

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE PARASETAMOL İLE
OLUŞTURULAN TESTİS HASARINDA
L-KARNİTİNİN ETKİSİ**

HÜSEYİN KISAOĞLU

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR - 2018

TEZ KODU: DEU.HIS.MSc - 2014970065

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARELERDE PARASETAMOL İLE
OLUŞTURULAN TESTİS HASARINDA
L-KARNİTİNİN ETKİSİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HÜSEYİN KISAOĞLU

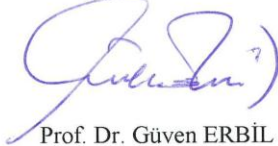
Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. H.Alper BAĞRIYANIK

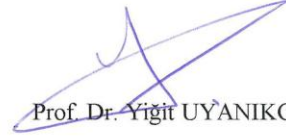
(Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2017.KB.SAG.038 sayı ile desteklenmiştir.)

TEZ KODU: DEU.HIS.MSc - 2014970065

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı, Histoloji ve Embriyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Hüseyin KISAOĞLU'nun **“Farelerde Parasetamol ile Oluşturulan Testis Hasarında L-karnitinin Etkisi”** konulu Yüksek Lisans tezini (23.07.2018) tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK
BAŞKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Güven ERBİL
ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi


Prof. Dr. Yigit UYANIKGİL
ÜYE
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Bekir Uğur ERGÜR
YEDEK ÜYE
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Meltem KURUŞ
YEDEK ÜYE
İzmir Katip Çelebi Tıp Fakültesi

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
ŞEKİL DİZİNİ	v
TABLO DİZİNİ	viii
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜRLER	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	12
2.1.2. Testis Anatomisi.....	13
2.1.3. Testis Histolojisi	14
2.1.3.1. Seminifer Tübül Yapısı	14
2.1.3.2. Sertoli Hücrelerinin İnce Yapısı ve İşlevi.....	15
2.1.3.3. Spermatogenik Hücreler	17
2.1.3.3.1. Spermatogonyumlar.....	17
2.1.3.3.2. Spermatisitler	18
2.1.3.3.3. Spermatidler	18
2.1.3.3.4. Spermiyumlar	18
2.1.3.4. Spermatogenezis	19
2.1.3.5. Leydig Hücreleri	19
2.1.4. Testis Fizyolojisi	19
2.2 Parasetamol.....	20
2.2.1. Parasetamolün Fiziksel Özellikleri	20
2.2.2. Parasetamol Sentezi	21
2.1.3. Parasetamolün Kimyasal Özellikleri	22

2.1.4. Parasetamolün Farmakolojik Özellikleri ve Metabolik Etkisi.....	22
2.3. Serbest Radikaller.....	24
2.3.1. Malondialdehit (MDA).....	26
2.4. Antioksidanlar.....	26
2.4.1. Glutasyon (GSH).....	27
2.4.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx).....	27
2.5. L-karnitin.....	28
2.5.1. L-karnitinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri.....	28
2.5.2. L-karnitinin Biyosentezi.....	28
2.5.3. L-karnitinin Metabolik Etkisi.....	29
2.5.4. L-karnitinin Antioksidan Mekanizması ve Ürüne Sistemi Üzerine Etkisi.....	30
3. GEREÇ VE YÖNTEM	32
3.1. Araştırmanın Tipi	32
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	32
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları	32
3.4. Çalışma Materyali.....	36
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	36
3.6. Veri Toplama Araçları	36
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	36
3.6.2. Araştırmada Kullanılacak Yöntemler	36
3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	37
3.6.2.2. Rutin Işık Mikroskopik Doku Takibi Protokolü	37
3.6.2.3. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü.....	38
3.6.2.4. Masson-Trikrom boya protokolü	39
3.6.2.5. Periodic Acid Schiff (PAS) Boya Protokolü.....	41
3.6.2.6. Histolojik Değerlendirme	42
3.6.2.6.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması	43
3.6.2.7. Morfometrik Değerlendirmeler	43

3.6.2.8. İmmünohistokimyasal İncelemeler	43
3.6.2.8.1. TUNEL Boya Protokolü	44
3.6.2.8.2. Aktive-Kaspaz 3 Boya Protokolü	44
3.6.2.9. Enzim Aktiviteleri	44
3.2.6.10. Elektron Mikroskopik Doku Takibi	45
3.7. Ararştırma Planı ve Takvimi	46
3.8. Verilerin Değerlendirmesi	47
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	47
3.10.Etik Kurul Onayı	47
4.BULGULAR	48
4.1. DENEK AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	48
4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	51
4.3. Histokimyasal Bulgular	53
4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Değerlendirmesi	53
4.3.2. Masson-Trikrom Boyama Değerlendirmesi	58
4.4. Morfometrik Bulgular	67
4.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması	67
4.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü	68
4.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı ve Epitel Yüksekliği Ölçümü	70
Şekil 39: Seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri	71
Şekil 40: Seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri	71
4.4.4. Tunika Albuginea Kalınlık Ölçümü	73
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular	74
4.5.2. TUNEL İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi	78
4.6. Ultrastrüktürel Bulgular	82
4.6.1. TEM bulguları	82
4.6.2. SEM bulguları	89
4.7. Enzim Analizleri	94

4.7.1. GSH Değerlendirmesi	94
4.7.2. GPx Değerlendirmesi	96
4.7.3. MDA Değerlendirmesi	97
5.TARTIŞMA	100
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	106
7.KAYNAKLAR.....	108
8.EKLER	119
8.1. EK-1 Etik Kurul Belgesi	119
8.2. EK-2 Özgeçmiş	120



SEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Serbest radikal kaynakları ve antioksidan molekülleri örnekleri(5).	6
Şekil 2: Parasetamol hepatotoksitesitesinde NAPQI-mitokondri ilişkisi(18).	8
Şekil 3: Parasetamol hepatotoksitesitesinin fare ve sıçan karşılaştırması(17).	8
Şekil 4: Sertoli hücresi ve spermatogenik seri hücreleriyle ilişkisi	16
Şekil 5: Spermatogenetik seri hücrelerinin bölünme ve farklılaşmasını gösteren şematik diyagram(38).	17
Şekil 6: Parasetamolün moleküler yapısı(115).....	21
Şekil 7: L-karnitinin moleküler yapısı(115).....	28
Şekil 8: Deney sonunda testislerin elde edilmesi	34
Şekil 9: Elde edilen testisler	34
Şekil 10: Koruyucu Grup Ağırlıkları Karşılaştırması	48
Şekil 11: Delta Denek Ağırlıkları.....	49
Şekil 12: Tedavi Grubu Ağırlık Karşılaştırması	50
Şekil 13: Delta Denek Ağırlıkları.....	50
Şekil 14: Delta Denek Ağırlık Karşılaştırması.....	51
Şekil 15: Koruyucu grup testis ağırlıkları karşılaştırması	52
Şekil 16: Tedavi grubu testis ağırlıkları karşılaştırması.....	52
Şekil 17: SF1 grubuna ait testisin histolojik(H&E) görüntüleri.	53
Şekil 18: SF2 grubuna ait testisin histolojik(H&E) görüntüleri.	54
Şekil 19: APAP1 grubuna ait testisin histolojik(H&E) görüntüleri.	55
Şekil 20: APAP2 grubuna ait testisin histolojik(H&E) görüntüleri.	56
Şekil 21: Koruyucu etki grubuna ait testisin histolojik (H&E) görüntüleri.	57
Şekil 22: Tedavi grubuna ait testisin histolojik (H&E) görüntüleri.	58
Şekil 23: SF1 grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.	59
Şekil 24: SF2 grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.	59
Şekil 25: APAP1 grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.....	60
Şekil 26: APAP2 grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.....	60
Şekil 27: Koruyucu etki grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.	61
Şekil 28: Tedavi grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.....	61
Şekil 29: SF1 grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.	62
Şekil 30: SF2 grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.	63
Şekil 31: APAP1 grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.	64
Şekil 32: APAP2 grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.	65

Şekil 33: Koruyucu etki grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.	66
Şekil 34: Tedavi grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.	67
Şekil 35: Johnsen testiküler biyopsi skorlaması.....	68
Şekil 36: Johnsen testiküler biyopsi skorlaması.....	68
Şekil 37: Seminifer tübül çap ölçüm ortalamaları.....	69
Şekil 38: Seminifer tübül çap ölçüm ortalamaları.....	70
Şekil 39: Seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri	71
Şekil 40: Seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri	71
Şekil 41: Seminifer tübül epitel yüksekliği ölçümleri.....	72
Şekil 42: Seminifer tübül epitel yüksekliği ölçümleri.....	73
Şekil 43: Tunika albugine kalınlık ölçümüne ait ortalama değerler	73
Şekil 44: Tunika albugine kalınlık ölçümüne ait ortalama değerler	74
Şekil 45: Grupların Aktif Kaspaz-3 (+) hücre sayısı.....	75
Şekil 46: SF1 grubu testis kesiti.	75
Şekil 47: APAP1 grubu testis kesiti.	76
Şekil 48: Koruyucu etki grubu testis kesiti.	76
Şekil 49: Grupların Aktif Kaspaz-3 (+) hücre sayısı.....	77
Şekil 50:SF2 grubu testis kesiti.	77
Şekil 51: APAP2 grubu testis kesiti.	78
Şekil 52: Tedavi grubu testis kesiti.	78
Şekil 53: Grupların TUNEL (+) hücre sayısı	79
Şekil 54: SF1 grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.	79
Şekil 55: APAP1 grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.	80
Şekil 56: Koruyucu etki grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.....	80
Şekil 57: Grupların TUNEL (+) hücre sayısı	81
Şekil 58: SF2 grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.	81
Şekil 59: APAP2 grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.	82
Şekil 60: Tedavi grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.	82
Şekil 61: SF1 grubu TEM kesiti.....	83
Şekil 62: SF2 grubu TEM kesiti.....	84
Şekil 63: APAP1 grubu TEM kesiti.....	85
Şekil 64: APAP2 grubu TEM kesiti.	86
Şekil 65: Koruyucu etki grubu TEM kesiti.	87
Şekil 66: Tedavi grubu TEM kesiti.	88

Şekil 67: APAP1 grubuna ait SEM kesiti	89
Şekil 68: APAP1 grubuna ait SEM kesiti	90
Şekil 69: SF2 grubuna ait SEM kesiti	91
Şekil 70: APAP2 grubuna ait SEM kesiti	92
Şekil 71: Tedavi grubuna ait SEM kesiti	93
Şekil 72: Tedavi grubuna ait SEM kesiti	94
Şekil 73: Koruyucu etki grubu GSH enzim aktiviteleri	95
Şekil 74: Tedavi grubu GSH enzim aktiviteleri	95
Şekil 75: Koruyucu etki grubu GPx enzim aktiviteleri	96
Şekil 76: Tedavi grubu GPx enzim aktiviteleri	97
Şekil 77: Koruyucu etki grubu MDA enzim aktiviteleri	98
Şekil 78: Tedavi grubu MDA enzim aktiviteleri	98

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Deney grupları ve grup başına kullanılan denek sayısı.	32
Tablo 2: Deney grupları dizaynı.....	35
Tablo 3: Doku takibi protokolü.....	37
Tablo 4: Hematoksilen ve eosin boya protokolü.....	38
Tablo 5: Masson trikrom boya protokolü.....	39
Tablo 6: PAS boya protokolü.....	41
Tablo 7: Johnsen testiküler skorlaması.	43
Tablo 8: Tüm gruplara ait enzim aktivitelerinin karşılaştırılması.....	99



KISALTMALAR

APAP: Parasetamol, asetaminofen.

GPx: Glutasyon Peroksidaz

KAT: Katalaz

SOD: Süperoksit dismutaz

NAPQI: N-asetil-p-benzokinonimin

ROT: Reaktif oksijen türevleri

ATP: Adenozin trifosfat

JNK: c-jun-N-terminal kinaz

SAB: SH3 domain-binding protein

AIF: Apoptoz indükleyici faktör

Bax: Bcl-2 associated X protein

AST: Aspartat

ALT: Alanin

LK: L-karnitin

LCIII: Light chain 3B

µm: Mikrometre

FSH: Folikül stimulan hormon

ABP: Androjen bağlayıcı protein

AMH: Antin-Müllerian hormon

AGER: Granülsüz endoplazmik retikulum

GnRH: Gonadotropin serbestleştirici hormon

LH: Lüteinleştirici Hormon

CYP1A1: Sitokrom p450 ailesi proteini 1

CYP2E1: Sitokrom p450 ailesi 2 E'nin 1 alt ailes üyesi

iNOS: İndüklenebilir oksit sentaz

DNA: Deoksiribonükleik asit

MDA: Malondialdehit

GST: Glutatyon s transferaz

KF: Kistik fibröz

SF: Serum fizyolojik

i.p.: İntraperitoneal

HE: Hematoksilen-eosin

PAS: Periyodik Asit Schiff

TEM: Geçirimli elektron mikroskobu, transmission electron microscopy

SEM: Taramalı elektron mikroskopi, scanning electron microscopy

TEŞEKKÜRLER

Yüksek lisans eğitimime katkılarını sağlayan Prof.Dr. GüvenERBİL, Prof.Dr. Ülker CANKURT, Prof.Dr. Çetin PEKÇETİN, Prof.Dr. Işıl TEKMEN, Prof. Dr. Bekir ERGÜR, Prof. Dr. Kazım TUĞYAN, Doç.Dr. Başak BAYKARA, Doç.Dr. Serap CİLAKE MICİLİ'ya,

Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Nevin ERSOY'a

Tez çalışmaları döneminde yardımlarından dolayı Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Müge KİRAY'a

Izmir Biyotip ve Genom (IBG) Merkezi Elektron Mikroskopi Birimine,

Yüksek lisansa başladığım günden beri her zaman yanımda olan değerli arkadaşlarım; Selma AYDEMİR, Feyyaz ÖZEL, Yavuz GENÇ, başta olmak üzere diğer bölüm arkadaşlarıma,

Histoloji ve Embriyoloji eğitimim boyunca daima yol gösterici olan, tecrübelerini paylaşmaktan çekinmeyen, tüm deneylerin yapılmasında ve tezimin tamamlanıp yazılmasında her konuda desteğini hissettiğim değerli danışman hocam Prof.Dr. H. Alper BAĞRIYANIK'a,

Tüm eğitim hayatım boyunca ve attığım her adımda beni yalnız bırakmayan, daima destekleyen aileme teşekkürü borç bilirim.

FARELERDE PARASETAMOL İLE OLUŞTURULAN TESTİS HASARINDA L-KARNİTİNİN ETKİSİ

Hüseyin KISAOĞLU

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Narlıdere, İzmir, hsynkisaoglu@gmail.com

ÖZET

Amaç:

Parasetamol kaynaklı testis toksisitesine L-karnitinin etkisi bilinmemektedir. Çalışmanın amacı, parasetamol ile oluşturulan testis hasarında L-karnitinin koruyucu ve tedavi etkilerinin histokimyasal, immünohistokimyasal, enzim aktiviteleri ve ultrastrüktürel olarak incelemektir.

Yöntem:

Denekler rastgele SF1, SF2, APAP1, APAP2, Koruyucu etki ve Tedavi gruplarına ayrıldı. SF gruplarına yalnızca serum fizyolojik verildi. APAP grubuna 400mg/denek/gün olacak şekilde intra peritoneal olarak Parasetamol (SİGMA-A-7085 100 gr) verildi. Koruyucu etki ve tedavi grubuna 500 mg/denek/gün olacak şekilde intra peritoneal olarak l-karnitin (SİGMA-C-0283 5g) verildi. SF1, APAP1 ve Koruyucu etki grubundaki fareler 10. günde, SF2, APAP2, Tedavi grubundaki fareler 15.günde ketamin/ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilerek testisleri alındı. Sol testistler enzim aktiviteleri için, sağ testisler histolojik incelemeler için kullanılmıştır. Fareler denek ve testis ağırlıkları gibi parametreler içeren sonuçlarla kayıt altına alınmıştır. Deneklerin deney başlangıcında ve sonunda ağırlıkları ölçülmüştür.

Işık mikroskopik incelemeler için elde edilen kesitler, Hematoksilen-Eozin (HE), Periyodik Asit Schiff (PAS) ve Masson Trikrom ile boyandı. Kesitlerde Johnsen skoru, seminifer tübül çapı, seminifer tübül epitel yüksekliği ve bazal membran kalınlığı değerlendirildi. Apoptozu saptamak için TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları yapıldı. Testis yapısı ultrastrüktürel olarak incelendi. Enzim aktivitelerini incelemeler için testis dokusunda ise glutatyon(GSH), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri incelendi.

Bulgular:

Yapılan ışık mikroskopik ve ultrastrüktürel incelemelerde SF1 ve SF2 gruplarında normal testis yapısı gözlemlendi. APAP1 ve APAP2 grubunda spermatogenik seri hücre diziliminde düzensizlik, germ hücre kaybı ve vakuolizasyon, seminifer tübül bazal membran kalınlığı ve çapında azalma ve intertisyel alanda bağ doku artışı gözlemlendi. Koruyucu etki ve Tedavi gruplarında ise testis yapısı normale yakın morfolojide görüldü.

İmmünohistokimyasal olarak TUNEL ve kaspaz-3 boyamaları yapılarak testis doku örneklerinde pozitif hücre aktivasyonuna bakıldı. SF1 ve SF2 grubuna göre APAP1 ve APAP2 grubunda apoptotik hücre sayısının anlamlı olarak arttığı belirlendi. Koruyucu etki ve Tedavi grubuyla APAP1 ve APAP2 grubu kıyaslandığında, Koruyucu etki ve Tedavi gruplarının apoptotik hücre sayısında anlamlı azalma gözlemlendi.

Sonuç: Çalışmamızda APAP ile oluşturulan testis hasarında, LK'nın koruyucu ve tedavi edici etkisi gösterildi.

Anahtar kelimeler: parasetamol, l-karnitin, testis, fare

THE EFFECT OF L-CARNITINE REGARDING THE TESTICULAR DAMAGE INDUCED BY PARACETAMOL IN MICE

Hüseyin KISAOĞLU

DokuzEylul University, Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology,
Narlidere, Izmir, hsynkisaoglu@gmail.com

ABSTRACT

Objective: No study involving the effects of L-carnitine with regard to testicular damage induced by paracetamol could be found. For this reason, the effect of L-carnitine with regard to testicular damage induced by paracetamol will be examined.

Method: Subjects were randomly separated to SF1, SF2, APAP1, APAP2, Protective effect and Treatment groups. SF groups were given only saline. Paracetamol (SIGMA-A-7085 100 gr) was intraperitoneally administered to the APAP group as 400 mg/exp/day. L-carnitine (SIGMA-C-0283 5g) was administered intraperitoneally to provide 500 mg/exp/day of protective effect and treatment group. SF1, APAP1 and Protective effect group were sacrificed on day 10, SF2, APAP2, treatment group were sacrificed on day 15 days under ketamine/xylazine anesthesia, and testes were collected. Left testis were used for enzyme activities, right testes were used for histological examinations. Mice were recorded with results including parameters such as subject and testicle weights. Subjects were weighed at the beginning and end of the experiment.

The sections obtained for light microscopic examinations were stained with Hematoxylen-Eosin (HE), Periodic Acid Schiff (PAS) and Masson Trichrome. In the sections, Johnsen score, seminiferous tubule diameter, seminiferous tubule epithelium height and basal membrane thickness were evaluated. TUNEL and active caspase-3 staining were performed to detect apoptosis. The testis structure was examined ultrastructurally. Glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA) levels were examined in testicular tissue for examining enzyme activities.

Results: On the light microscopic and ultrastructural examinations, testis structure was observed normal in SF1 and SF2 groups. In the APAP1 and APAP2 groups, irregularity in spermatogenic serial cell arrangement, germ cell loss and vacuolization, decrease in the thickness and diameter of the seminiferous tubule basement membrane, and interstitial connective tissue were observed. In the protective effect group and the treatment group, the testis structure was observed in the normal morphology. Immunohistochemically, TUNEL

and caspase-3 staining were performed to determine positive cell activation in testicular tissue specimens. We found that the number of apoptotic cells in the APAP1 and APAP2 groups increased significantly according to the SF1 and SF2 groups. When we compared the APAP1 and APAP2 groups with the protective effect and the treatment group, we observed that the protective effect and the treatment groups showed a significant decrease in the number of apoptotic cells.

Conclusion: In our study, we demonstrated the protective and therapeutic effect of LK in testicular damage induced by APAP.

Keywords: paracetamol, l-carnitine, testis, mice



1. GİRİŞ VE AMAC

Serbest radikaller, besinlerin oksijen harcanarak enerjiye dönüşümü esnasında ortaya çıkan reaktif moleküllerdir. Oksijen molekülleri canlıların yaşamı için gerekli olmakla birlikte, metabolizma esnasında serbest radikal kaynağı olarak tanınan ve son derece reaktif halde olan ara ürünler ortaya çıkar. Reaktif oksijen çeşitleri/metabolitleri olarak tanınan bu moleküller hücrede lipitler, proteinler ve DNA gibi bileşenlere hasar verir (5,136).

Bu sebeple serbest radikal oluşmasını kontrol altına almak ve bu moleküllerin zarar verici etkilerine engel olmak için hücrelerde antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Fakat bazı durumlarda hücrelerin mevcut olan antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen engelleyemez ve oksidatif stres adıyla bilinen durum oluşur (5,136).

Antioksidan, tanım olarak okside olabilen substrata bakarak ortamda daha seyrek derişimde olan ve buradaki substratın oksidasyonunu bariz biçimde geciktiren veya önleyen madde olarak tarif edilebilir. Bu tanıma bakarak antioksidanların fizyolojik işlevi, serbest radikalleri bulunduran kimyasal reaksiyonların neticesinde hücrenel bileşenlerde oluşabilecek zararı engellemektir (1,136).

Antioksidanların önemli bir işlevi lipid peroksidasyonunu önlemektir. Serbest radikaller ve reaksiyon sonucunda ortaya çıkan ürünler biyomoleküllerin, fagositlerin ve myofibroblastların aktivite düzeylerini artırır. Lipid peroksidasyonu ve ürünlerinin oluşturduğu fibrozisin, bazı hayvanlar üzerinde yapılan deney modellerinde antioksidanların belirli süreler içinde alımı ile azaldığı belirtilmiştir (2,3,136).

Antioksidan sistemler, enzimatik ve nonenzimatik olarak iki kısımda incelenirler. Antioksidan enzimler başlıca; Glutasyon peroksidaz (GPX), katalaz (KAT) ve süperoksit dismutaz (SOD)'dır. Nonenzimatik olan antioksidan sistemi içinde; E vitamini, C vitamini, seruloplazmin, taurin, ürik asit, bilirubin, transferrin, sistein, piruvat, albumin, β -Karoten, melatonin, glutasyon ve glukoz gibi moleküller bulunur (4,136).

Serbest radikaller, ultraviyole ışınlar, ilaçlar, lipid oksidasyonu, immunolojik reaksiyonlar, radyasyon etkisi, stres faktörü, sigara kullanımı, alkol ve biyokimyasal redoks reaksiyonları gibi bir takım etkenler sebebiyle meydana gelebilir (5).

Serbest Radikal Kaynakları	Antioksidan Moleküller
❖ Aşırı alkol tüketimi ❖ Sigara kullanımı ❖ Elektromanyetik radyasyon ❖ Güneş ışınları(UV) ❖ Kronik inflamasyonlar ❖ Aşırı demir yüklemesi ❖ Aşırı fiziksel egzersiz ❖ Yaşlanma ❖ Doğum kontrol hapları	❖ Enzimler (SOD, Katalaz, GSH-Px) ❖ Proteinler (Albumin, serüloplazmin) ❖ Selenyum ❖ Askorbik asit (C vitamini) ❖ Tokoferoller (E vitamini) ❖ Karotenoidler ❖ Flavonoidler ❖ Glutasyon ve tiyoller ❖ Koenzim Q, ubikinon ve türevleri

Şekil 1: Serbest radikal kaynakları ve antioksidan molekülleri örnekleri(5).

Serbest radikaller vücut içerisinde oksidatif fosforillenme, ürik asit metabolizması ve prostoglandin sentezi gibi biyokimyasal tepkimeler sonucunda devamlı olarak meydana gelir. Oksidatif stres, hücrel antioksidan sistemini meydana getiren SOD, KAT, GPx ve melatonin aracılığıyla azaltılır (137).

Testis bol miktarda kan damarı içeren bir organdır. Bu sebeple kan yoluyla transfer olan toksik maddelerin organ içerisinde oksidan-antioksidan sistemleri arasındaki denge durumunu dokuların aleyhi yönünde değiştirmesi olasıdır. Bu koşulda artan serbest radikal oranı, testis doku hasarına sebep. Oksidatif stres, spermatozoa fonksiyonlarının bozulmasına ve anormal spermatozoa üretimine sebep olmaktadır (6,137).

Parasetamol, diğer bir adıyla asetaminofen (APAP) $C_8H_9NO_2$ formül yapısına sahip, molekül ağırlığı 151,2 g/mol, su içerisindeki çözünürlük oranı düşük, sentetik yapı halinde bir bileşiktir. Fizyolojik pH'da anyonize şekilde bulunur. Parasetamol, para-aminofenol çeşidi olan fenasetin metabolitlerinden birisidir. Parasetamolün erime noktası 170 °C, yoğunluğu 21 °C'de 1.293 g/cm³'dür. 4-hidroksiasetanilit veya N-asetil-p-aminofenol olarak da isimlendirilen parasetamol kokusu olmayan, beyaz renkli, acımsı ve kristal toz bir yapıdadır (7).

APAP, Türkiye'de ve dünyada en çok kullanılan analjezik ve antipiretiklerdir. Erişkin bireylerde alınan günlük dozu 4 gr'ı aşmamalıdır. Tek dozda alınan 10-15 gr (150-250 mg/kg) APAP'ta hepatotoksisite ortaya çıkarabilir; 20-25 gr ve üzerinde olan dozlarda kullanımı potansiyel olarak ölümcül etkiye sahiptir (138).

Gastrointestinal sistemden hızlı bir şekilde emilerek, terapötik dozda kullanılması halinde yaklaşık olarak 30-60 dakika sonrasında kanda maksimum konsantrasyona çıkar. Aşırı doz alınması halinde maksimum kan düzeyine çıkması daha uzun süre alabilir. APAP'ın yıkımı karaciğerde olur. Büyük bir bölümü glukuronidasyon ve sülfatasyonla yıkılırken ufak

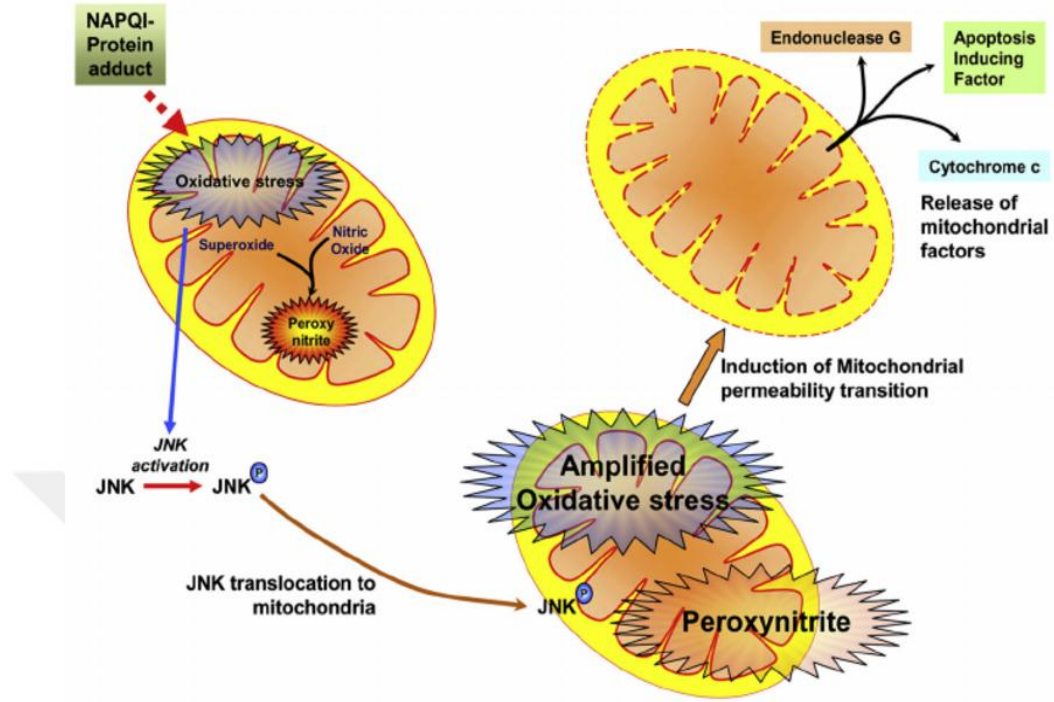
bir bölümü, toksitesi fazla miktarda yüksek olan elektrofilik alkilleyici roldeki bir ara ürüne dönüşür (8,9).

Oluşan bu konjugatların bir bölümü safrayla bir bölümü de kan dolaşımına transfer olarak idrar aracılığıyla atılır. % 5'inden daha küçük bir bölümü ise değişime uğramadan idrara transfer olmaktadır. %5-15'i ise karaciğerde mitokondriyal sitokrom p450 enzim sistemiyle N-asetil-p-benzokinonimin (NAPQI) adlı, aşırı reaktif olan, hücre makromoleküllerine bağlanma potansiyeli olan, toksik metabolite transforme olur. Bu ara ürün, karaciğerin hücrelerinde GSH aracılığıyla bağlanarak detoksifikasyonu sağlanır. GSH hızlıca NAPQI ile birleşir. Ortaya çıkan bu kompleks sonradan toksik etkisi olmayan sistein veya merkaptürik asit ile yeni bileşikler oluşturarak idrar yoluyla atılır (8,10,11,138). Fakat ilacın toksik etki oluşturacak dozda alınması halinde, karaciğerde bulunan glutatyon depoları hızlıca tükeneceğinden, bu ara ürünün nötralizasyonu yapılamaz.

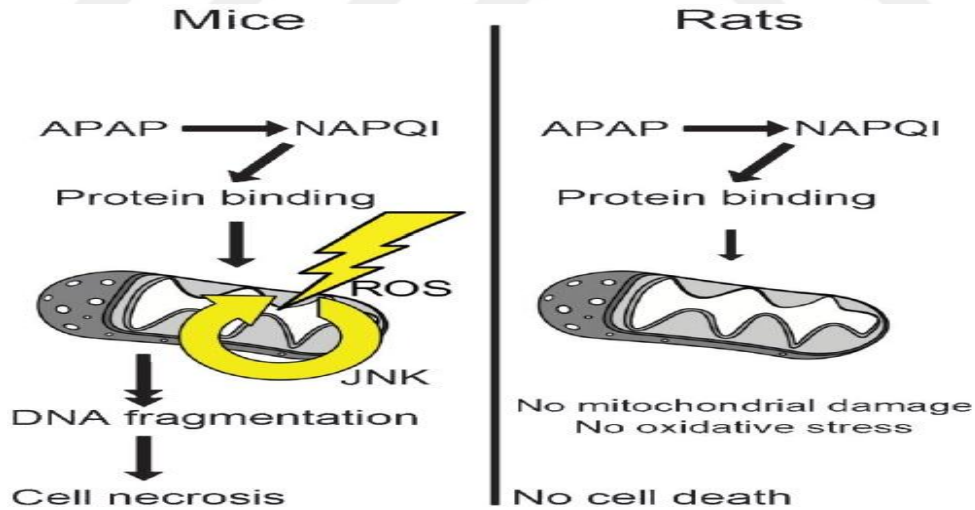
NAPQI karaciğerdeki GSH'ı tüketir ve hücrel proteinlerle kovalent biçimde bağlantı kurar. Karaciğerdeki GSH stokları %80-90 oranının altına düştüğü zaman NAPQI'nın detoksifikasyonu yapılamaz ve hücrede hasar meydana gelir. GSH'ın bitmesi ile hepatosit hücresinin içinde reaktif oksijen (ROT) ve nitrojen seviyeleri yükselir, nekrotik bir takım değişiklikler başlar. Artmış olan oksidatif stres seviyesi, hücre içindeki kalsiyum dengesinin, sinyal iletim mekanizmasının, mitokondriyal geçirgenliğin bozulmasına yol açar. Mitokondriyal membran potansiyeli yok olur ve adenosin trifosfatın (ATP) üretimi duraksar. Meydana gelenlerin sonucunda hücrede nekroz meydana gelir (12,17,138).

İlk aşamada NAPQI, öncelikle sisteine daha sonra ise mitokondriyal proteinler olmak üzere proteinlere bağlanır. APAP'a maruz kalan fare deneylerinde c-jun-N-terminal kinaz (JNK) aktivasyonunun karaciğer hasarında ve oksidatif strese etkisi olduğu gösterilmiştir (19). JNK oksidatif strese APAP zehirlenmesinin erken aşamalarında sitozolde fosforile olur. JNK'nın fosforile olması ile mitokondride translokasyonu gerçekleşir. Bu olay da mitokondriyal stresin artmasına neden olur. P-JNK'nın mitokondri üzerindeki görevi dış membranda yer alan SH3 domain-binding protein (SAB) proteini ile ilişkilidir. SAB proteinin susturulması düşük JNK aktivasyonuna sebep olmuş ve karaciğerde APAP hasarını azaltmıştır. Azalmış etkinin sebebi (tamamen kaybolmayan hasar) erken evrelerde APAP hasarında etkili olan diğer kinazlar (ASP1,MLK3,RIP,RIP3) da apoptozu sağlamaktadır. apoptoz including factor (AIF) ve Endonükleaz G'nin mitokondride nükleer translokasyonu nükleer DNA hasarı ile ilişkilidir. Bu iki etken mitokondriyal intermembran proteinleridir. Dışarı (sitozole) mitokondriyal matriks şişmesi ve dış membran parçalanması sonucu Bax

(Bcl2-associated X protein) poru ile salınırlar. Sonuç olarak sitozolde azalmış ATP seviyesi, otofaji ve hücre nekrozu gözlenir (17,18).



Şekil 2: Parasetamol hepatotoksitesinde NAPQI-mitokondri ilişkisi(18).



Şekil 3: Parasetamol hepatotoksitesinin fare ve sıçan karşılaştırması (17).

İnsanlardaki APAP toksisitesi faredekilere benzerdir. Sıçanların APAP toksisitesine çok fazla dirençliliği vardır. Ayrıca sıçanlarda daha az oksidatif stres gözlenmektedir. Farelerde JNK'nın yaygın aktivasyonu ve mitokondrial translokasyonu gözlenmiş ancak sıçanlarda gözlenmemiştir (18). APAP uygulamasından sonra gelişen nekrozu mitokondrial disfonksiyon destekler niteliktedir çünkü mitokondrial hasar insanlarda da gözlenmektedir.

Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nin batısında 70.000'den fazla hasta APAP zehirlenmesinden ve fazla dozundan şikayet ile hastaneye başvurmaktadır (19).

Fazla doz alınmadığı sürece, APAP toksikasyonunda, çoklukla ilk 24 saat içerisinde değişen oranlarda iştahsızlık, bulantılar ve kusmaların dışında bir belirti görülmez. 24-72 saat içerisinde serum aspartat (AST), alanin (ALT), bilirubin seviyesi ve protrombin zamanında uzama meydana gelebilir. Hepatotoksisitenin 3. aşaması olarak kabul edilen 72-96 saat aralığındaki dönemde, kusmalar ve karaciğer yetmezliği belirtileri oldukça belirgin hal alır. AST, ALT, bilirubin seviyesi ve protrombin zamanına ait değerler maksimuma seviyeye gelir. Böbrek yetmezliği ve pankreatit bu aralıkta oluşur. Karaciğer meydana gelen hasarın giderilmesi 5.günden itibaren olaylanır (8).

Wiger R. ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, fare testisi üzerinde 5 günlük APAP yüksek doz uygulamasında testis ağırlığının kontrol grubuna göre düşük olduğunu bildirmişlerdir. 5. ve 10. günlerdeki sakrifikasyon sonucunda erken pakiten spermatositlerde büyük bir azalma olduğunu ve bunun da spermiyogeneze aksamaya, gecikmeye neden olduğunu bildirmişlerdir. 27. ve 33. günlerde spermelerde anormal kromatin yapısını ve vas deferenste bulunan sperm miktarında artış tespit etmişlerdir. Sonuç olarak yüksek dozda APAP uygulamasının testiste DNA sentezini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (10).

Karnitin, "Gama-Trimetil amino beta hidroksi bütirik asit" yapısındadır ve $(CH_3)_3N-CH_2CH(OH)CH_2-COOH$ formül şekline sahip olup, suyun içinde iyice çözünen 161 Dalton moleküler ağırlığa sahip olan bir bileşiktir. Bir tane asimetrik yapıdaki karbon atomuna sahip olmasından ötürü D ve L haldeki formlarına sahiptir. L-karnitin (LK) doğada yalnızca L formunda bulunur. D formu ise kimyasal sentezlenme yoluyla üretilmektedir. Ayrıca başka form olan D-L formu bu 2 aktif maddenin %50 oranını ihtiva eder. Vücut dokularında L-karnitin yalnızca L formu sentezlenir ve yalnızca bu metabolik olarak aktif haldedir (139).

LK (3-hydroxy-4-N-trimethyl ammonio butaonate) canlı organizmanın farklı dokularında fizyolojik şekilde sentezlenen ve sitoplazmanın içinden mitokondrinin matriksine taşınacak uzun zincire sahip yapıdaki yağ asitlerinin iç mitokondri membranından transferinde görevli amino asit yapısına benzer şekilde olan bir maddedir. LK kolay bir açıklamayla, B grubu vitaminleri ile alakadar, amino asitlere ve vitaminlere benzer besleyici özelliğe sahip elementtir. Suyu sever yapıda olup ve hafif moleküldür. Çevrede bulunan dokularda özellikle uzun zincir yapısındaki yağ asitlerinin, beta oksidasyonu ile oksidatif fosforillenme aşamalarını takiben ATP sentezlenmesi için mitokondri membranından

transferinde önemli göreve sahiptir. Bu özelliğiyle enerji ihtiyaçları için özellikle yağ asitlerinden faydalanan dokular açısından esansiyel özellikte bir metabolittir (139).

Biyosentezi, lizin aminoasitinin metillenmesiyle ilerler, deoksikarnitin hidrosilazın katalizörlüğü eşliğinde deoksikarnitin karnitine transforme olması ile sona erer.

Ağız yolundan alındıktan sonra ince barsaklardan aktif taşınma veya pasif difüzyon ile %80'e yakın oranda absorbe edilerek asetile edilir. İnsanlarda %75'i besin referanslı, %25'i ise endojen referanslıdır. Kanın içerisinde ihtiva eden karnitin oranının %80 civarı serbest formda, %20 civarı ise ester (asil karnitin) yapısında bulunur (139). Besin aracılığıyla organizma içerisine alınan ve endojen olarak sentezi yapılan toplam karnitin primer filtrata transfer olarak %95 civarından fazlası reabsorbe edilir. Organizma içerisinde ihtiva eden karnitin %98 civarı kalp ve iskelet kasında muhafaza edilir. Geriye kalan %2 civarındaki kısmı ise karaciğer, ren ve serebellum gibi organlardadır. Plazma düzeyi ve eritrositlerdeki kısım %1'lik oranın altında yer alır (%0,6) (139).

Organizma içerisinde LK kuvvetli etkisi olan antioksidan benzeri özellikteki bileşiktir ve başta lipid peroksidasyonunun inhibisyonunu açık bir şekilde sağlamaktadır. Potansiyel olarak sahip olduğu antioksidan benzeri özelliklerinden ötürü bu yapıların oksidatif strese kaynaklı kronik biçimdeki hastalıkların önüne geçilmesinde yararlı etki gösterdiği bilinmektedir. ROT sentezlenmelerini hızlı hale getiren Fe^{++} (demir) ile birleşik yapılar ortaya koyarak lipid peroksidasyonunda azalma sağlamaktadır. LK sahip olduğu antioksidan benzeri kapasitesini artırarak dokularda ortaya çıkan bozulmayı azaltabilir. Genç sıçanlara oranla yaşlı ratlardaki lipid peroksidasyonunda meydana gelen artış ve antioksidan tesiri olan SOD, GSH ve KAT, C vitamini ve E vitaminine ait vücutta bulunma oranların azalması ve karnitin takviyesi ile artış sergileyebilmeleri bu konudaki fikri destekler yöndedir (139,140).

LK en çok; yaşlanmayı geciktirme, hafızanın (bilhassa Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklara karşı savunmada) geliştirilmesi, kalp krizi ve diğer kalp rahatsızlıklarının engellenmesinde savunucu olarak, perifer damar hastalıklarının ve kronik böbrek yetmezliğinin, sinirsel rahatsızlıklar ve depresyonun tedavilerinde, dengeli beslenme, diyet, obezite çalışmaları ve diyabet tedavisi, sperm olgunluğu ve hareketliliğini geliştirme ile sporcu sağlığı ile ilgili konularda işlevsel ve iyileştirmeye katkı amacıyla kullanma alanı mevcuttur (20,21,139,140).

Karnitin spermatozoalarda ve epididimiste oldukça fazla miktarda bulunur. Karnitin desteği farelerde sperm kalitesini artırır ve fiziksel stres sonucu oluşan hasarı azaltır.

Karnitin antiapoptotik etki olarak testiste hasar giderilmesine katkı sağlar. En güçlü hasar giderici etkisi germ hücreleri üzerindedir. Karnitin erkek infertilite deneylerinde oldukça fazla kullanılmaktadır (22).

Ahmed M. ve arkadaşları, yaptıkları gama ışını kaynaklı testis disfonksiyonunda, LK'nın spermatogenezis alakalı genlerin regülasyonunda testiküler aktiviteyi arttırdığını bulmuşlardır. Sperm başı anormalliklerinin normal ve hasar gurubuna göre iyileştirdiğini söylemişlerdir (23).



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

2.1.1. Testis Embriyolojisi

2.1.1.1. Gonadların Oluşumu

Gelişimin 7.haftasına kadar erkek ve ya dişi gonadlar morfolojik olarak benzer görünmektedir. Gonadlar gelişimin başlangıcında iki adet boylamasına, çöломik epitelin çoğalması ve altındaki mezenkimin yoğun hale gelmesiyle oluşmuş genital sırtlar şeklinde görünürler.

Primordial germ hücreleri, gelişimin başlangıçtaki aşamalarında vitellus kesesinin allantoise yakın kısmındaki endoderm hücreleri içinde ortaya çıkarlar. Sonbarsak mezenterinin alt kısmı boyunca ameboid davranışlarla ilerleyerek 5.haftanın erken evrelerinde öncül gonadlara varır, 6.haftada ise genital sırtlara yerleşir. Hücreler genital sırtlara yerleşememeleri durumunda gonadlar oluşamaz. Gonadların ovaryum ya da testise farklılaşmasında primordial germ hücrelerinin güdümlayici etkisi bulunmaktadır.

Primordial germ hücrelerinin primitif gonadlara varmasından önce ve esnasında genital sırtın epiteli çoğalır ve epitel hücrelerinin altlarındaki mezenkimin iç kısmına doğru yerleşirler. Burada primitif cinsiyet kordonları olarak isimlendirilen düzensiz şekilli kordonları meydana getirirler. Erkek ve dişi embriyolarda bahsedilen kordonlar yüzeyel epitele bağlıdır, bu evrede erkek ve dişi gonadlarının seçilebilmesi olanaksızdır. Bunlara farklılaşmamış gonad denilir.

Eğer embriyo genetik olarak XY kromozomlarını barındırıyor ise erkektir. Testis belirleyici faktörü kodlayan Y kromozomunda ki SRY geninin indüklemesiyle, primitif cinsiyet kordonları testis ya da medullar kordonları meydana getirmek üzere proliferasyona devam ederek medullanın içine doğru hareket ederler. Daha sonra rete testisi oluşturacaklardır. Gelişimin sonraki aşamalarında testis kordonlarının yüzey epiteliyle olan bağlantıları tunika albuginea isimli fibröz bir bağ dokunun araya girmesi ile sonlanır(136).

4.ayda testis kordonları hilal biçimini alır, bu hilalin uç kısımları rete testis ile devamlılık gösterir. Bunlar, sertoli hücreleri ve primitif germ hücrelerinden köken alırlar (26).

Gonadal sırtın orijinal mezenkiminden kaynaklanan leydig hücreleri testis kordonlarının ara bölgesinde yer alır ve buradaki kordonların farklılaşmaya başlamasından daha sonraki bir dönemde gelişmeye başlarlar. Gebeliğin 8.haftasında leydig hücreleri testesteronun üretimine başlatırlar.

Adolesan döneme kadar içi dolu vaziyette kalan testis kordonları ergenlikte lümenleri açılarak seminifer tübül yapıları şeklini alırlar. Seminifer tübüller kanalize olunca rete testis tübülleri ile birleşir ve duktuli efferenteslere giriş yaparlar. Bu duktuslar mezonefrik sistemin kalıntı boşaltım tübülleridir. Duktus deferens olarak adlandırılan bu kanal sistemi rete testis ile mezonefrik kanalları birbirlerine bağlar (26,136).

