



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK
LİSANS
TEZİ**

**AĞIR HİPOKSIYE MARUZ BIRAKILMIŞ
SIÇANLARDA HİPOKSİK ÖNKOŞULLAMANIN
PLAZMA TESTOSTERON DÜZEYLERİ,
TESTİS AĞIRLIĞI, SPERM SAYISI, OKSİDAN
HASAR VE HÜCRE HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ**

GAMZE BİLGİLİ

FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI

ŞUBAT 2016



**AĞIR HİPOKSİYE MARUZ BIRAKILMIŞ SIÇANLARDA HİPOKSİK
ÖNKOŞULLAMANIN PLAZMA TESTOSTERON DÜZEYLERİ, TESTİS
AĞIRLIĞI, SPERM SAYISI, OKSİDAN HASAR VE HÜCRE HASARI
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Gamze BİLGİLİ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
FİZYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2016

Gamze BİLGİLİ tarafından hazırlanan “Ağır hipoksiye maruz bırakılmış sıçanlarda hipoksik önkoşullamanın plazma testosteron düzeyleri, testis ağırlığı, sperm sayısı, oksidan hasar ve hücre hasarı üzerine etkileri” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ/OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof.Dr.Sibel DİNÇER

Fizyoloji A.D.,Gazi Üniversitesi Tıp
Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Başkan : Prof.Dr.Deniz ERBAŞ
Fizyoloji A.D.,Gazi Üniversitesi Tıp

Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Üye : Prof.Dr.Metin BAŞTUĞ
Fizyoloji A.D.,Ankara Üniversitesi Tıp

Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Tez Savunma Tarihi: 18/02/2016

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Ufuk KOCA ÇALIŞKAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Gamze BİLGİLİ

18.02.2016

AĞIR HİPOKSİYE MARUZ BIRAKILMIŞ SIÇANLARDA HİPOKSİK
ÖNKOŞULLAMANIN PLAZMA TESTOSTERON DÜZEYLERİ, TESTİS AĞIRLIĞI,
SPERM SAYISI, OKSİDAN HASAR VE HÜCRE HASARI ÜZERİNE ETKİLERİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Gamze BİLGİLİ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şubat 2016

ÖZET

Bu çalışmanın amacı ağır hipoksiye maruz bırakılmış sıçanlarda, hipoksik önkoşullamanın testis ağırlığı, sperm sayısı, serum testosteron düzeyi, hücre hasarı ve oksidan hasar üzerine etkilerini araştırmaktır. Çalışmada 24 adet erkek Wistar Albino sıçan her grupta 6 hayvan bulunacak şekilde Kontrol (K), Ön Koşullama (ÖK), Ağır Hipoksi (AH), ÖK+ AH olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. ÖK grubundaki denekler üç gün süre ile günde 2 saat %10'luk O₂'e, AH grubundaki denekler 3 gün süre ile normal atmosfer koşullarında yaşatıldıktan sonra 4. gün 3 saat süre ile %7'lik O₂'e maruz bırakılmışlardır. ÖK+AH grubundaki denekler ise 3 gün süre ile günde 2 saat %10'luk O₂ 'e, daha sonra 4.günde, 3 saat süre ile %7'lik O₂'e maruz bırakılmışlardır. Plazmada total testosteron düzeyleri, semende sperm sayısı ve hareketliliği değerlendirilmiş ve testis dokularında malondialdehid gibi oksidan ve GSH gibi antioksidan parametreler ölçülmüştür . Ayrıca testis dokusu histolojik olarak incelenmiştir. Sonuçlar Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiş; p <0.05 değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Ölçülen parametrelerde gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bununla birlikte histolojik bulgular, ağır hipoksinin testis morfolojisinde belirgin yapı bozukluğuna neden olduğunu, ağır hipoksi öncesi uygulanan ön koşullamanın kısmen koruyucu etki yaptığını göstermiştir. Bu çalışmada uygulanan hipoksik modelin testislerde neden olduğu yapısal hasara oksidatif stres dışında başka mekanizmaların da yol açmış olabileceği ve hücresel düzeydeki hasarın henüz testis fonksiyonlara yansımadağı sonucuna varılmıştır.

Bilim Kodu : 1023
Anahtar Kelimeler : Hipoksik ön koşullama, oksidatif stres, sperm sayısı, testis morfolojisi
Sayfa Sayısı : 85
Danışman : Prof. Dr. Sibel Dinçer

EFFECTS OF HYPOXIC PRE-CONDITIONING ON RATS EXPOSED TO
SEVERE HYPOXY ON PLASMA TESTOSTERONE LEVELS, TESTICLE
WEIGHT, SPERM COUNT, OXIDATIVE DAMAGE AND CELL DAMAGE

(M. Sc. Thesis)

Gamze BİLGİLİ

GAZİ UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

February 2016

ABSTRACT

The aim of this study is to determine whether hypoxic preconditioning has a protective effect on testicles, testicle weight, sperm count, serum testosterone level, cellular damage and oxidative damage against severe hypoxia. 24 male Wistar Albino rats were randomly divided into four groups, so that every group has 6 rats as Control (C), Preconditioning (PC), Severe Hypoxia (SH), PC+SH. Rats in PC group were exposed to 10% of O₂ for 2 hours/day through 3 consecutive days. Rats in SH group were kept under standard atmospheric conditions for 3 days, then were exposed to 7% O₂ for 3 hours on the fourth day. The rats in PC+SH groups were exposed to 10% O₂ for 2 hours/day for 3 days and then were exposed to 7% of O₂ on the fourth day. Plasma testosterone levels, number and mobility of sperms were measured in semen and antioxidant parameters such as GSH and oxidant parameters such as malondialdehyde were measured in testicular tissue. Moreover the testicles were examined histologically. Kruskal Wallis and Mann-Whitney U tests were used for statistical analyses; p values less than 0.05 were accepted as significant. There were no statistically significant changes in the measured parameters. However, histological findings showed that severe hypoxia caused significant morphological abnormalities in testicles, even though hypoxic preconditioning performed before severe hypoxia provided partially protective effect. Our results suggest that severe hypoxia may distort sperm morphology by several other mechanisms rather than oxidative stress alone and that cellular damage did not immediately affect testicular functions.

Science Code : 1023

Key Words : Hypoxic pre-conditioning, oxidative stress, sperm number, testicle morphology

Page Number :85

Supervisor : Prof. Dr. Sibel Dinçer

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Prof. Dr. Sibel Dinçer'e teşekkürlerimi sunarım.

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji Anabilim Dalı'ndaki eğitimim boyunca emeklerini, bilgilerini ve sevgilerini benden esirgemeyen, Prof. Dr. Lamia PINAR'a, Prof. Dr. Aydan BABÜL'e, Prof. Dr. Deniz ERBAŞ'a, Prof. Dr. K. Gonca AKBULUT'a ve Prof. Dr. Çiğdem ÖZER, Doç.Dr.Şevin Güney ve Dr.Tayfun Göktepe 'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda bana yardımcı olan, sevgisini ve desteğini her zaman hissettiren, tezimin her aşamasında emeği olan sevgili ailem'e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER LİSTESİ	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
RESİMLER LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hipoksi	3
2.1.1. Hipoksinin algılanması	3
2.1.2. Hipoksinin hücreler üzerine etkileri	4
2.1.3. Hipoksi ve oksidatif stres	13
2.1.4. Hipoksik önkoşullanma	16
2.2. Testis Fizyolojisi	17
2.2.1. Testis yapısı ve fonksiyonları	17
2.2.2. Sperm yapımı (Spermatogenezi uyaran hormonal faktörler).....	20
2.2.3. Sperm sayı ve motilitesinin değerlendirilmesi	23
2.3. Hipoksinin Testis Fonksiyonlarına Etkisi	25
2.3.1. Hipoksi, oksidan stres, antioksidan sistem ve testisler.....	25
2.4. Testiste Hipoksik Önkoşullama ve Oksidatif Stres	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereçler	27

	Sayfa
3.1.1. Deney hayvanları	27
3.1.2. Laboratuvar cihazları	27
3.1.3. Kimyasallar	29
3.2. Araştırma Planı	30
3.2.1. Deney grupları ve uygulanan deney protokolü	30
3.3. Tayin Yöntemleri	33
3.3.1. Plazmada total testosteron tayin yöntemi	33
3.3.2. Testis dokusunda malondialdehid (MDA) tayin yöntemi	33
3.3.3. Testis dokusunda redükte glutatmyon (GSH) tayin yöntemi	33
3.3.4. Histolojik yöntemler	34
3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemi	36
4. BULGULAR	37
4.1. Hayvan Ağırlığı Ölçümleri	37
4.2. Testis Ağırlığı Ölçümleri	38
4.3. Sperm Sayısı	39
4.4. Sperm Hareketliliği	40
4.4.1. +1 Sperm hareketliliği	40
4.4.2. +2 Sperm hareketliliği	41
4.4.3. +3 Sperm hareketliliği	42
4.4.4. +4 Sperm hareketliliği	43
4.5. Plazma Testosteron Düzeyleri	44
4.6. Doku Malondialdehit Düzeyleri	45
4.7. Doku Glutasyon Düzeyleri	46
4.8. Johnsen Skor	47
4.9. Histolojik Bulgular	48
5. TARTIŞMA	61

	Sayfa
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR.....	71
EKLER.....	83
EK-1. Etik kurul onayı.....	84
ÖZGEÇMİŞ	85



ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen bileşikleri	11
Çizelge 2.1. Başlıca Antioksidanlar	15
Çizelge 4.1. Kontrol (K), Önkoşullama (ÖK), Ağır Hipoksi (AH), Önkoşullama+Ağır Hipoksi gruplarının oksidan stres, sperm sayısı, hareketliliği ve plazma testosteron değerleri ve Johnsen skor (sıra ortalama±standart sapma).....	59



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Hipoksiye verilen temel cevaplar.	6
Şekil 2.2. HIF proteinlerinin aktivasyon ve inaktivasyonuna yol açan post-translasyonel modifikasyonlar.....	7
Şekil 2.3. A. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu, B. Enzimlerin serbest oksijen radikalleri üzerine etkisi	10
Şekil 2.4. Testis fonksiyonları	19
Şekil 2.5. Sperm yapımının Hormonal olarak uyarılması.....	20
Şekil 2.7. Normal sperm görüntüsü	24
Şekil 2.8. Sıçan sperm görüntüsü.....	24
Şekil 3.1. Hipoksik Kamara.....	28
Şekil 3.2. Makler kamara	29
Şekil 3.3. 20 x buyutmede sperm görüntüsü	32
Şekil 3.4. 20 x büyütmede sperm görüntüsü	32
Şekil 4.1. Hayvan ağırlıklarının gruplara göre dağılımı	37
Şekil 4.2. Testis ağırlıklarının gruplara göre dağılımı.....	38
Şekil 4.3. Sperm sayısının gruplara göre dağılımı	39
Şekil 4.4. +1 sperm hareketliliğinin gruplara göre dağılımı	40
Şekil 4.5. +2 sperm hareketliliğinin gruplara göre dağılımı	41
Şekil 4.6. +3 sperm hareketliliğinin gruplara göre dağılımı	42
Şekil 4.7. +1 sperm hareketliliğinin gruplara göre dağılımı	43
Şekil 4.8. Plazma testosteron düzeylerinin gruplara göre dağılımı	44
Şekil 4.9. Testis MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı	45
Şekil 4.10. Testis GSH düzeylerinin gruplara göre dağılımı	46
Şekil 4.11. Testiste johnsen skorlamanın gruplara göre dağılımı	47

RESİMLER LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait küçük büyültmeli resimde seminifer epitel (\leftrightarrow), interstisyel alan (Δ), seminifer tübül lümeninde spermiyumlar (\rightarrow) ve kapiller (\triangle) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x100).	48
Resim 4.2. Kontrol grubuna ait büyük büyültmeli resimde seminifer epitel (\leftrightarrow), Leydig hücreleri (\blacktriangleright) ve Sertoli hücresi (—) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).	49
Resim 4.3. Ön koşullama uygulanan gruba ait küçük büyültmeli resimde seminifer epitel (\leftrightarrow), intratübüler ödem (\blacklozenge), interstisyel ödem (\blacksquare), lümeninde spermiyum az olan tübüller (\diamond), seminifer tübül lümeninde spermiyumlar (\rightarrow) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x100).	50
Resim 4.4. Ön koşullama uygulanan gruba ait büyük büyültmeli resimde seminifer epitel (\leftrightarrow), Leydig hücreleri (\blacktriangleright) ve Sertoli hücresi (—) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).	51
Resim 4.5. Ön koşullama uygulanan gruba ait büyük büyültmeli resimde Sertoli hücresi (—) ve intratübüler ödem (\blacklozenge) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).	52
Resim 4.6. Ağır hipoksi uygulanan gruba ait küçük büyültmeli resimde seminifer epitel (\leftrightarrow), intratübüler ödem (\blacklozenge), interstisyel ödem (\blacksquare), şekilsel bozukluk gösteren seminifer tübüller (\uparrow), ödem alanında hyalinöz madde (*) ve tüm seri hücreleri lümene boşalan tübül yapısı ($>$) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100).	53
Resim 4.7. Ağır hipoksi uygulanan gruba ait büyük büyültmeli resimde tüm seri hücreleri lümene boşalan tübül yapısı ($>$) ve bazal membranda ondülasyon (J) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).	54
Resim 4.8. Ağır hipoksi uygulanan gruba ait büyük büyültmeli resimde vakuolizasyon gösteren Leydig hücreleri (\blacktriangleright) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).	55
Resim 4.9. Ağır hipoksi öncesi ön koşullama uygulanan gruba ait küçük büyültmeli resimde intratübüler ödem (\blacklozenge) ve interstisyel ödem (\blacksquare) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x100).	56
Resim 4.10. Ağır hipoksi öncesi ön koşullama uygulanan gruba ait büyük büyültmeli resimde intratübüler ödem (\blacklozenge), spermatogonyum (H), spermatozitler (+) ve spermatidler (x) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).	57

Resim**Sayfa**

- Resim 4.11. Ağır hipoksi öncesi ön koşullama uygulanan gruba ait büyük büyütmeli resimde Leydig hücreleri (►) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400). 58



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile aşağıda belirtilmiştir.

Simgeler	Açıklama
gr	Gram
mg	Miligram
µl	Mikrolitre
µmol	Mikromol
mM	Milimol
nmol	Nanomol
Kısaltmalar	Açıklama
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOR	Serbest Oksijen Radikalleri
MDA	Malondialdehit
AH	Ağır Hipoksi
ATP	Adenozin Trifosfat
ADP	Adenozin Difosfat
AMP	Adenozin Monofosfat
Ca²⁺	Kalsiyum
K⁺	Potasyum
Na⁺	Sodyum
HIF-1	Hipoksi İndüklenebilir Faktör
IGF-2	Insulin-like Growth Factor-2
pVHL	Von Hippel Lindau kompleksi
TGF beta	Transforming Growth Factor beta
O₂	Süperoksit
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
OH⁻	Hidroksil Radikalleri
ONOO⁻	Peroksi Nitrit

Kısaltmalar	Açıklama
ETZ	Elektron taşıma zinciri
BCL-2	B-Cell lymphoma 2
ÇDYA	Çoklu doymamış yağ asitleri
LOO-	lipit peroksit radikalleri
GRd	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
HÖ	Hipoksik Ön Koşullama
CoCl₂	Kobalt
K	Kontrol
AP-1	Activating Protein-1
CREB	cyclic AMP response element binding
NF-KB	nuclear factor-KB
NAD	Nikotinamid Adenin Nükleotid
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
LH	Lüteinleştirici Hormon
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
pVHL	Von Hippel Lindau Kompleksi
SF	Serum Fizyolojik
İ-R	İskemi-Reperfüyon

1. GİRİŞ

Organizma, fizyolojik ya da patolojik nedenlerle hipoksiye maruz kalabilir. Hipoksi sonucu, hücre membranında/organellerde yapısal ve metabolik değişiklikler görülür [1]. Hipoksi sırasında reaktif oksijen türlerinin (ROS) yani superoksit, hidrojen peroksit, peroksinitrit, hidroksil radikallerinin üretiminde artış olur ve antioksidan savunma sisteminin aktivitesindeki azalmaya bağlı olarak hücrelerde oksidatif hasar görülebilir [2].

Normal fizyolojik koşullar altında metabolizma sonucu açığa çıkan ROS, hücrelerdeki antioksidan savunma sistemleri aracılığı ile yok edilir [2;3]. Hipoksi sırasında ise mitokondriyal solunum zincirindeki sitokrom oksidaz tarafından suya indirgenen oksijen miktarı azalır ve bu durum mitokondride strese neden olarak ROS oluşumunu artırır. Böylece hücrede oksidatif stres görülür [4].

Serbest radikaller güçlü reaktif özellikleri olan moleküllerdir. Hücrenin savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırılamazlarsa hücre hasarıyla sonuçlanan bir dizi reaksiyonu başlatırlar [3].

Memeli testisleri serbest radikallerin oksidatif hasarına karşı çok hassastır [2]. ROS hücre membranındaki lipidlerle reaksiyona girerek lipid peroksidleri oluşturmakta, bunlar da membran geçirgenliğinde değişim yaratmaktadır [4,5,6].

Hipoksinin uzun sürmesi halinde, organizmanın koruyucu mekanizmalar geliştirdiği görülür. "Aklimatizasyon" olarak adlandırılan bu durum, yüksek irtifada uzun süre yaşayan kişilerde, kronik hipoksiye karşı tolerans ortaya çıkmasıdır [6].

İskemik veya hipoksik ön koşullama, hücrelerin kısa süreli olarak hipoksiye veya iskemiye maruz bırakılmasıdır. Önkoşullama ile sağlanan koruyucu etki mekanizmaları, aklimatizasyon süreçlerine göre daha hızlı devreye girmektedir. Fakat bu koruyucu etki mekanizmasının nasıl geliştiğine dair veriler yeterli değildir.

Son yıllarda iskemik veya hipoksik ön koşullamanın, böbrek, akciğer, kalp ve beyin gibi çeşitli dokularda koruyucu etkisinin olduğu in vivo ve invitro çalışmalarda

gösterilmiştir [7]. Ancak testis ve ilişkili erkek üreme organlarındaki etkisi üzerindeki çalışmalar az sayıdadır.

Hipoksik önkoşullamanın, hipoksiye maruz kalan erkek sıçanların testislerindeki oksidan hasara ve testis morfolojisine etkilerini araştırmak üzere planlanan bu çalışmada testis dokusunda MDA gibi oksidan hasar belirteci ve antioksidan etkili GSH düzeyleri ile testis dokusunun ışık mikroskopik incelemesi yapılmış; bunun yanısıra serum testosteron düzeyleri, testis ağırlığı, sperm sayısı ve hareketliliği ölçülmüştür.



2.GENEL BİLGİLER

2.1.Hipoksi

Oksijen tüketimi ve dokuya sağlanan oksijen düzeyleri arasında oluşan dengesizlikler doku hipoksisini ile sonuçlanır. Hipoksi iyon homeostazı, eritropoez, anjiyogenez, proliferasyon ve diferensiyasyon gibi süreç ve durumlarda bir takım patofizyolojik değişimlere yol açmaktadır [8].

Hipoksi yalnızca ateroskleroz, obstürüktif uyku apnesi, iskemik hastalıklar ve kanser gibi patolojik süreçlerde değil embriyonik gelişim gibi doğal fizyolojik süreçlerde de ortaya çıkar. Bunların dışında yüksek rakımlardaki çevresel koşullar da insanda fizyolojik fonksiyonları riske atacak hipoksiye neden olabilir [8].

Oksijen düzeylerinin düşük olmasına ilişkin literatürde birbirinden farklı terimler kullanılmaktadır. Hipoksemi, kandaki oksijen düzeylerinin düşüklüğünü ifade etmek için kullanılırken; hipoksi, hücresel fonksiyonların devamı için gerekli olan oksijenin dokulara sağlanamamasıdır. İskemi ise sadece oksijen düzeylerinin değil dokuya sağlanan kan akımının azalması dolayısıyla oksijenin yanısıra, dokuya sağlanan nutrisyonel faktörlerin de azalması ve CO₂, laktik asit, amonyum gibi metabolik ürünlerin dokularda birikimine neden olan bir durumdur [9].

Hipoksiye karşı geliştirilen cevap akut, subakut ve kronik olarak zaman bazında ve ayrıca anoksi, orta şiddette hipoksi, ağır hipoksi gibi şiddet bazında sınıflandırılabilir [9,10,11]. Beyin yüksek oksijen gereksinimi nedeniyle hipoksiye en duyarlı organ olarak kabul edilmekteyken, iskelet kası hipoksiye dayanıklılığı en yüksek dokulardandır [12].

2.1.1. Hipoksinin algılanması

Hipoksi pekçok moleküler süreci başlatmaktadır, ancak hipoksinin hücre tarafından tanınmasını sağlayan hücresel oksijen sensörleri net olarak ortaya konamamıştır. Hipoksinin algılanışı ile ilgili klasik bir teori hem proteini ile ilgilidir. Bu protein orta kısmında oksijenin bağlanmasını sağlayan demir elementi içerir.

Hem bölgesine sahip oksijen bağlayabilen pek çok proteinin var olduğu bilinmesine karşın henüz hipoksinin algılanmasında rol oynadığı düşünülen bir formuna rastlanmamıştır [13].

Bir diğer hipotez ise iyon kanallarını işaret eden membran modelidir. Hipoksi esnasında oksijen sensitif kanallardan iyon kanallarının inhibisyona uğradığı bildirilmiştir. Bu kanalların oksijen sensitif olarak adlandırılmalarının nedeni pH ya da ATP gibi sitoplazmik faktörlerin düzeylerinde bir değişim olmaksızın modülasyonlarının oksijen varlığı ile doğrudan ilişkili olmasıdır [14,15] ,ancak oksijenin bu iyon kanalları ile nasıl etkileşime geçtiği bilinmemektedir. Bu modelin çelişkili noktalarından biri ise aynı tip oksijen sensitif iyon kanallarının bazı tip hücrelerde hipoksi ile inhibe olurken, bazı tip hücrelerde aktive olmasıdır [16]. Oksijen tüketiminin hücredeki ana merkezi olmasından ötürü mitokondrinin hipoksi algılanmasında rolü olduğu öne sürülmüştür. Hipoksiyi taklit eden durumların ise mitokondriyal fonksiyonların inhibe olmasına neden olduğu bilinmektedir. Mitokondrinin farklı oksijen düzeylerini nasıl algılıyor olabileceği ise henüz aydınlatılamamıştır.

2.1.2. Hipoksinin hücreler üzerine etkileri

Çok hücreli organizmalar orta şiddette kronik hipoksi altında oksijen homeostazının sağlanması ve hayatta kalmak adına pek çok hücrel cevap geliştirirler (Şekil 2.1.).

Akut Etkiler

İyon Homeostazı

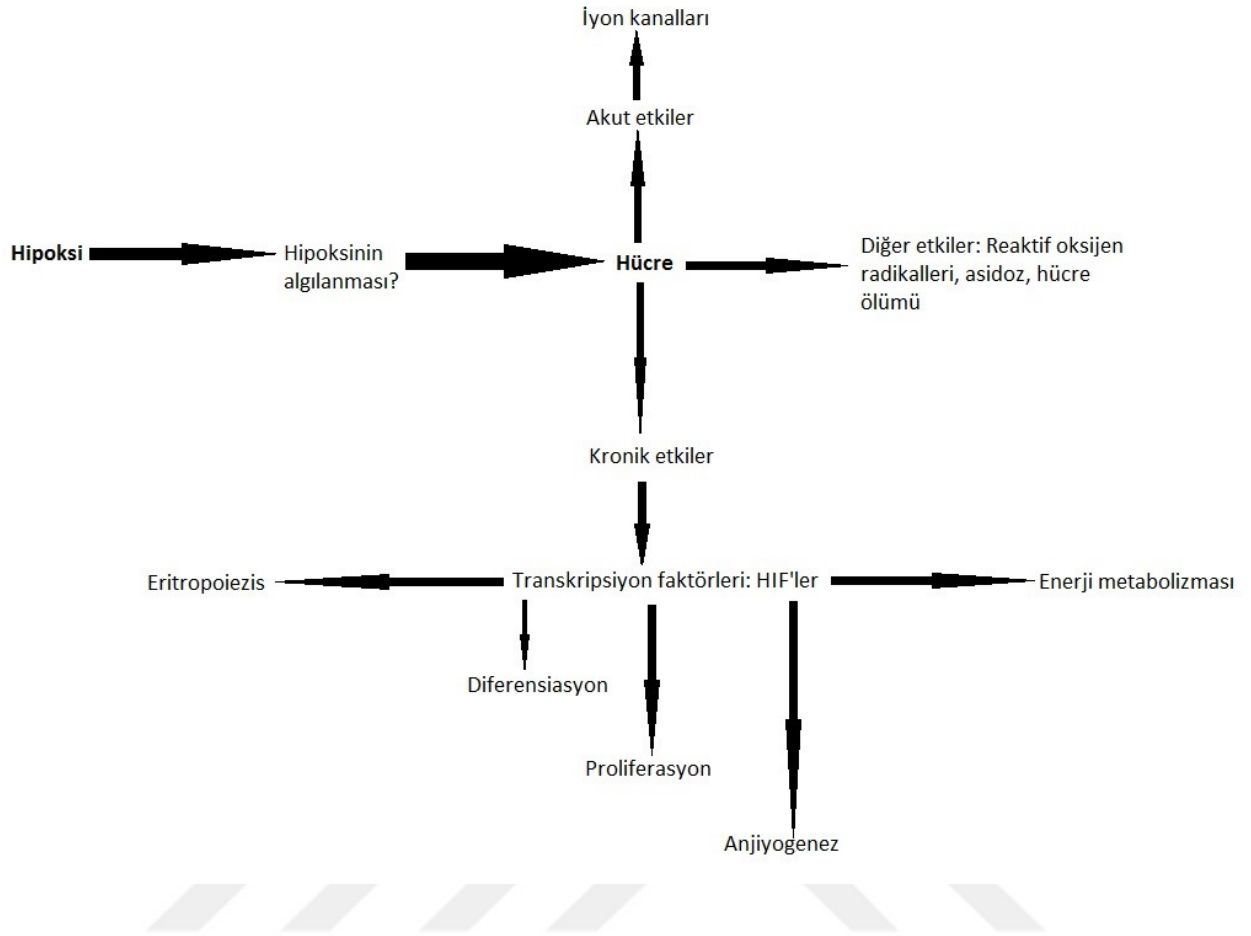
Hipoksiye verilen akut cevabın iyon homeostazında önemli bozulmalara neden olduğu düşünülmektedir. İyon kanallarının düşük oksijen seviyelerini ilk algılayan yapılar olduğu tahmin edilmektedir. Hücreler ürettikleri ATP'nin büyük kısmını iyon gradientinin devam ettirilmesinde kullanmaktadırlar. Normoksik koşullarda üretilen

ATP'nin % 60 kadarının Na^+/K^+ ATPaz veya Ca^{+2} ATPaz gibi iyon kanalı bağımlı ATPazlar tarafından tüketildiği bilinmektedir [17].

Hipoksi esnasında ATP/ADP oranının düşmesi hücre dışına K^+ çıkması, hücre içine Na^+ ve Ca^{+2} girmesi ile sonuçlanır. K^+ kanallarının azalan aktivitesi ile birlikte, hücre membranı depolarize olur ve voltaj bağımlı Ca^{+2} kanallarını açarak hücre içine Ca^{+2} girişine neden olur. Hücre içinde yüksek konsantrasyonlarda Ca^{+2} bulunması mitokondri metabolizmasında değişikliklere, membrandan serbest yağ asiti ve proteinlerin salınması ile sonuçlanacak şekilde lipaz ve proteazların aktivasyonuna, endonükleazların aktivasyonuna ve reaktif oksijen radikallerinin oluşmasına neden olur. Hipoksiye karşı verilen akut (depolarizasyon) ve kronik (gen ve protein ekspresyonlarında değişiklikleri) cevaplar arasındaki köprünün intrasellüler Ca^{+2} konsantrasyonlarındaki artış ile kurulduğu düşünülmektedir. Kronik hipoksi durumunda gen ekspresyonları oksijen ile regüle olan HIF (Hypoxia inducible factor) gibi trans

kripsiyon faktörleri tarafından düzenlenmektedir. Akut cevaptan kronik cevaba geçişi sağlayan anahtar proteinin CaM kinaz 2 olduğu düşünülmektedir. İntraselüler Ca^{+2} düzeylerinin artarak kalmodüline bağlanması CaM kinaz 2'yi aktive eder ve bu durum HIF-1 kompleks ko-aktivatörü olan p300'ün fosforilasyonu ile sonuçlanır. Fosforilasyon ise HIF-1 transkripsiyonel aktivitesini indüklemektedir [18].

Hipoksinin Na^+ üzerine etkilerine dair bilgiler sınırlıdır, bu nedenle hipoksik koşullarda Na^+ dağılımı net bilinmemektedir. Hipoksi esnasında intraselüler Na^+ konsantrasyonlarındaki artışın Na^+/Ca^{+2} pompasını tersine çevirerek intraselüler Ca^{+2} artışına katkıda bulunduğu düşünülmektedir [19]. Ancak kronik hipoksi durumunda Na^+ kanalı konsantrasyonlarında değişiklikler olduğu da bilinmektedir [20].



