



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**CİSPLATİN İLE İNDÜKLENEN TESTİS
HASARINA KARŞI ROSMARİNİK ASİTİN
KORUYUCU ETKİLERİ**

Birgül GÜR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

TRABZON – 2019

ONAY

Bu tez Yüksek Lisans Standartlarına Uygun Bulunmuştur.

Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Birgül GÜR'nün hazırladığı “Cisplatin ile indüklenen testis hasarına karşı rosmarinik asitin koruyucu etkileri” başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Engin YENİLMEZ

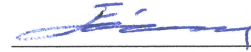


Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

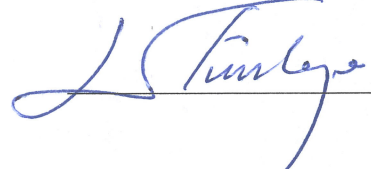
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ



Prof. Dr. Esin YULUĞ



Doç. Dr. Levent TÜMKAYA



Tarih: / /2019

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.....tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Ersan KALAY

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynak listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici davranışımın olmadığını beyan ederim.

28/06/2019

Birgöl GÜR

İthaf

Yüksek lisans tezim, tüm hayatım boyunca beni destekleyen ve maddi manevi hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ve tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen sevdiklerime ithaf ediyorum



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimimin ve tezimin her aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle, ilgi ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim danışmanım anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Engin YENİLMEZ hocama, geniş bilgi, deneyim ve imkânlarından faydalandığım çok değerli hocalarım Prof. Dr. Ersan ODACI, Prof. Dr. Esin YULUĞ, Prof. Dr. Yavuz TEKELİOĞLU, Doç. Dr. Gökçen KERİMOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZTÜRK OKATAN hocalarıma, Biyokimya Anabilim Dalından değerli hocam Prof. Dr. Ahmet ALVER'e, tez çalışmamda benden desteğini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Uzm. Dr. Senem ARI, Uzm. Dr. Gökşen Derya REİS KÖSE, Uzm. Dr. Ahmet Uğur AKMAN, Arş. Gör. Dr. Abdülkadir KUTLU, Arş. Gör. Dr. Tuğba ZENGİN, Arş. Gör. Dr. Tuğba ARICI, Arş. Gör. Dr. Ayşe Firuze BIYIK, Arş. Gör. Dr. Dilan ÇETİNAVCI, Arş. Gör. Elif ŞAHİN, Arş. Gör. Dr. Oğuzhan KESKİN, Arş. Gör. Ali KULABER'e ve son olarak tez çalışmamı TYL-2018-7279 no'lu proje olarak destekleyen KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Birgül GÜR
Trabzon, 2019

İÇİNDEKİLER**Sayfa****KABUL ve ONAY****BEYAN****İTHAF****TEŞEKKÜR****İÇİNDEKİLER****vi****TABLolar DİZİNİ****ix****ŞEKİLLER DİZİNİ****x****RESİMLER DİZİNİ****xi****KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ****xii****1. ÖZET****1****2. SUMMARY****2****3. GİRİŞ ve AMAÇ****3****4. GENEL BİLGİLER****5**

4.1. Testis Embriyolojisi

5

4.2. Testis Anatomisi

6

4.3. Testis Histolojisi

8

4.3.1. Seminifer Tübül

8

4.3.2. Seminifer Epitel

9

4.3.2.1. Sertoli Hücreleri

10

4.3.2.2. Spermatogenetik Hücreler

11

4.3.2.2.1. Spermatogenez

11

4.3.3. Spermatozoon Yapısı

15

4.3.4. İnterstisyel Doku

16

4.3.4.1. Leydig Hücreleri

16

4.3.5. Kan Testis Bariyeri

17

4.4. Epididimis

18

4.5. Apoptoz

20

4.6. Cisplatin

21

4.6.1. Cisplatinin Hücre İçine Alınışı

22

4.6.2. Cisplatinin Etki Mekanizması ve Toksisitesi

23

4.7. Oksidatif Stres	25
4.8. Antioksidanlar	27
4.9. Fenolik Bileşikler	27
4.10. Rosmarinik Asit	28
4.10.1. Rosmarinik Asitin Biyolojik Aktivitesi	29
4.10.2. Rosmarinik Asitin Antioksidan Aktivitesi	30
5. GEREÇ ve YÖNTEM	32
5.1. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği	32
5.2. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları	32
5.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulama	33
5.4. Doku Numunelerinin Elde Edilmesi	34
5.5. Histolojik İşlemler	35
5.5.1. Bouin Tespitinin Hazırlanışı	35
5.5.2. Işık Mikroskopik İnceleme İçin Dokuların Hazırlanması	35
5.5.3. Hematoksilen & Eozin Boyama Yöntemi	36
5.5.4. Histolojik Ölçümler	37
5.5.5. Sperm Sayısı, Hareketlilik, Canlılık ve Morfoloji Değerlendirmesi	38
5.6. İmmünohistokimyasal İşlemler	39
5.6.1. TUNEL Boyama	39
5.7. Biyokimyasal İncelemeler	41
5.7.1. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü	41
5.7.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini	42
5.7.3. Protein Tayini	45
5.7.4. Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Tayini	46
5.8. İstatistiksel Analiz	47
6. BULGULAR	48
6.1. Morfometrik Bulgular	48
6.2. Morfolojik Bulgular	49
6.2.1. Hematoksilen & Eozin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi	49
6.3. TUNEL Sonuçları	52
6.4. Semen Analizine Ait Bulgular	55
6.5. Biyokimyasal Değerlendirmeler	59
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	60

8. KAYNAKLAR	65
9. ETİK KURUL ONAYI	87
10. ÖZGEÇMİŞ	89



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı	42
Tablo 2. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı	44
Tablo 3. Deney gruplarına ait morfometrik ölçüm sonuçları	48
Tablo 4. Deney gruplarına ait apoptotik indeks değerlendirmesi	52
Tablo 5. Semen analizine ait ortalama ve standart sapma değerleri	55
Tablo 6. Doku biyokimyası sonuçlarının değerlendirilmesi	59



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Seminifer tubul epiteli	14
Şekil 2. Spermatozoon yapısı	16
Şekil 3. Cisplatinin kimyasal yapısı	21
Şekil 4. Rosmarinik asitin kimyasal yapısı	29
Şekil 5. Doku MDA seviyesi ölçümü için standart grafiği	42
Şekil 6. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği	44
Şekil 7. Protein standart grafiği (SOD için)	45
Şekil 8. Protein standart grafiği (GSH-Px için)	46

RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. Seminifer tubullerin H&E boyama ile gösterimi	9
Resim 2. Sıçanların bakımı ve barınması	32
Resim 3. Sıçanlara oral gavaj yoluyla rosmarinik asit verilmesi	33
Resim 4. Testis dokularının çıkarılması	34
Resim 5. Makler sayım kamarası	39
Resim 6. Kontrol grubuna ait testis dokusu (H&E)	49
Resim 7. Cis grubuna ait testis dokusu (H&E)	50
Resim 8. Cis+RA grubuna ait testis dokusu (H&E)	51
Resim 9. RA grubuna ait testis dokusu (H&E)	52
Resim 10. Kontrol grubuna ait testis dokusu (TUNEL)	53
Resim 11. Cis grubuna ait testis dokusu (TUNEL)	53
Resim 12. Cis+RA grubuna ait testis dokusu (TUNEL)	54
Resim 13. RA grubuna ait sıçan testis dokusu (TUNEL)	54
Resim 14. Cis grubuna ait sperm hücreleri	56
Resim 15. Cis grubuna ait sperm hücre morfolojileri	56
Resim 16. Kontrol grubuna ait epididimis dokusu	57
Resim 17. Cis grubuna ait epididimis dokusu	57
Resim 18. Cis+RA grubuna ait epididimis dokusu	58
Resim 19. RA grubuna ait epididimis dokusu	58

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

ABP	Androjen bağlayıcı protein
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
AI	Apoptotik indeks
AMH	Antimülleryen hormon
BAP	Bilimsel araştırma projeleri
BSA	Bovin serum albumin
CAT	Katalaz
CİS	Cisplatin
DAB	3, 3–diaminobenzidine
DNA	Deoksiribonükleik asit
FSH	Folikül stimüle edici hormon
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
HCG	İnsan koryonik gonadotropini
H&E	Hematoksilen eozin
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi
LH	Lüteinleştirici hormon
MDA	Malondialdehid
NBT	Nitro blue tetrazolium
OH	Hidroksil
PGC	Primordial germ hücreleri
RA	Rosmarinik asit
ROS	Reaktif oksijen türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
TBA	3- tiyobarbiturik asit
TBF	Testis belirleyici faktör
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase (Tdt) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay

Simgeler

°C	Santigrad derece
cm	Santimetre
dk	Dakika
gr	Gram
nm	Nanometre
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre



1. ÖZET

Cisplatin ile İndüklenen Testis Hasarına Karşı Rosmarinik Asitin Koruyucu Etkileri

Cisplatin (Cis) yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir. Rosmarinik asit (RA) antioksidan özellikli bir bileşiktir. Bu çalışmada Cis kullanımı ile sıçanlarda oluşabilecek testis hasarına karşı, RA'nın koruyucu etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması amaçlandı. Çalışmada 24 adet erişkin erkek Sprague Dawley tipi sıçan 4 gruba ayrıldı ve deney süresi 7 gün olarak belirlendi. Kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmadı. Cis ve Cis+RA gruplarına deneyin 3. günü tek doz 7 mg/kg Cis ip. olarak uygulandı. RA ve Cis+RA gruplarına, 50 mg/kg RA 7 gün boyunca oral gavaj ile verildi. Deney sürecinin sonunda (8. gün) denekler sakrifiye edilerek testisleri ve epididimisleri alındı. Testis ve epididimis doku örnekleri ışık mikroskopunda histopatolojik olarak incelendi. Testiste seminifer tübül hasar değerlendirmesi için Johnsen skorum sistemi ve apoptozis değerlendirmesi için ise TUNEL tekniği kullanıldı. Epididimal sperm analizinde; sperm sayısı, motilite, vitalite ve morfoloji değerlendirildi. Biyokimyasal olarak dokuda oksidatif stres parametreleri incelendi. Histopatolojik olarak, Cis grubu testis dokularında peritübüler dokuda ondülasyon ve germinal epitel kalınlığında azalma ile birlikte yer yer vakuolizasyon görüldü. Nekroza gitmiş primer spermatositler ve lümene dökülen immatür hücreler gözlenirken bazal kompartmanda spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri arasında açılmalar izlendi. Ayrıca interstisyel alanda yer yer ödem ve Leydig hücrelerinde atrofi görüldü. Bu histopatolojik bulgular Cis+RA grubunda farkedilir şekilde azalma gösterdi. Cis grubundaki apoptotik indeks artışının da Cis+RA grubunda azaldığı görüldü. Sperm analizinde Cis grubunda anormal morfoloji oranı artarken Cis+RA grubunda ise bu oranda azalma vardı. Bulgularımız cisplatinin testiküler fonksiyonu bozduğunu ve Rosmarinik asit tedavisinin bu toksisiteyi önleyebileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Cisplatin, Oksidatif stres, Rosmarinik asit, Testis, Toksisite

2. SUMMARY

Protective Effects of Rosmarinic Acid Against Cisplatin-Induced Testicular Injury

Cisplatin (Cis) is one of the commonly used chemotherapeutic agents. Rosmarinic acid (RA) is an antioxidant compound. In this study, it is aimed to investigate the protective effects of RA against testicular damage which may occur in Cis-treated rats. In this study 24 adult Sprague Dawley male rats were divided into 4 groups and the duration of the experiment was determined as 7 days. No treatment was performed in the control group. On day 3, single dose of 7 mg/kg Cis applied intraperitoneally to the rats of Cis and Cis+RA groups. 50 mg/kg RA was given to the rats of RA and Cis+RA groups by oral gavage for 7 days. At the end of the experiment (day 8), the rats were sacrificed and their testes were taken out and the epididymis were separated. Testis and epididymis tissue samples were examined histopathologically in light microscope. Johnsen scoring system was used for evaluation of seminiferous tubule damage in the testis and TUNEL technique was used for apoptosis. In the epididymal sperm analysis; sperm count, motility, vitality and morphology were evaluated. Biochemical parameters of oxidative stress were investigated. Histopathologically, Cis group testis showed peritubular tissues ondulation and decrease in germinal epithelium thickness. Necrotic primary spermatocytes and immature cells fallen into the lumen were observed. In the basal compartment, mild opening between spermatogonium and Sertoli cells was observed. In the interstitial area, edema and atrophy in Leydig cells were seen. These histopathological findings were significantly reduced in Cis+RA group. The increase in apoptotic index in Cis group decreased in Cis+RA group. In the sperm analysis, abnormal morphology rate increased in Cis group and decreased in Cis+RA group. Our results show that cisplatine disrupts testicular function and Rosmarinic acid treatment can prevent this toxicity.

Key words: Cisplatin, Oxidative stress, Rosmarinic acid, Testis, Toxicity

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması sonucu oluşan hastalıktır. Çeşitli kanser tipleri bulunmakta ve bunların tedavisi için birçok ilaç kullanılmaktadır. Tedavide kullanılan bu ilaçların yan etkileri halen araştırılmakta ve çözüm yolları aranmaktadır. Kanser tedavilerinde kullanılan başlıca kemoterapötik ajanlardan biri de Cisplatindir (Cis) (1).

Günümüzde Cis mesane kanseri, servikal kanser, küçük hücreli akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, baş-boyun skuamöz hücreli karsinomları ve testis kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Ancak tümör hücre direnci ve ciddi yan etkileri nedeniyle kullanımı sınırlıdır (%33) (2, 3). Cis DNA replikasyonu, onarımı ve hücre döngüsünü bozmakta, hücrelerdeki DNA ile etkileşime girerek apoptotik süreci de başlatmaktadır (4). Kanser tedavisinde kullanılan Cis'in en yaygın yan etkilerinden biri de gonadal disfonksiyondur (5). Sağlıklı testislerde Cis tedavisinin toksik etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (6-8). Yapılan çalışmalarda Cis'in, Leydig hücre disfonksiyonuna ve testiküler steroidojenik sentez bozukluğuna neden olarak, testosteron üretimini inhibe ettiği gözlemlenmiştir (9, 10). Cisplatin ile indüklenen testiküler hasarın hücresel/biyokimyasal mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Yapılan araştırmalarda, Cis tedavisinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimine ve oksidatif stresin başlatılmasına neden olduğu gösterilmiştir (11, 12). Testis, Cis gibi birçok oksidatif ajana karşı oldukça hassas bir organdır. Bu nedenle çok sayıda araştırmacı Cis kaynaklı testiküler toksisiteye karşı birçok maddenin koruyucu ve düzeltici etkilerini araştırmaktadır (13-15).

Günümüzde yoğun bir şekilde kullanılmakta olan sentetik ilaçların pek çok yan etkiler göstermesi ya da hastalık etmenlerinde bu ilaçlara karşı direnç gelişmesi insanları doğal ilaç olarak bilinen ürünleri kullanmaya yönlendirmiştir. Rosmarinik asit (RA), lamiasae bitki familyasında bulunan doğal polifenol bir bileşiktir. Biberiye, kekik, adaçayı ve nane gibi yemeklerde kullanılan otlarda yaygın olarak bulunmaktadır (16, 17). RA antioksidan, antimutagenik, antibakteriyel ve antiviral gibi dikkat çekici biyolojik etkinliklere sahiptir (18). Avrupa halk tıbbında çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılan önemli bir antioksidan bileşiktir. Bronşiyal astım, peptik ülser, katarakt, kanser, romatoid artrit ve diğer atritlerin de tedavisinde kullanılmaktadır (19). Lamiaceae bitkilerinden alınan ekstraktlar, geniş çaplı faydalı etkilere sahiptir. Örneğin, *Mentha piperita* yapraklarının özlerindeki RA, antioksidan ve anti-inflamatuar amaçlarla

kullanılmaktadır (20). Biberiye özütleri, sperm kalitesini ve doğurganlığı artırmak için de bir antioksidan olarak kullanılmıştır (21).

Bu çalışmada Cis kullanımı ile sıçanlarda oluşabilecek testis hasarına karşı, RA'nın koruyucu etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal olarak araştırılması amaçlandı. Çalışmamız literatürde bu konuyla ilgili herhangi bir araştırmaya rastlanmadığı için de bilime katkı sunacaktır.



4. GENEL BİLGİLER

Erkek üreme sistemi; iki testis, genital boşaltım kanalları, aksesuar cinsiyet bezleri (veziküla seminalisler, prostat, bulboüretal bezler) ve penisten oluşmaktadır. Spermin (spermatogenez) ve androjenlerin (steroidogenez) üretimi testislerin temel görevleridir (22, 23). Yerleşim yerlerine göre üreme organları iç ve dış olmak üzere iki gruba ayrılır. İç üreme organlarını testis, epididimis, duktus deferens, duktus ejaculatorius ve genital boşaltım kanalları; dış üreme organlarını ise penis ve skrotum oluşturur (24).

4.1. Testis Embriyolojisi

Cinsel gelişme ve farklılaşma üç düzeyde gerçekleşmektedir. Bunlar gamet füzyonu sırasında karar verilen kromozomal düzey, testis veya yumurtalıkların gelişimi olan gonad düzeyi ve gonadlar tarafından salgılanan hormonların etkisi altındaki ikincil cinsel organların ve karakterlerin gelişimi olan fizyolojik düzeydir (25). Embriyonun genetik açıdan cinsiyeti X veya Y kromozomuna sahip sperm ile X kromozomuna sahip ovumun birleşmesiyle (fertilizasyonla) belirlenmektedir (26).

Fertilizasyon ile birlikte embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti belirlenmekte fakat erkek ve dişi morfoloji özelliklerinin gelişimi başlamamaktadır. Gelişimin 7. haftasına kadar olan bölümü, her iki cinste de birbirine benzeyen genital sistemin “farklılaşmamış dönemi” olarak adlandırılır. Bu evredeki gonadlar da farklılaşmamış gonad adını alır (26, 27). Embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklılaşmamış gonadın korteksi overe diferensiye olmakta ve medullası gerilemektedir. Eğer embriyo XY seks kromozom kompleksine sahip ise medulla testise farklılaşarak, korteks bir takım kalıntıları dışında gerilemekte ve dejenere olmaktadır. Gelişimleri 5. haftada başlayan gonadlar (testisler ve overler) 3 yapıdan köken almaktadır (26).

- Posterior abdominal duvarın mezotel örtüsü (mezodermal epitel),
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu),
- Primordial germ hücreleri

Mezodermal (ceolomik) epitel, Sertoli hücreleri ve paramesonefrik kanalı oluşturur. Ara mezoderm, testiküler stroma ve mesonefrik (Wolf) kanala neden olan bir ürogenital sırt oluşturur. Primordiyal germ hücreleri yolk kesesinden göç ederler ve spermatogoniumları oluştururlar (28).

Primordial germ hücreleri (PGC), tüm somatik hücreler gibi diploiddir ve gebeliğin 2. haftasında birincil ektoderimde (epiblast) bulunabilmektedirler. Testislerin organogenezindeki ilk adım, destekleyici Sertoli hücrelerinin farklılaşmasıdır (29). Primordiyal gonadlar iki potansiyellidir. Bunlar moleküler sinyallere bağlı olarak yumurtalıklara veya testislere farklılaşma göstermektedirler. Testis belirleyici faktörün (TBF) tanımlanması, testiste veya yumurtalıklarda gelişme yolunu belirleyen sinyallerin başlangıcıdır ve TBF'nin bulunmaması yumurtalık gelişimine neden olmaktadır.

TBF tarafından tetiklenen gen ekspresyon olayları, primordial germ hücrelerini çevreleyecek hücrelerin interselüler bağlantıların oluşumuyla sonuçlanır. Bu şekilde gonadal kordonlar medulla içine doğru ilerlemeye başlamaktadır. Erkeklerde mezonefrik orijinli hücreler, gonadal kordların dış tarafında birikmeye başlayarak peritübüler miyositleri oluşturmaktadırlar. Gonadal kordlar testiküler kordlara, daha sonra seminifer tübüllere dönüşmektedir. Efferent kanallar, rete testis ve mesonefrik kanal (Wolff kanalı) birbirine bağlanmaktadır. 8. haftanın sonlarına doğru testosteronun etkisi ile mesonefrik kanalın baş bölümünün sıkı sarılması ve epididimise dönüşmesi yönünde yönlendirilmesi ile kanalın diğer kısmı deferens kanal olarak kalmaktadır.

8. hafta sonrası, testis kordonları arasındaki bazı mezenkimal hücreler Leydig hücrelerine dönüşmektedir. Bu, testosteron üretimini daha da arttırmaktadır. Testiküler kordlar arasındaki mezenkim, her testisi lobullere bölen septaların gelişimine yol açmaktadır. Bu hücrelerin kesin kaynağı bilinmemektedir. Bu aşamadaki mezenkim, testiküler kordlar ve gelecekteki tunika albuginea arasında bağ dokusu tabakasını oluşturmaktadır. Sölom epiteli nihayetinde diğer boşluklarda olduğu gibi bir mezotele dönüşmektedir. Son olarak, testis skrotuma göç etmektedir. Testiste göç iki aşamada gerçekleşir; ilk aşama transabdominal göç, ikinci aşama ise inguinal kanal geçişidir (25).

4.2. Testis Anatomisi

Testisler, erkekte temel üreme organıdır. Oval şekilli olup yaklaşık 4-5 cm uzunluğunda 2-3 cm eninde ve 20-30 gr ağırlığında sağda ve solda olmak üzere bir çift halde testis torbası (skrotum) denilen deri bir kese içinde asılı durumda bulunurlar. Sol testis sağdakine göre biraz daha aşağıda yer alırken, sağ testis de sola göre %10 daha ağırdır (24, 30).

Sıcaklıkları vücut sıcaklığından 2 °C daha düşüktür, yani 34-35 °C'dir (31). Testisler erken fetal dönemde karın boşluğunda böbreklere yakın olarak yer alırlar. Fetüs

geliştikçe aşağıya doğru hareket eden testisler doğumdan hemen önce kanalis ingunalis yoluyla skrotuma inerler (24, 30). Bu inişleri sırasında karın ön duvarı tabakalarını da sürüklerler. Bu yüzden şu tabakalarla kaplıdırlar (32):

- a) Deri (Skrotum)
- b) Tunika dartos
- c) Fasia spermatika eksterna
- d) Fasia kremasterika
- e) Fasia spermatika interna
- f) Tunika vaginalis testis

Her bir testis fascia medialis (iç yan yüz), fascia lateralis (dış yan yüz), margo anterior (ön kenar), margo posterior (arka kenar), extremitas superior (üst uç) ve extremitas inferior (alt uç) kısımlarına sahiptir. Üst uca appendiks testis denilen küçük yassı bir yapı bulunur. Arka kenarın dış kısmı boyunca ise kıvrıntılı bir yapı olan epididimis yerleşmiştir. Funiculus spermaticus da margo posteriora tutunur. Testis içten dışa; tunica vasculosa, tunica albuginea ve tunica vaginalisin lamina visceralisi (epiorchium) olmak üzere üç tabaka ile çevrelenmiştir. Bu üç tabakaya capsula testicularis denir. Testis kapsülü sempatik ve parasempatik uyarılara yanıt vererek spontan kasılmalar yapar (33, 34).

Tunica vaginalisin testisi örten iç yaprağına (visceral yaprağına) epiorchium, daha dıştaki scrotumun iç yüzünü döşeyen parietal yaprağına periorchium adı verilir. Epididimisin tutunduğu peritonla örtülü olmayan bölümden ise testisin damar ve sinirleri girip çıkmaktadır. Tunica vaginalis'in altında testisler bütünüyle tunica albuginea adı verilen sıkı, sağlam bir bağ dokusuyla sarılmıştır (35). Tunica albuginea kalın, fibröz bir tabakadır ve testisin arka kenarından içeri girerek organa damar, sinir ve kanalların girip çıktığı bölge olan mediastinum testis adı verilen vertikal bir bölme oluşturur. Testis içine giren bu bölmelere septula testis denir (36). Testis parankimine ulaşan kan damarları, lenf damarları ve genital boşaltım kanalları mediastinum testis içerisinden geçmektedir. Dallanan mediastinum testis, parankimi yaklaşık 250 lobüle bölmektedir. Birbiriyle ilişkili olan bu lobüller içerisinde 1–4 adet seminifer tübül bulunmaktadır (22).

Tunica vasculosa; gevşek bağ dokusundan oluşan, tunica albugineanın iç yüzünü, lopçukları saran ve damar ağının bulunduğu tabakadır. Testisin arka tarafından çıkan küçük venler önce birleşerek plexus pampiniformisi, daha sonra da vena testikularisi

oluştururlar. Bu oluşum sağ tarafta vena cava inferior, sol tarafta vena renalis sinistraya açılır (35).

Kıvrımlı yapılarından dolayı tubuli seminiferi contorti olarak adlandırılan ve lobuli testis içinde yer alan kanalcıklar testis parankimini meydana getirir. Her bir testis kanalcığı tubulus rectus adı verilen düz bir kanalcıkla devam eder. Bu kanalcıklar metiastinuma sokulur ve burada rete testis denilen ağı oluşturur. Lobuli testislerde yapılan spermiumlar rete testis ve sonrasında gelen duktuli efferentes adı verilen kanallar aracılığıyla epididimise iletilir. Testislerden kan akışını; testis arterleri, kremasterik arterler ve deferential arterler sağlamaktadır. Testiküler arter, renal arterin hemen altındaki abdominal aortadan çıkmaktadır. İç kasık halkasının üstündeki spermatik kordun bir bileşeni olmakla birlikte sonunda pampiniform pleksusu oluşturan damar ağı ile özdeşleşmektedir. Spermatik korddaki karşı akımın neden olduğu ısı değişimi, normal bir erkekte rektal sıcaklığın 2-4 °C altına düşen testis kanını sağlar (37).

4.3. Testis Histolojisi

Testisler; androjenlerin üretimi ile endokrin fonksiyona, spermatogenez ile de bir ekzokrin fonksiyona sahiptir (38). Skrotum içinde yer alan testisler sıkı bağ dokusu kapsülü (tunica albuginea) ile sarıdır (39). Mediastinumdan tunika albugineaya kadar uzanan ince bağ dokusu bölmelerine septula testis (septum) adı verilir. Bu septumların her biri 1-4 seminifer tübül içerir şekilde organı 250 adet testiküler lopçuklara bölmektedir (40, 41). Seminifer tübüller, çok uzun yapıda olup lobül içerisinde kendi üzerine katlanarak kıvrımlar oluşturur. Tubuli rektiler; dar kanallı, kısa segmentler olup epiteli izoprizmatik veya alçak prizmatik epiteldir (23, 42). Seminifer tübüllerin her iki ucu, rete testisin boşluklarına açılır (43). Rete testis, geniş lümenli olup epiteli tek katlı yassı, alçak izoprizmatik veya alçak prizmatik epitel şeklindedir. Rete testis uç kısmına doğru genişleyerek düz tübüller yapıdaki yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes ile birleşir. Duktuli efferentes, epididimisin baş kısmına doğru oldukça kıvrımlı bir yapıya dönüşür. Seminifer tübüller tarafından salgılanan sıvı, rete testiste toplanır; rete testis kanalları da duktuli efferentes ile epididimin baş kısmına bağlanır (23, 42).