2.1.2. Testis Anatomisi

Testisler ovoid biçimli iki adet erkek üreme organıdır. Spermatik kordonlar, skrotal kese içinde asılı şekilde vücut boşluğunun dış kısmında bulunurlar (27). 3 santimetre kalınlıkta, 10-14 gram ağırlıkta, 2-3 santimetre genişliğinde ve yaklaşık olarak 4 santimetre uzunluktadır (28).

Rete testis ve t. rekti testisin iç kısmında yer alır. Duktus ejakulatoryus, d. epididimis, d. deferens kanalları ise testisin dış kısmında yer alır. Bu kanallar bütünüyle genital kanal sistemini meydana getirir. Bu kanal sistemiyle birlikte bununla ilgili olan vezikula seminalis, bulboüretal bezler, prostat bezi ve kopulasyon organı olan penis erkek reproduktif sistemi oluşturur (28,141).

Aortanın bir dalı olan arteria testikularis, ikinci lumbar omurga düzeyinde aorta abdominalisten dallanan, testisin ve epididimisin perfüzyonuna koşul sağlayan arterdir (29,141).

Testisin ve epididimisin venleri pampiniform pleksusu meydana getirerek testis içerisindeki kapiller yatakların bir araya gelmesine aracılık ederler. Sonra birleşerek vena testicularis oluştururlar (30). Testisin venöz kanı sağ kısımda vena cava inferiora, sol kısımda vena renalis' e ulaşır. Testis venleri, duktus deferens spermatik kordonu ve testiküler arteri oluştururlar (29).

Kan, testis venlerinde arterlere göre daha düşük ısıdadır. Düşük ısıda olan kan, arteriyel kanın da ısınıp daha düşük ısıya indirilerek, vücudun öteki bölgelerinden farklı olarak yaklaşık 35°C ısıya sahip olmasını sağlar. Bu durum spermiyumların düzgün bir şekilde gelişimini sağlar (29,141). Testisin innervasyonu sadece otonom sinirler aracılığı ile olmaktadır (29).

2.1.3. Testis Histolojisi

Testislerin her biri skrotumun altında, üç tabakalı kapsül yapısı ile çevrelenmiştir. Bu yapı testiküler kapsül olarak adlandırılır ve Tunica vaginalis, T. albuginea ve T. vaskülozadan meydana gelir (31).

Testis en dışta iki katmandan oluşan, peritondan köken alan T. vaginalis örtülü haldedir. T. vaginalisin iç yüzeyi testisin anterior ve lateral yüzeyini çevreler, parietal yüzeyi ise skrotum yüzeyinde devamlılık göstermektedir. T. vaginalis tabakasının alt kısmında tunika albuginea tabakası yer almaktadır. En iç kısımda mevcut olan T. vasküloza ise gevşek bağ doku yapısındadır ve kan damarları bulundurmaktadır (32).

Tunika albuginea tabakası histolojik kesitlerde açık olarak gözlenen, düzensiz sıkı bağ doku yapısındadır. Bu tabaka testisin dorsal yüzü alanınca üçgen şeklinde bir kalınlaşma oluşturur ve mediastinum testis yapısını meydana getirerek organın parankimasının içine doğru sokulur. Buradan radial şekilde çıkan sıkı bağ dokusu yapısında olan, ince fibröz septumlar insanda testis dokusunu yaklaşık olarak 250 adet lobüle ayırır. Bu lobüllerin her biri, 1 ile 4 adet arasında seminifer tübül içermektedir. Seminifer tübüllerin ara kısmı t. vaskülozanın testis içerisine doğru uzanarak meydana getirdiği ara bağ (interstisyel) dokusu ile doldurulmuştur. Burada leydig hücre grupları, makrofajlar, fibroblastlar ve kan ve lenf damarları bulunmaktadır (33, 34).

2.1.3.1. Seminifer Tübül Yapısı

Seminifer tübül yapıları bir çok kılcal damar ağı ile çevrilmiş, birden fazla sayıda birleştirmeler yapan, fazlasıyla kıvrıntılı yapıda bulunur. Tübül çapları yaklaşık olarak 150 ile 250 µm, tübül uzunlukları 30 ile 70 cm arasındadır. Testis dokusunun yaklaşık % 92'sini oluştururlar. Seminifer tübüller yaklaşık 1000 adettir (33,35,141).

Seminifer tübüllerin duvarı seminifer epitel tabakası ile örtülüdür. Seminifer tübül epiteli özelleşmiş multilaminar epiteldir. Tübüller sertoli hücrelerini ve bazal lamina ile tübül lümeni ara kısmını kaplayan farklı gelişim basamaklarındaki 4-8 tabakalı spermatogenik hücreleri içerir. Tübül duvarının en dışında yaklaşık olarak kalınlığı 8-10 µm olan, fibroblast hücrelerince bol, silindir biçimli, multilaminar, tip I kollajen liflerden oluşan lamina propria olarak adlandırılan bir bağ doku tabakası ve orta kısmında bir bazal lamina yer almaktadır.

Bu bölge peritübüler doku ya da membrana propria olarak isimlendirilmektedir. Membrana propria seminifer epiteli dış kısmından çevreleyen özelleşmiş fibröz yapıdaki dokudur ve dört adet tabakadan meydana gelir(141). Dışardan içeriye doğru;

1-) Dış Hücresel Tabaka: Fibroblast hücrelerinden meydana gelir.

2-) Dış Hücresel Olmayan Tabaka: İçeriği glikoz ve proteinden oluşan bazal laminadır (141).

3-) İç Hücresel Tabaka: Fibroblast benzeri ince yassı miyoid hücrelerden meydana gelmiştir(141). Bu fibroblastlara ve düz kas hücrelerine benzeyen özellikler gösterir. Bu hücrelerin düzenli biçimde kasılmalarıyla seminifer tübül lümeninin içinde pasif biçimde hareket eden spermatogonyal hücrelerin tübül lümene doğru hareket etmelerini kolay hale getirir.

4-) İç Hücresel Olmayan Tabaka: Yapısında kollajen lifleri, glikoproteinleri ve hyaluronik asidi bol miktarda ihtiva eden tabakadır (34,35,36,141).

2.1.3.2. Sertoli Hücrelerinin İnce Yapısı ve İşlevi

Sertoli hücreleri bazal kısımda yerleşik oval biçimde heterokromatid çekirdek ile merkezi yerleşimli büyük bir çekirdekçik içeren, uzun piramidal şekilli hücrelerdir. Hücreler apikal-lateral yüz farklılaşmalarına sahiptir. Sertoli hücreleri tübül lümenine doğru katlantılar oluşturarak spermiyumların gelişimin ilk aşamasından lümene doğru bırakılıncaya dek yerleşebilecekleri bir bölge meydana getirirler (32,34,141).

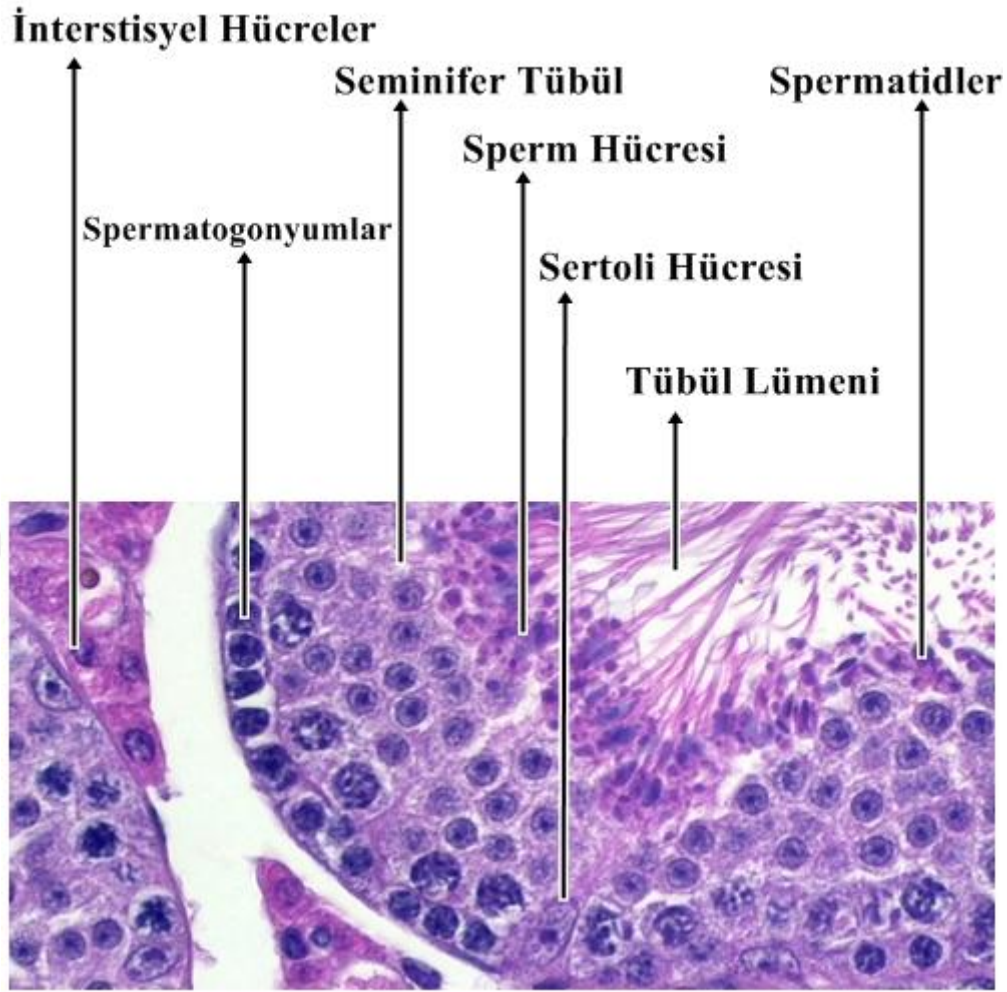
Sertoli hücrelerinin sitoplazması gelişmekte olan germ hücrelerine destek görevinde bulunan mikrotübül ve ara filamanlardan oluşan gelişmiş bir hücre iskeleti içermektedir. Ayrıca, iyi gelişmiş golgi kompleksi, bol miktarda mitokondri, lipofuskin içeren fazla sayıda vezikül ve lipid damlacıkları içerir (32,36).

Sertoli hücreleri, bazal ve lateral yüzeylerindeki zonula okludensler ile birbirlerinin yüzeylerine tutunurlar. Tübül epiteli bazal ve lümene bakan yapı olarak ikiye ayrılır (141). Bazal yapı kök hücreler olan spermatogonyumları içerir. Adluminal kompartman ise tübül lümenine yakındır ve primer spermatositleri, sekonder spermatositleri ve spermatidleri içerir (141). Spermatogonyumların farklılaşma aşamasında sperme özgün proteinler oluşur. Germ hücreleri spermatogenezi immünogenezden sonra gerçekleştirdiğinden immün sistem tarafından tehdit olarak belirlenebilir (141). Böylece spermatogenez için bir mikroçevre oluşturan bu kompartmanların meydana getirdiği kan-testis bariyeri, üstteki primer, sekonder spermatositler ve spermatidleri, alt kısımdaki spermatogonyumlardan ayırarak dolaşım sisteminde bulunan antiijenlerden, otoimmün bağışıklık reaksiyonlarından korur (31,33,35).

Sertoli hücrelerinin işlevleri:

1-)Spermatogenez sürecinde olan hücreleri beslemek, korumak ve desteklemek (141),

2-)Protein ve iyonlarca bol olan içeriği tübül lümenine sekrete etmek (141),



Şekil 4: Sertoli hücresi ve spermatogenik seri hücreleriyle ilişkisi

3-)Folikül stimulan hormon (FSH) kontrolünde, seminifer tübülün içinde spermatogenezin olaylanması için gerekli olan testosteronun birikmesini sağlayan androjen bağlayıcı protein (ABP)'i sentezlemek,

4-)Spermiyogenez olaylandıktan sonra atılan artık cisimleri fagosit etmek,

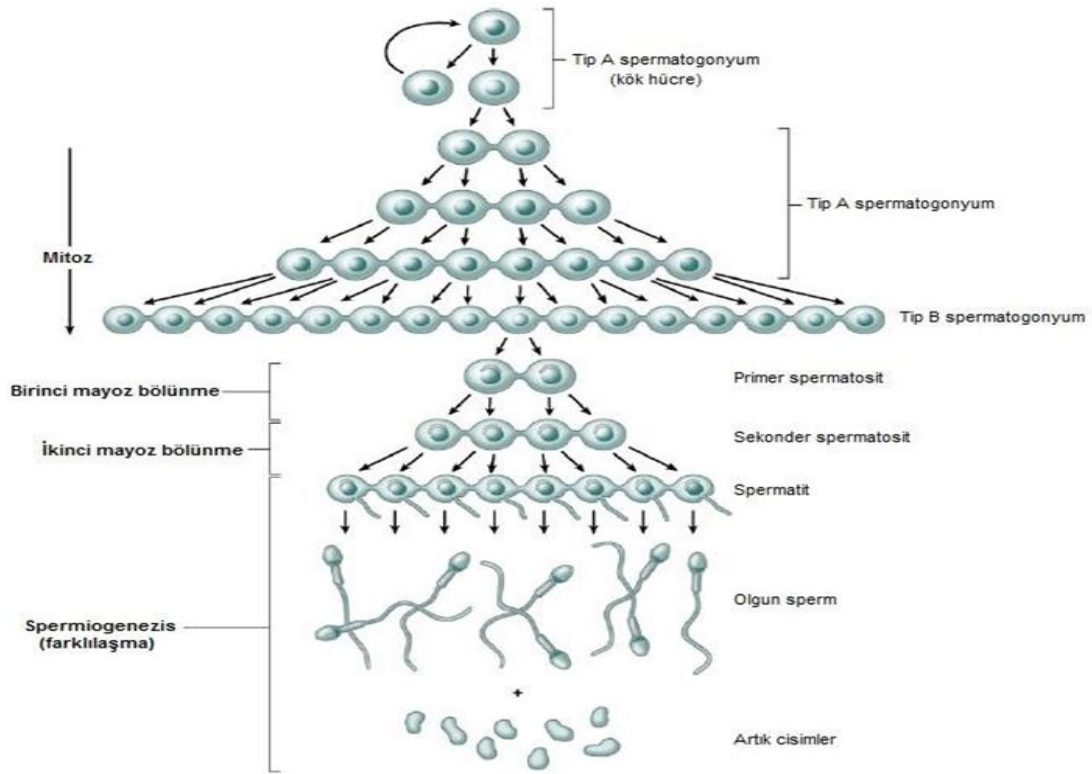
5-)Matür spermatidlerin spermiyasyon aşamasında seminifer tübül lümenine salınmasını kolaylaştırmak amacı ile aktin aracılı kasılmaları oluşturmak,

6-)Pitüiter bezin ön bölgesinden sekrete olan FSH'ın sentezini ve sekrete olmasını engelleyici rolü olan inhibin ve uyarıcı rolü olan aktivin olarak adlandırılan hormonları salgılamak,

7-)Embriyonik gelişim esnasında erkek fetusta paramezonefrik kanalların regresyonunu ve mezonefroz kanallarının meydana gelmesini indükleyen glikoprotein yapıda olan AMH üretmektir.(34,35,37,141).

2.1.3.3. Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik seriye ait hücreler seminifer tübül epitelinde yer alan çeşitli olgunlaşma basamaklarında bulunan ve bir bölünme düzenine sahip, bölünerek olgun spermilere dönüşen 4-8 tabakadan meydana gelen hücrelerdir. Lümen yüzeyinden tübülün bazaline doğru hücre tipleri sırasıyla; spermiumlar, spermatidler, sekonder spermatositler, primer spermatositler ve spermatogonyumlardır (35,141).



Şekil 5: Spermatogenetik seri hücrelerinin bölünme ve farklılaşmasını gösteren şema(38).

2.1.3.3.1. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, sertoli hücre-hücre bağlantılarının altında kalan bazal bölmede yer alırlar. Bu sebepten ötürü kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar. 3 farklı tipi vardır (34).

Tip A spermatogonyumlar seminifer tübül epitelinin kök hücreleridir. Puberte döneminden itibaren mitoz bölünmeye uğrayarak soluk renkte boyanan tip A açık spermatogonyumlarla koyu renkte boyanan tip A koyu spermatogonyumlara dönüşürler. Tip B spermatogonyumlarda mitoz bölünme geçiren tip a açık spermatogonyumlardan oluşurlar (32).

2.1.3.3.2. Spermatositler

Tip B spermatogonyumlar mitoz bölünmeye uğrayarak primer spermatositleri meydana getirir. Primer spermatositler mayoz bölünmeye uğrarlar (141). Mayoz I'in profaz evresi ortalama 22 gün sürdüğünden spermatogenik serinin boyut olarak en büyük ve histolojik kesitlerde en fazla gözlenen hücreleri primer spermatositlerdir. Mayoz I'in sonunda meydana gelen sekonder spermatositler hızlı interfaz evresi geçirdikleri ve hızlı bir biçimde 2. mayoz bölünme geçirdikleri için histolojik kesitlerde oldukça az rastlanırlar (33,34).

2.1.3.3.3. Spermatidler

Sekonder spermatositler ikinci mayoz bölünme aşamasını tamamlayıp seminifer tübülün lümeninin çevresinde sertoli hücrelerinin derin olan apikal bölgedeki sitoplazmik çöküntülerinde yer alacak spermatidleri oluştururlar. Spermatidler sertoli hücrelerinin apikal kısmındaki sitoplazma katlantılarında spermiyogenez olarak adlandırılan bir farklılaşma sürecini tamamlayarak olgun spermiumları meydana getirirler. Olgun spermiumlar bu aşamadan sonra spermiyasyon denilen olay ile seminifer tübülün lümen kısmına salınır. Sonuç olarak bir adet spermatogonyumdan dört adet olgun spermium meydana gelir (33,34).

2.1.3.3.4. Spermiumlar

İnsanlarda bir spermatogonyum hücresinden olgun bir spermium oluşması ortalama 74 günde farelerde ise 9 günde tamamlanır ve bu sürece spermatogenezis denilmektedir. Olgun bir spermiumun yapısı baş, boyun ve kuyruk bölgelerini içerir (31). Spermiumun baş bölgesinde yassı şekilde çekirdeğin üst kısmını örten, özel tipteki lizozom olan akrozom yapısı mevcuttur. Akrozom yapısı içerisinde hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi hidrolitik enzimleri içermektedir (32).

Boyun kısmı baş bölgesi ile flagella kısmı arasında bulunan kısa ve dar yapıdır. Flagella yapısının merkezi parçası olan aksonem yapısını oluşturan proksimal ve distal sentrioller yapılarında ihtiva eder (33,141).

Kuyruk yapısı orta kısım, esas kısım ve son parça olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır. Kuyruk yapısına ait olan orta parça sarmal bir yapıda dizilmiş mitokondrileri, 9+2 mikrotübüler yapıdaki aksonemi ve 9 adet dış yoğun fibrilleri bulundurur. Esas parça kuyruk yapısının en uzun parçasıdır ve 7 adet dış yoğun fibril ile sarılı olan merkez kısmı aksonem ve fibröz kılıftan meydana gelir. Kuyruk yapısının son parçasında sadece aksonem bulunur ve oldukça kısa bir bölgedir, burada fibröz kılıf ve dış yoğun fibriller yer almaz (34,38).

2.1.3.4. Spermatogenezis

Spermatogenezis, kök hücre olan spermatogonyumun olgunlaşıp spermiyum oluşuncaya kadar olan sürede gerçekleşen mitoz ile çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve başkalaşım aşamalarını içeren 3 basamakta gerçekleşen bir süreçtir (31).

- 1. Spermatositogenez:

Spermatogonyumların bölünerek spermatositleri meydana getirdikleri bu evre Spermatositogenez olarak isimlendirilir (35).

- 2. Mayoz bölünme:

Spermatositlerin takiben iki mayoz bölünme geçirdikten sonra spermatidleri meydana getirdikleri bu evre mayoz bölünme olarak isimlendirilir (35).

- 3. Spermiyogenez: Spermatidlerin bir dizi hücre farklılaşması süreçlerini tamamlayarak spermiyumları meydana getirdikleri bu evre spermiyogenezis olarak isimlendirilir (34).

2.1.3.5. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri seminifer tübül yapılarının arasında yer alan gevşek bağ dokusunda genellikle fenestralı kapiller ve küçük lenf damarlarının çevresine yakın olan konumda, tekli biçimde ya da küçük hücre grupları halinde gözlenirler (39,141).

Poligonal şekle sahip olan leydig hücrelerinin sitoplazmasında insan türüne has Reinke kristalleri olarak isimlendirilen kristalize proteinler, steroid hormon sentezleyen hücrelerin tipik özelliği tübüler yapıda kristal mitokondriler, sıkı halde paketlenmiş olan fazlaca bulunan granülsüz endoplazmik retikulum (AGER), iyi gelişmiş golgi kompleksi ve fazlaca yuvarlak biçimli lipid damlacıklar içerir (141). Bu hücreler erkek üreme organlarının farklılaşması ve ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişimini sağlayan testosteron hormonunu sentezlerler (34,35).

2.1.4. Testis Fizyolojisi

Testisler iki ana işleve sahiptir. Bunlardan biri erkek üreme hücresi olan spermiyumların oluşması, diğeri cinsiyet hormonu olan testosteronun sentezlenmesi, depo edilmesi ve salgılanmasıdır. Testise ait bu işlevler ergenlik döneminde başlar ve hipotalamo-hipofizer aksin kontrolü altında gerçekleşmektedir. Hipotalamustan sekrete olan gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH), hipofizbezinin frontal lobundan lüteinleştirici (LH) hormonun salgılanmasını tetikler. LH ise Leydig hücrelerindeki reseptörlerle eşleşerek bu

hücrelerde kolesterolden, başta testosteron olmakla beraber östrojen de olmak üzere diğer hormonların sentezlenmesini sağlar (40,141).

FSH hipofizin frontal lobunun diğer bir hormonudur, FSH tekrar hipotalamustan GnRH hormonu aracılığıyla sekrete olur ve sertoli hücrelerinde ABP'nin sentezlenmesini ve salınmasını tetikler. ABP testosteron hormonunu kendine bağlayarak seminifer tübüllerde çok yoğun oranda kalabilmesini sağlar. Böylece belli bölgelerde çok yoğun olarak kalan testosteron FSH'nin etkisi ile spermatogenezin düzgün olarak gerçekleşebilmesini sağlar. Testisler holokrin tipte salgı yapar. Bu şekilde günde ortalama yaklaşık 200.000.000 spermium oluşması sağlanır (40).

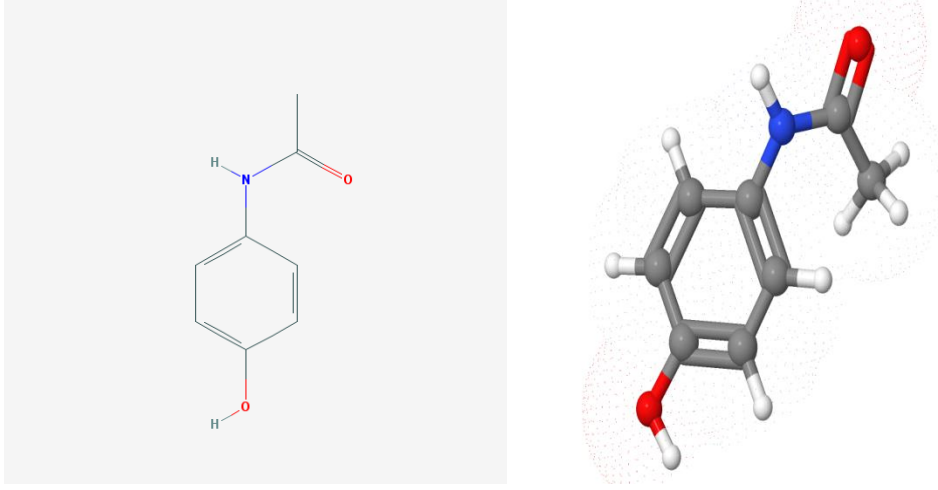
Sertoli hücrelerinde sentezlenen ve FSH sekresyonunu durduran inhibinin, devamlı olarak sekrete edilmesi durumunda FSH'nin artışı azalırken spermium miktarı azaldığında ise FSH miktarı artar (27).

2.2 Parasetamol

Asetanilidin analjezik etkisinin tesadüfen 1886 senesinde keşfedilmesi ilgileri p-aminofenol çeşitleri üzerinde toplamıştır. İlerleyen senelerde asetanilidin toksisite oluşturmaları ve organizma içerisinde meydana getirdiği tesirden sorumlu N-asetil-p-aminofenole dönüşmesi ile bu grup ile fazlaca çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar sonucunda toksik etki göstermeyen p-asetamidofenol yapısında bir bileşik geliştirilmiştir (41).

2.2.1. Parasetamolün Fiziksel Özellikleri

APAP (Şekil 5), sahip olduğu kapalı formülü $C_8H_9NO_2$ (MA:151 g/mol) olan N-(4-hidroksifenil)-asetamit veya 4-hidroksiasetanilit yapısında beyaz renkte, kristal yapıda, acı tadı olan bir maddedir. APAP'ın erime noktası 169-170°C dir (41). APAP, zayıf bir asittir. Doygun sulu çözeltisinin pH'sı 5.5- 6.5 (25°C) değerleri arasında değişir (42). APAP'ın pKa değeri 9.5dir (43,142).



Şekil 6: Parasetamolün moleküler yapısı (115)

APAP'ın, ultraviyole spektrumu, su, asidik su, metanol, asidik metanol ve sodyum metoksit içeren metanolde alınmıştır (44). Sulu ortamda spektrumda 242 nm dalga boyunda bir ana pik ve 280 nm dalga boyunda bir minor pik gözlenmiştir. Ortama asit eklenmesi, her iki pikte de değişikliğe sebep olmamıştır. Metanollü ortamda ise, 243 nm dalga boyunda ana pik gösterir ve bu pikin gözleendiği konumu ortama asit eklenmesi ile değişmez (142).

APAP, sıcak su, sodyum hidroksit çözeltisi, metanol, etanol, dimetilformamit, etilen diklorür, aseton ve etil asetatda çözünür iken eter, petrol eteri, pentan ve benzende ise çözünmez (45,142).

2.2.2. Parasetamol Sentezi

APAP'ın yaygın bir kullanım oranına sahip olması sebebi ile oldukça fazla miktarda üretilmekte ve sentezi için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. APAP'ın ticari olarak üretimi için genellikle fenol bileşiği kullanılmaktadır. Fenol bileşiğinin nitrolanması sonucunda meydana gelen o-nitrofenol ile p-nitrofenolün karışımı, distilasyon ile izomerlerine bölünür. Elde edilen p-nitrofenol izomeri indirgenerek p-aminofenol meydana gelir ve bu bileşiğin asetillenmesi ile APAP'a ulaşılmaktadır (46,142).

Diğer bir yöntem ise fenol ile asetik anhidritin reaksiyonuyla oluşan p-asetilfenol ilk olarak hidroksilaminle oksim çeşidine dönüştürülür. Oksim çeşidinin tıyonül klorür ve potasyum iyodürle tepkime vermesi sonucunda APAP oluşmaktadır (47).

APAP sentezlemek için kullanılan başka bir yol ise fenol ile diazonyum tuzunun tepkime vermesi sonucunda oluşandır (48).

2.1.3. Parasetamolün Kimyasal Özellikleri

Kuru ve saf haldeki APAP, 45°C sıcaklığa kadar kararlı haldedir. APAP sentezinde; başlangıç maddeleri, reaksiyon koşulları, reaktifler ile çözücü maddelerin kalitesi, uygunsuz saklama koşulları (sıcaklık, pH v.b.) ve saflaştırma işlemi gibi etkenler nedeni ile çeşitli safsızlık durumu oluşur(142). Oluşan safsızlıkların arasından en önemli olanı 4-aminofenoldür. 4-aminofenol, APAP'ın sentezlenmesi esnasında hareket maddesi olarak kullanılır. Ayrıca APAP nemli ortam koşullarında saklandığı durumda 4-aminofenole hidroliz olur. APAP'ın 4-aminofenole hidroliz olması hem asit hem baz katalizli koşulda gerçekleşmektedir (49).

APAP'ın oksidasyonunda, bileşiğin oksidasyonunun yanında safsızlık olarak da bilinen 4-aminofenolün kinomin ve başka bileşiklere dönüştüğü ifade edilmiştir. Saflığın bozulması, renk değişimi ile görülebilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda, 4-aminofenolün teratojenik ve nörotoksik tesir gösterdiği ifade edilmiştir(50).

2.1.4. Parasetamolün Farmakolojik Özellikleri ve Metabolik Etkisi

APAP'a benzer olan başka ağrı kesici ilaçlardan değişik olarak omurilik ve hipotalamus gibi peroksidleri az miktarda içeren ortamda prostaglandin sentezinin inhibisyonunu sağlayabilir ve tesiri kısa sürede başlar; plazmadaki seviyesi 30-60 dakika içerisinde maksimum miktara varır. Emilimi besinler ile birlikte alındığında azaltılır. İlk dozdan sonra ağrı kesici tesiri 3-4 saat boyunca devamlılık gösterir. Mutad dozda eliminasyon yarılanma ömrü yaklaşık 2.4 saattir, non-lineer eliminasyon kinetiği göstermesi sebebiyle fazla miktardaki dozda 7.3 saate çıkabilmektedir (51,142).

APAP ağız yoluyla 500-1000 mg'lık dozda verilir. İcap ederse bu doz 4-6 saat aralıklarla tekrar edilir. Günde en fazla alınabilecek dozu 4 gram olarak kabul edilir. Kaynakların kimisinde 3 gram hatta 2.6 gram olarak belirtilmektedir. Böbrek yetmezliği olan bireylerde ve alkolik olan bireylerde APAP dozu azaltılmalıdır. Üst kısımda belirtilen dozda 5-10 günden daha fazla süre zarfında kullanılması tavsiye edilmez. Çocuklarda karşılaşılabilecek hepatoksisite potansiyeli daha düşük olduğundan kg başına verilmesi belirlenen doz daha yüksektir; tek seferde 10 mg/kg dozunda verilir (51,142).

APAP terapötik dozda alındığında, geniş olarak kullanılan güvenilir ve etkili analjezik ve antipiretikdir. Ancak APAP'ın bir akut ve ya aşırı doz aşımı karaciğer yetmezliğine ilerleme potansiyeli olan ciddi karaciğer hasarına neden olabilir. Buna bağlı olarak, kimyasal olarak

indüklenmiş akut hepatotoksosite çalışmalarında yüksek dozda APAP ile zehirlenme yaygın olarak kullanılan bir deney modelidir (52).

Yüksek dozda alınması halinde maksimum kan seviyesine ulaşması daha uzun süre alabilir. Yıkımı karaciğerde gerçekleşir. Büyük bir kısmı glukuronidasyon ile sülfatasyon yolu kullanılarak eliminasyonu yapılırken küçük bir kısmı da, toksitesi çok fazla elektrofilik özellikte olan alkilleyici ara ürüne transforme olur (8,9).

Ortaya çıkan bu konjugatların bir bölümü safrayla bir bölümü de kan dolaşımına transfer olarak idrar aracılığıyla atılır. % 5'lik bölümünden daha az olan küçük bir bölümü ise değişime uğramadan idrara ulaşmaktadır. Arda kalan %5-15 arasında değişen bölüm ise karaciğerde mikrozomal sitokrom p450 enzim sistemi üzerinden NAPQI olarak adlandırılan, oldukça reaktif olan, hücreye ait makromoleküllere bağlanabilen, toksik özellikteki metabolite transforme olur. Bu ara ürün, karaciğer hücreleri içerisinde bulunan GSH enzimi tarafından bağlanarak detoksifikasyonu gerçekleştirilir (138). GSH hızlıca NAPQI ile birleşir, oluşan bu kompleks sonradan toksik etkisi olmayan sistein veya merkaptürik asit yeni oluşan bileşiklere dönüşerek idrar aracılığıyla elimine edilir (138). CYP1A1 (sitokrom p450 ailesi proteini 1) ve CYP2E1 (sitokrom p450 ailesi 2 E'nin 1 alt ailesi üyesi) alt insanlarda ve farelerde en önemli iki enzim isoformlarıdır (8,10,11,52). Ancak APAP'ın toksik olabilecek dozda alınması halinde, karaciğerdeki glutatyon depoları hızla tükeneceğinden, bu ara ürünün nötr hale getirilmesi mümkün olamaz.

NAPQI karaciğerdeki GSH'ı kullanarak tüketir ve hücrel proteinlere kovalent şekilde bağlanır. Karaciğerdeki GSH depoları % 80-90 oranlarının altına düştü zaman NAPQI detoksifiye edilemez ve hücrede hasar meydana gelir. APAP aşırı dozundan sonra mitokondriyal proteinlere bağlanmanın toksisite ile korele olduğu gözlenmiştir. Bu sonuç mitokondrinin kritik hedef olabileceğini destekler. GSH'ın karaciğerde tükenmesi ile hepatositlerin içerisindeki ROT ve nitrojen türleri artar, dokuda nekrotik değişiklikler gözlenmeye başlar. Artmış olan oksidatif stres, lizozomal demirin alınmasıyla birlikte intraselüler kalsiyum homeostazının, mitokondriyal geçirgenliğin ve sinyal iletiminin bozulmasına sebep olur. Hücrelerde mitokondriyal membran potansiyeli kaybolur ve ATP üretimi duraksar. Olanların neticesinde hücre nekrozu oluşur (12,17,53,54,55,138).

Bazı araştırmalar oksidatif stresin olduğunu göstermektedir. APAP zehirlenmesinden sonra indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS) ortaya çıkar ve nükleer faktör kappa B'nin

aktivasyonuna yol açar. Ayrıca bağışıklık sisteminin uyarıldığını gösteren pentraksin 3 ve neopterin seviyelerinde bir artış meydana gelir (56,57,58).

İlk aşamada NAPQI, öncelikle sisteine daha sonra ise mitokondrial proteinler olmak üzere proteinlere bağlanır. APAP'a maruz kalan fare deneylerinde JNK aktivasyonunun karaciğer hasarında ve oksidatif strese etkisi olduğu gösterilmiştir (19). JNK oksidatif strese APAP zehirlenmesinin erken aşamalarında sitozolde fosforile olur. JNK'nın fosforile olması ile mitokondride translokasyonu gerçekleşir. Bu olay da mitokondriyal stresin artmasına neden olur. P-JNK'nın mitokondri üzerindeki görevi dış membranda yer alan SAB proteinini ile ilişkilidir. SAB proteinin susturulması düşük JNK aktivasyonuna sebep olmuş ve karaciğerde APAP hasarını azaltmıştır. Azalmış etkinin sebebi (tamamen kaybolmayan hasar) erken evrelerde APAP hasarında etkili olan diğer kinazlar da apoptozu sağlamaktadır. AIF ve Endonükleaz G'nin mitokondride nüklear translokasyonu nüklear DNA hasarı ile ilişkilidir. Bu iki etken mitokondrial intermembran proteinleridir. Dışarı (sitozole) mitokondrial matriks şişmesi ve dış membran parçalanması sonucu Bcl2-associated X protein (Bax) poru ile salınırlar. Sonuç olarak sitozolde azalmış ATP seviyesi, otofaji ve hücre nekrozu gözlenir (17,18).

Şiddetli derecede olmadığı sürece, APAP toksikasyonunda, ekseriyetle ilk 24 saatlik süre zarfı içinde değişkenlik gösteren iştahsızlık hali, bulantı durumu ve kusma dışında belirti gözlenmez. 24-72 saatlik süre zarfı içerisinde vücudun sağ üst kadranda ağrı, serum AST, ALT, bilirubin ve protrombin zamanlarında uzama meydana gelir. Zehirlenme durumunun 3. evresi olarak kabul gören 72-96 saatlik süre zarfının arasında, kusma ve karaciğer yetmezliği belirtileri daha belirgin bir hale gelir. AST, ALT, bilirubin ve protrombin zamanı değerleri en yüksek seviyeye çıkar. Böbrek yetmezliği ve pankreatit bu aralıkta oluşur. Karaciğerde meydana gelen hasar 5.günden itibaren görülmeye başlar (8,59,60).

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikallerin biyolojik sistemlerin içindeki varlığı yaklaşık 50 sene önce farkedilmiştir. 1956 yılı içinde McCord ve Fridovich'in süperoksit dismutaz enzimini keşfetmeleri ile biyoloji alanında serbest radikallerin önemi anlaşılmaya başlanmıştır. Sonrasında yapılan çalışmalar ile serbest radikallerin hücresel boyuttaki fonksiyonları, nitrik oksit ve türevlerinin biyolojik sistemlerdeki önemini gösteren araştırmalar ile ortaya koyulmuştur (61,62).

Aerobik solunum yapan organizmalar, reaktif oksijen türevleri reaktif durumdaki molekülleri meydana getirirler (63). Reaktif oksijen bileşikleri ile ortamda meydana gelen radikal hücumu, yeterli seviyede antioksidan enzimler tarafından süpürülmediği takdirde, fazla miktarda ortaya çıkan serbest radikaller hücre zarı lipidlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerine hasar vererek lipid peroksidasyonun ürünlerinden olan malondialdehit ve 4-hidroksinoneal benzeri molekülerin oluşmasına sebep verir. Sonuç itibarıyla membran potansiyelinin farklılaşmasına ve bütünlüğünün kaybolmasına, hücre akışkanlığının bozulmasına, hücrenin bütünlüğü ve organellerinin dağılmasına sebep olur (64).

Serbest radikaller, bir ya da birden fazla sayıda eşleşmemiş haldeki elektrona sahip olan, çok kısa ömürlü, kararsız halde olan, düşük bir molekül ağırlığına sahip oldukça etkin moleküllerdir (65).

Sahip oldukları bu özelliklerinden ötürü radikal olmayan maddelerle reaksiyona girerek yeni radikaller meydana getirirler ve zincir reaksiyonlarının başlamasını sağlarlar (66,67). Bunlar organizmalarca hücre içerisinde mitokondriyal solunum zincirinde ya da hücre dışısında özellikle fagositlerce meydana getirilirler (68).

Serbest radikaller normal metabolizma esnasında meydana gelebildikleri gibi organizmanın yüksek sıcaklık, radyasyon, ilaç, hava kirliliği, sigara dumanı, inflamasyon, aşırı egzersiz gibi bir takım etkenlerle karşılaşılması sonucunda da meydana gelebilirler (69). Serbest radikallerin fazla miktarda oluşumu, doku hasarına, inflamasyona ve hücre fonksiyon bozukluklarına sebep olur. Son senelerde yapılan çalışmalar, serbest radikallerin miyokard enfarktüsü, iskemi, astım ve diyabet gibi birden fazla hastalıkla ve yaşlanma süreci ile ilişkisi olduğunu göstermektedir (70-73).

Serbest radikaller kan ve yapısal proteinleri okside edebilir ve proteinlerin daha basit bileşiklere parçalanmasını sağlayan sistemi yavaşlatabilir. Oksidasyon esnasında proteinler aminoasit kaybedebilir veya parçalanabilirler (74). Bu reaksiyonlar yapısal proteinlerin veya enzim fonksiyonlarının değişimine sebep olur (75). Protein oksidasyonu yüksek sıcaklık, inflamasyon, fiziksel egzersiz veya iskemi-reperfüzyon sonucunda oluşabilir (76,77).

DNA'ya ait her bir parça, serbest radikallerden gelecek saldırılara karşı zayıf bir hedeftir (78). DNA oksidasyonu sonucu mutasyonlar oluşur, kanser ve hücre yaşlanması gözlenir (76,79). Serbest radikaller karbonhidratları önemli ölçüde etkiler. Monosakkaritlerin yükseltgenmesi sonucunda hidrojen peroksit, oksoaldehitler ve peroksitler oluşur. Bu oluşan yapılar çeşitli hastalıkların ortaya çıkmasındaki patolojik proseslerde önemli rol oynarlar (80).

2.3.1. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), non-enzimatik oksidatif lipit peroksidasyonu sonucunda meydana gelir. İki'den fazla çift bağa sahip olan yağ asitlerinin oksidasyonunda serbestleşen siklik endoperoksitler MDA'nın esas kaynağını meydana getirmektedir. MDA serbest radikali proteinlerin amino kutuplarına, fosfolipidlere veya nükleik asitler ile bağlantı kurarak toksik etkisine sebep olur (81).

Bazı dokularda MDA enzimatik reaksiyonlar sonucunda meydana gelebilir. Oluşan MDA, hücre zarında iyon transportuna tesir ederek hücre zarındaki bileşiklerin çapraz şekilde bağlanmasına sebep olur. Sonuçta iyon geçirgenliğinin azalmasına ve enzim aktivitesinin değişmesine neden olur (82).

2.4. Antioksidanlar

Organizmanın meydana getirdiği serbest radikallerin toksik etkilerini engellemek için vücutta çeşitli antioksidan savunma yöntemlerini geliştirilmiştir. Serbest radikaller ile antioksidanlar arasındaki denge korunmadığında hücre hasarı ve ölümü ile sonuçlanan çok fazla patolojik bir tablo meydana gelmektedir (83).

Organizma içerisinde antioksidan kapasite ile serbest radikal üretim ölçüsü değerleri eşleşmektedir. Yüksek oksijen kullanım oranına sahip olan, karaciğer, beyin, böbrek gibi organlar yüksek miktarda antioksidan enzim aktivitesine sahiptir (84).

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri hücre zarı yapısında mevcut olan lipitleri peroksidasyon olayına karşıt savunmaları olmuştur. Koruyuculuğu sonucunda, antioksidanlar lipit peroksidasyonunu bloke eden moleküler yapılar olarak açıklanmıştır. Bugünlerde antioksidanlara ait bilgiler, lipitlerin yanı sıra protein, nükleik asit ve karbonhidrat gibi başka hedef molekülleri savunma etkilerini de içinde bulunduracak biçimde artırılmıştır. Böylelikle, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksijen hasarını önleyen veya bu etkinin ertelenmesini sağlayan maddeler olarak tanımlanmakta ve antioksidanların tesirleri değişik biçimlerde gözlemlenmektedir (84).

Antioksidanlar etkilerini 4 yol ile göstermektedir.

1)Reaktif oksijen çeşitlerinin enzim tabanlı tepkimeler vasıtasıyla veya direkt olarak temizlenmesi,

2)Reaktif oksijen çeşitlerinin meydana gelmesinin supresyon yolu ile önlenmesi,

3)Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum tepkimelerinin önlenmesi (141),

4)Hedef moleküllerin hasar aldıktan sonra onarımı veya temizlenmesidir (84,141).

2.4.1. Glutasyon (GSH)

Glutasyon , glutamin, sistein ve glisin amino asitlerinden oluşan suda çözünebilir bir tripeptiddir. Tiyol grubu, güçlü bir indirgeyici ajandır ve GSH'yi bol miktarda bulunan hücre içi küçük molekül tiyolü oluşturarak, bazı dokularda millimolar konsantrasyona ulaştırır. Önemli bir antioksidan olarak GSH, glutasyon S-transferazlar (GST) ve GPx ile katalizör yoluyla çeşitli elektrofilik bileşiklerin ve peroksidin detoksifikasyonunda rol oynar. GSH'nin önemi, bitkilerde, memelilerde, mantarlarda ve bazı prokaryotik organizmalarda yaygın kullanımla belirlenmiştir. Detoksifikasyona ek olarak, GSH, glioksilaz sistemi, ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere indirgenmesi, protein ve gen ekspresyonunun tiyol disülfid değişim reaksiyonları yoluyla düzenlenmesi dahil olmak üzere diğer hücresel reaksiyonlarda da rol oynar (85).

Tripeptit, okside GSH disülfid veya azaltılmış durumda hücre içi olarak bulunabilir. Hücredeki optimal GSH: GSH disülfid oranlarının korunması, hayatta kalma açısından kritik öneme sahiptir, dolayısıyla sistemin sıkı bir şekilde düzenlenmesi zorunludur. GSH eksikliği, hücreyi oksidatif hasar riski altına sokar. GSH'nin dengesizliğinin kanser, nörodejeneratif bozukluklar, kistik fibroz (KF), HIV ve yaşlanma gibi geniş bir patolojide gözlenmesi şaşırtıcı değildir (85,86).

2.4.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon Peroksidaz; 4 selenyum atomu bulunduran, sitozolde yerleşik, tetramer yapısında olan bir enzimdir. Hidrojen peroksit ve organik yapıdaki hidroperoksitler ile reaksiyona başlayarak hücreleri oksidatif hasar almasına karşıt savunur. Ayrıca, protein yapı formundaki sülfhidril gruplarını indirgenmiş durumda sabitleyerek birden fazla protein ve enzim inaktive olmasını önler, aminoasitlerin hücre zarından transportunu sağlar, hemoglobinin methemoglobine dönüşmesini engeller (83,87).

