood-testis barrier. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 15;102(46):16696-700.
17. Pearl P.Y. Lie, C. Yan Cheng, Dolores D. Mruk. Signalling pathways regulating the blood–testis barrier. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 2013; 45:621– 625.
18. Young B, Heath JW, Stevens A, Lowe JS, Deakin PJ. Wheater’s Functional Histology. A Text and Color Atlas. p. 328-336. Churchill Livingstone, Edinburgh, 2000.

19. Grover A, Smith CE, Gregory M, Cyr DG, Sairam MR, Hermo L. Effects of FSH receptor deletion on epididymal tubules and sperm morphology, numbers, and motility. *Mol Reprod Dev.* 2005;72(2):135-44.
20. Petrusz P, Jeyaraj AD, Grossman G. Microarray analysis of androgen-regulated gene expression in testis: the use of the androgen-binding protein (ABP)-transgenic mouse as a model. *Reprod Biol Endocrinol.* 2005; 93(1):70.
21. Krstic RV. *Human Microscopic Anatomy.* p. 342-361. Springer-Verlag, Berlin, 1991.
22. Ishii T, Matsuki S, Iuchi Y, Okada F, Toyosaki S, Tomita Y, Ikeda Y, Fujii J. Accelerated impairment of spermatogenic cells in SOD1-knockout mice under heat stress. *Free Radic Res.* 2005;39(7):697-705.
23. Acevedo JJ, Mendoza-Lujambio I, de la Vega-Beltran JL, Trevino CL, Felix R, Darszon A. K(ATP) channels in mouse spermatogenic cells and sperm, and their role in capacitation. *Dev Biol.* 2006 ; 15;289(2):395-405.
24. Özfiliz N. Alkol (Etanol) Kullanımının Testis Yapı ve İşlevi Üzerindeki Etkileri. *J Fac Vet Med* 20 2001: 109-115.
25. Obe G., Ristow H.: Mutagenic, cancerogenic and teratogenic effects of alcohol. *Mutat Res.* 1979;65(4): 229-59.
26. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Temel Patoloji (Basic Pathology, Çev. Ed. Çevikbaş U) 6. Baskı,* s. 234-235, 256-257, Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Şti. İstanbul, 2000.
27. Diamond I, Van Thiel DH, Lester R. Alcoholic myopathy and cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 1989 ; 16;320(7):458-60.
28. Urbano-Marquez A, Estruch R, Navarro-Lopez F, Grau JM, Mont L, Rubin E. The effects of alcoholism on skeletal and cardiac muscle. *N Engl J Med.* 1989 ; 16;320(7):409-15.
29. Rosenblum E., Gavaler J.S. and Van Thiel D.H.: Lipid Peroxidation: a mechanism for ethanol- associated testicular injury in rats. *Endocrinology* 1985;116: 311-318.
30. Villata J., Balleca J.L., Nicolas J.M., Martinez de Osaba M.J., Antunez E., Pimentel C.: Testicular function in asymptomatic chronic alcoholics: relation to ethanol intake. *Alcohol Clin Exp Res.* 1997; 21: 128-133.
31. Salonen I. Exposure to ethanol during capacitation impairs the fertilizing ability of human spermatozoa in vitro. *Int J Androl.* 1986 ; 9(4):259-70.
32. Koh P.O. and Kim M.O.: Ethanol exposure decreases cell proliferation and increases apoptosis in rat testes, *J Vet Med Sci* 2006;68(10): 1013-1017.
33. El Sokary G. H.: Quantitative study on the effects of chronic ethanol administration on the testis of adult male rat. *Neuro Endocrinol Lett* 2001; 22:93-99.
34. Anderson Jr RA, Willis BR, Oswald C, Reddy JM, Beyler SA, Zaneveld LJD. Hormonal imbalance and alterations in testicular morphology induced by chronic ingestion of ethanol. *Biochem Pharmacol* 1980; 29: 1409-19.