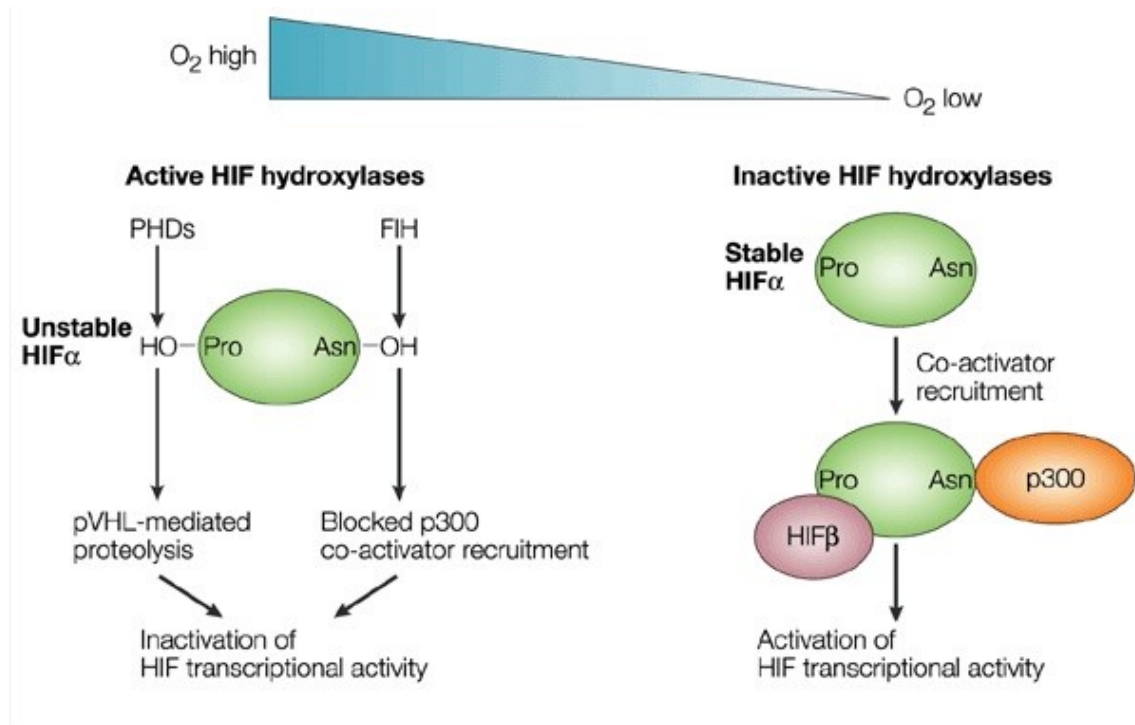
Şekil 2.1. Hipoksiye verilen temel cevaplar.

Kronik Etkiler

HIF (Hypoxia inducible factor)

Hipoksinin fizyoloji ve patofizyolojideki rolüne ilişkin bilgiler oksijen homeostazının temel regülatörleri olan HIF'lerin tanımlanması ile son yıllarda büyük bir artış göstermiştir. İyon kanallarının aktivasyonu akut bir cevap olsa da kronik hipoksi moleküler düzeyde gen ekspresyonunda değişikliklere neden olmaktadır. Bu süreçteki esas basamak HIF'lerin aktivasyon ve stabilizasyonudur. HIF'ler kronik hipoksi tarafından aktive edilen transkripsiyon düzenleyicileridir. HIF ailesine dahil üç tip faktör bulunmaktadır. HIF-1 pek çok hücrede sentezlenirken HIF-2 böbrek, kalp, akciğer, ince barsak ve endotel hücrelerinde sentezlenir. HIF-3 ise çok az anlaşılabilmiştir. HIF-1 transkripsiyon kompleksi hedef genin promotor ya da enhancer bölgelerinde yer alan hipoksi cevap elemanlarına bağlanır. HIF-1 kompleksi oksijen ile regüle olan indüklenebilen bir HIF-1 alfa altbirimi ve yapısal bir HIF-1 beta altbiriminden oluşur [21]. Normoksik koşullarda HIF-1 alfa bazı post-

translasyonel modifikasyonlara maruz kalır. Ortamda yeterli oksijen bulunduğunda oksijen sensitif HIF prolin hidroksilaz tarafından prolin rezidülerinden hidroksile edilir, bu hidroksilasyon von Hippel Lindau kompleksi (pVHL) tarafından ubiquitinasyonuna yol açar. Poliubukitin zincirleri eklenen HIF-1 alfa altbirimi proteozomlar tarafından hızlıca yıkıma uğratılır. Bunun dışında HIF-1 alfa factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) isimli bir başka oksijen bağımlı enzim tarafından C-terminalinde bulunan asparagin rezidüleri üzerinden hidroksile edilir. Böylece transkripsiyon ko-aktivatörü CBP/p300 ile birleşmesi ve dolayısıyla transaktivasyonel özelliklerini göstermesi engellenir. Tüm bu post-traslasyonel modifikasyonlar HIF-1'in labil ve inaktif durumda bulunmasını sağlar. Normoksik koşullarda HIF-1 alfa altbiriminin yarı ömrü 5 dakikadan daha azdır [14]. Hipoksik koşullarda HIF-prolin hidroksilaz ve FIH-1 enzimleri inaktif hale gelir. Hidroksile olmamış stabil HIF-1 alfa HIF-1 beta altbirimi ile dimerize olur ve bu heterodimer DNA üzerindeki hipoksi cevap elemanlarına bağlanır. FIH-1'de inaktif durumda olduğundan CBP/p300 ko-aktivasyon için olaya katılır. HIF proteinlerinin aktivasyon ve inaktivasyonları ile ilgili post-traslasyonel modifikasyonları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. HIF proteinlerinin aktivasyon ve inaktivasyonuna yol açan post-traslasyonel modifikasyonlar

Genomun %1-%5'lik bir kısmının hipoksi tarafından transkripsiyonel olarak regüle edildiği ve bu regülasyonların bir çoğunun HIF tarafından yapıldığı düşünülmektedir [22]. Şimdiye kadar eritropoiezis, anjiyogenezis, proliferasyon, enerji metabolizması ve apoptoz ile ilişkili olanlar da içerisinde olmak üzere 200'den fazla genin HIF'ler tarafından regüle edildiği saptanmıştır. Ancak HIF aktivasyonu ile ilişkili gen ekspresyon şekli hücre tipine özgüdür, yani HIF aktivasyonunun koruyucu etkileri bir hücre tipinde baskın iken bir başka hücre tipinde çok etkili olmayabilmektedir [23].

Anjiyogenezis

Anjiyogenezis mevcut vasküler yapılardan yeni kan damarlarının gelişmesi anlamına gelmektedir ve kronik hipoksinin anjiyogenezisi indüklediği bilinmektedir. HIF-1 anjiyogenezde önemli bir faktör olan VEGF'yi indüklemektedir ancak patolojik koşullarda kan akımının regülasyonuna genleri HIF-1 hedefleri arasında yer alan NO, endotelin-1, adrenomedullin gibi pek çok faktör katıldığından HIF'lerin anjiyogenezdeki rolünün daha karmaşık olduğu düşünülmektedir [24].

Proliferasyon

Kronik hipoksi hücre bölünmesini hızlandıran büyüme faktörlerinin sentezlenmesine neden olmaktadır. Bu proliferasyon akut ya da kronik hipoksik hasar sonucunda hücre migrasyon ve rejenerasyonu için gereklidir. Insulin-like Growth Factor-2 (IGF-2) ve Transforming Growth Factor beta (TGF beta) başta olmak üzere bazı büyüme faktörleri HIF-1'in hedef genleri arasında yer almaktadır [24].

Diferensiasyon

Hipoksinin bazı hücre serilerinde diferensiasyonu indüklediğine dair kanıtlar giderek artmaktadır. Hipoksi, HIF'ler ve hücre diferensiasyonunu düzenleyen Notch, OCT-4 ve MYC gibi moleküller arasında bir ilişki olduğu açıkça gösterilmiştir [25].

Enerji metabolizması

Kronik hipoksiye adapte olmada kilit bir olay, oksidatif fosforilasyondan anaerobik glikolizise dönüştür. Normoksemik koşullarda hücre enerjisi karbonhidrat, yağ ve

aminoasitlerin oksidatif metabolizması ile sağlanır. Hipoksi esnasında oksidatif fosforilasyon ile ATP üretimi durur. Bu durum glukoz kullanımı ve laktat üretimini hızlandıran glikolizisi aktive eder. Oksidatif fosforilasyonun anaerobik glikolizise dönüşü ATP/ADP oranlarında ciddi düzeylerde düşüğe neden olur. Enerji üretimindeki düşüşten ötürü hipoksik hücre protein sentezi gibi fazladan enerji harcanmasına neden olan sistemleri inaktive eder ve eldeki enerjiyi daha kritik olan iyon homeostazı ve membran potansiyelinin korunmasına aktarır. Glikoz metabolizması da HIF kompleksi tarafından regüle edilmektedir. HIF-1 kompleksi glikoliz yolağındaki tüm enzimlere ait olan ve glikoz transportu ile ilgili tüm genleri indükler [26].

Ayrıca HIF-1'in mitokondriyel solunumu baskıladığı öne sürülmektedir. Krebs siklusunda görevli piruvat dehidrogenaz enzimini inhibe eden piruvat dehidrogenaz kinaz 1, HIF-1 tarafından indüklenmektedir. Hipoksi esnasında AMP-aktif protein kinaz yolağı da birbirinden intraselüler Ca^{+2} konsantrasyon artışı, artan AMP düzeyleri ve HIF'ler aracılığı gibi bazı bağımsız mekanizmalar ile aktive olarak ATP üretiminde kullanılacak katabolik yolları indüklerken anabolik yolları durdurur [26].

Diğer Etkileri

Reaktif oksijen radikalleri

Reaktif oksijen radikalleri bir ya da daha fazla eşlenmemiş elektronu bulunan bileşiklere verilen addır. Yapılarındaki dengesizlik nedeniyle çok aktiftirler ve yaşam süreleri kısadır. İki tane eşleşmemiş elektronu olan oksijen önemli bir serbest radikaldir ve süperoksit adını alır. Süperoksitle reaksiyona giren moleküller serbest radikal oluşturur [27]. Oksijenin eşlenmemiş elektronları süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri (OH^*) ve peroksi nitrit ($ONOO^-$) gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu sağlar. Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen bileşikleri çizelge 2.1'de gösterilmiştir. [28]

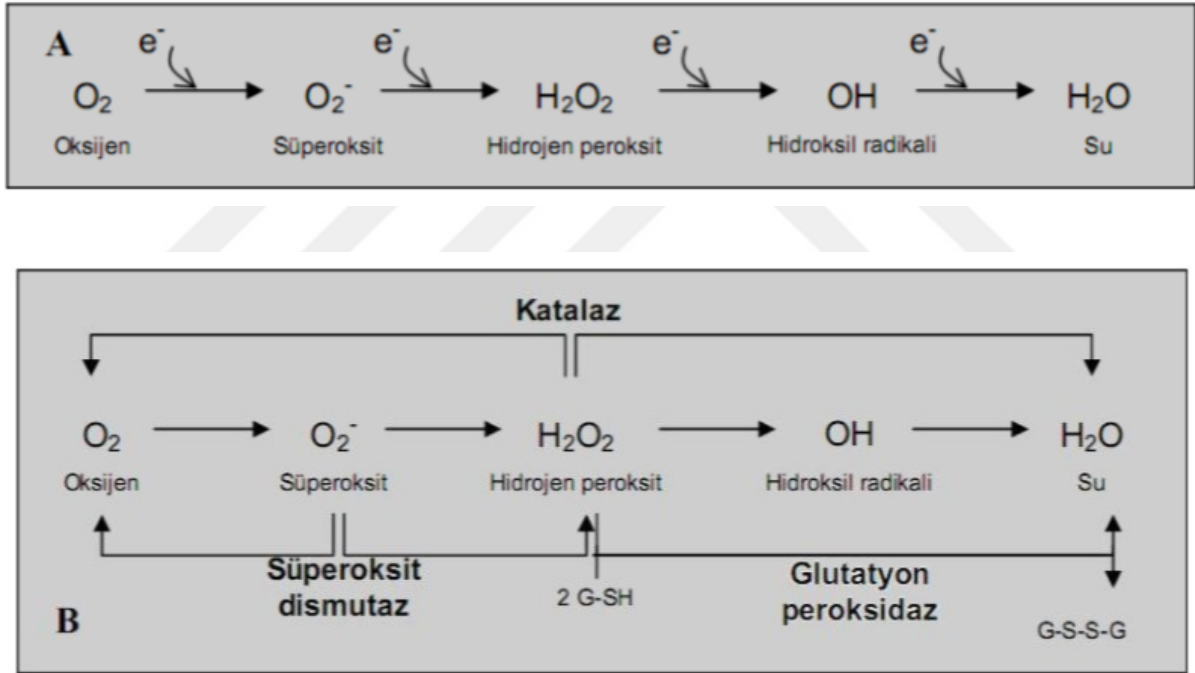
Normoksik koşullarda reaktif oksijen türleri pek çok bölge ve organelde üretilebilmesine karşın temel olarak mitokondriyel elektron transfer zincirinde (ETZ) üretilir. Normoksik koşullarda ETZ'deki elektron akışının yaklaşık %2'sinin reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olduğu bilinmektedir. Reaktif oksijen

türleri ayrıca hücre haberleşmesinde sekonder mesajcı olarak görev almaktadır [29].

Üç temel tip serbest oksijen radikali vardır.

1. Süperoksit (O_2^-) ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz sistemi ile,
2. Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit dismutaz enzimi ile,
3. Hidroksil radikali (OH^-), ise demir moleküllerinin katalize ettiği reaksiyonlardan oluşmaktadır.

Bu yapılar, özel enzimlerin katalize ettiği reaksiyonlarla birbirlerine dönüşerek organizmada dengede bulunurlar (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. A. Moleküler oksijenden reaktif ara ürünlerin oluşumu,

B. Enzimlerin serbest oksijen radikalleri üzerine etkisi

Reaktif oksijen türlerinin hipoksik koşullarda nasıl oluştuğu net aydınlatılamamıştır. İncelenen hücre ve organel tipine bağlı olarak hipoksik koşullarda reaktif oksijen türlerinin artış ya da azalma gösteriyor olabileceğine işaret eden çelişkili çalışmalar bulunsa da orta şiddetli kronik hipoksinin reaktif oksijen türleri konsantrasyonlarında nisbi bir artışa neden olduğu kabul edilmektedir [30]. Hücrelerde reaktif oksijen türü konsantrasyonlarının artışı toksik etkiler

yaratmaktadır. Hücrelerde süperoksit dismutaz ve enzimatik olmayan NADPH⁻ aracılı reaksiyonlar gibi antioksidan sistemler bulunmaktadır. Reaktif oksijen türlerindeki artışın mitokondriyel kaynaklı olduğu düşünülürse bunun HIF regülasyonunda önemli bir rol oynadığı da düşünülebilir. HIF-1 aktivasyonunun doğrudan reaktif oksijen türlerindeki değişimler ile korele olduğu gösterilmiştir, ancak mitokondriyel reaktif oksijen türlerinin HIF-1 stabilizasyonunu nasıl sağladıkları henüz açıklığa kavuşturulamamıştır [31].Reaktif oksijen türlerinin bilinmeyen bir sinyal transdüksiyon kaskadını harekete geçirerek HIF proli hidrosilaz üzerinde post translasyonel modifikasyonlara neden olduğu ve bu post translasyonel modifikasyonların HIF'leri labil hale getiren HIF proli hidrosilaz enzimini inaktive ettiği düşünülmektedir.

Çizelge 2.2. Serbest radikaller ve diğer reaktif oksijen bileşikleri

Serbest radikaller	Radikal olmayan reaktif O ₂ bileşikleri	ROS etkisi sonucu oluşan radikaller
Süperoksit (O ₂ ⁻)	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	Karbon merkezli radikaller (R.)
Hidroksil (OH.)	Singlet oksijen (¹ O ₂)	Peroksil/Karboksil (ROO.)
Hidroperoksil (HO ₂)	Hipokloröz asit (HOCl)	Alkoksil (RO.)
Nitrik oksit (NO.)	Peroksinitrit (ONOO.)	Thiyl radikaller (RS.)
Azot dioksit (NO ₂)	Ozon (O ₃)	
	Lipid hidroperoksit (LOOH)	

Asidoz

Aerobik-anaerobik glikoliz dönüşümü azalan ATP üretimine bağlı olarak H^+ iyonlarının tüketimini azaltırken diğer yandan ATPaz reaksiyonları gibi reaksiyonların artışı nedeniyle H^+ üretimi artar. Hipoksi H^+ homeostazının bozulmasına neden olur. Hem intraselüler hem de ekstraselüler pH'nın düştüğü gözlenir. Asidozun hücreler için koruyucu bir rolü olduğu düşünülmektedir. Asidoz bazı enzimatik reaksiyonları yavaşlatarak enerji tüketimini ve reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu azaltır [32]. Dahası asidoz hücre zarındaki kanallarda iyon akımlarını azaltarak iyon gradientinin korunması için gereken enerjinin azalmasına neden olur. Hipoksi ile indüklenen asidoz HIF-1 alfanın stabilizasyonunda önemli rol oynar. İntraselüler pH'nın düşmesi pVHL' nin (Multipurpose Adapter Protein) dağılımında değişikliklere neden olur. Yüksek pH'larda pVHL sitoplazma ve nükleoplazmada difüz yayılım gösterirken düşük pH'larda pVHL nükleollerde yoğunlaşır ve HIF-1 alfa'nın ubiquitinasyonu ve proteozomal yıkımı önlenmiş olur [33].

Hücre ölümü

Paradoksik olarak hipoksiye hücre adaptasyonu sadece hücre sağkalımını değil apoptozu da içerir. HIF-1 aynı zamanda BCL-2 ailesinden bazı proteinleri indükleyerek apoptozu regüle eder. Bu proteinler genellikle onkogen işlevi görmekle birlikte bazı durumlarda apoptozu indüklemektedirler. HIF-1 tarafından sağlanan koruyucu adaptasyonlar yetersiz kaldığında hücre ölümü gerçekleşmektedir. Tek başına orta şiddetli kronik hipoksinin hücre ölümüne yol açmakta yetersiz kaldığı gösterilmiştir [34]. Hücre ölümü artmış intraselüler Ca^{+2} düzeyleri, reaktif oksijen türlerinin oluşumu, hücre enerji düzeylerinde değişimler ve asidoz gibi bazı başka faktör ve olayların kombinasyonunu gerektirmektedir. Nekroz, apoptoz ve otofaji gibi çeşitli hücre ölüm tipleri mevcuttur. Nekroz ATP eksikliğinde olacağı gibi pasif tipte bir hücre ölümü şeklidir. Hücresel iyon gradientinin düşük ATP/ADP oranı nedeniyle bozulması ile ilişkilidir. Apoptoz, genetik programın aktivasyonu sonucu oluşan gecikmiş, enerji bağımlı bir hücre ölümü şeklidir. Otofaji ise apoptotik olmayan alternatif bir programlı hücre ölümü şeklidir. Hipoksik koşullarda hangi tip hücre ölümünü gerçekleştireceği tartışmalıdır. İntraselüler Ca^{+2} düzeylerinin artması hızlı ya da yavaş şekilde ATP tükenmesine yol açmaktadır. ATP'nin hızlı şekilde tüketilmesi nekroz ile sonuçlanırken yavaş

şekilde tüketilmesi apoptoz ile sonuçlanmaktadır. Dahası son zamanlarda otofajinin de hipokside görülebileceği öne sürülmüştür. Bu durumda hücre yapısal elemanlarını enerjiye dönüştürmek için yıkmaktadır. Hücre ölümünde HIF-1'in rolü de ayrıca tartışılmalıdır. HIF-1'in hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik faktörleri indükleyebildiği bilinmektedir ancak hangisinin daha baskın olacağı hücre tipine ve deney koşullarına bağlıdır. Kronik hipoksi altında HIF-1 apoptozu indüklemektedir. BCL-2 ailesindeki bazı apoptotik faktörleri indüklediği bilinmektedir. BCL-2 ailesi üç sınıfa ayrılmıştır. Birinci sınıftaki proteinler apoptozu inhibe ederler. İkinci sınıftaki proteinler apoptozu indükler. Üçüncü sınıftakiler ise dış mitokondri zarının geçirgenliğini artırarak sitokrom c gibi kaspazları aktive ederek apoptozu başlatacak faktörlerin salınımına neden olurlar.

Hipoksi ayrıca bir tümör supresör olan p53 proteinini stabilize etmektedir. Klasik olarak p53 hücre siklus ilerlemesini ve apoptozu kontrol eder. Normoksik koşullarda p53'ün yarı ömrü oldukça kısadır ve genellikle tespit edilemeyecek kadar düşük düzeylerde bulunur. Hücrenin DNA hasarı ya da kronik hipoksi gibi etmenlere maruz kalması p53'ün stabilize olmasına yol açar. Bir transkripsiyon faktörü olarak aktif hale gelen p53 hücre siklus regülasyonu ve apoptotik olayların başlamasına yol açacak genlerin transkripsiyonunu indükler. Öte yandan p53 HIF-1'in ubiquitinizasyon ve takiben proteozomal yıkımını indükler. Tüm bu faktörleri göz önünde bulundurarak, hipoksi ve hücre ölümünü genel bir pencereden inceleyerek adaptasyon dengelerinin nasıl kurulduğunu aydınlatan net çalışmalar mevcut değildir [34].

2.1.3. Hipoksi ve oksidatif stres

Hipoksi sırasında mitokondriyal solunum zincirindeki sitokrom oksidaz tarafından suya indirgenen oksijen miktarı azalır ve bu durum mitokondride strese neden olarak reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluşumunu artırır. Böylece hücrede oksidatif stres görülür [3,7].

Dokuda azalan oksijen miktarı ile beraber; dokunun enerji metabolizmasında değişiklikler olduğu, doku adenozin trifosfat (ATP) miktarının azaldığı ve biriken adenozin moleküllerinin aşırı oranda yıkıma uğradığı bildirilmektedir. Ayrıca normal koşullarda ROS oluşumuna yol açmayan ksantin dehidrogenazın, hipoksik

koşullarda aşırı adenozin yıkımı sonucu oluşan hipoksantin enzimatik yıkımı sırasında ROS üretimine neden olduğu da bilinmektedir [7].

Organizmada oksidatif mekanizmalar sonucu oluşan ROS, aşırı üretim veya vücuttaki oksidan/antioksidan dengenin bozulması durumunda, protein, lipid, karbonhidrat ve nükleotid gibi biyomolekülleri etkileyerek zararlı etki göstermeye başlar. Özellikle çoklu doymamış yağ asitleri (ÇDYA), ROS'un zararlı etkisinden daha kolay etkilenir ve zincirleme olarak devam eden, lipid yapısında bozukluk ve parçalanmaya yol açan lipid peroksidasyonuna neden olurlar. Membranlar ÇDYA'den zengin oldukları için ROS etkisine açıktırlar ve membranda yapı ve fonksiyon bozuklukları oluşmaktadır [35,36].

Kılıç ve arkadaşları hipokside beyin, kalp, akciğer ve karaciğer dokularında lipid peroksidasyon artışı olduğunu göstermişlerdir [37].

Malondialdehit (MDA), oksidatif stres sonucu gelişen lipidlerin peroksidasyon hasarının son ürünü olup lipid hasarı göstergesi olarak kullanılmaktadır [38,39]. Artmış MDA konsantrasyonu, lipid peroksidasyonunu ve doku hasarını işaret eder [40].

Hücrede serbest radikalleri uzaklaştırmak için çok sayıda antioksidan savunma mekanizması mevcuttur. Birçok enzimatik ve nonenzimatik sistem serbest radikallerin inaktivasyonuna neden olur. Çoğu hücrede bulunan süperoksid dismutazların (SOD) katalitik etkisiyle radikallerin kaybı belirgin olarak hızlanır. Glutasyon peroksidaz gibi enzimler serbest radikallere karşı koruyucudur.

Peroksizomlarda bulunan katalaz hidrojen peroksidi enzimatik olarak parçalar. Ayrıca sistein, glutasyon, seruloplazmin gibi sülfidril ile A, C ve E vitaminleri serbest radikallerin oluşumunu engelleyen ya da onları inaktive eden endojen ve eksojen antioksidanlardır. Bazı antioksidanlar Çizelge 2.2 'de gösterilmiştir [41].

Bir tripeptid (γ -glutamil-sisteinil-glisin) olan glutasyon (GSH); hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik peroksitlerin glutasyon peroksidaz etkisi ile indirgenmesinde ve ksenobiyotiklerin merkaptürat yolu ile detoksifikasyonunda yer almaktadır. Ayrıca, GSH direkt olarak serbest sülfidril grubu aracılığıyla H_2O_2 , süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hid-

roksil (OH.) ve alkoksil radikalleri (RO.) ile etkileşime girebilmekte, böylece hücreyi oksidanların, elektrofilik maddelerin, serbest radikallerin hasarına karşı korumada önemli bir rol üstlenmektedir [42,43].

Ayrıca doku için GSH konsantrasyonunun düştüğü durumlarda glikolitik enzim olan gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz aktivitesinin ve doku ATP içeriğinin azaldığı gösterilmiş ve GSH'un hücresel enerji durumunu etkileyebileceği ileri sürülmüştür [44].

Hipoksik koşullarda kan ve doku GSH düzeylerinin azaldığı, lipid peroksidasyon ürünlerinin ise arttığı bildirilmektedir [45,46].

Çizelge 2.3. Başlıca Antioksidanlar

ENZİMLER	YAĞDA ÇÖZÜNEN RADİKAL TUTUCULAR
Süperoksid dismutaz	E vitamini
Katalaz	β-karoten
Glutasyon peroksidaz	Bilirubin
Glutasyon redüktaz	Ubiquinol
Glutasyon transferaz	Flavonoidler
Glikoz 6 fosfat dehidrogenaz	Melatonin
Sitokrom oksidaz	
SUDA ÇÖZÜNEN RADİKAL TUTUCULAR	METAL İYONLARI BAĞLAYAN PROTEİNLER
İndirgenmiş glutasyon	Ferritin
C vitamini (Askorbik asid)	Transferrin
Ürik asit	Haptoglobin
Glukoz	Hemopeksin
Sistein	Seruloplazmin
Mukus	Albumin
Taurin	Laktoferrin
Sisteamin	

2.1.4. Hipoksik önkoşullanma

Hipoksi patolojik durumlarla ilişkili olmasına karşın son yıllarda önkoşullamanın indüklenmesi için kullanılmıştır. Önkoşullama, hücre, doku ya da organizmada, stres yaratan ancak zararlı olmayan bir duruma maruz bırakılarak, geçici bir adaptasyon cevabının uyarılması ve dolayısıyla zararlı etkenin yaratacağı hasarın azaltılmasına yönelik bir girişimdir. Bir başka deyişle bir organın maruz kaldığı kısa süreli iskemik periyotlar, aynı organda daha sonra meydana gelecek uzun süreli bir iskemi periyodunun neden olacağı hücre ölümünü önleyebilir. Bu koruyucu mekanizma iskemik önkoşullama olarak adlandırılmaktadır [47].

Hipoksik önkoşullamanın koruyucu etkisi kalp, karaciğer, beyin, ince barsak ve akciğerde gösterilmiştir [47,48].

Özellikle, koroner damarlar üzerinde yapılan çalışmalarda iskemiden sonra uygulanan kontrollü reperfüzyonun İ-R hasarını azalttığı gösterilmiştir [49].

Ünal ve arkadaşları sıçan arka bacak modelinde iskemiye takiben gerçekleştirdikleri kademeli reperfüzyonun nötrofil ve süperoksit radikallerinin birikimini azalttığını ve doku nekrozunu sınırlandırdığını ortaya koymuşlardır [50].

İskemik önkoşullamanın faydalı etkisi ilk kez Murry ve ark. tarafından 1986 yılında köpek kalbi üzerinde kısa süreli iskemi ve reperfüzyonu takiben oluşturulan, uzun süreli iskemiye bağlı modelde yapılan çalışmalar sonucunda gösterilmiş ve iskemik önkoşullama sayesinde doku kaybının % 70 azaldığı tespit edilmiştir [51].

İskemik önkoşullamanın iskelet kasındaki koruyucu etkisi ise ilk olarak 1992'de Mounsey ve ark. tarafından gösterilmiştir [52].

Hipoksik önkoşullamanın koruyucu etkisinin büyük ölçüde HIF izoformları ve bu izoformların hedef genleri aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Pek çok çalışmada hipoksik önkoşullama sağlayan sistemik hipoksinin erişkin ve yavru kemirgen beyninde HIF-1 alfa düzeylerinde artışa neden olduğu gösterilmiştir [53,54]. Dahası hipoksik önkoşullama HIF-1 alfabı indüklediği bilinen kobalt (CoCl₂) ve desferoksamin gibi bazı kimyasallarla da sağlanabilmektedir. Hipoksinin HIF

düzelelerini artırmasına karşı muhtemelen hipoksik ve iskemik hasara karşı koruma sağlayan, HIF'lerin kendilerinden çok hedef gen ürünleridir. Bu hedef genlerin bazı ürünleri olan EPO ve VEGF gibi faktörlerin doğrudan indüklenmesinin de beyni iskemiye karşı koruduğu bilinmektedir. Özellikle EPO'nun hem beyni iskemiye karşı koruduğu hem de EPO-aracılı önkoşullamaya neden olduğu bilinmektedir [55]. Ancak hipoksik önkoşullanma HIF transkripsiyon faktörlerinden daha karmaşık bazı mekanizmaları da içermektedir. Çalışmalar, AP-1 (activating protein-1), CREB (cyclic AMP response element binding), NF-KB (nuclear factor-KB), redox-regüle transkripsiyonel aktivatör SP1 gibi bazı başka transkripsiyon faktörleri ve bunların gen ürünlerinin de hipoksik önkoşullanma cevabında rol oynadığına işaret etmektedir [56,57]. Dahası önkoşullanma hiperoksi, oksidatif stres, enflamatuvar sitokinler, anestezikler ve metabolik inhibitörlerle de sağlanabilmektedir. Yine de önkoşullanmanın sağlanmasına yönelik en uygun araştırma stratejisi HIF-1 aktivitesinin artırılarak hipoksik cevabın taklit edilmesine dayanıyor gibi görünmektedir. HIF-1 aktivasyonu hedeflenmiş indüktörlerle, gen terapisi ile ya da hipoksi-mimetikler ile sağlanabilir [58].

