

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADRIAMİSİNİN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI
ÜZERİNE E VİTAMİNİ VE SELENYUM'UN KORUYUCU
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Alparslan ÜNAL**

**Danışman
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Öğr. Gör. Esra BALCIOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2018
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ADRIAMİSİNİN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI
ÜZERİNE E VİTAMİNİ VE SELENYUM'UN KORUYUCU
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**Hazırlayan
Alparslan ÜNAL**

**Danışman
Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR
Öğr. Gör. Esra BALCIOĞLU**

Yüksek Lisans Tezi

**Ağustos 2018
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı- Soyadı: **Alparslan ÜNAL**

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Adriamisinin Oluşturduğu Testis Hasarı Üzerine E Vitamini Ve Selenyum’un Koruyucu Etkisinin İncelenmesi ” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan**Alparslan ÜNAL****Danışman****Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR****Öğretim Görevlisi Esra BALCIOĞLU****Anabilim Dalı Başkanı****Prof. Dr. Birkan YAKAN**

Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR ve **Öğr. Gör. Esra BALCIOĞLU** danışmanlığında **Alpaslan ÜNAL** tarafından hazırlanan ““**Adriamisinin Oluşturduğu Testis Hasarı Üzerine E Vitamini Ve Selenyum’un Koruyucu Etkisinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji-Embriyoloji** Anabilim Dalı **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

.../.../2018

JÜRİ:

1. Danışman: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

(Pamukkale Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı)

2. Danışman: Öğretim Görevlisi Esra BALCIOĞLU

(Erciyes Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı)

Üye: Prof. Dr. Birkan YAKAN

(Erciyes Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı)

Üye: Dr. Öğretim Üyesi Halime TOZAK YILDIZ

(Ahi Evran Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı)

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Erciyes Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başlamamda, burada aldığım eğitimden tez konumun planlanmasına ve yürütülmesine kadar her daim yanımda olan 1. Danışman hocam Sn. Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a, tezimin bitirilmesinde ve yüksek lisans sonraki eğitim planlamamda yardımcı olan 2. Danışman hocam Sn. Öğr. Gör. Esra BALCIOĞLU'na, "Asistan eğitimi" adı altında öğrenci laboratuvarında bizlere mesleki tecrübelerini ziyadesiyle aktaran Anabilim Dalı Başkanımız Sn. Prof. Dr. Birkan YAKAN'a, ders döneminde bize öğrettiği değerli bilgilerden ötürü Sn. Doç. Dr. Arzu YAY'a ve tez çalışmamın gerek yazım gerek deneysel aşamalarında her daim yanımda ve yardımcı olan değerli arkadaşım Araştırma Görevlisi Emin KAYMAK'a, çalıştığı üniversitenin veri tabanının geniş imkanlarını benim erişimime sunan Öğr. Gör. Raziye ERKUL'a, Kapadokyadaki çalışma arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca; maddi olarak her daim beni destekleyen babam Hüseyin ÜNAL ile her sabah kahvaltımı önümden eksik etmeyen annem Elmas ÜNAL'a, ortaöğretimde derslerime yardımcı olan ablam Elif EROLTEKİN'e ve tez çalışmamın en umutsuz ve en umutlu anlarında yanımda olup benimle üzüntümü ve sevincimi paylaşan eşim Büşra ÜNAL'a sonsuz saygı ve teşekkürler.

ADRIAMİSİN'İN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI ÜZERİNE E VİTAMİNİ VE SELENYUMUN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ALPARSLAN ÜNAL

Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2018
Danışman: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

ÖZET

Adriamycin (ADR), kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapi ilacıdır. ADR kanser hücreleri yanında testis dahil birçok dokuda zararlı etki göstermektedir. Selenyum (Se) ve vitamin E üreme organları ve kısırlık üzerine koruyucu özelliklere sahiptirler. Bu çalışmanın amacı, ADR ile indüklenen testis hasarına karşı E vitamini ve Se'nin koruyucu etkisini araştırmaktır.

Deneyde her biri sekiz sıçandan oluşan sekiz grupta 64 hayvan incelendi. Bu çalışmada 60 günlük Wistar Albino cinsi sıçanlar kullanıldı. 33 günlük diyet boyunca; Kontrol grubuna (1. Grup) üç günde bir toplamda 12 kez gavajla mısır yağı ve üç günde bir toplamda 10 kez izotonik salin çözeltisi verildi. ADR, tek uygulandığı ve kombinasyon şeklinde uygulandığı gruplara 2mg/kg/gün dozda üç günde bir toplamda 10 kez ip yolla verildi. Vitamin E, tek uygulandığı ve kombine şeklinde uygulandığı gruplara 200 mg/kg/gün dozda üç günde bir toplamda 12 kez gavajla verildi. Se, tek uygulandığı ve kombinasyon şeklinde uygulandığı gruplara 2mg/kg/gün dozda üç günde bir toplamda 12 kez gavajla verildi. 33 günlük diyetin sonunda hayvanlar ketamin ve xylazin anestezisi altında dekapite edilerek testis dokuları alındı. Bu örnekler doku takibinden geçirildi ve rutin boyama işlemleri sonunda ışık mikroskopunda histopatolojik değişimler gözlemlendi. Seminifer tübüllerdeki değişikliklere bakılarak JTBS ile hasarın derecesi tespit edildi. Biyokimyasal yöntemlerle, önce testis dokusundaki lipid peroksidasyonunu ve antioksidan enzim aktivitelerini tayin etmek için Malondealdehyt (MDA), Süperoksit Dismutaz (SOD), Katalaz (CAT) ve Glutatyon Peroksidaz (GPx) aktivitelerine bakıldı. Sonra kandaki serum örneklerinden testesteron seviyeleri ölçümlendi. TUNEL yöntemiyle apoptotik hücrelerin sayımı yapıldı. Sonuç olarak ADR uygulanması sıçan testis dokularında hasar oluşturmuştur. Vitamin E ve Se tedavisi testis dokularında kısmen düzeltici etkiye sahip olduğunu kanıtlamıştır.

Anahtar Kelimeler: Adriamisin, Vitamin E, Selenyum, Testis, Sıçan

INVESTIGATION OF PROTECTIVE EFFECTS OF SELENIUM AND VITAMIN E ON ADRIAMYCIN-INDUCED TESTICULAR INJURY

ALPARSLAN ÜNAL

Erciyes University, Graduate School of Health Sciences
Department of Histology and Embryology
M.Sc. Thesis, July 2018
Supervisor: Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

ABSTRACT

Adriamycin (ADR) is a widely used chemotherapy drug in the treatment of cancer. ADR has harmful effects on many tissues including testis as well as cancer cells. Selenium (Se) and vitamin E have reproductive organs and protective properties on infertility. The aim of this study to investigate the protective effect of Vitamin E and Se against ADR-induced testicular injury.

We studied 64 animals in 8 groups, each consisting of 8 rats. 60-day-old Wistar rats used in this study. During the 33-day diet; control group (Group 1) received 12 times corn oil and 10 times isotonic saline solution. ADR was administered alone and in combination at a dose of 2 mg/kg/day, 10 times intraperitoneally. Vitamin E was administered alone and in combination at a dose of 200 mg/kg/day, 12 times with gavage. Se was administered alone and in combination at a dose of 2mg/kg/day, 12 times with gavage. At the end of the study, animals were decapitated under ketamine and xylazine anesthesia and testicular tissues were collected. The tissues were passed routine tissue follow-up procedure then histopathologic changes were observed on light microscope after routine hematoxylin-eosin stain. The changes in the seminiferous tubules were looked at. Accordingly, the extent of the damage was determined by JTBS. Malondialdehyde (MDA), Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione Peroxidase (GPx) activities were examined by biochemical methods to determine lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in testicular tissue. Testosterone levels were measured from the serum samples. Apoptotic cells were counted by the TUNEL method. As a result, ADR administration caused damage to rat testicular tissue. Vitamin E and Se treatment have provent to have a partial corrective effect on testicular tissues.

Key words: Adriamycin, Vitamin E, Selenium, Testis, Rat

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK..... | ii |
| YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI..... | iii |
| ONAY :..... | iv |
| TEŞEKKÜR | v |
| ÖZET | vi |
| ABSTRACT | vii |
| İÇİNDEKİLER..... | viii |
| KISALTMALAR ve SİMGELER..... | x |
| TABLolar LİSTESİ..... | xi |
| ŞEKİLLER LİSTESİ | xii |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1.TESTİS | 4 |
| 2.1.1. Testis Anatomisi | 4 |
| 2.1.2. Testis Histolojisi | 6 |
| 2.1.2.1. Seminifer Tübüller..... | 6 |
| 2.1.2.2.Sertoli Hücreleri: | 7 |
| 2.1.2.3. Spermatogenik Hücreler: | 8 |
| 2.1.2.4. Leydig Hücreleri:..... | 9 |
| 2.1.2.5. Genital Kanallar..... | 9 |
| 2.1.3. Testis Embriyolojisi | 10 |
| 2.1.4 Testis Fizyolojisi..... | 12 |
| 2.1.4.1 Spermatogenez | 12 |
| 2.2. ADRIAMİSİN (DOKSORUBİSİN)..... | 15 |
| 2.3. ANTİOKSİDAN | 16 |

| | |
|--|----|
| 2.3.1. Serbest Radikal | 16 |
| 2.3.2. Enzimatik Antioksidan tipleri..... | 18 |
| 2.4. VİTAMİN E..... | 19 |
| 2.5. SELENYUM..... | 21 |
| 3.GEREÇ VE YÖNTEM | 24 |
| 3.1. Deneysel Prosedür | 24 |
| 3.1.1. Doku Takibi Aşaması..... | 26 |
| 3.1.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Aşaması..... | 27 |
| 3.1.3. Johnsen'in Testiküler Biyopsi Skorlaması | 28 |
| 3.1.4. Biyokimyasal Analizler | 28 |
| 3.1.4.1. Malondealdehit (MDA) Düzey Tayini | 29 |
| 3.1.4.3. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini..... | 29 |
| 3.1.4.4. Glutatyonperoksidaz (GPx) Aktivite Tayini | 29 |
| 3.1.4.5. Kanda Testesteron Düzeyi Tayini | 29 |
| 3.1.5. TUNEL Metodu..... | 29 |
| 3.1.6. İstatistiksel Analiz..... | 30 |
| 4. BULGULAR | 31 |
| 4.1. Testis Ağırlıkları..... | 31 |
| 4.2. Işık Mikroskopik Bulgular..... | 32 |
| 4.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması Sonuçları | 42 |
| 4.4. Biyokimyasal Sonuçlar | 42 |
| 4.5. Apoptoz Sonuçları | 44 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 49 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 59 |

EKLER

ÖZGEÇMİŞ

KISALTMALAR ve SİMGELER

ADR: Adriamisin

CAT: Katalaz

DEKAM: Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi

ELİSA: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

FSH: Folikül Stimule Edici Hormon

GH: Büyüme Hormonu

GSH: Glutatyon

GPx: Glutatyon Peroksidaz

H&E: Hematoksilan Eozin

ip: intraperitoneal

JTBS: Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru

LH: Luteinizan Hormon

MDA: Malondialdehit

PBS: Fosfat Buffer Solüsyonu

ROS: Reaktif Oksijen Türevleri

Se: Selenyum

SF: Serum fizyolojik

SOD: Süperoksit dismutaz

SPSS: Statistiscsel Package for The Social Sciences

TDF: Testis Belirleyici Faktör

TUNEL: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine

TABLULAR LİSTESİ

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tablo 3.1 | 33 gün boyunca farklı besinlere tabi tutulan gruplar | 25 |
| Tablo 3.2 | Işık Mikroskobu Doku Hazırlama Tekniği | 26 |
| Tablo 3.3 | HematoksilenEozin Boyama Aşaması..... | 27 |
| Tablo 3.4 | Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması..... | 28 |
| Tablo 4.1. | Farklı gruplara ait hayvanlarda testis ağırlıkları..... | 32 |
| Tablo 4.2. | Johnsen'in Testiküler Skorlama Sonuçları | 42 |
| Tablo 4.3. | Doku örneklerinde ortalama Katalaz (CAT), Süperoksitdismutaz (SOD), Malondialdehit (MDA), Glutatyon Peroksidaz (GPx) ölçümleri | 43 |
| Tablo 4.4. | Kan Serumunda Testosteron Değerleri..... | 43 |
| Tablo 4.5. | TUNEL Yöntemi ile gruplara göre Apoptoz Değerleri | 44 |

ŞEKİLLER LİSTESİ

| | |
|--|----|
| Şekil 2.1: Testisin Anatomisi | 5 |
| Şekil 2.2: İnsan testisinin sagital kesitinin ve boşaltım kanallarının şematik görünümü | 6 |
| Şekil 2.3: İnsan seminifer epitelin şematik çizimi | 7 |
| Şekil 2.4: İnsan testisinin ışık mikroskopunda görünümü | 9 |
| Şekil 2.5: Spermatogonyumlardan sperm oluşumu | 13 |
| Şekil 2.6: Spermiogenezin ve olgun bir spermatozoonun şematik görünümü | 14 |
| Şekil 2.7: Vitamin E'nin Kimyasal Yapısı | 20 |
| Şekil 4.1. Kontrol grubuna (Grup 1) ait testis dokusu. Seminifer tübüller (ST) ile interstisiyel bağ dokusu içinde Leydig hücreleri (LH) ve kan damarları (ok) normal yapıda gözlenmekte. H&E boyama X20. | 34 |
| Şekil 4.2. Kontrol grubuna (Grup 1) ait testis dokusunda seminifer tübüllerin lümenlerinde (L) spermatozoonlar (Sz) ve epitelde Sertoli hücreleri (ok). İntertisiyel dokuda Leydig hücreleri (LH). H&E boyama X40. | 34 |
| Şekil 4.3. ADR grubuna (Grup 2) ait testis dokusunda düzensiz yapıda seminifer tübüller (ST) ve kan damarları (ok) içeren interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E boyama X20..... | 35 |
| Şekil 4.4. ADR grubuna (Grup 2) ait testis dokusu. BM: bazal membran, L: lümen, Ok: Sertoli hücreleri, LH: Leydig hücreleri, İD: interstisiyel bağ dokusu. H&E boyama X40..... | 35 |
| Şekil 4.5. Vitamin E grubuna (Grup 3) ait testis dokusunda seminifer tübüller (ST), interstisiyel bağ dokusu (İD) ve Leydig hücreleri (LH). H&E boyama X20. | 36 |
| Şekil 4.6. Vitamin E grubuna (Grup 3) ait testis dokusunda seminifer tübüller (ST) ve lümenleri (L) ile interstisiyel bağ dokusunda Leydig hücreleri (LH) izlenmekte. H&E boyama X40..... | 36 |
| Şekil 4.7. Se grubuna (Grup 4) ait testis dokusunda düzenli spermatogenik seri hücreleri içeren seminifer tübüller (ST) ve aralarında interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E boyama X20..... | 37 |
| Şekil 4.8. Se grubuna (Grup 4) ait testis dokusunun yüksek büyütmesinde seminifer tübüller (ST) ve interstisiyel bağ dokusu (İD) izlenmekte. H&E boyama X40. | 37 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.9. Se+Vitamin E grubuna (Grup 5) ait testis dokusunda sağlam yapıda seminifer tübüller (ST) ve çevresinde interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E boyama X20. | 38 |
| Şekil 4.10. Se+Vitamin E grubuna (Grup 5) ait testis dokusunda düzenli yapıda germinal epitele (GE) ve lümende (L)spermatozoonlara sahip seminifer tübüller ve interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E boyama X40. | 38 |
| Şekil 4.11. ADR+Vitamin E grubuna (Grup 6) ait testis dokusunda seminifer tübüller (ST) ve interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E boyama X20..... | 39 |
| Şekil 4.12. ADR+Vitamin E grubuna (Grup 6) ait testis dokusu.G: germinal epitelyum, L: lümen, İD: interstisiyel bağ dokusu ve LH: Leydig hücreleri. H&E boyama X40..... | 39 |
| Şekil 4.13. ADR+Se grubuna (Grup 7) ait testis dokusunda seminifer tübüllerin (ST) ve interstisiyel bağ dokusunun (İD) genel görünümü. H&E boyama X20. | 40 |
| Şekil 4.14. ADR+Se grubuna (Grup 7) ait testis dokusu. GE: germinal epitel, L: lümen, BM: bazal membran, İD: interstisiyel bağ dokusu. H&E boyama X40 | 40 |
| Şekil 4.15. ADR+Se+Vitamin E grubuna (Grup 6) ait testiste bozulmuş tübüler kontür ile seminifer tübüller (ST) ve interstisiyel bağ dokusu (İD).H&E boyamaX20 | 41 |
| Şekil 4.16. ADR+Se+Vitamin E grubuna (Grup 6) ait testis dokusunda germinal epiteli (GE) ve bazal membranı (BM) ile seminifer tübüller ve interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E boyama X40 | 41 |
| Şekil 4.17. Kontrol grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama. | 45 |
| Şekil 4.18. ADR grubuna ait testis dokusunda TUNEL boyamada apoptotik hücreler | 45 |
| Şekil 4.19. Vitamin E grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama | 46 |
| Şekil 4.20. Se grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama | 46 |
| Şekil 4.21. Se+Vitamin E grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama | 47 |
| Şekil 4.22. ADR+Vitamin E grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama | 47 |
| Şekil 4.23. ADR+Se grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama | 48 |
| Şekil 4.24. ADR+Se+Vitamin E grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama | 48 |

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser dünyada her yıl milyonlarca insanın ölümüne yol açan bir hastalıktır. Bu hastalığın tedavisinde kullanılan yöntemlerden birisi de kemoterapidir. Antrasiklin grubundan bir antibiyotik olan Adriamisin (ADR), kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapik ilaçtır. Bu ilaç; baş boyun tümörleri, mesane, prostat, lösemi gibi farklı tipte kanserlerin tedavisinde uzun zamandan beri kullanılmaktadır (1). Ancak bir taraftan tedavi amaçlı olarak kullanılırken aynı zamanda ADR'nin normal hücreler için de toksik etkisi olduğu bilinmektedir. Bu etkiler arasında en fazla bilineni ve en etkili olanı kardiyotoksisitedir (2). Bunun dışında böbrek (3), karaciğer (4), testis (5-7) gibi dokularda da toksik etkilerinin olduğu yapılan çalışmalarda gözlenmiştir.

ADR'nin doku ve organlarda oluşturduğu toksisitenin mekanizmaları tam olarak aydınlatılamasa da oksidatif strese bağlı olarak meydana geldiği üzerinde yoğunlaşmaktadır (8). Oksidatif strese bağlı olarak oluşan reaktif oksijen türevleri (ROS) ve serbest radikaller günümüzde ateroskleroz, kanser ve yaşlanma başta olmak üzere çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. ROS, normal oksijen metabolizmasına bağlı olarak vücutta oluşturulabildiği gibi dışarıdan ozon, x ray ışınları, sigara, hava kirlenmeleri, endüstriyel kimyasallar ile de vücuda girebilmektedir. Organizmada doğal olarak bulunan ve antioksidan olarak bilinen glutatyon, glutatyonperoksidaz (GPx), katalaz (CAT), süperoksitdismutaz (SOD) gibi maddelerin redoks tepkimelerine katılarak ROS'u yok ettiği bilinmektedir. Bunun yanında besinlerle vücudumuza aldığımız Vitamin A, Vitamin E, Vitamin C ile Se'nin de aralarında bulunduğu çinko, bakır, gibi çeşitli mineraller de antioksidan moleküller olarak ROS'a karşı koruyucu etkisi vardır (9).

Kanser tedavisinde kullanılan kimyasal maddelerin kanser hücrelerini farklı şekillerde etkilediği bilinmektedir. Ancak bu kimyasallar tedavi sırasında kanser hücreleri yanında

normal sağlıklı hücreleri de etkilemektedir (10). Son yıllarda kanser ilaçlarının normal hücreleri etkilemelerini önlemek için çok sayıda çalışma yapılmaktadır ve bu çalışmalarda koruyucu olarak çoğunlukla doğal antioksidanlar kullanılmıştır (11). Vitamin E ve Se bu amaçla kullanılan etkin antioksidanlardandır (12,13).

Dışarıdan hazır olarak da alınan Vitamin E, bitkisel yağlarda bol olarak bulunan doğal bir antioksidandır ve insanlardaki etkin formu Alfa Tokoferol olarak bilinmektedir (14). Alfa Tokoferol ile ilgili oldukça fazla çalışma yapılmış olmasına rağmen kanseri önleyici yöndeki etkileri hakkında tam olarak fikir birliğine varılamamıştır (15). Bununla birlikte, kalp üzerinde yapılan çalışmalarda, Vitamin E'nin kolesterol oksidasyonunu engelleyerek ateroskleroza engellediği ileri sürülse de kalp üzerine olumlu etkileri üzerine çelişkili bilgiler vardır (15,16). Vitamin E'nin yararlı etkilerinin bulunduğunu belirten bir çalışmada, antioksidan etkisini lipid peroksidasyon zincir başlama basamağını kırarak ya da doğrudan reaktif oksijen türevlerini süpürerek gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (9).

Bir diğer antioksidan olan Se, insanlar için dışardan hazır olarak alınan esansiyel bir besin maddesidir. Pek çok hücre içi fizyolojik ve biyokimyasal süreçte rol oynayan (17) bu molekül, antioksidan savunma sisteminin yapısal bir bileşenidir. Se, reaktif oksijen türevlerinin yok edilmesinde rol oynayan GPx enziminin kofaktörüdür (18). Bunun yanında, genital sistemin normal gelişimi ve üreme fonksiyonları için de gerekli bir elementtir (19).

Farklı antioksidanların bilinen etkileri yanı sıra, bunların ikili kombinasyonlarının da birlikte verilmesi ile koruyucu veya tedavi edici etkilerinin daha da artırılabilceği görüşünü ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Bu kapsamda, Se'nin faydalarının çoğunu, vitamin E ile birlikte sinerjistik olarak gösterdiği düşünülmektedir (20). Daha önce yapılan çalışmalarda, Vitamin E ve Se'nin sinerjistik olarak etkili olduğu, oksidatif strese karşı koruma (21) ve immüniteyi kuvvetlendirme (22) de dahil pek çok biyolojik sürece etki edebileceği gösterilmiştir (23).

Biz de bu çalışmada, antikanserojen bir antibiyotik olan ADR'nin testislerde oluşturabileceği hasar üzerine Vitamin E ve Se'nin ayrı ayrı ve birlikte verilmesi ile koruyucu etkisinin olup olmadığını biyokimyasal parametreler (MDA, SOD, CAT, GPx) ve histolojik yöntemler (ışık mikroskopisi görüntüleri, JTBS, Apoptotik hücre sayımı) kullanarak incelemeyi amaçladık. Böylece, kemoterapi sırasında oluşabilecek

doku ve/veya organ hasarlarının antioksidan özellikleri olan Se ve Vitamin E takviyesi ile en aza indirilebilecektir.



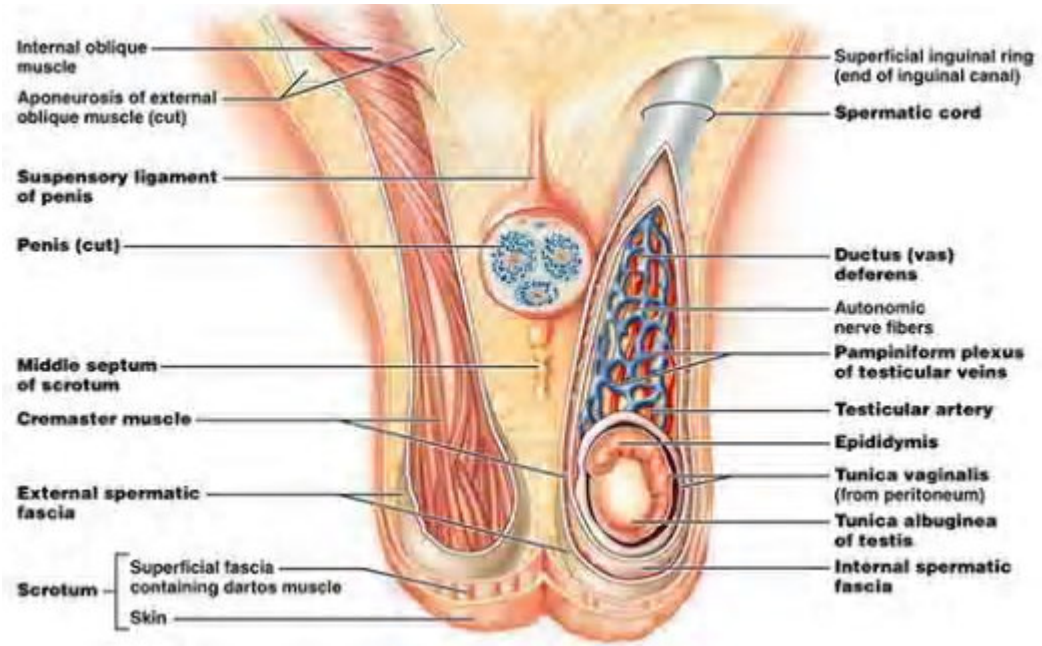
2.GENEL BİLGİLER

2.1.TESTİS

2.1.1. Testis Anatomisi

Testisler, erkek üreme hücrelerini barındıran ve erkeğe özgü eşey hormonlarını üreten, skrotum içerisinde asılı olarak bulunan erkek iç genital organlarıdır (Şekil 2.1). Sağlı sollu bir çift olarak bulunan testislerden soldaki sağdakine göre 1 cm daha aşağıda yerleşim gösterir. Testislerin her biri 4 – 5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 10 – 14 gr ağırlığındadır (24).

Testisin facies medialis ve facies lateralis olarak isimlendirilen iki yüzü, margo anterior ve margo posterior olmak üzere iki kenarı, ekstremitas superior ve ekstremitas inferior olarak adlandırılan iki ucu vardır. Testisin ön kenarı, her iki yüzü ve uçları düz-konveks olup iç periton zarı ile kaplıdır. Arka kenarının sadece lateral kısmı periton zarı ile çevrilidir. Periton barındırmayan medial bölüme epididimis tutunmuş olup buradan testisin damarları, kanalları ve sinirleri geçer (25).



