

Hipertermide Duktus Epididimis Yapısı

The Structure of Ductus Epididymis In Hyperthermia

Arzu Yurtcu¹, Celal Ilgaz¹, Deniz Erdoğan¹, İrem İnanç¹, Güleser Gökteş¹, Fatma Helvacıoğlu², İskender Kaplanoğlu³, Gülnur Take Kaplanoğlu¹

¹Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara, Türkiye

²Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bağlıca, Ankara, Türkiye

³Etilik Zübeyde Hanım Kadın Doğum Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tüp Bebek Servisi, Etilik, Ankara, Türkiye

ÖZET

Amaç: Hipertermi; vücut ısısının 41°C'ye ya da daha çok yükselmesi durumudur. Sıcak stresi duktus epididimis üzerinde çeşitli anomalilere neden olur. Super oksit dismutaz (SOD) ise oksidatif stresi engelleyebilen ve apoptotik süreci geri döndürebileceği düşünülen antioksidan bir maddedir. Bu nedenle çalışmamızda; hipertermi ile oluşturulan ısı stresinin ve stres öncesinde kullanılan SODun, duktus epididimis üzerindeki etkilerinin immünohistokimyasal olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Yöntemler: Çalışmada Wistar-Albino cinsi erkek sıçanlar, her grupta 6 denek olacak şekilde 7 gruba ayrıldı. Hipertermi deneklerin 42°C'de sıcak su banyosuna 20 dakika bırakılmasıyla gerçekleştirildi. Kontrol grubu olarak belirlenen 1. grup, 22°C'de 20 dakika bekletilerek 24 saat sonra duktus epididimis dokuları alındı. 2, 4, 6. gruplara hipertermiden bir saat önce NaCl+Katalaz uygulandı, 2. grup hipertermiden 6 saat, 4. grup 24 saat ve 6. grup 72 saat sonra dokuları alındı. 3, 5, 7. gruplara hipertermiden bir saat önce NaCl+Katalaz+SOD uygulaması yapıldı. 3. grup hipertermiden 6 saat, 5. grubun 24 saat, 7. grubun 72 saat sonra dokuları alındı. Alınan dokulara, hiperterminin neden olduğu apoptozisi belirlemek için Kaspaz 9, Kaspaz 8 ile Kaspaz 3 protein yapılarına etkisinin belirlenebilmesi amacıyla HSP 70 primer antikolarıyla indirekt immünohistokimyasal yöntem uygulanmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda morfolojik olarak bozuk spermium içeren lümenlerde Kaspaz 3 immunreaktivitesi belirlendi. Bu bulgu hipertermi etkisiyle testiste üretilen anormal spermiumların, epididimise ulaşabildiklerini gösterdi. Bazı bölgelerde yuvarlak spermatit başlarının epitele yöneldiği ve sterosilyalar arasında sokulduğu saptandı. Bu yönelmenin Sertoli hücrelerince ortadan kaldırılamamış artık cisimleri ve bozulan spermiumları fagosite eden esas hücrelerce düzenlenen bir mekanizma sonucu gerçekleştiği düşünüldü. Tüm Kaspazlar için SOD uygulamasının tutulumu azalttığı gözlemlendi.

Sonuç: Skrotal ısı yükselmesinin duktus epididimiste olumsuz etkisini gösterdiği ve SOD' un süreye koşut artan HSP70 senteziyle apoptozisi baskılayabileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Hipertermi, Duktus epididimis, SOD, Kaspaz, HSP70

Geliş Tarihi: 10.03.2014

Kabul Tarihi: 24.03.2014

ABSTRACT

Objective: Hyperthermia is the condition of the body temperature rising at 41°C or more. Heat stress on ductus epididymis leads to abnormal spermium production and spermatogenesis. Hyperthermia induced oxidative stress and apoptosis can be blocked by superoxide dismutase (SOD). In this study we aimed to determine the protective effects of SOD on ductus epididymis at hyperthermic conditions by using apoptotic and oxidative stress markers

Methods: Wistar Albino male rats were divided into seven groups. Every group has 6 rats. Control group (group 1) had set for 20 minutes in a pool which was 22° C temperature. On the 2nd, 4th, and 6th groups NaCl + catalase were applied one hour before hyperthermia, and then the rats were abandoned in 42° C water bath for 20 minutes. After that tissue were taken at 6th, 24th, 72th hours regarding 2nd, 4th, and 6th groups respectively. On the 3rd, 5th, and 7th groups NaCl + catalase + SOD was applied one hour before hyperthermia and then the rats were abandoned in 42° C water bath for 20 minutes. After hyperthermia for 20 minutes tissues were taken at 6th, 24th and 72th hours regarding 3rd, 5th and 7th groups respectively. In order to determine apoptosis caused by hyperthermia, removed tissues were subjected to indirect immunohistochemical method with HSP-70 primary antibodies to detect impact on Caspase 9, Caspase 8 and Caspase 3 protein structures.

Results: Morphologically abnormal spermium including lumens show positive Caspase-3 reaction. This was accepted as an indicator of abnormal spermiums, which were caused by effects of hyperthermia, can reach ductus epididymis. It was also remarkable that some areas, round spermatide heads directed into epithelium an even intruded into stereocilias. It was thought that, this direction can be caused by a mechanism which is organized by principle cells, which were not destroyed in Sertoli cells. It was observed that, for all caspases, SOD application is reducing the immunoreactivity in parallel to time.