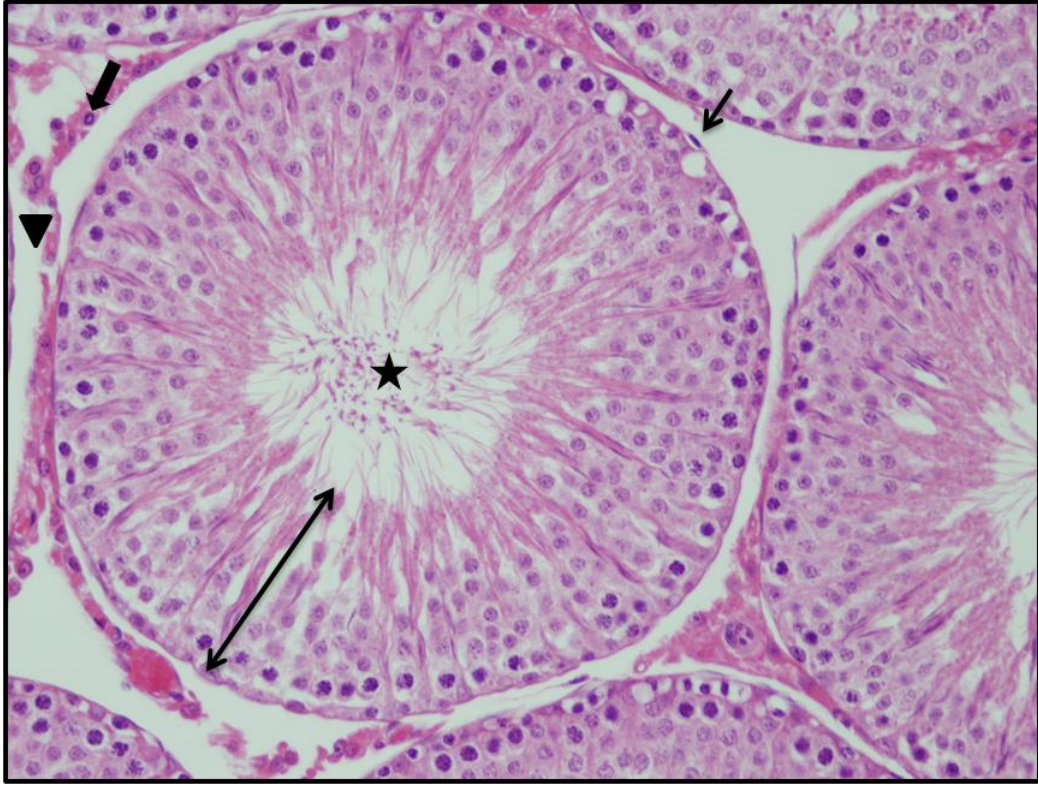
4.3.1. Seminifer Tübüller

Testisin interstisyel bağ dokusu arasına yerleşmiş olan seminifer tübüllerin her biri, 30-70 cm uzunluğunda ve 150 – 250 µm çapındadır. Seminifer tübül; tunika propria olarak

adlandırılan fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina, karmaşık bir germinal ya da seminifer epitelden ve devamında merkezi bir lümeninden oluşan özelleşmiş bir yapıdır. Bağ dokusu kılıfı olan tunika propriada, birbirine geçmiş ince tip I kolajen lif demetleri bulunmaktadır. En içte bazal laminaya bitişik bulunan tabaka düz kas özelliği gösteren yassılaştırmış miyoid hücreler ve kollajen liflerden oluşmaktadır. Bu miyoid hücrelerin ritmik kasılmaları ile spermatozoonların ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden boşaltım kanalı sistemine geçişi sağlanır (23, 42).

4.3.2. Seminifer Epitel

Seminifer epitel çok katlı, karmaşık bir yapıda olup, Sertoli hücreleri (destek hücreleri) ve spermatogenik seri hücrelerini içermektedir (42).



Resim 1. Seminifer tubullerin H&E boyama ile gösterimi. Seminifer tubulun lümeni (★), seminifer epitel (↔), interstisyel alan (▼) Leydig hücreleri (⬇) ve miyoid hücreler (→) görülmektedir (X 400).

4.3.2.1. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, testis histogenezi ve fonksiyonları için çok önemlidir. İlk zamanlarda bazı araştırmacılar bu hücrelerin yan sınırlarını ışık mikroskopunda göremediğinden bu hücrelerin sinsisyum oluşturdıklarına inanmışlardır. Bu hücreler ilk kez 1865'te fizyolog Enrico Sertoli tarafından tanımlanmıştır (44).

Sertoli hücresi, bazal membran üzerinde yer alan ve seminifer tübülün duvarını oluşturan, epitelyal kökenli bir somatik hücredir. Düzensiz şekilli bir çekirdek, belirgin nükleolus, düşük mitotik indeks, Sertoli-germ hücre bağlantılarının yanı sıra komşu Sertoli hücre membranları arasındaki özel sıkı birleşme kompleksleri bu hücreyi karakterize etmektedir. Sertoli hücrelerinin yüzey uzantıları germ hücrelerini çevreleyecek şekilde dışarı doğru uzanmaktadır. Bu, her bir germ hücresinin bir dizi bitişik Sertoli hücresi tarafından desteklendiği bir düzen sağlamaktadır (45). Ayrıca Sertoli hücreleri; sınırları iyi belirlenemeyen çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum, mitokondri, lizozom ve iyi gelişmiş golgi kompleksi ile az sayıda granüllü endoplazmik retikulum içeren hücrelerdir. Çekirdek etrafında, Charcot-Böttcher kristalleri olarak isimlendirilen protein yapısında kristalloid cisimcikler görülmektedir (46).

Sertoli hücresinin, germ hücrelerinin olgunlaşmasını kolaylaştıran birkaç farklı işlevi vardır:

1. Germ hücrelerinin geliştiği ve tübülün lümenine doğru ilerlediği bir fiziksel iskele sağlamaktadır.
2. Sertoli hücreleri arasında bulunan özel sıkı bağlantılar ile kan-testis bariyeri oluşturulmaktadır.
3. Germ hücre olgunlaşması için gerekli mikro ortamı sağlamaktadır.

Bu ayırt edici işlevler ayrıca fagositozu, sıvı salgılanmasını ve çeşitli moleküllerin üretimini de kapsamaktadır (47).

1970'lerde tanımlanan ilk ekstraselüler protein belirteçlerinden biri androjen bağlayıcı proteindir (ABP) ve o zamandan beri sayısız başka sekretuar ürün keşfedilmiştir. Seminifer tübül içinde yüksek seviyelerde androjenler de bulunmaktadır. Folikül uyarıcı hormon (FSH), Sertoli hücrelerinde bulunan, androjen bağlayıcı proteinin sekresyonunu sinyaliz eden yüksek afiniteli FSH reseptörlerine bağlanmaktadır. Sertoli hücreleri

tarafından salgılanan en önemli iki hormon anti-müllerian hormon (AMH) ve inhibindir. Anti-müllerian hormon embriyonik gelişimin kritik bir bileşenidir ve müllerian kanalların gerilemesinde rol oynamaktadır. İnhibin, FSH sekresyonunu baskılayan glikoprotein yapısındaki bir hormondur. Bazı araştırmacılar, serum inhibin B'nin infertil erkeklerin testislerinde, sperm varlığının ve bozulmuş testiküler fonksiyonun bağımsız bir belirteci olabileceğini öne sürmüşlerdir (47, 48).

Erişkin testiste, Sertoli hücreleri spermatogenez için yardımcı hücrelerdir. Spermatogonial kök hücrelerin farklılaşması için oyuk oluşturmakla birlikte gelişimsel germ hücreleri için yapısal destek, besin maddeleri ve büyüme faktörleri sağlamaktadır. Erişkin testisteki sperm oluşumunun Sertoli hücrelerinin sayısı ile ilişkili olması nedeniyle, gelişmekte olan testisteki Sertoli hücre çoğalmasının kontrolü, gelecekte üretilecek erkek germ hücreleri açısından çok önemlidir (49).

Sertoli hücre farklılaşması ve çoğalması erkek cinsiyet tayininde en önemli adımlardan biridir. FSH, Sertoli hücre farklılaşmasının ilk aşaması sırasında mevcut değildir. Bu nedenle, bu aşamada Sertoli hücre çoğalması diğer regülatörler tarafından kontrol edilir. Bir dizi endokrin bozucu ve inflamatuvar faktör, bu aşamada Sertoli hücre farklılaşmasını ve çoğalmasını bozabilmektedir (49, 50).

4.3.2.2. Spermatogenetik Hücreler

Spermatogenetik hücreler seminifer tübüllerde 4-8 tabaka halinde düzenlenmiş hücre serileridir. Bu hücreler bazal laminadan tübül lümenine doğru spermatogoniumlar, primer spermatositler, sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlar şeklinde yerleşmiştir. Bu germ hücreleri birbirini izleyen evrelerde sürekli bir değişim sürecindedirler (51).

4.3.2.2.1. Spermatogenez

Gametogenez, bir haploid hücrenin (n) mayoz ve hücre farklılaşması yoluyla bir diploid hücreden (2n) oluşturulmasıdır. Erkekteki gametogenez spermatogenez olarak adlandırılır. Spermatogenez, spermatogonyumun olgun spermatozoaya dönüşme sürecidir. Bu karmaşık işlem sırasında, ilkel totipotent kök hücreler genç hücreleri üretmek için bölünerek yaklaşık 70 günlük bir süreç ile spermatidlere dönüşmektedir (52). Spermatogenez mitoz ve mayoz bölünmeyi içermekle birlikte ön hipofizden FSH ve LH (Lüteinleştirici Hormon) ile düzenlenmektedir. Spermatogenez üç ana aşamaya ayrılabilir:

-Spermatositogenez evresinde; spermatogonyum bölünmeleri sonucunda oluşan hücrelerden spermatositler meydana gelmektedir (53).

-Mayoz evresinde; spermatositler, ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarının ve DNA miktarlarının eşit olarak her hücrede yarıya düştüğü spermatidleri oluşturmaktadır (54).

-Spermiyogenez evresi; spermatidlerin spermatozoon olarak adlandırılan kompleks bir yapıya farklılaşmasının gerçekleştiği safhadır (47).

Spermatogenezi başlatan ilk hücre spermatogonyumlardır. Bu hücreler, yaklaşık 12 µm çapında, bazal kompartmanda bazal lamina ile direk ilişki içinde olan diploid spermatogenik hücrelerdir. Sertoli hücreleri arasındaki tıkaçıcı bağlantıların altında bulunduklarından kan-testis bariyerinin dışında yer alırlar (53). Bu hücreler; kök hücre yenilenmesine katılarak sonradan spermatosite farklılaşacak olan hücreleri oluşturmaya devam etmekte ve çok sayıda hücre üretmek için mitotik bölünmelere uğramaktadırlar (55).

Spermatogonyum koyu tip A, açık tip A ve tip B spermatogonyumlar olmak üzere üç fonksiyonel şekildedir (53):

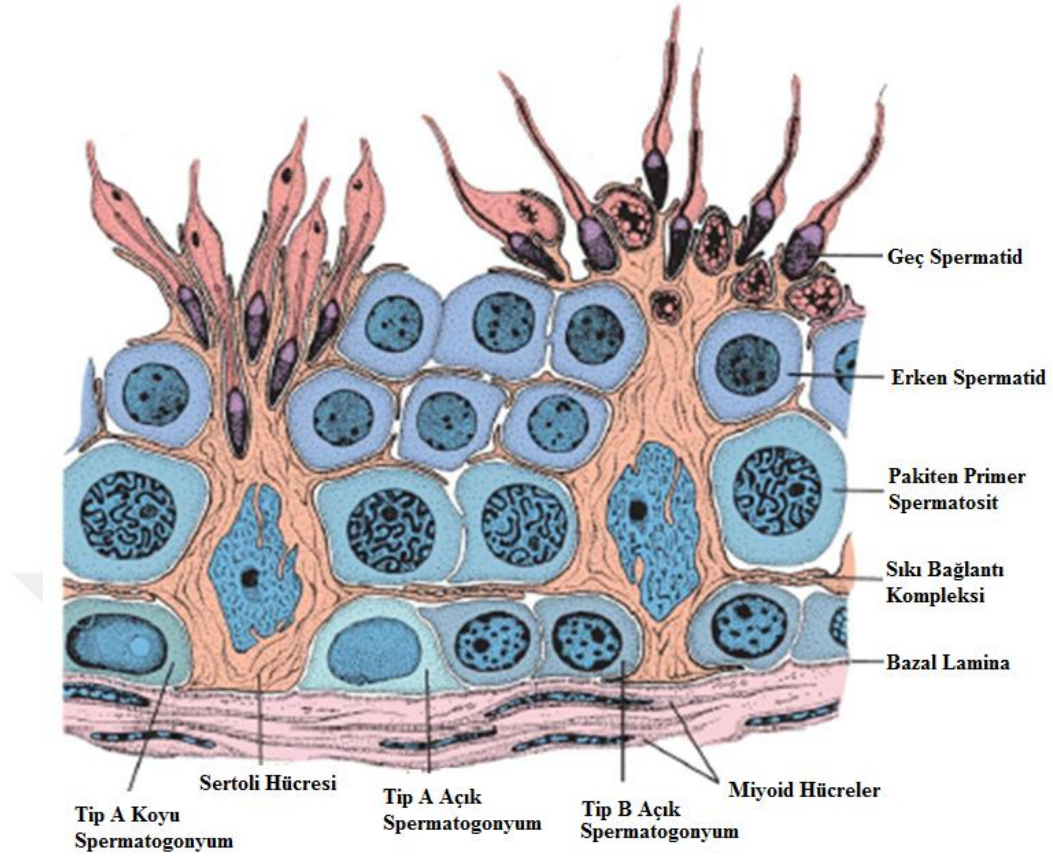
1-Koyu A tipi spermatogonyumlar; çekirdekleri oval ve heterokromatik olan bu hücreler küçük ve kubbe şeklindedir. Spermatogonyumun başlangıç havuzunu korurken doğrudan spermatid oluşumu sürecine katılmazlar. Ancak spermatogenez için kök hücrelerin sürekli olarak tedarik edilmesini sağlamaktadırlar. Mitozla bölünerek yeni koyu ve açık A tipi spermatogonyumları yapmaktadırlar.

2-Açık A tipi spermatogonyumlar; mitokondriyonlar, birkaç granüllü endoplazmik retikulum, az sayıda golgi kompleksi ve ribozomlar içermektedir. Çekirdekçikler çok belirgin ve çekirdek ökromatiktir. Yeni hücre üretmek için tekrarlanan mitotik bölünmelere uğrarlar. Bu hücreler, senkronize gelişime izin veren sitoplazmik köprülerle birbirlerine bağlanırlar. Ortaya çıkan hücreler B tipine dönüşmeden önce sırasıyla A1, A2, A3, A4 ve daha sonra da ara spermatogonyumları yaparlar.

3- B tipi spermatogonyumlar; küre biçiminde çekirdeğe ve merkezi yerleşimli çekirdekçiğe sahiptir. B tipi spermatogonyumların mitoz bölünmesiyle primer spermatositler oluşmaktadır (51, 53).

Primer spermatositler, germinal epitelin en büyük germ hücreleridir. Bunlar, birbirini takip eden iki mayoz bölünmesi geçirerek spermatid üretmektedir. İki ardışık hücre bölünmesi bir diploid primer spermatositten dört haploid spermatid verir (47). Mayoz öncesinde DNA'sını kopyalayan bu hücrelerde kromozom sayısı ($4n$) ve DNA miktarı ($2d$) iki katına çıkar (51).

Primer spermatositler, sekonder spermatosit oluşturmak için birinci mayoz bölünmesine girerler. İlk mayoz bölünmesinin profazı çok uzundur ve primer spermatosit en uzun ömüre sahiptir (47, 55). Yaklaşık 22 gün kadar süren profaz evresinde, kromozomlar görünür hale gelir. Tür içi çeşitliliği sağlayan crossing-over da mayoz I'de görülmektedir (22). Sekonder spermatositler, spermatidleri üretmek için ikinci mayoz bölünmesine uğrarlar. Sekonder spermatositler kısa ömürlü 23 kromozom ($22+X$ veya $22+Y$) içeren daha küçük hücrelerdir (47). Spermatositler, seminifer tübülün adluminal bölümünde, Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantıların hemen üzerinde bulunur. Bu sayede mayoz bölünmeler kan-testis bariyerinin içinde gerçekleşmiş olur. Mayoz bölünme sürecinin sonunda haploit sayıda kromozom içeren spermatidler oluşur. Spermatidler yaklaşık 7-8 μm çapında, küçük, yuvarlak şekilli hücrelerdir. Yoğunlaşmış kromatin bölgeleri içeren çekirdekleri ile ayırt edilirler (56). Spermatidler kemoterapiye ve radyoterapiye karşı duyarlıdır. Radyoterapi veya kanser kemoterapisinin sonlandırılmasının ardından, spermatogonyal kök hücreler spermatogenik süreci tekrar oluşturabilmektedirler. Post-mitotik Sertoli hücreleri bu tedavilere oldukça dirençlidirler (57).



Şekil 1. Seminifer tubul epiteli (Ross'dan, 22)

Spermatidler, **spermiyogenez** denilen bir hücresel değişim geçirirler. Bu spermatozoon üretiminin son aşamasıdır. Spermatidin, olgun spermiyum haline (spermatozoona) dönüştüğü bu süreç, dört ayrı evreye ayrılır:

1. Golgi Evresi: Granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenen ve döllenme için gerekli olan hidrolitik enzimler, golgi kompleksinde PAS-pozitif yapıdaki proakrozomal granüller şeklinde birikir. Daha sonra bu granüller birleşerek, akrozomal vezikülü oluştururlar. Giderek içeriği artıp genişleyen vezikülün konumu spermin ön kutbunu oluşturur. Sentriyoller ise akrozomun karşı tarafında hücre yüzeyine göç ederler. Sentriyol, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturacak olan dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki merkezi mikrotübülün parçalarının toplanmasını başlatır.

2. Başlık (Kep) Evresi: Akrozomal vezikül, yoğunlaşan çekirdeğin ön yarısını kaplar ve akrozom adını alır. Akrozom çekirdeğin üzerinde ayrı bir kapak oluşturur.

3. Akrozomal Evre: Bu evrede, hücrenin akrozomu içeren ön bölümü seminifer tübülün bazaline bakar. Çekirdek uzayıp yoğunlaşır. Sentriyollerden hücre yüzeyine dik

duranı, spermiyumun kuyruğunu yapacak bir flagellum oluşturur. Diğer, kuyruğun başlangıç kısmının çevresinde bir kuşak oluşturacak şekilde göç eder. Aynı süreçte sitoplazma flagellum çevresinde hareket edip onu sarar. Mitokondriler, flagellum orta parçası denilen proksimal kısmın etrafını sararak kalınlaşma oluştururlar. Orta kısım denilen bu bölgede mitokondriler sayesinde üretilen enerji ile spermatozoon hareketliliği sağlanır.

4. Olgunlaşma (Matürasyon) Evresi: Spermiyum olgunlaşma sürecini Sertoli hücresinde tamamlayıp kuyruklu hale geldiğinde, Sertoli hücresinden ayrılır ve lümende serbestleşir. Geri kalan sitoplazma artıkları Sertoli hücrelerince fagosite edilir (51, 54).

4.3.3. Spermatozoon Yapısı

Spermatozoon, DNA bakımından zengin, bölünmeyen ve son derece farklılaşmış karmaşık hareketli bir hücredir. Her sperm yaklaşık 60 µm uzunluğunda ve 1 µm genişliğindedir. Baş, boyun ve kuyruktan oluşmaktadır. Spermatozoonun normal başı oval olmakla birlikte uzunluğu 3-5 µm, genişliği 2-3 µm ve kalınlığı 1.5 µm'dir. Baş döllenme işlemi için nükleer materyaller içermektedir (28).

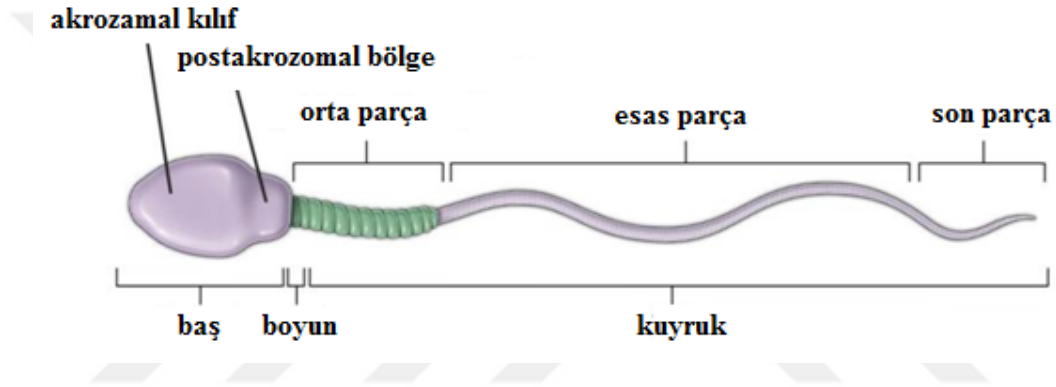
Baş kısmı yassılaştırmış çekirdek ve bunun anterior yarısını saran akrozomdan oluşmaktadır. Akrozom, sperm kafasını kapak gibi örter. Bu lizozom benzeri organel, spermin ovuma nüfuz etmesine aracılık eden hyalüronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve proteaz gibi hidrolitik enzimler bakımından zengindir (22, 28). Yumurtanın döllenebilmesi için, çoklu alanlarda plazma membranı ile dış akrozomal membranın kaynaşması sonucu meydana gelen akrozom reaksiyonu sırasında akrozomal enzimler serbest bırakılır (58). Bu sayede spermin penetrasyonu sonrasında gerçekleşecek olan fertilizasyon kolaylaştırılır.

Boyun, baş ve kuyruk arasında bir bağlantı oluşturmaktadır. Dar bir parça olup bir çift sentriol bulundurmaktadır. Distal sentriol, sperm kuyruğunun merkezi parçası olan aksoneme kaynaklık yapmaktadır. Ayrıca boyun, kaba liflerin başlangıcını da içermektedir (22, 59). Kırılgan ve dekapitatif spermatozoanın varlığı yaygın bir anormalliktir. Sperm kuyruğu spermatid aşamasında ortaya çıkarak orta, esas ve son parça olmak üzere üç kısımdan oluşmaktadır (47).

Orta parça, mitokondriler içermektedir. Mitokondriler hareket için gerekli enerjiyi sağlamaktadırlar (53). Bu mitokondriler, 9+2 diziliimli mikrotübüler aksonem ile dış yoğun lifleri sarmal şekilde kuşatmaktadır.

Esas parça, yaklaşık 40 µm uzunluğunda olup kuyruğun en uzun parçasıdır. Bu yapı yedi dış yoğun lifce sarılı merkezi bir aksonem ile bir fibröz kılıftan oluşmaktadır. Fibröz kılıf ve dış yoğun lifler keratin içermektedir. Keratin, spermin ileri hareketi esnasında mikrotübüler kayma ve kıvrılma için gereken protein iskeleti oluşturmaktadır.

Son parça, olgun spermde yaklaşık 5 µm uzunlukta olup kuyruğun çok kısa bir parçasıdır. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıf erken sonlandığından bu parça sadece aksonemden oluşmaktadır. Sperm, boyun bölgesinde oluşan ve bir kırbaç gibi distale geçen dalgalarla ilerlemektedir (22, 59).



Şekil 2. Spermatozoon yapısı (Ross'dan, 22)

4.3.4. İnterstisyel Doku

İnterstisyel alan, testislerde seminifer tübüllerin arasını oluşturan bağ dokusu yapısıdır. Bu alan sinirler, kan ve lenf damarları ve pencereci kapillerler ile doludur. Bağ dokusu; fibroblastlar, mast hücreleri, makrofajlar ve puberteye kadar pasif halde bulunan kümeleşmiş şekildeki Leydig hücrelerini içerir (42, 60).

4.3.4.1. Leydig Hücreleri

Önemli testiküler hücre soyundan biri de Leydig hücreleridir. Leydig hücreleri, mesonefrik mezenşimden göç eden steroidojenik öncü hücrelerden kaynak almaktadır (50, 61). Bu hücreler, AMH, desert hedgehog (DHH) ve FGF9 gibi Sertoli hücre sinyalleri etkisi altında, embriyonik gelişiminin 7. haftasında hızla çoğalmaya başlamaktadır (62). Leydig hücrelerinin ilk nesli testislerin belirlenmesinden sonra ortaya çıkan fetal tiptir. Diğer Leydig hücre tipleri ergenlik çağından önce ve ergenliğe eriştikten sonra ortaya

çıkılmaktadır (63). Gebelik ortasında, toplam testiküler hücre kütlelerinin %40'ını oluşturlar. İnsan gebeliğinin 8. haftasında fetal tip Leydig hücreleri testosteron ve diğer androjenleri üretmeye başlamaktadır (64).

Başlangıçta, testosteron ve diğer androjenlerin sentezi insan koryonik gonadotropini (hCG) tarafından düzenlenir (64). Ek olarak, fetal Leydig hücrelerinde adrenokortikotropik hormon (ACTH) reseptörünün ekspresyonu, ACTH'yi Leydig hücresi gelişiminin önemli bir regülatörü haline getirir. Testiküler ve adrenokortikal dokunun ortak kökeni, bu organları birlikte etkileyen anormalliklerle de desteklenmektedir (65).

Leydig hücreleri testisin seminifer tübülleri arasındaki interstisyel alan olarak adlandırılan kısımda bulunur ve doğumdan sonraki ilk 2-3 ay boyunca sayılarını arttırır (64). Testis interstisyumundaki bu hücreler; bağ dokusu içerisinde tek tek veya gruplar halinde bulunan, granüler sitoplazmalı, sitoplazmalarında yuvarlak bir çekirdek, belirgin çekirdekçik içeren düzensiz şekilli hücrelerdir. Aralarındaki doğrudan iletişimi çok sayıdaki gap junctionlar sağlamaktadır (66). Bol miktarda küçük lipid damlacıkları bulunduran bu eozinofilik hücrelerin yapılarında lipofuskin pigmenti, çubuk şekilli Reinke kristalleri ve tübüloveziküler kristaller bulunmaktadır. Bu hücreler bazen kan damarlarıyla ilişkili olabilir; hücreler 14–20 µm boyutundadır. Testosteron üretimi hücrenin düz endoplazmik retikulumunda ve mitokondrilerinde enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir (22, 23).

Leydig hücreleri erkek cinsiyet hormonu olan testosteronun başlıca kaynağıdır. Ayrıca steroidogenez için gerekli SF1 ve insülin benzeri faktör-3 (INSL3) üretirler (67). INSL3 ve reseptörü RXFP2, androjenler ve AMH ile birlikte, testiküler iniş sürecinde yer alırlar. Testiküler inişin ilk (transabdominal) fazı, insan fetüslerinde, 8-16. haftalar boyunca gerçekleşir (68). INSL3, Leydig hücresi tarafından üretilen ve testosteron gibi testiküler inişte çok önemli rol oynayan bir başka hormondur (69).

4.3.5. Kan Testis Bariyeri

Kan-testis bariyeri, seminifer epitelde bitişik Sertoli hücreleri arasındaki bir bazal bölüm (kompartman) ile bir adluminal bölüm arasında oluşur. Bazal bölüm, kan yoluyla taşınan maddeler için erişilebilir hücre dışı alandır. Ancak bariyerin tıkama özelliğinden dolayı bu maddelerin doğrudan adluminal bölüme ulaşması engellenir. Adluminal bölüm olgun germ hücreleri içerirken, bazal bölüm spermatogonia ve erken spermatositleri içerir

(70). Kan-testis bariyerinin farklı işlevsel bileşenleri; Sertoli hücreleri, peritübüler miyoid hücreler ve yakındaki kılcal damarlarda bulunan endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantı komplekslerini içerir. Bu bariyerin klinik önemi, puberte sonrası testiküler hasardan testis adlumsal kompartımanının korunması ve antisperm antikörlerinin gelişiminin engellenmesidir (71).

4.4. Epididimis

Spermatozoonlar, hareket edebilme kapasitesini, bir yumurtayı tanıma ve dölleme yeteneğini tamamen epididimis içinde kazanmaktadır. Spermatozoanın bu dönüşümüne sperm olgunlaşması denir. Sperm motilitesi ve dölleme kapasitesi androjene bağımlı süreçlerdir. Androjenlerin kaybı epididimal ağırlık kaybına ve epididimal sekresyonların bileşiminde değişikliklere neden olmaktadır (72).

