



**ERKEK SIÇANLARDA İRİNOTEKANIN NEDEN
OLDUĞU REPRODÜKTİF HASARA KARŞI ELAJİK
ASİTİN KORUYUCU ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Cemile Ceren GÜL

HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Aşlı TAŞLIDERE**

Yüksek Lisans Tezi – 2017

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

**ERKEK SIÇANLARDA İRİNOTEKANIN NEDEN OLDUĞU REPRODÜKTİF
HASARA KARŞI ELAJİK ASİTİN KORUYUCU ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Cemile Ceren GÜL

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016/32 proje numarası ile desteklenmiştir.

MALATYA


2017


KABUL VE ONAY SAYFASI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde yürütülmüş olan; **Cemile Ceren GÜL**'ün "**Erkek Sıçanlarda İrinotekannın Neden Olduğu Reprodüktif Hasara Karşı Elajik Asitin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması**" konulu bu çalışması, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 07/07/2017


Prof. Dr. İbrahim Enver ÖZAN
Fırat Üniversitesi
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Nigar VARDI
İnönü Üniversitesi
Üye


Yrd. Doç. Dr. Aslı TAŞLIDERE
İnönü Üniversitesi
Tez Danışmanı
Üye

ONAY

Bu tez, İnönü Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../2017 tarih ve 2017/..... sayılı Kararıyla da uygun görülmüştür.

Prof. Dr. Yusuf TÜRKÖZ
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Erkek Üreme Sistemi	3
2.1.1. Testis Anatomisi	3
2.1.1.1. Skrotum.....	4
2.1.1.2. Testisler (Orchis)	4
2.1.1.3. Mediastinum testis (corpus Highmori)	6
2.1.1.4. Epididimis.....	6
2.1.1.5. Duktus deferens (Vas deferens).....	6
2.1.2. Testis Embriyolojisi	7
2.1.2.1. Gonadlar.....	7
2.1.3. Testis Histolojisi	10
2.1.3.1. Seminifer Tübüller	10
2.1.3.2. Sertoli Hücreleri.....	11
2.1.3.3. Kan-Testis Bariyeri.....	13
2.1.3.4. Spermatogenez.....	13
2.1.3.5. Olgun (Matür) Spermin Yapısı	18
2.1.3.6. İntersitisyel Doku.....	20
2.1.3.7. Myoid hücreler.....	21
2.1.3.8. Leydig Hücreleri	21
2.1.3.9. Rete Testis.....	22
2.1.3.10. Duktuli Efferentes	22
2.1.3.11. Epididimis	23
2.1.3.12. Duktus deferens (vas deferens).....	24
2.1.3.13. Duktus ejakulatoryus	25

2.1.3.14. Veziküla Seminalis	25
2.1.3.15. Prostat Bezi	26
2.1.3.16. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri)	27
2.2. İrinotekan	27
2.3. Elajik Asit	28
3. MATERYAL ve METOT	31
3.1. Histolojik Yöntemler	31
3.1.1. Mayer'in Hematoksilen-Eozin Metodu:	33
3.1.2. Histolojik İnceleme İçin İstatiksel Değerlendirme	34
3.1.3. İmmunohistokimyasal boyama prosedürü	34
3.2. Biyokimyasal Yöntemler	35
3.2.1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması	35
3.2.2. Homojenatların Hazırlanması	36
3.2.3. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçümü	36
3.2.4. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü	36
3.2.5. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü	37
3.2.6. Doku Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü	37
3.2.7. Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü	37
3.2.8. Doku Protein Ölçümü	37
3.3. Organ Ağırlıkları ve Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi	38
3.4. Biyokimyasal Analizler İçin İstatiksel Değerlendirme	38
3.5. Sperm Analizleri İçin İstatiksel Değerlendirme	38
4. BULGULAR	39
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	39
4.1.1. Kontrol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları	39
4.1.2. İrinotekan (IR) Grubu Işık Mikroskopik Bulguları	40
4.1.3. İrinotekan + Elajik Asit Grubu Işık Mikroskopik Bulguları	44
4.1.4. Elajik Asit Grubu Işık Mikroskopik Bulguları	46
4.1.5. İmmunohistokimyasal Bulgular	48
4.2. Biyokimyasal Bulgular:	49
4.3. Spermatolojik Bulgular:	51
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
KAYNAKLAR	61

EKLER.....	73
EK 1. Özgeçmiş	73
Ek 2. Etik Kurul Onayı	74



TEŐEKKÜR

Eğitimim ve tez dđnemimde, deneysel çalıŐmalarımda ve bu tezin hazırlanmasında yol gđsteren sevgili tez danıŐmanım, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Aslı TAŐLİDERE' ye, her zaman destek olan Anabilim Dalı BaŐkanımız Prof. Dr. Nigar VARDI' ya, çalıŐmamın sperm analizlerinde bđyđk emeği geçen Prof. Dr. Muhterem AYDIN' a ve çalıŐmamın biyokimyasal analizinde yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Osman ÇİFÇİ'ye, ArŐ. Grv. NeŐe BAŐAK TÜRKMEN' e, tezimin laboratuvar kısmında bana yardımcı olan Biyolog Leyla YURTSEVEN'e ve bđlümdeki çalışma arkadaşlarıma teŐekkđr ederim. ÇalıŐmalarım ve eğitimim boyunca hep yanımda olup hiç bir desteğini esirgemeyen canım babama, beni her zaman anlayıŐ ve hoŐgđrđ ile karŐılayan biricik anneme ve destekçilerim canım kardeŐlerime sonsuz teŐekkđrlerimi ve Őukranlarımı sunarım.

Ayrıca 2016/32 no'lu projeyi maddi yđnden destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon BaŐkanlıđı'na katkılarından dolayı teŐekkđr ederim.

ÖZET

Erkek Sıçanlarda İrinotekanın Neden Olduğu Reprodüktif Hasara Karşı Elajik Asidin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

Amaç: İrinotekan (IR) bir kamptotesin türevi antineoplastik ve immunosupresif bir ilaçtır. Elajik asit (EA) güçlü bir antikanserojen ve antimitojenik doğal fenolik bir bileşiktir. Bu çalışma, İrinotekan ile oluşturulmuş reprodüktif hasara karşı Elajik Asitin koruyucu etkilerini göstermek amacıyla planlandı.

Materyal ve Metot: Çalışmamızda 40 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı. (n=10). Gruplar; Kontrol+CMC, IR, IR + EA, EA

Deney sonunda alınan örnekler rutin doku takip işlemlerinden geçirilerek, parafine gömüldü. 5 µm kalınlığında kesitler alınarak, H&E ve kaspaz-3 boyama metodları uygulanıp Leica DFC 280 ışık mikroskobu altında ve LeicaQWin Plus analiz sistemi kullanılarak incelendi.

Bulgular: Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi ile kontrol ve EA grubu testis örnekleri normal histolojik görünümde izlendi. IR grubunun testis dokusunda tunika albuginea tabakasında ve interstisyel alanda vasküler konjesyon, vakuolizasyon ve ödem, seminifer tübüllerde spermatogenik seri hücrelerde azalma, lümene dökülme ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler olduğu belirlendi. IR+EA grubunda ise bu bulgularda belirgin derecede azalma olduğu tespit edildi. Biyokimyasal analizlerde ise IR verilen sıçanlarda TBARS düzeyinin anlamlı düzeyde arttığı, EA uygulamasının bu artışı anlamlı düzeyde azalttığı izlendi. IR uygulaması GSH, SOD, GPx ve CAT düzeylerinde azalmaya neden olurken, EA uygulaması ise bu değerlerin artışına neden olmuştur.

Sonuç: İrinotekan ile oluşturulan reprodüktif hasara karşı Elajik Asitin iyileştirici etkileri olduğu belirlendi.

Anahtar kelimeler: İrinotekan, Testis, Elajik asit, Sıçan, Kaspaz-3.

ABSTRACT

The Investigation Of Potential Protective Effects Of Ellagic Acid Against Reproductive Damage Induced By Irinotecan In Male Rats

Aim: Irinotecan is a camptothecin derivative antineoplastic and immunosuppressive drug. Ellagic acid is a powerful anticarcinogenic and antimutagenic natural phenolic compound. This study was planned to demonstrate the protective effects of Ellagic acid against reproductive damage caused by Irinotecan.

Material and Method: In our study 40 Sprague-Dawley rats were used (n=10). Groups: Control+CMC, IR, IR+EA, EA

At the end of the study testis samples were processed by routine tissue techniques, embedded in paraffin. 5µm thick sections of tissues were cut, stained with H&E and caspase-3 examined under a Leica DFC280 light microscope by Leica Qwin and Image Analysis System.

Results: In control and EA groups, testis showed a normal histological appearance with H-E procedure. In IR group, testis tissue showed vascular congestion, oedema and vacuolisation in interstitial area, reduction in germ line cells in seminiferous tubules, squamation in lumen, arrested spermatocytes in different stage in division were observed. These findings were significantly decreased in IR+EA group. In biochemical analysis, IR lead to a significant increased in TBARS levels and significant decrease in GSH, SOD, GPx and CAT levels in testis tissue compared with other groups. In the IR+EA group there was an attenuated increased in TBARS levels and an increase in GSH, SOD, GPx and CAT activities.

Conclusion: As a result of EA have protective effects against the reproductive damage which created with IR.

Keywords: Irinotecan, Testis, Ellagic Acid, Rat, Caspase-3.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABP	: Androjen bağlayıcı proteini
A(CoA)	: Asetil koenzim
aER	: Granülsüz endoplazmik retikulum
cAMP	: Adenozin monofosfat
CAPE	: Kafeik asit fenetil ester
cAT	: Katalaz enzimi
CES	: Karboksil esteraz
CsA	: Siklosporin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
EA	: Elajik Asit
FSH	: Folikül stimulan hormon
gER	: Granüler endoplazmik retikulum
GSH	: Glutatyon
GST	: Glutatyon-s-transferaz
GPx	: Glutathione peroxidase
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
H-E	: Hematoksilen-Eosin
hCG	: İnsan koryonik gonadotropin
IR	: İrinotekan
i.p	: İntraperitoneal
LH	: Leydig hücreleri

MAL	: Malathion
NADPH	: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NO	: Nitrik oksit
PBS	: Phosphate Buffered Saline
ROS	: Serbest oksijen radikalleri
SE	: Standart hata
SOD	: Süperoksit dismutaz enzim
SRY	: Y kromozomu üzerinde cinsiyeti belirleyen bölge
StAR	: Steroidogenik akut regülatör protein
TBF	: Testis belirleyici faktör
Cm	: Santimetre
kg	: Kilogram
mg	: Miligram
mm	: Milimetre
m	: Metre
µm	: Mikrometre
nm	: Nanometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Erkek Üreme Organları	3
Şekil 2.2. Üç haftalık embriyoda, yolk kesesi duvarında allantois bağlantısına yakın bir yerde primordiyal germ hücrelerini gösteren şema (A). Primordiyal germ hücrelerinin son bağırsak ve dorsal mezenter boyunca genital kabartıya doğru giden göç yolu (B)	8
Şekil 2.3. Altı haftalık embriyonun, lumbal bölgeden geçen transvers kesitinde, primitif cinsiyet kordonlarıyla birlikte farklanmamış gonad görünümü. Bazı primordiyal germ hücreler primitif cinsiyet kordonlarına ait hücrelerle çevrelenmiştir.	9
Şekil 2.4. Seminifer tübüllerin görünümü.	11
Şekil 2.5. Spermatogenezin evreleri	14
Şekil 2.6. Spermiyogenez ve olgun spermatozoa	17
Şekil 2.7. Leydig hücreleri	22
Şekil 2.8. İrinotekanın kimyasal formülü	27
Şekil 2.9. Elajik asitin kimyasal formülü	29
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait sıçanların testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Normal histolojik görünümde seminifer tübüller, interstisyel alan ve spermatogenik seri hücreler görülmektedir. H-E; x20.....	39
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alan, Leydig hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri normal histolojik görünümde izlendi. H-E; X 40.....	40
Şekil 4.3. İrinotekan (IR) grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubuna ait testis dokusunda tunika albuginea tabakasında belirgin konjesyon (Oklar) gözlemlendi. H-E; X10.....	41
Şekil 4.4. IR grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubunda interstisyel alanda vasküler konjesyon (Siyah ok), vakuolizasyon (Siyah çerçeveli beyaz oklar), interstisyel ödem (Beyaz yıldız) ve tübül lümeninde germinatif hücrelerde azalma (Siyah yıldızlar) gözlemlendi. H-E; X20.	41
Şekil 4.5. IR grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubunda interstisyel alanda vasküler konjesyon (siyah oklar), vakuolizasyon (beyaz oklar) ve interstisyel ödem (Yıldız) gözlemlendi. H-E; X40.	42
Şekil 4.6. IR grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül lümeninde vakuolizasyon (Siyah oklar) ve seminifer tübül lümeninde belirgin ödem (Yıldız) gözlemlendi. H-E; X20.	42

Şekil 4.7. IR grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül epitelinde dejenerasyon ve lümene dökülen hücreler (Siyah oklar) gözlemlendi. H-E; X20.....	43
Şekil 4.8. IR grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler (Oklar) gözlemlendi. H-E; X40.	43
Şekil 4.9. IR+EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alanda ödem (Yıldız), tunika albuginea tabakasında konjesyonda belirgin azalma (siyah oklar), seminifer tübül hasarında azalma ve spermatogenik seri hücrelerde artış gözlemlendi. H-E; X10.	44
Şekil 4.10. IR + EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Lümene dökülen hücrelerde belirgin derecede azalma (Oklar) gözlemlendi. H-E; X20.....	45
Şekil 4.11. IR+EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül lümeninde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücrelerde azalma (Oklar) gözlemlendi. H-E; X40.	45
Şekil 4. 12. IR+EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alanda görülen vakuolizasyonda (Oklar) vasküler konjesyonda (Yıldız) ve ödemde azalma gözlemlendi. H-E; X40.	46
Şekil 4.13. EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler ve interstisyel alandaki hücre yapılarıyla birlikte testis dokusu normal histolojik yapıda gözlemlendi. H-E; X20.....	47
Şekil 4.14. EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübüller, spermatogenik seri hücreler ve interstisyel alan normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. H-E; X40.	47
Şekil 4.15. Deney gruplarındaki Kaspaz-3 aktiviteleri. Kontrol (A), IR (B), IR+EA (C), EA (D). Kaspaz-3; X40.....	48

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1. Tespit maddesi ve süresi	32
Tablo 3.2. Doku takip basamakları	32
Tablo 4.1. İrinotekanın oluşturduğu tübül çapı ve tübül epitel kalınlığındaki değişiklikler üzerine EA'nın etkileri	49
Tablo 4.2. Tübüllerin Histolojik Skorlaması	49
Tablo 4.3. Elajik Asit (EA) ve IR verilmiş sıçanlarda TBARS, GSH, CAT, SOD ve GPx düzeyleri	50
Tablo 4.4. EA ve IR verilmiş sıçanlarda Testis ağırlıkları, Epididimis ağırlıkları, Seminal vezikül ağırlıkları, Prostat ağırlıkları	51
Tablo 4.5. EA ve IR verilmiş sıçanlarda sperm motilitesi, epididimal sperm konsantrasyonu ve anormal sperm oranı	52

1. GİRİŞ

Kemoterapi, kontrolsüz olarak çoğalan hücreleri ortadan kaldırmak için kimyasal yada doğal, biyolojik yöntemler ve hormonlar kullanılarak uygulanan tedavi biçimidir (1). Kemoterapötik ajanlar, hücrelere proliferatif dönemdeki etki gösterir. Kanserli (neoplastik) hücrelerin sağlıklı hücrelere oranla kontrolsüz şekilde büyümesi ve çoğalmasından dolayı çoğu kemoterapi ilaçları bu niteliği taşıyan hücrelere etki göstermesi için geliştirilmiştir. Çoğu zaman normal hücrelerde kemoterapi ilaçlarıyla doğrudan etkilenmektedir. Kemoterapi ilaçlarının yan etkileri oldukça fazladır. Kan hücreleri, gastrointestinal sistemde yer alan hücreler, kıl follikülleri ve sperm hücreleri gibi oldukça hızlı bölünen hücrelerde bu etkiler görülmektedir (2, 3). Kemoterapi ilaçları, sağlıklı doku ve normal hücrelerde bile farklı düzeylerde yan etkilere neden olduğu için infertilite bu ilaçların üreme sisteminde meydana getirdiği olumsuz etkilerinden biridir (4-6). Aynı zamanda çoğu kemoterapi ilacı birçok sistemi etkileyerek hayati organlar üzerinde olumsuz etkiler oluşturur (2-5).

Bu ilaçlar hızla çoğalan ve farklılaşma özelliğindeki sağlıklı hücreler üzerinde ilk olarak etki gösterdiği için sitotoksik kemoterapi doğrudan gonadal hasar yaratır. Bu hasarların büyüklüğünde ilacın verilmesine, ilacın dozuna ve hastanın yaşına bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Kemoterapi tedavisine aynı zamanda radyoterapi de dahil olunca düşük dozlarda uygulansa dahi spermatogenezis ciddi şekilde etkilenir. Spermatogeneziste yer alan olaylar, sperm parametrelerindeki değişimler, ejakülasyondaki bozukluklar, hipotalamus hipofiz gonad eksenindeki fizyolojik değişimler kemoterapi ilaçlarının üreme sisteminde oluşturduğu yan etkiler arasında gösterilir (5, 7-9). Spermatogoniumlar ise çoğalmadığı ve farklılaşmadığından bu özelliği gösteren diğer hücrelere oranla kemoterapi ilaçlarının direkt etkilerine karşı oldukça dirençlidir. Fakat farklılaşma ve çoğalma özelliğindeki spermatogoniumlar, spermatozoidler ve spermatozoidler ise kemoterapötik ajanların direkt etkilerine karşı oldukça duyarlı olduğu için tedaviye başladıktan 4-6 hafta sonra infertilite bulguları görülmektedir (5-10).

Testisteki Leydig ve Sertoli hücreleri kemoterapi ilaçlarından çok etkilenmezken, germinal epitelyum oldukça hassastır. Kullanılan kemoterapi ilaçlarının dozuna ve uygulama süresine bağlı olup, var olan germinal epitelyumdaki kök hücreler,

tedavi sona erdikten sonra tekrardan spermatogenezis geriye dönebilmektedir (4, 5, 8, 11). Sperm DNA'sı kondanse (12) olmasına rağmen çoğu faktörden olumsuz etkilenir (13). Kemoterapide kullanılan ilaçların çoğalma ve farklılaşma fazında yer alan spermatogenik hücrelerin DNA'sındaki metilasyon yapısı (9), kromatini, sperm hücrelerinin baş bölgesinde bulunan basit (14) ve çekirdek matriks proteinleri (15) ile protamin ve histonların yapılarında(16) ve spermatozoal dekondensasyon süresinde aksaklıklar (17), kromozomlarda anöploidiler (18) ve iç iplikçiklerinde kırılmalar (16) gibi direkt kromatin ve DNA hasarları oluşturup erkek reproduktif sisteminde birçok olumsuz etkileye neden olurlar. Spermatogenez sürecinde köken spermatogoniadan yaklaşık olarak saniyede 1000 kadar olgun spermatozoa oluşur (19). Spermatositogenez ise mayoz ve spermiyogenez evrelerini oluşturan hücre bölünmelerini ve farklılaşma evrelerini içeren aktif ve daima yenilenen bir süreçtir. Spermatositogenez sonucunda spermatogoniadan spermatositler; mayoz sonucunda spermatositlerden spermatidler ve spermiyogenez sonucunda ise spermatidlerden olgun sperm hücreleri oluşur (20). Ayrıca gelişmelerine göre spermatogonia; köken, çoğalabilen ve farklılaşma özelliği gösteren hücreler olarak ikiye ayrılır. Mekanizması tam olarak keşfedilemesede spermatogenik hücrelerin direkt (9, 14, 15) yada oksidatif strese bağlı olarak dolaylı (13, 21, 22) oluşan DNA ve kromatin hasarı ile steroidogenezdeki bozukluklara neden olur. Spermatogenik hücrelerdeki yüksek mitotik aktiviteden dolayı ve kemoterapötik ajanların da daha çabuk çoğalabilen hücrelerdeki toksik etkisinin reproduktif sistem üzerindeki etkilerini tespit edebilmek için ilk olarak spermatogenezisin evrelerini ve evrelerde şekillenen hücre tiplerinin fizyolojilerini bilmek gerekir.

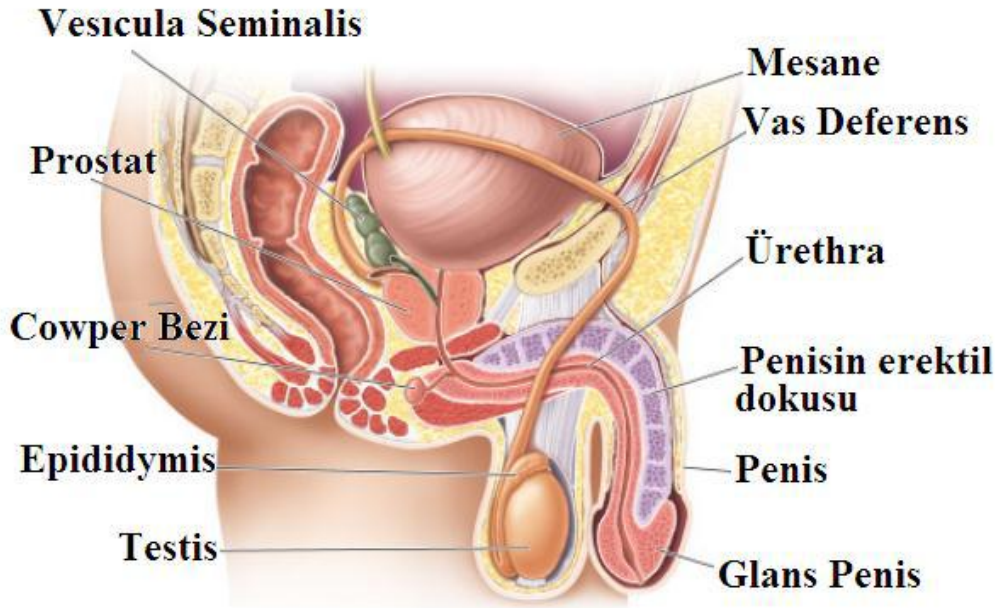
Reproduktif sisteminde oluşan yan etkileri önlemek için birçok in vitro ve in vivo çalışmaları yapılmaktadır. Bu deneysel çalışmaların çoğunda kemoterapi ilaçları oksidatif stres ve DNA hasarı yaratarak erkek reproduktif sisteminde olumsuz etkilere neden olur. Tedavi amaçlı olarak ise çeşitli yapılarıdaki birçok antioksidan maddelerin koruyucu ve iyileştirici etkisi olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (23, 24).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Erkek Üreme Sistemi

Erkek genital sistemi, sperm üretip sentezleyen ve androjenleri salgılayan bir çift testis ile testis dışı kanalları oluşturduğu bilinen epididimis, duktus deferens, ejakulatuar kanal ve erkek üretrasının bir parçasından oluşur. Testis ve testis dışı boşaltım kanallarına ek olarak, salgıları semen kitlesini oluşturan ve olgun spermatozoaya besin sağlayan aksesuar bezler seminal vezikülü, prostat bezi, bulboüretral bezleri ve erektil dokuyu oluşturan çiftleşme organı penisten meydana gelir (25).

Genital boşaltım yolları ise tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes, duktus epididimis, duktus deferens, duktus ejakulatorius ve hem genital, hemde idrar boşaltım yolu olarak kullanılan üretradan meydana gelir (26).



Şekil 2.1. Erkek Üreme Organları (27)

2.1.1. Testis Anotomisi

Erkek genital sisteminde iç kısımdaki organların bir bölümü pelvis boşluğunda ve diğer bölümleride perineumda yer almaktadır. Bu grupta testis, epididimis, duktus deferens, vezikula seminalis, prostat ve glandula bulboüretralis yer alır. Yetişkin bir

erkeğin testisi 4x3, 5x3 boyutlarında ovoid yapılıdır. Her bir testisin hacmi ise 30 ml kadardır. Testisin anterolateral 2/3 lük bölümü bağımsızken, posterolateral yüzü ise epididim, damarlar ve bağ dokusuyla çevrelenmiştir. ‘Mediastinum testis’ kısmında ise kranioposterior bölümünden, seminal taşıyıcılar uzanır (28).

Testis sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea olarak isimlendirilen dıştan bir kapsül ile çevrelenmiştir. Bu tabaka bol miktarda kollajen ve fibroblast içermektedir. Tunika albugineanın hemen altında yer alan ve gevşek bağ dokusu yapısında olan, tunika vasküloza olarak isimlendirilen damardan zengin bir tabaka bulunur (29).

