



T.C.

**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKRİLAMİD UYGULANMIŞ GENÇ ERKEK RATLARDA
LYCIUM BARBARUM (KURT ÜZÜMÜ) EKSTRAKTININ
FERTİLİTEYE ETKİSİNİN IŞIK MİKROSKOPİK VE
BİYOKİMYASAL İNCELENMESİ**

Havva İmran ÖZDEMİR

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

AĞUSTOS 2017

BOLU



T.C.

**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AKRİLAMİD UYGULANMIŞ GENÇ ERKEK RATLARDA
LYCIUM BARBARUM (KURT ÜZÜMÜ) EKSTRAKTININ
FERTİLİTEYE ETKİSİNİN IŞIK MİKROSKOBİK VE
BİYOKİMYASAL İNCELENMESİ**

Havva İmran ÖZDEMİR

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Aysel KÜKNER**

AĞUSTOS 2017

BOLU

Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma jürimiz tarafından oy birliği/ oy çokluğu ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aysel KÜKNER
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Abant İzzet Baysal Üniversitesi

(imza)



Prof. Dr. Meryem ÇAM
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Düzce Üniversitesi

(imza)



Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Abant İzzet Baysal Üniversitesi

(imza)



Tarih: 24/08/2017

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Havva İmran ÖZDEMİR' in Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYAZ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

(imza)



ÖZET

AKRİLAMİD UYGULANMIŞ GENÇ ERKEK RATLARDA *LYCIUM BARBARUM* (KURT ÜZÜMÜ) EKSTRAKTININ FERTİLİTEYE ETKİSİNİN IŞIK MİKROSKOBİK VE BİYOKİMYASAL İNCELENMESİ

Bu çalışmada akrilamidin genç erkek ratların testis ve epididimis dokularındaki toksik etkileri ve bir antioksidan olan kurt üzümünün bu etkiye karşı koruyuculuğu ışık mikroskopik ve biyokimyasal olarak incelenmiştir.

24 adet Wistar albino rat her grupta 6 adet olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. 5 gün boyunca akrilamid grubuna (G1) distile suda çözünmüş 50 mg/kg akrilamid gavajla verildi. Akrilamid+ kurt üzümü grubuna (G2) akrilamid ve 200 mg/kg kurt üzümü ekstraktı gavajla verildi. Kontrol grubuna (G3) bir işlem uygulanmadı. Kurt üzümü grubuna (G4) kurt üzümü ekstraktı G2 gibi verildi.

Ratların deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları istatistiksel olarak kıyaslandığında G1 ve G2’de anlamlı bir fark saptandı. Sperm sayılarının G1 ve G2’de azaldığı ancak istatistiksel bir fark olmadığı bulundu. Tüm gruplarda sperm DNA bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi. Testis dokuları değerlendirildiğinde; G1’de, seminifer tübüllerin lümeninde belirgin hücre döküntüsü, vakuol oluşumu ve rezidual cisimcikler; G2’de vakuol oluşumu görüldü. Apoptotik spermatogonyumları belirlemek amacıyla yapılan TUNEL boyamasında G1 ve G2’de istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. Spermatogonyumların proliferasyonunu değerlendirmek için yapılan Ki 67 boyaması istatistiksel olarak değerlendirildiğinde G1 ile G2 arasında anlamlı bir fark saptandı. Grupların testis dokularındaki MDA, SOD, CAT düzeyleri istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı bir fark bulunmadı. Grupların testesteron düzeyleri istatistiksel olarak kıyaslandığında G1-G2 ve G1-G4 arasında anlamlı bir fark bulundu. Grupların FSH düzeyleri istatistiksel olarak kıyaslandığında G1 ve G3 arasında anlamlı bir fark bulundu. Grupların epididimislerinde yapısal değişim gözlenmedi.

Yüksek dozda akut süre ile akrilamid uygulamasının testis dokusunda hasara neden olduğu ve FSH ile testesteron seviyesini düşürdüğü, kurt üzümünün ise kısmen koruma sağladığı sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: akrilamid, fertilité, *Lycium barbarum*, testis.

ABSTRACT

LIGHT MICROSCOPIC AND BIOCHEMICAL EXAMINATION OF THE EFFECT OF *LYCIUM BARBARUM* (GOJI BERRY) EXTRACT ON FERTILITY OF ACRYLAMIDE TREATED YOUNG MALE RATS

In this study, we examined the toxic effects of acrylamide on testis and epididymis of young male rats and the protective effect of goji berry (an antioxidant) against to these toxic effects.

A total number of 24 Wistar albino male rats were categorized into 4 groups which are consist of 6 rats. During 5 days, acrylamide group (G1) was treated with 50 mg/kg acrylamide solved in distilled water via gavage. Acrylamide+goji berry group (G2) was treated with acrylamide and 200 mg/kg goji berry extract via gavage. Nothing was applied to control group (G3). Goji berry group (G4) was treated with 200 mg/kg goji berry extract via gavage.

When the body weights of animals, which were measured before the examination and after the examination, were compared statistically, significant declines were found in G1 and G2. There were no morfological changes in sperms of groups. Sperm DNA integrity had been protected in all groups, and there were no significant change in sperm numbers. When testis tissues were examined; vacuole structures were detected in the seminiferous tubules of G1 and G2 animals, cell debris and residual bodies were detected in the lumen of some seminiferous tubules in G1 animals. We evaluated TUNEL (+) (apoptotic) spermatogonia numbers statistically and there were significant increases in G1 and G2. When Ki67 (+) (proliferative) spermatogonia numbers were evaluated statistically, there was significant decrease in G1 compared to G2. The level of MDA, CAT, SOD in testis tissue were evaluated statistically, and there were no difference between 4 groups. When serum testosterone levels were evaluated statistically, significant declines were found in between G1-G2 and between G1-G4. We evaluated FSH levels in serum statistically, and we found a significant decrease in G1 compared to G3. There was no change in the structure of epididymis.

We concluded that high dose and acute application of acrylamide gives harm to testes and leads to decrease in FSH and testosterone, and goji berry provides a partial protection.

Keywords: acrylamide, fertility, *Lycium barbarum*, testis.



TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki öğrenimim süresince tez danışmanlığımı sürdüren ve bu süreçte bilgisini ve desteğini esirgemeyen kıymetli hocam Prof. Dr. Aysel KÜKNER'e ve eğitimim süresince kendisinden ders aldığım, bizimle tecrübelerini paylaşan sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT'a,

Kurt üzümü ekstraktı hazırlamamda yardımcı olan sevgili hocam Yrd. Doç. Dr. Fatma PEHLİVAN KARAKAŞ'a ve arkadaşım Bihter Gökçe BOZAT'a,

Tezimin deney aşamasında yanımda olan ve destek veren kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Ayhan ÇETİNKAYA'ya ve Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi ailesine,

Tez çalışmamda emeği olan ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım Uzm. Bio. Şeyda ÖZSOY KARABÖRK'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteğini hissettiğim, her türlü bilgisini ve tecrübesini benimle paylaşan sevgili Ph. D Sevilay ERİMŞAH'a,

Tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Gizem İLTER AKTAŞ, Esra FİDAN, Gizem SÖYLER ve diğer bölüm arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca varlıklarıyla huzur veren, her anımda yanımda olan ve her türlü desteği veren canım aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Havva İmran ÖZDEMİR

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. TESTİS ANATOMİSİ	4
2.2. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ	6
2.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ	7
2.3.1. Sertoli hücreleri.....	7
2.3.2. Spermatogonik hücreler.....	9
2.3.3. Spermatogenez.....	9
2.3.4. Matür spermin yapısı	11
2.3.5. İnterstisyel doku.....	13
2.4. EPİDİDİMİS ANATOMİSİ.....	14
2.5. EPİDİDİMİS EMBRİYOLOJİSİ	14
2.6. EPİDİDİMİS HİSTOLOJİSİ.....	15
2.7. İNFERTİLİTE	15
2.8. SERBEST RADİKALLER.....	16
2.8.1. Serbest radikallerin biyolojik kaynakları	17
2.8.2. Serbest radikallerin oluşumuna etki eden diğer faktörler	17
2.9. ANTİOKSİDANLAR	17
2.9.1. Antioksidan savunma mekanizmaları.....	18
2.10. ROS VE İNFERTİLİTE İLİŞKİSİ	19
2.10.1. Erkek üreme sisteminde ROS kaynakları	19
2.10.1.1. Endojen kaynaklar.....	19
2.10.1.2. Ekzojen kaynaklar	19

2.10.1.2. ROS ve sperm fizyolojisi	19
2.10.2. ROS' un patolojik rolü.....	19
2.11. AKRİLAMİD.....	20
2.11.1. Akrilamidin metabolizması.....	20
2.11.2. Akrilamidin nörotoksik etkisi	21
2.11.3. Akrilamidin genotoksik etkisi.....	21
2.11.4. Akrilamidin erkek üreme sistemine etkisi	21
2.12. <i>LYCIUM BARBARUM</i> (KURT ÜZÜMÜ)	22
2.12.1. Kimyasal bileşenleri	22
2.12.2. Metabolizmaya etkisi.....	23
2.12.3. Antioksidan etkisi	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. DENEY HAYVANLARININ TEMİNİ VE BAKIMI	24
3.2. <i>LYCIUM BARBARUM</i> (KURT ÜZÜMÜ) EKSTRAKTININ HAZIRLANIŞI	24
3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI.....	25
3.4. ÖRNEKLERİN ALINMASI.....	26
3.5. ÖRNEKLERİN İNCELENMEK ÜZERE HAZIRLANMASI.....	26
3.6 KESİTLERİN ALINMASI VE BOYANMASI	28
3.7. HEMOTOKSİLEN- EOZİN BOYAMA PROTOKOLÜ	28
3.8. PAS (PERIODIC ACID SCHIFF) BOYASININ HAZIRLANIŞI VE BOYAMA PROTOKOLÜ.....	29
3.8.1. Coeleman's Schiff hazırlanışı.....	29
3.8.2. Periyodik asit hazırlanışı.....	29
3.8.3. Boyama protokolü.....	29
3.9. MASSON TRİKROM BOYAMA PROTOKOLÜ.....	29
3.10. TUNEL BOYAMA PROTOKOLÜ	30
3.11. Ki 67 BOYAMA PROTOKOLÜ.....	31
3.12. ANİLİN MAVİSİ HAZIRLANIŞI VE BOYAMA PROTOKOLÜ	32
3.13. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	32
3.13.1. Histolojik değerlendirme	32
3.13.2. Morfolojik değerlendirme.....	32
3.13.2.1. Sperm sayımı.....	32

3.13.2.2. Spermatogonyum sayımı.....	32
3.13.3. İstatiksel değerlendirme	33
3.13.4. Biyokimyasal değerlendirme	33
3.13.4.1. Antioksidan analizi.....	33
3.13.4.1.1. MDA analizi	34
3.13.4.1.2. CAT analizi	34
3.13.4.1.3. SOD analizi	35
3.13.4.2. Hormon analizi.....	35
4. BULGULAR	36
4.1. VÜCUT AĞIRLIKLARI.....	36
4.2. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR	38
4.2.1. Sperm morfolojisi ve sayısı	38
4.2.2. Hematoksilen- Eozin, Masson Trikrom ve PAS boyamaları.....	42
4.2.2.1. Kontrol grubu	42
4.2.2.2. Akrilamid grubu	46
4.2.2.3. Akrilamid+Kurt Üzümü grubu.....	51
4.2.2.4. Kurt üzümü grubu	55
4.2.3. İmmunohistokimyasal bulgular	59
4.2.3.1. TUNEL boyaması	59
4.2.3.2. Ki67 boyaması	62
4.3. BİYOKİMYASAL BULGULAR.....	66
4.3.1. Antioksidan analizi	66
4.3.1.1. MDA analizi.....	66
4.3.1.2. CAT analizi	67
4.3.1.3. SOD analizi	68
4.3.2. Hormon analizleri	69
4.3.2.1. Testesteron analizi.....	69
4.3.2.2. FSH analizi.....	71
5. TARTIŞMA	73
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
6.1. SONUÇ	80
6.2. ÖNERİLER	81

7. KAYNAKLAR	82
8. EKLER.....	85
EK-1. ETİK KURUL ONAYI.....	86
EK-2. TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU	87
09. ÖZGEÇMİŞ.....	88



TABLÖLAR

Tablo 3.1. Doku takibi işlemleri.....	27
Tablo 4.1. Grupların vücut ağırlıklarının tanımlayıcı istatistik değerleri (gr).....	38
Tablo 4.2. Grupların sperm sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri ($\times 10^5$).	41
Tablo 4.3. Grupların TUNEL (+) spermatogonyum sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.....	62
Tablo 4.4. Grupların Ki67 (+) spermatogonyum sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.....	65
Tablo 4.5. Grupların MDA düzeylerinin tanımlayıcı istatistik değerleri (nmol).	67
Tablo 4.6. Grupların CAT düzeylerinin tanımlayıcı istatistik değerleri (u/l).	68
Tablo 4.7. Grupların SOD düzeylerinin tanımlayıcı istatistik değerleri (u/ml).	69
Tablo 4.8. Grupların testesteron düzeylerinin tanımlayıcı istatistik değerleri (ng/ml).	70
Tablo 4.9. Grupların FSH düzeylerinin tanımlayıcı istatistik değerleri (ng/ml).	71

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Erkek üreme sistemi. Junquiera ve Carneiro (24)'dan alınmıştır.	5
Şekil 2.2. Spermatogenez. Junquiera ve Carneiro (24)'dan alınmıştır.	11
Şekil 2.3. Sperm matürasyonu ve matür sperm yapısı. Junquiera ve Carneiro (24)'dan alınmıştır.	13
Şekil 3.1. Kurt üzümü ekstraktının hazırlanışı.....	25
Şekil 3.2. Kurt üzümü ekstraktı.	25
Şekil 3.3. Kauda epididimisin parçalanışı.....	28
Şekil 4.1. Akrilamid grubunun deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları.	36
Şekil 4.2. Akrilamid+Kurt üzümü grubunun deney öncesi ve deney sonrası ağırlıkları.	37
Şekil 4.3. Kurt üzümü grubunun deney öncesi ve deney sonrası ağırlıkları.....	37
Şekil 4.4. Akrilamid grubuna ait sperm yayması (20X).	39
Şekil 4.5. Akrilamid+Kurt Üzüümü grubuna ait sperm yayması (20X).....	39
Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait sperm yayması (20X).	40
Şekil 4.7. Kurt Üzüümü grubuna ait sperm yayması (20X).	40
Şekil 4.8. Grupların ortalama sperm sayısı.	41
Şekil 4.9. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki seminifer tübüller (10X).....	43
Şekil 4.10. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki seminifer tübüller (20X).	43
Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki seminifer tübüller (4X).	44
Şekil 4.12. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki epididimis kanalları (4X).	44
Şekil 4.13. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki epididimis kanalları (4X).	45
Şekil 4.14. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki epididimis kanalları (4X).	45
Şekil 4.15. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (10X).....	47
Şekil 4.16. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (10X).....	47
Şekil 4.17. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (10X).....	48
Şekil 4.18. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (20X).....	48
Şekil 4.19. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (10X).....	49
Şekil 4.20. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (10X).....	49
Şekil 4.21. Akrilamid grubuna ait epididimis kanalları (4X).	50
Şekil 4.22. Akrilamid grubuna ait epididimis kanalları (4X).	50
Şekil 4.23. Akrilamid grubuna ait epididimis kanalları (4X)	51

Şekil 4.24. Akrilamid+Kurt üzümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).	52
Şekil 4.25. Akrilamid+Kurt üzümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).	52
Şekil 4.26. Akrilamid+Kurt üzümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).	53
Şekil 4.27. Akrilamid+Kurt üzümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).	53
Şekil 4.28. Akrilamid+Kurt üzümü grubuna ait epididimis kanalları (4X).	54
Şekil 4.29. Akrilamid+Kurt Üzüümü grubuna ait epididimis kanalları (4X).	54
Şekil 4.30. Akrilamid+Kurt üzümü grubuna ait epididimis kanalları (4X).	55
Şekil 4.31. Kurt Üzüümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).	56
Şekil 4.32. Kurt Üzüümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).	56
Şekil 4.33. Kurt Üzüümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).	57
Şekil 4.34. Kurt Üzüümü grubuna ait epididimis kanalları (4X).	57
Şekil 4.35. Kurt Üzüümü grubuna ait epididimis kanalları (4X).	58
Şekil 4.36. Kurt Üzüümü grubuna ait epididimis kanalları (4X).	58
Şekil 4.37. Akrilamid grubuna ait TUNEL (+) boyanan spermatogonyumlar (10X).	59
Şekil 4.38. Akrilamid+Kurt Üzüümü grubuna ait TUNEL (+) boyanan spermatogonyumlar (10X).	60
Şekil 4.39. Kontrol grubuna ait TUNEL (+) boyanan spermatogonyumlar (10X). ..	60
Şekil 4.40. Kurt Üzüümü grubuna ait TUNEL (+) boyanan spermatogonyumlar (10X).	61
Şekil 4.41. Grupların ortalama TUNEL (+) spermatogonyum sayıları.	62
Şekil 4.42. Akrilamid grubuna ait Ki67 (+) spermatogonyumlar (20X).	63
Şekil 4.43. Akrilamid+Kurt üzümü grubuna ait Ki67 (+) spermatogonyumlar (20X).	63
Şekil 4.44. Kontrol grubuna ait Ki67 (+) spermatogonyumlar (20X).	64
Şekil 4.45. Kurt Üzüümü grubuna ait Ki67 (+) spermatogonyumlar (40X).	64
Şekil 4.46. Grupların ortalama Ki67 (+) spermatogonyum sayısı.	66
Şekil 4.47. Grupların ortalama testesteron düzeyleri.	70
Şekil 4.48. Grupların ortalama FSH düzeyleri.	72

SİMGELER ve KISALTMALAR

ABP: Androjen Bağlayıcı Protein

ACR: Akrilamid

AMH: Anti-Müllerian Hormone

ATP: Adenozin Trifosfat

CAT: Katalaz

CYP2E1: Sitokrom P450 2E1

DAB: 3,3'-diaminobenzidine

DNA: Deoksiribonükleik asit

ER: Endoplazmik Retikulum

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

GSH: Redükte Glutasyon

GSH-Px: Glutasyon Peroksidaz

H&E: Hematoksilen- Eozin

HRP: Horseradish Peroxidase

LH: Luteinleştirici Hormon

MDA: Malondialdehit

MIF: Müllerian İnhibe Edici Faktör

MIS: Müllerian İnhibitör Madde

PAS: Periodik Asit Schiff

PUFA: Polyunsaturated Fatty Acid

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

RNA: Ribonükleik asit

RNS: Reaktif Nitrojen Türleri

SCF: Kök Hücre Faktörü

SOD: Süperoksit Dismutaz

SOR: Serbest Oksijen Radikalleri

TBA: Tiyoarbütirik Asit

TDF: Testis Belirleyici Faktör

TdT: Terminal Deoxyribonucleodyl Transferase

TUNEL: Terminal Deoxyribonucleodyl Transferase dUTP Nick and Labeling



1. GİRİŞ

İnfertilite tanım olarak; 1 sene boyunca korunmasız bir şekilde birliktelik yaşandığı halde kadının gebe kalamamasıdır (1). Son zamanlarda yaygınlaşması sebebiyle 2010 yılında Dünya Sağlık Örgütü tarafından hastalık olarak kabul edilmiştir (2). İnfertilitenin sebeplerine bakıldığında erkek faktörünün büyük ölçüde etkili olduğu görülmektedir. Erkeklerin infertil olmasının altında yatan sebeplerden bazıları; varikosel, kriptorşidizm, enfeksiyonlar, lezyonlar, kistik fibrozis ve oksidatif stresir (3).

Akrilamid; reaktivitesi oldukça yüksek olan, suda çözünebilen bir vinil (hidrojen atomunun başka bir organik molekülle bağlanmasıyla elde edilen moleküller) monomer türüdür (4, 5, 6). Akrilamid monomerleri; kağıt üretimi, madencilik, su arıtma, polyester reçine üretimi ve yağ endüstrisi gibi pek çok sektörde kullanılmak üzere üretilen polimerlerin yapımında kullanılmaktadır (4). Ayrıca yapılan çalışmalar, ekmek ve patates gibi karbonhidrattan zengin besinlerin yüksek ısıyla muamele edilmesiyle oluşan reaksiyonlar sonucunda akrilamidin açığa çıktığını ortaya koymuştur (6). Besinlerden açığa çıkan akrilamid oksidatif strese neden olup beraberinde çeşitli türlerde kanser, nörolojik bozukluklar, ve infertilite gibi pek çok hastalığa neden olmaktadır (6, 7). Yapılan çalışmalar akrilamidin özellikle erkek üreme sistemine etki ettiğini, sperm morfolojisinde ve testis dokusunda birçok hasara yol açtığını göstermiştir (6).

Serbest oksijen radikalleri (SOR), besinlerin oksijen ile muamele edilerek, enerjiye dönüşümleri sırasında oluşan reaktif moleküllerdir. Metabolik olaylar esnasında oluşan serbest oksijen radikalleri, son derece reaktif olan ara ürünler oluşmasına neden olmaktadır. Aerobik (oksijenli solunum yapan) organizmalar radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin oluşturabilecekleri potansiyel zararlara engel olmak için antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir. Fakat, bazen bu antioksidan savunma sistemleri, radikallerin zararlı etkilerini tam olarak önleyememektedir ve bu durum oksidatif stres olarak adlandırılmaktadır. UV ışınları, ilaçlar, radyasyon, stres, sigara, alkol ve biyokimyasal redoks reaksiyonları gibi pek çok etken SOR oluşuna neden olmaktadır (8, 9). Lidipler, proteinler, nükleik asitler ve tüm hücrel bileşenler oksidatif stresin potansiyel hedefleridir. Oksidatif stresin yol açtığı hasar maruz kalınan reaktif türlerinin miktarına, ne kadar

süre maruz kaldığına, ısıya, oksijen gerilimine ve çevresel faktörlere (iyonlar, proteinler, antioksidanlar vb.) bağlıdır (3).

SOR türlerinin az bir kısmı sperm hücrelerinin fertilite yeteneği kazanmasında ve akrozom reaksiyonu, hiperaktivasyonu, hareketi, kapasitasyonu gibi birtakım fonksiyonlarının gerçekleşmesinde rol oynamaktadır (10-13). SOR'dan oluşan nitrik oksit ve süperoksit anyonun spermin kapasitasyonuna, akrozom reaksiyonuna, hareketliliğine ve yumurtayı dölleme yeteneğine zararlı bir etkisinin olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (14).

Çoklu doymamış yağ asitleri (PUFA); ikiden fazla çift bağlı karbon içeren, spermin plazma membranında bulunan ve serbest radikallere karşı oldukça duyarlı bir makro moleküldür. SOR, PUFA ile lipid peroksidasyonu denenen kimyasal bir reaksiyona neden olmaktadır. Lipid peroksidasyonunun yan ürünlerinden biri malondialdehittir (MDA) (8). Değerlendirmelere bakıldığında, sperm fonksiyon bozukluğu, spermin hareketliliği ve sperm-oosit füzyon kapasitesiyle MDA seviyesi arasında negatif bir korelasyon olduğu görülmektedir (15, 16). Ancak bu ilişkinin nedeni tam olarak açıklanamamıştır. SOR, DNA'da bulunan bazlarda bazı modifikasyonlara yol açarak spermin DNA'sına zarar vermektedir (17). Oksidatif stres DNA'nın tek bir sarmalında veya iki sarmalında da kırılmalara yol açmaktadır. (17, 18). Bunlara ek olarak SOR nokta mutasyonu ve polimorfizm gibi ejakulat kalitesini düşüren mutasyonlara yol açmakta (3) ayrıca DNA'nın denature olmasında ve baz çiftlerinin oksidasyonunda etkili olabilmektedir (19). SOR mitokondrinin iç ve dış membranlarına zarar verip sitokrom c proteinlerini uyararak kaspazları aktive edip apoptoza yol açmaktadır. Erkek faktörünün etkili olduğu infertilite problemlerinde kaspaz 9 ve kaspaz 3'ün aktif olduğu görülmüştür (3). DNA'daki hasar az olduğunda sperm hücreleri kendi kendilerine tamir edebilmektedirler (20). Ayrıca oosit hücreleri de sperm hücrelerindeki hasarlı DNA'yı tamir edebilmektedir (3).

Önceden de belirtildiği gibi biyolojik sistemler, oksidatif stresin yol açtığı zararları telafi etmek amacıyla antioksidan savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Bu mekanizmalar enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalar olmak üzere iki gruptur. Enzimatik mekanizmalar; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutathion bağlı enzimler (Glutathion S transferaz (GSH), glutathion redüktaz (GS), glutathion peroksidaz (GPx)) gibi serbest radikalleri uzaklaştıran enzimlerden

oluşmaktadır. Enzimatik olmayan mekanizmalar ise biyolojik sistemlerde bulunan endojen bileşiklerin ve E vitamini, C vitamini, flavonoidler gibi dışarıdan alınan egzojen bileşiklerin SOR ile etkileşimleridir. (E vitamini, C vitamini, flavonoidler vb) (21).

Günümüzde vitamin ve mineral içeriği bakımından zengin olan biręok bitki antioksidan olarak kullanılmaktadır. Halk arasında kurt üzümü olarak bilinen ve ęok eski zamanlardan beri Çin tıbbında bitkisel bir tedavi seğeneği olarak kullanılan latince adıyla *Lycium Barbarum* bu bitkilerden biridir (9). *Lycium Barbarum* içeriğindeki A vitamini, C vitamini, B2 vitamini, selenyum, kalsiyum, demir, protein ve zengin lif yapısıyla oldukęa iyi bir antioksidan özellik göstermektedir. Diyabet, anksiyete, stres, kolestrol, hipertansiyon, enfeksiyonlar, soğuk algınlığı gibi pek ęok rahatsızlığın bitkisel tedavisinde kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak, erkek üreme sisteminde fertiliteye olan olumlu etkileriyle bilinmektedir (9, 22).

Bu ęalıřmada 2-3 aylık erkek ratlarda akrilamide bağlı testis ve epididimis dokusundaki akut dönem değişikliklere *Lycium Barbarum* bitki ekstraktının koruyucu etkisinin ışık mikroskopik ve biyokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu alanda yapılan ęalıřmalar literatürde oldukęa sınırlıdır. Elde edilecek olası olumlu sonuçlar, infertilite tedavisinde yeni yaklaşımları ortaya ęıkaracaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis Anatomisi

Erkek üreme sistemi; bir çift testis, epididimis, vas deferens, ejakülatuar kanal ve erkek üretrasından oluşan genital kanallar sisteminden, yardımcı bezlerden ve penisten oluşmaktadır (Şekil 2.1) (23, 24).

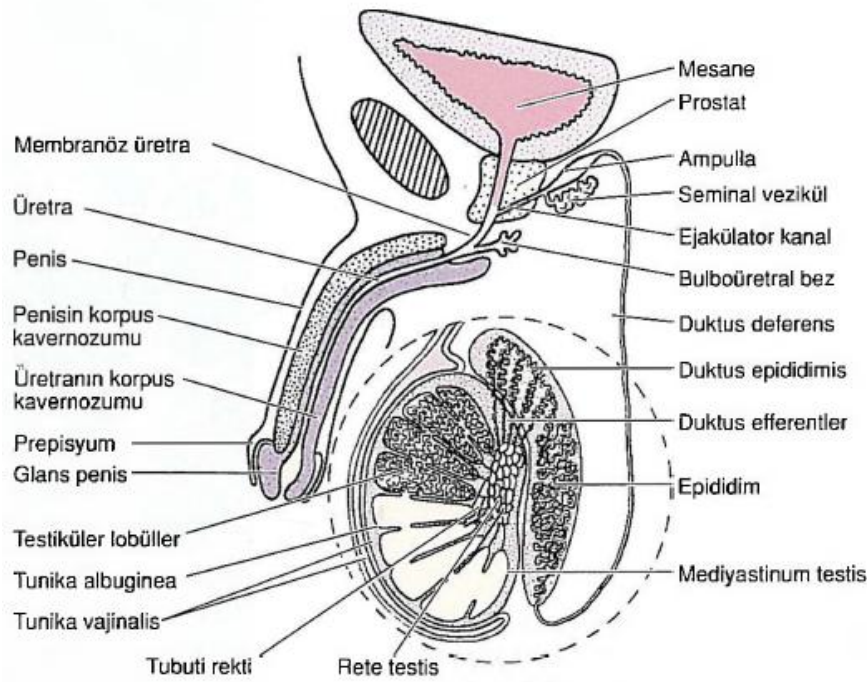
Testisler, erkek eşey hücresi olan sperm üretiminden sorumludurlar. Buna ek olarak, bünyesindeki endokrin hücreler testesteron hormonu salgılayarak üreme sisteminin fizyolojik gelişiminde rol almaktadır (23). Genital kanallar ve yardımcı bezler, sperm aktivitesi için önemli olan salgıların üretiminden, spermilerin dışarıya atılmasından ve beslenmesinden sorumludur. Sperm hücreleri ve yardımcı bezlerin salgıları semeni oluşturmaktadır (23).