Epididimis; Wolffian (mesonefrik) kanaldan türeyen, spermlerin geçmesi gereken çok kıvrımlı bir kanaldan oluşan bir organdır. Epididimis, testisin üst ve alt kutbuna bağlanmakta ve posterior yüzüyle de yakın ilişkili olarak yer almaktadır. Bu organ, baş (caput epididymidis), orta (corpus epididymidis) ve kuyruk (cauda epididymidis) olmak üzere üç ana bölüme ayrılmaktadır. Baş kısmı, testisin üst kutbunun, kuyruk kısmı ise testisin alt kutbunun üstünde bulunmaktadır. Baş kısmına duktuli efferentes bağlanır ve bu kısım sperm topluluğu içermez. Epididimis skrotum ve spermatik kordona yağlı fibröz bir bağ dokusu ile bağlanmakta ve posterior yönü hariç tunika vajinalisin visseral tabakası tarafından çevrilmiştir. Rete testisten yaklaşık 10 ductuli efferentes ortaya çıkmakta ve sonunda tek bir epididimal kanalı oluşturmak üzere bir araya gelmektedir (73).

Epididimise vasküler besleme iki kaynaktan yapılmaktadır. Kan, kaput ve korpus kısımlarına, testiküler arterin üst ve alt epididimal dallarından; kauda kısmına ise deferential arter dallarından sağlanmaktadır. Bu kan temini, damarların dolanbaçlığı ve çok sayıda anastomotik iletişimi ile karakterizedir (74).

Epididimisten alınan enine kesitte tübüllerin iç ve dış yüzeylerinin sınırları düz olup, etrafları bağ dokusu ve düz kas hücreleriyle çevrelenmektedir. Tübül epiteli yalancı çok katlıdır ve uzun, hareketsiz, stereosilyalı yüksek prizmatik esas hücreler ile küçük bazal hücreler bulundurmaktadır. Stereosilyumlar uzun mikrovilluslardır (23).

Epididimisin üç ana fonksiyonu; spermin olgunlaşması, taşınması ve depolanmasıdır. Epididimis yolu ile ulaşım yaklaşık bir hafta sürmektedir. Taşıma, düz

kasların epididimal epitelyum çevresinde kasılmasıyla sürekli bir sıvı hareketi şeklinde sağlanmaktadır. Sperm, epididimisin farklı yerlerinde farklı fonksiyonlara erişir. Spermatozoa, kaput (baş) bölgesinden geçerken motilite kabiliyeti elde etmekte, korpusu (gövde) geçerken dölleme becerisi kazanmaktadır. Kauda bölgesi ise boşalmaya kadar spermatozoayı depolar (75).

Efferent kanallardaki hareketli silyumlar sayesinde spermler, seminifer tübüllerden epididimise taşınmaktadır. Epididimis epitelindeki stereosilyumlu esas hücreler ise spermlerin geçişi sırasında testiküler sıvıyı emmekte ayrıca seminifer tübüllerde uzaklaştırılamayan artık maddeleri ve bozulan sperm hücrelerini fagosite etmektedir. Dahası bu hücreler, spermlerin dişi üreme yollarında depolanmasına kadar kapasitesini baskılayan bir glikoprotein salgılamaktadır. Bazal hücreler ise kök hücre özelliğindedir (23).

Proksimal epididimal kanalı geçmek esas olarak epididimal kanalı çevreleyen düz kasın spontan, peristaltik kasılmalarına bağlıdır. Diğer katkıda bulunan faktörler arasında spermin taşınmasına yardımcı olan hareketli silyanın yanı sıra salgılanan testis sıvısının akışı da bulunmaktadır. Epididimis yoluyla sperm nakil süresinin yaş ve cinsel aktiviteyle ve günlük sperm üretimindeki farklılıklarla doğrudan ilişkili olarak değiştiği gösterilmiştir (76).

Epididimal hücreler arasındaki sıkı bağlantı kompleksleri; spermatozoaya bağışıklık kazandıran, önemli bir fizyolojik ve anatomik bariyer olan kan-epididim bariyerini oluşturur. Spermatozoa immünojeniktir ve bağışıklık sisteminden korunmalıdır. Epididim ayrıca kauda bölgesinde depolanan spermatozoayı; katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidanların yerel etkileri yoluyla oksidatif saldırıdan koruma yeteneğine de sahiptir. Epididimis içindeki aktivitenin nihai sonucu olarak, yumurtayı dölleme yeteneğine sahip, yaşayabilir spermatozoa oluşur (77).

İnsan spermatozoonları epididim yolunda ilerlerken, hareketliliklerinde artış olduğu gösterilmiştir. Caput epididimise kıyasla, epididimin daha distal kısımları, etkili hareket edebilen daha yüksek kapasiteli bir spermatozoa oranına sahiptir (78). İnsan epididimisindeki spermlerin geçiş süresi ortalama 12 gündür; fakat bu oldukça değişkendir ve bazı spermler epididim yolunu 2 gün gibi kısa bir sürede ilerlemektedir (79). İnsanlarda, spermatozoanın ana depolama yeri, toplam spermatozoa sayısının yaklaşık yarısının

depolandığı cauda epididimistir ve sperm canlılığı ve hareketliliğinin korunmasının diğer türlerde olduğu kadar etkili olmadığı ileri sürülmüştür (80).

4.5. Apoptoz

Apoptoz, dokuların erken gelişimi ve büyümesinde önemli bir rol oynayan ve hücrel hemostazın devam etmesi için gerekli olan bir tür hücrel ölümdür. Apoptoz, doku hasarına neden olmaksızın, siklusun kontrollü bir şekilde düzenlenmesini ve istenmeyen zamanlarda istenmeyen hücrelerin çıkarılmasını ifade eden programlanmış hücre ölümüdür (81, 82).

Apoptoz terimi ilk defa 1972 senesinde Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (83). Apoptotik hücreler, organizmanın bazı dokularında sürekli olarak oluşur ve bu süreç tüm yaşam boyunca devam eder. Böylece ölüm (apoptoz) ve reformasyon (mitoz) bu dokularda hemostaz sağlayarak dinamik bir dengede ilerler (84). Hücreler apoptoza karar verdikten sonra, mitokondriden sitokrom-c sitoplazmaya salınarak hücreleri parçalamaktan sorumlu kaspaz denilen proteolitik enzimleri aktive eder (85).

Hücrenin sitoplazmik iskeletinin bozulması, apoptozise yol açarken, sitoplazmanın stabilizasyonu apoptozisi engeller. Apoptoz için sinyal alınmasının ardından hücrede birçok biyokimyasal ve morfolojik değişiklik görülür. İlk olarak hücre yoğunlaşmaya başlar, hücrel iskelet parçalanır ve hücrel membran çözülür. Nükleer DNA birçok parçaya ayrılır (86). Sitoplazma küçülmeye başlar. Daha sonra çekirdek parçalara ayrılır (87). Hücreler küçülmeye devam ederken, kendilerini makrofajlar tarafından uzaklaştırılmasına izin veren bir formda paketler. Makrofajlar tarafından fagositozlarını teşvik etmek için, apoptotik hücreler makrofaj tepkisini tetikleyen plazma membranı değişikliklerine maruz kalırlar. Bu değişikliklerden biri, fosfatidilserinin, hücrenin iç kısmından dış yüzeye translokasyonudur. Apoptozun son aşamaları genellikle membran kabarcıklarının ortaya çıkması ve apoptotik cisimler olarak adlandırılan küçük keseciklerin görünümü ile karakterizedir (88).

Apoptozis tanı yöntemleri arasında apoptotik hücre morfolojisinin değerlendirildiği ışık, floresan, lazerli konfokal, elektron ve faz-kontrast mikroskop incelemeleri yer alır. DNA fragmentasyonlarının belirlenmesinde agaroz jel elektroforezi, TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick and labeling), in situ hibridizasyon tekniği;

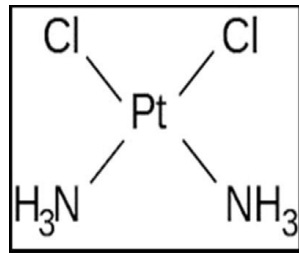
apoptozise özgü proteinlerin saptanmasında ise anneksin-V yöntemi ile flow sitometri kullanılır (89, 90).

Hematoksilen boyası kromatini boyadığından dolayı ışık mikroskopunda hematoksilen-eozin (HE) ile boyanan preparatlarda apoptotik hücreleri nükleus morfolojilerine göre değerlendirmek mümkündür. Hücresel küçülme, kondanse olmuş ve çekirdek zarının periferinde toplanmış kromatin, karyoreksis ve karyopiknozis görülebilir (91).

DNA kırıklarının in situ olarak tanınması TUNEL yöntemi ile sağlanır. Konvansiyonel parafin kesitlerde, terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) ve nonizotopik işaretli nükleotidler (sıklıkla biyotinli dUTP) kullanılarak apoptotik parçalanma sonucu DNA uçlarının in situ işaretlenmesinin ardından floresan veya enzimatik görüntülenmesi apoptotik hücreleri diğer hücrelerden ayırt etmektedir (92, 93).

4.6. Cisplatin

Cisplatin “Cis-diamminedichloroplatinum (II)” açık formüllü, kare düzlemsel geometriye sahip, amonyum ve klor atomları ile çevrili ağır metal (platin) koordinasyon bileşiğidir (Şekil 3). Bileşiğin cis ve trans olmak üzere iki izomeri vardır. Cis formu sitotoksiktir ve suda çözünme özelliğine sahiptir. Oda sıcaklığında beyaz veya koyu sarı ya da sarı-turuncu kristal tozdur (94).



Şekil 3. Cisplatinin kimyasal yapısı (Shahid'den, 95).

Peyronie'nin klorürü olarak bilinen Cisplatin dünyada ilk olarak 1845 yılında Michele Peyronie tarafından sentezlenerek tanımlandı (96). Kimyasal yapısı ilk olarak 1893 yılında Alfred Werner tarafından aydınlatılmıştır. Sonrasında Cis'in antineoplastik aktivitesi 1965'te Amerikan biyofizikçi ve kimyacı Barnett Rosenberg tarafından tesadüfen bulunmuştur (97).

1960’larda sitotoksik özelliklere sahip olduğu keşfedilmiş, 1965 yılında Rosenberg ve ark. tarafından *Escherichia coli* bakterisinden kimyasal bileşik olarak izole edilmiş ve potansiyel tümör büyümesini baskılama özellikleri çalışılmıştır (96).

İlk kez 1971 senesinde kanserli hastalarda başarıyla uygulanmaya başlanmıştır. İlk klinik çalışma 1972 yılında Rossof ve arkadaşları tarafından yayınlanmıştır (98). 1970’lerin sonunda, germ hücre kanserlerinin sistemik tedavisinde anahtar bileşen olarak yerini almıştır. Kanserde yaygın olarak kullanılan birçok kemoterapi ilacı arasında, Cisplatin en çok ilgilenilenlerden biridir (99). Cisplatin, 1978’de Amerika Gıda ve İlaç Kurumu tarafından yumurtalık ve testis kanserinde kullanılmak üzere ilk tanımlanmış ve onaylanmış platin bileşiktir (100).

Klinik çalışmalarda, cisplatin genellikle güçlü antitümör aktivitesi nedeniyle seçilir. Testis, yumurtalık, mesane, serviks, özofagus, baş-boyun tümörleri ve küçük hücreli akciğer kanserinin tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaçtır (101). Ancak renal toksisite, bulantı, kusma gibi birçok yan etkileri mevcuttur (102).

4.6.1. Cisplatinin Hücre İçine Alınışı

Cisplatin kemoterapisi; Cis’in intraperitoneal veya intravenöz uygulanmasını içerir (103). Cis’in, uygulama sonrası hemen hemen tüm dokulara ve hücre içi organellere dağıldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte yüksek konsantrasyonlar böbrek, karaciğer ve bağırsakta, en düşük konsantrasyon ise beyinde bulunmuştur (104, 105). Hücre içinde Cis esas olarak sitosol, mitokondri, çekirdek ve lizozomlarda birikmektedir (106). Düşük moleküler ağırlığı ve değişmeyen karakteri nedeniyle, uygulandıktan 5 gün sonra Cis’nin %27-45’i idrar ile vücuttan atılır, kalan kısmı ise vücutta ≤ 50 gün boyunca tutulur (107).

İlk zamanlarda Cis pasif difüzyon yoluyla hücre içine alındığı düşünülmüştür. Fakat yapılan son çalışmalar bir bakır transport proteini olan ‘*copper transporter 1*’in (CTR1) cisplatinin hücre içine aktif olarak alınmasında etkili olduğunu göstermiştir (94). İnsan hücrelerinde, cisplatinin, CTR1’in hızlı bozunmasını tetiklediği ve bunun sonucunda cisplatin akışının azaldığı ve ilaca direnç kazanıldığı teyit edilmiştir (108, 109).

İlacın aktivitesi, ortamda bulunan klor iyonu konsantrasyonundan etkilenir. Cis yüksek konsantrasyonda klorür iyonları (100 mM) nedeniyle kan içinde bozulmadan kalır. Bununla birlikte, Cis hücrelerin içinde, düşük klorür iyonu konsantrasyonunda (<103 mM) aktivitesini artırır. Cis, bir veya her iki klorür grubunun, pozitif yüklü türler üreten su veya

hidroksil ligandları ile değiştirilmesi sonucu hücre içi hidrolize uğrar. Bu sulandırılmış Cis formları, biyomoleküllerin nükleofil merkezleriyle kolayca reaksiyona girebilir ve sitotoksik hidroksil radikallerini oluşturmak üzere hidrojen iyonlarını kaybedebilir (110). Plazmada, toplam platinin sadece %2'si sulandırılmış formda bulunur; bununla birlikte Cis hücrenin içine girdiğinde bu oran %42'ye çıkmaktadır (111).

4.6.2. Cisplatinin Etki Mekanizması ve Toksisitesi

Metaller, insan hücresindeki biyolojik işlemlerin çoğu için gerekli olsa da, cisplatin apoptozisin indüklenmesine neden olan bir metalik-platinyum katyonudur (112). Cisplatinin birçok mekanizmada rol oynadığı bulunmuştur. Son kırk yıldır, birçok hücrel hedef belirlenmiş ve bunlar 5 bölüm altında toplanmıştır.

- (1) DNA hasarı
- (2) Sitoplazmik organel disfonksiyonu: endoplazmik retikulum stresi ve mitokondriyal disfonksiyon
- (3) Hem kaspaz bağımlı hem de ölüm reseptör aracılı apoptotik yollar
- (4) Oksidatif stres: Reaktif oksijen türlerinin oluşumu ile
- (5) İnflamasyon: Tümör nekroz faktörü ve diğer kemokinlerle apoptoz indüklenmesine aracılık etmektedir (113).

En iyi bilinen mekanizma DNA üzerindeki etkisidir (112). Cis'in hücrel ortam ile etkileşimi, kendisini DNA'ya yüksek afinitesi olan pozitif yüklü bir elektrofile dönüştürmekte ve DNA çapraz bağları oluşturmaya neden olmaktadır (94). DNA'daki guanin ve adenin N7 atomları, platin kompleksleri için ana bağlanma bölgeleridir (114). Cis sitotoksitesi, guanin moleküllerinden N⁷ ve O⁶ arasında interstrand veya intrastrand çapraz bağlanması ile ilişkilidir (115). İntra veya interstrand çapraz bağları, çift sarmalın hem bükülmesine hem de gevşemesine sebep olarak DNA yapısında büyük lokal çarpıklıklarına neden olabilmektedir. Çapraz bağlardan *cis*-Pt(NH₃)₂-d(GpG) (toplamın %60-65'i) ve *cis*-Pt(NH₃)₂-d(ApG) (22–30%) etkileşimin en fazla oluşan yapılarıdır (114). DNA-platin kovalent bağları replikasyon, transkripsiyon, translasyon ve DNA onarımı dahil olmak üzere temel hücrel süreçleri inhibe ederek kanser hücrelerinde apoptoza neden olmaktadır (115).

Oksidatif stres, cis toksisitesinde yer alan en önemli mekanizmalardan biridir. Mitokondri, Cis kaynaklı oksidatif stresin birincil hedefi olup, mitokondriyal protein sülfhidrit grubunun kaybı, kalsiyum alım inhibisyonu ve mitokondriyal membran potansiyelinin azalması ile sonuçlanır (116). Cis hücre DNA'sında meydana getirdiği sitotoksik etkilerin yanı sıra, mitokondriyal DNA'ya dört ila altı kat daha yüksek oranda toksik etkisi yapmaktadır (117). Mitokondriyal DNA (mtDNA) ile etkileşime girerek mtDNA replikasyonu ve mitokondriyal gen transkripsiyonunu inhibe etmektedir (110). Değiştirilmiş mtDNA, elektron taşıma zincirinde yer alan anormal ve/veya fonksiyonel olmayan proteinlerin sentezine yol açarak mitokondriyal disfonksiyona neden olmaktadır. Cis ile indüklenen mitokondriyal fonksiyonel hasar, bozulmuş solunum zinciri yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) aşırı üretilmesine ve hücrel oksidatif stresin indüklenmesine neden olmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi Cis tedavisinin dozu ve süresine bağlıdır (118). Cis aracılığıyla oluşturulmuş reaktif oksijen türleri kaspazların aktivasyonunu indükleyerek apoptozun uyarılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Tüm kaspaz üyeleri arasında, kaspaz-3 özellikle hücre iskeletinde bozulmaya, nükleer ölüme ve diğer hücre değişikliklerine neden olan önemli bir apoptotik efektördür (119).

Cisplatinin reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunda rol oynadığı, tümör baskılayıcı protein p53'ü etkilediği, ölüm reseptör-tümör nekroz faktörü etkileşimi ve intrinsik kaspazlar yoluyla apoptozisi indüklediği ve mitokondriyal disfonksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, cisplatin apoptozisi teşvik eden sitokrom c ve kaspazların mitokondriyal salınımına neden olmaktadır (112, 120). p53 ve p38 proteinlerinin ve ekstraselüler regüle edici kinaz 1/2 (ERK1/2) sinyal yollarının aktivitesini de arttırmaktadır (121). Mitokondrinin yanı sıra endoplazmik retikulum (ER) üzerindeki stres yoluyla hücrede kalsiyum sinyalizasyonunu etkilemektedir (112).

Cisplatin nefronun farklı bölgelerinde farklı nefrotoksik etkilere sahiptir. Damar yaralanmasının yanı sıra tübüler hasara, interstisyumda inflamatuvar hasara neden olmaktadır (122).

Cisplatinin birçok sistem üzerinde toksisitesinin olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, gastrointestinal toksisite, renal disfonksiyon, hepatotoksisite, nörotoksisite, miyelosupresyon, spermiotoksisite ve ototoksisite Cis'in iyi bilinen toksik etkileridir ve bu toksisite profili klinik etkinliğini büyük ölçüde azaltmıştır (107).

En yaygın Cis ile ilişkili klinik semptomlar arasında, bulantı, kusma, anoreksiya, kilo kaybı, bozulmuş gastrointestinal fonksiyonlar, diyare, gecikmiş mide motilitesi, mukozit, malabsorbsiyon ve tedavi rejiminin tamamlanmasından sonra uzun süre devam edebilen mukozal bariyer bozukluğu yer almaktadır (123, 124). Kemoterapi alan hastaların yaklaşık %70-80'inin bulantı ve/veya kusma yaşadığı, %67'sinde diyare olduğu tahmin edilmektedir. Bu rahatsız edici doza bağlı yan etkiler, hastanın yaşam kalitesi üzerinde önemli bir olumsuz etkiye sahiptir ve aynı zamanda doz azaltımlarına, gecikmelere ve hatta kanser tedavisinin kesilmesine de yol açabilmektedir. İshal, özellikle de nötropeni ile birlikte ortaya çıktığı zaman, Cis kemoterapisinin ciddi, zayıflatıcı ve hayatı tehdit eden bir komplikasyonu haline gelebilmektedir (123).

4.7. Oksidatif Stres

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve tükenmesi arasındaki dengesizliğin sonucu olarak, aşırı miktarda ROS artışı oksidatif stresi tanımlamaktadır. Aynı zamanda oksidatif stres, artmış serbest radikal oluşumunun yanı sıra koruyucu antioksidan savunma sisteminin azaltılmış aktivitesinin de yansımasıdır (125).

Serbest radikaller, bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektrona sahip atom veya moleküllerdir. Bunlar, metabolik süreçler ve çevresel oksidanların etkisi ile endojen ve eksojen kaynaklı olabilmektedir (126). Endojen stres genellikle sinyal yollarından, metabolik veya inflamatuvar süreçlerden türetilmekte olup hücre içi kökene sahiptir (127).

Serbest radikaller; hücresel solunum, fagosit aktivasyonuna neden olan mikrobiyal enfeksiyonlar, yoğun fiziksel aktivite, sigara dumanı, alkol, iyonize veya UV ışınlar, pestisitler veya ozon gibi toksinlerin etkisi ile de üretilebilmektedir. Fagositlerde oluşumu, çeşitli bakteri ve mantar türlerine karşı savunma mekanizmasında çok önemlidir (125).

ROS; normal metabolik süreçlerin bir yan ürünü olarak oluşturulan, stabil olmayan, reaktif, kısmen indirgenmiş oksijen türevlerine değinen kolektif bir terimdir (128). Oksidatif stres koşullarında üretilen aşırı ROS; hücresel proteinlere, lipidlere ve DNA'ya zarar verebilir ve hücrelerde ölümcül hasarlara neden olabilir (116). Bu radikaller bağışıklık sisteminde, nöral sistemde, enfeksiyonda ve kanser gelişiminde önemli bir modülatör faktör olarak tanımlanmaktadır (129, 130).

Fizyolojik koşullar altında, ROS sürekli olarak mitokondri tarafından üretilmektedir. En yaygınları süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) ve singlet oksijendir (1O_2) (131).

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelir (132). Bu nötrofiller, monositler, makrofajlar ve eozinofiller tarafından sürekli sentezlenmektedir (133).

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit veren herhangi bir sistem tarafından üretilir. Oksidazların (ürat oksidaz, glukoz oksidaz, D-aminoasit oksidaz) mevcudiyeti, iki elektronun moleküler oksijene aktarılmasıyla doğrudan hidrojen peroksit sentezine neden olabilir. H_2O_2 , metal iyonlarıyla etkileşimi sonucu yüksek oranda reaktif radikal üretebilir (134). H_2O_2 'nin doğrudan etkisi; hem protein yapısına yapılan saldırı ile demir salınımını, enzim inaktivasyonunu, DNA, lipid, -SH grupları ve keto-asitlerin oksidasyonunu içerir.

Fenton tipi reaksiyonlardan kaynak alan hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$), yüksek derecede zarar verebilen moleküllerdir. Bunlar DNA, proteinler, lipidler, amino asitler, şekerler ve metaller ile etkileşime girebilen en güçlü oksitleyici radikaller olarak rapor edilmiştir. Bu reaksiyonlar hidroksil radikallerinin reaktivitesi, kısa ömrü ile ilişkilidir ve hidrojen çıkarma, eklemenin yanı sıra elektron transferini içerir (135, 136).

Singlet oksijen, eşleşmemiş elektronlara sahip olmadığı için radikal özellikte değildir. Serbest radikal reaksiyonlarını başlatır ve benzer reaksiyonların sonunda da oluşmaktadır (137). Bunlar sitoplazmik membranların fosfolipid, glikolipid, gliserid ve sterol yapısındaki doymamış asitleriyle tepkimeye girerek peroksitler, aldehitler, hidroksi yağ asitler, alkoller, etan ve pentan gibi birçok lipid peroksidasyon ürününü meydana getirirler (138).

ROS, farklı biyomoleküller, lipidler, DNA, proteinler ile reaksiyona girer ve bunlarda oksidatif hasara neden olur. Bu reaksiyonlar arasında lipid peroksidasyonu, hücre ve membran proteinlerinden tiyol gruplarının uzaklaştırılması, DNA zincir kopmaları ve baz değişiklikleri yer alır (139).

Lipit oksidasyonu, hücre zarlarına karşı zararlı bir potansiyele sahiptir. Doymamış yağ asitleri esas olarak oksidasyona karşı hassas olduğundan $OH^{\cdot}$ ile peroksidasyona başlamaktadır (140). Lipidler üzerindeki oksidatif saldırı aynı zamanda malondialdehid ve

4-hidroksinonenal gibi reaktif aldehytlerin oluşumuyla sonuçlanır. 4-hidroksinonenal proteinlere bağlanabilir ve işlevlerini bozabilir (141). Malondialdehit (MDA), apraz bağ oluşturmak için proteinler veya DNA zerindeki birincil aminler ile reaksiyona girebilen bir dialdehittir (142).

4.8. Antioksidanlar

Reaktif oksijen radikallerinin oluşmasını ve bu radikallerin ortaya çıkardığı hasarları engelleyen savunma sistemlerine “antioksidan savunma sistemleri” ya da “antioksidanlar” denir (143). Antioksidanlar biyolojik sistemi, serbest radikallerin neden olduğu zararlı oksidatif süreçlerden koruyarak oksidatif stresi en aza indirmeye, kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve yaşlanma riskini azaltmaya yardımcı olmaktadır.

Superoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), katalaz (CAT), lipitte znen E vitamini, karotenler, suda znebilir C vitamini gibi vcttaki enzimatik ve non-enzimatik antioksidanlar ile birlikte çoğunlukla meyve ve sebze tüketiminden elde edilen diyet antioksidanları, serbest radikallere karşı büyük bir denge kurmaktadır (144).

SOD, süperoksit radikalini O_2^- hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) eviren enzimatik bir antioksidandır. İnsanlarda SOD’un üç formu bulunmaktadır. Bunlar; sitozolde bakır ve çinko içeren form, mitokondride manganez içeren form ve ekstrasellüler sıvılarda bulunan formdur.

GSH-Px, hücrelerin sitoplazmasında bulunup H_2O_2 ’den kaynaklanan oksidatif hasara karşı hücreleri koruyarak H_2O_2 ’den OH^- ’nin oluşmasını engellemektedir. GSH-Px, her biri bir selenyum atomu içeren dört protein alt biriminden oluşmaktadır (145).

Çoğunlukla meyve ve sebze tüketiminden elde edilen diyet antioksidanları, farklı biyomolekül sınıflarına mensup, farklı renklerde, çoklu biyoaktif etkilerden sorumlu yaygın bir grup molekülden oluşmaktadır. Bunlardan bazıları kanser ve benzeri hastalıkların önlenmesinde daha önemli bir rol oynarken, bazıları ise dejeneratif hastalıklarla daha etkin mücadelede kullanılmaktadır (146).

4.9. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, diğer adı ile polifenoller, bitkilere renklerini vermekte ve onları pek çok dış faktöre karşı korumaktadır (147). Bitkiler, sekonder metabolitler olarak 8000’den fazla farklı polifenol üretmektedir. Kimyasal olarak polifenoller, bir benzen halkasına bağlı bir veya daha fazla hidroksil grubuna sahip bileşiklerdir (148).

Serbest radikallerin; nükleik asitler, proteinler ve lipitlerde oksidatif hasara neden olduğu iyi bilinmektedir. Antioksidanlar olarak işlev gören fenolik bileşikler, zararlı serbest radikalleri temizler ve böylece hayati biyolojik molekülleri korurlar (149). ROS; kanser, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet gibi çeşitli oksidasyona bağlı hastalıkların gelişiminde rol oynamaktadır. Son zamanlardaki epidemiyolojik çalışmalar, meyve ve sebzeler açısından zengin diyetlerin, bu hastalıkların daha az sıklıkta görülmesini sağladığına işaret etmektedir (150, 151). Meyve ve sebzelerden doğal diyet antioksidanlarının alınmasının; glutatyon, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon-transferazın aracılık ettiği enzime bağlı savunma cevabının işlevini artırdığı da bilinmektedir (152).

Polifenollerin çift lipit katmanlarına nüfuz etme kabiliyeti hiç şüphesiz oksidasyona karşı korumada çok önemlidir. İki tabakanın polar olmayan bölgesinde bölünen polifenoller, iki mekanizma ile lipit oksidasyonunun yayılmasını önleyebilirler: (i) intramembran radikallerini yakalayarak ve / veya (ii) lipit zincirlerini ve lipid zincirlerini düzene sokan ve radikallerin çoğalmasını engelleyen membran akışkanlığını artırarak (153).