Conclusion: The scrotal temperature elevation shows its harmful effects on epididymis, but the SOD application may suppress apoptosis in parallel to time by increasing HSP70 level.

Key Words: Hyperthermia, ductus epididymis, SOD, caspase, HSP70

Received: 03.10.2014

Accepted: 03.24.2014

GİRİŞ

İnsan organizmasının işlev görebilmesi için ısı dengesinin düzenlenmiş olması gerekir. Organizmada doku ve hücrelerin en uygun biçimde işlevlerini gerçekleştirebildikleri ısı değerleri oldukça dardır. Organizma yalnızca 35-43°C arasında canlılığını sürdürebilir (1,2).

Enfeksiyonlar, aşılarda, biyolojik ajanlar, doku hasarı, kanser gibi çeşitli hastalıklar, ilaçlar gibi termoregülatör mekanizmada bozukluk yaratan etkenler nedeniyle, vücut sıcaklığının artışına "ateş" denir. Hipertermi ise, vücut ısısının 41°C ya da daha yüksek bir değere erişmesidir (3).

Normal spermatogenezis 34°C-35°C aralığında gerçekleşir. Bu nedenle testisler karın boşluğunun dışında vücut ısısından 2°C-3°C düşük ortam oluşturulan skrotum içinde yerleşmişlerdir (3).

Testiste üretilen spermiumlar duktus efferenteslerden duktus epididimise taşınır. Duktus epididimisi spermiumların olgunlaşması, depolanması, beslenmesi ve taşınması işlevlerini görür ve spermatogenezis sırasında oluşan artık cisimciklerin ortadan kaldırılmasında görev yapar. Ayrıca spermiumların duktus epididimiste kanalında olgunlaşarak ileri doğru hareket ve dölleme yeteneği kazandığı yerdir. Dolayısıyla duktus epididimisi üreme işlevinde oldukça önemli bir yere sahiptir (4,5,6,7,8,9).

Skrotum ısısı pek çok yerel etken ya da tüm vücut ısısının artmasıyla yükselir. Erkeklerde; ateşli hastalıklar, inmemiş testis olguları ile sauna, fırın gibi yüksek ısı gerektiren işlerde çalışılması, motorlu taşıt sürücülüğü, pantolonlar, dizüstü bilgisayar kullanımı testis ısısını yükseltmektedir. Hipertermi/termal stres koşulları, toksik maddeler, radyasyon ve ısı değişimleri gametogenezisi olumsuz yönde etkilemesi nedeniyle spermium üretimini ve hareketliliğini azaltır. Bunun da dönemsel ya da kalıcı infertiliteye eşlik eden testis ağırlığında geçici ve görece azalmayla birlikte embriyo gelişimini engellediği görülmüştür. Bu etkenler germ hücrelerinde oksidatif strese neden olurlar. Bu sitozolik antioksidan olan glutatyon peroksidaz (GSH) ve süperoksit dismutaz (SOD) düzeyini azaltır ve sonuçta serbest oksijen radikalleri artar (10,11,12,13,14,15,16).

Serbest radikaller aerobik hücrelerin tüm işlevleri sırasında ya da patolojik olgularda birer yan ürün olarak oluşabilir ve hücrelerde geri dönüşümlü ya da dönüşümsüz değişikliklere neden olabilir. Bunun sonucunda ciddi hücre, doku ve organ hasarı oluşur (17,18,19,20).

Antioksidanlar işlevlerine göre serbest radikal oluşumunu önleyen (SOD, kotalar, glutatyon peroksidaz) ve oluşan serbest radikallerin dokudaki etkilerini önleyen (E vitamini, retinoik asit, β karoten, glutatyon) antioksidanlar olarak iki gruba ayrılırlar. SOD, süperoksit hidrogen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler ve hücresel düzeydeki süperoksit en önemli düzenleyicisidir. Süperoksit molekülünü oksijen molekülüne yükseltgeyip diğer süperoksit molekülünü hidrogen peroksit (H₂O₂)'e indirgeyerek çalışmaktadır. SOD tarafından oluşturulan H₂O₂, katalaz ve glutatyon peroksidaz tarafından metabolize edilir (21,22,23).

Isı yükselmesinde hücresel yanıt ısı şok proteinlerinin (HSP) yapımının artmasıdır. Yüksek ısıya ökaryotik hücrelerde verilen en iyi cevap HSP genlerdir. Isı artışı sonucu hücrelerdeki ribozomlarda HSP sentezinin artması denatüre proteinlerin renatüre olmasına aracılık eder. İn vitro ortamda akut sıcaklık stresinde morula evresinde embriyoların HSP üretimiyle stresi tolere edebildikleri, kronik ısı stresinin embriyo gelişimde blastokist evresinden sonra olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir (13,24).

Tüm bu veriler doğrultusunda, çalışmamızda hipertermi etkisinde kalan deneklerde duktus epididimiste oluşabilecek değişimlere bir antioksidan olan SOD'un olası koruyucu etkilerinin apoptotik ve oksidatif stres belirteçleri kullanılarak ortaya konması amaçlandı.

YÖNTEMLER

Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Çalışmamız G.Ü.T.F yerel etik kuruldan alınan izin doğrultusunda Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezinin (GÜDAM)'de yapıldı. Araştırma için 150-200 gram ağırlığında 2 aylık yetişkin 42 adet erkek sıçandan 7 grup oluşturuldu (Tablo 1).

