

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**L-KARNİTİN'İN SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
TESTİKÜLER HİPERTERMİDE KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Seçil Ayça ÇAVUŞ

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

İZMİR-2012

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**L-KARNİTİN'İN SIÇANLARDA OLUŞTURULAN
TESTİKÜLER HİPERTERMİDE KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

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

Seçil Ayça ÇAVUŞ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: DOÇ. DR. BEKİR UĞUR ERGÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Seçil Ayça ÇAVUŞ L-KARNİTİN'İN SIÇANLARDA OLUŞTURULAN TESTİKÜLER HİPERTERMİDE KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI konulu yüksek lisans tezini 29.03.2012 tarihinde başarılı olarak tamamlamıŐtır.

Doç. Dr. Bekir Uğur ERGÜR

BAŞKAN



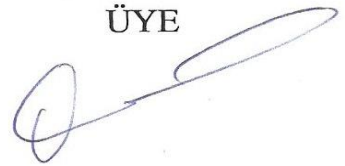
Doç. Dr. Ali Rıza őİŐMAN

ÜYE



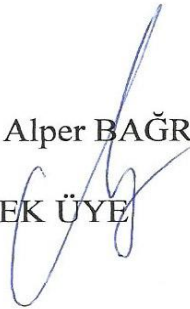
Doç. Dr. IŐıl TEKME

ÜYE



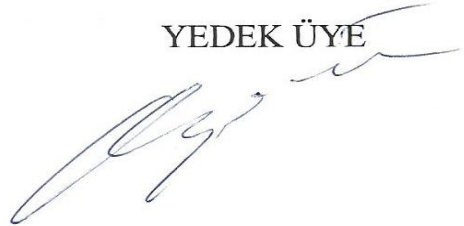
Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK

YEDEK ÜYE



Doç. Dr. Hakkı Oğün SERCAN

YEDEK ÜYE



İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ.....	v
KISALTMALAR.....	vi
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1. Testis.....	7
2.1.1. Testis Anatomisi	7
2.1.2. Testis Fizyolojisi	7
2.1.3. Testis Histolojisi.....	8
2.2. Hipertermi.....	14
2.3. Serbest Radikaller.....	17
2.4. Antioksidanlar.....	18
2.5. L-karnitin.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Araştırmanın Tipi.....	24
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı.....	24
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları.....	24
3.4. Çalışma Materyali.....	25
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	25
3.6. Veri Toplama Araçları.....	25
3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler.....	25
3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler.....	25
3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	26
3.6.2.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi.....	26
3.6.2.3. Histokimyasal İncelemeler	26
3.6.2.3.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü	27
3.6.2.3.2. Masson Trikrom Boya Protokol.....	28
3.6.2.3.3. Peryodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü.....	29

3.6.2.4. Morfometrik Değerlendirmeler.....	29
3.6.2.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.....	29
3.6.2.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü.....	30
3.6.2.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü	30
3.6.2.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler	30
3.6.2.5.1. TUNEL Boya Protokolü.....	31
3.6.2.5.2. Aktif Kaspaz -3 İmmunohistokimya Protokolü.....	31
3.6.2.6. Ultrastrüktürel İncelemeler	32
3.6.2.7. Biyokimyasal İncelemeler.....	32
3.6.2.7.1. Malondialdehit (MDA) Düzey Ölçümü	33
3.6.2.7.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzey Ölçümü	33
3.6.2.7.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzey Ölçümü	33
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	34
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	34
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	34
3.10. Etik Kurul Onayı.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	35
4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	35
4.3. Histokimyasal Bulgular.....	36
4.3.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi	36
4.3.2. Masson Trikrom Boyama Değerlendirmesi	38
4.3.3. PAS Boyama Değerlendirmesi	40
4.4. Morfometrik Bulgular.....	43
4.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.....	43
4.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü	44
4.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü.....	45
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	46
4.5.1. TUNEL Boyama Değerlendirmesi.....	46
4.5.2. Aktif Kaspaz 3 Boyama Değerlendirmesi.....	48
4.6. Ultrastrüktürel Bulgular	50
4.7. Biyokimyasal Bulgular.....	52
4.7.1. MDA Düzey Değerlendirmesi.....	52

4.7.2. GPx Düzey Değerlendirmesi	53
4.7.3. SOD Düzey Değerlendirmesi	54
5.TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
7. KAYNAKLAR	62
8. EKLER.....	72

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Doku takip protokolü.....	26
Tablo 2: Hematoksilen-Eozin boya protokolü.....	27
Tablo 3: Masson-Trikrom boya protokolü	28
Tablo 4: Peryodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü	29
Tablo 5: Johnsen testiküler biopsi skorlaması	30

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: Sertoli hücresi ve spermatogenik seri hücreleriyle ilişkisi	11
Şekil 2: Hipertermi ve apoptoz..	16
Şekil 3: Hücre enerji metabolizmasında L-karnitin rolü	22
Şekil 4: Grupların deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlıkları	35
Şekil 5: Grupların testis ağırlıkları	36
Şekil 6: Kontrol grubuna ait kesit, H&E	37
Şekil 7: Hipertermi grubuna ait kesit, H&E	37
Şekil 8: L-karnitin Koruyucu Etki grubuna ait kesit, H&E	38
Şekil 9: Kontrol grubuna ait kesit, Masson Trikrom.....	39
Şekil 10: Hipertermi grubuna ait kesit, Masson Trikrom	39
Şekil 11: L-karnitin Koruyucu Etki grubuna ait kesit, Masson Trikrom.....	40
Şekil 12: Kontrol grubuna ait kesit, PAS.....	41
Şekil 13: Hipertermi grubuna ait kesit, PAS.....	41
Şekil 14: L-karnitin Koruyucu Etki grubuna ait kesit, PAS.....	42
Şekil 15: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması	43
Şekil 16: Grupların seminifer tübül çap ortalaması.....	44
Şekil 17: Grupların seminifer tübül bazal membran kalınlığı ortalaması.....	45
Şekil 18: Kontrol grubuna ait kesit, TUNEL	46
Şekil 19: Hipertermi grubuna ait kesit, TUNEL	47
Şekil 20: L-karnitin Koruyucu Etki grubuna grubuna ait kesit, TUNEL.....	47
Şekil 21: Kontrol grubuna ait kesit, Aktif Kaspaz 3.....	48
Şekil 22: Hipertermi grubuna ait kesit, Aktif Kaspaz 3.....	49
Şekil 23: L-karnitin Koruyucu Etki grubuna grubuna ait kesit, Aktif Kaspaz 3.....	49
Şekil 24: Kontrol grubuna ait kesit, Uranil Asetat-Kurşun Sitrat.....	50
Şekil 25: Hipertermi grubuna ait kesit, Uranil Asetat-Kurşun Sitrat	51
Şekil 26: L-karnitin Koruyucu Etki grubuna grubuna ait kesit, Uranil Asetat-Kurşun Sitrat..	51
Şekil 27: Grupların MDA düzey ortalamaları	52
Şekil 28: Grupların GPx düzey ortalamaları.....	53
Şekil 29: Grupların SOD düzey ortalamaları.....	54

KISALTMALAR

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP-Biotin Nick-End Labeling

PBS: Phosphate Buffer Saline

TdT: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

DAB: Diaminobenzidin

GPx: Glutasyon Peroksidaz

MDA : Malondialdehit

SOD: Süperoksit Dismutaz

APAF-1: Apoptotik Peptidaz Aktivatör Faktör

OsO4: Osmium Tetraoksit

µm : Mikrometre

L-KARNİTİN'İN SIÇANLARDA OLUŞTURULAN TESTİKÜLER HİPERTERMİDE KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Seçil Ayça ÇAVUŞ

**Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı,
Narlıdere, İzmir.**

ÖZET

Amaç:

Çalışmamızda hiperterminin testiste oluşturduğu hasara karşı L-karnitin'in koruyucu etkisini histokimyasal, immünohistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal olarak incelemeyi amaçladık.

Yöntem:

Deneyisel modelimizde Wistar suşu erkek sıçanlar 3 gruba (n=7) ayrıldı. Kontrol grubu; 5 gün, günde 15 dakika, 22°C (oda sıcaklığı) su banyosu uygulanan grup. Hipertermi grubu; 5 gün, günde 15 dakika, 43°C sıcak su banyosu uygulanan grup. L-karnitin grubu; 250 mg/kg/gün L-karnitin'in hipertermi uygulamasından 1 saat önce ve 5 gün süre ile intraperitoneal yöntemle verildiği grup. Tüm denekler 5 günlük deney uygulanmasından 14 gün sonra sakrifiye edildi. Histokimyasal incelemeler için hematoksilin & eozin (H&E), masson trikrom ve periyodik asit schiff (PAS), immünohistokimyasal olarak da apoptozun belirlenmesi için TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları yapıldı, testis ince yapısı ultrastrüktürel düzeyde incelendi. Biyokimyasal incelemeler için doku homojenatlarında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve malondialdehit (MDA) düzeyleri incelendi.

Bulgular:

Yapılan histokimyasal ve ultrastrüktürel incelemelerde kontrol grubunda normal testis yapısı gözlemlendi. Hipertermi grubunda seminifer tübüllerinde vakuolizasyon, germ hücre kaybı ve intertisyel alanda bağ doku artışı gözlemlendi. L-karnitin grubunda ise normale yakın morfolojide testis yapısı gözlemlendi. Yapılan immünohistokimyasal incelemeler sonucu hipertermi grubu seminifer tübüllerinde kontrol grubuna oranla TUNEL (+) boyanan hücre

sayısının ve aktif kaspaz-3 immunpozitif boyanan hücre sayısının arttığı, koruyucu olarak L-karnitin verilen grupta ise immunpozitif boyanan hücre sayısının azaldığı gözlemlendi. Biyokimyasal olarak MDA, GPx ve SOD düzeyleri hipertermi grubunda kontrol grubuna oranla anlamlı olarak yüksek, L-karnitin grubuna kıyasla ise yine yüksek bulundu fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Sonuç:

Elde ettiğimiz verilere dayanarak testiküler hiperterminin testis de doku hasarı oluşturduğunu, oksidatif stresi ve apoptozu arttırdığını, koruyucu ajan olarak kullanılan L-karnitin'in oluşan doku hasarını ve biyokimyasal değişiklikleri azalttığını gözlemledik.

Anahtar Kelimeler: hipertermi, L-karnitin, testis, apoptoz.

PROTECTIVE EFFECTS OF L-KARNITIN AGAINST TESTICULAR HYPERTHERMIA ON RATS

ABSTRACT

Objective:

In this study we aimed to investigate protective effects of L-karnitin, a strong antioxidant, against possible negative effects of hyperthermia, on testes of male rats histolochemically, imunohistochemically, ultrastructural and biochemically.

Method:

21 Wistar albino rats were divided into 3 groups (n=7). Control Group; rats were subjected to water bath, 5 days, 15 minutes a day, at room temperature 22°C. Hyperthermia Group; rats were subjected to hot water bath, 5 days, 15 minutes a day, at 43°C. L-karnitin Group; 250 mg/kg/day L-karnitin, before hyperthermia, were applied for 5 days by intraperitoneal. All experimental animals were sacrificed 14 days after the water bath exposure for 5 days. Testes tissue slides were stained with hematoxylene & eosine (H&E), masson trichrome and periodic acid schiff (PAS) for histochemically. Immunohistochemical TUNEL and active caspase-3 stains were performed to determine apoptosis. Superoxide dismutase (SOD), glutathion peroxidase (GPx) and malondialdehyde (MDA) levels were evaluated biochemically. Also ultrastructural observations were used.

Results:

Histochemical and ultrastructural investigations showed that on hyperthermia group's seminifer tubules showed vacuolization, germ cell deprivation and increase of connective tissue on interstitial area. No significant changes were seen in L-karnitin group. After immunohistochemical investigations apoptotic cell death was increased in hyperthermia group compared with control group. L-karnitin group decreased TUNEL (+) cells and active caspase-3 immunoreactive cells compared with hyperthermia group. Tissue MDA, GPx and SOD levels in hyperthermia group showed an increase compared with control and L-karnitin groups.

Conclusion:

According to our results, we consider that testicular hyperthermia increases oxidative stress and apoptosis, causes tissue damage and biochemical changes in testis. In conclusion we assume that L-karnitin can minimize the histological damage and biochemical differences.

Key Words: hyperthermia, L-karnitin, testis, apoptosis.

1.GİRİŞ VE AMAC

Hipertermi, dokuların ya da hücrelerin belirli bir süre normal fizyolojik sıcaklıktan daha yüksek bir sıcaklığa (41 - 44° C) maruz kalmasıdır (1). Gelişen teknolojiyle birlikte diz üstü bilgisayarların kullanımının artması, uzun süreli araba kullanımı, çocuklarda plastik içerikli bezlerin kullanılması, enfeksiyon, sıcak banyo, sauna, egzersiz, mesleki maruziyet, yaşam tarzı, klinik vakalar (örneğin kriptorşitizm) gibi nedenlerle hiperterminin gerçekleşmesi fertilite açısından çeşitli sorunlara neden olmaktadır (2,3).

Testisin işlevi yüksek derecede ısı denetimine bağlı olduğu için hipertermi insanlarda, ratlarda ve farelerde üreme sistemi üzerinde olumsuz etki göstermektedir (2,4-6).

Spermatogenezisin gerçekleştirebilmesi için normal vücut ısısından birkaç derece daha düşük ısı gereklidir ve bu yüzden testisler skrotum içerisinde, vücut dışında bulunurlar (2,7,8). Yüksek ısı spermatogenezisi bozarak spermiyumların sayı, yapı ve hareketliliğini azaltmaktadır (9-11). Araştırma verileri hiperterminin gametogenezis üzerinde gösterdiği olumsuz etkisini apoptozisi indükleyerek gerçekleştirdiğini bildirmektedir (12).

Spermatogenezis toksik maddeler, radyasyon ve ısı değişimlerinden olumsuz etkilendiği için bu etkenler üreme hücrelerinde oksidatif strese neden olmaktadır. Deneysel hipertermi modellerinde hücrelerde serbest oksijen radikallerinin artarak spermatogenik hücrelerde mayoz bölünme düzenini bozduğu, sitozolik antioksidan olan GPx ve SOD düzeylerinin azaldığı ve leydig hücrelerinin fonksiyonlarının baskılandığı saptanmıştır (13-15).

L-karnitin, vücutta doğal olarak bulunan, 7 karbon atomu içeren, suda çözünen, küçük bir moleküldür. Kimyasal yapısı 3-hidroksi-4-N-trimetilamino bütirik asittir. L-karnitin'in biyosentezi için lysine ve methionine gibi iki temel aminoasit gereklidir (16).

L-karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin, hücresel enerji üretimi için β -oksidasyona uğradıkları yer olan mitokondriyal matriks içine taşınmasını sağlar. Ayrıca, antioksidan ve serbest radikal süpürücü etkilere sahip olduğu, hücre membranı ve DNA'yı serbest oksijen radikallerine bağlı hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (17-19). Erkek germ hücre serisinde oksidatif stres, nükleus ve mitokondride bütünlük kaybına ve spermatozoada hasarın gelişimine neden olur. L-karnitin, antioksidan özelliği sayesinde oksidatif stres kaynaklı erkek infertilitesini azaltmada olumlu etkiye sahiptir (20-22).

Bugüne kadar yapılan çalışmaların çoğunda, farklı patolojik durumlarda L-karnitinin antioksidan etkisi üzerinde durulmuştur ancak testiküler hipertermiye karşı koruyucu etkisi ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda sıçanlara uygulanan testiküler hipertermide L-karnitinin koruyucu etkisini histokimyasal, immunohistokimyasal, ultrastrüktürel ve biyokimyasal olarak ortaya koymayı amaçladık. Yapacağımız çalışmanın literatüre ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine katkısı olacağı inancındayız.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Testis

2.1.1. Testis Anatomisi

Testisler oval şekilli bir çift erkek temel üreme organıdır. Skrotum içerisinde spermatik kordon asılı halde vücut boşluğunun dışında bulunurlar (23). 3 cm kalınlığında, 10-14 gr ağırlığında, 2-3 cm genişliğinde ve yaklaşık 4 cm uzunluğundadır (24).

Testis içerisinde yerleşik olarak bulunan tubuli rekti ve rete testis ile testis dışında yerleşik olarak bulunan duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakülatöryus kanalları genital kanal sistemini oluşturur. Bu kanal sistemi ve bununla ilişkili olan vesikula seminalis, prostat bezi, bulboüretral bezler ve cinsel birleşme organı olan penis erkek üreme sistemini oluşturur (24).

2. lumbal vertebra seviyesinde aorta abdominalisten ayrılan, karın arka duvarından aşağı doğru uzanan ve daha sonra kanalis inguinalisten geçerek testis ve epididimisin kanlanması ve beslenmesini sağlayan arter; aortanın bir dalı olan a. testikularistir (25).

Testis ve epididimis venleri plexus pampiniformis'i oluşturarak testis içindeki kapiller yatakların toplanmasına aracılık ederler. Daha sonra birbirleri ile birleşerek v. testicularisi oluştururlar (26). Testisin venöz kanı sağda v.cava inferiora, solda v.renalis' e dökülür. Testis venleri, testiküler arter ve duktus deferens spermatik kordonu oluştururlar (23).

Kan testis venlerinde arterlerden daha düşük ısıda bulunur. Düşük ısıdaki kan arteriyel kanın ısısında azaltarak, testisin vücudun diğer kısımlarından daha düşük ısıya (35°C) sahip olmasını sağlar. Bu da spermiyumların normal gelişimi için gerekli bir durumdur (23).

Testisin inervasyonu yalnızca otonom sinirlerle olmaktadır (25).

2.1.2. Testis Fizyolojisi

Testisler iki temel işleve sahiptir. Bunlardan biri erkek germ hücresi olan spermiumların üretilmesi, diğeri seks hormonu testosteronun sentezlenmesi, depolanması ve salgılanmasıdır. Testisin bu işlevleri puberte döneminde başlar ve hipotalamo-hipofizer sistemin kontrolü altındadır. Hipotalamustan salgılanan gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH) hipofiz

bezinin ön lobundan luteinize edici (LH) hormonun salgılanmasını uyarır. LH ise Leydig hücrelerinde bulunan reseptörlere bağlanarak bu hücrelerde kolesterolden başlıca testosteron olmak üzere östrojen dahil diğer hormonların sentezlenmesini sağlar (27).

Diğer bir hipofiz ön lobu hormonu olan folikül uyarıcı hormon (FSH) ise yine hipotalamustan GnRH hormonu aracılığı ile salgılanır ve sertoli hücrelerinde androjen bağlayıcı protein'in (ABP) sentezini ve salınımını uyarır. ABP testosteronu bağlayarak onun seminifer tübüllerde yüksek yoğunlukta kalmasını sağlar. Bu şekilde bölgesel olarak ortamda yüksek yoğunlukta bulunan testosteron FSH'nın etkisiyle spermatogenezin normal olarak gerçekleşmesine olanak tanır. Testisler günde holokrin tip salgılama ile yaklaşık 200.000.000 spermiumun oluşumunu sağlar (27).

Sertoli hücrelerinde üretilen ve hipofiz bezinden FSH salınımını inhibe eden protein yapıdaki bir hormon olan inhibinin sürekli salgılanması durumuna FSH üretimi baskılanırken spermium sayısı azaldığında FSH miktarı artar (23).

2.1.3. Testis Histolojisi

Her bir testis skrotumun altında, 3 tabakalı bir kapsül ile sarılıdır. Bu yapıya testiküler kapsül denir ve tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vasküloza tabakalarından oluşur (28).

Testis en dışta 2 yapraklı, periton kökenli seröz bir kese olan tunika vaginalis tabakası ile örtülüdür. Tunika vaginalisin visseral yaprağı testisin ön ve yan yüzlerini çevreler, pariyetal yaprağı ise skrotum üzerinde uzanmaktadır. Tunika vaginalisin altında tunika albuginea tabakası bulunmaktadır. En içte bulunan tunika vasküloza tabakası ise gevşek bağ dokusundan oluşur ve kan damarlarını içermektedir (29).

Tunika albuginea düzensiz bağ dokusundan oluşan yoğun bir tabakadır. Bu tabaka testisin arka yüzü boyunca üçgen şeklinde bir kalınlaşma meydana getirir ve mediastinum testis yapısını oluşturarak organın parankimi içerisine sokulur. Buradan ışınal olarak çıkan septumlar testisi insanda yaklaşık olarak 250 lobüle ayırır. Her bir lobül, 1-4 arasında değişen sayıda seminifer tübül içerir. Seminifer tübüllerin arası tunika vaskülozanın testis içine uzanarak oluşturduğu interstisyel doku ile doldurulmuştur. Burada kan ve lenf damarları, makrofajlar, fibroblastlar ve leydig hücre grupları yer almaktadır (30, 31).

2.1.3.1. Seminifer Tübül Yapısı

Seminifer tübüller yoğun kapiller ağ ile çevrili, ikili-üçlü anastomozlar yapan, oldukça kıvrımlı yapıdadırlar. Çapları yaklaşık 150-250 mikrometre (μm), uzunlukları 30-70 (cm) dir ve testisin % 92 sini oluştururlar. Lobülün tepesine doğru kıvrımlarını kaybederek düz bir tüp halini alan (tubuli rekti) ve rete testis ile devam eden tübüller her iki testiste yaklaşık olarak 1000 adettir, uzunlukları ise yaklaşık 0,5 km dir (32, 30).

Seminifer tübüllerin duvarında en içte kalın bir seminifer tübül epiteli tabakası bulunur. Seminifer tübül epiteli özelleşmiş çok katlı epiteldir, sertoli hücrelerini ve farklı olgunlaşma aşamalarındaki 4 - 8 katlı spermatogenik seri hücrelerini içerir. Seminifer tübülleri bir bazal membran çevreler. Bazal membranın en dışında ortalama kalınlığı 8 -10 μm olan, fibroblastlarca zengin, çok katlı, silindir biçimli, tip I kollajen lif bantlarından oluşan bir gevşek bağ doku tabakası bulunur.

Bu bölgeye peritübüler doku ya da membrana propria da denilmektedir. Membrana propria ince bir bazal membran üzerine oturan seminifer tübül epitelini dıştan saran özelleşmiş fibröz bir dokudur. Buradaki gevşek bağ dokusunda kan damarları ve sinirler, ince kollajen ve retiküler lifler, fibroblastlar ve leydig hücre kümeleri bulunur (33, 31, 32).