Hastalıkların yönetiminde de fenolik bileşiklerin kabiliyeti iyi tanımlanmıştır. Fenolik ekstraktların anti-bakteriyel, anti-ülser aktivitesi, anti-viral ve anti-fungal özellikleri belirtilmektedir (154, 155). Fenolik bileşikler hipersensitif reaksiyonları ve TNF- α aracılı pro-inflamatuar yolları baskılayarak anti-alerjik özellik de gösterir (156).

Polifenolik bileşikler gibi doğal olarak oluşan antioksidanlar, nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için güvenli ve çok işlevli bileşikler olarak algılandıkları için büyük ilgi görmüştür. Yapılan çalışmalar RA'nın, polifenoller grubunun en güçlü antioksidanı olduğunu göstermiştir (157).

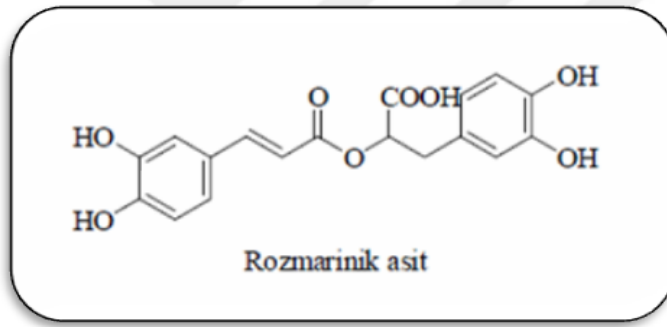
4.10. Rosmarinik Asit

Rosmarinik asit ilk olarak 1958 yılında iki İtalyan kimyager Scarpati ve Oriente tarafından biberiyeden (*Rosmarinus officinalis*) saf bir bileşik olarak izole edilmiştir (158). RA, Boraginaceae ailesinde yaygın görülürken Lamiaceae ailesi içinde Nepetoideae alt familyası ile sınırlıdır. Yaygın olarak; adaçayı (*Salvia officinalis*), nane (*Mentha piperita*), kekik (*Thymus vulgaris*), melisa (*Melissa officinalis*), biberiye (*Rosmarinus officinalis*) ve fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) gibi bitkilerde bulunmaktadır (159). RA, kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asitin doğal olarak oluşan polifenol flavonoidin esteridir. Kırmızı-

turuncu renkte olan RA'nın moleküler formülü $C_{18}H_{16}O_8$ ve IUPAC ismi (2R)-3-(3,4-dihidroksifenil)-2-[(E)-3-(3,4-dihidroksifenil)prop-2-enoil] oksipropanoik asittir (160).

Ellis ve Towers'ın 1970 yılındaki biyogenetik çalışmaları iki aromatik amino asit fenilalanin ve tirozinin, rosmarinik aside dahil olduğunu göstermektedir. İlginç bir şekilde, kafeik asit kısmı sadece fenilalanin ve 3,4-dihidroksifenil-laktik asit kısmı sadece tirozinden oluşmaktadır (161). Bu bileşikler antioksidan etkiye sahiptir. Bu sonuçlar *Coleus blumei*'nin hücre kültürleriyle benzer beslenme deneyleri ile doğrulanmıştır (162).

Rosmarinik asitin kimyasal sentezi uzun süre sonra aranmış ve 1991'de Albrecht tarafından elde edilmiştir (163). RA, her ikisi de orta konumda hidroksil grubu içeren iki fenolik halkadan doğal olarak oluşan hidroksillenmiş bir bileşiktir. İki halka arasında karbonil grubu, doymamış bir çift bağ ve bir karboksilik asit grubu bulunmaktadır (Şekil 4) (164).



Şekil 4. Rosmarinik asitin yapısı (Ferreira'dan, 165)

4.10.1. Rosmarinik Asitin Biyolojik Aktivitesi

Çoğu bitki; kimyasal yapısı ve biyoaktivitesi nedeniyle tıbbi bitkiler olarak tanımlanır. RA içeren bitkiler (Limon balsamı, biberiye, kekik, adaçayı ve nane gibi), yaygın olarak bahçelerde yetiştirilmekte ve mutfakta pişirilmede kullanılmakla birlikte gıda koruyucularından kozmetik ürünlere kadar geniş bir uygulama alanına sahip olan doğal üründür (16, 166).

RA'nın iyileştirici etkileri hem klinik uygulamalar hem de deneysel araştırmalarla kanıtlanmıştır (167). Yüksek biyolojik aktivitesi, kimyasal yapısı ve özellikle de iki

katekol kısmı ile ilgilidir. Katekol, fenolik antioksidanların güçlü antioksidan aktivitesi için önemli bir yapıtaşıdır (168).

Fenolik bileşikler serbest radikalleri nötralize etmek için elektronları veya hidrojen atomlarını kolayca bağlayabilirler ve sonuçta ortaya çıkan fenoksil radikalleri enzimatik olarak ana fenolik hallerine dönüştürülebilir (169). Benzer şekilde, RA bir fenolik asittir ve serbest radikalleri yakalayarak etkili bir antioksidan görevi görmektedir (170). Fenol, OH- ve diğer gruplar (katekol, fenolik asitler) H-bağışlayıcı aktiviteleri nedeniyle RA'nın antioksidan aktivitesini oluştururlar. Fenoliklerin antioksidan kapasitesi, büyük ölçüde hidroksil gruplarının sayısına bağlıdır. RA'da da olduğu gibi aromatik halkanın orta pozisyonundaki hidroksil grupları, antioksidan kapasiteyi büyük ölçüde artırır (171).

Suda çözünür bir polifenolik bileşik olan RA için çok sayıda biyolojik aktivite tanımlanmıştır. Bunlar arasında anti-inflamatuar, anti-oksidan, anti-tümör, anti-viral ve anti-mikrobiyal özellikler bulunmaktadır (172-174). Terapötik hedefler arasında Alzheimer hastalığı, kardiyovasküler hastalıklar, atopik dermatit (AD) benzeri semptomlar ve alerjik reaksiyonlar bulunmaktadır (175-178). Bunların yanısıra peptik ülser, artrit, katarakt, romatoid artrit ve bronşiyal astımın tedavisi için de kullanılmaktadır (166). Rosmarinik asit gibi fenolik bileşikler kansere karşı da koruma sağlayabilir ve *Rosmarinus officinalis* ve *Sanicula europaea* gibi kozmetik endüstrisinde kullanılan bitkilerin anti-oksidan aktivitesine katkıda bulunurlar (179).

RA, siklooksijenazı inhibe ederek prostaglandin sentezini bloke etmesi nedeniyle önemli bir anti-inflamatuar aktiviteye sahiptir (180). Avrupa halk hekimliğinde çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılmıştır. Birçok çalışma, biberiye özlerinin, çeşitli in vitro ve in vivo ortamlarda anti-inflamasyon, anti-tümör ve anti-proliferasyonda önemli rol oynadığını göstermiştir (181). Biberiye özlerinin anti-oksidan özelliğinden sperm kalitesini ve doğurganlığını iyileştirmek için de faydalanılmıştır (21). RA'nın iskemi-reperfüzyon ve karaciğer hasarı gibi oksidatif strese bağlı patolojilerde etkili bir ajan olduğu da gösterilmiştir (182).

4.10.2. Rosmarinik Asitin Antioksidan Aktivitesi

RA, genellikle serbest radikal toplayıcı olarak kabul edilen bir fenolik bileşiktir (168). Antioksidan etkileri temel olarak membran stabilizasyonu ve serbest radikal yayılımını engellemesi ile ilişkilidir (183).

RA'nın lipozomların fiziksel ve oksidatif stabilitesini arttırdığı, reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu, T hücreleri ve makrofajlardan IL-6 salınımını önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (184).

RA, genotoksik etki göstermemektedir ve mikronükleus sıklığını ve doksorubisinin neden olduğu DNA hasarının derecesini önemli ölçüde azaltmaktadır. RA'nın anti-oksidan aktivitesinin bu etkide rol oynadığı bildirilmektedir (185). Bazı araştırmalarda, RA'nın reaktif nitrojen türleri, peroksinitrit ve diğer çeşitli ROS'ların atılması yoluyla biyolojik sistemlerde antioksidan aktivite gösterdiği bildirilmiştir (186).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Etik Kurul Onayı ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ) Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Tarih: 04/10/2017; Protokol No: 2017/36) ve KTÜ Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje Kodu: TYL-2018-7279).

5.2. Deney Hayvanları ve Barınma Koşulları

Çalışmada ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen Sprague Dawley cinsi 24 adet erişkin erkek sıçan kullanıldı. Sıçanların tamamı KTÜ Tıp Fakültesi Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden sağlanarak çalışma süresince sıçanların bakımı, beslenme ve barınması bu merkezde bulunan sıçan takip odalarında ve dokuların eldesi de buradaki özel olarak hazırlanmış cerrahi müdahale odalarında gerçekleştirildi. Bu şekilde çevresel stres ve uyum problemi yaşanmaması amaçlandı.

Deney süresince, odaların sıcaklığı 22 ± 2 °C, nisbi nem oranı 50 ± 5 ve 12 saatlik karanlık/aydınlık döngüsü olacak şekilde ayarlama yapıldı. Çalışma süresince sıçanlar, standart su ve yem ile sınırsız beslendi ve standart Tıp III kafeslerinde barındırıldı (Resim 2).



Resim 2. Sıçanların bakımı ve barınması

5.3. Deney Gruplarının Oluşturulması ve Uygulama

Çalışmada kullanılan 24 adet erişkin Sprague Dawley sıçan, her grupta 6 tane olacak şekilde rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı. Gruplardaki sıçanlara uygulanan işlemler aşağıdaki gibi dzenlendi. Deney suresince (7 gün) uygulanan işlemler her gün aynı saatte (9-10 saatleri arası) gerçekleştirildi. Uygulanacak Cis (50 mg/100 ml Koçak farma) ve RA(536954-5 g, 96% Sigma-Aldrich Chemie Gmbh) dozları literatüre uygun olarak belirlendi (187, 188). Her gün taze olarak 50 mg/kg RA 1 ml hacimli serum fizyolojik içinde çözülerek hazırlandı.

Kontrol Grubu (n= 6): Herhangi bir uygulama yapılmadı.

Cis Grubu (n= 6): Tek doz 7 mg/kg Cis intraperitoneal (i.p.) olarak deneyin 3. günü uygulandı.

Cis + RA Grubu (n= 6): Deneyin 3. günü tek doz 7 mg/kg Cis i.p. olarak ve deneyin ilk gününden başlıyarak 50 mg/kg RA 7 gün boyunca oral gavaj yoluyla uygulandı.

RA Grubu (n= 6): Deney suresi boyunca (7 gün) oral gavaj yoluyla her gün 50 mg/kg RA verildi (Resim 3).



Resim 3. Sıçanlara oral gavaj yoluyla rosmarinik asit verilmesi

5.4. Doku Numunelerinin Elde Edilmesi

Deney sürecinin sonunda (8. gün) sıçanlar i.p. olarak verilen 90 mg/kg ketaminin ardından anestezi altında kansızlaştırma yolu ile sakrifiye edildi. Abdominal alt bölgeden, orta hat kesilerek ilk olarak sağ testise ait epididimis, sperm sayımı için tris tampon solüsyonu içeren vücut sıcaklığındaki petri kabına alındı. Sol testise ait epididimis ise histolojik değerlendirmeler için %10'luk formalin içine konuldu.

Çıkarılan sol ve sağ (yedek) testisler enine trimlendikten sonra her bir testisin aynı yarısı histolojik değerlendirmeler için Bouin solüsyonunda tespit işlemine tabi tutuldu, diğer yarıları ise biyokimyasal değerlendirmeler için eppendorf tüpleri içerisine alınıp biyokimyasal çalışma sürecine kadar KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD'da bulunan soğutucularda -20°C'de muhafaza edildi.



Resim 4. Testis dokularının çıkarılması

5.5. Histolojik İşlemler

5.5.1. Bouin Tespitinin Hazırlanışı

Testis dokusunun tespitinde kullanılan Bouin solüsyonunun hazırlanışı aşağıdaki gibidir;

- Doymuş pikrik asit çözeltisi: 75 ml
- Formaldehit (%37): 75 ml
- Glasiyal asetik asit: 5 ml

İlk önce 75 ml doymuş pikrik asit çözeltisi 75 ml formaldehit (% 37) ile karıştırıldı. Ardından üzerine yavaşça 5 ml glasiyal asetik asit eklenerek tekrar karıştırıldı (189). Bouin fiksatifine alınan testisler 72 saat ışık almayan kuru ortamda ve oda sıcaklığında saklandı.

5.5.2. Işık Mikroskopik İnceleme için Dokuların Hazırlanması

Dokuların takibi, kesit alımı, boyanması ve bu işlemler için gerekli olan solüsyonların hazırlanması KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Işık mikroskopik inceleme için %10'luk formaldehit içindeki sol epididimisler ve Bouin solüsyonu içindeki sol testis dokuları 72 saat fikse edildi. Daha sonra aşağıdaki gibi sırası, süresi ve dereceleri verilen alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi ve ksilen serilerinde saydamlaşması sağlanarak doku gömme cihazında (HistoCore Arcadia C-H Leica Minnesota, USA) parafin bloklar haline getirildi (190).

Dokuların takibi:

1. %70'lik etanol 1 gün
2. %90'lık etanol 1 gün
3. %96'lık etanol 1 gün
4. %100'lük etanol..... 1 gün
5. %100'lük etanol..... 1 saat
6. Ksilen 5 dakika (3 kez)
7. Dokular eritilmiş parafin içerisinde 58°C'de etüvde 15 dakika (3 kez) bekletildi ve sonrasında tekrar etüv içerisinde 2 saat bekletildi.
8. Dokular oda sıcaklığında bloklandı.

Elde edilen bloklara öncelikle tam otomatik mikrotom (LEICA RM2255, Germany) yardımıyla dokuya ulaşana kadar 20 µm'lik kesitlerle trimleme uygulandı ve dokuya ulaşınca dokudan 5 µm'lik ince kesitler alındı. Kesitler benmari içinde 37 °C'deki sıcak su üzerinde kırışıklıkların açılması için bekletildikten sonra lam üzerine alındı.

5.5.3. Hematoksilen & Eozin Boyama Yöntemi

Kesit alma işlemi tamamlandıktan sonra lam üzerine alınan doku kesitleri Hematoksilen & Eozin (H&E) boyaması için zembile yerleştirildikten sonra parafinin erimesi için 45 dk boyunca tam otomatik doku boyama cihazının (LEICA auto stainer XL, Minnesota, USA) 58 °C'lik fırınında bekletildi ve sonra aynı cihazda sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirildi (191).

1. Ksilen 5 dakika
2. Ksilen 5 dakika
3. %100'lük etanol..... 5 dakika
4. %96'lık etanol 5 dakika
5. %70'lik etanol 5 dakika
6. Distile su 1 dakika
7. Hematoksilen..... 2 dakika
8. Musluk suyu 5 dakika
9. Asit alkol 1 kez batır-çıkar
10. Distile su..... 1 dakika
11. Amonyaklı su..... 10 saniye
12. Distile su..... 1 dakika
13. Eozin 2 dakika
14. Distile su..... 1 dakika
15. %70'lik etanol 5 dakika
16. %96'lık etanol 5 dakika
17. %100'lük etanol..... 5 dakika

18. Ksilen 5 dakika
19. Ksilen 5 dakika
20. Entellan ile kapatıldı.

5.5.4. Histolojik Ölçümler

H&E ile boyanmış testis preparatlarında; seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı, lümene dökülen immatür hücrelerin bulunduğu tübül sayısı, KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Stereoloji Laboratuvarında bulunan Olympus DP 71 (Japan) kameralı ışık mikroskobunda (IM) (Olympus, BX51, Japan) Analysis 5 Research (Olympus Soft Imaging Solution, Germany) programı kullanılarak her testiste 25 seminifer tübül kesitinden hesaplandı.

Seminifer tübüllerdeki spermatogenetik hücreler, Sertoli hücreleri ve interstisyel alan ile birlikte epididimis dokusunun (en az 20 tübül kesiti) histolojik değerlendirmeleri ve sağ epididimisler kullanılarak yapılan sperm sayım değerlendirmesi yine aynı mikroskopta gerçekleştirildi ve gerekli fotoğraflar çekilerek dijital ortama aktarıldı.

Testis seminifer tübülünde hasar değerlendirmesi için Johnsen skorlama sistemi kullanıldı (192, 193). Skorlama H&E boyalı kesitlerde yapıldı.

Johnsen skorlama sistemi (193);

- 10: Germinal epitel çok sıralı, çok sayıda spermatozoa var
- 9: Germinal epitel disorganize ve lümene doğru yığılma, spermatozoa var
- 8: Germinal epitel çok sıralı, ancak lümende 10'dan az spermatozoa var
- 7: Spermatozoa yok, çok sayıda spermatid var
- 6: Spermatozoa yok, spermatid 10'dan az
- 5: Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit var
- 4: Spermatozoa yok, spermatid yok, spermatosit 5'den az
- 3: Germ hücre olarak sadece spermatogonia var
- 2: Germ hücresi yok, sadece Sertoli hücresi var
- 1: Seminifer tubul içinde hiç hücre yok

5.5.5. Sperm Sayısı, Hareketlilik, Canlılık ve Morfoloji Değerlendirmesi

Sperm sayımı amacıyla en fazla kullanılan aletlerden biri “Makler Sperm Sayım Kamarası (Sefi-Medical Instrument, Haifa, Israel)” dır (Resim 5). 1978 senesinde Prof. Dr. Amnon Makler bu kamarayı sperm sayımı için özel olarak geliştirmiştir. Kamaranın 10 µm derinliğinde olması spermatozoonların tek bir düzlemde serbestce hareket etmesine imkan vermektedir (194, 195).

Her grup ve gruplardaki her deney hayvanı için ayrı hazırlanmış tris tampon solüsyonu (pH: 7,5) içeren petri kaplarında sağ epididimisler hızlı bir şekilde parçalandı ve 37 C°’de 10-30 dk bekletilip spermlerin yüzdürülmesi sağlandı. Bu sıvıdan sperm sayımı, motilite (hareketlilik), vitalite (canlılık) ve morfoloji değerlendirmeleri ışık mikroskobu altında (Olympus DP 71) yapıldı.

Sperm sayısı ve hareketliliğini değerlendirmek için makler kamarasının merkezine bir damla semen (5 µl) damlatıldı ve makler kamarasının kapağı kapatıldı. Dört adet kuvarz bacak sayesinde spermlerin 10 µm derinlikte yüzmeleri sağlandı. Işık mikroskobunda (Olympus DP 71) 20X büyütmede 10 kare içerisinde motil ve non-motil spermler sayıldı ve 10^6 ile çarpılarak mililitredeki ($\times 10^6/\text{mL}$) sperm sayısı belirlendi. Motil sperm sayısının toplam sperm sayısına oranı hesaplanarak motilite yüzdesi (%) belirlendi. Normal sperm konsantrasyonu ($> 20 \times 10^6/\text{ml}$) dikkate alınarak değerlendirme yapıldı (194).

Vitalite değerlendirmesi için hazırlanan semen örneğinden lam üzerine 1 damla semen üzerine insülin enjektörü yardımıyla bir damla %1’lik eozin-Y damlatılarak karışımları sağlandı ve preparat lamel ile kapatıldı. Ardından IM’da her örnek için toplamda 100 adet olmak üzere canlı (eozin-Y ile boyanmayan) ve cansız (eozin-y ile boyanan) spermler sayılarak canlılık analizi yapıldı.

Morfolojik analiz için elde edilen semen örneği 3 dakika boyunca 1000 rpm’de (dakidaki devir sayısı) santrifüj edildi; süpernatant kısmından alınan 0,5 ml’lik örnek, lam üzerine yayılıp kurutuldu. Kurutulan preparatlar 3 dakika etanolle fiske edildi ve %1’lik eozin-Y ile boyandı. Her bir hayvana ait örnekte 100 sperm sayıldı ve anormal sperm %’si belirlendi (196).

Tris tamponu hazırlanışı: 121,14 g tris tartılıp, yaklaşık 200 ml distile suda çözüldükten sonra 1M HCl ile pH 7.4’e ayarlandı ve hacim 250 ml ye tamamlandı.



Resim 5. Makler Sayım Kamarası

5.6. İmmünohistokimyasal İşlemler

Testisteki apoptozu değerlendirmek için terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay (TUNEL) tekniği kullanılarak seminifer tübül germinal hücrelerinde DNA fragmentasyonları tanımlandı. Nekroz alanları bulunmayan, homojen boyanmış kahverengi nükleuslu TUNEL (+) hücreler apoptotik hücre olarak değerlendirildi. Mor renkte boyananlar ise nonapoptotik TUNEL (-) olarak değerlendirildi. Her sıçan testis dokusunda rastgele seçilen 10 seminifer tübülde TUNEL (+) hücre sayısının toplam hücre sayısına oranına göre apoptotik indeks (AI) ($AI = \frac{\text{TUNEL (+) hücre sayısı}}{\text{toplam hücre sayısı}} \times 100$) hesaplandı (197).

5.6.1. TUNEL Boyama

TUNEL boyama için parafin bloklardan 5 µm'lik kesitler pozitif şarızlı lamlara alındı ve bir saat boyunca 58 °C'lik etüvde yapılan deparafinizasyonun ardından in situ cell death detection kit, POD kiti kullanıldı (11684817910 Roche diagnostic, Mannheim, Germany). Elde edilen preparatlar ışık mikroskobu (Olympus BX-51) altında incelendi ve gerekli fotoğraflar çekildi. Harris hematoksilin ile çekirdekleri mavi-mor renge boyanan hücreler normal, kahverengi boyanan hücreler ise TUNEL (+) (apoptotik) olarak kabul edildi (190).

Elde edilen bulgular ışık mikroskopa adapte kamera ataçmanı (Olympus DP71; Olympus, Tokyo, Japan) ile fotoğraflandı ve bütün dijital görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldı. Hücre sayımları Analysis 5 Research programı (Olympus Soft Imaging Solutions, Germany) kullanılarak yapıldı. TUNEL boyamada aşağıdaki basamaklara göre sırasıyla yapılarak tamamlandı.

1. Ksilen..... 3x5 dakika
2. %100 etanol..... 2x5 dakika
3. %96 etanol..... 2x5 dakika
4. %70 etanol..... 2x5 dakika
5. Distile suda yıkama 1..... 5 dakika
6. Phosphate buffer saline (PBS)' de yıkama 1..... 2x5 dakika
7. H₂O₂ (%3)..... 15 dakika
8. Distile suda yıkama 2..... 5 dakika
9. PBS'de yıkama 2..... 2x5 dakika
10. Large volume UV (Ultra V) block..... 10 dakika
11. 75 µg terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) ve 50 µl TdT /dUTP karışımı (37 °C etüv, nemli ortam)..... 1,5 saat
12. PBS'de yıkama 3..... 2x5 dakika
13. 100 µl converter peroksidaz (37 °C'lik etüv)..... 30 dakika
14. PBS'de yıkama 4..... 3x5 dakika
15. 100 µl 3,3'-diaminobenzidine including kit (DAB) (Sigma, St Louis, MO, USA) (karanlık ortamda)..... 5 dakika
16. Distile suda yıkama 3..... 5 dakika
17. H&E..... 2 dakika
18. Distile suda yıkama 4..... 5 dakika
19. %70 etanol..... 2x5 dakika

20. %95 etanol..... 2x5 dakika
21. %100 etanol..... 2x5 dakika
22. Ksilen 2x5 dakika
23. Entellan ile kapatma.

5.7. Biyokimyasal İncelemeler

5.7.1. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeyi Ölçümü

Çıkarılan testislerden elde edilen dokuların yaklaşık 50-100 mg'lık kısmı MDA ölçümü için kullanıldı. MDA ölçümü için kullanılan dokular buz içinde 0.5 mL/L Triton X-100 içeren %1.15'lik KCl çözeltisinden 2 mL konularak homojenize edildi. Homojenatlar 3000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek elde edilen süpernatantlarda ilgili ölçümler yapıldı.

MDA ölçümü Mihara ve Uchiyama yöntemine göre yapıldı (198). Bu metodun esası, MDA'nın asidik ortamda tiyobarbitürik asitle oluşturduğu rengin 532 nm'de absorbensinin ölçülmesine dayanmaktadır.

Kullanılan Çözeltiler:

1- Doku homojenizasyon tamponu: 1.15 g KCl hassas terazide tartıldı ve son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı. Oluşan çözeltinin üzerine 0.5 mL Triton X-100 eklendi.

2- %1'lik H_3PO_4 çözeltisi: Bir miktar saf su üzerine 2.94 mL %85'lik H_3PO_4 alındı ve son hacim distile su ile 250 mL'ye tamamlandı.

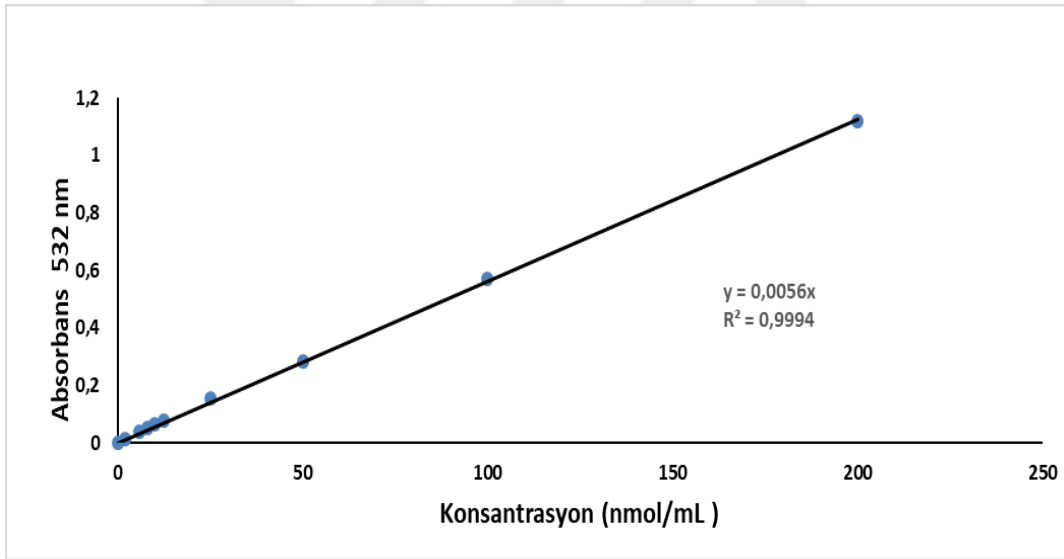
3- Tiyobarbitürik asit (TBA) çözeltisi: 0.67 g TBA tartıldı ve 50 mL distile suda magnetik bar yardımıyla 10 dk karıştırıldı. Ardından üzerine 50 mL asetik asit ilave edilerek çözüldü.

4- Standart çözeltiler: 8.3 μ L tetrametoksipropan 0.01 M HCl çözeltisine eklendi ve 50 °C'de 1 saat inkübe edildi. Bu oluşan 10 μ mol/mL'lik ara stok çözeltiden dilüsyonlar yapılarak 50, 40, 30, 20, 10 ve 5 nmol/mL'lik standart çözeltiler hazırlandı.

Tablo 1. Doku MDA seviyesi ölçümü için yapılan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Eklenen Miktar (mL)
Doku homojenatı	0.5
H ₃ PO ₄	3
Tiyobarbiturik asit	1

Tablo1’de verilen karışım vortekslandı. Ardından 100 °C’de etüvde inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 4000 rpm’de 10 dk santrifüj yapıldı. Süpernatantlar ELISA pleytine pipetlendikten sonra 532 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Şekil 5’deki standart grafik kullanılarak MDA konsantrasyonu hesaplandı. Sonuçlar ise nmol/g doku olarak hesaplandı.



Şekil 5. Doku MDA seviyesi ölçümü için standart grafiği

5.7.2. Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivite Tayini

SOD enzim aktivitesi Sun ve Oberley’in geliştirdiği yöntemin modifiye edilmesi sonucu yapıldı (199). Bu metod, ksantin-ksantin oksidaz ile oluşan süperoksitlerin SOD tarafından kullanılarak, nitroblue tetrazolium (NBT)’dan mor renkli formazan boyası oluşumunun engellenmesi esasına dayanır. Ortamdaki SOD aktivitesi ne kadar yüksek ise

ortamdan o kadar çok O_2^- kaldırılacağı için reaksiyondan sonra oluşan rengin şiddetinde azalma gözlenir. Reaksiyon sonucu oluşan renkli bileşiğin absorbanısı 560 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Kullanılan Çözeltiler:

1- 0.3 mM ksantin çözeltisi: 3.65 mg ksantin alındı ve 80 mL deiyonize suda çözüldü.