2.1.1.1. Skrotum

Testis ve funiculus spermaticus’un içinde yer aldığı bir torbadır. Uyluğun üst tarafının ön kısmında ve symphysis pubica’nın altında bulunan deri, fibröz kılıflar ve kas liflerinden oluşmaktadır. Embriyolojik olarak sağda ve solda bir çift halinde yer alan skrotum, gelişim boyunca orta hatta kaynaşır. Skrotumun dış yüzünün şekli bazı şartlara bağlı olarak değişir. Sıcakta ve yaşlılarda kaslar gevşer. Bu nedenle skrotumun yüzeyi genişleyip düzleşir. Soğukta ve gençlerde m.dartos kasının kasılması sonucu, yüzeyi buruşarak küçülür ve testisi sıkıca sarar (30). Skrotumda özel kokulu salgı yapan bezler ve çok sayıda ter bezi yer almaktadır. Testislerin normal fonksiyonu sağlaması için vücut sıcaklığından 2.5°C den daha düşük olması gerekir. Skrotum ise bu sıcaklığı koruyan bir mekanizmaya sahiptir (31).

2.1.1.2. Testisler (Orchis)

Erkek üreme hücreleri ve androjenlerin üretildiği bir çift organdır. Funiculus spermaticus’a asılı durumda bulunan testisler, sağlı sollu bir çift olup, skrotumun içinde bulunurlar. Testisler yaklaşık 5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 14 gram kadardır. Karın arka duvarında peritoneumun arkasında gelişir (30, 32). Gubernaculum, testisin alt kutbu canalis inguinalis’den geçerek, skrotum derisine bağlar. Bir görüşe göre, gubernaculum’un çekmesiyle testisler intrauterin hayatın 6.ay civarında canalis inguinalis’in iç ağzına gelir ve genellikle 7. ayda skrotuma iner (30). Testisler oval biçimde olup, yanlardan basıktır. Skrotum içinde hareket ederek sol testis sağ testisten 1 cm daha aşağıda yer alır (31).

Testislerin facies lateralis ve facies medialis adındaki iki yüzü; margo anterior ve margo posterior olarak adlandırılan iki kenarı, extremitas superior ve extremitas inferior adında iki uç kısmı bulunmaktadır (30, 33, 34). Testis tunika vajinalis testis, tunika albuginea ve tunika vasküloza olmak üzere üç tabaka ile sarılmıştır.

a. Tunika vajinalis testis: Embriyonik processus vajinalisin distal kalıntısı ile testisin büyük bölümünü işgal eden periton artığıdır ve mezotelyal hücrelerle döşelidir (30, 35). Tunika vajinalis testisin lamina visseralis (epiorchium) ve lamina parietalis (periorchium) adında iki yaprağı bulunmaktadır.

Lamina visseralis (Epiorchium): Epididymisin büyük kısmı ile arka kenarının medial bölümü hariç testisi örter ve bu iki oluşumu birbirine bağlar. Testis ve epididimisin arka kenarlarından, lamina parietalis olarak fascia spermatica interna'nın iç yüzüne geçer (30).

Lamina parietalis (Periorchium): Peritoneum'un fascia spermatica internayı döşeyen kısmıdır. Funiculus spermaticus'un ön ve iç kısmında yukarıya doğru biraz uzar. Bu nedenle lamina visseralis'den daha geniştir. Lamina parietalis'in iç yüzü düzdür ve mezotel ile kaplıdır (30).

b. Tunika albuginea: Testisi saran mavimsi beyaz renkli, sıkı yapılı fibröz bir tabakadır. Bu fibröz demetler, farklı yönlerde uzanarak birbiri içine girerler. Tunika albugineayı, arka kenarı hariç olmak üzere, dıştan tunika vajinalis testisin lamina visseralisi örter. Peritonun bulunmadığı arka kenara epididimis tutunur ve buradan testisin damar ve sinirleri girip çıkar. Tunika albuginea, arka kenarda testisin içine doğru kalın ve vertikal yarım bir bölme şeklinde uzantı gönderir. Bu bölmeye mediastinum testis denir (29, 30, 33).

c. Tunika vasküloza: Tunika albugineanın iç yüzündeki damar ağı tabakasıdır. Damarlar arasında kalan aralıkları da gevşek bağ dokusu doldurur. Tunika vasküloza, tunika albugineanın iç yüzünü ve tüm bölmelerin yüzlerini döşer. Böylece, testisin içindeki tüm lobuli testisi de sarmış olur (29, 30). Tunika albuginea ve septula testisler arasında boşluklarda uzun tüplerin oluşturduğu bez kümeleri bulunur. Sayıları 200-300 arasında değişen ve lobuli testis denilen bu bez kümelerinin büyüklükleri buldukları yere göre farklıdır.

Testisin innervasyonu, sempatik postgangliyonik ve visseral afferent sinirlerle gerçekleşir. Bu sinirler genelde damarları izleyerek testise ulaşır. Tunika albuginea hariç ayrılan sinirler interstisyuma kan damarları aracılığıyla ulaşır. Testis lenfatikleri, seminifer tübüller çevresinde pek görülmeyen lenfatik kapillerlerle interlobüler septadan başlayarak, spermatik kordu takip edip paraaortik, perikaval ve interaortokaval lenf düğümlerine açılırlar (30-34).

2.1.1.3. Mediastinum testis (corpus Highmori)

Yarım bölme şeklindeki bu yapı, testisin üst ucundan alt ucuna kadar uzanır ve yukarı kısmı daha geniştir. Mediastinum testisin ön ve yan kısımlarından çıkan bölmeler, testisi saran tunika albugineaya tutunurlar. Septula testis denilen bu bölmeler testisi piramit şeklinde boşluklara ayırır. Tabanı perifere, tepesi ise mediastinum testise bakan bu boşluklarda tubuli seminiferi kontorti ve tubuli seminiferi rekti denilen tüp şeklindeki bezler bulunur. Mediastinum testisten damarlar ve kanallar girip çıkar.

2.1.1.4. Epididimis

Epididimis spermiyumların depo edildiği ve olgunlaştığı bir oluşumdur. Testislerin arka kenarında yer alan epididimis yaklaşık olarak 6 metrelik duktus epididimisin bir araya toplanmasıyla oluşur. Epididimisi oluşturan bu kanala, duktus epididimis denir. Epididimisin üst kısmı daha kalındır ve aşağı doğru incelik. Kalın üst bölümüne kaput epididimis, orta bölümüne korpus epididimis ve alt bölümüne de kauda epididimis denilir. Testisten çıkan duktuli efferentes testisler kaput epididimise girer ve burada duktus epididimise açılır. Bu nedenle kaput epididimis daha kalındır ve testise yapışıktır (31).

2.1.1.5. Duktus deferens (Vas deferens)

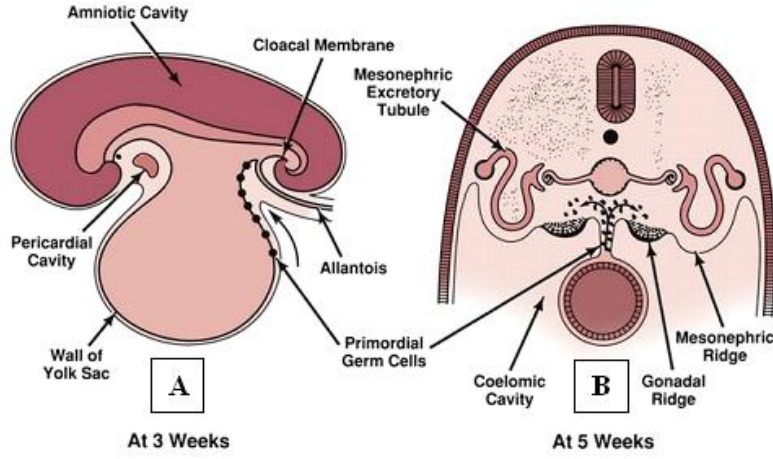
Duktus epididimis, epididimisin kuyruk kısmında kalınlaşarak duktus deferens adını alır. Önce kıvrıntılı, daha sonra düz bir seyirle, epididimisin arka ve medial tarafında yukarı doğru uzanır. Funiculus spermaticus içinde yukarı doğru çıkar ve kanalis inguinalisten geçerek karın boşluğuna ulaşmış olur (31, 36). Anulus inguinalis profundus'ta funiculus spermaticus'u meydana getiren diğer yapılardan ayrılmaktadır (31).

2.1.2. Testis Embriyolojisi

Cinsiyet farklanması, bazıları otozomal olan çok sayıda genin rol oynadığı karmaşık bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı, kısa kolu üzerinde SRY genini taşıyan Y kromozomudur. Gelişim gösteren gonadlar XX veya XY kromozoma sahip olur (37). Bu genin protein ürünü rudimenter durumdaki cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür. SRY proteini testis belirleyici faktördür (TBF). Bu faktör varsa fetusun cinsiyeti erkek olarak gelişir (38, 39).

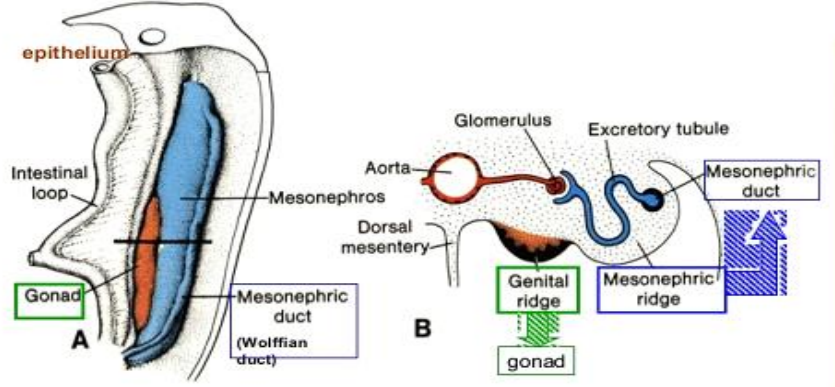
2.1.2.1. Gonadlar

Embriyonun cinsiyeti, genetik olarak daha fertilizasyon sırasında belirlenmediği için, gelişimin 7.haftasına gelinceye kadar gonadlar erkek ya da dişiye ait özellikte değildir (40). Gonadlar bir çift halde uzunlamasına, genital veya gonadal sırt halinde çıkarlar. Epitel proliferasyonu ve altında yer alan mezenşimin yoğunlaşmasıyla meydana gelir. Gelişimin yaklaşık 6. haftasında ise genital sırtlar içinde germ hücreleri yoktur. Epiblasttan kökenlenen primordial germ hücreleri, primitif çizgi boyunca göç ederek, üçüncü haftada yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin iç kısmında yerleşim gösterirler (Şekil 2.2A) (38, 39). Dördüncü haftanın sonlarında ise ameboid hareketlerle son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyip (Şekil 2.2B) Yaklaşık 5. haftanın başlarında primitif gonadlara ulaşır, 6. haftada ise artık genital sırtları işgal eder (39, 41). Bu hücreler genital sırtlara ulaşamazsa gonadlar gelişim gösteremez. Primordiyal germ hücreleri gonadların, over veya testise farklanmaları üzerinde indükleyici etkisi vardır (39).



Şekil 2.2. Üç haftalık embriyoda, yolk kesesi duvarında allantois bağlantısına yakın bir yerde primordiyal germ hücrelerini gösteren şema (A). Primordiyal germ hücrelerinin son bağırsak ve dorsal mezenter boyunca genital kabartıya doğru giden göç yolu (B) (42)

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmalarından hemen önce ve ulaştıkları sırada, genital sırttaki epitel hücreleri proliferasyon olarak altlarındaki mezenşimin içine gömülürler (39, 43). Bunlar primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz kordonları oluşturur. (Resim2.3) (38, 39). Hem erkek, hem de dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadların birbirinden ayrılması mümkün değildir. Bu evredeki gonada farklanmamış gonad denir (38, 39, 44).



Şekil 2.3. Altı haftalık embriyonun, lumbal bölgeden geçen transvers kesitinde, primitif cinsiyet kordonlarıyla birlikte farklanmamış gonad görünümü. Bazı primordial germ hücreler primitif cinsiyet kordonlarına ait hücrelerle çevrenmiştir (45).

Embriyo genetik olarak erkekse primordiyal germ hücreleri XY kromozom kompleksine sahiptir. Testis belirleyici faktörü kodlayan Y kromozomu üzerindeki SRY geninin etkisiyle, primitif cinsiyet kordonları testis veya medullar kordonları oluşturur. Bu kordonlar bezin hilusuna doğru, daha sonra rete testis tübüllerini oluşturacak olan minik hücre sıraları halinde bir ağ oluşturacak şekilde dağılırlar (36, 38, 39, 46-48). Gelişimin daha ileri evrelerinde, tunika albuginea denilen yoğun fibröz bir bağ doku tabakası testis kordonlarını yüzey epitelinden ayırır (28, 38). Dördüncü ayda, testis kordonları atnalı şeklini alır ve bu nalın açık uçları rete testisle devam eder. Bu durumda testis kordonları artık primitif germ hücreleri ve bezin yüzey epitelinden gelişen Sertoli destek hücrelerinden meydana gelir. Gonadal sırtın orijinal mezenşiminden köken alan interstisyel Leydig hücreleri testis kordonlarının arasında bulunur ve bu kordonların farklanmaya başlamasından hemen sonra gelişmeye başlar. Gestasyonun 8. haftasında, Leydig hücreleri testosteron üretmeye başlar (38, 39). Testisler işte bundan sonra genital kanal ve dış genital organların cinsiyetini etkileyecek hale gelir. Puberteye kadar solid halde kalan testis kordonları pubertede lümenleri açılarak seminifer tübüllerine dönüşürler. Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübülleriyle birleşir ve duktuli efferenteslere girerler. Efferent duktuslar mezonefrik sisteme ait boşaltım tübüllerinin geride kalan kısımlarıdır. Bu duktuslar rete testisle, ileride duktus deferens

olarak adlandırılacak olan wolffian ve mezonefrik kanalları birbirine bağlar (38, 39, 46, 48).

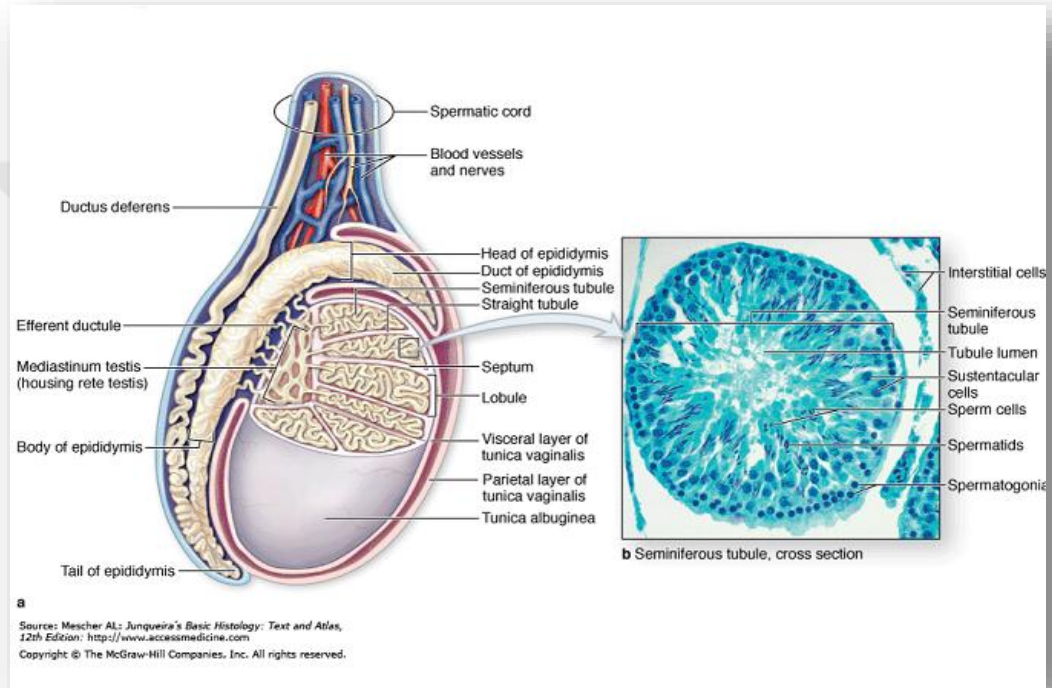
2.1.3. Testis Histolojisi

Testisler bir çift organ olup embriyolojik gelişimi, seksüel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkiler (49). Testisler endokrin salgı yapabilen ve aynı zamanda birleşik tübüler özellikte olan ekzokrin bir çift bezdir. Testisin ekzokrin ürünü sonucu üreme hücresi olan spermiyum oluşur. Endokrin ürünü ise Leydig hücreleri tarafından sentezlenen testosterondur (50). Testis, dıştan kalın bağ dokusu yapısında kapsül olan tunika albuginea tarafından çevrelenmektedir. Oldukça kalın bir sıkı bağ dokusu yapısında kapsül olan tunika albuginea her bir testisi sarar. Kapsülün iç kısmı ise tunika vasküloza kan damarları içeren gevşek bağ dokusudur. Testisin posteriyor yüzeyinde yer alan tunika albuginea tabakası kalınlaşmış , iç kısma doğru mediastinum testis halinde uzanmaktadır. Kan damarları, lenf damarları ve genital boşaltım kanalları testise girerken ve çıkarken mediastinum içinden geçer (36, 49, 51, 52).

2.1.3.1. Seminifer Tübüller

Her bir testis, kapsülden uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar tarafından yaklaşık 250 lobüle bölünür. Her bir lobül, yüksek düzeyde kıvrımlı birkaç seminifer tübülden oluşmaktadır. Bu lobüllerde, spermilerin üretildiği, kıvrımlı seminifer tübüller bulunur. Lobüllerde 1-4 adet seminifer tübül bulunur. Lobülün içinde yer alan her bir tübül bir halka şeklinde ve uzun olmasından dolayı oldukça kıvrımlıdır ve lobülün içinde kendi üzerine katlanma yapar. Halkanın uçları testisin mediastinumuna yakın ve kısa, düz bir yol izler. Seminifer tübüllerin bu kısmı düz tübül (tubulus rektus) olarak adlandırılır. Bu kısım mediastinumun içinde anastomozlaşan kanallar sistemi olan rete testis ile devam eder. Tunika propriya tarafından çevrelenen seminifer tübüller, seminifer epitelden meydana gelir. Her bir seminifer tübül yaklaşık 50 cm uzunluğunda (30-50 cm arasında) ve 150-250 çapındadır. Seminifer tübüller arasında yer alan boşluk sınırları, kan damarları, lenfatik kanalları, makrofajları ve Leydig hücrelerini kuşatan interstisyel doku ile doldurulmuştur (Şekil 2.4) (36, 49, 52, 53). Seminifer tübüller, epitel ve epitelin altındaki tip I kollajen ile fibroblastların yer aldığı bağ dokusundan (tunika propriya) meydana gelir (54). Seminifer epitel iki temel hücre popülasyonundan oluşan kompleks yapılı çok katlı, sıra dışı bir epiteldir. Farklılaşmakta olan

spermatogenik hücreler, seminifer epitelde rastgele yerleşmez. Spesifik hücre tipleri bir arada gruplanmışlardır. Bir seminifer tübülün herhangi bir bölümünde farklılaşmanın tüm fazları ardışık olarak oluşur ve kök hücrelerin soyları sitoplazmik köprülerle birbirine bağlı kalırken, senkronize bir şekilde mitotik ve mayotik bölünelere ve olgunlaşmaya uğrarlar. Seminifer tübülün herhangi bir bölgesinde aynı hücre birliği örüntüsünün ardışık ortaya çıkışı arasındaki evreler serisi, seminifer epitelin bir siklusunu oluşturur. İnsanda spermatogenez yaklaşık 74 gün kadar sürmektedir (36).



Şekil 2.4. Seminifer tübüllerin görünümü. (55)

2.1.3.2. Sertoli Hücreleri

Sertoli hücreleri uzun, prizmatik, replike olmayan ve seminifer epitelin çok tabakalı bazal laminası üzerinde uzanan hücrelerdir (49). Bu hücreler gelişmekte olan spermlerin mayozdan sonra yüzeyine tutundukları destek hücreleridir. Bazal sitoplazmada yer alan Sertoli hücrelerinin nükleusu ökromatik, büyük, oval veya üçgen şeklindedir. Bazı türlerde karyozom adındaki kendine özgü 3 parçalı yapıda RNA ve DNA bulunan cisimcik çifti tarafından sarılan 1-2 adet belirgin nükleolus içerir (56).

Hücre yan yüz zarları karmaşık içe katlanmalar oluşturduğundan dolayı hücre yan sınırları ışık mikroskopik olarak ayırt edilemez (57). Nükleuslarının en belirgin özelliği bir yada daha fazla derin invaginasyonlar yapmasıdır. Oldukça gelişmiş granüler ve agranüler endoplazmik retikulum (aER), belirgin golgi kompleksi, bol mitokondri, serbest ribozomlar, glikojen granülleri, primer ve sekonder lizozomlar, mikrotübüller ve mikrofilamentlere sahiptir (36, 46, 49, 52, 58).

Elektron mikroskopta Sertoli hücreleri sitoplazmalarında bol miktarda lipid damlacıkları içerdiği görülür. Sertoli hücreleri birbirlerine sıra dışı Sertoli hücre-Sertoli hücre bağlantı kompleksi aracılığıyla bağlanırlar (36, 49, 59). Bu kompleks iki sitoplazmik komponent ile karakterizedir:

a- Her hücrenin bağlantı bölgesinde yassılaştırmış bir aER sisternası plazma membranına paralel uzanır.

b-aER sisternaları ve plazma membranı arasında aktin filament demetleri hegzagonal olarak paketlenmiş halde yer almaktadır.

Sertoli hücre-Sertoli hücre bağlantı kompleksi seminifer epitel bazal ve luminal kompartımanlara ayırmaktadır. Her iki kompartımanda da spermatogonik hücreler, Sertoli hücrelerinin uzantıları tarafından kuşatılır. Sertoli hücreleri ve farklılaşmakta olan spermatogonik hücrelerin arasındaki bu yakın ilişki nedeniyle Sertoli hücrelerinin destekleyici hücreler olarak hizmet ettiği düşünülmektedir (36, 49, 59). Sertoli hücre-Sertoli hücre bağlantı kompleksi kan-testis bariyerinin bulunduğu alandır (25, 52). Bu bariyer seminifer epitelde iyon, amino asit, karbonhidrat ve protein kompozisyonu bakımından fizyolojik bir kompartımanlaşmanın oluşturulması için gereklidir (51, 52). Spermatogonyumların farklılaşması sonucu sperme ait proteinler ortaya çıkar. Ayrıca seksüel olgunlaşmanın, immünolojik yeteneğin gelişmesinden daha sonra meydana gelmesiyle, farklılaşma gösteren sperm yabancısı gibi algılanır. Bu nedenle, germ hücrelerinin kaybına neden olabilecek immün yanıtı başlatır (60). Seminifer tübüllere immüoglobulinlerin geçişi kan-testis bariyeri sayesinde önlenip, haploid germ hücreleri; sekonder spermatosit, spermatid ve spermilerin immün sistem arasında oluşabilecek teması önler (61). Sertoli hücrelerinin ekzokrin salgı ürünleri seminifer tübüllerin lümenlerinde oldukça yüksek konsantrasyondadır ve farklılaşmakta olan spermatogonik hücreler için yüksek konsantrasyonda testosteron içeren bir mikroçevrenin devamlılığını sağlar.

Sertoli hücreleri hem ekzokrin, hemde endokrin salgı fonksiyonuna sahiptir. Androjen bağlayıcı proteini (ABP) salgılar. ABP sayesinde luminal kısımdaki testosteron hormonu yüksek konsantrasyonda tutularak, gelişmekte ve farklılaşmakta olan sperm hücrelerinin olgunlaşmaları sağlanır. Burada folikül uyarıcı hormon (FSH) salınımını baskılayan inhibin, transferrin ve plazminojen aktivatör sentezlenir (46).

2.1.3.3. Kan-Testis Bariyeri

Seminifer tübüller ve interstisyel doku arasında bulunan kan-testis bariyeri, seminifer tübüller içerisine kan damarları ve lenfatik sistemle gelen maddelerin geçişini sınırlar (52, 60). Bu koruma bariyeri germ hücrelerinin kan yoluyla gelen ilaçlar, mutajenler ve toksik kimyasallar gibi ajanlara karşı korunmayı ve seminifer tübüllerin aminoasit, karbonhidrat, iyon ve protein içeriğinin, kan ve lenfin içeriğinden daha farklı olmasını sağlar (51, 52).

2.1.3.4. Spermatogenez

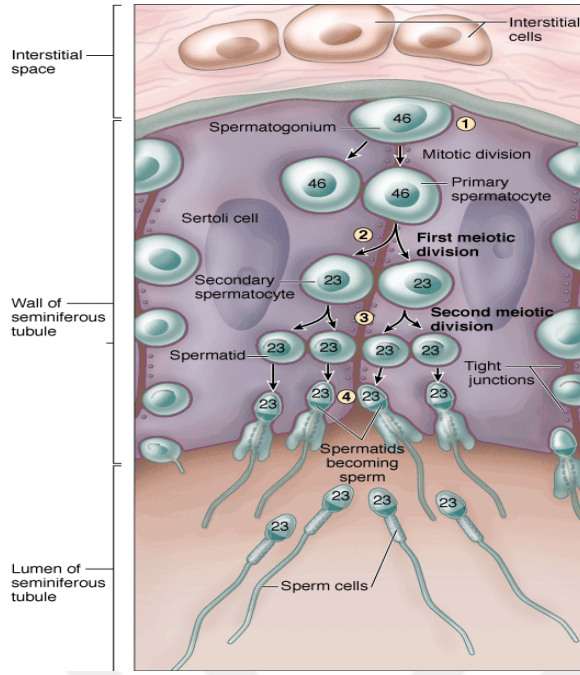
Spermatogenez, spermatogonyumdan sperm gelişimi sürecidir. Spermilerin üretildiği süreç olan spermatogenezde kompleks ve eşsiz bir olaylar serisi gerçekleşir. Puberteden hemen önce, hipofizyal gonadotropinlerin seviyesinin artmasıyla başlar ve yaşam boyunca devam eder (36). Gelişimleri açısından üç farklı faza ayrılır:

a) Spermatogonyal fazda spermatogonyumlar mitoz geçirip bölünerek yerlerine geçecek hücreleri oluştururken, aynı zamanda primer spermatositlere farklılaşmakta olan adanmış spermatogonyum hücrelerininide oluştururlar.

b) Spermatosit fazında (mayoz) primer spermatositler iki mayotik bölünmeye uğrayarak kromozom sayılarını ve DNA miktarlarını azaltırlar ve spermatid adı verilen haploid hücreleri oluştururlar.

c) Spermatid fazında (spermiyogenez), spermatidler matür (olgun) sperm hücrelerine farklılaşırlar.