2.1.3.2. Sertoli Hücrelerinin İnce Yapısı ve İşlevi

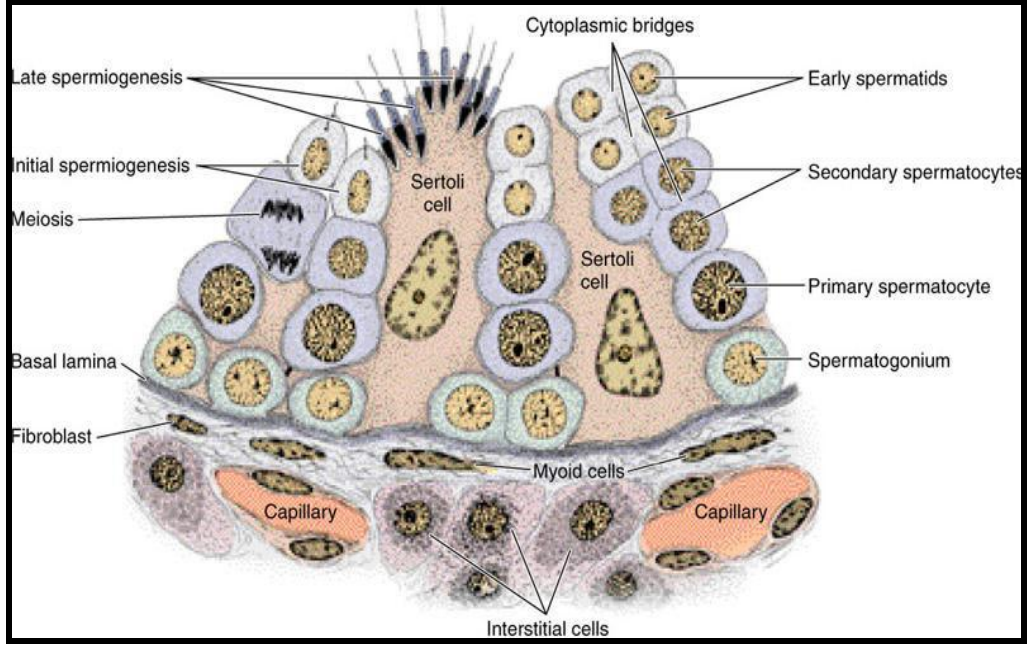
Sertoli hücreleri bazale yerleşmiş oval heterokromatid çekirdek ile merkezi yerleşimli bir büyük çekirdekçik içeren, uzun piramidal şekilli hücrelerdir. Hücreler apikal-yan yüz farklanmalarına sahiptir. Yan yüz zarlarının oluşturduğu karmaşık içe katlanmalar sonucunda hücre sınırları ışık mikroskobu ile ayırt edilememektedir. Sertoli hücrelerinin seminifer tübül lümene bakan apikal yüz membranları da katlanmalar ve kriptalar meydana getirerek yeni oluşan spermiyumların lümene bırakılma zamanına kadar yerleşebilecekleri bir alan oluştururlar (29, 31).

Sertoli hücrelerinin sitoplazması gelişmekte olan cins hücrelerine destek görevi gören mikrotübül ve ara filamanlardan oluşan gelişkin bir hücre iskeleti içermektedir. Bunun yanı sıra, iyi gelişmiş bir golgi kompleksi, bol miktarda mitokondri, lipofuksin içeren çok sayıda vezikül ve lipid damlacıkları içerir. Sitoplazmada ayrıca içeriği ve işlevi henüz tanımlanmamış Charcot-Bottcher kristaloidleri denilen inklüzyon cisimcikleri de bulunmaktadır (29, 33).

Sertoli hücreleri, taban ve yan yüzlerindeki sıkı bağlantı kompleksleriyle (zonula okludens) birbirlerine tutunurlar. Bu durum seminifer tübül epitelinin bazal ve adluminal kompartman olarak 2 kompartmana ayırır. Bazal kompartman spermatogonyumları içerir. Adluminal kompartman ise lümene yakındır ve primer spermatositleri, sekonder spermatositleri, spermatidleri içerir. Spermatogonyumlar farklılaşırken sperme özgü proteinler ortaya çıkar. Spermatogenezis immunolojik yeteneğin gelişmesinden uzun bir süre sonra olaylandığı için farklılaşmakta olan germ hücreleri yabancı olarak algılanabilir ve onları yok edecek olan bir immün yanıt oluşabilir. İşte spermatogenezis için mikro bir çevre sağlayan bu kompartmanların oluşturduğu kan-testis bariyeri, üstteki primer, sekonder spermatositler ve spermatidleri, alttaki spermatogonyumlardan ayırarak onları dolaşım sistemindeki antijenlerden, otoimmün reaksiyonlardan ve kanda bulunan maddelerden korur (30, 32, 28).

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları şunlardır:

- 1) Gelişmekte olan spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek,
- 2) Seminifer tübül lümenine protein ve iyonlardan zengin bir sıvıyı salgılamak,



Şekil 1: Sertoli hücresi ve spermatogenik seri hücreleriyle ilişkisi (34).

- 3) Folikül stimüle edici hormonun (FSH) kontrolü altında, seminifer tübül içerisinde spermatogenezin gerçekleşebilmesi için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein (ABP)'i sentezlemek,
- 4) Spermiyogenez sonunda atılan rezidüel cisimleri fagosit etmek,
- 5) Olgun spermatidlerin spermiyasyon sürecinde seminifer tübül lümenine salınımını kolaylaştırmak amacıyla aktin aracılı kasılmaları yapmak,
- 6) Hipofiz bezinin anterior kısmından salgılanan FSH'nin sentez ve salınmasını önleyen inhibin ve uyarıcı aktivin adı verilen hormonları salgılamak,
- 7) Embriyonik gelişim sırasında erkek fetusta müller (paramezonefrik) kanalların gerilemesini ve mezonefroz kanallarının oluşmasını sağlayan glikoprotein yapıdaki Anti-Müllerian Hormon (AMH)'u üretmektir (31, 35, 32).

2.1.3.3. Spermatogenik Hücreler

Spermatogenik hücreler seminifer tübül epitelinde çeşitli olgunlaşma aşamalarında bulunan 4-8 tabakalı hücrelerdir. Bazaldan lümene doğru hücre tipleri sırası ile; spermiumlar, spermatidler, sekonder spermatositler, primer spermatositler ve spermatogonyumlardır (32).

2.1.3.3.1. Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, sertoli hücreleri arasındaki bağlantıların altında kalan bazal kompartmanda yer alırlar. Bu yüzden kan-testis bariyerinin dışında bulunurlar. 3 farklı tipi bulunur (31).

Tip A spermatogonyumlar seminifer epitelin kök hücreleridir. Puberteden itibaren mitoz geçirerek soluk boyanan tip A açık spermatogonyumlar ile koyu boyanan tip A koyu spermatogonyumları meydana getirirler. Tip A açık spermatogonyumlar mitoz geçirerek tip B spermatogonyumları oluştururlar (29).

2.1.3.3.2. Spermatisitler

Tip B spermatogonyumlar mitoz geçirerek primer spermatisitleri oluşturur. Primer spermatisitler de mayoz bölünme geçirirler. Mayoz I'in profaz evresi yaklaşık 22 gün sürdüğü için spermatogenik serinin en büyük ve histolojik kesitlerde en çok karşılaşılan hücreleri primer spermatisitlerdir. Mayoz I'in sonunda oluşan sekonder spermatisitler kısa süren bir interfaz evresi geçirdikleri ve hızla ikinci mayoz bölünmeye girdikleri için histolojik kesitlerde çok zor görülürler (30, 31).

2.1.3.3.3. Spermatidler

Sekonder spermatisitler ikinci mayoz bölünmeyi tamamlayarak seminifer tübül lümeni yakınlarında sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntülerine yerleşmiş olarak bulunan spermatidler oluştururlar. Olgun spermiumlar da spermiasyon denilen olayla seminifer tübül lümenine salınır. Sonuç olarak 1 spermatogonyumdan 4 olgun spermium oluşur (31, 30).

2.1.3.3.4. Spermiyumlar

İnsanlarda bir spermatogonyumdan olgun bir spermiyum yaklaşık olarak 64 günde meydana gelir ve bu süreç spermatogenezis olarak adlandırılır. Olgun bir spermiyum baş, boyun ve kuyruk bölgelerinden oluşur (28). Baş bölgesinde yassı biçimli çekirdeğin yarısını örten, özel bir tip lizozom olarak kabul edilen akrozom bulunur. Akrozom hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin gibi hidrolitik enzimleri içerir (29).

Boyun bölgesi baş ile kuyruk arasındaki bağlantıyı sağlayan dar bir parçadır. Sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksonemi oluşturan proksimal sentriolü ve distal sentriolü içerir (30).

Kuyruk bölgesi ise orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere üç kısımdan oluşur. Kuyruğun orta parçasında sarmal olarak dizilmiş mitokondriler, 9+2 mikrotübüler yapıdaki aksonem ve 9 adet dış yoğun fibriller bulunur. Esas parça kuyruğun en uzun parçasıdır ve 7 adet dış yoğun fibrille sarılı merkezi aksonem ve fibröz kılıftan oluşur. Kuyruğun en kısa parçası olan son parçada yalnızca aksonem bulunur, dış yoğun fibriller ve fibröz kılıf bulunmaz (34, 31).

2.1.3.4. Spermatogenezis

Spermatogenezis bir spermatogonyumdan olgun spermiyum oluşurken meydana gelen çoğalma, büyüme, olgunlaşma ve başkalaşım evrelerini içeren bir süreçtir ve üç fazda gerçekleşir (28).

• 1. Spermatositogenez:

Spermatogonyumların bölünerek spermatositleri oluşturdukları bu evre Spermatositogenez olarak adlandırılır (32).

• 2. Mayoz bölünme:

Spermatositlerin ard arda iki mayoz bölünme geçirerek spermatidleri oluşturdukları bu evre mayoz bölünme olarak adlandırılır (32).

• 3. Spermiyogenez:

Spermatidlerin bir dizi hücre farklılaşması süreci geçirerek spermiyumları oluşturdukları bu evre spermiyogenezis olarak adlandırılır (31).

2.1.3.5. Leydig Hücreleri

Leydig hücreleri seminifer tübüllerin arasındaki gevşek bağ dokusunda çoğunlukla pencere tip kapiller ve küçük lenf damarlarına yakın konumda, tek tek ya da küçük gruplar halinde bulunurlar (36).

Poligonal şekilli leydig hücrelerinin sitoplazmasında insanlara özgü Reinke kristalleri olarak adlandırılan kristalize proteinler, steroid hormon üreten hücrelerin tipik özelliği olan tübüler kristal mitokondriler, sıkı paketlenmiş bol granülsüz endoplazmik retikulum (AGER), iyi gelişmiş bir golgi kompleksi ve çok sayıda yuvarlak lipid damlacıkları bulunur. Bu hücreler erkek genital organlarının farklanması ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumlu hormon olan testosteronu sentezlerler (31, 32).

2.2. Hipertermi

Hipertermi, vücut sıcaklığının 41 °C ya da daha yüksek bir değere yükselmesi sonucu ortaya çıkan bir durumdur. Denetlenmeyen ısı oluşumu, yetersiz ısı kaybı ya da bozuk ısı düzenlenimi vardır (36).

Hiperterminin testiste patolojik sonuçlara neden olabileceği olgular; ortam sıcaklığının yüksek düzeye ulaşması, sauna ve kaplıcalar, radyoterapi uygulamaları, diz üstü bilgisayarları, plastik içerikli bebek bezleri, mesleki maruziyet (jokey kıyafetleri ve pilotlar), uzun süreli araba kullanımı, enfeksiyonlar, egzersiz, erkeklerde kriptorşidizm şeklinde sıralanabilir (2, 3, 13, 37).

Tarihin ilk zamanlarından beri ateş önemli bir semptom olarak insanların dikkatini çekmiştir. Hipokrat (MÖ 360-407) ateşin önemini nabız hızına bağlamış, Andreus Celsus (1701- 1744) vücut ısısının sıcak havalarda da yükselebileceğini belirtmiştir. Galen (MS 129-201) vücutta bulunan sıcak, soğuk, kuruluk ve nemden oluşan dört niteliğin oranının düzgün olmasıyla kişinin sağlıklı olacağına inanmıştır. On birinci yüzyılda İbni Sina (MS 980-1037) ilk ateşin kalpten başlayıp sinir, arter ve venlerle tüm bedene yayıldığını, bu yayılımının bedenin normal işlevini bozduğunu, oluşan hararetin de gazap ve yorgunluğa yol açtığını belirtmiştir. 1868 yılında Carl August Wunderlich (1815-1877) 25.000 kişide 1 milyon aksiller ısı ölçümü yaparak normal vücut ısısının üst sınırını 38°C olarak tanımlamıştır (38).

Organizmada vücut ısını sabit tutan termoregülasyon sistemin merkezi hipotalamustur. Deri ve iç organlardan aldığı uyarıları ileten afferent sinirler anterior hipotalamustaki preoptik nükleusta birleşirler. Burası tam bir termostat gibi çalışır ve vücuttan ısı kaybını artırarak ya da azaltarak vücut ısını sabit tutmaya çalışır (39, 13, 37). Dinlenme sırasında bu ısı yaklaşık 37 °C derece olup referans ısı değeri olarak adlandırılır (40).

Vücut sıcaklığının normal değerinin üstüne çıkması ve belirli bir süre bu değerde kalması fertilité açısından da çeşitli sorunlar yaratmaktadır (3).

37 °C olan vücut içi sıcaklığının altındaki sıcaklıklarda oluşan spermatogenezisin düzenlenmesinde ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35 °C dir. Bu durum birkaç mekanizma ile denetlenir. Zengin bir venöz pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin etrafını sarar, testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan bir karşı ısı akımı sağlar. Bu ısı değişimiyle testisler serin tutulur. Diğer faktörler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki krameter kaslarının gevşemesi ile testislerin vücut dışına itilerek daha düşük ısıda kalmalarının sağlanmasıdır (41-44).

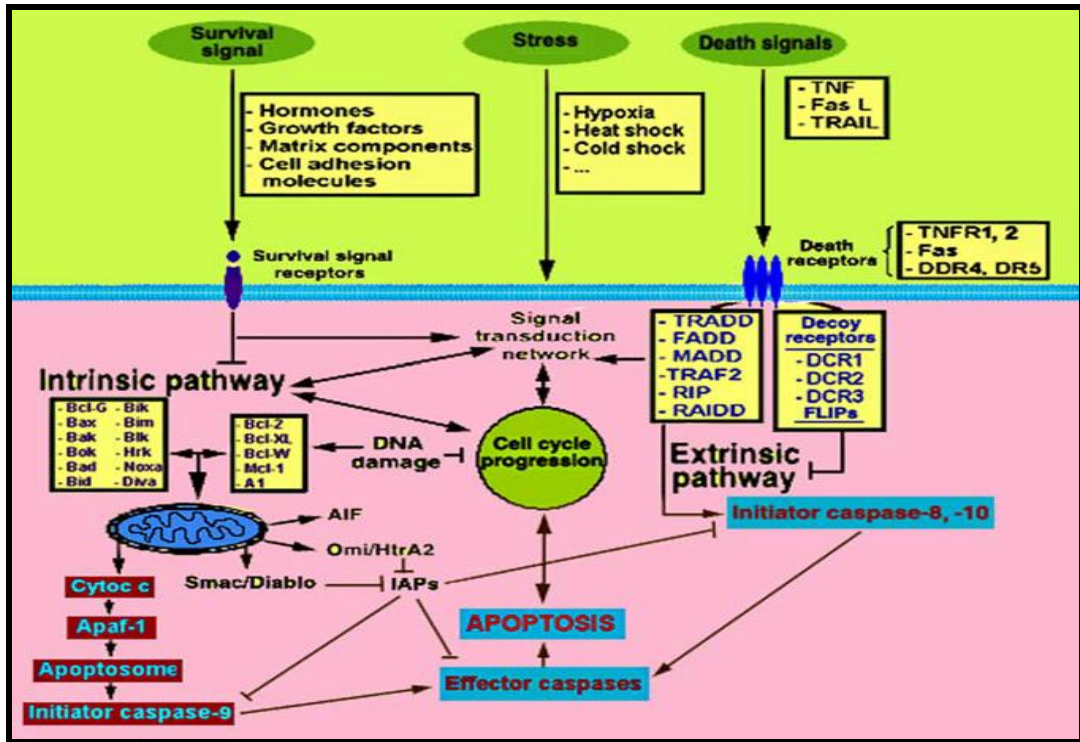
Testislerin karın duvarı içinde kalması, tubullerde hasar ve infertilite ile sonuçlanır. Gelişen teknolojiyle birlikte diz üstü bilgisayarların kullanımının artması, uzun süreli araba kullanımı, çocuklarda plastik içerikli bezlerin kullanımının artışı da erkeklerde infertiliteyi arttırmaktadır (45).

Sauna ve kaplıcalar da (43-45 °C, günde 30 dakika) insanlarda spermiyum sayısını azaltmaktadır, bazı olgularda bu azalma %90'ı bulmaktadır. Ayrıca kış mevsiminde spermiyum sayısının daha fazla olması erkeklerde mevsimsel bir etkiyi de düşündürmektedir (41, 46).

Son yıllarda yapılan infertilite çalışmalarında hiperterminin olası etkileri yaygın olarak incelenmektedir (12). Testisin işlevi yüksek derecede ısı denetimine bağlı olduğu için bugüne kadar hiperterminin erkek üreme sistemi üzerindeki olumsuz etkileriyle ilgili yapılan çalışmalarda, testis fonksiyonlarında bozulmaya ve testis ağırlığında azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (47, 50, 51). Sıcaklık stresinin leydig hücre fonksiyonlarını baskıladığı saptanmıştır (48). Radyasyon ve hipertemi uygulanmış sıçanlarda kan-testis bariyerinde yer alan zonula okludens 1 (ZO-1) ve okludin gibi proteinlerin azalması sonucu kan-testis bariyerinin bozulduğu bildirilmiştir. Kan testis bariyerin bozulmasının da spermatogenik serideki hücreler üzerine etki etmektedir (52). Hipertermi sonucu testiste eNOS ve iNOS enzimlerinde azalma, xantin oksidaz enzim miktarında ise artış görülmüştür (49). Ayrıca sıcaklık artışı spermiyum sayı, yapı ve hareketliliğinde azalmaya neden olmaktadır. Yüksek ısıda spermatogenezis düzeni de bozulmakta bu da infertiliteye yol açmaktadır (10, 11, 3).

Spermatogenez oldukça karmaşık bir süreç olup, toksik maddeler, radyasyon, ısı değişimlerine karşı son derece duyarlıdır. Bu etkenler germ hücrelerinde oksidatif strese neden olur. Deneysel hipertermi modellerinde hücrelerde serbest oksijen radikallerinin arttığı, antioksidan düzeylerinin azaldığı ve mayoz bölünme düzeninin bozulduğu gösterilmiştir (13-15)

Apoptozisin genel özelliği oksidatif stresin oluşmasıdır (15). Araştırma verileri hiperterminin spermatogenez üzerindeki olumsuz etkisini apoptozisi indükleyerek gerçekleştirdiğini göstermektedir. Hipertermi moleküler düzeyde hücre zarı bütünlüğünü bozarak Bcl-2 yolağını uyarır ve sitoplazmada APAF-1 erkini artırır. Sonuçta apoptozis gerçekleşir (12). Hipertermi kaynaklı apoptozisten en çok spermatogonyumlar etkilenmektedir ve hasar 2. ya da 4. nesilde ortaya çıkmaktadır. 2. olarak en çok etkilenen hücreler erken zigoten ve geç pakiten evresindeki primer spermatositlerdir (49).



Şekil 2: Hipertermi ve apoptoz (49).

2.3. Serbest Radikaller

Serbest radikallerin biyolojik sistemler içerisindeki varlığı yaklaşık olarak 50 yıl önce farkedilmiştir. 1956 yılında McCord ve Fridovich'in süperoksit dismutaz enzimini keşfetmeleriyle biyolojide serbest radikallerin önemi anlaşılmaya başlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda serbest radikallerin hücre düzeyindeki fonksiyonları nitrik oksit ve türevlerinin biyolojik sistemlerdeki önemini gösteren araştırmalarla ortaya koyulmuştur (53, 54).

Aerobik organizmalar sürekli olarak reaktif oksijen türevleri olarak adlandırılan moleküler oksijenden türetilen reaktif molekülleri üretirler (55). Reaktif oksijen bileşikleriyle ortamda oluşan radikal hücumu, yeterli derecede antioksidan enzimlerce süpürülmediği takdirde, aşırı miktarda oluşan serbest radikaller membran lipitlerindeki çoklu doymamış yağ asitlerine zarar vererek lipid peroksidasyon ürünleri olan malondialdehit, 4- hidroksinoneal gibi molekülerin oluşmasına neden olur. Sonuçta membran potansiyelinin değişimine ve bütünlüğünün kaybolmasına, hücre akışkanlığının bozulmasına, hücrenin bütünlüğü ve organellerinin dağılmasına yol açar (56).

Serbest radikaller bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, düşük molekül ağırlığına sahip çok etkin moleküllerdir (57).

Bu özelliklerinden dolayı radikal olmayan maddeler ile reaksiyona girerek yeni radikaller oluştururlar ve zincir reaksiyonları başlatırlar (58, 59). Bunlar organizmalar tarafından hücre içinde mitokondriyal solunum zincirinde ya da hücre dışında özellikle fagositler tarafından oluşturulurlar (60).

Serbest radikaller normal metabolizma sırasında oluşabildikleri gibi organizmanın yüksek sıcaklık, radyasyon, ilaç, hava kirliliği, sigara dumanı, inflamasyon, şiddetli egzersiz gibi etkenlere maruz kalması sonucunda da oluşabilirler (61). Serbest radikallerin fazla oluşumu, doku hasarına, inflamasyona ve hücre fonksiyon bozukluklarına yol açar. Son yıllarda yapılan çalışmalar, serbest radikallerin miyokard enfarktüsü, iskemi, astım ve diyabet gibi birçok hastalıkla ve yaşlanma süreciyle ilişkisi olduğunu göstermektedir (62-65).

Serbest radikaller kan ve yapısal proteinleri okside edebilir ve proteinlerin daha basit bileşiklere parçalanmasını sağlayan sistemi yavaşlatabilir. Oksidasyon sırasında proteinler

aminoasit kaybedebilir veya parçalanabilirler (66). Bu reaksiyonlar yapısal proteinlerin veya enzim fonksiyonlarının değişimine yol açar (67). Protein oksidasyonu yüksek sıcaklık, inflamasyon, fiziksel egzersiz veya iskemi-reperfüzyon sonucu oluşabilir (68, 69).

DNA'nın her bir parçası, serbest radikallerin saldırılarına karşı kolay bir hedeftir (70). DNA oksidasyonu sonucu mutasyonlar meydana gelir, kanser ve hücre yaşlanması görülür (68, 71). Serbest radikallerin karbohidratlar üzerinde de önemli etkileri vardır. Monosakkaritlerin oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, peroksitler ve okzoaldehitler meydana gelir. Bunlar çeşitli hastalıkların oluşmasındaki patolojik süreçlerde önemli rol oynarlar (72).

Önemli serbest radikallerden biri de Malondialdehit (MDA)' dir.

2.3.1. Malondialdehit (MDA)

Malondialdehit (MDA), enzimatik olmayan oksidatif lipit peroksidasyonu sonucu oluşur. İki den fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin oksidasyonunda serbest hale geçen siklik endoperoksitler MDA'nın asıl kaynağını oluşturmaktadır. MDA proteinlerin amino gruplarına, fosfolipidlere veya nükleik asitlere bağlanarak toksik etkisini gösterir (73).

Bazı dokularda MDA enzimatik reaksiyonlar sonucu oluşabilir. Oluşan MDA, hücre membranında iyon alış-verişine etki ederek membrandaki bileşiklerin çapraz bağlanmasına yol açar. Sonuçta iyon geçirgenliğinin azalmasına ve enzim aktivitesinin değişmesine neden olur (74).

