

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİ VE SİKLOFOSFAMİDİN
SIÇANLARDA TESTİS HİSTOLOJİSİ, APOPTOZİS VE
OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DEĞERLER ÜZERİNE ETKİSİ**

NUREDDİN ATASOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

YRD. DOÇ. DR. GÖKHAN CÜCE

KONYA 2016

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİ VE SİKLOFOSFAMİDİN
SIÇANLARDA TESTİS HİSTOLOJİSİ, APOPTOZİS VE
OKSİDAN-ANTIOKSİDAN DEĞERLER ÜZERİNE ETKİSİ**

NUREDDİN ATASOY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. GÖKHAN CÜCE

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 151318003 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2016

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi **Nureddin ATASOY**'un "**Çinko Oksit Nanopartikülleri ve Siklofosamidin Sıçanlarda Testis Histolojisi, Apoptozis ve Oksidan-Antioksidan Değerler Üzerine Etkisi**" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

KONYA / 13.07.2016

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Gökhan CÜCE

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Histoloji-Embriyoloji A.B.D.

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. S. Serpil KALKAN

Necmettin Erbakan Üniversitesi

Histoloji-Embriyoloji A.B.D.

İmzası

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hasan CÜCE

KTO Karatay Üniversitesi

Histoloji-Embriyoloji A.B.D.

İmzası

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun **15/07/2016** tarih ve **15/06**. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü

İmzası

APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “**The Effect of Zinc Oxide Nanoparticles and Cyclophosphamide On Testicular Histology, Apoptosis and Oxidane – Antioxidane Values of Rats**” by “*Nureddin ATASOY*” that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of “**Histology and Embriology**”, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan
Konya, Turkey / 13.07.2016

Principal Advisor

Assistant Professor Gökhan CÜCE

Necmettin Erbakan University Department of Histology and Embryology

Signature

Examination Committee Member

Professor S. Serpil KALKAN

Necmettin Erbakan University Department of Histology and Embryology

Signature

Examination Committee Member

Professor Hasan CÜCE

KTO Karatay University Department of Histology and Embryology

Signature

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kismet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences

Date and Signature

BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 13/07/2016

Öğrencinin Adı Soyadı: Nureddin ATASOY

İmzası:



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda yardım ve desteklerini esirgemeyen, tez çalışmalarım süresince bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gökhan Cüce'ye,

Yüksek Lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. S. Serpil Kalkan'a, öğretim üyesi hocalarım Prof. Dr. Aydan Özgörgülü'ye, Prof. Dr. Selçuk Duman'a, Prof. Dr. T. Murad Aktan'a ve KTO Karatay Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hasan Cüce'ye,

Yüksek Lisans eğitimim boyunca çalışmalarımın başından sonuna kadar her aşamada yanımda olan Araş. Gör. Dr. M. Enes Sözen'e, Araş. Gör. Dr. H. Tuğba Canbaz' a ve yüksek lisans arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteğini esirgemeyen aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i>	<i>ii</i>
<i>Approval</i>	<i>iii</i>
<i>Tez Beyan Sayfası</i>	<i>iv</i>
<i>Önsöz ve/veya Teşekkür</i>	<i>v</i>
<i>İçindekiler</i>	<i>vi</i>
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i>	<i>ix</i>
<i>Şekiller Listesi</i>	<i>xi</i>
<i>Resimler Listesi</i>	<i>xii</i>
<i>Tablolar Listesi</i>	<i>xiii</i>
<i>Özet</i>	<i>xiv</i>
<i>Abstract</i>	<i>xv</i>
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
<i>2.1. Testis Anatomisi</i>	<i>3</i>
<i>2.2. Testis Embriyolojisi</i>	<i>6</i>
<i>2.3. Testis Histolojisi</i>	<i>12</i>
<i>2.3.1. Skrotum</i>	<i>13</i>
<i>2.3.2. Testiküler Kapsül</i>	<i>13</i>
<i>2.3.3. Seminifer Tübüller</i>	<i>15</i>
<i>2.3.3.1. Sertoli (Destek) Hücreleri</i>	<i>16</i>
<i>2.3.3.2. Spermatoganjik Hücreler ve Spermatogenezis</i>	<i>19</i>
<i>2.3.3.2.1. Spermatogonyum (Gonosit)</i>	<i>20</i>
<i>2.3.3.2.2. Primer Spermatozit (Spermatozit-1)</i>	<i>21</i>
<i>2.3.3.2.3. Sekonder Spermatozit (Spermatozit-2)</i>	<i>21</i>
<i>2.3.3.2.4. Spermatid</i>	<i>21</i>
<i>2.3.3.2.5. Olgun Spermium (Spermatozoon)</i>	<i>24</i>
<i>2.3.4. İnterstisyel Alan</i>	<i>25</i>
<i>2.3.4.1. Leydig (İnterstisyel) Hücreleri</i>	<i>25</i>
<i>2.3.5. Testisin Histofizyolojisi</i>	<i>27</i>
<i>2.3.6. Testis Boşaltım Kanalları</i>	<i>28</i>
<i>2.3.6.1. Tübüli Rekti</i>	<i>28</i>

2.3.6.2. Rete Testis.....	28
2.3.6.3. Duktuli Efferentes.....	29
2.3.6.4. Duktus Epididimis.....	29
2.3.6.5. Duktus Deferens.....	31
2.3.6.6. Duktus Ejeküatoryus.....	32
2.4. Kemoterapötikler.....	32
2.4.1. Alkilleyici Ajanlar.....	35
2.4.1.1. Siklofosfamid (CP).....	36
2.5. Nanoteknoloji ve Nanopartiküller.....	39
2.5.1. Çinko Oksit (ZnO) Nanopartikülleri.....	44
2.6. Oksidatif Stres.....	46
2.6.1. Serbest Radikaller.....	47
2.6.2. Antioksidanlar.....	49
2.7. Apoptozis.....	51
2.7.1. Apoptozis Mekanizmaları.....	55
2.7.1.1. Ölüm Reseptörleri Aracılı (Hücre Dışı Kaynaklı) Apoptozis.....	55
2.7.1.2. Mitokondri Aracılı (Hücre İçi Kaynaklı) Apoptozis.....	56
2.7.1.3. P-53 Gen Aracılı Apoptozis.....	57
2.7.2. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	58
2.7.2.1. TUNEL Yöntemi.....	59
2.7.3. Apoptozisin Testisler Üzerindeki Rolü.....	60
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	61
3.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği.....	61
3.2. Deney Hayvanları.....	61
3.3. Çalışma Grupları.....	61
3.4. Kimyasallar.....	62
3.5. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi.....	63
3.6. Testis Ağırlıklarının Ölçülmesi.....	63
3.7. Bouin Çözeltilisinin Hazırlanması.....	64
3.8. Dokuların ve Kan Örneklerinin Alınması.....	64
3.9. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması.....	64
3.10. Kesitlerin Alınması ve Boyanması.....	65
3.11. İmmünohistokimyasal Boyama.....	67

3.12. TUNEL Metodu.....	68
3.13. İstatistiksel Yöntemler.....	70
4. BULGULAR.....	71
4.1. Vücut Ağırlık Farkı.....	71
4.2. Testis Ağırlık Farkı.....	71
4.3. Johnsen Skorlama.....	72
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	74
4.4.1. Bax Boyanması.....	74
4.4.2. Caspase-3 Boyanması.....	77
4.4.3. TUNEL Boyama.....	80
4.5. Biyokimya Sonuçları.....	83
4.5.1. Serum Biyokimya Sonuçları.....	83
4.5.2. Doku Biyokimya Sonuçları.....	83
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	85
6. KAYNAKLAR.....	88
7. ÖZGEÇMİŞ.....	96
8. EKLER.....	97

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

°C	Santigrat Derece
ABP	Androjen Bağlayıcı Hormon
AIF	Apoptozis İndükleyici Faktör
AMH	Antimüllerian Hormon
APAF-1	Apoptozis Proteaz Aktive Edici Faktör 1
ATP	Adenozin Trifosfat
CAT	Katalaz
cm	Santimetre
CP	Siklofosfamid
DER	Düz Endoplazmik Retikulum
DNA	Deoksiribonükleik Asit
eV	Elektron Volt
FAM	Fosforamid Mustard
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GER	Granüllü Endoplazmik Retikulum
GPX	Glutasyon Peroksidaz
GR	Glutasyon Redüktaz
GSH	Glutasyon
GST	Glutasyon-S-Transferaz
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu
H-E	Hematoksilen-Eozin
LH	Luteinizan Hormon
LOOH	Lipid Hidroperoksiti
MDA	Malandialdehid
MIS	Müllerian İnhibitör Madde
mm	Milimetre
nm	Nanometre
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
PAS	Periodik Asit Schiff
RNA	Ribonükleik Asit

RNS	Reaktif Azot Bileşikleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SOD	Süperoksit Dismutaz
SRY	Cinsiyet Belirleyici Gen
TDF	Testis Belirleyici Faktör
TdT	Terminal Deoksinükleotidil Transferaz
TNFR	Tümör Nekrozis Faktör Reseptör
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transpherase (TdT) - mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling
UV	Ultraviyole
ZnO	Çinko Oksit
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. Makro, mikro ve nano yapıların boyutlarının karşılaştırılması.....	1
Şekil 2.1. Testis anatomisi.....	3
Şekil 2.2. Testisin anatomik yapısı.....	5
Şekil 2.3. Farklılanmamış gonadın testis ve ovaryuma farklılanması.....	7
Şekil 2.4. Primordial germ hücreleri ile bu hücrelerin genital sırta doğru giden göç yolu.....	8
Şekil 2.5. Testis gelişiminin şematik görünümü.....	11
Şekil 2.6. Gelişimin 6. haftasında erkek (A) ve dişi (B) genital kanallar.....	12
Şekil 2.7. Seminifer tübül duvarı ve ilişkili yakın çevresi.....	16
Şekil 2.8. Spermatogenezin şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.9. Spermiogenez sürecinde spermatidlerde gözlemlenen değişiklikler....	23
Şekil 2.10. Olgun spermin (spermatazoon) yapısı.....	24
Şekil 2.11. İnterstisyel alan ve Leydig (intersitisyel) hücreleri	26
Şekil 2.12. Kemoterapötik ajanlar, etki mekanizmaları ve yan etkileri.....	34
Şekil 2.13. Siklofosfamidin kimyasal yapısı.....	36
Şekil 2.14. Nanoküre ve nanokapsül yapısının şematik gösterimi.....	42
Şekil 2.15. Hekzagonal çinko oksit yapısı.....	45
Şekil 2.16. Radikal ve non-radikal reaktif oksijen türleri.....	48
Şekil 2.17. Nekrozis ve apoptozisin şematik gösterimi.....	53
Şekil 3.1. Bandelin Sonoplus HD 2070 ultrasonik sonikatör.....	63

RESİMLER LİSTESİ

Resim 4.1. Kontrol grubuna ait testis kesitinde seminifer tübüllerin yapısı (H-E).....	72
Resim 4.2. Siklofosfamid (CP) grubuna ait testis kesitinde seminifer tübüllerin yapısı (H-E).....	73
Resim 4.3. Çinko oksit (ZnO) grubuna ait testis kesitinde seminifer tübüllerin yapısı (H-E).....	73
Resim 4.4. CP + ZnO grubuna ait testis kesitinde seminifer tübüllerin yapısı (H-E).....	74
Resim 4.5. Kontrol grubunda gözlemlenen negatif Bax ekspresyonu.....	75
Resim 4.6. Siklofosfamid (CP) grubunda gözlemlenen +2 değerlikli Bax ekspresyonu.....	76
Resim 4.7. Çinko oksit (ZnO) grubunda gözlemlenen +2 değerlikli Bax ekspresyonu.....	76
Resim 4.8. Cp + ZnO grubunda gözlemlenen +2 değerlikli Bax ekspresyonu.....	77
Resim 4.9. Kontrol grubunda gözlemlenen negatif Caspase-3 ekspresyonu.....	78
Resim 4.10. Siklofosfamid (CP) grubunda gözlemlenen +2 değerlikli Caspase-3 ekspresyonu.....	79
Resim 4.11. Çinko oksit (ZnO) grubunda gözlemlenen +1 değerlikli Caspase-3 ekspresyonu.....	79
Resim 4.12. CP + ZnO grubunda gözlemlenen +3 değerlikli Caspase-3 ekspresyonu.....	80
Resim 4.13. Kontrol grubuna ait kesitte gözlemlenen TUNEL pozitif hücreler.....	81
Resim 4.14. Siklofosfamid (CP) grubuna ait kesitte gözlemlenen TUNEL pozitif hücreler.....	81
Resim 4.15. Çinko oksit (ZnO) grubuna ait kesitte gözlemlenen TUNEL pozitif hücreler.....	82
Resim 4.16. CP + ZnO grubuna ait kesitte gözlemlenen TUNEL pozitif hücreler.....	82

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Deney hayvanlarına uygulanan tedavinin şekli, dozu ve süresi.....	62
Tablo 3.2. Bouin çözeltisi hazırlamak için gerekli olan maddeler ve miktarları.....	64
Tablo 3.3. Hematoksilen-Eozin (H&E) boyama protokol.....	65
Tablo 3.4. Johnsen skorlaması.....	66
Tablo 3.5. Bax ve Caspase-3 Boyama Protokolü.....	67
Tablo 3.6. Bax ve Caspase-3 boyanma şiddetinin değerlendirilmesi.....	68



ÖZET

T.C. NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİNKO OKSİT NANOPARTİKÜLLERİ VE SİKLOFOSFAMİDİN SIÇANLARDA TESTİS HİSTOLOJİSİ, APOPTOZİS VE OKSİDAN- ANTIOKSİDAN DEĞERLER ÜZERİNE ETKİSİ

Nureddin ATASOY

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ / KONYA – 2016

Siklofosfamid (CP) çocukluk ve yetişkin malignansilerde, organ nakillerinde immun supresif olarak, sistemik lupus eritematoz, multiple skleroz gibi hastalıklarda kullanılan kemoterapötik bir ilaçtır. Çinko oksit (ZnO) çok amaçlı inorganik bir malzeme olup ZnO nanopartikülleri ise boya, pigment, kozmetik ve kişisel bakım gibi farklı endüstriyel alanlarda kullanılan en yaygın malzemelerden birisidir. Bu çalışmada testislerde hasar oluşturduğu bilinen CP ile testis hasarı ve apoptozis çalışmalarının yetersiz kaldığı ZnO nanopartikül uygulamasının etkileri amaçlanmıştır.

Siçanlar; I. Grup (n=7) Kontrol, II. Grup (n=7) Siklofosfamid (20 mg/kg/gün ip) (CP), III. Grup (n=7) Çinko oksit (ZnO) nanopartikül (300 mg/kg/gün oral) ve IV. Grup (n=7) CP (20 mg/kg/gün ip) + ZnO (300 mg/kg/gün oral) olmak üzere 4 gruba ayrıldı. Tüm gruplara, 7 gün boyunca maddeler enjeksiyon ve oral yolla verildi. Siçanların sol testislerine Hematoksilen-Eozin, TUNEL, Bax ve Caspase-3 immünohistokimyasal teknikleri uygulandı. Sağ testis doku homojenatları ile kan serumları ise oksidatif stress markers (indirgenmiş Glutasyon, Catalase, TBARS) ölçüldü.

Gruplar; Johnsen skorlama bakımından karşılaştırıldığında, tüm gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu ve en düşük skor Grup 4’de gözlemlendi. İmmünohistokimyasal Bax boyanmasında Grup 2 ve Grup 3 arasında anlamlı bir fark gözlemlenmedi, bunun dışındaki diğer bütün gruplar arasında anlamlı fark ortaya çıkmıştır. Caspase-3 boyanmasında ise Grup 1 – Grup 2, Grup 1 – Grup 4, Grup 2 – Grup 4 ve Grup 3 – Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmıştır. TUNEL metodu sonucuna göre ise bütün gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür.

Serum GSH ve Katalaz seviyesi, sadece Grup 2 ve Grup 4’de benzerlik göstermiştir ve diğer gruplarda birbirinden anlamlı derecede farklı çıkmıştır. Serum TBARS seviyesi ise bütün gruplar arasında anlamlı bir farklılık göstermiştir. Doku GSH seviyesi, Grup1 – Grup 3 ile Grup 2 – Grup 4 arasında benzer olup diğer gruplarda farklılık göstermiştir. Doku Katalaz seviyesi, Grup 2 – Grup 3 gruplarında benzer olup diğer gruplarda anlamlı farklılık göstermiştir. Doku TBARS seviyesi ise bütün gruplarda anlamlı farklılık göstermiştir.

Sonuç olarak, çinko oksitin testislere, siklofosfamidden daha az zarar verdiği tespit edildi. Testislerde en fazla hasarın, ikisinin birlikte kullanıldığı grupta olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis; Çinko oksit nanopartikülü; Siklofosfamid; Testis

SUMMARY

T.C. NECMETTIN ERBAKAN UNIVERSITY
INSTITUTE of HEALTH SCIENCES

THE EFFECT OF ZINC OXIDE NANOPARTICLES AND CYCLOPHOSPHAMIDE ON TESTICULAR HISTOLOGY, APOPTOSIS AND OXIDANE-ANTIOXIDANE VALUES OF RATS

Nureddin ATASOY

Department of Histology and Embryology

Master's Thesis / KONYA – 2016

Cyclophosphamide (CP) is a chemotherapeutic drug used in diseases such as multiple sclerosis systemic lupus erythematosus, as immuno suppressive in organ transplantation in the childhood and adult malignancies. Zinc oxide (ZnO) is a multi purpose inorganic material and ZnO nanoparticles are one of the most common used in various industrial fields such as paint, pigment, cosmetics and personal care. In this study the effects of CP which is known cause damage to the testicles and the effects of ZnO nanoparticles applications which studies are not sufficient for testicular damage and apoptosis were investigated.

Rats were grouped into four as: I. Group (n=7) Control, II. Group (n=7) Cyclophosphamide (CP) (20 mg/kg/day ip), III. Group (n=7) Zinc oxide (ZnO) nanoparticles (300 mg/kg/day oral) and IV. Group (n = 7) CP + ZnO (20 mg/kg/day ip + 300 mg/kg/day oral). Elements were intraperitoneally injected and orally given to all groups for seven days. Hematoxiline-Eosine, TUNEL, Bax and Caspase-3 immunohistochemical techniques were applied to left testis. Right testis tissue homogenates and blood serums of oxidative stress markers (reduced glutathione, catalase, TBARS) were measured.

When Johnsen scoring terms compared, a significant difference was found between all groups and the lowest score was observed in the Group 4. In Bax immunohistochemical staining, a significant difference between Group 2 and Group 3 wasn't observed, all other groups had significant difference. In Caspase-3 staining, a statistically significant difference between Group 1 – Group 2, Group 1 – Group 4, Group 2 – Group 4 and Group 3 – Group 4 were observed. A significant difference between all groups was found when compared to control group.

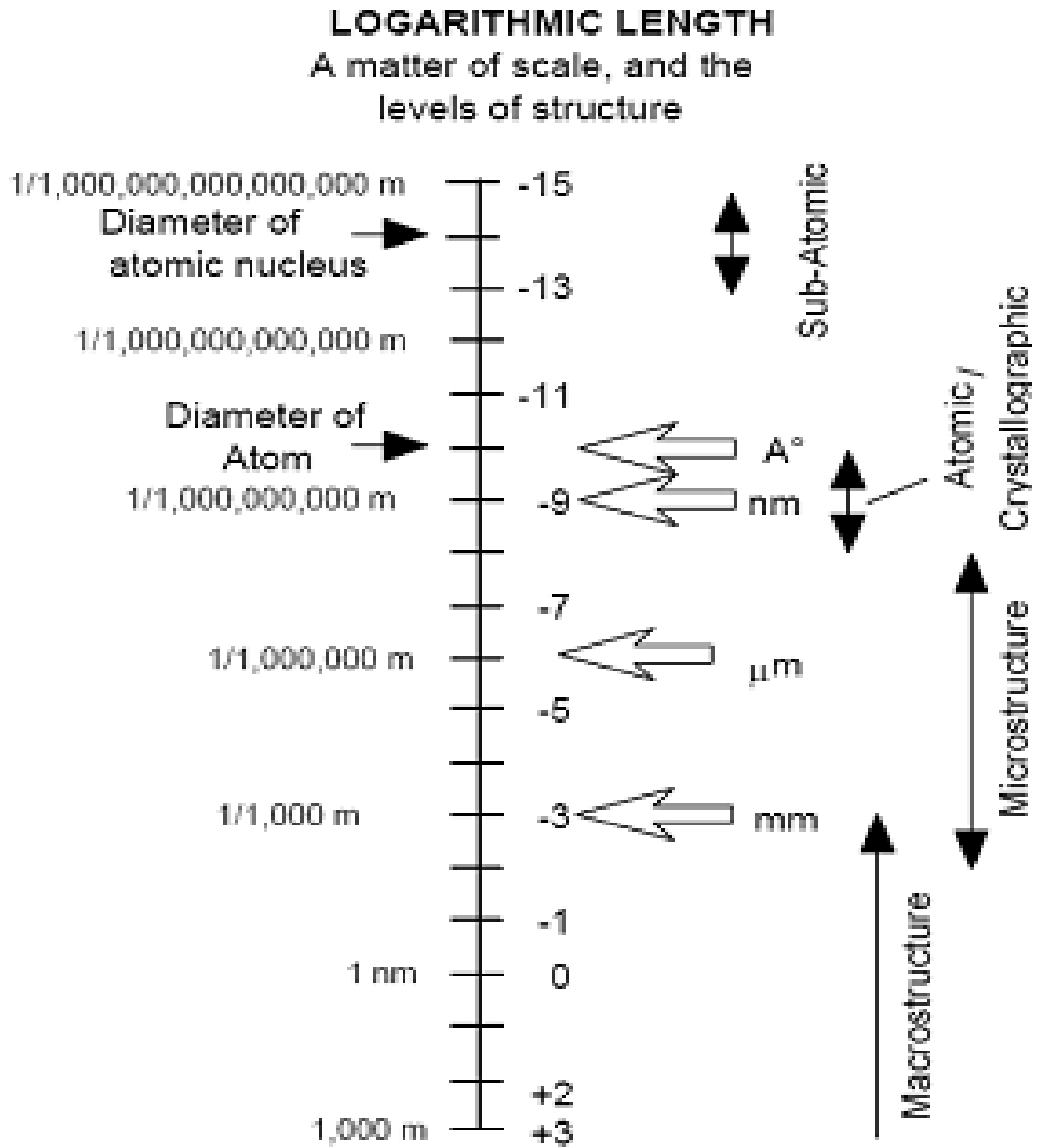
Serum levels of GSH and catalase were similar between Group 2 and Group 4 and were significantly different in all other groups. Serum TBARS levels showed a significant difference between all groups. Tissue GSH level was similar in Group 1 – Group 3 and Group 2 – Group 4, it showed significant differences in the other groups. Tissue levels of catalase, was similar in Group 2 – Group 3, significant differences were found in the other groups. Tissue TBARS levels showed significant differences in all groups.

In conclusion, it was observed that zinc oxide has given less damage to the testicles than cyclophosphamide. Maximum damage was observed in combined group in the testes.

Keywords: Apoptosis; zinc oxide nanoparticles; cyclophosphamide; testicular

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde, bilimlerdeki hızlı gelişmeler ile her geçen gün daha fazla ilgi uyandıran nanoteknoloji sayesinde, sanayi ve teknoloji alanlarında olduğu gibi biyoloji ve tıp alanlarında da hızlı gelişmeler görülmüştür. Nanoteknoloji ismi, ölçü birimi “nanometre” den köken almakta olup, metrenin milyarda birini ifade etmektedir. Bir nanometre (nm), düzlemine 2-3 tane atomun sığabileceği kadar küçüktür. Nanoteknoloji, nanometre boyutlarında malzemeler tasarlayarak yeni yöntemlerle belirlenmiş amaçlara yönelik aygıtlar ve aletler üretmeyi amaçlamaktadır (Konuk ve Oktay 2007).



Şekil 1.1. Makro, mikro ve nano yapıların boyutlarının karşılaştırılması

Çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri boya, pigment, metalurji katkı maddeleri, kauçuk, alaşımlar, seramik, kimyasal lifler, elektronik, katalizör, tıbbi tanı, kozmetik, kişisel bakım gibi çeşitli endüstriyel alanlarda en yaygın kullanılan malzemelerden biridir (Baek ve ark. 2012). ZnO nanopartikülleri UV dalga boyu aralığında soğurma özelliklerinden dolayı güneş kremleri ve kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır (Manzo ve ark. 2013). ZnO genellikle düşük bir toksisiteli bir malzeme olarak kabul edilmektedir. Çünkü çinko insan vücudunda temel bir eser elementtir ve gıdalarda geniş kapsamlı olarak bulunmakla birlikte ayrıca bir besin takviyesi olarak da ilave edilir. Bu nedenle çinko nanopartiküllerin toksisite değerlendirmesi çok az ilgi çekmektedir (Baek ve ark. 2012). Çinko oksitin non toksik olduğu geleneksel kavramlar üzerinde çok yaygın olarak kullanılmaya başlanmış olup, ZnO nanopartikülleri hakkındaki toksikolojik çalışmalar ise onların uygulama hızının gerisinde kalmıştır (Roy ve ark. 2014). İn vitro ortamda insan hücrelerinde ZnO nanopartiküllerin reaktif oksijen türlerini (ROS) tetikleyerek apoptozise aracılık ettiği belirtilmiştir (Akhtar ve ark. 2012; Roy ve ark. 2014).

Antineoplastik kemoterapötik bir ilaç olan siklofosamid (CP) ise alkilleyici bir kimyasal ajan olup, çocukluk ve yetişkin malignensilerde, sistemik lupus eritematoz, multiple skleroz gibi hastalıklarda sıkça kullanılan bir ilaçtır (Oh ve ark. 2007; Limandal 2013). CP'nin aktif metabolitleri fosforamid hardalı ve akroleindir (Zarei ve Shivanandappa 2013). Bunlar çok hızlı çoğalan dokulara müdahale ederek DNA dizilerinin çapraz bağlanmasına sebep olur (Higuchi ve ark. 2001). Ek olarak CP hidrojen peroksit üretimi üzerinden oksidatif DNA hasarına sebep olur (Murata ve ark. 2004). Fosforamid mustard kanser hücrelerini, akrolein ise normal hücreleri nekrozis ve apoptozis üzerinden öldürmektedir (Kern ve ark. 2002).

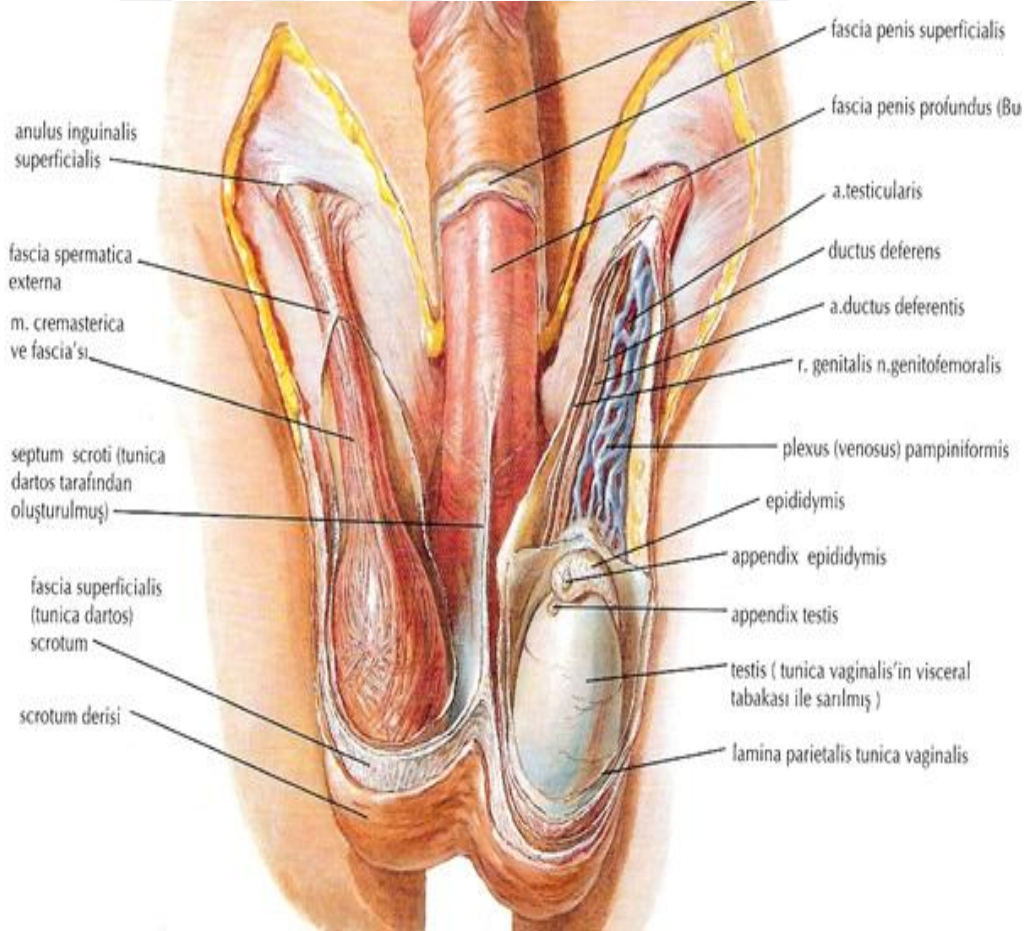
Bu çalışmada CP ve ZnO nanopartikül uygulamasının sıçanlarda testis dokusunda oluşturabileceği histolojik değişiklikler, oksidatif stres ve apoptozisin araştırılması amaçlanmış olup, testislerde hasar oluşturduğu ve apoptozisi arttırdığı bilinen CP grubuyla, testis hasarı ve apoptozis konusundaki çalışmaların yetersiz kaldığı ZnO nanopartikül gruplarının karşılaştırılması, çalışmamızın sonuçlarının daha objektif değerlendirilmesi, hatalı pozitif sonuçlardan kaçınılması gibi çalışmanın güvenilirliğini ve kalitesini arttırabilecek kriterler sağlayabileceği düşüncesindeyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. TESTİS ANATOMİSİ

Erkek üreme sisteminin temel üreme elemanı olan ve skrotum içinde bulunan testisler, sağlıklı solumak üzere yaklaşık olarak 4x2,5x3 santimetre (cm) boyutlara ve 10-15 gr ağırlığa sahip olan bir çift organdır. Bu organlar, erkek üreme hücreleri olan spermatazoonlar ile erkek seks hormonları olan androjenleri üretirler.

Skrotum içinde spermatik kort ile asılı duran ve birbirinden skrotal septum ile ayrılan testisler ovoid şekilli gonadlar olup, her biri yaklaşık olarak 25-30 ml hacme sahiptir. Yaklaşık olarak aynı büyüklüğe sahip olmalarına rağmen yapısal olarak farklılık gösteren testislerden sol testis sağ testise göre daha aşağıda yer alırken; buna karşın sağ testis sol testise göre %10 daha ağırdır ve sıcaklıkları vücut sıcaklığına göre 3-4 derece daha düşüktür (Odar 1986; Dere 1988; Arıncı ve Elhan 1999; Yıldırım 1999; Snell 2000; Karaöz 2002; Burukoğlu 2007; Drake ve ark. 2007; Seçkin 2008).



Şekil 2.1. Testis anatomisi

Testislerin temel fonksiyonlarını yerini getirebilmeleri için karın boşluğundan skrotuma doğru inmeleri zorunlu olup, bu inişleri sırasında da karın ön duvarı tabakalarını da beraberinde sürüklemektedirler. Bundan dolayı testisler, aşağıdaki sıralanmış olan tabakalar ile kaplıdır.

- a) Deri
 - b) Tunika dartos
 - c) Fasia spermatika eksterna
 - d) Fasia kremasterika
 - e) Fasia spermatika interna
 - f) Tunika vaginalis testis (Burukoğlu 2007).
- } Skrotum

Her bir testisin, fasia medialis (iç yan yüz) ve fasia lateralis (dış yan yüz) olmak üzere iki yüzü, ekstremities superior (üst uç) ve ekstremities inferior (alt uç) olmak üzere iki ucu ile margo anterior (ön kenar) ve margo posterior (arka kenar) olmak üzere iki tane de kenarı bulunmaktadır (Odar 1986; Karataş 1998; Şeftalioğlu 1998; Arıncı ve Elhan 1999).

Testisler, dış kısımdan iç kısma doğru tunika vaginalis, tunika albuginea ve tunika vaskulosa olmak üzere üç tabaka ile sarılıdırlar (Arıncı ve Elhan 1999).

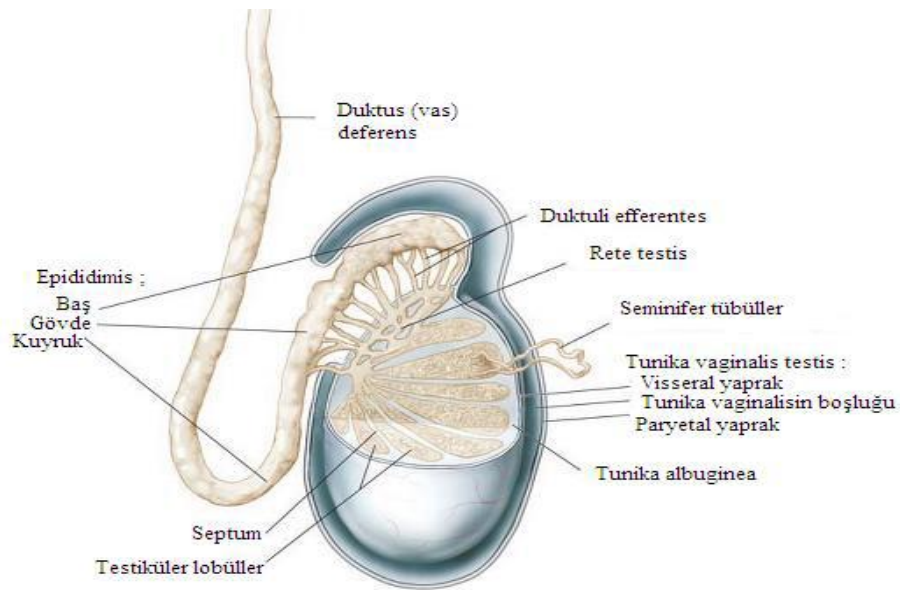
Testislerin karın boşluğundan skrotuma doğru inerken yanlarında getirdikleri abdominal periton tabakası olan ve en dışta bulunan tunika vaginalis, mezotelyal hücreler ile döşelidir ve bu tabaka skrotumun iç yüzeyini döşeyen lamina parietalis (periorchium) ile testisi saran lamina visceralis (epiorchium) olmak üzere iki yapaktan oluşmaktadır (Limandal 2013).

Testisi örten lamina visceralis'in altında kalan ve testisi dıştan saran mavimsi beyaz renkli fibröz bir katman olan tunika albuginea, fibroblast ve kollejenden zengin yapıda olan kompakt bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Tunika albuginea, testis arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testis adı verilen kalın ve vertikal bir bölme oluşturur. Mediastinum testis, organa damar, sinir ve kanalların girip çıktığı ve rete testisi adı verilen kanalcıkların bulunduğu bölgedir (Kuran 1983; Arıncı ve Elhan 1999; Gültekin 2013).

Testisin üst ucundan alt ucuna kadar uzanan mediastinum testisten çıkan uzantılara septula testis adı verilir ve bu uzantılar testisin derinliklerine doğru ışınal uzanarak organı yaklaşık 200-300 adet piramidal şekilli loba ayırır. Bu lopçuklara da lobuli testis adı verilir. Her bir lopta 1-4 tane olmak üzere tüm testiste toplamda yaklaşık sayıları 600-1000 arasında değişen sıkışık kıvrıntılı tübüller oluşur. Bu yapılara tübüli semineferi contorti (seminifer tübül) denir. Her seminifer tübül 30-80 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapında olup, spermatozoonların üretildiği yerlerdir.

İnterstisyel hücreler (Leydig hücreleri), spermatogenik hücreler (primordiyal germ hücreleri) ve Sertoli hücreleri (sustentakular hücreler, destek hücreler) tübüli semineferi kontortiler de bulunur. Bu tübüllerin gevşek bağ dokusunda yer alan interstisyel hücreler (Leydig Hücreleri) ise sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumlu olan testosteronu salgırlar. Reinke kristalleri ise bu hücrelerin sitoplazmalarında görülen karakteristik protein kristalleridir. (Arıncı ve Elhan 1999; Yıldırım 1999; Karaöz 2002; Snell 2004; Yetim 2011; Sayılmaz 2015).

Seminifer tübüller, testisin arka bölümünde birleşerek tübüli semineferi rekti adı verilen 20-30 tane kısa ve düz kanallar oluşturur. Bu kanallar daha sonra mediastinum testise girerek burada rete testis (Haller ağı) adı verilen bir kanal ağı oluştururlar. Mediastinum testisin üst ucunda yer alan ve bu ağdan başlayan 12-20 tane duktuli efferentes testis isimli küçük kanallar, tunika albuginea'dan geçerek epididimis adı verilen kanalı oluşturur (Yıldırım 1999; Yetim 2011).



Şekil 2.2. Testisin anatomik yapısı

Tunica albuginea'nın altında gevşek bağ dokusu yapısında damarsal bir tabaka daha yer alır. Bu tabakaya tunika vaskulosa adı verilir (Arıncı ve Elhan 1999).

Testis ve epididimis, aortanın dalı olan arteria testikularisten beslenirler. Testis ve epididimisin venöz drenajı ise pampiniform venöz pleksus olarak isimlendirilen duktus deferensin arteriyoru boyunca uzanan ve spermatik kordda (duktus deferens, duktus deferensin arter ve veni, testiküler arter, "plexus pampiniformis, plexus deferentialis, processus vaginalis peritonei, musculus cremaster, arteria cremasterica, vena cremasterica", lenf damarları, ilioinguinal sinir ve genitofemoral sinirin genital dallarından oluşur) testiküler arteri çevreleyen, 8-12 adet venden oluşan bir ağ tarafından yapılır. İç kasık halkasına doğru geçtikten sonra ise bu venler birleşerek vena testikularisi oluştururlar. Sağ testiküler ven, sağ böbrek veninin 4-5 cm kadar altından vena cava inferiora, sol testiküler ven ise vena renalis'e dökülmektedir (Yıldırım 1999; Gültekin 2013; Sayılmaz 2015).

Sinirler ile sempatik ve parasempatik lifler, plexus çöliakustan arteria testicularis çevresinde bulunan plexus testicularis ile gelirler ve bu sinirler, bezlerin çalışmasını kontrol etmektedirler (Yetim 2011).

Testisin innervasyonu ise esas olarak sempatik postganglionik ve visseral afferent sinirler ile gerçekleşmektedir. Sinirler genellikle damarları takip ederek testislere ulaşırlar. Tunica albuginea dışında dallara ayrılan sinirler ise kan damarları ile birlikte interstisyuma ulaşırlar (Gültekin 2013).

Testislerin lenf damarlarına bakıldığında ise funikulus spermatikus'u izledikleri ve oradan da nodus lenfatikus aorticus lateralis ve preaortisi'lerle birleştikleri görülmektedir (Kara 2010; Yetim 2011).

