



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**HİPOGONADİZMLİ HASTALARDA OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİ VE BU PARAMETRELERİN TEDAVİ İLE
ETKİLEŞİMİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Kenan GÜÇLÜ

KAYSERİ-2013



**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**HİPOGONADİZMLİ HASTALARDA OKSİDATİF STRES
PARAMETRELERİ VE BU PARAMETRELERİN TEDAVİ İLE
ETKİLEŞİMİ**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

**Hazırlayan
Dr. KENAN GÜÇLÜ**

**Danışman
Prof. Dr. GÜLDEN BAŞKOL**

Bu çalışma; Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSU-11-3403 kodlu proje ile desteklenmiştir.

KAYSERİ-2013

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	II
KISALTMALAR	III
TABLO LİSTESİ.....	V
ŞEKİL LİSTESİ.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. ERKEK HİPOGONADİZMİ.....	3
2.1.1. Etiyoloji, Patogenez ve Sınıflaması.	3
2.1.2. Erkek Üreme Fizyolojisi	5
2.1.3. Klinik Hikaye ve Fizik Muayene Bulguları.	7
2.1.4. Tanı..	8
2.1.5. Tedavi.....	10
2.2. SERBEST RADİKALLER	12
2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri.....	12
2.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ.....	15
2.4. OKSİDATİF STRES VE OKSİDATİF STRESİ GÖSTEREN BAZI PARAMETRELER	17
2.4.1. Proteinlerin İleri Oksidasyon Ürünleri (AOPP).....	18
2.4.2. Serbest TiyoL Grupları.....	19
2.4.3. Nitrik Oksit (NO)	21
2.4.4. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)	22
2.4.5. Malondialdehit (MDA)	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
4. BULGULAR.....	44
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇLAR	65
7. KAYNAKLAR	66
8. TEZ ONAY SAYFASI.....	75

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın planlanması ve yürütülmesinde desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülden Başkol'a ve desteklerinden dolayı Prof. Dr. Fahri Bayram'a teşekkürlerimi sunarım.

İhtisasım boyunca yetişmemizde emekleri olan tüm Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim üyelerine ve Biyokimya Anabilim Dalı başkanı sayın Prof. Dr. Sabahattin Muhtaroglu'na teşekkür ederim.

Tezime istatistik aşamasındaki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Ferhan Elmalı'ya; testlerin yapılmasında yardımcı olan Endokrinoloji servis hemşiresi Nilgün Yıldırım'a, uzmanlık eğitimi boyunca birlikte çalıştığımız tüm değerli asistan arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Ayrıca bu tezin her aşamasında benden desteğini ve yardımını hiç esirgemeyen sevgili eşime ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Kenan GÜÇLÜ

KISALTMALAR

AOPP	: İleri protein oksidasyon ürünleri
NO	: Nitrik oksit
8-OHdG	: 8-hidroksideoksiguanozin
MDA	: Malondialdehid
DNA	: Deoksiribonükleik asit
HHTA	: Hipotalamus-Hipofiz-Testis Aksı
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
FSH	: Follikül stimülan hormon
LH	: Luteinizan hormon
SOR	: Serbest Oksijen Radikalleri
IHH	: İdiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm
MIF	: Mülleryan inhibitör faktör
hCG	: Human chorionic gonadotropin
t-Tes	: Total testosteron
s-Tes	: Serbest testosteron
HPLC	: High performance liquid chromatography
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
MPO	: Miyeloperoksidaz
HOCl	: Hipokloröz asit
TBA	: Tiyoarbütirik asit
Cat	: Katalaz
SOD	: Süperoksit dismutaz
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
H ₂ O ₂	: Hidrojen peroksit
EDRF	: Endotel kaynaklı gevşetici faktör
cGMP	: Siklik guanozin monofosfat
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
NOS	: Nitrik oksit sentaz
nNOS	: Nöronal nitrik oksit sentaz
TnNOS	: Testiküler nöronal nitrik oksit sentaz
TNF α	: Tümör nekroz faktör alfa

TG	: Trigliserid
HDL	: Yüksek dansiteli lipoprotein
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
TK	: Total kolesterol
SHBG	: Seks hormon bağlayıcı globulin
E2	: Östradiol
IGF-1	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1
VKİ	: Vücut Kütle İndeksi
BKO	: Bel-kalça oranı
RIA	: Radio immuno assay
IRMA	: Immunoradiometric assay
TAC	: Total antioksidan kapasite
STZ	: Streptozosin
OD	: Optik dansite

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Primer ve Sekonder Hipogonadizm Nedenleri	5
Tablo 2.2. Biyolojik Önemi Olan Bazı Serbest Radikaller	13
Tablo 2.3. Serbest Radikallerin Etkilediği Moleküller ve Sonuçları	15
Tablo 2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri.....	17
Tablo 3.1. AOPP Çalışma Prosedürü.....	31
Tablo 3.2. TiyoL Çalışma Prosedürü	33
Tablo 3.3. NO Çalışma Prosedürü	36
Tablo 3.4. 8-OHdG Çalışma Prosedürü	38
Tablo 3.5. HPLC Sisteminin Özellikleri	40
Tablo 3.6. MDA Çalışma Prosedürü.....	40
Tablo 4.1. Tedavi Öncesi Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Bulguları	45
Tablo 4.2. Tedavi Sonrası Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Bulguları	45
Tablo 4.3. Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Hasta Grubunun Demografik Bulguları.....	46
Tablo 4.4. Tedavi Öncesi Hasta ve Kontrol Grubunun Rutin Çalışma Bulguları.....	47
Tablo 4.5. Tedavi Sonrası Hasta ve Kontrol Grubunun Rutin Çalışma Bulguları....	48
Tablo 4.6. Tedavi öncesi ve Tedavi sonrası Hasta Grubunun Rutin Çalışma Bulguları.....	49
Tablo 4.7. Tedavi Öncesi Hasta ve Kontrol Grubunun Biyokimyasal Çalışma Bulguları.....	50
Tablo 4.8. Tedavi Sonrası Hasta ve Kontrol Grubunun Biyokimyasal Çalışma Bulguları.....	50
Tablo 4.9. Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Hasta Grubunun Biyokimyasal Çalışma Bulguları.....	51
Tablo 4.10. Parametreler Arasındaki Korelasyonlar	52

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1. Lipid Peroksidasyonu ile MDA Oluşumu	25
Şekil 3.1. Kloramin T Standart Grafiği.....	32
Şekil 3.2. Glutasyon Standart Grafiği.....	34
Şekil 3.3. Griess Reaksiyonu	35
Şekil 3.4. NO Standart Grafiği.....	37
Şekil 3.5. 8-OHdG Standart Grafiği.....	39
Şekil 3.6. MDA Kontrol Kromatogramı	41
Şekil 3.7. Birinci Hastanın Tedavi Öncesi MDA Kromatogramı	41
Şekil 3.8. Birinci Hastanın Tedavi Sonrası MDA Kromatogramı	42

HİPOGONADİZMLİ HASTALARDA OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ VE BU PARAMETRELERİN TEDAVİ İLE ETKİLEŞİMİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışma; hipogonadotropik hipogonadizmlı hastalarda, oksidatif stres varlığını; protein, lipid ve nükleik asit oksidasyon ürünleri ile antioksidan parametre olan tiyol üzerinden göstermek ve hastalara uygulanan tedavi protokolünün, oksidatif stres üzerine olası etkilerini değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hipogonadizm tanısı alan 30 erkek hasta ile bunlarla yaş ve cinsiyet açısından uyumlu 20 sağlıklı gönüllü kontrol grubu olarak çalışmaya alındı. Oksidatif stresi değerlendirmek amacıyla; ileri protein oksidasyon ürünleri (AOPP), tiyol, malondialdehid (MDA), nitrik oksit (NO) ve 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Hasta grubu, kendi içinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası olarak karşılaştırıldığında; tedavi sonrası hasta grubunda tiyol değerlerinin istatistiksel olarak arttığı; AOPP, MDA ve NO değerlerinin ise istatistiksel olarak azaldığı, 8-OHdG değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü.

Sonuç: Hipogonadizm patogenezinde oksidatif stresin önemli bir faktör olduğu görüşü; bu çalışmada ölçülen yüksek AOPP, MDA, NO düzeyleri ve düşük tiyol düzeyleriyle desteklenmektedir. Çalışmamız; hipogonadizmlı hastalarda, plazma/serum AOPP, tiyol, MDA ve NO düzeylerinin değerlendirildiği, literatürdeki ilk çalışmadır. Bu tez çalışmasındaki bulguların, hastalığın patogenezinin açıklanması ve tedavi protokollerine faydalı olması açısından, literatüre önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.

Anahtar kelimeler: Hipogonadizm, AOPP, tiyol, MDA, NO, 8-OHdG.

OXIDATIVE STRESS PARAMETERS AND INTERACTION OF THESE PARAMETERS WITH THE TREATMENT IN PATIENTS WITH HYPOGONADISM

ABSTRACT

Aim: This study has been conducted in order to reveal the presence of oxidative stress in patients with hypogonadotropic hypogonadism over the antioxidant parameter thiol with protein, lipid and nucleic acid oxidation products, and further to evaluate the probable effects of current patient treatments on oxidative stress.

Material and Method: 30 male patients with a diagnosis of hypogonadism and age- and sex-matched control group of 20 healthy volunteers were included in this study. In order to assess oxidative stress; advanced oxidation protein products (AOPP), thiol, malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO) and 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) levels of the subjects were measured.

Findings: When the pre-treatment and post-treatment evaluations were made to the patient group, it was observed that thiol level was statistically higher, AOPP, MDA and NO levels were statistically lower and 8-OHdG level showed no statistically significant difference after treatment.

Result: The view that oxidative stress is a significant factor in hypogonadism pathogenesis is supported with high AOPP, MDA, NO levels and low thiol level measured in the study. Our study is the first to evaluate AOPP, MDA, NO and thiol levels of patients with hypogonadism in plasma/serum. We are in the opinion that this study will make significant contributions to the literature for the explanation of the pathogenesis of the disease and will be useful in treatment protocols.

Key Words: Hypogonadism, AOPP, thiol, MDA, NO, 8-OHdG.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği erkek hipogonadizmini; hipotalamo-hipofizer-testiküler aksta (HHTA) bir veya daha çok seviyede bozukluk sonucu testisin beklenen yaşla fizyolojik düzeyde testosteron sentezleyememesi ve spermatozoa sayısında azalma veya yokluğu ile karakterize bir sendrom olarak tanımlamıştır (1).

Hipogonadizm; testiküler bozukluk sonucu ortaya çıkarsa primer hipogonadizm, hipotalamik ya da hipofizer düzeyde bozukluk sonucu ortaya çıkarsa sekonder hipogonadizm olarak ifade edilir (2, 3). Hastalarda klinik belirtiler hipogonadizmin başlangıç zamanına bağlıdır. Prepubertal androjen yetersizliği; ufak testis ve penis, sekonder seks karakterlerinde ve iskelet sisteminde gelişim geriliği, uzun ekstremiteler boyu ve infertilite ile kendini gösterirken, puberteden sonra ise temel belirtiler libido azalması, erektil disfonksiyon, vücut kıllanmasında değişiklik, kemik ve kas kitlesinde azalma şeklinde görülür (2, 3).

Vücutta normal şartlarda meydana gelen fizyolojik ve patolojik olaylar sırasında serbest oksijen radikalleri (SOR) oluşmaktadır. Bu zararlı moleküllerin miktarı, vücudun antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aşarsa oksidatif stres olarak bilinen durum ortaya çıkar. Nükleik asitler, proteinler ve lipidler gibi temel hücre komponentleri oksidanlarla etkileşime girerek toksik bileşikler meydana gelmekte ve bu bileşiklerin ölçülmesiyle oksidatif stres ortaya konmaktadır. SOR'un günümüzde bir çok hastalığın patogeneğinde rol alabildiği gösterilmiştir. Literatürde, oksidatif

stresin hipogonadizm patogeneğinde rol oynadığına dair çalışmalar mevcuttur (4-8). Ancak bu çalışmalar; hipogonad hastaların semen örneklerinde oksidatif stresin araştırılması üzerine yoğunlaşmıştır. Literatür taramamızda hipogonad hastaların serum/plazma örneklerinde oksidatif stresi araştırıran çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmanın amacı, hipogonadizm tanısı konan hastaların serum/plazma örneklerinde oksidatif stres parametrelerini ölçerek; hipogonadizm ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi araştırmak ve hastalara klasik olarak uygulanan gonadotropin replasman tedavisinin bu parametreler üzerindeki etkisini değerlendirmektir. Bu amaçla hipogonadizm tanısı konan hastaların serum/plazmasında; nitrik oksit (NO), protein oksidasyonunu değerlendirmek için ileri protein oksidasyon rnleri (AOPP) ve tiyol, lipid peroksidasyonunu değerlendirmek için malondialdehid (MDA), nükleik asit oksidasyonu değerlendirmek için 8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) düzeyleri ölçülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ERKEK HİPOGONADİZMİ

Hipogonadizm; testislerin testosteron üretimi ve sperm yapımındaki veya her ikisinde birden yetersizliği sonucu ortaya çıkan klinik tablo olarak tanımlanır.

2.1.1. Etiyoloji, Patogenez ve Sınıflaması

Testiküler yetmezlik, primer hipogonadizm (hipergonadotropik hipogonadizm) olarak adlandırılırken, hipotalamik veya hipofizer yetmezlik ise sekonder hipogonadizm (hipogonadotropik hipogonadizm) olarak adlandırılmaktadır (2,3).

Primer hipogonadizm, Leydig hücrelerinden testosteron üretimini ya da seminifer tubuluslardan sperm üretimini ya da her ikisini birden etkileyen testiküler bir defekt sonucu meydana gelir. Negatif feedback mekanizması bozulduğu için gonadotropin düzeyleri yükselmiştir, bu nedenle hipergonadotropik hipogonadizm olarak da adlandırılır. Hipergonadotropik hipogonadizmin en sık görülen nedenleri; kromozomal bozukluklar, testislerin doğuştan yokluğu, kriptorşidizm, geçirilmiş orşit atakları, testis travmaları, testisi içine alan radyoterapi, kemoterapi, otoimmün testiküler yetmezliklerdir. Primer hipogonadizmde tedavi ile fertilitenin sağlanması mümkün değildir. Tedavinin esas amacı sekonder seks karakterlerinin kazandırılmasıdır (2,3).

Sekonder hipogonadizm ise hipotalamus ya da hipofizde meydana gelen patoloji sonucu gonadotropinlerin yetersiz salgılanması ile oluşur. Hipofizden luteinizan hormon (LH) ve follikül stimulan hormon (FSH) salgısında yetersizlik olduğu için sekonder hipogonadizm, hipogonadotropik hipogonadizm olarak da adlandırılabilir.

İdiyopatik hipogonadotropik hipogonadizm (İHH), izole LH ve izole FSH eksikliği, hipotalamus ve hipofiz tümörleri, granümatöz hastalıklar, kafa travmaları, ağır sistemik hastalıklar, üremi, hemokromatozis sekonder hipogonadizmin en sık görülen nedenleridir. Hastalara uygun tedavi verilerek, sekonder seks karakterlerin ve testislerin gelişmesi ile fertilitiyi sağlamak mümkündür (2, 3). Primer ve sekonder hipogonadizm nedenleri Tablo 2.1.'de gösterilmiştir (9).

2.1.2. Erkek Üreme Fizyolojisi

Cinsel gelişimin normal bir şekilde tamamlanarak, seksüel fonksiyonların devam ettirilebilmesi için, cinsel farklılaşmanın fetal hayatta tam olarak gerçekleşmesi ve hipotalamus-hipofiz-testis (HHT) aksının olgunlaşıp düzenli bir şekilde çalışması gerekmektedir. Bu aşamalardan herhangi birinde bozukluk meydana gelmesi sonucu hipogonadizm oluşmaktadır. Erkekte cinsel farklılaşmanın gerçekleşebilmesi için öncelikle olması gereken kromozomal yapının XY olmasıdır. Kromozom yapısı XY olur ise fetal testisler oluşarak, mülleryan inhibitör faktör (MİF) ve testosteron salgılanması olur. MİF, fütüste iç genital organların kadın lehinde gelişmesine neden olan Müller kanallarının farklılaşmasını inhibe eder. Bu kanalların inhibe olması ile birlikte, erkek iç genital organların gelişimini sağlayan wolf kanalları farklılaşmaya başlayarak, epididimis, vezika seminalis ve sperm kanalları gelişir. Ürogenital sinüs ve genital tüberkülün erkek yönünde farklılaşması ile erkek dış genital organları oluşur. Prostat ve prostatik üretra, ürogenital sinüsün farklılaşmasıyla; penis, penil üretra ve skrotum ise genital tüberkülün farklılaşmasıyla oluşur. Testislerin inguinal kanaldan skrotuma inmesi ve ekstragenital organların daha da büyümesi geç fetal-erken neonatal dönemde meydana gelir ve bunun için HHT aksının aktive olarak testosteron düzeyinin daha da artması gerekmektedir. Testislerin skrotuma inmesi ve ekstragenital organların normal neonatal büyüklüğüne ulaşması ile HHT aksı puberteye kadar baskılanır (2, 3, 9).

Tablo 2.1. Primer ve Sekonder Hipogonadizm Nedenleri

Primer Hipogonadizm Nedenleri	Sekonder Hipogonadizm Nedenleri
Konjenital bozukluklar Kromozomal bozukluklar Klinefelter ve diğer sendromlar Testosteron biyosentetik enzim defektleri Miyotonik distrofi Gelişimsel bozukluklar Prenatal dietilstilbesterol sendromu Kriptorşidizm Akkiz bozukluklar Orşit Kabakulak ve diğer virüsler Granülomatöz (tüberküloz, lepra) İnsan immünyetmezlik virüsü İnfiltratif hastalıklar Cerrahi, travmatik yaralanmalar ve testis torsiyonu Radyoterapi Toksinler İlaçlar Testosteron sentezi inhibitörleri ve antiandrojenler (ketokonazol, simetidin, flutamid, siproteron, spironolakton) Etanol Otoimmün testiküler yetmezlik Diğer organ-spesifik bozukluklarla ilişkili (Addison hastalığı, Hashimoto tiroiditi, insülin-bağımlı diyabet) Sistemik hastalıklar (siroz, kronik böbrek yetmezliği, orak hücreli anemi, akkiz immünyetmezlik sendromu, amiloidoz) Androjen direnç sendromları 5α-redüktaz eksikliği	İDİYOPATİK YA DA KONJENİTAL İzole GnRH eksikliği Anosmi ile (Kallmann sendromu) Diğer anormallikler ile (Prader-Willi sendromu, Laurence-Moon-Biedl sendromu, bazal ensefalosel) Parsiyel GnRH eksikliği Multipl hipotalamik/hipofizer hormon eksikliği Hipofizer hipoplazi ya da aplazi KAZANILMIŞ Travma, cerrahi sonrası, radyoterapi sonrası Neoplastik Hipofiz makro adenomları (prolaktinomalar, diğer fonksiyonel ve non-fonksiyonel tümörler) Kraniyofarınjiyomlar, germinomlar, gliomlar, lösemi, lenfomalar Hipofiz infarktı, karotid anevrizması İnfiltratif ve infeksiyöz hipotalamus ve hipofiz hastalıkları Otoimmün hipofizit Malnütrisyon ve sistemik hastalık Anoreksiya nervoza, kronik açlık, böbrek yetmezliği, karaciğer yetmezliği Ekzojen hormonlar ve ilaçlar Antiandrojenler, östrojenler ve antiöstrojenler, progesteronlar, gluko-kortikoidler, simetidin, spironolakton, digoksin, ilaca bağlı hiperprolaktinemiler (metoklopramid, trankilizanlar, antihipertansifler)

Hipotalamus, hipofizer hormonlar olan FSH, LH ile testis fonksiyonlarını kontrol altında tutar. Nörotransmitterlerin, hem negatif hem de pozitif kontrolü altında hipotalamus gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) salgılayarak, hipofiz bezinden FSH ve LH salınımına yol açar.

GnRH, portal sistem ile ön hipofize gelir. Hipofize ulaşan GnRH, ön hipofizdeki gonadotrop hücrelerden ritmik olarak gonadotropinlerin (LH ve FSH) salgılanmasına neden olur. Gonadotropinlerin her 6 saatte bir 3.8 kez salgılanmaktadır. Gonadotropin salgınma ritminin bozulması halinde normal fizyoloji bozulur. Eğer bu ritm normalden daha sık olursa, serum FSH düzeyi aşırı artarken, LH düzeyi azalır. Ritm normalden daha seyrek olursa serum FSH düzeyi azalırken, LH düzeyi aşırı artar (2, 3, 9).

LH, Leydig hücrelerini uyararak testisten testosteron salgılanmasını sağlar. FSH ise Sertoli hücrelerini uyararak spermatogenezin başlamasını sağlar. Sertoli hücrelerinde spermatogenezin başlayabilmesi için Leydig hücrelerinden salgılanan testosteroon da ihtiyaç vardır (9, 10).