2.4. Antioksidanlar

Organizmanın oluşturduğu serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek üzere vücutta çeşitli antioksidan savunma sistemleri geliştirilmiştir. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki hassas denge korunmadığı takdirde hücre hasarı ve ölümüyle sonuçlanan pekçok patolojik durum ortaya çıkmaktadır (75).

Organizmada antioksidan kapasite ile serbest radikal üretim miktarı değerleri eşleşmektedir. Yüksek oksijen tüketimine sahip, karaciğer, beyin, böbrek gibi organlar yüksek antioksidan enzim aktivitesine sahiptir (76).

Antioksidanların ilk belirlenen etkileri membran yapısında bulunan lipitleri peroksidasyona karşı korumaları olmuştur. Bunun sonucu olarak, başlangıçta antioksidanlar lipit peroksidasyonunu engelleyen moleküller olarak tanımlanmışlardır. Günümüzde ise, antioksidanların tanımı lipitlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler ve karbohidratlar gibi diğer hedef molekülleri koruyucu etkilerini de içerecek şekilde genişletilmiştir. Böylece, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksijen hasarını engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmakta ve bu tanıma bağlı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir (76).

Antioksidanlar etkilerini 4 şekilde göstermektedir.

- 1) Reaktif oksijen türlerinin enzimsel reaksiyonlar aracılığıyla veya doğrudan temizlenmesi,
- 2) Reaktif oksijen türlerinin oluşumunun baskılama yoluyla engellenmesi,
- 3) Metal iyonlarının bağlanması ve böylece radikal oluşum reaksiyonlarının engellenmesi,
- 4) Hedef moleküllerin hasar sonrası tamiri veya temizlenmesidir (76).

Organizma tarafından üretilen ve pek çok türü bulunan antioksidanlardan en önemlileri Superoksit Dismutaz (SOD) ve Glutasyon Peroksidaz (GPx) dir.

2.4.1. Süperoksit Dismutaz (SOD)

Süperoksit Dismutaz (SOD); süperoksit radikale karşı devreye giren ilk savunma sistemidir. SOD, süperoksit radikalının hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü sağlayarak hücre içindeki düzeyini azaltır. Süperoksit radikali birçok yükseltgenme reaksiyonunda yan ürün olarak üretilir, ama olasılıkla büyük bir kısmı mitokondrideki elektron taşıma zincirinde meydana gelen bir hata sonucu oluşur. Bu sebeple hücreler dismutasyon reaksiyonunu katalizleyerek oksijeni temizleyen ve detoksifiye eden süperoksit dismutazları içermektedir (77, 78). Oksijen kullanımı yüksek olan dokularda SOD aktivitesi fazladır. Buna karşın ekstraselüler sıvıda SOD aktivitesi çok düşüktür (79).

2.4.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx)

Glutasyon Peroksidaz (GPx); sitozolde yerleşik, tetramer yapısında, dört selenyum atomu içeren bir enzimdir. Hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerle reaksiyona girerek

hücreleri oksidatif hasara karşı korur. Ayrıca, protein yapısındaki sülfhidril (-SH) gruplarını indirgenmiş halde tutarak pek çok proteinin ve enzimin inaktivasyonunu engeller, aminoasitlerin membrandan transportunu sağlar, hemoglobinin methemoglobine dönüşmesini önler (75, 80).

Glutasyon peroksidaz, zar yapısındaki fosfolipit hidroperoksitlerini alkollere indirgeyerek özellikle E vitamininin yetersiz olduğu durumlarda peroksidasyona karşı korunma sağlar. Ayrıca proteinlerin yıkımı ve sentezinde, enzimlerin düzenlenmesinde DNA'nın oluşumunda ve en önemlisi serbest radikallere karşı hücrenin korunmasında önemli bir role sahiptir (75).

2.5. L-karnitin

L-karnitin (3-hidroksi 4-N-trimetilamino butirat), yapısal olarak aminoasitlere benzeyen vitamin benzeri bir maddedir. İlk kez 1905'te sığır kasından izole edilmiş olup, yapısı tam olarak 1927'de açıklanmıştır (81, 82, 20). Kırmızı ette ve kümes hayvanı etinde fazla miktarda bulunan L-karnitin %75'i diyetle alınır. Bu şekilde vücuda alınan L-karnitin aktif transport ile duodenum ve jejunumdan emilir. Böbreklerde, glomerüler filtrata geçen kısmın %90'nın dan fazlası tübüllerden geri emilir, çok az bir kısmı idrar ile atılır.

Kalan %25'lik kısmı ise vücutta iskelet kası, kalp, beyin, karaciğer ve böbrek gibi organlarda temel aminoasitler olan lizin ve metioninden endojen olarak sentezlenebilmektedir (81, 20, 83).

L-Karnitin'in biyosentezinde kofaktör olarak vitamin C, nikotinik asit, vitamin B6 ve Fe+2 gerekmektedir. Sentez işlemi, lizine bir transferaz reaksiyonu aracılığı ile metioninden metil gruplarının transfer edilerek 6- N-trimetillizin'e dönüştürülmesi ile başlar. Daha sonra bu molekül üzerine hidroksilaz, dehidrojenaz ve aldolaz enzimleri etki göstererek sonuçta L-karnitin oluşturulur (83, 84).

Lizin + metionin → trimetillizin → trimetilamino butirat → L-karnitin

L-karnitin, yağ metabolizmasında önemli rol oynayan, küçük, suda eriyebilen bir moleküldür. Hem plazmada hem de dokuda serbest L-karnitin veya açilkarnitin türevleri şeklinde, yağ asitlerine bağlı olarak bulunur (82, 85).

L- karnitin ve onun kısa zincirli esterleri olan; L-asetil karnitin ve L-propionil karnitin pekçok önemli hücre içi fonksiyona ve farmakolojik etkiye sahiptirler. L-karnitin, esterleri, bazı spesifik hücre içi enzimler ve membran taşıyıcılarından oluşan L-karnitin sistemi aşağıdaki fonksiyonlarda rol oynamaktadır.

1) Uzun zincirli yağ asitlerinin, β -oksidasyon yeri olan mitokondriyal matriks içine taşınmalarını sağlarlar. Mitokondri iç membranı uzun zincirli yağ asitlerine karşı geçirgen değildir. Bu membranı ancak L-karnitinle birleşerek geçebilmektedirler. Mitokondri iç membranını geçebilen açıl-karnitin ester, karnitin palmitoil transferaz I tarafından karnitin ve açıl-koenzim A (Açıl-KoA)'dan sentez edilir. Açıl-karnitin ester mitokondride β -oksidasyona uğrar (82, 20, 86).

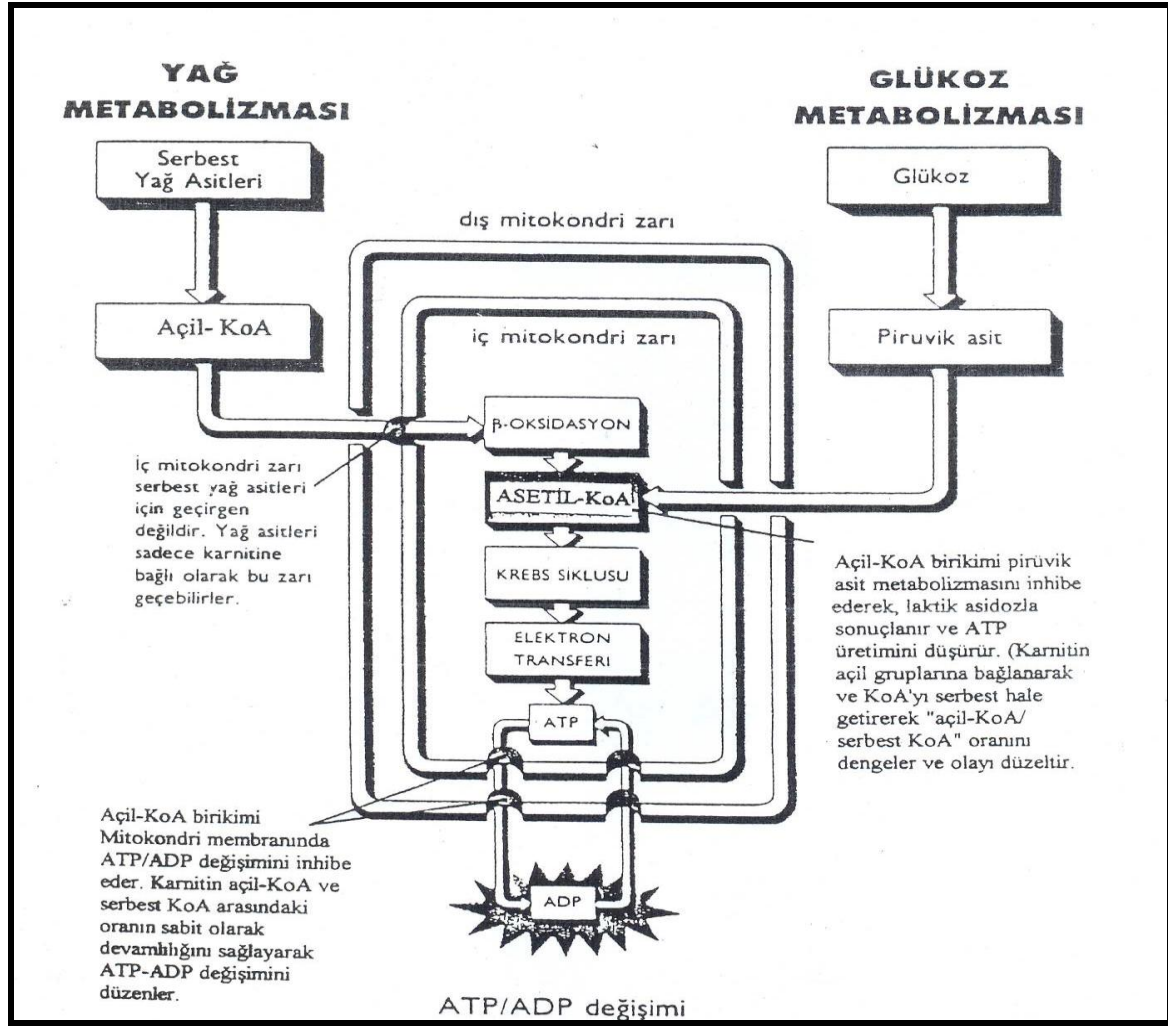
2) Mitokondri hücre membranının stabilizasyonunu sağlamakla birlikte peroksizomal seviyede lipid peroksidasyonda rol oynamaktadırlar (87, 21).

3) Mitokondri içindeki total KoA miktarı sabittir. Ancak, birçok enzimatik reaksiyonda serbest KoA kullanılmaktadır. L-karnitin, karnitin asetiltransferaz enzimi ile KoA'dan karnitine asetil birimlerinin geri dönüşümlü transferini katalizleyerek serbest KoA miktarını artırır.

Serbest KoA miktarının artması ise α -ketoglutarat dehidrogenaz aktivitesini arttırmak suretiyle Krebs siklusunu hızlandırarak mitokondri içindeki KoA/asetil KoA oranının korunmasını sağlar (88-90).

4) Karnitin, açıl gruplarını temizlemek suretiyle detoksifiye edici bir ajan olarak rol oynar. Bu yönüyle hücrenin ozmotik dengesinin devamını sağlar. Mitokondri içinde birikmeleri durumunda birçok enzimin inhibisyonuna neden olan ve yıkıcı etkileri olan açıl gruplarının, mitokondri dışına taşınmalarını sağlar. Uzun zincirli açiller düşük dozlarda, adenilat translokaz enzimini inhibe ederek ATP'nin mitokondri dışına taşınmasını durdururlar. Yüksek dozlarda ise, hücre içi membranlarda geri dönüşümsüz hasar oluştururlar. Uzun zincirli açıl-KoA miktarını azaltarak, serbest KoA miktarını artırarak açıl-KoA/serbest KoA oranını dengede tutmak suretiyle, bu olumsuz etkileri düzeltir (17, 62, 63). İskemik dokuda, karnitin rezervi hızlı tükenir ve uzun zincirli yağ asitleri okside edilemez, bunun sonucunda da uzun zincirli açıl-KoA ve uzun zincirli açıl karnitin esterleri birikir. Dokudaki karnitin seviyesinin normale yükseltilmesiyle, uzun zincirli açıl-KoA'dan açıl grupları

ayrılarak intramitokondriyal açıl-KoA miktarı normale düşürülür ve yüksek açıl KoA seviyelerinin getirdiği olumsuz etkiler geri çevrilir. Ayrıca aerobik piruvat metabolizması uyarılarak, piruvatın laktik asite dönüşmesi baskılanır, böylece hücre içi laktik asit birikimi de önlenir (89).



Şekil 3. Hücre enerji metabolizmasında L-karnitinin rolü (91)

L-karnitin, membran oluşumu ve bütünlüğü için gerekli fosfolipidlerin sentezini arttırmada ve fosfolipidlerin reaçilasyonu aracılığıyla membran hasarının onarımında önemli rol oynamaktadır (92). L-karnitin, β -oksidasyon için lipidleri sitozolden mitokondri içine taşıyarak lipid düzeylerini düşürmek suretiyle lipoperoksit üretimini azaltmaktadır (92, 19, 93). Serbest radikal hasarına karşı membranı stabilize ederek hücre hasarını önleyebilir ve ayrıca mitokondriyal hasarı engelleyebilir. Böylece serbest radikal oranını azaltarak, enerji

üretimini arttırabilir (21, 94). Ayrıca L-karnitin, ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile ROS'un oluşumunu önleyici etkiye sahiptir (95, 96). Son zamanlarda, L-karnitinin antiapoptotik aracı olarak etki ettiği de gösterilmiştir (95, 21, 94, 97).

L-karnitinin erkek üreme fonksiyonu üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır.

L-karnitin spermatozoanın ihtiyaç duyduğu enerjiyi sağlayarak spermatogenezi, sperm hareketi ve olgunlaşmasını pozitif olarak etkiler ve sperm metabolizmasında önemli bir rol oynar (98, 88).

Epididimal plazma insan vücudunda en yüksek karnitin seviyesini içerir. L-karnitin epididimal plazma içine salgılandıktan sonra spermatazoa tarafından alınarak kısmen asetil karnitin haline dönüştürülür. Sonuç olarak spermatazoa içerisinde serbest ve asetilenmiş L-karnitin şeklinde biriktirilir (82, 99, 100). Epididimal plazma ve spermatozoadaki L-karnitin konsantrasyonu dolaşımdakinden 2000 kat daha fazladır (82, 101). L-karnitin, yüksek affiniteli bir Na⁺ bağımlı organik katyon taşıyıcısı olan OCTN2 vasıtasıyla dolaşımdan duktus epididimis içerisine taşınır. Karnitin taşıyıcısı 2 olarak isimlendirilen diğer bir L-karnitin taşıyıcısı ise epididimal lümen içerisine L-karnitin sekresyonunu sağlar (102, 86).

L-karnitin sperm maturasyonu ve motilitesine de katkıda bulunur. Yapılan çalışmalar L-karnitin duktus epididimiste spermatozoanın olgunlaşması ve fertilizasyon kabiliyetinin gelişmesine yardım etmede rol oynadığını göstermiştir. Testiste üretilen spermatazoa epididimise girdiğinde hareketsizdir. Bu esnada L-karnitin içeriği de düşüktür. Hareketli ve matur hale gelebilmek için epididimal lümen içerisinde postgonadal modifikasyona uğramak zorundadır. Epididimisten geçişi esnasında, epididimal sıvıda L-karnitin artışına paralel olarak spermatozoanın kuyruk hareketi de başlar (92, 19, 82, 101).

Erkek germ hücre serisinde oksidatif stres nükleus ve mitokondride bütünlük kaybına ve spermatozoda hasara neden olur. L-karnitin antioksidan ve radikal süpürücü özellikleri vasıtası ile oksidatif stres kaynaklı erkek infertilitesini azaltmada faydalı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (20, 21, 22).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırma deneyseldir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırmanın deneysel ayağı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Histokimyasal ve immunohistokimyasal değerlendirmeler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda, biyokimyasal değerlendirmeler ise Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/Çalışma Grupları

Araştırmada toplam üç grup oluşturulmuştur. Deney grupları aşağıdaki şekilde düzenlenmiştir:

Kontrol grubu: Hipertermi uygulanmayan, yalnızca 22 °C (oda sıcaklığı) su banyosunda 5 gün, günde 15 dakika bekletilen ve 14 gün sonra sakrifikasyonun yapıldığı grup (n=7).

Hipertermi grubu: 43 °C sıcak su banyosunda, 5 gün, günde 15 dakika hipertermiye maruz bırakılan ve 14 gün sonra sakrifikasyonun yapıldığı grup (n=7).

L-karnitin grubu: 43 °C sıcak su banyosunda, 5 gün, günde 15 dakika hipertermiye maruz bırakılmadan 1 saat önce ve 5 gün süresince, intraperitoneal yoldan, 250 mg/kg/gün L-karnitin verilen ve 14 gün sonra sakrifikasyonun yapıldığı grup (n=7).

Yapılan literatür araştırmalarına göre hiperterminin testiste en fazla 14. günde hasar oluşturduğu saptanmış ve bu yüzden sakrifikasyon günü olarak 14. gün seçilmiştir. Antioksidan olarak kullandığımız L-karnitin yalnızca 5 günlük deney süresince uygulanmıştır. L-karnitin'in hipertermideki koruyucu etkilerine ait literatür bilgisi olmadığı için kullanım dozu ve uygulama süresi literatürdeki diğer modeller örnek alınarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda deneklere testiküler hipertermi uygulanması amacı ile hipertermi ve L-karnitin grupları için sıcaklığı 43 °C ye, kontrol grubu için ise sıcaklığı 22 °C ye ayarlanmış benmari kullanılmıştır.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Birimi'nden (DETFAB) temin edilen Wistar suşu toplam 21 erkek sıçan (200-220 g) kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Bilimi Anabilim Dalı, Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda Wistar suşunun bulunması ve literatür ile uyumlu olması nedeniyle bu tür ve cins seçilmiştir. Tüm denekler çalışma sonlanıncaya kadar Deney Hayvanları Laboratuvarlarında 12/12 saat karanlık/aydınlık periyodunda, 20–22 °C oda sıcaklığında barındırılmıştır. Denekler dinlendirilmiş musluk suyu ve standart pellet yem ile beslenmiştir.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmada kontrol grubuna yalnızca 22 °C'lik (oda sıcaklığı) su banyosu, hipertermi ve L-karnitin gruplarına 43 °C'lik sıcak su banyosu uygulanmıştır.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Araştırmada Kullanılan Demirbaş Malzemeler

Araştırmada testis ağırlıklarını ölçmek için hassas terazi (Sartorius, GC803S-0CE), deneklerden elde edilen dokuların takibinde etüv, kesitlerin alınmasında mikrotom, boyamalarda kullanılan distile su gereksinimi için distile su cihazı, immünohistokimyasal incelemeler için humidity chamber ve otomatik mikropipetler kullanılmıştır.

3.6.2. Araştırmada Kullanılan Yöntemler

Deney sonunda elde edilen doku örneklerine rutin doku takip prosedürü uygulanmış, ince kesitleri alınmış, çeşitli histokimyasal ve immünohistokimyasal boya uygulamalarına tabi tutulmuştur. Araştırmada histokimyasal değişiklikler için hematoksilin & eozin, PAS ve masson trikrom, immünohistokimyasal olarak apoptozun belirlenebilmesi için TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları yapılmıştır. Testisin ultrastrüktürel yapısı incelenmiş, biyokimyasal olarak MDA, GPx ve SOD düzeyleri ölçülmüştür.

3.6.2.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney başlangıcında ve deney sonunda (sakrifikasyon öncesi) deneklerin ağırlıkları ölçüldü. Sonuçlar SPSS 15,0 paket programında değerlendirildi. Deneklerin ağırlıklarının başlangıç ve deney sonundaki verilerinin, grup içinde karşılaştırılmasında $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney sonunda (sakrifikasyondan sonra) deneklerin testis ağırlıkları ölçüldü. Sonuçlar SPSS 15,0 paket programında değerlendirildi. Testis ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırılmasında $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.3. Histokimyasal İncelemeler

Sol testis histokimyasal incelemeler için %10'luk formolde 24–48 saat bekletilerek fikse edildi. Daha sonra fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından 4 farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. 1'er saatlik 2 kez yumuşak parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular sert parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo 1).

Tablo 1: Doku takip protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften Uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1-2	30'ar dakika
	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.6.2.3.1. Hematoksilen-Eozin Boya Protokolü

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki 20 dakika (etüvde) diğer ikisi 10'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için 5 değişim azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 2).

Tablo 2: Hematoksilen-Eozin boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda ısısında)	10 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda ısısında)	10 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile Su	Çalkalama
Boyama	Hematoksilen	10 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Eozin	2 dakika
Yıkama	%70-80-96-100-100'lük alkol	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.2. Masson Trikrom Boya Protokolü

Deparafinizasyon için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirdi. Distile suda çalkalandıktan sonra masson trikrom boyama seti (2049 GBL, İstanbul, Türkiye) içerisinde dokular üzerine 4 damla weigert hematoksilin boyası ile 4 damla ferrik klorür çözeltisi damlatıldı ve 10 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan 2 damla asit-alkol çözeltisi 4 dakika sonra uzaklaştırıldı. Ardından 2 damla ponceau asit fuksin azofloksin çözeltisi dokunun üzerini tamamen kaplayacak şekilde uygulandı 4 dakika bekletilen kesitler distile su ile yıkandı. Daha sonra 2 damla fosfomolibdik asit turuncu G boyası ile 10 dakika muamele edildikten sonra uzaklaştırıldı ve 8 damla açık yeşil boya ile 5 dakika boyandı. Boyamanın ardından distile su ile yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Masson Trikrom boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 2 (oda Isısında)	20 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen 3 (oda Isısında)	20 dakika
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%100'lük alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%96'lık alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%80'lik alkol	Çalkalama
Rehidratasyon	%70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:1 + No:2 solüsyonu	10 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:3	4 dakika
Boyama	No:4	4 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	No:5	10 dakika
Boyama	No:6	5 dakika
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Dehidratasyon	%70-80-96-100-100'lük alkoller	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 2	20 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen 3	20 dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.3.3. Peryodik Asit Schiff (PAS) Boya Protokolü

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bekletildi. Ardından ilki 1 saat (etüvde) diğer ikisi 30'ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra dehidratasyon işlemi için azalan alkol serilerinden geçirildi, distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika peryodik asit ile muamele edildi. Ardından 10 dakika akarsuda bekletilen kesitler distile suda çalkalanıp kurutulduktan sonra 20 dakika schiff reagent ile muamele edildi. Sonrasında 10 dk akarsuda yıkandı. Daha sonra dehidratasyon işlemi için artan alkol serilerinden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 4).

Tablo 4: Peryodik Asit Schiff (PAS) boya protokolü.

