



# **L-KARNİTİN'İN SIÇAN TESTİS HÜCRELERİ ÜZERİNE ETKİSİ**

**Ayşen Buket ER**

**Şubat 2012  
DENİZLİ**

**L-KARNİTİN'İN SIÇAN TESTİS HÜCRELERİ ÜZERİNE  
ETKİSİ**

**Pamukkale Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Yüksek Lisans Tezi  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**Ayşen Buket Er**

**Danışman: Yrd. Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ**

**Şubat 2012  
DENİZLİ**

## YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Ayşen BUKET ER tarafından, Yrd. Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ yönetiminde hazırlanan “L-Carnitinin Rat Testis Hücreleri Üzerine Etkisi” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Recep KUTLUBAY  
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Vural KÜÇÜKATAY  
Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ  
Jüri Üyesi(Danışman)



Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21/2/12 tarih ve 12-6-5 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY  
Müdür



Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza



Öğrenci Adı Soyadı : Ayşen Buket ER

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda yanımda olan, tezin her aşamasında özverilerini, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Erdoğın KOCAMAZ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin yürütülmesi esnasında, tüm laboratuvar imkânlarından faydalanmamı sağlayan ve laboratuvar çalışmalarımnda önerileri ile bana yol gösterici olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr.Recep KUTLUBAY'a, Sayın Prof.Dr.Gülçin ABBAN METE'ye, Sayın Prof.Dr.A.Çevik TUFAN'a, Sayın Yrd.Doç.Dr.E.Oğuzhan OĞUZ'a, Sayın Doç.Dr.Vural KÜÇÜKATAY'a, tezimin histolojik preparasyon aşamalarında tecrübelerinden yararlandığım Teknisyen Sayın Erdiç KARATAŞ'a deney aşamasında her türlü imkanı sağlayan Veteriner Hekim Sayın Barbaros ŞAHİN'e ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda ve Fizyoloji Anabilim Dalı'nda çalışan ve tezimin yapılmasında emeği geçen herkese ve ayrıca tez projemi destekleyen Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne teşekkür ederim.

Ayrıca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi katkılarını esirgemeyen aileme çok teşekkür ederim.

## ÖZET

### L-KARNİTİN'İN SIÇAN TESTİS HÜCELERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Er, Ayşen Buket  
Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Tez Yöneticisi: Yrd. Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ

Şubat 2012, 69 Sayfa

Erkek üreme sisteminin bir parçası olan testisin başlıca iki görevi hormon ve sperm üretmektir. Testiste üretilen başlıca hormon testosteron, seminifer tübüller arasındaki interstisyel dokuda bulunan Leydig hücreleri tarafından üretilir ve spermatogenez için önemlidir.

L-karnitin ise trimetillenmiş bir amino asittir ve erkeklerde genellikle duktus epididimiste üretilir. L-karnitinin, sperm motilitesini etkileyerek fertilizasyon kapasitesini arttırdığı bilinmektedir. Spermatogenez üzerinde etkisi olduğu düşünülen diğer bir madde ise  $SO_2$ 'dir. Vücuda alınmasıyla  $SO_3^-$ 'e dönen  $SO_2$ 'in hijyenik amaçlarla kullanımı eski çağlara kadar gitmektedir. Bu işlem vücutta sülfat oksidaz (SOX) enzimi aracılığı ile yapılmaktadır. Bu enzim hem endojen hemde eksojen kaynaklı sülfatin toksik etkilerinden hücreleri korur.  $SO_3^-$ 'ün solunum sistemi, merkezi sinir sistemi gibi sistemler üzerinde olumsuz etkileri bilinirken erkek genital sistemi üzerine etkisi bilinmemektedir.

Biz çalışmamızda bu iki farklı mekanizmayı bir araya getirerek L-karnitinin etkilerini, SOX yetersizliği oluşmuş hayvanlarda testiste oluşacak hasarı ve Sox yetersizliği ile L-karnitin arasında etkileşim olup olmadığını inceledik. Toplamda 24 adet erişkin erkek sıçan kullandık. Gruplarımızı, kontrol grubu, L-karnitin verilmiş deney grubu, SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubu ve SOX yetersizliği oluşturulmuş ve sonrasında L-karnitin verilmiş deney grubu olarak ayırdık. Rutin histolojik takip, immünohistokimyasal boyama ve oksidatif stres seviyeleri ölçümü ile bulgularımızı elde ettik. Bu bulgularımız L-karnitinin sperm oluşumunda olumlu etkisi olduğunu bir kez daha gösterirken, SOX eksikliğinin erkek üreme sistemi üzerine olumsuz etkisinin varlığını düşündürdü. Bulgular aynı zamanda seminifer tübül hücreleri üzerinde SOX eksikliği ile oluşan hasarın L-karnitin ile az da olsa düzeldiğini gösterdi.

**Anahtar kelimeler:** Testis, L-Karnitin, Sülfat oksidaz (SOX), Sıçan

**ABSTRACT****THE EFFECTS OF L-CARNITINE ON RAT TESTICULAR CELLS**

Er, Ayşen Buket

M. Sc. Thesis in Histology and Embriology Department

Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ

February 2012, 69 Pages

The main two tasks of testis which is the part of the male reproductive system, is to produce hormones and sperm. The main hormone produced in the testis is testosterone and produced by the Leydig cells that are located interstitial tissue between the seminiferous tubules. This hormone is important for spermatogenesis.

L-carnitine is an amino acid, usually produced in the ductus epididymis. L-carnitine, is known to increase the capacity of fertilization by affecting sperm motility.  $SO_2$  is a substance which are thought to have an effect on spermatogenesis.  $SO_2$  turns to  $SO_3^-$  in human body and use of  $SO_2$  goes back to ancient times. Oxidative  $SO_3^-$  mechanism is the main mechanism for  $SO_3^-$  detoxification. Sulphite oxidase (SOX) is the enzyme which is responsible of this process. The direct or indirect toxic effects of  $SO_3^-$  known. The effects on respiratory system, central nervous system known very well but the effect on the male reproductive system not published yet.

In our study we aimed to find out the effects of deficiency of SOX enzyme and L-carnitine and both together on testis cells. We use 24 male mature rat. We have 4 groups and every group has 6 rats. The groups classified as: control group, experimental group given L-carnitine, experimental group as SOX deficient group and experimental group both SOX deficient and L-carnitine given one. To have our achievements, routine histological procedure, immunohistochemical procedure and experiments about levels of oxidative stress were done. This achievements once more showed that L-carnitine has positive effect on production of sperm, suggesting the existence of the negative effect of lack of SOX on male reproductive system. Also seminiferous tubule cells has defects with deficiency of SOX enzyme but with L-carnitine treatment the cells shown up a slightly improvement.

**Keywords:** Testis, L-Carnitine, Sulphite oxidase (SOX), Rat

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
Teşekkür.....	i
Özet.....	ii
Abstract.....	iii
İçindekiler Tablosu.....	iv
Şekiller Dizini.....	vii
Tablolar Dizin.....	viii
Simge ve Kısaltmalar Dizini.....	ix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1. Genital Sistemin Gelişimi.....	3
2.1.1.Farklanmamış Gonadlar.....	4
2.1.2.Cinsiyet Belirlenmesi.....	4
2.1.3.Testislerin Gelişmesi.....	5
2.1.4.Testislerin İnmesi.....	5
2.2.Genital Boşaltım Yollarının Gelişmesi.....	7
2.2.1.Farklanmamış Evre (Undifferentiated stage).....	7
2.2.2.Erkek Genital Boşaltım Yolları ve Bezlerinin Gelişmesi.....	7
2.2.3.Dış Genitallerin Gelişimi.....	8
2.2.4.Erkek Dış Genitallerin Gelişimi.....	9
2.3.Erkek Genital Sistem Histolojisi.....	10
2.3.1.Seminifer Tübüller.....	10
2.3.2.Spermatogenezis.....	11
2.3.3.Spermiyogenez.....	13
2.3.4. Çekirdek Şekil ve Büyüklüğünün Değişmesi ile Birlikte, Kromatin Yoğunlaşması.....	15
2.3.5. Sertoli Hücreleri.....	16
2.3.6.İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri.....	18
2.3.7.Kan – Testis Bariyeri.....	19
2.4.Testis Anatomisi.....	19
2.5.Testis Fizyolojisi.....	21
2.6. L-Karnitin.....	24



2.6.1. L-Karnitin Yetersizliği .....	25
2.6.1.1. Primer Karnitin Yetersizliği .....	26
2.6.1.2. Sekonder Karnitin Yetersizliği .....	27
2.6.1.3. Karnitin Eksikliği ile Ortaya Çıkan Metabolik Bozukluklar .....	27
2.6.2. L-Karnitin'in Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisi .....	27
2.7. Sülfidler .....	29
2.7.1. $SO_3^-$ 'in Hücresel Sıvılarda Temel Kimyasal Reaksiyonu .....	29
2.7.2. $SO_3^-$ 'e Maruz Kalma .....	30
2.7.2.1. Endojen Maruz Kalma .....	30
2.7.2.2. Eksojen Maruz Kalma .....	33
2.7.3. $SO_3^-$ Toksisitesi .....	35
2.7.4. $SO_3^-$ Metabolizması .....	37
2.7.4.1. Oksidatif Olmayan $SO_3^-$ Metabolizması .....	37
2.7.4.2. Oksidatif $SO_3^-$ Metabolizması .....	37
2.7.5. $SO_3^-$ Oksidaz Yetersizliği Oluşturulmuş Sıçan Modeli .....	39
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	41
3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları .....	41
3.2. Deneysel Uygulama .....	41
3.2.1. SOX Yetersizliği Olan Sıçan Oluşturulması .....	41
3.3. Reaktif Hazırlanması .....	42
3.4. Uygulanan Teknikler .....	42
3.4.1. Doku Takip Yöntemi: .....	42
3.4.2. Histolojik Boyama .....	43
3.4.3. İmmünohistokimyasal Boyama .....	44
3.4.4. Doku Homojenizasyonu .....	45
3.4.5. SOX Aktivitesi Ölçümü .....	45
3.4.6. Protein Miktar Tayini .....	46
3.4.7. Plazma Total Oksidan Kapasite (TOK) ve Total Antioksidan Kapasite (TAK) Ölçümü .....	47
3.4.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) .....	47
3.4.9. İstatistiksel Analiz .....	48
4. BULGULAR .....	49
4.1. Histolojik Bulgular .....	49
4.2. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları .....	52

4.3. Total Oksidan Kapasite (TOK), Total Antioksidan Kapasite (TAK) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Değerleri.....	55
4.4. Karaciğer SOX aktivitesi Değerleri.....	57
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇLAR.....	62
7. KAYNAKLAR.....	63
8. ÖZGEÇMİŞ.....	69

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1 Spermatogenezis.....	11
Şekil 2.2 Sistein katabolizması esnasında sülfid oluşumu .....	31
Şekil 2.3 Metionin katabolizması esnasında sülfid oluşumu .....	32
Şekil 2.4 Sülfid oksidaz enziminin şematik gösterimi.....	38
Şekil 2.5 Sülfid oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonun şematik gösterimi.....	39
Şekil 4.1 Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusu ( HE- 10X Büyütme).....	49
Şekil 4.2 L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokusu (HE-10X Büyütme)..	50
Şekil 4.3 Kontrol grubu ve L-karnitin verilmiş deney gruplarına ait sıçan testis dokuları (HE- 40X Büyütme).....	51
Şekil 4.4 SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubuna ait sıçan testis dokusu (HE – 10X Büyütme ).....	52
Şekil 4.5 SOX yetersizliği oluşturulup, daha sonra da L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokusu HE – 10X Büyütme).....	52
Şekil 4.6 Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusu (İHK – 10X Büyütme).....	53
Şekil 4.7 L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokusu ( İHK-10X Büyütme).....	53
Şekil 4.8 SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubuna ait sıçan testis dokusu ( İHK – 10X Büyütme ).....	54
Şekil 4.9 SOX yetersizliği oluşturulup, daha sonra da L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokusu (HE – 10X Büyütme).....	55
Şekil 4.10 Total Antioksidan Kapasitenin gruplara göre karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.11 Total Oksidan Kapasitenin gruplara göre karşılaştırılması.....	56
Şekil 4.12 Oksidatif Stres İndeksinin gruplara göre karşılaştırılması.....	57
Şekil 4.13 Karaciğer SOX aktivitesi değerleri .....	58

**TABLULAR DİZİNİ**

	<b>Sayfa</b>
Tablo 2.1 L-Karnitinin Fizyolojik Rollerini .....25	25
Tablo 3.1 Wistar Albino sıçan karaciğer homojenatındaki SOX aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımının bileşenleri.....46	46

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>AOX</b>	Aldehit oksidaz
<b>ATP</b>	Adenozin Trifosfat
<b>cAMP</b>	Siklik Adenozin Monofosfat
<b>FSH</b>	Folikül Stimüle Eden Hormon
<b>i.p.</b>	Karın içi
<b>LH</b>	Luteinizan Hormon
<b>OSİ</b>	Oksidatif Stres Değeri
<b>PAS</b>	Periyodik Asit Shift
<b>SOX</b>	Sülfit Oksidaz
<b>SRY</b>	Y Kromozomunda Cinsiyet Belirleyen Bölge
<b>TAK</b>	Total Antioksidan Kapasite
<b>TDF</b>	Testis Belirleyici Faktör
<b>TOK</b>	Total Oksidan Kapasite
<b>XO</b>	Ksantin Oksidaz
<b>ZP1, ZP2 ve ZP3</b>	Zona Pellusida Glikoproteinler

## 1. GİRİŞ

Erkek üreme sistemi testisler, genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmaktadır (Junqueira 2005). Testisler, lobuli testis denilen konik şekilli lobüllere ayrılırlar. Her lobülde bir veya birkaç kıvrılmış tubuli seminiferi contorti bulunur. Seminifer tübül fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria, birkaç fibroblast katmanından oluşmaktadır. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler içerir. Seminifer epitelde iki tip hücre vardır: Sertoli ya da destek hücreleri ile spermatogenetik seriyi oluşturan hücreler. Testisin başlıca iki görevi hormon ve sperm üretmektir. Testiste üretilen başlıca hormon olan testosteron, spermatogenez, embriyo ve fetüsün gelişimi sırasında cinsel farklılaşma ve gonadotropin salgısının kontrolü için önemlidir. Spermatogenik seri hücreler 4-8 tabaka halinde düzenlenmiştir; işlevleri spermaları üretmektir (Junqueira 2005). Testisin interstisyel dokusu, androjen üretimi açısından önemlidir. Testisler de seminifer tübüller arasındaki boşluklar bağ dokusu, sinirler, kan ve lenf damarlarıyla doldurulmuştur. Bağ dokusu çeşitli tipte hücre içerir, bunlar arasında fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajlar bulunur. Ergenlikte işlevsel olarak belirgin hale gelen Leydig hücreleri interstisyel dokuda bulunur. Bu hücreler, sekonder seks karakterlerinin gerçekleşmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üretirler (Junqueira 2005).

L-karnitin trimetillenmiş bir aminoasittir. Lisin gibi aminoasitlerin hepatik metilasyonu ile endojen olarak sentez edilebilir. Uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondri membranı geçişine ve mitokondri içinde oksidasyon ve enerji üretimine yardımcı olduğu bilinmektedir (Doberenz vd 2007). L-karnitin erkeklerde başlıca duktus epididimide üretilir (Brooks 1979). Bilateral kriptorşidizm veya Klinifelter sendromu gibi şiddetli testis harabiyeti olan hastalarda L-karnitin seviyeleri düşüktür (Lewin vd 1981). L-karnitin uygulanması hem kantitatif hem de kalitatif olarak sperm motilitesini ve diğer sperm parametrelerini etkileyebilir. Etkisini daha çok epididimiste gösteren L-karnitin

motile sperm sayısını arttırarak fertilizasyon şansını yükseltmektedir (Costa vd 1994). Epididimiste androjenlerin etkisiyle serbest L-carnitin plazmadan ve epitel hücrelerinden aktif olarak taşınır. Bu taşınma mekanizması seminifer tübüllerin lüminal epitellerinde ve sertoli hücrelerinde bulunmaktadır. L-carnitin spermatozoa tarafından pasif transportla alınır. Epididimal spermatozoa L-carnitini yağ asidi metabolizmasında kullanarak asıl enerji metabolizmasına kaynak olarak kullanır (Ramadan vd 2002).

Spermatogenezis üzerinde etkisi olduğunu düşündüğümüz diğer bir madde ise  $SO_2$ 'dir. Vücuda alınmasıyla  $SO_3^-$ 'e dönen  $SO_2$ 'in hijyenik amaçlarla kullanımı eski çağlara kadar gitmektedir. Antik çağlarda Yunanlıların ev dezenfeksiyonunda, Romalılar ve Mısırlıların ise şarap kaplarını temizlemek amacı ile  $SO_2$  gazını kullandığı bilinmektedir. Hava kirliliğinin önemli bir bileşeni olan  $SO_2$ 'nin toksik etkileri uzun zamandan beri bilirse de,  $SO_3^-$ 'in besin katkı maddesi olarak kullanımı ile ortaya çıkan zararlı etkiler son otuz yıl içerisinde önem kazanmaya başlamıştır (Gunnison vd 1987).  $SO_2$  ve  $SO_3^-$  tuzlarının dışında  $SO_3^-$ 'e endojen olarak da maruz kalınmaktadır (Cooper 1983). Vücutta kükürt içeren aminoasitlerin ve diğer  $SO_3^-$  içeren bileşiklerin katabolizması esnasında önemli düzeyde  $SO_3^-$  oluşur. Endojen  $SO_3^-$  üretiminde en önemli yolak sistein ve metionin aminoasitlerinin katabolizmasıdır. Eksojen  $SO_3^-$  maruziyetini hava kirliliği, ilaçlar, yiyecek ve içeceklerdendir (Amdur 1969, Golembiewski 2002, McEviily vd 1992).  $SO_3^-$  ün solunum sistemi, merkezi sinir sistemi gibi sistemler üzerinde etkileri bilinirken erkek genital sistemi üzerine etkisi bilinmemektedir.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Genital Sistemin Gelişimi

Her ne kadar embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, ovumu dölleyen sperm çeşidi ile fertilizasyon sırasında belirleniyorsa da, erkek ve dişi morfolojik karakteristikleri, embriyonik dönemin 7. haftasına kadar gelişime başlamamaktadır. Genital sistem erken dönemde, her iki cinsten de birbirine benzemektedir ve bu nedenle genital sistemin gelişiminin başlangıç periyodu “seksüel gelişimin farklılaşmamış safhası” olarak adlandırılmaktadır (Moore 2001).

Gonadlar üç kaynaktan köken alırlar:

- Posterior karın duvarını döşeyen sölom epiteli.
- Sölom epitelinin altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordial germ hücreleri (Şeftalioğlu 1998)

Gonad gelişiminin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde bir kabarıklık – gonadal (genital) kabartı oluşturmaktadır (Moore 2001).

Primordial germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabarıklığın sölomik epiteli proliferasyonla olur ve epitel hücreleri altındaki mezenşim içine girerler. Bunlar burada primitif cinsiyet kadranları denilen düzensiz şekilli kordonları oluştururlar. Hem erkek, hem de dişi embriyolarında bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün olmamaktadır. İşte bu devredeki gonad, ‘farklanmamış gonad’ olarak bilinir. Gelişimin 6. haftasına kadar genital kabarıklıklar içinde germ hücreleri mevcut değildir (Langman 1999).



Primordiyal germ hücreleri, insan embriyosunda gelişimin 4 haftasında yolk kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirmektedir. Ameboid hareketlerle, son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır ve 6 haftada da genital kabarıklıkları işgal etmektedir. Kabarıklıklara ulaşamadıkları takdirde, gonadlar gelişemez. Gonadların over veya testise farklılaşmasında, primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi bulunmaktadır (Langman 1999).

### **2.1.1. Farklanmamış Gonadlar**

İlkel cinsiyet hücrelerinin göçlerinden az önce ya da göçleri sırasında gonad kabartısının sölom epiteli tekrar çoğalır ve altındaki mezenşime yayılarak düzensiz ilkel cinsiyet kordonları meydana getirirler. Hem erkek hem dişi embriyolarda bu kordonlar, yüzey epiteli ile devam ederler. 7. haftadan önce, her iki cinsin gonadları benzerdirler ve 'farklanmamış gonad' olarak adlandırılırlar (Şeftalioğlu 1998).

### **2.1.2. Cinsiyet Belirlenmesi**

Kromozomal ve genetik cinsiyet, fertilizasyonda ve sekonder oositi döleyen spermium'un X ya da Y cinsiyet kromozomu tarafından belirlenir. Y kromozom'u farklanmamış gonadın medullası üzerine, testis-belirleyici etkiye sahiptir. Testis-belirleyen faktör (Testis determining factor = TDF) geni, Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki cinsiyet belirleyen bölgede (Sex-determining Region of the Y kromozom = SRY) yerleşiktir. Bu faktör, farklanmamış gonadın ilkel cinsiyet kordonlarındaki hücrelerde sentezlendiğinde, taslak gonadlar, testislere farklılaşır. İnsan Y kromozomunun TDF yöresinde, 223 amino asit düzeni, Sinclair ve arkadaşları tarafından 1990 yılında bulunmuştur (Şeftalioğlu 1998). Y kromozom'u yokluğunda, ovaryumlar meydana gelir. Böylece, fertilizasyonda saptanan cins kromozom kompleksi (XX ya da XY), gonadın tipini belirleyerek, farklanmamış gonadın testis ya da ovaryumlara farklılaşmasını sağlar (Şeftalioğlu 1998).

Mevcut gonadların tipi ise, genital boşaltma yolları ve dış genital organların cinslere göre farklanmasını belirlemektedir. Testislerden üretilen androjenik testosteron, erkekliği oluşturur (Şeftalioğlu 1998).

### 2.1.3. Testislerin Gelişmesi

Y kromozomlu embriyonlarda, ilkel cinsiyet kordonları kalınlaşır ve gonadın medullasına uzanırlar. Oluşan bu kordonlara ‘testis’ ya da ‘medulla kordonları’ (testicular =medullary cords) denir. Testis kordonları, gonadın hilusunda ince hücre kordonlarına parçalanarak, rete testis’ler oluşur. Daha ileri gelişmede, kalın fibroz bir kapsül olan tunika albuginea oluştuğunda, testis kordonları yüzey epiteli ile bağıntılarını keserler (Şeftalioğlu 1998). Kalın fibroz tunica albugineanın 12. haftada oluşması, karakteristik olup, testisin geliştiğinin önemli bir göstergesidir. 16. haftada, testis kordonları at nalı biçimi’ni (horseshoe-shaped) alırlar ve uç noktaları birleşerek tübülü rekti’leri ( tübülü recti) yaparlar. Testis kordonları bu evrede, ilkel cinsiyet hücrelerini ve solom epitelinden köken alan Sertoli hücre’lerini içermektedir. Testis kordonları arasındaki mezenseşimde ise Leydig hücre’leri bulunur. Testis kordonlarının içi puberteye kadar doludur. Pubertede lümen kazanmakta ve seminifer tübül ismini almaktadır. Daha sonra, kanalize olan diğer genital boşaltma yollarına açılırlar. Giderek büyüyen testis, gerileyen mezonefrozdan ayrılır ve mezorkium(mesorchium) denilen kendi mezenteriyale asılı durur. Testis gelişmesinin son aşamasında, yüzey epiteli yassılaşımakta ve ergin testisin dış yüzünü döşeyen tek katlı mezotelium’u oluşturmaktadır (Şeftalioğlu 1998).