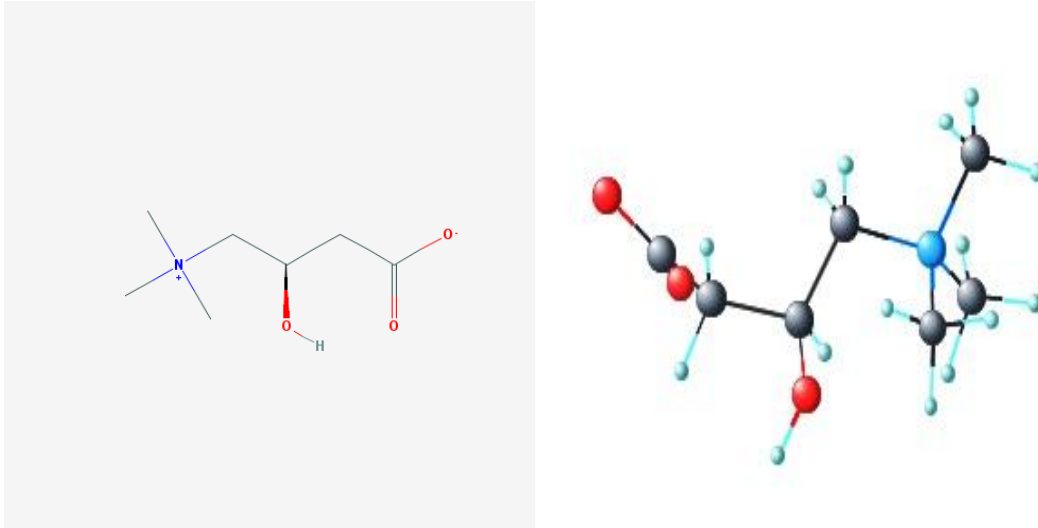
GPx, zar yapısında olan fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere indirgeyerek bilhassa E vitamininin yeterli olmadığı durumlarda peroksidasyona karşıt savunmaya katkı sağlar. Ayrıca proteinlerin yıkımında ve sentez aşamasında, enzimlerin düzenlenmesinde, DNA'nın oluşumunda ve en önemlisi de serbest radikallere karşıt hücrenin savunulmasında önemli bir göreve sahiptir (83).

2.5. L-karnitin

L-Karnitin canlı organizmaların içerisinde farklı dokularda fizyolojik olarak sentezi yapılan ve sitoplazmadan mitokondri matriksine taşınacak uzun zincire sahip yağ asitlerinin iç mitokondrial zarından transportunda görev sahibi amino asitlere benzer bir maddedir (139). İlk kez 1905'te Rus bilim adamı Krimberg tarafından sığır kasından izole edilmiş olup, yapısı tam olarak 1927'de açıklanmıştır. Bu keşfedildikten sonra, latince et manasına gelen "carnis" adı tanımlanmıştır (22,88,89).

2.5.1. L-karnitinin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Karnitin, "Gama-Trimetil amino beta hidroksi bütirik asit" yapısına sahiptir ve $(CH_3)_3N-CH_2CH(OH)CH_2-COOH$ kimyasal formülünde olup, suda çözünürlüğü iyi olan 161 Dalton moleküler ağırlığı bulunan bir bileşiktir (139). Katı, beyaz, kristal yapıda olup nem çeken özelliği bulunur ve toz halde bulunur. Erime noktası $197\text{ }^{\circ}\text{C}$, su da çözünürlüğü 2500mg/ml, pKa'sı 3.8 dir. Su da ve sıcak alkolde kolayca çözünürken aseton eter ve benzende çözünmez. Bir tane asimetrik şeklindeki karbon atomuna sahip olması sebebiyle D ve L formları mevcuttur. Dokularda yalnızca L formu sentezlenir ve yalnızca bu formun metabolik aktivitesi mevcuttur. D formunun L formu kadar vücutta metabolik bir aktiviteye sahip olmamasıyla birlikte yüksek dozlarda kullanıldığı takdirde toksik tesirinin görüldüğü bildirilmiştir (22,90,91,139).



Şekil 7: L-karnitinin moleküler yapısı (115)

2.5.2. L-karnitinin Biyosentezi

Önemli rolleri yağ metabolizması ve enerji üretimini kapsayan karnitin, endojen sentez ve besinler aracılığıyla organizma içerisine alınır. Beş basamakta olaylanan biyosentez

aşaması, lizin aminoasitinin metilasyonu süreciyle başlamış olur, deoksikarnitin hidroksilaz katalizörlüğü eşliğinde deoksikarnitin karnitine transforme olmasıyla da sona erer. Enzimatik aktivite yönünden karaciğerde, insanlarda ise karaciğere ek olarak böbreklerde son basamak reaksiyonu aktif halde olup karnitin sentezinin yapıldığı esnada, kas ve kalp dokusularında bahsi geçen enzim aktivitesinden yoksun olduğu için karnitin sentezi gerçekleştirilemez (92,139).

Biyosentezin gerçekleşmesi için; 4-bütiro-betain hidroksilaz enziminin yanında, primer olarak lizin ve metiyonin, kofaktör işlevi için ise vitamin B3, B6, C, folik asit ve Fe^{++} gereklidir (93,94,95). Sentez prosesinde metil grubu metiyoninden sağlanırken, karbon zincirleri ve azot grupları da lizin amino asitinden sağlanmaktadır(139).

2.5.3. L-karnitinin Metabolik Etkisi

Oral yoldan vücut içerisine alınan karnitin ince barsaklardan aktif taşıma yoluyla veya pasif difüzyon aracılığıyla yaklaşık olarak %80 oranında absorbe edilerek asetile edilir. İnsanlarda ki karnitin oranının %75 kadarı besin kaynaklı, %25 oranı ise endojen kaynaklıdır. Kanda mevcut olan karnitin %80'lik oranı serbest biçimde, %20'lik oranı ise ester(asil karnitin) biçiminde bulunur (96,139). Bu metabolik organizasyon ile uyumlu olarak dokudaki karnitin seviyelerinin kandaki seviyesinden yaklaşık 100-500 kat daha çok olduğu belirlenmiştir (97,98). Besinler aracılığıyla organizma içerisine alınan ve endojen olarak sentezlenen toplam karnitin miktarı primer filtrata geçerek %95 oranından çoğu geri emilir (139). Bu reabsorbsiyon mekanizmasının işleyişinde bir bozukluk gözlenmediği halde karnitin yetersizliği canlıların normal beslenme koşullarında görülmez. Başka bir şekilde ifade edilirse tübüllerde şekillenen reabsorbsiyon olayı, besinler aracılığıyla alınan karnitin miktarına, organizmada belirlenen karnitin ihtiyacına bir de plazmada ki karnitin seviyelerine göre düzenlenmesi sağlanır. Organizmanın sahip olduğu karnitin miktarının %98 kadarı kalp ve iskelet kasında muhafaza edilir. Bunun sebebi bu dokuların karnitin bağımlı olmasıdır. Kalan %2 oranı ise beyin, karaciğer ve ren gibi organları kapsar. Plazma ve eritrositlerde bulunan kısım %1 oranının altındadır (%0,6) (99).

LK'nın kas dokusundan plazmaya transportu epey yavaş bir şekilde gerçekleşmesine karşın, karaciğerden kana transportu daha kolay gerçekleşir. Bu nedenlerden ötürü plazma karnitin seviyeleri doku seviyelerini yansıtmaktan uzaktır (100).

2.5.4. L-karnitinin Antioksidan Mekanizması ve Ürüne Sistemi Üzerine Etkisi

Organizmada yer alan LK, alfa-tokoferol ve askorbik asit güçlü antioksidan benzeri özellikteki bileşiklerdir ve ayrıca lipid peroksidasyonunun bariz bir biçimde inhibe edilmesini sağlamaktadırlar. Potansiyel olarak antioksidan benzeri özelliklerinden ötürü bu yapıların oksidatif stresten kaynaklanan kronik hastalıkların engellenmesinde yararlı etkileri olduğu bilinmektedir (101,143). Karnitin'in, kalp kası üzerinde lipit esterlerinin birikimini ve lipit peroksidasyon ürünü olan MDA yapımını engelleyerek ATP sentezinde artış sağladığı öngörülmektedir (102). Bu özelliğinden farklı olarak ROT sentezlenmesini hızlandıran Fe^{++} ile kompleksler meydana getirerek lipit peroksidasyonun azalmasını sağlamaktadır (103,143). Ayrıca LK mevcut olan antioksidan kapasitenin artışını sağlayarak dokularda bozulma meydana gelmesini belirli seviyelerde azaltabilir.

Genç yaştaki sıçanlara kıyasla yaşlı sıçanlardaki lipid peroksidasyon düzeyinin artması ve antioksidan tesiri olan SOD, GSH ve KAT, C ve E vitamin seviyelerinin azalması ve karnitin takviyesi bu eksiklerde meydana gelen artış tesiri bu görüşü destekler niteliktedir (104,105,143). Arockia Rani ve Panneerselvam , yapmış oldukları çalışmalarında karnitin takviyelerinin askorbik asit seviyesinde bir artış sağladığını bulmuşlardır ve bunun muhtemel iki yoldan gerçekleşebileceğini belirtmişlerdir;

1.Askorbik asit karnitin sentezinde önemli bir kofaktör olduğu için karnitin takviyesi organizmada askorbik asitin daha az miktarda harcanmasına olanak sağlar ve kandaki seviyesi Rebouche ve Engel tarafından da vurgulandığı gibi yüksek seviyelerde kalır (143).

2.Karnitin aynı anda bir şelatör olarak fonksiyon görür (106,107) ve lipid peroksidasyonuna sebep olabilecek Fe^{++} 'i bağlayarak seviyesini düşürür; böylelikle antioksidan olarak gerekli askorbik asit düzeyi azalmış olur. Arockia Rani ve Panneerselvam, yaptıkları çalışmada yaşlı beyin dokusunda mevcut antioksidan kapasiteyi karnitin takviyelerinin artırdığını gözlemlemişlerdir. Bahsedilen bu antioksidanlar Selenyum, GSH ve vitamin E olup, aktivitelerinin artışı ile hücre membranları için lipid peroksidasyonu riski azalmış olur. Başka bir ifadeyle de LK aynı anda bir antioksidandır ve lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan toksik tesir gösteren son ürünlerini yok eder (108). Açıl karnitin, sperm enerji metabolizmasında ve sperm motilitesinde önemli rolü olan başlıca kaynaktır (109,143). Sperm hareketliliği düzgün olmayan hastalarda açıl-l-karnitin/LK oranında düşüş saptanmıştır (110). Matalliotakis ve ark tarafından karnitinin yoğun olarak epididimis bölgesinde saptandığı, sperm metabolizmasında karnitinin açıl karnitine transforme olmasının önemli bir yer tuttuğu ayrıca açıl karnitin normal olan spermatozoada karnitinden oldukça

fazla seviyelerde mevcut olduğu saptanmıştır (143). İnfertil olan erkek bireylerde LK tedavisi sonrasında sperm konsantrasyonu ve hareketliliğinde, sperm miktarında artış olduğu gözlenmiştir (111,112,140).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmamız prospektif deneysel bir çalışmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Tez araştırmasına literatür tarama ile Eylül 2015'te başlanmış olup; 30.11.2016 tarihinde etik kurul onayı alındıktan sonra iBG-izmir Deney Hayvanları Biriminde deneyler yapılarak veriler toplanmıştır. Çalışmamızın deney hayvanı modeli ve ilaç uygulaması Dokuz Eylül Üniversitesi iBG-izmir Deney Hayvanları Biriminde, histolojik ve immünohistolojik çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, elektron mikroskopik çalışmalar Dokuz Eylül Üniversitesi iBG-izmir Elektron Mikroskopik Görüntüleme biriminde ve enzim çalışmaları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Dalı'nda gerçekleştirilecektir. Araştırma Temmuz 2018'de tez savunma sınavı ile sonlanmıştır.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada toplam 6 grup oluşturulmuştur. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir.

Deney gruplarında tüm fareler rastgele seçilerek n=7 olmak üzere 6 çalışma grubuna ayrılmıştır.

Tablo 1: Deney grupları ve grup başına kullanılan denek sayısı.

1. Grup SF	SF 1 Grubu 0.5ml SF	n = 7
2. Grup SF	SF 2 Grubu 0.5ml+62.5-75µl SF	n = 7
3. Grup APAP	APAP 1 Grubu 400mg/kg	n = 7
4. Grup APAP	APAP 2 Grubu 400mg/kg	n = 7
5. Grup APAP+LK	Tedavi Grubu (400mg/kg+500mg/kg)	n = 7
6. Grup APAP+LK	Koruyucu Etki Grubu (400mg/kg+500mg/kg)	n = 7

1.GRUP: SF GRUBU(n=7): Bu gruptaki deneklere LK'nın ve APAP'ın çözücüsü olan SF intraperitoneal (i.p.) yolla verilmiş olup denekler 10. günde ketamin/ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilip testisleri alınmıştır.

2.GRUP: SF Grubu (n=7): Bu gruptaki deneklere LK'nın ve APAP'ın çözücüsü olan SF, 10. günden sonra 5 gün daha i.p. yolla verilmiş ve denekler 15.günde ketamin/ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilip testisleri alınmıştır.

3.GRUP: APAP Grubu (n=7): Bu gruptaki deneklere testis hasarı oluşturmak için literatürlerce desteklenmiş olan APAP'ın toksik değeri kadar (400mg/kg) deney hayvanları etik kurul ilkelerine uygun olarak 0.5-0.6 ml i.p ilk 5 gün boyunca verilmiş ve denekler 10. günde ketamin/ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilip testisleri alınmıştır.

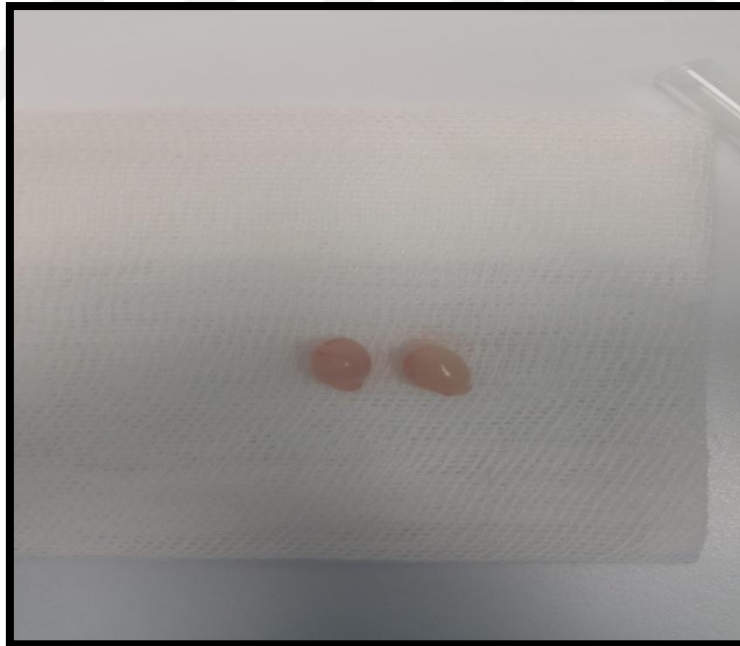
4.GRUP: APAP Grubu (n=7): Bu gruptaki deneklere testis hasarı oluşturmak için literatürlerce desteklenmiş olan APAP'ın toksik değeri kadar (400mg/kg) deney hayvanları etik kurul ilkelerine uygun olarak 0.5-0.6 ml i.p ilk 5 gün boyunca verilmiştir. Devamında deneklere 10. günden sonra 5 gün daha SF i.p. yolla verilmiş ve denekler 15.günde ketamin/ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilip testisleri alınmıştır.

5.GRUP: Tedavi Grubu (n=7): Bu gruptaki deneklere ilk 5 gün boyunca APAP (400mg/kg) i.p olarak verilmiştir. Devamında 10. günden sonra 5 gün boyunca LK (500mg/kg) 62.5-75 mikrolitre i.p yoldan tek doz olarak verilmiş ve denekler 15.günde ketamin/ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilip testisler alınmıştır (113).

6.GRUP: Koruyucu Etki Grubu (n=7): Bu gruptaki deneklere ilk 5 gün boyunca APAP (400mg/kg) i.p olarak verilmeden 5 gün önce LK (500mg/kg) 62.5-75 mikrolitre günde 1 kez i.p yoldan tek doz olarak verilmiş ve denekler 10. günde ketamin/ksilazin anestezisi altında sakrifiye edilip testisler alınmıştır (9,114).

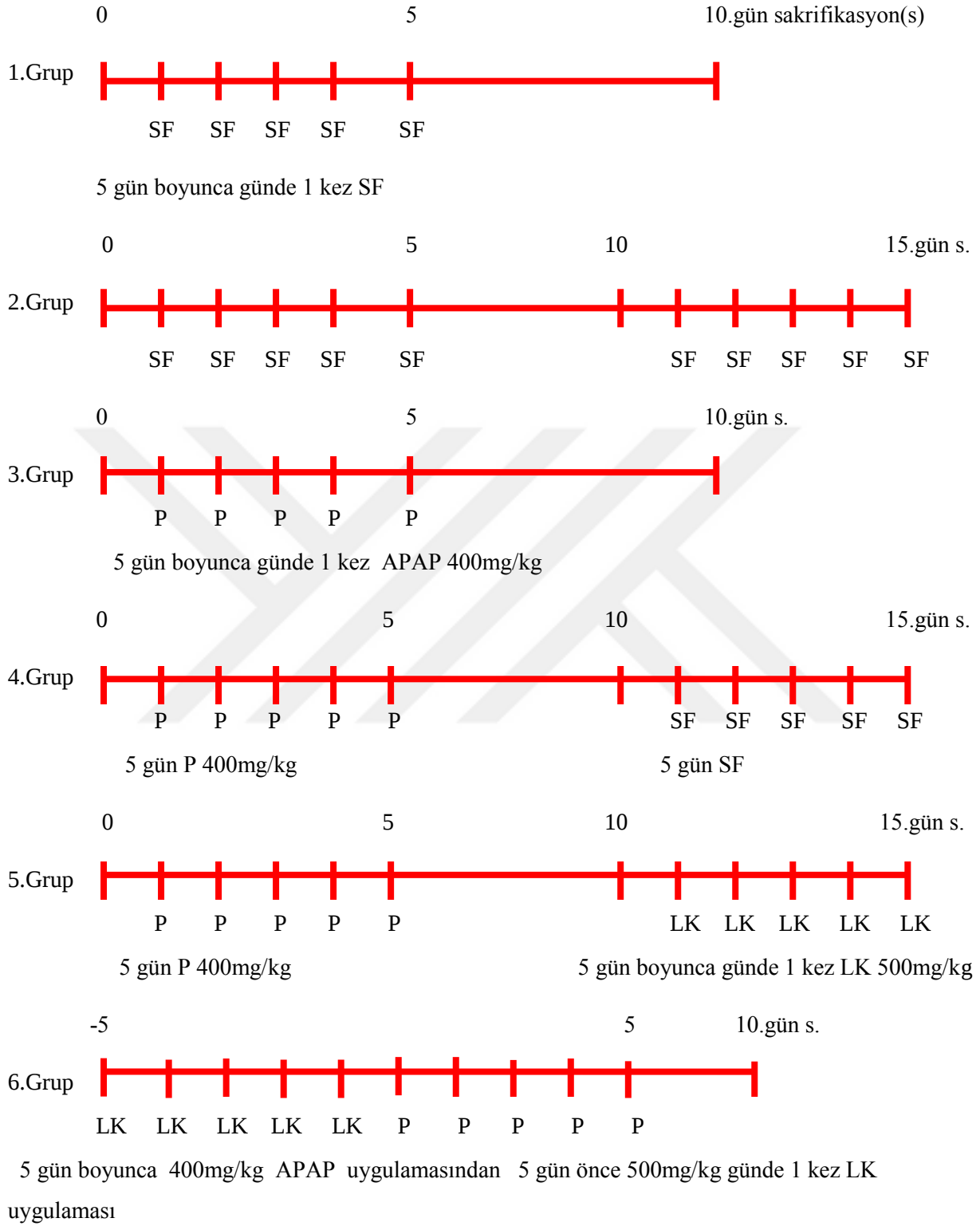


Şekil 8: Deney sonunda testislerin elde edilmesi



Şekil 9: Elde edilen testisler

Tablo 2: Deney grupları dizaynı



3.4. Çalışma Materyali

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi iBG-Deney Hayvanları Biriminden elde edilen, C57BL6 (BLACK6) suşu toplam 54 erkek fare kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi iBG Deney Hayvanları Biriminde, C57BL6 suşunun mevcut bulunması ve literatür taraması ile uyumlu oluşu sebebiyle bu fare türü seçilmiştir. Tüm denekler deney sona erinceye kadar iBG Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırılmıştır. Denekler bekletilmiş çeşme suyu ve pellet yem verilerek ad libitum şekilde beslenmiştir. Çeşitli sebepler ile deneyi devam ettiremeyecek halde olan veya deneyler tamamlanmadan yaşamı sonlanan denekler deney ve istatistik parametreler dahilinden çıkarılmıştır.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Birinci ve ikinci grubumuza sadece serum fizyolojik verilmiştir ve araştırmamızda elde ettiğimiz testis dokuları kontrol grubumuz için kullanmıştır. Diğer gruplarımıza verdiğimiz APAP ve LK bağımsız değişkenlerimiz olup bu gruplardan aldığımız testisler bağımlı değişkenlerimiz olmuştur.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada deneklerin ağırlıklarını ölçmek için terazi, deneklerden alınan testislerin ölçümü için hassas terazi, deneklerden elde edilen dokuların takibi için TissueTek marka otomatik doku takibi cihazı, deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom, hematoksilin-eosin boyamaları için Leica Stainer XL marka otomatik boyama cihazı, boyama aşamalarında distile su ihtiyacı için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemelerde kullanmak üzere humiditychamber ve mikropipetler, enzim incelemeleri için soğutmalı santrifüj cihazı, vorteks cihazı, inkübatör, homojenizatör ve buzluk, elektron mikroskopik incelemeler için Carl Zeiss Sigma 500 STEM GERMANY kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılacak Yöntemler

Sakrifikasyondan sonra alınan örnekler rutin doku takibi prosedürü uygulanmış, kesitleri alınmış, histokimyasal (Hematoksilin-eosin, Masson Trikrom, PAS boyamaları), immünohistokimyasal (TUNEL ve Aktive Kaspaz-3 immün boyamaları) boya işlemleri yapılmıştır. Enzim analizleri için homojenizasyon, enzim aktivitesi ve MDA düzeylerinin

saptanması işlemleri yapılmıştır. Elektron mikroskopik görüntüleme için elektron mikroskopik doku takibi yapılmış , TEM ve SEM incelenmiştir.

3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deneklerin ağırlıkları deney başlangıcında ve sakrifikasyon öncesinde tartılmıştır. Alınan testisler ise deney sonunda tartılmıştır. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans testi, deney grupların karşılaştırmasında da Mann Whitney U analizi kullanılmıştır. $P<0,05$ olan değerler istatistiksel anlamlı bulunmuştur.

3.6.2.2. Rutin Işık Mikroskopik Doku Takibi Protokolü

Bouin's fiksativ ile fiksasyonu gerçekleştirilen dokular, fiksativ uzaklaştırmak için oda sıcaklığında 2 gün boyunca günde 3 defa olmak üzere %70'lik etil alkol serilerinden geçirildi. Rutin doku takibinde 2.günden sonraki işlemler 60°C ki etüvün içerisinde gerçekleştirilmiştir ve dehidratasyonun sağlanması için her biri 20 dk olmak üzere artan etil alkol serilerinden geçirildi. Takiben yirmişer dk 4 sefer artan aseton serilerinden geçirilip 2 sefer 15 dk olmak üzere ksilolde içerisinde bekletildi ve 60°C ki etüvün içerisinde 1 saatlik iki değişim sıcak parafinde bekletilip takiben parafin ile immersiyonu sağlandı. Takiben dokular metal kasetler içerisine sıcak parafin ile gömüldü. Mikrotom cihazıyla parafin bloklardan 3.5µm'lik kesitler polilizin kaplı lamlara alındı. Elde edilen kesitlerden rutin ışık mikroskopik incelemeler için histokimyasal boyamaları yapıldı.

Tablo 3: Doku takibi protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Fiksasyon	Bouin's fiksativ	24 saat
Fiksativten Uzaklaştırma	%70 alkol serileri 1-2-3-4-5-6	2 gece
Dehidratasyon	%70 – 80 – 96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 1 – 2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin1 – 2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.2.3. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Kesitler alındıktan sonra parafinden arındırma prosesi için gece boyunca 60°C etüvün içerisinde bekletildi. Takiben ilk değişimi etüvün içerisinde diğer iki değişim oda sıcaklığında üç kez 20 dk boyunca ksilol içerisinde bekletildi. Takiben dehidratasyon için beş farklı azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su içerisine daldırılıp çıkarıldıktan yaklaşık 7 dakika boyunca Bio-Optica marka hematoksilen karışımı içerisinde bekletilerek nukleuslar boyandı. Boya işlemlerinin ardından, dokuda tutunan fazla boyayı uzaklaştırmak için kesitler 7 dakika boyunca akarsu altında bekletildi, Bio-Optica marka eosin boyası ile 2 buçuk dakika boyunca boyanarak sitoplazma boyaması gerçekleştirildi. Boyamayı takiben kesitler artan etil alkol serilerinden geçirildi. Örneklerin şeffaflaştırılması için 20 dakikalık üç ksilol değişimine tabi tutuldu. Merck Millipore marka entellan ile kesitlerin üstü lamel kaplandı (145).

Tablo 4: Hematoksilen ve eosin boya protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Mayer's Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akar su	10 Dakika
Boyama	Eozin	2 Dakika
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama

Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.4. Masson-Trikrom boya protokolü

Kesitler alındıktan sonra parafinden arındırma prosesi için gece boyunca 60°C etüvün içerisinde bekletildi. Takiben ilk değişimi etüvün içerisinde diğer iki değişim oda sıcaklığında üç kez 20 dk boyunca ksilol içerisinde bekletildi. Takiben dehidratasyon için beş farklı azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su içerisine alınıp preparatlar humidity chambera yerleştirildikten sonra beş damla A-Weigert demirli hematoksilin ve beş damla B-Weigert demirli hematoksilin damlatılıp on dk bekletildi. Daha sonra distile su ile yıkama yapmadan preparatlara on damla C-Pikrik asit alkolik çözeltisi damlatılıp dört dk bekletildikten sonra distile suyla yıkandı. Preparatlara 10 damla D-Gelincik kıvılcı fuksini çözeltisi damlatılıp dört dk sonra dH₂O ile yıkandı. Preparatlara on damla E-Fosfomolibdik asit çözeltisi damlatılıp yıkama yapılmadan boya uzaklaştırıldı ve 5 dakika etüvde kurutuldu. Preparatlara 10 damla F-Masson anilin mavisi çözeltisi damlatılıp beş dk bekletildikten sonra dH₂O ile yıkandı. Preparatlar %70, %80, %96, %99, %99 olmak üzere artan alkol serilerinden geçirilip, 3 seri ksilolde 20'şer dakika şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (145).

Tablo 5: Masson trikrom boya protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika

Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent A + Reagent B	10 Dakika
Boyama	Reagent C	4 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent D	4 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	10 Dakika
Boyama	Reagent F	5 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.5. Periodic Acid Schiff (PAS) Boya Protokolü

Kesitler alındıktan sonra parafinden arındırma prosesi için gece boyunca 60°C etüvün içerisinde bekletildi. Takiben ilk değişimi etüvün içerisinde diğer iki değişim oda sıcaklığında üç kez 20 dk boyunca ksilol içerisinde bekletildi. Takiben dehidratasyon için beş farklı azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su içerisine alınıp preparatlar humiditychambere yerleştirildikten sonra PAS boyama kiti (04-130802 Bio-Optica, Milano, İtalya) içerisinde periyodik asit solüsyonundan 10 damla damlatıp 10 dakika bekletilerek oksidasyon işlemi sonucunda aldehit gruplarının oluşması sağlandı. Ardından kesitler distile suda çalkalanarak üzerlerine 10 damla schiff reagent damlatılarak 20 dakika bekletildi. Böylece schiff reagentin içerdiği sülfür fuksin, bazik fuksine benzer çözünmeyen işaretli bileşiklerdeki 2 komşu aldehit gurubunun değişmesini sağladı. Daha sonra kesitler distile suda yıkanarak üzerlerine potasyum metabisülfid solüsyonundan 10 damla damlatılarak 2 dakika bekletildi. Kesitler yıkanmadan üzerlerine 10 damla fiksatif solüsyonundan damlatılarak 2 dakika bekletildi. Kesitler distile suda iyice çalkalandıktan sonra Mayer's hematoksilen solüsyonundan 10 damla damlatılarak 3 dakika bekletildi. Böylece nükleusların boyanması sağlandı. Sonrasında 5 dakika akar suda yıkandı. Boyamayı takiben kesitler artan etil alkol serilerinden geçirildi. Örneklerin şeffaflaştırılması için 20 dakikalık üç ksilol değişimine tabi tutuldu. Merck marka entellan ile kesitlerin üstü lamel kaplandı (145).

Tablo 6: PAS boya protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
Deparafinizasyon	Ksilol 1 (Etüvde)	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 2	20 Dakika
Deparafinizasyon	Ksilol 3	20 Dakika
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama

Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent A	10 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent B	20 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent C	2 Dakika
Boyama	Reagent D	2 Dakika
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Reagent E	3 Dakika
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Dehidratasyon	%70'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%80'lik Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	%96'lık Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Dehidratasyon	Absolu Alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilol 1	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 2	20 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilol 3	20 Dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.6. Histolojik Değerlendirme

Deneklerden alınan sağ testis doku örnekleri Hematoksilen-Eozin, Masson Trikrom ve PAS boyası ile boyanmış ve kesitler Oxion Euromex markalı ışık mikroskopunda incelenmiştir. Elde edilen görüntüler, hemorajik ve ödematöz değişiklikler, germ hücre dejenerasyonu, germ hücre tabakasının düzensizliği ve kaybı, seminifer tübüllerin rüptürü, interstisyel Leydig hücrelerinin dejenerasyonu semikantitatif olarak değerlendirilmiştir

(144). PAS boyama ile bazal membran kalınlığı ölçülmüştür. Masson Trikrom boyaması ile bağ dokusu yapısı incelenmiştir.

3.6.2.6.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Johnsen skorlaması için her grupta rastgele 10 adet tübül değerlendirildi. Gruplar arasındaki istatistiksel parametreler One Way ANOVA testi ile analiz edildi. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi (141) (Tablo 7).

Tablo 7: Johnsen testiküler skorlaması.

SKOR	HİSTOLOJİK BULGULAR
10	Birçok spermatozoa bulunan tam bir spermatogenezis
9	Birçok spermatozoa var, germinal epitelyum bozuk ve lümen oblitere
8	Yalnız birkaç spermatozoa var (<5-10)
7	Spermatozoa yok, bir çok spermatid var
6	Spermatozoa yok, yalnızca bir kaç spermatid var (<5-10)
5	Spermatozoa/spermatid yok, çok sayıda spermatosit var
4	Yalnızca birkaç spermatosit var (<5), spermatid/spermatozoa yok
3	Germ hücresi olarak yalnız spermatogonia mevcut
2	Tübüller içerisinde germ hücresi yok, sertoli hücreleri mevcut
1	Tübüller içerisinde hücre yok

3.6.2.7. Morfometrik Değerlendirmeler

PAS boyama ile seminifer tübül epitel yüksekliği X20 büyütmede 10 adet tübül üzerinden ölçülmüştür. PAS boyama X100 büyütmede 20 adet tübül üzerinden bazal membran kalınlıkları karşılaştırılmıştır. Seminifer tübül çapı ise X10 büyütmede 10 adet tübül üzerinden ölçülmüştür. Masson Trikrom boyaması ile bağ dokusu kalınlığı ve yapısı incelenmiştir(146).

3.6.2.8. İmmünohistokimyasal İncelemeler

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi için, dokular rutin takip işlemlerinden geçirildikten sonra TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate DNA nick-end labelling) kiti ve Aktive-Caspase3 kiti immun boyamaları yapılacaktır.

Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırık oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA kırıklarının serbest uçlarına terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) aracılığıyla biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinnükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine (DAB), işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Hemotoksilen ile zemin boyama yapılarak işlem sonlandırılır (147). İmmunohistokimyasal yöntemlerle fragmente nukleuslar veya sitoplazma koyu kahverengi boyanır.

3.6.2.8.1. TUNEL Boya Protokolü

Apoptoza giden hücre çekirdeklerini DNA fragmentasyonu hesaplaması terminaldeoksinnükleotidil transferaz aracılı dUTP nick end-labeling (TUNEL) reaksiyonuyla parafin kesitlerde TUNEL kiti kullanılarak yapıldı.. Deparafinizasyon sonrası kesitler önce 37°C de 10 dakika Proteinaz K ile daha sonra 37°C 60 dak. TdT de 60 dakika bekletilecektir. Converter POD uygulandıktan sonra kesitler DAB (diaminobenzidine) ile boyanacak, Mayer Hematoksilen ile ardaalan boyaması yapılacak ve entellan ile kapatılacaktır. Apoptotik indeksi hesaplamak için 10 tübül 20x büyütmede sayıldı ve apoptotik morfoloji gösteren hücrelerrin ortalaması hesaplandı (148).

3.6.2.8.2. Aktive-Kaspaz 3 Boya Protokolü

İmmünohistokimyasal inceleme için deparafinizasyon sonrası kesitler 10 dk. 10 Mm sitrat buffer ile mikrodalgada ısıtıldı. Pappen ile çevreleri sınırlandırıldı ve takiben kesitlere, 5 dk %3 konsantrasyondaki H₂O₂ ile muamele edildi. PBS solüsyonu ile inkübe edildi ve ardından yıkama yapılmadan Anti-Kaspaz 3, 1:200 (AB3623, Millipore) antikoru ile +4°C de enkübe edildi (141). Takiben önce 30 dakika biyotinlenmiş sekonder antikor daha sonra da 30 dakika streptavidin uygulandı. Reaksiyon farkındalığı için DAB kullanıldı. Zemin boyaması Bio-Optica hematoksilen ile yapıldı. Suyu uzaklaştırma işlemi gerçekleştirilen kesitler ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapama işlemi yapıldı (141,149).

3.6.2.9. Enzim Aktiviteleri

Homojenizasyon işlemi için, tüm farelerin 1-2 dakika içinde soğuk zemin üzerinde testis dokuları disseke edildi. Dokular soğuk serum fizyolojik ile hemen yıkandı ve lipid peroksidasyon ürünü olan MDA, antioksidan GSH ve antioksidan enzim GPx ölçümü için homojenize edildi. Doku örnekleri ultrasonik homojenizatörde (Bandelin Sonopuls, Germany) soğuk PBS içinde homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri buzla soğutulmuş ortamda yapıldı. Homojenatlar +4°C'de 600 g'de 10 dk santrifüj edilerek MDA ölçümü için ependorf

tüpüne ayrıldı, geri kalan homojenat +4°C’de 10000 g’de 20 dk süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonucu elde edilen süpernatant enzim ve protein ölçümleri için ayrılarak -80 °C’de saklandı, 30 gün içinde ölçümler yapıldı (141).

Enzim aktiviteleri ve MDA düzeylerinin hesaplanması için, MDA değerleri Bioxytech MDA-586 (Oxis International, USA) ticari kiti ile spektrofotometrik yöntemle ölçüldü. Sonuçlar μM olarak ifade edildi. Kitin çalışma yöntemi kromojenik bir reaktif ile MDA’nın 45°C’de reaksiyona girmesi temeline dayanır. 586 nm’de absorbans ölçülerek standart eğrisinden MDA değerleri belirlenir (141).

GSH ve GPx enzim aktiviteleri Oxis Research kitleri kullanılarak spektrofotometre (T80, PG instruments, UK) ile ölçüldü. Enzim aktiviteleri hazırlanan süpernatantlardan ölçüldü, GSH sonuçları μM , GPx sonuçları ünite/mg protein (U/mg pr) $\pm$ Standart Hata (SH) olarak gösterildi (141).

GSH seviyeleri Bioxytech GSH-420 (Oxis International, USA) kiti ile ölçüldü. Kitin çalışma yöntemi chromophoric thione oluşumu temeline dayanır. Tamponla karıştırılan süpernatanta indirgeyici ajan eklenerek oksidize glutatyon indirgenmiş forma dönüştürülür. Daha sonra kromojen eklenip pH artırılarak chromophoric thione oluşturulur. 420 nm’de absorbans ölçülerek GSH konsantrasyonu belirlenir (141).

GPx aktivitesi Bioxytech GPx-340 (Oxis International, USA) kiti ile saptandı. Bu kit Paglia ve Valentine’ın tanımladığı yöntemle göre hazırlandı. GPx, kümen hidroperoksit ile glutatyonun (GSH) oksidasyonunu katalizler. Glutatyon redüktaz (GR) ve NADPH varlığında, okside glutatyon (GSSG) indirgenmiş formuna (GSH) çevrilir, bu sırada NADPH okside olarak NADP’ ye dönüşür. Spektrofotometrede 340 nm’de absorbansdaki azalma ölçülür (141).

3.2.6.10. Elektron Mikroskopik Doku Takibi

Transmisyon elektron mikroskobu takibinde primer fiksasyon için %2.5 Gluteraldehit+%2.5 PFA ve %2.5 Gluteraldehit+%4 PFA (pH 7,4) konulan dokular + 4°C’de 48 saat bekletildi. Örnekler daha sonra 0,1M sodiumphosphate buffer ve 0,1M sucrose karışımında 3 kez 15 dk bekletildi. %2 sodiumphosphate buffered osmium tetroxide (pH 7,4) solüsyonu ile 90 dk postfiksasyon için muamele edildi. 0,1M sodiumphosphate buffer (pH 7,4) ile 3 kez 15 dk yıkandı. %50 oranında hazırlanmış aseton ile 2 kez 15 dk dehidratasyonu yapıldı. Dokular %70 aseton, %0,5 uranylasetate ve %1 phosphotungstic acid karışımında kontrastlama amacıyla + 4°C’ de 1 gece bekletildi. Daha sonra sırasıyla %80,90 ve 96’lık

aseton ile 2 kez 15 dk muamele edilen dokular %100'lük asetonda 2 kez 20 dk tutuldu. Propilen oksitte 2 kez 15 dk bekletilen dokular sırasıyla 30 dk 2:1, 1:1 ve 1:2 oranında hazırlanan propilen oksit: epon karışımlarında bekletildi. Epon solüsyonunda + 4°C'de 1 gece bekletildi. 3.gün hazırlanan yeni epon solüsyonunda 48 saat 65°C' lik etüvde polimerizasyon için bekletildi (141).

Daha sonra yarı ince kesitler alınarak alan belirlendi. Belirlenen alanlardan ince kesitler formvar kaplı gridler üzerine alındı. Uranil asetat ve kurşun sitratla kontrastlaması yapıldı ve transmisyon elektron mikroskopunda (Zeiss Sigma 500 STEM GERMANY) değerlendirildi (141).

Taramalı elektron mikroskobu takibinde alınan doku 3 kez PBS ile yıkandı. Primer fiksasyon için %2 Gluteraldehit kullanıldı. Daha sonra 15 dk x 2 kez %7'lik süktroz ile yıkandı. 30 dk Osmium ile muamele edildi. 5dk x 2 kez distile suda yıkandı. Artan alkol serilerinden geçirilip HDMS ile 5 dakika muamele edildi ve kurumaya bırakıldı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Tez Konusunun Belirlenmesi ve Literatür Araştırması



3.8. Verilerin Değerlendirmesi

Enzim değerlendirmelerinde tüm veriler ortalama $\pm$ SH olarak gösterildi. Grupların ortalamaları arasındaki farklar SPSS programında one-way ANOVA post hoc Bonferroni testi kullanılarak değerlendirildi. $p<0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı (141). Histolojik değerlendirmede tüm veriler SPSS 15,0 istatistik programına yüklendi. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi. Gruplar arasındaki farklar Kruskal Wallis ve Mann Whitney U testi ile değerlendirildi , $p<0.05$ anlamlılık düzeyi esas alındı (150).

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Deneklere metabolizmaya etki eden ilaçlar verileceğinden deneklerde mortalite görülebilir. Bu da deney süresinin uzamasına neden olabilir.

3.10.Etik Kurul Onayı

Çalışmamız “İBG-HADYЕК”nun 30 Kasım 2016 15/2016 Protokol Numaralı iznine sahiptir.

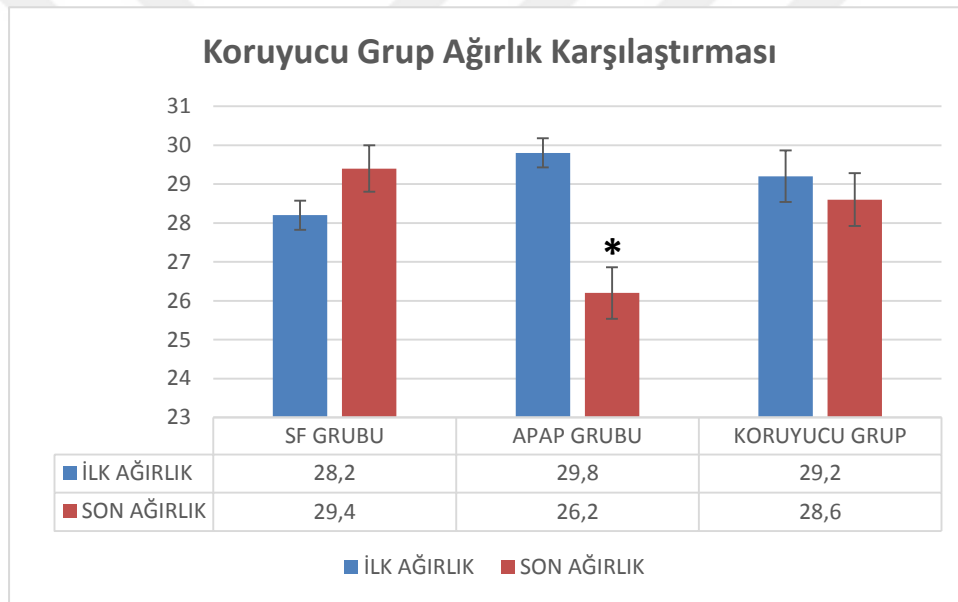
Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4.BULGULAR

4.1. DENEK AĞIRLIKLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Grupların deney başlangıç ağırlık ortalamaları; SF1 grubunda $28,20 \pm 0,374$ gr, APAP1 grubunda $29,80 \pm 0,374$ gr, Koruyucu etki grubunda $29,20 \pm 0,663$ gr olarak bulundu. Grupların deney bitiş ağırlık ortalamaları ise; SF1 grubunda $29,40 \pm 0,600$ gr, APAP1 grubunda $26,20 \pm 0,663$ gr, Koruyucu etki grubunda $28,60 \pm 0,678$ gr olarak bulundu.

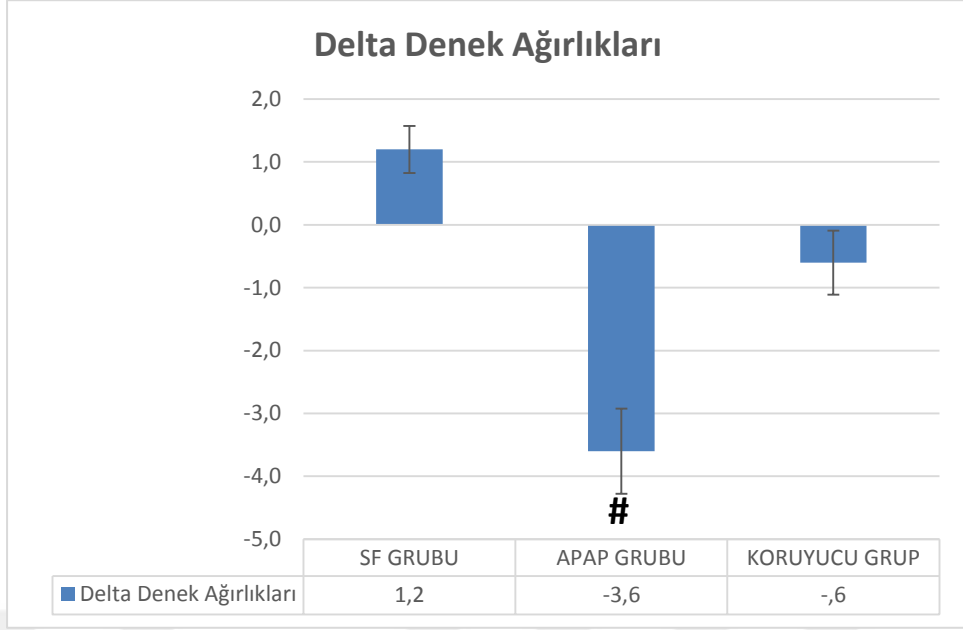
Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; SF1 grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi ($p=0,063$). APAP1 grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendi ($p=0,041$). Koruyucu etki grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi ($p=0,257$). (Wilcoxon Sıralı İşaretler Testi) (Şekil 10)



Şekil 10: Koruyucu Grup Ağırlıkları Karşılaştırması

* Başlangıç ağırlığına göre anlamlı artış gösteren grup ($p<0,05$)

Grup içinde deneklerin kilo artışını değerlendirmek için (son ağırlık ve ilk ağırlık arasındaki farkı) 'Δ' delta ağırlık değerleri olarak hesaplandı (Şekil 11).