LH ve FSH iki alt üniteden (α ve β) oluşan glikopeptidlerdir. α alt üniteleri ortaktır ve β alt üniteleri özgünlüğünü sağlar. Heterodimer yapı biyolojik aktivite için önemlidir. Alt üniteler serumda saptanabilir ve bazı patolojik durumlarda artabilirler (9).

HHT aksı, negatif ve pozitif feedback sistemi ile kontrol edilmektedir. Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin ile Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron negatif feedback sistemini oluşturur. İnhibin, ön hipofizden FSH salgısını, testosteron ise hipotalamustan GnRH salgısını inhibe eder. İnhibinin LH salgısı üzerine ise herhangi bir etkisi yoktur. Aktivin ise pozitif feedback sisteminde görev alır (2, 3, 11).

Püberte dönemi; seksüel üreme kapasitesinin kazanıldığı dönemdir. Puberte sırasında gözlenen fiziksel değişiklikler; boyun ve ağırlığın hızla artışı, ikincil seks karakterlerinin gelişimi, yağ ve kas dokularının dağılımının ve miktarının erkek tipine değişmesi şeklinde sıralanabilir. Sonuç olarak puberte tamamlandığında birey yetişkin görünümü kazanmış olur. Pubertenin tamamlanması bireyden bireye farklılık gösterir ve başlama yaşı büyük ölçüde genetik faktörlerce belirlenmektedir. Puberteyi etkileyen diğer önemli faktörler ise beslenme ve iklim gibi çevresel

faktörler, etnik özellikler, fiziksel ve ruhsal stresler ile her türlü hastalık durumudur. Pubertenin erken döneminde, özellikle uyku esnasında GnRH ve gonadotropinler (LH ve FSH) ritmik olarak salgılanmaya başlar. FSH ve LH salgısına cevap olarak gonadlardan seks steroidleri sentezlenmeye başlar. Çocukluk çağıının tersine puberte döneminde, hipofizin GnRH'a ve testislerin gonadotropinlere hassasiyeti artarken, hipotalamusun gonadal steroidlere olan hassasiyeti azalır. Bu yüzden hipotalamusun negatif feedback ile baskılanabilmesi için gonadal steroidlerin daha yüksek düzeylere ulaşması gerekir. Sonuç olarak pubertede GnRH, LH, FSH ve gonadal steroid düzeyleri belirgin şekilde artar ve bu dönemde görülen değişiklikler ortaya çıkar (3, 2, 9).

Bu dönemde pubik ve aksiller kıl gelişiminde, kemik epifizlerin kapanmasında ve boy uzamasının hızlanmasında adrenal korteks steroidleri de görev almaktadır (2, 3). Erkek çocuklarda pubertenin ilk fiziksel bulgusu testis hacimlerinin artmasıdır. Testis volümünün 4 mL'nin üzerine çıkması ya da uzun aksının 2,5 cm veya üzerinde olması puberteye girildiğini gösterir. Erkeklerde puberte ortalama 13.3 ± 1.3 yaşında başlar. Daha sonra pubik kıllanma, boyda ve peniste uzama ile devam eder. Pubertenin sonunda fertilité yeteneği kazanılır ve birçok psikolojik ve davranış değişiklikleri ortaya çıkar (2, 3, 9).

2.1.3. Klinik Hikaye ve Fizik Muayene Bulguları

Medikal hikaye; testisin inmesi, pubertal gelişim, traş olma sıklığı, vücut kıllarındaki değişiklikler, var olan veya geçirilmiş sistemik hastalık hikayesi üzerine odaklanmalıdır. Tam seksüel hikaye; libido değişikliklerini, erektile ve ejakulatuar fonksiyonları ve masturbasyon sıklığını, koital aktivite ve fertilitéyi (önceki ve şimdiki partnerleri) içermelidir. Önceki orşitis, sinopulmoner şikayetler, seksüel yolla geçen hastalıklar, genitoüriner enfeksiyonlar ve reproduktif bölgeyi etkileyen önceki cerrahi girişimlerle (örn: vasktomide, prostatektomide, varikosel bağlanması) ilgili bilgiler elde edilmelidir. Sigara ve alkol alımını içeren sosyal anamnez alınmalıdır. Medikasyon ve ilaç anamnezinde hormonal, spermatogenik ve erektile fonksiyonu etkileyen her ilaç sorgulanmalıdır. Bunlar keyif verici ilaçlar, anabolik steroidler, psikiyatrik ilaçlar, antihipertansifler, anti androjenik, sitotoksik ilaçlar ve

alternatif tıp tedavileri, çevresel toksinler ve sıcağa maruz kalma (saunalar ve jakuziler) ve radyasyonu kapsar (9).

Hipogonadizm; cinsel farklılaşma zamanından önce meydana gelirse ambigüus genitale, geç fetal veya erken neonatal dönemde meydana gelirse inmemiş testise ve ekstragenital organların yetersiz gelişimine neden olur. Puberteden önce başlayanlarda ise; testisler skrotuma inmiş ancak volümleri 5 mL'den küçüktür. Penis boyu 3-5 cm'den daha kısadır. Skrotum pigmentasyonunda ve ragat gelişiminde yetersizlik vardır. Prostatın boyutu küçüktür. Androjen eksikliğinden dolayı epifizlerin kapanması gecikmiştir. Bu nedenle iskeletleri önükoidal yapıdadır (2, 9).

Genel fizik muayenede boy ve parmak ucu arasındaki mesafe ölçülmeli, kas kitlesi ile yağ dokusu değerlendirilmelidir. Vücut kıl dağılımı karakteristiği incelenmeli, jinekomasti için meme muayenesi yapılmalıdır. Skrotal içerik incelenmeli, penil uzunluk ve üretral bütünlük ölçülmelidir. Skrotal incelemede orta hat füzyon değerlendirmesi (ör: bifid skrotum, hipospadias), testiküler boyut ölçümü ve kıvamı, var olan intra-testiküler kitleler, epididim anormallikleri, bilateral vas deferens varlığı, varikosel, hidrosel varlığı araştırılmalıdır. Normal testiküler boyut siyah ve beyaz erkeklerde 3.6-5.5 cm uzunluğunda 2.1-3.2 cm genişliğinde ve 15-35 mL hacminde. Asyalı erkeklerde ortalama testis boyutları biraz daha küçüktür. Azalmış testis volümü genellikle azalmış spermatogenik hücre anlamına gelir çünkü testiküler hacmin %80 inden daha fazlasını seminifer tübüller oluşturur (2, 9).

Hipogonad hastalarda epifizlerin kapanması geciktiği için kemik yaşları, kronolojik yaşlarından geridir ve osteoporoz görülür. Erkek tipi saç dökülmesi olmaz, sakal gelişimleri yetersizdir ve yüz görünüşleri kadınsıdır. Pubik ve aksiller bölge başta olmak üzere kıl gelişimi yetersizdir. Hipogonad hastalarda ses yapısı ince olup vücut yağ dağılımı bozuktur, kadın tipi yağ birikimi belirgindir. Kas kitlesinde ve gücünde azalma vardır. Libido azalmıştır ve ereksiyonda yetersizlik vardır. Çoğu kez ejakülasyon yoktur. Hipogonadotropik hipogonadizmde nadir olmakla birlikte jinekomasti görülebilir. Kallmann sendromunda anosmi görülür. Yarı damak ya da dudak gibi yüz anomalileri, ekstremit deformiteleri, sinir tipi sağırılık görülebilen durumlardır (2, 3).

Püberteden sonra ortaya çıkan hipogonadizmde ise; penis boyu normaldir. Testis volümü hafif küçüktür (5-15 mL). Skrotum pigmentasyonu, ragat gelişimi ve prostat volümü normale yakındır. İskelet oranları normaldir fakat sıklıkla osteopenik veya osteoporotiktir. Daha önce normal olan libidoda, ereksiyonda, sakal başta olmak üzere vücut kıllarında, kas kitlesi ve gücünde zamanla yetersizlik ortaya çıkar. Ses yapısı normaldir (2, 3).

2.1.4. Tanı

Anamnez: Libido kaybı, empotans, seksüel disfonksiyon, düşük volümlü ejakülat başta olmak üzere sistematik olarak hasta sorgulanmalıdır. Anosmi, hiposmi, orta hat deformiteleri, kriptorşidizm öyküsü hipogonadotropik hipogonadizm tiplerini akla getirmelidir. Testiküler travma öyküsü, kriptorşidizm, kabakulak orşidi, toksik maddelerle karşı karşıya kalma, radyoterapi ve kemoterapi testiküler yetersizlikle birlikte olabilir. Puberte sonrası başlayan empotans, seksüel disfonksiyon hipotalamik ya da hipofiz kaynaklı patolojileri gösterebilir. Adrenal yetersizlik, hipotiroidizm gibi diğer endokrin patolojiler, baş ağrısı şikâyeti ya da görme alanı bozuklukları nadiren de olsa epileptik ataklar hipofizer tümörler başta olmak üzere santral sinir sistemi ile birlikte olan hastalıkları düşündürür (2, 3, 9).

Fizik Muayene: Hastanın boyu, kilosu, vücut kütle indeksi, kulaç mesafesi, baş-pubis ve pubis-topuk mesafesi ölçümleri yapılmalı, kas ve vücut yağ dağılımı incelenmelidir. Kas kitlesi ve yağ dağılımının erkek tipi olup olmadığı belirlenmelidir. Jinekomasti ve galaktore olup olmadığı değerlendirilmeli, görme ve koku muayenesi yapılmalıdır. Sakal uzaması, aksiler, pubik ve vücut kıl dağılımı dikkatli bir şekilde muayene edilmelidir. Testis boyutlarında muayenenin önemli bir parçasıdır, puberte öncesi 3-4 mL hacminde ve uzunluğu 2 cm'den kısa iken erişkinlerde 20-30 mL hacminde 4.5-6.5 cm uzunluğunda 2.8-3.3 cm genişliğindedir. (2, 3, 9).

Laboratuvar Bulguları: Klinik bulgular gibi laboratuvar bulguları da tablonun derecesine ve süresine göre değişebilir. Başlıca bulgular şunlardır;

- Testosteron (serbest ve total) düşüktür.

- FSH, LH düşüktür (Testosteron seviyesi düşük olduğu halde FSH ve LH yüksekse olay primer testiküler hipogonadizmdir). GnRH eksikliğine bağlı bazı vakalarda (Kalmann sendromunda) LH seviyesi normal olabilir.
- Tabloya yol açan sebebe göre diğer hipofiz hormonlarında da değişiklik (artış veya düşüklük) olabilir
- Uzun süren vakalarda kemik mineral dansitesinde azalma olabilir.

Stimülasyon (dinamik) testleri:

Genellikle klinik tablo ve bazal hormonal incelemelere göre gerek kalmayabilir, ancak şüpheli ve ayırım için gereken vakalarda yapılabilir. Bu amaçla en çok kullanılan testler GnRH stimülasyon testi ve human chorionic gonadotropin (hcG) testidir.

GnRH stimülasyon testi: Olayın hipotalamik veya hipofizer olduğunu anlamak için yapılır. 1000 mg GnRH verildikten sonra 0, 30, 60, 90, 120. dakikalarda FSH ve LH ölçümü için kan alınır. Normalde FSH' da iki kat, LH' da 2-4 (3-6) kat artış olması gerekir. Eğer olay hipofizerse hiçbirinde artış olmazken, hipotalamik kökenli olaylarda artış olur. Nadiren izole FSH eksikliği olan bazı vakalarda (Kalmann sendromu gibi) LH' da da artış olmaz.

hcG stimülasyon testi: Şüpheli vakalarda en çok başvurulanan testtir. Değişik şekillerde (ve dozlarda) uygulanır. Genellikle 1000ü-2000ü hcG (LH) intramüsküler olarak uygulanır, 4 ve 5. günler total testosteron (t-Tes) ve serbest testosteron (s-Tes) için kan alınır, bazale göre % 100' den fazla artış olursa hipofiz gonad aksının sağlam olduğuna ve olayın hipofizde olduğuna karar verilir (2, 9).

2.1.5. TEDAVİ

Tedavinin hedefi olayın başlangıç zamanına, hastanın çocuk isteyip istememesine ve çocuk isteğinin zamanına göre değişir. Buna göre üç şekilde tedavi ihtimali mevcuttur.

a) Puberte Sonrası Başlayan ve Hastanın Çocuk İsteğinin Olmadığı Vakalar:

Bu hastalarda sadece testosteron replasman tedavisi yapmak yeterlidir. Ancak şu andaki mevcut imkanlara göre istenilen bir testosteron preparatının olduğu söylenemez (etki süresi, dozu, yan etki profili, homojenizasyonu, uygulama şekli).

Burada tedavinin amacı normal virilizasyonun devamını sağlamak, testosteron eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkabilecek komplikasyonları önlemektir. Yapılacak testosteron replasman tedavisinde en uzun etkili preparatı kullanmak uygundur. Tedavide en çok kullanılanlar enantat, spionat ve undekanoat gibi testosteron esterleridir. İntramusküler olarak 2-3 haftada bir uygulanır. Doz süresi hastaya göre ayarlanabilir. İntramusküler preparatlar dışında en çok kullanılanlar transdermal patch'lerdir (Testoderm, Androderm gibi). Bunların en büyük yan etkileri allerjik reaksiyonlardır. Oral preparatlar hem kullanım zorluğu hem de yan etkiler açısından pek tercih edilmez.

Gerek intramusküler enjeksiyonlarla uygulamada gerekse günlük patch'lerle yapılan testosteron replasman tedavisinde testosteron seviyesi enjeksiyonların ortasındaki günlerde veya günlük ölçümlerle kontrol edilmelidir. Testosteron replasman tedavisi yapılırken özellikle 40 yaş üstündeki hastalarda prostat hipertrofisi, prostat kanseri ve kardiyak etkiler gibi durumlar dikkate alınmalıdır (2, 3, 9).

b) Erişkinde Puberte Sonrası Başlayan ve Hastanın Çocuk İsteğinin Olduğu Durumlarda Tedavi:

Sekonder seks karakterleri ve seksüel gelişim normal olduğundan hedef hormonogenezin ve spermatogenezin sağlanması-sürdürülmesidir. Bu amaçla haftada üç gün (aralıklı) LH (hcG) tedavisi (1000Ü-5000Ü) ve haftada üç gün human menapozal gonadotropin FSH tedavisi (75Ü-150Ü) uygulanır. 2-2.5 aylık kontrollerle hormonogenez ve spermatogenez kontrol edilerek fertilité kabiliyeti takip edilir. Eşinin hamileliği gerçekleştiğinde yukarıda bahsedilen testosteron replasman tedavisine geçilir.

Hipotalamik vakalarda LH ve FSH tedavisine cevap vermeyen vakalarda pulsatil GnRH tedavisi de uygulanabilir. Her iki saatte bir GnRH verilerek de yapılan tedavide doz vakalara göre ayarlanmalıdır (Her bolusta 50-500 ng/kg gibi). Bu tedavi hipofizer kökenli vakalarda etkisizdir (uygulanamaz-uygulanmamalıdır) (2, 9).

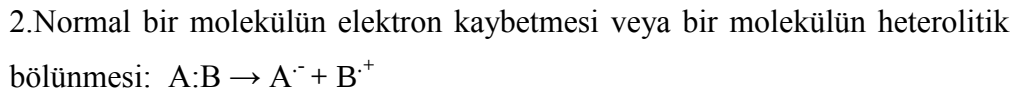
c) Erişkin Yaşta Olup Puberte Oluşmamış Sekonder Hipogonadotropik Hipogonadizmde Tedavi:

Tedavide amaç öncelikli sekonder seks karakterleri gelişimini sağlamak (hormonogenez) daha sonra spermatogenezi oluşturmaktır. Bu amaçla tedaviye hastanın yaşı da dikkate alınarak 1000ü-2000ü hcG tedavisiyle (haftada üç gün) başlanır. 2-3 aylık aralıklarla serum testosteron seviyesi kontrol edilir, yeterli seviyeye gelmezse doz arttırılarak tedaviye devam edilir. Yeterli testosteron konsantrasyonu (ve/veya testisler en az 8 mL'ye ulaşmışsa) sağlanırsa tedaviye menopozal gonadotropin (FSH:75 ü, haftada üç gün) eklenir. 4-6 aylık aralıklarla sperm sayısı kontrol edilir ve yeterli seviyede değilse 150 ü (haftada üç gün) dozu çıkılır. Bu tedaviyle genellikle 6-12 ayda spermatogenez sağlanır. Tedavinin başlangıcından spermatogeneze kadar geçen süre genellikle 2 yıldır. Ancak bir yılda da sonuç alınabilir. Spermatogenez sağlandıktan sonra hasta çocuk istiyorsa eşi hamile kalana kadar tedaviye devam edilir. Eğer çocuk isteği yoksa tedavi testosteron replasmanı ile sürdürülür (2, 3, 9).

2.2. SERBEST RADİKALLER

Serbest radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla çiftleşmemiş elektrona sahip, kısa ömürlü, kararsız, düşük molekül ağırlıklı, reaktif etkinliği çok fazla olan atom veya moleküllerdir (12). Yapılarının kararsız olması nedeniyle çok reaktif olan radikaller; amino asitler, proteinler, serbest yağ asitleri, lipidler, karbohidratlar ve nükleotidler gibi tüm hücre bileşenleriyle etkileşime girebilmektedirler (13, 14).

Serbest radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar (15):



Serbest radikaller; organizmalarda normal metabolik aktivite sırasında oluşabildikleri gibi organizmanın radyasyon, hava kirliliği, sigara dumanı, ilaç gibi dış etkenlere maruz kalması sonucunda oluşabilir (15).

İki tane eşleşmemiş elektrona sahip olan moleküler oksijen (O_2) ve triplet oksijen (3O_2), organizmalarda en fazla bulunan radikallerdir (15). Radikaller moleküler

oksijenden türeyebildiği gibi; karbon, nitrojen ve kükürt kaynaklıda oluşabilmektedir. Serbest radikallerle elektron alışverişi yapan veya zincirleme reaksiyonlara katılan birçok biyomolekül de yeni radikal oluşumuna yol açabilmektedir (14).

2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri (SOR)

Normal şartlarda kararlı, kokusuz, renksiz, tatsız, sudaki çözünürlüğü sınırlı olan oksijen, insan hayatı için hem gerekli hem de toksik olan bir moleküldür. Bir çok metabolik olayda terminal elektron akseptörü olarak görev yapar. Serbest radikallerin temel kaynağı moleküler oksijendir. SOR terimi, oksijenin radikal olan ve olmayan tüm türevlerini kapsayacak şekilde kullanılmaktadır. Oksijen molekülü reaktif olmamasına rağmen diğer radikallerle reaksiyona girme özelliğine sahiptir. Moleküler oksijenin indirgenmesi sonucunda süperoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türleri oluşur. Serbest oksijen radikalleri endojen olarak vücutta sentezlenen metabolik yan ürünlerdir. Vücutta normal veya patolojik olarak serbest radikaller üretilir. Tablo 2.2.'de biyolojik önemi olan bazı serbest oksijen radikalleri gösterilmiştir. Bu ürünler hemen sentez edildikleri yerde detoksifiye edilmezler ise zararlı etkilerini oluştururlar (12).

Tablo 2.2. Biyolojik Önemi Olan Bazı Serbest Radikaller

Radikaller	Non- radikaller
Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)
Hidroksil radikali ($OH^{\cdot-}$)	Hipokloröz asit ($HOCl$)
Peroksil radikali (RO_2)	Ozon (O_3)
Alkoksil radikali (RO)	Singlet oksijen (O)
Hidroperoksit radikali (HO_2)	Peroksinitrit ($ONOO$)
Nitrik oksit radikali (NO)	Hidroperoksid ($L(R)OOH$)
Organik radikaller ($R^{\cdot}$)	Azot dioksit (NO_2)
Hemoproteine bağlı radikaller	Hipohalöz asid (HOX)

Serbest radikal oluşumu lipid peroksidasyonu ile başlar ve zar yapısında yer alan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonuna neden olur (16). Lipid peroksidasyonuna bağlı olarak organellerde fonksiyon bozukluğu oluşur, lizozomal fragilite artışı ile

mikrozomal enzimlerde değişiklikler oluşur ve sonuçta hücre ölümü gerçekleşir. Serbest oksijen radikalleri özellikle hücre zarında hasara yol açarak lipid geçirgenliğini artırır ve lipoproteinlerin kana geçişine neden olur. Bu durum monosit ve makrofajların damar duvarına geçişini arttırarak aterogenezi hızlandırır. Serbest oksijen radikalleri damar düz kas hücrelerinin büyüme ve çoğalmasını uyarır, kovalent bağları etkileyerek protein, nükleik asit ve lipidlerin yapı ve fonksiyonlarını bozmaktadır (15).