35. Srikanth V, Malini J, Arunakaran P, Govindarajulu P, Balasubramanian K. Effects of ethanol treatment on epididymal secretory products and sperm maturation in albino rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 288: 509-15.
36. Van Thiel DH, Lester R, Sherins RJ. Hypogonadism in alcoholic liver disease: Evidence for a double defect. *Gastroenterology* 1974; 67: 1188-99.
37. Ren J-C, Banan A, Keshavarzian A, et al. Exposure to ethanol induces oxidative damage in the pituitary gland. *Alcohol* 2005; 35:91-101.
38. Zhu Q., Meisinger J., Emanuele N.V., Emanuele M. A., La Paglia N. And Van Thiel D.H.: Ethanol exposure enhances apoptosis within the testes. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2000; 24: 1550-1556.
39. McGivern RF, Handa RJ, Redei E: Decreased postnatal testosterone surge in male rats exposed to ethanol during last week of gestation. *Alcohol Clin Exp Res.* 1993; 17:1215-1222.
40. Leandro N. Quintans, Gerardo Castro, Jose A. Castro- Oxidation of Ethanol to Acetaldehyde and Free Radicals by Rat Testicular Microsomes *Arch Toxicol.* 2005;79: 25- 30.
41. Giannessi F, Giambelluca MA, Grasso L, Scavuzzo MC, Ruffoli R. Curcumin protects Leydig cells of mice from damage induced by chronic alcohol administration. *Med Sci Monit* 2008;14(11):BR237–42.
42. De Rooji DG.: Stem cells in the testis. *Int J Exp Pathol*, 79: 67-80, 1998.
43. Catoni, C., Peters, A., Schaefer, H.M. Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Anim. Behav* 2008; 76, 1107-1119.
44. Ruiz, D., Egea, J., Tomas-Barberan, F.A., Gil, M.I. Carotenoids from new apricot (*Prunus armeniaca* L) varieties and their relationship with flesh and skin color. *Agric. Food Chem* 2005; 53,6368- 6374.
45. Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier-Willi, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Brit. J. Nutr* 1998; 80, 77-112.
46. Büyükgöbüz O, Caferler JS. Apoptosis. *Sendrom.* 13(1): 102–107, 2001.
47. White E. Life, Death and Pursuit of Apoptosis. *Genes Dev.* 10: 1–15, 1996.
48. Kerr J.F., Wyllie A.H, Currie A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26 (4): 239-245.
49. Curtin JF, Cotter TG. Live and let die: Regulatory mechanisms in Fas-mediated apoptosis. *Cell Signal* 2003; 15: 983-992.
50. Van Cruyten S, Van Den Broeck W. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 2002; 31: 214-23.
51. Renvoize C, Biola A, Pallardy M, Breard J. Apoptosis: Identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol* 1998; 14: 111-120.
52. Honig LS, Rosenberg RN. Apoptosis and neurologic disease. *Am J Med* 2000; 108: 317-30.
53. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 217-245.

54. Ribble D, Goldstein NB, Norris DA, Shellman YG. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol* 2005; 5: 12.
55. Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, Lockshin RA. Cell death: Programmed, apoptosis, necrosis, or other Cell Death Differ 1995; 2: 87-96.
56. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
57. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis distinct modes death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982; 17: 229-259.
58. Thompson EB. Apoptosis and steroid hormones. *Mol Endocrinol.* 1994; 8: 665-73.
59. Bellamy C O, Malcomson R D, Harrison D J, Wyllie A H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 1995;6: 3-16.
60. Cummings M C, Winterford C M, Walker N I. Apoptosis. *Am J Surg Pathol* 1997; 21: 88-101.
61. Lipponen P, Aaltomaa S, Kosma VM, Syrjänen K. Apoptosis in breast cancer as related to histopathological characteristics and prognosis. *Eur J Cancer.* 1994; 30A(14): 2068-73.