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen 1 (etüvde)	1 saat
Deparafinizasyon	Ksilen 2-3 (oda ısısında)	30 dakika
Rehidratasyon	%100-100-96-80-70'lik alkol	Çalkalama
Yıkama	Distile su	Çalkalama
Boyama	Peryodik asit	5 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Schiff	20 dakika
Yıkama	Akarsu	10 dakika
Boyama	Hematoksilen	2-3 dakika
Yıkama	Akarsu	6 dakika
Dehidratasyon	%60-70-80-96-100'lük alkol serileri	Çalkalama
Şeffaflaştırma	Ksilen 1-2-3	20'şer dakika
Kapama	Entellan	

3.6.2.4. Morfometrik Değerlendirmeler

3.6.2.4.1. Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması

Deney gruplarındaki her bir denek için ayrı ayrı 100 adet tübül değerlendirilerek her bir tübüle Johnson Testiküler Biyopsi Skorlaması yapıldı ve değerlendirilen tübüllerin skorlamalarının ortalaması alındı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi (Tablo 5).

3.6.2.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Seminifer tübül çap ölçümü için PAS ile boyanan kesitlerden her grup için rastgele seçilen 100 tübülde, 20x'lik büyütmeyle Image Tool (UTHSCA Image Tool Version 3,0, USA) görüntü analiz programını kullanarak çap ölçümü yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 5: Jonhson testiküler biopsi skorlaması (103).

Skor	Histolojik Bulgular
10	Birçok spermatozoa bulunan tam bir spermatogenez
9	Birçok spermatozoa var, germinal epitel bozuk ve lümen oblitere
8	Yalnız birkaç spermatozoa var (<5-10)
7	Spermatozoa yok, birçok spermatid var
6	Spermatozoa yok, yalnızca birkaç 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

3.6.2.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

Bazal membran kalınlığı ölçümü için PAS ile boyanan kesitlerden her gruptan rastgele seçilen 100 tübülde, 100x'lik büyütmeyle Image Tool (UTHSCA Image Tool Version 3,0, USA) görüntü analiz programını kullanarak ölçüm yapıldı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.6.2.5. İmmünohistokimyasal İncelemeler:

Apoptotik hücrelerin belirlenmesi ve hücrelerdeki DNA fragmentasyonunun gösterilmesi için immünohistokimyasal yöntemler kullanıldı. Apoptotik sinyaller DNA üzerinde kırık oluşturmaktadır. Açığa çıkan DNA kırıklarının serbest 3'-OH 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. İmmünohistokimyasal yöntemlerle parçalı nukleuslar veya sitoplazma koyu kahverengi boyanır.

3.6.2.5.1. TUNEL Protokolü:

Bu teknik için Apoptag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kiti (Millipore S7101, USA) kullanıldı. Kesitler bir gece 60 °C'lik etüvde tutulduktan sonra 30'ar dakika üç değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından azalan derecede alkol serileri ile dehidratasyon sağlanarak distile suda çalkalandı. Boyanacak alanın etrafı pappen ile çizildikten sonra mikrodalgada 600 watta, 6 dakika sodyum sitrat solüsyonunda bekletildi. Soğuması için 20 dakika bekletildi. Ardından 3 kez PBS ile yıkandı. Her yıkamadan sonra doku etrafındaki fazla su kurutma kağıdı ile alındı. Daha sonra kesitler endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %3' lük H₂O₂ (TA-015-HP, Lab vision, Fremont, CA) ile 10 dk bekletildi. Tekrar PBS ile yıkanan kesitler equilibration buffer ile 10 dk bekletildi. Ardından kesitler TdT enzyme solüsyonu ile 37 °C de etüvde 1 saat inkübe edildi. Sonrasında PBS ile yıkanan kesitler working strength stop/sash buffer ile 10 dk bekletildi. PBS ile yıkanan kesitler TUNEL reaksiyonunun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra mayer's hematoksilen ile art alan boyaması sağlanan kesitler artan alkollerle dehidratasyon işlemine tabi tutuldu ve ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan ile kapatıldı.

3.6.2.5.2. Aktif Kaspaz 3 İmmünohistokimya Protokolü:

Alınan kesitler öncelikle 60 °C'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla 30' ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Suyu uzaklaştırılan dokuların etrafı pappen ile çizildi. Ardından

mikrodalgada sodyum sitrat solüsyonu (Bio-Optica) içerisinde, 600 wattta 6 dakika tutuldu. Soğuması için 20 dakika bekletildi. 3 kez PBS ile yıkanan kesitler 10 dk H₂O₂ ile oda ısısında muamele edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 1 saat bloklama solüsyonu (TA 125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile bekletildi. Primer antikor rat spesifik active caspase-3 (1:100; Neomarkers, Fremont, CA) ile + 4 °C’ de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidadz ikincil antikor (85-9043 Zymed Histostain Kit, San Francisco, USA) ile 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere mayer’s hematoksilin ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

3.6.2.6. Ultrastrüktürel İncelemeler

3.6.2.6.1. Elektron Mikroskopik Doku Takibi

Karnovski solüsyonuna (pH 7,4) konulan dokular + 4°C’de 48 saat bekletildi. Örnekler daha sonra 0,1M sodyumfosfat tamponu ve 0,1M sükroz karışımında 3 kez 15 dk bekletildi. %2 sodyumfosfat tampon osmium tetroksid (pH 7,4) solüsyonu ile 90 dk post fiksasyon için muamele edildi. 0,1M sodyumfosfat tampon (pH 7,4) ile 3 kez 15 dk yıkandı. %50 oranında hazırlamış aseton ile 2 kez 15 dk dehidratasyonu yapıldı. Dokular %70 aseton, %0,5 uranilasetat ve %1 fosfotungistik asit 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.

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 mikroskobunda (Carl Zeiss Libra 120) değerlendirildi.

3.6.2.7. Biyokimyasal İncelemeler

Sağ testis dokularının bir kısmı biyokimyasal analizler için kullanıldı. Doku örnekleri tartıldıktan sonra, 750 µL PBS içinde homojenizatörde (Tissuelyser II, QIAGEN, Germany) yaklaşık 3 dk süreyle 30 frekansta homojenize edildi. Homojenizasyon işlemleri sırasında örneklerin soğuk şartlarda kalmasına dikkat edildi. Homojenat, 10 000 g'de santrifüj edildi; elde edilen süpernatantlar, analiz süresine kadar -80°C de saklandı. Süpernatantlardan oksidatif stres göstergesi olarak MDA düzeyi ve antioksidan savunma sisteminin göstergeleri olarak da SOD ve GPx enzim aktiviteleri ölçüldü.

3.6.2.7.1. Malondialdehit (MDA) Düzey Ölçümü

Plazma ve doku homojenizatlarında malondialdehit (MDA) ölçümü, HPLC ile floresan deteksiyonla (Shimadzu VP Series and RF-10AXL floresan dedektör, Japan) yapıldı. MDA ölçümü için 40 uL plazma veya doku homojenizatlarına 100 uL saf su, 20 uL 2,8 mmol/L bütillenmiş hidroksi tolueen, 20 uL %8,1 sodyum dodesil sülfat, 600 uL tiyobarbitürik asit eklendikten sonra 95 °C'de 1 saat beklendi. Soğutulduktan sonra 1000 uL 1:15 piridin bütanol eklenerek vortekslendi. Organizma faz eppendorf tüplerine alınarak 15 000 g'de 15 dk santrifüjasyon sonrası üstteki kısım C18 [150x4,6 cm, partikül çapı 5 µm, (MN/EC 150/4.6 Nucleosil 100-5 C18, CatNo. 720120.46)] kolonuna enjekte edildi. Elüsyon işlemi 0,8 mL/dakika akış hızında gerçekleştirildi. Pikler Ex.515/Em.553 dalga boylarında detekte edildi. MDA piki 3,7 dk oluştu. Örnek pikleri standart grafiği ile kantite edildi. Elde edilen MDA değerleri protein başına oranlanarak düzeltildi.

3.6.2.7.2. Glutasyon Peroksidaz (GPx) Düzey Ölçümü

GPx değerleri, GPx ticari kiti ile (Oxis International, 21017) spektrofotometrik yöntemle Architect C16000 (Abbott, USA) otoanalizörü kullanılarak ölçüldü. Otoanalizöre aplikasyon kit üreticisinin prospektüsü doğrultusunda yapıldı.

3.6.2.7.3. Süperoksit Dismutaz (SOD) Düzey Ölçümü

SOD değerleri, SOD ticari kiti ile (Ransod, Randox International, SD125) spektrofotometrik yöntemle Architect C16000 (Abbott, USA) otoanalizörü kullanılarak ölçüldü. Otoanalizöre aplikasyon kit üreticisinin prospektüsü doğrultusunda yapıldı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Deney sonunda elde edilen verilerin değerlendirilmesinde SPSS 15,0 paket programı kullanıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterildi. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma planlanan doğrultuda ilerlemiş, herhangi bir aksaklıkla karşılaşılmamıştır. Araştırmada herhangi bir sınırlılık durumu ortaya çıkmamıştır.

3.10. Etik Kurul Onayı

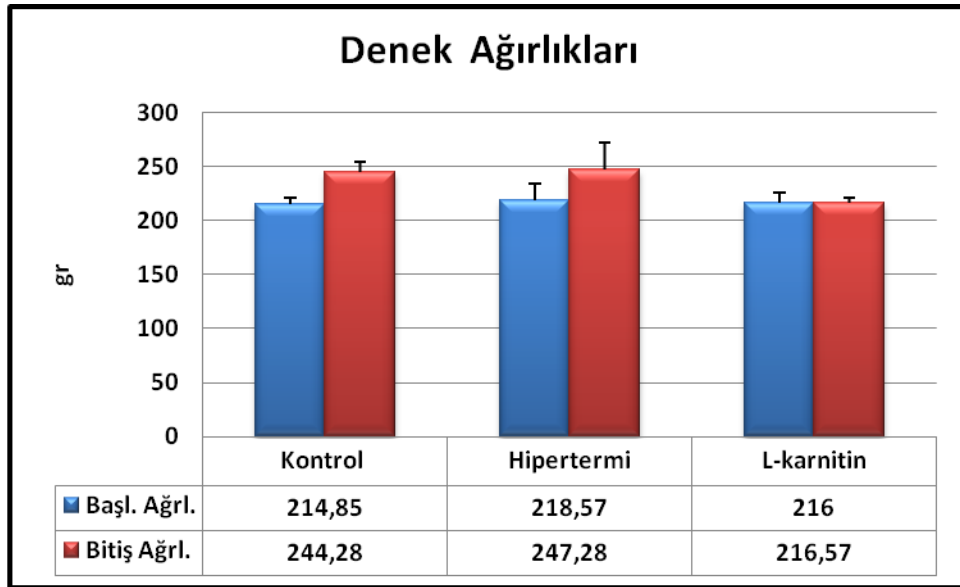
Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 8 Temmuz 2011 tarihinde gerçekleştirilen 06.14.2011 no' lu toplantıda, 14/2011 Protokol no ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

Etik kurul onayı Ek-1 olarak teze eklenmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Denek Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Grupların deney başlangıç ağırlık ortalamaları; kontrol grubunda $214,85 \pm 6,25$ gr, hipertermi grubunda $218,57 \pm 15,87$ gr, L-karnitin grubunda $216 \pm 9,55$ gr olarak bulundu. Deney bitiş ağırlık ortalamaları ise; kontrol grubunda $244,28 \pm 9,84$ gr, hipertermi grubunda $247,28 \pm 25,30$ gr, L-karnitin grubunda $216,57 \pm 4,68$ gr olarak saptandı. Bu değerler göz önünde bulundurulduğunda; kontrol ve hipertermi gruplarındaki deneklerde deney başlangıç ve bitiş ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ağırlık artışı saptanırken ($p=0,018$, $p=0,028$), L-karnitin grubunda L-karnitin yağ yakımını artırıcı özelliğinden dolayı başlangıç ve bitiş ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmadı ($p=0,932$). Sonuçlar SPSS 15,0 paket programında Wilcoxon Sıralı İşaretler Testi kullanılarak değerlendirildi (Şekil 4).

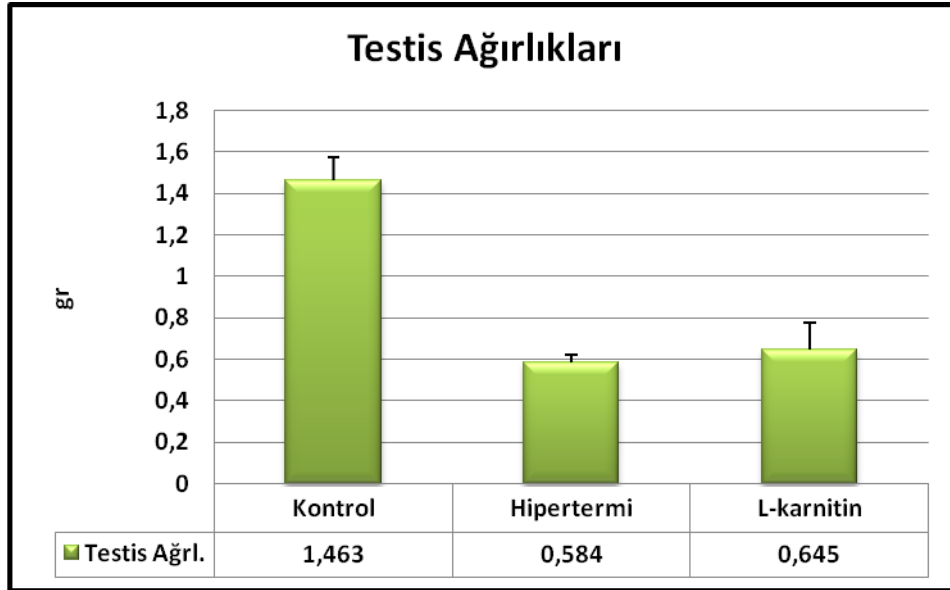


Şekil 4: Grupların deney başlangıcı ve deney sonundaki ağırlıkları.

4.2. Testis Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Grupların testis ağırlık ortalamaları; kontrol grubunda $1,463 \pm 0,11$ gr, hipertermi grubunda $0,584 \pm 0,04$ gr, L-karnitin grubunda $0,645 \pm 0,13$ gr olarak saptandı. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında hipertermi ve L-karnitin gruplarında kontrol grubuna göre testis ağırlıklarında anlamlı bir azalış tespit edildi ($p=0,002$, $p=0,002$). Sonuçlar SPSS 15,0 paket

programında Kruskal Wallis Varyans Analizi ve Mann-Whitney U testleri kullanılarak değerlendirildi (Şekil 5).



Şekil 5: Grupların testis ağırlıkları.

4.3. Histokimyasal Bulgular

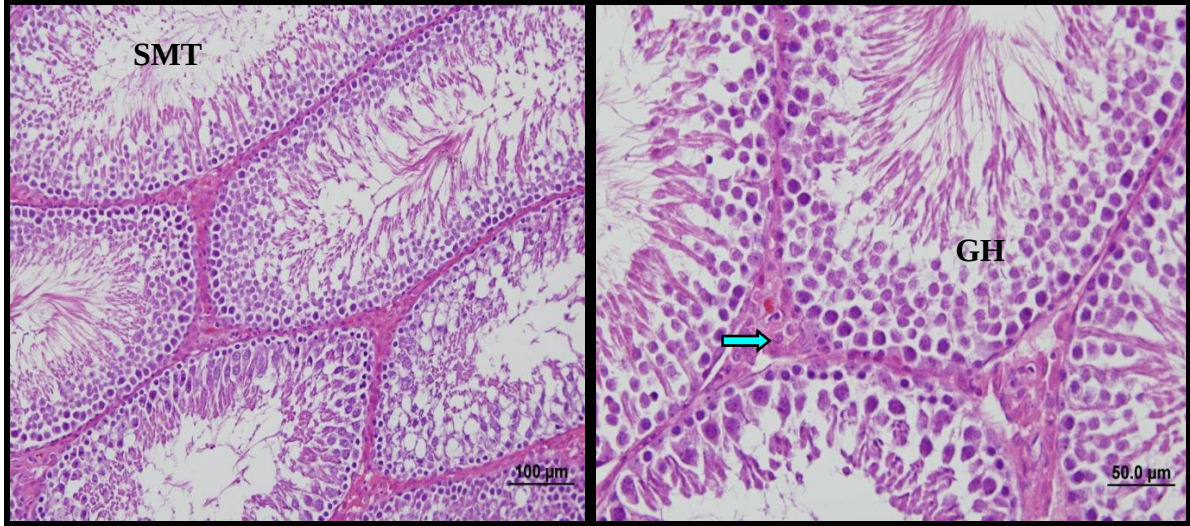
4.3.1. Hematoksilen-Eosin Boyama Değerlendirmesi

Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde seminifer tübül çaplarının birbirine yakın olduğu, tübül içerisinde bulunan germ hücrelerinin düzgün bir biçimde sıralandığı görüldü. Spermatogonyumlar bazal membranın hemen üzerinde ve koyu nukleuslu olarak gözlemlendi. Tübüllerin merkezinde ise gelişmekte olan spermatidler gözlemlendi. İntertisyel alanda Leydig hücreleri, bağ doku hücreleri ile kan ve lenf damarları görüldü (Şekil 6).

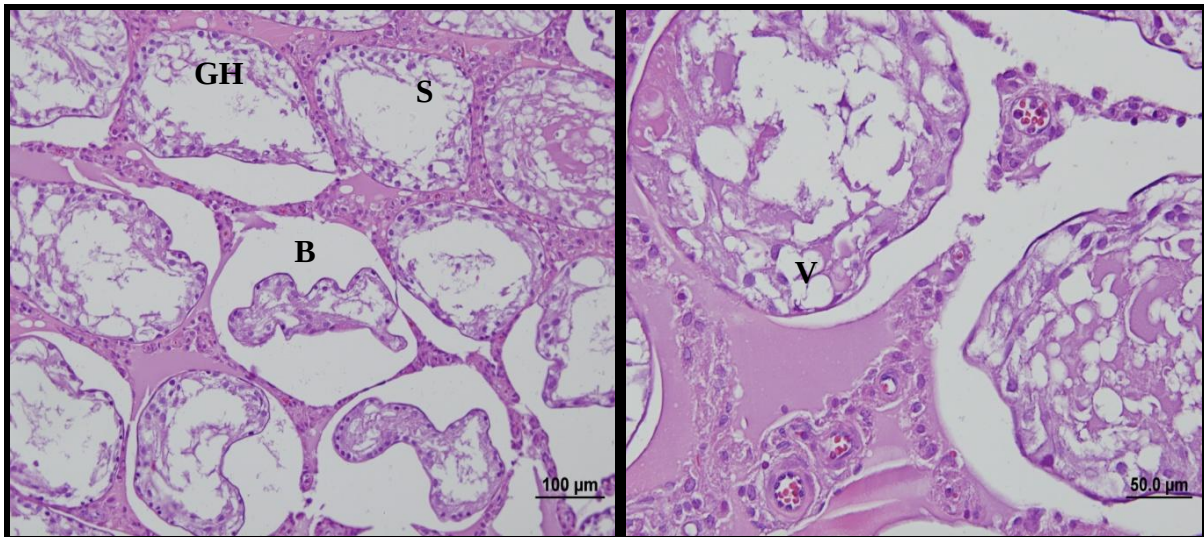
Hipertermi grubuna ait kesitler incelendiğinde germ hücre diziliminde düzensizlik ve kayıp, bazal membrandan ayrılma ve sertoli hücrelerinde kayıp görüldü. Hücresel kayba bağlı olarak seminifer tübül çaplarında azalma ve tübüllerde büzüşme gözlemlendi. Ayrıca seminifer tübüllerde germ hücrelerinin dökülmesi sonucu gelişen vakuolizasyon gözlemlendi (Şekil 7).

L-karnitin grubuna ait kesitler incelendiğinde hasarlı tübül sayısının ve hasarın şiddetinin daha az olduğu, çok sayıda tübülün normale yakın morfolojiye sahip olduğu

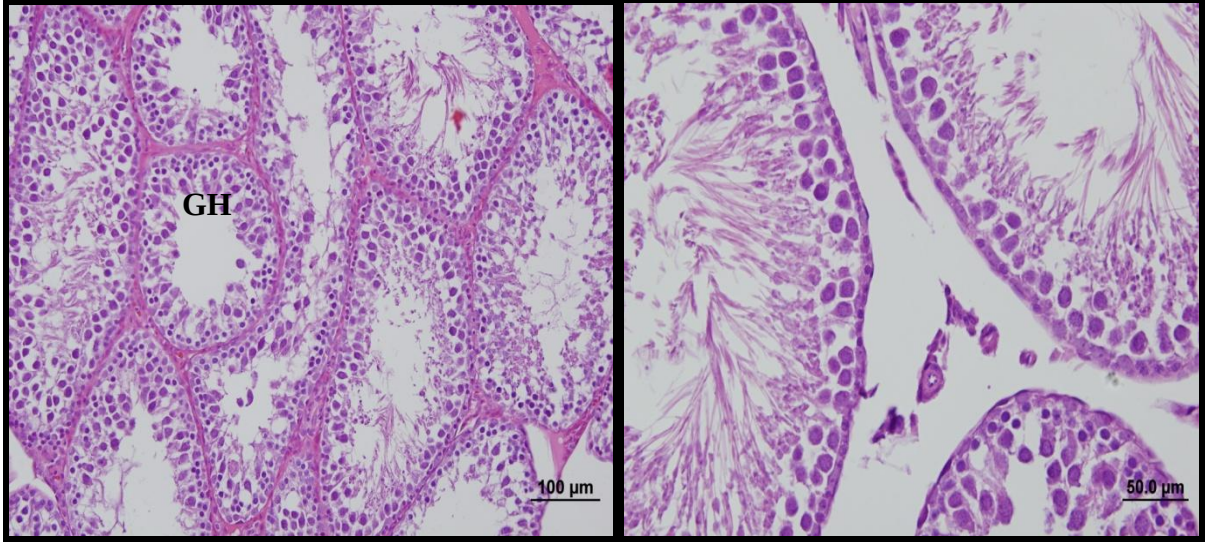
gözlemlendi. Germ hücre kayıplarının azaldığı, buna bağlı olarak da vakuolizasyonda azalış ve normale yakın çapta seminifer tübüller saptandı. Seminifer tübüllerin arasındaki intertisyel alan da çoğunlukla normale yakın morfolojide gözlemlendi (Şekil 8).



Şekil 6: Kontrol grubuna ait kesit. Sınırları düzgün seminifer tübüllerde (SMT) düzenli dizilim gösteren germ hücreleri (GH) gözlenmektedir. H&E, x20 ve x40 büyütme.



Şekil 7: Hipertermi grubuna ait kesit. Germ hücrelerinde (GH) ve sertoli hücrelerinde (SH) kayıp, tübüllerde vakuolizasyon (V) ve büzüşme (B) gözlenmektedir. H&E, x20 ve x40 büyütme.



