

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

SİSPLATİN'İN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI
ÜZERİNE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN
KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Hazırlayan
Tayfun CEYLAN

Danışman
Prof. Dr. Birkan YAKAN

Yüksek Lisans Tezi

Şubat 2017
KAYSERİ

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

**SİSPLATİN'İN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI
ÜZERİNE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN
KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Tayfun CEYLAN**

**Danışman
Prof. Dr. Birkan YAKAN**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
Tarafından TYL-2015-5948 nolu proje ile desteklenmiştir.**

**Şubat 2017
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 : Tayfun CEYLAN

İmza :

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“Sisplatin’in oluşturduğu testis hasarı üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester’in koruyucu etkisinin incelenmesi” adlı Yüksek Lisans tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi“ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Tayfun CEYLAN

Danışman

Prof. Dr. Birkan YAKAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Birkan YAKAN

Prof. Dr. Birkan YAKAN danışmanlığında **Tayfun CEYLAN** tarafından hazırlanan “**Sisplatin’in Oluşturduğu Testis Hasarı Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester’in Koruyucu Etkisinin İncelenmesi**” adlı bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Histoloji ve Embriyoloji** Anabilim Dalı **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

22/02/2017

Jüri**İmza**

Danışman: Prof. Dr. Birkan YAKAN (Erciyes Ü. Histoloji ve Embriyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR (Erciyes Ü. Histoloji ve Embriyoloji AD)

Üye : Prof. Dr. Elvan ÖZBEK (Sakarya Ü. Histoloji ve Embriyoloji AD)

ONAY

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

...../...../2017

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Aykut ÖZDARENDELİ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesinde, planlanmasında, yürütülmesinde ve lisansüstü eğitimim süresince benden hiçbir zaman yardımlarını, desteğini, hoşgörüsünü ve tecrübelerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Birkan YAKAN'a, yüksek lisans eğitimim boyunca hoşgörü ortamı içerisinde bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen değerli bölüm hocamız Sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR'a ve bölüm hocalarımız Doç. Dr. Arzu YAY ile Uzm. Dr. Esra BALCIOĞLU'na,

Çalışmanın deneysel bölümünde yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Emin KAYMAK, Betül YALÇIN ve diğer bölüm arkadaşlarım ile deneysel anlamda katkı sağlayan Öğr. Gör. Dr. Fazile CANTÜRK TAN'a, Kapadokya MYO'daki çalışma arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca karşılıksız sevgilerini, maddi-manevi desteklerini benden esirgemeyen, beni bu yolda teşvik eden, varlıklarıyla ve davranışlarıyla her zaman gurur duyduğum canım annem, sevgili babam ve kıymetli kardeşlerim Seher ve Tuğçe'ye,

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürler...

Tayfun CEYLAN

SİSPLATİN'İN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI ÜZERİNE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Tayfun CEYLAN

**Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi, Şubat 2017
Danışman: Prof. Dr. Birkan YAKAN**

ÖZET

Antikanserojen bir ilaç olan Sisplatin (CP), sıçan testislerinde spermatojenik seri hücrelerinde ve destek hücreleri olan Sertoli hücreleri ile Leydig hücrelerinde hasara yol açmaktadır. Bu hasarın ortadan kaldırılmasında koruyucu etkisiyle propolisin etken maddelerinden biri olan Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE)'in etkisini gözlemlemek amaçlandı.

Tüm prosedürler etik kurallara uygun olacak şekilde gerçekleştirildi. Grup 1'e (kontrol grubu) (n=8) deney boyunca diğer gruplara uygulanan CAPE ve CP kadar izotonik salin (SF) solüsyonu intraperitoneal (i.p.), Grup 2'ye (n=10) deneyin 7. günü tek doz CP (7 mg/kg) i.p. olarak verildi. Grup 3'e (n=10) deneyin başlangıcından itibaren 12 gün boyunca günlük CAPE (10 µmol/kg/gün) i.p. ve 7. günde CP (7 mg/kg) tek doz i.p. olarak verildi. Grup 4'e (n=10) ise deneyin başlangıcından itibaren 12 gün boyunca günlük CAPE (10 µmol/kg/gün) i.p. olarak verildi. Deneyin 14. gününde sıçanlar xylazin ve ketamin anestezisi altında dekapite edilerek testisler alındı. Testislerden alınan kesitler hematoxilen - eozin ile boyanarak histolojik hasar belirlendi. Sıçanlardan elde edilen testis dokusunda Malondialdehide (MDA), Katalaz (CAT) ve Süperoksit dismutaz (SOD) parametrelerine bakılarak, lipid peroksidasyon ürünü ve antioksidan enzim aktiviteleri tayin edildi. Tübüllerdeki hasarlanmanın derecesinin değerlendirilmesinde Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) kullanıldı. Comet Assay tekniğiyle de testis dokusunda ve duktus epididimiste sperm hücre düzeyinde DNA hasarı saptandı ve miktarı belirlendi.

Sonuç olarak tek doz CP uygulanması daha önceki çalışmalarda olduğu gibi sıçan testis dokusunda hasar oluşturmuştur. Sıçan testis dokusunda oluşan bu hasarın CAPE ile

düzeltilbileceği gösterilmiştir. Ancak CP olmaksızın yalnızca CAPE uygulanması da testis dokusunda hasar oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Sisplatin, Kafeik Asit Fenetil Ester, Testis, Sıçan



**INVESTIGATION ON THE PROTECTIVE EFFECT OF CAFFEIC ACID
PHENETHYL ESTER ON TESTICULAR INSULT INDUCED BY CISPLATIN**

Tayfun CEYLAN
Erciyes University, Institute of Medical Sciences
Department of Histology and Embryology
MSc Thesis, February 2017
Supervisor: Prof. Dr. Birkan YAKAN

ABSTRACT

An anticancer drug, cisplatin (CP), causes damage to spermatogenic serial cells in rat testis and Leydig cells and Sertoli cells which have sustentacular cells. It was aimed to observe the effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE), which is one of the active ingredients of propolis with its protective effect to eliminate this damage.

All procedures were carried out in accordance with ethical rules. Group 1 (control group) (n= 8) was given isotonic saline solution (SF) intraperitoneal (i.p.) during the experiment and Group 2 (n=10) was given a single dose of CP (7 mg/kg) i. p. on the 7th day of the experiment. Group 3 (n=10) was given (10 µmol/kg/day) CAPE i p. for 12 days from the beginning of the experiment and CP (7 mg/kg) was given on 7th day as a single dose. Group 4 (n= 10) was given (10 µmol/kg/day) CAPE i.p. daily for 12 days from the beginning of the experiment. On the 14th day of the experiment, rats were decapitated under xylazine and ketamine anesthesia and testes were taken. Sections taken from testes were stained with hematoxylin - eosin and histological damage was determined. Lipid peroxidation product and antioxidant enzyme activities were determined by examining the parameters of Malondialdehyde (MDA), Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD) in the testis tissues obtained from rats. The Johnsen Testicular Biopsy Score (JTBS) was used to assess the extent of damage to the tubules. DNA damage was detected using in the Comet Assay technique testis tissue and the amount of DNA damage in the sperm cell was determined in the ductus epididymis.

As a result, single dose CP administration caused a damage to the testicular tissue of in rats as it has been seen in previous studies. It has been shown that the damage in the CP-

administered testes can be decreased by CAPE application. However, only the implementation of CAPE without CP causes relatively damage to testicular tissue.

Keywords: Cisplatin, Caffeic Acid Phenethyl Ester, Testes, Rat



İÇİNDEKİLER

SİSPLATİN'İN OLUŞTURDUĞU TESTİS HASARI ÜZERİNE KAFEİK ASİT FENETİL ESTER'İN KORUYUCU ETKİSİNİN İNCELENMESİ	
İÇ KAPAK.....	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI.....	iii
KABUL VE ONAY.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	x
KISALTMALAR.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
TABLolar LİSTESİ.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. TESTİS.....	4
2.1.1. Testis Embriyolojisi.....	5
2.1.2. Testis Anatomisi.....	7
2.1.3. Testis Histolojisi.....	10
2.1.3.1. Seminifer Tübüller.....	11
2.1.3.2. Sertoli Hücreleri.....	13
2.1.3.3. Spermatojenik Hücreler.....	14
2.1.3.4. Spermatojenez ve Mayoz Evresi.....	14
2.1.3.5. Spermiyojenez.....	16
2.2. LİPİD PEROKSİDASYONU VE MALONDİALDEHİT.....	17
2.3. ANTİOKSİDANLAR.....	18
2.4. KEMOTERAPÖTİK AJANLAR.....	18

2.4.1. Sisplatin	19
2.5. KAFEİK ASİT FENETİL ESTER	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Deneysel Prosedür	25
3.1.1. Doku Takibi	26
3.1.2. Hematoksilen - Eozin Boyama	26
3.1.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS).....	27
3.1.4. Biyokimyasal Analizler	28
3.1.4.1. Malondialdehit (MDA) düzey tayini.....	28
3.1.4.2. Süperoksit dismutaz (SOD) aktivite tayini	28
3.1.4.3. Katalaz (CAT) aktivite tayini.....	29
3.1.5. Comet Assay Tekniği	29
3.1.6. İstatistiksel Analiz.....	30
4. BULGULAR	31
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	31
4.2. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru Sonuçları.....	35
4.3. Biyokimyasal Bulgular	36
4.4. Comet Assay Tekniği Bulguları	37
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	40
6. KAYNAKLAR	44
ÖZ GEÇMİŞ.....	54

KISALTMALAR

CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
CAT	: Katalaz
CP	: Sisplatin
DEKAM	: Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezi
ELİSA	: Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FDA	: Food and Drug Administration
H&E	: Hematoksilen & Eozin
ip	: İntraperitoneal
JTBS	: Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru
MDA	: Malondialdehit
SF	: Serum fizyolojik
SOD	: Süperoksit dismutaz
	Triphosphate DNA Nick-End Labelling
TUNEL	: Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated Deoxyuridine

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Erkek üreme sistemini oluşturan organ ve kanalların genel görünümü	4
Şekil 2.2.	Testiküler gelişim evrelerinin şematik diyagramı	6
Şekil 2.3.	Testis anatomisi	9
Şekil 2.4.	Testis ve üreme yollarının sagittal kesiti	11
Şekil 2.5.	Testiste seminifer tübüllerin ışık mikroskopik görünümü,	12
Şekil 2.6.	Seminifer epitelin şematik çizimi	13
Şekil 2.7.	İnsanda spermatojenezin şematik gösterimi	16
Şekil 2.8.	İnsanda spermiyojenin şematik gösterimi	17
Şekil 2.9.	Kafeik asit fenetil esterinin kimyasal yapısı	23
Şekil 4.1.	Kontrol grubuna (Grup 1) ait testis dokusu. H&E boyama x20	32
Şekil 4.2.	CP grubuna (Grup 2) ait testis dokusu. H&E boyama x20	33
Şekil 4.3.	CP grubuna (Grup 2) ait testis dokusu. H&E boyama x40	33
Şekil 4.4.	CP + CAPE grubuna (Grup 3) ait testis dokusu. H&E boyama x20	34
Şekil 4.5.	CP + CAPE grubuna (Grup 3) ait testis dokusu. H&E boyama x40	34
Şekil 4.6.	CAPE grubuna (Grup 2) ait testis dokusu. H&E boyama x20	35
Şekil 4.7.	Kontrol grubu tail DNA % 1,03, şekil DNA hasarsız sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, Japan)	38
Şekil 4.8.	CP grubu tail DNA %20,7, şekil DNA hasarlı sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, Japan)	38
Şekil 4.9.	CP + CAPE grubu tail DNA %11,6 , şekil DNA hasarlı sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, Japan)	39
Şekil 4.10.	CAPE grubu tail DNA %15,2, şekil DNA hasarlı sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, Japan)	39

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 2.1. Propolisin bileşimi ve bilinen farmakolojik aktiviteleri	22
Tablo 3.1. Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği	26
Tablo 3.2. Hematoksilen - Eozin boyama tekniği.....	27
Tablo 3.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması.....	28
Tablo 4.1. JTBS sonuçları.....	36
Tablo 4.2. Doku örneklerinde ortalama Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), Malondialdehit (MDA) ölçümleri	37
Tablo 4.3. Comet Assay sonuçları	37

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kemoterapötik ajanlar çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bunların toksisiteleri ve taşıdıkları minör riskler tedavide gösterdikleri potansiyel yararlılık düşünüldüğünde sıklıkla göz ardı edilir. Bu ilaçların çeşitli organ ve sistemlere olan toksisiteleri yanında risklerinden birisi de üreme çağındaki bireylerin over ve testis hasarına bağlı olarak üreme yeteneklerinin azalmasıdır (infertilite). Özellikle testis hücreleri mitotik, mayotik, morfojenik çeşitli süreçlere girdiklerinden kemoterapötik ajanlar tarafından hedef olarak seçilir, bu yüzden de kolayca hasarlanırlar (1).

Sisplatin (CP), kemoterapide bazı kanser türlerini tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır. İlk kez 1971 yılında kanser hastalarında başarı ile uygulanmaya başlanan ilaç Amerikan Gıda ve İlaç kurumundan (FDA) 1978 yılında onay almıştır (2). CP'in başlangıç plazma yarı ömrü 25-49 dakikadır, dağılım sonrası yarı ömrü 58-73 saattir ve esas olarak idrarla vücuttan atılır.

CP yapısı bakımından diğer antineoplastik ilaçlara benzemeyen organik platin türevi bir ilaçtır. Özellikle testis, over, mesane karsinomaları; CP temeline dayanan kemoterapiye duyarlıdır (1). Kemoterapötik ilaç CP, kaşeksi ve testis hasarı dahil, doza bağımlı olarak bir dizi yan etkiye neden olur (3). Nefrotoksisite, nörotoksisite, gastrointestinal irritabilite gibi yan etkilerinin yanında azoospermi, oligospermi ve infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (1). CP yüksek kümülatif doz alan hastalarda kalıcı azoospermi ve sonrasında infertilite geliştirebilir (3).

Son derece etkili bir antineoplastik DNA alkilleme maddesi olan Cis-diamminodichloroplatinum veya CP; testis, yumurtalık, meme, akciğer, mesane ile baş ve boyun dahil olmak üzere çok çeşitli solid tümörleri tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ancak, testis toksisitesi gibi olumsuz yan etkileri, kullanımını sınırlandırmaktadır (4).

CP, DNA ile etkileşerek, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur. Bu bağların ortaya çıkışı ise DNA transkripsiyon ve replikasyonunu inhibe eder. CP'in modifiye ettiği DNA, yeterince yenilenemediğinden, ortaya çıkan DNA hasarı apoptozisi başlatır. Bu hasar onarılamayacak boyutta ise, hücre tarafından tolere edilemez ve hücre ölümüne neden olur. CP'in testis dokusu için oldukça toksik olduğu ve apoptozis'i indüklediği ve histolojik yapıyı bozduğu gösterilmiştir (5). CP tümör büyümesi için gerekli olan neovaskülarizasyonu baskılar ve mitokondriyal enzim aktivitesini bozar. Seminifer tübüllerde CP uygulamasından sonra yaygın hasar ortaya çıkar. Hem insan hem de hayvan modellerinde kanser tedavilerinde benzer dozlarda kullanılan CP, sperm sayısı ve motilitesi ile spermin kromatin kalitesinde azalmaya neden olur (3).

CP'e bağlı testiküler hasar direkt olarak spermatojenik hücreler ve Sertoli hücreleri üzerinde ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda Leydig hücrelerinde de fonksiyon bozukluğu yaratmaktadır. CP uygulanan sıçanlarda sperm üretiminin, seminifer tübül çapının ve intratestiküler testosteron'un azaldığı ve seminifer tübülde TUNEL pozitif hücrelerde artış olduğu belirtilmiştir (2).

Bitkilerin büyük bir bölümü, yapraklarını, çiçeklerini ve meyvelerini, antimikrobik çürümeye karşı ürettikleri, su geçirmez ve ısı yalıtımı özellikleri olan reçinemsı maddelerle korurlar. Bal arıları bu reçinemsı maddeleri ağaçların gövdelerindeki çatlaklardan, tomurcuklardan ve yapraklardan toplarlar. Arıların çiğneyip, ağız sindirim enzimlerini ekleyerek ve kısmen de sindirerek, balmumu ile karıştırdıkları propolis adı verilen bu yapışkan madde, kovanda çeşitli amaçlar için kullanılır (6).

Kafeik Asit Fenetil Ester (CAPE), arıların bitkilerden topladığı özütün içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir ve bir halk ilacı olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (7). Propolisin antimikrobik, antienflamatuvar, immunomodülatör, antimutajenik, antioksidan ve antikarsinojenik etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu etkilerin çoğunun propolisin etken maddelerinden biri olan CAPE'e bağlı olduğu gösterilmiştir (8,9). Yapılan bir çalışmada sıçanlarda CAPE'in CP nefrotoksisitesini önleme potansiyeli olduğu da gösterilmiştir (10).

CAPE'in farmakolojik olarak güvenli bir bileşik olmakla birlikte aynı zamanda lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan enzim aktivitesini uyardığı gösterilmiştir (11). Buna ek olarak, CAPE'in transforme olmuş hücrelerin farklı tiplerinin büyümesini engellediği de gösterilmiştir. Ayrıca tümör oluşumunu önleyebilmiştir (7).

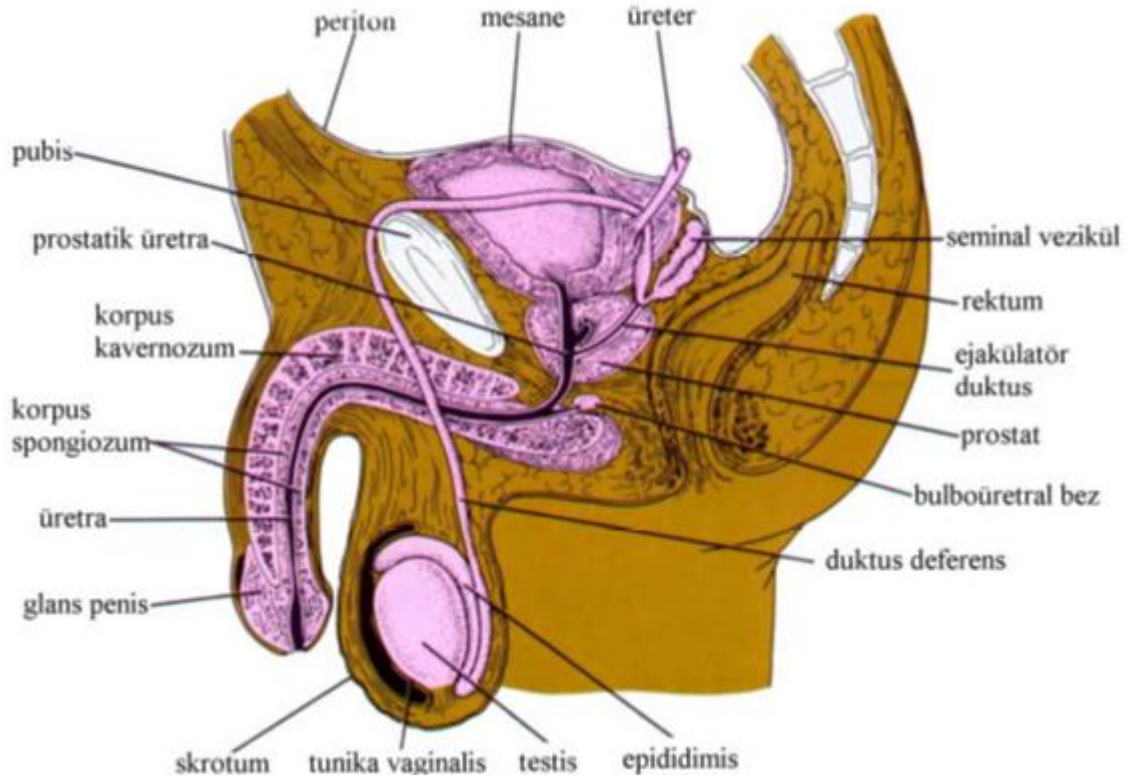
Birçok organ ve doku hasarında kullanılan CAPE'in testis hasarı üzerine koruyucu etkisini gösteren herhangi bir çalışma rapor edilmemiştir.