Serbest radikal etkisine karşı proteinler, çoklu doymamış yağ asitlerinden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Metiyonin, sistein gibi tiyol grubu içeren amino asitler ile triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi aromatik amino asitler oksidasyona en fazla derecede maruz kalmaktadırlar. Oksidasyon sonucu proteinlerin sekonder ve tersiyer yapılarında oluşan değişiklikler fonksiyonlarını etkilemektedir. Enzim veya reseptör olan membran proteinleri, özellikle serbest radikallerin modifikasyonuna duyarlı oldukları için önemli hücresel fonksiyonlarını kaybetmektedirler (17).

Proteinlerin tiyol gruplarının oksidasyonu, enzim fonksiyonundaki kayıplara, membran iyon ve metabolit transportunda aksamalara ve kontraktıl fonksiyonlarda bozulmalara neden olmaktadır (18).

Serbest oksijen radikalleri hücrede saldırdığı bir diğer önemli makromolekül nükleik asitlerdir. Serbest oksijen radikalleri etkilerini deoksiribonükleik asitin (DNA) temel taşı olan nükleotidin yapısı içinde yer alan pürin ve pirimidin bazları üzerinde gösterirler. Serbest radikaller, DNA çift sarmalının ayrılmasına, sarmal içinde çapraz bağlanmalara veya nükleik asit baz değişimlerine neden olabilir. Bu da kromozal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır (19).

Radikaller aracılığı ile özellikle guanin bazının hidroksilasyonu sonucunda DNA molekülünün yapısı değişmekte ve mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (20). DNA'nın yarılması, DNA-protein çapraz bağları, purinlerin otooksidasyonu gibi bazı durumlar reaktif oksijen türlerinin özellikle de hidroksil radikalının neden olduğu hasarlardır (21). Ayrıca aktive olmuş nötrofillerden kaynaklanan hidrojen peroksit, membrandan geçerek hücre çekirdeğinde hasarlara yol açabilmektedir (15). Tablo 2.3.'de serbest radikallerin etkilediği moleküller ve sonuçları özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Serbest Radikallerin Etkilediği Moleküller ve Sonuçları

Etkilenen bileşik	Sonuçlar
Doymamış amino asitler ve kükürt içeren amino asitler	Protein denatürasyonu Çapraz bağlanma Enzim inhibisyonu Hücre geçirgenliğinde değişimler
Nükleik asit bazları	Hücre gelişiminde değişimler Mutasyon
Karbohidratlar	Hücre yüzey reseptörlerinde değişim
Doymamış lipidler	Kolesterol ve yağ asitlerinin oksidasyonu
Kofaktörler	Nikotinamid ve flavin içeren kofaktörlerin aktifliğinde azalma Askorbat ve porfirin oksidasyonu
Antioksidanlar	α -tokoferol ve β -karoten gibi antioksidanların aktifliğinin azalması
Proteinler	Denatürasyon Peptit zincirinde kırılmalar
DNA	Baz modifikasyonları Zincirde kırılmalar
Hyalüronik asit	Sinovyal sıvının viskozitesinde değişim

2.3. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ

Çeşitli kaynaklardan gelen serbest radikallere maruz kalma, organizmanın birçok savunma mekanizmalarını geliştirmesine yol açmıştır. Bu mekanizmalar “antioksidan savunma sistemleri” ya da kısaca “antioksidanlar” olarak bilinirler. Normal şartlar altında hücre içi serbest radikallerin seviyeleri ile antioksidanların aktiviteleri arasında bir denge vardır. Bu denge, organizmaların yaşaması ve sağlığı için gereklidir. Bu dengenin serbest radikallerin lehine bozulması oksidatif stresle sonuçlanmaktadır (12, 22). Antioksidanların ilk belirlenen etkileri membranların yapısında bulunan lipidlerin peroksidasyona karşı korunması olmuştur. Günümüzde

ise, antioksidanların koruyucu etkilerinin lipidlerin yanı sıra proteinleri, nükleik asitleri ve karbonhidratları da kapsadığı gösterilmiştir. Böylece, antioksidanlar hedef moleküllerdeki oksidan hasarı engelleyen veya geciktiren maddeler olarak tanımlanmıştır ve bu tanımla bağlantılı olarak antioksidanların etkileri farklı şekillerde olabilmektedir. Antioksidan maddeler, aktif oksijen oluşumunu engelleyerek ya da oluşan aktif oksijenleri tutarak, oksidasyonun teşvik etmiş olduğu zararlanmaları hücresel bazda engellemekte ve dejeneratif hastalıkların oluşumunu durdurmaktadır (12, 22).

Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler;

1- Serbest radikal oluşumunun engellenmesi

- a- Başlatıcı reaktif türevleri uzaklaştırarak
- b- Oksijeni uzaklaştırarak veya konsantrasyonunu azaltarak
- c- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırarak

2- Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi

a- Toplayıcı etki: SOR'lerini etkileyerek onları tutmaya ve daha az reaktif başka moleküllere çevirmeye yönelik etki (enzimler).

b- Bastırıcı etki: SOR'leri ile etkileşip onlara bir proton ekleyerek aktivite kaybına neden olan etki (flavinoidler, vitaminler).

c- Onarıcı etki

d- Zincir kırıcı etki: SOR'lerini ve zincirleme reaksiyon başlatacak olan diğer maddeleri kendilerine bağlayıp reaksiyon zincirini kırarak fonksiyonlarını önleyici etki (hemoglobin, seroplazmin, mineraller, vitaminler).

Antioksidanlar yapılarına göre enzimatik yapıda olanlar ve enzimatik yapıda olmayanlar şeklinde gruplandırılabilir (Tablo 2.4.), hücre lokalizasyonlarına göre de intraselüler antioksidanlar, ekstraselüler antioksidanlar ve membran antioksidanları olarak gruplandırılabilir (23).

Tablo 2.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Süpürücü Antioksidanlar	Enzimatik Antioksidanlar	Sentetik Antioksidanlar	Koruyucu Antioksidanlar
Askorbik asit Alfa-tokoferol Tiyol Beta-karoten Ürik asit Flavonoidler Ko-enzim Q	Katalaz (Cat) Paraoksonaz (PON) Süperoksit dismutaz (SOD) Glutasyon peroksidaz(GSH-Px)	N-asetilsistein Allopurinol Probukol Penisilamin Deferoksamin Butil Hidroksitoluen	Transferrin Albümin Serüloplazmin Ferritin

2.4. OKSİDATİF STRES VE OKSİDATİF STRESİ GÖSTEREN BAZI PARAMETRELER

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde olup ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. “Oksidatif stres” olarak adlandırılan bu durum özetle: serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır.

Serbest oksijen radikalleri belirli düzeyi aşarsa veya antioksidanlar yetersiz kalırsa denge radikaller lehine bozulur ve ateroskleroz, kronik böbrek yetmezliği, diyabet, respiratuvar distres sendromu, romatoid artrit, sepsis ve alzheimer hastalığı gibi birçok patolojik durum meydana gelir (23). Serbest radikaller insanlarda elliden fazla hastalığın patolojisi ile ilişkilendirilmektedir.

Oksidatif stresle oluşan başlıca doku hasarları aşağıdaki gibi sıralanabilir:

- Protein oksidasyonu
- Lipid peroksidasyonu, membran fonksiyonlarının bozulması

- DNA yapısının bozulması (8-hidroksideoksiguanozin (8-OHdG) oluşumu ya da zincirin kırılması)

Oksidatif stresin gösterilmesinde doku hasarı sonucu ortaya çıkan protein, lipid ve nükleik asit gibi biyomoleküllerin oksidatif ürünlerine yönelik testler kullanılmaktadır.

2.4.1. Proteinlerin İleri Oksidasyon Ürünleri (AOPP)

Proteinler serbest oksijen radikallerine maruz bırakıldıklarında birçok kovalent değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerden bazıları serbest radikallerin protein molekülleri üzerine direkt etkileri sonucu oluşabildiği gibi, bazıları da oksidasyon yan ürünlerinin proteinlere kovalent olarak bağlanması ile meydana gelir (24, 25). Proteinlerin radikal aracılı hasarı; elektron kaybı, metal-iyon katalizli reaksiyonlar, lipid ve şekerlerin otooksidasyonu ile başlatılabilmektedir.

SOR'un proteinler üzerinde oluşturduğu oksidatif hasar, dört farklı şekilde gerçekleşebilir (26):

- Protein iskeletinin oksidasyonu
- Peptid bağlarının kırılması
- Amino asit yan zincirlerinin oksidasyonu
- Kovalent çapraz bağlanma reaksiyonları

Oksidatif hasar gören proteinlerin onarımı mümkün olmadığından, endojen proteazlar tarafından proteolitik yolla yıkılmaları gerekir. Ancak oksidatif hasarın derecesi, proteinlerin metabolik sonlarını belirlemekte ve kısmi oksidasyon, proteinlerin hidrofilik özelliğini artırırken; ileri derecede oksidasyon, proteinlere hidrofobik özellik kazandırmaktadır. Bu nedenle, kısmen denature ya da hafif derecede okside olan proteinler, proteolitik atağa karşı daha duyarlı; ileri derecede okside olanlar ise daha dirençlidirler (26). Protein oksidasyonunun saptanmasında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), izotop dilüsyon gaz kromatografisi-kütle spektrofotometrisi, Western blot ve spektrofotometri teknikleri kullanılmaktadır (27).

AOPP, ilk kez Witko-Sarsat ve ark (28) tarafından 1996'da kronik üremik hastaların plazmasında tanımlanmıştır. Protein oksidasyonunun son çapraz bağlanma ürünleri olarak kabul edilmekte ve bir oksidatif stres parametresi olarak kullanılabileceği öne sürülmektedir (29). Diğer taraftan yapısal olarak ileri glikasyon son ürünlerine

benzediği, yüksek oranda disülfid köprüleri ve tirozin çapraz bağlanmalarını içeren albümin agregatlarından oluştuğu, kendi klirensini de önleyebilen yüksek bir molekül ağırlığına sahip olduğu bilinmektedir (28, 29).

AOPP, klorlu oksidanların proteinlerle ileri reaksiyonu sonucu oluşan bir üründür. Klorlu oksidanların başlıca kaynağı da, miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesine sahip fagositik hücrelerdir. Çünkü MPO organizmada, *in vivo* klorlu oksidan üretebilen tek enzimdir (30, 31).

Fagositik hücreler tarafından oluşturulan hipokloröz asit (HOCl), SOR türleri içerisinde, en reaktif ve en toksik olan ajandır. Başlıca hedefi, membran proteinleri ve özellikle onların tiyol grupları olan HOCl; kloraminleri oluşturmak üzere endojen aminler ile reaksiyona girmekte ve kloraminlerle okside olan proteinler üzerinde AOPP oluşmaktadır (30).

AOPP, protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir belirteçdir. Witko-Sarsat ve ark (32) tarafından yapılan çalışmada, AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği, fakat lipid peroksidasyon markeri olan tiyobarbütirik asit (TBA) ile reaksiyonlaşan maddelerle korelasyon göstermediği bildirilmiştir. Üremik hastalarda, dolaşımdaki nötrofil sayısı ve monosit aktivasyonunun bir göstergesi olan neopterin düzeyleri ile plazma AOPP düzeyleri arasında, pozitif ilişki bulunması, AOPP'nin monosit aktivasyonu ile oluştuğunu göstermektedir (33, 34). Diğer taraftan AOPP'nin bizzat mononükleer fagositleri aktive ederek proinflamatuvar mediatör gibi davrandıkları da iddia edilmiştir (33).

2.4.2. Serbest Tiyol Grupları

Tiyol terimi kükürt grubu içeren bileşikleri ifade etmektedir. Plazmada en çok bulunan protein olan albüminin yapısında 34. konumda bulunan sisteil artığı, plazmanın başlıca serbest tiyol grubunu oluşturur ve plazmada bulunan başlıca ekstrasellüler antioksidandır (35). İntrasellüler ortamın başlıca antioksidanlarından olan katalaz (Cat), süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri plazmada nispeten düşüktür (36). Plazma antioksidanları arasında, vitamin E, serüloplazmin, transferin de yer almasına rağmen en yüksek

konsantrasyona sahip olan tiyol gruplarıdır ve bunun nedeni de protein düzeylerinin yüksek olmasıyla açıklanmaktadır (36, 37). Tiyol bileşiklerinin seçici olarak HOCl ve kloraminleri yakaladığı bilinmektedir. Bu nedenle plazmada HOCl'yi yakalayan en önemli antioksidanın tiyol olduğu söylenebilir (38).

Serbest tiyol grupları, çeşitli oksidanları indirgeyerek ve temizleyerek biyolojik sistemleri oksidatif strese karşı korurlar. Pek çok proteinin yapısında bulunan sistein grubunun oksidatif atağa uğraması sonucu disülfid bağları oluşabilmektedir (35). Tiyol gruplarının disüfidlere ve diğer oksitlenmiş türevlere dönüşümü, radikal aracılı oksidatif protein hasarının en erken gözlenebilen belirtisidir (39, 40). Proteinlerdeki tiyol grupları antioksidan özelliklerini, peroksidasyonu başlatan oksidanları tutarak gösterir (30). Tiyol grubu oksidasyonu, aynı zamanda protein oksidasyonunun göstergesi olarak da düşünülebilir. Albüminin sisteinilasyonu veya nitrozilasyonu, albüminin oksidan tamponlama kapasitesini önemli ölçüde düşürmektedir (35).

Serbest tiyol grubu içeren bileşikler, radikallerle direkt veya indirekt reaksiyona girerek ya da protein üzerindeki serbest tiyol gruplarıyla reversibl bağlar oluşturarak, proteinlerin oksidatif hasara uğramalarını önleyebilmektedirler. Tiyol gruplarının oksiasitler gibi diğer okside türlere ya da disüfidlere dönüşmesi; proteinlerin radikal aracılı oksidasyonu sırasında, en önce gözlenen olaylardan biridir. Protein yapısındaki amino asitlerin çoğu, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında, küçük değişiklikler geçirirken; tiyol grupları tüketilmekte ve protein üzerinde sülfid türevleri oluşmakta; böylece proteinde yapısal değişiklikler meydana gelmektedir (39, 41).

Tiyol gruplarının oksiasitler gibi diğer okside türlere ya da disüfidlere dönüşmesi; proteinlerin radikal aracılı oksidasyonu sırasında, en önce gözlenen olaylardan birisi olduğundan ve plazmada total peroksi radikal yakalama sürecinde ilk olarak tiyoller tüketildiğinden (37); plazma tiyol düzeylerinin tayini, proteinlerin SOR aracılı oksidasyondan ne denli etkilendiklerini göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Protein yapısındaki amino asitlerin çoğu, H_2O_2 varlığında, küçük değişiklikler geçirirken; tiyol grupları tüketilmekte ve protein üzerinde sülfid türevleri oluşmakta; böylece proteinde yapısal değişiklikler meydana gelmektedir (39).

2.4.3. Nitrik Oksit (NO)

Bir sinyal molekülü olarak keşfedildiği ilk yıllarda “endotel kaynaklı gevşetici faktör” adını alan NO; iki atom içeren dış yörüngesinde çiftleşmemiş elektron taşıması nedeniyle serbest radikal özelliği taşıyan gaz yapısında oldukça reaktif bir maddedir (42). Reaktivitesi pek çok radikalden düşüktür. Biyolojik sistemlerde çok kararsız olup, yarı ömrünün 30 saniyeden az olduğu bildirilmektedir. Kolaylıkla nitrit (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) oksitlenebilir. Yüksüz ve lipofilik olan NO, bütün biyolojik zarları geçme yetisine sahiptir. Bu özelliği ile parakrin hormon aktivitesine sahiptir (43, 44). Memelilerde NO’nın varlığı ilk kez 1916 yılında gösterilmiş, 1980 yılında Furchgott ve Zawavadzki tarafından “endotel kaynaklı gevşetici faktör” (EDRF) olarak tanımlanmış, sonradan EDRF’nin NO olduğu gösterilmiştir. 1985 yılında ise aktive olmuş makrofajların NO saldıgı bulunmuştur. Nitrik oksit, nitrik oksit sentaz (NOS) olarak adlandırılan enzimlerce başlıca damar endotel hücresinde, L-arjinin’in L-sitrüllin’e oksidasyonu sırasında üretilmektedir (45). Nitrik oksit; nöronlar, makrofajlar ve endotelial hücreler gibi birçok değişik hücreden sentezlenebildiği için nöronal, indüklenebilir ve endotelial NOS olarak üç izoenzim formu tanımlanmıştır (46). NO sentezinin, insanda vasküler tonüsün düzenlenmesinde önemli rol oynadığı, kan basıncı ve böbrek fonksiyonunun kontrolünde kesin bir role sahip olduğu bilinmektedir (47, 48). Trombosit agregasyonu, monosit adezyonu ve düz kas hücre proliferasyonunu inhibe etmesi ve antioksidan özelliklerinden dolayı; endojen antiaterojenik molekül olarak da adlandırılmaktadır (B8). NO’nın DNA hasarını arttırıcı etkisi vardır. Ayrıca NO’nın demirsülfür içeren enzimlerin fonksiyonunu değiştirdiği, mitokondrial solunumu bozucu zararlı etkiler gösterdiği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (49, 50).

NO, vasküler endotelial hücrelerde oluşturulan önemli bir vazodilatatördür Nitrik oksit pek çok biyolojik etkisini guanilat siklaz/siklik guanozin monofosfat (cGMP) sistemi aracılığı ile gösterir. NO düz kas hücrelerine girer ve 3',5'-siklik GMP (cGMP) oluşturmak üzere solubl guanilat siklazı stimüle eder. Böylece hücrede cGMP konsantrasyonu artar. Düz kas hücrelerinde cGMP, bir veya daha fazla protein kinazı siklik adenosin monofosfat (cAMP) gibi aktive eder. Aktive olan protein kinazlar düz kasın relaksasyonu ve ardından damarların dilatasyonundan

sorumludurlar. Peniste de NO etkisi ile kavernöz doku düz kasları gevşemekte, damarlar dilate olmakta ve ereksiyon sağlanmaktadır. Son zamanlarda nöronal NOS'un (nNOS) testise spesifik bir özel alt grubu olan testiküler nNOS (TnNOS) tespit edilmiştir. TnNOS'un; NO oluşumu için önemli bir etken olduğu ileri sürülmektedir. TnNOS sadece testisin Leydig hücrelerinde lokalize bulunmuştur ve steroidogeneizde etkin rol oynadığı düşünülmektedir (51).

2.4.4. 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG)

Serbest oksijen radikallerinin DNA'da yaptığı 20'nin üzerindeki oksidatif baz hasar ürününden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en yüksek olanı 8-OHdG'dir (52).

Guanin, DNA yapısındaki en düşük iyonizasyon özelliğine sahip molekül olarak serbest radikal etkilerine en açık ve oksidasyona en yatkın olanıdır (53). Guaninin 8. karbon atomuna hidroksil radikalının bağlanması sonucu, modifiye bir baz olan 8-OHdG oluşur. Bu ürün, normal oksidatif metabolizma sırasında üretilen endojen veya ekzojen kaynaklı SOR tarafından DNA'da oluşan bir mutajendir (53).

Serbest oksijen radikalleri direkt veya indirekt mekanizmalarla DNA hasarına neden olabilir. DNA hasarı, baz değişiklikleri, tek ve çift zincir kırılmaları veya kromozomal ayrılmalar şeklinde gerçekleşmektedir. Oksidatif DNA hasarının mutajenez, karsinogenez, yaşlanma, diyabet, karaciğer hastalıklarının gelişiminde önemli rolü olduğu ileri sürülmektedir (54). DNA hasarına neden olan radikal oluşum mekanizmaları şunlardır:

- İyonize radyasyona maruz kalma, yüksek oksijen konsantrasyonu, aktive fagositik hücreler, redoks döngü kimyasalları, sigara dumanı veya ozona maruziyet.
- H₂O₂, peroksinitrit, nitroz asit ve organik hidroperoksitlerin artışı. Otooksidasyon kimyasallarına maruz kalma (dihidroksifumarat, dopamin, L- dopa, noradrenalin, adrenalin).
- Ksantin oksidaz substratları olan ksantin veya hipoksantine maruziyet.
- Tümör nekroz faktör (TNF α) (55).

8-OHdG, DNA replikasyonu sırasında G-C'den A-T'ye dönüşüme neden olduğundan mutasyon eğilimini artırır. Bu bileşiğin DNA'yı tamir edici enzimler tarafından ortadan kaldırılması da yeni hatalara sebep olur (53). SOR üretimini arttıran tüm etkenler oksidatif DNA hasarlanmasını da arttırabilmektedir. Oksijen tüketiminin en yüksek olduğu dokularda 8-OHdG düzeyinin de doğrusal biçimde arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle 8-OHdG ölçümü, DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilmekte ve oksidatif DNA hasarını belirlemek için kullanılan en yaygın yöntemdir (53).