Tablo 1. Deney grupları ve uygulama

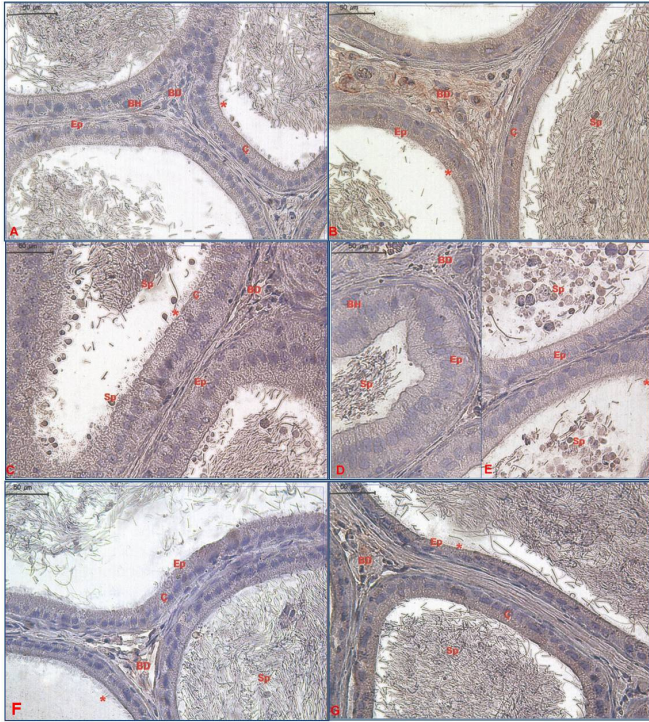
Gruplar	Uygulama	Denek Sayısı
Grup 1	22° C sıcak su banyosu uygulanan ve 24. saatte dokuların alındığı grup	6
Grup 2	Hipertermi uygulamasından bir saat önce NaCl + Katalaz uygulanan ve 6. saatte dokuların alındığı grup	6
Grup 3	Hipertermi uygulamasından bir saat önce NaCl + Katılan + SOD enjeksiyonu yapılan ve 6. saatte dokuların alındığı grup	6
Grup 4	Hipertermi uygulamasından bir saat önce NaCl + Katalaz uygulanan ve 24. saatte dokuların alındığı grup	6
Grup 5	Hipertermi uygulamasından bir saat önce NaCl + Katılan + SOD enjeksiyonu yapılan ve 24. saatte dokuların alındığı grup	6
Grup 6	Hipertermi uygulamasından bir saat önce NaCl + Katalaz uygulanan ve 72. saatte dokuların alındığı grup	6
Grup 7	Hipertermi uygulamasından bir saat önce NaCl + Katılan + SOD enjeksiyonu yapılan ve 72. saatte dokuların alındığı grup	6

İmmünohistokimyasal Yöntem

Süre sonunda her denekten alınan duktus epididimisi örnekleri %10'luk nötral formaldehite alınarak dokuların tespit edilmesi sağlandı. Alışılmış ışık mikroskopik izleme yöntemlerinden geçirilerek parafin bloklar oluşturuldu. Dokulara immünohistokimyasal yöntem olarak peroksidaz antiperoksidaz (PAP) indirekt immünohistokimyasal yöntem uygulanarak kaspaz 9 (Cat: RB-1205-P, Lot:1205P306, Neomarkers, USA), kaspaz 8 (Cat: RB-1200- P, Lot: 1200P708C, Neomarkers, USA), kaspaz 3 (Cat: RB-1197, Lot: 1197P08A, NeoMarkers, USA) ve HSP-70 (Cat: Sc-66048, Lot: J1408, Santa Cruz, USA) primer antikorları uygulandı. Sekonder kit olarak kaspaz 9, 8, 3 için Ultravision Detection System (Cat: TA- 125-UB, Lot: AUB70803, Lab Vision, Fremont, USA) ve HSP-70 için HRP kit (Cat: 85-9043, Lot: 1396691, Zymed, Frederick, USA) kullanıldı. Elde edilen bloklardan polilizinli camlara 4 µm'lik kesitler alınarak deparafinize ve dehidrate edildiler. Sonrasında %3'lük hidrogen peroksit ile etkin bırakılarak doku içerisindeki endojen peroksidaz aktiviteleri bloke edildi. Formaldehitin kapattığı antikor bağlanma bölgelerini açığa çıkartmak ereğiyle kaspaz 9, 8 ve 3 uygulanacak kesitlere "retriver" uygulaması yapıldı. HSP-70 için bu işlem uygulanmadı. Daha sonra, camlar PBS (Phosphate Buffer Saline, pH: 7.4) ile yıkandıktan sonra özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla kaspaz 9, 8, 3 için 5 dakika ve HSP-70 için 10 dakika Ultra V Blok uygulandı. Blok aşamasının ardından kesitler kaspaz 9, 8, 3 için 1 saat ve HSP-70 için +4°C' de bir gece primer antikorlara etkin bırakıldı. Bu sürelerin sonunda camlar PBS ile yıkandıktan sonra 10 dakika biyotinli sekonder antikor uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. Yeniden PBS ile yıkanan camlar, enzimin biyotine bağlanması amacıyla 10 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakıldı. Kromojen olarak kaspaz 9, kaspaz 8, kaspaz 3 antikorları için AEC (3-amino-9-ethylcarbazole, Cat:TA- 007-HAC, Lot: 007HAC13565, Lab Vision, Fremont, USA) uygulanarak gözle görülebilen immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. HSP-70 primer antikorunu için kromojen olarak DAB (3,3'-diaminobenzidine Tetrahydrochloride - Plus kit, Cat No; 00-2020, Lot; 421138A, Zymed, Frederick, USA) kullanıldı. Zemin boyamasında kaspaz 9, 8, 3 için Mayer' in hematoksileni (Cat:TA- 125-MH, Lot: AMH70809, Lab Vision, Fremont, USA) ve HSP-70 için Harris' in hematoksileni uygulandı. AEC ile boyanan camlar Ultramount (Cat: TA-125- UG, Lot: VM13518, Lab Vision, Fremont, USA), DAB ile boyanan camlar entellan ile kapatıldı. Tüm preparatlar Leica DM 4000 (Leica, Weetlar, Germany) mikroskopunda kamera ataçmanlı (DFC280 Plus Camera, Leica, Weetlar, Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında değerlendirilerek fotoğraflandırdı.