Spermatogenezin sonunda spermatidler son olgunlaşmalarını geçirip, spermiyasyon olarak adlandırılan bir süreç ile Sertoli hücrelerinden seminifer tübülün lümenine verilir.



Şekil 2.5. Spermatogenezin evreleri (55)

a) Spermatogonyal Faz

Spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri arasında bulunan zonula okludens tipi bağlantıların altında yer aldığı için kan-testis bariyerinin dışında bulunan ve bazal lamina ile direkt bağlantı halindeki hücrelerdir (62). Spermatogonyal fazda kök hücreler bölünerek kendi yerlerine geçecek olan hücreleri ve spermatogonyum popülasyonunu oluştururlar. Spermatogonyal kök hücreler çok sayıda bölünme geçirirler ve rutin H&E preparatlarında nükleer görünümünde farklılıklar gösteren spermatogonyal soyları üretirler (36, 49). İnsan spermatogonyumları, rutin histolojik preparatlarında nükleusların görünümü temel alınarak 3 tip olarak sınıflandırılmaktadır:

1) Tip A koyu spermatogonyumlar, ince granüllü kromatinli, yoğun bazofilik, oval nükleuslara sahiptirler. Bu spermatogonyumların seminifer epitelin kök hücreleri olduğu düşünülmektedir. Düzensiz aralıklarla bölünerek ya kök hücre olarak kalan bir çift tip A koyu (Ad) spermatogonyum ya da bir çift A açık (Ap) spermatogonyum oluştururlar. Tip A açık spermatogonyumlar, açık renk boyanan, ince granüler kromatinli oval nükleusa sahip olan hücrelerdir (36, 49). Ap spermatogonyumlar ise sperm hücrelerini üreten farklılaşma evresine yönlendirilmiş hücrelerdir. Birkaç kez mitotik bölünme geçirip sayılarını çoğaltırlar.

2) Tip B spermatogonyumlar, genellikle nüklear zarf boyunca ve merkezde yer alan nükleolusun çevresinde büyük kümeler oluşturacak şekilde yoğunlaşan kromatini olan nükleuslara sahip olan hücrelerdir. Tip B spermatogonyumların nükleus kromatini nükleolus çevresinde ve nükleer kılıf boyunca yoğunlaşma gösterirler (36, 49, 63, 64). Bir Ad spermatogonyumun iki Ap spermatogonyuma bölünmesinin karakteristik özelliği, kardeş hücrelerin ince sitoplazmik köprü ile birbirine bağlı kalmasıdır.

Tip A koyu spermatogonyumlar diğer spermatogenik seri hücreleri oluşturan kök hücrelerdir. Düzenli aralıklarla bölünerek Tip A koyu ve Tip A açık spermatogonyumları oluştururlar. Tip A koyu spermatogonyum kök hücre olarak kalırken, Tip A açık spermatogonyum ise farklılaşıp, olgunlaşarak spermiyum haline gelir (36, 49).

b) Spermatozoid Fazı (Mayoz Bölünme)

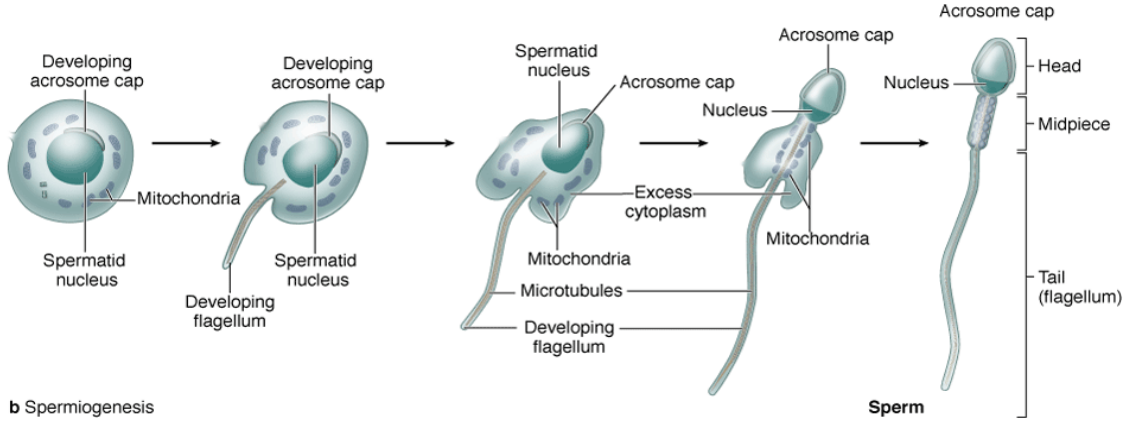
Spermatozoid fazında primer spermatozoidler mayoz geçirip hem kromozom sayısını, hemde DNA miktarını azaltmaktadır. Tip B spermatogonyumların mitoz geçirmesiyle primer spermatozoidleri üretir. Olgunlaştıktan bir süre sonra ve mayoz bölünme başlamadan DNA'larını replike ederler. Böylece, her bir primer spermatozoidin kromozomu ($2n$) ve iki katı kadar DNA'sı ($4d$) vardır. Her kromozom iki kardeş kromatidten oluşur. Bundan dolayı DNA miktarı $4d$ 'dir.

Mayoz I, kromozom sayısını ($2n$ 'den $1n$ ' ye) azaltır ve DNA miktarını haploid duruma ($4d$ 'den $2d$ ' ye) getirir. Böylece, sekonder spermatozoid haploid kromozom sayısı ($1n$) ve $2d$ miktarda DNA ile karakterizedir. Mayoz II'den önce DNA replikasyonu olmadığı için, bu bölünmeden sonra her bir spermatid haploid ($1n$) sayıda kromozoma sahiptir. Her bir kromozom tek bir kromatid ($1d$) içerir (51). Birinci mayoz bölünmenin profazının alt evreleri; leptoten, zigoten, pakiten, diploten ve diyakinez evreleridir. Bu alt evrelerde görülen temel olaylar; zigoten-pakiten evresinde homolog kromozomların eşleşmesini kolaylaştıran sinaptonemal kompleks oluşumu, homolog kromozomların eşleşmesi (sinapsis), homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri arasında genetik bilgi değişimi (krossing-over) ve eşleşmiş homolog kromozomların ayrılması gibi olaylardır. Profaz evresinin 22. gününden itibaren mikroskopta görülen hücrelerin çoğunluğu primer spermatozoid olarak gözlenmektedir. Profaz evresinden sonra, kardeş kromatit çiftleri metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden geçip sonrasında yavru hücreler olan sekonder spermatozoidlere dağılır (46).

Spermatogenetik serideki en büyük hücreler, nükleuslarında bulunan sinaptonemal kompleksinin bulunmasıyla karakterize primer spermatositlerdir. Testis doku örneklerinde sekonder spermatositlere çok nadir rastlanır. Bu hücreler interfazda kısa süreli kalan ve hızlıca ikinci mayotik bölünme geçiren hücrelerdir (63). Birinci mayotik bölünme ile oluşan hücreler sekonder spermatositler olarak adlandırılır. Bu hücreler yeni DNA sentezlemeden hemen ikinci mayotik bölünmenin profazına girerler. Her sekonder spermatositin kromozom sayısını azaltmıştır (1n); 22 otozom ve bir X ya da bir Y kromozomuna sahiptirler. Bu kromozomların her biri kardeş iki kromatidden oluşur. Sekonder spermatosit diploid DNA miktarına (2d) sahiptir. İkinci mayotik bölünmenin metafaz evresinde kromozomlar metafaz plağına dizilerek, kardeş kromatidler ayrılarak zıt kutuplara gider. İkinci mayotik bölünme sona erdiğinde ve nüklear membranlar tekrardan oluşunca her bir sekonder spermatositten her biri 23 tek iplikli kromozom (1n) ve (1d) miktarında DNA'ya sahip iki haploid spermatid oluşur. Haploid spermatidler, daha fazla bölünmez ve olgun spermi oluşturan bir farklılaşma sürecine (spermiyogenez) uğrarlar. Sperm bir oositi fertilize ettiği zaman normal diploid durum yeniden oluşur (36, 51).

c) Spermatid fazı (spermiyogenez)

Spermatidler olgun sperme farklılaşırken yüksek düzeyde yeniden şekillenmeye uğrarlar. Daha fazla hücre bölünmesi olmaz. Spermatidler, merkezde yer alan nükleus, Golgi kompleksi oldukça iyi gelişmiş olup, oldukça fazla mitokondri ve bir çift sentriyol bulunur. Spermatidin olgun sperme farklılaşması (spermiyogenez) 4 evrede gerçekleşir. Bu evreler, spermatidlerin özel bağlantılarla Sertoli hücre membranına bağlandığında meydana gelir (53). Spermiyogenez evresinde yer alan bu hücrelerin nükleusları yoğunlaşır ve uzar, kuyruk oluştuktan sonra sitoplazmanın büyük bir kısmı kaybolur. Sonuç olarak, seminifer tübülün lümenine salgılanan olgun spermatozoon oluşur (52, 65). Spermatidler, sekonder spermatositlerin ikinci mayoz bölünmesi ile oluşan haploid kromozomlu hücrelerdir ve seminifer tübülün adluminal bölgelerinde yer alırlar (36, 51). Buradaki hücrelere göre küçük, yoğun kromatin bölgeleri olan nükleusları ve seminifer tübüllerde lümen yakınında Sertoli hücrelerinin derin sitoplazmik çöküntüleri içine yerleşmeleri ile tanınırlar (36, 51, 53, 66).



Şekil 2.6. Spermiyogenez ve olgun spermatozoa (55)

Spermatidin olgun sperme farklılaşma evreleri;

- 1- Golgi fazı
- 2- Şapka fazı
- 3- Akrozomal faz
- 4- Olgunlaşma fazı

1- Golgi fazı: Bu faz, spermatidin çok sayıdaki Golgi kompleksinde kümelenen periyodik asit- schiff (PAS) pozitif granüllerinin bulunması ile karakterizedir. Bu proakrozomal granüller, glikoprotein bakımından zengindirler ve akrozomal vezikül denen ve nüklear zarfa komşu, membranla sınırlandırılmış bir vezikül oluşturmak üzere bir araya gelirler. Bu fazda akrozomal vezikül genişler ve içeriği artar. Akrozomal vezikülün pozisyonu, geliştirmekte olan spermın ön kutbunu belirler. Bu fazda, sentriyoller de jukstanükleer bölgeden spermatidin arka kutbuna göç ederler. Arka kutupta olgun sentriyol plazma membranına dik açı ile hizalanır. Sentriyol, sperm kuyruğunun aksonemini oluşturan dokuz periferik mikrotübül çiftinin ve iki mikrotübülün parçalarının bir araya gelmesini başlatırlar (36, 51, 53).

2- Şapka fazı: Bu fazda akrozomal vezikül nükleusun ön yarısının üzerinde yayılır. Bu, yeniden şekillenmiş yapıya akrozomal kep denir. Akrozomal kepin altındaki nüklear zarf parçası porlarını kaybederek kalınlaşır. Nüklear içerik de yoğunlaşır (36, 49, 53).

3- Akrozomal faz: Bu fazda spermatid kendini yeniden hizalar. Sertoli hücrenin içerisine iyice gömülür ve bazal laminaya doğru yönelir. Gelişmekte olan flagellum seminifer tübülün lümenine doğru uzanır. Nükleus ve onu çevreleyen akrozom da plazma membranının ön kısmına hemen komşu bir pozisyona taşınır ve sitoplazmik posteriora doğru yer değiştirir. Sitoplazmik mikrotübüller, akrozomun arka kenarından spermatidin arka kutbuna doğru uzanan silindirik kılıf olan manşeti oluşturmak için düzenlenir. Akrozomal evre sırasında nükleus uzayarak daha kondanse bir hal alır. Aynı zamanda sentriyollerden biri gelişip flagellumu meydana getirir. Mitokondri de flagellumun proksimal parçası etrafında toplanıp ‘orta parça’ adı verilen kalınlaşmış bölgeyi oluşturur. Bu bölge spermatozoa hareketlerinin kaynağını aldığı yerdir (36, 52, 60, 67).

4- Olgunlaşma (maturasyon) fazı: Spermatidlerin yeniden modellenmesinin bu son basamağında flagellanın etrafında yer alan fazla sitoplazma azaltılır ve olgun (matür) spermatozoon oluşur. Sitoplazmik artıkların spermden uzaklaştırıldığı fazdır ve Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatidler artık birbiriyle bağlantılı değildir ve seminifer tübül lümenine salınırlar (36, 39, 53, 60, 68).

2.1.3.5. Olgun (Matür) Spermin Yapısı

Olgun hale gelen erkek germ hücreleridir. Erişkinlerde spermatogonyumdan spermatozoon oluşumunda geçen süre yaklaşık olarak 64 gündür. Olgun insan spermatozoonu baş, boyun ve kuyruk bölümlerinden meydana gelen spermin baş kuyruk kısımlarını plazma membranı çepeçevre sarar (52).

Olgun insan spermi yaklaşık 60 µm uzunluğunda olup sperm başı yassıdır, sivridir ve 4,5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığındadır (36, 52). Nükleusun anterior üçte ikilik bölümünü saran akrozomal kep, hyaluronidaz, nöraminidaz, asit fosfataz ve akrozin olarak adlandırılan tripsin benzeri proteaz içermektedir. Bu akrozomal enzimler ovumun zona pellusidasının delinmesi için gereklidirler. Sperm yumurtaya temas ettiğinde akrozomal enzimlerin salıverilmesi akrozom reaksiyonunun ilk basamağıdır (36, 66). Bu karmaşık süreç spermin penetrasyonunu ve ardından gelen fertilizasyonu kolaylaştırır ve ovuma başka spermlerin girmesini önler (36, 52, 66). Kuyruk bölümü, yapısal olarak silyuma benzer ve orta kısım, esas kısım ve son kısım olmak üzere 3 bölgeye ayrılır. Orta kısım, sarmal

olarak dizilen mitokondrilerin oluşturduğu tabaka, 9+2 mikrotübüller aksonema ve dış yoğun lifler adındaki sperm boyun kısmındaki bağlantı parçasından kuyruk boyunca uzanan dokuz paralel filamandan meydana gelir (60). Mitokondriyonlar kalın fiberlerin ve aksonemal kompleksin etrafında sarmal tarzda sarılmışlardır. Bu mitokondriyonlar, kuyruğun hareketi için gerekli enerjiyi sağlarlar ve böylece sperm hareketinden sorumludurlar. Esas kısım, 40 µm uzunluğundadır ve kalın fiberlerin aksonemal kompleksin dışında olan fibröz kılıfı içerir. Son kısım ise olgun spermde flagellumun yaklaşık son 5 µm'lik kısmıdır ve yalnızca aksonemal kompleksi içerir (36, 51, 52, 69).

Yeni salınan sperm hücreleri hareketsizdir ve Sertoli hücreleri tarafından salgılanan bir sıvının içerisinde seminifer tübüllerden taşınırlar. Sıvı ve sperm seminifer tübüllerden akar. Lamina propriyanın peritübüler kontraktıl hücrelerinin peristaltik kasılmaları bu durumu kolaylaştırır. Daha sonra seminifer tübülün kısa segmenti olan düz tübüllere girerler. Düz tübüllerde epitel sadece Sertoli hücrelerinden oluşmaktadır. Mediastinum testiste sıvı ve sperm, tek katlı kübük epitel ile döşeli bir anostomozlaşan kanal sistemi olan rete testise girer. Rete testisten boşaltım kanal sisteminin ilk parçası olan duktuli efferentesin ekstratestiküler kısmına ve daha sonra duktus epididimisin proksimal kısmına geçer. Sperm hücreleri duktus epididimisin oldukça kıvrımlı kanalı 4-5 m boyunca hareket ederken hareket kazanırlar ve bazı olgunlaşma değişimlerine uğrarlar. Hareket kazanarak bazı olgunlaşma değişimleri geçirir. Bu değişimler :

- Nükleus DNA' sı yoğunlaşarak sperm başının büyüklüğü azalır.
- Sitoplazma azalarak sperm hücreleri daha da incelikir.
- Plazma membranının lipidleri ve proteinleri değişerek glikozilasyona uğrar.
- Dış akrozomal membrandaki değişimler (dekapasitasyon).
- Sperm hücrelerinin fertilizasyon yeteneğini inhibe etmek için yüzey-ilişkili dekapasitasyon faktörü eklenir.

Distal kısmın ve daha geniş kanalların etrafını saran düz kasların kasılması, spermi epididimis kanalının distal kısmına ulaşana kadar peristaltik hareketlerle hareket ettirmeye devam ederek bu bölgede spermler ejakülasyondan önce depolanırlar. Sperm, erkek boşaltım kanalı sisteminde birkaç hafta canlı kalabilir, fakat dişi üreme kanalında ancak 2-3 gün hayatta kalabilir. Dişi kanalında bir süre sonra ovumu fertilize edebilme yeteneği kazanırlar. Sperm membranındaki glikokaliks komponentlerinin (glikokonjugatlar) uzaklaştırıldığı ve yerine yenisinin konulduğu bu sürece kapasitasyon

denilir (36, 39, 70). Spermatogenez sırasında en önemli uyarıyı hormonlar yapmaktadır. Bu hormonlar (71-73) :

-Testosteron hormonu : Testis interstisyel dokusundaki Leydig hücrelerince salgılanır ve spermatojenik hücrelerin bölünmesi ve büyümesi için oldukça önemlidir. Diğer görevide ikincil cinsiyet karakterlerinin sürdürülmesidir (73).

-Lüteinizan hormon (LH): Hipofizin ön lobundan salgılanarak Leydig hücrelerini uyarıp testosteron salgılanmasını sağlar. Salgılanması negatif feed back ile düzenlenmektedir. Testosteron sentezinin artışı ile bu hormonun salınımı baskılanır, aksine testosteron seviyesi düşük ise artar (72, 73).

-Folikül stimülan hormon (FSH): Hipofizin ön lobundan salgılanarak Sertoli hücrelerini uyarmasını sağlar. Adenozin monofosfat (cAMP) artışına neden olur ve adenil siklaz yapımını sağlar. Androjen Bağlayıcı protein (ABP) nin sentezini ve salgılanmasını uyarıp, ABP nin testosterona bağlanmasını sağlayarak bu hormonu seminifer tübül lümenine taşıyıp spermatogenezini uyarır. Bu olay gerçekleşmezse spermatidler sperme dönüşmez (72, 73).

-Östrojenler: FSH sonucu uyarılmış Sertoli hücrelerinde testosterondan yapılmaktadır (71, 73).

-Büyüme hormonu (GH): Testisin metabolik fonksiyonlarının sağlanması için önemli bir hormondur. Spermatogonyumun erken bölünmesini sağlar, eksikliğinde ise spermatogenez aksar (72, 73).

2.1.3.6. İntersitisyel Doku

Testisin yaklaşık %30'unu gevşek bağ dokusu oluşturur. İntersitisyel doku adı verilen ve tübüllerin arasında yer alan bu bağ dokusunda Leydig hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, mast hücreleri, lenfositler, plazmositler, undifferansiye mezenkim hücreleri gibi çeşitli hücreler, sinirler, kılcak kan ve lenf damarları yer almaktadır. Aynı zamanda interstisyel alan androjen üretimi bakımından oldukça önemlidir (36, 52, 57, 69).

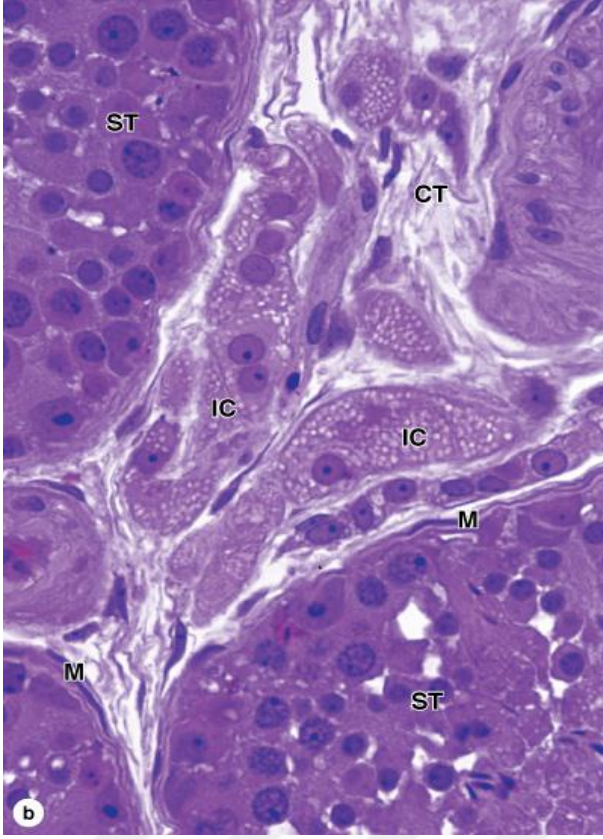
2.1.3.7. Myoid hücreler

Tunika propriya içerisinde yer alan miyoid hücreler ultrastrüktürel düzeyde bazal lamina ve bol miktarda aktin filamentleri içermeleri nedeni ile düz kas hücreleriyle ilişkili özellik gösterirler. Bu hücreler tipik fibroblastların yokluğunda kollajen sentezleme rollerinin işareti olan bir özellik olarak belirgin miktarda granüllü endoplazmik retikulum (gER) içermektedir. Myoid hücrelerin ritmik kasılmaları spermatozoanın ve testiküler sıvının seminifer tübüllerden boşaltım kanal sistemine akışına yardım eden peristaltik dalgalanmaları oluşturur (36). Spermiler böylece duktus epididimise ulaşır, epididimisi geçtikten sonra motilite yeteneği kazanmış olurlar (47, 51).

2.1.3.8. Leydig Hücreleri

Leydig Hücreleri (interstisyel hücreler) büyük, poligonal, eozinofilik hücrelerdir ve kendine has lipid damlacıkları içerirler. Bu hücrelerde genellikle çubuk şekilli ayırt edici sitoplazmik kristaller olan Reinke kristalleri ve lipofuksin pigmenti bulunur. Tübüloveziküler kristali mitokondriyonlar, steroid-salgılayan hücrelerin diğer bir karakteristik özelliğidir ve Leydig hücrelerinde de bulunmaktadır. İnaktif Leydig hücrelerini fibroblastlardan ayırt etmek güçtür. Bu hücreler pubertede gonadotropik stimülasyona uğradıklarında, tekrardan androjen salgılayan hücelere dönüşüp yaşam süresince aktif kalır. Leydig hücreleri erken fetal yaşam sırasında farklılaşarak testosteron salgırlar. Testosteronun salgılanması embriyonik gelişim ve üreme fonksiyonu için gereklidir. Bu hücreler erkek fetusun erkenden farklılaşmasında aktiftir fakat fetal hayatın 5. ayından itibaren inaktif bir periyoda girerler. Serumda bulunan testosteronun %95'i bu hücrelerce, geri kalanı ise adrenal korteks tarafından üretilir (36, 38). Testosteron sentezi sırasında plazma kolesterolü hücreye girer ve asetil koenzim A (CoA) tarafından esterleştirilir ardından sitoplazmada lipid damlacıkları olarak depo edilir. Diğer steroid salgılayan hücreler gibi Leydig hücreleri de bol miktarda granülsüz endoplazmik retikuluma (aER) sahiptirler. Bu özellik Leydig hücrelerinin eozinofilisinin nedenidir. Kolesterolde testosteron sentezi için gerekli enzimler aER ile ilişkilidir. Kolesterol, yağ damlacıklarından mitokondriyonlara steroidogenik akut regülatör protein (StAR) aracılığıyla taşınır ve ardından mitokondrideki sitokrom P450 enzimi olan kolesterol dezmolaz enzimi tarafından pregnenolon üretilir. Düz

endoplazmik retikulumdaki enzimler, pregnenolonu progesterona ve ardından testosterona dönüştürür (51, 57, 74).



Şekil 2.7. Leydig hücreleri (55)

2.1.3.9. Rete Testis

Rete testis, testisin mediastinumu içinde düzensiz biçimde anastomozlaşan kanallardan oluşur (51). Tubuli rekti adı verilen düz seminifer tübüller mediastinum testiste yer alan bu kanal rete testise açılır (49, 53). Bu kanallar tek katlı kübik ya da alçak prizmatik epitel ile döşeli düzensiz, anastomozlaşan kanallardır (49, 51). Bu hücreler, bir apikal silyum ve birkaç kısa mikrovillusa sahiptirler (49).