62. Lumachi F, Basso S. Apoptosis: life through planned cellular death regulating mechanisms, control systems, and relations with thyroid diseases. *Thyroid* 2002; 12(1): 27-34.
63. Evan G, Littlewood T. A matter of life and cell death. *Science* 1998; 281: 1317-1321.
64. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146(1):3-15.
65. Cohen JJ. Apoptosis: mechanisms of life and death in the immune system. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 ;103(4):548-54.
66. Hopwood D, Levison DA. Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *Pathol.* 1976;119(3):159-66.
67. Kiess W, Gallaher B. Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol.* 1998;138(5):482-91.
68. Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. *JAMA.* 1998; 28 : 279(4):300 -7.
69. Bellamy C O, Malcomson R D, Harrison D J, Wyllie A H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Cancer Biology* 1995;6: 3-16.
70. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 1999; 6:1028-1042.
71. Lou J, Lenke L G, Ludwig F J, O'Brien M F. Apoptosis as a mechanism of neuronal cell death following acute experimental spinal cord injury. *Spinal Cord* 1998;36 : 683-690.
72. Lu J, Ashwell K, Ken W S, Waite P. Advances in spinal cord injury: Role of Apoptosis. *Spine* 2000; 25:1859-1866.
73. Takagi T, Takayasu M, Mizuno M, Yoshimoto M, Yoshida J. Caspase activation in neuronal and glial apoptosis following spinal cord injury in mice. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2003; 43; 20-29.

74. Hu Y M, Benedict M A, Ding L Y. Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis. *EMBO J.* 1999;18: 3586- 3595.
75. Liu X Z, Xu X M, Hu R, Du C, Zhang S X, McDonald J W, Dong H X, Wu Y J, Fan G S, Jacquin M F, Hsu C Y, Choi D W. Neuronal and glial apoptosis after traumatic spinal cord injury. *J Neurosci* 1997;17: 5395- 5406.
76. Krajewski S, Krajewska M, Ellerby L M, Welsh K, Xie Z, Deveraux Q L, Salvesen G S, Bredesen D E, Rosenthal R E, Fiskum G, Reed J C: Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1996; 96:5752-5757.
77. Keane R W, Kraydieh S, Lotocki G, Bethea J R, Krajewski S, Reed J C, Dietrich W D. Apoptotic and anti-apoptotic mechanisms following spinal cord injury. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001; 60:422-429.
78. Choi W S, Lee E H, Chung C W. Cleavage of bax is mediated by caspase dependent or independent calpain activation in dopaminergic neuronal cells: protective role of Bcl 2. *J Neurochem* 2001;77:1531-1541.
79. Newton K, Strasser A: The Bcl-2 family and cell death regulation. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8: 68-75.
80. Takahashi K, Schwarz E, Ljubetic C, Murray M, Tessler A, Saavedra RA. DNA plasmid that codes for human Bcl-2 gene preserves axotomized Clarke's nucleus neurons and reduces atrophy after spinal cord hemisection in adult rats. *J Comp Neurol* 1999; 404: 159-71.
81. Nakatsuka H, Ohta S, Tanaka J, Toku K, Kumon Y, Maeda N, Sakanaka M, Sakaki S. Release of cytochrome c from mitochondria to cytosol in gerbil hippocampal CA1 neurons after transient forebrain ischemia. *Brain Research* 1999; 849: 216-219.
82. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science.* 1995; 267:1449-56.
83. Grell M, Krammer PH, Scheurich P. Segregation of APO-1/Fas antigen- and tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Eur J Immunol.* 1994 Oct; 24(10): 2563-6.
84. Bhojani MS., Chen G., Ross BD., Beer DG., Rehemtulla A. Nuclear localized phosphorylated FADD induces cell proliferation and is associated with aggressive lung cancer. *Cell Cycle.* 2005;4(11): 1478-81.