Çalışmamızda, antikanser bir ilaç olan CP'in testislerde oluşturacağı hasar üzerine propolisin etken maddelerinden biri olan CAPE'in varsa koruyucu etkisini biyokimyasal parametreler (MDA, SOD, CAT), Comet Assay tekniği ve Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS) yöntemlerini kullanarak incelemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS

Erkek genital sistemi bir çift testis, genital boşaltım yolları (tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatoryus ve üretra), bu yollara açılan yardımcı bezler (vezikula seminalis, prostat, bulbo-üretral bezler) ve dış genital organ olan penisten oluşur (12) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Erkek üreme sistemini oluşturan organ ve kanalların genel görünümü (13)

2.1.1. Testis Embriyolojisi

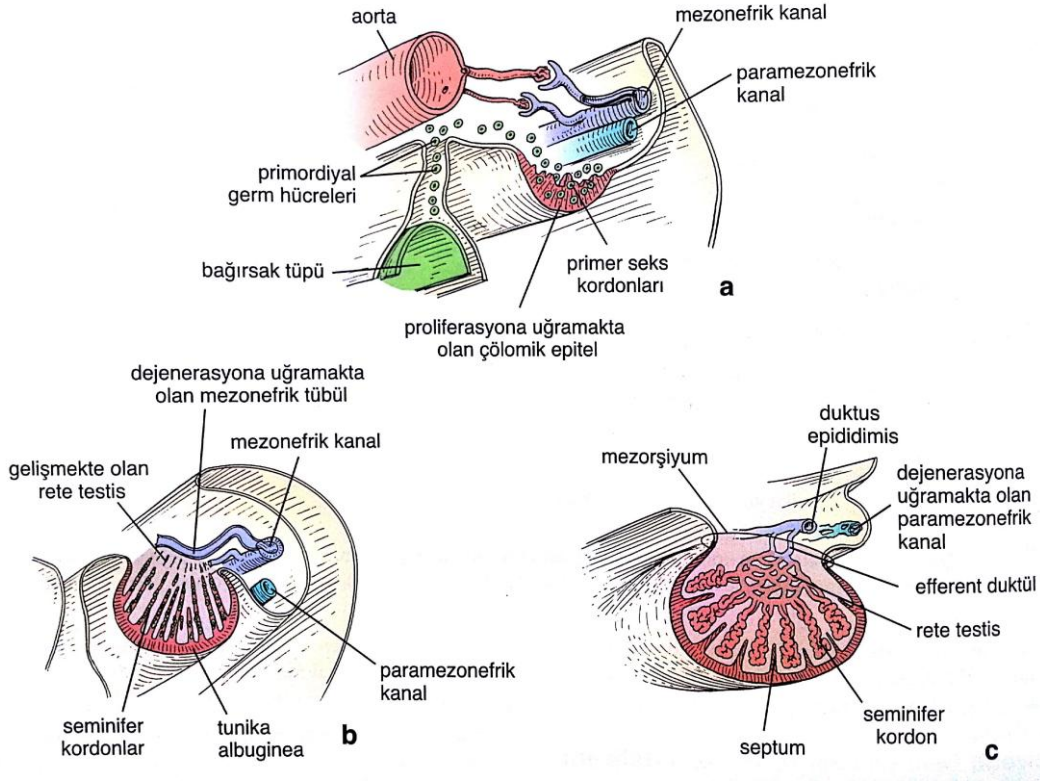
Embriyonun cinsiyeti genetik açıdan fertilizasyon sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar, erkek veya dişi morfolojik özelliklerine sahip değildirler (14).

Testisler abdominal kavitenin arka duvarında retroperitoneal olarak üriner sistemle yakın ilişki halinde gelişirler. Testisler (ovaryumlar gibi) üç kaynaktan köken alırlar:

- Ara mezoderm, posteriyor abdominal duvardaki ürogenital kabartıları yapar, Leydig (interstisyel hücreler) hücrelerinin ve miyoid hücrelerin (peritübüler kontraktıl hücreler) kaynağıdır.
- Mezodermal epitel (sölomik mezotelyum), ürogenital kabartıları döşer ve Sertoli hücrelerinin kaynağıdır.
- Primordiyal germ hücreleri, yolk kesesinden gelişmekte olan gonadlara göç ederler ve burada bölünerek spermatogonyumlara farklılaşırlar.

Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartılara göçü, ürogenital kabartılardaki mezodermal hücreleri ve sölomik mezotelyum hücrelerini proliferasyon ve primer cinsiyet kordonlarını oluşturmak üzere indükler. Bu evrede bu kordonlar, primordiyal germ hücrelerinden, pre-Sertoli hücrelerden ve bunları çevreleyen miyoid hücre tabakasından meydana gelir. Daha sonra, primer cinsiyet kordonları seminifer tübülleri, düz tübülleri ve rete testisi oluşturacak olan seminifer kordonlara farklılaşır (Şekil 2.2.) (13).

Gonadal gelişimin ilk safhaları 5. haftada ortaya çıkar, mezonefrozun medialinde, mezotelde bir kalınlaşma meydana gelir. Bu epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile mezonefrozun medialinde gonadal kabartı oluşturur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar gonadal kordonlar altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. Farklılaşmamış gonad bu halde, dışta yer alan bir korteks içte yer alan bir medulladan oluşur (15).



- a.** 5 haftalık bir embriyoda farklılaşmamış gonad evresi
b. Primer cinsiyet kordonlarının seminifer kordonlara farklılaşması
c. Testiküler gelişimin son evreleri (13)

Şekil 2.2. Testiküler gelişim evrelerinin şematik diyagramı

Gelişimin ilk evresinde testisler, posteriyor abdominal duvarda her iki cinsiyet için aynı olan farklılaşmamış primordiyumlar olan ürogenital kabartılardan gelişirler. Embriyo bu farklılaşmamış evrede hem erkek hem de dişi yönünde gelişme potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte, SRY geninin, özellikle de pre-Sertoli hücrelerinde ekspresyonu, embriyonun erkek yönünde gelişimini düzenler. Erkek gelişiminin erken evresinde seminifer kordonları ayıran mezenşim, farklılaşmamış primordiyumun testise gelişimini stümüle eden testosteronu üreten Leydig (interstisiyel) hücrelerini oluşturur. Testosteron, erkek genital sisteminin boşaltım kanallarına dönüşecek olan mezonefrik Wolff kanallarının büyümesinden ve farklılaşmasından da sorumludur. Ayrıca, bu erken evrede seminifer kordonların içerisinde gelişen Sertoli (sustentaküler) hücreleri diğer bir önemli hormonal madde olan Müllerian-inhibe edici faktörü (MIF) üretirler. Büyük bir glikoprotein olan MIF, paramezonefrik kanaldaki (Müller kanalı) hücre bölünmesini inhibe eder ve bu inhibasyon da dişi üreme organlarının gelişimini inhibe eder (13).

Dördüncü ayda, testis kordonları at nalı şeklini alır ve bu at nalının uçları rete testis ile devam eder. Bu durumda testis kordonları artık primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden köken almış Sertoli destek hücrelerinden meydana gelmiştir. Gonadal sırtın orijinal mezenşiminden köken alan interstisiyel Leydig hücreleri testis kordonlarının arasında bulunur ve bu kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlarlar. Gebeliğin 8. haftasında, Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlarlar. Testisler artık genital kanal ve dış genital organları etkileyecek hale gelmiştir (14).

Puberteye kadar solid halde kalan testis kordonları, pubertede lümenleri açılarak seminifer tübüller haline gelirler. Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübüleriyle birleşir ve duktuli efferenteslere girerler. Bu efferent duktuslar mezonefrik sistemin geride kalmış boşaltım tübülleridir. Duktus deferens olarak bilinen bu kanallar, rete testis ile mezonefrik veya Wolffian kanalları birbirine bağlarlar (14).

Gebeliğin yaklaşık 26. haftasında testisler abdomenden skrotuma iner. Testislerin bu göçüne, gelişmekte olan skrotum ile her bir testisin inferiyor kutbu arasında bağlantıyı sağlayan testosteron duyarlı ligament olan gubernakulumun testosteronun etkisiyle kısılması ve abdominal kavitenin ayrı gelişimi neden olmaktadır. Testisler abdominal kavite ile skrotum arasındaki dar geçit olan inguinal kanaldan geçerek skrotuma inerler. İniş esnasında testisler, ana boşaltıcı kanalları olan duktus deferensin kan damarlarını, lenf damarlarını ve sinirleri de beraberinde sürüklerler. Testislerin skrotum içerisindeki sıcaklığı vücut sıcaklığının 2-3 °C altındadır. Bu düşük sıcaklık spermatojenez için gerekli olmasına rağmen, normal vücut sıcaklığında da gerçekleşebilen hormon üretimi için gerekli değildir (13).

2.1.2. Testis Anatomisi

Funikulus spermatikusa asılı olarak skrotum içine yerleşmiş, sperm üreten bir çift erkek üreme organıdır (Şekil 2.3.) (16).

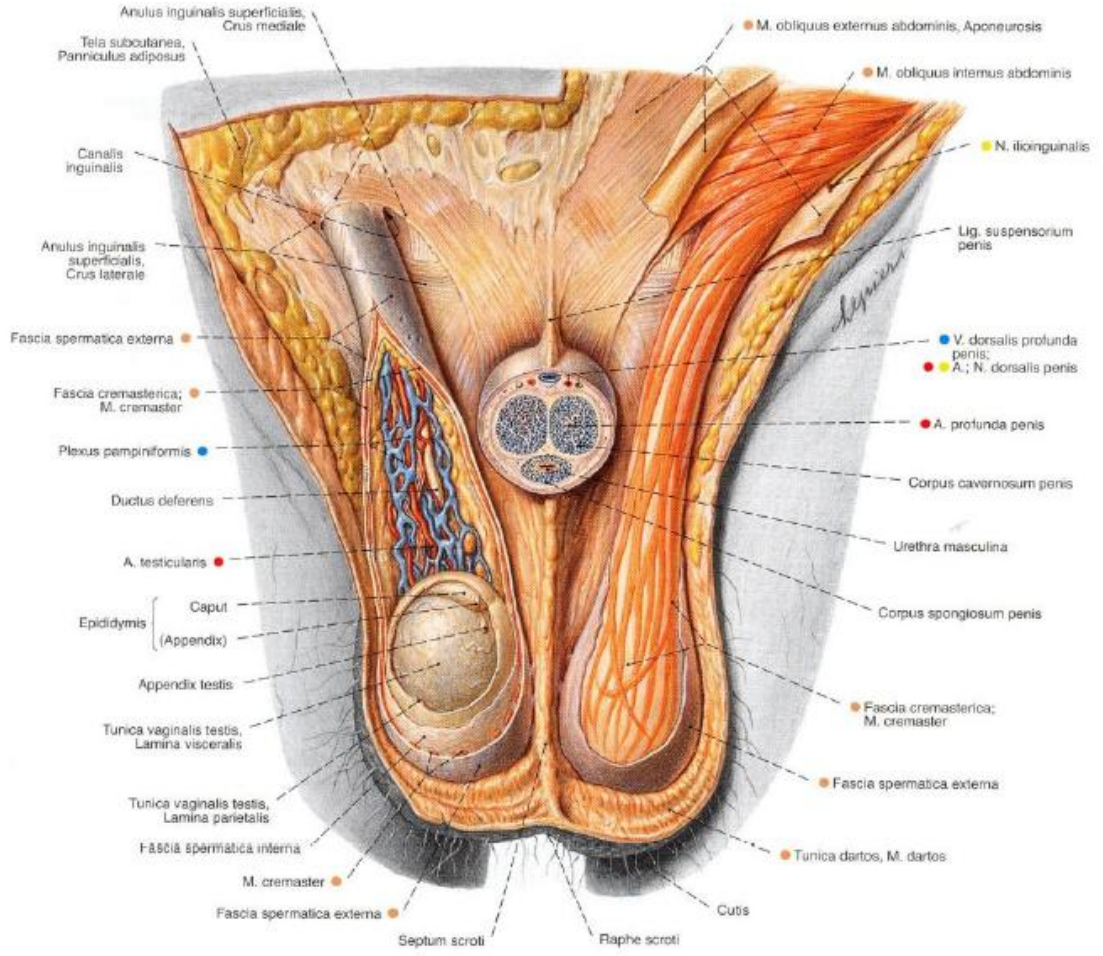
Kıvrımlı bir deri kesesi olan skrotumun iç yüzü septum skroti ile iki ayrı bölüme ayrılır. Testisler bu boşluklarda bulunur. Testisler oval şekilli olup, yetişkinlerde yaklaşık 4-5

cm uzunluğunda, 2,5 cm eninde ve 3 cm kalınlığındadır. Testislerin skrotum içindeki duruşları vertikal olmayıp, organın uzun eksenini yukarıdan aşağı ve önden arkaya eğik, biri (genellikle sol testis) diğerine göre biraz daha aşağı pozisyonundadır. Böylece günlük hareketlerde rahatsızlık verici çarpmalar olmaz (16).

Testisin facies medialis ve facies lateralis olmak üzere iki yüzü; margo anterior ve margo posterior iki kenarı; extremitas superior ve extremitas inferior olarak iki ucu vardır. Margo anterior peritoneum visceralenin uzantısı olan epiorchium ile kaplıdır. Margo posteriorun medial bölümünde corpus epididymis oturur. Margo posteriorun orta kısmında testis damar ve sinirleri ile spermin kanallarının geçtiği mediastinum testis denilen yapı bulunur. Extremitas superior üst uç olup caput epididymise yerleşmiştir. Extremitas inferior testisin alt ucu olup cauda epididymis ile örtülüdür (16).

Tunica albugineanın iç yüzünden ayrılan bağ dokusu uzantıları (septula testis) periferden mediastinum testise doğru uzanır. Septula testisler, testisi 200-300 lobüle (lobülü testis) ayırır. Lobüller piramit şeklinde olup tabanları testis yüzeyine ve tepeleri mediastinum testise doğrudur. Lobuli testislerin parankimini üreme hücrelerini yapan tubuli seminiferi kontorti denilen kanalcıklar oluşturur. Bir testiste 200-300 lobulus ve her bir lobulusta 1-4 arasında değişen sayıda tubulus seminiferi kontorti bulunur. Bu kanalların her birinin uzunluğu 70-80 cm, genişliği ise 0,12 ile 0,3 mm'dir. Toplam sayıları 400-900 arasında değişir.

Tubulus seminiferi kontortiler mediastinum testise doğru yaklaştıkça düzleşir ve birbirleriyle birleşerek sayıları 20-30 arasında değişen tubulus seminiferi rektilleri oluşturur. Bu tüplerin çapları 0,5 mm kadardır. Tubulus seminiferi rektiller mediastinum testisin fibröz dokusuna sokularak yukarı ve arkaya geçerler. Bu kanallar birbirleriyle birleşerek bir ağ meydana getirirler. Bu ağa rete testis denir. Rete testisten çıkarak epididimise uzanan ve sayıları 12-15 arasında değişen kanallara duktuli efferentes testis denir. Duktuli efferentes testisler kaput epididimiste duktus epididymis denilen kanallara açılırlar.



Şekil 2.3. Testis anatomisi (16)

Epididimis spermiumların depo edildiği ve olgunlaştığı bir oluşumdur. Testislerin arka kenarında bulunan epididimis yaklaşık 6 metrelik duktus epididimisin bir araya toplanmasıyla oluşan bir yapıdır. Epididimisin genişlemiş üst kısmına kaput epididimis, orta parçasına korpus epididimis, alt parçasına kauda epididimis denir. Testisten çıkan duktuli efferentes testisler direkt olarak kaput epididimise girerler ve burada duktus epididimise açılırlar. Bu sayede kaput epididimis testise bağlanmış olur. Kauda epididimise yaklaştıkça duktus epididimis çapı artar, kıvrımları azalır. Duktus epididimis kuyruğun ucunda duktus deferens ile devam eder (17).

Duktus deferens kauda epididimisin devamı şeklinde başlar ve duktus ejakulatoriusa kadar uzanır. Yaklaşık 40-50 cm uzunluğunda kalın duvarlı bir borudur. Epididimiste depo edilen spermiumların duktus ejakulatoriusa kadar taşınmasını sağlar. Duktus epididimis kauda epididimisin ucundan itibaren duktus deferens adını alır ve geçtiği

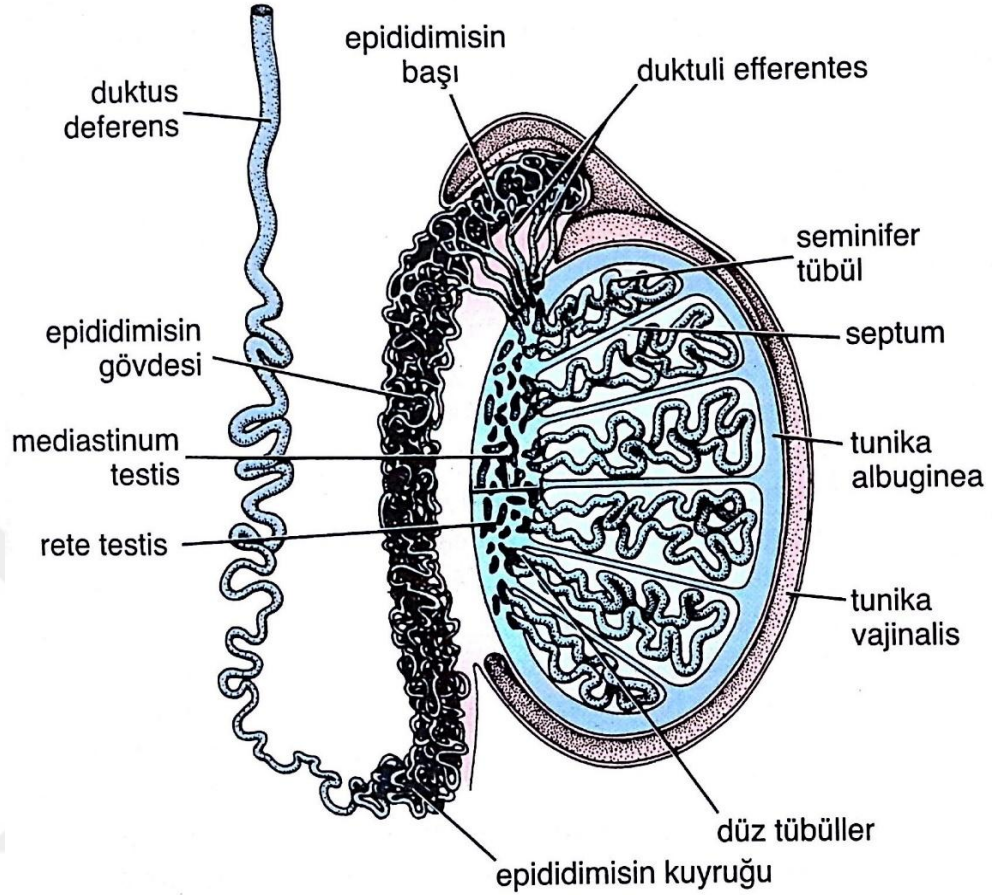
yerlere göre 4 parçaya ayrılır. Duktus deferensin kauda epididimisten itibaren testisin arka kenarı boyunca yükselen kısmına pars epididimika denir. Bu kısım testisin üst ucuna geldiğinde funikulus spermatikusun içerisine katılır ve pars funikulus adını alır. Kanalis inguinalis içerisinde ilerleyen parçasına pars inguinalis denir. İnguinal kanaldan pelvis içerisine girince funikulus spermatikusunu oluşturan diğer yapılardan ayrılır. Dışa ve aşağıya doğru uzanan bu kısmına pars pelvina denir. Pars pelvina pelvis boşluğunun yan duvarında ilerleyerek mesanenin arkasına ulaşır. Burada mesanenin tabanı ile rektum arasında yer alır. Duktus deferensin son bölümü genişler ve ampulla duktus deferentis adını alır. Ampullanın alt ucunda lümen tekrar daralır ve prostatın tabanı yakınında vezikula seminalisin kanalı ile dar bir açı yaparak birleşir ve duktus ejakulatoryusu oluşturur (17).