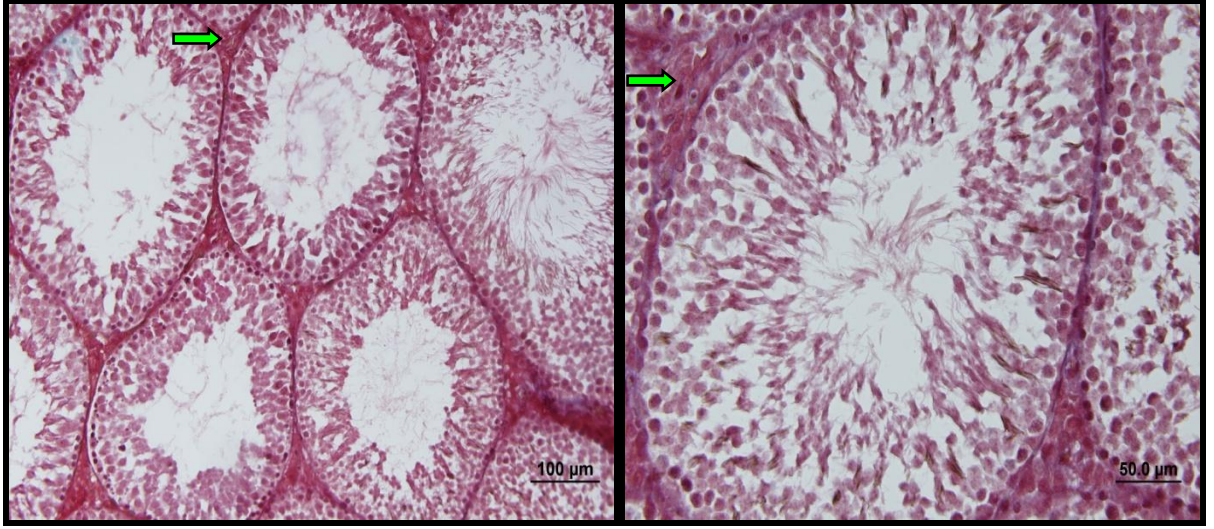
Şekil 8: L-karnitin grubuna ait kesit. Normale yakın morfolojiye sahip seminifer tübüllerde germ hücre yoğunluğunda artış (GH) ve vakuolizasyonda azalma gözlenmektedir. H&E, x20 ve x40 büyütme.

4.3.2. Masson-Trikrom Boyama Değerlendirmesi

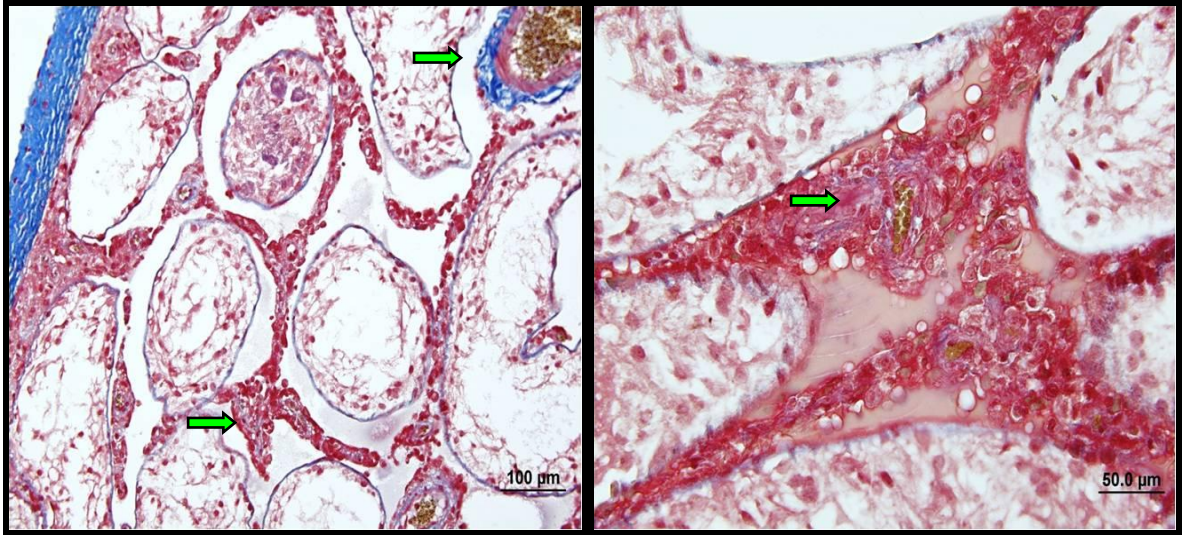
Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde normal yapıdaki intertisyel alan gözlendi (Şekil 9).

Hipertermi grubuna ait kesitler incelendiğinde intertisyel alanda bağ doku artışı gözlendi (Şekil 10).

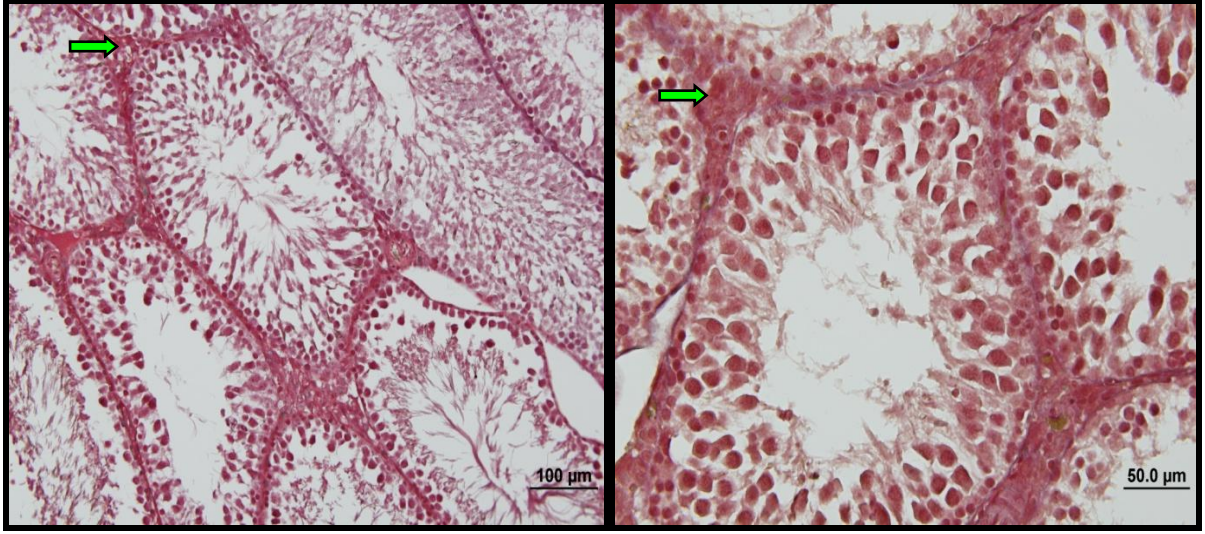
L-karnitin grubuna ait kesitler incelendiğinde normale yakın morfolojideki intertisyel alan gözlendi (Şekil 11).



Şekil 9: Kontrol grubuna ait kesit. Normal yapıdaki intertisyel alan (→) gözlenmektedir. Masson Trikrom, x20 ve x40 büyütme.



Şekil 10: Hipertermi grubuna ait kesit. İntertisyel alandaki (→) bağ doku artışı gözlenmektedir. Masson Trikrom, x20 ve x40 büyütme.



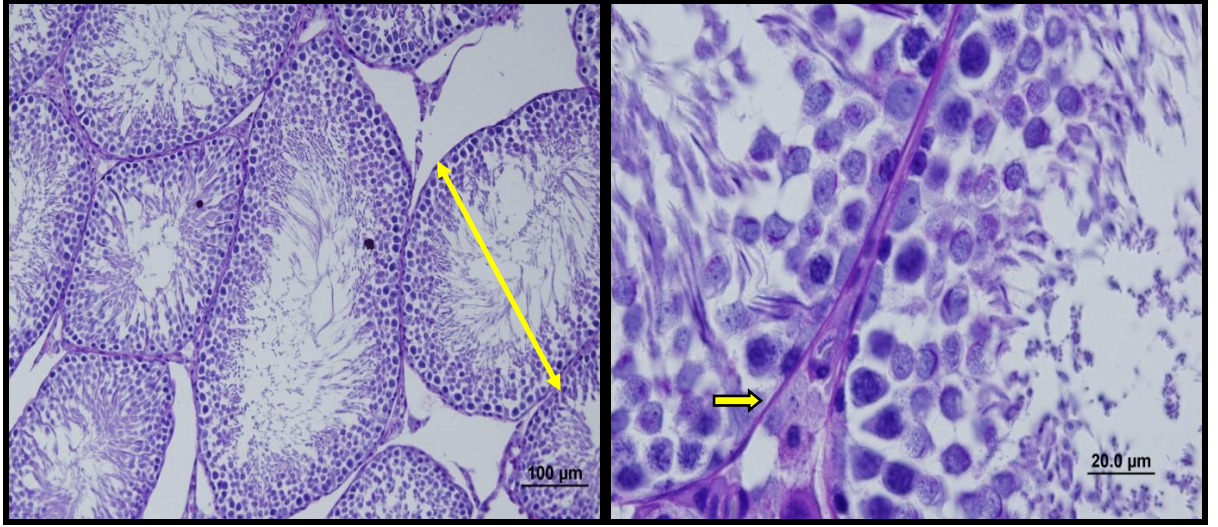
Şekil 11: L-karnitin grubuna ait kesit. Normale yakın morfolojideki intertisyal alan (→) gözlenmektedir. Masson Trikrom, x20 ve x40 büyütme.

4.3.3. PAS Boyama Değerlendirmesi

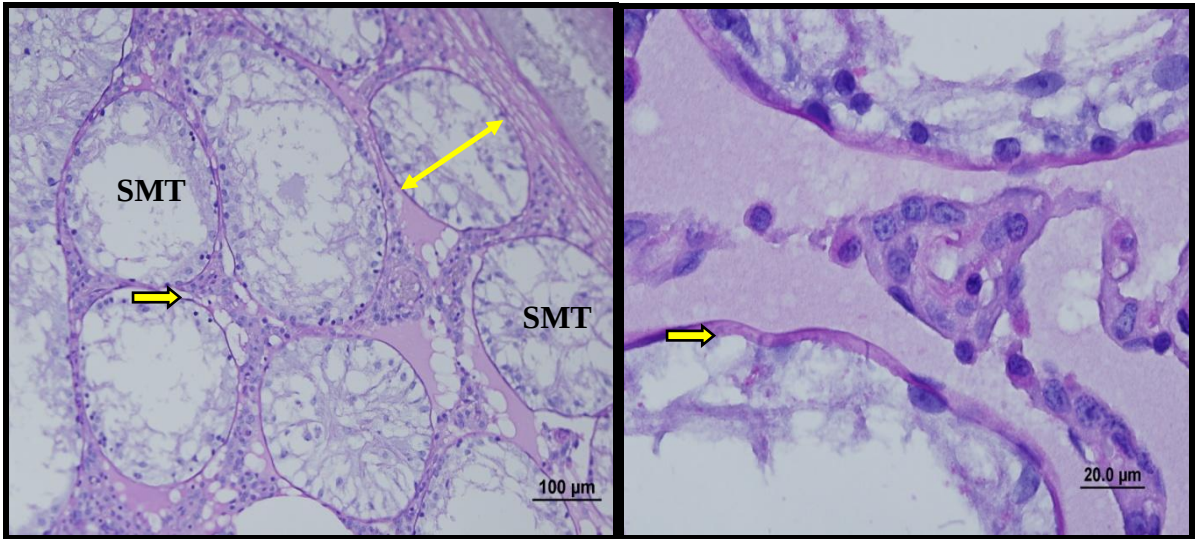
Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membranın normal kalınlıkta, seminifer tübül çaplarının normal boyutlarda olduğu gözlemlendi (Şekil 12).

Hipertermi grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membran kalınlığında artış, hücresel kayıp nedeniyle büzüşen seminifer tübüllerin çaplarında da azalma gözlemlendi (Şekil 13).

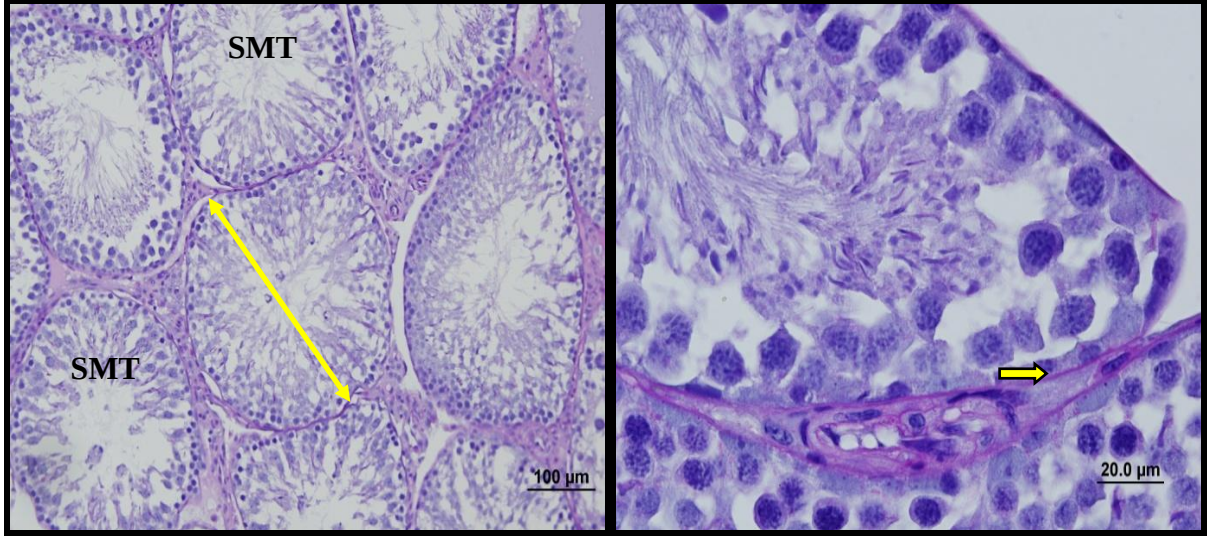
L-karnitin grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membran kalınlığının kontrol grubuna yakın kalınlıkta olduğu, normale yakın morfolojideki seminifer tübüllerin çaplarının da normale yakın olduğu saptandı (Şekil 14).



Şekil 12: Kontrol grubuna ait kesit. Normal kalınlıktaki bazal membran (→) ve normal çaptaki seminifer tübüller (↔) gözlenmektedir. PAS, x20 ve x100 büyütme.



Şekil 13: Hipertermi grubuna ait kesit. Kalınlaşmış bazal membran (→) ile çevrili seminifer tübüllerdeki (SMT) çap azalışı (↔) gözlenmektedir. PAS, x20 ve x100 büyütme.



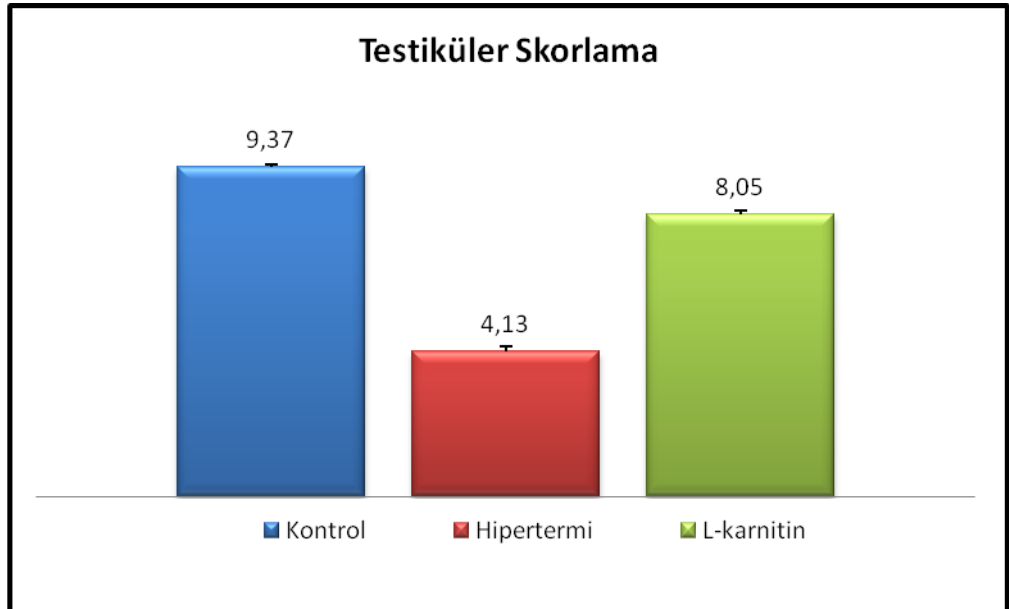
Şekil 14: L-karnitin grubuna ait kesit. Normale yakın kalınlıktaki bazal membranla (➡) çevrili seminifer tübüllerin (SMT) aynı zamanda normale yakın çapta olduğu (↔) gözlenmektedir. PAS, x20 ve x100 büyütme.

4.4. Morfometrik Bulgular

4.4.1. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Gruplar arasındaki tübül hasarını belirlemek için morfometrik ölçümler yapıldı. Bunun için Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması yöntemi kullanıldı.

Gruplar arası ortalamalar; kontrol grubu $9,37 \pm 0,08$, hipertermi grubu $4,13 \pm 0,14$, L-karnitin grubu ise $8,05 \pm 0,09$ olarak bulundu. Hipertermi grubu biyopsi skor ortalamalarında kontrol ve L-karnitin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edildi ($p=0,002$, $p=0,002$). L-karnitin grubunun biyopsi skor ortalamasında ise hipertermi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p=0,002$) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 15).

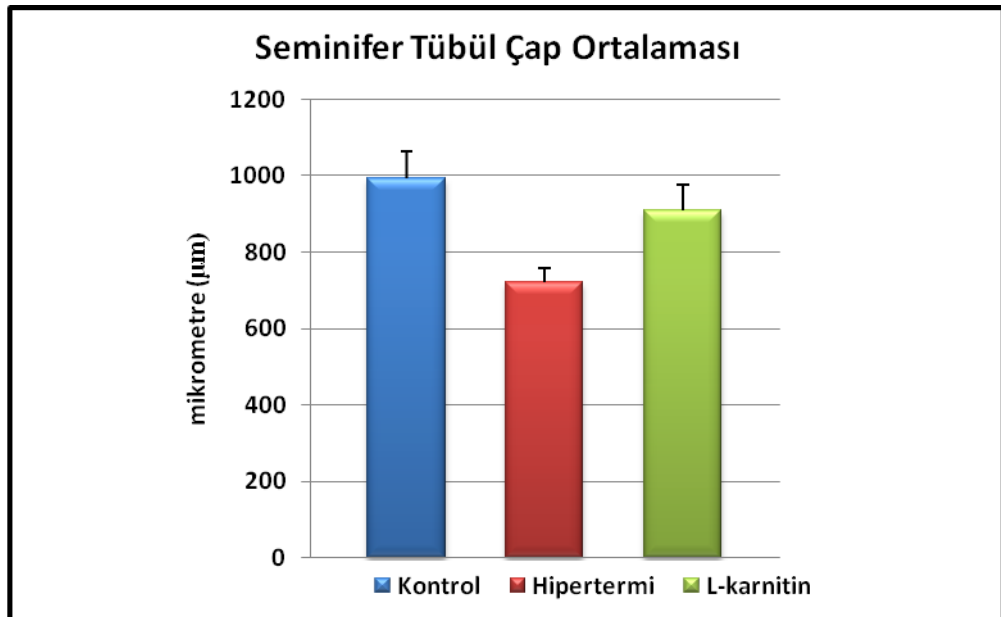


Şekil 15: Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.

4.4.2. Seminifer Tübül Çap Ölçümü

Gruplar arasındaki tübül hasarını belirlemek için seminifer tübül çap ölçümleri de yapıldı. Bunun için Image Tool (UTHSCA Image Tool Version 3,0, USA) görüntü analiz programı kullanıldı.

Gruplar arası ortalamalar; kontrol grubu $994,36 \pm 68,45 \mu\text{m}$, hipertermi grubu $722,51 \pm 36,57 \mu\text{m}$, L-karnitin grubu ise $909,25 \pm 68,25 \mu\text{m}$ olarak bulundu. Tüm gruplarda yapılan seminifer tübül çap ölçümleri sonucunda hipertermi grubunda kontrol ve L-karnitin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalış tespit edildi ($p=0,002$, $p=0,002$). L-karnitin grubunda ise hipertermi grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptandı ($p=0,002$) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 16).

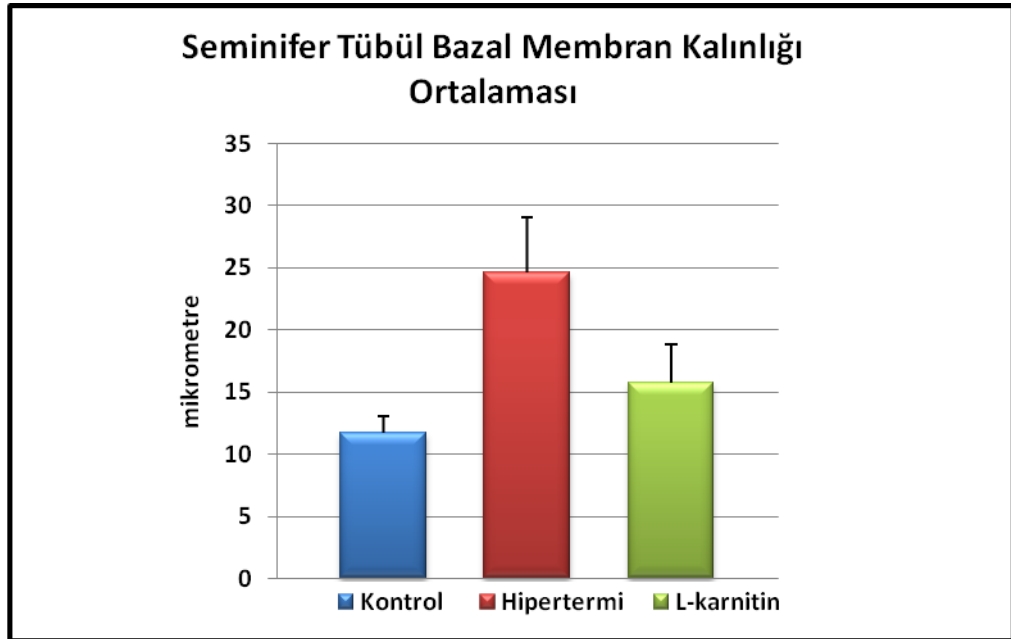


Şekil 16: Grupların seminifer tübül çap ortalaması.

4.4.3. Seminifer Tübül Bazal Membran Kalınlığı Ölçümü

Gruplar arasındaki tübül hasarını belirlemek için seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri de yapıldı. Bunun için Image Tool programı ((UTHSCA Image Tool Version 3,0, USA) kullanıldı.

Gruplar arası ortalamalar; kontrol grubu $11,75 \pm 1,30 \mu\text{m}$, hipertermi grubu $24,65 \pm 4,43 \mu\text{m}$, L-karnitin grubu ise $15,71 \pm 3,15 \mu\text{m}$ olarak bulundu. Tüm gruplarda yapılan seminifer tübül bazal membran kalınlığı ölçümleri sonucunda hipertermi grubunda kontrol ve L-karnitin gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p=0,002$, $p=0,004$). L-karnitin grubunda da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p=0,004$) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 17).



Şekil 17: Grupların seminifer tübül bazal membran kalınlığı ortalaması.