Testisler skrotum içine yerleşmiş, oval şekilli yaklaşık 4 cm uzunluğa 2,5 cm genişliğe sahip olan ve anterioposterior olarak 3 cm çapında olan spermiyum salgılayan bir çift bezdir. Ağırlığı 25-30 gr kadardır (25). Erişkin testislerin arka yüzleri epididimis ile ilişkilidir. Testis ve epididimis skrotumun içinde vas deferens, spermatik arter, venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordonla asılı durumdadır (26). Testislerin bu yerleşimleri normal vücut ısısından 2 °C-3°C daha düşük bir sıcaklıkta olmalarını sağlar. Sıcakkanlı canlılarda spermatogenez için gerekli olan moleküler reaksiyonlar vücut sıcaklığı olan 37°C’ de gerçekleşmez. Bu işlemlerin gerçekleşmesi ancak sıcaklığın 34°C olması ile mümkündür. Testislerin skrotumda yerleşik olmasının nedeni budur. Testislerden gelen serin kanı içeren pampiniform venöz pleksus her bir testistiküler arteri sarmıştır. Kan akış yönlerinin zıt olması nedeniyle bu venöz pleksus arterdeki kandan ısı çeker. Skrotumdan buharlaşan ter de ısı kaybına katkı sağlar. Böylelikle testis sıcaklığı kontrol altında tutulmaktadır (23).

Erken fetal dönemde, testisler peritonun arkasında abdominal boşlukta yer alırlar. Doğumdan önce seröz, müsküler ve fibröz tabakalardan köken alan yapılarla çevrelenip, skrotumdaki yerlerini alırlar. Testisi çevreleyen yapılar: skrotum, interkolumnar veya eksternal spermatik fasya, kremasterik fasya, infundibulum veya internal spermatik fasya, tunika vajinalis ve tunika albugeniadır (23, 25). Skrotum, deri ve dartos adlı iki tabakadan oluşur. Skrotumun derisi çok ince kahverengi ve

kıvrımlıdır. Dartos, düz kas dokusu içeren, ince, gevşek ve damarlı bir dokudur. Dartos skrotumun çevresinden tabanına doğru inerek testislerin yerleştiği boşluklu bir yapı olan septum skrotiyi oluşturur. İnterkolomnar veya eksternal spermik fasya ince bir zar şeklindedir. Kremasterik fasya, kremaster kası olarak adlandırılan kas lifleri demetlerinden oluşur. İfundibulum fasya, ince zarsı spermatik kordu saran bir yapıdır. Infundibulum fasya bütün testis ve epididim dokusunu çevreler ve tunika vajinalis ile birleşiktir (25).

Testisler, tunika vajinalis ve tunika albugenia olmak üzere iki kılıf ile örtülüdür. Tunika vajinalis testis ve epididimisi saran seröz bir kesedir. Bu kese fetal dönemde testisler abdomenden skrotuma geçerken peritondan gelişir. Tunika vajinalis dıştan skrotumu döşeyen pariyetal tabaka ile tunika albugeniayı testisin önden ve yandan saran iç viseral tabakadan oluşur (23). Kremaster kas liflerine kadar uzanır. Tunika albugenia testisi saran fibröz bir bağ dokusudur. Testis epididimise tutunan kısımları ve spermatik damarların posterior kenarlardan organa girdiği yerler hariç tunika vajinalis ile sarılıdır (25, 26).



Şekil 2.1. Erkek üreme sistemi. Junquiera ve Carneiro (24)'dan alınmıştır.

2.2. Testis Embriyolojisi

Erkek ve dişi gonadların gelişimi 7. haftadan itibaren başlamaktadır. Testis dokusu primordial germ hücrelerinden, mezodermal epitelden, ve embriyonik bağ dokusundan köken almaktadır (27).

Gelişimin 5. haftasında, mezonefrozun medialinde, mezotelde kalınlaşma gözlenir. Bu mezotel ve altındaki bağ doku proliferatif olarak, mezonefrozun orta noktasında genital kabartı oluşturur. Primordial germ hücreleri yolk kesesinde oluşup genital kabartılara göç ederler. Bu göç genital kabartılardaki hücrelerinin proliferatif olup primer seks kordonlarının oluşumunu indükler. Parmak şeklindeki primer seks kordonları, altındaki bağ dokusuna doğru büyüyerek dışta korteks ve içte medulladan oluşan bir gonad halini alır. Gonadın oluşturacağı doku çeşidi, embriyonun seks kromozomlarına bağlıdır. Gelişmekte olan embriyo eğer XX kromozomlarına sahipse farklılaşmak üzere olan gonadın korteksi ovaryuma farklanır, medullası geriler. Eğer embriyo XY kromozomlarına sahipse, medulla testise farklanır ve korteks dejenere olup birtakım kalıntılar bırakır. Y kromozomu üzerinde SRY geni taşımaktadır. SRY geni testiküler farklılaşmayı sağlayan testis belirleyici faktör (TDF) için gereklidir. TDF, primer seks kordonlarını uyararak farklılaşmamış gonadın medullasına doğru uzamasına yol açar. Daha sonra kordonlar dallanır, anastomoz yaparak rete testisi oluşturur. Tunika albugenianın gelişmesiyle birlikte seks kordonları (seminifer tübül kordonları) yüzey epiteli ile ilişkisini keser. Testis genişledikçe dejenere olan mezonefrozla bağlantısını koparır ve kendi mezenter dokusu olan mesorchium ile asılı durmaya başlar. Gelişim devam ettikçe seks kordonları (seminifer kordonlar) seminifer tübüllere, tubuli rektive ve rete testise farklılaşırlar. Mezenşim (embriyonik bağ dokusu) Leydig hücrelerini ve miyoid hücreleri oluşturur. Seminifer tübüller mezenşimden ayrılır. Leydig hücreleri 8. haftadan itibaren testesteron ve androstenodion salgılamaya başlar. Bu hormonlar erkek dış genitalinin gelişimde önemlidir. Fetal Sertoli hücrelerinden AMH salgılanmaktadır. Bu hormon puberteye kadar salgılanır daha sonra seviyesi düşer. AMH Müller kanalının gelişimini baskılamaktadır. Seminifer tübüllerin puberteye kadar lümenleri gelişmez, pubertenin başlamasıyla birlikte lümen gelişimi de başlar. Daha sonra olgun sperm hücresi üretecek olan seminifer tübüllerin duvarına ait spermatogonyumlar ise primordiyal germ hücrelerinin gonadlara göç edip

çoğalmasıyla oluşmaktadır (27, 28). Testisler, karın boşluğunun posterior kısmında gelişirler ve gebeliğin 26. Haftasında skrotuma inerler (28).

2.3. Testis Histolojisi

Testisler oldukça sıkı bir bağ dokusu kapsülü olan tunika albugenia ile çevrilidir (23, 28). Tunika albugenia, tunika fibroza ve tunika vaskulosa olmak üzere iki tabakadan oluşur. Tunika fibroza daha kalın yapıdadır ve damarlanması azdır. Tunika vaskulosa ise birçok küçük kan damarı içermektedir. Tunika vaskulosa testisi çevreler, posterior kenarlarında üçgen şekilli çıkıntılar oluşturur. Bu çıkıntılar testisin inferioruna kadar uzanıp bütünlüğünü kaybederek mediastinum denilen vertikal septumları oluşturur. Mediastinumdan uzanan bağ dokusu septumları dokuyu 250-300 adet lobçuğa böler. Lobçuklar 1 ile 4 arası seminifer tübül içerir. Mediastinum kan damarlarının, lenfatiklerin ve testis dokusunun kanallarının giriş çıkış bölgesidir (25, 26). Testisin her bir lobülü gevşek bağ dokusuyla birlikte sayıları 1-4 arası değişen seminifer tübüllerden ve testesteron salgılayan Leydig (interstisyel) hücrelerinden oluşur (23, 28). Lobüllerin içindeki seminifer tübüller halka yaparlar ve uzun olmalarından dolayı oldukça kıvrımlıdır. Halkaların uçları mediastiuma doğru kısalır ve düzleşir. Seminifer tübüllerin bu bölümüne düz tübül (tubulus rektus) denmektedir. Düz tübüller mediastinumda anastomozlaşarak kanallar sistemi olan rete testis ile devam ederler (28). Seminifer tübüller yaklaşık 150-250 µm çapa ve 50 cm uzunluğa sahiptirler. Tübüller lamina propria tarafından kuşatılan seminifer epitelden meydana gelmektedir. Lamina proprianın en iç tabakasında düz kas hücreleri gibi çalışan yassılaştırmış miyoid hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler tübüllerin kasılmasını sağlayarak sperm hücrelerinin ve testistiküler sıvının boşaltılmasına yardım ederler. Seminifer epitel, sertoli hücreleri ve spermatogenik hücreler olmak üzere 2 temel hücre çeşidinden oluşan kompleks ve çok katlı bir epitelidir (23, 26, 28).

2.3.1. Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri (Sustentaküler hücreler) ergenliğe kadar seminifer epitelin baskın hücre tipidir. Ergenlikten sonra ise tübüllerini oluşturan hücrelerin yaklaşık % 10'unu oluşturmaktadır. İlerleyen yaşlarda ise spermatogenik hücreler azaldığında tekrar sertoli hücreleri epitelin baskın hücre tipi olurlar (26).

Sertoli hücreleri uzun, prizmatik ya da piramidal, erişkinde amitotik ve seminifer tübülün bazal laminaına oturan hücrelerdir (23, 28). Sperm oluşumu sırasında hücreleri hem fiziksel olarak hem de metabolik olarak destekler. Sertoli hücrelerinin yapısı incelendiğinde belirgin granülsüz endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş golgi aygıtı, çok sayıda mitokondri ve lizozom, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum içerdiği görülmektedir (23). Sertoli hücrelerinde diğer aktif hücrelerde olduğu gibi ökromatik çekirdek bulunur. Çekirdek bir ya da birkaç iç katlantıya sahip, oval ya da üçgen şekilli olabilir. Sertoli hücrelerinin bazı çeşitlerinde RNA ve DNA içeren cisimcikler tarafından yanlardan kuşatılan, 3 parçalı karyozom adı verilen çekirdekçik bulunmaktadır. İnsandaki Sertoli hücrelerinin bazal sitoplazmasında karakteristik olarak ince fuziform kristalloidler olan inklüzyon cisimcikleri (Charcot-Böttcher) bulunmaktadır. Bu cisimciklerin lipid transportunda ve lipidin sertoli hücreleri tarafından kullanımında görev aldığı düşünülmektedir (28).

Sertoli hücrelerinin bazolateral bölgelerinde bulunan sıkı bağlantı kompleksleri kan testis bariyerini oluşturmaktadır (23, 26). Bu bariyer gelişmekte olan spermatidleri ve spermatositleri otoimmün reaksiyonlardan korur. Buna ek olarak, kan testis bariyeri seminifer epiteli bazal ve adluminal olmak üzere kompartmanlara böler (26).

Sertoli hücrelerinin başlıca görevleri; gelişim döneminde olan spermatogonik hücreleri korumak, beslemek ve desteklemek, spermatogenez sonrasında spermatidlerden arta kalan rezidual cisimcikleri fagosit etmek, olgun spermatidlerin aktin aracılıklı kasılmalarla seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak, tübül lümenine iyonlardan ve proteinlerden zengin sıvı salgılamak, hipofizden salgılanan FSH ile uyarılarak androjen bağlayıcı proteinlerin (ABP) üretimini ve sekresyonunu düzenlemek, inhibin ve aktivin altünitelerini salgılamaktır. İnhibinin gonadotropin salgılayıcı faktör ve FSH salınımı üzerinde negatif feedback etkisi vardır. Aktivinin ise FSH salınımı üzerinde negatif feedback etkisi vardır (26). Sertoli hücreleri plazminojeni aktif plazmine dönüştüren plazminojen aktivatör, seruloplazmin ve transferin sentezler. Bunlara ek olarak müllerian-inhibe edici faktör (MIF), kök hücre faktörü (SCF), ve gliyal hücre kaynaklı nörotropik faktör gibi glikoproteinler de salgılamaktadır (28).

2.3.2. Spermatogonik hücreler

Spermatogonik hücreler olgun sperme dönüşen hücrelerdir. Embriyonik dönemde vitellüs kesesinden köken alıp gonadal kabartılarda toplanan primordial germ hücrelerinden farklılaşırlar (28).

Spermatogonyumlar; bazal laminanın üzerinde yer alan, bazal laminayla doğrudan ilişkili, diploid olgunlaşmamış spermatogenik hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin arasındaki zonula okludens bağlantıların arkasında yer almaktadırlar (26, 28). Kök hücre olarak işlev görürler ve fertilite üzerinde önemli etkileri mevcuttur (26).

İnsanda bulunan spermatogonyumlar 3 çeşittir. Tip A koyu (Ad) spermatogonyumlar; granüllü kromatinlerinden dolayı yoğun bazofilik boyanan, oval çekirdekli, seminifer epitelin kök hücreleridir. Bölünerek Tip A hücrelerini oluştururlar. Tip A açık (Ap) spermatogonyumlar; açık renkte boyanan granüllü kromatinli oval çekirdeğe sahiptirler. Ap spermatogonyumlar birkaç bölünmeden sonra Tip B spermatogonyumlara dönüşürler. Tip B spermatogonyumlar; kümeler halinde yoğunlaşmış kromatin bulunduran yuvarlak çekirdekli hücrelerdir. Bölünüp primer spermatositleri oluştururlar (28).

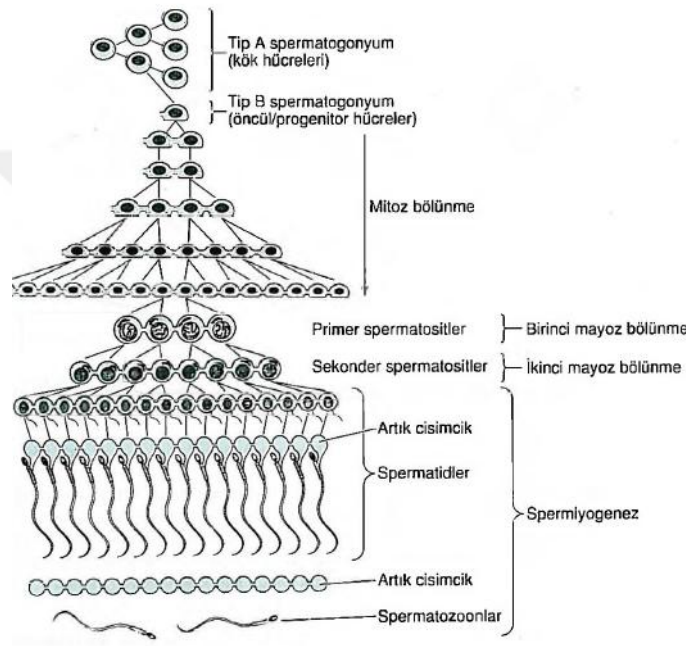
Spermatositler; Tip B spermatogonyumlar profaz 1'e girdiklerinde primer spermatosit adını alırlar. Spermatogonyumlardan iki kat daha fazla DNA içerirler. Primer spermatosit 1. mayozu tamamlayarak 2 adet sekonder spermatositi oluşturur. Her bir sekonder spermatosit olgun sperm hücresi oluşturmak üzere 2 adet haploid spermatid oluştururlar. Spermatidler spermiyogenez denen farklılaşma sürecine girerek olgun sperm hücrelerini oluştururlar (28).

2.3.3. Spermatogenez

Ergenlik dönemine girilmesiyle birlikte hipofiz bezinden salgılanan gonadotropin hormonların seviyesinde artış olmaktadır. Bu artış spermatogonyum hücrelerini tetikleyerek olgun sperm hücrelerinin üretimini başlatır. Bu olaya spermatogenez denmektedir. Spermatogenez gelişme evresindeki spermatogonyumların şeklindeki farklılıklara ve çekirdeklerin boyanma şekline göre 3 ayrı evreye ayrılmaktadır. Bu evreler sırasıyla; spermatogonyal evre, spermatosit evresi ve spermatid evresidir (23, 28).

Spermatogonyum kök hücrelerin mitozla çoğalarak yeni hücreler oluşturduğu ve primer spermatositlere farklanacak olan hücreleri sayıca arttırdığı evre spermatogonyal evredir. Tip B spermatogonyumların mitozla bölünmesi sonucu primer spermatositler oluşur. Spermatosit evresinde primer spermatositler mayoz I geçirir ve sekonder spermatositleri oluşturur. Sekonder spermatositler mayoz II'yi tamamlar. Bölünme tamamlandıktan sonra, her bir sekonder spermatositten 2 tane haploid (23 kromozomlu) spermatid oluşur. Spermatidler olgun sperm hücresi olan spermiyum (spermatozoon) oluşturmak üzere spermatid evresine girerler (Şekil 2.2). Bu evrede bölünme gerçekleşmez. Spermatidler birtakım morfolojik değişimler geçirerek yeniden şekillenirler. Bu yeniden şekillenme 4 fazda gerçekleşmektedir. Spermatidler ilk olarak golgi fazına girmektedir. Bu fazda spermatid hücrelerinin golgi aygıtlarında proakrozomal denilen PAS (+) granüller birikmektedir. Bu granüller spermin ön kutbunu belirleyen akrozomal vezikül denen yapıyı oluşturmaktadır. Süreç boyunca akrozomal veziküllerin hem içeriği hem de hacmi artar. Sperm kuyruğunun aksonem yapısını oluşturan mikrotübüllerin sentriyoller tarafından bir araya getirilmesi bu fazda başlar. Bunu takiben akrozomal vezikül spermatid çekirdeğinin ön yüzünün yarısına yayılarak şekillenir (28). Oluşan bu yapıya akrozomal kep bu evreye kep fazı denmektedir. Bu faz tamamlandıktan sonra spermatidler akrozom fazına girerler. Akrozom; hiyolürodinaz ve akrosin gibi hidrolitik enzimleri içeren, bu hücrelere özgü bir lizozom tipidir. Bu enzimler, oositleri çevreleyen korona radyata hücrelerini ayırıp, zona pellusidayı geçmek için (akrozom reaksiyonu) gerekmektedir. Bu fazda flagellumlar gelişir, spermatidler Sertoli hücreleri arasına yerleşirler. Sitoplazmik mikrotübüller akrozomun üzerinde bulunan bir kılıf olan manşeti oluşturmak üzere şekillenirler. Manşet, sitoplazmik fazlalıkların boyun kısmında yer almasını ve sperm başının şekillenmesini sağlar. Golgi fazında flagellum gelişimini başlatan sentriyoller bu fazda sperm hücrelerinin boyun bölgesini oluşturmak üzere şekil değiştirirler. Boyun bölgesi sentriyollerden gelişen kalın fibrillerin ve aksonemin mikrotübüllerinin uç noktasında yerleşik olan fibrillerin kuyruğa doğru ulaştığı, çekirdek ile flagellumun birleştiği yerdir. Mitokondriler, boyun bölgesindeki fibrillerin etrafında, heliks biçimli bir kılıf oluştururlar. Bu bölge spermin orta parçasıdır. Orta parçanın distal kısmında, 2 sütundan ve birçok bağlantı kuşağından oluşan fibröz bir kılıf bulunmaktadır. Bu kılıf esas parçayı sarar ve flagellum boyunca uzanır. Fibröz kılıfın distalinde kalan

kısım ise son parçayı oluşturur. Akrozom fazından sonra spermatidler olgunlaşma fazına girerler. Bu fazda flagellanın etrafında bulunan fazla sitoplazma azalır. Olgun sperm hücresi olan spermiyum oluşur. Bu evre sonunda rezidual cisimcik olarak adlandırılan sitoplazma artıkları Sertoli hücreleri tarafından fagosit edilir. Spermatogenez boyunca Sertoli hücrelerine bağlantı kompleksleriyle bağlı olan sperm hücreleri spermiyasyon adı verilen süreçle ortadan kalkar ve olgun sperm hücreleri seminifer tübülleri lümenine doğru salınırlar (23, 28).



Şekil 2.2. Spermatogenez. Junquiera ve Carneiro (24)'dan alınmıştır.

2.3.4. Matür spermin yapısı

Matür insan spermi, yaklaşık olarak 60 µm uzunluktadır. Baş kısmı sivri ve yassıdır. Baş kısmında bulunan akrozomal kep tripsin benzeri proteazlar olan hyalurodinaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin enzimleri içermektedir. Bu enzimler döllenme sürecinde oositin zona pellusidasını eritmek için gerekmektedir. Spermin zona pellusidaya temas etmesiyle bu enzimler salınır. Bu olaya akrozom reaksiyonu denmektedir (28).

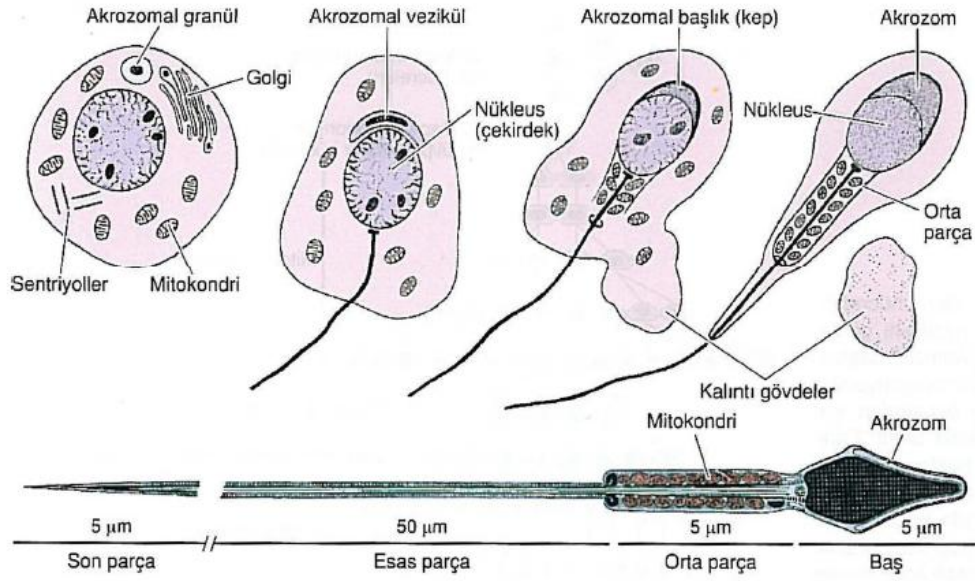
Sperm kuyruğu boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 4 parçadan oluşmaktadır. Boyun bölümü, sentriyolleri ve kalın fiberlerin başlangıç kısmını içerir. Orta parçada kalın fiberlerin ve aksonemal yapının etrafını sarmal şeklinde kuşatan mitokondriyonlar bulunmaktadır. Mitokondriyonlar sperm

hücrelerine gereken enerjiyi sağlamakla y k ml d rl r. Esas parça, kuyruğun en uzun kısmıdır. Kalın fibrilleri ve aksonemal yapının etrafını saran bağ dokusunu içerir. Son parça, kuyruğun yalnızca aksonem kompleksini içermektedir ( ekil 3.3) (28).

Sertoli hücrelerinden salgılanan bir miktar sıvı ile birlikte sperm hücreleri hareketsiz olarak seminifer tübüllerden salınırlar. Sperm hücreleri ilk önce düz tübüllere geçerler oradan da rete testise geçerler. Rete testisten boşaltım kanal sisteminin ilk parçası olan duktuli efferentese oradan da duktus epididimise geçerler (28).

Spermiumlar epididimisin kanallarında ilerlerken değişikliklere uğarlar. Çekirdek DNA' sı yoğunlaşır, sperm hücrelerinin ba ı küçülür. Sitoplazma azalır, sperm hücreleri daha ince olur. Plazma zarının lipidlerinde ve proteinlerinde glikolizasyon, akrozom membranında kapasitasyon olur ve fertilizasyonu inhibe den yüzey ilişkili dekapasitasyon faktörü eklenir. Hücrelerin duktus epididimisten ge i i sırasında hareket kazanmaları intraselüler siklik adenozin monofosfat (cAMP), kalsiyum iyonları ve pH ile ilgili düzey değişimleridir. Bu mekanizma, flagellar hareketi protein kinazların ve protein fosfatazların aktivasyonu sonucunda ortaya çıkan protein fosforilasyonundaki değişimler üzerinden düzenlenir (28).

Spermiumlar, boşaltım kanalları sisteminde birkaç hafta canlı kalır, fakat di i üreme kanalında yalnızca 2-3 gün canlı kalabilmektedir. Dişi  reme kanallarında belli bir süre sonra oositi dölleme yeteneği kazanabilmektedir. Bu süreçte sperm hücrelerinin membranındaki glikokaliks bileşenleri uzaklaştırılır ve yenisi üretilir. Bu olaya kapasitasyon denir. Kapasitasyon spermiumların zona pellusida reseptörlerine bağlanma affinitesini arttırmaktadır. Kapasitasyon sonucunda, spermiumlar aktif hale gelmektedir. Kapasitasyonun başarısı spermiumların hiperaktivitesi ile ilişkilendirilmektedir (28).



Şekil 2.3. Sperm matürasyonu ve matür sperm yapısı. Junquiera ve Carneiro (24)'dan alınmıştır.

2.3.5. İnterstisyel doku

Testisin seminifer tübülleri arasındaki dokuya interstisyel doku denir. Bu doku fibroblastlardan, lenf damarlarından, kapillerlerden ve interstisyel hücre de denilen leydig hücrelerinden oluşmaktadır (23).

Leydig hücreleri, sitoplazması eozinofilik boyanan, tipik yağ damlacıkları içeren büyük, yuvarlak veya poligonal hücrelerdir. Leydig hücreleri belirgin miktarda granülsüz endoplazmik retikulum içermektedir. Ayrıca bu hücrelerde lipofuksin pigmenti içeren ve çubuk şeklindeki sitoplazmik kristaller olan Reinke kristalleri bulunmaktadır. Leydig hücreleri hipofizden salgılanan LH etkisi ile steroid bir hormon olan testosteronu üretirler. Embriyonik gelişimde plasentadan salgılanan bu hormon gonadların gelişimi için önemlidir. Ergenlik döneminde ise sperm üretiminin başlamasında, yardımcı bezlerin salgı üretiminde ve sekonder cinsiyet özelliklerinin oluşumunda rol oynar. Yetişkinlikte ise sekonder cinsiyet özelliklerinin devamlılığında, bezlerin ve boşaltım kanallarının işlevlerini sürdürmesinde görev almaktadır (23, 28).

2.4. Epididimis Anatomisi

Epididimis, testisin dış arka sınırında bulunan; uzun, dar ve basık gövdeli; dışa ve arkaya doğru kıvrılan bir organdır. Epididimis korpus epididimis denilen gövde kısmı, kaput epididimis denilen baş kısmı ve kauda epididimis denilen kuyruk kısmı olmak üzere 3 kısımdan oluşmaktadır (25).

Kaput epididimis içeriye doğru kıvrılan yapısıyla ve duktus efferentesin aracılığı ile testisin üst kısmıyla bağlantı kurmaktadır. Kauda epididimis ise tunika vajinalis ile birleşiktir. Epididimisin kaudası; yukarıya ve geriye doğru bükülerek seminal kanala doğru uzanırlar. Epididimisin dış yüzü, üst ve alt kenarları serbest yüzeylerdir ve seröz bir membran ile çevrelenmiştir. Seröz membran, *digital fossa* veya epididim sinüsü denilen testisin dış yüzeyinin posteriorunda bulunan bir kese ve epididimisin iç kısımları hariç bütün epididimis gövdesini kaplamaktadır. Epididimis sinüsünün yukarısında ligamentum epididimis superior denilen tunika vajinalisten uzanan bir yapı bulunmaktadır. Alt kısmında ise ligamentum epididimis inferior denen bir kıvrıntı daha bulunmaktadır. Epididimis, gövdesini çevreleyen seröz membran ile testise bağlanmaktadır. Epididimisin etrafı bir bağ dokusu kapsülüyle sarılmıştır. Epididimisin kaput kısmı, silli silindirik epitel ile çevrelenmiş 10-15 adet tübülden oluşmaktadır. Epididimisin korpus ve kauda kısmı kıvrımlı tek bir tübülden oluşmaktadır. Bu kısımlar steriosilyalı epitel ile kaplıdır ve vas deferens olarak devam etmektedirler (25).

2.5. Epididimis Embriyolojisi

Fetal dönemde 6.-7. haftalarda, Sertoli hücreleri tarafından Müllerian inhibitör madde (MIS) sentezlenir. 8. haftada ise Leydig hücreleri tarafından testosteron üretilir. Testosteron salınımı mezonefrik duktuslardan, erkek genital duktusların oluşumunu uyarmaktadır. MIS salınımı ise paramezonefrik duktusun epitelyal-mezenşimal dönüşüm ile yok olmasına neden olur. Mezonefroz dejenere olurken, mezonefrik duktusların bir kısmı kaybolmaz ve duktuli efferentesi oluşturur. Duktuli efferenteslerin mezonefrik duktulilere açıldığı bölge duktus epididimise dönüşür (27).

2.6. Epididimis Histolojisi

Epididimis, duktuli efferentesten ve duktus epididimisten oluşan, her bir testisin superior ve posterior kısımlarında bulunan, skrotum içine oturmuş, bağ doku ile çevrelenmiş bir organdır. Duktuli efferentesin giriş yaptığı kısım epididimin baş kısmını oluşturmaktadır. Duktus epididimis ise gövde ve kuyruk kısımlarından oluşmaktadır. Epididimisin kuyruk kısmı duktus deferense açılmaktadır (23, 28).