2- 0.6 mM EDTA çözeltisi: 8.93 mg EDTA alındı ve 40 mL deiyonize suda çözüldü.

3- 150 μ M NBT çözeltisi: 4.9 mg NBT alındı ve 40 mL deiyonize suda çözüldü. NBT çözeltisi SOD reaktif karışımına en son eklendi.

4- 400 mM Na_2CO_3 çözeltisi: 1.01 g Na_2CO_3 alındı ve 24 mL deiyonize suda çözüldü.

5- %0.1’lik Bovin Serum Albumin (BSA) çözeltisi: BSA’dan 12 mg alındı ve 12 mL deiyonize suda çözüldü.

Yukarıdaki beş çözelti karıştırılarak SOD reaksiyon karışımı elde edildi.

6- 2 M Amonyum sülfat çözeltisi: 2.64 g amonyum sülfat 10 mL deiyonize suda çözüldü. Ksantin oksidaz enziminin dilüsyonunda kullanıldı.

7- 0,8 mM $CuCl_2$ çözeltisi: 5.37 g $CuCl_2$ alındı ve 50 mL deiyonize suda çözüldü. Spektrofotometrik ölçümden hemen önce oluşan reaksiyonu durdurmak için kullanıldı.

8- 167 U/L ksantin oksidaz çözeltisi: 3,3 U/mL’lik orijinal şişeden 101 μ L alınıp 2 mL’ ye amonyum sülfat çözeltisi ile tamamlandı. Ksantin oksidaz çözeltisi günlük hazırlandı.

50, 25, 12.5, 5, 4, 3, 2, 0.5, 0.25 U/mL’ lik SOD standartları kullanıldı. SOD standartları pH’sı 7.4 olan 50 mM’lık Tris-HCl çözeltisi ile dilue edilerek hazırlandı. Standart ve köre etanol/kloroform aşaması uygulanmadı. Numuneler 4 kat dilue edildi. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 2’ ye göre hazırlandı.

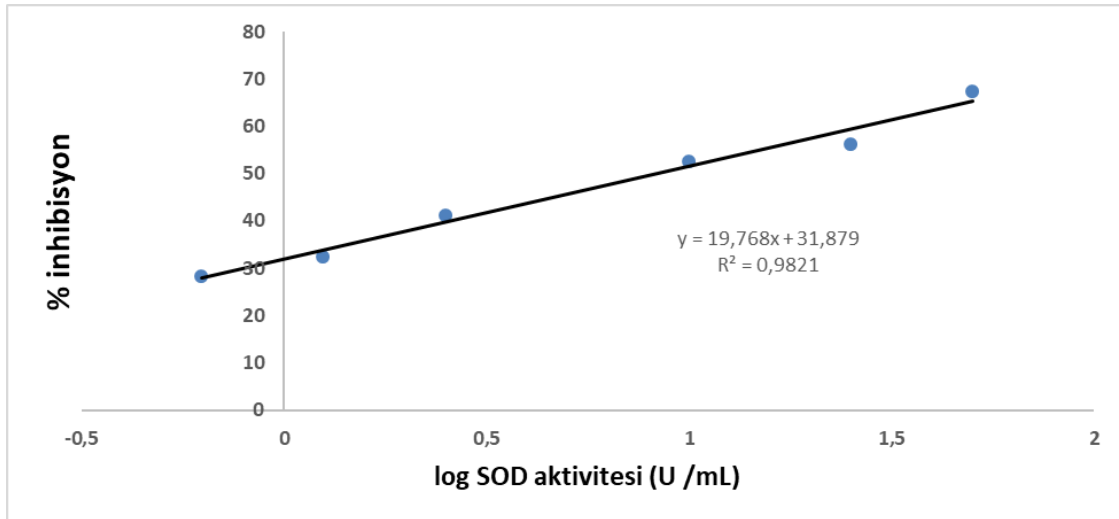
Tablo 2. SOD aktivitesi ölçümü için hazırlanan reaksiyon karışımı

Reaktifler	Miktar (mL)
Standart/Dilue Numune	0.25
SOD reaksiyon karışımı	1.25
Ksantin oksidaz	0.25
25°C’de 20 dakika karanlıkta inkübasyon	
Bakır klorür	0.5
560 nm’de spektrofotometrik ölçüm	

Hesaplamalar eşitlik 1’e göre % inhibisyon cinsinden yapıldı ve Şekil 6’daki standart grafik kullanılarak enzim aktiviteleri hesaplandı ve dilüsyon katsayısı olan 4 ile çarpıldı. Sonuçlar U/g protein olarak hesaplandı. Protein ölçümleri 72285-3 katalog numaralı Merck Millipore (ABD) Bikinkoninik Asit (BCA) protein assay kit kullanılarak yapıldı.

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A_{\text{Kör}} - A_{\text{Numune}})}{A_{\text{Kör}}} \times 100$$

(Eşitlik 1)



Şekil 6. SOD aktivitesi için standart konsantrasyonların logaritmasına karşı % inhibisyon grafiği

5.7.3. Protein Tayini

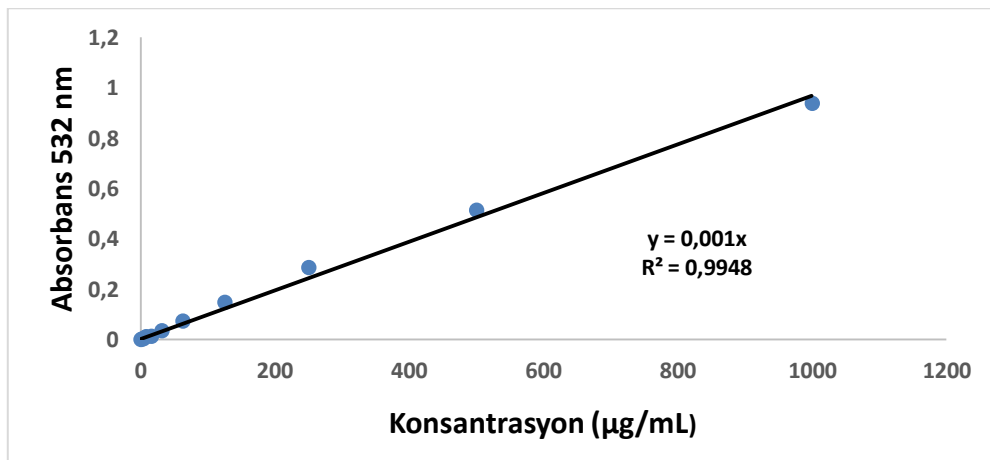
Protein tayini BCA yöntemine göre yapıldı. Yöntemin esası biüret reaksiyonudur. Cu^{+2} iyonları peptid azotlarına bağlanır ve Cu^{+1} iyonuna indirgenirler. İkinci bir reaksiyonda ise bu indirgenmiş Cu^{+1} iyonları BCA ile renkli bir kompleks oluştururlar ve bu rengin şiddeti protein yoğunluğu ile orantılıdır. Oluşan bu renk kompleksi 562 nm’de maksimum absorbans gösterir.

Protein Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması:

1. BCA çalışma reaktifi: Her bir numune için 200 μL BCA çözeltisi ve 4 μL %4’lük bakır (II) sülfat karıştırıldı ve BCA çalışma reaktifi oluşturuldu.

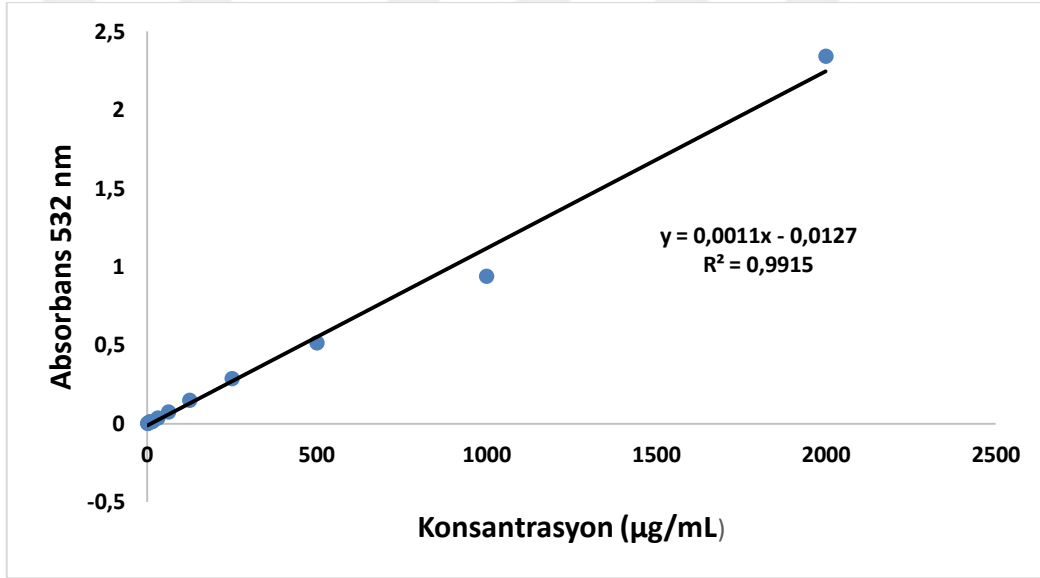
2. Standartların hazırlanması: 2 mg/mL’lik BSA stok çözeltisinden seri dilüsyon yapılarak 1000-500-250-125-62,5-31,25-15,63-7,81-3,90-1,95 mg/mL’lik standartlar ve kör hazırlandı.

SOD aktivitesinin hesap edilmesinde kullanılan numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 25 μL standart ve homojenizasyon tamponu (pH’sı 7.4 olan 50 mM’lık Tris-HCl) ile 4 kat seyreltilmiş 25 μL numune pleyte yüklendi. Üzerine 200 μL BCA çalışma reaktifi ilave edilip 30 sn çalkalayıcıda karıştırıldı ve üzeri kapatıldı. 37 °C’de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve 562 nm’de ölçüm yapıldı. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı. Dilüsyon katsayısı ile çarpılıp konsantrasyonlar belirlendi. SOD aktivite hesaplaması için kullanılan protein standart grafiği Şekil 7’de gösterilmiştir.



Şekil 7. Protein standart grafiği (SOD için)

GSH-Px aktivitesinin hesap edilmesinde kullanılan numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 25 µL standart ve %0.9'luk serum fizyolojik ile 10 kat seyreltilmiş 25 µL numune pleyte yüklendi. Üzerine 200 µL BCA GSH-Px aktivitesinin hesap edilmesinde kullanılan numunelerin protein konsantrasyonlarını belirlemek için, 25 µL standart ve %0.9'luk serum fizyolojik ile 10 kat seyreltilmiş 25 µL numune pleyte yüklendi. Üzerine 200 µL BCA working reagent ilave edilip 30 sn çalkalayıcıda karıştırıldı ve üzeri kapatıldı. 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra oda sıcaklığına gelmesi beklendi ve 562 nm'de ölçüm yapıldı. Sonuçlar mg/mL cinsinden hesaplandı. Dilüsyon katsayısı ile çarpılıp konsantrasyonlar belirlendi. GSH-Px aktivite hesaplaması için kullanılan protein standart grafiği Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. Protein standart grafiği (GSH-Px için)

5.7.4. Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Tayini

Dokuda GSH-Px ölçümünde Elabsicence firmasının (USA) E-BC-K096 nolu GSH-Px spektrofotometrik kiti kullanılmıştır. Dokuda GSH-Px ölçümü kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Hesaplamalar “Eşitlik 2” ye göre yapıldı.

$$= \frac{\text{ODNonenzyme tube} - \text{ODEnzyme tube}}{\text{ODStandard} - \text{ODBlank}} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

× Concentration of standard (20 µmol/L) x Dilution factor

÷ Reaction time ÷ (Protein concentration of sample × The volume of sample)

5.8. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, version 13.1, SSPS Inc., Chicago, IL, USA) programı kullanıldı. Her bir gruba ait biyokimyasal ve diğer sayısal veriler ortalama $\pm$ standart sapma (SS) olarak verildi. Grupların normal dağılımının uygunluğuna Kolmogorow- Simirnov testi ile bakıldı. Normal dağılıma uymayan gruplar Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Anlamlı grupların ikili karşılaştırmaları Mann-Whitney U testleri ile yapıldı. Gruplar arası karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlılık düzeyi $p<0.05$; düzeltme testlerinde ise anlamlılık düzeyi $p<0.008$ kabul edildi.



6. BULGULAR

6.1. Morfometrik Bulgular

İstatistiksel analizler sonucunda; apoptotik indeks (AI), germinal epitel kalınlığı, lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı, sperm vitalitesi ve sperm motilitesi değerlendirmelerinde gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0.05$).

Deney gruplarına ait testis dokularında seminifer tübül çapı, germinal epitel kalınlığı, lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı ve doku hasar değerlendirmesi için yapılan Johnsen skorlamasına ait ölçüm sonuçları Tablo 3'te verilmiştir.

Elde edilen istatistiksel verilere göre; seminifer tübül çapında, gruplar arasında istatistiksel anlamda bir farklılık bulunmadı. Germinal epitel kalınlığı, Cis ve Cis+RA grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldı; Cis+RA ve RA gruplarında ise Cis grubuna göre anlamlı olarak yükseldi. Lümenine immatür hücre dökülen seminifer tübül sayısı oranında kontrol grubuna göre Cis, Cis+RA ve RA gruplarında bir artış görüldü de, bu artış sadece Cis grubunda anlamlı olarak bulundu. Doku hasar değerlendirmesi için Johnsen skorlamasına ait yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda gruplar arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı.

Tablo 3. Deney gruplarına ait morfometrik ölçüm sonuçları

	Kontrol ortalama± SS	Cis ortalama± SS	Cis+RA ortalama± SS	RA ortalama± SS
Seminifer Tübül Çapı (µm)	266.94±8.83	255.97±6.16	263.76±5.98	265.77±9.48
Germinal Epitel Kalınlığı (µm)	84.81±3.43	68.46±2.30 ^a	77.35±0.73 ^{a,b}	79.70±4.00 ^b
Lümenine İmmatür Hücre Dökülen Tübül Sayısı (%)	4.74±2.51	18.86±7.24 ^c	11.54±7.70	7.96±3.69
Johnsen Skoru	9.67±0.37	9.45±0.12	9.63±0.15	9.71±0.16

^a: Kontrol grubuna göre Cis ve Cis+RA grubunda epitel kalınlığı anlamlı olarak azaldı ($p<0.008$).

^b: Cis grubuna göre Cis+RA ve RA grubunda epitel kalınlığı anlamlı olarak arttı ($p<0.008$).

^c: Kontrol grubuna göre Cis grubunda lümenine immatür hücre dökülen tübül sayısı oranı anlamlı olarak arttı ($p<0.008$).

6.2. Morfolojik Bulgular

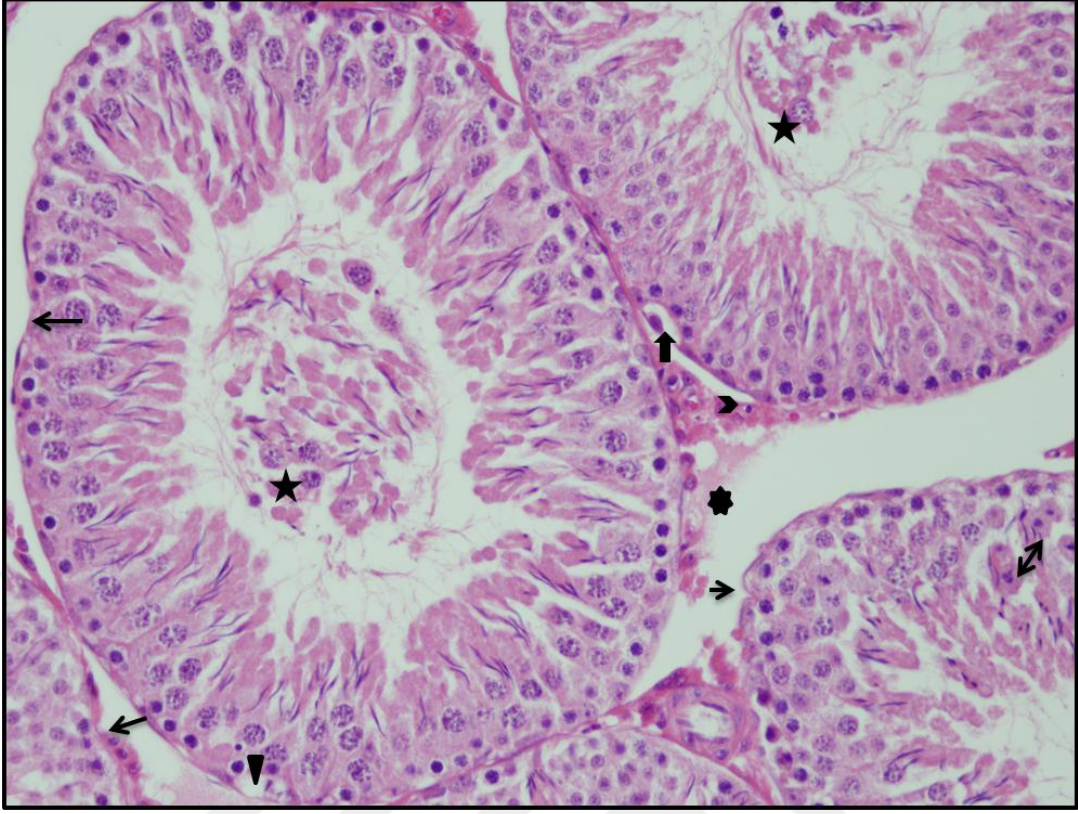
6.2.1. Hematoksilen & Eosin Boyalı Kesitlerin Histopatolojik Değerlendirilmesi

Testis dokusunun histolojik incelemesinde; kontrol grubuna ait testis kesitlerinde, seminifer tübüller, spermatogenik hücreler, miyoid hücreler ve Leydig hücreleri normal olarak izlendi ve patolojik bir bulguya rastlanmadı (Resim 6).



Resim 6. Kontrol grubuna ait testis dokusu (H&E, X400).

Cis grubuna ait testis kesitlerinde, interstisyel alanda ödem ve Leydig hücrelerinde atrofi görüldü. Peritübüler dokuda ondülasyon, germinal epitel kalınlığında azalma, seminifer epitelde vakuolizasyon, nekroza gitmiş primer spermatositler, bazal kompartmanda spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri arasında açılmalar izlendi. Lümenine immatür hücre dökülen seminifer tubul sayısında artış belirlendi (Resim 7).



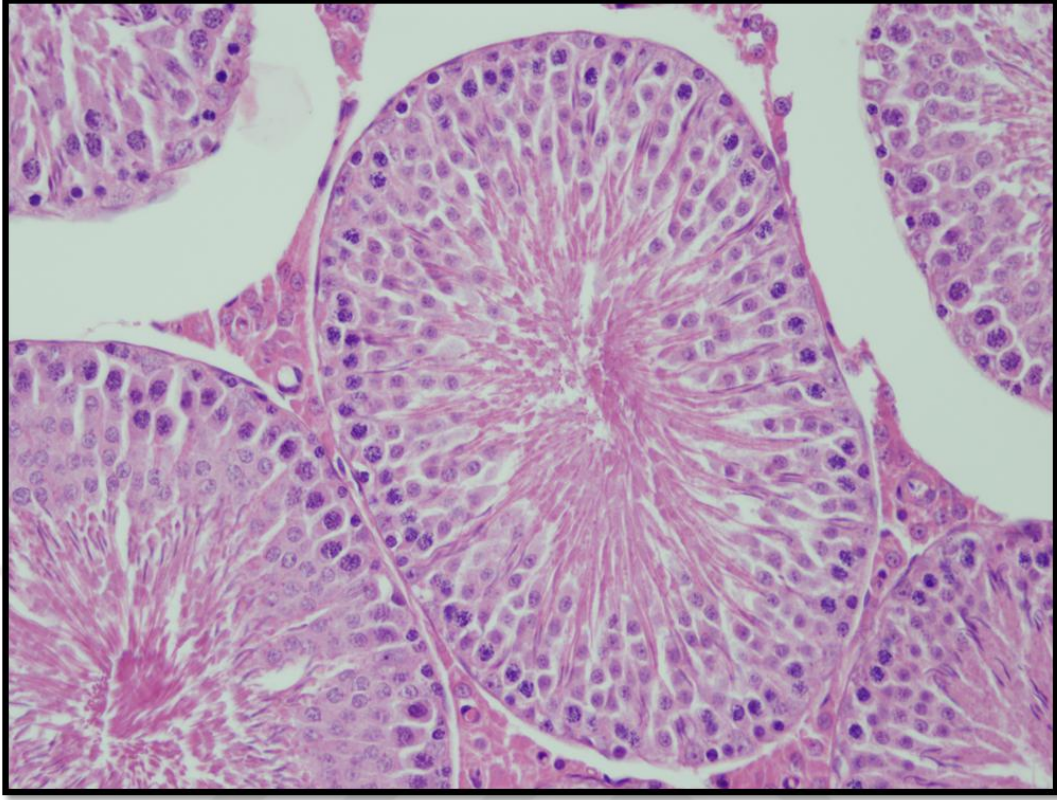
Resim 7. Cis grubuna ait testis dokusu. Peritübüler dokuda ondülasyon (→), Sertoli hücresi ile spermatogonium arasında açılma (↑), seminifer epitelde vakuolizasyon (▼), nekroza gitmiş primer spermatositler (↔), lümende immatür döküntü germinal hücreler (★), interstisyel alanda ödem (★) ve Leydig hücrelerinde atrofi (▶) izlenmektedir (H&E, X400).

Cis+RA grubuna ait testis dokusu kesitlerinde, interstisyel alanda yer yer ödem görüldü. Germinal epitelde az miktarda vakuolizasyon ve açılmalar ile az sayıda nekroza gitmiş germinal epitel hücreleri belirlendi. Cis grubuna göre, lümenine immatür hücrelerin döküldüğü seminifer tubül sayısı, germinal epitelde vakuolizasyon ve açılmalar gibi histopatolojik bulgular farkedilir şekilde azalma gösterdi (Resim 8).



Resim 8. Cis+RA grubuna ait testis dokusu. Tübül duvarında, hafif derecede açılma (↓), vakuolizasyon (▼), nekroza gitmiş germinal epitel hücreleri (↑) ve interstisyel alanda ödem (★) izlenmektedir (H&E, X400).

RA grubuna ait testis dokusu kesitlerinde, seminifer tübül ve interstisyel alan elemanlarında normal morfolojik yapı gözlemlendi (Resim 9).



Resim 9. RA grubuna ait testis dokusu (H&E, X400).

6.3. TUNEL Sonuçları

Deney gruplarına ait testis dokularında TUNEL tekniği ile değerlendirilen apoptotik indeks (AI) aşağıdaki Tablo 4’de ve resimlerde verildi.

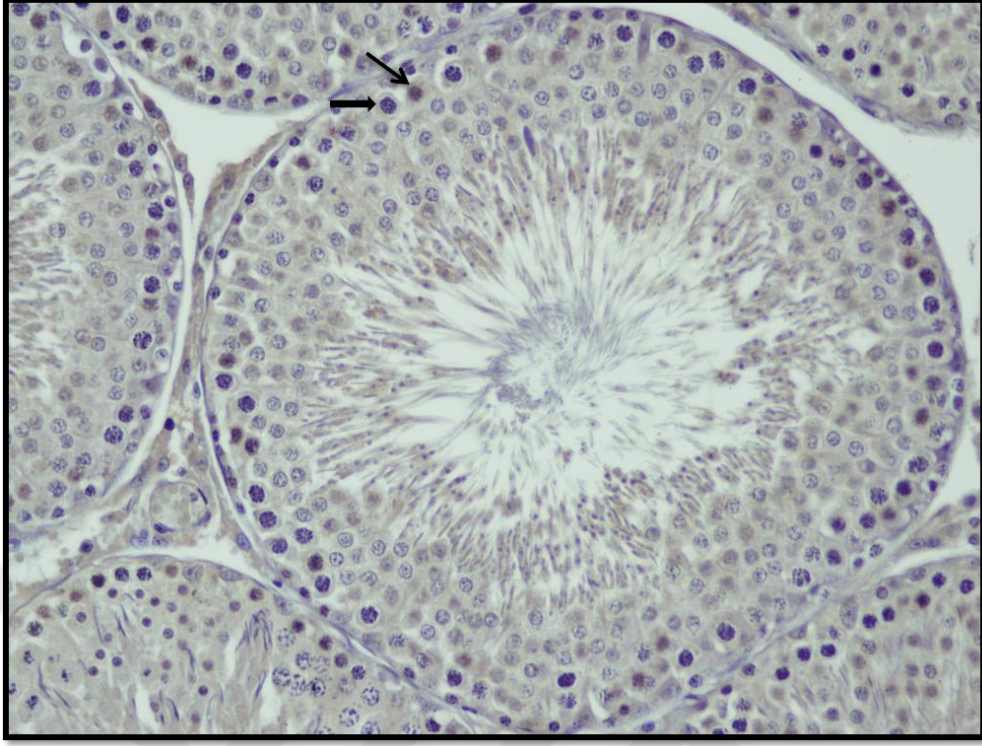
Apoptotik indeks değerlendirmesine göre; AI’in Cis ve Cis+RA gruplarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde arttığı, Cis grubuna göre ise Cis+RA ve RA gruplarında AI’in anlamlı olarak azaldığı görüldü. RA grubunda AI’in, kontrol grubuna göre arttığı belirlendi, ancak bu artış anlamlı değildi.

Tablo 4. Deney gruplarına ait apoptotik indeks değerleri

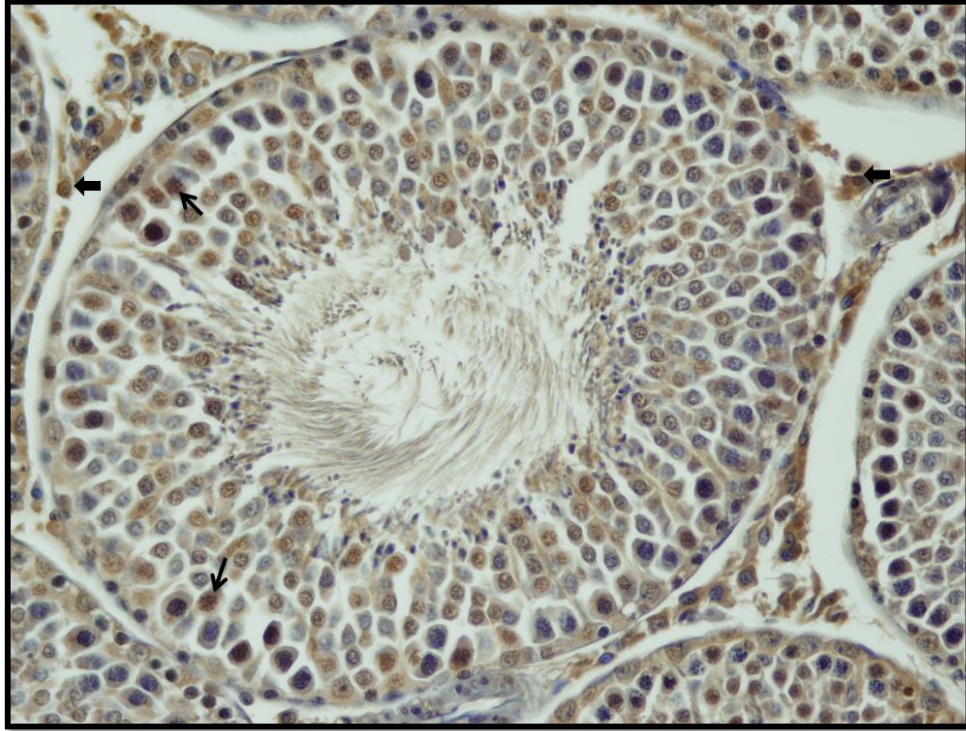
	Kontrol ortalama± SS	Cis ortalama± SS	Cis+RA ortalama± SS	RA ortalama± SS
Apoptotik İndeks (%)	2.10±0.64	22.72±9.50 ^a	8.04±2.26 ^{ab}	4.89±3.25 ^b

^a: Kontrol grubuna göre Cis ve Cis+RA grubunda AI anlamlı olarak arttı (p<0.008).