2.1.3.10. Duktuli Efferentes

Duktuli efferentes luminal yüzeye testere dişi görünümü veren yüksek ve alçak hücre kümelerini barındıran yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir (60). Kanalları döşeyen yalancı çok katlı prizmatik epitel, prizmatik ve kübik hücrelerden

oluşur. Hücre boyları eşit olmadığından dolayı, epitel yüzeyi girintili çıkıntılı görülür. Uzun boylu prizmatik hücreler genelde silyumludur. Kısa boylu hücrelerde silyum yer almaz, ancak yüzeylerinde fazlaca mikrovillus bulunur (36, 51). Prizmatik hücrelerin arasına serpiştirilmiş halde epitelyal kök hücre olarak görev yapan bazal hücreler bulunmaktadır (36, 49). Silyum bulundurmeyen alçak hücreler ise çok sayıda mikrovillus ve apikal yüzeyde kanaliküler invajinasyonlar, pinositotik veziküller, membranla sınırlandırılmış yoğun cisimcikler, lizozomlar ve endositotik aktive ile ilişkili diğer sitoplazmik yapılar içermektedirler. Seminifer tübüllerde salgılanan sıvının çoğunluğu duktuli efferenteste geri emilir (36).

İnsanda yaklaşık 20 duktuli efferentes mediastinumun superiyor ucundaki rete testisin kanallarını duktus epididimisin proksimal parçasına bağlar. Duktuli efferentes testisten çıktıklarında yüksek düzeyde kıvrımlı hal alırlar ve 6-10 konik kütle oluştururlar. Bazal kısımları epididimisin baş bölgesinin bir kısmını oluşturan bu yapıya koni vaskülozi denmektedir. Her biri yaklaşık 10 mm uzunluğundaki koni vaskülozi, 15-20 cm uzunluğunda yüksek düzeyde kıvrımlı hal almış kanalları içermektedir. Konilerin bazalinde duktuli efferentes tek bir kanala, yani duktus epididimise açılır. Boşaltım kanallarında düz kas tabakası ilk olarak duktuli efferentesin başlangıcında ortaya çıkar. Düz kas hücreleri duktülün duvarında dairesel bir kılıf gibi sıralanarak birkaç hücre kalınlığında bir tabaka oluştururlar. Kas hücrelerinin arasına serpiştirilmiş halde elastik fiberler bulunur. Duktuli efferentesin içerisinde sperm transportu, hem silyumların hareketi hem de fibromüsküler tabakanın kasılması ile gerçekleşir (36, 49).

2.1.3.11. Epididimis

Epididimis, duktuli efferentesi ve duktus epididimisi içeren bir organdır. Epididimis, testisin süperiyor ve posteriyor yüzeyleri boyunca uzanan, hilal şekilli bir yapıdır. Yaklaşık 7,5 cm uzunluğundadır ve duktuli efferentesten, duktus epididimisten ve ilişkili düz kaslardan, damarlardan ve bağ dokusu örtülerinden oluşmaktadır. Duktus epididimis yüksek düzeyde kıvrımlı, 4-6 m uzunluğunda bir tüptür. Epididimis baş, gövde ve kuyruk bölümlerine ayrılmaktadır. Duktuli efferentes baş kısmını, duktus epididimis ise gövde ve kuyruk kısımlarını işgal etmektedir (36, 49).

Testisten epididimise giren yeni üretilmiş spermler, duktus epididimis boyunca geçişleri sırasında motilite ve oositi fertilize etme yeteneği kazanarak matür hale

gelirler. Bu androjen bağımlı maturasyon süresince sperm başı, yüzey-ilişkili kapasitasyon faktörünü içeren epididimal sıvı glikokonjugatlarının eklenmesiyle modifiye edilir. Dekapasitasyon olarak adlandırılan bu süreç, spermin fertilize etme yeteneğini geri dönüşümlü olarak inhibe eder. Dekapasitasyon faktörü sonradan dışı üreme kanalında fertilizasyondan hemen önce meydana gelen kapasitasyon sırasında salıverilir. Duktus epididimis, spermlerin, bu kanaldan geçerken hareket ve fertilitate yeteneği kazandıkları özel bir kısımdır (49). Epididimisin yalancı çok katlı epitelindeki esas hücreler stereosilyumlar ile karakterizedir. Boşaltım kanal sistemi iki tip hücre içerir.

a) Esas hücreler epididimisin baş kısmında yaklaşık 80 µm yükseklikte iken, kuyruk bölgesinde yaklaşık 40 µm yüksekliktedir. Stereosilyum denilen çok sayıda uzun, modifiye mikrovillus uzanır (36).

b) Bazal hücreler, bazal laminanın üzerinde bulunan küçük, yuvarlak hücrelerdir. Kanal epitelinin kök hücreleridir (36, 49, 51).

Epididimal hücreler hem absorpsiyon, hem de salgılama fonksiyonu görmektedirler. Epididimisin baş kısmında ve gövdesinin büyük kısmında düz kas örtüsü, duktuli efferentese benzer şekilde ince bir sirküler düz tabakasından oluşmaktadır (49).

2.1.3.12. Duktus deferens (vas deferens)

Duktus deferens, boşaltım kanalının en uzun parçasıdır. Duktus deferens epididimisin kuyruk bölgesinin devamıdır. Duktus deferens, epididimise çok benzer şekilde yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Uzun prizmatik hücrelerde lümeneye doğru uzanan uzun mikrovilluslara sahiptirler. Yuvarlak bazal hücreler, bazal laminanın üzerinde uzanırlar. Epitel altında ise elastik liflerin bol bulunduğu lamina propriya kısmı yer alır. Mukoza, lümeneye doğru katlantılar yaptığı için lümeni düzensizdir (49).

Duktus deferens testisin posteriyor sınırı boyunca testiküler damarlara ve sinirlere yakın olarak yükselir. Daha sonra, spermatik kordonun bir komponenti olarak inguinal kanalın içinden geçer ve abdomene girer. Spermatik kordon, testise giden ve testise gelen bütün yapıları içermektedir. Duktus deferense ek olarak, spermatik kordon

testiküler arterleri, duktus deferense ve kremaster kasına giden küçük arterleri, pampiniform pleksusu, lenf damarlarını, sempatik sinir liflerini ve genitofemoral sinirin genital dalını içermektedir. Bu yapıların tamamı anterior abdominal duvardan köken alan fasiyal örtüler tarafından çevrelenmiştir. Spermatik kordondan ayrıldıktan sonra, duktus deferens pelviste mesane seviyesine kadar iner. Mesane seviyesinde genişleyip ampulla kısmını oluşturur ve bu yapının son kısmına seminal vezikülün kanalları da dahildir. Duktus deferens daha sonra prostata kadar uzanır ve üretraya açılır. Prostata giren segment artık ejakulatuvar duktus adını alır (49, 60).

Duktus deferensin ampullası, sıklıkla glandüler ve divertiküller sergileyen dallanmış uzun mukozal katlantılara sahiptir. Ampullayı çevreleyen kas örtüsü, duktus deferens boyunca uzanan kas örtüsünden daha incedir ve longitudinal tabakalar ejakulatuvar kanalın başlangıcının yakınlarında kaybolur. Ampullanın ve ejakulatuvar kanalın epiteli salgı fonksiyonuna sahip gibi görünmektedir. Hücreler çok sayıda sarı pigment granülü içerirler. Ejakulatuvar kanalın duvarı bir kas tabakasına sahip olmayıp, prostatın fibromusküler dokusu bunun yerini alır (36, 49).

2.1.3.13. Duktus ejakulatoryus

Duktus deferensin prostata giren segmentine ejakulatuvar duktus denir (49). Yaklaşık 1 cm uzunluğunda, basit prizmatik epitel bazende yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşeli düz bir kanaldır. Prostat bezine girerek burdan prostatik üretraya açılır. Mukoza lümenine doğru katlantılar yapar. Duvarında ise düz kaslar yer almaz (36, 49, 51). Epitelide fibröz bağ dokusu tabakası kuşatır (49).

2.1.3.14. Veziküla Seminalis

Mesanenin posteriyor duvarının üzerinde duktus deferensin ampullasına paralel konumlanmış bir çift, uzun ve yüksek düzeyde katlantılı (36, 49), yaklaşık uzunlukları 15 cm' ye ulaşan bir çift tübüler bezdir (49). Her bir veziküla seminalisin kısa boşaltım kanalı duktus deferensin ampullası ile birleşerek ejakulatuvar kanalı oluşturur. Duvarı mukoza, ince bir düz kas tabakası ve fibröz kılıf içermektedir. İnsan ejakulatının %70'lik kısmı bu bezin salgısından oluşur. Bu bezler, visköz yapıda sarımsı renkte, spermatozoonları aktive eden sitrat, inozitol, prostaglandinler ve çeşitli proteinler gibi maddeleri içeren salgıyı üretir. Bu salgıda bol miktarda fruktoz vardır ve

spermatozoonlar bu monosakkarit sayesinde, hareketi için gereken enerjiyi elde eder (57).

2.1.3.15. Prostat Bezi

Prostat, erkek üreme sisteminin en büyük aksesuar cinsiyet bezidir (36, 49, 51). Büyüklüğü ve şekli ceviz benzemektedir. Prostat bezinin temel fonksiyonu, seminal sıvının oluşumuna katkıda bulunan şeffaf, hafif alkali bir sıvı salgılamaktır. Bez pelvis içerisinde, mesanenin altında yer alır ve üretranın prostatik parçasını çevreler (36). 30-50 kadar tübüloalveolar bezden oluşmaktadır (36, 49, 51). Bazal hücreler ile salgı yapan hücrelerden oluşan prostat bezinin epiteli yalancı çok katlı epiteldir. Prostat bezinin salgısı, ejakulat sıvısının yaklaşık %15'lik kısmını oluşturan asit fosfotaz, amilaz ve fibrolizinden oldukça zengindir (75). Bezler üç konsantrik tabaka halinde düzenlenmektedir: içte bir mukozal tabaka, arada bir submukozal tabaka ve esas prostatik bezleri içeren bir periferik tabakadan oluşur (36). Mukozal tabakanın bezleri direkt olarak üretraya salgılama yaparlar. Diğer iki tabaka, üretranın posteriyor duvarındaki krista üretralisin her iki yanında yer alan prostatik sinüslere açılan kanallara sahiptir. Yetişkin prostat parankimi anatomik ve klinik olarak farklı dört zona ayrılmaktadır:

- **Merkezi zon**, prostat bezinin içinden geçen ejakülatuar kanalı çevreler. Bez dokusunun yaklaşık %25'ini içermektedir ve hem karsinoma, hem de enflamasyona karşı dirençlidir. Diğer zonlara kıyasla, merkezi zondaki hücreler daha belirgin ve hafif bazofilik ve komşu hücrelerden farklı seviyedeki geniş bir nükleusa sahiptir.
- **Periferik zon**, prostat dokusunun yaklaşık %70'ini oluşturur. Merkezi zonu çevreleyerek bezin posteriyor lateral parçasını işgal eder. İnflamasyonların ve prostatik karsinomaların çoğu burada gelişir.
- **Transizyonel zon (geçiş zonu)**, Prostatik bez dokusunun yaklaşık %5'ini oluşturan ve mukozal bezleri içeren bu zon prostatik üretrayı çevreler. Yaşlılarda bu zondaki parankim hücreleri hiperplaziye uğrayınca epitel hücrelerinde kitleler meydana gelir. Bu şekilde gelişen nodül yapıları prostatik üretrayı baskılayarak ürinasyonu zorlar. Bu rahatsızlıkta benign prostatik hiperplazia (BPH) adıyla bilinmektedir.

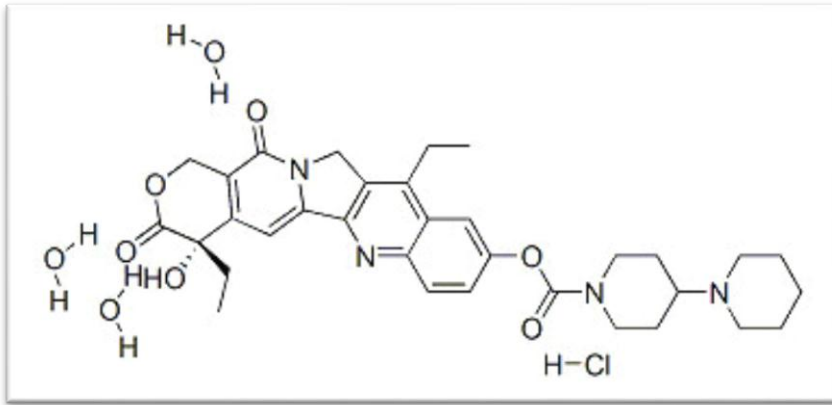
- **Periüretal zon**, bu bölgede submukozal ve mukozal bezler yer alır. BPH'nın ilerdeki dönemlerinde bu zon stromal komponentlerinden kaynaklanan patolojik büyüme gösterebilir. Prostatik bez epitelinin büyümesi dihidrotestosteron hormonu tarafından düzenlenmektedir.

2.1.3.16. Bulboüretal Bezler (Cowper Bezleri)

Bir çift halindeki bu bezler ürogenital diyaframda yer alan, bezelye büyüklüğündeki yapılardır. Bezlerden her birinin kanalı ürogenital diyaframın inferiyor fasiyasının içinden geçer ve penil uretranın başlangıç noktası ile birleşir (36). Bulboüretal bezler, mukus salgılayan tek katlı silindirik epitelle döşeli tübüloalveolar bezlerdir. Bezin salgısı, kayganlaştırıcı işlevi gören berrak bir mukustur (74, 76). Bezin berrak mukus benzeri salgısı yüksek miktarda galaktoz, galaktozamin, galakturonik asit, sialik asit ve metilpentoz içermektedir. Seksüel stimülasyon, preseminal sıvının büyük kısmını oluşturur (36, 49, 51).

2.2. İrinotekan

Bir topoizomerez inhibitörü olan İrinotekanın moleküler formülü $C_{33}H_{38}N_4O_6$, molekül ağırlığı 586,67802 g/mol'dür. Açık sarı renkte ve kristal görünümündedir. Safılık oranı yaklaşık %99 kadardır. Açık sarı solüsyonu 1 mg/ml DMSO çözeltisinde elde edilir. +4°C de, nem ve ışıktan uzak bir şekilde muhafaza edilmelidir (77).



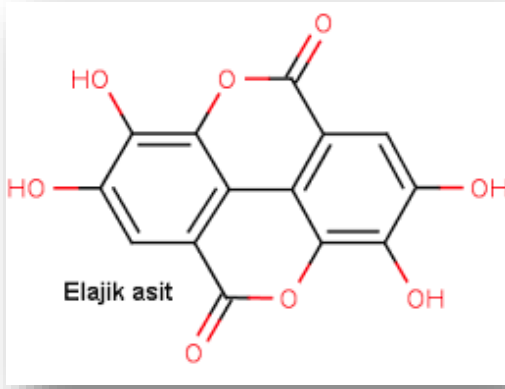
Şekil 2.8. İrinotekanın kimyasal formülü (80)

İrinotekan, *Camptotheca acuminata*'dan ekstrakte edilmiş, sitotoksik, kinoin bazlı alkaloid olan kamptotesinin yarı sentetik bir türevidir (78-80). İrinotekan, bir karboksil esteraz dönüştürücü enzim ile biyolojik olarak aktif bir metabolit 7-etil-10-hidroksi-kamptotesine (SN-38) dönüştürülür. Ana bileşik olan irinotekandan bin kat daha güçlü olan SN-38, topoizomerez-1 ile DNA arasındaki bölünebilir kompleks stabilize DNA kırıklarına neden olarak DNA replikasyonunu inhibe eder ve apoptotik hücre ölümünü tetikler. Daha sonra devam eden DNA sentezi irinotekanın sitotoksik etkilerini göstermesi için gerekli olduğundan S fazına özgü bir ajan olarak sınıflandırılır (80, 81). İrinotekanın aktif metaboliti olan SN-38 oluşurken farklı birçok metabolik enzim yer alır. Bu enzimlerin genlerinde yer alan farklılıklar hasta profillerini ortaya çıkarıp, genetiksel polimorfizm sonucunda farmakokinetik ve farmakodinamik farklılıkları ortaya koyar (81).

Bu ilacın küçük hücreli ve küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, ovaryum kanseri, kolorektal kanseri, servikal kanseri gibi pekçok tümöre karşı ve dirençli olan lenfoma ve lösemiye karşıda yine büyük ölçüde antitümöral etkisi bulunmaktadır (82). Bunun yanısıra yapılan toksikoloji çalışmalarında hematolojik sistemde ve lenfoid organlarda yaygın toksik etki yarattıkları gösterilmiştir. Miyelotoksisite, nötropeni, trombositopeni, anemi en ciddi toksik etkileri arasındadır. Hematolojik yan etkiler doza bağlıdır, doz ayarlaması ile azaltılabilmektedir (83).

2.3. Elajik Asit

Elajik asit pekçok meyve ve sebzede bulunan doğal fenolik bir bileşiktir. Molekül formülü $C_{14}H_6O_8$, ağırlığı 302,197 g/mol'dür. Kırmızı ve siyah frenk üzümü, kırmızı ve siyah ahududu, böğürtlen, yaban mersini ve çilek gibi meyvelerde bulunan 'ellagitannins' denilen maddeler vücutta elajik asite dönüştürülür (84).



Şekil 2.9. Elajik asitin kimyasal formülü (85)

Elajik asit ilk olarak 1960'lı yıllarda kan pıhtılaşması üzerine etkisi araştırılmış ve ardından farklı çalışmalarla devam etmiştir. 1970 ve 1980'li yıllarda ise araştırmacılar tarafından DNA'daki mutasyonları önleme ve kanser hücrelerinde apoptoza neden olan bir kanser inhibitörü olduğu yönünde birçok çalışma yapılmıştır (86). Elajik asit serbest radikallerin yıkıcı etkilerini bloke edici özelliği olan bir antioksidandır (87, 88). Aynı zamanda antimutajen ve antikanser bileşenlerine sahiptir (89, 90).

Çalışmalar; göğüs, özefagus, deri, kolon, prostat ve pankreas kanserli hücreler üzerindeki antikanser aktivitelerini göstermiştir. Elajik asit, P53 geninin, kanser hücreleriyle ortadan kaldırılmasını önleyerek kansere neden olan moleküllere bağlanıp etkisiz hale gelmesini sağlar. Yapılan araştırmalarda elajik asitin P53 genini muhafaza ettiğini göstermiştir. P53 geni, hasarlanan DNA yapısını yeniden onarabilme yeteneğine sahiptir. Yapılan deneysel çalışmalarda elajik asitin kontrolsüzce çoğalan hücrelerin büyümesini engelleyerek oluşan oksidatif hasara karşı koruyucu bir ajan olabileceği gösterilmiştir. Aynı zamanda kansere neden olan mutajenleri inaktif hale getirerek, kanser hücrelerinin yaşaması için gereken Nükleer Faktör Kappa B'yı (NFkB) engeller ve kanserli hücrelerin apoptoz sürecine girmesini başlatır (91).

Nar, çilek, ahududu, kiraz, kıvılcık, vişne, böğürtlen, kırmızı üzüm ve ceviz elajik asit bulunduran besinler arasındadır. Bu meyvelerin yapısındaki antioksidan oranlarını flavonoid, fenolik asit, antosiyaninin seviyeleri ve kompozisyonları etkiler.

Heinonen ve ark. (1998), bu meyve fenoliklerinin antioksidan oranlarını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, çıkardıkları fenolik madde ekstraktlarının lipid oksidasyonunu yok etme özelliklerini tespit etmişlerdir.

Ayrıca deneylerde kullanılan birçok antioksidan lipid peroksidasyonunu bloke etmelerinin yanısıra nükleik asitler, protein ve karbonhidrat yapılarının korunmasını sağlar. Oluşan serbest radikaller ve reaksiyon ürünleri biyomoleküllerin, fagositlerin ve myofibroblastların aktivitesini artırır. Yine yapılan çalışmalarda ortamdaki lipid peroksidasyonu ve lipid peroksidasyon ürünleriyle oluşturulan çoğu maddenin antioksidanlarla azaldığı gösterilmiştir (92, 93).



3. MATERYAL ve METOT

Çalışmamızda kullanılan sıçanlar İnönü Üniversitesi Deneysel Hayvanları Araştırma Merkezinden temin edildi. Ağırlıkları yaklaşık 300 gr olan, 40 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan kullanılarak rastgele seçilip 4 gruba ayrıldı. Gruplar sırasıyla:

1. Grup: Kontrol grubu (10 adet)
2. Grup: İrinotekan (IR) grubu (10 adet)
3. Grup: İrinotekan (IR) + Elajik Asit (EA) grubu (10 adet)
4. Grup: Elajik Asit (EA) grubu (10 adet)

Kontrol grubundaki sıçanlara 30 gün boyunca Elajik Asitin çözünürü olarak kullanılan CMC uygulandı. İrinotekan grubundaki sıçanlara ise IR, serum fizyolojik (SF) içerisinde çözülerek hafta bir defa 10 mg/kg/gün olacak şekilde intraperitoneal (i.p) olarak uygulandı. İrinotekan ile birlikte Elajik Asit uygulanan grupta ise sıçanlara 30 gün boyunca haftada bir defa 10 mg/kg/gün/i.p. IR ve 50 mg/kg/gün gınaşırı olacak şekilde EA gavaj yolu ile uygulandı. EA grubunda ise; %0,01 CMC içerisinde çözülerek 30 gün boyunca gınaşırı 50 mg/kg/gün olacak şekilde gavaj yolu ile uygulandı. Çalışmanın sonunda ketamin/ksilazin anestezisi altında sıçanlardan testis doku örnekleri histolojik ve biyokimyasal değerlendirmeler için alındı. Histolojik olarak ışık mikroskopik değerlendirme için Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama yöntemi, immunohistokimyasal değerlendirme için ise Kaspaz-3 boyama yöntemleri kullanıldı. Biyokimyasal değerlendirmeler için hücre antioksidan düzeyini değerlendirmek için TBARS ve antioksidan enzimlerin seviyeleri (GSH, CAT, SOD, GSH-Px) ölçüldü. Ayrıca spermatolojik olarak sperm hareketliliği, anormal sperm oranı (baş, kuyruk, total) ve epididimal sperm konsantrasyonu incelendi.

3.1. Histolojik Yöntemler

Histolojik incelemeler için alınan testis doku örnekleri %10'luk formalin içerisinde tespit edildi (Tablo: 3.1.).

Tablo 3.1. Tespit maddesi ve süresi

FİKSATİF	MADDELER	ORANI	TESPİT SÜRESİ
Formaldehit	Formaldehit	7 cc	24 saat
Solüsyonu	Distile su	93cc	24 saat

Formaldehit içerisinde tespit edilen dokulara rutin histolojik doku takip işlemleri uygulandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Doku takip basamakları.

%70 alkol	1 saat
%80 alkol	1 saat
%96 alkol	1 saat
%96 alkol	1 saat
Absolü alkol	1 saat
Absolü alkol	1 saat
Ksilen	1 saat
Ksilen	1 saat
Parafin I	1 saat
Parafin II	1 saat

Takip işlemlerinden geçirilip ardından dokular parafin bloklar içerisine alındı. Hazırlanan bloklardan mikrotom (Leica RM 2245) ile 5 µm kalınlığında kesitler alınarak, kesitlere Hematoksilen ve eozin boyama metodu uygulandı. Leica 280 ışık mikroskopunda ve Leica Q Win Görüntü Analiz Sisteminde (Leica Microsystems Imaging Solutions, Cambridge, UK) incelenerek fotoğraflar çekildi. İmmunohistokimyasal

boyama için alınan kesitler polilizin kaplı lamlar üzerine alındı. Alınan kesitlere Kaspaz-3 boyama metodu uygulandı.

3.1.1. Mayer'in Hematoksilen-Eozin Metodu:

Lamlara alınan doku örnekleri bir saat etüvde bekletildi ve doku çevresinde bulunan parafinin erimesi sağlandı. Daha sonra kesitlere sırası ile aşağıda verilen boya metodu uygulandı.

Ksilen I	5 dakika
Ksilen II	5 dakika
Ksilen III	5 dakika
%96 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
Absolü alkol	3 dakika
Absolü alkol	3 dakika
Distile suda yıkama	2 dakika
Mayer Hematoksilen	10 dakika
Çeşme suyu	20 dakika
Eozin	2 dakika
%96 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
Ksilen I	5 dakika
Ksilen II	5 dakika
Ksilen III	5 dakika

H-E ile boyanmış preparatlarda seminifer tübül çapları ve germinal epitel kalınlıkları ölçüldü (Tablo 4.1). Ölçümler, her preparattan 100 adet seminifer tübül sayılarak gerçekleştirildi. Histolojik skorlama, tübüllerin sağlam, atrofiye ve dejenere hücrelerin varlığına göre, her bir preparattan X20 büyütmede 10 farklı alan incelenerek yapıldı (Tablo 4.2).

