

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**SİKLOFOSFAMİD KAYNAKLI SIÇAN
GONADOTOKSİSİTESİNDE E VİTAMİNİ'NİN OLASI
ROLÜNÜN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

ÇİSEM LİMANDAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. GÖKHAN CÜCE

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 131318002 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2013

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**SİKLOFOSFAMİD KAYNAKLI SIÇAN
GONADOTOKSİSİTESİNDE E VİTAMİNİ'NİN OLASI
ROLÜNÜN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI**

ÇİSEM LİMANDAL

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. GÖKHAN CÜCE

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 131318002 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA 2013

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans *Çisem Limandal'ın "Siklofosamid Kaynaklı Sıçan Gonadotoksisitesinde E Vitamini'nin Olası Rolünün İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması"* başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Konya/ 01.10.2013

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Gökhan CÜCE

Meram Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji ABD

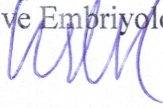


Jüri Üyesi

Prof. Dr. Hasan CÜCE

Meram Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji ABD

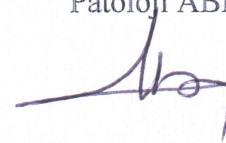


Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Hacı Hasan ESEN

Meram Tıp Fakültesi

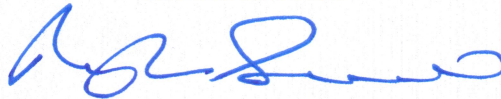
Patoloji ABD



Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 09.10.2013 tarih ve 19168 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neyhan Ergene

Enstitü Müdürü



APPROVAL

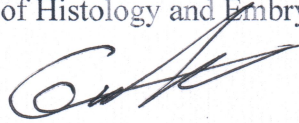
We certify that we have read this dissertation entitled "*Immunohistochemical Examination of the Role of the Vitamin E in Cyclophosphamide-Induced Rat Gonadotesticular Injury*" by "*Çisem Limandal*" that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of "*Histology and Embryology*", Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

Konya, Turkey / 01.10.2013

Principal Advisor

Assistant Professor Gökhan CÜCE

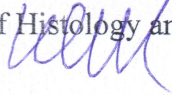
Department of Histology and Embryology



Examination Committee Member

Professor Hasan CÜCE

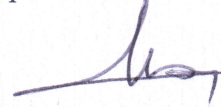
Department of Histology and Embryology



Examination Committee Member

Assistant Professor Hacı Hasan ESEN

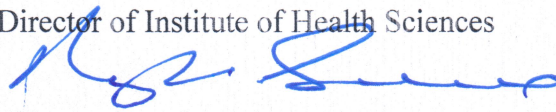
Department of Pathology



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

Prof. Dr. Neyhan Ergene

Director of Institute of Health Sciences



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: 01/10/2013

Öğrencinin Adı Soyadı: Çisem LİMANDAL

İmzası:



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimin yönlendirmesini ve sonuçlanmasını sağlayıp emeğini esirgemeyen danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Gökhan CÜCE' ye ve benzer şekilde çalışmamın şekillenmesinde, doğru biçimde denetlenmesinde ve fikir geliştirmemde yardımlarını esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Bölüm Başkanı Prof. Dr. Hasan CÜCE' ye en içten saygılarımla teşekkür ederim.

Köklü bir değişiklik yapmaya hazırlandığım ve geleceğime doğru attığım önemli bir adımda, bana sonsuz iyi niyetini ve desteğini sunan Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü Prof. Dr. Neyhan ERGENE' ye minnet ve şükranlarımı sunmayı kendime görev bilirim.

Bugüne kadar sunduğu sonsuz bilgi birikimi ve geleceğimde kullanacağım bilgilerin tohumlarını bana serptiği için, tökezlediğim her konuda bana yaşam koçluğu yapmaktan sıkılmadığı için, sevgi, ilgi ve bilgisini esirgmeden paylaştığı için ve bana Histoloji ve Embriyoloji'yi sevdirdiği için, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sayın Varol ŞAHİNTÜRK' e saygı, sevgi ve sonsuz minnet duygularımı arz ederim.

Bugüne kadar hiçbir konuda maddi manevi desteğini esirgemeyen, her konuda yanımda olan, bıkmadan beni bugünlere getiren, en başta annem Mukaddes ÖZOĞUL olmak üzere değerli aileme ve yakınlarıma sevgi dolusu teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım.

Çalışmalarım sırasında uzun süre ihmal ettiğim, buna rağmen büyük maddi manevi destek sunan, yardımlarını hiçbir koşulda esirgemeyen ve bana her zaman kuvvet veren eşim Ömer LİMANDAL' a sonsuz sevgi, minnet ve teşekkürlerimi iletirim.

Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 131318002 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

İç Kapak.....	i
Tez Onay Sayfası.....	ii
Approval.....	iii
Tez Beyan Sayfası	iv
Önsöz ve/veya Teşekkür.....	v
İçindekiler.....	vi
Kısaltmalar ve Simgeler Listesi.....	ix
Şekiller Listesi.....	x
Tablolar Listesi.....	xi
Resimler Listesi.....	xii
Özet.....	xiii
Abstract.....	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Testis Anatomisi.....	4
2.2. Testis Embriyolojisi.....	6
2.3. Testis Histolojisi.....	8
2.3.1. Seminifer Tübüller.....	8
2.3.1.1. Sertoli Hücreleri.....	9
2.3.1.2. Spermatogenetik Seri Hücreleri ve Spermatogenezis.....	11
2.3.1.2.1. Spermatogonyumlar.....	12
2.3.1.2.2. Primer ve Sekonder Spermatozitler.....	13
2.3.1.2.3. Spermatidler.....	13
2.3.1.2.4. Spermatozoonlar.....	14
2.3.2. İnterstisyel Alan.....	15
2.3.2.1. Leydig Hücreleri.....	16
2.4. Kemoterapötikler.....	17
2.4.1. Alkilleyici Ajanlar.....	18

2.4.1.1. Siklofosfamid (Cyclophosphamide= CP)	18
2.5. E Vitamini.....	21
2.6. Apoptozis.....	24
2.6.1. Apoptozisin Başlatılması.....	25
2.6.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu.....	25
2.6.3. Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler.....	26
2.6.4. Fagositoz.....	26
2.7. Apoptozis Mekanizması.....	26
2.7.1. Ekstresek / Reseptör Aracılı Yol.....	26
2.7.2. İntrensek (mitokondrial) Yol	27
2.8. Spermatogenezde Apoptozisin Rolü.....	27
2.9. Apoptozun Tespiti: TUNEL Metodu.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği.....	29
3.2. Deney Hayvanları.....	29
3.3. Deney Hayvan Grupları.....	29
3.4. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü.....	30
3.5. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) Hesaplaması	31
3.6. Histolojik Uygulamalar.....	31
3.6.1. Nötral Formaldehid Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı.....	31
3.6.2. Dokuların Alınması.....	31
3.6.3. Işık Mikroskobu için Dokuların Hazırlanması.....	31
3.6.4. Kesitlerin alınması ve boyanması	33
3.7. İmmünohistokimyasal Boyama.....	34
3.7.1. Bax ve C-Kit Boyama Metodu.....	34
3.7.2. Tunel Metodu.....	35
3.8. Apoptotik İndeks.....	37
3.9. Johnsen Skorlama Yöntemi.....	37
3.10. İstatistiksel Yöntemler	38

4. BULGULAR.....	39
4.1. Vücut Ağırlığı Farkı.....	39
4.2. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) hesaplaması.....	39
4.3. Histopatolojik Bulgular.....	39
4.4. Johnsen Skoru.....	40
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	43
4.5.1. Bax Boyama.....	43
4.5.2. C-Kit Boyama.....	47
4.5.3.TUNEL Boyama.....	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	56
6. KAYNAKLAR.....	59
7. ÖZGEÇMİŞ.....	73
8.EKLER.....	74

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

CP	Siklofosfamid
E vit	E vitamini
DNA	Deoksiribonükleik asit
TBF	Testis Belirleyici Faktör
SRY	Cinsiyet Belirleyici Gen
AMH	Antimüllerian Hormon
MIS	Müller kanallarını baskılayıcı madde
hCG	İnsan Koryon Gonadotropin Hormonu
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
ABP	Androjen Bağlayıcı Protein
LH	Luteinleştirici Hormon
µm	Mikrometre
cm	Santimetre
i.p.	Periton İçi
PAS+H	Periyodik Asit Schiff + Hematoksilen Boyası
°C	Santigrat Derece
FAM	Fosforamid Mustard
RNA	Ribonükleik Asit
LDL	Düşük Dansiteli Lipoproteinler
α	Alfa
H-E	Hematoksilen-Eozin boyası
TAİ	Testis Ağırlık İndeksi
StAR	Steroidogenik Akut Regülatör Protein
TBP	Tokoferol Bağlayıcı Protein
Apaf-1	Apopitozis Proteaz Aktive Edici Faktör1
TUNEL	Terminal-Deoksi Nükleotidil Transferaz Nick End-Labeling

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Siklofosfamid'in kimyasal yapısı.....18

TABLULAR LİSTESİ

Tablo1. TAİ değerlerinin değerlendirilmesi.....	39
Tablo2. Johnsen skorlamanın gruplar açısından değerlendirilmesi.....	40
Tablo3. Bax boyanması verilerinin Kruscal Wallis testi sonuçları.....	46
Tablo4. Bax boyanma verilerinin Man Whitney U Testi sonuçları.....	46
Tablo5. C-kit boyanması verilerinin Kruscal Wallis testi sonuçları.....	47
Tablo6. C-kit boyanması verilerinin Man Whitney U Testi sonuçları.....	47
Tablo7. TUNEL Boyamada One Way Anova Testi Sonuçları.....	51
Grafik1. TUNEL Boyamada Ortalama ve Standart Hata değerleri	55

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. 1. Gruba ait bir kesitte HE boyası	41
Resim 2. 2. Gruba ait bir kesitte HE boyası	41
Resim 3. 3. Gruba ait bir kesitte HE boyası.....	42
Resim 4. 4. Gruba ait bir kesitte HE boyası	42
Resim 5. 1. Gruptan alınan bir kesitte seminifer tübüllerde Bax boyanması.....	43
Resim 6. 2. Gruba ait kesitte spermatogonyumlarda Bax boyanması.....	43
Resim 7. 3. Gruba ait kesitte Bax boyanması.....	44
Resim 8. 4. Gruba ait bir kesitte Bax boyanması.....	44
Resim 9. 2. Gruba ait bir kesitte spermatogonyumlarda Bax boyanması.....	45
Resim 10. 2. Gruba spermatogonyumlarda Bax boyanması.....	45
Resim 11. 1. Gruba ait bir kesitte C-kit boyanması.....	48
Resim 12. 2. Gruba ait bir kesitte C-kit boyanması.....	48
Resim 13. 3. Gruba ait bir kesitte C-kit boyanması.....	49
Resim 14. 4. Gruba ait bir kesitte C-kit boyanması.....	49
Resim 15. 1. Gruba ait bir kesitte C-kit boyanması.....	50
Resim 16. 3. Gruba ait bir kesitte C-kit boyanması.....	50
Resim 17. 1. Gruba ait bir kesitte Tunel boyanması	52
Resim 18. 2. Gruba ait bir kesitte Tunel boyanması.....	52
Resim 19. 3. Gruba ait bir kesitte Tunel boyanması.....	53
Resim 20. 4. Gruba ait bir kesitte Tunel boyanması.....	53
Resim 21. 2. Grupta spermatogonyumlarda Tunel boyanması	54
Resim 22. 2. Grupta spermatogonyumlarda Tunel boyanması	54

ÖZET

SİKLOFOSFAMİD KAYNAKLI SIÇAN GONADOTOKSİSİTESİNDE E VİTAMİNİ'NİN OLASI ROLÜNÜN İMMÜNOHİSTOKİMYASAL YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Siklofosfamid kanser tedavisinde kullanılan yaygın bir ilaçtır ve testiste metabolitleri sebebiyle toksisiteye neden olur. Bu yan etkilerden korunmak için kanser tedavisi esnasında E vitamini gibi bazı antioksidan ajanlar toksisiteyi engelleyebilir. Bu çalışmada CP' nin sıçan testislerindeki toksik etkisi üzerine E vitaminin rolünün araştırılması amaçlandı. Çalışmamızda, 28 adet Wistar Albino türü sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol, 20 mg/kg Siklofosfamid, 20 mg/kg Siklofosfamid + 100 mg/kg E vitamini ve 100 mg/kg E vitamini verilen grup olmak üzere 4 gruba ayrıldı. 7 gün boyunca intraperitoneal olarak enjeksiyonlar gerçekleştirildi. Sıçanların testis dokuları alındıktan sonra rutin histolojik takipler yapıldı immünohistokimyasal teknikler uygulandı.

Testis Ağırlık İndeks'i bakımından gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı. Gruplar; Johnsen skorlama bakımından karşılaştırıldığında ise, bu gruplardan CP grubu, CP+Vit E grubu ve diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu. Apoptozisi göstermek için yapılan immünohistokimyasal Bax ve TUNEL metodu sonucuna göre CP grubu ile diğer üç grup arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü. C-kit ekspresyonu ise CP grubunda düşük, diğer gruplarda istatistiksel olarak yüksekti. Vitamin E uygulaması Johnsen skorlama, Bax, TUNEL ve C-kit ekspresyonları üzerine iyileştirici bir etki göstermiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada CP uygulamasının apoptozisi indüklediği, testis dokusu için toksik etkiye sahip olduğu ve histolojik yapıyı bozduğu saptandı. Elde edilen bulgulara göre, CP' ye bağlı olarak testis dokusunda meydana gelen hasarın E vit verilmesiyle önlenebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Apoptozis, E vitamini, Sıçan, Siklofosfamid, Testis.

ABSTRACT

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATION OF THE ROLE OF THE VITAMIN E IN CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED RAT GONADOTESTICULAR INJURY.

Cyclophosphamide is a commonly used drug to treat cancer and causes testicular toxicity due to metabolites. To avoid these side effects during cancer treatment, some of the antioxidant agents such as vitamin E can prevent toxicity. In this study, it is aimed to define the role of the Vitamin E on CP-induced testicular toxicity in rats. 28 Wistar Albino rats were used in the present study. Rats were divided into 4 groups as control, 20 mg/kg cyclophosphamide, 20 mg/kg cyclophosphamide + 100 mg/kg vitamin E and only 100 mg/kg vitamin E group respectively. Injections were administered intraperitoneally for 7 days. After the testicular tissue of rats were removed, routine histological and immunohistochemical techniques were performed.

There was no significant difference between the groups in terms of testicular weight index. Significant differences were found between CP group, CP + Vitamin E group and the other groups in terms of Johnsen scoring. Apoptosis was expressed by using immunohistochemical Bax and TUNEL method and CP group showed a significant difference between the other three groups. C-kit expression was lower in the CP group and statistically higher in the other groups. Vitamin E application showed a curative effect on Johnsen scoring, Bax, TUNEL and C-kit expressions.

In conclusion, the application of the CP induced apoptosis, had toxic effects on testicular tissue and histological structure was exchanged. According to the findings, administration of vitamin E can prevent the occurring testicular tissue damage due to CP.

Key words : Apoptosis, Vitamin E, Rat, Cyclophosphamide, Testis.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser, vücuttaki dokulardan birine ait bir veya birkaç hücrenin normal özelliklerinden farklı olarak değişim göstermesi ve kontrolsüz çoğalması ile meydana gelen ve genellikle tümör (kitle) oluşmasına sebep olan, çağımızın en önemli ölümcül hastalıklarından birisidir (Wright 2002).

Kemoterapi, özellikle kontrolsüz çoğalan hücrelere karşı seçici öldürücü etkileri olan, doğal veya sentetik kimyasal, biyolojik ajanlar ve hormonlarla yapılan tedavi şeklidir. Kemoterapi uygulamasının, bu tür hücrelere karşı başarılı sonuçlar vermesi, malign tümörlerin de bazı kimyasallar tarafından iyileştirilebileceği olasılığı üzerine çalışmacıları düşündürmüştür. Çalışmacılar bu fikirden yola çıkarak, antineoplastik ilaçlar üzerine birçok çalışma yapmış ve bu türde birçok sayıda ilacı tedavi amacıyla denemişlerdir (Pizzo ve Poplack 2001).

Kanserli (neoplastik) hücrelerin normal hücrelere göre daha hızlı büyümesi ve çoğalması nedeniyle çoğu kemoterapötik ilaç, bu tür özellik taşıyan hücrelerin yok edilmesi için geliştirilmiştir. Ancak bazı normal hücrelerde de benzer özellikler bulunmakta olup bu hücreler de kemoterapiden direkt olarak etkilenmektedir ve bununla birlikte yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu yan etkiler daha çok kan hücreleri, gastrointestinal sistemdeki hücreler, kıl follikülleri ve spermiler gibi hızlı bölünebilen hücreler üzerinedir. Bunun dışında bazı kemoterapötikler kalp, böbrekler, mesane, akciğerler ve sinir sistemi organları gibi hayati organlar üzerinde de olumsuz etkiler oluşturabilmektedir (Page ve Takimoto 2004; Sabanegh ve Ragheb 2009; Demirci ve ark. 2010; Ragheb ve Sabanegh 2010).

Antineoplastik kemoterapötik bir ajan olan siklofosfamid, alkilleyici bir kimyasal ajandır ve en çok kullanılan antikanser ve immunosuppresant (bağışıklık sistemi baskılayıcısı) bir ilaçtır. Siklofosfamid; akut ve kronik lösemi, meme kanseri, multitip myeloma, lenfoma, romatid artrit tedavisinde ve kemik iliği nakillerinde sıkça kullanılır (Kumar ve Kuttan 2005; Senthilkumar ve ark. 2006). DNA'da guanin içeren kısımları alkilleyerek etki eder ve yüksek dozlarda kullanıldığında etkili olabilmektedir, ancak yan etkileri olan hematotoksisite, ürotoksisite ve hepatotoksisite gibi etkilerinden dolayı sınırlı kullanılması gerekmektedir (Uyar ve ark. 1996).

Siklofosamid; akut ve kronik lösemi, meme kanseri, multitip myeloma, lenfoma, romatid artrit tedavisinde ve kemik iliği nakillerinde oldukça sık kullanılır. Bunların yanında CP' nin etkin biçimde tedavi ettiği hastalıklardan bazıları; immünolojik böbrek hastalıkları, bazı granüloamatöz hastalıklar veya vaskülit tipleri ve klasik tedaviye dirençli romatoid artrit sayılabilir (Papageorgio ve McLeod 2002).

Kemoterapötikler hızlı proliferasyon ve farklılaşma yeteneğindeki sağlıklı hücreler üzerinde primer yan etkiye sahip olduklarından dolayı, sitotoksik kemoterapi doğrudan gonadal hasara neden olmakta ve bu hasarın derecesi de ilacın verilmiş şekline, dozuna ve hastanın yaşına bağlı olarak değişebilmektedir. Köken spermatogoniumlar çoğalma ve farklılaşma göstermediklerinden dolayı, proliferatif ve farklılaşan hücelere göre kemoterapinin doğrudan etkilerine karşı genellikle daha dirençlidirler. Ancak proliferasyon ve farklılaşma gösteren spermatogoniumlar, spermatozoidler ve spermatidler ise, kemoterapinin doğrudan etkilerine çok daha hassas olduklarından, kemoterapötiklerle tedaviye başladıktan yaklaşık 4-6 hafta sonra, infertilite oranı oldukça artış göstermektedir (Meistrich ve ark. 1992; Ragheb ve Sabanegh 2010).

Alkilleyici ajanların erkek üreme organlarında yüksek toksisiteye neden olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur ve bu alkilleyici ajanlardan biri olan CP, kemoterapi tedavisinde renal hastalıklar ve bazı kanser türlerinde, yalnız başına veya başka ilaçlarla kombine olarak kullanıldığında, erkeklerde ve çocuklarda testiküler fonksiyonları azaltarak infertiliteye neden olduğu bildirilmiştir. CP'nin erkek rodentlerin üreme fonksiyonlarına olan olumsuz etkisi de kanıtlanmıştır (Chapman 1983).

Ayrıca bazı çalışmalarda da, CP'nin uzun dönem tedavisinin infertilite oluşumuna ve üreme organlarının ağırlığının azalmasına yol açtığı gözlenmiştir (Trasler ve ark. 1986).CP tedavisinin bazı çalışmalarda erkek hastalarda azospermi ve oligozoospermiye yol açtığı da gösterilmiştir (Howell ve Shalet 1998).

Yağda eriyen vitaminlerden olan E vitamini (E vit), biyolojik sistemlerde önemli bir antioksidandır (Kostner ve ark. 1995). E vitamini tokoferol yapısında olup α , β , γ , δ olarak 4 farklı tipin karışımı şeklinde bulunabilir ve yağda çözünür. E vitamininin en aktif şekli olan α -tokoferol çok kuvvetli bir antioksidandır ve hücre membran fosfolipidlerinde bulunan çoklu doymamış yağ asitlerini, serbest

radikallerin zararlı etkilerinden korur. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır (Burton ve Ingold 1989). E vitamini dokularda özellikle, membran bölgelerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. E vitamini bu bölgelerde, lipid peroksidasyonu zincirini kırarak hücre hasarını önler ve bununla birlikte hücre içi iletişimin normal şekilde ilerlemesine yardımcı olur (Nagel ve ark. 1997).

E vit başlıca işlevi çoklu doymamış yağ asitleri gibi hücre bileşenlerinin moleküler oksijen ve serbest radikaller tarafından enzimatik olmayan oksidasyonundan koruyan bir antioksidan olmasıdır (Champe ve Harvey 1997). Bununla birlikte E vitamininin serbest radikallerin zararlı etkilerini önlediği gösterilmiştir. Ayrıca E vitamini, sperm ve testislerin bazı kimyasallar ve radyasyon tarafından ortaya çıkan toksik hasarı önlediği ve bununla birlikte E vit' nin eksikliğinde testis dokusunun germinatif epitelinde dejenerasyonlar olduğu yapılan çalışmalarda ortaya konmuştur (Zhou ve ark. 2006; Şahintürk ve ark. 2007).

Bu kapsam çerçevesinde araştırma sonuçlarımızın toplum sağlığı açısından önemli olabileceği, literatüre katkı sağlayacağı ve bu konudaki araştırmalara ve farklı yorumlara ışık tutacağı düşüncesindeyiz. Bu çalışmanın amacı; belirli dozlarda verilen Siklofosfamid'in, sıçan testislerinde oluşturduğu toksisiteye E vitamininin nasıl bir etki göstereceğini, immünohistokimyasal yöntemler ışığında belirlemektir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Testis Anatomisi:

Testisler erkekte temel üreme organı olup, sağlı sollu bir çift organ olarak iki uyluk arasında skrotum içinde bulunurlar. Testislerin her biri 4-5 cm uzunluğunda, 2,5 cm genişliğinde, 3 cm kalınlığında ve 10-14 g ağırlığındadır. Yaklaşık aynı büyüklükte olmalarına karşın, yapısal olarak sol testis sağ testise göre biraz daha aşağıda yer alır. Ayrıca sağ testis soldakine göre %10 daha ağırdır. Sıcaklıkları vücut sıcaklığından 3-4 °C daha düşüktür (Odar 1986; Dere 1988; Arıncı ve Elhan 1999; Yıldırım 1999; Burukoğlu 2007; Seçkin 2008).

Testislerin temel fonksiyonlarını yapabilmeleri için karın boşluğundan skrotuma inmeleri zorunludur. Testisler bu inişleri sırasında karın ön duvarı tabakalarını da beraberinde sürüklerler. Testisler aşağıda sıralanmış olan tabakalarla 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 testis'in facies medialis ve facies lateralis olarak iki yüzü, margo anterior ve margo posterior olarak iki kenarı, ekstremitas süperior ve ekstremitas inferior olmak üzere iki ucu vardır. Margo anterior, peritoneum viscerale'nin uzantısı olan epiorchium ile kaplıdır. Margo posterior'un medial bölümüne corpus epididimis oturur. Margo posterior'un orta kısmında testis damar ve sinirleri ile spermin kanallarının geçtiği mediastinum testis denilen yapı bulunur. Ekstremitas süperior üst uç olup, buraya caput epididimis yerleşmiştir. Ekstremitas inferior testis'in alt ucu olup, cauda epididimis ile örtülüdür (Arıncı ve Elhan 1999; Gartner ve Hiatt 2007).

Testisler, dıştan içe doğru olmak üzere tunica vaginalis, tunica albuginea ve tunica vaskulosa olmak üzere üç tabaka ile sarılmışlardır (Arıncı ve Elhan 1999).

Tunica vaginalis, testislerin karın boşluğundan skrotum kesesine doğru inerken, beraberlerinde getirdikleri abdominal periton tabakası olan en dıştaki bu tabaka, mezotelyal hücrelerle döşelidir. Skrotumun iç yüzünü döşeyen lamina parietalis (periorchium) ve testisi saran lamina visceralis (epiorchium) olmak üzere iki yapraklıdır (Trainer 1987; Arıncı ve Elhan 1999).

Tunica albuginea, testisi örten lamina visceralis'in altında testisi dıştan saran mavimsi beyaz renkli, fibröz bir katman olup, bu tabakayı oluşturan beyaz fibröz demetler, farklı yönlerde uzanarak birbirlerinin içine girerler. Tunica albuginea, testis arka yüzünde kalınlaşarak mediastinum testisten kalın ve vertikal bir bölme oluşturur. Mediastinum testis, organa damar, sinir ve kanalların girip çıktığı ve rete testis adı verilen kanalcıkların bulunduğu bölgedir (Kuran 1993; Arıncı ve Elhan 1999). Testisin üst ucundan alt ucuna kadar uzanan mediastinum testisten çıkan uzantılara septula testis denir ve bu uzantılar testisin derinliklerine doğru ışınal uzanarak organı piramidal şekilli 250-300 tane lobçuğa (lobuli testis) ayırır. Her bir lobçuk, sayıları 600-1000 arasında değişen sıkışık kıvrıntılı tübüllerden oluşur. Bu yapılara tubuli semineferi contorti (seminifer tübül) denir. Her seminifer tübül 30-70 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadır (Arıncı ve Elhan 1999; Snell 2004).