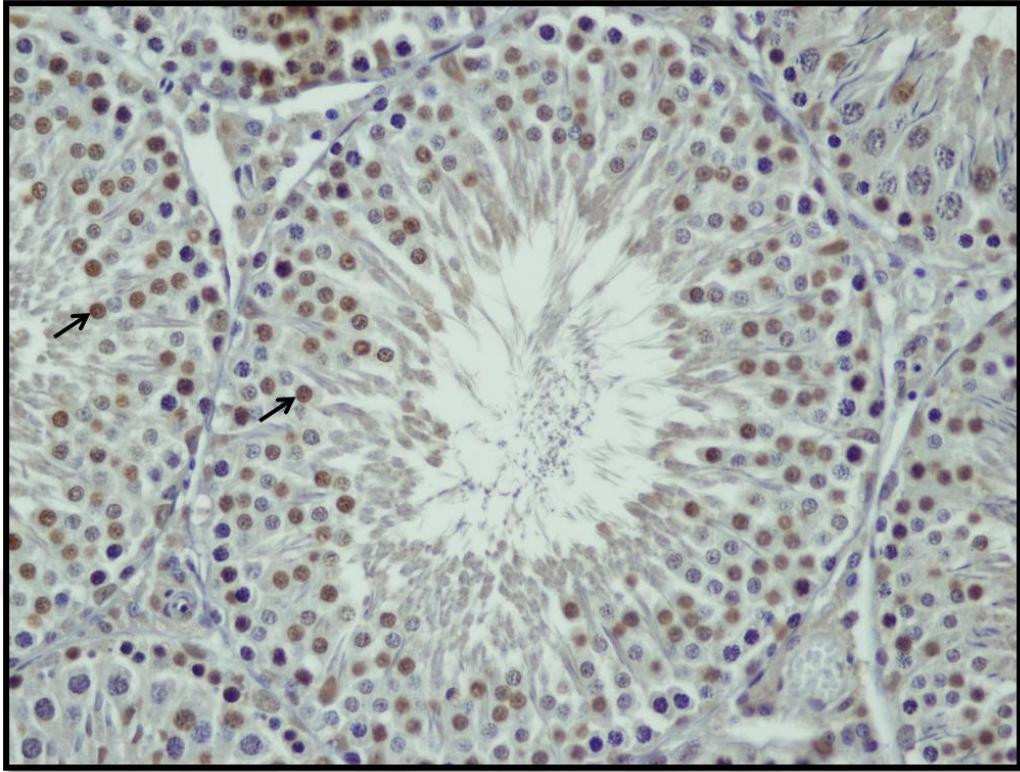
^b: Cis grubuna göre Cis+RA ve RA grubunda AI anlamlı olarak azaldı (p<0.008).



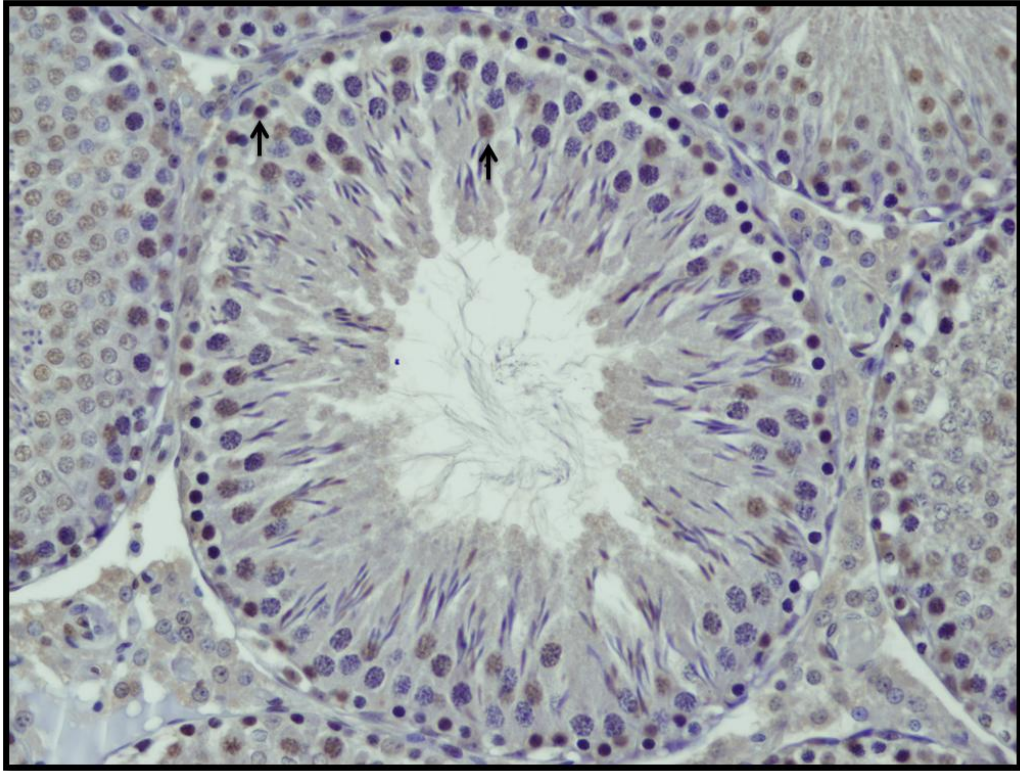
Resim 10. Kontrol grubuna ait testis dokusu. TUNEL (+) hücre (→), TUNEL (-) hücre (→) (TUNEL, X400).



Resim 11. Cis grubuna ait testis dokusu. TUNEL (+) spermatogenetik hücreler (→) ve TUNEL (+) Leydig hücreleri (←) izlenmektedir (TUNEL, X400).



Resim 12. Cis+RA grubuna ait testis dokusu. TUNEL (+) hücreler (→) (TUNEL, X400).



Resim 13. RA grubuna ait testis dokusu. TUNEL (+) hücreler (→) (TUNEL, X400).

6.4. Semen Analizine Ait Bulgular

Deney gruplarına ait epididimal semen analizinde sperm total sayısı, motilitesi, vitalitesi ve morfolojisinin istatistiksel değerlendirme sonuçları Tablo 5’de verilmiştir.

Gruplar arasında sperm sayısı farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı değildi. Sperm motilite oranı, kontrol, Cis+RA ve RA gruplarına göre Cis grubunda azaldı; bu azalma sadece RA grubuna göre anlamlı bulundu. Sperm vitalitesi, Cis grubuna göre tüm gruplarda bir artış gösterdi. Fakat bu artış sadece RA grubunda anlamlı idi. Anormal morfoloji oranı kontrol grubuna göre Cis grubunda anlamlı olarak arttı (Resim 15). Bu oran Cis+RA ve RA grubunda Cis grubuna göre anlamlı olarak azaldı. İkili karşılaştırmalarda kontrol ve RA grupları arasında ve Cis+RA ve RA grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

Tablo 5. Semen analizine ait ortalama ve standart sapma değerleri

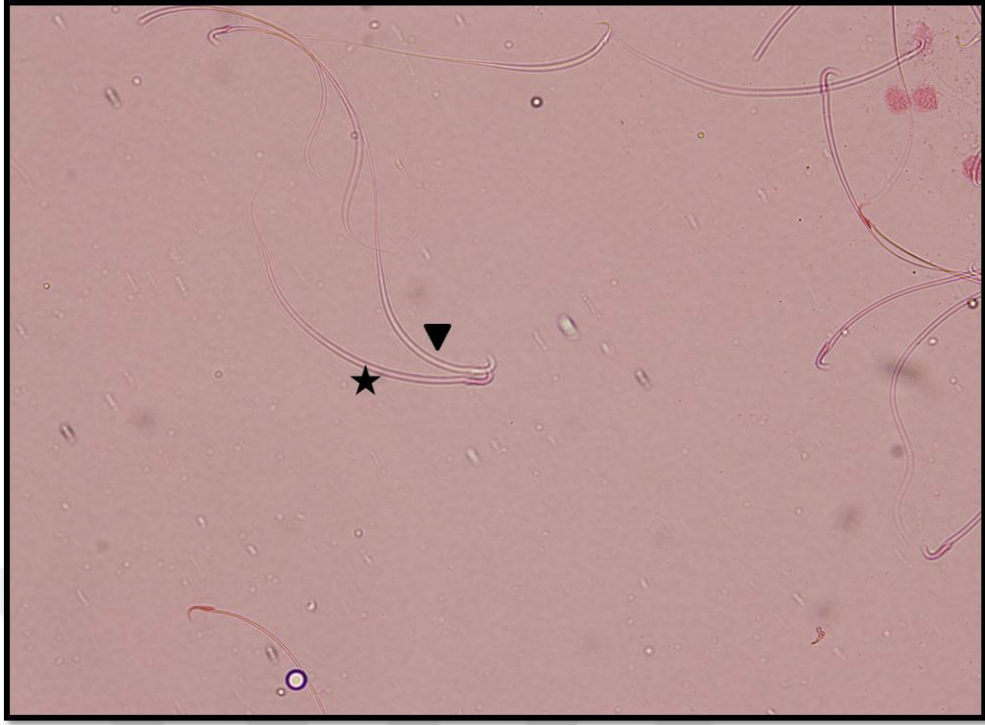
	Kontrol ortalama± SS	Cis ortalama± SS	Cis+RA ortalama± SS	RA ortalama± SS
Sperm Sayısı (x10 ⁶)	10.32±5.13	13.32±5.89	10.00±5.02	11.67±3.49
Sperm Motilitesi (Hareketlilik) (%)	28.87±12.11	15.21±14.27	22.83±10.44	37.16±11.61 ^a
Sperm Vitalitesi (Canlılık) (%)	45.33±10.92	30.67±6.01	38.67±14.46	50.00±13.57 ^b
Anormal Morfoloji Oranı (%)	14.67±5.47	31.33±5.32 ^c	14.67±4.83 ^d	11.33±3.92 ^d

^a: Cis grubuna göre RA grubunda sperm motilite oranı anlamlı olarak arttı (p<0.008).

^b: Cis grubuna göre RA grubunda sperm vitalitesi anlamlı olarak arttı (p<0.008).

^c: Kontrol grubuna göre Cis grubunda anormal morfoloji oranı anlamlı olarak arttı (p<0.008).

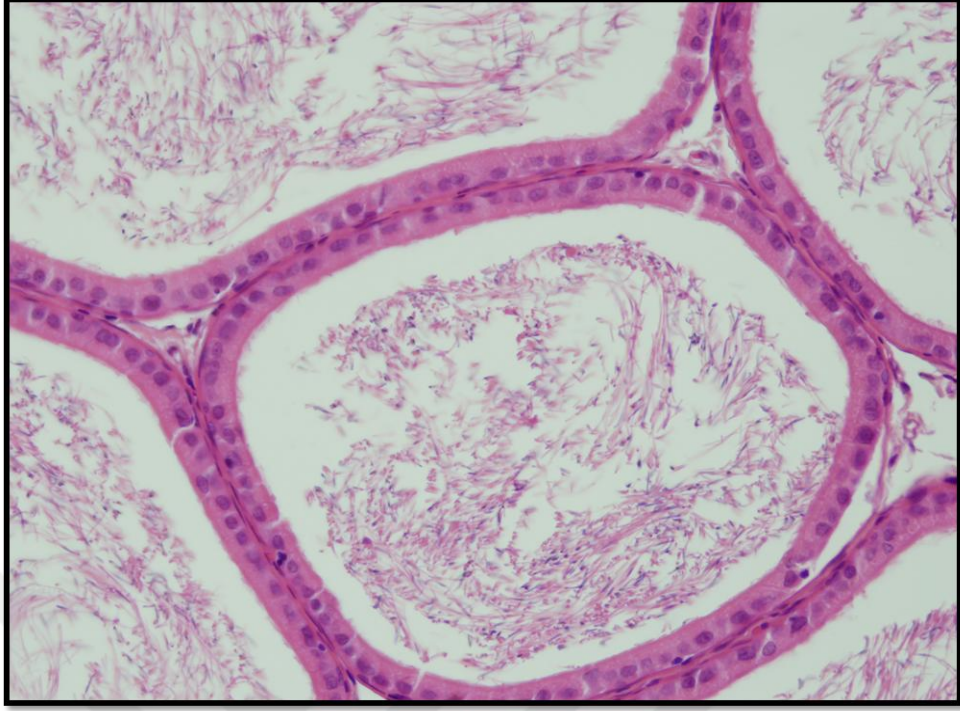
^d: Cis grubuna göre Cis+RA ve RA grubunda anormal morfoloji oranı anlamlı olarak azaldı (p<0.008).



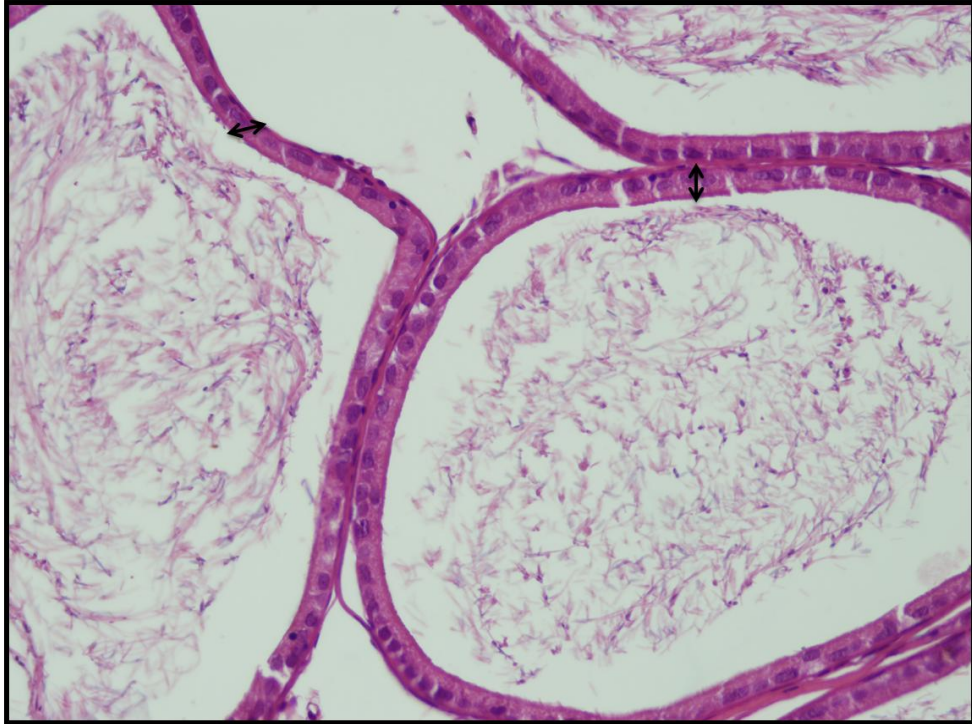
Resim 14. Cis grubuna ait sperm hücreleri. Canlı (eozin-Y ile boyanmayan) (▼) ve cansız (eozin-Y ile boyanan) (★) sperm hücreleri (Eozin-Y, X400).



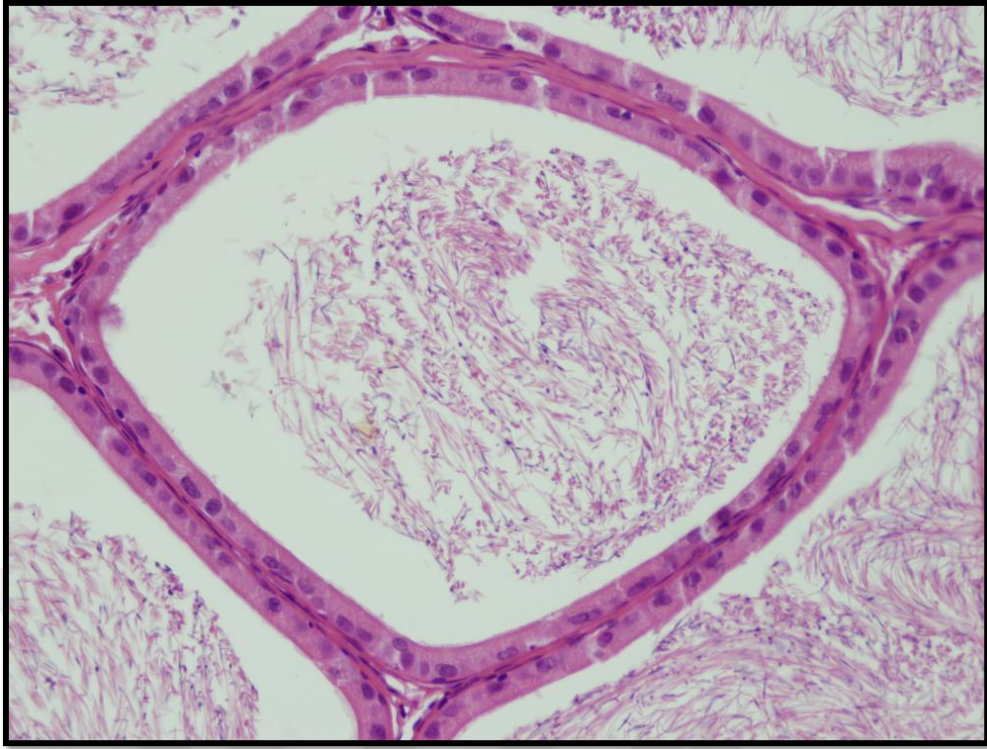
Resim 15. Cis grubuna ait sperm hücre morfolojileri. Normal (★), baş anomali (▼) ve boyun anomali (→) olan sperm (Eozin-Y, X200).



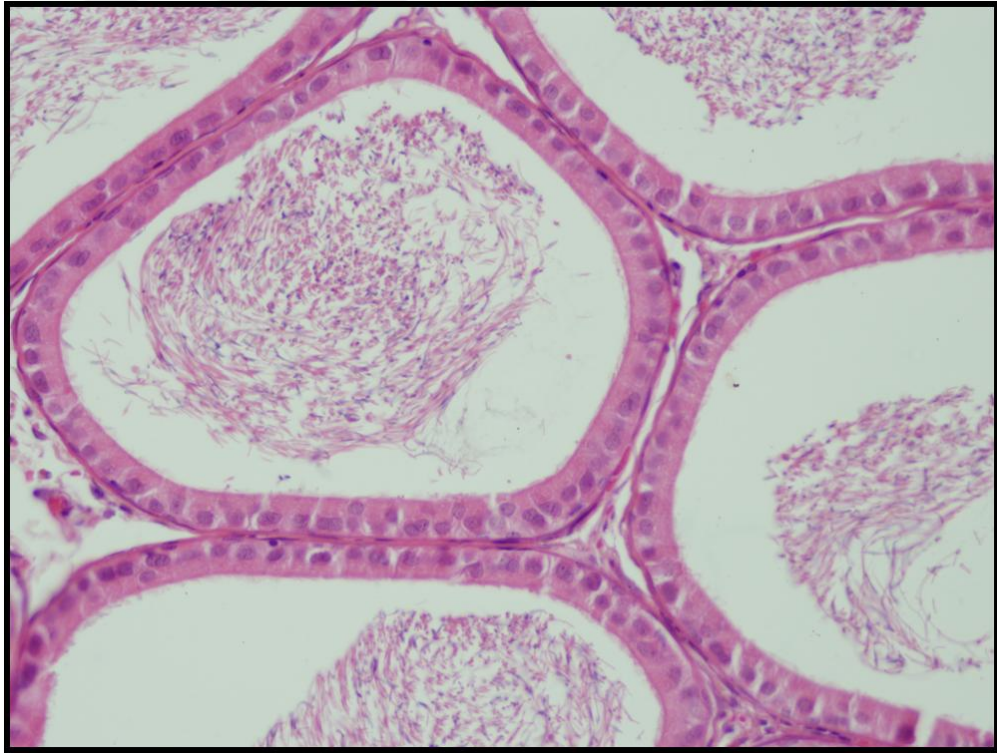
Resim 16. Kontrol grubuna ait epididimis dokusu (H&E, X400).



Resim 17. Cis grubuna ait epididimis dokusu. Yüksek prizmatikten alçak prizmatığe geçiş (↔) (H&E, X400).



Resim 18. Cis+RA grubuna ait epididimis dokusu (H&E, X400).



Resim 19. RA grubuna ait epididimis dokusu (H&E, X400).

6.5. Biyokimyasal Değerlendirmeler

Deney gruplarına ait testis dokusunda MDA, SOD ve GSH-Px değerleri ölçüldü, sonuçlar istatistiksel açıdan değerlendirildi ve gruplar arası anlamlı bir farklılık bulunamadı ($p>0.05$) (Tablo 6).

Testis dokusunda MDA seviyesinde, kontrol grubuna göre, Cis ve Cis+RA gruplarında anlamlı bulunmayan bir artma görülürken, RA grubunda ise anlamlı bulunmayan bir azalma olduğu görüldü. Testis dokusundaki MDA seviyesinde, Cis grubunda diğer gruplara göre anlamlı bulunmayan bir artış görüldü.

Testis dokusu SOD aktivitesi kontrol grubuna göre Cis, Cis+RA ve RA gruplarında azalmıştır. Ancak gruplar arasındaki bu değişimlerde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Cis grubuna göre testis dokusundaki SOD aktivitesi, Cis+RA ve RA gruplarında azalmıştır; ancak bu azalma anlamlı değildir.

Testis dokusu GSH-Px aktivitesinde, kontrol grubuna göre Cis+RA grubunda anlamlı bulunmayan bir azalma görülürken Cis grubunda ise yine anlamlı bulunmayan bir artış görüldü. Cis grubuna göre Cis+RA grubundaki azalma ile RA grubundaki artış ve Cis+RA grubuna göre RA grubundaki artış da anlamlı değildi.

Tablo 6. Doku biyokimyası sonuçlarının değerlendirilmesi

	Kontrol ortalama± SS	Cis ortalama± SS	Cis+RA ortalama± SS	RA ortalama± SS
MDA(nmol/g doku)	186.74±20.96	191.04±69.05	188.20±45.71	180.50±29.81
SOD(U/mg protein)	21.52±10.95	13.98±5.33	12.57±4.95	10.97±2.55
GSH-Px (U/mg protein)	3.36±0.40	3.92±1.36	2.75±1.05	4.55±1.37

Parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Kanserin, çağın en önemli hastalıklarından biri olması nedeniyle kemoterapötik ajanlar ve bunların istenmeyen etkileri halihazırda pek çok araştırmacının ilgi konusudur. Bu istenmeyen yan etkileri gidermek için ise antioksidan maddelere sıklıkla başvurulmaktadır.

Kanser tedavilerinde kullanılan başlıca kemoterapötik ajanlardan biri de cisplatindir. Ciddi yan etkileri sebebiyle kullanımını sınırlansa da günümüzde cisplatin hâlâ mesane kanseri, serviks kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, yumurtalık kanseri, testis kanseri, baş-boyun skuamöz hücreli karsinomları gibi birçok kanser tipinin tedavisinde kullanılmaktadır (2, 3). Bu durum ise cisplatini birçok araştırmamanın konusu haline getirmektedir.

Cisplatinin en yaygın yan etkilerinden biri de gonadal disfonksiyondur (5). Sağlıklı testislerde Cis tedavisinin toksik etkileri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (6-8). Yapılan çalışmalarda cisplatinin yan etkileri antioksidanlarla önlenmeye ya da tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Türk ve ark., cisplatinin istenmeyen etkilerine karşı ellajik asit uygulamasının, Kaya ve ark. ise hesperidin uygulamasının sonuçlarını araştırmışlardır (200, 201). Biz de çalışmamızda cisplatin kullanımı ile sıçanlarda oluşabilecek testis hasarına karşı rosmarinik asitin koruyucu etkilerinin olup olmadığını histolojik ve biyokimyasal olarak araştırdık.

Deneysel çalışmalarda cisplatinin; total sperm sayısı, motilitesi, vitalitesi, normal morfolojili sperm sayısı ve seminifer tübül çapında azalmaya ayrıca testiküler dokuda dejenerasyon, nekroz, ödem gibi histopatolojik bozukluklara neden olduğu bildirilmektedir (202). Türk ve ark., cisplatinin testis dokusunda ödem, nekroz ve dejenerasyon oluşturduğu, germinal epitelde incelleme ve bazı seminifer tübüllerde spermatogenik aktivitede düşüş meydana getirdiğini bildirmişlerdir (200). Lirdi ve ark.'ları, cisplatinin testis dokusunda, seminifer epitel hücrelerinde dejenerasyona, lümene olgunlaşmamış germ hücrelerinin dökülmesine ve peritübüler dokuda yer alan hücrelerin morfolojilerinin bozulmasına neden olduğunu rapor etmişlerdir (203).

Favareto ve ark., cisplatin uygulamasının, testislerde hücre kayıplarına ve germ hücrelerinin olgunlaşmadan lümene dökülmesine, seminifer epitelin germ hücre içeriğinin azalmasına, Sertoli hücrelerinin vakuolize bir hale gelmesine neden olduğunu

bildirmişlerdir (204). Mohammadnejad ve arkadaşları cisplatin toksisitesinin testis üzerindeki sonuçlarını; atrofik seminifer tübül, bazal lamina ile spermatogoniyumlar arasında bağlantı kayıpları, germinal epitelde apoptozis ve nekrozis, peritübüler alanda inflamasyon olarak belirtmişlerdir (205). Yine yapılan çalışmalar, cisplatine maruziyet sonucunda Sertoli hücrelerinin büzüşerek yıldız şekli aldıklarını, bazal membrandan ve komşu hücrelerden ayrıldıklarını ve bunun sonucunda da hücreler arası boşlukların arttığını bildirmektedir. Cisplatinin Sertoli hücre membranlarında hasara yol açması nedeniyle bu hücrelerdeki endoplazmik retikulum ve miyofibril yapılarının kasılıp gevşemesi sonucu germ hücrelerinin olgunlaşmadan lümene döküldüğü de çalışmalarda belirtilmiştir (206, 207). Biz de çalışmamızda cisplatinin testis dokusunda morfolojik hasar oluşturduğunu gördük. Cis grubunda; peritübüler dokuda ondülasyon ve germinal epitelyum kalınlığındaki azalma ile birlikte yer yer vakuolizasyon görüldü. Nekroza gitmiş primer spermatositler ve lümene dökülen immatür hücreler gözlenirken, bazal kompartmanda spermatogonyumlar ve Sertoli hücreleri arasında hafif derecede açılmalar izlendi. Ayrıca interstisyel alanda ödem ve yer yer Leydig hücrelerinde atrofi görüldü. Cisplatine bağlı testis hasarının araştırıldığı pek çok çalışmada saptanan germinal epitelde deskuamasyona bağlı tübül lümeninde germ hücre döküntüleri ve kaybı, interstisyel alanda ödem varlığı çalışmamızın bulgularını destekler niteliktedir (202, 208, 209).

Çalışmamızda, testis seminifer tübüllerinde hasar değerlendirmesi için uyguladığımız Johnsen skorlamasının sonuçları tüm gruplarda birbirine oldukça yakın bulunmuş olup gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. Bu durum 7 mg/kg i.p. tek doz verilen cisplatinin testislerde Johnsen skorunu düşürecek kadar ağır bir hasar vermemesinden kaynaklanmaktadır.