Normal şartlarda, insan dokularındaki 8-OHdG ve diğer okside baz oluşumu ile bunların onarım hızı, kişiden kişiye değişmekle birlikte, neredeyse birbirine eşittir. İnsan DNA'sında oluşan lezyonların yarı ömrü 8-60 dakika olup pirimidin lezyonlarının tamir süresi daha kısadır (56). Yaşa bağlı olarak bu yarılanma ömründe artış gözlenir. Bunun en muhtemel nedeni antioksidan enzim aktivitelerindeki azalmayla birlikte tamir mekanizmalarındaki yetersizliktir. Antioksidan mekanizmaların yetersiz kaldığı ya da bu moleküllerin oluşumunu hızlandıran oksidatif stres nedenlerinin ağır bastığı durumlarda onarılamayacak çoklukta okside baz oluşur ve bunlar bozulmuş DNA ürünlerine neden olarak hastalık sürecine katkıda bulunur (57).

Yaşa bağlı olarak, özellikle bağırsak, karaciğer ve böbrek dokusundaki DNA 8-OHdG düzeyinde artış görülür. Bu durumun yaşla birlikte artan; tümör, dejeneratif hasarlanma tipleri ve organ fonksiyon kapasitelerinde azalma gibi sorunlarla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Oksijen radikali üreten etkenlerin ve kanserojen maddelerin (benzen, aflatoksin), in vitro veya in vivo ortamda, deoksiguanozinden 8-OHdG oluşumunu hızlandırabildiği gösterilmiştir (58) .

İlk kez 1986 yılında okside olmuş DNA ürünleri düzeyi ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Günümüzde hücre, doku, kan, idrar ve diğer vücut sıvılarında 8-OHdG veya diğer okside DNA bazı düzeyi ölçen bir çok yöntem geliştirilmiştir. Oksidatif DNA baz hasarının ölçümü ya idrar ile atılan DNA onarım ürünleri ölçülerek saptanır ya da doğrudan baz hasarı analizlenir. Oksidatif hasar ürünleri arasında en sık ölçüm yapılan parametre 8-OHdG'dir. Genellikle 8-OHdG'yi tanıyan antikoları içeren kolonlarda idrar konsantre edildikten sonra HPLC ile ölçülür (59).

İdrardaki 8-OHdG miktarı diyetten etkilenmez. Nükleozidin polar şeker komponenti bağırsaklardan absorpsiyonu engeller.

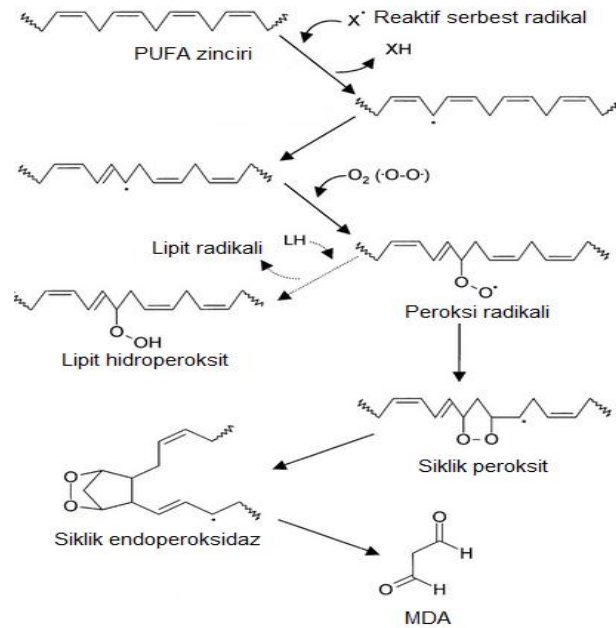
8-OHdG insanlarda başka ürünlere metabolize olup olmadığı tartışmalıdır. İdrar ile atılan 8-OHdG'nin bir kısmı ya da tamamı DNA'dan değil dGTP havuzundan da kaynaklanabilir (60).

2.4.5. Malondialdehid (MDA)

Serbest radikallerin hücre zarlarındaki yağ asitleri ile reaksiyona girerek sonuçta zar bütünlüğünün bozulması ile sonuçlanan reaksiyon dizisine lipid peroksidasyonu denir. Membrandaki kolesterol ve yağ asitlerinin doymamış bağları, serbest radikaller ile kolaylıkla reaksiyona girerek peroksidasyon ürünlerini oluşturabilir (61). Bir hücrede lipid hidroperoksitlerinin birikimi, fonksiyon bozukluğuna yol açabileceği gibi yüksek miktarda sitotoksik ürünler de oluşturabilir. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan en sitotoksik ürün aldehidlerdir. Bunlardan biri olan MDA, lipid peroksitlerin enzimatik olmayan oksidatif dekompozisyonu sonucu oluşur. MDA'nın asıl kaynakları üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu veya eikosonoid sentezinde serbestleşen siklik hidroperoksitlerdir. MDA, hücre membranının deformasyonuna, iyon geçişinin ve enzimatik fonksiyonların bozulmasına neden olur. Hücre zarlarından kolayca geçebileceği için hücre içindeki protein sentezini, enzimatik olayları ve DNA yapısını da olumsuz yönde etkilemektedir. MDA bu özelliklerinden dolayı mutajenik, genotoksik ve karsinojenik bir bileşiktir ve oksidan hasarı değerlendirmede sıklıkla kullanılır. MDA lipid peroksidasyonunun şiddetiyle orantılı olarak artar (62, 63).

Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler ve hücresel bileşenlere en çok zarar veren reaksiyonlardan biridir (Şekil 2.1.). Lipid peroksidasyon olayı üç aşamalı olarak meydana gelir. Tepkimenin ilk basamağı temel olayların meydana geldiği başlangıç aşamasıdır. Lipid peroksidasyonu, bir serbest radikalın, doymamış yağ asidinin metilen grubundan, bir hidrojen atomu koparmasıyla başlamaktadır. Kopartılan hidrojen atomu geride eşleşmemiş elektron taşıyan bir lipid radikali bırakır. Doymamış yağ asitlerinden oluşan karbon merkezli radikaller, bir moleküler düzenlenme ile konjuge dien yapısını oluşturur. Bu konjuge dien, fizyolojik koşullarda oksijen ile birleşmeye eğilimli olduğundan oksijen ile

reaksiyona girerek okside olur ve peroksil radikalini oluşturur (63). Tepkimenin ikinci basamağı ilerleme aşamasıdır. Peroksil radikali diğer lipid moleküllerinden hidrojen koparırsa kendisi lipid hidroperokside dönüşür. Peroksil radikalleri birbirleriyle birleşebilir ya da proteinlere saldırabilir. Bu radikaller, komşu yağ asit zincirlerinden bir hidrojen atomu çıkarmak suretiyle zincir reaksiyonunun ilerlemesine neden olabilirler (63). Tepkimenin üçüncü basamağı sonlanma aşamasıdır. İki lipid peroksil radikali biraraya gelerek zincirleme reaksiyonu sonlandırabilir. Bir lipid peroksil radikali ile bir lipid radikali bir araya gelirse eşleşmemiş elektron kalmayacağından dolayı bu zincirsel reaksiyonlar sonlanmış olur. Bununla birlikte, ilerleme reaksiyonları zincir reaksiyonlarını kıran bir antioksidan tarafından lipid perokside bir hidrojen atomu verilmesi ile de sonlandırılabilir (63).



Şekil 2.1. Lipid Peroksidasyonu ile MDA Oluşumu

Lipid radikallerinin hidrofobik yapıda olması nedeniyle reaksiyonların çoğu membrana bağlı moleküllerle meydana gelir. Membran permeabilitesini ve mikrovizkositesini ciddi şekilde etkiler. Peroksidasyonla oluşan MDA, membran komponentlerinin çapraz bağlanma ve polimerizasyonuna neden olur. Bu da

deformasyon, iyon transportu, enzim aktivitesi ve hücre yüzey bileşenlerinin agregasyonu gibi membran özelliklerini değiştirir. Diğer taraftan MDA, difüzyon sonucu DNA'nın azot bazıyla reaksiyona girerek mutajenik, genotoksik ve karsinojenik etkilere neden olur (64, 65).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen (Proje no: TSU-11-3403) ve Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylanan (16.09.2010 tarih, karar no: 2010/107) bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yapıldı.

3.1. GEREÇ

Biyokimyasal ölçümlerde, analitik saflıkta Sigma ve Merck marka kimyasal maddeler kullanıldı.

Çalışma sırasında saf su cihazları (MINIpure, EASYpure RF), spektrofotometre (Shimadzu UV-1601), soğutmalı santrifüj (Sigma 3K 30), hassas terazi (AND GR-200), pHmetre (WTW-330İ/SET), etüv (Dedeoğlu), su banyosu (Köttermann), derin dondurucu (Newbrunswick scientific), manyetik karıştırıcı (Labor Brand Hotplate Stirrer), vorteks (Velp scientifica 2x³), buzdolabı (Arçelik), kronometre, mikro ELISA okuyucu (BioTek ELx800), mikro ELISA yıkayıcı (BioTek ELx50), HPLC cihazı (Immun Diagnostik), otomatik pipetler (Socorex, Nichipet EX, Genex Gamma), balon jojeler, polipropilen cam ve ependorf tüpler, beher, mezür ve cam pipetler kullanıldı. Çalışmada kullanılan çözeltiler, deiyonize su ile hazırlandı. Çalışmada kullanılan tüm cam malzemeler deiyonize su ile yıkandıktan sonra bir gün boyunca %20'lik nitrik asit (HNO₃) içinde bekletildi ve sonrasında tekrar deiyonize su ile yıkandı.

3.1.1. Çalışma Grubu

Hasta Grubu:

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Polikliniğine, Eylül 2010-Temmuz 2012 tarihleri arasında başvurarak aynı Endokrinoloji uzmanı tarafından anamnez, fizik muayene bulguları ve laboratuvar tetkikleri ve hipofiz MR'ları ile hipogonadotropik hipogonadizm tanısı konulan, takip ve tedavileri aynı uzman tarafından sürdürülen 30 erkek hasta çalışma kapsamına alındı. Hastalara, yapılacak testler hakkında bilgi verildi. Çalışmayı kabul edenlerden Helsinki Deklarasyonu'na uygun olarak imzalı onam kağıdı alınarak, protokole dahil edildi. Başka bir hormonal veya sistemik hastalığı olanlar ve 6 ay öncesine kadar hipogonadizm tedavisi alanlar çalışma kapsamına alınmadı. İlk başta çalışma kapsamına alınmış olan ancak tedaviye uyum sağlamayan 6 hasta ise çalışma dışı bırakıldı. Hasta grubuna rutin olarak gonadotropin (FSH, LH) tedavisi uygulandı. İlk önce LH tedavisi başlanarak, 6-12 ay arasında testis volümü 8-10 mL seviyesine geldikten ve testosteron seviyeleri yeterli düzeye ulaştıktan sonra FSH tedavisine başlandı. Hastaların durumuna göre FSH tedavisi devam ettirildi. Her iki tedavide enjektabl olarak haftada 3 gün yapıldı. Hasta grubuna rutin tedavilerinin dışında ek bir tedavi uygulanmadı.

Çalışma öncesi rutin olarak; trigliserid (TG), total kolesterol (TK), yüksek dansiteli lipoprotein kolesterol (HDL-K), düşük dansiteli lipoprotein kolesterol (LDL-K), t-Tes, s-Tes, FSH, LH, östradiol (E2), seks hormon bağlayıcı globulin (SHBG), insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) düzeyleri ölçülerek; hastalar lipid profili ve hormonal fonksiyonları yönünden değerlendirildi.

Hastaların antropometrik ölçümleri (boy, kilo, bel çevresi, kalça çevresi) yapılarak, kg/m^2 formülünden vücut kütle indeksleri (VKİ) ile bel-kalça oranları (BKO) hesaplandı.

Kontrol Grubu:

Rutin laboratuvar sonuçları referans aralık içerisinde bulunan, sistemik hastalığı olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan, sigara içmeyen, hasta grubunun yaş ve cinsiyet dağılımına benzer şekilde seçilen 20 gönüllü erkek, kontrol grubu olarak çalışma kapsamına alındı.

Çalışmaya katılan hastalardan; tedaviye başlanmadan önce ve tedavi bitiminden sonra olmak üzere iki kez; sağlıklı gönüllülerden ise bir kez 2 adet CBC tüpü ile 10 cc düz biyokimya tüpüne kan numuneleri alındı.

Kan örnekleri, biyokimyasal ölçümlere uygun şekilde, antikoagülanlı ve düz tüplerde toplandı. Tüpler, 30 dakika içerisinde, 4°C’de 2000 g’de 10 dakika santrifüj edildi. Ayrılan plazma ve serum örnekleri alikotlara ayrılarak ependorf tüplerde -70°C’de dondurularak saklandı.

3.2. YÖNTEM

Hasta ve kontrol grubunun, plazma ve serum örneklerinde rutin analizler ve biyokimyasal çalışmalar yapıldı.

3.2.1. Rutin Analizler

TG, TK, HDL-K, LDL-K, FSH, LH, E2 ölçümleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez laboratuvarında; SHBG, IGF-1, t-Tes, s-Tes düzeyleri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı laboratuvarında çalışıldı.

- Serum TG, TK, HDL-K ve LDL-K düzeyleri Architect C8000 marka otoanalizörde uygun ticari kitler kullanılarak analiz edildi.
- Serum FSH, LH, E2 düzeyleri, Siemens ADVIA Centaur XP marka otoanalizörde uygun ticari kitler kullanılarak analiz edildi.
- Serum t-Tes düzeyleri, Biosource marka ticari kit kullanılarak radioimmuno assay (RIA) yöntemiyle analiz edildi.
- Serum s-Tes düzeyleri, DSL marka ticari kit kullanılarak RIA yöntemiyle analiz edildi.
- Serum SHBG ve IGF-1 düzeyleri, Immunotech marka ticari kit kullanılarak immunoradiometric assay (IRMA) yöntemiyle analiz edildi.

Tüm hastalarda gonadotropin tedavisi öncesi ve sonrasında tekrarlanmak üzere; boyları cm, kiloları kg olarak ölçüldü. VKİ; kilonun, boyun metre cinsinden karesine bölünerek hesaplandı (kg/m^2). Bel çevresi, kişi ayakta dururken, göğüs kafesinin en alt kısmı (son kosta) ile iliyak kemiğin en üst düzeyi esas alınarak inspirasyon ve ekspirasyonda ölçüldü ve ortalaması alındı. Kalça çevresi kalçanın en geniş yerinden

cm olarak ölçüldü. Daha sonra bel/kalça oranı (bel çevresi(cm)/kalça çevresi(cm)) hesaplandı. Kontrol grubu içinde aynı değerlendirmeler yapıldı.

3.2.2. Biyokimyasal Analizler

Alikotlar halinde dondurularak çalışma gününe kadar saklanan serum ve plazma örneklerinde AOPP (33) ve thiol (37) düzeyleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçülürken; 8-OHdG ve NO düzeyleri, ELISA yöntemi ile ticari kitler kullanılarak ölçüldü. MDA ölçümü ise uygun ticari kit kullanılarak HPLC cihazında yapıldı.

Çalışmada kullanılan spektrofotometrik yöntemlerin tekrarlanabilirliğini belirlemek amacıyla; rutin biyokimya sonuçlarına göre, sağlıklı olduğu kabul edilen kişilerden kan örnekleri alınarak serum havuzu oluşturuldu. Bu havuzlarda yonteme uygun ölçümler yapılarak, değişim katsayısı (CV) değerleri hesaplandı.

3.2.2.1. AOPP Tayini

AOPP düzeyleri, Witko-Sarsat ve ark (33) tarafından geliştirilen spektrofotometrik metod ile tayin edildi.

Prensip:

Plazmadaki uzun ömürlü klorlu oksidanlar ile proteinlerin çapraz bağlama ürünlerinin, potasyum iyodürü oksitlemesi ve açığa çıkan triiyodid iyonunun, 340 nm'de ölçülmesi esasına dayanır (33). Tablo 3.1.'de AOPP çalışma prosedürü açıklanmıştır.

Reaktifler:

- 0.015 M fosfat tamponu (PBS), pH 7.4
- Glasiyal asetik asit
- 1.16 M Potasyum İyodür (KI)
- Kloramin T Standartları (5-200 μ mol/L)

Tablo 3.1. AOPP Çalışma Prosedürü

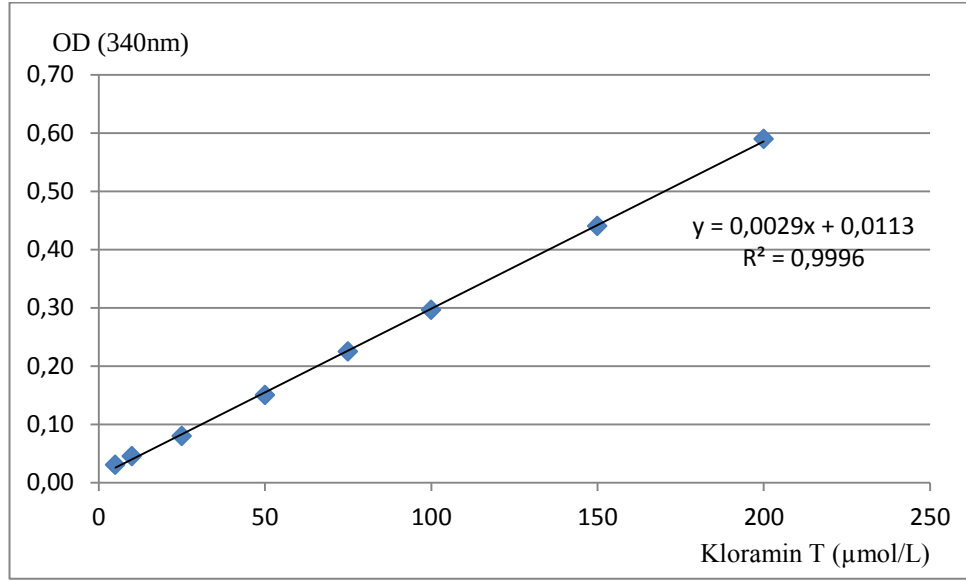
	Kör	Numune
Plazma	-	200 µl
PBS	1000 µl	800 µl
KI	10 µl	10 µl
Tüpler 25°C’de 2 dk inkübe edildi		
Asetik Asit	20 µl	20 µl
Asetik Asit ilavesinden hemen sonra, numune tüplerinin absorbansı, köre karşı 340 nm’de okundu		

Hesaplama:

Kloramin T ile hazırlanan standart grafik yardımıyla, plazma örneklerinin optik dansite (OD) değerlerinden AOPP seviyelerine geçildi ve plazma değerleri bulundu.

Standart Serinin Hazırlanması

200 µmol/L konsantrasyondaki stok Kloramin T çözeltisi, saf su ile uygun şekilde dilüe edilerek; 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150 ve 200 µmol/L konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı. Standartlar numune gibi çalışıldı. Kloramin T konsantrasyonuna karşılık gelen OD değerleriyle standart grafik çizildi (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Kloramin T Standart Grafiği

Plazma AOPP konsantrasyonları, litrede mikromol kloramin T ekivalanı (µmol/L) olarak verildi.

AOPP tayininde kullanılan metodun CV değeri, % 3.4 bulundu.

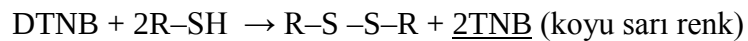
	Ölçüm sayısı	X ± SD	CV (%)
AOPP (µmol/L)	20	153.2 ± 5.2	3.4

3.2.2.2. Tiyoil Tayini

Plazma tiyoil seviyeleri, Hu ve ark (37) tarafından modifiye edilen metoda göre tayin edildi.

Prensip:

Reaksiyon, Ellman reaktifi [5.5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit); DTNB]'nin, serbest tiyoil gruplarıyla redüklenmesi sonucu oluşan koyu sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB)'in renk şiddetinin 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (38):



Tablo 3.2.'de tiyol çalışma prosedürü açıklanmıştır.