Testislerin inişi sırasında, birlikte sürükledikleri damarlar, sinirler ve duktus deferens anulus inguinalis profundusta bir araya gelerek funikulus spermatikusunu oluştururlar. Klinikte kısaca kordon denir. Funikulus spermatikus testisleri skrotum içerisinde asılı tutar. Anulus inguinalis profundustan testis arka kenarına kadar uzanır. Sol kordon sağdakinden biraz uzundur. Bu yüzden sol testis biraz daha aşağıdadır. Vezikula seminalisin kanalı ile duktus deferensin ampulla parçasını izleyen son kısım birleştikten sonra prostat içerisine girer ve duktus ejakulatorius adını alır. Uzunluğu 2 cm kadardır.

Bu kanal prostat içerisinde üretraya açılır. Testis aorta abdominalisin bir dalı olan arteria testikularis tarafından beslenir. Testisin venleri önce funikulus spermatikusunu saran, pleksus pampiniformisi meydana getirirler. Daha sonrada birbirleriyle birleşerek vena testikularisi oluştururlar. Sağ vena testikularis vena kava inferiora, sol vena testikularis vena renalis sinistraya açılır (17).

2.1.3. Testis Histolojisi

Testis sıra dışı bir kalınlığa sahip bağ dokusu yapısındaki kapsül olan tunika albuginea tarafından çevrelenmektedir. (Şekil 2.4.). Her bir testis, kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar tarafından yaklaşık 250 lobüle bölünür.



Şekil 2.4. Testis ve üreme yollarının sagittal kesiti (13)

Her bir lobül, yüksek düzeyde kıvrımlı birkaç seminifer tübülden oluşmaktadır. Testisin her bir lobülü, içinde sperm üretilen 1-4 seminifer tübülden ve Leydig (interstisiyel) hücrelerini içeren bağ dokusu yapısındaki stromadan meydana gelmektedir. Seminifer tübüller, tunika propriya tarafından çevrelenmiş bir seminifer epitelden meydana gelmektedir (13).

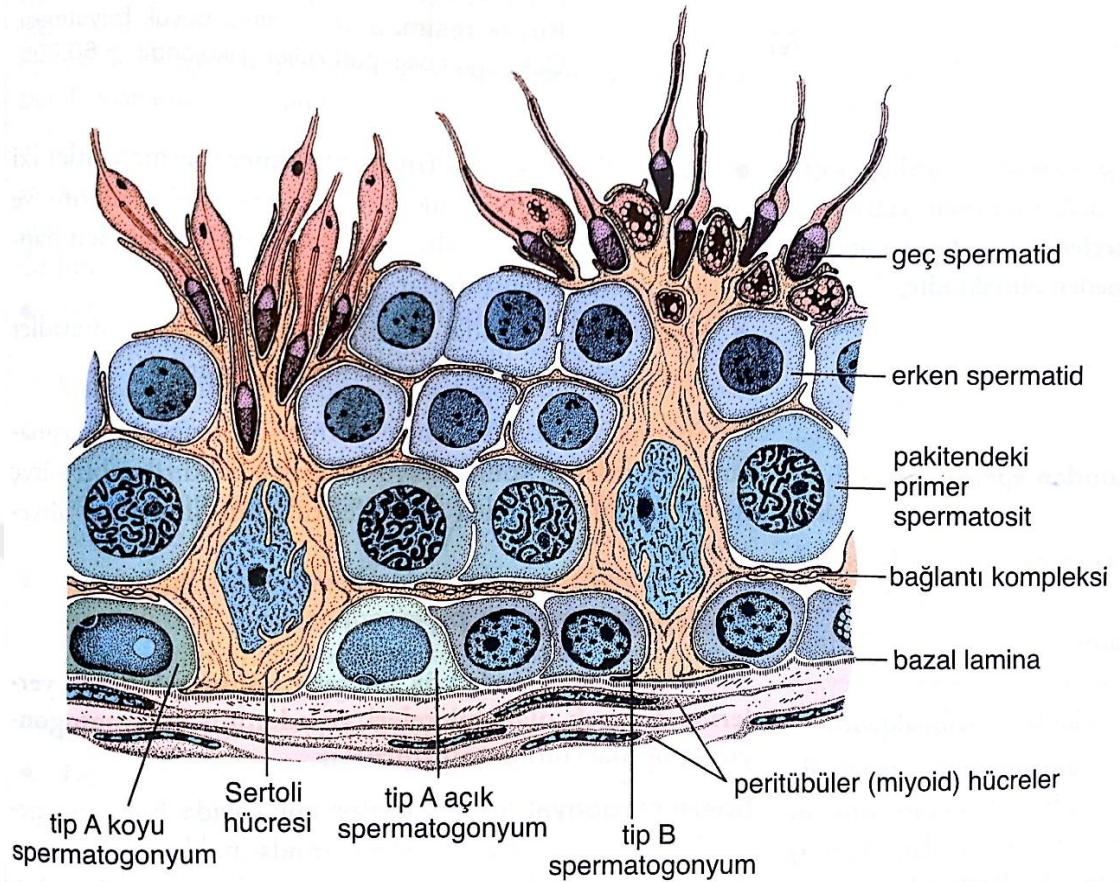
2.1.3.1. Seminifer Tübüller

Seminifer tübüller 30-80 cm uzunluğunda, 150-250 μm kalınlığında kıvrımlı seyreden kanallardır. Tübülleri döşeyen seminifer epitel veya germinal epitel, spermatojenik hücreler ve Sertoli hücreleri olmak üzere iki farklı hücre grubu içeren çok katlı bir epitelidir. Epitel altında yer alan tunika propriya, fibroblast içermeyen tipik birçok tabakalı bağ dokusudur. Bu tabaka insanda seminifer epiteli kuşatan ince bazal membran altında 3-5 sıra miyoid hücre ve kollajen lif tabakası içerir. Bu dokuya

peritübüler doku da denir. Kemiricilerde bu tabaka tek sıra yassı miyoid hücre tabakası şeklindedir. Miyoid hücreler elektron mikroskopik düzeyde düz kas hücrelerine benzer şekilde bazal lamina ile sarılı aktin filamentlerinden zengin hücreler olarak izlenirler. Bu hücrelerin kontraksiyonu tübül lümenindeki olgun spermilerin kanallara iletilmesini sağlar. Bağ dokusunun kollajen lifleri de bu hücreler tarafından sentezlenerek salgılanır. Seminifer epitelde yer alan hücre grubundan biri germ hücreleri olan spermatojenik hücrelerdir. Diğer hücreler ise germ hücrelerine destek olan ve onları besleyen Sertoli hücreleridir. Sertoli hücreleri bazal membrandan tübül lümenine kadar uzanan prizmatik hücrelerdir. Spermatojenik hücreler ise birbiri üzerine sıralanmış farklı gelişim aşamasında olan hücrelerdir. Bunlardan bazal membrana en yakın olanı spermatogonyumlardır. Lümene en yakın bulunan, daha olgun hücreler ise spermatidlerdir. Lümente spermiyumlar izlenir (18).



Şekil 2.5. Testiste seminifer tübüllerin ışık mikroskopik görünümü,
(X20, hematoksilen - eozin)



Şekil 2.6. Seminifer epitelin şematik çizimi (13)

2.1.3.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri, destek hücreleri ya da sustentaküler hücreler olarak da bilinmektedirler. Bu hücreler puberteden sonra çoğalmazlar. Sertoli hücreleri, komşu spermatojenik hücreleri çevreleyen ve onların arasındaki boşlukları dolduran yaygın apikal ve lateral uzantılara sahip prizmatik hücrelerdir. Bununla birlikte, Sertoli hücrelerinin bu karmaşık konfigürasyonu rutin hematoksilen-eozin ile boyalı preparatlarda net olarak gözlenemez. Sertoli hücreleri, seminifer epitelin tüm kalınlığı boyunca uzanarak tübüllere yapısal düzen verirler (13).

Sertoli hücreleri birbirlerine sıra dışı Sertoli hücresi-Sertoli hücresi bağlantı kompleksi aracılığıyla bağlanırlar. Bu kompleks bir bölümünde komşu membranlara 50'den fazla paralel kaynaşma çizgisi içeren oldukça sıkı bir bağlantı (zonula okludens) ile karakterizedir (13).

Sertoli hücresi-Sertoli hücresi bağlantı kompleksi kan-testis bariyeri olarak adlandırılan bir geçirgenlik bariyerini de oluşturmaktadır. Bu bariyer seminifer epitelde iyon, amino asit, karbonhidrat ve protein kompozisyonu bakımından fizyolojik bir kompartmanlaşmanın oluşturulması için gereklidir. Bu nedenle, seminifer tübüllerdeki ve boşaltım kanallarındaki sıvının kompozisyonu testiküler lenften ve kan plazmasından oldukça farklılık göstermektedir. Plazma proteinleri ve dolaşımdaki antikorlar seminifer tübüllerin lümenlerinin dışında tutulur. Kan testis bariyeri, genetik olarak farklı olan ve dolayısıyla antijenik olan haploid germ hücrelerini (sekonder spermatositler, spermatidler ve spermiler) yetişkin erkeğin immün sisteminden izole eder (13).

2.1.3.3. Spermatojenik Hücreler

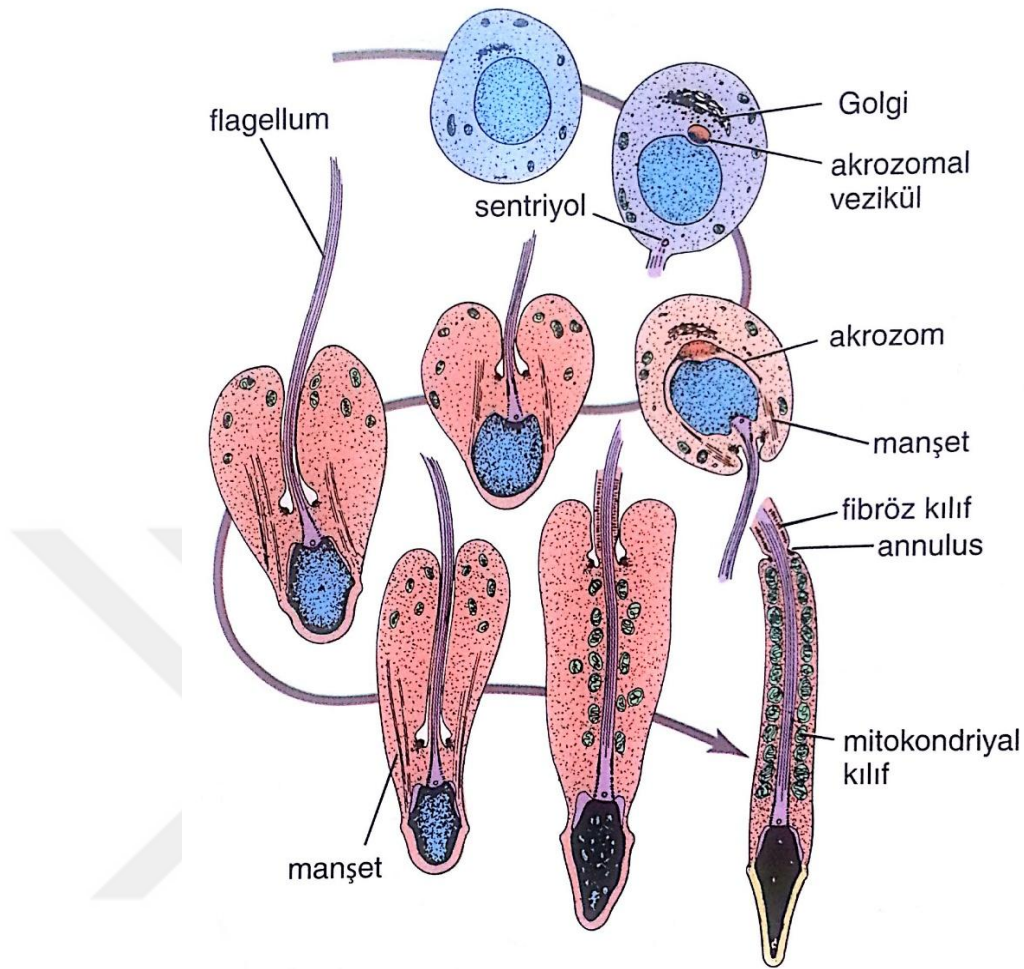
Seminifer tübüllerde, lümen ile bazal lamina arasında yerleşmiş 4-8 hücre katı oluşturan ve gelişmekte olan hücre serileridir. Bunlar çoğalıp farklılaşan ve sonuçta olgun germ hücreleri olan spermatozoonların oluşmasını sağlayan farklı dönemlerdeki hücreleri temsil ederler. Bir kök hücreden farklılaşıp spermatozoon oluşuncaya kadar geçen döneme spermatojenez denir. Spermatojenez; spermatositojenez, mayoz evresi ve spermiyozenez evrelerinden oluşur (12).

2.1.3.4. Spermatositojenez ve Mayoz Evresi

Yeni bir canlının oluşması haploid sayıda kromozoma sahip erkek ve dişi germ hücrelerinin birleşerek diploid sayıda kromozoma sahip zigot oluşumu ile başlar. Haploid germ hücrelerinin oluşması sadece gametlerde gametojenez olarak bilinen mayoz bölünme yolu ile gerçekleşen bir olaydır. Puberteden sonra olgun erkek germ hücrelerinin oluşması spermatojenez olarak bilinir. Spermatojenez, spermatogonyumun bölünüp farklılaşarak sperm oluşturmasıdır. Spermatositojenez spermatogonyumların mitozla bölünerek primer spermatositleri oluşturduğu dönemdir. Spermatositlerin ardı ardına iki bölünme geçirerek kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını yarıya düşürerek spermatidleri oluşturduğu evre mayoz adını alır. Primer spermatosit birinci mayoz bölünmesi ile iki adet sekonder spermatosite bölünür. Bu bölünme ile primer spermatositin diploid kromozom sayısı haploide inmiş olur. Sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesi sonucunda ise spermatidler oluşur.

Bu hücreler haploid kromozom ve DNA içeriğine sahiptirler. Spermatidlerin farklılaşarak hareketli spermatozoonlara dönüşmesine spermiyojenez denir. Bu olay testislerde gerçekleşir. İnsanlarda spermatojenez ve spermiyojenez yaklaşık 9 haftalık bir sürede tamamlanır (18).

Seminifer tübüllerde bazal membranın hemen üzerinde yer alan spermatogonyumlar kök hücrelerdir. Nükleus özelliklerine göre üç tip spermatogonyum tanımlanmıştır. Tip A koyu spermatogonyumlar ince granüler kromatine sahip yoğun bazofilik hücrelerdir. Bu hücrelerin diğer spermatojenik hücreleri oluşturan kök hücreler olduğu düşünülmektedir. Çeşitli aralıklarla bölünerek ya yine bir Tip A koyu spermatogonyum ya da Tip A açık spermatogonyum oluştururlar. Tip A koyu spermatogonyum kök hücre olarak kalırken, Tip A açık spermatogonyum farklılaşıp olgunlaşarak spermiyum haline gelir. Tip A açık spermatogonyumlar ince granüler, açık boyanan nükleusları ile koyu spermatogonyumlardan ayrılırlar. Bu hücreler de pek çok kez mitoz geçirip sayılarını artırırlar. Pek çok bölünmeden sonra Tip A spermatogonyumlar, Tip B spermatogonyumlara farklılaşır. Tip B spermatogonyumlar kromatini nüklear kılıf boyunca ve nükleolus çevresinde kaba kümeler yapan yuvarlak nükleuslu hücrelerdir. Bu hücreler primer spermatositleri oluşturmak üzere bölünmeye giderler. Tip A açık spermatogonyumlar ince sitoplazmik uzantılarıyla birbirine bağlı kalırlar. Bu durum takip eden mitoz ve mayoz bölünmelerde de geçerli olduğundan dolayı, spermatidlerin olgunlaşmalarının son dönemlerine kadar hücreler birbirlerine bağlılıklarını sürdürürler. Tip B spermatogonyumların mitoz bölünmesi sonucunda oluşan primer spermatositler oluşmalarından hemen sonra DNA'larını replike ederek mayoz bölünmeye hazırlanırlar. Her bir primer spermatosit 46 kromozom sayısına ($4n$) ve normalin iki katı DNA'ya ($2d$) sahiptir. Primer spermatositlerden birinci mayoz bölünme ile sekonder spermatositler oluşur. Primer spermatositlere oranla çok daha küçük olan sekonder spermatositler çok geçmeden ikinci mayoz bölünmeye girerler. Bu hücreler DNA sentezlemeden ikinci mayoz bölünmenin profazına girerler ve sonunda spermatidleri oluştururlar. Spermatidler 23 kromozom ($1n$) ve normalin yarısı DNA'ya ($1d$) sahip hücrelerdir. Yuvarlak veya poligonal şekilli, yoğun nükleuslu olan spermatidler, spermiyojenez olarak bilinen bir değişim dönemine girerler (18).



Şekil 2.7. İnsanda spermatojenezin şematik gösterimi (13)

2.1.3.5. Spermiyoenez

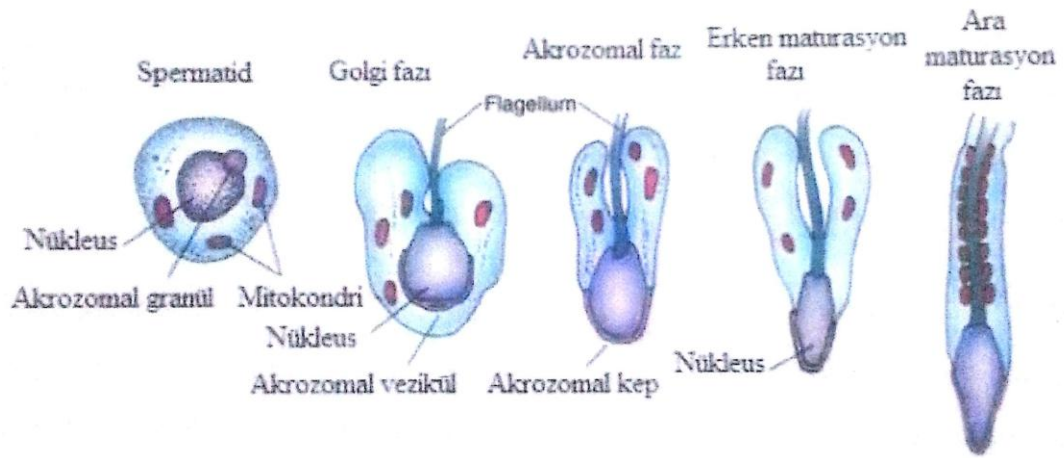
İkinci mayoz bölünmenin sonucunda oluşan her spermatid DNA içeriği olarak haploiddir (1d) ve (1n) olan kromozom sayısı 22 otozom ve bir X ya da Y kromozomu tarafından temsil edilmektedir. Daha fazla bölünme olmaz. Haploid spermatidler, olgun spermi oluşturan bir farklılaşma sürecine uğrarlar. Spermatid popülasyonunun olgun sperme farklılaşması esnasında meydana gelen yoğun yeniden şekillenme (spermiyoenez) dört fazdan oluşmaktadır (13).