### 2.1.4. Testislerin İnmesi

Testislerin ilk gelişim yerleri karın arka duvarı üzerindedir. 4. ayda bu yerleşim yerlerinden göç ederek 28. haftada derin inguinal halkaya, 42. haftada skrotuma inerler (Moore 2001).

Testisler karın arka duvarına ürogenital mezenter ile bağlıdır. Mezonefrozun gerilemesiyle bu bağlar yalnızca gonadın mezenteriyale haline gelirler, bu mezenter kaudal yönde gelişerek kaudal genital ligament adını alır. Testisin kaudal kutbunda,

gubernakulum adı verilen ekstraselluler matriksden zengin yoğun bir mezenşimal yapı aşağıya doğru uzanır(Moore 2001).

Gubernakulumun testislerin inişindeki rolü tam olarak açık değildir. Gubernakulum inguinal bölgede internal ve eksternal abdominal oblik kasların arasında sonlanır. Daha sonra testis inguinal halkaya doğru inmeye başlarken, gubernakulumun abdomen dışındaki kısmı oluşur ve inguinal bölgeden skrotal şişkinliğe doğru büyür. Gubernakulum kızlarda da oluşur; ancak rudimenter olarak kalır (Moore 2001).

Testislerin inguinal kanaldan geçişi visseral organların büyümesi sonucu karın iç basıncının artması nedeniyledir. Testislerin inişi androgenik hormonlarla düzenlenir. İniş sırasında testisler aorta tarafından beslenmeye devam eder ve testikuler damarlar lumbar yerleşimlerinden skrotum içindeki testislere kadar uzarlar (Moore 2001).

Testislerin inguinal kanal boyunca aşağıya inişleri 28. haftada olaylanır ve 2 -3 gün sürer. Testisler periton ve processus vaginalis'in dışına çıkarlar ve 4 hafta sonra yani 32.haftada skrotum içine girerler (Moore 2001).

Yenidoğanların %97'sinde testisler skrotum içindedir. Doğumda testisler skrotuma inmemiş olsa bile 3 ay içinde inebilirler (Moore 2001).

Testislerin aşağıya inişinde ayrı olarak, sölom boşluğunun peritonunda karın ön duvarının orta çizgisinin her iki yanına doğru bir uzantı oluşturur. Bu uzantılar processus vaginalis olarak bilinirler. Musküler ve fasiyel tabakalarla birlikte skrotal şişkinliğe ilerleyen prosesseus vaginalis inguinal kanalı oluşturur (Moore 2001).

Testisler skrotuma indikten sonra processus vaginalisin bir katlantısıyla sarılır. Buna tunika vaginalisin visseral tabakası, skrotum içini döşeyen kısımlarına da tunika vaginalisin pariyetal tabakası denir (Moore 2001).

Yetersiz androjen üretimine bağlı olarak ya da gubernakulum testisin kısa olması nedeniyle doğumdan sonra testislerden birisi ya da her ikisi birden pelvis boşluğunda ya da inguinal kanal içinde yerleşik kalabilirler. Buna "Kriptorşizm" denir. İnmemiş testislere abdominal boşluktaki yüksek ısının etkisiyle gelişir spermatoza üretimi olmaz (Moore 2001).

## **2.2. Genital Boşaltım Yollarının Gelişmesi**

### **2.2.1. Farklanmamış Evre (Undifferentiated stage)**

Gelişmenin 5–6. haftalarında, hem dişi hem erkek embriyonlar, iki çift genital ya da cinsiyet kanallarına sahiptirler. Bunlar, bir çift mezonefroz (Wolffian) ve bir çift paramezonefroz (Mullerian) kanallarıdır. Bu iki çift genital kanalın var olduğu döneme, genital boşaltma yollarının farklanmamış evresi denir (Şeftalioğlu 1998).

Mezonefroz kanalları, mezonefroz böbrek sistemi gelişirken, ürogenital kabartıların lateralinde, mezonefroz tübüllerin, bir çift pronefroz kanallarına açılmasıyla meydana gelmektedirler. Mezonefroz böbrek sisteminin kranialinden başlayıp, kaudaline kadar uzanırlar ve sonra ürogenital sinus'a açılırlar. Paramezonefroz kanalları, ürogenital kabartının, anterolateral yüzündeki sölom epitelinin uzunluğuna invaginasyonu ile oluşur. Kranialde huni benzeri bir yapı ile sölom boşluğuna açıldıktan sonra mezonefroz kanallarının lateralinde, onlara paralel seyrederek (kranial dikey parçaları), sonra onları ventral olarak kesip (yatay parçalar), kaudomedial yönde, ortada sağ ve soldan gelen kendi benzer parçalarıyla birleşirler (kaudal dikey parçalar) ve Y şeklinde uterovaginal taslağı(uterovaginal primordium) ya da uterovaginal kanal'ı (uterovaginal canal) oluştururlar.

Uterovaginal kanalın kaudal ucu, ürogenital sinüsün posterior duvarına değdiği yerde, paramezonefroz ya da Müller tuberkülü (Mullerian tubercle) meydana gelmektedir (Şeftalioğlu 1998).

### **2.2.2. Erkek Genital Boşaltım Yolları ve Bezlerinin Gelişmesi**

Fötal testislerde Sertoli hücreleri, mullerian inhibitor madde (MIS) adındaki hormonu sentezlerler. Sertoli hücreleri MIS üretimine 6 –7 haftada, interstisyel hücreler yani

Leydig hücreleri ise, testosteron salgılamaya 8. haftada başlamaktadırlar. Testosteron üretimi insan koryonik gonadotropik hormonu (hCG) tarafından uyarılır, testosteron erkeklerde mezonefrik kanallardan erkek genital duktusların oluşumunu uyarırken, MIS paramezonefrik duktusun epitelial–mezenşimal dönüşümü (transformation) ile kaybolmasına neden olur. Mezonefroz dejenere olduğundan, mezonefrik duktuslardan bazıları kalıcıdır ve efferent duktulileri (duktuli efferentes) oluşturmaktadırlar (Junqueira 2005). Bu duktuliler, mezonefrik duktusa açılırlar ve mezonefrik duktus bu bölgede duktus epididimise dönüşür. Epididimis distalinde mezonefrik duktus, kalın bir düz kas tabakası kazanır ve duktus deferens oluşur. Mezonefrik duktusların kaudal uçlarının lateralinden dışa doğru seminal veziküller gelişir. Bu, çift haldeki bezler, spermlerin beslenmesini sağlayan, sekresyon yapmaktadırlar. Seminal veziküllerin duktusu ile üretra arasında kalan mezonefrik duktus bölümü, ejakulatuar duktus olarak gelişmektedir(Moore 2001).

### **Prostat**

Üretranın prostatik parçasından meydana gelen, çok sayıda endodermal çıkıntı, etraftaki mezenşim içerisine doğru büyür. Prostadın glanduler bez epiteli bu endodermal hücrelerden gelişirken, epitelyum hücreleriyle ilişkili mezenşimden ise organın stroması ve düz kasları meydana gelmektedir (Moore 2001).

### **Bulboüretnal Bezler**

Bezelye şeklindeki bu organlar, üretranın spongioz parçasından, çift halde dışa doğru büyüyen hücrelerden gelişirler. Düz kas hücreleri ve stroma bölgedeki mezenşimden köken alırlar. Bezlerin salgısı semenle karışmaktadır (Moore 2001).

### **2.2.3. Dış Genitalerin Gelişimi**

Her iki cinste de dış genitalerin gelişimi yedinci hafta sonuna kadar birbirlerine benzemektedir. Seksüel farklılaşma, 9. haftada ortaya çıkmaya başlarken, 12. haftaya kadar dış genitalerin farklılaşması tam olmamaktadır. Dördüncü haftadan, yedinci haftanın başlangıcına kadar dış genitaler seksüel olarak farklanmamıştır. Dördüncü haftanın başlangıcında, her iki cinste de kloakal membranın kranial ucunda mezenşim proliferasyonu sonucu genital tüberkül oluşmaktadır. Daha sonra kısa bir süre içerisinde kloakal membranın her iki tarafından labioskrotal şişkinlikler (genital şişkinlikler) ve

ürogenital katlantılar(üretal katlantılar) gelişmektedir. Genital tüberkül hızla uzar ve bir fallus oluşmaktadır.

Altıncı haftanın sonunda, ürorektal septum kloakal membran ile birleştiğinde, kloakal membran; dorsalde anal membrana ve ventralde urogenital membrana bölünmektedir. Ürogenital membran ürogenital katlantılara bağlanmış, median bir oluk olan, ürogenital oluğun, tabanında yer almaktadır. Anal membran ve ürogenital membran bir hafta sonra yırtılırlar ve sırasıyla anus ve ürogenital açıklık oluştururlar (Moore 2001).

#### **2.2.4. Erkek Dış Genitallerin Gelişimi**

Farklanmamış dış genitallerin erkek yönünde gelişmeleri, fetal testisler tarafından üretilen testosteron hormonun etkisiyle olmaktadır. Fallus, uzayıp genişlediğinde, penisi oluşturur; penisin ventral yüzeyinde, ürogenital katlantılar, ürogenital oluğun lateral duvarlarını oluştururlar. Ürogenital oluk, ürogenital sinusun fallik parçasından uzanan, üretal plağın endodermal hücrelerin proliferasyonu ile döşenir. Penis in ventral yüzeyi boyunca, ürogenital katlantılar, birbirleriyle birleşerek spongioz üretra'yı meydana getirirler. Yüzey ektodermi penisin median hattında birleşerek penilrafe'yi oluşturur, böylece spongioz üretra penis içerisinde hapsedilir. Glans penisin ucunda, ektodermal kökenli içe doğru büyüyen ve hücresel bir kordon olan glanduler (üretal) plak meydana gelir, bu oluşum penis köküne doğru büyür ve spongioz üretra ile birleşir. Glandüler (üretal) plak, kanalize olarak, daha önce meydana gelen spongioz üretraya bağlanır. Bu üretranın terminal parçasını tamamlar ve dış üretal açıklık, glans penis ucuna açılmış olur (Moore 2001).

Glans penisin periferinde sirküler bir ektodermal içe büyüme yirminci haftada meydana gelmektedir. Bu içe büyüme kanalize olduğunda, örtücü bir deri katlantısı olan, prepusyum glans penise yapışık kalır ve genellikle doğumda geriye çekilemez haldedir. Penisin corpus spongiosum, corpus cavernosa kısımları ve fallus mezenşimden gelişmektedir. Labioskrotal şişkinlikler birbirine doğru büyüyerek sonuçta birleşirler ve skrotum meydana gelmektedir. Katlantıların birleşme çizgisi, skrotal rafe olarak açıkça görülür. İki vakada çok nadir bir anomali olan skrotumun agenezi (hiç oluşmaması) rapor edilmiştir (Moore 2001).

### 2.3. Erkek Genital Sistem Histolojisi

Erkek üreme sistemi, testisler genital kanallar, yardımcı bezler ve penisten oluşmuştur. Testisler gametlerin (spermler) meydana getirilmesi (spermatogenezis) ve steroid yapıdaki hormonların üretilmesi ile (steroidogenezis) görevlidir (Junqueira 2005).

Herbir testis dıştan tunika vaginalis ile sarılıdır. Testislerin arka yüzünde tunika vaginalis yoktur. Kan damarları, sinirler ve lenfatik damarlar testise bu bölgeden girer ve yine organı bu bölgeden terk ederler. Spermiler, testis dokusu içinde seminifer tübül (tübülus seminiferus kontortus) olarak adlandırılan tübül yapılarında gelişmelerini sürdürürler (Junqueira 2005).

#### 2.3.1. Seminifer Tübüller

Her bir seminifer tübül yaklaşık 150–250 µm çapında ve 30 – 70 cm uzunluktadır, karmaşık yapıda çok katlı bir epitel ile döşelidir. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu 250 m civarındadır. Kıvrımlı tübüller bir şebeke oluştururlar. Bu şebekedeki her tübül başlangıçta kör uçludur ve dallara ayrılır. Her bir tübül sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller ya da tübülü rekti adıyla bilinen kısa segmentler halinde sürer. Bu düz tübüller, seminifer tübüllerin rete testis denilen, epitelyum ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Mediastinumun bağ dokusunda bulunan rete, 10 – 20 duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır. Seminifer tübüller bir fibroz bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden oluşur (Junqueira 2005).

Seminifer tübülü saran fibroz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olarak bulunan en içteki katman, düz kas özellikleri gösteren yassılaştırmış miyoid hücrelerde içermektedir (Gartner 2007).

Epitelyum Sertoli (epitheliocytus sustentans) yada destek hücreleri ile spermatogenik seriyi oluşturan iki tip hücreden meydana gelmektedir. Spermatogenik (cellulae spermatogenicae) seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasını dolduracak 4– 8

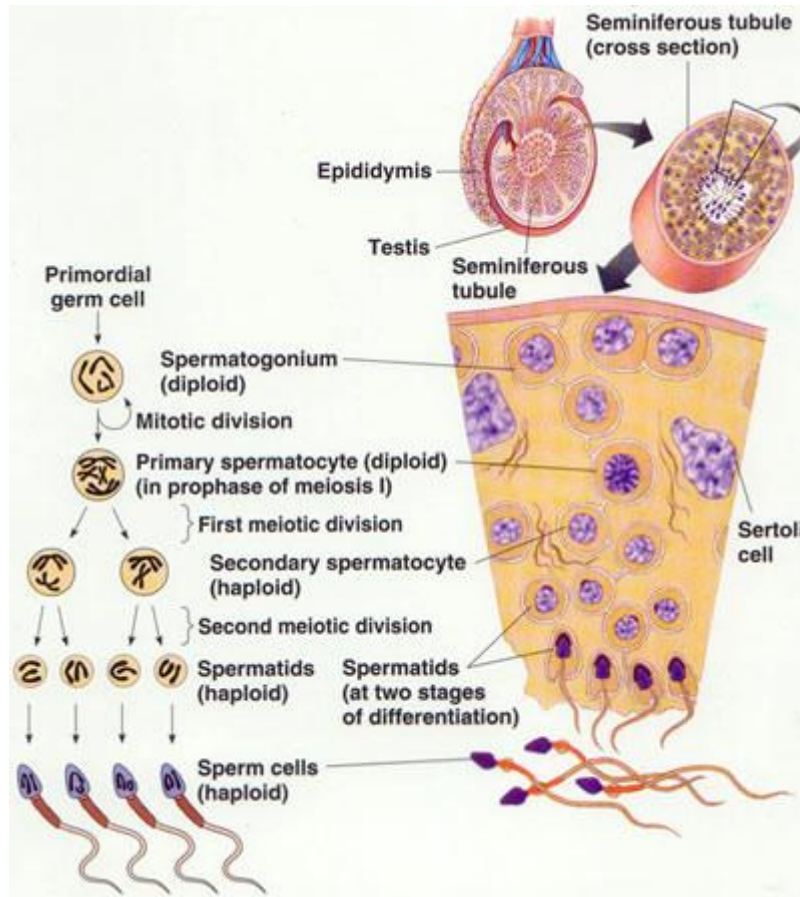
tabaka halinde düzenlenmişlerdir. Bu hücreler birkaç bölünmeden sonra farklılaşır ve spermeleri oluştururlar. Bunlar erkek germ hücrelerinin sürekli farklılaşma sürecindeki çeşitli evrelerde bulunabilirler. Başlangıçtan bitişe kadar spermatogenez olarak adlandırılan bu fenomen üç faza ayrılabilir.

**Spermatositogenez:** Spermatositogenez (Yun. Sperma; tohum + kytos; hücre +genesis; üretim) olarak adlandırılan evrede, spermatogonyumların bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelmektedir.

**Mayoz:** Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarının eşit olarak her hücrede yarıya düşürülmesi sonucu gerçekleşen ve spermatidlerin olduğu evre mayoz adını almaktadır.

**Spermiyogenez:** Spermiyogenez ise spermatidlerin özenli bir hücre farklılaşması süreci geçirerek spermeleri oluşturduğu safhadır (Junqueira 2005).

### 2.3.2. Spermatogenez



Şekil 2.1 Spermatogenez. <http://www.embriyo.org/?part=urun&gorev=oku&id=189>



Spermatogenez, bazal laminanın hemen üstüne yerleşmiş bir germ hücresi olan, spermatogonyum ile başlar. Bu, yaklaşık 12 µm çapında, nispeten küçük bir hücredir ve çekirdeği soluk boyanan kromatin içerir. Seksüel olgunlaşmada bu hücreler bir seri mitoz geçirirler ve yeni oluşan hücreler iki yol izleyebilir (Junqueira 2005).

Spermatogonyumların çoğu Ais (Aisolated) spermatogonyum olarak adlandırılan köken hücrelerdir. Bunun yanında diğer Tip A spermatogonyumlar; çoğalan (A paired=Apr ve Aaligned=Aal) ve farklılaşan [A1, A2, A3, A4 ara (Intermediet=In) ve Tip B (B)] spermatogonyumlardır. Aal, kendilerini yenileyebilen hücreler olarak düşünülürler. Apr ve Aal spermatogonyumlar, hücreler arası köprüler olarak bilinen sitoplazmik bağlantılarla diğer spermatogonyumlarla ilişki halindedirler. Hücreler arası köprüler, diğer tip spermatogenik hücrelerin ve spermatogonyum hücre gruplarının senkronize bir şekilde ilerlemesini sağlarlar. Spermatogonyum bölünme zinciri; “AisoAprAalo Aalo Aal, A1oA2oA3oA4oInoB” şeklindedir. Her bölünme ile hücre sayısı iki katına çıkar, bununla birlikte en olgun Aal, A1 hücresini şekillendirirken bölünme olmaz. Aralarında küçük morfolojik farklılıklar vardır. Çoğalan hücreler bundan sonra farklılaşan spermatogonyumlar olarak isimlendirilirler. Tip Ais, Apr, Aal spermatogonyumlar tüm seminifer tübüllerde görülürler. A1’den A2’ye bölünme başlaması ve ardından gelen bölünmeler, seminifer tübüllerde birbirleriyle bağlantılı belli safhaların oluşmasına neden olmaktadır. Tip A, Ara tip ve Tip B spermatogonyumlar yapısal olarak birbirlerinden farklıdır. Farklılıklar genel olarak çekirdekdeki kromatin miktarına göre belirlenir. Tip A’da, kromatin genelde az miktarda iken, Ara Tip’de orta derecede, Tip B’de ise çok miktarda bulunmaktadır. Spermatogonyumlar seminifer tübülün bazalinde yer alırlar. Farklılaşma fazının sonunda en olgun spermatogonyumlar genç primer spermatositleri şekillendirirler ve Tip B spermatogonyumların preleptoten spermatositleri oluşturmalarıyla hücre siklusunun S fazına girilir. Bu yeni hücrelerin oluşumu ile mayoz bölünme başlar ve spermatositogenezis evresine girilir (Russell 1990).

Tip B spermatogonyumlar primer spermatositlere farklılaşan öncül hücrelerdir. Oluşmalarından hemen sonra bu hücreler birinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Bu sırada primer spermatositin 46 (44+XY) kromozomu vardır ve DNA’sı da 4 N’dir. [N haploid kromozom sayısını (bu insanlarda 23 adettir) ya da bu kromozomlardaki DNA miktarını belirtmektedir]. Bu profazda, hücreler dört faz leptoten, zigoten, pakiten ve

diploten geçirerek diakinez safhasına ulaşırlar ve sonuçta kromozomlar ayrılır. Genlerdeki “crossing over” mayozun bu safhalarında oluşur. Daha sonra hücre metafaza girer ve metafazı takip eden anafazda kromozomlar her bir kutba doğru giderler. Bu bölünmede profazın yaklaşık 22 gün dolayında bir süre alması nedeniyle incelenen hücrelerin büyük çoğunluğu bu fazda görülürler. Spermatogenik seride en büyük hücreler primer spermatositlerdir, bunlar çekirdeklerinde kangal yapma sürecinin değişik evrelerinde kromozomların bulunması ile tanınırlar (Junqueira 2005).

Birinci mayotik bölünmeden sonra sekonder spermatositler denilen ve yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur. Bu sayıca azalma (46'dan 23'e) her hücredeki DNA miktarının eksilmesi (4 N'den 2 N'e) ile birlikte olur. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin gözlenmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve çabucak ikinci mayotik bölünmeye giren hücrelerdir. Sekonder spermatositlerin bölünmesi spermatidlerin oluşmasına yol açar; bunlar 23 kromozom içerir. Birinci ve ikinci mayotik bölünmeler arasında spermatositlerde S fazı (DNA sentezi) görülmediği için ikinci bölünmeden sonra her bir hücredeki DNA miktarı yarıya iner ve haploid (1 N) hücreler meydana gelir. Böylece, mayotik sürecin sonunda haploid sayıda kromozomlara sahip hücreler oluşur. Fertilizasyonla bunlar normal diploid sayıya dönerler. Hücre bölünmesindeki indirgeyici işlev sebebiyle mayotik süreç kromozom sayısının türler için sabit, belirli bir miktarda kalmasını sağlar (Junqueira 2005).

### **2.3.3. Spermiyogenez**

Spermatidlerin şekil değiştirerek olgun erkek cins hücreleri spermiyumlara dönüşmesi olayına spermiyogenezis denir. Spermatidler sekonder spermatositlerin bölünmesi ile oluşan hücrelerdir. Bunlar, 7 – 8 µm çapta olup, diğer hücrelerden küçük boyutları içeren yoğunlaşmış kromatin bölgeleri taşıyan nukleusları ve seminifer tübüllerde lümen yakınında (jukstaluminal) yerleşimleri ile tanınırlar. Spermatidler spermiyogenez denen karmaşık bir farklılaşma süreci geçirirler. Bu süreçte, akrozom (Yun. akron, ekstremite + soma, gövde) oluşur, çekirdek yoğunlaşır ve uzar, flagellum gelişir ve sitoplazmanın çoğu kaybolur. Sonuçta seminifer tübülün lümenine salınan olgun sperm meydana gelir (Erdoğan 2007).

Spermiyogenez: golgi fazı, akrozomal faz ve maturasyon fazı olmak üzere üç faza ayrılmaktadır.

**Golgi Fazı:** Spermatidlerin sitoplazması, nukleusun yakınında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, bir çift sentriyol, serbest ribozomlar ve düz endoplazma retikulumu tübüleri içermektedir. Küçük PAS (+) proakrozomal granüller Golgi kompleksinde birikirler ve bunun hemen sonrasında birleşerek membranla sınırlanmış bir akrozomal vezikülün içinde yer alan tek bir akrozomal granülü oluşturmaktadırlar. Sentriyoller göç ederek akrozomun olduğu bölgenin karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma gelirler. Flagellar aksonem oluşmaya başlar ve sentriyoller yeniden nukleusa doğru geri dönerken hareket ettikçe aksonemal komponentleri çevresini sarmaktadırlar (Junqueira 2005).