2.2. Testis Fizyolojisi

2.2.1. Testis yapısı ve fonksiyonları

Erişkin bir erkeğin testisi ovoid şekilli olup 4x3.5x3 cm boyutlarında ve her bir testisin hacmi 30 ml kadardır. Funiculus spermaticus aracılığıyla skrotum içinde asılı durumda ve oblik pozisyonda yerleşmiştir [59].

Testis dıştan içe; tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vasculosa olarak üç tabaka ile sarılıdır. Tunica vaginalis, embriyonik processus vaginalisin distal kalıntısı olmakla birlikte testisin büyük bölümünü kaplayan periton kalıntısıdır.

Tunica albuginea, testisleri kaplayan kalın, mavimsi beyaz renkte fibröz özellikte bir tabakadır. Tunica vasculosa, testisin damar ağından oluşan ve tunica albugineanın iç yüzünü örten tabakasıdır. Bu kısımdan çıkan interstisyel bağ doku uzantıları her bir seminifer tübül yapısını sarar ve birbirlerine bağlanmasını sağlar. Seminifer tübül, çok katlı epitel ile döşelidir ve iki tip hücre içerir :

- a. Sertoli hücreleri (bölünme özellikleri yoktur)
- b. Spermatojenik hücreler (spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler) .

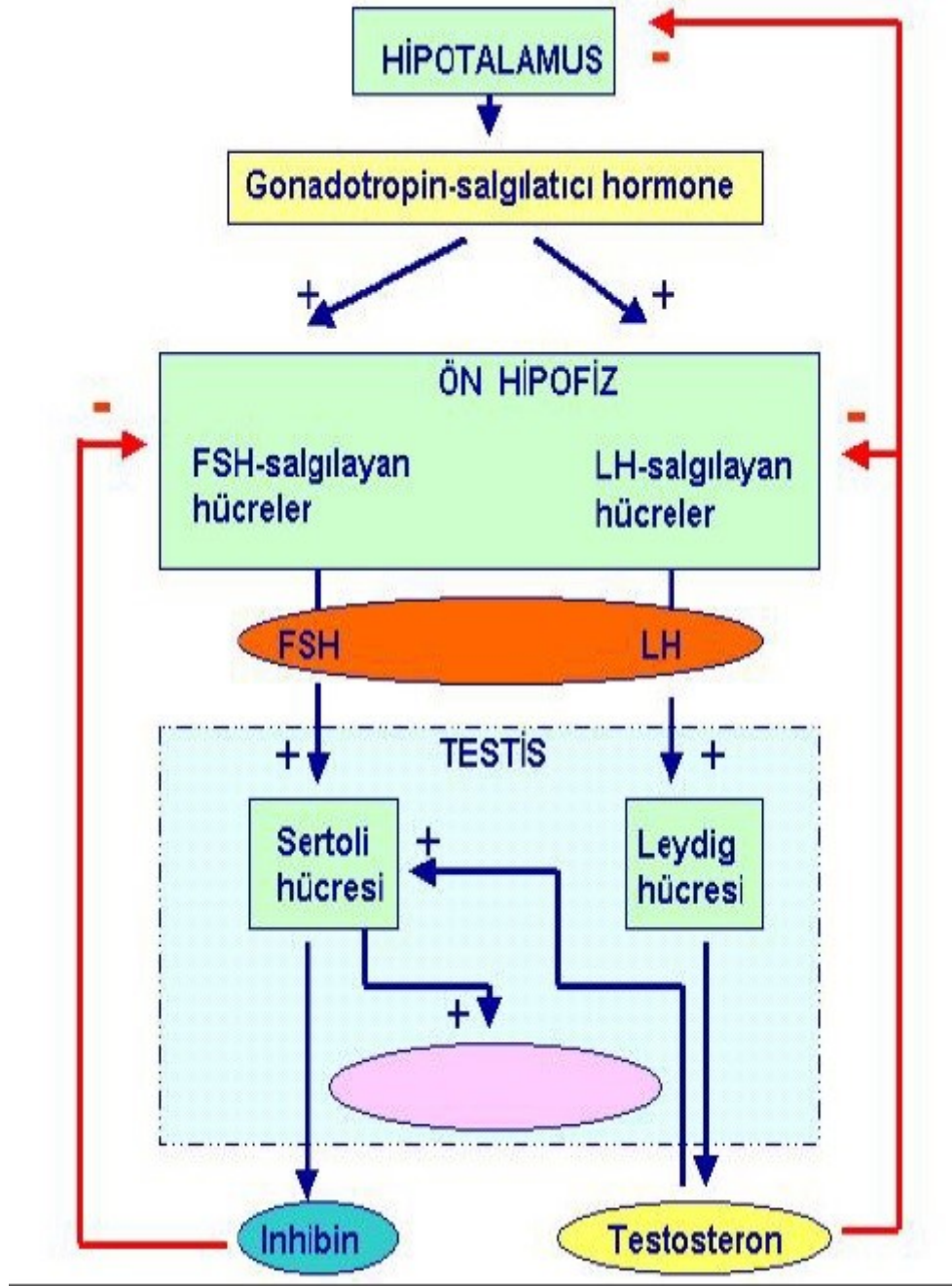
Sertoli hücrelerinin görevleri;

- 1- Gelişmekte olan spermatozoonların korunmasında, desteklenmesinde ve beslenmesinde görev alır.
- 2- Spermioyenez sırasında fazla sitoplazma sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosite edilir.
- 3- Dişi ve erkek üreme organlarının gelişimi esnasında müller kanallarının gelişimini engelleyen glikoprotein yapısındaki anti-müllerian hormonu üretirler ve böylelikle embriyonun erkek olarak gelişimi sağlanır.
- 4- Hipofizden folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını engelleyen inhibin hormonunu salgılar.
- 5- FSH ve testosteron kontrolü altında androjen-bağlayıcı proteini (ABP) üretir ve salgılar . Bu protein de seminifer tübül içinde spermatogenez için gerekli olan testosteronun yoğunlaşmasını sağlar [60].

Testis dokusu hem ekzokrin hem de endokrin fonksiyonlara sahiptir. Ekzokrin işlevi seminifer tubüllerde meydana gelen spermioyüm gelişimidir. Endokrin görevi ise Leydig hücreleri tarafından gerçekleştirilen testosteron üretimidir [61]. Hipofiz ön lobundan salgılanan FSH ve LH spermatogenezisi düzenleyen başlıca hormonlardır. LH Leydig hücreleri üzerinde etkisini göstererek testosteron üretimini uyarır. Hipofizden LH salgılanması negatif geri besleme ile düzenlenir. FSH sertoli hücrelerini uyarır. Adenil siklaz yapımını ve döngüsel adenozin monofosfat (cAMP) artışını uyarır [62,63].

Testosteron Leydig hücreleri tarafından salgılanır ve spermatojenik hücrelerin büyümesi ve bölünmesi için gereklidir. Ayrıca ikincil cinsiyet karakterlerinin devam ettirilmesinden de sorumludur [63]. Testosteron normal spermatogenetik hücrelerin gelişimi için gerekli olan hormondur. FSH ise sertoli hücrelerini etkileyerek bu hücrelerde androjen-bağlayıcı-protein üretimini artırır. Bu protein de testosteron ile bağlanarak tubul lümenine salgılanır. Tubül lümeninde biriken testosteron ise sperm yapımını uyarmaktadır. Bunun yanı sıra, sertoli hücrelerinden spermlerin yaşaması ve epididimis'e taşınmasında rolü olan testiküler sıvı salgılanmaktadır [64,65]. Leydig hücrelerinden salgılanan testosteron hem yerel olarak seminifer

tubullere, hem de kan yolu ile taşınarak erkek üreme bezlerine ve diğer birçok organa etki eder. Sertoli hücrelerinden salgılanan inhibin hormonu ise hipofiz ön lobundan gonadotropin hormonlarının salgılanmasını baskılamaktadır [64] (şekil 2.4).

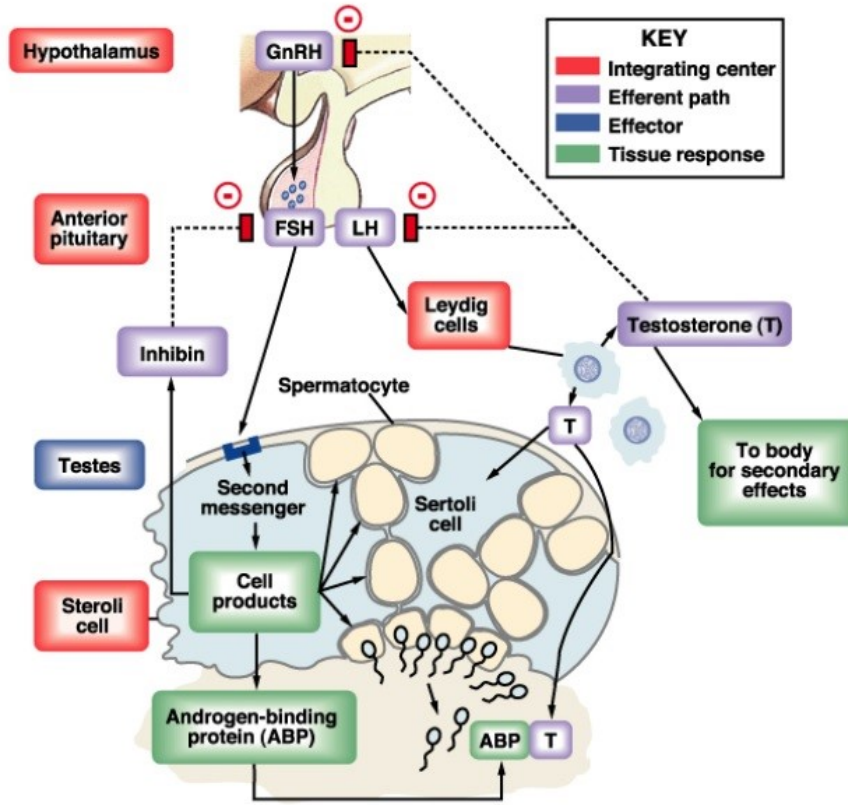


Şekil 2.4. Testis fonksiyonları

2.2.2. Sperm yapımı (Spermatogenezi uyaran hormonal faktörler)

Spermatogenez; hipofizden salgılanan FSH ile LH'nın testis üzerindeki etkileriyle ilişkilidir. LH, Leydig hücrelerine olan etkisiyle normal spermatogenez hücrelerinin gelişimi için gerekli testosteron yapımını uyarır. FSH ise sertoli hücrelerini etkileyerek adenilat siklazı ve sonuçta siklik adenozin monofosfat artışını uyarır. Böylece androjen bağlayıcı protein sentezi ve salgısı artar. Androjen bağlayıcı protein testosteronu bağlayarak seminifer tübül lümenine taşır. Spermatogenez testosteron ile uyarılır, östrojen ya da progesteronla inhibe edilir [66] (şekil 2.5) .

SPERMATOGENEZİ UYARAN HORMONAL FAKTÖRLER



Şekil 2.5. Sperm yapımının hormonal olarak uyarılması

Spermiyogenez dört fazda gerçekleşir. Bunlar; Golgi fazı, kep fazı, akrozomal faz ve olgunlaşma fazıdır.

Golgi fazı: Çekirdeğin bir kutbuna yerleşik Golgi kompleksi, PAS (+) granüller olan proakrozomal granülleri salgılamaya başlar ve bu glikoproteince zengin granüller birleşerek zarla sınırlı bir akrozom vezikülünün içinde yer alan tek bir akrozom granülünü oluşturur. Sentriyoller, göç ederek oluşan akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine yakın bir konuma yerleşirler. Kamçı aksonemi oluşmaya başlar, sentriyoller yeniden çekirdeğe doğru hareket ettikçe aksonem bileşenleri çevresine sarılır.

Kep fazı: Bu faz sırasında, akrozom kesesi büyüyerek çekirdek zarına tutunan bir kep oluşturur ve bu kep çekirdeğin çevresini sarmaya başlar. Bu arada çekirdekteki yoğunlaşma devam eder.

Akrozomal faz: Çekirdek yoğunlaşması, hücrenin uzaması ve mitokondrinin yer değiştirmesi bu fazda gerçekleşir. Akrozom oluşur.

Akrozom; hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve etkisi tripsine benzer bir proteaz gibi bazı hidrolitik enzimler içerir. Akrozomal faz sırasında hücrenin akrozomu içeren ön kutbu, seminifer tübülün tabanına doğru yönelir. Buna ek olarak çekirdek uzar ve daha yoğun bir hale gelir. Aynı zamanda sentriyollerden bir tanesi gelişerek flagellumu oluşturur. Mitokondri de flagellumun proksimal parçası etrafında toplanarak orta parça adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur.

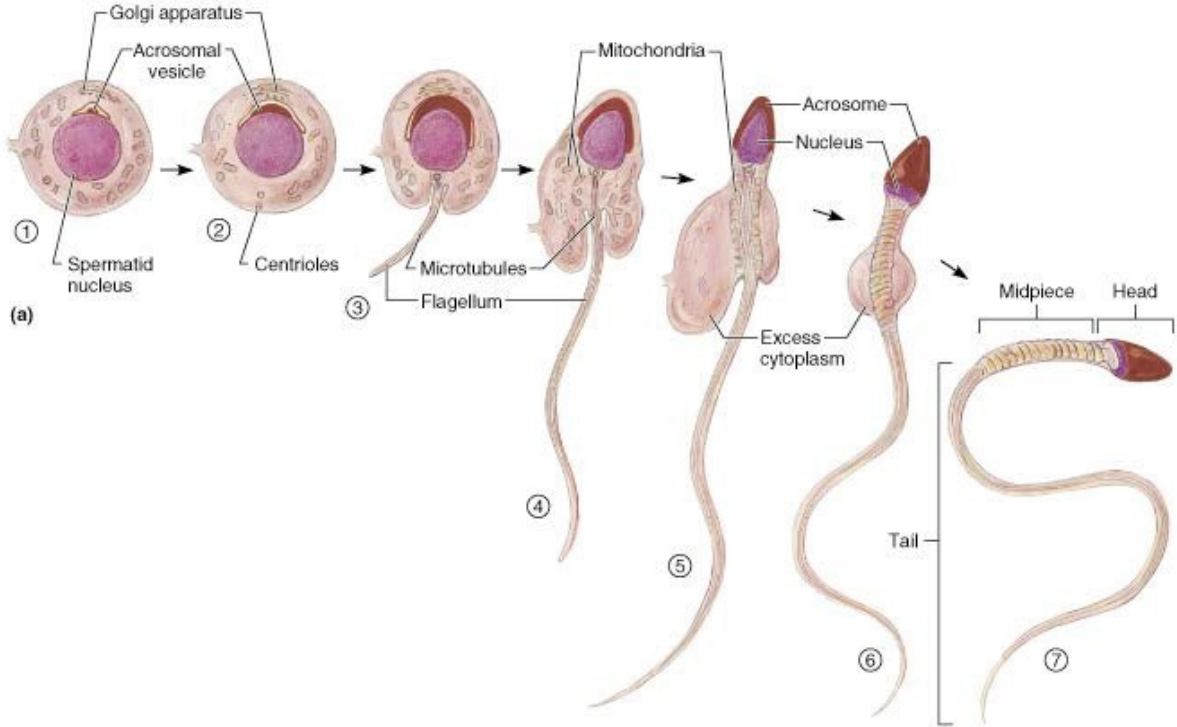
Mitokondrinin bu şekilde yerleşmesi, bu organellerin hücre hareketi ve yüksek enerji tüketimi ile ilgili olan bölgelerde toplanmasına başka bir örnek teşkil eder.

Flagellum hareketi; mikrotübüller, ATP ve dinein denilen ATPaz aktivitesine sahip bir proteinin etkileşmesi sonucunda oluşur **Olgunlaşma fazı:** spermatidin olgun spermatozoona dönüşmesi için fazla sitoplazmasını attığı fazdır. Burada Sertoli hücreleri devreye girer ve artık sitoplazmayı fagosite eder. Spermatozoonlar seminifer tübülün lümenine doğru salınırlar. Spermatogonyumların bölünmesi sırasında ortaya çıkan hücreler tamamen ayrılmaz ve sitoplazmik köprülerle

birbirlerine bağılı kalırlar. Hücreler arasındaki köprüler, tek bir spermatogonyumdan oluşan her primer ve sekonder spermatozitle spermatid arasındaki iletişimi sağlar. Olgun bir spermatozoon baş ve kuyruk olmak üzere iki elemandan oluşur:

Baş: Akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur. Çekirdek yoğunlaşmış ve yassılaştırmıştır. Uzunluğu 4-5 μm , genişliği 3-3,5 μm , kalınlığı 1-2 μm dir.

Kuyruk: Boyun, orta, esas ve son parçalar olarak dört kısımdan oluşur. Boyun yaklaşık 5 μm uzunluğunda, çekirdeğe tutunmuş proksimal sentriyol ve aksoneme kaynaklık eden distal sentriyolü bulunduran dar bir parçadır. Kuyruğun orta parçası yaklaşık 5 μm uzunluğundadır. Boyun ile esas parça arasında uzanır. 9+2 mikrotübül yapısında flagellumu kapsar. Çevrede spiral mitokondri halkası vardır. Esas parça yaklaşık 40 μm uzunluğunda, kuyruğun en uzun parçasıdır. Annulus adı verilen mitokondri sarmalın son dönümünün altında bulunan son yoğun halkadan itibaren başlar, mitokondri sarmalı içermez. Son parça yaklaşık 5 μm uzunluğundadır ve kuyruğun en kısa parçasıdır [67] (şekil 2.6).



Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Şekil 2.6. Spermin olgunlaşma evreleri

2.2.3. Sperm sayı ve motilitesinin değerlendirilmesi

Manuel olarak makler veya diğer sayım kamaraları ile değerlendirilebildiği gibi video mikroskopik yöntem, bilgisayar sistemi (CASA) veya fotomikrografi (time-exposure ve multipl-exposure) ile değerlendirilebilir [68]. Sağlıklı sonuç verebilmek için, 2 ayrı incelemede en az 200 sperm hücresinin hareket özellikleri değerlendirilmeli ve iki sonuç arasındaki fark %5 den fazla olmamalıdır.

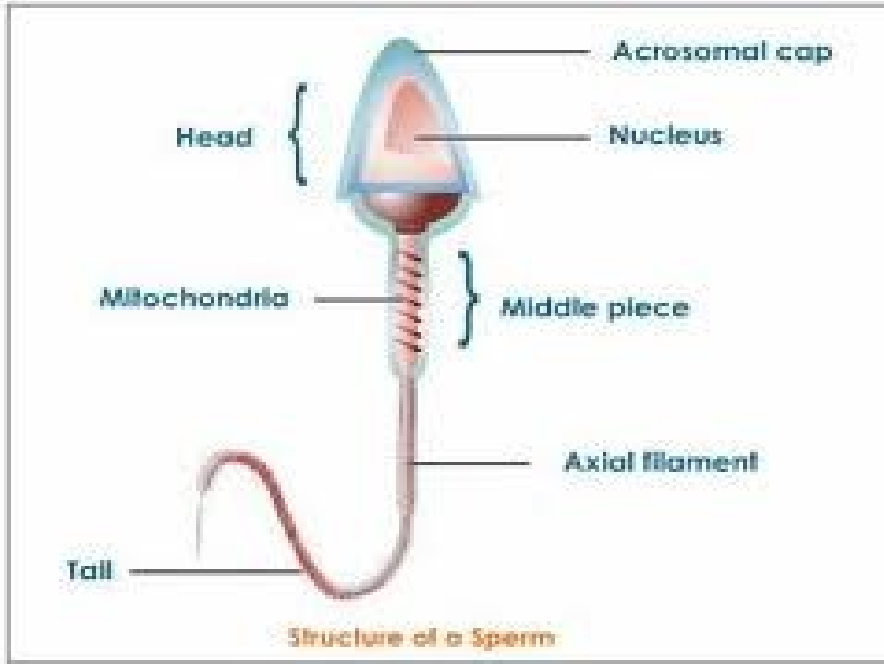
İnsanda sperm değerlendirmesi yapılırken normal sperm yapısını göz önünde bulundurmak gerekir (şekil 2.7).

Primer spermatositlerden sperme kadar, tüm işlem yaklaşık olarak 64-74 gün alır. Normal erkekte günde yaklaşık 30 milyon sperm yapılır [69].

Yetişkin bir insan için normal sperm analizi değerleri:

- Sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml 'den fazla
- Total sperm sayısı 30 milyon 'dan fazla
- Motilite yüzdesi (a+b) % 50'den fazla olmalı (a: ileri hızlı), (b: ileri yavaş) (insan için değerler) [69].

Erkek sıçanlarda ise testislerin skrotuma inmeleriyle beraber sperma üretimi başlar. İlk sperm üretimi yaklaşık 45 günlükken başlar ancak optimum üretim 75 günlükken gerçekleşir [70]. Ayrıca sıçan sperminin ortalama 200-300 milyon olduğu çeşitli çalışmalarda görülmüştür [71,72]. Sıçan spermi insan sperminden farklı olarak çengel şeklinde ince bir başa ve çok daha uzun kuyruğa sahiptir (Şekil 2.8).



Şekil 2.7. Normal sperm görüntüsü



Şekil 2.8. Sıçan sperm görüntüsü

2.3. Hipoksinin Testis Fonksiyonlarına Etkisi

2.3.1. Hipoksi, oksidan stres, antioksidan sistem ve testisler

Birçok hücrede normal aerobik metabolizma sırasında oksijenin toksik metabolitleri ortaya çıkar ve bunlar iskemi/reperfüzyon gibi patolojik durumlarda daha da artarak, endojen antioksidan mekanizmalarının kapasitesini aşar ve doku hasarı oluşturur [73,74].

Lipit peroksitleri azalmış organ ağırlığı, doku tahribi, hücre kaybı, hücre yaşlanma olaylarında etkilidir ve antioksidanlar bu olayları engelleyebilmektedir [75].

Glutatyon sistemi (ve enzimatik antioksidan mekanizma) hücre ve dokularda oksidatif hasarı engellemekte temel rol oynar.

GSH-Px, peroksil radikallerini uzaklaştıran bir antioksidan enzimdir. Bu enzimin rat spermünde sperm motilitesinin devamından sorumlu olduğu ve peroksil radikallerini detoksifiye ettiği gösterilmiştir [76].

GSH seviyesi okside glutatyon (GSSG) un elektron verici NADPH'ı kullanarak GSH'a çeviren Glutatyon Redüktaz (GR)'ın faaliyeti sonucunda sürdürülür. Hipoksinin GR oluşumu ve aktivitesini azalttığı ve testis dokusunda lipit peroksidasyonun artışına neden olduğu gösterilmiştir [8].

Oksidatif stresin spermatozoa fonksiyonlarını bozduğu ve anormal spermatozoa üretimine yol açtığı bilinmektedir [77].

Hipoksiye maruz kalmanın testiküler morfolojide belirgin değişiklikler ortaya çıkardığı, germinal hücre kaybı, spermatogenezin durması, çevre spermatitlerin mitokondilerinde metabolik strese ve lipit peroksidasyona neden olduğu gösterilmiştir [8]. Hipoksi seminifer epitel zarar vererek üreme sisteminde spermatojenik hücrelerde apoptozu teşvik ederek spermatogenez inhibe eder [78].

Hipoksiye maruz kalan erkeklerde sperm sayısının ve motilitesinin azaldığı pek çok çalışmada gösterilmiştir [79,80,81].Hipoksik koşulların testiküler ısı artışına neden

olduğu bilinmektedir [82] ve durumun reaktif oksijen radikali üretiminden kaynaklandığı, dahası antioksidan uygulaması ile önlenemediği gösterilmiştir [83]. Isı stresinin fare testisinde kaspaz-9 ve kaspaz-3'ü aktive ederek germ hücre apoptozunu indüklediği bilinmektedir [84, 85]. Dolayısıyla hipoksi sonucunda oluşan reaktif oksijen radikalleri ve bunlara bağlı oluşan ısı stresi, hipoksinin spermatogenez üzerindeki olumsuz etkilerine aracılık ediyor gibi görünmektedir.

2.4. Testiste Hipoksik Önkoşullama ve Oksidatif Stres

Yükseklige maruz kalmanın testis ağırlığında ve Glutasyon düzeylerinde azalma, MDA artışı ve GR gibi antioksidan enzimlerdeki artışla birlikte oksidatif strese neden olduğu gösterilmiştir [8]. Gerçekten de bazı çalışmalar, yüksek rakıma maruz kalmanın erkek üreme sistemi üzerinde olumsuz etkileri olabileceğine işaret etmektedir [79]. Bu durum dağcılar, sınır görevlileri ve yüksek rakımlı bölgelere yerleşmesi gereken diğer insanlarda gözlenirken, hayatı boyunca And dağları ve Himalayalar gibi yüksek rakımlı bölgelerde yaşayan yerli halkta fertilité sorunlarına normal popülasyondan daha sık rastlanmamaktadır [86]. Bu durumun büyük ölçüde testisteki esas üretim yeri leydig hücreleri olan HIF'ler tarafından düzenlenmekte olan anjiyogenez, nöro-endokrin aks dengelerinin değişmesi ve uzun dönemde hipoksiyi kompanse etmesine bağlı olduğu düşünölmektedir. Gerçekten de fare testisi ile çalışılan iskemi modellerinde önkoşullanmanın koruyucu etkiler gösterdiğine dair bulgular mevcuttur [87,88]. Ancak hipoksiye cevapta ana eleman olarak görölen HIF-1'in testiste normoksik koşullarda da stabil olduğunu ve hipoksiye maruz bırakılan testiste düzeylerinde anlamlı bir artış olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur [89]. Testiste steroidojenik enzimlerin aktif halde olması ve testis fizyolojisinin normal bir şekilde devam edebilmesi için oksijenizasyonu azalmış bir ortama ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir [90,91]. Dolayısıyla testis nispeten hipoksik bir organ olarak düşünölebilir. Tüm bunlar ve HIF'lerin bimodal davranış şekilleri de göz önünde bulundurulduğunda HIF'lerin testiste hipoksiye cevap vermekten farklı bir fonksiyon üstleniyor olabilecekleri iddia edilmiştir. Şimdiye dek yapılan mevcut çalışmalar da incelendiğinde her ne kadar çalışmaların çoğu testiste iskemik önkoşullanmanın koruyucu etkileri olabileceğini işaret etse de, yalnız hipoksiye karşı önkoşullanmanın testiste koruyucu bir etkisi olup olmayacağı halen netlik kazanmamış gibi görünmektedir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun G.Ü.E.T-13.039 kod numarası ve 29.05.2013 tarihli onayı ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilimdalı Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır.

3.1. Gereçler

3.1.1. Deney hayvanları

Çalışmada, Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen ortalama ağırlıkları 200 gr olan 24 adet 2 aylık Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Bütün hayvanlar, uygun sıcaklık ($25 \pm 1^{\circ}\text{C}$), nem ($50 \pm 10\%$), 12 saat aydınlık/ karanlık koşullarında, paslanmaz çelik kafeslerde yaşatıldı.

3.1.2. Laboratuvar cihazları

- Hipoksi Kamara (Şekil 3.1)
- Makler Kamera (Şekil 3.2)
- Su banyosu
- Sıvı azot tankı
- Derin dondurucu -80 C
- Manyetik karıştırıcı
- Buzdolabı
- Elektronik tartı
- Vorteks
- Soğutmalı santrifüj
- Farklı hacimlerde mikropipet
- Farklı hacimlerde eppendorf tüpler
- BioTek ELx 800 Bioelisa Reader
- pH metre
- Homojenizatör
- Steril enjektör

- Deiyonize su cihazı
- Steril enjektör
- Cerrahi malzemeler



Şekil 3.1. Hipoksik Kamara

Hipoksik kamara ve kontrol ünitesine ait teknik özellikler aşağıda verilmiştir.

- 1- Sistem yaşam kabini ve kontrol ünitesi olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur
- 2- Deney düzeneği açık hava basıncı altında çalışmaktadır.
- 3- Yaşam kabini en az beş adet standart sıçan kafesini içine alabilecek boyutlarda imal edilmiştir.
- 4- Yaşam kabini hava izolasyonu olan malzemedен yapılmıştır.
- 5- Kontrol ünitesi, deney kabini içerisindeki oksijen miktarını ölçmektedir. Bu değer belirlenen bir eşik değerinin altına düştüğünde kabin içerisine hipoksik gaz alımı

sırasında basınç artışı olmaması için gaz giriş ünitesi ile kullanılmış gaz tahliye ünitesi eş zamanlı olarak çalışır.

6- Kabin içerisinde herhangi bir nedenle iç basınç yükselmesini önlemek amacıyla ikinci bir güvenlik tedbiri olarak olası bir iç basınç artışında gaz çıkışını sağlayacak bir düzenek bulunmaktadır.



Şekil 3.2. Makler kamera

Sperm Sayma Kamerasının (Makler) Özellikleri:

Sayma Diskinin derinliği 10 mikrondur: Optik olarak düz iki parça camdan meydana gelir. Üst cam kapak görevi görmekte olup merkezinde her biri 0,1 x 0,1 mm'lik 100 kareye bölünmüş 1 mm²'lik ince kılavuz çizgiler bulunmaktadır. Aradaki boşluk kuvars pimlerle sağlam olarak sabitlenmiştir.

3.1.3.Kimyasallar

- TCA (Trichloroacetic acid) : MA 163,39 gr/mol
- BHT (Butylated hydroxytoluene) : Sigma (B-1378) MA 220,4 gr/mol

- TBA (2- Thiobarbituric acid) : Merck (L613080) MA144,15 gr/mol
- Na₂HPO₄ (Disodyum hidrojenfosfat): MA 141,96 gr/mol
- DTNB (5',5'- Dithiobis 2-Nitrobenzoic acid): Sigma (D-8130) MA 396,36 gr/mol
- SF (Serum Fizyolojik) : %0.9 NaCl

3.2. Araştırma Planı

Çalışmada, GÜDAM 'dan temin edilen ağırlıkları 200-220 gr arasında değişen 24 adet erişkin, erkek Wistar albino sıçan araştırma planı doğrultusunda 4 gruba ayrıldı.