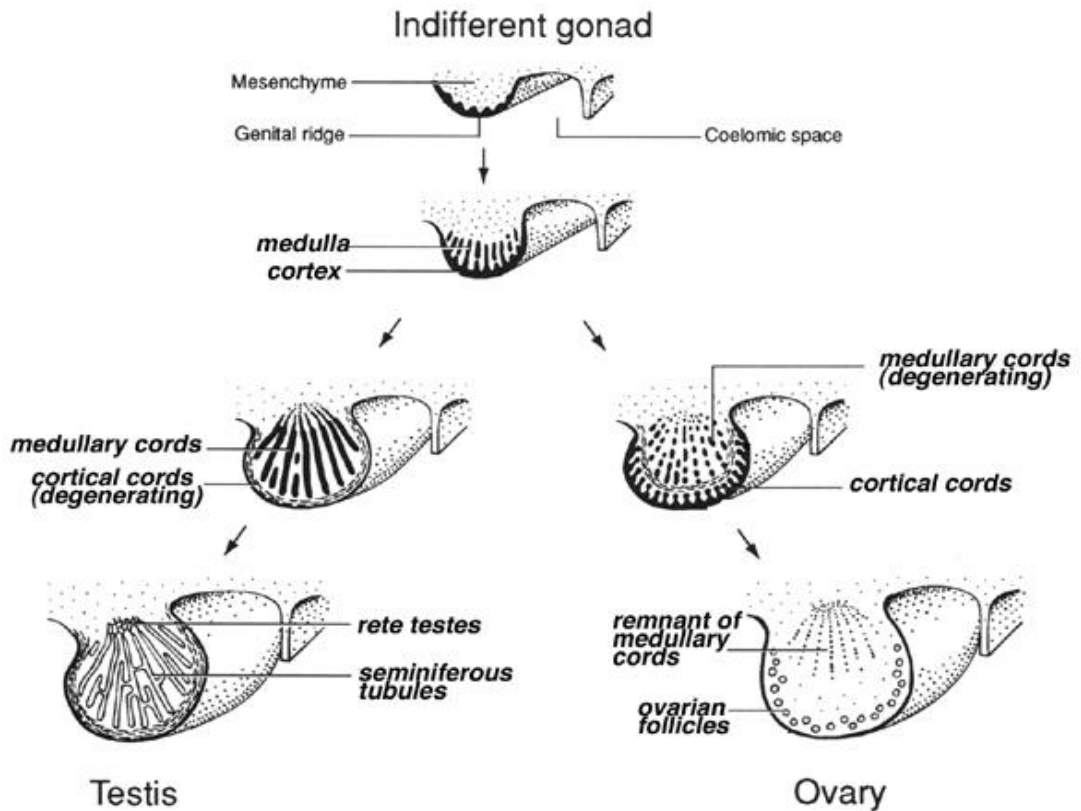
2.2. TESTİS EMBRİYOLOJİSİ

Embriyonun cinsiyeti, genetik açıdan döllenme sırasında belirlenmiş olsa da, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar erkek veya dişi morfolojik özelliklere sahip değildir. Genital gelişimin bu başlangıcı, erken dönemde her iki cinste de birbirine benzediği için bu başlangıç dönemine farklılaşmamış evre, bu evredeki gonadlara da farklılaşmamış gonad adı verilir (Petorak 1986; Sadler 2005; Limandal 2013).

Gonadlar (testisler ve overler) üç kaynaktan köken almaktadır:

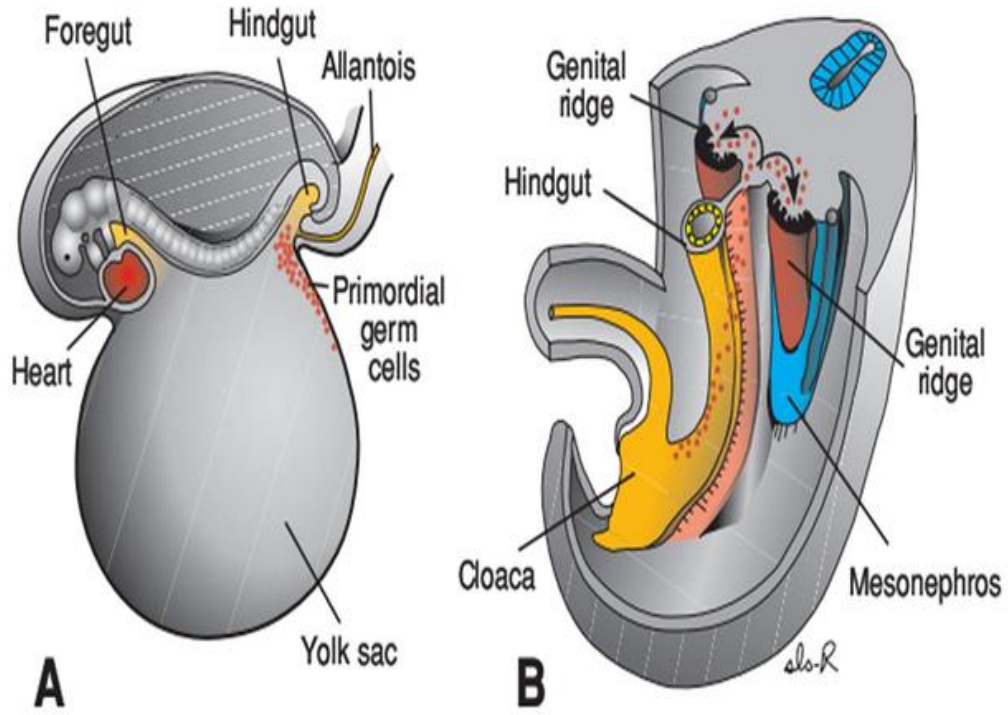
- Posterior abdominal duvarı döşeyen mezotel (mezodermal epitelyum)
- Altında bulunan mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordiyal germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri) (Moore ve Persaud 2009).

Gonadlar başlangıçta mezonefrozun medial bölgesi üzerindeki sölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşması sonucu oluşmuş genital veya gonadal sırtlar halinde belirir ve bu genital sırtlar içerisinde gelişimin 6. haftasına kadar germ hücreleri yoktur. Parmak şeklindeki epitelyal kordonlar, gonadal kordonlar altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler ve yeni gelişen primer seks kordonlarını andırırlar. Farklılaşmamış gonad yapısında dışta korteks, iç kısımda ise medulla bulunur. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklılaşmamış gonadın korteksi overe differansiye olur ve medullası geriler. Eğer embriyo XY seks kromozom kompleksine sahip ise, medulla testise farklılaşır ve korteks bir takım kalıntılar dışında gerileyerek dejenere olur (Kayalı ve ark. 1992; Taylor ve ark. 1999; Sadler 2005; Moore ve Persaud 2009).



Şekil 2.3. Farklılaşmamış gonadın testis ve ovaryuma farklılaşması

Yüksek alkali fosfataz aktivitesi gösteren primordiyal germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri), büyük ve yuvarlak şekilli ilkel üreme hücreleri olup; en erken 4. haftanın başında allantoisin çıkış noktasının yakınında bulunan vitellüs kesesinin endoderm hücreleri arasında görülmektedir. Embriyonun katlanması sonrasında vitellüs kesesinin dorsal kısmı, embriyonun içinde kalır ve bu olay gerçekleşirken de ilkel cinsiyet hücreleri, arka barsağın dorsal mezenteri boyunca genital sırtlara doğru göç ederler. 6. haftada primordiyal germ hücreleri, alttaki mezenkime girerek primer cinsiyet kordonlarına ulaşır ve burada germ kordonlarını oluştururlar. Bunun sonucunda da farklılaşmamış evre sona erer (Petorak 1986; Carlson 1996; Gürsoy ve Koptagel 1997; Hassa 2003; Moore ve Persaud 2009).



A. A 3-week-old embryo showing the primordial germ cells in the wall of the yolk sac close to the attachment of the allantois. **B.** Migrational path of the primordial germ cells along the wall of the hindgut and the dorsal mesentery into the genital ridge.

Şekil 2.4. Primordiyal germ hücreleri ile bu hücrelerin genital sırta doğru giden göç yolu

Eğer embriyo genetik olarak erkekse, primordiyal germ hücrelerinin cinsiyet kromozomları XY'dir. Seks kromozom komplekslerinden sadece Y kromozomunu bulunduran embriyolarda genellikle testisler gelişmekte olup, testislerin gelişimi de koordineli bir seri genin induksiyonu ile sağlanmaktadır (Sadler 2005; Gültekin 2013).

Erkek fenotipinin gelişimi için Y kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için önemlidir. Testis belirleyici faktör (Testis determining factor = TDF) için gerekli olan SRY (Sex-determining region of the Y kromozom) geni, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde bulunmaktadır (Ünlükal 2011; Gültekin 2013).

“Y” kromozomunun üzerinde bulunan seks belirleyici gen bölgesi (SRY)’nin etkisiyle primitif seks kordonlarının medüller bölgesinde bulunan hücreler Sertoli hücrelerine farklılaşmaya başlarken, kortikal bölgede bulunan hücreler ise dejenere olurlar. Yedinci haftada farklılaşan Sertoli hücreleri testis kordonlarını oluşturmak için organize olurlar (Sarıkaya 2006; Özyalvaçlı 2009).

Y kromozomu tarafından düzenlenen TDF testiküler farklılaşmayı sağlamaktadır ve bu faktörün etkisi altında primer seks kordonları, seminifer tübüllere farklılanmaktadır. Seminifer tübüllerin oluşumu, Sox9 ve Fgf9 genlerinin ekspresyonları sayesinde gerçekleşmektedir.

TDF’yi kodlayan Y kromozomu üzerindeki SRY geninin etkisiyle primitif cinsiyet kordonları, testis veya medullar kordonları oluşturmak üzere çoğalmaya devam ederek medullanın derinliklerine doğru ilerlerler. Kordonlar daha sonra burada dallanarak birbirleri ile anastomozlaşır ve ağsı görünümlü rete testisini oluştururlar.

Gelişimin daha ileri aşamalarında testis kordonlarının (gonadal kordonlar, seminiferöz kordonlar) yüzey epiteli ile olan bağlantıları tunika albuginea adı verilen yoğun fibröz bir bağ dokusunun araya girmesi sonucunda sona erer. 12. haftada gelişmekte olan gonadın kalın bir fibröz kapsülü olan tunika albugineası’nın belirginleşmesi ise erkek fetus için karakteristik bir özelliktir. Genişlemiş olan testis, aşamalı bir şekilde dejenere olan mezonefrozdaki ayrılır ve kendi mezenteri olan mesorchium ile asılı hale geçmektedir. Seminifer kordonlar ise seminifer tübüllere, tübüli rektile ve rete testisine farklılanmaktadır (Şeftalioğlu 1998; Hassa 2003; Sadler 2005; Moore ve Persaud 2009; Ünlükal 2011).

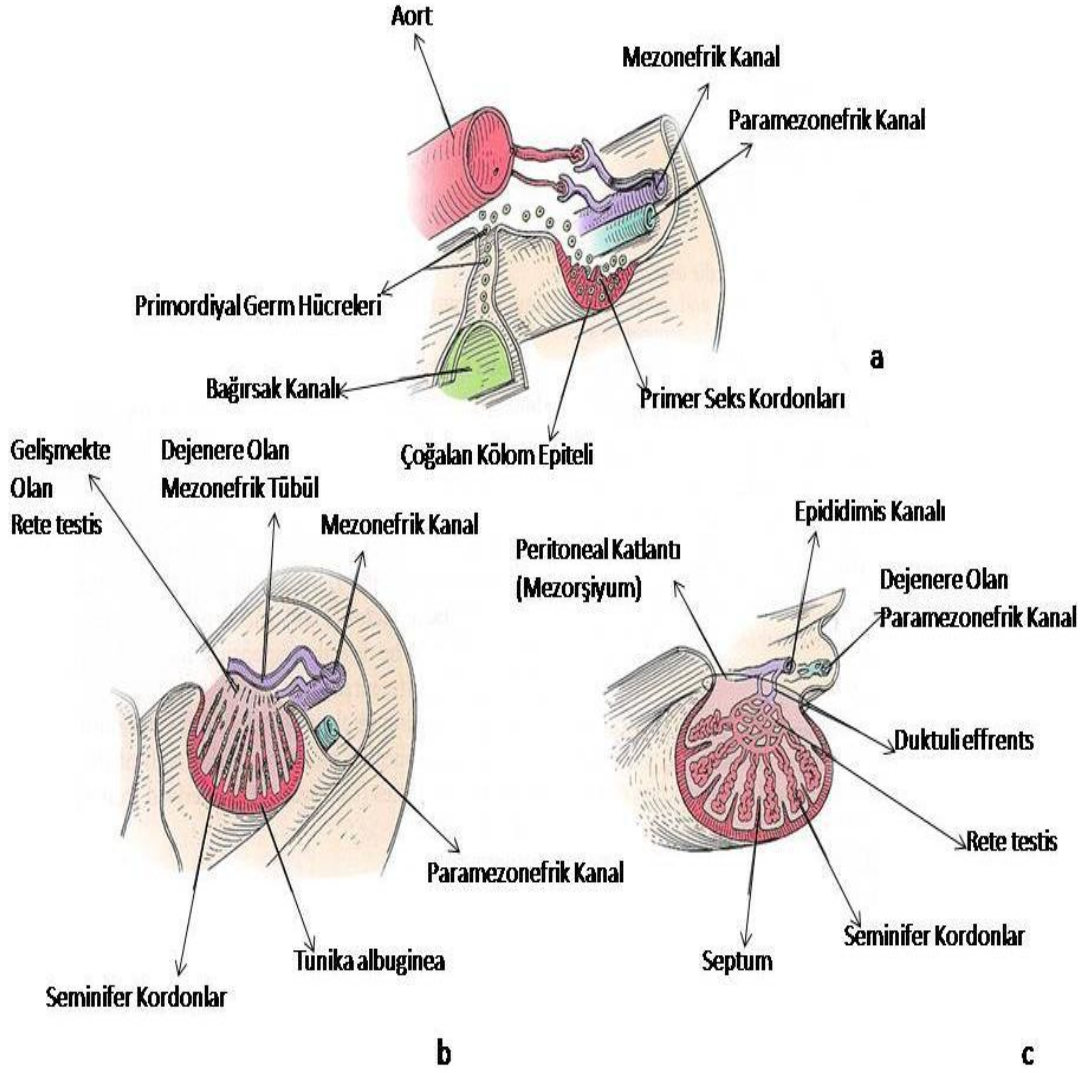
Gonadal sırtın mezenşiminden kökenlenen interstisyel hücreler (Leydig hücreleri), seminiferöz kordonların arasında yer alır ve bu kordonların farklılaşmaya başlamasından hemen sonra da gelişmeye başlarlar. Gestasyonun 8. haftasından itibaren bu hücreler, androjenik hormonları (testosteron ve androstenedione)

üretmeye başlarlar. Bu hormonlar mezonefrik kanallar ile dış genitalerin maskülin olarak (erkek yönünde) farklılaşmasını uyarırlar. Leydig hücrelerinin testosteron salgılaması aynı zamanda mezonefrik kanalların vaz deferense dönüşmesini sağlamaktadır.

Gelişimin erken dönemlerinde testosteron üretimi, human koryonik gonadotropin (hCG) ile kontrol edilirken ilerleyen dönemlerde pitüiter gonadotropinler tarafından kontrol edilmektedir (Sadler 2005; Moore ve Persaud 2009; Özyalvaçlı 2009).

Testosteron miktarı 8-12 haftalık periyotta en yüksek seviyesine ulaşmış olup, embriyodaki interstisyel hücreler gebeliğin 18. haftasına kadar işlevlerini sürdürmekte ve bundan sonra testosteron sentezindeki azalma ile birlikte gerilemektedirler. Daha sonrasında ise hipofizden salgılanan luteinizan hormon (LH) etkisiyle testosteron sentezini yeniden yapmaya başladıkları prepubertal döneme kadar dinlenme halinde kalırlar (Ünlükal 2011).

Testosterona ilave olarak fetal testisler, glikoprotein yapıda bir hormon olan antimüllerian hormon (AMH) veya müllerian inhibitör madde (MIS) adı verilen bir hormon daha salgırlar. AMH, Sertoli (destek) hücreleri tarafından salgılanmakta olup, müllerian kanalları çevreleyen mezenkimal hücre membranlarında bulunmaktadır ve apikalden kaudale doğru iç içe katlanarak uterusun beslenmesine neden olmaktadır. Bu hormonun salgılanması puberteye (ergenliğe) kadar devam eder ve sonrasında ise seviyesi azalmaktadır. AMH, aynı zamanda uterus ve tuba uterinalara farklılaşan paramezonefrik (müllerian) kanalların gelişimini de baskılamaktadır (Kayalı ve ark. 1992; Taylor ve ark. 1999; Sadler 2005; Moore ve Persaud 2009; Sayılmaz 2015).



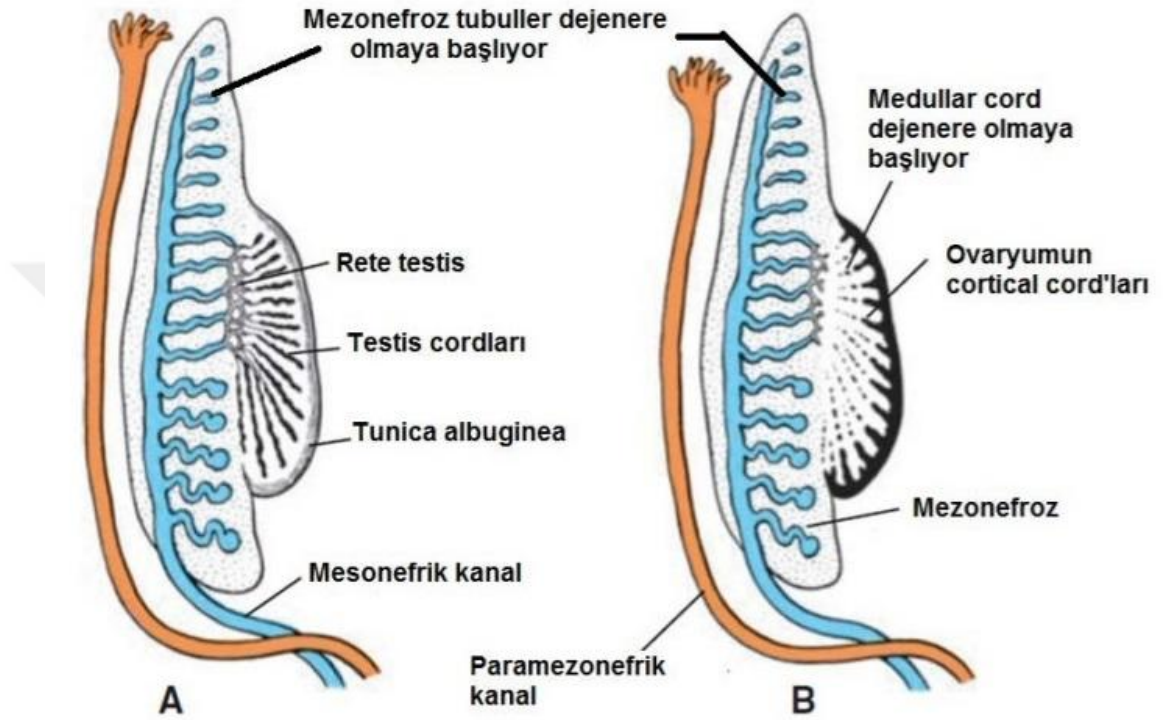
Şekil 2.5. Testis gelişiminin şematik görünümü

Puberteye kadar solid halde bulunan testis kordonları (lümenleri yoktur), pubertede lümenleri açılarak seminifer tübüller haline gelirler ve bu tübüllerin duvarında iki tip hücre bulunmaktadır:

- Testisin yüzey epitelinden gelişen ve destek hücreleri olan Sertoli hücreleri
- Primordial germ hücrelerinden farklılanan ve sperm hücrelerinin öncüleri olan spermatogonyumlar

Seminifer tübüller kanalize olur olmaz rete testis tübülleri ile birleşir ve duktuli efferenteslere girerler. Bu efferent kanallar mezonefrik sistemden geriye kalan boşaltım tübülleridir ve duktus deferens olarak bilinen bu kanallar, rete testis ile mezonefrik (wolffian) kanalları birbirine bağlamaktadır.

Gelişimin 5-6. haftalarında genital sistem farklılaşmamış olduğu için erkek ve dişi embriyoların ikisinde de mezonefrik (wolffian) ve paramezonefrik (müllerian) kanallar olmak üzere iki çift genital kanal mevcuttur. Bu kanallardan mezonefrik kanallar erkek üreme sisteminin gelişiminde önemli yer tutarken, paramezonefrik kanallar ise dişi üreme sisteminin gelişiminde önemli rol oynamaktadır.



Şekil 2.6. Gelişimin 6. haftasında erkek (A) ve dişi (B) genital kanallar

Sekizinci haftada fetal testisler tarafından salgılanan testosteronun etkisiyle her bir mezonefrik kanalın proksimal kısımları kıvrıntılı bir hal alarak epididimisi oluşturken; kanalın geriye kalan diğer kısımları ise duktus deferens ve duktus ejakulatoriusu oluşturmaktadır. Dişi fetüslerde ise mezonefrik kanallar ortadan tamamen kalktığı için sadece işlevsel olmayan birkaç kalıntı parça kalmaktadır. (Sadler 2005; Moore ve Persaud 2009; Ünlükal 2011; Gültekin 2013).

2.3. TESTİS HİSTOLOJİSİ

Testisler embriyonik gelişimi, seksüel olgunlaşmayı ve üreme fonksiyonlarını etkileyen ekzokrin ve endokrin fonksiyonu olan bileşik tübüler bezlerdir (Kalaycı 1986; Eşrefoğlu 2004). Ekzokrin salgısı, testis sıvısı ile canlı hücre spermiumu iken;

endokrin salgısı ise steroid yapıdaki testosteron salgısıdır. Bu yüzden testisler gametlerin yerine getirilmesi ve steroid yapıdaki hormonların üretilip salgılanması ile yükümlü bir çift organdır (Kalaycı 1986; Karaöz 2002; Kara 2010). Testislerde günlük milyonlarca sperm üretilmekte olup, sağlıklı bir erkeğin testislerinde günlük 150×10^6 kadar sperm üretilmektedir (Özdemir 2012).

2.3.1. Skrotum

Fibromusküler yapıda bulunan ve içerdiği bol miktardaki melanin pigmenti yüzünden kahverengi renkte olan skrotum, çok ince bir deriye sahiptir. Epidermis altında özel kokulu yağ bezleri, ter bezleri ile yağlarla bağlantısı olmayan ince kıllar ve fazla miktarda sinir sonlanmaları bulundurulur. Skrotum içinde spermatik kort ile asılı halde bulunan testisler, birbirinden septum skroti ile ayrılırlar. Skrotum, deri altında yağ dokusunun bulunmayışı, damardan ve ter bezlerinden zengin olması gibi yapısal özelliklere sahip olmasından dolayı testislerin ısısının ayarlanmasında önemli rol oynamaktadır (Kalaycı 1986; Karaöz 2002; Seçkin ve ark. 2008).

2.3.2. Testiküler Kapsül

Skrotum ile testis dokusu arasını dolduran oluşumlar 3 tabakalı testiküler kapsülü oluşturmaktadır. Testisin dış tabakası tunika vaginalis, orta tabakası tunika albuginea ve iç tabakası da tunika vaskulosa olarak adlandırılmaktadır.

Tunika Vaginalis

Karın bölgesinin arka duvarından gelişen ve tek katlı mezotel hücrelerden oluşan tunika vaginalis, testislerin ön ve yan yüzeylerini örten çift yapraklı seröz bir zarıdır. Aynı zamanda tunika vaginalis, testislerin skrotuma doğru göç etmeleri esnasında her bir testis yapısının kendisiyle beraber götürdüğü abdominal periton tabakasıdır. Bu tabaka dışta parietal ve içte ise visseral bir tabakadan oluşarak testisin ön ve yanlarından tunika albugineayı sarmaktadır.

Lamina visceralis olarak isimlendirilen iç yaprak ile lamina parietalis olarak adlandırılan dış yaprak arasında kalan boşluğa cavites seroza adı verilir ve periton boşluğu ile bağlantılıdır. Visseral yaprak tunika albuginea'yı örterken, parietal yaprak ise skrotumun iç yüzeyine dayanmaktadır (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Eşrefoğlu 2004; Seçkin ve ark 2008; Özdemir 2012).

Tunika Albuginea

Kapsülün en kalın ve belirgin olan tabakası, düz kas hücreleri içeren ve yoğun fibroelastik bağ dokusundan meydana gelen tunika albuginea tabakasıdır. Testisin etrafını yaklaşık 1 mm kalınlığında çevreleyen tunika albuginea, düzenli sıkı bağ dokusundan yapılmış olan fibröz bir membrandır. Tunika vaginalisin visseral yaprağını içten örter ve bazal lamina ile de tunika vaginalisten ayrılmaktadır.

Tunika albuginea testisin arka yüzeyinde, epididimisin organa yaslandığı yerde kalınlaşarak mediastinum testisi oluşturmaktadır. Mediastinum testisten çıkan sıkı bağ dokusu bölmeleri de ışımsal tarzda, karşı duran tunika albuginea tabakasına ulaşmaktadır (Kalaycı 1986; Eşrefoğlu 2004; Seçkin ve ark. 2008; Gültekin 2013).

Tunika Vaskulosa

Kapsülün en iç tabakasını oluşturan tunika vaskulosa, tunika albuginea'nın iç yüzeyinde bulunan ve damardan zengin olan gevşek bağ dokusu tabakasıdır. Tunika vaskulosa'ya ait olan damarlar trabekülalar içine girerler. Tunika albuginea'nın testis içine olan uzantılarının (septum) iç yüzeylerini de örten tunika vaskulosa aynı zamanda bütün lobülleri de dıştan sarmaktadır (Kalaycı 1986; Seçkin ve ark. 2008).

Periodik kontraksiyonlar yaparak testis hacmini düzenlemede görevli olan testiküler kapsül, aynı zamanda duktus sistemine de masaj etkisi yaparak spermiumların dışarıya doğru hareket etmelerine yardımcı olmaktadır (Kalaycı 1986). Tunika albuginea'nın testisin arka yüzeyinde kalınlaşmasıyla mediastinum testis oluşur ve mediastinum testisten kapsüle doğru uzanan radier seyirli ince fibröz bölmeler (septum) organı yaklaşık 300 kadar piramit biçimli lobüllere (testis lobülü) ayırmaktadır. Lobüllerin apikal kısımları mediastinuma doğru olup, hacimleri de yerine göre değişiklik göstermektedir (orta kısımdakiler büyük ve uzundur). Her testis lobülü kan damarlarını, sinirleri ve interstisyel hücreleri içeren gevşek bağ dokusu ile sarılı seminifer tübüller (tubuli kontorti seminiferi) den oluşmaktadır.

Seminifer tübüller, spermlerin üretildiği yapılar olup, her bir lobülde 1-4 tane kadar aşırı kıvrımlı seminifer tübül ve tübüllerin arasını dolduran gevşek bağ dokusu (interstisyum bezin stroması) bulunmaktadır (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004).

2.3.3. Seminifer Tübüller

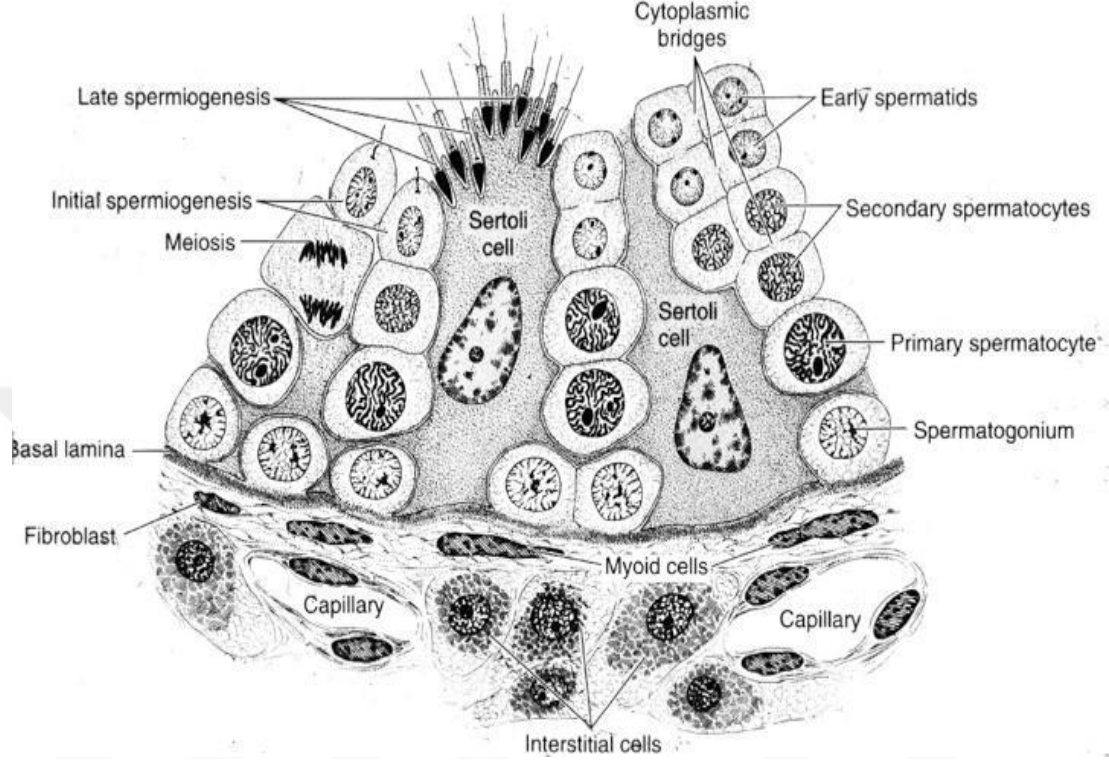
Spermatozoonların üretildiği yerler olan seminifer tübüller, yaklaşık olarak 150-250 µm çapa ve 30-80 cm uzunluğa sahip olup, iki ucu U şeklinde olan ve rete testise açılan kanacıklardır. Bir testisteki tübüllerin toplam uzunluğu yaklaşık olarak 250 m civarındadır. Tübüller kıvrımlı olup bir şebeke oluştururlar ve bu şebekedeki her tübül başlangıçta kör uçludur ve dallara ayrılmaktadır. Kıvrımlı olan ve anastomozlaşma gösteren seminifer tübüller sonlanırken lümenleri daralır ve düz tübüller veya tübüli rekti adı verilen kısa boşaltma kanalları halinde devam ederler. Boşaltıcı kanalları ilki olan tübüli rektiler, seminifer tübüllerin rete testis adı verilen ve epitel ile döşeli olan kanalların oluşturduğu labirente bağlanmasını sağlamaktadır (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Ross ve Pawlina 2006; Kierszenbaum 2006; Gartner ve Hiatt 2007).

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık bir germinal veya seminifer epitelden oluşmaktadır. Seminifer tübülleri döşeyen seminifer epitel, spermatogenik hücreler ve Sertoli hücreleri olmak üzere iki farklı hücre grubunu içeren modifiye çok katlı kübik epitelidir. Seminifer tübüller belirgin bir bazal lamina ile çevrili olup, epitelin üzerine oturduğu bazal lamina elastik fibrillerden zengindir ve yaşlandıkça da yoğunluğu artarak kalınlaşır. Epitel altında kalan bazal lamina bağ dokusu liflerini, yassılaştırmış fibroblastları ve düz kas hücrelerine benzeyen kasılabilen 3-5 sıra miyoid hücreler içeren, ince peritübüler doku ile kuşatılmıştır. Bu dokuya aynı zamanda tunika propria da denilmektedir.

Miyoid hücreler, seminifer tübüllerde izlenen ritmik kasılmalardan sorumlu hücreler olup, bu hücrelerin ritmik kasılmaları sonucunda da spermler boşaltım kanallarına doğru ilerlemektedir. Bu hücreler aynı zamanda kan-testis bariyerinin de önemli bir bileşeni olup, yaşın ilerlemesiyle birlikte bu tabaka da kalınlaşmaktadır. Miyoid hücreler, birbirlerine membranları sayesinde tutunurlar fakat makromoleküllerin seminifer tübüllere geçişini de tamamen engelleyemezler. (Kalaycı 1986; Jungueira 1998; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004; Yetim 2011).

Peritübüler dokunun dış kısmında da geniş lenfatik kapillerler bulunmaktadır. Böylece peritübüler doku ve lenf kapillerlerinin seminifer tübül ile kan arasında madde değişimine engel olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca erkeklerdeki kısırlık

olgularının çoğunda ve yaşlılık ile bazı klinik vakalarda (özellikle klinefelter sendromu gibi kromozom anomalilerinde) peritübüler dokunun kalınlaştığı bilinmektedir (Kalaycı 1986; Karaöz 2002; Altun 2013).



Şekil 2.7. Seminifer tübül duvarı ve ilişkili yakın çevresi

Her bir seminifer tübülü döşeyen epitelde iki tip hücre bulunmaktadır;

- 1- Sertoli (destek) hücreleri
- 2- Spermatogenik seri hücreleri

2.3.3.1. Sertoli (Destek) Hücreleri

İlk defa 1865 yılında fizyolog Enrico Sertoli tarafından kullanılan ve bölünme yeteneği olmayan Sertoli hücreleri, bazal laminadan tübül lümenine kadar uzanan uzun boylu primidal şekilli hücrelerdir. Seminifer tübüllerde bulunan hücrelerin yaklaşık olarak % 10-15'ini oluşturan Sertoli hücrelerinin elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerinde çok sayıda granülsüz (düz) endoplazmik retikulum (DER) ile az sayıda granüllü endoplazmik retikuluma (GER) sahip olduğu gözlemlenmiştir. Bunların yanı sıra iyi gelişmiş bir Golgi kompleksi ile bol miktarda mitokondri ve lizozoma sahiptir. Lizozomların fazla sayıda olması fagositik aktiviteye işaret

etmekte olup, spermatozit artıkları da Sertoli hücreleri tarafından temizlenmektedir. Düzensiz şekilli ve oldukça bükümlü olan nukleusta ise belirgin bir nukleolus ve az miktarda heterokromatin bulunmaktadır.

Spermatogenik hücrelere kıyasla daha az sayıda bulunan Sertoli hücreleri, germ hücreleri arasına düzenli aralıklarla yerleşmiş olup, belirgin olan çekirdekleri sayesinde germ hücrelerinden ayırt edilmektedir. Ayrıca bu hücrelerinin bazal sitoplazmalarında kendilerine has protein yapısında sekiz köşeli Charcot-Böttcher kristalleri ile uzun yapılı Sprango kristalleri bulunmaktadır fakat bu kristallerin görevleri ve kimyasal bileşimleri henüz tam olarak bilinmemektedir.(Kalaycı 1986; Kayalı ve ark. 1992; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Kierszenbaum 2006; Ross ve Pawlina 2006; Gartner ve Hiatt 2007; Seçkin ve ark. 2008).

Bazal lamina üzerine oturan Sertoli hücreleri birbirleriyle zonula okludens adı verilen sıkı bağlantılar ile bağlanarak, seminifer tübül lümenini (intratübüler aralık) çepeçevre saran kesintisiz bir hücre tabakası oluştururlar. Bu sayede tübül dışından intratübüler aralığa makromoleküller ile kanla taşınan maddelerin geçişi engellenmiş olur. Aynı zamanda bu bağlantı kompleksleri, seminifer tübül epitelini bazal kompartıman ve adluminal kompartıman olmak üzere ikiye ayırmaktadır. Bazal kompartımanda spermatogonyumlar ile primer spermatozitler bulunurken; adluminal kompartımanda ise sekonder spermatozitler ile spermatidler bulunmaktadır.

Spermatogenezis sırasında spermatogonyumların bölünmesiyle meydana gelen spermatogenik hücreler, bu bağlantılardan geçerek bariyerin alt kısmında yer alan bazal kompartımandan, bariyerin üst kısmında yer alan adluminal kompartımana doğru göç ederler ve bu bağlantılar tübülün etrafındaki doku ile beraber kan-testis bariyerinin temelini oluşturmaktadırlar. Kan-testis bariyeri, spermatogenezisin ileri safhalarında gerçekleşmekte olup, immünolojik anlamda çok önemli bir işleve sahiptir. İmmün sistem ile yabancı hücreler arasındaki etkileşimi ortadan kaldırarak, antikorların seminifer tübüllere geçişini engeller ve spermatogenik hücreleri de oto-immün reaksiyonlara karşı korur. Böylelikle serumlarında spermelere karşı fazla miktarda antikor bulunan hastalarda da herhangi bir fertilitte bozukluğu görülmemektedir (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Seçkin ve ark. 2008; Altun 2013; Limandal 2013).

Sertoli hücrelerinin yan yüzeylerinde kimyasal maddeler ile iyonların geçişinin sağlanabileceği ve oluklu bağlantı adı verilen gap junctionlar (neksus) da bulunmaktadır. Bu yolla hücrelerin iyon ve kimyasal madde alışverişi gerçekleşmektedir. Gap junctionlara ilaveten hücrelerin bazal kısmında da hemidesmozomlar yer almaktadır (Jungueira ve ark. 1998; Yetim 2011; Limandal 2013).

Sertoli hücrelerinin fonksiyonları:

- 1) Gelişen spermatazoonların desteklenmesi, korunması ve beslenmesi gibi görevlere sahiptir.
- 2) Kan-testis bariyerinin oluşmasını sağlayarak antijen ile antikor geçişini engeller ve spermaların oto-immün reaksiyonlardan korunmasını sağlar.
- 3) Artık parçacıkların fagositozu. Spermiyogenez esnasında fazla spermatid sitoplazmaları artık cisimcikler şeklinde atılır ve bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerinin lizozomları tarafından fagosite edilerek sindirilir.
- 4) Mikrofilamentler ve mikrotübüller yardımıyla germ hücrelerin bazal laminadan lümeneye doğru pasif hareketler ile salınmasını (spermiyasyon) sağlar.
- 5) Testosteronu östradiol haline dönüştürür.
- 6) Ön hipofiz bezinden folikül stimüle edici hormonun (FSH) sentez edilmesi ve salgılanmasını engelleyen inhibin ile FSH salınımı üzerine olumlu etkisi olan aktivin'i salgılar.
- 7) Embriyo gelişimi esnasında erkek fötuslarda Müller kanalının regresyonunu önleyen ve glikoprotein yapıda olan anti-müllerian hormonu (AMH) salgılar.
- 8) Spermiumların taşınmasını ve testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı proteini (ABP) salgılar.
- 9) Üreme hücrelerine demir taşıdığı varsayılan testiküler transferrinin sentez edilmesi ve salgılanmasını sağlar.
- 10) İnterstitiyel (Leydig) hücreler ile peritübüler hücrelerin fonksiyonlarının ve spermatogenezin parakrin kontrolünü sağlar (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Esrefoğlu 2004; Seçkin ve ark. 2008; Cumbul 2008; Özyalvaçlı 2009).

2.3.3.2. Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenezis

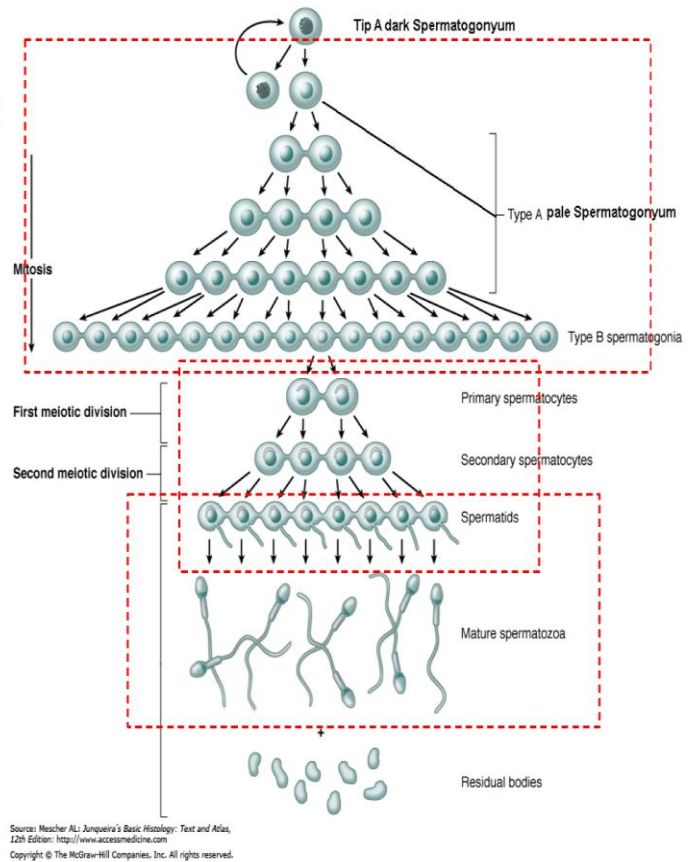
Spermatogenik hücreler, birbiri üzerine sıralanmış olan farklı gelişim aşamasındaki hücrelerdir. Bu hücreler bölünerek farklılaşır ve bazaldan lümene doğru spermatogonyumlardan başlayarak sırasıyla primer ve sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatazoonlar olarak devam ederler. Bunlardan bazal laminaya en yakın olan hücreler spermatogonyumlar, lümene en yakın bulunan ve daha olgun olan hücreler ise spermatidlerdir. Lümeninde bulunan hücreler ise spermatazoonlar diğer adıyla spermiumlardır. Başlangıçtan bitişe kadar yani spermatogonyumlardan spermatazoonların oluşmasına kadar geçen süreye spermatogenezis adı verilir ve spermatositogenez, mayoz ve spermiyogenez olmak üzere 3 evreye ayrılmaktadır. (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Eşrefoğlu 2004; Ross ve Pawlina 2006; Gartner ve Hiatt 2007).