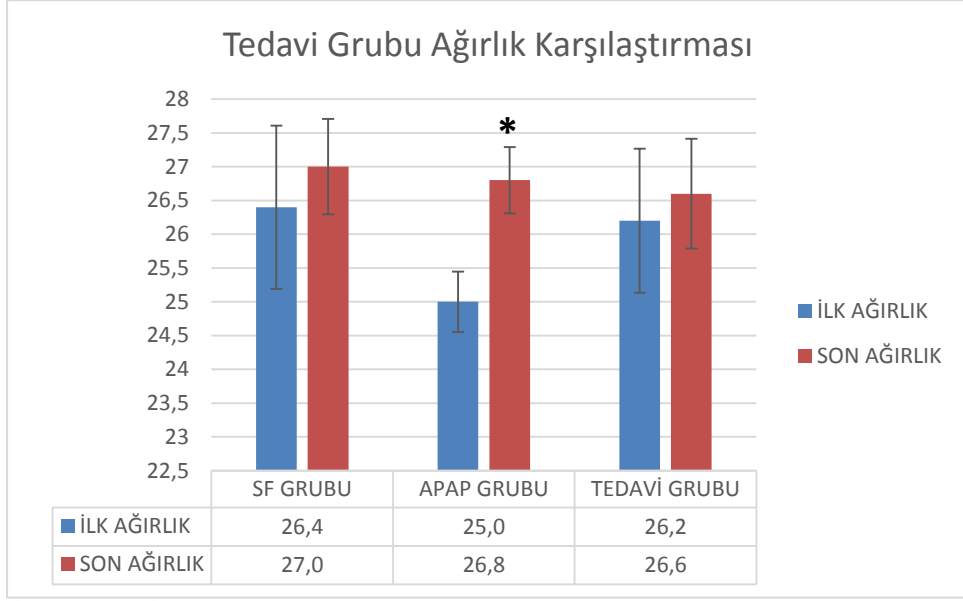
Şekil 11: Delta Denek Ağırlıkları

*; SF1 grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup($p<0,05$)

#; APAP1 grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

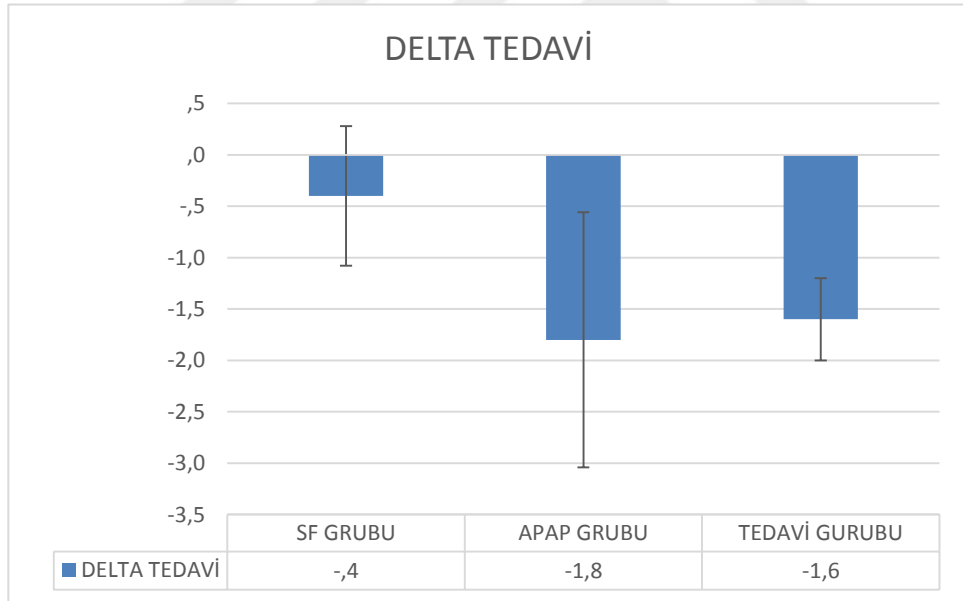
Grupların deney başlangıç ağırlık ortalamaları; SF2 grubunda $26,40 \pm 1,208$ gr, APAP2 grubunda $25,00 \pm 0,447$ gr, Tedavi grubunda $26,20 \pm 1,068$ gr olarak bulundu. Grupların deney bitiş ağırlık ortalamaları ise; SF2 grubunda $27,00 \pm 0,707$ gr, APAP2 grubunda $26,80 \pm 0,490$ gr, Tedavi grubunda $26,60 \pm 0,812$ gr olarak bulundu.

Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; SF2 grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi ($p=0,317$). APAP2 grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0,039$). Koruyucu etki grubunda başlangıç ve son ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmedi ($p=0,317$). (Wilcoxon Sıralı İşaretler Testi) (Şekil 12)

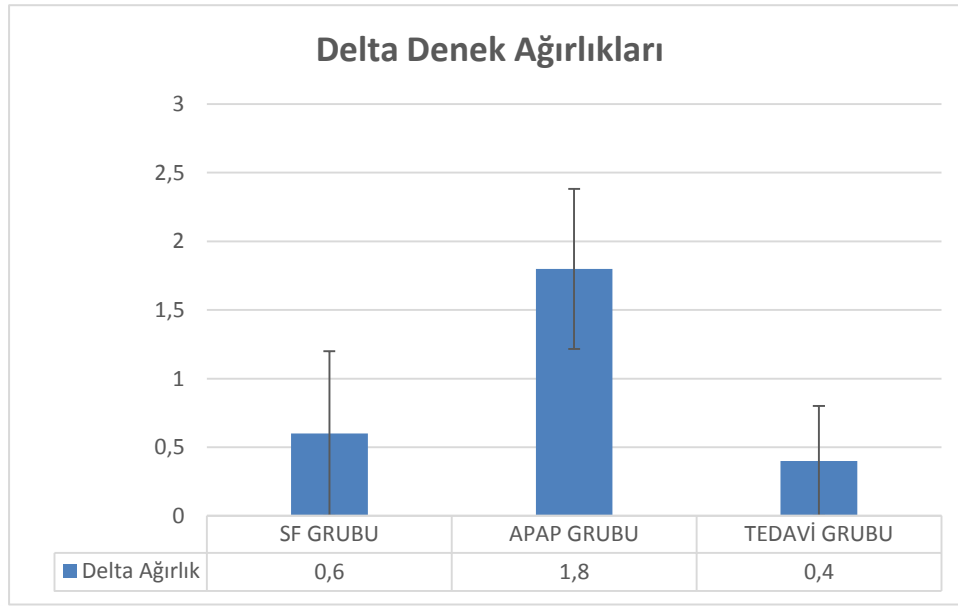


Şekil 12: Tedavi Grubu Ağırlık Karşılaştırması

Grup içinde deneklerin kilo artışını değerlendirmek için (son ağırlık ve ilk ağırlık arasındaki farkı) ‘ Δ ’ delta ağırlık değerleri olarak hesaplandı.



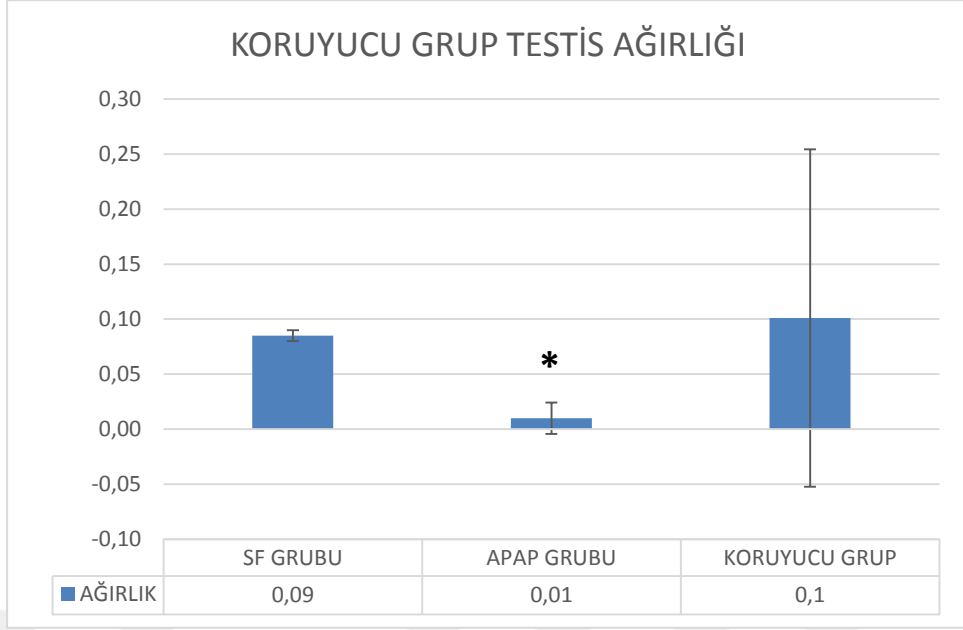
Şekil 13: Delta Denek Ağırlıkları



Şekil 14: Delta Denek Ağırlık Karşılaştırması

4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

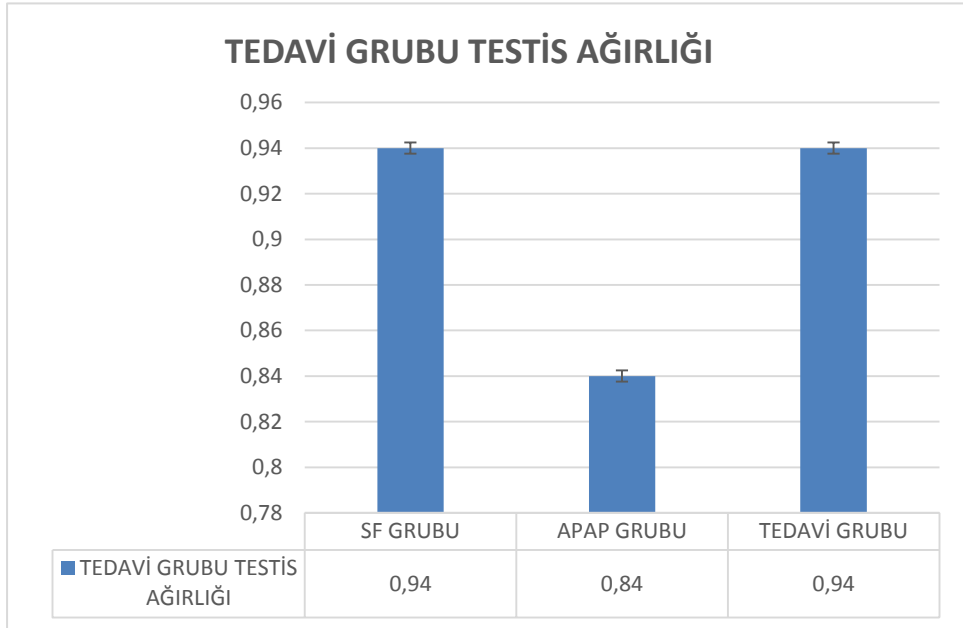
Grupların testis ağırlık ortalamaları; SF1 grubunda $0,103 \pm 0,005$ gr, APAP1 grubunda $0,065 \pm 0,014$ gr, Koruyucu etki grubunda $0,256 \pm 0,153$ gr şeklinde bulundu. Bulunan değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; SF1 grubu ile APAP1 grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,043$). SF1 grubu ile Koruyucu etki grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,465$). APAP1 grubu ile Koruyucu etki grubu karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0,043$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 15)



Şekil 15: Koruyucu grup testis ağırlıkları karşılaştırması

*; SF1 grubu ve Koruyucu grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p < 0,05$).

Grupların testis ağırlık ortalamaları; SF2 grubunda $0,094 \pm 0,002$ gr, APAP2 grubunda $0,084 \pm 0,002$ gr, Tedavi grubunda $0,094 \pm 0,002$ gr şeklinde bulundu. Bulunan değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; gruplar arasında anlamlı fark bulunmamıştır ($p = 0,059$, $p = 1,000$, $p = 0,059$) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 16)

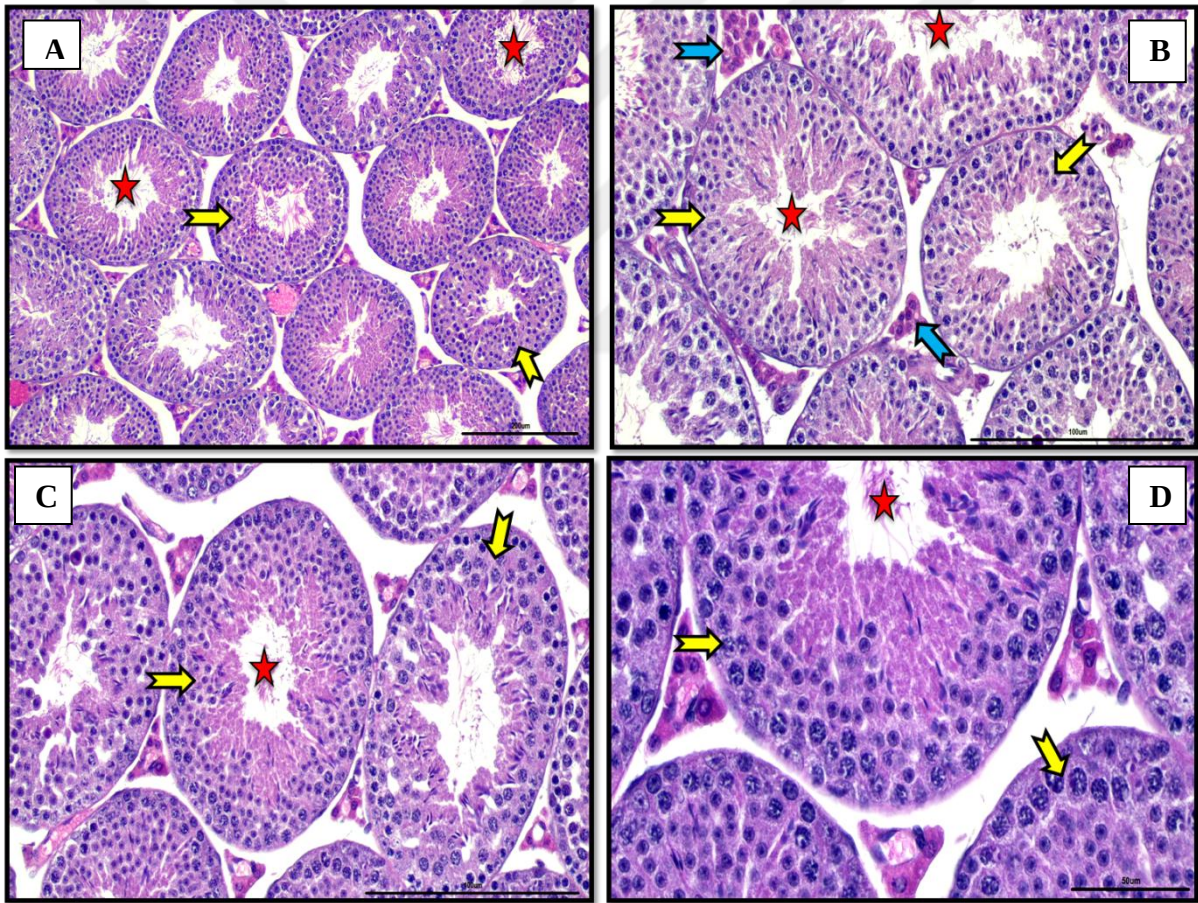


Şekil 16: Tedavi grubu testis ağırlıkları karşılaştırması

4.3. Histokimyasal Bulgular

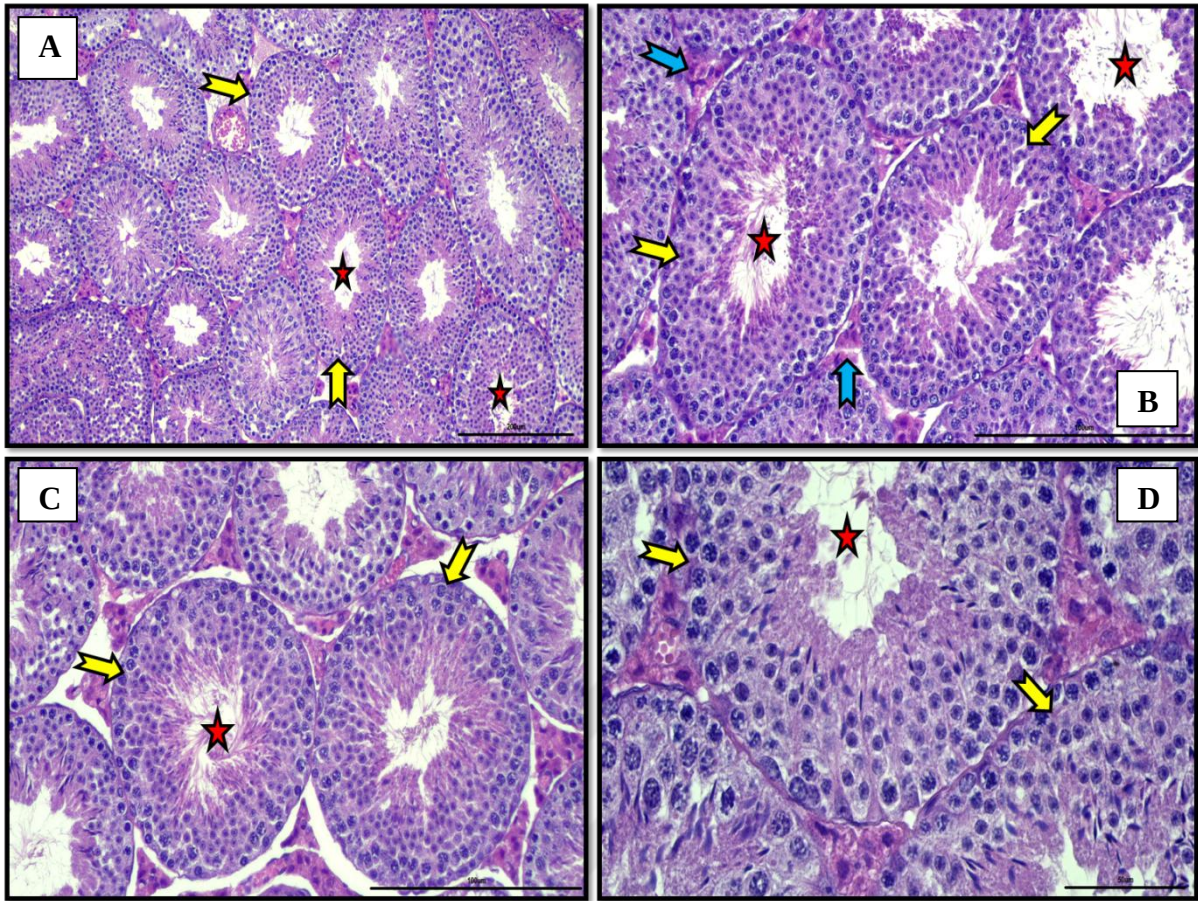
4.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Değerlendirmesi

SF1,SF2 grubuna ait kesitler incelendiğinde; normal morfolojide, tunika albuginea'dan itibaren tübül organizasyonunun ve intersitisyel alanın düzgün yapıda olduğu gözlemlendi. İntersitisyel alanda kan damarları, kan damarlarına yakın yerleşimde bulunan leydig hücreleri ve bağ doku hücreleri gözlemlendi. Leydig hücreleri poligonal şekli olan, büyük eksantrik yerleşimli nukleusa sahipti. Tübül epitelini oluşturan spermatogenik hücre serilerinin düzgün olarak sıralandığı ve tübül lümeninde gelişmekte olan sperm hücrelerinin varlığı gözlemlendi. Tübül duvarında bazal membrana oturmuş spermatogoniyumlar, tübüle sıralı yerleşmiş spermatositler ve spermatidler görüldü. Aralarında Sertoli hücreleri yer almaktaydı. Tübüllerin merkezinde ise spermatidler görüldü (Şekil 17, 18).



Şekil 17: SF1 grubuna ait testisin histolojik(H&E) görüntüleri.

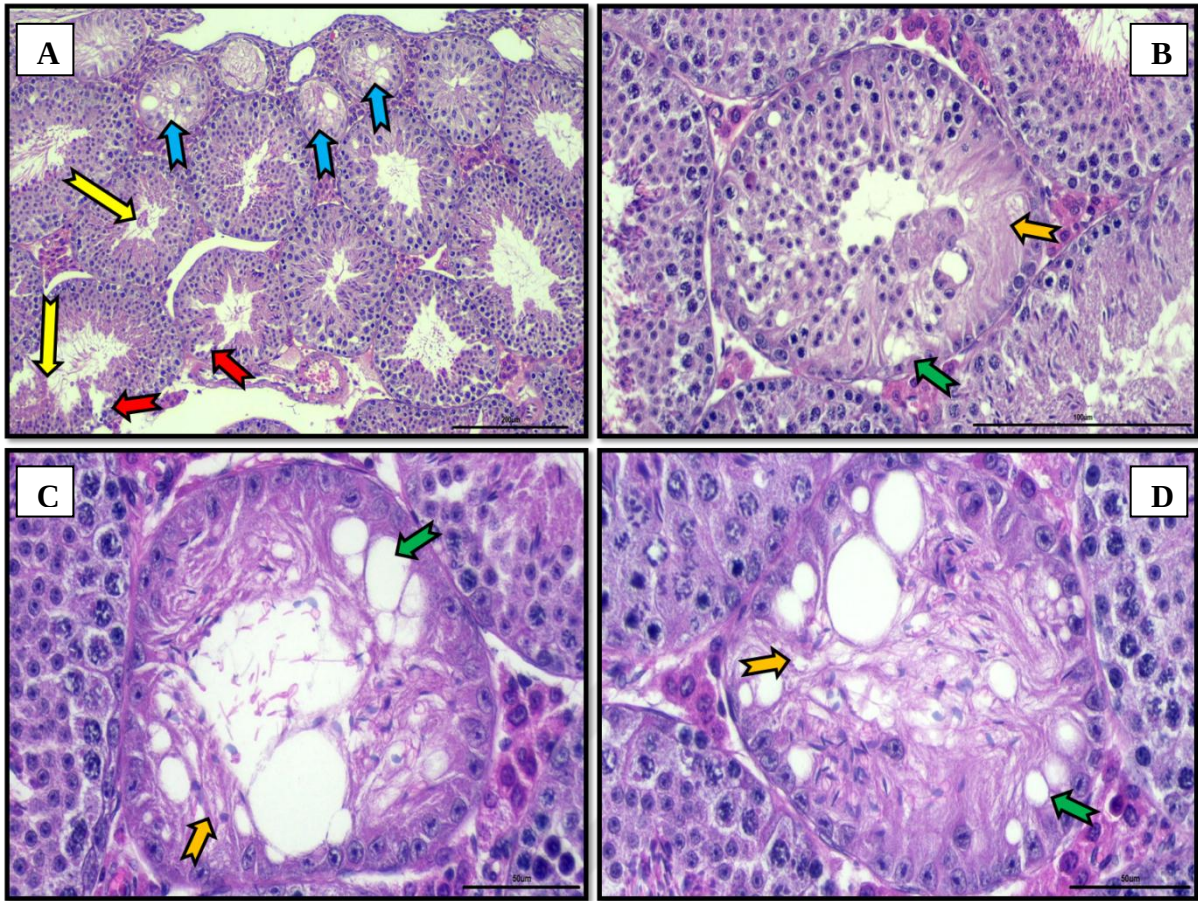
Testis kesitlerinin A; X10, B-C; X20, D; X40'lik görüntüleri gösterilmektedir. Görüntülerde, normal yapıdaki seminifer tübüller ve olgun spermiyumları kırmızı yıldız(★) ile gösterilmektedir. Düzenli spermatogenetik seri hücreleri **sarı ok** ile gösterilmektedir. **Mavi ok** Leydig hücrelerini göstermektedir.



Şekil 18: SF2 grubuna ait testisin histolojik (H&E) görüntüleri.

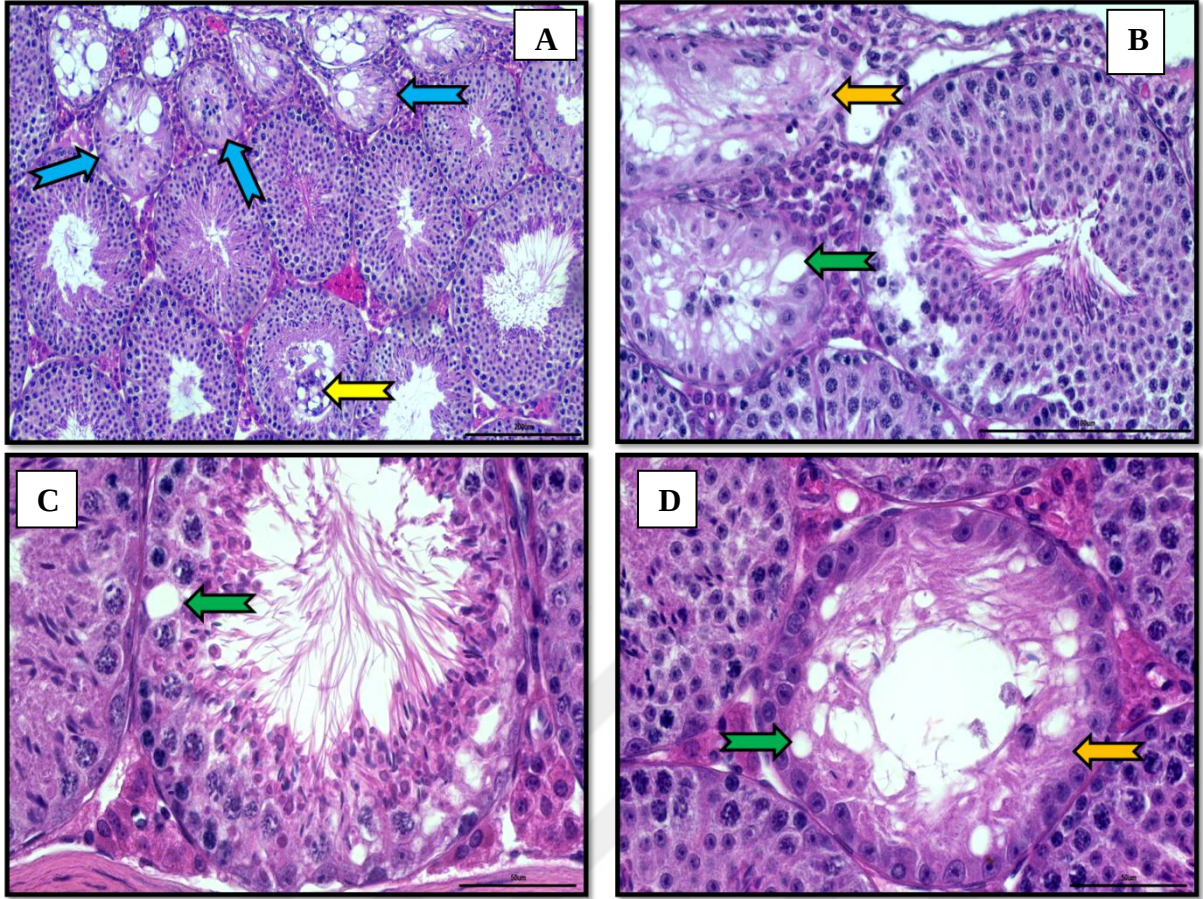
Testis kesitlerinin A; X10, B-C; X20, D; X40'lık görüntüleri gösterilmektedir. Görüntülerde, normal yapıdaki seminifer tübüller ve olgun spermiyumları kırmızı yıldız(★) ile gösterilmektedir. Düzenli spermatogenetik seri hücreleri **sarı ok** ile gösterilmektedir. **Mavi ok** Leydig hücrelerini göstermektedir.

APAP1 grubu SF1 grubuna göre, APAP2 grubu SF2 gurubuna göre incelendiğinde seminifer epitelde daha düzensiz bir yapı gözlemlendi. Seminifer epiteli oluşturan germ hücre diziliminde bozukluk ve kayıp, bazal membrandan yer yer ayrılma ve sertoli hücrelerinde kayıplar görüldü. Ayrıca seminifer tübül epitelinde germ hücrelerinin dökülmesi sonucu ortaya çıkan vakuolizasyonlar gözlemlendi (Şekil 19, 20).



Şekil 19: APAP1 grubuna ait testisin histolojik (H&E) görüntüleri.

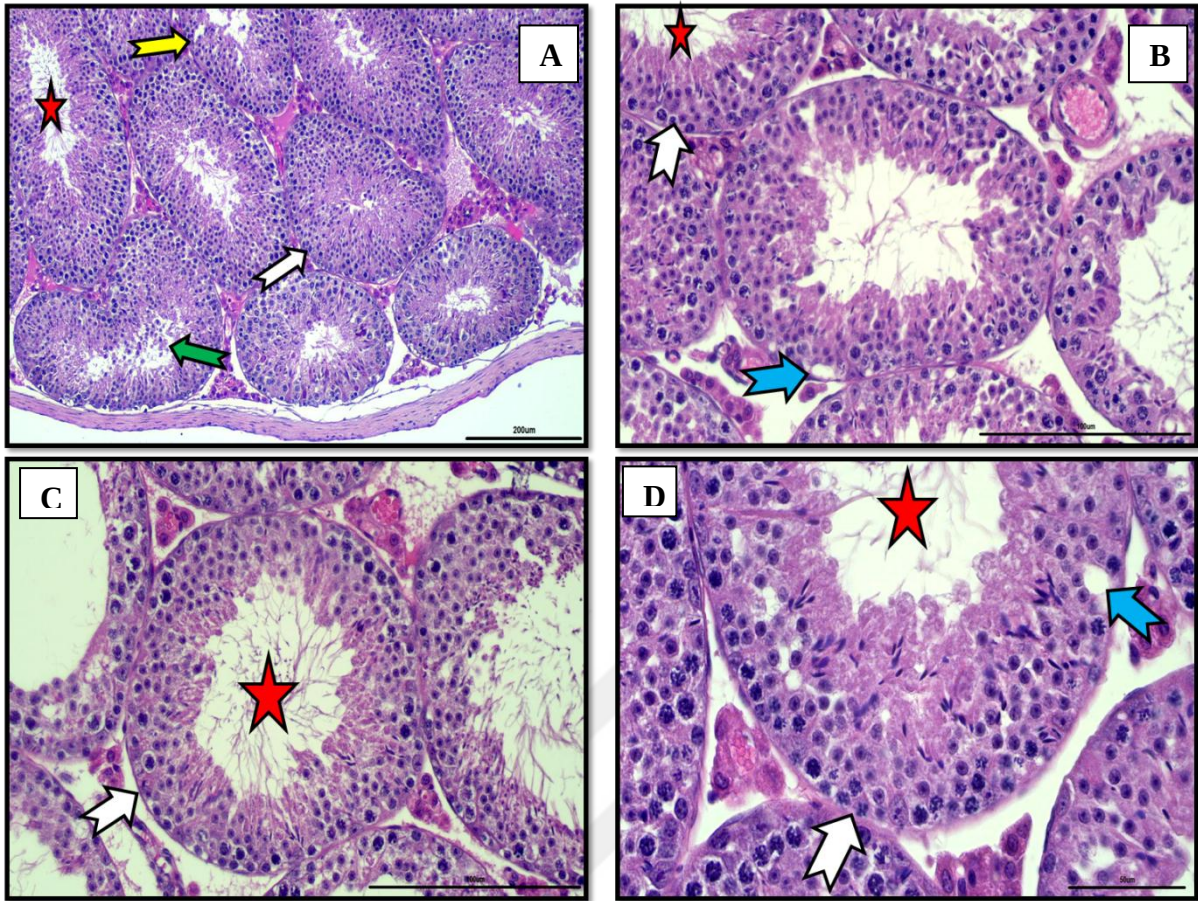
Testis kesitlerinin A; X10, B; X20, C-D; X40'lik görüntüleri gösterilmektedir. **Mavi ok** atretik tübüleri göstermektedir. **Sarı ok** seminifer tübül lümenine dökülmüş hücreleri göstermektedir. **Kırmızı ok** spermatogenik seri hücreleri arasındaki hücre-hücre bağlantılarının koptuğu yerleri göstermektedir. **Yeşil ok** spermatogenik seri hücreleri arasındaki vakuolleşmeyi göstermektedir. **Turuncu ok** spermatogenik hücre seri kaybını göstermektedir.



Şekil 20: APAP2 grubuna ait testisin histolojik (H&E) görüntüleri.

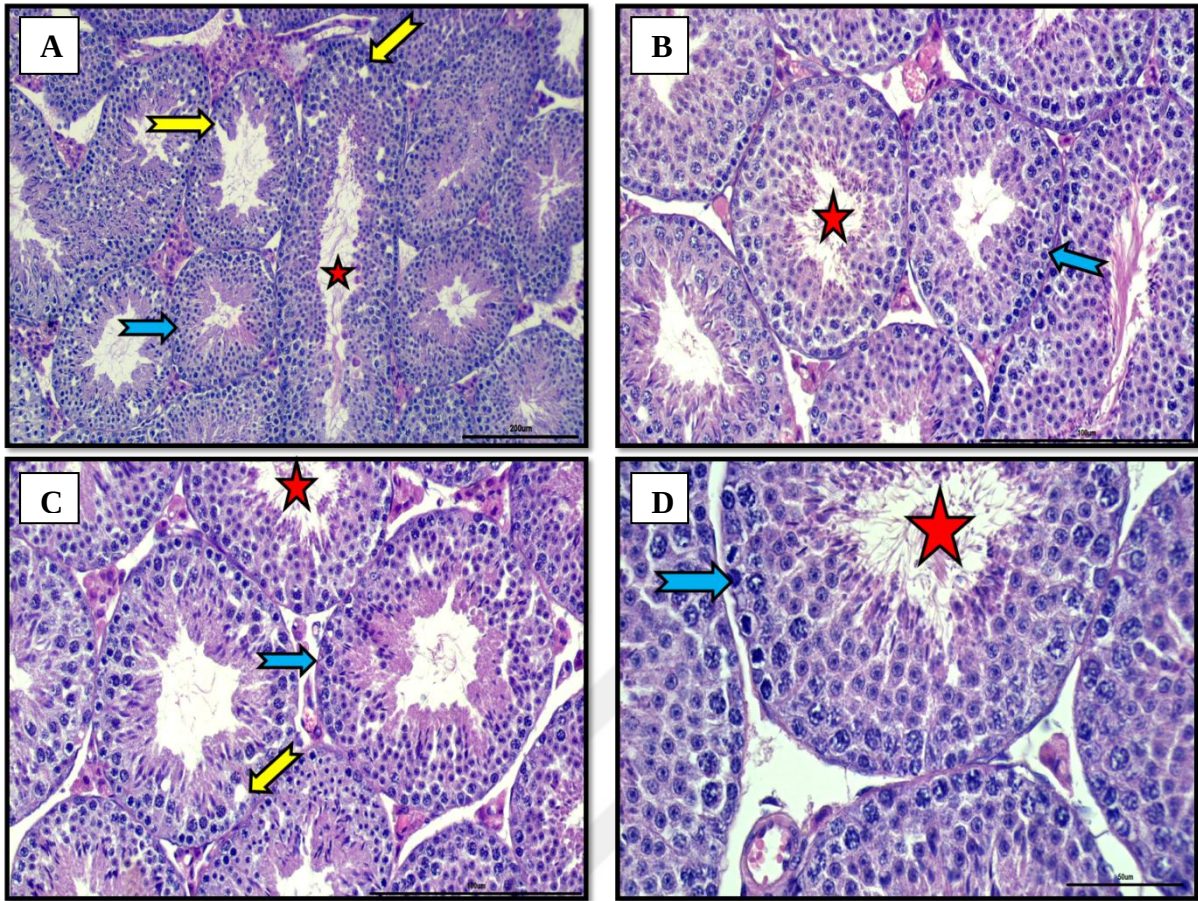
Testis kesitlerinin A; X10, B; X20, C-D; X40'lik görüntüleri gösterilmektedir. **Mavi ok** atretik tübüleri göstermektedir. **Sarı ok** seminifer tübül lümenine dökülmüş hücreleri göstermektedir. **Yeşil ok** spermatogenik seri hücreleri arasındaki vakuolleşmeyi göstermektedir. **Turuncu ok** spermatogenik hücre seri kaybını göstermektedir.

Koruyucu etki grubu APAP1 grubuna göre, Tedavi grubu APAP2 grubuna göre incelendiğinde, Koruyucu etki ve Tedavi gruplarında hasarlı tübül sayısının daha az olduğu ve çok sayıda tübülün normale yakın morfolojide olduğu gözlemlendi. Tübül epitelinde germ hücre kayıplarının ve vakuolizasyonun azaldığı, seminifer tübüller çaplarının normale yakın olduğu, interstisyel alanın da genelde normale yakın morfolojide olduğu gözlemlendi (Şekil 21, 22).



Şekil 21: Koruyucu etki grubuna ait testisin histolojik (H&E) görüntüleri.

Testis kesitlerinin A; X10, B-C; X20, D; X40'lik görüntüleri gösterilmektedir. Görüntülerde, normal yapıdaki seminifer tübüller ve olgun spermiyumları kırmızı yıldız (★) ile gösterilmektedir. **Sarı ok** spermatogenik seri hücreleri arasındaki hücre-hücre bağlantılarının koptuğu yerleri göstermektedir. **Beyaz ok** düzenli spermatogenetik seri hücrelerini göstermektedir. **Yeşil ok** seminifer tübül lümenine dökülmüş hücreleri göstermektedir. **Mavi ok** spermatogenik seri hücreleri arasındaki vakuolleşmeyi göstermektedir.



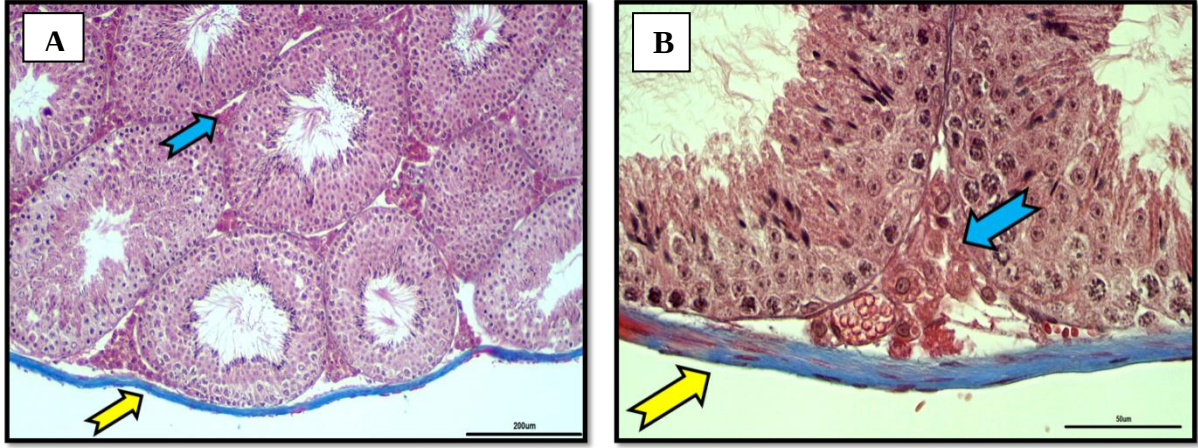
Şekil 22: Tedavi grubuna ait testisin histolojik (H&E) görüntüleri.

Testis kesitlerinin A; X10, B-C; X20, D; X40'lık görüntüleri gösterilmektedir. Görüntülerde, normal yapıdaki seminifer tübüller ve olgun spermiumları kırmızı yıldız (★) ile gösterilmektedir. **Sarı ok** spermatogenik seri hücreleri arasındaki hücre-hücre bağlantılarının koptuğu yerleri göstermektedir. **Mavi ok** düzenli spermatogenetik seri hücrelerini göstermektedir.

4.3.2. Masson-Trikrom Boyama Değerlendirmesi

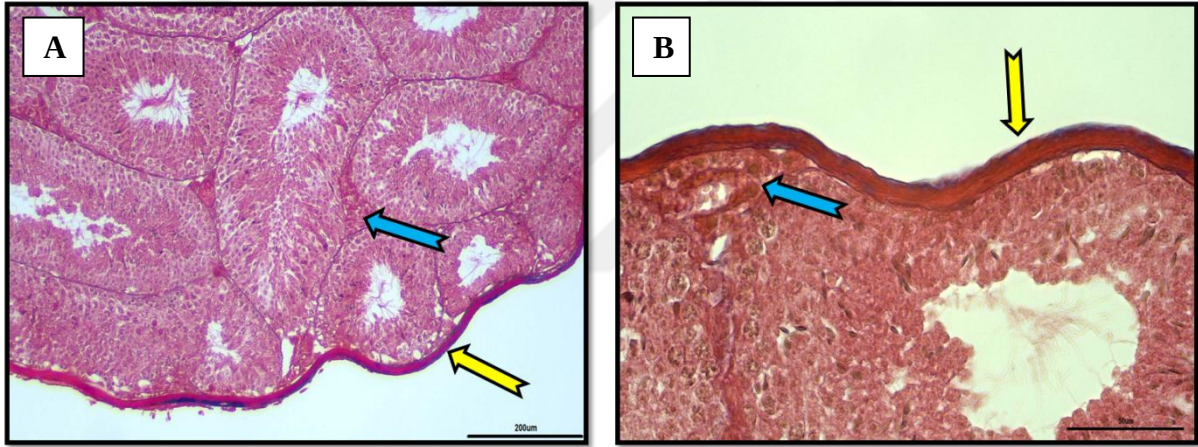
Masson Trikom boyama değerlendirmesinde tunika albuginea kalınlıkları ve interstisyel alanlar gösterilmiştir.

SF1 ve SF2 gruplarına ait testis kesitleri incelendiğinde, tunika albuginea ve interstisyel alan yapısının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 23, 24).



Şekil 23: SF1 grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.

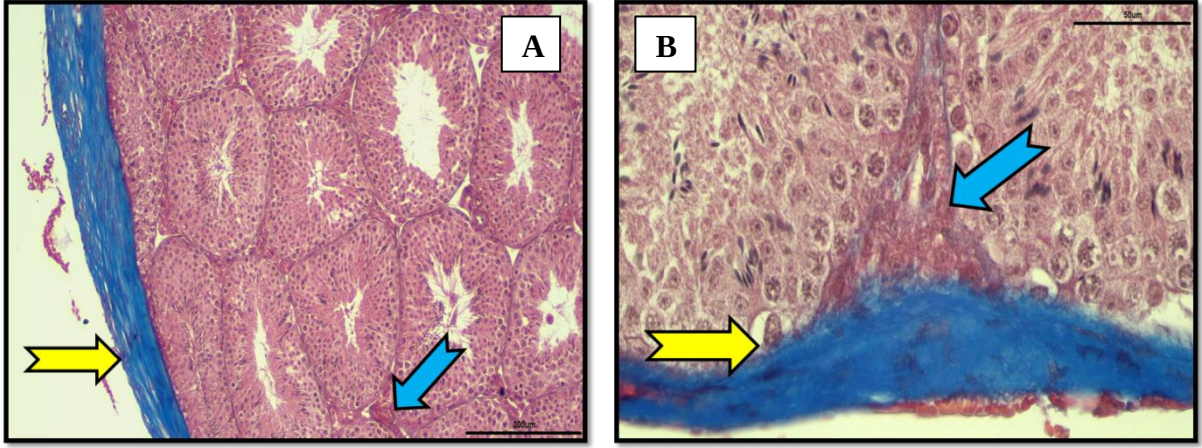
Testis kesitlerinin A; X20, B; X40'lik görüntüleri gösterilmektedir. **Sarı ok** ile tunika albuginea gösterilmektedir. **Mavi ok** ile interstisyel alandaki bağ doku gösterilmektedir.



Şekil 24: SF2 grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.

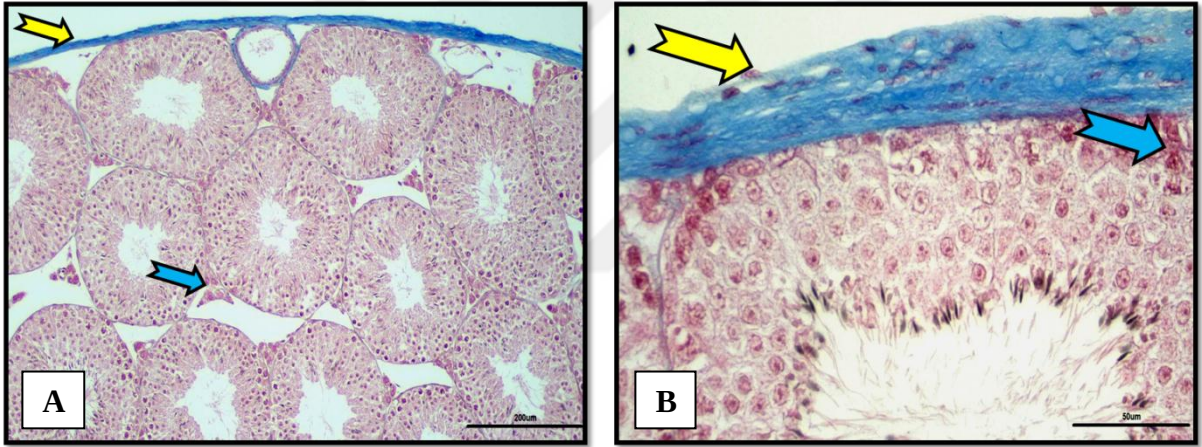
Testis kesitlerinin A; X20, B; X40'lik görüntüleri gösterilmektedir. **Sarı ok** ile tunika albuginea gösterilmektedir. **Mavi ok** ile interstisyel alandaki bağ doku gösterilmektedir.