3.2.1. Deney grupları ve uygulanan deney protokolü

Her grupta 6 hayvan olacak sekilde 4 gruba ayrıldı. Bu gruplar;

- 1.Grup: Kontrol (K),
- 2.Grup: Ön Koşullama (ÖK),
3. Grup: Ağır Hipoksi (AH),
4. Grup: Ön Koşullama+Ağır Hipoksi (ÖK+AH)

1. Kontrol Grubu: Bu gruptaki hayvanlar 3 gün süre ile normal atmosfer koşullarında yaşatıldıktan sonra, 4. Günde feda edilerek testis doku örnekleri toplandı.

2. ÖK Grubu: Sıçanlar 3 gün süre ile günde 2 saat %10 O₂ verilen hipoksik kamaraya yerleştirildikten sonra, 4.günde feda edilerek testis doku örnekleri toplandı.

3. AH grubu: Sıçanlar 3 gün süre ile normal atmosfer koşullarında yaşatılıp, 4.günde 3 saat süre ile %7 O₂ verilen hipoksik kamaraya yerleştirildikten sonra, feda edilerek testis doku örnekleri toplandı.

4. ÖK+AH Grubu: Sıçanlar 3 gün süre ile günde 2 saat %10 O₂ verilen hipoksik kamaraya yerleştirildi. 4.günde, 3 saat süre ile %7 O₂ verilen hipoksik kamarada bırakılıp bu sürenin sonunda feda edilerek testis doku örnekleri toplandı.

Bütün sıçanlar Alfazin (10mg/kg) ve Ketamin (90mg/kg) kokteyli ile anestezi altında kalplerinden kan alındıktan sonra feda edildi. Sağ epididimisten sağma yöntemi ile sperm elde edilip makler kamera ile sayıldı.Yine sağ testis histolojik incelenme için formaldehit içerisine alındı. Sol testis ise hızla çıkarılarak sıvı azotta dondurulup, çalışılincaya kadar -80 °C'de saklandı.Testis ağırlıklarına bakıldıktan sonra testis dokularında, GSH vwe lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malondialdehid gibi oksidatif stres ve antioksidan savunma mekanizmaları ile ilişkili parametreler incelendi.

Ejekulat epididimisten sağma yöntemi ile elde edildi.1 ml SF ile dilüe edildikten sonra analizi yapıldı.

İyice sıvılaştırılmış ve karıştırılmış, seyreltilmiş semenden küçük bir damla alınarak diskin merkezine konuldu ve üzerine kapama camı kapatılarak mikroskop altında 20 lik objektif ile sayım yapıldı (şekil 3.3-şekil 3.4).Bu işlem lam lamel altında da kontrol amaçlı tekrarlandı.

Sperm sayımı yapılan alandaki (yukarıdan aşağıya ya da soldan sağa yan yana 10 kare) hareketsiz sperm sayıldı ve toplam sperm sayısı ile orantılanarak hareketli sperm sayısı hesaplandı. Bu işlem birçok alanda tekrarlandı ve ortalamaları alındı.Bulunan sayı mL'de kaç milyon sperm olduğunu gösterdi. Ardından hareketlilik yüzdesi ve kalitesi hesaplandı.

Ortalama 250 milyon/ml olduğu bilinen erkek wistar sıçan spermleri bu sayıya göre değerlendirildi.Spermlerdeki hareketlilik WHO (world Healt Organization) kriterleri [92] gözönüne alınarak sınıflandırıldı.

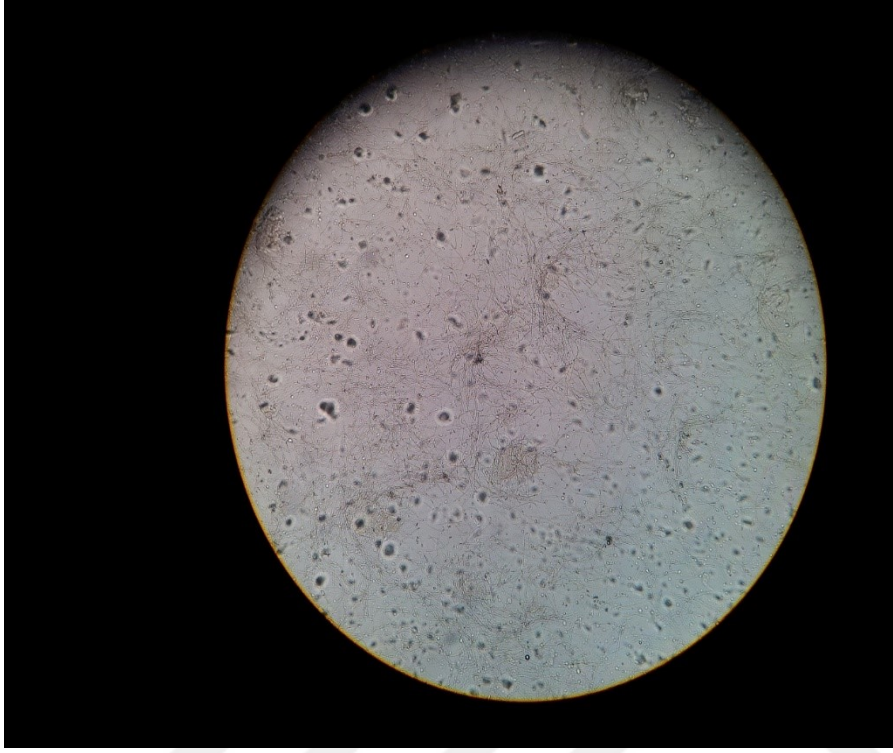
Bu sınıflandırmada;

+4 ileri hızlı sperm

+3 ileri yavaş sperm

+2 yerinde hareketli sperm

+1 hareketsiz sperm olarak değerlendirilir.



Şekil 3.3. 20 x buyutmede sperm görüntüsü



Şekil 3.4. 20 x büyütmede sperm görüntüsü

3.3 Tayin Yöntemleri

3.3.1. Plazmada total testosteron tayin yöntemi

Testis fonksiyonunu göstermek için Total Testesteron düzeyleri Radyoimmunoassay (RIA) yöntemiyle ölçüldü.

3.3.2. Testis dokusunda malondialdehid (MDA) tayin yöntemi

Testis dokusunda lipid peroksidasyon düzeyleri tiobarbütirik asit reaktif madde (TBARS) oluşumu yöntemi ile çalışıldı [93]. Doku örnekleri homojenizatör ile soğuk TCA (1 g doku + 9 ml % 10'luk TCA) içinde buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra 15 dakika süreyle 4000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant alınarak 4000 rpm'de 8 dakika tekrar santrifüj edildi. Örnekten 750 mikrolitre alınarak üzerine 750 mikrolitre % 0.67'lik TBA eklendi. Daha sonra örnekler 100 °C'de kaynayan su banyosunda 15 dakika bekletildi ve daha sonra soğutulularak 4000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant alınarak her bir örneğin absorbansı 532 nm'de tayin edildi. Testis lipid peroksidasyon düzeyi $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak MDA eşdeğeri olarak ifade edildi.

Sonuç: $(\text{absorbans} \times 128) / \text{doku ağırlığı} = \text{MDA nmol/ gr doku}$

3.3.3. Testis dokusunda redükte glutatmyon (GSH) tayin yöntemi

Testis dokusunda glutatyon (GSH) tayini için modifiye Ellman yöntemi [94]. kullanıldı. Lipid peroksidasyonunda anlatıldığı şekilde testis dokuları homojenize edilip santrifüj edildikten sonra, 2 hacim supernatant, 8 hacim 0.3 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 1 hacim ditiyobisnitrobenzoat (0.4 mg/ml % 1'lik sodyum sitrat) çözeltisi ile karıştırıldı. Daha sonra spektrofotometrede karışımın 412 nm dalga boyunda \checkmark -absorbansı ölçüldü ve glutatyon düzeyleri $13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ katsayısı kullanılarak hesaplandı.

Sonuçlar : $(4.23 \times \text{absorbans}) / \text{doku ağırlığı} = \mu\text{mol/gr doku}$

3.3.4.Histolojik yöntemler

Tüm doku örnekleri ışık mikroskopik inceleme için ilk olarak % 10' luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Tespit işleminden sonra doku örnekleri kasetlere konularak akar su altında 24 saat süresince yıkandı. Suyun uzaklaştırılması için dokular artan derecelerde alkol serilerinden (%70, %80, %90, %100) geçirildiler. Sonrasında dokular parlatılmaları amacıyla ksilolden geçirildi ve ardından erimiş parafine gömüldüler. Hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 4-5 mikron kalınlığındaki kesitlere tüm gruplar için Hematoksilen- Eozin boyaması uygulandı ve Leica Q Vin 3 programında değerlendirile

rek resimleri çekildi.

Hematoksilen – Eozin Boyama Yöntemi

Boya Solüsyonlarının Hazırlanışı

1- Harris Hematoksilen Solüsyonu

Hematoksilen 1gr

Alkol 10ml

Potasyum alum (alüminyum potasyum sülfat) 20gr

Distile su 200ml

Civa oksit 0.5gr

Glasiyal asetik asit 8ml

2- Eozin Solüsyonu

Eozin 1gr

Distile su 100ml

1 küçük timol kristali

Boyama Yöntemi

Deney gruplarından alınan kesitler 60°C etüvde 30 dakika bekletildikten sonra, 2x15 dakika ksilole alınarak parafinden arındırılmaları sağlandı. Daha sonra lamalar sırasıyla azalan alkol serilerinden geçirilip (%100, %96, %80, %70, %50) havada kurutuldu. 10 dakika akar suda yıkandıktan sonra, Harris Hematoksilen' de 10 dakika boyandı ve 10 dakika akar suda yıkandılar. % 70 alkol + 2 – 3 damla glasiyel asedik asit karışımına batırılıp tekrar 10 dakika akar suda yıkandı. Lamlar 15 dakika Eozin de bekletilip 10 dakika daha akar suda yıkandıktan sonra artan dereceli alkol serilerinden geçirilerek (%50, %70, %80, %96, %100), 2x15 dakika ksilole alındı ve entellan ile kapatıldı.

İstatistiksel verilerin oluşturulabilmesi amacıyla; her denek için rastgele 6 tübül seçilerek her tübülde 6 ayrı bölgede seminifer epitel boyu ölçüldü. Testiste spermatogenezisin değerlendirilebilmesi için Johnsen skorlama yapılarak istatistiksel veriler oluşturuldu [95].

Bu skorlamaya göre;

10-Normal tübül yapısı ve normal spermatogenezis

9-Spermatozoa varlığı olmasına karşın dağınık spermatogenezis görülmesi

8-Sadece birkaç spermatozoa varlığı

7-Spermatozoa görülmeksizin çok sayıda spermatid varlığı

6-Sadece birkaç spermatid varlığı

5-Hiç spermatozoa ve spermatid görülmeksizin çok sayıda spermatosit varlığı

4-Sadece birkaç spermatosit varlığı

3-Sadece spermatogonyum varlığı

2-Hiç üreme hücresi görülmemesi

1-Hiç üreme hücresi ve Sertoli hücresi görülmemesi

durumu kabul edildi

3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemi

Hayvanlardan elde edilen veriler sıra ortalama \pm SS (standart sapma) olarak verildi. Gruplar Kruskal-Wallis H Testi ile analiz edilerek kontrol grubu ile karşılaştırıldı. Her grup için elde edilen veriler Mann-Whitney U testi ile analiz edilerek gruplar arası fark araştırıldı. Uygulanan bütün testlerde güven aralığı % 95 olup. $p < 0.05$ olan değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Bütün testler, bilgisayar ortamında SPSS programının 15.0 versiyonu ile yapılmıştır.

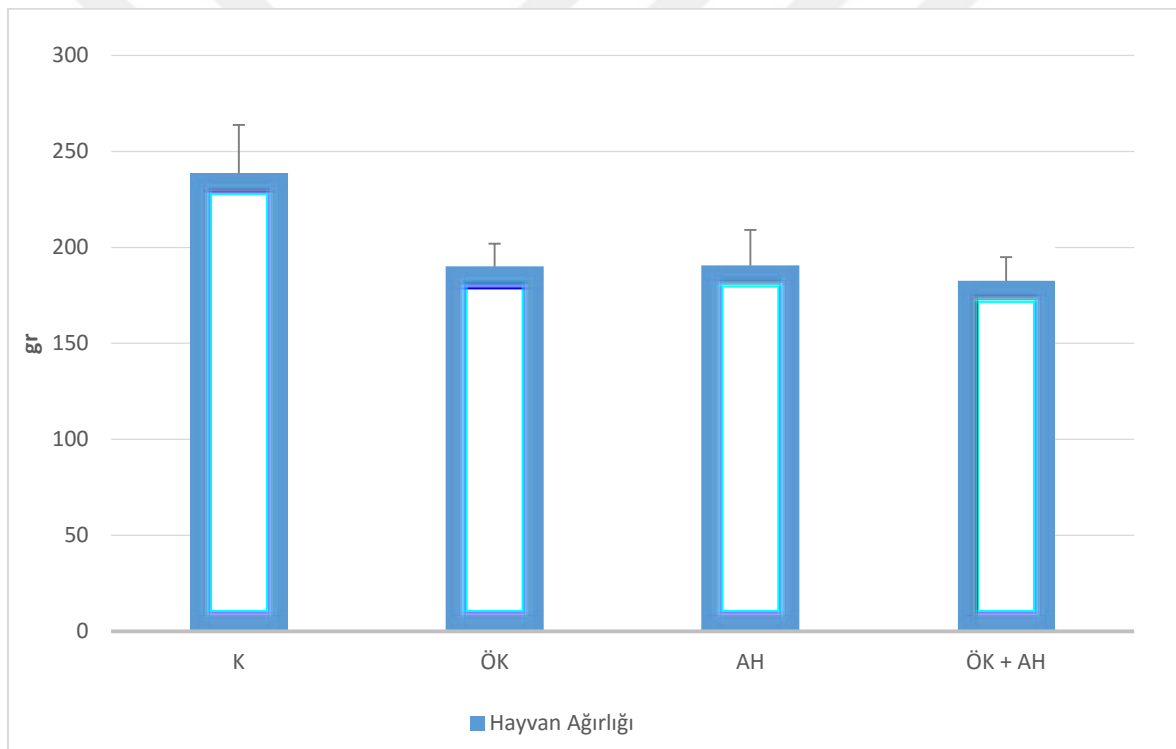


4. BULGULAR

4.1. Hayvan Ağırlığı Ölçümleri

Gruplar arasında hayvan ağırlığı ölçümleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$) (şekil 4.1). (Sırasıyla $238,5\pm25,4$ gr , $190\pm11,99$ gr , $190,5\pm18,7$ gr , $182,5\pm12,5$ gr)

Hayvan ağırlığı ölçümleri için sıra ortalama ve standart sapma değerleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



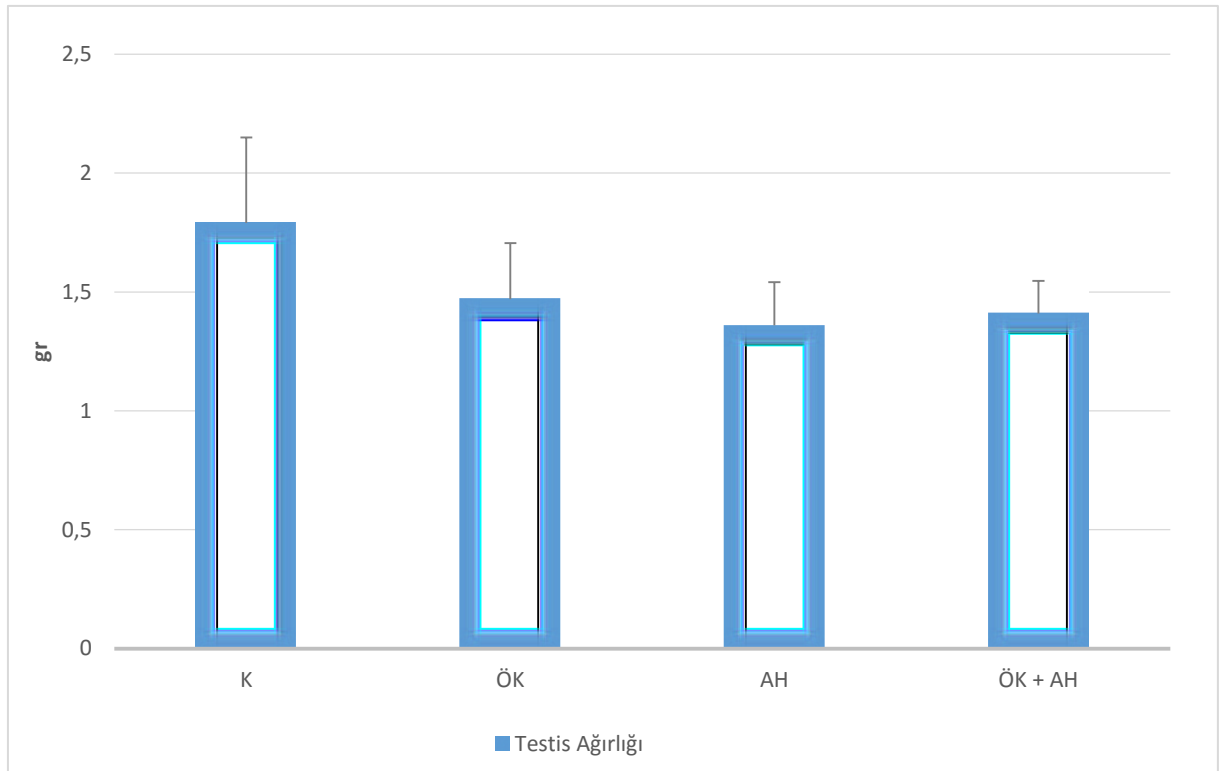
$P>0,05$

Şekil 4.1. Hayvan ağırlıklarının gruplara göre dağılımı

4.2. Testis Ağırlığı Ölçümleri

Gruplar arasında testis ağırlığı ölçümleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. ($p>0,05$) (şekil 4.2). (Sırasıyla $1,79\pm,36$ gr , $1,47\pm,24$ gr , $1,36\pm,18$ gr , $1,41\pm,14$ gr)

Testis ağırlığı ölçümleri için sıra ortalama ve standart sapma değerleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



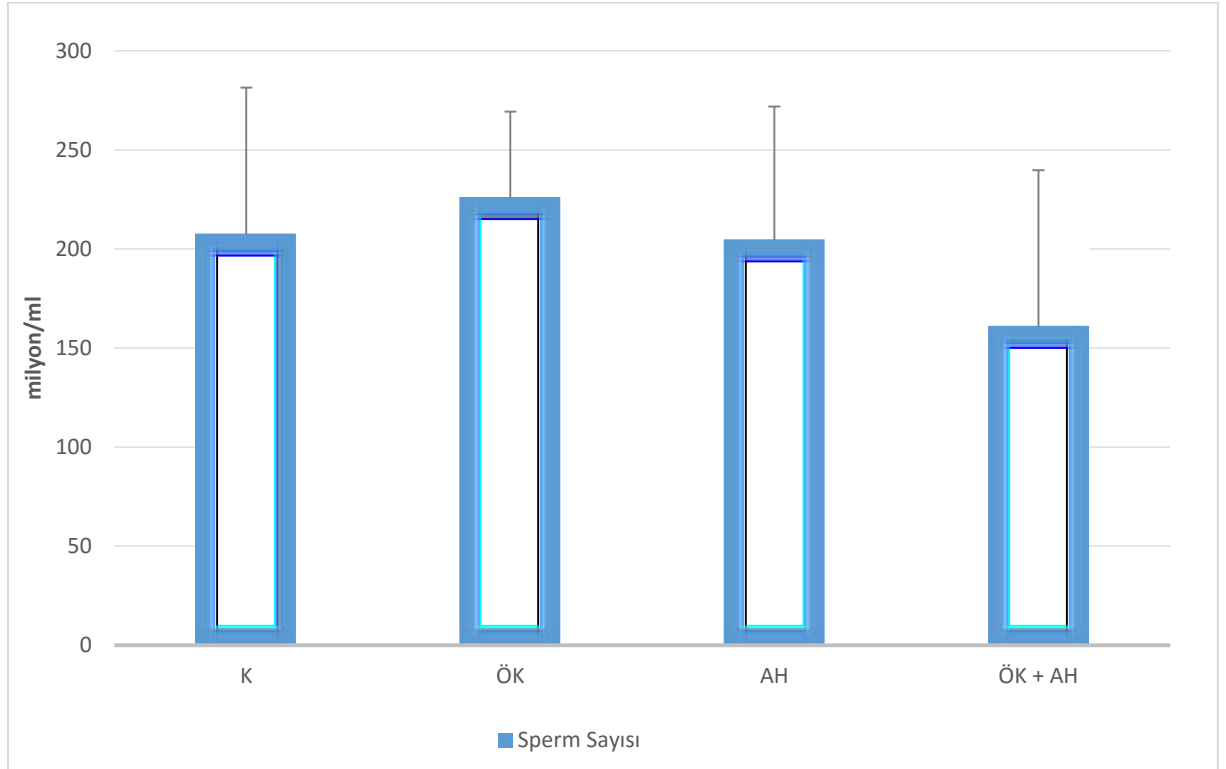
$P>0,05$

Şekil 4.2. Testis ağırlıklarının gruplara göre dağılımı

4.3. Sperm Sayısı

Gruplar arasında sperm sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($P>0,05$) (şekil 4.3). (Sırasıyla $208\pm73,9$ milyon/ml, $226\pm43,6$ milyon/ml, $205\pm67,4$ milyon/ml , $161\pm78,8$ milyon/ml)

Sperm sayısı için sıra ortalama ve standart sapma değerleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



$P>0,05$

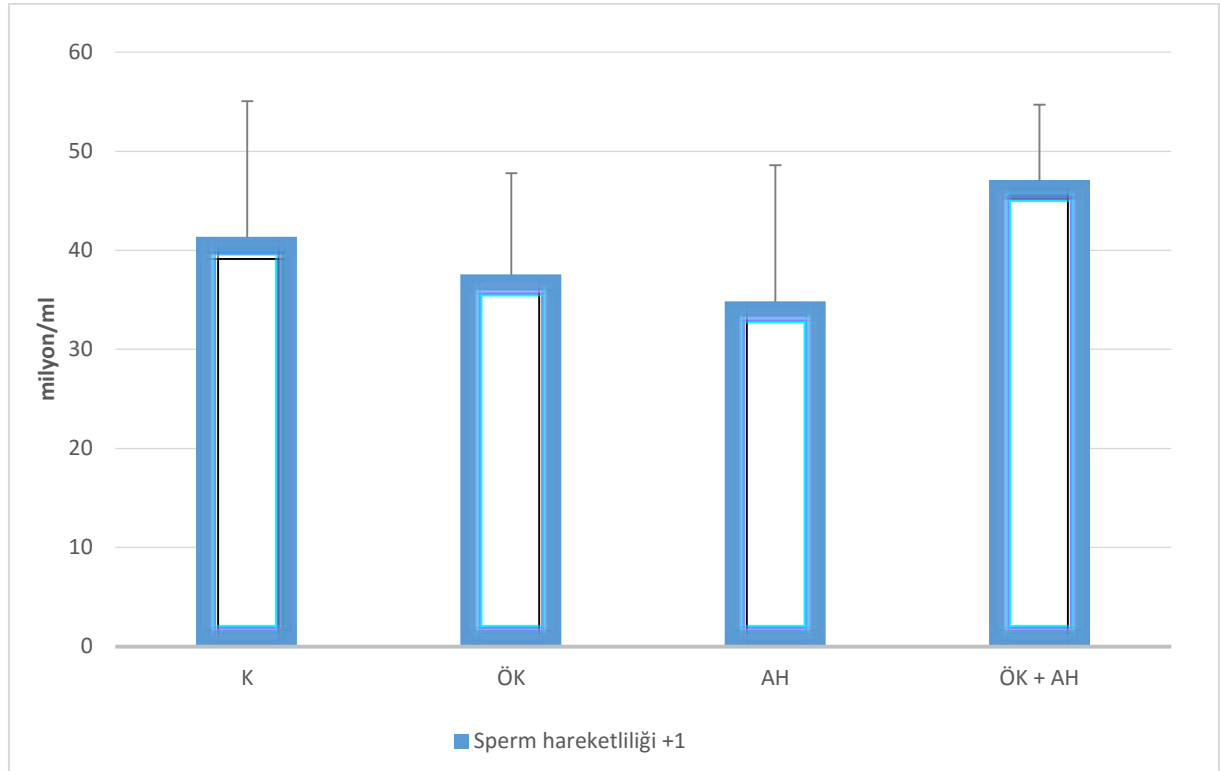
Şekil 4.3.Sperm sayısının gruplara göre dağılımı

4.4.Sperm Hareketliliği

4.4.1. +1 Sperm hareketliliği

Gruplar arasında +1 sperm sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$) (Şekil 4.4). (Sırasıyla 41,3±13,8 milyon/ml, 37,5±10,3 milyon/ml, 35±13,8 milyon/ml, 47±7,7 milyon/ml)

+1 Sperm hareketliliği için sıra ortalama ve standart sapma değerleri Çizelge 4.1'de gōsterilmiŐtir.



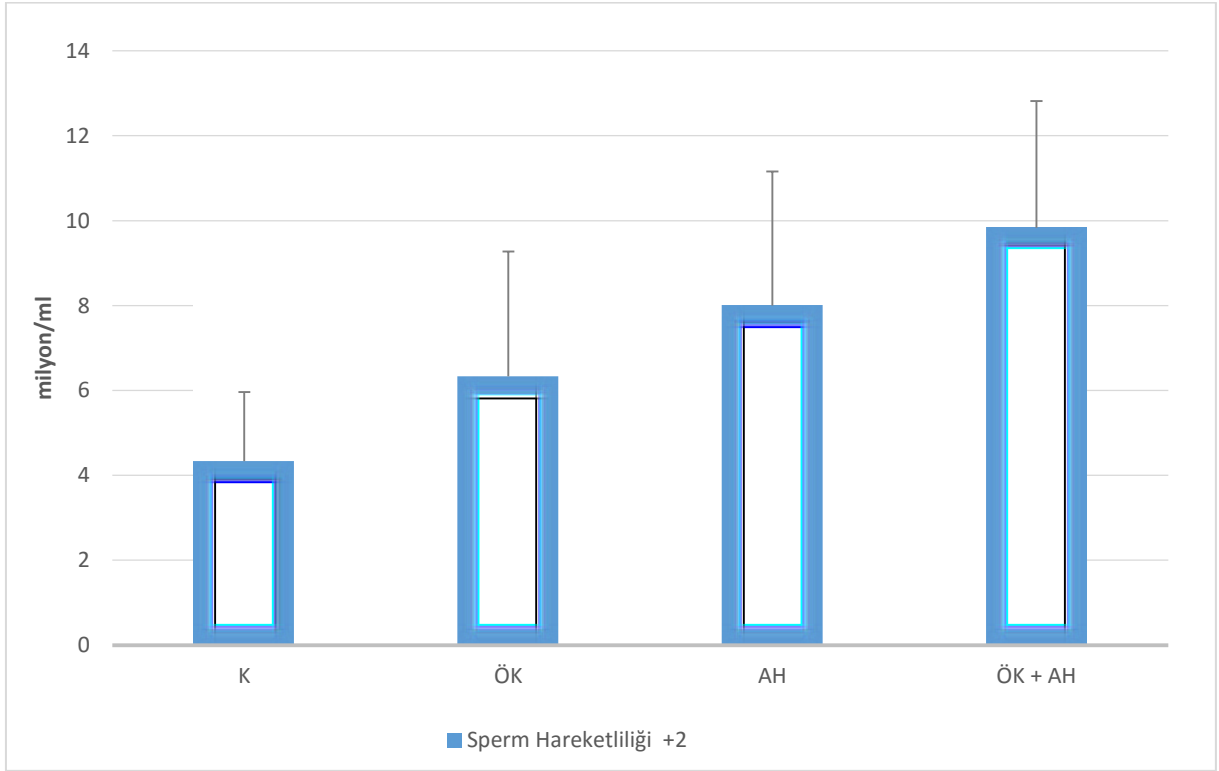
($p>0,05$)

Şekil 4.4.+1 sperm hareketliliğinin gruplara gōre dağılımı

4.4.2. +2 Sperm hareketliliği

Gruplar arasında sperm hareketliliği +2 açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$) (şekil 4.5). (Sırasıyla $4,3 \pm 1,6$ milyon/ml, $6,3 \pm 3$ milyon/ml, $8,0 \pm 3,2$ milyon/ml, $9,8 \pm 3$ milyon/ml)

+2 Sperm hareketliliği için sıra ortalama ve standart sapma değerleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



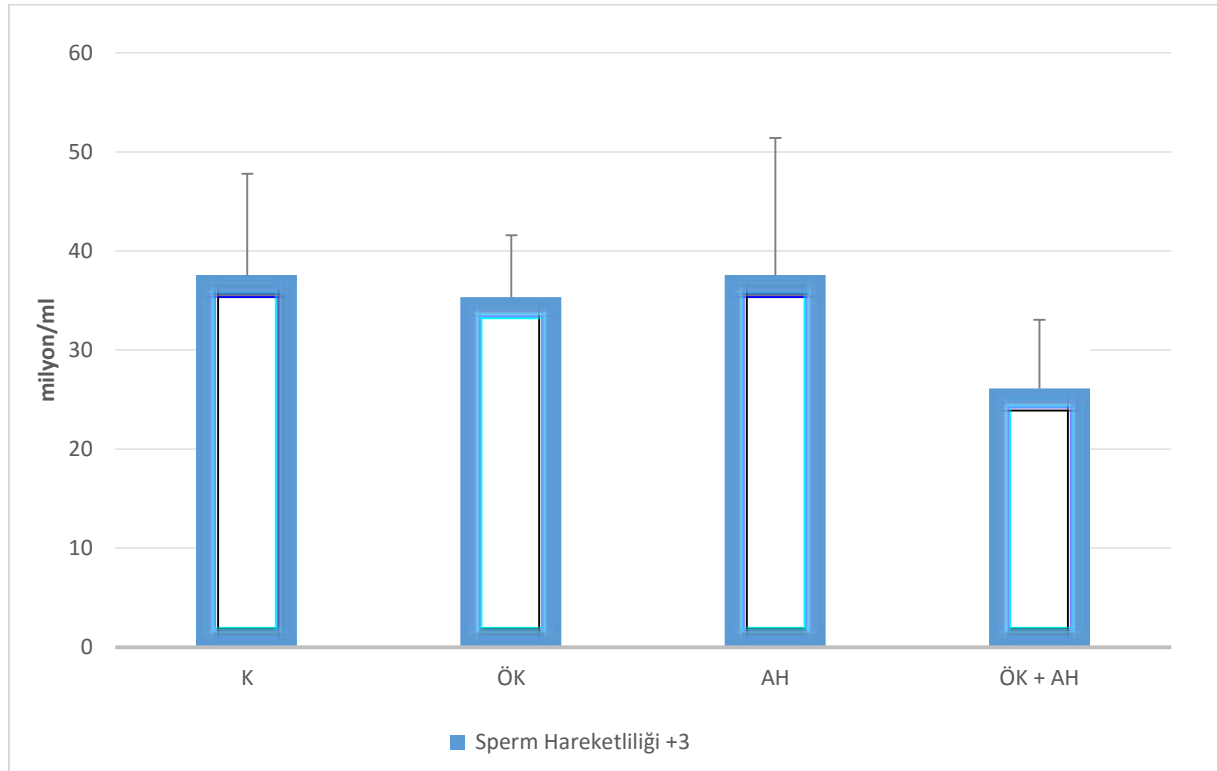
($p > 0,05$)

Şekil 4.5.+2 sperm hareketliliğinin gruplara göre dağılımı

4.4.3. +3 Sperm hareketliliği

Gruplar arasında +3 sperm hareketliliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. ($p > 0,05$) (Şekil 4.6). Sırasıyla ($37,5 \pm 10,3$ milyon/ml, $35,3 \pm 6,3$ milyon/ml, $37,5 \pm 14$ milyon/ml, $26,1 \pm 7$ milyon/ml)

+3 Sperm hareketliliği için sıra ortalama ve standart sapma değerleri izelge 4.1'de gösterilmiştir.