Spermatogenesis

■ 1- Spermatogonial faz (Mitoz)

■ 2- Spermatosit fazı (Mayoz)

■ 3- Spermatid fazı (Spermiyogenez)



Şekil 2.8. Spermatogenezisin şematik gösterimi

2.3.3.2.1. Spermatogonyum (Gonosit)

Bazal laminanın hemen üzerinde bulunan ve spermatogonyal kök hücrelerden (radyasyon ve kemoterapiye dirençli hücreler) köken alan spermatogonyumlar, pubertede hormonal etki ile birlikte mitozla çoğalarak diğer spermatogenik hücreleri oluşturan esas hücrelerdir. Aynı zamanda bu hücreler, Sertoli hücrelerinin arasında bulunan zonula okludens tipi bağlantıların altında buldukları için kan-testis bariyerinin dışında yer alan ve bazal lamina ile doğrudan bağlantılı olan hücrelerdir. Bunlar, yaklaşık 12 µm çapa ve 46 kromozoma (diploid) sahip hücreler olup, kendisinden gelişen diğer hücre tiplerine göre daha küçüktür. Nukleusun büyüklüğü, şekli, kromatin dağılımı ve histokimyasal yapısı gibi özellikler dikkate alındığında ise 2 tipe ayrılmaktadır (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Eşrefoğlu 2004; Kierszenbaum 2006; Seçkin ve ark. 2008; Yetim 2011; Limandal 2013):

1) Tip A Spermatogonyumlar: Tip A spermatogonyumlarda kendi içerisinde açık tip A spermatogonyumlar ve koyu tip A spermatogonyumlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Koyu tip A spermatogonyumlar, seminifer epitelin kök hücreleri (stem cell) olup, oval şekilli, heterokromatik nukleuslara sahiptir. Küçük ve kubbe biçimli olan bu hücreler, depo hücreleri olup hücre döngüsüne katılmazlar. Mitoz bölünme ile çoğalarak diğer koyu tip A spermatogonyumları ve açık tip A spermatogonyumları oluştururlar. Koyu tip A spermatogonyumların bölünmesi sonucunda oluşan açık tip A spermatogonyumlar, birbirlerine sitoplazmik köprüler sayesinde bağlı halde kalırlar ve bunlardan oluşacak olan diğer bütün spermatogenik seri hücreleri de birbirlerine sitoplazmik köprüler sayesinde bağlı halde bulunurlar. Böylece aynı ata hücreden gelişmiş olan kardeş hücreler belirlenebilmektedir. Açık tip A spermatogonyumlar ise oval şekilli olan ve açık renkte boyanan ökromatik çekirdek ile belirgin bir nukleolusa sahip olan hücrelerdir. Az sayıda Golgi kompleksine, birkaç tane GER ve ribozom ile mitokondriye sahip olan bu hücreler, testosteron ile uyarılarak mitoz bölünme geçirir ve B tipi spermatogonyumlara dönüşürler.

2) Tip B Spermatogonyumlar: Tip A spermatogonyumlardan daha büyük olan bu hücreler, yoğun kromatine sahip olan ve koyu renkte boyanan küre biçiminde nukleus ile merkezi yerleşimli nukleolusa sahiptir. Spermatogonyal fazın son basamağı ile spermatogonyumların en yaygın tipini oluşturan bu hücreler, birkaç

mitoz bölünme geçirerek primer spermatozitlere farklılaşırlar. Spermatozyumların mitoz bölünme geçirerek primer spermatoziti oluşturduğu bu döneme ise spermatozitogenez adı verilmektedir (Kalaycı 1986; Eşrefoğlu 2004; Ross ve Pawlina 2006; Gartner ve Hiatt 2007; Altun 2013).

2.3.3.2.2. Primer Spermatozit (Spermatozit-1)

Tip B spermatozyumların mitoz bölünmeleri sonucunda oluşan ve seminifer epitelin orta bölümünde bulunan, küre veya oval biçimli olabilen en büyük hacimli hücrelerdir. Başarılı mitoz bölünmeler geçirdikten sonra oluşan primer spermatoziti, DNA sentezini tamamladıktan sonra mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerler. Profaz aşaması çok uzun sürdüğü için (ortalama 20-22 gün) bu aşamada en fazla görülen hücre tipi primer spermatoziti'dir. Bu hücreler, tübül duvarının orta kısımlarına doğru göç ederken kendi DNA'larını eşleyerek spermatozyumlara göre iki kat daha fazla DNA miktarına sahip olurlar. Sonuçta 46 kromozom (diploid) ve $4n$ DNA'ya sahip hücreler olmuş olurlar (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Eşrefoğlu 2004; Altun 2013).

2.3.3.2.3. Sekonder Spermatozit (Spermatozit-2)

Birinci mayoz bölünme sonucunda sekonder spermatozit adı verilen haploid sayıda yani 23 kromozomlu küçük hücreler (spermatozit-1'in $2/3$ büyüklükte) oluşmaktadır. Bu hücrelerde, kromozom sayılarındaki azalmanın yanı sıra DNA miktarlarında da azalma görülmektedir. Bu aşamada 2 adet 23 kromozom ve $2n$ DNA'ya sahip hücre bulunmaktadır. Sekonder spermatoziti daha sonra hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve ardından da ikinci mayoz bölünme geçirirler. Bunun sonucunda 23 kromozomlu ve n miktarda DNA'ya sahip spermatidler oluşmaktadır. Sekonder spermatoziti, birbirlerine sitoplazmik köprüler sayesinde bağlıdırlar ve bu hücrelerin testis kesitlerinde gözlenebilmeleri çok zordur. Çünkü bu hücreler interfaz aşamasında çok kısa kalan ve hızlıca ikinci mayoz bölünmeye geçen kısa ömürlü hücrelerdir (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Eşrefoğlu 2004; Atal 2014).

2.3.3.2.4. Spermatid

Sekonder spermatoziti'nin ikinci mayoz bölünmesi sonucunda oluşan ve 23 kromozom (haploid) taşıyan spermatidler, sekonder spermatoziti'nin yarısı kadar

büyükükte (7-8 µm çapında), yoğunlaşmış kromatin alanları içeren çekirdekleri ve seminifer tübül lümenine yakın yerleşimleri sayesinde ayırt edilebilirler. Bu hücreler, birbirleriyle sitoplazmik bağlantı yapan sinsityal hücre kümesi oluştururlar (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Eşrefoğlu 2004; Özdemir 2012).

Akrozom oluşumu, nukleus yoğunlaşması ve uzaması, flagellum gelişmesi ve sitoplazmanın büyük bir kısmının kaybolması gibi olayları içeren spermiogenez, küre veya poligonal biçimli spermatidlerin, belirli değişimler geçirerek spermatozoon haline dönüşme sürecidir. Bu evrede, spermatogonyumlar ile spermatositler arasında bulunan köprüler birbirinden ayrılır ve yoğun transformasyon sonucunda da çekirdek karakteristik şeklini kazanır (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Eşrefoğlu 2004; Yetim 2011; Sayılmaz 2015).

Spermatidlerin, olgun spermere dönüşmesi sürecinde sırasıyla şu değişiklikler meydana gelir:

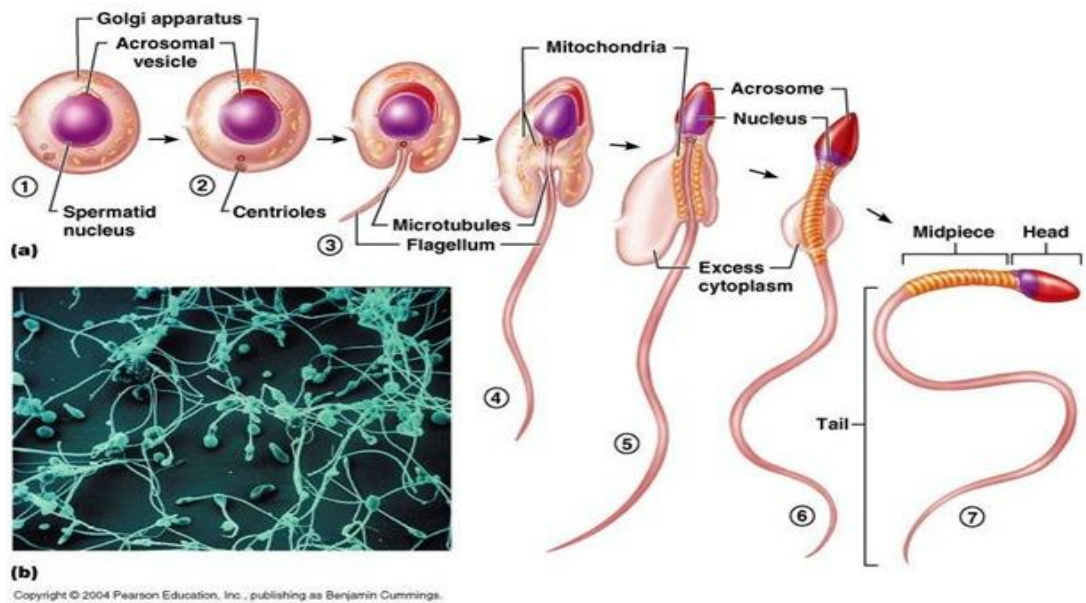
Akrozom Oluşması: Spermatidlerde spermiogenezin ilk belirtileri hücre organellerinde gözlemlenmektedir. Spermatidlerin sitoplazmaları, nukleus yakınında belirgin bir Golgi kompleksi, mitokondriler, serbest ribozomlar ve DER tübülleri ile bir çift sentriol içermektedir. Hücrenin Golgi kompleksinin olduğu bölgede, PAS(+) boyanan küçük proakrozom granüller dikkat çeker ve bu granüller, daha sonra membranla sınırlanmış büyük bir vezikül içerisinde toplanarak akrozom vezikülünü oluştururlar. Akrozom vezikülü, spermatid çekirdeğinin ön kutbuna doğru hareket ederek çekirdek zarına yapışır. Vezikülü çevreleyen zar, çekirdeğin 2/3'ünü saracak şekilde nukleusu kaplar ve bir başlık (head cap) oluşturur. Akrozom granülleri içerisinde, hücre içindeyken inaktif halde bulunan proteaz, asit fosfataz, aril sülfataz, N-asetilglukoril sülfataz ve özellikle dölleme sırasında spermiumun oositin etrafında bulunan engelleri aşarken kullandığı akrozin, hyaluronidaz ve nörominidaz gibi hidrolitik enzimler bulunmaktadır. Akrozomda çok sayıda hidrolitik enzim bulunduğu için aynı zamanda akrozom, özel tip lizozom olarak da yorumlanabilmektedir (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002).

Kuyruk Gelişmesi: Akrozom oluşurken bir çift sentriol, çekirdeğin arka kısmına doğru hareket ederek proksimal ve distal sentriolleri oluşturur. Distal sentriol, bazal cisim gibi işlev görerek spermiumun kuyruğunun merkezindeki

aksonemi (9+2) veya merkez fibrillerini oluşturmaktadır. Bu yapıyla aksonem flagellumun özünü oluşturur. Bu esnada akrozomal kepte nukleusun her iki yanında incelerek uzar ve böylece çekirdek üzerindeki son halini almış olur. Aksonem gelişir gelişmez üzerine bazı yapılar ilave edilerek kuyruğun ergin biçimini kazanması sağlanmış olur. Proksimal sentriol ise, nukleusun kaudal kısmındaki girintiye yerleşerek spermiumun boyun kısmının yapısına katılır (Karaöz 2002).

Çekirdekteki Değişiklikler: Kuyruk gelişirken mikrotübüller, nukleusun etrafında manşet adı verilen ve hücrenin kaudaline doğru uzanan bir bant oluştururlar. Manşetin şekillenmesiyle birlikte akrozomal kep ve nukleus, hücre zarının bitişiğine doğru hareket ederler. Buna bağlı olarak da spermatit uzamaya başlar. Sitoplazma da kaudale doğru uzayarak spermatidin spermium halini almasına katkıda bulunur (Karaöz 2002).

Artık Spermatid Sitoplazmasının Atılması: Spermatidin sitoplazması, uzayan spermiumun şekline uyarak onu dıştan sarar. Bu esnada manşet kaybolur ve mitokondriler, flagellumun proksimal kısmı çevresinde heliks şeklinde dizilim gösterirler. Geriye kalan sitoplazma parçası ve içindeki organeller, rezidüel cisim olarak atılırlar ve Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilerek ortadan kaldırılırlar. Sitoplazma ise spermiumun baş ve kuyruk kısmını çevreleyen ince bir halka şeklinde kalır ve bu dar alanda da sadece spermiumun hareketini sağlayacak olan organeller bulunmaktadır (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002).



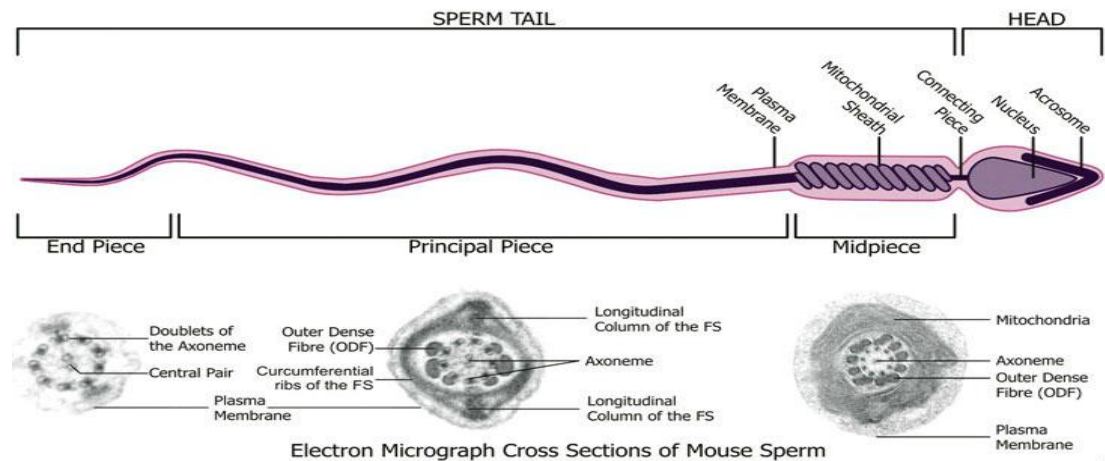
Şekil 2.9. Spermioenez sürecinde spermatidlerde gözlemlenen değişiklikler

2.3.3.2.5. Olgun Spermium (Spermatazoon)

50-60 μm uzunluğa sahip olan silindirik biçimli hareketli hücreler olup, baş ve kuyruk kısımlarından oluşurlar.

Baş: Yaklaşık 4 μm uzunluğa, 3 μm genişliğe ve 1 μm kalınlığa sahip uzun, basık, hafif armutsu bir yapıya sahiptir. Büyük bir kısmını çekirdek oluştururken; 2/3'lük ön kısmını hidrolitik enzimler içeren akrozom oluşturmaktadır. Akrozomun kaudalinde, hücre zarı ile nukleus zarı arasında akrozomun örtmediği kısım olan ve post akrozom yöresi adı verilen özelleşmiş koyu bir tabaka yer almaktadır. Döllenme sırasında bu bölgede, spermiumu saran hücre zarı ile dişi cins hücrenin zarı birleşerek erir ve bunun sonucunda da spermium, sekonder oosit içerisine girer.

Kuyruk: Boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere 4 bölümde incelenir. Boyun veya bağlantı parçası, proksimal sentriolden gelişen ve segmental bir dizilim gösteren konnektin yapıların bulunduğu kısımdır. Konnektin bağlar arasındaki çok ince filamenter bağlar, bu yapıları birbirine bağlar. Boyun, aynı zamanda spermiumun baş kısmı ile orta parçası arasındaki bağlantıyı da sağlamaktadır. Yaklaşık 5-9 μm uzunluğa ve 1 μm kalınlığa sahip olan orta parça, ortada aksonema ile çevrede koyu fibriller ve heliks şeklinde düzenlenmiş mitokondrileri bulunduran kısımdır. Mitokondrilere spermiumların hareketi için ihtiyaç duyulmaktadır. 40-45 μm uzunluğundaki yapısı ile kuyruğun en uzun parçası olan esas parça ise aksonema ile fibröz kılıfı ihtiva eden kısımdır. Sadece aksonem ile sitoplazmik kısmının olduğu son parça da, fibröz tabakanın bulunmadığı dar bölgedir (Kalaycı 1986; Karaöz 2002; Seçkin ve ark. 2008; Altun 2013; Atal 2014).



Şekil 2.10. Olgun spermin (spermatazoon) yapısı

2.3.4. İnterstisyel Alan

Androjen üretimi açısından önemli olan ve testisin seminifer tübülleri arasındaki boşlukları dolduran interstisyel bağ dokusu, kan ve lenf damarları ile sınırlardan zengin gevşek bağ dokusudur. Testiküler kapillerler pencereci olup, kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmelerine olanak sağlarlar. Bu doku içerisinde aynı zamanda fibroblast, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, makrofaj ve mast hücreleri gibi farklı hücre grupları bulunmaktadır. Puberteden sonra ise bu hücre gruplarının arasına, ergenlikte işlevsel olarak belirgin hale gelen ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumlu olan erkeklik hormonu testosteronun üretimini sağlayan Leydig hücreleri ya da diğer adıyla interstisyel hücreler katılırlar (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004; Gültekin 2013).

2.3.4.1. Leydig (İnterstisyel) Hücreleri

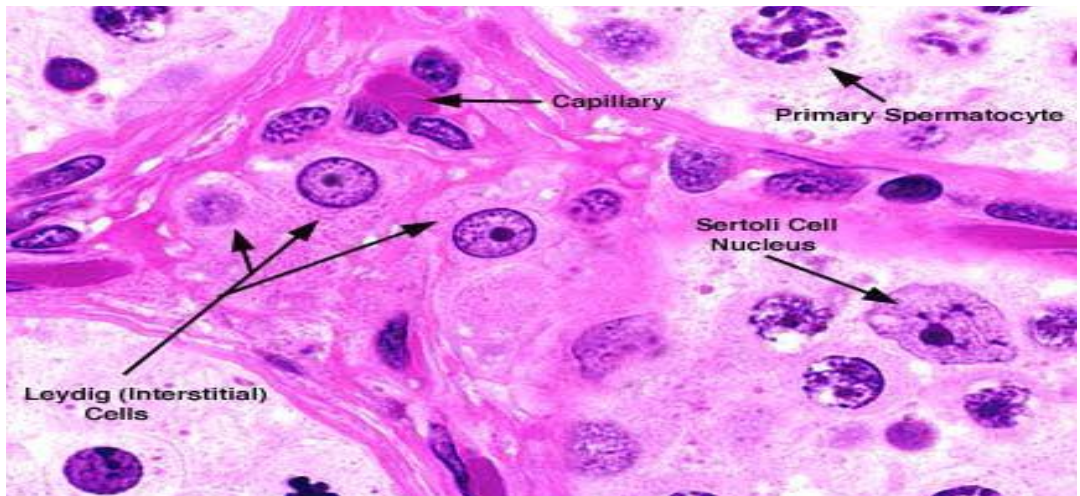
Testisin mezenşimal stromasından köken alan ve insanda testis hacminin yaklaşık % 12'sini oluşturan bu hücreler, tek tek ya da gruplar halinde, sıklıkla üçgen biçimli kümeler şeklinde ve bazen de kan damarlarına yakın halde bulunurlar. Yuvarlak veya poligonal şekilli olan bu hücreler, merkezi bir nükleus ile küçük yağ damlacıklarından zengin eozinofilik bir sitoplazmaya sahiptir ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminden sorumlu olan erkeklik hormonu testosteronu üretirler. Serumda bulunan testosteronun yaklaşık olarak % 95'lik kısmı Leydig hücreleri tarafından üretilirken; geriye kalan % 5'lik kısım ise surrenal kortekste üretilmektedir. Testosteron sentezi bu hücrelerin mitokondri ve DER'lerinde bulunan enzimler tarafından gerçekleştirilir. Sitoplazmalarında, azokarmin gibi uygun bir boya ile boyandığı zaman görülebilen ve çubuk şeklinde olan protein yapıda kristalloidler (Reinke kristalleri) gözlemlenmektedir (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004; Kierszenbaum 2006).

İnsanda gebelik esnasında üretilen plasental kökenli gonadotropinlerin kan yoluyla fetal testise ulaşarak Leydig hücrelerini uyarması sonucunda bu hücrelerden hormon üretilmeye başlanır. Sentezlenen testosteron hormonu, erkek genital organların embriyolojik farklılaşmasında etkilidir. İntrauterin yaşamda gebeliğin 18. haftasına kadar gelişmiş halde bulunan Leydig hücreleri, daha sonra dejenerasyona

uğrayarak gerilemeye başlarlar ve buna bağlı olarak da testosteron seviyesi de düşmektedir. Fetal dönem sona erdiğinde, interstisyel hücreleri uyaran plasentada ortadan kalkacağı için bu hücreler puberteye kadar inaktif durumda kalırlar. Pubertede, hipofiz bezi ön lobundan salgılanan luteinizan hormon (LH)'un etkisiyle hücreler yeniden aktif hale gelir ve testosteron salgılamaya başlarlar. Testosteron, kan ve lenf kapillerleri ya da peritübüler doku sıvısı yolu ile seminifer tübüllere geçer ve spermatogenezisi devam ettirir (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004).

Dolaşımdaki testosteron seviyeleri, interstisyel hücrelerin steroidojenik kapasitesi ve testisteki toplam sayıları ile ilişkilidir. Testis içerisindeki testosteronun lokal düzeyi, dolaşımdaki düzeyden 200 kat fazla olması gerekmektedir. Fakat, bu düzeylerde de seminifer tübüllerdeki spermatogenik hücrelerin çoğalması ve farklılaşması mümkün olmaktadır. Leydig hücrelerinin testosteron üretimi ergenlikle birlikte artarken, yaşın ilerlemesiyle de azalmaktadır. Leydig hücre sayılarındaki azalmalar, düşük LH uyarımları, hücrelerin testosteron üretme kabiliyetlerinin azalması ve önemli germ hücre kayıpları bu olayın olası nedenleri arasında gösterilmektedir (Karaöz 2002; Gültekin 2013).

LH ve prolaktin, Leydig hücre fonksiyonlarını düzenleyen hormonlar olup, prolaktin, LH reseptörünün gen ekspresyonunu düzenlerken, LH ise testosteron üretiminden sorumludur. Fazla miktardaki prolaktin, Leydig hücrelerinden androjen üretimini azaltabilir, spermatogenezisi zayıflatabilir ve kısırlığa yol açabilmektedir (Yetim 2011).



Şekil 2.11. İnterstisyel alan ve Leydig (intersitisyel) hücreleri

2.3.5. Testisin Histofizyolojisi

Testis, endokrin ve ekzokrin fonksiyonları olan bileşik tübüler bir bez olup, erkek üreme sisteminin fonksiyonlarını sürdürebilmesi için endokrin ve ekzokrin fonksiyonların birbiri ile uyum içinde olması gerekmektedir. Bu fonksiyonlar, hipotalamus-hipofiz-gonad ekseninin kontrolü altında olup, endokrin fonksiyonlar Leydig hücreleri üzerinden, ekzokrin fonksiyonlar ise seminifer tübüllerin spermatazonları üretmesi sonucunda gerçekleşir (Kalaycı 1986; Sayılmaz 2015).

Testisin i  salgılama işlevi yani endokrin fonksiyonu, interstisyel hücreler tarafından salgılan testosteron sayesinde gerçekleşmektedir. Testosteron, yüksek lokal etkiyle birlikte spermatogenik hücrelerin büyümesi ve bölünmesini etkilerken, kana geçerek yardımcı bezlerin (prostat, vesiküla seminalis, bulbo retral bez) görevlerini de etkilemektedir. Aynı zamanda erkeğe özgü ikincil cinsiyet karakterlerinin (sakal-bıyık, erkeğe özgü ses, müsküler vücut şekli vb.) ortaya çıkmasından da sorumludur.

Testosteron, adenohipofizden salgılan LH etkisiyle üretilir ve LH, interstisyel hücreler üzerine etki ederek spermatogenik seri hücrelerinin gelişimi için gerekli olan testosteron yapımını stimüle eder. LH dışında LH releasing hormon (LH-RH) ile prolaktin de interstisyel hücreleri direkt olarak etkileyerek testosteron salgılanmasını sa lar. Hipofizden LH salınımı negatif geri besleme ile düzenlenmektedir. Fazla miktardaki testosteron LH salınımını engellerken; az miktardaki testosteron ise LH salınımını artırmaktadır.

Spermatogenezin ba laması ve devam etmesinde etkili olan bir diğer hormon ise adenohipofizden salgılanan ve Sertoli hücrelerini uyaran FSH'dır. FSH, Sertoli hücrelerine etkileyerek adenilat siklaz yapımını ve döngüsel adenozin monofosfat (cAMP) artı ını uyarır. Ayrıca ABP'in sentez ve salgılanmasını sağlayarak, spermatogenezin ba laması için gerekli olan testosteronun yerel etkisi sağlanmış olur. Germ hücrelerinin sayısındaki azalma FSH salınımını uyarır ve bu da Sertoli hücreleri tarafından salgılanan inhibin ile kontrol edilir (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karataş 1998; Arıncı ve Elhan 1999; Yıldırım 1999; Yetim 2011; Atal 2014).

Testisin metabolik fonksiyonlarının kontrolü için gerekli olan diğere bir hormon ise büyüme hormonu (GH)'dur ve bu hormon, spermatogonyumların erkenden bölünmesini destekler. Bu hormonun yokluğunda ise spermatogenez durur veya sekteye uğrar (Atal 2014).

Testisin dış salgı işlevi yani ekzokrin fonksiyonu ise kıvrımlı olan seminifer tübüllerin holokrin salgı ürünü olan spermatazoonlardır. İnsanlarda iki testisten günlük ortalama 200-300 milyon kadar spermatazoon üretilmektedir. Bu spermlerin yapımı için iki testiste boyları 30-70 cm arasında değişen ortalama 800-1200 adet seminifer tübül çok geniş ve uzun bir yüzey oluşturmaktadır. Bu miktar fazla gibi gözükse de diğere türler ile kıyaslandığı zaman oldukça düşük miktardır. Oluşan ejakülat miktarı ise 2-6 ml'dir. Bu ejakülat, mililitrede 40-100 milyon kadar spermatazoon içermektedir ve bu sayı 20 milyonun aşağısına düştüğü zaman ise kısırlıktan söz edilebilmektedir (Kalaycı 1986; Yıldırım 1999; Hassa 2003; Yetim 2011; Gültekin 2013).

2.3.6. Testis Boşaltım Kanalları

Testis boşaltım kanalları, spermatazoonları taşıyan kanallar olup, iç genital kanallar (tübüli rekti, rete testis ve duktuli efferentes) ile dış genital kanallar (duktus epididimis, duktus deferens ve duktus ejakulatoryus)'dan oluşmaktadır.

2.3.6.1. Tübüli Rekti

Her testis lobülünün tepesinde seminifer tübüller, kısa, dar ve düzgün seyirli tübüli rektilerle devam ederler. Seminifer tübüllerin tübüli rekti'ye geçiş yerlerinde spermatogenik hücreler ortadan kaybolur ve geriye sadece Sertoli hücreleri kalır. Bu hücrelerde tek katlı prizmatik, alçak prizmatik ya da kübik epitele dönüşerek tübüli döşerler. Epitel, bazal membran üzerine oturur ve dıştan düz kas hücreleri içeren gevşek bağ dokusu ile sarıdır (Kalaycı 1986; Karaöz 2002; Seçkin ve ark. 2008).

2.3.6.2. Rete Testis

Tunica albuginea'nın yapmış olduğu mediastinum testis içerisinde yer alan ve fazla miktardaki damarların arasında genişlikleri değişen ve birbirleri ile anastomozlaşan ağ şeklindeki kanallar sistemidir. Tübüli rektiler, rete testisin içine boşalır ve rete testisi döşeyen epitel de tek katlı kübik veya tek katlı yassı epitel

şeklinde olabilir. Epitel hücreleri, tek bir apikal silyum ve birkaç mikrovillus içermektedir. Epitel hücreleri, ince bir bazal lamina üzerine oturur ve mediastinum testisin bol damarlı bağ dokusu ile dıştan sarılıdır.

Spermiumların tübülü rekti ve rete testislerden geçişleri hızlı olduğu için kesitlerde bu kanalların lümeninde spermiumlara çok nadir rastlanmaktadır (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004; Seçkin ve ark. 2008).

2.3.6.3. Duktuli Efferentes

Rete testisi epididimise bağlayan kanallardır. Rete testisten çıkan 10-20 adet duktuli efferentes adı verilen kanalcık, tunika albuginea'yı delerek testisten epididimise geçer. Bunlar çok kıvrıntılı borucuklar olup, tabanları epididime dönük tepesi mediastinuma bakan coni vaskulozi adı verilen konik yapıları teşkil eder. Bunların hepsi dıştan bağ dokusu ile sarılarak epididimisin başının bir kısmını oluştururlar.

Kanalları döşeyen psödostratifiye (yalancı çok katlı) epitel, prizmatik ve kübik hücrelerden oluşur. Hücrelerin boyları birbirleriyle eşit olmadığı için epitelin yüzeyi girintili çıkıntılı olarak görülmektedir. Uzun boylu olan prizmatik hücreler genellikle silyalı iken; kısa boylu hücreler ise silya içermez. Bu hücreler endositoz yapan hücreler olup, fazla miktarda mikrovillus, pinositoz vezikülü ve membranla sarılı cisimcik içerirler. Silyasız hücreler, seminifer tübüllerden salgılanan sıvının büyük bir kısmını absorbe ederken; silyalı hücre aktivitesi ve sıvı emilimi ise epididimise doğru sıvı akışı oluşturarak spermatazonların hareketine yardımcı olmaktadır.

Duktuli efferentes epiteli, ince bir bazal lamina üzerine oturur ve epitel de lenfositlere rastlanılabilir. Bazal lamina altında ise gevşek bağ dokusu ile epididimise yaklaştıkça kalınlığı artan sirküler olarak düzenlenmiş ince bir düz kas tabakası bulunmaktadır (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004; Seçkin ve ark. 2008).

2.3.6.4. Duktus Epididimis

Testisin arka yüzeyi boyunca uzanan ve duktuli efferenteslerin birleşmeleri sonucu oluşan, yaklaşık 4-6 m uzunluğa sahip son derece kıvrımlı tek bir kanaldır.

Testiküler sıvının %99'u epididimiste absorblanır ve epididimis baş (kaput), gövde (korpus) ve kuyruk (kauda) olmak üzere üç bölümde incelenir. Baş kısmı duktuli efferentesler ile testisin üst kutbuna, kuyruk kısmı ise gevşek bağ dokusu ve tunika vajinalis aracılığıyla testisin alt kutbuna bağlanmıştır. Kanalı kan damarlarından ve düz kas hücrelerinden zengin sıkı bağ dokusu sarar. Bu uzun kanal, çevresini saran bağ dokusu ve kan damarları ile beraber epididimisin kuyruk ve gövde kısmını oluşturur (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004; Seçkin ve ark. 2008).

Spermiumların toplanma ve depolanma yeri olan epididimis, yaklaşık 4 cm uzunluğa sahip virgül şeklinde bir organ olup, testislerin posterior sınırı boyunca uzanmaktadır. Spermiumlar, epididimise gelinceye kadar ergin (matür) değillerdir. Hareketleri kısıtlı olup, yönlendirilmiş hareketleri yoktur. Epididimisten yavaş yavaş geçerlerken, ileriye doğru gerçek hareket kapasitelerini kazanırlar (Karaöz 2002; Sayılmaz 2015).

Kanalı döşeyen epitel örtüsü salgısı, spermiumların olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır. Yalancı çok katlı sterosilyalı prizmatik epiteli, bazal hücreler ve prizmatik (esas) hücrelerden oluşmaktadır. Yüzeyleri stereosilya adını alan uzun ve dallanmış mikrovilluslar ile kaplı olan esas hücreler, absorpsiyon ve salgı yapma işlevi ile yükümlü hücreler olup, sperm olgunlaşmasını sağlayan siyalik asit, gliserofosfokolin ve spermiumun akrozomunu örten glikoproteinleri salgırlar. Duktuli efferenteste absorbe edilmemiş olan sıvı da burada absorbe edilir. Bazal hücreler ise esas hücreler arasında bazalde yerleşmiş olan küçük, yuvarlak ve piramit şeklindeki hücrelerdir. Açık renkte boyanırlar ve basit bir yapıya sahiplerdir (Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004; Seçkin ve ark. 2008).

Epididimis epitel örtüsünün farklı bölgelerinde prizmatik hücreler arasına dağılmış, koyu heterokromatik çekirdekli ve açık renk sitoplazmalı Halo hücreleri veya intraepitelyal lenfositler gözlenebilir (Karaöz 2002). Epididimis epiteli, bazal lamina üzerine oturur ve bazal lamina altında da ince bir lamina propriya ile en dışta sirküler olarak düzenlenmiş ince düz kas tabakası bulunur. Kas tabakası, epididimisin kuyruğuna doğru giderek kalınlaşır ve kuyrukta bu tabakanın iç ve dış kısmına longitudinal (uzunlamasına) seyirli iki kas tabakası daha eklenir. Böylece

duktus deferensle birleşmeden önce kas tabakası, içte ve dışta longitudinal, ortada ise sirküler olarak düzenlenmiş olur. (Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004).

2.3.6.5. Duktus Deferens

Epididimisin kuyruğunun devamı olan ve spermatozoayı epididimisin alt ucundan yukarısındaki duktus ejakulatoryusa iletmekle görevli duktus deferens, yaklaşık 2 mm çapında ve 40-50 cm uzunluğunda olan kalın duvara ve dar bir lümenine sahip mürsküler bir borudur. Tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika adventisya olmak üzere 3 tabakadan oluşur (Eşrefoğlu 2004; Seçkin ve ark. 2008; Sayılmaz 2015).

Tunika mukoza, epitel ve lamina propria'dan kurulu olan tabaka olup, epididimise benzer şekilde, stereosilyalı yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşelidir. Epitelin altında elastik liflerden zengin olan lamina propria yer alır. Mukoza, lümenine doğru longitudinal seyirli plikalar yapar. Bu nedenle lümen enine kesitlerde dardır ve yıldız biçiminde görülür. Elastik liflerce zengin olan bu tabakanın kas tabakasına yakın olan bölümleri ise bol damarlıdır.

Tunika muskularis adı verilen kuvvetli kas tabakası, iç ve dış kısımda longitudinal, ortada ise sirküler olarak seyreden düz kas fibrillerinden oluşan kalın bir tabakadır. En iyi sirküler tabaka gelişmiş olup, kanalın sonlarına doğru da iç tabaka ortadan kalkmaktadır. Bu kaslar, bol miktarda elastik lif içeren bağ dokusu içerisine konuqlandırılmıştır.

Tunika adventisya ise çok sayıda kan damarı ve sinir içeren fibroelastik bağ dokusu tabakasıdır. İçerisinde musculus cremaster'in çizgili kas liflerine de rastlanır.

Spermatik kordonun bir parçasını oluşturan duktus deferens, prostata girmeden önce genişleyerek ampullayı oluşturur ve ampullanın son kısmında ise seminal veziküller kanala katılır. Bundan sonra ise duktus deferens prostata girerek prostatik üretraya açılır. Prostata katılan segmente ise duktus ejakulatoryus adı verilir. Duktus deferensin mukoza tabakası ampulla boyunca duktus ejakulatoryusa kadar devam ederken, kas tabakası ise ampulladan sonra sona ermektedir (Kalaycı 1986; Jungueira ve ark. 1998; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004; Seçkin ve ark. 2008).

2.3.6.6. Duktus Ejeküatoryus

Yaklaşık 2 cm uzunluğa sahip olan ve ampulla duktus deferensin devamı olarak prostatın içinde veru montanumda üretra prostatikaya açılan bir çift kanaldır. Bu kanallar, prostat bezi içerisinde yer alan spermiumları üretraya ileten kısa, kıvrıntılı kanallar olup, prostat bezinin içerisinde daralarak spermiumların ve seminal vezikül salgılarının fişkirtılarak ileriye atılmasını sağlarlar. Mukozası çok ince olup, çok ince kıvrımlar ve ampulladakine benzer kriptalar oluşturur.

Duktus ejaküatoryus, proksimal bölgede tek katlı prizmatik veya yalancı çok katlı prizmatik, distal bölgede ise değişici (transizyonel) epitel ile döşelidir. Epitel hücreleri, salgılama işlevi ile yükümlüdürler. Lamina propria ise elastik fibrillerden zengin olan bağ dokusudur ve sadece başlangıç kısmında kas tabakası mevcuttur. Prostat dokusu içinde kas tabakası ortadan kaybolur ve çevresi prostat bezinin fibromüsküler stroması ile kuşatılır (Kalaycı 1986; Karaöz 2002; Eşrefoğlu 2004; Seçkin ve ark. 2008; Sayılmaz 2015).

2.4. KEMOTERAPÖTİKLER

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması ve metastaz yapması ile kendini gösteren ve gelişmiş ülkelerdeki ölüm oranlarında kalp damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer alan, kontrolsüz hücre bölünmesi hastalığıdır. Günümüzde kanser ile ilgili tedaviler cerrahi yolla ve kemoterapi ile radyoterapinin kombinasyonları şeklinde gerçekleşmektedir. Cerrahi yolla yapılan tedavilerde amaç tümürlü olan doku ve organın vücuttan dışarı atılması iken; radyoterapi ve kemoterapi ile yapılan tedavilerde ise amaç kanserli hücrelerin yok edilerek ortadan kaldırılmasıdır (Limandal 2013).

Kemoterapi sözcüğü ilk defa 1900'lerin başında enfeksiyon hastalıklarının tedavisi için ilaçlar geliştiren ünlü kimyacı Paul Ehrlich tarafından kullanılmıştır (Ateş ve Olgun 2014). Kemoterapi, kanser hastalıklarında hastaların normal hücrelerine zarar vermeksizin, kontrolsüz bir şekilde çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellemek veya yok etmek amacı ile doğal ya da sentetik kimyasal maddeler, biyolojik ajanlar veya hormonlar ile yapılan tedavilerin tamamını içine alan tedavi şeklidir (Atal 2014).

Kemoterapinin tedavi (yanıt), kontrol (tedavinin tam olarak sağlanamadığı durumlarda yaşam süresini uzatmak), semptomları hafifletme (tümöre bağlı semptomları hafifletme yoluyla tümörün etkisini azaltarak rahatlığı sağlamak) ve profilaksi olmak üzere dört temel ilkesi vardır (Sadırlı 2008; Sayılmaz 2015).

Profilaksi, kendi içerisinde adjuvan ve neoadjuvan olarak ikiye ayrılır. Adjuvan, nüksetme ihtimali yüksek olan tümörlerin cerrahi müdahale ile çıkarılması veya radyoterapi ile tedavi edilmelerini takiben yapılan kemoterapi işlemidir. Neoadjuvan ise lokal ileri kanserlerde, tümör kitlesini küçülterek lokal tedavinin başarısını arttırmak ve bazı durumlarda organ koruyucu yaklaşımlara olanak sağlamak amacıyla cerrahi ve/veya radyoterapi öncesinde kemoterapi uygulanmasıdır (Türker ve Dizdar 2005; Sadırlı 2008; Sayılmaz 2015).