BULGULAR**Kaspaz 9 İmmünreaktivitesi**

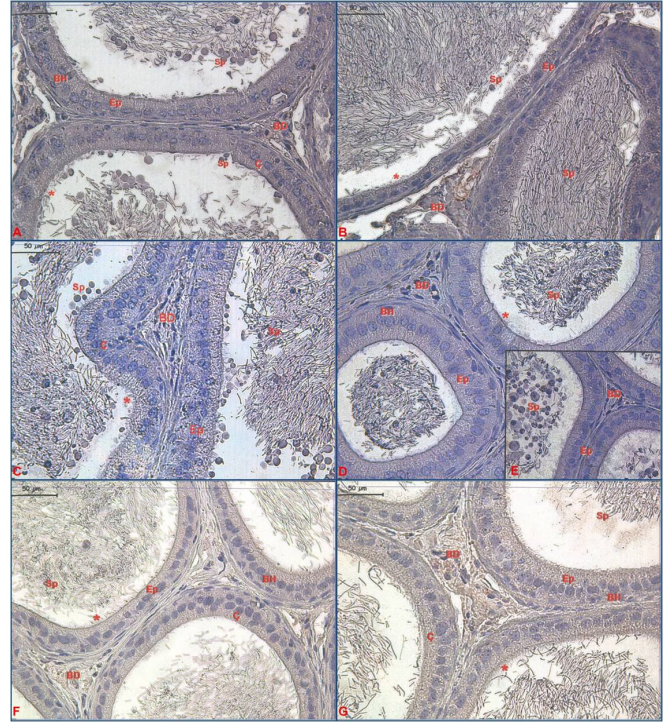
Grup 1'de kaspaz 9 boyamalarında herhangi bir immunreaktivite izlenmedi (resim ile gösterilmedi). 2.grupta epitel hücreleri ve lümendeki spermiumlarda belirgin tutulum izlenmedi. 3.grupta, apikal sitoplazma ve zarın ortadan kuvvetliye değişen tepkime gösterdiği saptandı. Lümendeki spermiumlarda belirgin immünreaktivite izlendi ve 2. gruba göre spermium anomalilerinin daha az olduğu iliyi çetti. Dördüncü grupta kaspaz 9'un epitel tutulumu diğer gruplara eşdeşken spermium anomalilerinin biraz daha belirgin olduğu dikkati çetti. İri başlı kısa kuyruklu, dev başlı uzun kuyruklu spermiumların çoğunlukla epitel yüzeyine yöneldikleri ve sterosilyalar arasına doğru girdikleri görüldü. 5.grupta kaspaz 9 tutulumu apikal sitoplazma ve hücre zarında yer yer ayırt edildi. Bazı lümenlerde spermiumlar normal yapı sergilerken, bazılarında hala anormal spermium birikimi iliyi çetti. Bu hücrelerde baş bölümünde ortadan kuvvetliye değişen immünreaktivite belirgindi. 6. grupta hiperteminin etkisini yitirmeye başladığı saptandı. Epitel ve lümen içeriğindeki kaspaz-9 immünreaktivitesinin olmadığı belirlendi. 7.grupta epitel ve lümen içeriğindeki kaspaz-9 tutulumunun bir önceki grup ile eşdeş olduğu belirlendi (Resim 1).



Resim 1. Kaspaz 9 immünboyaması. A: NaCl+Katalaz 6saat (Grup 2), B: NaCl+Katalaz+SOD 6saat (Grup 3), C: NaCl+Katalaz 24saat (Grup 4), D-E: NaCl+Katalaz+SOD 24saat (Grup 5), F: NaCl+Katalaz 72saat (Grup 6), G: NaCl+Katalaz+SOD 72saat (Grup 7), Ep: epitel, BH: Bazal Hücre, BD: Bağ Doku, Sp: Spermium, *: Sterosilya, Ç: Çekirdek (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Kaspaz 8 İmmünreaktivitesi