Lobçukların mediastinum testise bakan tepe kısmında bu tüpler gittikçe düzleşir, birbirleriyle birleşip kısa ve düz olan tubuli semineferi recti'yi oluştururlar. Tubuli semineferi rectiler mediastinum testis içine girerek arka ve yukarıya doğru uzanır, birbirleriyle anastomoz yaparak rete testis (Haller ağı) denilen ağı yaparlar. Rete testis mediastinum testis'in üst bölümünde ductuli efferentes denilen kanallara dönüşür. Bu kanallar testisin arka kenarının üst kısmından tunica albuginea'yı delerek organı terk eder (Arıncı ve Elhan 1999).

Tunica vasculosa, tunica albuginea'nın iç yüzünde bulunan damar ağı katmanıdır. Damarlar arasında gevşek bağ doku bulunur (Arıncı ve Elhan 1999). Testis ve epididimis, aortanın dalı olan arteria testikularisten beslenirler. Testis ve epididimisin venleri, önce funiculus spermaticusun saran bir ağ şeklinde pleksus pampiniformisi, daha sonra da birbirleriyle birleşerek vena testikularisi oluştururlar.

Bunlar da sağ tarafta vena cava inferior, sol tarafta vena renalis sinistraya açılır (Odar 1986; Arıncı ve Elhan 1999).

2.2. Testis Embriyolojisi:

Gonadların erkek veya dişi morfolojik özellikleri 7. haftadan sonra gözlenebilir ancak, embriyonun cinsiyeti döllenme sırasında belirlenmiştir. Üreme sistemi erken dönemde her iki cinste de birbirine benzediği için, üreme sistemi gelişiminin başlangıç dönemi cinsel gelişimin farklılaşmamış evresi olarak adlandırılır (Sadler 1996; Moore 2002).

Gonadlar (testisler ve overler) üç kaynaktan köken alırlar (Şeftalioğlu 1998; Moore 2002, 2003).

- 1. Karın arka duvarını döşeyen mezotel (mezodermal epitel),**
- 2. Altında bulunan mezenşim (embriyonik bağ dokusu),**
- 3. Primordial germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri)**

İnsanlarda gonadlar, mezonefroz boyunca uzanan mezodermden gelişir. Bu bölgenin kranial kısmındaki hücreler yoğunlaşarak adrenokortikal primordiayı, kaudal kısmındaki hücreler ise, 5. hafta civarında henüz seçilebilen genital kabartıları oluşturmak üzere organize olurlar. Parmak şeklindeki epitel kordonları, altındaki mezenşim içerisine doğru kısa sürede büyürler. İlkel gonadlar dışta korteks, içte medulla bölgelerinden oluşur. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahipse, farklılaşmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılaşır, medullası geriler. Embriyo XY kromozom çifti içeriyorsa medulla testisleri oluşturmak için ileri farklılaşırken, korteks bir takım kalıntılar bırakarak dejenere olur (Kayalı ve ark. 1992; Carlson 1996; Sadler 1996; Gürsoy ve Koptagel 1997; Şeftalioğlu 1998; Moore 2002; Hassa 2003; Moore 2003; Burukoğlu 2007).

Y kromozomunun kısa kolu üzerindeki testis belirleyici faktörler (TBF) için SRY (Sex-determining region Y) geni, farklılaşmamış gonadın testis olarak gelişiminde en önemli işlevi görür. Testis belirleyici faktör, ilkel cinsiyet

kordonlarını uyararak, farklanmamış gonad medullasının derinlerine doğru uzamalarına neden olur. Kordonlar mediastinum testiste dallanıp birbirleriyle anastomozlaşarak, rete testisi oluştururlar. Kalın fibröz bir kapsül olan tunika albuginea geliştikten sonra cinsiyet kordonlarının (seminifer kordonların), yüzey epiteli ile olan bağlantıları kaybolur. Yoğun bir yapısı olan tunika albugineanın gelişimi, erkek fetusta testis gelişiminin önemli bir özelliğidir. Büyüyen testis aşamalı olarak dejenere olan mezonefrozdaki ayrılır ve kendi mezenterisi olan mesonefrosun üzerine asılı hale gelir. Seminifer kordonlar, seminifer tübüllere, tubuli rekti ve rete testise farklıdır (Kayalı ve ark. 1992; Sadler 1996; Gürsoy ve Koptagel 1997; Şeftalioğlu 1998; Moore 2002; Hassa 2003; Moore 2003; Burukoğlu 2007).

Seminifer tübüller arasındaki mezenşimden interstisyel hücreler (Leydig hücreleri) farklıdır, mezenşimden ayrılırlar. 8. haftadan sonra Leydig hücreleri, androjenik hormonları (testosteron ve aldosteron) salgılamaya başlarlar, bu hormonlar mezonefrik ve dış genital kanalların erkek yönünde farklılaşmasını uyarır. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) hormonu testosteron üretimini artırır, hormonun miktarı 8-12 haftalık evrede en yüksek değerine ulaşır. Testosterona ek olarak fetüsün testislerinden, glikoprotein yapıda bir hormon olan Müller kanallarını baskılayıcı madde (MIS) ya da Antimüllerian hormon (AMH) adı verilen bir hormon da salgılanır. AMH Sertoli hücreleri tarafından salgılanır. Bu hormonun salınması ergenliğe kadar sürer, daha sonra ise düzeyi gittikçe azalır. AMH, paramezonefrik (Müller) kanalların gelişimini baskılar (Kayalı ve ark. 1992; Carlson 1996; Sadler 1996; Gürsoy ve Koptagel 1997; Şeftalioğlu 1998; Moore 2002; Hassa 2003; Moore 2003; Burukoğlu 2007).

Seminifer tübüllerin lümeni puberteye kadar kapalıdır, puberteden sonra lümen açılır. Seminifer tübül duvarında germinal ve non germinal olmak üzere iki tip hücre bulunur (Kayalı ve ark. 1992; Carlson 1996; Sadler 1996; Gürsoy ve Koptagel 1997; Şeftalioğlu 1998; Moore 2002; Hassa 2003; Moore 2003; Burukoğlu 2007).

Sertoli hücreleri: Destek hücreleri olarak da adlandırılan bu hücreler, testisin yüzey epitelinden gelişirler. Non germinal hücrelerdir.

Spermatogonyum: Sperm hücrelerinin öncüleri olan bu hücreler, primordiyal germ hücrelerinden farklılaşarak oluşurlar. Germinal hücrelerdir (Gürsoy ve Koptagel 1997; Moore 2002, 2003; Burukoğlu 2007).

Fötal testiste, Sertoli hücreleri tübüllerde çoğunluklu olan hücrelerdir. Daha sonraki fötal gelişme sırasında, testisin yüzey epiteli düzleşir ve yetişkin testisin dış yüzeyindeki mezoteli oluşturur. Rete testis, efferent kanalcıkları (duktuli efferentes) oluşturan, 15-20 adet mezonefroz tübülleri ile devam eder. Bu kanallar, duktus epididimisi oluşturan mezonefrik kanal ile bağlanırlar (Carlson 1996; Sadler 1996; Şeftalioğlu 1998; Arıncı ve Elhan 1999; Moore 2002; Hassa 2003; Moore 2003).

2.3. Testis Histolojisi:

Erkek üreme sistemi; testisler, testis içi genital kanallar (tubuli rekti, rete testis, duktuli efferentes), testis dışı genital kanallar (duktus epididymis, duktus deferens, duktus ejakulatorius, uretra) ve bu kanallara açılan yardımcı bezler (vesikula seminalis, prostat, glandula bulbouretralis) ile penis'ten oluşur (Erdoğan ve ark. 2007; Gartner ve Hiatt 2007; Junqueira ve Carneiro 2009).

Testisler, bileşik tübüler bez yapısında olup, hem ekzokrin hem de endokrin salgı oluştururlar. Germ hücrelerinin oluşturulması, erkek seks hormonu olan testosteron hormonunun sentezi, depolanması ve salgılanması testislerin işlevleridir (Junqueira ve Carneiro 2009).

Oval bir bez olan testis, tunika albuginea adı verilen sıkı fibroelastik bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül ile çevrilidir. Buradan bezin içine giren fibröz uzantılar (septum), bezi yaklaşık 250 adet piramidal testis lopçuğuna ayırır. Her lobülde gevşek bağ dokusu ile sarılı 1-4 seminifer tübül bulunur. Bu bağ dokusu bol miktarda kan ve lenf damarı, sinirler ve Leydig hücreleri adı verilen interstisyel hücreleri içerir. Seminifer tübüller erkek üreme hücreleri olan spermatozoonları üretirken, interstisyel hücreler de testis androjenlerini salgılar (Leesen ve ark. 1988; Fawcett ve Jensch 2002; Kierszenbaum 2006; Ross ve Pawlina 2006; Gartner ve Hiatt 2007; Junqueira ve Carneiro 2009).

2.3.1. Seminifer Tübüller

Spermatogenezisin olaylandığı yapılar olan seminifer tübüllerin her biri yaklaşık 30-70 cm uzunluğunda ve 150-250 µm çapındadır. Her iki testiste ortalama 250-1000 adet bulunur. Tübüllerin toplam uzunlukları yaklaşık 0,5 km kadardır

(Ross ve Pawlina 2006; Erdoğan ve ark. 2007; Gartner ve Hiatt 2007; Junqueira ve Carneiro 2009). Tübüller kıvrımlıdır ve başlangıçta kör uçludur. Sonlanırken lümen daralır ve düz tübüller veya tubuli rekti olarak adlandırılan kısa segmentler halinde devam eden kanallar şeklinde uzanır. Bu düz tübüller, seminifer tübüleri rete testis denilen, epitel ile döşeli kanalların oluşturduğu bir labirente bağlanmasını sağlar. Anastomoz yapan rete testis kanalları, yaklaşık 10-20 adet duktuli efferentes ile epididimisin baş kısmına bağlanmıştır (Ross ve Pawlina 2006; Gartner ve Hiatt 2007; Junqueira ve Carneiro 2009).

Seminifer tübüller fibröz bir bağ dokusu kılıfı, belirgin bir bazal lamina ve karmaşık yapıdaki çok katlı germinal epitelten (seminifer epitel de denir) oluşur. Seminifer tübülü saran fibröz tunika propria birkaç fibroblast katmanından oluşmuştur. Bazal laminaya yapışık olan en içteki katman, düz kas özellikleri de gösteren ve hareketsiz spermiumları rete testise iletmek için gerekli ritmik kasılmaları sağlayan, düz kas özelliğindeki yassılaştırmış miyoid hücreleri içerir (Leesen ve ark. 1988; Ross ve Pawlina 2006; Junqueira ve Carneiro 2009).

Seminifer epitel, başlıca iki tip hücre içerir:

1. Sertoli ya da destek hücreleri (Epitheliocytus sustentans)
2. Spermatogenik hücreler ya da spermatogenik seri hücreleri (Junqueira ve Carneiro 2009).

2.3.1.1. Sertoli (destek) hücreleri:

Destek hücreleridir. İlk kez 1865 yılında Enrico Sertoli, testiste çok sayıda ince uzantıları ile komşu germ hücrelerini saran ve onları çevre hücrelerden izole eden, dallanmalar yapmış bu hücreleri tanımlamış ve bu hücreleri Sertoli hücreleri olarak adlandırmıştır (Junqueira ve Carneiro 2009). Sertoli hücreleri puberteye kadar seminifer epitelin baskın hücre tipi iken, puberteden sonra seminifer tübül epitelindeki hücrelerin yaklaşık %10'unu oluşturur. İleri yaştaki erkeklerde spermatogenik hücre topluluğu azaldığında, Sertoli hücreleri yeniden epitelin baskın hücresi haline gelir (Leesen 1988; Kierszenbaum 2006; Gartner ve Hiatt 2007; Junqueira ve Carneiro 2009).

Prizmatik biçimli Sertoli hücreleri, seminifer tübülün bazaline oturur ve çevrelerinde yer alan spermatogenik hücrelerin arasından lümene kadar uzanırlar. Işık mikroskopunda spermatogenetik seri hücrelerini çevreleyen çok sayıda yan uzantı nedeniyle, Sertoli hücrelerinin sınırları iyi belirlenemez. Sertoli hücrelerinin üst ve yan hücre membranlarının sınırları düzensizdir. Gelişmekte olan spermatogenetik hücreler bu düzensiz aralıklardan lümene ulaşırlar. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda bu hücrelerin çok sayıda granülsüz endoplazmik retikulum, az miktarda granüllü endoplazmik retikulum, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, çok sayıda yuvarlak ve uzun mitokondriyonlar, lizozomlar, çok sayıda mikrotübül, lipid damlacıkları, kesecikler, glikojen granülleri ve filamentler içerdiği gösterilmiştir. Sıklıkla üçgen biçiminde olan uzamış çekirdeğinde çok sayıda girintiler, belirgin çekirdekçik ve az miktarda heretokromatin bulunur (Kalaycı 1986; Young ve Heat 2000; Fawcett ve Jensch 2002; Gartner ve Hiatt 2007; Junqueira ve Carneiro 2009).

Sertoli hücrelerinin bazal sitoplazmalarında protein yapısında kristalloid cisimcikler olan Charcot-Böttcher inklüzyonları görülmektedir. Bu ince ve mekik şeklindeki kristalloidler 10-25 µm uzunluğunda ve yaklaşık 1 µm genişliğindedir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, içeriğinde 15 nm uzunluğunda olan, düzenli ve sık yerleşmiş filametler bulundurduğu görülmüştür. Bu kristalloidlerin görevi ve kimyasal bileşimleri henüz bilinmemektedir (Ross ve Pawlina 2006; Erdoğan ve ark. 2007; Gartner ve Hiatt 2007).

Sertoli hücrelerinin bazal yan yüzleri (bazolateral) birbirleriyle sıkı bağlantılar (zonula okludens) oluştururlar. Bu ilişki kan-testis bariyerini oluşturur. Böylece seminifer tübüller, bazal kompartman ve adluminal kompartman olarak iki bölmeye ayrılır. Spermatogonyumlar bu bariyerin alt kısmında yer alan bazal kompartmanda bulunurlar. Spermatogenezis sırasında spermatogonyumların bölünmesi sonucu oluşan spermatogenik hücreler bu bağlantılardan geçerek bazal bölümden, bariyerin üzerinde yer alan adluminal bölüme doğru çıkarlar. Spermatozoonlara değişmekte olan spermatidler, başlarını Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazma çıkıntıları arasına sokarak gelişirler. Spermatidlerin kuyrukları geliştikçe, bunlar Sertoli hücrelerinin üst uçlarından lümene uzanan saçaklar halinde görünürler. Spermatozoonlar olgunlaşınca Sertoli hücrelerinden ayrılıp lümeninde serbestleşirler. Sertoli hücrelerinin yan yüzlerinde bulunan oluklu bağlantılar (gap junction) ile

hücrelerin iyon ve kimyasal alışverişi sağlanır. Sertoli hücrelerinde aralıklı bağlantılara ek olarak, bazal kısımda hemidesmozomlar, Sertoli hücreleri ile gelişimin erken dönemindeki spermatogenetik hücreler arasında desmozom benzeri kompleksler gözlenmektedir (Kalaycı 1986; Leesen ve ark. 1988; Tekelioğlu 1989; Young ve Heatt 2000; Fawcett ve Jensch 2002; Erdoğan ve ark. 2007; Gartner ve Hiatt 2007; Junqueira ve Carneiro 2009).

Sertoli hücrelerinin işlevleri:

- 1) Gelişmekte olan üreme hücrelerine fiziksel destek ve besin sağlar.
- 2) Kan-testis bariyerinin oluşturulmasını sağlar ve böylece gelişmekte olan üreme hücrelerinin immünolojik olarak tanınmasını engeller.
- 3) Spermatogenik hücrelerin bazal membrandan lümene doğru hareketinde, mikrotübülleri ve mikrofilamanlarıyla rol oynar.
- 4) Sürekli olarak seminifer tübüllere genital kanal yönünde akan, spermiyum taşınması için gerekli olan ve testosteronun yoğunlaşmasını sağlayan androjen bağlayıcı protein (ABP) salgılar.
- 5) Testosteronu östradiol haline çevirir.
- 6) Ön hipofiz bezinden folikül uyarıcı hormon (FSH) sentez ve salınmasını önleyen inhibin adlı peptidi ve FSH salınımı üzerine olumlu bir etki gösteren aktivin'i salgılar.
- 7) Embriyo gelişimi sırasında erkek fötüste Müller kanalının gerilemesini sağlayan Müller Kanallarını baskılayıcı madde olan glikoprotein yapıdaki AMH'yi salgılar.
- 8) Üreme hücrelerine demir taşıdığına inanılan testiküler transferrinin sentezlenmesi ve salgılanmasında görev alır.
- 9) Spermiyogenez sırasında fazla spermatid sitoplazması artık cisimcikler şeklinde atılır. Bu sitoplazmik parçacıklar Sertoli hücrelerindeki lizozomlar tarafından fagosite edilir ve sindirilir (Cumbul 2008).

2.3.1.2. Spermatogenik Hücreler ve Spermatogenezis:

Primitif erkek germ hücreleri olan spermatogonyumlar, puberteyle birlikte bölünüp farklılaşarak sperm hücrelerini oluşturur ve bu spermatozoon üretim

sürecine spermatogenez denir. Spermatogenik seri hücreleri, bazal lamina ve tübül lümeni arasındaki katmanlarda yer alırlar. Bazalden lümene doğru olgunlaşarak ilerleyen hücre tipleri; spermatogonyumlar, primer ve sekonder spermatositler, spermatidler ve spermatozoonlardır (Young ve Heat 2000; Kierszenbaum 2006).

2.3.1.2.1. Spermatogonyumlar:

Spermatogonyumlar, bazal membranın hemen üstünde bulunan 12 µm çapında, diğer spermatogenik seri hücrelerine göre daha küçük olan, diploid spermatogenik hücrelerdir. Spermatogonyumlar, Sertoli hücreleri arasındaki **zonula okludens** tipi bağlantıların altında yerleşim gösterdikleri için kan-testis bariyerinin dışında yer alan ve bazal lamina ile direkt bağlantı halinde olan hücrelerdir. Cinsel olgunluk çağında testosteronun etkisiyle birlikte mitoz bölünme ile çoğalmaya başlarlar. Yapısal olarak ayırt edilebilen 3 tip spermatogonyum vardır (Fawcett ve Jensch 2002; Gartner ve Hiatt 2007; Junqueira ve Carneiro 2009).

1. Koyu tip A spermatogonyumlar: Seminifer epitelin kök hücreleri olup, küçük ve kubbe şeklindeki hücrelerdir. Oval şekilli, heterokromatik çekirdekleri vardır. Hücre döngüsüne girmezler, depo hücrelerdir. Mitoz bölünme ile çoğalarak, diğer koyu A tipi spermatogonyumları ve açık A tipi spermatogonyumları oluştururlar (Ross ve Pawlina 2006; Gartner ve Hiatt 2007).

2. Açık tip A spermatogonyumlar: Oval şekilli, açık boyanan ökromatik çekirdekli ve belirgin çekirdekçiğe sahip hücrelerdir. Mitokondriyonları, az sayıda Golgi kompleksi, birkaç granüllü endoplazmik retikulumu ve ribozomları bulunur. Açık A tipi spermatogonyumlar, testosteron ile uyarılarak mitoz bölünmeler geçirir ve B tipi spermatogonyumlara dönüşürler. Bu hücreler B tipine dönüşmeden önce sırasıyla A1, A2, A3, A4 ve daha sonra ara spermatogonyumları yaparlar (Ross ve Pawlina 2006; Gartner ve Hiatt 2007).

3. Tip B spermatogonyumlar: Ortada yerleşik bir çekirdekçik çevresinde, büyük yoğunlaşmış kümeler oluşturan kromatin içeren küre biçiminde çekirdeğe sahip hücrelerdir. Spermatogonyumların en yaygın bulunan tipi olan B tipi spermatogonyumlar, primer spermatositleri oluştururlar ve spermatogenezis tamamlanır (Ross ve Pawlina 2006; Gartner ve Hiatt 2007).

Spermatogonyumların erkek üremesinde önemli etkileri vardır. Bu hücreler kısmen sessiz hücreler olup, radyasyon ve kanser kemoterapisine dirençlidirler. Mitoz ile bölünen spermatogonyumlar, mayoz ile bölünen spermatositler ve farklılaşmakta olan spermatidler ise kanser kemoterapisine ve radyasyona spermatogonyumlar kadar dirençli değildirler. Radyoterapi ya da kanser kemoterapisinin sonlandırılmasının ardından spermatogonyal kök hücreler yeniden spermatogenik sürece girebilirler. Postmitotik Sertoli hücreleri bu tedavilere yüksek oranda dirençlidirler (Fawcett ve Jensch 2002; Gartner ve Hiatt 2007; Junqueira ve Carneiro 2009).

2.3.1.2.2. Primer ve sekonder spermatositler:

Tip B spermatogonyumların başarılı mitoz bölünmeleri sonucu oluşan primer spermatositler, DNA sentezini tamamladıktan hemen sonra mayoz bölünmenin profaz aşamasına girerler. Spermatogenik hücrelerin yaşam süresindeki esas DNA sentez aktivitesinin bu son turu, mayozun profaz I aşamasına başlayan bir primer spermatositin spermatogonyuma göre iki kat DNA miktarına sahip olacağını belirler. Primer spermatositler 4C DNA'ya sahiptir ve 1C hücre başına yaklaşık 1.5 pg DNA'ya eşdeğerdir (Fawcett ve Jensch 2002; Gartner ve Hiatt 2007; Junqueira ve Carneiro 2009).

Birinci mayoz bölünmeden sonra oluşan sekonder spermatositler olarak adlandırılan ve yalnızca 23 kromozom (22+X veya 22+Y) içeren daha küçük hücreler oluşur (Junqueira ve Carneiro 2009). Sekonder spermatositler çok hızlı bir şekilde interfaz aşaması ve belirgin bir DNA sentezi olmayan ikinci mayoz bölünme geçirirler. Testis kesitlerinde sekonder spermatositlerin görülmesi zordur, çünkü bunlar interfazda kısa süre kalan ve hızla ikinci mayoz bölünmeye giren hücrelerdir (Young ve Heat 2000).

2.3.1.2.3. Spermatidler:

Sekonder spermatositlerin bölünmesi, 23 kromozom taşıyan iki adet spermatidin oluşmasıyla sonuçlanır. Böylece mayoz bölünme sürecinin sonunda haploid hücreler olan spermatidler oluşur (Kierszenbaum 2006; Junqueira ve Carneiro 2009).

Spermatidin olgun sperme farklılaşma süreci (spermiyogenez) 4 faz içerir. Bu fazlar, spermatidlerin özel bağlantılarla Sertoli hücre membranına fiziksel olarak bağlandığında oluşmaya başlarlar (Paker 1993).

Golgi Evresi: Spermatid çekirdeği etrafında Golgi kompleks bölgesinde veziküllü yapılar çoğalır (proakrozomal veziküller). Bu granüller çekirdek kılıfına yakın yerleşim gösteren akrozomal veziküllerle birleşir. Bu bölgede çekirdek yoğunluğunda artış görülür. Sentriyoller, akrozomal vezikülün şekillendiği çekirdek bölgesinin zıt kutbuna göç ederek sperm kuyruğunun şekillenmesini başlatır (Paker 1993; Ross ve Pawlina 2006).

Şapka (Kep) Evresi: Akrozomal vezikül büyüyerek çekirdeğin ön yarısına kadar yayılır ve çekirdek zarına tutunan bir şapka oluşturur. Bu yapıya akrozomal şapka adı verilir. Akrozomal şapkanın altında yer alan çekirdek zarı porlarını yitirerek kalınlaşır. Çekirdek içeriği yoğunlaşır (Paker 1993; Eşrefoğlu 2009).

Akrozomal faz: Bu evrede çekirdek yoğunlaşır ve yassılaşır uzar. Sitoplazmik kısım posteriora kalır. Sitoplazmik mikrotübüller silindirik bir kılıf olan manşet şeklinde düzenlenir. Akrozomal yüzeyin zıt kutbuna göç ederek, kuyruğun erken gelişimini başlatan sentrioller, spermin boyun bölgesini şekillendirmek üzere modifiye olurlar. Plazma membranı arka kısma doğru uzanırken manşet kaybolur ve mitokondriyonlar sitoplazma derininden boyun bölgesi ve uzantısına göç eder ve orta parça şekillenmiş olur (Paker 1993; Kierszenbaum 2006).

Olgunlaşma fazı: Spermiyogenezin son evresi olup, sitoplazmik kalıntıların spermden atıldığı evredir. Sitoplazma artıkları Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermatid türe özgü şeklini alırken, Sertoli hücrelerinden ayrılarak lümeneye dökülürler. Spermatidler artık birbirleriyle bağlantı halinde değildir ve seminifer tübülün lümenine bulunurlar (Paker 1993; Ross ve Pawlina 2006).

2.3.1.2.4. Spermatozoonlar (Spermler):

Olgunlaşmış erkek germ hücreleridir. İnsanda spermatogonyumdan, spermatozoon oluşumu arasında 64 gün vardır. Olgun insan spermatozoonu baş, boyun ve kuyruk bölümlerinden oluşur. Spermin baş ve kuyruk kısımlarını plazma membranı sarar (Junqueira ve Carneiro 2009).