Reaktifler:

- 0.1 M Tris-HCl tamponu, pH 8.2 (10 mM EDTA içerir)
- 10 mM DTNB (metanolde hazırlanır)
- 1.0 mM GSH (stok standart)
- Metanol

Tablo 3.2. Tiyol Çalışma Prosedürü

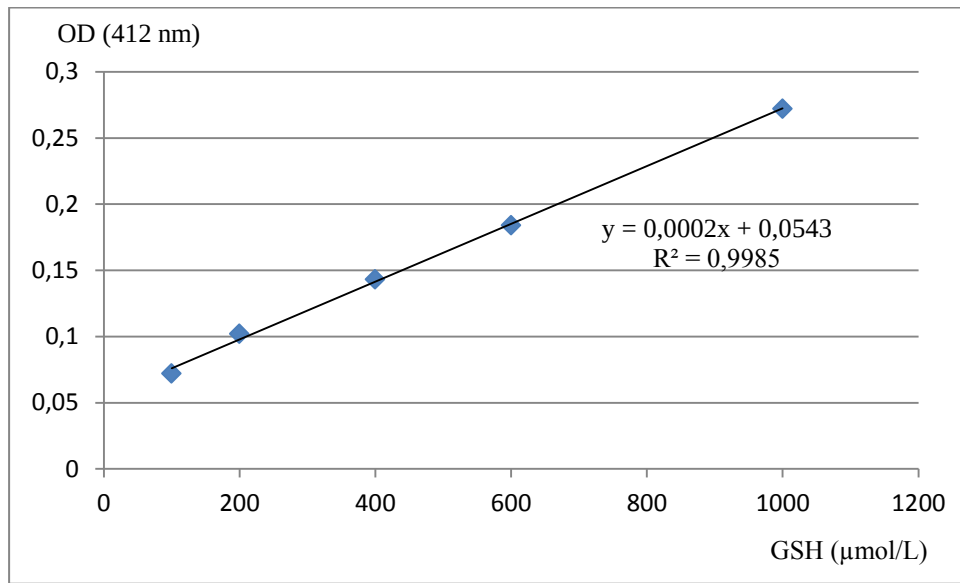
	Numune	Kontrol	Kör
Tris-HCL	100 µl	100 µl	105 µl
Serum	5 µl	5 µl	-
Metanol	-	5 µl	-
DTNB	5 µl	-	5 µl
Tüpler, oda ısısında 15 dk inkübe edildikten sonra; kontrol ve numune tüplerinin absorbanşı, kör tüpüne karşı 412 nm dalga boyunda okundu			

Hesaplama

Numune ve kontrol tüplerinin absorbanşları kullanılarak ΔOD değerleri hesaplandı. GSH ile hazırlanan standart grafik yardımıyla, plazma örneklerinin ΔOD değerlerinden tiyol seviyelerine geçildi.

Standart Serinin Hazırlanması

Stok GSH (1.0 mM) çözeltisi, saf su ile uygun şekilde dilüe edilerek; 100, 200, 400, 600, 800 ve 1000 µmol/L konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı ve numune gibi çalışıldı. GSH konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleriyle standart grafik çizildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Glutasyon Standart Grafiği

Standart grafik üzerinden bulunan plazma tiyol seviyeleri, litrede µmol tiyol olarak verildi (µmol/L).

Tiyol ölçümünde kullanılan metodun CV değeri, % 2.9 olarak bulundu.

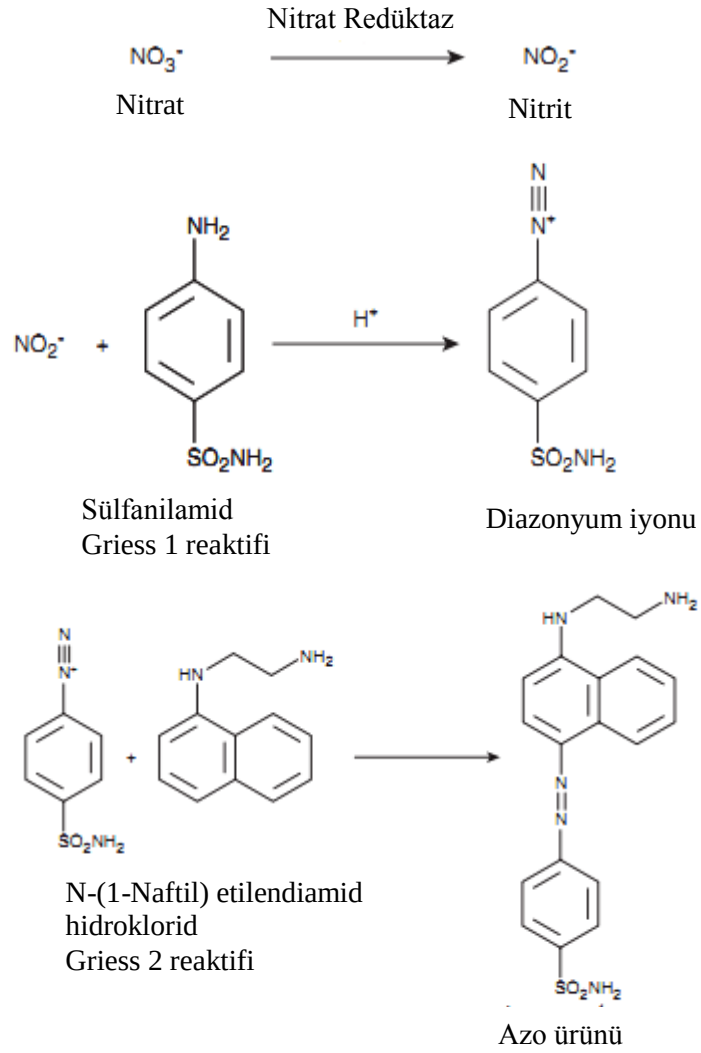
	Ölçüm sayısı	X ± SD	CV (%)
Tiyol (µmol/L)	20	193.3 ± 5.7	2.9

3.2.2.3. Nitrik Oksit Tayini

Serum NO düzeyleri Cayman marka ticari kit (Katalog No: 780001) kullanılarak tayin edildi.

Prensip:

Yarı ömrü çok kısa olan nitrik oksitin ölçümü, dayanıklı son ürünler olan nitrit (NO_2^-) ve nitrat (NO_3^-) konsantrasyonları üzerinden iki basamakta ölçülmesi esasına dayanır. İlk basamakta, nitrat redüktaz kullanılarak NO_3^- , NO_2^- 'ye dönüştürülür. İkinci basamakta NO_2^- , primer bir aromatik aminle (sülfanilamid) diazotizasyonun ardından N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorid ile mor renkli azo bileşikler oluşturur ve oluşan rengin şiddeti 540 nm'de ölçülür (Şekil 3.3.) (G3). Tablo 3.3.'de NO çalışma prosedürü açıklanmıştır.



Şekil 3.3. Griess Reaksiyonu

Reaktifler:

- Çalışma tamponu
- Nitrat redüktaz
- Nitrat redüktaz kofaktörleri
- Nitrat standart seri (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 μM)
- Griess 1 reaktifi (Sülfanilamid)
- Griess 2 reaktifi [N-(1-naftil) etilendiamin hidroklorid]

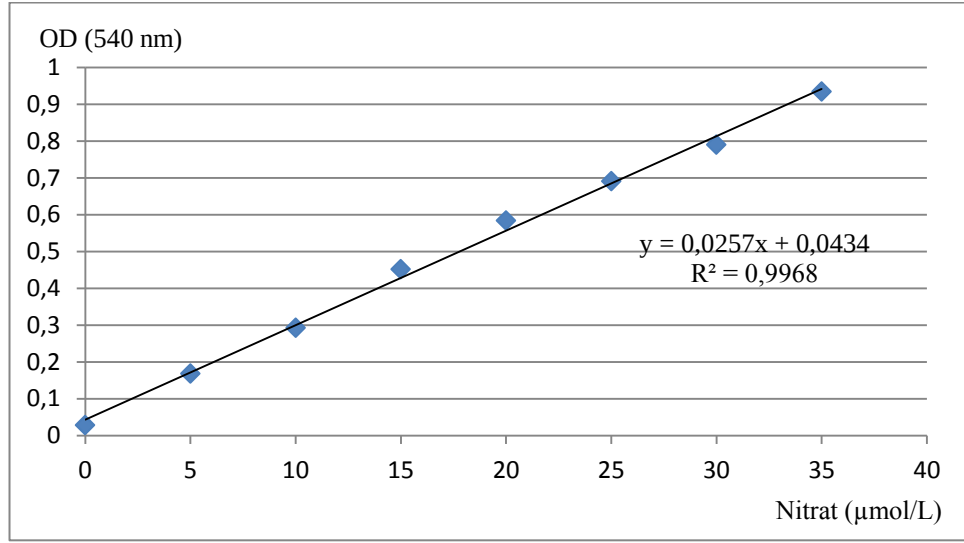
Çalışma öncesi serum örneklerine, Millipore marka Amicon Ultra-0.5, Ultracel-10 Membrane, 10 kDa (katalog no: UFC 501096) filtrelerle ultrafiltrasyon işlemi uygulandı. Bu işlem sonrasında örnekler, çalışma tamponuyla 1/2 oranında dilüe edildi.

Tablo 3.3. NO Çalışma Prosedürü

	Kör	Numune	Standart
Çalışma Tamponu	200 µl	-	-
Numune	-	80 µl	-
Standart	-	-	80 µl
Enzim Kofaktörü	-	10 µl	10 µl
Nitrat Redüktaz	-	10 µl	10 µl
Plate üzeri kapatılarak oda ısısında 3 saat inkübasyona bırakıldı			
Griess R1	-	50 µl	50 µl
Griess R2	-	50 µl	50 µl
Renk oluşumu için oda ısısında 10 dakika inkübasyona bırakılan numune ve standartların absorbansı 540 nm dalga boyunda okundu.			

Standart Serinin Hazırlanması:

Stok nitrat standart (200 µM) çözeltisi, çalışma tamponu ile uygun oranlarda dilüe edilerek, 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ve 35 µM konsantrasyonlarında standart seri hazırlandı. Standart konsantrasyonlarına karşılık gelen OD değerleri kullanılarak nitrat standart grafiği çizildi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. NO Standart Grafiği

Standart grafiği yardımıyla, numunelerin OD değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları hesaplanarak, dilüsyon faktörüyle çarpıldı. Serum NO düzeyleri, µmol/L olarak verildi.

3.2.2.4. 8-OHdG Tayini

Serum 8-OHdG düzeyleri Jalca marka ticari kit (Katalog No: KOG-HS10) kullanılarak kompetitif ELISA yöntemi ile tayin edildi.

Prensip:

Kompetitif ELISA yönteminde; ölçülmek istenen antijenle, işaretli antijen sınırlı sayıdaki antikora birleşmek üzere aynı anda ortama konularak antikora karşı yarışmaları sağlanır. Bağlanamayan antijenler uzaklaştırılır. Daha sonra ortama enzim işaretli sekonder antikor, monoklonal antikora bağlanması için ortama eklenir. Bağlanmayan enzim işaretli sekonder antikorlar yıkama ile ortamdan uzaklaştırılır. Kromatik solüsyonun ortama eklenmesiyle oluşan rengin şiddeti serumda bulunan 8-OHdG konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Tablo 3.4.'de 8-OHdG çalışma prosedürü açıklanmıştır.

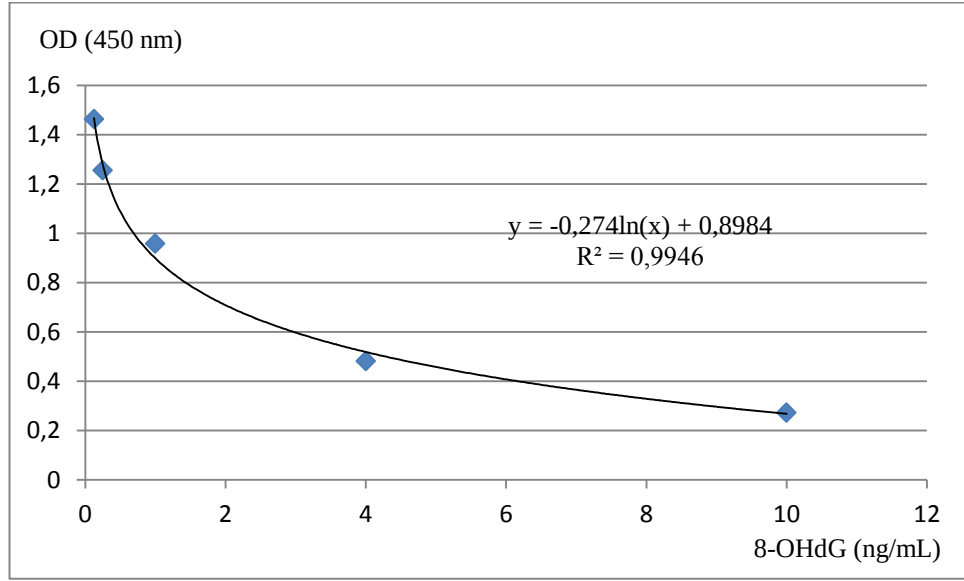
Reaktifler:

- Primer antikor (8-OHdG ye özgü monoklonal antikor)
- Sekonder antikor

- Kromatik solüsyon (3,3',5,5',-tetrametilbenzidin)
- Yıkama solüsyonu
- Stop solüsyonu (1 M fosforik asit)

Tablo 3.4. 8-OHdG Çalışma Prosedürü

	Numune	Standart
Numune	50 µl	-
Standart	-	50 µl
Primer antikor	50 µl	50 µl
Plate üzeri kapatılarak +4 °C’de bir gece inkübasyona bırakıldı		
Her bir kuyucuk 250 µl yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı		
Sekonder antikor	100 µl	100 µl
Plate üzeri kapatılarak oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı		
Her bir kuyucuk 250 µl yıkama solüsyonu ile 3 defa yıkandı		
Enzim substratı	100 µl	100 µl
Oda ısısında 15 dakika inkübasyona bırakıldı		
Stop solüsyonu	100 µl	100 µl
450 nm dalga boyunda numune ve standartların absorbanları okundu		



Şekil 3.5. 8-OHdG Standart Grafiği

Hesaplama:

Standart grafiği yardımıyla (Şekil 3.5.), numunelerin OD değerlerine karşılık gelen konsantrasyonları hesaplandı. Serum 8-OHdG düzeyleri, ng/mL olarak verildi.

3.2.2.5. Malondialdehit Tayini

Serum MDA düzeyleri Merkez Laboratuvarı Metabolizma biriminde Immundiagnostik marka ticari kit (Katalog No: KC1900) kullanılarak Agilent 1100 marka HPLC cihazında tayin edildi.

Prensip: MDA'nın derivatizasyon reaktifi ile floresan ürünlere dönüşmesini takiben reaksiyon solüsyonu eklenerek ortamın pH'sı optimum değerlere getirilir. MDA'nın oluşturduğu floresans, izokratik HPLC sisteminde, spektrofotometrik detektörle 553 nm (emisyon) ve 515 nm (eksitasyon)'de ölçülür. Tablo 3.5.'de HPLC sisteminin özellikleri, Tablo 3.6.'da MDA çalışma prosedürü açıklanmıştır.

Reaktifler:

- Mobil faz
- Kalibratör: Liyofilize haldeki kalibratör, çalışma öncesi tip I su ile çözülerek hazırlandı.
- Derivatizasyon solüsyonu

- Reaksiyon solüsyonu

Kontrol: Liyofilize haldeki kontrol, çalışma öncesi tip I su ile çözülerek hazırlandı.

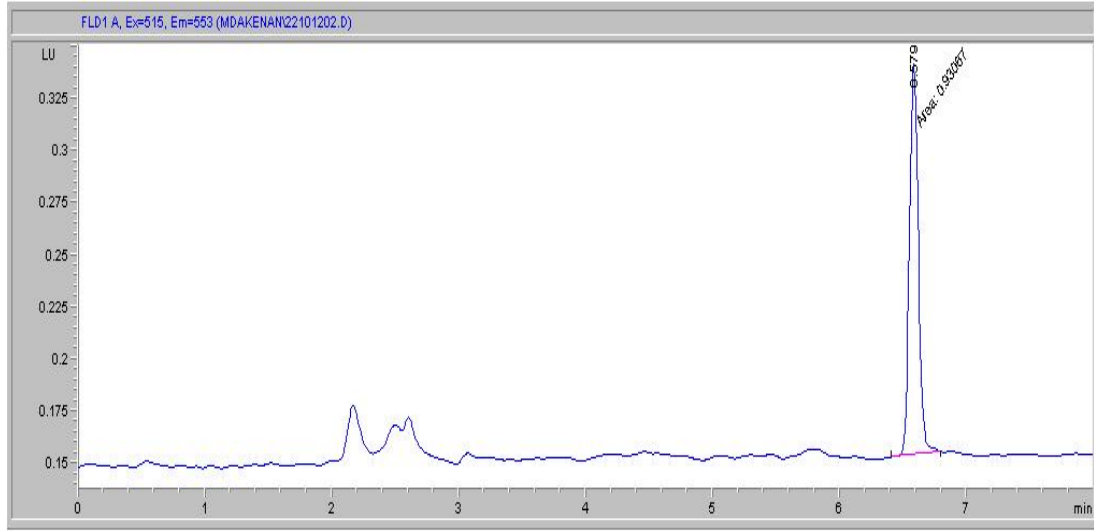
Tablo 3.5. HPLC Sisteminin Özellikleri

Analitik Kolon	Bischoff Prontosil Euroband, 5 µm, 125 mm x 4 mm
Akış hızı	0.8 - 1.2 mL/dk
Örnek hacmi	20 µl
Uygulama süresi	4 dk
Dalga boyu	Emisyon / Eksitasyon: 553 / 515 nm
Sensitivite	0.15 µmol/L
Linearite	100 µmol/L

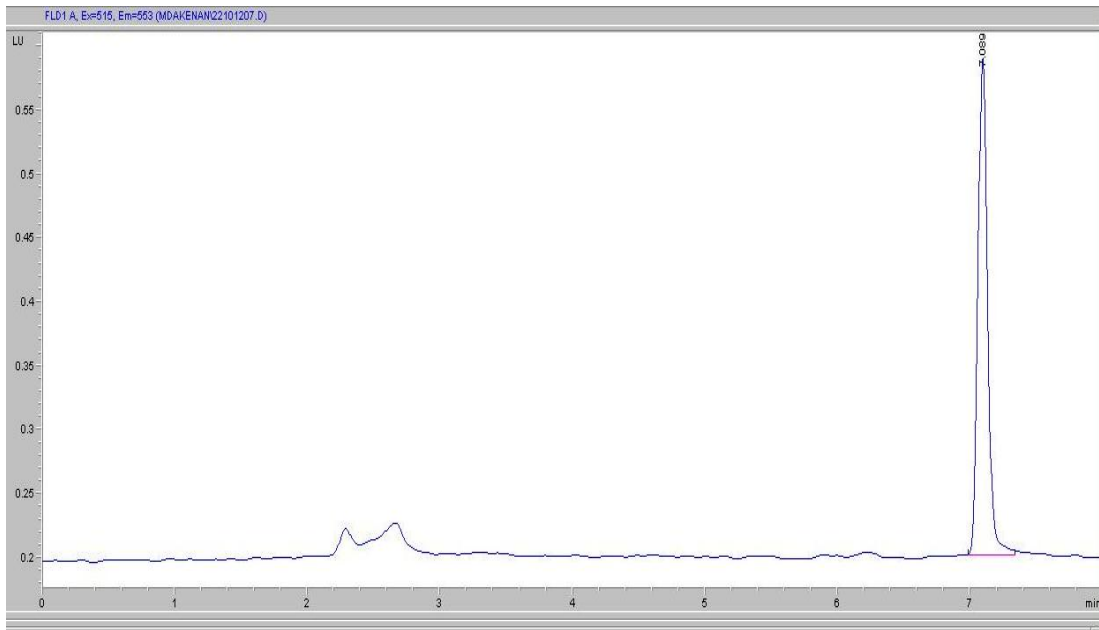
Tablo 3.6. MDA Çalışma Prosedürü

	Kör	Numune
Tip I su	20 µL	-
Serum	-	20
Derivatizasyon sol.	1 mL	1 mL
Tüpler 15 sn vortekslendikten sonra, 95 °C’de 60 dk inkübe edildi.		
Soğutulan tüpler 10000 rpm’de, 5 dk santrifüj edildi.		
Süpernatant	500 µL	500 µL
Reaksiyon solüsyonu	500 µL	500 µL
Tüpler vorteksle iyice karıştırıldı.		
Kör ve numune tüplerindeki karışımlardan 20 µL alınarak, HPLC sistemine enjekte edildi		

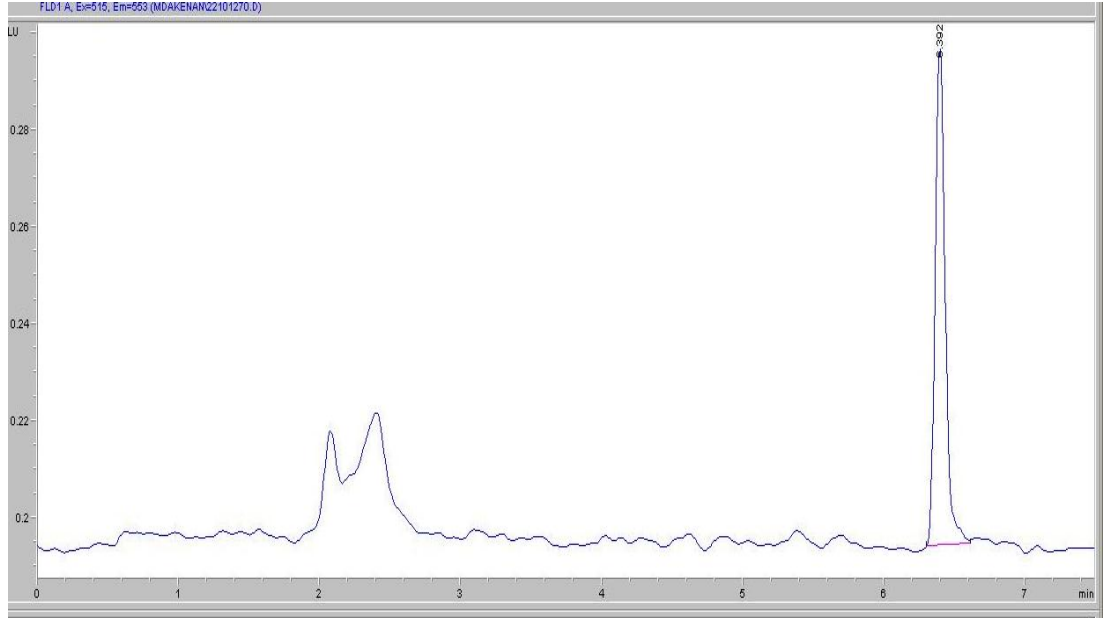
Kalibratör ve kontrol numune gibi çalışıldı. 1.97 ± 0.41 okunması gereken kontrol değeri, $1.87 \mu\text{mol/L}$ olarak okundu (Şekil 3.6.). Şekil 3.7. ve 3.8.'de birinci hastanın tedavi öncesi ve sonrası MDA kromotogramı görülmektedir.