Golgi fazı : Bu faz, spermatidin çok sayıdaki Golgi kompleksinde kümelenen periyodik asit-schiff (PAS) pozitif granüllerin bulunması ile karakterizedir.

Kep fazı : Bu fazda akrozomal vezikül, nükleusun ön yarısının üzerinde yayılır.

Akrozom fazı : Bu fazda spermatid kendini yeniden hizalar ve baş, Sertoli hücresinin içerisine iyice gömülür ve bazal laminaya doğru yönelir.

Olgunlaşma (maturasyon) fazı : Spermatidin yeniden modellenmesinin bu son fazında flagellanın etrafındaki fazla sitoplazma azaltılır ve olgun (matür) spermatozoon oluşur (13).



Şekil 2.8. İnsanda spermiyojenezin şematik gösterimi (19)

2.2. LİPİD PEROKSİDASYONU VE MALONDİALDEHİT

Hücre membranında bulunan fosfolipid, glikolipid, gliserid ve poliansatüre yağ asitlerinin serbest oksijen radikalleri tarafından peroksit, alkol, aldehid, hidroksi yağ asitleri, etan ve pentan gibi zararlı ürünlere dönüşmesi lipid peroksidasyonu olarak adlandırılır (20). Lipid peroksidasyonu, başlangıç, zincir gelişimi ve sonlanma olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli oksitleyici bir radikalın zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki α -metilen gruplarından hidrojen atomunu uzaklaştırması ile bağlar ve lipid hidroperoksitlerinin (LOOH) aldehid ve diğer karbonil bileşiklere dönüşmesiyle sona erer. Lipid peroksidasyonu sonucunda oluşan ürünlerden en önemlileri; malondialdehit (MDA) ve 4-hidroksinonenal (4-HNE)'dir (21,22). MDA, linolenik asit ve araşidonik asit gibi üç ya da daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin oksidasyonu ile oluşur ve

tiyobarbitürik asit ile ölçülebilir. Yüksek reaktivitesi ile MDA, hücre içi ve dışındaki protein, nükleik asit gibi birçok biyomoleküle etki eder ve membranlarda çapraz bağlanma ve polimerizasyona neden olarak esneklik kaybı, iyon transportu, enzim aktivitesinde bozukluklar gibi geri dönüşümsüz hasarlara yol açar (21).

2.3. ANTIOKSİDANLAR

Serbest radikaller, üzerinde elektron fazlalığı ya da eksikliği nedeniyle yüklü olan kimyasal olarak aktif atom ya da moleküllerdir. Serbest radikallerin en önemlileri özellikle reaktif tür oksijen içerenlerdir. Bu serbest radikalleri ortadan kaldıran, oksidasyonunu engelleyen ya da oksidasyon reaksiyonun gecikmesine neden olan maddelere antioksidanlar bu olaya da antioksidan savunma denir (23). Antioksidanlar, serbest oksijen radikallerini etkisiz hale getirip, reaksiyonları yavaşlatıp, sonlandırıp ya da serbest oksijen radikallerinin olumsuz etkilerini azaltmaya çalışırlar (21). Antioksidan savunma, radikal metabolit üretiminin önlenmesi, üretilmiş radikallerin temizlenmesi, oluşan hücre hasarının onarılması, sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması ve endojen antioksidan kapasitenin artırılması şeklinde beşe ayrılabilir. Bazı araştırmacılar antioksidan savunmayı enzimatik savunma ve nonenzimatik savunma olarak gruplandırmışlardır. SOD, CAT, GPx ve GST"nin rol aldığı antioksidan aktivitelerini "enzimatik antioksidan savunma", vitamin A, vitamin E, askorbat, glutatyon ve ürik asit gibi maddelerle gerçekleştirilen deoksidasyon işlemlerini ise "nonenzimatik antioksidan savunma" şeklinde adlandırmışlardır (24). Yapılan çalışmalar, antioksidanların serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücrelerin zarar görmesini engellediğini ortaya koymuştur (25).

2.4. KEMOTERAPÖTİK AJANLAR

Hücresinin biyokimyasal sürecini değiştiren ve doğrudan ya da dolaylı olarak hücrenin çoğalmasını engelleyen kemoterapi; normal hücrelere zarar vermeden anormal hücreleri yok etmek, tümör gelişimini baskılamak ya da ağrı/obstrüksiyon gibi belirtileri kontrol altına almak amacı ile neoplastik hastalıkların tedavisinde cerrahi ve radyoterapi ile birlikte ya da tek başına kullanılan bir yöntemdir (26,27).

Kemoterapötik ajanlar çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bunların toksisiteleri ve taşıdıkları minör riskler tedavide gösterdikleri potansiyel yararlılık düşünüldüğünde sıklıkla göz ardı edilir. Çeşitli organ ve sistemlere olan toksisiteleri yanında risklerden biri de üreme çağındaki bireylerin over ve testis hasarına bağlı olarak üreme yeteneklerinin azalmasıdır (infertilite). Özellikle testis hücreleri mitotik, mayotik, morfojenik çeşitli süreçlere girdiklerinden kemoterapötik ajanlar tarafından hedef olarak seçilir, bu yüzden de kolayca hasarlanırlar. Kemoterapötik ajanlar alkilleyiciler, antimetabolitler, mitotik inhibitörler, antibiyotikler, enzimler, hormonlar ve hormon antagonistleri gibi çeşitli kategorilere ayrıldıklarından, bunların genel etki mekanizmalarının benzerliğinden söz etmek doğru olmaz (1).

2.4.1. Sisplatin

CP yapısı bakımından diğer antineoplastik ilaçlara benzemeyen organik platin türevi bir ilaçtır. Hücre siklusuna özgü değildir ve DNA çift zincirinde çapraz bağlanma yapar (1).

CP solid tümörlerin tedavisinde kullanılan önemli bir antineoplastik ilaçtır (28). CP'e ait bulgular ilk olarak 1965 yılında yayınlanmış ve 1968 yılında sarkomlu bir farede intraperitoneal CP uygulaması sonucunda tümör boyutunda belirgin gerileme olduğu gözlenmiştir. İlk kez 1971 yılında kanser hastalarında başarı ile uygulanmaya başlanan ilaç Amerikan Gıda ve İlaç kurumundan (FDA) 1978 yılında onay almıştır (2, 29). CP baş, boyun, akciğer, kolorektal, hematolojik ve over kanserleri gibi katı neoplazilerin tedavisinde dünya çapında kullanılmaktadır (30, 31). CP tedavisinin testiküler fonksiyon üzerindeki etkileri, insan ve diğer hayvan modellerinde kaydedilmiştir (32-34). CP uygulanan hayvanlar, germ hücresi apoptozu, Leydig hücre disfonksiyonu ve kısırlığa neden olan testiküler steroidojenik bozukluk ile karakterize ciddi testis hasarları geliştirir. Spermatojenez, germ hücrelerinin nükleik asit sentezini inhibe ederek CP'den etkilenir (35). CP ayrıca Leydig hücrelerinin hasarıyla testosteron üretimini inhibe eder (36). CP, hücresel DNA molekülleri ile kovalent bağlar oluşturarak, replikasyon ve transkripsiyon gibi hayati süreçleri sona erdirir ve apoptozu indükler (37). CP'in üreme toksisitesine ve germ hücreli apoptozise neden olduğu moleküler mekanizma açıklığa kavuşturulamamaktadır (38, 39). CP'in başlangıç plazma

yarı ömrü 25-49 dakikadır, dağılım sonrası yarı ömrü 58-73 saattir ve esas olarak idrarla vücuttan atılır.

Testis, over, mesane karsinomaları; CP temeline dayanan kemoterapiye duyarlıdır (1). Kemoterapötik ilaç olan CP, kaşeksi ve testis hasarı dahil, doza bağımlı olarak bir dizi yan etkiye neden olur (3). Nefrotoksisite, nörotoksisite, gastrointestinal irritabilite gibi yan etkilerinin yanında azospermi, oligospermi ve infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (1). CP yüksek kümülatif doz alan hastalarda kalıcı azospermi ve sonrasında infertilite geliştirebilir (3).

Son derece etkili bir antineoplastik DNA alkilleme maddesi olan Cis-diamminodichloroplatinum veya CP; testis, yumurtalık, meme, akciğer, mesane ile baş ve boyun dahil olmak üzere çok çeşitli solid tümörleri tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ancak, testis toksisitesi gibi olumsuz yan etkileri, kullanımını sınırlandırmaktadır (4). Tedavi esnasında oluşan serbest oksijen radikalleri, sıklıkla hücre membranındaki lipid komponentlerine etki ederek lipid peroksidasyonuna sebep olmaktadır (40). Ayrıca, protein sentezinde azalmaya sebep olduğu, hücre bileşenleriyle reaksiyona girerek hücrenin asli görevlerini yapmasını engellediği ve DNA'yı bloke eden organik peroksitlerin oluşmasına sebep olduğu bilinmektedir (41). Serbest radikaller mitokondrilerin fonksiyonunda bozukluklara da sebep olmaktadır (42). Yapılan çalışmalarda CP'nin, lipid peroksidasyonuna, bazı enzim aktivitelerinde değişikliklere ve kromozom anomalilerine neden olduğu belirtilmiştir (40, 43-47).

CP, DNA ile etkileşerek, zincir içi ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur. Bu bağların ortaya çıkışı ise DNA transkripsiyon ve replikasyonunu inhibe eder. CP'in modifiye ettiği DNA, yeterince yenilenemediğinden, ortaya çıkan DNA hasarı apoptozisi başlatır. Bu hasar onarılamayacak boyutta ise, hücre tarafından tolere edilemez ve hücre ölümüne neden olur. CP'in testis dokusu için oldukça toksik olduğu ve apoptozis'i indüklediği ve histolojik yapıyı bozduğu gösterilmiştir (5). CP tümör büyümesi için gerekli olan neovaskülarizasyonu baskılar ve mitokondriyal enzim aktivitesini bozar. Seminifer tübüllerde CP uygulamasından sonra yaygın hasar ortaya çıkar. Hem insan hem de hayvan modellerinde kanser tedavilerinde benzer dozlarda kullanılan CP, sperm sayısı ve motilitesi ile spermin kromatin kalitesinde azalmaya neden olur (3).

CP'e bağı testiküler hasar direkt olarak spermatojenik hücreler ve Sertoli hücreleri üzerinde ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda Leydig hücrelerinde de fonksiyon bozukluğu yaratmaktadır. CP uygulanan sıçanlarda sperm üretiminin, seminifer tübül çapının ve intratestiküler testosteron'un azaldığı ve seminifer tübülde TUNEL pozitif hücrelerde artış olduğu belirtilmiştir (2).

CP, gerek süperoksit iyonları gerekse hidroksil radikalleri gibi aktif oksijen türlerini üretebilir, normal dokudaki antioksidan enzimleri inhibe edebilir. Bu nedenle, normal dokulara zarar vermemek şartıyla, antitümöral etkinliği olmaksızın, ilaçların meydana getirdiği hasarı azaltmak amacıyla çok sayıda koruyucu ajan antitümöral ilaçlarla birlikte kullanılmaktadır (48).

2.5. KAFEİK ASİT FENETİL ESTER

Bitkilerin büyük bir bölümü, yapraklarını, çiçeklerini ve meyvelerini, antimikrobik çürümeye karşı ürettikleri, su geçirmez ve ısı yalıtımı özellikleri olan reçinemsı maddelerle korurlar. Bal arıları bu reçinemsı maddeleri ağaçların gövdelerindeki çatlaklardan, tomurcuklardan ve yapraklardan toplarlar. Arıların çiğneyip, ağız sindirim enzimlerini ekleyerek ve kısmen de sindirerek, balmumu ile karıştırdıkları propolis adı verilen bu yapışkan madde, kovanda çeşitli amaçlar için kullanılır (6).

Scheller (1990) çalışmasında; propolisin bileşiminde, reçine, mumlu bitkiler, esansiyel yağlar, polen, organik maddeler ve mineraller bulunduğunu bildirmiştir (7). Schmit (1997), propolisin kimyasal bileşenleri ve bunların biyolojik aktiviteleri ile ilgili çalışma yapmıştır (7). Propolisin en temel bileşenleri fenolik bileşikler olup bunların içinde en fazla tespit edilen bileşik flavanoidler'dir (Scheller 1990). Şahinler ve Kaftanoğlu (2005) yaptıkları çalışmada; propolisin etanol ile ekstraktında yüksek konsantrasyonlarda aromatik asitler, esterler ve diğer türevleri gibi propolisin antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiinflamatuvar ve antikanser özelliğinden sorumlu benzyl sinamat, metil sinamat, kafeik asit, sinnamyl sinamat ve sinnamoylgicine gibi en yaygın bileşiklerin yanında yağ asidi, terpenoidler, esterler, alkoller, hidrokarbonlar ve aromatik asitler de tespit etmişlerdir (49). Ayrıca propoliste magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), iyot (I), potasyum (K), sodyum (Na), bakır (Cu),

çinko (Zn), manganez (Mn) ve demir (Fe) gibi mineraller; A, B1, B2, B6, C ve E vitaminleri ile çok sayıda yağ asidi tanımlanmıştır. Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanmış propolislerin ana bileşenlerinin naringenin, galangin, krisin, pinobanksin, kuarsetin gibi flavonoidler ve kafeik asit gibi fenolik asitler içerdiği rapor edilmiştir (50).

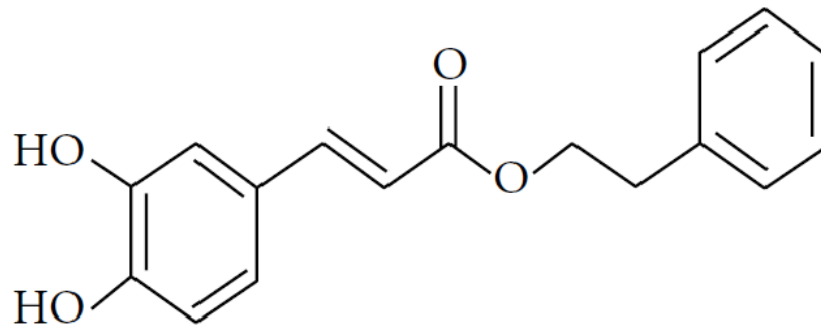
Tablo 2.1. Propolisin bileşimi ve bilinen farmakolojik aktiviteleri

Kimyasal (Chemical)	Aktivite (Activities)	Kaynaklar (References)
Quercetin	Antiviral Antihistaminik Ülsere karşı Kılcal damarları güçlendirici	Konig ve Dustman, (1985) Budavari, (1989)
Pinocembrin	Antibakteriyel Antifungal Küflenmeyi önleyici Lokal anestezi	Vilanueva ve ark., (1970) Metzner ve ark., (1977) Miyakodom ve ark., (1976) Pointz ve Metzner, (1979)
Kaffeik asit	Antibakteriyel Antifungal Antiviral Anti inflamatuvar	Vilanueva ve ark., (1970) Metzner ve ark., (1979) Koing ve Dustman, (1985) Bankova ve ark., (1983)
Kafeik asit fenetilester	Tumor sitotoksik	Grunberg ve ark., (1980)

Kaynak : Arıcılık Araştırma Dergisi (2012) (49)

CAPE, arıların bitkilerden topladığı özütün içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir ve bir halk ilacı olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (7, 51). Propolisin antimikrobik, antiinflamatuvar, immunomodülatör, antimutajenik, antioksidan ve antikarsinojenik etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu etkilerin çoğunun propolisin etken maddelerinden biri olan CAPE'ye bağlı olduğu gösterilmiştir (8, 9). 10 µmol konsantrasyonda in vitro koşullarda nötrofiller veya ksantin/ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan reaktif oksijen türlerini tamamen bloke eder (52). Yapılan çalışmalarda, CAPE'in antiinflamatuvar, antifungal ve antimikrobik (53), immünomodülatör (54), antimutajenik (55) ve antioksidan (56, 57) özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir.

CAPE'in kimyasal adı 2-feniletil (2E) -3- (3,4-dihidroksifenil) akrilattır. Ayrıca feniletil kafeinat veya fenetil kafeinat olarak da adlandırılır. Moleküler formülü $C_{17}H_{16}O_4$ 'tür (58). CAPE'in kimyasal yapısı Şekil 1'de verilmektedir. Grunberger ve ark. bu hidrofobik polifenolü tanımladılar (59). Bu polifenolik ester ayrıca kafeik asitin fenetil alkollerle reaksiyona sokulması ile sentezlenebilir (60-62). CAPE, birçok biyolojik aktivitede önemli rolünden sorumlu olan katekol halkasında hidroksil grupları olan bir polifenoldür (63).



Şekil 2.9. Kafeik asit fenetil esterinin kimyasal yapısı (64)

Yapılan bir çalışmada sıçanlarda CAPE'in CP nefrotoksitesini önleme potansiyeli olduğu da gösterilmiştir (10). CAPE'nin, CP'nin neden olduğu antioksidan enzim azalmalarına karşı koruyucu olduğu bulunmuştur. Serbest radikal süpürücü CAPE ile tedavi; plazmadaki kan üresi, nitrojen ve böbrek nitrik oksit düzeylerinde artışı zayıflatmış ve CP'ye bağlı akut böbrek yetmezliğine karşı histopatolojik koruma göstermiştir. CP ile tedavi edilmiş farelerin böbreklerinde geniş epitel hücre vakuolizasyonu, şişme, soyulma ve nekroz gözlenmiştir (65).

CAPE'in farmakolojik olarak güvenli bir bileşik olduğu gibi aynı zamanda lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan enzim aktivitesini uyardığı gösterilmiştir (11). Buna ek olarak, CAPE'in transforme olmuş hücrelerin farklı tiplerinin büyümesini engellediği de gösterilmiştir. CAPE'in bilinen antioksidan, serbest radikal süpürücü etkileri ile hücre savunma mekanizmalarını restore edebileceği ve böylelikle lipid peroksidasyonunu engelleyebileceği ve bu şekilde geniş bir yelpazeye sahip olan nefrotoksik ajanların toksik etkilerine karşı böbreği koruyabileceği öngörülmüştür (66). CAPE kullanımı serbest radikal oluşumunu baskılar ve böylece kemoterapiye bağlı

toksisiteler azaltılır (67). CAPE'in, terapötik etkinliği arttırmak ve kemoterapinin neden olduğu toksisiteleri azaltmak için kemoterapinin etkili bir adjuvanı olduğu bilinmektedir. CAPE lipid peroksidasyon aktivitesini, lipoksijenaz aktivitelerini, protein tirozin kinaz aktivitesini ve ornitin dekarboksilaz aktivitesini baskılar (68-71).