Yeni üretilen sperm hücreleri epididimis boyunca ilerlerken hareket ve dölleme yeteneği kazanmaktadır. Androjenlere bağımlı bu süreçte, epididimal sıvıda bulunan yüzey ilişkili dekapasitasyon faktörünün sperm başlarına eklenmesiyle sperm hücrelerinin başına gliserofosfakalin eklenir. Bu olaya dekapasitasyon denir. Dekapasitasyon spermin dölleme yeteneğini inhibe etmektedir. Sperm hücreleri dişi üreme kanalına girdikten sonra yüzeyde yer alan glikoproteinler ayrılır ve kapasitasyon gerçekleşir. Böylece sperm hücreleri dölleme yeteneklerini yeniden kazanırlar. Sperm hücreleri epididimde olgunlaştıktan sonra DNA içeriklerini ovuma aktarabilirler, kapasitasyon sayesinde ovumun zona pellusidasında bulunan sperm reseptörlerine bağlanabilirler. Bu bağlanmış akrozom reaksiyonunu uyarmaktadır (23, 28).

Epididimis yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Epiteli 2 çeşit hücreden oluşmaktadır. Bu hücreler uzun sterosilyalı ve prizmatik olan esas hücreler ile küçük, yuvarlak, kök hücreler olan bazal hücrelerdir. Esas hücreler glikolipid ve glikoprotein salgırlar, Sertoli hücreleri tarafından uzaklaştırılmamış olan rezidual cisimcikleri fagosite ederler ve suyun emiliminde rol alırlar. Bazal hücreler ise kök hücre görevini görmektedir. Bu epitel birkaç sıra halinde bulunan düz kas hücreleri tarafından sarılmıştır. Bu tabakalar içte ve dışta longitudinal olarak bulunur. Ek olarak epididimin kuyruk kısmında dairesel olarak dizilmiş bir düz kas tabakası daha bulunmaktadır. Bu kaslar peristaltik hareketlerle kasılarak sperm hücrelerinin kanal boyunca ilerlemelerini sağlamaktadır (23, 28).

2.7. İnfertilite

Tanım olarak infertilite 1 sene boyunca aktif ve korunmasız bir şekilde birliktelik yaşandığı halde, doğal yollarla dışide gebeliğin oluşmaması durumudur. Günümüzden çiftlerin yaklaşık %15'i infertilite sorunuyla, tıbbi tedavi için çeşitli kurumlara başvurmaktadır. İnfertil çiftlerin yaklaşık %50'sinde erkek faktörü etkili

olmaktadır (29). Yapılan araştırmalarda, erkek faktörüne bağlı olan infertilite nedenleri; pretestiküler nedenler, posttestiküler nedenler, ve primitif testiküler nedenler olmak üzere 3 grupta incelenmiştir. Pretestiküler nedenler kategorisinde hipogonadotropik hipogonadizm (FSH ve LH sekresyonunun normalden az olması) ve koital bozukluklar (ereksiyon bozuklukları ve retrograde ejakulasyon gibi ejakulatuar bozukluklar) olmak üzere 2 çeşit durum yer almaktadır. Posttestiküler nedenlerde ise konjenital olarak vas deferensin yokluğu, seminal kanalların tıkanması ve enfeksiyonu, aksesuar bezlerinin inflamasyonu ve otoimmün rahatsızlıklara bağlı olarak gelişen infertilite gibi nedenler bulunmaktadır. Primitif testiküler nedenlere yol ačan birçok etken bulunmaktadır. Varikosel, kriptorşidizm, orşit, testiste oluşan travma, testis torsiyonu, iatrojenik ajanlar, bazı sistemik hastalıklar ve karyotip anomalileri gibi genetik faktörler bu nedenler arasında yer almaktadırlar (30).

İnfertiliteye yol ačan sebepler bu şekilde belirlenmiş olsa da vakaların yaklaşık %40-50'si kadarında erkek bireyi etkileyen herhangi bir belirlenen neden olmadığı halde infertilite görölmektedir. Bu tip infertiliteye idiyopatik infertilite denmektedir. İdiyopatik infertilitenin ortaya çıkışında çevre kirliliği, reaktif oksijen türleri, genetik veya epigenetik anomaliler gibi pek çok faktörün bir arada etkili olduğu düşünölmektedir (29, 30).

2.8. Serbest Radikaller

Aerobik solunum yapan canlılar metabolizmaları için gerekli olan enerjiyi elde etmek için oksijeni suya indirgemektedirler. Oksijen indirgenirken serbest oksijen radikalleri denilen ürünler oluşmaktadır (31). Serbest radikaller bir ya da daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran oldukça reaktif moleküllerdir. Serbest oksijen radikalleri normal fizyolojik koşullarda sinyal iletiminde rol alıp, homeositazın korunması için gerekli olan önemli moleküllerdir. Ancak seviyeleri normalden yüksek olduğunda organizmada hasara neden olmaktadır (32). Serbest radikallerin reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrogen türleri (RNS) denilen 2 yaygın çeşiti bulunmaktadır (31). Süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, reaktif hidroksil radikali ve peroksil radikali reaktif oksijen türleridir. Reaktif nitrogen türleri nitrik oksit, nitröz oksit, peroksinitrit, nitroksil anyonu ve peroksinitröz asit olmak üzere 5 çeşittir (32). Aerobik organizmalar, serbest radikallerin yol ağtığı hasarı

engellemek veya hasarı en aza indirmek amacıyla antioksidan savunma sistemleri geliştirmiştir (31). Oksidanlar (serbest radikaller) ve antioksidanlar arasındaki denge bozulduğunda, oksidanların zararlı etkileri ortadan kaldırılamaz ve oksidatif stres denen durum ortaya çıkar. Oksidatif stres; mutasyonlara, hücre transformasyonlarına, kansere ve birçok sinir sistemi hastalıklarına neden olmaktadır (33).

2.8.1. Serbest radikallerin biyolojik kaynakları

Oksijenli solunum yapan canlılar ATP üretmek için oksijeni suya indirmek zorundadırlar. Oksijen suya indirgenirken radikallerin oluşması kaçınılmaz olmaktadır. Serbest radikallerin biyolojik kaynaklarından bir diğeri ise nötrofiller, monositler ve makrofajlar gibi fagositik hücrelerdir. Bu hücrelerin fagositoz için kullandıkları mekanizma reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Biyolojik moleküllerin otooksidasyonları da oksijen radikallerinin oluşmasına neden olmaktadır. Örneğin indirgenmiş karbon bileşikler oksidasyona yol açmaktadır. Dolayısıyla lipidler, proteinler, karbonhidratlar DNA ve RNA gibi karbon içerikli moleküller bu durumdan etkilenmektedir (33).

2.8.2. Serbest radikallerin oluşumuna etki eden diğer faktörler

Elektromanyetik radyasyon suyun radyolizini tetiklemektedir. Suyun radyolizi sonucu serbest radikaller oluşarak hidroksil, peroksit gibi ROS türlerinin oluşumuna neden olmaktadır. Çevreye salınan toksinler oksidatif metabolizmayı etkilemektedir. Endüstriyel bir atık olan karbon tetraklorid bu çeşit toksine örnek olarak verilebilir. Karbontetraklorür karaciğerde yükseltgenerek oldukça reaktif bir molekül olan trikloro metil radikaline dönüşmektedir. Pipo, puro ve sigara gibi tütün ürünlerinin dumanları da bol miktarda reaktif radikal içermektedir. Tıbbi tedavi amacıyla kullanılan ilaçlardan adriamisin, asetaminofen ve parasetamolün oksidatif hasara yol açtığı bilinmektedir (33).

2.9. Antioksidanlar

Aerobik canlılar, oksidatif stresin yol açabileceği hasarları engellemek üzere antioksidan savunma sistemleri geliştirmişlerdir. Bu sistemler enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Enzimatik olmayan antioksidan sistemleri E vitamini, A vitamini ve β -karoten gibi

dışarıdan besin yoluyla alınabilen, serbest radikalleri dengeleyen bileşiklerden oluşmaktadır. Enzimatik antioksidan sistemleri biyolojik sistemlerde bulunan süperoksit dismutaz, GSH peroksidaz, katalaz gibi oksijen radikalleriyle reaksiyona girip, vücut için oldukça zararlı olan bu bileşiklerin zararlarını ortadan kaldırmada görevli enzimlerden oluşmaktadır (34).

2.9.1. Antioksidan savunma mekanizmaları

Antioksidan savunma sistemleri engelleme, durdurma ve tamir etme mekanizmalarına sahiptirler (31).

Biyolojik sistemlerde bulunan bazı enzimler ve proteinler çalışma mekanizmalarıyla radikal oluşumu engellemekte veya radikal oluşumu gözlenmeksizin mekanizmalarını tamamlamaktadır. Sitokrom peroksidaz enzimi birçok hücrel oksijen indirgenme reaksiyonunda görev almasına rağmen serbest radikal oluşumuna neden olmamaktadır. Ribonükleotid redüktaz enzimi de reaksiyonları sırasında radikal oluşumunu engellemektedir. Demir ve bakır gibi ağır metallerin yol açtığı hasar metal şelasyon reaksiyonlarıyla engellenmektedir. Bu reaksiyonlarda ferritin, transferin gibi metal bağlayıcı proteinler görev almaktadırlar. Böylece ağır metallerin vücutta yol açabileceği lipid peroksidasyonu ve DNA fragmentasyonu gibi hasarlar engellenmektedir (31).

Enzimatik olmayan antioksidan savunma sistemleri (α -tokoferol (E vitamini) gibi fenolik bileşikler) serbest radikallerin oluşumuna yol açan reaksiyon zincirlerini engelleyerek radikal oluşumunu durdururlar. Enzimatik antioksidan sistemleri ise oksidan bileşiklerini detoksifiye ederler. Glutation peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimler bu işlevi gerçekleştirirler (31).

Engelleme ve durdurma mekanizmaları tam olarak yeterli olmadığında zararlı ürünler az miktarda da olsa oluşmaya devam etmektedir ve bu ürünler vücutta birikmektedir. Bu birikimler sonucunda DNA, hücre membranı, proteinler ve diğer bileşikler zarar görmektedir. Bu zararların tamirinde görev alan lipolitik enzimler ve proteolitik enzimler gibi birçok enzim biyolojik sistemlerde mevcuttur (31).

2.10. ROS ve İnfertilite İlişkisi

2.10.1. Erkek üreme sisteminde ROS kaynakları

Ejekülatla birlikte dışarı atılan spermier pek çok şekilde reaktif oksijen türlerine maruz kalmaktadırlar. Reaktif oksijen türlerinin kaynakları endojen ve ekzojen olmak üzere iki grupta incelenmektedir (32).

2.10.1.1. Endojen kaynaklar

Semen matür ve immatür spermiyumlar, epitel hücreleri ve lökositler gibi farklı hücreleri içermektedir. Bu hücreler çeşitli şekillerde oksijen radikali üretmektedirler (32). Bunlardan en önemlileri ROS üreticileri spermiyumlar ve peroksidaz pozitif olan lökositlerdir. Sperm üretimi sırasında spermierde ortaya çıkan ROS üretiminden sitoplazma artıkları sorumludur. Spermatogenezini başarıyla tamamlamış olan normal olgun spermierinde plazma membranlarında ve mitokondrilerinde ROS üretilmektedir (35). Peroksidaz pozitif lökositlerin yaklaşık %60'ını nötrofiller ve makrofajlar oluşturmaktadır. Semendeki peroksidaz pozitif lökositlerin kaynağı prostat ve seminal veziküllerdir. İnflamasyon ve enfeksiyon varlığında lökositler savunma mekanizmaları gereğince oldukça yüksek bir düzeyde ROS üretmektedirler (32, 35).

2.10.1.2. Ekzojen kaynaklar

Patolojik seviyede ROS üretime yol açan endüstriyel atıklar, sigara, alkol, omurilik hasarı ve varikosel gibi birçok ekzojen kaynak bulunmaktadır (32).

2.10.1.2. ROS ve sperm fizyolojisi

ROS üretiminin aşırı olması patolojik sonuçlara neden olsada, normal seviyede üretilen ROS fizyolojik bir öneme sahiptir. ROS, spermin olgunlaşmasında, hiperaktivasyonunda, kapasitasyonunda, ve sperm-oosit birleşmesinde sinyal üretiminde rol alarak spermi pozitif bir şekilde etkilemektedir (32).

2.10.2. ROS' un patolojik rolü

Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi plazma membranındaki içeriğindeki yağ asitlerinin oksidatif yıkımına neden olur. Bu olaya lipid peroksidasyonu denir.

Lipid peroksidasyonu sperm hücrelerinin plazma membranının akışkanlığına etki edip spermin oositle birleşme kapasitesini düşürmektedir (35). Oksidatif stres aksonemde protein fosforilasyonuna etki ederek spermin hareketliliğini düşürmektedir. Buna ek olarak, oksidatif stres ATP seviyesini düşürerek, sperm hücrelerinin kuyruk hareket sıklığını azaltmaktadır (11, 35). Oksidatif stres DNA bazlarında değişikliklere neden olarak DNA kırılmalarına, nokta mutasyonlarına ve kromozomal değişimlere neden olmaktadır (32, 35). Bunlara ek olarak, ROS üretiminin aşırı olması mitokondrinin iç ve dış zarlarına etki eder; apoptozu uyaran kaspazları aktive eden sitokrom c proteininin salınımına neden olur ve apoptozisi artırır (36).

2.11. Akrilamid

Akrilamid reaktivitesi oldukça yüksek olan α - β doymamış bir karbonil bileşiğidir. Su artımı, kozmetik ve kağıt üretimi gibi pek çok alanda kullanılmak üzere üretilen poliakrilamidin monomeridir (37). Bunlara ek olarak, karbonhidrattan zengin besin ürünlerinin (patates cipsi, ekmek ve gevrek gibi) yüksek ısıya maruz kalması sonucunda da oluşabilmektedir. Besinlerde bu şekilde akrilamid oluşumu iki şekilde gerçekleşmektedir. Yüksek karbonhidrat içerikli gıdalarda bulunan serbest asparajin yüksek ısıya maruz kaldığında, Maillard reaksiyonu gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon sonucunda asparajin bileşenlerine ayrılmakta ve sonuç olarak akrilamid oluşmaktadır. Benzer şekillerde akrilik asit, akrolein ve glutenin geçirdiği reaksiyonlar sonucunda da akrilamid açığa çıkabilmektedir (38). Hem endüstriyel alanda kullanıldığından hem de tüketilen birçok besinde bulunmasından dolayı akrilamide birçok şekilde maruz kalınmaktadır (37). Yapılan çalışmalarda akrilamidin sinir sistemi ve üreme sistemi gibi pek çok sisteme toksik bir etkisinin olduğu bildirilmiştir (39).

2.11.1. Akrilamidin metabolizması

Akrilamid sindirildikten sonra hızlı bir şekilde bütün vücuda yayılmaktadır. Timus, karaciğer, kalp, beyin ve böbrek gibi organlarda görülebilmektedir. Bunlara ek olarak plasentaya ve süte geçerek fetüsü ve yenidoğan bebekleri etkilemektedir (39). Akrilamid vücutta 2 şekilde metabolize edilmektedir. İlk yolak sitokrom p450 enzimleri olarak bilinen enzim sisteminin bir üyesi olan CYP2E enziminin katalizörlüğünde akrilamidin yükseltgenerek glisidamide dönüşmesidir (38, 40).

Diğer yol ise akrilamidin glutation S-transferaz enzimi katalizörlüğünde glutation ile birleşmesidir. Yapılan çalışmalar akrilamidin yaklaşık %86'sının idrarla birlikte dışarı atıldığını göstermektedir. Ancak idrarla dışarı atılan glisidamid miktarı yok denecek kadar azdır (38).

2.11.2. Akrilamidin nörotoksik etkisi

Akrilamid kinesin ve dynein motor proteilerine bağlanarak distal aksonapatiye neden olup, kol ve bacaklarda hassasiyete ve güç kaybına yol açmaktadır (4, 41).

2.11.3. Akrilamidin genotoksik etkisi

Akrilamid genotoksik bir madde olup skrotal mezotelinoma, tiroid tümörleri gibi pek çok kanser türüne neden olmaktadır. Akrilamidin mikronükleus, kromozomal değişimler, kardeş kromatid değişimleri ve mitoz bölünme anomalileri gibi birçok genotoksik etkisi gözlenmektedir (6). Ayrıca yapılan çalışmalarda, akrilamidin biyotransformasyonu sonucu oluşan glisidamidin DNA'ya bağlanarak eşey hücrelerinde ve somatik hücrelerde pek çok mutasyona neden olduğu gösterilmektedir (42).

2.11.4. Akrilamidin erkek üreme sistemine etkisi

Yapılan çalışmalar akrilamidin ve biyotransformasyonu sonucu oluşan glisidamidin üreme sistemine etki edip, infertiliteye yol açtığını göstermektedir (43).

Akrilamidin glisidamide dönüşebilmesi için P450 enzim sistemlerinin bir üyesi olan CYP2E1 enziminin katalizörlüğüne gereksinimi vardır. Spermatositlerin CYP2E1 enzimini ürettiği, dolayısıyla glisidamid oluşumuna ortam hazırladığı bilinmektedir. Glisidamid doğrudan DNA'ya bağlanıp, sperm hücreleri üzerinde genotoksik bir etki yapmaktadır. Aynı şekilde akrilamid de DNA'ya bağlanıp DNA hasarına ve mutasyonlara neden olmaktadır (42). Bunlara ek olarak spermatidlerin protoaminlerine bağlanarak gonad hücrelerinin deformasyonuna ve sperm hücrelerinde morfolojik anomalilere neden olmaktadır (5). Akrilamid testis dokusunda seminifer tübüllerin epitel hücrelerinin dejenerasyonuna yol açmaktadır. Ayrıca testis hücrelerinin gen ekspresyonunu baskılayıp spermatogenezi etkilemekte

sperm rezervlerinin azalmasına neden olmaktadır (5, 42). Akrilamidin oluşturduğu oksidatif stresin bir sonucu olarak spermatositlerin ve spermatogonyumların kalitesi düşmektedir. Akrilamid semende bulunan peroksidaz dismutaz ve glutation peroksidaz gibi önemli antioksidan enzimlerin aktivitesini düşürmektedir (42).

2.12. *Lycium Barbarum* (Kurt üzümü)

Kurt üzümü meyvesi; Çin, Tibet ve diğer Asya ülkelerinde yetişen 1-2 cm uzunluğunda, turuncu-kırmızı renkli bir meyvedir (44). Geleneksel Çin tıbbında oldukça yaygın olarak kullanılan bitkilerden biridir (45). Yapılan çalışmalar kurt üzümünün sağlığa birçok etkisinin olduğunu göstermektedir. Bu etkiler; kan şekerini ve lipid seviyesini düşürmesi, sinir sistemini koruyucu bir etkisinin olması, yaşlanma karşıtı bir özelliğinin olduğu, tümör oluşumunu engellediği, stresi azaltıcı bir etkisinin olması şeklinde sıralanabilmektedir (45-48).

2.12.1. Kimyasal bileşenleri

Lycium barbarum'un kimyasal bileşenleri içerisinde en çok bilinen polisakkarit kompleksleridir. Polisakkarit kompleksleri asidik heteropolisakkaritler ve polipeptidlerden oluşan glikopolipeptid kompleksleridir. Miktarca değişiklik gösterebilir polisakkaritler temel olarak 6 adet monosakkaritten oluşmaktadır. Bunlar ksiloz, glukoz, arabinoz, ramnoz, mannoz ve galaktoz monosakkaritleridir. *Lycium barbarum* polisakkaritleri ayrıca galakturonik asit ve 18 adet aminoasit içermektedir (44).

Kurt üzümüne kırmızı-turuncu rengini veren içeriğindeki karotenoidlerdir. *Lycium barbarum* ekstraktlarında 11 adet serbest karotenoid ve 7 adet karotenid esteri bulunmaktadır. Bu karotenoidlerin içinde en çok bulunan zeaksantindir. Zeaksantin özellikle göz sağlığını koruyucu özelliği ile dikkat çekmektedir (44).

Polisakkaritler ve karotenoidlerin dışında kurt üzümü bünyesinde betain, serebrosit, beta-sitosterol, p-kumarik asit gibi pek çok faydalı bileşik ile birçok vitamin bulunmaktadır. Bunlara ek olarak K, Ca, Zn, Fe, Co, Mn, Se ve Mg gibi pek çok mineral de bulunmaktadır (44).

2.12.2. Metabolizmaya etkisi

Lycium barbarum içeriğindeki 6 çeşit monosakkarit sayesinde metabolizma hızını arttırmaktadır. Polisakkaritleri endoplazmik retikulum hasarını engelleyerek, protein sentezini ve detoksifikasyonu artırır. Karaciğer hücrelerinin normal fonksiyonunun yerine getirilmesinde ve karaciğer rejenerasyonunda rol almaktadır. Ayrıca hepatosit sitokrom P450 enzim sisteminin bir üyesi olan CYP2E1 enziminin ekspresyonunu inhibe etmektedir (44).

2.12.3. Antioksidan etkisi

Yapılan birçok çalışma kurt üzümünün bir antioksidan olarak organizmayı koruyucu bir etkisinin olduğunu bildirmiştir. Kurt üzümünün SOD, CAT ve GSH-Px seviyesini arttırdığı ve MDA seviyesini düşürdüğü bilinmektedir (44).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Abant İzzet Baysal Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan 13.01.2016 tarihinde, 2016/02 karar no ile izin alınmıştır.

3.1. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Deneyimizde kullanılan ratlar Abant İzzet Baysal Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden alınmıştır. 2-3 aylık, ağırlıkları ortalama 300 gr olan 24 adet erkek Wistar albino rat kullanılmıştır. Denekler 22 ± 3 °C ısıda, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık ve %50-60 oranında nemlendirilen bir ortamda tutulmuş ve ad libitum olarak beslenmiştir. Beslenmede standart pellet yem kullanılmıştır.

3.2. *Lycium barbarum* (Kurt Üzüümü) Ekstraktının Hazırlanışı

Ticari olarak satılan kurutulmuş kurt üzümü meyvesinden (Goji Form) toplam 2 kg alındı. Özütler taze olması bakımından, haftalık hazırlandı. Kuru meyveler blender yardımı ile parçalanıp, toz haline getirildi. Toz haline getirilmiş meyveden 50'şer gr tartılıp, ayrı ayrı erlenlere konuldu. Üzerlerine 500'er ml %100'lik etanol ilave edilerek, çalkalamalı su banyosunda 40 °C'de 24 saat ekstraksiyon yapıldı. Daha sonra özütler filtre kağıdı ile süzülerek, filtrasyon işlemi yapıldı. Kalan sıvı kısım, fenolik maddelerin bozulmaması için, 40 °C'yi geçmeyecek sıcaklıkta, rotary evaporatör ile uçuruldu (Şekil 3.1). Özütün tam kuru halde elde edilebilmesi için, en son kalan uçmayan sıvı sulu kısım -60 °C'de liyofilize edilerek uçuruldu. Elde edilen etanol özütü (Şekil 3.2) kullanım süresi boyunca, buzdolabında -20 °C'de muhafaza edildi (45).



Şekil 3.1. Kurt üzümü ekstraktının hazırlanışı.



Şekil 3.2. Kurt üzümü ekstraktı.

3.3. Deney Gruplarının oluşturulması

24 adet rat her grupta 6'şar tane olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Gruplar aşağıdaki gibidir:

1-Grup 1 (G1) (Akrilamid Grubu): Bu gruba birbirini takip eden 5 gün boyunca gavaj yoluyla 50 mg/kg (6) distile suda çözünmüş akrilamid verildi.

2-Grup 2 (G2) (Akrilamid ve Kurt Üzümü Grubu): Bu gruba 5 gün boyunca 50 mg/kg distile suda çözünmüş akrilamid ve 200 mg/kg (46) kurt üzümü ekstraktı gavaj yoluyla verildi.

3- Grup 3 (G3) (Kontrol Grubu): Bu gruptaki deneklere herhangi bir işlem uygulanmadı.

4-Grup 4 (G4) (Kurt Üzüümü Grubu): Bu gruptaki deneklere 5 gün süreyle 200 mg/kg kurt üzüümü ekstraktı verildi.

3.4. Örneklerin Alınması

5. günün sonunda hayvanlar intramüsküler olarak 90 mg/kg ketamin 10 mg/kg ksilezin ile muamele edilerek sakrifiye edildi. Kalpten alınan kan biyokimyasal analizler için tüplere alındı. Sol testis ve sol epididimis tespit edilip, parafin blok hazırlanmak üzere %10'luk formaldehit çözeltisine alındı. Sağ testis ve sağ epididimisin bir kısmı biyokimyasal analizler için PBS çözeltisine alınıp - 80'e konuldu. Sağ epididimisin kauda kısmı sperm analizleri için ayrı bir kaptan PBS'ye alındı.

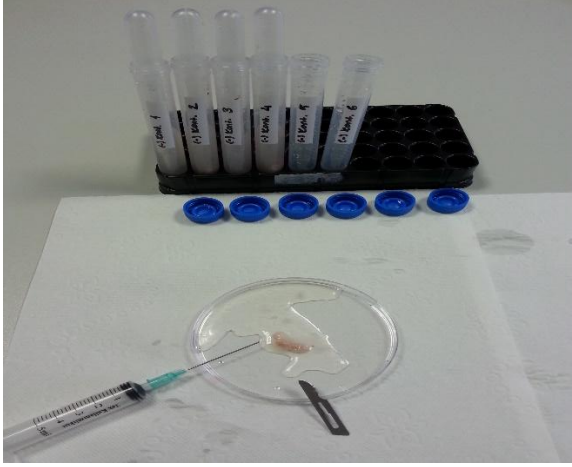
3.5. Örneklerin İncelenmek Üzere Hazırlanması

PBS çözeltisine konan sağ epididimisin kaudası bir miktar PBS ile birlikte petri kabına alındı. İnsulin iğnesinin ucu bükülerek kauda parçalandı (Şekil 3.3). Tübüllerin içindeki spermilerin açığa çıkması amaçlandı. Kauda parçalandıktan sonra parçalı sıvıdan örnek alınarak lamlara yayıldı ve kurumaya bırakıldı.

%10' luk formaldehit çözeltisindeki testis ve epididim dokuları Tablo 3.1'de belirtilen sürelerle histolojik takip işlemlerinden geçirilerek parafine gömüldü.

Tablo 3.1. Doku takibi işlemleri.

Musluk suyunda dokuların yıkanması	30 dk
%70' lik Etil Alkol	1-2 saat
%80' lik Etil Alkol	1-2 saat
%96' lık Etil Alkol	1 saat
%96' lık Etik Alkol	1 saat
%100' lük Etil Alkol	1 saat
%100' lük Etil Alkol	1 saat
Ksilen 1	1 saat
Ksilen 2	1 saat
Ksilen+ Parafin	30 dk
Parafin 1	2-3 saat
Parafin 2	2-3 saat
Gömme	-



Şekil 3.3. Kauda epididmisin parçalanışı.

3.6. Kesitlerin Alınması ve Boyanması

Hazırlanan bloklardan 2-3 mikron kalınlığında kesitler alınarak lamlara konuldu. Kesitler ışık mikroskobunda değerlendirilmek üzere H&E (Hematoksilen-eozin), PAS, Masson Trikrom boyaması, TUNEL ve Ki67 boyamalarıyla boyandı.

3.7. Hemotoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Kesitler etüvde 30 dk deparafinize edildi. Daha sonra 2'şer dk ksilol I ve ksilol II'de tutuldu. Ksilolden çıkarılan kesitler 1'er dk olmak üzere absolü alkol I ve absolü alkol II'de tutuldu. Bu işlemin ardından kesitler musluk suyunda yıkandı. Daha sonra 5 dk hemotoksilen (Harris hemotoksilen (BESLAB, Referans No:BS-002) boyasında tutuldu. Boyadan çıkarılan kesitler musluk suyunda yıkandı. Bu işlemde sonra 2 kez asit alkole daldırılıp çıkarıldı. Musluk suyundan alınan kesitler 10 sn. amonyaklı suda bekletildi. Kesitler daha sonra musluk suyunda yıkandı. Yıkanan kesitler 2 dk %80'lik alkolde bekletildi. Daha sonra kesitler alkolden alınarak 1dk. eozin (Merck) boyasında bekletildi. Eozinden alınan kesitler artan dereceli alkol serilerinden (2'şer dk 2 ayrı %96'lık alkol , 2'şer dk. 2 ayrı absolü alkol) geçirilerek ksilol I ve ksilol II' de 2'şer dk bekletildi. Daha sonra üzerlerine entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.8. PAS (Periodic acid Schiff) Boyasının Hazırlanışı ve Boyama Protokolü

3.8.1. Coeleman's Schiff hazırlanışı

1 gr bazik fuksin, 200 ml 60 °C distile su ile karıştırıldı. Bu karışım kaynama noktasına kadar ısıtıldı ve soğuması beklendi. Soğuduktan sonra üzerine 2 gr potasyum metabisülfid, 10 ml 1 N HCl ilave edildi. 24 Saat beklenildikten sonra 0.5 gr aktif karbon ilave edildi. 1 dk çalkalandı. Karışım şeffaflaşana kadar filtre edildi. Kullanılmak üzere buzdolabında ve karanlıkta saklandı.