Şekil 3.6. MDA Kontrol kromotogramı



Şekil 3.7. Birinci Hastanın Tedavi Öncesi MDA Kromotogramı



Şekil 3.8. Birinci Hastanın Tedavi Sonrası MDA Kromotogramı

Hesaplama:

$$\text{MDA konsantrasyonu}(\mu\text{mol/L}) = \frac{\text{Numune pik yüksekliği} \times \text{Kalibratör konsantrasyonu}}{\text{Kalibratör pik yüksekliği}}$$

3.3. İstatistiksel Değerlendirme

Veriler IBM SPSS Statistics 21.0 istatistik paket programında değerlendirildi. Her gruptaki katılımcı sayısı, tablolarda “n” olarak gösterildi. Verilerin normal dağılımına Shapiro-Wilk testi ile bakıldı. Normal dağılım gösteren değişkenlerin özet istatistikleri aritmetik ortalama $\pm$ standart sapma ($X \pm SD$); normal dağılmayan değişkenlerin özet istatistikleri median (%25. - %75.) şeklinde verildi. Gruplar arası karşılaştırmalarda normal dağılım gösteren değişkenler için bağımsız örneklerde t testi, normal dağılım göstermeyen değişkenler için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tekrarlı ölçümlerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren değişkenler için bağımlı örnek t testi, normal dağılım göstermeyen değişkenler için Wilcoxon t testi kullanıldı. Sayısal değişkenler arasındaki ilişki normal dağılım gösteren değişkenler için Pearson Korelasyon Analizi ile normal dağılım göstermeyen değişkenler için Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. $p<0.05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bölümü'nde Hipogonadizm tanısıyla takip ve tedavileri sürdürülen toplam 30 erkek hasta tedavi öncesi hasta grubunu oluşturmak üzere çalışma kapsamına alındı. Tedaviye uyum sağlayamayan 6 hasta çalışma kapsamından çıkartılarak 24 erkek hasta tedavi sonrası hasta grubunu oluşturdu. Sağlıklı 20 erkek gönüllü de kontrol grubunu oluşturmak üzere çalışma kapsamına alındı.

Çalışma gruplarına ait veriler; demografik bulgular, rutin analiz bulguları ve biyokimyasal çalışma bulguları şeklinde gösterildi.

4.1. DEMOGRAFİK BULGULAR

Tedavi öncesi hasta grubunu oluşturan 30 hastanın yaş ortalaması 29.30 ± 8.04 yıl, tedavi sonrası hasta grubunu oluşturan 24 hastanın yaş ortalaması 28.83 ± 8.72 yıl, kontrol grubunu oluşturan 20 sağlıklı gönüllünün yaş ortalaması da 29.35 ± 3.77 yıl olarak bulundu. Yaş ortalamaları bakımından, çalışma grupları arasında istatistiksel olarak fark görülmedi ($p>0.05$) (Tablo 4.1.).

Tablo 4.1.'de görüldüğü gibi; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; tedavi öncesi hasta grubunda kilo, boy, vücut kütle indeksi (VKİ) ve bel-kalça oranı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.1. Tedavi Öncesi Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Bulguları

Parametreler	Çalışma Grupları		<i>p</i>
	Tedavi Öncesi (n:30)	Kontrol Grubu (n:20)	
Yaş (yıl)	29.30 ± 8.04	29.35 ± 3.77	0.977
Kilo (kg)	84.33 ± 19.78	78.25 ± 5.06	0.117
Boy (cm)	1.78 ± 0.05	1.77 ± 0.02	0.354
VKİ (kg/m ²)	26.19 ± 5.37	24.74 ± 1.34	0.166
Bel-kalça oranı	0.89 ± 0.08	0.89 ± 0.04	0.786

Tablo 4.2. Tedavi Sonrası Hasta ve Kontrol Grubunun Demografik Bulguları

Parametreler	Çalışma Grupları		<i>p</i>
	Tedavi Sonrası (n:24)	Kontrol Grubu (n:20)	
Yaş (yıl)	28.83 ± 8.72	29.35 ± 3.77	0.795
Kilo (kg)	86.54 ± 15.17	78.25 ± 5.06	0.018
Boy (cm)	1.79 ± 0.05	1.77 ± 0.02	0.065
VKİ (kg/m ²)	26.60 ± 3.88	24.74 ± 1.34	0.036
Bel-kalça oranı	0.86 ± 0.06	0.89 ± 0.04	0.044

Tedavi sonrası hasta grubunda, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında; kilo ve VKİ değerleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunurken ($p < 0.05$), bel-kalça oranı değeri istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p < 0.05$). Boy değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.2.).

Hasta grubu, kendi içinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası olarak karşılaştırıldığında; kilo ve boy değerlerinin, tedavi sonrası hasta grubunda tedavi süresince istatistiksel anlamda arttığı bulunurken ($p<0.05$); VKİ ve bel-kalça oranı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.3.).

Tablo 4.3. Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Hasta Grubunun Demografik Bulguları

Parametreler	Hasta Grubu		<i>p</i>
	Tedavi öncesi (n:24)	Tedavi Sonrası (n:24)	
Kilo (kg)	84.50 ± 15.97	86.54 ± 15.17	0.022
Boy (cm)	1.79(1.75-1.85)	1.80(1.76-1.85)	0.016
VKİ (kg/m ²)	26.18 ± 4.26	26.60 ± 3.88	0.130
Bel-kalça oranı	0.87 ± 0.07	0.86 ± 0.06	0.061

4.2.RUTİN ANALİZ BULGULARI

Çalışma gruplarında ölçülen rutin parametreler için, istatistiksel karşılaştırma yapıldığında; hipogonad hasta grubunun tedavi öncesi TK, TG, LDL-K seviyeleri kontrol grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek bulunurken ($p<0.05$); buna karşılık HDL-K, t-Tes, s-Tes, E2 seviyeleri anlamlı şekilde daha düşük bulundu ($p\leq 0.001$). SHBG ve IGF-1 değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.4.).

Tablo 4.4. Tedavi Öncesi Hasta ve Kontrol Grubunun Rutin Çalışma Bulguları

Parametreler	Çalışma Grupları		<i>p</i>
	Tedavi öncesi (n:30)	Kontrol Grubu (n:20)	
TK (mg/dL)	184.46 ± 39.06	137.70 ± 9.90	0.001
TG (mg/dL)	116.26 ± 102.65	75.95 ± 21.27	0.045
HDL-K (mg/dL)	45.46 ± 9.84	54.65 ± 7.38	0.001
LDL-K (mg/dL)	112.49 ± 30.64	67.86 ± 12.28	0.001
Total Testosteron (ng/dL)	41.00(25.50-74.00)	530.50(462.75-555.50)	0.001
Serbest Testosteron (pg/mL)	1.75(1.47-2.25)	21.02(19.57-23.85)	0.001
E2 (pg/mL)	17.29 ± 10.40	30.75 ± 4.25	0.001
SHBG (nmol/L)	40.86 ± 19.08	43.80 ± 8.92	0.469
IGF-1 (ng/mL)	198.00(134.75-316.75)	249.50(212.50-280.00)	0.172

Tablo 4.5.'de görüldüğü üzere; hipogonad hasta grubunun, gonadotropin tedavisi sonrası değerleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; TK, TG ve LDL-K değerleri istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunurken ($p < 0.05$). HDL-K değeri istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p = 0.001$). E2 ve IGF-1 değerleri belirgin şekilde artarak, istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunurken ($p < 0.05$), SHBG değeri ise tedavi ile belirgin şekilde azalarak, istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p \leq 0.001$). t-Tes ve s-Tes değerlerinin, kontrol değerlerine yaklaştığı ve istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı tespit edildi ($p > 0.05$).

Tablo 4.5. Tedavi Sonrası Hasta ve Kontrol Grubunun Rutin Çalışma Bulguları

Parametreler	Çalışma Grupları		<i>p</i>
	Tedavi Sonrası (n:24)	Kontrol Grubu (n:20)	
TK (mg/dL)	156.29 ± 35.56	137.70 ± 9.90	0.021
TG (mg/dL)	110.66 ± 60.30	75.95 ± 21.27	0.013
HDL-K (mg/dL)	40.95 ± 8.51	54.65 ± 7.38	0.001
LDL-K (mg/dL)	91.87 ± 27.62	67.86 ± 12.28	0.001
Total Testosteron (ng/dL)	498.50(393.50-702.50)	530.50(462.75-555.50)	0.715
Serbest Testosteron (pg/mL)	18.09(8.20-23.25)	21.02(19.57-23.85)	0.087
E2 (pg/mL)	46.07 ± 31.35	30.75 ± 4.25	0.026
SHBG (nmol/L)	26.91 ± 12.69	43.80 ± 8.92	0.001
IGF-1 (ng/mL)	326.00(262.75-465.75)	249.50(212.50-280.00)	0.003

Hasta grubu, kendi içerisinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası olarak karşılaştırıldığında; t-Tes, s-Tes, E2 ve IGF-1 değerlerinin tedavi sonrası hasta grubunda tedavi süresince istatistiksel olarak arttığı bulunurken ($p \leq 0.001$); TK, LDL-K ve SHBG değerlerinin tedavi sonrası hasta grubunda tedavi süresince istatistiksel olarak azaldığı bulundu ($p < 0.05$). Tedavi sonrası hasta grubunda TG ve HDL-K değerlerinde, tedavi öncesi hasta grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.6.).

Tablo 4.6. Tedavi öncesi ve Tedavi sonrası Hasta Grubunun Rutin Çalışma Bulguları

Parametreler	Hasta Grubu		<i>p</i>
	Tedavi öncesi (n:24)	Tedavi Sonrası (n:24)	
TK (mg/dL)	183.12 ± 42.95	156.29 ± 35.56	0.002
TG (mg/dL)	95.00(67.50-127.50)	84.50(70.50-125.50)	0.977
HDL-K (mg/dL)	43.70 ± 9.63	40.95 ± 8.51	0.099
LDL-K (mg/dL)	110.86 ± 33.76	91.87 ± 27.62	0.004
Total Testosteron (ng/dL)	41.50(28.50-75.00)	498.50(400.00-679.00)	0.001
Serbest Testosteron (pg/mL)	2.32 ± 1.80	17.87 ± 11.59	0.001
E2 (pg/mL)	16.67 ± 11.05	46.07 ± 31.35	0.001
SHBG (nmol/L)	43.50(25.50-59.00)	22.50(18.50-35.50)	0.001
IGF-1 (ng/mL)	261.54 ± 163.73	378.45 ± 207.59	0.001

4.3. BİYOKİMYASAL ÇALIŞMA BULGULARI

Çalışma gruplarında ölçülen biyokimyasal parametreler için, istatistiksel karşılaştırma yapıldığında; hipogonad hasta grubunun tedavi öncesi AOPP, MDA ve NO değerleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunurken ($p < 0.05$); tiyol düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p \leq 0.001$). 8-OHdG değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.7.).

Tablo 4.7. Tedavi Öncesi Hasta ve Kontrol Grubunun Biyokimyasal Çalışma Bulguları

Parametreler	Çalışma Grupları		<i>p</i>
	Tedavi Öncesi (n:30)	Kontrol Grubu (n:20)	
AOPP (μmol/L)	272.67 ± 111.79	133.70 ± 42.73	0.001
Tiyol (μmol/L)	210.03 ± 47.43	291.38 ± 39.83	0.001
MDA (μmol/L)	2.79(2.17-4.76)	1.71(1.55-1.71)	0.001
NO (μmol/L)	20.28(13.89-25.13)	17.05(13.75-19.99)	0.034
8-OHdG (ng/mL)	0.18(0.16-0.21)	0.17(0.15-0.19)	0.661

Tablo 4.8. Tedavi Sonrası Hasta ve Kontrol Grubunun Biyokimyasal Çalışma Bulguları

Parametreler	Çalışma Grupları		<i>p</i>
	Tedavi Sonrası (n:24)	Kontrol Grubu (n:20)	
AOPP (μmol/L)	132.92 ± 40.39	133.70 ± 42.73	0.951
Tiyol (μmol/L)	290.27 ± 71.63	291.38 ± 39.83	0.948
MDA (μmol/L)	1.86(1.73-2.13)	1.71(1.55-1.71)	0.001
NO (μmol/L)	15.32(12.39-20.17)	17.05(13.75-19.99)	0.588
8-OHdG (ng/mL)	0.17(0.14-0.19)	0.17(0.15-0.19)	0.448

Tablo 4.8.'de görüldüğü gibi; tedavi sonrası hasta grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında; AOPP ve NO değerlerinin belirgin şekilde azalarak, tiyol değerlerinin ise belirgin şekilde artarak kontrol grubu değerlerine yaklaştığı görüldü ($p>0.05$). MDA değerleri, tedavi ile kontrol değerlerine yaklaşmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). 8-OHdG değerlerinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).

Hasta grubu, kendi içinde tedavi öncesi ve tedavi sonrası olarak karşılaştırıldığında; tiyol değerlerinin tedavi sonrası hasta grubunda, tedavi süresince istatistiksel olarak arttığı bulunurken ($p\leq 0.001$); AOPP, MDA ve NO değerlerinin tedavi sonrası hasta grubunda tedavi süresince istatistiksel olarak azaldığı bulundu ($p\leq 0.001$). 8-OHdG değerlerinde de istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$) (Tablo 4.9.).

Tablo 4.9. Tedavi Öncesi ve Tedavi Sonrası Hasta Grubunun Biyokimyasal Çalışma Bulguları

Parametreler	Hasta Grubu		<i>p</i>
	Tedavi öncesi (n:24)	Tedavi Sonrası (n:24)	
AOPP ($\mu\text{mol/L}$)	261.44 $\pm$ 82.32	132.92 $\pm$ 40.39	0.001
Tiyol ($\mu\text{mol/L}$)	212.07 $\pm$ 46.47	290.27 $\pm$ 71.63	0.001
MDA ($\mu\text{mol/L}$)	2.45(2.17-4.96)	1.86(1.75-2.09)	0.001
NO ($\mu\text{mol/L}$)	20.28(14.14-24.84)	15.32(12.51-19.45)	0.001
8-OHdG (ng/mL)	0.17 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.03	0.398

Tablo 4.10. Parametreler arasındaki korelasyonlar

Parametreler	r	p
AOPP-Tiyol	-0,542	0.001
AOPP-MDA	0,549	0.001
AOPP-LDL-K	0,342	0.003
MDA-Tiyol	-0,559	0.001

Yapılan korelasyon analizleri sonucunda; AOPP ile tiyol arasında anlamlı düzeyde negatif korelasyon tespit edilmiştir. AOPP ile MDA ve AOPP ile LDL-K arasında anlamlı düzeyde pozitif korelasyon tespit edilirken, MDA ile tiyol düzeyleri arasında da anlamlı düzeyde negatif korelasyon tespit edilmiştir.

5. TARTIŞMA

Hipogonadizm; hipotalamo-hipofizer-testiküler aksta bir veya daha çok seviyede bozukluk sonucu testisin fizyolojik düzeyde testosteron sentezleyememesi ve spermatozoa sayısında azalma ya da yokluğu veya her ikisinin birden bozukluğu ile karakterize bir hastalıktır. Hipotalamik ya da hipofizer düzeyde bozukluk sonucu ortaya çıkarsa hipogonadotropik hipogonadizm, testiküler bozukluk sonucu ortaya çıkarsa hipergonadotropik hipogonadizm olarak adlandırılmaktadır. Bu hastalarda semptom ve bulgular hipogonadizmin başladığı zamana göre değişebilir. Puberte öncesi dönemde androjen yetersizliği meydana gelirse tablo hepsinde aynıdır. Puberteden sonra ortaya çıkan hipogonadizmde; daha önce normal olan libidoda, ereksiyonda, sakal başta olmak üzere vücut kıllarında, kas kitlesi ve gücünde zamanla yetersizlik ortaya çıkar. Kas-iskelet sistemi bozukluğu, psikiyatrik kişilik bozuklukları, anormal vücut yağ dağılımı gibi bir çok organ ve sistemi etkileyen komplikasyonlar sık görülür (2).

Literatürde, testosteron tedavisinin metabolizmayı ve vücut kompozisyonunu etkilediğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (66-69).

Bhasin ve ark (70), yaptığı çalışmada testosteron replasman tedavisi yapılan hipogonadizmli genç erkek hastalarda vücut yağ kitlesinin düştüğü ve vücut kas kitlesinin arttığı raporlanmıştır. Bunu destekler şekilde, Naharci ve ark (71) ile Kapoor ve ark (67), testosteron replasman tedavisi verilen hipogonadizmli erkek hastalarda yaptıkları çalışmada kilo, VKİ, vücut kas kitlesinin arttığı, vücut yağ

kitlesinin gerilediğini ve bel-kalça oranının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğünü göstermişlerdir.

Çalışmamızda; gonadotropin tedavisi sonrasında hastaların, tedavi öncesine göre boy ve kilo değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olan bir artış tespit edilirken, bel-kalça oranında istatistiksel açıdan anlamlı olmayan bir azalma tespit edildi. VKİ’de ise istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. Tedavi sonrası ve kontrol grubu karşılaştırıldığında; bel-kalça oranında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilirken, VKİ ve kilo değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış tespit edildi. Çalışmamızda; gonadotropin tedavisi sonrasında, daha önce testosteron replasmanı ile yapılan çalışmalar ile benzer şekilde, azalmış bel-kalça oranı değerleri ile artmış VKİ ve kilo değerleri tespit edildi.

Gonadal steroidlerin puberte döneminde boy uzamasının hızlanmasında ve kemik epifizlerin kapanmasında görev aldığı bilinmektedir (2, 70). Hipogonad hastalarda androjen yetersizliğinden dolayı kemik epifizlerin kapanması gecikmiştir, bu yüzden hastalara uygulanan gonadotropin tedavisi ile henüz kapanmamış epifizler uyarılarak boyda kısa süreli bir artışın görülmesi beklenebilir (70).

Hipogonadizmlili hastalarda, abdominal yağ doku birikiminde bir artış olmakta ve bunun sonucunda aromatazla östradiole dönüşüm arttığı için testosteron düzeylerinde azalma daha da belirginleşmektedir. Bu da kısır döngü şeklinde daha fazla yağ doku birikimine, insülin direncine ve daha büyük düzeyde testosteron eksikliğine yol açmaktadır. Testosteron, anabolik etkisiyle yağsız vücut kitlesini artırır. Androjenlerin, vücut kompozisyonunu değiştirirken hangi mekanizmaları kullandığının araştırıldığı bir çalışmada; androjenlerin, adipojenik yolun progresyonunu inhibe ederek vücut yağ kitlesini düşürdüğü ve miyojenik yol aracılığı ile mezenkimal pluripotent hücrelerde farklılaşmaya neden olarak vücut kas kitlesini artırdığı ileri sürülmüştür (72). Ek olarak, testosteron adipositlerden leptin üretimini de baskılamaktadır. Bu hastalarda leptin seviyeleri ile serum testosteron seviyelerinin ters orantılı olduğu bilinmektedir. Adipositlerden aşırı leptin sekresyonu ya da leptin yıkımındaki yetersizlik bu değişikliklere neden olabilir. Hipogonad hastalara uygulanan tedavi sonrasında gözlenen vücut

kompozisyonundaki değişiklikler ile ilgili literatürdeki bilgiler yetersiz olduğundan daha kontrollü ve geniş kapsamlı yapılacak çalışmalara ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

Literatürde yapılan çalışmalarda; hipogonad hastalardaki düşük testosteron düzeylerinin, aterojenik lipid profili ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (73). Bu hastalarda; total kolesterol, LDL-K ve trigliserid düzeylerinin yükseldiğı, HDL-K düzeylerinin düştüğü bildirilmektedir. Testosteron replasman tedavisi uygulanan hipogonad hastalarda ise lipid profilinde düzelme olduğu öne sürülmüştür (73, 74). Tan ve ark (75), 3 ay süre ile 11 hipogonad hastaya uyguladıkları testosteron enantat tedavisinin sonunda TG, LDL-K ve HDL-K düzeylerinin anlamlı düştüğünü; total kolesterol düzeylerinin ise değişmediğini tespit etmişlerdir. Buna karşılık; Kapoor ve ark (67) ile Malkin ve ark (76), yaptıkları çalışmalarda, testosteron replasman tedavisi verilmiş hipogonadizmli erkek hastalarda, total kolesterol düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düştüğü, HDL-K düzeylerinin ise istatistiksel olarak anlamlı arttığı tespit edilmiştir. LDL-K ve trigliserid düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır.