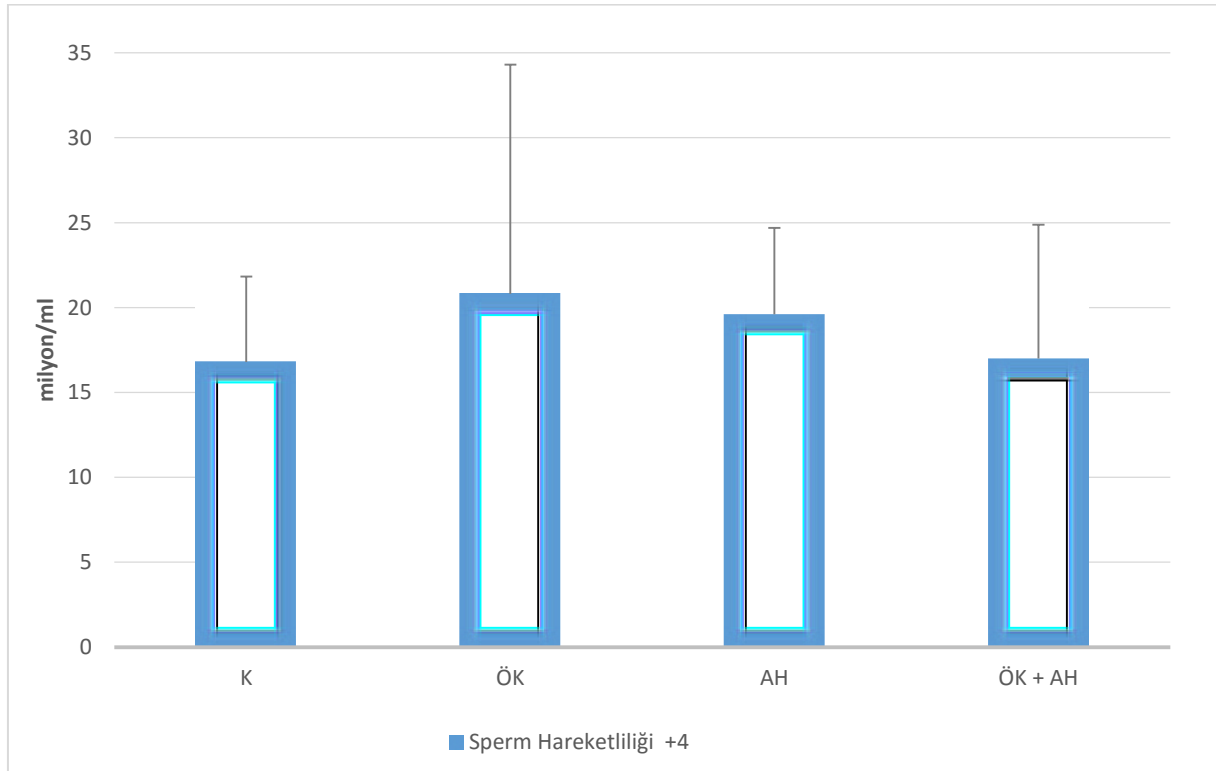
($p > 0,05$)

Şekil 4.6. +3 sperm hareketliliğinin gruplara göre dağılımı

4.4.4 +4 Sperm hareketliliği

Gruplar arasında +4 sperm hareketliliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$) (şekil 4.7). (sırasıyla $16,8 \pm 5$ milyon/ml, $20,8 \pm 13,5$ milyon/ml, $19,6 \pm 5,1$ milyon/ml, $17 \pm 7,9$ milyon/ml)

+4 Sperm hareketliliği için sıra ortalama ve standart sapma değerleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



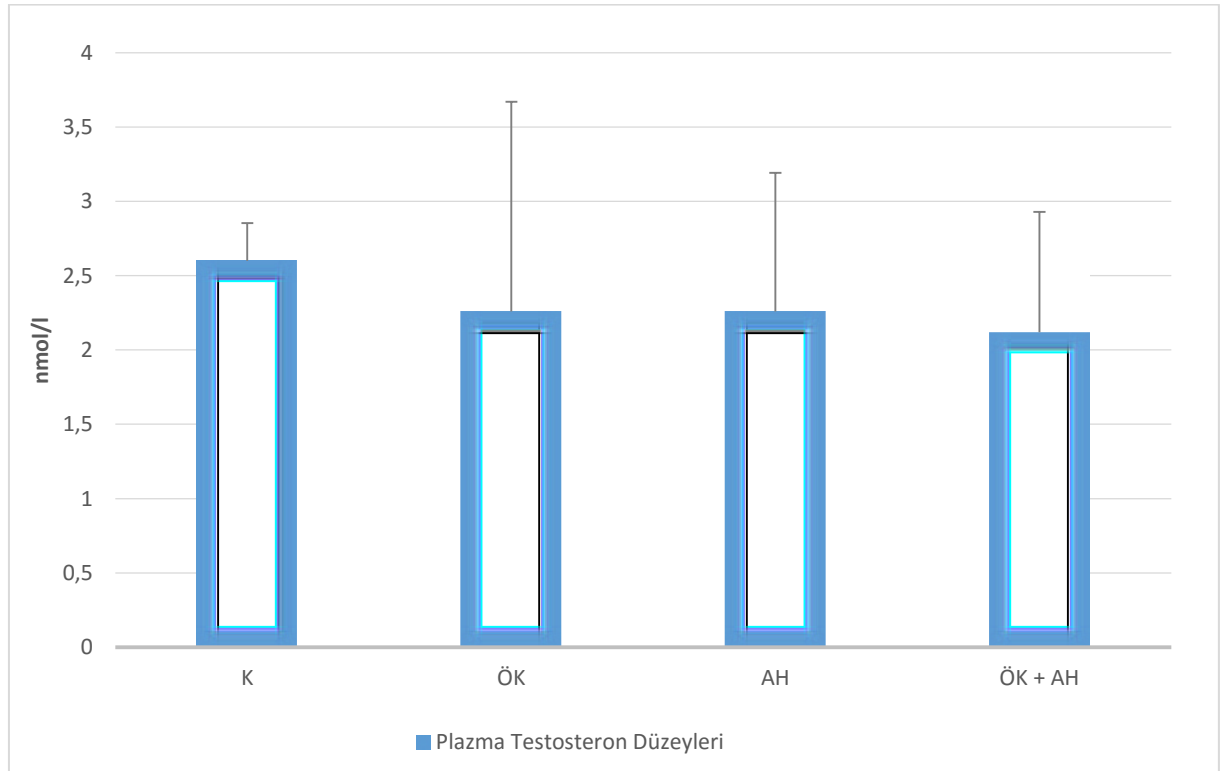
($p > 0,05$)

Şekil 4.7. +1 sperm hareketliliğinin gruplara göre dağılımı

4.5. Plazma Testosteron Düzeyleri

Gruplar arasında plazma testosteron düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. ($p > 0,05$) (şekil 4.8). (sırasıyla $2,6 \pm 0,3$ nmol/l, $2,3 \pm 1,4$ nmol/l, $2,3 \pm 0,9$ nmol/l, $2,1 \pm 0,8$ nmol/l)

Testis dokusunda plazma testosteron düzeylerinin sıra ortalama ve standart sapma değerleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



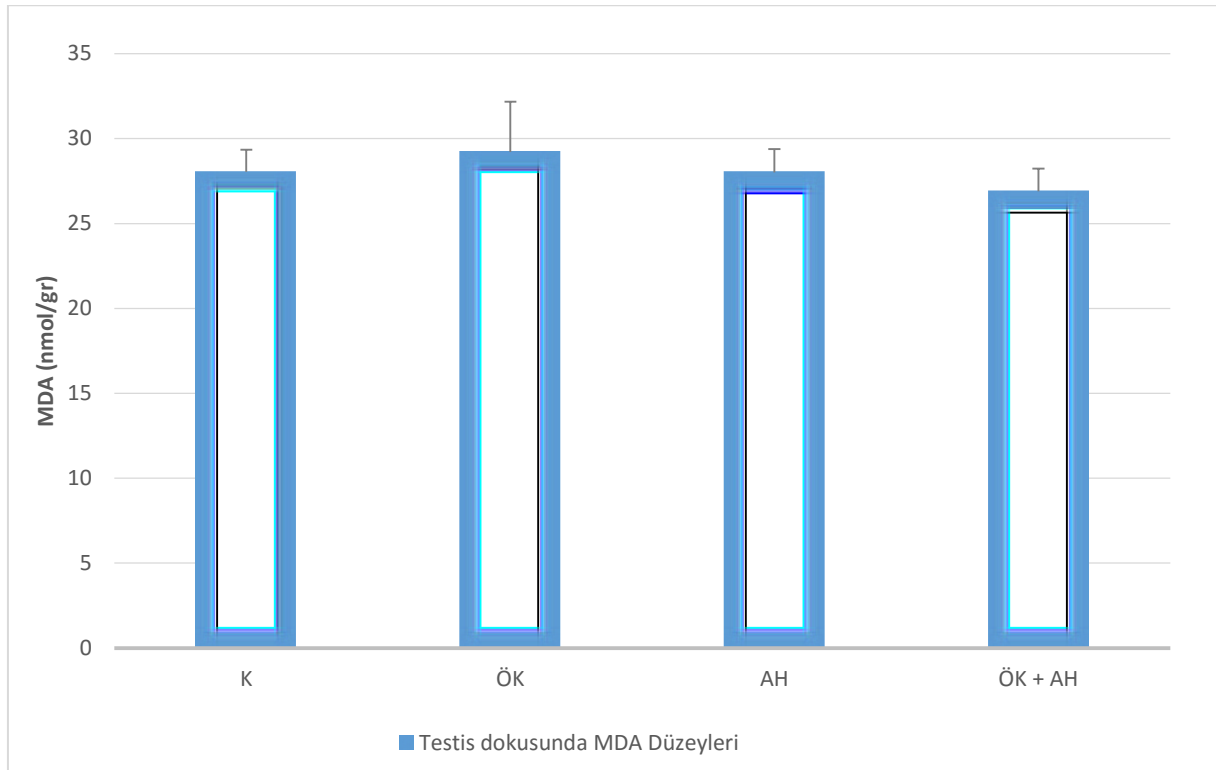
$P > 0,05$

Şekil 4.8. Plazma testosteron düzeylerinin gruplara göre dağılımı

4.6. Doku Malondialdehit Düzeyleri

Gruplar arasında MDA değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$) (şekil 4.9). (sırasıyla $28,1 \pm 1,3$ nmol/gr, $29,2 \pm 3$ nmol/gr, $28 \pm 1,4$ nmol/gr, $27 \pm 1,3$ nmol/gr)

Testis dokusunda MDA düzeylerinin sıra ortalama ve standart sapma değerleri çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



$P > 0,05$

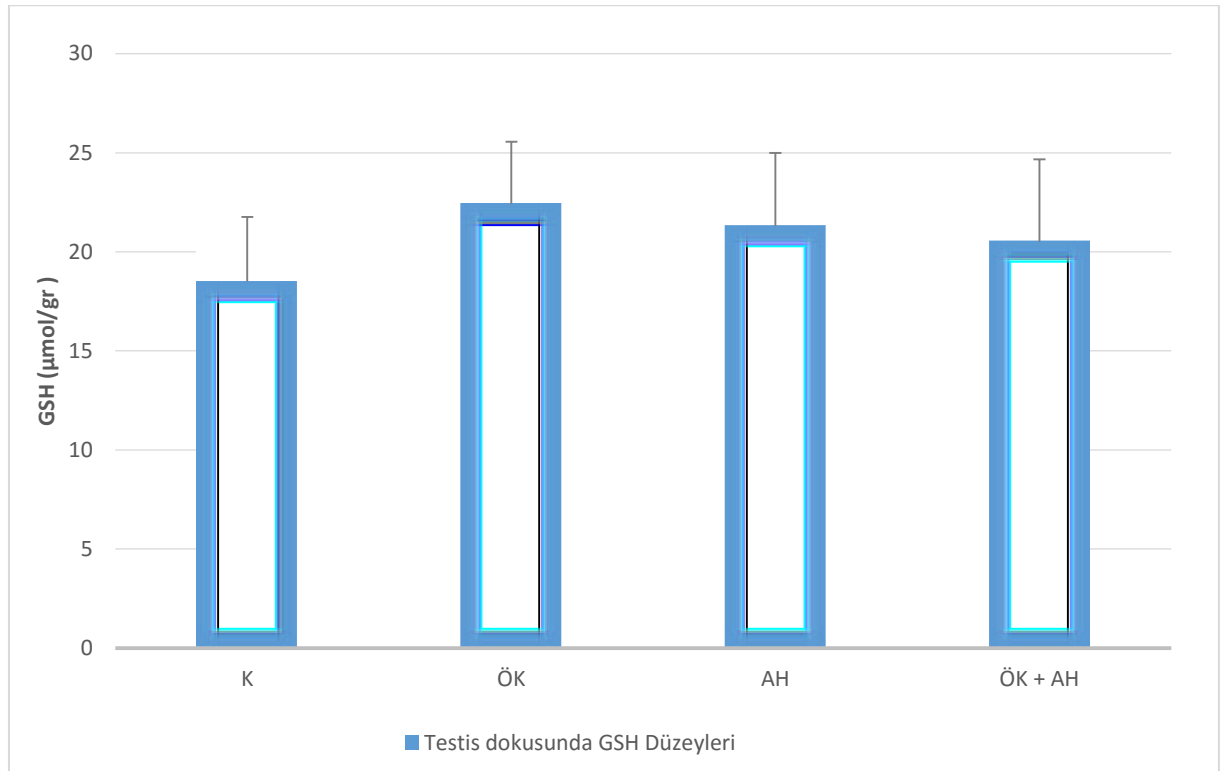
Şekil 4.9. Testis MDA düzeylerinin gruplara göre dağılımı

4.7. Doku Glutasyon Düzeyleri

Gruplar arasında GSH değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p > 0,05$) (şekil 4.10). (sırasıyla $18,5 \pm 3,3 \mu\text{mol/gr}$, $22,4 \pm 3,2 \mu\text{mol/gr}$, $21,3 \pm 3,7 \mu\text{mol/gr}$, $21 \pm 4,2 \mu\text{mol/gr}$)

Testis dokusunda GSH düzeylerinin sıra ortalama ve standart sapma değerleri

çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



$P > 0,05$

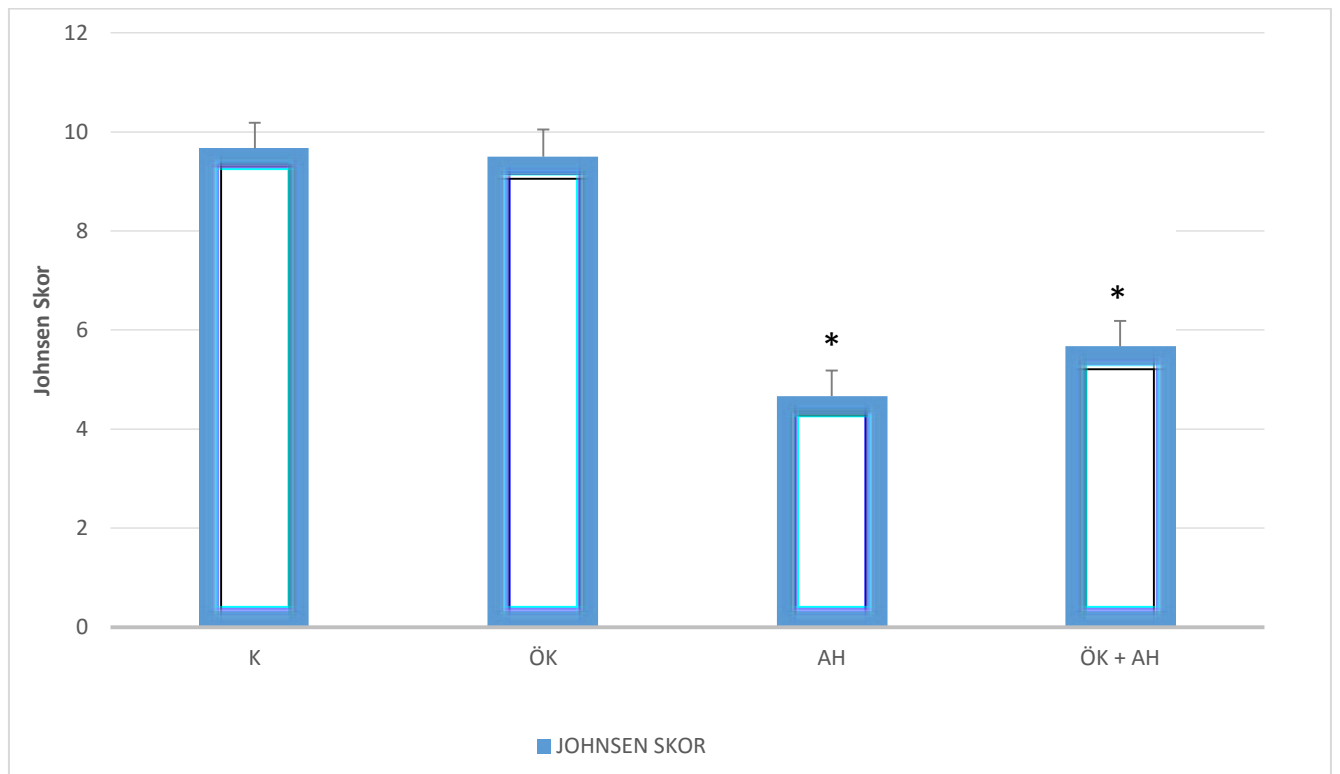
Şekil 4.10. Testis GSH düzeylerinin gruplara göre dağılımı

4.8. Johnsen Skor

Johnsen skorlamada AH ve ÖK+AH gruplarının kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p < 0.05$) (şekil 4.11) .(sırasıyla $9,67 \pm 0,52$, $9,5 \pm 0,55$, $4,67 \pm 0,52$, $5,67 \pm 0,52$) K-ÖK grubunda değişiklik olmadı.

Testis dokusunda johnsen skorunun sıra ortalama ve standart sapma değerleri

çizelge 4.1'de gösterilmiştir.



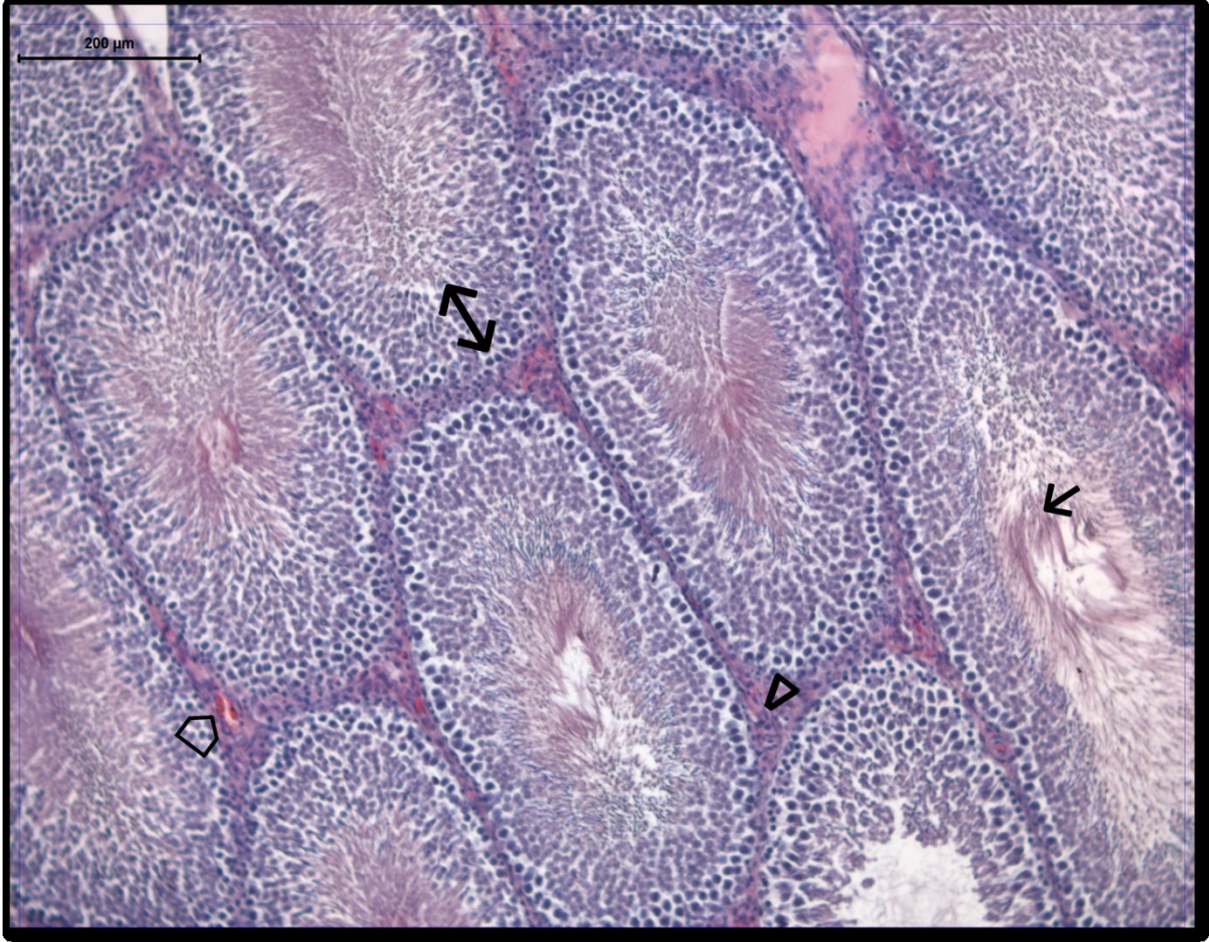
* K-AH: $p=0,003$ ($p < 0.05$), * K-ÖK+AH $p=0,003$ ($p < 0.05$), *ÖK-AH $p=,003$ ($p < 0.05$),

*ÖK-ÖK+AH $p=0,003$ ($p < 0.05$)

Şekil 4.11. Testiste johnsen skorlamanın gruplara göre dağılımı

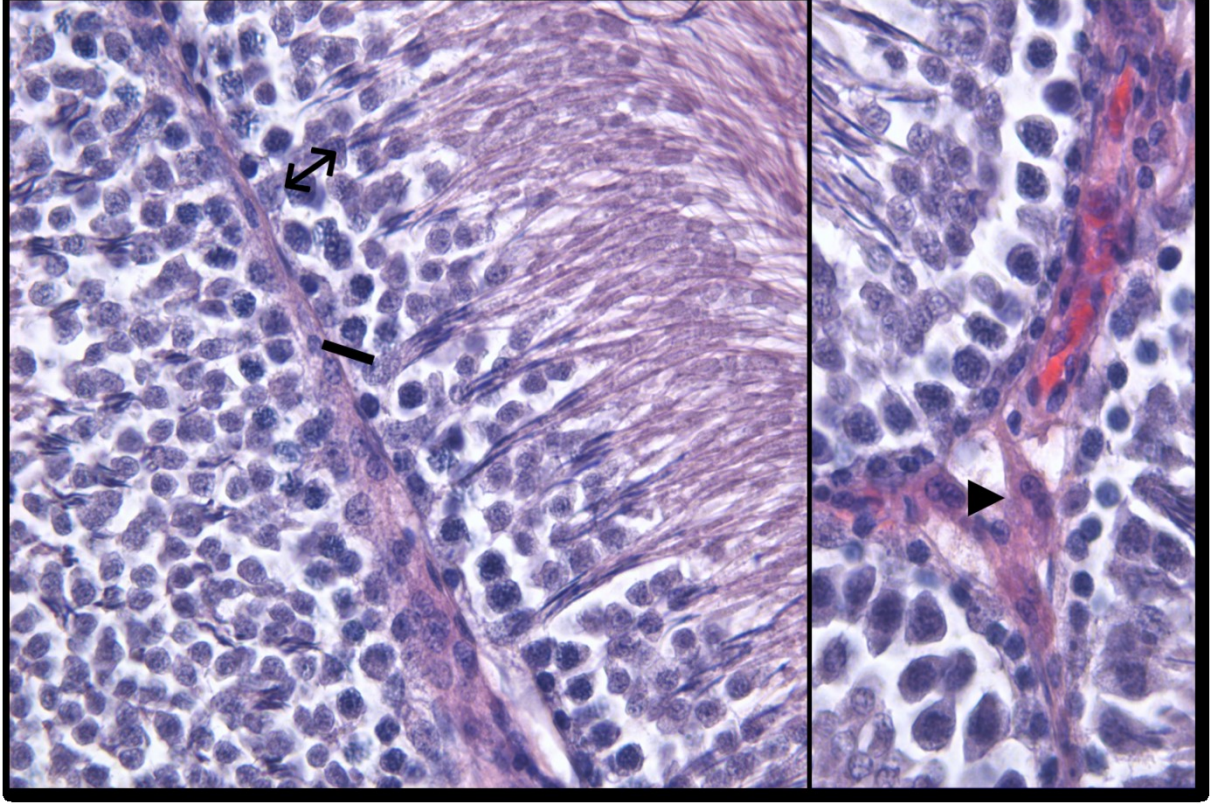
4.9. Histolojik Bulgular

Kontrol grubu hematoxilen eozin boyama küçük büyütmeli incelemelerde seminifer tübüller ve interstisyel alan normal yapıları ile izlendi. Seminifer tübül lümenlerinin spermiumlarla dolu olduğu, spermium kuyruklarının lümeneye doğru yönelim gösterdiği belirgindi. İnterstisyel alanda çok sayıda kapiller ve interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) izleniyordu (Resim 4.1).