3.8.2. Periyodik asit hazırlanışı

0.5 gr periyodik asit 100 ml distile su ile karıştırıldı.

3.8.3. Boyama protokolü

Kesitler 30 dk etüvde bekletildi. Daha sonra 2'şer dk ksilol I ve ksilol II'de bekletildi. Ksilolden alınan kesitler azalan dereceli alkol serilerinden geçirildi (absolü alkolde 2 dk, %95' lik alkolde 2 dk, %70'lik alkolde 2 dk). Alkol serilerinden alınan kesitler distile suda yıkandı. Bu işlemten sonra kesitler % 0.5 'lik periyodik asitte 7 dk bekletildi. Periyodik asitten alınan kesitler hazırlanmış olan Colemans Schiffte 35 dk bekletildi. Kesitler bu işlem bittikten sonra musluk suyunda yıkandı. Musluk suyundan alınan kesitler 30 sn Mayers hemotoksilenle muamele edildi. Kesitler daha sonra musluk suyuyla yıkandı. Bu işlemin ardından kesitler artan dereceli alkol serilerinden geçirildi (%95'lik alkolde 2 dk, absolü alkolde 2 dk). Daha sonra ksilol I ve ksilol II' de 2'şer dk bekletildi. Ksilolden alınan kesitler entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.9. Masson Trikrom Boyama Protokolü

Masson trikrom boyaması için Australian Biostain markalı (Kod: RRSK20-100) hazır boya kitleri kullanıldı. Kesitler etüvde 30 dk bekletildi. Etüvden alınan kesitler ksilol I ve ksilol II' de 2'şer dk bekletildi. Ksilollerden alınan kesitler azalan dereceli alkol serilerinden geçirildi. Daha sonra musluk suyunda yıkandı. Miktarca yeterli olacak şekilde hematoksin A ve hematoksin B eşit hacimlerde karıştırıldı. Karışım kesitlerin üzerine damlatılarak 20 dk beklendi. Süre bitiminden sonra kesitler musluk suyunda yıkandı. Kesitler daha sonra alınarak 2 kez %1'lik asit alkole batırılıp çıkarıldı. Bu işlemten sonra kesitler tekrar musluk suyunda yıkandı.

Kesitler sudan alınarak 5 dk Ponceau Fuksin solüsyonunda bekletildi. Daha sonra kesitler deiyonize suda yıkandı. Sudan alınan kesitler 10 dk fosfotungstik asitle muamele edildi. Bu işlemden sonra kesitlere metilen mavisi damlatılıp 5 dk beklendi. Daha sonra kesitler artan dereceli alkol serilerinden geçirildi. Alkol serilerinden alınan kesitler ksilol I ve ksilol II'de 2'şer dk bekletildi. Bu işlemden sonra entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.10. TUNEL Boyama Protokolü

Bu boyamada Merck Millipore markalı ApopTag Peroxidase In Situ Cell Detection Kit (S7100) kullanıldı. Kesitler 60°C' deki etüvde 2 saat bekletildi. Daha sonra ksilol I, ksilol II ve ksilol III'te 5'er dk bekletildi. Bu işlemin ardından azalan alkol serilerinden geçirildi. Alkol serilerinden alınan kesitler distile su ile 25 kat sulandırılmış olan Thermo Scientific markalı PBS (Phosphate Buffered Saline) solüsyonunda 5 dk bekletildi. PBS'den alınan kesitlerin üzerine 20 µl proteinaz K damlatılıp 15 dk oda sıcaklığında beklendi. Bu işlemden sonra distile su I ve distile su II' de 2'şer dk yıkandı. Sudan alınan kesitlerin etrafı Pap pen ile çizildi. Kesitler daha sonra 5 dk hidrojen peroksitle muamele edildi. Daha sonra 2'şer kere PBS ile yıkandı. PBS'den alınan kesitler silkelenerek kesitlerin üzerindeki fazla sıvılar giderildi. Bu işlemin ardından her bir kesite 75 µl/5 cm² olacak şekilde dengeleyici buffer damlatıldı. 10 sn oda sıcaklığında beklendi. Daha sonra her bir kesite 55 µl/5 cm² olacak şekilde TdT (Terminal deoxynucleotidyl Transferase) enzimi (33 µl Tdt enzimi stok solüsyonu ile 77µl reaksiyon tampon solüsyonu karıştırılarak elde edildi.) damlatıldı. Kesitlerin üzeri parafilmle kaplandı. 1 saat 37°C'de bekletildi. Bu sırada durdurucu yıkayıcı buffer (stop wash buffer) hazırlandı. Bu işlemin ardından kesitler 3 kere PBS solüsyonu ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra silkelenerek kurutulan kesitlerin üzerine 65 µl/5cm² olacak şekilde antiqoxigenin konjugatı damlatılarak 30 dk oda sıcaklığında beklendi. Daha sonra 4 defa PBS ile yıkandı. DAB (3,3 diaminobenzidine) kromojenden (Scytek Laboratories, Referans No: ACK125) 50 µl ve DAB substrattan (Scytek Laboratories, Referans No: ACC125) 1 ml alınarak hazırlanan DAB solüsyonundan her bir kesite 50 µl damlatıldı ve 5 dk beklendi. Bu işlemin ardından kesitler distile su ile yıkandı. Yıkanan kesitlerin üzerine dokuyu örtecek kadar sulandırılmış Mayer's hematoksilen (Abcam , katalog no: ab128990) damlatıldı. 40 sn bekletildi. Daha sonra kesitler distile su ile yıkandı.

Bu işlemin ardından kesitler 30'ar sn artan dereceli alkol serilerinden geçirildi. Alkol serilerinden alınan kesitler ksilol I ve ksilol II' de 1'er dk bekletildi. Ardından entellan damlatılıp lamelle kapatıldı.

3.11. Ki67 Boyama Protokolü

Kesitler 1 gece 37°C etüvde bekletildi. Etüvden alınan kesitler ksilol I, ksilol II ve ksilol III'de 5'er dk bekletildi. Daha sonra 5'er dk azalan dereceli alkol serilerinden geçirildi. Alkol serilerinden alınan kesitler distile su ile yıkandı. Daha sonra PBS ile yıkandı. Kesitler sitrat buffer (Thermo Scientific) dolu kaba dizilerek mikrodalgada 360 watta 3 kere 4 dk kaynatıldı. Daha sonra kesitler mikrodalgadan çıkarılarak soğuması beklendi. Kesitler soğuduktan sonra etrafı Pap pen ile çizildi. Bu işlemin ardından kesitlere üzerlerini örtecek kadar peroksit blok damlatıldı. 10 dk. oda sıcaklığında beklendi. Kesitler daha sonra PBS ile yıkandı. Üzerlerindeki fazla sıvı silkelenerek UV block damlatıldı. Oda sıcaklığında 5 dk beklendi. Daha sonra Thermo Scientific markalı seyreltilmiş Ki 67 primer antikoru (Katalog No: RB-9043-R7) kesitlerin üzeri kaplanacak şekile damlatıldı. Kesitlerin üzeri parafilm ile örtüldü. +4 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon süresi dolduktan sonra kesitler PBS ile yıkandı. Daha sonra kesitlere Thermo scientific markalı sekonder antikor kiti (Ref: TP-060-HL LOT: PHL100413) kullanılarak boyama işlemine devam edildi. Sekonder antikor (biotinylated-goat anti-polyvalent) damlatıldı. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Bu işlemin ardından kesitler PBS ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra kesitlere HRP (Horseradish peroxidase) enzimi damlatılarak 15 dk beklendi. Bu sırada DAB kromojen hazırlandı. Boyanın ışığa maruz kalmamasına özen gösterildi. Süre dolduktan sonra kesitler PBS ile yıkandı. Her bir kesite 50 µl DAB boyası damlatıldı. 5 dk beklendi. Daha sonra kesitler distile su ile yıkandı. Bu işlemden sonra mayer 's hemotoksilen seyreltilerek kesitlerin üzeri örtülecek şekilde damlatıldı. 40 sn beklendi. Daha sonra kesitler distile su ile yıkandı. Sudan alınan kesitler her birinde 30'ar saniye bekletilmek üzere artan dereceli alkol serilerinden geçirildi. Alkol serilerinden alınan kesitler ksilol I ve ksilol II' de 1'er dk bekletildi. Bu işlemden sonra kesitlere entellan damlatılarak lamelle kapatıldı.

3.12. Anilin Mavisini Hazırlanışı ve Boyama Protokolü

Önce PBS solüsyonu hazırlandı. Anilin mavisinden (Carlo Erba Reagent) 5 gr tartılarak 100 ml PBS solüsyonuna konuldu. Karışım kaynayınca kadar ısıtıldı. Daha sonra soğumaya bırakıldı. Karışım soğuduktan sonra filtre kağıdı ile süzüldü. Daha sonra karışımın pH'ı 3.5 olacak şekilde % 100'lük asetik asitle titre edildi.

% 3'lük gluteraldehitte fikse edilmiş sperm örnekleri 7 dk hazırlanan anilin mavisinde bekletildi. Daha sonra PBS ile yıkandı.

3.13. Sonuçların Değerlendirilmesi

3.13.1. Histolojik değerlendirme

Olympus CX21 markalı ışık mikroskopuyla histolojik değerlendirme yapıldı. Seminifer tübül yapıları, bağ dokusu yapısı ve damar yapıları incelendi. İnceleme sonunda her bir deney grubundan NIS elements D görüntüleme sistemi ve Nikon Eclipse 80i dijital kameralı mikroskop kullanılarak görüntüler elde edildi.

3.13.2. Morfolojik değerlendirme

3.13.2.1. Sperm sayısı

Epididimisin kaudasının parçalanmasıyla elde edilen spermelerden alınan örnekler Makler lamı ile 100 karede sayıldı. Elde edilen veriler istatistiksel analiz için kullanıldı.

3.13.2.2. Spermatogonyum sayısı

Her bir örnekten rastgele 10'ar adet seminifer tübül seçilerek TUNEL ve Ki67 boyamalarıyla immunohistokimyasal olarak işaretlenen apoptotik spermatogonyum hücreleri ve proliferatif spermatogonyum hücreleri sayıldı. Elde edilen veriler istatistiksel analizlerde kullanılmak üzere kaydedildi.

3.13.3. İstatiksel değerlendirme

Çalışmamızda elde edilen veriler IBM SPSS statistics version 20 programıyla değerlendirildi. Verilerin dağılımı Sharpio-Wilk normalite testi ile değerlendirildi. Grupların normal dağılım gösterdiği verilere tek yönlü varyans analizi ve t test yapıldı. Tek yönlü varyans analizi yapılırken varyansların homojen dağılıp dağılmamasına bakıldı. Varyansların homojenliği Levene testi ile ölçüldü. Varyansların homojen olduğu durumda Tukey HSD post hoc testi, homojen olmadığı durumda Tampane's T2 post hoc testi yapıldı. Verilerin normal dağılım göstermediği durumlarda ise Kruskal Wallis testi ve Mann-Whitney U testi yapıldı.

Test sonuçları değerlendirilirken p değerinin 0.05'ten küçük ve eşit olduğu durumlarda gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu kabul edildi.

3.13.4. Biyokimyasal değerlendirme

3.13.4.1. Antioksidan analizi

Biovision' un lipid peroxidation (MDA) colorimetric/ fluorometric assay kiti (katalog no:K739-100), Bioassay systems'in EnzyChrom™ superoxide dismutase assay kiti (ESOD-100) ve Gentaur'un EnzyChrom™ catalase assay kiti (ECAT-100) kullanılarak protokole uygun bir şekilde testis dokularında MDA, CAT ve SOD değerleri ölçüldü. Ölçümler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.13.4.1.1. MDA analizi

Çalışma için alınan doku örnekleri firma önerileri doğrultusunda homojenize edildi. Süpernatantlar elde edildi. Çalışmaya başlamadan önce kitler/tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Reaktifler homojen olmaları için vortekslelendikten sonra çalışmada kullanıldı. Testin değerlendirilmesinde kullanılacak olan standartlar, enzimler üretici firma önerileri doğrultusunda dilüe edildi. Test sonuçları standartların 532 nm’de ölçülen optik densitelerine/yoğunluklarına göre çizilen grafik dikkat alınarak değerlendirildi. Kitler/reaktifler oda sıcaklığına geldikten sonra; 96’lık boş plate’e sırası ile 200 µL örnekler pipetlendi. Reaktifler çalışılacak örnek sayısına göre hazırlandı. Tüm reaktifler hazırlandıktan sonra 600 µL TBA (Thiobarbituric acid) standartlar dahil tüm kuyucuklara pipetlendi ve 95 °C’de 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plate nazikçe çalkalandı. Hiç bekletilmeden 532 nm’de (OD_{532nm}) okutuldu.

3.13.4.1.2. CAT analizi

Çalışma için alınan doku örnekleri firma önerileri doğrultusunda homojenize edildi. Süpernatantlar elde edildi. Çalışmaya başlamadan önce kitler/tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Reaktifler homojen olmaları için vortekslelendikten sonra çalışmada kullanıldı. Testin değerlendirilmesinde kullanılacak olan standartlar, Enzimler üretici firma önerileri doğrultusunda dilüe edildi. Test sonuçları standartların 570 nm (550 ile 585 nm arası) de ölçülen optik densitelerine/yoğunluklarına göre çizilen grafik dikkat alınarak değerlendirildi. Kitler/reaktifler oda sıcaklığına geldikten sonra; 96 lık boş plate’in ilk kuyucuğuna “Blank/Boş kuyucuk” olarak değerlendirilmek üzere sadece 10 µL Assay buffer pipetlendi. Ardından sırası ile 10 µL örnekler pipetlendi. Reaktifler çalışılacak örnek sayısına göre hazırlandı. Tüm kuyucuklara 90 µL substrat ekelenerek katalaz reaksiyonu başlatıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra kit içerisinde bulunan Dye Reagent ve HRP (Horse Radish Peroksidase) Enzimi pipetlenerek yine oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Ardından Detection Reagent standartlar dahil tüm kuyucuklara eklendi. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda plate nazikçe çalkalandı. Hiç bekletilmeden 570 nm’de (OD_{570nm}) okutuldu. Bu değer OD_{570nm} olarak kabul edildi.

3.13.4.1.3. SOD analizi

Çalışma için alınan doku örnekleri firma önerileri doğrultusunda homojenize edildi. Süpernatantlar elde edildi. Çalışmaya başlamadan önce kitler/tüm reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Xantine reaktifi/reagent bulanık olabileceğinden kısa süreli vortekslendi. Enzimler vortekslendikten sonra çalışmada kullanılıncaya kadar buz üzerinde bekletildi. Testin değerlendirilmesinde kullanılacak olan standartlar firma önerileri doğrultusunda dilüe edildi. Sırasıyla 3.0, 2.4, 1.8, 1.2, 0.54, 0.24, 0.12 ve 0.0 (U/mL) olacak şekilde seri standartlar elde edildi. Test sonuçları standartların 440 nm de ölçülen optik densitelerine/yoğunluklarına göre çizilen grafik dikkat alınarak değerlendirildi. Kitler/reaktifler oda sıcaklığına geldikten sonra; 96 lık boş plate'e 20 µL SOD standartları ve ardından sırası ile örnekler pipetlendi. Reaktifler çalışılacak örnek sayısına göre hazırlandı. Her bir kuyucuğa 160 µL Assay buffer, 5 µL Xanthine ve 5 µL WST-1 pipetlendi. Hemen ardından multihanel/çok kanallı pipet yardımı ile 20 µL XO enzim pipetlendi. (Enzim pipetlenmesi çok hızlı ve seri olması gerektiği için çok kanallı pipet tercih edildi. Plate nazıkçe çalkalandı. Hiç bekletilmeden 440 nm'de (OD_{440nm}) okutuldu. Bu değer OD₀ olarak kabul edildi. Daha sonra plate oda sıcaklığında 60 dakika inkübasyona bırakıldı. Plate 440 nm'de yeniden okutuldu (OD_{440nm}).

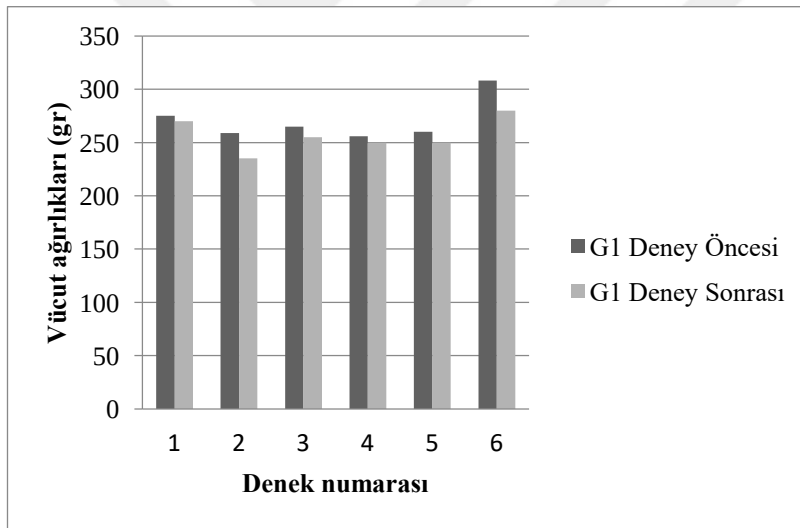
3.13.4.2. Hormon analizi

Serumdaki testosteron ve FSH değerleri ElabScience'ın elisa kitleri (Katalog No: E-EL0072 ve Katalog No: E-ELR0391) kullanılarak Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda ölçüldü.

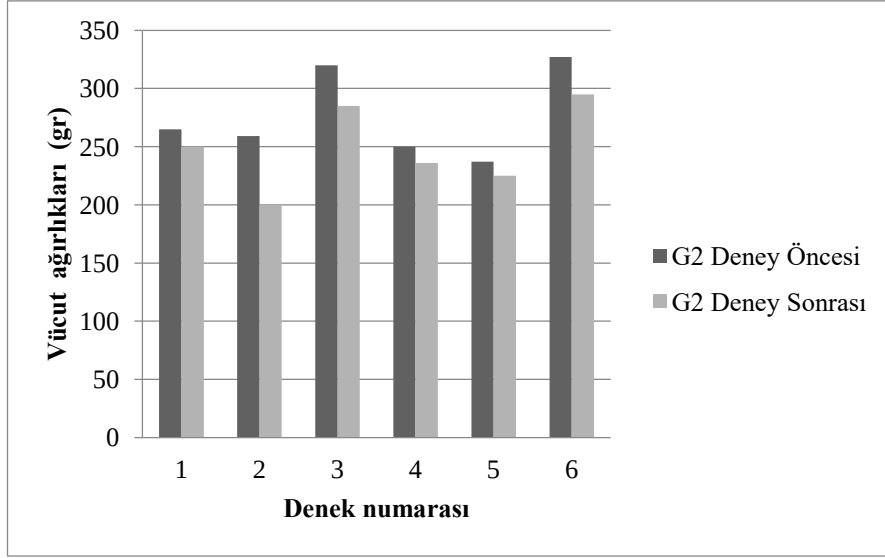
4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlıkları

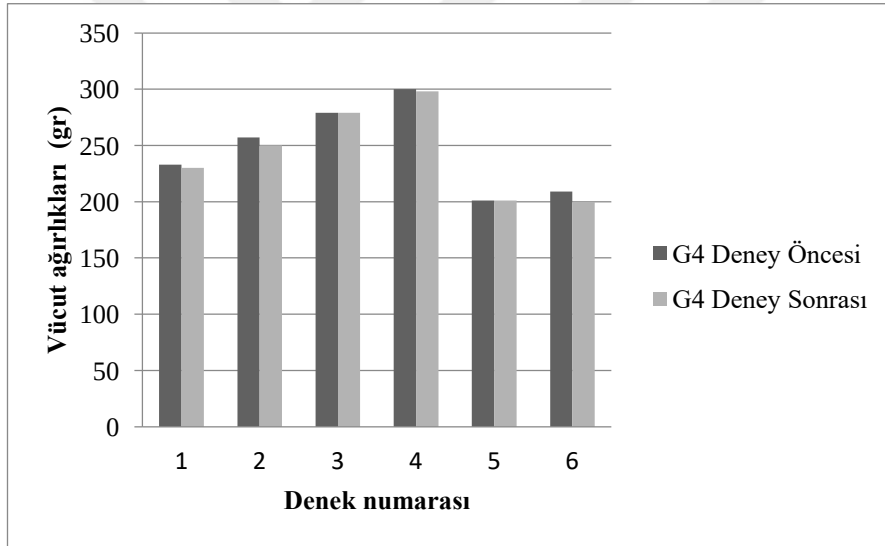
Akrilamid grubu (G1), akrilamid+kurt üzümü grubu (G2) ve kurt üzümü grubu (G4) deneklerinin, deney öncesi ve deney sonrası ağırlıkları karşılaştırıldığında, bütün gruplarda azalış gözlemlendi (Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3). Gözlenen bu azalış karşılaştırılmalı t testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 4.1). G1'deki deneklerin ve G2'deki deneklerin deney öncesi ve deney sonrası ağırlıklarındaki azalış arasında anlamlı bir fark bulunurken (G1 için $p=0,018$, G2 için $p=0,013$), G4'teki deneklerin ağırlıklarındaki azalış arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (G4 için $p=0,070$).



Şekil 4.1. Akrilamid grubunun deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları.



Şekil 4.2. Akrilamid+Kurt üzümü grubunun deney öncesi ve deney sonrası ağırlıkları.



Şekil 4.3. Kurt üzümü grubunun deney öncesi ve deney sonrası ağırlıkları.

Tablo 4.1. Grupların vücut ağırlıklarının tanımlayıcı istatistik değerleri (gr).

Gruplar	Tanımlayıcı İstatistik Değerleri					
	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	Median	p Değeri
G1 önce	270,0	19,5	256,0	308,0	262,5	p= 0,018*
G1 sonra	256,5	16,02	235,0	280,0	252,5	
G2 önce	276,3	37,8	237,0	327,0	262,0	p=0,013*
G2 sonra	248,5	36,2	200,0	299	243,0	
G3	235,6	31,6	275,0	195,0	241,5	p=0,070
G4 önce	246,5	39,2	201,00	300,0	245	
G4 sonra	243	40,3	200	298	240	

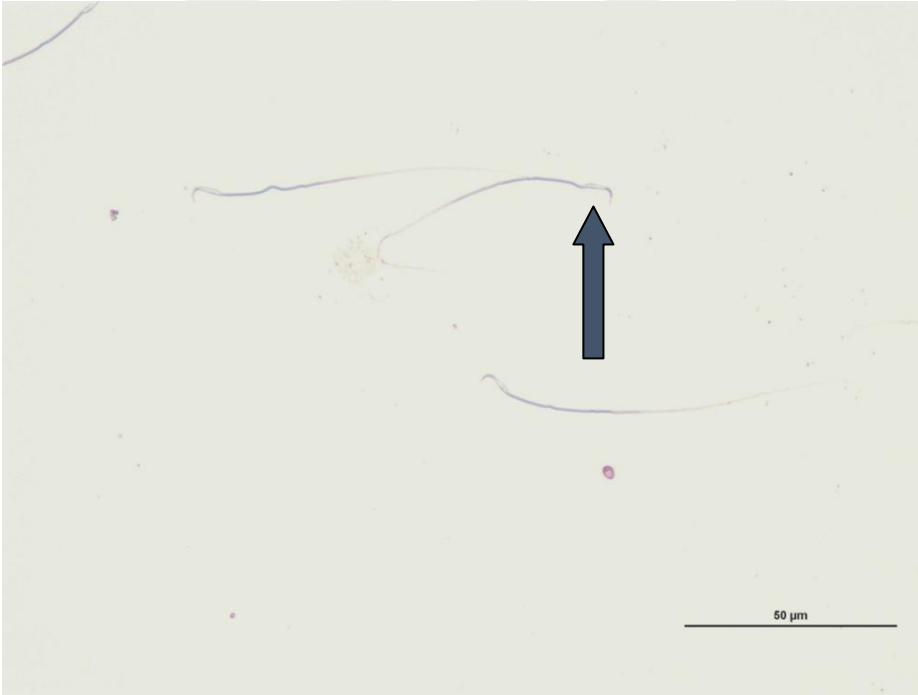
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

4.2.1. Sperm morfolojisi ve sayısı

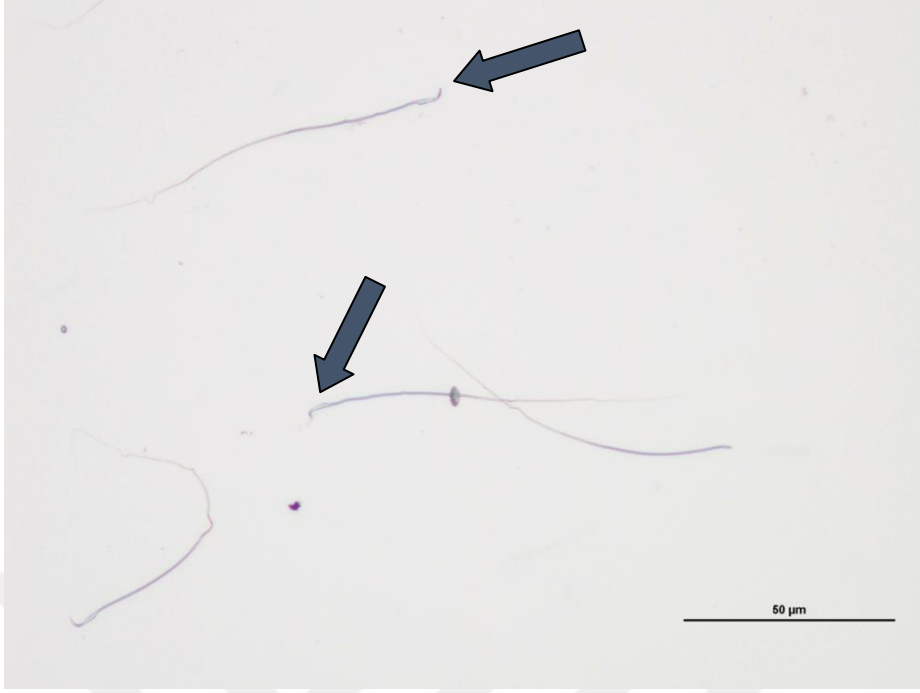
Grupların spermleri incelendiğinde morfolojik olarak normal oldukları görüldü. Sperm DNA bütünlüğünü incelemek üzere yapılan anilin mavisi boyamasında açık mavi boyananlar (-), koyu mavi boyananlar (+) olarak değerlendirildi. Tüm gruplarda sperm DNA bütünlüğünün korunduğu görülüp, gruplar arasında fark görülmedi (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7).



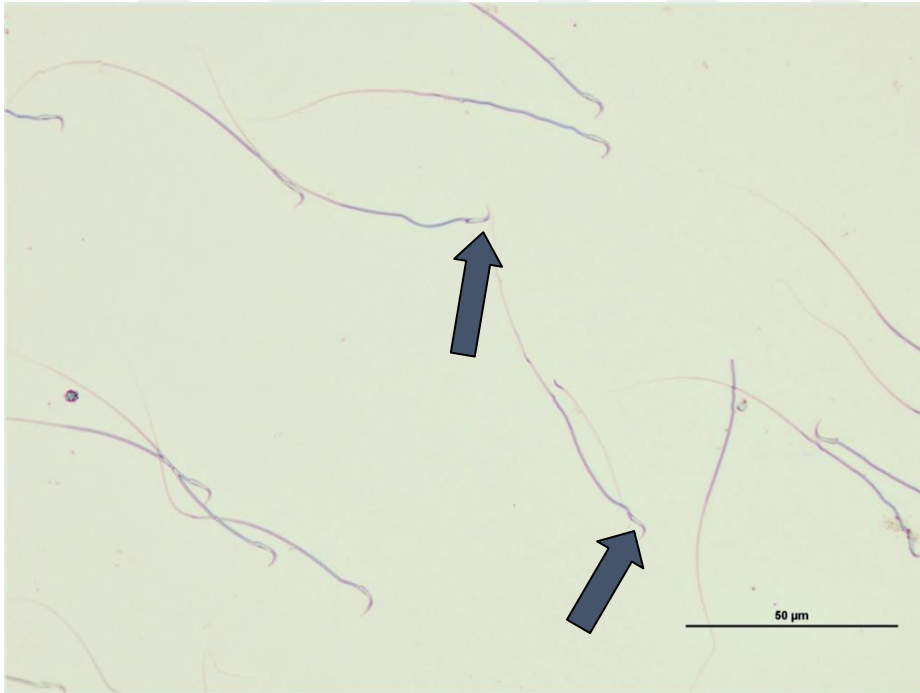
Şekil 4.4. Akrilamid grubuna ait sperm yayması (20X).



Şekil 4.5. Akrilamid+Kurt Üzümlü grubuna ait sperm yayması (20X).