Şekil 2.1: Testisin Anatomisi (26).

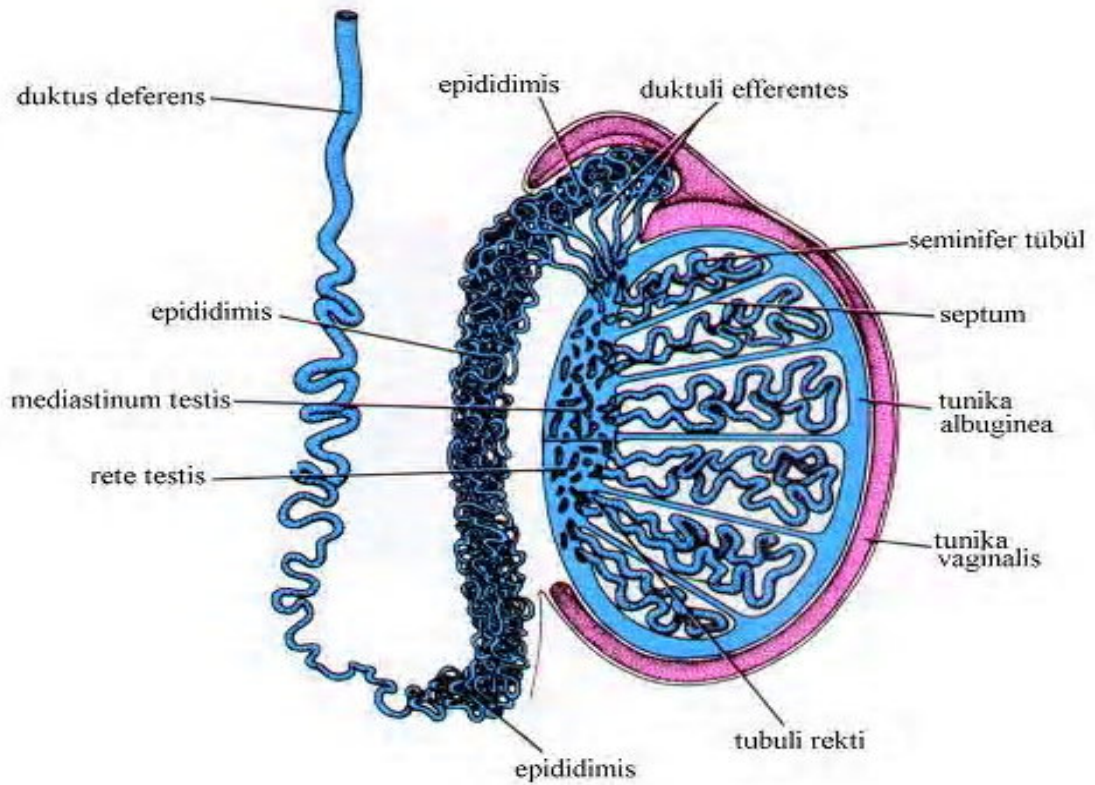
Testisler dıştan sağlam, kalın ve esnekliği olmayan fibröz bir tabaka olan tunika albuginea ile sarılıdır. Tunika albuginea testisin arka kenarında içeriye doğru girinti yaparak mediastinum testisi oluşturur. Burada testise giren çıkan arter, ven ve kanallar bulunur. Tunika albuginea'nın iç yüzeyinden çıkan uzantılar mediastinum testise uzanarak testis lobüllerini oluşturur. Bu lobüllerin içerisinde tubuli seminiferi kontorti denilen kanalcıklar bulunur. Tubuli seminiferi kontortiler mediastinum testise yaklaştıkça düzleşir ve birbirleriyle birleşerek tubulus seminiferi rectileri meydana getirir. Bunlar da mediastinum içerisinde bir araya gelerek rete testisi oluşturur. Rete testisten spermlerin depo edilip olgunlaştığı yer olan epididimise uzanan kanallara ductuli efferentes denir. Bunlar da epididimisin baş kısmında duktus epididimis denilen kanallara açılır (Şekil 2.2). Epididimisin orta parçası korpus epididimis, alt parçası ise cauda epididimis adını alır (24).

Testis, aortanın dalı olan testiküler arter tarafından beslenir (Şekil 2.1). Testisin venleri, spermatik funikulusu saran pampiniform pleksusu sarar daha sonra kendi aralarında birleşerek testiküler veni oluştururlar. Sağ testiste bulunan testiküler ven, vena cava inferiora bağlanırken; sol tarafta bulunan testiküler ven vena renalis sisternaya bağlanır. Lenfatik drenaj, tunika vajinalisin yüzeyinde ve epididymis ile testisin içerisinde gerçekleşir. Lenfatik venler, Spermatik funikulus ile beraber karın boşluğuna girerler.

Daha sonra Testiküler veni takip ederek aortun ön ve yanlarında bulunan lenf nodüllerine açılırlar. Medulla Spinalisin T10 – T11. segmentlerinden kaynaklanan sempatik sinir lifleri pleksuslar aracılığıyla testise gelir (25).

2.1.2. Testis Histolojisi

Testis, sıra dışı bir kalınlığa sahip fibröz bağ dokusu yapısında olan tunika albuginea tarafından çevrelenmektedir. Her bir testis kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar tarafından 250 kadar lobüle ayrılır (Şekil 2.2). Tunika albuginea, posteriora kalınlaşır ve içeriye doğru mediastinum testisi oluşturur. Kan damarlarının, lenf damarlarının ve genital boşaltım kanallarının testise giriş ve çıkışına mediastinum aracılık eder (27).



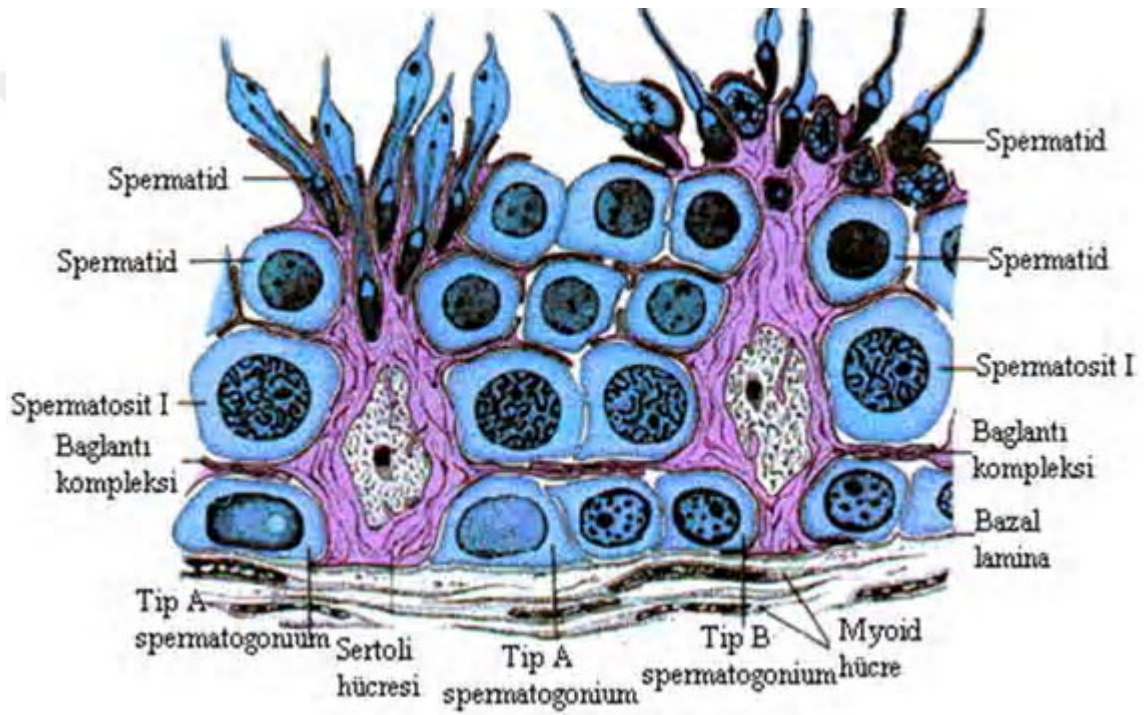
Şekil 2.2: İnsan testisinin sagittal kesitinin ve boşaltım kanallarının şematik görünümü (27).

2.1.2.1. Seminifer Tübüller

Testis lobüllerinin her biri, içerisinde sperm üretimini sağlayan çok sayıda girinti çıkıntı yapan 1 ila 4 adet seminifer tübül ile Leydig hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki stromadan meydana gelir. Seminifer tübüller halka şeklinde kıvrımlı borular olup bu

halkaların uçları mediastinuma yakındır ve bu bölümdeki tübüller devamı kıvrımlı olmayıp düz seyrederler. Seminifer tübüllerin bu kısmı düz tübül ya da tubuli rekti olarak adlandırılır. Bu bölümün devamında mediastinum içerisinde rete testis bulunur (Şekil 2.2) (27).

Her bir seminifer tübül 30 – 50 cm uzunluğunda ve 150 – 250 mikrometre çapındadır. Seminifer tübüller bazal membran üzerine oturmuş 4-8 sıralı hücrelerden oluşan seminifer epitele sahiptir. Seminifer Tübül epiteli Sertoli hücreleri ve spermatogjenik hücrelerden meydana gelir (Şekil 2.3) (27).



Şekil 2.3: İnsan seminifer epitelinin şematik çizimi (27).

2.1.2.2.Sertoli Hücreleri:

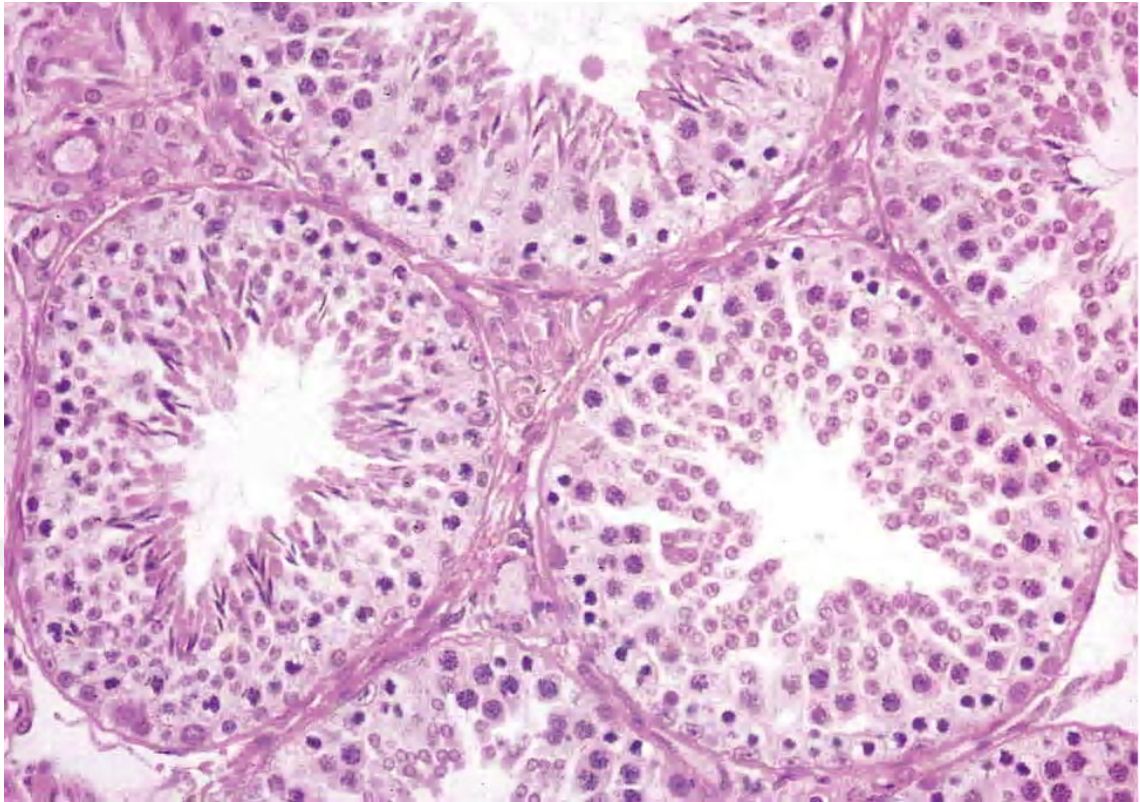
Komşu spermatogjenik hücreleri çevreleyen ve onlara desteklik sağlayan prizmatik hücrelerdir. Bunlar aynı zamanda tübüllerin yapısal bütünlüğünün korunmasından da sorumludur (27). Seminifer tübüllerde yan yana uzanan Sertoli hücreleri sıkı bağlantılarla birbirine bağlıdır. Bu bağlantılar gap junction tipindedir. Bu yolla Sertoli hücreleri arasında iyon değişimi gerçekleşir. Sertoli hücrelerinin esas fonksiyonu spermatozoonu oluşturacak hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek olup bunun yanında spermiyogenez sonucu oluşan sitoplazma artıklarını fagosite etmek, olgun

sperm oluşumunu sağlamak, seminifer tübül lümenine protein ve iyon bakımından zengin sıvı salgılamak, spermatogenez için gerekli testosteron miktarını arttıran androjen bağlayıcı protein (ABP) retmek, folikül stimüle edici hormon (FSH) salınımını önleyen inhibin üretmek, üreme organlarının gelişimi esnasında Mller kanallarının gerilemesini sağlayan Anti Müllerian Hormonu üretmek gibi görevleri de vardır.(28,29)

2.1.2.3. Spermatogenik Hücreler:

Düzenli olarak çoğalan ve olgun sperme farklılaşan hücrelerdir. Bu hücreler, primordiyal germ hücrelerinden köken alırlar. Bunlardan en olgunlaşmamış olanları spermatogonyum olarak adlandırılır ve epitel tabakanın en altında bazal laminanın üzerinde yerleştirler. En olgun olan spermatogenik hücelere ise spermatid denir ve bunlar da aralarda bulunan Sertoli hücrelerinin apikal bölümüne tutunmuşlardır (şekil 2.3) (27).

Seminifer tübüllerin bağ dokusu fibroblastlardan yoksun gevşek bağ dokusu yapısındadır. Bu bağ dokusu, seminifer epitelin üzerine oturduğu bazal laminanın altında, 3-5 tabakalı kasılabilme özelliğine sahip myoid hücreler ile kollajen fibrillerden oluşur. Myoid hücrelerin kasılabilme özelliği sayesinde spermatazonların ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden boşaltım kanallarına geçişi kolaylaşır. Myoid tabakanın dışındaki bağ dokusunda kan damarları, lenf damarları ve interstisiyel hücreler olarak bilinen Leydig hücreleri bulunmaktadır (27). (şekil 2.4).



Şekil 2.4: İnsan testisinin ışık mikroskopunda görünümü (27).

2.1.2.4. Leydig Hücreleri:

Sitoplazmasında lipit damlacıkları içeren büyük, poligonal, eozinofilik boyanan hücrelerdir. Diğer steroid salgılayan hücreler gibi Leydig hücreleri de düz endoplazmik retikulum yönünden zengindir. Kolesteroldan testosteron sentezi için gerekli enzimler de bu organelin çokluğuyla ilişkilidir. Leydig hücreleri, erken fetal yaşam sırasında farklılaşarak testosteron salgırlar. Testosteronun salgılanması embriyonik gelişim, cinsel olgunlaşma ve üreme fonksiyonları için elzemdir (27).

2.1.2.5. Genital Kanallar

Seminifer tübüllerin düz tübülleri mediastinum adı verilen bir bölgede, birbiriyle anastomozlaşma gösteren kanallardan oluşan rete testise bağlanır. Rete testis kanalları silyumlu ve mikrovilluslu tek katlı kübik ya da tek katlı prizmatik epitelden meydana gelir (27).

Rete testisi epididimise bağlayan yaklaşık 20 adet duktuli efferentes, yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Duktuli efferentesin testisi terk eden kısımları kıvrımlı bir

hal alır ve epididimis başını oluşturur. Duktuli efferentesin alçak prizmatik hücreleri çok sayıda mikrovillus içerir ve seminifer tübüllerde salgılanan sıvının çoğunluğu duktuli efferentes tarafından geri emilir. Duktuli efferentesin yüksek prizmatik hücreleri ise silyalıdır. Aynı zamanda boşaltım kanalının ilk kas tabakası duktuli efferenteste başlar. Silyumların hareketi ve kas tabakasının kasılması sayesinde spermin taşınması gerçekleşir (27).

Ay şeklinde 7,5 cm uzunluğunda olan epididimis, duktuli efferentes, duktus epididimis ve ilişkili düz kaslar ile damarlardan ve bağ dokusundan oluşan bir yapıdır. Duktuli efferentes epididimis başını; duktus epididimis ise epididimis gövdesi ve epididimis kuyruğunu kapsar. Testiste üretilip epididimise giren spermler epididimis başında yumurtayı dölleme yeteneği kazanan olgun spermler haline gelir. Duktus epididimis de boşaltım kanalının genelinde olduğu gibi yalancı çok katlı prizmatik epitele sahiptir. Duktuli efferentes tarafından emilemeyen sıvının çoğu epididimis gövdesi tarafından geri emilir. Stereosilyum bakımından zengin olan epididimisin esas hücreleri; glikokaliks, steroid, gliserofosfokolin, sialik asit ve glikoproteinleri salgılar. Baş kısmındaki ve gövdedeki kaslar spermin epididimis kuyruğuna itilmesini sağlar ve olgun spermlerin esas depo yerleşimi epididimis kuyruğudur. Burada depo edilen spermler, sinirsel uyarımla burada yer alan üç kas tabakasının şiddetli kasılmasına bağlı olarak duktus defferense geçer (27).

Epididimis kuyruğundan hemen sonra duktus deferens ya da diğer adıyla vas deferens gelir. Duktus deferens, testiküler arter, pamfiniform pleksus, lenf damarları ve sempatik sinir liflerinin hepsi birlikte spermatik kordu meydana getirir. Spermatik korttan çıktıktan sonra mesaneye inen duktus deferensin ucu genişleyerek vezikula seminalis ile birleşir ve duktus ejakulatoryus olarak adlandırılan bu yapı prostata girer. Duktus deferens epiteli, epididimis gibi yalancı çok katlı prizmatiktir. Bunlardan yüksek olanları mikrovillus içerirler (27).

2.1.3. Testis Embriyolojisi

Genital sistem gelişimi açısından özellikle gelişimin erken dönemlerinde üriner sistem ile çok yakın ilişki içindedir ve birlikte ürogenital sistem gelişimi olarak ele alınır. Ürogenital sistem embriyonun dorsal vücut duvarından köken alan intermediyer mezodermden gelişir. Bu primordiyal embriyonik bağ dokusu (mezenkim) özelliğindeki

mezodermden böbrekler, iç genital organlar ve genital kanallar oluşur. Embriyonun katlanması sırasında intermediyer mezoderm ventrale doğru çekilerek dorsal aortanın her iki yanında ürogenital kabartı adı verilen kabartıyı oluşturur. Ürogenital kabartının genital sistemi oluşturacak bölümü genital (gonadal) kabartı adını alır (30).

Üçüncü haftadan itibaren vitellüs kesesinde, allantoisin başlangıç yerine yakın bölgede endodermal hücrelerden primordial germ hücreleri gelişir. Beşinci haftada bu hücreler, dorsal mezenterden gonadal kabartıya doğru göç ederler ve altıncı haftada gonadal kabartıyı tamamen doldururlar (28,31). Gebeliğin yedinci haftasından hemen önce, sölom epiteli gonadal kordun kalınlaşmasıyla primitif seks kordonlarını meydana getirir. Her iki cinsin gonadları benzerdir ve indiferansiye gonadlar olarak adlandırılırlar (32). Gonadların testise dönüşümü Y kromozomundaki Testis Belirleyici Faktör (TDF) tarafından uyarılır. Yedinci haftada, primitif seks kordonları, testis veya meduller kordonları oluşturmak üzere gonadın medulla bölgesini doldurur. Bu kordonlar, seminifer tübüleri, tubuli rectiyi ve gonadın hilusunda ince ve küçük kordonlara parçalanıp ağ şekline dönüşerek rete testisi oluşturur. Seminifer tübül duvarındaki Sertoli hücreleri testis kordonlarında gelişirken, spermatogoniumlar, endodermal kökenli primordial germ hücrelerinden meydana gelir. Gelişim ilerledikçe testis kordonları yüzey epiteliyle olan ilişkilerini kaybederler. Bu, testisin üzerinde yer alan fibröz yapıdaki tunika albuginea sayesinde olur. Tunika albugineanın uzantıları, içerisinde seminifer tübüleri içeren testis septumlarını oluşturur. Seminifer tübüller rete testis lümenine bağlanıp sonrasında duktuli efferentes ile devam ederler. Bunlar ise Wolff kanalına dökülerek duktus deferensi oluştururlar (28,31,33). Sekizinci haftada mezenkimden farklılaşan Leydig hücreleri ortaya çıkar ve bunlar testesteron üretmeye başlar (33). Testesteron üretimine başlanması, mezonefrik kanalın boşaltım kanalı sistemine farklılaşmasını uyarır. Gelişmekte olan testise yakın olan proksimal mezonefrik kanal parçası büküntülü hale gelir ve bu yapı duktus epididimis adını alır. Yine aynı bölgedeki mezonefrik kanallardan birkaçı mediastinumdaki kordonlarla etkileşime girerek duktuli efferentese dönüşür. Böylece rete testis ile epididimis kanalı arasında bağlantı kurulur. Mezonefrik kanalın testise uzak olan distal parçası ise etrafını saran kalın bir kas tabakasıyla birlikte duktus deferense dönüşür (27). Gebeliğin ortasına gelindiğinde, testisin %50'sini Leydig hücreleri oluştururken doğuma doğru sayıları giderek azalır (33).

Başlangıçta karın içerisinde bulunan testisler, üçüncü fetal aydan itibaren skrotuma doğru inişe başlarlar. Hutson hipotezine (34) göre testisin inişinin iki evresi vardır. Birincisi transabdominal evre olup bu evre androjenden bağımsızdır ve iniş anti-Müllerian hormon etkisiyle olur. Testis karın arka duvarı boyunca inişe geçer; gebeliğin 17. haftasında iç inguinal halka hizasına gelir ve gebeliğin 28. haftasına kadar burada kalır. İkincisi inguinokrotal evre olarak adlandırılır. Testis bu dönemde inguinal kanal yoluyla karın ön duvarını geçerek skrotuma iner. Testisler abdominal kaviteden skrotuma inerken beraberinde kan damarlarını, lenf damarlarını, otonomik sinirleri ve testisleri dıştan saran tunika vaginalis olarak isimlendirilen abdominal periton uzantısını da sürüklerler. Testis, gebeliğin yedinci ayından sonra inguinal kanalı geçmiş ve doğumdan hemen önce de gelişimini tamamlamış halde skrotumdaki yerini alır (33,34). Büyüyen testis mezonefrozdaki ayrılır ve kendi mezenterisi içerisinde asılı kalacak şekilde son halini alır (35).

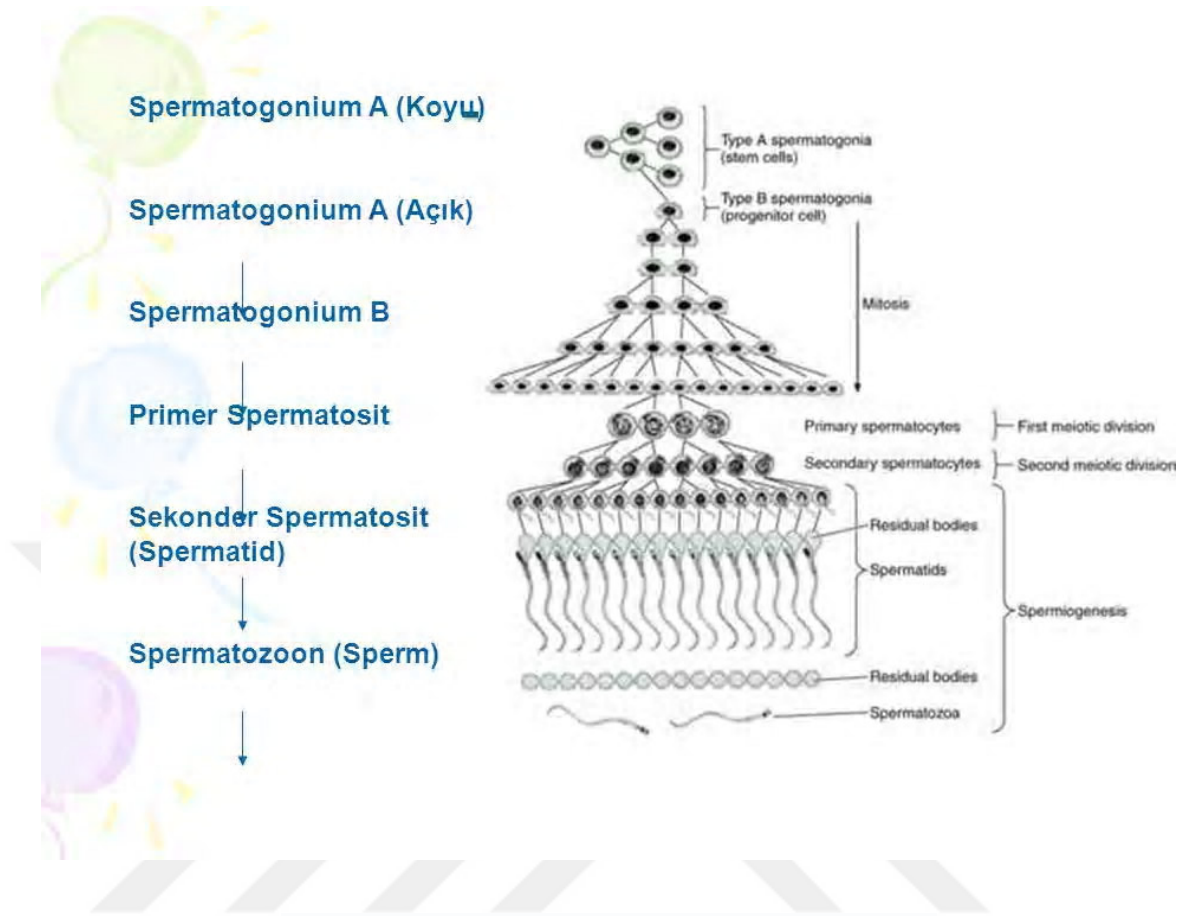
2.1.4 Testis Fizyolojisi

Testislerin sıcaklığı vücut ısısının yaklaşık 2 °C altındadır. Bu sperm üretimi için gerekli optimum sıcaklık değeridir. Sperm üretim süreci, spermatogenez, yaklaşık 13 yaş civarında başlayan, luteinizan hormon (LH) ve FSH etkisiyle aktif cinsel yaşam boyunca devam eden seminifer tübüllerde gerçekleşir (36).