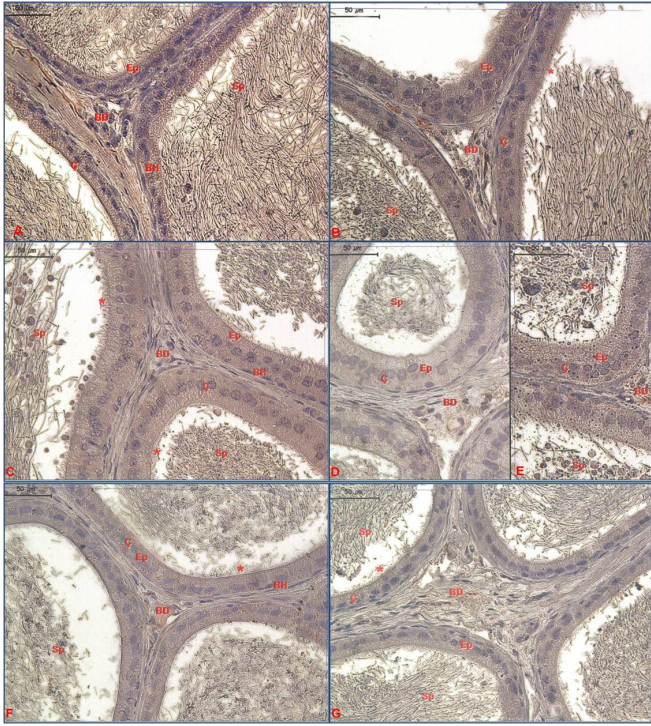
Grup 1'de kaspaz 8 boyamalarında herhangi bir immunreaktivite izlenmedi (resim ile gösterilmedi). 2.grupta anormal morfolojide spermiumların epitel hücre yüzeyine yöneldikleri görülmekle birlikte kaspaz-8 immünreaktivitesinin diğer gruplara eşdeş olduğu belirlendi. 3.grupta, anormal spermiumların 2.gruba göre daha az olduğu ayırt edildi ancak tutulum diğer gruplarla benzerdi. 4.grupta anormal büyük başlı, kısa kopuk kuyruklu ya da kuyruksuz spermiumların epitel yüzeyine sokuldukları dikkati çetti. 5.grupta doku genelinde, anormal spermium ve kanal kesitlerinin yanı sıra normal kanal kesitleri de gözlemlendi ve immünreaktivite benzerdi. 6.grupta kaspaz-8 immünreaktivitesi izlenmedi. 7.grupta bir önceki gruba benzer immünreaktivite özellikleri görüldü (Resim 2).



Resim 2: Kaspaz 8 immünboyaması. A: NaCl+Katalaz 6saat (Grup 2), B: NaCl+Katalaz+SOD 6saat (Grup 3), C: NaCl+Katalaz 24saat (Grup 4), D-E: NaCl+Katalaz+SOD 24saat (Grup 5), F: NaCl+Katalaz 72saat (Grup 6), G: NaCl+Katalaz+SOD 72saat (Grup 7), Ep: epitel, BH: Bazal Hücre, BD: Bağ Doku, Sp: Spermium, *: Sterosilya, Ç: Çekirdek (İmmünperoksidaz-Hematoksilen X400)

Kaspaz 3 İmmünreaktivitesi

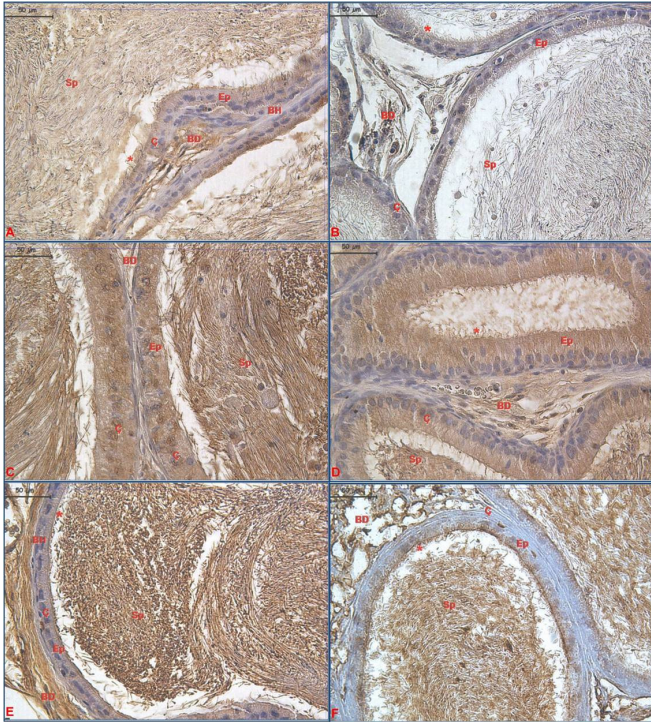
Grup 1'de kaspaz 3 boyamalarında tutulum rastlanmadı (resim ile gösterilmedi). 2. grupta kaspaz-3 immünreaktivitesinin, epitel hücrelerinde apikal hücre zarında ve tüm sitoplazmada yaygın olduğu belirlendi. 3.grupta doku genelinde, 2.gruba benzer tutulum izlenmekle birlikte lümendeki anormal spermiumların diğer gruplara karşı daha az olduğu iliyi çetti. 4.grupta epitel ve sterosilyalarda belirgin immünreaktivite izlendi. 5.grupta anormal spermiumlar göreceli olarak azalmıştı ve epitelde kaspaz-3 immünreaktivitesinin daha zayıf olduğu izlendi. 6.ve 7. gruplarda immünreaktivite izlenmedi (Resim 3).