CAPE aynı zamanda tümör oluşumunu da önleyebilmiştir (7). Kemoterapide, CAPE' in intestinal karsinogenezi baskıladığı, CAPE türevli bileşiklerin oral kansere karşı potansiyel ajanlar oldukları gösterilmiştir (72,73). CAPE'in, normal hücrelere karşı sitotoksositeye neden olmayan antitümör özellikleri oluşturduğu da bildirilmiştir (74,75).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Deneysel ve Klinik Araştırma Merkezinde (DEKAM) yetiştirilen ortalama 60 günlük sıçanlar kullanıldı. Sıçanlar araştırma süresince 19-21 °C sabit sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık dönemlerin bulunduğu, özel hazırlanmış otomatik olarak klimatize edilen odalarda korundu. Sıçanlar normal pellet cinsi yem ve su ile beslenildi. Her kafeste 3-5 adet sıçan barındırıldı. Deney aşamasına kadar mümkün olduğu kadar stressiz ortamda barınmaları sağlanmıştır. Deneye başlamadan önce hayvanların ağırlıkları ölçüldü ve ağırlıkları birbirine yakın olacak şekilde kontrol grubunda 8 adet ve deney gruplarında 10'ar adet sıçan bulunacak şekilde gruplandırılmıştır.

Grup 1 : Kontrol

Grup 2 : CP (7 mg/kg) Tek doz

Grup 3 : CP (7 mg/kg) Tek doz + CAPE (10 µmol/kg/gün) 12 gün

Grup 4 : CAPE (10 µmol/kg/gün) 12 gün

3.1. Deneysel Prosedür

Tüm prosedürler etik kurallara uygun olacak şekilde gerçekleştirildi. Grup 1'e (kontrol grubu) deney boyunca (1ml/kg/gün) izotonik salin (SF) solüsyonu intraperitoneal (i.p.), Grup 2'ye deneyin 7. günü Koçak marka CP (7 mg/kg) tek doz olarak i.p. olarak verildi. Grup 3'e deneyin başlangıcından itibaren 12 gün boyunca Sigma marka CAPE (10 µmol/kg/gün) i.p. olarak ve 7. günde CP (7 mg/kg) tek doz i.p. olarak uygulandı. Grup 4'e ise deneyin başlangıcından itibaren 12 gün boyunca CAPE (10 µmol/kg/gün) i.p. olarak verildi.

Deneyin 13. gününde sıçanlar xylazin ve ketamin anestezisi altında dekapite edilerek testis dokusu ve duktus epididimisten sperm örnekleri alındı.

3.1.1. Doku Takibi

Deneklerden elde edilen testisler %10'luk formaldehitte tespit edildikten sonra artan alkol serilerinden geçirilip, ksilende şaffaflaştırma işleminden sonra parafin bloklara gömüldü. Yapılan bu işlemler Tablo 3.1 de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Işık mikroskobu doku hazırlama tekniği

Sıra	İşlem	Süre	Sıra	İşlem	Süre
1	Formaldehit	48 saat	8	Absolü Alkol	1 saat
2	Akarsu	2 saat	9	Absolü Alkol	2 saat
3	%50 Alkol	1 saat	10	Ksilen 1	30 dakika
4	%70 Alkol	1 gece	11	Ksilen 2	30 dakika
5	%80 Alkol	1 saat	12	Ksilen 3	30 dakika
6	%96 Alkol	1 saat	13	Eriyik parafin	1 gece
7	Absolü Alkol	1 saat	14	Bloklama	

3.1.2. Hematoksilen - Eozin Boyama

Parafin bloklardan alınan 5-6 µm'lik kesitler Elips firmasından temin edilen İsolab marka lamlara yayıldı. Hazırlanan lamlar standart histolojik yöntemler kullanılarak ksilol ile parafini uzaklaştırıldı ve dereceli alkol serilerinden geçirilip sulandırıldı. Genel histolojik yapıyı görmek amacıyla kesitler Nanotek Lab. firmasından temin edilen Merck marka hematoksilen-eozin (H&E) (Tablo 3.2) ile boyanarak önce artan alkol serilerinden daha sonra ksilenden geçirilerek incelendi.

Tablo 3.2. Hematoksilen - Eozin boyama tekniği

Sıra	Yapılan İşlem	Süre	Sıra	Yapılan İşlem	Süre
1	Etüv (60 °C)	2 saat	13	Akarsu	5 dakika
2	Ksilen	20 dakika	14	Eozin	5 dakika
3	Ksilen	20 dakika	15	Akarsu	5 dakika
4	Ksilen	20 dakika	16	% 50 Alkol	1 dakika
5	Absolu Alkol 1	10 dakika	17	%70 Alkol	1 dakika
6	Absolu Alkol 2	10 dakika	18	%80 Alkol	1 dakika
7	%96 Alkol	10 dakika	19	%96 Alkol	1 dakika
8	%80 Alkol	10 dakika	20	Absolu Alkol 1	1 dakika
9	%70 Alkol	10 dakika	21	Absolu Alkol 2	2 dakika
10	%50 Alkol	10 dakika	22	Ksilen 1	20 dakika
11	Akarsu	5 dakika	23	Ksilen 2	20 dakika
12	Hematoksilen	8 dakika	24	Kapatma	

3.1.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru (JTBS)

Bu skorlamaya göre, hasarlanmaya neden olan herhangi bir olay sonrasında, testis içinde yer alan tübüllerin içindeki hücrelerin dağılımı belli bir sıra takip ederek progresif bir şekilde kaybolur. Tübüllerdeki bu hasarlanmanın derecesinin değerlendirilmesinde JTBS kullanıldı (Tablo 3.4). Histolojik incelemelerin sonuçları Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında iki uzman histolog tarafından değerlendirildi. Değerlendirme her gruptan rastgele seçilmiş 10 farklı preparattan 20'şer farklı tübül, 20'lik objektifteki farklı alanlar incelenerek yapıldı. Her grup için ayrı ayrı 200 adet tübül değerlendirilerek ortalama JTBS hesaplandı. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalar için SPSS paket programı kullanıldı. Elde edilen veriler önceden hazırlanan bir forma işlendi. Değerlendirme ölçütleri şöyleydi.

Tablo 3.3. Johnsen Testiküler Biyopsi Skorlaması

Skor	Histolojik Bulgular	Skor	Histolojik Bulgular
1	Tübüler kesitte hiç hücre yoktur	6	Az sayıda (5/ tübül) spermatid mevcuttur
2	Sadece Sertoli hücreleri vardır	7	Farklanma işareti olmaksızın fazla sayıda spermatid vardır
3	Germ hücreleri olarak sadece spermatogonyumlar vardır	8	Olgun spermatozoa olmaksızın geç spermatidler mevcuttur
4	Az sayıda (5/ tübül) spermatosit mevcuttur	9	Az sayıda (5/ tübül) spermatozoa vardır
5	Fazla sayıda spermatosit vardır	10	Fazla sayıda spermatozoanın görüldüğü tam spermatojenez mevcuttur

3.1.4. Biyokimyasal Analizler

3.1.4.1. Malondialdehit (MDA) düzey tayini

Molgen Biyoteknoloji Lab.'dan temin edilen YH Biosearch Laboratory firmasının ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı [Rat malondialdehide (MDA) ELISA Kit Cat No:YHB0708Ra]. Doku örneklerinin sonuçları nmol/mg protein olarak, serum örneklerinin sonuçları ise, nmol/ml olarak verildi.

3.1.4.2. Süperoksit dismütaz (SOD) aktivite tayini

Molgen Biyoteknoloji Lab.'dan temin edilen YH Biosearch Laboratory firmasının ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı [Rat Super Oxidase Dimutase (SOD) ELISA Kit Cat No:YHB1021Ra]. Doku örneklerinin sonuçları ng/mg protein olarak, serum örneklerinin sonuçları ise, ng/ml olarak verildi.

3.1.4.3. Katalaz (CAT) aktivite tayini

Molgen Biyoteknoloji Lab.'dan temin edilen YH Biosearch Laboratory firmasının ticari kiti kullanılarak Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışıldı [Rat Catalase (CAT) ELISA Kit Cat No:YHB0207Ra]. Doku örneklerinin sonuçları ng/mg protein olarak, serum örneklerinin sonuçları ise, ng/ml olarak verildi.

3.1.5. Comet Assay Tekniği

Duktus epididimisten alınan spermiler 4 °C de 10 dakika 300 g de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan sperm örnekleri Bioshop marka PBS (Ca⁺² ve Mg⁺² free) ile yıkandı. Spermde DNA hasarı yüksek alkali şartlarda tek hücre jel elektroforez (comet) kullanılarak araştırıldı. Kısaca, her bir mikroskop lamı PBS de hazırlanmış Elips Firmasından temin edilen Prona marka % 1 lik normal erime noktalı agarozla kaplandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra, ilk katın üstüne 37 °C'de % 0,7 lik düşük erime noktalı agarozun 100 µl ile 10 µl hücre süspansiyonu karıştırıldı ve birinci katın üzerine yayıldı. Lamalar 4°C'de buz aküsünün üzerinde 5 dk katılaşmaya bırakıldı. Lameller lamlardan kaldırıldı, taze hazırlanmış soğuk lizis çözeltisinde (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, %1 Triton X-100, %10 DMSO ve 40 mM dithiothreitol, pH:10) 1 saat 4 °C'de lize edildi. Daha sonra lizis çözeltisine 100 µg/ml proteinase K (Sigma®) eklenerek, lamalar 37°C'de bir gece inkübe edildi. Lamalar lizis çözeltisinden alındı, yatay elektroforez tankı taze hazırlanmış elektroforez tamponu (300 mM NaOH ve 1 mM EDTA, pH: 13) ile dolduruldu ve lamalar yerleştirildi, DNA sarmalının çözülmesi için 20 dakika bekletildi. 8°C'da 12 V-250 mA' de 20 dakika elektroforez uygulandı. Daha sonra lamalar alkali iyon ve deterjanların uzaklaştırılması için nötralizasyon çözeltisi (0,4 M Tris, pH 7,5) ile yıkandı. Nötralizasyondan sonra 50 µl ethidium bromide (1 µg/ml) ile boyandı ve lamelle kapatıldı. Bütün işlemler DNA hasarını önlemek için karanlıkta uygulandı. Görüntüler floresan mikroskop (Olympus, BX51, Japan) kullanılarak 400X büyütmeyle çekildi. Rastgele seçilmiş 50 hücre görüntüsü Comet Assay Software Project (CASP-1.2.2, Windows 2010) ile analiz edildi. Hasar tayini sperm başından geç etmiş, comete neden olan kırılmış DNA kuyruğundan belirlendi, kuyruklu hasarlı, kuyruksuz hasar görmemiş olarak düşünüldü.

3.1.6. İstatistiksel Analiz

Verilerin analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 21. 0) paket programında yapıldı. Tanımlayıcı istatistikler ortalama \pm standart sapma ya da ortanca (en küçük–en büyük) olarak gösterildi. Gruplar arasında ortalamalar bakımından farkın önemliliği One-Way ANOVA (Tek Yönlü Varyans Analizi) ile ortanca değerler bakımından farkın önemliliği ise Kruskal Wallis testi ile araştırıldı. Tek Yönlü Varyans Analizi ya da Kruskal Wallis test istatistiği sonucunun önemli bulunması durumunda post hoc Tukey HSD ya da Conover'in çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden olan durumlar tespit edildi. İstatistiksel olarak anlamlılık sınırı $p < 0,05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda i.p. olarak CP ve CAPE uygulanan sıçanların testisleri ışık mikroskopunda incelenerek değerlendirildi. Testis dokularında JTBS; MDA, CAT ve SOD enzim aktivite tayini için ELISA tekniği, sperm DNA hasarının saptanması için Comet Assay tekniği uygulandı ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Tubuller histopatolojik olarak değerlendirildi.

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

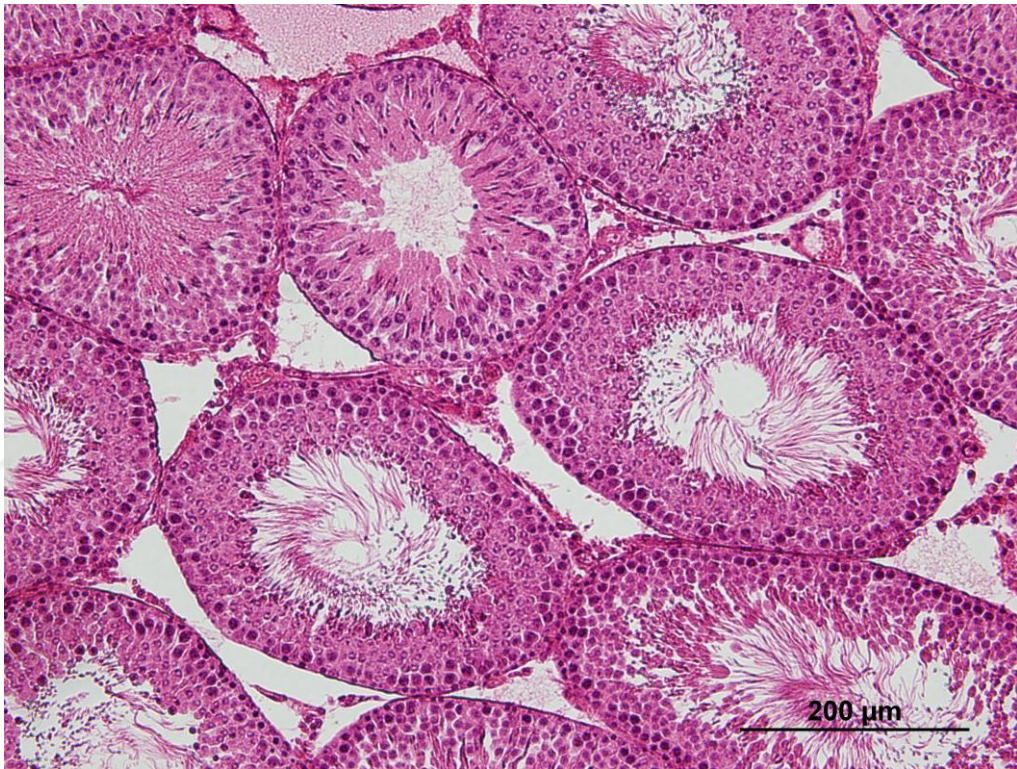
Kontrol grubuna ait testis dokusu kesitlerinde normale yakın tubul kesitleri görülmektedir (Şekil 4.1.).

CP uygulanan grupta lümene yakın alanlarda intersellüler boşluklar ve yer yer hücre kayıpları vardır. Bazı alanlarda bazal membran kayıpları gözlemlendi. Kesitlerde tubuli seminiferi kontortillerin bazal membran bozulmaları ileri düzeyde gözlemlendi. Spermatojenik hücre serilerinde primer ve sekonder spermatositlerin hasar derecesi giderek artan şekilde gözlemlendi. Bununla birlikte lümendeki hücreler çekirdekleri ile belirgin izlendi ancak kuyruk yapıları yoktu. İnterstisyel alandaki Leydig hücreleri kısmen hasarlanmış olarak izlendi. Spermatogonyum A ve B hücreleri ile spermatid ve spermatozon hücreleri birbirlerinden ayırt edilemiyordu. Spermatid seri hücrelerine ait olması gereken hücre safhalarında interstisyel ödem ve hücrel boşluklar gözlemlendi (Şekil 4.2. ve Şekil 4.3.).

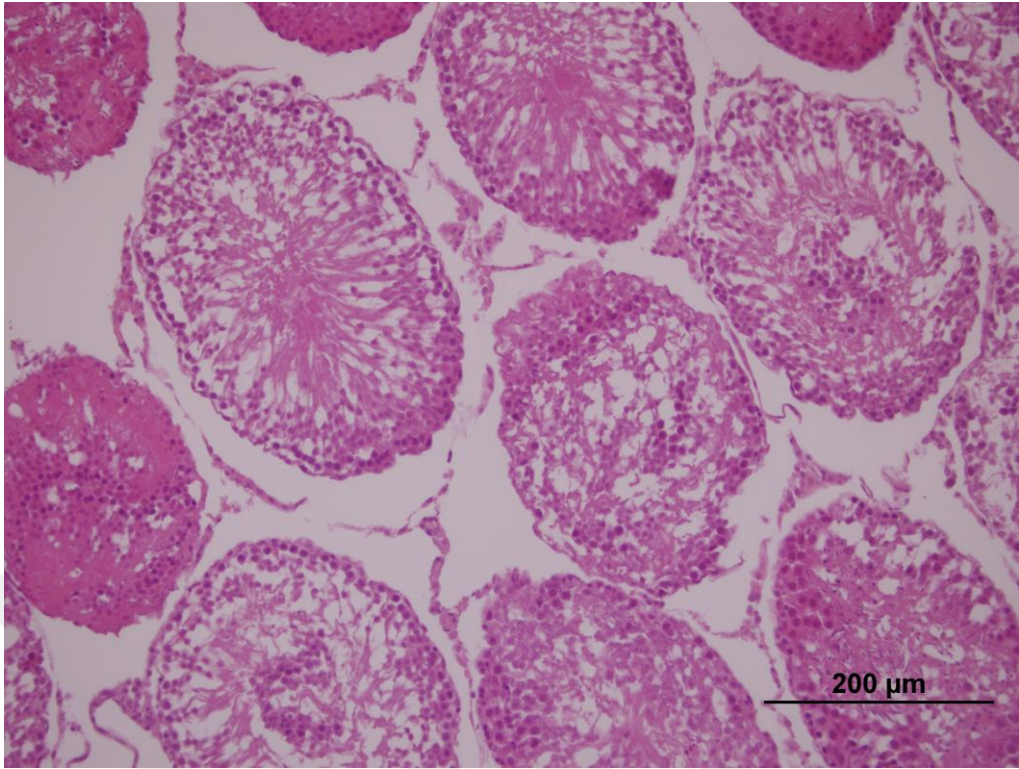
CP ve CAPE'nin birlikte uygulandığı grupta tubuller normale yakın olarak gözlemlendi. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinde sayıca ve morfolojik olarak düzelme işaretleri izlendi. Kesitlerde izlenen tubuli seminiferi kontortiller normale oldukça yakındı. Sertoli hücrelerinde düzelme belirgin olarak gözlemlendi. Spermatojenik seri hücreleri belirgin

şekilde normale yakındı. Bazal membran düzgün olarak gözlemlendi. Fibromusküler dokudaki hücreler normal olarak izlendi (Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.).