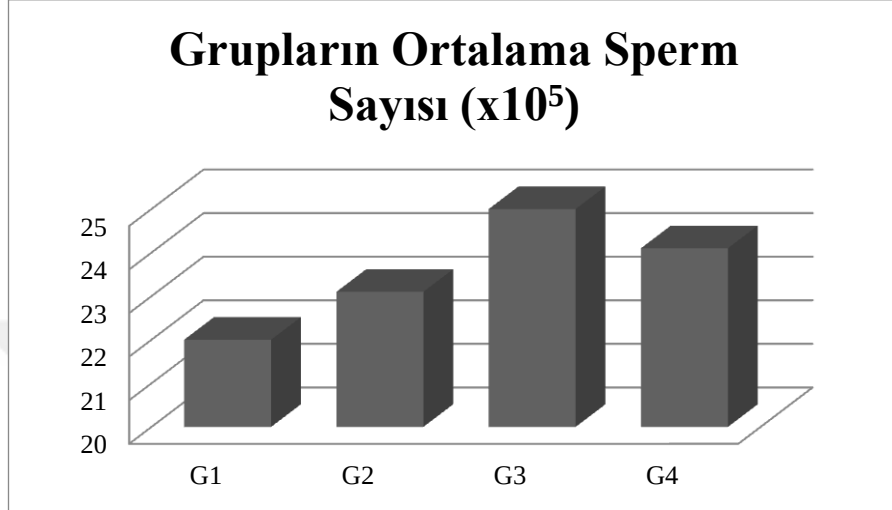


Şekil 4.6. Kontrol grubuna ait sperm yayması (20X).



Şekil 4.7. Kurt Üzümlü grubuna ait sperm yayması (20X).

Grupların sperm sayıları karşılaştırıldığında akrilamid uygulanmış gruplarda azalma olmasına karşın, istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmamıştır. Grupların ortalama sperm sayısı Şekil 4.8’de, tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 4.2’de gösterildi.



Şekil 4.8. Grupların ortalama sperm sayısı.

Tablo 4.2. Grupların sperm sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri (x10⁵).

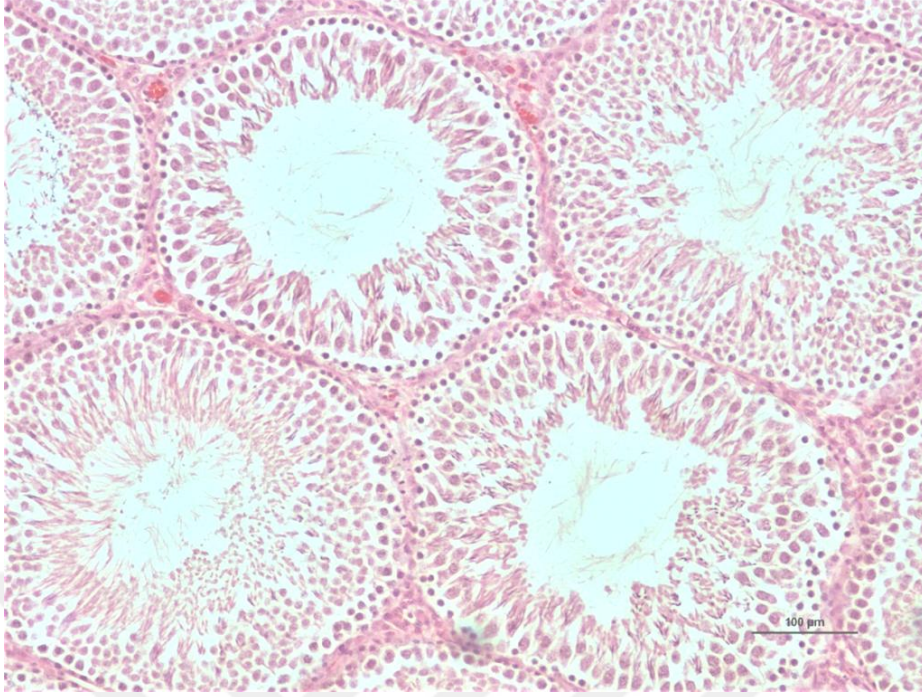
Gruplar	Tanımlayıcı İstatistik Değerleri					p değeri
	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	Median	
G1	22,00	5,05	15,00	30,00	23,00	0,925
G2	23,1	9,43	11,00	37,00	21,00	
G3	25	9,78	13,00	35,00	26,00	
G4	24,1	8,4	11,00	40,00	23,5	

4.2.2. Hematoksilen- Eozin, Masson Trikrom ve PAS boyamaları

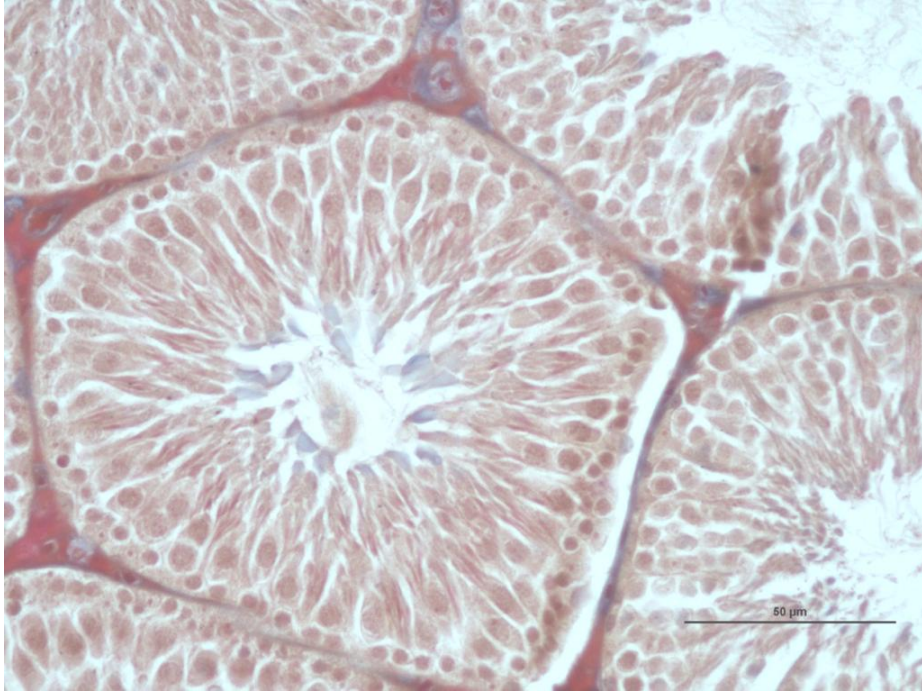
4.2.2.1. Kontrol grubu

Bu gruptaki deneklerin hemotoksilen-eozin ile boyanmış testis kesitleri incelendiğinde spermatogenik seri hücrelerinin bütünlüğünün korunduğu ve normal yapıda oldukları gözlemlendi. İntertisyal dokuda homojen olarak dağılan seminifer tübül yapıları düzgün olarak gözlemlendi. Seminifer tübüllerde Sertoli hücreleri ve intertisyal alanda Leydig hücreleri gözlemlendi (Şekil 4.9). Bağ dokuyu gözlemlemek için Masson trikrom ile boyanmış testis kesitleri incelendiğinde, intertisyal alanda gevşek bağ doku, lenf ve kan damarları gözlemlendi (Şekil 4.10). Bazal membranı gözlemlemek için PAS ile boyanan testis kesitleri incelendiğinde düzgün bir yapıda olduğu görüldü (Şekil 4.11).

Bu gruptaki deneklerin hemotoksilen-eozin ile boyanmış epididimis kesitleri incelendiğinde, epididimis kanallarını döşeyen, düzgün dizilmiş yalancı çok katlı streosilyalı epitel, epitelin bazaline yerleşen esas hücreler ve kanalların içinde hareket kazanmakta olan sperm hücreleri görüldü. Epididimis kanallarının etrafını saran ince bir düz kas tabakası gözlemlendi (Şekil 4.12). Bağ dokuyu gözlemlemek için yapılan Masson trikrom ile boyanmış epididimis kesitleri incelendiğinde, epididimis kanallarını çevreleyen gevşek bağ dokusu ve kan damarları gözlemlendi (Şekil 4.13). Bazal membranı gözlemlemek üzere PAS ile boyanan epididimis kesitleri incelendiğinde düzgün bir yapıda oldukları gözlemlendi (Şekil 4.14).



Şekil 4.9. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki seminifer tübüller (10X).



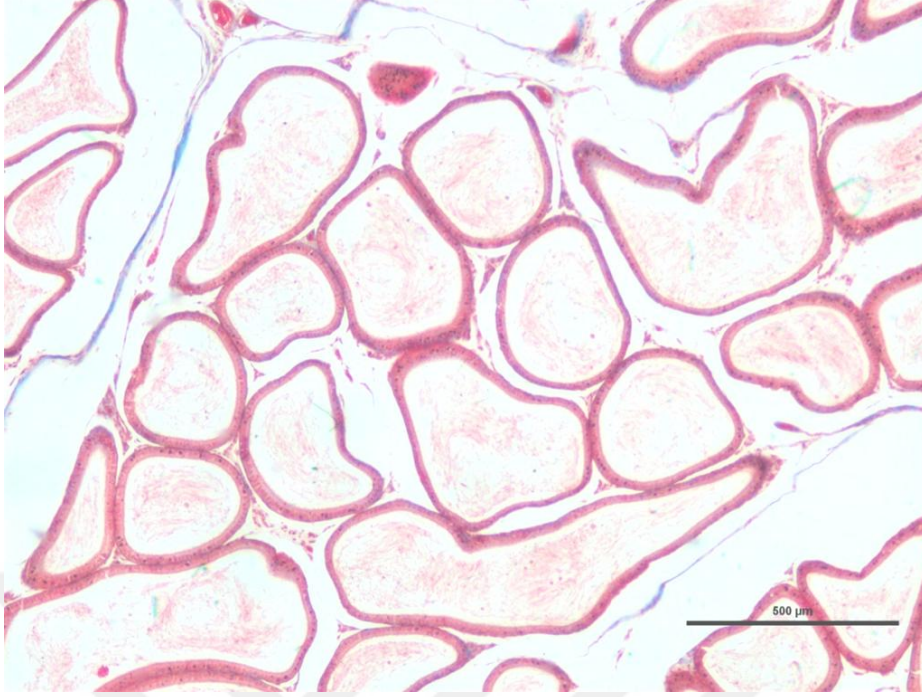
Şekil 4.10. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki seminifer tübüller (20X).



Şekil 4.11. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki seminifer tübüller (4X).



Şekil 4.12. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki epididimis kanalları (4X).



Şekil 4.13. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki epididimis kanalları (4X).

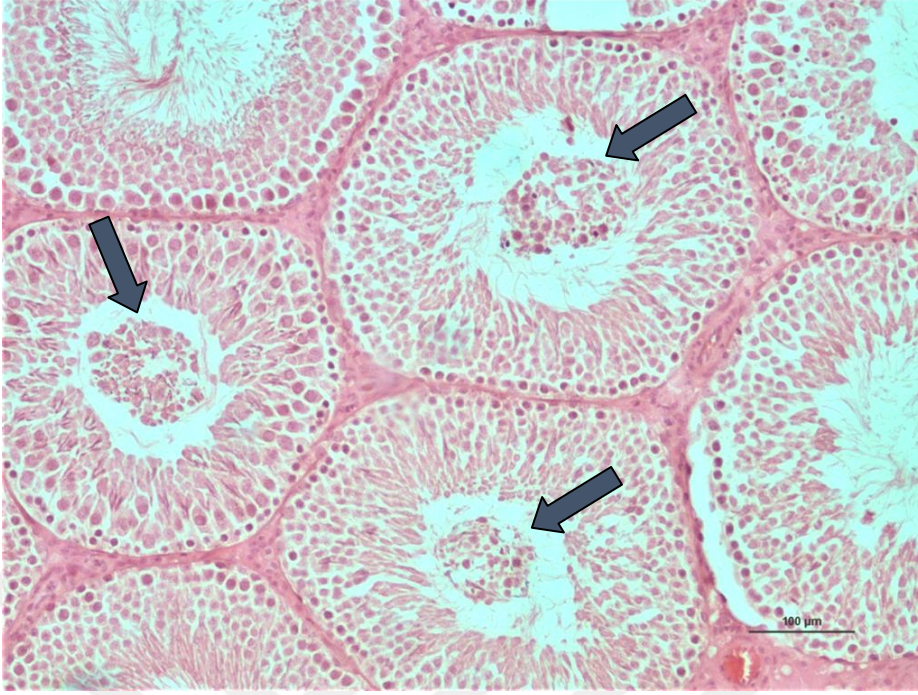


Şekil 4.14. Kontrol grubuna ait normal yapıdaki epididimis kanalları (4X).

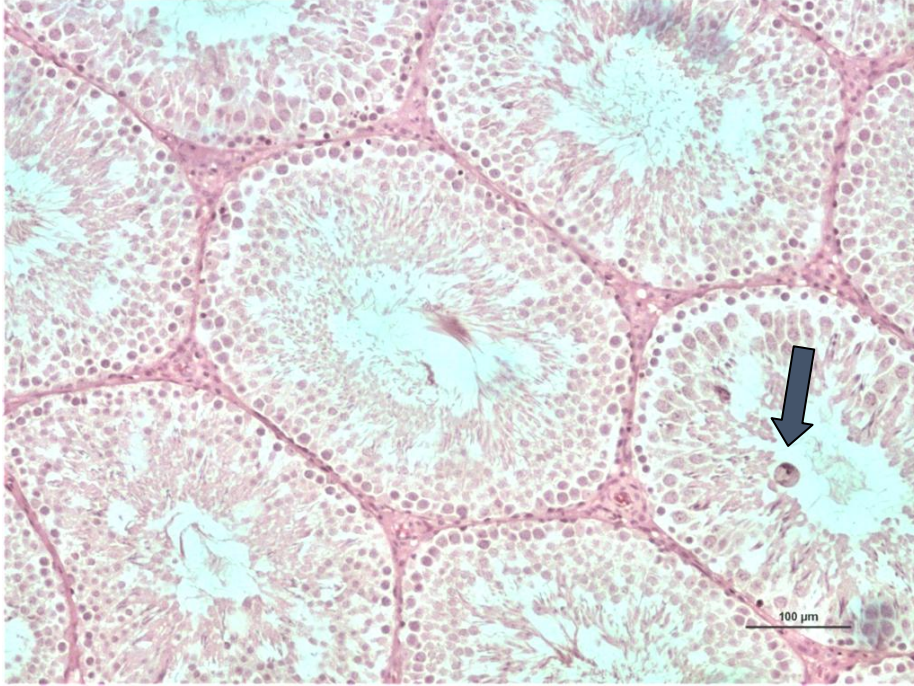
4.2.2.2. Akrilamid grubu

Bu gruptaki örneklerin testis dokusu hematoksil-e-eozin boyamasıyla incelendiğinde çok sayıda seminifer tübül lümeninde hücre döküntüleri (Şekil 4.15) ve bazı tübüllerde rezidual cisimcikler (Şekil 4.16) gözlemlendi. Bazı tübüllerde mayoz bölünme aşamaları ayırt edildi. Bunlara ek olarak, bazı seminifer tübüllerde vakuol yapılarına rastlandı (Şekil 4.17). Seminifer tübüllerde ağır dejenerasyon gözlenmedi. Sertoli hücreleri ve Leydig hücreleri normal bir şekilde gözlemlendi (Şekil 4.18). Masson trikrom boyamasıyla boyanmış kesitler incelendiğinde, ara bağ dokuda artış gözlenmedi (Şekil 4.19). PAS boyamasıyla boyanan kesitler incelendiğinde, bazal membranda herhangi bir kalınlaşma gözlenmedi (Şekil 4.20).

Bu grubun epididimis kesitleri incelendiğinde, epididimis kanallarında, kanalı çevreleyen dokularda ve sperm rezervlerinde herhangi bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.21). Ara bağ doku artışı (Şekil 4.22) ve bazal membran yapısında bir değişiklik gözlenmedi (Şekil 4.23).



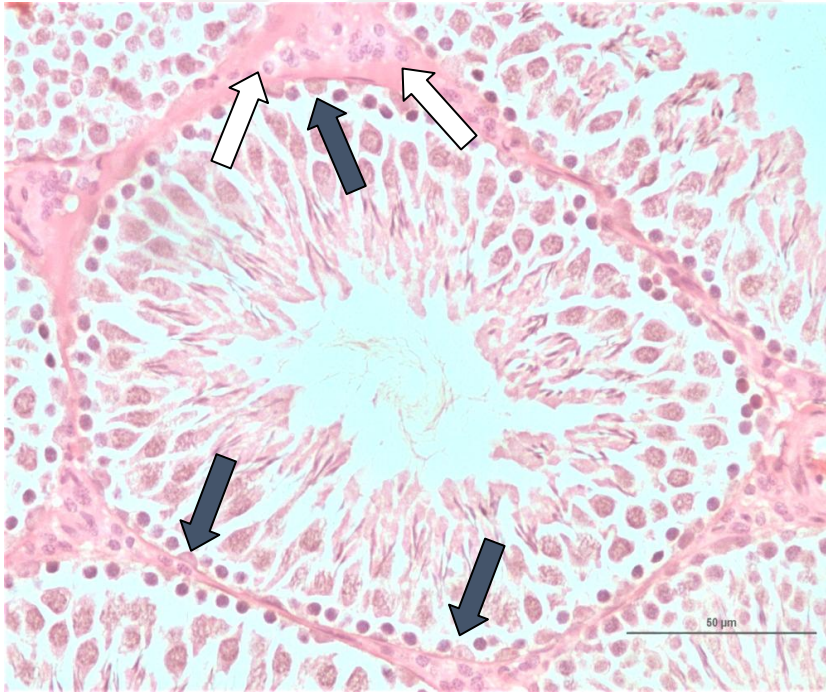
Şekil 4.15. Akrilamid grubuna ait semifer tübüller (10X).



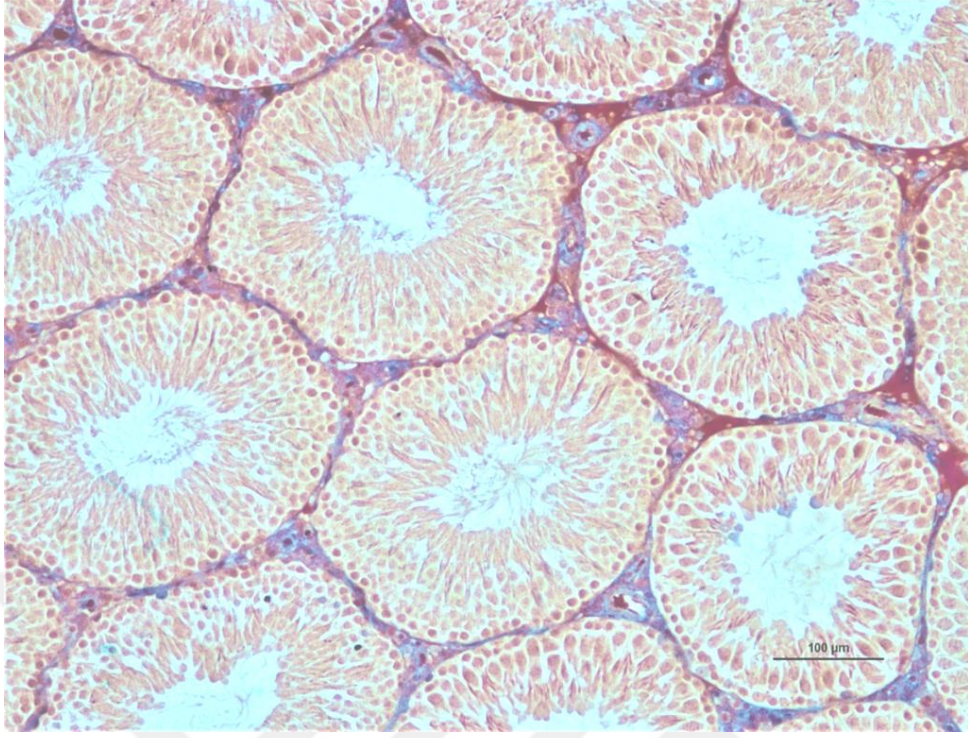
Şekil 4.16. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (10X).



Şekil 4.17. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (10X).



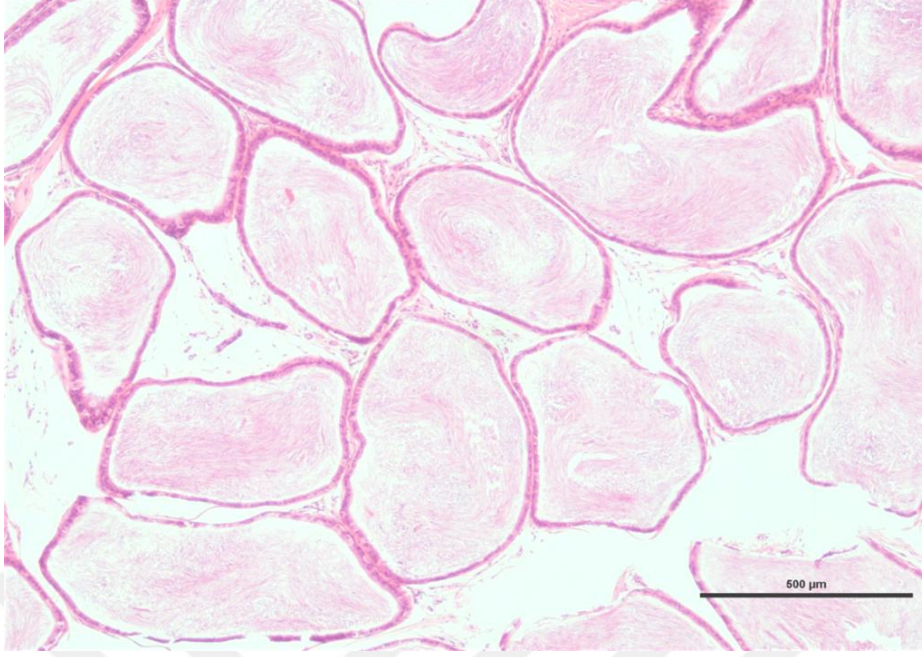
Şekil 4.18. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (20X).



Şekil 4.19. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (10X).



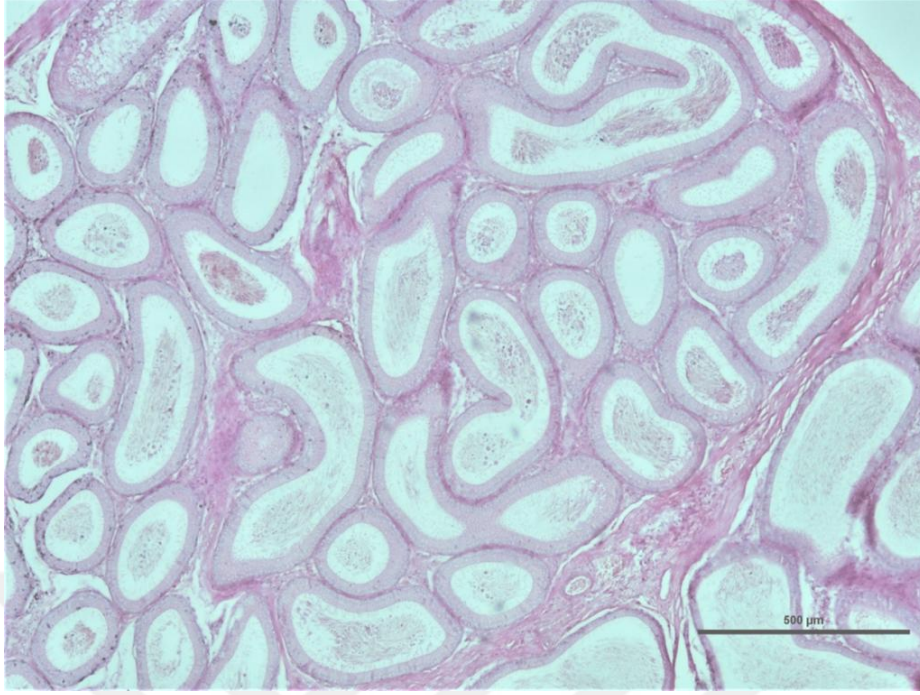
Şekil 4.20. Akrilamid grubuna ait seminifer tübüller (10X).



Şekil 4.21. Akrilamid grubuna ait epididimis kanalları (4X).



Şekil 4.22. Akrilamid grubuna ait epididimis kanalları (4X).

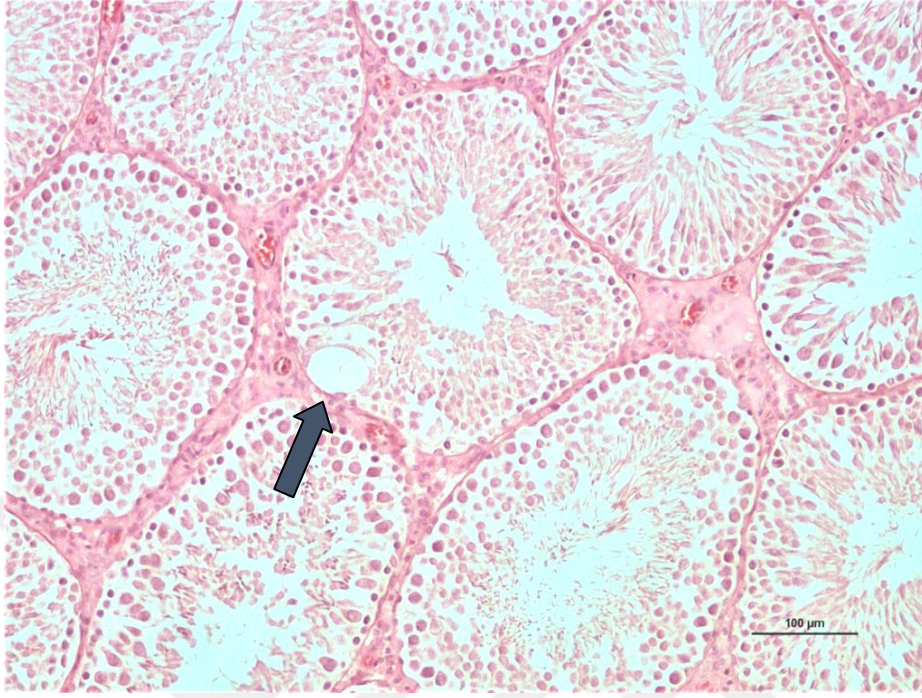


Şekil 4.23. Akrilamid grubuna ait epididimis kanalları (4X) .

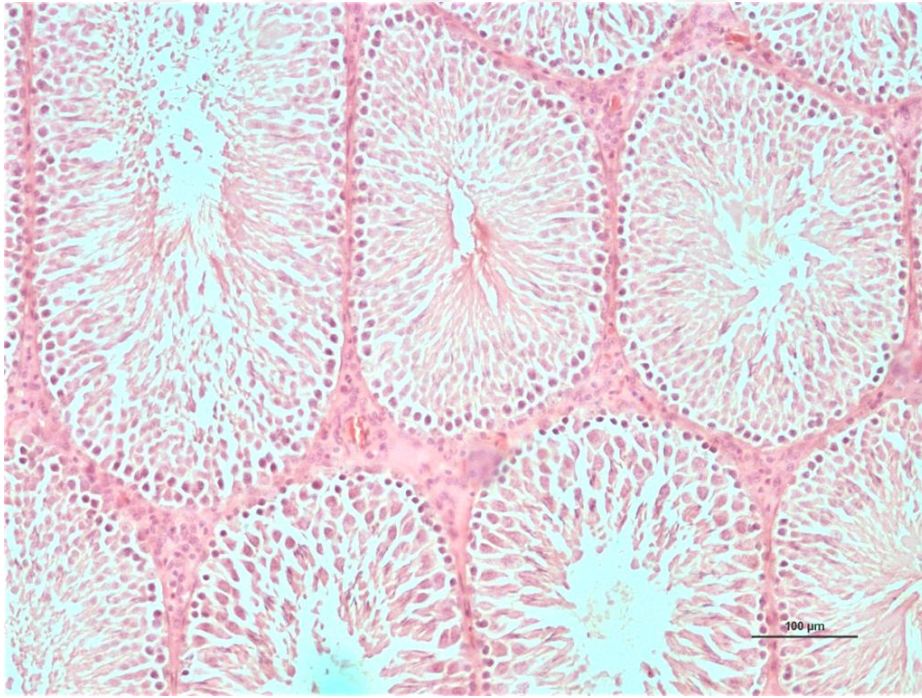
4.2.2.3. Akrilamid+Kurt Üzümlü grubu

Bu gruptaki deneklerin hemotoksilen-eozin ile boyanan testis kesitleri incelendiğinde bazı tübüllerde vakuol yapısı gözlemlendi (Şekil 4.24). Akrilamid grubunda olduğu gibi rezidual cisimciklere ve tübül lümeninde hücre döküntülerine rastlanmadı (Şekil 4.25). Spermatogenik hücre serileri normal olarak gözlemlendi. Sertoli hücrelerinde ve Leydig hücrelerinde bir değişiklik gözlenmedi. Bağ dokuyu incelemek üzere yapılan Masson trikrom boyamasıyla boyanan testis kesitleri incelendiğinde, bağ dokuda kalınlaşma görülmedi (Şekil 4.26). Bazal membranı incelemek için PAS boyamasıyla boyanan kesitler incelendiğinde, normal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.27).