APAP1 ve APAP2 grubuna ait testis kesitleri incelendiğinde, tunika albuginea ve interstisyel alanda bağ doku artışı gözlemlendi (Şekil 25, 26).



Şekil 25: APAP1 grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.

Testis kesitlerinin A; X20, B; X40'lik görüntüleri gösterilmektedir. **Sarı ok** ile tunika albuginea gösterilmektedir. **Mavi ok** ile interstisyel alandaki bağ doku gösterilmektedir.

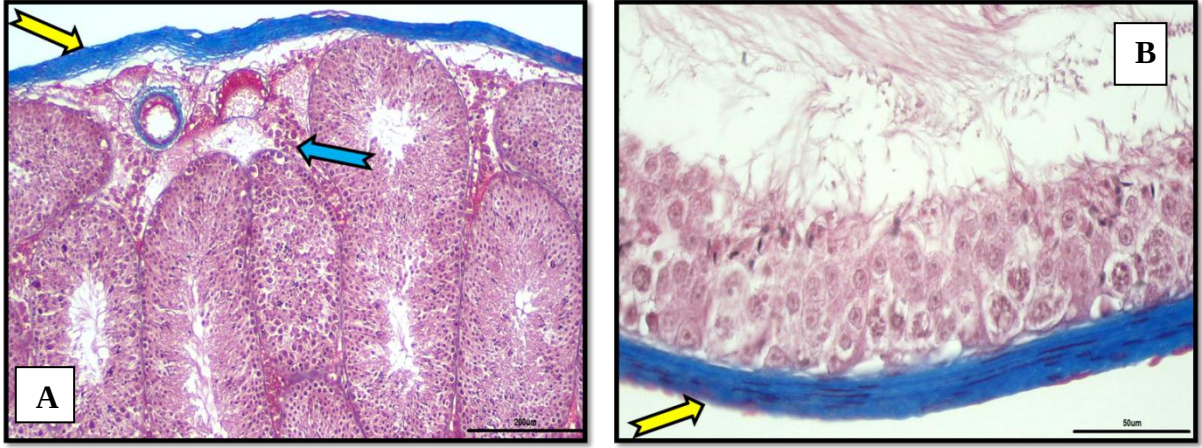


Şekil 26: APAP2 grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.

Testis kesitlerinin A; X20, B; X40'lik görüntüleri gösterilmektedir. **Sarı ok** ile tunika albuginea gösterilmektedir. **Mavi ok** ile interstisyel alandaki bağ doku gösterilmektedir.

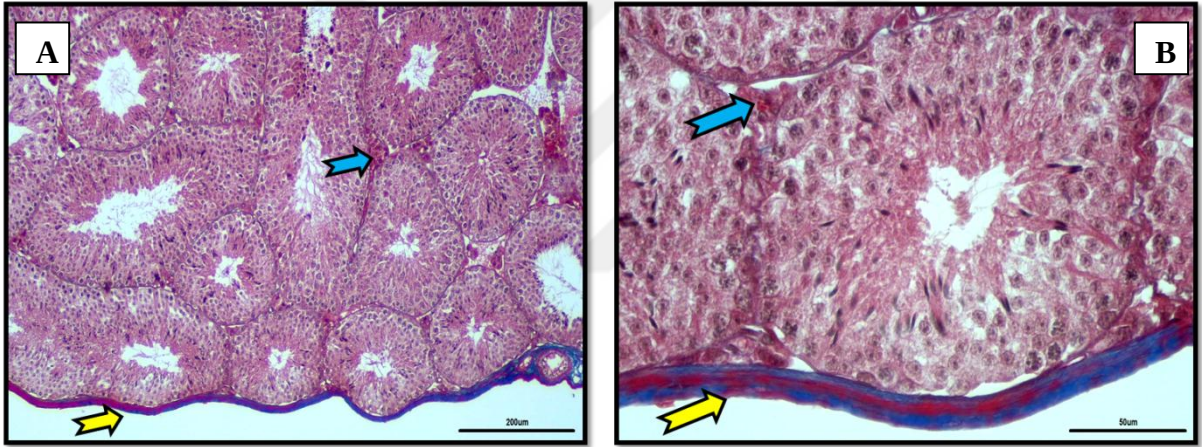
Koruyucu etki grubu ile APAP1 grubu karşılaştırıldığında, tunika albuginea ve interstisyel alanda APAP1 grubuna göre bağ dokusunda azalmanın olduğu ve bu değerlerin SF1 grubuna yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 27).

Tedavi grubu ile APAP2 grubu karşılaştırıldığında, tunika albuginea ve interstisyel alanda APAP2 grubuna göre bağ dokusunda azalmanın olduğu ve bu değerlerin SF1 grubuna yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 28).



Şekil 27: Koruyucu etki grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.

Testis kesitlerinin A; X20, B; X40'lik görüntüleri gösterilmektedir. **Sarı ok** ile tunika albuginea gösterilmektedir. **Mavi ok** ile interstisyel alandaki bağ doku gösterilmektedir.



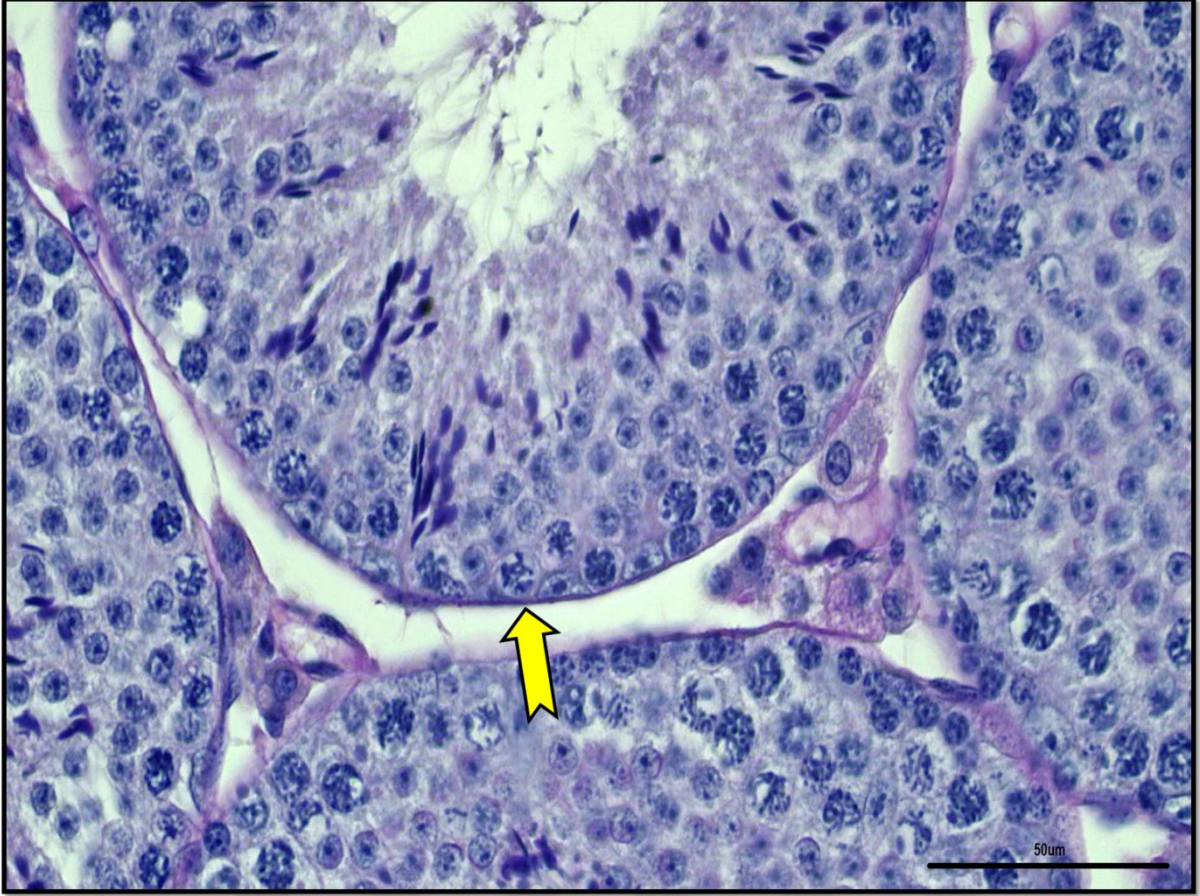
Şekil 28: Tedavi grubuna ait testisin histolojik (Masson Trikrom) görüntüleri.

Testis kesitlerinin A; X20, B; X40'lik görüntüleri gösterilmektedir. **Sarı ok** ile tunika albuginea gösterilmektedir. **Mavi ok** ile interstisyel alandaki bağ doku gösterilmektedir.

4.3.3. PAS Boyama Değerlendirmesi

Periodic Acid Schiff boyama değerlendirmesinde bazal membran kalınlığı ve seminifer tübül çapları gösterilmiştir.

SF1 ve SF2 gruplarına ait kesitler incelendiğinde, bazal membran kalınlığının ve seminifer tübül çaplarının normal olduğu gözlemlendi (Şekil 29, 30).



Şekil 29: SF1 grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.

Sarı ok ile seminifer tübül ve bazal membran gösterilmektedir (X40).



Şekil 30: SF2 grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.

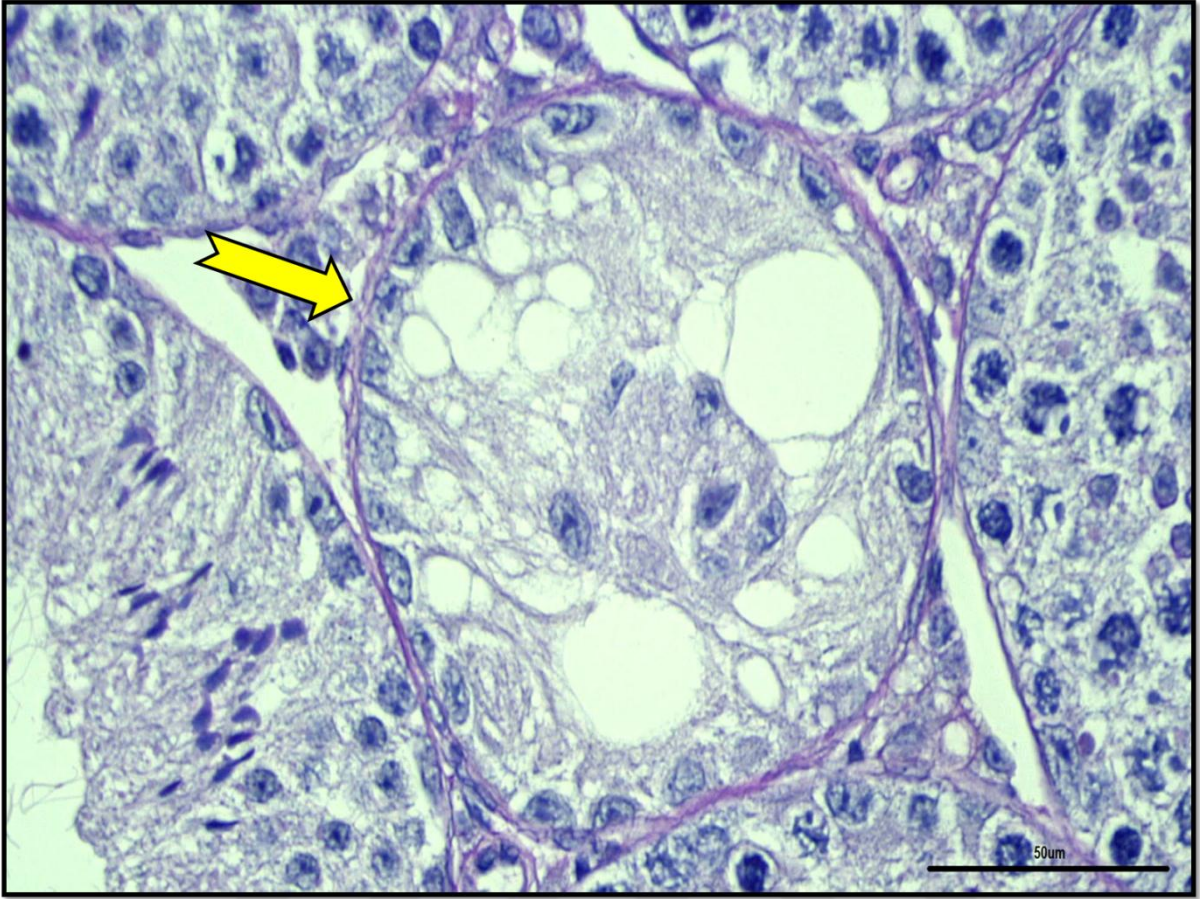
Sarı ok ile seminifer tübül ve bazal membran gösterilmektedir (X40).

APAP1 ve APAP2 gruplarına ait testis kesitleri incelendiğinde, bazal membran kalınlığında artış olduğu ve seminifer tübül çapında ise azalmanın olduğu gözlemlendi (Şekil 31, 32).



Şekil 31: APAP1 grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.

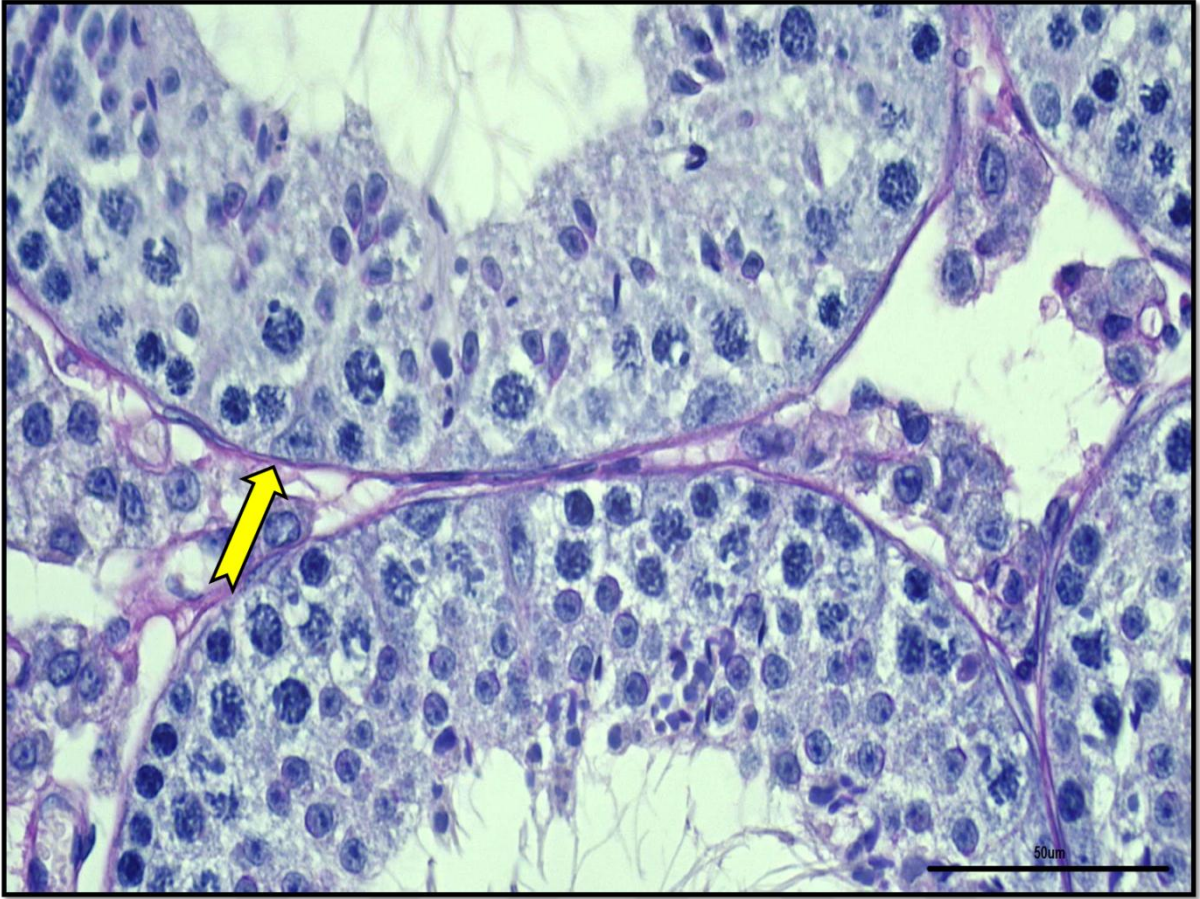
Sarı ok ile seminifer tübül ve bazal membran gösterilmektedir (X40).



Şekil 32: APAP2 grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.

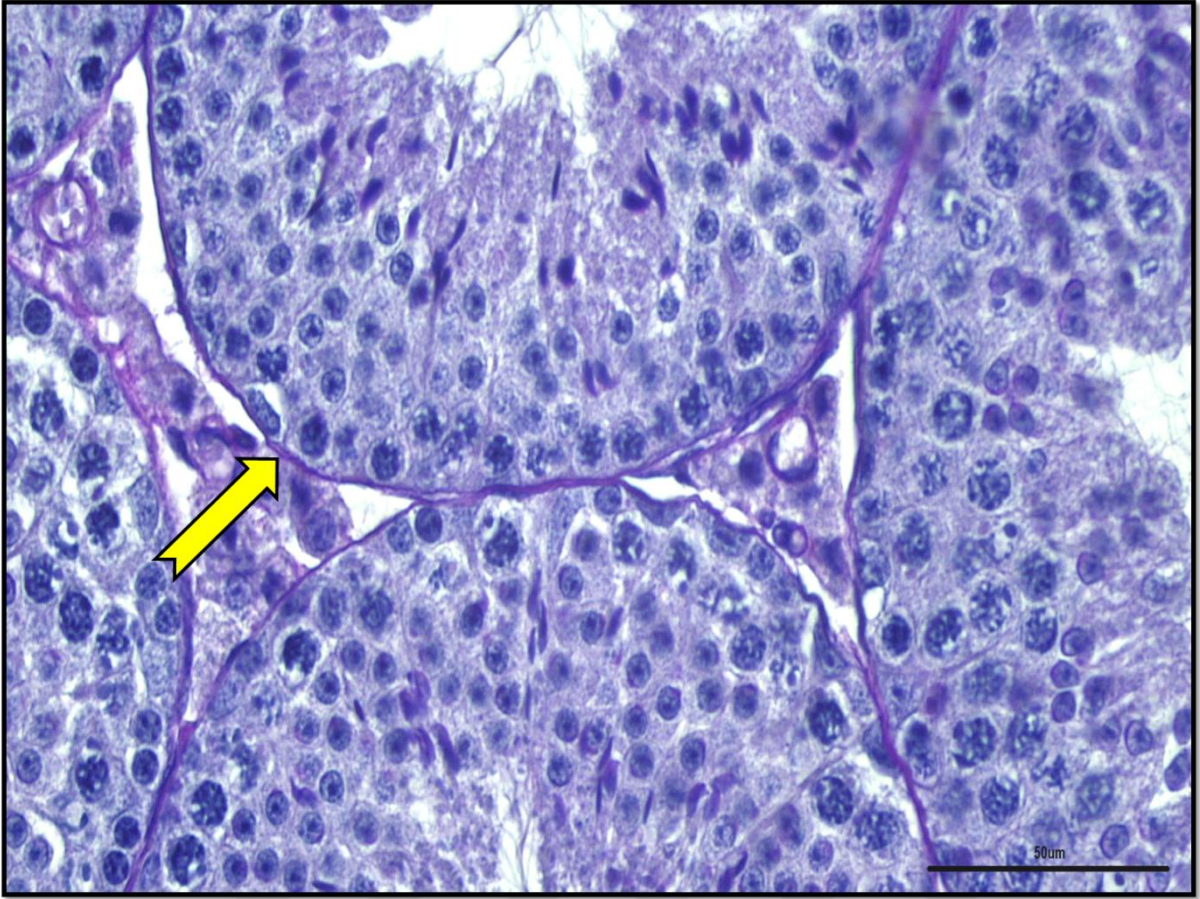
Sarı ok ile seminifer tübül ve bazal membran gösterilmektedir (X40).

Koruyucu etki ve Tedavi grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membran ve seminifer tübül çaplarının kontrol grubuna yakın olduğu gözlemlendi (Şekil 33, 34).



Şekil 33: Koruyucu etki grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.

Sarı ok ile seminifer tübül ve bazal membran gösterilmektedir (X40).



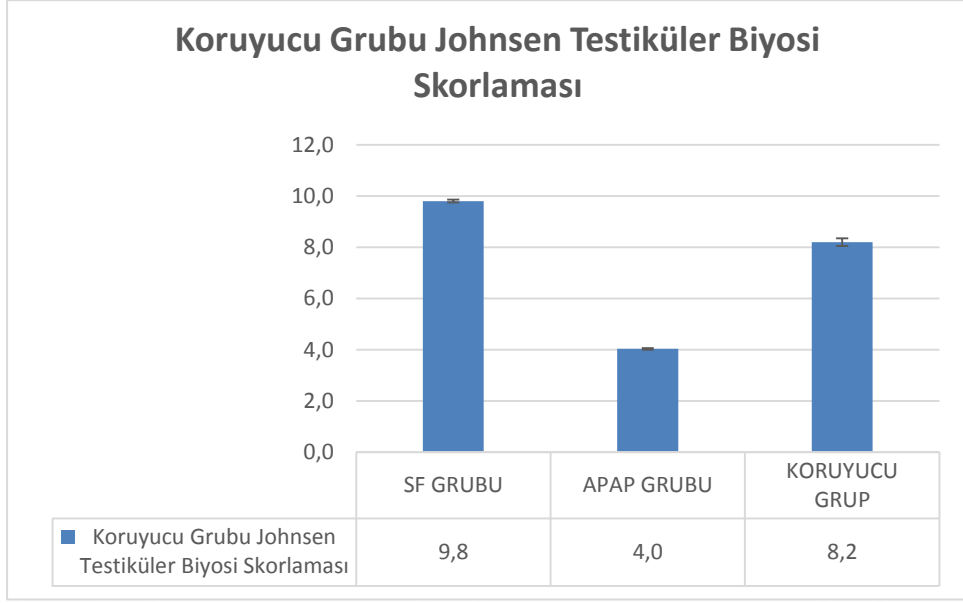
Şekil 34: Tedavi grubuna ait testisin histolojik (PAS) görüntüleri.

Sarı ok ile seminifer tübül ve bazal membran gösterilmektedir X40).

4.4. Morfometrik Bulgular

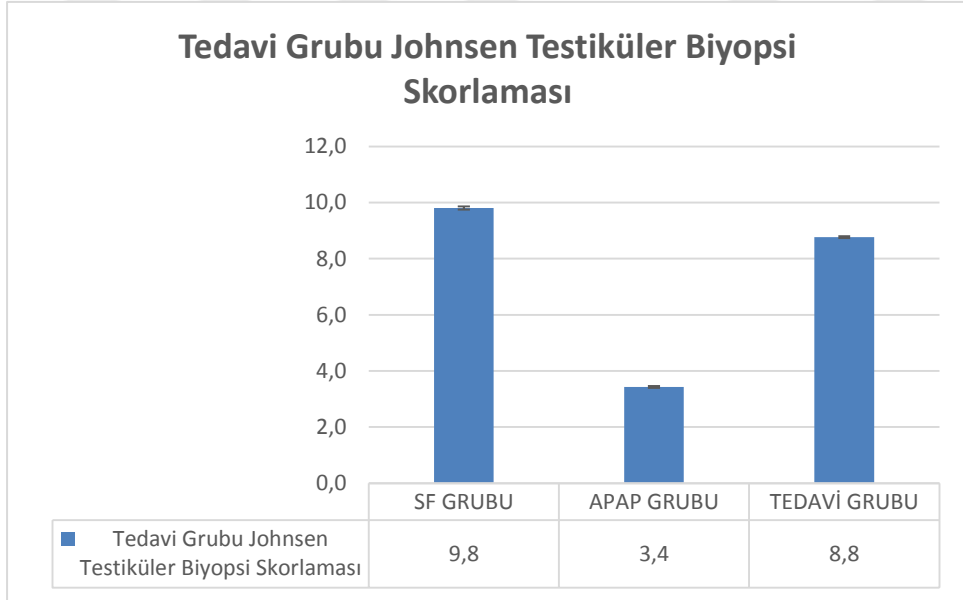
4.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Gruplar arası ortalamalar; SF1 grubu $9,800 \pm 0,577$, APAP1 grubu $4,033 \pm 0,0333$, Koruyucu etki grubu $8,200 \pm 0,1528$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 35)



Şekil 35: Johnsen testiküler biyopsi skoruması

Gruplar arası ortalamalar; SF2 grubu $9,800 \pm 0,577$, APAP2 grubu $3,433 \pm 0,0333$, Tedavi grubu $8,767 \pm 0,0333$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 36)

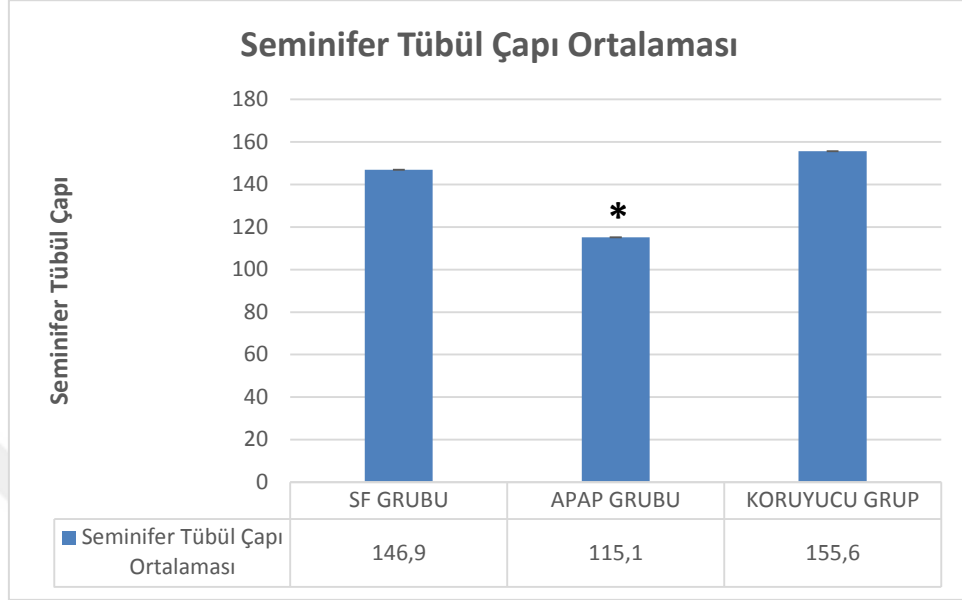


Şekil 36: Johnsen testiküler biyopsi skoruması

4.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Gruplar arası seminifer tübül çap ölçümü ortalamaları; SF1 grubu $146,910 \pm 0,044 \mu\text{m}$, APAP1 grubu $115,120 \pm 0,016 \mu\text{m}$, Koruyucu etki grubu $155,568 \pm 0,003 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü.

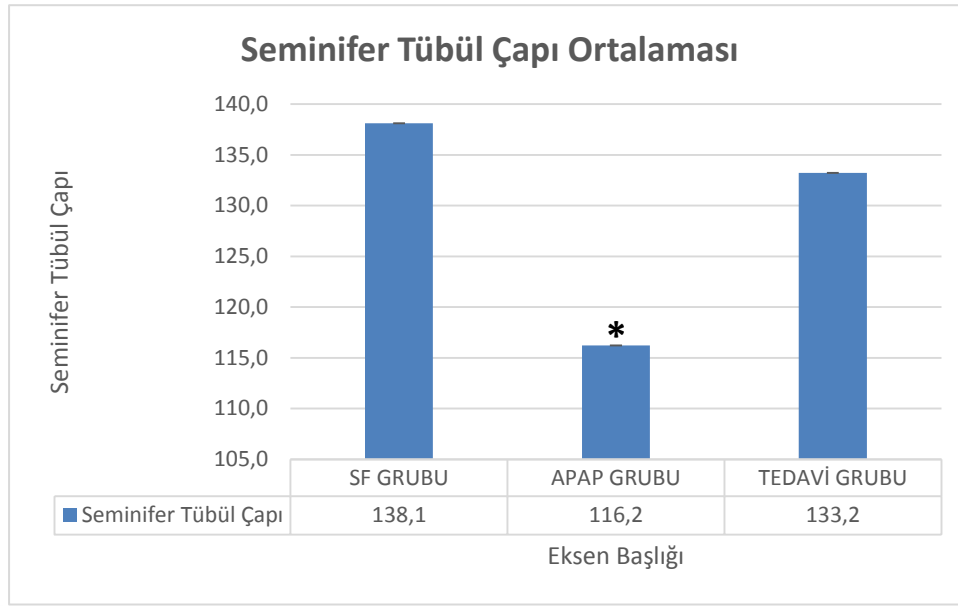
Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; APAP1 grubu ve Koruyucu etki grubu karşılaştırıldığında APAP1 grubunda anlamlı bir azalma saptandı ($p=0,020$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 37)



Şekil 37: Seminifer tübül çap ölçüm ortalamaları

*; Koruyucu etki grubu ile karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

Gruplar arası seminifer tübül çap ölçümü ortalamaları; SF2 grubu $138,097 \pm 0,0005$ μm , APAP2 grubu $116,222 \pm 0,0006$ μm , Tedavi grubu $133,220 \pm 0,0009$ μm olarak ölçüldü. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; APAP1 grubuna göre SF2 ve Tedavi grubunun seminifer tübül çaplarında anlamlı bir artış saptanmıştır ($p=0,022$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 38)

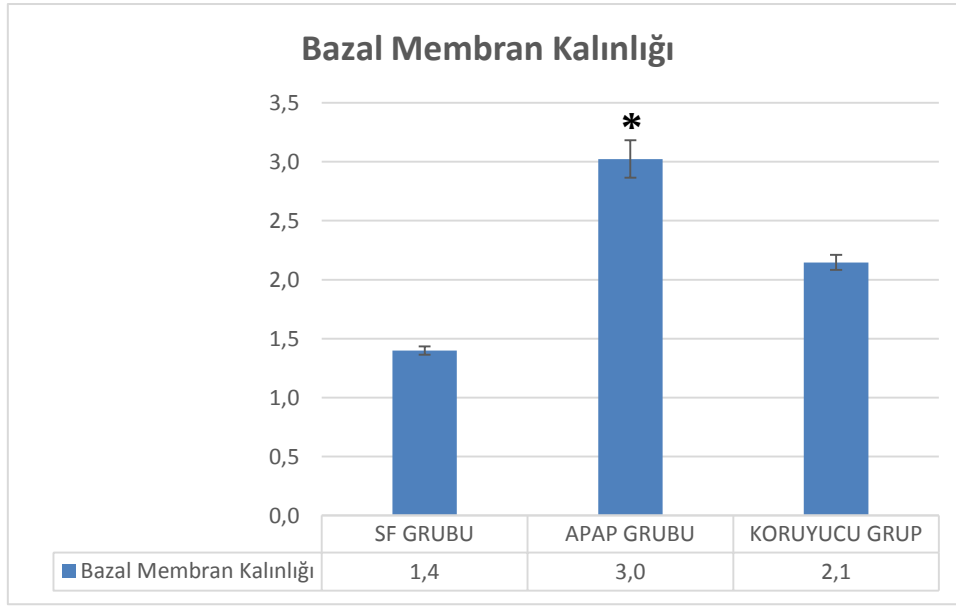


Şekil 38: Seminifer tübül çap ölçüm ortalamaları

*; SF2 grubu ve Tedavi grubuyla karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p < 0,05$)

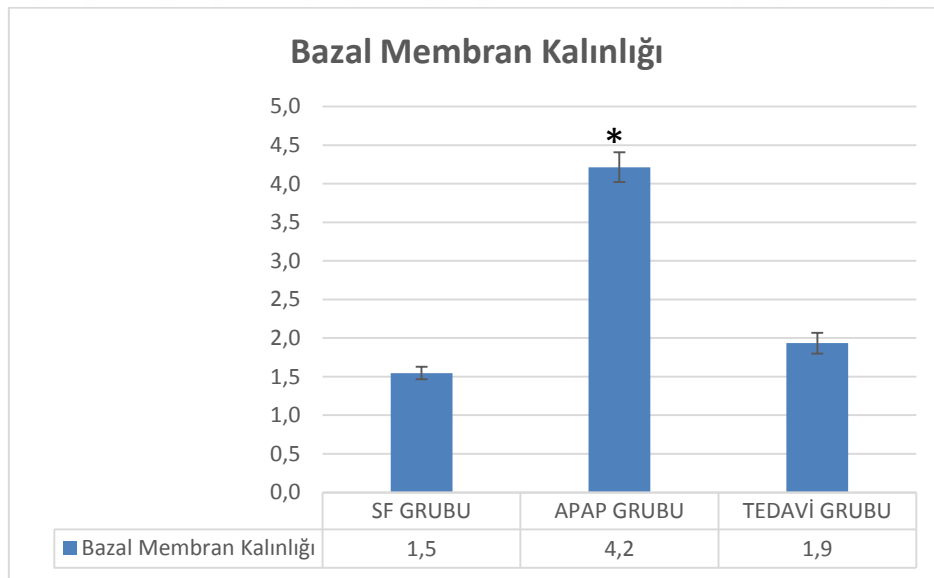
4.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı ve Epitel Yüksekliği Ölçümü

Gruplar arası seminifer tübül bazal membran kalınlığı ortalamaları; SF1 grubu $1,400 \pm 0,351 \mu\text{m}$, APAP1 grubu $3,023 \pm 0,158 \mu\text{m}$, Koruyucu etki grubu $2,146 \pm 0,643 \mu\text{m}$, olarak bulundu. SF1 grubu ile APAP1 grubu karşılaştırıldığında APAP1 grubunda anlamlı derecede artış gözlenmiştir ($p = 0,000$). Koruyucu etki grubu ile APAP1 grubu karşılaştırıldığında APAP1 grubu anlamlı derecede artış gözlenmiştir ($p = 0,002$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 39)



Şekil 39: Seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri

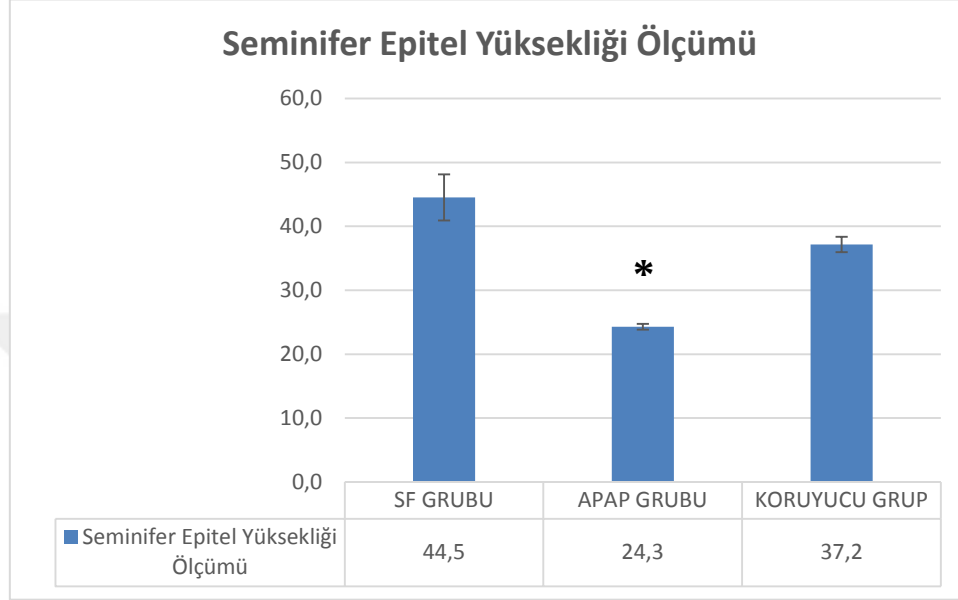
Gruplar arası seminifer tübül bazal membran kalınlığı ortalamaları; SF2 grubu $1,546 \pm 0,080 \mu\text{m}$, APAP2 grubu $4,213 \pm 0,192 \mu\text{m}$, Tedavi grubu $1,933 \pm 0,133 \mu\text{m}$, olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; SF2 ve Tedavi grupları ile karşılaştırıldığında APAP2 istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p=0,000$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 40)



Şekil 40: Seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri

*; SF2 grubu ve Tedavi grubuyla karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

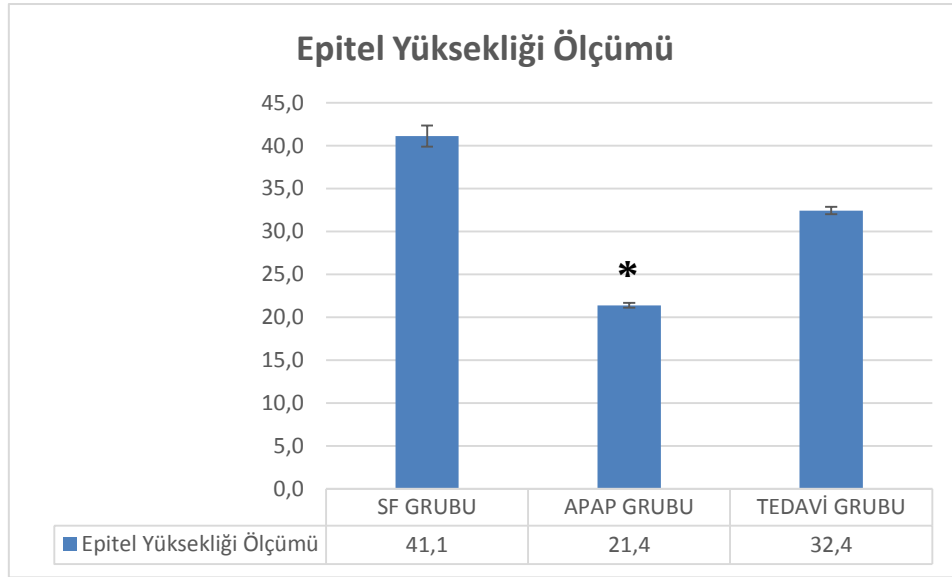
Gruplar arası seminifer tübül epitel yüksekliği ortalamaları; SF1 grubu $44,523 \pm 3,626 \mu\text{m}$, APAP1 grubu $24,286 \pm 0,458 \mu\text{m}$, Koruyucu etki grubu $37,150 \pm 1,200 \mu\text{m}$, olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; SF1 ve Koruyucu etki gruplarıyla kıyaslandığında APAP1 grubunun epitel yüksekliğinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p=0,002$, $p=0,015$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 41)



Şekil 41: Seminifer tübül epitel yüksekliği ölçümleri

*; SF1 grubu ve Koruyucu grubuyla karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

Gruplar arası seminifer tübül bazal membran kalınlığı ortalamaları; SF2 grubu $41,120 \pm 1,247 \mu\text{m}$, APAP2 grubu $21,376 \pm 0,280 \mu\text{m}$, Tedavi grubu $32,433 \pm 0,421 \mu\text{m}$, olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; SF2 ve Tedavi grupları ile karşılaştırıldığında APAP2 istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma göstermiştir ($p=0,000$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 42)

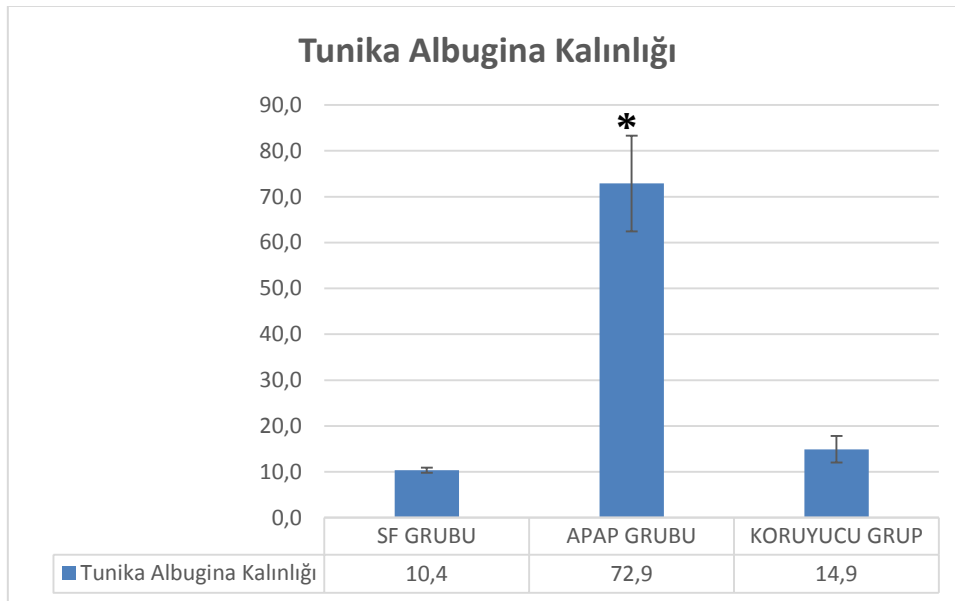


Şekil 42: Seminifer tübül epitel yüksekliği ölçümleri

*; SF2 grubu ve Tedavi grubuyla karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p < 0,05$)

4.4.4. Tunika Albuginea Kalınlık Ölçümü

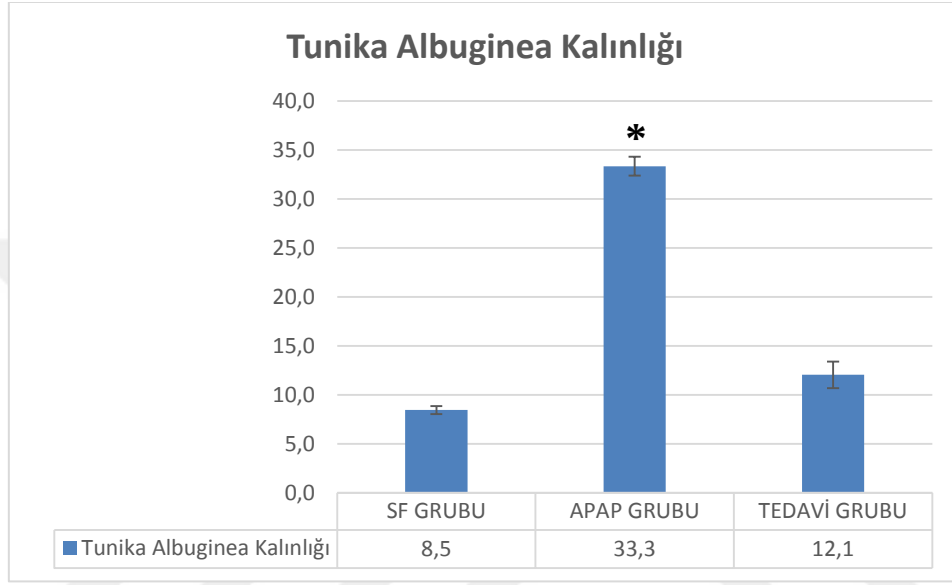
Gruplar arası tunika albugine kalınlık ortalamaları; SF1 grubu $10,376 \pm 0,555 \mu\text{m}$, APAP1 grubu $72,880 \pm 10,424 \mu\text{m}$, Koruyucu etki grubu $14,913 \pm 2,917 \mu\text{m}$, olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; SF1 grubu ve Koruyucu etki grubu APAP1 grubuyla karşılaştırıldığında APAP1 grubu istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p = 0,001$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 43)



Şekil 43: Tunika albugine kalınlık ölçümüne ait ortalama değerler

*; SF1 grubu ve Koruyucu etki grubuyla karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

Gruplar arası tunika albugine kalınlık ortalamaları; SF2 grubu $8,460\pm0,405 \mu\text{m}$, APAP2 grubu $33,344\pm0,964 \mu\text{m}$. Tedavi grubu $12,062\pm1,354 \mu\text{m}$, olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; SF2 grubu ve Tedavi grubu APAP2 grubuyla karşılaştırıldığında APAP2 grubu istatistiksel olarak anlamlı derecede artış göstermiştir ($p=0,000$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 44)



Şekil 44: Tunika albugine kalınlık ölçümüne ait ortalama değerler

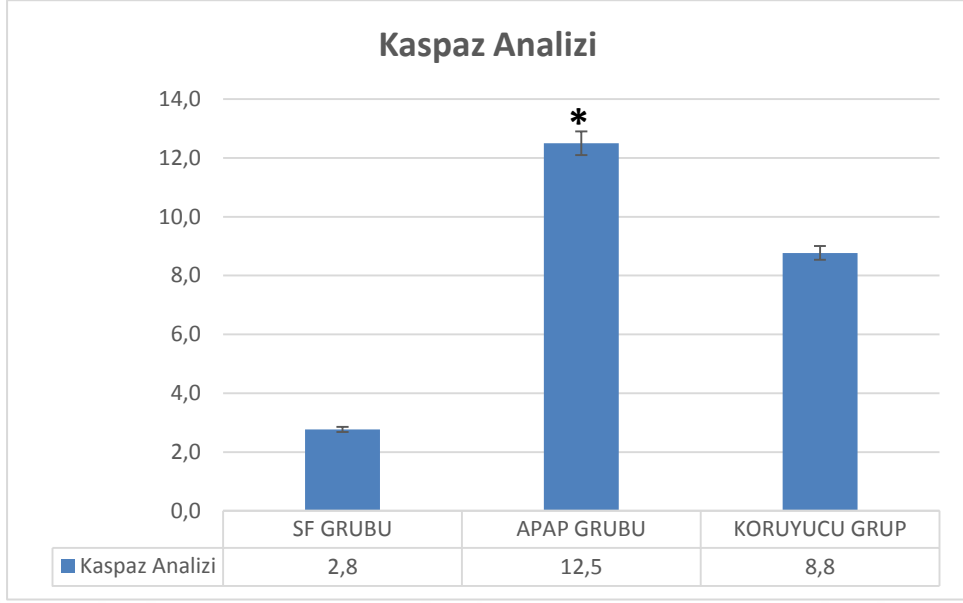
*; SF1 grubu ve Koruyucu etki grubuyla karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p<0,05$)

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.5.1. Aktif Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Testis dokularında apoptotik hücre varlığını göstermek için Aktif Kaspaz-3 immün boyaması yapıldı. Değerlendirmeler Image J programı ile gerçekleştirildi. Elde edilen dokularda, her denek için 10 ayrı tübülde apoptotik hücre varlığını gözlemlendi.