**Akrozomal Faz:** Akrozomal vezikül ve granül, yoğunlaşan nukleusun ön yarısını kaplayacak şekilde yayılır ve bundan sonra ‘akrozom’ adını alır. Akrozom, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içermektedir. Akrozom bu yüzden lizozomun özelleşmiş bir tipi gibi iş görür. Bu enzimlerin, korona radyata hücrelerini birbirinden ayırdığı ve zona pellusidayı sindirdiği bilinmektedir. Bunlar henüz ovulasyona uğramış yumurtayı çevreleyen yapılardır.

Spermiler ovumla karşılaştığında akrozomun dış membranı birçok bölgede plazma membranı ile kaynaşarak akrozomal enzimlerin boşalmasına yol açmaktadır. Bu işlem akrozomal reaksiyon olarak bilinir ve fertilizasyonun ilk basamaklarından birini oluşturmaktadır (Junqueira 2005).

Akrozomal faz sırasında hücrenin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelmektedir. Buna ek olarak nukleus uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturmaktadır. Mitokondriler de flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak ‘orta parça’ adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge spermilerin hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir (Kierszenbaum 2006).

Mitokondrilerin bu şekilde yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ve yüksek enerji tüketimi ile ilgili olan bölgelerde toplanmasına başka bir örnek teşkil etmektedir. Flagellum hareketi, mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşmaktadır.

**Maturasyon Fazı:** Geriye kalan artık sitoplazma Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir ve spermler tübülün lümenine doğru salınırlar. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatositle spermatid arasındaki iletişimi sağlamaktadır. Hücreden hücreye bilgi aktarımına izin vermesi sebebiyle bu köprüler spermatogenezdeki olaylar zincirinin koordinasyonunda önemli bir rol oynamaktadırlar. Spermatogenez süreci tamamlandığında sitoplazma ve sitoplazmik köprülerin artık cisimcikler olarak dökülmesi ile spermatidler arasında bir ayrılma oluşturmaktadır (Junqueira 2005).

#### **2.3.4. Çekirdek Şekil ve Büyüklüğünün Değişmesi ile Birlikte, Kromatin Yoğunlaşması**

Kuyruk gelişirken spermatid sitoplazmasındaki mikrotübülüsler, çekirdek etrafında manşet denilen bir bant oluştururlar. Manşetin oluşması ile çekirdek uzar ve akrozomla birlikte spermatidin bir kutbuna yanaşır. Buna bağlı olarak spermatid de uzamaya başlar. Sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellum olur. Mitokondriona flagellum proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeye yerleşir. Geri kalan spermatid sitoplazma artıkları seminifer tübül lümenine salınır ve Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir.

Spermler hareketli olup baş ve kuyruktan oluşurlar. Baş 4-5 mikrometre uzunlukta 2,5-3,5 mikrometre genişliğinde oval şekillidir. Büyük bir kısmı çekirdek oluşturur. Kromatini yoğun olup hacimce küçülmüştür. Bu sperme hareketlilik kazandırır (Gartner 2007).

Kuyruk 55 mikrometre uzunluktadır. Kalınlık ve tabakalanma farklılığıyla 4 parçadan oluşmuştur. Bunlar:

**Boyun:** Kısa bir parça olup segmentli kolonlardan oluşan bağlantı parçası ve proksimal sentriyolden yapılmıştır.

**Orta parça:** Kuyruğun 9+9+2 mikrotübül düzenini dairesel olarak saran ve ucuca düzenlenerek bir halka oluşturmuş mitokondriyon tabakasından yapılmıştır. Orta parçanın uzunluğu 5-7 mikrometredir.

**Esas parça:** 45 mikrometre uzunluğunda 0,5 mikrometre kalınlığındadır. Bu parça 9+0+2 mikrotübül düzenini kapsar. Elektron mikroskopta, kuyruğun enine kesiti

incelendiğinde dorsal ve ventral uzunluğuna düzenlenmiş kolonlar izlenir. Bu uzunluğa kolonlar, her biri yarım yol seyreden iki dairesel çubukla birbirlerine bağlanırlar. Dorsal kolondan başlayan ikinci dairesel çubuk yine yarım yol döndükten sonra dorsal kolona bağlanır.

Bu yapı enine kesitlerde büyük ve küçük iki kompartmana bölünmüş olarak gözlenir. küçük kompartmanda 3, büyük kompartmanda 4 kalın koyu dış fibril bulunur.

**Son parça:** Esas parça kuyruğun ucuna 5-7 mikrometre kala sona erer. Bu noktanın distalinde kalan kısım, son parçadır. Son parçada ortada aksonem ve üzerinde hücre zarı bulunur.

Spermiyogenez, çoğunlukla, seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinin apikal girintilerinde geçmektedir. Spermiyumların Sertoli hücrelerinden atılması olayına spermiyasyon denir. Spermatogonyum bölünmesi sonucu oluşan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlı kalırlar (Netter 2009).

### 2.3.5. Sertoli hücreleri

Sertoli hücreleri spermatogenez serisindeki hücreleri kısmi olarak saran uzamış pramidial hücrelerdir. Sertoli hücrelerinin tabanları bazal laminaya tutunur, apikal uçları ise sıklıkla seminifer tübülün lümenine uzanır. Işık mikroskopta, Sertoli hücrelerinin sınırları belirsiz olarak görülmektedir. Çünkü bunların spermatogenez seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda lateral uzantıları bulunmaktadır. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda ise, hücrelerin bol miktarda düz endoplazma retikulumu, bir miktar kaba endoplazma retikulumu, iyi gelişmiş golgi kompleksi ve çok sayıda mitokondri ile lizozomlar içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış çekirdek çok sayıda kıvrılmalar, belirgin bir çekirdekçik ve az miktarda heterokromatin görülür (Junqueira 2005).

Bitişik Sertoli hücreleri birbirlerine spermatogonyumlar seviyesinde sıkı (zonula okludens) bağlantılarla bağlanmışlardır. Bu spermatogonyumlar, içine kanda bulunan materyallerin serbestçe girebildiği bazal bölmede yerleşirler. Spermatogenez sırasında spermatogonyum serisi, bu bağlantılardan bir yolunu bulup geçerek adluminal bölmeye çıkarlar. Burada spermatogenezin daha ileri dönemleri kandan gelen ürünlerden bir kan-testis bariyeri ile korunurlar. Bu bariyer Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar ile oluşmaktadır. Spermatozoidler ve spermatozoidler Sertoli hücrelerinin apikal ve lateral kenarlarındaki derin girintilerde yerleşmişlerdir. Spermatozoidlerin flagellar kuyrukları geliştikçe bunlar Sertoli hücrelerinin apikal uçlarından çıkan püsküller şeklindeki

çıkıntılar halinde görülmektedirler. Sertoli hücreleri “gap junction” denilen birleşmelerle de ilişki kurar ve bu yolla hücrelerin iyonik ve kimyasal alışverişi sağlanır. Bu da seminifer epitelyum siklusunun koordinasyonunda önemli olabilmektedir (Erdoğan 2007).

- 1-Gelişmekte olan spermlerin desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin sağlanması,
  - 2- Fagositoz,
  - 3- Sekresyon,
  - 4- Anti-mullerian hormon üretimi,
- Sertoli hücrelerinin dört önemli fonksiyonudur.

**Gelişmekte olan spermlerin desteklenmesi, korunması ve beslenmesinin sağlanması:** Spermatogenik seri hücreleri birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlanmış olduklarından, bu hücreler şebekesi fiziksel olarak yaygın sitoplazmik Sertoli hücre dallanmaları ile desteklenir. Spermatozoidler, spermatidler ve spermier kan testis bariyeri ile kan desteğinden izole edildiğii için, bu spermatogenik hücreler besin maddelerinin ve metabolitlerin alınıp verilmesinde Sertoli hücrelerinin aracılığına muhtaçtırlar. Sertoli hücre bariyeri gelişen sperm hücrelerini immunolojik saldırıdan da korur (Junqueira 2005).

**Fagositoz:** Spermioyenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde dokulur. Bu sitoplazmik parçacıklar fagosite edilir ve Sertoli hücre lizozomları tarafından yıkılırlar (Junqueira 2005).

**Sekresyon:** Sertoli hücreleri, sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanallar yönünde akan ve sperm taşınımı için kullanılan bir sıvı salgılamaktadırlar. Androjen bağlayıcı protein sekresyonu Sertoli hücreleri tarafından folikül stimule edici hormon (FSH) ve testosteron kontrolü altında gerçekleştirilir. Bu protein, seminifer tübül icinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlamaktadır. Sertoli hücreleri, testosteronu oestradiyol haline çevirebilmektedirler. Bu hücreler aynı zamanda, anterior hipofiz bezinden FSH sentez ve salınmasını önleyen ‘inhibin’ adı verilen bir peptid salgılamaktadırlar (Junqueira 2005).

**Anti-Mullerian Hormon Üretimi:** Ayrıca Mullerian inhibe edici hormon olarak da isimlendirilen bu hormon embriyonik gelişme sırasında erkek fetusta Müller (paramezonefrik) kanallarının gerilemesini sağlayan bir glikoproteindir. Testosteron ise

Wolf (mezonefrik) kanallarından köken alan yapıların gelişmesini sağlamaktadır. Sertoli hücreleri insanda ve diğer hayvanlarda üreme periyodu süresince bölünmezler. Bu hücreler, özellikle enfeksiyon, kötü beslenme, x-ışını irradasyonu gibi olumsuz koşullar ve bu koşulların zararlı etkileri karşısında spermatogenik seri hücrelerine göre çok daha dayanıklıdır. Memelilerde spermlerin salınımı muhtemelen hücre hareketlerinin bir sonucudur; bu hareket Sertoli hücresinin apeksinde bulunan mikrotübüller ve mikrofilamentler ile sağlamaktadır (Erdoğan 2007).

### **2.3.6. İnterstisyel Doku ve Leydig Hücreleri**

Seminifer tübüller arasındaki boşluklar, kollajen lifler, kan ve lenf damarları, sinir lifleri ve çeşitli hücrelerce doldurulmuştur. Bu hücreler fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri ve testisin Leydig hücreleridir (Gartner, 2007).

Leydig hücreleri endokrin işlevleri nedeniyle kılcal damarlarla ilişkili yerleşim gösterirler ve değişen sayılar içeren topluluklar yaparlar. Bu hücreler steroid hormon sentezleyen hücrelere özgü organel ve enzimlerden zengindir. Leydig hücreleri çok köşeli, yaklaşık 15 µm çapında ve genelde tek çekirdekli hücrelerdir. Çekirdek çoğunlukla ekzantrik duruşlu olup 1 ya da 2 çekirdekçik bulunur. Çekirdek kromatinden yoksundur, bu nedenle soluk boyanır. Sitoplazma asidofiliktir. Sitoplazmalarında iyi gelişmiş Golgi kompleksi, mitokondriyonlar ve lipid damlacıkları içerir. Çok iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulumları vardır. Sitoplazmada peroksizom ve lizozomlar ve yaş ilerledikçe artan oranda da lipokrom pigmenti bulunur. Leydig hücrelerinde işlevleri bilinmeyen, insana özgü olan renksiz, azokarmin ile boyanan ve büyüklükleri değişebilen Reinke kristalleri bulunmaktadır (Akay, 2001).

Leydig hücreleri, ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesinden sorumlu olan testosteron hormonunu üreterek spermatogenezin sürekliliğini sağlar. Testosteron, mitokondriyon ve granülsüz endoplazmik retikulumda bulunan enzimlerce sentezlenir. Leydig hücrelerinin erk ve miktarları hormonal uyarılara bağlıdır (Kierszenbaum, 2006). Embriyonik gelişim sırasında, plasental gonadotropik hormon anne kanından fetusa geçerek, androjenik hormonları üreten fotal testiküler intersitisyel hücreleri uyarır. Hormonlar, embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik intersitisyel hücreler gebeliğin 4. ayına değin farklılaşmış olarak kalırlar. Daha sonra ise testosteron sentezindeki azalmaya koşut gerilerler. Hücreler, gebelik

süresince ve hipofizden salınan LH uyarımı altında testosteron sentezine yeniden başladıkları ergenlik öncesi döneme değin dinlenmede kalırlar (Junqueira 2005).

Olgun Leydig hücreleri, doğumdan sonraki birkaç hafta dışında, 10 yaşına değin erkek çocuk testisinde bulunmaz. Leydig hücrelerinin sayıları, ergenlikle birlikte artar, ileri yaşlarda azalır. Leydig hücre sayısı 60 yaşındaki bir erkekte, 20 yaşındaki bir erkekteki sayının yarısından da azdır (Erdoğan 2007).

### **2.3.7.Kan – Testis Bariyeri**

Kan ile siminifer tübüllerin iç bölgesi arasında bir bariyerin bulunması testikuler sıvı içine kandan çok az maddenin geçmesini açıklamaktadır. Pencere tipte olan testiküler kapillerler büyük moleküllerin serbest olarak geçişine izin vermektedirler. Erkek germ hücrelerinin kandan gelen zararlı ajanlara karşı korunmasında önemli olan bu bariyer, Sertoli hücrelerinin arasındaki tıkaçıcı bağlantılar ile oluşturmaktadır.

Seminifer tübüller arasındaki intersitisiyel doku içerisinde fibroblastlar, makrofajlar, mast hücreleri, kan damarları, ince kollojen ve retikulum lifleri bulunur. Kan damarları çevresinde 14-21 mm büyüklüğünde poligonal şekilli intersitisiyel ya da Leyding hücreleri yer alır. Bu hücreler testisin endokrin salgısı olan testosteronu oluştururlar. Leydig hücrelerinde çekirdek genelde bir ya da iki çekirdekcik içerir. Leydig hücrelerinin en önemli yapısal özelliklerinden biri de sitoplazmalarında Reinke kristalloidlerini içermeleridir (Gartner 2007).

### **2.4. Testis Anatomisi**

Testis scrotum içinde yer alan ve erkek üreme hücrelerinin (sperm) yapıldığı yumurta şeklinde bir çift organdır. Her bir testis'in facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü, margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı, extremitas superior ve extramitas inferior olmak üzere iki ucu vardır.

Testisler funiculus spermaticus aracılığı ile scrotum içinde oblik pozisyonda asılı durumdadır. Testisin her biri yaklaşık 10 – 14 gr ağırlığındadır.



Testislerin üst ucunda appendix testis adı verilen küçük, yassı bir yapı görülmektedir. Bu yapı para mesonephric kanalın üst ucunun kalıntısıdır. Testislerin arka kenarlarının dış kısmı boyunca epididymis yer alır; funiculus spermaticus da, epididymis'in medialinde olmak üzere, margo posterior'da bulunur. Testislerin ön kenarı, her iki yüzü ve uçları visceral periton (epiorchium) ile örtülüdür. Periton arka kenarı sadece lateral kısmını örtmektedir. İntrauterin hayatta karın boşluğunda yer alan testis doğumdan hemen önce canalis inguinalis'ten geçerek scrotum'a inmektedir. Bu geçiş sırasında karın boşluğunda kendisini saran periton kesesini (processus vaginalis) de beraberinde taşımaktadır. Doğumdan sonra processus vaginalis periton boşluğuyla ilişkisini keserek tunica vaginalis ismini alır. Tunica vaginalis'in scrotum'un iç yüzünü döşeyen lamina parietalis (periorchium) ve testis'in üzerini örten lamina visceralis (epiorchium) olmak üzere iki tabakası vardır. Bu iki tabaka arasında, çok az miktarda seröz sıvı bulunmaktadır. Testis'e gelen ve testis'ten çıkan damar ve sinirler de testis'in scrotum'a inişi sırasında onu takip ederler. Bu oluşumlar bir araya gelerek funiculus spermaticus adı verilen ve içerisinde, ductus deferens, a.v. testicularis, a.ductus deferentis, a.cremasterica, n.genitofemoralis'in genital dalı, otonomik sinirler ve lenf damarları içeren bir kordon meydana getirmektedirler (Sancak, Cumhuriyet 1999).

Tunica vaginalis testis'in iç tarafında da, testisleri saran iki tabaka daha vardır. Bunlar tunica vaginalis testis'ten derine doğru tunica albuginea ve tunica vasculosa olarak sıralanırlar.

Tunica albuginea, testisleri örten kalın, fibroz bir tabakadır. Elastikiyeti ve genişleme özelliği olmayan bu tabaka, margo posteriordan testis içine sokularak vertikal, mediastinum testis denilen bir bölme oluşturmaktadır. Mediastinum testis, testis'in extremitas superior'undan extremitas inferior yakınına kadar uzanmaktadır. Mediastinum testis'in ön ve yan kısmından çıkan uzantılara septula testis adı verilmektedir. Bu uzantılar, testis parankiminden geçerek tunica albuginea'nın iç yüzüne ulaşmakta ve böylece testis'i koni biçiminde lobuluslara (lobuli testis) bölmektedir. Testis parankimini, lobuli testis içinde bulunan kıvrımlı şeklinden dolayı 'tübülü seminiferi contonti' adı verilen kanalcıklar oluşturmaktadır. Her bir testis kanalcığı, mediastinum testis yakınında tübülü seminiferi recti adı verilen düz bir kanalcıkla uzanmaktadır. Bütün lobuluslardan gelen bu kanalcıklar, mediastinuma sokulmakta ve burada 'rete testis' denilen ağı oluşturmaktadır. Lobuli testis'lerde yapılan sperm'ler rete testis'ten ductuli efferentes testis adı verilen kanallar aracılığıyla epididymis'e gelmektedir.

Tunica vasculosa, testis'in damar ağından oluşan ve tunica albuginea'nın iç yüzünü örten tabakasıdır. Bu tabaka, tunica albugineanın uzantısı olan septula testislerin iç yüzünü kapladığı için lobuli testis'lerinde etrafında bir tabaka oluşturmaktadır.

**Arterler:** Testis'in arteri aorta abdominalis'den gelen a. testicularis'dir.

**Venler:** Ductus deferens çevresinde plexus pampiniformis denilen ven ağını yaparlar. Bu ağdan önce iki, sonra birer vena testicularis oluşur. V. testicularis dextra, v. cava inferior'a; v. testicularis sinistra, v. renalis sinistra'ya drene olur.

**Lenfatikler:** Lenf damarları funiculus spermaticus içinde yükselir. Nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aort içi laterales'te sonlanır.

**Sinirleri:** Testisleri innerve eden simpatik lifler 9–12 torakal spinal segmentlerinden çıkar. Testis'in vagal situmulasyon olması, fõtal hayatta, bõbreğin hemen altında olmasından kaynaklanmaktadır.

## 2.5. Testis Fizyolojisi

Testis ekzokrin ve endokrin işleve sahip bileşik túbüler bir bezdir. Testislerin iki önemli işlevi vardır (Netter 2009) :

- 1) Cinsiyet hormonları ya da androjenlerin sentezlenmesi (steroidogenezis )
- 2) Erkek üreme hücreleri olan spermiyumların üretilmesi ( spermatogenezis, gametogenezis )

Testisin iç salgılama işlevi, Leydig hücrelerinin testosteron, dihidrotestosteron, androstenedion gibi androjenler olarak tanımlanan erkek cinsiyet hormonlarının salgılanmasıdır. Testosteron en önemli testis hormonudur. Testislerde ve bõbrek üstü bezlerinde kolesterolden ya da doğrudan asetil koenzim A' dan sentezlenir. Testosteronun büyük bir kısmı hedef dokularda daha aktif olan dihidrotestosterona dönüşür (Bozdoğan 2003).

Testosteron sentezinin biyosentetik aşamaları şu şekilde gerçekleşir: Testosteron testislerden salgılandıktan sonra, yaklaşık %97' si zayıf bağlarla plazma albumini ya da güçlü bir şekilde cinsiyet hormonu bağlayan globulin olarak adlandırılan 1β globulinle bağlanır. Bağlı hormonun dolaşım sisteminde kalış süresi 30 dakika–1 saat olabilir. Bu süre sonunda testosteron ya dokularda tutulur ya da inaktif ürünlere dönüşerek vücuttan

atılır. Dokularda tutunmayan testosteron, karaciğerde başlıca androsteron ve dehidroepiandrosterona dönüşür. Aynı anda her iki yapı glukuronoidlerle ya da sülfatlarla birleşerek bağlı hale getirilir. Bunlar da safra içinde ya sindirim kanalına verilirler ya da idrarla böbreklerden atılırlar (Guyton 2007).

Testosteron protein sentezini artırır, yıkımını azaltır; böylece büyüme hızını etkiler. Kemik büyümesini durdurur. Testosteron esas etki yeri olan prostat ve diğer birkaç dokuda 5- $\alpha$  redüktaz enzimi aracılığı ile, dihidrotestosterona dönüşür ve sitoplazmik reseptör proteinine bağlanır.

Reseptör-hormon kompleksi daha sonra çekirdeğe gider, burada bir çekirdek proteiniyle bağlanarak DNA-RNA kayıt işlemini uyarır. RNA polimeraz aktifleşir ve prostat hücrelerinde RNA içeriği artar, bunu hücrel protein artışı izler. Böylece testosteron vücudun her yerindeki protein sentezini arttırmakla birlikte bu artış daha özgün olarak ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişmesinden sorumlu olan hedef organ ve dokularda görülmektedir (Noyan 2005).

Testosteron yüksek yerel etkiyle seminifer tübüllerde spermatogenezisi etkilerken, kana verilerek (endokrin etkiyle) hedef organları (iskelet kası vb.) ve erkek üreme sistemi yardımcı bezlerinin (prostat, vesikula seminalisler, bulboüretal bezler ) işlevini düzenler. Erkek üreme organlarının tümünün yapısı ve işlevleri testosteron varlığına bağlıdır. Testosteron, erkeğe özgü ikincil cinsiyet özelliklerinin (pubik kıllanma, sakal-bıyık, erkeğe özgü ses, kaslı vücut şekli ) ortaya çıkmasından sorumludur (Ross 2003).

Fötal yaşam süresince testisler, plasentada oluşturulan koryonik gonadotropinlerle uyarılarak orta düzeyde testosteron salgılar. Bu hormon, fötal gelişim sürecinde ve doğumdan sonra 10. haftaya değin vücutta bulunur. Yaklaşık 10-13 yaşına kadar testosteron üretilmez.

Puberte evresinde testosteron yapımı hızla artar. 50 yaşından sonra ise hızı düşüşe geçer, 80 yaşında en üst düzeyin % 20-50' sine iner. Her iki cinste de cinsel işlevler hipotalamo-hipofizer sistemin denetimi altında olaylanır. Hipotalamik nöronların arkuat çekirdeklerinde yüksek yoğunlukta sentezlenen gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH), hipotalamik hipofizer portal kan yoluyla, hipofiz bezinin ön lobuna taşınır ve LH ve FSH salgılanmasını uyarır. GnRH, 1-3 saatte birkaç dakika süreyle salgılanırlar.