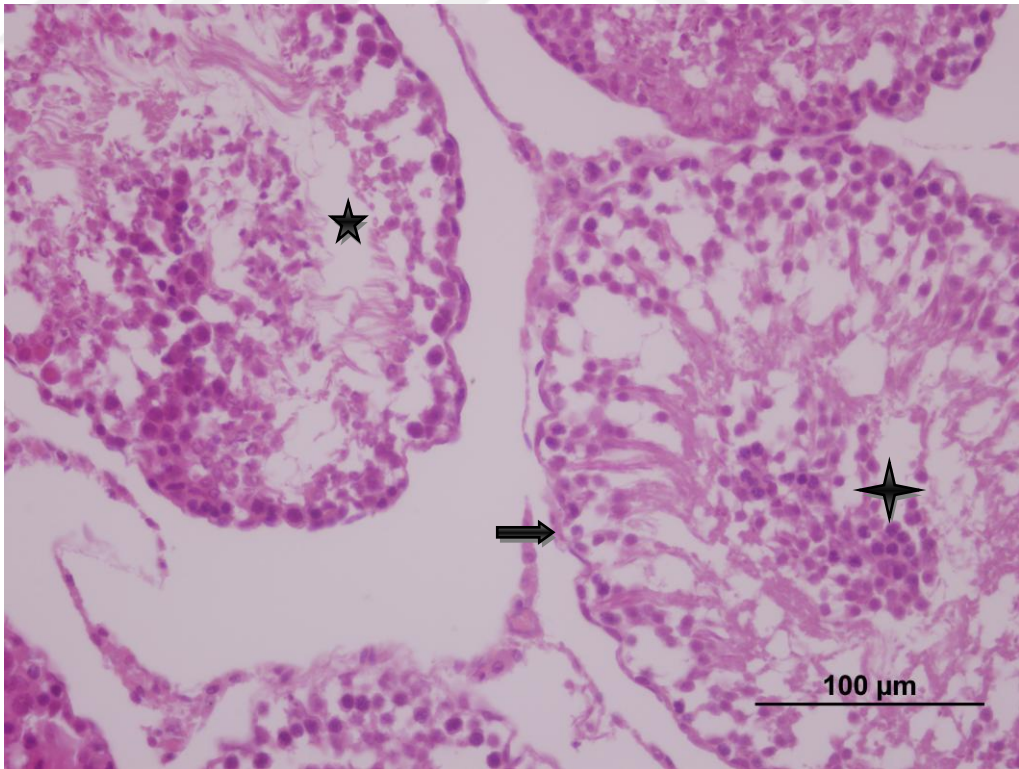
CAPE uygulanan grupta normal tubul kesitleri görülmekle birlikte hasarlı tubuller de izlendi. Tubullerdeki hasar daha çok tüm seri hücrelerinde kopukluk şeklindeydi. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinde sayıca nispeten azalma ve hasarlanma olduğu gözlemlendi. Sertoli hücrelerinde de nispeten hasarlanma gözlemlendi (Şekil 4.6.).



Şekil 4.1. Kontrol grubuna (Grup 1) ait testis dokusu. H&E boyama x20

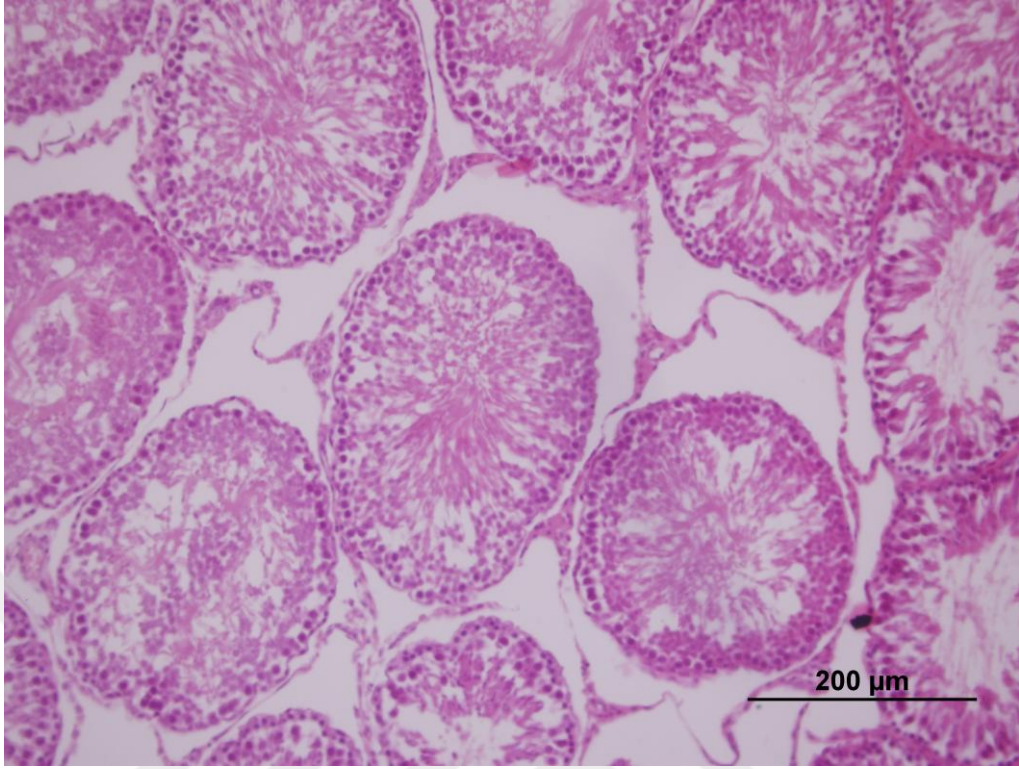


Şekil 4.2. CP grubuna (Grup 2) ait testis dokusu. H&E boyama x20 (1)

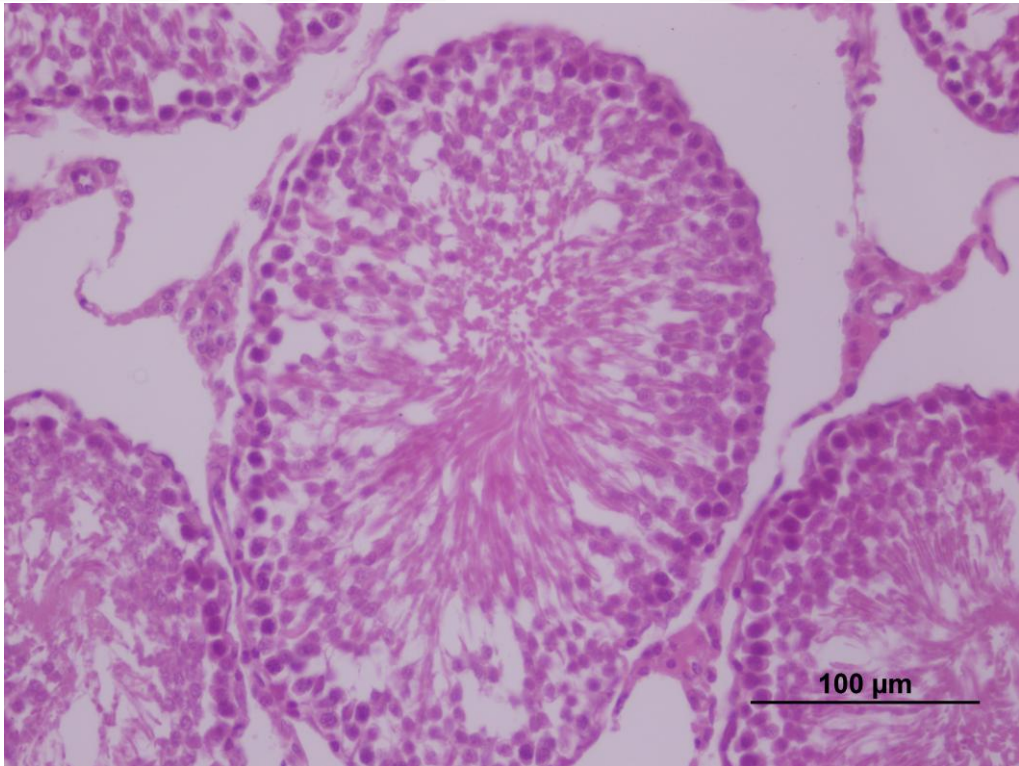


Şekil 4.3. CP grubuna (Grup 2) ait testis dokusu. H&E boyama x40 (2)

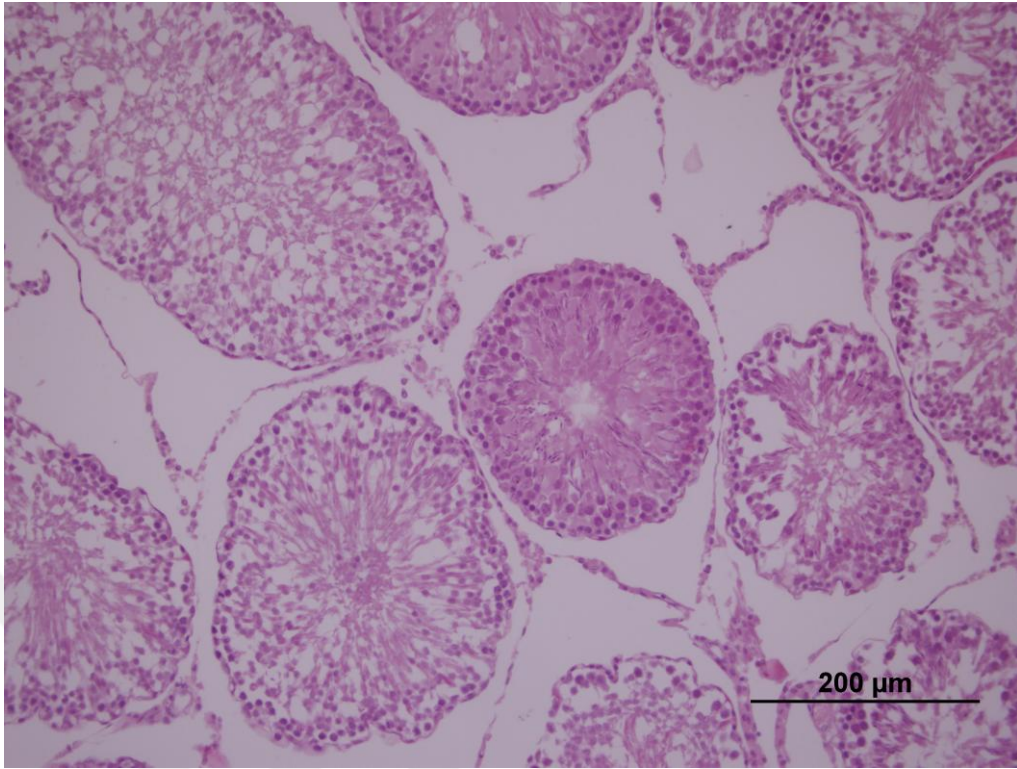
- ★ İntersitisiyel ödemi göstermektedir
- ⇒ Bazal membran kaybını göstermektedir
- ✦ Lümendeki kuyruksuz spermatozoonları göstermektedir



Şekil 4.4. CP + CAPE grubuna (Grup 3) ait testis dokusu. H&E boyama x20 (1)



Şekil 4.5. CP + CAPE grubuna (Grup 3) ait testis dokusu. H&E boyama x40 (2)



Şekil 4.6. CAPE grubuna (Grup 2) ait testis dokusu. H&E boyama x20

4.2. Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru Sonuçları

JTBS sonuçları Tablo 4.1.'de gösterilmiştir. Seminifer tubullerdeki germinal epitelin değerlendirildiği JTBS sonuçlarına göre CP uygulanan grupta biyopsi skoru kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış olarak belirlendi ($p<0,001$). CP ile birlikte CAPE verilen gruptaki biyopsi skoru sadece CP uygulanan gruba göre sayısal olarak artış göstermiştir ve bu artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,001$). Yalnızca CAPE uygulanan grupta ise biyopsi skoru kontrol grubuna göre azalmış olarak belirlendi. Ancak bu azalma CP grubunda olduğu kadar olmasada istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$).

Tablo 4.1. JTBS sonuçları. Değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

	Johnsen Testiküler Biyopsi Skoru
Grup 1 (n=8)	8,12 \pm 0,647
Grup 2 (n=10)	4,979 \pm 0,983*
Grup 3 (n=10)	6,483 \pm 0,656**
Grup 4 (n=10)	5,521 \pm 0,453
p değeri	<0,001

* Grup 1 ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$

** Grup 2 ile karşılaştırıldığında $p < 0,001$

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Gruplar arası değerlendirme MDA düzeyleri ve CAT ve SOD enzim aktiviteleri testis dokusunda değerlendirilmiştir. CAT için yapılan analizler değerlendirildiğinde yalnızca CP uygulanan grup kontrol grubuna göre belirli düzeyde düşük ve CP+CAPE uygulanan grup ise yalnızca CP uygulanan gruba göre yüksek bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi ($p > 0,05$). SOD için yapılan analizler değerlendirildiğinde yalnızca CP uygulanan grup, kontrol grubuna göre düşük ve CP+CAPE uygulanan grup ise yalnızca CP uygulanan gruba göre yüksek bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmedi ($p > 0,05$). MDA için yapılan analizler değerlendirildiğinde yalnızca CP uygulanan grup kontrol grubuna göre yüksek ve CP+CAPE uygulanan grup ise yalnızca CP uygulanan gruba göre düşük bulundu. Bu değerlerde istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$). Biyokimyasal verilerin değerlendirilmesi, gruplara göre doku biyokimyasal sonuçları Tablo 4.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Doku örneklerinde ortalama Katalaz (CAT), Süperoksit dismutaz (SOD), Malondialdehit (MDA) ölçümleri

	CAT	SOD	MDA
Grup 1 (n=8)	19,015±8,404	1,222±0,949	0,84±0,206
Grup 2 (n=10)	14,299±6,645	0,978±0,443	0,852±0,12
Grup 3 (n=10)	22,321±10,01	1,526±0,765	0,811±0,09
Grup 4 (n=10)	19,872±16,041	1,615±0,439	0,826±0,087
p değeri	>0,05	>0,05	>0,05

Tabloda CAT, SOD ve MDA değerleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

4.4. Comet Assay Tekniği Bulguları

Parçalanmış DNA'lı spermelerin mikrofotografik görünümü ve tüm gruptaki Head DNA ve Tail DNA sayıları sırasıyla (Tablo 4.3.)'te sunulmuştur. Sadece CP (Şekil 4.8.) uygulaması, sperm DNA parçalanma oranını kontrol (Şekil 4.7.) grubuna kıyasla önemli ölçüde artırdı ($p<0.001$). Sperm DNA parçalanma oranı CP+CAPE (Şekil 4.9.) grubunda CP grubuna göre anlamlı olarak ($p<0.001$) azaldı. Yalnızca CAPE (Şekil 4.10.) uygulanması kontrol (Şekil 4.7.) grubuna göre sperm DNA parçalanma oranını artırmış olsa da bu artış CP (Şekil 4.8.) grubunun oluşturduğu hasara kıyasla daha azdır ($p<0.001$).

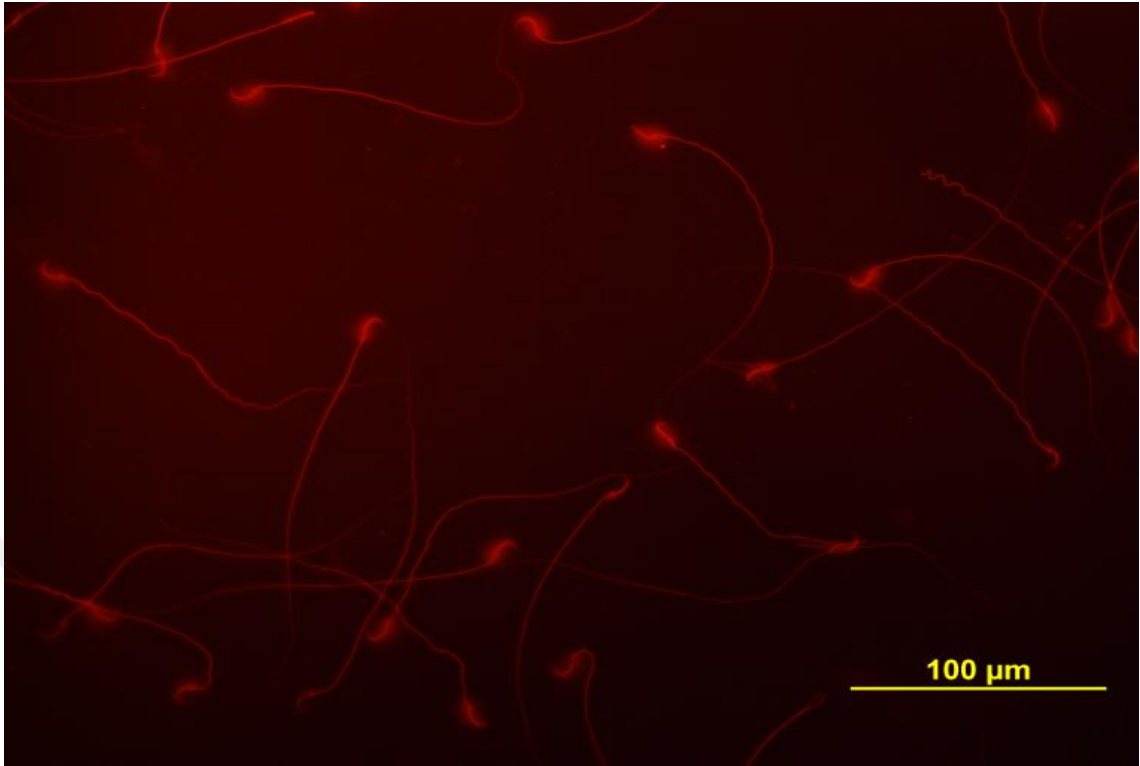
Tablo 4.3. Comet Assay sonuçları

	Head DNA	Tail DNA
Grup 1 (n=8)	98,969±0,6	1,031±0,6
Grup 2 (n=10)	79,28±4,584*	20,706±4,579*
Grup 3 (n=10)	88,383±2,133**	11,616±2,133**
Grup 4 (n=10)	84,733±3,398	15,266±3,398
p değeri	<0,001	<0,001

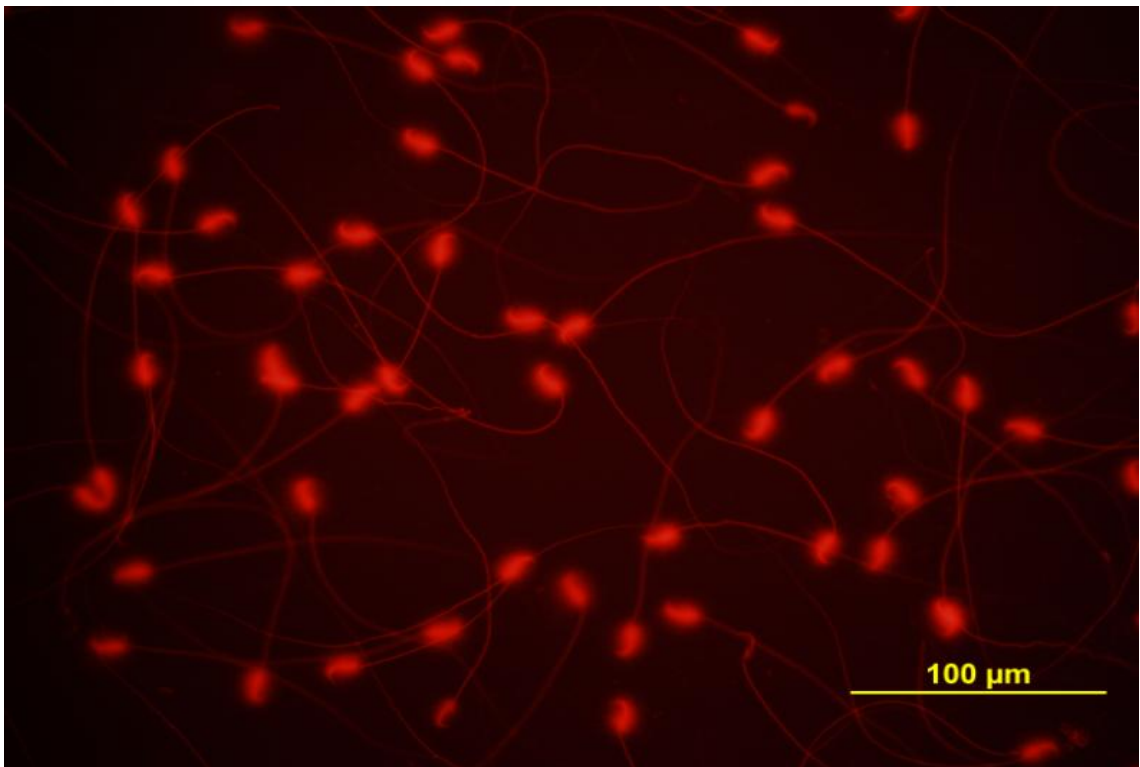
Tabloda Head DNA ve Tail DNA değerleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir.