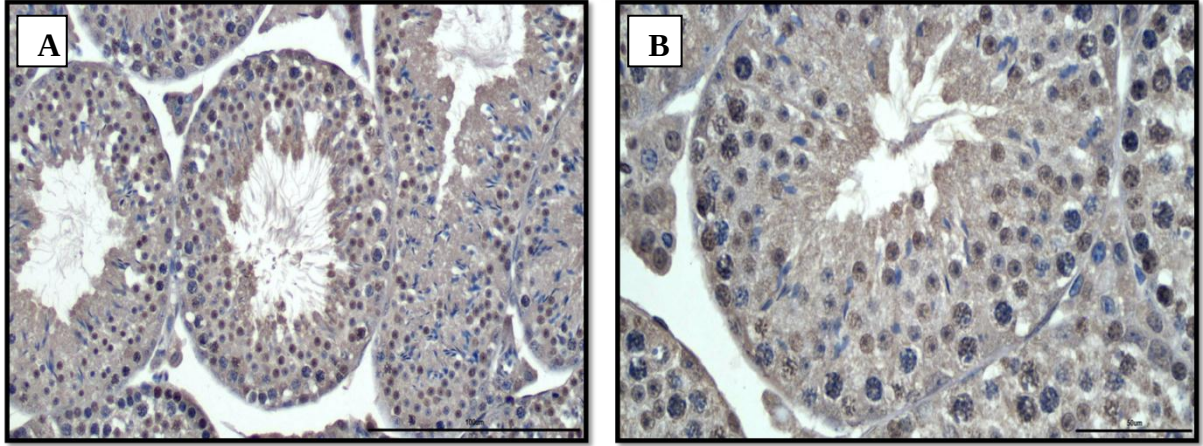
Elde edilen sonuçlara göre Aktif Kaspaz-3 hücre sayıları ortalaması; SF1 grubunda $2,767\pm0,088$, APAP1 grubunda $12,500\pm0,404$, Koruyucu etki grubunda $8,767\pm0,233$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; APAP1 grubu SF1 grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,006$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 45)



Şekil 45: Grupların Aktif Kaspaz-3 (+) hücre sayısı

*; SF1 grubuyla karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p < 0,05$)

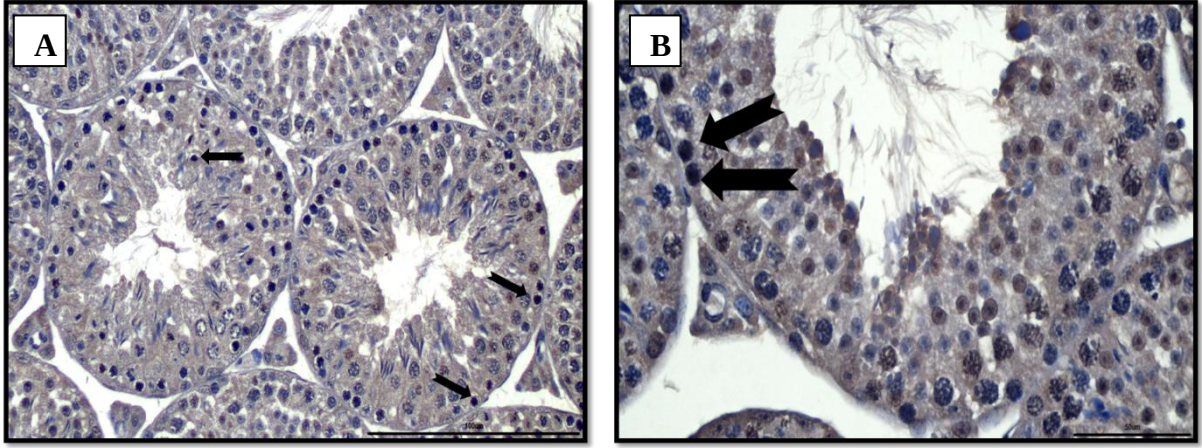
SF1 grubu kesitleri incelendiğinde, bazı seminifer tübüllerde apoptotik hücrelerin olduğu tespit edildi. Histolojik verilerde olduğu gibi seminifer tübüllerin yapısının düzgün olduğu gösterilmektedir (Şekil 46).



Şekil 46: SF1 grubu testis kesiti.

A: X20 **B:** X40

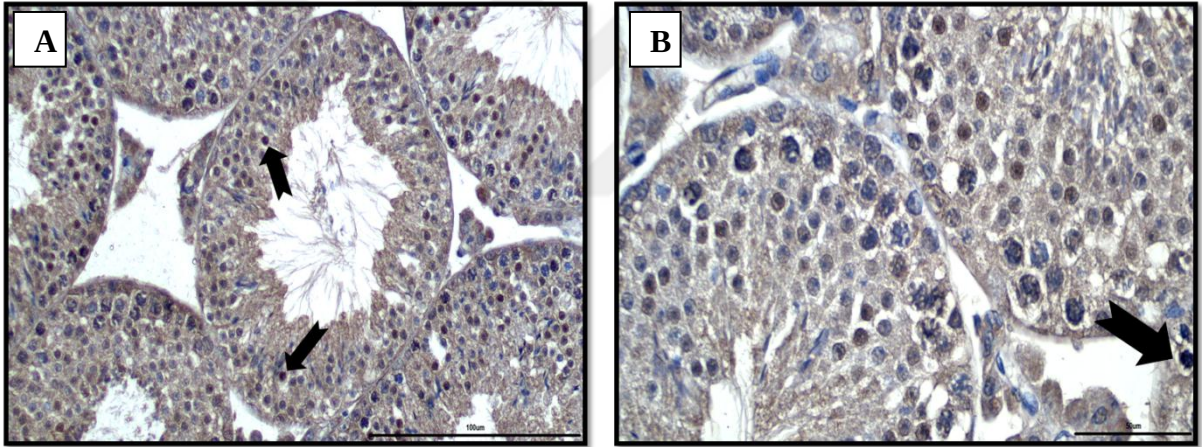
APAP1 grubuna ait testis kesitleri incelendiğinde, çok sayıda dejenere olmuş seminifer tübül varlığı ve çok miktarda apoptotik hücre gözlemlendi (Şekil 47).



Şekil 47: APAP1 grubu testis kesiti.

Siyah ok ile apoptotik hücreler gösterilmektedir. **A:** X20 **B:** X40

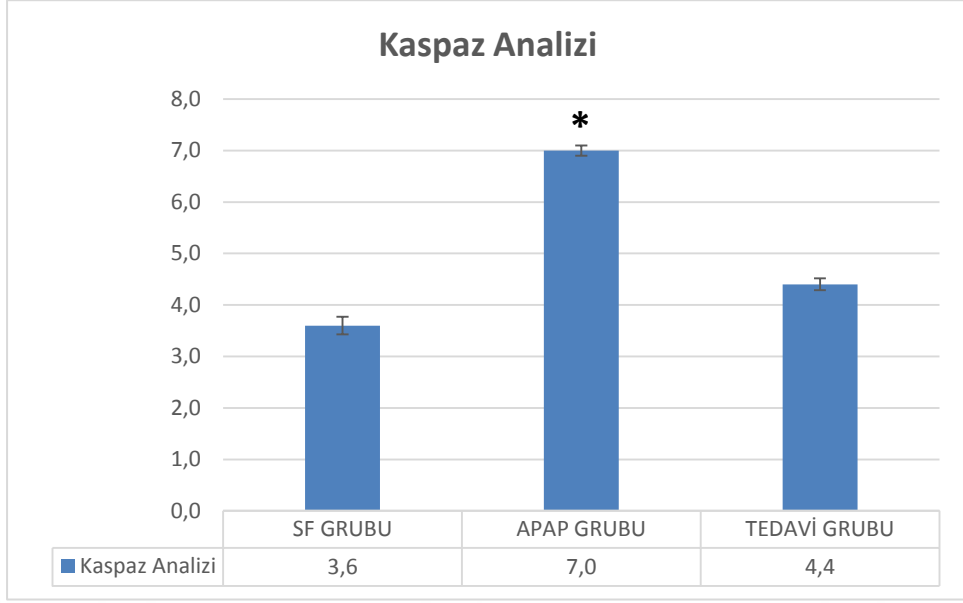
Koruyucu etki grubu testis kesitleri incelendiğinde, apoptotik hücre varlığı gözlemlendi. Ancak bu hücrelerin oranının, APAP1 grubuna göre azaldığı belirlendi (Şekil 48).



Şekil 48: Koruyucu etki grubu testis kesiti.

Siyah ok ile apoptotik hücreler gösterilmektedir. **A:** X20 **B:** X40

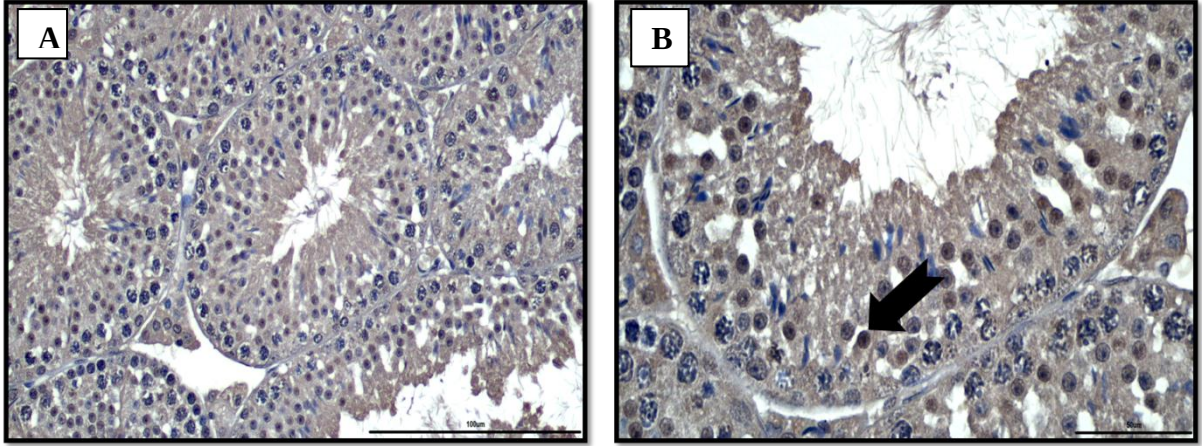
Elde edilen sonuçlara göre Aktif Kaspaz-3 hücre sayıları ortalaması; SF2 grubunda $3,600 \pm 0,173$, APAP2 grubunda $7,000 \pm 0,1734$, Tedavi grubunda $4,400 \pm 0,200$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; APAP2 grubu SF2 grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir artma bulundu ($p=0,027$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 49)



Şekil 49: Grupların Aktif Kaspaz-3 (+) hücre sayısı

*; SF2 grubuyla karşılaştırıldığında anlamlılık gösteren grup ($p < 0,05$)

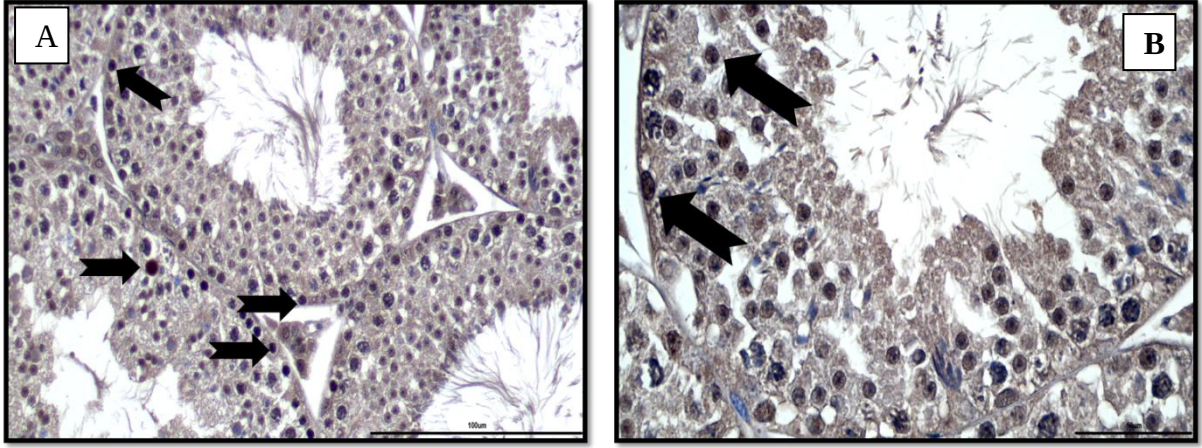
SF2 grubu kesitleri incelendiğinde, bazı seminifer tübüllerde apoptotik hücrelerin olduğu tespit edildi. Histolojik verilerde olduğu gibi seminifer tübüllerin yapısının düzgün olduğu gösterilmektedir (Şekil 50).



Şekil 50: SF2 grubu testis kesiti.

Siyah ok ile apoptotik hücre gösterilmiştir. **A:** X20 **B:** X40

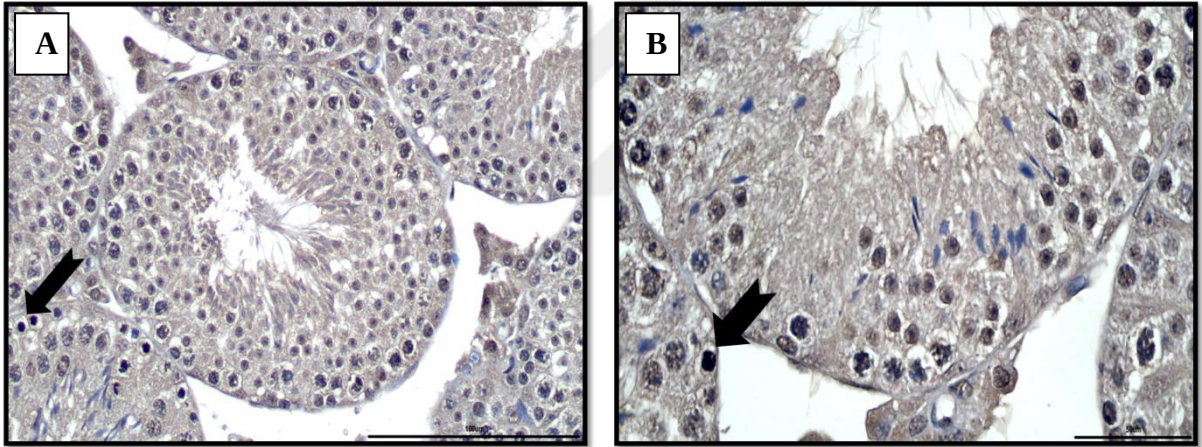
APAP2 grubuna ait testis kesitleri incelendiğinde, çok sayıda dejenere olmuş seminifer tübül varlığı ve çok miktarda apoptotik hücre gözlemlendi (Şekil 51).



Şekil 51: APAP2 grubu testis kesiti.

Siyah ok ile apoptotik hücreler gösterilmektedir. **A:** X20 **B:** X40

Tedavi grubu testis kesitleri incelendiğinde, apoptotik hücre varlığı gözlemlendi. Ancak bu hücrelerin oranının, APAP2 grubuna göre azaldığı belirlendi (Şekil 52).



Şekil 52: Tedavi grubu testis kesiti.

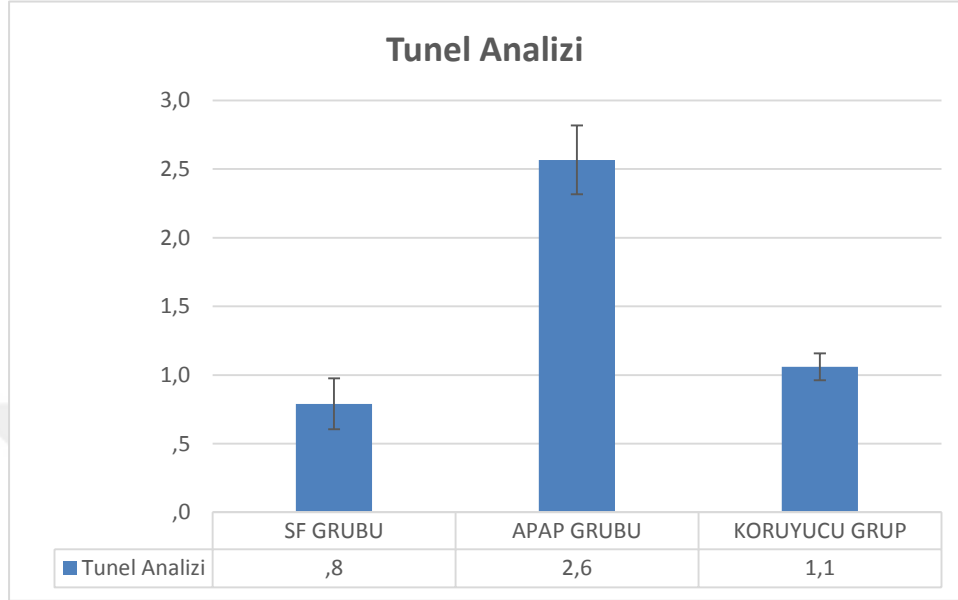
Siyah ok ile apoptotik hücreler gösterilmektedir. **A:** X20 **B:** X40

4.5.2. TUNEL İmmünohistokimyasal Değerlendirmesi

Deneklerden elde edilen testis kesitlerinde DNA hasarına sahip hücrelerin analizini yapmak için TUNEL immün boyama protokolü uygulandı. Image J programını kullanarak seminifer tübüller değerlendirildi. Her preparatta X20 büyütmede, 10 ayrı tübül incelendi.

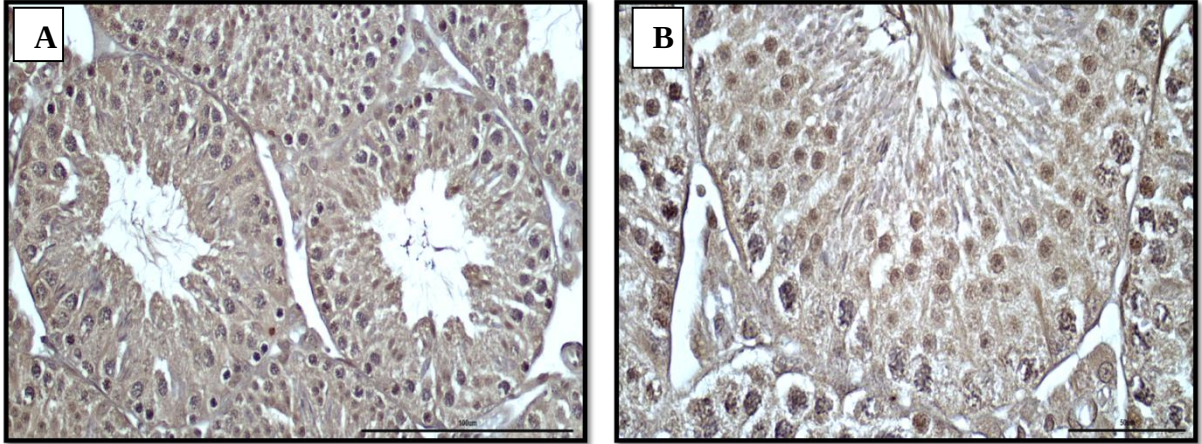
Elde ettiğimiz verilere göre TUNEL pozitif hücre sayısı ortalamaları; SF1 grubunda $0,793 \pm 0,185$, APAP1 grubunda $2,566 \pm 0,250$, Koruyucu etki grubunda $1,060 \pm 0,098$ değerleri

elde edildi. Gruplar arasından anlamlı bir fark görülmemektedir. (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 53)



Şekil 53: Grupların TUNEL (+) hücre sayısı

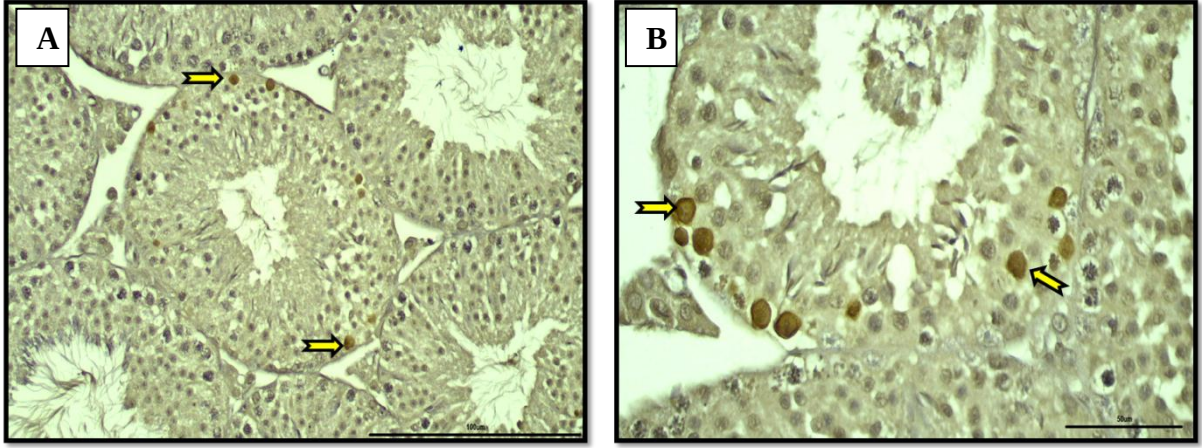
SF1 grubuna ait kesitleri incelediğimizde, tübüllerin normal yapıda olduğunu ve birkaç tübülde apoptotik hücrelerin varlığı gözlemledik (Şekil 54).



Şekil 54: SF1 grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.

A: X20, **B:** X40.

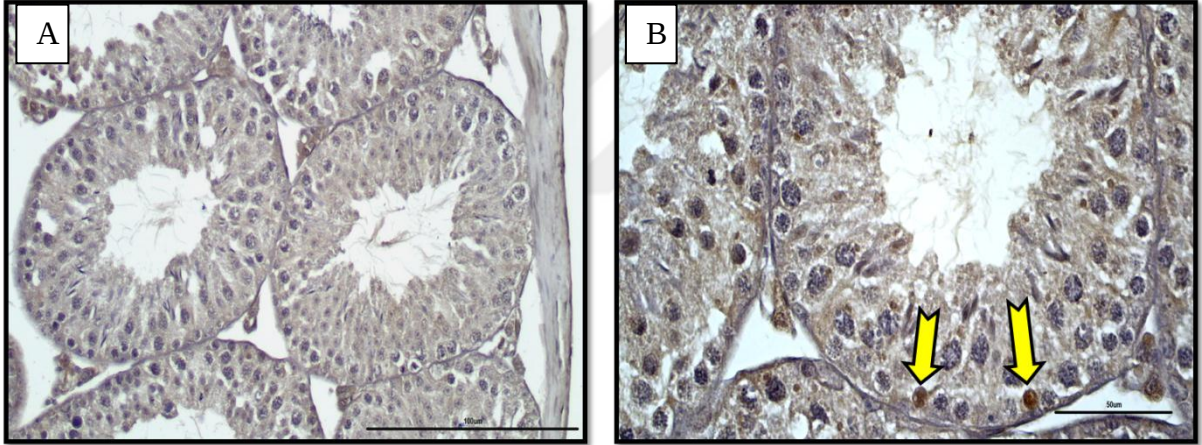
APAP1 grubuna ait kesitler incelendiğinde, çok sayıda dejenere olmuş seminifer tübül varlığı ve çok miktarda apoptotik hücre gözlemlendi (Şekil 55).



Şekil 55: APAP1 grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.

A: X20, **B:** X40. **Sarı ok** ile apoptotik hücreler gösterilmektedir.

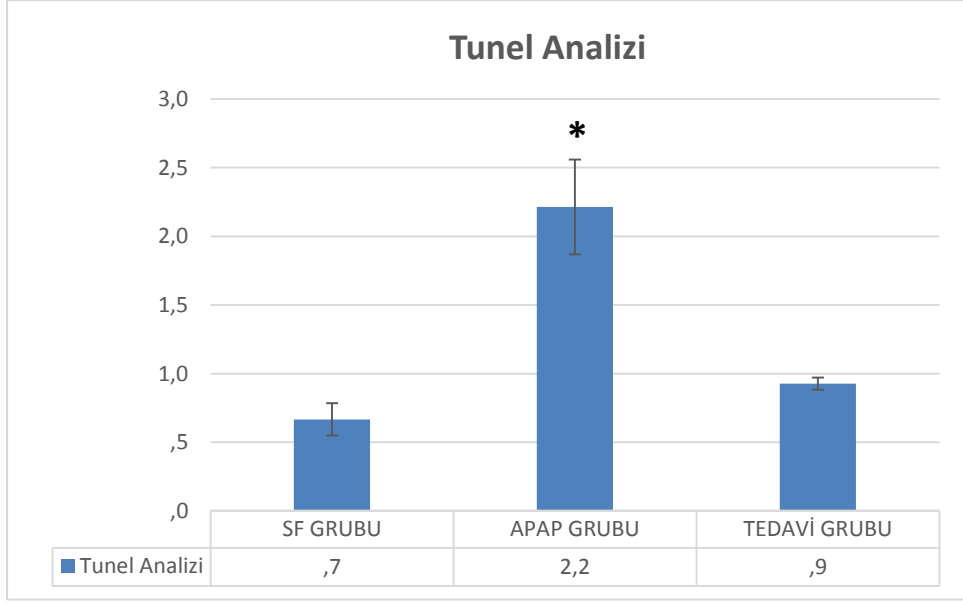
Koruyucu etki grubuna ait kesitler incelendiğinde, apoptotik hücre varlığı gözlemlendi. Ancak bu hücrelerin oranı, APAP1 grubuna göre azaldığı belirlendi (Şekil 56).



Şekil 56: Koruyucu etki grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.

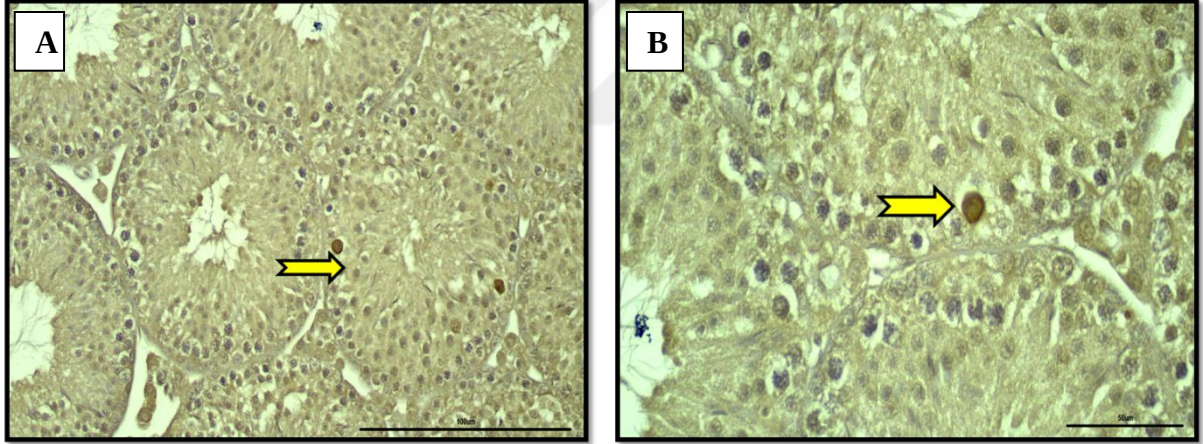
A: X20, **B:** X40. **Sarı ok** ile apoptotik hücreler gösterilmektedir.

Elde ettiğimiz verilere göre TUNEL pozitif hücre sayısı ortalamaları; SF2 grubunda $0,666 \pm 0,205$, APAP2 grubunda $2,213 \pm 0,345$, Tedavi grubunda $0,926 \pm 0,043$ değerleri elde edildi. Tüm gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; APAP2 grubu, SF2 grubu ve Tedavi grubu ile kıyaslandığında anlamlı bir artış saptanmıştır ($p=0,032$). (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 57)



Şekil 57: Grupların TUNEL (+) hücre sayısı

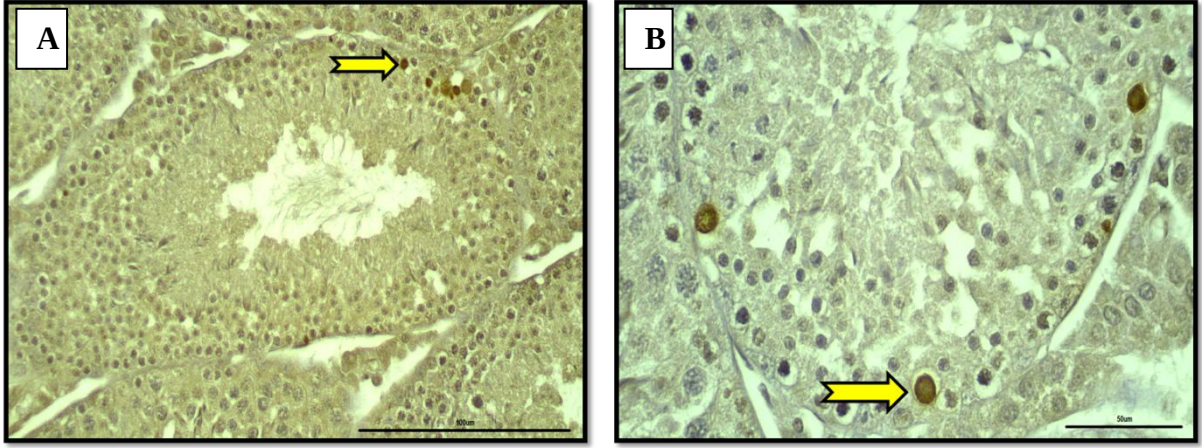
SF2 grubuna ait kesitleri incelediğimizde, tübüllerin normal yapıda olduğunu ve birkaç tübülde apoptotik hücrelerin varlığı gözlemledik (Şekil 58).



Şekil 58: SF2 grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.

A: X20, **B:** X40. **Sarı ok** ile apoptotik hücreler gösterilmektedir.

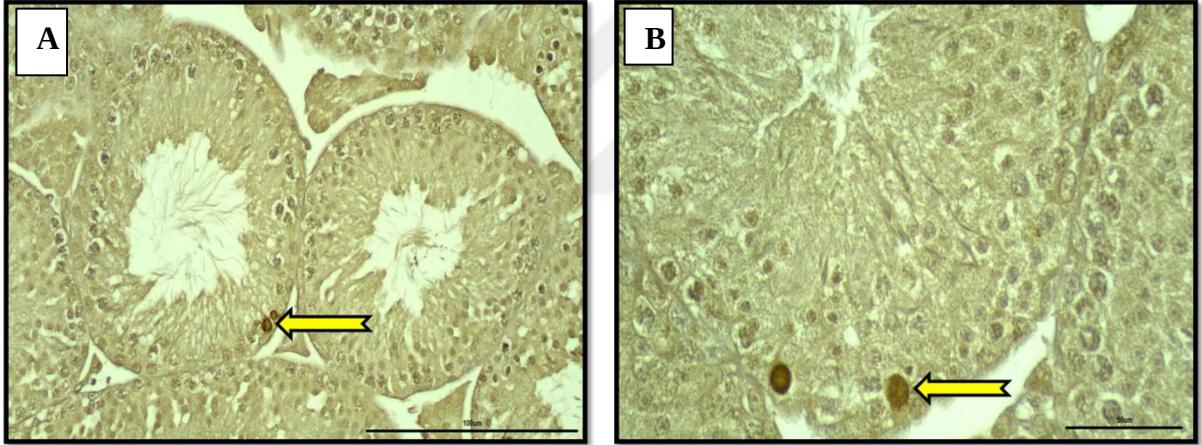
APAP2 grubuna ait kesitler incelendiğinde, çok sayıda dejenere olmuş seminifer tübül varlığı ve çok miktarda apoptotik hücre gözlemlendi (Şekil 59).



Şekil 59: APAP2 grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.

A: X20, **B:** X40. **Sarı ok** ile apoptotik hücreler gösterilmektedir.

Tedavi grubuna ait kesitler incelendiğinde, apoptotik hücre varlığı gözlemlendi. Ancak bu hücrelerin oranı, APAP2 grubuna göre azaldığı belirlendi (Şekil 60).



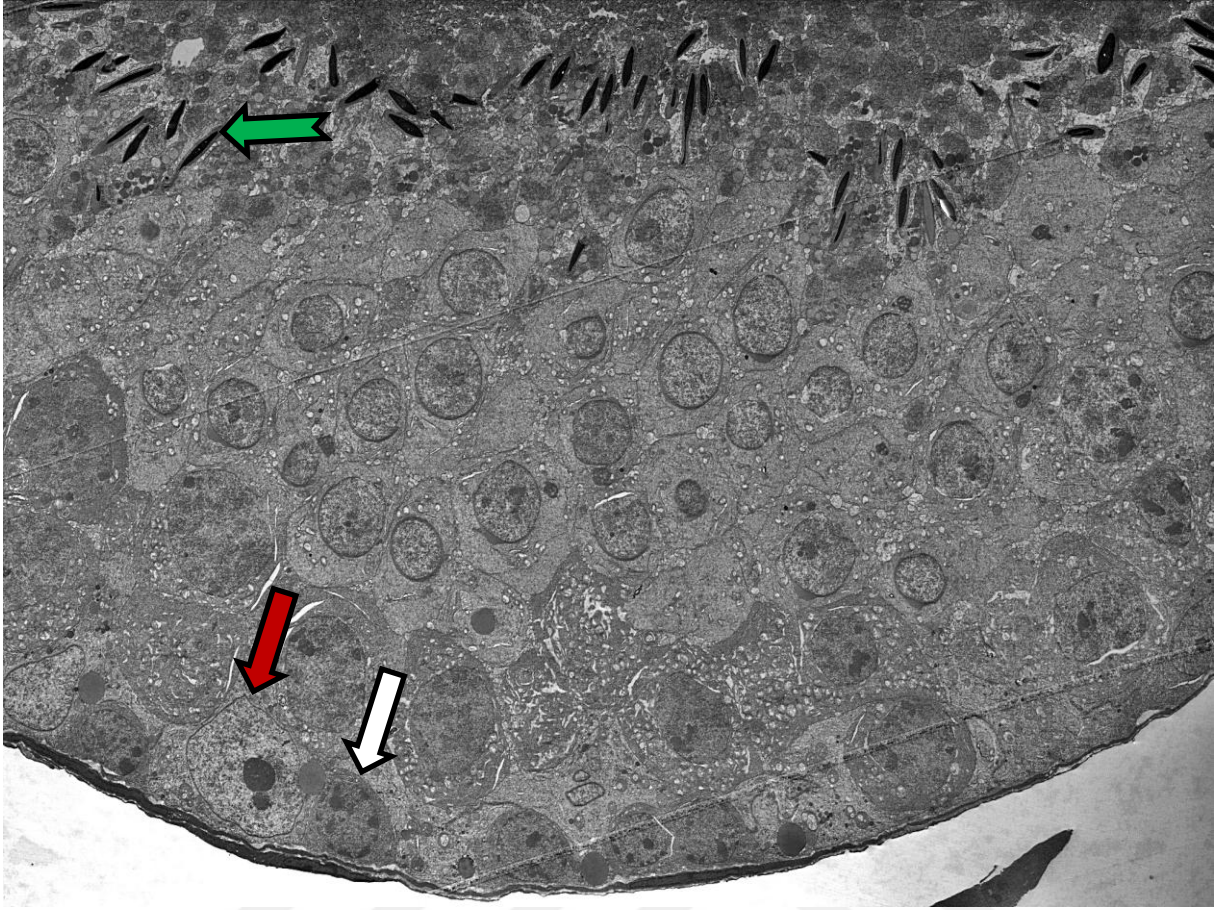
Şekil 60: Tedavi grubuna ait testisin histolojik (TUNEL) görüntüleri.

A: X20, **B:** X40. **Sarı ok** ile apoptotik hücreler gösterilmektedir.

4.6. Ultrastrüktürel Bulgular

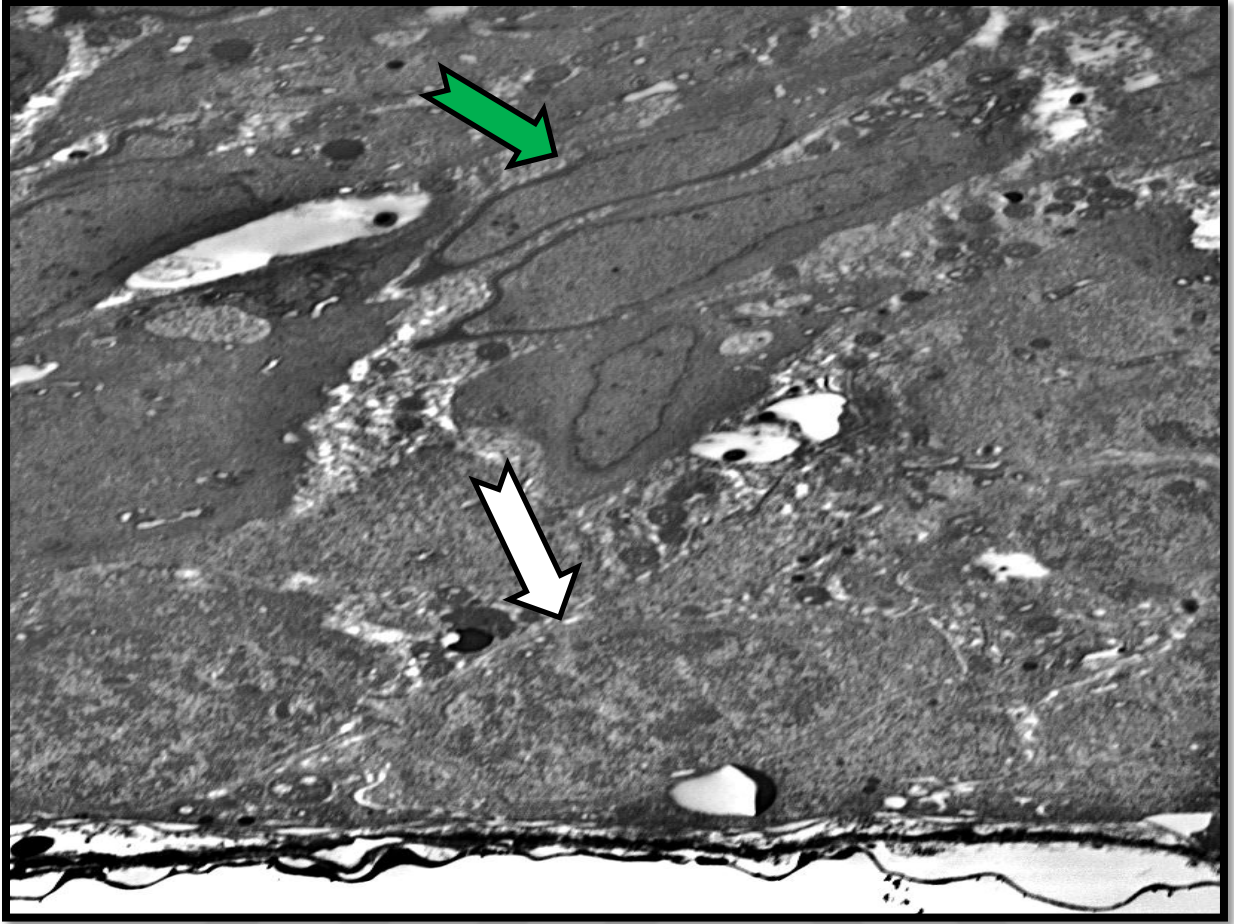
4.6.1. TEM bulguları

SF1 ve SF2 grubuna ait elektron mikroskopik kesitlerin incelemesinde bazal membran üzerine oturan düzenli morfolojide spermatogonyumlar ve sertoli hücreleri gözlemlendi. Sertoli hücreleri arasında morfolojileri düzgün sıkı bağlantılar da mevcuttu. Primer spermatositler sertoli hücre sitoplazmalarıyla sarılı olarak gözlemlendi (Şekil 61, 62).



Şekil 61: SF1 grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

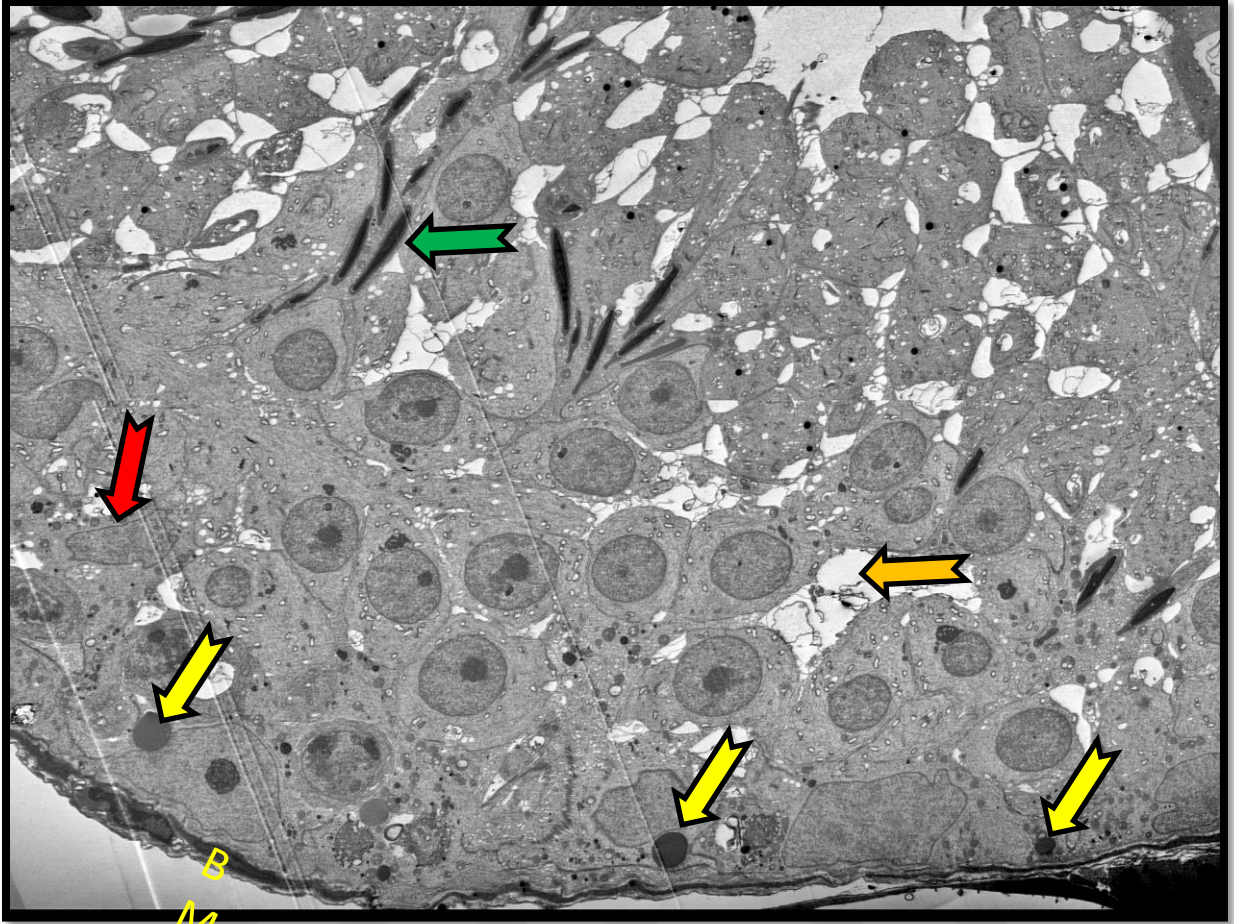
Yeşil ok ile olgun spermiumlar gösterilmektedir. **Kırmızı ok** ile A1 tip spermatogonya gösterilmektedir. **Beyaz ok** ile ara tip spermatogonya gösterilmektedir.