85. Srinivasula SM., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri ES. Molecular ordering of the Fas-apoptotic pathway: the Fas/APO-1 protease Mch5 is a CrmA-inhibitable protease that activates multiple Ced-3/ICE-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 93:14486-91.
86. Darmon AJ., Nicholson DW., Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 1995;377:446-448.
87. Martin SJ., Amarante-Mendes GP., Shi L., Chuang TH., Casiano CA., O'Brien GA., et al. The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *EMBO J.* 1996;15:2407-2416.

88. Andrade F., Roy S., Nicholson D., Thornberry N., Rosen A., Casciola-Rosen L. Granzyme B directly and efficiently cleaves several downstream caspase substrates: implications for CTL-induced apoptosis. *Immunity* 1998; 8: 451-460.
89. Nakamura K, Bossy-Wetzel E, Burns K, Fadel MP., Lozyk M. et al. Changes in endoplasmic reticulum luminal environment affect cell sensitivity to apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150: 731-740.
90. Rao RV., Hermel E., Castro-Obregon S., del Rio G., Ellerby LM. et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: mechanism of caspase activation. *J Biol Chem* 2001; 276: 869-874.
91. Karaboğa F., Deneysel Diyabetik Fare Beyin Dokusundaki Apoptotik Değişiklikler Üzerine D₃ Vitamininin Etkisinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Elazığ: Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Norloji Anabilim Dalı, 2010.
92. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı 2008.
93. Mountz J D, Zhou T. Apoptosis and autoimmunity (in) *A Textbook of Rheumatology: Arthritis and allied conditions*. WJ Kopman (Editör), Lippincott-Williams&Wilkins 2001.
94. Yılmaz İ . Erişkin ratlarda deneysel varikozel oluşturulması sonrası testislerde germ hücrelerinde apoptozis düzeylerinin yükselmesi ve yükselmiş olan apoptozisin varikoselektomi sonrası gerileme düzeyi ve süresinin tunel yöntemi ile değerlendirilmesi, Uzmanlık Tezi, Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi Üroloji Kliniği, İstanbul 2005.
95. Overbeeke R, Steffens-Nakken H, Vermes I, Reutelingsperger C, Hanen C.: Early features of apoptosis detected by four different flow cytometry assays. *Apoptosis*, 1998;3: 115.
96. Zhang G, Gurtu V, Kain S R, Yan G: Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of Annexin V. *Biotechniques* 1997; 23: 525-531.
97. Gatti R, Belletti S, Orlandini G, Bussolati O, Dall'asta V, Gazzola G C : Comparison of Annexin V and calcein-AM as early vital markers of apoptosis in adherent cells by confocal laser microscopy. *J. Histochem. Cytochem* 1998; 46: 895-900.
98. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson S A : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol* 1992; 119: 493-501.
99. Kressel M, Groscurth P : Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.*1994;278: 549-56.
100. Attanasio A., Schiffer D.: Ultrastructural detection of DNA strand breaks by in situ end-labelling techniques. *J. Pathol* 1990; 176:27-35.
101. Chapman R.S, Chresta C.M., Herberg A.A., Bere H. M., Heer S., Whetton A.D., Hickman J. A., Dive C.: Further characterization of the in situ terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) assay for the flow cytometric analysis of apoptosis in drug resistant and drug sensitive leukemia cells. *Cytometry* 1995;20:245- 256.
102. Sgonc R., Wick G.: Methods for the detection of apoptosis. *Int. Arch. Allergy Immunol* 1994;105: 327.

103. Apoptag Plus Peroksidaz In situ Apoptosis. S7101. Chemicon International. Kiti Kullanım Kitapçığı 2005 : 1-7.
104. Leers M P, Kolgen W, Bjorklund V, Bergman T, Tribbick G, Persson B, Bjorklund P, Ramaekers F C, Bjorklund B, Nap M, Jornvall H, Schutte B : Immunocytochemical detection and mapping of a cytokeratin 18 neo-epitope exposed during early apoptosis. *J. Patho* 1999; 187: 567–572.