* Grup 1 ile karşılaştırıldığında $p<0,001$

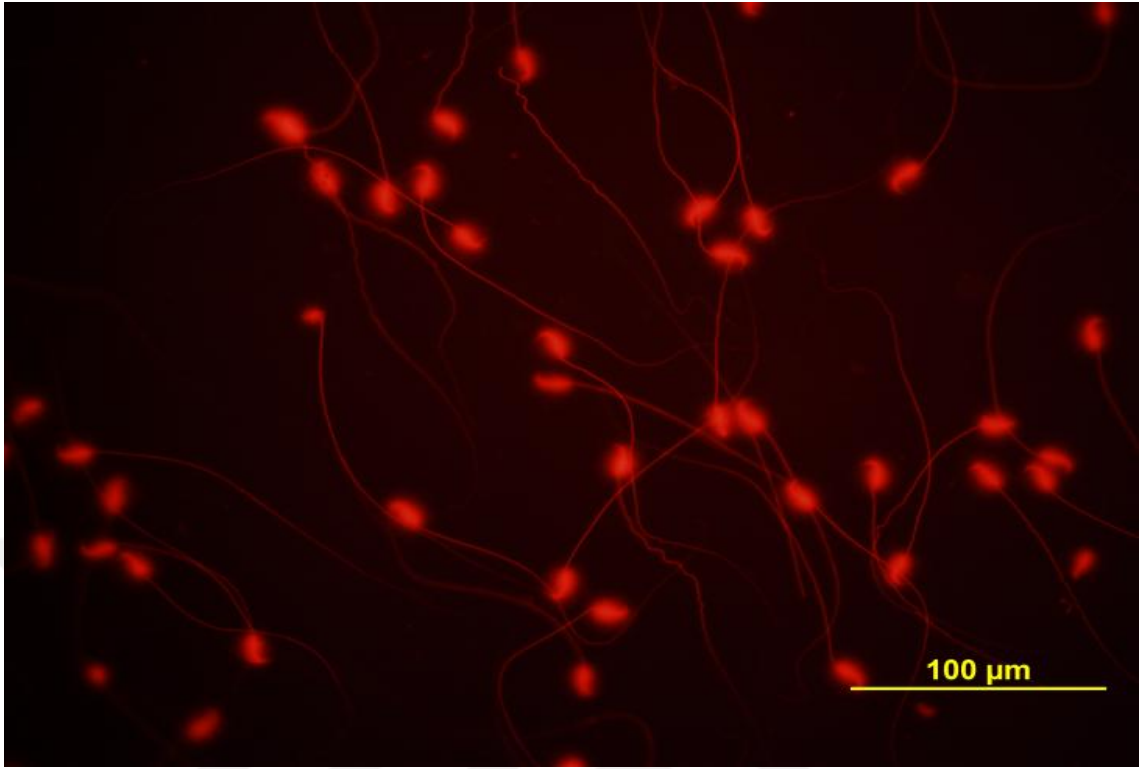
** Grup 2 ile karşılaştırıldığında $p<0,001$



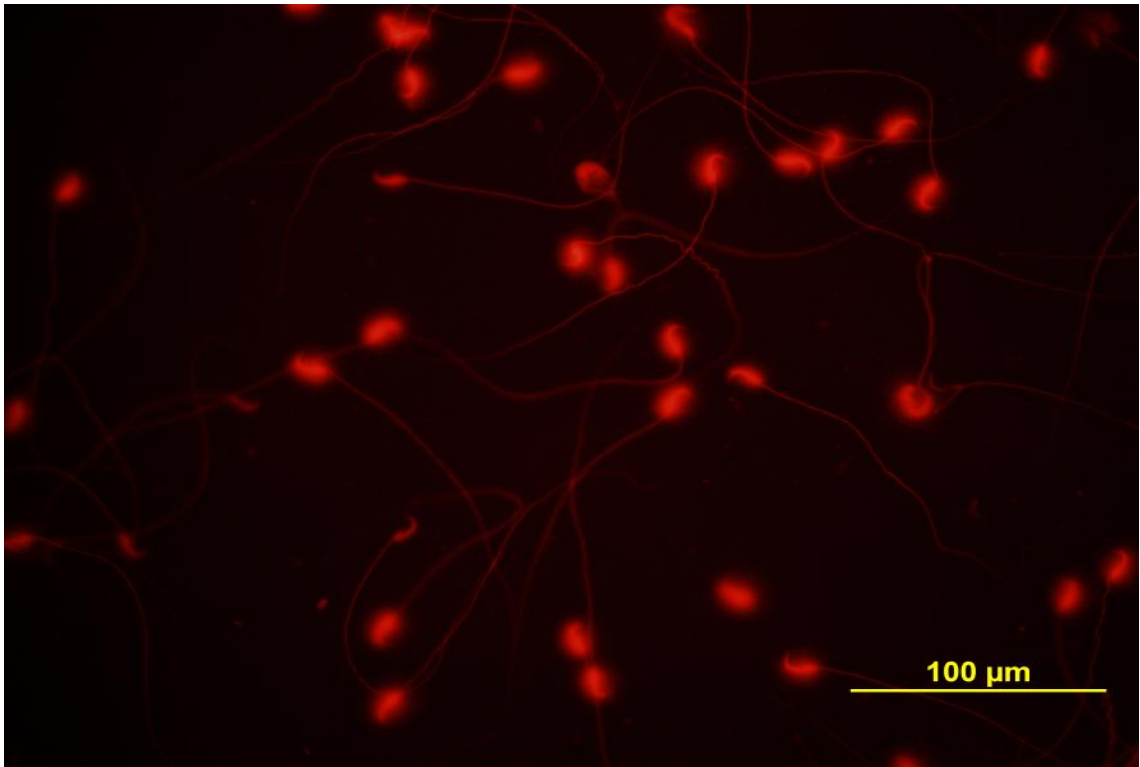
Şekil 4.7. Kontrol grubu tail DNA % 1,03, şekil DNA hasarsız sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, Japan)



Şekil 4.8. CP grubu tail DNA %20,7, şekil DNA hasarlı sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, Japan)



Şekil 4.9. CP + CAPE grubu tail DNA %11,6 , şekil DNA hasarlı sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, Japan)



Şekil 4.10. CAPE grubu tail DNA %15,2, şekil DNA hasarlı sperm hücrelerini göstermektedir (Ethidium bromide boyama x400, Olympus, Japan)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Platinin de içinde bulunduğu VIII. grup metallerin nötral kompleksleri antitümör ve karsinojenik etki gücüne sahiptir. Aralarında en etkin olan platin kompleksleridir ve CP de bunlardan biridir. Bu bileşikler selektif ve spesifik olarak hücre çoğalmasını inhibe ederler ve ayrıca antibakteriyel özellikleri de mevcuttur (76,77). CP'in terapötik etkisi, doz artışıyla belirgin derecede artmaktadır (78,79).

CP, kemoterapide bazı kanser türlerini tedavi etmek için kullanılan bir ilaçtır (2). CP yapısı bakımından diğer antineoplastik ilaçlara benzemeyen organik platin türevidir bir ilaçtır. Özellikle testis, over, mesane karsinomaları; CP temeline dayanan kemoterapiye duyarlıdır (1). Kemoterapötik bir ilaç olan CP, kaşeksi ve testis hasarı dahil, doza bağımlı olarak bir dizi yan etkiye neden olur (3). Nefrotoksisite, nörotoksisite, gastrointestinal irritabilite gibi yan etkilerinin yanında azospermi, oligospermi ve infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir (1). CP yüksek kümülatif doz alan hastalarda kalıcı azospermi ve sonrasında infertilite geliştirebilir (3).

CP'e bağlı testiküler hasar direkt olarak spermatojenik hücreler ve Sertoli hücreleri üzerinde ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda Leydig hücrelerinde de fonksiyon bozukluğu yaratmaktadır. CP uygulanan sıçanlarda sperm üretiminin, seminifer tübül çapının ve intratestiküler testosteronun azaldığı ve seminifer tübülde TUNEL pozitif hücrelerde artış olduğu belirtilmiştir (2).

CP, katı tümörlerin pek çok çeşidinde kullanılabilen, etkin bir kemoterapötik olmasına karşın, başta nefrotoksisite olmak üzere (80-85), testis hasarı (3), azospermi, oligospermi ve infertilite (1), hepatotoksisite (83,86-88), miyelosupresyon etki (82,89,90), nörotoksisite (82,88,89), geçici lökopeni, trombositopeni ve anemi (82) gibi doza bağımlı belirgin yan etkileri klinik kullanımını kısıtlamaktadır (83,88,91). CP ile

kanser kemoterapisinde klinik açıdan önemli olan nokta, yan etkilere karşı korunmanın sağlanmasıdır (85).

Soni KK ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada CP (2, 4, 6, 8 ve 10 mg/kg) dozlarında uygulamasından 5 gün sonra testisküler dokuda; germinal hücreler, Sertoli hücreleri ve Leydig hücrelerinde anormal histopatolojik lezyonlar meydana geldiği bildirilmiştir (92).

Soni KK ve ark. başka bir çalışmasında 10 mg/kg CP uygulanan grupta germinal hücrelerin, Sertoli hücrelerinin ve Leydig hücrelerinin dejenerasyonu ve dağınıklığı göstermişlerdir. Bununla birlikte spermatojenik hücre yoğunluğunda azalma olduğu bildirilmiştir. JTBS'ye göre CP uygulanan gruplarda azalma olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda CP uygulanan grupların MDA düzeylerinde önemli bir artış olduğu ortaya konmuştur (93).

Bizim çalışmamızda da tek doz CP (7 mg/kg) uygulanması sıçan testislerinde önemli ölçüde hasar oluşturmuştur. Bu hasar çoğunlukla spermatojenik seri hücrelerinde dağılma, seri hücrelerinin sıralarında bozulma, bazal membranlarda kayıp ve lümeneye yakın alanlarda ise kuyuksuz spermatozoon şeklindeydi. Histopatolojik değerlendirmelere göre spermatojenik hücre serilerinde primer ve sekonder spermatositlerin hasar derecesi giderek artan şekilde gözlemlendi. Seminifer tübül lümenindeki hücreler çekirdekli ancak kuyruk kaybına uğramıştı. İnterstisyel alandaki Leydig hücreleri de kısmen hasarlanmıştı. Spermatojenik seri hücrelerinin olması gereken sıraları ayırt edilemiyordu. Aynı zamanda spermatid seri hücrelerinin olması gereken alanlarda ödem ve vakuol görüntüleri izlendi. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar, benzer çalışmalarda sıçan testis dokusunda CP'nin oluşturduğu hasar ile paralellik göstermektedir. JTBS ölçümleri seminifer tübüllerde CP ile anlamlı şekilde hasar açığa çıktığını düşündürdü. Aynı zamanda Comet Assay tekniği sonuçları ile spermlerdeki hasarın DNA'daki hasarlanmalardan kaynaklandığı izlenimini edindirdi. Biyokimyasal parametreler doku hasarını göstermiş olsa da bu hasar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bitkilerin büyük bir bölümü, yapraklarını, çiçeklerini ve meyvelerini, antimikrobik çürümeye karşı ürettikleri, su geçirmez ve ısı yalıtımı özellikleri olan reçinensi maddelerle korurlar. Bal arıları bu reçinensi maddeleri ağaçların gövdelerindeki çatlaklardan, tomurcuklardan ve yapraklardan toplarlar. Arıların çiğneyip, ağız sindirim enzimlerini ekleyerek ve kısmen de sindirerek, balmumu ile karıştırdıkları propolis adı verilen bu yapışkan madde, kovanda çeşitli amaçlar için kullanılır (6). Arılar propolisi kovan içinde delik ve çatlakların kapatılmasında, peteklerin tamir edilmesinde ve birbirlerine yapıştırılmasında, kovan girişini daraltmak amacıyla ve savunmayı kolaylaştırmak gibi birçok amaca yönelik kullanılmaktadırlar. Propolis dezenfektan özellikte bir madde olup petek gözlerinin dezenfeksiyonunu sağlar (94).

CAPE, arıların bitkilerden topladığı özütün içerisinde bulunan keskin ve güzel kokulu propolis maddesinin aktif bileşenlerinden birisidir ve bir halk ilacı olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır (7). Propolisin antimikrobik, antiinflamatuvar, immunomodülatör, antimutajenik, antioksidan ve antikarsinojenik etkileri çeşitli çalışmalarla ortaya konulmuştur. Bu etkilerin çoğunun propolisin etken maddelerinden biri olan CAPE'ye bağlı olduğu gösterilmiştir (8,9).

CAPE'nin farmakolojik olarak güvenli bir bileşik olduğu gibi aynı zamanda lipid peroksidasyonunu azalttığı ve antioksidan enzim aktivitesini uyardığı gösterilmiştir (11). Buna ek olarak, CAPE'in transforme olmuş hücrelerin farklı tiplerinin büyümesini engellediği de gösterilmiştir (7).

Yılmaz HR ve arkadaşları (95) sıçan kemik iliği hücrelerinde CAPE'nin CP ile indüklenen kromozom hatalarına antiklastojenik etkisi araştırılan çalışmalarında sıçanlara i.p. (5 mg/kg) CP uygulanmış ve 24 saat öncesinde (10 µmol/kg) CAPE uygulanmıştır. Tek doz CP ile tedavi edilen hayvanların kemik iliği hücrelerinde hem anormal kromozomal hata hem de anormal metafaz figürleri gösterdiği bildirilmiştir. CAPE+CP ile tedavi edilen sıçanlarda, tek başına CP alanlara göre toplam kromozomal hata sayısı ve toplam anormal metafaz oranının anlamlı olarak daha düşük olduğu bildirilmiştir (p=0,0001).

Armağan ve arkadaşları (96) metotreksatın (i.p. 20 mg/kg) uygulanması ile oluşan oksidatif strese karşı CAPE (i.p. 10 µmol/kg) uygulayarak tedavi etmeyi amaçlamışlardır. Yaptıkları çalışmada metotreksatın azalttığı vücut ağırlığına karşı CAPE'nin anlamlı bir değişiklik yapmadığını bildirmişlerdir. Testisteki SOD aktivitesinin yüksek olduğu metotreksat grubuna göre metotreksat ile birlikte CAPE uygulanan grupta SOD aktivitesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda metotreksat grubundaki CAT aktivitesinin CAPE ile tedavi edilen gruba göre daha düşük olduğu bildirilmiştir. Yapılan bu çalışma metotreksatın oluşturduğu oksidatif stresin CAPE uygulanarak azaltılabileceğini göstermektedir.

CAPE'nin birçok dokuda düzeltici etkisi olduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Biz de yaptığımız çalışmada sıçan testis dokusunda CP ile oluşturulan hasarı engellemek için propolisin etken maddelerinden biri olan CAPE'yi uyguladık. CP ile birlikte CAPE uygulanan sıçanların testis dokularındaki seminifer tübüllerde iyileşme gözlemlendi. İnterstisyel alandaki Leydig hücrelerinde sayıca artış ve morfolojik olarak düzelme işaretleri gözlemlendi. Tubuli seminiferi kontorti kesitleri normale oldukça yakındı ve Sertoli hücrelerinde düzelme belirgin olarak izlendi. Bazal membran ve spermatojenik seri hücrelerinin normale yakın olduğu gözlemlendi. JTBS ölçüm sonuçları da CP ile birlikte CAPE uygulanmasının CP'in oluşturduğu hasarı azaltacağını göstermiştir. Yine spermelerde CP uygulanması ile meydana gelen DNA hasarının CP ile birlikte CAPE uygulanması ile azaldığı gözlemlendi. CP ile oluşan hasarın CP ile birlikte CAPE uygulanmasıyla tedavi edilmesi sonucu; MDA değerinin azalması ile SOD ve CAT değerlerinin artması istatistiksel olarak anlamlı olmasa da iyileşme belirtilerini göstermekteydi. CAPE'nin farklı ve daha yüksek dozlarda uygulanması muhtemelen biyokimyasal parametreleri daha anlamlı hale getirebilir.

Sonuç olarak CP birçok organı etkilediği gibi testis dokusunda da çok ciddi histopatolojik hasarlar oluşturmaktadır. Bu hasarı engellemek için koruyucu amaçlı verilen CAPE'nin testiste koruyucu ve düzeltici olabileceği gösterildi. Farklı ve daha yüksek dozlarda CAPE uygulanmasının hasarı daha çok iyileştirebileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Atabenli Erdemli E, Ergeneci D, Atahan Ş, Işıkay L. Cisplatinin sıçan böbrek ve testisleri üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 1999; 52: 139-145.
2. Bozdoğan S, Erişkin erkek sıçanlarda cisplatin ile oluşturulan testis hasarı üzerine sodyum selenitin etkisi, Yüksek lisans tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 2012: 30,38.
3. Whirledge SD, Garcia JM, Smith RG, Lamb DJ. Ghrelin Partially Protects Against Cisplatin Induced Male Murine Gonadal Toxicity in a GHSR-1a-Dependent Manner. Biol Reprod 2015; DOI:10.1095/biolreprod.114.123570.
4. Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. Asian J Androl 2008; 10; 2: 291–297.
5. Gültekin B, Sisplatin toksisitesinin sıçan testisinde yarattığı histolojik değişimlere çinkonun etkisinin araştırılması, Doktora tezi, Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya 2013: 26.
6. Türkiye Arı Yetiştiricileri Merkez Birliği, <http://www.tab.org.tr/TR,251/propolis.html> (26.01.2015).
7. Özen S, Akyol Ö, Iraz M, et al. Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Active Component of Propolis, against Cisplatin induced Nephrotoxicity in Rats. J Appl Toxicol 2004; 24: 27–35.
8. Pekmez H, Kuş İ, Çolakoğlu N, et al. The Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) on Structural Changes in the Prefrontal Cortex Induced by Cigarette Inhalation in Rats. EÜ Journal of Health Sciences 2004; 13: 18-25.

9. Alp H, Aytekin İ, Atakişi O, Ogün M. Ratlarda akut malathion toksisitesinin neden olduğu oksidatif stres üzerine kafeik asit fenetil ester ve elajik asitin etkileri. A.Ü. Vet. Bil. Derg. 2011; 6: 117-124.
10. Yılmaz HR, Söğüt S, Özyurt H, ve ark. Sıçanlarda Sispilatinle Olusturulan Nefrotoksisitede Metabolik Enzim Aktivitelerine Kafeik Asit Fenetil Ester'in Etkisi. Van Tıp Dergisi 2004; 11:1-6.
11. Ogetürk M, Kus I, Colakoglu N, et al. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. J. Ethnopharmacol 2005; 97: 273-280.
12. Özdamar S, Sorkun H. Genel Embriyoloji. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Kayseri 2002; 4-6.
13. Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı Ve Atlas (Altıncı baskıdan çeviri), Barış Baykal, Palme Yayıncılık, Ankara, 2014:785-802.
14. Sadler TW. Langman's Medical Embryology, 5th Ed., William and Wilkins, Baltimore, 1985.
15. Moore KM, Persaud T.V.N. İnsan Embriyolojisi, 6. İngilizce Baskıdan Çeviri, Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. 1.Türkçe Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, Türkiye; 2002; 305-341.
16. Gökmen FG. Sistemik Anatomi. İzmir Güven Kitabevi, 2003.
17. Unur E, Ülger H, Ekinci N. Anatomi. Kıvılcım Kitabevi. Kayseri 2009.
18. Esrefoglu M. Özel Histoloji. Medipres Matbaacılık, Malatya 2009; 978-975-6676-43-1.
19. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. W. B. Saunders Company, 2nd Edition. 2003.
20. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. Chem Biol Interact 2006; 160: 1-40.
21. Gutteridge, JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. Clin Chem 1995; 41: 1819-1828.