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

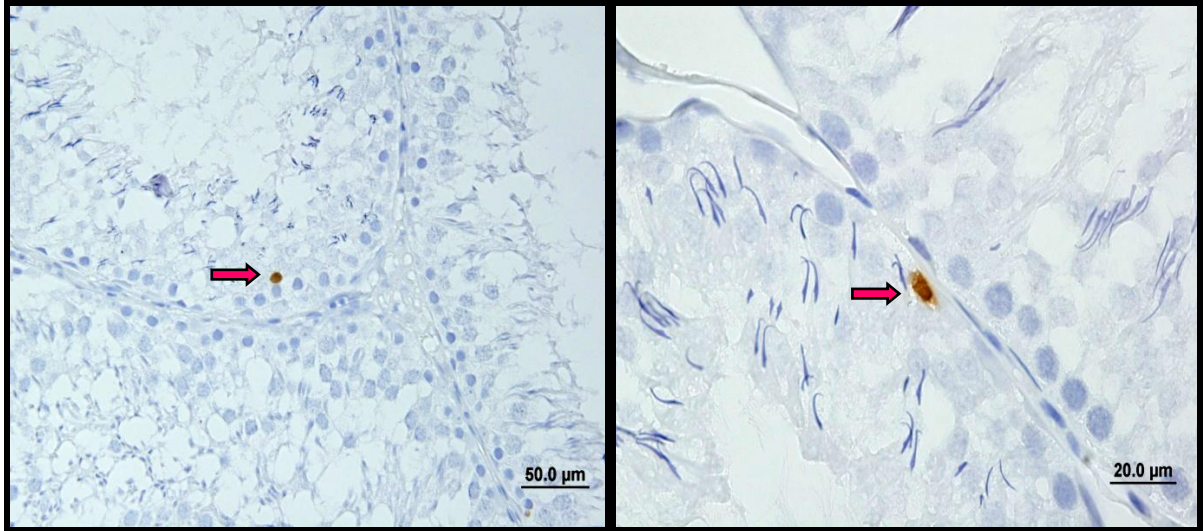
4.5.1.TUNEL Boyama Değerlendirmesi

Hücrelerdeki DNA fragmentasyonunu belirlemek için TUNEL boyaması yapıldı.

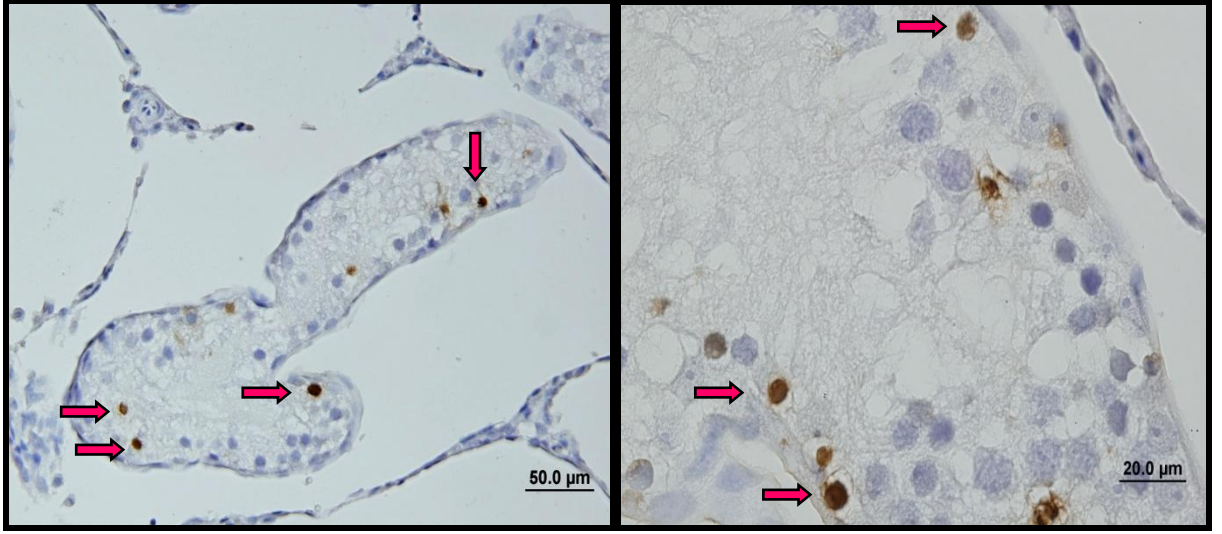
Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde birkaç hücre dışında TUNEL (+) hücreye rastlanmadı. (Şekil 18).

Hipertermi grubuna ait kesitler incelendiğinde TUNEL (+) hücre sayısının arttığı gözlemlendi (Şekil 19).

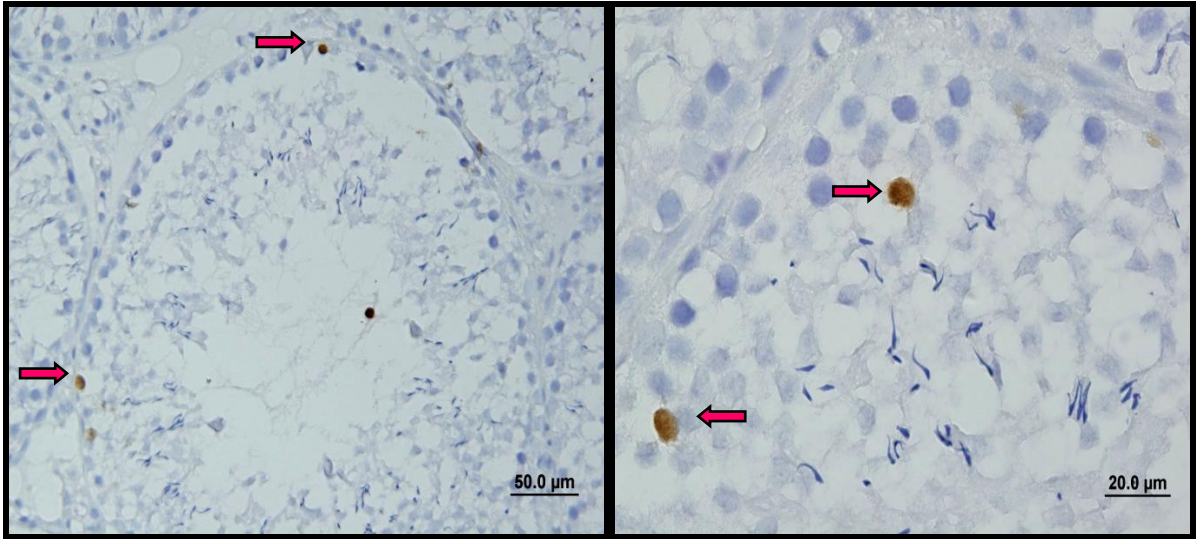
L-karnitin grubuna ait kesitler incelendiğinde TUNEL (+) hücre sayısında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 20).



Şekil 18: Kontrol grubuna ait kesit. TUNEL (+) hücreler (➡) gözlenmektedir. TUNEL, x40 ve x100 büyütme.



Şekil 19: Hipertermi grubuna ait kesit. Artan TUNEL (+) hücreler (➡) gözlenmektedir. TUNEL, x40 ve x100 büyütme.



Şekil 20: L-karnitin grubuna grubuna ait kesit. Az sayıdaki TUNEL (+) hücreler (➡) gözlenmektedir. TUNEL, x40 ve x100 büyütme.

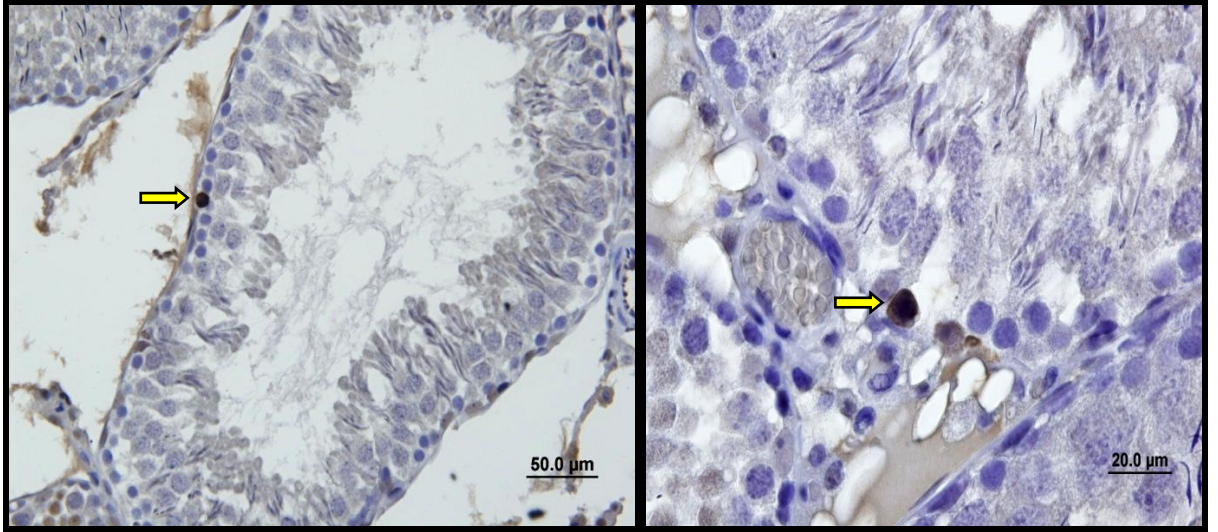
4.5.2. Aktif Kaspaz 3 Boyama Değerlendirmesi

TUNEL boyamaya ek olarak apoptotik hücreleri belirlemek için aktif kaspaz-3 boyaması yapıldı.

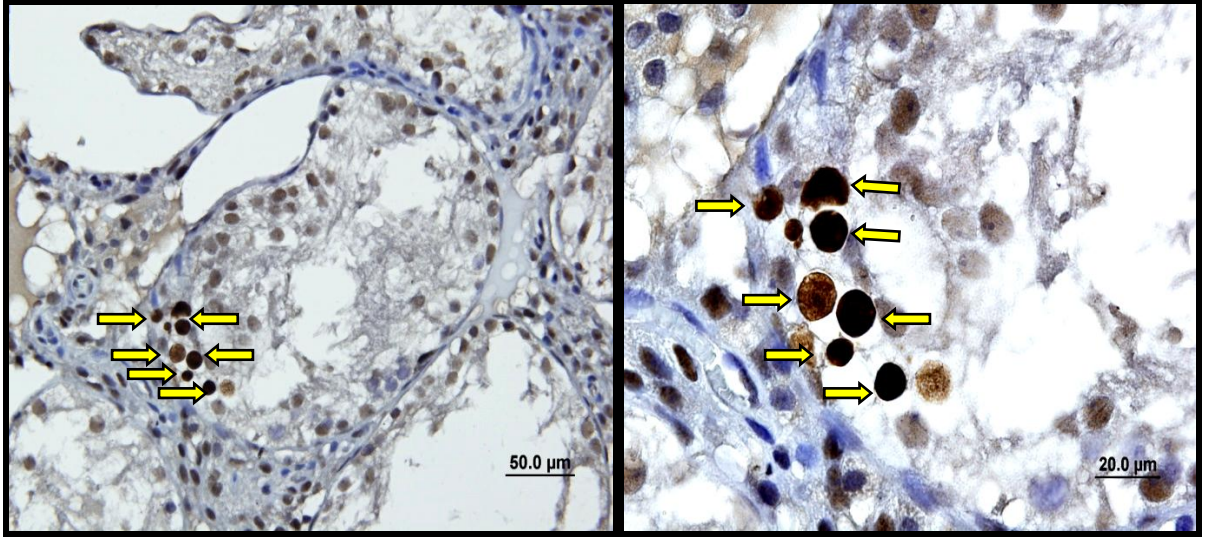
Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde birkaç pozitif hücre dışında aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren apoptotik hücreye rastlanmadı (Şekil 21).

Hipertermi grubuna ait kesitler incelendiğinde apoptotik hücre sayısının artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 22).

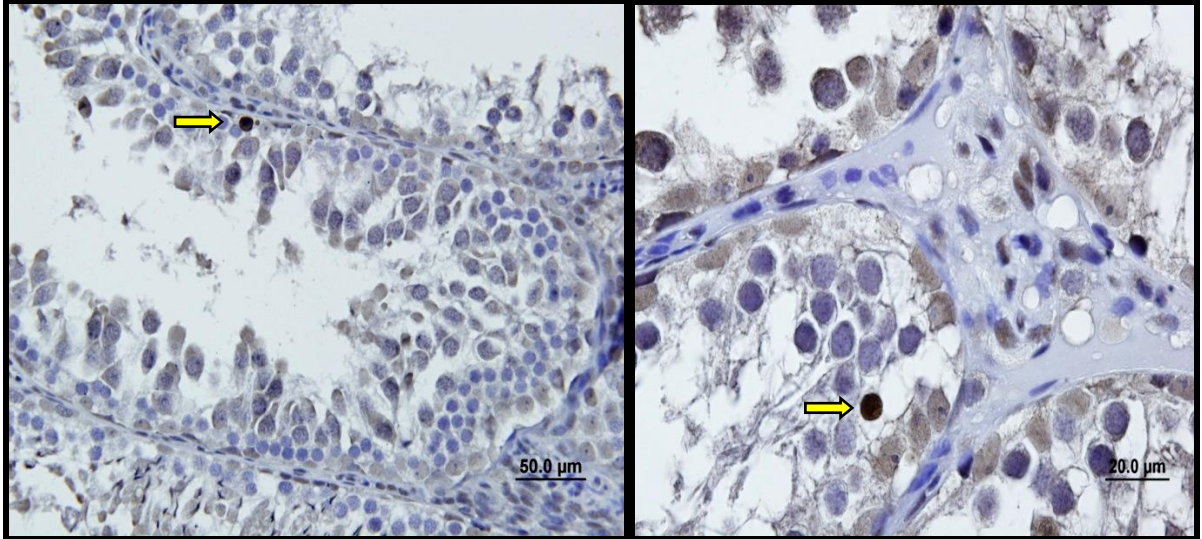
L-karnitin grubuna ait kesitler incelendiğinde apoptotik hücre sayısının önemli ölçüde azaldığı gözlemlendi (Şekil 23).



Şekil 21: Kontrol grubuna ait kesit. Aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücreler (➡) gözlenmektedir. Aktif kaspaz-3, x40 ve x100 büyütme.



Şekil 22: Hipertermi grubuna ait kesit. Artan sayıdaki aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücreler (➡) gözlenmektedir. Aktif kaspaz-3, x40 ve x100 büyütme.



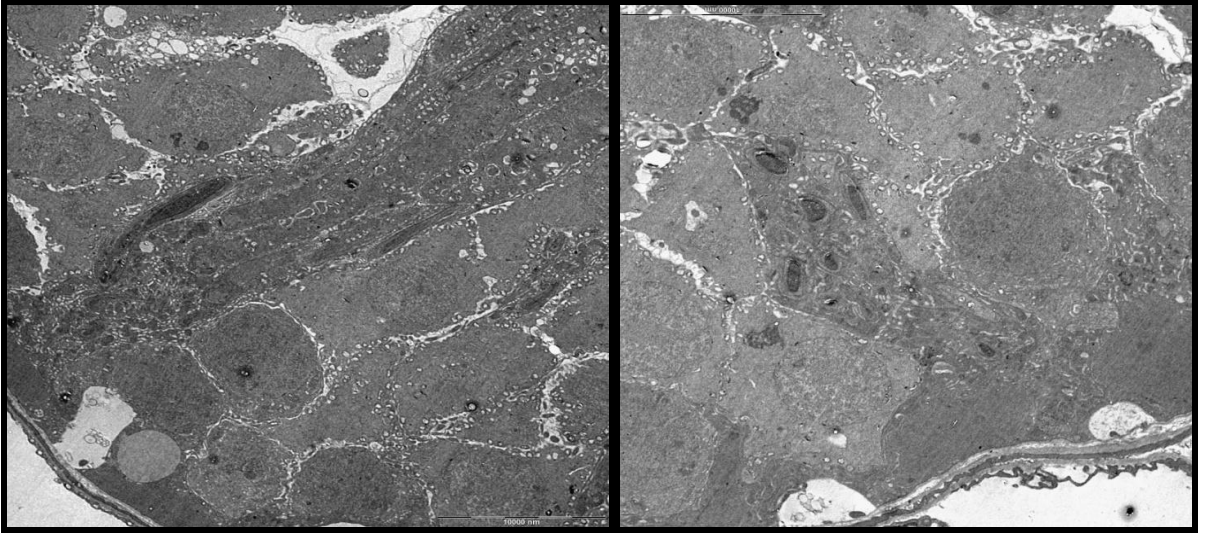
Şekil 23: L-karnitin grubuna grubuna ait kesit. Aktif kaspaz-3 immunoreaktivite gösteren hücre sayısındaki azalma (➡) gözlenmektedir. Aktif kaspaz-3, x40 ve x100 büyütme.

4.6. Ultrastrüktürel Bulgular

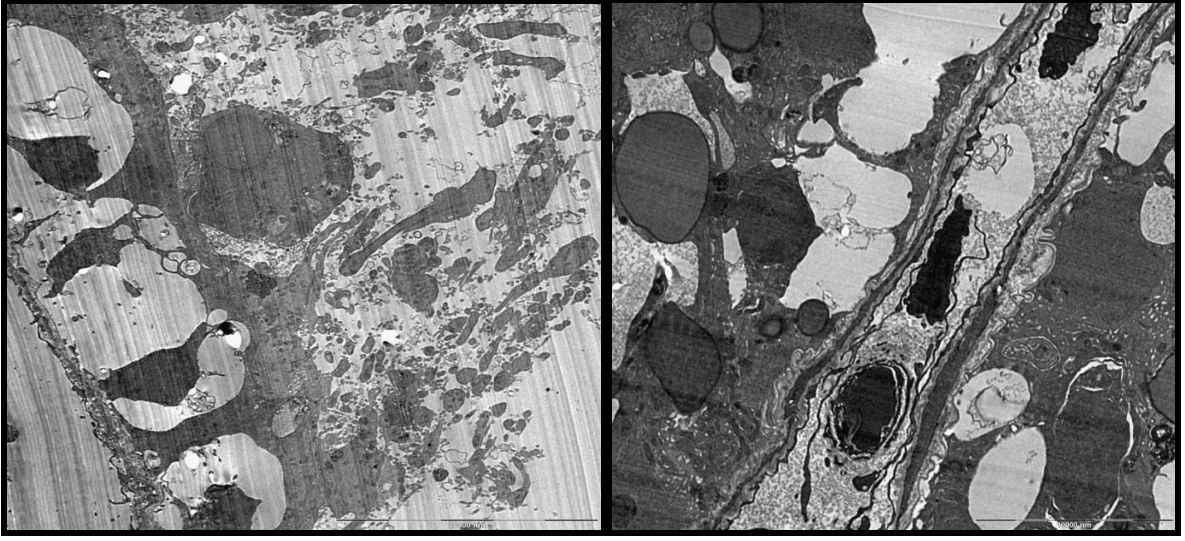
Kontrol grubuna ait kesitler incelendiğinde bazal membran üzerine oturan düzenli morfolojideki sertoli hücreleri ve spermatogonyumların varlığı gözlemlendi. Sertoli hücreleri arasında düzgün morfolojideki sıkı bağlantılar da mevcuttu. Primer spermatositlerde sertoli hücre sitoplazmalarıyla sarılı olarak gözlemlendi (Şekil 24).

Hipertermi grubuna ait kesitler incelendiğinde sertoli hücreleri ve spermatogonyumların oturduğu bazal membranda kalınlaşma gözlemlendi. Birbirine komşu hücreler arasında boşluklar olduğu saptandı. Sertoli hücresi, spermatogonyum ve primer spermatositlerde sitoplazma ile birlikte hücre organellerinin kaybı sonucu büzüşme, sitoplazmada lipid damlacıkları ve veziküller gözlemlendi (Şekil 25).

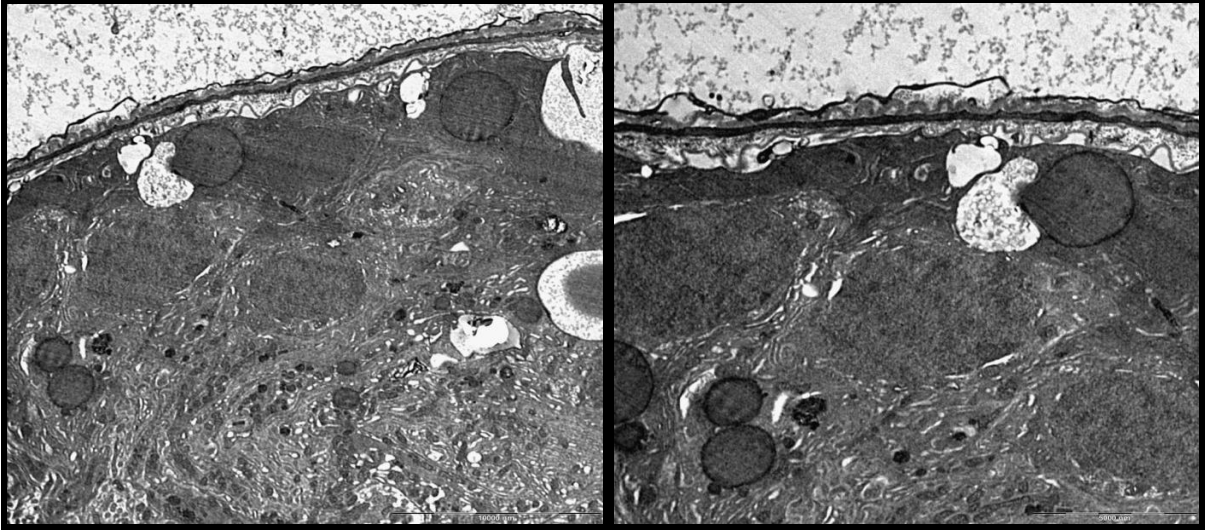
L-karnitin grubuna ait kesitler incelendiğinde kontrol grubuna benzer görünümde olduğu saptandı. Bazal membranın normal kalınlıkta olduğu ve hücreler arasındaki boşlukların azaldığı gözlemlendi. Sertoli hücresi, spermatogonyum ve primer spermatositlerde lipid damlacıkları, veziküllerin azaldığı gözlemlendi (Şekil 26).



Şekil 24: Kontrol grubuna ait kesit. Bazal membran üzerine oturan spermatogonyum, primer spermatosit ve sertoli hücresi gözlenmektedir. Uranil Asetat-Kurşun Sitrat, x1000 büyütme.



Şekil 25: Hipertermi grubuna ait kesit. Kalınlaşan bazal membran ve hücreler arasında oluşan boşluklar gözlenmektedir. Uranil Asetat-Kurşun Sitrat, x1000 büyütme.