105. Kockx M M, Muhring J, Knaapen M W M, de Meyer G R Y : RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Patho* 1998; 152: 885.
106. Tesarik J, Greco E, Cohen-Bacrie P, Mendoza C : Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol. Hum. Reprod* 1998; 4: 757.
107. Sinha Hikim A P, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang X-H, Swerdloff R S. Spontaneous germ celi apoptosis in humans: evidence for ethnic differences in the susceptibility of germ cells to programmed celi death. *J Clin Endoc and Metab* 1998; 83: 152.
108. Sharpe R M: Regulation of spermatogenesis. in *The Physiology of Reproduction*. Edited by Knobil E, Neill J D. Raven Press. New York 1994 : 1364-1434.
109. Jefferson K P, Persad R A, Holly M P. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol*. 2000;86: 598-606.
110. Hsueh A J W, Eisenhauer K, Chun S, Hsu S, Billig H. Gonodal Celi Apoptosis. *Recent Progress in Hormone Research* 1996;51: 432-457.
111. Tapanainen J S, Tilly J L, Vihko K K, Hsueh A J W. Hormonal control of apoptotic celi death in the testis: gonadotropins and androgens as testicular celi survival factors. *Mol Endocrinol* 1993;7: 643-650.
112. Yin Y, Hawkins K L, Devvolf W C, Morgantaler A. Heat stres causes testicular germ celi apoptosis in adult mice. *J Androl*. 1997;18: 159-16.
113. Lin W W, Lamb D J, Lipshultz L I, Kim E D. Demonstration of testicular apoptosis in human male infertility states using a DNA laddering technique. *Int UrolNephro*. 1999;31(3): 361-370.
114. Blanco-Rodriguez J, Garcia Martinez C. Apoptosis partern elicited by several apoptogenic agents on the seminiferous epithelium of the adult rat testis. *JAndrol*. 1998;19:487-497.
115. Korsmeyer S J. Regulators of cell death. *Reviews* 1995;11: 101-105.
116. Baytop T. Therapy with medicinal plants in Turkey. 2nd. Edition, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, p:242.
117. Al Zuhair H, El Sayeh B, Amenn HA, et. al. Pharmacological studies of cardomom oil in animals. *Pharmacol Res* 1996;34 (1- 2): 79- 82.
118. Sapro B, Gupta S, Tiwary AK. Role of volatile oil pretreatment and skin cholesterol on permeation of ion-paired diclofenac sodium. *Indian J Exp Biol* 2000;38 (9): 895- 900.
119. Nair S, Nagar R, Gupta R. Antioxidant phenolics and flavonoids in common Indian foods. *J Assoc Physicians India*. 1998;46 (8): 708- 710.

120. Dhuley JN. Anti-oxidant effects of cinnamon bark and greater cardamom seeds in rats fed high fat diet. *Indian J Exp Biol* 1999; 37(3): 238–242.
121. Malti J. El, Mountasif D. , Amarouch H. : Antimicrobial activity of *Elettaria cardamomum*: Toxicity, biochemical and histological studies 2007.
122. Akgül A.: Baharat Bilimi & Teknolojisi. Birinci Baskı, Ankara, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 15, Ankara 1993: 91-93.
123. Al Bataina BA, Maslat AO, Al Kofahil MM. Element analysis and biological studies on ten oriental spices using XRF and Ames test. *J Trace Elem Med Biol* 2003; 17 (2): 85-90.
124. Özgülen H. İksir-i Şifa. Timaş Yyamları, İstanbul 1998 : 301-302.
125. Pamuk A. Şifalı Bitkiler Ansiklopedisi. Pamuk Yayıncılık ve Matbaacılık, İstanbul 1995 : 648.
126. http://www.geocities.com/ayurveda_bilgi/sayfa_3.html.