Kanserli (neoplastik) hücrelerin, normal hücelere göre daha hızlı bir şekilde büyümesi ve çoğalması sebebiyle, bu tarz hücrelerin ortadan kaldırılması için geliştirilen ilaçlara da kemoterapötik ilaçlar adı verilmektedir (Limandal 2013). Kemoterapide kullanılan bu ilaçlar, yapı ve etki mekanizmaları bakımından farklı olduklarından kanser hücrelerini yok etmek için tedavilerde genellikle tek bir ilaç yerine birkaç ilaç birbiri ile kombine edilerek uygulanmaktadır. İlaçların birbirleri ile kombine edilerek uygulanması, hücrelerin daha iyi bir şekilde kontrol altına alınmasını ve hastalarda daha az oranda yan etkilerin görülmesini sağlamaktadır (Can 2005).

Birbirlerinden farklı yan etkilere sahip olan antineoplastik ilaçlar, farmakolojik özellikleri ile hücre döngüsü üzerindeki etkileri göz önüne alındığında alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, antitümör antibiyotikler, vinka (bitki) alkaloidler, hormonlar ve sınıflandırılmayanlar olmak üzere farklı gruplara ayrılabilirler (Şekil 2.12). Bu gruplar içerisinde en gonodotoksik olarak da alkilleyici ajanlar, antimetabolitler, vinka alkaloidler ve sınıflandırılmayanlar bilinmektedir (Can 2005; Gültekin 2013).

Sınıf/Etki Mekanizması	Kemoterapötik Ajanlar	Yan Etkiler
Alkilleiyici Ajanlar Hücre siklusüne özgü değiller; DNA'nın çift sarmalını parçalar; RNA, protein ve DNA sentezini baskılar.	Busulfan, Chlorambucil, Cyclophosphamide, Cisplatin, Carboplatin, Ifosfamide, Melphalan, Mechlorethamine hidroklorid, Thiotepa	<ul style="list-style-type: none"> Hematopoetik (trombositopeni, nötropeni) Gastrointestinal (bulantı-kusma, stomatit) Reproduktif Renal (hemorajik sistit, nefrotoksisite)
Antimetabolitler Hücresin S fazına etkili; DNA sarmalını kırarak veya prematür zinciri sonlandırarak DNA sentezi için gerekli enzimlerin üretimini baskılar.	Cytarabine, Capecitabine, Gemcitabine, Methotrexate, 5-Azacytidine, 5-Fluorouracil, Floxuridine, 6-Mercaptopurine, 6-Thiuganine	<ul style="list-style-type: none"> Hematopoetik (trombositopeni, nötropeni, anemi) Gastrointestinal (bulantı-kusma, stomatit, anoreksi, diyare) Dermatolojik (kaşıntı, döküntü, venlerde koyulaşma, alopesi)
Antitümör Antibiyotikler Hücre siklusüne özgü değiller; nükleik asid sentezini ve işlevini değiştirerek RNA ve DNA sentezini baskılar.	Bleomycin, Dactinomycin, Daunorubicin, Doxorubicin, Idarubicin, Mytomycin C, Mitoxantrone, Plicamycine	<ul style="list-style-type: none"> Hematopoetik (trombositopeni, nötropeni, anemi) Gastrointestinal (bulantı-kusma, stomatit) Kardiyak (kardiyotoksisite, aritmi, kardiyomyopati) Dermatolojik (hiperpigmentasyon, alopesi)
Nitrosürealar Hücre siklusüne özgü değiller; DNA replikasyonunu ve onanmini engellerler.	Carmustine, Lomustine, Semustine, Streptozocin	<ul style="list-style-type: none"> Hematopoetik (trombositopeni, nötropeni, anemi) Gastrointestinal (bulantı-kusma, stomatit) Reproduktif (over veya spermilerin baskılanması)
Vinka (Bitki) Alkaloidleri Hücresin M fazına etkili; RNA ve protein sentezini baskılar.	Vinblastine, Vincristine, VP-16, VM-26, Vindesine, Topotecan, Irinotecan, Paclitaxel, Docetaxel	<ul style="list-style-type: none"> Hematopoetik (trombositopeni, nötropeni, anemi) Gastrointestinal (bulantı-kusma, anoreksi, konstipasyon) Dermatolojik (lokal doku nekrozu, alopesi, paralizik ileus, çene ağrısı) Nörolojik (nörotoksisite, periferik nöropati) Reproduktif
Hormonlar Tümörü doğrudan etkilerler ya da tümörü besleyen vücut hormonlarını baskılar.	Androjenler, östrojenler, kortikosteroidler, progestinler, östrojen antagonistleri	<ul style="list-style-type: none"> Reproduktif (menstrüel bozukluklar) Hematopoetik (gizli enfeksiyonlar) Gastrointestinal (mide iritasyonu) Endokrin (jinekoma, Cushing Sendromu)
Sınıflandırılmayanlar Hücresin S fazına etkili; RNA, DNA ve protein sentezini baskılar.	Amsacrine, Hydroxyurea, L-Asparaginase, Procarbazine	<ul style="list-style-type: none"> Hematopoetik Gastrointestinal (bulantı-kusma, kabızlık, ishal)

Şekil 2.12. Kemoterapötik ajanlar, etki mekanizmaları ve yan etkileri

Kemoterapötik ajanlar, hücreler proliferatif dönemde oldukları zaman en fazla etkiye sahiptirler. Bu ajanlar, sadece anormal hücreleri değil, aynı zamanda kemik iliği, saç ve mukoza gibi hızlı çoğalabilen normal hücreleri de etkileyerek hastada kanama, yorgunluk, saç dökülmesi (alopesi), enfeksiyon, ağız içi kanaması (stomatit) ve diyare (ishal) gibi farklı yan etkilerin görülmesine sebep olmaktadır. Bunun dışında bazı kemoterapötikler de kalp, böbrek, mesane, akciğerler ve sinir sistemi organları gibi hayati önem taşıyan organlar üzerinde negatif etkiler oluşturabilmektedir. Yan etkilerin şiddeti ve sıklığı kişiden kişiye göre değişiklik göstermekte olup, kullanılan ilacın dozu, uygulama yöntemi, hastalığın yayılımı ve hastanın fiziksel durumu, önceden veya eş zamanlı olarak radyoterapi alma, yaş, beslenme durumu ve başka bir hastalığın varlığı gibi durumlar bu yan etkilerin gelişiminde önemli rol oynamaktadır (Can 2005; Türk 2013; Atal 2014).

Kemoterapötik ilaçlar, normal doku ve hücrelerde de farklı düzeyde yan etkilere sahip olduğu için, erkek infertilitesi ve sterilitesi kemoterapötik ilaçların üreme sistemi üzerinde meydana getirdiği olumsuz etkilerden birisidir. Spermatogenezdeki aksaklıklar, sperm kalitesindeki bozukluklar, ejakülasyon

bozukluğu, cinsel fonksiyon bozukluğu ve hipotalamus-hipofiz-gonad eksenindeki fonksiyon bozukluğu gibi olumsuz durumlar kemoterapötiklerin üreme sistemindeki yan etkileri arasında gösterilmektedir. Testislerdeki Sertoli ve Leydig hücreleri, kemoterapötik ilaçlara karşı kısmen dayanıklı iken; germinal epitel ise bu ilaçların zararlı etkilerine karşı oldukça duyarlıdır (Ragheb ve Sabanegh 2010; Gültekin 2013; Atal 2014).

2.4.1. Alkilleyici Ajanlar

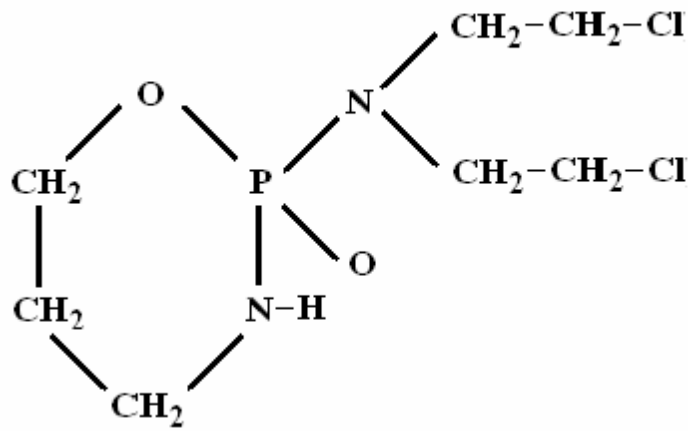
Kanser tedavilerinde kullanılan en önemli ilaç gruplarından birisi olan ve deoksiribonükleik asit (DNA) ile kovalent bağlar oluşturarak etki eden alkilleyici ajanlar, fizyolojik şartlar altında alkil gruplarını DNA gibi önemli biyolojik makromoleküllere bağlama yeteneğine sahiptir. Reaktif elektrofil olabilmeleri sayesinde hedef moleküller ile karbonyum iyonu oluştururlar ve bunun sonucunda da bu kimyasal ajanlar, hücresel DNA ile kompleks oluşturarak kanserli hücrelerin büyümelerini inhibe ederler. İfosfamid, klorambusil, melphalan, mekloretamin, siklofosfamid, karmustin, lomustin, sisplatin, karboplatin, busulfan, dakarbazin ve prokarbazin gibi ilaçlar bu gruba örnek olarak verilebilir (Hurley 2002; Türk 2013; Atal 2014).

Hücre döngüsünden bağımsız olan alkilleyici ilaçlar, kemik iliği ve lenfoid dokuda baskılanmaya yol açarlar. Lenfoid dokuyu etkilemeleri, immünoşüpresif etkinliğin temelini oluşturmaktadır. Bu ilaçların kullanımları sırasında belirli zaman aralıklarında kan sayımları yapılmalı ve lökopeni ile trombositopeniye eğilim görüldüğü anda ilaçların kullanımı kesilmelidir. İlaçların çoğunda kümülatif kemik iliği toksisitesi söz konusu olup, sıklıkla bulantı, kusma ve iştahsızlık gibi etkiler gösterirler. Bu ilaçlar içerisinde kemik iliğine en fazla toksik etki yapan ilaç busulfandır. Alkilleyici ilaçlar, intravenöz olarak kullanıldıkları zaman yan etkileri daha belirgin hale gelmektedir. Teratojenik, mutajenik ve karsinojenik etkileri mevcuttur. Siklofosfamid ile daha fazla olmak üzere saç dökülmesi de yapabilirler.

Farmakokinetik anlamda ön ilaç olan siklofosfamid, ifosfamid ve dakarbazin karaciğerde karma fonksiyonlu oksidazlar tarafından aktif metabolitlere dönüştürülürler. Bu metabolitler de daha sonra kanserli hücrelerde reaktif metabolitlere dönüşür (Türker ve Dizdar 2005).

2.4.1.1. Siklofosfamid (CP)

Kanser tedavilerinde en çok kullanılan ilaçlardan birisi olan siklofosfamid (CP), nitrojen mustrad grubundan alkilleyici antikanser bir ilaçtır. Kimyasal yapısı Şekil 2.13’de gösterilmiştir. Alkilleyici ajanlar, amino, karboksil, sülfidril ve fosfat gruplarına kovalent bağlanarak hücre fonksiyonlarını bozarlar ve hücreye en sık bağlandıkları kısımlar DNA, ribonükleik asit (RNA) ve protein kısımlarıdır (Limandal 2013).



Şekil 2.13. Siklofosfamidin kimyasal yapısı

Bağışıklık baskılayıcı ve antitümör ajan olan CP, bir oksazofosforin olup hem oral olarak hem de parenteral olarak uygulanabilmektedir. CP’in onkosidal etki gösterebilmesi için metabolik olarak aktive edilmesi gereklidir. Hem humoral hem de hüresel bağışıklık CP ile baskılanmakta olup, CP tarafından oluşturulan bağışıklık baskılayıcılık, ana ilaçtan ziyade ilacın metabolitleri tarafından kaynaklanmaktadır. Siklofosfamidin kanserostatik etkisi, fosforamid mustrad (FAM) oluşumunu sağlayan hepatik mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz sistemine ve metabolizmasına bağlı olup, karaciğerdeki mikrozomal sitokrom P450 monooksijenaz sistemi tarafından CP, aktif formları olan 4-hidroksisiklofosfamid ve aldofosfamide dönüştürülür (Bernacki ve ark. 1987; Pool ve ark. 1988; Budavari 1989; Kawabata ve ark. 1990; Boxtel 2007). Hem normal hem de tümörlü dokularda sitotoksik moleküller sonradan enzimatik olmayan bir yolla FAM ve akroleinlere dönüştürülürler (Boxtel 2007). FAM’ın DNA’ya bağlanarak hücre bölünmesini

baskıladığı ve bu sayede de siklofosfamidin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracılık ettiği düşünülmektedir. Akroleinin ise önemli makromoleküllerin sülfidril gruplarıyla reaksiyona girerek bağışıklığın baskılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Kwon ve ark. 1987; Pool ve ark. 1988; Kawabata ve ark. 1990; Yetim 2011). Ayrıca akrolein, mesane için boşaltma esnasında toksik olup, hemorajik sistit oluşturma ihtimali taşır. Hemorajik sistit, üriner epitelin CP'in aktif metaboliti olan akrolein tarafından hasar görmesi sonucu oluşur. Hemorajik sistit birkaç saat içinde gelişir ve tedaviyle birlikte bir-iki hafta içinde düzelme gösterir. Hemorajik sistit gelişimini artıran risk faktörleri arasında ise CP'in infüzyon ve metabolizma oranı, idrarın miktarı ve sıklığı, diğer nefrotoksik ilaçlara ve genitoüriner radyasyona maruz kalma gösterilebilir (Boxtel 2007; Erkurt ve ark. 2009).

Hematolojik ve solid tümörlerin tedavilerinde pozitif sonuçlar gösteren CP'in plazmadaki yarılanma ömrü 6,5 saat olup, parenteral olarak verildiği zaman aktif metabolitlerin plazma konstrasyon pikine ulaşmaları 2-3 saat sürmektedir (Yetim 2011; Limandal 2013).

Siklofosfamid, pediatrik solid tümörler, hodgkin dışı lenfomalar, çocukların akut lenfositik lösemisi, akciğer kanseri gibi hastalıklarda (Limandal 2013) ve ayrıca kuvvetli bağışıklık baskılayıcı etki göstermeleri sebebiyle romatoid artrit, çocukların nefrotik sendromu (Koyoma ve ark. 1977), Behçet hastalığı (Özyazgan ve ark. 1992), skleroderma, sistemik lupus eritematozus (SLE) ve diğer bazı otoimmün hastalıkların tedavi edilmesinde kullanılmaktadır (Yetim 2011).

Siklofosfamid'in en çok rastlanılan yan etkileri arasında hiperürisemi, bulantı-kusma ve diğer gastrointestinal sistem bozuklukları, alerjik reaksiyon, sekonder lösemi, kemik iliği depresyonu (mielosüpresyon), alopesi ve reproduktif sistem yan etkileri (amenore, oligomenore, azospermi, infertilite) gözlemlenmektedir (Banham ve ark. 1985; Hansen ve ark. 1995; Chu ve DeVita 2007).

Farklı klinik ve deneysel çalışmalarda CP'in gonadal yetmezlik, renal yetmezlik ve özellikle de hemorajik sistit oluşturduğu raporlara geçmiştir (Ayhancı 1997). CP tedavisi gören erkeklerde azospermi gelişirken, göğüs kanseri görülen bayan hastalarda ise çoğu zaman amenore oluşmaktadır (Koyoma ve ark. 1977;

Ayhancı 1997). Ayrıca emziren kadınlarda süte geçerek bebeklerde immünoşüpresyon, gelişme geriliği ve karsinogenez gibi toksik etkiler oluşturmaktadır. CP aynı zamanda antidiüretik hormon salgısını artırıp hipernatremiye yol açarak hemorajik sistit oluşturma riskini arttırmaktadır. Erkek Swiss farelerde yapılan çalışmalarda 200 mg/kg siklofosfamidin hemorajik sistit oluşturduğu rapor edilmiştir (Cavalletti ve ark. 1986).

Siklofosfamidin aynı zamanda insanlarda ve deney hayvanlarında mesane kanseri oluşturduğuna dair raporlarda mevcuttur (Al-Safi ve Maddocks 1986; Pool ve ark. 1988). CP kaynaklı kemik iliği mutajenitesi konusundaki çalışmalar CP'in insanlarda ve sıçanlarda hematopoietik sistemde kanserojen olabildiğini göstermiştir. Farelerde yapılan bir çalışmada 100 mg/kg CP'in intraperitoneal olarak uygulanması hematopoietik sistemde tümör gelişimini uyardığı gözlenmiştir. Sıçanlarda yapılan başka bir çalışmada ise 20 ve 40 mg/kg intraperitoneal Cp uygulamasının dalak ve kemik iliğinde mutajen olduğu gösterilmiştir (Ayhancı 1997; Limandal 2013).

Kemoterapi tedavilerinde siklofosfamidin renal hastalıklar ile bazı kanser türlerinde, tek başına ya da kombine edilerek kullanıldığında erkeklerde ve çocuklarda kısırlığa neden olduğu ve testis fonksiyonlarını azalttığı gözlemlenmiştir. CP, kanserli erişkin erkek hastalarda testiküler dokuda spermatogenez döngüsünün durmasını ve sperm sayılarının azalmasını sağlayarak azospermi ve oligospermiye neden olur (Chapman 1983; Howell ve Shalet 1998). Ayrıca CP ile yapılan uzun dönem tedaviler, fertilité ile reproduktif organların ağırlığının azalmasına neden olmaktadır (Trasler ve ark. 1986).

Hodgkin lenfomalı hastalara CP verildiği zaman hastalarda üreter kaynaklı tümörlerin geliştiği rapor edilmiş olup, içerisinde CP bulunan birden fazla kemoterapötik ajan ile tedavi edilen bu hastaların % 35-100'ünde de uzun vadeli azospermi görülebilmektedir ve spermatogenezin yeniden normal haline dönmesi de ortalama iki yıl sürmektedir (Bokemeyer ve ark. 1994; Ponsot ve ark. 1995).

Spermatogeneziste görevli olan spermatogenik hücreler, kemoterapötik ilaçların zararlı etkilerine karşı duyarlı oldukları için, kök hücre topluluğunda onarılamayan hasara yol açarak kalıcı kısırlığa neden olabilirler. Buradaki hücreler

içerisinden en duyarlı olan hücreler aktif olarak bölünen gonositler ve preleptoten fazına kadarki spermatositlerdir (Yetim 2011).

Siklofosamid, malign (kötü huylu) olmayan hastalıkların tedavilerinde tek ilaç olarak kullanılır ve bu yüzden de gonadotoksik etki oluşturmaktadır. Özellikle hızlı bölünen hücreler üzerinde etkili olan CP, en büyük etkisini testislerin germinal epiteli üzerinde göstermektedir (Akazawa ve ark. 1987). Ergenlikten önceki dönemlerde CP ile tedavi gören çocukların, ergenlik dönemlerinde fertilité potansiyellerini %50'lere kadar düşürebildiği gözlemlenmiştir (Levy ve Stillman 1991).

Siklofosamid ile tedavi gören çocuklarda, tedavi sonrasındaki 20 yıllık süre boyunca devam eden azospermi görülmektedir (Kenney ve ark. 2001; Limandal 2013). Watson ve ark. (1985), nefrotik sendrom sebebiyle çocukluk dönemlerinde CP kullanan 30 erkek hastanın tedaviden yaklaşık 13 sene sonra % 43'ünde azospermi saptamışlardır. Totalde 5-45 gr CP kullanmış olan bu hastalarda ilaç dozu ile sperm yoğunluğu arasında pozitif yönlü bir korelasyon bildirilmiş olup, hastalarda yalnızca hormonal olarak kendini gösteren dengelenmiş Leydig hücre yetersizliği görülmüştür.

2.5. NANOTEKNOLOJİ VE NANOPARTİKÜLLER

Bilimlerdeki hızlı gelişmeler ile günümüzün en heyecan verici ve ilgi uyandıran kısmı olan nanoteknoloji sayesinde, endüstriyel ve teknoloji alanlarında olduğu gibi biyoloji ve tıp alanlarında da hızlı gelişmeler görülmüştür (Konuk ve Oktay 2007). "Nano" kelime olarak, fiziksel bir büyüklüğün milyarda birini ifade etmekte olup, bir nanometre ise ölçü olarak metrenin milyarda birini ifade etmektedir ve düzlemine 2-3 tane atomun sığabileceği kadar küçüktür (Konuk ve Oktay 2007; Açık ve Güven 2012).

Nanoteknoloji, maddelerin atomik ve moleküler boyutlarda mühendisliğinin yapılarak yeni özelliklerinin açığa çıkarılması; nanometre boyutundaki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması, kontrolü ve üretimi amacıyla, fonksiyonel materyallerin, cihazların ve sistemlerin geliştirilmesidir. Bir başka deyişle farklı araçların, malzemelerin ve yapıların moleküler düzeylerde işlenmesi, oluşturulması ve manipüle edilmesi olarak tanımlanmaktadır (Açık ve Güven 2012).

Nanoteknolojinin ortaya çıkışı, 1959 yılında fizikçi Richard Feynman'ın malzeme ve cihazların moleküler boyutlarda üretilmesi üzerine söylemiş olduğu 'küçük boyutlarda yapılabilecek çok şey var' ifadesinin geçtiği ünlü konuşmasına kadar dayandırılabilir. 1981 yılında atomların direkt olarak görüntülerini veren taramalı tünelleme mikroskobu ile 1986 yılında atomik kuvvet mikroskobunun keşfi sayesinde biyolojik materyallerin de nano boyutta yüzey özelliklerinin incelenmesi mümkün olmuştur. Bu gelişmeler, bilim insanlarının nanometre boyutlarında bilime yönelmelerini sağlayarak nanoteknolojinin ivme kazanmasını teşvik etmiştir. 20. yüzyılın son çeyreğinde ise doğada mevcut olmayan yeni nano yapıların atomsal düzeyde tasarlanarak sentez edilmesi devri başlamıştır (Atlı-Şekeroğlu 2013).

Nano boyuttaki malzemelerin özellikleri makroskobik boyuttan tamamen farklı olup, nano boyutlara yaklaştıkça birçok yararlı olay ve yeni özellikler ortaya çıkmaktadır. Örneğin, iletim özellikleri (momentum, enerji ve kütle) bundan sonra sürekli olarak değil kesikli olarak tarif edilmektedir. Buna benzer olarak optik, elektronik, manyetik ve kimyasal davranışlar da klasik olarak değil kuantum olarak tanımlanmaktadır (Nanoteknoloji Strateji Grubu 2004).

Kimyasal ve fiziksel özellikler, yapının büyüklüğü ile atom yapısının ayrıntılarına, dışarıdan sisteme bağlanmış olan yabancı bir atomun cinsine ve yerine göre farklı ve olağanüstü davranışlar göstermektedir. Örneğin; mevcut nano yapıya yabancı bir atomun tutunması, elektronik özellikleri fark edilebilir şekilde değiştirmekte ve bu yabancı atom, geçiş elementi olduğu zaman tutunduğu nano yapıya manyetik özellikler kazandırabilmektedir. Kısacası, bir nano yapının fiziksel özellikleri ile bağ yapısı ve mukavemeti, o yapının büyüklüğüne ve boyutuna bağlı olarak önemli değişiklikler gösterebilmektedir (Açık ve Güven 2012).

Nanoteknolojinin Önemli Özellikleri:

- **Nanoteknoloji olanakların teknolojisidir.** Önce uygulanabilirliği olmayan yeni ürünlerin oluşturulmasına ve proseslerin geliştirilmesine imkan sağlamaktadır.
- **Nanoteknoloji geleneksel olanı bozar.** Yeni üretim amaçlı proseslerinin kullanımı ve daha yüksek standartlarda ürün eldesi nanoteknolojinin geleneksel teknolojilerin yerini almasına sebep olmaktadır.

- **Nanoteknoloji disiplinlidir.** Birçok farklı bilimsel alanın bir arada çalışmasını gerektiren nanoteknoloji, çeşitli teknolojik ve bilimsel disiplinlerden oluşmaktadır. Nano yapıya sahip malzemeler, nanoelektronik, nanobiyoteknoloji ve nanoanalitik örnek olarak verilebilir.

- **Nanoteknoloji evrenseldir.** Gelişmiş ülkeler bu alandaki araştırma ve çalışmaları desteklemek için kaynak ayırmaktadırlar. Dünya çapındaki girişimciler ise büyük şirketler aracılığıyla nanoteknolojiye yatırım yapmaktadır.

Nanoteknolojinin Amaçları:

- Nano boyutlu yapıların analizi ve fiziksel özelliklerinin anlaşılması
- Daha dayanıklı ve daha hafif yapıların oluşturulması
- Daha az malzeme kullanımı ve enerji sarfiyatı
- Nanometre boyuta sahip yapıların imalatı
- Nano ölçekli ve nano hassasiyete sahip cihazların geliştirilmesi
- Üstün malzeme özellikleri ile üretim süreçlerinin elde edilmesi
- Nanoskopik ve makroskopik dünya arasındaki bağın kurulması

Nanoteknolojiye karşı olan ilginin günden güne artmasının üç temel sebebi mevcuttur. Bunlar:

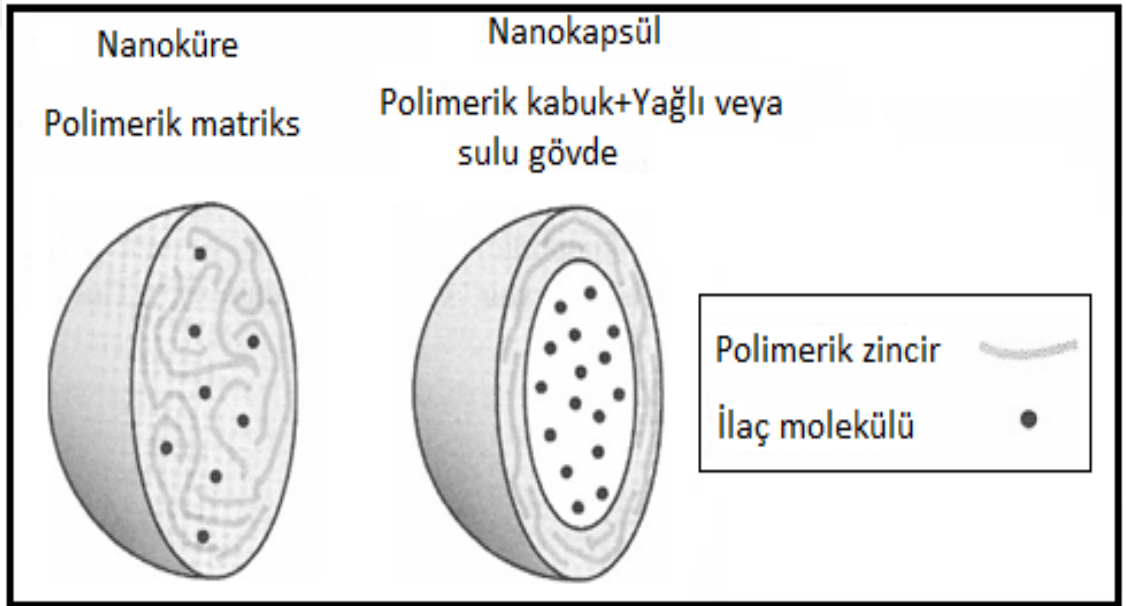
- Nanoteknolojik araştırma ve çalışmaların maddenin temel bilgisindeki eksiklikleri tamamlama potansiyeli vardır
 - Nanoteknoloji yeni uygulamaları da beraberinde getirecektir
 - Endüstriyel prototiplendirme başlamış olup, ticari boyut kazanmaktadır (Açık ve Güven 2012).

Nanoteknoloji ile birlikte ürünler, iletkenlik, yüksek derecede dayanıklılık, korozyon koruması, su ve kir tutmama, çizik direnci gibi yeni işlevler ve özellikler kazanmaktadır. Bundan dolayı son dönemlerde elektronik, kozmetik, gıda, spor malzemeleri ve ilaç endüstrisi gibi alanlarda kullanımı yaygınlaşmıştır (Çağlar ve Saral 2014).

Partikül büyüklükleri 10-1000 nm arasında farklılık gösteren, çözünmüş, hapsedilmiş veya adsorbe halde bulunan etkin maddeyi açığa çıkaran, doğal veya sentetik yapıya sahip polimerlerle hazırlanan katı kolloidal polimerik partiküller

sistemlere “nanopartiküller” denilmektedir (Erdoğan ve Özkan 2013). Nanopartikülleri büyük materyallerden ayıran yalnızca boyutları değildir. Kimyasal reaktiviteleri, enerji emilimleri ve biyolojik mobiliteleri açısından da büyük materyallerden farklı bir yapı gösterirler (Turgut ve ark. 2011).

Nanopartiküller, nanoküreler ve nanokapsüller şeklinde iki formu kapsarlar. Nanoküreler matriks sistemler olup, etken maddeler veya işaretleyiciler yüzeylere adsorbe ettirilebilmekte, partikül içerisinde tutulabilmekte veya çözülebilmektedir. Nanokapsüller ise, polimerik bir membran ile içte sıkı bir nukleustan oluşmuştur. Bu durumda etken madde genellikle içteki bölümde çözülmekte olup, yüzeye de adsorbe ettirilebilmektedir (Koç ve Baydan 2003).



Şekil 2.14. Nanoküre ve nanokapsül yapısının şematik gösterimi

Nanoteknolojide kullanılmakta olan nanopartiküller; “American Society for Testing and Materials (ASTM)”ın tanımlamasına göre partikül boyutları iki veya üç boyutlu olarak 1-100 nm uzunluğa sahip parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Farklı özelliklere göre sınıflandırmalar bulunmakla birlikte nanopartiküller basit olarak şu şekilde sınıflandırılabilir;

- Karbon nanopartiküller (fullerenes, çok duvarlı karbon nanotüpler vb.)
- Metal nanopartiküller (altın kolloidler, nanokabuklar, nanoçubuklar, süperparamagnetik demiroksit nanopartiküller vb.)
- Yarı iletken nanopartiküller (kuantum noktaları vb.) (Berk ve Akkurt 2012).

Metaller, yarı iletkenler, seramik, organik moleküler topluluklar, polimerik veya kompozit gibi farklı malzemelerden oluşabilen nanomateryallerin; bilişim ve iletişim, elektronik, biyoteknoloji, biyomedikal, tıp, kozmetik, tekstil, gıda, enerji, çevre, makine ve inşaat endüstrileri gibi geniş alanlardaki kullanımı her geçen yıl artmış olup, insan hayatının vazgeçilmezi haline gelmiştir (Atlı-Şekeroğlu 2013).

Nanoteknolojinin tıp bilimindeki kullanım alanı “nanotıp” olarak isimlendirilmektedir (Atlı-Şekeroğlu 2013). Tıp alanında nanoteknoloji ve nanopartiküller; analizleri daha duyarlı hale getirmek amacıyla biyomarkır tabanlı proteomik ve genomik teknolojilerde, manyetik rezonans, ultrason, floresan, nükleer ve bilgisayarlı tomografi gibi çeşitli radyolojik alanlarda moleküler görüntüleme amacıyla, ilaç geliştirme sistemleri, tanı ve hedefe yönelik tedavi ile aşı geliştirilmesi gibi çeşitli amaçlarla kullanılmaktadır (Berk ve Akkurt 2012). Bu yaygın ve yararlı kullanım özelliklerinin dışında molekül özellikleri sebebiyle solunum sistemi, kan, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem, bağışıklık sistemi ve cilt üzerindeki muhtemel toksik etkileri de araştırmalara konu olmuştur (Berk ve Akkurt 2012; Çağlar ve Saral 2014). Örneğin; elektriksel, mekanik ve termal özellikleri sebebiyle elektronik, bilgisayar ve havacılık endüstrisinde yaygın bir şekilde kullanılan karbon nanotüplerin, işlenmemiş halde çok hafif oldukları için havada asılı halde kalarak akciğerlere ulaşma potansiyeli taşıdığı belirlenmiştir (Berk ve Akkurt 2012).

Aralarında çinkonun (Zn) da yer aldığı metal nanopartiküller, kolaylıkla sentez edilebilmeleri ve kimyasal açıdan kolayca modifiye edilebilmeleri sebebiyle tüketim ve endüstriyel ürünlerde, makine endüstrisinde, askeri uygulamalarda ve özellikle tıpta geniş ölçüde kullanılmaktadır. Kristal yapıları ve güçlü metalik bağlar oluşturmaları sebebiyle üstün mekanik özellikler gösteren metal nanopartiküller ve alaşımları, iskelet-kas sistemimizin mekanik koşullarına en iyi uyum gösteren malzemelerin başında yer almaktadırlar (Atlı-Şekeroğlu 2013).

Yapılan çalışmalar sonucunda metal ve metaloksit nanopartikülleri, büyüklüklerine, şekillerine, yüzey bileşenlerine ve yüzeydeki atomik düzenlenmelerine göre üstün elektronik, manyetik, optik, kimyasal ve katalitik özellikler gösterirler (Arığ 2010).

2.5.1. Çinko Oksit (ZnO) Nanopartikülleri

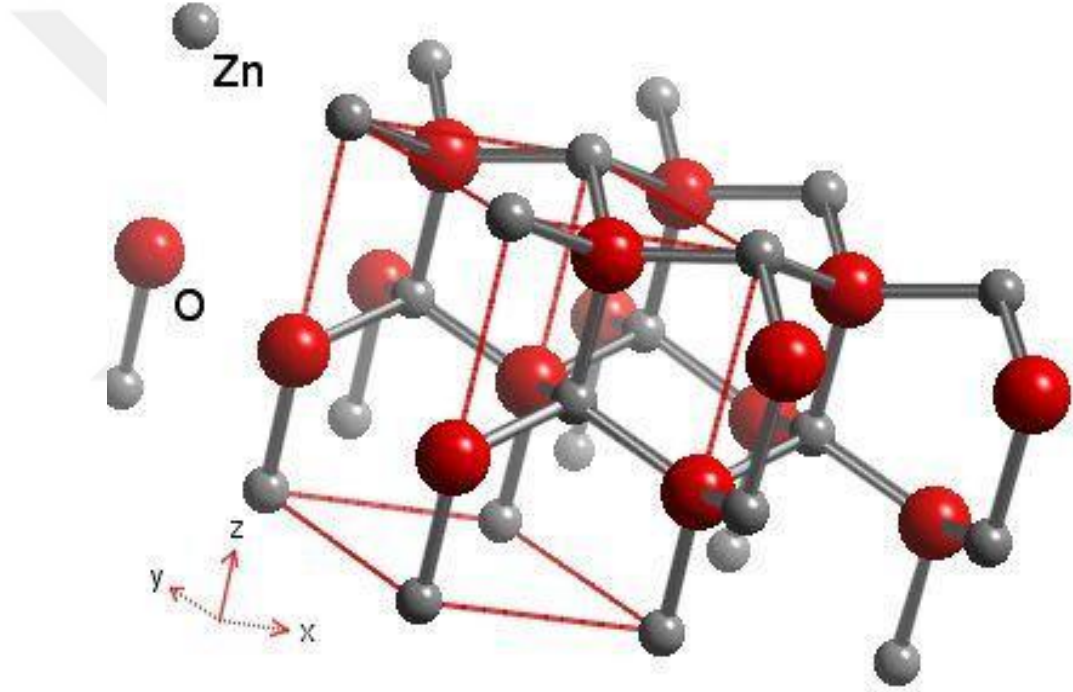
Mavimsi açık gri renkte ve kırılğan bir metal olan çinko (Zn), periyodik tablonun geçiş elementleri grubunda yer alır. Düşük kaynama sıcaklığı ile dikkat çeken Zn, yer kabuğunda en fazla bulunan elementler arasında 23. sırada yer almaktadır. Toz halde çok etkili bir redükleyici olan Zn, bileşiklerde +2 değerlikli olarak bulunur ve oluşturduğu bileşiklerle kovalent bağ yapar. (Gültekin 2013).

Çinko oksit (ZnO) çok amaçlı inorganik bir malzeme (Arığ 2010) olup, ZnO nanopartikülleri boya, pigment, metalurji katkı maddeleri, kauçuk, alaşımlar, seramik, kimyasal lifler, elektronik, katalizör, tıbbi tanı, kozmetik, kişisel bakım gibi çeşitli endüstriyel alanlarda en yaygın kullanılan malzemelerden biridir (Baek ve ark. 2012). ZnO, antimikrobiyal özellikleri sayesinde multivitaminler gibi besin takviyesi olarak da kullanılmaktadır (Cho ve ark. 2013). ZnO nanopartikülleri aynı zamanda UV dalga boyu aralığındaki soğurma özelliklerinden dolayı güneş kremleri ve kozmetik ürünlerinde de kullanılmaktadır (Manzo ve ark. 2013).

ZnO nanopartikülleri, yüksek geçirgenlik, piezoelektrik özellik, yarı iletkenlikte geniş bant aralığı, oda sıcaklığında ferromanyetizma, kimyasal duyarlılık özellikleri ile özel yüzey, hacim ve kuantum boyut etkisine sahip olmaları nedeniyle son yıllarda fazlaca dikkat çekmeye başlamıştır (Shao ve ark. 2006; Mende ve Driscoll 2007). Fotokatalitik özelliğe sahip olan ZnO nanopartikülleri, güneş ışığı altında organik kirliliği ayrıştırabilir (Arığ 2010) ve katalizörlerin, sensörlerin, piezoelektrik güç dönüştürücülerin, geçirgen iletkenlerin ve yüzey dalga araçlarının üretiminde büyük rol oynamaktadır (Castaneda 2009).

ZnO nanopartiküllerinin üstün özelliklere ve geniş kullanım alanlarına sahip olması, sol-jel metodu, mikroemülsiyon sentezi, mekanokimyasal proses, sprey pirolizi ve kurutma, organik başlangıç çözeltilisinin termal dekompozisyonu, RF plazma sentezi, süperkritik akışkan prosesi, hidrotermal proses, buhar taşınım prosesi, sono-kimyasal ve mikrodalgayla sentez yöntemleri gibi çeşitli üretim yöntemlerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Kullanılacak yöntemin düşük maliyetli olması, devamlı olması ve yüksek üretim oranına sahip olması üretim yönteminin seçimindeki en önemli kriterlerdir (Arığ 2010).

Geleceğin malzemesi olarak kabul edilen ZnO, oda sıcaklığında 3,4 eV geniş iletim bant aralığı ile 60 meV gibi büyük bir bağlanma enerjisine ve 0,4-2 μ optik dalga boyu aralığında yüksek geçirgenliğe sahip bir malzemedir. Kendinden daha büyük iletim bant aralığına sahip bileşikler bulunsada ZnO, sahip olduğu bağlanma derecesi, optik pompalama için düşük eşik değerine sahip olması, radyasyon direnci ve biyo-uyumluluk gibi özellikleri sayesinde birçok aygıt yapımı için ideal bir adaydır (Jagadish ve Pearton 2006; Singh ve ark. 2007; Arığ 2010). Hekzagonal kristal yapıya sahip olan ZnO (Bknz. Şekil 15), yaklaşık 1975 °C erime noktasına, 81.400 g/mol atom ağırlığına, 5600 g/cm³ yoğunluğa ve 40,3 J/mol K ısı kapasitesine sahiptir (Arığ 2010).



Şekil 2.15. Hekzagonal çinko oksit yapısı

ZnO nanopartiküllerinin sanayi alanında geniş bir şekilde uygulanması ile birlikte, insan vücudunun kasıtlı veya kasıtsız olarak ağızdan teneffüs etme, damar içine enjeksiyon, dermal penetrasyon da dahil olmak üzere birkaç olası yollar aracılığı ile nanopartiküllere maruz kalması mümkün olabilmektedir. Bunlar arasında, gastrointestinal sistem tarafından nanopartiküllerin alımı en önemli yollardan birisidir. ZnO genellikle düşük bir toksisiteli bir malzeme olarak kabul edilmektedir. Çünkü çinko insan vücudunda temel bir eser elementtir ve gıdalarda geniş kapsamlı olarak bulunmakla birlikte besin takviyesi olarak da ilave

edilmektedir. Bu nedenle çinko nanopartiküllerin toksisite değerlendirmesi çok az ilgi çekmektedir (Baek ve ark. 2012). Çinko oksitin non toksik olduğu geleneksel kavram üzerine çok yaygın olarak kullanılmaya başlamış fakat ZnO nanopartikülleri hakkındaki toksikolojik çalışmalar onların uygulama hızının gerisinde kalmıştır (Roy ve ark. 2014).