3.1.2. Histolojik İnceleme İçin İstatiksel Değerlendirme

İstatiksel analizler SPSS 13 ve MedCalc programı ile yapıldı. Tüm grupların ortalama değerleri nonparametrik Kruskal- Wallis testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasındaki farklılığın önemli olup olmadığı Mann-Whitney U testi ile ikili karşılaştırmalar yapılarak değerlendirildi. Alınan sonuçlar ortalama \pm standart hata (SEM) ile ifade edilerek, $p < 0.0001$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.1.3. İmmunohistokimyasal boyama prosedürü

Testis dokularından alınan 5 μ m'lik kesitler, immunohistokimyasal boyama için polizin kaplı lamlar üzerine alındı.

Xylol I	5 dakika
Xylol II	5 dakika
Xylol III	5 dakika
%100 alkol	3 dakika
%96 alkol	3 dakika
%80 alkol	3 dakika
Distile su	5 dakika
Antijen Retrieval Aşaması	15 dakika
Oda ısısında soğutma	20 dakika
Distile su	5 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	5 dakika

H ₂ O ₂ (Hidrojen Peroksit) Aşaması	10 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	5 dakika
Protein Bloke Aşaması (Süper Blok)	5 dakika
Primer Antikor Aşaması	2 saat
PBS (Phosphate Buffered Saline)	2x5 dakika
Sekonder Antikor	10 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	2x5 dakika
Streptavidin Peroksidaz (HRP) Aşaması	10 dakika
AEC Kromojen Aşaması	10 dakika
PBS (Phosphate Buffered Saline)	5 dakika
Distile su	5 dakika
Mayers Hematoksilen	40 sn
Çeşme Suyu	5 dakika
Distile Su	5 dakika
Aqueous mount ile kapatma	

3.2. Biyokimyasal Yöntemler

3.2.1. Örneklerin Alınması ve Hazırlanması

Çalışmamızın 30. gününde sıçanlar sakrifiye edilerek alınan doku örneklerinde (testis) malondialdehit (MDA) düzeyleri ile SOD, CAT, GSH-Px, GSH ve protein ölçümleri inceleninceye kadar -20°C’de muhafaza edildi.

3.2.2. Homojenatların Hazırlanması

Dokular derin dondurucudan alınan dokular tartıldıktan sonra cam tüplere alındı. Üzerine 1/10 (g/h) oranında dilüe edilecek şekilde %1,15'lik potasyum klorür ilave edilip ardından soğukluk muhafaza edilecek şekilde cam-teflon homojenizatörde 16.000 devir/dakika hızda 3 dakika kadar homojenizasyonu sağlandı. Hazırlanmış olan homojenatlarda doku MDA tayinleri yapıldıktan sonra geriye kalan homojenat +4°C'de 45 dakika 3500 rpm' de santrifüj edildikten sonra süpernatant elde edildi. Alınan süpernatantlarda GSH ve protein düzeyleriyle birlikte GSH-Px ve CAT enzim aktiviteleri ölçüldü. Geri kalan süpernatant kısmına kloroform/etanol (3/5,h/h) karışımından oluşan ayıraç 1/1 (h/h) oranında ilave edildi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. Daha sonra 45 dakika 3500 rpm'de santrifüj edildi. Üstte kalan kloroform/etanol fazında SOD enzim aktivitesi ve protein ölçümleri tekrar yapıldı.

3.2.3. Doku Malondialdehit (MDA) Düzeylerinin Ölçümü

Doku MDA düzeylerinin tayini spektrofotometrik olarak Ohkawa ve ark. (94) tarafından önerilen metoda göre yapıldı. MDA tayini; aerobik şartlar altında ve pH:3,5'te, doku homojenatının kaynar benmari içerisinde bir saat inkubasyonu sağlandıktan sonra, lipid peroksidasyonunun sekonder ürünü olan MDA'nın TBA ile reaksiyonu sonucu oluşan pembe renkli kompleksin 532 nm'de spektrofotometrik olarak ölçümü yöntemidir.

3.2.4. Doku Süperoksit Dismutaz (SOD) Aktivitesi Ölçümü

Dokudaki SOD enzim aktivitesi Sun ve ark. (95) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı. SOD tayini; ksantin/ksantin oksidaz sistemi ile üretilmiş olan süperoksitin nitroblue tetrazoliumu (NBT) indirgenmesi esasına dayanmaktadır. Açığa çıkan süperoksit radikallerinin NBT'yi indirgemesi ile oluşan renkli formazon spektrofotometrik olarak ölçülür ve 560 nm'de maksimum düzeyde absorban verir. Enzimin olmadığı ortamlarda indirgenme meydana gelerek mavimsi renk oluşur. Ortamda SOD varken indirgenme olmayıp mavi-mor renk oluşmaz ve enzim aktivite göstermesinden dolayı daha açık bir renk ortaya çıkar.

3.2.5. Doku Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px) Aktivite Ölçümü

Glutasyon peroksidaz, redükte glutasyonu kullanarak H_2O_2 'nin suya dönüşümünü sağlayan bir enzimdir. Dokulardaki GSH-Px aktivitelerinin tayini Beutler (96) yöntemiyle yapıldı. GSH-Px tayini; H_2O_2 varlığında GSH'yi okside glutasyon (GSSG)'a dönüşmesini katalize eder. H_2O_2 'nin bulunduğu ortamda GSH-Px'in oluşturduğu GSSG, glutasyon redüktaz ve NADPH yardımıyla tekrar GSH'a dönüştürülür. GSH-Px aktivitesi, deney ortamındaki NADPH'nin $NADP^+$ 'ya çevrilmesi ile optik dansitede meydana gelen absorban farkının 340 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülmedir.

3.2.6. Doku Katalaz (CAT) Enzim Aktivitesinin Ölçümü

Katalaz, katalitik aktivitesiyle H_2O_2 'yi dekompoze ederek su ve oksijene dönüştürür. Dokulardaki CAT enzim aktivitelerinin tayini Aebi (97) tarafından tarif edilen metoda göre yapıldı. CAT tayini; Hidrojen peroksit, 240 nm dalga boyundaki maksimum absorban gösterir. Deney ortamına ilave edilen H_2O_2 'nin CAT enzimi tarafından parçalanarak, ultraviyole spektrumda bir absorban azalmasıyla takip edilir. Absorbansta görülen bu azalma enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

3.2.7. Redükte Glutasyon (GSH) Ölçümü

Dokulardaki GSH aktiviteleri Ellman (98) tarafından ditiyonitrobenzoik asit geri çevirim metodu olarak tanımlanan yöntemle göre tayin edildi. GSH tayini; 5,5'-ditiyo-bis[2-nitrobenzoik asit](DTNB), sülfhidril bileşikler tarafından redükte edilip bir disülfid bileşiği olan sarı renkteki kompleksi oluşturur. Bu sarı renkli bileşik optik dansitesi 412 nm dalga boyunda ölçülüp GSH aktivitesi saptanır.

3.2.8. Doku Protein Ölçümü

Homojenat ve süpernatant kısımlardaki protein miktarı tayinleri Lowry ve ark. (99) tarafından tarif edilen yöntemle göre ölçüldü.

Alkali bakır ayırıcındaki Cu^{++} peptid bağları ile kompleks oluşturup her 7 veya 8 aminoasit artığı 1 atom bakır bağlar. Folin-Fenol ayırıcı, bakır ile muamele edilen karışıma ilave edilince mor-mavi bir renk oluşur ve bu renk 650 nm'de okunur.

3.3. Organ Ağırlıkları ve Sperm Parametrelerinin Değerlendirilmesi

Testis, epididimis, seminal veziküller ve prostat gibi organlar alındıktan sonra ağırlıkları tartılıp değerleri analiz edilerek ve sperm parametreleri değerlendirildi.

Epididimal sperm konsantrasyonu; Türk (100) ve ark. and Sönmez ve ark.'nın (101) tarif ettiği modifiye hemositometre yöntemi kullanılarak belirlendi. Seyreltilmiş sperm süspansiyonu yaklaşık olarak 10 µl sayım alanına damlatıldı ve 5 dakika bekletildikten sonra her iki kutucuktaki sperm hücreleri ışık mikroskobu yardımıyla 200^x büyütmede sayıldı. Sperm motilite yüzdesi Türk ve ark. and Sönmez (102) ve ark. tarafından tarif edildiği gibi bir ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi. Sperm motilite yüzdesi 400^x büyütmede değerlendirildi. Motilite tahminleri her bir örnek için üç farklı alanda yapıldı ve ardışık tahminlerin ortalaması final motilite skoru olarak kullanıldı. Morfolojik olarak anormal sperm oranını belirlemek için, eozin-nigrosin (%1,67 eozin, %10 nigrosin ve 0,1 M sodyum sitrat) ile boyanarak hazırlandı ve preparatlar ışık mikroskobunda 400^x büyütmede incelendi. Her preparat için toplam 300 spermatozoa (her grupta 210 hücre olmak üzere) baş, kuyruk ve toplam sperm anormallik oranları yüzde olarak ifade edildi (100).

3.4. Biyokimyasal Analizler İçin İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler için , “SPSS for Windows 12.0” programı kullanıldı. Normallik testi yapıldıktan sonra veriler non-parametrik test varsayımlarına uyduğu için grupların karşılaştırılmasında one-way ANOVA varyans analizi kullanıldı. Önemlilikler, Post-Doc Duncan testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Sonuçlar ortalama ± standart hata olarak ifade edilerek, p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

3.5. Sperm Analizleri İçin İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler, “SPSS/PC (Version 22; SPSS)” paket programı kullanılarak yapıldı. Alınan sonuçlar ortalama ± standart hata (SEM) olarak ifade edilerek, p<0.05 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Bütün gruplar arasındaki sperm karakteristiklerinin karşılaştırılmasında One-way ANOVA varyans analizi kullanıldı. Önemlilikler, TUKEY-HSD testi ile ikili karşılaştırmalar yapılarak değerlendirildi.

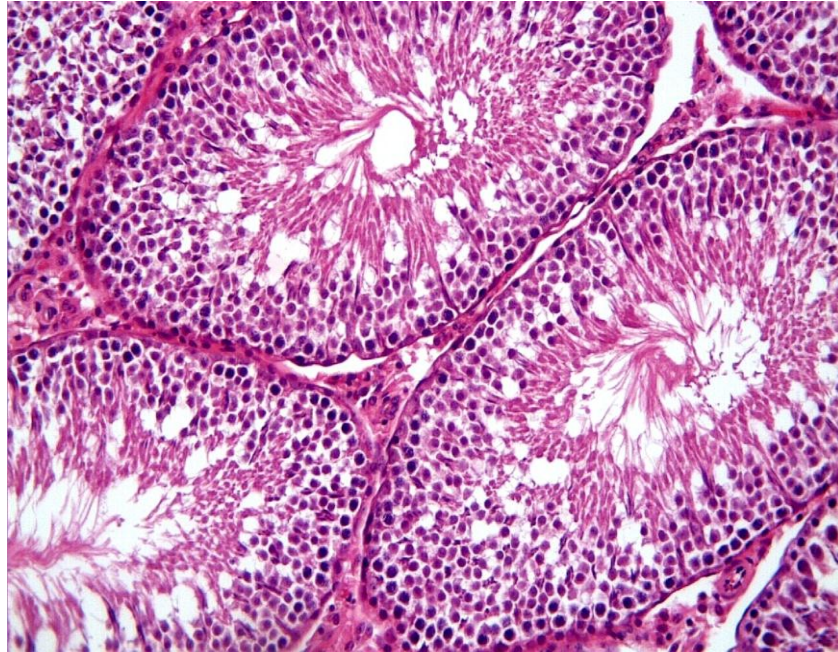
4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

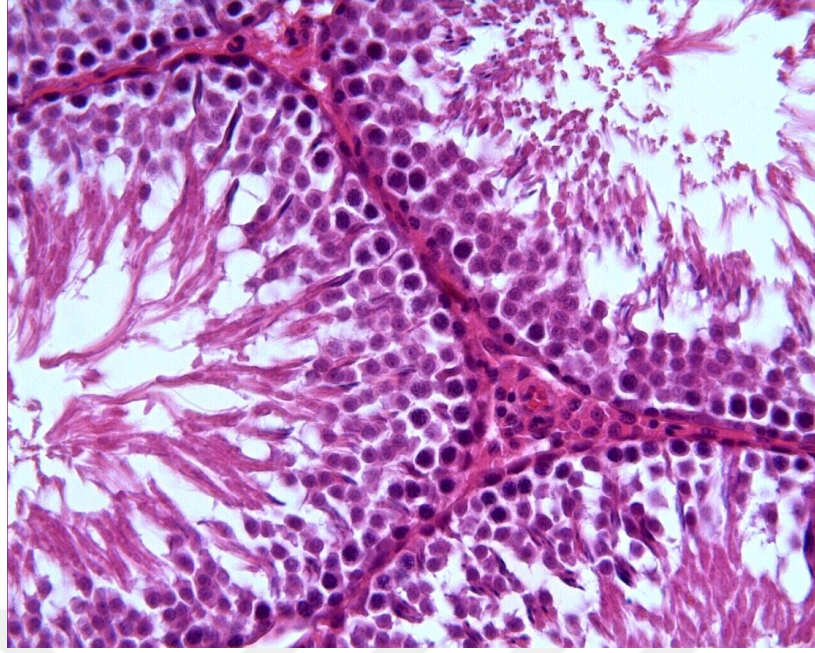
Işık mikroskopik olarak kontrol ve deney gruplarını oluşturan sıçanların testislerinin genel görünümünü saptamak için H-E boyaları uygulanmıştır.

4.1.1. Kontrol Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

Kontrol grubunu oluşturan sıçanların testis doku örneklerini ışık mikroskopik incelemelerinde normal histolojik görünümde olduğu izlendi. Seminifer tübül yapıları, bazal membran ve interstisyel alan normal histolojik yapıda gözlemlendi (Şekil 4.1). Seminifer tübüllerin epitelini oluşturan spermatogenik seri hücreler, Sertoli hücreleri ve interstisyel alanda bulunan bağ dokusu normal histolojik görünümdeydi (Şekil 4.2). Gelişmekte olan spermatidler, klasik görüntülerindeki gibi kuyruk lümende, baş tübül duvarına doğru yönelik, Sertoli hücrelerinin arasına lokalize olmuş şekilde gözlemlendi. Bu grupta; seminifer tübül çapları $303,45 \pm 2,99 \mu\text{m}$ ve germinal epitel yüksekliği ise $80,18 \pm 0,66 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü.



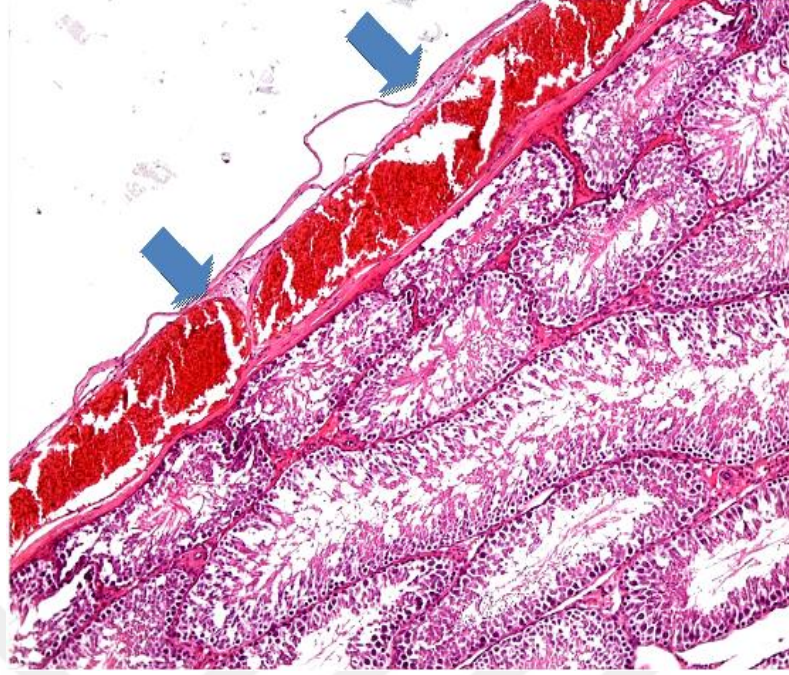
Şekil 4.1. Kontrol grubuna ait sıçanların testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Normal histolojik görünümde seminifer tübüller, interstisyel alan ve spermatogenik seri hücreler görülmektedir. H-E; x20.



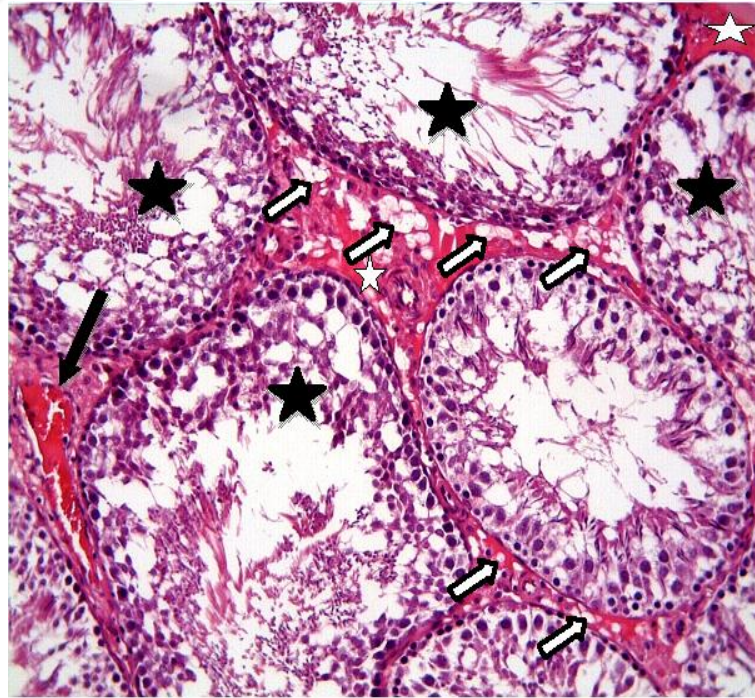
Şekil 4.2. Kontrol grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alan, Leydig hücreleri ve spermatogenik seri hücreleri normal histolojik görünümde izlendi. H-E; X 40.

4.1.2. İrinotekan (IR) Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

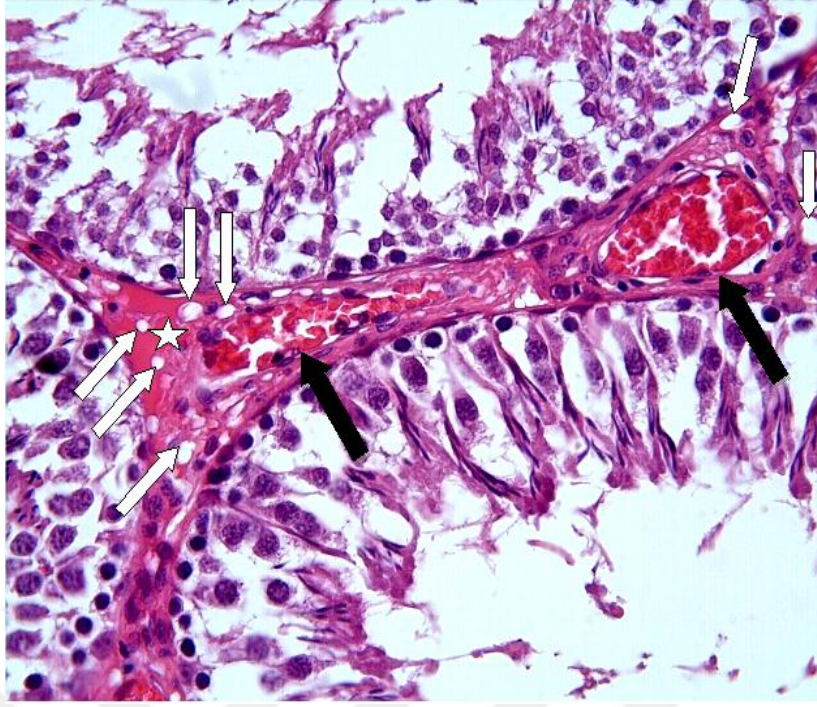
İrinotekan (IR) uygulanan sıçanların testis doku örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde seminifer tübüllerde hasar ve hücre sel dejenerasyonlar gözlemlendi. Testis dokusunu dıştan çevreleyen tunika albuginea tabakasında belirgin vasküler konjesyon (Şekil 4.3) tespit edildi. İnterstisyel alanda vasküler konjesyon, vakuolizasyon, interstisyel ödem ve tübül lümeninde germinatif hücrelerde azalma (Şekil 4.4, Şekil 4.5) olduğu gözlemlendi. Seminifer tübül yapıları incelendiğinde seminifer tübül lümeninde vakuolizasyon ve tübül lümeninde belirgin ödem (Şekil 4.6), seminifer tübül epitelinde dejenerasyon ve lümen e dökülen hücreler (Şekil 4.7) saptandı. Buna ilaveten testis dokusunda seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler (Şekil 4.8) olduğu gözlemlendi. Bu grupta ise seminifer tübül çapları $259,15 \pm 2,18$ μm ve germinal epitel yüksekliği ise $59,32 \pm 8,70$ μm olarak ölçüldü.



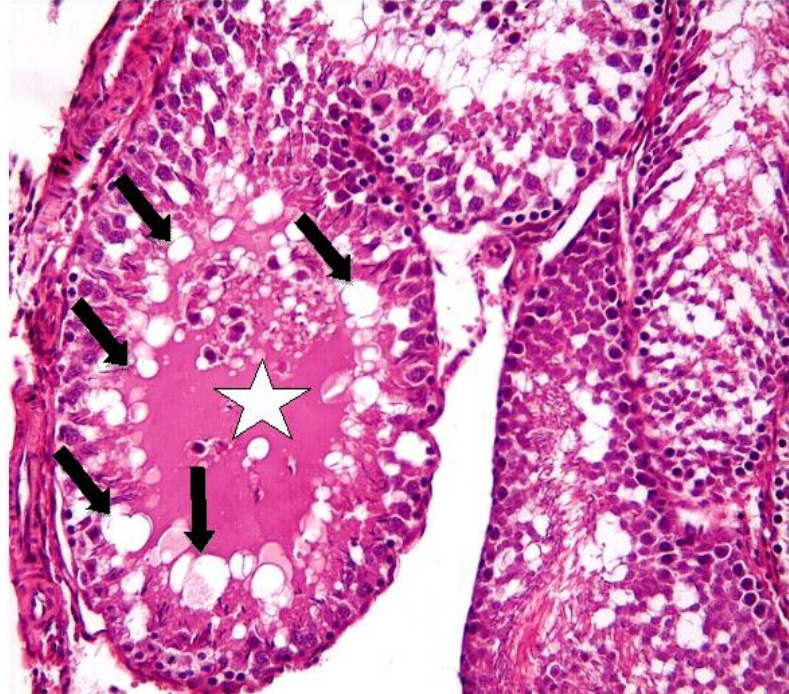
Şekil 4.3. İrinotekan (IR) grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubuna ait testis dokusunda tunika albuginea tabakasında belirgin konjesyon (Oklar) gözlemlendi. H-E; X10.



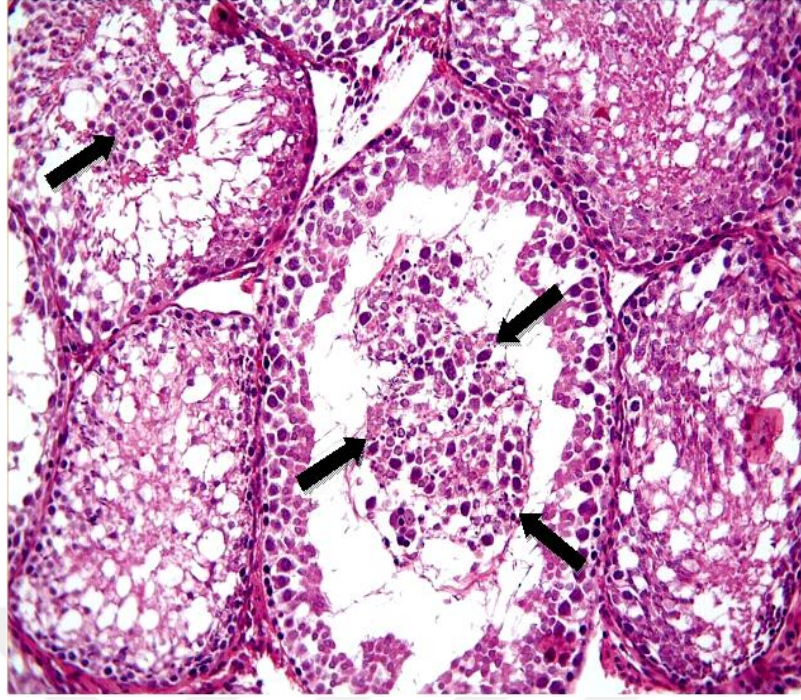
Şekil 4.4. IR grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubunda interstisyel alanda vasküler konjesyon (Siyah ok), vakuolizasyon (Siyah çerçevesi beyaz oklar), interstisyel ödem (Beyaz yıldız) ve tübül lümeninde germinatif hücrelerde azalma (Siyah yıldızlar) gözlemlendi. H-E; X20.