Baş: Yaklaşık 4.5- 5 µm uzunluğunda, 3 µm genişliğinde ve 1 µm kalınlığında olup, akrozomla sarılmış çekirdekten oluşur (Ross ve Pawlina 2006; Gartner ve Hiatt 2007). Çekirdek yassılaştırmış ve heterokromatiktir. Çekirdeğin ön yarısını akrozom örter. Akrozom lizozomlarda da bulunan hidrolitik enzimleri (proteazlar, asit fosfatazlar, hyaluronidaz, akrosin, nöraminidazlar) içerir. Bu enzimler, oositi çevreleyen korona radyata hücrelerini ayırır ve zona pellusidayı eritir (Kierszenbaum 2006)

Kuyruk: Spermiyumda kuyruk; boyun, orta parça, esas parça ve son parça olmak üzere dört bölgeye ayrılmıştır. Çekirdeğe tutunmuş proksimal sentriyol ve aksoneme kaynaklık eden distal sentriyolü bulunduran dar bir parça olan boyun, yaklaşık 5 µm uzunluğundadır. Boyun ile esas parça arasında uzanan kuyruğun orta parçası ise yaklaşık 5 µm uzunluğundadır. 9+2 mikrotübül yapısında filagellumu kapsar. Çevrede spiral mitokondriyon halkası vardır. Ayrıca bu parçada filagellum çevresinde kuyruk sonuna doğru incelerek kaybolan dokuz tek kalın fibril daha vardır. Kuyruğun en uzun bölümü olan esas parça yaklaşık 45 µm uzunluğundadır. Annulus adı verilen mitokondriyon sarmalın son dönümünün altında yoğun bir halka olan son halkadan itibaren başlar, mitokondriyon sarmalı içermez. Yedi dış yoğun lifle sarılı merkezi aksonem ve fibröz bir kılıftan oluşur. Hem dış yoğun lifler hem de fibröz kılıf, spermatozoanın öne hareketi sırasında mikrotübüller kayma ve kıvrılma için sağlam bir iskelet oluşturur. Son parça yaklaşık 5 µm uzunluğunda olup, kuyruğun en kısa bölümüdür. Dış yoğun lifler ve fibröz kılıfın erken sonlanması nedeniyle sadece aksonemi kapsar (Kierszenbaum 2006; Ross ve Pawlina 2006; Gartner ve Hiatt 2007).

2.3.2. İnterstisyel alan:

Seminifer tübüller arasındaki boşluklar, kollajen lifler, kan ve lenf damarları, sinir lifleri ve çeşitli hücrelerle doldurulmuştur. Testiküler kapillerler pencere tiptedir ve kan proteinleri gibi makromoleküllerin serbestçe geçmesine olanak verirler. İnterstisyum, Leydig hücreleri, fibroblastlar, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri, mast hücreleri ve makrofajları içermektedir (Junqueira ve Carneiro 2009).

2.3.2.1. Leydig hücreleri:

Leydig veya testisin interstisyel hücreleri endokrin işlevleri nedeniyle, interstisyel alanda kan veya lenf damarlarına yakın bulunan, yuvarlak ya da poligonal şekilli, eozinofilik bir sitoplazmaya sahip olan büyük hücrelerdir. Çekirdekleri ökromatiktir ve belirgin çekirdekçik içerir. Leydig hücreleri steroid hormon sentezleyen hücelere özgü organel ve enzimlerden zengindir. Eozinofilik sitoplazmalarında tübüler kristal mitokondriyonlar, bol granülsüz endoplazmik retikulum tubulusları, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, lizozomlar ve çok sayıda lipid damlacıkları bulunur. Leydig hücre sitoplazmalarında, işlevleri bilinmeyen ve insana özgü olan Reinke kristalleri denilen kristalize proteinler de görülür. Leydig hücreleri, ikincil seks karakterlerinin gelişmesinden sorumlu erkeklik hormonu olan testosteronu üreterek spermatogenezin sürekliliğini sağlarlar. Serumda bulunan testosteronun yaklaşık %95'i Leydig hücreleri tarafından, geri kalan kısmı ise adrenal korteks tarafından sentezlenir. Sitoplazmada peroksizom ve lizozomlar ve yaş ilerledikçe artan oranda da lipokrom pigmenti bulunur. Testosteron sentezi sırasında plazma kolesterolü hücreye girer, asetil koenzim A (CoA) tarafından esterleştirilir ve sitoplazmada lipid damlacıkları şeklinde depolanır. Düz endoplazmik retikulumda yağ asitleri kolesterole dönüştürülür. Kolesterol, yağ damlacıklarından mitokondriyonlara steroidogenik akut regülatör protein (StAR) aracılığıyla taşınır ve mitokondriyonlardaki sitokrom P450 enzimi olan kolesterol desmolaz enzimi tarafından pregnenolon üretilir. Granülsüz endoplazmik retikulumdaki enzimler, pregnenolonu progesterona ve daha sonra da onu testosterona dönüştürür (Tekelioğlu 2002; Kierszenbaum 2006; Junqueira ve Carneiro 2009).

İnterstisyel hücrelerin işlevleri ve miktarları hormonal uyarılara bağlıdır. İnsanda hamilelik sırasında plasentadan üretilen gonadotropik hormon, maternal kandan fötüsa geçer ve androjenik hormonları üreten fotal testiküler interstisyel hücreleri uyarır. Hormonlar, embriyonik farklılaşmada erkek genital organlarının gelişmesi için gereklidir. Embriyonik interstisyel hücreler hamileliğin 4. ayına değin işlevseldirler. Daha sonra ise testosteron sentezindeki azalmaya bağlı olarak gerilerler. Hücreler, gebelik boyunca ve hipofizden salınan luteinizan hormon (LH) uyarısıyla testosteron sentezinin yeniden yapılmaya başlandığı ergenlik öncesi döneme kadar dinlenmede kalırlar (Cormack 2001; Tekelioğlu 2002).

Olgun Leydig hücreleri, 10 yaşına kadar çocuk testisinde bulunmaz. Leydig hücrelerinin sayıları, ergenlikle birlikte artar, ileri yaşlarda ise azalır. Leydig hücre sayısı 60 yaşındaki bir erkekte, 20 yaşındaki bir erkekteki sayının yarısından daha azdır (Fawcett ve Jensch 2002).

2.4. Kemoterapötikler

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, invazif nitelik kazanması ve metastaz yapması ile kendini gösteren ve halen gelişmiş ülkelerin ölüm istatistiklerinde kalp damar hastalıkları nedenli ölümlerden sonra ikinci sırada yer alan, kontrolsüz hücre bölünmesi hastalığıdır. Günümüzde kanser tedavisi cerrahi, kemoterapi ve radyoterapinin kombinasyonu şeklinde uygulanmakta olup, cerrahi tedavide amaç, tümörlü doku ve organın vücuttan uzaklaştırılması iken, kemoterapi ve radyoterapide ise amaç kanserli hücrelerin yok edilmesidir (Gate ve Tew 2001; Türker ve Kayaalp 2002).

Kanserli (neoplastik) hücrelerin, normal hücrelere göre daha hızlı büyümesi ve çoğalması nedeniyle, kemoterapötikler bu tür özellikteki hücrelerin yok edilmesi için geliştirilmiştir. Ancak bazı normal hücrelerde de benzer özellikler bulunmakta ve bu hücreler de kanserli hücrelerin verdiği yanıtı vererek, kemoterapiden doğrudan etkilenmektedir. Bu etkilenmeler ise yan etkileri de beraberinde getirmektedir. Bu sebeple, daha çok kan hücreleri, gastrointestinal sistemdeki hücreler, kıl follikülleri ve spermeler gibi hızlı bölünebilen hücreler üzerinden yan etkiler gözlenmektedir. Bununla birlikte bazı kemoterapötikler kalp, böbrekler, mesane, akciğerler ve sinir sistemi organları gibi hayati organlar üzerinde de olumsuz etkiler oluşturabilmektedir (Page ve Takimoto 2004; Sabanegh ve Ragheb 2009; Demirci ve ark. 2010; Ragheb ve Sabanegh 2010).

Kemoterapinin etkinliğini kısıtlayan önemli bir faktör de, tümör hücrelerinin ilaca gösterdiği azalmış hassasiyet, yani ilaca karşı geliştirdiği dirençtir. Bu durum bazı kanser türlerinde kendiliğinden oluşurken (primer rezistans), bazılarında ise sonradan da gelişebilir (sekonder rezistans) (Gate ve Tew 2001).

Kemoterapötik ajanlardan en gonodotoksik olanları alkilleyiciler (siklofosamid, melfelan, busulfan, mustin, klorambusil, lamustin, karmustin),

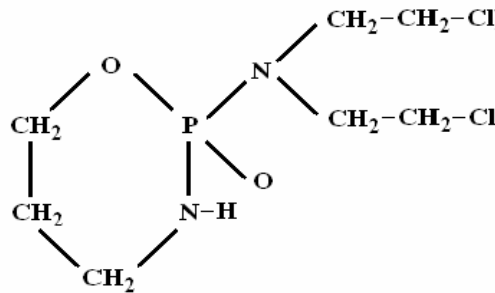
antimetabolitler (sitarabin), vinka alkaloidler (vinblastin) ve diğeri (prokarbazine, sisplatin, nitrojen mustart) olarak bilinir (Carter ve ark. 1993; Meistrich ve ark. 1997).

2.4.1. Alkilleyici Ajanlar

Kanser tedavisinde kullanılan en önemli ilaç gruplarından biri alkilleyici bileşiklerdir. Bu ajanlar, fizyolojik şartlar altında, alkil gruplarını DNA gibi önemli biyolojik makromoleküllere bağlama yeteneğine sahiptir. Reaktif elektrofil olma özelliği ile hedef moleküllerle karbonyum iyonu oluşturması sonucunda, bu kimyasal ajanlar hücre DNA ile kompleks oluşturarak kanserli hücre büyümesini inhibe ederler (Hurley 2002).

2.4.1.1. Siklofosfamid (CP)

Kanser tedavisinde en fazla kullanılan ilaçlardan birisi olan Siklofosfamid; alkilleyici antineoplastik bir ilaç olup, nitrojen mustard grubundandır. Kimyasal yapısı Şekil 1’de gösterilmiştir. Alkilleyici antineoplastik ajanlar genel olarak amino, karboksil, sülfidril ve fosfat gruplarına kovalent bağlanırlar ve hücre fonksiyonlarını bu şekilde bozarlar. En sık bağlandıkları hücre bölgeleri hücrenin deoksiribonükleik asit (DNA), ribonükleik asit (RNA) ve protein kısımlarıdır (Yagoda ve ark. 1972).



Şekil 1. Siklofosfamid’in kimyasal yapısı

Kanser tedavisinde en fazla kullanılan ilaçlardan birisi olan Siklofosfamid, bir Oksazofosforin olup, hem oral hem de parenteral olarak kullanılmaktadır. Bir antitümör ajan ve bağışıklık baskılayıcı olan siklofosfamidin onkosidal etki gösterebilmesi için metabolik olarak aktive edilmesi gerekir (Kawabata ve ark. 1990;

Pool ve ark. 1988). CP'nin kanserostatik aktivitesi fosforamid mustard (FAM) oluşumunu veren hepatik mikrozomal karma fonksiyon oksidaz sistemi ile metabolizmasına bağlıdır (Bernacki ve ark. 1987).

Hem humoral hem de hücrel bağışıklığın siklofosfamid ile baskılandığı bildirilmektedir. Siklofosfamid tarafından oluşturulan bağışıklık baskılayıcılık, ana ilaçtan ziyade onun metabolitlerinden kaynaklanmaktadır. P-450 monooksijenaz sisteminin etkisi altında siklofosfamid, 4-hidroksi siklofosfamide metabolize olur. Bu metabolit enzimatik olmayan bir yolla aldofosfamide yeniden düzenlenir. Bu da FAM ve akroleine ayrılır. FAM'ın DNA'ya bağlanarak hücre bölünmesini baskıladığı, CP'nin bağışıklık baskılayıcı ve antitümör etkilerine aracı olduğu düşünülmektedir. Öte yandan akroleinin önemli makromoleküllerinin sulfidril gruplarıyla hemen reaksiyona girdiği, böylece bağışıklığın baskılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Kawabata ve ark. 1990; Kwon ve ark. 1987; Pool ve ark. 1988). Oluşan ara ürünler veya son metabolitlerin; kanser seçiciliği, sistemik toksisite, mutajenite, teratojenite, genotoksisite ve kanserojenite gibi farklı etkileri olabileceği ileri sürülmüştür (Pool ve ark. 1988).

Hem hematolojik hem de solid tümörlerin tedavisinde başarılı sonuçlar veren siklofosfamid, hem oral hem de parenteral kullanılmaktadır. Siklofosfamidin plazmada yarılanma ömrü 6,5 saat olup, parenteral verilişte aktif metabolitlerin plazma konsantrasyon pikine ulaşması 2-3 saat sürer (Akçasu ve ark. 1992).

Siklofosfamid'in kullanım alanları şunlardır;

- 1) Hodgkin dışı lenfomalar (Glode ve ark. 1981).
- 2) Çocukların akut lenfositik lösemisi (Bokser ve ark. 1990).
- 3) Küçük hücreli olan veya olmayan akciğer kanseri (Thatcher ve ark. 1988).
- 4) Hodgkin hücreleri (Ataya ve ark. 1985).
- 5) Pediatrik solid tümörler (Bramwell ve ark. 1986).

CP ayrıca güçlü bağışıklık baskılayıcı etki göstermesi nedeniyle romatoid artrit, çocukların nefrotik sendromu (Koyama ve ark. 1977), Behçet hastalığı

(Özyazgan ve ark. 1992) ve diğer bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

En sık gözlenen yan etkileri, bulantı kusma ve diğer gastrointestinal bozukluklar ile kemik iliği depresyonu (Hansen ve ark. 1995), buna bağlı olarak lökopeni, trombositopeni ve bazı hastalarda alopesi gelişmekte olup, yaygın olarak reproduktif sistemde yan etkiler de oluşturmaktadır (Banham ve ark. 1985; Akçasu ve ark. 1992).

Çeşitli deneysel ve klinik çalışmalarda siklofosfamidin gonadal yetmezlik, renal yetmezlik ve özellikle hemorajik sistit oluşturduğu raporlara geçmiştir (Warne ve ark. 1973; Ataya ve ark. 1985; Montz ve ark. 1991; Kreuser ve ark. 1993). Siklofosfamid terapisi gören meme kanserli hastalarda çoğu zaman amenore oluşmuş olup, erkeklerde ise sık sık azospermi gelişmiştir (Koyama ve ark. 1977). Siklofosfamid, ovaryum foliküllerinde epitel doku için toksiktir. Zira dişi sıçanlara verilen 40 mg/100 gr siklofosfamid, ovaryum foliküllerinin normal gelişiminin inhibe olduğunu göstermiştir (Burkl ve Schiechl 1978). Siklofosfamid spermatogenik epitelyumda da toksisite oluşturmaktadır (Morris 1993). Bir siklofosfamid metaboliti olan akrolein'in de 3–10 mg/L arasındaki konsantrasyonlarının 12 günlük fare embriyosunda anormal gelişmelere neden olduğu gözlenmiştir (Stahlmann ve ark. 1985).

Siklofosfamid, emziren kadınlarda süte geçerek bebekte immünosupresyon, gelişme geriliği ve karsinogenezis gibi toksik etkiler yapmaktadır (Dökmeci 1988). Ayrıca antidiüretik hormon salgısını arttırarak, hipernatremiye yol açar ve hemorajik sistit riskini arttırır (Di Palma ve Di Gregorio 1990; Akçasu ve ark. 1992; Kurtoğlu 1992). Siklofosfamid metabolitlerinden olan akrolein, mesane mukozası için toksiktir (Luce ve Simons 1988). Erkek Swiss farelerde yapılan deneysel çalışmalarda, 200 mg/kg siklofosfamidin hemorajik sistit oluşturduğu raporlarda görülmüştür (Cavalletti ve ark. 1986). Siklofosfamidin insanlarda ve deney hayvanlarında mesane kanseri yaptığı yönünde çalışmalar da raporlarda bulunmaktadır (Al-Safi ve Maddocks 1986; Pool ve ark. 1988). Siklofosfamid kaynaklı kemik iliği mutajenitesi konusunda yapılan çalışmalar, bu maddenin insanlarda ve sıçanlarda hematopoyetik sistemde de kanserojen olabildiğini göstermiştir (Lähdetie ve ark. 1990; Bramwell ve ark. 1986). Farelerde yapılan bir deneysel çalışmada ise, 100 mg/kg intraperitoneal

siklofosamid uygulamasının hematopoetik sistemde tümör gelişimini uyardığı gözlenmiştir (Blom ve ark. 1995). Sıçanlarda yapılan farklı bir deneysel çalışmada 20 ve 40 mg/kg intraperitoneal siklofosamid uygulamasının dalakta ve kemik iliğinde mutajen olduğu gösterilmiştir (Moore ve ark. 1995). Hodgkin lenfomalı hastalara siklofosamid verildiğinde ise, hastalarda üreter kaynaklı tümörlerin geliştiği rapor edilmiştir (Ponsot ve ark. 1995).

Germinal epitel üzerinde çok güçlü toksik etkiye sahip olan siklofosamid, prepubertal dönemde bu ilaçla tedavi gören çocukların, puberte döneminde fertilité potansiyellerini %50'lere kadar düşürebildiği çalışmalarda kanıtlanmıştır (Levy ve Stillman 1991).

Benzer şekilde siklofosamid ile kanser tedavisi gören çocuklarda tedavi sonrasında 20 yıllık bir süre boyunca devam eden azoospermi (Aslam ve ark. 2000; Kenney ve ark. 2001) ve hatta kalıcı sterilite görülmekte olup (Meistrich ve ark. 1992), bunun sebebinin de sperm rejenerasyonundaki başarısızlıklar olduğu iddia edilmektedir (Socie ve ark. 2003; Ragheb ve Sabanegh 2010).

2.5. E Vitamini

1922 yılında Herbert McLean Evans (1882-1971) ve Katharine Scott Bishop (1889-1976) tarafından bulunan bu maddeye 1924 yılında Sure tarafından E vitamini ismi verilmiştir (Kayaalp 2002).

Doğal E vit olan D-alfa- tokoferolün molekül ağırlığı 430.69, kaba formülü ise $C_{29}H_{50}O_2$ 'dir (Boydağ 1998).

Vitamin E benzeri bileşikler iki gruba ayrılırlar. Birinci grup tokoferoller, ikinci grup ise tokotrienoller olup, tokoferollerde yan zincir doymuş iken, tokotrienollerdeki ise doymamıştır (Battioni ve ark. 1991; di Mascio ve ark. 1991).

E vitamininin en önemli işlevi şudur; çoklu doymamış yağ asitleri gibi hücre bileşenlerinin molekül halindeki oksijen ve serbest radikaller tarafından enzimatik olmayan oksidasyonundan korumada etkili bir antioksidan özelliği vardır (Champe ve Harvey 1997).

E vitaminin biyolojik aktif şekline tokoferol denir. Doğal olarak bulunan 8 tokoferol bulunmakta olup, bunlardan en aktif olanı α -tokoferoldür. Plazmadaki E vitamininin %80-90 kısmını α -tokoferol oluşturur ve dokudaki esas E vitamini şekli budur. Bunun nedeni α -tokoferol'ün LDL içinde öncelikle tekrar vücut içine alınmasına tokoferol bağlayıcı protein (TBP) yoluyla ve γ -tokoferolün karaciğerde çabuk yıkılmasına bağlıdır. Bu sebeple α tokoferol üstüne daha çok çalışma yapılmış ve suplemantasyonda (diyetin desteklenmesi) E vitamini temel faktördür. α -tokoferol kanda γ -tokoferolden 4-10 kat fazladır (Champe ve Harvey 1997).

Günlük besinin önemli bir kısmını oluşturan tahıl türleri E vitamini içermektedir ve E vitamini besinlerde yaygın olarak bulunur. Günlük gereksinimi vücut büyüklüğüne, kişinin fizyolojik durumuna, hatta beslenmesinde bulunan uzun zincirli yağların oranına göre değişmektedir (Kayaalp 2002). Bitkisel yağlar E vitamini açısından oldukça zengindir. Karaciğer ve yumurta ise orta derecede E vitamini içerir (Champe ve Harvey 1997). Buğday, ayçiçeği tohumu ve ayçiçeği yağı, mısır ve soya yağı, diğer bitkisel yağlarda ve bunlardan elde edilen margarinlerde E vitamini bulunur (Kayaalp 2002). α -tokoferol için önerilen günlük gereksinim erkeklerde 10 mg iken, kadınlarda 8 mg'dir. E vitamini gereksinimi, çoklu doymamış yağ asidi alımı arttığında yükselir (Champe ve Harvey 1997).

Diyetle alınan E vit yağda çözülmüş haldedir. Yağ sindirimi sırasında açığa çıkar ve enterositler tarafından intestinal kanaldan emilir. İnce bağırsakların üst kısmından absorbe edilen E vitamini, şilomikronlarla lenfte taşınır ve oradan da venöz kana geçer. Vücutta tüm dokularda ve en çok da yağ dokusunda depolanır. Ancak depolanan miktarı azdır. Dokularda, mitokondri ve mikrozoimler gibi membrandan zengin hücre bölgelerinde, yağ hücreleri, bazı endokrin bez hücreleri ve trombositlerde yüksek konsantrasyonda E vitamini bulunur (Marcus ve Coulston 1996; Kayaalp 2002; Murray 2009).

Diyetle alınan E vit yağda çözülmüş halde bulunur, yağ sindirimi esnasında açığa çıkar ve sindirilir. Bu nedenle yağ emiliminde bozukluk olması durumunda E vit eksikliği görülür (Murray 2009).

E vit, A vit ile yakın ilişki içerisinde olup mide-bağırsak sisteminden absorpsiyonu arttırarak karaciğer ve diğer organlarda A vit

konsantrasyonununmümkin olan en üst düzeyde tutulmasını sağlar. Bu sırada A vit'in de oksidatif streten korunmasına yardımcı olur (Boydağ 1998).

Oksidasyon sırasında ortaya çıkan süperoksit, diğer radikaller ve peroksit, membran enzimlerinden sitokrom P-450 oksidaz ve ksantin oksidaz tarafından katalizlenerek diğer proteinlerle serbest radikalleri oluştururlar. Bu serbest radikaller daha sonra mitokondri, mikrozm ve hücre zarlarında bulunan fosfolipidlerin doymamış yağ asitlerini oksitleyerek vücutta bozuklukların ortaya çıkmasına neden olur (Kalaycıoğlu 2006).

E vit vücuttaki en önemli antioksidandır ve hücre üzerinde zarların lipid fazını etkiler. Özellikle serbest radikal zincir tepkimelerini kırarak, toksik olan peroksil serbest radikal gibi radikallerin zararlı etkilerine karşı korunma sağlar (Dökmeçi 2000; Murray 2009).

E vitamini lipit peroksil radikallerini etkisiz hale getirmek için, kendisinin bir fenolik hidrojen atomunu peroksil radikaline (ROO*) transfer ederek aşağıdaki şekilde gerçekleştirir (Kayaalp 2002).



Özetle, E vit zincir kırıcı bir antioksidan olup başlıca işlevi lipid peroksitlerini etkisizleştirerek, peroksidasyon zincir tepkimelerini sonlandırmaktadır (Dökmeçi 2000).

Eksikliğinde; hayvanlarda kısırlık, fetüsün gelişmemesi, kanama, beyin dokusunun yumuşaması, kas hastalıkları, karaciğer harabiyeti gibi bozukluklar bulgular arasındadır. İnsanlarda ise; bazı hastalıklarda kandaki düzeyi ölçülerek düşük olduğu görülmüştür. Bu rahatsızlıklar ise; akne oluşumu, anemi, enfeksiyon, bazı kanser türleri, diş eti hastalıkları, safra kesesi taşı oluşumu, sinir-kas hastalıkları ve Alzheimer gibi olgular buna örnektir. Prematüre bebeklerde eksikliğine bağlı olarak anemi oluşabilir. E vitamini anneden çocuğa kan yoluyla geçmez ancak süt ile geçer. Doğumdan sonra anne sütü ile beslenmemiş bebeklerde eksikliği özellikle inek sütüyle beslendiklerinde görülebilir. Kan hücreleri dayanıksız olup kolaylıkla parçalanmaktadır. Parçalanan bu hücrelerden ortaya çıkan yıkım ürünlerinin etkisiyle kaslarda normal dışı yağlanma ve karaciğer ile dalak sorunları oluşur (Şeker 2006).

Fazlalığının zararlı bir etkisi bu güne kadar gösterilmemiştir. Çünkü diğer yağda eriyen vitaminler kadar depolanmazlar. Gereğinden fazla alınanlarda birkaç gün içerisinde dışkı ve idrarla vücuttan uzaklaştırılır. Çok yüksek dozları bulantı ve ishal yapabilir. Hayvan deneylerinde yüksek dozların büyümeyi durdurduğu, kasları zayıflattığı, alyuvar sayısını azalttığı ve kemikleşmeyi yavaşlattığı görülmüştür (Şeker 2006).

2.6. Apoptozis

Her hücre, doğar, çoğalır (proliferasyon), farklılaşır (diferansiasyon) ve ölür (apoptozis). Yeniden yapım ve yıkımın bir düzen içinde oluşu, apoptozis/proliferasyon dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Apoptozis, normal fizyolojik koşullarda gerçekleşen hücre ölümüdür (Hıkm ve ark. 1995; Erdoğan 2003). Apoptozis terimi, ilk kez 1972 yılında Kerr ve arkadaşları tarafından kullanılmıştır (Öztürk 2002; Tomatır 2003; Akşit ve Bildik 2008).

Programlanmış hücre ölümü, hücre intiharı, fizyolojik hücre ölümü apoptozis ile eş anlamda kullanılır (Schwartzman ve ark. 1993; Majno ve Joris 1995).