Şekil 62: SF2 grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

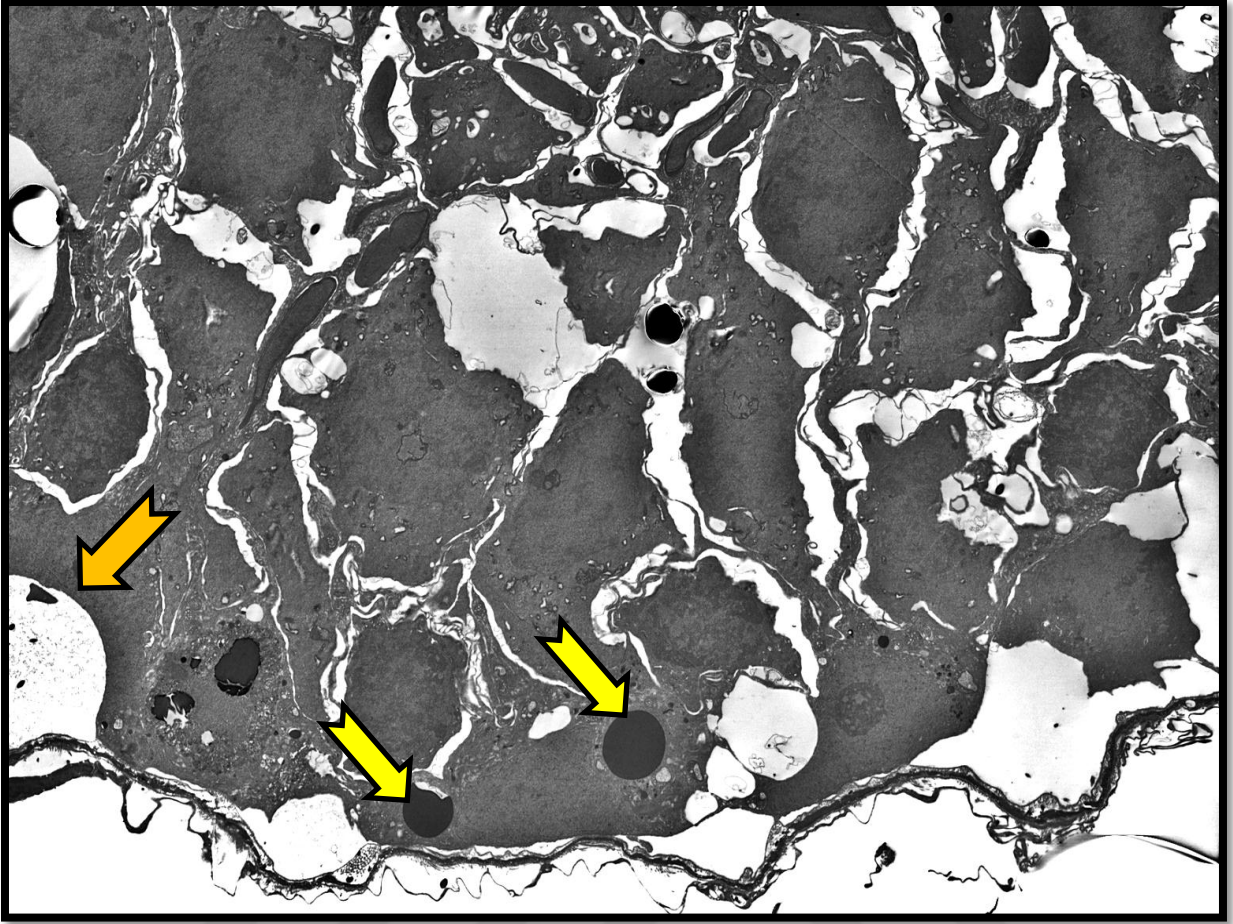
Yeşil ok ile olgun spermiumlar gösterilmektedir. **Beyaz ok** ile ara tip spermatogonya gösterilmektedir

APAP1 ve APAP2 grublarına ait kesitlerde birbirine komşu hücrelerin arasında boşluklar olduğu saptandı. Spermatogonyum, primer spermatositler ve sertoli hücresinde, sitoplazma ve hücre organallerinin kaybı sonucu büzüşme, ayrıca sitoplazmada lipid damlacıkları ile veziküller gözlemlendi (Şekil 63, 64).



Şekil 63: APAP1 grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

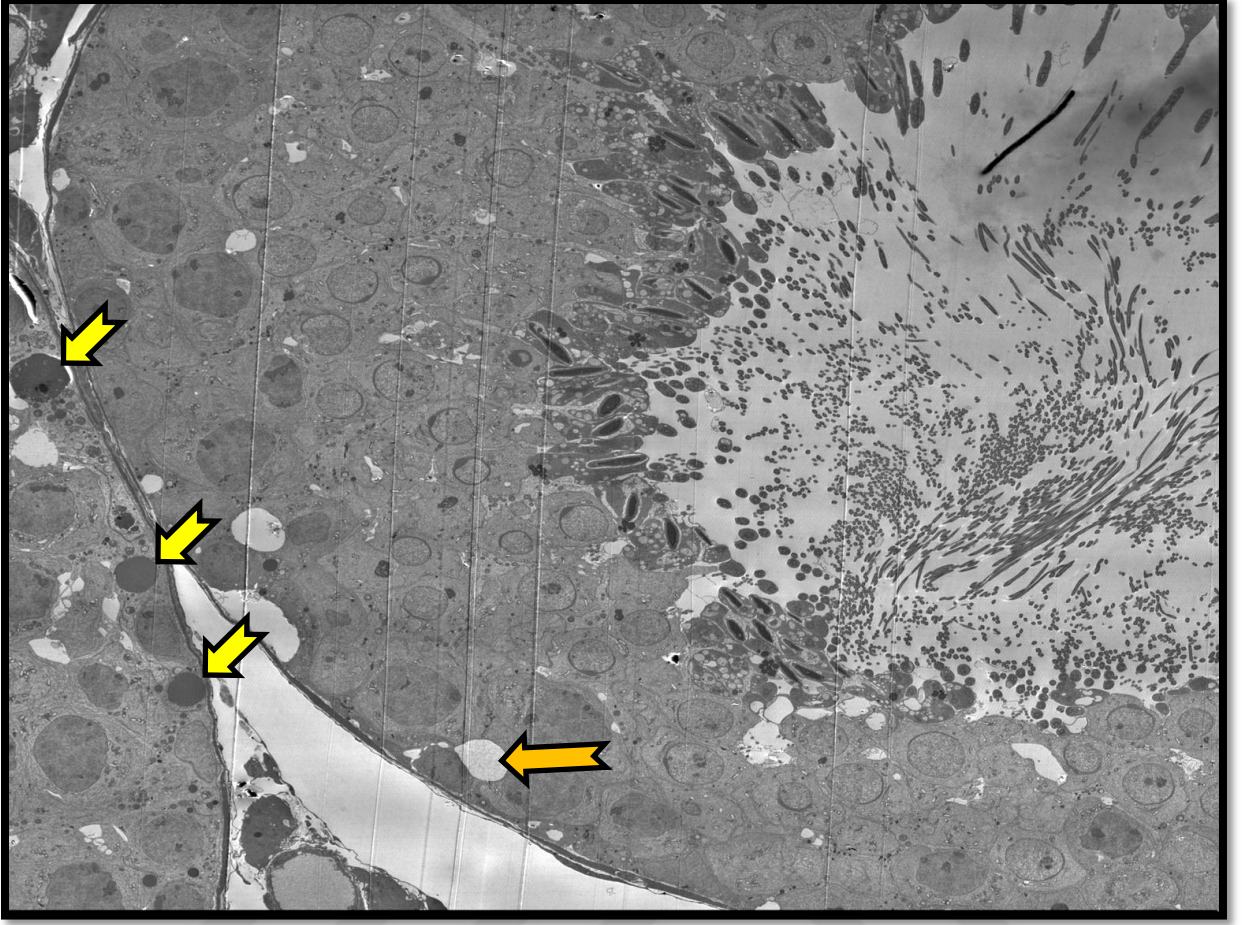
Yeşil ok ile olgun spermiumlar gösterilmektedir. **Kırmızı ok** ile sertoli hücresinin çekirdeği gösterilmektedir. **Turuncu ok** ile vakuolizasyon gösterilmektedir. **Sarı ok** ile sertoli hücresinin içerisindeki lipid damlacıkları gösterilmektedir.



Şekil 64: APAP2 grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

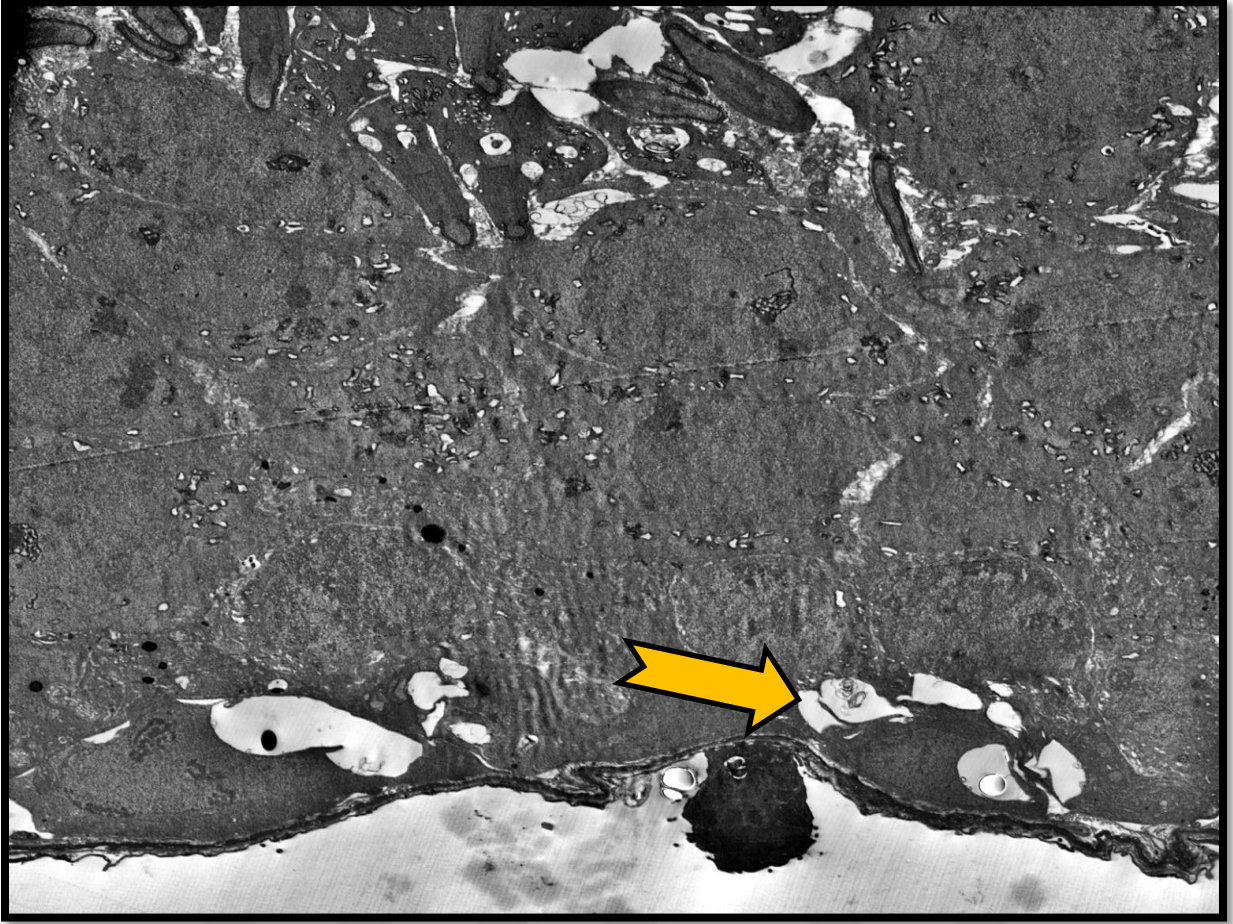
Sarı ok ile sertoli hücresinin içerisindeki lipit damlacıkları gösterilmektedir. **Turuncu ok** ile vakuolizasyon gösterilmektedir.

Koruyucu etki grubunda SF1 grubuna, Tedavi grubunda SF2 grubuna yakın görünüm olduğu saptandı. Bazal membranın kalınlığının normal olduğu ve hücreler arasında da boşlukların azaldığı gözlemlendi. Spermatogonyum, primer spermatositler ve sertoli hücrelerinde sitoplazmada lipit damlacıkları ve veziküllerin azaldığı gözlemlendi (Şekil 65, 66).



Şekil 65: Koruyucu etki grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

Sarı ok ile sertoli hücresinin içerisindeki lipid damlacıkları gösterilmektedir. **Turuncu ok** ile vakuolizasyon gösterilmektedir.



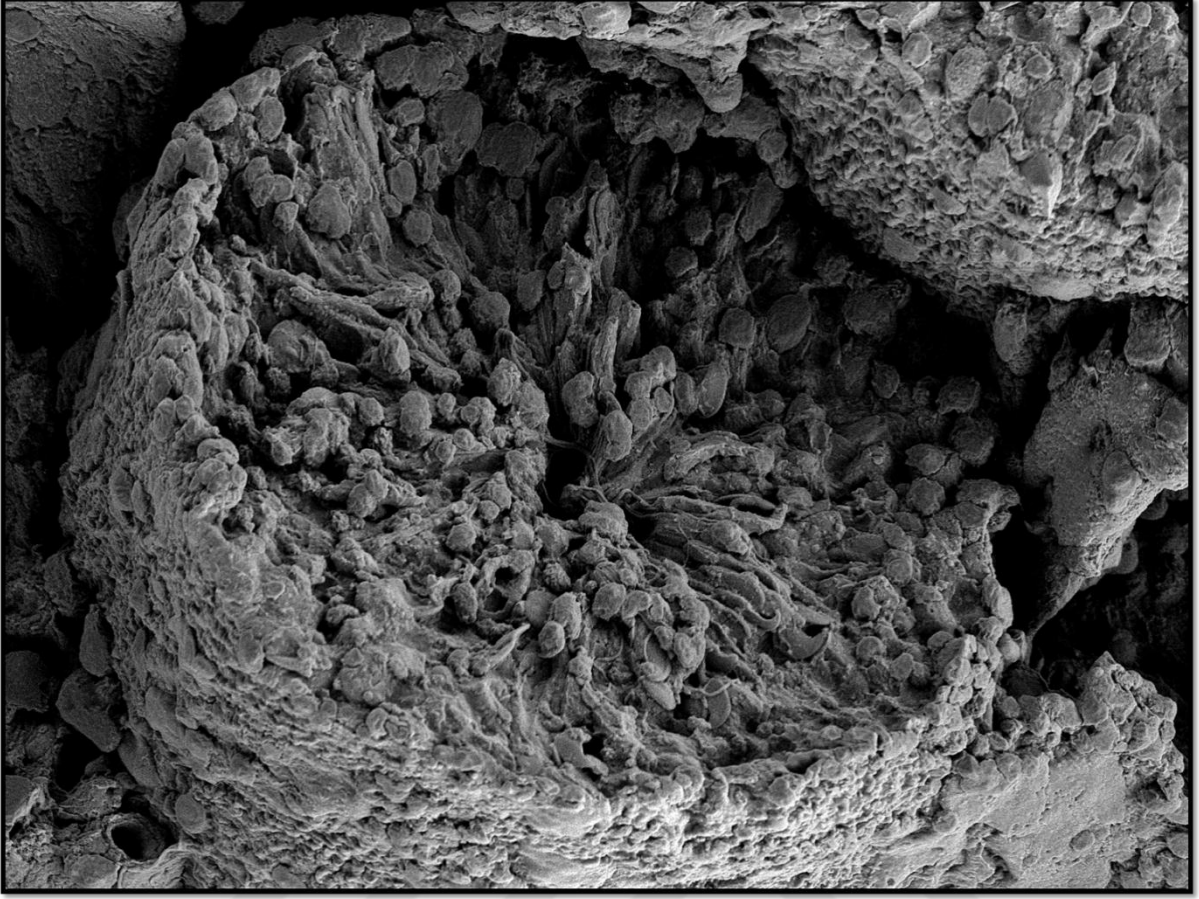
Şekil 66: Tedavi grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

4.6.2. SEM bulguları



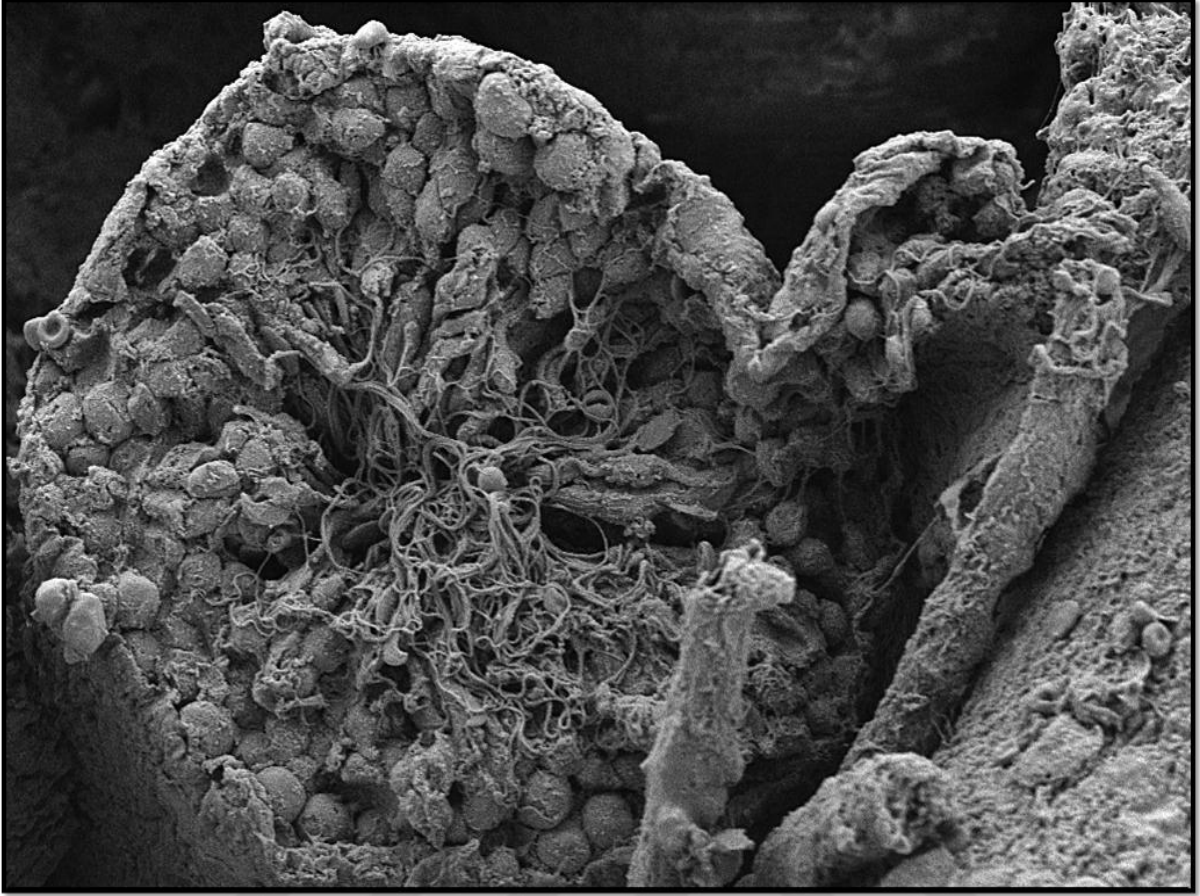
Şekil 67: APAP1 grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

500 X



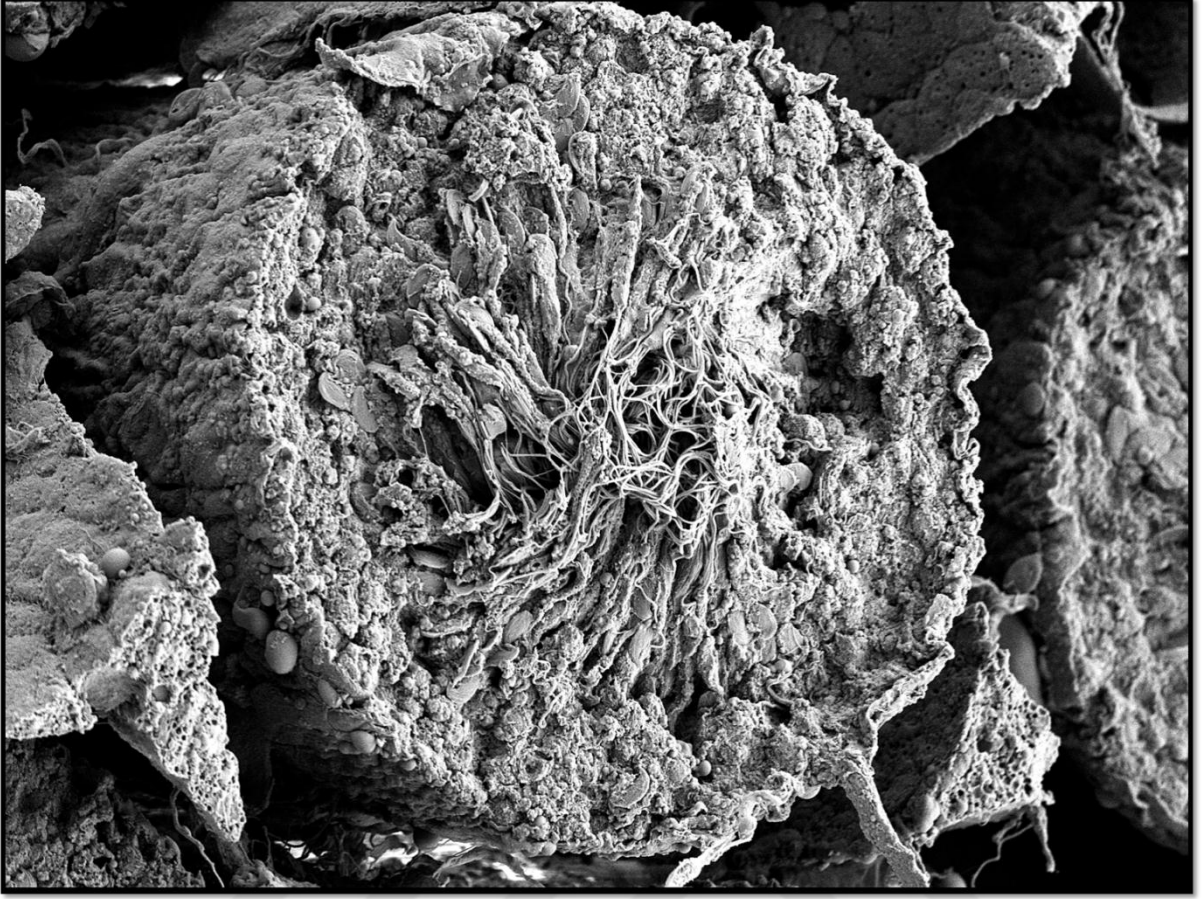
Şekil 68: APAP1 grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

1.85 K X



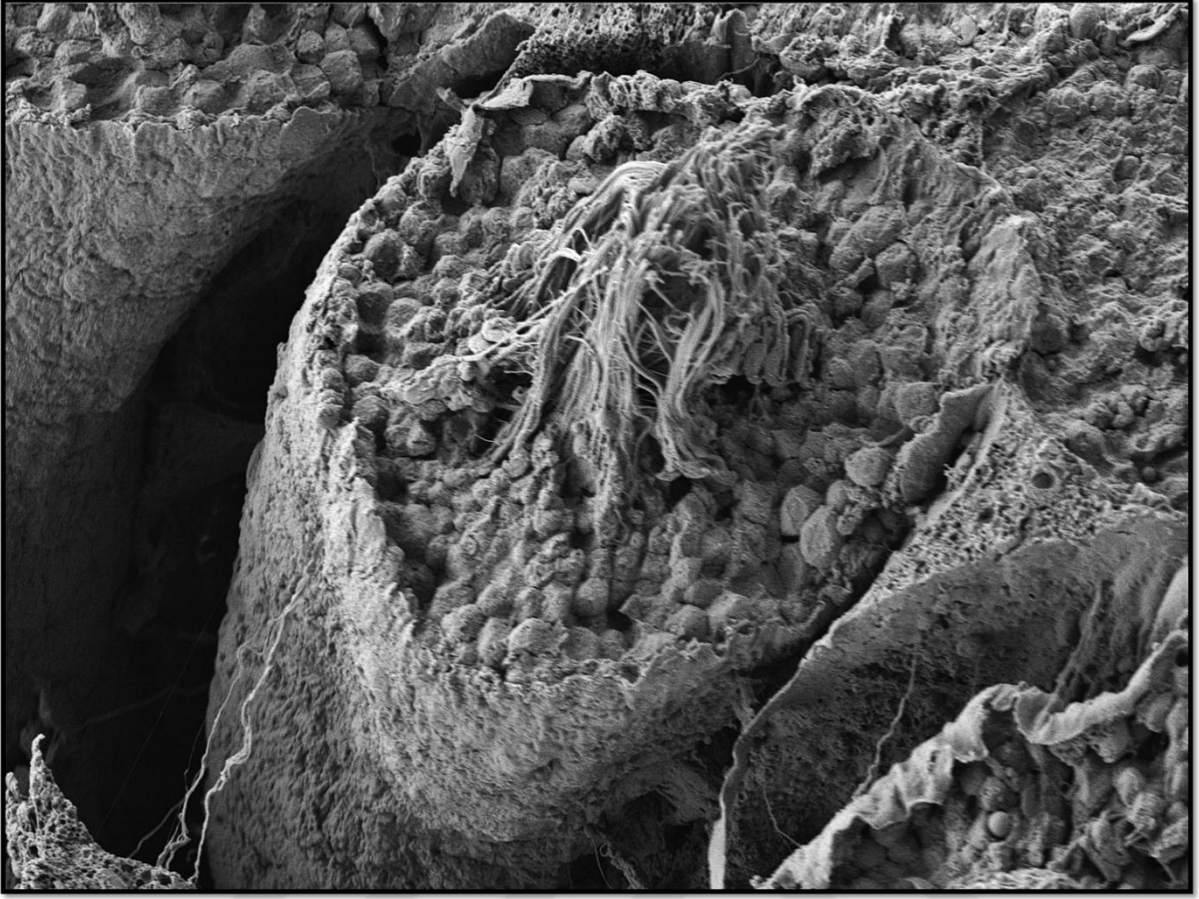
Şekil 69: SF2 grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

1.75 K X



Şekil 70: APAP2 grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

1.48 K X



Şekil 71: Tedavi grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

1.32 K X



Şekil 72:Tedavi grubuna ait testisin ultrastrüktürel yapısı

411 X

4.7. Enzim Analizleri

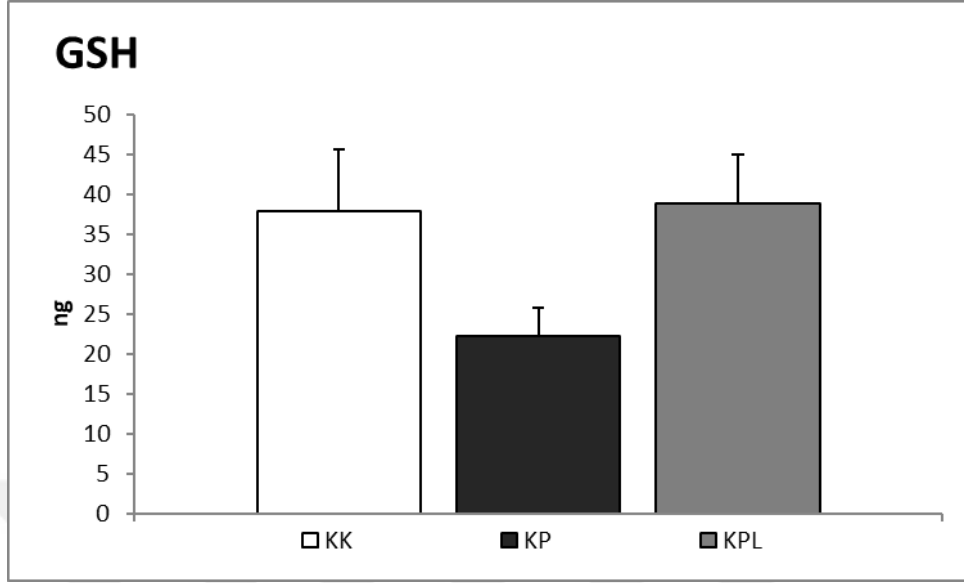
Fare sol testislerinin doku homojenatlarından MDA, GPx ve GSH enzim aktiviteleri ölçüldü.

4.7.1. GSH Değerlendirmesi

Tüm grupların GSH değerleri Tablo 8’de, ortalama GSH sonuçları Şekil 73 ve 74’te gösterilmektedir. APAP1 grubunun GSH değerleri SF1 grubuna göre düşük bulunmuştur fakat istatistiksel olarak anlamlılık yoktur ($p>0.05$). Koruyucu etki grubunda GSH değerleri APAP1 grubuna göre yüksek bulunmuştur fakat bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). SF1 ve Koruyucu etki grupları arasında GSH değerleri anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$).

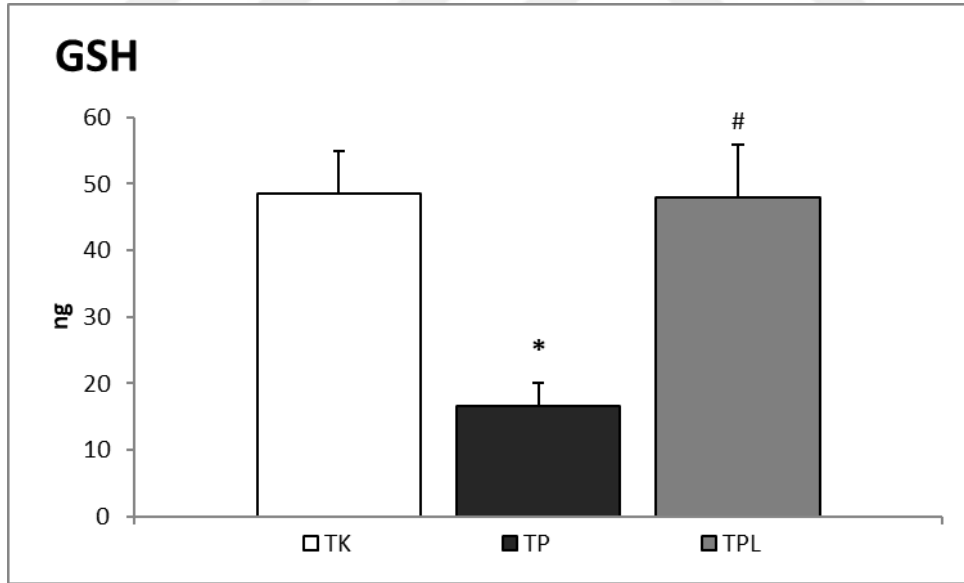
APAP2 grubunda GSH değerleri SF2 grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.003$). Tedavi grubunda GSH değerleri APAP2 grubuna göre anlamlı olarak yüksek

bulunmuştur ($p=0.004$). SF2 ve Tedavi grupları arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 73: Koruyucu etki grubu GSH enzim aktiviteleri

KK=SF1, KP=APAP1, KPL=,Koruyucu etki grubu



Şekil 74: Tedavi grubu GSH enzim aktiviteleri

TK=SF2, TP=APAP2, TPL=Tedavi grubu

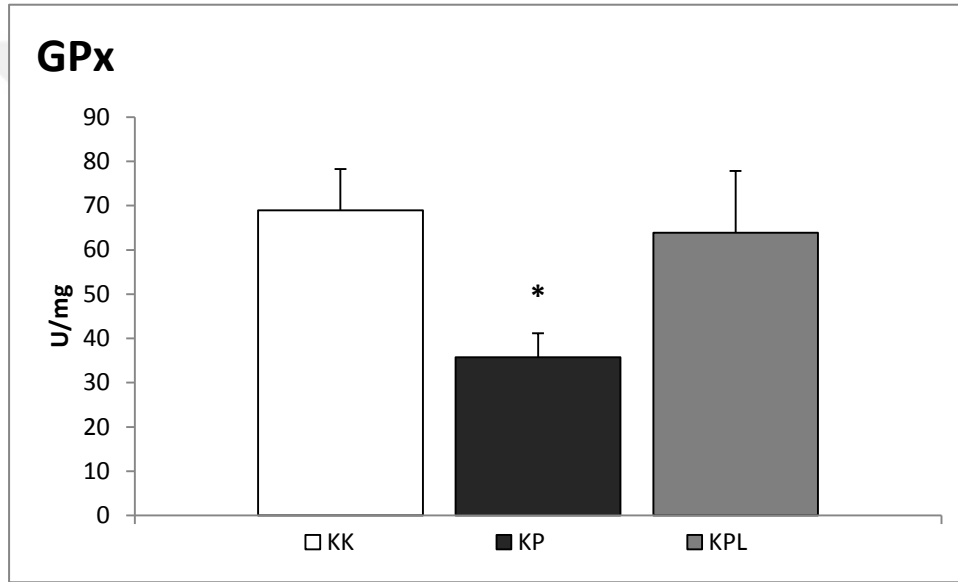
* TK grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)

TP grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)

4.7.2. GPx Değerlendirmesi

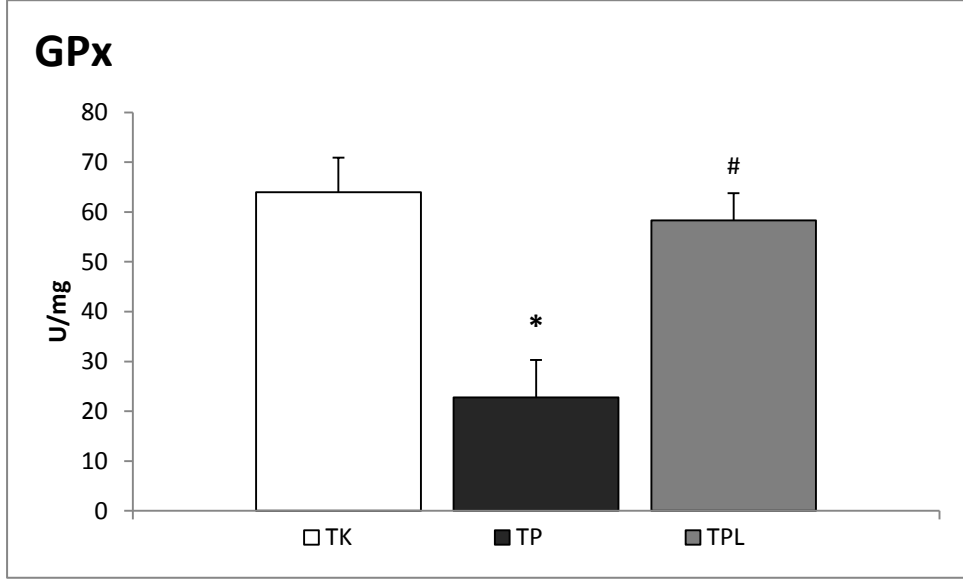
Tüm grupların GPx değerleri Tablo 8’de, ortalama GPx sonuçları Şekil 75 ve 76’te gösterilmektedir. APAP1 grubunda GPx değerleri SF1 grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.04$). Kouruyucu etki grubunda GPx değerleri APAP1 grubuna göre yüksek bulunmuştur fakat istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). SF1 ve Koruyucu etki grupları arasında GPx değerleri anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$).

APAP2 grubunda GPx değerleri SF2 grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.001$). Tedavi grubunda GPx değerleri APAP2 grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.003$). SF2 ve Tedavi grupları arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).



Şekil 75: Koruyucu etki grubu GPx enzim aktiviteleri

* KK grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)



Şekil 76: Tedavi grubu GPx enzim aktiviteleri

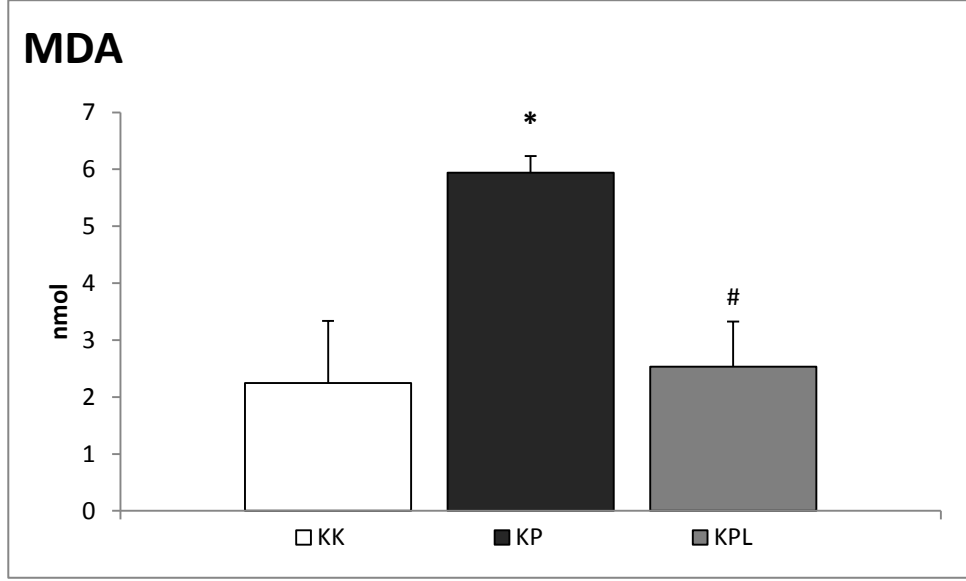
* TK grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)

TP grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)

4.7.3. MDA Değerlendirmesi

Tüm grupların MDA değerleri Tablo 8’de, ortalama MDA sonuçları Şekil 77 ve 78’de gösterilmektedir. APAP1 grubunun MDA değerleri SF1 grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p=0.007$). Koruyucu etki grubunda MDA değerleri APAP1 grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.011$). SF1 ve Koruyucu etki grupları arasında MDA değerleri anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$).

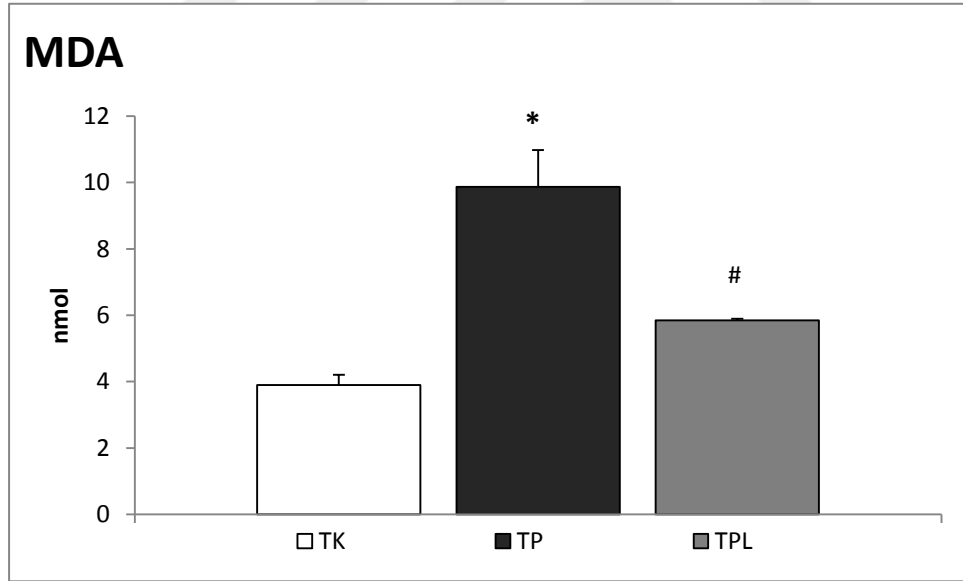
APAP2 grubunun MDA değerleri SF1 grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Tedavi grubunda MDA değerleri APAP2 grubuna göre anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p=0.001$). SF1 ve Tedavi grupları arasında MDA değerleri anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0.05$).



Şekil 77: Koruyucu etki grubu MDA enzim aktiviteleri

* KK grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)

KP grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)



Şekil 78: Tedavi grubu MDA enzim aktiviteleri

* TK grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)

TP grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.05$)

Tablo 8: Tüm gruplara ait enzim aktivitelerinin karşılaştırılması

Grup	MDA (nmol)	GSH (ng)	GPx (U/mg)
KK	2.24 ± 1.09	37.86 ± 7.76	68.96 ± 9.29
KP	5.93 ± 0.29*	22.26 ± 3.51*	35.74 ± 5.45*
KPL	2.53 ± 0.79 [#]	38.84 ± 6.12	63.84 ± 13.96
* KK grubuna göre anlamlı olarak farklı, # KP grubuna göre anlamlı olarak farklı			
TK	3.90 ± 0.30	48.48 ± 6.44	63.96 ± 6.97
TP	9.86 ± 1.10*	16.61 ± 3.37*	22.80 ± 7.52*
TPL	5.84 ± 0.04 [#]	48.01 ± 7.85 [#]	58.32 ± 5.46 [#]
* TK grubuna göre anlamlı olarak farklı, # TP grubuna göre anlamlı olarak farklı			

5.TARTIŞMA

Parasetamol, birçok ülkede çeşitli hastalıklarda ağrı kesici, ateş düşürücü ve grip için semptomatik tedavi olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bununla birlikte, doktorlar tarafından önerilen dozlarda alındığında genellikle güvenli olduğu kabul edilir. Bu ilacın yaygın kullanımı, toksikolojik yan etkilerine karşı daha sağlam önlemler alınmasını sağlar. İlacın toksik etkileri karaciğer, böbrekler ve testisler dahil olmak üzere belirli doku türlerinde görülür. APAP'ın yan etkilerinin artırması reaktif oksijen türevlerinin artmasına bağlı olabilir. ROT fizyolojik olarak üretilir ve sperm olgunlaşması, sperm-oosit etkileşimleri ve sperm hücrelerinin kapasitansı gibi bazı hücre mekanizmaları için gereklidir (116).

ROT düzeylerinin oksidatif strese (OS) neden olduğu ve genellikle bu durumda, vücuttaki oksidan/antioksidan durumunun dengesi bozulduğu ve bu dengesizliğin düzeltilmemesi durumunda dokuların zarar görebileceği bilinmektedir. Artan ROT seviyeleri çeşitli fizyolojik faktörlerin neden olduğu lipid peroksidasyonundan kaynaklanabilir, ayrıca spermatolojik parametreler, üreme sistemi ve dolayısıyla erkek fertilitesi üzerinde olumsuz etkileri vardır (116).

Ratnasooriya ve Jayakody tarafından yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre, uzun süreli APAP toksisitesi, erkek sıçanlarda doğurganlık oranlarında, cinsel performansta, libido ve cinsel güçte azalmalara neden olmaktadır. Bu APAP yan etkilerinin tersine çevrilebilir olmasına rağmen, bir antioksidan bileşik ile tedavi, hasara karşı koruma veya hafifletilmesinde yararlı olabilir (117).

Yano ve Dolder, 4.4 mmol/kg'lık dozlarda 5, 10 ve 50 günlük tek APAP enjeksiyonlarından sonra, erkek sıçanlarda testiküler değişikliklerin gözlemlendiğini bildirmiştir. Erkek sıçan testisi üzerinde yapmış olduğu çalışmada APAP uygulamasından sonra seminifer dokuda çeşitli modifikasyonlar olduğunu göstermişlerdir. APAP'ın seminifer tübüllerde deformasyona neden olduğu ve ayrıca kan damarlarında dilatasyon ve interstisyel dokuda ödem geliştiği bildirilmiştir. Seminal epitel seviyesinin her yerinde 5. ve 10. günde yapılan sakrifikasyonlarda bazal hücreler arasındaki bağlantı kaybının sertoli hücre fragmentasyonundan kaynaklandığı bildirilmiştir. Spermatik hücrelere destek ve besin sağlayan bu hücrelerdeki defekt, spermatik hücrelerin kaybına sebep olmuştur (13).

Bizim çalışmamızda, benzer şekilde APAP ile oluşturulan testis hasarında, APAP1 ve APAP2 gruplarının seminifer tübüllerinde deformasyonlar görüldü. APAP1 ve APAP2 gruplarında, kan damarlarında dilatasyon ve interstisyel dokuda ödem geliştiği görüldü.

benzer şekilde, APAP1, APAP2, Koruyucu etki ve Tedavi gruplarında sertoli hücreleri ile bu hücrelere yakın hücreler arasında vakuolizasyon gözlemlendi. Sertoli hücrelerinde APAP1 ve APAP2 gruplarında oldukça büyük lipid damlacıkları gözlemlendi.