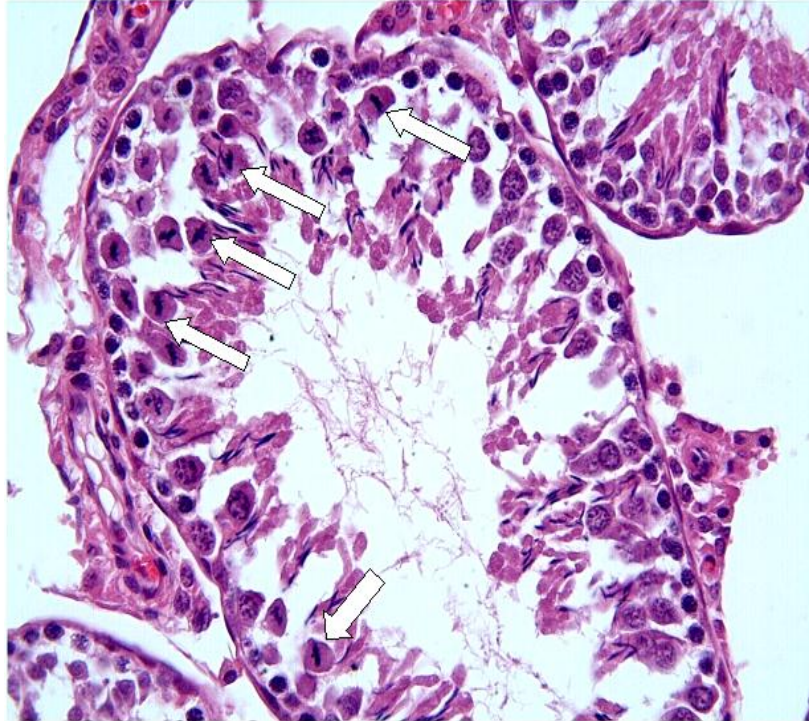
Şekil 4.5. IR grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubunda interstisyel alanda vasküler konjesyon (siyah oklar), vakuolizasyon (beyaz oklar) ve interstisyel ödem (Yıldız) gözlemlendi. H-E; X40.



Şekil 4.6. IR grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül lümeninde vakuolizasyon (Siyah oklar) ve seminifer tübül lümeninde belirgin ödem (Yıldız) gözlemlendi. H-E; X20.



Şekil 4.7. IR grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül epitelinde dejenerasyon ve lümeneye dökülen hücreler (Siyah oklar) gözlemlendi. H-E; X20.



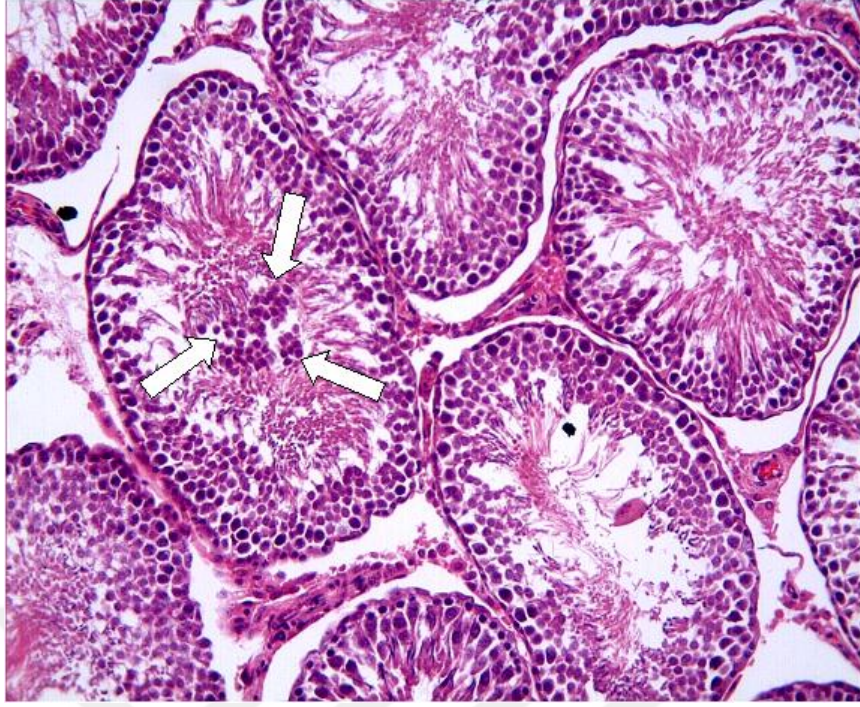
Şekil 4.8. IR grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. IR grubuna ait testis dokusunda seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler (Okular) gözlemlendi. H-E; X40.

4.1.3. İrinotekan + Elajik Asit Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

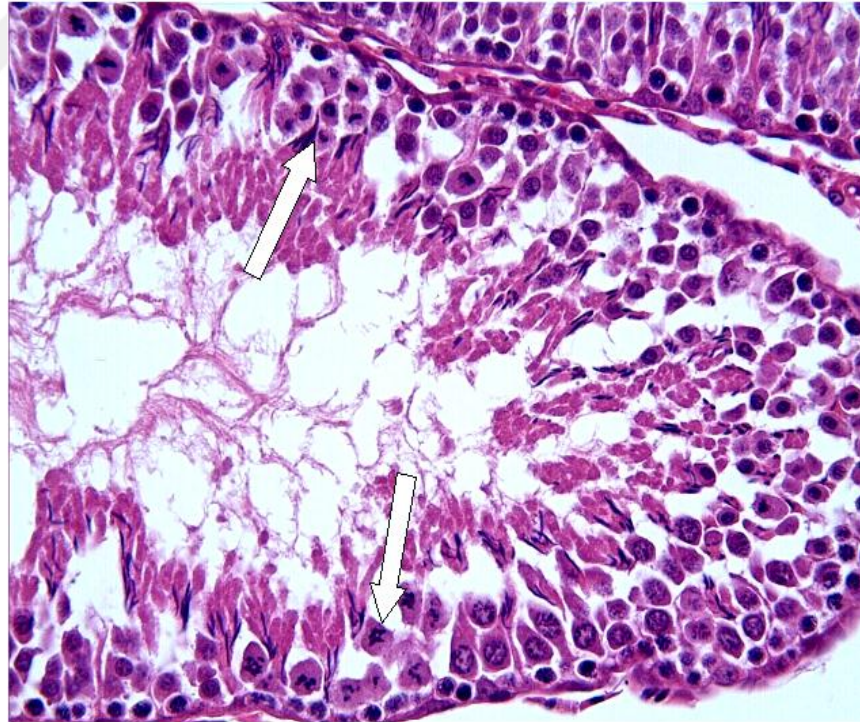
İrinotekan+ Elajik Asit grubunu oluşturan sıçan testis örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde, histopatolojik hasarın belirgin derecede azaldığı gözlemlendi. İnterstisyel alanda ödem, tunika albuginea tabakasında konjesyonda belirgin azalma, seminifer tübül hasarında azalma ve spermatogenik seri hücrelerde artış gözlemlendi (Şekil 4.9). Ayrıca lümeneye dökülen spermatogenik seri hücrelerde (Şekil 4.10) ve bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücrelerde (Şekil 4.11), interstisyel alanda görülen vakuolizasyonda, vasküler konjesyonda ve ödemde belirgin derecede azalma olduğu (Şekil 4.12) tespit edildi. Bu grupta seminifer tübül çapları $294,19 \pm 3,21 \mu\text{m}$ ve germinal epitel yüksekliği ise $70,58 \pm 11,43 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü.



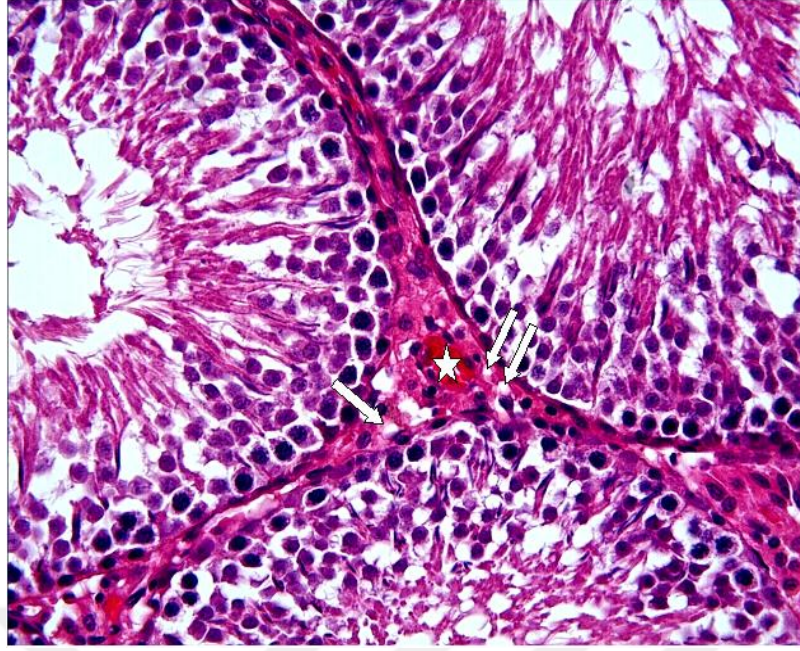
Şekil 4.9. IR+EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alanda ödem (Yıldız), tunika albuginea tabakasında konjesyonda belirgin azalma (siyah oklar), seminifer tübül hasarında azalma ve spermatogenik seri hücrelerde artış gözlemlendi. H-E; X10.



Şekil 4.10. IR + EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Lümeneye dökülen hücrelerde belirgin derecede azalma (Oklar) gözlemlendi. H-E; X20.



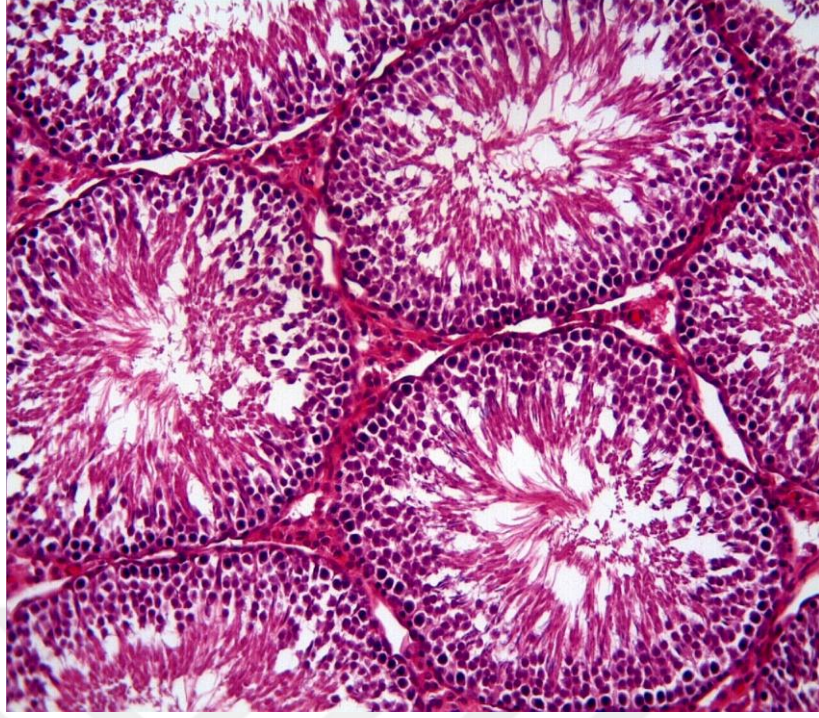
Şekil 4.11. IR+EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül lümeninde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücrelerde azalma (Oklar) gözlemlendi. H-E; X40.



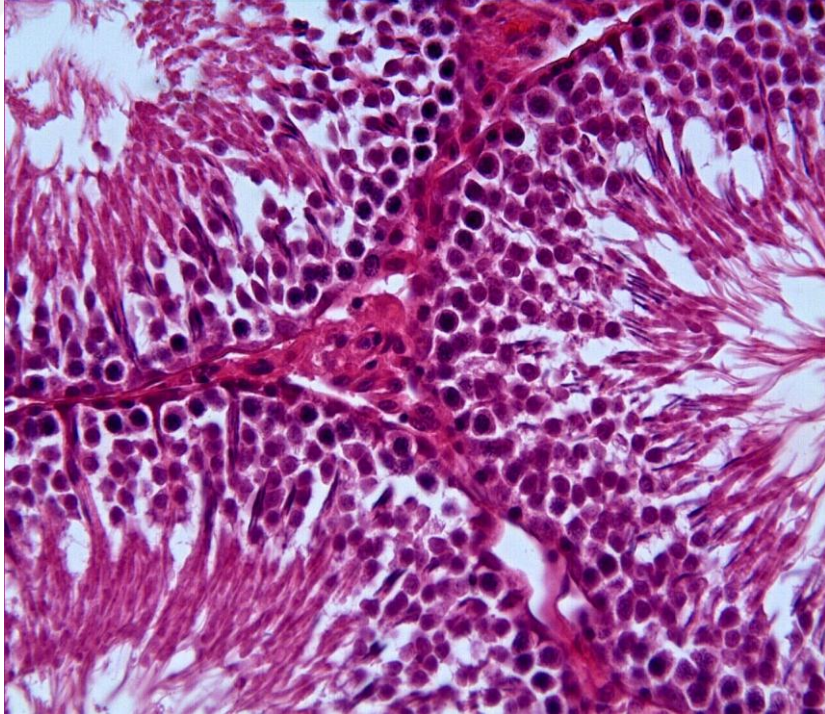
Şekil 4. 12. IR+EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. İnterstisyel alanda görülen vakuolizasyonda (Oklar) vasküler konjesyonda (Yıldız) ve ödemde azalma gözlemlendi. H-E; X40.

4.1.4. Elajik Asit Grubu Işık Mikroskopik Bulguları

Elajik Asit grubuna ait sıçan testis örneklerinin ışık mikroskopik incelemelerinde, seminifer tübül, bazal membran ve interstisyel alan kontrol grubuna benzer bir yapı gösterdi (Şekil 4.13). Seminifer tübül duvarındaki spermatogonik hücre serileri olan, spermatogonyum, primer spermatosit ve spermatid hücreleri ile destek hücreleri olan Sertoli hücreleri normal yapıda gözlemlendi. İntersitisyel alandaki bağ dokusu normal histolojik yapıda gözlemlendi (Şekil 4.14). Bu grupta ise seminifer tübül çapları $307,26 \pm 3,51 \mu\text{m}$ ve germinal epitel yüksekliği ise $78,01 \pm 13,33 \mu\text{m}$ olarak ölçüldü.



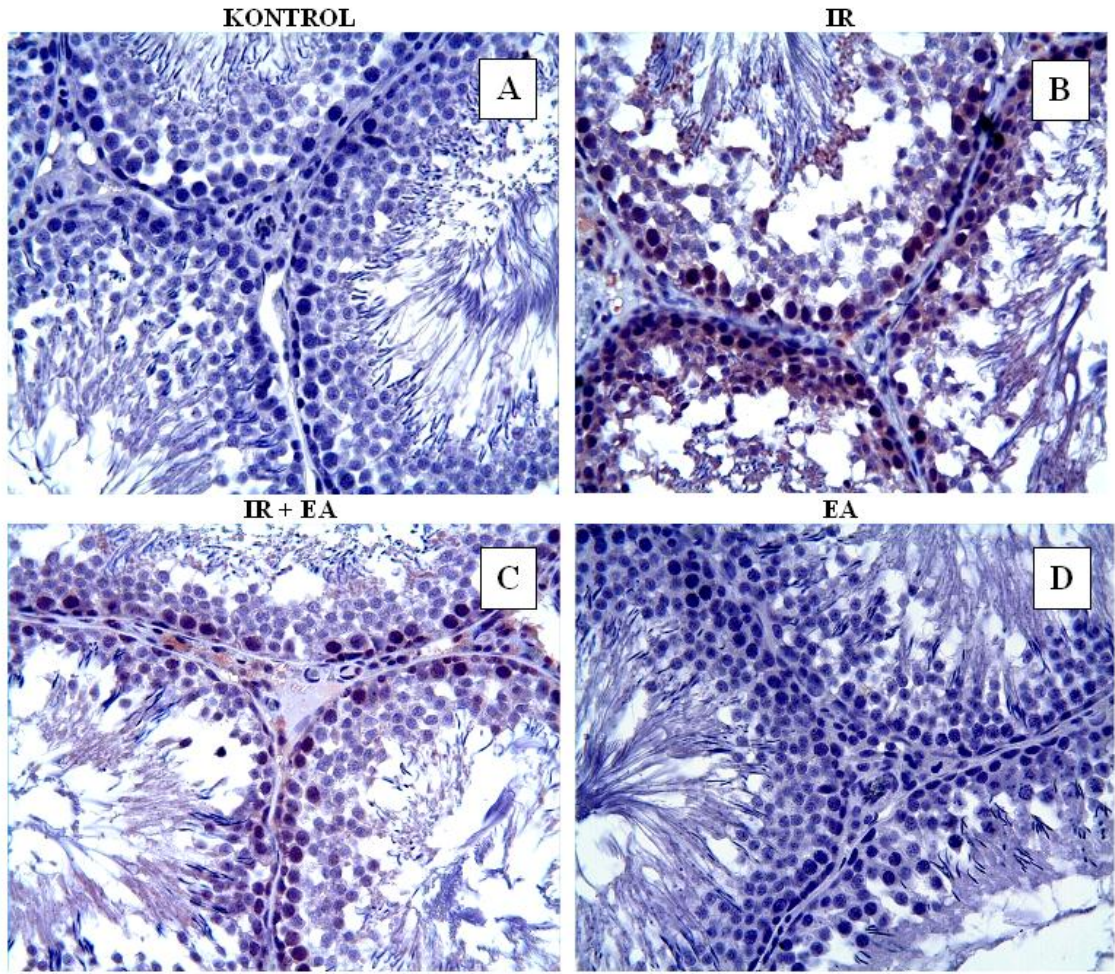
Şekil 4.13. EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübül duvarındaki spermatogenik hücreler ve interstisyel alandaki hücre yapılarıyla birlikte testis dokusu normal histolojik yapıda gözlemlendi. H-E; X20.



Şekil 4.14. EA grubuna ait sıçan testis dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Seminifer tübüller, spermatogenik seri hücreler ve interstisyel alan normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. H-E; X40.

4.1.5. İmmunohistokimyasal Bulgular

Kontrol (Şekil 4.15A), IR (Şekil 4.15B), IR + EA (Şekil 4.15C) ve EA (Şekil 4.15 D) gruplarında spermatogenik seri hücrelerde Kaspaz-3 immunreaktivite değerlendirilmesi yapıldı. IR grubunda belirgin derecede yoğun boyanmış Kaspaz-3 pozitif hücreler olduğu tespit edildi. IR + EA grubunda Kaspaz-3 pozitif boyanmış hücrelerin sayısında ve boyanma yoğunluğunda belirgin derecede azalma olduğu tespit edildi. Kontrol ve EA gruplarında ise Kaspaz-3 immunreaktivitesi gözlenmedi.



Şekil 4.15. Deney gruplarındaki Kaspaz-3 aktiviteleri. Kontrol (A), IR (B), IR+EA (C), EA (D). Kaspaz-3; X40.

Tablo 4.1. İrinotekanın oluşturduğu tübül çapı ve tübül epitel kalınlığındaki değişiklikler üzerine EA'nın etkileri (ort±SEM n=7).

GRUPLAR	Tübül Çapı	Tübül Epitel Kalınlığı
Kontrol	316,01 ± 3,50 ^a	80,83 ± 15,09 ^a
IR	259,15 ± 2,18 ^b	59,32 ± 8,70 ^b
EA	307,26 ± 3,51 ^a	78,01 ± 13,33 ^a
IR + EA	294,19 ± 3,21 ^c	70,58 ± 11,43 ^c

Aynı sütundaki a,b,c küçük harfleri gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir. (P<0.0001)

Tablo 4.2. Tübüllerin Histolojik Skorlaması (ort±SEM n=7).

GRUPLAR	Normal	Dejenere	Atrofik
Kontrol	2,88 ± 0,14 ^a	0,55 ± 0,09 ^a	0,30 ± 0,07 ^a
IR	0,68 ± 0,10 ^b	1,35 ± 0,10 ^b	1,60 ± 0,13 ^b
EA	2,60 ± 0,13 ^a	0,75 ± 0,10 ^c	0,53 ± 0,09 ^c
IR + EA	2,05 ± 0,94 ^c	1,13 ± 0,11 ^d	1,35 ± 0,14 ^d

Aynı sütundaki a,b,c,d küçük harfleri gruplar arasındaki farklılıkları göstermektedir. (P<0.0001)

4.2. Biyokimyasal Bulgular:

Tablo 4.3'de TBARS, SOD, CAT, GSH ve GPx düzeylerine ait değerler verilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda IR verilen sıçanlarda oksidatif hasarın göstergesi olan TBARS düzeyinin kontrol ve diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi. Bununla birlikte EA uygulamasının IR'nin neden olduğu TBARS artışında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı ve IR + EA grubundaki TBARS düzeyinin kontrol grubunun değerlerine yaklaştığı tespit edildi.

Sadece EA verilen grupta kontrol grubu ile arasında rakamsal farklılıklar olsa da istatistiksel olarak anlamlı değişimlerin olmadığı, bununla birlikte IR+EA uygulamasının antioksidan savunma sistemi elemanları olan GSH, SOD, GPx ve CAT düzeylerinde istatistik olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu gözlemlendi. Ancak EA uygulamasının GSH, GPx, CAT ve SOD düzeylerinde IR'ye bağlı olan değişikliği giderdiği ve istatistiksel olarak IR grubunda farklı olduğu gözlemlendi.

IR+EA grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş olduğu belirlendi. Bu parametrelerden sadece SOD düzeylerinin Kontrol ve EA grubuyla, IR+EA grubunda istatistiksel anlam içermediği, diğer parametrelerin ise artmasına rağmen Kontrol ve EA ile IR+EA arasında anlamlı olarak fark olduğu belirlendi.

Tablo 4.3. Elajik Asit (EA) ve IR verilmiş sıçanlarda TBARS, GSH, CAT, SOD ve GPx düzeyleri (ort±SEM n=7)

	Kontrol	IR	EA	IR + EA	p
TBARS(nmol /g tissue)	5.74±0.98 ^a	10.67±1.13 ^b	5.39±0.84 ^a	7.18±1.06 ^c	0,001
GSH (nmol/ml)	195.3±11.7 ^a	102.1±9.74 ^b	186.8±15.05 ^a	165.4±10.0 ^c	0,001
CAT (k/mg protein)	0.095±0.002 ^a	0.0037±0.0002 ^b	0.0098±0.0004 ^a	0.0061±0.0003 ^c	0,001
SOD (U/mg protein)	26.1±2.11 ^a	18.6±1.59 ^b	27.1±1.37 ^a	25.8±2.93 ^a	0,05
GPx (U/mg protein)	251.8±18.1 ^a	186.3±15.5 ^b	245,1±21.7 ^a	225.5±16.0 ^c	0,05

Aynı sütundaki a, b ve c harfleri gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı ($p \leq 0.01$) göstermektedir.

4.3. Spermatolojik Bulgular:

Gruplar testis ağırlıkları, epididimis ağırlıkları, seminal vezikül ağırlıkları ve prostat ağırlıkları açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Üreme sistemi organ (testis, epididimis, seminal vezikül ve prostat) ağırlıklarındaki değişimler Tablo 4.4' de sunuldu. Tablodan görüleceği üzere yapılan IR uygulaması ve EA tedavisi üreme sistemi organ ağırlıklarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak herhangi bir değişime neden olmamıştır.

Tablo 4.4. EA ve IR verilmiş sıçanlarda Testis ağırlıkları, Epididimis ağırlıkları, Seminal vezikül ağırlıkları, Prostat ağırlıkları (ort±SEM n=7).

GRUPLAR	Testis ağırlıkları		Epididimis ağırlıkları		Seminal vezikül ağırlıkları	Prostat ağırlıkları
	SAĞ	SOL	SAĞ	SOL		
Kontrol	1.528±0.0 6	1.526±0.0 4	0.639±0.0 3	0.655±0.0 2	1.543±0.08	0.455±0.02
IR	1.427±0.0 4	1.421±0.0 2	0.629±0.0 2	0.566±0.0 2	1.384±0.06	0.501±0.03
EA	1.504±0.0 3	1.443±0.0 3	0.672±0.0 1	0.630±0.0 2	1.173±0.09	0.555±0.04
IR + EA	1.518±0.1 0	1.453±0.0 3	0.675±0.0 2	0.601±0.0 1	1.440±0.08	0.454±0.02

Tablo 4.5' de sperm karakteristikleri olan sperm motilitesi, anormal sperm miktarı ve sperm konsantrasyonları verilmiştir. IR uygulamasının sperm motilitesi ve konsantrasyonunda kontrol grubu ve EA grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu belirlendi. IR + EA grubunda ise yapılan tedavi sonucu sperm motilitesi ve anormal sperm oranında IR grubuna göre rakamsal olarak düzelme

gözlensedede istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Bununla birlikte sperm konsantrasyonunun IR grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi. Kontrol ve EA grubu arasında ise istatistiksel olarak bir fark olmadığı saptandı.

Tablo 4.5. EA ve IR verilmiş sıçanlarda sperm motilitesi, epididimal sperm konsantrasyonu ve anormal sperm oranı (ort±SEM n=7).