LH ve FSH testislerdeki hedef dokular üzerinde siklik adenzin monofosfat ikinci haberci sistemini uyarır. Bu sistem daha sonra hedef hücrelerdeki özgül enzim sistemlerinin aktive olmasını sağlar. LH, Leydig hücrelerinde özgün reseptörlere bağlanarak etki gösterir. Adenohipofizden LH salgısı sürekli değildir, geceleri 90 dakikalık aralıklarla olur. LH dışında prolaktin ve LHRH' da doğrudan Leydig hücrelerini etkileyerek testosteron salgılanmasını etkiler.

Salgılanan testosteron düzeyi uyarıcı LH miktarlarıyla doğru orantılıdır. Yüksek düzey testosteron varlığı, negatif geri bildirim etkisi ile hipotalamus ve hipofiz ön lobu salgısını azaltarak testosteron sentezininin baskılanmasına neden olur ve hormon düzeyi normale gelir. Buna karşıt olarak, testosteron düzeyinin çok az olması koşulunda hipotalamustan yüksek düzeyde GnRH salgılanır, hipofiz ön lobundan LH ve FSH salgılanması artar ve testiküler testosteron salgısı yükselir (Kierszenbaum 2006).

LH dışında spermatogenezisin başlaması ve sürmesinde adenohipofizden salgılanan bir diğer hormon olan FSH da etkilidir. FSH, Sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklaz yapımını uyarır ve sonuçta cAMP artışına neden olur. Aynı zamanda androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılanmasını sağlar. ABP, testosteron ile bağlanır ve bunu seminifer tübül lümenine taşır. Böylece spermatogenezis için gerekli oranda testosteron yerel etkisi sağlanmış olur. Bu etki spermatogenezisin başlaması için gereklidir. Spermiumların azalması FSH salgısını uyarır. FSH salgılanması Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hormonuyla baskılanır. Östrojenler, kadın üreme hormonları, ABP' yi bağlayarak spermatogenezisi azaltır (Guyton 2007).

Testilerin dış salgısı, holokrin bir salgı ürünü olan spermiumlardır. İnsanda günlük ortalama spermium üretimi iki testisten toplam 200 milyondur. Spermatogenezisin düzenlenmesinde ısı çok önemlidir. Testiküler ısı yaklaşık 35°C' dir. Zengin venöz bir pleksus (pampiniform pleksus) her bir testiküler arterin çevresini sarar. Bu anatomik düzenlenim testiküler ısının sürdürülmesinde önemli olan karşı bir ısı akımı sağlar. Diğer etkenler; skrotumdaki terin buharlaşması ile ısı kaybı ve spermatik kordondaki kremaster kaslarının kasılması ile testislerin daha yüksek bir ısıda kalabileceği inguinal kanallara çekilmesidir (Hatipoğlu 2006).

## 2.6. L-Karnitin

Karnitin ilk 1905’de Krimberg ve Gluwitch tarafından et ekstratından izole edilmiştir. Kimyasal yapısı 1927’de belirlenmiştir. Karnitinin metabolik rolü, Fritz’in karnitin ilavesi ile farede yağ asitlerinin beta-oksidasyonunu bildirdiği zaman yani 1955’te ortaya çıkmıştır. Bu doğrultuda yapılan araştırmalar sonucunda, 1959 yılında karnitinin uzun zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunda gerekli bir madde olduğu gösterilmiştir

L-karnitin, tüm memelilerde bulunan önemli bir endojen moleküldür. Başlıca kaynağı diyet (%75) olmakla birlikte %25’i karaciğer ve böbrekte lizin ve metiyoninden sentezlenir. Endojen olarak sentezlendikten sonra iskelet ve kalp kaslarına taşınır. Plazma veya dokularda serbest formda ya da yağ asitlerine bağılı olarak yani ester formunda (açıl L-karnitin, propiyonil L-karnitin, Palmitoil L-karnitin) bulunur. L-karnitin, mitokondri membranından geçemeyen sitozoldeki uzun zincirli yağ asitlerinin, mitokondrilere taşınarak beta-oksidasyon ve oksidatif fosforilizasyon yolu ile ATP üretiminde önemli bir rol oynamaktadır (Doberenz vd 2007). L-karnitin ile ilgili yapılan çalışmalarda karnitinin sadece yağ asitlerinin mitokondriyal oksidasyonunda değil, aynı zamanda diğere bazı biyokimyasal fonksiyonların başarılmasında da rolü tespit edilmiştir (Ji vd 1996). L-karnitinin fizyolojik rolleri Tablo 2.1’de özetlenmiştir.

**Tablo 2.1.** L-Karnitinin Fizyolojik Rollerini

- Yağ asidi Açıl CoA'yı beta oksidasyon için mitokondri membranından geçirmek
- Pirüvat ve dallı zincirli ketoasitlerin oksidasyonunu kolaylaştırmak ve birikimlerini önleyerek hücreleri Açıl CoA'ların membran destabilize edici etkisinden korumak
- Yağ asidi metabolizması ve ketogenezinin düzenlenmesi
- Dallı zincirli aminoasit oksidasyonuna yardım
- Peroksizomal beta oksidasyon ile ortaya çıkan açıl köklerini yeniden oksidasyon için
- peroksizomdan mitokondriye taşımak
- Aerobik glikolizin aktivasyonu
- Solunum zincir fonksiyonlarının uyarılması
- Membran stabilizasyonu
- Sentez için asetil grup vericisi (asetil kolin sentezi gibi)
- Antioksidan etki

### 2.6.1. L-Karnitin Yetersizliği

Karnitin biyosentezi bir kofaktor olarak askorbik aside bağlıdır. Askorbik asit hidrolazların kofaktörüdür. Hidrolazlar, karnitin ve steroid hormonların sentezi üzerine etki eder. Bu nedenle diyetteki askorbik asit yetersizliğinde karnitin sentezinin oranı azalır. Bazı deney hayvanlarında lisin ve metiyonin aminoasitleri ile askorbik asit yetersizliğinde karnitin yetersizliği oluşabilmektedir. Yetersizliği meydana getiren başlıca sebep, biyosentezi olumsuz etkileyen kalıtsal rahatsızlıklardan kaynaklanmaktadır. Bu rahatsızlıklar metabolizmada L-karnitin transferini etkilemektedir. Bunlar genellikle lipidosis tarafından karakterize edilmekte ve kasları önemli derecede zayıflatarak zarar vermektedir.

Yağ asidi oksidasyonunda rol alan enzimlerin yetersizliği, karnitin alımı veya biyosentezin bozulması sonucu yağ asitleri oksidasyonu kesintiye uğratmakta ve birçok semptomların oluşmasına neden olmaktadır. Esasen karnitin yetersizliğine bağlı miyopati

ve kardiyomiyopatinin patojenezinde, özellikle kaslarda deoksikarnitin sentez kapasitesinin düşmesi ve transport sürecinin bozulması sorumlu tutulmaktadır. Nitekim karnitin yetersizliği, ilk defa insanlarda lipid birikimli miyopati şeklinde iskelet kaslarında gösterilmiştir (Brevetti vd 1991).

### **2.6.1.1. Primer Karnitin Yetersizliği**

Primer karnitin yetersizliğinde lipid metabolizmasının şiddetle etkilendiği ve kaslarda yağ depolanması sonucu kardiyak ve iskelet kaslarında fonksiyonel bozukluklar gözlenmiştir. Renal reabsorpsiyon ve kas hücrelerine karnitin transportunda görülen defektlerin sorumlu tutulduğu bu yetersizlik iki farklı formda tanımlanmaktadır:

**Miyopatik Sendrom:** Bu sendromda serum karnitin seviyesi normal, fakat kas seviyesi düşüktür. Öncelikle kas zayıflığı ile karakterize bir durumdur, kas liflerinde aşırı lipid birikimi mevcut olup biyopside kas liflerinde yağ infiltrasyonu gözlenir.

**Sistemik Sendrom:** Bu sendromda hem serum hem de doku karnitin seviyeleri anormal şekilde düşük bulunur. Öncelikle kardiyomiyopati mevcudiyetiyle karakterizedir, ayrıca ensefalopati, iskelet kası ve karaciğer dokusunda yağ depolanması dikkat çeker. Oluşumda renal tubuler, intestinal mukoza ve kasta karnitin membran transportundaki bir zaafiyet sorumlu tutulmaktadır. Normalde karnitin başlıca idrar yolu ile atılır ve % 98'i geri emilir. Reabsorpsiyon bozulduğunda karnitinin üriner itrahi artar, geri emilim azalır ve plazma-doku karnitin düzeyi düşer. Mitokondri membranında açilkarnitin taşınmasında rol alan "karnitin/acilkarnitin translokaz" enzim yetersizliğine bağlı yetmezlik resesif karakter göstermekte ve hastalarda hipoketotik koma, hiperamonemi, kardiyomiyopati, kardiyak aritmi ve iskelet kas zayıflığı gibi semptomlar gözlenmektedir. Primer karnitin yetersizliğinin miyopatik ve sistemik formları iyi bilinmekte olup erken teşhis ve rasyonel tedavi, morbidite ve mortalitenin azalmasında son derece etkindir. Miyopatik ve sistemik karnitin yetmezliği terimleri yerine son senelerde "Semptomatik karnitin yetmezliği" terimi kullanılmaktadır.

### **2.6.1.2. Sekonder Karnitin Yetersizliği**

Sekonder karnitin yetersizliği birçok metabolik hastalıkta tanımlanmıştır. Daha çok karnitin itrahının aşırı olduğu tübüler rahatsızlıklar ve kronik böbrek yetmezliğinde ortaya çıkmaktadır. Muhtelif dokulardaki eksikliğine rağmen serum karnitin seviyeleri normaldir. Kronik üriner enfeksiyonların tedavisinde kullanılan pivalat içeren antibiyotikler (pivampisilin gibi) ve antiepileptik olarak kullanılan valproik asit yapısındaki ilaçlar (sodyum valproat gibi) uzun süreli tedavilerde sekonder karnitin yetersizliğine yol açabilmektedir (Deniz 1999).

Konjenital metabolizma bozuklukları ve difteriden başka hastalıklarda da karnitin metabolizma bozuklukları bildirilmiştir. Diabetes mellitusta artan serbest yağ asitlerinin mitokondride okside olarak As-KoA'ya dönüşmesi sonucu ketogenezin hızlandığı, serum serbest karnitin seviyesinin düştüğu, bu seviyedeki azalmaya bağlı olarak kalp ve iskelet kası karnitinin de azaldığı bildirilmiştir.

### **2.6.1.3. Karnitin Eksikliği ile Ortaya Çıkan Metabolik Bozukluklar**

- Yağ asitleri enerji üretiminde kullanılmaz, sonuçta, özellikle kalp ve iskelet kaslarında enerji açığa çıkar.
- Serbest yağ asitleri ve trigliseridlerde artma gözlenir.
- Yağ asitleri sitoplazmada birikir.
- Kaslarda yağlanma meydana gelir.
- Toksik etkiye bağlı metabolik bozukluklar oluşabilir.
- Karbonhidratların aşırı kullanılmasına bağlı hipoglisemi oluşur.
- Karbonhidrat metabolizmasının bozulması sonucu laktik asit birikmesi gözlenir.
- Çocuklarda büyüme ve gelişme geriliği ve tekrarlayan enfeksiyonlar gözlenir.
- Beta-oksidasyon için gerekli olan serbest KoA eksikliği oluşur (Lango vd 2001).

### **2.6.2. L-Karnitin'in Erkek Üreme Sistemi Üzerine Etkisi**

Erkek üreme fonksiyonlarında karnitinlerin etkisi oldukça iyi tanımlanmıştır. Bununla beraber, karnitinin erkek infertilitesinin kontrolünü hangi mekanizma ile yaptığı henüz



tam olarak açıklanamamıştır. Karnitinler, spermatogenetik süreci, sperm hareketi ve olgunlaşmasını pozitif olarak etkileyen, spermatozoa tarafından kullanılmak üzere hazır enerji kaynağı sağlayarak sperm metabolizmasında önemli rol oynamaktadırlar (Caviglia vd 2004). Epididimal plazma insan vücudunda en yüksek karnitin seviyesini içerir. L-karnitin, memeli epitelden epididimal plazma içine salgılanır ve daha sonra da spermatozoa tarafından alınarak, kısmen asetil karnitin şeklinde esterifiye edilir. Sonuç olarak spermatozoa içerisinde serbest ve asetillenmiş L-karnitin şeklinde biriktirilir (Ramadan vd 2002). Epididimal plazma ve spermatozoada, L-karnitin konsantrasyonu dolaşım kanındaki seviyeden (10-50  $\mu$ mol) 2000 kat daha fazla olup 2-100 mmol kadar yüksek oranda bulunmaktadır (Enomoto vd 2002). L-karnitin, yüksek affiniteli bir Na<sup>+</sup>-bağımlı organik katyon taşıyıcısı olan OCTN2 vasıtasıyla dolaşımdan, epididimal epitelyumun hücreleri içine taşınır. Karnitin taşıyıcısı 2 olarak isimlendirilen diğer bir karnitin taşıyıcısı ise epididimal epitelyumdan lümen içerisine L-karnitin sekresyonunu sağlar (Kobayashi vd 2005). Karnitinler, sperm maturasyonu ve sperm motilitesine katkıda bulunur. Daha önceki çalışmalar, epididimde L-karnitin, spermatozoanın olgunlaşması ve fertilizasyon kabiliyetinin gelişmesine yardım etmede rol oynadığını göstermişlerdir. Testiste üretilen spermatozoa epididimise girdiğinde hareketsiz ve infertildir, bu esnada L-karnitin içeriği de düşüktür. Fertil hale gelebilmek için epididimal lümen içerisinde postgonadal modifikasyona uğramak zorundadır. Epididimden geçişleri esnasında, epididimal sıvıda L-karnitin artışına paralel olarak spermatozoanın kuyruk hareketi başlar (Balercia vd 2005).

Erkek germ hücre serisinde oksidatif stres, nükleus ve mitokondride bütünlük kaybına ve spermatozoada hasarın gelişimine neden olur. L-karnitin, antioksidan ve radikal süpürücü özellikleri vasıtası ile oksidatif stres kaynaklı erkek infertilitesini azaltmada faydalı etkilere sahip olduğu gösterilmiştir (Lenzi vd 2003). İnfertil hastalar üzerindeki bazı deneysel ve klinik çalışmalarda, seminal plazma total karnitin seviyesinin düşük olduğu görülmüş ve karnitin desteğinin üreme fonksiyonunu iyileştirdiği bildirilmiştir (Stradaoli vd 2004). İdiyopatik oligoasthenospermili infertil hastalara L-karnitin ve L-asetil karnitin uygulamasının, spermatozoa konsantrasyonunda ve hareketliliğinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Garolla vd 2005). Son zamanlarda karnitin/asetil-karnitin kompleksinin, bakteriyal prostato-vesiküloepididimitisli hastalara uygulanmasıyla, ROS üretiminde azalma, sperm hareketliliği ve canlılığında artış ve spontan gebelik oranında yükselme gözlenmiştir (Vicari, Calogero 2001).

## 2.7. Sülfidler

Sülfid oksidaz enzimi (SOX), hava kirliliği ve gıdalarla alınanın dışında, vücutta kükürt içeren amino asitlerin ve diğer sülfid ( $\text{SO}_3^-$ ) içeren bileşiklerin katabolizması sırasında oluşan  $\text{SO}_3^-$  detoksifikasyonunda önemli bir enzimdir. Ağız ve mide gibi asidik ortamlarda besinler ile alınan  $\text{SO}_3^-$  tuzları kolay ve hızlı bir şekilde sülfüröz asite ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) dönüşmekte bu asit de fizyolojik pH'da  $\text{SO}_3^-$ 'e dönüşmektedir (Gunnison, Jacobsen 1987).

Vücuda alınmasıyla  $\text{SO}_3^-$ 'e dönen  $\text{SO}_2$ 'in hijyenik amaçlarla kullanımı eski çağlara kadar gitmektedir. Antik çağlarda Yunanlıların ev dezenfeksiyonunda, Romalılar ve Mısırlıların ise şarap kaplarını temizlemek amacı ile  $\text{SO}_2$  gazını kullandığı bilinmektedir. Besin katkı maddesi olarak  $\text{SO}_3^-$ 'in ilk kullanım tarihi 1664 yılı olarak bildirilmektedir (Lester 1995). Hava kirliliğinin önemli bir bileşeni olan  $\text{SO}_2$ 'nin toksik etkileri uzun zamandan beri bilirse de,  $\text{SO}_3^-$ 'in besin katkı maddesi olarak kullanımı ile ortaya çıkan zararlı etkiler son otuz yıl içerisinde önem kazanmaya başlamıştır.

### 2.7.1. $\text{SO}_3^-$ 'in Hücresel Sıvılarda Temel Kimyasal Reaksiyonu

$\text{SO}_2$  ve onun çeşitli iyonlarla yaptığı tuzları, suda eriyebilir bileşikler olup sıvı ortamlarda hızlı bir şekilde aşağıdaki reaksiyonda gösterildiği gibi sülfüröz asit ( $\text{H}_2\text{SO}_3$ ) oluştururlar.  $\text{H}_2\text{SO}_3$  özellikle yüksek pH ve 37 C°'da kolayca bisülfid ( $\text{HSO}_3^-$ ) iyonuna dönüşür.  $\text{HSO}_3^-$  ise daha yüksek pH'larda  $\text{SO}_3^-$  iyonuna dönüşmektedir. Fizyolojik pH'larda  $\text{HSO}_3^-$  ve  $\text{SO}_3^-$  iyonlarının birbirlerine kolayca dönüşebildikleri gösterilmiş, bu yüzden  $\text{SO}_3^-$  her iki iyon için de ortak isim olarak kullanılmıştır.



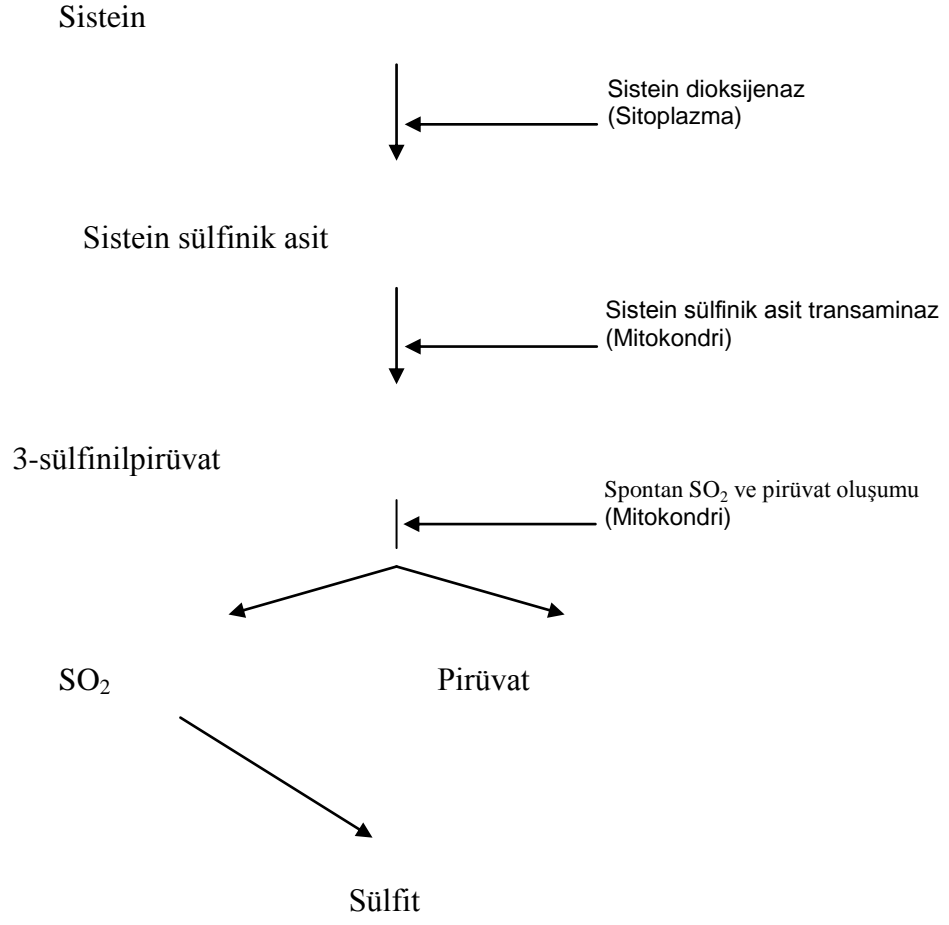
$\text{SO}_3^-$ 'in bu çok iyi bilinen reaksiyonunda görüldüğü gibi ağız ve mide gibi asidik ortamlarda besinler ile alınan  $\text{SO}_3^-$  tuzları kolayca ve hızlı bir şekilde  $\text{H}_2\text{SO}_3$ 'e dönüşmekte bu asit de fizyolojik pH'da  $\text{SO}_3^-$ 'e dönüşmektedir (Gunnison, Jacobsen 1987).

## 2.7.2. $\text{SO}_3^-$ 'e Maruz Kalma

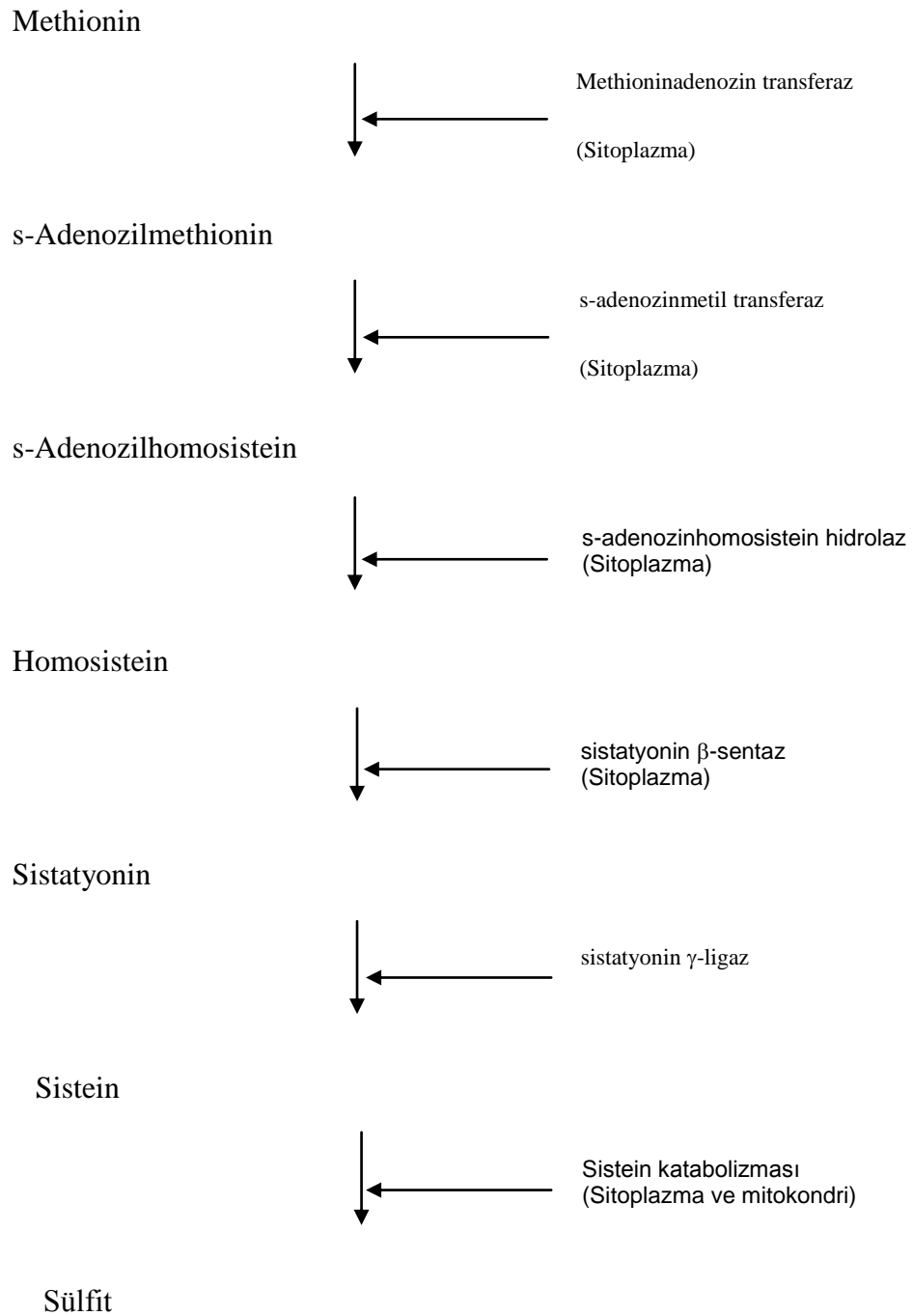
$\text{SO}_3^-$ 'lere 2 şekilde maruz kalınmaktadır.