22. Baydas G, Reiter RJ, Nedzvetskii VS. Melatonin protects the central nervous system of rats against toluene-containing thinner intoxication by reducing reactive gliosis. *Toxicol Lett* 2003; 137: 169 – 174.
23. Yilmaz B, Kilic S, Aksakal O, et al. Melatonin causes regression of endometriotic implants in rats by modulating angiogenesis, tissue levels of antioxidants and matrix metalloproteinases. *Arch Gynecol Obstet* 2015; 292: 209-216.
24. Byung PY. Cellular defenses against damage from reactive species. *Physiol Rev* 1994; 74: 139-172.
25. Gökpınar G, Koray T, Akçiçek E, et al. Algal antioksidanlar, EÜ Su Ürünleri Derg 2006; 23: 85-89.
26. Dinçol K. Kemoterapide Temel Prensipler. İn: Topuz E, Aydın A, Karadeniz AN;eds. Klinik Onkoloji. İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Yayınları;2000:34-47.
27. Can G, (çeviren). Kanser kemoterapi rehberi ve uygulamaya yönelik öneriler. Çeviri editörleri: Durna Z, Aydın A. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri; 2003.
28. Pronk LC, Schellens JH, Planting AS, van den Bent MJ, Hilken PH, van der Burg ME, et al. Phase I and pharmacologic study of docetaxel and cisplatin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol.* 1997;15:1071-9.
29. Kelland L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(8):573–84.
30. Lebowitz D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur J Cancer.* 1998;34(10):1522–34.
31. Prestayko AW, D'Aoust JC, Issell BF, Crooke ST. Cisplatin (cis diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev.* 1979;6(1):17–39.
32. Boekelheide K. Mechanisms of toxic damage to spermatogenesis. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2005;34:6–8.
33. Cherry SM, Hunt PA, Hassold TJ. Cisplatin disrupts mammalian spermatogenesis, but does not affect recombination or chromosome segregation. *Mutat Res.* 2004;564(2):115–1128.

34. Amin A, Hamza A. Effects of ginger and roselle on cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. *Asian J Androl.* 2006;8(5):607–12.
35. Adler ID, El Tarras A. Clastogenic effects of cis-diamminedichloroplatinum II. Induction of chromosomal aberrations in primary spermatocytes and spermatogonial stem cell of mice. *Mutat Res.* 1990;243(3):173–8.
36. Vawda AI. Effect of testosterone on cisplatin-induced testicular damage. *Arch Androl.* 1994;32(1):53–7.
37. Johnson SW, Ferry KV, Hamilton TC. Recent insights into platinum drug resistance in cancer. *Drug Resist Updat.* 1998;1(4):243–54.
38. Amin A, Hamza AA, Kmbal A, Daoud S. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl.* 2008;10(2):291–7.
39. Atessahin A, Sahna E, Turk G, et al. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res.* 2006;41(1):21–7.
40. Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. *Comp Biochem Physiol C* 132:123-128, 2002.
41. Santovito G, Irato P, Piccinni E, Albergoni V. Relationship between metallothionein and metal contents in red-blooded and white-blooded antarctic teleosts. *Polar Biol* 23:383-391, 2000.
42. Leibbrandt MEI, Grushenka HIW, Metz AL, Oziba AA, Haskins JR. Critical subcellular targets of cisplatin and related platinum analogs in rat proximal tubule cells. *Kidney Int* 48:761-770, 1995.
43. Özyurt H, Söğüt S, Yılmaz HR, ve ark. Sıçanlarda cisplatin ile oluşturulan nefrotoksisitede plazma SOD, ADA ve XO enzim aktiviteleri ile MDA, NO düzeyleri ve bunlar üzerine CAPE'nin etkileri. 17. Ulusal Biyokimya Kongresi, ANKARA, Kongre Özet Kitabı, s.439, 24-27 Haziran 2002.
44. Söğüt S, Özyurt H, Kotuk M, ve ark. Sıçanlarda Cisplatinle oluşturulan nefrotoksisitede plazma SOD, ADA, XO aktiviteleri ile MDA ve NO düzeyleri üzerine erdoğsteinin etkisi. 17. Ulusal Biyokimya Kongresi, ANKARA, Kongre Özet Kitabı, s. 473, 24-27 Haziran 2002.

45. Yılmaz HR, Sögüt S, Özyurt H, ve ark. Yüksek doz cisplatin uygulanan sıçanlarda karaciğer ADA, CAT, SOD, XO enzim aktiviteleri ile NO ve MDA düzeyleri üzerine kafeik asit fenetil ester'in (CAPE) etkisi. Klinik Biyokimya ve Kanser Sempozyumu, Kervansaray Termal Otel / Bursa. Özet Kitabı, s.123, 26-29 Eylül 2002.
46. Okuda M, Masaki K, Fukatsu S, Hashimota Y, Inui K. Role of apoptosis in cisplatin induced toxicity in the renal epithelial cell line LLC-PK1. Implication of the functions of apical membranes. *Biochem Pharmacol* 59:195-201, 2000.
47. Nefic H. Anticlastogenic effect of vitamin C on cisplatin induced chromosome aberrations in human lymphocyte cultures. *Mutat Res* 498: 89- 98, 2001.
48. Vickers AEM, Rose K, Fisher R, et al. Kidney slices of human and rat to characterize cisplatin-induced injury on cellular pathways and morphology. *Toxicol Pathol.* 2004;32: 577-590.
49. Konak F. *Arıcılık Araştırma Dergisi*, 2012; 7:9-13.
50. Doğanyığıt Z. Endotoksemi Oluşturulmuş Sıçanlarda Propolisin Karaciğer Koruyucu Etkinliğinin Araştırılması, Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri 2012: 22-23.
51. Mirzoena OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukot and Essent Fatty Acids* 55:441-449, 1996.
52. Sahin S, Sögüt S, Özyurt H, et al. Tissue xantine oxidase activity and nitric oxide levels after spinal cord ischemia/reperfusion injury in rabbits: comparison of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and methylprednisolone. *Neurosci Res Commun* 31: 111-121, 2002.
53. Dobrowolski JW, Vohoraq SB, Sharma K, et al. Antibacterial, antifungal, antiameobic, antiinflammatory, and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol* 35: 77-82, 1991.
54. Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against gram-negative infections and adjuvant effect of the watersoluble derivate. *Vaccine* 10: 817-823, 1992.

55. Edenharder R, von Petersdorff I, Rauscher R. Antimutagenic effects of flavanoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. *Mutat Res* 287: 261-74, 1993.
56. Krol W, Czuba Z, Scheller S, et al. Anti-oxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochem Int* 21: 593-97, 1990.
57. Pascual C, Gonzales R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 41: 9-13, 1994.
58. S. Kumazawa, M.-R. Ahn, T. Fujimoto, and M. Kato, "Radical-scavenging activity and phenolic constituents of propolis from different regions of Argentina," *Natural Product Research*, vol. 24, no. 9, pp. 804–812, 2010.
59. D. Grunberger, R. Banerjee, K. Eisinger et al. "Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis," *Experientia*, vol. 44, no. 3, pp. 230–232, 1988.
60. H.-C. Chen, J.-H. Chen, C. Chang, and C.-J. Shieh, "Optimization of ultrasound-accelerated synthesis of enzymatic caffeic acid phenethyl ester by response surface methodology," *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 18, no. 1, pp. 455–459, 2011.
61. H.-C. Chen, H.-Y. Ju, Y.-K. Twu et al. "Optimized enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester by RSM," *New Biotechnology*, vol. 27, no. 1, pp. 89–93, 2010.
62. A. Kurata, Y. Kitamura, S. Irie et al. "Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester analogues in ionic liquid," *Journal of Biotechnology*, vol. 148, no. 2-3, pp. 133–138, 2010.
63. X. Wang, S. Stavchansky, P. D. Bowman, and S. M. Kerwin, "Cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and catechol ring-fluorinated CAPE derivatives against menadione-induced oxidative stress in human endothelial cells," *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 14, pp. 4879–4887, 2006.
64. S. Kumazawa, M.-R. Ahn, T. Fujimoto, and M. Kato, "Radical-scavenging activity and phenolic constituents of propolis from different regions of Argentina", *Natural Product Research*, vol. 24, no. 9, pp. 804-812, 2010.

65. Özen S, Akyol Ö, Izar M. Role of Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Active Component of Propolis, against Cisplatin-induced Nephrotoxicity in Rats. *J Appl Toxicol.* 2004; 24: 27.
66. Parlakpınar H, Örum MH, Acet A. Kafeik asit fenetil ester (KAFE) ve miyokardiyal iskemi reperfüzyon (Mİ/R) hasarı. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2012; 1: 10-5.
67. S. Ozen, O. Akyol, M. Iraz et al. "Role of caffeic acid phenethyl ester, an active component of propolis, against cisplatininduced nephrotoxicity in rats," *Journal of Applied Toxicology*, vol. 24, no. 1, pp. 27–35, 2004.
68. K. Natarajan, S. Singh, T. R. Burke Jr., D. Grunberger, and B. B. Aggarwal, "Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, no. 17, pp. 9090–9095, 1996.
69. J. Laranjinha, O. Vieira, V. Madeira, and L. Almeida, "Two related phenolic antioxidants with opposite effects on vitamin E content in low density lipoproteins oxidized by ferrylmyoglobin: consumption vs regeneration," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 323, no. 2, pp. 373–381, 1995.
70. Y. Kimura, H. Okuda, and T. Okuda, "Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VII. Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species, and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil," *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 33, no. 5, pp. 2028–2034, 1985.
71. Z. S. Z. Zai Sheng Zheng, G. Z. X. Guo Zhen Xue, D. Grunberger, and J. H. Prystowsky, "Caffeic acid phenethyl ester inhibits proliferation of human keratinocytes and interferes with the EGF regulation of ornithine decarboxylase," *Oncology Research*, vol. 7, no. 9, pp. 445–452, 1995.
72. Mahmoud NN, Carothers AM, Grunberger D, Etal Plant phenolics decrease intestinal tumors in an animal model of familial adenomatous polyposis. *Carcinogenesis.* 2000; 21: 921-927.
73. Lee YJ, Liao PH, Chen WK, Yang CY. Preferential cytotoxicity of caffeic acid phenethyl ester analogues on oral cancer cells. *Cancer Lett.* 2000; 153: 51-56.

74. P. Komericki and B. Kränke, "Maculopapular exanthem from propolis: case report and review of systemic cutaneous and noncutaneous reactions," *Contact Dermatitis*, vol. 61, no. 6, pp. 353–355, 2009.
75. K. Frenkel, H. Wei, R. Bhimani et al. "Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester," *Cancer Research*, vol. 53, no. 6, pp. 1255–1261, 1993.
76. Chirina YI, Pedraza-Chaverri J. Role of oxidative and nitrosative stress in cisplatin induced nephrotoxicity. *Exp Tox Pathol* 2009; 61:223-242. -Y6.
77. Goyer RA; Clarkson TW, Casarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons, 6. Baskı, McGraw-Hill Companies Inc., Medical Publishing Division, USA, 2001.
78. Florea AM, Büsselberg D. Anti-cancer drugs interfere with intracellular calcium signaling. *NeuroToxicology* 2009; 30:803–810.
79. Hanigan MH, Devarajan P. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther* 2003; 1:47-61.
80. Borch RF, Pleasants ME. Inhibition of cis-platinum nephrotoxicity by diethyldithiocarbamate rescue in rat model. *Proc. Natl Acad Sci* 1979; 76:6611-6614.
81. Hanneman J, Baumann K. Cisplatin induced lipid peroxidation and decrease of gluconeogenesis in rat kidney cortex: different effects of antioxidants and radical scavengers. *Toxicology* 1988; 51:119-132.
82. Klaassen CD, Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10. Baskı, McGraw-Hill Companies Inc. Medical Publishing Division, USA, 2001.
83. Liu J, Liu Y, Habeebu SSM, Klaassen CD. Metallothionein (Mt)-null mice are sensitive to cisplatin induced hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 149: 24-31.
84. Sheikh-Hamad D, Cacini W, Buckley AR, et al. Cellular and molecular studies on cisplatin-induced apoptotic cell death in rat kidney. *Arch Toxicol* 2004; 78: 147-155.

85. Sueishi K, Mishima K, Makino K, Itoh Y, Tsuruya K, Hirakata H. Protection by a radical scavenger edaravone against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 451:203–8. 1.
86. Bompard G. Cisplatin induced changes on cytochrome P-450, lipid peroxidation and some P-450 related specific catalytic activities in rat liver. *J Toxicol Clin Exp* 1990; 10:375-383.
87. Dubskaia T, Vetoshkina TV, Goldberg VE. The mechanism of the hepatotoxicity of complex platinum compounds. *Eksp Klin Farmakol* 1994; 57:38-41.
88. Zicca A, Cafaggi S, Mariggio MA, et al. Reduction of cisplatin hepatotoxicity by procainamide hydrochloride in rats. *Eur J Pharmacol* 2002; 442: 265-272.
89. Kayaalp SO: Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, 8. Baskı, Cilt 1-2, Hacettepe Taç Kitapçılık Ltd ğirketi, Ankara 1998.
90. Mansour MA, Mostafa AM, Nagi MN, Khattab MM, Al-Shabanah OA. Protective effect of aminoguanidine against nephrotoxicity induced by cisplatin in normal rats. *Comp Biochem Physiol Part C* 2002; 132:123-128.
91. Sadzuka Y, Shoji T, Takino Y. Change of lipid peroxide levels in rat tissues after cisplatin administration. *Tox Lett* 1991; 57:159-166.
92. Soni KK, Kim HK, Choi BR, at al. Dose-dependent effects of cisplatin on the severity of testicular injury in Sprague Dawley rats: reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress. *Drug Design, Development and Therapy* 2016;10 3959–3968.
93. Soni KK, Zhang LT, You JH, at al. The effects of MOTILIPERM on cisplatin induced testicular toxicity in Sprague–Dawley rats. *Cancer Cell Int* (2015) 15:121.
94. Anonim, Propolis Tasarısı. Türk Standartları Enstitüsü. Ankara, 1989.
95. Yılmaz HR, Uz E, Altunbaşak A, at al. Anticlastogenic effect of caffeic acid phenethyl ester on cisplatin-induced chromosome aberrations in rat bone marrow cells. *Toxicology and Industrial Health*, 2010, 26(1) 33–37.
96. Armağan A, Uzar E, Uz E, at al. Caffeic acid phenethyl ester modulates methotrexate induced oxidative stress in testes of rat. *Human & Experimental Toxicology* (2008) 27: 547–552.

EK 1 : ETİK KURUL KARARI



T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(EÜHADYEK)



Tarih: 11.03.2015

Toplantı Sayısı: 03

Karar No:15/59

Erciyes Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 11.03.2015 tarihinde Prof. Dr. Harun ÜLGER'in başkanlığında toplanmıştır.

Üye Adı/Soyadı	Ünvanı	Bölümü	İmza
Harun ÜLGER	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Abdullah İNCİ	Prof. Dr.	Veteriner Fak.	
Özlem CANOZ	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Füsun Ferda ERDOĞAN	Prof. Dr.	Tıp Fak.	
Coşkun TEZ	Prof. Dr.	Fen Fak.	
Gökçen Yuvalı ÇELİK	Prof. Dr.	Eczacılık Fak.	Katılmadı
Ahmet ÖZTÜRK	Doç. Dr.	Tıp Fak.	
Betül AYCAN	Doç. Dr.	Eczacılık Fak.	
Servet KESİM	Doç. Dr.	Diş Hekimliği Fak.	
Serpil SARIÖZKAN	Doç. Dr.	DEKAM	
Serap ALTUNTAŞ EROĞLU	Av.	Kurumla İlişkisi Olmayan Üye	Katılmadı
Asiye GÖKBELEN	Yardımcı Değerlendirme Der. Başk.	Sivil Toplum Kuruluşu Temsilcisi	Katılmadı

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Ebriyoloji AD 'dan, Prof. Dr. Birkan YAKAN tarafından sunulan "Cisplatin'in Oluşturduğu Testis Hasarı Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester'in Koruyucu Etkisinin İncelenmesi" başlıklı proje incelenerek çalışmanın yapılmasının uygun olacağına ve Rektörlük makamına sunulmasına oybirliğiyle karar verildi.

Tarih : 11.03.2015

Etik kurul Başkanı : Prof. Dr. Harun ÜLGER

İmza

ÖZ GEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Ad - soyad : Tayfun CEYLAN
 Uyuşu : Türkiye Cumhuriyeti
 Doğum tarihi : 19.09.1988
 Doğum yeri : KAYSERİ
 Medeni durumu : Bekar
 Tel : +90 505 286 05 24
 E-mail : tyf.ceylan@gmail.com
 İletişim adresi : Eskişehir Bağları Osmanlı Mh. Genççay Sk. No=22
 Melikgazi/KAYSERİ

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD	2017
Lisans (Tezsiz Yüksek Lisans derecesiyle)	Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Biyoloji Eğitimi AD	2012

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Kurum	Görev
2015 - Halen	Kapadokya Meslek Yüksekokulu	Öğretim Görevlisi

YABANCI DİL

İngilizce

KONGRE KATILIM VE SERTİFİKALAR

5 - 8 Mayıs 2016	III. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, Kayseri
30 Nisan - 3 Mayıs 2016	XIII. Uluslararası Katılımlı Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir
26 - 28 Eylül 2013	Laboratuvar Hayvanları Bilimi 3. Ulusal Kongresi, Kayseri
13 - 15 Kasım 2015	II. Hematogenetik Sempozyumu, Gaziantep
16 - 19 Nisan 2015	II. Uluslararası Katılımlı Deneysel Hematoloji Kongresi, Kayseri
02 - 05 Mayıs 2010	Türk Kızılayı Hedef 25 Çalıştayı, Antalya
23 Eylül – 23 Aralık 2013	Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri
05 – 09 Eylül 2016	Eğiticinin Eğitimi, Kapadokya MYO, Nevşehir
18.01.2016	Temel İş Sağlığı ve Güvenliği, Kapadokya MYO, Nevşehir
11 – 12 Ağustos 2015	ISO – 9001:2009 Kalite Yönetim Sistemi, Mustafapaşa, Ürgüp, Nevşehir
09 – 10 Ekim 2015	Dökümantasyon, Mustafapaşa, Ürgüp, Nevşehir
12 – 13 Ekim 2015	İç Tetkikçi, Mustafapaşa, Ürgüp, Nevşehir
14 – 15 Ekim 2015	İstatistiksel Proses Kontrol Teknikleri, Mustafapaşa, Ürgüp, Nevşehir
03 Nisan 2011	Bilgisayar İşletmenliği (Operatör) Belgesi