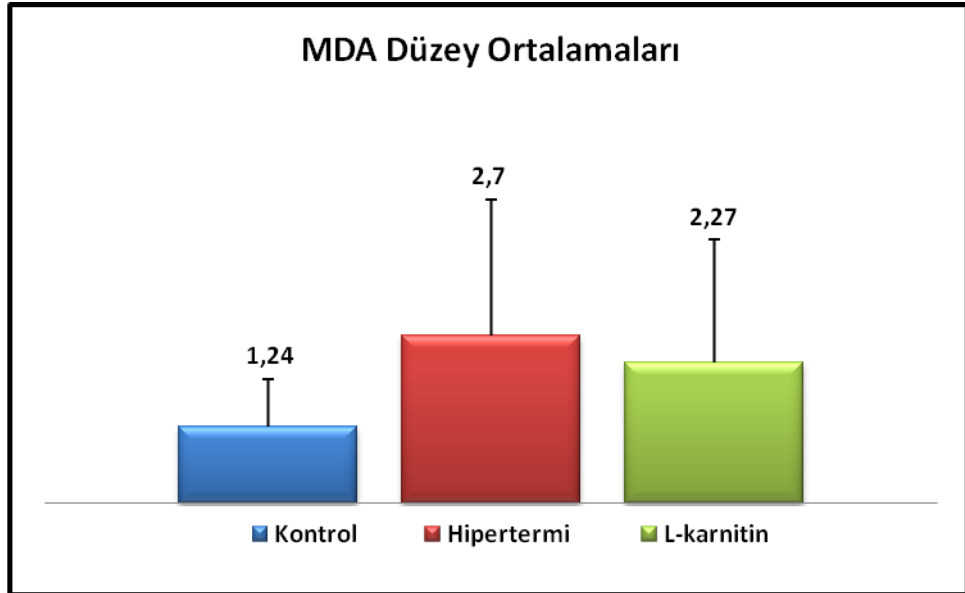
Şekil 26: L-karnitin grubuna grubuna ait kesit. Normal kalınlıktaki bazal membran ve birbirine yakın komşu hücreler gözlenmektedir. Uranil Asetat-Kurşun Sitrat, x1000, x1600 büyütme.

4.7. Biyokimyasal Bulgular

4.7.1. MDA Düzey Değerlendirmesi

Gruplar arasındaki hasarı belirlemek için serbest radikallerden olan MDA düzeyi ölçümleri de yapıldı.

Gruplar arası ortalamalar; kontrol grubu $1,24 \pm 0,76$ U/mg prot, hipertermi grubu $2,70 \pm 2,20$ U/mg prot, L-karnitin grubu ise $2,27 \pm 1,98$ U/mg prot olarak bulundu. Tüm gruplarda yapılan MDA düzeyi ölçümü sonucunda hipertermi ve L-karnitin gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p=0,047$). L-karnitin grubunda hipertermi grubu ile karşılaştırıldığında L-karnitin'in serbest radikal oluşumunu baskılayıcı özelliğinden dolayı MDA düzeylerinde bir azalış tespit edildi fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,749$) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 27).

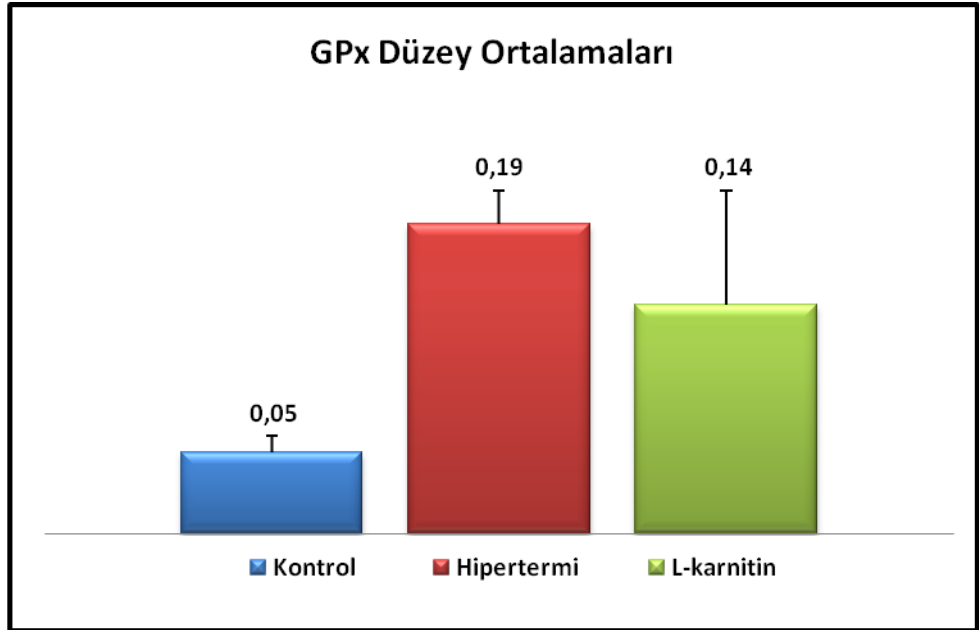


Şekil 27: Grupların MDA düzey ortalamaları.

4.7.2. GPx Düzey Değerlendirmesi

Gruplar arasındaki hasara karşı üretilen antioksidan aktiviteyi belirlemek için antioksidan enzimlerden olan GPx düzeyi ölçümleri de yapıldı.

Gruplar arası ortalamalar; kontrol grubu $0,05 \pm 0,01$ U/mg prot, hipertermi grubu $0,19 \pm 0,02$ U/mg prot, L-karnitin grubu ise $0,14 \pm 0,07$ U/mg prot olarak bulundu. Tüm gruplarda yapılan GPx düzeyi ölçümü sonucunda hipertermi grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış elde edildi ($p=0,009$). L-karnitin grubunda hipertermi grubu ile karşılaştırıldığında L-karnitin'in serbest radikal oluşumunu baskılayıcı özelliğinden dolayı GPx düzeylerinde bir azalış tespit edildi fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,347$) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 28).

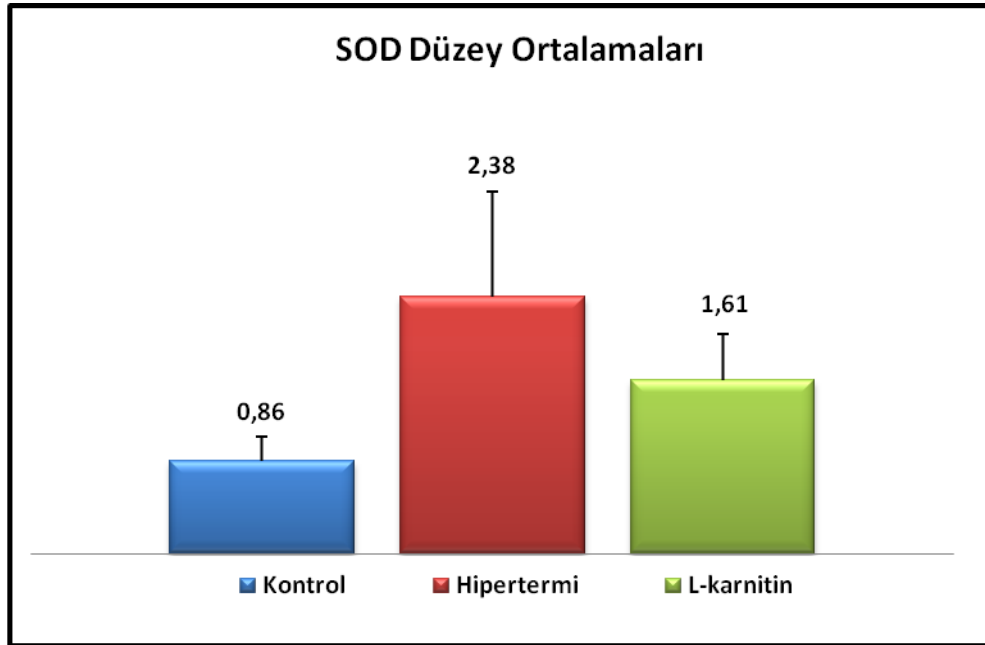


Şekil 28: Grupların GPx düzey ortalamaları.

4.7.3. SOD Düzey Değerlendirmesi

Gruplar arasındaki hasara karşı üretilen antioksidan aktiviteyi belirlemek için antioksidan enzimlerden bir diğeri olan SOD düzeyi ölçümleri de yapıldı.

Gruplar arası ortalamalar; kontrol grubu $0,86 \pm 0,22$ U/mg prot, hipertermi grubu $2,38 \pm 0,97$ U/mg prot, L-karnitin grubu ise $1,61 \pm 0,42$ U/mg prot olarak bulundu. Tüm gruplarda yapılan SOD düzeyi ölçümü sonucunda hipertermi ve L-karnitin gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi ($p=0,009$, $p=0,028$). L-karnitin grubunda hipertermi grubu ile karşılaştırıldığında L-karnitin'in serbest radikal oluşumunu baskılayıcı özelliğinden dolayı SOD düzeylerinde bir azalış tespit edildi fakat istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,117$) (Kruskal Wallis Varyans Analizi) (Mann-Whitney U) (Şekil 29).



Şekil 29: Grupların SOD düzey ortalamaları.

5.TARTIŞMA

İnsan vücudunun normal koşullardaki sıcaklığı 36,5- 37 °C'dir ve sağlıklı bir insan için bu sıcaklık çok hassas bir değerdir. Bu değer günlük aktiviteye ve dinlenmeye bağlı olarak (uyanıklık – uyku döngüsü) değişkenlik gösterir. Vücut sıcaklığı öğleden sonra ya da akşama doğru en yüksek, sabaha karşı en düşük düzeydedir. Gece çalışanlarda ise bu durum tam tersidir. Egzersiz, beslenme, kronik böbrek yetmezliği, şok, ısı ölçülen anatomik bölgelerdeki yerel yangılar gibi bazı olgular bu fizyolojik değişikliği etkiler. Sıcaklık düştüğünde donma tehlikesi yaşanır, sıcaklık arttığında ise kişi kendisini bitkin hisseder. Sıcaklığın 40 °C nin üzerine çıkmasında ise koma hali görülür. Hipertermi bu koşulda ortaya çıkar.

Hipertermi vücut sıcaklığının 41°C ya da daha yüksek bir değere yükselmesiyle ortaya çıkan bir olgudur (36). Spermatogenezin gerçekleşebilmesi için testislerin ihtiyaç duyduğu sıcaklık 35 °C olduğu için spermatogenezini engelleyen ve testislere zarar veren faktörlerin başında yüksek sıcaklık gelmektedir (104).

Kaynaklarda hiperterminin testis üzerine olan etkilerini inceleyen çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalarda yüksek sıcaklığın insan, koyun, domuz, sığır, sıçan, fare gibi çeşitli hayvan türlerinin testislerinde germ hücre kaybı ve kan akımı azalışına bağlı olarak testisküler ağırlık azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (10). Bartlett ve Sharpe de bu amaçla sıçan testisleri üzerine yaptıkları çalışmada 43°C de 30 dakika süreli sıcaklığın testis ağırlığını %39 oranında azaldığını belirtmişlerdir (105). Bizde aynı sıcaklığı kullanarak yapmış olduğumuz çalışmamızda testis ağırlığının %60' lara kadar azaldığını gözlemledik.

Kriptorşidizm gibi birtakım etmenler testiste sıcaklık artışına neden olur. Bu da germ hücrelerinde apoptoza, spermiyum DNA bütünlüğünde bozulma ve canlılığında azalmaya, hatta infertiliteye neden olmaktadır.

Yüksek sıcaklığın ejakülat kalitesini düşürdüğü bilinmektedir. Hjollund ve ark. oturarak çalışan insanların spermiyum yoğunluklarını ölçmek için 99 sağlıklı erkekte ölçümler yapmışlardır. Bu erkekleri 24 saat gözlemleyerek kan ve ejakülat örnekleri almışlardır. Sonuç olarak skrotal ısının her 1°C artması ile spermiyum yoğunluğunun %4 azaldığı belirlenmiştir. Benzer sonuçlar toplam spermiyum sayısında, FSH ve inhibin için de

bulunmuştur. Hareketlilik, yapı, pH ve testosteron düzeyinin ise sıcaklık ile önemli bir şekilde ilişkili olmadığı belirtilmiştir. Skrotal sıcaklık ve ejakülat kalitesi arasında yakın bir ilişki olduğu ancak oturarak çalışmanın buna az bir etkisinin bulunduğu bildirilmiştir (115).

İrez ve ark. yüksek ısıda çalışan işçilerde ısıнын spermiyum değerleri üzerine olan etkilerini incelemek amacıyla bir çalışma yapmışlardır. 1 hafta süresince otomatik ısıölçer ile ısı ve nem ölçülüp, kaydedilmiştir. Yüksek ısıda çalışan 34 işçi çalışma grubu, normal ısıyla çalışan 26 işçi ise kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Yapılan spermiyum analizleri sonucu çalışma grubunda spermiyum sayımı, normal (%) ve hareketli spermiyum (%) oranı kontrol grubuna karşın belirgin olarak düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Çalışma grubunda %20,5 olguda spermiyum sayısı 20 milyon/ml'nin altında saptanmıştır. Bu bulgularla yüksek ısıнын ejakülat değerleri üzerine olan baskılayıcı etkisi ile erkek infertilitesinde rol oynadığı vurgulanmıştır (114).

Steinberger ve Dixon'nun yaptıkları çalışmada testisleri 43°C de 15 dk süreyle sıcak suda bekletildikten sonra testisten alınan doku kesitlerini incelediklerinde sıcaklığın seminifer epitelde germ hücre dejenerasyonlarına neden olduğunu belirtmişlerdir (113).

Perez-Crespo ve ark. tarafından 2008 yılında yapılan bir çalışmada spermatogenezis aşamalarındaki farklı hücrelerin ısı artışına olan duyarlılıkları ve skrotal sıcaklık şiddetinin spermiyum kalitesine olan etkisi incelenmiştir. Olgun CD1 fareleri alınarak sıcaklık 42°C'de 30 dakika ve nem %60'a olacak şekilde gün başına 14 saatlik ılık uygulanarak sonuçlar incelenmiştir. Epididimisteki spermiyumlar üzerine sıcaklık şoku etkisiyle termal stres altında cinsiyet oranının bozulduğu vurgulanmıştır. Sıcaklık uygulamasından sonra yaşamda kalan spermiyum yüzdesinin azaldığı belirtilmiştir. Bu çalışmada genel olarak spermatogenezisin bozulduğu, DNA, RNA protein sentezinin zayıfladığı ve sıcaklığın protein yıkımına neden olduğu ve DNA bütünlüğünün bozulduğu belirtilmiştir (11).

Hiperterminin açığa çıkardığı serbest radikal aracılı DNA hasarı, genellikle uygulamadan sonraki ilk hücre bölünmesinde veya ilk birkaç bölünme içindeki hücrelerde ölüme yol açar. Hücre ölümü hipertermiye karşı hücresel yanıtın en son aşamasında gerçekleşir. Son zamanlarda elde edilen pek çok veri hipertermiye bağlı DNA çift zincir kırıklarının apoptotik ölümün de ortaya çıktığı bilinmektedir. Erkek üreme sisteminde apoptozis, erkek gametlerin aşırı üretiminin kontrolünden sorumlu olan fizyolojik bir süreçtir. Ancak yüksek sıcaklık gibi eksternal olaylarda meydana getirilen stres, total germ hücre

kaybına yol açan testiküler apoptoziste artışa neden olmaktadır. Apoptozisin morfolojik işaretleri başta spermatogonyumlar olmak üzere tüm germ hücrelerinde oldukça sık gözlenmiştir.

Rockett ve ark. 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada fareleri 43°C'lik yüksek sıcaklığa maruz bırakarak 8 saat sonra sakrifiye etmiş ve seminifer tübülleri incelemişlerdir. Tübüllerde yaygın vakuoller, piknotik çekirdekli germ hücreleri saptamış, TUNEL yöntemiyle de apoptotik hücrelerin arttığını belirtmişlerdir. Buradaki apoptozun sebebi yüksek sıcaklığının bazı sitoplazmik köprülerde denaturasyona neden olması, bunun komşu hücrelerde de dejenerasyona neden olarak çeşitli apoptotik mekanizmaları devreye sokmasıdır (10). Bu çalışmaya paralel olarak bizde yapmış olduğumuz çalışmada hipertermiye maruz kalan sıçanlarda histokimyasal olarak yaygın tübül hasarı, ultrastrüktürel olarak nukleus hasarı ve immunohistokimyasal olarak apoptozun geliştiği gözlemledik.

Khan ve ark. postnatal 7. günde 1 saat boyunca 43°C'lik yüksek sıcaklığa maruz bıraktıkları erkek sıçanları 15. saatte sakrifiye ederek seminifer tübül hücrelerinde apoptozun arttığını göstermişlerdir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre yüksek sıcaklıktan en fazla spermatogonyumlar ve primer spermatositlerin etkilendiği, spermatidlerin ve sertoli hücrelerinin ise etkilenmediği belirtilmiş, buna kanıt olarak da mitoz (spermatogonium) ve mayoza (primer spermatosit) giden hücrelerin yüksek sıcaklığa daha hassas olduğu gösterilmiştir (106). Bizde yapmış olduğumuz çalışmada yüksek sıcaklıktan en fazla etkilenen hücrelerin spermatogonyumlar ve primer spermatositler olduğunu gözlemledik.

Lue ve ark. sıçanların vücut sıcaklığını 43°C'e yükseltildikten sonra 1, 2, 9 ve 56. günlerde sakrifiye etmiş ve TUNEL pozitif hücre sayısında artış olduğunu görmüşlerdir. Bu artışın spermatogonyumlar ve primer spermatositlerde olduğu tespit edilmiştir (110). Bizde çalışmamızda elde ettiğimiz bulgularla bu çalışmaya paralellik göstererek en fazla TUNEL pozitif hücrelerin spermatogonyumlar ve primer spermatositler olduğunu saptadık.

Amir ve Zvi' nin yaptıkları çalışmada hiperterminin erkeklerde Leydig hücrelerinde membran dejenerasyonuna neden olarak gametogenezi engellediği bildirilmiştir (112).

Ezesoar (1985) skrotal ve abdominal testisleri karşılaştırarak yaptığı elektron mikroskopik bir çalışmada abdominal testiste skrotal testise oranla hücre sitoplazmasında çok sayıda lipid damlacıklarının olduğunu, mitokondri kristallerinin düzensizleştiğini ve DER de

dilatasyonların oluştuğunu göstermiştir (107). Biz de çalışmamızda hipertermi sonrası mitokondri kristallarının bozulduğunu, DER sisternalarında dilatasyonların oluştuğunu ve lipid damlacıklarının arttığını tespit ettik.

Osorio ve ark. yaptığı bir çalışmada yoğun egzersiz sonrası vücut sıcaklığının yükselmesiyle antioksidan savunma sistemlerinin etkilediğini, hipertermik ortamda SOD ve GPx düzeylerinin arttığını göstermişlerdir (108). Çalışmamızdan elde ettiğimiz sonuçlar bu çalışmayla paralellik göstermektedir.

Volek ve arkadaşları da yapmış oldukları çalışmada yüksek sıcaklığın serum MDA seviyesini anlamlı olarak arttırdığını belirtmişlerdir (109). Bizde çalışmamızda hipertermi sonrası MDA düzeylerinin arttığını gözlemledik.

Son dönemlerde antioksidan özelliğe sahip maddelerin serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarına karşı gösterdikleri antiapoptotik etkileri pekçok araştırmacı tarafından çalışılmaktadır. Bu maddelerden biride L-karnitindir.

L-karnitin vitamin benzeri bir madde olup aminoasit yapısındadır. Endojen olarak iskelet ve kalp kasında, karaciğerde, böbreklerde ve beyinde, lysine ve metionin aminoasitlerinden sentezlenir. L-karnitin antioksidan etkisinin yanında ROS temizleyicisi olarak da görev yapar. L-karnitin ayrıca biyolojik mebranları lipid peroksidasyonunun son ürünü olan malondialdehid (MDA) gibi maddelerin birikmesini engelleyerek korur.

Spermatozoa normal metabolik aktivitesi sırasında ROS üretir. Bu yüzden oksidatif stres erkek infertilitesinde majör faktör olarak yer alır. İnfertil erkeklerin seminal ROS seviyeleri büyük oranda yüksektir. Spermatozoa ve seminal plazma yüksek oranda ROS temizleyicileri, süperoksit dismutaz ve katalaz enzimleri içermektedir. L-karnitin antioksidan etkilerinin yanında ROS temizleyicisi olarak da görev yapar. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlara göre L-karnitin sıçan dokularında MDA seviyelerindeki artışı inhibe etmek ve endojen antioksidan savunma mekanizmasını arttırmak suretiyle hücreleri hasara karşı korumaktadır (17, 18). Bizde çalışmamızda L-karnitin uygulanan grubun uygulanmayan gruba kıyasla MDA oranının düşük, SOD ve GPx oranlarının yüksek olduğunu gözlemledik.

Spermatozoa testis içindeyken immobil ve infertildir. Postgonadal değişim epididim içerisinde olur. Epididim içerisinde hareketlilik kazanır ve fertil hale gelir. Spermin hareketli

hale gelmesinin, seminal plazmadaki karnitin miktarının artışıyla paralel olduğu gösterilmiştir. Bir çok çalışmada infertil hastalarda seminal plazma karnitin düzeyinin düşük olduğu ve L-karnitin eklendiğinde reproduktif fonksiyonların düzeldiği gösterilmiştir.

L-karnitin memeli epitelyumunda, epididimal plazma ve spermatozoada özgün ve asetillenmiş olarak bulunur. En fazla L-karnitin konsantrasyonu epididimal sıvı içerisinde olup kandan 2000 kat daha fazla miktardadır. Yapılan çalışmalar epididim içindeki L-karnitin spermatozoa maturasyonunda rolü olduğunu göstermiştir.

Ramadan ve ark. çalışmalarında testisin manyetik alana maruziyetinden 1 saat önce uygulanan L-karnitin'in olması beklenen histopatolojik değişiklikleri (seminifer epitelde dökülme spermatogonyumların ortadan kalkması, spermatogenezin inhibisyonu) engellediğini belirtmişlerdir. L-karnitin'in hem ROS seviyesini düşürerek hem de hücrelerin ihtiyacı olan enerjiyi sağlayacak asetil gruplarının kaynağını oluşturarak koruma sağladığı bildirilmiştir (99). Bizim çalışmamızda da testiküler hipertermi uygulamasından 1 saat önce uyguladığımız L-karnitin seminfer tübüleri hasara karşı koruduğu saptanmış, spermatogenetik hücrelerin bütün serileri (spermatogonia, primer spermatosit, sekonder spermatosit ve spermium) izlenmiştir.

Costa ve ark. yaptığı çalışmada L-karnitin kullanılan grupta kullanılmayan gruba kıyasla interstisyel ödem, bağ doku artışı ve germ hücre kaybının daha az olduğu seminfer tübül morfolojisinin büyük oranda korunduğu gösterilmiştir (111). Bizde bu çalışmayla paralel sonuçlar elde ettik.

Amendola ve ark. yaptıkları çalışmada farelerde 10 Gy x ışınına maruziyetten sonra ekzojen L-karnitin uygulamasının, spermatogonyal kök hücrelerin rejenerasyonunu arttırmak suretiyle spermatogenezin iyileşme süresinde kısalma meydana getirdiğini göstermişlerdir. L-karnitin'in yüksek metabolik aktivite gerektiren bu süreçte katılan hücrelerin ihtiyacı olan enerjiyi sağlayacak asetil gruplarının kaynağını oluşturarak rejenerasyon süresini kısaltmaktadır. Bu bilgiyi yansıtabilecek biçimde çalışmamızda L-karnitin tedavisi seminfer epitelin rejenerasyon oranını arttırmıştır (116).

Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarda, L-karnitin ve türevlerinin testislerde MDA ve nitrik oksit seviyelerindeki artışı inhibe ettiği ve endojen antioksidan savunma mekanizmasını arttırarak hücreleri hasara karşı koruduğu gösterilmektedir.

L-karnitinin erkek fertilitatesini hangi mekanizmayla etkilediği tam olarak bilinmemesine rağmen, yapılan son çalışmalar sertoli hücre metabolizması üzerine karnitinin direkt etkisine dikkati çekmektedir.