Sperm üretimindeki azalma, cisplatinin germ hücrelerinde toksik etki yaptığını doğrulamaktadır (210). Bu gibi sitotoksik ilaçların seminifer tübüllerde hücre ölümüne yol açarak spermatogenezi deprese ettiği bilinmektedir (202). Benzer çalışmalarda da, cisplatin uygulaması sonucunda, sperm sayısı ve hareketinde azalma, anormal morfolojiye sahip sperm sayısında ise artış gözlenmiştir (200, 202, 209, 211). Rezvanfar ve ark. cisplatinin canlı sperm oranını da azalttığını bildirmişlerdir (209). Kaya ve ark. tek doz 7 mg/kg i.p. Cis uygulamasının ardından Cis'in sperm motilitesini ve epididimal sperm konsantrasyonunu düşürdüğünü; anormal sperm oranını arttırdığını belirlemişlerdir (201). Türk ve ark. da tek doz 7 mg/kg i.p. cisplatin uygulamasının epididimal sperm

konsantrasyonunu ve motiliteyi azalttığını, sperm morfolojik anomalilerini ise arttırdığını bildirmektedir (200). Benzer şekilde Aksu ve ark., cisplatinin sperm yoğunluğu ve motilitesinde anormal değişikliklere sebep olduğunu belirtmişlerdir (212). Bizim çalışmamızdaki semen analizine ait verilerin istatistiksel analiz sonuçlarına göre; sperm motilite oranı Cis grubuna kıyasla tüm gruplarda artmıştı ancak bu artış yalnızca RA grubunda istatistiksel olarak anlamlı idi. Sperm vitalitesi de Cis grubuna göre tüm gruplarda bir artış gösterdi. Fakat bu artış yine sadece RA grubunda anlamlı olarak bulundu ($p<0,008$). Total sperm sayısında diğer gruplara göre Cis grubunda anlamlı olmayan bir artış olsa da artan bu sperm sayısının önemli bir kısmının anormal morfolojili spermiler olduğu belirlendi. Anormal morfoloji oranı; kontrol grubuna göre Cis grubunda anlamlı olarak artmıştı ve tedavi (Cis+RA) grubunda ise Cis grubuna kıyasla anlamlı bir azalma vardı ($p<0,008$). Bu da rosmarinik asitin cisplatin toksisitesine bağlı gelişen anormal sperm morfoloji oranını etkin biçimde tedavi ettiğini göstermektedir.

Testislerde, homeostazisin temini ve hasarlı germ hücrelerinin ortadan kaldırılması spontan apoptozlarla sağlanmaktadır. Kemoterapi ve radyoterapi ise apoptozu arttıran dış etmenlerdir (213). Peltola ve arkadaşları cisplatinin serbest radikal üretimini artırdığını, inflamasyonu ve apoptozisi tetikleyerek hücrelerde hasara neden olduğunu belirtmişlerdir (214). Bir diğer çalışmada, cisplatinin doza bağlı olarak germ hücrelerinde apoptozu tetiklediği rapor edilmiştir (8). Bu tetiklemenin, cisplatinin neden olduğu DNA kırıkları sonucu ortaya çıktığı da bildirilen bilgiler arasındadır (215). Domitrović ve ark. ise RA ile oksidatif stresin, inflamatuvar yanıtın ve apoptotik hücre ölümünün baskılanmasının, Cis kaynaklı böbrek hasarının tedavisinde etkili olacağını belirtmişlerdir (216). Hajhosseini ve ark., çalışmalarında; elektromanyetik alana maruz kalan sıçan grubuna göre rosmarinik asit grubunda Sertoli hücrelerinin apoptozis düzeyinin anlamlı derecede azaldığını belirtmişlerdir (217). Lirdi ve ark. cisplatine bağlı gelişen germ hücre apoptozunun saptanmasında TUNEL yöntemini kullanmışlar ve cisplatinin TUNEL (+) hücre sayısını anlamlı bir şekilde yükselttiğini belirlemişlerdir (203). Cisplatinin yol açtığı testis hasarına bitki özlerinin nasıl tesir ettiğinin araştırıldığı bir diğer çalışmada da TUNEL (+) germ hücre sayısında büyük ölçüde artış bildirilmiştir (215). Biz de çalışmamızda apoptotik indeks (AI) tespiti amacıyla TUNEL yöntemini kullandık. Değerlendirmelerimiz sonucunda Cis grubunda AI'nin kontrol grubuna göre anlamlı derecede attığını gördük. Tedavi (Cis+RA) grubunda ise Cis grubuna göre anlamlı derecede azalma mevcuttu. Cis

grubundaki anlamlı artışa karşın Cis+RA grubundaki anlamlı azalış, cisplatin ile birlikte verilen RA'nın testiste cisplatin toksisitesini azaltarak koruyucu ve / veya tedavi edici etki yaptığının göstergesidir.

Lipit oksidasyonu, hücre zarlarına karşı zararlı bir potansiyele sahiptir. Doymamış yağ asitleri esas olarak oksidasyona karşı hassas olduğundan OH⁻ ile peroksidasyona başlamaktadır (140). Lipidler üzerindeki oksidatif saldırı aynı zamanda malondialdehid ve 4-hidroksinonenal gibi reaktif aldehytlerin oluşumuyla sonuçlanır (141). Malondialdehit (MDA), çapraz bağ oluşturmak için proteinler veya DNA üzerindeki birincil aminler ile reaksiyona girebilen bir dialdehittir (142). Türk ve ark., tek doz 7 mg/kg i.p. cisplatin uygulaması ile artan MDA düzeyinin, 10 gün boyunca oral gavaj ile günde 10 mg/kg dozunda verilen ellajik asit tarafından normale yakın düzeye düşürüldüğünü göstermişlerdir (200). Kaya ve ark. ise tek doz 7 mg/kg i.p. cisplatin uygulamasının ardından 14 gün boyunca 50 mg/kg hesperidin uygulayarak cisplatin tarafından yükseltelen MDA düzeylerini anlamlı ölçüde düşük bulmuşlardır (201). Zhao ve ark. da cisplatinin sıçan testislerinde MDA içeriğini arttırdığını bildirmişlerdir (218). Ayrıca RA'nın astrosit kültüründe üretilen MDA miktarını düşürerek oksidatif strese karşı koruma sağladığı, H₂O₂'nin indüklediği hücre hasarını önlediği bilinmektedir (219). Hajhosseini ve ark., çalışmalarında elektromanyetik alana maruz kalan sıçan grubuna göre rosmarinik asit grubunun MDA düzeyinin anlamlı derecede azaldığını rapor etmişlerdir (217). Biz de diğer gruplara göre Cis grubu testis dokularındaki MDA seviyesinde artış tespit etsek de istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı bir fark bulamadık. Cis+RA ve RA gruplarında ise Cis grubuna göre MDA seviyesinde az miktarda olsa bir azalma görülmesi RA'nın koruyucu etki yaptığını bir işaret olarak kabul edilebilir.

Süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) dokulardaki oksidan hasara karşı koyan önemli antioksidan enzimlerdir. Zhang ve ark., RA tedavisinin, karaciğer ve böbrekte SOD ve GSH-Px aktivitesinde anlamlı bir artış sağladığını belirtmişlerdir (220). Zhao ve ark. testiste yaptıkları bir çalışmada cisplatinin SOD ve GSH-Px aktivitelerini azalttığını bildirmişlerdir (218). Benzer şekilde Kaya ve ark. cisplatin uygulamasının SOD ve GSH-Px düzeylerini düşürdüğünü tespit etmişlerdir (201). Türk ve ark., da cisplatinin GSH-Px düzeyini azalttığını bildirmişlerdir (200). Bizim çalışmamızda ise SOD ve GSH-Px aktivitelerinde gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0.05).

Çalışmamızda 3. gün tek doz 7 mg/kg cisplatin verildi ve 7 günlük sürenin sonucunda cisplatinin testis dokusunda histolojik yapıyı bozduğu ve apoptozu indüklediği saptandı. Bununla birlikte antioksidan etkiye sahip doğal bir ürün olan RA'nın yedi gün süreyle verilmesi sonucu, cisplatinin testiste oluşturduğu hasarların önemli ölçüde düzeltildiği görüldü. Ayrıca saf antioksidan grubumuzdan elde ettiğimiz sperm sayısı, motilitesi ve vitalitesine ait verilerin kontrol grubuna ait verilerden daha yüksek olduğunu, anormal morfolojili sperm oranının ise daha düşük olduğunu gördük. Buna dayanarak rosmarinik asitin sağlıklı insanlarda da sperm sayısını, kalitesini artırmak amacıyla kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, kanser tedavisi için kullanılan cisplatinin histopatolojik ve biyokimyasal analizlere göre testis dokusunda hasara yol açtığını, rosmarinik asitin ise bu hasarı önemli ölçüde düzelttiğini söyleyebiliriz. Ancak RA'nın cisplatin kaynaklı testis hasarı üzerine etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için farklı Cis ve RA dozu ve uygulama sürelerine sahip başka çalışmalarda ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

8. KAYNAKLAR

1. Vokes EE, Weichselbaum RR, Mick R, McEvilly JM, Haraf DJ, Panje WR (1992). Favorable long-term survival following induction chemotherapy with cisplatin, fluorouracil, and leucovorin and concomitant chemoradiotherapy for locally advanced head and neck cancer. JNCI: Journal of the National Cancer Institute 84(11): 877-882.
2. Miller RP, Tadagavadi RK, Ramesh G, Reeves WB (2010). Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity. Toxins 2(11): 2490-2518.
3. Dos Santos NAG, Rodrigues MAC, Martins NM, Dos Santos AC (2012). Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. Archives of Toxicology 86(8): 1233-1250.
4. Wang G, Reed E, Li QQ (2004). Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer. Oncology Reports 12(5): 955-965.
5. Ateşşahin A, Şahna E, Türk G, Çeribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A, Bulmuş Ö (2006). Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. Journal of Pineal Research 41(1): 21-27.
6. Sawhney P, Giammona CJ, Meistrich ML, Richburg JH (2005). Cisplatin-induced long-term failure of spermatogenesis in adult C57/Bl/6J mice. Journal of Andrology 26(1): 136-145.
7. Seaman F, Sawhney P, Giammona CJ, Richburg JH (2003). Cisplatin-induced pulse of germ cell apoptosis precedes long-term elevated apoptotic rates in C57/BL/6 mouse testis. Apoptosis 8(1): 101-108.
8. Zhang X, Yamamoto N, Soramoto S, Takenaka I (2001). Cisplatin-induced germ cell apoptosis in mouse testes. Archives of Andrology 46(1): 43-49.
9. Adler ID, El Tarras A (1990). Clastogenic effects of cis-diamminedichloroplatinum II. Induction of chromosomal aberrations in primary spermatocytes and spermatogonial stem cells of mice. Mutation Research Letters 243(3): 173-178.
10. Vawda AI (1994). Effect of testosterone on cisplatin-induced testicular damage. Archives of Andrology 32(1): 53-57.

11. Çayır K, Karadeniz A, Şimşek N, Yıldırım S, Karakuş E, Kara A, Şengül E (2011). Pomegranate seed extract attenuates chemotherapy-induced acute nephrotoxicity and hepatotoxicity in rats. *Journal of Medicinal Food* 14(10): 1254-1262.
12. Karadeniz A, Simsek N, Karakus E, Yildirim S, Kara A, Can I, Kisa F, Emre H, Turkeli M (2011). Royal jelly modulates oxidative stress and apoptosis in liver and kidneys of rats treated with cisplatin. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Article ID 981793, Pages 10.
13. Aminsharifi A, Shakeri S, Ariaifar A, Moeinjahromi B, Kumar PV, Karbalaeeidoost S (2010). Preventive role of exogenous testosterone on cisplatin-induced gonadal toxicity: an experimental placebo-controlled prospective trial. *Fertility and Sterility* 93(5): 1388-1393.
14. Ilbey YO, Ozbek E, Cekmen M, Simsek A, Otunctemur A, Somay A (2009). Protective effect of curcumin in cisplatin-induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Human Reproduction* 24(7): 1717-1725.
15. Ilbey YO, Ozbek E, Simsek A, Cekmen M, Otunctemur A, Somay A (2009). Chemoprotective effect of a nuclear factor-κB inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate, against cisplatin-induced testicular damage in rats. *Journal of Andrology* 30(5): 505-514.
16. Clifford MN (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates—nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79(3): 362-372.
17. Baba S, Osakabe N, Natsume M, Yasuda A, Muto Y, Hiyoshi K, Takano H, Yoshikawa T, Terao J (2005). Absorption, metabolism, degradation and urinary excretion of rosmarinic acid after intake of *Perilla frutescens* extract in humans. *European Journal of Nutrition* 44(1): 1-9.
18. Gamaro GD, Suyenaga E, Borsoi M, Lermen J, Pereira P, Ardenghi P (2011). Effect of rosmarinic and caffeic acids on inflammatory and nociception process in rats. *ISRN Pharmacology* Article ID 451682, 1–6.
19. Kuo CF, Su JD, Chiu CH, Peng CC, Chang CH, Sung TY, Huang SH, Lee WC, Chyau CC (2011). Anti-inflammatory effects of supercritical carbon dioxide extract

- and its isolated carnosic acid from *Rosmarinus officinalis* leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59(8): 3674-3685.
20. McKay DL, Blumberg JB (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives 20(8): 619-633.
 21. Malo C, Gil L, Gonzalez N, Martínez F, Cano R, De Blas I, Espinosa E (2010). Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). Cryobiology 61(1): 142-147.
 22. Ross MH, Pawlina W (2016). Histology atext atlas with correlated cell and molecular biology. 7th. ed. Wolters Kluwer Health 790-812.
 23. Eroschenko VP (2001). Di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. Di Fore Histoloji Atlası – Fonksiyonel Yönleriyle. 9th. ed. Çeviren: Demir R, Palme Yayıncılık, Ankara, 283-288.
 24. Yıldırım M (2003). İnsan Anatomisi. Altıncı baskı. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul; Sayfa: 226-232.
 25. Patni P, Mohanty SK, Singh R (2017). Embryonic development of the testis. in male infertility: Understanding, causes and treatment, Springer, Singapore; Pages: 13-24.
 26. Moore KM, Persaud TVN (2002). Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. 6th ed. Çeviren: Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Sti., İstanbul, 323-325.
 27. Sadler TW (2010). Langman's Medical Embryology. Langman Medikal Embriyoloji. 11th ed. Çeviren: Başaklar AC, Palme Yayıncılık, Ankara, 246-248.
 28. Varghese AC, Deepinder F, Chandra A, Jeat AW, Pathan F, Agarwal A. Male Reproductive System-Anatomy and Physiology. Pages: 1-14.
 29. Karl J, Capel B (1998). Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium. Developmental Biology 203(2): 323-333.

30. Tortora GJ, Derrickson B (2009). Principles Anatomy and Physiology. 12th ed. America: John Wiley & Sons, 1082-1093.
31. Raff H, Widmair EP, Strang KT (2010). Vander's Human Physiology. Vander İnsan Fizyolojisi. 10th ed. Çeviren: Demirgören S, İzmir Güven Kitabevi, İzmir, 657-665.
32. Kılıçoğlu M (2007). Erişkin sıçanlarda etan dimetan sülfonat tarafından oluşturulan testis hasarının ve bu hasarın önlenmesinde çeşitli vitaminlerin etkinliğinin değişik yöntemlerle araştırılması. Uzmanlık tezi, Osmangazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
33. Toprak M, Akkın MS (1996). Anatomi Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul; Sayfa: 844-861.
34. Sancak B, Cumhuriyet M (1999). Fonksiyonel Anatom Baş-Boyun ve İç Organlar. Beşinci baskı. Odtü Yayıncılık, Ankara.
35. Gartner LP, Hiatt JL (2007). Color Textbook of Histology. 11th ed. Saunders Company, Philadelphia, 489-501.
36. Şimşek E (1992). Anatomi Fizyoloji. Hacettepe Taş Kitapçılık, Ankara.
37. Agger P (1971). Scrotal and testicular temperature: its relation to sperm count before and after operation for varicocele. Fertility and Sterility 22(5): 286-297.
38. Ding Y, Tang J, Zou J, She R, Wang Y, Yue Z, Tian J, Xia K, Yin J, Wang D (2011). The effect of microgravity on tissue structure and function of rat testis. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 44(12): 1243-1250.
39. Middendorff R, Müller D, Mewe M, Mukhopadhyay AK, Holstein AF, Davidoff MS (2002). The tunica albuginea of the human testis is characterized by complex contraction and relaxation activities regulated by cyclic GMP. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 87(7): 3486-3499.
40. Kierszenbaum AL (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Çeviren: Ramazan Demir, Palme Yayıncılık, Ankara, 532-564.
41. Junqueira LC, Carneiro J (2009). Temel Histoloji Text & Atlası. Çeviren: Solakoğlu S, Aytekin Y, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 418-439.

42. Junqueira LC, Carneiro J (2006). Basic Histology. Temel Histoloji. Onuncu baskı, Çeviren: Aytekin Y, Solakoğlu S, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 431-442.
43. Roosen-Runge EC, Holstein AF (1978). The human rete testis. Cell and Tissue Research 189(3): 409-433.
44. Koyuncu D (1995). Erişkin sıçan testisindeki parakrin etkileşimlerin değişik yöntemlerle araştırılması. Doktora tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
45. Nagano T (1966). Some observations on the fine structure of the Sertoli cell in the human testis. Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie 73(1): 89-106.
46. Farsak F (2011). Medulla spinalis yaralanmasının testis ince yapısına etkisi. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı, Adana.
47. Sharma RK (2007). Physiology of male gametogenesis. Falcone T, Hurd W (Ed.), Clinical Reproductive Medicine and Surgery, 73-83. <https://www.elsevier.com/books/clinical-reproductive-medicine-and-surgery/falcone/978-0-323-03309-1>
48. Von Eckardstein S, Simoni M, Bergmann M, Weinbauer GF, Gassner P, Schepers AG, Nieschlag E (1999). Serum inhibin B in combination with serum follicle-stimulating hormone (FSH) is a more sensitive marker than serum FSH alone for impaired spermatogenesis in men, but cannot predict the presence of sperm in testicular tissue samples. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 84(7): 2496-2501.
49. Petersen C, Söder O (2006). The Sertoli cell—a hormonal target and ‘super’ nurse for germ cells that determines testicular size. Hormone Research in Paediatrics 66(4): 153-161.
50. Söder O (2007). Sexual dimorphism of gonadal development. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism 21(3): 381-391.
51. Ross MH, Pawlina W (2006). Histology. Lippincott Williams & Wilkins. Page: 728-759.

52. Clermont Y (1972). Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews* 52(1): 198-236.
53. Karpenko NO, Bondarenko V A, Kavok NS, Borikov, O (2007). The maturation of the spermatozoa: events, consequences and possible ways of control. *Fiziologichnyi Zhurnal* (Kiev, Ukraine: 1994) 53(1): 91-103.
54. Erdoğan D, Görgün M, Hatipoğlu MT, Ilgaz C (2007). Özel Histoloji. İkinci baskı. Hatipoğlu Yayınevi, Ankara, 156-167.
55. De Kretser DM, Kerr JB, Paulsen C A (1981). Evaluation of the ultrastructural changes in the human Sertoli cell in testicular disorders and the relationship of the changes to the levels of serum FSH. *International Journal of Andrology* 4(1-6): 129-144.
56. Dym M, Fawcett DW (1971). Further observations on the numbers of spermatogonia, spermatocytes, and spermatids connected by intercellular bridges in the mammalian testis. *Biology of Reproduction* 4(2): 195-215.
57. Junquiera LC (2006). Erkek Üreme Sistemi. Temel Histoloji. Çeviren Aytekin Y, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 512-547.
58. Barros C Franklin LE (1968). Behavior of the gamete membranes during sperm entry into the mammalian egg. *The Journal of Cell Biology* 37(3): C13.
59. Abraham L. (2006). Üreme Sistemi. Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Çeviren Demir R. Birinci baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 531-564.
60. Bloom W, Fawcett DW (1986). *A Textbook of Histology*. 8th ed. W. B. Saunders Company, US, 796-828.
61. O'shaughnessy PJ, Baker PJ, Johnston H (2006). The foetal Leydig cell—differentiation, function and regulation. *International Journal of Andrology* 29(1): 90-95.
62. Clark AM, Garland KK, Russell LD (2000). Desert hedgehog (Dhh) gene is required in the mouse testis for formation of adult-type Leydig cells and normal development of peritubular cells and seminiferous tubules. *Biology of Reproduction* 63(6): 1825-1838.

63. Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Papadopoulos V, Zirkin BR, Hardy MP (2006). In search of rat stem Leydig cells: identification, isolation, and lineage-specific development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(8): 2719-2724.
64. Svechnikov K, Landreh L, Weisser J, Izzo G, Colón E, Svechnikova I, Söder O (2010). Origin, development and regulation of human Leydig cells. *Hormone Research in Paediatrics* 73(2): 93-101.
65. Stikkelbroeck NM, Otten BJ, Pasic A, Jager GJ, Sweep CF, Noordam K, Hermus AR (2001). High prevalence of testicular adrenal rest tumors, impaired spermatogenesis, and Leydig cell failure in adolescent and adult males with congenital adrenal hyperplasia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(12): 5721-5728.
66. De Krester DM (1994). The cytology of the testis. In Knobill E, Neil JD (Eds), *The Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press: 1177–1290.
67. Achermann JC, Ozisik G, Ito M, Orun UA, Harmanci K, Gurakan B, Jameson JL (2002). Gonadal determination and adrenal development are regulated by the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1, in a dose-dependent manner. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87(4): 1829-1833.
68. Ferlin A, Arredi B, Zuccarello D, Garolla A, Selice R, Foresta C (2006). Paracrine and endocrine roles of insulin-like factor. *Third Journal of Endocrinological Investigation* 29(7): 657-664.
69. Ivell R, Anand-Ivell R (2009). Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction. *Human Reproduction Update* 15(4): 463-476.
70. Fawcett DW (1973). Observations on the organization of the interstitial tissue of the testis and on the occluding cell junctions in the seminiferous epithelium. *Advances in the Biosciences* 10: 83-89.
71. Dym M, Fawcett DW (1970). The blood-testis barrier in the rat and the physiological compartmentation of the seminiferous epithelium. *Biology of Reproduction* 3(3): 308-326.

72. Cohen J, Ooms MP, Vreeburg JTM (1981). Reduction of fertilizing capacity of epididymal spermatozoa by 5 α -steroid reductase inhibitors. *Experientia* 37(9): 1031-1032.
73. Turner TT, D'Addario D, Howards SS (1978). Further observations on the initiation of sperm motility. *Biology of Reproduction* 19: 1095–1101.
74. Macmillan EW (1954). The blood supply of the epididymis in man. *British Journal of Urology* 26(1): 60-71.
75. Elzanaty S, Richthoff J, Malm J, Giwercman A (2002). The impact of epididymal and accessory sex gland function on sperm motility. *Human Reproduction* 17(11): 2904-2911.
76. Curtis SK, Amann RP (1981). Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *Journal of Animal Science* 53(6): 1645-1657.
77. Potts RJ, Jefferies TM, Notarianni LJ (1999). Antioxidant capacity of the epididymis. *Human Reproduction* 14(10): 2513-2516.
78. Bedford JM (1973). The maturation of spermatozoa in the human epididymis. *J Reprod Fertil* 18: 199-213.
79. Johnson L, Varner DD (1988). Effect of daily spermatozoon production but not age on transit time of spermatozoon through the human epididymis. *Biology of Reproduction* 39(4): 812-817.
80. Bedford JM (1994). The status and the state of the human epididymis. *Human Reproduction* 9(11): 2187-2199.
81. Gerschenson LE, Rotello RJ (1992). Apoptosis: a different type of cell death. *The FASEB Journal* 6(7): 2450-2455.
82. Allen PD, Newland AC, Bustin SA (1993). The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Reviews* 7(1): 63-73.
83. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26(4): 239.

84. Elmore S (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology* 35(4): 495-516.
85. Chen Q, Gong B, Almasan A (2000). Distinct stages of cytochrome c release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation* 7(2): 227-233.
86. Onal M, Ovet G, Onal O (2016). Review of apoptosis. *Medcrave Online Journal of Immunology* 3(1): 73.
87. Searle J (1982). Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathology Annual* 17(2): 229-259.
88. Hassan M, Watari H, AbuAlmaaty A, Ohba Y, Sakuragi N (2014). Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *BioMed Research International* Article ID 150845, Pages 23.
89. Saraste A, Pulkki K (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* 45(3): 528-537.
90. Tasdemir E, Galluzzi L, Maiuri MC, Criollo A, Vitale I, Hangen E, Modjtahedi N, Kroemer G (2008). Methods for assessing autophagy and autophagic cell death. In *Autophagosome and Phagosome*, Humana Press 29-76.
91. Ulukaya E (2003). Apoptozis ders notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı, 15-26.
92. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 119(3): 493-501.
93. Kressel M, Groscurth P (1994). Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell and Tissue Research* 278(3): 549-556.
94. Wang D, Lippard SJ (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* 4(4): 307-320.
95. Shahid F, Farooqui Z, Khan F (2018). Cisplatin-induced gastrointestinal toxicity: An update on possible mechanisms and on available gastroprotective strategies. *European Journal of Pharmacology* 827(15): 49–57.

96. Prestayko AW, Crooke ST, Carter SK (1980). Cisplatin, current status and new developments. University of Alabama in Birmingham Comprehensive Cancer Center. Bristol Laboratories. Academic Press, New York.
97. Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 205(4972): 698-699.
98. Rossof AH, Slayton RE, Perlia CP (1972). Preliminary clinical experience with cis-diamminedichloroplatinum (II) (NSC 119875, CACIS). *Cancer* 30(6): 1451-1456.
99. Kelland L (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer* 7(8): 573-584.
100. Liira J, Verbeek JH, Costa G, Driscoll TR, Sallinen M, Isotalo LK, Ruotsalainen JH (2014). Pharmacological interventions for sleepiness and sleep disturbances caused by shift work. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Article ID CD009776 Issue 8.
101. Giaccone G (2009). Clinical perspectives on platinum resistance. *Drugs* 59: 9–17.
102. Iwasaki Y, Nagata K, Nakanishi M, Natuhara A, Kubota Y, Ueda M, Arimoto T, Hara H (2005). Double-cycle, high-dose ifosfamide, carboplatin, and etoposide followed by peripheral blood stem-cell transplantation for small cell lung cancer. *Chest* 128(4): 2268-2273.
103. Markman M, Bundy BN, Alberts DS, Fowler JM, Clark Pearson DL, Carson LF, Wadler S, Sickel J (2001). Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology* 19(4): 1001-1007.
104. Kart A, Cigremis Y, Karaman M, Ozen H (2010). Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Experimental and Toxicologic Pathology* 62(1): 45-52.

105. Cayir K, Karadeniz A, Yildirim A, Kalkan Y, Karakoc A, Keles M, Tekin S (2009). Protective effect of L-carnitine against cisplatin-induced liver and kidney oxidant injury in rats. *Open Medicine* 4(2): 184-191.
106. Kuhlmann, MK, Burkhardt G, Köhler H (1997). Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrology, dialysis, transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association* 12(12): 2478-2480.
107. Hassan I, Chibber S, Naseem I (2013). Vitamin B2: a promising adjuvant in cisplatin based chemoradiotherapy by cellular redox management. *Food and Chemical Toxicology* 59: 715-723.
108. Lin X, Okuda T, Holzer A, Howell SB (2002). The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Pharmacology* 62(5): 1154-1159.
109. Holzer AK, Manorek GH, Howell SB (2006). Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Molecular Pharmacology* 70(4): 1390-1394.
110. Dasari S, Tchounwou PB (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 740(5): 364-378.
111. Chirino YI, Sánchez González DJ, Martínez Martínez CM, Cruz C, Pedraza Chaverri J (2008). Protective effects of apocynin against cisplatin-induced oxidative stress and nephrotoxicity. *Toxicology* 245(1-2): 18-23.
112. Florea AM, Büsselberg D (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers* 3(1): 1351-1371.
113. Manohar S, Leung N (2017). Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *Journal of Nephrology* 31(1): 15-25.
114. Fichtinger Schepman AMJ, Van der Veer JL, Den Hartog JH, Lohman PH, Reedijk J (1985). Adducts of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum (II) with DNA: formation, identification, and quantitation. *Biochemistry* 24(3): 707-713.