Apoptozis, yunancada apo (= ayrı) ve ptosis (= düşen) kelimelerinin birleştirilmesi ile oluşmuş, sonbaharda ağaçlardan dökülen yapraklar olarak tarif edilmiştir (Touchette ve Fogle 1991). Kerr (1972), fizyolojik olarak ölen hücrelerin çekirdeklerinde yoğunlaşmış kromatin parçalarını saptamış ve organelerin iyi korunduğunu fark ederek bu olayı büzüşme nekrozu olarak tanımlamıştır.

Apoptozis, hücrenin yaşam döngüsü boyunca yapım-yıkım dengesinin sürdürülmesini sağlamak gibi önemli bir görevi sağlamakta yükümlüdür. Hücrelerin doğru yer, zaman ve sayıda olmasını sağlayan apoptozis mitozis ile birlikte homeostazisi sağlamak üzere dokuda sürekli dinamik bir denge halindedir (Cummings ve ark. 1997).

Apoptotik süreç esnasında, hücrede birçok morfolojik değişiklikler meydana gelir. Apoptozise uğrayacak hücreler küçülür, büzülür, hücreler arası bağlantılarını kaybeder, kromatin yoğunlaşır, nüklear piknoz görülür ve hücre küçük apoptotik

cisimler oluşturmak üzere yıkılır. Apoptotik cisimler makrofajlarca fagosite edilirler (Walker ve ark. 1988; Öztürk 2002).

Apoptotik süreçte şu aşamalar gözlenir (Öztürk 2002).

1. Apoptozis'in başlatılması,
2. Hücre içi proteazların aktivasyonu,
3. Hücrede meydana gelen morfolojik değişiklikler,
4. Fagositoz.

2.6.1. Apoptozis'in Başlatılması

Apoptotik sürecin başlamasında ilk önce hücre içi ve hücre dışı kaynaklı ölüm sinyalleri etkili olur. Bu sinyallere maruz kalan hücre, ilgili genetik mekanizmaları harekete geçirir ve apoptozisi başlatır (Öztürk 2002). Hücre içinden kaynaklanan sinyaller; metabolizma ve siklus bozuklukları, hiperkalsemi, pH değişiklikleridir. Hücre dışından kaynaklı sinyaller ise, ultraviyole ışınları, hipoksi, ısı değişiklikleri, anti-kanser ilaçlar ve toksik maddelerdir. Dış kaynaklı olan sinyaller DNA hasarı meydana getirerek, apoptozise yol açmaktadır (Ergin 2002, Öztürk 2002).

2.6.2. Hücre İçi Proteazların Aktivasyonu

Hücre içi ya da hücre dışından gelen apoptotik sinyaller, hücre içerisinde bulunan proteazları aktive eder. Bu proteazlara kaspaz adı verilir (caspase: cysteine containing aspartate specific proteases). Bu kaspazların aktive olması apoptotik sürecin başlamasına yol açar (Öztürk 2002). Mitokondri apoptozis olayında önemli bir rol oynar. Mitokondrial yol, sitotoksik ajanlar ve oksidatif baskı gibi çeşitli hücre içi ve dışı etkiler sonucu aktive olur. Apoptotik sinyaller, mitokondriye ait iç ve dış membranlar arasındaki boşluktan sitoplazmaya doğru sitokrom C salınmasında artışa neden olur. Sitokrom C apoptozis proteaz aktive edici faktöre (Apaf-1) bağlanır. Apaf-1'e tutunan sitokrom C sitoplazmada apoptozom oluşumuna neden olarak kaspazları aktive eder. Kaspazların aktivasyonu da sonuçta apoptozise yol açar (Lawen ve Grutter 2000).

2.6.3. Hücrede Meydana Gelen Morfolojik Değişiklikler

Apoptotik sürecin sonlarına doğru kaspazlar DNA kırılmalarına sebep olur. Aktin filamanının yıkımı sonucunda, hücre normal şeklini kaybeder ve hücre membranının simetrisi bozulur. Su kaybeden hücre büzülür ve hücre yüzeyinde kraterler oluşur. Çekirdek büzülerek parçalanır ve son olarak hücrenin parçalanmasıyla apoptotik cisimcikler meydana gelir (Öztürk 2002).

2.6.4. Fagositoz

Apoptotik cisimler çevredeki parankim hücreleri ve makrofajlarca fagosite edilerek dokulardan temizlenir. Apoptozis sırasında inflamasyon oluşmaz (Lawen ve Grutter 2000).

2.7. APOPTOZ MEKANİZMASI

Apoptoz süreci; hücre membranı tarafından ölüm sinyallerinin alınmasıyla (ekstresek), DNA hasarına genlerin yanıtıyla (intresek), veya proteolitik enzimlerin doğrudan hücreye girişiyle (Perforin – Granzim) 3 farklı şekilde gelişebilir (Roshal ve ark. 2001).

2.7.1. Ekstresek / Reseptör Aracılı Yol

Hücre dışından kaynaklı olup, hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerinin tutulması ile düzenlenen apoptozdur. Apoptozun dış yolu Tümör Nekroz Faktör (TNF) ailesi hücre yüzey reseptörlerinin ligantlar yolu ile aktive edilmesi ile uyarılır. Hücre ölümünü düzenleyen mekanizmaların başlıcası, sitokine bağlı dış apoptozis yoludur. TNF-alfa, TNF ile ilişkili apoptozis uyarıcı ligantlar (TRAIL) ve Fas ligantları, bazı malign ve normal hücrelerde kendilerine özgü reseptörlerle birleşerek hücre ölümüne neden olurlar (Elmore 2007). Bu proteinlerin hücre dışı kısımları ligant bağlanması için önemlidir. Sitoplazmik kısımlarında kısmen korunmuş olan bir ölüm bölgesi (DD) olup, bu bölgeler sitoplazmik sinyal proteinlerinin bağlanarak apoptozisin başladığı yerlerdir. Ligandlar bağlandığında 3 Tümör Nekroz Faktör Reseptörü (TNFR) ya da Fas molekülü kompleks oluşturur. TNFR ve Fas trimerlerinin sitoplazmik bölümleri sırasıyla TNFR'e bağlı ölüm bölgesi (TRADD) ve Fas'a bağlı ölüm bölgesi (FADD/Mort-1) denen adaptör proteinlere bağlanır. Bu

proteinlerin hem DD hem de proteazların ölüm oluşturan kısımlarına (DED) bağlanan bölgesi vardır. Reseptörlerin sitoplazmik kısımları, adaptör proteinler ve proteazlar ölümü başlatan sinyalleme kompleksini (DISC) oluştururlar (Brooks 2006).

2.7.2. İntrensek (mitokondrial) Yol

Apoptozun yaygın yolu olan iç yol hücrenin kendi içinden, sitotoksik ilaçlar gibi hasar yapıcı ajanlarla başlar. İç sinyaller ile oluşan apoptozda mitokondri önemli rol oynamaktadır. Dış zar geçirgenliğinde artış sonucu mitokondri zarı potansiyelinin bozulması dış zarda hızlı bir şişmeyi izleyerek iki zar arasında bulunan çeşitli proteinlerin hücre sitoplazmasına çıkmasına yol açar. Temel olarak mitokondrideki solunum zincirinde yer alan bir enzim olan sitokrom c, apoptoz indükleyici faktör (AİF), SMAC ve ENDO G adlı DNaz enzim, sitoplazmaya dağılır. Sitokrom c, sitoplazmada inaktif monomerler halinde bulunan Apaf-1 (apoptotik proteaz aktive eden faktör) molekülüne bağlanarak apoptozom adı verilen yapının oluşumunu sağlar (Ow ve ark. 2008). Apoptozom, kaspaz 9 u aktive etmek üzere keser, kaspaz9 diğer kaspazları proteolitik bir zincir halinde aktive ederek apoptozun gerçekleşmesini sağlar.

2.8. Spermatogenezde Apoptozisin Rolü

Doku canlılığında ve devamında, enfekte hücrelerin ortadan kaldırılmasında ve normal fizyolojik ortamın korunmasında görevli olan apoptozis, testiküler dokuda da sıkça oluşan bir durumdur. Spermatogenez, spermatogonyal kök hücreden mitotik ve mayotik bölünmeler sonucu hücre farklılaşması ile olgun sperm oluşmasıdır. Normal spermatogenez içinde, hücre gelişimi ve farklılaşmasına ilave olarak germ hücre ölümü de görülür ve bu sperm oluşumunda kritik rol oynar (Sharpe 1994; Sinha-Hikim ve ark. 1998). Apoptozis, spermatogenezde genellikle spermatositler ve spermatogonyumda programlı hücre ölümüne yol açar. Germ hücrelerindeki bu ölüm spermatozoonun normal gelişimi için mutlaka gereklidir (Jefferson ve ark. 2000).

Erken gelişimsel evrede başlayan bu apoptotik hücre eliminasyonu, olgunlaşmakta olan germ hücreleri ile Sertoli hücreleri arasında uygun sayısal oranı

sağlamaya yönelik fizyolojik bir yanıt olarak tanımlanmıştır (Sharpe 1994; Beumer ve ark. 2000). Androjen eksikliğinde, azospermik ya da oligospermik hastalarda, deneysel kriptorşidizm oluşturulan hayvanlarda, ısı artışının olduğu olgularda testislerde oluşan programlı hücre ölümlerinde apoptoziste artış gözlenebilir (Davis ve Firlit 1966; Heiskanen ve ark. 1996). Spermatogenezde testiküler germ hücre apoptozisinin hormonal kontrol altında gerçekleştiği bildirilmiştir (Tapanainen ve ark. 1993).

2.9. Apoptozun Tespiti: TUNEL Metodu

Apoptozisde DNA parçalanması, hücre şeklindeki yapısal değişikliklerle ilişkilidir. Hücrede apoptozisi belirlemek için kullanılan birçok yöntem vardır. Apoptozisde ortaya çıkan DNA parçalanmasını gösteren yöntemlerden biri TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate (dUTP) nick-end labelling) yöntemidir (Kano ve ark. 1999).

TUNEL yöntemi, kimyasal olarak işaretlenmiş ve işaretlenmemiş nükleotidler kullanılarak serbest 3'OH uçlarının işaretlenmesi ilkesine dayanır. Tepkime tamponuna eklenmiş olan nükleotidlerin, terminal deoksinnükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak, enzimatik olarak DNA'ya bağlanması sağlanır. TdT tek sarmallı ya da çift sarmallı DNA'nın 3'OH uçlarına serbest olarak eklenen nükleotid trifosfatları katalizler. Serbest olarak bulunan nükleotidler digoksinin konjugat eklenmesiyle bir oligomer oluştururlar. Daha sonra digoksinin ile konjuge olan nükleotidlerin peroksidaz tepkimesi verebilen antidigoksinin antikoru ile bağlanması sağlanır. Böylece bağlanmış peroksidaz antikoru, immunohistokimyada duyarlı görünüm sağlayan kromojenik substratlarla bağlanır. Sonuç olarak apoptotik cisimciklerde çok yüksek oranda bulunan 3'OH uçlarının hassas ve özel boyanması gerçekleşmiş olur (deTorres ve ark. 1997; Deng ve ark. 2001). TUNEL yöntemi özellikle apoptozisin erken evrelerinin gösterilmesi açısından özel ve önemlidir (Torres ve ark. 1997).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı tarafından Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde gerçekleştirildi. Doku örnekleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında incelendi.

3.1. Etik Kurul ve Bilimsel Araştırma Proje Desteği

Çalışma için Necmettin Erbakan Üniversitesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nin Etik Kurulu'nun 2013/132 no'lu kararında geçen etik kurul onayı alındı. Proje Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinatörlüğü'nce (BAP No: 131318002) desteklendi.

3.2. Deney Hayvanları

Bu çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kombassan Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinde ağırlıkları 280-380 gr arasında değişen 3 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 ortam sağlandı.

3.3. Deney Hayvan Grupları

Sıçanlar; I. Grup (n=7) Kontrol, II. Grup (n=7) Siklofosamid (CP) (Cyclophosphamide-(Endoxan®,Eczacıbaşı-Baxter) tedavisi alan, III. Grup (n=7) Siklofosamid+Vitamin E ve IV. Grup (n=7) ise sadece Vitamin E (Evigen,Aksu Farma) alan grup olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

Kontrol grubuna; 7 gün boyunca günde 1 kez sıçanların vücut ağırlıklarına göre hacmi hesaplanarak belirlenen dozda izotonik sodyum klorür çözeltisi (CP çözücüsü olduğu için) intraperitoneal yolla verildi ve uygulamadan yarım saat sonra

hayvanların ortalama vücut ağırlıklarına göre hacmi hesaplanarak bulunan dozda zeytinyağı E vitamini çözücüsü olduğu için yine intraperitoneal yolla verildi.

Siklofosfamid (CP) grubuna; 7 gün boyunca günde bir kez 20 mg/kg siklofosfamid intraperitoneal yolla verildi.

Siklofosfamid (CP) + Vitamin E grubuna; 7 gün boyunca günde bir kez 20 mg/kg siklofosfamid intraperitoneal yolla ve uygulamadan yarım saat sonra 100 mg/kg E vitamini yine intraperitonealenjeksiyonla verildi.

E vitamini grubuna; 7 gün boyunca günde 1 kez 100 mg/kg E vitamini intraperitonealenjeksiyonla verildi.

Enjeksiyon işlemleri 7 gün boyunca, her gün aynı saatte uygulandı. 7 günün sonunda sıçanlara yüksek doz Ketalar-Rompun ile ötenazi yapıldı.

Gruplar için Zeytinyağı ve İzotonik Sodyum Klorür dozunun hesaplanması:

E vitamini yağda çözünen bir vitamindir. Çalışmada kullanılacak olan E vitamini ampulünde 2 ml zeytinyağı içinde 300 mg Alfa tokoferol çözdürülmüştür. Çalışmada kullanılan hayvanların ortalama ağırlığı 280-380 gr'dır. Yukarıda belirttiğimiz 100 mg/kg doza göre 300 gr'lık bir hayvan için 30 mg Vit E intraperitoneal enjeksiyonla verildi. Grup I ve Grup II' ye ise 7 gün boyunca aynı doz 30 mg zeytinyağı intraperitoneal enjeksiyonla verildi. Endoxan ilaç kutusu içerisinde 1000 mg siklofosfamid ve 50 ml çözücü ampul bulunmaktadır. İlaç sulandırıldıktan sonra 1 ml'de 20 mg/kg siklofosfamid ihtiva etmektedir.Çalışmada kullanılan hayvanların ortalama ağırlığının 280-380 gr olduğu belirtilmişti. Grup II ve Grup III'te 300 gr'lık bir hayvan için vurulması gereken doz; bir hayvan için 6 mg siklofosfamid içeren 0,3 ml izotonik sodyum klorür çözeltisidir. Grup1 ve Grup IV'te bir hayvan için verilmesi gereken izotonik sodyum klorür dozu 0,3 ml' dir. Bu nedenle çalışmamızda, kontrol grubuna 7gün boyunca izotonik sodyum klorür çözeltisi verildikten yarım saat sonra, belirlenen miktarda zeytinyağı verilmiştir.

3.4. Vücut Ağırlıklarının Ölçümü

Deneye başlamadan önce ve deney sonunda, sıçanların vücut ağırlıkları tartılarak kaydedildi ve gözlenen değişimler deney sonu vücut ağırlığı farkı olarak adlandırıldı.

3.5. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ) hesaplaması

Aynı hayvana ait olan vücut ağırlığı ve sağ-sol testis ağırlıkları aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve her bir hayvan için TAİ değerleri belirlendi (Şahintürk ve ark. 2007);

$$\text{TAİ: } [(\text{sağ}+\text{sol testis ağırlıkları toplamı})/\text{vücut ağırlığı}] \times 100$$

3.6. Histolojik Uygulamalar

3.6.1. Nötral Formaldehid Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı

Doku tespitinde kullanılan nötral formaldehid solüsyonu aşağıdaki oranlar baz alınarak hazırlandı;

Na ₂ HPO ₄	6,5 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	3,5 g
Formalin	100 ml
Distile su	900 ml

3.6.2. Dokuların Alınması

Tüm hayvanlar deneyin sonunda tartıldı ve Ketalar-Rompun derin anestezisi altındayken ötenazi edildi. Testisler skrotumdan çıkarılıp nötral formalin solüsyonunda tespit edildi.

3.6.3. Işık Mikroskobu için Dokuların Hazırlanması

Testislerin üzerine tespit sıvısı döküldükten sonra her iki ucundan enjektör ucu ile testislerin kapsüllerine karşılıklı delikler açıldı. Dokular nötral formalin solüsyonunda yirmi dört saat bekletildi. Dokular sertleştikten sonra testisler enine olacak şekilde önce ortadan iki eşit parçaya ve daha sonra bu parçalar da yeniden ikiye bölündü ve kasetlere alındı. Bu şekilde kasetlenen dokular etiketlenerek

kodlandı ve olağan doku takibi sürecine alınarak her hayvana ait parafin bloklar hazırlandı. Her testisten 2'şer blok hazırlandı.

Parafin bloklar hazırlamak için kullanılan doku takip yönteminin basamakları aşağıda gösterilmiştir.

Doku takip yöntemine ait süreler aşağıda saat cinsinden verilmiştir.

Kimyasal	Uygulama Süresi (saat)
%70 Alkol	1
%80 Alkol	1
%95Alkol I	1
%95 Alkol II	1
%100 Alkol I	1
%100 Alkol II	1
Ksilol I	1
Ksilol II	1
%50 Parafin - %50 Ksilol	1
Parafin I	1
Parafin II	1
Parafin III	1
Bloklama	

3.6.4. Kesitlerin alınması ve boyanması

Her bloktan 4 µm kalınlığında seri kesitler alındı. Her lam üzerine 2 kesit gelecek şekilde dokular alınarak, lamalar numaralandırıldı. Testis dokusunda meydana gelen histolojik değişiklikleri gözlemlemek için kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) ile boyandı.

Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi basamaklarına ait uygulama süreleri:

Kimyasal madde	Uygulama süresi (dk)
Ksilol I	15
Ksilol II	15
%96 Alkol I	5
%96 Alkol II	5
%90 Alkol	5
%80 Alkol	5
%70 Alkol	5
Distile su	5
Hematoksilen	1
Çeşme suyunda yıkama	Suyun rengi şeffaf olana kadar
Eozin	5
%70 Alkol	2
%80 Alkol	2
%90 Alkol	2
%96 Alkol I	2
%96 Alkol II	2
Ksilol I	5
Ksilol II	5
Lamların kapatılması	

3.7. İmmünohistokimyasal Boyama

Elde edilen parafin bloklardan alınan 4 µm kalınlığındaki kesitler poly-Llysine ile kaplı lamalar üzerine yerleştirildi. Çalışmada immünohistokimyasal yöntemle; C-kit (CD117) (SC-168, Lot:E1206, Santa Cruz Biotechnology) ve Bax monoklonal İmmünglobulin G (IgG) (Santa Cruz Biotechnology U.S.) kullanılarak boyamalar yapıldı.

Bax ve C-kit boyanma aşağıdaki kriterlere göre değerlendirildi.

0: hiç boyanma yok

+1: Zayıf boyanma var

+2: Orta şiddette boyanma var.

+3: Kuvvetli şekilde boyanma var

3.7.1. Bax ve C- kit Boyama Yöntemi

Deparafinizasyon	1 saat
Distile Su	5 dakika
Fosfat tamponlu tuzlu su (PBS), (Ph:7,6)	5 dakika
%3'lük H ₂ O ₂ 'de	20 dakika
Distile su, PBS'de yıkama ve tekrar temiz PBS	5 dakika
Süper Blok(V- Blok)	7 dakika
Distile su, PBS	Bekletme
Primer antikor	1 saat
Distile su, PBS'de yıkama ve tekrar temiz PBS	5 dakika
Sekonder antikor	20 dakika
Distile su, PBS'de yıkama ve tekrar temiz PBS	5 dakika
Streptavidin Peroxidase	20 dakika
Distile su, PBS'de yıkama ve tekrar temiz PBS	5 dakika

ABC kromojen	15 dakika
Distile su	5 dakika
Zıt boya olarak Mayer's Hematoksilen	3 dakika
Akarsuda akıtma	1 dakika
Amonyaklı su	1-2 saniye
Distile su	1-2 saniye
Kurulama	
Özel kapatma maddesi ile kapatma	

3.7.2. TUNEL Metodu

Hücrelerde DNA parçalanması ve apoptotik hücre ölümünün belirlenebilmesi amacıyla in situ apoptozis belirleme kiti (ApopTag Plus, In Situ Apoptosis Detection Peroksidase kit, S7101-KIT, Chemicon) kullanıldı.

- Parafin giderme ve suya indirme: Doku kesitleri, 2x5 dk toluol, 2x5 dk absolü alkol, 3 dk %95 alkol, 3 dk %70 alkol'de bekletildi ve 5 dk PBS ile çalkalandı.
- Proteinlerin sindirilmesi: Kesitler Proteinaz K (20µg/ml) ile oda ısısında 15 dk inkübe edildi.
- 2x2 dk distile su ile çalkalandı.
- Endojen peroksidazın maskelenmesi: Kesitler PBS ile hazırlanmış %3 H₂O₂ ile 5 dk oda ısısında muamele edildi.
- PBS ile 2x5 dk yıkandı.
- Dengeleme tamponu: Lamların etrafı dikkatlice kurulanıp, kesitlerin üzerine 75µl dengeleyici tampon konulup, plastik lameller ile kapatıldı. 30 dk oda ısısında inkübe edildi.
- Tdt enziminin uygulanması: Plastik lameller kaldırılıp etrafı kurulandı ve her lam üzerine 55µl Tdt enzimi konuldu ve plastik lameller ile kapatıldı. Nemli ortamda 37 °C etüvde 1 saat inkübe edildi.
- Durdurma/ Yıkama: Plastik lameller kaldırıldı ve kesitler durdurma/yıkama tamponu ile oda ısısında 10 dk yıkandı.

- PBS ile 3x5 dk yıkandı.
- Anti-Digoksinin-Peroksidaz: Her kesit üzerine 65µl Anti-Digoksinin-Peroksidaz konuldu ve üzerlerine plastik lameller tekrar kapatılarak oda ısısında 30 dk bekletildi.
- Plastik lameller kaldırıldı ve kesitler PBS ile 3x5 dk yıkandı.
- Renk reaksiyonu: Kesitlerin çevresi kurulandıktan sonra her kesit üzerine 75µl DAB (diaminobenzidine) substrat solüsyonu damlatıldı. 3-6 dk arasında pozitif renk reaksiyonu mikroskop altında tespit edildi.
- Renk reaksiyonu oluşmasından sonra kesitler distile su ile 3x1 dk yıkandı.
- Kesitler distile su ile 5 dk tekrar yıkandı.
- Zıt Boya Uygulaması: Kesitler metil yeşili ile 1 dk. boyandı ve distile suda boyama durduruldu.
- Fazla boyanın giderilmesi amacıyla kesitler 2x10 sn. %100 alkol ile ardından 30 sn tekrar %100 alkol ile çalkalandı.
- Kapatma: Kesitler 2x2 dk. toluolde tutuldu. Toluolden çıkarıldıktan sonra entellan yapıştırıcı maddesi kullanarak kapatıldı.

Uygulama esnasında hazırlanması gerekli solüsyonlar:

% 3 H₂O₂: 3 ml H₂O₂ / 27 ml PBS= 30 ml

Tdt: 77 µl Reaksiyon Tamponu + 33 µl Tdt Enzimi =110 µl

DAB Substrat: 147 µl DAB Dilüsyon solüsyonu + 3 µl DAB Substratı= 150µl

Durdurma/Yıkama tamponu: 1ml yıkama solüsyonu + 34 ml distile su = 35ml

Boyama Özgüllüğü Kontrolleri:

Pozitif kontrol olarak, 5 mg/kg dozunda Deksmetazon uygulanmış erişkin sıçana ait timus dokusu ve kit içinden çıkan doku kesiti kullanıldı.

3.8. Apoptotik İndeks

Tüm gruplara ait deney hayvanlarının testis doku kesitlerinde apoptoz tayini için TUNEL boyaması uygulandı. Dokular ışık mikroskopunda 40'lık büyütmede rastgele seçilen 10 tane seminifer tübülde pozitif boyanan apoptotik çekirdekler sayılarak aşağıdaki formüle göre yapıldı.

Apoptotik İndeks (APOİ)= Apoptotik çekirdek sayısı/ Toplam hücre sayısı x 100 (Tunçdemir ve Öztürk 2008).

3.9. Johnsen Skorlama

İncelenen tubuli seminiferi kontorti kesitlerine verilen puanların toplamı, sayılan tübül sayısına bölünerek, bu puanlama sistemine göre ortalama puan hesaplanmıştır(Ivan 1993).

Skor	Histolojik bulgular
10	Birçok spermatozoa bulunan tam bir spermatogenezis
9	Birçok spermatozoa var, germinal epitel bozuk ve lümen Oblitere
8	Yalnız birkaç spermatozoa var (<5-10)
7	Spermatozoa yok, birçok spermatid var
6	Spermatozoa yok, yalnızca birkaç spermatid var (<5-10)
5	Spermatozoa/spermatid yok, çok sayıda spermatosit var
4	Yalnızca birkaç spermatosit var (<5), spermatid / spermatozoa yok
3	Germ hücresi olarak yalnız spermatogonia mevcut
2	Tübüller içerisinde germ hücresi yok, Sertoli hücreleri mevcut
1	Tübüller içerisinde hücre yok

3.10. İstatistiksel Yöntemler

Bax ve C-Kit verileri Kruscal Wallis testi ile değerlendirildi ve hangi gruplar arasında fark olduğunu belirlemek amacıyla Man Whitney U Testi uygulandı. Histopatolojik veriler, Testis ağırlıkları ve Tunel Uygulamasının verilerine ise One Way Anova testi uygulandı ve ikili gruplar tekrar Independent T Testi ile değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlığı Farkı

Araştırmamızın başlangıcı ve deney sonunda olmak üzere; Kontrol, CP, Vit E ve CP+Vit E deney grubundan oluşan sıçanların vücut ağırlıkları ölçüldü. Bu sonuçlara göre deney grupları arasında vücut ağırlığı bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

4.2. Testis Ağırlık İndeksi (TAİ)

Aynı hayvana ait olan vücut ağırlığı ve sağ-sol testis ağırlıkları aşağıdaki formüle göre hesaplandı ve her bir hayvan için TAİ değerleri belirlendi (Şahintürk ve ark. 2007); gruplar arası TAİ değerlerinin değerlendirilmesinde, gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıkmadı.

$$\text{TAİ: } [(\text{sağ}+\text{sol testis ağırlıkları toplamı})/\text{vücut ağırlığı}] \times 100$$

Grup	N	MEAN+ SE	P
1	7	0,97- 0,3	0,22
2	7	1,03- 0,4	
3	7	0,97- 0,2	
4	7	1,07- 0,3	

Tablo1: Gruplar arası TAİ değerlerinin değerlendirilmesinde gruplar arası P>0,05 çıkmıştır.