Resim 3: Kaspaz 3 immünboyaması. A: NaCl+Katalaz 6saat (Grup 2), B: NaCl+Katalaz+SOD 6saat (Grup 3), C) NaCl+Katalaz 24saat (Grup 4), D-E: NaCl+Katalaz+SOD 24saat (Grup 5), F: NaCl+Katalaz 72saat (Grup 6), G: NaCl+Katalaz+SOD 72saat (Grup 7), Ep: epitel, BH: Bazal Hücre, BD: Bağ Doku, Sp: Spermium, *: Sterosilya, Ç: Çekirdek (Immünperoksidaz – Hematoksilen X400)

HSP70 İmmünreaktivitesi

Grup 1'de HSP70 boyamalarında immunreaktivite görülmedi (resim ile gösterilmedi). 2.grupta HSP70 tutulumu epitel hücre apikal sitoplazmasında ve zarda, ara doku ve lümen birikintilerinde gözlemlendi. 3.grupta ortadan zayıfa değişen tutulum belirlendi. 4.grupta tutulumun ortadan zayıfa değiştiği görüldü. Lümen içeriği yoğun boyandığı dikkati çekti. 5.grupta yaygın boyanma görülmüştür. 6.grupta immunreaktivite izlenmedi. 7.grupta bir önceki gruba benzer özellikler izlendi (Resim 4).



Resim 4: HSP70 immünboyaması. A: NaCl+Katalaz 6saat (Grup 2), B: NaCl+Katalaz+SOD 6saat (Grup 3), C) NaCl+Katalaz 24saat (Grup 4), D: NaCl+Katalaz+SOD 24saat (Grup 5), E: NaCl+Katalaz 72saat (Grup 6), F: NaCl+Katalaz+SOD 72saat (Grup 7), Ep: epitel, BH: Bazal Hücre, BD: Bağ Doku, Sp: Spermium, *: Sterosilya, Ç: Çekirdek (Immünperoksidaz – Hematoksilen X400)

TARTIŞMA

İnsan organizmasının işlev görebilmesi için ısı dengesinin düzenlenmesi gerekir. Organizma yalnızca 35-43°C arasında canlılığını sürdürebilir. Hipertermi vücut ısısının 41°C ya da daha yüksek bir değere erişmesidir (1,2). Son yıllarda gelişen teknolojiyle birlikte dizüstü bilgisayar, uzun süreli araba ve çocuklarda plastik içerikli bezlerin kullanılmasıyla oluşan hipertermi sonucu infertilitenin arttığı belirtilmiştir (25). Normal spermatogenezis vücut ısısından 2°C-3°C düşük ortamda olduğundan, erkek genital sistem hipertermiden en çok etkilenen dokulardan sayılabilir. Spermiumların olgunlaşmasını, taşınmasını, depolanmasını ve beslenmesi işlevlerini yerine getiren duktus epididimis üreme fonksiyonunda önemli bir organdır (4,5,6,7,8,9). Literatürde testis üzerine yapılan çalışmalar sıklıkla izlenirken direk epididimis üzerine yapılan çok fazla çalışma görülmektedir.

Hipertermi ile ilgili çalışmalarda, ısı artışının, moleküler düzeyde, çoğu geri dönüşümsüz süreçler olan nükleik asit yapısının ve protein sentezinin bozulmasına, hücre zarı geçirgenliği ve lipid peroksidasyonun artmasına neden olduğu ve tüm bu süreçlerin apoptozisi tetiklediği belirtilmiştir (26).

Apoptozisin genel özelliği oksidatif stresin oluşmasıdır (16). Son yıllarda yayınlanan verilerde, sitosolik bir antioksidan olan SOD, lipid peroksidasyonunu engelleme ve serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırmaları özellikleri ile ön plana çıkmıştır (27). Dada ve arkadaşları 5-7 yıl yüksek ısı etkisinde kalan erkeklerde oligoastenozoospermi, 12-15 yıl kalanlarda ise azospermi bulgularına rastlamıştır (10,11).

Birbirini destekleyen pek çok çalışmada ise, skrotal ısı yükselmesinin sıçan, fare ve insanlarda testis ağırlığının azalmasına, spermium yapılarının, hareketliliğinin bozulmasına ve canlılığın azalmasına neden olduğu bildirilmiştir (28,29,30).

Bizim çalışmamızda da apoptozisi başlatıcı kaspazlardan kaspaz-9 tutulumunun, SOD uygulaması yapılan 3.grup ile SOD uygulaması yapılmayan 2.grup karşılaştırıldığında, 3.grupta 2.gruba göre, duktus epididimis epitelinde, bazal ve apikal hücrelerde immunreaktivitenin oldukça zayıf olduğu görüldü. Hipertermi uygulanan 4.grupta ise olgunlaşmamış spermiumların stereosilyalar arasında gömülü durduğu ayırt edilirken, iri başlı kısa kuyruklu ve dev başlı uzun kuyruklu spermiumların epitel yüzeyine yöneltiler izlendi. 5.grupta ise bazı lümenlerde spermiumların normal yapı yitirdiği, bazılarında ise hala anormal spermium birikiminin sürdürüldüğü dikkati çekti. Hipertermi uygulanan 6.grupta yapılan değerlendirmelerde immunreaktivitenin azaldığı ve 7.grupta immunreaktivitenin görülmediği izlendi. Bu bulgu hiperterminin 72 saate kadar etkinliğinin azaldığının göstergesi olarak kabul edildi.

Hjollund ve arkadaşları, aktif hareket gerektirmeyen işi olan erkeklerin iş sırasında skrotal sıcaklığının 0.7 derece fazla ve bu erkeklerin spermium yoğunluğunun %75 daha az olduğunu saptanmıştır (31). Yapılan başka bir çalışmada hiperterminin, spermiumların canlılık, hareket ve yoğunluğunun azalttığı belirtilmiştir ve hiperterminin sürekliliği durumunda spermiumların çok fazla parçalanmış DNA içerdiği gözlenmiştir (32,33).