Yapılan çalışmalarda memeli hücrelerinde ZnO'in genotoksitesinden ve etkilerinden bahseden çalışmalar mevcutken (Sharma ve ark. 2009; a-Hackenberg ve ark. 2011; b-Hackenberg ve ark. 2011; Demir ve ark. 2014), in vivo ve in vitro test sistemlerinde genotoksisite oluşturmadığını belirten çalışmalarda mevcuttur (Kwon ve ark. 2014). İn vitro ortamda insan hücrelerinde ZnO nanopartiküllerin ROS'u tetikleyerek apoptozise aracılık ettiği belirtilmiştir (Akhtar ve ark. 2012; Roy ve ark. 2014).

2.6. OKSİDATİF STRES

Oksidatif stres; biyolojik sistemlerdeki prooksidanlar ile antioksidanlar arasındaki dengenin antioksidanların aleyhine olacak şekilde bozulması durumudur (Valko ve ark. 2007). Yani oksijen ve oksijen kaynaklı oksidanların, ROS'ni arttırmasıyla başlayan bir durum olarak tanımlanabilir. ROS, kanser, romatizmal hastalıklar, yaşlanma, toksin maruziyeti, fiziksel hasar, enfeksiyon ve inflamasyon gibi birçok hastalıkta karşımıza çıkmaktadır. Çoğu hücrenin antioksidan savunma mekanizmaları oksidatif stres altında bozulmaktadır. Hem ROS üretiminin artımı, hem de hücrel antioksidan kapasitenin azalması oksidatif stresin gelişimine neden olur (Tunç 2006). Hücreler hafif derecedeki oksidatif stresi kendi başlarına tolere edebilseler de genelde antioksidan sistemlerini aktif hale getirirler. Hücre içi savunma sistemlerinin yetersiz kaldığı durumlarda ise ROS ile antioksidanlar arasındaki denge bozulur ve bunun sonucunda da oksidan hasarına duyarlı olan DNA, protein, karbonhidratlar ve yağlar gibi hücrel makromoleküller zarar görür (Romero ve ark. 1998; Halliwell ve Whiteman 2004; Atal 2014).

Oksidatif stres öncelikli olarak lipit peroksidasyonuna sebep olurken; lipit peroksidasyonu ise ROS tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu içeren kimyasal olaydır. Bu olay, organizmadaki kuvvetli oksitleyici radikalın membran yapısındaki doymamış yağ asidi zincirinin α -

metilen gruplarında bulunan hidrojen atomunu uzaklaştırmasıyla başlar ve böylece lipit radikali ve daha sonrasında da dien konjugatlar oluşmuş olur. Oksijen ilavesi sonucunda oluşan yüksek reaktiviteye sahip peroksil radikali, diğer yağ asitlerine saldırması sonucunda lipit hidroperoksiti (LOOH) oluşturur. Böylece lipit peroksidasyonu yayılmış olur.

Lipit peroksidasyonu sonucunda alkanlar, malondialdehid (MDA) ve isoprostanlar gibi yeni bileşikler oluşur. Lipit peroksidasyonunun göstergesi olan bu bileşiklerin, nörodejeneratif hastalıklar, iskemik reperfüzyon hasarlanması ve diyabetle ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ohkawa ve ark. 1979; Southorn ve Powis 1988; Sinclair ve ark. 1990; Lovell ve ark. 1995; Girotti 1998; Atal 2014).

2.6.1. Serbest Radikaller

Fizyolojik şartlar altında insan vücudunda oluşan serbest oksijen radikalleri (ROS) ile antioksidan savunma sistemi bir denge halindedir. Canlı bireylerdeki serbest radikallerin esas kaynağı oksijendir ve ROS, normal hücre metabolizması sırasında ortaya çıkan yan ürünlerdir. Bu ürünlerin başlıca hedef molekülleri çoklu doymamış yağ asitleri, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerdir. Yoğun ROS üretimi veya antioksidanların azalması, biyomoleküllerde yapısal ve fonksiyonel değişimlere neden olarak oksidatif strese yol açar (Kara 2010; Atal 2014).

ROS yüksek reaktif okside edici ajanlar olup, elektron paylaşabilmek ve diğer moleküllerle hızlı reaksiyona girebilmek için dış yörüngesinde tek ve paylaşılmamış elektron taşıyan moleküllerdir. Bu moleküller elektron transferi, enerji üretimi ve diğer metabolik fonksiyonların temelini oluştururlar. Paylaşılmamış olan elektron molekülü stabilitesini bozarak proteinler, karbonhidratlar, yağlar ve inorganik maddelerle tepkimeye girer ve bunun sonucu olarak da enerjinin açığa çıkmasını sağlar (Tunç 2006; Atal 2014; Sayılmaz 2015).

ROS, tek bir elektronunu başka bir moleküle verebilenler (radikaller) ve elektron eksikliği yokken başka moleküller ile radikallerden daha zayıf bir şekilde birleşebilenler (non-radikaller) şeklinde iki gruba ayrılmaktadırlar (Atal 2014).

Radikaller	Non- radikaller
Süperoksit, O_2^-	Hidrojen peroksit, H_2O_2
Hidroksil, OH^\cdot	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksil, RO_2	Ozon, O_3
Alkoksil, RO	Singlet oksijen, O^1
Hidroperoksit, HO_2	Peroksinitrit, $ONOO^-$
Nitrik oksit, NO	Hidroperoksid, $L(R)OOH$

Şekil 2.16. Radikal ve non-radikal reaktif oksijen türleri

Serbest radikaller, hücrenel veya biyolojik kaynaklı olarak oluşabilmektedir. Radikallerin oluşumunu sağlayan biyolojik kaynaklar; radyasyon, virüsler, UV ışınları, hava kirliliği oluşturan fosil kaynaklı yakıtların yanma sonucundaki ürünleri, sigara dumanı, çevresel kirlenmeler, pestisitler, aktive olmuş fagositler, antineoplastik ilaçlar, enfeksiyon, stres ve lipid metabolizması sonucu ortaya çıkan ürünler gibi hücre metabolizmasının toksik ürünleridir.

Radikallerin oluşumunu sağlayan hücrenel kaynaklar ise mitokondriyal elektron transport sistemi, oksidatif stres durumları (iskemi ve reperfüzyon hasarı, travma, intoksikasyon), peroksizomlardaki enzimler, enzimler ve proteinler; triptofan dioksijenaz, ksantin oksidaz, hemoglobin vb. küçük moleküllerin otooksidasyonu sonucu oluşan tioller, katekolaminler, hidrokinonlar, flavinler, tetrahidroproteinler, antibiotikler ve fagositik hücrelerin aktivasyonu ile meydana gelen solunumsal patlamalarıdır (Atal 2014; Sayılmaz 2015).

Serbest radikaller, stabilize olabilmek için proteinler, karbonhidratlar, yağlar ve inorganik maddeler ile tepkimeye girerler. Radikaller, tepkimeye girdiği hücrenin DNA ve RNA ile enzimatik aktivitelerini etkileyerek hücre hasarı oluştururlar ve oluşturdukları bu etkiler, toksik, mutajenik ve karsinojenik olabilmektedir (Nordberg ve Arner 2001).

ROS, süperoksit anyon, hidrojen peroksit, peroksil radikaller ve reaktif hidroksil radikalleri içerirler. Bu radikallerden çoğu üreme biyolojisinde önemli rol oynamaktadır. Bunlara ilaveten, üreme ve sperm fonksiyonları üzerinde etkili olan nitrik oksit (NO) ve peroksinitrit anyonu gibi nitrojen kökenli serbest radikaller de bulunmaktadır. ROS'dan nitrik oksitin erkek üreme sistemi üzerindeki birçok

fonksiyonun kontrolünde düzenleyici görevi olduğu da gösterilmiştir (Tunç 2006). Endojen L-arjininden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenen ve hem hücre içi hem de hücre dışında düzenleyici rol üstlenen NO, yarılanma ömrü kısa olan (2-5 saniye), suda ve yağda çözünebilen serbest bir radikaldir (Lowenstein ve ark. 1994; Tunç 2006).

Çok yönlü biyolojik bir haberci olan NO, nörotransmisyon, penil ereksiyon, düz kas hücrelerinin proliferasyonu, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, immün sistemin düzenlenmesi gibi birçok farklı biyolojik etkilere sahiptir. Paylaşılmamış elektronunu üzerinde bulundurmaması nedeniyle de hızlı bir şekilde diffüze olur ve stabilitesini arttırır (Radomski ve ark. 1987; Garg ve Hassid 1989).

2.6.2. Antioksidanlar

Serbest radikaller tarafından oluşturulan hasarı önleyen, oluşan ürünlerin seviyelerini kontrol eden ve serbest radikalleri yakalayarak stabilize eden sistemlere antioksidan sistemi (Sayılmaz 2015), okside olan substrata göre ortamda daha az derişimde bulunan ve substratın oksidasyonunu belirgin halde geciktiren veya engelleyen maddelere de antioksidan adı verilir (Young ve Woodside 2001).

Antioksidanlar, serbest radikallere saldıran elektron göndererek radikalleri etkisiz hale getirirler. Serbest radikallerden ve lipit peroksidasyonunun etkilerinden antioksidan sistemler sayesinde korunmak mümkün olup, lipit peroksidasyonu engellemelerini dışında antioksidanların proteinleri, karbonhidratları ve nükleik asitleri koruma gibi görevleri vardır (Halliwell 1995; Atal 2014).

Oksidatif hasarı önleyen, sınırlayan ya da kısmen tamir eden antioksidanlar içinden düşük molekül ağırlığına sahip olanlar, güvenli bir şekilde serbest radikallerle etkileşerek hayati moleküllerin hasara uğramasından önce zincir reaksiyonlarını durdururlar (Beckman ve Ames 1998; Shi ve ark. 1999).

Vücudumuz, oksidatif stres sonucunda doğabilecek hasarları önleyebilmek için antioksidan vitaminler, antioksidan enzimler, glutatyon (GSH) ve sülfidrillerden meydana gelen antioksidan savunma sistemi ile donatılmıştır (Gutteridge 1995). Bu sistemler, enzimatik olan ve enzimatik olmayan (non-enzimatik) olmak üzere ikiye ayrılırlar:

1) Enzimatik Antioksidanlar: Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), selenyum bağımlı olan glutatyon peroksidaz (GPX), glutatyon-S-transferaz (GST) ve glutatyon redüktaz (GR).

2) Non-Enzimatik Antioksidanlar: E vitamini (α -tokoferol), C vitamini (askorbik asit), A vitamini, ürik asit, glukoz, piruvat, flavonoidler, GSH, sistein, albümin, bilirubin, melatonin, haptoglobulin, seruloplazmin, transferrin, laktoferrin, ferritin, oksipurinol, ubiquinon (koenzim Q10), mannitol, taurin, β -Karoten, lipoik asit ve hemopeksin (Halliwell ve Gutteridge 2000; Urso ve Clarkson 2003).

Enzimatik antioksidanlar genellikle hücre içinde, non-enzimatik antioksidanlar ise hücre dışında daha etkilidir (Cutler ve ark. 2005). Enzimatik antioksidanlar içerisinde yer alan SOD, süperoksitin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler (Bannister ve ark. 1987; Zelko ve ark. 2002) ve neredeyse bütün aerobik hücrelerde ve ekstrasellüler sıvılarda bulunmaktadır (Johnson ve Giulivi 2005). Bir diğer enzim olan ve yaşayan tüm organizmalarda bulunan katalaz ise, hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve moleküler oksijene parçalayarak biyolojik sistemleri H_2O_2 'nin zararlarına karşı korumaktadır (Gaetani ve ark. 1996; Chelikani ve ark. 2004). Glutatyon sistemleri içerisinde yer alan GPX ise H_2O_2 ile organik peroksidin indirgenmesinde rol oynar (Deaton ve Marlin 2003).

Non-enzimatik gruplar içerisinde yer alan C vitamini, suda çözünebilen monosakkarit bir antioksidandır ve insanlarda sentez edilmediği için dışarıdan diyetle alınması gerekir (Smirnoff 2001). Güçlü bir indirgeyici olan C vitamini H_2O_2 'i nötralize edebilir (Padayatty ve ark. 2003) ve bitkilerde stres mekanizması olarak görev yapar (Shigeoka ve ark. 2002). Antioksidan özelliğe sahip olan ve yağda çözünebilen E vitamini ise dağılımı ve biyolojik aktivitesi en fazla olan vitamin olup, membranı lipid peroksidasyonuna karşı korumaktadır (Brigelius-Flohe ve Traber 1999; Herrera ve Barbas 2001; Traber ve Atkinson 2007). Bir başka antioksidan olan ve aerobik yaşamdaki her canlıda bulunan GSH ise, hücrelerden aminoasit senteziyle üretilmekte olup, antioksidan özelliğini tiyol grubundan almaktadır. GSH, ortamda bulunan hidroksil ve singlet oksijen gibi ROS'ni temizler ve aynı zamanda da serbest radikaller ve peroksidler ile reaksiyona girerek hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur (Sayılmaz 2015). Hücre membranlarından ve kan-beyin bariyerinden kolaylıkla

geçebilen ve güçlü bir antioksidan olan melatonin ise hücrelerdeki çeşitli ROS'nin temizlenmesini sağlamaktadır (Reiter ve ark. 1997).

Aktioksidanlar yapmış oldukları etkileri başlıca şu şekilde gösterirler;

- ROS ve RNS'lerin başlatıcıları olan zincir başlatıcı katalizörlerin yakalanarak uzaklaştırılması yoluyla serbest radikallerin oluşumunun önlenmesi
- Birincil antioksidanların (GPX, GST, peroksidaz) serbest radikal sistemine elektron sunmasıyla oluşan radikalleri kendisine bağlayarak etkisiz hale getirmesine dayanan zincir kırıcı etkisi
 - Katalik metal iyonlarının ortamdaki uzaklaştırılması
 - O_2^- ve H_2O_2 gibi serbest oksijen radikallerinin ortamdaki uzaklaştırılması (Gutteridge 1995; Sayılmaz 2015).

Antioksidanlar oluşan oksidanları dört farklı mekanizma sayesinde etkisiz hale getirirler. Bu mekanizmalar ise şunlardır:

Scavenging (temizleme) etkisi: Enzimlerin, ROS'ni etkileyerek onları tutmaya ve daha zayıf bir moleküle çevirme durumu

Quencher (baskılama) etkisi: Vitaminler ve flavonoidler tarafından oksidanlara bir hidrojen aktarılarak yapılan etkisiz hale getirme durumu

Onarma etkisi: Oksidatif hasar görmüş biyomoleküllerin onarılması durumu

Zincir koparma Etkisi: Hemoglobin, seruloplazmin ve E vitamini tarafından yapılan ve oksidanlar ile zincirleme reaksiyonu başlatacak maddeleri kendine bağlayıp, reaksiyon zincirini kırarak fonksiyonları engelleme durumu (Onat ve ark. 2002; Taysi ve ark. 2002; Cherubini ve ark. 2005; Sayılmaz 2015).

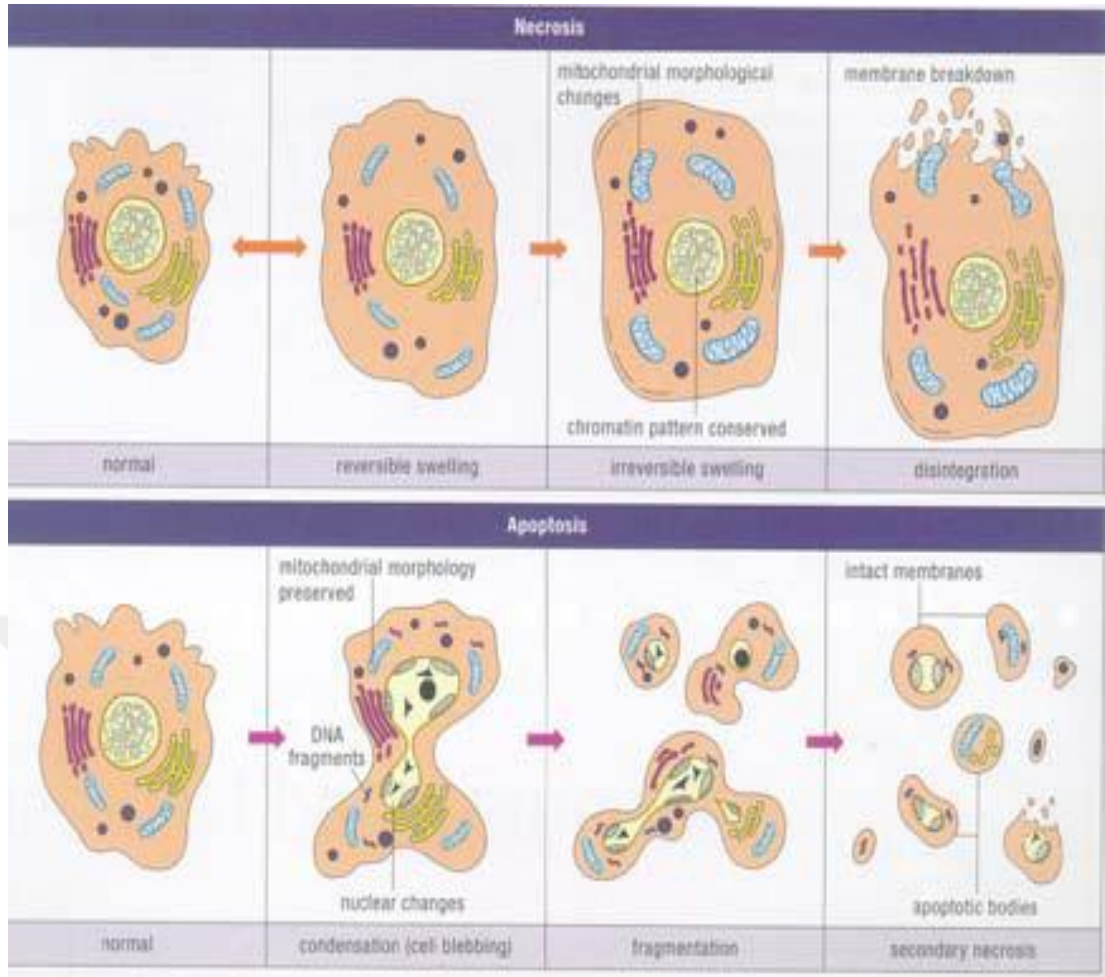
2.7. APOPTOZİS

Çok hücreli organizmalarda hücre bölünmesi sonucunda artan hücre sayıları hücre ölümleri ile dengelenmektedir. Bir organizmadaki hücreye gereksinim duyulmadığı zaman hücre içi haberci sistemleri aktive edilerek o hücrenin intihar süreci başlatılır. Bu intihar süreci Yunanca'da yaprak dökümü anlamında kullanılan apoptoz veya programlı hücre ölümü şeklinde gerçekleşmektedir. Hücre ölümleri

fizyolojik koşullar altında gerçekleştiği için bu ölüm şekline fizyolojik hücre ölümü de denilmektedir (Güleş ve Eren 2008).

Apoptozis terimi ilk olarak 1972 yılında İskoçyalı araştırmacılar olan Kerr, Wyllie ve Currie adındaki patoloğlar tarafından kullanılmıştır. Bu araştırmacılar, elektron mikroskopik çalışmalar ile apoptozisin, patolojik ve programsız ölüm olan nekrozdan tamamen farklı olduğunu göstermişlerdir (Öztürk 2002; Güçlü 2004). Kerr ve ark. (1972), fizyolojik şekilde ölen hücrelerin nükleuslarında yoğunlaşmış kromatin parçaları gözlemlemiş ve organellerin iyi bir şekilde korunduklarını fark ederek bu olaya büzüşme nekrozu ismini vermişlerdir.

Apoptozisi daha iyi anlayabilmek için nekrozisten farkını bilmek gereklidir. Nekrozis, patolojik şartlarda gerçekleşen ve fizyolojik olmayan ölüm şekli olup, apoptozis ise hem fizyolojik hem de patolojik şartlarda gerçekleşen ölüm şeklidir. Nekroziste aşırı sıvı girişi sonucu olarak hücre şişerken, apoptoziste ise nekrozisin tersine hücre küçülmektedir. Nekroziste kromatin kitlesi normal hücredeki gibiyken, apoptoziste ise nükleus membranının etrafında toplanmış halde bulunur. Nekroziste hücre membranı bütünlüğünü kaybeder ve hücre içi materyaller dışarı çıkarken, apoptoziste ise hücre membranında küçük kesecikler oluşmaktadır. Nekroziste membran bütünlüğü bozulduğu için inflamasyon oluşurken, apoptoziste ise komşu hücreler ya da makrofajlar tarafından fagosite edildiği için inflamasyon oluşmaz. Nekrotik hücreler lizise uğrarken, apoptotik hücreler ise “apoptotik bodies” adı verilen membranla kaplı küçük parçalara ayrılır. Nekroziste ATP’ye ihtiyaç yokken, apoptoziste ATP’ye ihtiyaç duyulur (Ulukaya 2003; Güçlü 2004).



Şekil 2.17. Nekrozis ve apoptozisin şematik gösterimi

Apoptozis, nekrozisin tersine genetik olarak kontrol edilen, iyi bir şekilde organize olmuş dokularda hücre sayısını belirlemek için çok önemli olan özel bir hücre ölümü çeşididir. Apoptozis, çok hücreli organizmaların gelişim süreci ve doku devamlılığı, dokulardaki hücre popülasyonunun korunması ve yaşlanma gibi hemostatik bir mekanizmanın sağlanması amacıyla fizyolojik olarak gerçekleşir. Bunun yanı sıra hücreler, hastalıklar veya zararlı ajanlar tarafından zarar gördüğü zaman veya immün reaksiyonlarda koruyucu mekanizma olarak ortaya çıkar (Güleş ve Eren 2008; Özdemir 2012).

Apoptozis, hücrenin yaşamı boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlamakla yükümlü olup, apoptotik hücreler organizmanın bazı doku ve hücrelerinde devamlı olarak oluşmaktadır ve bu oluşum hayat boyu devam etmektedir. Böylece hücrelerin doğru yer, zaman ve sayıda olmasını sağlayan ölüm (apoptoz) ile yeniden yapım (mitoz) doku homeostazisini sağlamak için dokularda dinamik bir denge halinde süregelmektedir (Cummings ve ark. 1997; Elmore 2007).

Apoptotik süreçte gözlemlenen aşamalar sırasıyla şu şekilde sıralanmaktadır;

- 1) Apoptozis'in başlatılması
- 2) Hücre içi proteazların (kaspazların) aktivasyonu
- 3) Hücrede meydana gelen çeşitli biyokimyasal ve morfolojik değişiklikler
- 4) Fagositoz

Apoptozis'in Başlatılması: Hücre içinden ve hücre dışından gelen ölüm sinyalleri, apoptotik sürecin başlamasında etkili olan uyarılardır. Bu uyarılara maruz kalan hücrelerde ilgili genetik mekanizma harekete geçerek apoptozisi başlatır. Metabolizma ve siklus bozuklukları, DNA hasarı, hiperkalsemi, hücre içi pH seviyesinin düşmesi gibi etkiler hücre içinden kaynaklanan sinyaller olup, hipoksi, ısı, radyasyon, anti-kanser ilaçlar ile UV ve gamma ışınları da hücre dışından kaynaklanan sinyallerdir. Dış kaynaklı sinyaller, DNA hasarı meydana getirerek apoptozise yol açmaktadır.

Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu: Hücre içinden veya hücre dışından gelen apoptotik sinyaller, hücre içerisinde bulunan ve kaspaz (caspase: cysteine containing aspartate specific proteases) adı verilen bir takım proteazları aktive ederler (Öztürk 2002). Şimdiye kadar tanımlanmış 14 adet kaspaz mevcut olup (Strasser ve ark 2000), bu kaspazlar başlatıcı kaspazlar ve efektör kaspazlar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Güçlü 2004). Ölüm reseptörleri adaptör proteinler aracılığı ile, iç sinyaller ise mitokondri aracılığı ile başlatıcı kaspazları aktive ederler (Öztürk 2002). Aktive olan başlatıcı kaspazlar, apoptotik uyarı ile başlayan ölüm sinyallerini efektör kaspazlara ileterek bu kaspazları aktif hale getirirler. Effektör kaspazlar ise ilgili proteinleri (nüklear membran proteini olan Laminin A ve DNA tamirinde görev alan poli polimeraz) parçalayarak apoptotik hücre metabolizmasının oluşmasını sağlamaktadır (Güçlü 2004). İlk olarak tanımlanan kaspaz ICE olarak bilinen prokaspaz 1'dir ve kaspaz 1 (ICE), kaspaz 2 (ICH, Need-2), kaspaz 3 (CPP32, apopain, Yama), kaspaz 4 (ICH-2, TX) ve kaspaz 5 önemli kaspaz gruplarındandır. Kaspaz inhibitör ailesi olan IAP (İnhibitör of Apoptosis), apoptozisi inhibe ederek apoptozis mekanizmasını durdurur. Bu inhibitörler, birçok kötü huylu hücre tarafından ekspresse edilmektedir (Güçlü 2004).

Hücrede Oluşan Biyokimyasal ve Morfolojik Değişiklikler: Apoptozis için sinyal alındıktan sonra hücrelerde birçok biyokimyasal ve morfolojik değişiklik gözlemlenmektedir. Hücre küçülmeye ve kondansemaya başlar, hücre iskeleti dağılır ve çekirdek zarı bölge bölge erir. Çekirdek DNA'sı parçalara ayrılır (Güleş ve Eren 2008). Apoptotik sürecin sonlarına doğru, kaspazlar DNA kırılmalarına yol açarlar. Aktin filamanlarının yıkımına bağlı olarak hücre normal şeklini kaybeder ve hücre membranının asimetrisi bozulur. Hücreler özelleşmiş yüzeysel yapılarını ve diğer hücrelerle olan temas yüzeylerini kaybederler. Su kaybederek küçülür ve büzüşürler. Hücre yüzeyinde kraterler oluşur. Kromatin çekirdek membranına yakın kısımlarda yoğunlaşarak, değişik şekil ve büyüklüklerde çöker. Elektron mikroskop ile bakıldığında kromatinin yoğun granüler yarım ay, hilal veya yüzük şeklinde çekirdek membranının iç yüzünde yerleştiği izlenir. Çekirdek de hücre gibi büzüşür. Bazen membranla sarılı olarak birkaç parçaya ayrılabilir. Apoptotik süreç ilerledikçe hücrelerde sitoplazmik çıkıntılar oluşur. Hücre daha sonra "apoptotik cisim" adı verilen membranla çevrili küçük parçalara bölünür. Bu parçaların içlerinde sitoplazma ve sıkıca paketlenmiş organeller bulunur. Bazılarında çekirdek parçaları da mevcuttur (Ayaşlıoğlu 2001; Öztürk 2002; Güçlü 2004; Güleş ve Eren 2008).

Fagositoz: Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve fagositler tarafından fagosite edilerek dokulardan temizlenir ve apoptozis sırasında inflamasyon oluşmaz (Öztürk 2002; Limandal 2013).

2.7.1. Apoptozis Mekanizmaları

2.7.1.1. Ölüm Reseptörleri Aracılı (Hücre Dışı Kaynaklı) Apoptozis

Hipoksi, hipertermi ve radyasyon gibi hücre dışı kaynaklı sinyaller, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerini aktive ederek apoptotik süreci başlatırlar. Apoptoziste görev alan membran reseptörleri içindeki en önemli grup TNFR (Tümör Nekrozis Faktör Reseptör) ailesidir. Bu hücre yüzey reseptörleri (Fas (APO-1, CD95), TNFR-1, DR3, DR4, DR5) membranda bulunur ve bu reseptörlerin sisteinden zengin hücre dışı alanları ve sitoplazmanın iç kısmında homolog ölüm bölgeleri (TRADD, FADD) bulunmaktadır (Güçlü 2004; Elmore 2007). Ölüm bölgeleri, ölüm reseptörlerine ligand bağlandığı zaman apoptotik mekanizmayı uyararak hücre dışından gelen uyarıları hücre içine iletirler (Ashkenazi ve Dixit 1998).

Hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaların başında sitokine bağlı dış apoptozis yolu gelmektedir ve apoptozisin dış yolu, TNFR ailesi hücre yüzey reseptörlerinin ligandlar yoluyla aktive edilmesi sonucunda uyarılmaktadır. TNF-alfa, TNF ile alakalı apoptozis uyarıcı ligandlar (TRAIL) ve Fas ligandları, bazı kötü huylu ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek hücre ölümüne neden olmaktadır (Elmore 2007). Ligandlar bağlandığı zaman 3 TNFR ya da Fas molekülü kompleks oluşturur. TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik kısımları sırasıyla TNFR'e bağlı ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD/Mort-1) adı verilen adaptör proteinlere bağlanır. Bu proteinlerin hem ölüm bölgelerine hem de proteazların ölüm oluşturan kısımlarına (DED) bağlanan bölgeleri mevcuttur. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları ile adaptör proteinler ve proteazlar ölümü başlatan sinyalleme kompleksini (DISC) oluştururlar (Brooks 2006).

Fas lenfoid hücrelerde, hepatositlerde, akciğerlerde ve bazı tümör hücrelerinde bulunmakta olup, ilgili ligandına da FasL adı verilmektedir. Fas reseptörü hücre dışı, membranöz ve hücre içi olmak üzere üç kısımdan oluşur ve bu ölüm reseptörü kendine has ligandı bağladığı zaman, reseptörün ölüm alanı apoptotik mekanizmayı uyarılmaktadır (Güçlü 2004).

2.7.1.2. Mitokondri Aracılı (Hücre İçi Kaynaklı) Apoptozis

DNA hasarı, pH'da düşme, hücre siklusu bozuklukları gibi hücre içi kaynaklı sinyallerle oluşan apoptoziste mitokondri önemli rol oynamaktadır. Sinyaller, dış mitokondri zarında geçirgenlik artışına neden olur ve mitokondri dış zarının geçirgenliğini bazı proteinler ayarlamaktadır. Bu proteinlerin en önemlisi Bcl-2 grubu proteinleridir. Bu proteinler, birbirlerine zıt etki gösteren iki gruptan oluşmaktadır. Bu gruplardan birisi apoptozisi indükleyici etkiye sahip olan proapoptotikler (Bax, Bad, Bcl-XS, Bak vb.), diğeri ise apoptozisi baskılayıcı etkiye sahip olan antiapoptotikler (Bcl-2, Bcl-XL vb.) dir. Apoptozis süreci içerisinde Bcl-2, Bax ve Bcl-X başlıca görev alan mitokondri molekülleridir (Öztürk 2002; Güçlü 2004; Gültekin 2013).

Mitokondri dış membranında bulunan ve iyon transportunu düzenleyen Bcl-2, Bax'ın mitokondrial membrana tutunmasını engelleyerek, mitokondrinin iki zarı

arasındaki sitokrom C'nin sitoplazmaya salınımını inhibe eder ve apoptozisi engeller. Olayın bu şekilde gerçekleşmediği durumlarda ise, sitoplazmada bulunan Bax apoptotik uyarının alınmasını takiben mitokondri membranına tutunur ve buradaki küçük porların oluşumunu indükleyerek sitokrom C ve AIF (Apoptozis İndükleyici Faktör)'ün mitokondriden sitozole çıkmasını sağlar. Bir hücrenin sitoplazmasında immünohistokimyasal olarak Bax proteinin gözlemlenmesi o hücrede apoptozis'in meydana geldiğinin göstergesidir (Gross ve ark 1999, Deveraux ve ark 2001; Güçlü 2004).

Apoptozisin yaygın yolu olan iç yol, hücrenin kendi içinden sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlar. Sitotoksik ajanlar ve oksidatif baskı gibi çeşitli hücre içi ve hücre dışı etkiler, mitokondrial yolu aktive ederler. Apoptotik sinyaller, mitokondriye ait iç ve dış membranlar arasındaki boşluktan sitoplazmaya doğru sitokrom C salınmasına neden olur. Sitokrom C kaspaz sistemini aktifleştirir ve sitoplazmaya alınan sitokrom C, burada APAF-1'e (Apoptotic Protease Activating Factor-1) tutunur. APAF-1'e prokaspaz-9 ve ATP eklenmesiyle birlikte sitoplazmada apoptozom adlı kompleks oluşur. Prokaspaz-9 daha sonra aktif olan kaspaz-9'a dönüşür ve bu da efektör kaspazlardan prokaspaz-3'ü aktifleyerek hücreyi apoptozise götürür (Grütter 2000; Öztürk 2002; Güçlü 2004).

2.7.1.3. P-53 Gen Aracılı Apoptozis

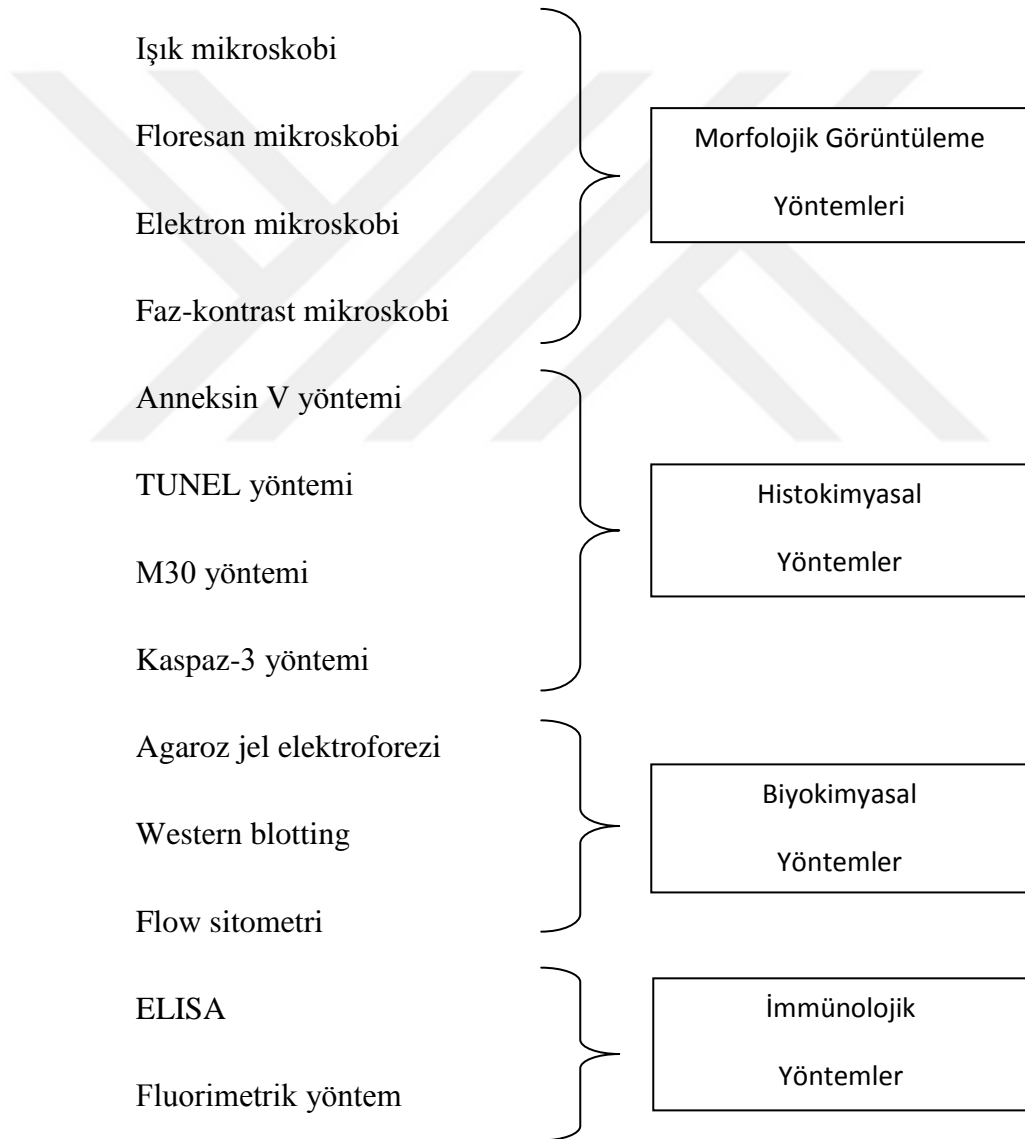
Hücrede iç veya dış sinyaller nedeniyle DNA hasarı oluştuğu zaman aktive olan bazı genler, hücrenin apoptozisine neden olabilir. Bu genler içerisinde en önemlisi p-53 geni olup, insan tümörlerinin %50'den fazlasında mutasyona uğradığı tespit edilen bu genin, kanser oluşumunu önlemede kritik rol oynadığı kabul edilmektedir. Normal zamanda inaktif halde bulunan p-53 geni, DNA hasarı oluştuğu zaman aktifleşerek p21 genini harekete geçirir. p-21 geni hücrenin geç G1 fazında kalmasını ve S fazına geçmesini engelleyerek hücre döngüsünde blokaj yapar. Böylece oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenmiş olur. p-53 geni aynı zamanda DNA tamiri yapan proteinlerin transkripsiyonunu da sağlamakta olup, bu proteinler DNA'daki hasarı tamir edebilirse, hücre döngüsündeki blokaj ortadan kalkar. DNA tamir edilemediği zaman ise p-53 geni yeniden harekete geçerek Bcl-2 gen ailesi üyelerinden proapoptotik olarak bilinen Bax proteinini aktive eder ve

hücreyi apoptozise götürerek DNA hasarlı hücrenin ortadan kaldırılmasını sağlar (Öztürk 2002; Güçlü 2004).

2.7.2. Apoptozisin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

Apoptozisin belirlenebilmesi için farklı yöntemler geliştirilmiş olup, morfolojik değerlendirmelerin yanında apoptozise özgü olan bazı aktivasyonların molekül düzeyinde de değerlendirilmesi gereklidir (Güçlü 2004).

Apoptozisin belirlenmesinde kullanılan yöntemler şu şekilde sıralanabilir; (Güçlü 2004; Güleş ve Eren 2008).



2.7.2.1. TUNEL Yöntemi

Apoptoziste ortaya çıkan DNA parçalanmasını gösteren yöntemlerden birisi olan TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transpherase (TdT)-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling) yöntemi, DNA kırıklarının in situ olarak tanınmasını sağlar. Apoptotik parçalanma sonucunda DNA parçaları, DNA polimeraz veya Klenow fragmenti kullanılarak işaretlenebilmektedir. Ancak terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak yapılan işaretleme, göreceli olmak kaydıyla daha duyarlı bir yöntem olarak bulunmuştur (Kanoh ve ark. 1999; Güçlü 2004; Güleş ve Eren 2008).

DNA dizi kırıkları, değişime uğramış olan nükleotidlerin 3'-OH uçlarının TdT kullanılarak enzimatik olarak işaretleme sonucunda tespit edilmektedir. TdT, tek veya çift sarmallı DNA'nın 3'-OH uçlarına eklenen nükleotid trifosfatları katalizler. Serbest halde bulunan nükleotidler, digoksinin konjugat eklenmesi sonucunda bir oligomer oluştururlar ve DNA parçaları, digoksinin nükleotid ile işaretleme Daha sonra ise digoksinin ile konjuge olan nükleotidlerin peroksidaz tepkimesi verebilen anti-digoksinin antikoru ile bağlanması sağlanır. Bağlanmış olan peroksidaz antikoru, immunohistokimya duyarlı görünüm sağlayan kromojenik substratlarla bağlanır ve lokalizasyon kromojenik substratlar (DAB) ile boyanarak görünür hale getirilirler (Wijsman ve ark. 1993; Collins ve ark. 1997; Torres ve ark. 1997; Deng ve ark. 2001).

TUNEL tekniği, özellikle apoptozisin erken dönemlerinin gösterilmesi açısından önemlidir (Torres ve ark. 1997). İn situ apoptoz tespit kiti, apoptozis ile ilişkili olan kromatin yoğunlaşmasını ve DNA parçalanmasını özgün olarak tespit ettiği için apoptozisi nekrozdan ayırmaktadır. Pozitif boyanma apoptozisin biyokimyasal ve morfolojik kanıtları ile doğrudan bağlantılıdır (Labat-Moleur ve ark. 1998). Konvansiyonel parafin kesitler, TdT ve nonizotopik işaretli nükleotidler kullanılarak yapılan in situ işaretleme sonrasında gerçekleştirilen floresan veya enzimatik görüntüleme, apoptotik hücreleri diğer hücrelerden ayırmada yeterli olmaktadır (Güleş ve Eren 2008).