4.3. Histopatolojik Bulgular:

Grup 1 ve Grup 4'te; testislerde seminifer tübüller, interstisyel bağ dokusu ve Leydig hücreleri normal histolojik yapısında incelendi. Sertoli hücrelerinin çeperlerinde yerleşmiş olan spermatogenik seri hücreleri spermatogonyumlardan başlayarak düzenli bir konfigürasyonda gözlenmiştir. Ayrıca seminifer tübüllerindeki erken spermatidler ve geç spermatidler de ayırt edilebilmektedir (Resim 1, Resim 4).

CP uygulanmış 2. gruptaki sıçanların testislerinde; seminifer tübüllerde ve spermatogenik seri hücrelerinde dejeneratif değişiklikler saptanmıştır. Seminifer tübüllerde spermatogenik hücre sayısında azalmalara rastlanırken, daha çok primer

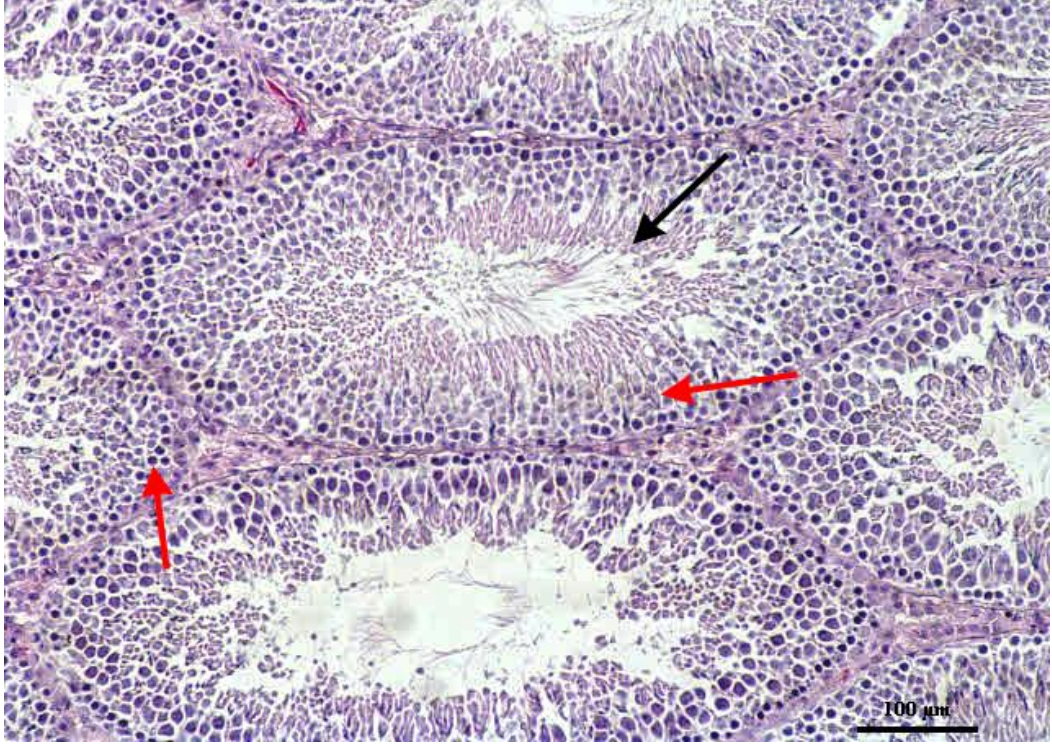
spermatozitlerden başlayan spermatogenik seri hücrelerinin bazal membrandan ayrıldığı, tüm epitelyum boyunca hücreler arası mesafenin arttığı, seminifer tübül epitelinde düzenli konfigürasyonun bozulduğu ve geç spermatidlerin daha az gözlendiği belirlenmiştir (Resim2). Siklofosamid ve Vitamin E'nin birlikte uygulandığı 3. grupta lümende spermatozoonların ve spermatidlerin CP grubuna göre daha fazla gözlendiği belirlenmiştir.

4.4. Johnsen Skorlama

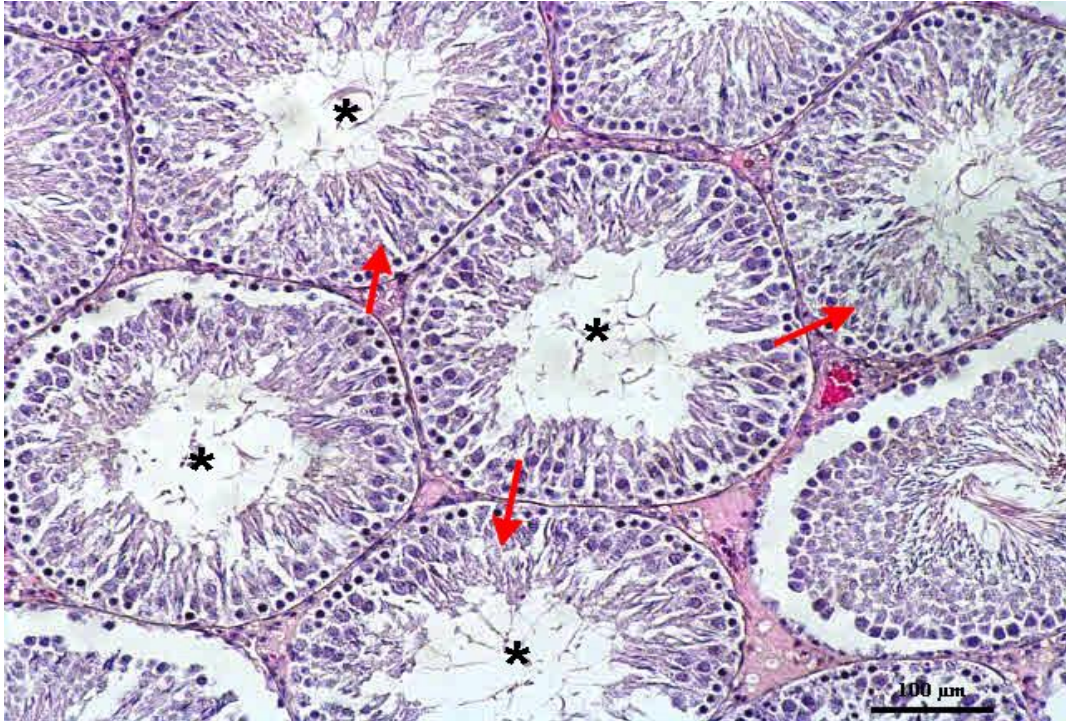
Seminifer tübül duvarındaki spermatogenez Johnsen skoruna göre değerlendirildi. Grup 1 ve Grup 4'e ait örneklerde ortalama değer 9,1 olarak bulunurken, Grup 2'de bu değer 7,47, Grup 3'te ise 8,25 bulundu. Bu değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark çıktı.

Gruplar	N	SE	Subset for alpha=0,05		
			1	2	3
2	7	0,10	7,47 ^c		
4	7	0,02			9,11 ^a
1	7	0,05			9,10 ^a
3	7	0,14		8,25 ^b	

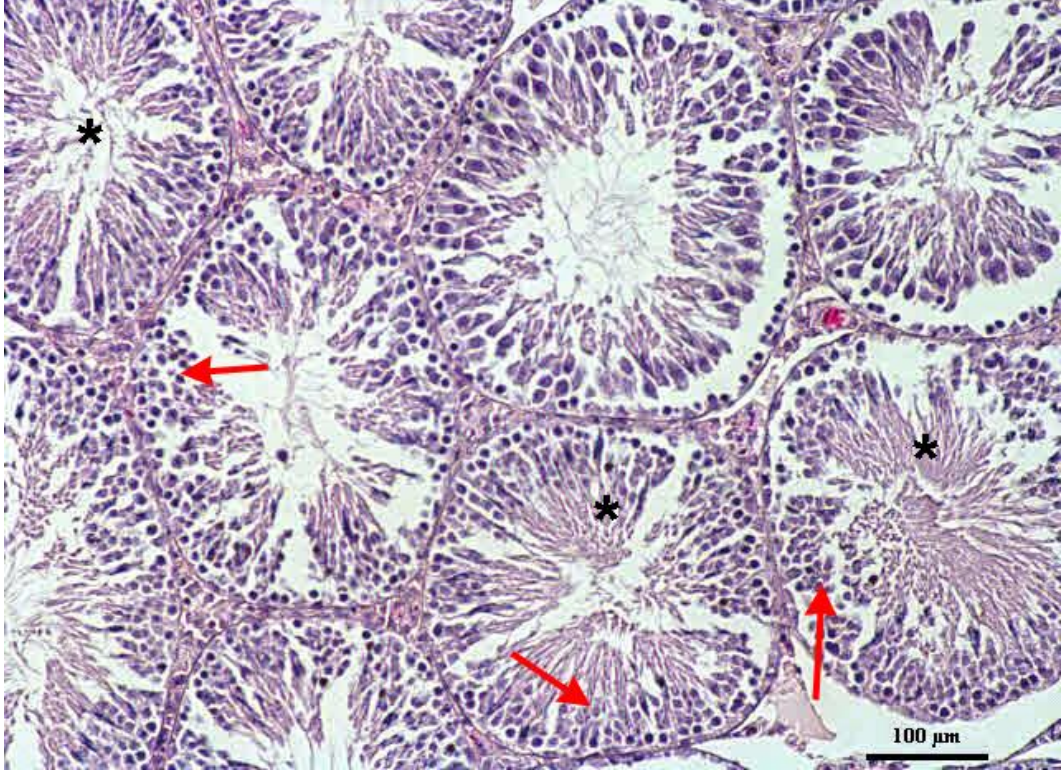
Tablo2: Johnsen skorlamasının gruplar açısından değerlendirilmesi, farklı sütünlardaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0,05$, One Way Anova). Daha sonra ikişerli gruplar halinde Independent T testi uygulanarak sonuçlar kontrol edilmiştir.



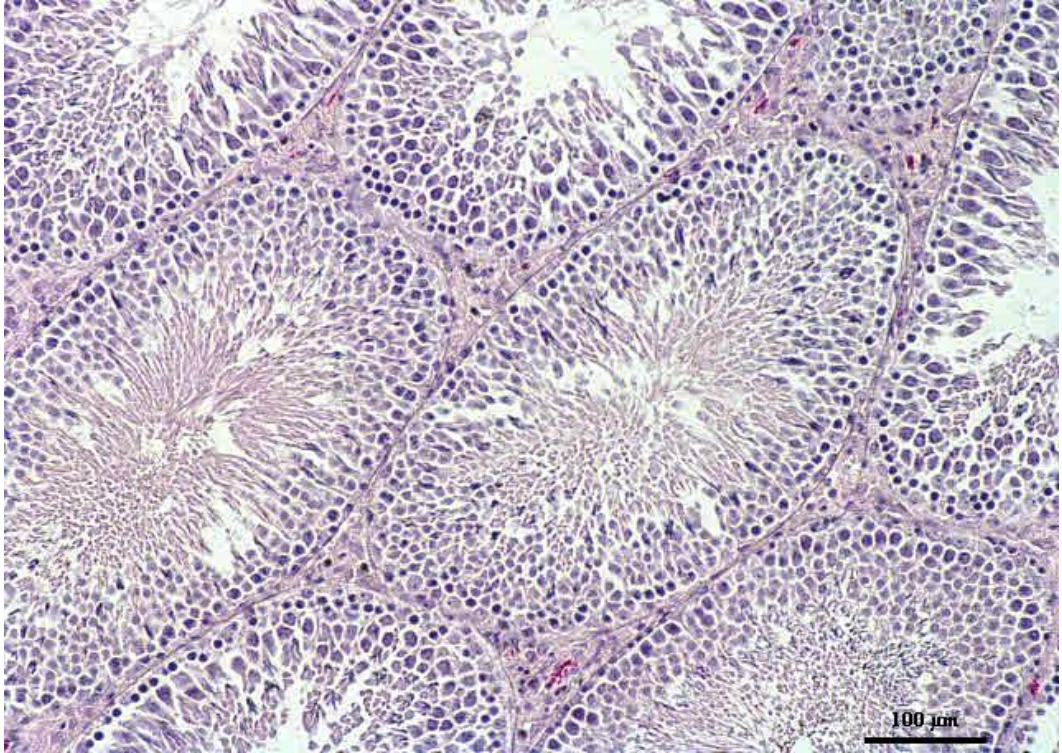
Resim 1:1. gruba ait bir kesitte, düzenli spermatogenik seri hücreler (kırmızı ok) ve spermatozoonlar (siyah ok) gösterilmektedir (H-E).



Resim 2:2. Gruba ait bir kesitte seminifer tübüllerde düzeni bozulmuş spermatogenik seri hücreler (oklar) ve tübül lümenlerinde spermatozoonların yokluk sınırında olduğu (*) gözlenmektedir (H-E).



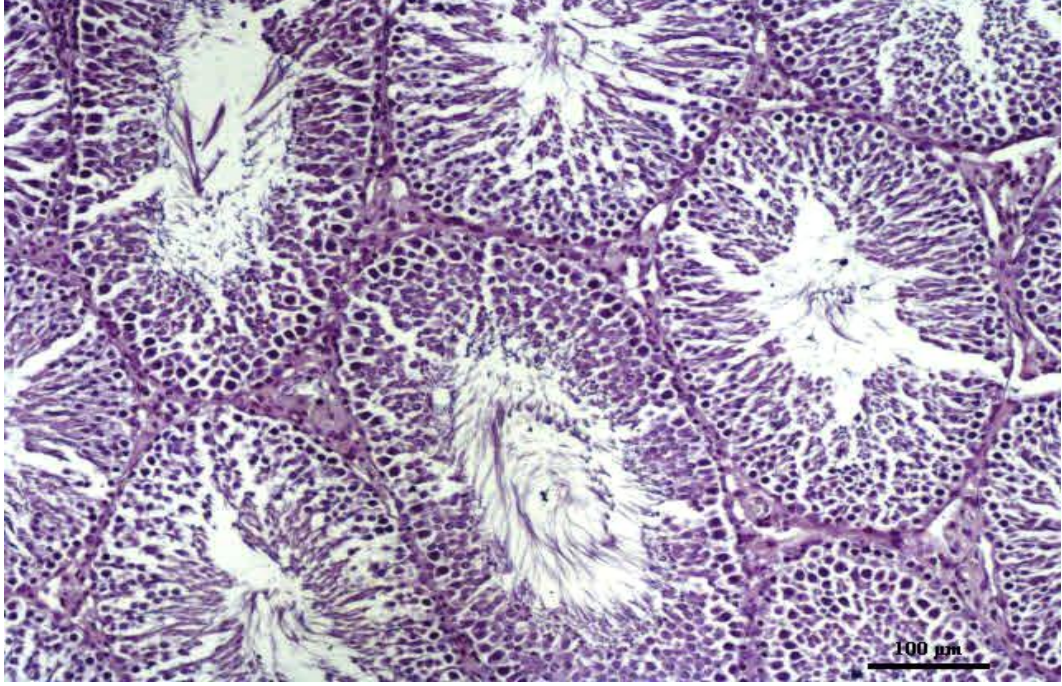
Resim 3: 3. gruptan alınan bir kesitte spermatidler (oklar) ve tübül lümeninde gözlenen spermatozoonların varlığının (*) arttığı gözlemlendi (H-E).



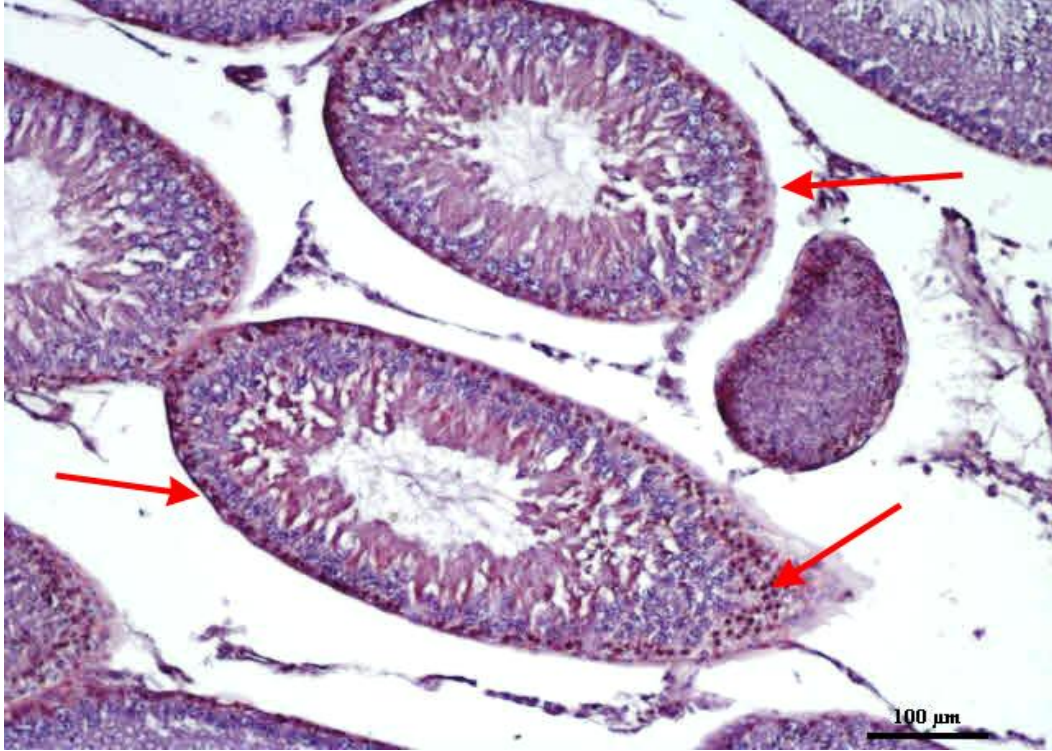
Resim 4 : 4. gruptan alınan bir kesitte tübüldeki spermatozoonlar ve düzenli spermatogenik seri hücreler kontrol grubuyla aynı özellikleri sergilemektedir.

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

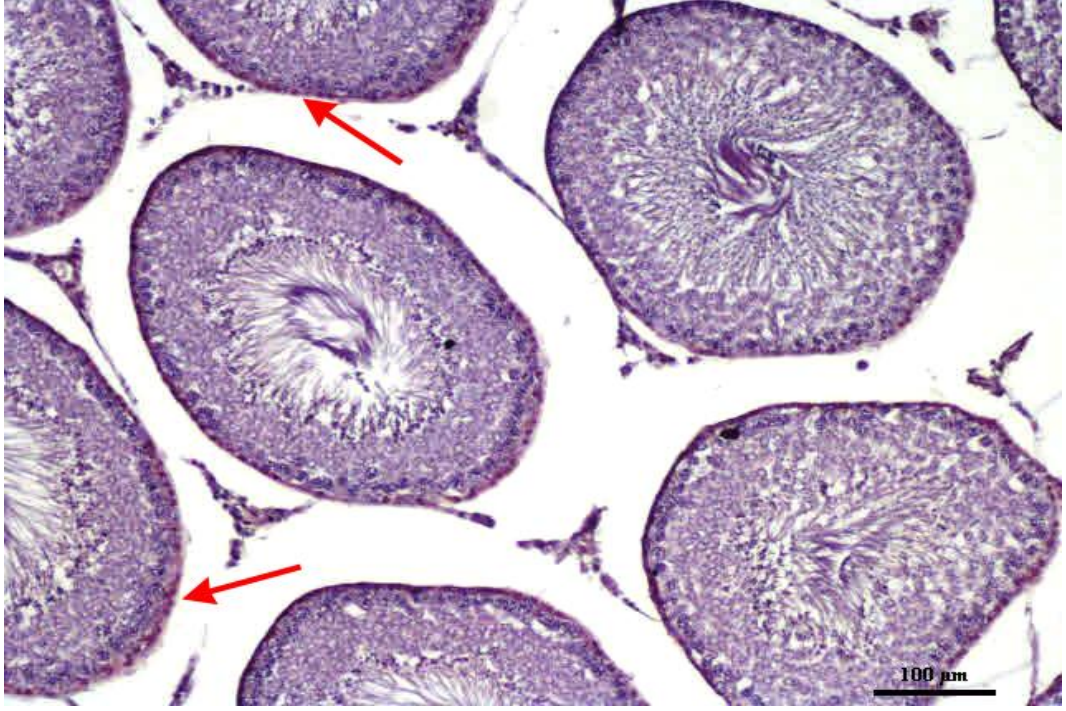
4.5.1. Bax boyanması



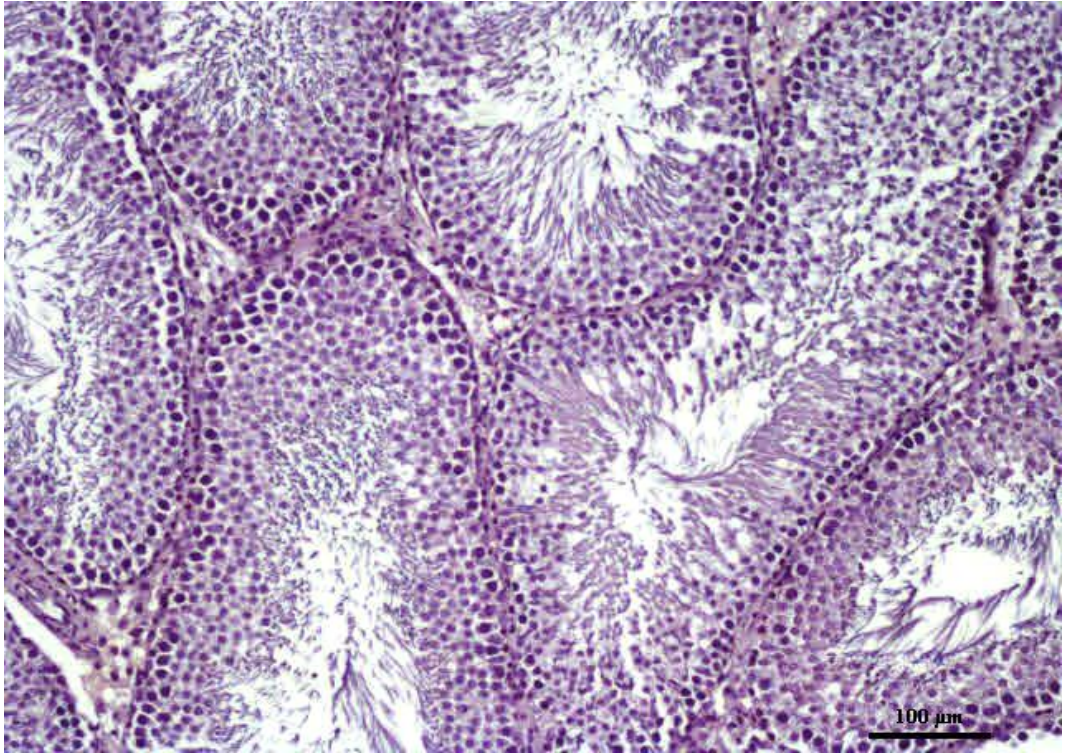
Resim 5: 1. gruptan alınan bir kesitte immünohistokimyasal olarak seminifer tübüllerde negatif Bax boyanması gözlenmektedir.



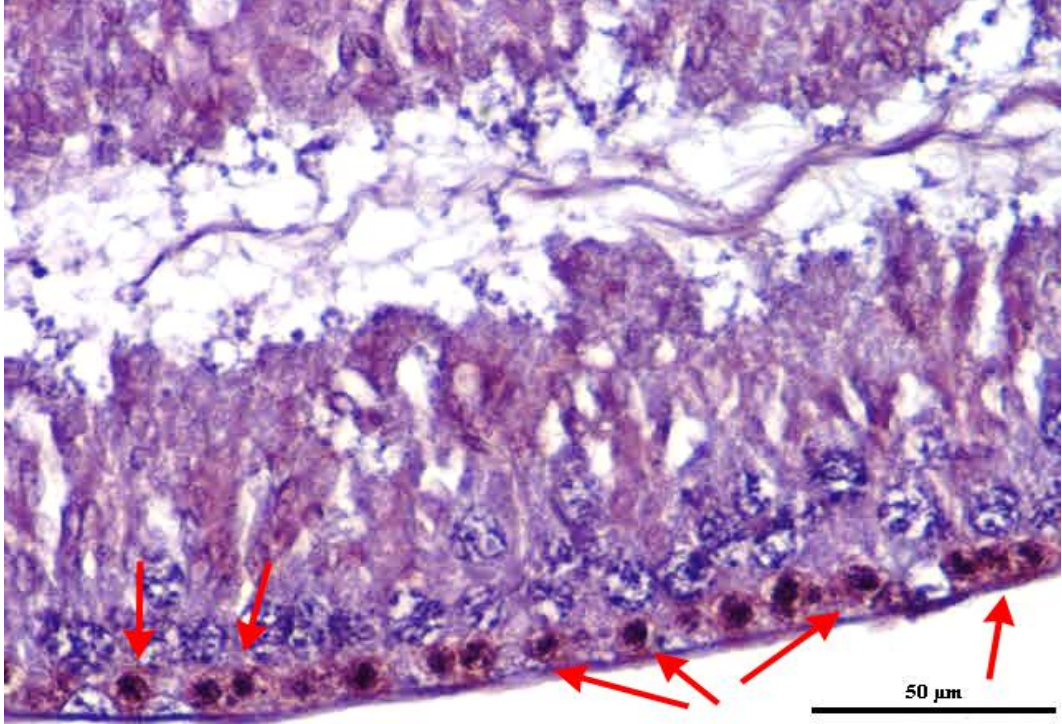
Resim 6: 2. gruba ait bir kesitte spermatogonyumlarda şiddetli Bax boyanması (oklar) gözlenmektedir.