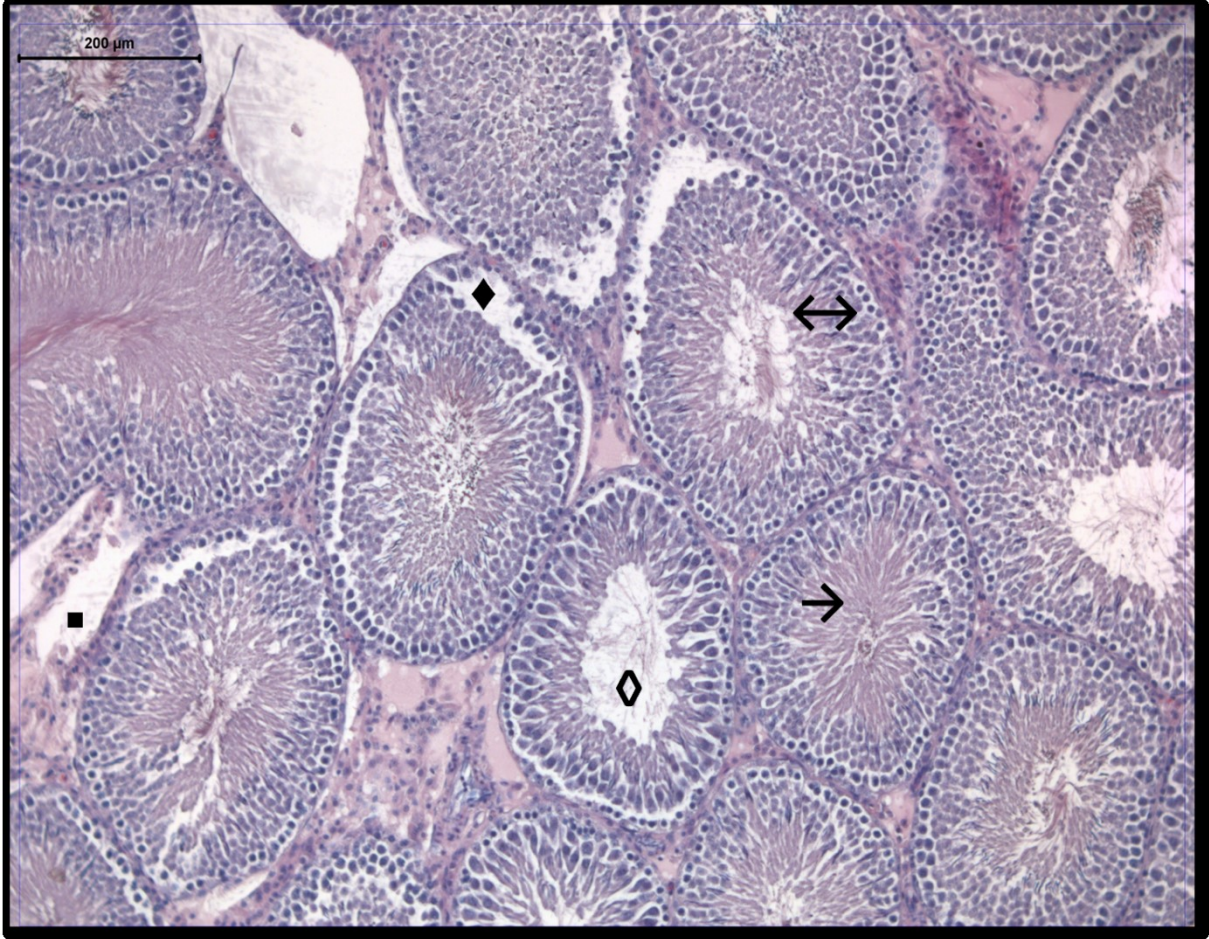
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait küçük büyütmeli resimde seminifer epitel (\leftrightarrow), interstisyel alan (Δ), seminifer tübül lümeninde spermiumlar (\rightarrow) ve kapiller (\triangle) görülüyor (Hematoxilen-Eozin x100).

Büyük büyültmeli incelemelerde seminifer epitele ait spermatogenik hücreler ile Sertoli hücreleri normal yapıda gözlemlendi. İnterstisyel alanda yapılan incelemelerde Leydig hücreleri eozinofilik sitoplazmaları, yuvarlak ve oval şekilleri ile belirgindi (Resim 4.2).



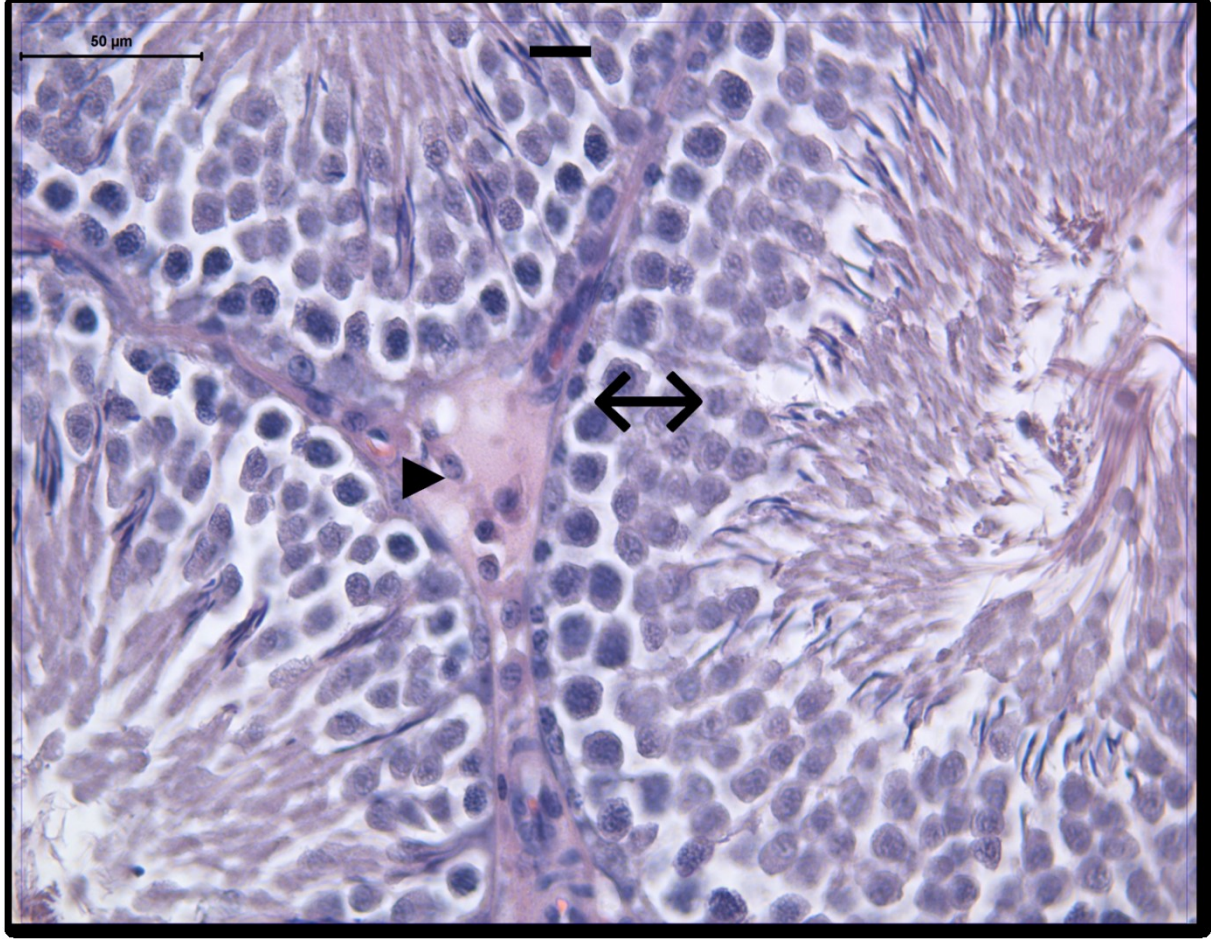
Resim 4.2. Kontrol grubuna ait büyük büyültmeli resimde seminifer epitel (↔), Leydig hücreleri (▶) ve Sertoli hücresi (→) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

Ön koşullama uygulanan gruba ait küçük büyütmeli incelemede; normal yapıya sahip seminifer tübüller gözlenmekle birlikte, yer yer intratübüler ve interstisyel ödemin olduğu ilgiyi çekti. Seminifer tübüllerde genel olarak lümenin spermiumlar ile dolu olduğu gözlenirken, yer yer lümenleri az sayıda spermiumla dolu tübüller belgindi (Resim 4.3).

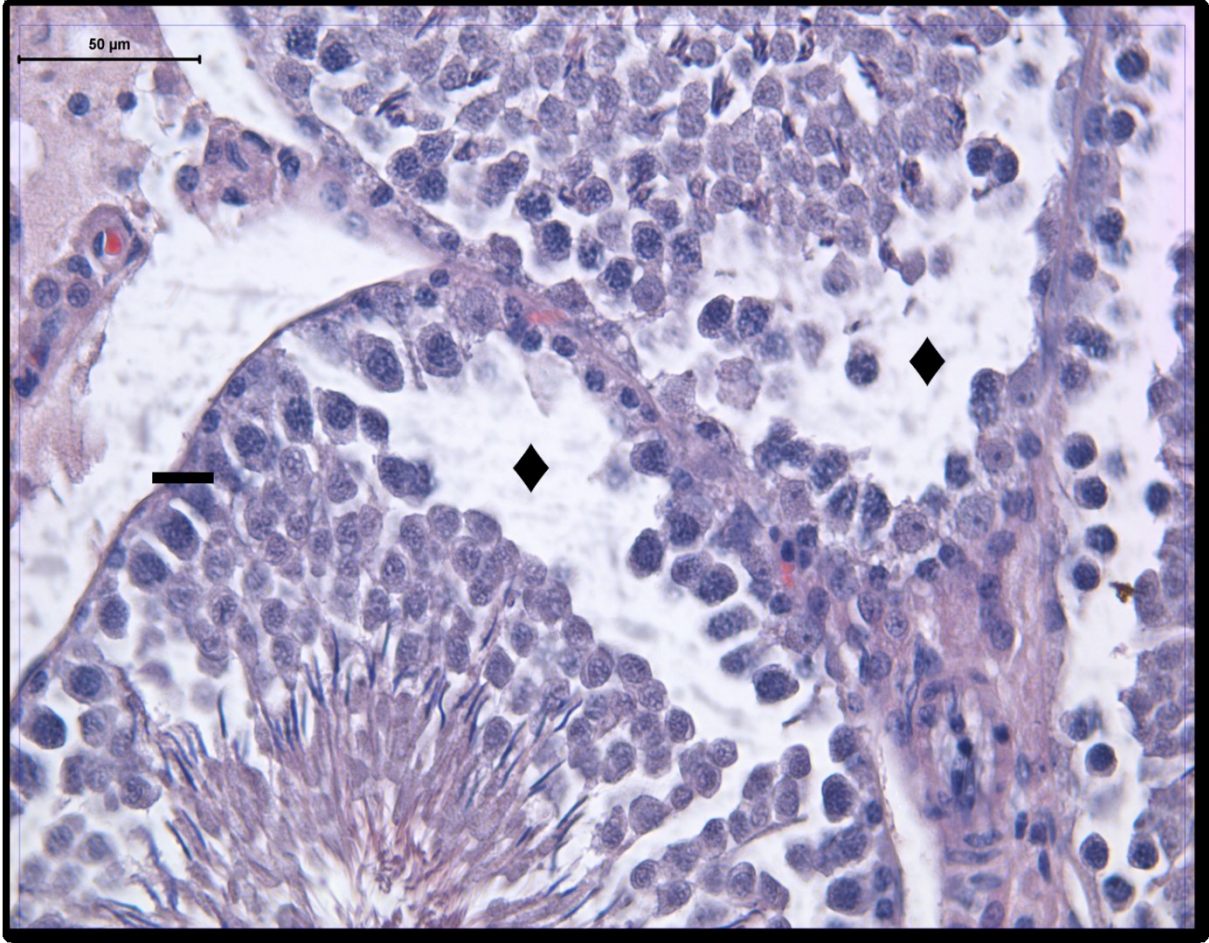


Resim 4.3. Ön koşullama uygulanan gruba ait küçük büyütmeli resimde seminifer epitel (↔), intratübüler ödem (◆), interstisyel ödem (▪), lümeninde spermium az olan tübüller (◊), seminifer tübül lümeninde spermiumlar (→) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x100).

Büyük büyültmeli incelemelerde çoğu tübülde seminifer epitel ve Sertoli hücreleri normal yapıları ile gözlendi (Resim 4.4 ve 4.5),



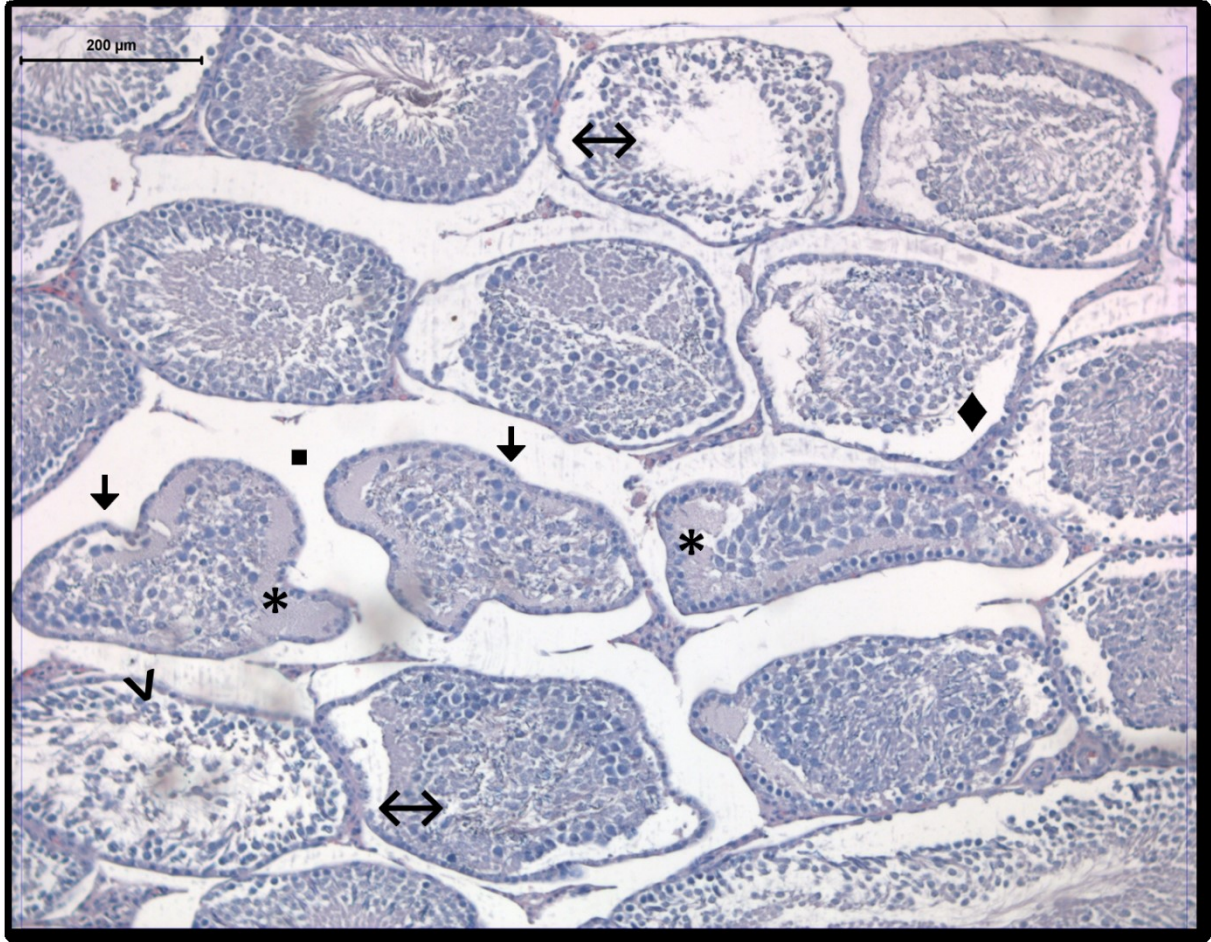
Resim 4.4. Ön koşullama uygulanan gruba ait büyük büyültmeli resimde seminifer epitel (↔), Leydig hücreleri (▶) ve Sertoli hücresi (←) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).



Resim 4.5. Ön koşullama uygulanan gruba ait büyük büyültmeli resimde Sertoli hücresi (—) ve intratübüler ödem (◆) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

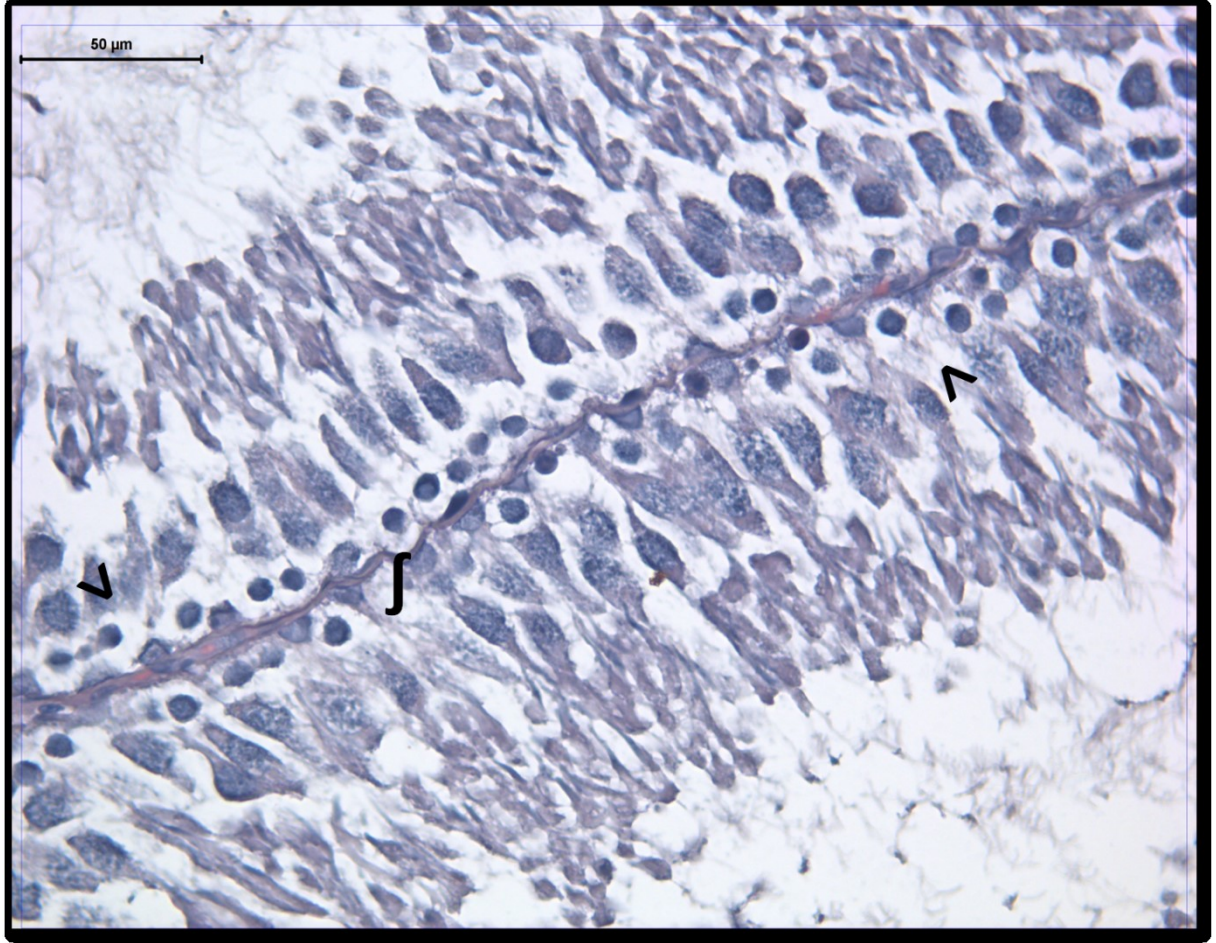
Ağır hipoksi uygulanan gruba ait küçük büyültmeli incelemelerde, seminifer epitelin çoğu tübülde büyük dejenerasyon gösterdiği ilgiyi çekti. Seminifer tübüllerin şekilsel anlamda bozulduğu ve enine kesitlerde girintili çıkıntılı bir görünüm sergiledikleri dikkati çekti. İntratübüler ve interstisyel ödem son derece yoğun olarak izlendi. İntratestiküler ödemin olduğu tübüllerde spermatozoid düzeyinden itibaren tüm seri hücrelerinin lümenine boşaldığı, seminifer tübüllerin sadece spermatogonyumlardan ibaret bir görünüm kazandığı dikkati çekti. Ayrıca bu yapıdaki tübüllerde ödem alanının hiyalinöz eozinofilik bir madde ile dolduğu gözlemlendi. Bir grup tübülde ise seminifer epitelin kısmen korunduğu gözlenirken, bu tür tübüllerde hücreler arası bağlantıların bozulduğu ve ödemin varlığı belirgin olarak ayırt edildi, bu tübüllerin lümenlerinde hiç olgun spermium izlenmedi. Az

sayıda tübülde ise seminifer tübül yapısının korunduğu ve lümenin spermium kuyrukları ile dolu olduğu gözlemlendi (Resim 4.6).



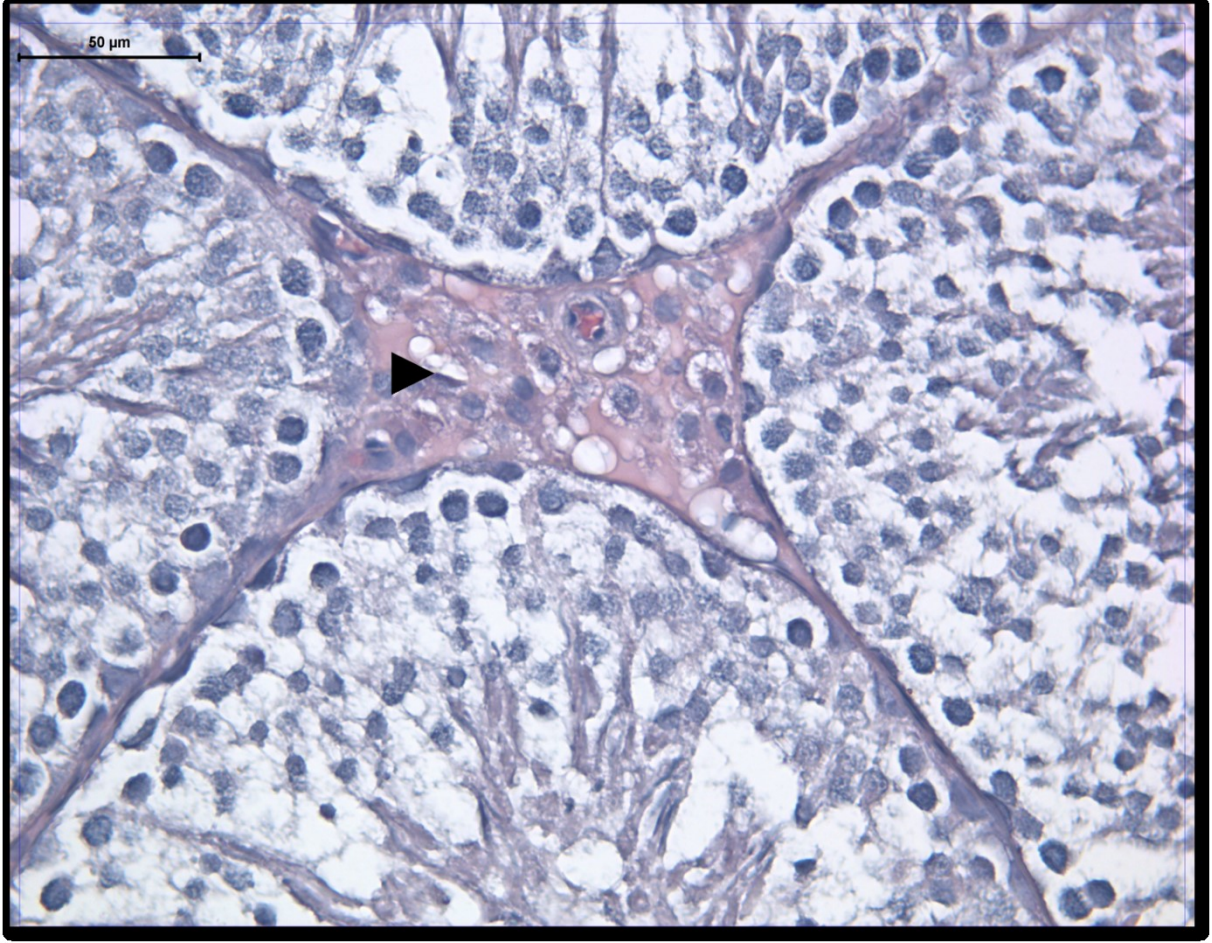
Resim 4.6. Ağır hipoksi uygulanan gruba ait küçük büyütmeli resimde seminifer epitel (↔), intratübüler ödem (◆), interstisyel ödem (▪), şekilsel bozukluk gösteren seminifer tübüller (*), ödem alanında hyalinöz madde (+) ve tüm seri hücreleri lümen boşalan tübül yapısı (>) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100).

Büyük büyütmeli incelemelerde az dejenerasyon gösteren seminifer tübüllerde dahi tüm epitel boyunca ödemin varlığı izlenirken, önemli bir bulgu olarak bu tübüllerde bazal membranda ondülasyon dikkati çekti (Resim 4.7).



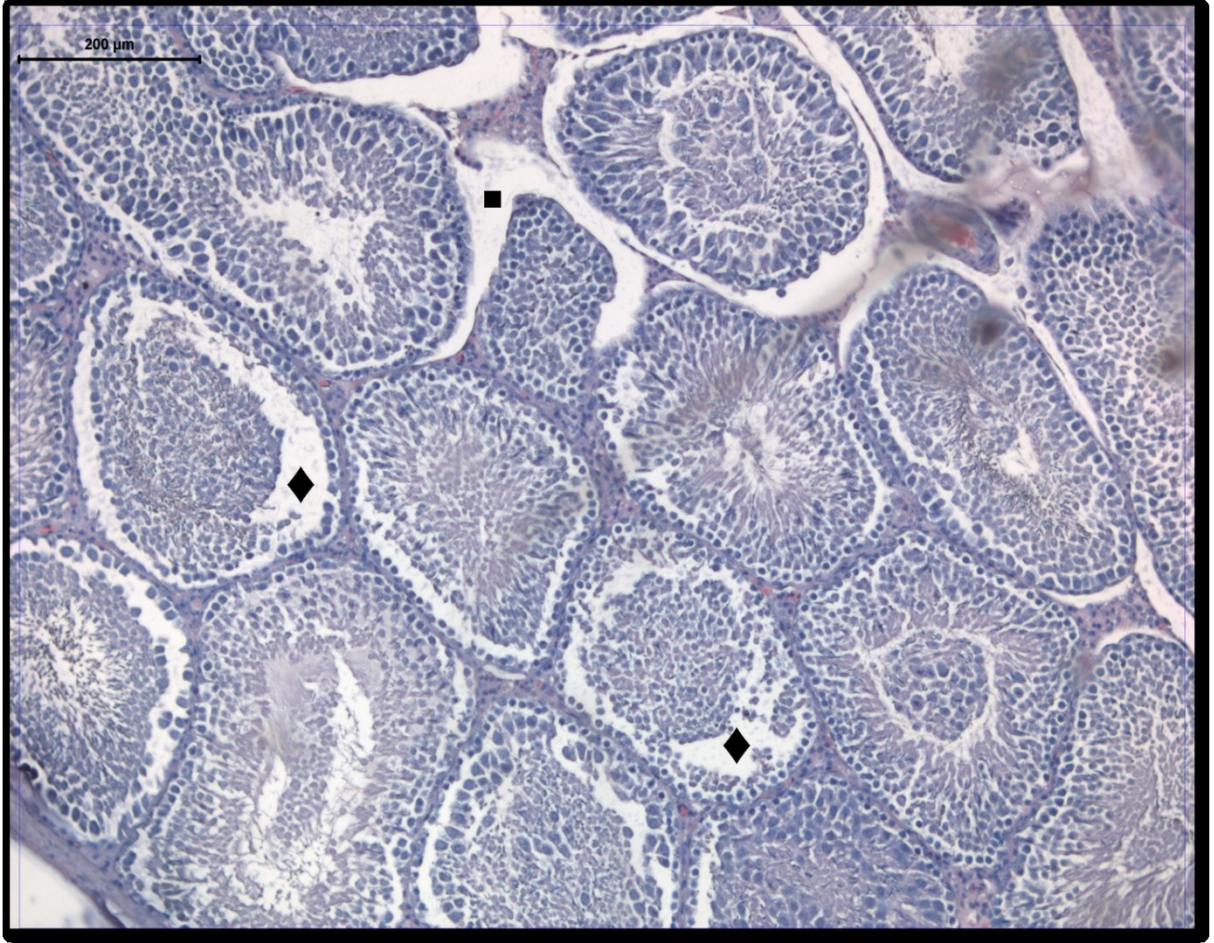
Resim 4.7. Ağır hipoksi uygulanan gruba ait büyük büyültmeli resimde tüm seri hücreleri lümene boşalan tübül yapısı (>) ve bazal membranda ondülasyon (J) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

İntersitisyel alanda yapılan incelemelerde Leydig hücrelerinde belirgin vakuolizasyon gözlemlendi (Resim 4.8).