### 2.7.2.1. *Endojen Maruz Kalma*

$\text{SO}_2$  ve  $\text{SO}_3^-$  tuzlarının dışında  $\text{SO}_3^-$ 'e endojen olarak da maruz kalınmaktadır. Vücutta kükürt içeren amino asitlerin ve diğer  $\text{SO}_3^-$  içeren bileşiklerin katabolizması esnasında önemli düzeyde  $\text{SO}_3^-$  oluşur. Endojen  $\text{SO}_3^-$  üretiminde en önemli yolak sistein ve metionin amino asitlerinin katabolizmasıdır (Cooper 1983). Sistein katabolizması sisteinin, sistein dioksijenaz (CDO) ile sistein sülfirik aside çevrilmesi ile başlar. Bu enzim sitoplazmada bulunduğu için reaksiyon da burada başlamaktadır (Yamaguchi 1973). Daha sonra sistein sülfirik asit, mitokondriye giderek orada sistein sülfirik asit transaminaz enzimi ile transaminasyona uğrayarak 3-sülfinilpirüvat oluşturur. Son aşamada bu molekül spontan olarak  $\text{SO}_2$  ve pirüvata dönüşür (Cooper 1983).  $\text{SO}_2$  ise hidrate olarak  $\text{SO}_3^-$  oluşturmak üzere  $\text{H}_2\text{SO}_3$ 'e dönüşür (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2** Sistein katabolizması esnasında sülfir oluşumu



**Şekil 2.3** Metionin katabolizması esnasında sülfid oluşumu (Gunnison, Jacobsen 1987).

Metionin katabolizmasında da  $\text{SO}_3^-$ 'in kaynağı sisteindir. Şöyle ki; metionin bir sitoplazmik enzim olan, metionin s-adenozin transferaz ile s-adenozil metionine dönüşür. Bu da s-adenozinmetil transferaz ile s-adenozin homosistein'e döner. Daha sonra bu bileşik s-adenozin homosistein hidrolaz ile homosistein'e bu da sistasyonin beta sentaz ile sistasyonin'e dönüşür. Bunu sistasyoninin sistasyonin gama ligaz ile sistein'e

dönüşümü izler (Şekil 2.3). Bu reaksiyon zinciri sonucu oluşan sistein ise daha önce tarif edildiği şekilde bir dizi reaksiyon sonucu  $\text{SO}_3^-$  oluşturmaktadır (Benevenga 1984). Bunlara ilaveten hipotaurin katabolizması ve hidrojen kükürt ( $\text{H}_2\text{S}$ ) oksidasyonu da daha az önemli oldukları düşünülen diğer endojen  $\text{SO}_3^-$  oluşum mekanizmalarıdır (Gunnison, Jacobsen 1987).

### 2.7.2.2. Eksojen Maruz Kalma

Eksojen  $\text{SO}_3^-$  maruziyetini hava kirliliği, ilaçlar, yiyecek ve içecekler ile olmak üzere 3 ana başlık altında toplayabiliriz.

**Hava kirliliği ile maruz kalma:** Fosil enerji kaynaklarının yakılmasına bağlı olarak atmosfere katılan  $\text{SO}_2$ , bilindiği gibi hava kirliliğinin önemli bir bileşenidir (Amdur 1969).  $\text{SO}_2$ 'nin zararlı etkileri hakkında bilinenler 1950'li yılların başına kadar oldukça azdı. Londra'da 1952 yılının kışında  $\text{SO}_2$ 'in atmosfer havasındaki düzeyinin 0.15 ppm'lik sınır değerini 10 kat aşarak 1.5 ppm'e yükselmesi ile kardiopulmoner hastalığı olan kişilerde mortalite artışı arasındaki ilişkinin gözlemlenmesi araştırmacıları  $\text{SO}_2$  toksisitesi açısından daha detaylı çalışmalar yapmaya itmiştir (Samet vd 2000). O tarihten bu yana  $\text{SO}_2$  solunması ile ortaya çıkan zararlı etkiler pek çok çalışmada bildirilmiştir. Bu çalışmalarda  $\text{SO}_2$ 'in solunum sisteminde başta bronkokonstrüksiyon olmak üzere alveol kalınlaşması, alveol hiperplazisi, akciğer ödemi ve akciğer kanserine yatkınlık gibi toksik etkileri gösterilmiştir (Hoelscher vd 2003)

$\text{SO}_2$ 'e hava kirliliği ile maruz kalmanın solunum sistemindeki bahsedilen etkilerine ek olarak kan ve beyin dokusunda da çeşitli etkileri rapor edilmiştir. Bu etkiler, beyin tümörlerinin görülme sıklığında artış, görsel ve somatosensorial uyarılma potansiyelerinde izlenen latens uzaması, eritrosit antioksidan savunma sistemi ve lipid peroksidasyonundaki değişiklikler olarak sıralanabilir (Kucukatay vd 2003).

**İlaçlar ile maruz kalma:**  $\text{SO}_3^-$  ilaç endüstrisinde çeşitli dozlarda ilaç etkinliğinin azalmasına neden olan oksidasyonu önlemek amacı ile kullanıldığı gibi, suda eriyebilirliği olmayan çeşitli ilaçlara ilave edilerek eriyebilirlik kazandırmak için de kullanılmaktadır (Golembiewski 2002).

İlaçların  $SO_3^-$  içeriği 0.01 mg/ml ile 3,2 mg/ml aralığında değişmektedir. İlaçlara ilaveten total parenteral beslenme sıvıları, periton dializ sıvıları yine  $SO_3^-$  içermekte ve kullanımları esnasında oldukça yüksek oranda bu maddeye maruz kalınmaktadır. Örneğin bir çalışmada 10 litre periton dializ sıvısı kullanılması ile yaklaşık 500 mg  $SO_3^-$ 'in absorbe edilebileceği hesap edilmiştir (Halaby, Mattocks 1965).

Bunların dışında ilaç endüstrisinde inert madde olarak kullanılan jelatin, kola, dekstroz gibi maddeler de  $SO_3^-$  içermektedir. Bunların izin verilen  $SO_3^-$ ' içeriği kola için % 0.008, jelatin için % 0.15'dir. Örneğin 500 mg'lık bir tablet yaklaşık % 25 kola içermektedir. Buradan hesapla bu tabletin yaklaşık 0.01 mg  $SO_2$  içerdiği bulunabilir (Dalton-Bunnow 1985). Oldukça düşük olan bu oranın kimi astımlılarda astım krizini provoke edebildiği bildirilmiştir (Koepke vd 1983).

**Yiyecek ve içeceklerle maruz kalma:**  $SO_3^-$ 'in bir başka kullanım alanı yiyecek ve içeceklerin korunması ve dayanıklılığının artırılması amacı ile gıda endüstrisidir. İlk olarak karışık fonksiyonlu bir enzim olan ve pek çok gıdada bulunan Polifenol oksidazı (PDO) inhibe ettiğinin bulunması,  $SO_3^-$ 'in gıda sanayiinde kullanılmasına neden olmuştur (McEvily vd 1992). Bu enzim fenollerin oksidasyonundan sorumludur ve onun  $SO_3^-$  ile inhibe edilmesi besinlerin kararmasına neden olan melanin oluşumunu engellemektedir (Nicolas vd 1994). Daha sonra kararmayı önleyici etkisine ek olarak antimikrobial, renk ve kıvam koruyucu ve renk ağartıcı olarak pek çok değişik amaçla yoğun bir şekilde bu endüstride kullanım alanı bulmuştur (Fazio, Warner 1990).

$SO_3^-$ 'in bu amaçla kullanılması diğer besin katkı maddelerinde olduğu gibi olası toksik etkilerine karşı bir takım düzenlemelerin ve kuralların ortaya konmasına neden olmuştur. Amerikan Besin ve İlaç İdaresi (Food And Drug Administration-FDA) İlk olarak 1959 yılında aşağıda listelenen  $SO_3^-$  bileşiklerini Genellikle Güvenli Kabul Edilen (Generally Recognized As Safe=GRAS) besin katkı maddeleri olarak bildirmiştir (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1974).

Bu  $SO_3^-$  içeren bileşiklerin besinlerdeki oranları, çeşitli deneysel çalışmalar sonucunda Dünya Sağlık Örgütü Besin Katkı Maddeleri Uzman Komitesince (WHO Expert Committee on Food Additives) belirlenmiş ve 1974 yılında açıklanmıştır (Joint

FAO/WHO Expert Committee on Food Additives 1974). Bu komiteye göre günlük kabul edilebilir sülfite alımı (The Acceptable Daily Intake=ADI) 0.7 mg/kg olarak belirlenmiştir. Bu rakamlar ve  $\text{SO}_3^-$ 'in genel olarak güvenli kabul edilmesi günümüzde de geçerliliğini korumaktadır.

Sıçan, fare ve maymunlarla yapılan çalışmalarda  $^{35}\text{S}$ -işaretli  $\text{SO}_3^-$ 'in ağız yoluyla alımını takiben %70-95 oranında bağırsaklardan emildiği gösterilmiştir (Gibson, Strong 1973). Beslenme alışkanlığına göre günlük  $\text{SO}_3^-$  tüketimi kolayca kabul edilebilir düzeyin üzerine çıkabilir.

### 2.7.3. $\text{SO}_3^-$ Toksikitesi

Günlük  $\text{SO}_3^-$  tüketiminin, yiyecek ve içeceklerle alınan miktarına, hava kirliliği ve ilaç endüstrisi yoluyla alımının da katılması ile oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Besinlerle  $\text{SO}_3^-$  alımının zararlı etkileri ilk olarak 1973 yılında rapor edilmiştir (Kochen 1973). Bu tarihten şimdiye dek, daha çok allerjik ve astımlı bireylerde olmak üzere normal bireylerde de oldukça yoğun olarak  $\text{SO}_3^-$  hipersensitivitesi rapor edilmiştir (Vally vd 2000). Bu hipersensitivite hastalarda başta bronkokonstrüksiyon olmak üzere ürtiker, laringeal ödem ve/veya anjiödem olarak ortaya çıkmaktadır. Bu şikayetlerle başlayan ve sonu ölümlü biten anafilaktik şok vakası rapor edilmiştir. Bu etkilerin ortaya çıkış mekanizmaları aşağıdaki şekilde özetlenebilir;

- 1)  $\text{SO}_3^-$ 'in alımını takiben su ile birleşip  $\text{H}_2\text{SO}_3$  oluşumu ve bu asidin direk iritan etkisi (Fine vd 1987)
- 2) İrritan reseptörlerin ve pulmoner C liflerinin uyarılması sonucu çeşitli pulmoner nöropeptidlerin salınımı (Widdicombe 1975)
- 3) Mast hücre degranülasyonu (Sprenger vd 1989)
- 4) Nöral kolinerjik refleks mekanizmanın uyarılması (Tan vd 1982)
- 5) İmmünglobulin E aracılı (IgE) immün yanıt (Lester 1995)

Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar ile bu maddenin allerjik yan etkilerine ilaveten özellikle yüksek dozlarda, pek çok hücreyel yapı ile etkileşebildiği gösterilmiş ve toksik özellikleri daha iyi tanımlanmaya başlanmıştır. Genetik materyalde sitozin ve urasil bazları ile reaksiyona girerek hasar ve mutasyonlara sebebiyet verdiği, lipid ve proteinler



ile reaksiyona girdiği gösterilmiştir (Southerland vd 1982). Bu sayılan etkilerde direk veya dolaylı olarak oksijen (O<sub>2</sub>) ve kükürt merkezli radikaller en önemli mekanizmadır (Abedinzadeh 2001). Bunlara ilaveten elastaz gibi serin proteinazların inhibitörü olan  $\alpha_1$ -antiproteinazı ( $\alpha_1$ -AP) aktivitesini engelleyerek, akciğer hasarı oluşturduğu bildirilmiştir (Reist vd 1998).

Yukarıda bahsedilen zararlı etkilerine rağmen SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, aşağıda özetlenecek olan deneysel çalışmalardan elde edilen bulgular nedeniyle Dünya Sağlık Örgütü Besin Katkı Maddeleri Uzman Komitesince güvenli kabul edilen maddeler sınıfında yer almıştır. Örneğin Alarie ve arkadaşları 18 ay boyunca 0,1 ve 5 ppm SO<sub>2</sub> gazı soluttukları maymun ve kobaylarda minimal zararlı etkiler bulmuşlardır (Alarie vd 1975). Bir başka çalışmada Til ve arkadaşları sığırcılara 2 yıl süresince ve 3 kuşak boyunca % 0.25 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> içeren yem vermişler ve SO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in herhangi bir zararlı etkisini saptayamamışlardır (Til vd 1972).

Günümüzde Dünya Sağlık Örgütü'nün maksimum 0,7 mg/kg olarak kabul ettiği günlük SO<sub>3</sub><sup>-</sup> alımı düzeyi, Til ve arkadaşlarının sığırcılarda yaptığı çalışmadan elde ettikleri sonuçlara dayanmaktadır. Şöyle ki; bu araştırmacı grubunun kullandıkları ve herhangi bir zararlı etki bulamadıkları % 0.25 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> içeren yemin tüketilmesi, yaklaşık olarak günde 72 mg/kg SO<sub>3</sub><sup>-</sup> alımına karşılık gelmektedir (Til vd 1972). Dünya Sağlık Örgütü'nün ilgili komitesi buna 100 katlık bir güvenlik faktörünü de ekleyerek 0.7 mg/kg SO<sub>3</sub><sup>-</sup> alımının zararlı bir etkisi olmayacağını bildirmiştir. Ek olarak, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in ilave edildiği besinlerin tiamin (Vit B1) içeriğini azalttığı gösterilmiştir. Vit B1'den yoksun diyetle beslenen sığırcılarda SO<sub>3</sub><sup>-</sup> toksisitenin ortaya çıkması, kırmızı et gibi Vit B'ce zengin besinlerde kullanımının yasaklanmasına yol açmıştır (Gunnison 1981).

Sonuç olarak 0.7 mg/kg olan günlük kabul edilebilir SO<sub>3</sub><sup>-</sup> alımının SO<sub>3</sub><sup>-</sup>'e maruziyet açısından riskli bazı iş kollarında çalışan insanlarda ve beslenme alışkanlığına göre kolaylıkla aşılabileceğini tahmin etmek zor değildir. Günlük SO<sub>3</sub><sup>-</sup> tüketiminin hesap edildiği az sayıdaki çalışmada bu sınırın hayli üstüne çıkıldığı görülmüştür. Bu çalışmalarda bir restoran öğününün dahi 200 mg SO<sub>3</sub><sup>-</sup> içerebildiği ve bir tahminle Amerikan popülasyonunun % 99'unun yiyecek ve içeceklerle günlük ortalama 163 mg SO<sub>3</sub><sup>-</sup> tükettiği hesaplanmıştır (Lester 1995). Yiyecek ve içeceklerle birlikte hava kirliliği ve

$\text{SO}_3^-$  içeren çeşitli ilaçlar birlikte düşünüldüğünde,  $\text{SO}_3^-$ 'e maruz kalınmanın 163 mg/gün düzeyinin de üzerine çıkması kuvvetli bir olasılıktır.

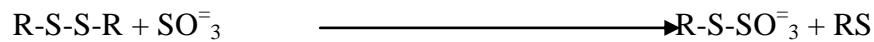
#### 2.7.4. $\text{SO}_3^-$ Metabolizması

Gerek endojen oluşan gerekse de eksojen maruz kalınan  $\text{SO}_3^-$ 'in detoksifiye edilmesi gerekir. Bunun için 2 temel yolak vardır. Bunlar;

- Oksidatif olmayan  $\text{SO}_3^-$  metabolizması
- Oksidatif  $\text{SO}_3^-$  metabolizması'dır.

##### 2.7.4.1. Oksidatif Olmayan $\text{SO}_3^-$ Metabolizması

$\text{SO}_3^-$  detoksifikasyonunda oksidatif metabolizmaya göre daha az öneme sahiptir.  $\text{SO}_3^-$ 'in bu şekildeki detoksifikasyonunda sülfitolizis reaksiyonu önemli yer tutar.  $\text{SO}_3^-$  bu reaksiyon ile sistin, okside glutatyon (GSSG) gibi küçük veya daha büyük molekül ağırlıklı proteinlerle disülfid bağları aracılığı ile birleşir ve s-sulfonat adı verilen bileşiği oluşturur. Bu bileşiğin idrarda bulunmaması,  $\text{SO}_3^-$ 'in bu yolla metabolizmasının oldukça az bir öneme sahip olduğunu düşündürmektedir (Gunnison vd 1987).



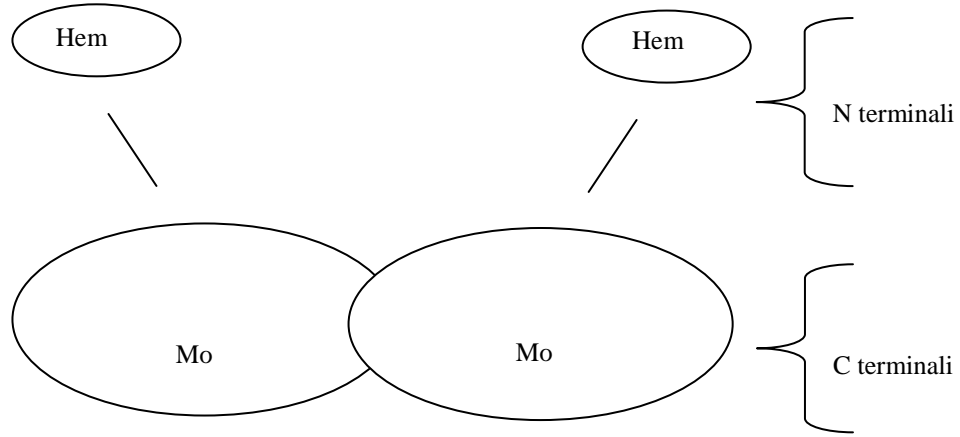
Oksidatif olmayan bir diğer  $\text{SO}_3^-$  metabolizması yoluğu tiosülfattır. Tiosülfat  $\text{SO}_3^-$  ve 3-merkaptoprüvatın reaksiyona girmesi ile oluşan bir bileşiktir ve  $\text{SO}_3^-$  bu yolla idrarla atılmaktadır. Ayrıca  $\text{SO}_3^-$ 'in, tiosistein ile reaksiyona girerek tiosülfat oluşturduğu bildirilmiştir (Shih vd 1979).

##### 2.7.4.2. Oksidatif $\text{SO}_3^-$ Metabolizması

Oksidatif  $\text{SO}_3^-$  metabolizması  $\text{SO}_3^-$ 'in temel detoksifikasyon mekanizmasıdır. Bu işlem vücutta SOX enzimi aracılığı ile yapılmaktadır. SOX, (EC 1.8.3.1) molekül ağırlığı

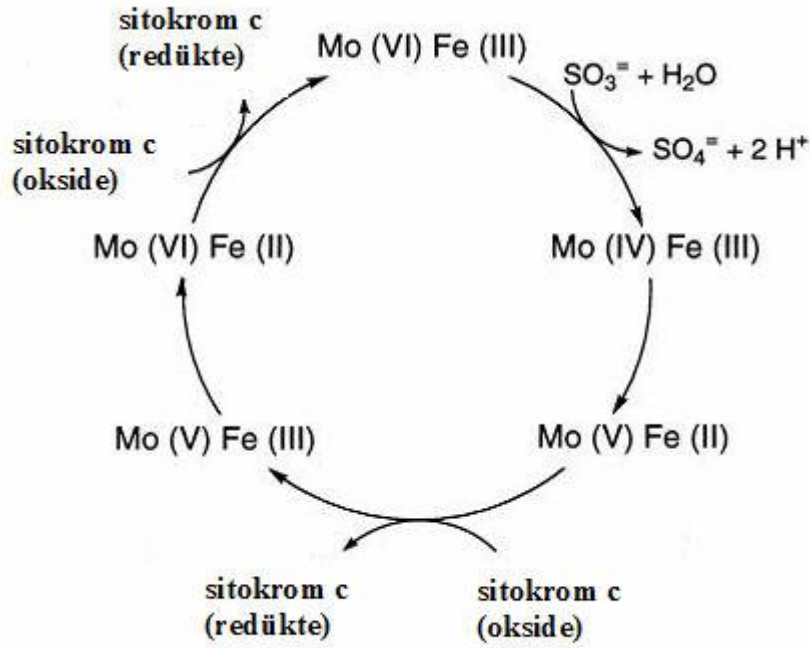
104 kilodalton (kDa) olan bir molibdohemoproteindir ve memelilerde kofaktör olarak Mo kullanan 3 enzimden birisidir (Cohen vd 1971). Diğer Mo kullanan enzimler ksantin oksidaz (XO, EC 1.2.3.2) ve Aldehit oksidaz (AOX, EC 1.2.3.1) olarak bildirilmiştir (Johnson vd 1974).

SOX birbirine benzer her biri 52 kDa'luk 2 subünitten oluşmuş dimerik bir yapıya sahiptir ve mitokondrinin iç membranında lokalize olmuştur. 52 kDa'luk bu subünitler, Hem içeren küçük bir N terminaline ve Mo içeren büyük bir C terminaline sahiptir (Kisker vd 1997). Bu yapının SOX etkinliğini Mo içeren büyük C terminali gösterir (Şekil 2.4).