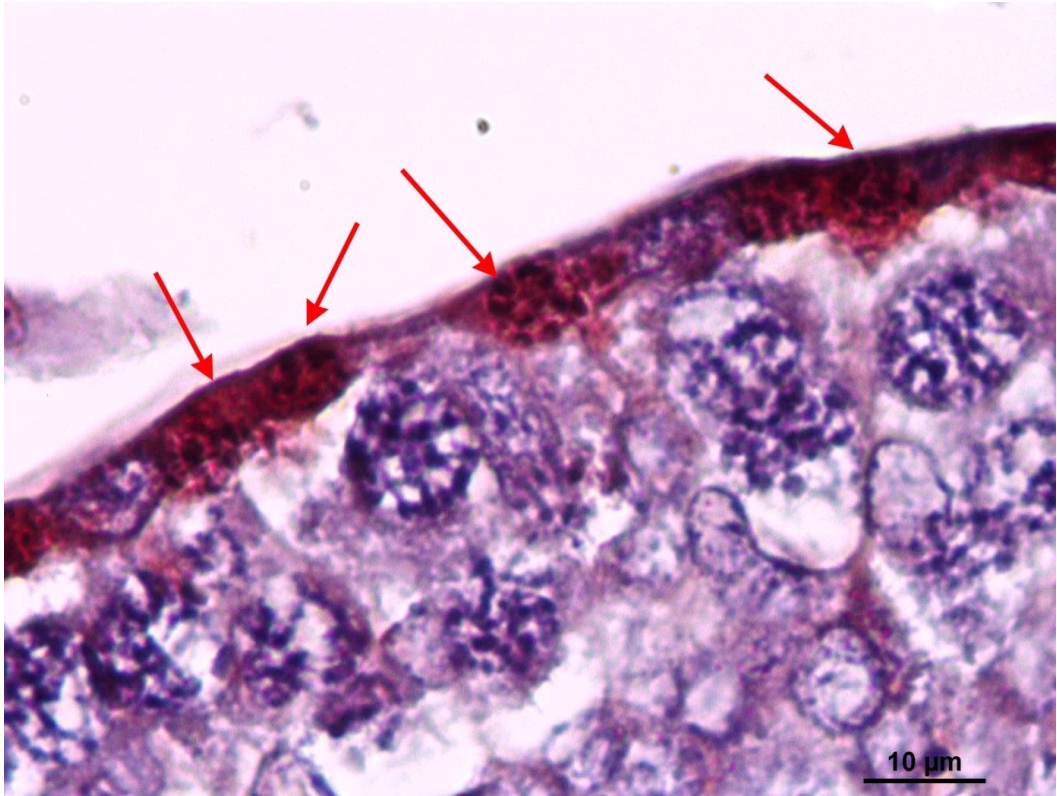
Resim 7:3. gruba ait bir kesitte Bax boyanması şiddetinin ve boyanan hücre sayısının (oklar) azaldığı gözlenmektedir.



Resim 8:4. gruba ait bir kesitte negatif Bax boyanması gözlenmektedir.



Resim 9:2. gruba ait bir kesitte spermatogonyumlarda Bax boyanması (oklar) gözlenmektedir.



Resim 10:2. gruba ait bir kesitte spermatogonyum hücrelerinde (oklar) Bax boyanması gözlenmektedir.

Çalışmamızda apoptozisin varlığını belirlemek için dört gruba da uygulanan immünohistokimyasal Bax boyaması değerlendirildi. Bax proteininin testis dokusunda görünür hale getirilerek incelenmesi için yapılan bu boyamada saptanan reaksiyonun yoğunluğuna göre değerlendirme yapıldı.

Bax	N	Ortalama+SE	P
Grup1	7	0,71+0,18	0,007
Grup2	7	1,71+0,28	
Grup3	7	1+	
Grup4	7	0,57+0,2	

Tablo3 : Tüm gruplar arasında Bax boyanması verilerinin Kruscal Wallis testi sonuçları

Kruscal Wallis testi sonucu gruplar arasında fark olduğu tespit edildi ($P<0,05$) (Tablo 3) ve tüm gruplara Man Whitney U Testi uygulandı. Bu test sonucu Grup1-Grup2, Grup2-Grup3 ve Grup2- Grup4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıktı ($P<0,05$).

Gruplar	N	P
Grup1-Grup2	7	0,015
Grup2-Grup3	7	0,024
Grup2-Grup4	7	0,11

Tablo 4:Bax boyanması verilerinin Man Whitney U Testi sonuçları

Grup 1 (Resim 5) ve Grup 4'te (Resim 8) Bax boyanması diğer gruplara göre zayıf olarak gözlemlendi. Grup 3'te(Resim 7) Bax boyanma şiddeti Grup 2'ye (Resim 6) kıyasla daha az bulundu. Bax boyanması spermatogonyum hücrelerinde tespit edildi.

4.5.2. C-kit Boyanması

C- Kit boyanmasının Grup 1 ve Grup 4'te spermatogonyumlarda ve Leydig hücrelerinde ekspresye olduğu gözlemlendi. CP grubunda bu boyanın ekspresyonunun düştüğü sonucuna varıldı.

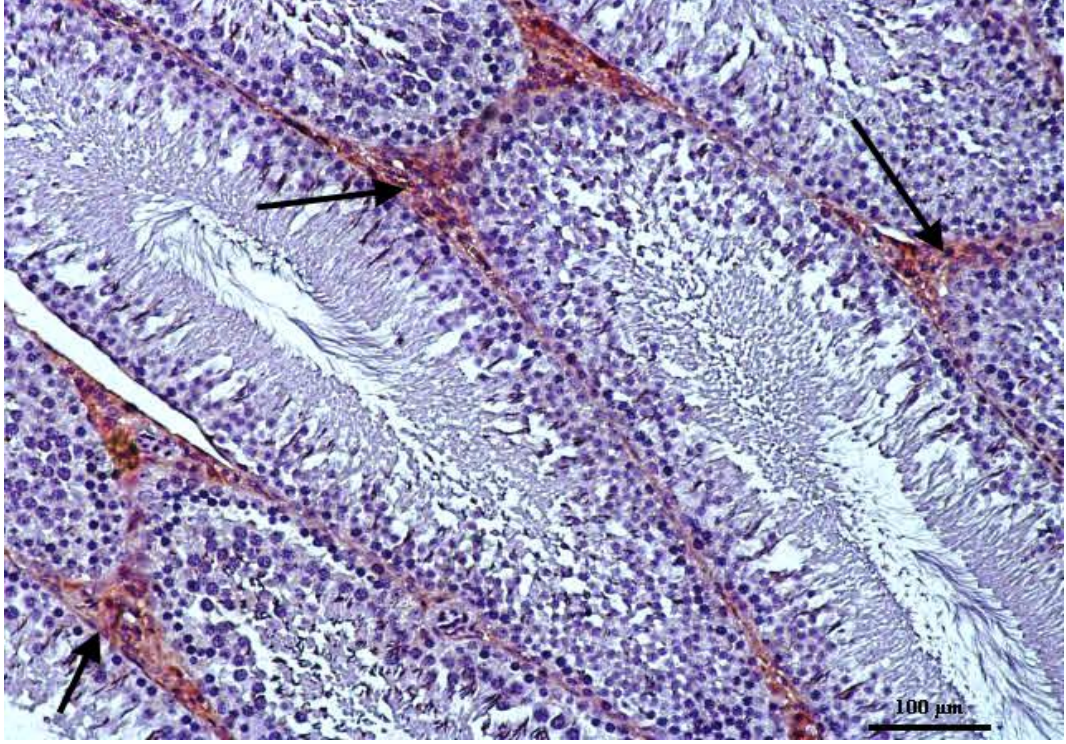
C-Kit	N	Ortalama+ SE	P
Grup 1	7	2,42+0,29	0,007
Grup 2	7	1,00+0,21	
Grup 3	7	1,71+0,18	
Grup 4	7	2+0,21	

Tablo 5 : Tüm gruplar arasında C-kit boyanması verilerinin Kruskal Wallis testi sonuçları

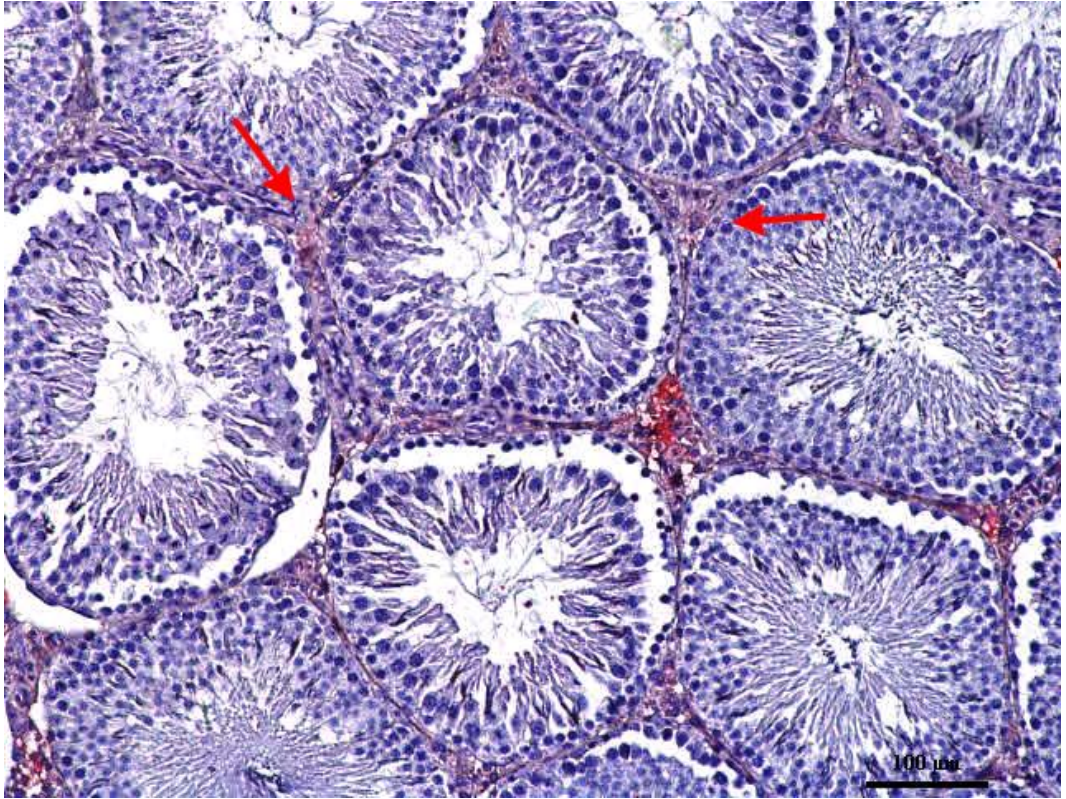
Kruskal Wallis testi sonucu gruplar arasında fark olduğu tespit edildi ($P<0,05$) ve tüm gruplara Man Whitney U Testi uygulandı. Gruplar arasında Grup1-Grup2 ve Grup2-Grup3, Grup2-Grup4 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmıştır.

Gruplar	N	P
Grup1-Grup2	7	0,007
Grup2-Grup3	7	0,032
Grup2-Grup4	7	0,01

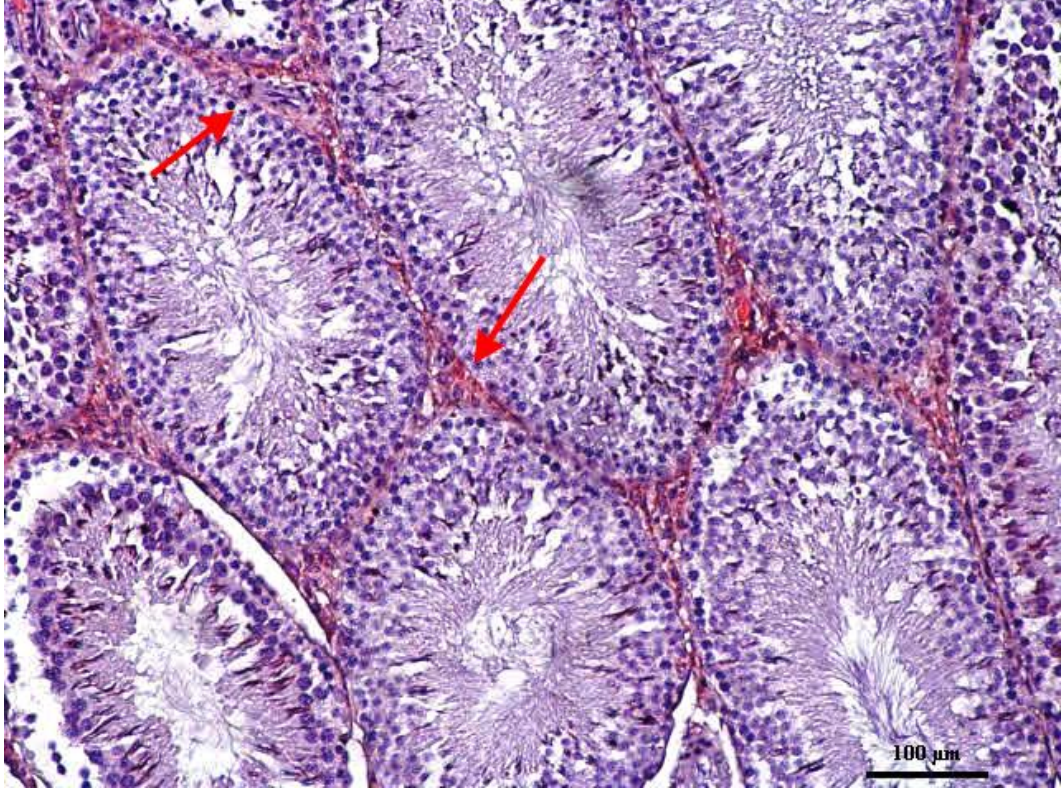
Tablo 6:C-kit boyanması verilerinin Man Whitney U Testi sonuçları



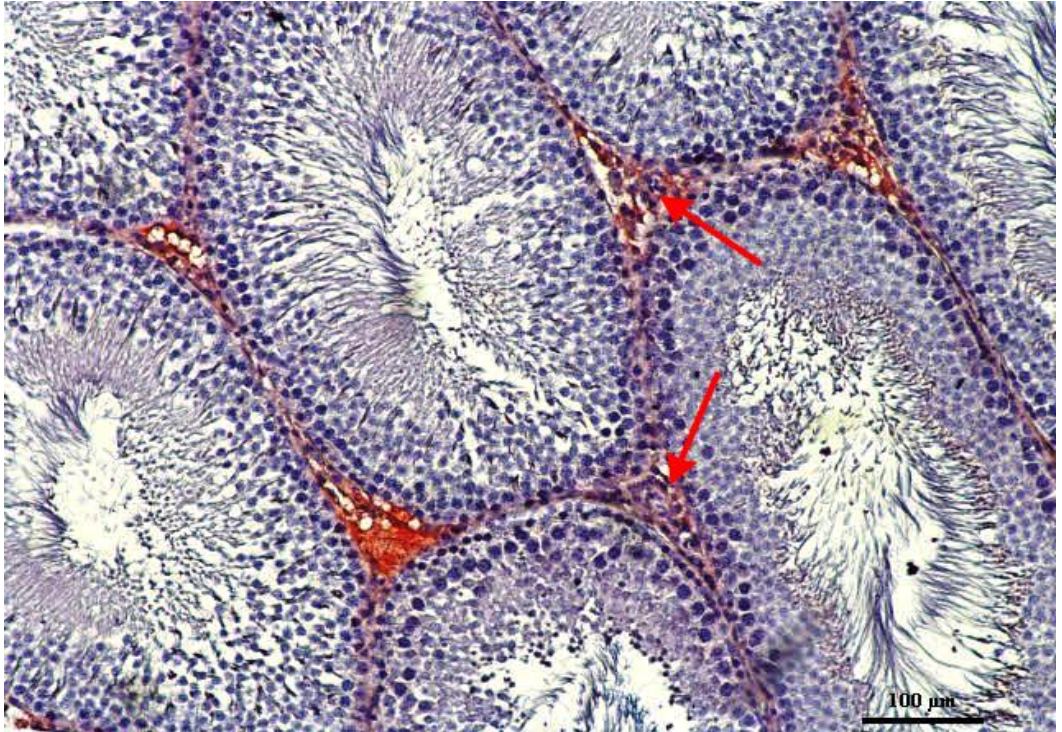
Resim 11:1. gruba ait bir kesitte C-kit boyanması, Leydig hücrelerinin bulunduğu intersellüler aralıkta (oklar) boyanma gözlenmektedir.



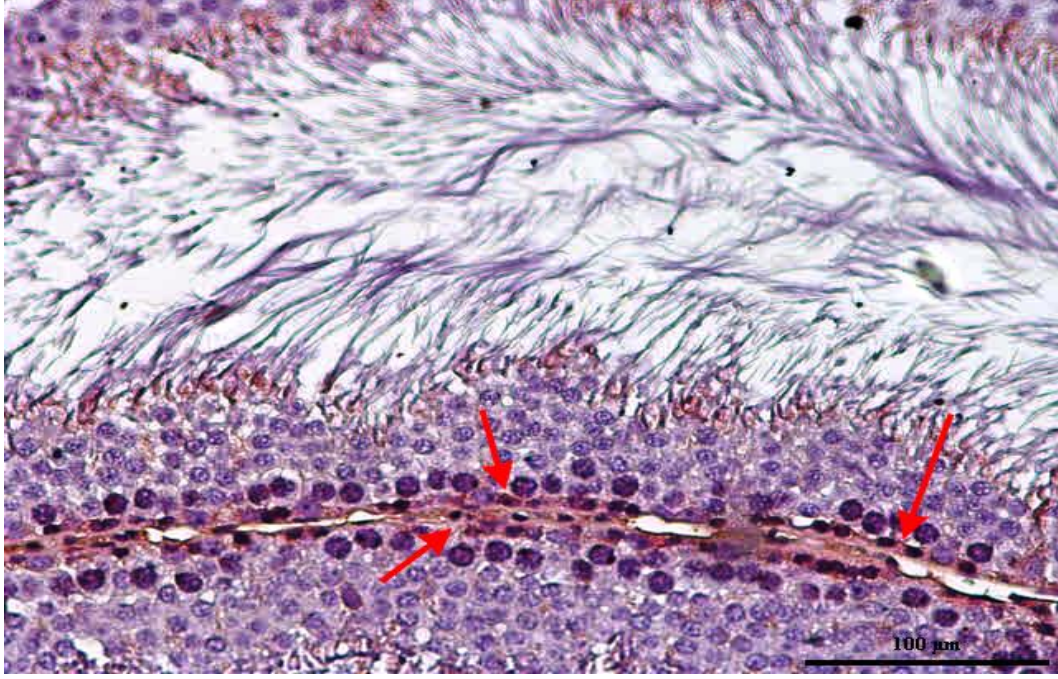
Resim 12:2. gruba ait bir kesitte Leydig hücrelerinin bulunduğu intersellüler aralıkta C-kit boyanmasının şiddetinin düştüğü (oklar) gözlenmektedir.



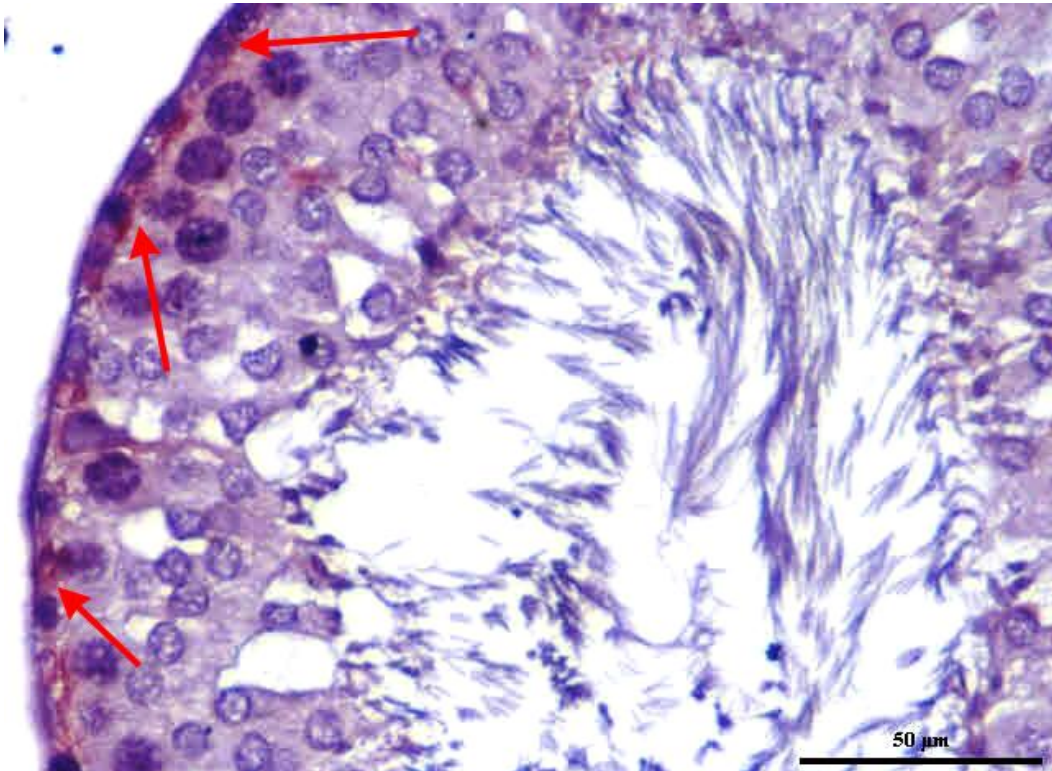
Resim 13:3. gruba ait bir kesitte Leydig hücre boyanmasının sadece siklofosamid grubuna (2. Grup) göre arttığı gözlenmiştir.



Resim 14:4. grupta kontrol grubuna benzer boyanma özelliği gözlenmiştir.



Resim 15:1. gruba ait bir kesitte spermatogonyumlarda ve spermatozoonlarda C-kit boyanması gözlenmektedir.



Resim 16:3. gruba ait bir kesitte ve spermatogonyumlarda C-kit boyanması (oklar) gözlenmektedir.

C-Kit boyanması Grup 1 (Resim 11, Resim 15) ve 4. Grupta (Resim 14) spermatogonyumlarda ve Leydig hücrelerinde tespit edildi. Grup 2 (Resim 12) bu

boyanın ekspresyonunun düştüğü fakat Grup 3'te (Resim 13, Resim 16) tekrar arttığı tespit edilmiştir.

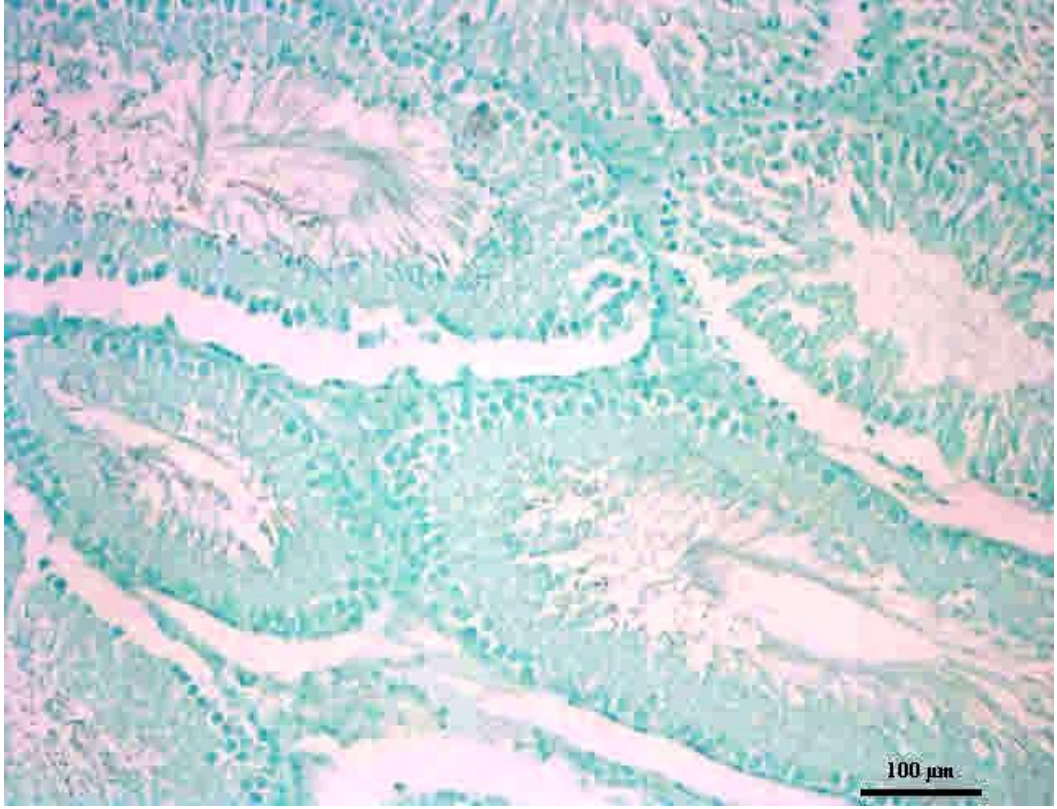
4.5.3. TUNEL Boyama

TUNEL yöntemi ile boyama sonucu, nukleusları boyanmış olan hücrelerapoptotik olarak değerlendirildi. Tunel boyama gruplar arasında One Way Anova ile değerlendirilmiştir. Farklı sütunlardaki farklı harfler istatistiksel olarak anlamlı farklılığı temsil etmektedir (Tablo 7).