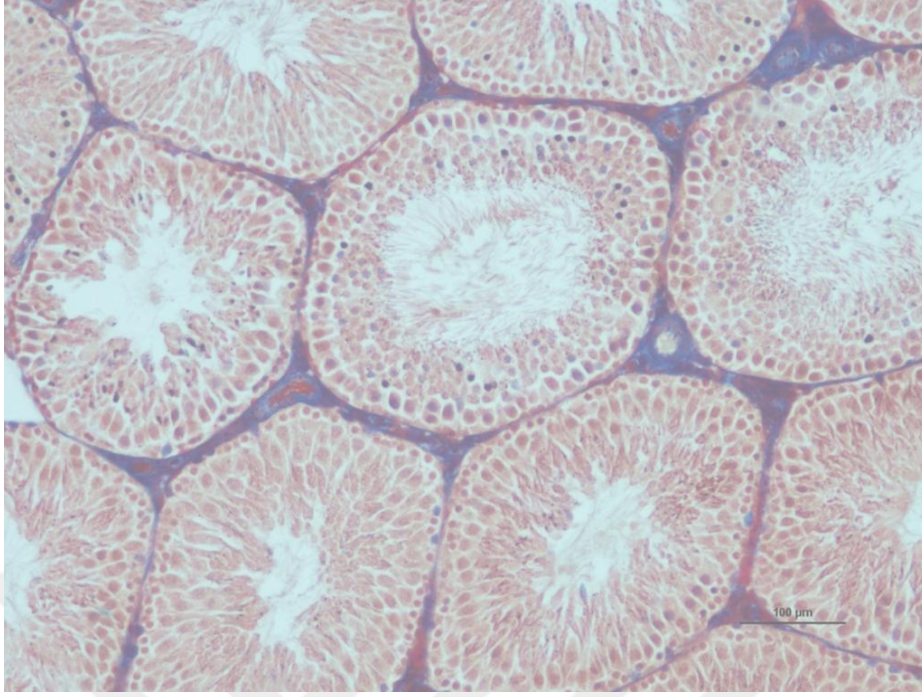
Bu gruptaki deneklerin hemotoksilen-eozin ile boyanan epididimis kesitleri incelendiğinde, epididimis kanalını döşeyen epitel, kanalı çevreleyen doku ve sperm rezervlerinin normal olduğu gözlemlendi (Şekil 4.28). Epididimis kesitlerinin bağ dokusunu gözlemlemek için Masson trikromla boyanan kesitler incelendiğinde, bağ dokuda kalınlaşma gözlenmedi (Şekil 4.29). Epididimis kanallarının bazal membranlarını gözlemlemek için PAS boyamasıyla boyanan kesitler incelendiğinde bir değişikliğe rastlanmadı (Şekil 4.30).



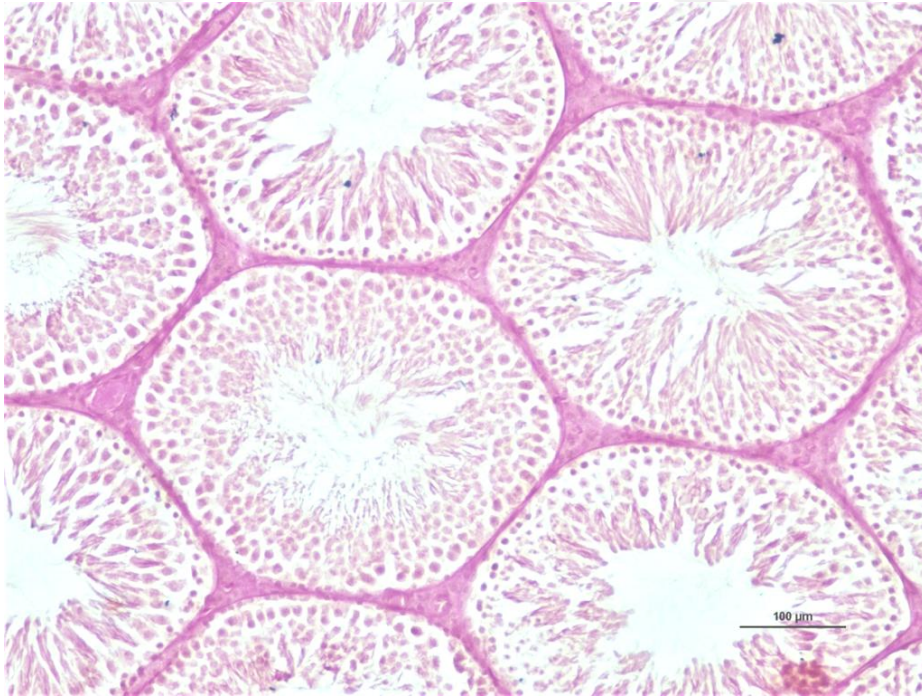
Şekil 4.24. Akrlamid+Kurt üzümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).



Şekil 4.25. Akrlamid+Kurt üzümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).



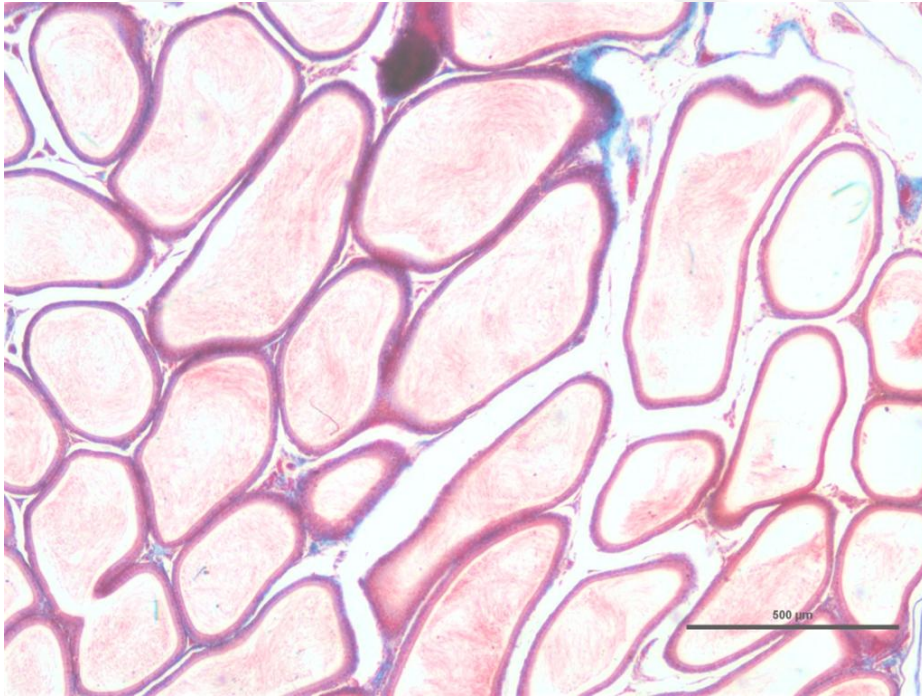
Şekil 4.26. Akrilamid+Kurt üzümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).



Şekil 4.27. Akrilamid+Kurt üzümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).



Şekil 4.28. Akrlamid+Kurt üzüümü grubuna ait epididimis kanalları (4X).



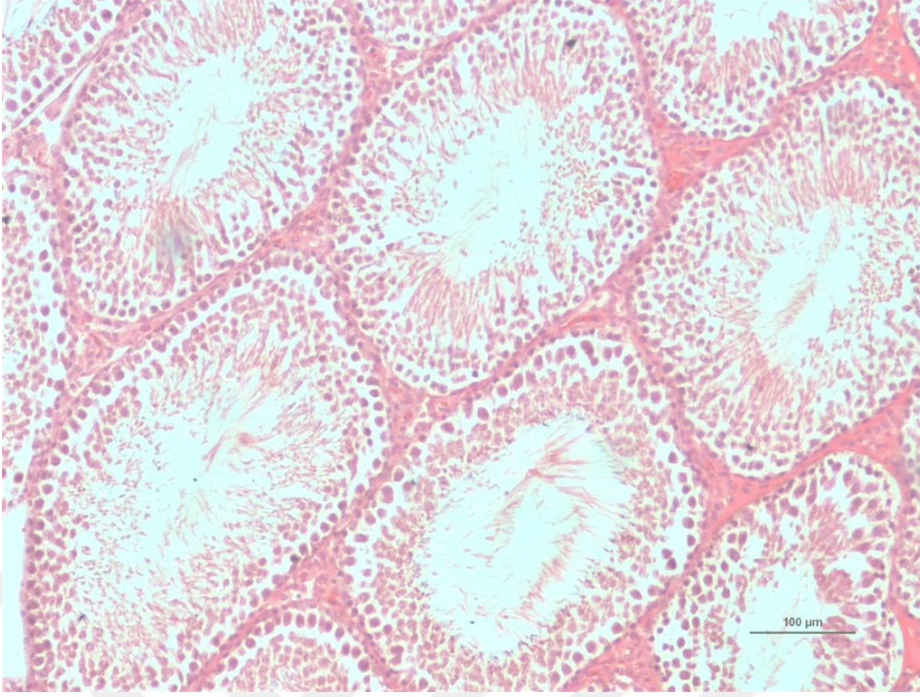
Şekil 4.29. Akrlamid+Kurt Üzüümü grubuna ait epididimis kanalları (4X).



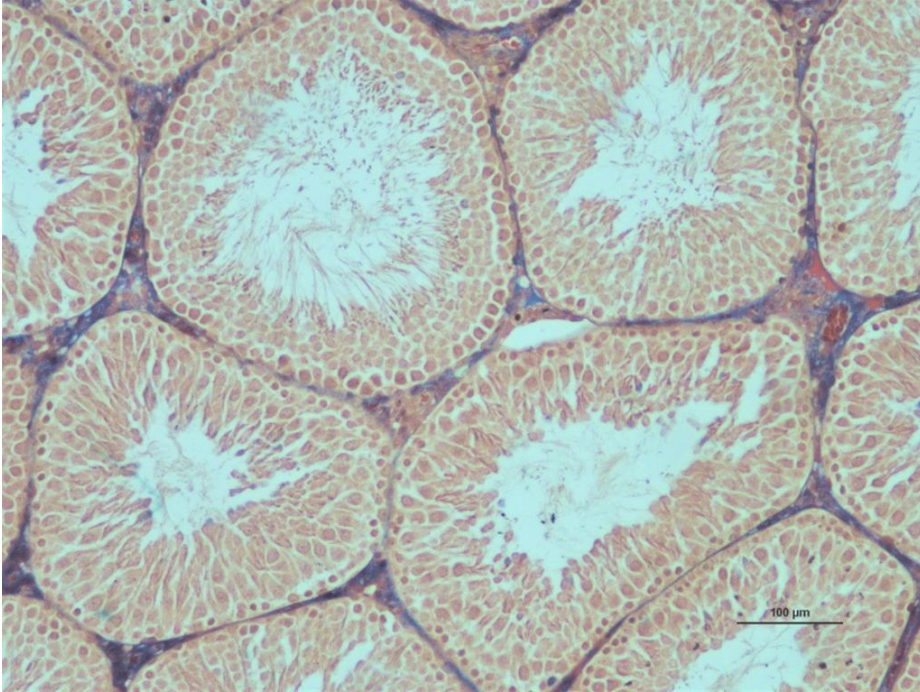
Şekil 4.30. Akrilamid+Kurt  z m  grubuna ait epididimis kanalları (4X).

4.2.2.4. Kurt  z m  grubu

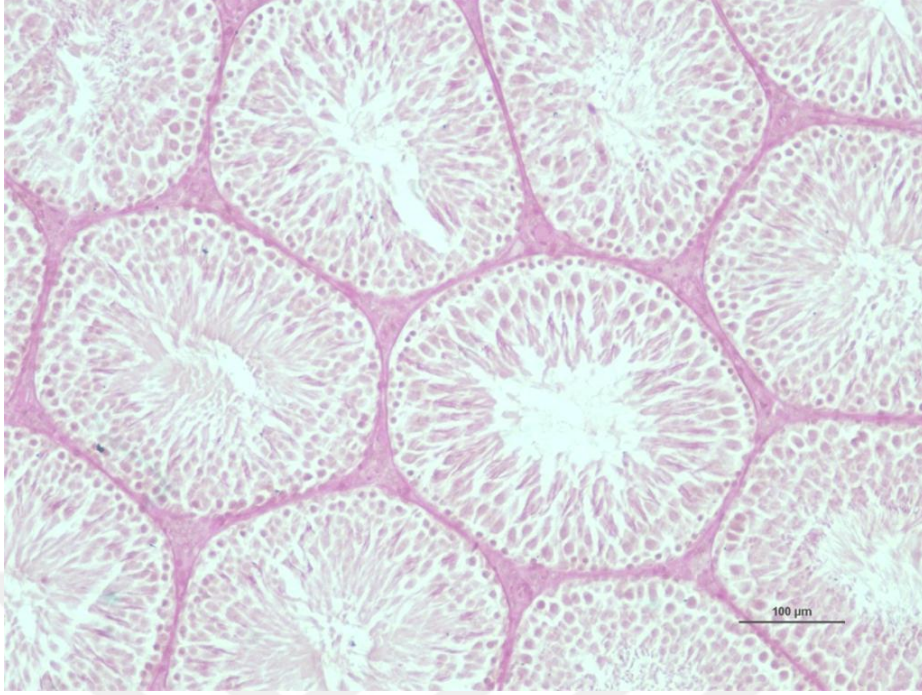
Bu gruptaki deneklerin hemotoksilen-eozin ile boyanmış, Masson trikrom ile boyanmış ve PAS boyamasıyla boyanmış testis kesitleri ( ekil 4.31,  ekil 4.32,  ekil 4.33) ile epididimis kesitleri ( ekil 4.34,  ekil 4.35,  ekil 4.36) incelendiğinde, kontrol grubuyla benzer sonuçlar gözlendi.



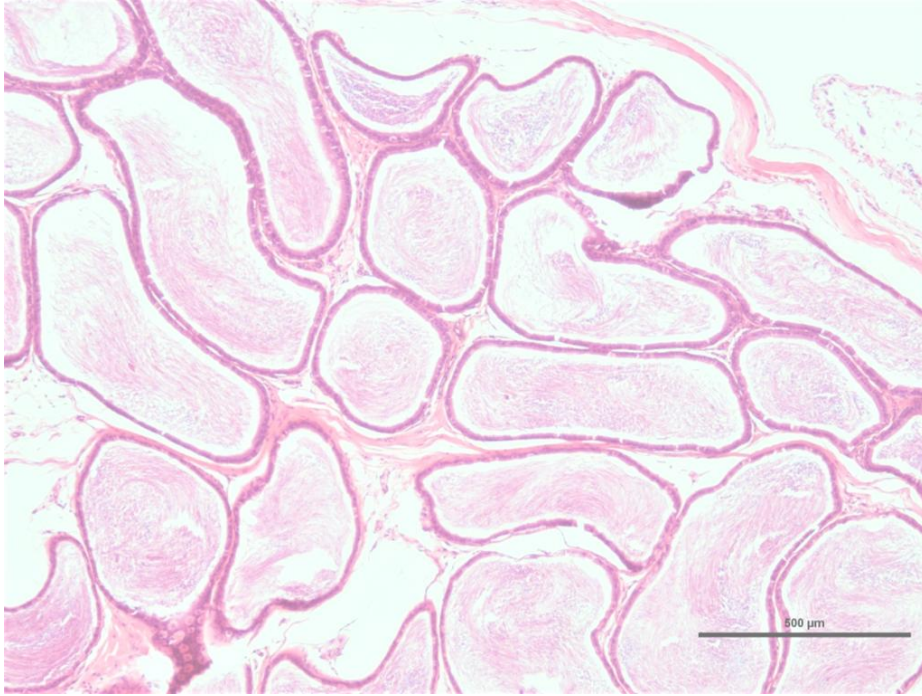
Şekil 4.31. Kurt Üzüümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).



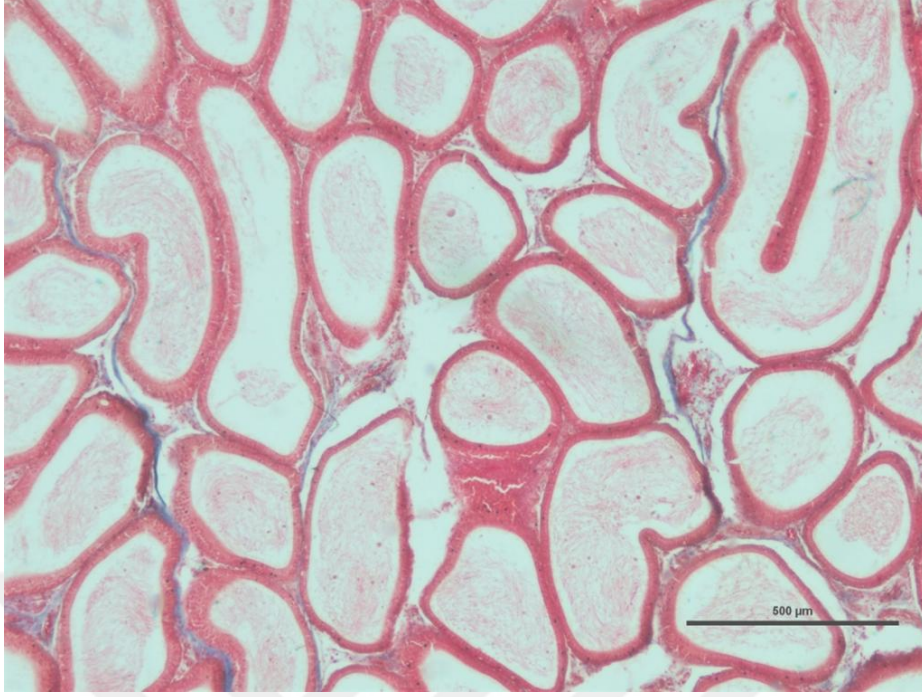
Şekil 4.32. Kurt Üzüümü grubuna ait seminifer tübüller (10X).



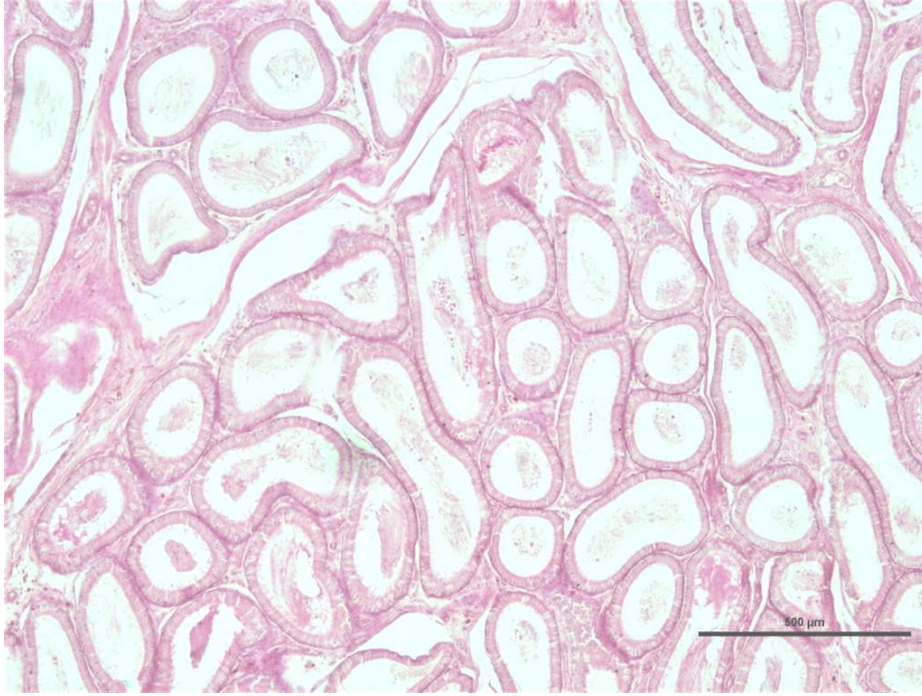
Şekil 4.33. Kurt Üzümlü grubuna ait seminifer tübüller (10X).



Şekil 4.34. Kurt Üzümlü grubuna ait epididimis kanalları (4X).



Şekil 4.35. Kurt Üzümleri grubuna ait epididimis kanalları (4X).

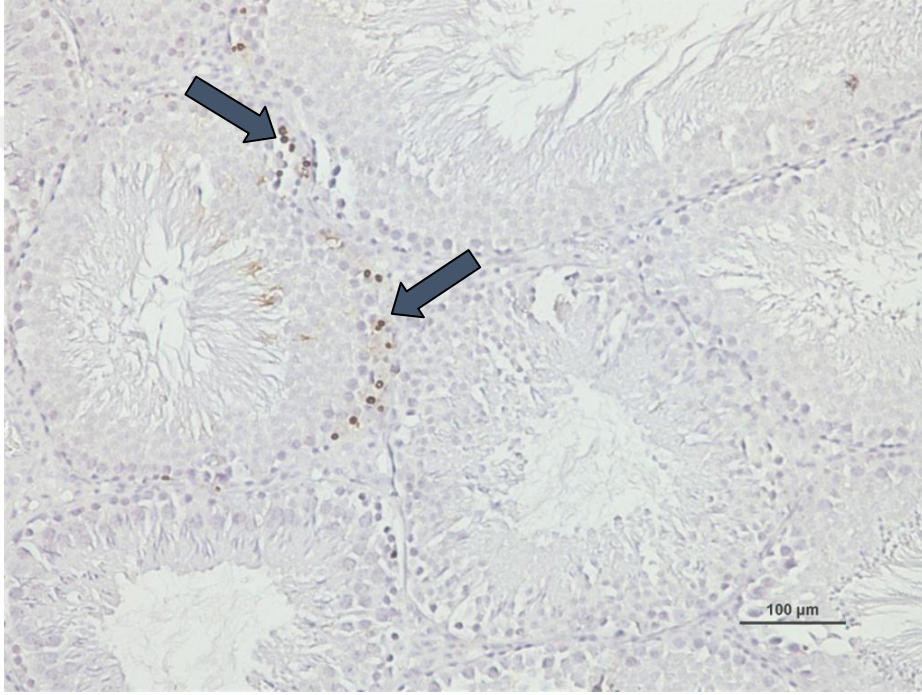


Şekil 4.36. Kurt Üzümleri grubuna ait epididimis kanalları (4X).

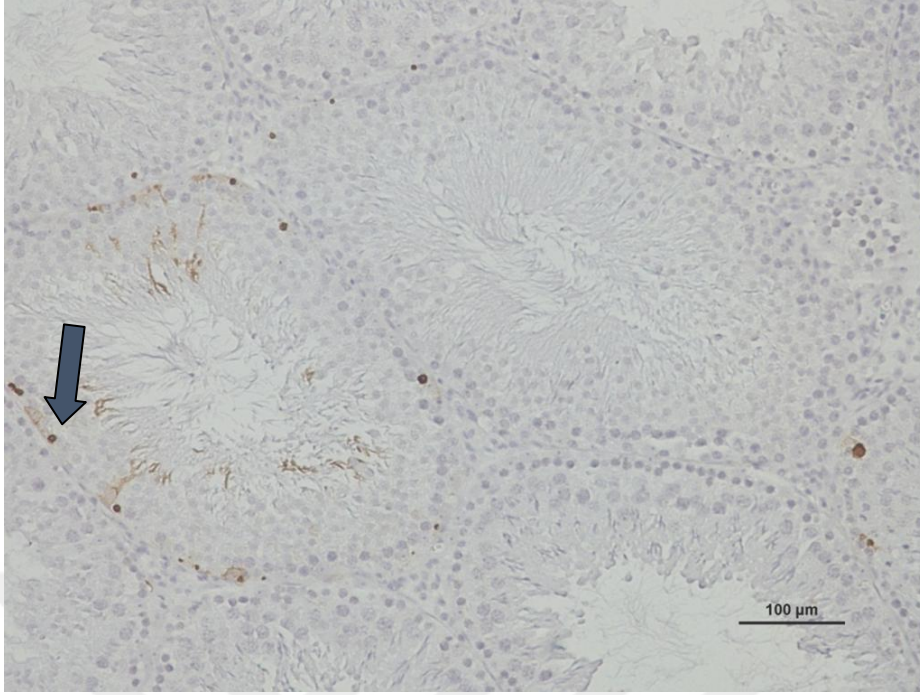
4.2.3. İmmunohistokimyasal bulgular

4.2.3.1. TUNEL boyaması

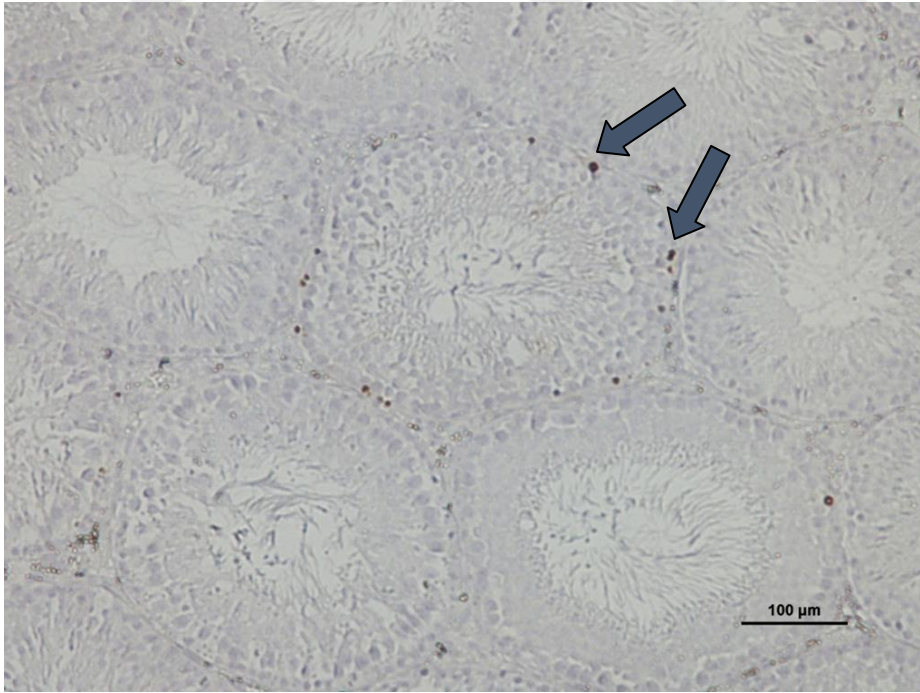
Apoptotik spermatogonyumları tespit etmek amacıyla yapılan TUNEL boyaması değerlendirildiğinde; akrilamid grubu (G1) (Şekil 4.37) ve akrilamid+kurt üzümü grubundaki (G2) (Şekil 4.38) TUNEL (+) spermatogonyumların, kontrol grubu(G3) (Şekil 4.39) ve kurt üzümü (G4) (Şekil 4.40) grubuna göre daha fazla olduğu saptandı.



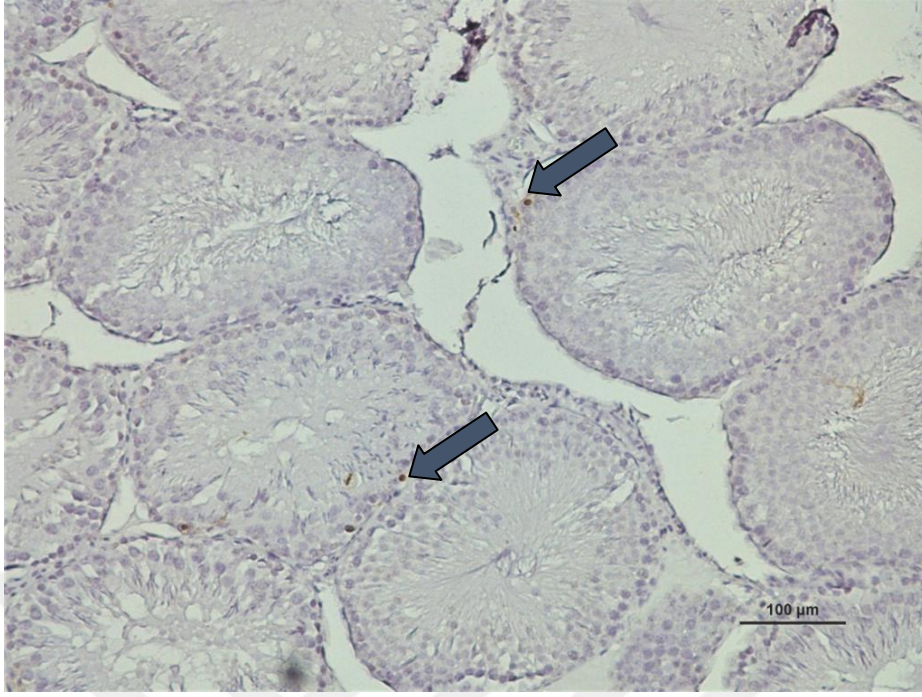
Şekil 4.37. Akrilamid grubuna ait TUNEL (+) boyanan spermatogonyumlar (10X).



Şekil 4.38. Akrlamid+Kurt Üzüümü grubuna ait TUNEL (+) boyanan spermatogonyumlar (10X).



Şekil 4.39. Kontrol grubuna ait TUNEL (+) boyanan spermatogonyumlar (10X).