**Şekil 2.4** Sülfite oksidaz enziminin şematik gösterimi

SOX  $\text{SO}_3^-$ 'i okside ederek  $\text{SO}_4^-$ 'a dönüştürür. İdrarla atılan inorganik  $\text{SO}_4^-$ 'in yaklaşık % 90'ının SOX enzimi tarafından oluşturulduğu gösterilmiştir.  $\text{SO}_3^-$ 'in, enzimin aktif bölgesine bağlanması Mo'un iki elektron kaybı ile sonuçlanırken  $\text{SO}_3^-$   $\text{SO}_4^-$ 'a çevrilir. Enzimin yeniden görev yapması sitokrom c'nin molekül içi elektron transferi yapmasına bağlıdır (Garrett vd 1998). Bu işlem de iki basamakta yapılarak enzimin işlevselliği tekrar kazandırılır (Şekil 2.5).



**Şekil 2.5** Sülfid oksidaz tarafından katalizlenen reaksiyonun şematik gösterimi (Johnson 1998)

### 2.7.5. SO<sub>3</sub><sup>-</sup> Oksidaz Yetersizliği Oluşturulmuş Sıçan Modeli

Deney hayvanları ile yapılan SO<sub>3</sub><sup>-</sup> toksisitesi çalışmalarını insana uyarlamak için iki yol vardır.

1) Deney hayvanlarının insandan daha yüksek olan SO<sub>3</sub><sup>-</sup> detoksifiye etme kapasitelerini aşacak oranda SO<sub>3</sub><sup>-</sup> yüklemesi yapmak,

2) SOX enzim düzeylerini mümkün olduğu oranda insanların düzeyine indirmek.

Bu yöntemlerden ilkinin, aşağıdaki sebeplerden dolayı kullanılması mümkün olmamaktadır;

- SO<sub>3</sub><sup>-</sup>'in, tadından dolayı besin veya su tüketimini azaltması
- Yüksek dozlarda ilave edildiği besinin bileşenleri ile reaksiyona girmesi
- Gastrointestinal sistemde şiddetli irritasyon yapması
- Aspirasyona bağlı ölümlere yol açması (Gunnison vd 1981).

İkinci yöntemde, hayvanlar yüksek W ve Mo'suz diyet ile beslenmektedir. Bu metod ile yetersizliğin oluşturulması, enzimin kofaktörü olan Mo'un diyetten çıkarılması ve dışarıdan W verilerek Mo'un yerine W'in geçmesi esasına dayanır. Hayvanların bu şekilde bir diyete tabi tutulması ile üç haftada efektif bir şekilde SOX enzim yetersizliğinin oluşturulabildiği ilk defa Gunnison ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Gunnison vd 1987).

Bu işlem sonrasında hayvanların SOX enzim düzeyi başlangıçtaki düzeylerinin yaklaşık % 1'ine düşmekte, bunun dışında hayvanlar arasında genel görünüm sağlık açısından herhangi bir fark gözlenmemektedir (Gunnison vd 1987). Bu modelin oluşturulması diğer Mo içeren XO ve AOX enzimlerinde de eksiklik meydana getirmektedir (Johnson vd 1974). Yapılan çalışmalarda AOX enziminin bazı memeli türlerinde hiç bulunmadığı, insanlarda saptanan genetik XO eksikliğinin ise ciddi bir sağlık problemi yaratmadığı bildirilmiştir (Sardesai 1993). Bu modelin kullanıldığı çalışmaların hiçbirinde, hayvanların genel durumunda bozulma veya eksiklik oluşturma protokolüne bağlı bir toksik etki gözlenmemiştir (Gunnison 1987). Sonuç olarak, deneysel SO<sub>3</sub> toksisitesi çalışmalarından elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabilmesi için, SOX yetersizliği oluşturulmuş deney hayvanları kullanılmasının gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları

Çalışmamızda, Pamukkale Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Birimi'nden alınan 24 adet erkek Wistar Albino türü sıçanlar kullanılmıştır. Tüm denekler için önerilen optimum çevresel koşullar aynı merkez tarafından sağlanmış ve sıçanlar, ışıklandırması (12 saat aydınlık/karanlık siklusunda, 07:00-19:00 saatleri arası aydınlık), havalandırılması (%60-70 nem) ve oda ısısı (20-24 °C ) kontrol edilen bir odaya yerleştirilmiştir.

#### 3.2. Deneysel Uygulama

Bu çalışma; ergin dönemdeki sıçanlardan oluşmuştur. Sıçanlar 6'şar hayvan olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Birinci grup sıçanlar normal sıçanlara 7 gün boyunca i.p. 300 mg/kg L-karnitin verilmiştir. İkinci grup sıçanlar hiçbir muamele görmemiştir ve birinci grup sıçanların kontrolü olmuştur. Üçüncü grup sıçanlara özel yem verilerek sülfite oksidaz yetersiz hayvanlar elde edilmiştir. Bu hayvanlara 7 gün boyunca i.p. 300mg/kg L-karnitin verilmiştir. Dördüncü grup sıçanlar sülfite oksidaz yetersiz olmuştur ve üçüncü grubun kontrolü olmuştur. İnceleme ve bulguların fotoğraflandırılmasında, Olympus BX51 marka ışık mikroskobu ve Olympus DP72 dijital kamera kullanılmıştır.

##### 3.2.1. SOX Yetersizliği Olan Sıçan Oluşturulması

Gunnison ve arkadaşlarının tarif ettiği şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu metod ile yetersizliğin oluşturulması, enzimin kofaktörü ve esansiyel bir element olan Mo'un diyetten çıkarılması ile birlikte dışarıdan W verilerek Mo'un yerine W'in geçmesi esasına dayanır.

Bu çalışmada diyetten Mo çıkarılması işlemi sıçanlar için oluşturulmuş ve Amerikan Gıda Enstitüsü (American Institute of Nutrition) tarafından 1976 yılında kabul edilmiş özel bir yem kullanarak gerçekleştirilmiştir. Literatürde bu diyetin adı American Institute of Nutrition'ın baş harflerinin kısaltmaları ve yine bu enstitü tarafından kabul edildiği yıla (1976) atfen AIN-76 olarak geçmektedir ve teorik olarak hiç Mo içermemektedir. Hayvanların içme sularına 200 ppm dozunda W ilave etmek sureti ile yeni SOX enzimi sentezi esnasında W'in enzimin aktif bölgesi için Mo ile yarışmaya girerek onun yerine bağlanması amaçlanmıştır. SOX yetersizliğinin gelişip gelişmediği, hayvanların 3 hafta boyunca yukarıdaki gibi beslenmesini takiben karaciğer SOX enzim aktivitesinin ölçümü ile kontrol edilmiştir.

### **3.3. Reaktif Hazırlanması**

**Fiksatif Solüsyonu Hazırlama:** % 37'lik formaldehitden 10 ml, distile sudan 90 ml alınarak % 10'luk fiksatif solüsyonu hazırlanmıştır.

### **3.4. Uygulanan Teknikler**

#### **3.4.1. Doku Takip Yöntemi:**

- a. Alınan dokular formaldehitde 1 gece bekletildi.
- b. Akarsuda 30 dakika yıkandı.
- c. %70'lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- d. %80'lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- e. %90'lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- f. %100'lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- g. Ksilende 1 saat bekletildi.

- h. Ksilende 1 saat bekletildi.
- i. Parafinde 1 saat bekletildi.
- j. Parafinde 1 saat bekletildi.
- k. Dokulara parafinle gömme ve etiketlenme işlemi yapıldı.

### 3.4.2. Histolojik Boyama

#### **Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi:**

- a. Bloklardan 5 µ' luk kesitler alınıp ılık su havuzuna bırakıldı.
- b. Lamlarla dokular toplanır ve zembillere yerleştirildi.
- c. Etuvde 2 saat 60 C'de bırakıldı.
- d. Ksilende 2 seri halinde 30'ar dakika olmak üzere toplam 1 saat tutuldu.
- e. Sırasıyla %100, %90, %80, %70'lik azalan etil alkol serilerinden toplam 10 dakika olacak şekilde geçirildi.
- f. Alkolden çıkan preparatlar akar suda yıkandı.
- g. Hematoksilende 2,5-3 dakika bekletildi.
- h. Akar suda yıkandı.
- i. Asit-alkole daldırılıp çıkartıldı.
- j. Akar suda yıkandı.
- k. Amonyaga daldırılıp çıkartıldı.
- l. Akar suda yıkandı.
- m. Eozinde 3-5 saniye tutuldu.
- n. Akar suda yıkandı.
- o. Sırasıyla %70, %80, %90, %100'luk artan etil alkol serilerinde toplam 10 dakika olacak şekilde geçirildi.
- p. Ksilende 30 dakika bekletildi.
- q. Entellan kullanılarak dokuların üzeri kapatıldı.



### 3.4.3. İmmunohistokimyasal boyama

Doku takip yöntemi tamamlanan testis bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µ' luk kesitler alınıp, kesitler benmariye bırakıldı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir: (Reaktifler için İnvitrogen Histostain-Plus kit kullanılmıştır.)

- a. Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.
- b. Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 gece bekletildi.
- c. Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.
- d. Kesitler sırasıyla %100, %90, %80, %70'lik etil alkol serilerinde toplam 10 dakika bekletildi.
- e. Alkolden çıkan preparatlar akarsuda yıkanarak 10 dakika PBS'de bırakıldı. Bu aşamada kesitler PAP pen kullanılarak işaretlendi.
- f. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, % 30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Metanol (1:9) karışımı ile 30 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
- g. PBS ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. (İnvitrogen, Camarillo, CA 93012, A.B.D.)
- h. Kesitler üzerine OCT2 primer antikoru ilave edilerek 2 saat bekletildi. Bu çalışmada kullanılan primer antikorların dilüsyonu 1:200 şeklindedir. Primer antikor PBS ile dilüe edildi.
- i. Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikorlarla 20 dakika muamele edildi.
- j. Tekrar PBS ile yıkanması yapılan kesitlere, biotinlenmiş-sekonder antikorlara kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) 10 dakika kadar muamele edildi.
- k. Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3-10 dakika kadar muamele edildi.

- l. Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin (Merk Harris' hematoksilen) ile zıt boyama yapıldı.
- m. Kesitler akarsu da yıkanmış ve sırasıyla %70, %80, %90, %100'lük etil alkol serilerinde toplam 10 dakika bekletildi.
- n. Dokuların üzeri entellan ile kapatıldı.

#### 3.4.4. Doku Homojenizasyonu

$K_2HPO_4$  ve  $KH_2PO_4$  ya da  $NaH_2PO_4$  ve  $Na_2HPO_4$  kullanılarak 400mMol olacak şekilde çözelti hazırlandı. 50mMol olması için 0.4M  $PO_4$  tamponundan dilüsyon yapıldı. 50mM  $po_4$  tamponu içine EDTA tableti ilave edildi. pH 7.4 olacak şekilde solüsyon hazırlandı.

Homojenizasyon için 50mM EDTA'lı fosfat tamponu içine her 50ml için 1 tablet proteaz inhibitörü ilave edildi. Her karaciğer örneğinin homejenizasyonu için 5cc solüsyon örneklerin üzerine ilave edildi ve 11.000 g de 10 dakika santrifüj edildi. Supernatant alındı ve  $-20^\circ C$  dereceye kaldırıldı.

#### 3.4.5. SOX Aktivitesi Ölçümü

Cohen ve Fridovich tarafından önerilen metoda göre Wistar Albino sıçan karaciğer homojenatlarında sülfite oksidaz enzim aktivitesi tayin edildi. Bu yöntem; SOX aktivitesi ile  $SO_3^-$ 'e bir oksijen daha eklenerek  $SO_4^-$  oluşması ve bu esnada açığa çıkan bir elektronun, sitokrom c'de bulunan okside demirin  $Fe^{+3}$ 'e transfer edilerek redüksiyona uğramasıyla okside formdan redükte forma geçen demirin absorban artışına neden olması prensibine dayanır. Homojenizasyon işlemi sırasında elde edilen homojenat Tablo 3.1'de verilen reaksiyon karışımı ile 550 nm dalga boyunda oda sıcaklığında SOX aktivitesi kaydedilmiş ve absorbanstaki 0.100 birimlik artış 1 unite SOX aktivitesi olarak ifade edilmiştir.

**Tablo 3.1** Wistar Albino sıçan karaciğer homojenatındaki SOX aktivitesinin tayini için reaksiyon karışımının bileşenleri.

<b>İçerik Stok Solusyonlar</b>	<b>Eklenen Hacim (ml)</b>	<b>Son Konsantrasyon</b>
Tris-HCl pH:8,50 50 mM	1,6	80 mM
Sitokrom c 0,2 mM	0,5	1 mM
KCN 10 mM	0,1	1 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> 0,01 mM	0,1	0,001 mM
Homojenat	0,2	
Ultra saf su	3 ml'ye tamamla	
Toplam hacim	3	

#### **3.4.6. Protein Miktar Tayini**

Wistar Albino sıçanlara ait dokulardan elde edilen homojenatların protein miktarı tayini, BSA (sığır serum albumin) standart olarak kullanılarak Lowry vd (1951)'nin metoduyla yapıldı. Bu metod, alkali ortamda proteinlerin peptid bağlarının ve tinosin artıklarının bakır ile kompleks oluşturması prensibine dayanır.

1:10 veya 1:20 oranında seyreltilmiş olan fraksiyonlar test tüplerine 50µl hacimde alındı. Sonra % 2'lik bakır sulfat, %2'lik sodyum potasyum tartarat ve % 2'lik sodyum karbonat içeren 0,1 N NaOH'in 1:1:100 oranında karışmasıyla oluşan 200µl alkali bakır reaktifi ile karıştırıldı ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda, deiyonize distile su ile 1:1 oranında seyreltilmiş olan Folin (fosfomolibdik-fosfotungstik asit) reaktifinden her bir tupe 20µl ilave edildi. Folin reaktifini koyar koymaz hemen karıştırıldı ve 10 dakika daha inkübe edildi. Oluşan rengin şiddeti her bir tüp için 660 nm'de köre karşı ölçüldü. Protein miktarları elde edilen eğim değeri kullanılarak hesaplandı.

### 3.4.7. Plazma Total Oksidan Kapasite (TOK) ve Total Antioksidan Kapasite (TAK) Ölçümü

Plazma total oksidan kapasite (TOK) ve total antioksidan kapasite (TAK) ölçümleri için santrifüje edilen kan örnekleri analize kadar -80 °C’de saklanmıştır.

Plazma total oksidan kapasite düzeyi (TOK) Erel’in geliştirdiği otomatize edilmiş bir yöntem ile kolorimetrik olarak ticari bir kit aracılığıyla (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) ölçülmüştür.

Ölçümün prensibi örneğin içindeki oksidanların ferröz iyon-o-dianisidine kompleksinin ferrik iyonla dönüşümünün sağlanması ve bunun da asidik bir ortamda kromojen ile reaksiyona girerek absorban artışına sebep olmasına dayanmaktadır. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonun hızını yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Örnekte bulunan oksidanların (lipidler, proteinler vb) miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti 492 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçülmüş, sonuçlar  $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$  Eqv/L birimi ile ifade edilmiştir.

Plazma total antioksidan kapasite düzeyi (TAK) yine Erel’in geliştirdiği otomatize edilmiş bir yöntem ile kolorimetrik olarak ticari bir kit aracılığıyla (Rel Assay Diagnostic, Türkiye) ölçülmüştür. Ölçümün prensibi örneğin içindeki tüm antioksidanların mavi-yeşil ABTS radikalini renksiz redükte ABTS haline getirmesi esasına dayanır. Spektrofotometrik olarak ölçülen absorban değişikliği örneğin total antioksidan düzeyi ile ilişilidir. Deneklerin plazma total antioksidan kapasite düzeyleri 405 nm dalga boyunda ELISA okuyucu ile spektrofotometrik olarak ölçülmüş sonuçlar  $\mu\text{mol Trolox}$  Eqv/L birimi ile ifade edilmiştir.

### 3.4.8. Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)

Oksidatif stres düzeyinin bir diğer göstergesi hesapla elde edilen Oksidatif Stres İndeksi (OSİ)’dir. Bu indeks çalışmamızda elde edilen TOK ve TAK değerleri kullanılarak aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır:

$$\text{OSİ} = \text{TOK} (\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ Eqv/L}) / \text{TAK} (\mu\text{mol Trolox Eqv/L}) \times 100$$

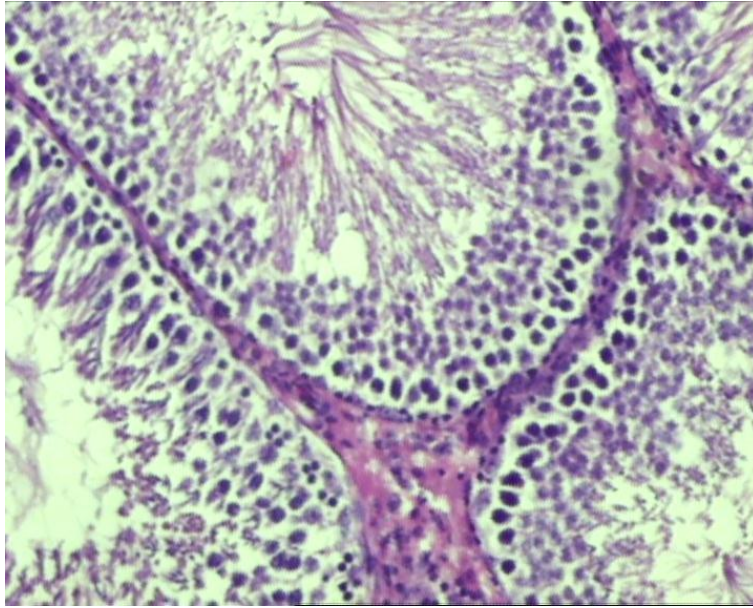
### **3.4.9. İstatistiksel Analiz**

Total antioksidan kapasite, total oksidan kapasite ve oksidatif stres indeksi değerlerinin karşılaştırılmasında One-way ANOVA testi kullanıldı (SPSS programı version 11.0, SPSS Inc, Chicago, IL, USA). Elde edilen sonuçlar için  $p<0.05$  değeri anlamlı olarak kabul edildi.

## 4. BULGULAR

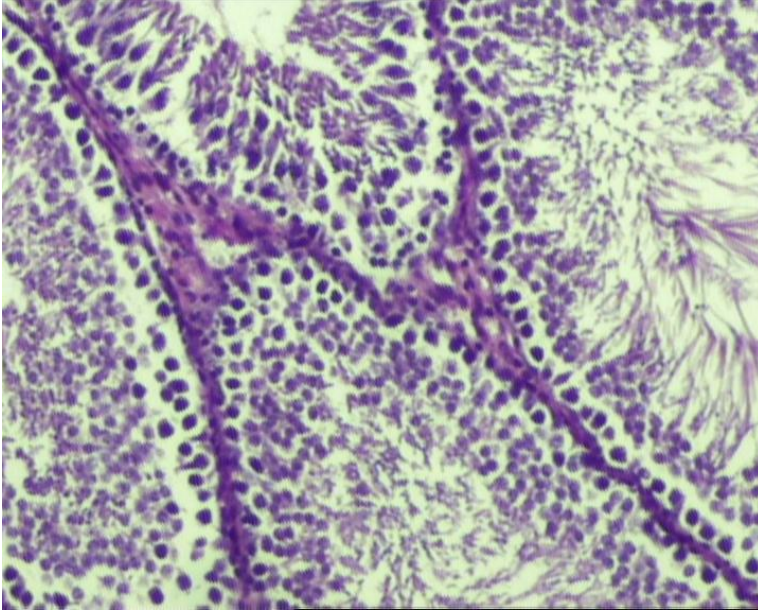
### 4.1. Histolojik Bulgular

Kontrol grubuna ait sıçan testis dokularının enine kesitinde, spermatogenik hücreler ve Sertoli hücrelerini içeren seminifer tübüllerin, uniform büyüklük ve şekilleri ile normal yapıda oldukları görüldü. Seminifer tübüller ve seminifer tübüller arasındaki interstisiyel bağ dokuda herhangi bir değişiklik saptanmadı (Şekil 4.1). Seminifer epiteli oluşturan spermatogenik hücreler değişik olgunlaşma aşamaları göstermekteydi. Bazal kompartımanda yerleşik olan spermatogonialar, oval ya da yuvarlak, kondanse kromatin yapısına sahip çekirdekleri ile dikkat çekmekteydi. Buna karşılık gelişmekte olan primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermier ise adluminal kompartımanı oluşturmaktaydı (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1** Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun enine kesiti (HE- 10X Büyütme)

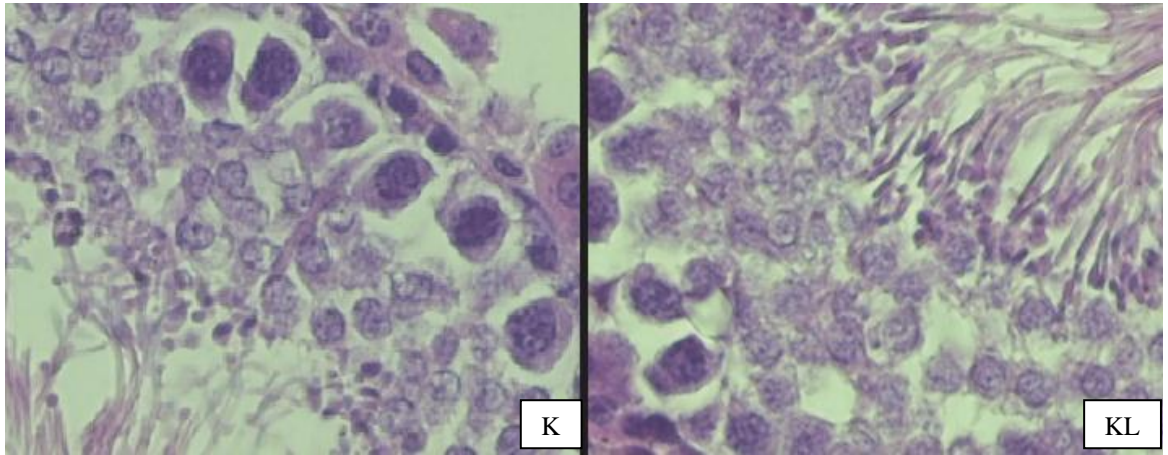
L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokularının enine kesitinde, seminifer tübüllerin uniform büyüklük ve şekilleri ile normal yapıda oldukları görüldü. Seminifer tübüller içindeki germinal epitel hücrelerinin düzenli ve sayıca kontrol grubuna göre fazla olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca seminifer tübüller arasındaki intersisyal alanda bağ dokusu yapısının kontrol grubuna göre daha yaygın olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2** L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokusunun enine kesiti ( HE-10X Büyütme)

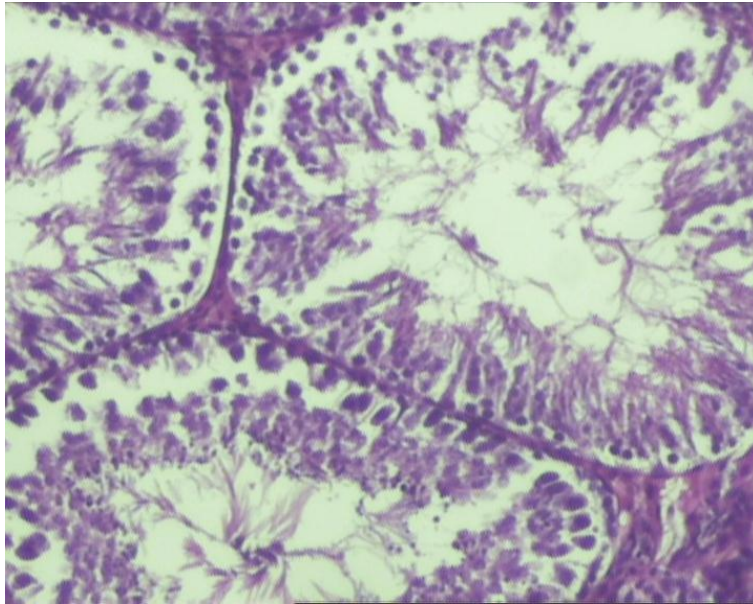
Kontrol grubu ve L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokularının enine kesitleri karşılaştırıldığında, L-karnitin verilmiş deney grubunda sekonder spermatozoid ve spermatozoid sayısında belirgin şekilde artış gözlemlenmiştir (Şekil 4.3).