2.1.4.1 Spermatogenez

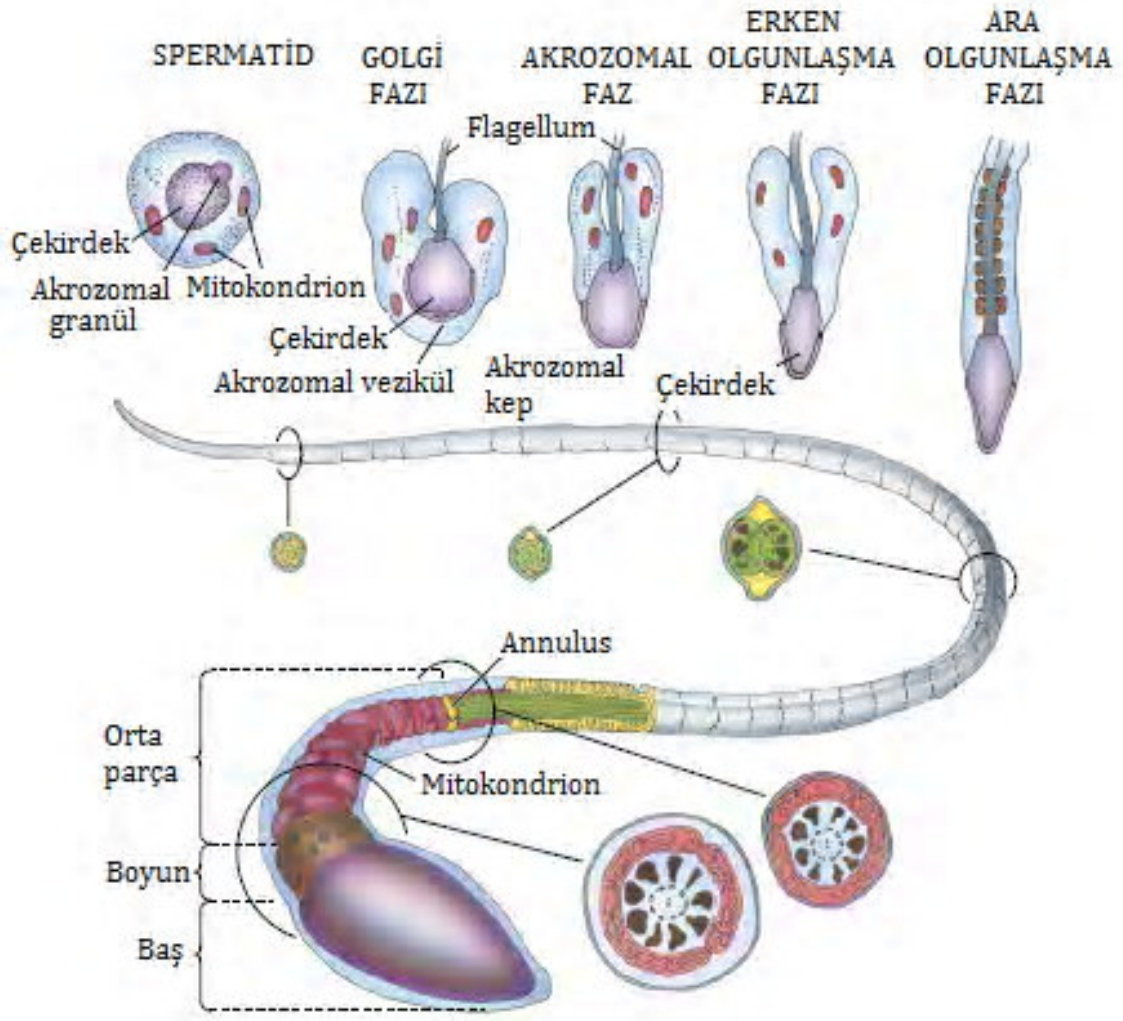
Seminifer tübüllerin en dıştaki bölümünde 2 – 3 katman şeklinde spermatogonyumlar bulunur. Spermatogonyumlar sürekli kendilerini yenileyerek farklılaşan hücrelerdir (36).

Mayoz: Yaklaşık 24 günlük bir süreç içerisinde sertoli hücrelerinin seviyesine ulaşan spermatogonyumların her biri birer primer spermatozite dönüşür. Her bir primer spermatozite bölünerek iki adet sekonder spermatoziti oluşturur. Birkaç gün içerisinde de her bir sekonder spermatozitin bölünmesiyle ikiye adet spermatid oluşur. Neticede tek bir spermatogonyumdan 4 adet, koromozom sayısı yarıya inmiş spermatid oluşur. Spermatogonyumlardan spermatidlerin sonrasında da spermilerin (spermatozoa) oluşumu yaklaşık 64 günde tamamlanır (36) (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Spermatogonyumlardan sperm oluşumu (37).

Sperm oluşumu: Epiteloid hücre özelliklerini gösteren spermatidler, uzamaya başlayarak baş ve kuyruk bölgelerinin de oluşmasıyla spermatozoonlara dönüşür. Baş kısmında bir çekirdek ve onun da önünde Golgi aparatlarından meydana gelen akrozom barındırır. Spermin yumurtaya girebilmesini sağlayan lizozomal enzimler akrozom içerisinde bulunur. Kuyruk kısmında, 9+2 mikrotübül çiftinden oluşan zarla çevrili aksonem yapısı ile kuyruğun başa yakın olan kısmında yoğun mitokondriyumların bulunduğu genel yapıya flagellum denir (Şekil 2.6). Bu yapı spermin hareketinden sorumludur (36).



Şekil 2.6: Spermiogenezin ve olgun bir spermatozoonun şematik görünümü (27).

Spermatogenezin uyarıcı hormonları şunlardır;

1-Testosteron: Leydig hücreleri tarafından üretilen testosteron germinal hücrelerin sperme dönüşümünde gereklidir.

2-LH: Ön hipofizden salgılanarak Leydig hücrelerinden testosteron salınımını uyarır.

3-FSH: Ön hipofizden salınarak Sertoli hücrelerini hedef alır ve spermatidlerin sperme dönüşümünü sağlar.

4-Östrojenler: FSH'nin uyarımına bağlı olarak Sertoli hücrelerinden sentezlenir ve spermiyogenezde rol aldığı düşünülmektedir.

5-Büyüme hormonu (GH): Testislerin temel metabolik gereksinimlerinin yanında spermatogoniumların dönüşümünü hızlandırmak için de gerekir (36).

2.2. ADRIAMİSİN (DOKSORUBİSİN)

Kanser, her yıl pek çok yaşam alan ölümcül bir hastalıktır. Kemoterapi, kanser tedavisinde kullanılan stratejilerden biridir. ADR'nin; mesane, meme, baş-boyun ve lösemiye kapsayan pek çok kanser tipinin tedavisi için kemoterapik ajan olarak kullanılan antrasiklin grubundan bir antibiyotiktir (1). Neredeyse 40 yıldır katı tümörlerin ve lösemilerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (38). Diğer tüm antrasiklinler gibi ADR, DNA'ya müdahale ederek etki gösterir (1). ADR'nin öncelikli hedefi bölünen hücrelerin DNA'sıdır. İlaç; DNA polimeraz, RNA polimeraz ve DNA topoizomeraz gibi bazı nüklear proteinlerin aktivasyonunu engelleyerek ve DNA ipliklerinden birini kırarak G2 fazında hücre döngüsünü bloke etmek suretiyle DNA sarmalının içerisine müdahale etmektedir (39).

ADR kardiyotoksik etkisi ile bilinir. Bu aynı zamanda pek çok doku ve organda toksisiteye neden olur (1). ADR'nin en etkili ve en tehdit edici yan etkisi 500-550 mg/m² dozda verildiğinde %4 oranında, 551-600 mg/m² dozda %18 oranında ve 600 mg/m² dozdan daha fazla alındığında %36 oranında kalp yetmezliği ile sonuçlanan kardiyomiyopatidir. Kardiyomiyopatiye neden olan ADR'nin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır ancak kanıtlar oksidatif stresin gelişimini ve yapısal deformasyona aracılık eden apoptozise yol açan kardiyak inflamasyonu teşvik ettiği yönündedir. Mitokondriye bağımlı ve bağımsız yolda ADR tarafından serbest radikal oluşumu, miyokardiyumda oksidatif strese neden olur. ADR'nin neden olduğu kardiyotoksisiteye karşı çeşitli antioksidanlarla yapılan tedavi, prelinik modellerde umut verici iyileştirmeleri göstermiştir. Ancak ADR kardiyotoksitesindeki antioksidanların yararı üzerine yapılan klinik çalışmalar antioksidanların biyolojik olarak kullanılabilirliği, terapinin zamanlaması, malignanın tipi ve derecesi, diğer kombinasyonel antineoplastik ilaçlar nedeniyle istikrarsız sonuçlar göstermiştir. Bunun dışında, ADR, NLRP3 inflamazomunun aktivasyonu aracılığıyla interlökin-1β salınımına neden olmaktadır. Bu da tedavinin yönetilmesini daha fazla zorlaştıran kardiyak inflamasyona neden olmaktadır (8).

ADR kullanımı, kalp üzerindeki sitotoksik etkisi yanında, testiküler toksisiteyi kapsayan yan etkileri nedeni ile de ciddi biçimde kısıtlanmaktadır. ADR tedavisi spermatazoanın sayısı ve kalitesindeki hasarla karakterize olan spermatogenik aktivitenin azalmasıyla ilişkilendirilmektedir. Geçmişte yapılan çalışmaların sonuçları ADR uygulanan sıçanlarda seminifer tübül epitelyal hücre döngüsünün belirli safhalarında apoptozis, testosteron konsantrasyonunda azalma, anormal sperm morfolojilerindeki artış, hareketli sperm oranında azalma, spermatogonyum sayısında azalmanın olduğu gösterilmiştir. Ek olarak ADR, testiküler dokularda germ hücrelerinin azalmasıyla seminifer tübüllerin çapında daralma gibi ciddi dejeneratif değişikliklere neden olmaktadır. Ancak, ADR'nin neden olduğu lipid peroksidasyonunun testiküler toksisiteden de sorumlu olduğu tespit edilmiştir ve artan lipid peroksidasyonu erkek fertilitesi için zararlı olabilir (39).

Yaygın şekilde kullanımına rağmen ADR'nin etkisi hala tartışma konusudur ve yüksek etkisini açıklayan birkaç farklı mekanizmanın olduğu ileri sürülmektedir. Tüm bu mekanizmaların hücre ölümünü teşvik eden bir yoldaki hücrelere hasar vererek hücre proliferasyonunu engellemeye neden olduğu zannedilmektedir (38).

2.3. ANTIOKSİDAN

2.3.1. Serbest Radikal

ROS ve serbest radikallerin keşfindeki son gelişmeler, sağlık ve hastalıkların yönetiminde umut verici bir tıbbi devrim olarak nitelendirilmektedir. Yaşam için vazgeçilmez bir element olmasına karşın, oksijen belirli durumlarda insan vücudu üzerinde zararlı etkilere yol açmaktadır. Oksijenin olası zararlı etkilerinin çoğu, ROS olarak bilinen ve oksijeni diğer moleküllerle paylaşmaya eğilimli olan birçok kimyasal bileşiğin aktivitesi ve düzenlenişi nedeniyle (9).

Bir serbest radikal, orbitalinde paylaşılmamış elektron içeren, kendi başına var olabileceği yeteneğine sahip herhangi spesifik bir molekül olarak tanımlanabilir. Paylaşılmamış elektronların varlığı, radikallerin çoğu tarafından paylaşılan belirli yaygın özelliklere yol açar. Çoğu radikal, kararsız ve yüksek derecede reaktiftir. Bunlar, diğer moleküllerden elektron alabilme veya onlara elektron verebilme yeteneği sayesinde indirgen ya da yükseltgen olarak davranabilir. Pek çok hastalık durumundaki oksijen ihtiva eden önemli serbest radikaller; hidroksil radikali, süper oksit anyon radikali, hidrojen peroksit, singlet oksijen, hidroklorit, nitrik oksit radikali ve peroksinitrit

radikalidir. Bunlar yüksek oranda reaktif türevler olup nükleus ve hücre membranlarını değişikliğe uğratarak DNA, proteinler, karbonhidratlar ve lipitler gibi düzenli biyolojik moleküllere zarar vermektedir. Serbest radikaller, homeostazinin bozulmasına ve hücre hasarına yol açan önemli makromoleküllere saldırır. Serbest radikaller, vücutta tüm molekül çeşitlerini hedef alır. Bu hedefler arasında lipitler, nükleik asitler ve proteinler en büyük olanlardır.

Bir antioksidan, saldırgan bir serbest radikal ile bir elektron paylaşmak suretiyle onu nötralize etmek için yeterince kararlılığa sahip bir moleküldür. Bu sayede serbest radikalin oluşturacağı hasarı azaltır. Antioksidanlar serbest radikalleri süpürücü etkisi sayesinde hücre hasarını engelleyebilir. Düşük molekül ağırlığına sahip bu bileşikler güvenli bir şekilde serbest radikallerle etkileşime girebilir ve zincir reaksiyonlarını ölümcül maddelerin zarar vermesinden önce sonlandırabilir. Glutasyon, ubikuionol, ürik asit gibi bazı antioksidanlar vücutta normal metabolik faaliyetler sonucu üretilir. Diğer hafif antioksidanlar, diyetle aldığımız besin maddelerinde bulunur. Vücutta serbest radikalleri süpüren birkaç enzim sistemi olmasına karşın başlıca mikrobesein olan antioksidanlar Vitamin E, Vitamin C ve Vitamin A'dır.

Antioksidan terimi ilk olarak spesifik bir şekilde oksijen tüketimini engelleyen bir kimyasal atfederek kullanılmıştır. İlk olarak 19.yy'nin sonu ve 20.yy'nin başında yapılan bir çalışma ile antioksidanların kullanımının önemi ortaya konmuştur. Antioksidanların biyolojideki rolü üzerine ilk araştırmalarda, doymamış yağların oksidasyonunu engellemedeki etkileri üzerine odaklanılmıştır. Daha sonra, A, C ve E vitaminleri tanımlanmış ve yaşayan organizmaların biyokimyasında antioksidanların önemi ortaya konmuştur. Antioksidanlar için iki temel etki mekanizması açıklanmıştır. Bunlardan ilki; bir antioksidanın, bir elektronunu sistemde var olan serbest bir radikale aktarmasıyla zincir kırma mekanizmasıdır. İkinci mekanizma, reaksiyon zinciri başlatıcı katalizörü söndürerek, ROS'u veya reaktif nitrojen türevlerini ortadan kaldıran sekonder antioksidanları içermektedir. Antioksidanlar, biyolojik sistemler üzerine etkilerini elektron aktarma, metal şelasyonu, koantioksidanlar ve gen ekspresyonunu düzenleme şeklinde farklı mekanizmalar tarafından gösterebilirler (9).

Savunma sistemlerinde antioksidanların davranışı; koruma, radikallerin süpürülmesi, tamir etme, adaptasyon olmak üzere dört farklı düzeyde gerçekleşebilir. Bunlardan ilki, serbest radikallerin düzenlenişini baskılayan antioksidan korumasıdır. Kesin

mekanizmalar ve radikallerin düzenlenişi in vivo ortamda henüz yeterince aydınlatılmamış olmasına rağmen metal, hidrojen peroksitin dağılmasını teşvik eder. Hidrojen peroksit en önemli radikal kaynaklarından biridir. Böyle reaksiyonları ortadan kaldırmak için, bazı antioksidanlar hidrojen peroksitleri alkol ve suya dönüştürerek azaltır (40).

Glutasyon peroksidaz, glutasyon s transferaz ve fosfolipit hidroperoksit glutasyon peroksidaz lipit hidroperoksillerini dağıtarak alkole dönüştürdüğü bilinen antioksidanlardır.

Fosfolipit hidroperoksit glutasyon peroksidaz, biyomembranların içerisindeki fosfolipit hidroksillerinin miktarını azaltabildiği için eşsizdir. Glutasyon peroksidaz ve katalaz hidrojen peroksiti suya dönüştürerek işlev görür.

İkinci savunma hattı, antioksidanların lipit peroksidasyon zincirini yok ederek veya zincir yayılma reaksiyonlarını kırarak aktif radikalleri süpürmesidir. Çeşitli tehlikeli radikalleri süpüren antioksidanlar hidrofilik ve lipofilik olarak ikiye ayrılır; Vitamin C, ürik asit, bilirubin, albümin ve tiyoller hidrofilik olanlardır. Vitamin E ve ubikuinol lipofilik radikal süpürücü antioksidanlardır.

Üçüncü savunma hattı, tamir ve antioksidanların yeniden sentezlenmesidir. Proteolitik enzimler, proteazlar, proteinazlar ve peptidazlar memeli hücrelerinin mitokondri ve sitozolünde mevcut halde bulunur. Okside olmuş proteinlerin birikmesini engeller ve oksitlenerek modifiye olmuş proteinleri aza indirgeyerek serbest radikal etkisini ortadan kaldırır.

Dördüncü savunma hattı, adaptasyon olarak da bilinen, serbest radikal oluşumunun ve reaksiyonlarının belirdiği yerlere uygun antioksidanların düzenlenmesi ve bunların hedef bölgeye taşınmasıyla serbest radikal etkisinin ortadan kaldırılmasına dayalıdır (40).

2.3.2. Enzimatik Antioksidan tipleri

Hücreler, oksidatif strese karşı antioksidan enzimlerin karşılıklı etkileşimi ile korunur. Oksidatif fosforilasyon ile açığa çıkan süperoksit, ilk olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) dönüştürülür, daha sonrasında suya ve oksijene (2H₂O + O₂) dönüştürülür. Bu detoksifikasyon yolağı; SOD'un birinci aşamayı katalizlediği sonra CAT ve çeşitli peroksidazların hidrojen peroksidi ortadan kaldırdığı çoklu enzim çalışmasının bir

sonucudur. SOD, süperoksit anyonunun, peroksit ve oksijene dönüşümünü katalizleyen yakın ilişkili enzimlerin bir sınıfıdır. SOD enzimleri neredeyse tüm aerobik hücrelerde ve hücre dışı bileşenlerde yer alır. SOD'un metal kofaktör bağımlı üç büyük ailesi vardır; Bunlardan biri kofaktör olarak bakır ve çinkoyu bağlıyor iken, diğer tipi manganezin her ikisine de bağımlıdır. Sonuncu tip enzim ise kofaktör olarak nikel kullanır. İnsanlarda SOD'un 3 formu da bulunur. SOD1 sitoplazmada, SOD2 mitokondride, SOD3 ekstraselüler ortamda yer almaktadır. SOD1 iki birimden (dimer) meydana gelirken diğerleri tetramer yapıdadır. SOD2 reaktif merkezinde manganez bulundururken, SOD1 ve SOD3 reaktif merkezlerinde bakır ve çinko barındırır.

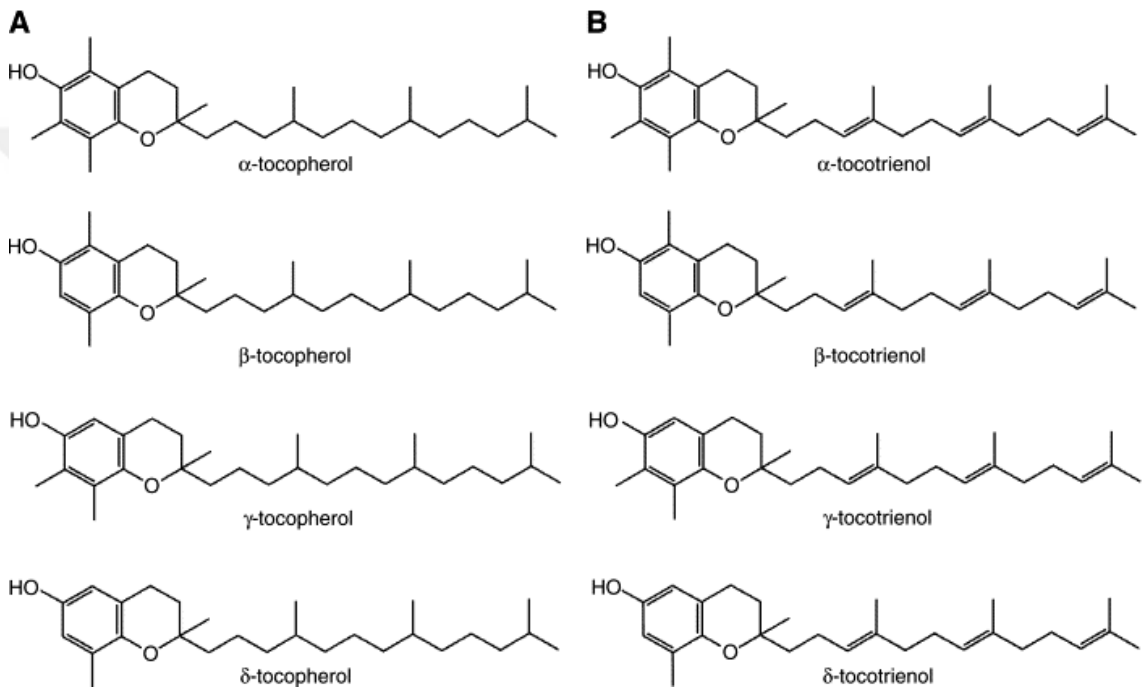
CAT, neredeyse oksijenli solunum yapan tüm canlı organizmalarda bulunan yaygın bir enzimdir. Fonksiyonu, hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırıştırmaaktır. Hidrojen peroksit normal metabolik süreçlerin çoğunda üretilen zararlı bir maddedir. CAT, ortaya çıkan zararı önlemek için, hidrojen peroksiti hızlı bir şekilde daha az zararlı maddelere dönüştürmek zorundadır. Bu yüzden hücreler tarafından sıklıkla kullanılan CAT, hızlı bir şekilde hidrojen peroksiti daha az reaktif olan oksijen ve suya dönüştürür. CAT, tüm organlardaki hücrelerde özellikle de karaciğerde daha fazla konsantrasyonlarda kullanır.

Glutasyon sistemi; glutasyon, glutasyon redüktaz, GPx ve glutasyon s transferazı kapsar. Bu sistem hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalarda bulunur. GPx, hidroperoksitlerin ve hidrojenperoksitin parçalanmasını sağlayan 4 tane selenyum kofaktörüne sahip bir enzimdir. Hayvanlarda en son 4 farklı izoenzimi olduğu bulunmuştur. Lipit hidroperoksitlerine karşı en etkili olanı tip-4 GPx iken, en fazla bulunanı tip-1 GPx hidrojen peroksitine karşı çok etkili bir temizleyicidir. Glutasyon s transferaz lipit peroksitlere karşı yüksek etki gösterir. Bu enzimler özellikle karaciğerde fazla miktarda bulunmakla birlikte metabolizma detoksifikasyonuna da görev yaparlar (9).

2.4. VİTAMİN E

Vitamin E bazı besinlerde doğal olarak bulunan, belirgin antioksidan aktiviteleriyle yağda çözünebilir bir grup bileşenin ortak ismidir (41). Vitamin E sekiz forma sahiptir, bunlar; kromanol halkası üzerinde doymuş bir yan zincire sahip tokoferol izoformları ve doymamış yan zincire sahip tokotrienol izoformları olarak sınıflandırılır. Bunların her biri de kromanol halkası üzerindeki metil gruplarının yeri ve sayısı tarafından tanımlanan alfa, beta, teta ve gama formları şeklinde sınıflandırılır (Şekil 2.7) (42).

Vitamin E'nin sekiz formu da insanlarda tamamen absorbe edilir ancak bunların bozulma oranı ve vücutta tutulma süresi, görece biyopotansiyellerinin etkisi ile büyük oranda farklılık gösterir. Kısaca, Vitamin E formları karaciğer tarafından ayrıştırıldıktan sonra diğer formları hızlı bir şekilde metabolize olurken ve diğer ksenobiyotikler gibi benzer yollarla sekrese olurken, yalnızca Alfa Tokoferol'un tercihen dokuların hücre membranında biriktirildiği gözlenmiştir (42).