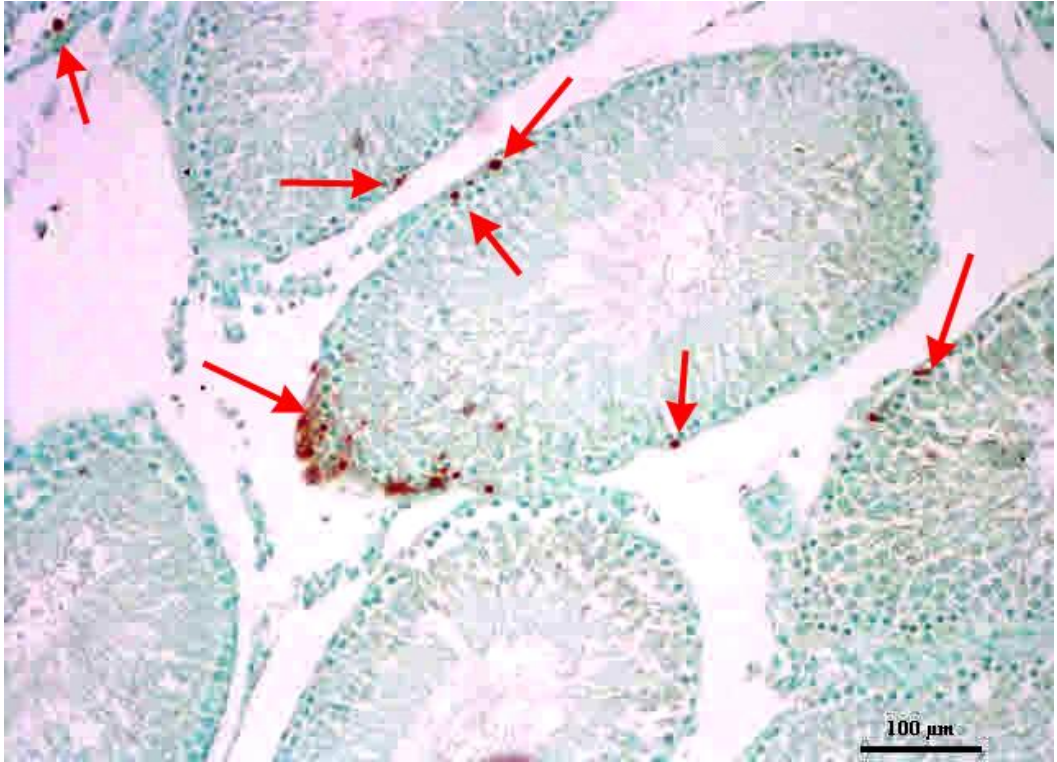
Gruplar	N	Subset for alpha=0,05	
		1	2
1	7	1,19 ^b	3,31 ^a
3	7	1,79 ^b	
4	7	1,09 ^b	
2	7		

Tablo 7: TUNEL verilerinin One Way Anova Testi Sonuçları

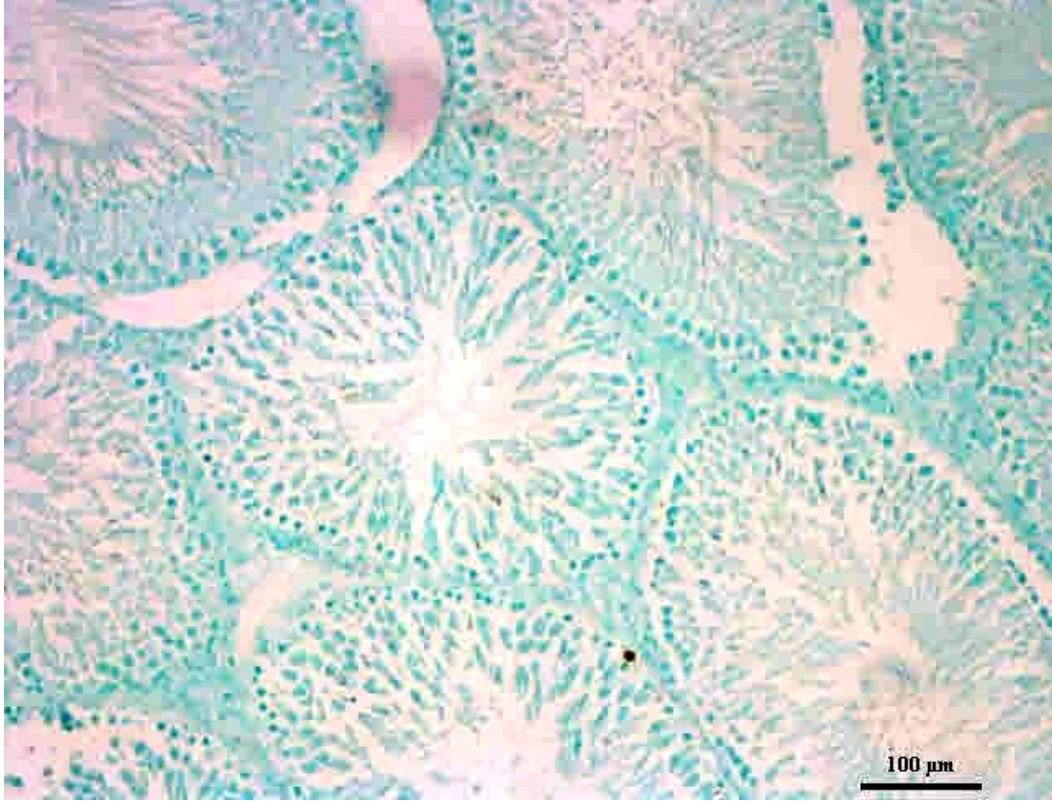
Tunel boyanan pozitif hücre sayısının 1. grupta (Resim 17) ve 4. Grupta (Resim 20), 2. gruba (Resim 18, Resim 21, Resim 22) göre düşük çıkmıştır fakat 3. grupta bu sayının tekrar azaldığı tespit edilmiştir.



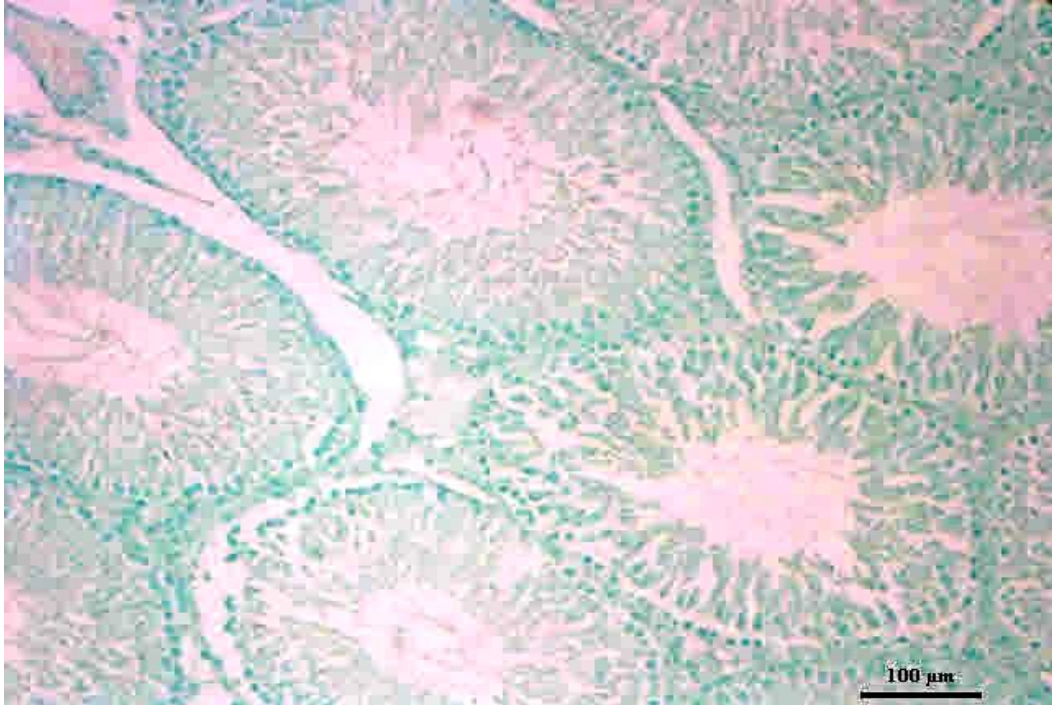
Resim 17:1. gruba ait bir kesitte negatif TUNEL boyanması gözlenmektedir.



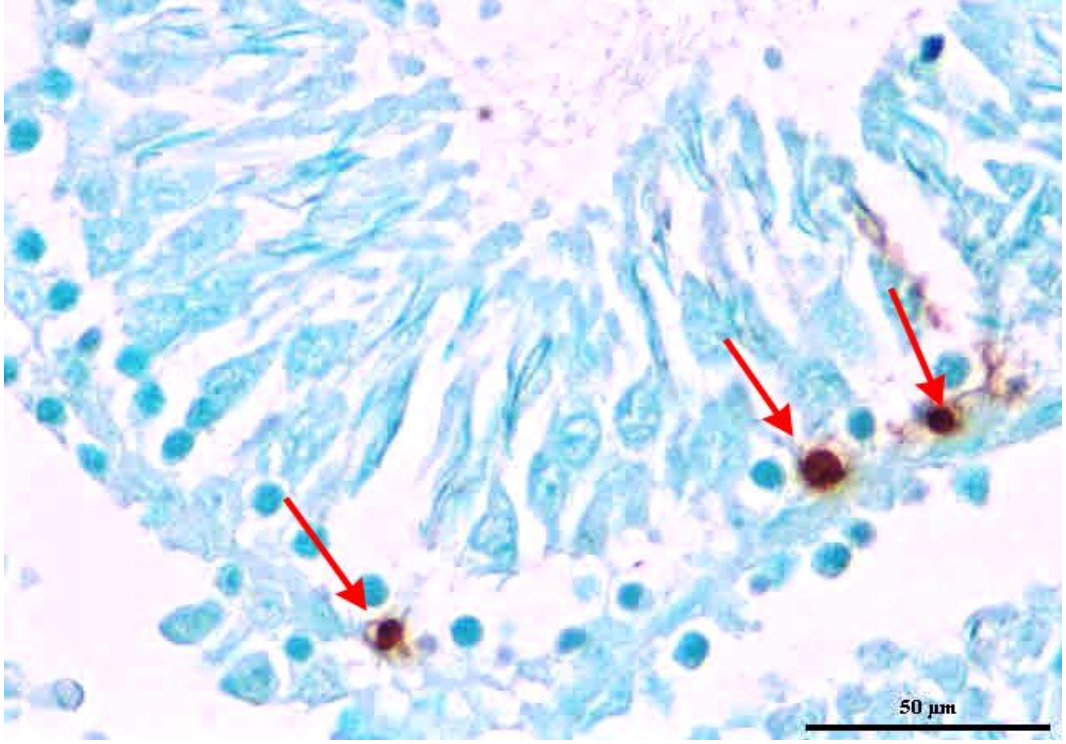
Resim 18:2. gruba ait bir kesitte pozitif TUNEL boyanması gözlenmektedir.



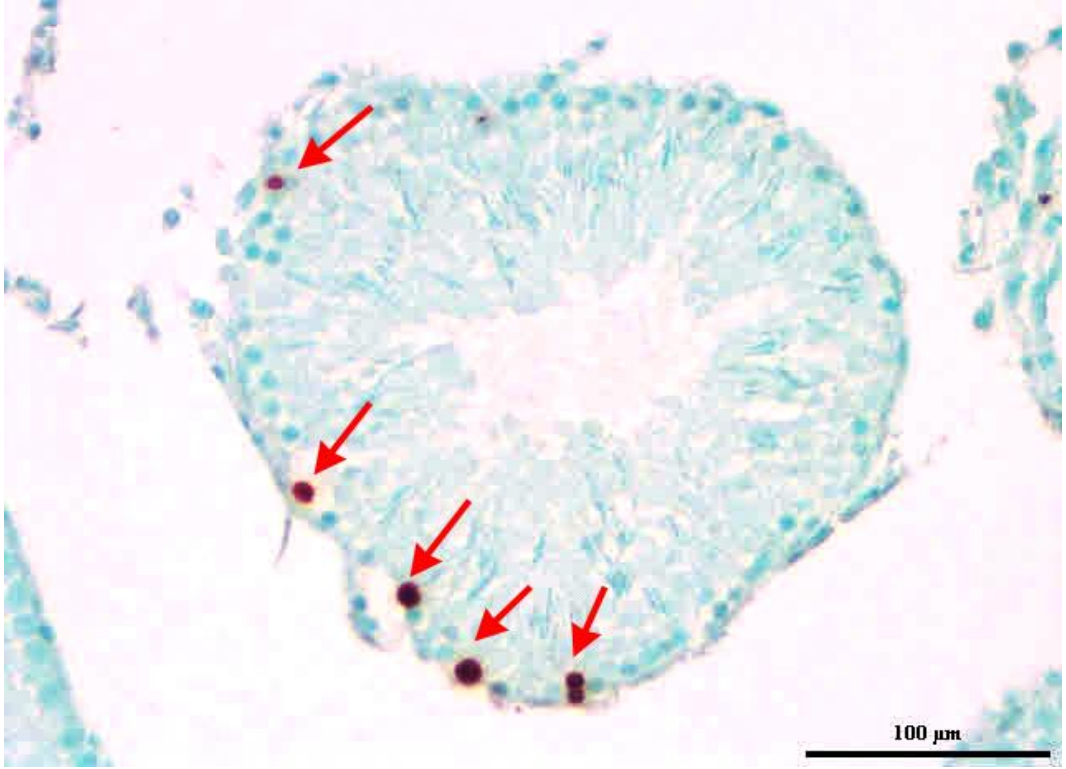
Resim 19:3. gruba ait bir kesitte negatif TUNEL boyanması gözlenmektedir.



Resim 20:4. grupta negatif TUNEL boyanması gözlenmektedir.

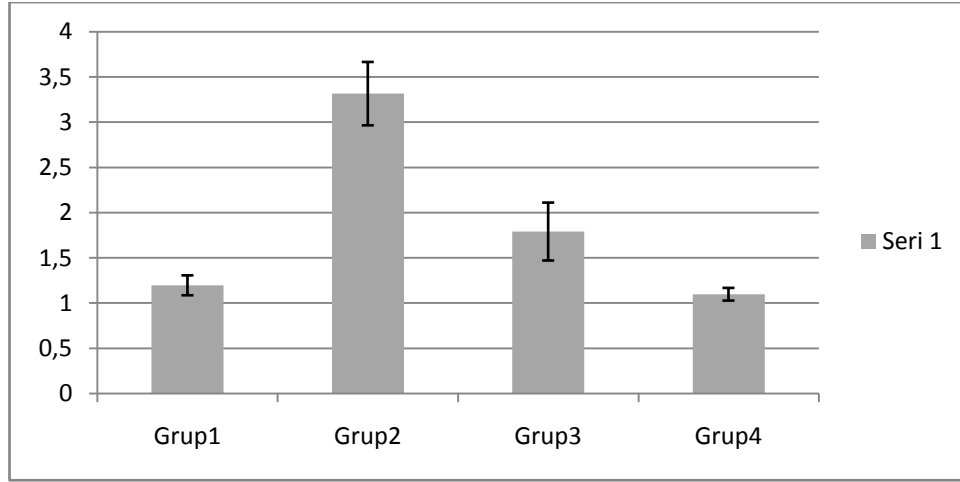


Resim 21:2. Grupta pozitif TUNEL boyanması spermatogonyumlarda (oklar) gözlenmektedir.



Resim 22:2. grupta pozitif TUNEL boyanması spermatogonyumlarda (oklar) gözlenmektedir.

Independent T Testi sonucu yapılan grup içi değerlendirmede ise Grafik 1’de gruplar ortalaması ve standart hataları verilmiştir. Grup 1 ve 2 arasında, Grup 2 ve 3 arasında, Grup 2 ve 4 arasında $p < 0,05$ çıkmıştır. Siklofosfamid grubunda (Grup 2) TUNEL boyaması diğer tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı farklı çıkmıştır. TUNEL pozitif boyanan hücreler spermatogonyumlar ve primer spermatositler olarak tespit edilmiştir.



Grafik 1: Tunel Boyamada Ortalama ve Standart Hata değerleri gösterilmiştir.

5.TARTIŞMA

Araştırmamızda oluşturduğumuz çalışma grupları arasında siklofosfamid verilen grupta oluşan histopatolojik hasarların CP+Vitamin E verilen grupta düzeldiği gözlenmiştir. Çalışmamız Bax boyanması yönünden değerlendirildiğinde, CP+E vitamini grubunun testis dokularında negatif boyanma gözlenirken, CP grubunda çoğu hücrede pozitif boyanma dikkat çekti. TUNEL yöntemi uygulanan kesitler incelendiğinde ise CP+E vit grubunda CP grubuna göre çok az sayıda apoptotik hücreye rastlanırken, CP grubunda dejeneratif seminifer tübüllerin germ hücrelerinde çok sayıda apoptotik hücre gözlemlendi. C-kit yönünden değerlendirildiğinde ise CP grubunda ekspresyon düşük olarak gözlenirken, CP+E vitamini verilen grupta C-kit ekspresyonunun yükseldiği gözlenmiştir.

Çeşitli kemoterapik ajanların gonadlar üzerine toksik etki gösterdiği bilinmektedir Alkilleyici ajanlar (mekloremin, siklofosfamid, klorambusil, ifosfamid, dakarbazin, tiotepa, melfalan, busulfan, karmustin, lomustin, prokarbazin) özellikle gonadotoksiktir (Poyrazoğlu ve ark. 2010). Kemoterapi rejim kombinasyonlarında yaygın olarak kullanılan ilaçlardan birisi olan siklofosfamid glomerulonefritide ve behçet hastalığında immun supresif olarak da kullanılmaktadır. (Trasler ve ark. 1986).

Çocukluk çağında kemoterapi rejiminde siklofosfamid tedavisi gören bireylerin, yetişkinliğinde yüksek oranda gonadal disfonksiyon görülme ihtimalinin çok yüksek olduğunu belirtmişlerdir (Kenney ve ark. 2001).

Kronik düşük doz CP tedavisinin, ratlarda reproduktif organ ağırlığında düşüşe ve infertilite oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir(Ghosh ve ark. 2002). Bu çalışmalara paralel yapılan araştırmalarda CP tedavisi sonucunda vücut ve testis ağırlığında azalma (Elangovan ve ark. 2006, Selvakumar ve ark. 2006), bir diğer çalışmada da testis ağırlığında azalma tespit edilmiştir (Khan and Jena 2013). Bizim çalışmamızda incelediğimiz bulgular arasında CP'nin testis ağırlığında azalmaya neden olduğu fakat istatistiksel olarak anlamlı farklılığa neden olmadığı tespit edildi. Bunun sebebinin CP'nin sadece 7 gün boyunca uygulanması olabileceğini düşünmekteyiz.

Memeli testislerinde germ hücreleri olgun spermatozoa oluşumu ile sonuçlanan farklılaşma aşamasını geçirmeden önce birkaç kez mitoz ile klonal olarak çoğalırlar(Şeftalioğlu 1998). Bu klonal genişleme fazla olduğundan sertoli hücrelerinin destekleyici kapasitesi ile germ hücre sayısını denkleştirmek için apoptozis gibi bir mekanizma gerekir. Bu şekilde, apoptozis erkek gametlerin aşırı üretimini kontrol eder (Agarwal ve Sait 2003, Yao ve ark. 2009). Bizim çalışmamızda da bu çalışmalara paralel olarak, Bax ve Tunel ekspresyonu, kontrol grubu ve sadece vitamin E verilen grupta gözlenmiştir.

Laila ve Sahar'ın yaptıkları çalışmaya göre, sıçanlara 7 gün boyunca her gün 20 mg/kg intraperitoneal CP uygulanmış, CP grubunda testiküler germ hücrelerinde TUNEL pozitif boyanmış hücrelerin önemli derecede arttığı tespit edilmiştir. Bu çalışmada tedavi gruplarından birine E vitamini verilmiş ve CP grubu ile karşılaştırıldığında TUNEL pozitif hücrelerde düşüş gözlenmiştir (Laila ve Sahar 2009). Cai ve ark. (1997) 70 mg /kg dozunda siklofosfamid uyguladıkları sıçanlarda Tunel metodu ile belirledikleri apoptozis insidansının 4. ve 8. saatlerde giderek arttığını ve 12. saatte ise pik yaptığını vurgulamışlardır(Cai ve ark. (1997). Bizim çalışmamızda da CP grubunda TUNEL pozitif hücrelerin sayısı artmış fakat CP verilen gruba göre E vitamini verilen grupta düşmüştür.

Selvakumar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada da, 4 gruba ayırdıkları sıçanlara 10 hafta boyunca gavajla ve intraperitoneal olarak verilen 15 mg/kg CP sonucunda, sperm konsantrasyonu ve motilitesinde önemli bir düşüklüğe yol açtığı, ölü ve anormal spermlerin kontrol grubuna göre arttığı bildirilmiştir. (Selvakumar ve ark. 2006). Farklı bir çalışma olan Rezvanfar ve ark.yaptığı çalışmada ise, sıçanlara 28 gün boyunca her gün 6 mg/kg i.p olarak verilen CP'nin spermatogenezi olumsuz yönde etkilediğini, sperm kalitesinin düştüğünü, seminifer tübüllerin yoğun hasara uğradığını gözlemişlerdir (Rezvanfar ve ark. 2008). Bizim çalışmamızın sonuçlarına göre de, deney grubunda yoğun tübül hasarı ve apoptoz, spermatogenetik hücrelerde dejenerasyon gözlenirken, tedavi grubu olan CP+E vit grubunda ise bu parametrelerde iyileşme olduğu gözlenmiştir.

Laila ve Sahar'ın yaptıkları çalışmada ayrıca germinal epitelin dejenere olduğu ve kayb olduğu, spermatogonial hücre tabakasında nekroz, seminifer tübüllerde

atrofik değişiklikler gözleendiği ve spermatogenezin engellendiği bildirilmiştir. Hem E vit hem de CP uygulanan grupta ise hücrenel hasarın azaldığı kaydedilmiştir(Laila ve Sahar 2009). Bizim çalışmamızda da CP verilen gruba göre E vitamini verilen grupta Johnsen skorlama ortalaması yükselmiştir.

Çeribaşı ve arkadaşlarının yaptıkları farklı bir çalışmada ise, 8 hafta boyunca haftada bir kez ip. olarak CP verilen sıçanlarda, fazla sayıda çekirdek içeren dev hücrelerin oluştuğu, germinal hücrelerde düzensizlik, dejenerasyon, nekroz, Sertoli hücrelerinde vakuol, ve tubullerde atrofi görüldüğü bildirilmiştir (Çeribaşı ve ark. 2010). Bu çalışmaya paralel olarak bizim çalışmamızda da, germinatif hücrelerdeki düzensizlik ve dejenerasyon, testiküler ve tübüler atrofi gözlenmiştir. Sertoli hücrelerinde vakuol ve damar konjesyonu gözlenmemiştir, bunun sebebinin de CP uygulama süresinin farklı olmasından kaynaklanabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Grieco ve ark. C-kit'in kemirgenlerde ve insanlarda Leydig hücrelerinde ekspresse olduğunu belirtmişlerdir, ayrıca köpek testisi ile yaptıkları bir çalışmada C-kit ekspresyonunun normal testiste leydig hücrelerinde ve spermatogonyum hücrelerinde ekspresse olduğunu belirtmişlerdir(Grieco ve ark. 2010). Yetişkin fare testisinde C-Kit'in spermatogonyum ve Leydig hücreleri tarafından ekspresse olduğu belirtilmiştir (Unni ve ark. 2009). Bizim çalışmamızda CP grubunda ekspresyon düşük olarak gözlenirken, CP+E vitamini verilen grupta C-kit ekspresyonunun istatistiksel olarak anlamlı bir yükseliş gösterdiği gözlenmiştir.

Çalışmamız Siklofosfamid tarafından oluşturulan testis toksisitesi üzerine vitamin E'nin koruyucu etkisinin olduğunu immünohistokimyasal yöntemler ışığında ortaya koymaktadır. Siklofosfamid gibi antikanserojen ajanların kullanımında, yan etkileri azaltmak için antioksidan olarak Vitamin E'nin de verilmesini önermekteyiz.

6.KAYNAKLAR

1. Agarwal A, Said TM. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2003;9(4):331-45.
2. Akçasu D, Banoğlu N, Berkarda Ş. *Farmakoloji, İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar*, Nobel Tıp Kitabevi, 1992, p: 822.
3. Akşit H, Bildik A. Derleme Apoptozis, *YYÜ Veteriner Fakóltesi Dergisi*. 2008; 19(1): 55- 63.
4. Al-Safi SA, Maddocks JL. Does 2-mercaptoethane sulphonate (mesna) prevent cyclophosphamide and azathioprine induced immunosuppression In vitro studies. *Br J Clin Pharmacol*. 1986;21(3):267-70.
5. Arıncı K, Elhan A. *Anatomi-Cilt 1*, Güneş Kitabevi, 1999, Ankara, p: 390.
6. Aslam I, Fishel S, Moore H, Dowell K, Thornton S. Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future. *Hum Reprod*. 2000;15:2154-9.
7. Ataya KM, Mckanna JA, Weintraub AM, Clark MR, Lemaire JW. A luteinizing hormone releasing hormone agonist for the prevention of chemotherapy induced ovarian follicular loss in rats.*Cancer Res*. 1985;45(8):3651-6.
8. 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 Oncol*. 1985;12(1 Suppl 2):2-6.
9. Battioni JP, Fontecave M, Jaouen M, Mansuy D. Vitamin E derivatives as new potent inhibitors of microsomal lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;174(3):1103-8.