2.7.3. Apoptozisin Testisler Üzerindeki Rolü

Doku canlılığı ve devamında, enfekte hücrelerin yok edilmesinde ve normal fizyolojik ortamın korunmasında etkili olan apoptozis, testiküler dokuda da sıkça karşılaşılan bir durumdur. Testislerdeki germ hücre dejenerasyonu, hem gelişim sırasında hem de erişkinlerde oldukça sık rastlanılan bir durum olup, bu dejenerasyon sırasında en çok kullanılan mekanizma ise apoptozistir.

Spermatogonyal kök hücrelerden hücre farklılaşması ile spermium oluşması durumu olan spermatogenezde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ek olarak germ hücre ölümleri de görülmektedir ve bu durum sperm oluşumunda kritik rol oynamaktadır (Sharpe 1994, Sinha-Hikim ve ark 1998).

Erken gelişimsel dönemde başlayan apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile destek hücreleri arasındaki sayısal oranı sağlamak için oluşturulmuş fizyolojik bir yanıttır (Sharpe 1994; Rodriguez ve ark. 1997; Sinha-Hikim ve ark. 1998; Beumer ve ark. 2000). Androjen eksikliğinde, azospermi veya oligospermi görülen hastalarda, deneysel kriptorşidizm meydana getiren hayvanlarda ve ısı artışının gözlemlendiği durumlarda testislerde gerçekleşen apoptoziste artış gözlemlenebilmektedir (Heiskanen ve ark. 1996; Ikeda ve ark. 1999).

Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisi hormonal kontrol altında yapılmakta olup, seminifer tübül epitelinin ısı, radyasyon ve soğutma gibi faktörlere karşı olan duyarlılığı da germ hücre apoptozisini arttıran bir diğer faktördür (Tapanainen ve ark. 1993; Blanco-Rodriguez ve Martinez-Garcia 1998). Sonuç olarak, testiküler fizyolojiyi bozan hücre dışı sinyallerin varlığında fizyolojik olmayan düzeyde apoptozis gerçekleşir ve klinik olarak spermatogenezde bozulma ve infertilite oluşabilmektedir (Korsmeyer 1995).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinde gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında incelenmiştir.

3.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

Çalışma için Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alındı (Karar No: 2014/058 ve 2016/015). Proje Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nce (BAP No: 151318003) desteklendi.

3.2. Deney Hayvanları

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinde ağırlıkları 250-30 gr arasında değişen 4 aylık 28 adet erkek Wistar Albino türü sıçan kullanılarak uygulandı. Ratlar standart diyet ile beslendiler. 22 ± 2 °C oda sıcaklığı, % 60 nem oranı, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ritim sağlandı. Kullanılan deney hayvanlarında seçim kriteri olarak literatürde yer alan rat modeli kullanılmasının yanında, temin etme olanakları da göz önünde bulunduruldu.

3.3. Çalışma Grupları

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezinden elde edilen ratlar, her grupta 7 erkek rat olacak şekilde 4 gruba ayrıldı.

1) Kontrol Grubu: 7 gün boyunca sıçanların günlük beslenmelerine devam etmeleri sağlandı.

2) Siklofosfamid (CP) Grubu: 7 gün boyunca günde bir kez 20 mg/kg olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulandı.

3) Çinko oksit (ZnO) Nanopartikül Grubu: 7 gün boyunca günde bir kez 300 mg/kg olacak şekilde oral olarak uygulandı.

4) Siklofosfamid (CP) + Çinko oksit (ZnO) Nanopartikül Grubu: 7 gün boyunca günde bir kez 20 mg/kg CP intraperitoneal olarak, uygulamadan hemen sonra ise 300 mg/kg ZnO nanopartikülü oral olarak uygulandı (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Deney hayvanlarına uygulanan tedavinin şekli, dozu ve süresi

Deney Grupları	Sıçan Sayısı	Tedavi	Uygulama Dozu	Süre
Grup I	7	Normal Beslenme	-	1 hafta
Grup II	7	CP	20 mg/kg/gün	1 hafta
Grup III	7	ZnO	300 mg/kg/gün	1 hafta
Grup IV	7	CP + ZnO	20 mg/kg/gün + 300 mg/kg/gün	1 hafta

İşlemler bir hafta boyunca her gün aynı saatte uygulandı ve hiçbir grupta deney hayvanı kaybı yaşanmadı. Deney sonunda ratlar, intraperitoneal olarak uygulanan 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi altındayken sakrifiye edildi.

3.4. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallardan siklofosfamid (CP) için, Eczacıbaşı-Baxter firmasının Endoxan® adlı ürünü kullanıldı. Kutu içerisinde 500 mg CP ile 25 ml çözücü ampul bulunmaktadır ve CP, kutu içerisindeki 25 ml izotonik NaCl çözücü ampul içerisinde çözdürülerek hazırlanmaktadır. Diğer bir kimyasal olan çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri için ise Nanografi isimli firmanın NG04SO3803 (ZnO 99 + %, 10-30 nm) kodlu ürünü kullanılmıştır. ZnO nanopartikülleri, 300 mg/ml olacak şekilde distile su içerisinde hazırlanmıştır. Karışım, oral uygulamadan önce Bandelin Sonopuls HD 2070 marka ultrasonik sonikatör eşliğinde karıştırılarak hayvanlara verilmiştir.



Şekil 3.1. Bandelin Sonoplus HD 2070 ultrasonik sonikatör

3.5. Vücut Ağırlıklarının Ölçülmesi

Çalışma başında ve çalışma sonunda ratların vücut ağırlıkları terazi ile tartılarak kaydedildi ve hayvanların göstermiş oldukları ağırlık değişimleri deney sonu vücut ağırlık farkı olarak isimlendirildi.

3.6. Testis Ağırlıklarının Ölçülmesi

Testis ağırlıkları, her sıçan için sağ ve sol testis olmak üzere hassas terazide tartılarak kaydedildikten sonra, sol testisler Bouin çözeltilisine alındı. Sağ testis doku homojenatları ile kan serumları ise oxidative stress markers (indirgenmiş Glutatyon, Catalase, TBARS) analizi için Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarına gönderildi.

3.7. Bouin Çözeltisinin Hazırlanması

Dokuların takibinde kullanılacak olan Bouin çözeltisi aşağıdaki oranlar baz alınarak hazırlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Bouin çözeltisi hazırlamak için gerekli olan maddeler ve miktarları

Maddeler	Miktarları
Toz pikrik asit (13 gr/lit)	1,95 gr
Formaldehit (% 40)	50 ml
Glasiyal asetik asit	10 ml
Distile su	150 ml

Çözeltiyi hazırlamak için ilk önce 1,95 gr (13 gr/lit) toz pikrik asit 150 ml distile su içerisinde tamamen çözdürülerek doymun hale getirildi. Doymuş olan pikrik asit çözeltisi üzerine önce 50 ml % 40'lık formaldehit, daha sonra ise elde edilen karışımın üzerine de 10 ml glasiyal asetik asit yavaşça ilave edilerek karıştırıldı ve böylece çözelti hazır hale getirildi.

3.8. Dokuların ve Kan Örneklerinin Alınması

Çalışmada kullanılan tüm deney hayvanları, çalışma sonunda ağırlıkları kaydedildikten sonra derin anestezi (Ketamin-Ksilazin) altındayken servikal dislokasyon ile öldürüldü ve hayvanların karın bölgeleri açılarak testisler çıkartıldı. Aynı zamanda hayvanların kalplerinden alınan kan örnekleri, antikoagülanlı steril tüplere aktararak etiketlendi. Örnekler daha sonra 3500 rpm'de 20 dk boyunca santrifüj edilerek serumların ayrılması sağlandı. Ayrılmış olan serumlar eppendorf tüplere alınarak çalışma zamanına kadar -80 °C'de saklandı.

3.9. Işık Mikroskobu İçin Dokuların Hazırlanması

Çıkarılmış olan testisler üzerine tespit sıvısı döküldükten sonra testislerin üzerine bistüri ile hafif birer kesik atıldı ve Bouin çözeltisi içerisinde 1 gün dokuların sertleşmesi için beklenildi. Sertleşmiş olan testis dokuları, enine olacak şekilde önce iki eşit parçaya, sonrasında ise bu bölünen parçalarda yeniden ikiye bölünerek eş parçalara ayrıldı. Dokular daha sonra etiketlenerek kasetlendi ve doku takibi

sürecinde alkol serilerinden geçirilerek (% 70, % 80, % 90, % 96) dehidrate edildi. Dehidre olan dokular daha sonra ksilen (Ksilol-I, Ksilol-II) ile şeffaflaştırılarak parafin içine alındı. Dokular parafinde belli bir süre bekletildikten sonra oda sıcaklığında gömülerek her hayvana ait parafin bloklar hazırlandı.

3.10. Kesitlerin Alınması ve Boyanması

Hazırlanmış olan parafin bloklardan MIKROM HM 325 markalı mikrotom sayesinde 3 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her bir lama 3 kesit gelecek şekilde dokular lam üzerine alındı ve etiketlendi. Kesitler, dokularda meydana gelen histolojik değişimleri gözlemek için Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyandı ve daha sonra üzerine entellan ilave edilerek lamel ile kapatıldı. Boyama protokolü Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Hematoksilen-Eozin (H-E) boyama protokolü

Kimyasal Madde	Uygulama Süresi
Ksilol-I	10-15 dk
Ksilol-II	10-15 dk
% 96 Alkol-I	5 dk
% 96 Alkol-II	5 dk
% 90 Alkol	5 dk
% 80 Alkol	5 dk
% 70 Alkol	5 dk
Distile Su	5 dk
Hematoksilen	1 dk
Çeşme Suyunda Yıkama	Suyun rengi açılana kadar
Eozin	5 dk
% 70 Alkol	2 dk
% 80 Alkol	2 dk

% 90 Alkol	2 dk
% 96 Alkol-I	2 dk
% 96 Alkol-II	2 dk
Ksilol-I	5-10 dk
Ksilol-II	5-10 dk
Lamların Kapatılması	

Hazırlanan preparatlar mikroskopta farklı büyütmelemlerde incelenerek germinal epitelin düzgün olup olmadığına, spermatogenik faaliyetlerin aşamalarına ve seminifer tübüllerin çaplarına bakıldı. Bu özellikler dikkate alınarak bir puanlama sistemi oluşturuldu ve bu puanlamada Johnsen skoru kullanıldı (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. Johnsen skorlaması (Johnsen 1970).

Skor 1	Seminifer tübüller içerisinde hücre yok
Skor 2	Tübüller içerisinde germ hücreleri yok, sadece destek hücreleri var
Skor 3	Mevcut olan germ hücreleri gonositlerdir
Skor 4	Spermatid ve spermatazoon hiç olmayıp, 5 taneden az spermatozoon mevcuttur
Skor 5	Spermatid ve spermatazoon yoktur fakat spermatozoon mevcuttur
Skor 6	Spermatazoon olmayıp, 10 taneden az sayıda spermatid mevcuttur
Skor 7	Çok sayıda spermatid mevcut olup, spermatazoon hiç yoktur.
Skor 8	Germinal epitel çok sıralı olup, lümeninde 10 taneden az sayıda spermatazoon mevcuttur
Skor 9	Disorganize görünümlü çok sıralı germinal epitel, epitel hücreleri spermatazoonlarla karışmış ve lümeninde obliterasyona neden olan hücre dökülmesi mevcut
Skor 10	Çok tabakalı germinal epitel, bol miktarda spermatazoon ve açık merkezi lümen içeren tübüller içerir

3.11. İmmünohistokimyasal Boyama

Hazırlanmış olan parafin bloklardan elde edilen 3 µm kalınlığındaki kesitler poly-Llysine kaplı lamalar üzerine alındı ve daha sonra Avidin-biyotin peroksidaz yöntemi (ABC metodu) ile immünohistokimyasal olarak boyandı. Boyama yaparken primer antikor olarak Bax monoklonal İmmünglobülin G (IgG) (Santa Cruz Biotechnology U.S.) ve Caspase-3 kullanıldı. Bax ve Caspase-3 boyama protokolü Tablo 3.5’de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Bax ve Caspase-3 Boyama Protokolü

İşlem	Süresi
Deparafinizasyon	1 saat
Distile su	5 dk
Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS) (pH:7,6)	5 dk
% 3’lük hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	20 dk
PBS’de yıkama ve temiz PBS’de bekletme	5 dk
Süper Blok (V-Blok)	8-10 dk
PBS	1-2 sn
Primer antikor	1 saat
PBS’de yıkama ve temiz PBS’de bekletme	5 dk
Sekonder antikor	20 dk
PBS’de yıkama ve temiz PBS’de bekletme	5 dk
Streptavidin Peroxidase	20 dk
PBS’de yıkama ve temiz PBS’de bekletme	5 dk
ABC kromojen	15 dk
Distile su	5 dk
Zıt boya Mayer’s Hematoksilen	10 dk

Çeşme suyunda yıkama	3 dk
Distile su	1-2 sn
Amonyaklı su	10 sn
Çeşme suyunda yıkama	3 dk
Distile su	1-2 sn
Kurulama ve özel kapatma maddesi ile kapatma	

Bu işlemlerden geçirilerek boyanan doku kesitleri NİKON H550S marka araştırma mikroskobu ile değerlendirildi. İmmünohistokimyasal olarak hücre sitoplazmalarında gözlemlenen boyanmanın şiddeti için aşağıdaki kriterler göz önüne alınarak değerlendirilme yapıldı (Tablo 3.6).

Tablo 3.6. Bax ve Caspase-3 boyanma şiddetinin değerlendirilmesi

Derece	Anlamı
0	Boyanma yok
+1	Güçsüz, zayıf boyanma
+2	Orta derecede boyanma
+3	Güçlü, belirgin boyanma

3.12. TUNEL Metodu

Hücrelerde gerçekleşen DNA parçalanması ve apoptozisin belirlenebilmesi için in situ apoptozis belirleme kiti (ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7101 ve Chemicon) kullanıldı ve işlemler sırasıyla aşağıdaki gibi uygulandı.

➤ Parafin giderme ve suya indirme: Alınmış olan doku kesitleri, 2x5 dk toluol, 2x5 dk absöü alkol, 3 dk % 95 alkol ve 3 dk % 70 alkol'de bekletildikten sonra 5 dk PBS ile çalkalandı.

➤ Kesitler, proteinlerin sindirilmesi için 20 µg/ml Proteinaz K ile oda sıcaklığında 15 dk inkibe edildi ve sonrasında 2x2 dk distile su ile çalkalandı.

➤ Endojen peroksidazın maskelenmesi için doku kesitleri, PBS ile hazırlanmış olan % 3'lük H₂O₂ (3 ml H₂O₂ + 27 ml PBS) ile 5 dk oda sıcaklığında muamele edildi ve sonrasında 2x5 dk PBS ile yıkandı.

➤ Lamların çevresi iyice kurulandıktan sonra, kesitlerin üzerine 75 µl dengeleme tamponu konuldu ve üzerleri plastik lameller ile kapatıldı. Daha sonra kesitler yarım saat oda sıcaklığında inkübe edildi.

➤ Kesitlerin üzerindeki plastik lameller kaldırılarak etrafı kurulandı ve daha sonra her bir lam üzerine 55 µl Tdt enzimi (38,5 µl reaksiyon tamponu + 16,5 µl Tdt enzimi) ilave edilerek plastik lameller ile tekrardan kapatıldı. Kesitler daha sonra nemli ortamda 37 °C'lik etüvde 1 saat boyunca inkübe edildi.

➤ Kesitler plastik lameller kaldırıldıktan sonra durdurma/yıkama tamponu (1 ml yıkama solüsyonu + 34 ml distile su) ile oda sıcaklığında 10 dk, sonrasında ise PBS ile 3x5 dk yıkandı.

➤ Kesitlerin üzerine 65 µl Anti-Digoksin-Peroksidaz konularak üzerleri plastik lameller ile kapatıldı ve yarım saat oda sıcaklığında bekletildi.

➤ Kesitler plastik lameller kaldırıldıktan sonra PBS ile 3x5 dk yıkandı.

➤ Kesitlerin etrafı iyice kurulandıktan sonra her kesit üzerine 75 µl DAB (diaminobenzidine) substrat solüsyonu (73,5 µl DAB dilüsyon solüsyonu + 1,5 µl DAB substratı) damlatılarak, 3-6 dk arasında mikroskop altında pozitif renk reaksiyonu tespit edildi.

➤ Renk reaksiyonu oluştuktan sonra kesitler distile su ile 3x1 dk yıkandı.

➤ Kesitler yeniden distile su ile 5 dk yıkandı.

➤ Kesitlere zıt boya olarak 1 dk metil yeşili uygulandı ve boyama distile suda durduruldu.

➤ Fazla boyanın temizlenmesi amacıyla kesitler 2x10 sn % 100'lük alkol ile sonrasında ise yeniden 30 sn boyunca % 100'lük alkol ile çalkalandı.

➤ Kesitler daha sonra 2x2 dk toluolde tutuldu ve toluolden çıkarıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.

Kesitlerin boyanma özgüllüğü kontrol edilirken; pozitif kontrol olarak 5 mg/kg dozda deksametazon uygulanmış erişkin sıçan timus dokusu ve kit içerisinde çıkan doku kesiti kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise Tdt enziminin uygulandığı aşamada kesitin üzerine Tdt enzimi yerine distile su damlatılmıştır.

Apoptozis tayini için TUNEL boyama yöntemi uygulanan testis doku kesitlerinin ışık mikroskopik incelenmesinde pozitif olarak boyanan çekirdeklere bakılarak apoptotik hücreler belirlendi ve boyama sonuçları One Way Anova Analizi ile değerlendirildi.

3.13. İstatistiksel Yöntemler

Bax ve Caspase-3 verileri gibi gözlemsel değerler Kruscal Wallis testi ile değerlendirildikten sonra gruplar arasındaki farkı belirlemek için Mann Whitney U testi uygulandı. Histopatolojik veriler, vücut ağırlıkları, testis ağırlıkları ile TUNEL verileri gibi sayısal değerler ise One Way Anova Analizi ile değerlendirildi ve anlamlılık seviyesi olarak $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlık Farkı

Deney başında ve deney sonunda vücut ağırlıkları ölçülen sıçan grupları arasından sadece Grup 1’de anlamlı fark gözlemlenmiştir (p: 0,017, p<0,05). Diğer gruplarda yapılan ölçümler arasında anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir (p>0,05) (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Canlı ağırlık, ortalama ve standart hata.

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata		P
	1. Ölçüm	2. Ölçüm	
Grup 1 (N: 7)	290,71 ± 3,84	307,14* ± 4,54	0,017
Grup 2 (N: 7)	295,71 ± 2,36	285,50 ± 2,18	0,134
Grup 3 (N: 7)	296,42 ± 2,97	298,64 ± 5,61	0,505
Grup 4 (N: 7)	289,71 ± 4,66	281,28 ± 8,34	0,395

4.2. Testis Ağırlık Farkı

Sağ ve sol testis ağırlıkları toplanarak yapılan istatistiksel değerlendirme sonucunda, Grup 1 ile diğer tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık ortaya çıkmıştır. Grup 2 ile Grup 4 ortalamaları benzer bulunmuş olup, Grup 3 ortalaması ise diğer tüm gruplardan istatistiksel açıdan anlamlı bir farklılık göstermiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Testis ağırlığının gruplar açısından değerlendirilmesi, farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,05)

Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 (N: 7)	3,18 ± 0,04 ^a
Grup 2 (N: 7)	2,67 ± 0,04 ^b
Grup 3 (N: 7)	2,98 ± 0,03 ^c
Grup 4 (N: 7)	2,53 ± 0,05 ^b

4.3. Johnsen Skorlama

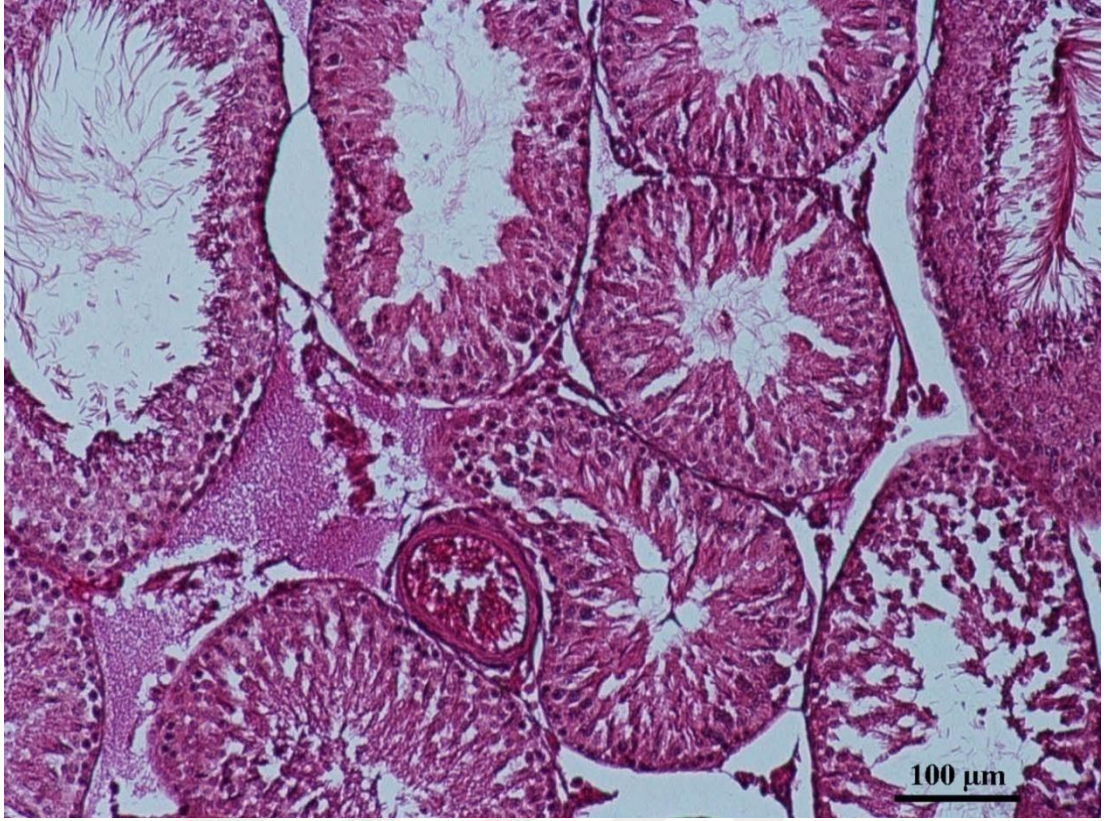
Çalışmamızda Johnsen skor sonuçları One Way Anova Analizi (Tukey HSD) ile değerlendirildi. Seminifer tübül duvarında gerçekleşen spermatogenez, Johnsen skoruna göre değerlendirildi ve değerlendirme sonucunda tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık olduğu gözlenmiştir. En düşük skor ise Grup 4'te gözlenmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Johnsen skorunun gruplar açısından değerlendirilmesi, farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir (p<0,05)

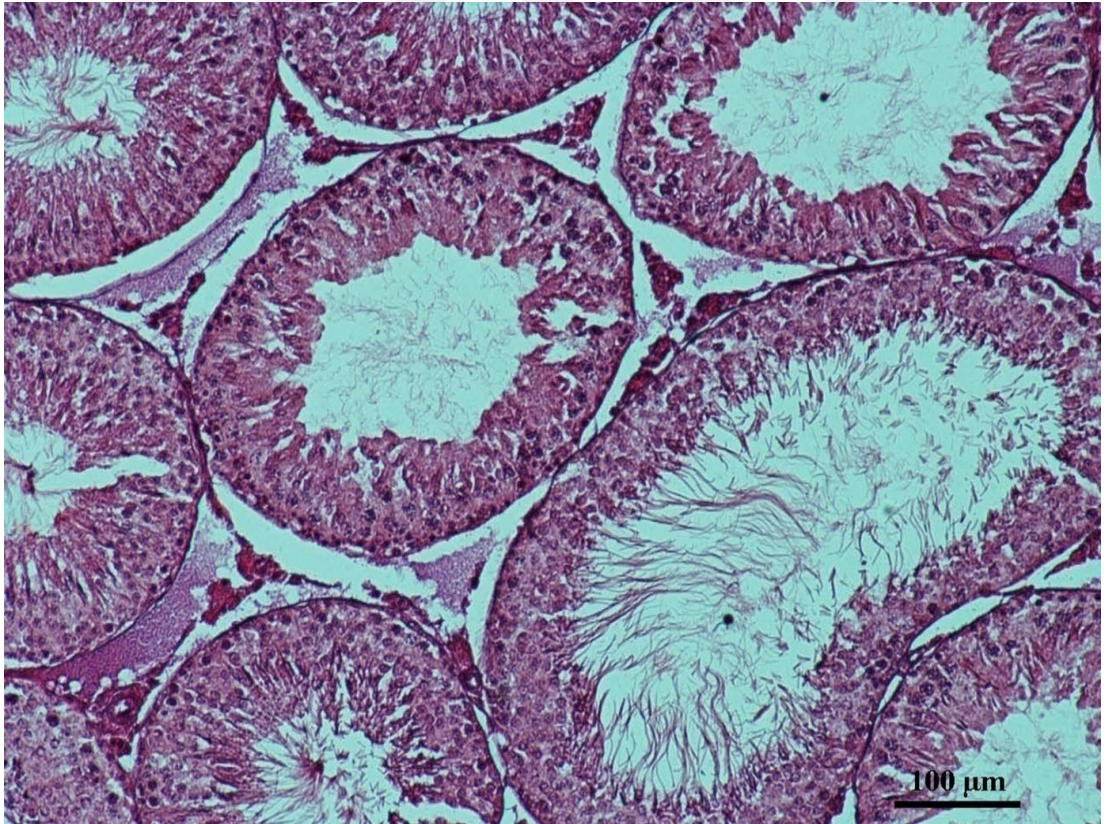
Gruplar	Ortalama ± Standart Hata
Grup 1 (N: 7)	9,75 ± 0,04 ^a
Grup 2 (N: 7)	7,24 ± 0,22 ^b
Grup 3 (N: 7)	7,46 ± 0,11 ^c
Grup 4 (N: 7)	6,38 ± 0,06 ^d



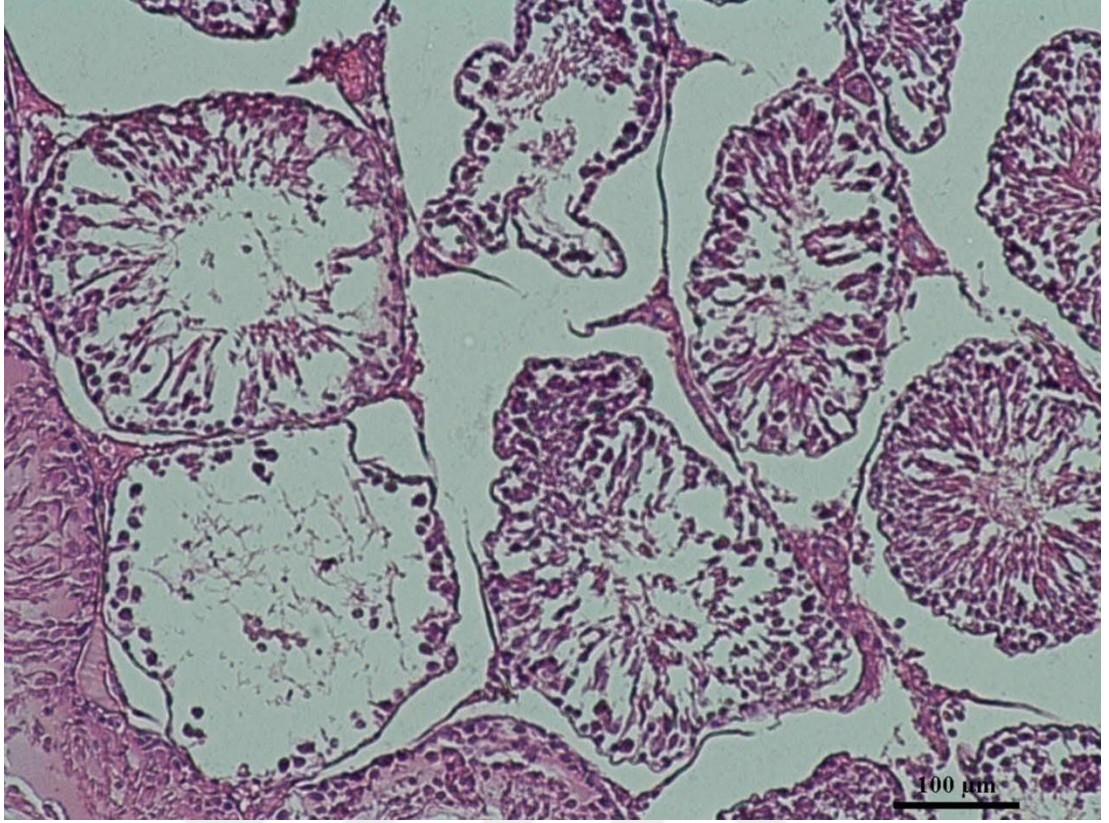
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait testis kesitinde seminifer tübüllerin yapısı (H-E)



Resim 4.2. Siklofosfamid (CP) grubuna ait testis kesitinde seminifer tübüllerin yapısı (H-E)



Resim 4.3. Çinko oksit (ZnO) grubuna ait testis kesitinde seminifer tübüllerin yapısı (H-E)



Resim 4.4. CP + ZnO grubuna ait testis kesitinde seminifer tübüllerin yapısı (H-E)

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmamızda Bax ve Caspase-3 immünohistokimya boyama sonuçlarına Kruscal Wallis testi uygulandı ve gruplar arasında fark çıkması sonucunda hangi gruplar arasında fark olduğu Mann Whitney U testi ile belirlendi.

4.4.1. Bax Boyanması

Çalışmamızda Bax ile yapılan boyama sonuçlarına uygulanan Kruscal Wallis testi sonucunda gruplar arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir. Gruplar arasında fark çıkmasına bağlı olarak gruplara Mann Whitney U testi uygulandı ve hangi gruplar arasında fark olduğu tespit edildi. Grup 2 – Grup 3 arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiş olup, bunun dışındaki diğer bütün gruplarda anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır ($p < 0,05$) (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Bax boyanmasının Mann Whitney U testi sonuçları

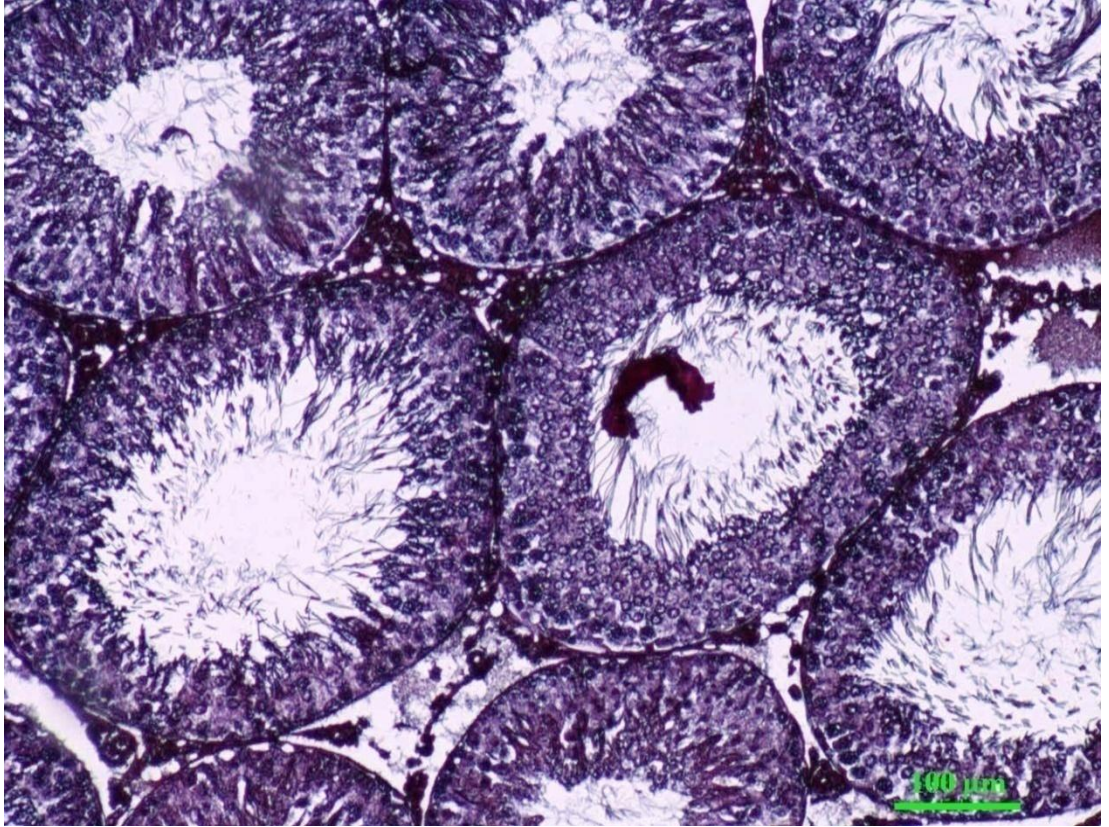
Gruplar	P
Grup 1 – Grup 2 (N: 7)	0,002

Grup 1 – Grup 3 (N: 7)	0,011
Grup 1 – Grup 4 (N: 7)	0,001
Grup 2 – Grup 3 (N: 7)	0,165
Grup 2 – Grup 4 (N: 7)	0,038
Grup 3 – Grup 4 (N: 7)	0,002

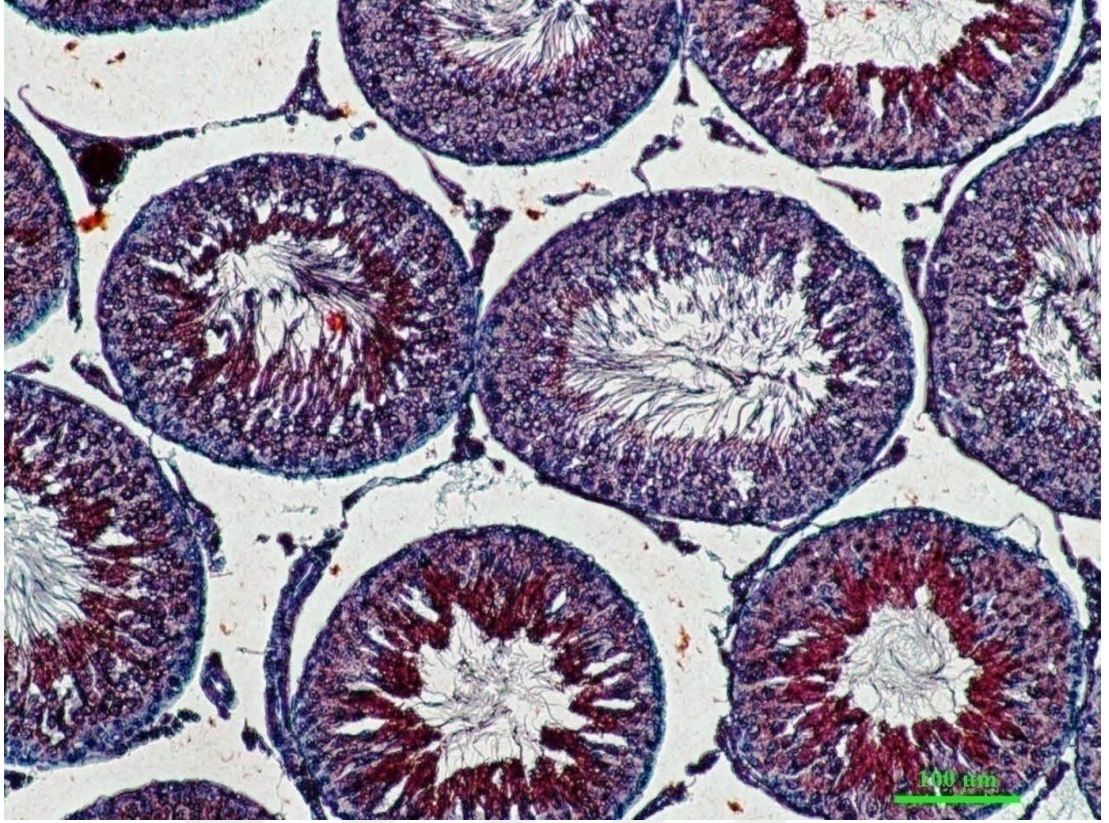
Gruplar arasında farklılık gösteren bir diğer unsur ise Bax boyanmasının şiddetidir ve aşağıdaki Tablo 4.5’ de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Bax boyanmasının şiddeti

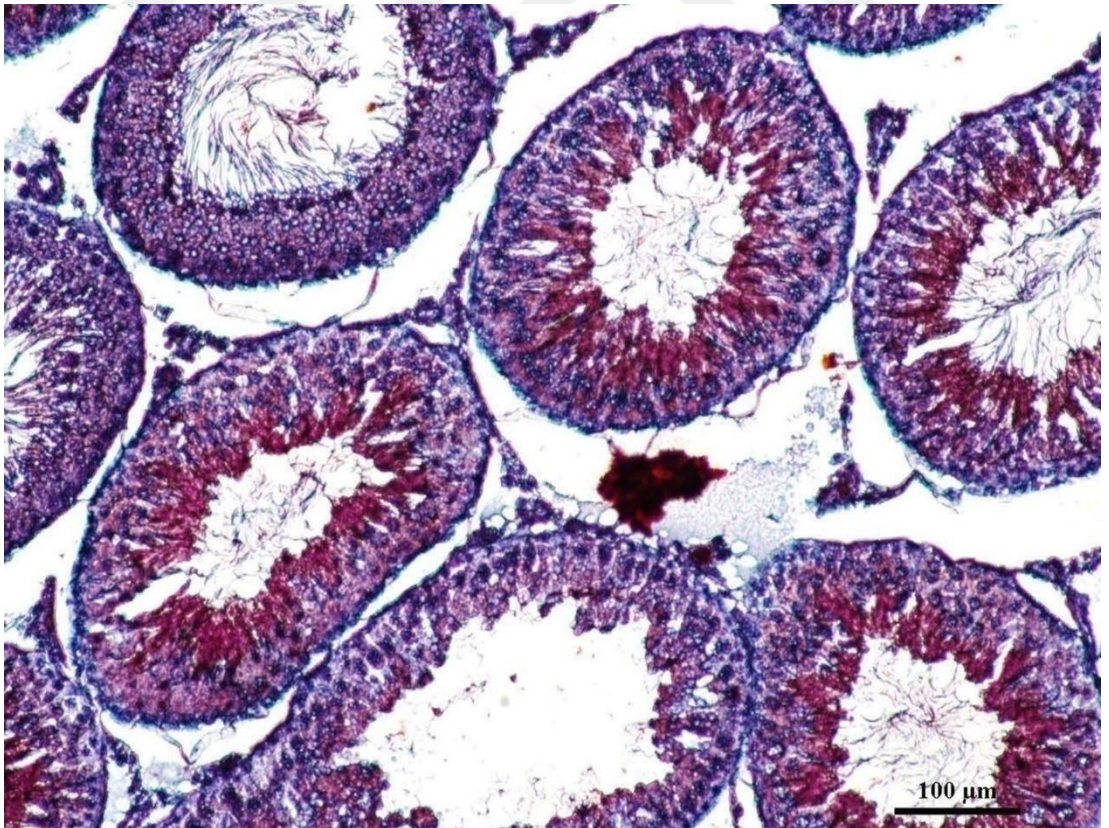
Gruplar	% 25	Median	% 75
Grup 1 (N: 7)	0	0	1
Grup 2 (N: 7)	1	2	2
Grup 3 (N: 7)	1	1	2
Grup 4 (N: 7)	2	3	3



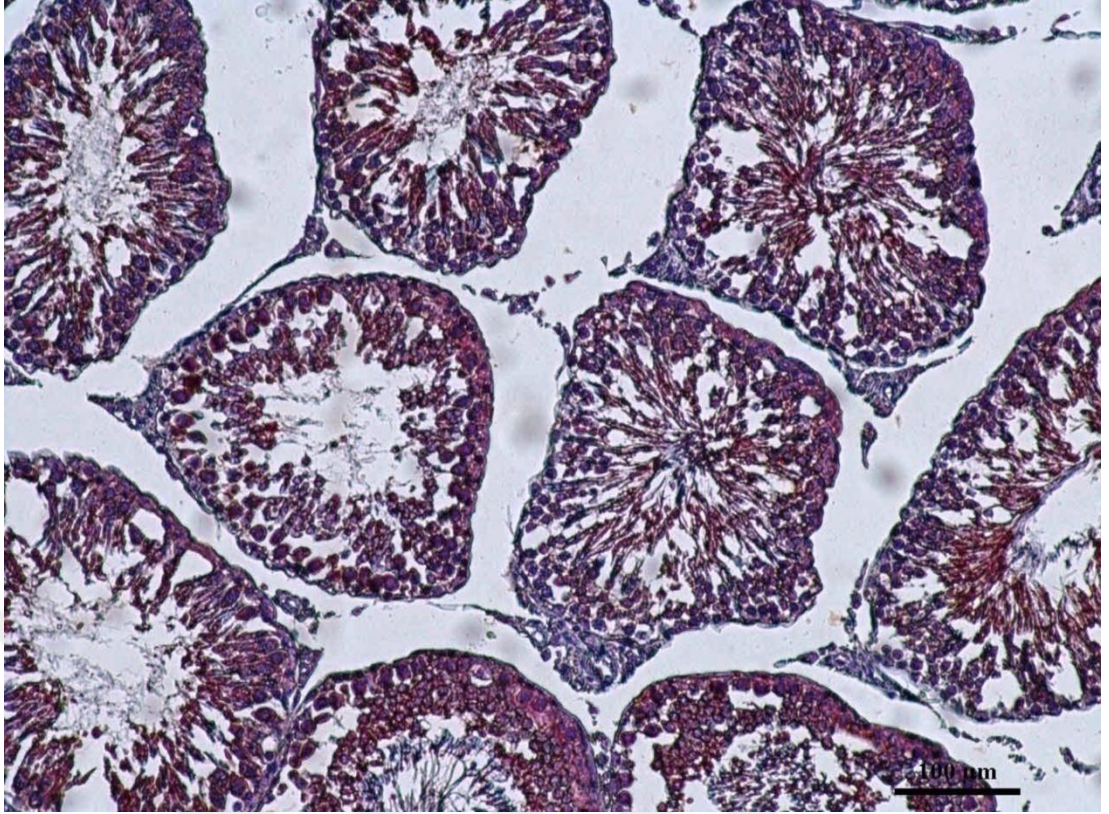
Resim 4.5. Kontrol grubunda gözlemlenen negatif Bax ekspresyonu



Resim 4.6. Siklofosfamid (CP) grubunda gözlemlenen +2 değerlikli Bax ekspresyonu



Resim 4.7. Çinko oksit (ZnO) grubunda gözlemlenen +2 değerlikli Bax ekspresyonu



Resim 4.8. Cp + ZnO grubunda gözlemlenen +2 değerlikli Bax ekspresyonu

4.4.2. Caspase-3 Boyanması

Çalışmamızda Caspase-3 immünohistokimya boyama sonuçları arasında yapılan Kruscal Wallis testi sonucunda gruplar arasında fark olduğu tespit edilmiştir. Gruplar arasında fark çıkması sonucunda Mann Whitney U testi ile yapılan grup karşılaştırmaları sonucunda Grup 1 – Grup 2, Grup 1 – Grup 4, Grup 2 – Grup 4 ve Grup 3 – Grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmıştır ($p < 0,05$) (Tablo 4.6).