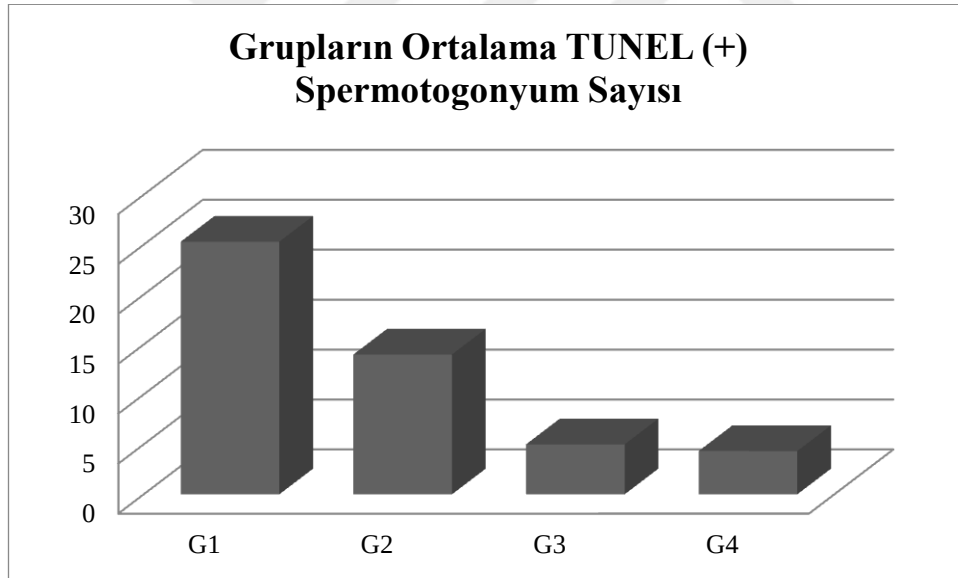
Şekil 4.40. Kurt Üzümlü grubuna ait TUNEL (+) boyanan spermatogonyumlar (10X).

Gruplar arası TUNEL (+) spermatogonyum sayılarını istatistiksel olarak değerlendirmek için, ışık mikroskopunun 40X'lik büyütmesiyle 10 farklı tübülde TUNEL (+) boyanan spermatogonyumlar sayıldı. Grupların tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 4.3'te, ortalama TUNEL (+) spermatogonyum sayısı aralarındaki ilişki Şekil 4.41'de gösterilmektedir.

TUNEL (+) spermatogonyum sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; G1 ile diğer gruplar arasında (G1-G2 için $p = 0,025$, G1-G3 için $p = 0,002$, G1-G4 için $p = 0,002$), G2 ile G3 arasında ($p = 0,011$), G2 ile G4 arasında ($p = 0,005$) ve tüm gruplar arasında ($p = 0,000$) anlamlı bir fark saptanırken; G3 ile G4 arasında ($p = 0,748$) anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 4.3. Grupların TUNEL (+) spermatogonyum sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.

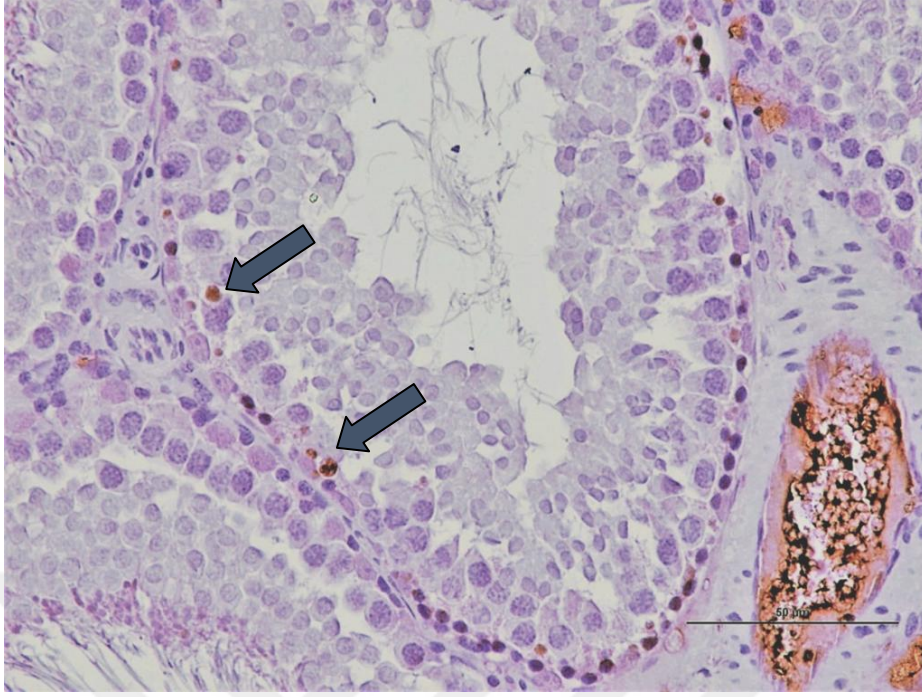
Gruplar	Tanımlayıcı İstatistik Değerleri				
	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	Median
G1	25,3	8,57	16,00	37,0	22,0
G2	14,00	6,07	7,0	22,0	13,0
G3	5,00	2,2	2,00	8,00	4,5
G4	4,33	1,21	3,00	6,00	4,5



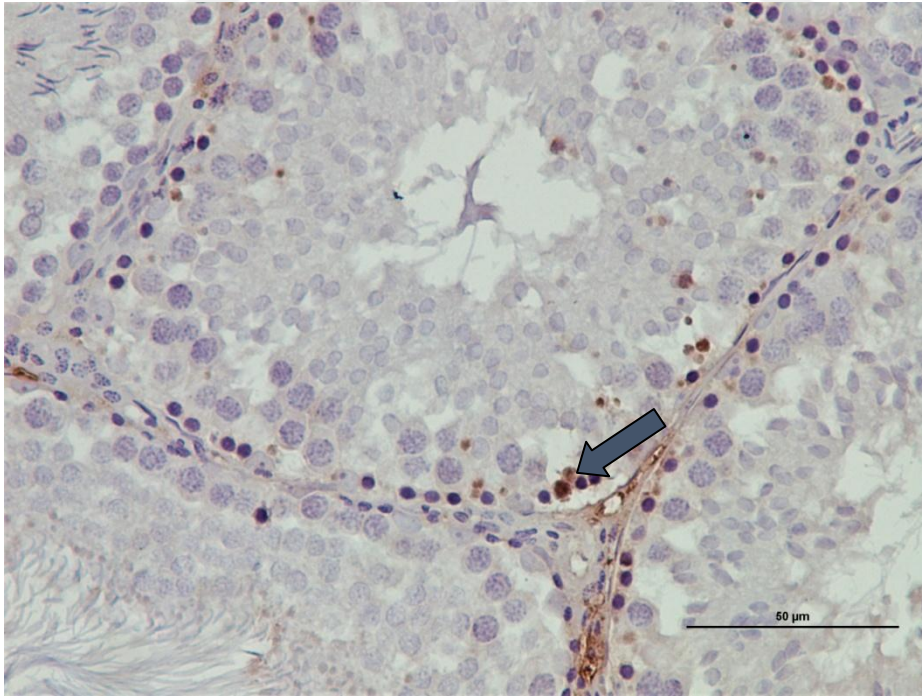
Şekil 4.41. Grupların ortalama TUNEL (+) spermatogonyum sayıları.

4.2.3.2. Ki67 boyaması

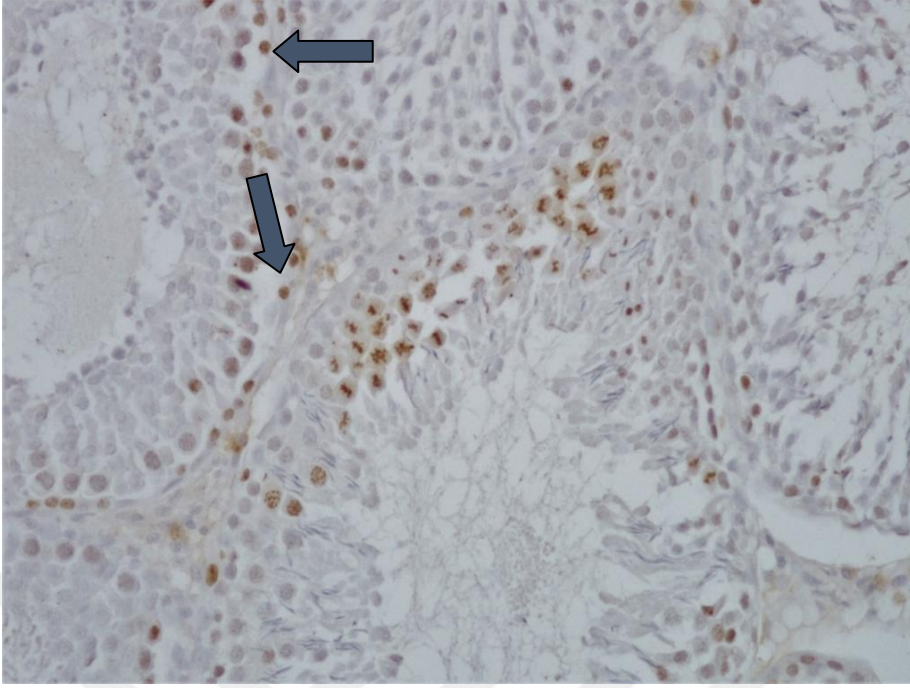
Spermatogonyumların proliferasyonunu tespit etmek amacıyla yapılan Ki67 boyaması ışık mikroskopuyla gözlemsel olarak değerlendirildiğinde; akrilamid grubu (G1) (Şekil 4.42) ve akrilamid+kurt üzümü grubundaki (G2) (Şekil 4.43) Ki67(+) spermatogonyumların, kontrol grubu (G3) (Şekil 4.44) ve kurt üzümü grubuna (G4) (Şekil 4.45) göre daha az olduğu görüldü.



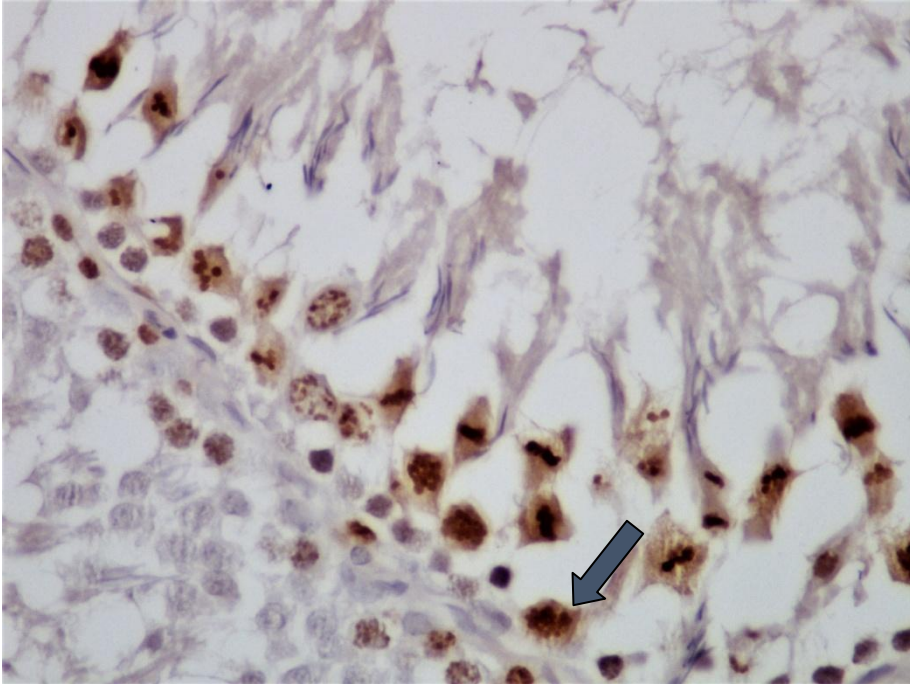
Şekil 4.42. Akrylamid grubuna ait Ki67 (+) spermatogonyumlar (20X).



Şekil 4.43. Akrylamid+Kurt üzüümü grubuna ait Ki67 (+) spermatogonyumlar (20X).



Şekil 4.44. Kontrol grubuna ait Ki67 (+) spermatogonyumlar (20X).



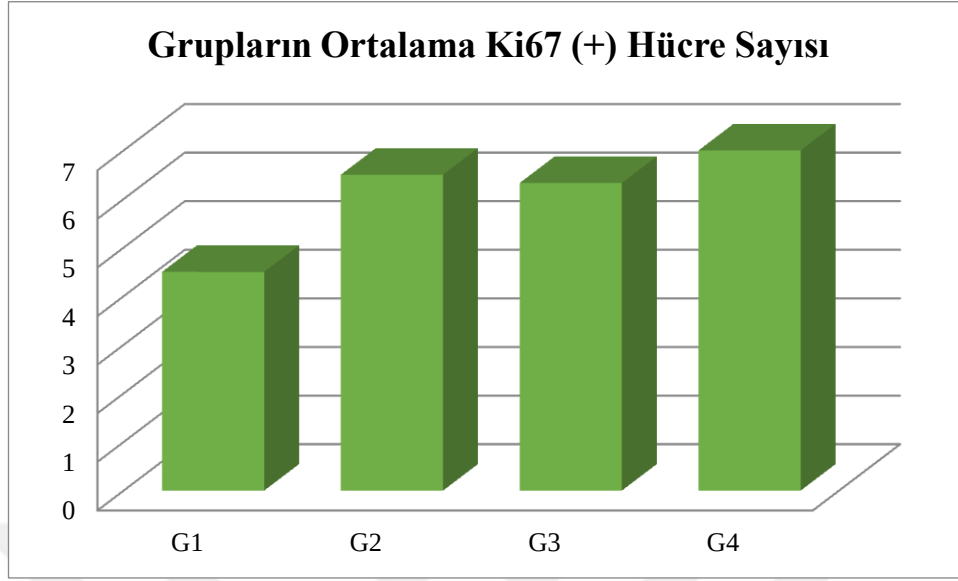
Şekil 4.45. Kurt Üzümlü grubuna ait Ki67 (+) spermatogonyumlar (40X).

Gruplar arası Ki67 (+) spermatogonyum sayılarını istatistiksel olarak değerlendirmek için, ışık mikroskobunun 40X'lik büyütmesiyle 10 farklı tübül sayıldı. Grupların tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 4.4'te, ortalama Ki67 (+) spermatogonyum sayıları arasındaki ilişki Şekil 4.46'da gösterilmektedir.

Ki67 (+) spermatogonyum sayıları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; G1 ile G2 arasında ($p=0,016$) anlamlı bir fark bulunurken, diğer gruplar arasında (G1-G3 için $p=0,166$, G1-G4 için $p=0,118$, G2-G3 için $p=0,359$, G2-G4 için $p=0,451$, G3-G4 için $p=0,677$ ve G1-G2-G3-G4 için $p=0,12$) anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 4.4. Grupların Ki67 (+) spermatogonyum sayılarının tanımlayıcı istatistik değerleri.

Gruplar	Tanımlayıcı İstatistik Değerleri				
	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	Median
G1	4,5	1,38	3,0	6,0	4,5
G2	6,5	0,84	6,0	8,0	6,0
G3	6,33	2,50	4,0	11,0	5,5
G4	7,0	3,16	5,0	13,0	5,5



Şekil 4.46. Grupların ortalama Ki67 (+) spermatogonyum sayısı.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. Antioksidan analizi

4.3.1.1. MDA analizi

Gruplardaki deneklerin testis dokularındaki MDA düzeyleri ölçüldü. Ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi. Grupların testis dokularındaki MDA düzeyleri arasında anlamlı bir fark olmadığı saptandı. (G1-G2 için $p=0,522$, G1-G3 için $p=0,574$, G1-G4 için $p=0,423$, G2-G3 için $p=1,0$, G2-G4 için $p=0,337$, G3-G4 için $p=0,630$ ve G1-G2-G3-G4 için $p=0,76$). Grupların tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Grupların MDA düzeylerinin tanımlayıcı istatistik değerleri (nmol).

Gruplar	Tanımlayıcı İstatistik Değerleri				
	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	Median
G1	70,76	57,42	34,68	184,46	47,07
G2	66,89	27,96	35,14	106,98	62,38
G3	111,4	136	34,68	387,6	60,5
G4	89,1	40,50	31,76	134,68	98,9

4.3.1.2. CAT analizi

Gruplardaki deneklerin testis dokusundaki CAT düzeyleri ölçüldü. Ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi. Sadece kurt özümü uygulanan grubun testis dokularının CAT düzeyi arttırmış olsa da, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulundu. (G1-G2 için $p=0,522$, G1-G3 için $p=0,423$, G1-G4 için $p=0,150$, G2-G3 için $p=0,936$, G2-G4 için $p=0,200$, G3-G4 için $p=1,0$ ve G1-G2-G3-G4 için $p=0,354$). Grupların tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 4.6’ da gösterilmiştir.

Tablo 4.6. Grupların CAT düzeylerinin tanımlayıcı istatistik değerleri (u/l).

Gruplar	Tanımlayıcı İstatistik Değerleri				
	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	Median
G1	8,56	5,93	5,04	20,51	6,10
G2	8,13	3,42	5,65	14,76	6,74
G3	10,21	6,60	5,50	21,22	6,49
G4	16,36	13,80	6,06	42,04	11,5

4.3.1.3. SOD analizi

Gruplardaki deneklerin testis dokularındaki SOD düzeyleri ölçüldü. Ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi. Grupların testis dokularındaki SOD düzeyleri bakımından aralarında anlamlı bir fark olmadığı bulundu (G1-G2 için $p=0,294$, G1-G3 için $p=0,551$, G1-G4 için $p=0,471$, G2-G3 için $p=0,182$, G2-G4 için $p=0,159$, G3-G4 için $p=0,915$ ve G1-G2-G3-G4 için $p=0,288$). Grupların tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 4.7’de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Grupların SOD düzeylerinin tanımlayıcı istatistik değerleri (u/ml).

Gruplar	Tanımlayıcı İstatistik Değerleri				
	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	Median
G1	42,91	4,65	35,21	48,75	43,44
G2	47,94	10,097	40,21	67,08	44,46
G3	40,87	6,650	32,52	48,96	41,35
G4	40,45	6,58	31,25	50,83	41,15

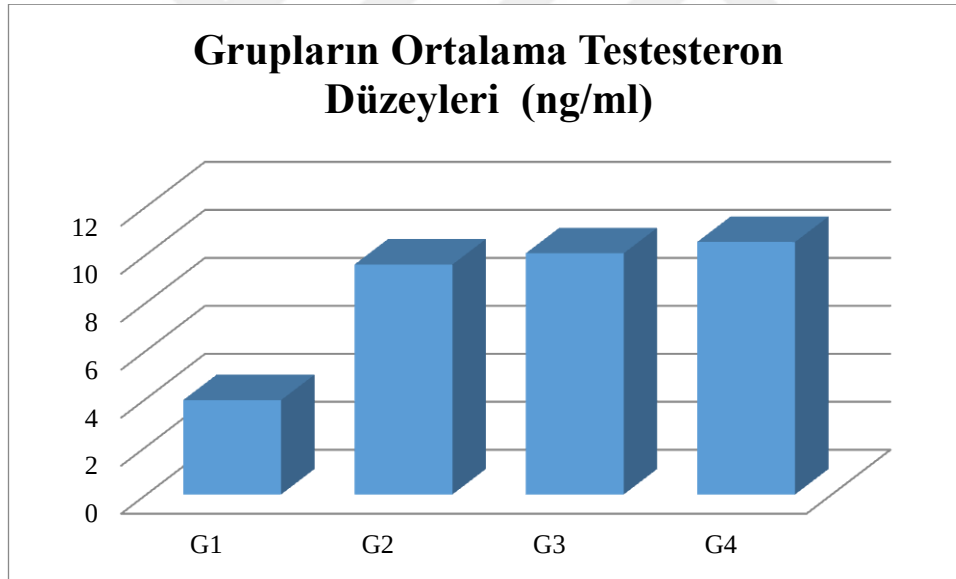
4.3.2. Hormon analizleri

4.3.2.1. Testesteron analizi

Gruplardaki deneklerin testesteron düzeyleri ölçüldü. Ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; akrilamid grubu (G1) ile akrilamid+kurt üzümü grubu (G2) arasında ve akrilamid grubu (G1) ile kurt üzümü grubu (G4) arasında anlamlı bir fark bulunurken (G1-G2 için $p=0,031$, G1-G4 için $p=0,049$), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (G1-G3 için $p=0,072$, G2-G3 için $p=0,891$, G2-G4 için $p=0,779$, G3-G4 için $p=0,901$ ve G1-G2-G3-G4 için $p=0,143$). Grupların tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 4.8’de, ortalama testesteron düzeyleri arasındaki ilişki Şekil 4.47’de gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Grupların testesteron düzeylerinin tanımlayıcı istatistik değerleri (ng/ml).

Gruplar	Tanımlayıcı İstatistik Değerleri				
	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	Median
G1	3,93	2,094	1,11	5,99	4,08
G2	9,58	5,11	2,58	16,23	10,4
G3	10,05	6,55	3,07	18,20	8,95
G4	10,52	6,26	5,12	19,20	7,49



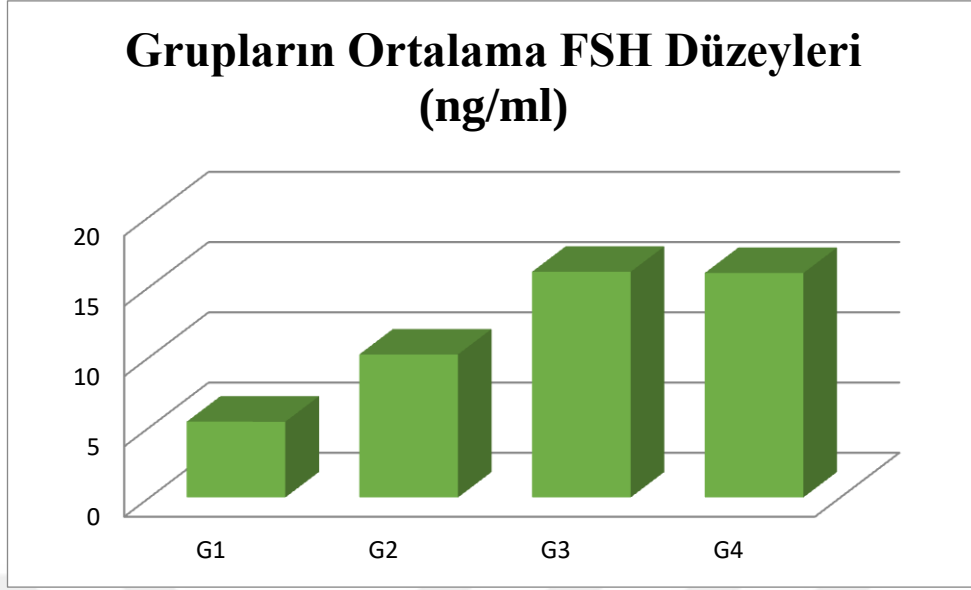
Şekil 4.47. Grupların ortalama testesteron düzeyleri.

4.3.2.2. FSH analizi

Gruplardaki deneklerin serum FSH düzeyleri ölçüldü. Ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; akrilamid grubu (G1) ve kontrol grubu (G3) arasında anlamlı bir fark bulunurken (G1-G3 için $p=0,007$), diğer gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı (G1-G2 için $p=0,249$, G1-G4 için $p=0,056$, G2-G4 için $p=0,340$, G2-G3 için $p=0,207$, G3-G4 için $p=0,986$ ve G1-G2-G3-G4 için $p=0,093$). Grupların tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 4.9’da, ortalama FSH değerleri arasındaki ilişki Şekil 4.48’de gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Grupların FSH düzeylerinin tanımlayıcı istatistik değerleri (ng/ml).

Gruplar	Tanımlayıcı İstatistik Değerleri				
	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maksimum	Median
G1	5,39	4,24	0,25	11,40	4,16
G2	10,18	8,60	0,55	26,23	8,72
G3	16,06	6,36	4,75	22,73	17,21
G4	15,972	11,24	6,54	36,13	12,9



Şekil 4.48. Grupların ortalama FSH düzeyleri.

5. TARTIŞMA

Akrilamid (ACR); polar fonksiyonel gruplar içeren ve suda çözünebilen monomer bir moleküldür (4). Akrilamid polimerleri kağıt üretimi, su arıtımı ve yağ üretimi gibi birçok endüstriyel alanda ve biyomoleküler laboratuvarlarda kullanılan elektroforez jeli gibi malzemelerin üretiminde kullanılmaktadır (49). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2002 yılında birçok besindeki akrilamid miktarını açıklamasıyla beraber kanserojen oluşundan ötürü halkın ve bilim dünyasının ilgisini çekmiştir. Özellikle karbonhidrat ve protein içeren gıdaların ısıtılması sonucunda asparajin gibi aminoasitler ile glikoz gibi indirgenen şekerlerin etkişimi ile oluşan Maillard reaksiyonu sonucunda açığa çıktığı bilinmektedir (37, 38). Araştırmalar akrilamidin pek çok mekanizmayla, sinir sisteminde, iskelet-kas sisteminde ve üreme sisteminde hasara yol açtığını göstermektedir (4, 39).

Bu çalışmada genç erkek ratlara uygulanan akrilamidin testislerdeki toksik etkileri ve güçlü antioksidan özelliği olan kurt üzümü ekstraktının toksik etkiye karşı koruyuculuğu ışık mikroskopik ve biyokimyasal olarak incelenmiştir.

Akrilamidin testislerdeki toksik dozu 45-60 mg/kg olup, çalışmamızda 50 mg/kg doz kullanılmıştır (6, 50).

Hayvanların deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları ölçülmüş; G1,G2 ve G4'teki ratların vücut ağırlığında azalma görülmüştür. Bu azalma G1 ve G2 için istatistiksel olarak anlamlı iken, G4 için anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Artan dozlarda (5-15-30-45-60 mg/kg) akrilamid verilen çalışmalarda, akrilamid uygulaması öncesi ve sonrası vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bildirilmiştir (4, 6). Tyl ve ark. (4) çalışmalarında akrilamidin yol açtığı vücut ağırlığı kaybının ve nörotoksik bulguların uygulama bittikten sonraki 2. ve 3. haftalarda etkisini kaybettiğini belirtmişlerdir. Nörotoksik etki sonucunda ratlarda oluşan uyuşukluk ve huzursuzluk sonucunda ortaya çıkan beslenme yetersizliğinin vücut ağırlık kaybına neden olabileceği şeklinde yorumlanmışlardır. Amagese ve Farnsworth (44)'ün 2011 yılında yayınlanan derleme makalesinde kurt üzümünün metabolizmayı hızlandırdığı belirtilmiştir. Çalışmamızda sadece kurt üzümü uygulanan G4'teki deneklerin deney sonunda vücut ağırlıklarının azalması, metabolizmalarının hızlanması sonucu olabilir. Bu

gruptaki hayvanların oral gavaj uygulaması sonucunda strese maruz kalması deney sonrası gözlenen vücut ağırlığı kaybının bir diğer nedeni olabilir.

Akrilamid; sperm hücrelerinin DNA bütünlüğünü ve mobilitesini etkilemekte, sperm rezervlerini düşürmektedir (4, 42, 43).

Çalışmamızda deney sonunda kurban edilen ratların sağ epididimislerinin kauda kısmı alınarak PBS'ye konulmuş ve sperm sayımı yapılmıştır. Sayılan sperm değerlendirildiğinde, G1 ve G2'nin G3 ve G4'e göre daha az sayıda sperm rezervlerinin olduğu fakat bunun istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur. Ancak Yang ve ark. (6) yaptıkları çalışmada sperm rezervlerinin uygulanan tüm dozlardaki akrilamiden etkilenip istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığını belirtmektedirler. Diğer bir yandan, Tyl ve ark. (4) 2000 yılında yapmış oldukları çalışmada akrilamid uygulanıp kurban edilen ratların epididimal sperm konsantrasyonu ile kontrol grubunun epididimal sperm konsantrasyonu arasında istatistiksel anlamda fark olmadığı belirtilmiştir.

Çalışmamızda sperm DNA bütünlüğünü incelemek üzere anilin mavisi boyanan örnekler incelendiğinde, 4 grup arasında bir fark olmadığı ve tüm gruplarda sperm DNA bütünlüğünün korunduğu gözlemlendi. Pourtezari ve ark. (42) 2014 yılında yaptıkları çalışmada, fareler 2 gruba ayrılmış; bir grup 35 gün boyunca normal bir şekilde beslenmiş, diğer gruba 35 gün süre ile içme sularına 10 mg/kg akrilamid katmak suretiyle, akrilamid uygulanmış, süre bitiminde kurban edilen hayvanlardan elde edilen spermatozoilere anilin mavisi boyaması yapılmıştır. Akrilamid grubundaki anilin mavisi (+) boyanan sperm sayıları ile kontrol grubundaki anilin mavisi (+) boyanan sperm sayıları karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu bulgular ile çalışmamızın bulguları kıyaslandığında, akrilamidin yüksek dozdaki akut etkisi sperm DNA bütünlüğünü etkilememekte, ancak düşük dozdaki kronik etkisi sperm DNA bütünlüğünü bozmaktadır.

Akrilamidin verilen doz ve süreye bağlı olarak testis dokusunda hasara yol açtığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (6, 50). Çalışmamızda deney sonrası G1 ve G2'deki hayvanların testis dokusu ile G3 ve G4'teki hayvanların testis dokusu karşılaştırıldığında, G1 ve G2'de bir takım yapısal değişiklikler olduğu gözlemlenmiştir.

G1'deki hayvanların seminifer tübül lümeninde hücre döküntüleri, bazı tübüllerde rezidua cisimcikler ve vakuol yapıları tespit edilmiştir.