Literatürde APAP hasarının bazal membrana olan etkisini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. APAP hasarının bazal membran kalınlıkları ilk kez bizim çalışmamızda ölçülmüştür. APAP1 ve APAP2 grubunun bazal membran kalınlıklarında anlamlı bir artış gözlenmiştir. Koruyucu etki ve Tedavi gruplarının bazal membran kalınlıkları SF1 ve SF2 gruplarına benzerlik göstermiştir.

Monsees TK ve arkadaşları, sertoli hücrelerindeki bu defektin dokuda kayıplara ve infertiliteye sebep olabileceğini bildirmişlerdir (14).

Kristensen ve arkadaşlarının prenatal erkek sıçanlarda yapmış oldukları çalışmada, APAP'a mağruz kalmış prenatal sıçanların, prenatal normal sıçanlara oranla testesteron miktarında azalma olduğu bildirilmiştir (15).

Driesche S. ve arkadaşlarının yaptığı, insan fetal testisinin xenograft modelinde 7 günlük terapötik APAP doz uygulamasının testesteron üretimini düşürdüğünü bildirmişlerdir (16).

Literatürde APAP hasarının testise olan etkisini Johnsen testiküler biyopsi skorlaması ile inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. APAP hasarının Johnsen skorlaması ilk kez bizim çalışmamızda ölçülmüştür. APAP1 ve APAP2 grubunda skorlama değerlerinde azalma tespit edilmiştir fakat bu azalma anlamlılık göstermemiştir. Koruyucu etki ve Tedavi gruplarının skorlama değerleri ise SF1 ve SF2 gruplarına benzerlik göstermiştir.

Literatürde APAP ile oluşturulan testis hasarında seminifer tübül çapını ve epitel yüksekliğini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. APAP hasarında seminifer tübül çapı ve epitel yüksekliği ilk kez bizim çalışmamızda ölçülmüştür. APAP1 ve APAP2 grubunda anlamlı bir azalma gözlenmiştir. Koruyucu etki ve Tedavi gruplarının değerleri ise SF1 ve SF2 gruplarına benzerlik göstermiştir.

Literatürde APAP ile oluşturulan testis hasarında Tunika Albuginea kalınlığını inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. APAP hasarında Tunika Albuginea kalınlığı ilk kez bizim çalışmamızda ölçülmüştür. APAP1 ve APAP2 grubunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Koruyucu etki ve Tedavi gruplarının değerleri ise SF1 ve SF2 gruplarına benzerlik göstermiştir.

Aksu ve ark. APAP tedavisinin, GSH, CAT, GSH-px ve SOD aktiviteleri de dahil olmak üzere sperm motilitesinde, canlı sperm oranlarında ve oksidan enzim seviyelerinde azalmaya neden olduğu göstermişler; bununla birlikte sperm başındaki anormallikler, spermin orta kısmı ve spermin bütünü de dahil olmak üzere sperm anormalliği oranlarını arttırdığını gözlemlemişlerdir. Nitekim MDA (lipit peroksidasyonunun bir göstergesi) seviyelerindeki artışlar, ROT'un aşırı üretimi ile ilişkili olduğunu ve muhtemelen APAP'ın yan etkilerinden sorumlu olduğunu bulmuşlardır. APAP toksisitesi, spermatolojik kaliteyi düşürürken, testis dokularında apoptoz ve MDA düzeylerini artırdığını bulmuşlardır (118).

Bizim çalışmamızda, benzer şekilde, kaspaz-3 aktivitesi açısından en düşük değerler SF1 ve SF2 gruplarında, en yüksek değerleri ise APAP1 ve APAP2 gruplarında görüldü. benzer şekilde, APAP1 ve APAP2 gruplarının GPx seviyelerinin anlamlı olarak azaldığı görüldü. Tedavi grubunun GPx seviyelerinin APAP2 grubuna göre anlamlı olarak arttığı görüldü. Koruyucu etki ve Tedavi gruplarının seviyelerinin SF1 ve SF2 gruplarına benzer olduğu görüldü.

Literatürde APAP ile oluşturulan testis hasarında TUNEL immünohistokimyasal değerlendirmesini inceleyen çalışmaya rastlanmamıştır. APAP hasarında TUNEL pozitif hücre sayısı ilk kez bizim çalışmamızda ölçülmüştür. APAP1 grubunda artış gözlenmiştir ancak anlamlı değildir. APAP2 grubunda anlamlı bir artış gözlenmiştir. Koruyucu etki ve Tedavi gruplarının değerleri ise SF1 ve SF2 gruplarına yakın değerler göstermiştir.

Wiger R. ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, fare testisi üzerinde 5 günlük APAP yüksek doz uygulamasında testis ağırlığının kontrol grubuna göre düşük olduğunu bildirmişlerdir. 5. ve 10. günlerdeki sakrifikasyon sonucunda erken pakiten spermatositlerde büyük bir azalma olduğunu ve bunun da spermiyogenezde aksamaya, gecikmeye neden olduğunu bildirmişlerdir. 27. ve 33. günlerde spermelerde anormal kromatin yapısını ve vas deferenste bulunan sperm miktarında artış tespit etmişlerdir. Sonuç olarak yüksek dozda APAP uygulamasının testiste DNA sentezini inhibe ettiğini bildirmişlerdir (10).

Bizim çalışmamızda benzer şekilde APAP ile oluşturulan testis hasarında APAP1 ve APAP2 gruplarının testis ağırlıklarının SF1 ve SF2 gruplarına göre düşük olduğu görüldü.

Salvesen ve arkadaşları kaspaz-3, memeli hücrelerinde apoptozun temel aracı olarak tanımlanabilir çünkü diğer kaspaz enzimlerini aktive ederek apoptotik süreci başlattığını bulmuşlar. Bununla birlikte, kaspaz-3 nükleer ve sitosolik substratların bölünmesine, kromatin yoğunlaşmasına, DNA fragmentasyonuna ve apoptotik cisimlere neden olur

olduğunu bulmuşlardır (119). Gach ve ark. Alternatif olarak, ROT, bir mitokondriyal bağımlı yolla apoptozu teşvik eder (120). Boulares ve ark. PRC'nin insanlarda lenfosit ve hepatoma hücrelerinde apoptozu tetiklediğini, hiçbir çalışmada PRC'nin testiküler dokudaki apoptotik aktivite üzerindeki etkisini incelemmediğini bildirmişlerdir (121). Aksu ve ark. kaspaz-3 aktivitesi açısından, en düşük değerleri kontrol grubunda, en yüksek değerleri APAP grubunda bulmuşlardır (118).

Ekalou ve ark. tedavi edilen sıçanların spermatozoasında sperm başı anormalliklerinin anlamlı bir şekilde arttığı gözlemiştir. Erkek albino sıçanların formaldehit ve analjeziklerle tedavisinden sonra anormal sperm insidansında artışlar bildirilmişlerdir (122). Hole ve ark. çeşitli anti-enflamatuar analjezikler ve bazı steroidler prostaglandin üretimini inhibe ettiğini ve prostaglandinlerin inhibisyonunun spermatogenezi engellediği bildirmişlerdir (124). Aspirin, parasetamol ve kafein içeren analjeziklerin sperm başı anormalliklerine neden olduğu kesin mekanizma tam olarak belirlenmemesine rağmen, genellikle sperm hücresine zarar veren maddeler üç mekanizmadan biriyle meydana gelebilir: fizyolojik, sitotoksik ve genetik. Çeşitli kimyasallara maruz kalmak, morfolojik anormallikler, testis DNA'sındaki değişikliklere (delesyonlar, nokta mutasyonu veya her ikisinin bir kombinasyonu), spermatozoanın farklılaşma sürecine, hipofiz-hipotalamik veya seks hormonal etkilere bozan değişikliklere neden olabilir (123,125-127).

Garrity ve ark. TUNEL değerlendirmesi, apoptotik hücrelerin kantifikasyonu için DNA fragmentasyonunu tespit etmek için kabul edilen bir teknik olmasına rağmen, apoptoza bağlı olarak hücresel DNA fragmentasyonunu, doku takip koşullarından türetilen kimyasal olarak üretilmiş DNA fragmentasyonuna göre ayırt etmez şeklinde bildiride bulunmuşlardır (128).

Moldeus ve ark. testis, kimyasal aktivasyona sahip mikrosomal enzimlerin kayda değer seviyelerini içerir ve detoksifikasyon için GSH konsantrasyonları ve seminal veziküller asetaminofen'i reaktif bir metabolite dönüştürdüğünü bulmuşlardır (129). APAP'ın spesifik proteinlere kovalent bağlanmasının immünohistokimyasal analizi , subtoksik dozdan toksik doza artış meydana geldikçe bazı hedef proteinlerin daha rahat hedef haline gelmesinin protein arıllasyonu ile gerçekleştiğini bulmuşlardır (130).

Micheli ve ark. testise parasetamol ile hasar verdikten sonra NAPQI metaboliti etkisiyle testis üzerinde GSH değerlerini ölçtüklerinde 4. ve 8. saatlerde GSH'ın düştüğünü bulmuşlardır (131).

Bizim çalışmamızda, benzer şekilde, APAP1 grubunun GSH seviyelerinde bir azalma olduğu ancak anlamlı olmadığı, APAP2 grubunda ise anlamlı bir azalma olduğu görüldü. Tedavi grubunun GSH seviyelerinin APAP2 grubuna göre anlamlı olarak arttığı görüldü. Koruyucu etki ve Tedavi gruplarının seviyelerinin SF1 ve SF2 gruplarına benzer olduğu görüldü.

Organizma içerisinde LK güçlü antioksidan özellikteki bileşiktir ve özellikle lipid peroksidasyonunu belirgin şekilde inhibe etmektedir. Potansiyel antioksidan özelliklerinden dolayı bu yapıların oksidatif strese bağlı kronik hastalıkların önlenmesinde faydalı olduğu bilinmektedir(20). ROT sentezini hızlandıran Fe^{++} (demir)'le kompleksler oluşturarak lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır. L-karnitin antioksidan kapasiteyi artırarak doku bozulmasını azaltabilir. Gençlere oranla yaşlı ratlardaki lipid peroksidasyonun artması ve antioksidan etkiye sahip olan SOD, glutatyon ve katalaz, C ve E vitaminlerinin azalması ve karnitin ilaveleri ile artış gösterebilmeleri bu görüşü desteklemektedir (21).

LK en çok; yaşlanmayı geciktirme , hafızanın (özellikle Alzheimer ve Parkinson gibi hastalıklardan korunmada) geliştirilmesi, kalp krizi ve diğer kalp rahatsızlıklarının önlenmesinde koruyucu olarak, perifer damar hastalıklarının ve kronik böbrek yetmezliğinin, sinirsel rahatsızlıklar ve depresyonun tedavilerinde, dengeli beslenme, diyet, obezite çalışmaları ve diyabet tedavisi, sperm olgunluğu ve hareketliliğini geliştirme ile sporcu sağlığı ile ilgili konularda fonksiyonel ve tedaviye destek amacı ile kullanım alanı bulmaktadır (20,21).

Karnitin spermatozoalarda ve epididimiste oldukça fazla miktarda bulunur. Karnitin desteği farelerde sperm kalitesini artırır ve fiziksel stres sonucu oluşan hasarı azaltır. Karnitin antiapoptotik etki olarak testiste hasar giderilmesine katkı sağlar. En güçlü hasar giderici etkisi germ hücreleri üzerindedir. Karnitin erkek infertilite deneylerinde oldukça fazla kullanılmaktadır (22).

Ahmed M. ve arkadaşları, yaptıkları gama ışını kaynaklı testis disfonksiyonunda, LK spermatogenezis alakalı genlerin regülasyonunda testiküler aktiviteyi arttırdığını bulmuşlardır. Sperm başı anormalliklerinin normal ve hasar gurubuna göre iyileştirdiğini söylemişlerdir (23).

Ramadan L. ve arkadaşları yapmış oldukları yüksek manyetik alan ile indüklenen testis hasarında LK belirgin bir şekilde testis hasarını iyileştirdiğini göstermişlerdir. Bunu da sperm kalitesi, günlük sperm sayımı ve hareketliliğe dayalı olarak yapmışlardır (25).

ZHU B. ve arkadaşları yaptıkları siklofosfamid ile indüklenen germ hücre apoptozunda, LK testosteron seviyesini arttırdığını, otofaji membranında bulunan LCS-III seviyesini arttırdığını ve germ hücre apoptozunun azaldığını bulmuşlardır. Bu da LK germ hücre apoptozunu nasıl azalttığını açıklar niteliktedir (24).

Hinton ve ark. l-karnitinin çeşitli toksik faktörlere karşı koruma yeteneği, antioksidan ve antiperoksidatif etkilerinden kaynaklandığını bulmuşlardır. L-karnitin, erkek genital organlarında yaygın olarak bulunan endojen bir madde olduğunu bulmuşlardır (132).

Bertelli ve ark. l-karnitin, ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından üretilen ROT oluşumunu önleyerek ve hücre zarına verdiği zararı azaltarak sperm hücrelerini oksidatif strese karşı kordüğünü bildirmişlerdir. L-karnitin ayrıca sperm motilitesine ve olgunlaşmasına doğrudan katkıda bulunduğu bildirmişlerdir. L-karnitin, hücresel enerji metabolizmasında ve yağ asiti β -oksidasyon yollarında bir kofaktör olarak rol oynadığını söylemişlerdir. Bu nedenle, hücre bölünmesinin gerçekleştiği ve hücresel düzeyde yüksek enerji devir hızlarının gözlemlendiği üreme biyolojisinde de ana işlevi olduğu düşünülmektedir sonucuna varmışlardır (133).

Wang ve ark., LC'nin astenozoospermili erkeklerin ejakülatör sperm motilitesini arttırabildiğini göstermiştir (134). Başka bir çalışmada, Shi ve ark. ayrıca testiküler sperm motilitesinin in vitro LK'ye maruz kaldıktan sonra iyileştiğini de göstermiştir (135).

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda APAP ile oluşturulan hasar modelinin testis dokusunda hasara yol açtığını gösterdik. Deneklerde hasar oluşmasıyla beraber dokudaki oksidatif stres ve reaktif oksijen türevlerinin, seminifer tübüllerde hasara yol açtığını, buna bağlı olarak spermatogenetik seri hücrelerinin apoptoza girdiğini saptadık.

Denek ağırlıkları ölçüldüğünde, APAP1 ve APAP2 grubunun denek ağırlıklarının azaldığını bulduk. Bu denek ağırlıklarındaki azalmaya APAP hasarının neden olduğunu düşünmekteyiz. Koruyucu etki grubuna ait deneklerin deney sonunda ağırlıklarının SF grubuna yakın olduğunu bulduk. Bunun LK'nın antioksidan benzeri koruyucu etkilerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Tedavi grubunun denek ağırlıklarının deney sonunda arttığını bulduk. Bunun LK'nın serbest radikallerin oluşumunu giderici etkisinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Deneklerin testis ağırlıkları ölçüldüğünde, APAP1 ve APAP2 grubunun denek ağırlıklarının azaldığını bulduk. Bu azalmaya APAP hasarının neden olduğunu düşünmekteyiz. Koruyucu etki ve Tedavi grubuna ait deneklerin testis ağırlıklarının SF1, SF2 grubuna yakın olduğunu bulduk. Bunun LK'nın antioksidan benzeri koruyucu etkilerinden kaynaklandığını düşünmekteyiz. LK'nın koruyucu ve tedavi etkisi grupları için olumlu etkileri vardır.

Testis dokusunda oluşturulan hasarı seminifer tübüllerde ve interstisyel aralıkta histolojik, immünohistokimyasal ve ultrastrüktürel olarak belirledik. Koruyucu etki ve Tedavi grubunda tunika albuginea kalınlığının, bazal membran kalınlığının, seminifer tübül epitel yüksekliğinin, seminifer tübül çapının SF1, SF2 grubuna benzer bir yapı gösterdiğini bulduk. Böylelikle LK'nın APAP hasar modeliyle oluşan çok yönlü hasarda koruyucu ve tedavi edici etkisi olduğunu tespit ettik. Hasar gruplarında ise kalınlıklar arttığı, epitel yüksekliği ve tübül çapını azaldığı için APAP'ın testis ve tübül beslenmesini olumsuz yönde etkilediğini düşünmekteyiz.

Tedavi ve koruyucu etki gruplarının spermatogenik seri hücrelerindeki apoptozun SF1, SF2 grubuna benzer bir yapı gösterdiğini bulduk. Böylelikle LK'nın APAP hasar modeliyle oluşan hücresel hasarda koruyucu ve tedavi edici etkisi olduğunu tespit ettik. Hasar gruplarında apoptotik hücreler arttığı için, bu hasarın p450 mitokondrial yolak üzerinden veya serbest radikal birikiminin giderilememesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Literatürde APAP ile indüklenmiş hasar modelinin testis dokusunda oluşturduğu hasara karşı LK'nın etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Testis dokusunda APAP ile oluşan hasara karşı LK'nın koruyucu ve tedavi edici etkileri ilk defa çalışmamızda histokimyasal ve morfometrik olarak; Hematoksilen-Eozin, Masson-Trikrom ve PAS boyamaları ile, immünohistokimyasal olarak TUNEL ve Kaspaz-3 boyamaları yapılarak tespit edildi. Bu etkiler ultrastrüktürel olarak tespit edildi. Ayrıca enzim aktivitelerinde MDA, GSH ve GPx ile de LK'nın etkisi gösterildi.

Bu bilgiler ışığında, deneysel olarak APAP ile oluşturulan hasar modelinin fare testis dokusunda oluşturduğu hasarda LK uygulamasının, gelecekte umut verici bir tedavi yöntemi olabileceği gösterildi. Ancak hasar ve tedavi mekanizmasını destekleyen daha çok çalışmaya ihtiyaç olmakla birlikte koruyucu ve tedavi edici etkileri için spermiyumun yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin incelenmesi de elde edilen verileri güçlendirecektir.

7.KAYNAKLAR

- 1.I S Young, J V Woodside. Antioxidants in health and disease. J Clin Pathol 2001;54:176–186.
- 2.Agarwal, A., Sekhon, L.H., 2010, The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Human Fertility,13(4): 217–225.
- 3.Krahenbuhl S, Talos C, et al.. Reduced antioxidative capacity in liver mitochondria from bile duct ligated rats. Hepatology 1995;22:607-12.
- 4.Maria L. Urso , Priscilla M. Clarkson. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. Elsevier Toxicology 189 (2003) 41-54.
- 5.www.oksantest.oksantre.com.tr 2012. Oksante AR-GE laboratuvarı; oksidatif stres ve antioksidanlar.
- 6.Adel A. Zalata, Ashraf H. Ahmed, et all. Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. Asian J Androl 2004 Dec; 6: 313-318.
- 7.Lewis RK, Paloucek FP. Assessment and treatment of acetaminophen overdose. Clinical pharmacy, 1991, 10: 765-774.
- 8.[http://www.guventip.com.tr/panel/r_dosya/asetaminofen\(parasetamol\).pdf](http://www.guventip.com.tr/panel/r_dosya/asetaminofen(parasetamol).pdf)/02.07.201
- 8.Bursa Güven Tıp Laboratuvarı klinik laboratuvar testleri; asetaminofen(parasetamol).
- 9.Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, yedinci baskı, 2. cilt.(1995), Feryal Matbaacılık, Ankara.
- 10.WIGER R.,et all. Effects of acetaminophen and hydroxyurea on spermatogenesis and sperm chromatin structure in labrotary mice. Reproductive Toxicology, Vol. 9, No. I, pp. 21-33, 1995.
- 11.Yapar K., ve ark. Hepatoprotective effect of L-carnitine against acute acetaminophen toxicity in mice. Experimental and Toxicologic Pathology 59 (2007) 121-128.
- 12.Gu J., et all. In Vivo Mechanisms of Tissue-Selective Drug Toxicity: Effects of Liver-Specific Knockout of the NADPH-Cytochrome P450 Reductase Gene on Acetaminophen Toxicity in Kidney, Lung, and Nasal Mucosa. Mol Pharmacol 67:623–630, 2005.
- 13.C. L. Yano, H. Dolder. Rat testicular structure and ultrastructure after paracetamol treatment. Contraception,(2002); 66:463–467.
- 14.Monsees TK, et all. Sertoli cells as a target for reproductive hazards. Andrologia,2000;32:239–46.

- 15.D. M. Kristensen, et all. Paracetamol (acetaminophen), aspirin (acetylsalicylic acid) and indomethacin are anti-androgenic in the rat foetal testis. *international journal of andrology*,2012; 35(3):377-84.
- 16.Sander van den Driesche, et all. Prolonged exposure to acetaminophen reduces testosterone production by the human fetal testis in a xenograft model. *Sci Transl Med*. 2015 May 20; 7(288): 288ra80.
- 17.Jaeschke H., et all. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *Journal of Clinical Translational Hepatology* 2014 vol. 2 | 153–161,DOI: 10.14218/JCTH.2014.00014.
- 18.Jaeschke H. , etall. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity,A clinically relevant model to test the efficacy of natural products . *Life Sciences* 88 (2011) 737–745.
- 19.McGill M. R. , et all. Acetaminophen-induced Liver Injury in Rats and Mice: Comparison of Protein Adducts, Mitochondrial Dysfunction, and Oxidative Stress in the Mechanism of Toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 November 1; 264(3): 387–394.
- 20.Yavuz H. Biyokimyasal Özellikleri ile L - Karnitin. *J. Fac. Vet. Med. Istanbul Univ*. 38 (2), 207-218, 2012.
- 21.Baumgartner, M. and BLUM, L. L-carnitine. L-versus D- or D,L-carnitine. Occurrence, Metabolism, Biosynthesis, Animal Feeding Studies, Regulations, pp:1-7. Lonza Ltd. Muenchensteinerstrasse 38, CH-4002, Basel.
- 22.NG. C. M., et all. The Role of Carnitine in the Male Reproductive System. *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 1033: 177–188 (2004).
- 23.Mohamed Mohamed Ahmed, et all. l-Carnitine protects against testicular dysfunction caused by gamma irradiation in mice. *Acta Histochemica* 116 (2014) 1046–1055.
- 24.Bin ZHU, et all. Protective effect of L-carnitine in cyclophosphamide-induced germ cell apoptosis. *Zhu et al. / J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)* 2015 16(9):780-787.
- 25.RAMADAN L. A., et all. Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzim Q10 and l-CARNITINE in mice. *Pharmacological Research*, Vol. 46, No. 4, 2002.
- 26.Langman medikal embriyoloji 9.baskı(2005) Palme yayıncılık.
27. Dere F. *Anatomi Ders Kitabı*. Adana : Okullar Pazarı Kitabevi, 1989: 655-668.
28. Gökmen G, İçten N. *Sistemik Anatomi*. İzmir : İzmir Güven Kitabevi, 2003: 531-546.
29. Snell RS. *Uygulamalı Anatomi*. Ankara : Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1993: 135-142.

30. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. Ankara : İzmir Güven Kitabevi, 2000: 329-337.
31. Erkoçak A. Genel Histoloji. İzmir : 1984: 138-160.
32. Eroschenko VP. Di Fiore's Atlas Of Histology With Functional Correlations. Ankara : Palme Yayıncılık, 2001: 251-265.
33. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara : Palme Yayıncılık, 2006: 365-390.
34. Gartner LP, Hiatt JL. Color Atlas of Histology. China : WB Saunders Company, 2001: 435-458.
35. Paker,Ş. Histoloji. Bursa : Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1990: 448-467.
36. Ross HM, Pawlina W. Histology A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 647-789.
37. Young B, Heath JW. Wheather's Functional Histology A Text and Colour Atlas. New York : Williams & Wilkins, 2000: 286-432.
38. Jungueira LC, Carneiro J. Basic Histology. New York : 2003: 359-375.
39. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000.
40. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Ankara : Nobel Kitabevi, 2005: 200-456.
41. Budari, S., (1996). Acetaminophen, The Merck Index- encyclopedia of chemicals, Drugs and Biologicals, s. 9.
42. Fairbrother, J.E., Acetaminophen. (1974). Analytical profiles of drug substances, Vol. 3, s. 1-109.
43. Perez-Ruiz, T., Martinez-Lozano, C., Tomas, V., ve Galera, R., (2005). Migration behaviour and separation of acetaminophen and p-aminophenol in capillary zone electrophoresis: analysis of drug based on acetaminophen. J. Pharm. Bio. Anal., 38:1, 87-93.
44. El-Obeid, H.A., Al-Badr, A.A., (1985). Acetaminophen. Analytical profiles of drug substances, Volume 14, s. 552-553.
45. El-Obeid, H.A., ve Al-Badr, A.A., (1985). Acetaminophen. Analytical profiles of drug substances, Vol. A4, s. 568.
46. Korolkovas, A., (1988). Essentials of medicinal chemistry, John Wiley Sons, Newyork, Cilt 1, s. 257.
47. Tüzün, C., (1975). Aromatik bileşikler, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi yayınları Sayı 117, s. 161.

48. Akgün, H., Balkan, A., Bilgen, A. A., Çalığ, Ü., Gökhan, N., Dalkara, S., Erdoğan, H., Erol, D.D., Erkan, M., Özkanlı, F., Palaska, E., Saraç, S., Ėafak, C., Tozkoparan, B., (2004). *Farmasötik Kimya*, Hacettepe Üniversitesi Yayınevi, s. 570.
49. Criado, A., Cardenes, S., Galego, M., Valcarcel, M., (2000). Fast urinary screening for paracetamol using on-line microwawe assisted hydrolysis and spectrophotometric detection. *Analyst*, 125, 1179-1183.
50. Medina AR, Cordova MLF, Diaz AM. (1999). A very simple resolution of the mixture paracetamol and salicylamide by flow injection-solid phase spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta*; 394: 149-158.
51. Kayaalp O., (2002). *Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji*, onbirinci baskı, 2. cilt., Hacettepe Taş, Ankara.
52. Keleva T, Cavar I, Vukojevic K, Babic M, Culo F., (2013). The effect of glucagon and cyclic adenosine monophosphate on acute liver damage induced by acetaminophen. *Histol Histopathol* 28: 245-255.
53. Gunawan BK, Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease. *Clin Liver Dis.* 2007; 11:459–75. v. [PubMed: 17723915]
54. Bauer I., Vollmar B., Jaeschke H., Rensing H., Kraemer T., Larsen R. and Bauer M. (2000). Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat. *J. Hepatol.* 33, 395-406.
55. Dambach D.M., Durham S.K., Laskin J.D. and Laskin D.L. (2006). Distinct roles of NF-kappaB p50 in the regulation of acetaminopheninduced inflammatory mediator production and hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 211, 157-165.
56. Cavar I., Kelava T., Vukojevic K., Saraga-Babic M. and Culo F. (2010). The role of prostaglandin E2 in acute acetaminophen hepatotoxicity in mice. *Histol. Histopathol.* 25, 819-830.
57. Demirbas S., Cakir E., Akgul E.O., Seyrek M., Cayci T., Kurt Y.G., Uysal B., Aydin I., Kurt B., Yaman H. and Erbil M.K. (2011). Elevated serum neopterin levels in acetaminophen-induced liver injury. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 31,165-70.
58. Yaman H., Cakir E., Akgul E.O., Aydin I., Onguru O., Cayci T., Kurt Y.G., Agilli M., Aydin F.N., Gulec M., Altinel O., Isbilir S., Ersoz N., Yasar M., Turker T., Bilgi C. and Erbil K.M. (2011). Pentraxin 3 as a potential biomarker of acetaminophen-induced liver injury. *Exp. Toxicol. Pathol.*
59. McGill MR, Lebofsky M, Norris HR, Slawson MH, Bajt ML, Xie Y, et al. Plasma and liver acetaminophen-protein adduct levels in mice after acetaminophen treatment: dose-

response, mechanisms, and clinical implications. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;269:240–249. doi: 10.1016/j.taap.2013.03.026.

60. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 2007;11:525– 548. doi: 10.1016/j.cld.2007.06.006.

61. Helliwell B, Guttridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford : Clarendon Press, 1995.

62. Droge W. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. *Physiol Rev* 2002;82: 47-95.

63. Berlin JA, Colditz GA. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. *Am J Epidemiol* 1990;132: 612–628.

64. Özgöçmen S. Romatizmal Hastalıklarda Oksidatif Stresin Rolü. *Türk Fiz Tıp Rehab* 2007;53: 33-35.

65. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zafariet K. Increasing intracellular camp and cgmp inhibitscadmiuminduced oxidative stress in rat submandibularsaliva. *Comp Biochem Physiol* 2003;135: 331–336.

66. Kökoğlu E. Serbest Radikal Reaksiyonlarının Kanserdeki Rolü. 1998;11: 358 64.

67. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling introduction. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33: 368–70.

68. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B. Serbest Radikaller. *MEÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2000;1, 52-58.

69. Valentine JS, Wertz DL, Lyons TJ, Liou LI, Goto JI, Gralla EB. The dark side of dioxygen biochemistry. *Curr Opin Chem Biol* 1998;2: 253–262.

70 Castro PF, Greig D, Perez O, Moraga F, Chiong M, Diaz-Araya G et al. Relation between oxidative stress catecholamines and impaired chronotropic, response to exercise in patients with chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol* 2003;92: 215–218.

71. Evans JL, Goldfine LD, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stres and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23: 599–622.

72. Niki E. Free radicals in the 1900's: from in vitro to in vivo. *Free Radic Res* 2000;33: 693–704.

73. Young LS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;54: 76–86.

74. Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis free radicals and aging. *Free Radic Biol Med* 2002;33: 29–36.
75. Radak Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Ohno H, Sasvari M et al. The effect of exercise training on oxidative damage of lipids, proteins and DNA in rat skeletal muscle: evidence for beneficial outcomes. *Free Radic Biol Med* 1999;27: 69–74.
76. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32: 790–796.
77. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci* 2000;899: 191–208.
78. Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002;32: 1102–1115.
79. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged dna bases. *Free Radic Biol Med* 2002;33: 1–14.
80. Tauler P, Aguilo A, Gimeno I, Fuentespina E, Tur JA, Pons A. Response of blood cell antioxidant enzyme defences to antioxidant diet supplementation and to intense exercise. *Eur J Nutr Epub Ahead* 2005.
81. Öztürk M, Güzelhan Y, Sayar K, Tüzün Ü. Yaygın gelişimsel bozukluğu olan çocuklarda plazma malondialdehit ve glutasyon düzeylerinin araştırılması. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni* 2001;11: 155-159.
82. Child RB, Wilkinson DB, Fallowfield JL, Donnelly AE. Elevated serum antioxidant capacity and plasma malondialdehyde concentration in response to a simulated half-marathon run. *Med Sci Sports Exerc* 1998;30: 1603-1607.
83. Yalçın AS. Antioksidanlar. *Klinik Gelişim* 1998;11: 342–346.
84. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 2004;15: 91–96.,
85. Townsend D, Tew K, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biopha*. 2003;57:145-155.
86. Luschak V. Glutathione homeostasis and functions: potetial targets for medical interventions. 2012;736837:26. doi:10.1155/2012/736837.
87. Nelson DL, Cox MM, (Kılıç N.Çeviri Editörü). *Biyokimyanın İlkeleri*. Ankara : Palme Yayıncılık, 2005.
88. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganism and mammals. *Annu Rev Nutr* 1998;18: 39-61.
89. Jeulin C, Lewin LM. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatazoa. *Hum Reprod Update* 1996;2: 87-102.

90. Çitil, M., 2002. Veteriner hekimlikte karnitin. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 8 (1), 77-82.
91. Da Torre, S.D., Creer, M.H., Progwizd, S.M., Corr, P.B., 1991. Amphipathic lipid metabolites and their relation to arrhythmogenesis in ischemic heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 23 (1), 11-22.
92. Bremer, J., 1990. The role of carnitine in intracellular metabolism. *Journal of Clinical Chemistry Clinical Biochemistry* 28, 297-301.
93. Banji, M.S., 1984. Nutrition and health implications of lysin-carnitine relationship. *World Review of Nutrition and Dietetics* 44, 185-211.
94. Borum, P.R., 1983. Carnitine. *The Annual Review of Nutrition* 3, 233-259.
95. Rebouche, C.J., 1987. Carnitine metabolism and human nutrition. *The Journal of Applied Nutrition* 117, 1024-1031.
96. Bremer, J., 1983. Carnitine-metabolism and functions. *Physiology Review* 63, 1420-1480.
97. Harmeyer, J., Schlumbohm, C., 1997. Die physiologische Bedeutung von L-Carnitin und Effekte von Carnitinzulagen bei Haustieren. In: *Proc. Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier. 6. Symposium, Jena/Thüringen*, pp. 42-46.
98. Scholte, H.R., Jonge, P.C., 1987. Metabolism, Function and Transport Carnitine in Health and Disease. In: *Gitzelmann, R., Baerlocher, K., Steinman, B., (Hrsg.). Carnitin in der medizin*, Schattauer, Stuttgart, New York, pp. 21-59.
99. Brevetti, G., Perna, S., 1992. Metabolic and Clinical Effects of L-carnitine in Peripheral Vascular Disease. In: *Ferrari, R., DiMauro, S., Sherwood, G. (Eds.), L-carnitine and Its Role in Medicine: From Function to Therapy*. Academic Press, London, pp. 359-378.
100. Evans, A., 2003. Dialysis-related carnitine disorder and levocarnitine pharmacology. *The American Journal of Kidney Diseases* 41 (suppl. 4), S13-S26.
101. Balercia, G., Regoli, F., Armeni, T., Koverech, A., Mantero, F., Boscaro, M., 2005. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertility and Sterility* 84, 662-671.
102. Rodrigues, B., Xiang, H., McNeill, J.H., 1988. Effect of L-Carnitine treatment on lipid metabolism and cardiac performance in chronically diabetic rats. *Diabetes* 37, 1358-1364.
103. Arduini, A., 1992. Carnitine and its acetyl esters as secondary antioxidants? *American Heart Journal* 123, 1726-1727.

104. Gülçin, İ., 2006. Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine. *Life Sciences* 78, 803-811.
105. Schnackenberg, C.G., Wilcox, C., 2001. The SOD mimetic tempol restores vasodilation in afferent arterioles of experimental diabetes. *Kidney International* 59, 1859-1864.
106. Koudelová, J., Mourek, J., Drahotka, Z., Rauchová, H., 1994. Protective effect of carnitine on lipoperoxide formation in rat brain. *Physiological Research* 43, 387-389.
107. Rauchova, H., Dobesova, Z., Drahotka, Z., Zicha, J., Kunes, J., 1998. The effect of chronic L-carnitine treatment on blood pressure and plasma lipids in spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmacology* 342, 235-239.
108. Fabriello, R.G., Calabrese, F., 1988. Prevention of ischemia induced increase in MDA by acetyl carnitine. *Annals of Neurology* 24, 114-118.
109. Burns, K.A., Casillas, E.R., 1989. The metabolism of acetylcarnitine and acetate by bovine and hamster epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 41, 218-226.
110. Bartelloni, M., Canale, D., Izzo, P.L., Giorgi, P.M., Meschini, P., Menchini-Fabris, G.F., 1987. L-Carnitine and acetylcarnitine in human sperm with normal and reduced motility. *Acta Europaea Fertilitatis* 18, 29-31.
111. Abd-Allah, A.R., Helal, G.K., Al-Yahya, A.A., Aleisa, A.M., Al-Rejaie, S.S., Al-Bakheet, S.A., 2009. Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which compromise sperm motility and survival may be altered by L-carnitine. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2, 73-81.
112. Moradi, M., Moradi, A., Alemi, M., Ahmadnia, H., Abdi, H., Ahmadi, A., Bazargan-Hejazi, S., 2010. Safety and efficacy of clomiphene citrate and L-carnitine in idiopathic male infertility: a comparative study. *Urology Journal* 7, 188-193.
113. Qing Zhang, et al. Effects of L-carnitine on follicular survival and graft function following autotransplantation of cryopreserved-thawed ovarian tissues. *Cryobiology* 71 (2015) 135–140.
114. Kaya I., ve ark. Investigation of Protective Effect of L-Carnitine on L-Asparaginase Induced Acute Pancreatic Injury in Male Balb/c Mice. *Dig Dis Sci* (2015) 60:1290–1296.
115. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, 02.07.2018.
116. Ko EY, Sabanegh ES Jr, Agarwall A (2014) Male infertility testing: reactive oxygen species and antioxidant capacity.

117. Ratnasooriya WD, Jayakody JR (2000) Long-term administration of large doses of paracetamol impairs the reproductive competence of male rats. *Asian J Androl* 2:247–

255. *Fertil Steril* 102:1518–1527.

118. E. H. Aksu¹, M. Ozkaraca, F. M. Kandemir, A. D. Omur, E. Eldutar, S. Kucukler & S. Comaklı. Mitigation of paracetamol-induced reproductive damage by chrysin in male rats via reducing oxidative stress. Emrah Hicazi Aksu, PhD, Department of Reproduction and Artificial Insemination, Veterinary Medicine Faculty, Ataturk University, Turkey. Accepted: January 3, 2016 doi: 10.1111/and.12553

119. Salvesen GS, Dixit VM (1997) Caspases: intracellular signalling by proteolysis. *Cell* 91:443–446.

120. Gach K, Długosz A, Janecka A (2015) The role of oxidative stress in anticancer activity of sesquiterpene lactones. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 388:477–486.

121. Boulares AH, Zoltoski AJ, Stocia BA, Cuvillier O, Smulson ME (2002) Acetaminophen induces a caspase-dependent and Bcl-XL sensitive apoptosis in human hepatoma cells and lymphocytes. *Pharmacol Toxicol* 90:38–50.

122. U Ekaluo, E Ikpeme, A Udokpoh. Sperm head abnormality and mutagenic effects of aspirin, paracetamol and caffeine containing analgesics in rats. *The Internet Journal of Toxicology*. 2008 Volume 7 Number 1.

123. Lister, C.F. and McLean, A.E; 1997. Inhibition of DNA synthesis by paracetamol in different tissues of the rat in vivo. *Toxicology* 116: 49-57.

124. Hole, J.W; 1993. Human anatomy and physiology (6th edition). Wm. C. Brown publishers, Iowa.

125. Bruce. W. R. and Heddle, J. A; 1979. The mutagenic activity of 61 agents as determined by the micronucleus, Salmonella and sperm abnormality assays. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 21: 319-334.

126. Wyrobek, A. J. and Bruce, W. R; 1978. The Induction of sperm-shape abnormalities in mice and humans, In: A. Holander and F. J. de Series (Eds.). *Chemical Mutagens*. (Vol. 5). Plenum Press, New York, pp. 257-285.

127. Letz, G; 1990. Male reproductive toxicology, In: J. Ladou (Ed.). *Occupational Medicine*. Appleton and Lange. Connecticut, pp. 288-296.

128. Garrity, M. M., Burgart, L. J., Riehle, D. L., Hill, E. M., Sebo, T. J., and Witzig, T. (2003). Identifying and quantifying apoptosis: Navigating technical pitfalls. *Mod Pathol* 16, 389–94.
129. Moldeus P, Anderson B, Rahimtula A, and Berggren M (1982). Prostaglandin synthetase catalyzed activation of paracetamol. *Bioclieni. Pliariiiacol.* 3 1:1363-1368.
130. Bartolone, J. B., Sparks, K., Cohen, S. D., and Khairallah, E. A. (1987). Immunochemical detection of acetaminophen bound liver proteins. *Biochem. Pharmacol.* 36, 1193–1196.
131. L. Micheli, D. Cerretani, A.I. Fiaschi, G. Giorgi, M.R. Romeo, and F.M. Runci. Effect of Acetaminophen on Glutathione Levels in Rat Testis and Lung. *Environ Health Perspect Vol 102(Suppl 9):63-64* (1994).
132. Hinton BT, Snoswell AM, Setchell BP. The concentration of carnitine in the luminal fluid of the testes and epididymis of the rat and other mammals. *J Reprod Fertil* 1979; 56: 105–111.
133. Bertelli A, Conte A, Ronca G (1994) L-propionyl carnitine protects erythrocytes and low density lipoproteins against peroxidation. *Drugs Exp Clin Res* 20:191-197.
134. Wang YX, Yang SW, Qu CB, Huo HX, Li W, Li JD, et al. [L-carnitine: safe and effective for asthenozoospermia]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2010; 16(5):420-2. Chinese.
135. Shi JZ, Zhang SS, Zhang Z, Liang Q, Shi Y, Hua JL, et al. [Expressions of sperm-specific genes in carnitine-cultured testis sperm of obstructive azoospermia patients]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2010;16(6):504-9. Chinese.
136. <http://openaccess.ogu.edu.tr:8080> 2018.
137. SÖYLEMEZ, Hakan, UĞRAŞ, Yahya Murat, BEYTUR, Ali, OĞUZ, Fatih, KURUŞ, Meltem and KARABULUT, BAY Aysun. "Sigara dumanına maruz kalan sıçanlarda resveratrolün testis dokusundaki antioksidan etkisinin değerlendirilmesi", TUBITAK, 2011.
138. AKTAŞ, Özgür, ESKİOCAK, Sevgi, ÖZGÜN, Gülben Sayılan, YALÇIN, Ömer and SÜT, Necdet. "Asetaminofen ile toksik hepatit oluşturulan ratlarda ", Türk Biyokimya Derneği, 2013.
139. forum.donanimhaber.com, 2018.

140. YAVUZ, Halil and KURTOĞLU, Firuze. "Biyokimyasal özellikleri ile L - Karnitin", İstanbul Üniversitesi, 2012.
141. acikerisim.deu.edu.tr, 2018.
142. library.neu.edu.tr, 2018.
143. GÜLLE, Kanat, AKPOLAT, Meryem, ÖZ, Zehra Safi, BAKKAL, Bekir Hakan, ARASLI, Mehmet and KÖKTÜRK, Füzün. "İyonize Radyasyona Maruz Kalmış Sıçan Ovaryumunda Gelişmekte Olan Foliküllerde Morfolojik Değişiklikler Üzerine L-karnitinin Koruyucu Etkisi", Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 2017.
144. www.turkurolojidergisi.com, 2018.
145. <https://www.bio-optica.it/> 2018
146. D. Abadjieva, Sv. Grigorova and M. Petkova. Testicular Morphometry and Histology of Rabbit Bucks Supplemented with Iodine in Drinking Water. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. DOI: 10.3923/ajava.2016.491.497
147. www.istanbulsaglik.gov.tr, 2018.
148. DIBYENDU DUTTA, IN PARK, AND NATHANIEL C. MILLS. Fixation Temperature Affects DNA Integrity in the Testis as Measured by the TUNEL Assay. Toxicologic Pathology, 40: 667-674, 2012, ISSN: 0192-6233 print / 1533-1601 DOI: 10.1177/0192623311436182.
149. <http://www.merckmillipore.com/TR/tr> 2018
150. kutuphane.uludag.edu.tr, 2018

8.EKLER

8.1. EK-1 Etik Kurul Belgesi



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
İZMİR ULUSLARARASI BİYOTİP VE GENOM ENSTİTÜSÜ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (İBG-HADYEK)
KARARI



TOPLANTI TARİHİ	30/11/2016	TOPLANTI GÜNÜ	Çarşamba
TOPLANTI SAYISI	12	TOPLANTI SAATİ	10:30

Sayın Prof. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK,

15/2016 Protokol No'lu; yürütücüsü olduğunuz "Farelerde Parasetamol İle Oluşturulan Testis Hasarında L-Karnitin Etkisi" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.

Prof.Dr.Sedef AKGÜNGÖR
Başkan

Prof.Dr. H. Alper BAĞRIYANIK
Başkan Yardımcısı

(Proje Koordinatörü)

Prof. Dr. Ensari GÜNELİ
Üye

Doç.Dr. H. Güneş ÖZHAN
Üye

Doç.Dr. Ralph Meuwissen
Üye

Doç.Dr. Devrim PESEN OKVUR
Üye

Uzm. Umur KELEŞ
Üye

Uzm. Kerem ESMEN
Üye

(Katılamamıştır)

Ecz. Ferdane KAHRAMAN

Üye
(Katılamamıştır)

8.2. EK-2 Özgeçmiş



HÜSEYİN KISAOĞLU

Kişisel Bilgiler

İletişim Bilgileri

Kimlik Numarası	61738175064
Doğum Tarihi	11/04/1991
İletişim Adresi	Ilıca Mah. Palandöken Sok. No:14 Daire:4
Telefon	(539) 744 15 30
E-posta	hsynkisaoglu@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri

01 Ağustos 2014 - Şu Anda (4 yıl)
Yüksek Lisans, Tezli Program, DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ, HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (YL)

01 Eylül 2009 - 01 Şubat 2014 (4 yıl 6 ay)
Lisans, İkinci Öğretim, ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ, TÜRKİYE
FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ, BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
Ağırlıklı Genel Not Ortalaması: 2.49 / 4.0

Yabancı Dil Bilgileri

İSPANYOLCA (Okuma: Orta, Yazma: Orta, Konuşma: Başlangıç)

İNGİLİZCE (Okuma: İyi, Yazma: İyi, Konuşma: İyi)

TÜBİTAK Burs ve Destekleri

Panelistlik/İzleyicilik/Raportörlük Sayısı

Panelistlik/Dış Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
İzleyicilik/Danışmanlık Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0
Raportörlük Sayısı	ARDEB/BİDEB 0	TEYDEB 0	Toplam 0