Bu çalışmada ise; hipogonad hasta grubunun tedavi öncesi TG, total kolesterol ve LDL-K düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek, HDL-K düzeyleri ise istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşüktü. Gonadotropin tedavisi sonrasında ise tedavi öncesine göre, total kolesterol ve LDL-K düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı olan bir düşüş, trigliserid düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüş ve HDL-K düzeyinde ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir azalma tespit edildi.

Hipogonadizmli hastalarda sık görülen bozulmuş lipid profilinin, vücut yağ dağılımı ve insülin direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir (73). Testosteron, abdominal bölge yağ dokusunu azaltarak vücut kompozisyonu ve lipid profili üzerindeki olumlu etkilerini gösterir. Hedef dokularda ise aterojenik bir hormon olan insülin duyarlılığını artırıp insülin direncini düzeltmesiyle de lipid profilini olumlu yönde etkiler. Bu çalışmada, gonadotropin tedavisi sonrası lipid profilinde meydana gelen olumlu değişiklikleri, testosteronun vücut kompozisyonun olumlu yönde değiştirmesi ve insülin direncini azaltması ile ilişkili olduğunu söyleyebiliriz.

Eckardstein ve ark (77), dolaşımdaki HDL-K düzeylerinde androjenlerle oluşan düşüşlerin, artmış HDL-K katabolizmasının bir yansıması olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Testosteron, HDL-K düzeylerini düzenleyen iki önemli enzimin, hepatik lipaz ve çöpçü reseptör B1 enzimlerinin sentezini uyarır. Hızlanmış katabolizma sonucunda HDL-K düzeylerinde düşme meydana gelir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bu bulgular ile hipogonadizm tanısı konan hastalarda gonadotropin tedavisinin lipid profiline yaptığı olumlu katkıların uzun dönemde kardiyovasküler riskleri azaltmada etkili olabileceğini söyleyebiliriz. Bu çalışma, daha uzun süreli tedavi ile daha etkin lipid profilinin kontrolü olabileceğini de akla getirmektedir.

Çalışmamızda; gonadotropin tedavisinden sonra beklendiği gibi serum total ve serbest testosteron düzeyleri normal değerlere ulaşırken, IGF-1 düzeyi istatistiksel açıdan anlamlı bir artış gösterdi ve normal düzeyin de üzerine çıktı. Daha önce yapılan çalışmalardan, seks steroidlerinin IGF-1 düzeyini artırdığı bilinmektedir ve IGF-1 düzeyindeki bu artışın doku androjenizasyonunun dolaylı bir göstergesi olabileceği belirtilmektedir (78, 79). Yine beklendiği gibi gonadotropin tedavisiyle SHBG düzeyleri istatistiksel olarak azalarak normal düzeylerin altına düştü. Bilindiği üzere serum SHBG düzeyi, serum total testosteron düzeyini etkileyen önemli bir faktördür ve androjen eksikliği serum SHBG düzeyini artırırken, androjen replasman tedavisi serum SHBG düzeyini azaltmaktadır (2). Yine beklendiği üzere, testosteron düzeyinin yükselmesine paralel olarak serum östrojen düzeyinin de belirgin yükseldiğini tespit ettik. Östrojen düzeyinin yükselmesinin nedeni, hCG'nin testiküler aromataz enzimini aktive etmesi ve bu enzimin Leydig hücrelerinden salgılanan testosteronu aromatize etmesine ile açıklanmaktadır (2, 80).

Serbest oksijen radikalleri (SOR); vücutta normal metabolizma sırasında oluşan zararlı moleküllerdir. Bu maddelerin aşırı şekilde arttığı durumlarda ya da vücudun antioksidan savunma sisteminin yetersiz kaldığı durumlarda oksidatif stres olarak bilinen durum ortaya çıkar. SOR; proteinler, lipidler ve nükleik asitler gibi temel hücre komponentleri ile etkileşime girmekte, toksik bileşikler meydana gelmekte ve

bu bileşiklerin ölçülmesiyle oksidatif stres ortaya konmaktadır. SOR'un günümüzde bir çok hastalığın patogenezinde rol alabildiği gösterilmiştir (23, 81).

Hipogonad hastalarda seminal plazmada yapılmış çok sayıda oksidatif stres çalışması olmasına karşın, serum/plazmada oksidatif stresin değerlendirildiği çalışma sayısı yok denecek kadar azdır. Biz bu çalışma ile literatürde daha önce hiç çalışılmamış olan plazma AOPP ve tiyol düzeyleri ile serum MDA ve NO düzeylerini araştırdık.

Literatürde yapılan çalışmalar, infertil hipogonadizimli erkeklerin sağlıklı kontrollere göre anlamlı olarak daha yüksek seminal SOR seviyelerine ve daha düşük seminal antioksidan kapasiteye sahip olduklarını göstermiştir (8). Seminal plazmada; SOD, GSH-Px ve katalaz gibi enzimatik antioksidanlar bulunurken, askorbat, ürat, α - tokoferol, piruvat, glutatyon, taurin gibi non-enzimatik antioksidanların varlığı da gösterilmiştir (82).

Literatürde artmış SOR düzeylerinin infertil hipogonad hastalarda iki mekanizma ile infertileye neden olduğu ileri sürülmüştür. Birinci mekanizma da, SOR'un sperm membranına hasar verdiği, spermelerin motilitesini azalttığı ve oositle olan kapasitasyon yeteneğini bozduğu gösterilmiştir. İkinci mekanizma da ise SOR'un direk purin ve pirimidin bazlarına etki ederek sperm DNA'sını hasarladığı ileri sürülmüştür. Lewis ve ark (7), fertil erkeklerin seminal plazmasındaki total antioksidan kapasite (TAC) düzeylerinin infertil erkeklere göre daha yüksek olduğunu raporlamıştır.

Mancini ve ark (5), azalmış TAC düzeylerinin erkek infertilesinin patogenezinde rol oynadığını, seminal plazma TAC düzeylerinin, tiroid hormonları ile pozitif, FSH ve LH hormonları ile negatif korelasyon gösterdiğini ileri sürerek seminal plazma antioksidan kapasitenin sistemik hormonal regülasyonla ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Testosteron düzeyleri ile seminal plazma TAC düzeyleri arasında ise korelasyon bulamamışlardır.

Yine Mancini ve ark (6), bir başka çalışmalarında sekonder erkek hipogonadizmde testosteron tedavisinin antioksidan sistem üzerine olan etkisini incelemişler, plazma koenzim Q düzeylerinin izole hipogonad hastalarda anlamlı olarak düşük iken testosteron tedavisi ile koenzim Q düzeylerinin anlamlı şekilde yükseldiğinin

bulmuşlardır. Bununla beraber, moleküler mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, östrojenlerin *in vivo* ve *in vitro* lipid peroksidasyonuna karşı potent antioksidan olarak görev yaptığı, testosteron ve östradiolun glutatyon peroksidaz gibi antioksidanların etkisini arttırdığını ileri sürmüşlerdir.

Bizde çalışmamızda, hipogonadizm tanısı alan hastaların plazmasında protein oksidasyonunu göstermek için oksidatif stresi göstermede güvenilir bir belirteç olarak kabul edilmiş olan AOPP düzeylerine baktık.

Bu çalışmada; hipogonad hasta grubunun tedavi öncesi plazma AOPP düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksekti. Gonadotropin tedavisi sonrasında ise tedavi öncesine göre, hastaların plazma AOPP düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşerek kontrol düzeylerine yaklaştı. Tedavi sonrası ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise plazma AOPP düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

AOPP; proteinlerle klorlu oksidanların ileri reaksiyonu sonucu oluşan bir üründür ve oksidatif stres süresince üretilir. Aktive nötrofillerdeki myeloperoksidaz tarafından hipokloröz asit ve kloraminlerin etkileşimi yoluyla üretimi gerçekleşir. AOPP düzeylerinin, protein oksidasyonunun göstergesi olan plazma ditirozin ve ileri glikasyon son ürünü olan pentozidin düzeyleri ile korelasyon gösterdiği bildirilmiştir ve protein oksidasyonunun derecesini belirlemede duyarlı bir belirteçtir (83). Bu çalışmada; hipogonadizmli hastalarda plazma AOPP düzeylerinin, sağlıklı erkeklere kıyasla yaklaşık iki kat yüksek olması, artmış SOR düzeyleri sonucu ciddi bir protein oksidasyonunun varlığını düşündürmektedir. Literatürde hipogonad hastalarda SOR üretiminin; sperm plazma membranında NADPH oksidaz sistemi ve/veya mitokondriyal defekt sonucu NADPH bağımlı oksido-redüktaz yoluyla meydana geldiği fikri ileri sürülsede mekanizma tam olarak bilinmektedir. Bulgularımız; AOPP düzeylerinin düşmesinin, yapılan gonadotropin tedavisinin protein oksidasyonu oluşumunu engellediğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda; AOPP düzeyleri ile serum LDL-K düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon bulunmuştur. Bulgularımızı destekler nitelikte Nguyen-Khoa ve ark (84), HOCl'nin oksidatif etkilerini inceledikleri bir çalışmada; HOCl ile oksitlenen LDL-K

(HOCl-oksLDL)'nin; AOPP içeriğinin 100 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. Ayrıca, HOCl'nin LDL-K yapısını değiştirdiği ve LDL-apoB proteinini başlıca hedef olarak kabul ettiği gösterilmiştir.

Literatür taramamızda hipogonad hastalarda plazma AOPP düzeyleri ile ilgili yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu konuda literatür bilgileri çok yetersiz olduğu için yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır. Sonuçlarımızın, bu açıdan literatüre önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz.

Sistein artıkları şeklinde albümin yapısında lokalize bulunan serbest tiyol plazmada bulunan başlıca antioksidanlardandır (35). Himmelfarb ve ark (85), oksidatif strese sekonder gelişen tiyol kaybını “tiyol stres” olarak adlandırmışlardır. Tiyol grubunun okside olması protein oksidasyonunun göstergesi olarak düşünülebilir ve tiyol stres'in belirlenmesi de hem antioksidan gücün kaybını hem de protein oksidasyonunun derecesini yansıtabilir (85).

Aktan ve ark (4) yaptıkları bir çalışmada, hipogonad hastaların seminal plazma tiyol düzeyleri, fertil erkeklerinkine göre düşük bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Piomboni ve ark (86), yaptığı bir çalışmada ise normospermik hastaların seminal plazmasında, azospermik ve lökositospermik hastalara göre anlamlı yüksek tiyol düzeyleri elde edilmiştir.

Çalışmamızda; hipogonad hasta grubunun tedavi öncesi plazma tiyol düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşüktü. Gonadotropin tedavisi sonrasında ise tedavi öncesine göre, hastaların plazma tiyol düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artarak kontrol düzeylerine yaklaştı. Tedavi sonrası ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise plazma tiyol düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi. Bu bulgularla beraber; AOPP ve tiyol düzeyleri arasında negatif yönde korelasyon tespit edildi.

Tiyol'ün, AOPP düzeyleri ile negatif yönde korelasyon göstermesi ve düzeylerinin azalması; hipogonad hastalarda artmış SOR nedeniyle ciddi protein oksidasyonu olduğunu, oksidatif stres şartlarında üretilen SOR'a cevaben antioksidan özellikteki tiyol düzeylerinin azaldığını ve antioksidan savunma sisteminin zayıfladığını göstermektedir. Uygulanan gonadotropin tedavisi ile oksidatif stresin ortadan

kalkarak tiyol düzeylerinin normal düzeylere geldiğini söyleyebiliriz. Literatür taramamızda hipogonad hastalarda plazma tiyol düzeyleri ile ilgili yapılan bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Lipid hidroperoksitleri yıkıldığında çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir ya da hücrenin diğer bölümlerine hasarı yayarlar. Bu aldehitlerden en önemlisi MDA olarak adlandırılan moleküldür. MDA düzeyi, lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi korelasyon gösterir (63).

Aktan ve ark (4), yaptığı çalışmada 28 idiyopatik erkek infertil hastanın seminal plazmasında spektrofotometrik yöntemle ölçülen MDA düzeyleri fertil erkeklerinkine göre anlamlı yüksek olduğu gösterilmiştir. Barakat ve ark (87), intraperitoneal streptozosin (STZ) enjeksiyonu ile diyabetik hale getirilen 140 tane erkek rat üzerinde yaptığı bir çalışmada kavernoöz doku MDA düzeylerini; 12 hafta boyunca testosteron ve sildenafil verilen kontrol ratlarına göre anlamlı olarak yüksek bulmuşlardır. Aydemir ve ark (88), yaptıkları çalışmada seminal plazma hipervizikositesinin artmış seminal plazma MDA düzeyleri ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Siciliana ve ark (89), yaptıkları çalışmada azalmış seminal plazma antioksidan kapasitenin artmış seminal plazma MDA düzeyleri ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Suleiman ve ark (90), yaptıkları çift kör plasebo kontrollü bir çalışmada, sperm MDA konsantrasyonunun astenozoospermik ve oligoastenozoospermik hastalarda daha yüksek olduğunu ve E vitamini verilen grupta MDA konsantrasyonun önemli derecede azaldığını ve astenozoospermik erkeklerde sperm hareketliliğinin arttığını göstermiştir.

Bu çalışmada; hipogonad hasta grubunun tedavi öncesi serum MDA düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksekti. Gonadotropin tedavisi sonrasında ise tedavi öncesine göre, hastaların serum MDA düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü tespit edildi. Tedavi sonrası hipogonad hasta grubunun serum MDA düzeyleri ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksek bulundu.

Lipid peroksidasyonunu yansıtan MDA ölçümleri sıklıkla, MDA'nın tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu renkli kompleksin spektrofotometrik olarak ölçülmesi

esasına dayanmaktadır (65). Ancak, plazmada bulunan glukoz, bilirubin, üre, ürik asit, kreatinin, hemoglobin gibi maddeler, interferansa neden olmakta ve yöntemin duyarlılığını azaltmaktadır. Çalışmamızda, daha spesifik/sensitif bir yöntem olan HPLC yöntemi ile MDA ölçümü yapılmıştır (91).

Çalışmamızda; MDA ile AOPP düzeyleri arasında pozitif yönde korelasyon tespit edilirken, tiyol düzeyleri ile negatif yönde korelasyon tespit edilmiştir. Benzer şekilde; Başkol ve ark (92), huzursuz bacak sendromu olan hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada MDA ile AOPP düzeyleri arasında pozitif, MDA ile tiyol düzeyleri arasında negatif korelasyon tespit etmişlerdir. Yine benzer olarak, Kütük ve ark (93), koroner arter hastalarında oksidatif stres üzerine yaptıkları çalışmada, AOPP ile MDA düzeylerinin pozitif yönde korelasyon gösterdiğini saptamışlardır.

Bu çalışmada; hipogonadizimli hastalarda serum MDA düzeylerinin, sağlıklı erkeklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek olması ve plazma AOPP düzeyleri ile pozitif yönde korelasyon göstermesi, aşırı miktarda artmış SOR üretimi sonucunda hem lipid hem de protein oksidasyonunun varlığını desteklemektedir. MDA ile tiyol düzeylerinin negatif yönde korelasyon göstermesi ise artmış lipid peroksidasyonuna karşı antioksidan özellikteki tiyol düzeylerinin azaldığını ve antioksidan savunma sisteminin zayıfladığını göstermektedir. Bulgularımız; serum MDA düzeylerinin düşmesinin, yapılan gonadotropin tedavisinin lipid peroksidasyonu oluşumunu engellediğini düşündürmektedir. Tedavi sonrasında kontrole göre MDA düzeyleri istatistiksel olarak hala yüksekti. Bu bize, yapılacak daha uzun süreli ve etkin tedavi ile MDA düzeylerinin kontrol düzeylerine yaklaşabileceğini akla getirmektedir. MDA ile ilgili literatür taraması yapıldığında, hipogonad hastalarda yapılan bu çalışmanın literatürde ilk ve tek olduğu belirlendi.

NO, erkek üreme sisteminin birçok fonksiyonunu regüle eden serbest bir radikaldır ve fizyolojik seviyelerin üzerinde sperm ve testis fonksiyonlarına ve steroid yapımı üzerine negatif etkileri vardır (94). Son zamanlarda TnNOS olarak bilinen nNOS'un testise spesifik bir özel alt grubu, NO oluşumu için önemli bir etken olarak tespit edilmiştir. TnNOS sadece testisin Leydig hücrelerinde lokalize bulunmuştur ve steroidogeneizde etkin rol oynadığı düşünülmektedir (51). eNOS ve NO'nin erkek üreme sistemindeki olası etkilerini belirlemeye yönelik yapılan çeşitli çalışmalarda,

NO'nun testiste Leydig hücre steroid yapımını inhibe ettiği, germ hücre apoptozisine neden olduğu, Sertoli hücresi tight junction dinamikleri (hücreler arası bağlantı) ve testiküler kan akımının düzenlenmesi gibi etkilerinin olduğu saptanmıştır (51, 95). O'Bryan ve ark (96), yaptığı çalışmada anormal sperm eNOS ekspresyonunun azalmış sperm hareketliliği ile ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Balercia ve ark (97), yaptığı çalışmada yüksek NO konsantrasyonu varlığında sperm hareketliliğinin anlamlı bir şekilde azaldığını bulmuşlardır. Bir çalışmada, NO'nun seminifer tübüllerdeki miyofibroblastların gevşemesine aracılık ettiği ve böylece sperm transportu için gerekli olan seminifer tübüllerin peristaltik aktivitelerinde inhibe edici rolü olabileceği iddia edilmiştir (98).

Çalışmamızda; literatürde daha önce hipogonad hastaların serumunda bakılmayan NO düzeylerini ölçtük. Hipogonad hasta grubunun tedavi öncesi serum NO düzeyleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha yüksekti. Gonadotropin tedavisi sonrasında ise tedavi öncesine göre, hastaların serum NO düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düştüğü tespit edildi. Tedavi sonrası ve kontrol grubu karşılaştırıldığında ise serum NO düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi.

Hipogonadizmde; ROS kadar reaktif nitrojen türleri (RNS)'nin de sorumlu olduğu düşünülmektedir. NO ile ilgili artan çalışmalar, bu molekülünün organizmada pek çok sistemle ilgili geniş bir yelpazeye yayılan önemli işlevleri olduğunu ortaya koymuştur. Bu fonksiyonların bazıları, vazodilatasyon, trombosit agregasyonu, damar düz kas proliferasyonunun inhibisyonudur. NO'nun kardiyoprotektif bir ajan olmasına karşın bu etkisi sadece fizyolojik konsantrasyonlarda olmaktadır (48). Zıt olarak, son yörüngesinde bulunan eşleşmemiş elektronu nedeniyle serbest radikal özelliği vardır. Ortamda O_2^- 'nin fazla olması sonucunda NO ile O_2^- reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşur. Böylece hem NO'nun fizyolojik etkisi inhibe edilir ve düzeyi azalır, hem de çok daha potent bir oksidan madde oluşmuş olur. Bundan dolayı NO'nun hem düşüklüğü, hem de yüksekliği patolojik durumlar oluşturur. Ayrıca normal endotel fonksiyonu için de NO'nun fizyolojik düzeyde bulunması gereklidir (99). Bu bilgiler ışığında hipogonadizmli hastalarda, NO düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek bulunmasından dolayı, bu hastaların NO

aracılığıyla oksidatif strese maruz kaldığını akla getirmektedir. Literatürde bu konuda yapılan çalışmaların yetersiz olduğu ve bu konunun aydınlatılması için yeni çalışmaların yapılmasının gerekli olduğu kanaatindeyiz.

Hidroksil radikalının, DNA'da yaptığı en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en iyi bilinen baz hasar ürünü 8-OHdG'dir. 8-OHdG ölçümü DNA'daki oksidatif hasarın doğrudan göstergesi olarak kabul edilir (58).