Camacho ve ark. (51) yaptıkları çalışmada, ratların içme suyuna 14 gün boyunca artan dozlarda (2, 5, 10, 50 mg/kg) akrilamid eklemişlerdir. Hayvanlar sakrifiye edildikten sonra 50 mg/kg akrilamid uygulanan ratların testislerinde eşey hücrelerinin azalması ve tahribatı gözlenmiş, seminifer tübül lümenlerinde hücre döküntülerine rastlanmıştır. Ayrıca, Lebda ve arkadaşlarının (43) 2014 yılında yaptıkları çalışmada ratlar 2 gruba ayrılmış; 21 gün boyunca bir grubun içme suları %0,05'lik akrilamid içerecek şekilde hazırlanmış, diğer gruba aynı şekilde akrilamid verilmiş; ancak buna ek olarak besin takviyesi şeklinde %1'lik α -lipoik asit verilmiştir. Hayvanların testis dokuları incelendiğinde seminifer tübüllerinde spermatogonyum ve Sertoli hücrelerinde vakuol oluşumu, germinal epitelyum hücrelerinin dejenere olması, çok çekirdekli dev hücre varlığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar akrilamid uyguladığımız ratların testis dokularındaki değişiklikler ile uyum göstermektedir. Creasy ve ark. (52) 2012'de yayınlanan makalesinde, rezidual cisimciklerin normalde sperm maturasyonu sırasında Sertoli hücreleri tarafından temizlenen sitoplazma artıklarının temizlenmemesinin bir sonucu olarak ortaya çıktığını belirtmektedir. Yine aynı makalede Sertoli hücreleri ve eşey hücreleri arasındaki bağlantıların bozulmasından dolayı, eşey hücrelerinin Sertoli hücrelerine tutunmasının engellendiği ve bu şekilde hücre döküntülerinin ortaya çıktığı söylenmektedir. Sertoli hücresi ve eşey hücreleri arasındaki bağlantının bozulmasının nedenini ise Sertoli hücresinin toksik bir etkiye maruz kalmasının bir sonucu olarak açıklamaktadırlar. Yapmış olduğumuz bu çalışmada akut uygulanan akrilamidin Sertoli hücrelerinde ışık mikroskopik olarak dejenerasyona neden olmadığı g r lm ştir. Ancak moleküler düzeyde toksik bir etkisinin olabileceği düşünülebilir. Zhang ve arkadaşlarının (46) 2013 yılında yaptıkları çalışmada, bisfenol A'nın toksik etkisi ile oluşturulan testis hasarına kurt üzümünün koruyucu etkisi araştırılmış, bunun için birbirini takip eden 7 gün boyunca deney grubuna 20 mg/kg bisfenol A gavaj yoluyla verilmiştir. Tedavi gruplarına ise bisfenol A ve oral gavaj yoluyla artan dozlarda (50, 100, 200 mg/kg) kurt üzümü polisakkaritleri verilmiştir. Deney sonunda sakrifiye edilen hayvanların testisleri incelendiğinde, kurt üzümü polisakkaritlerinin bisfenol A'nın toksik etkisi sonucu oluşan testis hasarına karşı koruyucu bir etkisinin olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, Dursun ve arkadaşlarının (45)

2015 yılında yayınlanan çalışmasında, ratlara testis torsiyonu yapılarak oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarına kurt üzümünün koruyucu etkisi araştırılmış; bunun için tedavi grubuna torsiyon yapıldıktan sonra 7 gün boyunca 100 mg/kg kurt üzümü ekstraktı intraperitoneal enjeksiyonla vermiştir. Deney sonunda kurt üzümünün testis dokusunda oluşan iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu bir etkisinin olduğu gözlenmiştir. Akrilamidin toksik etkisine karşı uyguladığımız kurt üzümü ekstraktının seminifer tübüllerdeki yapısal etkilenmeleri azalttığı tespit edilmiştir.

Çalışmamızda spermatogonyumlarda oluşan apoptozu tespit etmek amacıyla TUNEL boyaması yapılmış; G1 ve G2'deki ratların testislerinde G3 ve G4'deki ratların testislerine kıyasla daha çok TUNEL (+) spermatogonyum görülmüş ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu bulgulara göre, yüksek dozdaki akut ACR uygulaması apoptozu arttırmaktadır. G1 ve G2 TUNEL (+) spermatogonyum sayısı bakımından karşılaştırıldıklarında G1'de daha fazla TUNEL (+) spermatogonyum olduğu ve bu farkın istatistiksel açıdan anlamlı olduğu bulunmuştur. Bu durumda kurt üzümünün antioksidan özelliği sayesinde testis dokusunda koruyucu bir özelliği olduğu söylenebilir. Camacho ve arkadaşlarının (51) yaptıkları çalışmada da, 14 gün boyunca uygulanan 50 mg/kg akrilamidin eşey hücrelerinde apoptoza yol açtığı bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda akrilamid ve akrilamidin yükseltgenmesi sonucu oluşan glisidamidin birçok mekanizmayla DNA hasarına yol açabileceği söylenmiştir. Glisidamidin veya akrilamidin glutatyon ile birleşerek, hücrenin glutatyon seviyesini düşürdüğü ve bunun bir sonucu olarak reaktif oksijen türlerinin DNA hasarına yol açabileceği belirtilmiştir. Aynı zamanda akrilamidin glisidamide dönüşmesinde rol alan CYP2E1 enziminin doğrudan DNA'ya bağlanarak hasara yol açtığı ve bu enzimin aktivitesinin serbest radikal ve reaktif oksijen türlerinin oluşumuna neden olup DNA hasarına neden olabileceği belirtilmiştir (49, 53). Camacho ve ark. (51) akrilamidin caspase 3 ve Fas gibi proapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığını ve bunun eşey hücrelerindeki apoptozu indüklediğini belirtmişlerdir. Katen ve arkadaşlarının (53) 2016'da yayınlanan makalesinde, akrilamidin kronik olarak uygulanması sonucu oluşan sperm DNA hasarına güçlü bir antioksidan olan resveratrolün koruyucu etkisi araştırılmıştır. Farelerin içme sularına 0,18mg/kg akrilamid karıştırılarak bir gruba 3 ay, bir gruba 6 ay akrilamid uygulanmıştır. Tedavi gruplarına ise akrilamid uygulanırken bir yandan haftada 1 kere olmak suretiyle 100 µl/kg resveratrol

intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Çalışmanın sonunda akrilamidin düşük dozda kronik etkisinin apoptoza yol açmadığı ancak DNA hasarı oluşturduğu bulunmuştur. Resveratrolün ise DNA hasarına karşı koruyucu bir etkisinin olduğu tespit edilmiştir. Yine bu çalışmada akrilamidin glisidamide dönüşmesinde rol alan CYP2E1 enziminin resveratrol tarafından inhibe edildiği ve resveratrolün koruyucu etki mekanizmasının bu mekanizma olabileceği belirtilmiştir.

Çalışmamızda yüksek doz ve akut olarak uygulanan akrilamidin spermatogonyumların hücre proliferasyonunu etkileyip etkilemediğini tespit etmek amacıyla Ki67 boyaması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda G1 ve G2'de Ki67 (+) spermatogonyum sayısının diğer gruplara göre az olduğu; G1 ile G2 arasında Ki67 (+) spermatogonyum sayısı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu ve G2'de daha fazla Ki67 (+) spermatogonyum olduğu bulunmuştur. Bu sonuçlar bize akrilamidin hücre proliferasyonunu azalttığını, kurt üzümünün bu etkiye karşı koruyucu olduğunu göstermektedir. Tyl ve ark. (4) 2000 yılında yayınladıkları makalede, akrilamidin kinezin bağımlı motor proteinleri etkilediğini ve bu proteinlerin mitoz ve mayozun anafaz evresinde kromozomların ayrılmasında görev aldığını belirtmişlerdir. Buna ek olarak, Yang ve arkadaşlarının (6) 2005 yılında yayınladıkları makalede akrilamidin hücre döngüsü ve hücre proliferasyonu ile bağlantılı olan genlerin ekspresyonunun düzenini bozduğu belirtilmiştir.

Çalışmamızda deneklerin testis dokularındaki antioksidan miktarlarını ölçmek amacıyla MDA, CAT ve SOD düzeyleri ölçülmüş; ölçülen veriler istatistiksel olarak kıyaslandığında anlamlı bir fark görülmemiştir. Lebda ve ark. (43) 2014 yılında yaptıkları çalışmada, testis dokularındaki MDA seviyesini ölçmüş, akrilamidin MDA seviyesini arttırdığını tespit etmişlerdir. Elghaffar ve ark. (39) 2015 yılında yaptıkları çalışmada, ratlar 3 gruba ayrılmış; 28 gün boyunca 1.gruba normal içme suyu verilmiş, 2.gruba 25 mg/kg akrilamid içeren içme suyu verilmiş, 3.gruba 2. gruba verildiği gibi akrilamid verilmiş ardından 4 hafta boyunca haftada 2 kez olmak suretiyle 50 mg/kg sarımsak yağı verilmiştir. Hayvanlar 7., 14., 21., ve 28. günlerde sakrifiye edilmiştir. Deney sonunda CAT aktiviteleri ölçüldüğünde; akrilamid uygulanan ratlarda 7., 14. ve 21.günde sakrifiye edilenlerde azaldığı, 28.günde sakrifiye edilenlerde arttığı görülmüştür. SOD aktivitesi ölçüldüğünde; 7. ve 21.günde sakrifiye edilen hayvanlarda azaldığı, 14. ve 28.günde sakrifiye edilen

hayvanlarda arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar antioksidan seviyelerinin, akut veya kronik akrilamid uygulanmasına göre değişebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda hayvanların serumlarındaki testesteron düzeyleri tespit edilmiş, G1'in testesteron düzeyinin diğer gruplara oranla düşük olduğu görülmüştür. Camacho ve ark. (51) yaptıkları çalışmada, akrilamid uygulanan hayvanların testesteron düzeylerinin azaldığı görülmüştür. Çalışmamızda hayvanların testesteron düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, G1 ile G2 arasında ve G1 ile G4 arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu sonuçlara göre, akrilamid uygulaması testesteron seviyesini düşürmekte ve kurt üzümünün buna karşı koruyucu bir etkisinin olduğu görülmektedir. Camacho ve ark. (51) çalışmasında akrilamidin hücre iskeletini oluşturan proteinlere etki ettiği belirtilmektedir. Yine bu çalışmada akrilamidin toksik hasarına bağlı olarak hücre iskeletinin fonksiyonunu kaybetmesi; Leydig hücre membranındaki LH reseptörlerine, LH sentezine ve taşınmasına etki edip, dolaylı olarak testesteron seviyesinin düşmesine neden olabileceği şeklinde yorumlanmıştır. Ayrıca hücre iskeletinin hasara uğraması kolesterolün azalmasına neden olup, sonuç olarak testesteron sentezinin azalmasına yol açabileceği belirtilmiştir.

Çalışmamızda hayvanların serumlarındaki FSH düzeyleri ölçülmüş, G1 ve G2'nin FSH düzeylerinin düşük olduğu görülmüştür. FSH seviyeleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, sadece G1 ve G3 arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. Bu bulgulara göre akrilamidin yüksek dozdaki akut uygulaması, FSH seviyesini düşürmektedir. Ayrıca G2'nin FSH seviyesinin, G3'ün FSH seviyesine yaklaştığı görülmekte ve kurt üzümünün akrilamidin yol açtığı toksik etkiden FSH seviyesini korumada etkili olduğu anlaşılmaktadır. Camacho ve arkadaşlarının (51) daha önce bahsedilen çalışmasında 14 gün boyunca 50 mg/kg uygulanan akrilamidin FSH seviyesini düşürdüğü görülmüştür. Camacho ve arkadaşlarının (51) çalışması çalışmamızın bulgularını desteklemektedir.

Çalışmamızın sonunda grupların epididimis dokuları değerlendirilmiş, akrilamid verilen grupların kontrol grubuyla aralarında bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Lebda ve ark. (43) 2014 yılında yaptıkları çalışmada, akrilamid uygulanan hayvanların epididimislerinin kauda kısmında ödem, kaput kısmında ise epitelyum hücre düzeninde bozulmalar görülmüştür. Lebda ve arkadaşlarının (43)

bulguları ile çalışmamızın bulguları kıyaslandığında, kronik akrilamid uygulamasının epididimis dokusunun morfolojik düzenine etki ettiğini ancak akut uygulamasında bir değişikliğe yol açmadığını görülmektedir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

6.1. Sonuç

Çalışmamızda akrilamid ve akrilamid+kurt üzümü uygulanan grupların deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında, vücut ağırlıklarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı tespit edildi. Bu da akrilamidin metabolizmayı etkilediğini göstermektedir.

Akrilamid uygulanan ratların seminifer tübüllerinde belirgin olarak hücre döküntüsü ve bazı seminifer tübüllerde rezidual cisimcikler görüldü. Ayrıca, akrilamid grubu ve akrilamid+kurt üzümü grubuna ait bazı seminifer tübüllerde vakuol yapıları gözlemlendi. Bu bulgular yüksek dozda akut süre ile akrilamid uygulamasının testis dokusunda yapısal değişimlere neden olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda apoptotik spermatogonyumların tespiti için TUNEL boyaması yapıldı. Akrilamid grubu ve akrilamid+kurt üzümü grubunun TUNEL (+) spermatogonyum sayısının diğer gruplara göre daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Ayrıca, akrilamid grubunun TUNEL (+) spermatogonyum sayısının akrilamid+kurt üzümüne göre daha fazla olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu.

Çalışmamızda proliferatif spermatogonyumların tespiti için Ki67 boyaması yapıldı. Ki67 (+) hücre sayısının akrilamid ve akrilamid+kurt üzümü uygulanan gruplarda azaldığı tespit edildi. Ayrıca akrilamid grubunda akrilamid+kurt üzümüne göre daha az Ki67 (+) spermatogonyum olduğu ve bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi.

Grupların testis dokularındaki antioksidan değerleri (MDA, CAT, SOD) ölçüldü ve gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmadı.

Grupların serum testosteron düzeyleri ölçüldü. Akrilamid grubu ve akrilamid+ kurt üzümü grubu ile akrilamid grubu ve kurt üzümü grubu arasında anlamlı bir fark bulundu.

Grupların serum FSH düzeyleri ölçüldü ve akrilamid grubu ile akrilamid+kurt üzümü grubunda FSH düzeyinin azaldığı görüldü. Ayrıca, akrilamid grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edildi.

Bu sonuçlar yüksek dozdaki akut akrilamid uygulamasının testis dokusunda yapısal değişimlere neden olduğunu, FSH ve testesteron seviyesini düşürdüğünü ve kurt üzümünün ise kısmen koruma sağladığını göstermektedir.

6.2. Öneriler

Çalışmamızda Sertoli hücrelerinde bir değişim gözlenmemiştir. Ancak akrilamid ve akrilamid+kurt üzümü uygulanan gruplarda Sertoli hücreleriyle ilgili fonksiyonel ve moleküler düzeyde oluşan hasarlarla ilişkilendirilen seminifer tübüllerin lümenlerinde oluşan reziduel cisimcikler ve hücre döküntüleri gözlenmiştir. Bunlara ek olarak bu gruplarda FSH seviyesinin düştüğü tespit edilmiştir. Çalışmamızda Leydig hücrelerinde bir değişim gözlenmemiştir. Ancak akrilamid grubu ve akrilamid+kurt üzümü grubunda testesteron seviyesi azalmıştır. Bu yüzden akrilamidin Sertoli ve Leydig hücrelerinde moleküler düzeyde değişikliklere neden olabileceği ve konu ile ilgili yapılacak moleküler çalışmalarda daha detaylı bilgi elde edilmesi için araştırılmalarının yararlı olacağı ve diğer çalışmalara kaynak oluşturabileceği düşünülmektedir.

Aynı dozda uygulanan akrilamidin testis dokusundaki kronik etkileri incelebilir ve akut sonuçlar ile karşılaştırılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. 2017, Fertility Answers, <http://www.fertilityanswers.com/>, 20.12.2015.
2. 2017, WHO, <http://www.who.int/reproductivehealth/topics/infertility/definitions/en/>, 20.12.2015.
3. **Agarwal A, Makker K, Sharma R.** Clinical Relevance of Oxidative Stress in Male Factor Infertility. *American Journal of Reproductive Immunology*, **2008**; 59: 2-11.
4. **Tyl RW, Marr MC, Myers CB, Ross WP, Friedman M.** Relationship between acrylamide reproductive and neurotoxicity in male rats. *Reproductive Toxicology*, **2000**; 14: 147-157.
5. **Wang H et al.** Reproductive toxicity of acrylamide-treated male rats. *Reproductive Toxicology*, **2010**; 29: 225-230.
6. **Yang HJ, Lee SH, Jin Y, Choi JH, Han CH, Lee MH.** Genotoxicity and toxicological effects of acrylamide on reproductive system in male rats. *J. Vet. Sci.*, 2005; 6: 103-109.
7. **Prasad SN, Muralidhara.** Evidence of acrylamide induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster* - its amelioration with spice active enrichment: relevance to neuropathy. *Neurotoxicology*, **2012**; 33: 1254-64.
8. 2012, Oksante Ar-ge Laboratuvarı, <http://www.oksante.com.tr/oksantest.pdf>, 18.12.2015.
9. **Cheng D, Kong H.** The Effect of Lycium Barbarum Polysaccharide on Alcohol Induced Oxidative Stress in Rats. *Molecules*. **2011**; 16: 2542-2550.
10. **Aitken RJ.** Molecular Mechanisms Regulating Human Sperm Function. *Mol Hum Reprod.*, **1997**; 3: 169-173.
11. **Gagnon C, Iwasaki A, De Lamirande E, Kavalski N.** Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa. *Ann N Y Acad Sci.*, **1991**; 637: 436-477.
12. **Agarwal A, Nallella KP, Allamaneni SS, Said TM.** Role of Antioxidants in Treatment of Male Fertility: An overview of literature. *Reprod Biomed Online*. **2004**; 8: 616-627.
13. **Griveau JF, Le Lannou D.** Reactive Oxygen Species and Human Spermatozoa: Physiology and Pathology. *Int J Androl.*, **1997**; 20: 61-69.
14. **Wu TP, Huang BM, Tsai HC, Lui MC, Liu MY.** Effects of nitric oxide on human spermatozoa activity, fertilization and Mouse embryonic development. *Arch Androl.*, **2004**; 50: 173-179.
15. **Lenzi A, Lambardo F, Gandini L, Alfano P, Dondero F.** Computer Assisted Sperm Motility Analysis at the Moment of induced pregnancy during gonadotropin treatment for hypogonadotropic hypogonadism. *J Endocrinol Invest*, **1993**; 16: 683-686.
16. **Armstrong JS, Rajosekaran M, Chamulitrat W, Gatti P, Hellstrom WJ, Sikka SC.** Characterization of Reactive Oxygen Species Induced Effects On Human Spermatozoa Movement and Energy Metabolism. *Free Radic Biol Med*, **1999**; 26: 869-880.
17. **Kemal Duru N, Morshedi M, Oehninger S.** Effects of Hydrogen Peroxide on DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Fertil Steril*, **2000**; 74: 1200-1207.
18. **Aitken RJ, Krausz C.** Oxidative Stress, DNA damage and Y chromosome. *Reproduction*. **2001**; 122: 497-506.
19. **Kodama H, Yamagauchi R, Fukuda J, Kasai H, Tanaka T.** Increased oxidative deoxyribonucleic acid damage in the spermatozoa of infertile male patients. *Fertil Steril*. **1997**; 68: 519-524.
20. **Agarwal A, Prabhakaran SA, Sikka SC.** Clinical Relevance of Oxidative Stress in Patients With Male Factor Infertility Evidence- Based Analysis. *AUA Update Series*, **2007**; 26: 1-12.

21. **Kalender Y, Kaya S, Durak D, Uzun FG, Demir F.** Protective Effects of catechin and quercetin on antioxidant status, lipid peroxidation and testis-histoarchitecture induced by chlorpyrifos in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2012**; 33: 141-148.
22. **Wu SJ, Ng LT, Lin CC.** Antioxidant effects of common integrents of traditional chinese medicine *Angelica sinensis*, *Lycium barbarum* and *Poria coco*. *Phototherapy Research*, **2004**; 18: 1008-1012.
23. **Mescher AL.** Erkek Üreme Sistemi. Solakoğlu S. *Junquiera's Temel Histoloji*. 13.Baskı. İstanbul: Nobel Matbaacılık San. Tic. Ltd. Şti.: **2015**: 429-446.
24. **Junquiera LC, Carneiro J, Abrahamssohn PA, SontoS MFD, Zorn TMT.** Erkek Üreme Sistemi. Aytekin Y, Solakoğlu S. *Temel Histoloji*. 10.Baskı. İstanbul: Nobel Matbaacılık: **2006**: 431-440.
25. **Gray H.** The Urogenital Organs. Spitzka EA. *Anatomy Descriptive and Applied. A New American Edition*. New York: Librarian of Congress: **1913**: 1372-1382.
26. **Kierszenbaum A, Tres LL.** Male Reproductive System. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Patology*. 4th Ed., Philadelphia: Elsevier: **2015**: 611-657.
27. **Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG.** Urogenital System. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 9th Ed., Philadelphia: Elsevier: **2013**: 247-286.
28. **Ross MH, Pawlina W.** Erkek Üreme Sistemi. Baykal B. *Histoloji*. 6. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık: **2014**: 784-808.
29. **Jungwirth A, Diemer T, Dohle GR, Giwercman A, Zopa Z, Krausz C, Tournaye H.** European Association Of Urology Working Group On Male Infertility Guidelines on Male Infertility. *Eur. Urol.* **2012**; 62(2): 324-332.
30. **Krausz C.** Male infertiliy: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best practice& Research Clinical Endocrinology& Metabolism*, **2011**; 25: 271-285.
31. **Sies H.** Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, **1997**; 83: 291-294.
32. **Kothori S, Thopmson A, Agarwal A, Plessis SSD.** Free radicals: their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology*. **2010**; 48: 425-435.
33. **Davies KJA.** Oxidative stres: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.*, **1995**; 61: 1-31.
34. **Sies H.** Strategies of antioxidant defence. *Eur J. Biochem*, **1993**; 215: 213-219.
35. **Agarwal A, Saleh R.A.** Role of oxidants in male infertility: rationale, significance, and treatment. *Urologic Clinics of North America*, **2002**; **29**.
36. **Mannesh M, Jayalekshmi H.** Role of reactive oxygen spcies and antioxidants and pathophysiology of male reproduction. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. **2006**; 21(2): 80-89.
37. **Altufan AA, Beceren AT, Şehirli AÖ, Demiralp E, Şener G, Omurtag GZ.** Resveratrol ameliorates oxidative damage and protects against acrylamide-induced oxidative stres in rats. *Mol. Biol. Rep*, **2012**; 29: 4589-4596.
38. **Capuano E, Fogliana V.** Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT- Food Science and Tecnology*, **2011**; 44: 793- 810.
39. **Elghaffar SKA, Fiedan IO, Omar HDE.** Acrylamide induced testisticular toxicity in rats: protective effect of garlic oil. *Biomarkers Journal*, **2015**; 1: 1-5.

40. **Nixon BJ, Katen AL, Stanger SJ, Schjenken JE, Nixon B, Roman SD.** Mouse spermatocytes Express CYP2E1 and respond to acrylamide exposure. *Plos One*, **2014**; 9: Issue 5.
41. **Tyl RW, Friedman MA.** Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. *Reproductive Toxicology*. **2003**; 17: 1-13.
42. **Pourentezari M, Talebi A, Abbasi A, Khalili MA, Mangoli E, Anvari M.** Effects of acrylamide on sperm parameters, chromatin quality, and the level of blood testosterone in mice. *Iran J Reprod Med.*, **2014**; 12(5): 335-342.
43. **Lebda M, Gad S, Gaffar H.** Effects of Lipioc Acid on acrylamide induced testicular damage. *Mater Sociomed*, **2014**; 26(3): 208-212.
44. **Amagese H, Farnsworth NR.** A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). *Food Research International*, **2011**; 44: 1702-1717.
45. **Dursun R et al.** The protective effect of goji berry extract in ischemic reperfusion in testis torsion. *Int J Exp Med*, **2015**; 8(2): 2727-2733.
46. **Zhang C et al.** Protective effects of *Lycium barbarum* polysaccharides on testis spermatogenic injury induced by bisphenol A in mice. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, **2013**; 1-9.
47. **Tang WM et al.** A review of the anticancer and immunomodulatory effects of *Lycium Barbarum* fruit. *Inflammopharmacol*, **2012**; 20: 307-314.
48. **Gündüz E et al.** *Lycium barbarum* extract provides effective protection against paracetamol-induced acute hepatotoxicity in rats. *Int J Exp Med*, **2015**; 8(5): 7898- 7905.
49. **Nixon BJ, Stenger SJ, Nixon B, Roman SD.** Chronic exposure to acrylamide induces DNA damage in male germ cells of mice. *Toxicological Sciences*, **2012**; 129(1): 135-145.
50. **Rajeh N, Ali H, ElAssouli S.** Protective effects of 5-aminosalicylic acid on acrylamide toxicity in the testis and blood leukocytes of the rat. *Kuwait Medical Journal*, **2014**; 46(1): 32-43.
51. **Camacho L et al.** Effects of acrylamide exposure on serum hormones, gene expression, cell proliferation, and histopathology in male reproductive tissues of Fischer 344 rats. *Toxicology Letters*, **2012**; 211: 135-143.
52. **Creasy D et al.** Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicologic Pathology*, **2012**; 40: 40-121.
53. **Katen AL, Stanger SJ, Anderson AL, Nixon B, Roman SD.** Chronic acrylamide exposure in male mice induces DNA damage to spermatozoa; potential for amelioration by resveratrol. *Reproductive Toxicology*, **2016**; 63: 1-12.

8. EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

EK-2. Tez Çalışması Orijinallik Raporu



ETİK KURUL ONAYI



T.C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu

Sayı : B.30.2.ABÜ.0.05.05-050.01.04-46
Konu: Proje çalışması hk.

14.12/2016

Sayın, Prof.Dr.Aysel KÜKNER
AİBÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Deneyisel çalışma projeniz daha önce Etik Kurul tarafından değerlendirilmiş olup; 2016/02no'lu "Akrilamid Uygulanmış Genç Erkek Ratlarda *Lycium Barbarum* (Kurt Üzümü) Ekstraktının Fertiliteye Etkisinin Işık Mikroskopik ve Biyokimyasal İncelenmesi" başlıklı araştırmada proje yürütücüsü olan Yrd. Doç. Dr. Elçin Hakan TERZİ'nin OHAL kapsamında kurumla ilişkisinin kesildiğinden dolayı çalışmadan çıkarılması ve projenin bundan sonraki aşamalarını tarafınızca yürütüleceği talebiniz, YÖK' ün 02/11/2016 tarih ve 758550160-104.01.03.01-68024 sayılı yazısı emsal alınarak " tez danışmanı alınarak yerine yeni tez danışmanı atanması durumunda tezlerde aynı konunun devam edebileceğine ve hazırlanan tezlerin akademik sorun teşkil etmeyeceği" kararı gereği etik olarak uygun olduğu kararı verilmiştir.

Saygılarımla.


Prof. Dr. Aysel KÜKNER
Hayvan Araştırmaları
Yerel Etik Kurul Başkanı

TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

 T.C. ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ DOKTORA / YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU		07/08/2017
AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne		
Öğrencinin Adı Soyadı:	Havva İmran ÖZDEMİR	
Numarası:	146209001	
Anabilim Dalı:	Histoloji ve Embriyoloji	
Lisansüstü Eğitim Düzeyi:	Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐	
Tez Başlığı:	Akriamid Uygulanmış Genç Erkek Ratlarda <i>Lyctum Barbarum</i> (Kurt Üzümlü) Ekstraktının Fertiliteye Etkisinin Işık Mikroskopik ve Biyokimyasal İncelenmesi	
Yukarıda başlığı yazılı olan tez çalışmasının kapak sayfası, giriş, ana bölümler ve sonuç bölümlerinden oluşan 99 sayfalık kısmına ilişkin 07/08/2017 tarihinde tarafından/tez danışmanımca Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezinin benzerlik oranı "alıntılar hariç" yapıldığında % 5 "alıntılar dahil" yapıldığında ise %5 olarak tespit edilmiştir. Uygulanan Filtrelemeler: 1- Kaynakça Hariç 2- Alıntılar Hariç/ Dahil "AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması Ve Kullanılması Uygulanması Esasları" nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini, aksinin tespit edileceği durumda her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Bilgilerinize arz ederim. Havva İmran ÖZDEMİR  EK: 1 adet tezin tüm başlığını öğrencinin ad soyad bilgisini ve tezin toplam sayfa sayısını göstererek çekilde raporunda ilgili benzerlik oranı alınmış olan görüntüsü eklenecektir.		
TEZ DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR 07/08/2017 Prof. Dr. Aysel KÜKNER 		

09. ÖZGEÇMİŞ

1991 yılında Hamburg'ta doğdum. İlköğretim ve ortaöğretimimi İstanbul'da tamamladım. 2009 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Yabancı Diller Yüksek Okulu'nda 1 yıl hazırlık okudum. 2010 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yüksek öğrenimime başladım. 2013 yılında Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nin Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında staj yaptım. Ocak 2014'te Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldum ve aynı yıl Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