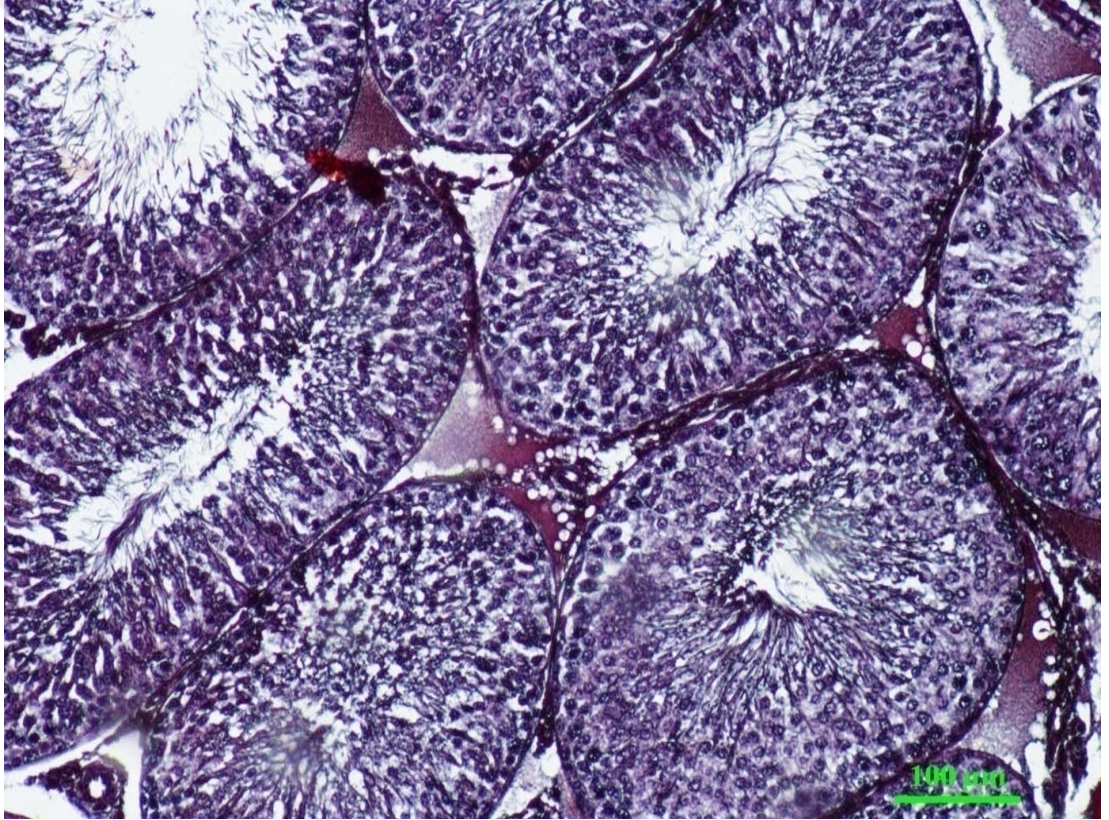
Tablo 4.6. Caspase-3 boyanmasının Mann Whitney U testi sonuçları

Gruplar	P
Grup 1 – Grup 2 (N: 7)	0,004
Grup 1 – Grup 3 (N: 7)	0,053
Grup 1 – Grup 4 (N: 7)	0,001
Grup 2 – Grup 3 (N: 7)	0,073
Grup 2 – Grup 4 (N: 7)	0,017
Grup 3 – Grup 4 (N: 7)	0,001

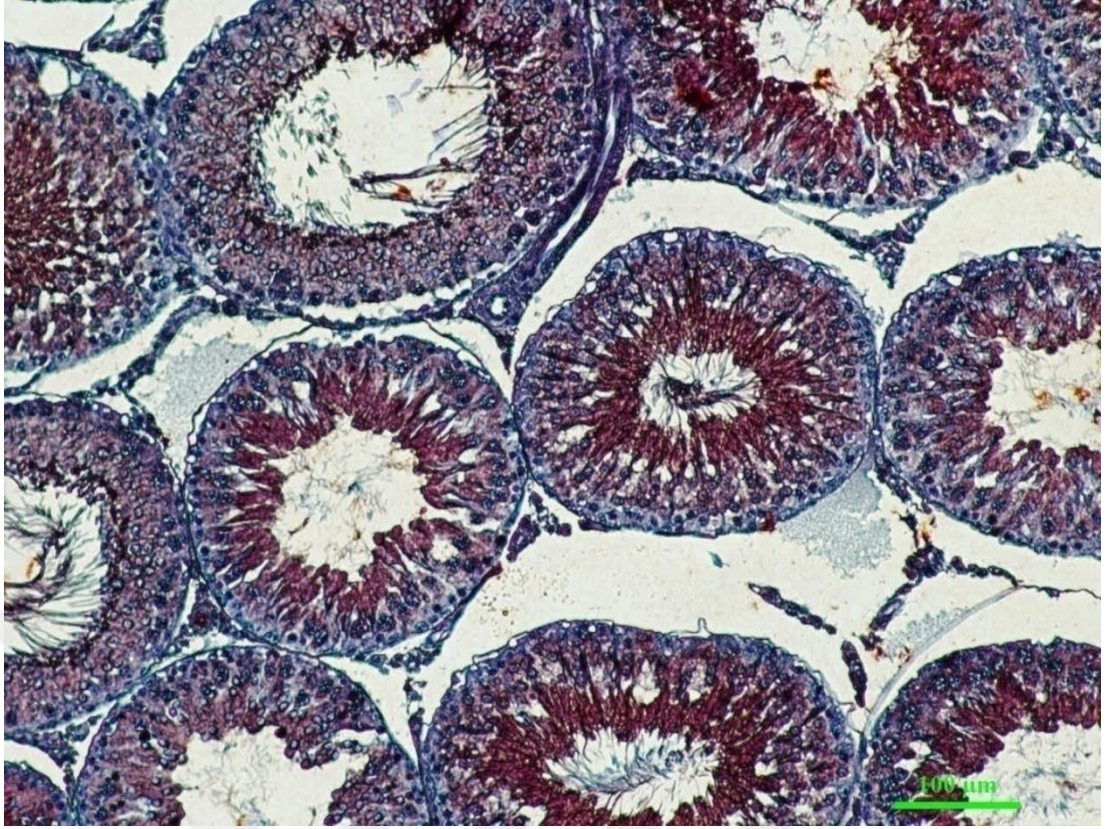
Caspase-3 immünohistokimyasal boyanmanın şiddeti de gruplar arasında farklılık göstermekte olup, aşağıdaki Tablo 4.7’de verilmiştir.

Tablo 4.7. Caspase-3 boyanmasının şiddeti

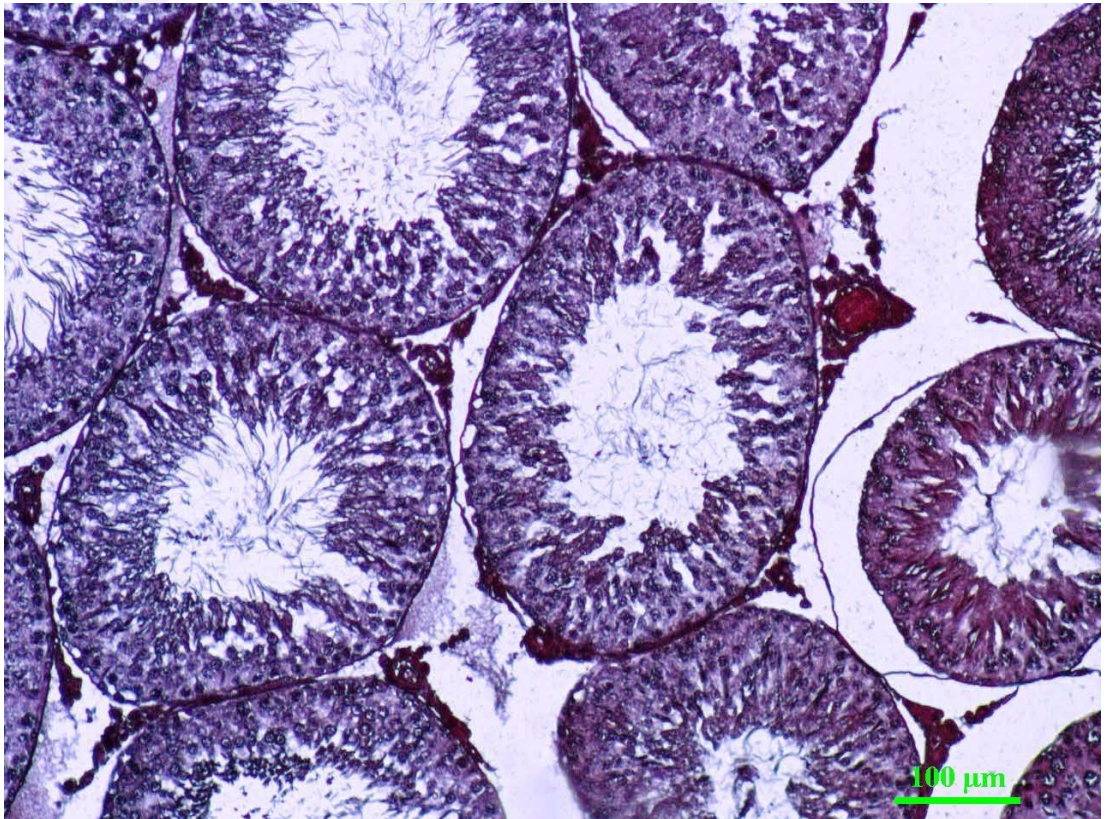
Gruplar	% 25	Median	% 75
Grup 1 (N: 7)	0	0	1
Grup 2 (N: 7)	1	2	2
Grup 3 (N: 7)	1	1	1
Grup 4 (N: 7)	3	3	3



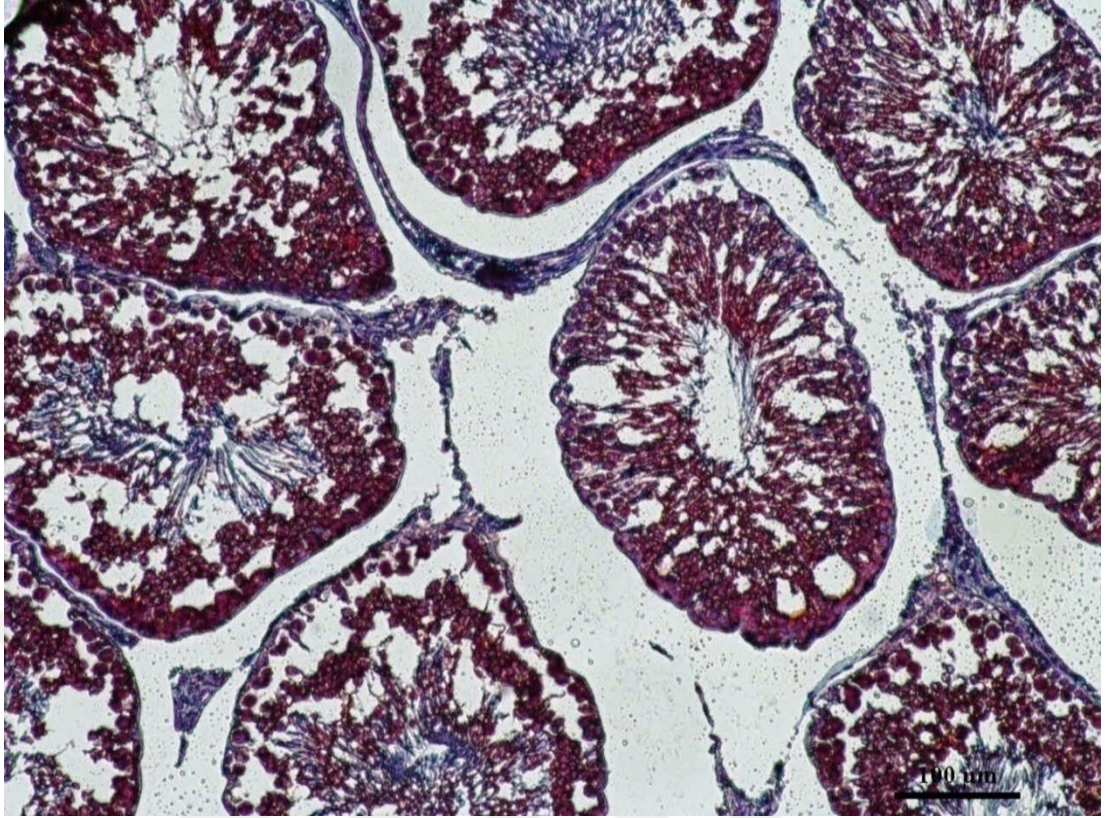
Resim 4.9. Kontrol grubunda gözlemlenen negatif Caspase-3 ekspresyonu



Resim 4.10. Siklofosamid (CP) grubunda gözlemlenen +2 değerlikli Caspase-3 ekspresyonu



Resim 4.11. Çinko oksit (ZnO) grubunda gözlemlenen +1 değerlikli Caspase-3 ekspresyonu



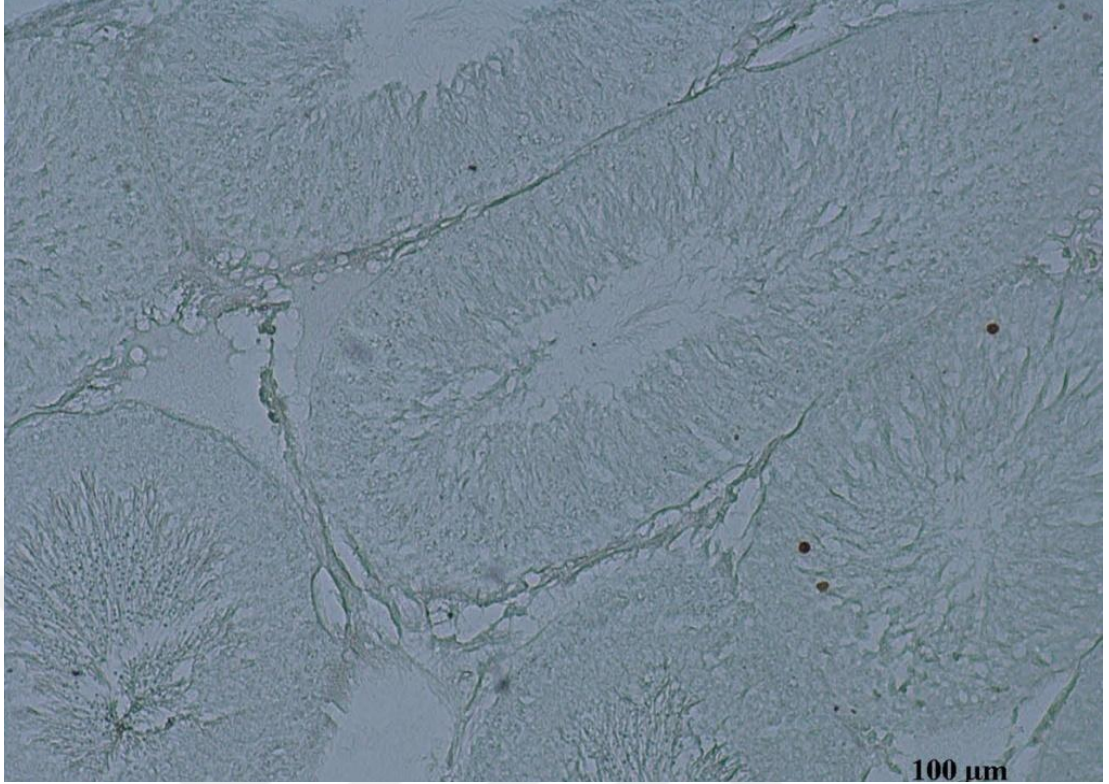
Resim 4.12. CP + ZnO grubunda gözlemlenen +3 değerlikli Caspase-3 ekspresyonu

4.4.3. TUNEL Boyama

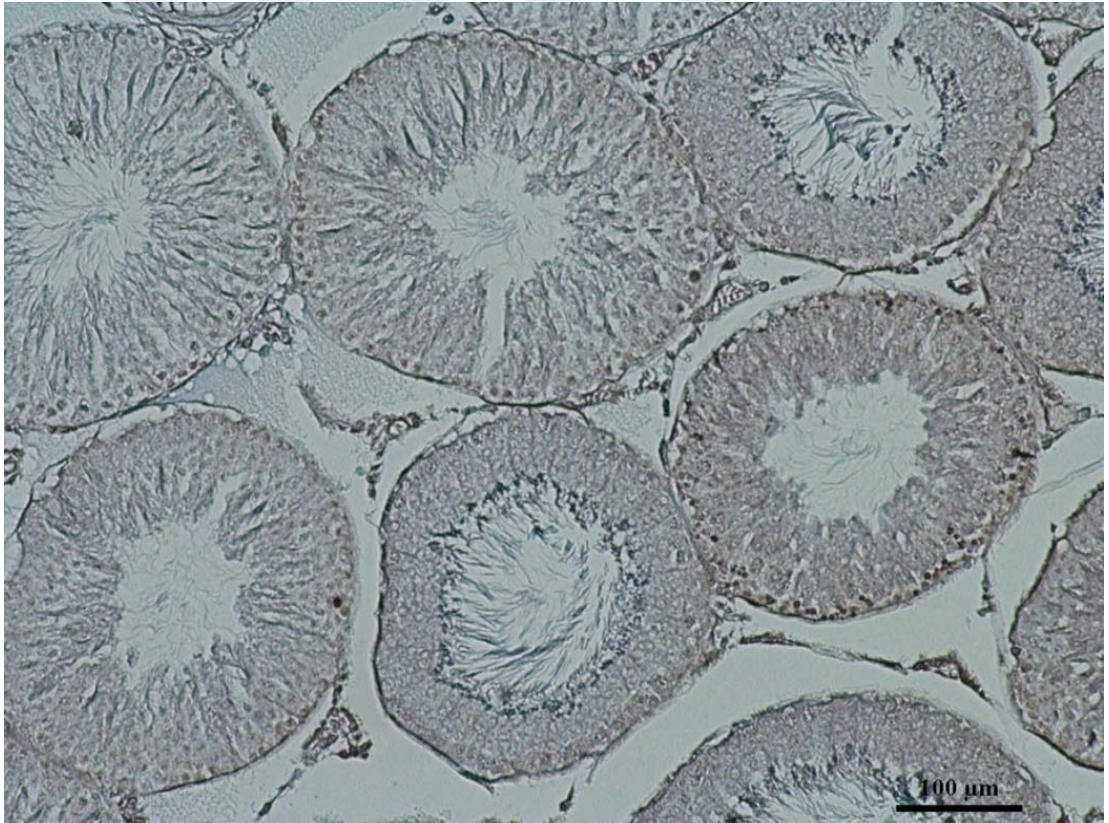
TUNEL yöntemi ile boyama sonucunda çekirdekleri boyanmış olan hücreler apoptotik hücre olarak değerlendirildi. TUNEL boyama sonuçları One Way Anova Analizi ile değerlendirildi (Tablo 4.8). Değerlendirme sonucunda pozitif hücre sayısının tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir ($p < 0,05$).

Tablo 4.8. TUNEL pozitif hücre sayısı sonuçları, farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$)

Gruplar	Ortalama \pm Standart Hata
Grup 1 (N: 7)	3,22 \pm 0,36 ^a
Grup 2 (N: 7)	12,06 \pm 0,41 ^b
Grup 3 (N: 7)	6,55 \pm 0,32 ^c
Grup 4 (N: 7)	26,92 \pm 1,50 ^d



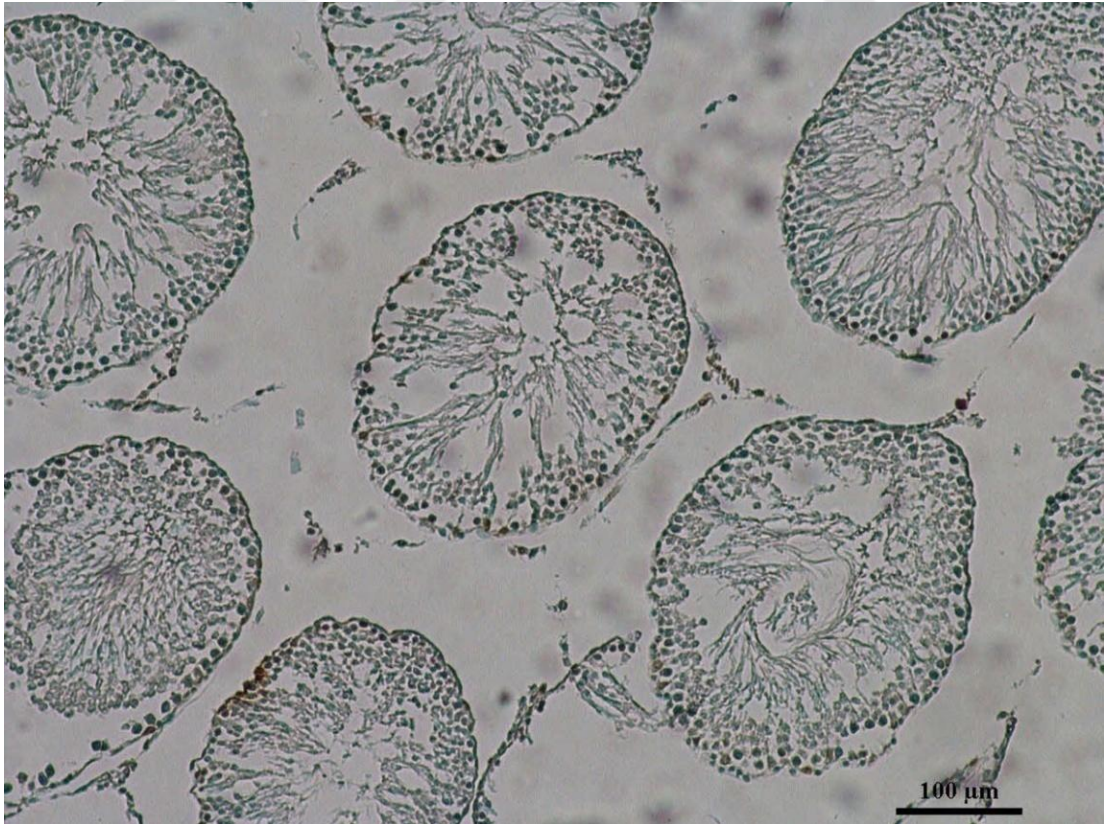
Resim 4.13. Kontrol grubuna ait kesitte gözlemlenen TUNEL pozitif hücreler



Resim 4.14. Siklofosfamid (CP) grubuna ait kesitte gözlemlenen TUNEL pozitif hücreler



Resim 4.15. Çinko oksit (ZnO) grubuna ait kesitte gözlemlenen TUNEL pozitif hücreler



Resim 4.16. CP + ZnO grubuna ait kesitte gözlemlenen TUNEL pozitif hücreler

4.5. Biyokimya Sonuçları

Deney sonunda testis ağırlıkları ölçülen sıçanların sağ testis doku homojenatları ile kan serumları oxidative stress markers (indirgenmiş Glutasyon, Catalase, TBARS) analizi için Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarına gönderildi.

4.5.1. Serum Biyokimya Sonuçları

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarından elde edilen serum biyokimya sonuçları aşağıda gösterilen Tablo 4.9'da verilmiş olup, farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.9. Serum biyokimya sonuçları, ortalama \pm standart hata

Gruplar	Glutasyon (GSH)	Katalaz	TBARS
Grup 1 (N: 7)	321,37 ^a \pm 8,93	61,25 ^a \pm 3,49	12,28 ^a \pm 0,72
Grup 2 (N: 7)	223,82 ^b \pm 8,08	46,55 ^b \pm 2,49	18,37 ^b \pm 0,53
Grup 3 (N: 7)	276,38 ^c \pm 4,82	50,62 ^c \pm 1,21	15,21 ^c \pm 0,28
Grup 4 (N: 7)	212,17 ^b \pm 13,1	42,00 ^b \pm 2,52	23,61 ^d \pm 1,47

Serum GSH seviyesi, Grup 2 ve Grup 4'te, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştır. Grup 3, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmışken; Grup 2 ve Grup 4 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksektir.

Serum Katalaz seviyesi, Grup 2 ve Grup 4'te, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalma gözlemlenmiştir. Grup 3, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmışken; Grup 2 ve Grup 4 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksektir.

Serum TBARS seviyesi, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te Grup 1'e göre anlamlı olarak yükselmiştir.

4.5.2. Doku Biyokimya Sonuçları

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarından elde edilen doku biyokimya sonuçları aşağıda gösterilen Tablo

4.10'da verilmiş olup, farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$).

Tablo 4.10. Doku biyokimya sonuçları, ortalama \pm standart hata

Gruplar	Glutasyon (GSH)	Katalaz	TBARS
Grup 1 (N: 7)	14,24 ^a \pm 0,77	3,18 ^a \pm 0,39	0,36 ^a \pm 0,03
Grup 2 (N: 7)	8,68 ^b \pm 0,56	1,94 ^b \pm 0,16	1,63 ^b \pm 0,12
Grup 3 (N: 7)	12,00 ^a \pm 0,53	2,28 ^b \pm 0,09	0,80 ^c \pm 0,05
Grup 4 (N: 7)	8,01 ^b \pm 0,62	1,08 ^c \pm 0,06	2,21 ^d \pm 0,13

Doku GSH seviyesi, Grup 2 ve Grup 4'te, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştır. Grup 3'ün ortalaması da Grup 2 ve Grup 4'e göre istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmuştur.

Doku Katalaz seviyesi, Grup 2 ve Grup 4'te, Grup 1 ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak azalmıştır. Grup 3 ise Grup 1'e göre anlamlı olarak azalmışken; Grup 2 ile benzerdir.

Doku TBARS seviyesi, Grup 2, Grup 3 ve Grup 4'te, Grup 1'e göre anlamlı olarak yükselmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Serum ve doku GSH, Katalaz ve TBARS seviyeleri literatürle uyuşan bir şekilde siklofosfamid grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişime uğramıştır.

Serum ve doku GSH, Katalaz ve TBARS seviyeleri, çinko oksit grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değişime uğramıştır.

Çinko oksit + Siklofosfamid grubunda serum GSH ve Katalaz ortalamaları siklofosfamid grubuyla benzerken, TBARS siklofosfamid grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek çıkmıştır. Doku GSH siklofosfamid grubuyla benzerken, Katalaz ve TBARS ise tüm gruplardan farklı çıkmıştır.

Johnson skor ortalaması, kontrol grubuna göre diğer tüm gruplarda anlamlı olarak düşmüştür. Bax boyamasında Grup 2 – Grup 3 arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmemiş olup, bunun dışındaki diğer bütün gruplarda anlamlı bir fark ortaya çıkmıştır. TUNEL pozitif hücre sayısının tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık gösterdiği gözlemlenmiştir. Bax boyanmasında, sadece siklofosfamid ve çinko oksit grubu benzerlik göstermekte olup, diğer tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık çıkmıştır.

Caspase 3 boyanmasında, siklofosfamid ve çinko oksit grubu benzerdir. Aynı zamanda çinko oksit grubu kontrol grubuyla da benzer çıkmıştır. Diğer gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark ortaya çıkmıştır.

Memeli spermatogenezi, fizyolojik, biyokimyasal ve morfolojik değişiklikleri içeren karmaşık ve benzersiz bir süreçtir (D'Occhio ve ark. 2007). Testisin fonksiyonel ünitesi olan seminifer tübüller içerisinde spermatogenezis ile spermler üretilmektedir. Spermatogenezis; mayoz, mitoz ve spermiyogenezden oluşur. Gonadotropinler, androjenler, FSH, LH, GnRH ve testosteronu içeren önemli biyomoleküller tarafından düzenlenir. Spermatogenezis boyunca Sertoli hücreleri, gelişmekte olan germ hücrelerini destekler (Chojnacka ve ark. 2016). Testisin seminifer tübüllerinde, hücreler olgunlaştıkça yoğun morfolojik ve fonksiyonel değişiklikler gözlenir (Kramer and Krawetz 1997).

Yuvarlak diploid spermatogonyum, kondanse çekirdek, akrozom ve flagelluma sahip haploid spermatozoaya farklılaşır (Evenson ve Wixon 2005; D'Occhio ve ark. 2007). Spermatogenezis insanlarda yaklaşık 63 gün sürmektedir (Kramer ve Krawetz 1997). Bu olgunlaşma sürecinde içerisinde değişiklik oluşturabilen, radyasyon, kimyasal maddeler ve ilaçlar, beslenme, testise etki eden termal stres ve germ hücresine etki eden oksidatif stres gibi çok çeşitli dış kaynaklı etken bulunmaktadır (Evenson ve Wixon 2005). Çalışmalarda çok sayıda nanopartikülün spermatogenezisi etkilediği belirtilmiştir (Kobyliak ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2015).

Çinko oksit (ZnO) nanopartikülleri boya, pigment, metalurji katkı maddeleri, kauçuk, alaşımlar, seramik, kimyasal lifler, elektronik, katalizör, tıbbi tanı, kozmetik, kişisel bakım gibi çeşitli endüstriyel alanlarda en yaygın kullanılan malzemelerden biridir (Baek ve ark. 2012). ZnO nanopartikülleri UV dalga boyu aralığında soğurma özelliklerinden dolayı güneş kremleri ve kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır (Manzo ve ark. 2013). ZnO genellikle düşük bir toksisiteli bir malzeme olarak kabul edilmektedir. Çünkü çinko insan vücudunda temel bir eser elementtir ve gıdalarda geniş kapsamlı olarak bulunmaktadır ve ayrıca bir besin takviyesi olarak ilave edilmektedir. Bu nedenle çinko nanopartiküllerin toksisite değerlendirmesi çok az ilgi çekmektedir (Baek ve ark. 2012). Çinko oksitin non toksik olduğu geleneksel kavramlar üzerine çok yaygın olarak kullanılmaya başlamış olup, ZnO nanopartikülleri hakkındaki toksikolojik çalışmalar ise onların uygulama hızının gerisinde kalmıştır (Roy ve ark. 2014). İn vitro ortamda insan hücrelerinde ZnO nanopartiküllerin reaktif oksijen türlerini (ROS) tetikleyerek apoptozise aracılık ettiği belirtilmiştir (Akhtar ve ark. 2013; Roy ve ark. 2014).

Testis dokusundaki araştırmalar çok az sayıdadır ve bir çalışmada çinko oksit nanopartiküllerinin testiküler toksik etki gösterdiğini belirtmişlerdir. 50 ve 300 mg/kg dozda oral yolla 35 gün boyunca uygulanan çinko oksit nanopartiküllerinin testiste histopatolojiyi arttırdığı belirtilmiştir. Fakat oksidan-antioksidan değerleri ve apoptozis markerleri araştırılmamıştır (Talebi ve ark. 2013). Bizim çalışmamızda çinko oksit nanopartikülleri 300 mg/kg dozda Johnson skorunu düşürdü ve siklofosamid ile birlikte kullanımı daha düşük bir Johnson skorunun ortaya çıkmasına neden oldu.

Fare Sertoli hücre hattı (TM4) ve spermatozoid hücre hattına (GC2-spd), çinko oksit nanopartikülleri verildikten sonra, ROS seviyesinin yükseldiği belirtilmiştir. Glutasyon seviyesinin düştüğü ve MDA (TBARS) seviyesinin ise ZnO uygulanan grupta yükseldiği bildirilmiştir. ZnO nanopartiküllerinin oluşturduğu sitotoksik etkinin, antioksidan kullanılarak kısmen kaldırabileceğini belirtmişlerdir (Liu ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda da çinko oksit grubunda kontrol gruplarına göre serum ve doku GSH, Katalaz seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı derecede düştüğü, TBARS seviyesinin ise yükseldiği görülmüştür.

Siklofosfamid (CP) çocukluk ve yetişkin malignansilerde, organ nakillerinde immun supresif olarak, sistemik lupus eritematoz, multiple skleroz gibi hastalıklarda kullanılan bir kemoterapötik ilaçtır (Oh ve ark. 2007). CP'nin aktif metabolitleri fosfamid hardalı ve akroleindir (Zarei ve Shivanandappa 2013). Bunlar çok hızlı çoğalan dokulara müdahale ederek DNA dizilerinin çapraz bağlanmasına sebep olur (Higuchi ve ark. 2001). Ek olarak CP hidrojen peroksit üretimi üzerinden oksidatif DNA hasarına sebep olur (Murata ve ark. 2004). Fosforamid mustard kanser hücrelerini, akrolein ise normal hücreleri nekrozis ve apoptozis üzerinden öldürmektedir (Kern ve ark. 2002).

Siklofosfamidin testislere zarar verdiğini bildiren çok sayıda çalışma mevcuttur (Le ve ark. 2015; Turedi ve ark. 2015; Zhao ve ark. 2015; Bakhtary ve ark. 2016). Bizim çalışmamızda da siklofosfamid testislerde apoptozisi arttırmıştır. Bunun yanında antioksidan seviyesini azaltarak oksidan seviyeyi de arttırmıştır.

Sonuç olarak çalışmamızda güncel bir konu olan çinko oksit nanopartiküllerinin, testiste apoptozis markerlerin ekspresyonunu arttırdığı, TBARS seviyesini arttırdığı ve GSH ile Katalaz seviyesini düşürdüğü anlaşıldı. Çinko oksitin testislere, siklofosfamidten daha az zarar verdiğini, testislerde en fazla hasarın, ikisinin birlikte kullanıldığı grupta oluştuğunu gözledik. Çinko oksit nanopartiküllerinin kullanımı ile ilgili daha çok sayıda toksisite çalışmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

6. KAYNAKLAR

1. Açık Z, Güven S. Nanoteknoloji, Çevre ve Aile. Tüketici Yazıları (III), Hacettepe Üniversitesi Tüketici-Pazar-Araştırma-Danışma Test ve Eğitim Merkezi (Editörler: Babaoğul M, Şener A, Buğday EB). Elma Teknik Basım Matbaacılık, 2012, Ankara, s: 142-147.
2. Akazawa N, Mikami SI, Kimura SI. Effects of Vitamin E Deficiency on the Hormone Secretion of the Pituitary-Gonadal Axis of the Rat. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 1987; 152(3): 221-229.
3. Akhtar MJ, Ahamed M, Kumar S, Khan MAM, Ahmad J, Alrokayan SA. Zinc Oxide Nanoparticles Selectively Induce Apoptosis in Human Cancer Cells Through Reactive Oxygen Species. *International Journal of Nanomedicine*. 2012; 7: 845-857.
4. Al-Safi SA, Maddocks JL. Does 2-Mercaptoethane Sulphonate (mesna) Prevent Cyclophosphamide and Azathioprine Induced Immunosuppression? In vitro studies. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 1986; 21(3): 267-70.
5. Altun A. Azospermik Olgulardan Alınan TESE Dokularının Ultrastrüktürel İncelenmesi ve NOS İzofomlarının Etkisinin Değerlendirilmesi. İstanbul Bilim Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2013 (Tez Danışmanı: Doç. Dr.Canan Hürdağ).
6. Arıç E. Nanoyapıda Çinko Oksit Partiküllerinin Üretimi ve Karakterizasyonu. İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı, Üretim Metalurjisi ve Teknolojileri Mühendisliği Programı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2010 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Sebahattin Gürmen).
7. Arıncı K, Elhan A. Anatomi. Cilt 1-2, Güneş Kitabevi, 1999, Ankara.
8. Ashkenazi A, Dixit VM. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*. 1998; 281: 1305-1308.
9. Atal S. Erişkin Erkek Sıçanlarda Metotreksat Kaynaklı Testis Hasarında Kurkuminin Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 2014 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Varol Şahintürk).
10. Ateş S, Olgun N. Kemoterapiye Bağlı Alopesi ve Yaşam Kalitesi. Hacettepe Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Dergisi. 2014; 67-80.
11. Atlı-Şekeroğlu Z. Nanoteknolojiden Nonogenotoksikolojiye: Kobalt-Krom Nanopartiküllerinin Genotoksik Etkisi. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*. 2013; 70(1): 33-42.
12. Ayaşlıoğlu E. Apoptoz. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2001; 21: 57-62.
13. Ayhancı A. Siklofosamid Sitotoksitesinin Çinko ile Etkileşimi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Eskişehir, 1997 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ruhi Uyar).
14. Baek M, Chung HE, Yu J, Lee JA, Kim TH, Oh JM, Lee WJ, Paek SM, Lee JK, Jeong J, Choy JH, Choi SJ. Pharmacokinetics, Tissue Distribution, and Excretion of Zinc Oxide Nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2012; 7: 3081-3097.
15. Bakhtyari Z, Shahrooz R, Ahmadi A, Soltanalianjad F. Ethyl Pyruvate Ameliorates The Damage Induced by Cyclophosphamide on Adult Mice Testes. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2016; 10: 79-86.
16. Banham S, Dorward A, Hutcheon A, Ahmedzai S, Cunningham D, Burnett A, Soukop M, Lucie N, Kaye S. The Role of VP-16 in the Treatment of Small-Cell Lung Cancer: Studies of the West of Scotland Lung Cancer Group. *Semin Oncology*. 1985; 12(1 Suppl 2): 2-6.
17. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of The Structure, Function, and Applications of Superoxide Dismutase. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*. 1987; 22(2): 111-180.
18. Beckman KB, Ames BN. The Free Radical Theory of Aging Matures. *Physiological Reviews*. 1998; 78(2): 547-581.
19. Berk S, Akkurt İ. Nonopartikül: Geleceğin Korkulu Rüyası. *Tüberk Toraks*. 2012; 60(2): 180-184.
20. Bernacki RJ, Bansal SK, Gurtoo HL. Combinations of Mesna with Cyclophosphamide or Adriamycin in the Treatment of Mice with Tumors. *Cancer Research*. 1987; 47: 799-802.
21. Beumer TL, Roepers-Gajadien HL, Gademan IS, Lock TMTW, Kal HB, Rooij DGD. Apoptosis Regulation in the Testis: Involvement of Bcl-2 Family Members. *Molecular Reproduction and Development*. 2000; 56(3): 353-359.
22. Blanco-Rodriguez J, Martinez-Garcia C. Apoptosis Patern Elicited by Several Apoptogenic Agents on the Seminiferous Epithelium of the Adult Rat Testis. *Journal of Andrology*. 1998; 19(4): 487- 497.