Biz de yaptığımız çalışmada hipertermi uygulamasından bir saat önce NaCl + katalaz verilen hipertermi grupları ile NaCl + kotalaz + SOD verilen gruplarda, özellikle 6 saatlik grupların duktus epididimis karşılaştırılmasında, SOD verilen grupta hipertermi grubuna (NaCl + katalaz verilen grup) karşın anormal spermium sayısının daha az olduğu gözlemlendi.

Rockett ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ısının gen ifadenemesi ve testis ağırlığında göreceli geçici azalmaya neden olduğu belirtilmiştir. Abdominal ısı stresine yanıt olarak testiküler germ hücrelerinde apoptozis ile azalmaya ve ısının kromozomal ayrılmalara neden olduğu belirtilmiştir (12). Bizim çalışmamızda da kaspaz-8 ve 9 ile yapılan değerlendirmelere ek olarak, apoptozisi ilerletici kaspazlardan kaspaz-3 değerlendirmesi de yapıldı. NaCl + katalaz verilen hipertermi grupları ile NaCl + kotalaz + SOD verilen gruplar karşılaştırıldığında, SOD verilen gruplarda duktus epididimiste azalan kaspaz-3 tutulumu ayırt edildi.

Hipertermi Reaktif Oksijen türevleri (ROS) artışına neden olarak HSP artışına yol açabilir (34,35). Hücreler, ROS'ların oluşturduğu hasarlardan korunmak için enzimlere bağlı (SOD, katalaz, GST) ve bağımsız (vitaminler, ürik asit ve glutatyon) savunma sistemlerini kullanırlar (36). Hiperterminin yalnızca ısı şok ailesi (HSP) üyelerini değil aynı zamanda HSP'leri fosforile eden MAPK, p38, JNK ve protein kinaz C (PKC) gibi proteinleri arttırdığı da gösterilmiştir (37). Du ve arkadaşları ısı şoku uygulanan meme dokusu hücrelerinde mitokondriyal değişiklikler, kromatin yoğunlaşması ve apoptotik cisimcikler ile belirlenen apoptozisin uyarıldığını bildirmişlerdir (38).

Bizim çalışmamızda da, SOD'un olası koruyuculuğunu ve ısının etkisini belirleyebilmek amacıyla HSP70 immünreaktivitesi de değerlendirildi. Kontrol, hipertermi (NaCl + katalaz verilen grup) ve SOD grupları karşılaştırıldığında özellikle SOD verilen gruplarda duktus epididimiste yaygın immün tutulum izlendi.

SONUÇ

Çalışmamızda yapılan değerlendirmelerde, kaspaz-3 tutulumunun özgül olduğu belirlendi. Bazı lümenlerde anormal morfolojideki spermiumlarda kaspaz-3 pozitifliğinin belirlenmesi, hiperterminin asıl hedefi olan testis dokusunda oluşan yapısal bozukluklar nedeniyle oluşan anormal spermiumların duktus epididimise ulaştığının bir göstergesi olarak kabul edildi. Spermatit başlarının epitelle ve stereosilyalara arasına değin sokulmasının Sertoli hücrelerince artık cisimlerin kaldırılamamış olduğunun ve bozulan spermiumları fagosite edemediğinin göstergesi olarak sayıldı. Tüm kaspazlar için SOD uygulamasının süreye koştut tutulumu azalttığı gözlemlendi.

HSP70 tutulumunun özellikle 72. saatte görülüyor olması stresin süreye bağımlı olarak azaldığını düşündürdü. SOD uygulanan gruplarda uygulanmayan gruplara karşı artan tutulumun belirlenmesi koruyucu özellik gösterdiğinin göstergesi olarak düşünüldü.

Sonuç olarak hipertermiye koştut, spermium yapısının, hareketliliğinin bozulmasına ve canlılığının azalmasına neden olduğu bilinen skrotal ısı yükselmesinin, duktus epididimiste etkisini gösterdiği, SOD uygulamasının süreye koştut apoptozisi baskılayabileceği, bunu da artan HSP70'in koruyucu etkisiyle gerçekleştirmiş olabileceği sonucuna varıldı.