Şekil 2.7: Vitamin E'nin Kimyasal Yapısı (43)

Keşfedilen 4 tokoferol ve 4 tokotreinol formu arasında Alfa Tokoferol biyolojik olarak en aktif Vitamin E formudur ve bitkisel yağlardan, işlenmemiş taneli tahıllardan ve çerezlerden yüksek miktarlarda elde edilir. Vitamin E keşfedildiği günden beri, çok sayıda araştırmacı çiftlik hayvanları ve laboratuvar hayvanları kadar, insanlar için de besin değeri olduğunu kanıtlanmıştır. Vitamin E, Lenfatik yolla absorbe edilir ve şilomikronlar aracılığı ile sistemik dolaşıma taşınır. Absorbsiyon sonrasında büyük oranda karaciğerde depolanır. Vitamin E, yağda çözünebilir özellikleri sayesinde Lipit depolayabilen organeller ve plazma membranları içererisine alınır, bu nedenle de vücut boyunca dağılır. Vitamin E, Se, çoklu doymamış yağ asitleri, kükürt içeren amino asitler, diğer vitaminler, bazı diğer mineralleri ile sentetik antioksidanları kapsayan

birkaç besin maddesi ile etkileşim halindedir. Vitamin E hayvanlar için çok kritik fonksiyonlara sahiptir. Örneğin, serbest radikal aktive edicilerin veya reaktif oksijen türevlerinin yan etkilerinden hücreleri korumada etkili bir biyolojik antioksidan olarak etki gösterir. Vitamin E, ince bağırsakta olası lipitlerin ve esansiyel aminoasitlerin taşınmasında spesifik bir rol oynar. Vitamin E, demir metabolizması ve steroid yapımıyla da ilişkilidir ve enfeksiyon hastalıklarına karşı cevap veren hücrel ve humoral bağışıklığı uyarır.

Vitamin E yetmezliği hastalıkları ve semptomları, etkilediği türlere göre çeşitlilik gösterir. Genital sistem, immün sistem, kardiyovasküler sistem, kas sistemi, dolaşım sistemi, iskelet sistemi ve sinir sistemi hastalıklarını kapsar. Dahası Vitamin E yetmezliği, karaciğer, böbrek, akciğer ve adipoz doku rahatsızlıklarının birçoğunda kendini gösterir. Vitamin E yetmezliği iskemik kalp hastalığı yetmezliği, meme kanseri ve enfeksiyonların görülme sıklığını arttırabilir (14).

Bugüne kadar Vitamin E'nin, kanser veya ateroskleroz gibi oksidatif stresle ilişkili olduğuna inanılan hastalıkları engellemek için klinik denemelerde test edildiği ancak denemelerin büyük çoğunluğunda bu tür hastalıkları engelleyemediği veya ilerlemesini geciktirici bir etkisi olmadığı belirtilmiştir (44).

Vitamin E, Aterosklerozun patogenezinin sorumlu etkenlerden biri olduğu kabul edilen LDL'nin oksidatif düzenlenmesine karşı önemli bir antioksidan olduğu kabul edilmiştir. Ancak, bu konuda Vitamin E'nin rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır (16).

Vitamin E, spermatozoa antioksidant sisteminin önemli bir bileşenidir ve lipit peroksidasyonu ile reaktif oksijen türevlerine karşı membran koruyucularından biridir. Vitamin E takviyesinin tavşanlarda toplam sperm sayısını ve sperm konsantrasyonunu arttırdığı gözlenmiştir. Öte yandan koçlarda Vitamin E yetmezliği, spermatogonyum dejenerasyonu, testiküler hasar ve seminifer tübüllerin dejenerasyonu gibi üreme organları üzerinde zararlı etkilere yol açabildiği belirtilmiştir (45).

2.5. SELENYUM

Mikrobeyinler, insan vücudunda çok az miktarlarda gereksinim duyulan diyetle alınan minerallerdir. Bunlar muhtemelen ksenobiyotiklerle birkaç alanda etkileşime girme, emilim ve sekresyon, vücutta metallerin taşınması, hedef proteinlere bağlanma,

metabolizma ile toksik metallerin ayrılması ve oksidatif stresle etkileşim halindedir. Ek olarak bunlar, metalloenzimler için koenzim olarak veya aktif bölgelerde prostetik grup olarak hizmet edebilmektedir. Se, esansiyel bir elementtir ve antioksidant glutatyon peroksidaz ile idiodotironin deiyodinaz'ı kapsayan önemli enzimlerin kilit bir bileşenidir. Selenoenzimlerin büyük çoğunluğu oksidatif strese karşı korumada kilit rol oynar. Artan kanıtlar, aminoasit Sistein-Se formunda Se içeren çoğu selenoproteinin, antioksidan aktiviteyle ilişkilendirilen önemli fonksiyonları olduğunu ileri sürülmüştür (23).

Se, fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerin çoğunda büyük rol oynar. Se bileşikleri hızlı bir şekilde solunum ve sindirim yoluyla emilir. Selenyum klorid, deri aracılığıyla vücuda girer. Modern yaşamın stresli koşullarında (sigara, alkol, çevre kirliliği) Se gereksinimi sürekli olarak artmaktadır. Sonuç olarak, organizmaların immün sistemleri stres faktörlerinin olumsuz etkilerine karşı Se'nin ilave dozlarına ihtiyaç duymaktadır. Se'nin uygun miktarlarda alımı, vücut sağlığının devamı için ve bir dizi hastalığın gelişiminin önlenmesi ve tedavisinde önemlidir. Se ayrıca, antioksidan özellikleri sayesinde genetik hasardan ve deformasyondan hücreleri korumaktadır (46). Serbest oksijen radikalleri için bir süpürücü olarak biyolojik fonksiyonundan dolayı nöroprotektif ve antioksidan özelliklere sahiptir. Bu element, normal oksijen metabolizması sırasında üretilen serbest radikallerin etkilerine karşı hücreleri koruyan antioksidan enzimlerin zorunlu bir bileşenidir (47). Se ve selenoproteinlerin bu özellikleri ve koruyucu rolü DNA ve RNA ile de ilişkilidir ve antikanser terapisinde uygulanmaktadır. Bir kanserin gelişme riskinin kandaki Se seviyesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Düşük Se seviyesine sahip insanların büyük kanser riski taşıdığı sanılmakta ve özellikle Se ile birlikte düşük Vitamin E'nin bu riski daha da katladığı düşünülmektedir. Se, kansere sebep olan ve teratojenik etkisi bilinen aflotoksin aktivitesini de nötralize ettiği gösterilmiştir. Se tedavisinin, derinin squamöz hücreli kanserlerinin veya bazal hücreli kanserlerinin gelişimini engellemediğinin gözlenmiş olmasına rağmen prostat, akciğer, kolorektal ve testis gibi belirli kanser tiplerinin gelişimi yavaşlatabildiği ile ilgili bulguların olması önemlidir (46).

Se, hayvanlarda üreme ve normal gelişimin düzenlenmesinde zorunlu bir besindir. Pek çok çalışma, Se'un erkek üreme performansı üzerine belirgin bir etkiye sahip olduğunu kanıtlanmıştır ve normal testiküler fonksiyonu, testiküler hücre yapısını, spermin

hareketliliğini ve fonksiyonunu sürdürülebilir kılar. Bazı çalışmalarda, Se'nin kadınların gebe kalma ihtimalini yükselttiği ve erkekte Sertoli hücrelerinin sayısını arttırdığı tespit edilmiştir. Ayrıca, bazı çalışmalar, immün organlar, karaciğer ve pankreatik beta hücrelerinin apoptozu üzerine Se'un koruyucu etkilerinin bulunduğu ortaya konulmuştur (19).



3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen ortalama 60 günlük erkek sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar araştırma süresince 19-21 °C sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık dönemlerin bulunduğu, özel hazırlanmış otomatik olarak klimatize edilen odalarda yetiştirildi. Sıçanlar normal pellet cinsi yem ve su ile serbest beslenmiş olup her kafeste 3-5 adet sıçan bulunmaktaydı. Deney aşamasına kadar mümkün olduğu kadar stressiz bir ortamda barınmaları sağlandı. Deneye başlamadan önce hayvanların ağırlıkları ölçüldü ve ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde kontrol ve deney gruplarında 8'er adet Wistar Albino cinsi sıçan bulunacak şekilde gruplar oluşturuldu. Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi Birimi (BAP) tarafından TYL-2016-6937 no'lu proje ile desteklenmiştir.

3.1. Deneysel Prosedür

Grup 1: (Kontrol) Çalışmanın ilk gününden itibaren 3 gün arayla 12 kez mısır yağı (1 ml/kg/gün) ve çalışmanın altıncı gününden itibaren 3 gün arayla 10 kez izotonik salin (0,5 ml/kg/gün) gavajla verildi.

Grup 2: (ADR) Çalışmanın altıncı gününden itibaren 3 gün arayla 10 kez ADR (2 mg/kg/gün) ip olarak verildi.

Grup 3: (Vitamin E) Çalışmanın ilk gününden itibaren 3 gün arayla 12 kez Vitamin E (200 mg/kg/gün) gavajla verildi.

Grup 4: (Se) Çalışmanın ilk gününden itibaren 3 gün arayla 12 kez Se (2 mg/kg/gün) gavajla verildi.

Grup 5: (Se+Vitamin E) Çalışmanın ilk gününden itibaren 3 gün arayla 12 kez hem Se (2 mg/kg/gün) hem Vitamin E (200 mg/kg/gün) gavajla verildi.

Grup 6: (ADR+Vitamin.E) Çalışmanın ilk gününden itibaren 3 gün arayla 12 kez Vitamin E (200 mg/kg/gün) gavajla ve çalışmanın altıncı gününden itibaren 3 gün arayla 10 kez ADR (2 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak verildi.

Grup 7: (ADR+Se) Çalışmanın ilk gününden itibaren 3 gün arayla 12 kez Se (2 mg/kg/gün) gavajla ve çalışmanın altıncı gününden itibaren 3 gün arayla 10 kez ADR (2 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak verildi.

Grup 8: (ADR+Se+Vitamin E) Çalışmanın ilk gününden itibaren 3 gün arayla 12 kez hem Se (2 mg/kg/gün) hem Vitamin E (200 mg/kg/gün) gavajla verildi. Çalışmanın altıncı gününden itibaren 3 gün arayla 10 kez ADR (2 mg/kg/gün) intraperitoneal olarak verildi. (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 33 gün boyunca farklı besinlere tabi tutulan gruplar.

| 0 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 | 30 | 33 | Gün | Grup |
|--|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|-------------------|------|
| Mısır yağı (1 ml/kg) (gavaj) | | | | | | | | | | | | Kontrol | G1 |
| izotonik solün (0,5 mg/kg) (i.P.) | | | | | | | | | | | | | |
| ADR 2 mg/kg (i.P.) | | | | | | | | | | | | ADR | G2 |
| Vitamin E (200 mg/kg) (gavaj) | | | | | | | | | | | | Vit E | G3 |
| Selenyum (2 mg/kg) (gavaj) | | | | | | | | | | | | Sel | G4 |
| Vitamin E (200 mg/kg) (gavaj) | | | | | | | | | | | | Vit E + | G5 |
| Selenyum (2 mg/kg) (gavaj) | | | | | | | | | | | | | |
| Vitamin E (200 mg/kg) (gavaj) | | | | | | | | | | | | Vit E + | G6 |
| ADR 2 mg/kg (i.P.) | | | | | | | | | | | | | |
| Selenyum (2 mg/kg) (gavaj) | | | | | | | | | | | | Sel + | G7 |
| ADR 2 mg/kg (i.P.) | | | | | | | | | | | | | |
| Vitamin E (200 mg/kg) + Selenyum (2 mg/kg) (gavaj) | | | | | | | | | | | | Vit E Sel + | G8 |
| ADR 2 mg/kg (i.P.) | | | | | | | | | | | | | |

Deney sonunda sıçanlar xylazin ve ketamin anestezisi altında dekapite edilerek hayvandan kan ve testis dokusu örnekleri alındı. Alınan kanda testosteron seviyesine bakıldı.

Her deney hayvanının testislerinden bir tanesi parafin tekniğine uygun doku takibi yapılmak üzere %10'luk formaldehit solüsyonu içerisinde; diğeri ise biyokimyasal analizler için -80 dereceye kaldırıldı. Formaldehit solüsyonuna kaldırılan testis örneklerinden hazırlanan preparatların fotoğraflarından testiküler biyopsi skorlaması yapıldı ve yine bu preparatlarda Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine (TUNEL) adı verilen bir yöntem ile apoptozis değerlendirildi.

3.1.1. Doku Takibi Aşaması

%10'luk formaldehitte tespit edilen dokular artan alkol serilerinden geçirilip ksilende şeffaflaştırıldıktan sonra parafin bloklara gömüldü. Bu süreç esnasında uygulanan işlemler Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 Işık Mikroskobu Doku Hazırlama Tekniği.

| İşlem sırası | Kimyasal | Süre |
|--------------|------------------------|---------|
| 1 | %10'luk formaldehid | 72 saat |
| 2 | Musluk suyu | 1 gece |
| 3 | %50'lik alkol | 1 saat |
| 4 | %70'lik alkol | 1 gece |
| 5 | %80'lik alkol | 1 saat |
| 6 | %90'lik alkol | 1 saat |
| 7 | %96'lik alkol | 1 saat |
| 8 | Absolu alkol | 1 saat |
| 9 | Absolu alkol | 1 saat |
| 10 | Absolu alkol | 1 saat |
| 11 | Ksilen | 20 dk |
| 12 | Ksilen | 20 dk |
| 13 | Ksilen | 20 dk |
| 14 | Eriyik parafin (60 °C) | 1 gece |
| 15 | Bloklama | |

3.1.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Aşaması

Parafin bloklardan mikrotomda alınan 5-6 mikronluk testis doku kesitleri su banyosundan lamlara alındıktan sonra rutin H & E boyaları ile boyanarak preparatlar hazırlandı. Bu aşamada uygulanan işlemler Tablo 3.3’de verilmiştir.

Tablo 3.3 HematoksilenEozin Boyama Aşaması.

| İşlem sırası | İşlem basamağı | Süre |
|--------------|-----------------------|--------|
| 1 | Etüv(60 °C) | 2 saat |
| 2 | Ksilen | 10 dk |
| 3 | Ksilen | 10 dk |
| 4 | Ksilen | 10 dk |
| 5 | absolu alkol | 5dk |
| 6 | absolu alkol | 5dk |
| 7 | %96’lik alkol | 5dk |
| 8 | %80’lik alkol | 5dk |
| 9 | %70’lik alkol | 5dk |
| 10 | %50’lik alkol | 5dk |
| 11 | Musluk suyunda yıkama | 5dk |
| 12 | Hematoksilen | 8dk |
| 13 | Musluk suyunda yıkama | 5dk |
| 14 | Eozin | 3-5dk |
| 15 | Musluk suyunda yıkama | 1dk |
| 16 | %50’lik alkol | 1-2dk |
| 17 | %70’lik alkol | 1-2dk |
| 18 | %80’lik alkol | 1-2dk |
| 19 | %96’lik alkol | 1-2dk |
| 20 | absolu alkol | 1-2dk |
| 21 | absolu alkol | 1-2dk |
| 22 | Ksilen | 10dk |
| 23 | Ksilen | 10dk |
| 24 | Kapatma | |

3.1.3. Johnsen'in Testiküler Biyopsi Skorlaması

Bu skorlamaya göre, hasara neden olan herhangi bir durum sonrasında testis içerisindeki seminifer tübül hücrelerinin dağılımı belli bir sıra takip ederek progresif şekilde kaybolur. Tübüllerdeki bu hasarlanmanın değerlendirilmesinde Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) kullanıldı (Tablo 3.4). Histolojik incelemeler Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında iki uzman histolog tarafından birbirinden bağımsız olarak değerlendirildi. Her gruba ait 8 preparattan 5'er alan, toplamda 40 alan olacak şekilde 200 adet seminifer tübüldeki değişimler gözlenerek ortalama JTBS hesaplandı.

Tablo 3.4 Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.

| Skor | Bulgular |
|------|---|
| 1 | Tübüler kesitte hiçbir hücre yoktur |
| 2 | Sadece sertoli hücreleri vardır |
| 3 | Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyumlar vardır |
| 4 | Az sayıda (5/ tübül) spermatozoid vardır |
| 5 | Fazla sayıda spermatozoid mevcuttur |
| 6 | Az sayıda (5 / tübül) spermatid vardır |
| 7 | Farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır |
| 8 | Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur |
| 9 | Az sayıda (5 tübül) spermatozoa vardır |
| 10 | Fazla sayıda spermatozoanın görüldüğü tam spermatogenez mevcuttur |

3.1.4. Biyokimyasal Analizler

Derin dondurucuda -80 derecede tutulan dokular çıkarılıp buz üzerinde 0.5 M, 7.0 pH'deki fosfat buffer'da homojenize edildi. Daha sonra 16000'da 5 dk 4 cg derecede kırılmamış hücre çökeltileri ve hücre birikintileri santrifüje edildi. Süpernatant kısmında lipit peroksidasyonuna bağlı olarak Malondealdehit seviyesi, glutatyonperoksidaz aktivitesi, katalaz aktivitesi ve süperoksid dismutaz aktivitesi tespit edildi.

3.1.4.1. Malondealdehit (MDA) Düzey Tayini

Nanotek firmasından temin edilen RAT malondialdhehydhe (MDA) ELİSA Kit. Seri: 201-11-0157 no'lu ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışıldı. Doku örneklerinin sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

3.1.4.2. Süperoksitdismutaz (SOD) Aktivite Tayini

Nanotek firmasından temin edilen RAT Super Oxidase Dismutase (SOD) ELİSA Kit. Seri: 201-11-0169 no'lu ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışıldı. Doku örneklerinin sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

3.1.4.3. Katalaz (CAT) Aktivite Tayini

Nanotek firmasından temin edilen RAT Catalase (CAT) ELİSA Kit. Seri: 201-11-5106 no'lu ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışıldı. Doku örneklerinin sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

3.1.4.4. Glutatyonperoksidaz (GPx) Aktivite Tayini

Nanotek firmasından temin edilen RAT GlutathionePeroxidase (GPx) ELİSA Kit. Seri: 201-11-1705 no'lu ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışıldı. Doku örneklerinin sonuçları nmol/mg protein olarak verildi.

3.1.4.5. Kanda Testesteron Düzeyi Tayini

Fine Biotech firmasından temin edilen RAT Testosterone (T) ELİSA Kit. Seri: ER 1462 no'lu ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında çalışıldı. Oda sıcaklığında bekletilen Serum örnekleri üzerinden testosteron seviyesi ölçümlendi.

3.1.5. TUNEL Metodu

Deneklere ait tüm kesitlerde apoptotik hücreleri belirlemek için Roche marka InSitu Cell Detection Apoptosis Fluorescein Kit'i kullanıldı. Boyama işlemi kitin prosedürüne

uygun olarak yapıldı; 5-6 mikron kalınlığındaki testis dokuları sırasıyla deparifinizasyon ve rehidratasyon işlemlerine tabi tutulduktan sonra PBS ile yıkandı. Daha sonra antijen geri kazanımı için 0.01 M sodyum sitrat tamponunda mikrodalga fırında 350 W'de 5 dakika bekletildi, ardından oda sıcaklığında 20 dk. Soğumaya bırakıldı. PBS ile 3 defa 5'er dk. Yıkanan dokular TUNEL reaksiyon karışımı ile 37 C 'de nemli ve karanlık ortamda 60 dk. inkübe edildi. PBS ile 3 defa 5 'er dk. yıkanan dokulara 4',6-diamidino-2-phenylindole ile zıt boyama yapıldı. Gliserollü kapatma solüsyonu ile kapatılan doklar Olympus BX-51 Floresan mikroskopta 450-500 nm dalga boyunda görüntülendi. Apoptotik indeks için 20X objektifte her gruptan 100'er alan olacak şekilde apoptotik hücre sayımı yapıldı.

3.1.6. İstatistiksel Analiz

Testiküler skorlama, Tunel yöntemi ve Biyokimyasal testlerin istatistiksel analizi için SPSS 22 Programı kullanıldı. Gruplar arasındaki karşılaştırma için One Way Anova testi ve Post Hoc analizi için Tukey testi uygulandı. Veriler artı (+), eksi (-) standart sapma olarak belirtildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Bu çalışmada, erişkin sıçanlara, testiste beklenen doku hasarını gözlemlemek için, ADR uygulandı, ADR'in testis üzerine olası hasarını engellemek için de Vitamin E ve Se takviyesi yapıldı. Deney süresince deney ve kontrol grubu sıçanlarda ölüm gözlenmedi. ADR uygulanan sıçanlarda az miktarda kıl dökülmesi, ishal, iştahta azalma ve hayvanların aktivitelerinde düşüş kaydedildi. Otuz üç günlük deney sonunda testis dokuları çıkarıldı, ağırlıkları tartıldı ve rutin doku takibinden sonra morfolojik olarak değerlendirildi. Testis dokusu örneklerindeki MDA, CAT, SOD, GPx ve kandaki testesteron düzeyleri ELİSA testleri ile tayin edildi. Seminifer tübüllerdeki hasarın derecesinin belirlenmesi için JTBS kullanıldı. Ayrıca, seminifer tübül hücrelerindeki apoptozu gözlemlemek için TUNEL yöntemi ile DNA fragmantasyonuna bakıldı. Elde edilen tüm veriler istatistiksel olarak değerlendirildi.

4.1. Testis Ağırlıkları

Sakrifiye işleminden sonra deney hayvanlarından çıkarılan testislerin ağırlıkları tartıldı. Gruplara ait testis ağırlıkları ve farklılıkları Tablo 4.1'de gösterilmiştir. Kontrol grubuna ait testislerin ağırlıkları ortalama $1,49\pm 0,15$ gr, Se grubunda $1,60\pm 0,16$ gr, Vitamin E grubunda $1,51\pm 0,16$ gr, Se+Vitamin E grubunda $1,51\pm 0,16$ gr, ADR grubunda $1,01\pm 0,14$ gr, ADR+Se grubunda $0,98\pm 0,13$ gr, ADR+Vitamin E grubunda $1,08\pm 0,15$ gr ve ADR+Se+Vitamin E grubunda ise $1,08\pm 0,25$ gr olarak ölçüldü. Ortalama testis ağırlıkları istatistiksel olarak karşılaştırıldığında; kontrol grubu ile Se, Vitamin E, Se+Vitamin E grupları arasında anlamlı farklılık olmadığı görüldü ($p>0,05$). Fakat ADR grubu ve ADR'nin kombine edildiği gruplara ait testislerin ağırlığında meydana gelen azalmanın hem kontrol grubuna göre hem de Se, Vitamin E, Se+Vitamin E gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0,05$). Ayrıca, ADR grubu ile

ADR ve antioksidan moleküllerin kombine olarak verildiği grupların testis ağırlıkları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı saptandı ($p>0,05$).

Tablo 4.1. Farklı gruplara ait hayvanlarda testis ağırlıkları.

| Grup | K | S | E | S+E | ADR | ADR+S | ADR+E | ADR+S+E | <i>p</i> |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| Testis Ağırlığı | 1,49 ± 0,15 ^a | 1,60 ± 0,16 ^a | 1,51 ± 0,16 ^a | 1,51 ± 0,16 ^a | 1,01 ± 0,14 | 0,98 ± 0,13 | 1,08 ± 0,15 | 1,08 ± 0,25 | <0,05 |

Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. $p < 0.05$ Anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol grubuna (Grup 1) ait testis dokusu kesitlerinde seminifer tübüllerin sıkı ve bir arada yapıları ile hasarsız bir yapıya sahip oldukları gözlenmiştir. Bütün seminifer tübüllerde germinal epitel düzenli yapıları ile ayırt edilmektedir. Seminifer tübüllerin lümenlerinde spermatozonlar belirgin şekilde görülmektedir. İnterstisyel alanda kan damarları ve Leydig hücre grupları bulunmaktadır (Şekil 4.1). Bu gruba ait testis dokusunun yüksek büyümesinde seminifer tübüllerin belirgin bir bazal membranla çevrelenmiş olduğu görülmektedir. Bazal membran seminifer tübüllerin etrafında düzenli bir hat şeklindedir. Sertoli hücreleri ile spermatojenik hücreler düzenli yerleşim göstermektedir (Şekil 4.2). Spermatogoniumlar küçük koyu çekirdekleri ile bazal membran üzerine yerleşik iken daha üstte iri ve koyu çekirdekleri ile spermatositler ve daha lümeneye yakın alanda bol sayıda soluk çekirdekli spermatidler yer almaktadır. Olgunlaşmakta olan spermatidler ve lümeneye çok sayıda olgun spermatozonlar bulunmaktadır.

ADR grubuna (Grup 2) ait testis dokusu kesitleri incelendiğinde, hemen bütün seminifer tübüllerin yapısındaki bozulmalar ile testisin ADR'den etkilendiği gözlenmiştir (Şekil 4.3). Seminifer tübüllerin kontürlerindeki düzensizlik çok net olarak gözlenirken germinal epitel hücre serilerinin yerleşim düzeni kaybolmuştu. Seminifer tübül çapları değişmiş, yer yer küçük tübüllerin varlığı da gözlenmekte idi. Ayrıca, tübüllerin arasındaki interstisyel alanda yer alan Leydig hücrelerinin azlığı belirgindi. Tübül lümenlerindeki spermatozoa azlığı ve bu alana dökülmüş olgunlaşmamış spermatojenik

hücrelerin varlığı dikkat çekiyordu. Ek olarak, ADR grubuna ait kesitlerin neredeyse tamamında tübüllerin bazal membranında invajinasyonlar mevcuttu (Şekil 4.4).

Vitamin E grubuna (Grup 3) ait testis kesitlerinin histolojik görünümleri kontrol grubuna benzer olmakla beraber bu gruba ait sıçanların seminifer tübül lümeninde daha az spermatazoanın varlığı göze çarpıyordu (Şekil 4.5-4.6).