127. <http://www.ipekaldemir.com/champissage.htm>.
128. Ravindran, M.K.(Ed).Cardamom: the genus *Elettaria*. New York: Taylor and Francis.2002.
129. Marongiu B., Pıras A., Porcedda S.: Comparative Analysis of the Oil and Supercritical CO₂ Extract of *Elettaria cardamomum* (L.) Maton. 2004; 52: 6278-6282.
130. Anderson RA Jr, Willis BR, Oswald C, Zaneveld LJ. Male reproductive tract sensitivity to ethanol: a critical overview. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;18 1:305-10.
131. Suneetha WJ, Krishnakantha TP.: Cardamom extract as inhibitor of human platelet aggregation. *Phytother Res* 2005; 19(5): 437-440.
132. Van Thiel DH, Gavaler JS, Lester R, Goodman MD. Alcohol-induced testicular atrophy. An experimental model for hypogonadism occurring in chronic alcoholic men. *Gastroenterology.* 1975;69(2):326-32.
133. Van Thiel DH, Cobb CF, Herman GB, Perez HA, Estes L, Gavaler JS. An examination of various mechanisms for ethanol-induced testicular injury: studies utilizing the isolated perfused rat testes. *Endocrinology* 1981;109(6):2009-15.
134. Van Thiel DH. Ethanol: its adverse effects upon the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *J Lab Clin Med* 1983;101(1):21-33.
135. Rosenblum ER, Gavaler JS, Van Thiel DH. Lipid peroxidation: a mechanism for alcoholinduced testicular injury. *Free Radic Biol Med* 1989;7(5):569-77.
136. Anderson RA Jr, Willis BR, Oswald C. Spontaneous recovery from ethanol-induced male infertility. *Alcohol.* 1985;2(3):479-84.
137. Willis BR, Anderson RA Jr, Oswald C, Zaneveld LJ. Ethanol-induced male reproductive tract pathology as a function of ethanol dose and duration of exposure. *J Pharmacol Exp Ther* 1983;225(2):470-8.
138. Berryman SH, Anderson RA Jr, Weis J, Bartke A. Evaluation of the co-mutagenicity of ethanol and delta 9-tetrahydrocannabinol with Trenimon. *Mutat Res.* 1992;278(1):47-60.
139. Zhu Q, Van Thiel DH, Gavaler JS. Effects of ethanol on rat Sertoli cell function: studies in vitro and in vivo. *Alcohol Clin Exp Res* 1997;21(8):1409-17.

140. Gordon GG, Altman K, Southren AL, Rubin E, Lieber CS. Effect of alcohol (ethanol) administration on sex-hormone metabolism in normal men. *N Engl J Med* 1976; 7;295(15):793-7.
141. Giannessi F, Giambelluca MA, Grasso L, Scavuzzo MC, Ruffoli R. Curcumin protects Leydig cells of mice from damage induced by chronic alcohol administration. *Med Sci Monit* 2008; 14(11):237-42.
142. Kasdallah-Grissa A, Mornagui B, Aouani E, Hammami M, Gharbi N, Kamoun A, El-Fazaa S. Protective effect of resveratrol on ethanol-induced lipid peroxidation in rats. *Alcohol Alcohol* 2006;41(3):236-9.
143. Kurus M, Ugras M, Ates B, Otlu A Apricot ameliorates alcohol induced testicular damage in rat model. *Food Chem Toxicol* 2009; 47(10):2666-72.
144. Anderson RA Jr, Berryman SH, Phillips JF, Feathergill KA, Zaneveld LJ, Russell LD. Biochemical and structural evidence for ethanol-induced impairment of testicular development: apparent lack of Leydig cell involvement. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1989 ;100(1):62-85.
145. Weinberg J, Vogl AW. Effects of ethanol consumption on the morphology of the rat seminiferous epithelium. *J Androl* 1988;9(4):261-9.