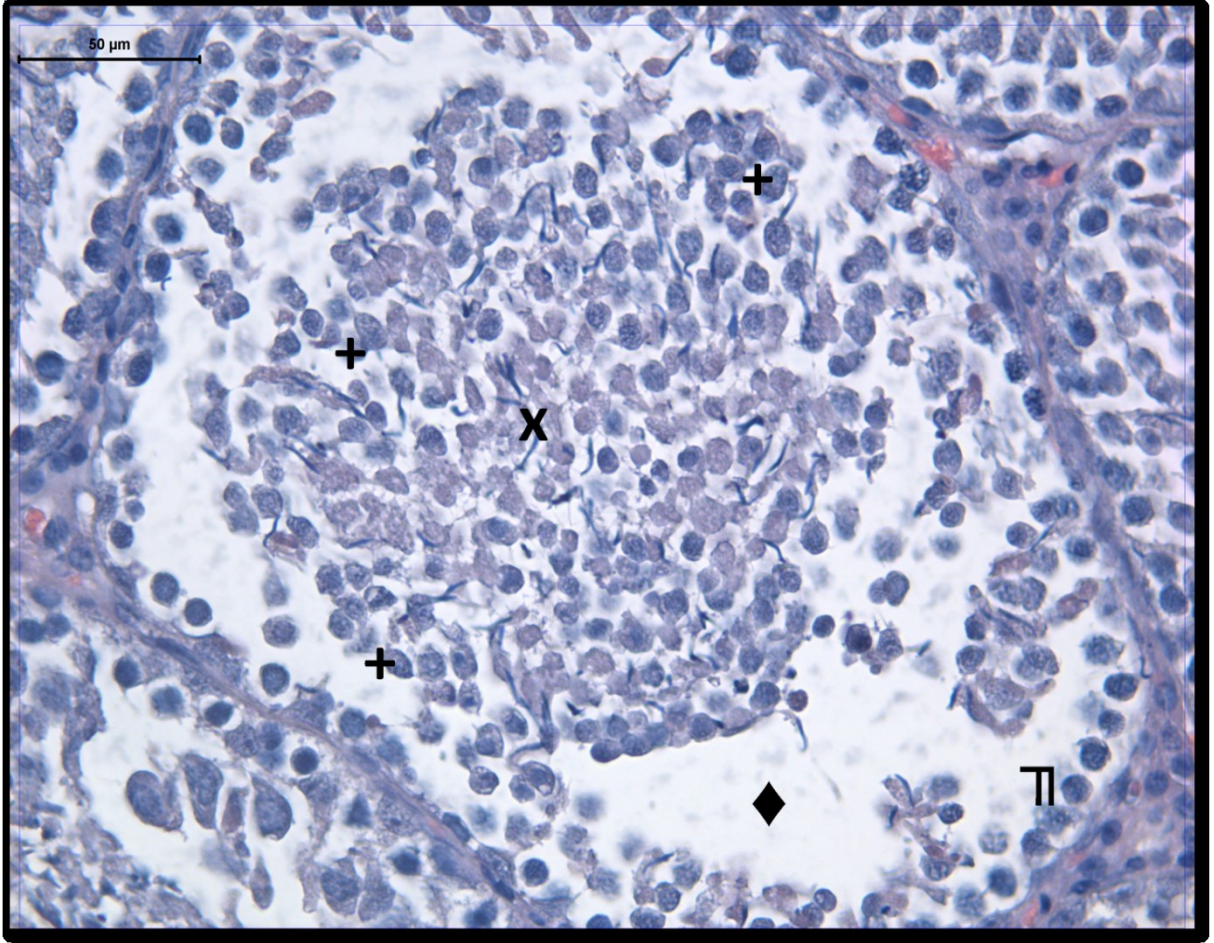
Resim 4.8. Ağır hipoksi uygulanan gruba ait büyük büyültmeli resimde vakuolizasyon gösteren Leydig hücreleri (►) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

Ağır hipoksi öncesi ön koşullama uygulanan grupta, doku genelinde ağır hipokside gözlenen seminifer tübül ve interstiyel alandaki yoğun ödem ve belirgin dejenerasyon izlenmemekle birlikte çoğu seminifer tübülde intratübüler ödemin belirgin olduğu dikkati çekti. Bazı seminifer tübüllerde epitelin sadece spermatogonyumlardan oluştuğu, diğer seri hücrelerinin ise lümeneye boşaldığı dikkati çekerken, lümenleri olgun spermium kuyrukları ile dolu olan tübüllerde de spermiosit seviyesinde ödemin varlığı dikkati çekti (Resim 4.9).



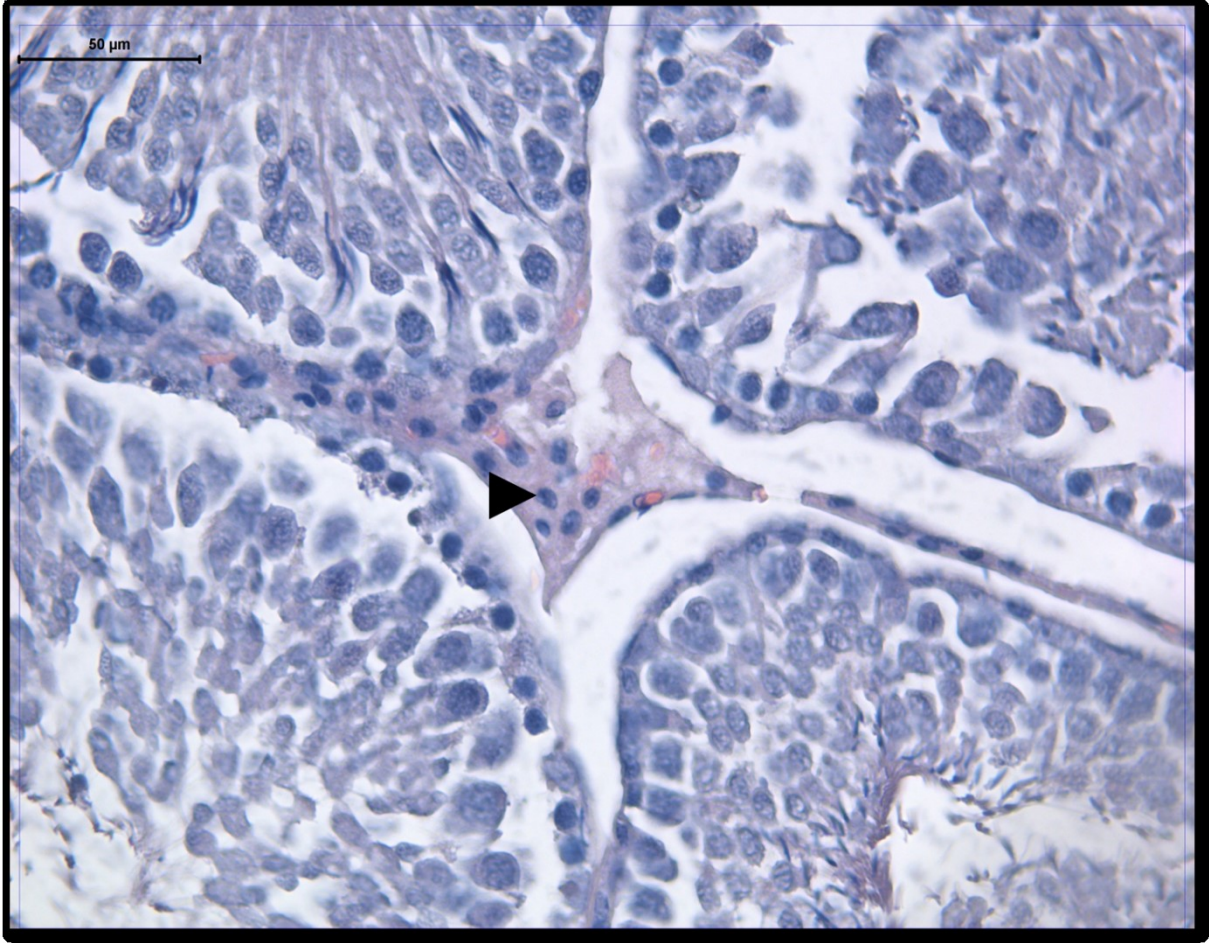
Resim 4.9. Ağır hipoksi öncesi ön koşullama uygulanan gruba ait küçük büyütmeli resimde intratübüler ödem (◆) ve interstisyel ödem (■) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x100).

Büyük büyütmeli incelemelerde, yoğun ödeme sahip ve spermatogenik epitelin sadece spermatogonyumlardan oluştuğu görülen tübüllerde, lümendeki hücre grubunun spermatozoidler, spermatidler ve spermiumları içerdiği izlendi (Resim 4.10)



Resim 4.10. Ağır hipoksi öncesi ön koşullama uygulanan gruba ait büyük büyültmeli resimde intratübüler ödem (◆), spermatogonyum (Π), spermatositler (+) ve spermatidler (x) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).

İnterstisyel alanda ödemin doku genelinde olmadığı, ödemin olduğu alanlarda da ağır hipoksi grubuna karşın azaldığı ilgiyi çekti. Ağır hipoksi grubundan ayrıcalıklı olarak bu grupta Leydig hücrelerinde ödem izlenmedi, yapı kontrol grubuna eşdeşti (Resim 4.11).



Resim 4.11. Ağır hipoksi öncesi ön koşullama uygulanan gruba ait büyük büyütmeli resimde Leydig hücreleri (►) görülüyor (Hematoksilen-Eozin x400).

Çizelge 4.1. Kontrol (K),Önkoşullama (ÖK),Ağır Hipoksi (AH),Önkoşullama+Ağır Hipoksi gruplarının oksidan stres,sperm sayısı, hareketliliği ve plazma testosteron değerleri ve Johnsen skor (sıra ortalama±standart sapma)

PARAMETRELER	K	ÖK	AH	ÖK+AH
Hayvan Ağırlığı (gr)	238,5±25,4	190±11,99	190,5±18,7	182,5±12,5
Testis Ağırlığı (gr)	1,79±,36	1,47±,24	1,36±,18	1,41±,14
Sperm Sayısı (milyon/ml)	208±73,9	226±43,6	205±67,4	161±78,8
Sperm Hareketliliği+1 (milyon/ml)	41,3±13,8	37,5±10,3	35±13,8	47±7,7
Sperm Hareketliliği+2 (milyon/ml)	4,3±1,6	6,3±3	8,0±3,2	9,8±3
Sperm Hareketliliği+3 (milyon/ml)	37,5±10,3	35,3±6,3	37,5±14	26,1±7
Sperm Hareketliliği+4 (milyon/ml)	16,8±5	20,8±13,5	19,6±5,1	17±7,9
Plazma Testosteron Düzeyleri (nmol/l)	2,6±0,3	2,3±1,4	2,3±0,9	2,1±0,8
MDA (nmol/gr)	28,1±1,3	29,2±3	28±1,4	27±1,3
GSH (µmol/gr)	18,5±3,3	22,4±3,2	21,3±3,7	21±4,2
JOHNSEN SKOR	9,67±0,52	9,5±0,55	4,67±0,52	5,67±0,52



5. TARTIŞMA

Ağır hipoksinin oksidatif strese neden olduğu çeşitli hayvan ve insan çalışmalarında gösterilmiştir [96,97]. Hipoksinin testislerde ROS oluşumuna neden olarak üreme fonksiyonlarını engellediği de bilinmektedir [98].

Testislerde ROS üretimi normal fizyolojik bir olaydır. Bununla birlikte ROS sentezindeki artışlar testis hücrelerinde lipit peroksidasyona ve DNA hasarına yol açmaktadır [99]. Agarwal ROS'un fizyolojik ve patolojik olarak rolünü erkek üreme sisteminde tanımlamış ve ROS'un aşırı üretimini, bozulmuş sperm hareketliliği, konsantrasyonu ve morfolojisi ile ilişkilendirmiştir [75].

Sperm mitokondrisinde oluşan sızıntılar ve mitokondride meydana gelen mitokondriyel DNA hasarı testislerde oluşan ROS'un ana kaynağıdır ve mitokondriyel solunum zincirinden dışarı sızan elektronlar spermatozoada süperoksit üretimine neden olmaktadır [100]. Ayrıca sperm çekirdeğindeki kromotin yapının oksidan hasara karşı savunmasız olduğu da rapor edilmiştir [101].

Hipoksi ile oluşan oksidatif stresin spermatozoa fonksiyonlarını bozduğu ve anormal spermatozoa üretimine yol açtığı bilinmektedir [77]. Hipobarik hipoksi modeliyle oluşturulan oksidatif streste de spermatogenezin olumsuz etkilendiği ve semen spermatozoa sayısının düştüğü gösterilmiştir [102].

Varikosel hipoksi sebebi olup spermatik kord etrafında pampiniform pleksustaki damarların anormal genişlemesi olarak tanımlanır ve infertil çiftlerin % 40'ında görülür. Varikoselde seminal ROS düzeyi daha yüksek bulunmuştur. [103]. Nguyen ve ark da hipoksi sonrası hastaların %25'inde infertilite geliştini bildirmişlerdir [104].

Yapılan bir çalışmada, insan spermine yüksek konsantrasyonda eklenen H₂O₂'nin ROS ve NO düzeyini arttırdığı görülmüştür [105]. Ayrıca yüksek lökosit veya granülosit içeren semendeki spermelerde artan ROS miktarı, sperm hareketliliği ve

sperm morfolojisinde belirgin şekilde bozulmaya, bu durum da oosit penetrasyonunda azalmaya neden olmuştur [106].

MDA seviyesi ölçümleri, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak sıklıkla kullanılmaktadır. [107,108,109]. Çeşitli çalışmalar MDA düzeylerinin testislerde iskemi sırasında yükselmiş olduğunu göstermiştir [110,111]. Birçok yayında MDA seviyesindeki artışla, azalmış sperm motilitesinin ilişkisi gösterilmiştir [112,113]. Biz de çalışmamızda testis dokusunda ağır hipoksinin yaratacağı olası hasarı göstermek üzere lipid peroksidasyonu için önemli bir belirteç olan MDA düzeylerini araştırdık. MDA düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0,05$).

Zhang ve ark.nın farelerde yapmış olduğu bir çalışmada, 28 gün süreyle günde 8 saat uygulanan aralıklı hipoksinin (% 10 \pm % 0.5 'luk O_2 'in) MDA düzeylerini artırdığı bulunmuştur [114].

Liao ve ark [115] ile Farias ve ark.'nın [116] sıçanlarda yapmış oldukları çalışmalarda, 32 gün süre ile hipobarik hipoksi uygulamasının (sırasıyla 5000m ve 4600 m) testislerde lipid peroksidasyonu arttırdığını gösterilmiştir.

Literatürde hipoksinin testis dokusu üzerindeki etkileri daha çok iskemi-reperfüzyon çalışmaları ile gösterilmiştir.

Azizollazi ve ark'nın gerçekleştirdiği bir araştırmada testis iskemi-reperfüzyonunda serum MDA seviyelerinin arttığı rapor edilmiştir [117]. Tanyel ve Çiftçi tek taraflı testis torsiyonunun, karşı taraf testis kan akımını azalttığını ve karşı taraf testiste MDA düzeylerini artırdığını ortaya koymuşlardır [118].

Chu ve ark. [119] ve Gözen ve ark [120] sıçanlarda yapmış oldukları iskemi reperfüzyon hasarı çalışmalarında testislerde apoptotik faaliyetleri ve MDA seviyelerini yüksek bulmuşlardır.

Hipoksik önkoşullamanın koruyucu etkisi de değişik çalışmalarda MDA düzeyleri ile değerlendirilmiştir.

İskemik ön koşullamanın iskemiye bağlı doku MDA düzeylerindeki artış üzerine olan etkisi izole kobay akciğerlerinde ve sıçan testislerinde araştırılmıştır. Kobay akciğerlerinde 90 dk'lık hipoksik ön koşullamanın, MDA artışını engellemeye yönelik bulunmuş olmasına rağmen, sıçan testislerinde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemiştir [110]. Bir diğer çalışmada ise testiküler dokudaki MDA seviyesinin reperfüzyon başladıktan 4 saat sonra arttığı rapor edilmiştir [121].

Her dokunun kendine özgü bir kritik iskemi süresi vardır. Bu sürenin normotermik koşullarda iskelet kasında 4 saat, sinir dokusunda 8 saat, yağ dokusunda 13 saat, deride 24 saat ve kemik dokusunda 4 gün olduğu bilinmektedir [19].

Çeşitli çalışmalarda iskeminin testis üzerindeki olumsuz etkilerinin farklı saatlerde ortaya çıktığı [122,123]. en belirgin etkinin üç saat ve sonrasında görüldüğü belirtilmiştir [124].

Deneyisel testis iskemi modelinde genel düşünce hipoksik dönemin 4-6 saatten uzun sürmesinin kalıcı doku hasarıyla sonuçlanacağıdır [124]. Buna karşın Anderson ve ark insanlardaki kalıcı doku hasarının 12 saatlik iskemiden sonra görüldüğünü belirtmişlerdir [125].

Bu çalışmalar testis dokusunda iskemiye bağlı MDA artışının iskemi ve iskemik ön koşullama süresi ile ilişkili olabileceğini göstermektedir. Hipoksi ile yapılan çalışmalar ise çok daha uzun süreli çalışmalardır. Bizim çalışmamızda uygulanan hipoksi ve hipoksik önkoşullama modeli, süre açısından çok daha kısa olduğu için MDA düzeylerinde belirgin bir değişiklik yaratmamış olabilir.

Antioksidanlar, genellikle ROS ve lipid peroksidasyon oluşumunu iyileştiren, ortadan kaldıran ve baskılayan bileşiklerdir. Testisler gelişmiş bir antioksidan savunma sistemine sahiptir ve bu savunma sistemlerinin arasında da GSH önemli bir yer tutmaktadır [99,126]. GSH, peroksil radikallerini uzaklaştıran bir antioksidandır ve sıçanlarda sperm motilitesinin devamından sorumlu olduğu gösterilmiştir [127].

Biz de çalışmamızda testislerde oksidan hasara karşı savunmayı testis dokusunda glutasyon düzeylerini ölçerek değerlendirdik.

Çeşitli çalışmalarda hipokside hem doku, hem de kan GSH seviyesinde azalma olduğu, lipid peroksidasyon ürünlerinin ise arttığı bildirilmektedir [128,129].

Castillo ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, sıçanlar 32 gün boyunca ardışık olarak 96 saatlik normoksi ve hipoksi periyotlarına maruz bırakıldığında hipoksik gruptaki sıçanların testis dokularında MDA düzeylerinin arttığı, GSH düzeylerinin ise azaldığı gösterilmiştir [130]. Benzer bir çalışmada Zepeda ve ark., hipoksik gruptaki sıçan testislerinde lipid peroksidasyondaki artışı ve GSH düzeylerindeki azalmayı göstermişlerdir [131].

Ünal ve ark tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada sıçanlarda 2 saat süreli testis torsiyonu ardından uygulanan 3 günlük reperfüzyonun doku GSH düzeylerini azalttığı bildirilirken [132], Guimarae ve ark'nın gerçekleştirdiği çalışmada ise 2 saatlik iskemi ve bunu takiben 3 saatlik reperfüzyon sonrasında testis dokusunda glutasyon seviyelerinin değişmediği belirlenmiştir [133].

Farias ve ark.nın yaptığı aralıklı hipoksi çalışmasında, okside glutasyonu redükte glutatyonu çeviren bir enzim olan glutatyon redüktazın epididimiste testisten daha yüksek bulunduğunu ifade etmişler ve epididimisin oksidatif strese ROS üretimi artışına karşı muhtemelen testisten daha güçlü bir mekanizmaya sahip olduğunu vurgulamışlardır [8].

Çalışmamızda GSH düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ($p>0,05$). Bu durum MDA düzeylerinde olduğu gibi hipoksi ve hipoksik ön koşullamada süre bağımlı değişikliklerden kaynaklanabileceği gibi, hipoksik şartlarda antioksidan savunmanın testislerde epididimis kadar etkili olmamasından da kaynaklanmış olabilir.

Hipoksinin hayvan ağırlığı, testis ağırlığı, testosteron düzeyleri üzerine etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.

Çeşitli yayınlarda farklı hipoksi koşullarına (bir kısmı hipoksik kamara ile 530 torr ya da 390 torr, bazıları da 4500 m üzeri hipobarik hipoksi ile) maruz kalan memelilerde kilo kaybı, dehidratasyon, yağ kaybı, kas kitlesinde azalma gibi bulgular olduğu gözlenmiştir [134,135]. Vücut ağırlığı ve organ ağırlığının anabolik ve katabolik süreçlerin sonucunda gerçekleştiği düşünülecek olursa, hipoksinin genelde katabolik süreçleri arttırdığı söylenebilir.

Zepeda ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada, sıçanlar 32 gün boyunca ardışık olarak 96 saatlik normoksi ve hipoksi periyotlarına maruz bırakıldığında hipoksik gruptaki sıçanların vucut ağırlığında ve testiküler kitle oranında azalma görülmüştür [131].

Farias ve ark.'nin yapmış olduğu çalışmada sıçanlar hipobarik hipoksiye maruz bırakılmış, 60 gün sonra testiküler ağırlık azalması görülmüş, ayrıca incelenen sperm analizlerinde spermlerin spermatogenezi tamamlayamadığı gözlenmiştir [116].

Madrid ve ark.'nin fareler üzerinde yaptığı bir çalışmada 20 gün boyunca normobarik hipoksiye (% 8.1) maruz bırakılan deney hayvanlarında, ortalama testis ağırlıklarının hipoksinin ilk günü yükseldiği ve daha sonra sabit kaldığı, testiküler vaskülarizasyonun ve ödemin belirgin olarak arttığı, testosteron düzeylerinin hipoksinin ilk günü artış gösterdiği ancak 5. günden sonra düşmeye başladığı görülmüştür. Hipobarik hipoksik hayvanlarda da benzer bulgular tarif edilmiştir [136].

Çalışmamızda hayvan ağırlığı ve testis ağırlığı hipoksi uygulanan gruplarda kontrol grubuna göre azalmakla birlikte bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. ($p>0,05$). Ayrıca ön koşullama grubunun değerlerinde de diğer hipoksi grupları ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu durum bizim çalışmamızdaki hipoksi süresinin literatürdeki çalışmalardan daha kısa olması ile açıklanabilir.

Gerek hücre düzeyinde gelişebilecek hipoksi, gerekse hipoksik koşullarda aktiviteleri artan oksidatif enzimlerin aracılığı ile üretilen oksijen radikalleri birçok

dokuda olduğu gibi testisler üzerinde de olumsuz etkiler yaparak testosteron üretimindeki azalmada etkin bir rol oynamaktadır.

Hipoksik olgularda bazal LH ve FSH düzeylerinin de düştüğü ve hipotalamo-hipofizer-gonadal aksın işleyişinin sekteye uğradığı bilinmektedir [137]. Buna karşın steroidojenik prekürsörlerin varlığında, hipoksinin intraselüler Ca^{+2} artışına neden olarak Leydig hücrelerinden testosteron sekresyonunu artırdığı gösterilmiştir [138]. Testosteronun akut dönemde koroner ve pulmoner sirkülasyonda vazodilatör etkiler gösterdiği, immunmodülasyonda rol aldığı ve antitrombotik etkileri olan bazı sitokinlerin ekspresyonunu artırdığı da gösterilmiştir [139]. Bu veriler bir arada düşünüldüğünde testosteron sekresyonu ve hipoksiye cevap arasında fonksiyonel bir ilişki var gibi gözükmektedir.

Hermans ve arkadaşları hamilelik süresince sıçanlara aralıklı hipoksi uygulamışlar ve doğum öncesi hipoksiye maruz kalan erkek sıçanların erişkinlik dönemlerinde kan testosteron düzeylerinin önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir [140]. Yardımcı ve ark. sıçanlarda yapmış oldukları bir çalışmada her 100 g vucut ağırlığı başına 2 cc kan (total kan volumünün yaklaşık %30 u) alarak 10 gün iskemi uygulamışlar ve ortalama plazma testosteron düzeyini önemli derecede düşük bulmuşlardır [141]. İnsanlarda benzer şekilde hipoksiye yol açan varikoselli vakalarda serum testosteron düzeylerinin kontrole göre düşük olduğu gözlemlenmiştir [142].

Çalışmamızda kontrol grubu sıçanlarda ölçülen testosteron değerleri literatür ile uyumlu (2-3 nmol/l) olmakla birlikte hipoksi uygulamalarının anlamlı derecede azalma yaratmaması hipoksi süresinin literatürdeki çalışmalara göre daha kısa olmasından kaynaklanabilir.

Ejakülasyon konsantrasyonu, sperm morfolojisi, sayısı ve motilitesi gibi semen parametreleri sperm dölleme potansiyelini belirlemek için kullanılır. Ancak DNA hasarı ile ilgili bir bilgi vermemektedir [101]. Zepeda ve ark.nın yapmış olduğu hipobarik hipoksi çalışmasında ayrıca sperm DNA hasarı incelenmiş ve hipoksik grupta sperm DNA hasarı olduğu görülmüştür [131].

Çalışmamızda sperm sayı ve motilitesinde gruplar arasında istatistiksel bir fark görülmemesine ($p>0,05$) karşın sperm motilite analizlerinde; +3 ileri yavaş hareketli spermiler ÖK+AH grubunda en düşük, yine +2 yerinde hareketli ve +1 hareketsiz spermiler ÖK+AH grubunda en yüksek görülmüştür. Yani en uzun süre hipoksiye maruz kalan ÖK+AH grubunda motil spermilerde azalma, immotil spermilerde ise artma görülmüştür. Çalışmamızda sperm sayımı ve hareketliliği makler kamera ile gözle yapılmış ve WHO kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir. Ancak manuel bir test olmasından dolayı bakan kişiler ile ilgili olarak %5 -10 arası farklılık göstermektedir. İstatistiksel olarak farklı olmasa da anlamlılığa yakın değerler bulunmuştur.

Farias ve ark.'ı aralıklı hipooksinin, edidimal sperm sayısında ve hareketliliğinde önemli düşüğe sebep olduğunu göstermişlerdir [8]. Liao ve ark [115] da yapmış oldukları hipobarik hipoksi modeli ile sperm sayısında azalma gözlemlemişlerdir. Farias ve ark. hipoksi sonrası, önce spermatogenezin bozulduğunu, oksidatif stres ile ilgili değişikliklerin daha sonra görüldüğünü ifade etmişlerdir [8].

Cikutovic ve ark'nın hipobarik hipoksi modeli ile sıçanlarda yapmış oldukları bir çalışmada hipoksinin testis sperm üreme parametrelerinde ve hayvanların üreme aktivitesinde belirgin bir azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. [143].

Hipoksinin memeli testis histolojisindeki değişimlerini konu alan ilk çalışma 1949'da Harrison ve ark tarafından yapılmıştır [122]. Harrison ve ark.ratlarda bir saat süren testis hipoksisinde spermatogenik bozulmanın ilk olarak seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerinde olduğunu göstermişlerdir. Buna karşın 1969'da Steinberger ve Tjioe bu değişimleri ancak iki saatlik hipoksi sonrasında izleyebilmişlerdir [123]. Cosentino ve ark ise değişik sürelerde hipoksi sonrası testisleri incelediklerinde en ciddi değişimleri üç saat ve sonrasında bulmuşlardır [124].

Bizim çalışmamızda da 3 saatlik ağır hipoksi sonrası gözlenen histolojik bulgular ağır hipoksinin testis hasarına yol açtığını gösteren yayınlarla uyumludur, şöyle ki ağır hipoksinin başta ödem ve ödeme bağlı dejeneratif değişiklikler olmak üzere testis morfolojisinde belirgin yapı bozukluğuna neden olduğu, seminifer tübülleri

şekil olarak bozduğu ve bu tübüllerin lümenlerinde hemen hiç olgun spermiyum izlenmediği, leyding hücrelerinde vakuolizasyon ve sertoli hücrelerinde dejenerasyon yarattığı görüldü.

Ağır hipoksi öncesi uygulanan ön koşullamanın ise başta Leydig hücreleri ve seminifer tübüllerde olmak üzere dejenerasyon bulgularını kısmen de olsa önleyebildiği izlendi.

Çalışmamızda spermatogenez değerlendirmesi için Johnsen skoru kullanıldı. Bunun nedeni Johnsen skorunun seminifer tübüllerde gerçekleşen spermatogenezin yeterliliğini ve olgun spermatozoa sayısını vermesidir. Bu skorlamaya göre ağır hipoksi ve önkoşullama+ağır hipoksi grubunda kontrole ve önkoşullama gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur. ($p<0.05$)

Yani ağır hipoksi ve ÖK+AH de spermatogenez olumsuz etkilenmiştir. Bu bulgular hipoksiye maruz kalma süresi uzadıkça spermatogenezin de bozulduğunu ve uyguladığımız önkoşullamanın spermatogenez üzerinde yeterince koruyucu olmadığını göstermektedir.

Cho ve arkadaşlarının hipoksik önkoşulllanmış fareler üzerinde yapmış olduğu çalışmada, biyokimyasal test sonuçları ile histolojik analizler arasında bir korrelasyon olmadığı görülmüştür. Biyokimyasal test sonuçlarında farklılık görünmezken histolojik bulgularda, hipoksik önkoşullamaya maruz bırakılan tüm deney grupları kontrol gruplarıyla kıyaslandığında, önemli farklılıklar görülmüştür. Cho ve ark. elde ettikleri bulgular; ağır hipoksi öncesi uygulanan hipoksik önkoşullamanın testis dokusunda koruyucu bir etki yaptığını göstermiştir [144].

Bizim bulgularımızda da Cho ve ark. benzer şekilde biyokimyasal parametreler ile histolojik bulgular arasında bir korelasyon görülmemiştir. Yani hipoksinin neden olduğu hücresel hasara ölçülen parametrelerde bir bozulma eşlik etmemiştir.

Sonuç olarak bu çalışmada uygulanan hipoksik modelin testislerde neden olduğu yapısal hasara oksidatif stres dışında başka mekanizmaların yol açmış olabileceği ve hücresel düzeydeki hasarın henüz fonksiyonlara yansımadağı düşünülmüştür.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, ölçülen parametreler açısından gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlılık bulunmamasının nedeni her grupta az sayıda sıçan kullanılmış olması olabilir. Çünkü histolojik bulgular ağır hipoksinin testislerde dejeneratif değişikliklere neden olduğunu, spermatogenezi olumsuz etkilediğini, hipoksik önkoşullamanın ise ağır hipoksinin yarattığı bu etkileri kısmen de olsa düzeltebildiğini göstermiştir. Hücresel düzeydeki hasarın ölçülen parametrelerde ve fonksiyonlarda görülmemesinin diğer bir nedeni de çalışmamızda uyguladığımız hipoksi süresi ile ilgili olabilir.

Hipoksik önkoşullamanın üreme fonksiyonları üzerinde koruyucu etkisini gösterebilmek için daha fazla sayıda hayvan kullanarak ve belki de farklı önkoşullama modelleri ile gerçekleştirilecek daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Çalışmanın Eksiklikleri: Çalışmamızda hipoksi ile ilişkisi olan HIF tarafından regüle edilen ilgili gen ve proteinlerin transkripsiyonları çalışılabilir. Antioksidan savunmanın epididimiste testisten daha yüksek olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir, buradan yola çıkarak epididimis dokusunda da ilgili parametreler çalışılabilir. Fertiliteyi etkileyen Testosteron, FSH ve LH parametrelerinin birbiri ile korelasyonu gereklidir bu yüzden Testosteronla birlikte FSH ve LH bakılabilir. Spermelerde DNA hasarı ve apoptozla ilgili belirteçler çalışılabilir.