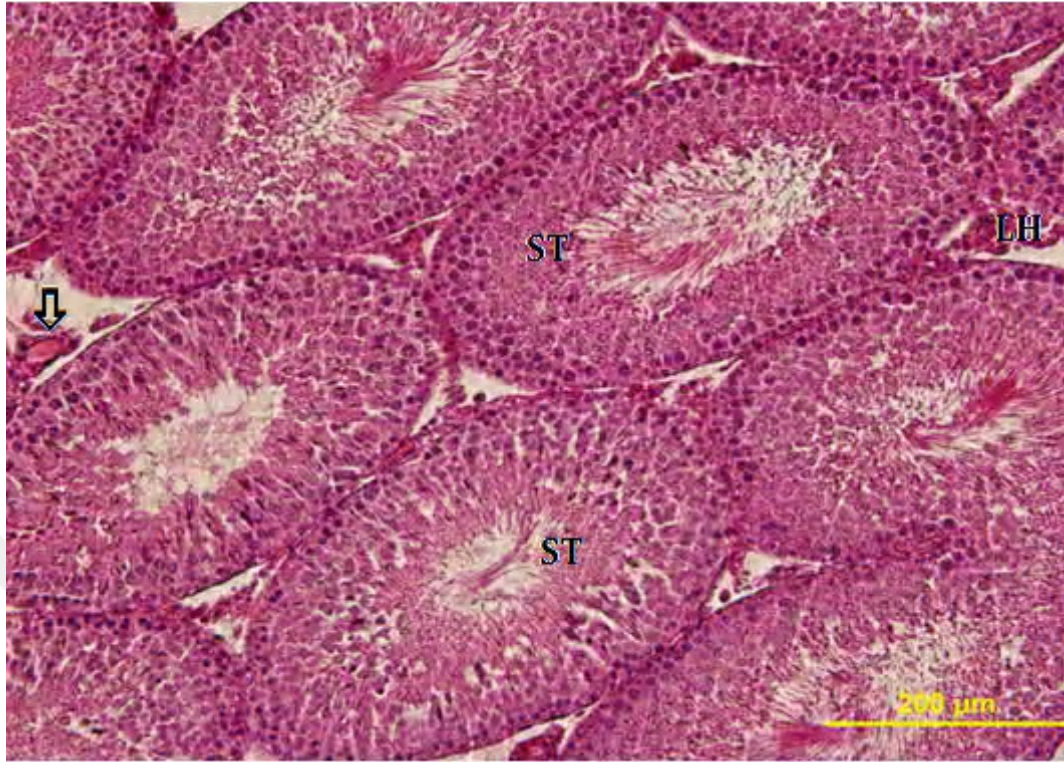
Se grubuna (Grup 4) ait testis kesitlerinin histolojik görünümleri kontrol grubundakilere benzerdi (Şekil 4.7). Bazı tübüllerin spermatogenetik hücre serileri arasında yer yer boşluklar gözlemlendi (Şekil 4.8).

Se+Vitamin E grubuna (Grup 5) ait testislerin histolojik yapıları kontrol grubuna benzer bir görünüm sergilemekteydi. Düzenli yerleşim gösteren germinal epitel düzgün kontürlü bazal membran üzerine yerleşmişti. Spermatojenik hücre serisindeki hücrelerin görünümü ayırt edilebilmekte ve lümeninde sağlıklı spermatogonyumlar belirgindi (Şekil 4.9). Bu grupta ek olarak, peritübüler alanda Leydig hücrelerinin yoğunluğu kontrol grubuna benzerdi (Şekil 4.10).

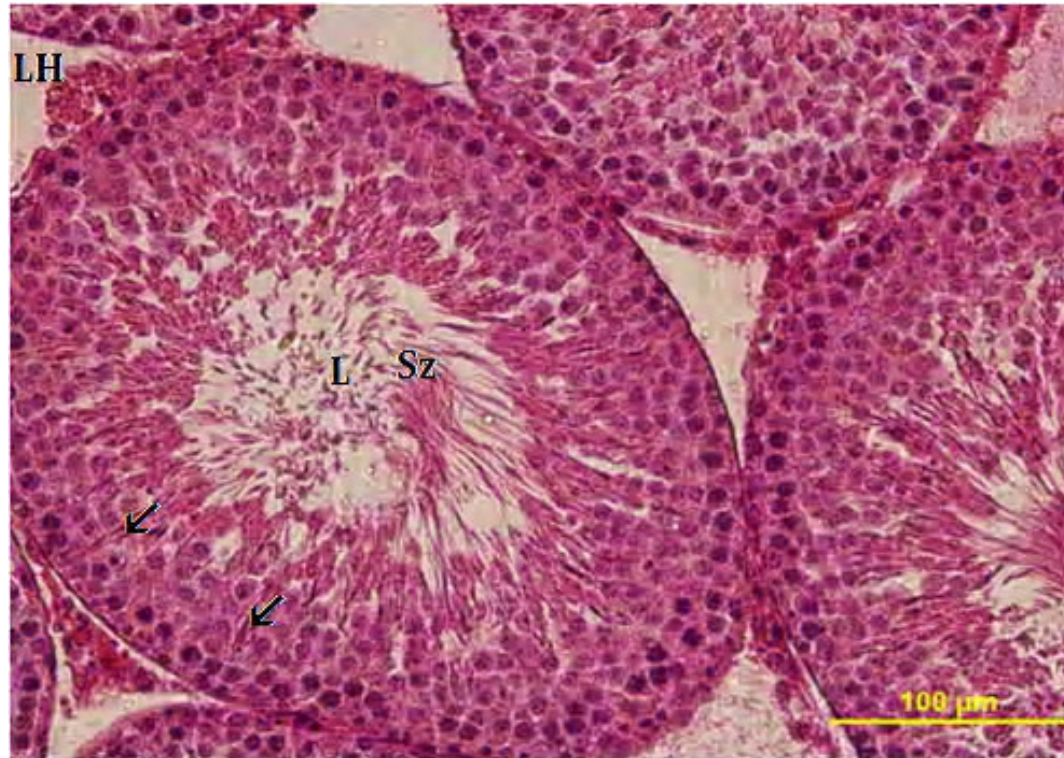
ADR+Vitamin E grubuna (Grup 6) ait örneklerde tübüllerin germinal epiteli düzgündü ve büyük oranda korunmuştu fakat tübüler bazal membranda invajinasyonlar vardı (Şekil 4.11) ve tübül lümenindeki spermatozoonların miktarı ADR grubuna göre fazlaydı (Şekil 4.12).

ADR+Se grubuna (Grup 7) ait histolojik kesitlerde, tübüllerini oluşturan germinal epitel ve spermatojenik seri büyük ölçüde korunmuştu (Şekil 4.13). Lümeninde spermatozoonlar kuyrukları ve çekirdekleriyle bütün olarak belirgindi fakat bazı tübüllerde bazal lamina invajinasyonları ve tübüler kontürde düzensizlikler gözlemlendi (Şekil 4.14).

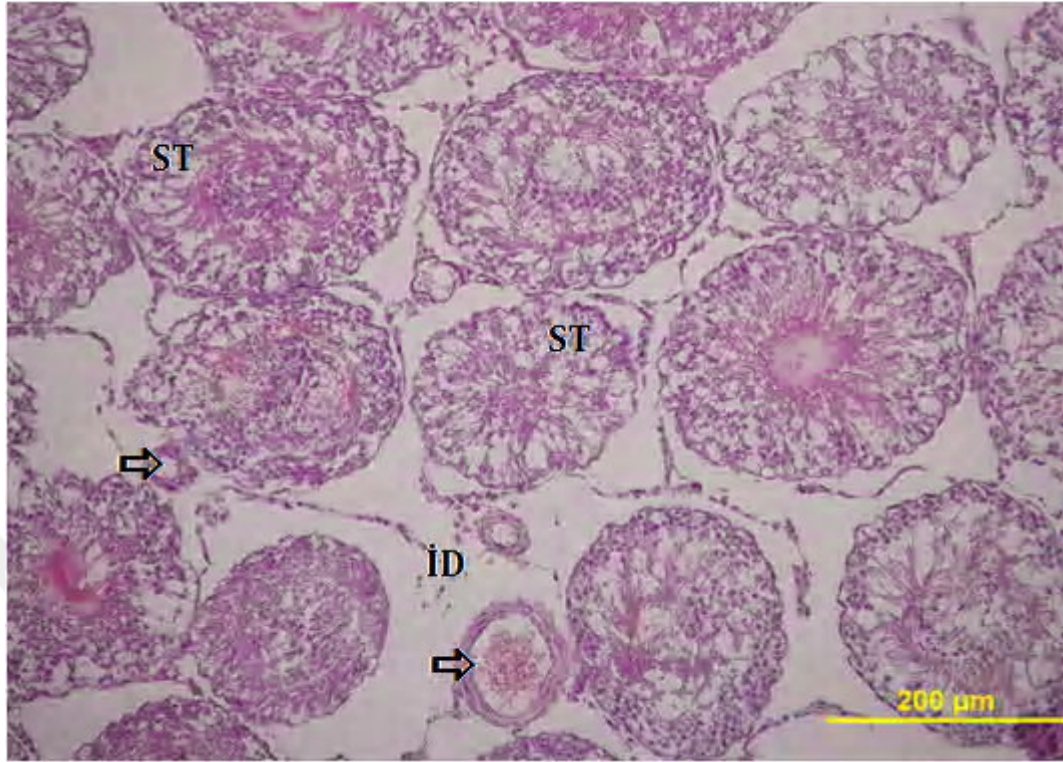
ADR+Se+Vitamin E grubuna (Grup 8) ait testis kesitlerinde spermatogonyumlar belirgin olarak gözlemlendi. Spermatozoonların bulunduğu tabakada yer yer vakuol oluşumu gözlemlenirken birlikte Leydig hücrelerinin bulunduğu interstisyel alanlarda ödem oluşumu dikkat çekici bir başka özellikti (Şekil 4.15.). Bunun yanında bu gruba ait deneklerin seminifer tübüllerinde spermatozoonlar arasındaki ayırım belirsiz gözükmekteydi. Lümenindeki spermatozoa miktarı kontrole göre azdı fakat ADR uygulanan gruba göre lümenindeki sperm sayısı fazlaydı (Şekil 4.16.).



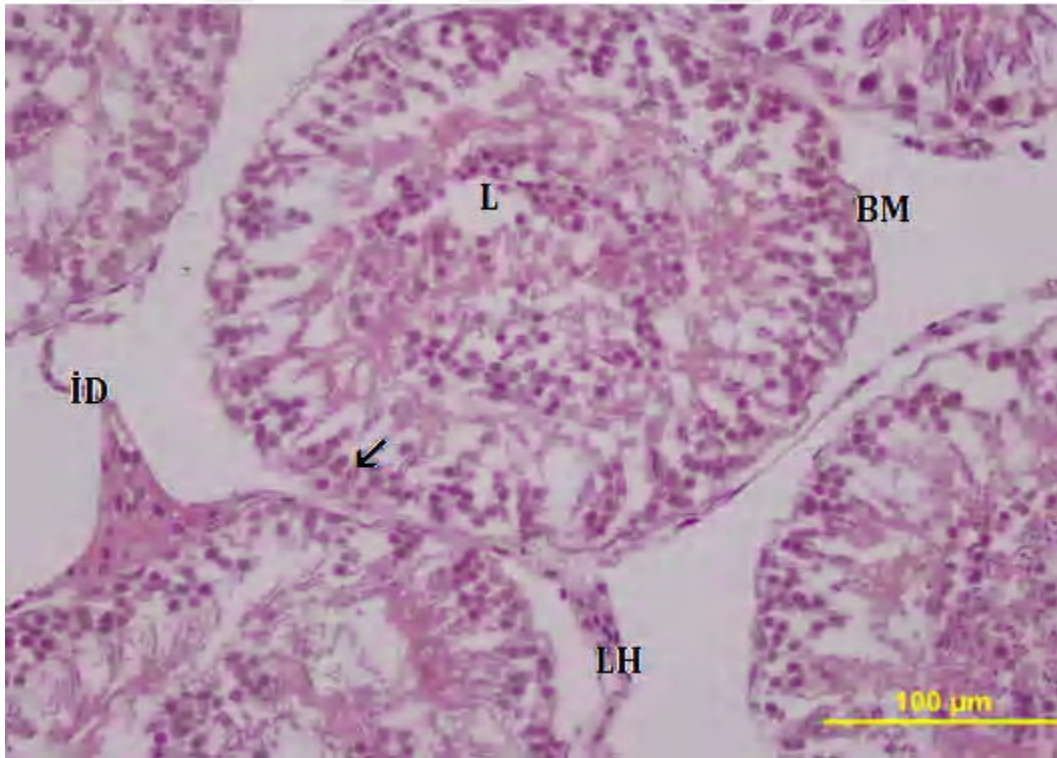
Şekil 4.1. Kontrol grubuna (Grup 1) ait testis dokusu. Seminifer tübüller (ST) ile interstisyel bağ dokusu içinde Leydig hücreleri (LH) ve kan damarları (ok) normal yapıda gözlenmekte. H&E X20.



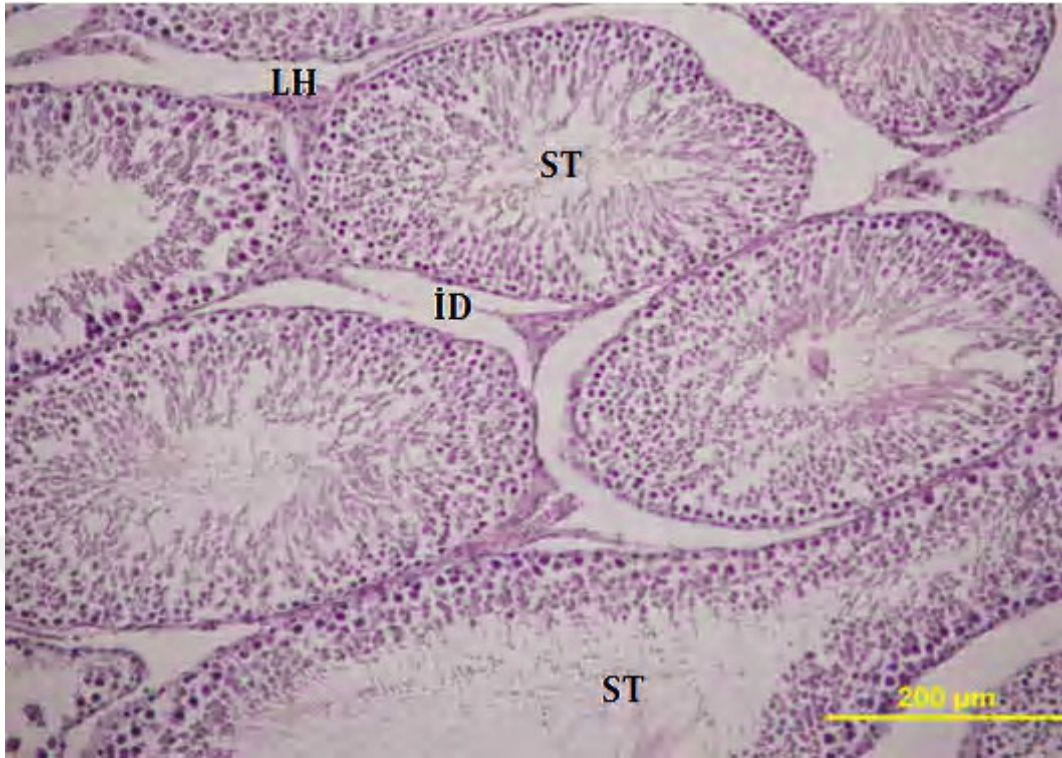
Şekil 4.2. Kontrol grubuna (Grup 1) ait testis dokusunda seminifer tübüllerin lümenlerinde (L) spermatozoonlar (Sz) ve epitelde Sertoli hücreleri (ok). İntertisyel dokuda Leydig hücreleri (LH). H&E X40.



Şekil 4.3. ADR grubuna (Grup 2) ait testis dokusunda düzensiz yapıda seminifer tübüller (ST) ve kan damarları (ok) içeren interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E X20.



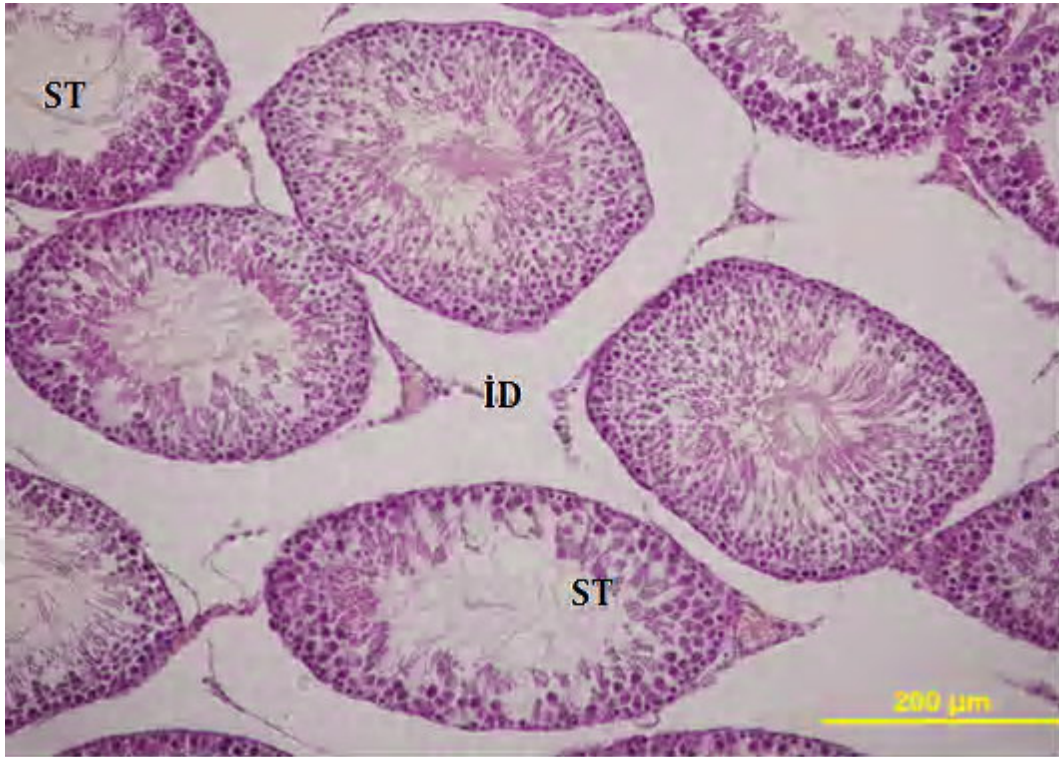
Şekil 4.4. ADR grubuna (Grup 2) ait testis dokusu. BM: bazal membran, L: lümen, Ok: Sertoli hücreleri, LH: Leydig hücreleri, İD: interstisiyel bağ dokusu. H&E X40.



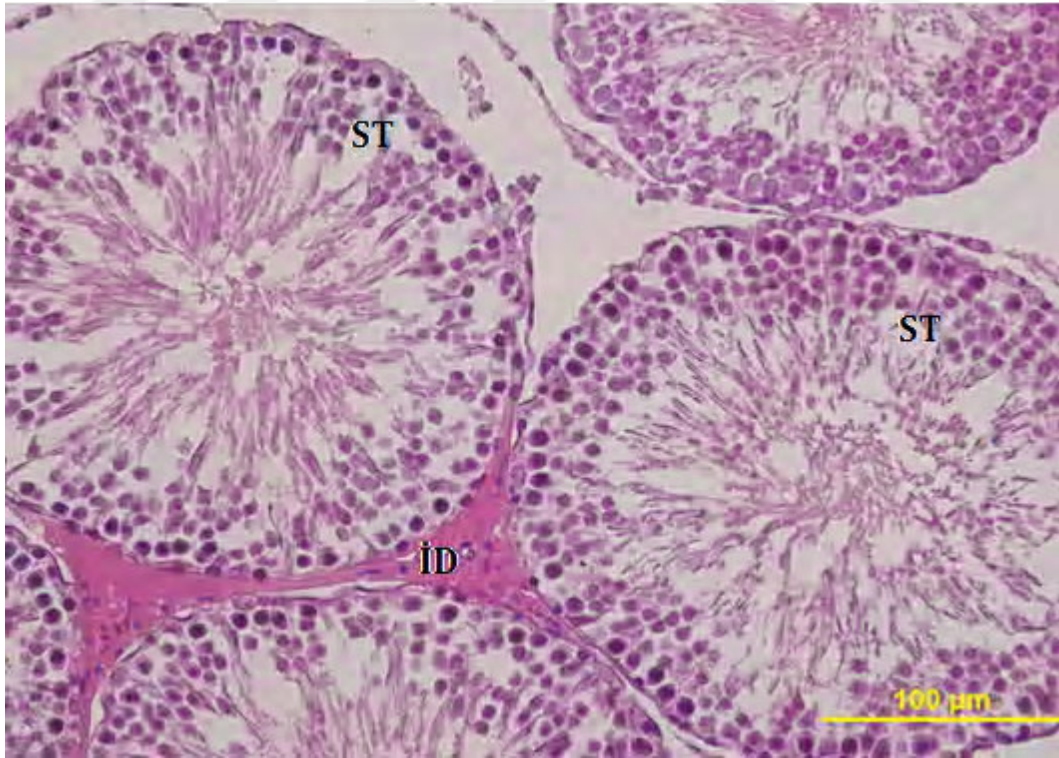
Şekil 4.5. Vitamin E grubuna (Grup 3) ait testis dokusunda seminifer tübüller (ST), interstisiyel bağ dokusu (İD) ve Leydig hücreleri (LH). H&E X20.



Şekil 4.6. Vitamin E grubuna (Grup 3) ait testis dokusunda seminifer tübüller (ST) ve lümenleri (L) ile interstisiyel bağ dokusunda Leydig hücreleri (LH) izlenmekte. H&E X40.



Şekil 4.7. Se grubuna (Grup 4) ait testis dokusunda düzenli spermatogenik seri hücreleri içeren seminifer tübüller (ST) ve aralarında interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E X20.



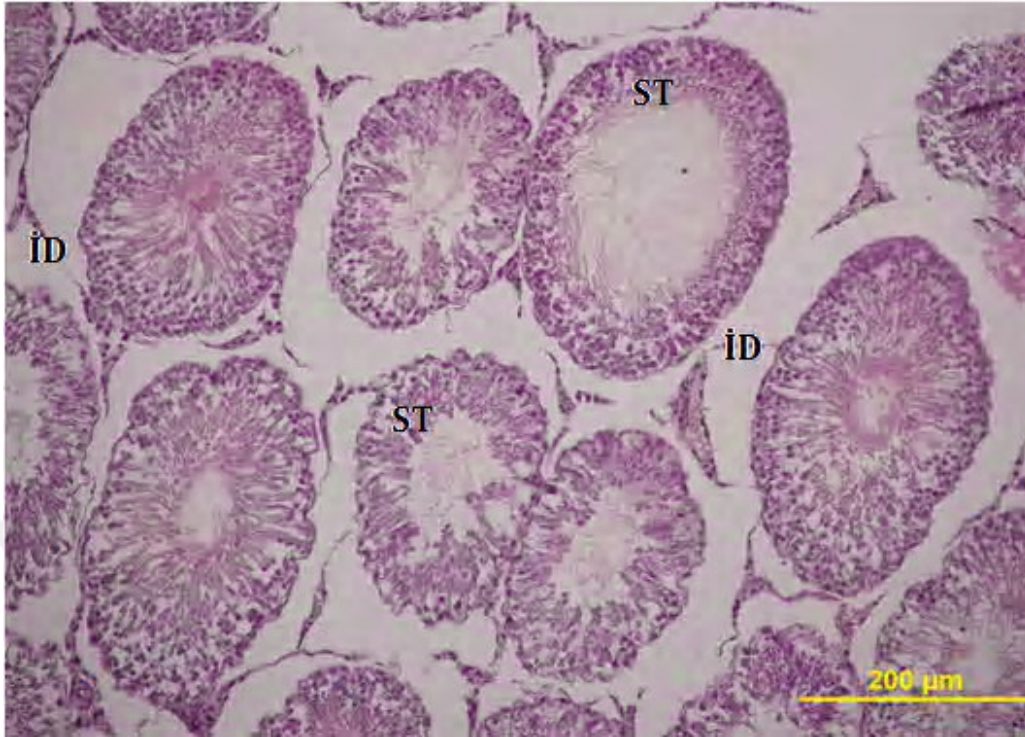
Şekil 4.8. Se grubuna (Grup 4) ait testis dokusunun yüksek büyütmesinde seminifer tübüller (ST) ve interstisiyel bağ dokusu (İD) izlenmekte. H&E X40.



Şekil 4.9. Se+Vitamin E grubuna (Grup 5) ait testis dokusunda sağlam yapıda seminifer tübüller (ST) ve çevresinde interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E X20.



Şekil 4.10. Se+Vitamin E grubuna (Grup 5) ait testis dokusunda düzenli yapıda germinal epitele (GE) ve lümende (L)spermatozoonlara sahip seminifer tübüller ve interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E X40.



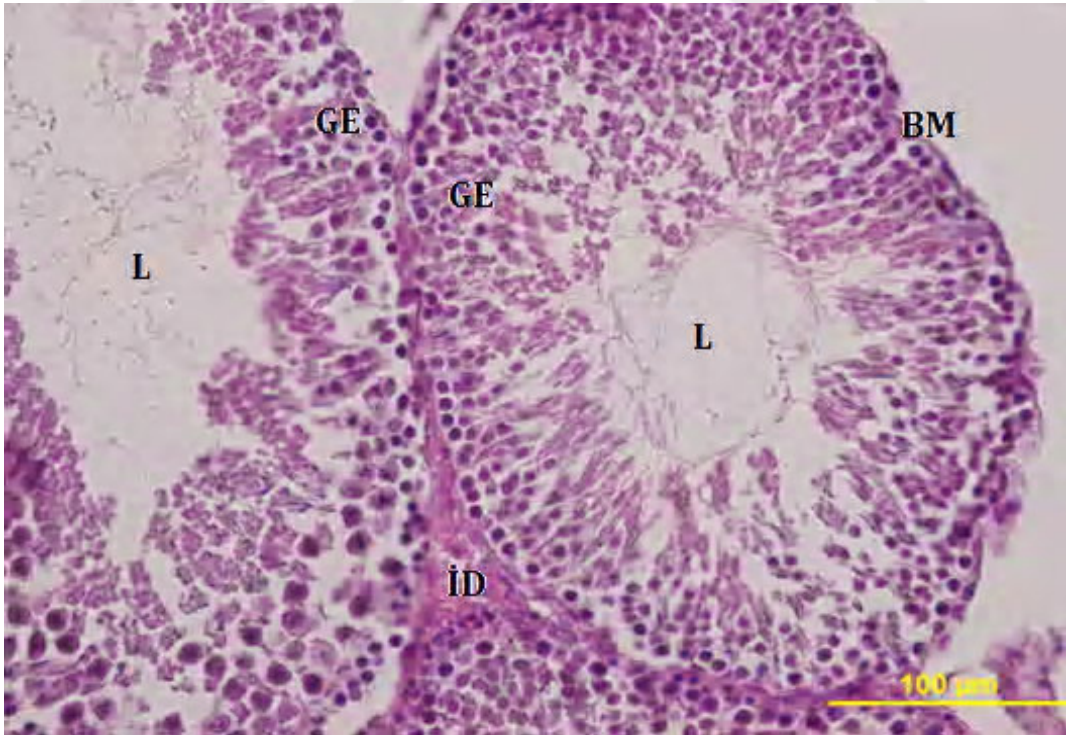
Şekil 4.11. ADR+Vitamin E grubuna (Grup 6) ait testis dokusunda seminifer tübüller (ST) ve interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E X20.