Ramadan ve ark. L-karnitin yağ asidi oksidasyonu, glukoz alımı ve laktat/prüvat sekresyonunu arttırmak sureti ile sertoli hücrelerindeki yağ ve karbonhidrat metabolizmasını olumlu yönde etkilediğini ortaya koymuşlardır (99). Benzer şekilde Caviglia ve ark. sertoli hücre kültürüne L-karnitin ilavesinin, germ hücre maturasyonu için gerekli olduğu bilinen prüvat ve laktat sekresyonunda önemli bir artışa neden olduğunu göstermişlerdir (98).

Yapılan çalışmalarda L-karnitinin hücreleri serbest radikal kaynaklı DNA hasarına karşı koruduğu gösterilmiştir. Ishii ve ark. L-karnitin ilave edilmiş kültüre nöronlarda DNA fragmentasyonunun azaldığını bildirmişlerdir (97). Sundaram ve ark. ise sıçanların iskelet kaslarında artmış olan DNA zincir kırıklarının L-karnitin uygulaması ile azaldığını göstermişlerdir (93). Bizim çalışmamızda da spermatogonyum ve spermatositlere ait apoptotik değişikliklerin L-karnitin antioksidan etkisi ile azaldığı saptanmıştır. Bununla birlikte L-karnitin koruyucu etkisi seminifer epitelin rejenerasyon oranını arttırmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmadan elde edilen verilere göre hipertermi uygulamasının testiste doku hasarı oluşturduğu, oksidatif stresi ve apoptozu arttırdığı, biyokimyasal parametrelerde de değişikliklere neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Hipertermi uygulama sıcaklığı ve maruz kalma süresi hasarın şiddeti açısından büyük önem taşımaktadır.

Literatürde L-karnitin'in testiküler hipertermideki koruyucu etkisini gösteren bir çalışma bulunmamaktadır. Bu açıdan çalışmamız literatürdeki boşluğu dolduracaktır. L-karnitin'in testiküler hipertermideki koruyucu etkisi ilk defa bizim çalışmamızda histokimyasal olarak hematoxilen & eozin, masson trikrom ve PAS, immünohistokimyasal olarak TUNEL ve aktif kaspaz-3 boyamaları yapılarak, testis ince yapısı ultrastrüktürel düzeyde incelenerek ve biyokimyasal olarak MDA, SOD, GPx düzeyleri ölçülerek değerlendirildi.

Bu bilgiler ışığında çalışmamızın testiküler hipertermi hasarına karşı koruyucu önlemlerin alınması konusunda yol gösterici olacağı kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Numanoglu S. Östrojen Bağımlı Meme Kanseri Hücrelerinde (MCF-7) Genistein ve Hiperterminin Kombine Etkisinin Araştırılması. İzmir , Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı (Yüksek Lisans Tezi), 2008.
2. Mieusset R, Bujan L, Modinat C, Mansat A, Pontonnier F, Grandjean H. Association of scrotal hyperthermia with impaired spermatogenesis in infertile men. *Fertil Steril* 1987;48: 1006–1011.
3. Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E, (Çeviri Bafflar M.). Diz üstü bilgisayar kullanıcılarında skrotum ısısında artış. *Hum Reprod* 2005;20: 452-455.
4. Lue Y, Hikim AP, Wang C, Im M, Leung A, Swerdloff RS. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the ‘two-hit’ approach to male contraceptive development. *Endocrinology* 2000;141: 1414–1424.
5. Jannes P, Spiessens C, Van der Auwera I, D’Hooghe T, Verhoeven G, Vanderschueren D. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. *Hum Reprod* 1998;13: 372–375.
6. Husmann DA, Levy JB. Current concepts in the pathophysiology of testicular undescend. *Urology* 1995;46: 267-276.
7. Angelova P, Davidoff M, Bakalska M, Kanchev L. In vitro effects of substance p and arginin zasopression on testosterone production in Leydig cells of short and long photoperiodic hamsters. *Andrologia* 1996;28: 321-326.
8. Chowdhury AK, Steinberger E. Early changes in germinal epithelium of rat testes following exposure to heat. *J Reprod Fertil* 1970;22: 205–212.
9. Sailer BL, Sarkar LJ, Bjordahl JA, Jost LK, Evenson DP. Effects of heat stress on mouse testicular cells and sperm chromatin structure. *J Androl* 1997;18: 294-301.
10. Rockett JC, Mapp LF, Carges BJ et al. Effect of hyperthermia on spermatogenesis, apoptosis, gen expression and fertility in adult male mice. *Biol Repr* 2001;65: 229-239.

11. Perez-Crespo M, Pintado B, Gutierrez-Adan A. Scrotal heat stress effects on sperm viability, sperm dna integrity and the offspring sex ratio in mice. *Molecular Reproduction and Development* 2008;75: 40-47.
12. Yanhe L, Amiya P, Sinha H, Christina W, Michael I, Andrew L, Ronald S. Testicular heat exposure enhances the suppression of spermatogenesis by testosterone in rats: the “two-hit” approach to male contraceptive development. *Endocrinology* 2000;141: 41414-41424.
13. Vydra N, Malusecka E, Jarzab M, Lisowska K, Glowala- Kosinska M, Benedyk K, Widlak P, Krawczyk Z, Widlak W. Spermatocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces hsp70 iresistant apoptosis in male germ cells. *Cell Death and Differentiation* 2006;13: 212–222.
14. Fiorenza MT, Mangia F. Hyperthermia specifically inhibits bivalent chromosome disjunction in maturing mouse oocytes. *Biology of Reproduction* 1992;46: 658-664.
15. Pavitra R. Decreased glutathione levels potentiate the apoptotic efficacy of selenium: possible involvement of p38 and JNK MAPKs—in vitro studies. *Mol Cell Biochem* 2008;309: 21–32.
16. Ferrari R. L-Carnitine. London: Academic Press Limited 1992: 5-17.
17. Dokmeci D, Akpolat M, Aydogdu N, Uzal C, Doganay L, Turan FN. The protective effect of L-carnitine on onizing radiation-induced free oxygen radicals. *Scand J Lab Anim Sci* 2006;33: 1-9.
18. Mansour HH. Protective role of carnitine ester against radiation-induced oxidative stress in rats. *Pharmacol Res* 2006;54: 165-171.
19. Balercia G, Regoli F, Armeni T, Koverech A, Mantero F, Boscaro M. Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined Lcarnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril* 2005;84: 662-671.
20. Lenzi A, Lombardo F, Sgrò P, Salacone P, Caponecchia L, Dondero F et al. Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril* 2003;79: 292-300.

21. Cavallini G, Ferraretti AP, Gianaroli L, Biagiotti G, Vitali G. Cinnoxycam and Lcarnitine/ acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. J Androl 2004;25: 761-770.
22. Gürbüz B, Yaltı S, Fiçicioğlu C, Zehir K. Relationship between semen quality and seminal plasma total carnitine in infertile men. Obstet Gynaecol 2003;23: 653-656.
23. Dere F. Anatomi Ders Kitabı. Adana : Okullar Pazarı Kitabevi, 1989: 655-668.
24. Gökmen G, İçten N. Sistematik Anatomi. İzmir : İzmir Güven Kitabevi, 2003: 531-546.
25. Snell RS. Uygulamalı Anatomi. Ankara : Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1993: 135-142.
26. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. Ankara : İzmir Güven Kitabevi, 2000: 329-337.
27. Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Ankara : Nobel Kitabevi, 2005: 200-456.
28. Erkoçak A. Genel Histoloji. İzmir : 1984: 138-160.
29. Eroschenko VP. Di Fiore's Atlas Of Histology With Functional Correlations. Ankara : Palme Yayıncılık, 2001: 251-265.
30. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara : Palme Yayıncılık, 2006: 365-390.
31. Gartner LP, Hiatt JL. Color Atlas of Histology. China : WB Saunders Company, 2001: 435-458.
32. Paker,Ş. Histoloji. Bursa : Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1990: 448-467.
33. Ross HM, Pawlina W. Histology A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001: 647-789.
34. Jungueira LC, Carneiro J. Basic Histology. New York : 2003: 359-375.
35. Young B, Heath JW. Wheather's Functional Histology A Text and Colour Atlas. New York : Williams & Wilkins, 2000: 286-432.
36. Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000.

37. Khadir A, Verreault J, Averill A. İnhibition of antioxidants and hyperthermia enhance bleomycin induce cytotoxicity and lipid peroxidation in chinese hamster ovary cells. Archives of Biochemistry and Biophysics 1999;370: 163-175.
38. Tabak F. Ateş Patogenezi, Ateş Tipleri, Erişkinde Ateş Yönetimi. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Ateşli Hastaya Yaklaşım Sempozyumu. 2006;53: 5327-5336.
39. Ünal M. Sıcak ve Soğuk Ortamda Egzersiz. İstanbul : İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası, 2002: 65-66.
40. Fox B F. Beden Eğitimi ve Sporun Fizyolojik Temelleri. Ankara : Bağırhan Yayımevi, 1999.
41. Junguerira LC, Carniero J, Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviri Editörleri). Temel Histoloji. İstanbul : Nobel Tıp Kitapevi, 2006.
42. Robert E, Donald CM. Histology and Cell Biology. Rapid Review Series, 2006.
43. Costoanzo LS. Saunder's Text & Review Series Physiology. Philadelphia : W.B, Saunders Company, 1998.
44. Hatiboğlu MT. Anatomi ve Fizyoloji. Ankara : Hatiboğlu Yayınevi, 2009.
45. Huges F, Childlowski JA. The Enzimology of Apoptosis, Apoptoz in Normal Development and Cancer. London : S. Mels Ed, Taylor ve Francrs Ltd, 1996: 21-22.
46. William F. Ganong Tıbbı Fizyoloji Bilimler Derneği. İstanbul : Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.
47. Missuet R, Bujan L, Mansat A, Pontonier F, Grandjean H. Effects of artificial cryptorchidism on sperm morphology. Fertil Steril 1987;47: 150-155.
48. Gorostizaga A, Brion L, Maloberti P et al. Heat shock triggers MAPK activation and mkip-1 induction in leydig testicular cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 2005;327: 23-28.

49. Rodriguez JB. Keep cycling or die: the role of germ cell apoptosis in spermatogenesis. Spain , Valladolid University, School Of Medicine, Department of Cell Biology.
50. Nieschlag E, Behre HM. Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction. Second Edition: 257-258.
51. Moore CR, Chase HD. Heat Application and Testicular Degeneration. Anat Rec 1923;26: 344-403.
52. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junction and loss of barrier function in pathophysiology. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology 2004;36: 1206-1237.
53. Helliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford : Clarendon Press, 1995.
54. Droge W. Free Radicals in The Physiological Control of Cell Function. Physiol Rev 2002;82: 47-95.
55. Berlin JA, Colditz GA. A meta-analysis of physical activity in the prevention of coronary heart disease. Am J Epidemiol 1990;132: 612–628.
56. Özgöçmen S. Romatizmal Hastalıklarda Oksidatif Stresin Rolü. Türk Fiz Tıp Rehab 2007;53: 33-35.
57. Abdollahi M, Bahreini-Moghadam A, Emmami B, Fooladian F, Zafarizadeh K. Increasing intracellular cAMP and cGMP inhibits cadmium-induced oxidative stress in rat submandibular saliva. Comp Biochem Physiol 2003;135: 331–336.
58. Kökoğlu E. Serbest Radikal Reaksiyonlarının Kanserdeki Rolü. 1998;11: 358-64.
59. Sen CK. Antioxidant and redox regulation of cellular signaling introduction. Med Sci Sports Exerc 2001;33: 368–70.
60. Tamer L, Polat G, Eskandari G, Ercan B. Serbest Radikaller. MEÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2000;1, 52-58.

61. Valentine JS, Wertz DI, Lyons TJ, Liou LI, Goto JI, Gralla EB. The dark side of dioxygen biochemistry. *Curr Opin Chem Biol* 1998;2: 253–262.
62. 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.
63. Evans JL, Goldfine LD, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002;23: 599–622.
64. Niki E. Free radicals in the 1900's: from in vitro to in vivo. *Free Radic Res* 2000;33: 693–704.
65. Young LS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol* 2001;54: 76–86.
66. Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis free radicals and aging. *Free Radic Biol Med* 2002;33: 29–36.
67. 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.
68. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation aging and disease. *Free Radic Biol Med* 2002;32: 790–796.
69. Stadtman ER, Levine RI. Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci* 2000;899: 191–208.
70. 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.
71. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged dna bases. *Free Radic Biol Med* 2002;33: 1–14.
72. 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.

73. 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.
74. 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.
75. Yalçın AS. Antioksidanlar. Klinik Gelişim 1998;11: 342-346.
76. Mercan U. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi 2004;15: 91-96.
77. Montgomery R, Dryer R, Conway T, Spector A, (Atlan N. Çeviri Editörü). Biyokimya-Olgu Sunumlu Yaklaşım. Ankara : Palme Yayıncılık, 2000.
78. Powers SK, Ji LL, Leeuwenburgh C. Exercise training- induced alterations in skeletal muscle antioxidant capacity. Med Sci Sports Exerc 1999;31: 987-997.
79. Günay M, Tamer K, Cicioğlu İ, Spor Fizyolojisi ve Performans Ölçümü. Ankara : Gazi Kitabevi, 2006.
80. Nelson DL, Cox MM, (Kılıç N.Çeviri Editörü). Biyokimyanın İlkeleri. Ankara : Palme Yayıncılık, 2005.
81. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganism and mammals. Annu Rev Nutr 1998;18: 39-61.
82. Jeulin C, Lewin LM. Role of free L-carnitine and acetyl-L-carnitine in post-gonadal maturation of mammalian spermatzoa. Hum Reprod Update 1996;2: 87-102.
83. Coşkun Ö. Yoğun muskuler egzersizde L-karnitinin sıçan karaciğeri, iskelet kası ve testis dokularına etkileri. Kayseri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, 1998.
84. Cox RA, Hoppel CL. Carnitine and trimethylaminobutyrate synthesis in rat tissues. Biochem J 1974;142: 699-701.

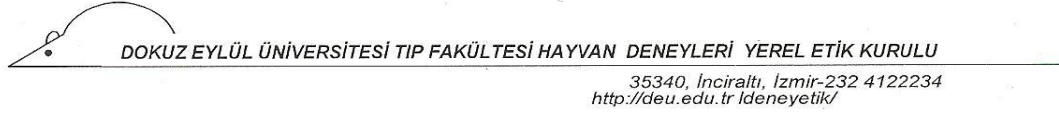
85. Vanella A, Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Di Giacomo C, Sorrenti V et al. Lpropionyl- carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. *Cell Biol Toxicol* 2000;16: 99-104.
86. Kobayashi D, Goto A, Maeda T, Nezu JI, Tsuji A. OCTN2-mediated transport of carnitine in isolated Sertoli cells. *Reproduction* 2005;129: 729-736.
87. Gülçin İ. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Sci* 2006;78: 803-11.
88. Stradaoli G, Sylla L, Zelli R, Verini Supplizi A, Chiodi P, Arduini A et al. Seminal carnitine and acetylcarnitine content and carnitine acetyltransferase activity in young Maremmano stallions. *Anim Reprod Sci* 2000;64: 233-245.
89. Önal A, Astarçioğlu H, Örmən M, Atila K, Sarıoğlu S. Sıçandaki renal iskemireperfüzyon hasarında L-karnitinin koruyucu etkisi. *Ulus Travma Derg* 2004;10: 160-167.
90. Xuan W, Lamhonwah AM, Librach C, Jarvi K, Tein I. Characterization of organic cation/carnitine transporter family in human sperm. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;306: 121-128.
91. Santa Farma İlaç Firması Kataloğu.
92. Vicari E, Calogero AE. Effects off treatment with carnitines in infertile patients with prostatitis-epididymitis. *Hum Reprod* 2001;16: 2338-2342.
93. Sundaram K, Panneerselvam KS. Oxidative stres and DNA single strand breaks in skeletal muscle of aged rats: role of carnitine and lipoicacid. *Biogerontology* 2006;7: 111-118.
94. Garolla A, Maiorino M, Roverato A, Roveri A, Ursini F, Foresta C. Oral carnitine supplementation increases sperm motility in asthenozoospermic men with normal sperm phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase levels. *Fertil Steril* 2005;83: 355-361.
95. Kocer I, Taysi S, Ertekin MV, Karslioglu I, Gepdiremen A, Sezen O et al. The effect of L-carnitine in the prevention of ionizing radiation-induced cataracts: a rat model. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245: 588-594.
96. Guitton N, Brouazin-Jousseau V, Dupais A, Jégou B, Chenal C. Radiation effect on rat sertoli cell function in vitro and in vivo. *Int J Radiat Biol* 1999;75: 327-333.

97. Ishii T, Shimpo Y, Matsuoka Y, Kinoshita K. Anti-apoptotic effect of acetyl-L-carnitine and L-carnitine in primary cultured neurons. *Jpn J Pharmacol* 2000;83: 119-124.
98. Caviglia D, Scarabelli L, Palmero S. Effects of carnitines on rat sertoli cell protein metabolism. *Horm Metab Res* 2004;36: 221-225.
99. Ramadan LA, Abd-Allah AR, Aly HA, Saad-el-Din AA. Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q10 and L-carnitine in mice. *Pharmacol Res* 2002;46: 363-370.
100. Bruns KA, Casillas ER. The metabolism of acetylcarnitine and acetate by bovine and hamster epididymal spermatozoa. *Biol Reprod* 1989;41: 218-226.
101. Enomoto A, Wempe MF, Tsuchida H, Shin HJ, Cha SH, Anzai N et al. Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition. *J Biol Chem* 2002;277: 36262-36271.
102. Dokmeci D. Oxidative stress, male infertility and the role of carnitines. *Folia Med* 2005;1: 26-30.
103. http://www.androloji.org.tr/images/File/EAU_Kilavuzlari/eau_infertilite_kilavuzu.pdf
104. Yang HS, Han DK, Kim JR, Sim JC. Effects of α -tocopherol on cadmiuminduced toxicity in rat testis and spermatogenesis. *J. Korean Med Sci* 2006;21: 445-451.
105. Barlett S, Sharpe RM. Effect of local heating of the rat testis on the levels in interstitial fluid of a putative paracrine regulator of the leydig cells and its relationship to changes in sertoli cell secretory function. *Journal of Reproduction & Fertility Ltd.* 1987;80: 279-287.
106. Khan RV, Brown IR. The effect of hyperthermia on the induction of cell death in brain, testis, thymus of the adult and developing rat. *Cell Stres Chaperones* 2002;7: 73-90.
107. Ezeasor DN. Light and electron microscopical observations on the leydig cells of the scrotal and abdominal testes of naturally unilateral cryptorchid west african dwarf goats. *J Anat* 1985;141: 27-40.

108. Osorio RAL, Christofani JS, Almeida VD, Russo AK, Picarro IC. Reactive oxygen species in pregnant rats: effects of exercise and thermal stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 2003;135: 89–95.
109. Volek JS, Kraemer WJ, Rubin M, Gomez AL, Ratamess NA, Gaynor P. L-Carnitine L-tartrate supplementation favorably affects markers of recovery from exercise stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282: 474-482.
110. Lue YH, Hikim AP, Swerdloff RS, Im P, Taing KS, Bui T, Leung A, Wang C. Single exposure to heat induces stage-specific germ cell apoptosis in rats: role of intratesticular testosterone on stage specificity. *Endocrinology* 1999;140: 1709- 1717.
111. Costa M, Canale D, Filicori M, D Iddio S, Lenzi A. L-carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicenter study. *Andrologia* 1994;26: 155-159.
112. Arav A, Roth Z. Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes?. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2008; 282: 150-152.
113. Jegou B, Laws AO, Kretser DM. Changes in testicular function induced by short-term exposure of the rat testis to heat: further evidence for interaction of germ cells, Sertoli cells and Leydig cells. *International Journal of Andrology* 1984; 7: 244-257.
114. Irez T, Oral E, Ghahremanpour D, et al. Yüksek ısıya maruz kalmanın spermogram üzerine etkileri. *Türk Fertilite Dergisi* 1997; 1: 54-57.
115. Hjøllund NH, Storgaard L, Ernst E, Bonde PJ, Olsen J. Impact of diurnal scrotal temperature on semen quality. *Reproductive Toxicology* 2002; 16: 215-221.
116. Amendola R, Bartoleschi C, Cordelli E, Mauro F, Uccelli R, Spanò M. Effects of L-acetylcarnitine (LAC) on the post-injury recovery of mouse spermatogenesis monitored by flow cytometry. 1. recovery after x-irradiation. *Andrologia* 1989; 21: 568-75.

8.EKLER

Ek-1, Etik Kurul Raporu



Toplantı No : 06/14/2011
Toplantı Tarihi : 08 Temmuz 2011

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na

44/2011 Protokol No'lu; Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Seçil Ayça ÇAVUŞ'un yürütücüsü olduğu "**L-Karnitin'in sıçanlarda oluşturulan testiküler hipertermide koruyucu etkilerinin araştırılması**" isimli projenin uygulanmasında etik açıdan sakınca yoktur. Ancak, başvuru formunda araştırmacıların görev tanımlarının yapılması, sakrifikasyon yönteminin yüksek doz anestezi ile yapılması önerilir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederiz.


Prof. Dr. Osman YILMAZ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik
Kurul Başkanı


Prof. Dr. A. Necati GÖKMEN
Başkan Yardımcısı


Prof. Dr. Alper SOYLU
Üye

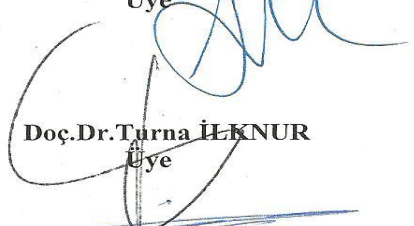

Prof. Dr. Ayşe GELAL
Üye


Prof. Dr. Selman SÖKMEN
Üye


Prof. Dr. O. Nejat SARIOSMANOĞLU
Üye

Prof. Dr. Abdullah KUMRAL
Üye


Prof. Dr. Hüseyin BASKIN
Üye


Doç. Dr. Turna İLKUNUR
Üye


Doç. Dr. H. Alper BAĞRIYANIK
Üye


Doç. Dr. Tonay İNCEBOZ
Üye


Vtr. Hekim Adnan SERPEN
Üye

Ayşe Nur BALİN
Üye(Topl.katılamadı)


Doç. Dr. Şermin GENÇ
Üye

NOT: Projede yapılan düzeltmelerin metin içinde **bold** karakter kullanılarak yapılması projenin incelenmesi açısından sağlıklı olacaktır.

Ek 2, Özgeçmiş

ÖZGEÇMİŞ SEÇİL AYÇA ÇAVUŞ

TC Kimlik No / Pasaport No:	16559958648
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi:	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı İnciraltı/İZMİR
Telefon:	0232 412 45 66
Faks:	
e-posta:	secilaycacavus@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
TR	Celal Bayar Üniversitesi	Fen Fakültesi	Biyoloji	Lisans	2008

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
---------------	------	-------	-------------	------------	--------------

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Testis, Skrotum, Hipertermi

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)	
---	--

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
Lisans Mezuniyet İkinciliği	Celal Bayar Üniversitesi Fen Fakültesi	2008

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

--

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

--

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

--

Düzenlenme Tarihi: 29/02/2012