Literatürde; semende yapılmış çalışmalara göre, yüksek düzeyde oksidatif strese bağlı olarak defektif sperm fonksiyonu ve DNA hasarı oluşmaktadır (100). Serbest oksijen radikallerinin yoğun bir biçimde üretiminin sperm fonksiyonlarında defekte neden olduğu ve DNA hasarı yaptığı gösterilmiştir. Erkek infertil hastaların spermatozoasında yüksek oranda bulunan DNA hasarı, azalmış fertilizasyon oranları ile birliktedir (101). Serbest radikal saldırıları sperm nükleusundaki DNA'yı hasara uğratar ve sperm plazma membranındaki lipid peroksidasyonunu indükler. Bu değişimlerin bir sonucu olarak spermatozoa fertilizasyon kapasitesini ve normal embriyonik gelişim desteğini kaybeder (102). Yasuda ve ark (103), 128 hipogonad hasta üzerinde yaptığı çalışmada serum 8-OHdG düzeyleri ile tükürük 8-OHdG düzeyleri çalışılmış ve sonuçlar birbiri ile uyumlu bulunmuştur. Hastaları ciddi (14 hasta) ve hafif (128 hasta) hipogonad olarak iki gruba ayırmışlardır. Ciddi hipogonadizmi olan hastaların tükürük 8-OHdG düzeyleri hafif hipogonad hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Hastalara 6 ay boyunca haftalık sildenafil tedavisi uygulanması sonrasında, 8-OHdG düzeylerinin anlamlı şekilde azaldığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak; tükürük 8-OHdG düzeylerinin hipogonad hastalarda oksidatif stresi göstermede bio-marker olarak kullanılabileceğini öne sürmüşlerdir.

Bu çalışmada; tedavi öncesi ve sonrası hasta grubu ile kontrol grubu serum 8-OHdG düzeyi bakımından karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çalışmamızda; hipogonad erkek hastaların yaş ortalaması 29 ± 3 'tü. Yaşa bağlı olarak, bağırsak, karaciğer ve böbrek gibi dokularda 8-OHdG düzeyinde artış görüldüğü bildirilmektedir. Yine oksidatif stres kaynağı olarak gösterilen sigaranın serum ve tükürük 8-OHdG düzeylerini arttırdığı ileri sürülmüştür. Yasuda ve ark.

(103), yapmış olduğu çalışmada; ciddi hasta grubu olarak nitelenen kişilerin yaş ortalamalarının ileri (48 ± 10) olduğu ve hepsinin sigara kullanıcısı olduğu belirtilmektedir. Bunlar, 8-OHdG düzeylerini yükseltecek faktörlerdir. Bizim çalışmamızda hastalarımızın genç olması sonuçlarımızın farklı çıkmasının bir nedeni olabilir. Bir diğ er neden de; serum 8-OHdG tayininde kullandığımız ELISA metodunun yeterince hassas olmaması olabilir. 8-OHdG ölçümü metodları içerisinde spesifite ve sensitivitesi en yüksek olan metodun HPLC yöntemiyle 8-OHdG düzeylerinin ölçülmesi olduğu belirtilmektedir. Literatürde bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar yetersizdir. 8-OHdG düzeylerinin hipogonad hastalarda oksidatif stresi göstermede bir bio-marker olarak kullanılıp kullanılamayacağını, daha ileri düzeyde ve daha kontrollü yapılacak çalışmalar ile araştırılması gerektiği kanaatindeyiz.

Sonuç olarak; yüksek AOPP, MDA, NO ve düşük tiyol düzeyleriyle yansıtıldığı gibi; hipogonadizm patogenezinde oksidatif stresin önemli bir faktör olduğu görüşü desteklenmektedir. Çalışmamız, hipogonadizmli hastalarda plazma/serumda AOPP, tiyol, MDA ve NO düzeylerinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Bu tez çalışmasındaki bulguların, hastalığın patogenezinin açıklanması ve tedavi protokollerine faydalı olması açısından, literatüre önemli katkılar sağlayacağı kanaatindeyiz. Örnek büyüklüğü daha geniş olan ve daha kontrollü yeni çalışmalar ile bu ilişkinin daha iyi açıklanacağı kanısındayız.

6.SONUÇLAR

Hipogonadizm hastalığında, oksidatif stres varlığını; protein, lipid ve nükleik asit oksidasyon ürünleri ile antioksidan parametreler üzerinden göstermek ve hastaların mevcut tedavi protokolünün, oksidatif stres üzerine olası etkilerini araştırmak amacıyla yapılan bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar bulunmuştur:

1. Protein oksidasyonunun göstergesi olarak; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, tedavi öncesi hipogonadizimli hastalarda; plazma AOPP düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek, buna karşılık tiyol düzeyleri anlamlı bir şekilde düşük bulundu.
2. Lipid peroksidasyonun göstergesi olarak; kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, tedavi öncesi hipogonadizimli hastalarda serum MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu.
3. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, tedavi öncesi hipogonadizimli hastalarda serum NO düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek bulundu.
4. Gonadotropin tedavisinin oksidatif stres parametreleri üzerine olan etkisinin göstergesi olarak; tedavi öncesi hipogonadizimli hastalarla karşılaştırıldığında; tedavi sonrası hipogonadizimli hastalarda; plazma AOPP, serum MDA ve NO düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalırken, plazma tiyol düzeyleri anlamlı bir şekilde yükseldi.
5. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında; tedavi sonrası hipogonadizimli hastalarda; plazma AOPP, tiyol ve serum NO düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, serum MDA düzeyleri istatistiksel olarak anlamlı yüksekti.
6. Serum 8-OHdG düzeyleri açısından; gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

7.KAYNAKLAR

1. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği. Adrenal ve Gonadal Hastalıklar Kılavuzu 2011;68-75.
2. Melmed S, Kleinberg D. Hypogonadotropic Hypogonadism. In: Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR, Kronenberg HM (eds). Williams Textbook of Endocrinology (12th ed). Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011;194-6,1035-49.
3. Jockenhövel F. Male Hypogonadism (1th ed). UNI-MED Verlag AG, Bremen 2004 pp 12-118.
4. Aktan G, Doğru S, Küçükgergin S, et al. Mystery of idiopathic male infertility: is oxidative stress an actual risk ? Andrology 2013;99:1211-15.
5. Mancini A, Festa R, Silvestrini A, et al. Hormonal regulation of total antioxidant capacity in seminal plasma. J Androl 2009; 30 (5): 534-40.
6. Mancini A, Leone E, Festa R, et al. Effects of Testosterone on Antioxidant Systems in Male Secondary Hypogonadism. J Androl 2008, 29 (6): 622-9.
7. Lewis SEM, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. Fertil Steril. 1995;64:868-70.
8. Pasqualotto F, R Sharma, H Kobayashi, et al. Oxidative stress in normospermic men undergoing infertility evaluation. J Androl 2001; 22: 316-22.

9. Swerdloff RS, Wang C. The testis and male sexual function. In: Goldman L, Schafer AI (eds) Cecil Textbook of Medicine (24th ed). Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier; 2011:chap 242.
10. Burris AS, Rodbard HW, Winters SJ, et al. Gonadotropin therapy in men with isolated hypogonadotropic hypogonadism: The response to human chorionic gonadotropin is predicted by initial testicular size. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66:1144-9.
11. Welt C, Sidis Y, Keutmann H, et al. Activins, inhibins, and follistatins: From endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med* 2002;227:724-52.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine (3nd ed). Oxford Science Publications 2001, pp 22-24, 86-130, 196.
13. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izaković M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006; 160: 1-40.
14. Valdez LB, Arnaiz SL, Bustamante J, Alvarez S, Costa LE, Boveris A. Free radical chemistry in biological systems. *Biol Res* 2000; 33: 1-8.
15. Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49: 481-93.
16. Weiss SJ, Lobuglio AF. Phagocyte-Generated Oxygen Metabolites and Cellular Injury. *Lab Invest* 1982; 47:5-18.
17. Nordberg J, Arner ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biol Med* 2001; 31: 1287–1312.
18. Shacter E. Protein Oxidative Damage. *Methods Enzymol* 2000; 319: 428-36.
19. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-28.
20. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA Damage. *Carcinogenesis* 2000; 21: 361-70.
21. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez De Castro I. Antioxidant Enzymes and Human Diseases. *Clin Biochem* 1999; 32: 595-603.
22. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 181-200.

23. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-28.
24. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids* 2003; 25: 207-18.
25. Griffiths HR. Antioxidant and protein oxidation. *Free Radic Res* 2000; 33: 47-58. Stadtman ER, Levine RL. Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci* 2000; 899: 191-208.
26. Stadtman ER. Protein modification in aging. *J Gerontol* 1988; 43: 112-120.
27. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int* 1996; 49: 1304-13.
28. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V. Importance of oxidatively modified proteins in chronic renal failure. *Kidney Int* 2001; 59: 108-13.
29. Dalle-Donne I, Giustarini D, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation in human diseases. *Trends Mol Med* 2003; 9: 169-76.
30. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 598-625.
31. Aksu G, Ozturk C, Kavakli K, Genel F, Kutukculer N. Hypercoagulability: interaction between inflammation and coagulation in familial Mediterranean fever. *Clin Rheumatol* 2007; 26: 366-370.
32. Witko-Sarsat V, Gausson V, Descamps-Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int Suppl* 2003; 84: 11-4.
33. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Nguyen Khoa T, et al. Advanced oxidation protein products as a novel mediators of inflammation and monocyte activation in chronic renal failure. *J Immunol* 1998; 161: 2524-2532.
34. Bar-Or D, Bar-Or R, Rael LT, Gardner DK, Slone DS, Craun ML. Heterogeneity and oxidation status of commercial human albumin preparations in clinical use. *Crit Care Med* 2005; 33: 1638-41.
35. Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280: 1-8.

36. Wayner DD, Burton GW, Ingold KU, Barclay LR, Locke SJ. The relative contributions of vitamin E, urate, ascorbate and proteins to the total peroxy radical-trapping antioxidant activity of human blood plasma. *Biochim Biophys Acta* 1987; 924: 408-19.
37. Hu ML, Louie S, Cross CE, Motchnik P, Halliwell B. Antioxidant protection against hypochlorous acid in human plasma. *J Lab Clin Med* 1993; 121: 257-62.
38. Dean RT, Fu S, Stocker R, Davies Mj. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem J* 1997; 324: 1-18.
39. Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, Martin SW. Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 179-86.
40. Himmelfarb J, Stenvinkel P, Ikizler A, Hakim RM. The elephant in uremia: oxidant stress as a unifying concept of cardiovascular disease in uremia. *Kidney Int* 2002; 62: 1524-38.
41. Prakash M, Shetty MS, Tilak P, Anwar N. Total thiols: biomedical importance and their alteration in various disorders. *OJHAS* 2009; 8: 1-9.
42. Kılınç A, Kılınç K. Nitrik Oksit: Biyolojik fonksiyonları ve toksik etkileri. Palme Yayıncılık 2003.
43. Murphy MP, Packer MA, Scarlett JL, Martin SW. Peroxynitrite: a biologically significant oxidant. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 179-86.
44. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE. Oxidation of Nitric Oxide in Aqueous Solution to Nitrite But not Nitrate: Comparison with Enzymatically Formed Nitric Oxide From L-arginine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90:8103-8107.
45. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 2000; 190: 244-54.
46. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 193-201.
47. Moro MA, Russel RJ, Cellet S, et al. cGMP mediates the vascular and platelet actions of nitric oxide: confirmation using an inhibitor of the soluble guanylyl cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 1480-5.

48. Akçakoyun M. Koroner Arter Hastalığı Olgularında Koroner Risk Faktörleri ile Endotel Fonksiyonları Arasındaki İlişki, Kardiyoloji Uzmanlık Tezi, İstanbul 2004: 58.
49. Gross SS, Wolin MS. Nitric Oxide: Pathophysiological Mechanisms. *Annu. Rev. Physiol* 1995; 57: 737-769.
50. Higashino H, Tabuchi M, Yamagata S. Serum nitric oxide metabolite levels in groups of patients with various diseases in comparison of healthy control subjects. *J Med Sci* 2010; 10: 1-11.
51. Lee NP, Cheng CY et al. Nitric oxide/nitric oxide synthetase, spermatogenesis and tight junction dynamics. *Biol Repord* 2004;70: 267-76.
52. McDorman KS, Pachkowski BF, Nakamura J, Wolf DC, Swenberg JA. Oxidative DNA damage from potassium bromate exposure in Long-Evans rats is not enhanced by a mixture of drinking water disinfection by-products. *Chem Biol Interact* 2005;152:107-17.
53. Maura L, Casalini C, Cariaggi R, Michelucci L, Dolara P. Levels of 8-Hydroxyguanosine as a marker of DNA damage in human leukocytes. *Free Radie Biol Med* 2000; 28: 13-7.
54. Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta* 2004; 339: 1-9.
55. Liepnicks J, Kluge-Beckerman B, Benson M. Characterization of amyloid A protein in secondary amyloidosis: the predominant deposition of serum amyloid Al. *Biochim Biophys Acta* 1995;1270:81-6.
56. Shigenaga MK, Ames BN. Assay for 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; A biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Free Radic Biol&Med* 1991; 10: 211-6.
57. Buthumrung N, Mahidol C, Navasumrit P, et al. Oxidative DNA damage and influence of genetic polymorphisms among urban and rural school children exposed to benzene. *Chem Biol Interact* 2008; 172: 185-94.
58. Chen HI, Liou SH, Ho SF, et al. Oxidative DNA damage estimated by plasma 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG): influence of 4, 4'- methylenebis (2-chloroaniline) exposure and smoking. *J Occup Health* 2007; 49(5): 389-98.

59. Müftüoğlu M. DNA Tamiri ve Erken Yaşlanma Sendromları. *Turkish Journal of Biochemistry* 2003; 28 (1); 20-4.
60. Jia L, Shafirovich V, Geacintov NE, Broyde S. Lesion specificity in the base excision repair enzyme hNeill: modeling and dynamics studies. *Biochemistry* 2007; 8:5305-14.
61. Ray G, Batra S, Shukla NK at al. Lipit peroxidation, free radical production and antioxidant status in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2000; 59: 163–170.
62. Draper HH, McGirr LG, Hadley M. The metabolism of malondialdehyde. *Lipids*, 1986; 21: 305-307.
63. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res* 1998; 39: 1529-42.
64. Rumley AG, Paterson JR. Analytical aspects of antioxidants and free radical activity in clinical biochemistry. *Ann Clin Biochem* 1998; 35: 181-200.
65. Knight JA, Pleper RK, Macellon L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipit peroxidaiton. *Clin Chem* 1988; 34: 2433-38.
66. Snyder PJ, Peachey H, Berlin JA, et al. Effects of testosterone replacement in hypogonadal men. *J Clin Endorinol Metab* 2000;85:2670-7.
67. Kapoor D, Goodwin E, Channer KS, Jones TH. Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol* 2006;154:899-906.
68. O'Connor DB, Archer J, Hair WM, Wu FC. Exogenous testosterone, aggression and mood in eugonadal and hypogonadal men. *Physiol Behav* 2002;75:557-66.
69. Shabsigh R, Katz M, Yang G, et al. Cardiovascular issues in hypogonadism and testosterone therapy. *Am J Cardiol* 2005;96:67-72.
70. Bhasin S, Woodhouse L, Storer TW. Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol* 2001;170:27-38.
71. Naharci MI, Pinar M, Bolu E, Olgun A. Effect of testosterone on insulin sensitivity in men with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism. *Endocrine Practice* 2007;13:629-35.
72. Singh R, Artaza JN, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Bhasin S. Androgens stimulate myogenic differentiation and inhibit adipogenesis in C3H 10T1/2

- pluripotent cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Endocrinology* 2003;144:5081-8.
73. Berg G, Schreier L, Geloso G, et al. Impact on Lipoprotein Profile after Long-Term Testosterone Replacement in Hypogonadal Men. *Horm Metab Res* 2002;34:87-92.
 74. Bolu E, Sonmez A, Tapan S, et al. HDL Cholesterol Subfractions and the Effect of Testosterone Replacement in Hypogonadism. *Horm Metab Res* 2013; 45(6):443-8.
 75. Tan KC, Shiu SW, Pang RW, Kung AW. Effects of testosterone replacement on HDL subfractions and apolipoprotein A-I containing lipoproteins. *Clin Endocrinol* 1998;48(2):187-94.
 76. Malkin CJ, Pugh PJ, Kapoor D, Jones RD, Channer KS and Jones TH. The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:3313-8.
 77. Eckardstein A, Wu FC. Testosterone and atherosclerosis. *Growth Horm IGF Res* 2003;13:72-84.
 78. Hagenfeldt Y, Linde K, Sjoberg HE, Zumkeller W, Arver S. Testosterone increases serum 1,25-dihydroxyvitamin D and IGF-1 in hypogonadal men. *Int J Androl* 1992;15:92-102.
 79. Bilezikian JP, Morishima A, Bell J, et al. Increased bone mass as a result of estrogen therapy in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* 1998;339:599-603.
 80. Young J, Couzinet B, Chanson P, et al. Effects of human recombinant luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in patients with acquired hypogonadotropic hypogonadism: Study of Sertoli and Leydig cell secretions and interactions. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:3239-44.
 81. Thomas M. The Role of Free Radicals and Antioxidants: How do We Know that they are Working. *Critical Rev. Food Sci. Nutr.* 1995; 35: 21-39.
 82. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa: superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl* 1987; 8:336-48.

83. Gausson V, Witko-Sarsat V, Descamps-Latscha B. Are advanced oxidation protein products potential uremic toxins? *Kidney Int Suppl* 2003; 84: 11-4.
84. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, Witko-Sarsat V, et al. Oxidized low-density lipoprotein induces macrophage respiratory burst via its protein moiety: A novel pathway in atherogenesis? *Biochem Biophys Res Commun* 1999 ; 263: 804-9.
85. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int.* 2000; 58: 2571-8.
86. Piomboni P, Stendardi A, Gambera L, et al. Protein modification as oxidative stress marker in normal and pathological human seminal plasma. *Redox Rep.* 2012;17(5):227-32.
87. Barakat GM, Moustafa ME, Bikhazi AB. Effects of selenium and exendin-4 on glucagon-like peptide-1 receptor, IRS-1, and Raf-1 in the liver of diabetic rats. *Biochem Genet* 2012;50(11-12):922-35.
88. Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, Akyolcu MC. The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men. *J Androl* 2008;29:4-46.
89. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, et al. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J Androl* 2001;22:798-803.
90. Suleiman SA, Ali ME, Zaki ZM et al. Lipid peroxidation and human sperm motility: protective role of vitamin E. *J Androl* 1996;17:530.
91. Tüközkán N, Erdamar H, Seven I. Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *Firat Tıp Dergisi* 2006;11(2): 88-92.
92. Baskol G, Korkmaz S, Erdem F, Caniklioglu A, Kocyigit M, Aksu M. Assessment of nitric oxide, advanced oxidation protein products, malondialdehyde and thiol levels in patients with restless legs syndrome. *Sleep Med* 2012;13(4):414-8.
93. Kütük U, Erkan A, Erçin U, et al. Koroner arter hastalarında oksidatif stres ve koroner anjiyografi parametrelerinin korelasyonu. *Türk Kardiyol Dern* 2011;1:154.

94. Romeo C, Santoro G, Ientile R et al. Nitric oxide production is increased in the spermatic veins of adolescents with left idiopathic varicocele. *J. Pediatric Surg.* 2001; 36: 389-93.
95. Zini A, O'Bryan MK, Magid MS et al. Immunohistochemical localization of endothelial nitric oxide synthase in human testis, epididymis and vas deferens suggests a possible role for nitric oxide in spermatogenesis, sperm maturation and programmed cell death. *Biol Reprod* 1996; 55:935-41.
96. O'Bryan MK, Zini A, Cheng CY, Schlegel PN. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. *Fertil Steril* 1998; 70:1143-7.
97. Balercia G, Moretti S, Vignini A, et al. Role of nitric oxide concentrations on human sperm motility. *J Androl* 2004; 25:245-49.
98. Setchell BP, Maddoks S, Brooks DE et al. Anatomy, vasculature innervation and fluids of the male reproductive tract. *The Physiology of Reproduction* (2nd ed). 1994;1063-175.
99. Ley SB, Leonard JM. Male hypogonadotropic hypogonadism: Factors influencing response to human chorionic gonadotropin and menopausal gonadotropin, including prior exogenous androgens. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:746.
100. Aitken RJ, Fisher H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa, the balance of benefit and risk. *Bioessays* 1994;16:259.
101. Henkel R, Kierspel E, Staf T, et al. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril* 2005;83:635-42.
102. Aitken RJ. Founders Lecture. Human spermatozoa: fruits of creation, seeds of doubt. *Reprod Fertil Dev* 2004;16:655.
103. Yasuda M, Ide M, Furuyo K et al. Salivary 8-OHdG: A Useful Biomarker for Predicting Severe ED and Hypogonadism. *J Sex Med* 2008; 5:1482-91.

8.TEZ ONAY SAYFASI

Dr. Kenan GÜÇLÜ'nün “ Hipogonadizmli Hastalarda Oksidatif Stres Parametreleri ve Bu Parametrelerin Tedavili ile Etkileşimi” konulu tezi 17.07.2013 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

Prof. Dr. Gülden BAŞKOL (Danışman)

Prof. Dr. Fahri BAYRAM

Prof. Dr. Mustafa KULA

Prof. Dr. Eser KILIÇ