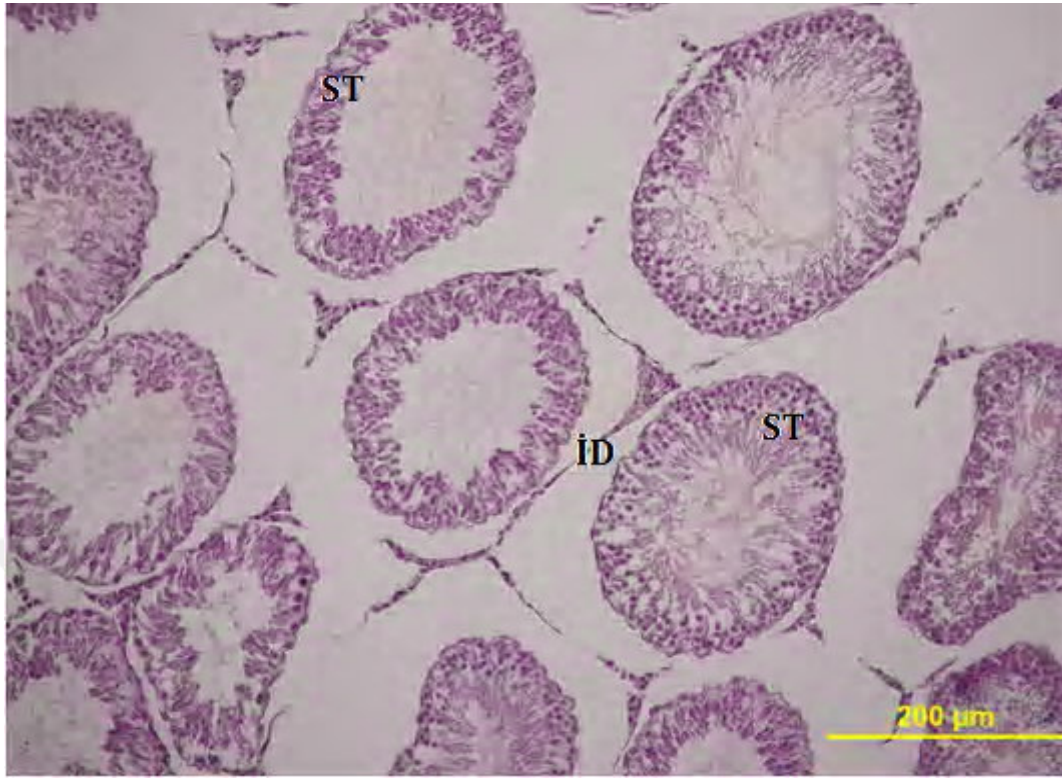
Şekil 4.12. ADR+Vitamin E grubuna (Grup 6) ait testis dokusu. G: germinal epitelyum, L: lümen, İD: interstisiyel bağ dokusu ve LH: Leydig hücreleri. H&E X40



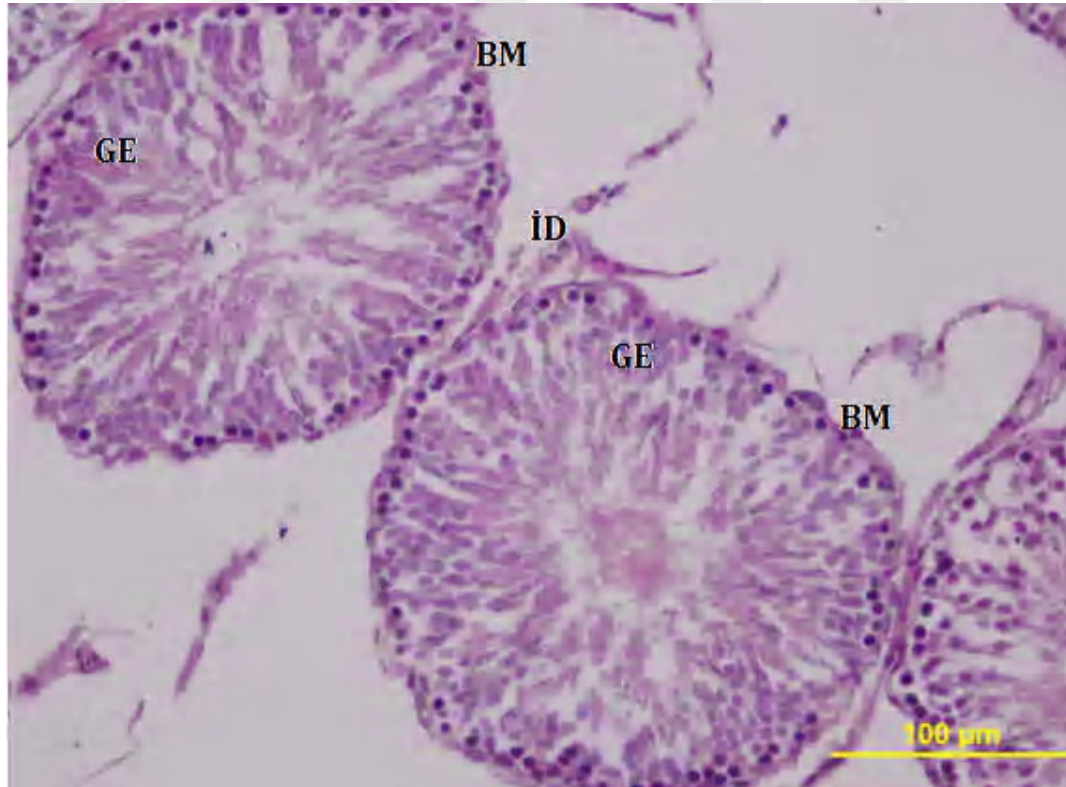
Şekil 4.13. ADR+Se grubuna (Grup 7) ait testis dokusunda seminifer tübüllerin (ST) ve interstisiyel bağ dokusunun (İD) genel görünümü. H&E X20.



Şekil 4.14. ADR+Se grubuna (Grup 7) ait testis dokusu. GE: germinal epitel, L: lümen, BM: bazal membran, İD: interstisiyel bağ dokusu. H&E X40



Şekil 4.15. ADR+Se+Vitamin E grubuna (Grup 6) ait testiste bozulmuş tübüller kontür ile seminifer tübüller (ST) ve intertisiyel bağ dokusu (İD).H&E X20



Şekil 4.16. ADR+Se+Vitamin E grubuna (Grup 6) ait testis dokusunda germinal epiteli (GE) ve bazal membranı (BM) ile seminifer tübüller ve interstisiyel bağ dokusu (İD). H&E X40

4.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması Sonuçları

Seminifer tübüllerdeki germinal epitelin değerlendirildiği Johnsen tübüler biyopsi sonuçlarına göre kontrol, Se, vitamin E, Se+Vitamin E, ADR, ADR+Se ve ADR+vitamin E, ADR+Se+Vitamin E grupları için elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilerek Tablo 4.2’de gösterilmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda kontrol grubu ile antioksidan özellikte olan Se, vitamin E ve Se+Vitamin E uygulanan gruplardan elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Fakat antioksidan uygulanan gruplar kendi içlerinde değerlendirildiğinde vitamin E grubu ile hem Se hem de Se+Vitamin E grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0,05$). ADR uygulaması yapılan gruptan elde edilen veriler; kontrol grubu dahil tüm gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p<0,05$). ADR+Se, ADR+vitamin E ve ADR+Se+Vitamin E grupları kendi içlerinde değerlendirildiğinde anlamlı farklılık gözlenmezken ($p>0,05$), diğer gruplarla karşılaştırıldığında anlamlı fark olduğu belirlendi ($p < 0,05$).

Tablo 4.2. Johnsen’in Testiküler Skorlama Sonuçları.

| Grup | K | S | E | S+E | ADR | ADR+S | ADR+E | ADR+S+E | <i>p</i> |
|----------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| Johnsen Skoru | 9,05 ± 0,95 ^{ab} | 9,05 ± 0,84 ^b | 8,25 ± 0,95 ^a | 9,07 ± 0,85 ^b | 5,82 ± 1,29 ^c | 7,55 ± 1,63 ^d | 7,35 ± 1,51 ^d | 7,05 ± 1,55 ^d | <0,05 |

Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. $p < 0.05$ Anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

4.4. Biyokimyasal Sonuçlar

Testis dokusunda ADR’nin yol açtığı oksidatif strese bağlı olarak oluşması muhtemel oksidatif hasarın tespitinde ve antioksidan moleküllerin hasarın derecesinin azaltılmasına olan etkisini belirlemede ELISA yöntemi kullanılarak elde edilen sonuçlar Tablo 4.3’de gösterilmiştir. Oksidatif stresin tetiklediği lipid peroksidasyonunun ürünü olan MDA miktarı gruplar arasında değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığı tespit edildi ($p>0,05$). Antioksidant

enzimlerden olan CAT, SOD ve GPx seviyelerinde de gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p>0,05$). Ortalama değerlere bakıldığında; Se+Vitamin E tedavili grupta hem CAT hem de GPx değerlerinin en yüksek olduğu gözlemlendi.

Tablo 4.3. Doku örneklerinde ortalama CAT, SOD, MDA, GPx ölçümleri.

| Grup | K | S | E | S+E | ADR | ADR+S | ADR+E | ADR+S+E | P |
|------|------------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------|-------|
| CAT | 0,65 ± 0,42 | 0,53 ± 0,20 | 0,44 ± 0,09 | 0,61 ± 0,18 | 0,58 ± 0,27 | 0,58 ± 0,16 | 0,59 ± 0,17 | 0,51 ± 0,30 | |
| MDA | 3,5 ± 2,93 | 3,31 ± 4,28 | 3,23 ± 2,21 | 6,97 ± 6,53 | 4,01 ± 2,90 | 3,98 ± 2,64 | 3,91 ± 2,55 | 4,62 ± 1,61 | |
| GPX | 64,41 ± 13,82 | 61,95 ± 13,19 | 56,94 ± 6,06 | 66,91 ± 18,24 | 56,06 ± 26,89 | 64,42 ± 15,02 | 58,53 ± 10,62 | 56,75 ± 3,90 | <0,05 |
| SOD | 0,51 ± 0,13 | 0,47 ± 0,16 | 0,45 ± 0,07 | 0,50 ± 0,08 | 0,44 ± 0,22 | 0,54 ± 0,15 | 0,52 ± 0,21 | 0,45 ± 0,06 | |

Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

ELISA yöntemi ile çalışmada kullanılan hayvanların kan serumlarındaki testosteron değerine bakıldı. Tablo 4.4'de görüldüğü gibi, kontrol grubunun ortalama testosteron seviyesi $18,83 \pm 0,78$ pg/ml, Se grubunda $18,78 \pm 0,71$ pg/ml, vitamin E grubunda $19,04 \pm 0,49$ pg/ml ve Se+Vitamin E'nin uygulanan grupta testosteron seviyesi $19,04 \pm 0,44$ pg/ml olarak belirlendi. Kemoterapik uygulamasına maruz kalan gruplarda ortalama testosteron seviyeleri; ADR grubunda $16,15 \pm 1,9$ pg/ml, ADR+Se grubunda $14,99 \pm 1,37$ pg/ml, ADR+Vitamin E grubunda $16,67 \pm 1,05$ pg/ml ve ADR+Se+vitamin E grubunda $15,16 \pm 1,47$ pg/ml olarak ölçüldü. Bu sonuçlar doğrultusunda kontrol grubu ile ADR, ADR+Se, ADR+Vitamin E ve ADR+Se+Vitamin E grupları arasında anlamlı fark olduğu ($p < 0,05$) ancak Se, vitamin E ve Se+vitamin E grupları arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p > 0,05$).

Tablo 4.4. Kan Serumunda Testosteron Değerleri.

| Grup | K | S | E | S+E | ADR | ADR+S | ADR+E | ADR+S+E | p |
|-------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| Testosteron | $18,83 \pm$ $0,78^a$ | $18,78 \pm$ $0,71^a$ | $19,04 \pm$ $0,49^a$ | $19,04 \pm$ $0,44^a$ | $16,15 \pm$ $1,90^b$ | $14,99 \pm$ $1,37^b$ | $16,67 \pm$ $1,05^b$ | $15,16 \pm$ $1,47^b$ | < 0,05 |

Veriler ortalama standart sapma olarak verilmiştir. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler

gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir.

4.5. Apoptoz Sonuçları

Çalışmada ADR'nin apoptoz üzerine etkisi ve antioksidan özellikteki Se ve vitamin E'nin olası koruyucu özelliklerini belirlemek üzere TUNEL yöntemi uygulandı. Kontrol, Se, vitamin E ve Se+Vitamin E gruplarına ait görüntülerde apoptotik hücreler sıklıkla spermatogonyum ve primer spermatosit seviyesinde gözlenirken, ADR grubunda seminifer tübülü çevreleyen hücre serilerinin tamamında gözlemlendi (Şekil 4.17-4.24). Apoptotik hücre sayım sonuçları istatistiksel olarak değerlendirilerek Tablo 4.5'de gösterildi. Elde edilen verilere göre kontrol, Se ve vitamin E grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Bunun aksine Se+Vitamin E'nin birlikte kullanıldığı grup istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; kontrol grubu, Se grubu ve Vitamin E grubu ile anlamlı farklılık gösterdi ($p<0,05$).

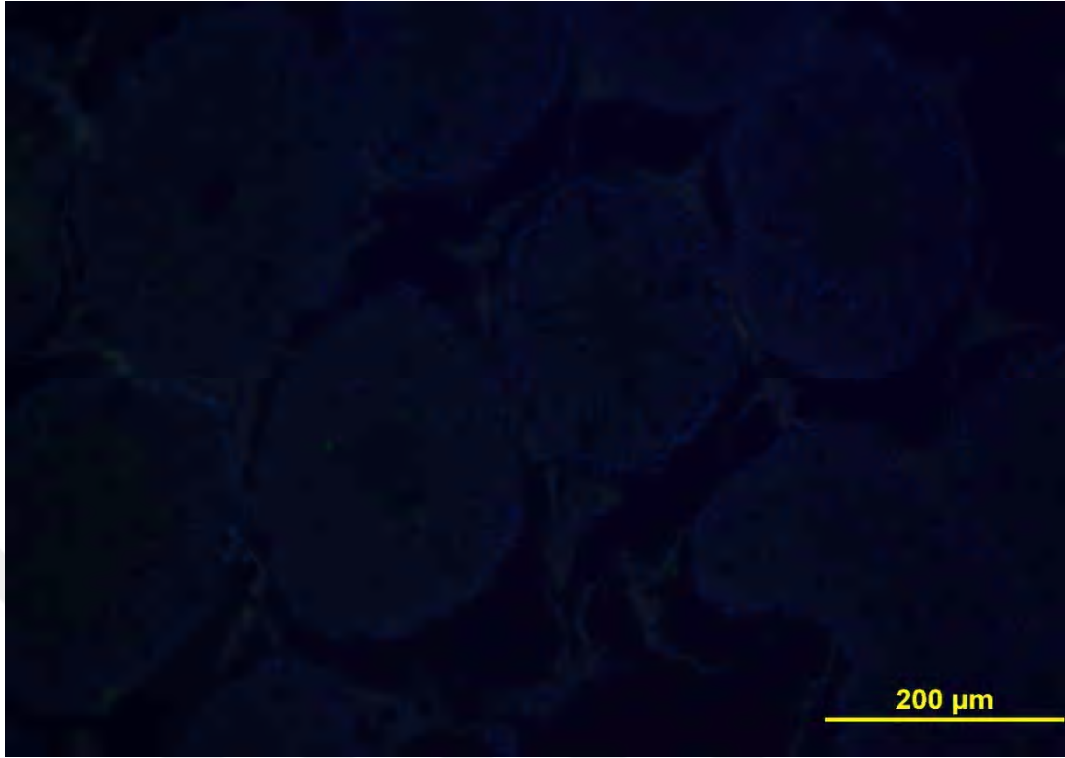
ADR uygulanan gruba ait apoptotik hücre sayısı kontrol, Se, vitamin E gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış göstermiştir ($p<0,05$).

ADR+Vitamin E, ADR+Se ve ADR+Se+Vitamin E gruplarında ise koruyucu amaçlı verilen Se ve Vitamin E'nin apoptotik hücre sayısını azalttığı belirlendi. Fakat istatistiksel olarak anlamlılık sadece ADR+Vitamin E ve ADR+Se+Vitamin E gruplarında bulundu ($p<0,05$).

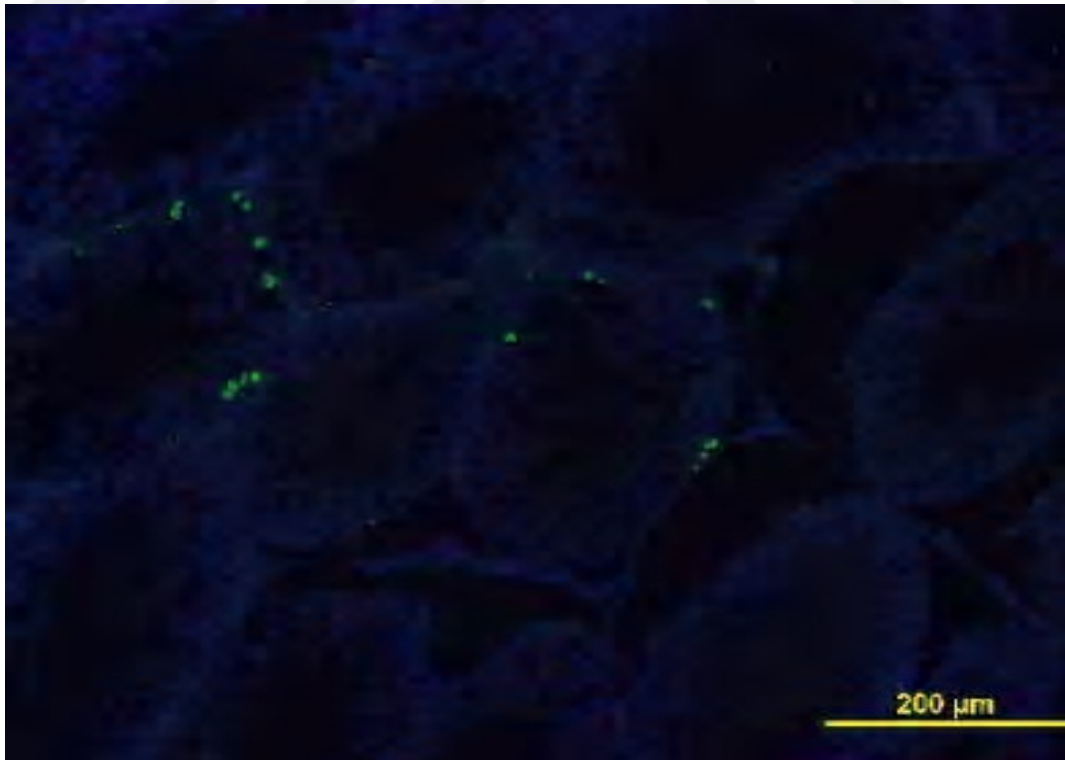
Tablo 4.5. Kontrol ve Deney Gruplarına Ait Apoptotik hücre Sayısı.

| Grup | K | S | E | S+E | ADR | ADR+S | ADR+E | ADR+S+E | <i>p</i> |
|-----------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| Hücre Sayısı (n=100) | 0,46 ± 0,90 ^a | 0,80 ± 1,26 ^{ab} | 1,01 ± 1,31 ^a | 2,03 ± 2,62 | 2,80 ± 3,67 | 2,05 ± 0,59 | 1,65 ± 2,30 ^b | 1,51 ± 1,68 ^b | <0,05 |

Veriler ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir. $p<0,05$ Anlamlı olarak kabul edilmiştir. Aynı satırda yer alan aynı harfler gruplar arasındaki benzerliği, farklı harfler gruplar arasındaki farklılığı ifade etmektedir



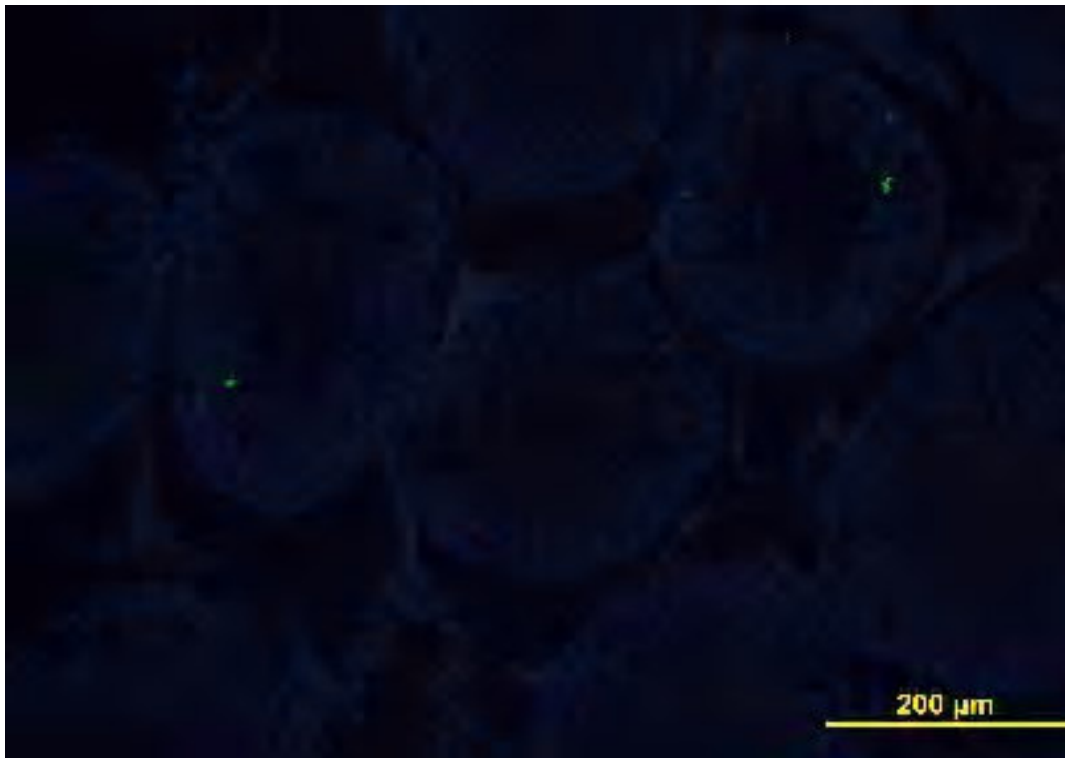
Şekil 4.17. Kontrol grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama.



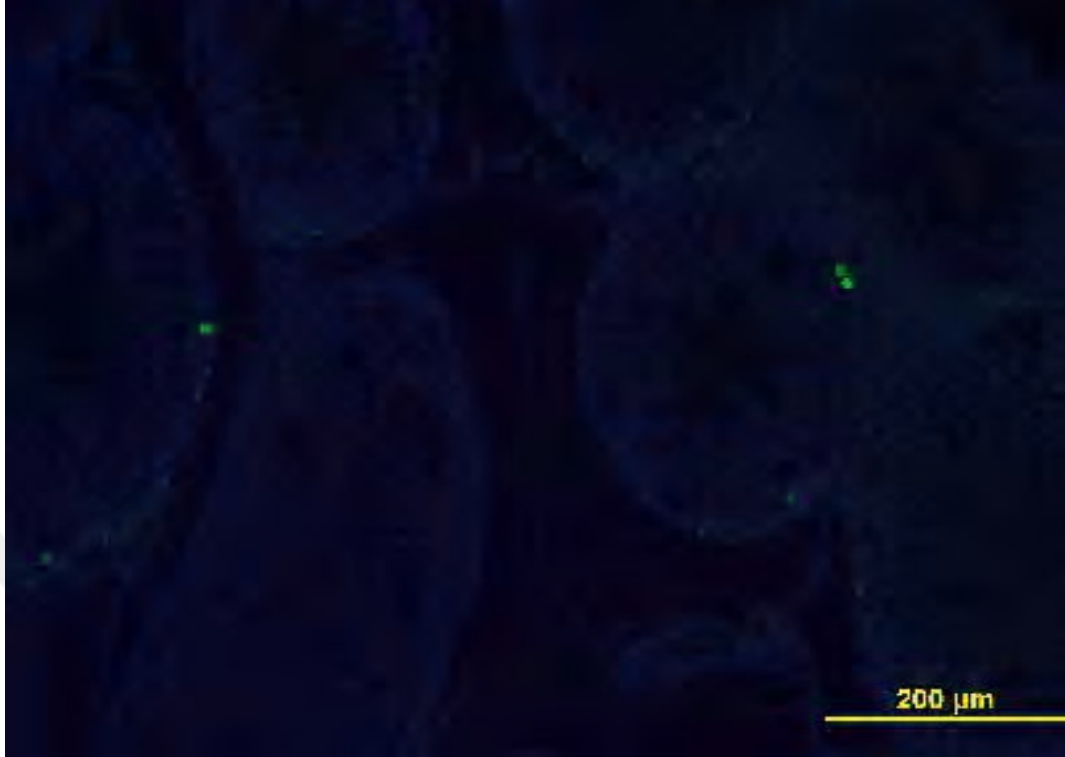
Şekil 4.18. ADR grubuna ait testis dokusunda TUNEL boyamada apoptotik hücreler.