GRUPLAR	Sperm motilitesi (%)	Epididimal sperm konsantrasyonu (milyon/ gram doku)	Anormal sperm oranı (%)		
			Baş	Kuyruk	Total
Kontrol	94.09±0.96 ^a	342.28±7.67 ^a	4.14±0.34 ^a	3.57±0.36 ^a	7.71±0.60
IR	61.42±3.40 ^b	241.42±9.92 ^b	7.57±0.42 ^b	7.28±0.52 ^b	14.85±0.26
EA	94.28±0.49 ^a	359.71±8.28 ^a	4.14±0.26 ^a	3.14±0.45 ^a	7.28±0.60
IR + EA	75.95±4.31 ^{ab}	266.57±9.28 ^a	4.57±0.57 ^{ab}	4.14±0.26 ^{ab}	8.71±0.80

Aynı sütundaki a,b,c,d harfleri gruplar arasındaki istatistiksel farklılığı ($p \leq 0.01$) göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Kemoterapi ilaçları farklı kanser türlerini tedavi ederken aynı zamanda organizmada oldukça ciddi yan etkilere neden olur. Kemoterapi ilaçlarının erkek ve dişilerde oluşturduğu en önemli yan etkilerden biri infertilitedir. Spermatogenez ve steroidogeneztteki bozukluklar, testiküler yapı, oligo-, azoo-, astenozoo- ve teratozoo-spermi, gonadotropin seviyelerindeki değişimler, sperm DNA ve kromozom yapılarındaki hasarlar kanserli erkekler ve sağlıklı deney hayvanlarında ortaya koyulan yan etkilerdir (103).

Kemoterapi ilaçları lipid, kolesterol ve protein peroksidasyonu ile oksidatif strese neden olur. Genellikle spermatogenik hücrelerdeki apoptosis, DNA hasarı, sperm kalitesinin değişmesi, infertilite gibi yan etkiler erkek üreme sisteminde görülür (104-108). Kemoterapi ilaçlarının erkeklerdeki gonadotoksik etkilerinin ortadan kaldırılmasına yönelik antioksidan ve hormon uygulamalarıyla germ hücrelerinin ve spermelerin dondurularak saklanması gibi yöntemler kullanılır (103).

Araştırmacılar tarafından kamptotesinlerin kimyasal içeriğinin keşfedilmesinin ardından bu ilaçlar kullanılarak deneysel çalışmalar başlamıştır. Fakat suda az çözünen kamptotesinin, veriminin düşük ve toksisitesinin yüksek olması nedeniyle çalışmalara ara verilmiştir. DNA Topoizomeraz I enzimine etki eden mekanizmasının saptanmasıyla bu ilacın üzerine yoğunlaşmış, ardından yarı sentetik türevleride sentezlenmiştir. Zayıf çözünürlüğü nedeniyle kamptotesinin fizyolojik koşullar altında hidrolizi klinikte kullanımını sınırlar (109). Kamptotesinlerin ayrıca antitümör etkisi dışında antiprotozoal, antiviral, antimalaryal etkisi vardır (110). Kamptotesinlerin yarı sentetik türevlerinden olan irinotekan ve topotekanın küçük hücreli akciğer, kolorektal ve ovaryum kanserlerinde kullanılmak üzere onaylandıktan sonrada bu ilaçların klinik çalışmaları halen devam etmektedir (109). İrinotekan kamptotesinlerin suda çözünen, yarı sentetik türevidir. Aktif metaboliti ise SN-38 (7-etil-10-hidroksikamptotesin) dir (111). İrinotekan hem erkek hem de kadın hastalara sıklıkla uygulanan ve tek başınada kullanılabilen bir ilaçtır. İrinotekanın diğer ilaçlarla kombinasyonundaki en büyük nedeni toksisitenin daha az oluşu ve tümörlerin ilaca olan duyarlılığıdır (112). Sisplatin ilacıyla kombine edilmesiyle ilerlemiş küçük hücreli olmayan ve küçük hücreli akciğer kanserinde olumlu sonuç elde edilmiştir (113). Metastatik ve rekürren kolorektal kanser

tedavisinde birinci ve ikinci basamak tedavi olarak uygulanmaktadır. Ayrıca lenfoma, akciğer, gastrointestinal ve pankreas malignitelerinin tedavisinde de kullanılmaktadır. İrinotekan ilacıyla yapılan faz II çalışmalarında da gastrik kanserlerin tedavisinde aktif olduğu tespit edilmiştir. Tek olarak ve sisplatin ve/veya 5FU ile yapılan çalışmalarda gastrik kanserin birinci ve ikinci basamak tedavisinde olumlu sonuçlar elde edilmiştir (114). En sık görülen yan etkilerden biriside nötropenidir (115). İrinotekan karboksilesterazlar (CES) tarafından SN-38'e dönüşmektedir. CES tümör dokusu, serum, bağırsak ve yüksek miktarda karaciğerde bulunur (116). İrinotekan servikal, kolorektal, küçük hücreli veya küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve ovaryum kanseri gibi pekçok solid tümöre, lösemi ve dirençli lenfomaya karşı büyük ölçüde antitümöral etkisi vardır (113).

İrinotekanın fertilité üzerindeki etkileri henüz tanımlanmamıştır. Yapılan bir araştırmaya göre Tanaka ve ark. İrinotekanı diğér bazı ilaçlarla kombine olarak uyguladıkları perimenopozal kadınlarda menoz semptomlarını belirlemiştir. Yapılan başka bir çalışmada ise İrinotekan uygulamasından sonra granüloza hücrelerinin apoptozunda artış gözlenmiştir. Buna ilaveten, prepubertal hastalara irinotekanın verilmesinin doğurganlık üzerine etkileri ile ilgili herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (111). Ayrıca İrinotekan içeren kemoterapi gören erkeklerde genel olarak sperm üretiminde olası bir bozulmanın gözlendiğı hastalara tedavi sürecinde bildirilmektedir (117).

Kemoterapötik ilaçlardan birisi olan siklofosfamid uygulanan sıçan deneylerinde sperm motilitesinde azalış, ölü germ hücreleri, anormal sperm ve ölü sperm sayısında artış, ciddi testiküler yapı bozukluğu (106, 118, 119) testosteron seviyesinde azalma (118, 120), A tipi spermatogonyumlar, leptoten öncesi ve pakiten safhasındaki spermatosit ve spermatid sayısında azalmalar (120) sperm nükleer matriks profilinde (121), spermilerin kromozomu ve içeriğindeki basit protein yapısında değışim (122) ile spermatosit DNA yapısında çift zincir kırıkları gözlenmiştir (123, 124). Yetişkin erkek sıçanlar kullanılarak yapılan birçok çalışmada, sisplatinin testis üzerinde, sperm yoğunluğu ve motilitesinde azalma, normal yapılı sperm oranında azalma, seminifer tübüllerin çapında daralma, epididimis, seminal bez ve prostat ağırlıklarının azalması, testiküler dokunun dejenere olması, nekroz ve ödem gibi bulgular gözlenmiştir (104, 118, 125-127). Bunun yanısıra testiküler apoptotik germ hücre sayısında (128, 129),

serumda FSH düzeyinde belirgin artış tespit edilmiştir (130). Sisplatinle yapılan bazı araştırmalarda ise epididimal sperm sayısında, sperm motilitesinde ve intratestiküler sperm DNA'sında kırılmaların olduğu (131) ve testosteron seviyesinde azalmalara (118, 132-134) yol açtığı belirlenmiştir.

Ayrıca pubertal dönemde sıçanlarda Favareto ve ark.nın yaptığı sisplatin verilen benzer etkilerin görüldüğu bir çalışmada; 45 günlük pubertal dönemdeki sıçanlara 3 hafta boyunca 1 mg/kg/gün doz sisplatin verildiğinde sıçanların yaklaşık 66. günlerindeki üreme sistemine ait tüm organ ağırlıkları, sperm yoğunluğu, sperm motilitesi ve sperm üretimi azalmıştır. Fertilité potansiyeli artmış olup, intratestiküler testosteron oranı azalmış, seminifer tübül çapı daralmıştır. Hareketsiz sperm sayısı ve TUNEL-pozitif apoptotik hücreleri de önemli ölçüde artmıştır. Aynı çalışmadaki sıçanlar 140 günlükken üreme organ parametreleri incelenip ve sperm motilitesiyle testisteki histopatolojik bulgular dışındaki diğer parametrelerde iyileşme olduğu görülmüştür (135). Sisplatinin farelere uygulandığı deneysel çalışmalarda da, testisin histolojik hasarına ve üreme organ ağırlıklarında azalmaya, sperm kalite parametrelerinde değişimlere (136), sperm DNA'sında çift zincir kırıklarına (137) ve spermatogoniumlardaki kromozom değişimlerine (138) aynı sıçanlarda olduğu gibi benzer toksisitelere neden olur.

Birçok araştırmacı tarafından yapılan çalışmalarda lenfoma gibi ağır kanser hastalarının tedavisinde kullanılan prokarbazin sıçanlara verildiğinde testis dokularında atrofi (139, 140) Leydig ve Sertoli hücrelerindeki hasara bağlı androjen bağlayıcı proteinlerle testosteron seviyesinde önemli derecede azalma, FSH seviyesinde artış, yanısıra spermatogenezis sırasındaki aksaklıkların (141-143) sonucu olarak epididimal sperm rezervlerinde azalış ve buna bağlı olarak infertilite (142, 143) görülmüştür.

Metotreksat (MTX) ise çok uzun yıllardır yüksek dozlarda kanser tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Laboratuvar hayvanlarında da en fazla çalışılan ilaçlardan biridir. Düşük ve orta dozda kullanılan metotreksatın sıçan testislerinde oligospermiye neden olduğu, ancak testiküler atrofiye yol açmadığı bildirilmiştir (144). Ayrıca yapılan diğer çalışmalarda Metotreksatın testislerin ağırlığı, germinal epitel kalınlığında ve seminifer tübül çapında azalmaya neden olduğu (145), beraberinde tübüler dejenerasyonların görüldüğu (146), tüm spermatogenik seri hücrelerde özellikle spermatosit ve spermatidlerde letal etki gösterdiği (147), Leydig ve Sertoli hücrelerinin büyüklüğünü

azaltıcı (148) etkiye neden olduğu görülmüştür.

Bir diğer kemoterapotik ilaç olan doksorubisinin farklı dozlarda uygulamaları sıçanlarda testis, epididimis, seminal bez, prostat ağırlıkları ve testesteron seviyelerinde önemli azalmalara neden olmuştur. Bunun yanı sıra seminifer tübül çapında, germinal hücre tabakası kalınlığında, sperm sayısı, sperm motilitesinde azalmalara, sperm anormalitesinde de artışa neden olmuştur. Yapılan diğer araştırmalarda ise spermatogeneziste bozulma, dejenerasyon, ödem ve nekroz gibi ciddi testiküler hasara neden olduğu (149-151) spermelerde DNA hasarına neden olduğu (152) gösterilmiştir.

Bizim çalışmamızda da yapılan diğer literatür bilgileriyle uyumlu olarak, tunika albuginea tabakasında vasküler konjesyon, interstisyel alanda vasküler konjesyon, vakuolizasyon, interstisyel ödem ve tübül lümeninde germinatif hücrelerde azalma, seminifer tübül lümeninde vakuolizasyon ve belirgin ödem, seminifer tübül lümenine dökülmüş hücreler ve seminifer tübül epitelinde dejenerasyon, seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler olduğu gösterilmiştir. Elajik asidin ise antioksidan özelliğine bağlı olarak bu etkileri azalttığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda apoptotik hücreler kaspaz-3 aktivitesi ile belirlendi. Kaspazların apoptoz sürecinde proteolitik yarıklanma kaskadını başlattığı ve böylece apoptotik olayların gelişiminde önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir. Kaspaz ailesinin 14 üyesinden biri olan kaspaz-3, apoptozisin erken basamaklarında aktive olan bir proteazdır (153). Yapılan çalışmalarda doksorubisinin spermatogenik hücrelerde p53, Bax, Fas, Bcl-2 ve kaspaz indikatörlü apoptoza (154, 155) sebep olduğu gösterilmiştir. On hafta süresince haftada bir defa 1,2 mg/kg/dozda epirubisin uygulanan sıçanlarda ise germ hücrelerinin apoptoza uğradığı görülmüştür (156). Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizde çalışmamızda IR grubunda yoğun boyanmış Kaspaz-3 pozitif hücreler olduğunu, IR + EA grubunda ise pozitif boyanmış hücre sayısında ve boyanma yoğunluğunda belirgin derecede azalma olduğunu tespit ettik. Kontrol ve EA gruplarında ise Kaspaz-3 immunreaktivitesi gözlemlenmedi.

Patolojik bir süreç sonucu veya vücutta meydana gelen fizyolojik işlevler sonucunda oksidatif hasar oluşur. Organizmanın oluşan hasara karşı kendini enzimatik veya nonenzimatik antioksidan sistemler ve moleküllerle koruması gerekir. SOD ve

GSH-Px hücre düzeyinde etkili olan antioksidan enzimlerdendir. Kemoterapi ilaçları doğrudan ve dolaylı olarak testiküler yapı bozukluklarına ve oksidatif strese neden olup erkek reproduktif sisteminde gonadotoksik hasara yol açar. Bu ilaçların uygulanmasıyla ROS seviyesinde artışa ve antioksidan seviyelerinde (GSH, GSH-Px, katalaz) azalmalara yol açar. Oksidanların ve antioksidanların seviyesindeki artış veya azalış testislerin steroidogenik ve spermatogenik fonksiyonlarında hasar yaratıp hormonal değişimlerle sperm yapısında işlevsel ve genetik yapı bozukluklarına yol açar (19). Gavajla veya intraperitoneal yollarla verilen farklı yapılardaki ve özellikteki antioksidanlar yardımıyla ROS seviyeleri azaltılıp, antioksidan aktiviteleri artırılıp kemoterapötiklerin erkek reproduktif sisteminde oluşturduğu olası yan etkiler en aza indirgenmeye veya tam olarak önlenmeye çalışılmaktadır.

Elajik asitle ilgili yapılan diğer çalışmalarda (157) alkolle oluşturulan toksisiteye karşı antioksidan etkiye sahip elajik asitin iyileştirici etkisini araştırılmış ve alkole bağlı artan TBARS ve NO seviyelerinin EA'in etkisiyle önemli ölçüde azaldığını ve normale yakın seviyelere indiğini göstermişlerdir. Alp ve ark. ise malathion (MAL) uygulanan gruplardaki tüm dokularda NO seviyelerinin büyük ölçüde arttığını, CAPE ve EA'nın ise NO seviyelerini azalttığını tespit etmişlerdir. Pari ve ark. (158) Siklosporin (CsA) kullanılarak oluşturulan toksisiteye karşı, EA'in redükte GSH seviyelerini artırdığını bu nedenle karaciğerde koruyuculuk gösterdiğini üstelik TBARS seviyelerini ve hidroperoksidleri büyük ölçüde azalttığını gözlemlemişlerdir. Enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan seviyelerinin karaciğer dokusunda EA verilmesiyle arttığını bildirmişlerdir. Alp ve ark.; MAL uygulanan gruplarda bulunan karaciğer, akciğer ve böbrek dokularındaki MDA birikimi ve hücre hasarının artışıyla redükte GSH düzeylerinin azaldığı, fakat CAPE ve EA'in ise redükte GSH seviyelerini artırdığı görülmüştür. Alp ve ark. (159) bu çalışma ile CAPE ve EA'in akut MAL toksisitesi esnasında oluşan oksidatif stres üzerine diğer çalışmalarla uyumlu olarak antioksidan etki gösterdikleri ve toksikasyon çalışmalarında kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Çalışmamızda biyokimyasal olarak TBARS, SOD, CAT, GSH ve GPx seviyeleri ölçüldü. IR verilen sıçanlarda oksidatif hasarın göstergesi olan TBARS düzeyinin kontrol ve diğer tüm gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı belirlendi. Bununla birlikte EA uygulamasının IR' nin neden olduğu TBARS artışında istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı ve IR + EA grubundaki TBARS düzeyinin kontrol

grubunun değerlerine yaklaştığı tespit edildi. Sadece EA verilen grupta kontrol grubu ile arasında rakamsal farklılıklar olsa da istatistiksel olarak anlamlı değişimlerin olmadığı gözlenmiştir. Bununla birlikte IR+EA uygulamasının antioksidan savunma sistemi elemanları olan GSH, SOD, GPx ve CAT düzeylerinde istatistik olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu gözlendi. Ancak EA uygulamasının GSH, GPx, CAT ve SOD düzeylerinde IR'ye bağlı olan değişikliği giderdiği ve istatistiksel olarak IR grubunda farklı olduğu gözlendi. IR+EA grubuna göre ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüş olduğu belirlendi. Bu parametrelerden sadece SOD düzeylerinin Kontrol ve EA grubuyla, IR+EA grubunda istatistiksel anlam içermediği, diğer parametrelerin ise artmasına rağmen Kontrol ve EA ile IR+EA arasında anlamlı olarak fark olduğu belirlendi.

Kemoterapi ilaçlarının erkek reproduktif sistemi üzerindeki olumsuz etkilerinin antioksidanlar kullanılarak azaltılmasına yönelik pekçok deneysel çalışma bulunmaktadır. Önceki çalışmalar flavanoidlerden elajik asitin (155) serbest radikal süpürücü etkisiyle doksorubisinin sebep olduğu testis hasarında, spermilerin kalite parametrelerindeki bozukluklarda (motilite, yoğunluk, anormalite) steroidogenezisteki hasarlarda ve apoptotik germ hücre miktarındaki artışlarda önleyici rol oynayabileceğini göstermiştir. Yapılan pekçok deneysel çalışmada kullanılan güçlü bir antioksidan olan Elajik asitin (126, 128) testis ve spermelerdeki yapısal, fonksiyonel, genetik bozukluklar ile testosteron seviyelerindeki azalmaları kısmen önlediği veya tamamen azalttığı belirlenmiştir. Son yıllarda yapılan araştırmalarda Siklofosfamidle oluşturulan gonadotoksisiteye karşı Elajik asitin (106, 119) koruyucu etkileri olduğu ve histopatolojik hasarı azalttığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda bu bulgularla uyumlu olarak EA uygulamasının IR'nin neden olduğu testiküler hasarı belirgin şekilde azalttığını gözlemledik.

Ayrıca çalışmamızda gruplar testis ağırlıkları, epididimis ağırlıkları, seminal vezikül ağırlıkları ve prostat ağırlıkları açısından istatistiksel olarak karşılaştırıldı. IR uygulamasının ve EA tedavisinin üreme sistemi organ ağırlıklarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak herhangi bir değişime neden olmadığı gözlenmiştir. Buna ilaveten yapılan spermatolojik incelemelerde sperm karakteristikleri olan sperm motilitesi, anormal sperm miktarı ve sperm konsantrasyonları değerlendirilmiştir. IR uygulamasının sperm motilitesi ve konsantrasyonunda kontrol grubu ve EA grubuna

göre istatistiksel olarak önemli düzeyde azalmaya neden olduğu belirlendi. IR + EA grubunda ise yapılan tedavi sonucu sperm motilitesi ve anormal sperm oranında IR grubuna göre rakamsal olarak düzelme gözlemlense de istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Bununla birlikte sperm konsantrasyonunun IR grubuna göre anlamlı düzeyde arttığı tespit edildi. Kontrol ve EA grubu arasında istatistiksel olarak bir farkın olmadığı saptandı. Literatürde IR'nin üreme sisteminin üzerine etkilerini gösteren histopatolojik araştırmaya rastlanmamıştır ve bu konu ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonucunda erkek sıçanlarda testis dokusunda kemoterapotik ilaçlardan İrinotekanın neden olduğu reproduktif hasara karşı Elajik Asit'in koruyucu etkileri olduğu gözlemlendi. Histopatolojik olarak IR ile hasar oluşturulan grupta testiste tunika albuginea tabakasında ve interstisyel alanda vasküler konjesyon, vakuolizasyon, interstisyel ödem ve tübül lümeninde germinatif hücrelerde azalma, seminifer tübül lümeninde vakuolizasyon ve belirgin ödem, seminifer tübül lümenine dökülmüş hücreler ve seminifer tübül epitelinde dejenerasyon, seminifer tübül epitelinde bölünmenin herhangi bir evresinde duraksamış hücreler olduğu tespit edildi. İmmunohistokimyasal olarak ise Kaspaz-3 immunreaktivite değerlendirmesinde IR grubunda yoğun boyanmış Kaspaz-3 pozitif hücreler gözlemlendi. IR + EA grubunda pozitif boyanmış hücre sayısında ve boyanma yoğunluğunda belirgin derecede azalma olduğu tespit edildi. Kontrol ve EA gruplarında ise Kaspaz-3 immunreaktivitesi gözlemlenmedi. IR + EA grubunda ise bu histopatolojik bulgularda belirgin derecede azalma olduğu görüldü. Biyokimyasal analizlerde ise IR verilen sıçanlarda TBARS düzeyinin anlamlı düzeyde arttığı, EA uygulamasının ise bu artışı önemli derecede azalttığı izlendi. IR uygulaması GSH, SOD, GPx ve CAT düzeyinde azalmaya neden olurken, EA uygulaması ise bu değerlerin artışına neden olmuştur. IR uygulamasının sperm motilitesi ve konsatrasyonu ve sperm oranında önemli derecede azalmaya neden olurken, EA uygulaması bu değerlerin hepsinde rakamsal olarak artışa neden olmuş ancak istatistiksel olarak sadece sperm konsantrasyonunda önemlilik göstermiştir.

Sonuç olarak bu çalışma EA uygulamasının sıçanlarda IR ile oluşturulan reproduktif hasarı azalttığını göstermektedir. IR ile ilgili yapılan histopatolojik çalışmalara literatürde rastlanmadığı için çalışmamızın yapılacak olan benzer projelere destek olacağı düşüncesindeyiz.

KAYNAKLAR

1. Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology. Lippincott: Williams & Wilkins, Philadelphia 2001.
2. Page R, Takimoto C. Principles of chemotherapy. In: Cancer Management: A Multidisciplinary Approach Medical, Surgical & Radiation Oncology. Editors: R Pazdur, LR Coia, WJ Hoskins, LD Wagman. PRR, New York 2004.
3. Ragheb AM, Sabanegh ES. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonado- toxicity. Anticancer Agents Med Chem 2010; 10: 92-102.
4. Sabanegh ES, Ragheb AM. Male fertility after cancer. Urology 2009; 73: 225-31.
5. Ragheb AM, Sabanegh ES. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonado- toxicity. Anticancer Agents Med Chem 2010; 10: 92-102.
6. Schrader M, Müller M, Straub B, Miller K. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic, basis and clinical aspects. Reprod Toxicol 2001; 15: 611.
7. Demirci U, Benekli M, Büyükberber S, Coşkun U. Late side effects of cancer therapy. Int J Hematol Oncol 2010; 4: 250-61.
8. Schrader M, Müller M, Straub B, Miller K. The impact of chemotherapy on male fertility: a survey of the biologic, basis and clinical aspects. Reprod Toxicol 2001; 15: 61.
9. Delbes G, Hales BF, Robaire B. Toxicants and human sperm chromatin integrity. Molecular Human Reproduction 2010; 16: 14-22.
10. Meistrich ML. Restoration of spermatogenesis by hormone treatment after cytotoxic therapy. Acta Paediatr Suppl 1999; 88: 19-22.
11. Colpi GM, Contalbi GF, Nerva F, Sagone P, Piediferro G. Testicular function following chemo-radiotherapy. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004; 113.
12. Johnson GD, Lalancette C, Linnemann AK, Leduc F, Boissonneault G, Krawetz SA. The sperm nucleus: chromatin, RNA, and the nuclear matrix. Reproduction 2011; 141: 21-36.

13. Türk G, Aksu EH, Bozkurt T. Spermatozoon DNA'sı hasarı. FÜ Sağlık Bil Vet Derg 2006; 20: 85-95.
14. Codrington AM, Hales BF, Robaire B. Exposure of male rats to cyclophosphamide alters the chromatin structure and basic proteome in spermatozoa. Hum Reprod 2007; 22: 1431- 42.
15. Codrington AM, Hales BF, Robaire B. Chronic cyclo- phosphamide exposure alters the profile of rat sperm nuclear matrix proteins. Biol Reprod 2007; 77: 303-11.
16. O'Flaherty C, Hales BF, Chan P, Robaire B. Impact of chemotherapeutics and advanced testicular cancer or hodgkin lymphoma on sperm deoxyribonucleic acid in- tegrity. Fertil Steril 2010; 94: 1374-9.
17. Grenier L, Robaire B, Hales BF. Paternal exposure to cy- clophosphamide affects the progression of sperm chro- matin decondensation and activates a DNA damage response in the prepronuclear rat zygote. Biol Reprod 2010; 83: 195-204.
18. Tempest HG, Ko E, Chan P, Robaire B, Rademaker A, Martin RH. Sperm aneuploidy frequencies analysed before and after chemotherapy in testicular can- cer and Hodgkin's lymphoma patients. Hum Reprod 2008; 23: 251-8.
19. Aitken RJ, Roman SD. Antioxidant systems and oxi- dative stress in the testes. Oxid Med Cell Longev 2008; 1: 15-24.
20. Hess RA, de Franca LR. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium. In: Molecular Mechanisms in Spermatogenesis. Editor: CY Cheng. Adv Exp Med Biol (Book Series) 2008; 636: 1-15.
21. Agarwal A, Sekhon LH. The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility. Hum Fertil 2010; 13: 217-25.
22. Tremellen K. Oxidative stress and male infertility-a clinical perspective. Hum Reprod Update 2008; 14: 243-58.
23. Ateşşahin A, Karahan İ, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Çeribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. Reprod Toxicol 2006; 21: 42-7.
24. Türk G, Çeribaşı AO, Şahna E, Ateşşahin A. Lycopene and ellagic acid prevent testicular apoptosis induced by cisplatin. Phytomedicine 2011; 18: 356-61.

25. Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. Second Ed. WB Saunders Company, Philadelphia, 2001: 487-508.
26. Erkoçak A. Özel Histoloji, Genital sistem, Ankara üniversitesi tıp fakültesi yayınları, 2.baskı Ankara 1990: 166-194.
27. <https://www.msxlab.org/forum/tip-bilimleri/24409-canlilarda-ureme-ve-ureme-sistemi.html>.
28. Snell RS. Clinical anatomy, 3rd ed. Boston, 1986: Brown and Company.
29. Kuran O. *Sistematik anatomi*. İstanbul, 1983: Filiz Kitabevi.
30. Arıncı, K; Elhan A. (2001). Anatomi (3. Baskı). Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti.
31. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı-Anatomi Kitabı-Kıvılcım Kitabevi Eylül 2012 Kayseri.
32. Aktümsek, A., 2006, Anatomi ve fizyoloji insan biyolojisi, 3. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara.
33. Sancak B, Cumhuriyet M. Fonksiyonel Anatomi. 2. Baskı, Ankara: Medipress, 2012: 291-92.
34. Snell, R.S., 2004, Klinik anatomi, (Çev.: Yıldırım, M.), 6. Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
35. Trainer, T.D Histology of the normal testis. Am J Surg Pathol. 1987: 11, 797-809.
36. Ross, M.H; Pawlina, W. (2014). Histoloji Konu Anlatımı Ve Atlas (6.baskı) Philadelphia: Lippincott Williams –Wilkins.
37. Şeftalioğlu A. Genel ve özel insan embriyolojisi, 3.Baskı. Ankara: Feryal Matbaası, 1998: 346-50.
38. Moore, K.L., 2009, İnsan embriyolojisi, (Çev.: Dalkılıç, H., Yıldırım, M.), Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
39. Sadler, T.W., 2005, Langman Medikal Embriyoloji, (Çev.: Başaklar, A.C.), 9. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
40. Cumhuriyet, M., Yener, N., Tuncel, M., Temel Anatomi, Ankara, ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık 2001: 287-91.
41. Şeftalioğlu, A. Genel ve özel İnsan Embriyolojisi (3. Baskı). Ankara: Tıp-Teknik Yayıncılık Ltd. Şti. 1998: 346-54.

42. From Migeon CJ, Berkovitz GD, Brown TR. Sexual differentiation and ambiguity. In: Kappy MS, Blizzard RN, Migeon CJ, editors. Wilkins: the diagnosis and treatment of endocrine disorders in childhood and adolescence. Springfield [IL]: Charles C. Thomas 1994.
43. Moore, K.L, Persaud, T.V.N. Embriyoloji ve doğum defektlerinin temelleri. (S.Müftüoğlu, P.Atilla, F.Kaymaz Çev.) İstanbul: Güneş Tıp Kitabevleri. 7.Baskı 2009.
44. Hassa, H., İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları, Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Basımevi, Eskisehir, 2003: 418.
45. Healthappointments.com– Free Articles On Medical And Healthcare Topics- Chapter 16: Urogenital system.
46. Kierszenbaum, AL., *Histology and cell biology*, An introduction To pathology.3rd Edition Elsevier 2012.
47. Şahintürk, V., Subfertil Erkeklerin Sperm Morfolojilerinin Işık Mikroskopik ve FloresanYöntemlerle İncelenmesi, Doktora Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir 2000.
48. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri İle İnsan Embriyolojisi. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çeviren). 8. Baskı, İstanbul: Nobel, 2009.
49. Eşrefoğlu M.Özel Histoloji. Medipress Matbaacılık, Malatya 2009: 978-975-6676-43.
50. Erbeni T. Histoloji II. İkinci baskı. SBAD Yayınları, Ankara 1996: 156-72.
51. Kierszenbaum, A.L., Histoloji ve hücre biyolojisi, (Çev.: Demir, R.), Palme Yayıncılık, Ankara, 2006: 618.
52. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Temel Histoloji, (Çeviri: Aytekin, Y., Solakoğlu, S.,) 10. Baskıdan Çeviri, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 2009: 135.
53. Paker Ş.*Histoloji*, 2.Baskı. Bursa,1993: Uludağ Üniversitesi Basımevi.
54. Moore KL, Dalley AF. Clinically Oriented Anatomy, Williams&Wilkins, Int ed. 1995: 278-81, 307-13.
55. Mescher AL: Jungueria's Basic Histology: Text and Atlas, 12th Edition.
56. Skinner M, Griswold M. *Sertoli Cell Biology*. USA, 2005: Elsevier Academic Press.
57. Tekelioğlu M.Özel histoloji ince yapı ve gelişme. 1.Baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Ankara, 2002: 231-44.

58. Mesccher AL. Junqueira's Basic Histology Text and Atlas. 13nd Edition. 2013: 429-448.
59. Bozdoğan Erişkin Erkek Sıçanlarda Sisplatin Ile Oluşturulan Testis Hasarı Üzerine Sodium Selenitin Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2012.
60. Ross-Cormack, D.H.(2001). Essential Histology (6th ed.). USA: Lippincott Williams&Wilkins. 412-26.
61. Kopera I, Bilinska BC, Cheng Y, Mruk D.Sertoli-germ cell junctions in the testis: a review of recent data. *Phil. Trans. R.Soc.B.*, 2010, 365, 1593-605.
62. Ross-Young, B.,Heat, J.W. Wheater's Functional Histology; A text and Colour Atlas (4th ed.). London: Churchill Livigstone. 2000: 328-339.
63. Young, B.,Heat, J.W. Wheater's Functional Histology; A text and Colour Atlas (4th ed.). London: Churchill Livigstone, 2000.
64. Özdamar S, Sorkun H.Genel Embriyoloji. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları, Kayseri 2002: 4-6.
65. Temel Histoloji. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi; 2009: 418-34.
66. Gajera HP, Patel SV,Golakiya BA. 2008, Fundamentals of Biochemistry-A textbook.
67. Stambe C, Atkins RC, Tesch GH, Kapoun AM. Hill PA, Schreiner GF et al. Blockade of p38alpha MAPK ameliorates acute inflammatory renal injury in rat anti-GBM.
68. Gartner LP, Hiatt JL.Color Textbook of Histology, 3.Edition.
69. Cormack, D.H.(2001) Essential Histology (6th ed.) USA: Lippincott Williams&Wilkins.
70. Yousef, M., Vitamin E modulates reproductive toxicity of pyrethroid lambda-cyhalothrin in male rabbits, *Food and Chemical Toxicology*, 2010: 1152–1159.
71. Ackermann, U., 2006, Pdq fizyoloji, İstanbul Medikal Yayıncılık, İstanbul.
72. Patton, H., 1989, Textbook of physiology, Nobel yayınları, İstanbul.
73. Şahintürk, V. ve Erçakır, M., 1999, Histoloji ve Embriyoloji Laboratuar Kılavuzu, Osmangazi Üniversitesi Yayınları, Eskişehir.
74. Tekelioğlu M. (2002). Özel histoloji, İnce yapı ve gelişme. Ankara:Antıp A.Ş.

75. Gartner LP, Hiatt JL.Çeviri: Dağdeviren A. Renkli Histoloji Atlas, 4.Baskı. Ankara, 2009: Güneş Tıp Kitabevleri.
76. Skinner M, Griswold M.*Sertoli Cell Biology*. USA, 2005: Elsevier Academic Press)ve Tekelioğlu.
77. Camptothecin[webpageontheInternet].Herbs-Tech:<http://www.herbstech.com/product/camptothecin.asp>.
78. Mi Z, Burke TG. Reduced Albumin Binding Promotes the Stability and Activity of Topotecan in Human Blood, 1995; 34: 13722-8.
79. Burke TG. Chemistry of the camptothecins in the bloodstream. Drug stabilization and optimization of activity, 1996; 803: 29-31.
80. Venditto VJ, Simanek EE. Cancer therapies utilizing the camptothecins: A review of the in vivo literature. *Mol Pharmaceut* 2010; 7: 307-49.
81. Jong FA, Jonge MJA, Verweij J, Mathijssen RHJ. Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy. *Cancer Lett* 2006; 234: 90-106.
82. Fuchs C, Mitchell EP, Hoff PM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2006; 32: 491– 503.
83. Lorusso D, Pietragalla A, Mainenti S, Masciullo V, Vagno GV, Scambia G. Review role of topotecan in gynaecological cancers: Current indications and perspectives. *Crit Rev Oncol Hemat* 2010; 74: 163–74.
84. Lucile T Abe, Franco M Lajolo and Maria Ines Genovese. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Malden, 92(8), suppl. 1, Part 2, 2012: p. 1679-1687.
85. Ellagic acid - C₁₄H₆O₈ – PubChem.
86. <https://www.cancertutor.com/ellagicacid-Stop tumor growth and kill cancer cells naturally with ellagic acid>.
87. S. Hakkinen. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*. Volume 32, Issue 5, June 1999, Pages 345-53.
88. J. Milivojevic et el. Chemical and Antioxidant Properties of Cultivated and Wild *Fragaria* and *Rubus* Berries. *Journal of Food Quality*, 2011: 34, 1-9.
89. E. M. Daniel et el Extraction, stability, and quantitation of ellagic acid in various fruits and nuts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 1989: 2(4), 338-49.

90. S.Hakkinen. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. *Food Research International*. Volume 32, Issue 5, June,1999: Pages 345-53.
91. *Nutr Cancer*. Ellagic acid and natural sources of ellagitannins as possible chemopreventive agents against intestinal tumorigenesis in the Min mouse. 2006; 54(1): 79-83.
92. Agarwal, A., Sekhon, L.H., The role of antioxidant therapy in the treatment of male infertility, *Human Fertility*, 2010; 13(4): 217–25.
93. Gülçiçek, O.B., 2008, Deneysel Tıkanma İkterinde Curcuminin Oksidatif Stres Ve Hepatik Hasar İlişkisi, Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi 2.Genel Cerrahi Kliniği.
94. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues bythiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8.
95. Sun Y, Oberley LW, Li Y. A simple method for clinical assay of superoxidedismutase. *Clin Chem* 1988; 34: 497-500.
96. Beutler E. Red cell metabolism. In: *A Manual of Biochemical Methods*. New York: Grune Strottan 1975; 67-9.
97. Aebi H. Catalase in vitro assay methods. *Methods Enzymol* 1984; 105: 121-6.
98. Ellman G.Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959; 82: 70-7.
99. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with pholin. 1951.
100. G. Türk, A. Ateşşahin, M. Sönmez, A. Yüce and A.O. Çeribaşı, Lycopene protects against cyclosporine A-induced testicular toxicity in rats, *Theriogenology* 67 (2007), pp. 778–85.
101. M. Sönmez, A. Yüce and G. Türk, The protective effects of melatonin and vitamin E on antioxidant enzyme activities and epididymal sperm characteristics of homocysteine treated male rats, *Reprod Toxicol* 23- 2007; pp. 226–31.
102. M. Sönmez, G. Türk and A. Yüce, The effect of ascorbic acid supplementation on sperm quality, lipid peroxidation and testosterone levels of male Wistar rats, *Theriogenology* 63-2005; pp. 2063–2072.
103. Gaffari Türk, Kemoterapötiklerin erkek üreme sistemi üzerindeki yan etkileri ve koruyucu stratejiler, *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2013; 17: 73-92.

104. Ateşşahin A, Karahan İ, Türk G, Gür S, Yılmaz S, Çeribaşı AO. Protective role of lycopene on cisplatin-induced changes in sperm characteristics, testicular damage and oxidative stress in rats. *Reprod Toxicol* 2006; 21: 42-7.
105. Ateşşahin A, Türk G, Karahan İ, Yılmaz S, Çeribaşı AO, Bulmuş Ö. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril* 2006- 85(Suppl1): 1216-22.
106. Türk G, Çeribaşı AO, Sakin F, Sönmez M, Ateşşahin A. Antiperoxidative and anti-apoptotic effects of lycopene and ellagic acid on cyclophosphamide induced testicular lipid peroxidation and apoptosis. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 587-96.
107. Donya SM, Aly FA, Abo-Zeid MAM. Antigenotoxic efficacy of some vitamins against the mutagenicity induced by ifosfamide in mice. *Nature Sci* 2010; 8: 55-66.
108. Alam SS, Hafiz NA, El-Rahim AHA. Protective role of taurine against genotoxic damage in mice treated with methotrexate and tamoxfine. *Environ Toxicol Pharmacol* 2011; 31: 143-52.
109. *Marmara Pharmaceutical Journal* 18: 85-100, 2014 DOI: 10.12991/mpj.2014186125, Kamptotesin.
110. Lorence A, Nessler CL. Molecules of interest camptothecin, over four decades of surprising findings. *Phytochemistry* 2004; 65: 2735-49.
111. *Molecular Human Reproduction*, Vol.22, No.11, Irinotecan metabolite SN38 results in germ cell loss in the testis but not in the ovary of prepubertal mice. 2016; pp. 745–55.
112. Fuchs C, Mitchell EP, Hoff PM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2006; 32: 491– 503.
113. Saijo N. Clinical Trials of Irinotecan Hydrochloride (CPT, Campto Injection, Topotecin Injection) in Japan. *Ann NY Acad Sci* 1996; 803: 292-305.
114. Wilke H, Bouche O, Rougier P, Köhne CH. Irinotecan for the treatment of gastric cancer. *EJC Suppl* 2004; 2: 48-51.
115. Campto® Kısa Ürün Bilgisi [web page on the internet]. (Erişim 10.02.2011) T.C. İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü.
116. Jong FA, Jonge MJA, Verweij J, Mathijssen RHJ. Role of pharmacogenetics in irinotecan therapy. *Cancer Lett* 2006; 234: 90-106.
117. *Cancer Research UK*, www.cancerresearchuk.org, date of access 28/2/2016.

118. İlbey YÖ, Özbek E, Şimşek A, Ötünçtemur A, Çekmen M, Somay A. Potential chemoprotective effect of melatonin in cyclophosphamide and cisplatin induced testicular damage in rats. *Fertil Steril* 2009; 92: 1124-32.
119. Çeribaşı AO, Türk G, Sönmez M, Sakin F, Ateşşahin A. Toxic effect of cyclophosphamide on sperm morphology, testicular histology and blood oxidant-antioxidant balance, and protective roles of lycopene and ellagic acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010; 107: 730-6.
120. Ghosh D, Das UB, Misro M. Protective role of α -tocopherol-succinate (provitamin-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: a correlative approach to oxidative stress. *Free Radic Res* 2002; 36: 1209-18.
121. Codrington AM, Hales BF, Robaire B. Chronic cyclophosphamide exposure alters the profile of rat sperm nuclear matrix proteins. *Biol Reprod* 2007; 77: 303-11.
122. Codrington AM, Hales BF, Robaire B. Exposure of male rats to cyclophosphamide alters the chromatin structure and basic proteome in spermatozoa. *Human Reproduction* 2007;22: 1431-42.
123. Codrington AM, Hales BF, Robaire B. Spermogenic germ cell phase-specific DNA damage following cyclophosphamide exposure. *J Androl* 2004; 25: 354-62.
124. Aguilar-Mahecha A, Hales BF, Robaire B. Effects of acute and chronic cyclophosphamide treatment on meiotic progression and the induction of DNA double-strand breaks in rat spermatocytes. *Biol Reprod* 2005; 72: 1297-304.
125. Ateşşahin A, Şahna E, Türk G, Çeribaşı AO, Yılmaz S, Yüce A, Bulmuş Ö. Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *J Pineal Res* 2006; 41: 21-7.
126. Türk G, Ateşşahin A, Sönmez M, Çeribaşı AO, Yüce A. Improvement of cisplatin-induced injuries to sperm quality, the oxidant-antioxidant system, and the histologic structure of the rat testis by ellagic acid. *Fertil Steril* 2008; 89 (5 Suppl): 1474-81.
127. Beytur A, Ciftci O, Oguz F, Oguzturk H, Yılmaz F. Montelukast attenuates side effects of cisplatin including testicular, spermatological, and hormonal damage in male rats. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012; 69: 207-13.

128. Türk G, Çeribaşı AO, Şahna E, Ateşşahin A. Lycopene and ellagic acid prevent testicular apoptosis induced by cisplatin. *Phytomedicine* 2011; 18: 356-61.
129. Amin A, Hamza AA, Kambal A, Daoud S. Herbal extracts counteract cisplatin-mediated cell death in rat testis. *Asian J Androl* 2008; 10: 291-7.
130. Azu OO, Duru FIO, Osinubi AA, Oremosu AA, Norohna CC, Okanlawon AO, Elesha SO. Long-term treatment with kigelia africana fruit extract ameliorates the testicular toxicity following cisplatin administration in male sprague-dawley rats. *J Med Plants Res* 2011; 5: 388-97.
131. Ahmed EA, Omar HM, El-Ghaffar SKhA, Ragb SMM, Nasser AY. The antioxidant activity of vitamin C, DPPD and L-cysteine against cisplatin-induced testicular oxidative damage in rats. *Food Chem Toxicol* 2011; 49: 1115-21.
132. Çiftçi O, Beytur A, Çakır O, Gürbüz N, Vardı N. Comparison of reproductive toxicity caused by cisplatin and novel platinum-n-heterocyclic carbene complex in male rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 109: 328-33.
133. İlbey YÖ, Özbek E, Çekmen M, Şimşek A, Ötünçtemur A, Somay A. Protective effect of curcumin in cisplatin induced oxidative injury in rat testis: mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B signaling pathways. *Hum Reprod* 2009; 24: 1717-25.
134. İlbey YÖ, Özbek E, Şimşek A, Çekmen M, Ötünçtemur A, Somay A. Chemoprotective effect of a nuclear factor-kB inhibitor, pyrrolidine dithiocarbamate, against cisplatin- induced testicular damage in rats. *J Androl* 2009; 30: 505-14.
135. Favareto APA, Fernandez CDB, da Silva DAF, Anselmo- Franci JA, Kempinas WDG. Persistent impairment of testicular histology and sperm motility in adult rats treated with cisplatin at peripuberty. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 109: 85-96.
136. Narayana K, Verghese S, Jacob SS. L-ascorbic acid partially protects two cycles of cisplatin chemotherapy-induced testis damage and oligo-asthenoteratospermia in a mouse model. *Exp Toxicol Pathol* 2009; 61: 553-63.
137. Narayana K. Cisplatin induces duplex 3' overhangs and 5' blunt ends in epididymal epithelium in a Bax-dependent manner without any protection from L-ascorbic acid. *Eur J Pharmacol* 2010; 641: 238-45.

138. Tohamy AA, El-Ghor AA, El-Nahas SM, Noshay MM. β -glucan inhibits the genotoxicity of cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. *Mutat Res* 2003; 541: 45-53.
139. Parchuri N, Wilson G, Meistrich ML. Protection by gonadal steroid hormones against procarbazine-induced damage to spermatogenic function in LBNF1 hybrid rats. *J Androl* 1993; 14: 257-66.
140. Johnson FE, Doubek WG, Tolman KC, Janney CG. Testicular cytotoxicity of intravenous procarbazine in rats. *Surg Oncol* 1993; 2: 77-81.
141. Delic JI, Bush C, Peckham MJ. Protection from procarbazine-induced damage of spermatogenesis in the rat by androgen. *Cancer Res* 1986; 46: 1909-14.
142. Velez de la Calle JF, Soufirt JCI, Chodorget F, Boisseau CI, Kercret H, Jegou B. Reproductive effects of the anti-cancer drug procarbazine in male rats at different ages. *J Reprod Fertil* 1988; 84: 51-61.
143. Ward JA, Robinson J, Furr BJA, Shalet SM, Morris ID. Protection of spermatogenesis in rats from the cytotoxic procarbazine by the depot formulation of zoladex, a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Cancer Res* 1990; 50: 568-74.
144. Johnson FE, Farr SA, Mawad M, Woo YCS. Testicular cytotoxicity of intravenous methotrexate in rats. *J Surg Oncol* 1994; 55: 175-8.
145. Serati Nouri H, Azarmi YA, Movahedin M. Effect of growth hormone on testicular dysfunction induced by methotrexate in rats. *Andrologia* 2009; 41: 105-10.
146. Vardı N, Parlakpınar H, Ateş B, Otlu A. Metotreksatın neden olduğu testiküler hasara karşı klorogenik asidin koruyucu etkileri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30: 507-13.
147. Işık A, Işılay L, Erdemli EA, Akbay C, Anafarta K. Sıçan testisinde metotreksat'ın ışık ve elektron mikroskop düzeyinde etkileri. *Ank Üniv Tıp Fak Mec* 1997; 50: 125-9.
148. Saxena AK, Dhungel S, Bhattacharya S, Jha CB, Srivastava AK. Effect of chronic low dose of methotrexate on cellular proliferation during spermatogenesis in rats.

149. Ateşşahin A, Türk G, Karahan İ, Yılmaz S, Çeribaşı AO, Bulmuş Ö. Lycopene prevents adriamycin-induced testicular toxicity in rats. *Fertil Steril* 2006; 85(Suppl 1): 1216-22.
150. Saalu LC, Enye LA, Osinubi AA. An assessment of the histomorphometric evidences of doxorubicin-induced testicular cytotoxicity in wistar rats. *Int J Med Medic Sci* 2009; 1: 370-4.
151. Xin Y-F, You Z-Q, Gao H-Y, Zhou G-L, Chen Y-X, Yu J, Xuan YX. Protective effect of *Lycium barbarum* polysaccharides against doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Phytother Res* 2012; 26: 716-21.
152. Trivedi PP, Kushwaha S, Tripathi DN, Jena GB. Evaluation of male germ cell toxicity in rats: correlation between sperm head morphology and sperm comet assay. *Mutat Res* 2010; 703: 115-21.
153. Yang GS, Wang W, Wang YM, Chen ZD, Wang S, Fang JJ. Effect of cocaine on germ cell apoptosis in rats at different ages. *Asian J. Androl* 2006; 8 (5): 569-75.
154. Yeh Y-C, Liu T-J, Wang L-C, Lee H-W, Ting C-T, Lee W-L, Hung CJ, Wang KY, Lai HC, Lai HC. A standardized extract of *Ginkgo biloba* suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *Br J Pharmacol* 2009; 156: 48-61.
155. Çeribaşı AO, Sakin F, Türk G, Sönmez M, Ateşşahin A. Impact of ellagic acid on adriamycin-induced testicular histopathological lesions, apoptosis, lipid peroxidation and sperm damages. *Exp Toxicol Pathol* 2012; 64: 717-24.
156. Geng J, Fan J, Jiang H-W, Fang Z-J, Wang X, Sun J-L, Ding Q, Chen G. Elevated serum soluble Fas ligand is a promising marker of testicular toxicity induced by epirubicin in rats. *Toxicol Lett* 2009; 186: 96-103.
157. Devipriya N., Srinivasan M., Sudheer AR., Menon VP. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study. *Singapore Med. J.*, 2007; 48, 311.
158. Pari L., Sivasankari R. Effect of ellagic acid on cyclosporine A-induced oxidative damage in the liver of rats. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2008; 22: 395–401.
159. Alp Harun; Ratlarda Akut Malathion Toksikitesinin Neden Olduğu Oksidatif Stres Üzerine Kafeik Asit Fenetil Ester ve Elajik Asit'in Etkileri, Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg. Araştırma Makalesi 2011; 6(2): 117-24.

EKLER

EK 1. Özgeçmiş

1990 yılında Malatya’da doğdum. İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimimi tamamladım. 2014 güz döneminde Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi bölümüne başladım. Yüksek lisansa başladıktan 6 ay sonra kaydımı sildirdim. 2015 bahar döneminden beri İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yüksek lisans yapıyorum.



Ek 2. Etik Kurul Onayı



İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 03-02-2016
Toplantı Yeri : Tıp.Fak.Toplantı Salonu-Malatya
Araştırma Protokol no.su : 2016/A-15
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü : Sıçan
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soyü : Wistar Albino veya Sprauge- Dawley
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti : E D Farketmez
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı : 40 Adet
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı : 3-4 aylık 250-300 g

Tıp Fakültesi Öğretim Üyelerinden Yrd. Doç. Dr. Aslı Taşlıdere'nin yürütücüsü olduğu "Erkek Sıçanlarda İrinotekanın Neden Olduğu Reprodüktif Hasara Karşı Elajik Asitin Koruyucu Etkilerinin Araştırılması" isimli 2016/A-15 Protokol no.lu çalışmanın dosyası incelendi.

Adı geçen araştırmanın; araştırma protokolüne tamamen uyulmak, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesi'nde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere çalışmanın yapılmasında herhangi bir etik sakınca bulunmadığına oy birliği ile karar verildi.

Doç.Dr.M.Arif ALADAĞ Başkan	Prof. Dr. Nigar VARDI Üye	Prof. Dr. Yılmaz ÇİĞREMİŞ Üye
Vet.Hek.M.Zafer BOZDAĞ Üye	Yrd.Doç.Dr.Mehmet KARATAŞ Üye	Yrd.Doç.Dr. Mustafa KARAKAPLAN Üye
Salih AVCI Sivil Üye	Ahmet GÖNÜLLÜOĞLU Sivil Üye	