**Şekil 4.3** Kontrol grubu ve L-karnitin verilmiş deney gruplarına ait sıçan testis dokularının enine kesitleri (HE- 40X Büyütme) (K: Kontrol grubu, KL: L-Karnitin verilmiş deney grubu)

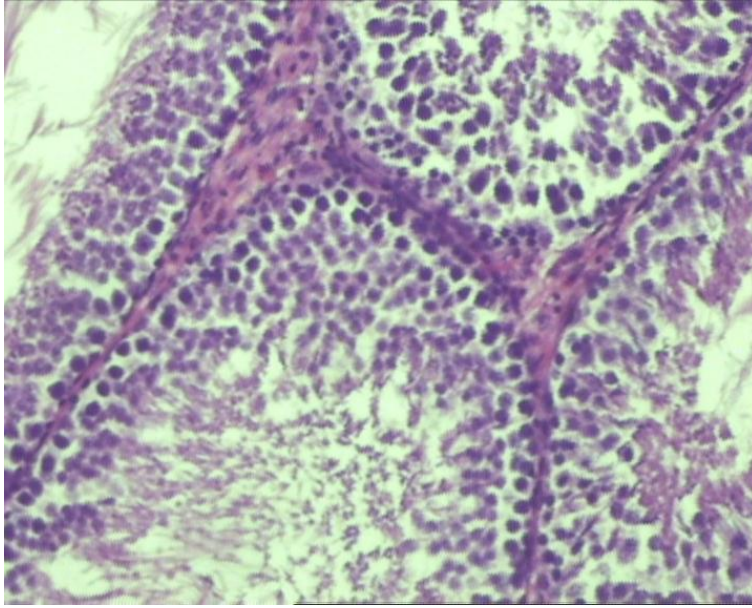
SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubuna ait sıçan testis dokularının enine kesitinde kontrol grubuna ve l-karnitin verilmiş gruba göre seminifer tübüllerin uniform şekil ve büyüklüklerini kaybettikleri dikkati çekti. Germinal epitel hücrelerinin düzenli dizilim göstermediği, seminifer tübüllerdeki spermatozoid yoğunluğunun belirgin şekilde azaldığı ve hücreler arasındaki boşlukların arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4** SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubuna ait sıçan testis dokusunun enine kesiti (HE – 10X Büyütme )



SOX yetersizliği oluşturulup daha sonra L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokularının enine kesitinde sadece SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubunun aksine seminifer epiteli oluşturan spermatogenik hücre serisinin daha iyi korunduğu, seminifer tübüllerdeki spermastosit yoğunluğunun kontrol grubuna benzediği ve hücreler arası boşluğun azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.5).

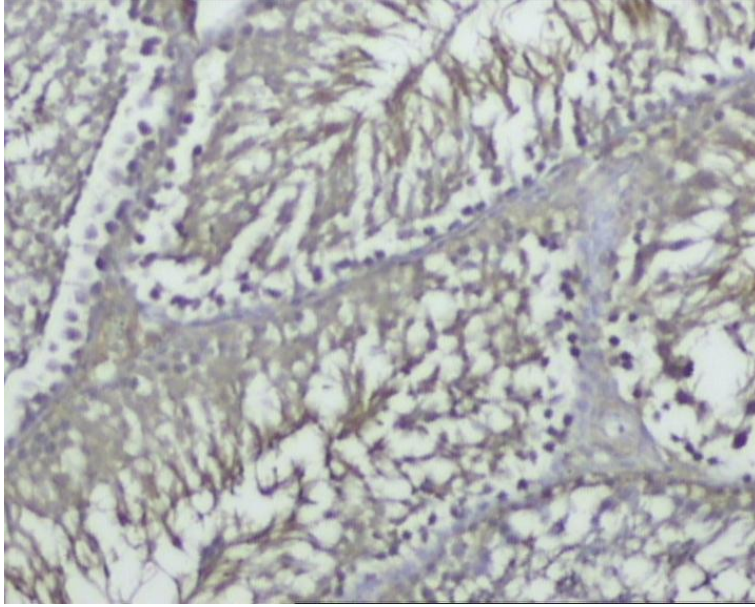


**Şekil 4.5** SOX yetersizliği oluşturulup, daha sonra da L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokusunun enine kesiti (HE – 10X Büyütme)

#### **4.2. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları**

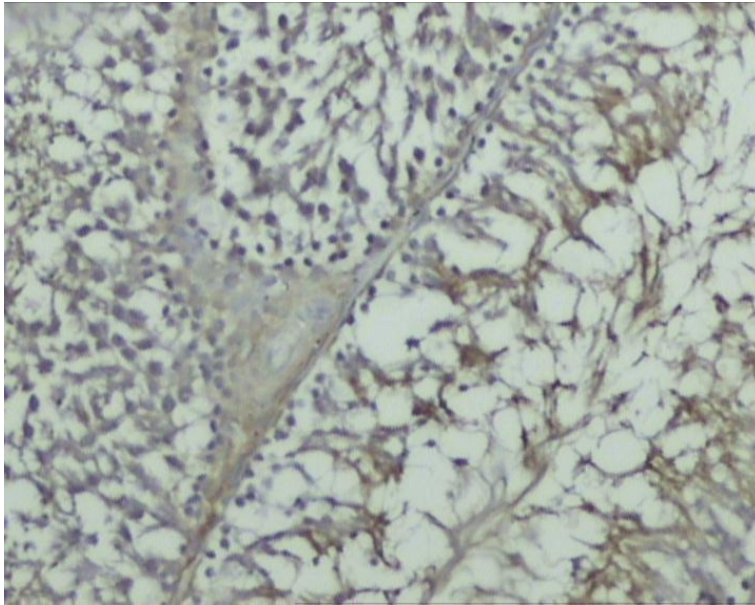
İmmünohistokimyasal boyamada kullanılan OCT2 antikorunun germinal epitel hücrelerinde, spermatozoada ve Leydig hücrelerinde pozitif boyanma göstermesi beklenmektedir. Bu bağlamda bulgular karşılaştırılmıştır.

Kontrol grubuna ait sıçan testis dokularının enine kesitine bakıldığında, beklenildiği gibi germinal epitelde ve spermatozoa da pozitif boyanma görülmektedir (Şekil 4.6). İnterstisyel alanda boyanma yalnızca Leydig hücrelerinde görülmektedir.



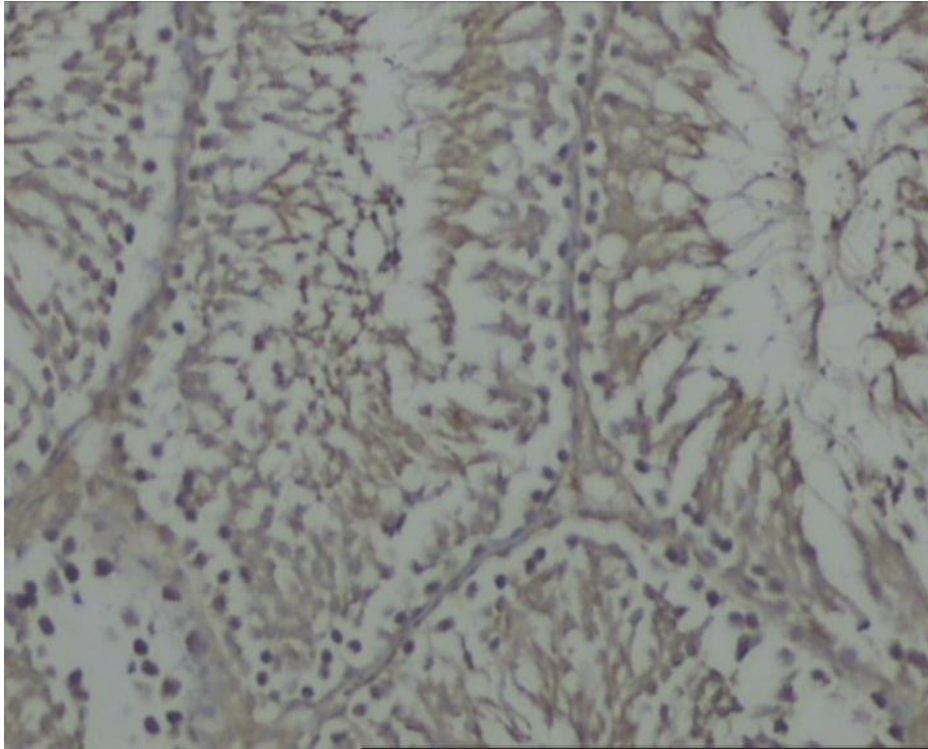
**Şekil 4.6** Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun enine kesiti (İHK – 10X Büyütme)

L-Karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokularının enine kesitinde benzer olarak pozitif boyanma yalnızca germinal epitelde ve Leydig hücrelerinde görülmektedir. L-karnitin verilmesi ile spermatogenik hücrelerin sayısındaki artış bu yöntem ile de gösterilebilmektedir. İnterstisyel alanda bağ dokusu yapısının artışı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7** L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokusunun enine kesiti (İHK – 10X Büyütme)

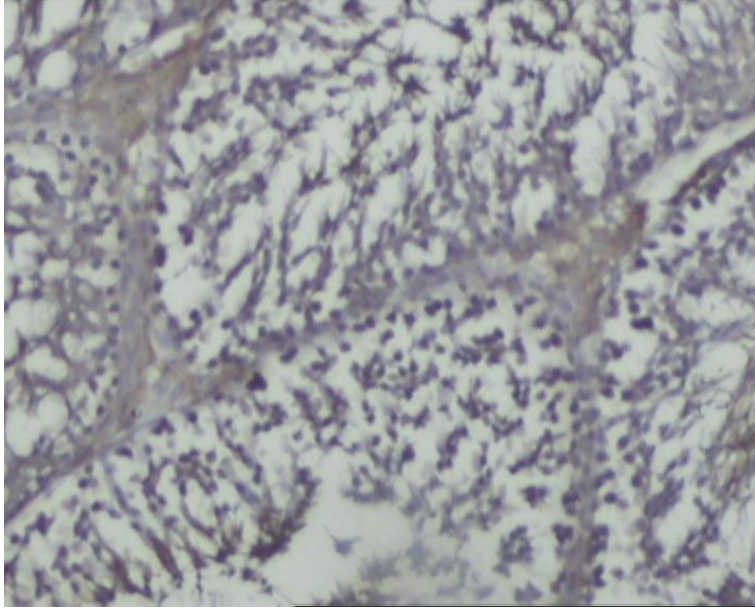
SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubuna ait sıçan testis dokularının enine kesitinde spermatogenik seri hücrelerinin sayısında belirgin şekilde azalma görülürken interstisyel alanda bağ dokusunda boyanmanın az olması dikkat çekmiştir (Şekil 4.8).



**Şekil 4.8** SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubuna ait sıçan testis dokusunun enine kesiti (İHK – 10X Büyütme)

SOX yetersizliği oluşturulup daha sonra L-karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokularının enine kesitinde spermatogenik hücrelerin dağılımı kontrol grubuna benzer dizilim göstermektedir. İnterstisyel alanda bağ dokusu yapısı artışı da gözlemlenmektedir (Şekil 4.9).

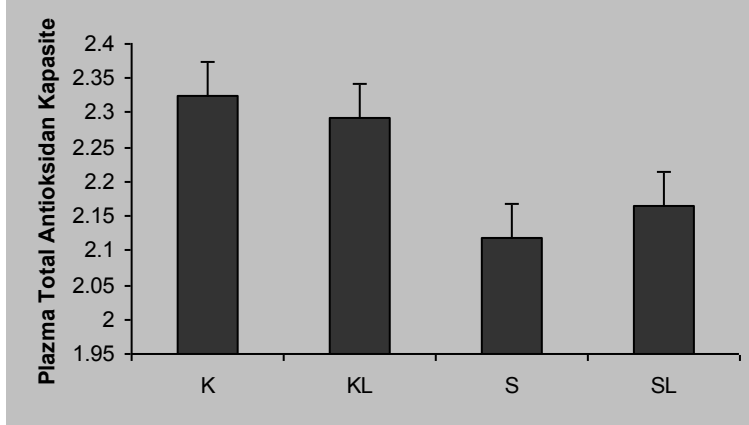




**Şekil 4.9** SOX yetersizliği oluşturulduktan sonra L-Karnitin verilmiş deney grubuna ait sıçan testis dokusunun enine kesiti (İHK 10X).

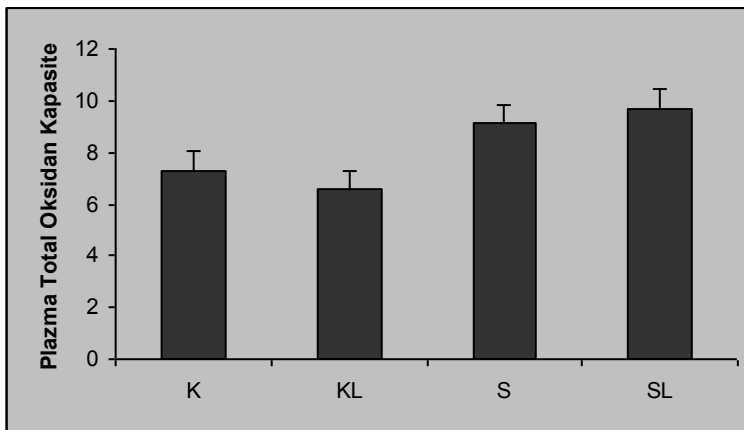
### **4.3. Total Oksidan Kapasite (TOK), Total Antioksidan Kapasite (TAK) ve Oksidatif Stres İndeksi (OSİ) Değerleri**

Kontrol grubu, L-karnitin verilmiş deney grubu, SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubu ve SOX yetersizliği oluşturulduktan sonra L-karnitin verilmiş deney gruplarında ortalama total antioksidan kapasite değerleri ( $\pm$  SD) sırası ile 2.33 ( $\pm$  0.09), 2.29 ( $\pm$  0.04), 2.12 ( $\pm$  0.06) ve 2.16 ( $\pm$  0.08) olarak belirlendi. Alınan örneklerle yapılan istatistiksel karşılaştırma, total antioksidan kapasitenin kontrol grubu ortalamasının en fazla olduğu ve L-Karnitin ilave edilen grupta da bu kapasitenin ortalamasının düştüğü, fakat anlamlı bir fark göstermediği görülmüştür. SOX yetersizliği oluşturulmuş grup ile SOX yetersizliği oluşturulduktan sonra L-Karnitin verilmiş deney grubunun ortalaması karşılaştırıldığında antioksidan kapasitenin anlamlı derece de farklı olmadığı görülmüştür. Fakat kontrol grubu ve SOX yetersizliği oluşturulmuş grup ortalaması karşılaştırıldığında ise bu grupların antioksidan kapasiteleri arasında anlamlı bir şekilde farklılık saptanmıştır. SOX yetersizliği oluşturulmuş gruplarda antioksidan kapasitesi seviyelerinin ortalamasında düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.10).



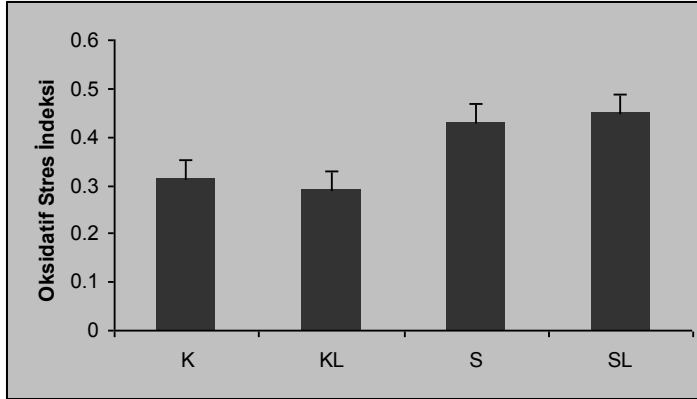
**Şekil 4.10** Total Antioksidan Kapasite ortalamalarının gruplara göre karşılaştırılması. (K:Kontrol grubu, KL: L-Karnitin verilmiş deney grubu, S: SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubu, SL: SOX yetersizliği oluşturulduktan sonra L-Karnitin verilmiş deney grubu)

Kontrol grubu, L-karnitin verilmiş deney grubu, SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubu ve SOX yetersizliği oluşturulduktan sonra L-karnitin verilmiş deney gruplarında ortalama total oksidan kapasite değerleri ( $\pm$  SD) sırası ile  $7.30 (\pm 1.32)$ ,  $6.56 (\pm 1.25)$ ,  $9.11 (\pm 1.67)$  ve  $9.68 (\pm 1.03)$  olarak belirlendi. Total oksidan kapasite değerlerinin ortalaması karşılaştırıldığında her 4 grup için de anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11** Total Oksidan Kapasite ortalamalarının gruplara göre karşılaştırılması. (K:Kontrol grubu, KL: L-Karnitin verilmiş deney grubu, S: SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubu, SL: SOX yetersizliği oluşturulduktan sonra L-Karnitin verilmiş deney grubu)

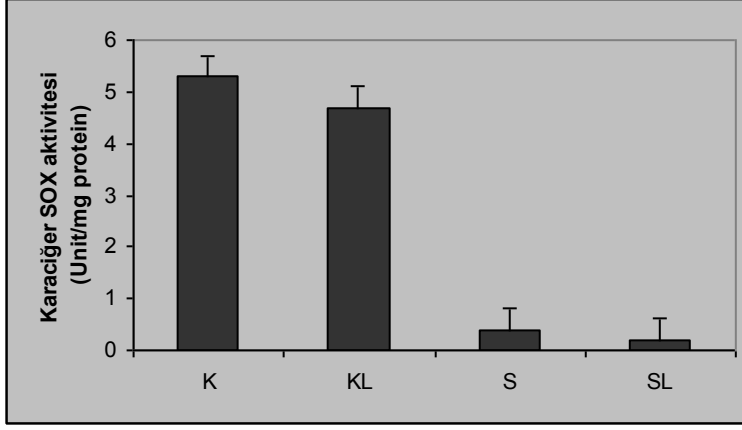
Kontrol grubu, L-karnitin verilmiş deney grubu, SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubu ve SOX yetersizliği oluşturulduktan sonra L-karnitin verilmiş deney gruplarında ortalama oksidatif stres indeksi değerleri ( $\pm$  SD) sırası ile  $0.31 (\pm 0.07)$ ,  $0.29 (\pm 0.05)$ ,  $0.43 (\pm 0.08)$  ve  $0.45 (\pm 0.09)$  olarak belirlendi. Oksidatif stres indeksi değerlerinin ortalaması karşılaştırıldığında her 4 grup için de anlamlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 4.12).



**Şekil 4.12** Oksidatif Stres İndeksi ortalamalarının gruplara göre karşılaştırılması. (K:Kontrol grubu, KL: L-Karnitin verilmiş deney grubu, S: SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubu, SL: SOX yetersizliği oluşturulduktan sonra L-Karnitin verilmiş deney grubu)

#### 4.4. Karaciğer SOX aktivitesi Değerleri

Özel yem ve su ile beslenen sıçanlarda SOX yetersizliğinin olup olmadığını teyit etmek amacıyla tüm gruplara ait sıçan karaciğer dokularında enzim aktivitesi ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar karaciğerden elde edilen süpernatandan Lowry yöntemine göre protein ölçümü yapılarak unit/mg protein olarak ifade edilmiştir. Buna göre; Wistar albino sıçanlarda kontrol grubunda ortalama  $5.43 \pm 0.036$  unit/mg protein ve L-karnitin verilmiş deney grubunda ortalama  $4.74 \pm 0.044$  unit/mg protein olarak belirlenen SOX aktivitesi, SOX yetersiz grupta ortalama  $0.045 \pm 0.015$  unit/mg protein ve SOX yetersizliği oluşturulduktan sonra L-karnitin verilmiş deney grubunda ortalama  $0.024 \pm 0.017$  unit/mg protein olarak ölçülmüştür (Şekil 4.13). 7 hafta boyunca Mo içermeyen yemle ve 200 ppm tungsten içeren suyla beslenen sıçanlarda SOX yetersizliğinin olduğu gözlemlendi. Postmitokondriyal, sitozolik ve mikrozomal fraksiyonların protein miktarlarını hesaplamak için 0'dan 200 mg BSA'ya kadar olan standart BSA eğrisi kullanıldı.



**Şekil 4.13** Karaciğer SOX aktivitesi değerleri. (K:Kontrol grubu, KL: L-Karnitin verilmiş deney grubu, S: SOX yetersizliği oluşturulmuş deney grubu, SL: SOX yetersizliği oluşturulduktan sonra L-Karnitin verilmiş deney grubu)

## 5. TARTIŞMA

Spermatogenez saniyede 1000 sperm üretebilme kapasitesine sahip ve aktif olarak sürekli tekrarlanan bir süreçtir. Bu süreçte doğal olarak meydana gelen hücre bölünmesi, germinal epitel tarafından yüksek oranda mitokondriyel oksijen tüketimini göstermektedir. Ayrıca; testisteki zayıf vaskülarizasyon, bu dokuda oksijen durumunun düşük ve bu düşük oksijen miktarı için olan rekabetin oldukça şiddetli olmasıdır. Hem spermatogenez hem de Leydig hücresi oksidatif stresle hasar görebildiği için bu dokudaki düşük oksijen miktarı, testisin kendini serbest radikallerin hasarından koruyabileceği mekanizmaların önemli bir parçası olabilmektedir (Chen vd 2005).

Birçok farklı **in vivo** ve **in vitro** çalışmada L-Karnitin antiapoptotik etkisi, membran geçirgenliğini değiştirme özelliği ve mitokondri fonksiyonlarını arttırıcı özelliği farklı mekanizmalar ile açıklanmıştır. L-karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin  $\beta$ -oksidasyon için mitokondri içine taşınmasında gerekli bir faktördür. Ayrıca, antioksidatif ve serbest radikal süpürücü etkilere sahip olduğu ve hücre DNA ve membranlarını serbest oksijen radikalleri aracılığıyla oluşturulan hasara karşı koruduğu gösterilmiştir (Dökmeci vd 2006). L-Karnitin uygulamasıyla yaralanma sonrası fare spermatogenezindeki iyileşmesini çalışarak L-Karnitin'in germ hücreleri üzerindeki etkisini göstermiştir (Amendola 1989).