Çıkar Çatışması

Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

- Sund-Levander M, Forsberg C, Wahren LK. Normal oral, rectal, tympanic and axillary body temperature in adult men and women. *Scand J Caring Sci* 2002; 6: 122-8.
- Çelik Ömür S. Yoğun Bakım Hastalarında Vital Bulguların Takibi ve Önemi. *Güncel Gastroenteroloji Derg* 2004; 8: 146-50.
- Kierszerbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. Demir R (Çeviri Editörü), Ankara: Palme Yayıncılık; 2006.
- Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Jimmy D. Neill, editör, Elsevier Academic Press Publications St. Louis USA; 2006.
- Berne RM, Levy MN, Koeppe BM, Stanton BA. Fizyoloji. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği (Çev), 5. Baskı. Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri; 2008.
- Guyton AC, Hall JE. Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H., Çağlayan Yeğen B. (Çeviri Editörleri), 11. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2007.
- Bozdoğan Ö. Fizyoloji. 2. Baskı. Ankara: Palme Yayıncılık; 2004.
- Andonian S, Hermo L. Cell-and region-specific localization of lysosomal and secretory proteins and endocytic receptors in epithelial cells of the cauda epididymidis and vas deferens of the adult rat. *Journal of Andrology* 1999; 20: 415.
- Chinoy NJ. Structure and physiology of mammalian vas deferens in relation to fertility regulation. *Journal of Biosciences* 1985; 7: 215-21.
- Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Human Reproduction* 2005; 20: 452-5.
- Dada R, Gupta NP, Kucheria K. Spermatogenic Alterations in Men with High Testiculo Epididymal Temperatures. *Indian J Hum Genet* 2002; 8: 20-5.
- Rockett JC, Mapp FL, Garges JB, Luft JC, Mori C, Dix DJ. Effects of Hyperthermia on Spermatogenesis, Apoptosis, Gene Expression and Fertility in Adult Male Mice. *Biol Reprod* 2001; 65: 229-39.
- Jannes P, Spiessens C, Auwera IV, D'Hooghe T, Verhoeven G, Vanderschueren D. Male subfertility induced by acute scrotal heating affects embryo quality in normal female mice. *Human Reproduction* 1998; 13: 372-5.
- Vydra N, Malusecka E, Jarzab M, Lisowska K, Glowala-Kosinska M, Benedyk K, Widlak P, Krawczyk Z, Widlak W. Spermatoocyte-specific expression of constitutively active heat shock factor 1 induces HSP70 i-resistant apoptosis in male germ cells. *Cell Death and Differentiation* 2006; 13: 212-22.
- Fiorenza MT, Mangia F. Hyperthermia Specifically Inhibits Bivalent Chromosome Disjunction in Maturing Mouse Oocytes. *Biol Reprod* 1992; 46: 658-64.
- Ranawat P, Bansal MP. Decreased glutathione levels potentiate the apoptotic efficacy of selenium: Possible involvement of p38 and JNK MAPKs-in vitro studies. *Mol Cell Biochem* 2008; 309: 21-32.
- Yılmaz F. Desfluranın Antioksidan Etkinliğinin Propofol İle Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi. Isparta: Süleyman Demirel Üniversitesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı; 2006.
- Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23: 21-48.
- Southorn PA, Powis G. Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 1988; 63: 381-9.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen MT. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 1993; 90: 7915-22.
- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 1995; 41: 1819-28.
- Akkuş İ. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri. 1. Baskı. İstanbul: Mimoza Yayınları; 2000.
- Hileman EA, Achanta G, Huang P. Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets* 2001; 5: 697-710.
- Ross MH, Kaye IG, Pawlina W. Histology A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology. 5. Baskı. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- Sheynkin Y, Jung M, Yoo P, Schulsinger D, Komaroff E. Increase in scrotal temperature in laptop computer users. *Hum. Reprod.* 2005;20:452-5.
- Henle KJ, Leeper DB. Effects of hyperthermia (45 degrees) on macromolecular synthesis in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Res.* 1979;39:2665-74.
- Lysiak JJ, Nguyen QAT, Turner TT. Peptide and nonpeptide reactive oxygen scavengers provide partial rescue of the testis after torsion. *Journal of Andrology.* 2002; 23: 400-9.
- Legare C, Thabet M, Sullivan R. Expression of heat shock protein 70 in normal and cryptorchid human excurrent duct. *Molecular Human Reproduction* 2004; 10: 197-202.
- Setchell BP. The Parkes Lecture. Heat and the testis. *J Reprod Fertil* 1998;114: 179-94.
- Jara M, Esponda P, Carballada R. Abdominal temperature induces region-specific p53-independent apoptosis in the cauda epididymidis of the mouse. *Biol Reprod* 2002; 67: 1189-96.
- Hjollund NH, Bonde JP, Jensen TK, Olsen J. Diurnal scrotal skin temperature and semen quality. The Danish First Pregnancy Planner Study Team Int J Androl 2000; 23: 309-18.
- Perez-Crespo M, Pindato B, Gutierrez-Adan A. Scrotal Heat Stress Effects on Sperm Viability, Sperm DNA Integrity, and the Offspring Sex Ratio in Mice. *Molecular Reproduction and Dev* 2008; 75: 40-7.
- Banks S, King SA, Irvine DS, Saunders PT. Impact of a mild scrotal heat stress on DNA integrity in murine spermatozoa. *Reproduction* 2005; 129: 505-14.
- Salo DC, Donovan CM, Davies KJ. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart and liver during exercise. *Free Radic Biol Med* 1991; 11: 239-46.
- Zuo L, Christofi FL, Wright VP, Merola AJ, Berliner LJ, Clanton TL. Intra- and extracellular measurement of reactive oxygen species produced during heat stress in diaphragm muscle. *Am J Cell Physiol* 2000; 279: 1058-66.
- Zhang P, Omaye ST. Antioxidant and prooxidant roles for β -carotene, α -tocopherol and ascorbic acid in human lung cells. *Toxicol In Vitro* 2001; 15: 13-24.
- Venkatakrishnan CD, Tewari AK, Moldovan L, Cardounel AJ, Zweier JL, Kuppasamy P, Ilangovan G. Heat shock protects cardiac cells from doxorubicin-induced toxicity by activating p38 MAPK and phosphorylation of small heat shock protein 27. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: 2680-91.
- Du J, Di HS, Wang GL. Establishment of a bovine epithelial mammary cell line and its ultrastructural changes when exposed to heat stress. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* 2007; 23: 471-6.