KAYNAKLAR

1. Hochachka, P. W., Rupert, J. L. and Monge, C. (1999). Adaptation and conservation of physiological systems in the evolution of human hypoxia tolerance. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 124, 1-17.
2. Wang z, Yu J, Wu J, Qi F, Wang H, Wang Z, Xu Z. (2016). Scutellarin protects cardiomyocyte ischemia-reperfusion injury by reducing apoptosis and oxidative stress. *Life Sciences*, (14) .
3. Gutteridge, J. M. C. (1995). Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clinical Chemistry* 41(12), 1819-1826.
4. Nakanishi, K., Tajima, F., Nakamura, A., Yagura, S., Oookawara, T., Yamashita, H., Suzuki, K., Taniguchi N. and Ohno, H. (1995). Effects of hypobaric hypoxia on antioxidant enzymes in rats. *Journal of Physiology*, 489 (3), 869-876.
5. Maiti, P., Singh, S. B., Sharma, A. K., Muthuraju, S., Banerjee, P. K. and Ilavazhagan, G. (2006). Hypobaric hypoxia induces oxidative stress in rat brain. *Neurochem Int*, 49(8), 709-716.
6. Davidson JO, Yuill CA, Wassink G, Bennet L, Gunn AJ.(2015) Spontaneous pre-existing hypoxia does not affect brain damage after global cerebral ischaemia in late-gestation fetal sheep. *Dev Neurosci*. 37(1), 56-65.
7. Chambers, D. E., Parks, D. A., Patterson, G., Roy, R., McCord, J. M., Yoshida, S. and Downey, J. M. (1985). Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 17(2), 145-152.
8. Farias, J. G., Puebla, M., Acevedo, A., Tapia, P. J., Gutierrez, E., Zepeda, A. and Reyes, J. G. (2010). Oxidative stress in rat testis and epididymis under intermittent hypobaric hypoxia: protective role of ascorbate supplementation. *Journal of Andrology*, 31(3), 314-321.
9. Brahim-Horn, M. C., Pouysségur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS letters*, 581(19), 3582-3591.
10. Toescu, E. C. (2004). Hypoxia sensing and pathways of cytosolic Ca²⁺ increases. *Cell Calcium*, 36(3), 187-199.
11. Lee, K., Roth, R. A. and LaPres, J. J. (2007). Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacology & Therapeutics*, 113(2), 229-246.
12. Boutilier, R. G. (2001). Mechanisms of cell survival in hypoxia and hypothermia. *Journal of Experimental Biology*, 204(18), 3171-3181.
13. Wenger, R. H. (2000). Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. *Journal of Experimental Biology*, 203(8), 1253-1263.

14. López-Barneo, J., Pardal, R. and Ortega-Sáenz, P. (2001). Cellular mechanism of oxygen sensing. *Annual Review of Physiology*, 63(1), 259-287.
15. Prabhakar, N. R. (2006). Novel partners and mechanisms in oxygen sensing. *Experimental Physiology*, 91(5), 801-801.
16. Kemp P. J and Peers C. (2007). Oxygen sensing by ion channels. *Essays Biochem* (43), 77- 90.
17. Hansen, A. J. (1985). Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiological Reviews*, 65(1), 101-148.
18. Semenza G. L, Shimoda L. A and Prabhakar N. R. (2006). Novartis. *Found. Symp*, (272), 2-8.
19. Pie, g. N., Czubryt, m. P. (1995). The contribution of ionic imbalance to ischemia/reperfusion-induced injury. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 27(1), 53-63.
20. Xia, Y., Haddad, G. G. (1999). Effect of prolonged O₂ deprivation on Na⁺ channels: differential regulation in adult versus fetal rat brain. *Neuroscience*, 94(4), 1231-1243.
21. Bracken, C. P., Whitelaw, M. L., & Peet, D. J. (2003). The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 60(7), 1376-1393.
22. Siddiq, A., Aminova, L. R. and Ratan, R. R. (2007). Hypoxia inducible factor prolyl 4-hydroxylase enzymes: center stage in the battle against hypoxia, metabolic compromise and oxidative stress. *Neurochemical Research*, 32(4-5), 931-946.
23. Loor, G., Schumacker, P. T. (2008). Role of hypoxia-inducible factor in cell survival during myocardial ischemia–reperfusion. *Cell Death & Differentiation*, 15(4), 686-690.
24. Wenger, R. H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *The FASEB Journal*, 16(10), 1151-1162.
25. Simon, M. C., Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 9(4), 285-296.
26. Wang, G. L., Semenza, G. L. (1993). General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(9), 4304-4308.
27. McCord J. (1993). Human disease, free radicals and the oxidant / antioxidant balance. *Clin Biochem*, (26), 351 - 357.

28. Cuzzocrea S, Reiter RJ. (2001). Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury. *Eur, Journal Pharmacol*, 426, 1-10.
29. Sauer, H., Wartenberg, M. and Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 11(4), 173-186.
30. Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C. and Schumacker, P. T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(20), 11715-11720.
31. Chandel, N. S., McClintock, D. S., Feliciano, C. E., Wood, T. M., Melendez, J. A., Rodriguez, A. M. and Schumacker, P. T. (2000). Reactive Oxygen Species Generated at Mitochondrial Complex III Stabilize Hypoxia-inducible Factor-1 α during Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry*, 275(33), 25130-25138.
32. Zauner, A., Daugherty, W. P., Bullock, M. R. and Warner, D. S. (2002). Brain oxygenation and energy metabolism: part I—biological function and pathophysiology. *Neurosurgery*, 51(2), 289-302.
33. Mekhail, K., Gunaratnam, L., Bonicalzi, M. E. and Lee, S. (2004). HIF activation by pH-dependent nucleolar sequestration of VHL. *Nature Cell Biology*, 6(7), 642-647.
34. Banasiak, K. J., Xia, Y. and Haddad, G. G. (2000). Mechanisms underlying hypoxia-induced neuronal apoptosis. *Progress in Neurobiology*, 62(3), 215-249.
35. Halliwell, B., Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 57(5), 715S-724S.
36. Uysal M. (1998). Serbest radikaller, lipit peroksitleri ve organizmada prooksidan-oksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim*, (11), 336-341.
37. Kılıç İ, Kılıç BA, Güven C, Demirpençe E. and Akşit MA. (2000). Role of nitric oxide in hypoxia-induced changes in newborn rats. *Biol Neonate*, 78, 191-197.
38. Berk, M., Ng, F., Dean, O., Dodd, S., Bush, A. I. (2008). Glutathione: a novel treatment target in psychiatry. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(7), 346-351.
39. [Dokucu Ai](#), [Ozturk H](#), [Ozturk H](#), [Tuncer Mc](#), [Yilmaz F](#). (2009). The effects of molsidomine on hypoxia inducible factor alpha and sonic hedgehog in testicular ischemia/reperfusion injury in rats. *International Urology and Nephrology*, 41(1), 101-8.

40. Draper, H. H., Hadley, M. (1989). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, (186), 421-431.
41. Mitchell RN, Cotran RS (Çeviri: U. Çevikbaş).(2000). Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu.Kumar V, Cotran RS, Robbins SL (Eds.). *Temel patoloji'de. 6. Baskı.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi (WB Saunders Co. izniyle),3-24.
42. Meister A, Anderson ME. (1983). Glutathione. *Annu Rev Biochem*, (52), 711-760.
43. Sies, H. (1999). Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(9), 916-921.
44. Pullar, J. M., Winterbourn, C. C. and Vissers, M. C. (1999). Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(4), H1505-H1512.
45. Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T. (2002). Animal response to drastic changes in oxygen availability and physiological oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 133(4), 537-556.
46. Ilavazhagan, G., Bansal, A., Prasad, D., Thomas, P., Sharma, S. K., Kain, A. K. and Selvamurthy, W. (2001). Effect of vitamin E supplementation on hypoxia-induced oxidative damage in male albino rats. *Aviation, Space, and Environmental Medicine*, 72(10), 899-903.
47. Yang, C. C., Lin, L. C., Wu, M. S., Chien, C. T., & Lai, M. K. (2009). Repetitive Hypoxic Preconditioning Attenuates Renal Ischemia/Reperfusion Induced Oxidative Injury via Upregulating HIF-1 α -Dependent bcl-2 Signaling. *Transplantation*, 88(11), 1251-1260.
48. Sharp, F. R., Bernaudin, M. (2004). HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(6), 437-448.
49. Okamoto, F., Allen, BS., Buckberg, GD., Bugyi, H. and Leaf, J. (1986). Studies of controlled reperfusion after ischemia XIV. Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *Journal Thorac Cardiovasc Surg*, (92), 613-620.
50. Ünal, S., Özmen, S., Demlr, Y., Yavuzer, R., Latifoglu, O., and Atabay, K. (2001). The effect of gradually increased blood flow on ischemia-reperfusion injury. *Annals of Plastic Surgery*, 47(4), 412-416.
51. Murry, C.E., Jennings, R.B. and Reimer, K.A. (1986). Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 74(5),1124-1136.

52. Mounsey, R. A., Pang, C. Y. and Forrest, C. (1992). Preconditioning: A new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 107(4), 549-552.
53. Bernaudin, M., Nedelec, A. S., Divoux, D., MacKenzie, E. T., Petit, E. and Schumann-Bard, P. (2002). Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 22(4), 393-403.
54. Jones, N. M., Bergeron, M. (2001). Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 21(9), 1105-1114.
55. Prass, K., Scharff, A., Ruscher, K., Löwl, D., Muselmann, C., Victorov, I. and Meisel, A. (2003). Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke*, 34(8), 1981-1986.
56. Blondeau, N., Widmann, C., Lazdunski, M., & Heurteaux, C. (2001). Activation of the nuclear factor- κ B is a key event in brain tolerance. *The Journal of Neuroscience*, 21(13), 4668-4677.
57. Ryu, H., Lee, J., Zaman, K., Kubilis, J., Ferrante, R. J., Ross, B. D. and Ratan, R. R. (2003). Sp1 and Sp3 are oxidative stress-inducible, antideath transcription factors in cortical neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(9), 3597-3606.
58. Giaccia, A., Siim, B. G. and Johnson, R. S. (2003). HIF-1 as a target for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(10), 803-811.
59. Kuran, O. (1983). *Sistematik anatomi*, Ankara: Filiz Kitabevi 512-524.
60. Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2006). *Temel Histoloji* (10. Baskı). İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 216-221.
61. Habert R., Veniard B., Brignaschi P., Gangnerau M.N., Picon R. (1989). Absence of development of late steroidogenic lesions in rat testis during the end of fetal life. *Arch Androl*, 22, 41-48.
62. Levallet, J., Pakarinen, P. and Huhtaniemi, I. T. (1999). Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations, and gonadal dysfunction. *Archives of Medical Research*, 30(6), 486-494.
63. Berne, R.M., Levy, M.N., (2008). *Fizyoloji* (Beşinci Baskı). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 942-943.
64. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. (2000). *Harper's Biochemistry*. (2000) 25th edition. New York: Appleton & Lange.
65. Junqueira L.C., Carneiro, J. and Kelley R.O. (1992). *Temel Histoloji*. (Çeviri editörü; Prof. Dr. Yener Aytekin). İstanbul: Barış Kitabevi.

66. Sternberg SS. Histology for pathologist. New York: Raven Press Lt, 1992: 731-9.
67. Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2009) Temel Histoloji, (Çeviri: AYTEKİN, Y., Solakoğlu, S., 10. Baskıdan Çeviri), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 135.
68. Ginsburg, K. A., Armant, D. R. (1990). The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movement measurements obtained by manual and videomicrographic analysis. *Fertility and Sterility*, 53(5), 882-887.
69. Günalp İ. Fertilité and Sterilité, (1975). *Modern Üroloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, 1013-1043.
70. Maeda K, Ohkura S, Tsukamura H. Physiology of the reproduction.(2000) In: Krinke GJ, editor. The laboratory rat (Handbook of experimental animals) London: Academic Press,148-149.
71. Slott VL, Suarez JD, and Perreault S.D.(1991) Rat sperm motility analysis: methodologic considerations, *Reprod Toxicol*, 5(5), 449-58.
72. Wier, P. J., Rumberger, D. (1995). Isolation of rat sperm from the vas deferens for sperm motion analysis. *Reproductive Toxicology*, 9(3), 327-330.
73. Evans, P. H. (1993). Free radicals in brain metabolism and pathology. *British Medical Bulletin*, 49(3), 577-587.
74. Flitter, WD. (1993). Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Brit Med Bull*, 49, 545-555.
75. Agarwal, A., Virk, G., Ong, C. and Plessis,S.S.(2014).Effect of oxidative stress on male reproduction. *The World Journal of Men's Health*, 32(1),1-17.
76. Calvin, H.I., Cooper, G.W. and Wallace, E.W. (1981). Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cysteine-rich structural proteins of the mitochondrial capsule. *Gamete Res*, 4, 139-145.
77. Zalata, A. A., Ahmed, A. H., Allamaneni, S. S., Comhaire, F. H. and Agarwal, A. (2004). Relationship between acrosin activity of human spermatozoa and oxidative stress. *Asian Journal Androl*, 6(4), 313-318.
78. Hodkinson PD, Hunt BJ, Parmar K, and Ernsting J.(2003) . Is mild normobaric hypoxia a risk factor for venous thromboembolism. *Journal Thromb Haemost*, (1), 2131-3.
79. Okumura, A., Fuse, H., Kawachi, Y., Mizuno, I. and Akashi, T. (2003). Changes in male reproductive function after high altitude mountaineering. *High Altitude Medicine & Biology*, 4(3), 349-353.
80. Verratti, V., Berardinelli, F., Di Giulio, C., Bosco, G., Cacchio, M., Pellicciotta, M. and Tenaglia, R. (2008). Evidence that chronic hypoxia

- causes reversible impairment on male fertility. *Asian Journal of Andrology*, 10(4), 602-606.
81. Barnholt, K. E., Hoffman, A. R., Rock, P. B., Muza, S. R., Fulco, C. S., Braun, B. and Friedlander, A. L. (2006). Endocrine responses to acute and chronic high-altitude exposure (4,300 meters): modulating effects of caloric restriction. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 290(6), E1078-E1088.
 82. Saypol, D.C. (1981). Varicocele. *Journal Androl*, 2, 61-67.
 83. A. Vargas, Á., Bustos-Obregón, E. and Hartley, R. (2011). Effects of hypoxia on epididymal sperm parameters and protective role of ibuprofen and melatonin. *Biological Research*, 44(2), 161-167.
 84. Hikim, A. P. S., Lue, Y., Yamamoto, C. M., Vera, Y., Rodriguez, S., Yen, P. H. and Swerdloff, R. S. (2003). Key apoptotic pathways for heat-induced programmed germ cell death in the testis. *Endocrinology*, 144(7), 3167-3175.
 85. Vera, Y., Rodriguez, S., Castanares, M., Lue, Y., Atienza, V., Wang, C. and Hikim, A. P. S. (2005). Functional role of caspases in heat-induced testicular germ cell apoptosis. *Biology of Reproduction*, 72(3), 516-522.
 86. Abelson, A. E., Baker, T. S. and Baker, P. T. (1974). Altitude, migration, and fertility in the Andes. *Social Biology*, 21(1), 12-27.
 87. Sahinkanat, T., Ozkan, K. U., Tolun, F. I., Ciralik, H. and Imrek, S. S. (2007). The protective effect of ischemic preconditioning on rat testis. *Reprod Biol Endocrinol*, 5(47), 6.
 88. Duru, F. I., Olabiyi, O., Noronha, C. C., Akinwande, A. I. and Okanlawon, A. O. (2007). Brief ischaemia reduces testicular lipid peroxidation following subsequent ischaemia: an evidence for ischaemic preconditioning. *Nigerian Quarterly Journal of Hospital Medicine*, 18(3), 149-152.
 89. Palladino, M. A., Pirlamarla, P. R., McNamara, J., Sottas, C. M., Korah, N., Hardy, M. P. and Hermo, L. (2011). Normoxic Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Rat Leydig Cells In Vivo and In Vitro. *Journal of Andrology*, 32(3), 307-323.
 90. Diemer, T., Allen, J. A., Hales, K. H. and Hales, D. B. (2003). Reactive oxygen disrupts mitochondria in MA-10 tumor Leydig cells and inhibits steroidogenic acute regulatory (Star) protein and steroidogenesis. *Endocrinology*, 144(7), 2882-2891.
 91. Payne, A. H., Youngblood, G. L. (1995). Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *Biology of Reproduction*, 52(2), 217-225.
 92. World Health organization: Laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. Geneva: WHO Press, 2010.

93. Casini, A., Ferrali, M., Pompelam, A., Comporti, M. (1986). Lipid peroxidation and cellular damage in extrahepatic tissues of bromobenzene intoxicated mice. *American Journal of Pathology*, 123, 520-530
94. Aykaç, G., Uysal, M., Yalçın, A. S., Koçak-Toker, N., Sivas, A. and Öz, H. (1985). The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology*, 36(1), 71-76.
95. Johnsen, S. G. (1970). Testicular biopsy score count—a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormone Research in Paediatrics*, 1(1), 2-25.
96. Radak, Z., Lee, K., Choi, W., Sunoo, S., Kizaki, T., Oh-Ishi, S. and Asano, K. (1994). Oxidative stress induced by intermittent exposure at a simulated altitude of 4000 m decreases mitochondrial superoxide dismutase content in soleus muscle of rats. *European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology*, 69(5), 392-395.
97. Askew Ew. (2002). Work At High Altitude and Oxidative Stress. *Antioxidant Nutrients*. *Toxicology*. 180(2):107-19.
98. Velickovic, L. J., Stefanovic, V. (2014). Hypoxia and spermatogenesis. *International Urology and Nephrology*, 46(5), 887-894.
99. Lector, C. (1996). Oxidative stress and role of antioxidants in normal and abnormal sperm function. *Frontiers in Bioscience*, 1, e78-86.
100. Desai, N., Sabanegh, E., Kim, T., & Agarwal, A. (2010). Free radical theory of aging: implications in male infertility. *Urology*, 75(1), 14-19.
101. Zribi, N., Chakroun, N. F., Elleuch, H., Abdallah, F. B., Ben Hamida, A. S., Gargouri, J. and Keskes, L. A. (2011). Sperm DNA fragmentation and oxidation are independent of malondialdehyde. *Reprod Biol Endocrinol*, 9, 47.
102. Baker, L. A. and Turner, T. T. (1995). Leydig cell function after experimental testicular torsion despite loss of spermatogenesis. *Journal of Andrology*, 16(1), 12-17.
103. Shiraishi, K., Matsuyama, H. and Takihara, H. (2012). Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *International Journal of Urology*, 19(6), 538-550.
104. Nguyen, L., Lievano, G., Ghosh, L., Radhakrishnan, J., Fornell, L. and John, E. (1999). Effect of unilateral testicular torsion on blood flow and histology of contralateral testes. *Journal of Pediatric Surgery*, 34(5), 680-683.
105. Plessis, S.S., McAllister, D.A., Luu, A., Savia, J., Agarwal, A., Lampiao, F. (2010). Effects of H₂O₂ exposure on human sperm motility parameters,

- reactive oxygen species levels and nitric oxide levels. *Andrologia*. 42, 206–210.
106. Koppers, A.J., Mitchell, L.A., Wang, P., Lin M. and Aitken, R.J. (2011). Phosphoinositide 3-kinase signalling pathway involvement in a truncated apoptotic cascade associated with motility loss and oxidative DNA damage in human spermatozoa. *Biochem Journal*. (436), 687–698.
 107. Oh, S.J., Kwak, C., Baek, M., Kim, C.S., Kim, K.S. and Choi, H. (2004). Histologic and molecular changes in the ipsilateral and contralateral epididymides of the rat in response to unilateral testicular torsion followed by detorsion. *Fertil Steril* 81(1),882-7.
 108. Wilhelm Filho, D., Torres, M. A., Bordin, A. L., Crezcynski-Pasa, T. B. and Boveris, A. (2004). Spermatic cord torsion, reactive oxygen and nitrogen species and ischemia–reperfusion injury. *Molecular Aspects of Medicine*, 25(1), 199-210.
 109. Akgür, F. M., Kiliç, K., Aktuğ, T. and Olguner, M. (1994). The effect of allopurinol pretreatment before detorting testicular torsion. *The Journal of Urology*, 151(6), 1715-1717.
 110. Ceylan, H., Yüncü, M., Armutçu, F., Gürel, A., Bağcı, C. and Demiryürek, A. T. (2005). Effects of early phase of preconditioning on rat testicular ischemia. *Urologia Internationalis*, 74(2), 166-172.
 111. Barlas, M., & Hatiboğlu, C. (2002). The effect of nitric oxide in testicular ischemia-reperfusion injury. *International Urology and Nephrology*, 34(1), 81-86.
 112. Agarwal, A., & Prabakaran, S. A. (2005). Mechanism, measurement and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian Journal of Experimental Biology*, 43(11), 963.
 113. Kefer, J. C., Agarwal, A. and Sabanegh, E. (2009). Role of antioxidants in the treatment of male infertility. *International Journal of Urology*, 16(5), 449-457.
 114. Zhang, G. L., Yu, F., Dai, D. Z., Cheng, Y. S., Zhang, C. and Dai, Y. (2012). CPU86017-RS attenuate hypoxia-induced testicular dysfunction in mice by normalizing androgen biosynthesis genes and pro-inflammatory cytokines. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33(4), 470-478.
 115. Liao, W., Cai, M., Chen, J., Huang, J., Liu, F., Jiang, C. and Gao, Y. (2010). Hypobaric hypoxia causes deleterious effects on spermatogenesis in rats. *Reproduction*, 139(6), 1031-1038.
 116. Farias, J. G., Bustos-Obregón, E., Orellana, R., Bucarey, J. L., Quiroz, E. and Reyes, J. G. (2005). Effects of chronic hypobaric hypoxia on testis histology and round spermatid oxidative metabolism. *Andrologia*, 37(1), 47-52.




117. Azizollahi, S., Babaei, H., Derakhshanfar, A., & Oloumi, M. M. (2011). Effects of co-administration of dopamine and vitamin C on ischaemia-reperfusion injury after experimental testicular torsion-detorsion in rats. *Andrologia*, 43(2), 100-105.
118. Tanyel, F. C., Büyükpamukçu, N. and Hiçsönmez, A. (1989). Contralateral testicular blood flow during unilateral testicular torsion. *British Journal of Urology*, 63(5), 522-524.
119. Chu, W., Li, S., Wang, S., Yan, A. and Nie, L. (2015). Ischemic postconditioning provides protection against ischemia-reperfusion injury in intestines of rats. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(6), 6474.
120. Gozen, A., Demiryurek, S., Taskin, A., Ciralik, H., Bilinc, H., Kara, S. and Ceylan, H. (2013). Protective activity of ischemic preconditioning on rat testicular ischemia: effects of Y-27632 and 5-hydroxydecanoic acid. *Journal of Pediatric Surgery*, 48(7), 1565-1572.
- 121- Bozlu, M., Coşkun, B., Çayan, S., Acar, D., Aktaş, S., Ulusoy, E. and Akbay, E. (2004). Inhibition of poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase decreases long-term histologic damage in testicular ischemia-reperfusion injury. *Urology*, 63(4), 791-795.
122. Harrison, R. G., Weiner, J. S. (1949). Vascular patterns of the mammalian testis and their functional significance. *Journal of Experimental Biology*, 26(3), 304-316.
123. Steinberger, E., Tjioe, D. Y. (1968). Spermatogenesis in rat testes after experimental ischemia. *Fertility and Sterility*, 20(4), 639-649.
124. Cosentino, M. J., Nishida, M., Rabinowitz, R. and Cockett, A. T. (1985). Histological changes occurring in the contralateral testes of prepubertal rats subjected to various durations of unilateral spermatic cord torsion. *The Journal of Urology*, 133(5), 906-911.
125. Anderson, J. B., Williamson, R. C. N. (1988). Testicular torsion in Bristol: A 25-year review. *British Journal of Surgery*, 75(10), 988-992.
126. Vernet, P., Aitken, R. J. and Drevet, J. R. (2004). Antioxidant strategies in the epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 216(1), 31-39.
127. Calvin, H. I., Cooper, G. W. and Wallace, E. (1981). Evidence that selenium in rat sperm is associated with a cysteine-rich structural protein of the mitochondrial capsules. *Gamete Research*, 4(2), 139-149.
128. Pullar, J. M., Winterbourn, C. C. and Vissers, M. C. (1999). Loss of GSH and thiol enzymes in endothelial cells exposed to sublethal concentrations of hypochlorous acid. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 277(4), H1505-H1512.

129. Sarada, S. K. S., Sairam, M., Dipti, P., Anju, B., Pauline, T., Kain, A. K., ... & Kumar, D. (2002). Role of selenium in reducing hypoxia-induced oxidative stress: an in vivo study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(4), 173-178.
130. Castillo, R. L., Zepeda, A. B., Short, S. E., Figueroa, E., Bustos-Obregon, E. and Farías, J. G. (2015). Protective effects of polyunsaturated fatty acids supplementation against testicular damage induced by intermittent hypobaric hypoxia in rats. *Journal of biomedical science*, 22(1), 1-9.
131. Zepeda, A. B., Aguayo, L. G., Fuentealba, J., Figueroa, C. A., Salgado, P. K., Calaf, G. M. and Farías, J. G. (2012). Blueberry extracts protect testis from hypobaric hypoxia induced oxidative stress in rats. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012.
132. Unal, D., Karatas, O. F., Savas, M., Yeni, E., Keser, B. S., Verit, A. and Bitiren, M. (2007). Protective effects of trimetazidine on testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Urologia Internationalis*, 78(4), 356-362.
133. Guimarães, S. B., Kimura, O. S., & Vasconcelos, P. R. L. D. (2010). Dimethylsulfoxide attenuates ischemia-reperfusion injury in rat testis. *Acta Cirurgica Brasileira*, 25(4), 357-361.
134. Clegg, E. J. (1971). Weight changes in different organs of the mouse at two levels of reduced atmospheric pressure. *Journal of Applied Physiology*, 30(5), 764-767.
135. Farías, J. G., Bustos-Obregon, E., Tapia, P. J., Gutiérrez, E., Zepeda, A., Juantok, C. and Reyes, J. G. (2008). Time course of endocrine changes in the hypophysis-gonad axis induced by hypobaric hypoxia in male rats. *Journal of Reproduction and Development*, 54(1), 18-21.
136. Madrid, E., Reyes, J. G., Hernández, B., García, J. M., San Martín, S., Olivero, P. and Parraga, M. (2013). Effect of normobaric hypoxia on the testis in a murine model. *Andrologia*, 45(5), 332-338.
137. Semple, P. D., Beastall, G. H., Watson, W. S. and Hume, R. (1981). Hypothalamic-pituitary dysfunction in respiratory hypoxia. *Thorax*, 36(8), 605-609.
138. Hwang, G. S., Chen, S. T., Chen, T. J. and Wang, S. W. (2009). Effects of hypoxia on testosterone release in rat Leydig cells. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 297(5), E1039-E1045.
139. Smith, A. M., Jones, R. D. and Channer, K. S. (2006). The influence of sex hormones on pulmonary vascular reactivity: possible vasodilator therapies for the treatment of pulmonary hypertension. *Current Vascular Pharmacology*, 4(1), 9-15.
140. Hermans, R. H., Longo, L. D. and McGIVERN, R. F. (1994). Decreased postnatal testosterone and corticosterone concentrations in rats following acute intermittent prenatal hypoxia without alterations in adult male sex behavior. *Neurotoxicology and Teratology*, 16(2), 201-206.

141. Yardımcı, S., Koçkar, M. C., Delibaşı, T., Taştan, H. and Yavuzer, S. (1996). Erişkin Erkek Ratlarda Ciddi Akut Kan Kaybını Takiben Plazma Seks Hormon Düzeylerinde Görülen Değişiklikler. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences*, 16(6), 440-442.
142. Abdel-Meguid, T. A., Farsi, H. M., Al-Sayyad, A., Tayib, A., Mosli, H. A. and Halawani, A. H. (2014). Effects of varicocele on serum testosterone and changes of testosterone after varicocelectomy: a prospective controlled study. *Urology*, 84(5), 1081-1087.
143. Cikutovic, M., Fuentes, N. and Bustos-Obregón, E. (2009). Effect of intermittent hypoxia on the reproduction of rats exposed to high altitude in the Chilean Altiplano. *High Altitude Medicine & Biology*, 10(4), 357-363.
144. Cho, S., Park, E. M., Zhou, P., Frys, K., Ross, M. E. and Iadecola, C. (2005). Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 25(4), 493-501.



EK-1. Etik kurul onayı

 T.C. GAZİ ÜNİVERSİTESİ Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu		 * B E 5 N B F 2 9 *
Sayı : 66332047-604.01.02-4023	17/02/2014	
Konu : Değerlendirme ve Onay		
 Sayın Yrd.Doç.Dr.Şevin GÜNEY Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi		
 <p>Daha önce onay alan, G.Ü.ET-12.082 kod numaralı "<i>Sıçanlarda Hipoksik Ön Koşullamanın Akciğerdeki Oksidan-Antioksidan Sistemler Üzerine Etkisi</i>" adlı çalışmanız hakkında vermiş olduğunuz bilâ tarihli dilekçeniz incelenmiş olup, testis ve diğer doku örneklerinin kullanılması ile ilgili talebiniz Başkanlığımızca uygun görülmüştür.</p> <p>Bilgilerinizi saygılarımla rica ederim.</p>		
  Prof.Dr. Leyla AÇIK Kurul Başkanı		
 <small>Ankara Tel:0 (312) 202 20 57 Faks:0 (312) 202 20 63 E-Posta :hadyek@gazi.edu.tr Web Adresi :http://dhek.gazi.edu.tr</small>		

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Bilgili Gamze
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 1984, Ankara
Medeni hali : Evli

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniv.Tıp Fak. Fizyoloji	Devam ediyor
Yüksek lisans	Ankara Üniv. Eğitim Bilimleri	2009
Lisans	Gazi Üniv. Biyoloji	2006
Lise	Abidinpaşa Y.D.A.Lise	2001

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

TFBD 41. Ulusal Fizyoloji Kongresi, 9-13 Eylül 2015, Çanakkale ACTA
PHYSIOLOGICA Volume: 215 Pages: 248 Supplement: 704
Special Issue: SI Meeting Abstract: PC220 Published: SEP 2015



GAZİ GELECEKTİR..