L-Karnitin'in hücresel enerji metabolizmasını arttırıcı ve antiapoptotik etkisi göz önüne alınarak, L-Karnitin'in sperm motilitesini ve olgunlaşmasını arttırıcı etkisi olduğu bildirilmiştir (Coşkun vd 1988). Bu çalışmalar L-Karnitin'in erkek infertilitesinde tedavi yöntemi olarak kullanılabileceğini önerir.

Seminal L-Karnitin konsantrasyonunun L-Karnitin uygulamasından sonra belirgin olarak değişmediği, bunun sebebinin de L-Karnitin konsantrasyonunun seminal sıvıda normalde de çok yüksek olduğu ve uygulama sonrasında da istatistiksel olarak belirgin bir



fark görülmediği bildirilmiştir (Bornman vd 1989). Bizim yaptığımız çalışmada ki immünohistokimyasal bulgularımız bu sonucu desteklemektedir.

Yapılan çalışmalarda L-karnitin, serbest radikal kaynaklı mitokondriyal ve nükleer DNA hasarına karşı hücreleri koruduğu gösterilmiştir. Karnitinin yaşlı ratlarda oksidan üretimini azaltmak ve antioksidan durumunu arttırmak suretiyle, yaşlanma esnasında oluşan oksidatif stres aracılı DNA hasarını indirgeyerek mitokondriyal fonksiyonları iyileştirdiği gösterilmiştir (Majno, Joris 1995). Bizim yaptığımız çalışmada SOX etkisi ile oluşan seminifer tübül hasarının L-karnitin verilmesi ile düzeldiği görülmüştür fakat bu etki mekanizmasının oksidatif stres seviyesinin düşürülmesi ile olmadığını, L-karnitinin anti-apoptotik etkisi ile olduğunu düşülmekteyiz.

Günlük  $SO_3^-$  tüketiminin, yiyecek ve içeceklerle alınan miktarına, hava kirliliği ve ilaç endüstrisi yoluyla alımının da katılması ile oldukça yüksek olduğu bilinmektedir. Besinlerle  $SO_3^-$  alımının zararlı etkileri rapor edilmiştir (Kohen 1973). Günümüzde Dünya Sağlık Örgütü'nün maksimum 0.7 mg/kg olarak kabul ettiği günlük  $SO_3^-$  alımı düzeyi, Til ve arkadaşlarının sıçanlarda yaptığı çalışmadan elde ettikleri sonuçlara dayanmaktadır. Şöyle ki; bu araştırmacı grubunun kullandıkları ve herhangi bir zararlı etki bulamadıkları % 0.25  $Na_2S_2O_5$  içeren yemin tüketilmesi, yaklaşık olarak günde 72 mg/kg  $SO_3^-$  alımına karşılık gelmektedir (Til vd 1972). Sonuç olarak 0.7 mg/kg olan günlük kabul edilebilir  $SO_3^-$  alımının  $SO_3^-$ 'e maruziyet açısından riskli bazı iş kollarında çalışan insanlarda ve beslenme alışkanlığına göre kolaylıkla aşılabileceğini tahmin etmek zor değildir. Günlük  $SO_3^-$  tüketiminin hesap edildiği az sayıdaki çalışmada bu sınırın hayli üstüne çıkıldığı görülmüştür.

Sıçanlarda SOX yetersizliği İlk olarak Gunnison ve arkadaşları tarafından oluşturulmuş ve sülfid toksisitesi çalışmalarında kullanılmıştır (Johnson ve Rajagopolon 1976). Bu deneysel modelin insanlara uyarlanabilecek sülfid toksisitesi çalışmalarında kullanılmasının ana sebepleri, sıçanların sülfid metabolize etme kapasitelerinin insana göre 20 kat fazla olması ve basta sıçanlar olmak üzere deneysel sülfid toksisitesi çalışmalarında kullanılan pek çok türün farklı düzeyde sülfid metabolize etme yeteneklerinin olmasıdır (Gunnison vd 1981, Kucukatay 2003). Bu model, hayvanların diyetinden molibdenin çıkartılması ve içme sularına tungsten (W) ilave edilmesi sureti ile oluşturulmaktadır. W verilmesinin veya molibdensiz diyetin toksisitesi ile ilgili literatürde

oldukça az sayıda çalışma yapılmıştır. Toksikitesi hakkında bilinenlerin oldukça az olmasına rağmen, W'in en düşük toksisiteye sahip metal olduğu ileri sürülmektedir (Abedinzadeh 2001, Meng 2003). Bu çalışmada SOX yetersizliği oluşturma metodunda kullanılan ve 3 hafta boyunca hayvanların içme suyuna ilave edilen 200 ppm'lik veya daha yüksek tungsten dozu ile yapılmış bir toksisite çalışmasına rastlanmamıştır. Tungsten verilmeksizin diyetten molibden çıkarılmasının ise herhangi bir toksisiteye neden olmadığı bildirilmiştir (Jakus 2000, Kucukatay 2003). Tungsten verilmesi ve diyetten molibdenin çıkarılması ile organizmada bulunan 3 enzimin aktivitesinde eksiklik ortaya çıkmaktadır. Bunlar sulfat oksidaz (SOX), ksantin oksidaz (XO) ve aldehit oksidaz (AOX) enzimleridir (Cohen vd 1971, Johnson vd 1974). Daha önce de bahsedildiği gibi SOX enzim eksikliği ile ortaya çıkan patolojik tablo çok iyi bilinmekle birlikte, XO ve AOX enzim aktivitelerinin genetik olarak yokluğunda dahi yaşamı tehdit eden bir sorunun ortaya çıkmadığı bildirilmiştir (Johnson ve Rajagopolon 1976, Küçükatay 2003).

İlgili gruplarda SOX enzim aktivite yetersizliğinin oluşturulduğunu teyit etmek amacıyla karaciğer SOX enzim aktivitesi ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonuçları etkin bir yetersizliğin geliştiğini göstermektedir. Literatürde bu protokol uygulanarak karaciğer SOX enzim aktivitesinin yaklaşık %90- 95 oranında azaldığı bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada ölçülen karaciğer SOX enzim düzeyinin de yaklaşık bu oranda baskılandığı bulunmuştur (Johnson ve Rajagopolon 1976, Hui vd 1989, Küçükatay 2003).

$SO_3$  ün solunum sistemi, merkezi sinir sistemi gibi sistemler üzerinde etkileri bilinirken erkek genital sistemi üzerine etkisi bilinmemektedir. Bulgularımız SOX yetersizliğinin erkek üreme sistemi üzerine spermatogenezi azaltıcı etkisinin olduğunu göstermektedir.

## 6. SONUÇLAR

Biz çalışmamızda L-karnitinin etkilerini, SOX yetersizliği oluşmuş hayvanlarda testiste oluşacak hasarı ve SOX yetersizliği ile L-karnitin arasında etkileşim olup olmadığını inceledik.

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde L-karnitinin daha önceki çalışmalarla bağlantılı olarak testiste spermatogenik seri hücreleri üzerinde etkili olduğunu gösterildi.

Aynı zamanda SOX enzimi yetersizliği oluşturulan sıçanlarda spermatogenik seri hücreleri üzerinde zararlı etkisi olduğu bulundu ve buna ek olarak SOX yetersizliği oluşturulan hayvanlara L-karnitin verildiğinde ise bu zararlı etkinin tolere edilebildiği gösterildi. Ancak yapılan oksidatif stres ölçümlerinde bu 4 grup arasında hiçbir anlamlı fark gözlenmemiştir. Bu bulgu da bize SOX enzim eksikliğinin hücreler üzerindeki etkisinin oksidatif stres hasarıyla olmadığını ve farklı bir mekanizmayla olduğunu düşündürdü.

Sonuç olarak testis hücreleri üzerine SOX enzim eksikliğinin zararlı etkilerinin olduğu gösterilse bile bu etki mekanizmasının açıklanabilmesi için başka çalışmaların yapılması gerekir. L-karnitin ile SOX enzimi arasında bir ilişkinin olduğu belirgindir ancak yapılan bu çalışma ile bu etki mekanizmasının nasıl olduğunu açıklamak için yeterli değildir. Fakat SOX enzim eksikliği olan canlılara L-karnitin'in sperm sayısı ve motilitesi üzerine pozitif etki ettiği düşünülmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Abedinzadeh, Z. (2001). Sulfur-centered reactive intermediates derived from the oxidation of sulfur compounds of biological interest. *Can J Physiol Pharmacol*, 79(2):166-70.
- Akay, M. T. (2001). Genel Histoloji. 5. Baskı. **Palme Yayınevi**, Ankara.
- Amdur, M. O. (1969). Toxicologic appraisal of particulate matter, oxides of sulfur, and sulfuric acid. *J Air Pollut Control Assoc*, 19(9):638-44.
- Amendola, R., Bartoleschi, C., Coredelli E. *et al.* (1989). Effects of L-acetylcarnitine (LAC) on the post-injury recovery of mouse spermatogenesis monitored by flowcytometry: 1. Recovery after X-irradiation. *Andrologia*, 21: 568–575.
- Balercia, G., Regoli, F., Armeni, T., Koverech, A., Mantero, F., Boscaro, M. (2005). Placebo-controlled double-blind randomized trial on the use of L-carnitine, L-acetylcarnitine, or combined L-carnitine and L-acetylcarnitine in men with idiopathic asthenozoospermia. *Fertil Steril*, 84: 662-71.
- Benevenga, N.J. (1984). Evidence for alternative pathways of methionine catabolism. *Adv Nutr Res*, 6:1-18.
- Bozdoğan, Ö. (2004). Fizyoloji. 2. Basım. **Palme Yayıncılık**, Ankara.
- Brevetti, G., Angelini, C., Rosa, M., Carrozzo, R., Perna, S., Corsi, M. (1991). Muscle carnitine deficiency in patients with severe peripheral vascular disease. *Circulation*, 84(4): 1490-1495.
- Brooks, D.E. (1979). Carnitine, acetylcarnitine and the activity of carnitine acetyltransferases in seminal plasma and spermatozoa of men, rams and rats. *J Reprod Fertil*, 56:667-73
- Caviglia, D., Scarabelli, L., Palmero, S. (2004). Effects of carnitines on rat Sertoli cell protein metabolism. *Horm Metab Res*, 36: 221-5.
- Chen, H., Liu, J., Luo, L. *et al* (2005). Vitamin E, aging and Leydig cell steroidogenesis. *Exp Gerontol.* ;40(8-9):728-36.
- Cohen, H.J., Fridovich, I., Rajagopalan, K.V. (1971). Hepatic sulfite oxidase. A functional role for molybdenum. *J Biol Chem*, 246(2):374-82.
- Cooper, A.J. (1983). Biochemistry of sulfur-containing amino acids. *Annu Rev Biochem*, 52:187-222.

- Costa, M., Canale, D., Filicori, M. *et al.* 1994. L-Carnitine in idiopathic asthenozoospermia: a multicentre study—Italian study group on carnitine and male infertility. *Andrologia*, 26: 155–159.
- Coşkun, Ö., Kutlubay, R., Yakan, B., Ekmekçioğlu, O., Öztürk, Ö. (1998). L-Carnitine Uygulanan Ratların Testis Dokusunda Görülen Morfolojik ve Morfometrik Değişiklikler. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 18(4): 236-239.
- Cumhur, M., Yener, N., Tuncel, M. (2001). Temel Anatomi. **ODTU Yayıncılık**, Ankara.
- Dalton-Bunnow, M. F. (1985). Review of sulfite sensitivity. *Am J Hosp Pharm*, 42(10):2220-6.
- Deniz, G. (1999). Karnitin: Sentez, metabolizma, fonksiyon ve iskemik kalpte terapötik önemi. *T Klin Tıp Bilimleri*, 19: 55-62.
- Doberenz, J., Hirche, F., Keller, U., Eder, K. (2007). Pivalate lowers litter sizes and weights in female rats independent of its effect on carnitine status. *Reprod Toxicol*. 24(1):83-8
- Dökmeci, D., Inan, M., Basaran, U. M., Yalcin, O., Aydogdu, N., Turan, F. N., Uz, Y. H. (2006). Protective effect of L-carnitine on testicular ischaemia–reperfusion injury in rats. *Cell Biochemistry and Function* 25(6): 611–618,
- Enomoto, A., Wempe, M. F., Tsuchida, H., Shin, H. J., Cha, S. H., Anzai, N. et al (2002). Molecular identification of a novel carnitine transporter specific to human testis. Insights into the mechanism of carnitine recognition. *J Biol Chem*, 277: 36262-71.
- Erdoğan, D., Hatipoğlu, M. T., Görgün, M., Ilgaz, C. (2007). Özel Histoloji. 2.Basım, **Hatiboğlu Yayınevi**, Ankara.
- Fazio, T., Warner, C. R. (1990). A review of sulphites in foods: analytical methodology and reported findings. *Food Addit Contam*, 7(4):433-54.
- Fine, J. M., Gordon, T., Sheppard, D. (1987). The roles of pH and ionic species in sulfur dioxide- and sulfite-induced bronchoconstriction. *Am Rev Respir Dis*, 136(5):1122-6.
- Garolla, A., Maiorino, M., Roverato, A., Roveri, A., Ursini, F., Foresta, C. (2005). Oral carnitine supplementation increases sperm motility in asthenozoospermic men with normal sperm phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase levels. *Fertil Steril*, 83: 355-61.
- Garrett, R. M., Johnson, J. L., Graf, T. N., Feigenbaum, A., Rajagopalan, K. V. (1998). Human sulfite oxidase R160Q: identification of the mutation in a sulfite oxidase-deficient patient and expression and characterization of the mutant enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(11):6394-8.

- Gartner, L. P., Hiatt, J. L. (2007). Color Textbook Of Histology. 3. Basım, **WB Saunders Company**, Philadelphia.
- Gibson, W. B., Strong, F. B. (1973). Metabolism and elimination of sulphite by rats, mice and monkeys. *Fd Cosmet Toxicol*, 11: 185-198.
- Golembiewski, J. A. (2002). Allergic reactions to drugs: implications for perioperative care. *J Perianesth Nurs*, 17(6):393-8.
- Gunnison, A. F. (1981). Sulphite toxicity: a critical review of in vitro and in vivo data. *Food Cosmet Toxicol*, 19(5):667-82.
- Gunnison, A. F., Dulak, L., Chiang, G., Zaccardi, J., Farruggella, T. J. (1981). A Sulphite-Oxidase-Deficient Rat Model: Subchronic Toxicology. *Fd Cosmet Toxicol*, 19: 221-232.
- Gunnison, A. F., Farruggella, T. J., Chiang, G., Dulak, L., Zaccardi, J., Birkner, J. (1981). A Sulphite-Oxidase-Deficient Rat Model: Metabolic Characterization. *Fd Cosmet Toxicol*, 19: 209-220.
- Gunnison, A. F., Jacobsen, D. W. (1987). Sulfite Hypersensitivity, A Critical Review. *CRC Crit Rev Toxicol*, 17 (3): 185-214.
- Gunnison, A. F., Sellakumar, A., Currie, D., Synder, E. A. (1987). Distribution, Metabolism And Toxicity of Inhaled Sulfur Dioxide And Endogenously Generated Sulfite in the Respiratory Tract of Normal and Sulfite Oxidase-Deficient Rats. *J Toxicol Environl Health*, 21: 141-162.
- Guyton, A. C. (2007), Textbook of medical physiology. Eleventh edition WB, **Saunders Company** 997-1004 Philadelphia, Toronto.
- Hatipoğlu, M. T., Hatipoğlu, H. G. (2006), Yüksekokullar Anatomi Ders Kitabı. **Selvi Yayınevi**, Ankara.
- Johnson, J. L., Rajagopalan, K. V., Cohen, H. J. (1974). Molecular basis of the biological function of molybdenum. Effect of tungsten on xanthine oxidase and sulfite oxidase in the rat. *J Biol Chem*, 249(3):859-66.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1974). Toxicological Evaluation of Certain Food Additives with a Review of General Principle and of Specifications. 17<sup>th</sup> Report. **Food and Agriculture Organization**. Rome
- Junqueira, L., Carneiro, J., Kelley, O. R. (1998). Temel Histoloji. Lange medical book. Çeviri editörü: Prof. Dr. Yener Aytekin. **Barış Kitabevi**.
- Kierszenbaum, A. L. (2006), Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Demir R. (Çev.), **Palme Yayıncılık**, Ankara

- Kisker, C., Schindelin, H., Pacheco, A., Wehbi, W. A., Garrett, R. M., Rajagopalan, K. V., Enemark, J. H., Rees, D. C. (1997). Molecular basis of sulfite oxidase deficiency from the structure of sulfite oxidase. *Cell*, 91(7):973-83.
- Kobayashi, D., Goto, A., Maeda, T., Nezu, J. I., Tsuji, A. (2005). OCTN2-mediated transport of carnitine in isolated Sertoli cells. *Reproduction*, 129: 729-36.
- Kochen, J. (1973). Sulfur dioxide, a respiratory tract irritant, even if ingested. *Pediatrics*, 52(1):145-6.
- Koepke, J. W., Senler, J. C., Dunhill, A. L. (1983). Presence of sulfur dioxide in commonly used bronchodilator solutions. *J Allergy Clin Immunol*, 72:504-8.
- Kucukatay, V., Agar, A., Yargicoglu, P., Gumuslu, S., Aktekin, B (2003). Changes in somatosensory evoked potentials, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes in experimental diabetes: effect of sulfur dioxide. *Arch Environ Health*, 58(1):14-22.
- Kucukatay, V., Genç, O., Kocamaz, E., Emmungil, G., Erken, H. A., Bağcı, H. (2008). Spinal reflexes in normal and sulfite oxidase deficient rats: effect of sulfite exposure. *Toxicology and Industrial Health*, 24: 147–153
- Lango, R., Smolenski, R. T., Narkiewicz, M., Suchorzewska, J., Lysiak-Szydłowska, W. (2001). Influence of L-carnitine and its derivatives on myocardial metabolism and function in ischemic heart disease and during cardiopulmonary bypass. *Cardiovasc Res*, 51(1): 21-29.
- Lenzi, A., Lombardo, F., Sgrò, P., Salacone, P., Caponecchia, L., Dondero, F. et al (2003). Use of carnitine therapy in selected cases of male factor infertility: a double-blind crossover trial. *Fertil Steril*, 79: 292-300.
- Lester, M. R. (1995). Sulfite Sensitivity: Significance in Human Health. *Journal of The American College of Nutrition* 14: 229-232.
- Lewin, L. M., Shalev, D. P., Weissenberg, R., Soffer, Y. (1981). Carnitine and acetylcarnitines in semen from azoospermic patients. *Fertil Steril*, 36:214-8.
- Majno, G., Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 146(1):3-15
- McEvily, A. J., Iyengar, R., Otwell, W. S. (1992). Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 32(3):253-73.
- Moore–Persaud, (2001) İnsan Embriyolojisi Klinik Yonleri ile. Çeviri Editorleri Prof. Dr.Mehmet Yıldırım, Prof. Dr. İmer Okar, Prof. Dr. Hakkı Dalcık. 6. Baskıdan Çeviri **Nobel kitabevleri .**
- Netter, F. H., Ovalle, W. K., Nahirney, P.C. (2009) Temel Histoloji. Müftüoğlu S, Kaymaz F, Atilla P (Çev.), **Güneş Tıp Kitabevleri**, Ankara.

- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M.J., Aubert, S.Y (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 34(2):109-57.
- Noyan, A. (2005) Yaşamda ve Hekimlikte Fizyoloji.15. Basım, Ankara.
- Ramadan, L. A., Abd-Allah, A. R., Aly, H. A., Saad-el-Din, A. A. (2002). Testicular toxicity effects of magnetic field exposure and prophylactic role of coenzyme Q10 and L-carnitine in mice. *Pharmacol Res*, 46: 363-70.
- Ross, M. H., Kaye, G. I., Pawlina, W. (2003) Histology A Text and Atlas with Cell and Molecular Biology. 4. Basım. **Baltimore, Philadelphia.**
- Russell, L. D., Ettlın, R. A., Hıkım, A. P. S., CLEG, E. D. (1990). Histological and histopathological evaluation of the testis. *Cache river pres*, Bolesta.
- Samet, J. M., Dominici, F., Curriero, F. C., Coursac, I., Zeger, S. L. (2000). Fine Particulate Air Pollution And Mortality in 20 U.S. Cities, 1987-1994. *N Engl J Med*, 343: 1742-1749.
- Sancak, B., Cumhur, M. (1999). Fonksiyonel Anatomi. **METU PRESS**, Ankara.
- Sardesai, V. M. (1993). Molybdenum: an essential trace element. *Nutr Clin Pract*, 8(6):277-81.
- Shih, V. E., Carney, M. M., Mandell, R. (1979). A simple screening test for sulfite oxidase deficiency: detection of urinary thiosulfate by a modification of Sörbo's method. *Clinica Chimica Acta*, 95: 143-145.
- Southerland, W. M., Akogyeram, C. O., Toghrol, F., Sloan, L., Scherrer, R. (1982). Interaction of bisulfite with unsaturated fatty acids. *J Toxicol Environ Health*, 10(3):479-91.
- Sprenger, J. D., Altman, L. C., Marshall, S. G., Pierson, W. E., Koenig, J. Q. (1989). Studies of neutrophil chemotactic factor of anaphylaxis in metabisulfite sensitivity. *Ann Allergy*, 62(2):117-21.
- Şeftalioğlu, A. (1998), Genel&Özel İnsan Embriyolojisi, **Tıp&Teknik Yayıncılık Ltd. Şti.** Üçüncü Baskı, Ankara.
- Tan, W. C., Cripps, E., Douglas, N., Sudlow, M. F. (1982). Protective effect of drugs on bronchoconstriction induced by sulphur dioxide. *Thorax*, 37(9):671-6.
- Til, H. P., Feron, V. J., De Groot, A. P. (1972). The toxicity of sulphite. I. Long-term feeding and multigeneration studies in rats. *Food Cosmet Toxicol*, 10(3):291-310.
- Vally, H., de Klerk, N., Thompson, P. J. (2000). Alcoholic drinks: important triggers for asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 105(3):462-7.



- Vicari, E., Calogero, A. E. (2001). Effects off treatment with carnitines in infertile patients with prostato-vesiculo-epididymitis. *Hum Reprod*, 16: 2338-42.
- WEB\_1 <http://www.embriyo.org/?part=urun&gorev=oku&id=189> (30.11.2011)
- Widdicombe, J. G. (1975). Reflex control of airways smooth muscle. *Postgrad Med J*, 51(7):36-44.
- Yamaguchi, K., Sakakibara, S., Asamizu, J., Ueda, I (1973). Induction and activation of cysteine oxidase of rat liver. II. The measurement of cysteine metabolism in vivo and the activation of in vivo activity of cysteine oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 297(1):48-59

## 8. ÖZGEÇMİŞ

Ayşen Buket Er 10.06.1986 tarihinde Ankara’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İstanbul’da tamamladıktan sonra lise öğrenimini Denizli Anadolu Lisesinde bitirerek, 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde okumaya hak kazandı. 2005-2006 yıllarında Erasmus bursu ile Hollandada bir sene okudu. 2009 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji AD’ da yüksek lisansına başladı.