23. Bokemeyer C, Schmoll HJ, Rhee JV, Kuczyk M, Schuppert F, Poliwoda H. Long-term Gonadal Toxicity After Therapy for Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphoma. *Annals of Hematology*. 1994; 68: 105–110.
24. Boxtel CJV. Antineoplastik Ajanlar, İlaç Yararları ve Riskleri, Farmakoterapötik Ürünler. *Türk Eczacıları Birliği Yayınları*, 2007, Ankara, s: 185-188.
25. Brigelius-Flohe R, Traber MG. Vitamin E: Function and Metabolism. *The FASEB Journal*. 1999; 13(10): 1145–1155.
26. Brooks NL. Apoptotic Markers in Ejaculated Human Spermatozoa. Department of Medical Biosciences University of the Western Cape Bellville. 2006 (Supervisor: Prof. Dr. Gerhard van der Horst, Co-supervisor: Dr. Silke Dyer).
27. Budavari S. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals*. Centennial Edition, 1989, 11th Edition, USA.
28. Burukoğlu D. Kadmiyumun Siçan Testisinde Oluşturduğu Toksikitede Çinkonun Koruyucu Etkilerinin Işık ve Elektron Mikroskop İle İncelenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Eskişehir, 2007 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cengiz Bayçu).
29. Can G. Antineoplastik İlaçların Yan Etkileri ve Hemşirelik Yaklaşımları. *Hemşirelikte Eğitim ve Araştırma Dergisi*. 2005; 2(2): 8-15.
30. Carlson BM. *Patten's Foundations of Embryology*. Mcgraw-Hill Inc, 1966, 6th Edition, New York, p: 752.
31. Castaneda L. Synthesis and Characterization of ZnO Micro and Nano-Cages, *Acta Materialia*. 2009; 57(5): 1385-1391.
32. Cavalletti E, Tofanetti O, Zunino F. Comparison of Reduced Glutathione with 2-Mercaptoethane Sulfonate to Prevent Cyclophosphamide-Induced Urotoxicity. *Cancer Letters*. 1986; 32(1): 1-6.
33. Chapman RM. Gonadal Injury Resulting From Chemotherapy. *American Journal of Industrial Medicine*. 1983; 4(1-2): 149-161.
34. Chelikani P, Fita I, Loewen PC. Diversity of Structures and Properties Among Catalases. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004; 61(2): 192–208.
35. Cherubini A, Ruggiero C, Polidori MC, Mecocci C. Potential Markers of Oxidative Stress in Stroke. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005; 39: 841-852.
36. Cho WS, Kang BC, Lee JK, Jeong J, Che JH, Seok SH. Comparative Absorption, Distribution, and Excretion of Titanium Dioxide and Zinc Oxide Nanoparticles After Repeated Oral Administration. *Particle and Fibre Toxicology*. 2013; 10: 9.
37. Chojnacka K, Zarzycka M, Mruk DD. Biology of the Sertoli Cell in the Fetal, Pubertal, and Adult Mammalian Testis. *Results and Problems in Cell Differentiation*. 2016; 58: 225-251.
38. Chu E, DeVita VT. *Physicians' Cancer Chemotherapy Drug Manual*. Jones and Bartlett Publishers, 2007, Sudbury, Massachusetts.
39. Collins JA, Schandl CA, Young KK, Vesely J, Willingham MC. Major DNA Fragmentation Is a Late Event in Apoptosis. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1997; 45(7): 923-934.
40. Cumbul A. Deneysel Vazektominin Farklı Süreler Sonrasında Erişkin Siçan Testisinde Oluşturduğu Morfolojik Değişikliklerin Stereolojik Yöntemlerle İncelenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Eskişehir, 2008 (Tez Danışmanları: Prof. Dr. Varol Şahintürk, Yrd. Doç. Dr. Ünal Uslu).
41. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *The American Journal of Surgical Pathology*. 1997; 21(1): 88-101.
42. Cutler RG, Plummer J, Chowdhury K, Heward C. Oxidative Stress Profiling: Part II. Theory, Technology, and Practice. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005; 1055: 136-158.
43. Çağlar AB, Saral S. Kozmetolojide Toksikite Sorunu. *Türk Dermatoloji Dergisi*. 2014; 4: 248-251.
44. Deaton CM, Marlin DJ. Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*. 2003; 2(3): 278–291.
45. Demir E, Akça H, Kaya B, Burgucu D, Tokgün O, Turna F, Aksakal S, Vales G, Creus A, Marcos R. Zinc Oxide Nanoparticles: Genotoxicity, Interactions with UV-Light and Cell-Transforming Potential. *Journal of Hazardous Materials*. 2014; 264(15): 420-429.
46. Deng X, Wang Y, Chou J, Cadet JL. Methamphetamine Causes Widespread Apoptosis in the Mouse Brain: Evidence From Using An Improved TUNEL Histochemical Method. *Molecular Brain Research*. 2001; 93(1): 64-69.
47. Dere F. *Anatomi Atlası ve Ders Kitabı Cilt 2*, Nobel Tıp Kitapevi, 1988, 5. Baskı, Adana, s: 459.
48. Deveraux QL, Schendel SL, Reed JC. Antiapoptotic Proteins: The Bcl-2 and Inhibitor of Apoptosis Protein Families. *Cardiology Clinics*. 2001; 19(1): 57-74.

49. D'Occhio MJ, Hengstberger KJ, Johnston SD. Biology of Sperm Chromatin Structure and Relationship to Male Fertility and Embryonic Survival. *Animal Reproduction Science*. 2007; 101: 1-17.
50. Drake RI, Vogl W at Mitchell AWM. *Grays Anatomi* (Çeviri: Yıldırım M.). Güneş Kitabevleri, 2007, Ankara, s: 1058.
51. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*. 2007; 35(4): 495-516.
52. Erdoğan A, Özkan A. Kanser Tedavisinde ve Tümör Görüntülemesinde Nanoteknolojik Uygulamalar. *Archives Medical Review Journal*. 2013; 22(3): 426-440.
53. Erkurt MA, Kuku İ, Kaya E, Aydoğdu İ. Kanser Kemoterapisi ve Böbrek. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2009; 16(1): 63-68.
54. Eşrefoğlu M. Renkli Resimli Genel ve Özel Histoloji. Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık, 2004, Malatya, s: 305-312.
55. Evenson DP, Wixon R. Environmental Toxicants Cause Sperm DNA Fragmentation as Detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA). *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005; 207: 532-537.
56. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, Mangerini R, Arena S, Kirkman HN. Predominant Role of Catalase in the Disposal of Hydrogen Peroxide Within Human Erythrocytes. *Blood*. 1996; 87(4): 1595-1599.
57. Garg UC, Hassid A. Nitric Oxide-Generating Vasodilators and 8-Bromo-Cyclic Guanosine Monophosphate Inhibit Mitogenesis and Proliferation of Cultured Rat Vascular Smooth Muscle Cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1989; 83(5): 1774-1777.
58. Gartner LP, Hiatt JL. *Color Textbook of Histology*, Saunders Company, 2007, 3rd Edition, Philadelphia.
59. Girotti AW. Lipid Hydroperoxide Generation, Turnover, and Effector Action in Biological Systems. *Journal of Lipid Research*. 1998; 39(8): 1529-1542.
60. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 Family Members and the Mitochondria in Apoptosis. *Genes & Development*. 1999; 13: 1899-1911.
61. Grütter MG. Caspases: Key Players in Programmed Cell Death. *Current Opinion in Structural Biology*. 2000; 10(1): 649-655.
62. Gutteridge JMC. Lipid Peroxidation and Antioxidants as Biomarkers of Tissue Damage. *Clinical Chemistry*. 1995; 41(12): 1819-1828.
63. Güçlü E. Apoptozis. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Semineri, Konya, 2004 (Danışman: Prof. Dr. Selçuk Duman).
64. Güleş Ö, Eren Ü. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2008; 2: 73-78.
65. Gültekin B. Sisplatin Toksisitesinin Siçan Testisinde Yarattığı Histolojik Değişimlere Çinkonun Etkisinin Araştırılması (Deneysel Çalışma). Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Konya, 2013 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan Canbilen).
66. Gürsoy E, Koptagel E. *Embriyoloji Atlası*. Esnaf Ofset Matbaacılık, 1997, Sivas.
67. Hackenberg S, Scherzed A, Technau A, Kessler M, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Burghartz M, Hagen R, Kleinsasser N. Cytotoxic, Genotoxic and Pro-Inflammatory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles in Human Nasal Mucosa Cells In Vitro. *Toxicology In Vitro*. 2011; 25(3): 657-663.
68. Hackenberg S, Zimmermann FZ, Scherzed A, Friehs G, Froelich K, Ginzkey C, Koehler C, Burghartz M, Hagen R, Kleinsasser N. Repetitive Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles Induces DNA Damage in Human Nasal Mucosa Mini Organ Cultures. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2011; 52(7): 582-589.
69. Halliwell B, Whiteman M. Measuring Reactive Species and Oxidative Damage In Vivo and In Cell Culture: How Should You Do It and What Do The Results Mean? *British Journal of Pharmacology*. 2004; 142(2): 231-255.
70. Halliwell B. How to Characterize an Antioxidant: An Update. *Biochemical Society Symposia*. 1995; 61: 73-101.
71. Hansen F, Stenbygaard L, Skovsgaard T. Effect of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) on Hematologic Toxicity Induced by High-Dose Chemotherapy in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Acta Oncologica*. 1995; 34(7): 919-924.
72. Hassa H. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve İVF Laboratuar Uygulamaları. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basımevi, 2003, Eskişehir.

73. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsalo A, Rapola J, Dunkel L. Apoptotic Cell Death in the Normal and Cryptorchid Human Testis: The Effect of Human Chorionic Gonadotropin on Testicular Cell Survival. *Pediatric Research*. 1996; 40: 351- 356.
74. Herrera E, Barbas C. Vitamin E: Action, Metabolism and Perspectives. *Journal of Physiology Biochemistry*. 2001; 57(1): 43-56.
75. Higuchi H, Nakaoka M, Kawamura S, Kamita Y, Kohda A, Seki T. Application of Computer-Assisted Sperm Analysis System to Elucidate Lack of Effects of Cyclophosphamide on Rat Epididymal Sperm Motion. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2001; 26(2): 75-83.
76. Howell S, Shalet S. Gonadal Damage From Chemotherapy and Radiotherapy. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*. 1998; 27(4): 927-943.
77. Hurley LH. DNA and Its Associated Processes as Targets for Cancer Therapy. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2(3): 188-200.
78. Ikeda M, Kodama H, Fukuda J, Shimizu Y, Murata M, Kumagai J, Tanaka T. Role of Radical Oxygen Species in Rat Testicular Germ Cell Apoptosis Induced by Heat Stress. *Biology of Reproduction*. 1999; 61(2): 393- 399.
79. Jagadish C, Pearton S. Zinc Oxide Bulk, Thin Films and Nanostructures, Processing, Properties and Applications. Elsevier, 2006, First Edition, Amsterdam, The Netherlands.
80. Johnsen SG. Testicular Biopsy Score Count - A Method For Registration of Spermatogenesis in Human Testes. Normal Values and Results of 335 Hypogonadal Males. *Hormones*. 1970; 1(1): 2-25.
81. Johnson F, Giulivi C. Superoxide Dismutases and Their Impact Upon Human Health. *Molecular Aspects of Medicine*. 2005; 26(4-5): 340-352.
82. Jungueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Temel Histoloji (Çeviri: AYTEKİN Y, SOLAKOĞLU S, AHİŞALİ B). Barış Kitapevi, 1998, 8. Baskı, İstanbul, s: 407-418.
83. Kalaycı Ş. Histoloji. Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1986, Bursa, s: 260-279.
84. Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, Fujiwara H. Significance of Myocytes with Positive DNA In Situ Nick End-Labeling (TUNEL) in Hearts with Dilated Cardiomyopathy, Not Apoptosis But DNA Repair. *Circulation*. 1999; 99(21): 2757-2764.
85. Kara İ. Streptozotosin İle Diyabet Oluşturulmuş Sıçanlarda Alfa Lipoik Asidin Testis Dokularına Etkisinin Histolojik Yönden İncelenmesi. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Konya, 2010 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan Canbilen).
86. Karaöz E. Özel Histoloji. SDÜ Basımevi, 2002, Isparta, s: 195-213.
87. Karataş S. Sıçanlarda Kadmiyum Klorür'ün (CdCl₂) Testis Dokusuna Etkisi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 1998 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cengiz Bayçu).
88. Kawabata TT, Chapman MY, Kim DH, Stevens WD, Holsapple MP. Mechanisms of In Vitro Immunosuppression by Hepatocyte-Generated Cyclophosphamide Metabolites and 4-Hydroperoxycyclophosphamide. *Biochemical Pharmacology*. 1990; 40(5): 927-935.
89. Kayalı H, Satıroğlu G, Taşyürekli G. İnsan Embriyolojisi. Alfa Basım Yayım Dağıtım, 1992, 7. Baskı, İstanbul.
90. Kenney LB, Laufer MR, Grant FD, Grier H, Diller L. High Risk of Infertility and Long Term Gonadal Damage in Males Treated with High Dose Cyclophosphamide for Sarcoma during Childhood. *Cancer*. 2001; 91(3): 613-621.
91. Kern JC, Kehrer JP. Acrolein-Induced Cell Death: A Caspase-Influenced Decision Between Apoptosis and Oncosis/Necrosis. *Chemico-Biological Interactions*. 2002; 139(1): 79-95.
92. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972; 26(4): 239-257.
93. Kierszenbaum AL. Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş (Çeviri: Demir R). Palme Yayıncılık, 2006, Ankara.
94. Kobyliak NM, Falalyeyeva TM, Kuryk OG, Beregova TV, Bodnar PM, Zholobak NM, Shcherbakov OB, Bubnov RV, Spivak MY. Antioxidative Effects of Cerium Dioxide Nanoparticles Ameliorate Age-Related Male Infertility: Optimistic Results in Rats and The Review of Clinical Clues for Integrative Concept of Men Health and Fertility. *The EPMA Journal*. 2015; 6: 12.
95. Koç F, Baydan E. Nanopartiküller. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2003; 12(2): 65-69.
96. Konuk M, Oktay S. Biyolojik Sistemlerde Uygulamalara Yeni Bir Yaklaşım: Nanoteknoloji ve Nanomateryaller. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*. 2007; 3: 27-34.

97. Korsmeyer SJ. Regulators of cell death. *Trends in Genetics*. 1995; 11(3): 101- 105.
98. Koyoma H, Wada T, Nishizawa Y, Iwanaga T, Aoki Y, Terasawa T, Kosaki G, Yamamoto T, Wada A. Cyclophosphamide-Induced Ovarian Failure and Its Therapeutic Significance in Patients with Breast Cancer. *Cancer*. 1977; 39(4): 1403-1409.
99. Kramer JA, Krawetz SA. RNA in Spermatozoa: Implications for The Alternative Haploid Genome. *Molecular Human Reproduction*. 1997; 3: 473-478.
100. Kuran O. *Sistemik Anatomi*. Filiz Kitabevi, 1983, İstanbul, s: 512-514.
101. Kwon CH, Borch RF, Engel J, Niemeyer U. Activation Mechanisms of Mafosfamide and the Role of Thiols in Cyclophosphamide Metabolism. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1987; 30(2): 395-399.
102. Kwon JY, Lee SY, Koedrih P, Lee JY, Kim KM, Oh JM, Yang SI, Kim MK, Lee JK, Jeong J, Maeng EH, Lee BJ, Seo YR. Lack of Genotoxic Potential of ZnO Nanoparticles in In Vitro and In Vivo Tests. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 2014; 761: 1-9.
103. Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. TUNEL Apoptotic Cell Detection in Tissue Sections: Critical Evaluation and Improvement. *The Journal Histochemistry & Cytochemistry*. 1998; 46(3): 327-334.
104. Le X, Luo P, Gu Y, Tao Y, Liu H. Squid Ink Polysaccharide Reduces Cyclophosphamide-Induced Testicular Damage Via Nrf2/ARE Activation Pathway in Mice. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2015; 18: 827-831.
105. Levy MJ, Stillman RJ. Reproductive Potential in Survivors of Childhood Malignancy. *Pediatrician*. 1991; 18(1): 61-70.
106. Limandal Ç. Siklofosfamid Kaynaklı Sıçan Gonadotoksitesinde E Vitamini'nin Olası Rolünün İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması. Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Konya, 2013 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Gökhan Cüce).
107. Liu Q, Xu C, Ji G, Liu H, Mo Y, Tollerud DJ, Gu A, Zhang Q. Sublethal Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Male Reproductive Cells. *Toxicology In Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*. 2016; 35: 131-138.
108. Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, Markesberry WR. Elevated Thiobarbituric Acid-Reactive Substances and Antioxidant Enzyme Activity in The Brain in Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1995; 45(8): 1594-1601.
109. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric Oxide: A Physiologic Messenger. *Annals of Internal Medicine*. 1994; 120(3): 227-237.
110. Manzo S, Miglietta ML, Rametta G, Buono S, Di Francia G. Embryotoxicity and Spermotoxicity of Nanosized ZnO for Mediterranean Sea Urchin Paracentrotus Lividus. *Journal of Hazardous Materials*. 2013; 254-255: 1-9.
111. Mende LS, Driscoll JLM. ZnO Nanostructures, Defects and Devices. *Materials Today*. 2007; 10(5): 40-48.
112. Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (Çeviri: Dalçık H, Yıldırım M). Nobel Tıp Kitapçevleri, 2009, 8. Baskıdan Çeviri, İstanbul, s: 263-267.
113. Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA Damage Induced by a Hydroperoxide Derivative of Cyclophosphamide. *Free Radical & Biology Medicine*. 2004; 37(6): 793-802.
114. Nanoteknoloji Strateji Grubu. Nanobilim ve Nanoteknoloji Stratejileri, Vizyon 2023 Projesi, 2004, Ankara.
115. Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and The Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001; 31(11): 1287-1312.
116. Odar İV. *Anatomi*. Hacettepe Kitapçılık Ltd. Şti, 1986, Ankara.
117. Oh MS, Chang MS, Park W, Kim DR, Bae H, Huh Y, Park SK. Yukmijihwang-Tang Protects Against Cyclophosphamide-Induced Reproductive Toxicity. *Reproductive Toxicology*. 2007; 24(3-4): 365-370.
118. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. *Analytical Biochemistry*. 1979; 95(2): 351-358.
119. Onat T, Emerk K, Sözmén EY. İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık, 2002, Ankara.
120. Özdemir İ. Deneysel Diyabet Oluşturulmuş Sıçanların Testis Dokularında Egzersiz Koruyucu Etkilerinin İncelenmesi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji-Embriyoloji Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2012 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet Kanter).
121. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 9(2): 143-148.

- 122.Özyalvaçlı ME. Varikoselli İnfertil Hastalarda İnternal Spermatik Ven Duvarında Nos İzofomlarının Ekspresyonu ve Periferik Ven İle Karşılaştırılması. Sağlık Bakanlığı İstanbul Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Üroloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, 2009 (Tez Danışmanı: Doç. Dr. S. Erdinç Ünlüer).
- 123.Özyazgan Y, Yurdakul S, Yazıcı H, Tüzün B, İşçimen A, Tüzün Y, Aktunç T, Pazarlı H, Hamuryudan V, Müftüoğlu A. Low Dose Cyclosporin A Versus Pulsed Cyclophosphamide in Behçet's Syndrome: A Single Masked Trial. *British Journal of Ophthalmology*. 1992; 76(4): 241-243.
- 124.Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as An Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition*. 2003; 22(1): 18-35.
- 125.Petorak İ. Medikal Embriyoloji. Beta Basım Yayım Dağıtım, 1986, 2. Baskı, İstanbul, s: 220-223.
- 126.Ponsot Y, Guerin JG, Carmel M. Transitional Cell Carcinoma of the Ureter and Cyclophosphamide: Apropos of A Case. *Progres en Urologie*. 1995; 5(4): 578-579.
- 127.Pool BL, Bos RP, Niemeyer U, Theuws JLG, Schmahl D. In vitro/ In vivo Effect of Mesna on the Genotoxicity and Toxicity of Cyclophosphamide A Study Aimed at Clarifying the Mechanism of Mesna's Anticarsinogenic Activity. *Toxicology Letters*, 1988; 41(1): 49-56.
- 128.Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous Nitric Oxide Inhibits Human Platelet Adhesion to Vascular Endothelium. *The Lancet*. 1987; 330(8567): 1057-1058.
- 129.Ragheb AM, Sabanegh ES. Male Fertility-Implications of Anticancer Treatment and Strategies to Mitigate Gonadotoxicity. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 2010; 10(1): 92-102.
- 130.Reiter RJ, Carneiro RC, Oh CS. Melatonin In Relation to Cellular Antioxidative Defense Mechanisms. *Hormon and Metabolic Research*. 1997; 29(8): 363-372.
- 131.Rodriguez I, Christiane O, Araki K, Garcia I, Vassalli P. An Early and Massive Wave of Germinal Cell Apoptosis is Required for the Development of Functional Spermatogenesis. *The Embo Journal*. 1997; 16(9): 2262- 2270.
- 132.Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, Jareno EJ, Romero B, Marin N, Roma J. Lipid Peroxidation Products and Antioxidants in Human Disease. *Environmental Health Perspectives*. 1998; 106(5): 1229-1234.
- 133.Ross MH, Pawlina W. *Histology a Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 5th Edition, Philadelphia.
- 134.Roy R, Singh SK, Chauhan LKS, Das M, Tripathi A, Dwivedi PD. Zinc Oxide Nanoparticles Induce Apoptosis by Enhancement of Autophagy Via PI3K/Akt/mTOR İnhibition. *Toxicology Letters*. 2014; 227(1): 29-40.
- 135.Sadırlı SK. Kanserli Hastalarda Semptom Kontrolünün Değerlendirilmesi. Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Hemşirelik Anabilim Dalı, İç Hastalıkları Hemşireliği, Yüksek Lisans Tezi, Edirne, 2008 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Serap Ünsar).
- 136.Sadler TW. Langman's Medikal Embriyoloji (Çeviri: Başaklar A.C). Palme Yayıncılık, 2005, 9. Baskı, Ankara, s: 328-337.
- 137.Sarıkaya Ş. Genital Embriyoloji. Türk Üroloji Yeterlilik Kurulları Sınav Hazırlık Kitabı, Kongre Basımevi, 2006, İstanbul, s: 31-36.
- 138.Sayılmaz A. Metotreksat (MTX) Toksisitesinin Sıçan Testisinde Yarattığı Histolojik Değişimlere C Vitamini Etkisinin Araştırılması. Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Konya, 2015 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Aydan Özgörgülü).
- 139.Seçkin İ, Ertürkoğlu A.Ş, Taşyürekli M, Arda O, Alkan F, Oktar H. Özel Histoloji Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi, 2008, İstanbul, s: 155-167.
- 140.Seçkin İ. Erkek Üreme Sistemi Özel Histoloji Ders Kitabı. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları, 2008, İstanbul, s: 252.
- 141.Shao ZB, Wang CY, Geng SD, Sun XD, Geng SJ. Fabrication of Nanometer-Sized Zinc Oxide at Low Decomposing Temperature. *Journal of Materials Processing Technology*. 2006; 178(1-3): 247-250.
- 142.Sharma V, Shukla RK, Saxena N, Parmar D, Das M, Dhawan A. DNA Damaging Potential of Zinc Oxide Nanoparticles in Human Epidermal Cells. *Toxicol Letters*. 2009; 185(3): 211-218.
- 143.Sharpe RM. Regulation of Spermatogenesis, in the Physiology of Reproduction (Edited by Knobil E, Neill JD). Raven Press, 1994, New York.
- 144.Shi H, Noguchi N, Niki E. Comparative Study on Dynamics of Antioxidative Action of α -Tocopherol Hydroquinone, Ubiquinol and α -Tocopherol Against Lipid Peroxidation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1999; 27(3-4): 334-346.

145. Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y, Yoshimura K. Regulation and Function of Ascorbate Peroxidase Isoenzymes. *Journal of Experimental Botany*. 2002; 53(372): 1305–1319.
146. Sinclair AJ, Barnett AH, Lunec J. Free Radicals and Antioxidant systems in Health and Disease. *British Journal of Hospital Medicine*. 1990; 43(5): 334-344.
147. Singh P, Kumar A, Deepak, Kaur D. Growth and Characterization of ZnO Nanocrystalline Thin Films and Nanopowder Via Low-Cost Ultrasonic Spray Pyrolysis. *Journal of Crystal Growth*. 2007; 306: 303-310.
148. Sinha Hikim AP, Wang C, Lue Y, Johnson L, Wang XH, Swerdloff RS. Spontaneous Germ Cell Apoptosis in Humans: Evidence for Ethnic Differences in the Susceptibility of Germ Cells to Programmed Cell Death. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1998; 83(1): 152-156.
149. Smirnoff N. L-Ascorbic Acid Biosynthesis. *Vitamins and Hormones*. 2001; 61: 241–266.
150. Snell RS. *Klinik Anatomi*. Nobel Tıp Kitabevi, 2004, 6. Baskı, İstanbul, s: 236.
151. Snell RS. Structures of the Anterior Abdominal Wall: Scrotum, Testis, and Epididymides. *Clinical Anatomy for Medical Students*. Lippincott Williams & Wilkins, 2000, 6th Edition, Philadelphia, p: 153-157.
152. Southorn PA, Powis G. Free Radicals in Medicine. I. Chemical Nature and Biologic Reactions. *Mayo Clinic Proceedings*. 1988; 63(4): 381-389.
153. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis Signaling. *Annual Review of Biochemistry*. 2000; 69(1): 217-245.
154. Şeftalioğlu A. Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi. Tıp ve Teknik Yayıncılık, 1998, 3. Baskı, Ankara.
155. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJ. Hormonal Control of Apoptotic Cell Death in the Testis: Gonadotropins and Androgens as Testicular Cell Survival Factors. *Molecular Endocrinology*. 1993; 7(5): 643-650.
156. Taylor MF, Boer-Brouwer M, Woolveridge I, Teerds KJ, Morris ID. Leydig Cell Apoptosis After The Administration of Ethane Dimethane Sulfonate to the Adult Male Rat is A Fas-Mediated Process. *Endocrinology*. 1999; 140: 3797-3804.
157. Taysi S, Polat F, Gül M, Sari RA, Bakan E. Lipid Peroxidation, Some Extracellular Antioxidants, and Antioxidant Enzymes in Serum of Patients with Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology International*. 2002; 21(5): 200-204.
158. Torres CD, Munell F, Ferrer I, Reventós J, Macaya A. Identification of Necrotic Cell Death by the TUNEL Assay in the Hypoxic-Ischemic Neonatal Rat Brain. *Neuroscience Letters*. 1997; 230(1): 1-4.
159. Traber MG, Atkinson J. Vitamin E, Antioxidant and Nothing More. *Free Radical Biology & Medicine*. 2007; 43(1): 4–15.
160. Trasler JM, Hales BF, Robaire B. Chronic Low Dose Cyclophosphamide Treatment of Adult Male Rats: Effect on Fertility, Pregnancy Outcome and Progeny. *Biology of Reproduction*. 1986; 34: 275–83.
161. Tunç L. Erkek İnfertilitesi ve Nitrik oksitler. *Androloji Bülteni*. 2006; 25: 128-131.
162. Turedi S, Yulug E, Alver A, Kutlu O, Kahraman C. Effects of Resveratrol on Doxorubicin Induced Testicular Damage In Rats. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie*. 2015; 67: 229-235.
163. Turgut O, Keskin HL, Avşar AF. Nanoteknoloji Nedir? *Turkish Medical Journal*. 2011; 5(1): 43-49.
164. Türk G. Kemoterapötiklerin Erkek Üreme Sistemi Üzerindeki Yan Etkileri ve Koruyucu Stratejiler. *Marmara Pharmaceutical Journal*. 2013; 17: 73-92.
165. Türker A, Dizdar Ö. Kemoterapötikler. *Meslek İçi Sürekli Eğitim Dergisi*. 2005; 11-12: 73-85.
166. Ulukaya E. Apoptozis Ders Notları. Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 2003, Bursa.
167. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative Stress, Exercise, and Antioxidant Supplementation. *Toxicology*. 2003; 189(1-2): 41-54.
168. Ünlükal N. Profonefos ve MCPA'nı Testise Etkilerinin Ultrastrüktürel Düzeyde İncelenmesi. Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2011 (Tez Danışmanları: Prof. Dr. Attila Dağdeviren ve Prof. Dr. Gülten Karabay).
169. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2007; 39(1): 44-84.

170. Watson AR, Rance CP, Bain J. Long Term effects of Cyclophosphamide on Testicular Function, *British Medical Journal*. 1985; 291: 1457-1460.
171. Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van De Velde CJ, Cornelisse CJ, Van Dierendock JH. A New Method to Detect Apoptosis in Parafin Sections: In situ End-Labeling of Fragmented DNA. *The Journal Histochemistry & Cytochemistry*. 1993; 41: 7-12.
172. Yetim İ. Siklofosfamide Bağlı Sıçan Testis Hasarında E Vitamininin Rolünün Histolojik Olarak İncelenmesi. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir, 2011 (Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Dilek Burukoğlu).
173. Yıldırım M. İnsan Anatomisi, Sistemik Temel Bilgiler, Klinik Özellikler, TUS-Çalışma Soruları ve Yanıtları, Seçilmiş Şekiller, Kısa Sözlük. Nobel Tıp Kitapevleri, 1999, 4. Baskı, İstanbul, s: 225-229.
174. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in Health and Disease. *Journal of Clinical Pathology*. 2001; 54: 176-186.
175. Zarei M, Shivanandappa T. Amelioration of Cyclophosphamide-Induced Hepatotoxicity By The Root Extract of *Decalepis Hamiltonii* in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 57: 179-184.
176. Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002; 33(3): 337-349.
177. Zhang XF, Gurunathan S, Kim JH. Effects of Silver Nanoparticles on Neonatal Testis Development in Mice. *International Journal of Nanomedicine*. 2015; 10: 6243-6256.
178. Zhao H, Jin B, Zhang X, Cui Y, Sun D, Gao C, et al. Yangjing Capsule Ameliorates Spermatogenesis in Male Mice Exposed to Cyclophosphamide. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*. 2015; 2015: 980583.

7. ÖZGEÇMİŞ

Nureddin ATASOY 1991 yılında Isparta’da doğdu. İlköğrenimini Ülkü ilköğretim okulunda, lise eğitimini Halıkent lisesinde tamamladı. 2009 yılında Ordu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandı. 2011 yılında yatay geçiş ile Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümüne geçerek eğitimini burada sürdürdü. 2013 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Bölümünden mezun oldu. 2013 yılında Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.



8. EKLER

EK A: Etik Kurul Onayı



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi



Karar Sayısı: 2014 – 058

Karar Tarihi: 14.11.2014

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji A.D.'den Yrd.Doç.Dr.Gökhan CÜCE, Nureddin ATASOY, Tıbbi Biyokimya A.D.'den Prof.Dr.Mehmet AKÖZ ve Mühendislik Fakültesi Mekanik Bölümünden Uzm.Mürsel EKREM tarafından sunulan "**Çinko Oksit Nano Partikülleri ve Siklofosamidin Sıçanlarda Testis Histolojisi ve Oksidan-Antioksidan Değerler Üzerine Etkisi**" başlıklı tez projesi 9 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

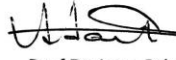
Projede 4 grupta toplam 28 adet sıçan (Wistar Albino) kullanılacağı ve sıçanların anestezi altında eksanguinasyon ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.

Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin, Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddeler gereğince "Etik Kurallara Uygunluk Esası" dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.

Necmettin Erbakan Üniversitesi KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ndeki ilgili maddelerde belirtilen başvuru sahibinin sorumlulukları ve hayvan deneyleri ile ilgili etik ilkeler saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında yönerge ilkelerine uyulduğu ve çalışmanın deneysel kısmını gerçekleştirecek araştırmacıların deney hayvanları kullanım sertifikasına sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından "**Uygun**" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.


Prof.Dr.Selim KUTLU
Başkan

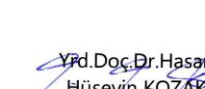

Prof.Dr.Lema TAVLI
Üye



Prof.Dr.Ayşe Saide
ŞAHİN
Üye

Prof.Dr.Mehmet GÜL
Üye-Katılmadı


Doç.Dr.Ercan KURAR
Üye


Doç.Dr.Tevfik
KÜÇÜKKARTALLAR
Üye


Yrd.Doç.Dr.Hasan
Hüseyin KOZAK
Üye


Yrd.Doç.Dr.Ömer
TANYELİ
Üye

Dr.Ahmet UZUNAY
Üye-Katılmadı


Vet.Hek.Alpaslan ÖZKÜRKÇÜLER
Üye


Mustafa ŞİRİN
Üye

Adres : Meram Tıp Fakültesi Kampüsü 42080 Akyokuş – Meram / KONYA

Tel : +90 332 223 71 11

Faks : +90 332 223 71 24

e-posta : konudam@konya.edu.tr

Elektronik Ağ : <http://www.konya.edu.tr/merkezler/konudam>



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
KONÜDAM Deneysel Tıp Uygulama ve
Araştırma Merkezi Müdürlüğü




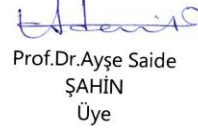
Karar Sayısı: 2016 – 015

Karar Tarihi: 26.02.2016

Proje yürütücüsünün başvurusu doğrultusunda **14.11.2014** tarih ve **2014/058** sayı ile onay alan "**Çinko Oksit Nano Partikülleri ve Siklofosfamidin Sıçanlarda Testis Histolojisi, Apoptozis ve Oksidan-Antioksidan Değerler Üzerine Etkisi**" başlıklı araştırma projesinden Yrd.Doç.Dr. Mürsel EKREM'in çıkarılmasının "**Uygun**" olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

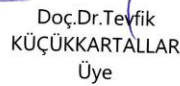

Prof.Dr.Selim KUTLU
Başkan


Prof.Dr.Lema TAVLI
Üye


Prof.Dr.Ayşe Saide
ŞAHİN
Üye


Prof.Dr.Mehmet GÜL
Üye


Doç.Dr.Ercan KURAR
Üye


Doç.Dr.Tefik
KÜÇÜKKARTALLAR
Üye


Yrd.Doç.Dr.Hasan
Hüseyin KOZAK
Üye


Yrd.Doç.Dr.Ömer
TANYELİ
Üye

Vet.Hek.Halil Aydın
ŞİMŞEK
Üye-Katılmadı


Vet.Hek.Alpaşlan ÖZKÜRKCÜLER
Üye


Mustafa ŞİRİN
Üye

Adres : Meram Tıp Fakültesi Kampüsü 42080 Akyokuş – Meram / KONYA
Tel : +90 332 223 71 11 e-posta : konudam@konya.edu.tr
Faks : +90 332 223 71 24 Elektronik Ağ : <http://www.konya.edu.tr/merkezler/konudam>

EK B: İntihal Raporu

08.08.2016

Turnitin

preferences

turnitin Originality Report

Processed on: 30-Jul-2016 00:07 EEST
ID: 691079614
Word Count: 18116
Submitted: 1

Nureddin Atasoy Yüksek Lisans Tezi
By Nureddin Atasoy

Similarity Index
22%

Similarity by Source
Internet Sources: 21%
Publications: 5%
Student Papers: 2%

Document Viewer

include sources include bibliography exclude matches < 5 words

mode: show highest matches together

1. GİRİŞ VE AMAÇ Günümüzde, bilimlerdeki hızlı gelişmeler ile her geçen gün daha fazla ilgi uyandıran nanoteknoloji sayesinde, sanayi ve

teknoloji alanlarında olduğu gibi biyoloji ve tıp alanlarında da hızlı gelişmeler görülmüştür. Nanoteknoloji ismi, ölçü birimi "nanometre" den

köken almakta olup,

metrenin milyarda birini ifade etmektedir. Bir nanometre (nm), düzlemine 2-3 tane atomun sığabileceği kadar küçüktür. Nanoteknoloji, nanometre boyutlarında

malzemeler tasarlayarak

yeni yöntemlerle belirlenmiş amaçlara yönelik aygıtlar ve aletler üretmeyi amaçlamaktadır

(Konuk ve Oktay 2007). Şekil 1.1: Makro, mikro ve nano yapıların boyutlarının karşılaştırılması Çinko oksit (ZnO) nanopartiküller boyası, pigment, metalurji katkı maddeleri, kâğıt, alajantlar, seramik, kimyasal filer, elektronik, katalizör, tıbbi tiner, kozmetik, kişisel bakım gibi çeşitli endüstriyel alanlarda en yaygın kullanılan malzemelerden biridir (Baek ve ark. 2012). ZnO nanopartiküller UV dalga boyu aralığında soğurma özelliklerinden dolayı güneş kremleri ve kozmetik ürünlerinde kullanılmaktadır (Marzo ve ark. 2013). ZnO genellikle düşük bir toksisiteli bir malzeme olarak kabul edilmektedir. Çünkü çinko insan vücudunda temel bir eser elementtir ve gıdalarda geniş kapsamli olarak bulunmakta birlikte aynı bir besin takviyesi olarak da ilave edilir. Bu nedenle çinko nanopartiküllerin toksisite değerlendirilmesi çok az ilgi görmektedir (Baek ve ark. 2012). Çinko oksit'in non toksik olduğu geleneksel

1 2% match (Internet from 20-May-2015)
<http://openaccess.nyu.edu.tr:8080>

2 2% match (Internet from 22-Aug-2015)
<http://acikerisim.selcuk.edu.tr:8080>

3 1% match (Internet from 27-May-2016)
<http://acikerisim.deu.edu.tr>

4 1% match (Internet from 11-Mar-2016)
<http://acikerisim.deu.edu.tr>

5 1% match (Internet from 18-May-2015)
<http://www.konmalaqerit.com>

6 1% match (Internet from 07-Jul-2015)
<http://www.istanbulsaqlik.gov.tr>

7 1% match (Internet from 01-Jun-2015)
<http://openaccess.nyu.edu.tr:8080>

8 1% match (Internet from 12-Jul-2016)
<http://obozluyor.deu.tr>

9 1% match (Internet from 04-Dec-2012)
<http://vfdereq.vyu.edu.tr>

10 1% match (Internet from 28-Mar-2016)
<http://www.dogaltesleri.net>

11 1% match (Internet from 06-Apr-2014)

https://turnitin.com/newreport.asp?r=39-9940218252315&svr=04&lang=en_us&cid=691079614&pid=2&f=1

1/1