Şekil 4.19. Vitamin E grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama.



Şekil 4.20. Se grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama.



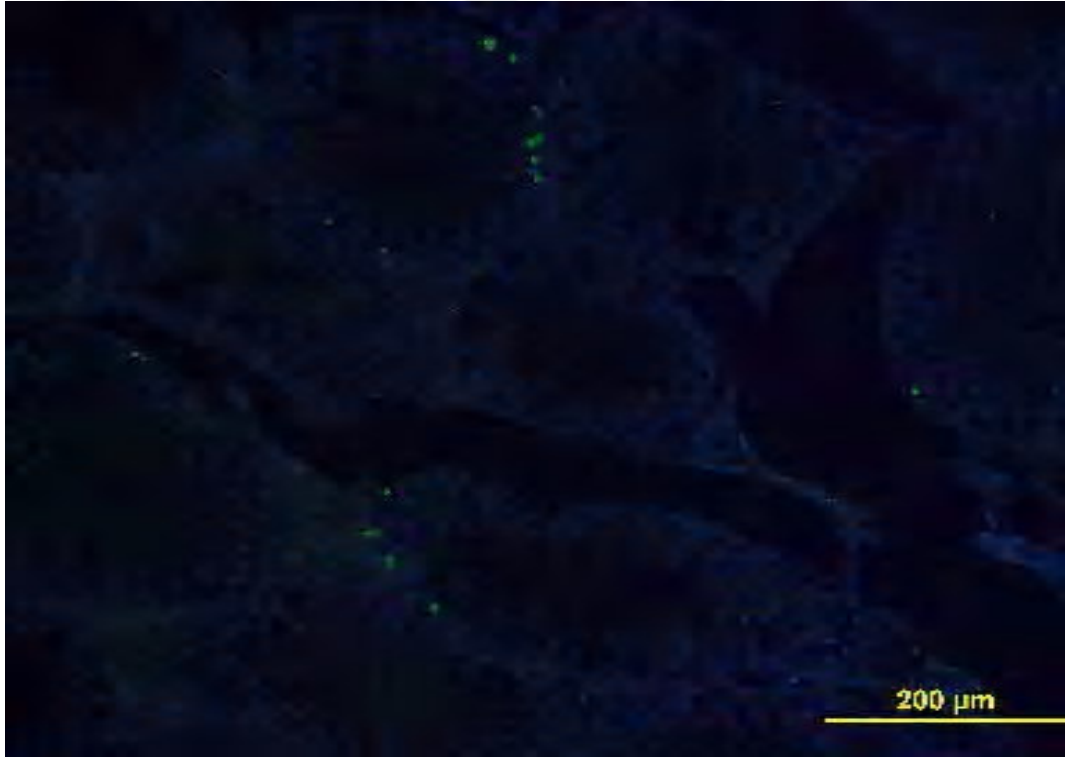
Şekil 4.21. Se+Vitamin E grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama.



Şekil 4.22. ADR+Vitamin E grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama.



Şekil 4.23. ADR+Se grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama.



Şekil 4.24. ADR+Se+Vitamin E grubuna ait testis dokusunda TUNEL Boyama.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kanser bütün dünyada ölümcül hastalıkların en önde gelenlerindedir. Bu nedenle kanser tedavisi üzerine oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. Kanser tedavisi için kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi uygulamalar yapılmaktadır. Kemoterapi kanser tedavisinde kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Kemoterapide kanserin türüne ve evresine göre değişen çok sayıda ajan kullanılmaktadır (48).

Kanser tedavisinde kullanılan kimyasal maddelerin, tedavi sırasında kanserli hücreler yanında normal sağlıklı hücreleri de etkilediği bilinmektedir (48). Bu nedenle, kanser ilaçlarının normal hücreleri etkilemelerini önlemeye yönelik çok sayıda çalışma yapılmaktadır ve bu çalışmalarda koruyucu olarak çoğunlukla doğal antioksidanlar kullanılmaktadır (11). Vitamin E ve Se bu amaçla kullanılan etkin antioksidanlardandır (12,13). Vitamin E ile ilgili oldukça fazla çalışma yapılmış olduğu belirtilmesine rağmen (14) kansere karşı kullanılan ilaçların zararlı etkilerini önlemede etkileri hakkında tam olarak fikir birliğine varılamamıştır (15). Vitamin E'nin yararlı etkilerini inceleyen bir çalışmada, antioksidan etkisini lipit peroksidasyon zincir başlama basamağını kırarak ya da doğrudan reaktif oksijen türevlerini süpürerek gerçekleştirdiği ileri sürülmüştür (9).

Bir diğer antioksidan olan Se pek çok hücre içi fizyolojik ve biyokimyasal süreçte rol oynamaktadır (17) ve antioksidan savunma sisteminin yapısal bir bileşenidir. Ayrıca bazı çalışmalarda, farklı antioksidanların birlikte verilmesi ile koruyucu veya tedavi edici etkilerinin daha da artırılabilceği görüşü ortaya koymuştur. Bu kapsamda, bazı çalışmaların (20-23) bulgularının ışığı altında, Se'nin ve vitamin E'nin etkileri göz önünde tutularak, birlikte sinerjistik etki gösterebileceğini düşündük.

Bu amaçla, Se ve Vitamin E'nin tek tek ve birlikte koruyucu etkisinin olup olmadığını

incelemek için, doku hasarı oluşturduğu bilinen bir kemoterapik ajan olan ADR'nin testis üzerine etkilerini değerlendirdik.

ADR; lösemi, mesane ve baş boyun kanserleri gibi pek çok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (49). Diğer antrasiklinler gibi ADR de DNA'yı etki ederek kanserli hücreler üzerinde etkisini gösterir. ADR organizmada kanser hücreleri dışındaki diğer sağlam doku ve organlardaki hücreler üzerine de toksik etki gösterir. ADR'nin başta kalp (50) olmak üzere diğer doku ve organlar üzerine toksik etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu organlardan biri de testisdir. Pek çok araştırmada, ADR'nin spermatogenez sürecinde gelişim bozukluklarına yol açarak sperm sayısında azalmaya ve üreme sistemi üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu ortaya konmuştur (5-7).

Çalışmamızda, 10 kere, günlük 2mg/kg olmak üzere toplam 20 mg/kg ADR uygulamasının testiste ne gibi değişimlere yol açtığını organ ağırlığı ile histopatolojik ve biyokiyasal düzeyde incelendi. ADR uygulaması yapılan tüm gruplarda, birlikte Se ve vitamin E verilmiş olsa dahi, kontroller ile Se ve Vitamin E gruplarına göre testis ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğunu gözlemlendi. Benzer bir çalışmada, ADR'nin testis ve epididimis ağırlığında azalmaya yol açtığı görülmüş ve ağırlıktaki kaybın, ADR uygulamasının ardından testis ve epididimde oluşan spermatojenik hücre sayısındaki azalmaya bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir (51). Diğer çalışmalarda, ADR uygulamasından sonra testisteki ağırlık kaybının spermatogenezde azalma, Leydig hücre atrofisi ve germ hücre kaybından kaynaklandığını belirtmişlerdir (52,53). Bu çalışmada elde ettiğimiz testis yapısındaki benzer yapısal bozulmalar, ADR toksisitesini göstermekte ve benzer şekilde, ağırlık kaybının nedeni olabilmektedir.

ADR'nin testis üzerine sitotoksik etkisi pek çok çalışmada gösterilmiştir. Seminifer tübül hacmi ve sayısında azalma, spermatogonyada vakuol oluşumu, spermatogenezde bozulma, germ hücre sayısında azalma, düzensiz tübül oluşumu, seminifer tübül epitelinde incelmeye ile bu epitele ait hücrelerde olgunlaşma düzeninin bozulması, intersitisiyel alanda boşluklar testis dokusunda ADR'ye bağlı olarak gelişen en yaygın histopatolojik bulgulardandır (39). Kato ve arkadaşlarının (54) 2 mg/kg /gün ADR uygulanan çalışmalarında, erkek sıçanlarda Sertoli hücrelerinde morfolojik bozulmaların olduğu, Çeribaşı ve arkadaşları (39) tarafından yapılan başka bir çalışmada aynı dozda ADR verilen sıçanların testis kesitlerinde seminifer tübül çapında ve JTBS skorunda azalma, intersitisiyel ödem, Sertoli hücrelerinde vakuolizasyon,

tübüllerde atrofi, germ hücrelerinde azalma, organizasyon bozukluğu ve nekroz gözlenmiştir. Bizim çalışmamızda, tek başına 2mg/kg ADR uygulanan grupta kontrol ve diğer gruplara göre JTBS değerinde anlamlı azalmalar vardı. Skorlamaya paralel olarak ışık mikroskopik bulgularımızda ADR grubuna ait sıçanların testis kesitlerinde dejenerasyon çok belirgindi; normal boyuttaki tübül kontürlerindeki düzensizlikler, bazal membran kayıpları, germinal epitelde azalma, tübül lümeninde spermatozoa azlığı ve lümeneye dökülmüş olgunlaşmamış spermatojenik hücreler ve yer yer küçük çaplı tübüller, intersitisiyel alanda Leydig hücre kayıpları bunlardan başlıcalarıydı. Bu bulgular önceki çalışmalarla uyumluydu ve ADR verilmesinin sıçan testislerinde toksisite oluşturduğunu göstermektedir.

ADR'nin toksik etkilerinin nedeni olarak ROS oluşumunu işaret eden bazı raporlar bulunmaktadır (55). ROS; süperoksit iyonu, hidroksil radikali, peroksil radikali, alkoksil radikallerini kapsayan serbest radikaller ile oksijen, ozon ve hidrojen peroksit gibi radikal olmayan molekülleri kapsar. Normal oksijen metabolizması sonucu açığa çıkan bu moleküllere erkek üreme sistemindeki bazı fizyolojik olaylarda ihtiyaç duyulur. Ancak bunların aşırı üretimi, oksidatif stresin gelişmesinin bir sonucu olarak lipid peroksidasyonuna yol açabilir. Hücreler, ROS'u belirli ölçüde ya da tamamen azaltacak antioksidan mekanizmalara sahiptir. SOD, CAT ve GPx; oksitlenmiş membran bileşenlerinden türevlenen ROS'u temizleyen antioksidan enzimlerdendir (56,57). Lipid peroksidasyonu artışının, testislerde ADR uygulamasının toksik etkilerinden biri olduğu kabul edilir. Ateşşahin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (39) 10 mg/kg dozda ADR uygulaması sonucunda aşırı serbest radikal oluşumuna bağlı MDA seviyesinde yükselme meydana geldiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda, 2 mg/kg dozda ADR uygulanan grupta MDA seviyesinde kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık yoktu. Bunun sebebi, testis dokusunda oksidatif stresin oluşumu için gereken dozun ve sıklığın, bizim çalışmamızda kullandığımız dozdan ve sıklıktan daha fazla ADR uygulaması olabilir. Pande ve Flora tarafından (58) 2002'de yapılan bir çalışmada oksidatif stres altındaki hücrelerde GSH reduktazın veya NADPH'nin düşük aktivitesini telafi etmek adına CAT aktivitesinin artabileceği gösterilmiştir. Bizim çalışmamızda da, Çeribaşı ve arkadaşlarının çalışmasına (39) benzer olarak, ADR uygulanan grupta CAT aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir fark olmamasına karşın belli ölçüde artış meydana gelmiştir. Diğer antioksidan enzimlerden GPx ve SOD seviyesi, ADR uygulanan grupta kontrol grubuna göre anlamsız kabul edilecek seviyede azalmıştı.

Muhtemelen yüksek dozda uygulanacak ADR tedavisi altında GPx ve SOD aktivitesi anlamlı olabilecek şekilde baskılanabilir. Oksidatif stres altında SOD ve GPx aktivitesinde kontrol grubuna göre oluşan anlamsız farklılıklara daha önceki çalışmalarda da rastlandı (39,59).

Spermatazoanın farklılaşması üreten Leydig hücrelerinin ürettiği testosteron sayesinde sürdürülebilir. Leydig hücrelerinde meydana gelebilecek bir hasar sperm sayısında, sperm hareketliliğinde ve testosteron seviyesinde önemli bir azalma meydana getirebilir (60). ADR spermatogenez üzerine etkisini Leydig hücrelerinde oluşturduğu olumsuz etki ile de oluşturabilir. Leydig hücrelerindeki bir bozulma testosteron üretimini de etkileyecektir. Bizim çalışmamızda, 2mg/kg dozda ADR uygulanan gruptaki sıçanlarda serum testosteron seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı şekilde azalma ile daha önceki çalışmaların (39,60) sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

ADR'nin testiste kontrollü hücre ölümünü (apoptozis) tetiklediği bilinmektedir (61). Geçmişte yapılan bir çalışmada ADR'nin neden olduğu spermatogonik hücrelerin sitoplazmasındaki FAS-L'nin ve Kaspaz-3'ün immünoaktivitesinin önemli miktarlardaki artışı ile ADR'nin apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (62). Bir başka çalışmada ADR'nin proapoptotik proteinleri (BAX) arttırarak ve antiapoptotik proteinleri (Bcl-2) azaltarak programlı hücre ölümüne yol açtığı ortaya konmuştur (39). Bu çalışmalarla desteklenecek çalışmamızda, TUNEL yöntemini kullanarak ADR tedavisi uygulanan grupta kontrol grubuna göre apoptotik hücrelerin sayısındaki artışın anlamlı olduğunu gözlemledik.

Hücreler fazla miktarda enzim ve antioksidan içeriğine sahip olmasına karşın, bu moleküller, oksidatif stresin yol açtığı redoks durumunu normalize etmede yetersiz kalabilir. Bu durumda, dışarıdan besin olarak alınacak antioksidant takviyesine ihtiyaç duyulabilir (11). Değişik çalışmalarda farklı kimyasalların etkilerini azaltmak veya ortadan kaldırmak için çok fazla sayıda antioksidan özellikli madde kullanılmıştır. Vitamin E ve Se bu tür maddelerdendir.

Vitamin E, spermatogonik hücrelerin antioksidan savunma sisteminin kompleks bağlantı ağının başlıca bileşenlerinden biridir. Aynı zamanda, lipid peroksidasyonunun yayılmasını engellemede, zincir reaksiyonlarını kıran bir antioksidan olarak işlev gören, membranın başlıca korucuyularından biridir (63). Diyetle Vitamin E takviyesi, DNA'yı, lipidleri ve proteinleri oksidatif hasardan koruyabilmektedir (64). Vitamin

E'nin bu koruyucu etkisinin, serbest radikalleri doğrudan süpürücü özelliğinden kaynaklanıyor olabileceği ileri sürülmüştür (65). Vitamin E aynı zamanda ROS tarafından başlatılan zincir reaksiyonlarını kırmak için çift tabakalı fosfolipit membranla reaksiyona da girebilir (66).

Geçmişten günümüze Vitamin E, anti infertilite özelliğe sahip bir vitamin olarak bilinir (67) ve erkek üreme sisteminin normal fonksiyon gösterebilmesiyle ilişkilendirilir (68). Erkek hayvanlarda, testiküler kayıp, üreme toksisitesinin en önemli parametrelerinden biridir ve genellikle testiküler kitlede azalmaya germinal hücrelerinin kaybı eşlik eder (69). EL-Faras ve arkadaşları (70) yaptıkları çalışmada 4 hafta boyunca haftada 1 kez 3 ml/ kg dozda karbon tetraklorür tedavisi gören sıçanların diyetine 4 hafta boyunca haftada 4 kez 100 mg/kg dozda Vitamin E takviyesini takiben vücut ağırlığı, testis ağırlığı ve sperm ağırlığının kontrol grubu düzeyine çekildiğini gözlemlemişlerdir. Bizim çalışmamızda da yalnızca Vitamin E verilen sıçanların testis ağırlığı kontrol grubuna yakın olmakla birlikte yalnızca ADR uygulanan gruba göre testis ağırlığında anlamlı bir artış vardı. Düzeltici etkisini gözlemek adına, ADR ile birlikte Vitamin E verilen grupta testis ağırlığı kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde azaldı ve Vitamin E'nin burada düzeltici rolüne rastlanmamış gibi görünse de Vitamin E'nin uzun süreli kullanımında spermatojenik süreci hızlandırması ve Leydig hücre sayısını veya aktivitesini düzenleyerek testis ağırlığında artış yapmasını beklemek mantıklı olabilir.

Vitamin E, spermatogeneziste ve sperm olgunlaşmasında kilit bir rol oynayan testisin fizyolojik işlevlerinin sürdürülebilmesinde önemlidir (45). Geçmişte yapılan bir çalışmada, Sodyum arsenit uygulamasının sıçanların testis dokusunda oluşturduğu hasara karşı Vitamin E'nin seminifer tübül çapını arttırarak, seminifer tübül duvarını kalınlaştırarak ve tübül lümenindeki boşluğu azaltarak testislerin morfolojik görünümünde düzeltici etki sağladığı görülmüştür (71). Bir başka çalışmada da Vitamin E'nin testiküler sperm sayısını arttırdığı ve testis morfolojisinde olumlu değişimleri desteklediği belirtilmiştir (72). Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda, sıçanların testis kesitlerinde seminifer tübül epiteli ve Sertoli hücrelerinin değerlendirildiği JTBS'de yalnızca Vitamin E verilen gruba ait bireylerin kontrol grubuna yakın olduğunu gözlemlenmiştir. Yine sadece Vitamin E verilen grupta, yalnız ADR ve ADR'nin kombine şekilde verildiği gruplara göre skorlamada anlamlı artış gözlemledik. Koruyucu etkisini gözlemek adına ADR ile birlikte Vitamin E

verdiğimiz grupta yalnızca ADR uygulanan gruba göre elde edilen skorlamada anlamlı bir artış gözlemlendi. Bu da Vitamin E'nin testisin morfolojik yapısındaki düzeltici etkisini kanıtlamaktadır.

Gevrek ve Özdemir'in (73) yaptığı yeni bir çalışmada cisplatin uygulamasının testis dokusunda tetiklediği apoptotik hücre sayısındaki artışa karşın, 50 mg/ kg doz Vitamin E tedavisi alan grupta kontrol grubuna yakın seyrettiği gözlemlendi. Bizim çalışmamızda, Vitamin E uygulanan gruba ait seminifer tübül hücrelerinde apoptotik hücrelerin sayısının kontrol grubuna yakın olduğu; yalnızca ADR'li gruba göre ise anlamlı şekilde azaldığı gözlemlendi, ADR+Vitamin E'nin grubundaki apoptotik hücre sayısı kontrol grubuna göre anlamlı şekilde fazla olmakla birlikte yalnızca ADR tedavisi uygulanan gruba göre apoptotik hücre miktarı sayısal olarak azalma gösterdi fakat bu azalma sayısal olarak anlamlı değildi.

Biyokimyasal parametreler ışığında çalışmamızda Vitamin E'nin lipit peroksidasyonu ve antioksidant enzimler üzerindeki etkilerini inceledik. Vitamin E tedavisi uygulanan grupta Lipit peroksidasyonunun bir ürünü olan MDA ürünü, kontrol grubuyla yakındı fakat ADR grubuyla da anlamlı farklılık göstermedi. Buna karşın MDA seviyesi Vitamin E grubunda diğer tüm gruplara göre sayısal olarak en düşük düzeydeydi. Bu çalışmada kısmen de olsa Vitamin E'nin lipit peroksidasyonunu azalttığını kanıtladı. ADR+Vitamin E grubunda MDA seviyesi kontrol grubuna yakındı ancak yalnızca sayısal olarak anlamsız kabul edilecek düzeyde ADR'li gruba göre yüksekti. Antioksidan sistemlerin aktivitelerinin artışı, Vitamin E'nin serbest radikal süpürücü etkisinin sonuçlarından biri olarak düşünülebilir (65). Çalışmamızda, Vitamin E verilen grupta CAT, GPx ve SOD aktiviteleri kontrol ve diğer gruplara nazaran anlamlı bir farklılık göstermedi. Benzer şekilde, ADR+Vitamin E grubunda CAT, GPx ve SOD aktiviteleri kontrol grubuna göre ve ADR grubuna göre anlamlı farklılık göstermemekle birlikte SOD aktivitesi ADR+Vitamin E grubunda yalnız ADR uygulanan gruba göre bir miktar artmıştı.

Benzer bir çalışmada Vitamin E'nin serum testosteron, LH ve FSH seviyelerini yükselttiği gözlemlendi (70), Bir başka çalışmada Vitamin E, dioksinle oluşturulan testis hasarını düşürdüğü ve azalan sperm sayısı, testosteron, LH, FSH seviyelerini antagonize ettiği gösterilmiştir (74). Bizim çalışmamızda Vitamin E verilen grupta serum testosteron seviyesi kontrol grubuna yakın değerlerde gözlenirken ADR verilen gruba

göre anlamlı bir artış vardı. ADR+Vitamin E grubunda ADR grubuna göre serum testosteron seviyesi sayısal olarak üstündü ancak bu üstünlük anlamlı değildi.

Se, normal gelişim ve üreme fonksiyonlarının düzenlenmesi için gerekli olan bir mikro besindir (19). Aynı zamanda testislerin önceliği, selenyumdan faydalanmak ve bunu sürdürmektir. Testislerde selenyum miktarının azalması membran hasarına ve spermatozoon anomalilerine yol açabilir (75). Se, normal testis fonksiyonları için elzem olup erkek üreme kapasitesinde hem yapısal olarak hem enzimatik olarak majör role sahiptir. Bu yüzden Se eksikliği plazma testosteron seviyesinde azalma gibi düşük sperm üretimi gibi konularla ilişkilidir (76). Daha önce yapılan bir çalışmada nikotinin sıçan testis ağırlığında oluşturduğu hasara karşı 10 mikrogram/kg/gün dozda Se'nin düzeltici etkisi gözlenmiştir (77). Biz de çalışmamızda 2 mg/kg dozda Se uyguladık. Yalnızca Se verilen gruptaki sıçanların testis ağırlığı kontrol grubuna benzer iken ADR uygulanan gruba göre anlamlı şekilde artış gösterdi. Bu bulgularımız önceden yapılmış bir çalışmayla uyumluydu (78). Se'nin ADR ile kombine olarak verildiği grupta testis ağırlığı kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış göstermişti. Se+ADR grubundaki testis ağırlığı ADR grubuna göre sayısal olarak artmış gözükse de bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu bulgular Se'nin testis ağırlığını korumadaki etkili olabileceğini göstermektedir.

Jana ve arkadaşları (79) yaptıkları bir çalışmada, egzersizin testiste yol açtığı gametogenik ve spermatojenik bozulmaya karşı sodyum selenit takviyesinin önemli ölçüde tedavi edici olduğunu ortaya koymuşlardır. Yapılan başka çalışmalarda da kadmiyumun sıçan testisinde neden olduğu histopatolojik ve apoptotik değişimleri selenyumun azalttığı gözlemlenmiştir (80,81).

Bu çalışmada, Se ile tedavi gören grupta JTBS skoru kontrol grubuyla aynı iken ADR ile tedavi gören gruba kıyasla skorlamada anlamlı şekilde artış vardı. Düzeltici etkisin gözlemlenmesi adına ADR+Se grubunda JTBS değeri, ADR grubuna göre anlamlı olarak artmıştı. Bu bulgular önceki çalışmalarla uyumluydu (80,81). Apoptotik gözlemlerimize göre; yalnızca Se verilen grupta kontrole yakın TUNEL pozitif hücreye rastlanırken yalnızca ADR verilen gruba göre Se'li grupta TUNEL pozitif hücrelerin sayısı anlamlı olarak azalmıştı. ADR+Se grubunda ADR grubuna göre TUNEL pozitif hücrelerin sayısı azalmıştı fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Se, GPx'in ana bileşenlerinden biridir (75). GPx; hidrojen proksit ve lipit peroksit gibi

ROS türevlerinin aşırı artışına bağlı oluşan oksidatif hasara karşı SOD, CAT ile birlikte antioksidant işlevi görür. Cao ve arkadaşları (78) tarafından yapılan bir çalışmada, 0,75 mg/kg dozda günlük olarak aflotoksine maruz kalan sıçanlarda 0,4 mg/kg doz Se uygulaması, testis dokusuna ait GPx aktivitesini arttırırken ROS ve MDA seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır. Başka iki çalışmada da, karbamizol ve kadmiyuma maruz kalan sıçan testislerinde Se'nin oksidatif hasarı azalttığını, serbest radikalleri elimine ederek ve antioksidant savunma sistemini geliştirerek sperm kalitesini arttırdığını göstermiştir (17,82). Yine geçmişte yapılan başka bir çalışmada, varikoselli sıçanların testis homojenatlarında antioksidan enzim (CAT, SOD, GPx) seviyelerinde ciddi bir azalma ve MDA seviyesinde ciddi bir artış gözlemlenirken selenyum bileşiğinin farklı dozlardaki uygulamasının antioksidan enzim aktivitelerini arttırdığı, MDA düzeyini ise azalttığı gösterilmiştir (83). Bizim yaptığımız çalışmada; Se verilen grupta CAT, GPx, SOD ve MDA düzeylerinde kontrol grubuna göre ve ADR grubuna göre anlamlı farklılıklar görmedik. Buna karşın Se grubunda MDA seviyesi ADR grubuna göre düşük seviyede gözlemlendi. Se grubunda GPx ve SOD testis seviyeleri ADR grubuna göre yüksek gözlemlendi.