146. Anderson RA Jr, Willis BR, Oswald C, Zaneveld LJ. Partial reversal of ethanol-induced male reproductive pathology following abstinence. *Alcohol Alcohol* 1985;20(3):273-86.
147. Anderson RA Jr, Phillips JF, Zaneveld LJ. Chronic ethanol ingestion during puberty alters the transient increase in testicular 5 alpha-reductase in the Swiss-Webster mouse. *J Androl.* 1989;10(1):28-36.
148. Seetharam YN, Sujeeth H, Jyothishwaran G, Barad A, Sharanabasappa G, Umareddy B, Vijaykumar MB, Patil SB. Antifertility effect of ethanolic extract of Amalakyadi churna in male albino mice. *Asian J Androl* 2003;5(3):247-50.
149. Van Thiel DH, Gavalier JS, Cobb CF, Sherins RJ, Lester R. Alcohol-induced testicular atrophy in the adult male rat. *Endocrinology* 1979;105(4):888-95.
150. Gavalier JS, Perez HA, Estes L, Van Thiel DH. Morphologic alterations of rat Leydig cells induced by ethanol. *Pharmacol Biochem Behav.* 1983;18 Suppl 1:341-7.
151. Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z., Ferencik, M.: Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 1999; 65, (18-19), 1865-1874.
152. Oyagbemi A.A., Adedara I.A., Saba A.B., Farombi, E.O. Role of oxidative stress in reproductive toxicity induced by co-administration of chloramphenicol and multivitamin-haematinics complex in rats. *Basic Clin. PharmacolToxicol* 2010; 107, 703-708.
153. Kehrer, JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23 (1): 21-48.
154. Priuska, E.M, Schacht, J. Formation of free radicals by gentamicin and iron and evidence for an iron/gentamicin complex. *Biochem Pharmacol* 1995; 50 (11): 1749- 1752.

155. Rosenblum ER, Gavaler JS, Van Thiel DH. Vitamin A at pharmacologic doses ameliorates the membrane lipid peroxidation injury and testicular atrophy that occurs with chronic alcohol feeding in rats. *Alcohol* 1987;22(3):241-9.
156. Schlorff EC, Husain K, Somani SM. Dose and time dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol* 1999;18(2-3):203-14.
157. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update* 2001;7:473-481.
158. Emanuele NV, Lapagli N, Steiner J, et al. Peripubertal Paternal Ethanol Exposure. *Endocrine* 2001; 14(2): 213-9.
159. Tyulina OV, Huentelman MJ, Prokopieva VD, Boldyrev AA, Johnson P. Does ethanol metabolism affect erythrocyte hemolysis. *Biochim Biophys Acta*. 2000; 1535: 69-77.
160. Bartke A Apoptosis of male germ cells, a generalized or a cell type-specific phenomenon. *Endocrinology*. 1995; 136:3-4.
161. Jena K.,Kumar Kar P.,Kausar,Babu Ch.S., Effects of temperature on modulation of oxidative stress and antioxidant defences in testes of tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta*. *Journal of Thermal Biology* 2013; S0306-4565(13)00023-5.
162. Halliwell B Antioxidant characterization. Methodology and mechanism. *Biochemical Pharmacology* 1995; 49(10), 1341-1348.
163. Abdel-Wahhab M, Aly S. Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. *Journal of Applied Toxicology* 2005; 25(3): 218-223.

9. ÖZGEÇMİŞ

12.02.1985 yılında Elazığ'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Elazığ'da tamamladım. 2005 yılında Elazığ Fırat Üniversitesi Biyoloji bölümünü kazandım ve 2009 yılında aynı fakülteden mezun oldum. 2009 yılında Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji programında yüksek lisans eğitimime başladım. 2010 yılından itibaren Fırat Üniversitesi Hastanesi Tüp Bebek Ünitesinde Androloji ve Embriyoloji laboratuvarında görev yapmaktayım.