10. Bernacki RJ, Bansal SK, Gurtoo HL. Combinations of mesna with cyclophosphamide or adriamycin in the treatment of mice with tumors. *Cancer Res.* 1987;47(3):799-802.
11. Beumer TL, Roepers LH, Gademan SU, Lock MTW, Tycho KB, Kal HB, Rooij DG. Apoptosis Regulation in the testis involvement of Bcl-2 Family members. *Mol Repr Development.* 2000;56: 353-59.
12. Blom JM, Tamarkin L, Shiber JR, Nelson RJ. Learned immunosuppression is associated with an increased risk of chemically-induced tumors. *Neuroimmunomodulation.* 1995;2(2):92-9.
13. Boydağ S. Deneysel diabetes mellitusta gelişen hemodinamik değişiklikler üzerin vitamin E'nin etkisi, ESOGÜ Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tez Çalışması, Eskişehir, 1998 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Kevser Erol).
14. Bokser L, Szende B, Schally AV. Protective Effects of D-Trp-luteinising Hormone-Releasing in Female Microcapsules Against Cyclophosphamide- Induced Gonadotoxicity in Female Rats. *Br J Cancer.* 1990;61(6):861-5.
15. Bramwell VH, Mouridsen HT, Santoro A, Blackledge G, Somers R, Thomas D, Sylvester R, Van Oosterom A. Cyclophosphamide versus ifosfamide: preliminary report of a randomized phase II trial in adult soft tissue sarcomas. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1986;18 Suppl 2:S13-6.
16. Brooks NL. Apoptotic Markers in Ejaculated Human Spermatozoa. Department of Medical Biosciences University of the Western Cape Bellville. 2006 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gerhard van der Horst).
17. Burkl W, Schiechl H. The growth of follicles in the rat ovary under the influence of busulphan and endoxan. *Cell Tissue Res.* 1978;186(2):351-9.
18. Burton GW, Ingold KU. Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann NY Acad Sci.* 1989; 570:7-22.

19. Burukoğlu D. Kadmiyumun sıçan testisinde oluşturduğu toksisitede çinkonun koruyucu etkilerinin ışık ve elektron mikroskop ile incelenmesi, Doktora tezi, Osmangazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir, 2007 (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Cengiz Bayçu).
20. Cai L, Hales BF, Robaire B. Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod.* 1997;56(6):1490-7.
21. Carlson BM. Patten's Foundations of Embryology, McGraw Hill, Inc. 1996,sixth edition, New york, p: 752.
- 22.Carter MD, Hollander MB, Lipshultz LI. In the medicine cabinet, clues to infertility. *Contemp Urol.* 1993;5:51-63.
- 23.Cavalletti E, Tofanetti O, Zunino F. Comparison of reduced glutathione with 2-mercaptoethane sulfonate to prevent cyclophosphamide-induced urotoxicity. *Cancer Lett.* 1986;32(1):1-6.
24. Champe PC, Harvey RA. Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevi, 1997, 2. Baskı, İstanbul, p:438.
25. Chapman RM. Gonadal injury resulting from chemotherapy, *Am J Indust Med.* 1983;4: 149-161.
26. Cormack DH. Essential Histology,Lippincott Williams& Wilkins, 2001, 2nd edition, USA, p:412-426.
27. Cumbul A. 2008, Deneysel vazokteminin farklı süreler sonrasında erişkin sıçan testisinde oluşturduğu morfolojik değişikliklerin stereolojik yöntemlerle incelenmesi, Doktora Tezi, ESOGÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eskişehir. (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Varol Şahintürk; Yrd. Doç. Dr. Ünal Uslu).
28. Cummings MC, Winterford CM, Walker NI. Apoptosis. *Am J Surg Pathol.* 1997;21:88- 101.
29. Ceribaşı AO, Türk G, Sönmez M, Sakin F, Ateşşahin A. Toxic Effect of Cyclophosphamide on Sperm Morphology,Testicular Histology and Blood Oxidant-

Antioxidant Balance, and Protective Roles of Lycopene and Ellagic Acid. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2010;107(3):730-6.

30. Davis JR, Firlit CF. The germinal epithelium of cryptorchid testes, experimentally induced in prepubertal and adult rats. *Fertil Steril.* 1966;17(2):187-200.

31. Demirci U, Benekli M, Büyükberber S, Coşkun U. Late side effects of cancer therapy. *Int J Hematol Oncol.* 2010;4, p:250-61.

32. Deng X, Wang Y, Chou J, Cadet JL, et al. Methamphetamine causes widespread apoptosis in the mouse brain: evidence from using an improved TUNEL histochemical method. *Molecular Brain Research.* 2001; 93(1): 64-69.

33. Dere F. *Anatomi Atlası ve Ders Kitabı Cilt 2*, Nobel Tıp Kitapevi, 1988, 5. Baskı Adana, p: 459.

34. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1):194-200.

35. Di Palma JR, Di Gregoria GJ. *Basic Pharmacology in medicine*, 1990, Third edition, p: 558-9.

36. Dökmeci İ. *Toksikoloji, Akut Zehirlenmelerde Tanı ve Tedavi*, Nobel Tıp Kitabevi, 1988,1. Baskı, p: 158-355.

37. Dökmeci İ. *Vitaminler, Farmakoloji-Temel kavramlar*, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd, 2000, İstanbul, p: 815-817.

38. Elangovan N, Chiou TJ, Tzeng WF, Chu ST. Cyclophosphamide treatment causes impairment of sperm and its fertilizing ability in mice. *Toxicology.* 2006;222(1-2):60-70.

39. Elmore S. Apoptosis a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.

40. Erdoğan BB. Apoptozis mekanizmaları: tümör gelişiminde fas-fasl bağımlı apoptozis. *Akciğer Arşivi.*2003; 4: 165-174.

41. Erdoğan D, Görgün M, Hatipoğlu T, Ilgaz C. Özel Histoloji, Hatipoğlu Yayınevi, 1999, 2. Baskı, Ankara, p:156-172.
42. Ergin M. Apoptosis. Arşiv. 2002;11, 495-504.
43. Eşrefoğlu M. Özel Histoloji, Medipres Matbaacılık Ltd. Şti, 2009, Malatya, p:254-267.
44. Fawcett DW, Jensch RP. Bloom and Fawcett`s Concise Histology, Arnold Hodder Headline Group, 2nd ed. London, 2002, p: 73.
45. Gartner LP, Hiatt JL. Color textbook of histology, Saunders Company, 2007, 3. Baskı, Philadelphia, p:489-501.
46. Gate L, Tew KD. Glutathione S-transferases as emerging targets, Expert Opin Ther Targets. 2001;5(4):477-489.
47. Ghosh D, Das UB, Misro M. Protective role of alpha-tocopherol-succinate (provitamin-E) in cyclophosphamide induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: a correlative approach to oxidative stress. Free Radic Res. 2002;36(11):1209-18.
48. Glode M, Robinson J, Gould FS. Protection from Cyclophosphamide-Induced Testicular Damage with an Analogue of Gonadotropin-Releasing Hormone, Lancet. 1981;1(8230):1132-4.
49. Grieco V, Banco B, Giudice C, Mosca F, Finazzi M. Immunohistochemical expression of the KIT protein (CD117) in normal and neoplastic canine testes. J Comp Pathol. 2010;142(2-3):213-7.
50. Gürsoy E, Koptagel E. Embriyoloji atlası, Esnaf Ofset Matbaacılık, 1997, Sivas, p: 222.
51. 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 Oncol. 1995;34(7):919-24.

52. Hassa H. İnfertil olgulara klinik yaklaşım ve IVF laboratuvar uygulamaları. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Basımevi, 2003, Eskişehir.
53. Heiskanen P, Billig H, Toppari J, Kaleva M, Arsallo A, Rapola J, Dunkel L. apoptotic celi death in the normal and cryptorchid human testis the effect of human chorionic gonadotropin on testicular celi survival. *Pediatric Research*. 1996; 40: 351-56.
54. Hıkım A P S, Wang C, Leung A R, Swerdloff S. Involvement of apoptosis in the induction of germ cell degeneration in adult rats after gonadotropin-releasing hormone antagonist treatment. *Endocrinology*. 1995; 136 (6): 2770-2775.
55. Howell S, Shalet S. Gonadal damage from chemotherapy and radiotherapy, *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* 1998;27:927-43.
56. Hurley LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy, *Nat Rev Cancer*. 2002;2(3):188-200.
57. Ivan D. *Pathology of Infertility*, Mosby- Year Book. Inc. 1993, 1st edition, USA, p: 42.
58. Jefferson KP, Persad RA, Holly MP. Apoptosis and Relevance to Urologists. *Br J Urol*. 2000; 86: 598-606.
59. Junquera LC, Carneiro J. *Temel Histoloji Text ve Atlas*. Nobel Tıp Kitabevleri, 2009, İstanbul, p: 418-435.
60. Kalaycı Ş. *Histoloji*, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1986, Bursa.
61. Kalaycıoğlu L. *Biyokimya*, Nobel Yayınevi, 2006, 3. Baskı, Ankara, p:654.
62. Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K, Noda T, Fujiwara T, Fukuda K, Minatoguchi S, et al. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick endlabeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation*. 1999; 99(21): 2757.
63. Kawabata TT, Chapman MY, Kim DH, Stevens WD, Holsapple MP. Mechanisms of in vitro immunosuppression by hepatocyte-generated

cyclophosphamide metabolites and 4-hydroperoxycyclophosphamide. *Biochem Pharmacol.* 1990;40(5):927-35.

64. Kayaalp O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji-2, Hacettepe-Taş Kitapçılık, 1998, Ankara, p:1547-1550.

65. Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli M. İnsan embriyolojisi, Alfa Basım Yayım Dağıtım, 1992, 7. Baskı, İstanbul.

66. 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;91:613-21.

67. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239-257.

68. Khan and G. B. Jena. Effect of Sodium Valproate on the Toxicity of Cyclophosphamide in the Testes of Mice: Influence of Pre- and Post-Treatment Schedule. *Toxicol Int.* 2013; 20(1): 68–76

69. Kierszenbaum AL. Histoloji ve hücre biyolojisi, Palme Yayıncılık, 2006, Ankara, p:532-560.

70. Kostner GM, Ottl K, Jauhiainen M, Enholm C, Esterbauer H. Human plasma phospholipids transfer protein accelerates exchange/transfer of α -Tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochem. J.* 1995; 305:659-667.

71. Koyama H, Wada T, Nishizawa Y, Iwanaga T, Aoki Y. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. *Cancer.* 1977;39(4):1403-9.

72. Kreuser ED, Klingmüller D, Thiel E. The role of LHRH-analogues in protecting gonadal functions during chemotherapy and irradiation. *European Urology.* 1993;23(1):157-63; discussion 163-4.

73. Kumar KBH, Kuttan R. Chemoprotective activity of an extract of *Phyllanthus amarus* against cyclophosphamide induced toxicity in mice. *Phytomedicine.* 2005;12(6-7):494-500.

74. Kuran O. Sistematik Anatomi, Filiz Kitabevi, 1983, 3. Baskı, İstanbul, p: 512-4.
75. Kurtoğlu S. Zehirlenmeler, Teşhis ve Tedavi, Erciyes Üniversitesi Yayınları-30, 1992, Kayseri, p: 121-491.
76. Kwon CH, Borch RF, Engel J, Niemeyer U. Activation mechanisms of mafosfamide and the role of thiols in cyclophosphamide metabolism. *J Med Chem.* 1987;30(2):395-9.
77. Lähdtie J, Rätty R, Sorsa M. Interaction of Mesna (2-mercaptoethane sulfonate) with the mutagenicity of cyclophosphamide in vitro and in vivo. *Mutat Res.* 1990;245(1):27-32.
78. Lawen A, Grutter MG. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10:649-55.
79. Laila ME Sabik, Sahar S. Abd. El-Rahman. Alpha-tocopherol and ginger are protective on Cyclophosphamide-induced gonadal toxicity in adult male albino rats. *Basic and Applied Pathology.* 2009;2: 21–29.
80. Leeson TS, Leeson CR and Paparo AA. *Text/Atlas of Histology*, W.B.Saunders Company, 1985, 5th edition, Philadelphia, p: 498.
81. Levy MJ, Stillman RJ. Reproductive potential in survivors of childhood malignancy. *Pediatrician.* 1991;18:61-70.
82. Luce JK, Simons JA. Efficacy of mesna in preventing further cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis. *Med Pediatr Oncol.* 1988;16(6):372-4.
83. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995;146(1):3-15.
84. Marcus R, Coulston AM. *Vitamin Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*, Mc Graw-Hill Companies, 1996, 9th edition, New York, p:1585-1590.
85. Meistrich ML, Wilson G, Brown BW, da Cunha MF, Lipshultz LI. Impact of cyclophosphamide on long-term reduction in sperm count in men treated with combination chemotherapy for Ewing and soft tissue sarcomas. *Cancer.* 1992;70:2703-12.

86. Meistrich ML, Wilson G, Mathur K, Lillian MF, Rodriguez MA, McLaughlin P, Hagemester FB. Rapid recovery of spermatogenesis after mitoxantrone, vincristine, vinblastine, and prednisone chemotherapy for Hodgkin's disease. *J Clin Oncol.* 1997;15: 3488–3495.
87. Montz FJ, Wolff AJ, Gambone JC. Gonadal protection and fecundity rates in cyclophosphamide-treated rats. *Cancer Res.* 1991;51(8):2124-6.
88. Moore FR, Urda GA, Krishna G, Theiss JC. An in vivo/in vitro method for assessing micronucleus and chromosome aberration induction in rat bone marrow and spleen. 1. Studies with cyclophosphamide. *Mutat Res.* 1995;335(2):191-9.
89. Moore KL. İnsan embriyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, 2002, İstanbul, p: 560.
90. Moore KL. The developing human clinically oriented embryology, the beginning of human development: first week, 2003, Seventh edition, p: 15-41.
91. Morris ID. Protection against cytotoxic-induced testis damage--experimental approaches. *Eur Urol.* 1993;23(1):143-7.
92. Murray RK. Harper Biyokimya, Nobel Tıp Kitapevleri, 2009, İstanbul, p:928.
93. Nagel E, zu Vilsendorf AM, Bartels M, Pichlmayr R. Antioxidative vitamins in prevention of ischemia/reperfusion injury, *Internat J Vit Nutr Res.*1997;67:298-306.
94. Odar İV. Anatomi, Hacettepe Taş Kitapçılık Ltd. Şti, 1986, Ankara, p: 458.
95. Ow P, Green RD, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c functions beyond respiration. *Nature Reviews Mol Cell Bio.* 2008;9:532-42.
96. Ozyazgan Y, Yurdakul S, Yazici H, Tüzün B, Işçimen 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. *Br J Ophthalmol.* 1992;76(4):241-3.
97. Öztürk F. Apoptoz. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 2002; 9(2):143-148.

98. Page R, Takimoto C. Principles of chemotherapy. In Cancer Management: A Multidisciplinary Approach Medical, Surgical & Radiation Oncology. Editors: R Pazdur, LR Coia, WJ Hoskins, LD Wagman. PRR, 2004, New York. p: 21-38.
99. Paker Ş. Histoloji, Uludağ Üniversitesi Basımevi, 1993, 2. Baskı, Bursa, p:258–278.
100. Papageorgio C, McLeod HL. Chemoterapy Principles and Pharmacology, The Washington Manual of Oncology, 2002, Philadelphia, p:11-49.
101. Pizzo PA, Poplack DG. Principles and Practice of Pediatric Oncology, Lippincott Williams & Wilkins, 2001, Philadelphia.
102. Ponsot Y, Guerin JG, Carmel M. Transitional cell carcinoma of the ureter and cyclophosphamide: apropos of a case. Prog Urol. 1995;5(4):578-9.
103. Pool BL, Bos RP, Niemeyer U, Theuws JL, Schmähl D. In vitro/in vivo effects of Mesna on the genotoxicity and toxicity of cyclophosphamide--a study aimed at clarifying the mechanism of Mesna's anticarcinogenic activity. Toxicol Lett. 1988;41(1):49-56.
104. Poyrazoğlu S, Bas F, Darendeliler E, Darendeliler F. Endocrine late effects of childhood cancer therapy. Türk Onkoloji Dergisi. 2010;25(1):37-46.
105. Ragheb AM, Sabanegh ES. Male fertility-implications of anticancer treatment and strategies to mitigate gonadotoxicity. Anticancer Agents Med Chem. 2010;10:92-102.
106. Rezvanfar M, Sadrkhanlou R, Ahmadi A, Shojaei-Sadee H, Rezvanfar M, Mohammadirad A, Salehnia A, Abdollahi M. Protection of cyclophosphamide-induced toxicity in reproductive tract histology, sperm characteristics, and DNA damage by an herbal source; evidence for role of free-radical toxic stress. Hum Exp Toxicol. 2008;27(12):901-10.
107. Roshal M, Zhu Y, Planelles V. Apoptosis in AIDS. Apoptosis. 2001;6: 103-16.
108. Ross MH, Pawlina W. Histology- a text and atlas with correlated cell and molecular biology, Lippincott Williams & Wilkins, 2006, 5. Edition, Philadelphia, p:729-747.

109. Ruhi Uyar, Adnan Ayhancı, Yılmaz Altuner. Siklofosfamid Ürotoksisitesi Verapamil ile Azaltılabilir mi?, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 1996; 18(1): 29-39.
110. Sabanegh ES, Ragheb AM. Male fertility after cancer. *Urology*. 2009;73:225-31.
111. Sadler TW. Langman's medikal embriyoloji, Palme yayıncılık, 1996, Ankara, p: 272-5.
112. Schwartzman RA, Cidloski JA. Apoptosis; the biochemistry and molecular biology of programmed cell death. *Endocrine Reviews*. 1993;14:133-144.
113. Seçkin İ. Erkek üreme sistemi Özel Histoloji Ders Kitabı, Cerrahpaşa Tıp Fak. Yayınları, 2008, İstanbul, p: 252.
114. Selvakumar E, Prahalathan C, Sudharsan PT, Varalakshmi P. Chemoprotective effect of lipoic acid against cyclophosphamide-induced changes in the rat sperm. *Toxicology*. 2006;217(1):71-8.
115. Senthilkumar S, Yogeeta SK, Subashini R, Devaki T. Attenuation of cyclophosphamide induced toxicity by squalene in experimental rats, *Chem Biol Interact*. 2006;160(3):252-60.
116. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis, *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, 1994; New York, p: 38-55.
117. 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. *J Clin Endoc and Metab*. 1998;83: 152.
118. Snell RS. Klinik anatomi, Nobel Tıp Kitabevi, 2004, 6. Baskı, İstanbul, p:236
119. Socie G, Salooja N, Cohen A, Rovelli A, Carreras E, Locasciulli A, Korthof E, Weis J, Levy V, Tichelli A; Late Effects Working Party of the European Study Group for Blood and Marrow Transplantation. Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2003;101:3373-85.

120. Stahlmann R, Bluth U, Neubert D. Effects of the cyclophosphamide metabolite acrolein in mammalian limb bud cultures. *Arch Toxicol.* 1985;57(3):163-7.
121. Şeftalioğlu A. Genel ve özel insan embriyolojisi, Üçüncü Baskı, Tıp ve teknik yayıncılık, 1998, Ankara, p:620.
122. Şahintürk V, Güçlü C, Bayçu C. Protective effects of vitamin E on ethane dimethane sulfonate-induced testicular toxicity in rats, *Asian J Androl.* 2007;9(1):117-24.
123. Şeker ME. Türkiye’de bulunan bazı üzüm türlerinin çekirdeklerindeki e-vitamini miktarının HPLC ile tayini. Celal Bayar Üniversitesi; Yüksek Lisans Tezi; 2006. (Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ali Çelik).
124. Tapanainen JS, Tilly JL, Vihko KK, Hsueh AJW. Hormonal control of apoptotic cell death in the testis gonadotropins and androgens as testicular cell survival factors. *Mol Endocrinol.* 1993;7:643-650.
125. Trainer TD. Histology of the normal testis. *Am J Surg Pathol.* 1987 Oct;11(10):797-809.
126. Trasler JM, Hales BF, Robaire B. Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats : Effect on fertility, pregnancy outcome and progeny, *Biol Reprod.* 1986;34, p: 275–83.
127. Tekelioğlu M. Genel tıp histolojisi, Beta Basım Yayım Dağıtım, 1989, Ankara, p:13-82.
128. Tekelioğlu M. Özel Histoloji, İnce Yapı ve Gelişme. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antip A.Ş. Yayınları,2002, p:231–244.
129. Thatcher N, Smith DB, Lind MJ, Anderson H, Barclay J, Chopra MP, Fitzgerald M.D. Double Alkylating Agent Therapy with Ifosfamide and Cyclophosphamide for Advanced Non–Small Cell Lung Cancer from the Manchester Lung Tumour Group. *Cancer.* 1988;61(1):14-8.
130. Tomatır AG. Apoptoz; programlı hücre ölümü, *T Klin. Bilimleri.*2003; 23:499-508.

131. de Torres C, Munell F, Ferrer I, Reventós J, Macaya A, et al. Identification of necrotic cell death by the TUNEL assay in the hypoxic-ischemic neonatal rat brain. *Neuroscience letters*. 1997;230(1): 1-4.
132. Touchette N, Fogle S. Apoptosis: it chimes with mitosis. *JNIH Res*. 1991;3:75.
133. Tunçdemir M, Öztürk M. The effects of ACE inhibitor and angiotensin receptor blocker on clusterin and apoptosis in the kidney tissue of streptozotocin-diabetic rats. *J Mol Histol*. 2008; 39(6):605-16.
134. Türker FA, Kayaalp SO. “Kanser kemoterapisinin esasları ve antineoplastik ilaçlar, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık, 2002, Ankara, p: 380-415.
135. Unni SK, Modi DN, Pathak SG, Dhabalia JV, Bhartiya D. Stage-specific localization and expression of c-kit in the adult human testis. *J Histochem Cytochem*. 2009;57(9):861-9.
136. Walker NI, Harmon BV, Gobe GC, Kerr JF. Pattern of cell death. *Methods Achiev Exp Pathol*. 1988;13:18-54.
137. Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FI. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. *N Engl J Med*. 1973;289(22):1159-62.
138. Wright NA. Cell proliferation in carcinogenesis, *The Cancer Handbook*, Nature Publishing Group, 2002, London, p: 114-25.
139. Yagoda A, Mukherji B, Young C, Etcubanas E, Lamonte C, Smith JR, Tan CT, Krakoff IH. Bleomycin an antitumor antibiotic. Clinical experience in 274 patients. *Ann Intern Med*. 1972;77(6): 861-870.
140. Yao PL, Lin YC, Richburg JH. TNF alpha-mediated disruption of spermatogenesis in response to Sertoli cell injury in rodents is partially regulated by MMP2. *Biol Reprod*. 2009;80(3):581-9.
141. Yıldırım M. İnsan Anatomisi, 1999, Nobel Tıp Kitabevleri, 5. Baskı, Ankara, p: 351.

142. Young B, Heat JW. Wheater's Functional Histology; A Text and Colour Atlas, Churchill Livingstone, 2000, 4th edition, London, p: 328–339.

143. Zhou DX, Qiu SD, Zhang J, Tian H, Wang HX. The protective effect of vitamin E against oxidative damage caused by formaldehyde in the testes of adult rats, Asian J Androl. 2006;8(5):584-8.

7.ÖZGEÇMİŞ

Çisem Limandal 1987 yılında Samsun'da doğdu. İlk ve ortaöğrenimini Ankara'da, lise öğrenimini ise Kayseri'de tamamladı. 2011 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü'nden mezun oldu. 2011 yılında 6 ay süre ile Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Üreme Sağlığı Merkezi'nde Androloji-Embriyoloji alanında gönüllü stajyerlik eğitimi aldı. 2011 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil Biyokimya Laboratuvarında 2 ay süre ile gönüllü stajyerlik yaptı. 2011 yılında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Histoloji Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2013 yılında yatay geçiş ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Histoloji Embriyoloji (Tıp) Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine devam etti ve Eylül 2013'te mezun oldu. 2013'te evlendi ve eş durumu dolayısıyla Diyarbakır'da yaşamaktadır.



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



Karar Sayısı: 2013 – 132

Karar Tarihi: 19.07.2013

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.'den Prof.Dr.Hasan CÜCE ve Çisem GÜRSOY tarafından sunulan ve **2013-81 Etik Karar Sayısı** ile kabul edilen **"Siklofosfamide Bağlı Sıçan Testis Hasarında E Vitamininin Rolünün Histolojik Olarak İncelenmesi."** başlıklı Tez Projesi; Proje yürütücüsün başvurusu ile proje yürütücüsünün Yrd.Doç.Dr.Gökhan CÜCE olarak, proje isminin **"Siklofosfamid Kaynaklı Sıçan Gonadotoksitesitesinde, E Vitami'nin Olası Rolünün İmmünohistokimyasal Yöntemlerle Araştırılması"** olarak değiştirilmesinin ve projeden Prof.Dr.Hasan CÜCE'nin çıkarılmasının **"Uygun"** olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

Prof.Dr.K.Esra
NURULLAHOĞLU ATALIK
Başkan- Katılmadı

Prof.Dr.Lema TAVLA
Üye

Prof.Dr.A.Saide ŞAHİN
Üye

Prof.Dr.Selim
KUTLU
Üye-Katılmadı

Doç.Dr.Mehmet GÜL
Üye

Doç.Dr.Tevfik
KÜÇÜKKARTALLAR
Üye

Yrd.Doç.Dr.Mehmet
ERGİN
Başkan V.

Dr.M.Metin
ŞENER
Üye

Vet.Hek.Alpaslan
ÖZKÜRÇÜLER
Üye-Katılmadı

Mustafa ŞİRİN
Üye