115. Dugbartey GJ, Peppone LJ, de Graaf IA (2016). An integrative view of cisplatin-induced renal and cardiac toxicities: molecular mechanisms, current treatment challenges and potential protective measures. *Toxicology* 371: 58-66.
116. Saad SY, Najjar TA, Alashari M (2004). Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 31(12): 862-867.
117. Jamieson ER, Lippard SJ (1999). Structure, recognition, and processing of cisplatin-DNA adducts. *Chemical Reviews* 99(9): 2467-2498.
118. Yáñez JA, Teng XW, Roupe KA, Fariss MW, Davies NM (2003). Chemotherapy induced gastrointestinal toxicity in rats: involvement of mitochondrial DNA, gastrointestinal permeability and cyclooxygenase-2. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 6(3): 308-314.
119. Khan R, Khan AQ, Qamar W, Lateef A, Tahir M, Rehman MU, Ali F, Sultana S (2012). Chrysin protects against cisplatin-induced colon. toxicity via amelioration of oxidative stress and apoptosis: probable role of p38MAPK and p53. *Toxicology and Applied Pharmacology* 258(3): 315-329.
120. Canta A, Pozzi E, Carozzi V (2015). Mitochondrial dysfunction in chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN). *Toxics* 3(2): 198-223.
121. Scuteri A, Galimberti A, Maggioni D, Ravasi M, Pasini S, Nicolini G, Bossi M, Miloso M, Cavaletti G, Tredici G (2009). Role of MAPKs in platinum-induced neuronal apoptosis. *Neurotoxicology* 30(2): 312-319.
122. Pabla N, Dong Z (2008). Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. *Kidney International* 73(9): 994-1007.
123. Bearcroft CP, Domizio P, Mourad FH, Andre EA, Farthing MJG (1999). Cisplatin impairs fluid and electrolyte absorption in rat small intestine: a role for 5-hydroxytryptamine. *Gut* 44(2): 174-179.
124. Song MY, Ku SK, Kim HJ, Han JS (2012). Low molecular weight fucoidan ameliorating the chronic cisplatin-induced delayed gastrointestinal motility in rats. *Food and Chemical Toxicology* 50(12): 4468-4478.

125. Poljsak B, Šuput D, Milisav I (2013). Achieving the balance between ROS and antioxidants: when to use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Article ID 956792, Pages 11.
126. Riley PA (1994). Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology* 65: 27-33.
127. De Bont R, Van Larebeke N (2004). Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. *Mutagenesis* 19(3): 169-185.
128. Chio IIC, Tuveson DA (2017). ROS in cancer: the burning question. *Trends in Molecular Medicine* 23(5): 411-429.
129. Bittar A, Jun J, La JH, Wang J, Leem JW, Chung JM (2017). Reactive oxygen species affect spinal cell type-specific synaptic plasticity in a model of neuropathic pain. *Pain* 158(11): 2137-2146.
130. Kalashnikova I, Mazar J, Neal CJ, Rosado AL, Das S, Westmoreland TJ, Seal S (2017). Nanoparticle delivery of curcumin induces cellular hypoxia and ROS-mediated apoptosis via modulation of Bcl-2/Bax in human neuroblastoma. *Nanoscale* 9(29): 10375-10387.
131. Yin B, Barrionuevo G, Batinic Haberle I, Sandberg M, Weber SG (2017). Differences in reperfusion-induced mitochondrial oxidative stress and cell death between hippocampal CA1 and CA3 subfields are due to the mitochondrial thioredoxin system. *Antioxidants & Redox Signaling* 27(9): 534-549.
132. Fridovich I (1978). The biology of oxygen radicals. *Science* 201(4359): 875-880.
133. Halliwell B, Gutteridge J (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219(1): 1.
134. Gutteridge JM (1994). Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions* 91(2-3): 133-140.
135. Kohen R, Nyska A (2002). Invited review: Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 30(6): 620-650.

136. Halliwell B, Gutteridge JM (2015). Free radicals in biology and medicine. Oxford University Press, USA Page 38-39.
137. Akkuş İ (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Birinci baskı. Mimoza Yayınları, Sayfa: 1-60.
138. Mercan U (2004). Toksikolojide serbest radikallerin önemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Dergisi 15(1): 91-96.
139. Shukla SK, Gupta ML (2010). Approach towards development of a radioprotector using herbal source against lethal irradiation. International Journal of Plant Sciences 1(5): 118-125.
140. Milne GL, Musiek ES, Morrow JD (2005). F2-isoprostanes as markers of oxidative stress in vivo: an overview. Biomarkers 10(sup1): 10-23.
141. Doorn JA, Petersen DR (2003). Covalent adduction of nucleophilic amino acids by 4-hydroxynonenal and 4-oxononenal. Chemico-Biological Interactions 143: 93-100.
142. Gürbüz G, Heinonen M (2015). LC–MS investigations on interactions between isolated β -lactoglobulin peptides and lipid oxidation product malondialdehyde. Food Chemistry 175: 300-305.
143. Şener G, Yeğen Berrak Ç (2009). İskemi reperfüzyon hasarı. Klinik Gelişim Dergisi 22(3): 5-14.
144. Kumar P, Chand S, Maurya PK (2016). Quercetin-modulated erythrocyte membrane sodium-hydrogen exchanger during human aging: correlation with ATPase's. Archives of Physiology and Biochemistry 122(3): 141-147.
145. Brigelius Flohe R (1999). Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. Free Radical Biology and Medicine 27(9-10): 951-965.
146. Patrice T, Rozec B, Sidoroff A, Blanloeil Y, Despins P, Perrigaud C (2016). Influence of Vitamins on Secondary Reactive Oxygen Species Production in Sera of Patients with Resectable NSCLC. Diseases 4(3): 25.

147. Cemeroğlu B, Yemenicioğlu A, Özkan M (2004). Meyve ve sebzelerin bileşimi. Meyve ve sebze işleme teknolojisi. İkinci baskı, Başkent Matbaacılık, Ankara,1: 1-88.
148. Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine* 31(6): 435-445.
149. Rice Evans C, Miller N, Paganga G (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science* 2(4): 152-159.
150. Jakus V (2000). The role of free radicals, oxidative stress and antioxidant systems in diabetic vascular disease. *Bratislavske Lekarske Listy* 101(10): 541-551.
151. Barbaste M, Verge S, Dumas M, Soulet S, Nay B, Arnaudinaud V, Vercauteren J (2002). Dietary antioxidants, peroxidation and cardiovascular risks. *Journal of Nutrition Health and Aging* 6(3): 209-223.
152. Duthie GG, Gardner PT, Kyle JA (2003). Plant polyphenols: are they the new magic bullet? *Proceedings of the Nutrition Society* 62(3): 599-603.
153. Oteiza PI, Erlejman AG, Verstraeten SV, Keen CL, Fraga CG (2005). Flavonoid-membrane interactions: a protective role of flavonoids at the membrane surface? *Journal of Immunology Research* 12(1): 19-25.
154. Vilegas W, Sanommiya M, Rastrelli L, Pizza C (1999). Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2): 403-406.
155. Abram V, Donko M (1999). Tentative identification of polyphenols in *Sempervivum tectorum* and assessment of the antimicrobial activity of *Sempervivum L.* *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(2): 485-489.
156. Noguchi Y, Fukuda K, Matsushima A, Haishi D, Hiroto M, Koder Y, Inada Y (1999). Inhibition of Df-protease associated with allergic diseases by polyphenol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47(8): 2969-2972.
157. Soobrattee MA, Neergheen VS, Luximon-Ramma A, Aruoma OI, Bahorun T (2005). Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and

- actions. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 579(1-2): 200-213.
158. Scarpati ML, Oriente G (1958). Isolamento e costituzione dell'acido rosmarinico (dal rosmarinus off.). *Ricerca Science* 28: 2329–2333.
 159. Petersen M, Abdullah Y, Benner J, Eberle D, Gehlen K, Hücherig S, Janiak V, Kim KH, Sander M, Weitzel C, Wolters S (2009). Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. *Phytochemistry* 70(15-16): 1663-1679.
 160. Swamy MK, Sinniah UR, Ghasemzadeh A (2018). Anticancer potential of rosmarinic acid and its improved production through biotechnological interventions and functional genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 102(18): 7775-7793.
 161. Ellis BE, Towers GHN (1970). Biogenesis of rosmarinic acid in *Mentha*. *Biochemical Journal* 118(2): 291-297.
 162. Razzaque A, Ellis BE (1997). Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. *Planta* 137(3): 287–291.
 163. Zinsmeister HD, Becker H, Eicher T (1991). Moose, eine Quelle biologisch aktiver Naturstoffe? *Angewandte Chemie* 103(2): 134-151.
 164. Furtado MA, De Almeida LCF, Furtado RA, Cunha WR, Tavares DC (2008). Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 657(2): 150-154.
 165. Ferreira LG, Celotto AC, Capellini VK, Albuquerque AAS, Nadai TRD, Carvalho MTD, Evora PRB (2013). Does rosmarinic acid underestimate as an experimental cardiovascular drug? *Acta Cirurgica Brasileira* 28: 83-87.
 166. Petersen M, Simmonds MS (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry* 62(2): 121-125.
 167. Nunes S, Madureira AR, Campos D, Sarmiento B, Gomes AM, Pintado M, Reis F (2017). Therapeutic and nutraceutical potential of rosmarinic acid-Cytoprotective properties and pharmacokinetic profile. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 57(9): 1799-1806.

168. Fadel O, El Kirat K, Morandat S (2011). The natural antioxidant rosmarinic acid spontaneously penetrates membranes to inhibit lipid peroxidation in situ. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1808(12): 2973-2980.
169. Sakihama Y, Cohen MF, Grace SC, Yamasaki H (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology* 177(1): 67-80.
170. Brewer MS (2011) Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 10(4): 221–247.
171. Sroka Z, Cisowski W (2003). Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food and Chemical Toxicology* 41(6): 753-758.
172. Bulgakov VP, Inyushkina YV, Fedoreyev SA (2012). Rosmarinic acid and its derivatives: biotechnology and applications. *Critical Reviews in Biotechnology* 32(3): 203-217.
173. Wu WY, Wang YP (2012). Pharmacological actions and therapeutic applications of *Salvia miltiorrhiza* depside salt and its active components. *Acta Pharmacologica Sinica* 33(9): 1119.
174. Chu X, Ci X, He J, Wei M, Cao Q, Guan M, Xie X, Deng X, He J (2012). Effects of a natural prolyl oligopeptidase inhibitor, rosmarinic acid, on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Molecules* 17(3): 3586-3598.
175. Vladimir Knežević S, Blažeković B, Kindl M, Vladić J, Lower Nedza A, Brantner A (2014). Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. *Molecules* 19(1): 767-782.
176. Karthik D, Viswanathan P, Anuradha CV (2011). Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 58(5): 514-521.

177. Jang AH, Kim TH, Kim GD, Kim JE, Kim HJ, Kim SS, Jin YH, Park YS, Park CS (2011). Rosmarinic acid attenuates 2, 4-dinitrofluorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. *International Immunopharmacology* 11(9): 1271-1277.
178. Sanbongi C, Takano H, Osakabe N, Sasa N, Natsume M, Yanagisawa R, Inoue KI, Sadakane K, Ichinose T, Yoshikawa T (2004). Rosmarinic acid in perilla extract inhibits allergic inflammation induced by mite allergen, in a mouse model. *Clinical & Experimental Allergy* 34(6): 971-977.
179. D'Amelio FS (1999). *Botanicals: A Phytocosmetic Desk Reference*. CRC Press, London, Pages: 361.
180. Astani A, Reichling J, Schnitzler P (2012). *Melissa officinalis* extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. *Chemotherapy* 58(1): 70-77.
181. Cheng AC, Lee MF, Tsai ML, Lai CS, Lee JH, Ho CT, Pan MH (2011). Rosmanol potently induces apoptosis through both the mitochondrial apoptotic pathway and death receptor pathway in human colon adenocarcinoma COLO 205 cells. *Food and Chemical Toxicology* 49(2): 485-493.
182. Ramalho LN, Pasta ÂA, Terra VA, Augusto M, Sanches SC, Souza Neto FP, Cecchini R, Gulin F, Ramalho FS (2014). Rosmarinic acid attenuates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats. *Food and Chemical Toxicology* 74: 270-278.
183. Perez Fons L, Garzon MT, Micol V (2010). Relationship between the antioxidant capacity and effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) polyphenols on membrane phospholipid order. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 161-171.
184. Vostálová J, Zdařilová A, Svobodová A (2010). Prunella vulgaris extract and rosmarinic acid prevent UVB-induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* 302(3): 171-181.
185. Furtado RA, De Araujo FRR, Resende FA, Cunha WR, Tavares DC (2010). Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. *Journal of Applied Toxicology: An International Journal* 30(3): 254-259.

186. Qiao S, Li W, Tsubouchi R, Haneda M, Murakami K, Takeuchi F, Yoshino M (2005). Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264. 7 macrophages. *Free Radical Research* 39(9): 995-1003.
187. Fallahzadeh AR, Rezaei Z, Rahimi HR, Barmak MJ, Sadeghi H, Mehrabi S, Rabani SM, Kashani IR, Barati V, Mahmoudi R (2017). Evaluation of the effect of pentoxifylline on cisplatininduced testicular toxicity in rats. *Toxicological Research* 33:(3) 255-263.
188. Sotnikova R, Okruhlicova L, Vlkovicova J, Navarova J, Gajdacova B, Pivackova L, Fialova S, Krenek P (2013). Rosmarinic acid administration attenuates diabetes-induced vascular dysfunction of the rataorta. *Journal of Pharmacy* 65(5): 713-23.
189. Demir R, Yilmazer S, Öztürk M, Üstünel İ, Demir N, Korgun ET, Akkoyunlu G (2001). *Histolojik Boyama Teknikleri*. Palme Yayıncılık, Ankara, 9-10.
190. Bancroft JD, Cook HC, Turner DR (1994). *Manual of histological techniques and their diagnostic application*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 425-427.
191. Demir R, Yilmazer S (2001). *Histolojik Boyama Teknikleri*. Palme Yayıncılık, Ankara; Sayfa: 1-50.
192. Oliveira Filho AB, Souza RS, Azeredo-Oliveira MT, Peruquetti RL, Cedenho AP (2010). Microdissection testicular sperm extraction causes spermatogenic alterations in the contralateral testis. *Genetics and Molecular Research* 9(3): 1405-13.
193. Johnsen SG (1970). Testicular biopsy score count - a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones* 1: 2-25.
194. Duru NK (1998). *Subfertil ve İnfertil Sperm Parametreleri*. GATA Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Notları, Ankara.
195. Makler A (1980). The improved 10 mic. Chamber for rapid sperm count and motility evaluation. *Fertility and Sterility* 33: 337-338.
196. Trivedi P, Tripathi DN, Jena GB (2011). Hesperetin protects testicular toxicity of doxorubicin in rat: Role of NFjB, p38 and caspase-3. *Food and Chemical Toxicology* 49: 838–847.

197. Potten CS (1996). What is an apoptotic index measuring? A commentary. *British Journal of Cancer* 74(11): 1743.
198. Mihara M, Uchiyama M (1978). Determination of malondialdehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry* 86: 271.
199. Sun Y, Oberley LW, Li Y (1988). A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clinical Chemistry* 34: 497.
200. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Ceribaşı AO, Yüce A (2008). Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertility and Sterility* 89(5): 1474-81.
201. Kaya K, Ciftci O, Cetin A, Doğan H, Başak N (2014). Hesperidin protects testicular and spermatological damages induced by cisplatin in rats. *Andrologia* 13: 1011.
202. Ateşşahin A, Karahan İ, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Ceribaşı AO (2006). Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reproductive Toxicology* 21(2): 42-7.
203. Lirdi LC, Stumpp T, Sasso-Cerri E, Miraglia SM (2008). Amifostine protective effect on cisplatin-treated rat testis. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 291(7): 797-808.
204. Favareto AP, Fernandez CD, da Silva DA, Anselmo-Franci JA, Kempinas Wde G (2011). Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with cisplatin at peri-puberty. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 109(2): 85-96.
205. Mohammadnejad D, Abedelahi A, Soleimani Rad J, Mohamadi Roshandeh A, Rashtbar M, Azami A (2012). Degenerative effect of Cisplatin on testicular germinal epithelium. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 2: 173-177.
206. Aydinler A, Aytekin Y, Sayın Ü, Kuntsal L, Topuz E (1995). Cisplatin'in testis dokusuna etkisi: ultrastrüktürel ve biyokimyasal bir çalışma. *Turkish Journal of Pathology* 11(1): 5-9.

207. Pogach LM, Lee Y, Giglio W, Naumoff M, Huang HF (1989). Zinc acetate pretreatment ameliorates cisplatin-induced Sertoli cell dysfunction in Sprague-Dawley rats. *Cancer Chemotherapy Pharmacology* 24(3): 177-80.
208. Kata FS (2013). Effect of Cisplatin drug on sperm characterizes, spermatogenesis and sex hormones levels of male mice *Mus musculus* L. *Journal of Basrah Researches (Sciences)* 39(2A): 112-24.
209. Rezvanfar MA, Rezvanfar MA, Shahverdi AR, Ahmadi A, Baeeri M, Mohammadirad A, Abdollahi M (2013). Protection of cisplatin-induced spermatotoxicity, DNA damage and chromatin abnormality by selenium nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 266(3): 356-65.
210. Lee J, Richburg JH, Shipp EB, Meistrich ML, Boekelheide K (1999). The fas system a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* 140(2): 852-8.
211. Salem EA, Salem NA, Maarouf AM, Serefoglu EC, Hellstrom WJ (2012). Selenium and lycopene attenuate cisplatin-induced testicular toxicity associated with oxidative stress in Wistar rats. *Urology* 79(5): 1184.e1-1184.e6.
212. Aksu EH, Kandemir FM, Altun S, Küçükler S, Çomaklı S, Ömür AD (2016). Ameliorative effect of carvacrol on cisplatin- induced reproductive damage in male rats. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 30(10): 513-520.
213. Majino G, Joris I (1995). Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *The American Journal of Pathology* 146(1): 3-13.
214. Peltola V, Huhtaniemi I, Ahotupa M (1992). Antioxidant enzyme activity in the maturing rat testis. *International Journal of Andrology* 13: 450-455.
215. Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S (2008). Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian Journal of Andrology* 10(2): 291-297.
216. Domitrović R, Potočnjak I, Crnčević Orlić Ž, Škoda M (2014). Nephroprotective activities of rosmarinic acid against cisplatin-induced kidney injury in mice. *Food and Chemical Toxicology* 66: 321-328.

217. Hajhosseini L, Khaki A, Merat E, Ainehchi N (2013). Effect of rosmarinic acid on Sertoli cells apoptosis and serum antioxidant levels in rats after exposure to electromagnetic fields. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 10(6): 477-480.
218. Zhao Y, Gao L, Zhang H, Guo J, Guo P (2014). Grape seed proanthocyanidin extract prevents DDP-induced testicular toxicity in rats. *Food and Function* 5(3): 605-611.
219. Gao LP, Wei HL, Zhao HS, Xiao SY, Zheng RL (2005). Antiapoptotic and antioxidant effects of rosmarinic acid in astrocytes. *Pharmazie* 60: 62–65.
220. Zhang Y, Chen X, Yang L, Zu Y, Lu Q (2015). Effects of rosmarinic acid on liver and kidney antioxidant enzymes, lipid peroxidation and tissue ultrastructure in aging mice. *Food and Function* 6(3): 927-931.

9. ETİK KURUL ONAYI



T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
KTÜ HAYVAN DENEYLERİ
YEREL ETİK KURUL BAŞKANLIĞI

Sayı : 53488718 - 526
Konu: Onay Belgesi

04/10/2017

Sayın, Prof. Dr. Engin YENİLMEZ
Histoloji ve Embriyoloji ABD. Öğretim Üyesi.

“Cisplatin ile İndüklenen Testis Hasarına Karşı Rosmarinik Asit’in Koruyucu Etkileri”
başlık ve 2017/36 protokol numaralı çalışma önerisi Kurulumuzca incelenmiş olup;
yürürlükteki etik ilke ve kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinize ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Ahmet AYAR
Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanı

Ek: 1 adet onay belgesi

61060 - Trabzon / TÜRKİYE

Tel: +90 (452) 377 5493

Faks: +90 (402) 525 2270

Elektronik Adres: ktu.edu.tr

Ayrıntılı Bilgi İçin İrtibat

Şerafettin YILMAZ

e posta

serafettinyilmaz@ktu.edu.tr

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR FORMU

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Karadeniz Teknik Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ	Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 61080 /Trabzon
	TELEFON	0462- 3775853 – 0462-3775403
	FAKS, E- posta	0462- 3252270 – etikhd@ktu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ETİK KURUL DOSYA NO:	2017 / 36
	ÇALIŞMANIN ADI	"Cisplatin ile İndüklenen Testis Hasarına Karşı Rosmarinik Asit'in Koruyucu Etkileri"
	SORUMLU ARAŞTIRMACI	ÜNVANI/ADI/SOYADI Prof. Dr. Engin YENİLMEZ
	UZMANLIK ALANI	Histoloji ve Embriyoloji
	TEZ SAHİBİ/DİĞER ARAŞTIRICILAR, ÜNVANI/ADI/SOYADI	Yük.Lis.Öğr.Birgül GÜR, Prof.Dr.Ahmet ALVER, Arş.Gör.Elif ŞAHİN, Yük.Lis.Öğr.Cansu KAYA
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ		TEZ ☒ AKADEMİK AMAÇLI ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 3	Tarih: 03/10/2017
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'na incelenmiş; yapılan inceleme sonucunda araştırmanın KTÜ Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Yönergesi'ne uygun bulunarak onaylanmasına ve araştırmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına toplantıya katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.	
	ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYILARI	Erkek Sıçan -24 Adet
	BAŞLANGIÇ Tarihi ve ETİK KURUL İZİN SÜRESİ:	

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı Etik Kurul Üyeliği	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyeti	Araştırma İle İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ahmet AYAR Başkan	Fizyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Fizyoloji ABD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Ahmet ALVER Başkan Yrd.	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ABD.	E	☒ E ☐ H	☐ E ☒ H	KATILMADI
Prof.Dr.Ali CANSU Üye	Pediyatri	KTÜ Tıp Fakültesi Pediyatri ABD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Engin YENİLMEZ Üye	Histoloji ve Embriyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD	E	☒ E ☐ H	☐ E ☐ H	OYLAMAYA KATILMADI
Doç.Dr.Zerrin PULATHAN Üye	Kalp ve Damar Cerrahisi	KTÜ Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi ABD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Celal ÇANDIRLI Üye	Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi	KTÜ Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi ABD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç.Dr.Rezzan ALİYAZICIOĞLU Üye	Temel Eczacılık Bilimleri Biyokimya	KTÜ Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri ABD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof.Dr.Nadir BAŞÇINAR Üye	Balıkçılık Teknolojisi	KTÜ Sürmene Deniz Bilimleri Fakültesi Balıkçılık Teknolojisi	E	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI
Prof.Dr.Serdar TÜRKİYILMAZ Üye	Genel Cerrahi	KTÜ Tıp Fakültesi Genel Cerrahi ABD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Y.Doç.Dr.Emel ÇAKIR Üye	Tıbbi Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji ABD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Sait AL Üye	Veteriner Hekim	KTÜ Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Uzm.Dr.Nuran AYDIN Üye	Nöroloji	Kanuni Eğitim ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Bölümü	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Ecz.Nuran EYÜPOĞLU Üye	Eczacı		K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	KATILMADI

10. ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : GÜR, Birgül
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 24.11.1988 – TRABZON
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0462 377 77 40
E-Posta : brgl_gr@hotmail.com
Yazışma adresi : 2 Nolu Erdoğdu Mh. Kışla Sok. Gökkuşığı Sitesi A Blok
Ortahisar/TRABZON

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurum Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	: KTÜ SABE Histoloji ve Embriyoloji AD	2019
Pedagojik Formasyon	: KTÜ Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği	2016
Yüksek Lisans	: Giresun Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	2014
Lisans	: Giresun Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2011
Lise	: Erdoğdu Lisesi	2005

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR/BİLDİRİLER

1. Çavuşoğlu K, Yalçın E, Yapar K, Oruç E, **Gür B** (2015). The effects of grape seed extract against toxicity of benzene on liver and kidney tissues of albino mice: biochemical evaluation. *Türk Biyokimya Dergisi* 40(1): 66-73.
2. Çavuşoğlu K, **Gür B**, Yalçın E, Demirtaş G, Çiçek F (2014). The effect of lambda-cyhalothrin on root tip cytology, pigment contents and antioxidant defense system of *Allium cepa*. *Cytologia* 79(1): 95-101.
3. Çavuşoğlu K, Yalçın E, Yapar K, **Gür B**, Çiçek F (2014). The protective role of grape seed extract against chronic toxicity of benzene in swiss albino mice. *Cumhuriyet Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Bilimleri Dergisi* 35(1): 1-11.

4. Özen E, Çiçek F, **Gür B**, Aydın N, Akıncı B, Topal M, Keser G, Çavuşoğlu K (2011). Paraquat'ın *Allium cepa*' da bazı sitotoksik ve biyokimyasal parametreler üzerine etkileri. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi 23(2): 117-124.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

1. **Gür B**, Yalçın E, Çiçek F, Çavuşoğlu K (2013). Biochemical alterations in *E. coli* induced from UV stres. The International Conference on Environmental Science and Technology, Kapadokya, Nevşehir-TURKEY, 18- 21 June 2013.
2. Yalçın E, **Gür B**, Çiçek F, Demirtaş G, Çavuşoğlu K (2013). The effects of heat treatment on some biochemical barameters of *Fusarium species*. The International Conference on Environmental Science and Technology, Kapadokya, Nevşehir-TURKEY, 18-21 June 2013.
3. Yalçın E, **Gür B**, Demirtaş G, Karakuşlu S, Çiçek F, Çavuşoğlu K (2013). The nutritional values and some biochemical parameters of gm maize. The International Conference on Environmental Science and Technology, Kapadokya, Nevşehir-TURKEY, 18-21 June 2013.

Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

1. Çiçek F, Yalçın E, **Gür B**, Çavuşoğlu K, Aydoğan M (2012). Siklodekstrin tutuklu poli (laktid-ko-glikolid) mikrokürelerinin kolesterol gideriminde kullanılabirliği. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, 03-07 Eylül 2012.
2. Yalçın E, Çavuşoğlu K, Yapar K, Çiçek F, Demirtaş G, **Gür B** (2012). Albino farelerde formaldehit tarafından teşvik edilen toksisite üzerine yeşil çay (Gren tea) özütünün koruyucu etkisinin araştırılması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, 03-07 Eylül 2012.
3. Kurt D, Çavuşoğlu K, Yalçın E, Çiçek F, Demirtaş G, **Gür B** (2012). "1,4 dioksanın *Allium cepa* L. (Amaryllidaceae) kök ucu hücrelerinde toksik etkilerinin araştırılması. 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, İzmir, 03-07 Eylül 2012.
4. Çiçek F, Demirtaş G, Yalçın E, Çavuşoğlu K, **Gür B**, Taşlı B (2014). Lambda-cyhalothrin'in *Allium cepa*'da pigment içerikleri ve antioksidan savunma sistemi üzerine etkileri. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, 23-27 Haziran 2014.
5. **Gür B**, Kaya C, Uzun F, Reis Köse GD, Çavuşoğlu İ, Kalyoncu Nİ, Yenilmez E (2018). Levetirasetama maruz kalan gebe sıçan yavrularının midelerindeki

- histolojik değişiklikler. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Antalya, 10-13 Mayıs 2018.
6. Kaya C, **Gür B**, Yuluğ E, Uzun F, Arı NS, Kadioğlu Duman M, Çavuşoğlu İ, Yenilmez E (2018). Levetirasetam uygulanan gebe sıçanların yavrularında karaciğer toksisitesi. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Antalya, 10-13 Mayıs 2018.
7. **Gür B**, Kutlu A, Arı NS, Zengin T, Çetinavcı D, Kulaber A, Yuluğ E, Tekelioğlu Y, Yenilmez E (2019). Sıçan Mide mukozasında cisplatin toksisitesine karşı rosmarinik asitin histopatolojik etkileri. 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası kalıtımlı), Edirne, 24-26 Nisan 2019.
8. Kutlu A, **Gür B**, Arıcı T, Bıyık A. F, Keskin O, Akman AU, Kerimoğlu G, Öztürk Okatan D, Yenilmez E (2019). Cisplatinin sıçan ince bağırsağında oluşturduğu hasara karşı rosmarinik asitin etkisi. 24. Ulusal Elektron Mikroskopi Kongresi (Uluslararası kalıtımlı), Edirne, 24-26 Nisan 2019.