Testosteron Leydig hücrelerinde üretilir ve testiküler fonksiyonun sürdürülebilmesi ile spermatogenezin düzenlenmesi için gereklidir (84,85). Testiküler testosteron sentezinin yoksunluğu, insanlarda ve kemiricilerde sperm konsantrasyonunun azalmasına yol açarak spermatogenezini engeller (85,86). Serum testosteron seviyesindeki azalma, Aflotoksine maruz kalmış ratlarda sperm konsantrasyonundaki azalmayı da beraberinde getirdi (87,88). Cao ve arkadaşlarının (78) yaptığı çalışmada 0,4 mg/ kg doz uygulanan Se'nin aflotoksin uygulamasına maruz kalan sıçanlarda serum testosteron seviyesi ve sperm konsantrasyonundaki azalmayı hafifletmiştir. Se verilmesinin, özellikle spermatogenezisi geliştirerek ve testosteron seviyesindeki azalmayı hafifleterek koruyucu etkisi olduğu bu çalışmada kanıtlandı. Bizim çalışmamızda Se verilen grupta serum testosteron seviyesinin kontrol grubuna yakın gözlemlerken bu değer yalnızca ADR grubuyla kıyaslandığında anlamlı olarak artış gösterdi. Düzeltici etkisini gözlemlenmek amacıyla oluşturduğumuz ADR+Se grubunda serum testosteron seviyesi ADR grubuna yakındı.

Vitamin E, Se'nin de etkisiyle, hidroperoksit oluşumunu yok ederek oksidatif hasara duyarlı membran lipitlerini koruyor ve oksidatif stres kaynaklı peroksidatif hasardan

lipit içerikli membran ve organelleri korur (89). Önceki çalışmalar, Vitamin E ve Se'nin birlikte oksidatif strese karşı korumada sinerjistik olarak etki edebilen önemli besinler olduğunu kanıtlamıştır (21). Bu bileşiklerin, lipit peroksidasyonu sonucu oluşan serbest radikalleri azalttığı gibi enzimatik ve nonenzimatik aktiviteleri düzelttiği diğer çalışmalarda da gözlenmiştir (90). Yapılan bir çalışmada, Dimethoate'nin serebral kortekste tetiklediği oksidatif strese karşı Se ve Vitamin E kombinasyonunun, bu maddelerin tek başına uygulamasından daha fazla etkili olduğu ortaya konmuştur (91). Çalışmamızda Vitamin E ve Se'nin birlikte etkilerini araştırmak amacıyla morfolojik, histopatolojik, biyokimyasal bulguları değerlendirdik. Vitamin E ve Se'nin kombine olarak verildiği grupta testis ağırlığının kontrol grubuna yakın seyrettiğini gördük. ADR+Se+Vitamin E tedavili grupta testis ağırlığının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığını gözlemledik. ADR+Se+Vitamin E grubunda yalnız ADR tedavisi uygulanan gruba göre testis ağırlığında anlamlı bir artış gözlenmedi. Bunun sebebi, ADR'nin yol açtığı organ indeksindeki azalmayı tersine çevirmek için Vitamin E ve Se'nin daha uzun süreli ve yüksek dozlarda kullanılması olabilir.

Yaptığımız çalışmada Se+Vitamin E grubunda seminifer tübül çapının ölçüldüğü JTBS skoru kontrol grubuna yakındı fakat ADR grubuna göre anlamlı olarak fazlaydı. ADR + Se+Vitamin E grubunda skorlama değeri yalnızca ADR uygulanan gruba göre anlamlı olarak fazlaydı. Vitamin E ve Se kombinasyonu apoptozu azaltıcı etki de gösterdi. Güncel çalışmamızda, Se+Vitamin E grubunda TUNEL pozitif hücrelerin sayısı kontrol grubuna göre anlamlı olarak fazlaydı ancak ADR tedavili gruba göre anlamlı olarak azalmıştı. Bunun yanında ADR'nin tetiklediği apoptozun azaltılmasına yönelik bulgulara ADR+Se+Vitamin E tedavisi uygulanan grupta yalnızca ADR uygulanan gruba göre apoptotik hücrelerin sayısı anlamlı olarak azalmıştı. Bu bulgular, vitamin E ve Se kombinasyonunun testiküler yapıyı koruyucu etkisinin yanında tedavi edici özelliği olduğu yönünde önemli bir kanıt olabilir.

Çalışmamızda, biyokimyasal parametreler ışığında Vitamin E ve Se kombinasyonunun lipit peroksidasyonu, antioksidant enzim aktiviteleri ve serum testosteron düzeyi üzerine etkilerini araştırdık. Se+Vitamin E grubunda MDA, CAT, SOD ve GPx testis konsantrasyonları kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı değildi fakat CAT ve GPx aktiviteleri Se+Vitamin E grubunda sayısal olarak en yüksek düzeydeydi. Benzer şekilde, ADR+Se+Vitamin E tedavisi gören grupta da MDA, CAT, SOD ve GPx testis

konsantrasyonları kontrol ve diğer gruplara göre anlamlı farklılık göstermedi. Olasıdır ki, 2 mg/ kg dozda verilen ADR tedavisinin, testislerin morfolojisinde oluşturduğu histopatolojik değişimler lipid peroksidasyonunu tetikleyecek düzeyde değildi. Buna karşılık Vitamin E ve Se uygulamasının günlük dozu ve tedavi periyodu bu moleküllerin antioksidant etkilerini açığa çıkarmada yeterli gelmemiş olabilir. Son olarak çalışmamızda, Vitamin E ve Se'nin birlikte verildiği grupta serum testosteron düzeyi kontrol grubundakine yakın iken ADR tedavili gruba göre anlamlı şekilde artış göstermişti. Ancak düzeltici etkisini görebilmek adına ADR+Se+Vitamin E grubunda serum testosteron düzeyi kontrole göre anlamlı olarak azalma gösterdi. Buna karşın, ADR+Se+Vitamin E grubunda sıçanların serum testosteron düzeyi ile ADR grubundaki sıçanların serum testosteron düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamadı. Vitamin E ve Se eklenmesi, ADR'nin Leydig hücreleri üzerinde oluşturduğu baskıyı kaldırmış olabilir ancak testosteron üretimini aktifleştirmek için Vitamin E ve Se tedavisinin daha uzun süreli periyodlarına ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Sonuç olarak; vitamin E ve Se'nin hem ayrı ayrı uygulaması hem de birlikte uygulaması, ADR ile oluşturulan testis hasarına karşı morfolojik ve histopatolojik olarak gözle görülür bir şekilde koruyucu etkiye sahip olduğu gözlemlendi. Ancak, vitamin E ve Se'nin antioksidant özellikleri ve serum testosteron düzeyine etkilerini daha net ortaya koyabilmek için, bu mikro moleküllerin daha yüksek dozda ve daha uzun süreli kullanımına gerek duyulduğu bizim çalışmamızda ortaya konmuştur.

6. KAYNAKLAR

- 1- Pichiah PB, Sankarganesh A, Kalaiselvi S, et.al Adriamycin induced spermatogenesis defect is due to the reduction in epididymal adipose tissue mass: A possible hypothesis. *Med Hypotheses* 2012; 78(2): 218-20.
- 2- Kumar D, Kirshenbaum LA, Li T, Danelisen I, Singal PK. Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol. *Antioxid Redox Signal* 2001; 3(1): 135-45.
- 3- Okuda S, Oh Y, Tsuruda H, et al. Adriamycin induced nephropathy as a model of chronic progressive glomerular disease. *Kidney Int* 1986; 29(2): 502–10.
- 4- Al-Bekairi AM, Osman AM, Hafeez MA, et al. Effect of desferrioxamine on the hepatotoxicity of adriamycin in normal mice. *Drug Dev. Res* 1993; 29(1): 56-62.
- 5- Herman EH, Ferrans VJ. Animal models of anthracycline cardiotoxicity: basic mechanisms and cardioprotective activity. *Prog Pediatr Cardiol* 1997; 8(2): 49–58
- 6- Au WW, Hsu TC. The genotoxic effects of adriamycin in somatic and germinal cells of the mouse. *Mutat Res* 1980; 79(4): 351–61.
- 7- Lui RC, Laregina MC, Herbold DR, Johnson FE. Testicular cytotoxicity of intravenous doxorubicin in rats. *J Urol* 1986; 136(4): 940–43.
- 8- Potnuri AG, Kondru SK, Samundrala PK, Allakonda L. Prevention of adriamycin induced cardiotoxicity in rart – A comparative study with subacute angiotensin-converting enzyme inhibitor and nonselective beta blocker therapy. *Met. & Endorcine* 2017; 14: 59-64.
- 9- Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev* 2010; 4(8): 118-126.
- 10- Sabanegh, ES. Ragebh, AM. Male fertility after cancer. *Urology* 2009; 73(2): 225-31.

- 11- Mut-Salud N, Álvarez PJ, Garrido JM, et al. Antioxidant intake and antitumor therapy: Toward nutritional recommendations for optimal results. *Oxid Med Cell Longev* 2016; 2016: 2-56.
- 12- Singh KC, Kaur R, Marar T. Ameliorative Effect of Vitamin E on Chemotherapy Induced Side Effects in Rat Liver. *Jpt* 2011; 5(6): 481-492.
- 13- Boussada M, Ali RB, Said AB, et al. Selenium and a newly synthesized thiocyanacetamide reduce doxorubicin gonadotoxicity in male rat. *Biomed.& Pharmacotherapy* 2017; 89: 1005-1017.
- 14- Rengaraj D, Hong YH. Effects of dietary vitamin E on fertility functions in poultry species. *Int.j. Mol. Sci* 2015; 16(5): 9910-21.
- 15- Lonn E, Bosch J, Yusuf S, Sheridan P, et al. HOPE and HOPE-TOO Trial Investigators. Effects of long term vitamin E supplementation on cardiovascular events and cancer. *JAMA* 2005; 293(11): 1338-47.
- 16- Noguchi N, Niki E. Dynamics of vitamin E action against LDL oxidation. *Free Radical Research* 1998; 28(6): 561-572.
- 17- Sakr SA, Mahran HA, Nofal AE. Effect of selenium on carbimazole-induced testicular damage and oxidative stress in albino rats. *J Trace Elem Med Biol* 2011; 25(1): 59-66.
- 18- Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet* 2000; 356(9225): 233-41.
- 19- Song R, Yao X, Shi L, Ren Y, Zhao H. Effects of dietary selenium on apoptosis of germ cells in the testis during spermatogenesis in roosters. *Theriogenology* 2015; 84(4): 583-8.
- 20- Naderi M, Keyvanshokoh S, Salati AP, Ghaedi A. Combined or individual effects of dietary vitamin E and selenium nanoparticles on humoral immune status and serum parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under high stocking density. *Aquaculture* 2017; 474: 40-47.
- 21- Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J Dairy Sci* 2002; 85(9): 2173-9.
- 22- Hernken RW, Harmon RJ, Tramsel S. Selenium for Dairy Cattle: a Role for Organic Selenium. In: Lyons TP, Jacques KA, editors. *Biotechnology in feed*

- industry. Proceedings of the Alltech 14th annual symposium. Loughborough, LEC, UK: Nottingham University Press; 1998; 797-803.
- 23- El-Shenawy NS, AL-Harbi MS, Hamza RZ. Effect of vitamin E and selenium separately and in combination on biochemical, immunological and histological changes induced by sodium azide in male mice. *Exp Toxicol Pathol* 2015; 67(1): 65-76.
- 24- Unur E, Ülger H, Ekinci N. *Anatomi. Kıvılcım Kitabevi. Kayseri* 2009.
- 25- Arıncı K, Elhan A. *Anatomi. Güneş Tıp Kitabevi. Ankara*; 1997; 417-422.
- 26- Sobotta İnsan Anatomisi Atlası. Urban & Schwarzenberg, Münih 19. baskı Türkçe çevirisi, Beta Yayınevi, İstanbul. 2. cilt: 224-23.
- 27- Ross MH and Pawlina W. *Histology Text and Atlas. Sixty edition Wolter Kluwer-Lippincott Williams and Wilkins* 2011 Baltimore Male Reproductive System 784-829.
- 28- Jangueria LC, Carneiro J, Kelley OR. *Temel Histoloji (Çev: Aytekin Y. Solakoğlu S. Ahışalı B.) Barış kitabevi, 1998: 407-422.*
- 29- Ross HM, Romrell JL. *Histology: a text and atlas. Section 21: Male reproductive system. 2nd edition. 2006: 603-625.*
- 30- Moore KM, Persaud TVN. *İnsan Embriyolojisi, 6. İngilizce Baskıdan Çeviri, Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. 1.Türkçe Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Türkiye; 2002; 305-341.*
- 31- Rafique M, Pervez S, Tahir F. Protective effect of zinc over lead toxicity on testes. *J Coll Physicians Surg Pak* 2010; 20(6): 377-81.
- 32- Sadler TW. *Ürogenital Sistem. Basaklar AC. Langman's Medikal Embriyoloji. 9.Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara* 2005; 313-354.
- 33- Petorak İ. *Medikal Embriyoloji. İstanbul: Beta Dağıtım A.Ş; 1986; 220-3*
- 34- Rozanski TA, Bloom DA. The undescended testis. Theory and management. *Urol Clin North Am* 1995; 22: 107-8.
- 35- Şeftalioğlu A. *Genel ve özel insan embriyolojisi. 3. Baskı. Ankara: Feryal Matbaası, 1998: 346-50.*
- 36- Guyton AC, Hall JE, Çev (Ed). Çavuşoğlu H. *Tıbbi Fizyoloji 10. Baskı, İstanbul: Nobel Kitabevleri, 2001.*

- 37- Atal S. Erişkin Erkek Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarında Kurkuminin Etkisi Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ocak, 2014.
- 38- Savatier J, Rharass T, Canal C, et al. Adriamycin dose and time effects on cell cycle, cell death, and reactive oxygen species generation in leukaemia cells. *Leuk Res* 2012; 36(6): 791-98.
- 39- Çeribaşı AO, Sakin F, Türk G, Sönmez M, Ateşşahin A. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64(7-8): 717-24.
- 40- Niki E. Antioxidant defenses in eukaryotic cells. In: Poli G, Albano E, Dianzani MU, editors. *Free radicals: From basic science to medicine*. Basel, Switzerland: Birkhauser Verlag; 1993; 365-73.
- 41- Hamre K. Metabolism, interactions, requirements and functions of vitamin E in fish. *Aqua. Nutr* 2011; 17(1): 98-115.
- 42- Raederstorff D, Wyss A, Calder PC, Weber P, Eggersdorfer M. Vitamin E function and requirements in relation to PUFA. *British Journal of Nutrition* 2015; 114(8): 1113-22.
- 43- Bregelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: Function and metabolism. *FASEB J* 1999; 13(10): 1145-1155
- 44- Pfluger P, Kluth D, Landes N, Vogt CB, Flohe RB. Vitamin E: underestimated as an antioxidant. *Redox Report* 2004; 9(5): 249-54.
- 45- Oda SS, El-Maddawy ZKh. Protective effect of vitamin E and selenium combination on deltamethrin-induced reproductive toxicity in male rats. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64(7-8): 813-9.
- 46- Bodnar M, Konieczka P, Namiesnik J. The properties, functions, and use of selenium compounds in living organisms. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2012; 30(3): 225-52.
- 47- Bozkurt S, Arikan DC, Kurutas EB, et al. Selenium has a protective effect on ischemia/reperfusion injury in a rat ovary model: biochemical and histopathologic evaluation. *J Pediatr Surg* 2012; 47(9): 1735-41.
- 48- Chemotherapy: Maging side effects and safe handling. *Can Vet J* 2009; 50: 665-668.

- 49- Blum RH, Carter SK. Adriamycin. A new anticancer drug with significant clinical activity. *Ann Intern Med* 1974; 80(2): 249-59.
- 50- Tan C, Tasaka H, Yu KP, Murphy ML, Karnofsky DA. Daunomycin, an antitumor antibiotic, in the treatment of neoplastic disease. Clinical evaluation with special reference to childhood leukemia. *Cancer* 1967; 20(3): 333-53.
- 51- Ward JA, Bardin CW, Knight M, et al. Delayed effects of doxorubicin on spermatogenesis and endocrine function in rats. *Reprod Toxicol* 1988; 2(2): 117-26.
- 52- Badkoobeh P, Parivar K, Kalantar SM, Hosseini SD, Salabat A. Effect of nano-zinc oxide on doxorubicin- induced oxidative stress and sperm disorders in adult male wistar rats. *Iran J Reprod Med* 2013; 11(5): 355-64.
- 53- Rezvanfar MA, Sadrkhanlou RA, Ahmadi A, et al. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. *Hum Exper Tox* 2008; 27(12): 901-910.
- 54- Kato M, Makino S, Kimura H, et al. Sperm motion analysis in rats treated with adriamycin and its applicability to male reproductive toxicity studies. *J Toxicol Sci* 2001; 26(1): 51-9.
- 55- Goodman J, Hochstein P. Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 77(2): 797-803.
- 56- Agrawal A, Cocuzza M, Abdelrazik H, Sharma RK. Oxidative stress measurement in patients with male or female factor infertility. *Transworld Research Network* 2008a; 195-218.
- 57- Agrawal A, Makker K, Sharma R. Clinical relevance of oxidative stress in male factor infertility: an update. *Am J Reprod Immun* 2008b; 59(1): 2-11.
- 58- Pande M, Flora SJ. Lead induced oxidative damage and its response to combined administration of α -lipoic acid and succimers in rats. *Toxicology* 2002; 177(2-3): 187-96.
- 59- Türk G, Çeribaşı AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. Antiperoxidative and antiapoptotic effects of lycopene and elagic acid on cyclophosphamide-induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 2010a; 22(4): 587-96.

- 60- Mohamed RH, Karam RA, Hagrass HA, Amer MG, Abd El-Haleem MR. Antiapoptotic effect of spermatogonial stem cells on doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Gene* 2015; 561(1): 107-14.
- 61- Hou M, Chrysis D, Nurmio M, et al. Jahnukainen K. Doxorubicin induces apoptosis in germ line stem cells in the immature rat testis and amifostine cannot protect against this cytotoxicity. *Cancer Res* 2005; 65(21): 9999-10005.
- 62- Rizk SM, Zaki HF, Mina MA. Propolis Attenuates Doxorubicin- Induced Testicular Toxicity in Rats. *Food Chem. Toxicol* 2014; 67: 176-86.
- 63- Niki E. Evidence for beneficial effects of vitamin E. *Korean J. Intern. Med* 2015; 30(5): 571–79.
- 64- EFSA Panel on Dietetic Products NaAN: Scientific opinion on the substantiation of health claims related to vitamin E and protection of DNA, proteins and lipids from oxidative damage (ID 160, 162, 1947), maintenance of the normal function of the immune system (ID 161, 163). *EFSA J* 2010; 8: 1816–1846.
- 65- Gurel A, Coskun O, Armutcu F, Kanter M, Ozen OA. Vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in frontal cortex and hippocampus: biochemical and histological studies. *J Chem Neuroanat* 2005; 29(3): 173–8.
- 66- Verma RJ, Nair A. Amerliorative effect of vitamin E on aflatoxin-induced lipid peroxidation in the testis of mice. *Asian J Androl* 2001; 3(3): 217–1.
- 67- Uzunhisarcikli M, Kalender Y, Dirican K, et al. subacute and subchronic administration of methyl parathion-induced testicular damage in male rats and protective role of vitamins C and E. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2007; 87(2): 115-122.
- 68- Chen H, Liu J, Luo L, et al. Vitamin E, aging and leydig cell steroidogenesis. *Experimental Gerontology* 2005; 40(8-9): 728-36.
- 69- Khan MR, Khan GN, Ahmed D. Evaluation of antioxidant and fertility effects of *Digera muricata* in male rats. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 2011; 5(6): 688–699.
- 70- El-Faras AA, Sadek IA, Ali YE, Khalil M, Mussa EB. Protective effects of Vitamin E on CCl₄ induced testicular toxicity in male rats. *Physiol Int* 2016; 103(2): 157-168.
- 71- Momeni HR, Oryan S, Eskandari N. Effect of vitamin E on sperm number and testis histopathology of sodium arsenite-treated rats. *Reprod Biol* 2012; 12(2): 171-81.

- 72- Fahim MA, Tariq S, Adeghate E. Vitamin E modifies the ultrastructure of testis and epididymis in mice exposed to lead intoxication. *Ann Anat* 2013; 195(3): 272-7.
- 73- Gevrek F, Erdemir F. Investigation of the effects of curcumin, vitamin E and their combination in cisplatin-induced testicular apoptosis using immunohistochemical technique. *Turk J Urol* 2018; 44(1): 16-23.
- 74- Yin HP, Xu JP, Zhou XQ, Wang Y. Effects of vitamin E on reproductive hormones and testis structure in chronic dioxin-treated mice. *Toxicol. Ind. Health* 2012; 28(2): 152–161.
- 75- Shi LG, Yang RJ, Yue WB, et al. Effect of elemental nano-selenium on semen quality, glutathione peroxidase activity, and testis ultrastructure in male Boer goats. *Anim Reprod Sci* 2010; 118(2-4): 248-54.
- 76- Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Burk RF. Sequential development of flagellar defects in spermatids and epididymal spermatozoa of selenium-deficient rats. *Reproduction* 2004; 127(3): 335-42.
- 77- Seema P, Swathy SS, Indira M. Protective effect of Selenium on Nicotine-Induced Testicular Toxicity in Rats. *Biol Trace Elem Res* 2007; 120(1-3): 212-8.
- 78- Cao Z, Shao B, Xu F, et al. Protective effect of Selenium on Aflatoxin B1-Induced Testicular Toxicity in Mice. *Biol Trace Elem Res* 2017; 180(2): 233-238.
- 79- Jana K, Samanta PK, Manna I, et al. Protective effect of sodium selenite and zinc sulfate on intensive swimming-induced testicular gamatogenic and steroidogenic disorders in mature male rats. *Appl. Physiol. Nutr. Metab* 2008; 33(5): 903–914.
- 80- Li JL, Gao R, Li S, et al. Testicular toxicity induced by dietary cadmium in cocks and ameliorative effect by selenium. *Biometals* 2010; 23(4): 695-705.
- 81- El-Maraghy SA, Nassar NN. Modulatory effects of lipoic acid and selenium against cadmium-induced biochemical alterations in testicular steroidogenesis. *J. Biochem. Mol. Toxicol* 2011; 25(1): 15-25.
- 82- Kara H, Cevik A, Konar V, Dayangac A, Yilmaz M, Protective effects of antioxidants against cadmium-induced oxidative damage in rat testes. *Biol Trace Elem Res* 2007; 120(1-3): 205-11.

- 83- Taghizadeh L, Eidi A, Mortazavi P, Rohani AH. Effect of selenium on testicular damage induced by varicocele in adult male Wistar rats. *J Trace Elem Med Biol* 2017; 44: 177-185.
- 84- Payne AH, Youngblood GL. Regulation of expression of steroidogenic enzymes in Leydig cells. *BiolReprod* 1995; 52(2): 217–25.
- 85- Walker WH. Testosterone signaling and the regulation of spermatogenesis. *Spermatogenesis* 2011; 1(2): 116–120.
- 86- Ren XM, Wang GG, Xu DQ, et al. The protection of selenium on cadmium-induced inhibition of spermatogenesis via activating testosterone synthesis in mice. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(10): 3521–3529.
- 87- Elsaad ASA, Mahmoud HM. Phytic acid exposure alters aflatoxinB1-induced reproductive and oxidative toxicity in albino rats (*Rattus norvegicus*). *Evid Based Complement Alternat Med* 2009; 6(3): 331–34.
- 88- Mathuria N, Verma RJ. Curcumin ameliorates aflatoxininduced toxicity in mice spermatozoa. *Fertil Steril* 2008; 90(3): 775–780.
- 89- Gupta S, Kumar H, Soni J. Effect of vitamin E and selenium supplementation on concentrations of plasma cortisol and erythrocyte lipid peroxides and the incidence of retained fetal membranes in crossbred dairy cattle. *Theriogenology* 2005; 64(6): 1273-86.
- 90- Gan L, Liu Q, Xu HB, Zhu YS, Yang XL. Effects of selenium overexposure on glutathione peroxidase and thioredoxin reductase gene expressions and activities. *Biol Trace Elem Res* 2002; 89(2): 165-75.
- 91- Amara IB, Soudani N, Hakim A, et al. Selenium and vitamin E, natural antioxidants, protect rat cerebral cortex against dimethoate-induced neurotoxicity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 2011; 101(3): 165-174.

ADRIAMİSİNİN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI ÜZERİNE E VİTAMİNİ VE SELENYUM'UN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

ORJİNALLİK RAPORU

| | | | |
|-------------------|---------------------|----------|------------------|
| %6 | %6 | %4 | % |
| BENZERLİK ENDEKSİ | İNTERNET KAYNAKLARI | YAYINLAR | ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ |

BİRİNCİL KAYNAKLAR

| | | |
|---|--|-----|
| 1 | dspace.trakya.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı | %1 |
| 2 | www.firattipdergisi.com İnternet Kaynağı | %1 |
| 3 | sagens.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı | %1 |
| 4 | www.fizyolojikongresi2014.org İnternet Kaynağı | %1 |
| 5 | www.journalagent.com İnternet Kaynağı | <%1 |
| 6 | www.researchgate.net İnternet Kaynağı | <%1 |
| 7 | slideplayer.biz.tr İnternet Kaynağı | <%1 |
| 8 | es.scribd.com İnternet Kaynağı | <%1 |

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Mehmet Alparslan ÜNAL
Uyruğu: Türkiye (TC)
Doğum Tarihi ve Yeri: 07.02.1987 / ANTALYA
Medeni Durumu: Evli
Tel: + 90 (546) 400 80 03
email: m.alpunal@gmail.com
Yazışma Adresi: alparslan.unal@kapadokya.edu.tr

EĞİTİM

| Derece | Kurum | Mezuniyet Tarihi |
|------------|---|------------------|
| Üniversite | Akdeniz Üniversitesi Fen Fak. Biyoloji Bölümü | 2012 |
| Lise | Antalya Anadolu Lisesi | 2004 |
| İlköğretim | Barbaros İO., Başöğretmen Atatürk İO. | 2001 |

YABANCI DİL

İngilizce

İŞ DENEYİMİ

Kapadokya Üniversitesi 2014-Halen

KATILDIĞI KONGERELER

12. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi 27-30 Mayıs 2014